

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-514348

(P2025-514348A)

(43)公表日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全57頁)

(21)出願番号	特願2024-563689(P2024-563689)	(71)出願人	524394379
(86)(22)出願日	令和5年4月28日(2023.4.28)		タビラ セラピューティクス ビービー
(85)翻訳文提出日	令和6年12月23日(2024.12.23)		TAVIRA THERAPEUTICS
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/061210		BV
(87)国際公開番号	WO2023/209137		ベルギー、ヘフェルレー 3001、ガ
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)		ストン ゲーンスラーン 1
(31)優先権主張番号	22170610.4		Gaston Geenslaan 1,
(32)優先日	令和4年4月28日(2022.4.28)		3001 Heverlee, Belg
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ium
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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	(74)代理人	100103034
	最終頁に続く		弁理士 野河 信久
		(74)代理人	100159385
			弁理士 甲斐 伸二
		(74)代理人	100163407
			弁理士 金子 裕輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノ随伴ウイルスの接合

(57)【要約】

本発明は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上において、ソルターゼ認識配列(式中、n及びmは0~25の範囲であり、Xは任意の天然アミノ酸である)が挿入されていることを特徴とするアデノ随伴ウイルス(AAV)のVP1、VP2又はVP3カプシドタンパク質に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域又はVR-VIII領域の1以上に、ソルターゼ認識配列が挿入されていることを特徴とするアデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質。

【請求項 2】

前記挿入されたソルターゼ認識配列が、X_n-LPXTG-X_m [配列番号10]、X_n-NPXTG-X_m [配列番号40]、X_n-LPXTA-X_m [配列番号41]、X_n-LAXTG-X_m [配列番号42]、X_n-LPXAG-X_m [配列番号48]、X_n-LPXLG-X_m [配列番号49]、X_n-APXTG-X_m [配列番号50]、X_n-LPXSG-X_m [配列番号51]、X_n-FPXTG-X_m [配列番号52]、X_n-XPKTG-X_m [配列番号53]及びX_n-LPEXG-X_m [配列番号54](式中、n及びmは0~25の範囲であり、Xは任意の天然アミノ酸である)からなる群より選択される一般配列モチーフを有する配列であることを特徴とする、請求項1に記載のAAVカプシドタンパク質。

10

【請求項 3】

前記挿入されたソルターゼ認識配列が一般配列モチーフX_n-LPXTG-X_m [配列番号10]を有することを特徴とする、請求項1又は2に記載のAAVカプシドタンパク質。

【請求項 4】

n及び/又はmが0~20の範囲である、請求項1~3のいずれか1項に記載のAAVカプシドタンパク質。

【請求項 5】

Xがグルタミン又はグルタミン酸である、請求項2~4のいずれか1項に記載のAAVカプシドタンパク質。

20

【請求項 6】

前記VP1-VP2転移領域がAAV2中のPVKTAP [配列番号1]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定され、前記VR-I領域がAAV2中のSSQSGASN [配列番号2]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定され、前記VR-IV領域がAAV2中のSRTNTPSGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS [配列番号3]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定され、及び/又は前記VR-VIII領域がAAV2中のQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV [配列番号4]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定される、請求項1~5のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

30

【請求項 7】

前記VR-IV領域中の挿入がAAV2中のTPSGTTTTQS [配列番号5]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列を有するフラグメント中にあり、及び/又はVR-VIII領域中の挿入がAAV2中のLQRGNRQAA [配列番号6]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列を有するフラグメント中にある、請求項1~6のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 8】

ソルターゼ認識配列LPXTG [配列番号10]が挿入されている領域において、前記領域の1以上のアミノ酸が欠失されているか又は置換されている、請求項1~7のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

40

【請求項 9】

前記AAVがAAV2又はAAV9である、請求項1~8のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 10】

nが5~20の間、好ましくは5~15の間、より好ましくは10~15の間である、請求項1~9のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 11】

mは5~20の間、好ましくは5~15の間、より好ましくは10~15の間である、請求項1~10のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

50

【請求項 1 2】

前記リンカー配列X_n又はX_mは、少なくとも80%がグリシン、セリン、スレオニン及びアラニンからなる、請求項1～11のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 1 3】

前記リンカー配列X_m又はX_nがグリシン、セリン、スレオニン及びアラニンから選択されるアミノ酸からなる、請求項1～12のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 1 4】

LPXTG [配列番号10]中のXはアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン又はグルタミンであり、好ましくはLPXTG [配列番号10]中のXはグルタミンである、請求項1～13のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

10

【請求項 1 5】

前記AAVカプシドタンパク質の1以上のリジン(K)がグリシン(Gly)、セリン(Ser)又はアラニン(Ala)に変異されており、好ましくはグリシン(Gly)に変異されている、請求項1～14のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 1 6】

請求項1～15のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質をコードする核酸。

【請求項 1 7】

請求項16に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項1～15のいずれか1項に記載のAAVカプシドタンパク質を含むAAV粒子。

20

【請求項 1 9】

VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域中の残余のソルターゼ認識配列により特徴づけられ、前記残余のソルターゼ認識配列が異種性接合体分子に作動可能に連結している、AAVカプシドタンパク質を含む接合AAV粒子。

【請求項 2 0】

非接合カプシドAAVタンパク質の接合AAVカプシドタンパク質に対する比が1/59～59/1の間、好ましくは1/20～20/1の間、好ましくは1/10～10/1の間、より好ましくは1/5～5/1の間である、請求項19に記載の接合AAV粒子。

【請求項 2 1】

末端のトリグリシンアミノ酸配列の存在により特徴づけられる異種性接合体分子に残余のソルターゼ認識配列を介して作動可能に連結されている、請求項19又は20に記載の接合AAV粒子。

30

【請求項 2 2】

前記残余のソルターゼ認識配列を介してターゲティング部分に作動可能に連結されている、請求項19～21のいずれか1項に記載の接合AAV粒子。

【請求項 2 3】

医薬として使用するための、請求項19～22のいずれか1項に記載の接合AAV粒子。

【請求項 2 4】

- 細胞を、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域又はVR-VIII領域の1以上がソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質をコードする1以上の核酸と接触させる工程；

40

- 前記細胞に複数のAAVカプシドタンパク質をAAV粒子に組み立てさせ、該細胞から前記AAV粒子を回収する工程；及び

- 前記AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させる工程

を含む、接合AAV粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、広く遺伝子治療の分野に関する。特に、本発明は、異種性分子(例えば、ターゲティング分子)をAAVカプシドに、制御された様式で接合体化するための技術に関

50

する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子治療(GT)は、導入遺伝子の付加によって細胞生理を改変し、それによって疾患を処置又は予防することを含む治療様式である。この革新的な技術は、疾患を引き起こす欠陥遺伝子を修正又は置き換えるためにウイルスベクターを使用する。遺伝子治療は、現在根治的処置が利用可能ではない、稀でより複雑な破壊的疾患の処置に非常に有望である。

【0003】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、現在、遺伝子治療における主要な遺伝子送達ビヒクルである小さな非病原性ウイルスである。それは、広い組織親和性を有し、疾患表現型と関連せず、高度に免疫原性ではない。さらに、AAVは、単回投与後に長期持続性の治療効果を提供する可能性を有する。

【0004】

組換えAAV(rAAV)は、ウイルス遺伝子をトランスに配置し、そしておよそ4.5kbの導入遺伝子に置き換えた、ウイルスの操作されたバージョンである。rAAVベースのGT産物は、一般に、安全且つ有効であることが示されているが、それらは、いくつかの欠点を有する。例えば、形質導入の根底にあるプロセス、すなわち、ターゲット組織での細胞侵入、ターゲット細胞内でのウイルス粒子の治療用ペイロードの脱外被及び発現は非効率であり、したがって、治療効果を達成するために大量のベクター用量を必要とする。全身投与後、これは、肝臓における蓄積及び治療用ベクターに対する免疫応答をもたらす。重要なことに、高用量のrAAVは、肝毒性及び血栓性微小血管障害などの重篤な有害事象と関連しており、AAV GT試験において数人の患者の死をもたらした。さらに、AAV血清型に依存して、ヒト集団の40~70%がAAV中和抗体を保有する。これらの抗体は、観察される免疫応答に寄与し、有効性を低下させ、GT製品の再投与を妨げ、多くのGT試験において排除基準である血清陽性をもたらす。これらの生物学的問題の次に、大量の高度に精製されたrAAV産物の製造は高価であり、そして製造能力は限度がある。

【0005】

これらの問題を解決するための最も有望なアプローチの1つは、改善された免疫回避及び形質導入特性を示す新規カプシドの設計である。天然に存在するAAVベクターの特定の組織又は細胞型への広範な親和性を、カプシド操作を介して狭めることによって、rAAV産物は、より強力になり、より低い用量での処置を可能にする。これにより、安全上のリスク及び製造コストが低減される。しかし、カプシド操作(例えば、指向性進化カプシド設計プラットフォーム)における多大な努力にもかかわらず、臨床において画期的な革新は検証されていない。これは、一部には、指向進化ライブラリー生成のための出発材料として使用される、天然に見出されるAAV血清型の広範な親和性、新規rAAV血清型の製造における困難性、並びにげっ歯類及び非ヒト霊長類(NHP)におけるカプシドライブラリーのスクリーニングの必要性に起因し、後者は、ヒト翻訳に対する障壁である。

【0006】

製造可能性に影響を及ぼすことなく、ターゲット組織に対する特異性が増加し、オフターゲット形質導入がより低いカプシドを操作するための有望な方法は、製造後の段階でAAV粒子を特異的な(再)ターゲティンググループと接合体化することである。いくつかのグループは、カプシドタンパク質にターゲティンググループを遺伝的に組み込んでいるか、又はAAV粒子が精製された後に共有結合又は非共有結合を可能にするアダプター分子とそれらを接合体化している。これらのrAAV接合体は、特定の組織への形質導入効率がより高く、例えば肝臓において、オフターゲット効果がより低い。しかし、カプシドに必要とされる修飾は、しばしば生産収率に影響を及ぼす。加えて、モジュール性が低く、複雑で、しばしば多成分からなる遺伝的又は化学的デザインセットアップのため、これらのシステムは現在の商業的な製造実施とほとんど互換性がない。より最近では、カプシドタンパク質は、ナノボディと遺伝的に融合されており、その結果、ターゲティングが改善

10

20

30

40

50

された。しかし、ターゲッティング効率は、特定のAAVナノボディ構築物に大きく依存していた。これは、修飾されたAAVピリオンの予測不可能なフォールディング及び四次構造形成、並びにナノボディの直接的な遺伝子組込みによって引き起こされる超分子動態に対するナノボディ融合の未知の効果に遡ることができる。また、大きなタンパク質性部分の遺伝子挿入は、市販の樹脂を使用するアフィニティー精製の効率に負の影響を与える。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

要約すると、AAVをターゲッティンググループと接合体化することは、遺伝子治療のためのrAAV粒子の形質導入プロファイルを改善するための有望な戦略であるが、現在の方法では、商用の遺伝子治療製品に必要とされる設計及び/又は性能品質を欠き、製造のハードルが高い。臨床的及び商業的成功となるために、AAV接合のためのより良好なアプローチが切に必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

広範な実験を通して、本発明者らは、ソルターゼ認識配列をAAV粒子のカプシド配列の内部に導入して、ターゲッティング分子とAAVカプシドとの接合を可能にし、接合AAV粒子を製造し、組織及び細胞をより効率的且つ特異的にターゲッティングできることを見出した。驚くべきことに、ソルターゼ認識配列が典型的にはC-末端で使用される分子生物学及びバイオテクノロジーの技術分野における一般的なコンセンサスとは対照的に、本発明者らは、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、及びVR-VIII領域へのソルターゼ認識配列の挿入が、ソルターゼ反応に供された後に当該領域の構造的完全性を維持することを見出した。内部ソルターゼ認識配列の使用は、改善された特性(例えば、目的の組織及び細胞のより効率的且つ特異的なターゲッティング)を有するテラーメイドのAAV粒子の新たな「世代」を生成するために特に価値がある。加えて、本発明者らによってなされた分子設計の考慮は、適切な親AAV血清型と比較した場合に類似の製造効率を維持しながら、AAV製造方法及びプラットフォームのモジュール性を高めることを可能にする。

20

【0009】

したがって、本発明の一態様は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上に、ソルターゼ認識配列が挿入されていることを特徴とするアデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質を提供する。ある特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列は、X_n-LPXTG-X_m [配列番号10]、X_n-NPXTG-X_m [配列番号40]、X_n-LPXTA-X_m [配列番号41]、X_n-LAXTG-X_m [配列番号42]、X_n-LPXAG-X_m [配列番号48]、X_n-LPXLG-X_m [配列番号49]、X_n-APXTG-X_m [配列番号50]、X_n-LPXSG-X_m [配列番号51]、X_n-FPXTG-X_m [配列番号52]、X_n-XPKTG-X_m [配列番号53]及びX_n-LPEXG-X_m [配列番号54](式中、n及びmは0~25の範囲であり、Xは、X_n及びX_mについて独立して選択される任意の天然アミノ酸である)からなる群より選択される一般配列モチーフを有する。好ましくは、(AAV)VP1、VP2、又はVP3カプシドタンパク質は、VR-I領域、VR-IV領域、及びVR-VIII領域の1以上において、ソルターゼ認識配列X_n-LPXTG-X_m[配列番号10](式中、n及びmは0~25の範囲であり、Xは任意の天然アミノ酸である)が挿入されている。任意選択で、n及びmは0~20の範囲である。好ましくは、Xはグルタミン酸(E)又はグルタミン(Q)である。

30

40

【0010】

ある特定の実施形態において、VP1-VP2転移領域は、AAV2中の配列番号1[PVKTAP]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定され、VR-I領域は、AAV2中の配列番号2[SSQSGASN]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定され、VR-IV領域は、AAV2中の配列番号3[SRTNTPSGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定さ

50

れ、VR-VIII領域は、AAV2中の配列番号4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列により規定される。

【0011】

ある特定の実施形態において、VR-IV領域中の挿入がAAV2中の配列番号5[TPSGTTTQS]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列を有するフラグメント中にあり、及び/又はVR-VIII領域中の挿入がAAV2中の配列番号6[LQRGNRQAA]若しくは別のAAV血清型における対応するアミノ酸配列を有するフラグメント中にある。

【0012】

ある特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]が挿入されているある領域では、当該領域の1以上のアミノ酸が欠失されているか、及び/又は当該領域の1以上のアミノ酸が置換されている。

10

【0013】

任意選択で、AAVはAAV2又はAAV9である。

【0014】

任意選択で、nは15~20の間、又は10~15の間、又は5~10の間、又は0~5の間であるか、又は10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1である。好ましくは、nは5以上20以下、好ましくは5以上15以下、より好ましくは10以上15以下である。

【0015】

任意選択で、mは15~20の間、又は10~15の間、又は5~10の間、又は0~5の間であるか、又は10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1である。好ましくは、mは5~20の間、好ましくは5~15の間、より好ましくは10~15の間である。

20

【0016】

ある特定の実施形態において、リンカー配列X_n又はX_mは、少なくとも80%のグリシン(Gly)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、及びアラニン(Ala)からなる。好ましくは、リンカー配列X_m又はX_nは、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)及びアラニン(Ala)から選択されるアミノ酸からなる。

【0017】

ある特定の実施形態において、LPXTG中のXは、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、アスパラギン(Asn)又はグルタミン(Gln)、好ましくはグルタミン(Gln)である。

30

ある特定の実施形態において、AAVカプシドタンパク質の1以上のリジン(K)は、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、又はアラニン(Ala)に変異されている。

【0018】

本発明のさらなる関連する態様は、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つによるカプシドタンパク質をコードする核酸を対象とする。

【0019】

本発明のさらにより一層関連する態様は、前述の態様の核酸を含む発現ベクターを対象とする。

【0020】

本発明のさらなる関連する態様は、AAV粒子に関する。特に、AAV粒子は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上に挿入されているソルターゼ認識配列を有するAAVカプシドタンパク質を含む。ソルターゼ接合反応前及びソルターゼ接合反応後の両方のAAV粒子(すなわち、接合AAV粒子)が意図される。したがって、本発明のさらなる態様は、上記の実施形態のいずれか1つによるAAVカプシドタンパク質を含むAAV粒子を対象とする。さらに、本発明のなおさらなる関連する態様は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域における残余のソルターゼ認識配列(すなわち、接合反応後に存在するような修飾されたソルターゼ認識配列)により特徴づけられ、残余のソルターゼ認識配列が異種性接合体分子に作動可能に連結している、AAVカプシドタンパク質を含む接合AAV粒子を対象とする。

40

【0021】

50

ある特定の実施形態において、接合AAV粒子は、ソルターゼ認識配列を介して異種性接合体分子に作動可能に連結しており(すなわち、融合されており)、好ましくは、当該接合体分子は、末端のトリグリシンアミノ酸配列の存在により特徴づけられている。任意選択で、異種性接合体分子は、低分子、炭水化物、脂質、又はポリペプチドである。

【0022】

ある特定の実施形態において、接合AAV粒子は、ソルターゼ認識配列を介してターゲッティング部分に作動可能に連結している(すなわち、融合されている)。任意選択で、ターゲッティング部分は、細胞レセプターのリガンドであるか、又は細胞表面タンパク質に結合するタンパク質である。任意選択で、細胞表面タンパク質に結合するタンパク質は、抗体又はナノボディである。任意選択で、抗体又はナノボディは、HER2に特異的に結合する。

10

【0023】

本発明のなおさらなる態様は、医薬としての、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つによる接合AAV粒子の使用を対象とする。

【0024】

上記の本発明の実施形態の関連する態様は、本明細書に記載されるような接合AAV粒子を製造する方法を対象とする。特定の実施態様では、接合AAV粒子を製造する方法は、

- 細胞を、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域又はVR-VIII領域の1以上がソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質をコードする1以上の核酸と接触させる工程；

20

- 細胞に複数のAAVカプシドタンパク質をAAV粒子に組み立てさせ、該細胞から当該AAV粒子を回収する工程；及び
- AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させる工程を含む。

【0025】

本発明の上記及びさらなる態様及び好ましい実施形態は、以下のセクション及び添付の特許請求の範囲に記載されている。添付の特許請求の範囲の主題は、本明細書に具体的に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

30

【図1】(A)野生型AAV(wtAAV)及び組換えAAV(rAAV)の模式的な遺伝子ビルドアップ。(B)ソルターゼA機構の模式図

【図2】(A)VP1、VP2、VP3タンパク質、並びにVP1-VP2、VR-I、VR-IV、及びVR-VIII領域の概略図。(B)リンカー配列に隣接する内部LPQTGモチーフの一般的表示。

【図3】LPQTGモチーフは、AAV2-HB0 VR-IV(AA 453と454との間)に、リンカーなしで、又はモチーフAバンドの両側に1つ若しくは2つのGGSGS[配列番号47]リピートに隣接して挿入されており、VIII-1とVIII-2には、VP3のN-末端のフラグメントと接合されたNbのモル質量(～19kDa)と一致するバンドが見られ、接合反応を実証する。Strt-A:ソルターゼAのみ、Nb:ナノボディのみ

【図4】AAV2、VR-I、0-1-2 L。265位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、0、1又は2つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。矢印:接合産物。

40

【図5】AAV2、VR-IV、0-1-3-4-5 L。453位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、0、1、3、4又は5つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。矢印:接合産物。

【図6】AAV2、VR-VIII 0-1-2-3-4-5L。587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、0、1、2、3、4又は5つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。矢印:接合産物。

【図7】AAV9、VR-IV 0-1-2-3L。455位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、0、1、2又は3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A。

50

矢印：接合産物。

【図8】AAV9、VR-VIII 0-1-3L。589位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、0、1又は3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A。矢印：接合産物。

【図9】5つの異なる構築物の比較。265位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、2つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、453位に位置するLPQTGタグを有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGSリンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、455位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A、及び589位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A。矢印：接合産物。

10

【図10】GGG-ピオチン。587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、1つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。矢印：接合産物。

【図11】HER2対GFP。453位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、589位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A。矢印：接合産物。

【図12】AAV2_VR-VIII及びAAV9_VR-IV中のLPQTG対LPETG。587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、587位に位置するLPETGタグ[配列番号44]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0、455位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A、及び455位に位置するLPETGタグ[配列番号44]を有し、3つのGGSGS[配列番号43]リンカーが両側に隣接しているAAV9-A。矢印：接合産物。

20

【図13-1】インビトロターゲットティング。587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。(A)%形質導入細胞、(B)%形質導入細胞((A)から拡大)。

【図13-2】インビトロターゲットティング。587位に位置するLPQTGタグ[配列番号43]を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカーが両側に隣接しているAAV2-HB0。(C)フローサイトメトリーの結果。

30

【図14】抗HER2ナノボディと接合させた異なるAAVベクターと非接合ベクターとの形質導入効率の比較。形質導入効率は、GFP蛍光によって測定する。

【図15】異なる構築物の生産収率の比較。(A)産生株細胞培養物の溶解物中の平均ウイルスゲノム(「Vg」)収率(左Y軸)及び%完全ウイルス粒子(右Y軸；黒点)。(B)産生株細胞培養物の上清中の平均ウイルスゲノム(「Vg」)収率(左Y軸；黒点)及び%完全ウイルス粒子(右Y軸)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「当該(the)」は、文脈から明らかにそうでないと判断されない限り、単数及び複数の両方の指示対象を含む。

40

【0028】

「含む(comprising)」、「含む(comprises)」及び「で構成される(compri sed of)」との用語は、本明細書で使用される場合、「含む(including)」、「含む(includes)」又は「含有する(containing)」、「含有する(contains)」と同義であり、包括的又はオープンエンドであり、追加の列挙されていない部材、要素又は方法ステップを排除しない。これらの用語はまた、「からなる(consisting of)」及び「から本質的になる(consisting essentially of)」を包含し、これらは、特許用語において十分に確立した意味を有する。

50

端点による数値範囲の列挙は、それぞれの範囲内に含まれている全ての数及び分数、並びに列挙された端点を含む。これは、数値範囲が、「～以上～以下」との表現又は「～の間」との表現又は別の表現によって導入されるかどうかにかかわらず、数値範囲に適用される。

【0029】

本明細書で使用される「約」又は「およそ」との用語は、測定可能な値、例えば、パラメータ、量、持続時間等に言及する場合、指定された値の変動及び指定された値からの変動、例えば、指定された値の及び指定された値からの $\pm 10\%$ 以下、好ましくは $\pm 5\%$ 以下、より好ましくは $\pm 1\%$ 以下、さらにより好ましくは $\pm 0.1\%$ 以下の変動を、このような変動が開示された発明において実施するのに適切である限り、包含することを意味する。「約(about)」又は「およそ(approximately)」との修飾語が言及する値は、それ自体も具体的に、かつ好ましく開示されることが理解されるべきである。

10

【0030】

「1以上の」又は「少なくとも1つ」との用語、例えば、1以上の部材又は部材グループの少なくとも1つの部材は、それ自体明らかであるが、さらなる例示によって、当該用語は、とりわけ、当該部材のうちのいずれか1つ、又は当該部材のうちのいずれか2つ以上、例えば、当該部材のうちのいずれか3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上若しくは7つ以上等、及び全ての当該部材までの言及を含む。別の例では、「1以上の」又は「少なくとも1つ」は、1、2、3、4、5、6、7又はそれ以上を指してもよい。

【0031】

本明細書における発明の背景の考察は、発明の脈絡を説明するために含まれている。これは、言及された資料のいずれかが、特許請求の範囲のいずれかの優先日の時点で任意の国において公開されたか、公知であったか、又は通常の一般的知識の一部であったことを認めるものと解釈されるべきではない。

20

【0032】

本開示を通して、様々な刊行物、特許及び公開された特許明細書は、識別引用によって参照される。本明細書に引用される全ての文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、本明細書中で具体的に言及されたこのような文献の教示又は節は、参照により組み込まれる。

【0033】

別段の規定のない限り、本発明の開示において使用される全ての用語(技術用語及び科学用語を含む)は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるような意味を有する。さらなる指針によって、用語の定義は、本発明の教示をより正しく評価するために含まれている。特定の用語が本発明の特定の態様又は本発明の特定の実施形態に関連して定義される場合、このような含意又は意味は、別段の規定のない限り、本明細書全体を通して、すなわち、本発明の他の態様又は実施形態の文脈においても適用されることを意味する。例えば、モノを対象とする実施形態は、方法及び用途の対応する特徴にも適用可能である。

30

【0034】

以下の文章では、本発明の異なる態様又は実施形態をより詳細に規定する。そのように規定された各態様又は実施形態は、そうでないことが明らかに示されない限り、任意の他の態様(複数可)又は実施形態(複数可)と組み合わせてもよい。特に、好ましい又は有利であると示された任意の特徴は、好ましい又は有利であると示された任意の他の1以上の特徴と組み合わせてもよい。

40

【0035】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」への言及は、実施形態に関連して説明された特定の特徴、構造、又は特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して様々な場所における「一実施形態では」又は「ある実施形態では」との語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指すとは限らない。さらに、特定の特徴、構造、又は特性は、1以上の実施形態において、

50

本開示から当業者に明白であるように、任意の好適な様式で組み合わせてもよい。さらに、本明細書に記載された、いくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれる他の特徴ではなくいくつかの特徴を含むが、異なる実施形態の特徴の組合せは、当業者によって理解されるように、本発明の範囲内であり、異なる実施形態を形成することを意味する。例えば、添付の特許請求の範囲では、当業者によって理解されるように、特許請求される実施形態の代替的な組合せが包含される。

【0036】

別段の指示がない限り、具体的に詳細に記載されていない全ての方法、工程、技術及び操作は、当業者に明らかであるように、それ自体公知の様式で実施することができ、実施されている。例えば、標準的なハンドブック並びに本明細書で言及される一般的な背景技術及びそこで引用されるさらなる参考文献(例えば、Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, ISBN 0879693096, 1989及び対応する最新版の第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)が参照される。

10

【0037】

一般に、本発明におけるアミノ酸配列及びその番号付けは、配列番号7に示されるAAV2 VP1カプシド配列を参照している。同じ番号付けは、より短いVP2及びVP3タンパク質について維持される。ソルターゼ認識配列の挿入、リンカー配列の任意選択的な挿入、及びカプシドタンパク質骨格におけるアミノ酸の欠失は、長さの異なるポリペプチドをもたらすことがさらに留意される。また、これらのポリペプチドについて、カプシドタンパク質骨格におけるアミノ酸は、配列番号7により規定されたままである。AAV2カプシドタンパク質と他のAAV血清型のものとの間の配列類似性は、配列アラインメントにおいて、配列番号7を参照して対応するアミノ酸を同定することを可能にする。例示的に、対応するAAV9の位置への言及もまた、本記載を通してなされる。

20

【0038】

本発明は、配列番号7、8又は9とは異なるAAVカプシド配列(例えば、天然に存在する血清型バリエーション及び親和性を変更するための人工的な修飾)に等しく適用できる。このようなバリエーションは、例えばR585A、R588A突然変異体の場合のように、VR領域内にも起こり得る。それゆえ、例示的に、本明細書に開示されるAAV2位置はまた、他のAAV血清型バリエーション(天然に存在するもの及び人工的に生成されたもの)における対応するアミノ酸位置を対象として含むことが意図される。

30

【0039】

本明細書を通して使用される「タンパク質」との用語は、一般に、1以上のポリペプチド鎖、すなわち、ペプチド結合によって連結しているアミノ酸残基のポリマー鎖を含む巨大分子を包含する。この用語は、天然に、組換え的に、半合成的に、又は合成的に製造されたタンパク質を包含してもよい。この用語はまた、ポリペプチド鎖の1以上の共発現型又は発現後型の修飾、例えば、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、グアニジニル化、リン酸化、スルホン化、メチル化、ユビキチン化、シグナルペプチド除去、N-末端Met除去などを保有するタンパク質を包含する。この用語はさらに、対応するネイティブタンパク質に対してアミノ酸配列の変異(例えばアミノ酸の欠失、付加及び/又は置換)を保有するタンパク質バリエーション又は突然変異体を含む。この用語は、全長タンパク質及びタンパク質の部分又はフラグメント(例えば、このような全長タンパク質のプロセッシングから生じる天然に存在するタンパク質部分)の両方を意図する。

40

【0040】

本明細書を通して使用される「ポリペプチド」との用語は、一般に、ペプチド結合によって連結しているアミノ酸残基のポリマー鎖を包含する。したがって、特にタンパク質が単一のポリペプチド鎖のみから構成される場合、「タンパク質」及び「ポリペプチド」との用語は、このようなタンパク質を示すために本明細書中で区別なく使用してもよい。この用語は、ポリペプチド鎖のいかなる最小長にも限定されない。この用語は、天然に、組換え的に、半合成的に、又は合成的に製造されたポリペプチドを包含し得る。この用語は、全長ポリペプチド及びポリペプチドの部分又はフラグメント(例えば、このような全長

50

ポリペプチドのプロセッシングから生じる天然に存在するポリペプチド部分)の両方を意図する。

【0041】

本明細書を通して使用される「ペプチド」との用語は、好ましくは、50以下のアミノ酸、例えば45以下のアミノ酸、好ましくは40以下のアミノ酸、例えば35以下のアミノ酸、より好ましくは30以下のアミノ酸、例えば25以下、20以下、15以下又は10以下のアミノ酸を含む、ペプチド結合によって連結しているアミノ酸残基の短鎖を指す。ペプチドを依然としてペプチドと見なす厳密な最大長はない。ペプチドとの用語は、天然に、組換え的に、半合成的に、又は合成的に製造されたペプチド、例えば、上記のポリペプチドについて考察されたものを包含してもよい。

10

【0042】

「アミノ酸」との用語は、天然に存在するアミノ酸、天然にコードされたアミノ酸又はタンパク質原性アミノ酸、非天然にコードされたアミノ酸、非天然に存在するアミノ酸、天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸アナログ及びアミノ酸ミメティックを包含し、それらはすべてそれらの構造がそのような立体異性形態を可能にするという条件でD-及びL-立体異性体である。アミノ酸は、本明細書において、それらの名称、それらの一般に知られている3文字コード、又はIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される1文字コードのいずれかによって言及される。「天然にコードされたアミノ酸」は、20の一般的なアミノ酸又はピロリシン、ピロリン-カルボキシ-リジン又はセレノシステインのうちの一つであるアミノ酸を指す。20の一般的なアミノ酸は、アラニン(A又はAla)、システイン(C又はCys)、アスパラギン酸(D又はAsp)、グルタミン酸(E又はGlu)、フェニルアラニン(F又はPhe)、グリシン(G又はGly)、ヒスチジン(H又はHis)、イソロイシン(I又はIle)、リジン(K又はLys)、ロイシン(L又はLeu)、メチオニン(M又はMet)、アスパラギン(N又はAsn)、プロリン(P又はPro)、グルタミン(Q又はGln)、アルギニン(R又はArg)、セリン(S又はSer)、スレオニン(T又はThr)、バリン(V又はVal)、トリプトファン(W又はTrp)、及びチロシン(Y又はTyr)である。1以上の個々の原子が、異なる原子、同じ原子の同位体、又は異なる官能基のいずれかで置き換えられているアミノ酸アナログも含まれる。

20

【0043】

「コードする」は、当技術分野における一般的な解釈に従って解釈されるべきであり、それゆえ、核酸配列又はその一部が、問題の生物の遺伝コードによって、特定のアミノ酸配列、例えば、1以上の所望のタンパク質若しくはポリペプチドのアミノ酸配列、又は鋳型-転写産物(例えば、RNA若しくはRNAアナログ)の関係にある別の核酸配列に対応することを示す。本明細書を通して、アミノ酸位置及び/又はアミノ酸配列における修飾に言及する多数の言及がなされているが、AAVカプシドタンパク質が核酸配列から翻訳される実施形態において、当該修飾がコード核酸配列に導入されることは明らかである。

30

【0044】

本明細書を通して使用される「核酸」との用語は、典型的には、本質的にヌクレオシド単位から構成される任意の長さのポリマー(好ましくは線状ポリマー)を指す。ヌクレオシド単位は、一般に、複素環式塩基及び糖基を含む。複素環式塩基は、とりわけ、天然に存在する核酸中に広く存在するアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)及びウラシル(U)などのプリン及びピリミジン塩基、他の天然に存在する塩基(例えば、キサントシン、イノシン、ヒポキサントシン)並びに化学的又は生化学的に修飾された(例えば、メチル化された)非天然又は誘導体化塩基を含んでもよい。核酸は、二本鎖、部分的に二本鎖、又は一本鎖であり得る。一本鎖の場合、核酸は、センス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。加えて、核酸は、環状又は線状であり得る。

40

【0045】

当業者は、配列間の配列同一性を評価できることが理解される。アミノ酸又は核酸の異なる配列間の配列同一性を検証するための方法及びツールは周知である。このようなツールとしては、(Protein)BLAST、ClustalW2、SIMアラインメントツール、Translat

50

orX、及びT-COFFEEが挙げられる。2つの配列間の同一性のパーセンテージは、アルゴリズムの選択及びパラメータに依存して、わずかな差異を示す場合がある。本明細書で使用される「配列同一性」との用語は、ヌクレオチド(又はアミノ酸)レベルでの配列間の関係を指す。「%同一」との表現は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインメントされた配列、例えば2つ以上を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内の配列の部分は、配列の最適なアラインメントのための参照配列と比較して、挿入及び/又は欠失を含んでもよい。参照配列は、挿入又は欠失を含まない。参照ウィンドウを選択し、次いで、ウィンドウ内の配列間で同一であるヌクレオチド(又はアミノ酸)の数を決定し、同一のヌクレオチド(又はアミノ酸)の数をウィンドウ内のヌクレオチド(又はアミノ酸)の数で割り、100を掛けることによって、「%同一性」を計算する。特に断りのない限り、配列同一性は参照配列の全長にわたって計算される。特定のアミノ酸配列とクエリーポリペプチドのアミノ酸配列との間の同一性パーセントを決定するための手順例は、適切なアルゴリズムパラメータを使用して、NCBIウェブサイト(www.ncbi.nlm.nih.gov)においてウェブアプリケーション又はスタンドアロン実行可能プログラム(BLASTバージョン2.2.31+)として利用可能なBlast 2配列(BI2seq)アルゴリズムを使用して、2つのアミノ酸配列をアラインメントすることを伴う。適切なアルゴリズムパラメータの例としては、以下が挙げられる：行列=Blosum62、ギャップを開くためのコスト=11、ギャップを伸長するためのコスト=1、期待値=10.0、ワードサイズ=3)。当業者は、配列データベース中又は本明細書中に示される任意の配列が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又は核酸の前駆体であってもよく、そして成熟分子からプロセッシングされた部分を含んでもよいことを容易に理解する。

10

20

【0046】

一般に「AAV」と略される「アデノ随伴ウイルス」は、無エンベロープの正二十面体カプシド内の4.7 kbの一本鎖DNAゲノムから構成される非病原性パルボウイルスを指す。全長の用語及びその略語の両方が、ウイルス自体又はその誘導体を指すために使用されてもよい。AAVゲノムは、rep遺伝子及びcap遺伝子をコードする2つのオープンリーディングフレームの発現を担う3つのAAVプロモーター(すなわち、p5、p19、及びp40；名称は、それらの相対的なマップ位置を指す)を含む。2つのrepプロモーター(p5及びp19)は、単一のAAVイントロンの差次的スプライシングと共役して、rep遺伝子からの4つのRepタンパク質(Rep 78、Rep 68、Rep 52、及びRep 40)の産生を駆動する。異なるRepタンパク質は、ウイルス複製の様々な態様に関する異なる酵素特性を有する。Cap遺伝子は、p40プロモーターから発現され、選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始点によって、3つのカプシドタンパク質、ウイルスタンパク質1(VP1)、ウイルスタンパク質2(VP2)、及びウイルスタンパク質3(VP3)をコードする。VP1、VP2、及びVP3は、AAVのカプシド形成に関与する(すなわち、VP1、VP2、及びVP3は、AAVカプシドタンパク質である)。したがって、VP1、VP2、及びVP3は、重複する配列を有し、VP3は、VP2の配列内に完全に含まれ、これは、ひいては、VP1内に含まれる。最も高い構造的変異(VR)を有する領域は、当該技術分野においてVR-I~VR-IXと注釈が付けられている。本発明は、VR-I、VR-IV、及びVR-VIII領域内の配列操作を対象とする。加えて、本発明は、VP1-VP2転移領域(すなわち、VPタンパク質の各々に独特のN-末端VP1部分の末端及びVP2タンパク質配列のN-末端をマークする領域)内の配列操作を包含する。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムの地図位置95に位置する。さらに、cap遺伝子内の代替リーディングフレームとして存在するオープンリーディングフレームは、AAVカプシドタンパク質を核小体に局在化させ、カプシドアセンブリプロセスにおいて機能するウイルスタンパク質であるアセンブリ活性化タンパク質(AAP)を産生する。AAVゲノムは、両末端に逆方向の末端反復を含む。

30

40

【0047】

本明細書で使用される「AAV」との用語は、必要とされる場合又はそうでないことが明示的に示される場合を除いて、全てのサブタイプ及び/又は血清型(天然に存在する形態及び組換え形態；rAAV)を対象として含むことを理解されたい。したがって、「AAV

50

」との用語は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAV、又はそれらの任意の組合せを包含する。当業者は、上記の指示が、当該AAVによって感染され得る対象を指すことを理解する。例えば、霊長類AAVは、霊長類に感染しうるAAVを指す。種々のAAV血清型のゲノム配列、それらのネイティブな逆方向末端反復(ITR)、Repタンパク質、及びカプシドサブユニットは、当該分野で記載されている。このような配列は、文献又はGenBank、UniProtなどの公的ナリポジトリに見出すことができる。「AAV」との用語は、天然には存在しないカスタム設計されたAAVカプシドタンパク質を含有するモザイクAAV及びキメラAAV(例えば、指向進化によって得られたAAVを含む)を等しく包含する。異なる血清型間のゲノム多様性は、AAVの組織親和性に影響を及ぼすウイルスカプシドの超可変領域(HVR)に最も集中していることが当該技術分野において記載されている。AAVベクターの組織親和性は、細胞表面レセプター、細胞取込み、AAVの細胞内プロセッシング、AAVゲノムの核送達、AAVの脱外被、及び第2鎖DNA変換などの他の要素(すなわち、パラメータ)に依存することが当業者に公知である。本発明の文脈における好ましいAAV血清型は、AAV2及びAAV9であるが、本明細書に記載される任意の実施形態は、モザイクAAV及びキメラAAVを含む任意のAAV血清型に等しく適用可能であることが想定される。

10

【0048】

本明細書で使用される「親和性」(tropism)との用語は、ウイルスによる(本文脈ではAAVによる)、特定の宿主種又は宿主種内の特定の細胞型の好ましいターゲティングを指す。特定のウイルスについて、ウイルスの親和性は、そのウイルスの相対的嗜好性を表す。絶対形質導入効率が類似していなくても、ウイルスが同じ特徴を好む(例えば、第2のウイルスが同じ細胞(すなわち、同じ細胞型)に感染することにもより成功する場合、ウイルスは、別のウイルスと比較した場合、類似(又は同一)の親和性を有するとみなすことができる。第2のウイルスは、試験される全ての所定の細胞型を感染させることにおいて、第1のウイルスよりも効率的であり得るが、相対的な嗜好性が類似(又は同一)である場合、第2のウイルスは、一般に、当該分野において、第1のウイルスと類似(又は同一)の親和性を有すると考えられる。

20

【0049】

「AAV(ウイルス)粒子」、「AAVピリオン」又は「AAV(ベクター)粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質及びカプシド形成された一本鎖核酸鎖から構成されるウイルス粒子を指す。ある特定の実施形態において、AAV粒子は、異種性核酸配列(すなわち、真核細胞(例えば、哺乳動物細胞又は昆虫細胞などであるが、これらに限定されない)に送達される導入遺伝子などの野生型AAVゲノム以外の核酸)を含む。一般に、関連用語「AAVカプシド」は、AAV粒子の外表面(すなわち、カプシド)を指す。AAVカプシドは、1:1:10のVP1:VP2:VP3比でカプシド中に存在すると予測される3つのVPを60コピー(合計)含有する。したがって、本明細書を通して、「AAVカプシドタンパク質」への言及は、VP1、VP2、及びVP3タンパク質のそれぞれ、又は示される場合、それらの任意の選択を包含する。「接合AAV粒子」との用語が使用される本明細書を通じた例において、これは、ソルターゼ接合反応に供されたAAV粒子を示すことが理解されるべきである。

30

40

【0050】

「ソルターゼ」は、「ソルターゼ酵素」と区別なく使用されるが、天然において、特定の表面タンパク質をペプチドグリカンに共有結合することによって細菌細胞壁の形成において役割を果たす酵素のファミリーを指す。最も広い解釈において、ソルターゼは、アミノ酸のストレッチを認識し、アミノ酸のそのストレッチ内で部位特異的に切断し、そして最後に、アクセプター部分のN-末端残基とのペプチド結合を介して切断部位からすぐC-末端側に基質部分を結合する酵素として規定できる。言い換えると、ソルターゼ酵素は、基質タンパク質中のソルターゼ認識モチーフを認識し、ペプチド転移反応を実施する。第

50

1の反応工程において、ソルターゼは、ソルターゼ認識モチーフ中のペプチド結合を切断し、切断されたソルターゼ認識モチーフを有するアシル中間体を形成する。第2の反応工程において、ソルターゼは、ソルターゼアクセプターモチーフ(典型的には、少なくとも1つのグリシン又はグリシンのストレッチ)を有するアクセプター部分に結合し、アシル中間体を転移させる。この反応により、基質タンパク質とアクセプター部分との間に新たなペプチド結合が形成される。「ソルターゼ認識モチーフ」を指すために本明細書中及び当該分野で区別なく使用される代替の用語としては、「ソルターゼ認識配列」及び「ソルターゼ認識タグ」が挙げられる。

【0051】

異なるソルターゼが当技術分野において記載されている。その非限定的な例としては、グラム陽性酵素中に天然に存在するソルターゼ酵素が挙げられる。好ましいソルターゼ酵素としては、ソルターゼA、ソルターゼB、ソルターゼC、ソルターゼD、ソルターゼE、及びソルターゼFが挙げられる。より具体的なソルターゼサブファミリーが記載されており、これらもまた、「ソルターゼ」との用語に包含される。同定されたソルターゼを、その配列又は機能的特徴(例えば、ペプチド転移活性)に基づいて正しいクラス及び/又はサブファミリーに割り当てることは、十分に当業者の能力の範囲内である。本明細書を通して「ソルターゼ」に対して一般的な言及がなされる場合、特に断りのない限り、天然に存在する及び人工的に操作された全てのソルターゼのタイプ及びサブタイプが想定されることは明らかである。

【0052】

本明細書に記載されるようなAAVカプシドタンパク質は、AAVカプシドタンパク質と異種性接合体(分子)との間の物理的結合を収容することを目的とする。当技術分野で「外因性」との用語と区別なく使用される「異種性」との用語は、ある特定の部分(本発明の文脈では、接合体分子)が、AAVの天然の未修飾バージョンでは生じていないことを示す。したがって、分子生物学及びバイオテクノロジーの分野において一般的に受け入れられている命名法に従って、「異種性接合体」及び「異種性接合体分子」とは、天然には当該分子を含まないか又は発現しない宿主生物中に存在する分子を指す。

【0053】

本発明者らは、ソルターゼ認識配列をAAV粒子のカプシド配列中の特定の内部位置に導入して、適切な親AAV血清型と比較した場合に同様の生産効率を維持しながら、より効率的且つ特異的に組織及び細胞をターゲティングするための、ターゲティング分子とAAVカプシドとの接合(接合AAV粒子を産生するため)を可能にしうることを予想外に見出した。この知見は、多くの理由で注目に値する。

【0054】

-バイオテクノロジー適用のために、ソルターゼ認識配列は、タンパク質のC-末端に、又は機能的であるためには少なくともその近傍に位置する必要があるという一般的な教示が当該分野に存在する。AAVカプシドタンパク質中の内部に位置するソルターゼ認識配列が機能的であり、且つアクセス可能であるという観念は予想外である。

【0055】

-注目すべきことに、ソルターゼ反応を行った後でさえ、(接合)AAVカプシドを形成する(現在は分割された)カプシドの構造的及び機能的完全性は維持される。伸長されたリンカー配列の導入の際でさえ、AAVカプシドタンパク質は、ソルターゼ酵素によって会合されることに対して影響を受けやすいままであった。さらに、驚くべきことに、表面露出領域における比較的長いリンカー配列(当技術分野において最大挿入長として示される34アミノ酸の長さを超える)と組み合わせたソルターゼ認識配列の挿入は、ウイルスカプシドタンパク質の構造的特性にも機能的特性にも負の影響を及ぼさないことが見出された。

-VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、及びVR-VIII領域が、ソルターゼ反応を完了するためにソルターゼ及びアクセプター部分の両方を近接させることができるような程度にアクセス可能であることは想定できなかった。

【0056】

-予想外に、本発明者らによる知見は、異なるAAV血清型において容易に再現され得る(又はそれに外挿され得る)。血清型間のAAVカプシドタンパク質の配列多様性は、内部ソルターゼ認識配列を挿入及び使用するための障壁を形成しない。

【0057】

したがって、本発明は、ソルターゼ認識配列がそれらのタンパク質配列内に、特にVP1、VP2、又はVP3カプシドタンパク質に挿入されていることを特徴とする、アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質を提供する。より具体的には、本発明は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上に、ソルターゼ認識配列が挿入されていることを特徴とするアデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質に関する。任意選択で、AAVカプシドタンパク質はVP1であり、ソルターゼ認識配列は、VP1~VP2、VR-I、VR-IV、VR-VIII、又はそれらの任意の組合せに挿入される。好ましくは、AAVカプシドタンパク質はVP1であり、ソルターゼ認識配列は、VR-I、VR-IV、VR-VIII、又はそれらの任意の組み合わせに挿入される。あるいは、AAVカプシドタンパク質はVP2であり、ソルターゼ認識配列は、VR-I、VR-IV、VR-VIII、又はそれらの任意の組み合わせに挿入される。あるいは、AAVカプシドタンパク質はVP3であり、ソルターゼ認識配列は、VR-I、VR-IV、VR-VIII、又はそれらの任意の組み合わせに挿入される。VP3の配列がVP2の配列によって完全に包含され、VP2の配列がひいてはVP1の配列によって完全に包含されることを考慮すると、AAVカプシドタンパク質は、本明細書で規定されるVP3タンパク質の配列を含むタンパク質であってもよい。代替的又は追加的に、AAVカプシドタンパク質は、本明細書で規定されるVP2タンパク質の配列を含むタンパク質であってもよい。さらに代替的又は追加的に、AAVカプシドタンパク質は、本明細書に記載されるVP3タンパク質の配列を含むタンパク質であってもよい。想定される態様において、VP1、VP2、又はVP3配列は、1以上のソルターゼ認識モチーフの存在に起因して、これらのタンパク質のカノニカル配列とは異なることが明らかである。したがって、本発明の対象であるAAVカプシドタンパク質は、天然に存在するVP1、VP2、若しくはVP3タンパク質又はそれらのコード配列と100%配列同一性を共有しない。それゆえ、ある特定の実施形態において、AAVカプシドタンパク質は、天然に存在する(すなわち、野生型)AAVカプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくともとも約80%同一、好ましくは少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、又は少なくとも約98%同一であるアミノ酸配列を含み、カプシドタンパク質は、少なくとも1つのソルターゼ認識配列を含む。好ましい実施形態において、AAVカプシドタンパク質は、天然に存在する(すなわち、野生型)AAV2又はAAV9、好ましくはAAV2カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくともとも約80%同一、好ましくは少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、又は少なくとも約98%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0058】

好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、N-末端リンカー(すなわち、ソルターゼ認識モチーフのリンカー配列N-末端)に作動可能に連結している。代替的な好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、C-末端リンカー(すなわち、ソルターゼ認識モチーフのリンカー配列C-末端)に作動可能に連結している。より好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、N-末端リンカー配列及びC-末端リンカー配列に隣接する。任意選択で、リンカー配列は、GGGS[配列番号39]配列若しくはその任意の複数、又はGGSGS[配列番号47]配列若しくはその任意の複数である。任意選択で、リンカー配列は、GGGS[配列番号39]配列を含むか、GGSGS[配列番号47]配列を含むか、又はそれらの任意の組合せを含む。

【0059】

本明細書に記載される任意のソルターゼ認識配列及び任意選択のリンカー配列について、これらの配列の各々は、AAVカプシドタンパク質のN-末端部分及びC-末端部分に作動可能に連結していなければならないことは明らかである。「作動可能に連結している」と

の用語は、分子生物学の当業者に周知であり、そしてそのように記載される成分が、それらの通常の機能を実施するように構成されている要素の配置をいう。したがって、AAVカプシドタンパク質配列内の内部位置に作動可能に連結されたソルターゼ認識配列は、当該AAVカプシドタンパク質の翻訳を妨害しない。制御配列は、コード配列の発現を指示するように機能する限り、コード配列と連続している必要はない。

【0060】

任意選択で、ソルターゼ認識配列は、天然に存在するソルターゼ酵素(例えば、グラム陽性細菌中の天然に存在するソルターゼ酵素であるが、これに限定されない)のソルターゼ認識配列に対応する配列である。好ましくは、ソルターゼ認識配列は、ソルターゼA、ソルターゼB、ソルターゼC、ソルターゼD、ソルターゼE、及びソルターゼFからなる群より選択されるソルターゼの一般的なソルターゼ認識配列に対応する配列である。好ましくは、ソルターゼ認識配列は、ソルターゼAの一般的なソルターゼ認識配列に対応する配列である。

10

【0061】

ある特定の実施形態において、AAVカプシドタンパク質は、ソルターゼA、ソルターゼB、ソルターゼC、ソルターゼD、ソルターゼE、及びソルターゼFからなる群より選択されるソルターゼの2つ以上のソルターゼ認識配列を含む。複数のソルターゼ認識配列が挿入されている実施形態では、当該ソルターゼ認識配列は、AAVカプシドタンパク質の異なる位置に挿入されていることが好ましい。このような実施形態におけるソルターゼ認識配列は、ソルターゼA、ソルターゼB、ソルターゼC、ソルターゼD、ソルターゼE、及びソルターゼFからなる群より選択されるソルターゼの同一のソルターゼ認識配列又はソルターゼ認識配列の任意の組合せであってもよい。好ましくは、AAVカプシドタンパク質は、少なくともソルターゼA認識配列を含む。

20

【0062】

任意選択で、ソルターゼ認識配列は、以下からなる群より選択される一般配列モチーフを有する配列である：LPXTG[配列番号10]、NPXTG[配列番号40]、LPXTA[配列番号41]、LAXTG[配列番号42]、LPXAG[配列番号48]、LPXLG[配列番号49]、APXTG[配列番号50]、LPXSG[配列番号51]、FPXTG[配列番号52]、XPKTG[配列番号53]、及びLPEXG[配列番号54](式中、Xは任意のアミノ酸である)。好ましくは、ソルターゼ認識配列は、一般配列モチーフLPXTG[配列番号10](式中、Xは任意のアミノ酸であり、XはX_n及びX_mについて独立して規定される)を有する配列である。なおさらに好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、LPQTG[配列番号43]、LPETG[配列番号44]、LPNTG[配列番号45]、LPDTG[配列番号46]、NPQTN[配列番号55]、QVPTG[配列番号56]、LPNTA[配列番号57]、LPLTG[配列番号58]、APKTG[配列番号59]、DPKTG[配列番号60]、SPKTG[配列番号61]、APATG[配列番号62]、LAETG[配列番号63]、LPEAG[配列番号64]、LPECG[配列番号65]、LPESG[配列番号66]、又はLMVGG[配列番号67]である。最も好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、LPQTG[配列番号43]又はLPETG[配列番号44]である。本明細書に記載されるソルターゼ認識配列を記載する代替の適切な方法は、「X_n-ソルターゼ認識配列-X_m」の形式によるものである。したがって、この形式は、「X」が任意のアミノ酸を示し、「n」及び「m」がリンカー配列の長さ(すなわち、アミノ酸の量)を示す整数である、リンカー配列の任意選択的な存在を示す。明らかに、Xは、X_n及びX_mについて互いに独立して規定できる。したがって、ある特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列の直前に配列X_nが存在し、直後に配列X_mが存在する。したがって、本明細書に記載されるソルターゼ認識配列は、代わりにX_n-LPXTG-X_m[配列番号10]、X_n-NPXTG-X_m[配列番号40]、X_n-LPXTA-X_m[配列番号41]、X_n-LAXTG-X_m[配列番号42]、X_n-LPXAG-X_m[配列番号48]、X_n-LPXLG-X_m[配列番号49]、X_n-APXTG-X_m[配列番号50]、X_n-LPXSG-X_m[配列番号51]、X_n-FPXTG-X_m[配列番号52]、X_n-XPKTG-X_m[配列番号53]、及びX_n-LPEXG-X_m[配列番号54](式中、Xは任意のアミノ酸であり、n及びmは0~25の範囲である)により示してもよい。好ましくは、ソルターゼ認識配列は、一般配列モチーフX_n-L

30

40

50

PXTG-Xm[配列番号10] (式中、Xは、任意のアミノ酸であり、そしてn及びmは、0~25の範囲である)を有する配列である。より好ましくは、ソルターゼ認識配列は、Xn-LPQTG-Xm[配列番号43]、Xn-LPETG-Xm[配列番号44]、Xn-LPNTG-Xm[配列番号45]、Xn-LPDTG-Xm[配列番号46]、Xn-NPQTN-Xm[配列番号55]、Xn-QVPTG-Xm[配列番号56]、Xn-LPNTA-Xm[配列番号57]、Xn-LPLTG-Xm[配列番号58]、Xn-APKTG-Xm[配列番号59]、Xn-DPKTG-Xm[配列番号60]、Xn-SPKTG-Xm[配列番号61]、Xn-APATG-Xm[配列番号62]、Xn-LAETG-Xm[配列番号63]、Xn-LPEAG-Xm[配列番号64]、Xn-LPECG-Xm[配列番号65]、Xn-LPESG-Xm[配列番号66]、又はXn-LMVGG-Xm[配列番号67]である。最も好ましくは、ソルターゼ認識配列は、Xn-LPQTG-Xm[配列番号43]又はXn-LPETG-Xm[配列番号44]である。

10

【0063】

上記のように、ある特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列の前及び/又は後にリンカー配列が存在する(すなわち、ソルターゼ認識配列の前又は後にXn及び/又はXm配列が存在し、n及び/又はmが少なくとも1であり、Xn及びXmのXは互いに独立して規定できる実施形態)。したがって、本発明は、n及び/又はmが0である実施形態を想定するが、n及び/又はmが少なくとも1である実施形態も同様に想定する。それゆえ、ある特定の実施形態において、n及び/又はmは、0以上25以下、例えば少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4又は少なくとも5、好ましくは5以上20以下、例えば10以上15以下の整数である。

【0064】

任意選択で、n及び/又はmは、15以上20以下、又は15~20の間の整数である。任意選択で、n及び/又はmは、10以上15以下、又は10~15の間の整数である。任意選択で、n及び/又はmは、5以上10以下、又は0~5の間の整数である。任意選択で、n及び/又はmは、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は0である。さらに想定されるのは、nが0であり、mが0以上25以下、好ましくは0以上20以下の整数である実施形態である。同様に想定されるのは、mが0であり、nが0以上25以下、好ましくは0以上20以下の整数である実施形態である。

20

【0065】

リンカー配列Xn及びXmの正確な配列は、本発明を特に限定するものではない。しかし、好ましいXn及びXm配列(又はその特徴)は、以下の段落に記載する。好ましくは、リンカー配列Xn、Xm、又はXn及びXmの両方は、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%のグリシン、セリン、スレオニン、及びアラニンからなる。より好ましくは、リンカー配列Xn、Xm、又はXn及びXmの両方は、グリシン、セリン、スレオニン、及びアラニンからなる。あるいは、リンカー配列Xn、Xm、又はXn及びXmの両方は、少なくとも65%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%のグリシン及びセリンからなる。さらなる代替の実施形において、リンカー配列Xn、Xm、又はXn及びXmの両方は、グリシン及びセリンからなる。特定の実施形態において、リンカー配列はGGSGS[配列番号47]である。

30

40

【0066】

ソルターゼ認識配列が挿入されていてもよい本明細書に記載される領域の各々は、当該分野を通して何度も記載されており、したがって、これらの領域を同定することは、十分に当業者の能力の範囲内である。任意選択で、VP1-VP2転移領域は、配列番号1[PVKTAP]により規定される。任意選択でVR-I領域は、配列番号2[SSQSGASN]により規定される。任意選択で、VR-IV領域は、配列番号3[SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]により規定される。任意選択で、VR-VIII領域は、配列番号4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]により規定される。好ましい実施形態において、VR-I領域は、配列

50

番号2[SSQSGASN]により規定され、VR-IV領域は、配列番号3[SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]により規定され、VR-VIII領域は、配列番号4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]により規定される。さらに好ましい実施形態において、VP1-VP2転移領域は、配列番号1[PVKTAP]により規定され、VR-I領域は、配列番号2[SSQSGASN]により規定され、VR-IV領域は、配列番号3[SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]により規定され、VR-VIII領域は、配列番号4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]により規定される。配列番号1～配列番号4は、ソルターゼ認識モチーフが挿入されていない配列、すなわち、本発明者らが、任意選択的に1以上のリンカーに隣接する1以上のソルターゼ認識モチーフに受容可能であることを見出した配列に対応することが理解されるべきである。AAV2ではないAAV血清型における対応するアミノ酸配列も同様に想定される。

10

【0067】

ソルターゼ認識配列がVR-IV領域に挿入されている実施形態において、ソルターゼ認識配列は、好ましくは、配列番号5[TPSGTTTQS]を有するフラグメントに挿入されていてもよく、且つ/又はVR-VIII領域における挿入は、配列番号6[LQRGNRQAA]を有するフラグメントにおいてである。このような実施形態において、ソルターゼ認識配列は、配列番号5の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、又は9番目のアミノ酸の後に挿入されていてもよい。代替的なこのような実施形態において、ソルターゼ認識配列は、配列番号6の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、又は9番目のアミノ酸の後に挿入されていてもよい。さらに代替的な実施形態において、第1のソルターゼ認識配列は、配列番号5の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、又は9番目のアミノ酸の後に挿入されていてもよく、そして第2のソルターゼ認識配列は、配列番号6の1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、又は9番目のアミノ酸の後に挿入されていてもよい。

20

【0068】

本明細書に記載されるソルターゼ認識配列は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、及び/又はVR-VIII領域のゲノム配列にソルターゼ認識配列を挿入することによって、該領域に挿入されていてもよい。挿入は、当該領域中のカノニカルアミノ酸の除去を伴わない挿入であってもよい。このような実施形態において、ソルターゼ認識配列は、元の配列に加えて導入される。あるいは、本明細書に記載されるソルターゼ認識配列は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、及び/又はVR-VIII領域のゲノム配列における挿入及び欠失(置換又は置換えを生じる)によって、該領域に挿入されていてもよい。

30

【0069】

欠失又は置換は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、及び/又はVR-VIII領域の構造的完全性(及び結果としてAAVカプシドタンパク質)が維持される限り、当該領域の任意の数のアミノ酸に対応してもよい。いくつかの実施形態において、AAVタンパク質の機能的完全性は、挿入部位が特定の機能性(例えば、AAV2中のVR-VIIIのHSPG結合部位)を妨害するという点で影響され得るが、これらは、接合タンパク質のさらなる使用に重要ではない。しかし、さらなる実施形態では、領域(及び結果としてAAVカプシドタンパク質)の構造的完全性及び機能的完全性の両方が維持される。

40

【0070】

理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、表面露出したリジンが、任意選択的に、許容されない副産物の生成を可能にすることによって、ソルターゼ媒介ペプチド転移の反応効率を低下させ得ることに注目する。したがって、本発明の実施形態において、1以上の表面露出リジンは、例えば、グリシン、セリン又はアラニンにおいて変異されている。どのリジンをターゲットとするかの選択は、LPXTGタグなどの挿入部位が付加されるループからのそれらの距離に基づく。

【0071】

当業者は、AAV2ではないAAV血清型について本明細書に開示されるものに対応するアミノ酸を同定できる。一般に、ソルターゼ認識配列が挿入されている領域に近接してい

50

るリジン変異が想定される。

【0072】

例示的には、AAV2のVR-I領域の30近傍のリジンは、K258、K321、K490、K507、K527、K532、K544、K549、K556、K620、K640、K649、K665、K692、及びK706に対応し；AAV2のVR-IV領域の30近傍のリジンは、K258、K309、K313、K321、K490、K507、K527、K532、K544、K549、K556、K620、K640、K649、K665、K688、K692、及びK706に対応し；AAV2のVR-VIII領域の30近傍のリジンは、K309、K490、K507、K527、K532、K544、K549、K556、K620、K640、K688、及びK706に対応する。

【0073】

例示的には、AAV2のVR-I領域の15近傍のリジンは、K258、K507、K527、K549、及びK706に対応し；AAV2のVR-IV領域の15近傍のリジンは、K258、K490、K507、K532、K544、K549、K556、及びK665に対応し；VR-VIII領域の15近傍のリジンは、K490、K507、K527、及びK532に対応する。

【0074】

例示的には、AAV2のVR-IV領域の5近傍のリジンはK549であり、AAV2のVR-VII領域の5近傍のリジンはK507である。

【0075】

任意選択で、ソルターゼ認識配列は、VR-I領域に挿入され、AAV2中のK258位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K692位、K706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、VR-I領域に挿入され、AAV2中のK258位、K507位、K527位、K549位及びK706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、VR-I領域に挿入され、AAV2中のK258位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K692位、K706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、Xn-LPXTG-Xm[配列番号10]である。

【0076】

任意選択で、本明細書において想定される実施形態において、ソルターゼ認識配列は、VR-IV領域に挿入され、AAV2中のK258位、K309位、K313位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K688位、K692位、及びK706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、VR-IVに挿入され、AAV2中のK258位、K490位、K507位、K532位、K544位、K549位、K556位及びK665位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、VR-IV領域に挿入され、AAV2中のK258位、K309位、K313位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K688位、K692位及びK706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、Xn-LPXTG-Xm[配列番号10]である。さらに好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]をVR-IV領域に挿入し、AAV2中のK549位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸は、好ましくはグリシン又はアラニンに変異されている。

【0077】

任意選択で、ソルターゼ認識配列は、VR-VIII領域に挿入され、AAV2中のK309位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K688位、及びK706位のリジン、又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、VR-VIII

10

20

30

40

50

領域に挿入され、AAV2におけるK490位、K507位、K527位及びK532位の1以上のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、VR-VIII領域に挿入され、AAV2中のK309位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K688位及びK706位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸の1以上が変異されている。任意選択で、ソルターゼA認識配列は、X_n-LPXTG-X_m[配列番号10]である。

【0078】

さらに好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]をVR-VIII領域に挿入し、K507位のリジン又は別の血清型における対応するアミノ酸は、好ましくはグリシン又はアラニンに変異されている。

10

【0079】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載されるAAVカプシドタンパク質のいずれかをコードする核酸(すなわち、核酸配列)、及びAAV粒子を製造するための方法におけるそれらの使用を対象とする。したがって、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上にソルターゼ認識配列を有する本明細書に記載のAAVカプシドタンパク質のいずれかをコードする核酸配列が包含される。核酸は、DNA、RNA、バリエーション、又はDNA及びRNAの任意の組合せであってもよい。本開示の核酸構築物を構築するための方法は周知である。核酸は、プロモーター配列をさらに含む核酸であり得る。本明細書で規定される「プロモーター」との用語は、特定の遺伝子の転写を開始し、したがって遺伝子が転写されることを可能にするDNAの領域である。プロモーターは、RNAポリメラーゼによって認識され、次いで転写を開始する。したがって、プロモーターは、RNAポリメラーゼによって直接結合されるか、又はRNAポリメラーゼの動員に関与するかのいずれかであるDNA配列を含む。プロモーター配列はまた、遺伝子クラスター中の遺伝子の転写レベルを増強するためにタンパク質(すなわち、トランス作用性因子)と結合できるDNAの1以上の領域である「エンハンサー領域」を含み得る。エンハンサーは、典型的にはコード領域の5'末端にあるが、プロモーター配列から離れていてもよく、例えば、遺伝子のイントロン領域内又は遺伝子のコード領域の3'側にあってもよい。プロモーターは、遺伝子の開始コドンに近接して、好ましい実施形態では同じ鎖上に、典型的には遺伝子の上流(5')に位置していてもよい。プロモーターは大きさが変化してもよく、好ましくは約100以上1000以下のヌクレオチド長である。

20

30

【0080】

したがって、核酸との用語は、本発明のさらなる態様である、(組換え)核酸ベクター及び(組換え)核酸発現ベクターを包含する。核酸(発現)ベクターは、限定されるものではないが、生物、組織、又は細胞培養物などの環境内の細胞に本発明の核酸を輸送するのに適していることが当業者に知られている。このようなベクターは、例示として、本明細書の主題であるAAVカプシドタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを製造するのに有用である。このような実施形態では、本発明の対象であるAAVカプシドタンパク質は、インビトロ又はインビボ条件で核酸によって発現していてもよい(すなわち、核酸は、少なくともAAVカプシドタンパク質のアミノ酸配列をコードする)。したがって、本明細書に記載される核酸は、AAV粒子及び最終的に接合AAV粒子を製造するのに好適であり得るか、又はその製造を支援するのに好適であり得、当該(任意選択的に接合)AAV粒子は、本明細書を通してさらに詳細に記載される。組換え発現ベクターは、タンパク質をコードする核酸を指し、核酸は、コードされたタンパク質、本文脈ではAAVカプシドタンパク質を発現できる。このようなベクターの例としては、プラスミド、核酸ウイルスベクター及びウイルスゲノム(DNAゲノム及びRNAゲノムの両方を含む)が挙げられる。したがって、組換えAAVベクターは、本開示によって想定される。

40

【0081】

「組換えAAVベクター」との用語は、「組換えAAV」、「組換えAAVウイルス」、及び「組換えAAVウイルス粒子」などの用語と区別なく使用され、AAVウイルスカプシドにカプセル化されたゲノムDNAが異種性核酸を含有することを示す。本発明の組換えAA

50

Vベクターにおいて、少なくともAAVカプシドタンパク質は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域のうちの1以上における1以上のソルターゼ認識配列により特徴づけられるAAVカプシドタンパク質を含む異種性核酸で置き換えられる。ベクターに含まれるコードされた配列及び要素は、ベクターを細胞の内部に導入するために適切な任意の手段によって、適切な宿主細胞中で発現できる。適切な方法としては、例示として、感染、形質転換、形質導入、及びトランスフェクションが挙げられるが、これらに限定されない。治療遺伝子及び/又はレポーター遺伝子(すなわち、ターゲット細胞に送達されることが想定される「ペイロード」)に加えて、ベクターは、機能として発現の調節を有する複数の成分(すなわち、要素、特徴)を含んでいてもよく、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、イントロン、コザック配列、ポリA配列、選択要素、又は複製起点が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0082】

ある特定の実施形態において、核酸は、天然に存在する(すなわち、野生型)AAVカプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも少なくとも約80%同一、好ましくは少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、又は少なくとも約98%同一であるアミノ酸配列を有するAAVカプシドタンパク質をコードする配列を含み、カプシドタンパク質は、少なくとも1つのソルターゼ認識配列を含む。好ましい実施形態において、核酸は、天然に存在する(すなわち、野生型)AAV2又はAAV9、好ましくはAAV2カプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも少なくとも約80%同一、好ましくは少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、又は少なくとも約98%同一であるアミノ酸配列を有するAAVカプシドタンパク質をコードする配列を含む。

20

【0083】

本発明は、異種性接合体分子をAAV粒子に(接合AAV粒子となる)、そしてより具体的にはAAVカプシドタンパク質に結合するための頑強且つ効率的な手段を提供することを目的とする。それゆえ、本発明のなおさらなる態様は、AAVカプシドタンパク質のVP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域のうちの1以上にソルターゼ認識配列を含むAAV粒子を対象とする。当業者は、ソルターゼ接合反応を行った後、C-末端グリシン残基が「切断」され、ソルターゼ認識配列の残りの部分が接合体分子とは異なるグリシンに連結されるので、ソルターゼ認識配列は修飾されることを理解する。したがって、当業者は、接合のための出発材料(すなわち、「インプット」材料)としての役割を果たす両方のAAV粒子が想定されるが、ソルターゼ接合反応を行うことによって得られるAAV粒子(すなわち、「アウトプット」材料；接合AAV粒子)も同様に想定されることを理解する。一般に、本開示を通して、ソルターゼ接合反応後のAAVカプシドタンパク質のソルターゼ認識配列部分は、「修飾ソルターゼ認識配列」、又は代替的に「残存ソルターゼ認識配列」として示される。したがって、本明細書で言及される残余のソルターゼ認識配列は、接合AAVカプシドタンパク質を、異種性接合体分子(例えば、以下にさらに記載される接合体分子であるが、これらに限定されない)と物理的に接続し、好ましくは作動可能に連結することが理解されるべきである。

30

【0084】

言い換えると、本発明は、したがって、ゲノム修飾が、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域の1以上におけるソルターゼ認識配列の存在である、ゲノム修飾されたAAVカプシドタンパク質を含むAAV粒子を提供する。したがって、ゲノム修飾は、AAVカプシドタンパク質がVP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域の1以上においてソルターゼ認識配列を有さない任意のAAV粒子に対して考慮されるべきである。

40

【0085】

したがって、ある特定の実施形態において、AAV粒子は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域の1以上においてソルターゼ認識配列の存在により特徴づけられるAAVカプシドタンパク質を含む。代替の実施形態において、接合AA

50

V粒子は、異種性接合体分子に作動可能に連結しているVP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及び/又はVR-VIII領域の1以上における残余のソルターゼ認識配列の存在により特徴づけられるAAVカプシドタンパク質を含む。ソルターゼ認識配列の内部位置及びソルターゼ接合反応の詳細を考慮すると、接合反応後のAAVカプシドタンパク質(これは、VP1タンパク質、VP2タンパク質、又はVP3タンパク質であってもよい)は、2つの別個のタンパク質；残余のソルターゼ認識配列のVP部分N-末端、残余のソルターゼ認識配列、及び接合体分子を含む第1のN-末端タンパク質；並びに(最初の)ソルターゼ認識配列のVP部分C-末端を含む第2のC-末端タンパク質として、AAVカプシド中に効果的に存在する。ソルターゼ認識配列は、接合反応を行った後に両方の部分が構造的完全性を保持するように、AAVカプシドタンパク質配列に挿入されている。

10

【0086】

接合AAV粒子に関して、本発明者らは、AAVカプシドタンパク質の相対的に低い部分が接合体化されている接合AAV粒子が、AAVカプシドタンパク質の相対的に高い部分が接合体化されている接合AAV粒子と比較して、形質導入効率のより顕著な改善を示すことをさらに予想外に観察した。接合AAV粒子中の接合AAVカプシドタンパク質の量が少ないのは、ソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質の量が少ないか、又は接合反応を実施するための(任意選択的に意図的に)最適でないパラメータの結果であり得ることは明らかである。両方の実施形態が本開示によって想定される。

【0087】

それゆえ、任意選択で、接合AAV粒子中の接合カプシドタンパク質(すなわち、修飾カプシドタンパク質)に対する非接合カプシドタンパク質(すなわち、非修飾カプシドタンパク質又は非接合カプシドタンパク質)の比は、約1/59~約59/1の間、好ましくは約1/20~約20/1の間、好ましくは約1/15~約15/1の間、好ましくは約1/10~約10/1の間、より好ましくは約1/9~約9/1の間、より好ましくは約1/8~約8/1の間、より好ましくは約1/7~約7/1の間、より好ましくは約1/6~約6/1の間、より好ましくは約1/5~約5/1の間である。好ましい実施形態において、接合AAV粒子中の接合カプシドタンパク質(すなわち、修飾カプシドタンパク質)に対する非接合カプシドタンパク質(すなわち、非修飾カプシドタンパク質)の比は、約1/5未満、好ましくは約1/10未満、好ましくは約1/15未満、好ましくは約1/20未満である。好ましい実施形態において、接合AAV粒子は、少なくとも1つの接合カプシドタンパク質(すなわち、多くとも59の非接合カプシドタンパク質)を含む。好ましい実施形態において、接合AAV粒子は、1以上20以下の接合カプシドタンパク質、好ましくは1以上15以下の接合カプシドタンパク質、好ましくは1以上10以下の接合カプシドタンパク質、より好ましくは1以上5以下の接合カプシドタンパク質を含む。特定の実施形態において、接合AAV粒子は、1つの接合カプシドタンパク質を含む。好ましくは、接合AAV粒子は、少なくとも5%の接合AAVカプシドタンパク質を含む。一方、本発明者らは、望ましい場合には、本発明がカプシドタンパク質の効率的な接合を可能にすることを見出し、これは興味深い。したがって、特定の実施形態において、接合AAV粒子は、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、より好ましくは少なくとも40個、例えば少なくとも50個の接合カプシドタンパク質を含む。

20

30

【0088】

一般に、各AAV粒子は、少なくとも1つのVP1及び少なくとも1つのVP2を、理論的にはVP1:2:3又は5:5:50の比で含むと仮定される。したがって、カプシドタンパク質の1以上の領域にソルターゼ認識配列を導入することによって、粒子中の接合タンパク質の数に影響を及ぼすことができることが理解されるであろう。

40

【0089】

任意選択で、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上においてソルターゼ認識配列を含む(任意選択的に接合)AAV粒子中のVP1、VP2又はVP3タンパク質は、同一のアミノ酸配列を有する(すなわち、互いに異なる配列を有するVP1カプシドタンパク質が単一の組み立てられたAAV粒子中に構成されておらず、互いに異なる配列を有するVP2カプシドタンパク質が単一の組み立てられたAAV粒子中に構成

50

されておらず、及び/又は互いに異なる配列を有するVP3カプシドタンパク質が単一の組み立てられたAAV粒子中に構成されていない)。このような実施形態において、ソルターゼ認識配列は異なってもよく、及び/又はソルターゼ認識配列(複数可)は、AAVカプシドタンパク質の異なる領域に挿入されてもよい。

【0090】

異種性接合体分子の詳細は、これらがソルターゼ媒介接合体分子について受容可能であるという条件で、本発明について特に限定されない。一般的に、これは、N-末端トリグリシン配列(すなわち、GGG)の存在を伴う。限定ではなく例示として、適切な異種性接合体分子は、低分子、炭水化物、脂質、又はタンパク質であってもよい。

【0091】

好ましい実施形態において、異種性接合体分子は、ターゲッティング部分である。本明細書で使用される「ターゲッティング部分」との用語は、特定の組織、細胞型、及び/又は器官に、他のそれぞれの組織、ターゲット及び/又は器官よりも優先的に結合できる任意の分子を包含する。ターゲッティング部分の詳細は、本発明を特に限定するものではなく、したがって、例示として、細胞レセプターのリガンド及び細胞表面タンパク質に結合するタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、好ましい異種性接合体分子としては、抗体及び抗体フラグメント(例えば、ナノボディであるが、これに限定されない)が挙げられる。任意選択で、異種性接合体分子が抗体又は抗体フラグメント(例えば、抗体)である実施形態において、異種性接合体分子は、ヒト上皮増殖因子レセプター2(HER2)に特異的に結合する。

【0092】

本発明の関連する態様は、医薬として使用するための、本明細書に記載される接合AAV粒子を対象とする。したがって、それを必要とする対象の処置方法が本発明に包含され、当該方法は、接合AAV粒子を対象に投与する工程を含む。医薬の製造のための、本明細書に記載されるような接合AAV粒子の使用も想定される。本発明の目的が使用され得る特定の医学的状態としては、増殖性疾患(すなわち、癌)及び組織特異的疾患(例えば、肝疾患)が挙げられる。接合AAV粒子(例えば、本明細書に記載されるAAVカプシドタンパク質、本明細書に記載される核酸、及び本明細書に記載される核酸ベクター)と相互に関連する本明細書に記載される産物はまた、医療目的のために使用してもよいことが明らかである。

【0093】

「対象」、「患者」、及び「必要とする対象」との用語は、区別なく使用してもよく、動物、好ましくは温血動物、より好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくは哺乳動物、具体的にはヒト及び非ヒト哺乳動物を指す。「哺乳動物」又は「哺乳動物対象」との用語は、そのように分類される任意の動物を指し、したがって、ヒト、家畜、商業動物、農場動物、動物園動物、スポーツ動物、ペット及び実験動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、雌ウシ；霊長類、例えば、類人猿、サル、オランウータン、及びチンパンジー；イヌ科動物、例えば、イヌ及びオオカミ；ネコ科動物、例えば、ネコ、ライオン、及びトラ；ウマ科動物、例えば、ウマ、ロバ、及びシマウマ；食用動物、例えば、ウシ、ブタ、及びヒツジ；有蹄動物、例えば、シカ及びキリン；げっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモットなどを含むが、これらに限定されない。好ましい患者はヒト対象である。特に好ましいのは、両方の性別及びその全年齢カテゴリーを含むヒト対象である。

【0094】

本発明の関連する態様は、細胞中で本明細書に記載されるカプシドタンパク質をコードする核酸を発現させること、細胞にAAV粒子を形成させること、AAV粒子を回収すること、及びこれらを目的の分子に接合体化することを含む、接合AAV粒子を製造する方法を対象とする。特定の実施態様では、該方法は、

- 細胞を、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域又はVR-VIII領域の1以上がソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質をコードする1以上の核酸と接触させ

10

20

30

40

50

る工程；

- 該細胞に複数のAAVカプシドタンパク質をAAV粒子に組み立てさせ、当該細胞からAAV粒子を回収する工程；及び
- AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させる工程を含む。

【0095】

当業者は、複数のAAVカプシドタンパク質をコードする1以上の核酸を細胞に提供する工程と、AAV粒子を回収収集する工程との間に、AAVカプシドタンパク質の転写及び翻訳並びにAAV粒子への組立てを可能にするために、当該細胞を培養する工程が行われることを理解する。任意選択で、この方法において列挙される1以上の核酸配列は、3つの核酸配列：rep遺伝子及びcap遺伝子をコードする第1の核酸、導入遺伝子領域及びITR領域を含む第2の核酸、並びにAAV粒子の組立てのための任意のヘルパータンパク質をコードする第3の核酸に対応する。ある特定の実施形態において、AAV粒子を回収する工程の前に、細胞培養物中に含有される細胞の溶解工程が行われる。AAV粒子の製造方法は、当該技術分野で何度も説明されており、したがって当業者には公知である。

【0096】

好ましい実施形態において、ソルターゼ認識配列は、ソルターゼA認識配列であり、より好ましくは、X_n-LPXTG-X_m[配列番号10]配列である。

【0097】

好ましい態様において、AAVカプシドタンパク質は、VR-I領域、VR-IV領域、又はVR-VIII領域の1以上にソルターゼ認識配列を含む。

【0098】

任意選択で、AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させる前に、この方法は、組み立てられたAAV粒子を富化、精製、及び/又は単離する追加の工程をさらに含む。前述の実施形態の代わりに、及び/又はそれに加えて、AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させる前に、該方法は、組み立てられたAAV粒子の一部ではないAAVカプシドタンパク質を枯渇又は除去する工程をさらに含む。

【0099】

ある特定の実施形態において、本明細書で想定される方法の接合工程において、AAVカプシドタンパク質、ソルターゼ、及び異種性接合体分子は、1:1:1の比で提供される。代替的な実施形態において、過剰のソルターゼ及び異種性接合体分子は、1: 1: 1の分子比が維持されるように提供される。なおさらなる実施形態において、過剰の異種性接合体分子は、1:1: 1の比、好ましくは1:1: 5の比、より好ましくは1:1 10の比が維持されるように提供される。好ましい実施形態において、AAVカプシドタンパク質、ソルターゼ、及び異種性接合体分子は、約1:0.1:1の比で提供される。

【0100】

任意選択で、AAV粒子をソルターゼ及び異種性接合体分子と接触させた後、この方法は、少なくとも1つの接合AAVカプシドタンパク質を含む組み立てられた接合AAV粒子を富化、精製、及び/又は単離するさらなる工程を含む。さらなる実施形態において、該方法は、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、又はさらには100%の接合AAVカプシドタンパク質を含有する組み立てられた接合AAV粒子を富化、精製、及び/又は単離するさらなる工程を含む。

【0101】

任意選択で、AAVカプシドタンパク質は、複数の異なるソルターゼ認識配列を含み、そしてAAV粒子は、連続的な様式で、異なるソルターゼ及び接合分子と接触される。複数の異なるソルターゼ認識配列は、単一のAAVカプシドタンパク質中に提供されてもよく、あるいは、各々が異なるソルターゼ認識配列を(任意選択的に、AAVカプシドタンパク質中の異なる位置に)含むAAVカプシドタンパク質のコレクションを使用することによ

って提供されてもよい。好ましくは、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域又はVR-VIII領域の1以上にソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質が提供される。ある特定の実施形態において、天然に存在するAAVカプシドタンパク質と、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域、又はVR-VIII領域の1以上にソルターゼ認識配列を含むAAVカプシドタンパク質との組合せが提供される。

【0102】

そのようなAAVカプシドタンパク質に関して本明細書に記載される任意の実施形態は、そのような(単離された)AAVカプシドタンパク質に等しく適用可能であるが、核酸又は核酸ベクターによってコードされたAAVカプシドタンパク質、及び(組み立てられた)AAV粒子にもまたその逆にも適用可能であることは明らかである。

10

【0103】

上記の本明細書に記載される実施形態に加えて、本発明はさらに、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上において、ソルターゼ認識配列 $X_n-LPXTG-X_m$ [配列番号10](式中、 n 及び m は0~20の範囲であり、 X は任意の天然アミノ酸である)が挿入されていることを特徴とする、アデノ随伴ウイルス(AAV)VP1、VP2又はVP3カプシドタンパク質に関する。特定の実施形態では、アデノ随伴ウイルス(AAV)VP1、VP2又はVP3カプシドタンパク質は、VP1-VP2転移領域、VR-I領域、VR-IV領域及びVR-VIII領域の1以上にソルターゼ認識配列 $X_n-LPXTG-X_m$ [配列番号10](式中、 n 及び m は0~20の範囲であり、 X は任意の天然アミノ酸である)が挿入されていることを特徴とし、ここで、VP1-VP2転移領域は配列番号1[PVKTAP]により規定され、VR-I領域は配列番号2[SSQSGASN]により規定され、VR-IV領域は配列番号3[SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]により規定され、VR-VIII領域は配列番号4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]により規定される。特定の実施形態において、VR-IV領域中の挿入が配列番号5[TPSGTTTTQS]を有するフラグメント中にあり、及び/又は配列番号6[LQRGNRQAA]を有するフラグメント中にある。特定の実施形態では、ソルターゼ認識部位が挿入されている領域の1以上のアミノ酸が欠失している。

20

【0104】

上記実施形態のいずれかの特定の実施形態において、AAVは、AAV2又はAAV9である。上記実施形態のいずれかのさらなる特定の実施形態において、 n は、15~20の間、10~15、5~10の間、0~5の間であるか、又は10、9、8、7、6、5、4、3、2、若しくは1である。特に、 m は、15~20の間、10~15の間、5~10の間、0か5の間であるか、又は10、9、8、7、6、5、4、3、2若しくは1個のアミノ酸であることが想定される。上記実施形態のいずれかの特定の実施形態において、リンカー配列 X_n 又は X_m は、少なくとも80%のGly、Ser、Thr及びAlaを含む。好ましくは、リンカー配列 X_m 又は X_n は、Gly、Ser、Thr及びAlaから選択されるアミノ酸からなる。上記実施形態のいずれかの特定の実施形態において、LPXTG中の X は、Asp、Glu、Ans又はGln、典型的にはGlnである。上記実施形態のいずれかの特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-1領域に挿入され、K258位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K692位、K706位のリジンの1以上が変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-1領域に挿入され、K258位、K507位、K527位、K549位、及びK706位のリジンの1以上が変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-IV領域に挿入され、K258位、K309位、K313位、K321位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K649位、K665位、K688位、K692位、及びK706位のリジンの1以上が変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-IVに挿入され、K258位、K490位、K507位、K532位、K544位、K549位、K556位、及びK665位のリジンの1以上が変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-IVに挿入され、K549位のリジンが変異されてい

30

40

50

る。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-VIIIに挿入され、K309位、K490位、K507位、K527位、K532位、K544位、K549位、K556位、K620位、K640位、K688位、及びK706位のリジンの1以上が変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]は、VR-VIIIに挿入され、K490位、K507位、K527位、及びK532位の1以上のリジンが変異されている。さらなる特定の実施形態において、ソルターゼ認識配列LPXTG[配列番号10]がVR-VIIIに挿入され、K507位のリジンの1以上がGly又はAlaに変異されている。本明細書に記載される実施形態の好ましい実施形態において、当該1以上のリジンは、Gly、Ser又はAlaに変異されている。本発明はまた、本明細書の上記の実施形態のいずれか1つのカプシドタンパク質をコードする核酸を提供する。本発明はさらに、これらの核酸を含む発現ベクターを提供する。本発明は、本明細書の上記のAAVカプシドタンパク質を含むAAV粒子をさらに提供する。特定の実施形態では、修飾タンパク質に対する非修飾AAVタンパク質の比は、1/20、1/10又は1/5~5/1、10/1又は20/1である。特定の実施形態では、AAV粒子は、ソルターゼ認識部位を介して、接合体(例えば、小分子、炭水化物、ポリペプチド)に融合されている。さらなる特定の実施形態において、AAV粒子は、ソルターゼ認識部位を介して、ターゲッティング部分(例えば、細胞レセプターのリガンド、又は細胞表面タンパク質に結合するタンパク質)に融合されている。さらなる特定の実施形態において、細胞表面タンパク質に結合するタンパク質は、抗体又はナノボディ、例えば、HER2に結合する抗体又はナノボディである。本発明はさらに、本明細書に記載されるAAV粒子の使用、例えば、医薬として使用するための本明細書に記載されるAAV粒子を提供する。

10

20

【0105】

本発明をその特定の実施形態と併せて説明してきたが、前述の説明に照らして、多くの代替例、改変例、及び変形例が当業者には明白であることは明らかである。それゆえ、添付の特許請求の範囲の趣旨及び広い範囲において、以下の通りこのような代替例、改変例、及び変形例を全て包含することが意図される。本発明の本明細書に開示される態様、記述、及び実施形態は、以下の非限定的な実施例によってさらに支持される。

【実施例】

【0106】

実施例1：一般的な設計情報、考慮事項、及び探索結果

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、小型、非病原性、無エンベロープのssDNAウイルスである。そのゲノム(4.7kb)は、2つの主要なオープンリーディングフレームからなる。rep遺伝子は、4つの複製タンパク質をコードする；cap遺伝子は、AAVカプシドの3つの構造タンパク質(VP1、VP2及びVP3)をコードし、これらは、選択的スプライシング及び代替開始コドンを通じて形成される。1:1:10の比で、それらは60-サブユニットカプシドコート形成する。rep及びcap遺伝子に隣接しているのは、逆方向の末端反復(ITR)であり、これは、ウイルスDNA複製及びパッケージングに必要とされる唯一の遺伝的要素である。結果として、ウイルスrep及びcap遺伝子は、産生プロセスの間にトランスで提供することができ、そして~4.5kbの目的の導入遺伝子を、ITRの間に挿入することができ、組換えAAV(rAAV)ウイルスベクターが得られる(図1A)。

30

40

【0107】

ソルターゼ反応は、一般に、当該分野を通して多数の例において記載されており、したがって、当業者に公知である。ソルターゼA反応の一般的な概要を図1Bに示す。これは、均質且つ予測可能な薬物対抗体比を有する効率的且つ制御された抗体-薬物カップリングをもたらす。この技術は、これまで、AAVベクターへのターゲッティング部分の酵素的カップリングには使用されていない。

【0108】

AAVベクターをターゲッティングする能力は、リガンドのターゲッティング能力に依存する。ナノボディは、これに適した好ましい部分である。それらは、小さくコンパクトな構造を、高い特異性、高い安定性及び低い免疫原性プロファイルと組み合わせ、ソルタ

50

ーゼA技術は、薬物又は他のナノボディへのナノボディ接合のために広く使用されている。さらに、ナノボディは、実質的に任意の細胞レセプターに対して設計できる。本発明を、乳癌放射性核種療法において使用される抗HER 2(ヒト上皮増殖因子レセプター2)ナノボディ2Rs15dを用いて説明する。

【0109】

ソルターゼA LPXTG認識モチーフ[配列番号10]は、ターゲットタンパク質の露出ループの一部として機能することができる。以前の文献は、AAVカプシドの可変領域(VR)-I V及びVR-VIIIへの34アミノ酸までのペプチド挿入が十分に許容されることを示している。VR-IV及びVR-VIIIにおけるLPXTG認識モチーフ[配列番号10]の配置を(図2A及び2B)に示す。ソルターゼA酵素上のLPXTG [配列番号10]結合クレフトはかなり深い結合ポケットなので、LPXTG [配列番号10]フランキングリンカーの長さや配列が考慮される。

10

【0110】

AAV2の天然の親和性を弱めるために、ヘパラン硫酸プロテオグリカンレセプターに結合する能力が変異(R585A及びR588A)によって破壊されているAAV2-HB0を、本発明の実施例において使用する。しかし、この特定のAAV2突然変異体の変異は、本発明の状況について限定的ではなく、そして本明細書に記載される知見は、一般的な他のAAV血清型及び他のAAV2変異に容易に適用可能であることが明らかである。

【0111】

ソルターゼA媒介カップリング反応は、Ab認識(例えば、HA又はFLAG)及びアフィニティータグ(例えば、His)タグ化ナノボディタンパク質を用いて実施する。組換え2Rs15dナノボディを本実施例では使用する。

20

【0112】

異なる構築物を実験で試験して、ソルターゼAを用いてリガンド結合を評価する。任意選択的なリンカーを有するLPQTGモチーフ[配列番号43]を、表1に示すように挿入した。

【0113】

【表1】

表1 試験された挿入部位に関する配列情報

カプシド / 領域 / アミノ酸	隣接する配列 (5AA) (小文字) 及び 挿入した配列 (大文字)
VP1 / VR-IV / 453-454	ntpsg- LPQTG - tttqs [配列番号 36]
VP1/ VR-VIII/ 587-588	lqrgn - GGSGS LPQTG GGSGS - rqaat [配列番号 37]
VP1/ VR-VIII/ 587-588	lqrgn - GGSGS GGSGS LPQTG GGSGS GGSGS - rqaat [配列番号 38]

30

【0114】

ナノボディを、ナノボディ産生のために、典型的には、Gly₅タグでN-末端にタグ化し、3xFLAG-His₆でC-末端に融合する。非接合及び望ましくない生成物を、ダイアフィльтраーションを用いて除去する。

【0115】

AAV2はLPQTG[配列番号43]を異なるリンカー長でループIV及びVIIIに挿入することを許容する。LPQTGモチーフ[配列番号43]を、AAV2-HB0 VR-IV(AA453と454の間)VR-VIII (AA587と588の間)に、リンカーなしで、又はモチーフのいずれかの側に1若しくは2個のGGSGS[配列番号47]リピートに隣接させて挿入した。次に、Gly₅-ナノボディを、ソルターゼAを用いて接合体化した。ウェスタンブロットを行い、抗VP抗

40

50

体(VP1、2及び3を検出)及び抗FLAG抗体(ナノボディを検出)を用いて画像化した。ソルターゼA反応は、接合中にVP一次構造を切断するので、17~18kDaのバンドが予想され、VIII-1及びVIII-2に見られる(図3)。

【0116】

実施例2: AAV2_VR-I 0-2L

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号13、配列番号14、配列番号15)[265位に位置するLPQTGタグを有し、0、1又は2つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも100倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。混合物を25で16時間インキュベートした。次いで、反応させた試料を、ソルターゼA又はナノボディを含まないソルターゼ反応緩衝液中の等量のベクターと共に、SDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にブロットした。ブロッキング後、膜を1:1000ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

10

【0117】

並行して、等量の未反応ナノボディを別のSDS-PAGEゲルにロードし、これをPVDF膜にブロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

20

【0118】

結果及び考察

ナノボディ接合試料を用いた抗VP1/2/3染色ブロット(図4)では、55kDa参照バンドのすぐ上にかすかなバンドが見られ(矢印)、リンカー長が0から1、2つのGGSGS[配列番号47]要素に増加するにつれて強度が増加する。この見かけの分子量は、53kDaのC-末端VPフラグメントを生じるソルターゼA媒介性骨格切断と整合する。

【0119】

同様に、35kDaマーカーのすぐ上にかすかなバンドが見られ、これはナノボディ接合VP1又はVP2フラグメントを指している可能性がある。しかし、100倍過剰のナノボディ及びナノボディ調製物中の未知の40kDa種は、よりかすかなバンドの同定を困難にする。

30

【0120】

結論として、LPQTGタグ[配列番号43]をVR-Iに挿入することができ、接合はあまり効率的ではない。接合効率は、リンカー長の増加と共に増加するが、一般に、この挿入部位ではあまり効率的ではない。

【0121】

実施例3: AAV2_VR-IV 0-5L

40

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号16~配列番号20)[453位に位置するLPQTGタグを有し、0、1、3、4又は5つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。ソルターゼAもナノボディも含まないが、同一の反応混合物も作製した。反応混合物を25で16時間インキュベートした。次いで、試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にブロットした。ブロッキング後、膜を1:1000ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4で16

50

時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0122】

並行して、反応混合物を別のSDS-PAGEゲルにロードし、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0123】

結果及び考察

ナノボディ接合試料を用いた抗VP1/2/3染色プロットでは、37~39kDaの明瞭なバンドがはっきりと見られる(図5)。強度は、0から1~3つのリンカー反復まで増加し、リンカー長が4及び5つのリンカー反復まで増加するにつれて安定化するようである。この見かけの分子量は、ほとんどのフラグメントが予想される分子量よりもわずかに高く移動することを考慮すると、32~35kDaのC-末端VPフラグメントを生じるソルターゼA媒介性骨格切断と整合する。

10

【0124】

同様に、55kDaマーカーの周りにバンドが見られ、これはナノボディ接合N-末端VPフラグメントを示す。このバンドは、リンカーフラグメントの非存在下では見られず、1つのリンカー反復が見られる場合にはほとんど目に見えないが、3、4、又は5つのリンカー反復では明らかに見られ、3、4、又は5つの反復の間で強度の明らかな差はない。

20

【0125】

結論として、LPQTGタグ[配列番号43]は、良好な接合効率でAAV2中のVR-IVに挿入できる。接合効率は、リンカー長の増加と共に増加し、LPQTGタグの各側の3つのGGSGSリンカー反復でプラトーになるようである。

【0126】

実施例4: AAV2_VR-VIII 0-5L

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号21~配列番号26)[587位に位置するLPQTGタグを有し、0、1、2、3、4又は5つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0]を、1xソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に、ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。ソルターゼAもナノボディも含まないが、同一の反応混合物も作製した。反応混合物を25で16時間インキュベートした。次いで、試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:1000ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

30

【0127】

並行して、反応混合物を、同一量のナノボディのみを含有する試料と共に、別のSDS-PAGEゲルにロードした。これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

40

【0128】

結果及び考察

ナノボディ接合試料を用いた抗VP1/2/3染色プロットでは、17~20kDaの明瞭なバンドがはっきりと見られる(図6)。強度は、0から1~3~4つのリンカー反復まで増加し(2つのリンカー反復は強度がより低い)、5つのリンカー反復で再びより低いようである。この見かけの分子量は、17~20kDaのC-末端VPフラグメントを生じるソルターゼA媒

50

介性骨格切断と整合する。

【0129】

同様に、70kDaマーカーの周りにバンドが見られ、これは未反応のVP1/2/3バンドの場合のようにわずかに高く移動するが、ナノボディ接合N-末端VPフラグメントを示す。このバンドは、リンカーフラグメントの非存在下では見られず、1~2~3~4つのリンカー反復から増加し、そして5つのリンカー反復について再びわずかに低い。

【0130】

結論として、LPQTGタグ[配列番号43]は、中程度の接合効率でAAV2中のVR-VIIIに挿入できる。接合効率は、リンカー長の増加と共に増加し、LPQTGタグ[配列番号43]の各側の4つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復でピークに達するようである。

10

【0131】

実施例5：AAV9_VR-IV 0-3L

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号27~配列番号30)[455位に位置するLPQTGタグを有し、0、1、2又は3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。混合物を25℃で16時間インキュベートした。次いで、反応させた試料を、ソルターゼA又はナノボディを含まないソルターゼ反応緩衝液中の等量のベクターと共に、SDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:1000マウス抗VP1/2/3(Progen#65158)と共に4℃で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

20

【0132】

並行して、等量の未反応AAVと等量の未反応ナノボディとを別のSDS-PAGEゲルにロードし、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4℃で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

30

【0133】

結果及び考察

ナノボディ接合試料を用いた抗VP1/2/3染色プロットでは、37kDaの明瞭なバンドがはっきりと見られる(図7)。強度は0から1つのリンカー反復まで増加し、1、2及び3つのリンカー反復は同様の強度を有する。この見かけの分子量は、ほとんどのフラグメントが予想される分子量よりもわずかに高く移動することを考慮すると、33kDaのC-末端VPフラグメントを生じるソルターゼA媒介性骨格切断と整合する。

【0134】

抗FLAGゲルでは、45kDaにバンドが見られ、これはナノボディ接合N-末端VPフラグメントを示す。このバンドは、リンカーフラグメントの非存在下では見られないが、1~2~3つのリンカー反復で強度が増加する。

40

【0135】

結論として、LPQTGタグ[配列番号43]は、良好な接合効率でAAV9中のVR-IVに挿入できる。接合効率は、リンカー長の増加と共に増加し、LPQTGタグ[配列番号43]の各側の3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復でその最高値に達し、より長いリンカー長はこの構築物で試験されていない。

【0136】

実施例6：AAV9_VR-VIII 0-1-3L

材料及び方法

50

LPQGTG含有AAVベクター(配列番号31、配列番号32、配列番号33)[589位に位置するLPQGTGタグを有し、0、1、又は3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。混合物を25℃で16時間インキュベートした。次いで、反応させた試料を、ソルターゼAを含まない試料と共に、SDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:1000マウス抗VP1/2/3(Progen#65158)と共に4℃で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

10

【0137】

並行して、反応混合物を、ソルターゼAを含まない試料と共に、別のSDS-PAGEゲルにロードして泳動させ、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4℃で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0138】

結果及び考察

ナノボディ接合試料を用いた抗VP1/2/3染色プロットでは、17kDaのかすかなバンドが見られる(図8)。バンドは、1つのリンカー反復では識別不可能であるが、強度は、1~3つのリンカー反復で増加する。この見かけの分子量は、17kDaのC-末端VPフラグメントを生じるソルターゼA媒介性骨格切断と整合する。

20

【0139】

抗FLAGゲルでは、70kDaにバンドが見られ、これはナノボディ接合N-末端VPフラグメントを示す。このバンドは、リンカーフラグメントの非存在下では非常にかすかであるが、1~3個のリンカー反復で強度が増加する。

【0140】

結論として、LPQGTG[配列番号43]タグは、AAV9中のVR-VIIIに挿入できるが、接合は非効率的である。接合効率は、リンカー長の増加と共に増加し、LPQGTGタグ[配列番号43]の各側の3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復でその最高値に達し、より長いリンカー長はこの構築物で試験されていない。

30

【0141】

実施例7: AV2_VR-I 2L、AAV2_VR-IV 3L、AAV2_VR-VIII 3L、AAV9_VR-IV 3L、and AAV2_VR-VIII 3L

材料及び方法

LPQGTG含有AAVベクター(配列番号15、配列番号18、配列番号24、配列番号30、配列番号33)[265位に位置するLPQGTGタグを有し、両側に2つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0、453位に位置するLPQGTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0、587位に位置するLPQGTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0、455位に位置するLPQGTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV9-A、及び589位に位置するLPQGTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中で、ソルターゼA及び抗HER2ナノボディ(配列番号12)と共にインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。混合物を25℃で16時間インキュベートした。次いで、反応させた試料を、ソルターゼA又はナノボディを含まないソルターゼ反応緩衝液中の等量のベクターと共に、SDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:1000ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4℃

40

50

で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0142】

並行して、反応混合物を別のSDS-PAGEゲルにロードし、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0143】

結果及び考察

抗VP1/2/3染色プロットでは、ソルターゼAにより生成されたC-末端VPフラグメントに関連するいくつかのバンドが見られる(図9)。AAV2_VR-Iについては、~58kDaのバンドはかなり弱く、非効率的なカップリングを示している。AAV2_VR-IV及びAAV9_VR-IVについては、~38kDaのバンドがはっきりと見られ、効率的なカップリングを示している。AAV2_VR-VIII及びAAV9_VR-VIIIについて、~18kDaのバンドは、AAV2_VR-Iよりも高い強度で見られるが、AAV2_VR-IV及びAAV9_VR-IVよりも低い強度で見られ、中間のカップリングを示す。

【0144】

同知見はFLAG染色プロットに反映されている。接合AAV2_VR-I及びAAV9_VR-VIIIに対応するバンドは、ナノボディからのバックグラウンドによって完全に不明瞭である。接合AAV2_VR-VIIIに対応するバンドは、非常にかすかに見られる。AAV2_VR-IV及びAAV9_VR-IVに対応するバンドがはっきりと見られる。

【0145】

結論として、VR-IVへの挿入は、最も高いカップリング効率を示す。VR-VIIIへの挿入は、より低い効率ではあるが機能するようであり、VR-Iへの挿入は、非常に低い相対効率ではあるが可能である。

【0146】

実施例8：GGG-ビオチン

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号22(587_1L_pdAAVe_008))[587位に位置するLPQTGタグを有し、1つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中のソルターゼA及びビオチンタグ化抗GGGペプチド(GGG-[K(ビオチン)]-アミド、Cambridge Research Biochemicals、crb1000649h)と共にインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも100倍高かったが、GGG-ビオチンペプチドは、AAVウイルスタンパク質と比較して250倍高いモル濃度で存在した(試料(1))。コントロール試料は、(2)「AAVなし」、(3)ソルターゼAなし、(4)GGG-ビオチンペプチドなし、(5)GGG-ビオチンペプチドのみ、(6)BSAを含むGGG-ビオチンペプチド、及び(7)BSAのみを含んだ。コントロール反応では、すべての成分は反応(1)と同じ濃度であり、試料(6)及び(7)中のBSAの質量は、試料(1)中のウイルスタンパク質の質量と同一であった。反応混合物を25で16時間インキュベートした。

【0147】

次いで、反応試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:10000ストレプトアビジン-HRP(ThermoScientific、21130)と共にインキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0148】

ゲル上のVPの分子量についての参照として、抗VP1/2/3抗体を用いてプロットし、画像化したAAVのみの試料を、異なるプロットから含めた。

【0149】

結果及び考察

ストレプトアビジン-HRPプロットでは、VP1、2及び3のソルターゼA媒介ビオチン標

識を試料(1)において観察することができ、すべての陰性コントロールは接合の徴候を示さなかった(図10)。分子量は、非接合VPよりも低く、これは、17kDaのC-末端フラグメントが除去されていることから予想される。

【0150】

実施例9：HER2対GFP

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号24、配列番号30)[453位に位置するLPQTGタグを有し、3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0、589位に位置するLPQTGタグを有し、3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中でソルターゼA及び抗HER2ナノボディ(配列番号12)、抗GFPナノボディ(配列番号11)と共に、又はナノボディなしで、抗GFPナノボディ(配列番号11)と共にインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。混合物を25℃で16時間インキュベートした。次いで、反応試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:1000ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4℃で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

10

【0151】

並行して、反応混合物を別のSDS-PAGEゲルにロードし、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4℃で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

20

【0152】

結果及び考察

以前の実験で観察されたように、587位にLPQTG[配列番号43]挿入を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復が各側に隣接する、AAV2のソルターゼA媒介性ナノボディ接合は見えるが、非効率的である(図11)。455位にLPQTG[配列番号43]挿入を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復が各側に隣接する、AAV9のソルターゼA媒介性ナノボディ接合は、良好な接合効率で見られる。

30

【0153】

この実験から最も重要なことには、抗HER2ナノボディと抗GFPナノボディとの間に接合効率の差はないようである。

【0154】

実施例10：AAV2_VR-VIII及びAAV9_VR-IV中のLPQTG対LPETG

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号24、配列番号34、配列番号30、配列番号35)[587位に位置するLPQTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0、587位に位置するLPETGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0、455位に位置するLPQTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV9-A、及び455位に位置するLPETGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中で、ソルターゼA及び抗HER2ナノボディ(配列番号12)と共にインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも5倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して50倍高いモル濃度で存在した。混合物を25℃で20時間インキュベートした。次いで、反応試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させ、PVDF膜にプロットした。ブロッキング後、膜を1:500ウサギ抗VP1/2/3(Progen#61084)と共に4℃で16時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗ウサギ抗体(Dako P0448)と共に室温で1時間

40

50

インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0155】

並行して、反応混合物を、別のSDS-PAGEゲルにロードして泳動させ、これをPVDF膜にプロットし、1:1000マウス抗FLAG抗体(Novus Bio NBP1-97410)で4で16時間染色した。洗浄後、ゲルを1:10000のHRP-接合ヤギ抗マウス抗体(Dako P0447)と共に室温で1時間インキュベートし、化学発光を用いて発色させた。

【0156】

結果及び考察

以前の実験で観察されたように、587位にLPQTGの挿入を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復が各側に隣接する、AAV2のソルターゼA媒介性ナノボディ接合は見えるが、非効率的である(図12)。455位にLPQTG[配列番号43]挿入を有し、3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復が各側に隣接する、AAV9のソルターゼA媒介性ナノボディ接合は、良好な接合効率で見られる。

10

【0157】

抗VP1/2/3及び抗FLAGプロットの両方から、LPETG[配列番号44]は、少なくとも、455位にLPXTG[配列番号10]が挿入され、各側に3つのGGSGS[配列番号47]リンカー反復が隣接するAAV9への抗HER2ナノボディ接合について、LPQTG[配列番号43]と比較して接合効率がわずかに高いようである。

【0158】

実施例11: インビトロターゲットティング

20

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号24)[587位に位置するLPQTGタグを有し、両側に3つのGGSGSリンカーが隣接するAAV2-HB0]を、ソルターゼA及び抗HER2ナノボディ(配列番号12)(「接合抗HER2 Nb」)、ソルターゼA及び抗GFPナノボディ(配列番号11)(「接合抗GFP Nb」)、ソルターゼAを含まない抗HER2ナノボディ(配列番号12)(「Nbありの非接合」)、並びにナノボディもソルターゼAも含まないもの(「Nbなしの非接合」)と共に、1xソルターゼ反応緩衝液(300mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5)中でインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。反応物を25で20時間インキュベートした後、Micro Float-A-Lyzer 100 kDa MWCO(Repligen、F235049)を用いてPBSに対して透析し、ソルターゼA酵素及び未反応のナノボディを除去した。最後に、ウイルスゲノム力価を、ddPCRを使用して決定した。

30

【0159】

MCF-10A(HER2陰性)及びBT-474(HER2陽性)細胞を、10%FBSとRPMI1640(Gibco)とを補充したMEBM(Lonza)培地及びGlutamaxと10%FBSとを補充したMEBM(Lonza)中でそれぞれ培養した。細胞を、90µlの培地中50,000細胞で播種し、30µl中1E5vg/細胞のMOIでベクターと混合した。この混合物を96ウェルプレートに播種し、3時間後、80µlの培地を添加した。72時間後、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、遠心沈殿させ、1:10000 PerCP-Cy5.5接合抗HER2抗体(BioLegend 324416)を含む400µlのPBSに再懸濁した。室温で30分間インキュベートした後、Attuneフローサイトメーターを用いて細胞懸濁液を分析した。

40

【0160】

結果及び考察

ナノボディの有無にかかわらず、また接合にかかわらず、LPQTG含有AAVベクター(配列番号24)は、MCF-10A HER2陰性細胞を形質導入しない(図13A、13B、及び13C)。これは、非修飾AAV2が1E5のMOIでMCF-10A細胞を効率的に(86%)形質導入するので、HB0変異の結果である可能性が最も高い(データは示さず)。

【0161】

BT-474 HER2陽性細胞に関して、形質導入効率は、非接合又は抗GFPナノボディ接

50

合ベクターと比較して、抗HER2ナノボディと接合したAAVベクターで劇的に高い。

【0162】

これらの結果は、本発明者らのベクターとターゲティングナノボディとの接合が、形質導入効率及び特異性の増加をもたらすことを明確に示す(図13A、13B、及び13C)。

【0163】

実施例12：形質導入効率の比較

材料及び方法

LPQTG含有AAVベクター(配列番号24及び配列番号30)[587位に位置するLPQTGタグを有し、3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV2-HB0、及び455位に位置するLPQTGタグを有し、3つのGGSGSリンカーが両側に隣接するAAV9-A]を、1×ソルターゼA及び抗HER2ナノボディ(配列番号12)(「接合抗HER2 Nb」と共に、並びにソルターゼAを含まない抗HER2ナノボディ(配列番号12)(「Nbと非接合」と共にインキュベートした。ソルターゼAのモル濃度は、混合物中のAAVウイルスタンパク質のモル濃度よりも10倍高かったが、ナノボディは、AAVウイルスタンパク質と比較して100倍高いモル濃度で存在した。反応物を25℃で20時間インキュベートした後、Micro Float-A-Lyzer 100 kDa MWCO(Repligen、F235049)を用いてPBSに対して透析し、ソルターゼA酵素及び未反応のナノボディを除去した。最後に、ウイルスゲノムカバレッジを、ddPCRを使用して決定した。

【0164】

BT-474(HER2陽性)細胞を、10%FBSとRPMI1640(Gibco)とを補充したMEBM(Lonza)培地及びGlutamaxと10%FBSとを補充したMEBM(Lonza)中でそれぞれ培養した。細胞を、90µlの培地中50,000細胞で播種し、30µl中1E5vg/細胞のMOIでベクターと混合するか、又は未反応ナノボディのみの同等の希釈物と混合した。この混合物を96ウェルプレートに播種し、3時間後、80µlの培地を添加した。72時間後、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理し、遠心沈殿させ、1:10000 PerCP-Cy5.5接合抗HER2抗体(BioLegend 324416)を含む400µlのPBSに再懸濁した。室温で30分間インキュベートした後、Attuneフローサイトメーターを用いて細胞懸濁液を分析した。

【0165】

結果及び考察

形質導入効率は、非接合ベクターと比較して、抗HER2ナノボディと接合されたAAVベクターについて92倍(AAV2_VR-VIII3L、配列番号24)及び8倍(AAV9_VR-IV3L、配列番号30)高い(図14)。

【0166】

これらの結果は、本発明者らのベクターとターゲティングナノボディとの接合が、形質導入効率の増加をもたらすことを明確に示す。

【0167】

興味深いことに、この効果は、AAV9_VR-IV3L(~12%)と比較して接合効率(約2%)が低いAAV2_VR-VIII3Lについて10倍を超えて顕著である。これは、挿入位置又は用いた基本血清型に起因している可能性がある。

【0168】

実施例13：異なる構築物の生産収率の比較

材料及び方法

HEK293細胞を、10%FBSを含むDMEM中、10cmペトリ皿あたり3.6E+06生存細胞で播種し、そしてPEIproを用いて、製造業者の推奨に従って、導入遺伝子プラスミド(ITR隣接CAG-GFPをコードする)、アデノウイルスヘルパー遺伝子をコードするプラスミド、及びrep/capをコードするプラスミドでトランスフェクトした。AAV2、AAV9、AAV2-VR-VIII-LPQTG-3L[配列番号24]及びAAV9-VR-IV-LPQTG-3L[配列番号30]の各々を、デュプロでトランスフェクトした。トランスフェクトしたプレートを37℃及び5%CO2で保存し、培地を、トランスフェクションの24時間後に5%FBSを含むDMEM

10

20

30

40

50

と交換した。トランスフェクションの72時間後、上清を回収した。トリプシンを用いて細胞を除去し、別のファルコンチューブに保存した。両方のチューブを1000gで5分間回転させた。培地の上清を新しいチューブに移し、細胞画分の上清を廃棄した。

【0169】

次に、3回の凍結/解凍サイクルを用いて細胞ペレットを溶解し、37℃で1時間DNaseで処理し、最後に遠心分離を用いて不溶性デブリを取り除いた。ddPCRを用いて、ウイルスゲノム(「Vg」)力価を、上清及び細胞画分から決定した。ELISAを用いて、ウイルス粒子(「Vp」)力価を、上清及び細胞画分から決定した。

【0170】

結果及び考察

生産収率及びパーセンテージフル(percentage full)に関していくらかの変動性があるが、突然変異体ベクターの接着生産は、祖先(AAV2及びAAV9)血清型の接着生産と同様である(図15A及び15B)。言い換えると、各側に15アミノ酸が隣接しているLPQTG部位の挿入は、生産収率の有意な減少をもたらさない。

【0171】

本願中で参照する配列

AAV2野生型Cap

VP2開始 T138

VP3開始 M203

【0172】

【表2】

VP1-VP2 transition P135-G141

PVKTAP [SEQ ID NO: 1]

VR-I S261-N268

SSQSGASN [SEQ ID NO: 2]

VR-IV S446-S474

SRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQS [SEQ ID NO: 3]

T PSGTTTQS [SEQ ID NO: 5]

VR-VIII Q575-V600

QYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV [SEQ ID NO: 4]

LQRGNRQA A [SEQ ID NO: 6]

【0173】

10

20

30

40

50

【表 3】

VP1 [SEQ ID NO: 7]

1 MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKCLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY
51 KYLGFNGLD KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNFY LKYNHADAEF
101 QERLKEDTSF GGNLGRAVFO AKKRVLEPLG LVVEE**PVKTAP** GKKRPVEHSP
151 VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT
201 NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDENRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
351 PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
401 QMLRTGNNTF FSYTFEDVFP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
501 SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQSEKT
551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV

A A

601 LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
701 TSNYNKSVNV DFTVDINGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

10

VP2 [SEQ ID NO: 8]

138 TAP GKKRPVEHSP
151 VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT
201 NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDENRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
351 PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
401 QMLRTGNNTF FSYTFEDVFP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
501 SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQSEKT
551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV

A A

601 LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
701 TSNYNKSVNV DFTVDINGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

20

30

【 0 1 7 4 】

40

50

【表 4】

VP3 [SEQ ID NO: 9]

203 MATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
 251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDENRFHCH FSPRDWQRLI
 301 NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
 351 PYVLGSAHQG CLPPFPADVF MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
 401 QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
 451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
 501 SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQGSEKT
 551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV
 A A
 601 LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
 651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
 701 TSNYNKSVMV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

10

【0175】

HB⁰バリエーションを参照する変異R585A及びR588A

認識モチーフ：

X_n-LPXTG-X_m

LPXTG [配列番号10]

Xは任意の天然AAであるか、又はXはDEQNであるか、若しくはXはQである。

n = 0-20

m = 0-20

【0176】

VR-Iループの近傍30オングストローム以内の表面露出リジン：

K258 K321 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620 K640 K649
K665 K692 K706

ループVR-Iの近傍15オングストローム以内の表面露出リジン：

K258 K507 K527 K549 K706

【0177】

VR-IVループの近傍30オングストローム以内の表面露出リジン：

K258 K309 K313 K321 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620
K640 K649 K665 K688 K692 K706

VR-IVループの近傍15オングストローム以内の表面露出リジン：

K258 K490 K507 K532 K544 K549 K556 K665

VR-IVループの近傍5オングストローム以内の表面露出リジン：

K549

【0178】

VR-VIIIループの近傍30オングストローム以内の表面露出リジン：

K309 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620 K640 K688 K706

VR-VIIIループの近傍15オングストローム以内の表面露出リジン：

K490 K507 K527 K532

VR-VIIIループの近傍5オングストローム以内の表面露出リジン：

K507

【0179】

20

30

40

50

【表 5】

GFP nanobody:

GGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAG
MSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCQVTVSSAAADY
KDHGDYKDHDIKDDDDKGAHHHHHH [SEQ ID NO: 11]

HER2 nanobody:

GGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVSQAGGSLKLTCAASGYIFNSCGMGWYRQSPGRERELVSR
ISGDGDTWHKESVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNLSLKPEDTAVYFCVAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAADY
KDHGDYKDHDIKDDDDKGAHHHHHH [SEQ ID NO: 12]

10

AAV2-VR-I-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERHKDDSRGLVLPQYKYLGFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNMTATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGLPQTGASNDNHYFGY
STPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTF
EDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQ
QRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNDRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIE
KVMITDEEEIIRTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWN
PEIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 13]

20

【 0 1 8 0 】

30

40

50

【表 6】

AAV2-VR-I-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERHKDDSRGLVLPQYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKRRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGSGSGSLPQTGGSGSG
ASNDNHYFGYSTPWGYPDFNRFHCHFSRQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANN
LTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT
GNNFTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQFSQAGASDIRDQSR
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNDRSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQ
GSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQG
PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENSKRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 14]

10

AAV2-VR-I-2L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERHKDDSRGLVLPQYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKRRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGSGSGSGSLPQTG
GSGSGSGSGASNDNHYFGYSTPWGYPDFNRFHCHFSRQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQ
NDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNDRSLVNPGPAMASHKDDEEKFFP
QSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMV
WQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAFITQYST
GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID
NO: 15]

20

AAV2-VR-IV-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERHKDDSRGLVLPQYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKRRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YDFNRFHCHFSRQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFP
HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTNTPSGLPQTGTTTQSRQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQ
QRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNDRSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIE
KVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIPHTD
GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
PEIQYTSNYSKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 16]

30

【 0 1 8 1 】

40

50

【表 7】

AAV2-VR-IV-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPFPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKAKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPFVHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YFDNRFHCHFSRQWRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSMLRTGNNTFSYTFEDVFP
HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLRSRTNTPSGGGGSGGGGSLPQTGGGGGTTTQSRQLQFSQAGASDI
RDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGFAMASHKDDEEKFFPQSGVL
IFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNFPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRD
VYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAFITQYSTGQVSV
EIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 17]

10

AAV2-VR-IV-3L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPFPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKAKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPFVHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YFDNRFHCHFSRQWRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSMLRTGNNTFSYTFEDVFP
HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLRSRTNTPSGGSGSGGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGGTT
TQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGFAMAS
HKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNFPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADV
NTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAK
FAFITQYSTGQVSVIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
[SEQ ID NO: 18]

20

AAV2-VR-IV-4L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPFPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAKAKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPFVHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YFDNRFHCHFSRQWRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSMLRTGNNTFSYTFEDVFP
HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLRSRTNTPSGGSGSGGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGGS
GSGSGSGGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDS
LVNPGFAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNFPVATEQYGSVSTNLQA
GNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPA
NPSTTFSAAKFAFITQYSTGQVSVIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRP
IGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 19]

30

【 0 1 8 2 】

40

50

【表 8】

AAV2-VR-IV-5L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQLRTGNNTFTSYTFEDVVF
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGGSGSGGSGSGGSGSGGSGGSLPQTGGGGSGS
SGSGSGSGGSGSGSGGSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRITNPVATEQ
YGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPQP
ILLKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTV
TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 20]

10

AAV2-VR-VIII-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQLRTGNNTFTSYTFEDVVF
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSK
TSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMIT
DEEEIRITNPVATEQYGSVSTNLQAGNLPQTGAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVLQGPWAKIPHTD
GHFHPSPMLGGFGLKHPPPPQILLKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWN
PEIQYTSNYSKSVNVDFTVTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 21]

20

AAV2-VR-VIII-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
GKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWG
YDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQLRTGNNTFTSYTFEDVVF
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSK
TSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMIT
DEEEIRITNPVATEQYGSVSTNLQAGNGGSLPQTGGGGSAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVLQGP
PIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPPQILLKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEWE
LQKENSKRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTVTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 22]

30

【 0 1 8 3 】

40

50

【表 1 1】

AAV9-VR-IV-2L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQGTGDESVDPDQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAP
VADNNEGADGVGSSGNWHCDSQWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSIVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSKTINGSGGSGGGSGGLPQTGGSGGSGGSGGQQTLKFSV
AGPSAMAVQGRNYPGFSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFF
PLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGM
VWQDRDVYLLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPIILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYS
TGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID
NO: 29]

10

AAV9-VR-IV-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQGTGDESVDPDQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAP
VADNNEGADGVGSSGNWHCDSQWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSIVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSKTINGSGGSGGGSGGGGGLPQTGGGGSGGSGGSGGSGG
QNGQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYPGFSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMA
SHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGW
VQNGQILPGMVWQDRDVYLLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPIILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
L [SEQ ID NO: 30]

20

AAV9-VR-VIII-0L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQGTGDESVDPDQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAP
VADNNEGADGVGSSGNWHCDSQWLGDVRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSIVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYPGFSYRQQRVS
TTVTQNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVM
ITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQALPQTGQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLLQGPWAKIPHT
DGNFHPSPLMGGFGMKHPPPIILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKR
WNPEIQYTSNYKSNVFEAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 31]

30

【 0 1 8 6 】

40

50

【表 1 2】

AAV9-VR-VIII-1L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPFVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDPQP IGEPPAAPSGVGSGLTMASSGGGAP
VADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYFDNRFHCHFSRPRDQWRLINNNWGRFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSKTINGSGGNQQTILKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVS
TTVTQNNSEFAWPAGSSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVM I
TNEEEIKTNPVATESYQVATNHQSAQAAGSGSLPQTGGSGSGQAQTGWVQNGGILPGMVWQDRD VYLQ
GP IWAKIPHTDGNFHP SPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEW
ELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSNVFAVNTG VYSEPRPIGTRYLTRNL [SEQ ID NO: 32]

10

AAV9-VR-VIII-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPFVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDPQP IGEPPAAPSGVGSGLTMASSGGGAP
VADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYFDNRFHCHFSRPRDQWRLINNNWGRFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSKTINGSGGNQQTILKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVS
TTVTQNNSEFAWPAGSSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVM I
TNEEEIKTNPVATESYQVATNHQSAQAAGSGSGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGQAQTGW
VQNGGILPGMVWQDRD VYLQGP IWAKIPHTDGNFHP SPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSNVFAVNTG VYSEPRPIGTRYLTRN
L [SEQ ID NO: 33]

20

AAV2-VR-VIII-LPETG-3L:

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIQWVKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADA
AALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRVLLEPLGLVEEVPKTAP
GKKRPFVEHSPVEPDSSSGTGKAGQPAKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAP
MADNNEGADGVGNSSGNWHCDSWTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFGYSTPWG
YFDNRFHCHFSRPRDQWRLINNNWGRFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQL
PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFTFSYTFEDVFP
HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSK
TSADNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDEEKFPQSGVLIFGKQGEKTNVDIEKVMIT
DEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNGSGSGSGGGGSLPETGGGGSGSGSGSGGAQAATADV
NTQGVLPGMVWQDRD VYLQGP IWAKIPHTDGHFHP SPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAK
FASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSNVNDFTVDINGVYSEPRPIGTRYLTRNL
[SEQ ID NO: 34]

30

【0 1 8 7】

【表 1 3】

AAV9-VR-IV-LPETG-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNAADA
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRLLLEPLGLVEEAAKTAP
GKKRPFVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDPQP IGEPPAAPSGVGSGLTMASSGGGAP
VADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
WGYFDNRFHCHFSRPRDQWRLINNNWGRFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDSY
QLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFQFSYEFENV
PFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSKTINGSGSGSGSGSGGGGSLPETGGGGSGSGSGSGSG
QNQQTILKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPAGSSWALNGRNSLMNPGPAMA
SHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGW
VQNGGILPGMVWQDRD VYLQGP IWAKIPHTDGNFHP SPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSNVFAVNTG VYSEPRPIGTRYLTRN
L [SEQ ID NO: 35]

40

50

【 0 1 8 8 】

VP1カプシドVR-IV領域アミノ酸453-454

NTPSGLPQTGTTTQS [配列番号36]

VP1カプシドVR-VIII領域アミノ酸587-588

LQRGNNGSGSLPQTGGGSGSRQAAT [配列番号37]

VP1カプシドVR-VIII領域アミノ酸587-588二連リンカー

LQRGNNGSGSGGSGSLPQTGGGSGSGGSGSRQAAT [配列番号38]

リンカー配列1: GGGGS [配列番号39]

【 0 1 8 9 】

【 表 1 4 】

10

Xn-NPXTG-Xm: NPXTG [SEQ ID NO: 40]

Xn-LPXTA-Xm: LPXTA [SEQ ID NO: 41]

Xn-LAXTG-Xm: LAXTG [SEQ ID NO: 42]

Sortase A recognition sequence 1: LPQTG [SEQ ID NO: 43]

Sortase A recognition sequence 2: LPETG [SEQ ID NO: 44]

20

Sortase A recognition sequence 3: LPNTG [SEQ ID NO: 45]

Sortase A recognition sequence 4: LPDTG [SEQ ID NO: 46]

Linker sequence 2: GGSGS [SEQ ID NO: 47]

【 0 1 9 0 】

30

40

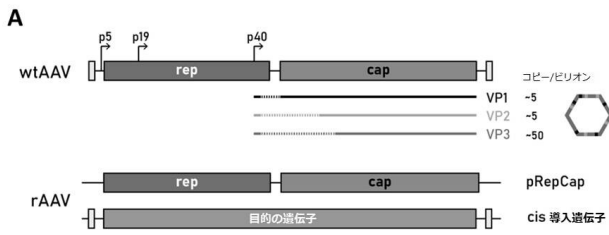
50

【表 1 5】

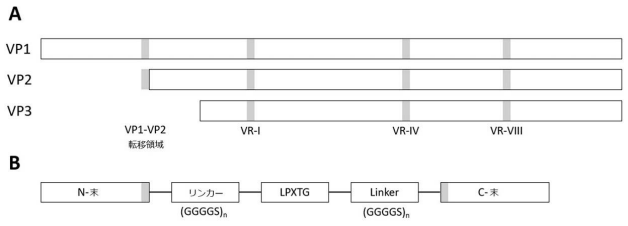
Xn-LPXAG-Xm: LPXAG [SEQ ID NO: 48]	
Xn-LPXLG-Xm: LPXLG [SEQ ID NO: 49]	
Xn-APXTG-Xm: APXTG [SEQ ID NO: 50]	
Xn-LPXSG-Xm: LPXSG [SEQ ID NO: 51]	
Xn-FPXTG-Xm: FPXTG [SEQ ID NO: 52]	10
Xn-XPKTG-Xm: XPKTG [SEQ ID NO: 53]	
Xn-LPEXG-Xm: LPEXG [SEQ ID NO: 54]	
Xn-NPQTN-Xm: NPQTN [SEQ ID NO: 55]	
Xn-QVPTG-Xm: QVPTG [SEQ ID NO: 56]	
Xn-LPNTA-Xm: LPNTA [SEQ ID NO: 57]	20
Xn-LPLTG-Xm: LPLTG [SEQ ID NO: 58]	
Xn-APKTG-Xm: APKTG [SEQ ID NO: 59]	
Xn-DPKTG-Xm DPKTG [SEQ ID NO: 60]	
Xn-SPKTG-Xm: SPKTG [SEQ ID NO: 61]	
Xn-APATG-Xm: APATG [SEQ ID NO: 62]	30
Xn-LAETG-Xm: LAETG [SEQ ID NO: 63]	
Xn-LPEAG-Xm: LPEAG [SEQ ID NO: 64]	
Xn-LPECG-Xm: LPECG [SEQ ID NO: 65]	
Xn-LPESG-Xm: LPESG [SEQ ID NO: 66]	
Xn-LMVGG-Xm: LMVGG [SEQ ID NO: 67]	40

【 図 面 】

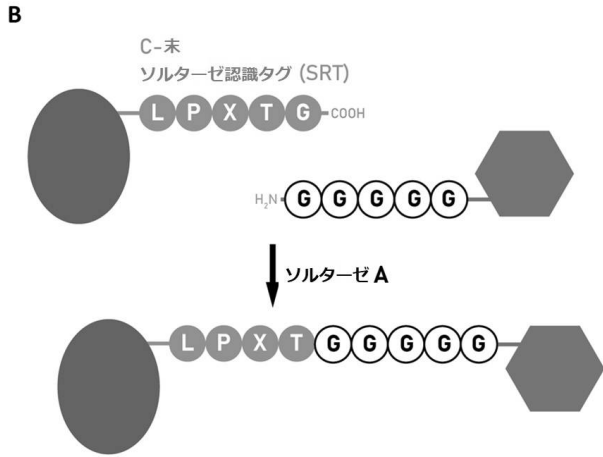
【 図 1 】



【 図 2 】

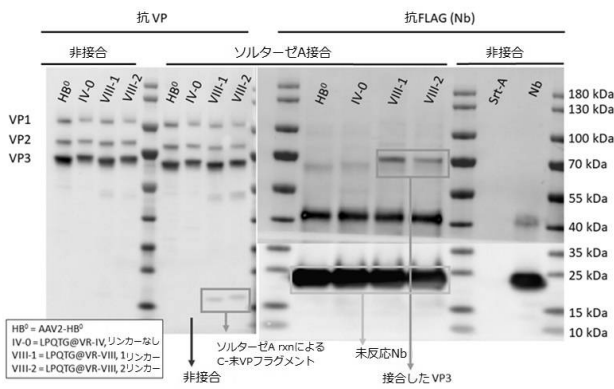


10

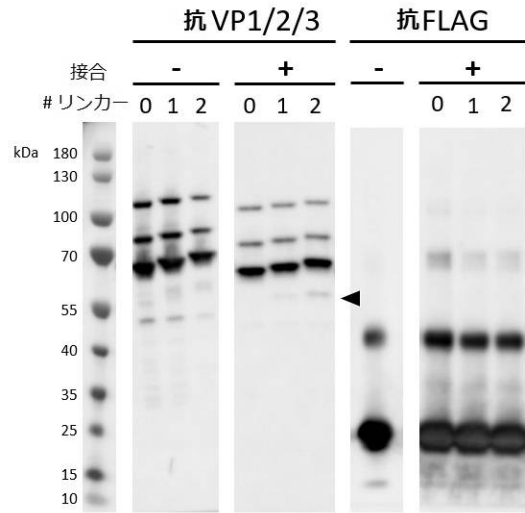


20

【 図 3 】



【 図 4 】

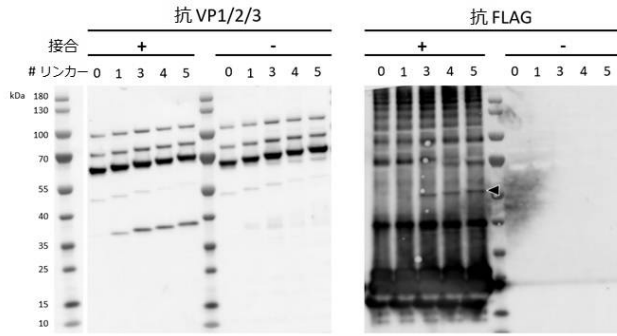


30

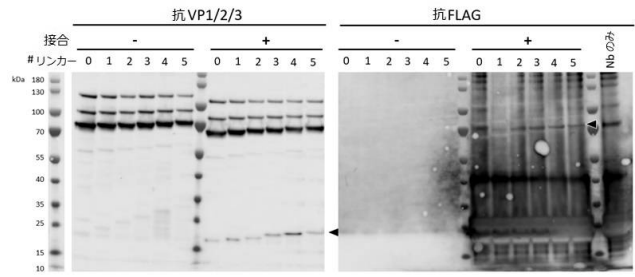
40

50

【 図 5 】

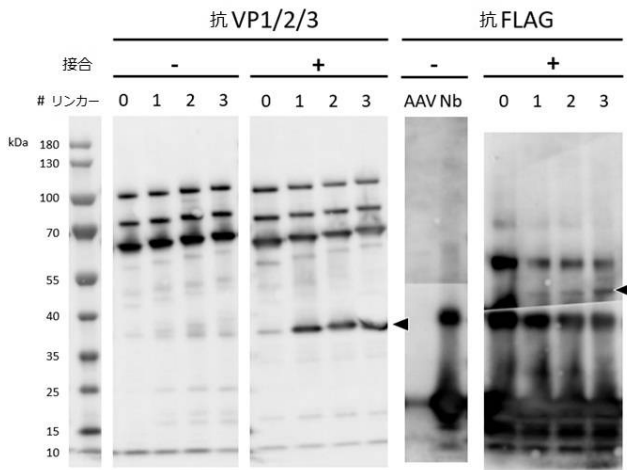


【 図 6 】

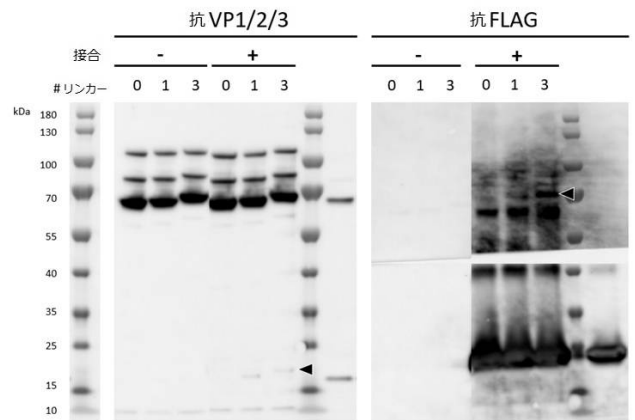


10

【 図 7 】

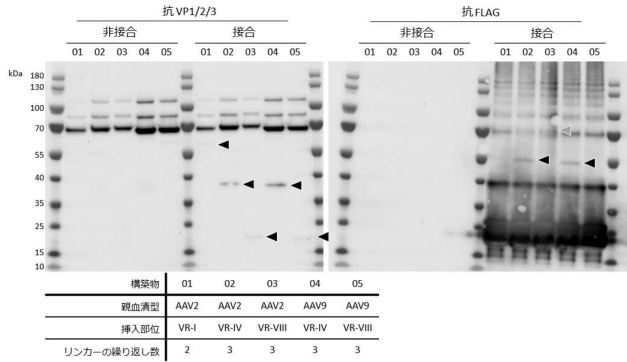


【 図 8 】

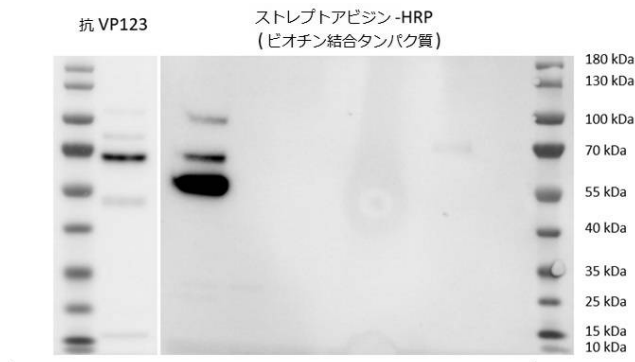


20

【 図 9 】



【 図 10 】



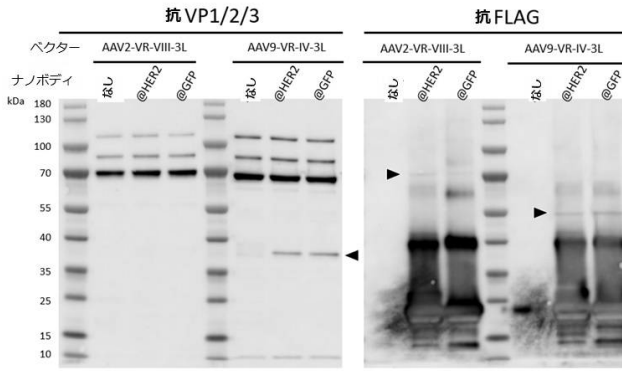
30

レーン	Ref	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
AAV	X	X		X	X			
SrtA		X	X		X			
GGG-ビオチン		X	X	X		X	X	
BSA							X	X

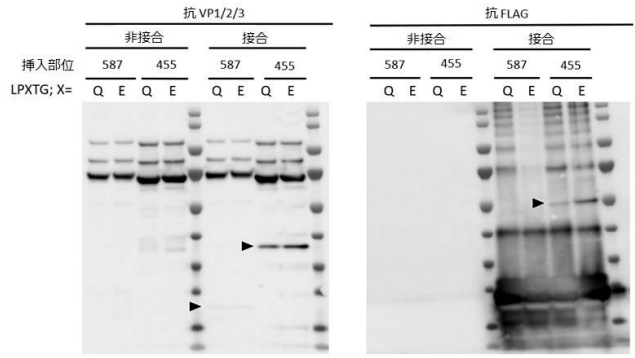
40

50

【 図 1 1 】

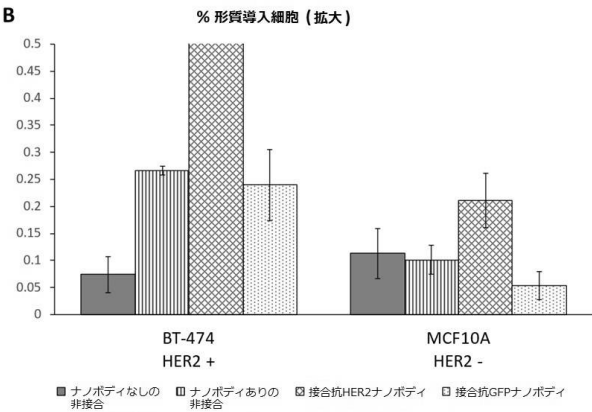
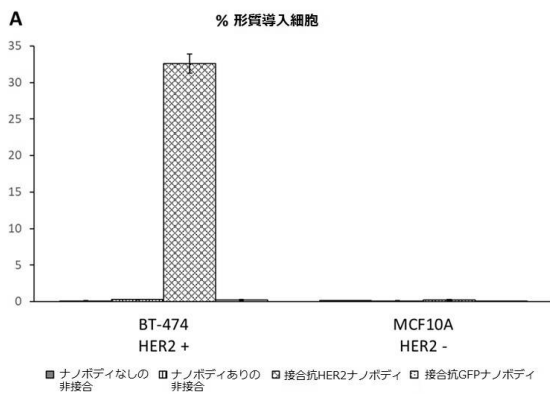


【 図 1 2 】

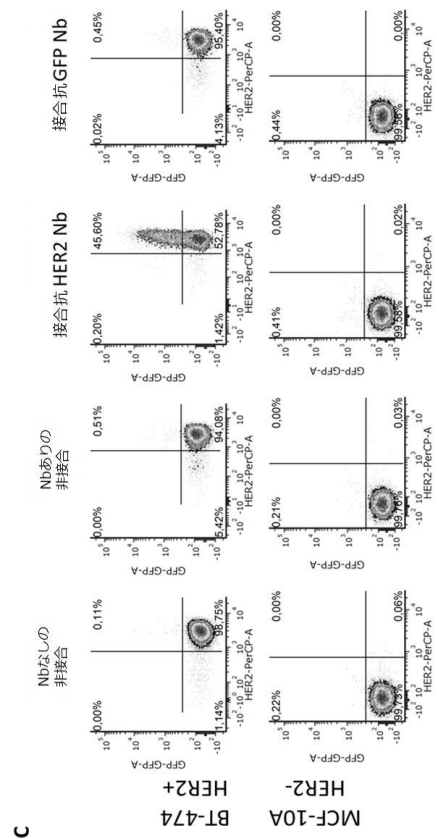


10

【 図 1 3 - 1 】



【 図 1 3 - 2 】



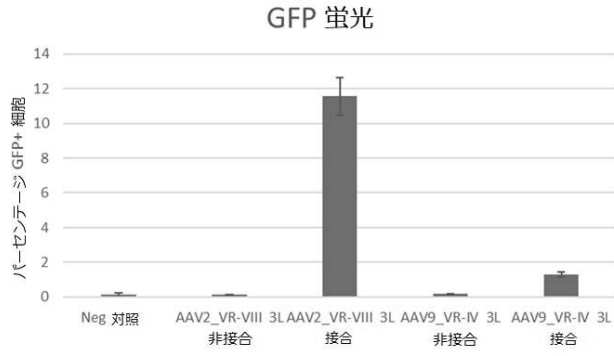
20

30

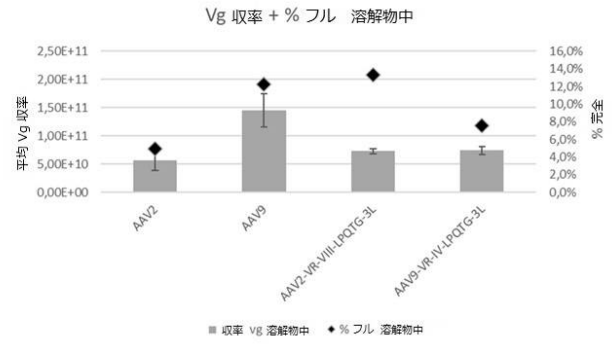
40

50

【 図 1 4 】

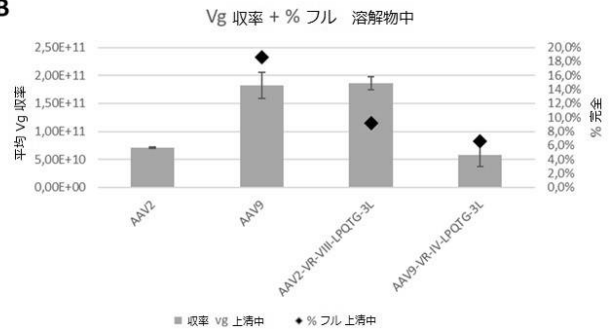


【 図 1 5 】



10

B



20

【 配列表 】

202551434800001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/864 C07K14/015 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 C07K		
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, BIOSIS, CHEM ABS Data, 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.
A	PEARCE HANNAH A. ET AL: "Site-Specific Glycation and Chemo-enzymatic Antibody Sortagging for the Retargeting of rAAV6 to Inflamed Endothelium", MOLECULAR THERAPY- METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 14, 23 July 2019 (2019-07-23), pages 261-269, XP093066903, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2019.07.003 figure 1	1-24
A	WO 2018/191750 A2 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 18 October 2018 (2018-10-18) paragraph [00186]; figure 7	1-24
	----- -/-- -----	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2023	Date of mailing of the international search report 04/08/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schwachtgen, J	

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

page 1 of 2

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061210

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GAELEN T. HESS ET AL: "M13 Bacteriophage Display Framework That Allows Sortase-Mediated Modification of Surface-Accessible Phage Proteins", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 23, no. 7, 3 July 2012 (2012-07-03), pages 1478-1487, XP055545353, US ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc300130z figures 1,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-24

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/061210

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/061210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018191750 A2	18-10-2018	US 2020405639 A1	31-12-2020
		WO 2018191750 A2	18-10-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,MC,ME,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,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

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100189429

弁理士 保田 英樹

(74)代理人 100213849

弁理士 澄川 広司

(72)発明者 ヘンカーツ, エルス

ベルギー、ルーヴェン 3 0 0 0、バス 5 1 0 5、ワイストラート 6、シーオー カーユー ルーヴェン アールアンドディ

(72)発明者 ムイヤールト, ベンジャミン

ベルギー、ルーヴェン 3 0 0 0、バス 5 1 0 5、ワイストラート 6、シーオー カーユー ルーヴェン アールアンドディ

(72)発明者 ブラウンス, ティーヌ

ベルギー、ルーヴェン 3 0 0 0、バス 5 1 0 5、ワイストラート 6、シーオー カーユー ルーヴェン アールアンドディ

F ターム (参考) 4B065 AA95X AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

4H045 AA10 AA20 AA30 FA74