(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-518145
(P2025-518145A)
(43)公表日　令和7年6月12日(2025.6.12)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K	*14/015(2006.01)*	C07K	14/015	ZNA	4B065
C12N	*7/01 (2006.01)*	C12N	7/01		4C076
C12N	*15/35 (2006.01)*	C12N	15/35		4C084
C12N	*15/864(2006.01)*	C12N	15/864	100Z	4C086
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	31/7088		4C087

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全79頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-570348(P2024-570348)
(86)(22)出願日　令和5年5月31日(2023.5.31)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月23日(2024.12.23)
(86)国際出願番号　PCT/AU2023/050463
(87)国際公開番号　WO2023/230657
(87)国際公開日　令和5年12月7日(2023.12.7)
(31)優先権主張番号　2022901483
(32)優先日　令和4年5月31日(2022.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オーストラリア(AU)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　524436543
マウント スペック インベストメント ピーティーワイ エルティーデー
MOUNT SPEC INVESTMENTS PTY LTD
オーストラリア国 ４００６，クイーンズランド，フォーティチュード ヴァリー，５２０ ウィッカム ストリート，エイチキュー サウス タワー，レベル ３
(74)代理人　110000084
弁理士法人アルガ特許事務所
(72)発明者　ライトン，クリストファー
オーストラリア国 ４００６，クイーンズランド，フォーティチュード ヴァリー，マウント スペック インベストメン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　修飾されたアデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質及びその方法

(57)【要約】
本発明は、修飾された組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質及びそのＡＡＶ粒子に関する。一態様では、修飾された組換えＡＡＶ粒子は、修飾を含まない組換えＡＡＶ粒子の効果と比較すると、網膜細胞の形質導入の増加を提供する。本発明はまた、修飾されたＡＡＶカプシドタンパク質及びそのＡＡＶ粒子をコードする核酸に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に記載の配列またはその機能的等価物による挿入を含む、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質。
【請求項２】
前記挿入が、ＡＡＶ８カプシドタンパク質のＶＲ－ＶＩＩＩにあるか、またはＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置にあり、前記挿入が、親ＡＡＶカプシドタンパク質に対するものである、請求項１に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項３】
前記挿入が、好ましくは前記ＡＡＶ８のカプシドタンパク質のアミノ酸５９０に対応する位置に、またはＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置に位置する、請求項１または２に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項４】
前記挿入が、配列番号１２１または１２５に記載の配列による親ＡＡＶカプシドタンパク質に対するものである、請求項１～３のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項５】
前記挿入が、配列番号２～１０８のいずれか１つによる配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項６】
前記挿入が、配列番号１に記載の配列と比較すると、１または２つ以下のアミノ酸だけ異なる配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項７】
前記挿入が、配列番号１０９または配列番号１１０に記載の配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項８】
前記挿入が、任意選択的に、配列番号１１１及び／または配列番号１１２に記載の配列を含む、前記挿入の５’及び／または３’末端に隣接するリンカーを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項９】
前記挿入が、配列番号１２９または１３８に記載の配列を含む、請求項８に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項１０】
前記挿入が、任意選択的に、配列番号１３０～１３３または１３９～１４０に記載の配列を含む、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３カプシドタンパク質のうちの１つ以上または全て、好ましくはＶＰ３カプシドタンパク質にある、請求項１～９のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項１１】
前記組換えカプシドタンパク質が、Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆのうちの１つ以上または全てから選択される変異を含み、好ましくは、前記ＡＡＶ８カプシドタンパク質にＹ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆの各々を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項１２】
配列番号１３５または１４２のうちのいずれか１つに記載の配列を含む、請求項１１に記載の組換えＡＡＶカプシドタンパク質。
【請求項１３】
前記ＡＡＶカプシドタンパク質が、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ７、またはＡＡＶ１０カプシドタンパク質である、請求項１～１２のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶカプシ

ドタンパク質。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか１項に記載のＡＡＶカプシドタンパク質を含む、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子。
【請求項１５】
請求項１～１３のいずれか１項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする、単離された核酸。
【請求項１６】
配列番号１３４または１４１に記載の配列を含む、請求項１５に記載の単離された核酸配列。
【請求項１７】
配列番号１２４に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする、単離された核酸。
【請求項１８】
組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドＶＰ３タンパク質であって、前記ＶＰ３タンパク質が、配列番号１３０～１３３または１３９～１４０に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する、前記組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドＶＰ３タンパク質をコードする、単離された核酸。
【請求項１９】
組換えＡＡＶカプシドタンパク質をコードする前記核酸が、ｐ５エンハンサエレメント、好ましくはＡＡＶ２　ｐ５エンハンサエレメントを含む、請求項１６または１７に記載の単離された核酸。
【請求項２０】
組換えＡＡＶカプシドタンパク質をコードする前記核酸が、ＡＡＶ８　３’ＵＴＲを含む、請求項１７～１６または１９のいずれか１項に記載の単離された核酸。
【請求項２１】
配列番号１３６または１４３に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子をコードする、単離された核酸。
【請求項２２】
前記核酸が、任意選択的に、配列番号１２２に従って定義されるＡＡＶ２　ｒｅｐ核酸配列を含む、請求項２１に記載の単離された核酸。
【請求項２３】
ＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む、請求項２１または２２に記載の単離された核酸。
【請求項２４】
任意選択的に、配列番号１１４に従って定義される配列に従って、前記ＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の開始コドンにＡＴＧからＡＣＧへの変異を含む、請求項２２に記載の単離された核酸。
【請求項２５】
治療用分子を発現するための発現カセットを含み、任意選択的に、前記治療用分子が、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、及びｃＤＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、及びｈｐＲＮＡである、請求項２１～２４のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。
【請求項２６】

前記治療用分子が、任意選択的に、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症または層状角膜移植拒絶症、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、及び眼血管新生からなる群から選択される眼疾患の治療に好適である、請求項２５に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項２７】

前記治療用分子が、血管新生及び／または炎症を阻害する、請求項２５または２６に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項２８】

前記治療用分子が、

－エンドスタチン、アンジオスタチン、もしくはエンドスタチンとアンジオスタチンとの融合体を含むか、

－結合タンパク質であるか、

－抗体の抗原結合部位を含むか、

－ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びアフリベルセプトからなる群から選択されるか、

－炎症を阻害するか、または、

－インターロイキン１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン１受容体アンタゴニスト（ＩＬ－１ＲＡ）、もしくはＩＬ－１０とＩＬ－１ＲＡとの融合体である、請求項２５～２７のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項２９】

前記治療用分子が、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、胎盤成長因子（ＰＩＧＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、ＴＩＥリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、アンジオポエチン様３（ＡＮＧＰＴＬ３）、アンジオポエチン様４（ＡＮＧＰＴＬ４）、インスリン様成長因子－Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）、形質転換成長因子アルファ（ＴＧＦ－α）、形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦ－β）、またはＴＮＦ－アルファ（例えば、抗炎症性可溶性ＴＮＦ－Ｒ）の阻害剤である、請求項２５～２８のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項３０】

前記治療用分子が、任意選択的に、ＶＥＧＦ抗体、ＶＥＧＦ受容体抗体、またはＶＥＧＦ　ｓｉＲＮＡから選択される、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤である、請求項２９に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項３１】

前記発現カセットが、任意選択的に、ロドプシン、ロドプシンキナーゼ、ＲＰＥ６５、及びレチンアルデヒド結合タンパク質１（ＲＬＢＰ１）からなる群から選択される治療用分子の発現を駆動するための網膜特異的プロモータを含む、請求項２１～３０のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。

【請求項３２】

前記発現カセットが、

ａ）第１の部位特異的組換え配列及び第２の部位特異的組換え配列を含むキルスイッチと、

ｂ）前記治療用分子をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節可能なエレメントであって、前記調節可能なエレメントの活性が、調節因子化合物によって調節される、前記調節可能なエレメントと、

ｃ）前記調節因子化合物と結合することが可能である調節因子化合物結合ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された構成的プロモータであって、前記調節因子化合物と結合すると、前記調節因子化合物結合ポリペプチドが、前記治療用分子の発現を調節し、前記第１の部位特異的組換え配列と前記第２の部位特異的組換え配列との間の組換えによる前記キルスイッチの活性化が、前記カセットからの前記治療用分子をコードする前記核酸の発現をサイレンシングする、前記構成的プロモータと、を含む、請求項２１

～３１のいずれか１項に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードする単離された核酸。
【請求項３３】
請求項１４に記載のＡＡＶ粒子と、１つ以上の担体または賦形剤と、を含む、薬学的組成物。
【請求項３４】
標的細胞、組織、または器官内でのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子の形質導入効率を増加させるためのエクスビボ、インビトロ、またはインビボでの方法であって、前記方法が、前記標的細胞、組織、または器官内の前記ＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、前記標的細胞、組織、または器官を請求項１４に記載のＡＡＶ粒子または請求項３３に記載の組成物と接触させることを含み、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、前記形質導入効率が増加する、前記方法。
【請求項３５】
前記方法が、インビボでの方法であり、前記ＡＡＶ粒子が、治療用分子を発現するための発現カセットを含み、前記発現カセットを含み、かつ前記カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、前記治療用分子の前記発現が増加する、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記形質導入効率が、前記カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００％以上増加する、請求項３４または３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記形質導入効率が、前記カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０倍以上増加する、請求項３４または３５に記載の方法。
【請求項３８】
標的細胞、組織、または器官においてアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子に対する免疫応答を低減させるための方法であって、前記方法が、前記標的細胞、組織、または器官における前記ＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、前記標的細胞、組織、または器官を請求項１４に記載のＡＡＶ粒子または請求項３３に記載の組成物と接触させることを含み、前記免疫応答が、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、低減する、前記方法。
【請求項３９】
前記標的細胞が、網膜細胞であり、前記標的組織が、網膜組織であり、前記標的器官が、眼である、請求項３４～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、請求項１４に記載のＡＡＶ粒子または請求項３３に記載の組成物を前記対象に投与し、それによって前記対象における前記状態、障害、または疾患を治療することを含む、前記方法。
【請求項４１】
状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象においてそれを行うための医薬の調製における、請求項１４に記載のＡＡＶ粒子または請求項３３に記載の組成物の使用。
【請求項４２】
状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象においてそれを行うことにおける使用のための、請求項１４に記載のＡＡＶ粒子または請求項３３に記載の組成物。
【請求項４３】

前記状態、障害、または疾患が、任意選択的に、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症または層状角膜移植拒絶症、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、及び眼血管新生からなる群から選択される眼疾患である、請求項４０に記載の方法、請求項４１に記載の使用、または請求項４２に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４４】

前記対象が、周辺視野の減少、中心視野の減少、夜間視力の減少、及び色覚の損失を含む群から選択される眼障害の少なくとも１つの症状を有する、請求項４０もしくは４３に記載の方法、請求項４１もしくは４３に記載の使用、または請求項４２もしくは４３に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４５】

投与される前記ＡＡＶ粒子またはその組成物が、請求項１～１３のいずれか１項に記載の修飾されたカプシドタンパク質を含み、発現カセットが、

ａ）第１の部位特異的組換え配列及び第２の部位特異的組換え配列を含むキルスイッチと、

ｂ）治療用分子をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節可能なエレメントであって、前記調節可能なエレメントの活性が、調節因子化合物によって調節される、前記調節可能なエレメントと、

ｃ）前記調節因子化合物と結合することが可能である調節因子化合物結合ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された構成的プロモータであって、前記調節因子化合物と結合すると、前記調節因子化合物結合ポリペプチドが、前記治療用分子の発現を調節し、前記第１の部位特異的組換え配列と前記第２の部位特異的組換え配列との間の組換えによる前記キルスイッチの活性化が、前記カセットからの前記治療用分子をコードする前記核酸の発現をサイレンシングする、前記構成的プロモータと、を含む、請求項４０もしくは４３～４４のいずれか１項に記載の方法、請求項４１もしくは４３～４４のいずれか１項に記載の使用、または請求項４２～４４のいずれか１項に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４６】

前記ＡＡＶ粒子が、硝子体内または網膜下に投与され、前記キルスイッチが、部位特異的リコンビナーゼまたは部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸を投与することによって活性化され、前記部位特異的リコンビナーゼが、第１の部位特異的組換え配列と第２の部位特異的組換え配列との間の組換えを触媒し、それによって前記治療用分子の発現をサイレンシングする、請求項４５に記載の方法、使用、または使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４７】

前記治療が、前記調節因子化合物を、眼に局所的にまたは点眼剤で投与することを含む、請求項４５または４６に記載の方法、使用、または使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４８】

好ましくは、前記組換えＡＡＶまたはその組成物の前記投与前に、免疫抑制剤の投与を含む、請求項４０もしくは４３～４７のいずれか１項に記載の方法、請求項４１もしくは４２～４７のいずれか１項に記載の使用、または請求項４２～４７のいずれか１項に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項４９】

任意選択的に、手術、眼内レンズとのレンズ置き換え、レーザー手術、または薬物療法を含む群から選択される追加の治療の施行をさらに含む、請求項４０もしくは４３～４８のいずれか１項に記載の方法、請求項４１もしくは４２～４８のいずれか１項に記載の使用、または請求項４２もしくは４３～４８のいずれか１項に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。

【請求項５０】
前記組換えＡＡＶ粒子または組成物が、硝子体内に投与される、請求項４０もしくは４３～４９のいずれか１項に記載の方法、請求項４１もしくは４２～４９のいずれか１項に記載の使用、または請求項４２もしくは４３～４９のいずれか１項に記載の使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。
【請求項５１】
前記免疫抑制剤及び／または追加の療法が、静脈内、経口、皮下、または筋肉内に投与される、請求項４８に記載の方法、使用、または使用のためのＡＡＶ粒子もしくは組成物。
【請求項５２】
請求項１４に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を含む、単離された哺乳動物細胞。
【請求項５３】
前記哺乳動物細胞が、任意選択的に、光受容体、網膜神経節細胞、双極細胞、線維柱帯、網膜色素上皮細胞、アマクリン細胞、星形細胞、水平細胞、ミクログリア、またはミューラーグリア細胞からなる群から選択されるヒト細胞、好ましくはヒト網膜細胞である、請求項５２に記載の単離された哺乳動物細胞。
【請求項５４】
対象における疾患、状態、または障害を防止または治療するための、請求項１４に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子または請求項３３に記載の組成物を含む、キット。
【請求項５５】
任意選択的に、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症または層状角膜移植拒絶症、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、及び眼血管新生からなる群から選択される、対象における眼疾患を防止または治療するための、請求項５４に記載のキット。
【請求項５６】
標的細胞、組織、または器官においてアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムの力価を増加させるための方法であって、前記方法が、前記標的細胞、組織、または器官を、前記標的細胞、組織、または器官内の前記ＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、請求項１４に記載のＡＡＶ粒子と接触させることを含み、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、前記ベクターゲノムが増加される、前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０２２年５月３１日に出願された豪国仮特許出願第ＡＵ２０２２９０１４８３号からの優先権を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、修飾された組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質及びそのＡＡＶ粒子に関する。一態様では、修飾された組換えＡＡＶ粒子は、修飾を含まない組換えＡＡＶ粒子の効果と比較すると、網膜細胞の形質導入の増加を提供する。本発明はまた、修飾されたＡＡＶカプシドタンパク質及びそのＡＡＶ粒子をコードする核酸に関する。
【背景技術】
【０００３】
組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターは、遺伝子療法を送達する有効な手段である。そのような組換えＡＡＶベクターの使用は、（１）様々な分裂細胞及び非分裂細胞に感染する能力、（２）標的細胞ゲノムに組み込まれるのではなくエピソームのままであ

る傾向、（３）治療用導入遺伝子の長期発現をもたらす能力、（４）他のウイルスベクターと比較して、免疫応答を誘発する可能性の低さ、（５）アデノウイルスまたは単純ヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの助けを借りずに複製し生産的な感染を開始する能力のなさ、ならびに（６）任意の既知の疾患との関連性の欠如に起因して、近年着実に増加している（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）。

【０００４】

組換えＡＡＶベクター設計は、野生型ＡＡＶのゲノム工学に基づいている（Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．＆Ｋｌｅｉｎｓｃｈｍｉｄｔ　２０１１、Ｓａｍｉｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。ＡＡＶは、およそ４．７ｋｂの長さであり、５’及び３’逆位末端反復配列（複製及びパッケージングのためのシス作用エレメントを含有する）、ｒｅｐ遺伝子、ならびにｃａｐ遺伝子をコードする、一本鎖ＤＮＡゲノムを有する。ｒｅｐ遺伝子は、転写され、代替的にスプライシングされて、ゲノム複製及びパッケージング、ならびに転写調節を担う４つの異なるタンパク質を産生する。ｃａｐ遺伝子は、単一のプロモータから転写され、２つの翻訳開始部位を有し、代替的にスプライシングされて、３つの構造タンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３）を産生する。これらは、５０単位のＶＰ３と、各々１０単位のＶＰ１及びＶＰ２からなる二十面体カプシドを形成するように組み立てられる。ｃａｐ遺伝子の５’末端内、及びｃａｐオープンリーディングフレームのフレーム外には、ＡＡＰ遺伝子が存在する。これは、効率的なウイルスアセンブリを確保するのに役立つアセンブリ活性化タンパク質をコードする。ｃａｐ遺伝子は、特定の組織に対するウイルスの安定性及び向性に影響を及ぼす。

【０００５】

標的組織または細胞タイプに応じて、所与の自然に存在するＡＡＶベクター血清型は、標的組織または細胞の形質導入において比較的有効ではない場合がある。そのような１つの例は、網膜細胞（例えば、網膜色素上皮及び光受容体）の形質導入である。したがって、ＡＡＶカプシドタンパク質を操作するための努力がなされている。例えば、カプシドの個々のアミノ酸は、ウイルスの安定性を高め、ウイルスの向性を改善するように操作されている。一例では、保存されたチロシン残基は、チロシンリン酸化及びその後のユビキチン媒介性プロテアソーム分解を回避するために、フェニルアラニン残基で置換されている（Ｚｈｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）。またＡＡＶの寿命を延ばすために、同様に、保存されたセリン及びスレオニンアミノ酸は、バリン残基で置換されており（Ａｓｌａｎｉｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２、Ａｓｌａｎｉｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）、保存されたリジンは、グルタミン酸で置換されている（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。いくつかの標的細胞または組織に対して、改善された安定性及び高められた向性を有する組換えＡＡＶカプシドが産生されているが、ＡＡＶに対する中和抗体などの問題（Ｈａｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）は、依然として非常に多岐にわたる。例えば、ＡＡＶ２バリアント７ｍ８に対する中和抗体が、以前に報告されている（Ｄａｌｋａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）。

【０００６】

さらに、眼の網膜細胞の形質導入に関して、ヒト網膜の効率的な形質導入は、依然として大きな課題である（Ｂｏｒｄｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）。１つの例は、硝子体への送達を介したヒト網膜の形質導入である。より多くの拡散量を提供しながら、より単純かつより安全であるので、この投与経路は、他の経路を上回って好ましい。しかしながら、硝子体内にＡＡＶ中和抗体が存在すること、網膜の内境界膜によって作り出される物理的障壁、及び光受容体細胞または網膜色素上皮に好適な向性を有するＡＡＶを利用することは、眼に対する遺伝子療法の施行に関連する主要なハードルである。

【０００７】

上述の制限の点において、形質導入効率が改善されている、及び／または低減された免疫原性応答と関連付けられている組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【０００８】
本発明者らは、カプシド修飾を有しないＡＡＶと比較すると、形質導入効率の増加及び免疫原性の低減を提供する修飾されたカプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の生成を初めて実証する。有利なことに、これらのＡＡＶは、発現カセットを伴ってパッケージングされると、加齢黄斑変性などの眼障害の治療を含む、遺伝子療法を必要とする疾患、状態、または障害に対する治療用途を改善している。
【０００９】
したがって、本発明の第１の態様では、配列番号１に記載の配列またはその機能的等価物による挿入を含む組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質が提供される。
【００１０】
本発明の別の態様では、配列番号１に記載の配列またはその機能的等価物による挿入であって、挿入が、任意選択的に、配列番号１３０～１３３または１３９～１４０に記載の配列を含む、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３カプシドタンパク質のうちの１つ以上または全て、好ましくはＶＰ３カプシドタンパク質にある、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ＶＰカプシドタンパク質が提供される。
【００１１】
一実施形態では、挿入は、ＡＡＶ８カプシドタンパク質のループＩＶ、領域６、もしくは可変領域ＶＩＩＩ（ＶＲ－ＶＩＩＩ）に、またはＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置にある。この実施形態では、挿入は、親ＡＡＶカプシドタンパク質に対するものである。
【００１２】
一実施形態では、挿入は、好ましくはＡＡＶ８のカプシドタンパク質のアミノ酸５９０に対応する位置に、またはＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置に位置する。
【００１３】
一実施形態では、挿入は、配列番号１２１または１２５に記載の配列による親ＡＡＶカプシドタンパク質に対するものである。
【００１４】
一実施形態では、挿入は、配列番号２～１０８に記載の配列のうちのいずれか１つによる配列を含む。
【００１５】
一実施形態では、挿入は、配列番号１に記載の配列による配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する。別の実施形態では、挿入は、配列番号１に記載の配列による配列と比較すると、１または２つ以下のアミノ酸だけ異なる配列を含む。
【００１６】
一実施形態では、挿入は、配列番号１０９または配列番号１１０に記載の配列による配列を含む。
【００１７】
一実施形態では、挿入は、挿入の５’及び／または３’末端に隣接するリンカーを含む。任意選択的に、リンカーは、配列番号１１１（「ＴＧ」；例えば、ＡＣＣＧＧＴによってコードされる）及び／または配列番号１１２（「ＧＬＳ」；例えば、ＧＴＣＴＴＴＣＧＡによってコードされる）による配列を含む。一実施形態では、挿入は、配列番号１２９及び／または１３８の配列を含む。
【００１８】
一実施形態では、挿入は、任意選択的に、配列番号１３０～１３３または１３９～１４０に記載の配列を含む、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３カプシドタンパク質のうちの１つ以上または全て、好ましくはＶＰ３カプシドタンパク質にある。

【００１９】
一実施形態では、組換えカプシドタンパク質は、Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆのうちの１つ以上または全てから選択される変異を含む。好ましくは、組換えカプシドタンパク質は、任意選択的に、配列番号１３５または１４２のうちのいずれか１つに記載の配列を含むＡＡＶ８カプシドタンパク質にＹ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆの各々を含む。
【００２０】
一実施形態では、組換えＡＡＶカプシドタンパク質は、組換えＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ７、またはＡＡＶ１０カプシドタンパク質からなる群から選択される。
【００２１】
本発明の一態様では、本明細書に記載のＡＡＶカプシドタンパク質を含む組換えＡＡＶ粒子が提供される。好ましくは、ＡＡＶ粒子は、任意選択的に、配列番号１２３に記載の配列に従って定義されるＡＡＶ２　ｒｅｐタンパク質をコードするＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の存在下でパッケージングされる。
【００２２】
本発明の一態様では、任意選択的に、配列番号１３４または１４１に記載の配列を含む、本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする単離された核酸が提供される。
【００２３】
本発明の一態様では、配列番号１３４または１４１に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする単離された核酸が提供される。
【００２４】
本発明の一態様では、任意選択的に、配列番号１３６または１４３に記載の配列を含む、本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子をコードする単離された核酸が提供される。
【００２５】
本発明の一態様では、配列番号１３６または１４３に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子をコードする単離された核酸が提供される。
【００２６】
本発明の一態様では、配列番号１２４に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする単離された核酸が提供される。
【００２７】
本発明の一態様では、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドＶＰ３タンパク質であって、ＶＰ３タンパク質が、配列番号１３０～１３３または１３９～１４０に記載の配列に対して、少なくとも６０％の配列同一性、少なくとも７０％の配列同一性、少なくとも８０％の配列同一性、少なくとも９０％の配列同一性、または１００％の配列同一性を有する、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドＶＰ３タンパク質をコードする単離された核酸が提供される。
【００２８】
一実施形態では、組換えＡＡＶカプシドタンパク質をコードする核酸は、ｐ５エンハンサエレメント、好ましくはＡＡＶ２　ｐ５エンハンサエレメントを含む。好ましくは、ｐ５エンハンサエレメントは、ＡＡＶカプシド遺伝子の下流に位置する。任意選択的に、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質をコードする核酸は、ＡＡＶ８３’ＵＴＲを含む。

【００２９】
一実施形態では、組換えＡＡＶ粒子をコードする核酸は、任意選択的に、配列番号１２２に記載の配列に従って定義されるＡＡＶ２　ｒｅｐ核酸配列を含む。任意選択的に、ＡＡＶ２　ｒｅｐ核酸配列の発現は、ｐ５プロモータによって駆動される。
【００３０】
一実施形態では、翻訳が、任意選択的に、配列番号１１４に従って定義される配列に従って、下流のフレーム内メチオニンで始まるように、ＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子は、ＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の開始コドンにＡＴＧからＡＣＧへの変異を含む。
【００３１】
一実施形態では、組換えＡＡＶ粒子をコードする核酸は、ＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）を含む。
【００３２】
一実施形態では、組換えＡＡＶ粒子は、治療用分子を発現するための発現カセットを含む。さらなる実施形態では、治療用分子は、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、及びｃＤＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、及びｈｐＲＮＡである。好ましい実施形態では、治療用分子は、任意選択的に、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症または層状角膜移植拒絶症、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、及び眼血管新生からなる群から選択される眼疾患の治療に好適である。
【００３３】
一実施形態では、治療用分子は、血管新生及び／または炎症を阻害する。さらなる実施形態では、治療用分子は、
－エンドスタチン、アンジオスタチン、もしくはエンドスタチンとアンジオスタチンとの融合体を含むか、
－結合タンパク質であるか、
－抗体の抗原結合部位を含むか、
－ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びアフリベルセプトからなる群から選択されるか、
－炎症を阻害するか、または、
－インターロイキン１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン１受容体アンタゴニスト（ＩＬ－１ＲＡ）、もしくはＩＬ－１０とＩＬ－１ＲＡとの融合体である。
【００３４】
さらなる実施形態では、治療用分子は、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、胎盤成長因子（ＰＩＧＦ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、ＴＩＥリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、アンジオポエチン様３（ＡＮＧＰＴＬ３）、アンジオポエチン様４（ＡＮＧＰＴＬ４）、インスリン様成長因子－Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）、形質転換成長因子アルファ（ＴＧＦ－α）、形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦ－β）、またはＴＮＦ－アルファ（例えば、抗炎症性可溶性ＴＮＦ－Ｒ）の阻害剤である。好ましい実施形態では、治療用分子は、任意選択的に、ＶＥＧＦ抗体、ＶＥＧＦ受容体抗体、またはＶＥＧＦ　ｓｉＲＮＡから選択される、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の阻害剤である。
【００３５】
さらなる実施形態では、発現カセットは、任意選択的に、ロドプシン、ロドプシンキナーゼ、ＲＰＥ６５、及びレチンアルデヒド結合タンパク質１（ＲＬＢＰ１）、または本明細書の表５に列挙されるプロモータのうちのいずれかからなる群から選択される、治療用分子の発現を駆動するための網膜特異的プロモータを含む。
【００３６】
一実施形態では、発現カセットは、
ａ）第１の部位特異的組換え配列及び第２の部位特異的組換え配列を含むキルスイッチと、

ｂ）治療用分子をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節可能なエレメントであって、調節可能なエレメントの活性が、調節因子化合物によって調節される、調節可能なエレメントと、

ｃ）調節因子化合物と結合することが可能である調節因子化合物結合ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された構成的プロモータであって、調節因子化合物と結合すると、調節因子化合物結合ポリペプチドが、治療用分子の発現を調節し、第１の部位特異的組換え配列と第２の部位特異的組換え配列との間の組換えによるキルスイッチの活性化が、カセットからの治療用分子をコードする核酸の発現をサイレンシングする、構成的プロモータと、を含む。

【００３７】

本発明の一態様では、本明細書に記載のＡＡＶ粒子と、１つ以上の担体または賦形剤と、を含む、薬学的組成物が提供される。

【００３８】

本発明の一態様では、標的細胞、組織、または器官内でのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子の形質導入効率を増加させるための方法であって、方法が、標的細胞、組織、または器官内のＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、標的細胞、組織、または器官を本明細書に記載のＡＡＶ粒子と接触させることを含み、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、形質導入効率が増加する、方法が提供される。

【００３９】

好ましい実施形態では、ＡＡＶ粒子は、治療用分子を発現するための発現カセットを含む。この実施形態では、治療用分子の発現は、発現カセットを含み、かつカプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると増加する。

【００４０】

この実施形態では、方法は、エクスビボ、インビトロ、またはインビボでの方法である。さらなる実施形態では、標的細胞は、網膜細胞であり、標的組織は、網膜組織であり、標的器官は、眼である。

【００４１】

一実施形態では、形質導入効率は、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００％以上増加する。

【００４２】

別の実施形態では、形質導入効率は、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０倍以上増加する。

【００４３】

本発明の一態様では、標的細胞、組織、または器官においてアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子に対する免疫応答を低減させるための方法であって、方法が、標的細胞、組織、または器官におけるＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、標的細胞、組織、または器官を本明細書に記載のＡＡＶ粒子と接触させることを含み、免疫応答が、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子と比較すると、低減する、方法が提供される。

【００４４】

一実施形態では、標的細胞は、網膜細胞であり、標的組織は、網膜組織であり、標的器官は、眼である。

【００４５】

本発明の一態様では、状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物を対象に投与し、それによって対象における状態、障害、または疾患を治療することを含む、方

法を提供する。

【００４６】

本発明の一態様では、状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象においてそれを行うための医薬の調製における、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物の使用を提供する。

【００４７】

本発明の一態様では、状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象における使用のための、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物を提供する。

【００４８】

一実施形態では、状態、障害、または疾患は、任意選択的に、網膜色素変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症または層状角膜移植拒絶症、黄斑変性、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、及び眼血管新生からなる群から選択される眼疾患である。

【００４９】

一実施形態では、対象は、周辺視野の減少、中心視野の減少、夜間視力の減少、及び色覚の損失を含む群から選択される眼障害の少なくとも１つの症状を有する。

【００５０】

一実施形態では、状態、障害、または疾患を治療することを必要とする対象に投与されるＡＡＶ粒子またはその組成物は、本明細書に記載の修飾されたカプシドタンパク質と、発現カセットであって、

ａ）第１の部位特異的組換え配列及び第２の部位特異的組換え配列を含むキルスイッチと、

ｂ）治療用分子をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節可能なエレメントであって、調節可能なエレメントの活性が、調節因子化合物によって調節される、調節可能なエレメントと、

ｃ）調節因子化合物と結合することが可能である調節因子化合物結合ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された構成的プロモータであって、調節因子化合物と結合すると、調節因子化合物結合ポリペプチドが、治療用分子の発現を調節し、第１の部位特異的組換え配列と第２の部位特異的組換え配列との間の組換えによるキルスイッチの活性化が、カセットからの治療用分子をコードする核酸の発現をサイレンシングする、構成的プロモータと、を含む、発現カセットと、を含む。

【００５１】

この実施形態では、ＡＡＶ粒子は、硝子体内または網膜下に投与され得、キルスイッチは、部位特異的リコンビナーゼまたは部位特異的リコンビナーゼをコードする核酸を投与することによって活性化され得、部位特異的リコンビナーゼが、第１の部位特異的組換え配列と第２の部位特異的組換え配列との間の組換えを触媒し、それによって治療用分子の発現をサイレンシングする。さらなる実施形態では、治療は、調節因子化合物を眼に局所的にまたは点眼剤で投与することを含む。

【００５２】

一実施形態では、本明細書に記載の方法または使用は、免疫抑制剤の投与を含む。免疫抑制剤の投与が企図される場合、免疫抑制剤は、好ましくは、組換えＡＡＶもしくはその組成物の投与前に、または代替的に、組換えＡＡＶもしくはその組成物の投与と同時に投与される。好ましくは、組換えＡＡＶまたはその組成物は、１回投与されるが、しかしながら、免疫抑制剤が投与される場合、組換えＡＡＶまたはその組成物は、２回以上投与され得る。

【００５３】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の方法または使用は、任意選択的に、手術、眼内レンズとのレンズ置き換え、レーザー手術、または薬物療法を含む群から選択される追加の療法の施行を含む。免疫抑制剤の投与を含む任意の追加の療法的治療は、所望の治療

効果を達成するために、１回、２回、３回、またはそれ以上投与され得る。
【００５４】
一実施形態では、本明細書に定義される組換えＡＡＶ粒子またはその組成物は、硝子体内または網膜下に投与される。一実施形態では、追加の療法及び／または免疫抑制剤は、静脈内、経口、皮下、または筋肉内に投与される。
【００５５】
本発明の一態様では、本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を含む単離された哺乳動物細胞が提供される。一実施形態では、哺乳動物細胞は、任意選択的に、光受容体、網膜神経節細胞、双極細胞、線維柱帯、網膜色素上皮細胞、アマクリン細胞、星形細胞、水平細胞、ミクログリア、またはミュラーグリア細胞からなる群から選択されるヒト細胞、好ましくはヒト網膜細胞である。
【００５６】
本発明の一態様では、対象における疾患、状態、もしくは障害を防止もしくは治療するために、または対象における疾患、状態、もしくは障害を防止もしくは治療するために使用される場合、本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子またはその組成物を含むキットが提供される。任意選択的に、キットは、
－リコンビナーゼ、またはリコンビナーゼをコードする核酸配列を含む発現カセット、
－点眼剤製剤または局所製剤、
－治療用分子をコードする核酸の発現をサイレンシングするための、リコンビナーゼ、またはリコンビナーゼをコードする核酸配列を含む発現カセット、を含み得る。
【００５７】
本発明の一態様では、標的細胞、組織、または器官においてアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムの力価を増加させるための方法であって、方法が、標的細胞、組織、または器官を、標的細胞、組織、または器官内のＡＡＶ粒子の形質導入に十分な条件下で、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物と接触させることを含み、カプシド挿入を有しないＡＡＡＶ粒子と比較すると、ベクターゲノムが増加する、方法が提供される。
【００５８】
本発明の一態様では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムの力価を増加させることを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、方法が、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物を対象に投与することを含み、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子を受けた対象と比較すると、ベクターゲノムが増加する、方法が提供される。
【００５９】
本発明の別の態様では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムの力価を増加させることを必要とする対象においてそれを行うための医薬の調製におけるＡＡＶ粒子またはその組成物の使用であって、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子を受けた対象と比較すると、ベクターゲノムが増加する、使用が提供される。
【００６０】
本発明の別の態様では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターゲノムの力価を増加させることを必要とする対象においてそれを行うことにおける使用のためのＡＡＶ粒子またはその組成物であって、カプシド挿入を有しないＡＡＶ粒子を受けた対象と比較すると、ベクターゲノムが増加する、ＡＡＶ粒子またはその組成物が提供される。
【００６１】
本明細書のいかなる実施形態も、特に明記されない限り、任意の他の実施形態に準用して適用されるものとみなされる。
【００６２】
本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲を制限されることはなく、それらの実施形態は、例示の目的のみを意図している。機能的に等価な製品、組成物、及び方法は、本明細書に記載されるように、明らかに本発明の範囲内である。
【００６３】
本明細書全体を通じて、特に明記されない限り、または文脈から特に必要とされない限

り、単一の工程、物質の組成、工程の群または物質の組成の群への言及は、これらの工程、物質の組成、工程の群、または物質の組成の群のうちの１つ及び複数（すなわち、１つ以上）を包含すると解釈されるものとする。

【００６４】

本発明は、以下の非限定的な実施例によって、及び添付の図面を参照して、以下に記載される。

【図面の簡単な説明】

【００６５】

【図１－１】ＡＡＶ力価を改善するための修飾されたＡＡＶ２／８ベクターの生成。Ａ．ＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ２　ｃａｐ遺伝子の代わりにｐＲＣ－ＡＡＶ２ベクターにクローニングして、組換えプラスミドｐＡＡＶ２／８を作製した。ＡＡＶ複製を負に調節する２つの最大のＲｅｐアイソフォーム（ｐ７８及びｐ６８）の翻訳を防止するために、翻訳が、下流のフレーム内メチオニンで始まるように、内因性ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の上流にクローニングし、開始因子メチオニンをＡＴＧからＡＣＧに変異させた。これによって、ＡＡＶ力価に１．６７倍の増加が生じた。ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子の下流にクローニングして、エンハンサエレメントとして作用させた。これによって、ウイルス力価にさらに１．７４倍の増加が生じた。Ｂ．ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼを使用してＰＣＲを重複させることによって、Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３ＦアミノＮ酸置換をＡＡＶ８　ｃａｐ　ＯＲＦに導入した。全てのＡＡＶ力価が増加し、Ｔ４９４Ｖ（１．４１倍）及びＹ７３３Ｆ（１．３３倍）が最も有効であった。３つ全ての置換の組み合わせは、ウイルス力価を１．７５倍増加させた。

【図１－２】ＡＡＶ力価を改善するための修飾されたＡＡＶ２／８ベクターの生成。Ａ．ＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ２　ｃａｐ遺伝子の代わりにｐＲＣ－ＡＡＶ２ベクターにクローニングして、組換えプラスミドｐＡＡＶ２／８を作製した。ＡＡＶ複製を負に調節する２つの最大のＲｅｐアイソフォーム（ｐ７８及びｐ６８）の翻訳を防止するために、翻訳が、下流のフレーム内メチオニンで始まるように、内因性ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の上流にクローニングし、開始因子メチオニンをＡＴＧからＡＣＧに変異させた。これによって、ＡＡＶ力価に１．６７倍の増加が生じた。ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子の下流にクローニングして、エンハンサエレメントとして作用させた。これによって、ウイルス力価にさらに１．７４倍の増加が生じた。Ｂ．ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼを使用してＰＣＲを重複させることによって、Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３ＦアミノＮ酸置換をＡＡＶ８　ｃａｐ　ＯＲＦに導入した。全てのＡＡＶ力価が増加し、Ｔ４９４Ｖ（１．４１倍）及びＹ７３３Ｆ（１．３３倍）が最も有効であった。３つ全ての置換の組み合わせは、ウイルス力価を１．７５倍増加させた。（続き）

【図２－１】ＡＡＶ２／８カプシド修飾ウイルス粒子をコードするプラスミドライブラリの構築の概略図。Ａ．導入された制限部位の対を使用して、カプシドタンパク質ＶＰ１のアミノ酸Ｎ５９０に隣接するＡＡＶ２／８ゲノムをコードするプラスミド３’に、ペプチド配列をコードするランダムに生成されたオリゴヌクレオチドのプールをクローニングした。ｃａｐヌクレオチド配列は小文字で示され、対応するアミノ酸配列は大文字であり、制限部位は青色で示され、挿入部位のすぐ上流のアミノ酸は赤色で示される。Ｂ．ＡＡＶ２　ｐ５プロモータを有する組換えＡＡＶ２／８　Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ三重変異体ベクターのベクターマップ。

【図２－２】ＡＡＶ２／８カプシド修飾ウイルス粒子をコードするプラスミドライブラリの構築の概略図。Ａ．導入された制限部位の対を使用して、カプシドタンパク質ＶＰ１のアミノ酸Ｎ５９０に隣接するＡＡＶ２／８ゲノムをコードするプラスミド３’に、ペプチド配列をコードするランダムに生成されたオリゴヌクレオチドのプールをクローニングした。ｃａｐヌクレオチド配列は小文字で示され、対応するアミノ酸配列は大文字であり、制限部位は青色で示され、挿入部位のすぐ上流のアミノ酸は赤色で示される。Ｂ．ＡＡＶ

２　ｐ５プロモータを有する組換えＡＡＶ２／８　Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ三重変異体ベクターのベクターマップ。（続き）
【図３】ＡＡＶ２／８カプシドのループＩＶ（ＶＲ－ＶＩＩＩ）内のランダムペプチドディスプレイライブラリの構築。Ａ．ＡＡＶ２／８　Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ三重変異体ベクターｐ５プロモータ及び３’エンハンサ配列をＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）に隣接させて、ＡＡＶ２／８カプシドのループＩＶ内にランダムペプチドライブラリを示した。Ｎ５９０ライブラリは、Ｎ末端に２つの追加の固定アミノ酸、及びＣ末端に３つの固定アミノ酸に隣接させて、ランダムな７つのアミノ酸ペプチドを示す。Ｎ５９０ライブラリからの３つのクローンのＤＮＡ配列決定は、異なるランダムなペプチドが各クローンによってコードされたことを検証した。Ｂ．各クローン（及びライブラリ）のＳｂｆＩ消化は、ＩＴＲの存在を裏付けた。
【図４】エクスビボでのＡＡＶ８　Ｎ５９０ライブラリ選択。新規のＡＡＶバリアントを同定するために、ヒト網膜及び網膜下組織において、初期ＡＡＶライブラリの５ラウンド選択方法を実施した。選択プロセスに続いて、新規のＡＡＶバリアントを、ＩＴＲ－２エレメントを含有しない細菌プラスミドに再クローニングし、配列決定した。選択されたクローンは、ＡＡＶ２９３細胞におけるトリプルトランスフェクションを使用して産生されたＡＡＶベクターであり、機能アッセイで使用した。
【図５】免疫原性に対するＡＡＶ８バリアントの機能評価。レポータとしてｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼを使用して、２４ウェル及び９６ウェルプレート内でＣｏｓ－７、ＬｎＣａｐ、及びＭｅｌ細胞を、同じ力価の組換えＡＡＶ２／８及びＡＡＶ２／８　Ｃ１ｍ１ベクターで形質導入した。
【図６】ＡＡＶ８カプシドのループＩＶへのペプチド挿入の比較。カプシドタンパク質ＶＰ３　ＡＡＶ８のＮ５９０位へのペプチド挿入のＣｌｕｓｔａｌ　Ｏ（１．２．４）多重配列アラインメント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｃｌｕｓｔａｌｏ／）。ＭＶｉｅｗ１．６３を、アラインメントの図表現に使用した（Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。エクスビボでのＡＡＶ８　Ｎ５９０ライブラリ選択後に得られた挿入（図６）を、野生型ＡＡＶ２及びＡＡＶ８カプシドのＮ５９０における挿入の公開されている配列：ＡＡＶ－７ｍ８（Ｋｈａｂｏｕ　ｅｔ　ａｌ，２０１６）、ＡＡＶ２．ＮＮ、ＡＡＶ２．ＧＬ（Ｐａｖｌｏｕ　ｅｔ　ａｌ，２０２１）、ＡＡＶ８＿ｌｕｎｇ，　ＡＡＶ８＿ｂｒｅａｓｔ（Ｂｕｅｎｉｎｇ　ａｎｄ　Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ，２０１９）、ＡＡＶ８＿ｌｉｂＮＧ（Ｂｏｅｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ，２０２０）と比較した。
【図７】様々なＡＡＶ－ＧＦＰ最適化クローンのレポータ蛍光の分析。ＡＲＰＥ１９細胞を、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰレポータプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃６７６３４）を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。示されるのは、ＧＦＰを発現している示されたＡＡＶバリアントで形質導入したＡＲＰＥ１９細胞の代表的な蛍光顕微鏡画像である。Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、形質導入後２４時間及び４８時間でＧＦＰ発現を実証し、それらが、眼への硝子体内注射を介してヒト臨床試験（ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ：ＮＣＴ０３３２６３３６）で現在試験されている「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、ＡＲＰＥ１９細胞を形質導入するのに効率的であり、親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドよりも実質的に効率的であることを示した。
【図８】初代網膜細胞株における様々なＡＡＶ－ＧＦＰ及びｔｄＴｏｍａｔｏ最適化クローンのレポータ蛍光の試験。ヒト初代ＲＰＥ混合培養物（継代４～７）を、ｔｄＴｏｍａｔｏレポータプラスミド（ｐＡＡＶ－ＭＣＳにクローニングされたｔｄＴｏｍａｔｏ、Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を含有するＡＡＶ、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰレポータプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃６７６３４）を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。示されるのは、ＧＦＰまたはＴｄＴｏｍａｔｏを発現している示されたＡＡＶバリアントで形質導入

したヒト初代ＲＰＥ細胞の代表的な蛍光顕微鏡画像である。Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドは、形質導入後４８時間でＧＦＰ及びｔｄＴｏｍａｔｏの発現を実証し、それらが、「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、初代ＲＰＥ細胞を形質導入するのに効率的であることを示した。親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドは、初代ＲＰＥ細胞培養物の形質導入を無効にすることを示した。

【図９－１】ＡＲＰＥ１９及び初代ＲＰＥ細胞株におけるｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ　ＡＡＶＣ１ｍ１及びＣ１ｍ２を用いた形質導入アッセイ。Ａ～Ｂ）Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、ＡＲＰＥ１９及び初代ＲＰＥ細胞におけるｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの堅牢な発現を実証した。形質導入後５日目及び７日目のルシフェラーゼの蓄積は、ＡＡＡＶ２－７ｍ８バリアント及び親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜色素細胞の形質導入においてより効率的であることを示す。相対的な形質導入効率は、５日目のＣ１ｍ２カプシドでは特に高かった（ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと比較して、最大６倍の差）。これらの差は、実験の全期間（７日間）の間観察された。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２　ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した細胞は、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントよりも顕著に高いルシフェラーゼ活性を有した（図９Ａ及びＢ）。したがって、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０におけるペプチド挿入Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２は、ヒト網膜細胞において高い形質導入効率を示した。

【図９－２】ＡＲＰＥ１９及び初代ＲＰＥ細胞株におけるｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ　ＡＡＶＣ１ｍ１及びＣ１ｍ２を用いた形質導入アッセイ。Ａ～Ｂ）Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、ＡＲＰＥ１９及び初代ＲＰＥ細胞におけるｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの堅牢な発現を実証した。形質導入後５日目及び７日目のルシフェラーゼの蓄積は、ＡＡＡＶ２－７ｍ８バリアント及び親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜色素細胞の形質導入においてより効率的であることを示す。相対的な形質導入効率は、５日目のＣ１ｍ２カプシドでは特に高かった（ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと比較して、最大６倍の差）。これらの差は、実験の全期間（７日間）の間観察された。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２　ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した細胞は、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントよりも顕著に高いルシフェラーゼ活性を有した（図９Ａ及びＢ）。したがって、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０におけるペプチド挿入Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２は、ヒト網膜細胞において高い形質導入効率を示した。（続き）

【図１０】修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、効率的にヒト網膜外植片を形質導入する。Ａ～Ｂ。Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、形質導入後１日目及び２日目にｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの堅牢な発現を実証し、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアント及び親ＡＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜外植片を形質導入することにおいてより効率的であることを示した。相対的な形質導入効率は、２日目のＣ１ｍ２カプシドでは特に高かった（ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと比較して、最大２０倍の差）。これらの差は、実験の全期間（１４日間）の間継続された。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した網膜外植片は、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントよりも顕著に高いルシフェラーゼ活性を有した（図１０Ｂ）。したがって、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０におけるペプチド挿入Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２は、ヒト網膜外植片の高い形質導入効率を示した。ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントはまた、第１世代ＡＡＶバリアントと比較して、成熟光受容体細胞、ミュラー細胞、及び神経節細胞の形質導入においてより効率的であった。

【図１１】修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、ヒト網膜色素上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片を形質導入した。Ａ～Ｂ。Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方は、形質導入後１日目及び２日目に網膜外植片においてｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの発現を実証し、「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、ヒトＲＣＳ外植片を形質導入するのに効率的であり、親ＡＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドよりも

効率的であることを示した。
【図１２－１】修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、異なる細胞タイプを効率的に形質導入する。Ａ～Ｂ。眼黒色腫細胞株Ｍｅｌ２９０、９２－１（Ａ）、ＬＸ２肝星細胞、Ｈｕｈ７肝細胞癌細胞（Ｂ）、及び形質転換されたヒト臍帯静脈内皮細胞、ＥＡ．ｈｙ９２６（Ｃ）を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで三回形質導入した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中２×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。
【図１２－２】修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、異なる細胞タイプを効率的に形質導入する。Ａ～Ｂ。眼黒色腫細胞株Ｍｅｌ２９０、９２－１（Ａ）、ＬＸ２肝星細胞、Ｈｕｈ７肝細胞癌細胞（Ｂ）、及び形質転換されたヒト臍帯静脈内皮細胞、ＥＡ．ｈｙ９２６（Ｃ）を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで三回形質導入した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中２×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。（続き）
【図１３】修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規のＡＡＶ８バリアントによって、ラット網膜上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片、ならびに初代ラットＲＰＥ細胞株を形質導入する。Ａ．ラットＲＣＳ外植片を、ｓｅｃＮａＮｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。ヒト及びラットＲＣＳ外植片を用いた実験間のＲＬＵの直接比較を可能にするように獲得値を調整した。複数の

時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。Ｂ．１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、初代ラットＲＰＥ混合細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。ヒト及びラット細胞培養物を用いた実験間のＲＬＵの直接比較を可能にするように獲得値を調整した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。

【図１４】修飾されたカプシドＣ１ｍ１及びＣ１ｍ２を使用した、初代ＲＰＥ細胞株における潜在的な治療用遺伝子ＩＬ１０による形質導入アッセイ。初代ヒトＲＰＥ細胞を、ＩＬ１０遺伝子を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。Ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２）、ＩＬ－１０－ｐＡＡＶ、及びＰｈｅｌｐｅｒプラスミドをＡＡＶ２９３細胞株（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）に三回トランスフェクションすることによって、ＡＡＶベクターを調製した。非特異的対照として、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＴｄＴｏｍａｔｏを使用した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中５×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。１００μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって推奨されるようにＩＬ１０　ＥＬＩＳＡキットを使用するＩＬ１０タンパク質の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。

【図１５】エンドスタチン－アンジオスタチン融合タンパク質を発現する修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、エクスビボでのヒト外植片における脈絡膜発芽を調節する。Ａ．分泌されたエンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を含有し、Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで、１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で４８時間の間３回、網膜外植片を形質導入した。エンドスタチン－アンジオスタチンＡＡＶを、外植片当たり２×１０^{9}ｖｇで添加した。分泌されたエンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子をｐＡＡＶ－ＭＣＳ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）にクローニングした。ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータを使用して、分泌されたエンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を発現させた。対照外植片は、未治療のままにしたか、または蛍光レポータ遺伝子を含有する非特異的ＡＡＶで治療した。外植片由来の脈絡膜芽を７日目に撮影した。個々の外植片を、４倍の倍率で、Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＩＸ７３顕微鏡で位相差光学系を使用して撮影した。脈絡膜発芽の代表的な画像を示す。Ｂ．発芽面積は、ＦＩＪＩ／Ｉｍａｇｅ　Ｊを使用して定量化した（Ｓｃｈｉｎｄｅｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ，２０１２）。Ｃ．エンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を発現するＡＡＶ－Ｃ１ｍ２による形質導入後の発芽面積の定量化結果を示す（ｎ＝３つの生物学的複製物）。

【００６６】

配列表の説明

配列番号１－アミノ酸配列、カプシド挿入

配列番号２～１０８－アミノ酸配列、カプシド挿入

配列番号１０９－アミノ酸配列、カプシド挿入

配列番号１１０－アミノ酸配列、カプシド挿入
配列番号１１１－アミノ酸リンカー配列
配列番号１１２－アミノ酸リンカー配列
配列番号１１３－核酸配列、ＡＡＶ２　ｒｅｐ及びＡＡＶ８遺伝子を含む野生型ＡＡＶ配列
配列番号１１４－核酸配列、ＡＡＶ２　ｒｅｐ及びＡＡＶ８遺伝子、ならびにｐ５プロモータを含む野生型ＡＡＶ配列
配列番号１１５－核酸配列、ＡＡＶ２　ｒｅｐ及びＡＡＶ８遺伝子、ｐ５プロモータ及びｐ５エンハンサを含む野生型ＡＡＶ配列
配列番号１１６－核酸配列、ＡＡＶ２　ｒｅｐ及びＡＡＶ８遺伝子、ｐ５プロモータ、ｐ５エンハンサ、ならびに変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを含むＡＡＶ配列
配列番号１１７－核酸配列、ＡＡＶ２　ｒｅｐ及びＡＡＶ８遺伝子、ｐ５プロモータ、ｐ５エンハンサ、ならびに変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを含むＡＡＶ配列（Ｎ５９０にランダム挿入を有するライブラリの構築に使用される親ベクター）
配列番号１１８－核酸配列、ｐ５プロモータ
配列番号１１９－核酸配列、ｐ５エンハンサ
配列番号１２０－核酸配列、野生型ＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１２１－アミノ酸配列、野生型ＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１２２－核酸配列、野生型ＡＡＶ２　ｒｅｐ
配列番号１２３－アミノ酸配列、野生型ＡＡＶ２　ｒｅｐ
配列番号１２４－核酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１２５－アミノ酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１２６：核酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８　ｃａｐ（Ｎ５９０にランダム挿入を有する）
配列番号１２７－アミノ酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８　ｃａｐ
（Ｎ５９０にランダムな挿入を有する）
配列番号１２８－核酸配列、リンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入
配列番号１２９－アミノ酸配列、リンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入
配列番号１３０－アミノ酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有する挿入を含むＶＰ３配列
配列番号１３１－アミノ酸配列、リンカー配列による挿入を含むＶＰ３配列
配列番号１３２－アミノ酸配列、Ｃ１ｍｕｔ１挿入を含むＶＰ３配列
配列番号１３３－アミノ酸配列、リンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入を含むＶＰ３配列
配列番号１３４－核酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖ、及びリンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入を有するＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１３５－アミノ酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖ、及びリンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入を有するＡＡＶ８　ｃａｐ
配列番号１３６－核酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖ、及びリンカー配列によるＣ１ｍｕｔ１挿入を有する、ＡＡＶ２　ｒｅｐ配列及びＡＡＶ８　ｃａｐ配列を有するＡＡＶ配列
配列番号１３７－核酸配列、リンカー配列によるＣ１ｍｕｔ２挿入
配列番号１３８－アミノ酸配列、リンカー配列によるＣ１ｍｕｔ２挿入
配列番号１３９－アミノ酸配列、挿入Ｃ１ｍｕｔ２、及び変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを含むＶＰ３配列
配列番号１４０－アミノ酸配列、リンカー配列による挿入Ｃ１ｍｕｔ２、及び変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを含むＶＰ３配列
配列番号１４１－核酸配列、リンカー配列による挿入Ｃ１ｍｕｔ２、及び変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８カプシド

配列番号１４２－アミノ酸配列、リンカー配列による挿入Ｃ１ｍｕｔ２、変異Ｙ４４７Ｆ Ｙ７３３Ｆ Ｔ４９４Ｖを有するＡＡＶ８カプシド
配列番号１４３－核酸配列、変異Ｙ４４７Ｆ Ｙ７３３Ｆ Ｔ４９４Ｖ、及びリンカー配列によるＣ１ｍｕｔ２挿入を有する、ＡＡＶ２ ｒｅｐ配列及びＡＡＶ８ ｃａｐ配列を有するＡＡＶ配列
【発明を実施するための形態】
【００６７】
一般的な技術及び定義
特に具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、（例えば、細胞培養、分子遺伝学、細胞生物学、タンパク質化学、及び生化学における）当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有すると解釈されるものとする。
【００６８】
特に示されない限り、本開示で利用される分子技法及び統計技法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技法は、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ，１９８４、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９、Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（編集者）１９９１、Ｄ．Ｍ．Ｇｌｏｖｅｒ ａｎｄ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（編集者）１９９５ ａｎｄ １９９６、及び現在までの全ての更新を含むＦ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（編集者）１９８８、Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（編集者）（現在までの全ての更新を含む）などの文献を通じて記載され、説明されている。
【００６９】
本明細書及び添付の請求項で使用されるように、単数形の用語、ならびに単数形の「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、例えば、任意選択的に、文脈が特に明らかに指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「治療用分子」への言及は、任意選択的に、１つ以上の治療用分子を含む。
【００７０】
「及び／または」という用語、例えば、「Ｘ及び／またはＹ」は、「Ｘ及びＹ」または「ＸまたはＹ」のいずれかを意味することが理解されるものとし、両方の意味またはいずれかの意味のための明示的な裏付けを提供するものと解釈されるものとする。
【００７１】
本明細書全体を通じて、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、または「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「含むこと」などの変化形は、記述されたエレメント、整数、もしくは工程、またはエレメント、整数、もしくは工程の群の包含を意味するが、任意の他のエレメント、整数、もしくは工程、またはエレメント、整数もしくは工程の群の除外を意味しないことが理解されるであろう。
【００７２】
一般に、「約」という用語及び範囲の使用は、約という用語によって修飾されるかどうかにかかわらず、理解される数が本明細書に記載の正確な数に限定されないことを意味し、本発明の範囲から逸脱することなく、実質的に引用される範囲内の範囲を指すことが意図される。本明細書で使用される場合、「約」は、当業者によって理解され、それが使用される文脈に対してある程度変動するであろう。当業者にとって明らかではない用語の使用がある場合、それが使用される文脈を考慮して、「約」は、特定の用語の最大プラスまたはマイナス１０％、より好ましくは５％、より好ましくは１％を意味する。
【００７３】
カプシド修飾
本発明は、標的細胞における形質導入の改善及び／または免疫原性の低減を提供する修飾されたアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）カプシドタンパク質の生成を対象とする。
【００７４】
ＡＡＶシェルは、６０コピーのウイルスタンパク質（ＶＰ）、ＶＰ１（８７ｋＤａ）、ＶＰ２（７３ｋＤａ）、及びＶＰ３（６１ｋＤａ）から組み立てられる。各ＶＰサブユニ

ットの保存されたコアは、８本鎖のβバレルモチーフ及びαヘリックスからなる（Ｘｉｅｅｔ　ａｌ．，２００２）。カプシドの外側表面は、βバレルの鎖を接続する大きなループによって形成される。例えば、ＡＡＶ８のアミノ酸５８１～６０１からの残基は、ＶＰサブユニットの指様ループを包含し、ＶＲ－ＶＩＩＩを形成し、Ｎａｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７における命名法と一致する。これらのループのアミノ酸配列及び構造トポロジーは、組織向性及び形質導入効率を促進することが報告されている（Ａｇｂａｎｄｅ－ＭｃＫｅｎｎａ　ａｎｄ　Ｋｌｅｉｎｓｃｈｍｉｄｔ，２０１１）。さらに、これらの残基は、ＶＰ間の対称的相互作用を通じて形成された、二十面体３回転軸を囲む突起の上部に寄与する。したがって、この配列は、カプシド上で主要な位置を保持する。この領域は、いくつかの血清型において、ヘパリン硫酸結合及び細胞取り込みに重要であることが示されている部位を含む。

【００７５】

ＡＡＶカプシドは、３つの重複するコード配列からなり、これらは、代替的な開始コドン使用に起因して長さが変動し、相互作用して、二十面体対称性のカプシドを形成する。これらの可変タンパク質は、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３として言及され、ＶＰ１は最長であり、ＶＰ３は最短である。ＡＡＶ粒子は、約１：１：１０（ＶＰ１：ＶＰ２：ＶＰ３）の比の３つ全てのカプシドタンパク質からなる。Ｎ末端でＶＰ１及びＶＰ２に含まれるＶＰ３は、粒子を構築する主要な構造的構成要素である。Ｐ４０を示す、同じプロモータによって制御されるカプシドタンパク質は、同じｍＲＮＡから翻訳される。

【００７６】

本明細書に記載のカプシドタンパク質は、いくつかの異なる付番システムを使用して言及される場合がある。便宜上、本明細書で使用される場合、ＡＡＶ配列は、ＶＰ１の最初の残基のアミノ酸１で始まるＶＰ１の付番を使用して言及され、次いで、順番に付番される（すなわち、アミノ酸２、３、４、５、６など）。しかしながら、本明細書に記載のカプシドタンパク質は、タンパク質の対応する領域に挿入を有するＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３（本明細書ではｖｐ１、ｖｐ２、及びｖｐ３と互換的に使用される）を含む。ＡＡＶ８では、可変タンパク質は、全長ＶＰ１の付番を使用して、ＶＰ１（アミノ酸１～７３８）、ＶＰ２（アミノ酸１３８～７３８）、及びＶＰ３（アミノ酸２０３～７３８）に対応する。明確にするために、挿入を指す場合、特定のＶＰカプシド配列の第１のアミノ酸をアミノ酸１として使用する場合、一般に、ＡＡＶ８のＶＰ１のアミノ酸５９０、ＶＰ２のアミノ酸５９０、またはＶＰ３のアミノ酸５９０における挿入を指す。

【００７７】

一実施形態では、挿入は、ＡＡＶ８カプシドタンパク質のループＩＶ、領域６、もしくは可変領域ＶＩＩＩに、またはＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置にある。付番システム、ループ、領域、及び可変領域の指定は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｒａｕｐｐ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２で使用される命名法及び命名と一致する。

【００７８】

一実施形態では、本発明の修飾されたカプシドタンパク質を生成するために、野生型ＡＡＶ８血清型のカプシドが使用される。野生型ＡＡＶ８血清型のアミノ酸配列の一例は、配列番号１２１に従って示される。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「野生型」という用語は、本発明のカプシドタンパク質の挿入のない天然ＡＡＶ配列を指す。これは、「親」という用語と互換的に使用され得、他の天然で存在しない修飾を含有する配列を含み得る。言い換えれば、自然に存在するＡＡＶは、修飾が行われる野生型配列の源であり得るが、天然で存在しないＡＡＶは、限定されないが、組換え、修飾、または改変、キメラ、ハイブリッド、合成、人工などを含む。ＡＡＶは、本明細書に記載の挿入が導入される出発物質として使用され得る。これは、本発明の主題以外のカプシドの領域に挿入、変異、または置換を有するＡＡＶを含む。例えば、ＡＡＶは、本発明の組換えカプシドタンパク質が挿入される配列として使用され得る

変異Ｙ４４７Ｆ　Ｙ７３３Ｆ　Ｔ４９４Ｖ（例えば、配列番号１２５による配列）のうちの１つ以上または全てを含み得る。

【００８０】

修飾されたＡＡＶカプシドタンパク質またはＡＡＶ粒子の使用が企図される場合、「修飾された」という用語は、本明細書に記載の挿入を含むＡＡＶカプシドタンパク質またはＡＡＶ粒子を指すことが理解されるであろう。しかしながら、修飾されたＡＡＶカプシドタンパク質またはＡＡＶ粒子は、例えば、形質導入効率を改善する目的で、他の修飾（例えば、変異）を含有してもよい。

【００８１】

修飾されたカプシドタンパク質を生成するためにＡＡＶ８血清型が使用されることが好ましいが、他のＡＡＶ血清型カプシドの相同領域における修飾も本発明によって包含されることが理解されるであろう。例えば、限定されないが、ｐｉ．１、ｐｉ．２、ｐｉ．３、ｒｈ．３８：ｒｈ．４０；ｒｈ．４３；ｒｈ．４９；ｒｈ．５０、ｒｈ．５１；ｒｈ．５２；ｒｈ．５３；ｒｈ．５７；ｒｈ．５８；ｒｈ．６１；ｒｈ．６４；ｈｕ．６；ｈｕ．１７；ｈｕ．３７；ｈｕ．３９；ｈｕ．４０；ｈｕ．４１；ｈｕ．４２；ｈｕ．６６；及びｈｕ．６７を含む、野生型配列として有用である他のＡＡＶが挙げられる。野生型配列として有用であるなお他のＡＡＶとしては、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ９、及びｓｈＨ１０ＡＡＶが挙げられる。別の実施形態では、ＡＡＶ野生型配列は、クレードＥ　ＡＡＶである。別の実施形態では、ＡＡＶ野生型配列は、クレードＤ　ＡＡＶである。クレードは、互いに系統発生学的に関連するＡＡＶの群であり、ＡＡＶ　ｖｐ１アミノ酸配列のアラインメントに基づいて、（少なくとも１０００反復のうちの）少なくとも７５％のブートストラップ値及び０．０５以下のポアソン補正距離測定値による近隣結合アルゴリズムを使用して決定される。近隣結合アルゴリズムは、文献に広く記載されている。例えば、Ｍ．Ｎｅｉ　ａｎｄ　Ｓ．Ｋｕｍａｒ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｔｉｃｓ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　２０００）を参照されたい。

【００８２】

クレードＥは、前述のＡＡＶ８（Ｇａｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００２）、４３．１ｒｈ．２；４４．２／ｒｈ．１０：ｒｈ．２５；２９．３／ｂｂ．１；及び２９．５／ｂｂ．２、米国特許公開第ＵＳ２００３／０１３８７７７２Ａ１号を含有することを特徴とする。追加のクレードＥ配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第７，０９６，１１１号に記載されている。ＡＡＶ７は、クレードＤに属し、８５～８８％のａａ配列同一性の範囲のＶＰ１またはＶＰ３アミノ酸配列に基づいて、クレードＥメンバーＡＡＶ８及びＡＡＶ１０に最も近く関連する。ＡＡＶ７をＡＡＶ８に重ねると、全体的なＣαＲＭＳＤは、０．７５Åであり、構造的同一性は９３％であり、これは、０．９２Åの上述のＡＡＶ２と比較してわずかに低い（Ｍｉｅｔｚｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０２１）。

【００８３】

ＡＡＶ粒子の形質導入効率は、カプシドの表面に露出したアミノ酸残基の性質によって決定することができるので（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）、カプシドタンパク質のアミノ酸を操作することは、形質導入効率を改変させる１つのアプローチである。しかしながら、カプシドタンパク質の特定のアミノ酸の置換は、カプシドタンパク質を誤って折り畳むことを引き起こす場合がある。誤った折り畳みを最小限に抑えるための１つのアプローチは、カプシド内のみで可変領域に修飾を行うことである。例として、ＡＡＶ８のカプシドの可変領域を以下の表１に列挙する。

【００８４】

【表１】

表１：ＡＡＶ８カプシドの可変領域

可変領域	対応するアミノ酸
VRI	261-273
VRII	325-330
VRIII	381-384
VRIV	450-466
VRV	490-503
VRVI	527-532
VRVII	545-556
VRVIII	581-601
VRIX	704-713

【００８５】

本明細書の実施例に記載の方法によるＡＡＶ８カプシドライブラリのスクリーニングによって、修飾されたカプシドタンパク質を含まないＡＡＶ粒子と比較した場合の、形質導入効率の増加及び免疫原性の低減を示す修飾されたＡＡＶ８バリアントカプシドタンパク質の同定に至った。

【００８６】

いくつかの実施形態では、修飾された組換えＡＡＶ（例えば、ＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、いずれか１つの可変領域（ＶＲ）（例えば、ＶＲＩ、ＶＲＩＩ、ＶＲＩＩＩ、ＶＲＩＶ、ＶＲＶ、ＶＲＶＩ、ＶＲＶＩＩ、ＶＲＶＩＩＩ、またはＶＲＩＸ）に、好ましくはＶＲＶＩＩＩに、１つ以上のアミノ酸挿入を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の挿入に加えて、組換えｒＡＡＶ（例えば、バリアントｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、２つ以上の可変領域（例えば、ＶＲＩ及びＶＲＩＩ、ＶＲＩ及びＶＲＶＩＩ、ＶＲＶ及びＶＲＶＩＩ、ＶＲＶ及びＶＲＩ及びＶＲＶＩＩ、またはＶＲＩＶ及びＶＲＩＩ）に１つ以上のアミノ酸変異を有し得る。本明細書に開示の組換えｒＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、２つ以上の可変領域の任意の組み合わせに１つ以上のアミノ酸変異を有し得、本明細書の例に限定されないことが理解されるべきである。

【００８７】

一例では、組換えｒＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、ＡＡＶ　ＶＰ１、ＶＰ２、もしくはＶＰ３タンパク質の可変領域のうちのいずれか１つ、またはそれらの任意の組み合わせに挿入を有する。単一の遺伝子によってコードされる場合、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３が、それらのアミノ酸の大部分を共有することが当該技術分野において知られている。具体的には、ＶＰ３配列全体はまた、ＶＰ２及びＶＰ１内に含有される。したがって、当業者は、本明細書に記載のカプシド修飾がＶＰ３に対して行われるが、修飾はまた、ＡＡＶカプシドのＶＰ１及びＶＰ２、好ましくはＶＰ３のＶＲ－ＶＩＩＩ内、最も好ましくはＶＰ３のＶＲ－ＶＩＩＩのアミノ酸位置５９０に適用可能であることを理解するであろう。好ましくは、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３カプシドタンパク質は、ＡＡＶ８血清型に属する。

【００８８】

当業者は、当該技術分野における既知の方法に基づいて、ＡＡＶ８以外のＡＡＶ血清型のカプシドタンパク質の対応する位置を決定する方法を理解するであろう。例えば、ＡＡＶアミノ酸の配列アラインメントは、Ｎａｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７で採用されたアプローチに従って、アミノ酸配列の差を決定するために行うことができる。一例では、ＣｌｕｓｔａｌＷなどの多重配列アラインメントプログラムが使用され得る。

【００８９】
本発明は、好ましくは、配列番号１による修飾を含む組換えＡＡＶカプシドの使用を企図するが、配列番号１による修飾を含む組換えＡＡＶカプシドの効果と比較すると、形質導入効率を維持または増加させる（または同様のまたは増加された免疫原性を示す）かのいずれかの保存的バリエーションを含有するアミノ酸配列も本発明に包含されることが理解されるであろう。配列番号１、配列番号１０９、または配列番号１１０と比較すると、形質導入効率を維持もしくは増加させる（または同様のまたは増加された免疫原性を示す）かのいずれかの保存的バリエーションを含有する配列は、本発明の範囲内に収まる機能的等価物であるとみなされる。したがって、一例では、配列番号１、配列番号１０９、または配列番号１１０の機能的等価物（すなわち、形質導入効率が維持されているかまたは増加している）は、本発明の範囲内に収まる。
【００９０】
そのような保存的アミノ酸変化の詳細が表２に提供されている。当業者が認識するであろうように、そのような小さな変化は、組換え細胞で発現されると、ポリペプチドの活性を変化させないと合理的に予測することができる。そのような配列は、ポリペプチド分子中の少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、その位置に異なる残基が挿入されている。これらの部位は、所望の活性を維持するために、比較的保存的な様式で置換されることが好ましい。
【００９１】

【表２】

表２：例示的な置換。

元の 残基	例示的な 置換
Ala(A)	val;leu;ile;gly
Arg(R)	lys
Asn(N)	gln;his
Asp(D)	glu
Cys(C)	ser
Gln(Q)	asn;his
Glu(E)	asp
Gly(G)	pro、ala
His(H)	asn;gln
Ile(I)	leu;val;ala
Leu(L)	ile;val;met;ala;phe
Lys(K)	arg
Met(M)	leu;phe
Phe(F)	leu;val;ala
Pro(P)	gly
Ser(S)	thr
Thr(T)	ser
Trp(W)	tyr
Tyr(Y)	trp;phe
Val(V)	ile;leu;met;phe、ala

【００９２】

したがって、一実施形態では、修飾された組換えＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、表２に列挙される修飾のうちのいずれか１つ以上を含み、したがって、配列番号２～１０８のうちのいずれか１つによる配列を有する。

【００９３】

【表３－１】

表３：ＡＡＶカプシド挿入の例

修飾	修飾	修飾
GNRVD(配列番号 1)	GNRLD(配列番号 39)	GHRID(配列番号 77)
PNRVD(配列番号 2)	GNRMD(配列番号 40)	GHRLD(配列番号 78)
ANRVD(配列番号 3)	GNRFD(配列番号 41)	GHRMD(配列番号 79)
GQRVD(配列番号 4)	GNRAD(配列番号 42)	GHRFD(配列番号 80)
GHRVD(配列番号 5)	PNRID(配列番号 43)	GHRAD(配列番号 81)
PQRVD(配列番号 6)	PNRLD(配列番号 44)	PQRID(配列番号 82)
PHRVD(配列番号 7)	PNRMD(配列番号 45)	PQRLD(配列番号 83)
AQRVD(配列番号 8)	PNRFD(配列番号 46)	PQRMD(配列番号 84)
AHRVD(配列番号 9)	PNRAD(配列番号 47)	PQRFD(配列番号 85)
GNKVD(配列番号 10)	ANRID(配列番号 48)	PQRAD(配列番号 86)
PNKVD(配列番号 11)	ANRLD(配列番号 49)	PHRID(配列番号 87)
ANKVD(配列番号 12)	ANRMD(配列番号 50)	PHRLD(配列番号 88)
GQKVD(配列番号 13)	ANRFD(配列番号 51)	PHRMD(配列番号 89)
GHKVD(配列番号 14)	ANRAD(配列番号 52)	PHRFD(配列番号 90)
PQKVD(配列番号 15)	GQRID(配列番号 53)	PHRAD(配列番号 91)
PHKVD(配列番号 16)	GQRLD(配列番号 54)	AQRID(配列番号 92)
AQKVD(配列番号 17)	GQRMD(配列番号 55)	AQRLD(配列番号 93)
AHKVD(配列番号 18)	GQRFD(配列番号 56)	AQRMD(配列番号 94)
GNRID(配列番号 19)	GQRAD(配列番号 57)	AQRFD(配列番号 95)
AQRAD(配列番号 20)	ANKFD(配列番号 58)	PHKMD(配列番号 96)
AHRID(配列番号 21)	ANKAD(配列番号 59)	PHKFD(配列番号 97)
AHRLD(配列番号 22)	GQKID(配列番号 60)	PHKAD(配列番号 98)
AHRMD(配列番号 23)	GQKLD(配列番号 61)	AQKID(配列番号 99)
AHRFD(配列番号 24)	GQKMD(配列番号 62)	AQKLD(配列番号 100)
AHRAD(配列番号 25)	GQKFD(配列番号 63)	AQKMD(配列番号 101)
GNKID(配列番号 26)	GQKAD(配列番号 64)	AQKFD(配列番号 102)
GNKLD(配列番号 27)	GHKID(配列番号 65)	AQKAD(配列番号 103)
GNKMD(配列番号 28)	GHKLD(配列番号 66)	AHKID(配列番号 104)
GNKFD(配列番号 29)	GHKMD(配列番号 67)	AHKLD(配列番号 105)

【００９４】

【表３－２】

GNKAD(配列番号 30)	GHKFD(配列番号 68)	AHKMD(配列番号 106)
PNKID(配列番号 31)	GHKAD(配列番号 69)	AHKFD(配列番号 107)
PNKLD(配列番号 32)	PQKID(配列番号 70)	AHKAD(配列番号 108)
PNKMD(配列番号 33)	PQKLD(配列番号 71)	
PNKFD(配列番号 34)	PQKMD(配列番号 72)	
PNKAD(配列番号 35)	PQKFD(配列番号 73)	
ANKID(配列番号 36)	PQKAD(配列番号 74)	
ANKLD(配列番号 37)	PHKID(配列番号 75)	
ANKMD(配列番号 38)	PHKLD(配列番号 76)	

【００９５】

当業者は、表２に概説されるものなどの保存的アミノ酸変化を行うことによって、配列ＧＮＲＶＤＡＨ（配列番号１０９）及びＧＮＲＶＤＤＦ（配列番号１１０）に同様の修飾を行うことができることを理解するであろう。

【００９６】

「ペプチド」という用語は、「ポリペプチド」という用語と互換的に使用される。ポリペプチドまたはポリペプチドのクラスは、参照アミノ酸配列に対するそのアミノ酸配列の同一性の程度（同一性％）によって、またはある参照アミノ酸配列に対する同一性が別のものよりも高い同一性％を有することによって定義することができる。参照アミノ酸配列に対するポリペプチドの同一性％は、典型的には、ギャップ作成ペナルティ＝５、及びギャップ延長ペナルティ＝０．３のパラメータを用いるＧＡＰ分析（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０；ＧＣＧプログラム）によって決定される。一実施形態では、クエリ配列は、少なくとも５アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、少なくとも５つのアミノ酸の領域にわたって２つの配列を整列させる。別の実施形態では、クエリ配列は、少なくとも６アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、少なくとも６つのアミノ酸の領域にわたって２つの配列を整列させる。別の実施形態では、クエリ配列は、少なくとも７アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、少なくとも７つのアミノ酸の領域にわたって２つの配列を整列させる。さらにより好ましくは、ＧＡＰ分析は、参照アミノ酸配列の全長にわたって２つの配列を整列させる。ポリペプチドまたはポリペプチドのクラスは、参照ポリペプチド（例えば、配列番号１）と同じ活性、または異なる活性、またはより良好な活性を有し得る。一実施形態では、修飾された組換えＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、表３に列挙される修飾のうちのいずれか１つ以上に対してある程度の相同性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【００９７】

例えば、組換えＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、関連する指定された配列番号、好ましくは配列番号１に対して、少なくとも３５％、より好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも４５％、より好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも５５％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも６５％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも７６％、より好ましくは少なくとも８０％、より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９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４

％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、及びさらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一であるアミノ酸配列を含み得る。修飾された組換えＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質が、指定された配列番号に対して１００％同一性を有するアミノ酸配列を含み得る場合、アミノ酸配列は、指定された配列番号に対して同一である。

【００９８】

別の例では、組換えＡＡＶ（例えば、組換えｒＡＡＶ８）カプシドタンパク質は、配列番号１に従って定義される配列とは異なる１つ、２つ、または３つのアミノ酸を含み得る。好適なペプチドの例が、表３に概説されている。

【００９９】

当業者は、カプシド挿入がスペーサを含有し得ることを理解するであろう。本発明における使用に好適なスペーサの一例は、リンカーである。「リンカー」または「リンカー領域」という用語は、任意選択的に、アミノ酸５９０に対応する位置で、カプシド遺伝子内の上のカプシド挿入のうちのいずれかを一緒に連結する、約１～３０個のアミノ酸のオリゴまたはポリペプチド領域を指す。任意選択的に、短い、例えば、２～１０アミノ酸長のオリゴまたはポリペプチドリンカーは、カプシド挿入とカプシド遺伝子の配列との間の連結を形成し得る。グリシン－セリン二重鎖は、好適なリンカーの一例である。例えば、一態様では、リンカーは、それぞれ、配列番号１１１及び１１２によるＴＧ及び／またはＧＬＳのアミノ酸配列を含む。別の例では、リンカーは、ＧＧＧＳ、ＧＧＧＳＧＧＧＳ、またはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳのアミノ酸配列を含む。好ましくは、リンカーは、アミノ酸Ｇ及びＡによって形成された短い配列を含む。当業者は、本明細書に記載の本発明における使用に好適なリンカーを決定する場合、リンカーは、多くの場合、Ｇ、Ａ、Ｓアミノ酸で構成され、配列は、それらの特性及びＡＡＶ可塑性ループとの相互作用に基づいて決定することができることを理解するであろう。

【０１００】

形質導入効率及び免疫原性

本発明の一実施形態では、標的細胞におけるＡＡＶ粒子の形質導入効率を増加させるための方法が提供される。形質導入効率は、修飾されたカプシドを有する本発明のＡＡＶ粒子が、例えば、治療用分子またはレポータ遺伝子を含み得るＡＡＶ粒子の発現カセット内に含有される遺伝子の発現の増加を生じる能力を含むと理解される。代替的に、形質導入効率の増加は、例えば、ＡＡＶ粒子自体の発現レベルを測定することによって（すなわち、ウエスタンブロットによってＶＰ１、２、または３タンパク質の発現を決定することによって）、またはベクターゲノム量を測定することによって決定することができる。ベクターゲノムは、当該技術分野において既知の方法、または本明細書の実施例に記載の方法を使用して測定することができる。例えば、ＤＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮＡキットを使用して、研究エンドポイントで標的組織（例えば、眼）から、及びｄｄＰＣＲによって定量可能なベクターコピー（ベクターゲノム）から単離され得る。

【０１０１】

形質導入効率の増加は、同じ細胞、組織、または器官タイプにおいて、修飾されたカプシドを有するＡＡＶ粒子を修飾されたカプシドを含まない親ＡＡＶ粒子と比較することによって評価されることが意図される。例えば、図２Ｂに記載のＡＡＶ８修飾カプシド遺伝子を含むＡＡＶ粒子の使用が企図される場合、相対的な比較は、修飾されたカプシドを含まない同一のＡＡＶ粒子に対するものである。形質導入効率の増加の評価はまた、標的細胞の感染性の増加として知られている場合があり、本明細書の実施例に概説される方法を含む、当該技術分野において既知の方法によって決定することができる。一例では、ベクターゲノムの測定が評価され得る。この場合、標的組織、細胞、または器官におけるベクターゲノムの量の増加を確認することによって、カプシド修飾を伴わないＡＡＶ粒子の効果と比較した場合の形質導入効率の増加が示される。別の方法では、ＡＡＶ粒子がＧＦＰなどのレポータを含む場合、ＦＡＣＳが利用され得る。この場合、標的組織、細胞、また

は器官からのＧＦＰシグナルの量の増加を確認することによって、カプシド修飾を伴わないＡＡＶ粒子の効果と比較した場合の形質導入効率の増加が示される。さらに、追加の例としては、画像分析を用いた画像サイトメトリーまたは蛍光顕微鏡法を挙げることができる。

【０１０２】

標的細胞、組織、または器官を形質導入するために、本明細書に開示のＡＡＶ粒子、またはｒＡＡＶ粒子を含む組成物のうちのいずれか１つが使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のＡＡＶ粒子を使用して形質導入される細胞、組織、または器官は、発現カセット内に含まれる目的の遺伝子で形質導入される。いくつかの事例では、遺伝子は、眼障害の治療に有用性を有する治療用分子である。いくつかの実施形態では、細胞、組織、または器官は、インビトロ設定で形質導入され得、細胞、組織、または器官が、培地でインキュベートまたは灌流される。細胞は、ある特定の条件下で培養された多くの細胞のうちの１つ、または収穫された器官の一部、オルガノイドの一部、または生物であり得る。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、細胞、組織、または器官は、例えば、疾患を治療する目的で、インビボで形質導入される。いくつかの実施形態では、そのようなｒＡＡＶ粒子は、治療用タンパク質またはＲＮＡをコードする目的の遺伝子（すなわち、治療用分子）を含む。いくつかの実施形態では、眼（または両目）または脳の細胞または組織を形質導入するための組成物が提供される。いくつかの実施形態では、眼（または両目）または脳における特定の組織が標的とされる。例えば、網膜または網膜の１つ以上の細胞タイプが標的とされ得る。この場合、標的細胞としては、光受容体、網膜神経節細胞、双極細胞、線維柱帯、網膜色素上皮細胞、アマクリン細胞、星形細胞、水平細胞、ミクログリア、またはミュラーグリアを挙げることができる。

【０１０４】

本明細書で使用される場合、「眼細胞」という用語は、眼における、または眼の機能と関連付けられた任意の細胞を指す。この用語は、桿体、錐体、及び光感受性神経節細胞、網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞、ミュラー細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞を含む、光受容体細胞のうちのいずれか１つ以上を指す場合がある。一実施形態では、眼細胞は、双極細胞である。別の実施形態では、眼細胞は、水平細胞である。別の実施形態では、眼細胞は、神経節細胞である。

【０１０５】

本発明の別の例では、ＡＡＶ粒子またはその組成物は、ＡＡＶ粒子または組成物が標的細胞、組織、または器官に投与されると生じ得る免疫応答の低減（すなわち、免疫原性の低減）において有用性を有する。いくつかの事例では、ＡＡＶ粒子が、ヒト集団の高い割合に感染することが示されている親野生型ウイルスと高い相同性を有する場合、ＡＡＶ粒子の投与は、対象において免疫応答を誘導することができる。これは、典型的には、ＡＡＶ粒子の形質導入効率に対する制限を提示している。野生型ＡＡＶに対する体液性及び細胞媒介性免疫の両方が、健康なドナーにおいて記録されており、少なくとも抗ＡＡＶ抗体の場合、遺伝子移入の転帰に潜在的に高い影響を有することが示されている。いくつかの要因がｒＡＡＶベクターの全体的な免疫原性に寄与し得るが、ベクター設計及び総ベクター用量は、免疫媒介性毒性の原因となるようである。本明細書に記載の修飾されたカプシドを有するＡＡＶ粒子を使用することによって、標的細胞、組織、または器官に投与されると、免疫応答の低減が観察されることが想定され、これは、形質導入効率を増加させ得る。

【０１０６】

免疫応答の低減または免疫原生の低減は、同じ細胞、組織、または器官タイプにおいて、修飾されたカプシドを有するＡＡＶ粒子を修飾されたカプシドを含まない親ＡＡＶ粒子と比較することによって評価することができる。例えば、図２Ｂに記載のＡＡＶ８修飾カプシド遺伝子を含むＡＡＶ粒子の使用が企図される場合、相対的な比較は、修飾されたカ

プシドを含まない同一のＡＡＶ粒子に対するものである。免疫原生の低減の評価は、本明細書の実施例に概説されている方法を含む、当該技術分野において既知の方法によって決定することができる。一例では、血清ウイルス中和（ＳＶＮ）アッセイが使用され得る。別の例では、免疫応答の機能的能力の評価は、エクスビボで（すなわち、短期または長期培養で単離され、研究された細胞の）特定の細胞機能を測定することによって行うことができる。

【０１０７】

ＡＡＶ粒子

「ＡＡＶ」という用語は、ＡＡＶ１型（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ２型（ＡＡＶ２）、ＡＡＶ３型（ＡＡＶ３）、ＡＡＶ４型（ＡＡＶ４）、ＡＡＶ５型（ＡＡＶ５）、ＡＡＶ６型（ＡＡＶ６）、ＡＡＶ７型（ＡＡＶ７）、ＡＡＶ８型（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ９型（ＡＡＶ９）、Ｒｈ７４、ＡＡＶ９＿ｈｕ１４、ＡＡＶｓｈＨ１０、鳥類ＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＡ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶ、ならびに当該技術分野における他の既知のＡＡＶ血清型を含む。

【０１０８】

パルボウイルスファミリーのメンバーであるＡＡＶは、４．７キロ塩基（ｋｂ）の一本鎖線状ＤＮＡゲノムを有する小さな非エンベロープ正二十面体ウイルスである。このウイルスは、精製されたアデノウイルスストック中の混入物質として発見されたので、ＡＡＶは、ディペンドウイルス属に割り当てられている（Ｄ．Ｍ．Ｋｎｉｐｅ，Ｐ．Ｍ．Ｈｏｗｌｅｙ，Ｆｉｅｌｄ’ｓ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ｅｄ．Ｓｉｘｔｈ，２０１３）。ＡＡＶは、自然では複製欠損であるので、ＡＡＶは、その野生型状態では、複製に必要なタンパク質因子を提供するためにヘルパーウイルス（典型的にはアデノウイルス）に依存する。ＡＡＶの４．７ｋｂのゲノムは、複製に重要なヘアピン形状へと折り畳まれる２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）に隣接している。

【０１０９】

一態様では、本発明は、典型的には、目的の治療用分子を発現するための、好ましくは、眼障害の治療を必要とする対象においてそれを行うための修飾されたカプシド及び発現カセットを含有する組換えＡＡＶ粒子の使用を企図する。「組換えＡＡＶ粒子」という用語は、組換えＤＮＡ／ＲＮＡ技術によって構築または修飾されている分子を指す。例えば、一実施形態では、ＡＡＶ粒子のカプシドは、修飾されており、組換え自体とみなすことができるが、より大きなＡＡＶ組換え粒子の一部を形成する場合がある。

【０１１０】

本発明の組換えＡＡＶカプシドは、典型的には、目的の標的細胞、組織、または器官への送達のために、ＡＡＶ粒子内に含有される。「ＡＡＶビリオン」または「ＡＡＶ粒子」または「ＡＡＶベクター」は、少なくとも１つのＡＡＶカプシドポリペプチドで構成されるウイルス粒子を指し、典型的には、カプシドに包まれたポリヌクレオチド発現カセットを含む。粒子が異種核酸（すなわち、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子などの、野生型ＡＡＶゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、それは、「ＡＡＶベクター」または「ＡＡＶ発現ベクター」と称され得る。「ＡＡＶ粒子」という用語は、目的の遺伝子を含む核酸発現カセットを含有しない粒子を含み得るが、典型的には、目的の遺伝子を含む核酸発現カセットを含有する粒子に関する。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ２血清型のＩＴＲ及び／またはｒｅｐ　ＯＲＦを含む。他の実施形態では、ＡＡＶ粒子は、ＡＡＶ８血清型、ならびにＡＡＶ２血清型のＩＴＲ及び／またはｒｅｐ　ＯＲＦからの修飾されたカプシドタンパク質を含む擬似型であってもよい。好適な擬似型ＡＡＶ粒子の一例は、配列番号１３６または１４３の配列によるものである。

【０１１１】

本明細書に記載のＡＡＶ粒子が「発現カセット」を含むことが企図される場合、これらの用語は、発現時に眼の網膜細胞への発現を標的とするものを含む、様々な核酸配列をコードする核酸配列を指す。発現カセットはまた、核酸挿入の一部として、ＡＡＶ起源では

ない異種核酸配列を含み得る。この異種核酸配列は、典型的には、細胞の遺伝子形質転換のための目的の配列を含む。一般に、異種核酸配列は、少なくとも１つ、一般に２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）に隣接する。いくつかの場合では、ＩＴＲは、天然ＡＡＶとは異なる血清型のものであり得る。これらの場合では、ＡＡＶベクターは、擬似型ベクターであるとみなされ得る。

【０１１２】

自然では複製欠損であり、ヒト身体のほぼ全ての細胞タイプを形質導入することが可能であることによって、ＡＡＶは、遺伝子療法またはワクチン送達における治療的使用のための理想的なベクターの代表である。その野生型状態では、ＡＡＶのライフサイクルは、感染後にＡＡＶゲノムが宿主染色体に部位特異的に組み込まれる潜伏段階、ならびにアデノウイルスまたは単純ヘルペスウイルスのいずれかの感染後に、組み込まれたゲノムがその後に感染性ウイルスへと救済、複製、及びパッケージングされる感染段階を含む。ベクター化される場合、ＡＡＶのウイルスＲｅｐ及びＣａｐ遺伝子は、除去され、ウイルス産生の間にトランスで提供され、ＩＴＲが残存する唯一のウイルスＤＮＡとなる（Ｖａｓｉｌｅｖａ＆Ｊｅｓｓｂｅｒｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ｒｅｖｉｅｗｓ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（２００５））。次いで、Ｒｅｐ及びＣａｐは、遺伝子付加または遺伝子標的化を実施するための一連の可能な移入ベクター構成に置き換えられる。

【０１１３】

そのようなベクター化された組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、分裂細胞及び非分裂細胞の両方を形質導入し、静止状態の組織において堅牢かつ安定な発現を示す。様々な遺伝性疾患または後天性疾患を治療するための、完了したかまたは進行中のｒＡＡＶ遺伝子療法臨床治験の数は、劇的に増加している。具体的には、非病原性、非分裂細胞を含む広い宿主範囲の感染性、及び潜在的な部位特異的染色体組み込みの特性によって、ＡＡＶは遺伝子移入のための魅力的なツールとなっている。西側諸国で承認された最初のｒＡＡＶベースの遺伝子療法（２０１２年に欧州連合において使用が承認されている、リポタンパク質リパーゼ欠乏症のためのＧｌｙｂｅｒａ（登録商標））は、遺伝子療法コミュニティ、投資家、及び規制当局が、ｒＡＡＶ療法を世界中のクリニックに移行させる現実的な可能性を刺激した。

【０１１４】

当業者は、標的細胞、組織、または器官を形質導入するための好適性を有するように、ＡＡＶ粒子を操作することができる。例えば、対象が肝臓に関連付けられた疾患、障害、または状態を有する場合、当業者は、肝臓の形質導入に有効であるＡＡＶ血清型（例えば、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９）を利用することができる。同様に、対象が心臓の横紋筋に関連付けられた疾患、障害、または状態を有する場合、当業者は、心臓の形質導入に有効であるＡＡＶ血清型（例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９）を利用することができる。形質導入される細胞、器官、または組織に応じて好適な血清型の例を、以下の表４に概説する。

【０１１５】

一例では、本発明は、網膜の細胞に送達するためのＡＡＶ粒子内の治療用分子の発現を企図する。ＡＡＶ粒子が網膜の細胞を標的とすることができるいくつかのアプローチが存在する。一例は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、またはＡＡＶ８血清型のその任意の擬似型の粒子を使用することであり得る。

【０１１６】

【表４】

表４：特定の細胞、組織、または器官への発現を標的とするために利用され得る好適なＡＡＶ血清型の例。

組織	血清型
中枢神経系	AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9
加熱物	AAV1、AAV8、AAV9
腎臓	AAV2
肝臓	AAV7、AAV8、AAV9
肺癌	AAV4、AAV5、AAV6、AAV9
膵臓	AAV8
光受容体細胞	AAV2、AAV5、AAV8
網膜細胞	AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8、shH10AAV
骨格筋	AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9、rh74

【０１１７】

追加的に、ＡＡＶ粒子は、標的細胞、組織、または器官における発現を制限する追加の調節エレメントを含有し得る。肝臓の場合、肝臓特異的プロモータが使用され得る。同様に、心臓の状態、疾患、または障害の治療では、心臓特異的プロモータが使用され得る。網膜の細胞の形質導入が企図される場合、以下の表５に列挙されるものを含む、網膜細胞特異的プロモータを利用することによって発現を制限することができる。

【０１１８】

【表５－１】

表５：網膜の細胞への発現を制限するための好適なプロモータ

ミュラーグリア細胞	サイズ(bp)	起源、細胞発現、強度
CHX10	164	網膜前駆細胞
GFAP	2600	ミュラーグリア細胞
GFAP	2600	ミュラーグリア細胞(Novartis)
GfaABC1D	686	ミュラーグリア細胞 低酸素誘導反応性 MGC プロモータ
HRSE-6xHRE-GfaABC1D	-820	HRE は、(A/G)CGT(G/C)C である。メタロチオネイン II プロモータからの HRSE(90bps)
RLBP1	2789	ミュラーグリア細胞
短い RLBP1	581	ミュラーグリア細胞
マウス CD44	1775	ミュラーグリア細胞
マウス sbCD44	363	ミュラーグリア細胞
ProB2	592	ミュラーグリア細胞
光受容体細胞	サイズ(bp)	起源、細胞発現、強度
マウス RHO	1400	桿体 PRC
ヒト RHO(ロドスピン(rhodospin))	800	桿体 PRC
ヒト RHO	520	桿体-PRC
マウス桿体オスピン(ospin)mOp500	500	桿体-PRC -385/+86
マウス桿体オプシン	221	桿体-PRC 桿体及び錐体 PRC。AY327580.1:bp
ヒトロドスピンキナーゼ(RHOK/GRK1)	294	1,793~2,087(-112~+180)。錐体形質導入には NHP における IRBP よりも効率的
ヒト青オプシン HB570	570	S 錐体及び M 錐体 PRC のサブセット
ヒト青オプシン HB569	569	青錐体オプシン PRC

【０１１９】

【表５－２】

PR0.5	496	赤錐体 PRC
PR1.7	1700	赤錐体 PRC
PR2.1	2,100	赤錐体 PRC
3LCR-PR0.5	-600	赤錐体 PRC
マウス青オプシン(mBP500)	500	マウスのオプシン
ヒト光受容体間レチノイド結合タンパク質(hIRBP)	235	錐体及び桿体 PRC X53044.1、bp2,603~2,837
IRBPe/GNAT2	500	錐体 PRC
マウス CAR/ARR3	500	錐体 PRC、一部の桿体、及び RPE
ヒト CAR/ARR3	405-500	錐体 PRC、一部の桿体、及び RPE 細胞
CAR/ARR3	215	錐体 PRC
ヒト赤オプシン	2,100	ヒト赤錐体オプシン

【０１２０】

本明細書で使用される場合、「プロモータ」という用語は、それらが作動可能に連結される対応する核酸コード配列（例えば、目的の遺伝子または治療用分子）の転写を直接的または間接的のいずれかで制御する核酸配列を指す。「作動可能に連結された」は、プロモータまたは調節エレメントが、それが連結された導入遺伝子に対する機能的効果を有する能力を指す。

【０１２１】

プロモータは、転写を調節するために単独で機能することができるか、または１つ以上の他の調節配列（例えば、エンハンサもしくはサイレンサ、または調節エレメント）と協働して作用することができる。本発明の文脈において、プロモータは、典型的には、その転写を調節するために、目的の遺伝子または治療用分子に作動可能に連結されている。プロモータが目的の遺伝子または治療用分子に作動可能に連結されている場合、プロモータは、（１）遺伝子のインビボもしくはインビトロでの（例えば、網膜細胞において）顕著な程度の細胞、組織、もしくは器官特異的発現を付与することができ、及び／または（２）標的細胞、組織、もしくは器官における遺伝子の発現レベルを増加させることができる。

【０１２２】

プロモータは、相同（すなわち、核酸発現カセットでトランスフェクトされる動物、具体的には、哺乳動物と同じ種から）または異種（すなわち、発現カセットでトランスフェクトされる動物、特に哺乳動物の種以外の源から）であり得る。したがって、プロモータの源は、任意のウイルス、任意の単細胞原核生物もしくは真核生物、任意の脊椎動物もしくは無脊椎動物生物であり得るか、または合成プロモータ（すなわち、天然で存在しない配列を有する）でさえあり得、プロモータが本明細書に記載の調節エレメントと組み合わせて機能的であることを条件とする。一実施形態では、プロモータは、哺乳動物プロモータ、具体的には、マウスまたはヒトプロモータである。代替的に、プロモータは、誘導性プロモータまたは構成的プロモータであってもよい。一実施形態では、プロモータは、キメラプロモータである（すなわち、異なる種からのエレメントを含有する）。

【０１２３】

核酸発現カセットの長さを最小限に抑えるために、調節エレメントは、最小プロモータ、または本明細書に記載のプロモータの短縮されたバージョンに連結され得る。本明細書で使用される「最小プロモータ」（基本プロモータまたはコアプロモータとも称される）は、発現を駆動することが依然として可能であるが、フルサイズのプロモータの一部であ

り、発現の調節（例えば、組織特異的）に寄与する配列の少なくとも一部を欠く。この定義は、（組織特異的な）調節エレメントが欠失している－遺伝子の発現を駆動することが可能であるが、組織特異的な様式でその遺伝子を発現する能力を損失しているプロモータ、ならびに遺伝子の発現を駆動することが可能である（おそらく減少している）が、必ずしもその遺伝子を組織特異的な様式で発現する能力を失っていない、（組織特異的な）調節エレメントが欠失しているプロモータの両方を網羅する。好ましくは、本明細書に開示の核酸発現カセットに含有されるプロモータは、長さが１０００ヌクレオチド以下、９００ヌクレオチド以下、８００ヌクレオチド以下、７００ヌクレオチド以下、６００ヌクレオチド以下、５００ヌクレオチド以下、４００ヌクレオチド以下、３００ヌクレオチド以下、または２５０ヌクレオチド以下である。

【０１２４】

「誘導性」プロモータは、環境制御下にあり得るプロモータであり得、本発明のいくつかの実施形態で使用され得る。誘導性プロモータによる転写を開始することができる環境条件の例としては、嫌気性条件及び光の存在が挙げられる。誘導性プロモータでは、転写の速度は、誘導剤に応答して増加する。例示的な誘導性プロモータとしては、限定されないが、テトラサイクリン誘導性発現系（またはＴｅｔ応答エレメント（ＴＲＥ）及びｔｅｔＯ）、ならびにその転写活性がグルココルチコステロイドホルモンによって誘導され得るステロイドホルモン遺伝子からの誘導性プロモータが挙げられる。

【０１２５】

特定の実施形態によれば、治療用分子の発現の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％は、標的細胞、組織、または器官内、好ましくは網膜の細胞内に生じる。したがって、特定の実施形態によれば、治療用分子の発現の２５％未満、１０％未満、５％未満、２％未満、またはさらには１％未満が、標的細胞、組織、または器官以外の、好ましくは網膜の細胞以外の器官または組織に生じる。

【０１２６】

標的細胞、組織、または器官への発現を標的とするためのアプローチは、細胞、組織、または器官における遺伝子発現を増加させるための核酸調節エレメントを使用することである。本明細書で使用される「調節エレメント」は、遺伝子の転写を調節及び／または制御することが可能な転写制御エレメント、具体的には、非コードシス作用転写制御エレメントを指す。本明細書で使用される網膜特異的調節エレメントは、網膜内の遺伝子の転写を調節及び／または制御することが可能な転写制御エレメント、具体的には非コードシス作用転写制御エレメントを指す。

【０１２７】

調節配列、または制御エレメントは、関連付けられたコード配列の転写、ＲＮＡ処理、もしくは安定性、または翻訳のタイミング及びレベル／量に影響を与えるヌクレオチド配列を指す。調節配列としては、プロモータ、翻訳リーダー配列、イントロン、エンハンサ、ステムループ構造、リプレッサ結合配列、終了配列、ポリアデニル化認識配列などを挙げることができる。特定の調節配列は、それに作動可能に連結されたコード配列の上流及び／または下流に位置し得る。調節エレメントは、少なくとも１つの転写因子結合部位（ＴＦＢＳ）、より具体的には、組織特異的転写因子のための少なくとも１つの結合部位を含み得る。

【０１２８】

典型的には、本明細書で使用される調節エレメントは、調節エレメントを含まない遺伝子の転写と比較すると、遺伝子発現を増加させるかまたは高める。したがって、調節エレメントは、特にエンハンサ配列を含むが、転写を増加させる調節エレメントは、典型的な遠い上流エンハンサ配列に限定されないが、それらが調節する遺伝子の任意の距離で生じ得ることが理解されるものである。実際、転写を調節する配列は、それらがインビボで調節する遺伝子の上流（例えば、プロモータ領域内）または下流（例えば、３’ＵＴＲ内）

のいずれかに位置し得、遺伝子のすぐ近くまたはさらに遠く離れて位置し得ることが当該技術分野において知られている。注目すべきことに、本明細書に開示の調節エレメントは、典型的には、自然に存在する配列を含むが、そのような調節エレメントまたは調節エレメントのいくつかのコピー、すなわち、天然で存在しない配列を含む調節エレメント（の一部）の組み合わせもまた、調節エレメントとして想定される。本明細書で使用される調節エレメントは、転写制御に関与するより大きな配列の一部、例えば、プロモータ配列の一部を構成し得る。しかしながら、調節エレメント単独では、典型的には、転写を開始するのに十分ではないが、この目的のために（それ自体が調節エレメントであり得る）プロモータを必要とする。本明細書に開示の調節エレメントは、核酸分子、すなわち、単離された核酸、または単離された核酸分子もしくはポリヌクレオチドとして提供される。

【０１２９】

本発明の文脈において、核酸調節エレメントは、典型的には、調節エレメントを含む人工配列を含み、組換えＡＡＶベクターに存在する転写因子結合部位（ＴＦＢＳ）を再配列することによって得られる。網膜における遺伝子発現を増加させるための核酸調節エレメントは、当該技術分野において既知であり、本発明で利用され得る。

【０１３０】

本発明はまた、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＡＵ２０１９／０５００４６に記載されている治療用分子の発現を系統的に制御及びサイレンシングするための調節可能な発現カセットの使用を企図する。一例では、本発明は、キルスイッチと、治療用分子をコードする核酸配列に作動可能に連結された調節可能なエレメントと、を含む、発現カセットの使用を企図し、調節可能なエレメントの活性が、調節因子化合物によって調節され、キルスイッチの活性化が、カセットからの治療用分子をコードする核酸の発現をサイレンシングする。発現カセットは、好ましくは、配列番号１に定義されるものなどの修飾されたＡＡＶカプシドタンパク質またはその機能的等価物を含む本発明のウイルス粒子内に含有される。

【０１３１】

本開示によって包含される調節可能な発現カセットは、「キルスイッチ」を含む。「キルスイッチ」という用語は、本明細書に定義されるカセットのエレメント（複数可）を指し、カセットからの治療用分子（複数可）をコードする核酸の発現をサイレンシングすることができる。「サイレンシング」という用語は、この文脈では、発現の完全かつ不可逆的な抑制を指すために使用される。一例では、サイレンシングは、本明細書に定義される発現カセットからの治療用分子をコードする核酸の発現を完全に無効にする。

【０１３２】

一例では、キルスイッチは、カセットからの治療用分子（複数可）またはその一部をコードする核酸配列の除去を容易にすることができる。別の例では、キルスイッチは、治療用分子（複数可）のカセットからの発現に必要とされる転写機構の一部または全ての除去を容易にする。別の例では、キルスイッチは、１つ以上のプロモータの除去を容易にする。別の例では、キルスイッチは、転写活性化因子遺伝子の除去を容易にする。別の例では、キルスイッチは、ウイルスベクターまたはＡＡＶ粒子からの発現カセット全体の除去を容易にする（すなわち、全ての外来遺伝子及び調節エレメントが除去される）。別の例では、キルスイッチは、上のエレメントのうちの１つ以上をコードする配列の逆転を容易にする。例えば、キルスイッチは、プロモータ（複数可）、治療用分子（複数可）、または転写活性化因子をコードする配列（複数可）の一部または全ての逆転を容易にすることができる。

【０１３３】

本発明の文脈において、任意のイントロンが、本明細書に記載の発現カセットにおいて利用され得る。「イントロン」という用語は、核スプライシング装置によって認識及びスプライシングされるのに十分大きいイントロン全体の任意の部分を包含する。典型的には、発現カセットのサイズを可能な限り小さく保ち、発現カセットの構築及び操作を容易にするために、短い機能的なイントロン配列が好ましい。いくつかの実施形態では、イント

ロンは、発現カセット内のコード配列によってコードされるタンパク質をコードする遺伝子から得られる。イントロンは、コード配列に対して５’、コード配列に対して３’、またはコード配列内に位置し得る。イントロン５’をコード配列に配置する利点は、ポリアデニル化シグナルの機能にイントロンが干渉する機会を最小限に抑えることである。実施形態では、本明細書に開示の核酸発現カセットは、イントロンをさらに含む。好適なイントロンの非限定的な例は、マウス微小ウイルス（ＭＶＭ）イントロン、ベータ－グロビンイントロン（ベータＩＶＳ－１）、第ＩＸ因子（ＦＩＸ）イントロンＡ、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）小ｔイントロン、及びベータ－アクチンイントロンである。

【０１３４】

ポリＡ尾部の合成を指示する任意のポリアデニル化シグナルは、本明細書に記載の発現カセットにおいて有用であり、それらの例は、当業者に周知である。例示的なポリアデニル化シグナルとしては、限定されないが、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期遺伝子に由来するポリＡ配列、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル、最小ウサギベータ－グロビン（ｍＲＢＧ）遺伝子、及びＬｅｖｉｔｔ ｅｔ ａｌ．，１９８９に記載の合成ポリＡ（ＳＰＡ）部位が挙げられる。

【０１３５】

ＡＡＶベクターは、典型的には、いずれかの末端に約１４５ｎｔの逆位末端反復（ＩＴＲ）を含み、これは、核酸送達のためのＤＮＡ複製及びビリオンへのパッケージングに必要な配列を含有する。一例では、ＡＡＶ血清型２のＩＴＲが使用される。しかしながら、他の好適な血清型からのＩＴＲが選択されてもよい。これらのＩＴＲまたは他のＡＡＶ構成要素は、当業者に利用可能な技法を使用して、ＡＡＶ血清型から容易に単離することができる（ＷＯ２００６／１１０６８９を参照されたい）。

【０１３６】

非病原性であり、広範囲の組織特異性を呈するので、核酸送達のために様々な組換えＡＡＶベクター系が開発されている。ＡＡＶベクターは、当該技術分野において既知の技法を使用して容易に構築することができる。例えば、米国特許第５，１７３，４１４号及び同第５，１３９，９４１号、国際公開第ＷＯ１９９２／０１０７０号及び同第ＷＯ１９９３／０３７６９号、Ｍｕｚｙｃｚｋａ．，１９９２、Ｋｏｔｉｎ，１９９４、及びＺｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，１９９４を参照されたい。

【０１３７】

別の例では、ＡＡＶは、自己相補的ＡＡＶ（ｓｃ－ＡＡＶ）である（例えば、ＵＳ２０１２／０１４１４２２を参照されたい）。自己相補的ＡＡＶベクターは、ＤＮＡ合成または複数のベクターゲノム間の塩基対合を必要とせずに、ｄｓＤＮＡへと折り畳むことができる逆位反復ゲノムをパッケージングする。

【０１３８】

一実施形態では、組換えＡＡＶ粒子は、配列番号１３６または１４３に記載の配列に対して、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％同一であるか、または同一である配列を有する。当業者は、本明細書に記載され、当該技術分野において既知のものを含む、配列の機能または構造を実質的に変化させることなく、配列番号１３６または１４３による配列に修飾が行われ得ることを理解するであろう。

【０１３９】

ＡＡＶ産生

ｒＡＡＶ粒子及び核酸ベクターを産生する様々な方法が知られている（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｚｏｌｏｔｕｋｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００２及び米国特許公開第ＵＳ２００７００１５２３８号及び同第ＵＳ２０１２０３２２８６１号を参照されたく、プラスミド及びキットは、ＡＴＣＣ及びＣｅｌｌ ｌＢｉｏｌａｂｓ Ｉｎｃから入手可能である）。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子を含む発現カセット（例えば、プラスミド）は、例えば、ｒｅｐ遺伝子（例えば、Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅ

ｐ５２、及びＲｅｐ４０をコードする）及びｃａｐ遺伝子（本明細書に記載の修飾されたＶＰ領域を含む、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３をコードする）を含有する１つ以上のヘルパープラスミドと組み合わされ得、核酸発現カセットがカプシド内にパッケージングされるかまたはカプシドに包まれ、その後精製されるように、ヘルパーまたはプロデューサ細胞と呼ばれる組換え細胞にトランスフェクトされ得る。

【０１４０】

哺乳動物ヘルパー細胞の非限定的な例としては、ＨＥＫ２９３細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ細胞、またはＣＨＯ細胞が挙げられる（例えば、ＡＴＣＣ(登録商標)、ＣＲＬ－１５７３(商標)、ＡＴＣＣ(登録商標)、ＣＲＬ１６５１(商標)、ＡＴＣＣ(登録商標)、ＣＲＬ－１６５０(商標)、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２、ＡＴＣＣ(登録商標)、ＣＣＬ－１０(商標)、またはＡＴＣＣ(登録商標)ＣＣＬ－６１(商標)を参照されたい）。ヘルパー細胞は、ｒｅｐタンパク質及び／またはｃａｐタンパク質をコードするｒｅｐ及び／またはｃａｐ遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、パッケージングは、インビトロで実施される。いくつかの実施形態では、目的の遺伝子を含有する核酸発現カセット（例えば、プラスミド）は、例えば、第１の血清型ｒｅｐ遺伝子、及び同じ血清型または異なる血清型のｃａｐ遺伝子を含有する１つ以上のヘルパープラスミドと組み合わせられ、ｒＡＡＶ粒子がパッケージングされるようにヘルパー細胞にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、１つ以上のヘルパープラスミドは、ｒｅｐ遺伝子及びｃａｐ遺伝子を含む第１のヘルパープラスミドと、以下のヘルパー遺伝子：Ｅｌａ遺伝子、Ｅｌｂ遺伝子、Ｅ４遺伝子、Ｅ２ａ遺伝子、及びＶＡ遺伝子のうちの１つ以上を含む第２のヘルパープラスミドと、を含む。ヘルパー遺伝子は、ヘルパータンパク質Ｅｌａ、Ｅｌｂ、Ｅ４、Ｅ２ａ、及びＶＡをコードする遺伝子である。ヘルパープラスミド、及びそのようなプラスミドを作製する方法は、当該技術分野において既知であり、市販されている（例えば、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｃｅｌｌｂｉｏｌａｂｓ、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、及びＡｄｄｇｅｎｅからの、例えば、ｐＤＦ６、ｐＲｅｐ、ｐＤＭ、ｐＤＧ、ｐＤＰｌｒｓ、ｐＤＰ２ｒｓ、ｐＤＰ３ｒｓ、ｐＤＰ４ｒｓ、ｐＤＰ５ｒｓ、ｐＤＰ６ｒｓ、ｐＤＧ（Ｒ４８４Ｅ／Ｒ５８５Ｅ）、及びｐＤＰ８を参照されたい）。特定の血清型の野生型ＡＡＶコード領域をコードするプラスミドも知られており、利用可能である。例えば、ｐＳｕｂ２０１は、野生型ＡＡＶ２ゲノムのコード領域を含むプラスミドである（Ｓａｍｕｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７）。

【０１４１】

ＩＴＲ配列及びＩＴＲ配列を含有するプラスミドは、当該技術分野において既知であり、市販されている（例えば、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｃｅｌｌｂｉｏｌａｂｓ、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、及びＡｄｄｇｅｎｅから入手可能な製品及びサービスを参照されたい）。ヘルペスウイルスベースの系を使用するＡＡＶの大規模産生のための方法も既知である。例えば、Ｃｌｅｍｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００９を参照されたい。中和抗ＡＡＶ抗体に対してより耐性であり得るエクソソーム関連ＡＡＶを産生する方法も既知である。

【０１４２】

擬似型ｒＡＡＶベクターを産生し、使用するための方法も、当該技術分野においても既知である（例えば、Ｄｕａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１、Ｈａｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２０００、Ｚｏｌｏｔｕｋｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００２、及びＡｕｒｉｃｃｈｉｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００１を参照されたい）。

【０１４３】

目的の遺伝子

本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物は、目的の遺伝子を、治療を必要とする対象の治療のために標的細胞、組織、または器官に送達するために使用することができる。一例では、目的の遺伝子は、疾患、障害、または状態の治療における有用性を有すると知られている治療用分子であり得る。別の例では、治療用分子は、目的のＲＮＡまたはタンパク質をコードする遺伝子であり得る。本発明の治療用分子は、治療用分子が送達され

る細胞、組織、または器官において治療効果を有することが想定される。眼障害を治療する場合、治療用分子の治療効果は、標的細胞または組織における炎症及び／または血管新生を阻害することであり得る。本開示によって包含される治療用分子は、本明細書に開示の発現カセットから発現されることができるか、またはそれから発現される核酸から翻訳されることができる限り、特に限定されない。

【０１４４】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、または「核酸」、または「核酸分子」は、ヌクレオチドのポリマーを意味し、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、及びｃＤＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、及びｈｐＲＮＡが挙げられる。所与のポリヌクレオチドは、例えば、自動合成器で作製された細胞、ゲノム、もしくは合成起源のものであり得るか、炭水化物、脂質、タンパク質、もしくは他の材料と組み合わせられ得るか、蛍光もしくは他の基で標識され得るか、または本明細書に定義される特定の活性を実施するために固体支持体に結合され得るか、または当業者に既知の自然には見出されない１つ以上の修飾されたヌクレオチドを含み得る。ポリマーは、一本鎖、本質的に二本鎖、または部分的に二本鎖であり得る。塩基対形成は、Ｇ：Ｕ塩基対を含む、ヌクレオチド間の標準的な塩基対形成を指す。「相補的」は、２つのポリヌクレオチドが、それらの長さの一部に沿って、または一方もしくは両方の全長に沿って塩基対形成（ハイブリダイゼーション）することが可能であることを意味する。

【０１４５】

本明細書におけるポリヌクレオチドまたは核酸配列は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）配列またはリボ核酸（ＲＮＡ）配列であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、及びウラシルを含む自然に存在する塩基を挙げることができる。配列はまた、修飾された塩基を含有し得る。そのような修飾された塩基の例としては、アザ及びデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジン、及びウラシル；ならびにキサンチン及びヒポキサンチンが挙げられる。核酸は、二本鎖または一本鎖のいずれかであり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、「核酸」という用語は、相補的核酸配列を含む。

【０１４６】

「核酸分子」またはその誘導体という用語は、本明細書で使用される場合、修飾されていないＤＮＡもしくはＲＮＡ、または修飾されたＤＮＡもしくはＲＮＡを含むことが意図される。例えば、本開示の核酸分子は、一本鎖及び二本鎖ＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖ＲＮＡ、ならびに一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるＲＮＡ、一本鎖、またはより典型的には二本鎖、もしくは一本鎖及び二本鎖領域の混合物であり得るＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子で構成されることが有用であり得る。加えて、核酸分子が、ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはＲＮＡ及びＤＮＡの両方を含む三本鎖領域で構成されることが有用であり得る。本開示の核酸分子はまた、安定性または他の理由のために修飾された１つ以上の修飾された、塩基、またはＤＮＡもしくはＲＮＡ骨格を含有し得る。「修飾された」塩基としては、例えば、トリチウム化塩基、及びイノシンなどの通常ではない塩基が挙げられる。ＤＮＡ及びＲＮＡに様々な修飾が行われ得、したがって、「核酸分子」は、化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態を包含する。「ポリヌクレオチド」という用語は、対応する意味を有するものとする。

【０１４７】

「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、ポリヌクレオチドが自然に見出される場合、その天然状態でそれが会合しているかまたは連結されているポリヌクレオチド配列から一般に分離されているポリヌクレオチドを意味する。好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは、自然に見出される場合、自然では関連する他の構成要素を少なくとも９０％含まない。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、自然に見出されない様式で２つのより短いポリヌクレオチド配列が共有的に接合していることによって、自然に存在しない（キメラポリヌクレオチド）。

【０１４８】

「キメラ遺伝子」は、天然では接合されて見出されない、共有結合的に接合された配列

を含む任意の遺伝子を指す。典型的には、キメラ遺伝子は、自然では一緒に見出されない制御配列及び転写配列、またはタンパク質コード配列を含む。したがって、キメラ遺伝子は、異なる源由来である制御配列及びコード配列、または同じ源由来であるが、自然に見出されるものとは異なる様式で配置された制御配列及びコード配列を含み得る。「内因性」という用語は、本明細書では、調査下の生物と同じ発達段階で通常改変されていない生物に存在するか、または生物において産生される物質を指すために使用される。「内因性遺伝子」は、生物のゲノムにおけるその自然の位置にある天然遺伝子を指す。本明細書で使用される場合、「組換え核酸分子」、「組換えポリヌクレオチド」、またはそれらの変形は、組換えＤＮＡ／ＲＮＡ技術によって構築または修飾された核酸分子を指す。「外来性ポリヌクレオチド」、または「外因性ポリヌクレオチド」、または「異種ポリヌクレオチド」などという用語は、実験的操作によって細胞のゲノムに導入される任意の核酸を指す。

【０１４９】

外来または外因性遺伝子は、非天然生物もしくは細胞に挿入される遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入される天然遺伝子、またはキメラ遺伝子であり得る。代替的に、外来または外因性遺伝子は、生物もしくは細胞、またはそれに由来する子孫のゲノムを編集することの結果であり得る。「導入遺伝子」は、形質転換手順によってゲノムに導入されている遺伝子である。

【０１５０】

「遺伝子操作された」、「遺伝子修飾された」、「遺伝子修飾」、またはそれらのバリアントという用語は、人間による任意の遺伝子操作を指し、形質転換または形質導入、遺伝子編集、シスジェネシス、細胞における遺伝子の変異、及びこれらの行為が行われた細胞もしくは生物またはそれらの子孫における遺伝子の調節を変化させるかまたは調節することなどによって、遺伝子を細胞に導入することを含む。

【０１５１】

さらに、ポリヌクレオチド（核酸）の文脈における「外因性」という用語は、ポリヌクレオチドを自然では含まない細胞に存在する場合のポリヌクレオチドを指す。細胞は、コードされたポリペプチドの産生量の変化を生じる非内因性ポリヌクレオチド、例えば、内因性ポリペプチドの発現を増加させる外因性ポリヌクレオチドを含む細胞、またはその天然状態でポリペプチドを産生しない細胞であり得る。本発明のポリペプチドの産生の増加は、本明細書では「過剰発現」とも称される。本発明の外因性ポリヌクレオチドは、それが存在するトランスジェニック（組換え）細胞または無細胞発現系の他の構成要素から分離されていないポリヌクレオチド、及びその後、少なくともいくつかの他の構成要素を除くように精製されたそのような細胞または無細胞系で産生されるポリヌクレオチドを含む。外因性ポリヌクレオチド（核酸）は、自然に存在する、隣接する一連のヌクレオチドであり得るか、または単一のポリヌクレオチドを形成するために接合された（天然で存在する及び／または合成された）異なる源からの２つ以上の隣接する一連のヌクレオチドを含み得る。典型的には、そのようなキメラポリヌクレオチドは、目的の細胞におけるオープンリーディングフレームの転写を駆動するのに好適なプロモータに作動可能に連結された本発明のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを少なくとも含む。

【０１５２】

ポリヌクレオチドの同一性％は、ギャップ作成ペナルティ＝５、及びギャップ伸長ペナルティ＝０．３を用いるＧＡＰ（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０）分析（ＧＣＧプログラム）によって決定される。好ましくは、ＧＡＰ分析は、それらの全長にわたって２つの配列を整列させる。

【０１５３】

定義されたポリヌクレオチドに関して、上で提供されるものよりも高い同一性数値％が好ましい実施形態を包含することが理解されるであろう。したがって、適用可能な場合、最小同一性％の数字に照らして、ポリヌクレオチドが、関連する指定された配列番号に対して、少なくとも５０％、少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好

ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より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９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、さらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一であるポリヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

【０１５４】

本明細書でポリヌクレオチド同一性を指す場合、所与の配列同一性は、オープンリーディングフレーム配列を参照していることが理解されるであろう。

【０１５５】

さらなる実施形態では、本発明は、本明細書に具体的に記載されるポリヌクレオチドと実質的に同一または同一であるポリヌクレオチドに関する。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドに関して、「実質的に同一の」という用語は、ポリヌクレオチドによってコードされる天然タンパク質の少なくとも１つの活性を維持しながらの、１つまたはいくつかの（例えば、２、３、または４つの）ヌクレオチドの置換を意味する。加えて、この用語は、ヌクレオチドの付加または欠失を含み、これによって、ポリヌクレオチドによってコードされる天然タンパク質の少なくとも１つの活性を維持しながら、１つまたはいくつかの（例えば、２、３、または４つの）アミノ酸によってコードされる天然タンパク質のサイズの増加または減少が生じる。

【０１５６】

本発明はまた、例えば、本発明のポリヌクレオチドのスクリーニングの方法または本発明のポリペプチドをコードする方法におけるオリゴヌクレオチドの使用に関する。本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」は、最大５０ヌクレオチド長のポリヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、本発明の核酸分子上のオリゴヌクレオチドと相補的配列との間の安定なハイブリッドの形成に必要とされるサイズである。それらは、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはいずれかの組み合わせもしくは誘導体であり得る。オリゴヌクレオチドは、典型的には、１０～３０ヌクレオチド長、一般的に１５～２５ヌクレオチド長の比較的短い一本鎖分子である。ゲノム編集のためのガイドとして、プローブ、または増幅反応におけるプライマーとして使用される場合、そのようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、オリゴヌクレオチドと標的核酸分子上の相補的配列との間の安定なハイブリッドの形成に必要とされるサイズである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、少なくとも１５ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも１８ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも１９ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも２０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも２２ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも２５ヌクレオチド長である。プローブとして使用される本発明のオリゴヌクレオチドは、典型的には、放射性同位体、酵素、ビオチン、蛍光分子、または化学発光分子などの標識とコンジュゲートされる。

【０１５７】

当業者は気付くであろうように、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドプライマーの配列は、本発明の方法に対するそれらの有用性に影響を与えることなく、ある程度変動し得る。本発明の方法に有用な本明細書に開示のオリゴヌクレオチドの「バリアント」（本明細書では、その使用に応じて「プライマー」または「プローブ」とも称される）は、本明細書に定義される特定のオリゴヌクレオチド分子のものに近いゲノムに対して変動するサイズの分子を含み、及び／またはそれに近いゲノムにハイブリダイズすることが可能である。例えば、バリアントは、追加のヌクレオチド（１、２、３、４つ、またはそれ以上など）、またはそれらが依然として標的領域にハイブリダイズする限りより少ないヌクレオ

チドを含み得る。さらに、いくつかのヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが標的領域をハイブリダイズする能力に影響を与えることなく置換され得る。加えて、本明細書に定義される特定のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズするゲノムの領域に近く（例えば、限定されないが、５０ヌクレオチド以内または１００ヌクレオチド以内）にハイブリダイズするバリアントを容易に設計することができる。

【０１５８】

本発明は、例えば、ＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼのガイド、核酸分子を同定するためのプローブ、または核酸分子を産生するためのプライマーとして使用することができるオリゴヌクレオチドを含む。プローブ及び／またはプライマーは、本発明のポリヌクレオチドの相同体を他の種からクローニングするために使用することができる。さらに、そのような相同体についてゲノムライブラリまたはｃＤＮＡライブラリをスクリーニングするために、当該技術分野において既知のハイブリダイゼーション技法を使用してもよい。

【０１５９】

本発明の修飾されたカプシドタンパク質を含む、本明細書に記載の組換えＡＡＶ粒子をコードするヌクレオチド配列はまた、中程度の、または好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ヌクレオチド配列とハイブリダイズする能力によって定義することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、本明細書では、少なくとも約２５、好ましくは約５０個のヌクレオチド、７５もしくは１００、最も好ましくは約２００個以上のヌクレオチドの核酸配列を、約６５℃の温度の約１Ｍの塩を含む溶液、好ましくは６×ＳＳＣ、または同等なイオン強度を有する任意の他の溶液を含む溶液中でハイブリダイズさせ、約０．１Ｍまたはそれ以下の塩を含む溶液、好ましくは０．２×ＳＳＣ、または同等なイオン強度を有する任意の他の６５℃の溶液中で洗浄することを可能にする条件として定義される。一実施形態では、ストリンジェントな条件は、（１）洗浄に低イオン強度及び高温、例えば、０．０１５ＭのＮａＣｌ／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のＮａＤｏｄＳＯ$_4$を５０℃で用いること、（２）ハイブリダイゼーション中に、ホルムアミド、例えば、０．１％のウシ血清アルブミン、０．１％のＦｉｃｏｌｌ、０．１％のポリビニルピロリドンを含む５０％（体積／体積）のホルムアミド、７５０ｍＭのＮａＣｌを含むｐＨ６．５の５０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムなどの変性剤を４２℃で用いること、または（３）５０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５ＭのＮａＣｌ、０．０７５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理された鮭精子ＤＮＡ（５０ｇ／ｍｌ）、０．２×ＳＳＣ及び０．１％のＳＤＳ中０．１％のＳＤＳ及び１０％のデキストラン硫酸を４２℃で用いることである。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、一晩、すなわち、少なくとも１０時間実施され、好ましくは、少なくとも２回洗浄液を変えながら、少なくとも１時間洗浄が実施される。これらの条件は、通常、約９０％以上の配列同一性を有する配列の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする。

【０１６０】

中程度の条件は、本明細書では、少なくとも５０個のヌクレオチド、好ましくは約２００個以上のヌクレオチドの核酸配列を、約４５℃の温度の約１Ｍの塩を含む溶液、好ましくは６×ＳＳＣ、または同等なイオン強度を有する任意の他の溶液を含む溶液中でハイブリダイズさせ、室温の約１Ｍの塩を含む溶液、好ましくは６×ＳＳＣ、または同等なイオン強度を有する任意の他の溶液中で洗浄することを可能にする条件として定義される。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、一晩、すなわち、少なくとも１０時間実施され、好ましくは、少なくとも２回洗浄液を変えながら、少なくとも１時間洗浄が実施される。これらの条件は、通常、最大５０％の配列同一性を有する配列の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする。当業者は、５０％～９０％の間で同一性が変動する配列を特異的に同定するために、これらのハイブリダイゼーション条件を修正することが可能であろう。

【０１６１】

本明細書で使用される「導入遺伝子」という用語は、核酸配列が導入される細胞におい

て発現するポリペプチドまたはポリペプチドの一部分をコードする特定の核酸配列を指す。しかしながら、導入遺伝子は、ＲＮＡとして発現され、典型的には、核酸配列が挿入される細胞において特定のポリペプチドの量を制御する（例えば、低下させる）ことも可能である。導入遺伝子は、プロモータ（及び／またはそれが導入される動物、具体的には、哺乳動物、例えば、核酸発現カセットが遺伝子療法に使用される場合）に対して相同であっても異種であってもよい。

【０１６２】

導入遺伝子は、全長ｃＤＮＡもしくはゲノムＤＮＡ配列、または状態、障害、もしくは疾患の治療を必要とする対象における治療に有効である少なくともいくつかの生物学的活性を有するその任意の断片、サブユニット、もしくは変異体であってもよい。具体的には、導入遺伝子は、ミニ遺伝子、すなわち、そのイントロン配列の一部、大部分、または全てを欠く遺伝子配列であり得る。したがって、導入遺伝子は、任意選択的に、イントロン配列を含有し得る。任意選択的に、導入遺伝子は、ハイブリッド核酸配列、すなわち、相同及び／または異種ｃＤＮＡ及び／またはゲノムＤＮＡ断片から構築されたものであってもよい。

【０１６３】

「変異型」が企図される場合、核酸配列は、野生型または自然に存在する配列とは異なる１つ以上のヌクレオチドを含有し得る、すなわち、変異体核酸配列は、１つ以上のヌクレオチド置換、欠失、及び／または挿入を含有する。ヌクレオチド置換、欠失、及び／または挿入は、そのアミノ酸／核酸配列が野生型アミノ酸／核酸配列とは異なる遺伝子産生物（すなわち、タンパク質または核酸）を生じさせることができる。そのような変異体の調製は、当該技術分野において既知である。本発明の文脈では、導入遺伝子ヌクレオチド配列に導入される任意のヌクレオチド置換、欠失、及び／または挿入は、導入遺伝子の治療効果の機能に顕著な悪影響を及ぼさないが、機能を高め得る。

【０１６４】

一例では、ＡＡＶ粒子またはその組成物は、治療用ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。例えば、核酸配列は、本明細書に定義されるＡＡＶ粒子から発現され、細胞機構によって翻訳されて、治療用ポリペプチドを産生することができる。

【０１６５】

例示的な治療用ポリペプチドとしては、免疫グロブリン、抗体、及び抗原結合断片などの結合タンパク質が挙げられる。例えば、治療用ポリペプチドとしては、抗体の定常領域に連結された単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）、二量体ｓｃＦｖ（ｄｉ－ｓｃＦｖ）、（ｓｃＦｖ）ｎ、ｓｃＦｖ、またはｄｉ－ｓｃＦｖ、Ｆｃもしくは重鎖定常ドメイン（ＣＨ）２及び／またはＣＨ３、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、及び抗体が挙げられる。一例では、治療用ポリペプチドは、抗体またはＴＲＡＰ分子である。そのような治療用分子の例としては、ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びアフリベルセプトが挙げられる。

【０１６６】

別の例では、治療用ポリペプチドは、抗体の抗原結合部位を含む。

【０１６７】

別の例では、治療用分子は、阻害性オリゴヌクレオチドであり得る。例示的な阻害性オリゴヌクレオチドとしては、単離されたかまたは合成されたアンチセンスＲＮＡまたはＤＮＡ、ｓｉＲＮＡまたはｓｉＤＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ模倣物、ｓｈＲＮまたはＤＮＡ、及びキメラアンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡが挙げられる。本明細書で使用される「アンチセンス」という用語は、コード配列に相補的であり、したがってこのコード配列に結合することが可能なヌクレオチドの配列を意味し、これは、転写を受けるＤＮＡ二重らせんの鎖の配列、またはメッセンジャーＲＮＡ分子の配列のいずれかであり得る。「ショートヘアピンＲＮＡ」または「ｓｈＲＮＡ」という用語は、二重領域及びループ領域を有するＲＮＡ構造を指す。低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）という用語は、時折、低分子干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られており、２０～２５塩基対長の二本

鎖ＲＮＡ分子のクラスである。特定のタンパク質への翻訳を阻害または防止するｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡという用語と組み合わせたタンパク質名によって示される。したがって、ＶＥＧＦの翻訳を干渉するｓｉＲＮＡは、発現「ＶＥＧＦ　ｓｉＲＮＡ」によって示される。「マイクロＲＮＡ」（略称ｍｉＲＮＡ）という用語は、植物、動物、及び一部のウイルスに見出される小さい非コードＲＮＡ分子（約２２ヌクレオチドを含有する）であり、ＲＮＡサイレンシング及び遺伝子発現の転写後調節において機能する。接頭辞「ｍｉＲ」にダッシュ及び数字が続き、後ろの数字は、多くの場合、命名の順序を示している。１つまたは２つのヌクレオチドを除いてほぼ同一の配列を有する異なるｍｉＲＮＡには、追加の小文字の注釈が付けられている。多数のｍｉＲＮＡが当該技術分野において既知である（ｍｉＲＢａｓｅ　Ｖ．２１　ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ；Ｋｏｚｏｍａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ－Ｊｏｎｅｓ，２００４）。別の例では、本開示によって包含される阻害性オリゴヌクレオチドは、１つ以上のｍｉＲＮＡの活性を阻害する。様々な種が、この目的に好適である。例としては、アンタゴマー（ａｎｔａｇｏｍｉｒ）、干渉ＲＮＡ、リボザイム、ｍｉＲＮＡスポンジ、及びｍｉＲマスクが挙げられる。「アンタゴマー」という用語は、本開示の文脈において、標的ｍｉＲＮＡに結合し、ｍｉＲＮＡのその同族遺伝子標的への結合を防止することによってｍｉＲＮＡ機能を阻害する、化学修飾させたアンチセンスオリゴヌクレオチドを指すために使用される。

【０１６８】

一例では、治療用分子は、「抗血管新生分子」である。「抗血管新生分子」という用語は、本開示の文脈において、血管の発達を阻害する、例えば、血管新生、内皮細胞成長、血管の安定性、及び／または脈管新生を阻害する、本明細書に定義されるＡＡＶ粒子から発現される分子を指すために使用される。本開示によって包含される抗血管新生分子としては、ポリヌクレオチド（複数可）、ポリペプチド（複数可）、抗体（複数可）、またはそれらのコンジュゲートもしくは融合タンパク質が挙げられる。例示的な抗血管新生分子としては、ＶＥＧＦ及びＶＥＧＦファミリーのメンバー、ＰＩＧＦ、ＰＤＧＦファミリー、線維芽細胞成長因子ファミリー（ＦＧＦ）、ＴＩＥリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、ＡＮＧＰＴＬ３、及びＡＮＧＰＴＬ４の阻害剤が挙げられる。他の例では、抗血管新生分子は、インスリン様成長因子Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、ＶＩＧＦ、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ＣＴＧＦ及びＣＴＧＦファミリーのメンバー、ＴＧＦ－α及びＴＧＦ－βなどの成長ホルモンを阻害する。抗血管新生分子の他の例としては、ＶＥＧＦに対する抗体、ＶＥＧＦ受容体に対する抗体、及びアンジオスタチン、エンドスタチン、及びそれらの融合体などの血管新生阻害剤が挙げられる。したがって、一例では、治療用分子は、エンドスタチン及び／またはアンジオスタチンを含む。別の例では、治療用分子は、本明細書に記載の分子のうちの１つ以上の融合体である。例えば、治療用分子は、エンドスタチン及びアンジオスタチンの融合体を含み得る。

【０１６９】

一例では、治療用分子は、抗炎症分子である。一例では、抗炎症分子は、ＩＬ－１０、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１１、またはＩＬ－１３などのインターロイキンである。例えば、抗炎症分子は、ＩＬ－１０であり得る。別の例では、抗炎症分子は、インターロイキンＩＬ－１受容体アンタゴニスト（ＩＬ－１ＲＡ）、またはＩＬ－１０及びＩＬ－１ＲＡの融合体である。他の例では、抗炎症分子は、ＩＬ－１、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）、またはＩＬ－１８などの炎症促進性サイトカインを阻害する。他の例では、抗炎症分子は、対象におけるＣＤ１４＋ＣＤ１６＋細胞の産生または数を増加させ、ＩＬ－６レベルを低減し、ＴＮＦ－アルファレベルを低減し、及び／またはＩＬ－１０レベルを増加させる。

【０１７０】

別の例では、治療用分子は、神経栄養因子である。神経栄養因子は、発達中のニューロンの成熟及び成体ニューロンの維持を担うと考えられている。この点で、神経栄養因子を使用して、神経細胞の変性及び死を阻害または逆転させることができる。神経栄養因子の例としては、例えば、脳由来神経栄養因子、神経成長因子、形質転換成長因子、グリア細

胞株由来神経栄養因子、ニューロトロフィン３、ニューロトロフィン４／５、及びインターロイキン１－Ｂが挙げられる。

【０１７１】

別の例では、治療用分子は、がん細胞に対して細胞毒性である。他の例では、治療用分子は、核因子－カッパＢ（ＮＦκＢ）、Ｃ－キット（ＣＤ１１７、幹細胞因子受容体）、ヒードショックタンパク質９０（Ｈｓｐ９０）、Ｒａｓ－Ｒａｆマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＥＫ）経路、Ｂｃｌ－２、ＩＬ－２、またはＴＮＦ－アルファ（例えば、抗炎症性可溶性ＴＮＦ－Ｒ）のうちの１つ以上を阻害する。

【０１７２】

治療及び防止

本発明の一態様では、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはその組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患、状態、または障害を治療または防止するための方法が提供される。

【０１７３】

本明細書では、治療される「患者」及び「対象」という用語は、互換的に使用され、ヒトまたは他の哺乳動物の患者及び対象を指し、本発明の方法を使用して検査または治療される任意の個体を含む。本発明の範囲内に収まる好適な哺乳動物としては、限定されないが、霊長類、コンパニオン動物（すなわち、ネコ及びイヌ）、実験動物（例えば、ウサギ、マウス、ラット）、ならびに遺伝子療法を受けることができる疾患、状態、または障害に罹患している任意の他の哺乳動物が挙げられる。

【０１７４】

本発明が、遺伝子療法を受けることができる疾患、状態、または障害を治療または防止することが企図される場合、本発明のＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターは、広範囲の疾患、状態、または障害において有用であることが理解されるであろう。ＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターは、眼障害を治療するために使用されることが好ましいが、ＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターの有用性は、網膜細胞、黒色腫細胞、及び肝細胞を含む様々な細胞タイプで実証されている。具体的には、網膜細胞、黒色腫細胞、及び肝細胞を含む様々な細胞タイプについて、形質導入効率の増加が示されている。したがって、ＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターの治療有用性は、眼障害に限定されないことが理解されるであろう。

【０１７５】

一例では、本発明のＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターは、眼障害の治療または防止することを対象とする。「眼障害」という用語は、本開示の文脈において、ヒトの眼及び視覚系に影響を及ぼす障害及び異常を指すために使用される。例えば、眼障害としては、限定されないが、眼、網膜、脈絡膜、もしくは黄斑の天性、発達性、炎症性、感染性、血管性、閉塞性、血管新生性、変性、新生物性、腫瘍前、医原性、外傷性、緑内障性、移植後合併症、白内障、及び特発性の疾患、またはこれらの疾患の全身性素因、関連、もしくは合併症（遺伝性遺伝子ジストロフィーにおける転移性ブドウ膜黒色腫もしくは多系統作用など）が挙げられる。

【０１７６】

他の例示的な眼障害としては、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、ブドウ膜炎、虹彩炎、巨細胞性動脈炎、血管炎、周辺性ブドウ膜炎、角膜移植拒絶症、眼内炎症、及び層状角膜移植拒絶症が挙げられる。本開示によって包含される眼障害の他の例としては、黄斑変性、糖尿病性網膜症、嚢胞様黄斑浮腫、臨床的に顕著な黄斑浮腫、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、または眼の血管新生が挙げられる。例えば、眼障害は、「眼内新生血管疾患」であり得る。「眼内血管新生疾患」という用語は、本開示の文脈において、眼の血管新生を特徴とする疾患を指すために使用される。眼内新生血管疾患の例としては、限定されないが、例えば、増殖性網膜症、脈絡膜血管新生（ＣＮＶ）、萎縮型加齢黄斑変性（ＡＭＤ）、滲出型加齢黄斑変性（ＡＭＤ）、糖尿病性及び他の虚血関連網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、病理学的近視、フォンヒッペルリンダウ病、眼

のヒストプラスマ症、網膜中心静脈閉塞症（ＣＲＶＯ）、角膜血管新生、及び網膜血管新生が挙げられる。例えば、本開示の方法は、滲出型ＡＭＤを治療することを包含する。別の例では、本開示の方法は、ＣＮＶを治療することを包含する。

【０１７７】

一例では、本開示の方法は、網膜における内皮細胞成長の阻害を包含する。例えば、本開示の方法は、網膜下色素上皮及び／または網膜下空間における内皮細胞成長の阻害を包含する。

【０１７８】

別の例では、眼障害は、感染症である。

【０１７９】

別の例では、眼障害は、がんである。一例では、がんは、ブドウ膜黒色腫、毛様体黒色腫、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、眼内リンパ腫、網膜芽細胞腫、または髄上皮腫、脈絡膜血管腫、脈絡膜転移、結膜カポジ肉腫、悪性結膜腫瘍、眼窩または涙腺リンパ腫、結膜リンパ腫、結膜黒色腫または異型を伴う原発性後天性黒色素沈着症、眼窩悪性腫瘍、涙腺悪性腫瘍、色素性結膜腫瘍、結膜扁平上皮癌、結膜上皮内新生物、または眼表面扁平上皮新生物である。一例では、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【０１８０】

別の例では、眼障害は、脈絡膜母斑、脈絡膜骨腫、太田母斑、結膜母斑、眼球上デルモイド、涙腺良性腫瘍、眼窩良性腫瘍、甲状腺眼症の症状、瞼裂斑、または翼状片である。

【０１８１】

別の例では、眼障害は、ＲＰＥ６５によるレーベル先天性黒内障、またはＲＰＥ６５変異によって引き起こされる眼障害である。別の例では、眼障害は、ＭＥＲＴＫ、もしくはＲＰＧＲ、もしくはＰＤＥ６Ｂ、もしくはＲＬＢＰ１、もしくは他の遺伝子の変異によって引き起こされる網膜色素変性、またはＭＥＲＴＫ、もしくはＲＰＧＲ、もしくはＰＤＥ６Ｂ、もしくはＲＬＢＰ１の変異によって引き起こされる別の疾患である。別の例では、眼障害は、コロイデレミア、またはＣＨＭの変異によって引き起こされる眼障害である。別の例では、眼障害は、１色覚、またはＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、ＧＮＡＴ２、ＰＤＥ６Ｃ、ＰＤＥ６Ｈ、及びＡＴＦ６遺伝子の変異によって引き起こされる眼障害である。別の例では、Ｘ関連網膜分離症、またはＲＳ１の変異によって引き起こされる眼障害である。別の例では、眼障害は、レーベル遺伝性視神経症である。別の例では、眼障害は、移植の合併症である。

【０１８２】

一例では、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のＡＡＶベクターまたは粒子を投与することを含む。例えば、上に言及された方法は、キルスイッチと、治療用分子をコードする核酸と、を含む、発現カセットを含むＡＡＶベクターまたは粒子を投与することを含み得、キルスイッチの活性化が、治療用分子をコードする核酸の発現をサイレンシングする。一例では、発現カセットは、治療用分子をコードする核酸に作動可能に連結された調節可能なエレメントをさらに含み、調節可能なプロモータの活性が、調節因子化合物を対象に投与することによって調節される。一例では、発現カセットは、調節因子化合物に結合する調節因子化合物結合分子に作動可能に連結された構成的プロモータをさらに含み、調節因子化合物に結合すると、調節因子結合ポリペプチドが、治療用分子の発現を調節する。

【０１８３】

別の例では、調節因子化合物結合分子及び治療用分子は、別々の発現カセットから発現される。

【０１８４】

本明細書に記載のＡＡＶカプシド、粒子、及びＡＡＶベクターはまた、追加の治療と組み合わせて投与され得る。

【０１８５】

一例では、追加の治療としては、手術、眼内レンズによるレンズ置き換え、レーザー手

術、または薬物療法を挙げることができる。

【０１８６】

別の例では、追加の治療は、対象におけるＡＡＶ粒子またはベクターに対する有害な免疫応答を防止するための免疫抑制剤を含み得る。免疫抑制剤の投与が企図される場合、治療は、ＡＡＶ粒子もしくはベクターの投与前に、または投与と同時に提供され得、十分な免疫抑制が達成されるように、一時的、例えば、１週間、２週間、３週間、４週間、またはそれ以上であり得る。

【０１８７】

一実施形態では、治療される対象は、本明細書に記載されているか、または当該技術分野において既知の眼障害に関連付けられた疾患または障害の１つ以上の症状を呈する。

【０１８８】

例えば、眼障害の症状としては、

－周辺視野の減少、

－中心視野の減少、

－夜間視力の減少、

－色覚の損失、を挙げることができる。

【０１８９】

眼疾患が加齢黄斑変性である場合、症状の非限定的な例としては、

－視界のぼやけまたはかすみ、

－視覚を弱い光から明るい光に適応させることにおける困難性、

－視界の暗さまたは欠損、

－視覚の歪み、のうちの１つ以上が挙げられる。

【０１９０】

したがって、本明細書に記載のＡＡＶ粒子またはベクターによる治療に対する陽性応答は、上記の症状または当該技術分野において既知の他の症状のうちの１つ以上の向上を含み得る。例えば、本明細書に記載の方法の結果として投与されたＡＡＶベクターによる治療に対して陽性応答を有する個体は、視界のぼやけもしくはかすみが低減され得、視覚を弱い光から明るい光に適応させることにおける困難性が低減され得、視界の暗さもしくは欠損が低減され得、及び／または視覚の歪みが低減され得る。代替的に、症状は、全て消失する場合がある。

【０１９１】

一実施形態では、対象は、眼障害の症状を呈するようになっている。別の実施形態では、対象は、１０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、２０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、３０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、４０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、５０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、６０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、７０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、８０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象は、９０％以上の光受容体損傷／損失を有する。別の実施形態では、対象の神経節細胞及び視神経への双極細胞回路は、損傷がないままである。

【０１９２】

「治療有効量」は、本明細書では、疾患、状態、または障害に関連付けられた症状のうちの１つ以上を低減することが可能である、本明細書に定義される任意の量の組成物またはＡＡＶベクターを示すために使用される。治療有効量の単回投与は、十分であり得るか、または数日もしくは数週間にわたって、１日数回などの、一定期間にわたって繰り返し適用され得る。活性成分の量は、治療される状態、状態の進行段階、宿主の年齢及びタイプ、ならびに適用される製剤のタイプ及び濃度によって変動するであろう。任意のある場合における適切な量は当業者に容易に明らかであり、またはルーチン実験により決定することができるであろう。

【０１９３】
対象の「治療」または「治療すること」という用語は、疾患もしくは状態、疾患もしくは状態の症状、または疾患もしくは状態のリスク（または感受性）の遅延、遅らせること、安定化、治癒、回復、緩和、除去、変化、救済、悪化の低下、向上、改善、または影響を与えることを目的とした薬物または化合物の適用または投与を含む。「治療する」という用語は、傷害、病理、または状態の治療または改善の成功の任意の兆候を指し、弱化、寛解、悪化の速度の低下、疾患の重症度の低下、安定化、症状の減少、または傷害、病理、もしくは状態を対象に対してより許容可能にすること、変性もしくは衰退の速度を遅らせること、変性の最終点の弱体化をより低くすること、または対象の身体的もしくは精神的幸福を改善することなどの任意の客観的または主観的パラメータが挙げられる。

【０１９４】
本明細書で使用される場合、「防止すること」または「防止」は、疾患または障害を獲得するリスク（またはその感受性）の可能性の少なくとも低減（すなわち、疾患の臨床症状のうちの少なくとも１つを、疾患に曝露され得るかまたは疾患の素因を有するが、疾患の症状をまだ経験していないかまたは示していない患者において発症を引き起こさないこと）を指すことが意図される。そのような患者を同定するための生物学的及び生理学的パラメータは、本明細書で提供され、医師によって周知でもある。例えば、加齢黄斑変性の場合、対象は、疾患の家族歴を有する場合があるか、または個体をＡＭＤに対して素因を有する年齢の対象である場合があるか、または喫煙、肥満、高コレステロール、もしくは高血圧の病歴を有する場合があり、さらに疾患の任意の明らかな症状を示す。この場合、本明細書に記載のＡＡＶベクター及びその組成物は、対象におけるＡＭＤに関連付けられた１つ以上の症状の発症を防止するのに有用であると企図される。

【０１９５】
本発明はまた、疾患、状態、または障害の治療または防止を必要とする対象の同定または診断のための方法を企図する。好ましくは、方法は、眼障害の治療を必要とする対象を同定することを含む。本明細書で使用される診断は、対象または患者が疾患、状態、または障害の治療または防止を必要とするという決定を指す。本明細書に記載の方法によって診断される疾患または障害のタイプは、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載の任意のタイプであり得、好ましくは眼障害である。

【０１９６】
一実施形態では、眼障害の治療または防止を必要とする対象を同定する工程は、以下のうちの１つ以上または全てを介した眼の評価を含む：
－血管造影（例えば、フルオレセイン血管造影またはインドシアニングリーン血管造影）、
－網膜電図、
－超音波検査、
－パキメトリー、
－光干渉断層撮影、
－コンピュータ断層撮影（ＣＴ）及び磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）。

【０１９７】
製剤
本明細書に記載のＡＡＶ粒子及び他の分子は、対象への投与に好適な薬学的組成物として製剤化され得る。例示的な薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含み得る。特定の投与経路に応じて、例えばＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．Ｎ．Ｊ．ＵＳＡ，１９９１）に記載の、当該技術分野において既知の様々な許容される担体が使用され得る。

【０１９８】
例示的な薬学的組成物はまた、薬学的に許容される滅菌水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液、またはエマルション、ならびに使用の直前に滅菌注射溶液または分散液中で

再構築するための滅菌粉末を含み得る。好適な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒、またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物、植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤、または抗菌剤、及び抗真菌剤などのアジュバントを含有し得る。

【０１９９】

ｒＡＡＶ粒子の使用を容易にするための様々な製剤が開発されている。例えば、ｒＡＡＶ粒子の水性注射溶液の投与のために、溶液は、必要な場合、好適に緩衝され得、液体希釈剤は、最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張にすることができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、本明細書に開示の組換えＡＡＶ粒子のうちのいずれか１つ以上の複数を含む。ＵＳＰグレードの担体及び賦形剤は、ヒト対象へのｒＡＡＶ粒子の送達に特に有用である。そのような組成物は、任意選択的に、リポソーム、脂質、脂質複合体、マイクロスフィア、マイクロ粒子、ナノスフィア、もしくはナノ粒子をさらに含み得るか、または治療を必要とする対象の細胞、組織、器官、もしくは身体に投与するために製剤化され得る。そのような組成物を作製するための方法は周知であり、例えば、Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２nd ｅｄｉｔｉｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ，２０１２において見出すことができる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅにおいて見出すことができる。

【０２００】

別の例では、ＡＡＶ粒子は、徐放性送達系または標的送達系に組み込まれ得る。例示的な徐放系としては、ポリマーマトリックス、リポソーム、及びマイクロスフィアが挙げられる。リポソームは、生分解性及び両親媒性薬物送達系であり得、リン脂質及びコレステロールを使用して製剤化され得る。マイクロスフィアは、生分解性及び生体適合性ポリマーを使用して製剤化され得る。

【０２０１】

一例では、調節因子化合物は、局所製剤で提供される。例えば、調節因子化合物は、点眼剤製剤として提供され得る。好適な例示的な点眼剤製剤としては、溶液、懸濁液、軟膏、ゲル、またはフォームが挙げられる。一例では、点眼剤製剤は、本明細書に定義される調節因子化合物及び好適な担体を含む。例示的な担体としては、生理食塩水溶液、ポリエチレングリコールなどの水ポリエーテル、ポリビニルアルコール及びポビドンなどのポリビニル、メチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体、鉱油及び白色ワセリンなどの石油誘導体、ラノリンなどの動物性脂肪、カルボキシポリメチレンゲルなどのアクリル酸のポリマー、ピーナッツ油などの植物性脂肪、ならびにデキストランなどの多糖、ならびにヒアルロン酸ナトリウムなどのグリコサミノグリカン、ならびに塩化ナトリウム及び塩化カリウムなどの塩が挙げられる。

【０２０２】

一例では、ＡＡＶベクターまたはその粒子は、眼のスポンジ、メッシュワーク、機械的リザーバ、または機械的インプラントなどの、ＡＡＶベクターまたはその粒子の制御されたまたは持続的な放出を可能にするデバイス内またはデバイス上に存在する。インプラント可能なデバイスなどのインプラント（例えば、Ｕ．Ｓ．５，４４３，５０５、４，８５３，２２４、及び４，９９７，６５２を参照されたい）、デバイス（例えば、Ｕ．Ｓ．５，５５４，１８７、４，８６３，４５７、５，０９８，４４３、及び５，７２５，４９３を参照されたい）、例えば、機械的リザーバ、眼内デバイスもしくは眼内導管を有する眼外デバイス、またはポリマー組成物で構成されるインプラントもしくはデバイスは、ＡＡＶベクターもしくはその粒子の眼投与に特に有用である。

【０２０３】

一例では、ＡＡＶベクターまたはその粒子は、形質導入効率を高めるため、すなわち、宿主細胞へのＡＡＶベクターの形質導入を高めるために製剤化される。好適な組成物は、

米国特許第６，２２５，２８９号及び同第６，５１４，９４３号にさらに記載されている。

【０２０４】

投与及び用量

一例では、本明細書に定義されるＡＡＶ粒子またはその組成物が、対象に投与される。一例では、組成物は、硝子体内注射を介して投与される。別の例では、組成物は、網膜下注入を介して投与される。一例では、網膜下注射の前に硝子体手術が実施される。別の例では、組成物は、皮下注射を介して投与される。別の例では、組成物は、筋肉内注入を介して投与される。別の例では、組成物は、静脈内注入を介して投与される。別の例では、組成物は、食品または飲料組成物として投与される。調節因子化合物として熱または光の使用を伴う他の例では、そのような化合物は、必要に応じて対象の眼に適用され得る。

【０２０５】

一例では、ＡＡＶベクターまたはその粒子を含む薬学的組成物は、眼の特定の領域に送達するために眼科用器具を介して投与される。特殊な眼科用器具の使用は、隣接する眼組織への損傷を最小限に抑えながら、ＡＡＶベクターまたはその粒子の正確な投与を確実にする。眼の特定の領域へのＡＡＶベクターまたはその粒子の送達はまた、罹患していない細胞の治療用分子への曝露を制限し、それによって副作用のリスクが低減される。そのような眼科用器具の一例は、鉗子及び網膜下針または鋭い曲がったカニューレの組み合わせである。

【０２０６】

その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１９１４４１８６に開示の調節可能なエレメントを使用することが望ましい場合、ＡＡＶベクターまたはその粒子からの治療用分子の発現は、対象への調節因子化合物の投与を介して調節され得る。治療用分子の発現は、その後、キルスイッチ活性化因子を対象に投与することによって、またはキルスイッチ活性化因子をコードする核酸配列を含むＡＡＶベクターもしくはその粒子を投与することによって、サイレンシングすることができる。ＡＡＶベクターまたはその粒子、調節因子化合物、及びキルスイッチ活性化因子の各々は、薬学的組成物として対象に投与され得る。投与経路の選択は、例えば、宿主、ＡＡＶベクターの免疫原性、治療用分子産生の望ましい持続時間などの様々な要因に依存するであろう。

【０２０７】

一例では、ＡＡＶベクターまたはその粒子を含む薬学的組成物は、硝子体内または網膜下注射によって投与され、調節因子化合物（複数可）を含む薬学的組成物は、その後、点眼剤によって局所投与され、キルスイッチ活性化因子は、その後、局所、及び／または硝子体内もしくは網膜下注射によって投与される。点眼剤の使用が企図される場合、組成物またはその一部は、疎水性角膜を通じて眼内環境に拡散することができる。

【０２０８】

別の例では、薬学的組成物は、硝子体への送達（すなわち、硝子体内投与）を介してヒト網膜に投与される。本発明の文脈において、この投与経路は、より多くの拡散量を提供しながら、より単純かつより安全であるので、好ましい。網膜の内境界膜によって作り出される物理的障壁とともに、硝子体におけるＡＡＶ中和抗体の存在は、この投与を選択する際のハードルであることが知られている。ＡＡＶ粒子またはその組成物は、形質導入効率の増加及び免疫応答の低減と関連付けられているので、硝子体に投与する場合に特に有利である。別の例では、組成物は、経口投与され得る。別の例では、組成物は、鼻腔内投与され得る。

【０２０９】

当業者は、宿主の免疫系に起因する導入遺伝子発現の損失を最小限に抑えるように、投薬量及び投与経路を選択することができることを理解するであろう。例えば、インビボで眼細胞を接触させるためには、本明細書に記載の方法を実施する前に、ヌル発現ＡＡＶベクター（すなわち、治療用分子をコードする核酸配列を含まないＡＡＶベクター）を宿主に投与することが有利であり得る。ヌル発現ＡＡＶベクターの事前投与は、宿主において

、ＡＡＶベクターまたはその粒子に対する免疫（例えば、耐性）を作り出すように機能することができ、それによって、宿主の免疫系によって除去されるＡＡＶベクターの量を減少させることができる。

【０２１０】

本明細書に開示の組成物はまた、例えば、静脈内または腹腔内投与などによって、全身投与され得る。この投与経路は、必要に応じて、ＡＡＶ粒子に対する任意の潜在的な有害な免疫応答を抑制するための免疫抑制剤の投与に特に好適である。ＡＡＶ粒子及びその組成物は、対象における免疫原性を低減することができることが想定されるが、免疫抑制剤の使用は、免疫応答をさらに抑制及び／または最適化するために併用してもよい。

【０２１１】

キット

本開示による組成物は、キットまたはパックで提供され得る。例えば、本明細書に開示の組成物は、疾患、状態、または障害を治療するための書面による指示書とともに好適な容器にパッケージングされ得る。一例では、組成物は、眼障害の治療のための点眼器または予め充填されたシリンジなどの単回投与容器内で提供され得る。

【０２１２】

本開示のキットは、治療システムを含み得る。そのような治療システムは、特定の治療上の必要性を満たすために確立された速度で、かつある期間にわたって、組成物の事前にプログラムされた、ヒトの手のかからない送達を提供することができる。このシステムは、例えば、患者の介入を最小限に抑え、処方されたレジメンへの準拠を最適化するように設計することができる。

【０２１３】

一例では、キットは、疾患、状態、または障害を治療するための本明細書に定義されるＡＡＶベクターまたはその粒子を含む。

【実施例】

【０２１４】

一般材料及び方法

倫理に関する声明

この研究のための倫理審査承認は、Ｍｅｔｒｏ Ｓｏｕｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｅｔｈｉｃｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ（ＨＲＥＣ参照番号：ＨＲＥＣ／１８／ＱＰＡＨ／１８９）から得た。Ｑｕｅｅｎｓｌａｎｄ Ｅｙｅ Ｂａｎｋによって、ドナーまたは近親者からの組織に関する研究のためのインフォームドコンセントを死亡前に得た。ヒトの眼杯を死後２４時間以内に回収し、４℃で保管した。収集の前に、ドナー試料を試験し、ＨＩＶならびにＢ型及びＣ型肝炎について陰性であった。これらの調査で使用した眼杯を、死後４８～７２時間にＡＡＶで形質導入した。

【０２１５】

細胞培養

ヒト胚性腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）及び１×Ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐ（Ｇｉｂｃｏ）を含むＲＰＭＩ１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ）中で、５％のＣＯ２／９５％湿度の空気中、３７℃で培養した。短いタンデム反復プロファイリングを使用して、それらの同一性を確認し、マイコプラズマについて定期的に試験して、マイコプラズマを含まないことを確実にした。

【０２１６】

プラスミド構築

ｐＡＡＶ－ＲＣ２のＨｉｎｄＩＩＩとＰｍｅＩ制限部位との間にＨｉｎｄＩＩＩ－ＰｍｅＩ制限断片としてＡＡＶ２ ｒｅｐ－ＡＡＶ８ ｃａｐからのＡＡＶ８ ｃａｐオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をクローニングすることによって、ｐＡＡＶ２／８を作製した。ｐＡＡＶ２／８のＸｂａＩとＨｉｎｄＩＩＩ制限部位との間にＸｂａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ制限断片として７ｍ８（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃６４８３９）からのｐ５プロモータをクローニングすることによって、ｐＡＡＶ２／８ ｐ５を作製した。ＡＡＶ

８　ｃａｐ　ＯＲＦの下流のｐＡＡＶ２／８　ｐ５のＰｍｅＩ制限部位にＰｍｅＩ－ＥｃｏＲＶ制限断片としてＡｄｄｇｅｎｅプラスミド＃１１２８６４からのｐ５プロモータをクローニングすることによって、ｐＡＡＶ２／８　ｐ５－２を作製して、エンハンサとして作用させた。

【０２１７】

ＫＯＤ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼを使用してＰＣＲを重複させることによって、Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆアミノ酸置換をＡＡＶ８　ｃａｐ　ＯＲＦに導入した。ＰＣＲに使用したオリゴヌクレオチドの配列を表６に列挙する。ＡＡＶ２　ｒｅｐ－ＡＡＶ８　ｃａｐは、Ｊｏｈｎ　Ｃｈｉｏｒｉｎｉから贈呈された。７ｍ８は、Ｊｏｈｎ　Ｆｌａｎｎｅｒｙ及びＤａｖｉｄ　Ｓｃｈａｆｆｅｒから贈呈された（Ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃６４８３９）。

【０２１８】

【表６－１】

表６：オリゴヌクレオチドプライマー配列

プライマー名	ヌクレオチド配列	目的
AAV8capF1058_BsiWI	TGCCGTACGTTCTCGGCTC	導入
AAV8capY447F-Rev	CCGAGACAAGTAGAACAGGTACTGGTC	Y447F置換
AAV8capY447F-For	GACCAGTACCTGTTCTACTTGTCTCGG	AAV8 capへ
AAV8capR1475_MluI	GAGACGCGTTGTTGGCGG	遺伝子。
AAV8capF1464_MluI	ACAACGCGTCTCAACGACAAC	導入
AAV8capY733F-Rev	GGGTGAGGAAACGGGTG	Y733F置換
AAV8capY733F-For	CACCCGTTTCCTCACCC	AAV8 capへ
AAV8cap-Rev_PmeI	GCTGTTTAAACGAATTCGCCC	遺伝子。
AAV8capT494V-For	ACAACGCGTCTCAACGGTAACCG	T494V置換。
N590 F1	CCAATCAGGCAAAGAACTGG	導入
N590 R1	CTTAAGATCACCGCGAGATCTGTTTTGCTGCTGCAAGTTATC	*Bgl*II-RGD-*Afl*II
N590 F2	AGATCTCGCGGTGATCTTAAGACGGCTCCTCAAATTGGAAC	挿入
N590 R2	GCTGTTTAAACGAATTCGCCC	n590以降。

【０２１９】

【表６－２】

N590 F3	GATAACTTGCAGCAGCAAAACACCG GT N_{21} GGTCTTTCGACGGCTCCTCAAATTGG AAC	ランダムな7aaの作製
N590 R3	GTTCCAATTTGAGGAGCCGT	BglII-AflIIに挿入
N590 R3	GTTCCAATTTGAGGAGCCGT	BglII-AflIIに挿入

略語：ａａ、アミノ酸；ＲＧＤ、アルギニン－グリシン－アスパラギン酸

【０２２０】

ＡＡＶ２／８ランダムペプチドディスプレイライブラリ構築

ＫＯＤ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼを使用してＰＣＲを重複させることによって、ランダムペプチドディスプレイライブラリ作成のためにｐＡＡＶ２／８ ｐ５－２（Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ）に独自の制限部位の対を付加し、制限消化及びライゲーションによって、またはＮＥＢｕｉｌｄｅｒキットを使用してのいずれかで導入した。これらは、それぞれ、Ｎ５９０のＢｇｌＩＩ／ＡｆｌＩＩ直後の３’であった。制限部位の各対の間に、ＲＧＤペプチドをコードする９つの塩基対配列を含めた。ＰｍｅＩ部位の既存のｐ５プロモータ／エンハンサ３’を有するＩＴＲ－ＡＡＶ６のＸｂａＩとＰｍｅＩ制限部位との間に３つのｐ５－ＡＡＶ２ｒｅｐ－ＡＡＶ８ｃａｐ（Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ変異体）Ｎ５９０ＢｇｌＩＩ／ＡｆｌＩＩカセットをクローニングすることによって、ＡＡＶ２逆位末端反復（ＩＴＲ）配列を付加した。ランダムペプチドディスプレイプラスミドライブラリを作成するために、形態：２１ｎｔ相同配列－制限部位１－Ｎ２１－制限部位２－２１ｎｔ相同配列のオリゴヌクレオチドを合成し、相補的リバースプライマーを使用して二本鎖ＤＮＡに変換し、ゲル精製し、ＮＥＢｕｉｌｄｅｒキットを使用する相同組換えによって（対応する制限酵素対で切断した）ベクターＤＮＡでライゲーションした。ＩＴＲ含有プラスミド及びＮ５９０プラスミドライブラリを使用して形質転換し、ＮＥＢ Ｓｔａｂｌｅ Ｅ．ｃｏｌｉ細胞内で増殖させた。全ての他のプラスミドをＮＥＢ ５α細胞内で増殖させた。ＰＣＲに使用したオリゴヌクレオチドの配列を表６に列挙する。

【０２２１】

ＡＡＶ産生

直径１０ｃｍのペトリ皿内で、５μｇのｐＨｅｌｐｅｒ、２．５μｇのｐＡＡＶ２／８プラスミド、及び２．５μｇのＩＴＲ－ＣＭＶ－ｔｄＴｏｍａｔｏでトランスフェクトした７０～８０％コンフルエントなＨＥＫ２９３細胞からＡＡＶを産生した。５００μｌのＤＭＥＭにプラスミドを最初に添加し、続いて３０μｌの線形ポリエチレンイミン２５００ｋＤａ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ）を上下にピペッティングすることによって混合し、室温で１０分間インキュベートし、１０ｍｌの新鮮な培地中でＨＥＫ２９３細胞に滴加し、穏やかに揺することによって混合し、３７℃でインキュベートした。４８時間後、細胞スクレーパを使用して細胞培地中に細胞を下げ、１５ｍｌのチューブに移し、４００ｇで５分間の遠心分離によって収集し、１ｍｌのＰＢＳで洗浄し、１．５ｍｌのチューブに移し、１０，０００ｇで分間の遠心分離によってペレットを形成した。６００μｌのＰＢＳを細胞ペレットに添加し、ドライアイス中での凍結及び３７℃での解凍の３サイクルによって細胞を溶解させて、ＡＡＶを放出させた。２回目の解凍後、チューブを穏やかに軽く叩くことによって細胞破片を分散させた。最終遠心分離後（７，０００ｇで５分間、続いて１０，０００ｇで２分間）、ＡＡＶを含有する上清を新鮮な１．５ｍｌのチ

ューブに移した。ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ／ａａｖ－ｔｉｔｒａｔｉｏｎ－ｑｐｃｒ－ｕｓｉｎｇ－ｓｙｂｒ－ｇｒｅｅｎ－ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ／に記載されているようにｑＰＣＲによって、ＡＡＶ滴定を実施した。ＡＡＶランダムペプチドディスプレイライブラリを同様に生成したが、５μｇのｐＨｅｌｐｅｒ及び０．５μｇのＩＴＲ隣接ランダムペプチドディスプレイライブラリプラスミドを使用した。

【０２２２】

エクスビボでのライブラリ選択

新規のＡＡＶバリアントを同定するために、ヒト網膜及び網膜下組織において、初期ＡＡＶライブラリの５ラウンド選択方法を実施した。各工程において、ＤＭＥＭ培地中で培養した死後網膜及びＲＣＳ外植片に、ＡＡＶライブラリを添加した。形質導入１２時間後に、培地を交換し、４８時間でゲノムＤＮＡを網膜及び網膜下外植片から抽出した。以下のプライマープラス鎖５’ＧＴＴＴＣＣＣＴＧＣＡＧＡＣＡＡＴＧＣＧ３’及びマイナス鎖５’ＴＣＡＡＡＡＴＧＧＡＧＡＣＣＣＴＧＣＧＴ３’を使用して、成功したビリオンをＰＣＲ増幅した。その結果、ライブラリｃａｐ遺伝子を含有するＰＣＲ産生物を、ＡＡＶ－ｒｅｐ遺伝子及びＩＴＲ－２を含有する細菌プラスミドに再クローニングし、ＡＡＶ２９３細胞を使用して再パッケージングした。選択プロセスに続いて、新規のＡＡＶバリアントを、ＩＴＲ－２エレメントを含有しない細菌プラスミドに再クローニングし、配列決定し、下流プロセスのためにＡＡＶ２９３細胞を使用して、ＡＡＶベクターを産生した。

【０２２３】

統計的分析

特に記述されない限り、データは、平均及び平均の標準誤差として提示される。Ｐ＜０．０５を、統計的に有意であるとみなした。

【０２２４】

結果

ＡＡＶ力価を改善するためのベクター最適化

本発明者らは、血管に隣接するヒト網膜に感染するためのその独自の優先性を理由として、かつＡＡＶ８に対する中和抗体のヒト硝子体内での低い優位性（Ｈａｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）を理由として、遺伝子療法ベクターとして使用するために組換えＡＡＶ２／８を修飾することができるかどうかを調査することを選択した。最初に、ＡＡＶ２　ｃａｐ遺伝子の代わりに、ＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子をｐＲＣ－ＡＡＶ２ベクターにクローニングして、組換えプラスミドｐＡＡＶ２／８を作製した。このプラスミドにおけるウイルス複製（ｒｅｐ）遺伝子の転写は、細菌プロモータからのものである。ＡＡＶ力価を改善することができるかどうかを調査するために、ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ２　ｒｅｐ遺伝子の上流に付加し、翻訳が下流のフレーム内メチオニンで開始されるように、開始因子メチオニンをＡＴＧからＡＣＧに変異させた。これは、ＡＡＶ複製を負に調節する２つの最大のＲｅｐアイソフォーム（ｐ７８及びｐ６８）の翻訳を防止する効果を有する（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。これによって、ＡＡＶ力価に１．６７倍の増加が生じた（図１ａ）。追加的に、ＡＡＶ２　ｐ５プロモータをＡＡＶ８　ｃａｐ遺伝子の下流にクローニングして、エンハンサエレメントとして作用させた。これによって、ウイルス力価にさらに１．７４倍の増加が生じた（図１ａ）。

【０２２５】

ＡＡＶ２　ｃａｐ遺伝子内でのいくつかの保存されたチロシン及びスレオニン残基の類似の（しかし非リン酸化）アミノ酸との置換は、ＡＡＶ２力価を増加させることが報告されている。したがって、ＡＡＶ８におけるＹ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、及びＹ７３３Ｆに対応するこれらのうちの最も重要な３つ（Ｐｅｔｒｓ－Ｓｉｌｖａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９、Ｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）を、ＡＡＶ８ウイルス力価に対するそれらの効果について調査した。全てのＡＡＶ力価が増加し、Ｔ４９４Ｖ（１．４１倍）及びＹ７３３Ｆ（１．３３倍）が最も有効であった（図１ｂ）。３つ全ての置換の組み合わせは、ウイルス力価を１．７５倍増加させた（図１ｂ）。発現ベクターのプラスミドマップを図２ｃ

に示す。まとめると、これらの結果は、プラスミドシス作用調節配列及び保存されたＡＡＶ８カプシド残基に対する変化が、ＨＥＫ２９３パッケージング細胞を使用して産生された組換えＡＡＶ２／８の力価を高めることができるベクターを産生したことを示している。

【０２２６】

ＡＡＶ２／８ランダムディスプレイペプチドライブラリの作成

標的細胞へのウイルス結合にとって重要な部位でベクターカプシドの表面に曝露されるように、短いペプチド配列をＶＰ１－３のループＩＶに挿入し、配置することによって、組換えＡＡＶ２／２ベクター向性を変化させることができる（Ｎｉｃｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００１、Ｇｒｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００１、Ｇｉｒｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９、Ｍｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）。発明者らは、ヒト網膜のＡＡＶ標的化を高める新規の組換えカプシド構造をスクリーニングするために、ＡＡＶ２／８を使用して同様の戦略を用いることができると推論した。ＡＡＶ２／８ Ｙ４４７Ｆ、Ｔ４９４Ｖ、Ｙ７３３Ｆ三重変異体ベクターを、ＡＡＶ２／８カプシドのループＩＶ内にランダムペプチドライブラリを示すように操作し、ＡＡＶ２逆位末端反復を有するｐ５プロモータ及び３’エンハンサ配列に隣接させた。受容体結合に関与するＡＡＶ２／８カプシドドメイン内のそれらの位置を理由として、ループＩＶ部位を選択した。

【０２２７】

ライブラリは、Ｎ末端に２つの追加の固定アミノ酸、及びＣ末端に３つの固定アミノ酸に隣接させて、ランダムな７つのアミノ酸ペプチドを示す（ペプチド挿入と適合することが以前実証されている）（Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００１）（図２ａ）。ライブラリからの３つのクローンのＤＮＡ配列決定は、異なるランダムなペプチドが各クローンによってコードされたことを検証した（図３ａ）。各クローンのＳｂｆＩ消化によって、ＩＴＲの存在を確認した（図３ｂ）。個々のパッケージング細胞がライブラリから単一のプラスミドのみを取り込むことを目的として、ＡＡＶライブラリを生成するためにＨＥＫ２９３パッケージング細胞を高い細胞：プラスミド比でトランスフェクションし、その結果、各ＡＡＶカプシドは、含有するＩＴＲ隣接ライブラリｃａｐ遺伝子によってコードされるペプチド配列のみを示した。

【０２２８】

指向性進化によって硝子体からヒト網膜に感染するＡＡＶ８バリアントの同定

新規のＡＡＶバリアントを同定するために、ヒト網膜及び網膜下組織において、初期ＡＡＶライブラリの５ラウンド選択方法を実施した。各工程において、ＤＭＥＭ培地中で培養した死後網膜及びＲＣＳ外植片に、ＡＡＶライブラリを添加した。形質導入１２時間後に、培地を交換し、４８時間でゲノムＤＮＡを網膜及び網膜下外植片から抽出した。以下のプライマープラス鎖５’ＧＴＴＴＣＣＣＴＧＣＡＧＡＣＡＡＴＧＣＧ３’及びマイナス鎖５’ＴＣＡＡＡＡＴＧＧＡＧＡＣＣＣＴＧＣＧＴ３’を使用して、成功したビリオンをＰＣＲ増幅した。その後、ライブラリｃａｐ遺伝子を含有するＰＣＲ産生物を、ＡＡＶ－ｒｅｐ遺伝子及びＩＴＲ－２を含有する細菌プラスミドに再クローニングし、ＡＡＶ２９３細胞を使用して再パッケージングした。選択プロセスに続いて、新規のＡＡＶバリアントを、ＩＴＲ－２エレメントを含有しない細菌プラスミドに再クローニングし、配列決定した。選択されたクローンは、ＡＡＶ２９３細胞におけるトリプルトランスフェクションを使用して産生されたＡＡＶベクターであり、機能アッセイで使用した。

【０２２９】

免疫系におけるＡＡＶ８バリアントの機能評価

レポータとしてｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼを使用して、２４ウェル及び９６ウェルプレート内でＣｏｓ－７、ＬｎＣａｐ、及びＭｅｌ細胞を、同じ力価の組換えＡＡＶ２／８及びＡＡＶ２／８ Ｃ１ｍ１ベクターで形質導入した。ＡＡＶを、ＦＢＳを含まない２５０μＬのＤＭＥＭ培地、または示された希釈（１／１０、１／１００、１／１０００）での適合ドナーから得た血清の２５０μＬのいずれかで希釈し、３７℃で１時間事前インキュベーションした。ＡＡＶ形質導入細胞は、５％のCO_2ＴＣインキュベータ内

で、３７℃で１６～２４時間インキュベートした。分泌されたルシフェラーゼを含有する培地を収集し、－８０℃で保管し、エンドポイントで測定した。製造業者のプロトコルに従って、ＰＨＥＲＡｓｔａｒ　ＦＳＸ（ＢＭＧ－Ｌａｂｔｅｃｈ，Ｏｒｔｅｎｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）及びＮａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、ルシフェラーゼ発現を測定した。ＡＡＶ２／８　Ｃ１ｍ１バリアントは、ドナーの血清中に存在する抗ＡＡＶ８抗体によって効率的に中和を逃れたが（血清試料ｐ１４６及びｐ２６１が示されている）、未修飾ＡＡＶ２／８親カプシドは、血清中に存在する抗体によって認識された（図５Ａ～Ｂ）。

【０２３０】

ＡＡＶ２／８カプシドのループＩＶへのペプチド挿入の比較

カプシドタンパク質ＶＰ３　ＡＡＶ８のＮ５９０位へのペプチド挿入のＣｌｕｓｔａｌ Ｏアラインメント（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｍｓａ／ｃｌｕｓｔａｌｏ／）。ＭＶｉｅｗ１．６３を、アラインメントの図表現に使用した（Ｂｒｏｗｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。エクスビボでのＡＡＶ８　Ｎ５９０ライブラリ選択後に得られた挿入（図６）を、野生型ＡＡＶ２及びＡＡＶ８カプシドのＮ５９０における挿入の公開されている配列：ＡＡＶ－７ｍ８（Ｋｈａｂｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、ＡＡＶ２．ＮＮ、ＡＡＶ２．ＧＬ（Ｐａｖｌｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０２１）、ＡＡＶ８＿ｌｕｎｇ、ＡＡＶ８＿ｂｒｅａｓｔ（Ｂｕｅｎｉｎｇ　ａｎｄ　Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ，２０１９）、ＡＡＶ８＿ｌｉｂＮＧ（Ｂｏｅｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０２０）と比較した。

【０２３１】

様々なＡＡＶ－ＧＦＰ最適化クローンのレポータ蛍光の分析

ＡＲＰＥ１９細胞を、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰレポータプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃６７６３４）を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。（Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）に記載されているように、Ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２）、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰレポータプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃６７６３４）、及び線状ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用するｐＨｅｌｐｅｒプラスミド２５ｋＤａ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ）、及びＡＡＶ２９３（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）細胞の三重トランスフェクションによって、ＡＡＶベクターを調製した。インビトロでの適用のために、Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１９）プロトコルによってＡＡＶを精製した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中５×１０^{4}細胞／ウェルで１２ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ：１×１０^{4}～１×１０^{5}のＡＡＶで形質導入した。ＥＶＯＳ　Ｃｅｌｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはＯｌｙｍｐｕｓ　ＩＸ７３倒立顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ）を使用して、生細胞撮像を４８時間及び７２時間で実施した。ＮｕｃＢｌｕｅ（商標）Ｌｉｖｅ　ＲｅａｄｙＰｒｏｂｅｓ（商標）Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して、核染色を行った。示されるのは、ＧＦＰを発現している示されたＡＡＶバリアントで形質導入したＡＲＰＥ１９細胞の代表的な蛍光顕微鏡画像である。Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方は、形質導入後２４時間及び４８時間でＧＦＰ発現を実証し、「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、ＡＲＰＥ１９細胞を形質導入するのに効率的であり、親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドよりも実質的により効率的であることを示した（図７）。

【０２３２】

初代網膜細胞株における様々なＡＡＶ－ＧＦＰ最適化クローンのレポータ蛍光の試験

ヒト初代ＲＰＥ混合培養物（継代４～７）を、ｔｄＴｏｍａｔｏレポータプラスミド（ｐＡＡＶ－ＭＣＳにクローニングされたｔｄＴｏｍａｔｏ、Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）

を含有するＡＡＶ、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＧＦＰレポータプラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ＃６７６３４）を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中１×１０^{4}細胞／ウェルで播種し、ＭＯＩ：１×１０^{4}～１×１０^{5}のＡＡＶで形質導入した。細胞を４％のＰＦＡで固定し、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　６５００ＨＳハイコンテント撮像システムを使用して撮像した。ＮｕｃＢｌｕｅ（商標）Ｌｉｖｅ　ＲｅａｄｙＰｒｏｂｅｓ（商標）Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して、核染色を行った。示されるのは、ＧＦＰまたはＴｄＴｏｍａｔｏを発現している示されたＡＡＶバリアントで形質導入したヒト初代ＲＰＥ細胞の代表的な蛍光顕微鏡画像である。Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドは、形質導入後４８時間でＧＦＰ及びｔｄＴｏｍａｔｏの発現を実証し、それらが、「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、初代ＲＰＥ細胞を形質導入するのに効率的であることを示した（図８Ａ～Ｂ）。親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドは、初代ＲＰＥ細胞培養物の形質導入を無効にすることを示した。

【０２３３】

ヒト網膜細胞株及び外植片における最適化ＡＡＶベクターの形質導入効率

まず、次いで、ヒトＡＰＲＥ１９細胞において形質導入効率を試験した。ＡＰＥ１９細胞を、ｓｅｃＮａＮｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。分泌されたＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）レポータ遺伝子をｐＡＡＶ－ＭＣＳ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）プラスミドにクローニングした。発現カセットを、ＡＡＶ２逆位末端反復に隣接させた。ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータを使用して、ＳｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータ遺伝子を発現させた。（Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）に記載されているように、Ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２）、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ－ｐＡＡＶ－ＭＣＳ、及び線状ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用するｐＨｅｌｐｅｒプラスミド２５ｋＤａ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ）、及びＡＡＶ２９３（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）細胞の三重トランスフェクションによって、ＡＡＶベクターを調製した。インビトロでの適用のために、Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１９）プロトコルによってＡＡＶを精製した。

【０２３４】

細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中２×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。３つの独立した生物学的複製物を使用した。

【０２３５】

継代６～８での初代ヒトＲＰＥ細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉ

ｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中５×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。Ａ）に記載されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性のために細胞を処理した。

【０２３６】

Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、ＡＲＰＥ１９及び初代ＲＰＥ細胞におけるｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの堅牢な発現を実証した。形質導入後５日目及び７日目のルシフェラーゼの蓄積は、ＡＡＡＶ２－７ｍ８バリアント及び親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜色素細胞の形質導入においてより効率的であることを示す。相対的な形質導入効率は、５日目のＣ１ｍ２カプシドでは特に高かった（ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと比較して、最大６倍の差）。これらの差は、実験の全期間（７日間）の間観察された。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２　ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した細胞は、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントよりも顕著に高いルシフェラーゼ活性を有した（図９Ａ及びＢ）。したがって、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０におけるペプチド挿入Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２は、ヒト網膜細胞において高い形質導入効率を示した。

【０２３７】

次いで、ヒト網膜外植片において形質導入効率を試験した。死後のヒト眼杯を、受領直後に切開した。硝子体液を除去した後、使い捨ての３．５ｍｍ（または４ｍｍ）生検パンチ（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用して眼球壁にパンチ生検を実施して、網膜及び網膜色素上皮、脈絡膜及び強膜（ＲＣＳ）外植片を得た。各眼杯から最大１６個の生検を得た。同じ眼杯からのパンチ生研を、２４ウェルプレートにランダムに群に分け、ＡＡＶ形質導入前に低酸素及び低温から回復させるために、ダルベッコ改変イーグル培地：１０％ｖ／ｖのウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した栄養混合物Ｆ－１２（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）中で２４時間、５％のＣＯ２加湿空気雰囲気中３７℃でインキュベートした。

【０２３８】

網膜外植片を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータプラスミドを含有するＡＡＶで３回形質導入し、１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、７ｍ８、ＡＡＶ２／８ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドで４８時間パッケージングした。ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ－ＡＡＶを外植片当たり２×１０^{9}ｖｇで添加した。分泌されたＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）レポータ遺伝子をｐＡＡＶ－ＭＣＳ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）プラスミドにクローニングした。発現カセットを、ＡＡＶ２逆位末端反復に隣接させた。ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータを使用して、ＳｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータ遺伝子を発現させた。（Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９）に記載されているように、Ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２）、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ－ｐＡＡＶ－ＭＣＳ、及び線状ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用するｐＨｅｌｐｅｒプラスミド２５ｋＤａ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＵＳ）、及びＡＡＶ２９３（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）細胞の三重トランスフェクションによって、ＡＡＶベクターを調製した。インビトロでの適用のために、Ｋｉｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１９）プロトコルによってＡＡＶを精製した。

【０２３９】

続いて、ＡＡＶ形質導入網膜外植片を、２４ウェルプレート内で、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲ

ＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。

【０２４０】

Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、形質導入後１日目及び２日目にｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの堅牢な発現を実証し、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアント及び親ＡＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜外植片を形質導入することにおいてより効率的であることを示した（図１０Ａ）。相対的な形質導入効率は、２日目のＣ１ｍ２カプシドでは特に高かった（ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと比較して、最大２０倍の差）。これらの差は、実験の全期間（１４日間）の間継続された。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２　ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した網膜外植片は、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントよりも顕著に高いルシフェラーゼ活性を有した（図１０Ｂ）。したがって、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０におけるペプチド挿入Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２は、ヒト網膜外植片の高い形質導入効率を示した。

【０２４１】

次いで、ヒト上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片において形質導入効率を試験した。死後のヒト眼杯を、受領直後に切開した。硝子体液及び網膜を除去した後、使い捨ての４ｍｍ生検パンチ（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用して眼球壁にパンチ生検を実施して、ＲＣＳ外植片を得た。各眼杯から最大８つの生検を得た。同じ眼杯からのパンチ生研を、２４ウェルプレートにランダムに群に分け、ＡＡＶ形質導入前に低酸素及び低温から回復させるために、ダルベッコ改変イーグル培地：１０％ｖ／ｖのウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した栄養混合物Ｆ－１２（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）中で２４時間、５％のＣＯ２加湿空気雰囲気中３７℃でインキュベートした。

【０２４２】

ＲＣＳ外植片を、ｓｅｃＮａＮｏＬｕｃレポータプラスミドを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。ＲＣＳ外植片を、１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、ＡＡＶで４８時間形質導入した。ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ－ＡＡＶを外植片当たり2×10^{9}ｖｇで添加した。

【０２４３】

続いて、ＡＡＶ形質導入網膜外植片を、２４ウェルプレート内で、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。

【０２４４】

Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方は、形質導入後１日目及び２日目にｓｅｃＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼの発現を実証し、「ベンチマークとされる」ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同程度に、ヒトＲＣＳ外植片を形質導入するのに効率的であり、親ＡＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドよりも効率的であることを示した（図１１Ａ～Ｂ）。

【０２４５】

次に、発明者らは、追加の細胞タイプにおけるＣ１ｍ１及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの効果を決定しようと試みた。眼黒色腫細胞株Ｍｅｌ２９０、９２－１（図１２Ａ）、ＬＸ２肝星細胞、Ｈｕｈ７肝細胞癌細胞（図１２Ｂ）、及び形質転換されたヒト臍帯静脈内皮細胞（ＥＡ．ｈｙ９２６）（図１２Ｃ）を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで三回形質導入した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中２×10^4細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×10^4のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。総計算ＲＬＵを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。

【０２４６】

Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方は、眼メラノーマ細胞及び肝細胞癌細胞に対して中等度の向性を示した。興味深いことに、Ｃ１ｍ２カプシドは、肝線維症に関与する主要な細胞タイプであるＬＸ２肝星細胞（ＳＶ４０形質転換細胞株）において向性の増加を示した。ＥＡ．ｈｙ９２６細胞株は、血管内皮細胞に特徴的ないくつかの特徴を示し、７ｍ８のカプシドで効率的に形質導入された。しかしながら、Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方は、ＥＡ．ｈｙ９２６細胞株において低い向性を示した。

【０２４７】

修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規のＡＡＶ８バリアントによって、ラット網膜上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片、ならびに初代ラットＲＰＥ細胞株を形質導入する。

【０２４８】

ラット（Ｗｉｓｔａｒ）の眼を切開し、抗生物質を含有するＤ－ＰＢＳに入れた。硝子体液を除去した後、使い捨ての２ｍｍ生検パンチ（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用して眼球壁にパンチ生検を実施して、網膜色素上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片を得た。各眼から最大４つの生検を得た。同じラット眼からのパンチ生検を、２４ウェルプレートにランダムに群に分け、ＡＡＶ形質導入前に１０％ｖ／ｖのウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で２４時間、５％のCO_2中３７℃でインキュベートした。ラットＲＣＳ外植片を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、１×10^9ｖｇ／ウェルで、外植片をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣ

ＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。ヒト及びラットＲＣＳ外植片を用いた実験間のＲＬＵの直接比較を可能にするように獲得値を調整した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。図１３Ａに示されるように、Ｃ１ｍ１及びＣ２ｍ２を含有するＡＡＶを用いたＲＣＳ外植片の形質導入は、３日及び７日の治療にわたってＡＡＶ７ｍ８と比較すると、形質導入効率に顕著な増加を生じた。

【０２４９】

また、初代ラットＲＰＥ混合細胞培養物を、ｓｅｃＮａｎｏＬｕｃレポータを含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔２０血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中５×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。５０μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって推奨されるように、Ｎａｎｏ－Ｇｌｏ（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム及びＣＬＡＲＩＯｓｔａｒ　Ｐｌｕｓプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用するｓｅｃＮａｎｏＬｕｃ活性の測定のために、アリコートを処理した。ヒト及びラット細胞培養物を用いた実験間のＲＬＵの直接比較を可能にするように獲得値を調整した。複数の時点のデータを、各時点での総発光を計算するための変換（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、Ｅｘｃｅｌで処理した。図１３Ｂに示されるように、Ｃ１ｍ１及びＣ２ｍ２を含有するＡＡＶを用いたラットＲＰＥ細胞の形質導入は、３日及び７日の治療にわたって形質導入効率の増加を生じた。

【０２５０】

修飾されたカプシドＣ１ｍ１及びＣ１ｍ２を使用した、初代ＲＰＥ細胞株における潜在的な治療用遺伝子ＩＬ１０による形質導入アッセイ。

【０２５１】

継代６～８の初代ヒトＲＰＥ細胞を、ＩＬ１０遺伝子を含有し、７ｍ８、ＡＡＶ２／８ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで３回形質導入した。ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータを使用して、ＩＬ１０遺伝子を発現させた。Ｒｅｐ／ｃａｐプラスミド（ＡＡＶ７ｍ８、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２、Ｃ１ｍ１、及びＣ１ｍ２）、ＩＬ－１０－ｐＡＡＶ、及びＰｈｅｌｐｅｒプラスミドをＡＡＶ２９３細胞株（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）に三回トランスフェクションすることによって、ＡＡＶベクターを調製した。非特異的対照として、ＡＡＶ－ＣＭＶ－ＴｄＴｏｍａｔｏを使用した。

【０２５２】

細胞を、１０％ｖ／ｖのウシ胎仔血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中５×１０^{4}細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、ＭＯＩ１×１０^{4}のＡＡＶで形質導入した。１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で、細胞をＡＡＶで２４時間形質導入した。続いて、ＡＡＶ形質導入細胞を、１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した５００μＬのＤＭＥＭ／Ｆ１２（フェノールレッドを含まない）培地中で培養した。１００μＬの培地アリコートを、示された時点で除去し、－８０℃で凍結した。製造業者（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって推奨されるようにＩＬ１０

ＥＬＩＳＡキットを使用するＩＬ１０タンパク質の測定のために、アリコートを処理した。複数の時点のデータを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ９ソフトウェアによって分析した。

【０２５３】

Ｃ１ｍ１　ＡＡＶ２／８カプシド及びＣ１ｍ２　ＡＡＶ２／８カプシドの両方が、初代ＲＰＥ細胞におけるＩＬ１０遺伝子の発現を実証した。形質導入後７日目の実質的な量のＩＬ１０タンパク質は、修飾されたカプシドが、親ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシドと比較して、ヒト網膜色素細胞の形質導入においてより効率的であることを示した。ＩＬ１０発現は、７日目のＣ１ｍ２カプシドで特に高く、ＡＡＶ２－７ｍ８バリアントと同等であった。形質導入後７日目に、Ｃ１ｍ２　ＡＡＶ２／８を使用して形質導入した細胞は、ＡＡＶ２／８　ｐ５－２カプシド及びＣ１ｍ１カプシドよりも顕著に高いＩＬ１０発現を有した（図１４）。したがって、データは、ＡＡＶ８カプシドのＮ５９０位でのＣ１ｍ１またはＣ１ｍ２の挿入が、ヒト網膜細胞への治療用遺伝子としてのＩＬ１０の効率的な送達を提供することを示している。

【０２５４】

エンドスタチン－アンジオスタチン融合タンパク質を発現する修飾されたカプシド配列Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２を有する新規ＡＡＶ８バリアントは、エクスビボでのヒト外植片における脈絡膜発芽を調節する。

【０２５５】

死後のヒト眼杯を、受領直後に切開した。硝子体液を除去した後、使い捨ての２ｍｍ生検パンチ（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を使用してパンチ生検を実施して、網膜色素上皮、脈絡膜、及び強膜（ＲＣＳ）外植片を得た。各眼杯から最大１２個の生検を得た。同じ眼杯からのパンチ生検を、２４ウェルプレート内でランダムに群に分け、ＡＡＶ形質導入前に低酸素及び低温から回復させるために、ダルベッコ改変イーグル培地：１０％ｖ／ｖのウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｇｉｂｃｏ）、及び１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充した栄養混合物Ｆ－１２（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）中で２４時間、５％のＣＯ２中３７℃でインキュベートした。

【０２５６】

分泌性エンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を含有し、Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングしたＡＡＶで、１％ｖ／ｖのＦＢＳを補充したＤＭＥＭ／Ｆ１２中で４８時間の間３回、網膜外植片を形質導入した。エンドスタチン－アンジオスタチンＡＡＶを、外植片当たり2×10^{9}ｖｇで添加した。分泌されたエンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子をｐＡＡＶ－ＭＣＳ（Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌａｂｓ）にクローニングした。ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモータを使用して、分泌されたエンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を発現させた。対照外植片は、未治療のままにしたか、または蛍光レポータ遺伝子を含有する非特異的ＡＡＶで治療した。

【０２５７】

エクスビボでのヒト脈絡膜発芽アッセイは、マウス眼外植片のプロトコルから適合させた（Ｓｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）。形質導入後、脈絡膜外植片を、高分解能撮像（Ｃｅｌｌｖｉｓ）のために、２４ウェルガラス底プレート内の３０μＬの冷成長因子還元Ｇｅｌｔｒｅｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）に埋め込んだ。Ｇｅｌｔｒｅｘ「ドーム」を、ＴＣインキュベータ内で、＋３７℃で２０分間重合させた。外植片を、２．５％のＦＢＳ、ＶＥＧＦ１６５を含む成長因子、アスコルビン酸、及びペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＥＢＭ－２培地（Ｌｏｎｚａ）中で、５％のＣＯ２中３７℃で成長させた。外植片由来の脈絡膜芽を、図１５Ａに示されるように７日目に撮影した。個々の外植片を、４倍の倍率で、Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＩＸ７３顕微鏡で位相差光学系を使用して撮影した。脈絡膜発芽の代表的な画像を示す。発芽面積は、ＦＩＪＩ／Ｉｍａｇｅ　Ｊを使用して定量化した（Ｓｃｈｉｎｄｅｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）（図１５Ｂ）。エンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を発現するＡＡＶ－Ｃ１ｍ２による形質導入

後の発芽面積の定量化結果を示す（ｎ＝３つの生物学的複製物）（図１５Ｃ）。予想通り、外植片由来の脈絡膜芽は、分泌型エンドスタチン－アンジオスタチン融合遺伝子を含有し、Ｃ１ｍ１及びＣ１ｍ２カプシドでパッケージングされたＡＡＶで形質導入した外植片において、顕著に阻害された。

【０２５８】

参考文献

１．Ｗａｎｇ，Ｄ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ｖｅｃｔｏｒ ａｓ ａ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．１８，３５８－３７８（２０１９）．

２．Ｂｏｕｔｉｎ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｖａｌｅｎｃｅ ｏｆ ｓｅｒｕｍ ＩｇＧ ａｎｄ ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ ｆａｃｔｏｒｓ ａｇａｉｎｓｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ（ＡＡＶ）ｔｙｐｅｓ １，２，５，６，８，ａｎｄ ９ ｉｎ ｔｈｅ ｈｅａｌｔｈｙ ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｕｓｉｎｇ ＡＡＶ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２１，７０４－７１２（２０１０）．

３．Ｃａｌｃｅｄｏ，Ｒ．，Ｖａｎｄｅｎｂｅｒｇｈｅ，Ｌ．Ｈ．，Ｇａｏ，Ｇ．，Ｌｉｎ，Ｊ．＆ Ｗｉｌｓｏｎ，Ｊ．Ｍ．Ｗｏｒｌｄｗｉｄｅ ｅｐｉｄｅｍｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｔｏ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓｅｓ．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１９９，３８１－３９０（２００９）．

４．Ｄｏｎｇ，Ｊ．－Ｙ．，Ｆａｎ，Ｐ．－Ｄ．＆ Ｆｒｉｚｚｅｌｌ，Ｒ．Ａ．Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｐａｃｋａｇｉｎｇ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｄｅｎｏ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｖｉｒｕｓ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７，２１０１－２１１２（１９９６）．

５．Ａｇｂａｎｄｊｅ－ＭｃＫｅｎｎａ，Ｍ．＆ Ｋｌｅｉｎｓｃｈｍｉｄｔ，Ｊ．ＡＡＶ ｃａｐｓｉｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ ｃｅｌｌ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｆｔｏｎ ＮＪ．８０７，４７－９２（２０１１）．

６．Ｓａｍｕｌｓｋｉ，Ｒ．Ｊ．＆ Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｎ．ＡＡＶ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｕｒｐｏｓｅｓ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｖｉｒｏｌ．１，４２７－４５１（２０１４）．

７．Ｚｈｏｎｇ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｘｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ２ ｖｅｃｔｏｒｓ：ｐｏｉｎｔ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｙｒｏｓｉｎｅｓ ｌｅａｄ ｔｏ ｈｉｇｈ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ａｔ ｌｏｗｅｒ ｄｏｓｅｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０５，７８２７－７８３２（２００８）．

８．Ａｓｌａｎｉｄｉ，Ｇ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．，Ｈｉｇｈ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｍｏｎｏｃｙｔｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｃａｐｓｉｄ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＡＡＶ２ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｖａｃｃｉｎｅ ３０，３９０８－３９１７（２０１２）．

９．Ａｓｌａｎｉｄｉ，Ｇ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．，Ｏｐｔｉｍｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃａｐｓｉｄ ｏｆ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ２（ＡＡＶ２）ｖｅｃｔｏｒｓ：ｔｈｅ ｆｉｎａｌ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ？ ＰｌｏＳ Ｏｎｅ ８，ｅ５９１４２（２０１３）．

１０．Ｌｉ，Ｂ．ｅｔ ａｌ．Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ Ｓｕｒｆａｃｅ－Ｅｘｐｏｓｅｄ Ｌｙｓｉｎｅ Ｒｅｓｉｄｕｅｓ Ｌｅａｄｓ ｔｏ Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｂｙ ＡＡＶ２，Ｂｕｔ Ｎｏｔ

AAV8, Vectors in Murine Hepatocytes In Vivo. Hum. Gene Ther. Methods 26, 211-220 (2015).
11. Shi, W., Arnold, G. S. & Bartlett, J. S. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. Hum. Gene Ther. 12, 1697-1711 (2001).
12. Xie, Q. etal., The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 10405-10410 (2002).
13. Yang, L. etal., A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 3946-3951 (2009).
14. Bartel, M. A., Weinstein, J. R. & Schaffer, D. V. Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery. Gene Ther. 19, 694-700 (2012).
15. Zinn, E. et al., In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. Cell Rep. 12, 1056-1068 (2015).
16. Bordet, T. & Behar-Cohen, F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives. Drug Discov. Today 24, 1685-1693 (2019).
17. Ramlogan-Steel, C. A. et al., Gene therapy and the adeno-associated virus in the treatment of genetic and acquired ophthalmic diseases in humans: Trials, future directions and safety considerations. Clin. Experiment. Ophthalmol. 47, 521-536 (2019).
18. Wiley, L. A. et al., Assessment of Adeno-Associated Virus Serotype Tropism in Human Retinal Explants. Hum. Gene Ther. 29, 424-436 (2018).
19. Dalkara, D. et al., In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. Sci. Transl. Med. 5, 189ra76-189ra76 (2013).
20. Halbert, C. L. et al., Prevalence of Neutralizing Antibodies against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 2, 5, and 6 in Cystic Fibrosis and Normal Populations: Implications for Gene Therapy using AAV Vectors. Hum. Gene Ther. 17, 440-447 (2006).

21. Li, J., Samulski, R. J. & Xiao, X. Role for highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. J. Virol. 71, 5236-5243 (1997).
22. Petrs-Silva, H. et al., High-efficiency Transduction of the Mouse Retina by Tyrosine-mutant AAV Serotype Vectors. Mol. Ther. 17, 463-471 (2009).
23. Kay, C. N. et al., Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel, Capsid-Mutated AAV Vectors. PLOS ONE 8, e62097 (2013).
24. Nicklin, S. A. et al., Efficient and Selective AAV2-Mediated Gene Transfer Directed to Human Vascular Endothelial Cells. Mol. Ther. 4, 174-181 (2001).
25. Grifman, M. et al., Incorporation of Tumor-Targeting Peptides into Recombinant Adeno-associated Virus Capsids. Mol. Ther. 3, 964-975 (2001).
26. Girod, A. et al., Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. Nat. Med. 5, 1052-1056 (1999).
27. Mueller, O. J. et al. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. Nat. Biotechnol. 21, 1040-1046 (2003).
28. Kimura T. et al., Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications. Sci Rep. 9 (1) : 13601 (2019).
29. Brown N. P. et al., MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. Bioinformatics. 14 (4) : 380-1 (1998).
29. Khabou H. et al., Insight into the mechanisms of enhanced retinal transduction by the engineered AAV2 capsid variant -7 m8. Biotechnol Bioeng. Dec; 113 (12) : 2712-2724 (2016).
30. Buening, H., & Srivastava, A. Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. Molecular therapy. Methods & Clinical Development, 12, 248-265 (2019).
31. Pavlou M et al., Novel AAV capsids for intravitreal gene therapy of photoreceptor disorders. EMBO Mol Med., 13 (4) (2021).
32. Boerner, K. et al., Pre-arrayed Pan-AAV Peptide Display Libraries for Rapid Sing

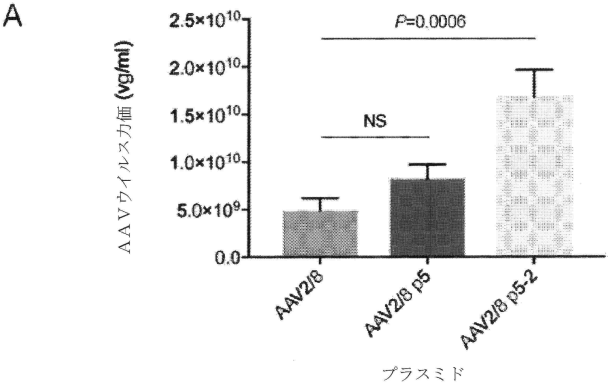
le-Round Screening. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 28(4), 1016-1032 (2020).
33. Raupp, C. et al., The Threefold Protrusions of Adeno-Associated Virus Type 8 Are Involved in Cell Surface Targeting as Well as Postattachment Processing. J Virol., 86(17): 9396-9408 (2012).
34. Nam et al., Structure of Adeno-Associated Virus Serotype 8, a Gene Therapy Vector, J Virol., v. 81(22) (2007).
35. Mietzsch, M. et al., Completion of the AAV Structural Atlas: Serotype Capsid Structures Reveals Clade-Specific Features, Viruses, 13(1): 101 (2021).
36. Shao, Z., et al., Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. PLoS One. Jul 26; 8(7): e69552 (2013).
37. Schindelin, J., et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, 9(7), 676-682 (2012).
38. Gao, G., et al., Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. PNAS, 99(18) 11854-11859 (2002).
39. Wu Z., et al., Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. J Virol., 80(22) 11393-7 (2006).
40. Perbal, J., A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984).
41. Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989).
42. Brown T. A., (editor) Essential Molecular Biology: A Practical Approach. Volumes 1 and 2, IRL Press (1991).
43. Glover D. M., and Hames B. D., (editors), DNA Cloning: A Practical Approach. Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)
44. Ausubel F. M., et al., (editors), Current Protocols in Molecular Biology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present),
45. Coligan J. E., et al. (editors) Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons (including all updates until present).
46. Nei M. and Kumar S., Molecular Evolutio

n and Phylogenetics. Oxford University Press, New York (2000).
47. Needleman S. B., and Wunsch C. D., A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol 48 (3) : 443-53 (1970).
48. Knipe D. M., and Howley P. M., Clinical Infectious Dsieases, Field's Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ed. Sixth (2013).
49. Vasileva & Jessberger, Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting, Nature reviews. Microbiology, 3 : 837-847 (2005).
50. Muzyczka, Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells, Current Topics in Microbiol, and Immunol. 158 : 97-129 (1992).
51. Kotin, Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy, Human Gene Therapy 5 : 793-801 (1994).
52. Zhou et al., Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood, J Exp. Med. 179 : 1867-1875 (1994).
53. Zolotukhin et al., Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28 : 158-167 (2002).
54. Samulski et al., A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication, J Virology, 6 : 3096-3101 (1987).
55. Clement et al., Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies, Hum Gene Ther., 20 (8) : 796-806 (2009).
56. Duan et al., Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation, J. Virol., 75 : 7662-7671 (2001).
57. Halbert et al., Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated

virus vectors with different serotypes, J. Virol., 74：1524－1532（2000）.
58. Zolotukhin et al., Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors, Methods, 28：158－167（2002）.
59. Auricchio et al., Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics：the retina as a model, Hum. Mol. Genet., 10：3075－3081（2001）.
60. Kozomara et al., miRBase：annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data Nuc Acids Res, 42：68－73（2013）.
61. Griffiths-Jones, S., The microRNA Registry, Nuc Acids Res, 1：32（2004）.
62. Remington's Pharmaceutical Sciences（Mack Publishing Co. N. J. USA（1991）.
63. Remington：The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition. Pharmaceutical Press,（2012）.

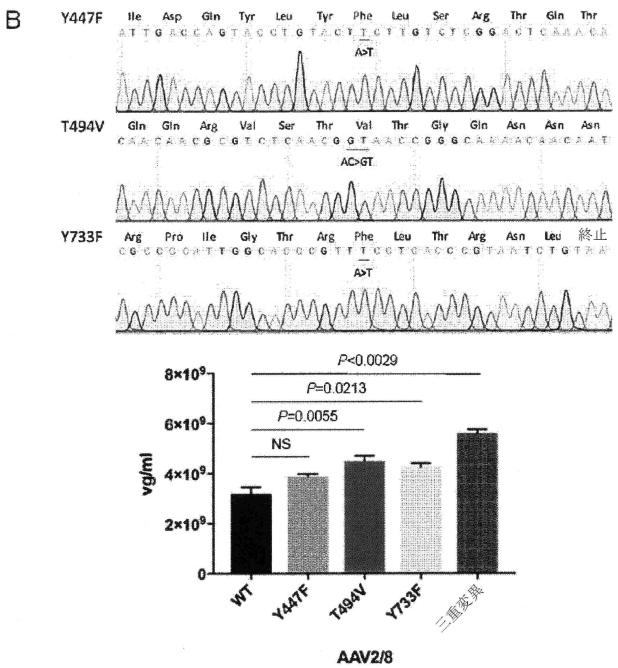
【図面】

【図１－１】

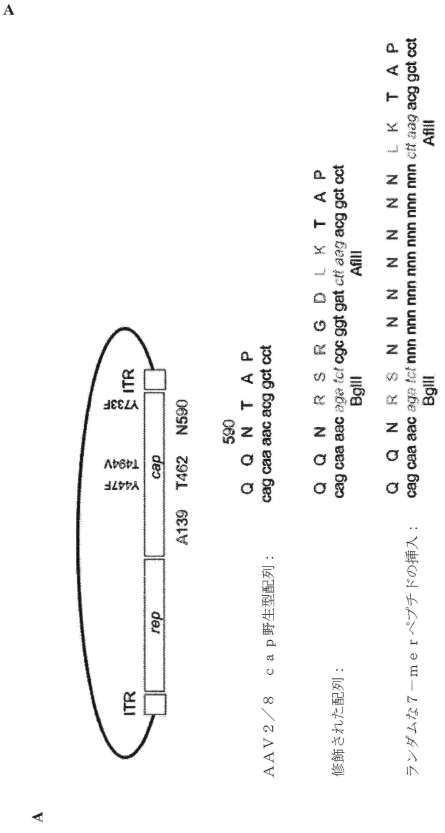


【図１－２】

（続き）

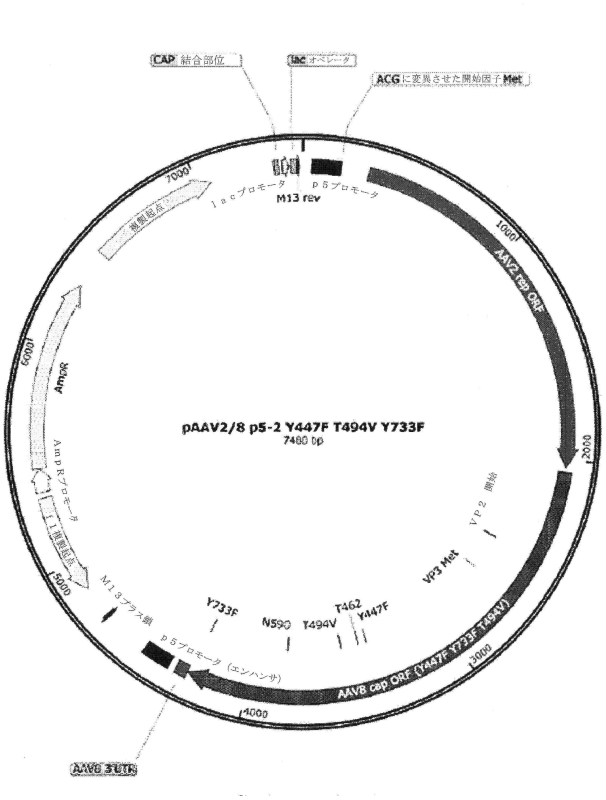


【図２－１】

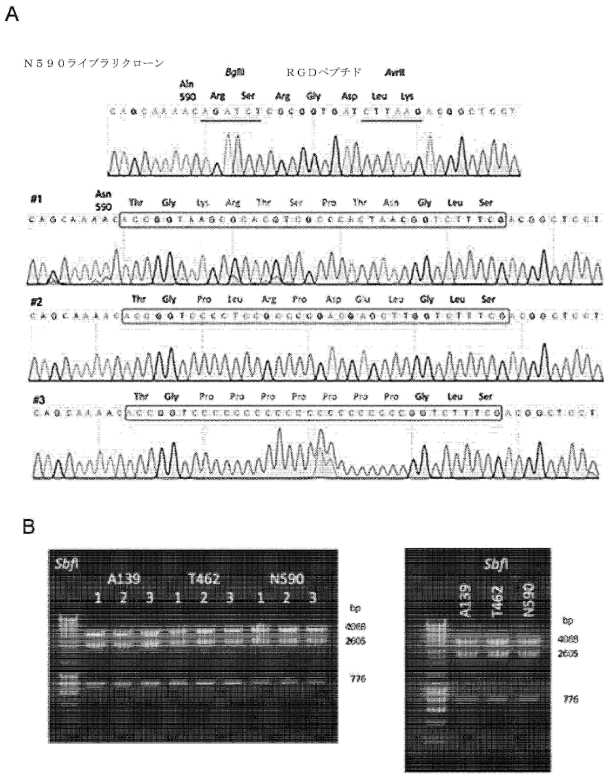


【図２－２】

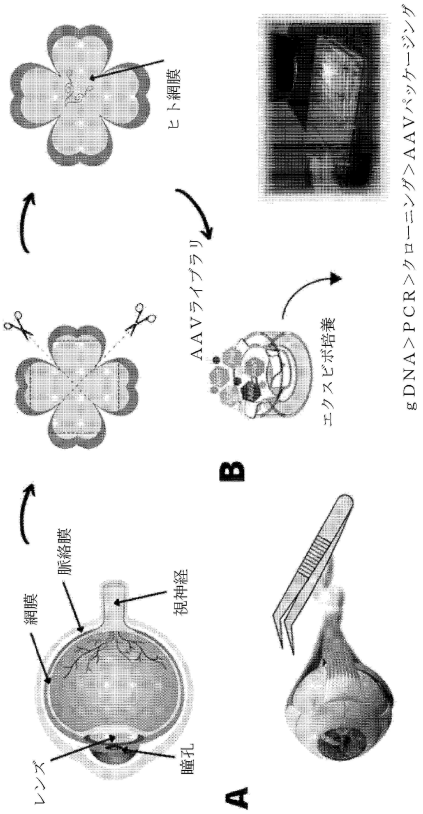
（続き）



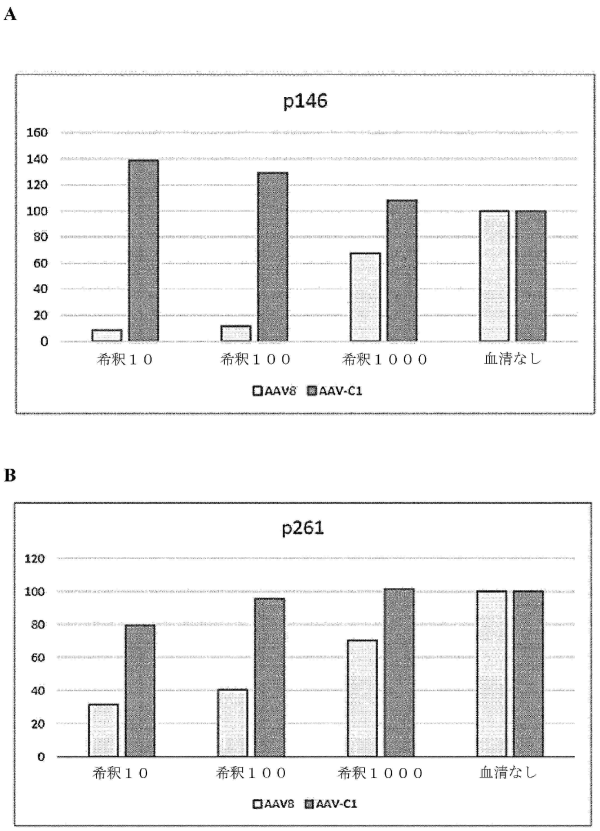
【図３】



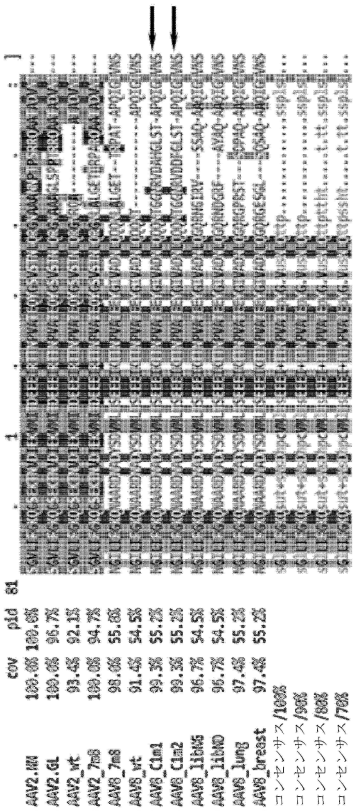
【図４】



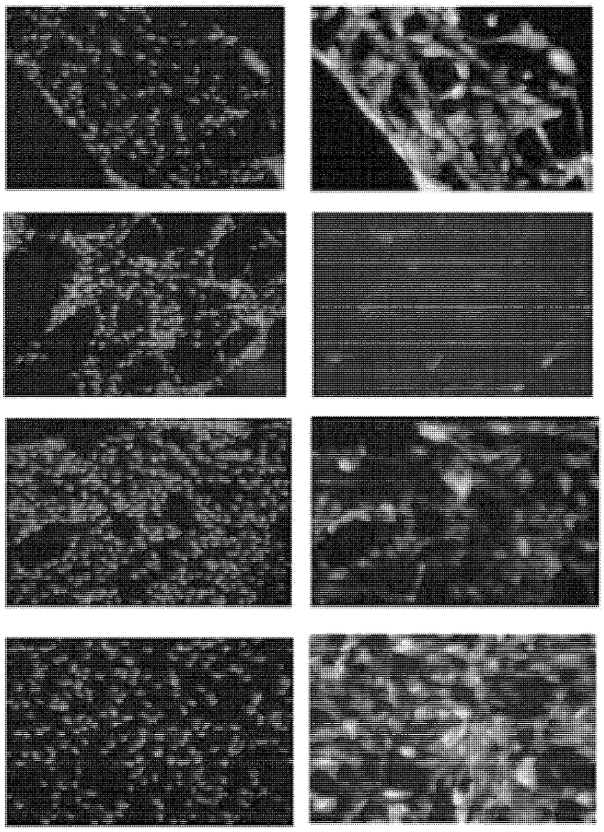
【図５】


A
p146
160
140
120
100
80
60
40
20
0
希釈１０
希釈１００
希釈１０００
血清なし
AAV8
AAV-C1
B
p261
120
100
80
60
40
20
0
希釈１０
希釈１００
希釈１０００
血清なし
AAV8
AAV-C1

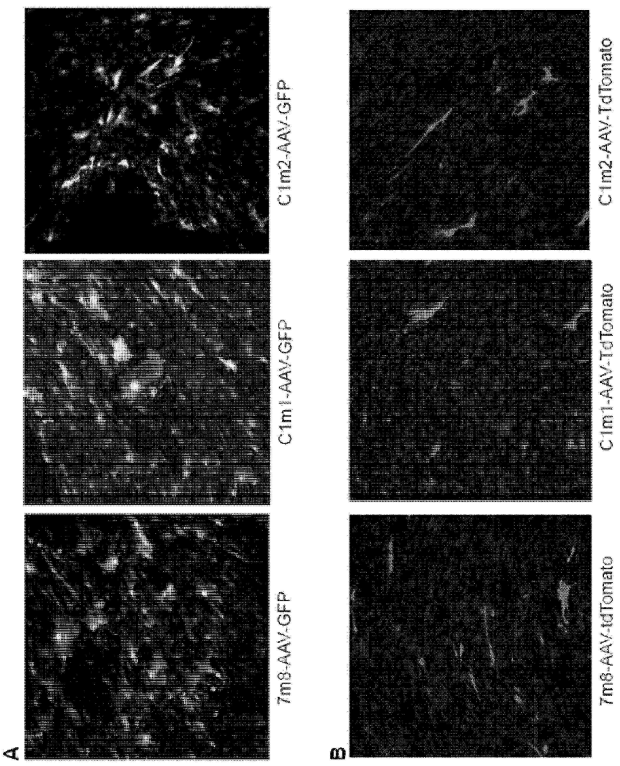
【図６】



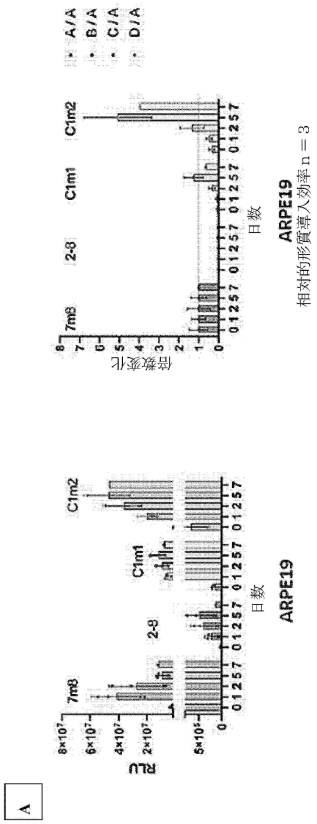
【図７】



【図８】

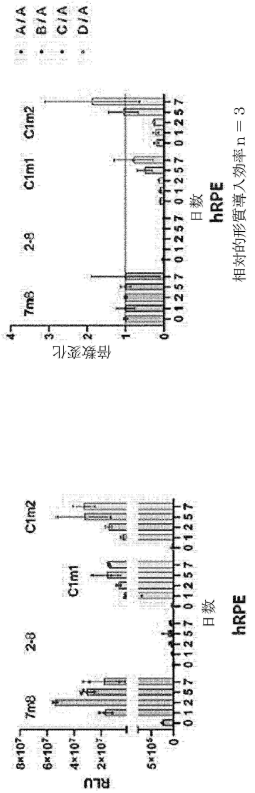

C1m2-AAV-GFP
C1m2-AAV-TdTomato
C1m1-AAV-GFP
C1m1-AAV-TdTomato
7m8-AAV-GFP
7m8-AAV-tdTomato
A
B

【図９－１】

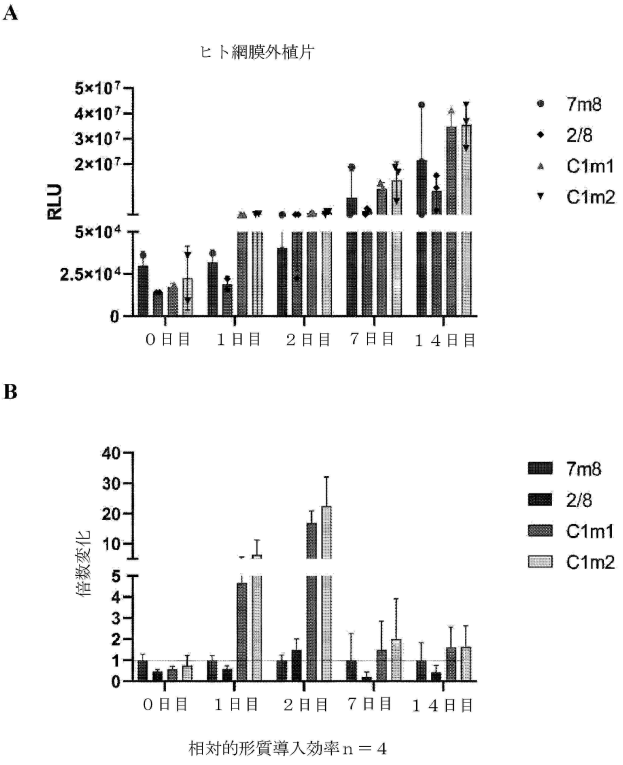


【図９－２】

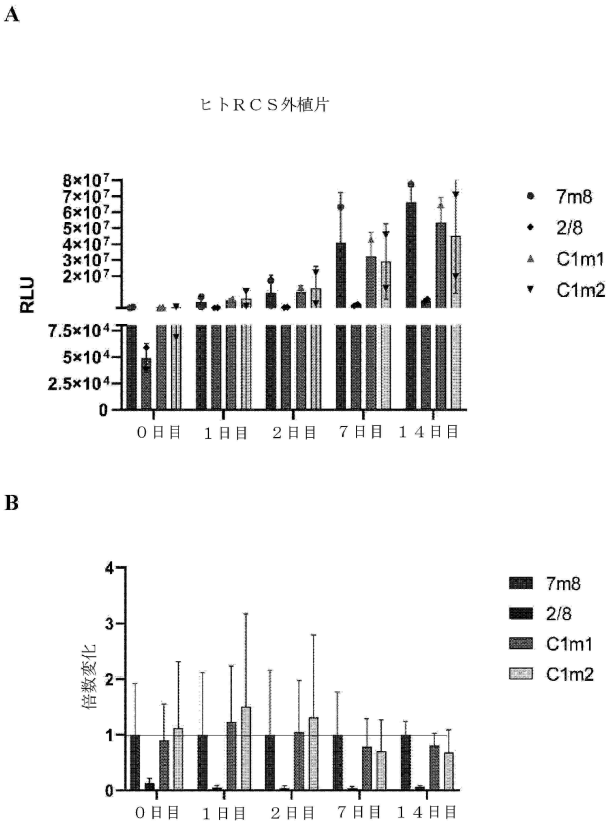
（続き）



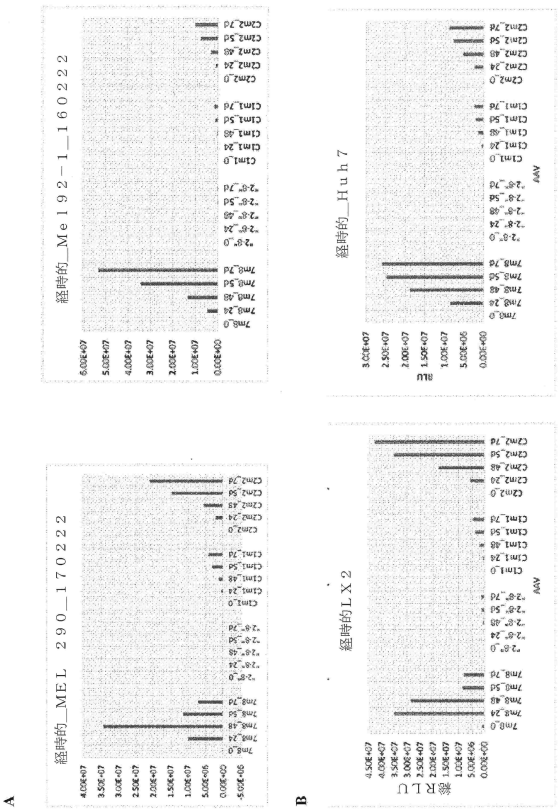
【図１０】



【図１１】

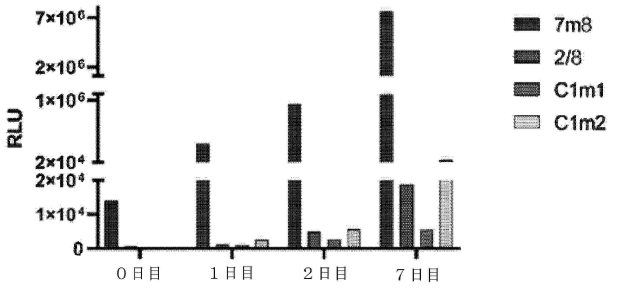


【図１２－１】

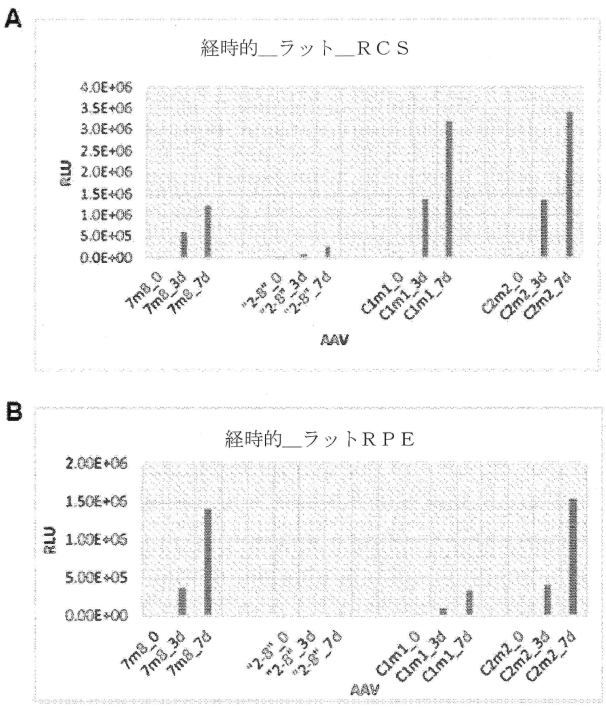


【図１２－２】

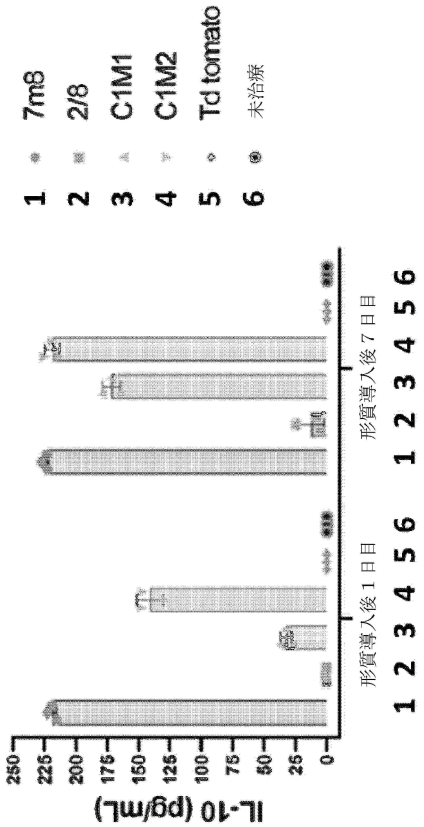
（続き）



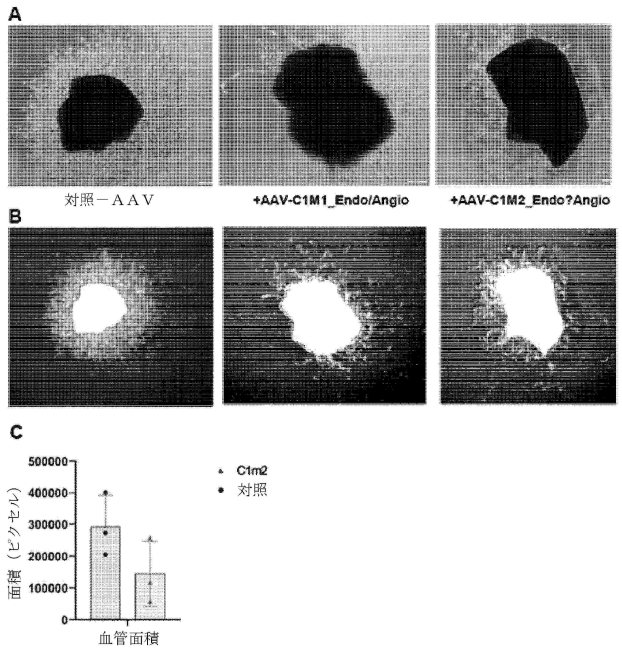
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【配列表】

２０２５５１８１４５０００００１.ｘｍｌ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2023/050463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/005 (2006.01) A61K 35/761 (2015.01) A61K 48/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01) C07K 14/075 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

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)

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)

STN: Registry, Caplus: Sequence search based on the insertion sequence of SEQ ID NO: 1, key words/control terms used for limitation based on features of the invention (ADENO-ASSOCIATED VIRUS"+NT,OLD,UF/CT, AAV? OR ADENO-ASSOCIATED, INSERTION AND CAPSID).

GenomeQuest: 90% Sequence identity to the native AAV8 capsid of SEQ ID NO: 121

Preliminary search tool provided by IP Australia, Esp@cenet and Google Scholar: Mount Spec Investments Pty Ltd (Applicant); Layton, C (Inventor).

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 August 2023	17 August 2023
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	**Authorised officer** Colton Payne AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 3 9935 9609

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2023/050463
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/076711 A2 (REGENXBIO INC) 14 April 2022 Claim 1, page 82, Example 11, page 53, SEQ ID NO: 103	17-32
X	WO 2020/206189 A1 (REGENXBIO INC) 08 October 2020 Claims 43, 51 and 62, pages 120, and 122-123	17-32
X	US 2019/0343920 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 14 November 2019 Claim 5, page 36	17-32
X	WO 2021/030764 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INCORPORATED) 18 February 2021 Page 14, claim 25 and page 61	17-18, and 21
X	KAY, C.N., *et al.*, 2013, Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors, PLoS One, **8(4)**, pages 1-12 Table 1, page 2, Results, pages 3-7	17-32

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2023/050463

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2023/050463

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2022/076711 A2	14 April 2022	WO 2022076711 A2	14 Apr 2022
		AU 2021356667 A1	08 Jun 2023
		CA 3193697 A1	14 Apr 2022
		CN 116568815 A	08 Aug 2023
		IL 301647 A	01 May 2023
		KR 20230082614 A	08 Jun 2023
WO 2020/206189 A1	08 October 2020	WO 2020206189 A1	08 Oct 2020
		AR 118584 A1	20 Oct 2021
		CA 3135798 A1	08 Oct 2020
		CN 114127089 A	01 Mar 2022
		EP 3947420 A1	09 Feb 2022
		IL 286911 A	31 Oct 2021
		JP 2022528416 A	10 Jun 2022
		TW 202102526 A	16 Jan 2021
		US 2022186256 A1	16 Jun 2022
US 2019/0343920 A1	14 November 2019	US 2019343920 A1	14 Nov 2019
		US 2017348387 A1	07 Dec 2017
WO 2021/030764 A1	18 February 2021	WO 2021030764 A1	18 Feb 2021
		AU 2020330121 A1	03 Mar 2022
		CA 3151021 A1	18 Feb 2021
		EP 4013770 A1	22 Jun 2022
		JP 2022546236 A	04 Nov 2022
		US 2022281923 A1	08 Sep 2022

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

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	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*38/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/02	
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｋ	*9/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/08	
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	

,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,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

ト ピーティーワイ エルティーデー内

(72)発明者 コズロフ，セルゲイ

オーストラリア国 ４０００６，クイーンズランド，フォーティチュード ヴァリー，マウント スペック インベストメント ピーティーワイ エルティーデー内

(72)発明者 スティール，ジェイソン

オーストラリア国 ４０００６，クイーンズランド，フォーティチュード ヴァリー，マウント スペック インベストメント ピーティーワイ エルティーデー内

Ｆターム（参考） 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA24 CA44
4C076 AA12 BB01 BB13 BB15 BB16 BB24 CC10 FF70
4C084 AA02 AA13 CA01 CA53 MA52 MA58 MA66 NA14 ZA33
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA17 MA52 MA58 MA66 NA14 ZA33
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA17 MA52 MA58 MA66 NA14 ZA33
4H045 AA10 CA01 EA20 FA74