

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508059

(P2025-508059A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 C 0 8 7
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

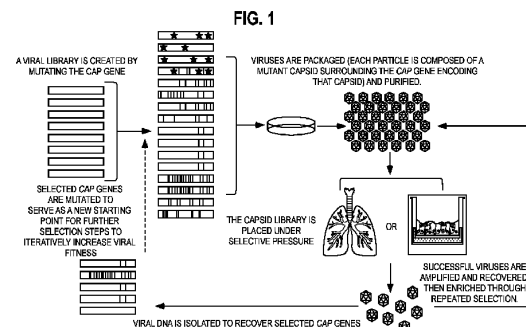
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全85頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-553391(P2024-553391)	(71)出願人	518402130
(86)(22)出願日	令和5年3月6日(2023.3.6)		4ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年11月5日(2024.11.5)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063789		0 8 , エメリービル, ホールトン ストリート 5 8 5 8 , スイート 4 5 5
(87)国際公開番号	WO2023/172873	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	63/317,450	(74)代理人	100113413
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100181641
	最終頁に続く		弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺向性が改善されたアデノ随伴ウイルス変異体カプシドおよびその使用

(57)【要約】

本開示は、肺細胞に向性を付与する変異体A A Vカプシドタンパク質、および変異体A A Vカプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス、およびそれを含む医薬組成物、ならびに肺障害の処置のための肺細胞への異種核酸の送達におけるそれらの使用を提供する。本明細書に記載の変異体A A Vカプシドタンパク質を含む組換えA A Vビリオンおよびその医薬組成物は、肺障害および疾患の処置のための肺の1または複数の細胞への核酸配列の送達において使用され得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対応する親 A A V カプシドタンパク質に対するペプチド挿入を含む変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質であって、前記ペプチド挿入が、D N T V T R S (配列番号 1 4)、S N S V Q S I (配列番号 1 5)、および N S T R H T D (配列番号 1 6) から選択されるアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス A A V カプシドタンパク質。

【請求項 2】

前記挿入部位が、前記カプシドタンパク質の G H ループ内に位置する、請求項 1 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 3】

前記挿入部位が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 5 7 0 と 6 1 1 との間の位置、または別の A A V 血清型のカプシドタンパク質中の対応する配置の 2 つの隣接するアミノ酸の間に位置し、好ましくは、前記挿入部位が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 5 8 7 と 5 8 8 とに対応するアミノ酸の間、または A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 5 8 8 と 5 8 9 とに対応するアミノ酸の間、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置に位置する、請求項 2 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 4】

前記ペプチド挿入が、Y₁ Y₂ D N T V T R S Y₃ Y₁ Y₂ S N S V Q S I Y₃ および Y₁ Y₂ N S T R H T D Y₃ から選択されるアミノ酸配列を含み、Y₁ - Y₃ の各々が、A l a、L e u、G l y、S e r、T h r および P r o から独立して選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 5】

前記ペプチド挿入が、L A D N T V T R S A (配列番号 4 2)、L A S N S V Q S I A (配列番号 4 3)、および L A N S T R H T D A (配列番号 4 4) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 6】

前記挿入部位が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 5 8 7 および 5 8 8 に対応するアミノ酸の間、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質における前記対応する配置に位置する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 7】

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 に対する 1 または複数のアミノ酸置換、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の 1 または複数の前記対応する置換をさらに含み、前記 1 または複数のアミノ酸置換が、Y 6 F、S 1 6 Y、G 1 8 E、P 3 0 L、R 3 7 L、H 3 8 Q、V 6 5 A、L 9 1 I、E 9 9 D、R 1 0 3 L、R 1 0 3 C、S 1 0 9 T、V 1 1 8 A、Q 1 2 0 H、E 1 3 3 D、E 1 3 4 Q、P 1 3 5 A、V 1 3 6 G、K 1 3 7 E、T 1 3 8 R、T 2 0 0 I、D 2 1 3 Y、G 2 2 0 R、P 2 5 0 S、D 2 8 3 E、N 3 1 2 K、T 3 4 4 S、E 3 4 7 D、G 3 7 6 A、P 3 9 9 H、G 4 0 6 E、Q 4 2 8 H、P 4 3 6 H、N 4 4 9 D、P 4 5 1 Q、N 4 6 9 D、D 4 7 2 N、T 4 9 1 I、K 5 3 2 E、K 5 4 4 E、R 5 8 5 K、A 5 9 1 D、A 5 9 3 E、D 5 9 4 N、D 6 0 8 N、H 6 4 1 N、K 6 8 8 R、N 7 0 5 S および V 7 0 8 I からなる群から必要に応じて選択され、ナンバリングは、配列番号 2 に従う、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 8】

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置に対する V 7 0 8 I アミノ酸置換を含む、請求項 7 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 9】

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 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 %、または少なくとも 99 % 同一である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 10】

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、前記配列番号 70～72 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 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 %、または少なくとも 99 % 同一である、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 11】

前記配列番号 70～72 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 12】

前記カプシドタンパク質が、野生型 A A V カプシドタンパク質を含む A A V ビリオンによる肺細胞の感染性と比較して増加した前記肺細胞の前記感染性を感染性 r A A V ビリオンに付与する、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシド。

【請求項 13】

前記カプシドタンパク質が、前記対応する親 A A V カプシドタンパク質を含む A A V と比較して、中和抗体による中和に対する増加した耐性を感染性 r A A V ビリオンにさらに付与する、請求項 12 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 14】

請求項 1～13 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項 15】

請求項 1～13 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質を含む感染性組換え A A V (r A A V) ビリオン。

【請求項 16】

1 または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸をさらに含む、請求項 15 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 17】

前記遺伝子産物が、タンパク質、低分子干渉 RNA、マイクロ RNA、短鎖ヘアピン RNA またはアンチセンス RNA である、請求項 16 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 18】

1 または複数の遺伝子産物をコードする前記ヌクレオチド配列が発現制御配列に作動可能に連結されている、請求項 16 または 17 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 19】

前記発現制御配列が、ユビキタスプロモーターを含む、請求項 18 に記載の r A A V。

【請求項 20】

前記発現制御配列が、組織特異的プロモーターを含む、請求項 18 に記載の r A A V。

【請求項 21】

前記異種核酸が、C F T R またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 16～20 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 22】

請求項 15～21 のいずれか一項に記載の r A A V を含む宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 15～21 のいずれか一項に記載の r A A V と、薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物。

【請求項 24】

肺細胞に異種核酸を送達する方法であって、(i) H D I T K N I (配列番号 12)、N Q D Y T K T (配列番号 13)、D N T V T R S (配列番号 14)、S N S V Q S I (

10

20

30

40

50

配列番号 15)、NSTRHTD (配列番号 16)、TNRTSPD (配列番号 17)、LAHDITKNIA (配列番号 40)、LANQDYTKTA (配列番号 41)、LADNTVTRSA (配列番号 42)、LASNSVQSIA (配列番号 43)、LANSTRHTDA (配列番号 44)、LATNRTSPDA (配列番号 45) からなる群から選択されるペプチド挿入を含む変異体カプシドタンパク質ならびに (ii) 1 または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む rAAV ビリオンと前記肺細胞を接触させることを含み、好ましくは、前記 rAAV ビリオンが、肺、気管支内、鼻腔内、気管内および／または気管支内投与によって哺乳動物対象に投与される、方法。

【請求項 25】

10

前記ペプチド挿入が、 $Y_1Y_2HDITKNIY_3$ 、 $Y_1Y_2NQDYTKTY_3$ 、 $Y_1Y_2DNTVTRSY_3$ 、 $Y_1Y_2SNSVQSIY_3$ 、 $Y_1Y_2NSTRHTDY_3$ 、および $Y_1Y_2TNRTSPDY_3$ から選択されるアミノ酸配列を含み、 Y_1-Y_3 のそれぞれが、Ala、Leu、Gly、Ser、Thr、および Pro から独立して選択される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ペプチド挿入が、LAHDITKNIA (配列番号 40)、LANQDYTKTA (配列番号 41)、LADNTVTRSA (配列番号 42)、LASNSVQSIA (配列番号 43)、LANSTRHTDA (配列番号 44)、LATNRTSPDA (配列番号 45) から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記挿入部位が、前記カプシドタンパク質の前記 GH ループ内、好ましくは AAV2 (配列番号 2) の VP1 のアミノ酸 570 と 611 との間、または別の AAV 血清型の前記カプシドタンパク質中の対応する配置に位置し、好ましくは前記挿入部位が、AAV2 (配列番号 2) の VP1 のアミノ酸 587 と 588 とに対応するアミノ酸の間、または AAV2 (配列番号 2) の VP1 のアミノ酸 588 と 589 とに対応するアミノ酸の間、または別の AAV 血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置、より好ましくは AAV2 (配列番号 2) の VP1 のアミノ酸 587 と 588 とに対応するアミノ酸の間、または別の AAV 血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置に位置する、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 28】

前記変異体 AAV カプシドタンパク質が、AAV2 (配列番号 2) の VP1 に対する 1 または複数のアミノ酸置換、または別の AAV 血清型のカプシドタンパク質中の 1 または複数の対応する置換をさらに含み、前記 1 または複数のアミノ酸置換が、Y6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S および V708I からなる群から必要に応じて選択され、ナンバリングは、配列番号 2 に従う、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記変異体 AAV カプシドタンパク質が、AAV2 (配列番号 2) の VP1 または別の AAV 血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置に対する V708I アミノ酸置換を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記変異体 AAV カプシドタンパク質が、前記配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 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%、

50

または少なくとも 99% 同一である、請求項 24～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記変異体 AAV カプシドタンパク質が、前記配列番号 70～72 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 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%、または少なくとも 99% 同一である、請求項 24～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記変異体 AAV カプシドタンパク質が、前記配列番号 70～72 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる、請求項 24～30 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記肺細胞が、上気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、初代、二次または三次気管支上皮細胞、気管上皮細胞、線毛気道上皮細胞、肺肺胞上皮 1 型 (AECI) または 2 型 (AECI) 細胞、平滑筋細胞または内皮細胞である、請求項 24～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

肺疾患の処置を必要とする対象に、(i) HDITKNI (配列番号 12)、NQDYTKT (配列番号 13)、DNTVTRS (配列番号 14)、SNSVQSI (配列番号 15)、NSTRHTD (配列番号 16)、TNRTSPD (配列番号 17)、LAHDITKNIA (配列番号 40)、LANQDYTKTA (配列番号 41)、LADNTVTRSA (配列番号 42)、LASNSVQSIA (配列番号 43)、LANSTRHTDA (配列番号 44)、LATNRTSPDA (配列番号 45) および (ii) 1 または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸からなる群から選択されるペプチド挿入を含む変異体カプシドタンパク質、または前記 rAAV ビリオンおよび薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を含む治療有効量の rAAV ビリオンを投与する工程を含む、肺疾患を処置するための方法。

20

【請求項 35】

前記肺疾患が、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、特発性肺線維症 (IPF)、嚢胞性線維症、肺動脈性肺高血圧症、肺高血圧症、肺癌 (一次、二次および転移性)、界面活性剤欠乏症、ウイルスおよび／または細菌感染症、急性気管支炎、肺炎 (ウイルス性、細菌性および真菌性肺炎を含む)、気道感染症 (咽頭炎、クループ、アスペルギルス、コクシジウム症、ハンタウイルス肺症候群、およびヒストプラズマ症を含む)、化学性および過敏性肺臓炎、結核および他の抗酸菌感染症 (限定されないが、マイコバクテリウム・アビウムを含む)、サルコイドーシス、呼吸器合胞体ウイルス、肺水腫、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、塵肺症 (黒肺症、石綿肺、珪肺を含む)、間質性肺疾患 (サルコイドーシスおよび自己免疫疾患を含む)、肺、胸水、胸膜炎、中皮腫、気胸、急性気管支炎、細気管支炎 (閉塞性細気管支炎を含む)、突然死症候群、睡眠時無呼吸、気管支異形成症、潜在性肺異形成、器質化肺炎、電子タバコまたはパイプの使用に関連する肺損傷 (EVALI)、中東呼吸器症候群 (MERS)、原発性線毛機能不全症、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、アルファ-1-アンチトリプシン欠損症、喘息、間質性肺疾患、および COVID-19 (コロナウイルス疾患 2019) から選択される、請求項 34 に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記肺疾患が、COPD である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記異種核酸が、アルファ-1-抗トリプシン、アルファ-1-抗キモトリプシン、アルファ-1-マクログロブリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ 1 (MMP1)、マトリックスメタロプロテイナーゼ 12 (MMP12)、ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ、CYP1A1、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ヘムオキシゲナーゼ-1、TGF-β-1、TNF-α、IL-1 複合体、IL-8、IL-13、ヒト白血球抗原 (HLA-B7 および Bw16)、ビタミン D 結合タンパク質、および／また

40

50

はベータ-2-アドレナリン作動性受容体、またはそれらの生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記肺疾患が、IPFである、請求項35に記載の方法。

【請求項39】

前記異種核酸が、SFTPA1（界面活性剤A1）およびCaveolin-1またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記肺疾患が、アルファ-1-アンチトリプシン欠損症である、請求項35に記載の方法。

【請求項41】

前記異種核酸が、アルファ-1-アンチトリプシンまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記肺疾患が、嚢胞性線維症である、請求項35に記載の方法。

【請求項43】

前記異種核酸が、配列番号30もしくは配列番号31から選択されるヌクレオチド配列、またはそれらと少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも99%同一の配列を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記rAAVまたは医薬組成物が吸入によって前記対象に投与される、請求項34～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

前記rAAVまたは医薬組成物が、前記rAAVを含むエアロゾル懸濁液の吸入によって前記対象に投与され、好ましくは前記エアロゾル懸濁液が液体ネブライザーによって生成される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

(i) HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、LAHDITKNIA（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LADNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQSI（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）からなる群から選択されるペプチド挿入を含む変異体カプシドタンパク質と、(ii) CFTRまたはその生物学的に活性な部分から選択される遺伝子およびSERPINA1またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含む感染性rAAV。

【請求項47】

前記ヌクレオチド配列が、ユビキタスプロモーターに作動可能に連結されたCFTRまたはその生物学的に活性な部分をコードする、請求項46に記載の感染性rAAV。

【請求項48】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号102もしくは配列番号103、または配列番号102もしくは配列番号103と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも99%同一の配列から選択される、請求項47に記載の感染性rAAV。

【請求項49】

前記ヌクレオチド配列が、アルファ-1-アンチトリプシンをコードし、ユビキタスプロモーターに作動可能に連結されている、請求項46に記載の感染性rAAV。

【請求項50】

請求項46～49のいずれか一項に記載のrAAVと、薬学的に許容され得る担体とを

10

20

30

40

50

含む医薬組成物。

【請求項 5 1】

前記変異型 A A V カプシドタンパク質は、対応する親 A A V カプシドタンパク質を含む A A V と比較して、感染性 r A A V ビリオンに、中和抗体による中和に対する増加した耐性、好ましくは少なくとも 1.5 倍の増加した耐性を付与し、好ましくは前記親 A A V カプシドタンパク質が血清型 2 のカプシドタンパク質である、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 5 2】

対応する親 A A V カプシドタンパク質に対するペプチド挿入を含む変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質であって、前記ペプチド挿入が、Q A D T T K N (配列番号 19)、N A V K T D F (配列番号 20)、T N Q T L S A (配列番号 21)、E N R T T S N (配列番号 22)、P Q Q D T T H (配列番号 23)、N A T N H V I (配列番号 24)、T N N S K P D (配列番号 25)、S K L T L N N (配列番号 26)、V T A G M G A (配列番号 27)、P N S T T N N (配列番号 28)、N S T S R I D (配列番号 29)、V A S H T N N (配列番号 30)、R S H Q E I P (配列番号 31)、L N T T K D I (配列番号 32)、I I D A T K N (配列番号 33)、N H I S Q T N (配列番号 34)、S N S A H I T (配列番号 35)、S T H Q S N N (配列番号 36)、K T P N L T S (配列番号 37)、S N T P A L S (配列番号 38)、S P G A T T N (配列番号 39)、L A Q A D T T K N A (配列番号 47)、L A N A V K T D F A (配列番号 48)、L A T N Q T L S A A (配列番号 49)、L A E N R T T S N A (配列番号 50)、L A P Q Q D T T H A (配列番号 51)、L A N A T N H V I A (配列番号 52)、L A T N N S K P D A (配列番号 53)、L A S K L T L N N A (配列番号 54)、L A V T A G M G A A (配列番号 55)、L A P N S T T N N A (配列番号 56)、L A N S T S R I D A (配列番号 57)、L A V A S H T N N A (配列番号 58)、L A R S H Q E I P A (配列番号 59)、L A L N T T K D I A (配列番号 60)、L A I I D A T K N A (配列番号 61)、L A N H I S Q T N A (配列番号 62)、L A S N S A H I T A (配列番号 63)、L A S T H Q S N N A (配列番号 64)、L A K T P N L T S A (配列番号 65)、L A S N T P A L S A (配列番号 66) および L A S P G A T T N A (配列番号 67) から選択されるアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質。

【請求項 5 3】

前記ペプチド挿入が、Y₁Y₂D N T V T R S Y₃ Y₁Y₂S N S V Q S I Y₃ および Y₁Y₂N S T R H T D Y₃ から選択されるアミノ酸配列を含み、Y₁－Y₃ の各々が、A l a、L e u、G l y、S e r、T h r および P r o から独立して選択される、請求項 5 2 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 5 4】

前記挿入部位が、前記カプシドタンパク質の前記 G H ループ内、好ましくは A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 570 と 611 との間、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の対応する配置、より好ましくは A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 のアミノ酸 587 と 588 または 588 と 589 に対応するアミノ酸の間、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の対応する配置に位置する、請求項 5 2 または 5 3 に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 5 5】

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、A A V 2 (配列番号 2) の V P 1 に対する 1 または複数のアミノ酸置換、または別の A A V 血清型の前記カプシドタンパク質中の 1 または複数の対応する置換をさらに含み、前記 1 または複数のアミノ酸置換が、Y 6 F、S 16 Y、G 18 E、P 30 L、R 37 L、H 38 Q、V 65 A、L 91 I、E 99 D、R 103 L、R 103 C、S 109 T、V 118 A、Q 120 H、E 133 D、E 134 Q、P 135 A、V 136 G、K 137 E、T 138 R、T 200 I、D 213 Y、G 220 R、P 250 S、D 283 E、N 312 K、T 344 S、E 347 D、G 376 A、P

399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705SおよびV708Iからなる群から必要に応じて選択され、ナンバリングは、配列番号2に従う、請求項52～54のいずれか一項に記載の変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項56】

前記変異体AAVカプシドタンパク質が、AAV2（配列番号2）のVP1または別のAAV血清型の前記カプシドタンパク質中の前記対応する配置に対するV708Iアミノ酸置換を含む、請求項54に記載の変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項57】

前記配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも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%、または少なくとも99%同一である、請求項52～56のいずれか一項に記載の変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項58】

前記カプシドタンパク質が、野生型AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンによる肺細胞の感染性と比較して増加した前記肺細胞の前記感染性を感染性rAAVビリオンに付与する、請求項52～57のいずれか一項に記載の変異体AAVカプシド。

【請求項59】

前記カプシドタンパク質が、前記対応する親AAVカプシドタンパク質を含むAAVと比較して、中和抗体による中和に対する増加した耐性を感染性rAAVビリオンにさらに付与する、請求項58に記載の変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項60】

請求項52～59のいずれか一項に記載の変異体AAVカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項61】

請求項52～59のいずれか一項に記載の変異体AAVカプシドタンパク質を含む感染性組換えAAV（rAAV）ビリオン。

【請求項62】

1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸をさらに含む、請求項61に記載のrAAVビリオン。

【請求項63】

前記遺伝子産物が、タンパク質、低分子干渉RNA、マイクロRNA、短鎖ヘアピンRNAまたはアンチセンスRNAである、請求項62に記載のrAAVビリオン。

【請求項64】

前記1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列が発現制御配列に作動可能に連結されている、請求項62または63に記載のrAAVビリオン。

【請求項65】

前記発現制御配列が、ユビキタスプロモーターを含む、請求項64に記載のrAAV。

【請求項66】

前記発現制御配列が、組織特異的プロモーターを含む、請求項64に記載のrAAV。

【請求項67】

前記異種核酸が、CFTRまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項62～66のいずれか一項に記載のrAAV。

【請求項68】

請求項61～67のいずれか一項に記載のrAAVを含む宿主細胞。

【請求項69】

請求項62～67のいずれか一項に記載のrAAVと、薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物。

【請求項70】

肺細胞に異種核酸を送達する方法であって、前記肺細胞を請求項62～67のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の r A A V と接触させることを含み、好ましくは、前記 r A A V ビリオンが、肺投与、気管支内投与、鼻腔内投与、気管内投与および／または気管支内投与によって哺乳動物対象に投与される、方法。

【請求項 7 1】

前記肺細胞が、上気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、初代、二次または三次気管支上皮細胞、気管上皮細胞、線毛気道上皮細胞、肺肺胞上皮 1 型 (A E C I) または 2 型 (A E C I I) 細胞、平滑筋細胞または内皮細胞である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

治療有効量の請求項 6 9 に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することによって肺障害を処置する方法。

【請求項 7 3】

前記医薬組成物が吸入によって前記対象に投与される、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記医薬組成物が、前記 r A A V を含むエアロゾル懸濁液の吸入によって前記対象に投与され、好ましくは前記エアロゾル懸濁液が、液体ネブライザーによって生成される、請求項 7 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 3 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 317, 450 号に基づく利益を主張し、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

E F S - W E B による配列表提出

約 144, 000 バイトのファイルサイズで、2023 年 3 月 3 日またはその前後に作成された「090400-5019-WO-Sequence-Listing」と題するコンピュータ可読 XML ファイルは、本出願の配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

アデノ随伴ウイルス (A A V) に基づく遺伝子送達ベクターは、前臨床疾患モデルおよび最近ではいくつかの疾患標的に対するヒト臨床試験の両方で有望性が実証されている。野生型 A A V は非病原性であり、任意の既知の疾患との病因的関連がないので、A A V に基づくベクターは極めて安全である。さらに、A A V は、肝臓、筋肉、肺、網膜および脳を含む多数の組織における非常に効率的な遺伝子送達および持続的な導入遺伝子発現の能力を提供する。

【0004】

A A V は、2 つのオープンリーディングフレーム、rep および cap を含む一本鎖 DNA ウイルスである。第 1 の遺伝子は、ゲノム複製に必要な 4 つのタンパク質 (Rep 78、Rep 68、Rep 52、および Rep 40) をコードし、第 2 の遺伝子は、集合してウイルスカプシドを形成する 3 つの構造タンパク質 (VP 1-3) を発現する。その名称が示すように、A A V は、能動的複製のために、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在に依存する。ヘルパーの非存在下では、それは、そのゲノムがエピソーム的に維持されるかまたは宿主染色体に組み込まれる潜在状態を確立する。複数の相同霊長類 A A V 血清型および多数の非ヒト霊長類血清型が特定されている。A A V 2 は、遺伝子送達ビヒクルとして最もよく特徴付けられる。

【0005】

A A V は、ますます多くの臨床試験で有望な結果をもたらしている (Bainbridge ら、2008; Carpentier 他、2012; Gaudet ら、2010; MacLaren ら、2014; A. M. Maguire ら、2009; A. Maguir

10

20

30

40

50

e & Simonelli、2008年；Nathwani他、2011、2014；Stroes他、2008）。しかしながら、抗カプシド免疫応答、特定の組織の限定された形質導入、特定の細胞型への標的送達の不可能性、および比較的低いパッケージング容量など、AAVの有用性を制限し得る遺伝子送達の障害がある。多くの状況において、AAVを改善する能力で合理的な設計を効果的に実施するには、機構的知識が不十分である。代替として、特定の生物医学的ニーズを満たす新規AAV変異体を作製するための戦略として定向進化が登場した。定向進化戦略は、遺伝的多様化および選択プロセスを利用して、生体分子の機能を徐々に改善する有益な突然変異の蓄積を可能にする。このプロセスでは、野生型AAV capsid遺伝子は、ウイルス粒子のライブラリーを生成するためにパッケージングされた大きな遺伝子ライブラリーを作成するためにいくつかの異なるアプローチを使用して多様化され、次いで、選択圧が遺伝子送達障壁を克服することができる新規変異体を単離するために適用される。

10

【0006】

以前に、概念実証適用は、AAV定向進化を使用して、インビトロでヒト肺上皮またはインビボでブタ肺に遺伝子送達するための最適化されたAAV変異体を作製することができることを示している。これらの以前の研究は、肺上皮形質導入に最適化されたAAV変異体が、それらが選択されたモデルに関連して評価された場合、CFの遺伝子治療処置の有意な改善をもたらし得ることを実証している。しかしながら、これらのベクターの評価は、ブタ肺上皮形質導入のために進化させたベクターによるヒト肺上皮の形質導入の制限をもたらすブタ肺上皮とヒト肺上皮との間の種の違いを実証した。

20

【0007】

肺障害の処置のためのヒト肺細胞（ヒト肺上皮など）への送達が改善された新規AAV変異体の開発が当技術分野で必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書では、親AAVカプシドタンパク質に対するアミノ酸配列に1または複数の改変を有する変異体アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドタンパク質であって、AAVビリオン中に存在する場合、未改変の親AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンによる肺細胞の感染性に対する1または複数の種類の肺細胞の増加した感染性を付与する変異体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。本明細書に記載の変異体AAVカプシドタンパク質を含む組換えAAVビリオンおよびその医薬組成物、変異体rAAVカプシドタンパク質およびビリオンを作製する方法、ならびに研究および臨床診療において、例えば肺障害および疾患の処置のための肺の1または複数の細胞への核酸配列の送達において、これらのrAAVカプシドタンパク質およびビリオンを使用する方法も提供される。

30

【0009】

本開示のいくつかの態様では、変異体アデノ随伴ウイルス（AAV）カプシドタンパク質が提供され、これらの変異体AAVカプシドタンパク質は、親AAVカプシドに対するアミノ酸配列に1または複数の改変を有し、これは、AAVビリオン中に存在する場合、アミノ酸配列改変を含まない親AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンによる肺細胞の感染性に対する1または複数の種類の肺細胞（例えば、肺胞上皮細胞、気管支（一次、二次または三次）上皮細胞または気管上皮細胞、線毛気道上皮細胞、肺胞上皮1型（AECI）または2型（AECII）細胞、平滑筋または内皮細胞を含むがこれらに限定されない気道上皮細胞）の増加した感染性を付与する。

40

【0010】

本開示のいくつかの態様では、組換えAAV（rAAV）ビリオンが提供され、これらのrAAVビリオンは、本明細書に記載の変異体カプシドタンパク質を含み、rAAVビリオンは、対応する未改変の親AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンによる肺細胞の感染性に対する1または複数の種類の肺細胞の感染性の増加を示す。いくつかの実

50

施形態では、r A A V ビリオンは、親 A A V カプシドタンパク質を含む A A V ビリオンに対するすべての肺細胞の感染性の増加を示す。他の実施形態では、r A A V ビリオンは、肺の特定の細胞型の感染性の増加を示すが、親 A A V カプシドタンパク質を含む A A V ビリオンの他の相対的なものではない。別の言い方をすれば、r A A V ビリオンは、肺の特定の細胞型に優先的であるが他の細胞型には優先的ではない感染性の増加を示し、例えば、r A A V は、1 または複数の肺上気道細胞の優先的な感染性の増加を示すが、すべての細胞型の感染性の増加を示すわけではない。いくつかの態様では、本明細書に記載の変異体カプシドタンパク質は、これらの r A A V ビリオンにヒト A A V 中和抗体に対する耐性の増加を付与する。

【0011】

いくつかの実施形態では、r A A V ビリオンは、異種核酸を含む。いくつかのかかる実施形態では、異種核酸は、ポリペプチドをコードする RNA をコードする。他のこのような実施形態では、異種核酸配列は、ポリペプチドをコードしない RNA、例えば異種核酸配列、RNA 干渉剤、ヌクレアーゼのガイド RNAなどをコードする。いくつかの実施形態では、異種核酸は、ポリペプチドをコードするヌクレオチドおよび干渉 RNA をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0012】

対象感染性 r A A V ビリオンおよび薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、エアロゾル化送達に適した液体／懸濁液として製剤化される。関連する実施形態では、医薬組成物は、対象が吸入する r A A V ビリオンを含む呼吸用粒子のエアロゾル懸濁液として投与される。呼吸用粒子は、液体または固体であり得る。r A A V ビリオンを含む液体粒子のエアロゾルは、圧力駆動エアロゾルネブライザーまたは超音波ネブライザーなどの任意の適切な手段によって生成することができる。r A A V ビリオンを含む固体粒子のエアロゾルは、任意の固体粒子エアロゾル発生器を用いて生成され得る。

【0013】

標的細胞を r A A V ビリオンと接触させることによって異種核酸を標的細胞（肺細胞など）に送達する方法において本明細書に記載される変異体カプシドタンパク質を含む r A A V ビリオンの使用も提供される。いくつかの実施形態では、標的細胞は、インビボにおいて、例えば、肺疾患の処置を必要とする個体の肺において存在する。他の実施形態では、標的細胞は、インビトロである。

【0014】

本明細書に記載の変異体カプシドタンパク質を含む有効量の r A A V ビリオンまたは有効量の r A A V ビリオンを含む医薬組成物を、そのような処置を必要とする対象に投与することによって肺疾患を処置する方法も提供される。

【0015】

本明細書に記載の変異体 A A V カプシドタンパク質をコードする配列を含む単離核酸、および単離核酸を含む宿主細胞も提供される。さらに他の実施形態では、単離核酸および／または単離宿主細胞は r A A V を含む。

【0016】

いくつかの態様では、変異体 A A V カプシドタンパク質は、対応する親 A A V カプシドタンパク質に対するカプシドタンパク質の GH ループ内、好ましくは GH ループの表面露出領域内に約 5 アミノ酸～約 20 アミノ酸の挿入（a「異種ペプチド」、または「ペプチド挿入」）を含み、変異体カプシドタンパク質は、A A V ビリオンに存在する場合、対応する親 A A V カプシドタンパク質を含む A A V ビリオンによる網膜細胞の感染性と比較して、網膜細胞の増加した感染性を付与する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、H D I T K N I（配列番号 12）、N Q D Y T K T（配列番号 13）、D N T V T R S（配列番号 14）、S N S V Q S I（配列番号 15）、N S T R H T D（配列番号 16）、T N R T S P D（配列番号 17）、I S D Q T K H（配列番号 18）、Q A D T T K N（配列番号 19）、N A V K T D F（配列番号 20）、T N Q T L S A（配列番号 21）、E N

10

20

30

40

50

RTTSN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNN SKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASH TNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPAL（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）、LAHDITKNIA（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LADNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQ SIA（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）、LAISDQTKHA（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTDFA（配列番号48）、LATNQTL SAA（配列番号49）、LAENRTTSNA（配列番号50）、LAPQQDTTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配列番号52）、LATNNSKPD（配列番号53）、LASKLTLNNA（配列番号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、LAPNSTTNN（配列番号56）、LANSTSRIDA（配列番号57）、LAVASH TNN（配列番号58）、LARSHQEIPA（配列番号59）、LALNTTKDIA（配列番号60）、LAIIDATKNA（配列番号61）、LANHISQTN（配列番号62）、LASNSAHITA（配列番号63）、LASTHQSNNA（配列番号64）、LAKTPNL TSA（配列番号65）、LASNTPALSA（配列番号66）およびLASPGATTN（配列番号67）からなる群から選択される配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0017】

いくつかの態様では、変異体AAVカプシドタンパク質は、対応する親AAVカプシドタンパク質に対するカプシドタンパク質のGHループ内にペプチド挿入を含み、対応する親AAVカプシドタンパク質に対する1または複数のアミノ酸置換をさらに含み、変異体カプシドタンパク質は、AAVビリオンに存在する場合、対応する親AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンによる肺細胞の感染性と比較して、肺細胞の増加した感染性を付与する。いくつかの好ましい態様では、変異体AAVカプシドタンパク質は、HDI TKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNR TSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTL SA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNN SKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASH TNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPAL（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）、LAHDITKNIA（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LADNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQ SIA（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）、LAISDQTKHA（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTDFA（配列番号48）、LATNQTL SAA（配列番号49）、LAENRTTSNA（配列番号50）、LAPQQDTTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配列番号52）、LATNNSKPD（配列番号53）、LASKLTLNNA（配列番号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、LAPNSTTNN（配列番号56）、LANSTSRIDA（配列番号57）、LAVASH TNN（配列番号58）、LARSHQEIPA（配列番号59）、LALNTTKDIA（配列番号

60)、L A I I D A T K N A (配列番号61)、L A N H I S Q T N A (配列番号62)、L A S N S A H I T A (配列番号63)、L A S T H Q S N N A (配列番号64)、L A K T P N L T S A (配列番号65)、L A S N T P A L S A (配列番号66)およびL A S P G A T T N A (配列番号67)からなる群から選択される配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、かつ、A A V 2のV P 1に対するV 7 0 8 I置換をさらに含む。

【0018】

本明細書に開示される変異体A A Vカプシドを含むr A A Vの製造および／または送達のための方法も本明細書に開示される。さらに、本明細書に開示される変異体A A Vカプシドを含むr A A Vを含み、本明細書に記載される方法で使用するためのキットが本明細書で提供される。

10

【0019】

他の実施形態では、前の段落の変異体カプシドタンパク質を含むA A Vビリオンは、先または後に開示される実施形態のいずれかを組み込むことができる。実際、明確にするために別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は、単一の実施形態では組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で説明されている本発明の様々な特徴は、別個にまたは任意の適切な部分的組み合わせで提供されてもよい。本発明に関連する実施形態のすべての組み合わせは、本発明によって具体的に包含され、あたかもそれぞれおよびすべての組み合わせが個々に明示的に開示されているかのように本明細書に開示される。さらに、様々な実施形態およびその要素のすべての部分的組み合わせもまた、本発明によって具体的に包含され、あたかもそのような部分的組み合わせのそれぞれおよびすべてが個々に明示的に本明細書に開示されているかのように本明細書に開示される。

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、改善された気道形質導入を付与する変異体A A Vカプシドを特定するために使用される定向進化プロセスを示す図である。

【0021】

【図2】図2は、モデルシステム決定木の概略図である。決定は、第2ラウンドおよび第3ラウンドのNHP送達後に行われた配列決定分析に基づいた。

30

【0022】

【図3】図3aは、10億を超える変異体の全多様性を有するカプシドライブラリーの推定された遺伝的多様性を示す。図3bは、カプシドライブラリーの産生性を示しており、それらはすべて、インビボ治療用ベクターエボリューションプロセスのための材料を産生するのに十分なレベルで製造された。投与されるウイルスゲノム(v g)は、標的用量を表し、送達装置および投与経路に関連する損失を考慮していない。

【0023】

【図4】図4は、選択プロセスの1～3ラウンドにわたってカプシドライブラリーを投与したNHPの気管ならびに一次、二次および三次気管支に存在するウイルスゲノムのd d P C R定量化を示す図である。

40

【0024】

【図5】図5は、ラウンド3の配列決定分析における「ヒット」の頻度を示す。配列決定分析は、各領域に対する配列決定された集団内の全頻度に基づいた。左パネル(気管および一次気管支)の頻度は、以下の通りである：(i)点突然変異体#1=13%；(ii)ペプチド挿入#1=11%；(iii)ペプチド挿入#2=4%；(iv)ペプチド挿入#3=6%；(v)A A V 2点突然変異体=11%；(vi)A A V 2ペプチド挿入=40%；(vii)キメラ=7%；(viii)その他=8%。右側のパネル(二次および三次気管支)の頻度は、以下の通りである：(i)点突然変異体#1=9%；(ii)ペプチド挿入#1=3%；(iii)ペプチド挿入#2=10%；(iv)ペプチド挿入#3=3%；(v)ペプチド挿入#4=7%；(vi)A A V 2点突然変異体=9%；(

50

v i i) A A V 2 ペプチド挿入 = 5 4 % ; (v i i i) その他 = 5 %。

【 0 0 2 5 】

【 図 6 】 図 6 A ~ 図 6 B は、選択したラウンド 4 (図 6 a) および 5 (図 6 b) について、ヒト I V I G の非存在下および存在下で、投与されたカプシドライブラリーからのヒト上気道 A L I 培養物中に存在するウイルスゲノムの d d P C R 定量化を示す。

【 0 0 2 6 】

【 図 7 】 図 7 は、ラウンド 5 の配列決定分析における「ヒット」の頻度を示す。配列決定分析は、I V I G の存在下および非存在下での選択のための配列決定された集団内の総頻度に基づいた。左側のパネル (インビトロラウンド 5 A - I V I G) 頻度は、以下の通りである： (i) 点突然変異体 # 1 = 1 0 % : (i i) ペプチド挿入 # 1 = 1 7 % ; (i i i) ペプチド挿入 # 2 = 8 % ; (i v) ペプチド挿入 # 3 = 1 % ; (v) ペプチド挿入 # 4 = 4 % ; (v i) ペプチド挿入 # 5 = 9 % ; (v i i) ペプチド挿入 # 6 = 1 5 % ; (v i i i) A A V 2 ペプチド挿入 = 3 5 % ; (v i i i) その他 = 1 % 。右側のパネル (インビトロラウンド 5 B + I V I G) 頻度は、以下の通りである： (i) 点突然変異体 # 1 = 6 . 7 % : (i i) ペプチド挿入 # 1 = 1 1 . 5 % ; (i i i) ペプチド挿入 # 2 = 9 . 6 % ; (i v) ペプチド挿入 # 3 = 2 . 9 % ; (v) ペプチド挿入 # 4 = 1 . 9 % ; (v i) ペプチド挿入 # 5 = 1 6 . 3 % ; (v i i) ペプチド挿入 # 6 = 1 0 . 6 % ; (v i i i) A A V 2 ペプチド挿入 = 4 0 . 4 % 。

10

【 0 0 2 7 】

【 図 8 】 図 8 A ~ 図 8 C は、蛍光顕微鏡法を使用してレポーター E G F P 発現によって測定された肺上気道上皮 A L I 培養物における A A V カプシド形質導入効率を示す。図 8 a ~ 図 8 b は、A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 と比較した 6 つの新規変異体のヒト (図 8 a) および N H P (図 8 b) の頂端形質導入を示す。図 8 c は、A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 と比較した 6 つの新規変異体のヒト基底形質導入を示す。アデノ随伴ウイルス (A A V)、気液界面 (A L I)、非形質導入 (N T)、感染多重度 (M O I) 。

20

【 0 0 2 8 】

【 図 9 A 】 図 9 A ~ 図 9 C 免疫細胞化学 (図 9 a、図 9 b) および d d P C R (図 9 c) による A A V 2 および A A V 1 0 1 と比較した上位の新規カプシドの二次分析。蛍光顕微鏡法を使用してレポーター E G F P 発現によって測定された肺上気道上皮 A L I 培養物における A A V カプシド形質導入効率 (図 9 a)。顕微鏡写真のピクセル強度の定量化 (図 9 b)。形質導入後の転写物定量化 (図 9 c)。アデノ随伴ウイルス (A A V)、気液界面 (A L I)、非形質導入 (N T)、感染多重度 (M O I)、平均蛍光強度 (M F I)、ハウスキーパー (H K)。エラーバー = 標準偏差。1 条件当たり n = 3。

30

【 図 9 B 】 図 9 A ~ 図 9 C 免疫細胞化学 (図 9 a、図 9 b) および d d P C R (図 9 c) による A A V 2 および A A V 1 0 1 と比較した上位の新規カプシドの二次分析。蛍光顕微鏡法を使用してレポーター E G F P 発現によって測定された肺上気道上皮 A L I 培養物における A A V カプシド形質導入効率 (図 9 a)。顕微鏡写真のピクセル強度の定量化 (図 9 b)。形質導入後の転写物定量化 (図 9 c)。アデノ随伴ウイルス (A A V)、気液界面 (A L I)、非形質導入 (N T)、感染多重度 (M O I)、平均蛍光強度 (M F I)、ハウスキーパー (H K)。エラーバー = 標準偏差。1 条件当たり n = 3。

40

【 図 9 C 】 図 9 A ~ 図 9 C 免疫細胞化学 (図 9 a、図 9 b) および d d P C R (図 9 c) による A A V 2 および A A V 1 0 1 と比較した上位の新規カプシドの二次分析。蛍光顕微鏡法を使用してレポーター E G F P 発現によって測定された肺上気道上皮 A L I 培養物における A A V カプシド形質導入効率 (図 9 a)。顕微鏡写真のピクセル強度の定量化 (図 9 b)。形質導入後の転写物定量化 (図 9 c)。アデノ随伴ウイルス (A A V)、気液界面 (A L I)、非形質導入 (N T)、感染多重度 (M O I)、平均蛍光強度 (M F I)、ハウスキーパー (H K)。エラーバー = 標準偏差。1 条件当たり n = 3。

【 0 0 2 9 】

【 図 1 0 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 B は、粘液の存在下または非存在下で、C A G プロモーター

50

に作動可能に連結されたEGFPレポーター遺伝子を含む核酸を有する特定のAAVカプシドによる形質導入後のヒト気道上皮細胞培養物におけるEGFP発現を示す。培養物を気液界面で30日間以上；感染時の7日後；－粘液、粘液なし；＋粘液、粘液あり；頂端形質導入；感染多重度（MOI）25，000で増殖させた。

【発明を実施するための形態】

【0030】

定義

【0031】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の言及を含む。例えば、「細胞（a cell）」という用語は、それらの混合物を含む複数の細胞を含む。

【0032】

本明細書で使用される場合、「を含む」という用語は、組成物および方法が列挙された要素を含むが、他の要素を排除しないことを意味することを意図している。「から本質的になる」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図される使用のための組み合わせにとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。例えば、本明細書で定義される元素から本質的になる組成物は、単離および精製方法からの微量汚染物質、ならびにリン酸緩衝生理食塩水、防腐剤などの薬学的に許容され得る担体を排除しない。「からなる」は、他の成分の微量元素および本明細書に開示される組成物を投与するための実質的な方法工程を除くことを意味するものとする。これらの移行用語のそれぞれによって定義される態様は、本開示の範囲内である。

【0033】

アデノ随伴ウイルスは、エンベロープのない正二十面体カプシド内の4.7kbの一本鎖DNAゲノムから構成される非病原性パルボウイルスである。ゲノムは、ウイルスの複製起点およびパッケージングシグナルとして機能する逆方向末端反復配列（ITR）に隣接する3つのオープンリーディングフレーム（ORF）を含む。rep ORFは、ウイルス複製、転写調節、部位特異的組込み、およびビリオンアセンブリにおいて役割を果たす4つの非構造タンパク質をコードする。cap ORFは、集合して60merウイルスカプシドを形成する3つの構造タンパク質（VP1～3）をコードする。最後に、cap遺伝子内に代替のリーディングフレームとして存在するORFは、AAVカプシドタンパク質を核小体に局在化させ、カプシドアセンブリプロセスで機能するウイルスタンパク質である集合体活性化タンパク質（AAP）を産生する。

【0034】

いくつかの天然に生じる（「野生型」）血清型および100を超えるAAVの既知の変異体があり、これらはそれぞれ、アミノ酸配列、特にカプシドタンパク質の超可変領域内で異なり、したがって遺伝子送達特性が異なる。AAVはいずれのヒト疾患にも関連しておらず、組換えAAVを臨床用途にとって魅力的なものにしている。

【0035】

本明細書の開示の目的のために、「AAV」という用語は、限定するものではないが、ウイルス自体およびその誘導体を含む、アデノ随伴ウイルスの略語である。別段の指示がある場合を除き、この用語は、すべてのサブタイプまたは血清型、ならびに複製適格性および組換え型の両方を指す。「AAV」という用語は、限定されないが、AAV1型（AAV-1またはAAV1）、AAV2型（AAV-2またはAAV2）、AAV3A型（AAV-3AまたはAAV3A）、AAV3B型（AAV-3BまたはAAV3B）、AAV4型（AAV-4またはAAV4）、AAV5型（AAV-5またはAAV5）、AAV6型（AAV-6またはAAV6）、AAV7型（AAV-7またはAAV7）、AAV8型（AAV-8またはAAV8）、AAV9型（AAV-9またはAAV9）、AAV10型（AAV-10またはAAV10またはAAVrh10）、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ヤギAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVを含む。「霊長類AAV」は霊長類に感染するAAVを指し、「非霊長類A

10

20

30

40

50

AAV」は非霊長類哺乳動物に感染するAAVを指し、「ウシAAV」はウシ哺乳動物に感染するAAVなどを指す。

【0036】

AAVの様々な血清型のゲノム配列、ならびに天然末端反復配列（TR）、Repタンパク質、およびカプシドサブユニットの配列は、当技術分野で公知である。そのような配列は、文献またはGenBankなどの公開データベースに見出すことができる。例えば、GenBank受託番号NC_002077.1（AAV1）、AF063497.1（AAV1）、NC_001401.2（AAV2）、AF043303.1（AAV2）、J01901.1（AAV2）、U48704.1（AAV3A）、NC_001729.1（AAV3A）、AF028705.1（AAV3B）、NC_001829.1（AAV4）、U89790.1（AAV4）、NC_006152.1（AAV5）、AF085716.1（AAV-5）、AF028704.1（AAV6）、NC_006260.1（AAV7）、AF513851.1（AAV7）、AF513852.1（AAV8）NC_006261.1（AAV-8）、AY530579.1（AAV9）、AAT46337（AAV10）およびAA088208（AAVrh10）を参照のこと。その開示は、AAV核酸およびアミノ酸配列を教示するために参照により本明細書に組み込まれる。例えば、Srivistavaら（1983）J. Virology 45:555; Chioriniら（1998）J. Virology 71:6823; Chioriniら（1999）J. Virology 73:1309; Bantel-Schaalら（1999）J. Virology 73:939; Xiaoら（1999）J. Virology 73:3994; Muramatsuら（1996）Virology 221:208; Shadeら（1986）J. Virol. 58:921; Gaoら（2002）Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854; Morisら（2004）Virology 33:375-383; 国際特許公開の国際公開第00/28061号、国際公開第99/61601号、国際公開第98/11244号; および米国特許第6,156,303号も参照のこと。

10

20

【0037】

AAV血清型に関連する天然に存在するcap（カプシド）タンパク質の配列は当技術分野で公知であり、AAV1（配列番号1）、AAV2（配列番号2）、AAV3A（配列番号3）、AAV3B（配列番号4）、AAV4（配列番号5）、AAV5（配列番号6）、AAV6（配列番号7）、AAV7（配列番号8）、AAV8（配列番号9）、AAV9（配列番号10）、およびAAV10（配列番号11）として本明細書に開示されるものを含む。「変異体AAVカプシドタンパク質」または「AAV変異体」という用語は、例えば本明細書の配列番号1～11に示されるような、天然に存在するまたは「野生型」AAVカプシドタンパク質配列に対する少なくとも1つの改変または置換（欠失、挿入、点突然変異などを含む）を含むアミノ酸配列を含むAAVカプシドタンパク質を指す。変異体AAVカプシドタンパク質は、野生型カプシドタンパク質のアミノ酸配列に対して約80%またはそれを超える同一性、例えば野生型カプシドタンパク質のアミノ酸配列に対して85%またはそれを超える同一性、90%またはそれを超える同一性、または95%またはそれを超える同一性、例えば野生型カプシドタンパク質に対して98%または99%の同一性を有し得る。変異体AAVカプシドタンパク質は、野生型カプシドタンパク質ではない場合がある。

30

40

【0038】

本明細書の開示の目的のために、「AAVビリオン」または「AAVウイルス粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質およびカプシド化AAVポリヌクレオチドで構成されるウイルス粒子を指す。

【0039】

本明細書における開示の目的のために、用語「rAAV」は、組換えアデノ随伴ウイルスを指す略語である。ポリヌクレオチドに適用される「組換え」とは、ポリヌクレオチドが、クローニング、制限またはライゲーション工程、および自然界で見出されるポリヌク

50

レオチドとは異なる構築物をもたらす他の手順の様々な組み合わせの産物であることを意味する。組換えウイルスは、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。これらの用語はそれぞれ、元のポリヌクレオチド構築物の複製物および元のウイルス構築物の子孫を含む。

【0040】

用語「rAAVベクター」は、rAAVビリオンrAAVウイルス粒子（例えば、感染性rAAVビリオン）を包含し、これは定義により、rAAVポリヌクレオチドを含み、rAAV（例えば、rAAV（ss-rAAV）をコードする一本鎖ポリヌクレオチド；rAAV（ds-rAAV）をコードする二本鎖ポリヌクレオチド、例えばrAAVをコードするプラスミド；など）をコードするポリヌクレオチドも包含する。

10

【0041】

AAVビリオンが異種ポリヌクレオチド（すなわち、野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド、例えば、標的細胞に送達される導入遺伝子、標的細胞に送達されるRNAi剤またはCRISPR剤などである。）を含む場合、それは典型的には「組換えAAV（rAAV）ビリオン」または「rAAVウイルス粒子」と呼ばれる。一般に、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの、一般に2つのAAV逆方向末端反復配列（I' I' R）に隣接している。

【0042】

「パッケージング」という用語は、AAV粒子の集合およびカプセル化をもたらす一連の細胞内事象を指す。AAV「rep」および「cap」遺伝子は、アデノ随伴ウイルスの複製およびカプシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。AAV repおよびcapは、本明細書ではAAV「パッケージング遺伝子」と呼ばれる。

20

【0043】

AAVの「ヘルパーウイルス」という用語は、AAV（例えば、野生型AAV）が哺乳動物細胞によって複製およびパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアなどのポックスウイルスを含む、AAVのための様々なそのようなヘルパーウイルスが当技術分野で公知である。アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含するが、サブグループCのアデノウイルス5型が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物および鳥類起源の多数のアデノウイルスが公知であり、ATCCなどの寄託機関から入手可能である。ヘルペスウイルス科のウイルスは、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）およびエプスタイン・バー・ウイルス（EBV）、ならびにサイトメガロウイルス（CMV）および仮性狂犬病ウイルス（PRV）を含む。ATCCなどの寄託機関からも入手可能である。

30

【0044】

「ヘルパーウイルス機能」という用語は、（本明細書に記載の複製およびパッケージングのための他の要件と併せて）AAVの複製およびパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにコードされる機能を指す。本明細書に記載されるように、「ヘルパーウイルス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、または例えば、必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列をトランスで産生細胞に提供することを含む、いくつかの方法で提供され得る。例えば、1または複数のアデノウイルスタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドまたは他の発現ベクターを、rAAVベクターと共に産生細胞にトランスフェクトする。

40

【0045】

「感染性」ウイルスまたはウイルス粒子という用語は、適切に組み立てられたウイルスカプシドを含み、ウイルス種が向性である細胞にポリヌクレオチド成分を送達することができるものである。この用語は、ウイルスの複製能力を必ずしも意味しない。感染性ウイルス粒子を計数するためのアッセイは、本開示および当技術分野の他の箇所に記載されている。ウイルス感染性は、全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比として表すことができる。全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比を判定する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Graingerら、（2005）Mol. Ther. 11

50

：S337 (TCID50 感染力価アッセイを記載している)；および Zolotukhin ら. (1999) Gene Ther. 6：973 を参照のこと。実施例も参照のこと。

【0046】

本明細書で使用される「向性」という用語は、特定の宿主種の細胞または宿主種内の特定の細胞型のウイルス（例えば、AAV）による優先的標的化を指す。例えば、心臓、肺、肝臓および筋肉の細胞に感染し得るウイルスは、肺および筋肉の細胞のみに感染し得るウイルスに対してより広い（すなわち、増加した）向性を有し、向性はまた、宿主の特定のタイプの細胞表面分子に対するウイルスの依存性を含み得る。例えば、いくつかのウイルスは表面グリコサミノグリカン（糖鎖）を有する細胞のみに感染することができるが、他のウイルスはシアル酸を有する細胞のみに感染することができる（そのような依存性は、ウイルス感染の潜在的な宿主細胞として特定のクラスの分子を欠損した様々な細胞株を使用して試験することができる）。場合によっては、ウイルスの向性は、ウイルスの相対的な選好を表す。例えば、第1のウイルスは、すべての細胞型に感染することができる可能性があるが、それらの細胞に表面グリコサミノグリカン（糖鎖）を感染させることにおいてはるかに成功している。第2のウイルスもまた同じ特徴（例えば、第2のウイルスはまた、それらの細胞に表面グリコサミノグリカン（糖鎖）を感染させることにおいてより成功している）を好む場合、たとえ絶対形質導入効率が類似していなくても、第2のウイルスは、第1のウイルスと同様の（または同一の）向性を有すると見なすことができる。例えば、第2のウイルスは、試験されたすべての所与の細胞型に感染する際に第1のウイルスよりも効率的であり得るが、相対的な優先度が類似している（または同一である）場合、第2のウイルスは、依然として第1のウイルスと同様の（または同一の）向性を有すると考えることができる。いくつかの実施形態では、対象変異体 AAV カプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に生じるビリオンに対する変化していない。いくつかの実施形態では、対象変異体 AAV カプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に生じるビリオンに対して拡大される（すなわち、広がっている）。いくつかの実施形態では、対象変異体 AAV カプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に生じるビリオンに対して低下している。

【0047】

（例えば、複製適格性 AAV）という用語は、感染性であり、感染細胞（すなわち、ヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス機能の存在下で）で複製されることもできる表現型的野生型ウイルスを指す。AAV の場合、複製適格は一般に、機能的 AAV パッケージング遺伝子の存在を必要とする。一般に、本明細書に記載の rAAV ベクターは、1 または複数の AAV パッケージング遺伝子の欠如のために哺乳動物細胞（特にヒト細胞）では複製不能である。典型的には、そのような rAAV ベクターは、複製適格性 AAV が AAV パッケージング遺伝子と入ってくる rAAV ベクターとの間の組換えによって生成される可能性を最小限に抑えるために、AAV パッケージング遺伝子配列を欠いている。多くの実施形態では、本明細書に記載の rAAV ベクター調製物は、複製適格性 AAV（RC AAV と呼ばれる rcAAV）を少しでも含むものである（例えば、 10^2 rAAV 粒子あたり約 1 rcAAV 未満、 10^4 rAAV 粒子あたり約 1 rcAAV 未満、 10^6 rAAV 粒子あたり約 1 rcAAV 未満、 10^{12} rAAV 粒子あたり約 1 rcAAV 未満、または rcAAV なし）。

【0048】

「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの改変ヌクレオチドを含んでよく、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変は、ポリマーの組み立ての前または後に分け与えられ得る。本明細書で使用されるポリヌクレオチドという用語は、二本鎖および一本鎖分子を互換的に指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドを含む本明細書の任意の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知または予測されている2つの相補

10

20

30

40

50

的一本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。

【0049】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと特定のパーセントの「配列同一性」を有し、これは、アラインメントされたとき、2つの配列を比較したときに塩基またはアミノ酸のそのパーセンテージが同じであることを意味する。配列類似性は、いくつかの異なる方法で判定することができる。配列同一性を判定するために、`ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/`においてワールドワイドウェブ上で利用可能なBLASTを含む方法およびコンピュータプログラムを使用して配列をアラインメントさせることができる。別のアラインメントアルゴリズムは、Oxford Molecular Group, Inc. の完全子会社である米国ウィスコンシン州マディソンからGenetics Computing Group (GCC) パッケージで入手可能なPASTAである。アラインメントのための他の技術は、Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996)、ed. Doolittle、米国カリフォルニア州サンディエゴのHarcourt Brace & Co. の一部門であるAcademic Press, Inc. に記載されている。特に興味深いのは、配列中のギャップを可能にするアラインメントプログラムである。Smith-Watermanは、配列アラインメントにおけるギャップを可能にするアルゴリズムの1つのタイプである。Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997) を参照のこと。また、NeedlemanおよびWunschアラインメント法を使用するGAPプログラムは、配列をアラインメントするために利用することができる。J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970) を参照のこと。

【0050】

「遺伝子」という用語は、細胞内で何らかの機能を果たすポリヌクレオチドを指す。例えば、遺伝子は、遺伝子産物をコードすることができるオープンリーディングフレームを含むことができる。遺伝子産物の一例は、遺伝子から転写および翻訳されるタンパク質である。遺伝子産物の別の例は、転写されるが翻訳されないRNA、例えば機能性RNA産物、例えばアプタマー、干渉RNA、リボソームRNA (rRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、非コードRNA (ncRNA)、ヌクレアーゼのガイドRNAなどである。

【0051】

「遺伝子発現産物」または「遺伝子産物」という用語は、上で定義したように、特定の遺伝子の発現から生じる分子である。遺伝子発現産物としては、例えば、ポリペプチド、アプタマー、干渉RNA、メッセンジャーRNA (mRNA)、rRNA、tRNA、非コードRNA (ncRNA) などが挙げられる。

【0052】

「siRNA剤」(「低分子干渉 (small interfering)」または「低分子干渉 (short interfering) RNA」(またはsiRNA)) という用語は、目的の遺伝子(「標的遺伝子」)を標的とするヌクレオチドのRNA二重鎖である。「RNA二重鎖」とは、RNA分子の2つの領域間の相補的対合によって呼ばれる構造を指し、二本鎖の領域を形成する。RNA (dsRNA)。siRNAは、siRNAの二重鎖部分のヌクレオチド配列が標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるという点で、遺伝子を「標的とする」。いくつかの実施形態では、siRNAの二重鎖の長さは30ヌクレオチド未満である。いくつかの実施形態では、二重鎖は、10番目の29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11または10ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、二重鎖の長さは19~25ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、「siRNA媒介遺伝子標的指向化」は、DNA構築物を利用して動物細胞の内因性RNA干渉(RNAi)経路を活性化する遺伝子サイレンシング技術であるDNA指向性RNA干

渉 (d d R N A I) の使用によって達成される。そのような D N A 構築物は、プロセッシングされると 1 つまたは複数の標的遺伝子のサイレンシングをもたらす自己相補的二本鎖 R N A、典型的にはショートヘアピン R N A (s h R N A) を発現するように設計される。内因性 m R N A またはウイルス R N A を含む任意の R N A は、所望の m R N A 標的に相補的な二本鎖 R N A を発現するように構築物を設計することによってサイレンシングすることができる。したがって、s i R N A 剤の R N A 二重鎖部分は、s h R N A と呼ばれる短いヘアピン構造の一部であり得る。二重鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二重鎖を形成する 2 つの配列の間に配置されたループ部分を含み得る。ループの長さは様々であり得る。音波実施形態では、ループは、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13 ヌクレオチド長である。ヘアピン構造はまた、3' または 5' オーバーハング部分を含むことができる。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、0、1、2、3、4 または 5 ヌクレオチド長の 3' または 5' オーバーハングである。一般に、標的遺伝子の発現産物（例えば、m R N A、ポリペプチドなど）のレベルは、5' 非翻訳 (U T) 領域、O R F または 3' U T 領域を含む標的遺伝子転写物の少なくとも 19~25 ヌクレオチド長セグメント（例えば、2021 ヌクレオチド配列）に相補的な特定の二本鎖ヌクレオチド配列を含む s i R N A 剤（例えば、s i R N A、s h R N A など）によって低下する。いくつかの実施形態では、低分子干渉 R N A は、約 19~25 n t の長さである。例えば、P C T 出願国際公開第 0144895 号；国際公開第 99/32619 号；国際公開第 01/75164 号；国際公開第 01/92513 号；国際公開第 01/29058 号；国際公開第 01/89304 号；国際公開第 02/16620 号および国際公開第 02/29858 号；および s i R N A 技術の説明のための米国特許公開第 20040023390 号を参照されたい。s i R N A および/または s h R N A は、核酸配列によってコードされることがあり、核酸配列はプロモーターも含み得る。核酸配列は、ポリアデニル化シグナルも含み得る。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、合成最小ポリアデニル化シグナルである。

【0053】

「アンチセンス R N A」という用語は、遺伝子発現産物に相補的な R N A を包含する。例えば、特定の m R N A を標的とするアンチセンス R N A は、m R N A に相補的な R N A ベースの作用物質（改変 R N A であり得る）であり（例えば、R N A の安定性を変化させること、R N A の翻訳を変化させることなどによって）、アンチセンス R N A の m R N A へのハイブリダイゼーションは、m R N A の発現を変化させる。「アンチセンス R N A」は、アンチセンス R N A をコードする核酸も含む。

【0054】

「C R I S P R / C a s 9 剤」に関して、「C R I S P R」という用語は、C R I S P R R N A (c r R N A) を使用して侵入核酸のサイレンシングをガイドすることによって、ウイルスおよびプラスミドに対する適応免疫を細菌および古細菌に提供するように進化した、クラスター化されて規則的に配置された短い回文配列リピート / C R I S P R 関連 (C a s) 系を包含する。C a s 9 タンパク質（またはその機能的等価物および/または変異体、すなわち C a s 9 様タンパク質）は、タンパク質と c r R N A および t r a c r R N A と呼ばれる 2 つの天然に生じるまたは合成の R N A 分子（ガイド R N A と呼ばれる）との会合に依存する D N A エンドヌクレアーゼ活性を天然に生じる。場合によっては、2 つの分子は共有結合して単一の分子（単一ガイド R N A (「s g R N A」) と呼ばれる) を形成する。したがって、C a s 9 または C a s 9 様タンパク質は、C a s 9 または C a s 9 様タンパク質を活性化し、タンパク質を標的核酸配列に誘導する D N A 標的化 R N A（この用語は、2 分子ガイド R N A 配置および単一分子ガイド R N A 配置の両方を包含する）と会合する。

【0055】

C a s 9 または C a s 9 様タンパク質がその天然の酵素機能を保持している場合、それは標的 D N A を切断して二本鎖破壊を生成し、これはゲノム変化（すなわち、編集：欠失、挿入（ドナーポリヌクレオチドが存在する場合）、置換など）をもたらすことがあり、

それによって遺伝子発現を変化させる。Cas 9のいくつかの変異体（この変異体はCas 9様という用語に包含される）は、DNA切断活性が低下するように改変されている（いくつかの場合、それらは標的DNAの両方の鎖ではなく一本鎖を切断するが、他の場合、それらはDNA切断活性を著しく低下させていない）。DNA切断活性が低下した（DNA切断活性がない）Cas 9様タンパク質であっても、標的DNAに誘導してRNAポリメラーゼ活性を遮断することができる。あるいは、Cas 9またはCas 9様タンパク質は、VP 64転写活性化ドメインをCas 9タンパク質に融合し、融合タンパク質を、MS 2-RNAアプタマーを含む単一ガイドRNAと共送達して、転写を活性化する細胞内の相乗的活性化メディエーター（Cas 9-SAM）複合体を形成することによって改変され得る。したがって、酵素的に不活性なCas 9様タンパク質は、標的DNAの転写を遮断または活性化するために、DNA標的化RNAによって標的DNA中の特定の位置に標的化され得る。本明細書で使用される「CRISPR/Cas 9剤」という用語は、上記または当技術分野で公知のCRISPR/Cas 9のすべての形態を包含する。

10

【0056】
CRISPR剤に関する詳細な情報は、例えば、(a) Jinekら、Science. 2012 Aug. 17; 337 (6096): 816-21: ‘‘A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity’’; (b) Qi et al., Cell. 2013 Feb. 28; 152 (5): 1173-83: ‘‘Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression’’、および(c) 米国特許出願第13/842, 859号及びPCT出願番号PCT/US13/32589において発見され得る。これらの全ては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。したがって、本明細書で使用される「CRISPR剤」という用語は、Cas 9系（例えば、Cas 9またはCas 9様タンパク質；DNA標的化RNAの任意の成分、例えばcrRNA様RNA、tracrRNA様RNA、単一ガイドRNAなど；ドナーポリヌクレオチドなど）で 사용할 ことができる天然に生じるおよび／または合成配列を含む任意の薬剤（またはそのような薬剤をコードする核酸）を包含する。

20

30

【0057】
「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」（ZFN）とは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生成される人工DNAエンドヌクレアーゼを意味する。ZFNは、所望のDNA配列を標的とするように操作することができ、これにより、ジンクフィンガーヌクレアーゼが固有の標的配列を切断することが可能になる。細胞に導入されると、ZFNを使用して、二本鎖破壊を誘導することによって細胞内の標的DNA（例えば、細胞のゲノム）を編集することができる。ZFNの使用に関するさらなる情報については、例えば、Asuriら、Mol Ther. 2012 February; 20 (2): 329-38; Bibikovaら Science. 2003 May 2; 300 (5620): 764; Woodら Science. 2011 Jul. 15; 333 (6040): 307; Ochiai 40
ら Genes Cells. 2010 August; 15 (8): 875-85; Takasuら、Insect Biochem Mol 2010 October; 40 (10): 759-65; Ekkerら、Zebrafish 2008 Summer; 5 (2): 121-3; Youngら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr. 26; 108 (17): 7052-7; Goldbergら、Cell. 2010 Mar. 5; 140 (5): 678-91; Geurtsら、Science. 2009 Jul. 24; 325 (5939): 433; Flisikowskaら、PLoS One. 2011; 6 (6): e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 2011 Jun. 13; Flauschil 50
ら、

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul. 19; 108 (29): 12013-7; および Yuら、Cell Res. 2011 November; 21 (11): 1638-40を参照のこと。これらのすべては、ZFNに関連するそれらの教示について参照により本明細書に組み込まれる。「ZFN剤」という用語は、ジンクフィンガーヌクレアーゼおよび／またはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0058】

「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」または「TALEN」薬剤という用語は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) が、TAL (転写活性化因子様) エフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生成される人工DNAエンドヌクレアーゼであることを指す。TALENは、実質的に任意の所望のDNA配列に結合するように迅速に操作することができ、細胞に導入されると、TALENを使用して、二本鎖破壊を誘導することによって細胞内の標的DNA (例えば、細胞のゲノム) を編集することができる。TALENの使用に関するさらなる情報については、例えば、HockemeyerらNat Biotechnol. 2011 Jul. 7; 29 (8): 731-4; WoodらScience. 2011 Jul. 15; 333 (6040): 307; TessonらNat Biotechnol. 2011 Aug. 5; 29 (8): 695-6; およびHuangら、Nat Biotechnol. 2011 Aug. 5; 29 (8): 699-700を参照のこと。これらの全ては、TALENに関連するそれらの教示について参照により本明細書に組み込まれる。「TALEN剤」という用語は、TALENおよび／またはTALENをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0059】

「制御エレメント」または「制御配列」という用語は、ポリヌクレオチドの複製、複製、転写、スプライシング、翻訳、または分解を含む、ポリヌクレオチドの機能的調節に寄与する分子の相互作用に関与するヌクレオチド配列を指す。調節は、プロセスの頻度、速度、または特異性に影響を及ぼし得、本質的に増強または阻害性であり得る。当該分野で公知の制御エレメントとしては、例えば、プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列が挙げられる。プロモーターは、RNAポリメラーゼに結合し、通常はプロモーターの下流 (3' 方向) に位置するコード領域の転写を開始する特定の条件下で可能なDNA領域である。プロモーターは、遍在的に作用する、すなわち、多くの細胞型において活性であり得る、例えば、CAGまたはCMVプロモーター；または組織もしくは細胞特異的である。

【0060】

「動作可能に連結された」または「作動可能に連結された」という用語は、遺伝的エレメントの並置を指し、エレメントは、それらが予想される方法で動作することを可能にする関係にある。例えば、プロモーターがコード配列の転写の開始を助ける場合、プロモーターはコード領域に動作可能に連結される。この機能的関係が維持される限り、プロモーターとコード領域との間に介在残基が存在し得る。

【0061】

「発現ベクター」という用語は、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド領域を含むベクターを包含し、意図する標的細胞においてタンパク質の発現を行うために使用される。発現ベクターはまた、標的におけるタンパク質の発現を促進するためにコード領域に動作可能に連結された制御エレメントを含み得る。制御エレメントと、それらが発現のために作動可能に連結されている1つまたは複数の遺伝子との組み合わせは、「発現カセット」と呼ばれることがあり、その多くは当技術分野において公知で利用可能であるか、または当技術分野で利用可能な成分から容易に構築され得る。

【0062】

「異種」という用語は、比較されている実体の残りのものとは遺伝子型的に異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって異なる種に由来するプラス

10

20

30

40

50

ミドまたはベクターに導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。その天然のコード配列から除去され、天然には連結されていないコード配列に動作可能に連結されたプロモーターは、異種プロモーターである。したがって、例えば、異種遺伝子産物をコードする異種核酸配列を含む r A A V は、天然に生じる野生型 A A V に通常含まれないポリヌクレオチドを含む r A A V であり、コードされた異種遺伝子産物は、天然に生じる野生型 A A V によって通常コードされない遺伝子産物である。

【0063】

用語「遺伝子変化」および「遺伝子改変」（およびその文法上の変形）は、有糸分裂または分裂以外によって遺伝的エレメント（例えば、ポリヌクレオチド）が細胞に導入される過程を指すために本明細書では互換的に使用される。エレメントは、細胞に対して異種であってもよく、または細胞内に既に存在するエレメントの追加のコピーもしくは改良されたバージョンであってもよい。遺伝子変化は、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、またはポリヌクレオチドーリポソーム複合体との接触などの当技術分野で公知の任意のプロセスを介して組換えプラスミドまたは他のポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクトすることによって行われ得る。遺伝子変化はまた、例えば、DNA もしくは RNA ウイルスまたはウイルスベクターによる形質導入または感染によって達成され得る。一般に、遺伝的エレメントは、細胞内の染色体またはミニ染色体に導入される。細胞およびその子孫の表現型および／または遺伝子型を変化させる任意の変化がこの用語に含まれる。

【0064】

細胞改変に関して、外因性 DNA による（例えば、組換えウイルスを介して）「遺伝子改変された」または「形質転換された」または「トランスフェクトされた」または「形質導入された」という用語は、そのような DNA が細胞内に導入された場合を指す。外因性 DNA の存在は、永続的または一過性の遺伝的变化をもたらす。形質転換 DNA は、細胞のゲノムに組み込まれていてもよく、または組み込まれていなくてもよい（共有結合していてもよい）。「クローン」は、有糸分裂によって単一の細胞または共通の祖先に由来する細胞の集団である。「細胞株」は、多くの世代にわたってインビトロで安定した増殖が可能な初代細胞のクローンである。

【0065】

本明細書で使用される場合、細胞は、インビトロでのおよび／またはインビボでの長期間の細胞の長期培養中にその機能を果たすために配列が利用可能である場合、遺伝子配列によって「安定に」改変、形質導入、遺伝子改変、または形質転換されると言われる。一般に、そのような細胞は、改変された細胞の子孫にも継承可能な遺伝子変化が導入されるという点で「遺伝的に」改変されている（遺伝子改変されている）。

【0066】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。この用語はまた、改変されたアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションを包含する。ポリペプチド、例えば、抗血管新生ポリペプチド、神経保護ポリペプチド、遺伝子産物を哺乳動物対象に送達することに関連して議論される場合、およびその組成物は、それぞれのインタクトなポリペプチド、またはインタクトなタンパク質の所望の生化学的機能を保持するその任意の断片もしくは遺伝子操作された誘導体を指す。同様に、抗血管新生ポリペプチドをコードする核酸、神経保護ポリペプチドをコードする核酸、および哺乳動物対象への遺伝子産物の送達に使用する他のかかる核酸（レシピエント細胞に送達される「導入遺伝子」と呼ばれ得る）への言及は、インタクトなポリペプチドまたは所望の生化学的機能を有する任意の断片もしくは遺伝子操作された誘導体をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0067】

本明細書で使用される場合、「単離された」プラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、ビリオン、宿主細胞、タンパク質、または他の物質は、物質または類似の物質が天然に生

10

20

30

40

50

じるかまたは最初に調製される場合にも存在し得る他の成分の少なくともいくつかを欠く物質の調製物を指す。したがって、例えば、単離された物質は、それを供給源混合物から濃縮するために精製技術を使用することによって調製され得る。濃縮は、溶液の体積当たりの重量などの絶対的な基準で測定することができ、または供給源混合物中に存在する第2の潜在的な干渉物質に関して測定され得る。本開示の実施形態の増加する濃縮は、ますます単離される。単離されたプラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、宿主細胞または他の物質は、いくつかの実施形態では、精製されており、例えば、約80%~約90%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、少なくとも約98%純粋、または少なくとも約99%、またはそれを超えて、純粋である。

【0068】

本明細書で使用される場合、「処置」、「処置すること」などの用語は、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患またはその病徴を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であってよく、および／または疾患および／または疾患に起因する有害作用の部分的または完全な治癒という点で治療的であり得る。本明細書で使用される「処置」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の処置を包含し、(a) 疾患（および／または疾患によって引き起こされる病徴）に罹患しやすい可能性があるか、または疾患を獲得するリスクがあるが、それを有するとしてまだ診断されていない対象における疾患の発生を予防することと、(b) 疾患（および／または疾患によって引き起こされる病徴）を阻害すること、すなわちその発症を停止させることと、(c) 疾患（および／または疾患によって引き起こされる病徴）を軽減すること、すなわち、疾患（および／または疾患によって引き起こされる病徴）の退行を引き起こすこと、すなわち、疾患および／または疾患の1または複数の病徴を寛解することと、を含む。例えば、対象組成物および方法は、肺疾患の処置を対象とし得る。

【0069】

「個体」、「宿主」、「対象」および「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用され、限定されないが、ヒト；サルを含む非ヒト霊長類を含む哺乳動物；哺乳動物のスポーツ動物（例えば、ウマ）；哺乳動物飼育動物（例えば、ヒツジ、ヤギなど）；哺乳動物ペット（犬、猫など）；げっ歯類（例えば、マウス、ラットなど）を指す。

【0070】

いくつかの実施形態では、個体は、以前にAAVに天然に曝露されたことがあり、結果として抗AAV抗体（すなわち、AAV中和抗体）を保有するヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、AAVベクターを以前に投与されたことがあり（その結果、抗AAV抗体を保有し得る）、異なる症状の処置のため、または同じ症状のさらなる処置のためにベクターの再投与を必要とするヒトである。例えば、肝臓、筋肉および網膜（このビヒクルに対する中和抗体によって影響を受けるすべての組織）へのAAV遺伝子送達を含む臨床試験における陽性結果に基づいて、多くのそのような治療適用／疾患標的が存在する。

【0071】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。有効量を1または複数の投与で投与することができる。本開示の目的のために、有効量の化合物（例えば、感染性rAAVビリオン）は、特定の疾患状態（例えば、肺疾患）（および／またはそれに関連する病徴）の緩和、寛解、安定化、逆転、予防、進行の緩徐または遅延に十分な量である。したがって、有効量の感染性rAAVビリオンは、個体の標的細胞（または標的細胞）に異種核酸を効果的に送達することができる感染性rAAVビリオンの量である。有効量は、例えば、当技術分野でよく理解されている技術、例えば、RT-PCR、ウェスタンブロッティング、ELISA、蛍光または他のレポーター読み出しなどを使用して、異種核酸配列によってコードされる遺伝子産物（RNA、タンパク質）を細胞または組織内で検出することによって前臨床的に判定され得る。有効量は、例えば、当該分野で公知の方法を用いて疾患の発症または進行の変化を検出することによって臨床的に判定され得る。

【0072】

「定向進化」という用語は、遺伝子多様化および選択プロセスの反復的なラウンドを通して自然進化をエミュレートし、それによって生体分子の機能を徐々に改善する有益な突然変異を蓄積する、インビトロおよび／またはインビボでのカプシドエンジニアリング方法論を指す。定向進化は、多くの場合、目的の細胞または組織型のより効率的なレベルの感染性を有するAAV変異体をライブラリーから選択するための「バイオパニング」と呼ばれるインビボ方法を含む。

【0073】

「干渉RNA」という用語は、人工miRNAを含む低分子干渉RNAおよびマイクロRNA(miRNA)の両方を包含する。

【0074】

「2Aペプチド」は、同じmRNAから等モルレベルの複数の遺伝子を産生し、マルチシストロニックベクター中のIRESエレメントの代わりに使用され得る約20アミノ酸の「自己切断」ペプチドを指す。非限定的な例としては、T2A、P2A、E2AおよびF2Aペプチド配列が挙げられる。異種核酸が複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む実施形態では、複数（例えば、2）の遺伝子産物の発現は、複数（例えば、2）の独立したプロモーターによって媒介され得るか、または単一のプロモーターによって媒介されてよく、複数の導入遺伝子は、内部リボソーム進入部位(IRES)または2Aペプチド配列によって分離されている。

【0075】

「増加した耐性」とは、対象感染性rAAVビリオンがヒト抗AAV抗体の存在下で増加した感染性を示すことを意味する。ウイルス感染性は、全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比として表すことができる。したがって、感染性の増加は、全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比率の増加を意味する。ヒト抗AAV抗体に対するAAVの耐性を判定するために、遺伝子送達効率（すなわち、感染性）をヒト抗AAV抗体の非存在下の場合の50%に低下させるのに必要な抗体濃度（例えば、血清濃度、IVIg濃度など）(mg/mL)を得るために、様々な濃度のヒト抗AAV抗体の存在下でAAVの感染性を測定する。ヒト抗AAV抗体の非存在下における遺伝子送達効率の50%まで遺伝子送達効率を低下させるためにより高い抗体濃度を必要とするウイルスは、抗体中和に対する増大した耐性を有すると言われる。したがって、耐性の2倍の増加は、遺伝子送達効率をヒト抗AAV抗体の非存在下の50%に低下させるのに必要な抗体濃度の2倍の増加を意味する。いくつかの実施形態では、対象感染性rAAVビリオンは、野生型AAV（例えば、AAV2（野生型AAV血清型2））または野生型カプシドタンパク質を含むAAVによって示される耐性よりも少なくとも約1.5倍（例えば、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍など）大きいヒトAAV中和抗体に対する耐性を示す。

【0076】

対象感染性rAAVビリオンは、ヒトAAV中和抗体の存在下で哺乳動物細胞の形質導入の増加を示すと言われ得る。いくつかの実施形態では、対象感染性rAAVビリオンは、野生型AAV（例えば、AAV2（野生型AAV血清型2））または野生型カプシドタンパク質を含むAAVによって示される形質導入よりも、ヒトAAV中和抗体の存在下で哺乳動物細胞の少なくとも約1.5倍（例えば、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150

10

20

30

40

50

倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍など)大きい形質導入を示す。

【0077】

いくつかの実施形態では、対象感染性rAAVビリオンは、野生型AAVカプシドタンパク質に結合する中和抗体への結合の減少を示す。例えば、対象感染性rAAVビリオンは、野生型AAVカプシドタンパク質に対する抗体の結合親和性と比較して、野生型カプシドAAVタンパク質に結合する中和抗体に対する結合(例えば、親和性の低下)が少なくとも約1.5倍(例えば、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍など)低下し得る。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、抗AAV中和抗体は、約 10^{-7} M未満、約 5×10^{-6} M未満、約 10^{-6} M未満、約 5×10^{-5} M未満、約 10^{-5} M未満、約 10^{-4} M未満、またはそれ未満の親和性で対象感染性rAAVビリオンに結合する。

【0079】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、エンベロープを持たないカプシドの内部に含まれる4.7kbの一本鎖DNAゲノムを有するパルボウイルスのファミリーである。天然に生じるAAVのウイルスゲノムは、複製およびパッケージングシグナルのウイルス起源として機能する2つの逆方向末端反復配列(ITR)を2つの一次オープンリーディングフレーム(ORF):rep(ウイルス複製、転写調節、部位特異的組込みおよびビリオンアセンブリにおいて機能するタンパク質をコードすること)およびcapに隣接して有する。cap ORFは、集合して60merのウイルスカプシドを形成する3つの構造タンパク質をコードする。多くの天然に生じるAAV変異体および血清型が単離されており、いずれもヒト疾患に関連していない。

20

【0080】

AAVの組換えバージョンが遺伝子送達ベクターとして使用されることができ、目的のマーカーマたは治療用遺伝子がrepとcapの代わりにITR間に挿入される。これらのベクターは、インビトロおよびインビボで分裂細胞および非分裂細胞の両方を形質導入することが示されており、有糸分裂後の組織において数年間にわたって安定な導入遺伝子発現をもたらすことができる。例えば、Knipe D M、Howley P M、Fields' Virology. Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia、Pa.、USA、2007; Gao G-P、Alvira M R、Wang L、Calcedo R、Johnston J、Wilson S M. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:11854-9; Atchison R W、Casty B C、Hammon W M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles、Science 1965; 149:754-6; Hoggan M D、Blacklow N R、Rowe W P. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical、biological、and immunological characteristics、Proc Natl Acad U S A 1966; 55:1467-74; Blacklow N R、Hoggan M D、Rowe W P. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. Proc Natl Acad Sci U S A 1967; 58:1410-5; Bantel-S

30

40

50

chaal U, zur Hauser', H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984; 134: 52-63; Mayor H D, Melnick J L. Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (picodnavirus group). *Nature* 1966; 210: 331-2; Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004; 330: 375-83; Flotte T R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-10を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0081】

組換えAAV（本明細書では「AAV」または「rAAV」と互換的に呼ばれる）は、ますます多くの臨床治験で有望な結果をもたらしている。しかしながら、抗カプシド免疫応答、特定の組織の低形質導入、特定の細胞型への標的送達の不可能性、および比較的低い運搬能力など、AAVの有用性を制限し得る遺伝子送達の障害がある。多くの状況において、AAVを改善する能力で合理的な設計を効果的に実施するには、機構的知識が不十分である。代替として、特定の生物医学的ニーズを満たす新規AAV変異体を作製するための戦略として定向進化が登場した。定向進化戦略は、遺伝的多様化および選択プロセスを利用して、生体分子の機能を徐々に改善する有益な突然変異の蓄積を可能にする。このプロセスでは、野生型AAV cap遺伝子は、ウイルス粒子のライブラリーを生成するためにパッケージングされた大型の遺伝子ライブラリーを作成するためのいくつかのアプローチによって多様化され、次いで、遺伝子送達障壁を克服することができる新規変異体を単離するために選択圧が適用される。重要なことに、遺伝子送達問題の根底にある機構的基礎は、機能の定向進化について知られている必要はなく、したがって、増強されたベクターの開発を加速することができる。

【0082】

典型的には、本明細書に開示される変異体は、AAVライブラリーおよび／またはライブラリーの使用によって生成された。そのような1つまたは複数のAAVライブラリーは、ウイルスゲノム工学の分野の当業者に公知であり容易に利用可能な一連の定向進化技術によって、AAVカプシドの構造タンパク質をコードする遺伝子であるcop遺伝子を突然変異させることによって生成される。例えば、BartelらAm. Soc. Gene Cell Then. 15th Annu. Meet. 20、5140（2012）；Bowles、D.らJ. Virol. 77、423-432（2003）；GrayらMol. Ther. 18、570-578（2010）；Grimm、D.らJ. Virol. 82、5887-5911；Koerber、J. T.らMol. Ther. 16、1703-1709（2008）；Li W.らMol. Ther. 16、1252-1260（2008）；Koerber、J. T.らMethods Mol. Biol. 434、161-170（2008）；Koerber、J. T.らHum. Gene Ther. 18、367-378（2007）；およびKoerber、J. T.らMol. Ther. 17、2088-2095（2009）を参照のこと。そのような技術は、限定されないが、以下の通りである：i）ランダムな点変異を所定の修正可能な速度でAAVキャップオープンリーディングフレーム（ORF）に導入するエラープロンPCR；ii）複数のAAV血清型を有する遺伝子ライブラリーを得るためのAAV cap遺伝子のランダムキメラを作製するためのインビトロまたはインビボウイルス組換えまたは「DNAシャッフリング」；iii）cap ORF中の縮重オリゴヌクレオチドのライゲーションによるカプシドの所定の部位へのランダムペプチド挿入；iv）トランスポ

ース突然変異誘発を使用した AAV cap ORF のランダムな位置へのペプチドをコードする配列の定義された挿入；v) 「ループスワップライブラリー」を生成するための天然 AAV 血清型および変異体間の各アミノ酸配置の保存レベルに基づいて生物情報学的に設計されたペプチド配列のライブラリーで AAV カプシドの表面ループを置換；vi) 祖先変異体のライブラリーを生成するための AAV 血清型間の縮重の配置でのランダムアミノ酸置換 (Santiago-Ortiz ら、2015)；およびそのような技術の組み合わせ。

【0083】

DNA シャッフリングは、固有の、多くの場合有益な方法でそれらの親特性を組み合わせるキメラを生成する。しかしながら、いくつかは、事実上、ライブラリーの多様性を低下させるパッケージングが不可能であり得る。ライブラリーの多様性濃縮は、限定されないが、上記 iii ~ iv) などのペプチド挿入技術によって達成される。ライブラリーの多様性は、上記の v) などの技術にも集中しており、そのような集中は、AAV カプシドの表面露出ループ上にある複数の超可変領域に向けられる。これらの技術の多くは、カプシドの小領域のみが変異した変異体カプシドを生成するが、これらの技術は、完全なカプシドを改変するための追加の突然変異誘発戦略と対にすることができる。

【0084】

1 つまたは複数の AAV ライブラリーが生成されると、次いで、各 AAV 粒子が、そのカプシドをコードする cap 遺伝子を取り囲む突然変異体カプシドから構成されるように、ウイルスがパッケージングされ、精製される。次いで、ライブラリーの変異体が、AAV の分野の当業者に公知であり、容易に利用可能なインビトロおよび／またはインビボ選択圧技術に供される。例えば、Maheshri、N. ら Nature Biotech、24、198-204 (2006)；Dalkara、D. ら Sci. Transl. Med. 5、189ra76 (2013)；Lisowski、L. ら Nature、506、382-286 (2013)；Yang、L. ら PNAS、106、3946-3951 (2009)；Gao、G. ら Mol. Ther. 13、77-87 (2006)；および Bell、P. ら Hum. Gene. Ther. 22、985-997 (2011) を参照のこと。例えば、限定されないが、AAV 変異体は、i) 異なる画分の溶出が変化した結合特性を有する変異体を生じる親和性カラム；ii) ヒト体内の細胞の挙動を模倣する組織試料または不死細胞株から単離された、効率および／もしくは組織特異性が向上した AAV 変異体をもたらす初代細胞；iii) 標的組織への感染に成功した AAV 変異体をもたらす、臨床遺伝子治療環境を模倣する動物モデル；iv) 感染した移植ヒト細胞を有する AAV 変異体を産生するヒト異種移植モデル；ならびに／またはそれらの選択技術の組み合わせを使用して選択され得る。

【0085】

ウイルスが選択されると、それらは、限定されないが、アデノウイルス媒介複製、PCR 増幅、次世代配列決定およびクローニングなどの既知の技術によって回収されてよく、次いで、ウイルスクローンは、選択技術の反復ラウンドを通して濃縮され、AAV DNA は、目的の選択された変異体 cap 遺伝子を回収するために単離される。そのような選択された変異体は、さらなる改変または突然変異を受けることができ、したがって、AAV ウイルス適合性を反復的に増加させるさらなる選択ステップのための新しい出発点として役立つが、特定の例では、さらなる突然変異なしで成功したカプシドが生成されている。

【0086】

本明細書に開示される AAV 変異体は、エアロゾル投与後の霊長類肺スクリーニングの使用を含む、上記の技術などのインビボ定向進化方法論の使用によって少なくとも部分的に生成された。したがって、本明細書に開示される AAV 変異体カプシドは、対応する親 AAV カプシドタンパク質よりも効率的な霊長類肺細胞の形質導入を付与するアミノ酸配列の 1 または複数の改変を含む。本明細書で使用される「対応する親 AAV カプシドタンパク質」とは、対象変異体 AAV カプシドタンパク質と同じ野生型または変異体 AAV 血

10

20

30

40

50

清型の AAV カプシドタンパク質を指すが、対象変異体 AAV カプシドタンパク質の 1 または複数のアミノ酸配列改変を含まない。

【0087】

いくつかの実施形態では、対象変異体 AAV カプシドタンパク質は、対応する親 AAV カプシドタンパク質に対する AAV カプシドタンパク質 GH ループまたはループ IV に共有結合によって挿入された約 5 アミノ酸～約 20 アミノ酸の異種ペプチドを含む。AAV カプシドタンパク質の「GH ループ」またはループ IV とは、当技術分野で AAV カプシドタンパク質の OH ループまたはループ IV と呼ばれる溶媒アクセス可能な部分を意味する。AAV カプシドの OH ループ／ループ IV については、例えば、van Viet ら、(2006) Mol. Ther. 14: 809; Padron ら (2005) J. Virology, 79: 5047; および Shen ら、(2007) Mol. Ther. 15: 1955 を参照のこと。したがって、例えば、挿入部位は、AAV VP1 カプシドタンパク質の約アミノ酸 411～650 の範囲内であり得る。例えば、挿入部位は、AAV1 VP1 のアミノ酸 571～612 内、AAV2 VP1 のアミノ酸 570～611 内、AAV3A VP1 のアミノ酸 571～612 内、AAV3B VP1 のアミノ酸 571～612 内、AAV4 VP1 のアミノ酸 569～610 内、AAV5 VP1 のアミノ酸 560～601 内、AAV6 VP1 のアミノ酸 571～612 内、AAV7 VP1 のアミノ酸 572～613 内、AAV8 VP1 のアミノ酸 573～614 内、AAV9 VP1 のアミノ酸 571～612 内、または AAV10 VP1 のアミノ酸 573～614 内、またはそれらの任意の変異体の対応するアミノ酸内であり得る。当業者は、様々な AAV 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸配列の比較に基づいて、「AAV2 のアミノ酸に対応する」挿入部位が、任意の所与の AAV 血清型のカプシドタンパク質内にあることを知っているであろう。野生型（天然に生じる）血清型 AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、および AAV4-10 の間およびその間のアミノ酸位置を提供する野生型 AAV 配列番号 1-11 のアラインメントについては、米国特許出願公開第 2019/0255192 号の図 6 も参照されたく、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0088】

ある特定の実施形態では、挿入部位は、任意の野生型 AAV 血清型または AAV 変異体の VP1 のアミノ酸 570～614 の間に位置する 2 つの隣接するアミノ酸の間の単一の挿入部位であり、例えば、挿入部位は、任意の AAV 血清型または変異体の VP1 のアミノ酸 570～610、アミノ酸 580～600、アミノ酸 570～575、アミノ酸 575～580、アミノ酸 5809585、アミノ酸 585～590、アミノ酸 590～600 またはアミノ酸 600～614 に位置する 2 つの隣接するアミノ酸の間である。例えば、挿入部位は、アミノ酸 580 と 581、アミノ酸 581 と 582、アミノ酸 583 と 584、アミノ酸 584 と 585、アミノ酸 585 と 586、アミノ酸 586 と 587、アミノ酸 587 と 588、アミノ酸 588 と 589、またはアミノ酸 589 と 590 の間であり得る。挿入部位は、アミノ酸 575 と 576 との間、アミノ酸 576 と 577 との間、アミノ酸 577 と 578 との間、アミノ酸 578 と 579 との間、またはアミノ酸 579 と 580 との間であり得る。挿入部位は、アミノ酸 590 と 591、アミノ酸 591 と 592、アミノ酸 592 と 593、アミノ酸 593 と 594、アミノ酸 594 と 595、アミノ酸 595 と 596、アミノ酸 596 と 597、アミノ酸 597 と 598、アミノ酸 598 と 599、またはアミノ酸 599 と 600 の間であり得る。例えば、挿入部位は、AAV2 のアミノ酸 587 と 588 との間、AAV1 のアミノ酸 590 と 591 との間、AAV3A のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV3B のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 584 と 585 との間、AAV5 のアミノ酸 575 と 576 との間、AAV6 のアミノ酸 590 と 591 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、AAV8 のアミノ酸 590 と 591 との間、AAV9 のアミノ酸 588 と 589 との間、または AAV10 のアミノ酸 588 と 589 との間であり得る。特定の実施形態では、挿入部位は、AAV2 のアミノ酸 587 と 588 との間、または AAV2 のアミノ酸 5

88と589との間である。

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるペプチド挿入は、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、または20アミノ酸の長さを有する。別の実施形態では、本明細書に開示されるペプチド挿入は、本明細書に開示されるペプチド挿入のいずれか1つのアミノ末端（N末端）および／またはカルボキシル末端（C末端）に1～4個のスペーサーアミノ酸を含む。例示的なスペーサーアミノ酸は、限定されないが、ロイシン（L）、アラニン（A）、グリシン（G）、セリン（S）、トレオニン（T）およびプロリン（P）を含む。特定の実施形態では、ペプチド挿入は、N末端に2個のスペーサーアミノ酸およびC末端に2個のスペーサーアミノ酸を含む。他の実施形態では、ペプチド挿入は、N末端に2個のスペーサーアミノ酸およびC末端に1個のスペーサーアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0090】

いくつかの実施形態では、挿入ペプチドは、HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTLSA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQD TTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNNSKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASH TNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN N（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNT PALS（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0091】

他の好ましい実施形態では、挿入ペプチドは、HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTLSA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQD TTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNNSKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASH TNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN N（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNT PALS（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）から選択されるアミノ酸配列のN末端および／またはカルボキシル末端に1～3個のスペーサーアミノ酸（Y₁～Y₃）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。特定のこのような実施形態では、挿入ペプチドは、LAHDITKNI A（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LADNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQSI A（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）、LAI SDQTKHA（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTDF A（配列番号48）、LATNQTLSAA（配列番号49）、LAENRTTSNA（配列番号50）、LAPQQD TTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配列番号52）、LATNNSKPD A（配列番号53）、LASKLTLNNA（配列番号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、L

APNSTTNN (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASHTNNA (配列番号58)、LARSHQEIPA (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDATKNA (配列番号61)、LANHISQTNA (配列番号62)、LASNSAHITA (配列番号63)、LASTHQSNNA (配列番号64)、LAKTPNL TSA (配列番号65)、LASNTPALSA (配列番号66) および LASPGATTNA (配列番号67) からなる群から選択される。

【0092】

いくつかの実施形態では、対象変異体AAVカプシドタンパク質は、GHループまたはループIV内の約5アミノ酸～約20アミノ酸のペプチド挿入以外の任意の他のアミノ酸配列改変を含まない。例えば、いくつかの実施形態では、対象変異体AAVカプシドタンパク質は、HDITKNI (配列番号12)、NQDYTKT (配列番号13)、DNTVTRS (配列番号14)、SNSVQSI (配列番号15)、NSTRHTD (配列番号16)、TNRTSPD (配列番号17)、ISDQTKH (配列番号18)、QADTTKN (配列番号19)、NAVKTDF (配列番号20)、TNQTLSA (配列番号21)、ENRTTSN (配列番号22)、PQQDTTH (配列番号23)、NATNHVI (配列番号24)、TNNSKPD (配列番号25)、SKLTLNN (配列番号26)、VTAGMGA (配列番号27)、PNSTTNN (配列番号28)、NSTSRID (配列番号29)、VASHTNN (配列番号30)、RSHQEIP (配列番号31)、LNTTKDI (配列番号32)、IIDATKN (配列番号33)、NHSQTN (配列番号34)、SNSAHIT (配列番号35)、STHQSNNA (配列番号36)、KTPNLTS (配列番号37)、SNTPALSA (配列番号38)、SPGATTN (配列番号39)、LAHDITKNIA (配列番号40)、LANQDYTKTA (配列番号41)、LADNTVTRSA (配列番号42)、LASNSVQSIA (配列番号43)、LANSTRHTDA (配列番号44)、LATNRTSPDA (配列番号45)、LAISDQTKHA (配列番号46)、LAQADTTKNA (配列番号47)、LANAVKTDF (配列番号48)、LATNQTLSAA (配列番号49)、LAENRTTSNA (配列番号50)、LAPQQDTTHA (配列番号51)、LANATNHVIA (配列番号52)、LATNNSKPD (配列番号53)、LASKLTLNNA (配列番号54)、LAVTAGMGAA (配列番号55)、LAPNSTTNN (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASHTNNA (配列番号58)、LARSHQEIPA (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDATKNA (配列番号61)、LANHISQTN (配列番号62)、LASNSAHITA (配列番号63)、LASTHQSNNA (配列番号64)、LAKTPNL TSA (配列番号65)、LASNTPALSA (配列番号66) and LASPGATTNA (配列番号67) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチド挿入か、それから本質的になるか、またはそれからなり、かつ、変異体AAVカプシドは、他のアミノ酸置換、挿入または欠失を含まない (すなわち、変異型AAVカプシドタンパク質は、前記挿入を含み、それ以外は対応するAAVカプシドタンパク質と同一である。言い換えると、前記挿入を含む変異体AAVカプシドタンパク質は、それ以外はペプチドが挿入された親AAVカプシドタンパク質と同一である。別の例として、対象変異体AAVカプシドタンパク質は、HDITKNI (配列番号12)、NQDYTKT (配列番号13)、DNTVTRS (配列番号14)、SNSVQSI (配列番号15)、NSTRHTD (配列番号16)、TNRTSPD (配列番号17)、ISDQTKH (配列番号18)、QADTTKN (配列番号19)、NAVKTDF (配列番号20)、TNQTLSA (配列番号21)、ENRTTSN (配列番号22)、PQQDTTH (配列番号23)、NATNHVI (配列番号24)、TNNSKPD (配列番号25)、SKLTLNN (配列番号26)、VTAGMGA (配列番号27)、PNSTTNN (配列番号28)、NSTSRID (配列番号29)、VASHTNN (配列番号30)、RSHQEIP (配列番号31)、LNTTKDI (配列番号32)

10

20

30

40

50

、I I D A T K N（配列番号33）、N H I S Q T N（配列番号34）、S N S A H I T（配列番号35）、S T H Q S N N（配列番号36）、K T P N L T S（配列番号37）、S N T P A L S（配列番号38）、S P G A T T N（配列番号39）、L A H D I T K N I A（配列番号40）、L A N Q D Y T K T A（配列番号41）、L A D N T V T R S A（配列番号42）、L A S N S V Q S I A（配列番号43）、L A N S T R H T D A（配列番号44）、L A T N R T S P D A（配列番号45）、L A I S D Q T K H A（配列番号46）、L A Q A D T T K N A（配列番号47）、L A N A V K T D F A（配列番号48）、L A T N Q T L S A A（配列番号49）、L A E N R T T S N A（配列番号50）、L A P Q Q D T T H A（配列番号51）、L A N A T N H V I A（配列番号52）、L A T N N S K P D A（配列番号53）、L A S K L T L N N A（配列番号54）、L A V T A G M G A A（配列番号55）、L A P N S T T N N A（配列番号56）、L A N S T S R I D A（配列番号57）、L A V A S H T N N A（配列番号58）、L A R S H Q E I P A（配列番号59）、L A L N T T K D I A（配列番号60）、L A I I D A T K N A（配列番号61）、L A N H I S Q T N A（配列番号62）、L A S N S A H I T A（配列番号63）、L A S T H Q S N N A（配列番号64）、L A K T P N L T S A（配列番号65）、L A S N T P A L S A（配列番号66）and L A S P G A T T N A（配列番号67）から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド挿入を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、ペプチド挿入が、A A V 2 カプシドのV P 1 のアミノ酸587と588の間、または別の親A A V のV P 1 の対応するアミノ酸の間、例えば、A A V 1、A A V 3 A、A A V 3 B、A A V 6もしくはA A V 9のV P 1 のアミノ酸588と589の間、A A V 4のV P 1 のアミノ酸586と587の間、A A V 5のV P 1 のアミノ酸577と578の間、A A V 7のV P 1 のアミノ酸589と590の間、A A V 8もしくはA A V 10のV P 1 のアミノ酸590と591の間に位置し、変異体A A V カプシドタンパク質配列は、それ以外は対応する親A A V カプシドタンパク質配列、例えば配列番号1～12のいずれか1つと同一である。

10

20

30

40

50

【0093】

他の実施形態では、対象変異体A A V カプシドタンパク質は、例えば本明細書に開示されるようなまたは当技術分野で公知のようなG H ループ内へのペプチド挿入を含むことに加えて、親A A V カプシドタンパク質と比較して約1～約100個のアミノ酸置換または欠失、例えば1～約5、約2～約4、約2～約5、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、約25～50、約50～100個のアミノ酸置換または欠失を含む。したがって、いくつかの実施形態では、対象変異体カプシドタンパク質は、対応する親A A V カプシド、例えば配列番号1～12に示される野生型カプシドタンパク質と85%またはそれを超える、90%またはそれを超える、95%またはそれを超える、または98%またはそれを超える、例えば99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、対象変異体カプシドタンパク質は、A A V 2 カプシドタンパク質（配列番号2）のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0094】

さらなる実施形態では、1または複数のアミノ酸置換は、ペプチドの挿入前にナンバリングされたA A V 2 V P 1 カプシドタンパク質の1、6、15、16、18、30、34、37、38、57、65、66、81、91、99、101、103、109、118、120、133、134、135、136、137、138、144、164、176、188、196、200、213、220、226、236、240、250、283、312、344、347、363、368、371、376、399、428、436、449、451、456、463、469、472、484、491、524、532、535、551、585、591、593、594、608、641、688、698、705、708、719、721、および／または735のアミノ酸残基、または別のA A V カプシドタンパク質の対応するアミノ酸残基である。いくつかのこのような実施

形態では、1または複数のアミノ酸置換は、ペプチドの挿入前にナンバリングされたAAV2 VP1カプシドタンパク質のY6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S、およびV708I、または別のAAVカプシドタンパク質の対応するアミノ酸残基からなる群から選択される。他のこのような実施形態では、1または複数のアミノ酸置換は、ペプチドの挿入前にナンバリングされたAAV2 VP1カプシドタンパク質のM1L、L15P、P34A、N57D、N66K、R81Q、Q101R、S109T、R144K、R144M、Q164K、T176P、L188I、S196Y、G226E、G236V、I240T、P250S、N312K、P363L、D368H、N449D、I456K、S463Y、D472N、R484C、A524T、P535S、N551S、A593E、I698V、V708I、V719M、S721L、およびL735Q、または別のAAVカプシドタンパク質の対応するアミノ酸残基からなる群から選択される。いくつかの好ましい実施形態では、対象変異体カプシドタンパク質は、AAV2 VP1カプシドタンパク質（配列番号2）のアミノ酸残基708にアミノ酸置換を含む。特に好ましい実施形態では、対象変異体カプシドタンパク質は、AAV2 VP1カプシドタンパク質に対するV708Iアミノ酸置換（配列番号2）を含み、必要に応じて本明細書に記載の1または複数のアミノ酸置換をさらに含む。

10

20

【0095】

いくつかの実施形態では、対象変異体AAVカプシドタンパク質は、1または複数の肺細胞型の感染性の増加をrAAVに付与し、AAV2（野生型AAV血清型2）によって示される耐性と比較してヒトAAV中和抗体に対する耐性の増加もrAAVに付与する。場合によっては、rAAVは、AAV2（野生型AAV血清型2）によって示される耐性と比較して、ヒトAAV中和抗体に対する増加した耐性を示す。場合によっては、rAAVは、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約1.5倍（例えば、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約30倍など）大きいヒトAAV中和抗体に対する耐性を示す。いくつかの場合、rAAVは、野生型AAV血清型2（AAV2）によって示される哺乳動物細胞の形質導入と比較して、ヒトAAV中和抗体の存在下で1または複数の哺乳動物肺細胞型の形質導入の増加を示す。

30

【0096】

好ましい実施形態では、変異体AAVカプシドタンパク質が提供され、a)カプシドタンパク質のGHループにペプチド挿入であって、ペプチド挿入が、a)HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTLISA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNN SKPD（配列番号25）、SKLT LNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASHTNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPALIS（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）、LAHDITKNI A（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LANDNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQSI A（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）、LAISDQ

40

50

TKHA（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTF
FA（配列番号48）、LATNQTL SAA（配列番号49）、LAENRTTSNA
（配列番号50）、LAPQQDTTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配
列番号52）、LATNNSK PDA（配列番号53）、LASKLT L NNA（配列番
号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、LAPNSTT NNA（配列番号5
6）、LANSTSRIDA（配列番号57）、LAVASHT NNA（配列番号58）
、LARSHQEIPA（配列番号59）、LALNTTKDIA（配列番号60）、L
AIIIDATKNA（配列番号61）、LANHISQTNA（配列番号62）、LAS
NSAHITA（配列番号63）、LASTHQSNNA（配列番号64）、LAKTP
NLTSA（配列番号65）、LASNTPALSA（配列番号66）およびLASPG
ATTNA（配列番号67）から選択されるアミノ酸配列を含むか、本質的にこれらから
なるペプチド挿入と、b）AAV2のアミノ酸配列（配列番号2）と比較した1または複
数の以下のアミノ酸置換、または別のAAV親血清型（つまりAAV2以外）の対応する
置換と、を含み、置換アミノ酸は、対応する配置：M1L、L15P、P34A、N57
D、N66K、R81Q、Q101R、S109T、R144K、R144M、Q164
K、T176P、L188I、S196Y、G226E、G236V、I240I、P2
50S、N312K、P363L、D368H、N449D、T456K、S463Y、
D472N、R484C、A524I、P535S、N551S、A593E、I698
V、V708I、V719M、S721L、L735Qおよびそれらの組合せでは、天然
に生じない。好ましい実施形態では、1または複数のアミノ酸置換は、V708I置換を
含む。好ましくは、ペプチド挿入部位は、AAV2カプシドのアミノ酸587と588と
の間、または別のAAV血清型のカプシドタンパク質の対応する配置に位置する。

10

20

30

40

50

【0097】

特に好ましい実施形態では、変異体AAVカプシドは、AAV2のVP1のアミノ酸5
87と588との間のアミノ酸配列HDITKNI（配列番号12）を含むペプチド挿入
を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、またはAAV2のVP1の
対応するアミノ酸または別のAAVカプシドの対応するアミノ酸の間のアミノ酸配列LA
HDITKNI A（配列番号40）を含むか、それから本質的になるか、またはそれから
なり、AAV2カプシド（配列番号2）のアミノ酸配列または別のAAVカプシドの対応
する残基に対して残基708にV708Iアミノ酸置換をさらに含む。変異体AAVカプ
シドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または対応する親AAVカプシドの全長と少
なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、ま
たは少なくとも約99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好まし
い実施形態では、変異体AAVカプシドは、以下のアミノ酸配列（AAV102）に対し
て少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%
の配列同一性を有するか、少なくとも約99%の配列同一性を有するか、または100%
同一であるアミノ酸配列を有する。

【化 1】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN LAHDITKNIARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYN
KSINVDFTVDITNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 68)

10

20

【0098】

別の実施形態では、変異体 AAV カプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6 もしくは AAV9 の VP1 のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 586 と 587 との間、AAV5 のアミノ酸 577 と 578 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、または AAV8 もしくは AAV10 のアミノ酸 590 と 591 との間に位置するペプチド挿入であって、LAHDITKNI A (配列番号 40) および HDITKNI (配列番号 12) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるペプチド挿入と、b) AAV3A もしくは AAV3B のアミノ酸 709 におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1 もしくは AAV6 の配置 709 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4 のアミノ酸 707 または AAV9 のアミノ酸 709 のアスパラギンからイソロイシンへの置換、または AAV7 のアミノ酸 710 または AAV8 または AAV10 のアミノ酸 711 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または AAV5 のアミノ酸 697 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および 3～12 のいずれか 1 つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 と 588 との間のアミノ酸配列 LAHDITKNI A (配列番号 40) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるアミノ酸配列 HDITKNI (配列番号 12) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるアミノ酸配列を含むペプチド挿入と、b) AAV2 のアミノ酸配列と比較したアミノ酸 708 でのバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2 から 5、5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸置換を含む。

30

40

【0099】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 とアミノ酸 588 との間のアミノ酸配列 HDITKNI (配列番号 12) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはアミノ酸配列 LAHDITKNI A (配列番号 40) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号 2 のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

50

【0100】

特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、アミノ酸配列 NQDYTKT (配列番号 13) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、または AAV2 の VP1 のアミノ酸 587 と 588 の間または別の AAV カプシドの対応するアミノ酸との間のアミノ酸配列 LANQDYTKTA (配列番号 41) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入を含み、かつ AAV2 カプシド (配列番号 2) のアミノ酸配列または別の AAV カプシドの対応する残基に対して残基 708 に V708I アミノ酸置換をさらに含む。変異体 AAV カプシドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列または対応する親 AAV カプシドの全長と少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、以下のアミノ酸配列 (AAV103) に対して少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98% の配列同一性を有するか、少なくとも約 99% の配列同一性を有するか、または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する。

10

【化 2】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
GFENGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTITTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN

20

【化 3】

NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLANQDYTKTARQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILI
KNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 69)

30

【0101】

別の実施形態では、変異体 AAV カプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6 もしくは AAV9 の VP1 のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 586 と 587 との間、AAV5 のアミノ酸 577 と 578 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、または AAV8 もしくは AAV10 のアミノ酸 590 と 591 との間に位置するペプチド挿入であって、LANQDYTKTA (配列番号 41) および NQDYTKT (配列番号 13) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるペプチド挿入と、b) AAV3A もしくは AAV3B のアミノ酸 709 におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1 もしくは AAV6 のアミノ酸 709 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4 のアミノ酸 707 または AAV9 のアミノ酸 709 のアスパラギンからイソロイシンへの置

40

50

換、または AAV7 のアミノ酸 710 または AAV8 または AAV10 のアミノ酸 711 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または AAV5 のアミノ酸 697 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および 3 ~ 12 のいずれか 1 つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) アミノ酸配列を含むか、もしくは NQDYTKT (配列番号 13) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、または AAV2 カプシドのアミノ酸 587 とアミノ酸 588 との間のアミノ酸配列 LANQDYTKTA (配列番号 41) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV2 のアミノ酸配列と比較したアミノ酸 708 におけるバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2 から 5、5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸置換を含む。

10

【0102】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 と 588 との間にアミノ酸配列 NQDYTKT (配列番号 13) を含むか、またはアミノ酸配列 LANQDYTKTA (配列番号 41) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号 2 のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

【0103】

特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、アミノ酸配列 DNTVTRS (配列番号 14) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、または AAV2 の VP1 のアミノ酸 587 と 588 の間または別の AAV カプシドの対応するアミノ酸との間のアミノ酸配列 LADNTVTRSA (配列番号 42) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入を含み、かつ AAV2 カプシド (配列番号 2) のアミノ酸配列または別の AAV カプシドの対応する残基に対して残基 708 に V708I アミノ酸置換をさらに含む。変異体 AAV カプシドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列または対応する親 AAV カプシドの全長と少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、以下のアミノ酸配列 (AAV104) に対して少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98% の配列同一性を有するか、少なくとも約 99% の配列同一性を有するか、または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する。

20

30

40

50

【化 4】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRHFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTNL
NGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPL
IDQYLYLSRTNTPSGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQRGNLADNTVTRSARQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 70)

10

20

【0104】

別の実施形態では、変異体 AAV カプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6 もしくは AAV9 の VP1 のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 586 と 587 との間、AAV5 のアミノ酸 577 と 578 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、または AAV8 もしくは AAV10 のアミノ酸 590 と 591 との間に位置するペプチド挿入であって、LADNTVTRSA (配列番号 42) および DNTVTRS (配列番号 14) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV3A もしくは AAV3B のアミノ酸 709 におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1 もしくは AAV6 のアミノ酸 709 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4 のアミノ酸 707 または AAV9 のアミノ酸 709 のアスパラギンからイソロイシンへの置換、または AAV7 のアミノ酸 710 または AAV8 または AAV10 のアミノ酸 711 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または AAV5 のアミノ酸 697 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および 3~12 のいずれか 1 つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) アミノ酸配列を含むか、DNTVTRS (配列番号 14) を含むか、それからなるか、本質的になるか、AAV2 カプシドのアミノ酸 587 と 588 との間のアミノ酸配列 LADNTVTRSA (配列番号 42) を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV2 のアミノ酸配列と比較したアミノ酸 708 のバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2 から 5、5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸置換を含む。

30

40

【0105】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 とアミノ酸 588 との間のアミノ酸配列 DNTVTRS (配列番号 14) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはアミノ酸配列 LADNTVTRSA (配列番号 42) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号 2 のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

【0106】

50

特に好ましい実施形態では、変異体 A A V カプシドは、アミノ酸配列 S N S V Q S I (配列番号 15) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、または A A V 2 の V P 1 のアミノ酸 5 8 7 と 5 8 8 の間または別の A A V カプシドの対応するアミノ酸との間のアミノ酸配列 L A S N S V Q S I A (配列番号 43) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入を含み、かつ A A V 2 カプシド (配列番号 2) のアミノ酸配列または別の A A V カプシドの対応する残基に対して残基 7 0 8 に V 7 0 8 I アミノ酸置換をさらに含む。変異体 A A V カプシドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列または対応する親 A A V カプシドの全長と少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好ましい実施形態では、変異体 A A V カプシドは、以下のアミノ酸配列 (A A V 105) に対して少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98% の配列同一性を有するか、少なくとも約 99% の配列同一性を有するか、または 100% 同一であるアミノ酸配列を有する。

10

20

30

40

50

【化 5】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN LASNSVQSIARQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
NTPVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYN
KSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 71)

【0107】

別の実施形態では、変異体 A A V カプシドタンパク質が提供され、a) A A V 1、A A V 3 A、A A V 3 B、A A V 6 もしくは A A V 9 の V P 1 のアミノ酸 5 8 8 と 5 8 9 との間、A A V 4 のアミノ酸 5 8 6 と 5 8 7 との間、A A V 5 のアミノ酸 5 7 7 と 5 7 8 との間、A A V 7 のアミノ酸 5 8 9 と 5 9 0 との間、または A A V 8 もしくは A A V 10 のアミノ酸 5 9 0 と 5 9 1 との間に位置するペプチド挿入であって、L A S N S V Q S I A (配列番号 43) および S N S V Q S I (配列番号 15) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) A A V 3 A もしくは A A V 3 B のアミノ酸 7 0 9 におけるバリンからイソロイシンへの置換、A A V 1 もしくは A A V 6 のアミノ酸 7 0 9 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、A A V 4 のアミノ酸 7 0 7 または A A V 9 のアミノ酸 7 0 9 のアスパラギンからイソロイシンへの置換、または A A V 7 のアミノ酸 7 1 0 または A A V 8 または A A V 10 のアミノ酸 7 1 1 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または A A V 5 のアミノ酸 6 9 7 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および

3～12のいずれか1つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) アミノ酸配列を含むか、SNSVQSI (配列番号15) を含むか、それからなるか、もしくは本質的なるか、またはAAV2カプシドのアミノ酸587と588との間のアミノ酸配列LASNSVQSI A (配列番号43) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV2のアミノ酸配列と比較したアミノ酸708のバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2から5、5から10、または10から15のアミノ酸置換を含む。

【0108】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2カプシドのアミノ酸587とアミノ酸588との間のアミノ酸配列SNSVQSI (配列番号15) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはアミノ酸配列LASNSVQSI A (配列番号43) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号2のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

10

【0109】

特に好ましい実施形態では、変異体AAVカプシドは、アミノ酸配列NSTRH TD (配列番号16) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、またはAAV2のVP1のアミノ酸587と588の間または別のAAVカプシドの対応するアミノ酸との間のアミノ酸配列LANSTRH TDA (配列番号44) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入を含み、かつAAV2カプシド (配列番号2) のアミノ酸配列または別のAAVカプシドの対応する残基に対して残基708にV708Iアミノ酸置換をさらに含む。変異体AAVカプシドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または対応する親AAVカプシドの全長と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好ましい実施形態では、変異体AAVカプシドは、以下のアミノ酸配列 (AAV106) に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%の配列同一性を有するか、少なくとも約99%の配列同一性を有するか、または100%同一であるアミノ酸配列を有する。

20

【化6】

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYL
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVK TAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRHFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA

30

40

50

【化 7】

DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
 KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLANSTRHTDARQAATA
 DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILI
 KNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNY
 NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 72)

【0110】

別の実施形態では、変異体 AAV カプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6 もしくは AAV9 の VP1 のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 586 と 587 との間、AAV5 のアミノ酸 577 と 578 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、または AAV8 もしくは AAV10 のアミノ酸 590 と 591 との間に位置するペプチド挿入であって、LANSTRHTDA (配列番号 44) および NSTRHTD (配列番号 16) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV3A もしくは AAV3B のアミノ酸 709 におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1 もしくは AAV6 の配置 709 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4 のアミノ酸 707 または AAV9 のアミノ酸 709 のアスパラギンからイソロイシンへの置換、または AAV7 のアミノ酸 710 または AAV8 または AAV10 のアミノ酸 711 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または AAV5 のアミノ酸 697 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および 3~12 のいずれか 1 つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) アミノ酸配列を含むか、NSTRHTD (配列番号 16) を含むか、それからなるか、もしくは本質的になるか、または AAV2 カプシドのアミノ酸 587 と 588 との間のアミノ酸配列 LANSTRHTDA (配列番号 44) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV2 のアミノ酸配列と比較したアミノ酸 708 のバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2 から 5、5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸置換を含む。

【0111】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 とアミノ酸 588 との間のアミノ酸配列 NSTRHTD (配列番号 16) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはアミノ酸配列 LANSTRHTDA (配列番号 44) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号 2 のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

【0112】

特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、アミノ酸配列 TNRTSPD (配列番号 17) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるか、または AAV2 の VP1 のアミノ酸 587 と 588 の間または別の AAV カプシドの対応するアミノ酸との間のアミノ酸配列 LATNRTSPDA (配列番号 45) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入を含み、かつ AAV2 カプシド (配列番号 2) のアミノ酸配列または別の AAV カプシドの対応する残基に対して残基 708 に V708I アミノ酸置換をさらに含む。変異体 AAV カプシドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列または対応する親 AAV カプシドの全長と少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。特に好ましい実施形態では、変異体 AAV カプシドは、以下のアミノ酸配列 (AAV107) に対して少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98% の配列同一性を有するか、少なくとも約 99% の配列同一性を有するか、または 100% 同一であるアミノ酸配列を有す

る。

【化 8】

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMNPL
IDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVSTNLQRGN LATNRTSPDARQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 73)

10

20

【0113】

別の実施形態では、変異体 AAV カプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6 もしくは AAV9 の VP1 のアミノ酸 588 と 589 との間、AAV4 のアミノ酸 586 と 587 との間、AAV5 のアミノ酸 577 と 578 との間、AAV7 のアミノ酸 589 と 590 との間、または AAV8 もしくは AAV10 のアミノ酸 590 と 591 との間に位置するペプチド挿入であって、LATNRTSPDA (配列番号 45) および TNRTSPD (配列番号 17) から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV3A もしくは AAV3B のアミノ酸 709 におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1 もしくは AAV6 のアミノ酸 709 におけるアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4 のアミノ酸 707 または AAV9 のアミノ酸 709 のアスパラギンからイソロイシンへの置換、または AAV7 のアミノ酸 710 または AAV8 または AAV10 のアミノ酸 711 のトレオニンからイソロイシンへの置換、または AAV5 のアミノ酸 697 のグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、かつ、必要に応じてそれ以外は配列番号 1 および 3~12 のいずれか 1 つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) アミノ酸配列を含むか、TNRTSPD (配列番号 17) を含むか、それからなるか、もしくは本質的になるか、または AAV2 カプシドのアミノ酸 587 と 588 との間のアミノ酸配列 LATNRTSPDA (配列番号 45) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるペプチド挿入と、b) AAV2 のアミノ酸配列と比較したアミノ酸 708 のバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質は、2 から 5、5 から 10、または 10 から 15 のアミノ酸置換を含む。

30

40

【0114】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a) AAV2 カプシドのアミノ酸 587 とアミノ酸 588 との間のアミノ酸配列 TNRTSPD (配列番号 17) を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはアミノ酸配列 LATNRTSPDA (配列番号 45) を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなり、それ以外は配列番号 2 のアミノ酸配列と同一であるペプチド挿入を含む。

50

【0115】

他の実施形態では、変異体AAVカプシドは、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTLSA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNNSKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASHTNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPAL（配列番号38）、and SPGATTN（配列番号39）から選択されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入からなるか、またはAAV2のVP1のアミノ酸587とアミノ酸588との間、または別のAAVカプシドの対応するアミノ酸の間のLAISDQTKHA（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTDF（配列番号48）、LATNQTLSAA（配列番号49）、LAENRTTSNA（配列番号50）、LAPQQDTTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配列番号52）、LATNNSKPD（配列番号53）、LASKLTLNNA（配列番号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、LAPNSTTNN（配列番号56）、LANSTSRIDA（配列番号57）、LAVASHTN（配列番号58）、LARSHQEIPA（配列番号59）、LALNTTKDIA（配列番号60）、LAIIDATKNA（配列番号61）、LANHISQTN（配列番号62）、LASNSAHITA（配列番号63）、LASTHQSNNA（配列番号64）、LAKTPNLTS（配列番号65）、LASNTPAL（配列番号66）and LASPGATTN（配列番号67）を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入からなり、かつAAV2カプシド（配列番号2）のアミノ酸配列に対する1または複数のアミノ酸置換をさらに含む。いくつかの態様では、1または複数のアミノ酸置換は、AAV2カプシド（配列番号2）のアミノ酸配列または別のAAVカプシドの対応する残基に対して残基708にV708Iアミノ酸置換を含む。変異体AAVカプシドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または対応する親AAVカプシドの全長と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。

【0116】

関連する実施形態では、変異体AAVカプシドタンパク質が提供され、a) AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6もしくはAAV9のVP1のアミノ酸588と589との間、AAV4のアミノ酸586と587との間、AAV5のアミノ酸577と578との間、AAV7のアミノ酸589と590との間、またはAAV8もしくはAAV10のアミノ酸590と591との間に位置するペプチド挿入であって、ペプチド挿入は、HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTLSA（配列番号21）、ENRTTSN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNNSKPD（配列番号25）、SKLTLNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASHTNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPAL（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）、LAHDITKNI（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）を含むか、それから本質的になるか、もしくはそれからなるペプチド挿入からなり、かつAAV2カプシド（配列番号2）のアミノ酸配列に対する1または複数のアミノ酸置換をさらに含む。いくつかの態様では、1または複数のアミノ酸置換は、AAV2カプシド（配列番号2）のアミノ酸配列または別のAAVカプシドの対応する残基に対して残基708にV708Iアミノ酸置換を含む。変異体AAVカプシドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列または対応する親AAVカプシドの全長と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%またはそれを超えるアミノ酸配列同一性を有し得る。

号41)、LADNTVTRSA(配列番号42)、LASNSVQSLA(配列番号43)、LANSTRHTDA(配列番号44)、LATNRTSPDA(配列番号45)、LAISDQTKHA(配列番号46)、LAQADTTKNA(配列番号47)、LANAVKTDFA(配列番号48)、LATNQTLSSA(配列番号49)、LAENRTTSNA(配列番号50)、LAPQQDTHA(配列番号51)、LANATNHVIA(配列番号52)、LATNNSKPKDA(配列番号53)、LASKLTLNNA(配列番号54)、LAVTAGMGAA(配列番号55)、LAPNSTTNN(配列番号56)、LANSTSRIDA(配列番号57)、LAVASHTNNA(配列番号58)、LARSHQEIPA(配列番号59)、LALNTTKDIA(配列番号60)、LAIIDATKNA(配列番号61)、LANHISQTN(配列番号62)、LASNSAHITA(配列番号63)、LASTHQSNN(配列番号64)、LAKTPNL TSA(配列番号65)、LASNTPALSA(配列番号66)、およびLASPGATTN(配列番号67)から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる、ペプチド挿入と、b)AAV3AもしくはAAV3Bのアミノ酸709位におけるバリンからイソロイシンへの置換、AAV1もしくはAAV6の配置709のアラニンからイソロイシンへの置換、AAV4のアミノ酸707もしくはAAV9のアミノ酸709におけるアスパラギンからイソロイシンへの置換、またはAAV7のアミノ酸710もしくはAAV8もしくはAAV10のアミノ酸711におけるスレオニンからイソロイシンへの置換、またはAAV5のアミノ酸697におけるグルタミンからイソロイシンへの置換と、を含み、必要に応じて、それ以外は配列番号1および3~12のいずれか1つと同一である。好ましい実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a)ISDQTKH(配列番号18)、QADTTKN(配列番号19)、NAVKTDF(配列番号20)、TNQTLSSA(配列番号21)、ENRTTSN(配列番号22)、PQQDTH(配列番号23)、NATNHVI(配列番号24)、TNNSKPKD(配列番号25)、SKLTLNN(配列番号26)、VTAGMGA(配列番号27)、PNSTTNN(配列番号28)、NSTSRID(配列番号29)、VASHTNN(配列番号30)、RSHQEIP(配列番号31)、LNTTKDI(配列番号32)、IIDATKN(配列番号33)、NHISQTN(配列番号34)、SNSAHIT(配列番号35)、STHQSNN(配列番号36)、KTPNL TS(配列番号37)、SNTPALSA(配列番号38)、およびSPGATTN(配列番号39)から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはAAV2カプシドのアミノ酸587と588の間のLAISDQTKHA(配列番号46)、LAQADTTKNA(配列番号47)、LANAVKTDFA(配列番号48)、LATNQTLSSA(配列番号49)、LAENRTTSNA(配列番号50)、LAPQQDTHA(配列番号51)、LANATNHVIA(配列番号52)、LATNNSKPKDA(配列番号53)、LASKLTLNNA(配列番号54)、LAVTAGMGAA(配列番号55)、LAPNSTTNN(配列番号56)、LANSTSRIDA(配列番号57)、LAVASHTNNA(配列番号58)、LARSHQEIPA(配列番号59)、LALNTTKDIA(配列番号60)、LAIIDATKNA(配列番号61)、LANHISQTN(配列番号62)、LASNSAHITA(配列番号63)、LASTHQSNN(配列番号64)、LAKTPNL TSA(配列番号65)、LASNTPALSA(配列番号66)およびLASPGATTN(配列番号67)から選択されるアミノ酸配列からなる、ペプチド挿入と、b)AAV2のアミノ酸配列と比較したアミノ酸708におけるバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質が、2から5、5から10、または10から15のアミノ酸置換を含む。

【0117】

さらに別の実施形態では、変異体カプシドタンパク質は、a)ISDQTKH(配列番号18)、QADTTKN(配列番号19)、NAVKTDF(配列番号20)、TNQTLSSA(配列番号21)、ENRTTSN(配列番号22)、PQQDTH(配列番号23)、NATNHVI(配列番号24)、TNNSKPKD(配列番号25)、SKLTLNN(配列番号26)、VTAGMGA(配列番号27)、PNSTTNN(配列番号28)、NSTSRID(配列番号29)、VASHTNN(配列番号30)、RSHQEIP(配列番号31)、LNTTKDI(配列番号32)、IIDATKN(配列番号33)、NHISQTN(配列番号34)、SNSAHIT(配列番号35)、STHQSNN(配列番号36)、KTPNL TS(配列番号37)、SNTPALSA(配列番号38)、およびSPGATTN(配列番号39)から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはAAV2カプシドのアミノ酸587と588の間のLAISDQTKHA(配列番号46)、LAQADTTKNA(配列番号47)、LANAVKTDFA(配列番号48)、LATNQTLSSA(配列番号49)、LAENRTTSNA(配列番号50)、LAPQQDTHA(配列番号51)、LANATNHVIA(配列番号52)、LATNNSKPKDA(配列番号53)、LASKLTLNNA(配列番号54)、LAVTAGMGAA(配列番号55)、LAPNSTTNN(配列番号56)、LANSTSRIDA(配列番号57)、LAVASHTNNA(配列番号58)、LARSHQEIPA(配列番号59)、LALNTTKDIA(配列番号60)、LAIIDATKNA(配列番号61)、LANHISQTN(配列番号62)、LASNSAHITA(配列番号63)、LASTHQSNN(配列番号64)、LAKTPNL TSA(配列番号65)、LASNTPALSA(配列番号66)およびLASPGATTN(配列番号67)から選択されるアミノ酸配列からなる、ペプチド挿入と、b)AAV2のアミノ酸配列と比較したアミノ酸708におけるバリンからイソロイシンへのアミノ酸置換と、を含み、変異体カプシドタンパク質が、2から5、5から10、または10から15のアミノ酸置換を含む。

10

20

30

40

50

号23)、NATNHVI (配列番号24)、TNNSKPD (配列番号25)、SKLTLNN (配列番号26)、VTAGMGA (配列番号27)、PNSTTNN (配列番号28)、NSTSRID (配列番号29)、VASH TNN (配列番号30)、RSHQEIP (配列番号31)、LNTTKDI (配列番号32)、IIDATKN (配列番号33)、NHISQTN (配列番号34)、SNSAHIT (配列番号35)、STHQSN (配列番号36)、KTPNLT S (配列番号37)、SNTPAL S (配列番号38)、およびSPGATTN (配列番号39)から選択されるアミノ酸配列を含むか、それからなるか、もしくはそれから本質的になるか、またはAAV2カプシドのアミノ酸587と588の間のLAISDQTKHA (配列番号46)、LAQADTTKNA (配列番号47)、LANAVKTDFA (配列番号48)、LATNQTL SAA (配列番号49)、LAENRTTSNA (配列番号50)、LAPQQDTTHA (配列番号51)、LANATNHVIA (配列番号52)、LATNNSKPD A (配列番号53)、LASKLTLNNA (配列番号54)、LAVTAGMGAA (配列番号55)、LAPNSTTNN A (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASH TNN A (配列番号58)、LARSHQEIPA (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDATKNA (配列番号61)、LANHISQTN A (配列番号62)、LASNSAHITA (配列番号63)、LASTHQSNNA (配列番号64)、LAKTPNLTSA (配列番号65)、LASNTPAL S A (配列番号66)およびLASPGATTNA (配列番号67)から選択されるアミノ酸配列からなる、ペプチド挿入を含み、それ以外は配列番号2のアミノ酸配列と同一である。

10

20

【0118】

別の実施形態では、以下のアミノ酸配列：VPTGaEtLNvng (配列番号74)を含むか、それからなる、またはそれから本質的になる、配列番号2のwt AAV2のアミノ酸586～597の置換を含む変異体AAVカプシドタンパク質が提供される。小文字は野生型AAV2配列中のアミノ酸に対応する。言い換えると、変異体AAVカプシドタンパク質は、AAV2に対して以下のアミノ酸置換を含む：G586V、N587P、R588T、Q589、A591E、A593L、D594NおよびT597G。変異体AAVカプシドタンパク質は、上述のアミノ酸置換を含んでよく、それ以外は配列番号2と同一であり得るか、または配列番号2と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一であり得る。

30

【0119】

別の実施形態では、以下のアミノ酸配列：LAPDFTTLDA (配列番号75)を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる、配列番号2のwt AAV2のアミノ酸588～597の置換を含む、1または複数の肺細胞に対する改善された向性を有する変異体AAVカプシドタンパク質が提供される。言い換えると、変異体AAVカプシドタンパク質は、AAV2に対して以下のアミノ酸置換を含む：R588L、Q589A、A590P、A591D、T592F、A593T、D594T、V595L、N596DおよびT597A。変異体AAVカプシドタンパク質は、上述のアミノ酸置換を含んでよく、それ以外は配列番号2と同一であり得るか、または配列番号2と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一であり得る。

40

【0120】

別の実施形態では、1または複数の肺細胞に対する改善された向性を有する変異体AAVカプシドタンパク質が提供され、配列番号6のwt AAV5 (SSTTAPATGTYN; 配列番号76)のアミノ酸575～586の、TGRQNPDM SGLS (配列番号77)TGQRALDLRGLS (配列番号78)、TGWMSNQWLGLS (配列番号79)、TGV S QEPWAGLS (配列番号80)、TGV S L LVP SGLS (配列番号81)、TGGMG S WH SGLS (配列番号82)、TGSPLVFQAGLS (配列番号83)、TGLYDN SHVGLS (配列番号84)、TGDGDVGgG

50

GLS（配列番号85）、TGPSpNPYtGLS（配列番号86）、TGN SGLA
EAGLS（配列番号87）およびTGLYSPNDGGLS（配列番号88）から選択
されるアミノ酸配列による置換を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる
。変異体AAVカプシドタンパク質は、上述のアミノ酸置換を含んでよく、それ以外は配
列番号6と同一であり得るか、または配列番号6と少なくとも80%、少なくとも90%
、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一であり得る。

【0121】

別の実施形態では、1または複数の肺細胞に対する改善された向性を有する変異体AA
Vカプシドタンパク質が提供され、配列番号6のwt AAV5（PANPGTTATY
LEG；配列番号89）のアミノ酸533～545の、FSPTYPSVWWFQR（配
列番号90）、VMPWgLVFVCFDF（配列番号91）、CMTAWPVDASF
LN（配列番号92）、IYLRLGIYWCAgV（配列番号93）、GLGGSSt
GSRTSA（配列番号94）、LFICFCFCFYA（L）FF（配列番号95）、I
DDDCSVaGyRSW（配列番号96）、SNGITFKDRRCLL（配列番号9
7）、FMIGNKVPiA（L）Pg（配列番号98）およびIYLRLGIYWCA
GN（配列番号99）から選択されるアミノ酸配列による置換を含むか、それからなるか
、またはそれから本質的になる。関連する実施形態では、1または複数の肺細胞に対する
改善された向性を有する変異体AAVカプシドタンパク質が提供され、配列番号6（PA
NPGTTATYLE；配列番号100）のwt AAV5のアミノ酸533～544の
、以下のアミノ酸配列：LSTpFIvAGSGI（配列番号101）による置換を含む
。各配列中の小文字は、野生型AAV5配列中のアミノ酸に対応する。変異体AAVカプ
シドタンパク質は、上述のアミノ酸置換を含んでよく、それ以外は配列番号6と同一であ
り得るか、または配列番号6と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%
、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一であり得る。

【0122】

本明細書に開示されるAAV変異体は、エアロゾル投与後の霊長類肺スクリーニングの
使用を含むインビボ定向進化の使用によって生成された。いくつかの実施形態では、本明
細書に開示される変異体カプシドタンパク質は、AAVビリオン中に存在する場合、対応
する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVを含むAAVビリオンによる肺細胞
の形質導入と比較して、肺細胞の形質導入の増加を付与する。例えば、いくつかの実施形
態では、本明細書に開示される変異体カプシドタンパク質は、AAVビリオン中に存在す
る場合、対応する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVカプシドタンパク質を
含むAAVビリオンよりも霊長類肺細胞のより効率的な形質導入を付与し、例えば、肺細
胞は、親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVを含むAAVビリオンよりも多く
の対象変異体AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンを取り込む。いくつかのこ
のような実施形態では、AAV変異体ビリオンまたは変異体rAAVは、対応する親AA
Vカプシドタンパク質を含む野生型AAVビリオンまたはrAAVによる肺細胞の形質導
入と比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍
、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、または50倍超の肺細胞の
形質導入の増加を示す。特定のこのような実施形態では、本明細書に開示される変異体カ
プシドタンパク質は、AAVビリオン中に存在する場合、対応する親AAVカプシドタン
パク質または野生型AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンよりも広範な霊長類
肺細胞の形質導入を付与する。換言すれば、変異体AAVビリオンは、対応する親AA
Vカプシドタンパク質を含むビリオンによって形質導入されていない細胞型、したがって対
応する親AAVビリオンよりも多くの種類の細胞を肺において形質導入する。いくつかの
実施形態では、AAV変異体ビリオンは肺細胞を優先的に形質導入し、例えば対象rAA
Vビリオンは、別の肺細胞または非肺細胞、例えば肺外の細胞よりも2倍、5倍、10倍
、15倍、20倍、25倍、50倍または50倍超の特異性で肺細胞に感染する。いくつ
かの実施形態では、形質導入された肺細胞は、上気道細胞である。いくつかの実施形態で
は、肺細胞は、上気道上皮細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、肺胞上皮細

10

20

30

40

50

胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、一次、二次または三次気管支上皮細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、気管上皮細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、線毛気道上皮細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、肺胞上皮1型（AECI）細胞または2型（AECII）細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、平滑筋細胞である。いくつかの実施形態では、肺細胞は、内皮細胞である。肺細胞の形質導入の増加、例えば、形質導入の効率の増加、より広い形質導入、より優先的な形質導入などは、遺伝子発現を測定するための当技術分野における任意の数の方法によってインビトロまたはインビボで容易に評価することができる。例えば、AAVは、ユビキタスまたは組織特異的プロモーターの制御下で、レポーター遺伝子、例えば蛍光タンパク質を含む発現カセットを含むゲノムと共にパッケージングされてもよく、形質導入の程度は、例えば蛍光顕微鏡法によって蛍光タンパク質を検出することによって評価される。別の例として、AAVは、バーコード化核酸配列を含むゲノム、および例えばPCRによって核酸配列を検出することによって評価される形質導入の程度と共にパッケージングされ得る。別の例として、AAVは、肺疾患を処置するための治療用遺伝子を含む発現カセットを含むゲノムと共にパッケージングされてもよく、形質導入の程度は、AAVが投与された罹患患者の肺疾患の処置を検出することによって評価される。

10

20

30

40

50

【0123】

異種核酸を肺細胞に送達する方法であって、肺細胞を、(i) HDITKNI（配列番号12）、NQDYTKT（配列番号13）、DNTVTRS（配列番号14）、SNSVQSI（配列番号15）、NSTRHTD（配列番号16）、TNRTSPD（配列番号17）、ISDQTKH（配列番号18）、QADTTKN（配列番号19）、NAVKTDF（配列番号20）、TNQTL SA（配列番号21）、ENRTT SN（配列番号22）、PQQDTTH（配列番号23）、NATNHVI（配列番号24）、TNN SKPD（配列番号25）、SKLT LNN（配列番号26）、VTAGMGA（配列番号27）、PNSTTNN（配列番号28）、NSTSRID（配列番号29）、VASHTNN（配列番号30）、RSHQEIP（配列番号31）、LNTTKDI（配列番号32）、IIDATKN（配列番号33）、NHISQTN（配列番号34）、SNSAHIT（配列番号35）、STHQSN（配列番号36）、KTPNLTS（配列番号37）、SNTPAL S（配列番号38）、SPGATTN（配列番号39）、LAHDITKNI A（配列番号40）、LANQDYTKTA（配列番号41）、LADNTVTRSA（配列番号42）、LASNSVQSI A（配列番号43）、LANSTRHTDA（配列番号44）、LATNRTSPDA（配列番号45）、LAISDQTKH A（配列番号46）、LAQADTTKNA（配列番号47）、LANAVKTDF A（配列番号48）、LATNQTL SAA（配列番号49）、LAENRTT SNA（配列番号50）、LAPQQDTTHA（配列番号51）、LANATNHVIA（配列番号52）、LATNNSKPD A（配列番号53）、LASKLT LNN A（配列番号54）、LAVTAGMGAA（配列番号55）、LAPNSTTNN A（配列番号56）、LANSTSRIDA（配列番号57）、LAVASHTNNA（配列番号58）、LARSHQEIPA（配列番号59）、LALNTTKDIA（配列番号60）、LAIIDATKNA（配列番号61）、LANHISQTN A（配列番号62）、LASNSAHITA（配列番号63）、LASTHQSNNA（配列番号64）、LAKTPNLTS A（配列番号65）、LASNTPAL SA（配列番号66）およびLASPGATTNA（配列番号67）から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、(ii) 1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含むrAAVビリオンと、接触させることを含む方法が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、方法はインビトロまたはエクスピボ方法である。いくつかの実施形態では、異種核酸は、タンパク質および／または低分子干渉RNAをコードする。いくつかの好ましい実施形態では、肺細胞は、肺または気管の任意の細胞である。他の好ましい実施形態では、肺細胞は、肺胞上皮細胞、気管支（一次、二次または三次）上皮細胞または気管上皮細胞を含むが、これらに限定されな

10

20

30

40

50

号44)、LATNRTSPDA(配列番号45)、LAISDQTKHA(配列番号46)、LAQADTTKNA(配列番号47)、LANAVKTDF A(配列番号48)、LATNQTLSAA(配列番号49)、LAENRTTTSNA(配列番号50)、LAPQQD TTHA(配列番号51)、LANATNHVIA(配列番号52)、LATNNSK PDA(配列番号53)、LASKLTLNNA(配列番号54)、LAVTAGMGAA(配列番号55)、LAPNSTTTNNA(配列番号56)、LANSTSRIDA(配列番号57)、LAVASHTNNA(配列番号58)、LARSHQEIPA(配列番号59)、LALNTTKDIA(配列番号60)、LAIIDATKNA(配列番号61)、LANHISQTNA(配列番号62)、LASNSAHITA(配列番号63)、LASTHQSNNA(配列番号64)、LAKTPNL TSA(配列番号65)、LASNTPALSA(配列番号66)およびLASPGATTNA(配列番号67)から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、(ii)1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含むrAAVピリオンを対象に投与することを含む方法。関連する態様では、rAAVまたはそれを含む医薬組成物は、肺、気管支内、鼻腔内、気管内および／または気管支内投与によって対象に投与される。好ましい態様では、対象の肺への異種核酸の送達は、1または複数のコードされた遺伝子産物を対象の肺に送達する。遺伝子産物の使用は、限定するものではないが、細胞内の因子のレベルを高めること、因子の分泌によって隣接細胞内の因子のレベルを高めること、細胞内の因子のレベルを低下させること、または因子の分泌によって隣接細胞内の因子のレベルを低下させることを含む。遺伝子産物は、欠損または欠損遺伝子産物(例えば、遺伝子産物は、治療的置換遺伝子であり得る)のレベルを補完するか、欠損遺伝子産物(例えば、遺伝子産物は、欠陥遺伝子産物の発現を低下させるsiRNAまたはmiRNAなどの干渉RNAであり得る)のレベルを低下させるか、新しい支持遺伝子産物を導入するか、支持遺伝子産物のレベルを補完するか、妨害遺伝子産物のレベルを低下させるか、または、妨害遺伝子産物のレベルを低下させ、かつ支持遺伝子産物のレベルを導入または補完する両方で、設計することができる。

10

20

30

40

50

【0125】

肺疾患を処置するための方法であって、それを必要とする対象に、(i)HDITKNI(配列番号12)、NQDYTKT(配列番号13)、DNTVTRS(配列番号14)、SNSVQSI(配列番号15)、NSTRHTD(配列番号16)、TNRTSPD(配列番号17)、ISDQTKH(配列番号18)、QADTTKN(配列番号19)、NAVKTDF(配列番号20)、TNQTLSA(配列番号21)、ENRTTSN(配列番号22)、PQQD TTH(配列番号23)、NATNHVI(配列番号24)、TNNSKPD(配列番号25)、SKLTLNN(配列番号26)、VTAGMG A(配列番号27)、PNSTTTNN(配列番号28)、NSTSRID(配列番号29)、VASHTNN(配列番号30)、RSHQEIP(配列番号31)、LNTTKDI(配列番号32)、IIDATKN(配列番号33)、NHISQTN(配列番号34)、SNSAHIT(配列番号35)、STHQSNNA(配列番号36)、KTPNL TS(配列番号37)、SNTPAL S(配列番号38)、SPGATTN(配列番号39)、LAHDITKNIA(配列番号40)、LANQDYTKTA(配列番号41)、LADNTVTRSA(配列番号42)、LASNSVQ SIA(配列番号43)、LANSTRHTDA(配列番号44)、LATNRTSPDA(配列番号45)、LAISDQTKHA(配列番号46)、LAQADTTKNA(配列番号47)、LANAVKTDF A(配列番号48)、LATNQTLSAA(配列番号49)、LAENRTTTSNA(配列番号50)、LAPQQD TTHA(配列番号51)、LANATNHVIA(配列番号52)、LATNNSK PDA(配列番号53)、LASKLTLNNA(配列番号54)、LAVTAGMGAA(配列番号55)、LAPNSTTTNNA(配列番号56)、LANSTSRIDA(配列番号57)、LAVASHTNNA(配列番号58)、LARSHQEIPA(配列番号59)、LALNTTKDIA(配列番号60)

、L A I I D A T K N A（配列番号61）、L A N H I S Q T N A（配列番号62）、L A S N S A H I T A（配列番号63）、L A S T H Q S N N A（配列番号64）、L A K T P N L T S A（配列番号65）、L A S N T P A L S A（配列番号66）およびL A S P G A T T N A（配列番号67）から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、（ii）1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列、1または複数の遺伝子産物がプロモーターに作動可能に連結されている異種核酸と、を含む治療有効量の組換えAAV（rAAV）を、投与することを含む方法もまた、本明細書で提供される。組換えAAV（rAAV）の使用であって、（i）H D I T K N I（配列番号12）、N Q D Y T K T（配列番号13）、D N T V T R S（配列番号14）、S N S V Q S I（配列番号15）、N S T R H T D（配列番号16）、T N R T S P D（配列番号17）、I S D Q T K H（配列番号18）、Q A D T T K N（配列番号19）、N A V K T D F（配列番号20）、T N Q T L S A（配列番号21）、E N R T T S N（配列番号22）、P Q Q D T T H（配列番号23）、N A T N H V I（配列番号24）、T N N S K P D（配列番号25）、S K L T L N N（配列番号26）、V T A G M G A（配列番号27）、P N S T T N N（配列番号28）、N S T S R I D（配列番号29）、V A S H T N N（配列番号30）、R S H Q E I P（配列番号31）、L N T T K D I（配列番号32）、I I D A T K N（配列番号33）、N H I S Q T N（配列番号34）、S N S A H I T（配列番号35）、S T H Q S N N（配列番号36）、K T P N L T S（配列番号37）、S N T P A L S（配列番号38）、S P G A T T N（配列番号39）、L A H D I T K N I A（配列番号40）、L A N Q D Y T K T A（配列番号41）、L A D N T V T R S A（配列番号42）、L A S N S V Q S I A（配列番号43）、L A N S T R H T D A（配列番号44）、L A T N R T S P D A（配列番号45）、L A I S D Q T K H A（配列番号46）、L A Q A D T T K N A（配列番号47）、L A N A V K T D F A（配列番号48）、L A T N Q T L S A A（配列番号49）、L A E N R T T S N A（配列番号50）、L A P Q Q D T T H A（配列番号51）、L A N A T N H V I A（配列番号52）、L A T N N S K P D A（配列番号53）、L A S K L T L N N A（配列番号54）、L A V T A G M G A A（配列番号55）、L A P N S T T N N A（配列番号56）、L A N S T S R I D A（配列番号57）、L A V A S H T N N A（配列番号58）、L A R S H Q E I P A（配列番号59）、L A L N T T K D I A（配列番号60）、L A I I D A T K N A（配列番号61）、L A N H I S Q T N A（配列番号62）、L A S N S A H I T A（配列番号63）、L A S T H Q S N N A（配列番号64）、L A K T P N L T S A（配列番号65）、L A S N T P A L S A（配列番号66）およびL A S P G A T T N A（配列番号67）から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、（ii）肺疾患の処置のための、プロモーターに作動可能に連結された1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含む組換えAAV（rAAV）の使用もまた、本明細書で提供される。組換えAAV（rAAV）の使用であって、（i）H D I T K N I（配列番号12）、N Q D Y T K T（配列番号13）、D N T V T R S（配列番号14）、S N S V Q S I（配列番号15）、N S T R H T D（配列番号16）、T N R T S P D（配列番号17）、I S D Q T K H（配列番号18）、Q A D T T K N（配列番号19）、N A V K T D F（配列番号20）、T N Q T L S A（配列番号21）、E N R T T S N（配列番号22）、P Q Q D T T H（配列番号23）、N A T N H V I（配列番号24）、T N N S K P D（配列番号25）、S K L T L N N（配列番号26）、V T A G M G A（配列番号27）、P N S T T N N（配列番号28）、N S T S R I D（配列番号29）、V A S H T N N（配列番号30）、R S H Q E I P（配列番号31）、L N T T K D I（配列番号32）、I I D A T K N（配列番号33）、N H I S Q T N（配列番号34）、S N S A H I T（配列番号35）、S T H Q S N N（配列番号36）、K T P N L T S（配列番号37）、S N T P A L S（配列番号38）、S P G A T T N（配列番号39）、L A H D I T K N I A（配列番号40）、L A N Q D Y T K T A（配列番号41）、L A D N T V T R S A（配列番号42）、L A S N S V Q S I A（配列番号

10

20

30

40

50

43)、LANSTRHTDA (配列番号44)、LATNRTSPDA (配列番号45)、LAISDQTKHA (配列番号46)、LAQADTTKNA (配列番号47)、LANAVKTDFA (配列番号48)、LATNQTL SAA (配列番号49)、LAENRTTSNA (配列番号50)、LAPQQDTTHA (配列番号51)、LANATNHVIA (配列番号52)、LATNNSKPKDA (配列番号53)、LASKLTLNNA (配列番号54)、LAVTAGMGAA (配列番号55)、LAPNSTTNNA (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASHTNNA (配列番号58)、LARSHQEIPA (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDATKNA (配列番号61)、LANHISQTNA (配列番号62)、LASNSAHITA (配列番号63)、LASTHQSNNA (配列番号64)、LAKTPNLTSA (配列番号65)、LASNTPALSA (配列番号66) およびLASPGATTNA (配列番号67) から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、(ii) 肺疾患の処置のための医薬品の製造において、プロモーターに作動可能に連結された1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含む組換えAAV (rAAV) の使用もまた、本明細書で提供される。いくつかの態様では、異種核酸は、複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含み、その場合、複数 (例えば、2) の遺伝子産物の発現は、複数 (例えば、2) の独立したプロモーターによって媒介され得るか、または単一のプロモーターによって媒介されてよく、複数の導入遺伝子は、内部リボソーム進入部位 (IRES) または2Aペプチド配列によって分離されている。好ましい実施形態では、異種核酸は、治療的タンパク質および／または治療的低分子干渉RNAをコードする。関連する態様では、rAAVによって送達される遺伝子産物は、妨害遺伝子産物のレベルを低下させる、および／または支持遺伝子産物のレベルを導入もしくは補完する。

10

20

30

40

50

【0126】

本明細書に開示される変異体rAAVベクターまたはビリオンおよび／または方法を用いて処置することができる肺疾患は、単一遺伝子疾患、複雑な遺伝性疾患、後天性疾患および外傷性損傷を含むが、これらに限定されない。いくつかの態様では、肺疾患は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、特発性肺線維症 (IPF)、嚢胞性線維症、肺動脈性肺高血圧症、肺高血圧症、肺癌 (一次、二次および転移性)、界面活性剤欠乏症、ウイルスおよび／または細菌感染症、急性気管支炎、肺炎 (ウイルス性、細菌性および真菌性肺炎を含む)、気道感染症 (咽頭炎、クループ、アスペルギルス、コクシジウム症、ハンタウイルス肺症候群、およびヒストプラスマ症を含む)、化学性および過敏性肺臓炎、結核および他の抗酸菌感染症 (限定されないが、マイコバクテリウム・アビウムを含む)、サルコイドーシス、呼吸器合胞体ウイルス、肺水腫、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、塵肺症 (黒肺症、石綿肺、珪肺を含む)、間質性肺疾患 (サルコイドーシスおよび自己免疫疾患を含む)、肺、胸水、胸膜炎、中皮腫、気胸、急性気管支炎、細気管支炎 (閉塞性細気管支炎を含む)、突然死症候群、睡眠時無呼吸、気管支異形成症、潜在性肺異形成、器質化肺炎、電子タバコまたはパイプの使用に関連する肺損傷 (EVALI)、中東呼吸器症候群 (MERS)、原発性線毛機能不全症、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、アルファ-1-アンチトリプシン欠損症、喘息、間質性肺疾患、およびCOVID-19 (コロナウイルス疾患2019) から選択される。

【0127】

いくつかの態様では、IPFの処置の標的となり得る遺伝子は、SFTPA1 (界面活性剤A1) およびCaveolin-1を含むが、これらに限定されない。COPDの処置を標的とし得る遺伝子は、アルファ-1-抗トリプシン、アルファ-1-抗キモトリプシン、アルファ-1-マクログロブリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ1 (MMP1)、マトリックスメタロプロテイナーゼ12 (MMP12)、ミクロソームエポキシドヒドロラーゼ、CYP1A1、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ヘムオキシゲナーゼ-1、TGF-ベータ-1、TNF-アルファ、IL-1複合体、IL-8、IL-1

3、ヒト白血球抗原（H L A－B 7およびB w 1 6）、ビタミンD結合タンパク質、および／またはベータ－2－アドレナリン作動性受容体またはその生物学的に活性な部分をコードする遺伝子を含むが、これらに限定されない。

【0128】

いくつかの態様では、C O V I D－1 9を処置する方法であって、それを必要とする対象に、（i）対象変異体A A Vカプシドタンパク質と、（i i）1または複数のプロモーターに作動可能に連結された1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸またはr A A Vを含む医薬組成物と、を含む治療有効量の組換えA A V（r A A V）を投与することを含み、遺伝子産物が、ウイルス遺伝子産物もしくは宿主細胞遺伝子をノックダウン、改変および／または過剰発現して、肺もしくは鼻咽頭のいずれかにおけるウイルス病原性もしくは複製を低減もしくは排除し、および／またはウイルス上のエピトープに対する中和抗体を発現する方法が提供される。

10

【0129】

いくつかの態様では、I P Fを処置する方法であって、それを必要とする対象に、（i）対象変異体A A Vカプシドタンパク質と、（i i）1または複数のプロモーターに作動可能に連結された1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含む治療有効量の組換えA A V（r A A V）またはr A A Vを含む医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。いくつかの好ましい実施形態では、I P Fの処置のためにr A A Vが提供され、r A A Vは、対象変異体A A Vカプシドタンパク質と、S F T P A 1および／またはC a v e o l i n－1またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む。

20

【0130】

いくつかの態様では、C O P Dを処置する方法であって、それを必要とする対象に、（i）対象変異体A A Vカプシドタンパク質と、（i i）1または複数のプロモーターに作動可能に連結された1または複数の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸と、を含む治療有効量の組換えA A V（r A A V）またはr A A Vを含む医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。いくつかの好ましい実施形態では、C O P Dの処置のためにr A A Vが提供され、r A A Vは、対象変異体A A Vカプシドタンパク質と、アルファ－1－アンチトリプシンまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列を含む核酸とを含む。

30

【0131】

いくつかの好ましい態様では、対象変異体A A VカプシドおよびC F T Rまたはその生物学的に活性な部分をコードする核酸を含むr A A Vが、本明細書に記載の嚢胞性線維症もしくはそれに関連する肺疾患の処置のために、または嚢胞性線維症もしくはそれに関連する肺疾患を処置するための医薬品の製造における使用のために提供される。好ましくは、C F T Rまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列は、発現制御配列に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒトC F T Rまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列は、天然のヒトC F T Rタンパク質をコードし、以下の配列またはそれと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一の配列を有する。

40

【化 9】

ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGC
TGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGA
CATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGA
AAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATG
CCCTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTT
AGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTT
CCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATA
GGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTG
GCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATA
AGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAAATAAGTATTGGACAA
CTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTG
GCACATTTCTGTGTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATC
TGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCCTGATAGTCCTT
GCCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAG
AGCTGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATTGAAAATA
TCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAA
AACTTAAGACAAACAGAACTGAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATA
CTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTG
CTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGAAAAATATTCACCACCATC
TCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTA
CAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAATAACAGGATTTCTTACA
AAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGA
TGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAA
GCAAAACAAAACAATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTT
CTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTTCAAG
ATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGAC
TTCACTTCTAATGGTGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATTA
AGCACAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCA

10

20

30

40

50

【化 10】

CCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAA
GACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGC
AAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGA
CTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAAGCTG
TGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAAGTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAAATGGA
ACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATT
TTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAAC
TCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAAGAAGAAATTCAATCC
TAAGTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGA
CAGAAACAAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAG
GAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTCCATTGTGCA
AAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAG
AGAGAAGGCTGTCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAGAGGCGATACTGCCT
CGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTC
TGTCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAA
AGACAACAGCATCCACACGAAAAAGTGTCCTGGCCCCCTCAGGCAAACTTGACT
GAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAACTGGCTTGGAAATAAG
TGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCTTTTTTGATGATATGGAGA
GCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATATTACTGTCCACA
AGAGCTTAATTTTTTGIGCTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGG
CTGCTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAG
GGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACAGCACC
AGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCT
ATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTCGAAA
ATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTC
AACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAAT
TTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATT
GTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCA
ACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTCCTCCAAACC
TCACAGCAACTCAAACAAGTGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCA
TCTTGTTACAAGCTTAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCCTTCGGACGGCAGCC
TTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTT
CTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAAATAGAAATGATTTTTGT

10

20

30

40

50

【化 1 1】

CATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTTAACAACAGGAGAAGGAGA
AGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCA
GTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATCTGTGAGCC
GAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACC
AAACCATACAAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACA
CGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATC
TCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCCCTTC
TCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGAAGAAGTGGATCAGGGAA
GAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCA
GATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCT
TTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACT
TGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAG
GTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTT
GTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGC
TAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCA
TTTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTTG
CTGATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGC
CAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTACGATTCCATCCA
GAAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCCTCCGACA
GGGTGAAGCTCTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAG
ATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTT
AG (配列番号 102)

10

20

30

【0 1 3 2】

好ましい実施形態では、ヒト C F T R または生物学的に活性化された切断型 C F T R タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、ヒトにおける発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、アミノ酸 708～759 を欠く生物学的に活性な切断型ヒト C F T R タンパク質をコードし、以下のヌクレオチド配列またはそれと少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 % 同一の配列を含む。

40

【化 1 2】

ATGCAGCGCAGCCCACTGGAGAAGGCAAGCGTGGTGTCCAAGCTGTTCTTTTC
CTGGACCAGGCCTATCCTGAGGAAGGGATACAGGCAGCGGCTGGAGCTGAGC
GACATCTATCAGATCCCTTCTGTGGACAGCGCCGATAATCTGTCCGAGAAGCTG
GAGAGAGAGTGGGATAGGGAGCTGGCCTCTAAGAAGAACCCAAAGCTGATCA

50

【化 1 3】

ATGCCCTGCGGAGATGCTTCTTTTGGCGGTTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTGTA
TCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCACTGCTGCTGGGCAGAATCATCG
CCTCTTACGACCCCGATAACAAGGAGGAGGAGCATCGCCATCTATCTGGGC
ATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTATCGTGAGGACACTGCTGCTGCACCCAGCCATC
TTCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGAATCGCCATGTTTCAGCCTGATC
TACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCTCCAGGGTGCTGGACAAGATCTCCATCGG
CCAGCTGGTGTCCCTGCTGTCTAACAATCTGAACAAGTTTGATGAGGGACTGGC
CCTGGCACACTTCGTGTGGATCGCACCCTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCT
GATCTGGGAGCTGCTGCAGGCAAGCGCCTTTTGGGACTGGGCTTCCTGATCGT
GCTGGCCCTGTTCCAGGCAGGACTGGGACGCATGATGATGAAGTACAGAGACC
AGAGGGCCGGAAGATCTCTGAGCGGCTGGTCATCACCAGCGAGATGATCGAG
AACATCCAGTCCGTGAAGGCCTATTGTTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGAT
CGAGAATCTGCGCCAGACAGAGCTGAAGCTGACCAGAAAGGCCGCCTACGTG
AGGTACTTCAACTCTAGCGCCTTCTTTTTCTCTGGCTTTTTCTGTGGTGTTCCTGA
GCGTGCTGCCATACGCCCTGATCAAGGGCATCATCTGCGGAAGATCTTTACCA
CAATCTCCTTCTGCATCGTGCTGAGAATGGCCGTGACAAGGCAGTTTCCCTGGG
CCGTGCAGACCTGGTATGACTCTCTGGGCGCCATCAATAAGATCCAGGATTTC
TGCAGAAGCAGGAGTACAAGACACTGGAGTATAACCTGACCACAACCGAGGT
GGTCATGGAGAATGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTTGGCGAGCTGTTTCG
AGAAGGCCAAGCAGAACATAACAATCGCAAGACATCTAACGGCGACGATAG
CCTGTTTTTTCAGCAATTTTTCCCTGCTGGGCACCCCGTGCTGAAGGACATCAA
CTTCAAGATCGAGAGGGGACAGCTGCTGGCAGTGGCAGGCTCCACAGGCGCCG
GCAAGACCTCTCTGCTGATGATGATCATGGGCGAGCTGGAGCCAAGCGAGGGC
AAGATCAAGCACTCCGGCCGGATCTCTTTTTGCAGCCAGTTCTCCTGGATCATG
CCCGGCACCATCAAGGAGAATATCATCTTTGGCGTGTCTACGATGAGTACAG
ATATAGGTCTGTGATCAAGGCCTGTCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTTCG
CCGAGAAGGATAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACACTGAGCGGAGG
ACAGAGGGCAAGGATCTCCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGACGCCGATCTGT
ATCTGCTGGACAGCCCCCTTTGGCTATCTGGATGTGCTGACCGAGAAGGAGATCT
TCGAGTCCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAATAAGACAAGGATCCTGGTGACC
TCTAAGATGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGG
CTCCTCTTACTTTTATGGCACATTCAGCGAGCTGCAGAATCTGCAGCCTGACTT
CAGCTCCAAGCTGATGGGCTGTGACTCCTTTGATCAGTTCTCTGCCGAGAGGCG
CAACTCCATCCTGACAGAGACCCTGCACAGATTCTCTCTGGAGGGCGACGCAC

10

20

30

40

50

【化 1 4】

CCGTGAGCTGGACAGAGACCAAGAAGCAGTCCTTTAAGCAGACCGGCGAGTTC
GGCGAGAAGAGGAAGAATTCTATCCTGAACCCCTATCAATAGCACACTGCAGGC
CCGGAGAAGGCAGTCTGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCC
AGAATATCCACAGAAAGACAACCGCCAGCACAAAGGAAGGTGTCCCTGGCACCT
CAGGCAAACCTGACCGAGCTGGACATCTACTCCCGCCGGCTGTCTCAGGAGAC
CGGACTGGAGATCTCTGAGGAGATCAATGAGGAGGATCTGAAGGAGTGCTTTT
TCGACGATATGGAGAGCATCCCAGCCGTGACAACCTGGAACACATACCTGCGC
TATATCACCGTGCACAAGTCCCTGATCTTTGTGCTGATCTGGTGTCTGGTCATCT
TCCTGGCAGAGGTGGCAGCATCTCTGGTGGTGTCTGTGGCTGCTGGGCAACACA
CCCCTGCAGGACAAGGGCAATTCTACCCACAGCCGCAACAATTCCTACGCCGT
GATCATCACATCTACCTCTAGCTACTACGTGTTCTACATCTATGTGGGCGTGGC
CGATACTGCTGGCCATGGGCTTTTTCCGGGGCCTGCCCTGGTGCACACACT
GATCACCGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGG
CCCCTATGTCCACACTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGGTTTT
CCAAGGACATCGCCATCCTGGACGATCTGCTGCCTCTGACCATCTTTGATTTCA
TCCAGCTGCTGCTGATCGTGATCGGAGCAATCGCAGTGGTGGCCGTGCTGCAG
CCTTACATCTTCGTGGCCACAGTGCCAGTGATCGTGGCCTTTATCATGCTGCGC
GCCTATTTCTGTCAGACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCCG
GTCCCCTATCTTTACACACCTGGTGACCTCCCTGAAGGGACTGTGGACACTGAG
GGCCTTCGGCCGGCAGCCATACTTTGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCT
GCACACAGCCAATTGGTTTCTGTATCTGAGCACCTGCGCTGGTTTCAGATGCG
GATCGAGATGATCTTCGTGATCTTTTTTCATCGCCGTGACCTTCATCTCCATCCTG
ACAACCGGAGAGGGAGAGGGAAGAGTGGGAATCATCCTGACACTGGCCATGA
ACATCATGTCTACCCTGCAGTGGGCCGTGAATTCCTCTATCGACGTGGATAGCC
TGATGAGATCTGTGAGCAGGGTGTTTAAGTTCATCGACATGCCCACAGAGGGC
AAGCCTACAAAGAGCACCAAGCCATACAAGAACGGCCAGCTGTCCAAAGTGA
TGATCATCGAGAATTCTCACGTGAAGAAGGACGATATCTGGCCATCCGG

(配列番号 103)

【0 1 3 3】

好ましくは、CFTR またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列は、発現制御配列に作動可能に連結されている。いくつかの態様では、プロモーターは、構成的プロモーター、必要に応じて切断型サイトメガロウイルス前／初期 (CMV ie) エンハンサー／プロモーターであり、ヒト CFTR またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。他の態様では、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり、好ましくは、プロモーターは、肺細胞における核酸の優先的発現を指示し、ヒト CFTR またはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。好ましい実施形態では、プロモーターは、切断

型CMV i eプロモーターであり、ヒトCFTRまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されている。特に好ましい実施形態では、CMV i eプロモーターは、以下の配列またはそれと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一の配列を有するCMV 173である。

【化15】

ACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGT (配列番号104)

10

【0134】

特に好ましい実施形態では、rAAVベクターは、(i) HDITKNI (配列番号12)、NQDYTKT (配列番号13)、DNTVTRS (配列番号14)、SNSVQSI (配列番号15)、NSTRHTD (配列番号16)、TNRTSPD (配列番号17)、ISDQTKH (配列番号18)、QADTTKN (配列番号19)、NAVKTDF (配列番号20)、TNQTLISA (配列番号21)、ENRTTSN (配列番号22)、PQQDTTH (配列番号23)、NATNHVI (配列番号24)、TNNSKPD (配列番号25)、SKLTLNN (配列番号26)、VTAGMGA (配列番号27)、PNSTTNN (配列番号28)、NSTSRID (配列番号29)、VASHTNN (配列番号30)、RSHQEIP (配列番号31)、LNTTKDI (配列番号32)、IIDATKN (配列番号33)、NHISQTN (配列番号34)、SNSAHIT (配列番号35)、STHQSN (配列番号36)、KTPNLTS (配列番号37)、SNTPAL (配列番号38)、SPGATTN (配列番号39)、LAHDI (配列番号40)、LANQDYTKTA (配列番号41)、LADNTVTRSA (配列番号42)、LASNSVQSI (配列番号43)、LANSTRHTDA (配列番号44)、LATNRTSPDA (配列番号45)、LAISDQTKHA (配列番号46)、LAQADTTKNA (配列番号47)、LANAVKTDF (配列番号48)、LATNQTLISAA (配列番号49)、LAENRTTSNA (配列番号50)、LAPQQDTTHA (配列番号51)、LANATNHVIA (配列番号52)、LATNNSKPD (配列番号53)、LASKLTLNNA (配列番号54)、LAVTAGMGAA (配列番号55)、LAPNSTTNN (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASHTNNA (配列番号58)、LARS (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDA (配列番号61)、LANHISQTNA (配列番号62)、LASNSAHIT (配列番号63)、LASTHQSN (配列番号64)、LAKTPNLTS (配列番号65)、LASNTPALSA (配列番号66) および LASPGATTN (配列番号67) から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、(ii) 5' から3' に：(a) AAV2 末端反復配列と (b) プロモーターと (c) ヒト嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) タンパク質またはヒトCFTRタンパク質配列のアミノ酸708~759を欠く生物学的に活性な切断型CFTRタンパク質をコードするヌクレオチド配列と (d) ポリアデニル化配列と (e) AAV2 末端反復配列とを含む核酸と、を含む。

20

30

40

【0135】

いくつかの態様では、対象に、嚢胞性線維症の1または複数の特徴を寛解するのに有効な量のrAAVを投与し、その非限定的な例は、上気道および下気道の炎症、異常な上皮サイトカインシグナル伝達およびIgEレベルの上昇を含む。他の態様において、嚢胞性線維症に関連する上気道疾患、下気道疾患、鼻咽頭疾患、副鼻腔炎および／または唾液疾患を含むがこれらに限定されない嚢胞性線維症に関連する肺疾患を処置するための方法で

50

あって、(i) HDITKNI (配列番号12)、NQDYTKT (配列番号13)、DNTVTRS (配列番号14)、SNSVQSI (配列番号15)、NSTRHTD (配列番号16)、TNRTSPD (配列番号17)、ISDQTKH (配列番号18)、QADTTKN (配列番号19)、NAVKTDF (配列番号20)、TNQTLSA (配列番号21)、ENRTTSN (配列番号22)、PQQDTTH (配列番号23)、NATNHVI (配列番号24)、TNNSKPD (配列番号25)、SKLTLNN (配列番号26)、VTAGMGA (配列番号27)、PNSTTNN (配列番号28)、NSTSRID (配列番号29)、VASHTNN (配列番号30)、RSHQEIP (配列番号31)、LNTTKDI (配列番号32)、IIDATKN (配列番号33)、NHISQTN (配列番号34)、SNSAHIT (配列番号35)、STHQSN (配列番号36)、KTPNLTS (配列番号37)、SNTPAL (配列番号38)、SPGATTN (配列番号39)、LAHDITKNIA (配列番号40)、LANQDYTKTA (配列番号41)、LADNTVTRSA (配列番号42)、LASNSVQSI (配列番号43)、LANSTRHTDA (配列番号44)、LATNRTSPDA (配列番号45)、LAISDQTKHA (配列番号46)、LAQADTTKNA (配列番号47)、LANAVKTDF (配列番号48)、LATNQTL (配列番号49)、LAENRTTSNA (配列番号50)、LAPQQDTTHA (配列番号51)、LANATNHVIA (配列番号52)、LATNN (配列番号53)、LASKLTLNNA (配列番号54)、LAVTAGMGAA (配列番号55)、LAPNSTTNN (配列番号56)、LANSTSRIDA (配列番号57)、LAVASHTNNA (配列番号58)、LARSHQEIPA (配列番号59)、LALNTTKDIA (配列番号60)、LAIIDATKNA (配列番号61)、LANHISQTN (配列番号62)、LASNSAHITA (配列番号63)、LASTHQSN (配列番号64)、LAKTPNL (配列番号65)、LASNTPALSA (配列番号66) および LASPGATTNA (配列番号67) から選択されるペプチド挿入を含むか、それからなるか、またはそれから本質的になるカプシドタンパク質と、(ii) ヒト嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) タンパク質をコードするヌクレオチド配列またはヒトCFTRタンパク質配列のアミノ酸708~759を欠く生物学的に活性な切断型CFTRタンパク質をプロモーターに作動可能に連結された核酸と、を含む治療有効量の感染性rAAVを、対象者に投与することを含む方法が、本明細書に提供される。

10

20

30

40

50

【0136】

対象変異体カプシドタンパク質を含む本発明のrAAV遺伝子治療ベクターは、標的細胞 (例えば、上気道細胞) において治療的有效レベルの遺伝子産物 (例えば、CFTRまたはその生物学的に活性な部分) を達成および維持するための様々な手段によって患者に投与され得る。いくつかの態様では、感染性rAAVを1または複数の投与量で対象 (例えば、嚢胞性線維症を有する対象) に投与し、各投与量は、約 1×10^{13} ~ 約 1×10^{15} ベクターゲノム (vg)、約 1×10^{13} ~ 約 1×10^{14} vg、約 1×10^{14} ~ 約 1×10^{15} vg、または約 1×10^{15} ~ 約 5×10^{15} vgを含む。いくつかの好ましい態様では、各投与量は、約 1×10^{14} vgまたは約 1×10^{15} vgのrAAVを含む。他の態様では、肺疾患を処置するために、約 10^{12} ~ 10^{14} ベクターゲノム (vg) / kgの少なくとも1つの用量を対象に投与する。関連する態様では、対象に、約 1×10^{11} ~ 約 1×10^{14} vg / kg、約 1×10^{12} ~ 約 9×10^{13} vg / kg、約 1×10^{12} vg / kg ~ 約 9×10^{12} vg / kg、好ましくは約 2×10^{12} vg / kg ~ 約 3×10^{12} vg / kg、より好ましくは約 2.6×10^{12} vg / kg、約 2.7×10^{12} vg / kg、約 2.8×10^{12} vg / kg、約 2.9×10^{12} vg / kg、約 3.0×10^{12} vg / kgまたは約 3.1×10^{12} vg / kgが投与される。

【0137】

いくつかの態様では、処置は、対象への単回用量以下の投与を含み、遺伝子産物 (例え

ば、C F T Rまたはその生物学的に活性な部分)の永続的かつ維持された治療濃度を達成するのに有効である。関連する態様では、処置は、対象変異体カプシドタンパク質および遺伝子産物をコードする異種核酸を含むr A A Vの約 1×10^{13} ~約 1×10^{15} プラーク形成単位(p f u)、ウイルス粒子(v p)またはウイルスゲノム(v g)の吸入による単回用量以下のヒト(例えば、嚢胞性線維症を有するヒト)への投与を含む。他の態様では、投薬処置は複数回投与スケジュールであり得る。A A Vベクターのヒトへの投与に関する方法は、K a yら(2000、N a t G e n e t 24:257-261)によって以前に記載されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの好ましい実施形態では、感染性r A A Vを、肺、気管支内、鼻腔内、気管内および/または気管支内投与によって対象に投与する。いくつかの好ましい実施形態では、感染性r A A Vを、r A A Vを含むエアロゾル懸濁液(例えば、ネブライザーを介して)の吸入によって投与する。

10

【0138】

本発明の目的のために、本明細書の開示は、上記の対象変異体A A Vカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。単離核酸は、A A Vベクター、例えば組換えA A Vベクターであり得る。

【0139】

本明細書の開示は、限定されないが、対象核酸を含む単離された(遺伝子改変された)宿主細胞などの宿主細胞をさらに提供する。本明細書に開示される本発明による宿主細胞は、インビトロ細胞培養物からの細胞などの単離された細胞であり得る。そのような宿主細胞は、本明細書に記載されるように、対象r A A V変異体ビリオンを産生するのに有用である。一実施形態では、そのような宿主細胞は、核酸で安定に遺伝子改変されている。他の実施形態では、宿主細胞は、核酸で一過性に遺伝子改変される。そのような核酸は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、リポソーム媒介性トランスフェクションなどを含むがこれらに限定されない確立された技術を使用して、宿主細胞に安定にまたは一過性に導入される。安定な形質転換のために、核酸は、一般に、選択マーカー、例えば、ネオマイシン耐性などのいくつかの周知の選択マーカーのいずれかをさらに含むであろう。そのような宿主細胞は、様々な細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、マウス細胞および霊長類細胞(例えば、ヒト細胞)のいずれかに核酸を導入することによって生成される。例示的な哺乳動物細胞には、初代細胞および細胞株を含むが、これらに限定されず、例示的な細胞株は、293細胞、COS細胞、HeLa細胞、Vero細胞、3T3マウス線維芽細胞、C3H10T1/2線維芽細胞、CHO細胞などを含み、例示的な宿主細胞は、限定なしで、HeLa細胞(例えば、American Type Culture Collection(ATCC)番号CCL-2)、CHO細胞(例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293細胞(例えば、ATCC番号CRL-1573)、Vero細胞、NIH 3T3細胞(例えば、ATCC番号CRL-1658)、Huh-7細胞、BHK細胞(例えば、ATCC番号CCL10)、PC12細胞(ATCC番号CRL1721)、COS細胞、COS-7細胞(ATCC番号CRL1651)、RAT1細胞、マウスL細胞(ATCC番号CCL1.3)、ヒト胎児腎(HEK)細胞(ATCC番号、CRL1573)、HL Hep G2細胞などを含む。宿主細胞は、A A Vを産生するSf9細胞などの昆虫細胞に感染させるためにバキュロウイルスを使用して作製することもできる(例えば、米国特許第7,271,002号;米国特許出願第12/297,958号を参照のこと)。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された宿主細胞は、上記のように、変異体A A Vカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に加えて、1または複数のA A V r e pタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。他の実施形態では、宿主細胞は、r A A V変異体ベクターをさらに含む。r A A V変異体ビリオンは、そのような宿主細胞を使用して生成することができる。r A A Vビリオンを生成する方法は、例えば、米国特許出願公開第2005/0053922号および米国特許出願公開第2009/0202490号に記載されている。

20

30

40

50

【0140】

本明細書に開示される変異体 rAAVベクターのいくつかの実施形態では、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結されている。適切な構成的プロモーターは、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター (CMV) (Stinskiら、(1985) *Journal of Virology* 55 (2) : 431-441)、CMV初期エンハンサー／ニワトリp-アクチン (CBA) プロモーター／ウサギβ-グロビンイントロン (CAG) (Miyazakiら (1989) *Gene* 79 (2) : 269-277、CSB (Jacobsonら (2006)、*Molecular Therapy*、13 (6) : 1074-1084)、ヒト伸長因子1αプロモーター (EF1α) (Kimら (1990) *Gene* 91 (2) : 217-223)、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (PGK) (Singer-Samら (1984) *Gene* 32 (3) : 409-417、ミトコンドリア重鎖プロモーター (Loderioら (2012) *PNAS* 109 (17) : 6513-6518)、ユビキチンプロモーター (Wulffら (1990) *FEB S Letters* 261 : 101-105)を含む。他の実施形態では、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの例では、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、組織特異的または細胞型特異的調節エレメントに作動可能に連結される。例えば、いくつかの例では、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、肺特異的調節エレメント、例えば肺細胞において作動可能に連結された遺伝子の選択的発現を付与する調節エレメントに作動可能に連結される。肺特異的プロモーターは、界面活性剤タンパク質B (SPB) 遺伝子プロモーターおよび界面活性剤タンパク質C (SPC) プロモーターを含むが、これらに限定されない。

【0141】

a) 対象変異体 AAVカプシドタンパク質および1または複数の遺伝子産物をコードする異種核酸を含む rAAVと、b) 薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤または緩衝剤と、を含む医薬組成物も本明細書で提供される。いくつかの好ましい実施形態では、核酸は、治療用遺伝子をコードするおよび／または干渉RNAをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤は、ヒトまたは非ヒト患者における使用に適している。そのような賦形剤、担体、希釈剤、および緩衝剤は、過度の毒性なしに投与することができる任意の医薬品を含む。薬学的に許容され得る賦形剤は、水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールなどの液体を含むが、これらに限定されない。薬学的に許容され得る塩は、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩を含み得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などの補助物質が、そのようなビヒクル中に存在してもよい。多種多様な薬学的に許容され得る賦形剤が、当技術分野で公知であり、本明細書で詳細に議論する必要はない。薬学的に許容され得る賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000) 「*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*」、20th edition、Lippincott、Williams、& Wilkins; *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (1999) H. C. Anselら、eds.、7th ed.、Lippincott、Williams、& Wilkins; および *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2000) A. H. Kibbeら、eds.、3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. を含む様々な刊行物に詳細に記載されている。

【0142】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{15}$ のベクター粒子もしくはベクターゲノム、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ のベクター粒子もしくはベクターゲノム、または約 1×10^{10} 、約 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、約 4×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 6×10^{10} 、約 7×10^{10} 、約 8×10^{10} 、約 9×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 2×10^{11} 、約 3×10^{11} 、約 4×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 6×10^{11} 、約 7×10^{11} 、約 8×10^{11} 、約 9×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 2×10^{12} 、約 3×10^{12} 、約 4×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 6×10^{12} 、約 7×10^{12} 、約 8×10^{12} 、約 9×10^{12} 、約 1×10^{13} 、約 2×10^{13} 、約 3×10^{13} 、約 4×10^{13} 、約 5×10^{13} 、約 6×10^{13} 、約 7×10^{13} 、約 8×10^{13} 、約 9×10^{13} 、約 1×10^{14} 、約 2×10^{14} 、約 3×10^{14} 、約 4×10^{14} 、約 5×10^{14} 、約 6×10^{14} 、約 7×10^{14} 、約 8×10^{14} 、約 9×10^{14} 、約 1×10^{15} のベクター粒子もしくはベクターゲノムを含む。

10^{11} 、約 2×10^{11} 、約 3×10^{11} 、約 4×10^{11} 、約 5×10^{11} 、約 6×10^{11} 、約 7×10^{11} 、約 8×10^{11} 、約 9×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 2×10^{12} 、約 3×10^{12} 、約 4×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 6×10^{12} 、約 7×10^{12} 、約 8×10^{12} 、約 9×10^{12} もしくは約 1×10^{13} のベクター粒子もしくはベクターゲノムを含む。いくつかの態様では、医薬組成物は、約 1×10^{11} ～約 1×10^{12} のベクター粒子またはベクターゲノムを含む。

【実施例】

【0143】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を例示するものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本発明をその好ましい実施形態に関連して説明してきたが、本出願を読むことから当業者にはその様々な変更が明らかであろう。

【0144】

実施例 1

定向進化スクリーニングを用いて、非ヒト霊長類（NHP）への気管内エアロゾル投与後に、霊長類肺のより効率的な形質導入および霊長類肺の上気道細胞への遺伝子送達効率の向上を付与することができる AAV カプシド変異体を特定した。選択プロセスは、インビボでの NHP 肺への送達およびインビトロでのヒト肺培養物の使用を組み込んだ。

【0145】

方法

【0146】

治療用ベクターエボリューション

【0147】

定向進化プロセスを適用して、エアロゾル投与後に霊長類肺において上気道細胞を広く形質導入することができる AAV カプシド変異体を発見した（図 1）。手短に言えば、様々な分子生物学技術およびいくつかの異なる AAV 血清型を鋳型として使用して、約 10 億個の固有の合成変異体 AAV カプシド配列のライブラリーを 37 個の異なる独自のサブライブラリーから作成した。ライブラリーを HEK293T 細胞にパッケージングして、各ウイルス粒子が、同じカプシドをコードするウイルスゲノムを取り囲む合成カプシドシェルで構成されるようにウイルス粒子を作製した。次いで、ライブラリー内の変異体を、臨床遺伝子治療処置を模倣するために NHP およびヒト細胞培養物中でインビボおよびインビトロ選択圧技術に供した。すべての合成ライブラリーを第 1 ラウンドの選択のために注入した。DNA を肺組織または細胞培養物から採取した後、組織から増幅したカプシドのゲノムを、次の選択ラウンドのための出発ライブラリーとして上記のようにパッケージングした。この手順を合計 5 サイクル行った。

【0148】

モチーフは、特定の選択基準が満たされたときに「ヒット」として宣言された：（1）モチーフは、選択の 2 またはそれを超える連続するラウンドにおける配列決定された集団の一定のパーセンテージを表すか、または（2）選択の 1 または複数のラウンドにおける配列決定された集団の一定のパーセンテージを表すモチーフである

【0149】

モデル系がインビボ NHP からインビトロ近位気道器官型培養に移行した時点は、NHP 送達の第 2 ラウンドおよび第 3 ラウンドの後に行われた配列決定分析の結果に基づいた（図 2）。簡潔には、インビトロヒト ALI モデル系への移行は、以下の場合に起こった：（1）最も高頻度のヒットは、配列決定された集団の特定の割合を表し、（2）配列決定されたクローンの特定の割合未満は、固有の配列を表す

【0150】

選択は、以下の選択完了基準が満たされたときに完了したとみなされた：ラウンドにおいて 2 つ未満の新しい「ヒット」が特定され、（1）組み合わせられた「ヒット」は配列決定された集団の特定の割合を表し、および／または（2）単一の「ヒット」は集団の特定の割合を表す。

【0151】

細胞株およびライブラリー作製

【0152】

HEK293T細胞は、American Type Culture Collection（バージニア州マナッサス）から入手した。細胞を、10%ウシ胎児血清（FBS；カリフォルニア州カールスバッドのGibco）および1%ペニシリン／ストレプトマイシン（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド）を補充したダルベッコ改変イーグル培地中、37℃および5%CO₂で培養した。三重トランスフェクションを使用してHEK293T細胞においてウイルスライブラリーを作製し、イオジキサノール勾配遠心分離^{19、21}およびAmicon濾過によってウイルスを精製した。DNase耐性ゲノム力価を、以前に記載されたように、定量的PCR（qPCR）によって判定した。^{19、21}

10

【0153】

気管内注射および組織採取

【0154】

選択の各ラウンドについて、4～6歳で体重5.5～7.1kgの雄カニクイザル（Macaca fascicularis）1匹が、投与された。10mg/kgのケタミンおよび15μg/kgのデクスメドミジンを筋肉内（IM）送達して動物が麻酔された。5mLのライブラリーを1.75mg/mLのヒト静脈内免疫グロブリン（IVIG）とブレ複合体化し、以下に記載されるように投与した。各動物に5mmの気管内チューブを挿管し、チューブの先端を鎖骨の高さ（気管分岐部の約5cm上）に配置し、その位置を蛍光透視法によって確認した。動物を投与のために座位の椅子に配置した。

20

【0155】

第1ラウンドの選択のために、ネブライザー装置を気管内チューブの遠位端に接続し、バード呼吸器を使用して、20cmH₂Oの圧力で15±1呼吸/分の速度で呼吸を送達した。第2ラウンドおよび第3ラウンドの選択のために、AeroEclipse IIネブライザー装置を気管内チューブの遠位端に接続し、バード呼吸器を使用して、15～20cmH₂Oの圧力で12～24呼吸/分の速度で呼吸を送達した。投与終了後、各動物は抜管され、鎮静を逆転させるために0.15mg/kgのアチパメゾールIMを投与した。動物を、麻酔から完全に回復するまで、それらのホームケージに戻る前に視覚的に監視した。

30

【0156】

安楽死を、15±1日目に静脈内送達される100mg/kgペントバルビタールナトリウムを使用して訓練された獣医学スタッフによって行った。以下に詳述するように、気管を含む肺を摘出し、解剖した。DNAを上気道細胞から単離し、ウイルスゲノム増幅まで-20℃で保存した。

【0157】

上気道上皮細胞単離

【0158】

過剰な粘膜分泌物および残留血液を除去するために、NHPまたはヒト肺をリン酸緩衝生理食塩水（PBS；カリフォルニア州カールスバッドのGibco）で洗い流した。気管ならびに一次、二次および三次気管支を実質肺組織から分離した。過剰な支持組織およびリンパ節を除去した。気管および気管支を2～4cm片に切り取り、酵素溶液に配置して上皮細胞を軽減した（プロナーゼ、1.4mg/mLおよびDNase、0.1mg/mL）。気管と一次気管支を一緒に処理し、二次および三次気管支細胞溶液を4℃で48時間、1日に2回チューブを反転させてインキュベートした。全体積の10%までのFBSの添加によって酵素を失活させた。次いで、切片を長さ方向に切断し、上皮裏層を軟骨から削り取った。細胞を回収し、300×gで10分間遠心分離した。細胞ペレットをPBSで2回すすいだ。ペレットを5%FBSを含むサプリメント（ATCC、マナッサス、バージニア州）を含む気道上皮細胞基礎培地に再懸濁し、細胞を組織培養処理した10

40

50

cm皿に播種して線維芽細胞を接着させ、気道上皮細胞への細胞単離をさらに精製した。播種の2～4時間後、非接着細胞を含む培地を回収し、 $300\times g$ で10分間遠心分離した。ペレット化した細胞を溶解してライブラリーDNAを抽出するか、またはPBSに再懸濁し、計数し、インビトロ選択ラウンドのために播種した。

【0159】

インビトロライブラリー形質導入

【0160】

ヒト胎盤コラーゲンIV型 (Sigma) への播種の30日後に、ヒトALI培養物を形質導入した。形質導入の日に、3つのインサートをトリプシン-EDTA 0.05% (ThermoFisher) と共に37℃で10分間インキュベートした。トリプシンを規定のトリプシン阻害剤 (ThermoFisher) で不活性化した。細胞をインサートから回収し、血球計算盤で計数した。インサートごとに平均細胞数を判定し、インサートごとに必要な総ウイルスゲノムを計算するために使用した。培養物によって生成された粘液を、PBSで洗浄することによってウイルス形質導入の前に除去した。ラウンド4については50,000、ラウンド5については10,000、25,000および50,000の感染多重度 (MOI) を使用した。各ラウンドを2つの並行セットで実行し、1つは細胞投与前に30分間、ライブラリーをヒトIVIGの1:10希釈液とプレ複合体化し、もう1つはIVIGプレ複合体化なしであった。細胞は、ライブラリーを用いて24時間頂端側に曝露された。感染の4日後、DNAを培養物から単離し、ウイルスゲノム増幅まで-20℃で保存した。

【0161】

DNA定量化、DNA増幅および配列決定分析

【0162】

DNeasy Blood & Tissueキット (Qiagen) を用いて、上記の細胞からDNAを単離した。AAVライブラリーゲノムをデジタル液滴ポリメラーゼ連鎖反応 (ddPCR) によって定量した。AAV変異体cap遺伝子をPCRによって増幅した。NotIおよびHindIIIを使用して、cap遺伝子をpSub2ライブラリーパッケージングプラスミドに挿入した。次いで、第三者DNA配列決定設備によってcap遺伝子を配列決定した。配列決定ファイルは、Geneiousソフトウェア (Biomatters) を使用して分析した。

【0163】

結果

【0164】

送達装置パラメータおよび上気道細胞分離のためのパイロット研究

【0165】

2つの送達装置、Valley Biosystemの社内ネブライザーおよびAeroEclipse II呼吸作動ネブライザー (Trudell Medical International) を使用して、複数の臨床的に移動可能な装置との下流互換性を可能にした。換気パラメータがすべての肺葉および肺胞嚢に適切に分布することを確実にするために、両送達装置をエバンスブルー色素を送達するパイロット研究で評価した。Valley Biosystem社の社内ネブライザーは、肺胞区画を含むすべての葉への良好な分布を示し、従属する葉でより強い色素が観察された。選択の第1ラウンドと並行して、エアロゾル化AAV粒子を挿管NHPに送達するためにAeroEclipse II呼吸作動ネブライザーを首尾よく適合および開発するために、追加の方法開発および気道送達装置試験を行った。色素分布研究を通して、両方の肺葉を含む6つすべてのNHP肺葉への優れた非依存性送達を実証された。次いで、AeroEclipse IIネブライザーを選択したラウンド2およびラウンド3に使用した。

【0166】

合計6個のNHP肺を使用して上気道細胞単離プロトコルを最適化した。プロトコルの最適化は、治療用ベクターエボリューションの間に使用された3セットすべてのNHP肺

から単離された気管ならびに一次、二次および三次気管支からの細胞の高い収率および純度をもたらした。

【0167】

ライブラリーの生成および作製

【0168】

治療用ベクターエボリューションプログラムのラウンド1の開始前に、37個すべてのカプシドライブラリーを合成し、製造し、特徴づけた。図3aに示すように、プラスミドライブラリーの多様性は、10億を超える遺伝的変異体配列の全多様性について、ライブラリーあたり約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ を超える固有の変異体を含むと推定された。これは、AAV変異体の高品質で非常に多様な出発ライブラリーを表す。次に、第1ラウンドの選択のために十分な材料を生成するために、個々のライブラリーの作製を完了した。図3bに示されるように、すべてのライブラリーが、インビボ治療用ベクターエボリューション選択のための材料を産生するのに十分なレベルで製造された。作製後およびライブラリー投与前に、全てのライブラリーからの配列を、非機能突然変異（すなわち、フレームシフト突然変異または終止コドン）の存在およびサンガー配列決定による固有の配列の頻度について評価した。ほとんどのライブラリーは、非機能的突然変異の頻度が最小限であり、すべてのライブラリーをNHPへの投与の第1ラウンドに組み込んだ。

10

【0169】

NHP肺へのエアロゾル送達

【0170】

選択の第1ラウンドために、すべてのライブラリーを組み合わせ、Valley Biosystemsの社内ネブライザーシステムを使用した単回用量エアロゾル投与によって単一のNHPに首尾よく投与した。投与前に、ライブラリーを 1.75 mg/mL ヒトIVIGとインキュベートした。これは、ヒトNAbの高いが生理学的に関連する肺粘液濃度を表す。 $1.7 \times 10^{12} \text{ v g}$ の投与ライブラリー用量は、製造上の考慮に基づいて、現在の最大実現可能用量よりも約100倍低い用量を表す。したがって、これは、気管および気管支において上気道細胞を形質導入することができるベクターの発見を可能にするためのストリンジェントな選択圧を表す。投与の2週間後にNHP肺を採取した。別々の気管／一次気管支および二次／三次気管支試料で肺から細胞を単離し、細胞からDNAを単離した。両方の領域から、高い総細胞収量およびアセチル化チューブリン+細胞の高い集団が得られた。このプロセスを、漸進的に低用量のウイルスライブラリーを使用してさらに2ラウンド繰り返した。

20

30

【0171】

選択の各ラウンドからのDNA単離後、AAVウイルスライブラリーゲノムをddPCRによって定量して、目的の細胞型へのライブラリーベクターの局在化の成功を確認した。各ラウンド投与された低用量に対応して、上気道に存在するウイルスゲノムの量の用量依存的減少があった（図4）。

【0172】

ddPCRによる定量化に加えて、組織からのカプシド遺伝子の増幅は、目的の細胞型へのライブラリーベクターの局在化の成功を表す。NHP中の各ラウンドの選択から増幅されたカプシドを、配列分析のために、および後続のラウンドの選択を開始するためにAAVライブラリーパッケージングプラスミドにクローニングした。ライブラリー内の個々のクローンに対して配列決定を実施して、集団内の変異体の頻度を判定した。各ラウンドの気管／一次気管支および二次／三次気管支試料からの最小90個のクローンに対する配列決定を行った。変異体を配列決定データ内のモチーフの存在について評価した。変異体を、複数の配列において生じる統一的バリエーション（例えば、カプシド内の一貫した位置における特定の点突然変異または特定のペプチド挿入配列）の存在に基づいてモチーフにグループ分けした。モチーフが、選択の2またはそれを超える連続したラウンドにおいて配列決定された集団の特定の割合または選択の1または複数のラウンドにおいて配列決定された集団の特定の割合を表す場合、そのモチーフをヒットとして指定した。

40

50

【0173】

2つのモチーフ（点突然変異体#1、気管／一次気管支領域内のペプチド挿入#1（配列番号40）および二次／三次気管支領域内の1つのモチーフ（ペプチド挿入#2（配列番号41）を、インビボでのラウンド3後のヒットとして指定した（図5）。さらに、2つのさらなる目的のモチーフ（ペプチド挿入#3（配列番号42）、ペプチド挿入#4（配列番号43）を、どちらかまたは両方がさらなるインビトロラウンドの治療用ベクターエボリューション後にヒットとして指定され得るかどうかを判定するためにモニターされるモチーフとして特定した。気管／一次気管支領域の点突然変異体#1および二次／三次気管支領域のペプチド挿入#2が各領域で最も頻繁なヒットであり、これらのヒットのそれぞれがその領域の配列決定されたAAV集団の特定の割合を表した（図5）。全配列決定された集団内で、配列決定されたAAVクローンの特定の割合が固有のAAV配列を表した。したがって、治療用ベクターエボリューションプログラムのラウンド3で行われた配列決定分析に基づいて、モデル系を選択プロセスの残りの部分についてインビボNHPからインビトロ近位気道器官型培養に移行した。

10

【0174】

ヒトALI培養への頂端送達

【0175】

インビトロでの選択のラウンド4および5については、3人のヒト肺ドナー由来の細胞をプールし、トランスウェルシステムにおいて多層気液界面（ALI）培養で培養した。細胞は、線条層を形成し、粘液を生成した。ライブラリー形質導入の前に、アセチル化チューブリン（線毛細胞のマーカー）、サイトケラチン5（基底細胞のマーカー）、およびムチン（杯細胞のマーカー）に対する抗体を使用する免疫細胞化学分析によって、ヒトエクスビボ肺上皮気道培養物の細胞培養組成物を解凍後30日で評価した。

20

【0176】

AAVライブラリーを、それぞれ50,000および10,000のMOIで、ラウンド4および5について近位気道器官型培養系の頂端側に投与した。選択のインビボ部分と同様に、インビトロで各ラウンドからDNAを単離した後、AAVウイルスライブラリーゲノムをddPCRによって定量して、目的の細胞型へのライブラリーベクターの局在化の成功を確認した。選択のインビボ部分とは異なり、おそらくインビトロで使用される高いMOIのために、ラウンド間で用量依存性は観察されなかった（図6a）。さらに、ヒトIVIGとのプレインキュベーションは、形質導入後のゲノム存在に有意な影響を及ぼさないようであった（図6b）。

30

【0177】

前述のように、組織からのカプシド遺伝子の増幅は、目的の細胞型へのライブラリーベクターの局在化の成功を表す。インビトロでの各選択ラウンドから増幅されたカプシドを、配列分析のために、およびその後の選択ラウンドを開始するために、AAVライブラリーパッケージングプラスミドに再度クローニングした。ライブラリー内の個々のクローンに対して配列決定を再度実施して、集団内の変異体の頻度を判定した。各ラウンドについてヒトIVIGの非存在下および存在下の条件からの最低89個のクローンに対する配列決定を行った。

40

【0178】

選択のインビボ部分（点突然変異体#1、ペプチド挿入#1、ペプチド挿入#2）中に特定されたヒットは、2ラウンドのインビトロ選択後に比較的高い頻度のままであった（図7）。目的の変異体の1つ（ペプチド挿入#3）は頻度が低下し、ヒットとして指定される基準を満たしたことはなかった。ラウンド3後にモニターされている他の変異体（ペプチド挿入#4）は、ラウンド4後のヒットとして指名される基準を満たしたが、ラウンド5では頻度も減少した（図7）。ラウンド4に続いて、2つのさらなるモチーフ（ペプチド挿入#5（配列番号44）、ペプチド挿入#6（配列番号45）をヒットとして指定した。ラウンド5では新たなヒットは特定されず、組み合わせたヒットは配列決定された集団の50%超を表した（図7）。したがって、治療用ベクターエボリューションプログ

50

ラムのラウンド5で行われた配列決定分析に基づいて、発見プログラムは完了したと考えられた。

【0179】

結果

【0180】

AAVカプシドは、ネブライザーを使用したライブラリーの気管内エアロゾル投与の1ラウンド後のNHPにおける3ラウンドの連続した選択から、気管ならびに一次、二次および三次気管支から単離された単離された上気道細胞集団から首尾よく増幅された。ヒトのインビトロALI培養物を選択のその後の2ラウンドに利用した。NHP肺またはヒトALI培養物からのウイルスゲノムの増幅に成功した後、ライブラリー内の個々のクローンに対して配列決定を行った。個々の配列を、統一的バリエーションの存在に基づいてモチーフにグループ化し、配列決定分析内の頻度およびバリエーションの多様性に基づいて評価した。分析後、6つの変異体配列がヒットとして現れ、さらなる特徴付けのために推薦された。これら6つの変異体(AAV102-AAV107、配列番号68~73)はAAV2ベースのカプシドであり、それぞれループ領域に挿入されたペプチドおよびV708Iアミノ酸置換を含む。

10

【0181】

上記の選択ラウンドのそれぞれについてのペプチド挿入モチーフの頻度の概要を以下の表1に示す。

20

30

40

50

【表 1 - 1】
表 1

ペプチド 挿入	配列 番号	ラウンド 1 T/1°	ラウンド 1 2/3°	ラウンド 2 T/1°	ラウンド 2 2/3°	ラウンド 3 T/1°	ラウンド 3 2/3°	ラウンド 4 (+ IVIG)	ラウンド 4 (- IVIG)	ラウンド 5 (+ IVIG)	ラウンド 5 (- IVIG)
LAHDITKNIA	40					10.78%	3.03%	9.7%	10.8%	11.7%	17.1%
LANQDYTKTA	41			0.54%		3.92%	10.10%	6.8%	8.9%	9.7%	7.6%
LADNTVTRSA	42			1.63%		5.88%	3.03%	0.5%	2.3%	2.9%	1.0%
LASNSVQSLA	43			0.54%		0.98%	7.07%	6.3%	4.2%	4.9%	3.8%
LANSTRHTDA	44					0.98%	3.03%	10.6%	4.7%	16.5%	9.5%
LATNRTSPDA	45			0.54%			1.01%	10.1%	9.9%	10.7%	13.2%
LAISDQTKHA	46		1.10%	0.54%		0.98%	4.04%		1.9%	2.9%	1.0%
LAQADTTKNA	47		1.10%			2.94%	2.02%	2.4%	3.3%	1.0%	2.9%
LANAVKTDEA	48					0.98%		1.9%	3.8%	2.9%	2.9%
LATNQTLCAA	49					1.96%	1.01%	3.9%	3.3%	3.9%	1.9%
LAENRTTSNA	50					3.92%	2.02%	3.4%	3.3%		3.8%
LAPQQDTTHA	51					0.98%	4.04%	2.4%	3.3%	4.9%	1.0%
LANATNHVIA	52					1.96%		1.0%	2.3%		1.9%
LATNNSKADA	53							1.4%	2.3%	1.0%	
LASKITLNNA	54			0.54%			1.01%	0.5%	0.5%		1.0%
LAVTAGMGAA	55						3.03%	1.9%	0.9%		
LAPNSTTNNA	56			0.54%		0.98%	1.01%	0.5%	1.9%		
LANSTSRIDA	57						2.02%	3.4%	1.4%	3.9%	2.9%
LAVASHTNNA	58			1.09%			4.04%	0.5%	0.5%		1.0%
LARSHQZIPA	59					1.96%	1.01%	0.5%	1.4%	1.0%	1.0%
LALNTTKDIA	60						2.02%	1.0%	0.9%	4.9%	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

LAIIDATKNA	61					0.98%	1.01%	0.5%	1.9%	1.0%	4.8%
LANHISQYNA	62			0.34%		2.94%		1.4%	0.5%	1.0%	
LASNSAHITA	63					1.96%		0.5%	1.4%		
LASTHQSNNA	64			1.09%		0.98%	4.04%	1.0%	0.5%		
LAKTPNLITSA	65			1.09%		2.94%		1.0%	0.9%		1.0%
LASNTPALSA	66			0.34%		0.98%	1.01%	1.4%	1.4%		1.9%
LASPGATTNA	67							1.4%	0.9%	1.0%	

T/1^c = 気管 / 一次気管支2/3^c = 二次 / 三次気管支

IVIG = ヒト静脈内免疫グロブリン (1:10)

【0182】

定向進化スクリーニングから特定された配列決定されたクローンは、ペプチド挿入のみを有し（例えば、配列番号40、41、42、43、44または45）、それ以外は配列番号2と同一である変異体カプシド、ならびに様々なアミノ酸置換と組み合わせたペプチド挿入を有する変異体カプシドを含んでいた。定向進化スクリーニングから特定された配列決定されたクローンにおいて表1の挿入ペプチドと組み合わせて許容されたアミノ酸置換（配列番号2に対するナンバリング）の要約を表2に提供する（各場合において、変異体AAVカプシドタンパク質は、それ以外は配列番号2と同一である）：

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2

挿入	配列 番号	置換	挿入	配列 番号	置換
LAHDITKNIA	40	V708I	LAQADTTKNA	47	S109T
LAHDITKNIA	40	E99D + V708I	LAQADTTKNA	47	R585K
LAHDITKNIA	40	E347D	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	K532E + V708I	LAQADTTKNA	47	R103L + K532E
LAHDITKNIA	40	D283E + V708I	LAQADTTKNA	47	E133D
LAHDITKNIA	40	G18E + G220R + V708I	LAQADTTKNA	47	T491I + K532E
LAHDITKNIA	40	T138R	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	R37L + H38Q + V708I	LANAVKTDFA	48	D608N + V708I
LANQDYTKTA	41	V708I	LANAVKTDFA	48	Q120H + V708I
LANQDYTKTA	41	N449D + D472N + V708I	LAENRTTSNA	50	V708I
LANQDYTKTA	41	P436H	LAENRTTSNA	50	T138R
LANQDYTKTA	41	K544E	LAENRTTSNA	50	S109T
LANQDYTKTA	41	K532E + V708I	LAENRTTSNA	50	S109T + V708I
LANQDYTKTA	41	P250S + V708I	LARSHQEIPA	59	G376A + V708I
LANQDYTKTA	41	S109T + N312K + H641N + V708I	LAIIDATKNA	61	T138R + G376A + Q428H + V708I
LANQDYTKTA	41	N705S + V708I	LATNNSKPDA	53	K532E
LANQDYTKTA	41	K532E + K688R + V708I	LATNNSKPDA	53	V118A + M371I
LANQDYTKTA	41	P451Q + A593E + V708I	LANSTSRIDA	57	K532E + V708I
LASNSVQSIA	43	D213Y + V708I	LASPGATTNA	67	Y6F
LASNSVQSIA	43	T200I	LAISDQTKHA	46	E134Q + P135A +

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

					V136G + K137E + V708I
LASNSVQSIA	43	T344S + E347D			
LASNSVQSIA	43	V708I			
LADNTVTRSA	42	V708I			
LANSTRHTDA	44	L91I			
LANSTRHTDA	44	P30L + A593E + V708I			
LANSTRHTDA	44	P250S + V708I			
LANSTRHTDA	44	V708I			
LATNQTLCAA	49	R103C + V708I			
LATNQTLCAA	49	V118A + V708I			
LAPQQDTTHA	51	S109T + V708I			
LAPNSTTNA	56	S16Y + V708I			
LAPQQDTTHA	51	N469D + V708I			
LATNRTSPDA	45	A591D + V708I			
LATNRTSPDA	45	V708I			

10

20

【0183】

実施例 2

上気道上皮細胞形質導入に対する優先性を示す、上で特定された 6 つの変異体カプシド配列（AAV102 - AAV107；配列番号 68～73）を、様々な感染多重度（MOI）で非ヒト霊長類（NHP）およびヒトエキスピボ肺上気道気液界面（ALI）培養物においてインビトロで特徴付けた。

【0184】

簡潔には、EGFPを駆動するユビキタスプロモーター（CMVエンハンサー、ニワトリベクターアクチンプロモーターおよびウサギベクターグロビンスプライスアクセプター部位、CAG）を有するレポーターカセットを含有するAAV102 - AAV107のcap変異体配列をそれぞれ含む組換えAAV（rAAV）を製造した。6 つの変異体AAVカプシド、AAV101、ならびに天然血清型AAV2およびAAV5の形質導入を、4 つの感染多重度、12，500、25，000、50，000および100，000においてインビトロで評価した。

30

【0185】

インビトロでの器官型ALI培養物における気道上皮の形質導入増強のために操作された第1世代カプシド変異体（AAV101）は、天然に生じるAAVカプシドよりも優れていることが示されている（米国特許出願公開第2021／0395772号の配列番号12を参照のこと。公開その内容が参照により本明細書に組み込まれる）。しかしながら、嚢胞性線維症（CF）において臨床的利益を達成するのに十分なレベルでインビトロおよびインビボの両方で効率的に形質導入することができるベクターを特定するために、さらなる発見が行われた。

40

【0186】

方法

【0187】

AAV 製造

【0188】

変異体カプシドタンパク質AAV101 - AAV107ならびに天然血清型AAV2およびAAV5のそれぞれを含むrAAVは、市販のトランスフェクション試薬およびフラットウェア中で培養したヒト胎児腎臓293（HEK293）細胞を利用するトリプル

50

ラスミドトランスフェクションプロセスで産生された。トランスフェクトした細胞は、上清と共に回収され、続いてヌクレアーゼ処理し、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターを通して清澄化された。清澄化された回収物を、親和性クロマトグラフィー (AVB Sepharose HP、Cytiva Life Sciences) を使用して精製し、 0.005% Pluronic (登録商標) F68を含むDPBSに緩衝液交換した。 $0.2\mu\text{m}$ 濾過後、原薬 (BDS) をクライオバイアル (Corning) に分注し、 -80°C で保存した。

【0189】

AAV力価分析のためのデジタル液滴PCR (ddPCR)

【0190】

ウイルスゲノム力価をddPCRによって判定する。試験試料を希釈し、DNase処理し、次いで、 0.02% Pluronic F68、ddPCR Supermix、およびSV40PolyA配列に対応するプライマー／FAM標識プローブを含むDPBSにさらに希釈する。 $20\mu\text{L}$ の試料を、Bio-Rad Automated Droplet Generatorを使用して液滴に分配し、PCRに供し、次いで、蛍光シグナルについて各液滴を個別に測定するBio-Rad QX200 Droplet Readerで読み取る。データは、陽性液滴および陰性液滴のポアソン統計分析を使用して標的配列の絶対定量を提供するBio-Rad QuantaSoftソフトウェアを使用して分析される。試料に対して負のベースラインを設定するために、テンプレートなし対照を使用する。内部ddPCR参照標準ウイルスを参照標準対照として使用する。

【0191】

上気道上皮細胞の単離および培養

【0192】

気道上皮細胞を、公開されているプロトコル (Karpら、2002) に従って移植から拒絶されたNHPおよびヒトドナー肺の気管および一次～三次気管支から単離した (Donor Network West)。単離した細胞を凍結し、液体窒素中で保存した。

【0193】

トランスウェルインサート ($0.4\mu\text{m}$ 、 0.32cm^2 、Corning、ニューヨーク州コーニング) 上の気管支上皮細胞増殖キット (ATCC、バージニア州マナッサス) 中の増殖サプリメントを用いて、気道上皮細胞基底培地中のヒト胎盤コラーゲンIV ($60\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Millipore Sigma、マサチューセッツ州バーリントン) 上で気道上皮細胞を解凍した。播種の2日後、培地をインサートおよび基底チャンバーから吸引した。基礎チャンバーに、成長サプリメントが提供されたPneumaCult ALI基礎培地を補充した (Stem Cell Technologies、バンクーバー、カナダ)。基礎培地を2～3日ごとに交換した。トランスウェルの頂端側の液体を、気液界面 (ALI) が達成されるまで毎日吸引した。細胞を30日間成熟させた後、細胞の特徴づけおよび形質導入を行った。

【0194】

AAV形質導入

【0195】

少なくとも30日間の培養後、細胞を広範囲に洗浄して、蓄積した粘液を除去した。各種の3つのインサートを採取し、細胞を計数した。AAV力価および各種の平均細胞数に基づいて、ウイルスの体積を12, 500、25, 000、50, 000および100, 000のMOIに達するように希釈した。体積を希釈剤と等しくして、各種についてインサートあたり $100\mu\text{L}$ の形質導入体積を得た。ヒト細胞は、頂端および基底に形質導入され、NHP細胞は、粘液洗浄後にAAVで頂端に形質導入された ($n=1$ /条件)。感染の24時間後にインサート上の液体を吸引し、基底区画培地を交換した。感染の7日後に免疫細胞化学のために細胞を固定した。

【0196】

免疫細胞化学

【0197】

細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温にて20分間固定した。次いで、細胞をZeiss AxiO Observer D. 1 蛍光顕微鏡を使用して画像化して、細胞上を見下ろすEGFPを可視化した。次いで、細胞を含有するインサートを最適切断温度培地(OCT、ThermoFisher、マサチューセッツ州ウォルサム)に包埋し、CryoStarクライオスタット上で20 μ mスライスに切片化した。インサートの断面を含むスライドを、PBS中0.02%トリトンX-100中2%ヤギ血清、5%ウシ血清アルブミン中、室温で1時間遮断した。次いで、スライドを一次抗体と室温で2時間インキュベートし、0.02%トリトンX-100で3回洗浄し、二次抗体と室温で1時間インキュベートした。次いで、スライドを室温で5分間、DAPI(核染色)で対比染色し、3回洗浄し、Prolong Gold Anti-fade mountant(ThermoFisher)を使用してカバースリップで密封した。次いで、Zeiss AxiO Observer D. 1 蛍光顕微鏡を使用して細胞を画像化した。

10

【0198】

AAV転写物検出のためのデジタル液滴ポリメラーゼ連鎖反応(ddPCR)

【0199】

製造業者の説明書(Qiagen、Hilden、Germany)に従ってQiagen RNeasy Plus Mini Kitを使用して各インサートからRNAを抽出した。RNAを定量し、2 μ gのcDNAが、iScript cDNA Synthesis Kitを製造者の説明書(総体積40 μ L、Bio-Rad、カリフォルニア州ハーキュリーズ)に従って使用して作製された。cDNAの希釈は、水中で1:10および1:100で50 μ Lの総体積にされ、アッセイプレートウェルあたり2 μ Lを添加した。マスターミックスは、ウェルあたり18 μ Lの総体積まで、2 $\times$ Supermix ddPCR(商標)(dUTPなし、Bio-Rad)およびddPCR適合性プライマー/プローブミックス(HPRT1 HEK-ハウスキーパー、20 $\times$ ID Bio-RadおよびSV40 FAM ID(Furuta-Hanawa、Yamaguchi & Uchida、2019))で作製された。SV40プライマー/プローブは、SV40ポリアデニル化部位がウイルス送達導入遺伝子カセットの一部として含まれるので、EGFP導入遺伝子転写物レベルを測定するための代用物である。マスターミックスおよびcDNAは、ddPCR(商標)96ウェルアッセイプレート中で合わせられ、製造業者の指示に従ってQX200(商標)AutoDG Droplet Digital(商標)PCR Systemにロードされた。液滴を生成し、プレートをC1000 Touch Thermal Cyclerに移してPCRを行った。ThermoCyclerの条件は以下の通りであった: 94 $^{\circ}$ C 10分、94 $^{\circ}$ C 30秒、60 $^{\circ}$ C 1分(ステップ2~3、39 $\times$ を繰り返す)、98 $^{\circ}$ C 10分、12 $^{\circ}$ Cで保持。次いで、プレートを、パラメータをFAMおよびHEKチャンネルで読み取るように設定したQX200(商標)Droplet Readerに移した。データを、3000の閾値を有するQuantaSoftソフトウェアで分析し、次いで、さらなる分析が完了したExcelファイルに転送した。実行可能なリードを有する最低希釈を使用して、ハウスキーパー値に対するSV40の比を使用してグラフを作成した。

20

30

40

【0200】

平均蛍光強度計算

【0201】

形質導入されたALIの各ウェルについて、Zeiss AxiO Observer D. 1 蛍光顕微鏡を使用して10 $\times$ 対物レンズを使用して1ウェルあたり3枚の画像を撮影した。画像化された領域は、ウェルごとに一貫した不偏パターンで選択された。各画像の露光時間は、標準AAV2 MOI 25,000形質導入ウェルを使用して設定した。画像化後、ImageJソフトウェアを使用して、全ての画像を処理した。バックグラウンド蛍光を差し引いた後、「Measure Mean Gray Value」ツールを使用してMFI値を得た。各ウェルからの3つの画像の平均を取って、各ウェルの最

50

終 M F I 値を見つけた。次いで、条件内の各ウェルを平均し、標準偏差を計算して最終グラフを作成した（図 3 b）。

【 0 2 0 2 】

結果

【 0 2 0 3 】

新規カプシドの A A V 製造

【 0 2 0 4 】

変異体カプシドタンパク質および野生型血清型を含む r A A V を、C e l l S T A C K 上で培養した H E K 2 9 3 細胞における三重トランスフェクションによって製造し、親和性クロマトグラフィーを使用して精製した。上清および細胞採取後に、d d P C R 分析（表 1、上流生産性）によって上流生産性（細胞培養表面積 1 平方センチメートル当たりの l o g ウイルスゲノム（v g）の単位で報告）を測定した。すべての新規カプシドは、G F P ペイロードをパッケージングすることができ、フラットウェア生産プロセスを使用して生産された他の A A V ベクターと同等の生産性を示した。下流収率（回収された v g の % として報告）を、親和性精製および緩衝液交換（表 3、下流収率）の後に d d P C R によって判定した。A A V 1 0 1 - E G F P の初期パッケージングおよび収率データも、生産性および収率の比較のために表 3 に示す。

【表 3 - 1】

表 3

ベクター	ペプチドインサート*	アミノ酸置換*	上流生産性 (log vg/cm ²)	下流収率 (回収された % vg)
AAV101-EGFP	N/A	N/A	9.97	42%
AAV102-EGFP	LAHDITKNIA (配列番号 40)	V708I	9.95	46%
AAV103-EGFP	LANQDYTKTA (配列番号 41)	V708I	10.02	40%
AAV104-EGFP	LADNTVTRSA (配列番号 42)	V708I	10.02	61%

【表 3 - 2】

ベクター	ペプチドインサート*	アミノ酸置換*	上流生産性 (log vg/cm ²)	下流収率 (回収された % vg)
AAV105-EGFP	LASNSVQSIA (配列番号 43)	V708I	9.82	56%
AAV106-EGFP	LANSTRHTDA (配列番号 44)	V708I	10.01	57%
AAV107-EGFP	LATNRTSPDA (配列番号 45)	V708I	9.88	52%

* 配列番号 2 の AAV2 カプシドに対して

【 0 2 0 5 】

A A V 新規変異体の形質導入効率

【 0 2 0 6 】

実施例 1 で特定された 6 つの新規変異体：A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 の形質導入効率を A A V 対照と比較した。各カプシドは、E G F P を駆動するユビキタスプロモーター（C A G）を有するカセットを含んでいた。ヒトおよび N H P 上気道上皮細胞を、粘液の除去後に形質導入した。感染の 7 日後、細胞を落射蛍光顕微鏡を使用してトップダウンで画像化して E G F P を可視化した。

【0207】

頂端に形質導入されたヒト細胞については、最小の E G F P 発現が A A V 2 および A A V 5 対照において検出された。6 つの新規変異体のうち、A A V 1 0 2 および A A V 1 0 3 の形質導入効率は、蛍光顕微鏡法によって分析した場合、A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 よりも低用量で高かった（図 8 a）。M O I 1 0 0, 0 0 0 における A A V 1 0 3 形質導入は、低く、おそらくそのウェルの非効率的な粘膜洗浄のためであった。A A V 1 0 6 形質導入は、A A V 2 および A A V 5 よりも高かった。

10

【0208】

頂端に形質導入された N H P 細胞では、E G F P パターンは細胞内で可変であった。トランスウェルの外側縁の周りの増強された形質導入は、トランスウェルの中央の限定された形質導入を伴うリングパターンで繰り返し観察された。全体として、新規変異体は、A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 よりも強い形質導入効率を示した。A A V 1 0 2 および A A V 1 0 4 は、最高レベルの E G F P を発現した（図 8 b）。N H P 形質導入パターンは、おそらくエッジ効果のために、ヒト培養物の場合ほど明らかではなかった。N H P 形質導入について示される全ての画像は、形質導入を可視化するためにウェルの縁の一部を捕捉する。

20

【0209】

基底に形質導入されたヒト細胞では、異なるパターンが出現した。A A V 1 0 4 は、A A V 2、A A V 5 および A A V 1 0 1 よりも高い形質導入効率を有していた（図 8 c）。A A V 1 0 2 および A A V 1 0 3 は、頂端投与時のように優れた形質導入を示さなかった。全体として、基底形質導入は頂端形質導入よりも低かった。これらのカプシド変異体がインビボでの N H P およびインビボでのヒト A L I への頂端投与によって選択されたことを考えると、頂端投与と比較した基底投与後の形質導入の相対的欠如は驚くべきことではない。N H P インビトロ培養物は、基底に形質導入されなかった。

【0210】

ヒト ex vivo 肺上皮気道培養物の細胞培養組成物を、アセチル化チューブリン（A c - t u b；線毛細胞）、サイトケラチン 5（K R T 5；基底細胞）およびムチン（M U C 5 a c；杯細胞）に対する抗体を使用する免疫細胞化学分析によって解凍後 30 日で評価した。ヒトの頂端形質導入細胞および基底に形質導入された細胞の断面分析を完了し、この A L I 系内の特定の細胞変異体向性についての非決定的な結果を得た（データは示さず）。この異種培養系内の各カプシドの特異的向性を適切に理解するためには、さらなる分析が必要である。インビボでのさらなる研究はまた、各カプシドに対する細胞特異的形質導入をより良好に特徴付けるのに役立ち得る。

30

【0211】

A A V 2 および A A V 1 0 1 と比較して、ヒト A L I 培養物における最初の頂端形質導入スクリーニングから最も性能の高い変異体である A A V 1 0 2 および A A V 1 0 3 をさらに調べるために追跡調査を完了した。E G F P を示す免疫細胞化学分析を図 9 a に示す。平均蛍光強度が平均化され、1 ウェルあたり 3 つの画像、1 条件あたり 3 つのウェルのデータからグラフ化された（図 9 b）。最後に、デジタル液滴 P C R により、各変異体の転写レベルを判定した（図 9 c）。3 つすべての分析により、低 M O I で頂端に形質導入した場合のエクスピボ気道培養物の形質導入効率において A A V 1 0 2 および A A V 1 0 3 が A A V 2 よりも優位であることが確認された。

40

【0212】

粘液の存在下および非存在下で、A A V 2、A A V 5、A A V 6 および A A V 1 0 1 と比較して、A A V 1 0 2 - A A V 1 0 7 のそれぞれによる A L I 培養物中のヒト気道上皮

50

細胞の頂端形質導入を比較するための追加の追跡調査が完了した。手短に言えば、ヒト肺上皮細胞培養物を気液界面で少なくとも30日間増殖させた。細胞は、粘液の存在下または非存在下で、CAGプロモーターによって駆動されるEGFPレポーター遺伝子を有するAAV102-AAV107または対照カプシドを形質導入された(MOI=25, 000)。形質導入の7日後、カプシドの形質導入効率の代表としてEGFPの画像が撮影された。カプシドAAV102-AAV107の各々は、粘液の非存在下で形質導入された場合、野生型AAV血清型と比較して、およびAAV101対照と比較して、より強い形質導入効率を示した(図10Aおよび10B、上部パネル)。粘液の存在下での形質導入は、各カプシド(粘液の非存在下で形質導入を示さなかったAAV5を除く)の形質導入効率を低下させた(図10Aおよび図10Bの上のパネルを下のパネルと比較する)。

10

【0213】

実施例1による、エアロゾル化送達技術およびヒトエキスピボ上気道上皮ALI培養物への頂端投与を用いたNHPでの選択によって特定された6つのトップAAVカプシド変異体のインビトロ分析は、変異体カプシドタンパク質を有するrAAVが、AAV101および野生型AAV血清型と比較して、ヒトおよびNHPエキスピボ上気道上皮ALI培養物の形質導入に優れていることを実証している。異なる変異体は、投与経路に応じて形質導入に対する優先性を示した。AAV102およびAAV103は、より低いMOIでAAV101およびWT血清型よりも良好にヒトインビトロ上気道上皮ALI培養物を頂端に形質導入した。基底に形質導入されたヒト細胞では、AAV104が最も高い形質導入効率を有していた。

20

【0214】

実施例3

新規AAVカプシド変異体を、中和抗体スクリーニングおよびNHPにおけるインビボベクターの特徴づけにおいて調べる。

【0215】

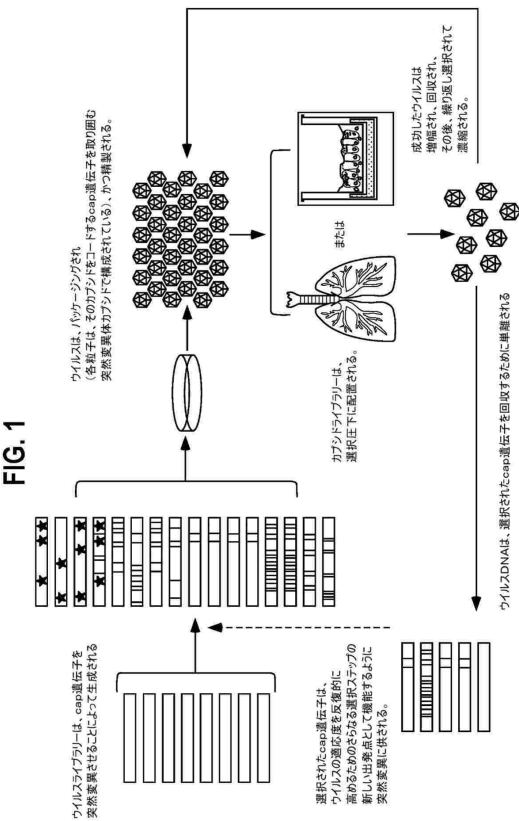
本発明の材料および方法を好ましい実施形態に関して説明してきたが、本発明の概念、主旨および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法に変形を適用できることは当業者には明らかであろう。当業者に明らかなすべてのそのような類似の置換および修正は、本発明の主旨、範囲および概念内にあると考えられる。

30

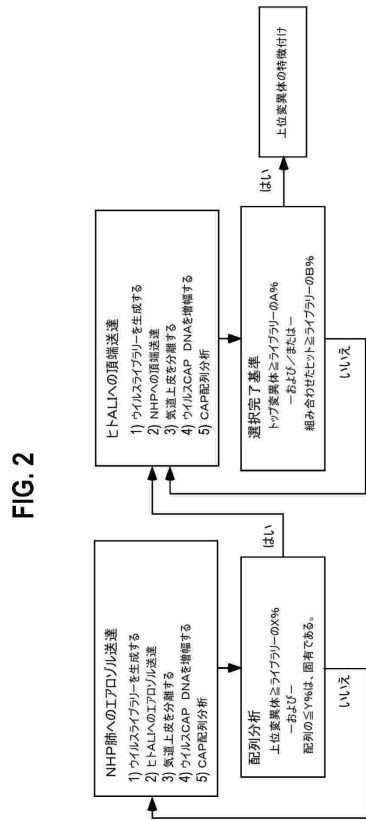
40

50

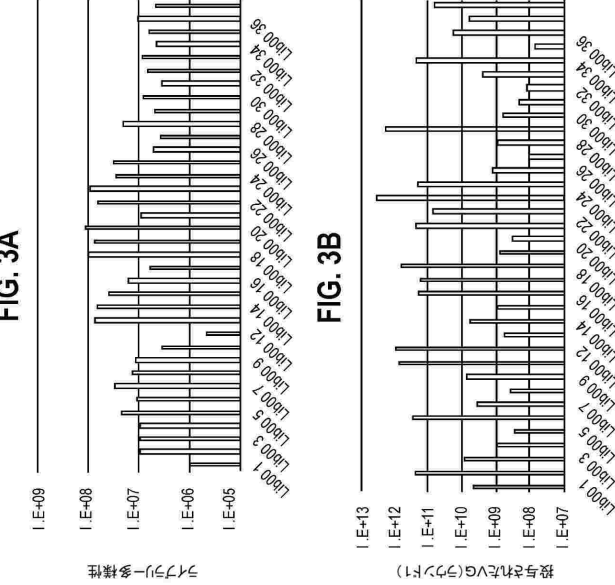
【図面】
【図 1】



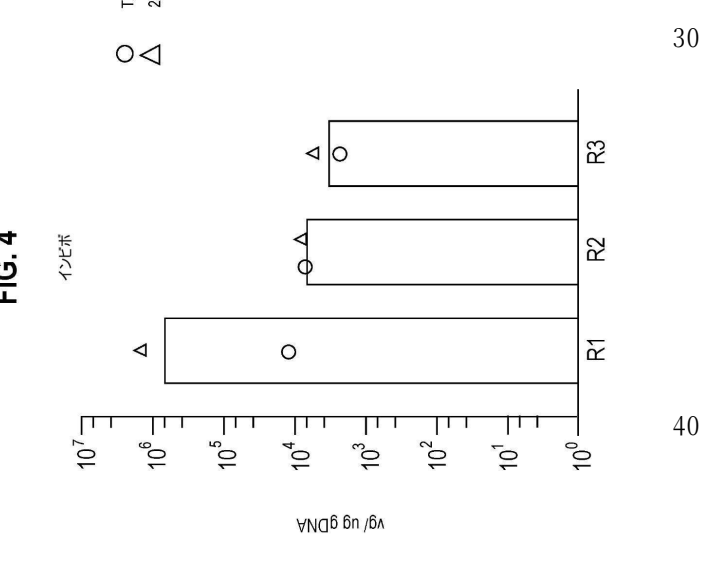
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

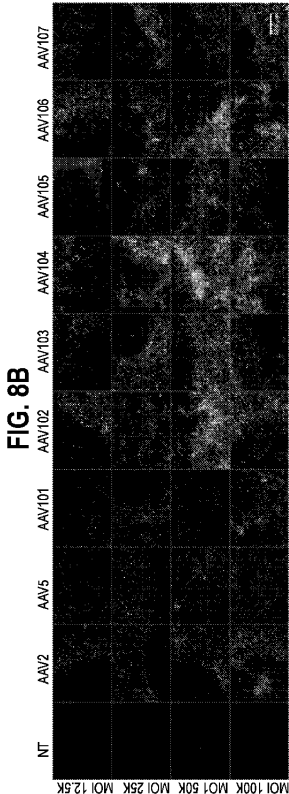
20

30

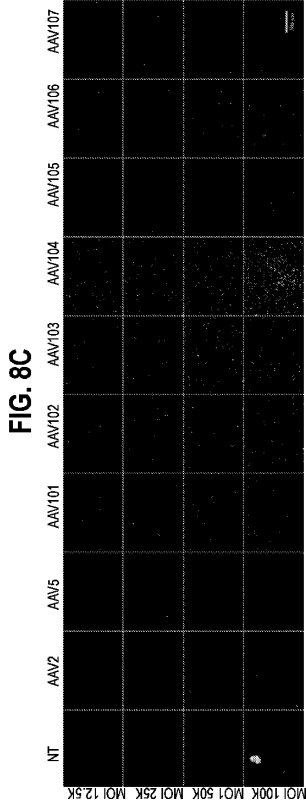
40

50

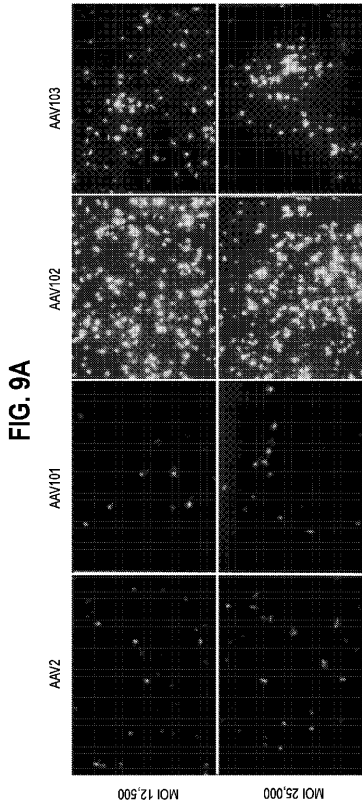
【 図 8 B 】



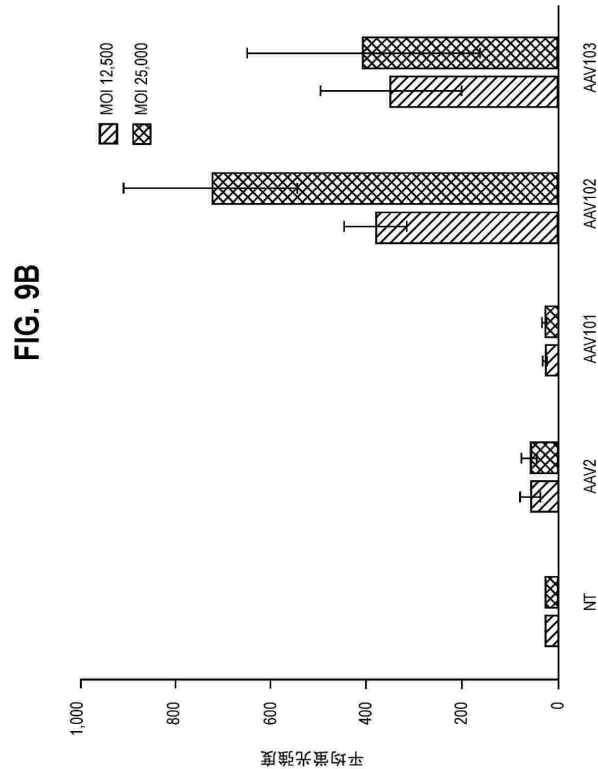
【 図 8 C 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



10

20

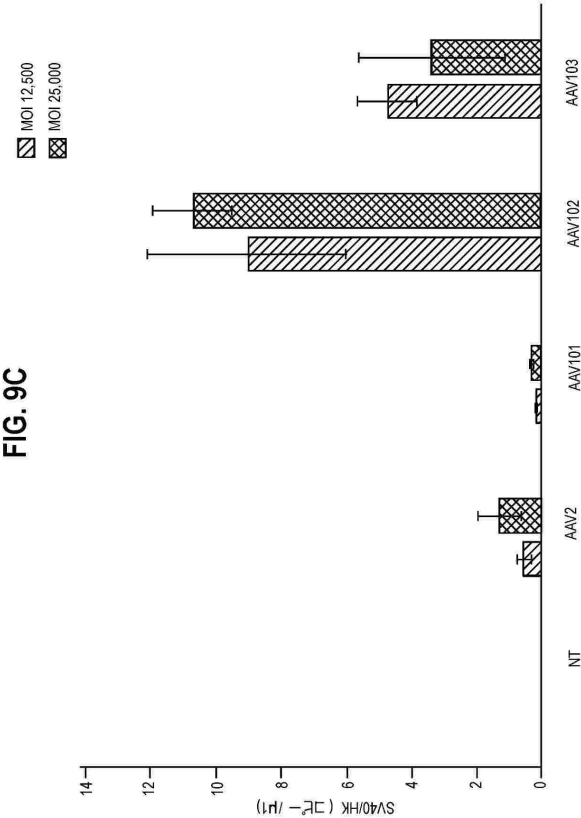
30

40

50

【図 9 C】

FIG. 9C



【図 10】

FIG. 10A

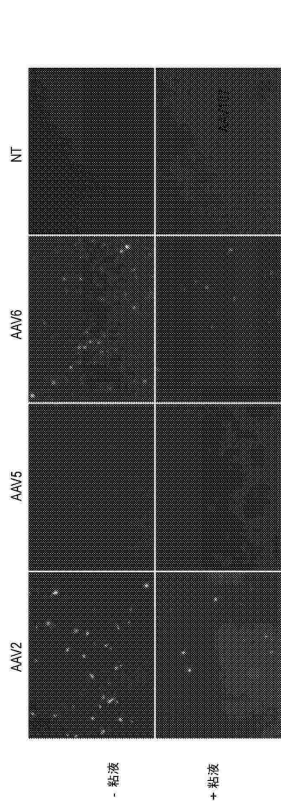
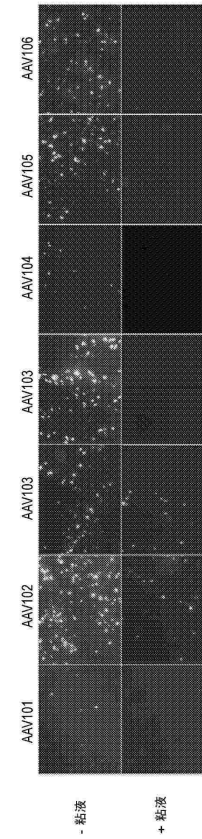


FIG. 10B



【配列表】

2025508059000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. C12N 15/861; C07K 14/705; C12N 15/86 (2023.01) ADD.		
CPC - INV. C12N 15/861; A61K 9/0019; A61K 48/0075; C07K 14/705; C12N 15/86; C12N 15/8645 ADD. C12N 2750/14143		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2021/0380643 A1 (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC.) 09 December 2021; [0014], [0015], [0016], [0018], [0057], [0082], [0118], [0137], [0180]	1-3 --- 24, 27-28, 34-37, 40-41, 44-45
Y	US 2021/0395772 A1 (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC.) 23 December 2021; [0007], [0022], [0024], [0026], [0027], [0029], [0030], [0266]	24, 27-28, 34-37, 40-41, 44-45
Y	US 2021/0317229 A1 (AFFYIMMUNE THERAPEUTICS INC.) 14 October 2021; [0011], [0080]	28
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2023 (20.07.2023)		Date of mailing of the international search report AUG 23 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63789

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63789

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-23, 30-33, 51, 55, 57-74
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-5, 24-29, 34-50, 52-54, 56; SEQ ID NO: 14 (peptide insertion amino acid sequence); Y6F (substitution); chronic obstructive pulmonary disease (pulmonary disease); alpha-1-antitrypsin (heterologous nucleic acid)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63789

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-5, 24-28, 34-50, 52-54, 56; SEQ ID NO: 14 (peptide insertion amino acid sequence); Y6F (substitution); chronic obstructive pulmonary disease (pulmonary disease); alpha-1-antitrypsin (heterologous nucleic acid) are directed towards a variant AAV capsid protein that confers tropism to lung cells and recombinant adeno-associated viruses comprising the variant AAV capsid protein and methods and pharmaceutical compositions comprising same and their use in the delivery of heterologous nucleic acids to lung cells for the treatment of pulmonary disorders.

The variant AAV capsid protein, method, and pharmaceutical compositions of Claims 1-3 (each in-part), 24 (in-part), 27-28 (each in-part), 34-37 (each in-part), 40-41 (each in-part), and 44-45 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Group I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 14 (first exemplary peptide insertion amino acid sequence); Y6F (first exemplary substitution); chronic obstructive pulmonary disease (first exemplary pulmonary disease); alpha-1-antitrypsin (first exemplary heterologous nucleic acid). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1, 24, 28, 34-35, and 37 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional peptide insertion amino acid sequence(s), substitution(s), pulmonary disease(s) and heterologous nucleic acid sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional peptide insertion amino acid sequence(s), substitution(s), pulmonary disease(s) and heterologous nucleic acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected peptide insertion amino acid sequence(s), substitution(s), pulmonary disease(s) and heterologous nucleic acid sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 15 (peptide insertion amino acid sequence); S16Y (substitution); idiopathic pulmonary fibrosis (pulmonary disease); alpha-1-antitrypsin (heterologous nucleic acid).

No technical features are shared between the peptide insertion amino acid sequences, substitutions, pulmonary diseases and heterologous nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein; a method of delivering a heterologous nucleic acid to a lung cell comprising contacting the lung cell with an rAAV virion comprising (i) a variant capsid protein comprising a peptide insertion and (ii) a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products, preferably wherein the rAAV virion is administered to a mammalian subject by pulmonary, endobronchial, intranasal, intratracheal and/or intrabronchial administration; a method for treating a pulmonary disease comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an rAAV virion comprising (i) a variant capsid protein comprising a peptide insertion and (ii) a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products, or a pharmaceutical composition comprising the rAAV virion and a pharmaceutically acceptable carrier; a pharmaceutical composition comprising the rAAV and a pharmaceutically acceptable carrier; a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein, wherein the peptide insertion comprises an amino acid sequence; these shared technical features are previously disclosed by US 2021/0395772 A1 (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC.) (hereinafter "4D").

4D discloses a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein (a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein; abstract; paragraphs [0034], [0090], [0345]); a method of delivering a heterologous nucleic acid to a lung cell comprising contacting the lung cell with an rAAV virion (a method of delivering a heterologous nucleic acid to a lung cell comprising contacting the lung cell with an rAAV virion; abstract; claim 17) comprising (i) a variant capsid protein comprising a peptide insertion (a variant capsid protein comprising a peptide insertion; abstract; paragraphs [0034], [0090], [0345]) and (ii) a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products (a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products; claim 1), preferably wherein the rAAV virion is administered to a mammalian subject by pulmonary, endobronchial, intranasal, intratracheal and/or intrabronchial administration (the rAAV virion is administered to a mammalian subject by pulmonary, endobronchial, intranasal, intratracheal and/or intrabronchial administration; paragraph [0022]); a method for treating a pulmonary disease comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an rAAV virion (a method for treating a pulmonary disease comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an rAAV virion; claim 17) comprising (i) a variant capsid protein comprising a peptide insertion (a variant capsid protein comprising a peptide insertion; abstract; paragraphs [0034], [0090], [0345]) and (ii) a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products (a heterologous nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding one or more gene products; claim 1), or a pharmaceutical composition comprising the rAAV virion and a pharmaceutically acceptable carrier; a pharmaceutical composition comprising the rAAV and a pharmaceutically acceptable carrier (a pharmaceutical composition comprising the rAAV and a pharmaceutically acceptable carrier; claim 11); a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein, wherein the peptide insertion comprises an amino acid sequence (a variant adeno-associated virus (AAV) capsid protein comprising a peptide insertion relative to a corresponding parental AAV capsid protein, wherein the peptide insertion comprises an amino acid sequence; abstract; paragraphs [0034], [0090], [0345]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the 4D reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	11/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/06 (2006.01)	A 6 1 P	31/06	

,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,C O,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,I R,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,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST, SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フランシス, ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホールトン ストリート 5 8 5
8, スイート 4 5 5, 4ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 コッターマン, メリッサ エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホールトン ストリート 5 8 5
8, スイート 4 5 5, 4ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ナイ, ジュリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホールトン ストリート 5 8 5
8, スイート 4 5 5, 4ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 クローズ, ロクサーヌ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エメリービル, ホールトン ストリート 5 8 5
8, スイート 4 5 5, 4ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02

CA24 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA12 MA13 MA55 MA59 NA13

NA14 ZA59 ZA62 ZB26 ZB31 ZB33 ZB35

4H045 AA10 BA10 CA01 EA20 FA74