

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-517628
(P2025-517628A)

(43)公表日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K	14/015		4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195		4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/315 (2006.01)	C 0 7 K	14/315		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全179頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-564799(P2024-564799)			(71)出願人	504389991
(86)(22)出願日	令和5年5月4日(2023.5.4)				ノバルティス アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和6年12月11日(2024.12.11)				スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/054639				3 5
(87)国際公開番号	WO2023/214346			(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)				弁理士 小林 浩
(31)優先権主張番号	63/364,287			(74)代理人	100095360
(32)優先日	令和4年5月6日(2022.5.6)				弁理士 片山 英二
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100120134
(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	弁理士 大森 規雄
	最終頁に続く			(74)代理人	100131990
					弁理士 大野 玲恵
				(72)発明者	シリーロ, アゴスティーノ
					スイス国 バーゼル 4 0 0 2, ポストフ
					ァッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の組換え A A V V P 2 融合ポリペプチド

(57)【要約】

本開示は、A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むアデノ随伴ウイルス (A A V) V P 2 融合ポリペプチドに関する。本開示はさらに、そのような A A V V P 2 融合ポリペプチドを含む r A A V ビリオン、及びそのような A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸のライブラリー、そのような r A A V ビリオンを含む医薬組成物、並びに関連する方法及び使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

AAV VP2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) VP2 融合ポリペプチドであって、前記ポリペプチドリガンドが、前記 AAV VP2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合され、GP2 ポリペプチド、Sso7d ポリペプチド及びアフィボディからなる群より選択される、AAV VP2 融合ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の Sso7d ポリペプチド、及びそれと少なくとも 80%、85%、90%、又は 95% の配列同一性を有する Sso7d ポリペプチドからなる群より選択される、請求項 1 に記載の AAV VP2 融合ポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の Sso7d ポリペプチド（ここで、21 位、23 位、25 位、28 位、30 位、32 位、40 位、42 位及び 44 位のアミノ酸残基 X は、独立して、D、R、H、N、A、I、Y 及び W から選択される）、並びにそれと少なくとも 80%、85%、90%、又は 95% の配列同一性を有する Sso7d ポリペプチドから選択されるからなる群より選択される、請求項 2 に記載の AAV VP2 融合ポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドリガンドと前記 AAV VP2 カプシドポリペプチドとの間にペプチドリンカーをさらに含み、特に、前記ペプチドリンカーが、グリシン-セリン (GS) リンカー及びアラニン-プロリン-セリン (APS) リンカーからなる群より選択され、より具体的には、前記 GS リンカーは、式 [GGGS] n のものであり、前記 APS リンカーは、式 [APS] n のものであり、式中、n は、1~10 の範囲の整数であり、特に、n は、1、2、3、4、5 又は 6 であり、より具体的には、前記 GS リンカーの場合、n は、1、2、3 又は 4 であり、前記 APS リンカーの場合、n は、2、3、4 又は 5 である、請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載の AAV VP2 融合ポリペプチド。

【請求項 5】

前記 AAV VP2 カプシドポリペプチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAVrh. 32.33、ウシ AAV 又はトリ AAV. 5 からなる群、特に、AAV1、AAV6、AAV8 及び AAV9 からなる群より選択される AAV 血清型のものである、請求項 1~4 のいずれか 1 項に記載の AAV VP2 融合ポリペプチド。

【請求項 6】

前記 AAV VP2 カプシドポリペプチドが、その天然の受容体に対する少なくとも 1 つの結合部位に少なくとも 1 つの変異を含み、特にここで、

a) 前記 AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV6 のものであり、その VP3 領域内に、配列番号 3 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及び D590A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 AAV VP2 融合ポリペプチドは、配列番号 3 の前記 VP1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：a i) K531E 及び V473D；a i i) K531E、K459S、V473D 及び N500E；a i i i) G266A 及び N269Q；a i v) G266A、N269Q 及び D590A；a v) K531E、V473D、G266A 及び N269Q；若しくは a v i) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q 及び D590A を含み；

b) 前記 AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV8 のものであり、その VP3 領域内に、配列番号 4 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q 及び A592D からなる群より選択される少なくとも 1 つ

10

20

30

40

50

のアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、配列番号 4 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：b i) G 2 6 8 E 及び N 2 7 1 Q；b i i) S 3 8 7 A；b i i i) G 2 6 8 E、N 2 7 1 Q 及び S 3 8 7 A；b i v) A 5 9 2 Q；若しくは b v) A 5 9 2 D を含み；

c) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 9 のものであり、その V P 3 領域内に、配列番号 5 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：Q 5 9 0 A、W 5 0 3 A、N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、配列番号 5 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：c i) W 5 0 3 A；c i i) N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A；c i i i) Q 5 9 0 A 及び W 5 0 3 A；若しくは c i v) Q 5 9 0 A、W 5 0 3 A、N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A を含み；

d) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 2 のものであり、その V P 3 領域内に、配列番号 6 の V P 1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換 R 5 8 5 A を含み；或いは

e) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、その V P 3 領域内に、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、配列番号 7 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：e i) V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E；e i i) R 5 1 4 A；又は e i i i) V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A を含む、請求項 5 に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【請求項 7】

a) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 3 A、T 1 6 2 R 及び／又は P 1 9 1 N を含み；或いは b) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 1 以外の A A V 血清型のものであり、配列番号 7 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：少なくとも 1 つのアミノ酸置換に対応する、E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【請求項 8】

前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドが、配列番号 7 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換 V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E をさらに含む、請求項 7 に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 10】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチド又は請求項 9 に記載の核酸を含む細胞であって、前記細胞が、昆虫細胞（例えば、S f 9 細胞）及び H E K 2 9 3 細胞からなる群より選択される、細胞。

【請求項 11】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドを含む組換え A A V (r A A V) ビリオン。

【請求項 12】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸配列をさらに含み、特にここで、前記 A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融

10

20

30

40

50

合ポリペプチドと、前記核酸配列によりコードされる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドが同一である、請求項 1 1 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 1 3】

治療用核酸、治療用タンパク質、又は治療用抗体若しくは抗体フラグメントをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 1 1 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 1 4】

前記ビリオンが、A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドをさらに含み、特に、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドが、以下：A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 1 3、A A V r h . 8、A A V r h . 1 0、A A V r h . 3 2 . 3 3、ウシ A A V 又はトリ A A V からなる群、とりわけ、A A V 1、A A V 6、A A V 8 及び A A V 9 からなる群より選択される同じ A A V 血清型のものである、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 1 5】

前記 A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 ポリペプチドが、前記 A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 カプシドポリペプチドの天然の受容体に対する少なくとも 1 つの結合部位に少なくとも 1 つの変異を含み、特に、前記 A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 ポリペプチドは、各 A A V カプシドポリペプチドの共有 V P 3 領域に同じ少なくとも 1 つの変異を含み、より具体的には、

a) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 6 のものであり、各々が、前記共有 V P 3 領域内に、配列番号 3 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：K 5 3 1 E、V 4 7 3 D、K 4 5 9 S、N 5 0 0 E、G 2 6 6 A、N 2 6 9 Q、及び D 5 9 0 A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは各々、配列番号 3 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：a i) K 5 3 1 E 及び V 4 7 3 D；a i i) K 5 3 1 E、K 4 5 9 S、V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E；a i i i) G 2 6 6 A 及び N 2 6 9 Q；a i v) G 2 6 6 A、N 2 6 9 Q 及び D 5 9 0 A；a v) K 5 3 1 E、V 4 7 3 D、G 2 6 6 A 及び N 2 6 9 Q；若しくは a v i) K 5 3 1 E、K 4 5 9 S、V 4 7 3 D、N 5 0 0 E、G 2 6 6 A、N 2 6 9 Q 及び D 5 9 0 A を含み；

b) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 8 のものであり、各々が、前記共有 V P 3 領域内に、配列番号 4 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：G 2 6 8 E、N 2 7 1 Q、S 3 8 7 A、A 5 9 2 Q 及び A 5 9 2 D からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは各々、配列番号 4 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：b i) G 2 6 8 E 及び N 2 7 1 Q；b i i) S 3 8 7 A；b i i i) G 2 6 8 E、N 2 7 1 Q 及び S 3 8 7 A；b i v) A 5 9 2 Q；若しくは b v) A 5 9 2 D を含み、

c) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 9 のものであり、各々が、前記共有 V P 3 領域内に、配列番号 5 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：Q 5 9 0 A、W 5 0 3 A、N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは各々、配列番号 5 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：c i) W 5 0 3 A；c i i) N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A；c i i i) Q 5 9 0 A 及び W 5 0 3 A；又は c i v) Q 5 9 0 A、W 5 0 3 A、N 5 6 2 A 及び E 5 6 3 A を含み、

d) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 2 のものであり、各々が、前記共有 V P 3 領域内に、配列番

号 6 の V P 1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換 R 5 8 5 A を含み；或いは

e) 前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、各々が、前記共有 V P 3 領域内に、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して以下：V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、配列番号 7 の前記 V P 1 アミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換：e i) V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E；e i i) R 5 1 4 A；若しくは e i i i) V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A を含む、請求項 1 4 に記載の r A A V ビリオン。

【請求項 1 6】

請求項 1 1 及び 1 3 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の r A A V ビリオンと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 7】

医薬品として使用するための請求項 1 1 及び 1 3 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の r A A V ビリオン又は請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから成る A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含むライブラリー構築物であって、前記ポリペプチドリガンドは、A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合され、前記ポリペプチドリガンドは、G P 2 ポリペプチド、S s o 7 d ポリペプチド及びアフィボディからなる群より選択される、ライブラリー構築物。

【請求項 1 9】

前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の S s o 7 d ポリペプチド、及びそれと少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % の配列同一性を有する S s o 7 d ポリペプチドからなる群より選択され、特に、前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の S s o 7 d ポリペプチド（ここで、2 1 位、2 3 位、2 5 位、2 8 位、3 0 位、3 2 位、4 0 位、4 2 位及び 4 4 位のアミノ酸残基 X は、独立して、D、R、H、N、A、I、Y 及び W から選択される）、並びにそれと少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % 又は 9 5 % の配列同一性を有する S s o 7 d ポリペプチドからなる群より選択される、請求項 1 8 に記載のライブラリー構築物。

【請求項 2 0】

請求項 1 8 又は 1 9 に記載の複数のライブラリー構築物を含むライブラリーであって、前記ライブラリーが、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は 10^9 のユニークなライブラリー構築物を含むライブラリー。

【請求項 2 1】

各ライブラリー構築物が、r A A V ビリオン内に存在し、特に、前記 r A A V ビリオンは、請求項 2 又は 3 に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドを含み、所与の r A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドと、前記所与の r A A V ビリオン内に存在するライブラリー構築物によってコードされる A A V V P 2 融合ポリペプチドは同一である、請求項 2 0 に記載のライブラリー。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つの所望の特徴を備える A A V V P 2 融合ポリペプチドを作製する方法であって、以下：b) 請求項 2 0 又は 2 1 に記載のライブラリーを複数の細胞と接触させるステップと、c) 前記細胞の少なくとも一部から核酸分子を単離するステップと、d) ステップ b) で単離された少なくとも 1 つの核酸分子のポリペプチドリガンド又はその断片をコードする配列の少なくとも一部を決定するステップとを含み、特に、ステップ b) の前記複数の細胞が、非ヒトモデル動物に存在する、方法。

【請求項 2 3】

A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む A A V V P 2 融合ポリペプチドであって、前記ポリペプチドリガンドは、前記 A A V V P 2 カプシド

10

20

30

40

50

ポリペプチドのN末端に融合されており、前記ポリペプチドリガンドは、最大10kDaの分子量を有する、AAV VP2融合ポリペプチド。

【請求項24】

AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むAAV VP2融合ポリペプチドであって、前記ポリペプチドリガンドが、前記AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合しており、前記AAV VP2カプシドポリペプチドが、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)及び／又はシアル酸(SIA)への結合を消失若しくは減少させる1つ以上の変異を含む、AAV VP2融合ポリペプチド。

【請求項25】

a) 前記AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、前記AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D213A、T162R、及び／若しくはP191Nを含むか、又はb) 前記AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV1以外のAAV血清型のものであり、配列番号7の前記VP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群より選択されるアミノ酸置換の少なくとも1つに対応する少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、AAV VP2融合ポリペプチド。

【請求項26】

請求項25に記載のAAV VP2カプシドポリペプチドを含むrAAVビリオン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、遺伝子治療アプローチにおけるAAVのターゲティング改善のための、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むアデノ随伴ウイルス(AAV) VP2融合ポリペプチドを提供する。本開示はさらに、そのようなAAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオン、及びそのようなAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸のライブラリー、並びに関連する組成物、方法及び使用を提供する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的手段により提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2022年5月5日に作成された前記ASCIIの複製は、PAT059281-US-PPS SLと命名され、サイズが54,417バイトである。

【背景技術】

【0003】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、その優れた安全性と有効性プロファイルによって最も有望な遺伝子導入ベクターの1つである。AAVベクターを他のベクターから識別する、AAVベクターの立証された特徴としては、安定した長期発現、広宿主域、増殖細胞及び有糸分裂後の細胞を形質導入する能力、組織培養で産生されるAAVベクターの高い力価、非病原性ウイルスからの誘導、並びに野生型ウイルス及び組換えベクター両者の低い免疫原性などが挙げられる。

【0004】

しかし、AAVベクターは、その広い向性のために、多くの標的器官への形質導入効果が低く、従って、高ベクター用量を適用する必要がある。このベクター系の最大限の潜在能力は、改善された細胞形質導入率及び特異性を呈示し、その結果、安全性プロファイルの改善をもたらす修飾AAVベクターによって初めて実現されることが一層明らかになっ

てきている。

【0005】

リターゲッティングの試みは、突起のループを形成する可変領域の露出位置及び受容体結合におけるそれらの機能のために、そうした可変領域に的が絞られている。しかし、これらの部位は、小さなペプチドの挿入しか許容しない。米国特許出願公開第20180163229号明細書は、AAV VP2のN末端に融合したDARPinを含むバリエーションAAVカプシドポリペプチドを開示している。

【0006】

少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の増加及び／又は向性の増加、細胞型選択性の改善及び／又はターゲティング特異性の改善など、遺伝子治療のための改善されたAAV特性を媒介することができるさらなる変異型AAVカプシドポリペプチドに対する高いアンメットニーズが依然として存在する。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)VP2融合ポリペプチドを提供し、例えば、ここで、ポリペプチドリガンドは、直接又はペプチドリンカーを介して、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合される。ポリペプチドリンカーは、最大10kDaの分子量を有する。rAAVビリオンアセンブリのために、典型的にはAAV VP1及び／又はVP3カプシドポリペプチドと一緒に使用されると、本明細書に提供されるAAV VP2融合ポリペプチドは、良好な修飾レベルを示し得るが、これは、満足な数のAAV VP2融合ポリペプチドがrAAVビリオンに組み込まれることを意味する。

【0008】

本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチドは、前記ポリペプチドリガンドに融合していないが、それ以外はAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるVP2カプシドポリペプチドと同一であるAAV VP2カプシドポリペプチドと比較して、少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の改善及び／又は向性の増加を媒介することができる。少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の改善及び／又は向性の増加は、少なくとも1つの組織又は細胞型に発現する細胞表面分子に結合する能力を有するポリペプチドリガンドによって媒介され得る。従って、本明細書に提供されるAAV VP2融合ポリペプチドを含み、且つその表面にポリペプチドリガンドを提示するrAAVビリオンは、高い細胞型選択性及び／又はターゲティング特異性を賦与し、それにより生体内分布の制限及び安全な遺伝子導入を可能にすることから、治療用途及び基礎研究への応用に際して細胞型特異的遺伝子導入に使用することができる。

【0009】

従って、一態様では、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから構成されるアデノ随伴ウイルス(AAV)VP2融合ポリペプチドが本明細書に提供され、ここで、ポリペプチドリガンドが、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合しており、ポリペプチドリガンドは、最大10kDaの分子量を有する。

【0010】

他の態様では、本明細書には、そのようなAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸、及びそのようなAAV VP2融合ポリペプチド又はそれをコードする核酸を含む細胞が提供される。

【0011】

他の態様では、本明細書には、本明細書に開示されるAAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオン、及びそのようなrAAVビリオンを含む医薬組成物が提供される。

【0012】

他の態様では、本明細書には、本明細書に開示されるAAV VP2融合ポリペプチド

10

20

30

40

50

をコードする核酸構築物のライブラリー、及びそのようなライブラリーを用いて所望の特徴を有する AAV VP2 融合ポリペプチドを作製する方法が提供される。

【0013】

他の態様では、本明細書には、本明細書に開示される AAV VP2 融合ポリペプチドを含む rAAV ビリオン及びそのような rAAV ビリオンを含む医薬組成物を使用する治療方法が提供される。

【0014】

別の態様では、本明細書には、AAV VP2 カプシドポリペプチドが提供され、a) AAV VP2 カプシドポリペプチドは、AAV 血清型 AAV1 のものであり、配列番号 7 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及び P191N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2 カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、T162R、及び／若しくは P191N を含むか、又は b) AAV VP2 カプシドポリペプチドは、AAV1 以外の AAV 血清型のものであり、配列番号 7 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及び P191N からなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも 1 つに対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み、特に、b i) AAV VP2 カプシドポリペプチドは、AAV 血清型 8 のものであり、配列番号 4 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R、及び P192N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2 カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D214A、K163R 及び／若しくは P192N を含むか、又は b i i) AAV VP2 カプシドポリペプチドは、AAV 血清型 9 のものであり、配列番号 5 の VP1 アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R 及び P191N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2 カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、S162R 及び／又は P191N を含む。

【発明を実施するための形態】

【0015】

定義

明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上明確に別段の指示がない限り、複数の参照を含む。例えば、「1 つの (a) 細胞」という用語は、それらの混合物を含む複数の細胞を含む。

【0016】

全ての数値表記、例えば、pH、温度、時間、濃度及び分子量は、範囲を含め、0.1 の増分ずつ (+) 又は (-) に変動する近似値である。必ずしも明記されているとは限らないが、全ての数値表記には、用語「約」が前に付くことが理解されるべきである。数値 X に関して用語「約」は、例えば $X \pm 15\%$ を (その範囲内にある全ての値を含めて) 意味する。また、必ずしも明記されているとは限らないが、本明細書に記載される試薬は単に例であり、それと同等の試薬が当技術分野で公知であることも理解されるべきである。

【0017】

本明細書及び以下の特許請求の範囲全体を通じて、文脈上特に必須でない限り、語句「～を含む (comprise)」、並びに「～を含む (comprises)」及び「～を含んでいる (comprising)」などの変化形は、特に注記しない限り、本明細書ではそのオープンエンド形式の非限定的な意味で使用される。

【0018】

本明細書で使用されるとき、「～からなる (consisting of)」は、態様、実施形態及び／又はクレーム要素に特定されていないいかなる要素、ステップ、又は成分も除外する。本明細書で使用されるとき、「～から本質的になる (consistin

10

20

30

40

50

g e s s e n t i a l l y o f)」は、態様、実施形態及び／又はクレームの基本的な新規の特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又はステップを除外しない。

【0019】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、互換的に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基からなる化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、典型的には、少なくとも2つのアミノ酸又はアミノ酸バリエーションを含み、タンパク質又はペプチド配列に含まれ得るアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸又はバリエーションを含む任意のペプチド又はタンパク質を包含する。この用語は、中でも、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同のポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは、天然ペプチド、組換えペプチド、又はそれらの組み合わせを含む。

10

【0020】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。これらは、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドの1つ以上を含み得る。従って、この用語は、限定されないが、一本鎖、二本鎖、若しくは多本鎖のデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、或いはプリン塩基及びピリミジン塩基、又は他の天然、化学的若しくは生化学的に修飾された、非天然、若しくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含むポリマー、例えば、参照核酸と類似の結合特性を有し、且つ天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で代謝される天然ヌクレオチドの類似体、ロック核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)を包含する。別に指示のない限り、特定の核酸配列は、暗黙に、その保存的に修飾されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補的配列、並びに明示的に示される配列も包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(又は全ての)コドンの3位が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって達成され得る(Batzner et al. Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); 及びRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。

20

30

【0021】

「配列同一性」及び「配列相同性」という用語は、本明細書では互換的に使用され、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに関連して使用される場合、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの2つの配列を比較又は整列させたときに、同じ相対位置にある塩基又はアミノ酸のパーセンテージを指す。従って、2つの分子の両方のサブユニット位置が同じ単量体サブユニットによって占有される場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンによって占有される場合、それらは、その位置で相同又は同一である。2つの配列間の相同性は、一致又は相同位置の数の直接関数であり、例えば、2つの配列中の位置の半分(例えば、長さが10サブユニットのポリマー中の5つの位置)が相同である場合、2つの配列は50%相同であり；位置の90%(例えば、10のうちの9)が一致又は相同である場合、2つの配列は、90%相同である。配列同一性は、いくつかの異なる方法で決定することができる。例えば、「配列同一性」のパーセンテージは、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定することができ、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列の断片は、2つの配列の最適な整列のための参照配列(付加又は欠失を含まない)と比較して、付加又は欠失(例えば、ギャップ又はオーバーハング)を含み得る。パーセンテージは、両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を取得し、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、結果に100を掛けて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算され得る。出力は、照会配列に関する対象配列のパーセント同一性である。配列は、様々な方法及びコンピュータプログラムを用いて整列させることができる(例えば

40

50

、BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFTなど）。例えば、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215:403-10を参照されたい。

【0022】

本明細書において、例えば、核酸、ポリペプチド、細胞、又は生物に適用される場合に使用される用語「天然に存在する」又は「修飾されていない（非修飾）」は、自然界に存在するものである。例えば、生物（ウイルスなど）に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、その生物に存在するか、又はその生物の1つ以上の構成要素から単離されるかにかかわらず、天然に存在する。

【0023】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドに関する「バリエーション」という用語は、非バリエーションポリヌクレオチド又はポリペプチド配列とも呼ばれる親ポリヌクレオチド又はポリペプチドと少なくとも1つの残基、即ちポリヌクレオチドの場合は少なくとも1つのヌクレオチド、ポリペプチドの場合は少なくとも1つのアミノ酸が異なるポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。

【0024】

本明細書で論じられる核酸、ポリペプチド又はウイルスに関する「単離された」という用語は、その天然環境において通常それに付随して見出される1つ以上の成分から分離された核酸、ポリペプチド又はウイルスを指す。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸又はペプチドは、「単離されていない」が、その天然の状態の共存物質から部分的若しくは完全に分離された同じ核酸又はペプチドは、「単離されている」。分離は、より大きな核酸から（例えば、遺伝子や染色体から）、或いは核酸又はタンパク質と通常接触している他のタンパク質若しくは分子からの除去を含み得る。この用語は、完全な分離を包含するが、それを必要とするわけではない。従って、単離された核酸又はタンパク質は、実質的に精製された形態で存在してもよいし、又は例えば、宿主細胞などの非天然環境に存在してもよい。

【0025】

本明細書で使用される場合、「異種核酸配列」を含む単離された核酸は、天然の状況において単離核酸の1つ以上の他の成分に作動可能に連結された状態で存在しない部分（即ち、異種核酸部分）を含む単離核酸を指す。例えば、異種核酸は、単離核酸の他の成分（例えば、プロモーター）が天然に由来するか、又は単離核酸の他の成分（例えば、プロモーター）が細胞、細菌細胞、ウイルス、若しくは生物において異種核酸と作動可能に連結された状態で存在しない、細胞、細菌細胞、ウイルス、若しくは生物において本来天然に存在しない核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、異種核酸は、導入遺伝子を含む。本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」とは、核酸分子の1つ以上の構成要素に本来結合していない目的の分子（例えば、治療用タンパク質、治療用RNA分子、又はレポータータンパク質）をコードする核酸配列である。いくつかの実施形態では、異種核酸配列は、ヒトタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、異種核酸配列は、RNA配列、例えば、shRNAをコードする。

【0026】

本明細書で使用される場合、「レポーター配列」という用語は、蛍光タンパク質又は酸化酵素などのレポータータンパク質をコードする核酸配列を指し、これにより、そのようなレポーター配列を含むrAAVベクターによる感染を可視化すること、即ち、レポータータンパク質の発現に基づいて標的細胞又は標的組織の形質導入の成功をモニターすることが可能になる。好ましい酸化酵素は、ホタルルシフェラーゼであり；例示的な蛍光タンパク質としては、GFP及びそのバリエーション、例えば、eGFP、及びsfCherryが挙げられる。レポーター配列は、治療用導入遺伝子若しくは本明細書に開示されるAAV-VP2融合ポリペプチドをコードする核酸に加えて、又はそれに代わって、rAAVビリオンにパッケージングすることができる。

【0027】

「バーコード配列」という用語は、本明細書で使用される場合、それが組み込まれる核酸配列を同定する手段として用いられる、特定の配列を有するユニークなオリゴヌクレオチド配列（例えば、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、50、75、100ヌクレオチド）を指す。例えば、バーコードは、ライブラリー中の個々のメンバー（例えば、バリエーション）を識別又は同定する手段として使用することができる。

【0028】

特定のRNAを「コードする」DNA配列又はDNAポリヌクレオチド配列は、RNAに転写可能なDNA配である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるRNA（mRNA）をコードすることもできるし、或いはDNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA（例えば、tRNA、rRNA、若しくはガイドRNA；「ノンコーディング」RNA又は「ncRNA」とも呼ばれる）をコードすることもできる。DNA配列又はDNAポリヌクレオチド配列はさらに、特定のポリペプチド又はタンパク質配列を「コード」することもでき、この場合、例えば、DNAは、ポリペプチド又はタンパク質配列に翻訳され得るmRNAを直接コードする。「タンパク質コード配列」又は特定のタンパク質若しくはポリペプチドをコードする配列は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、インビトロ又はインビボでmRNAに転写され（DNAの場合）、ポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）ことが可能な核酸配列である。コード配列の境界は、5'末端（N末端）の開始コドン及び3'末端（C末端）の翻訳停止ナンセンスコドンによって決定され得る。コード配列は、原核生物又は真核生物のmRNAからのcDNA、原核生物又は真核生物のDNAからのゲノムDNA配列、及び合成核酸を含み得るが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、コード配列の3'に位置する。

【0029】

本明細書で使用される用語「プロモーター」又は「プロモーター配列」は、例えば、RNAポリメラーゼに結合することによって、作動可能に連結されたコード配列又はノンコーディング配列、例えば、下流（3'方向）のコード配列又はノンコーディング配列の転写を促進することができる（例えば、検出可能なレベルの転写を引き起こすことができる、及び／又は検出可能なレベルの転写を、プロモーターの非存在下で得られるレベルよりも増大させることができる）DNA調節配列である。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、転写開始部位によりその3'末端で結合され、上流（5'方向）に伸長して、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで転写を開始するための最小数の塩基又はエレメントを含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、転写開始部位、並びにRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメインを含み得る。転写を開始するのに十分な配列に加えて、プロモーターは、転写の調節に関与する他の調節エレメントの配列（例えば、エンハンサー、コザック（Kozak）配列及びイントロン）も含み得る。誘導性プロモーター及び構成的プロモーターをはじめとする様々なプロモーターを用いて、本明細書に開示されるベクターからの発現を駆動することができる。いくつかの実施形態、例えば、本明細書中に開示される核酸分子及びベクターにおいて使用され得る、当技術分野で公知のプロモーターの例としては、CMVプロモーター、173CMVプロモーター、HCMVプロモーター、CBhプロモーター、CAGプロモーター、mCCTプロモーター、CBAプロモーター、smCBAプロモーター、及び免疫グロブリン遺伝子、SV40、又は他の組織特異的遺伝子（例えば、RLBP1、RPE、VMD2）に由来するプロモーターが挙げられる。さらに、既知の調節エレメントを混合してマッチングすることにより機能性プロモーターを作製するための標準的な技術も当技術分野で知られている。プロモーターの断片、例えば、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで転写を開始するのに少なくとも最小限の数の塩基又はエレメントを保持する断片を使用してもよい。

【0030】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的に活性なプロモーター（即ち、任意の細胞型において、及び／又は任意の条件下で、発現を構成的に駆動するプロモーター）であってよい。他の実施形態では、プロモーターは、特定の組織環境、例えば、ニューロ

ン、心臓細胞などにおいて構成的に活性なプロモーターであり得る。他の実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーター（即ち、その活性が、外部刺激、例えば、特定の温度、化合物、又はタンパク質の存在によって制御されるプロモーター）であってよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーターが見出される物理的状況に依存して活性の駆動が可能又は不可能になる、空間的に制限されたプロモーターであってもよい。空間的に制限されたプロモーターの非限定的な例としては、組織特異的プロモーター、細胞型特異的プロモーターなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、プロモーターが見出される時間的状況に依存して発現を駆動する、時間的に制限されたプロモーターであってもよい。例えば、時間的に制限されたプロモーターは、胚発生の特定の段階においてのみ、又は生物学的プロセスの特定の段階においてのみ発現を駆動し得る。時間的に制限されたプロモーターの非限定的な例としては、マウスの毛包周期プロモーターがある。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、多細胞生物において、プロモーターが特定の細胞のサブセットでのみ発現を駆動するような組織特異的である。例えば、組織特異的プロモーターとしては、神経細胞特異的プロモーター、脂肪細胞特異的プロモーター、心筋細胞特異的プロモーター、平滑筋特異的プロモーター、光受容体特異的プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。神経細胞特異的プロモーターとは、例えば、末梢投与、中枢神経系（CNS）への直接投与、又はインビトロ、エクスピボ、若しくはインビボなどでの神経細胞への送達の際に、非神経細胞における発現と比較して、作動可能に連結された異種核酸、例えば目的のタンパク質若しくはペプチド又はshRNAをコードする核酸の神経細胞における発現を優先的に駆動又は制御するプロモーターを指す。

20

【0032】

「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上のポリヌクレオチド（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、この用語は、転写調節配列と、転写される配列との機能的関係を指す。例えば、プロモーター又はエンハンサー配列は、適切な宿主細胞又は他の発現系においてコード配列の転写を刺激又は調節する場合、コード配列と作動可能に連結している。一般に、ある配列に作動可能に連結されたプロモーター転写調節配列は、その配列に対して連続的であるか、又は短いスペーサー配列で隔てられており、即ち、それらはシス作用性である。しかし、エンハンサーのようないくつかの転写調節配列は、その転写を増強するコード配列と物理的に連続するか、又はそれと近接して位置する必要はない。

30

【0033】

本明細書において互換的に使用される「DNA調節配列」、「制御エレメント」、及び「調節エレメント」という用語は、ノンコーディング配列（例えば、ショートヘアピンRNA）若しくはコード配列（例えば、導入遺伝子）の転写を賦与及び／又は調節し、且つ／又はコードされたポリペプチドの翻訳を調節する、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナルなどの転写及び翻訳制御配列を指す。

【0034】

「ポリアデニル化（polyA）シグナル配列」及び「ポリアデニル化配列」という用語は、転写終結及びRNA転写物の3'末端へのアデノシンホモポリマー鎖の付加のためのシグナルを賦与する調節エレメントを指す。ポリアデニル化シグナルは、終結シグナル（例えば、AAUAAA配列又は他の非正規配列）、及び任意選択で隣接する補助エレメント（例えば、GUリッチエレメント）並びに／又は効率的な切断及びポリアデニル化に関連する他のエレメントを含み得る。ポリアデニル化配列は、mRNAの3'末端にポリアデニル化によって結合した一連のアデノシンから構成され得る。例示的なポリAシグナル配列は、BGH及びSV40ポリAシグナル配列である。いくつかの実施形態では、DNA調節配列又は制御エレメントは、組織特異的調節配列である。

40

【0035】

50

「転写後調節エレメント」（「PRE」）という用語は、mRNAに転写されると、mRNA転写物のレベルで遺伝子発現を調節する1つ以上の調節エレメントを指す。このような転写後調節エレメントの例としては、マイクロRNA結合部位、RNA結合タンパク質結合部位などをコードする配列が挙げられる。本明細書に開示される核酸分子及びベクターと共に使用され得る転写後調節エレメントの例としては、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメント（WPRE）、及び肝炎転写後調節エレメント（HPRE）が挙げられる。

【0036】

「イントロン」という用語は、核酸から発現されるポリペプチド転写物（例えば、目的のタンパク質）の1つ以上のアミノ酸に対してノンコーディングである核酸配列、例えば、オープンリーディングフレーム内のものを指す。イントロン配列は、DNAからRNAに転写され得る（即ち、pre-mRNA中に存在し得る）が、タンパク質が成熟mRNAから発現される前に、例えば、スプライシングによって除去され得る。

【0037】

「エキソン」という用語は、核酸から発現される転写物（例えば、目的のタンパク質）の1つ以上のアミノ酸をコードする核酸配列、例えば、オープンリーディングフレーム（ORF）内のものを指す。エキソン配列は、DNAからRNAに転写され得る（即ち、pre-mRNA中に存在し得る）し、ポリペプチドに翻訳される成熟mRNA（即ち、RNAのプロセッシングされた形態（例えば、スプライシング後））中にも存在し得る。

【0038】

いくつかの実施形態では、「ベクター」は、宿主細胞で発現可能な目的の核酸（例えば、導入遺伝子）、例えば、細胞、組織、及び／又は生物への送達に適したより大きな核酸配列若しくは構造内の目的の核酸を含有する任意の遺伝的要素（例えば、DNA、RNA、又はそれらの混合物）、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ビリオンなどである。例えば、ベクターは、インサート（例えば、発現しようとする遺伝子又はその遺伝子のオープンリーディングフレームをコードする導入遺伝子を含む異種核酸）と、上記インサートの送達又は発現の制御に適した1つ以上の追加要素を含み得る。ベクターは、例えば、適切な制御エレメントと関連する場合、複製及び／又は発現が可能であってもよいし、細胞間で遺伝情報を伝達することが可能であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、宿主細胞における発現に適したベクター、例えば、AAVベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えば、細胞又はバイオリクター中での発現及び／又は複製に適したプラスミドであってもよい。いくつかの実施形態では、標的細胞における異種核酸配列、例えば、目的のタンパク質をコードする導入遺伝子、shRNAなどの発現のために特別に設計されたベクターは、発現ベクターと呼ばれることがあり、これは、一般に、導入遺伝子の発現を駆動するプロモーター配列を有する。他の実施形態では、ベクター、例えば、転写ベクターは、転写は可能であるが、翻訳されない、つまり、標的細胞内でそれらを複製することはできるが、発現することはできない。転写ベクターを用いて、そのインサートを増幅することができる。

【0039】

「発現ベクター」という用語は、発現しようとするヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現制御配列を含むポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、単独で、又は宿主細胞により、若しくはインビトロ発現系において供給される発現のための他の要素と組み合わせて、発現のために十分なシス作用エレメントを含み得る。発現ベクターとしては、例えば、組換えポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド（例えば、ネイキッド又はリボソーム中に含有される）並びにウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。

【0040】

「プラスミド」という用語は、当該プラスミドが宿主細胞内で複製されるような、インタクトな「レプリコン」を含む非染色体（通常は二本鎖）DNA配列を指す。プラスミド

10

20

30

40

50

は、環状核酸であってもよい。プラスミドが単細胞生物内に配置されると、プラスミドのDNAの結果としてその生物の特徴が変化するか、又は形質転換される。例えば、テトラサイクリン耐性（TcR）の遺伝子を担持するプラスミドは、以前はテトラサイクリンに感受性であった細胞を、それに対して耐性の細胞に形質転換する。

【0041】

本明細書で使用される「組換えウイルス」という用語は、導入遺伝子又は他の異種核酸を含む、非野生型及び／又は人工的に生産された組換えウイルス（例えば、パルボウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス又はアデノ随伴ウイルスなど）を指すことが意図される。組換えウイルスは、ウイルス（例えばAAV）カプシド内にパッケージングされた組換えウイルスベクター（例えば導入遺伝子を含む）を含み得る。特定のタイプの組換えウイルスは、「組換えアデノ随伴ウイルス」、又は「rAAV」であってもよい。ウイルスカプシドにパッケージングされた組換えウイルスゲノムは、ウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組換えウイルスは、ウイルスベクター（例えば、例えば、本明細書に記載されるような、目的の導入遺伝子を含む）を含む。ウイルスベクターの例としては、限定されないが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、キメラAAVベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、DNAウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、又はそれらのバリエーション若しくは誘導体が挙げられる。

10

【0042】

「AAV」は、アデノ随伴ウイルスの略語であり、ウイルス自体又はその誘導体を指すために使用され得る。この用語は、明示的に別段の記載がある場合を除き、全てのサブタイプ、並びに天然型と組換え型の両方を包含する。用語「rAAV」は、組換えアデノ随伴ウイルス又は組換えAAVベクターを指す。

20

【0043】

本明細書で使用される場合、「AAVベクター」という用語は、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクター、又はそれに由来する1つ以上の核酸配列を含むベクターを指し、限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシAAV又はトリAAV.5ウイルスベクターを含む。AAVベクターは、例えば、機能性フランキング逆方向末端反復（「ITR」）配列を保持しながら、その全部若しくは一部において、例えばrep及び／又はcap遺伝子が欠失したAAV野生型遺伝子の1つ若しくは複数を含み得る。一部の実施形態では、AAVベクターは、例えば、1つ以上のAAVカプシドタンパク質を含むタンパク質シェル、即ち「カプシド」にパッケージングされてもよく、これにより、標的細胞の核にベクター核酸を送達するためのビヒクルが提供され得る。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、1つ以上のAAV ITR配列（例えば、AAV2 ITR配列）を含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、1つ以上のAAV ITR配列（例えば、AAV2 ITR配列）を含むが、追加のウイルス核酸配列は一切含まない。いくつかの実施形態では、AAVベクター構成要素（例えば、ITR）は、rAAVカプシドとは異なる血清型ウイルスに由来する（例えば、AAVベクターは、AAV2に由来するITRを含んでもよいし、AAVベクターをAAV9カプシドにパッケージングしてもよい）。これらのベクター構築物の実施形態は、例えば、国際公開第2019/094253号パンフレット（PCT/US2018/058744号明細書）に記載されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

30

40

【0044】

rAAVベクターは、一本鎖AAVベクター及び自己相補性AAVベクター（scAAV）を含む。scAAVのベクターの少なくとも一部（例えば、コード領域の少なくとも一部）が分子内二本鎖DNAを形成することから、scAAVは「自己相補性」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、rAAVは、scAAVである。他の実施形態では、rAAVは、一本鎖AAVである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、遺伝子治

50

療に使用するための s c A A V を賦与するように、天然に存在するアデノ随伴ウイルス (A A V) から操作される。これらのベクター構築物の実施形態並びにそれらを調製及び精製する方法は、例えば、国際公開第 2 0 1 9 / 0 9 4 2 5 3 号パンフレット (P C T / U S 2 0 1 8 / 0 5 8 7 4 4 号明細書) に提供されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0045】

本明細書で使用される場合、「ウイルス」又は「ビリオン」は、例えば、単独で、又は 1 つ以上のウイルスカプシドなどの 1 つ以上の追加の構成要素と組み合わせて、ウイルスベクターを含むウイルス粒子を示す。例えば、A A V ウイルスは、例えば、A A V カプシドタンパク質膜と結合した線状、一本鎖 A A V 核酸ゲノムを含む。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、「ウイルス」、「ビリオン」、「A A V ウイルス」、「組換え A A V ビリオン」、「r A A V ビリオン」、「A A V ベクター粒子」、「フル (f u l l) カプシド」、「フル (f u l l) 粒子」などの用語は、感染性の、複製欠損ウイルス、例えば、A A V I T R によって片側又は両側が隣接されるウイルスベクター中に、目的の異種ヌクレオチド配列をカプセル化した A A V タンパク質シェルを含むものを指す。r A A V ビリオンは、A A V ベクターを規定する配列、例えば、1 つ以上のプラスミドを、単独で又は A A V ヘルパー機能及びアクセサリ機能 (r e p 遺伝子及び c a p 遺伝子など) をコードする核酸と組み合わせて、例えば同じプラスミド上又は追加のプラスミド上に含む、好適な宿主細胞中で産生され得る。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、A A V ベクター (目的の組換えヌクレオチド配列を含む) の、後の遺伝子送達のための感染性組換えビリオン粒子へのパッケージングを達成する A A V ポリペプチドをコードすることができるようになる。

20

【0047】

「パッケージング」とは、核酸配列を包膜する A A V ビリオン又は A A V 粒子のアセンブリをもたらす一連の細胞内事象を指す。パッケージングは、本明細書に開示される A A V V P 2 融合ポリペプチドを含むカプシドへの核酸配列の包膜を意味し得る。

【0048】

「感染性」ビリオン、ウイルス又はウイルス粒子は、ウイルス種に対して向性の細胞に送達可能なポリヌクレオチド成分を含むものである。この用語は、ウイルスの複製能力に関するあらゆる結論を必ずしも許容するわけではない。本明細書で使用される場合、「感染性」ウイルス又はウイルス粒子とは、標的細胞に接近したとき、標的細胞に感染することができ、標的細胞に異種核酸を発現することができるものである。従って、「感染力」とは、ウイルス粒子が標的細胞に接近し、標的細胞に感染し、標的細胞で異種核酸を発現する能力を指す。感染力は、インビトロ感染力又はインビボ感染力を指す。感染性ウイルス粒子をカウントするためのアッセイは、当技術分野で公知である。ウイルス感染力は、総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。総ウイルス粒子は、ウイルスゲノムコピー数として表すことができる。ウイルス粒子が細胞内で異種核酸を発現する能力は、「形質転換」と呼ぶことができる。ウイルス粒子が細胞内で異種核酸を発現する能力は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) アッセイ (例えば、ここで、ウイルスは G F P をコードするヌクレオチド配列を含み、G F P はウイルス粒子に感染した細胞で産生され、検出及び／又は測定される) などのマーカー遺伝子の評価を含め、いくつかの技術を用いて；或いは、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 又は蛍光活性化細胞選別 (F A C S) による産生タンパク質の測定によって検定することができる。

30

40

【0049】

「複製コンピテント」ビリオン又はウイルス (例えば、複製コンピテント A A V) とは、感染細胞内で (即ち、ヘルパーウイルス又はヘルパーウイルス機能の存在下で) 複製可能な感染性ウイルスを指す。A A V の場合、複製能力は一般に、機能性 A A V パッケージング遺伝子、即ち、c a p 遺伝子及び r e p 遺伝子の存在を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、A A V ベクターは、1 つ以上の A A V パッケー

50

ジング遺伝子が欠如しており、哺乳動物細胞（ヒト細胞など）において複製不能である。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、あらゆるAAVパッケージング遺伝子配列が欠如しており、AAVパッケージング遺伝子と入来AAVベクター同士の組換えによって複製コンピテントAAVを生成する可能性を最小限にする。

【0050】

「逆方向末端反復」又は「ITR」という用語は、例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）及び／又は組換えアデノ随伴ウイルスベクター（rAAV）において、T字型の回文構造を形成しうるヌクレオチド配列の区間を指す。Muzyczka et al., (2001) Fields Virology, Chapter 29, Lippincott Williams & Wilkins。組換えAAVベクターにおいて、これらの配列は、ゲノムパッケージング及び第2鎖合成において機能的役割を果たし得る。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、変異又は短縮された1つ以上のITRを含む。

10

【0051】

「cap遺伝子」又は「カプシド遺伝子」という用語は、ウイルスのカプシド、即ち、タンパク質シェルを形成する、又はその形成に寄与するカプシドタンパク質をコードする核酸配列を指す。AAVの場合、カプシドタンパク質は、典型的に、VP1、VP2、及びVP3である。他のパルボウイルスの場合、カプシドタンパク質の名称及び番号は異なり得る。本明細書で使用される用語「AAV VP1カプシドポリペプチド」、「AAV VP2カプシドポリペプチド」及び「AAV VP3カプシドポリペプチド」には、野生型AAVカプシドポリペプチド、並びにそのバリエーション及び断片、特に機能性バリエーション及び断片が含まれる。機能性AAVカプシドポリペプチドのバリエーション及び断片は、AAVカプシドのアセンブリに使用することができる。

20

【0052】

「rep遺伝子」は、AAVの複製及び産生に必要な非構造タンパク質（rep78、rep68、rep52及びrep40）をコードする核酸配列を指す。

【0053】

用語「AAVヘルパー機能」は、AAV遺伝子産物、例えば、生産性AAV複製のためにトランスで機能するものを提供するために発現され得るAAV由来のコード配列を指す。例えば、AAVヘルパー機能は、主要なAAVオープンリーディングフレーム（ORF）であるrepとcapの両方を含み得る。rep発現産物は、中でも、以下：DNA複製のAAV起点の認識、結合及びニッキング；DNAヘリカーゼ活性；並びにAAV（又は他の異種）プロモーターからの転写の調節など、多くの機能を有することが証明されている。Cap発現産物は、必要なパッケージング機能を提供する。AAVヘルパー機能を使用して、AAVベクターに欠けているトランスでのAAV機能を補完することができる。

30

【0054】

「AAVヘルパー構築物」という用語は、一般に、AAVベクター、例えば、標的細胞又は組織に目的のヌクレオチド配列を送達するためのベクターから欠失したAAV機能を賦与するタンパク質又は核酸を提供若しくはコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を指す。AAVヘルパー構築物は、AAV複製のために欠落しているAAV機能を補完するために、AAV rep及び／又はcap遺伝子の一過性発現をもたらすために一般に使用される。典型的には、ヘルパー構築物は、AAV ITRを欠いているため、複製又はパッケージングのいずれもそれ自体ですることができない。AAVヘルパー構築物は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、又はビリオンの形態であり得る。いくつかのAAVヘルパー構築物が開示されており、例えば、Rep及びCap発現産物の両方をコードする、一般に使用されているプラスミドpAAV/Ad及びpLM29+45などがある。例えば、以下を参照されたい：Samulski et al., (1989) J. Virol., 63:3822-3828; McCarty et al., (1991) J. Virol., 65:2936-2945。Rep及び／又は

40

50

C a p 発現産物をコードする他のベクターがいくつか開示されている。例えば、米国特許第 5, 139, 941 号明細書及び同第 6, 376, 237 号明細書を参照されたい。これらのベクター構築物の実施形態並びにそれらを調製及び精製する方法は、例えば、国際公開第 2019/094253 号パンフレット (P C T / U S 2018/058744 号明細書) に提供されており、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0055】

A A V の「ヘルパーウイルス」は、哺乳動物細胞内での A A V の複製及びパッケージングを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス及びワクシニアなどのポックスウイルスをはじめ、A A V 用のこうした多様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 型がヘルパーウイルスとして最も一般的に使用されている。

10

【0056】

「ヘルパーウイルス機能」という用語は、哺乳動物細胞内での A A V 複製及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おいてコードされた機能を指す。ヘルパーウイルス機能は、例えば、アデノウイルスヘルパー機能を含む。このようなヘルパーウイルス機能は、ヘルパーウイルスの賦与、例えば、A A V 製造に際して必要な機能をコードする核酸配列をプロデューサー宿主細胞に賦与するなど、いくつかの方法で提供され得る。

【0057】

「向性」及び「形質導入」という用語は、相互に関連しているが、違いがある。本明細書で使用される「向性」という用語は、A A V ベクター又はビリオンが 1 つ以上の指定細胞型に感染する能力を指すが、ベクターが 1 つ以上の指定細胞型の細胞を形質導入するためにどのように機能するかも包含し得る；即ち、向性は、A A V ベクター又はビリオンの特定の細胞型若しくは組織型への優先的進入、並びに／或いは特定の細胞型若しくは組織型への進入を促進する細胞表面との優先的相互作用を指し、任意選択で、且つ好ましくはそれに、細胞内での A A V ベクター又はビリオンにより担持される配列の発現、例えば、組換えウイルスの場合、異種ヌクレオチド配列の発現が続く。本明細書で使用される場合、「形質導入」という用語は、A A V ベクター又はビリオンが、1 つ以上の特定の細胞型に感染する能力を指し；即ち、形質導入は、A A V ベクター又はビリオンの細胞内への進入、及びベクターゲノムの発現を達成するための A A V ベクター又はビリオン内に含まれる遺伝物質の細胞中への移入を指す。全ての場合ではないが、場合によっては、形質導入と向性は相関し得る。

20

【0058】

本明細書で使用される「向性プロファイル」という用語は、1 つ以上の標的細胞、組織及び／又は器官の形質導入のパターンを指す。異なる A A V 血清型は、偏向した向性プロファイルを示すため、例えば、カプシドの操作によって、向性を変えることができる。

【0059】

「宿主細胞」という用語は、目的の外来性核酸を含む細胞、例えば、1 つ以上の微生物、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞を意味する。例えば、宿主細胞は、A A V ヘルパー構築物、A A V ベクタープラスミド、アクセサリ機能ベクター、及び／又は他の転移 D N A を含んでもよい。この用語は、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、自然の、偶発的、又は意図的な変異のために、形態、又はゲノム若しくは全 D N A 補体が、必ずしも元の親細胞と完全には同一ではない場合もある。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「細胞株」という用語は、インビトロで連続的又は長期的に増殖及び分裂することができる細胞の集団を指す。特定の状況下では、このようなクローン集団の保存又は導入中に、核型に自発的变化又は誘導された変化が起こりうる。従って、細胞株に由来する細胞は、祖先の細胞又は培養物と厳密に同一ではない場合もあり、言及される細胞株にはそのようなバリエーションも含まれる。

【0061】

50

「トランスフェクション」という用語は、一旦外性DNAが細胞膜内に導入されると、外来DNAが細胞に取り込まれ、それによって細胞が「トランスフェクト」されることを指す。例えば、以下を参照されたい：Graham et al., (1973) *Virology*, 52:456; Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York; Davis et al., (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., (1981) *Gene*, 13:197。このような技術を使用して、好適な宿主細胞に1つ以上の外性DNA部位を導入することができる。いくつかの実施形態では、「形質導入」という用語は、細胞による外来DNAの取り込みを指すために使用され、この場合、外来DNAがウイルス又はウイルスベクターによって付与される。その結果、外性DNAが細胞膜内に導入されると、細胞は「形質導入」されたことになる。いくつかの実施形態では、「形質転換」という用語は、細菌細胞による外来DNAの取り込みを指すために使用される。

10

20

30

40

50

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質又はポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル、多重又は一本鎖、又は無傷の免疫グロブリンであり得、天然供給源又は組換え供給源に由来し得る。天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書では、VHと略す)及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書では、VLと略す)及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLを含む。VH及びVL領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができ、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が点在する。各VH及びVLは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシル末端に配列された3つのCDR及び4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。抗体は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、又はキメラ抗体であり得るが、これらに限定されない。抗体は、任意のアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスであり得る。本文書全体を通じて、用語「抗体」又は「抗体分子」はまた、文脈上特に指示がない限り、その任意の断片及びその任意の誘導体も含む。

【0063】

用語「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する(例えば、結合、立体障害、安定化/不安定化、空間分布によって)能力を保持する抗体の少なくとも一部を指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、VH及びCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、sdAb(VL又はVHのいずれか)などの単ドメイン抗体、ラクダVHHドメイン、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのFab断片を含む二価断片などの抗体断片から形成された多重特異性抗体、及び抗体の単離されたCDR又は他のエピトープ結合断片が含まれるが、これらに限定されない。抗原結合断片はまた、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR及びビス-scFvに組み込まれ得る(例えば、Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005を参照されたい)。抗原結合断片はまた、フィブロネクチンIII型(Fn3)のようなポリペプチドに基づ

く足場に移植され得る（フィブロネクチンポリペプチドミニボディを記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照されたい）。用語「scFv」は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片と、重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片とを含む融合タンパク質を指し、軽鎖及び重鎖可変領域は、例えば、合成リンカー、例えば、短い可撓性ポリペプチドリナーを介して連続的に連結され、一本鎖ポリペプチドとして発現することができ、scFvは、それが由来する無傷の抗体の特異性を保持する。本明細書で使用する場合、明記されていない限り、scFvは、例えば、ポリペプチドのN末端及びC末端に関して、いずれかの順序でVL及びVH可変領域を有していてもよく、scFvは、VL－リンカー－VHを含んでいてもよく、又はVH－リンカー－VLを含んでいてもよい。

10

【0064】

「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原特異性及び結合親和性を付与する抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。例えば、一般に、各重鎖可変領域（例えば、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）中に3つのCDR、及び各軽鎖可変領域（LCDR1、LCDR2、及びLCDR3）中に3つのCDRが存在する。所与のCDRの正確なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」ナンバリングスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (「Chothia」ナンバリングスキーム)、又はそれらの組合せ、及びImmunogenetics (IMGT) ナンバリング (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Lefranc et al., (2015) Nucleic Acids Res. 43, D413-422) (「IMGT」ナンバリングスキーム)を含む、多くの周知のスキームの任意のものを使用して決定され得る。所与のCDR領域（例えば、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2又はLCDR3）についてのKabatとChothiaとを組み合わせたナンバリングスキームにおいて、いくつかの実施形態では、CDRは、Chothia CDRの一部として定義されるアミノ酸残基とともに、Kabat CDRの一部として定義されるアミノ酸残基に対応する。本明細書で使用される場合、「Chothia」ナンバースキームに従って定義されるCDRは、時に「超可変ループ」とも呼ばれる。IMGT下で、抗体のCDR領域は、プログラムIMGT/DomainGap Alignを使用して決定され得る。一般に、特に示されない限り、抗体分子は、1つ以上のKabat CDR及び／又はChothia CDRの任意の組合せを含み得る。

20

30

【0065】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンに特異的に結合することができるか、又は分子と相互作用することができる任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、一般に、アミノ酸、炭水化物、又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面グループからなり、特異的な三次元構造特性、及び特異的な電荷特性を有することができる。エピトープは、「線状」又は「コンホメーション」であり得る。コンホメーション及び線状エピトープは、例えば、前者への結合が変性溶媒の存在下で失われるが後者への結合は失われないという点で区別される。

40

【0066】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」という語句は、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、又は同じ遺伝子源に由来する、抗体、二重特異性抗体などを含むポリペプチドを指す。この用語はまた、単一分子組成の抗体分子の調製物を含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。

50

【0067】

本明細書で使用する「ヒト抗体」という語句は、フレームワーク領域及びCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。定常領域も、ヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列、又はヒト生殖系列配列の変異バージョン、又は、例えば、Knappik et al., (2000. J Mol Biol 296, 57-86)に記載されるように、ヒトフレームワーク配列分析に由来するコンセンサスフレームワーク配列を含む抗体に由来する。免疫グロブリン可変ドメイン、例えばCDRの構造及び位置は、周知のナンバリングスキーム、例えば、Kabatナンバリングスキーム、Chothiaナンバリングスキーム、又はKabatとChothiaの組合せ、及びIMMUNOGENTICS (IMGT) ナンバリングを使用して規定され得る（例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U. S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; 及びAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948 and Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Lefranc et al., (2015) Nucleic Acids Res. 43, D413-422を参照されたい)。

10

20

【0068】

ヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでの無作為若しくは部位特異的変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入される変異、又は安定性若しくは製造を促進するための保存的置換）を含み得る。しかしながら、本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含むことを意図しない。

30

【0069】

本明細書で使用する「組換え抗体」という語句は、組換え手段によって調製、発現、作製又は単離された全ての抗体を含み、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニック又はトランスクロモソームである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、又はそれから調製されたハイブリドーマ、ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトマから単離された抗体、組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、及びヒト免疫グロブリン遺伝子の全部又は一部の配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体などの組換えヒト抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、フレームワーク及びCDR領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、特定の実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（又はヒトIg配列のための動物トランスジェニックが使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、従って、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及びVL配列に由来し、関連するが、インビボではヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在し得ない配列である。

40

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、単一の抗原部位における抗体と抗原と

50

の間の相互作用の強さを指す。それぞれの抗原部位において、抗体の可変領域は、多数の部位において抗原と弱い非共有結合力を介して相互作用する；相互作用が多いほど、親和性が高くなる。本明細書で使用される場合、IgG抗体又はその断片（例えば、Fab断片）についての用語「高親和性」は、標的抗原について、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、 10^{-11} M以下、 10^{-12} M以下、又は 10^{-13} M以下の親和性を有する抗体を指す。しかしながら、高親和性結合は、他の抗体アイソタイプについて変化し得る。例えば、IgMアイソタイプに対する高親和性結合は、 10^{-7} M以下、又は 10^{-8} M以下の親和性を有する抗体を指す。

【0071】

本明細書で使用される「結合特異性」又は「特異的結合」という用語は、個々の抗体結合部位が異なる抗原決定基と反応するのではなく、1つの抗原決定基と反応する能力を指す。抗体の結合部位は、分子のFab部分に位置し、重鎖及び軽鎖の超可変領域から構築される。抗体の結合親和性は、単一の抗原決定基と抗体上の単一の結合部位との間の反応の強さである。それは、抗原決定基と抗体の結合部位との間で作用する引力と斥力との合計である。

【0072】

用語「処置する」及び「処置」は、治療的処置を意味し、対象が望ましくない生理学的変化又は障害を減速することである。本発明の目的のために、有益又は所望の臨床結果は、検出可能であるか不可能であるかに関わらず、症状の軽減、疾患の程度の減少、病状の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患の進行の遅延又は緩徐化、病状の軽減又は緩和、及び寛解（部分的か完全かを問わない）を含むが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない場合の期待される生存期間と比較した生存期間の延長も意味し得る。

【0073】

任意の特定の疾患又は障害の「予防」、「予防する」及び「予防すること」という用語は、当該の疾患又は障害の任意の症状が現れる前に対象に本発明の化合物を投与するなどの、予防的（prophylactic）又は予防的（preventive）措置を指す。

【0074】

「対象」という用語は、本発明の方法による処置が提供される動物、ヒト又は非ヒトを指す。獣医学的及び非獣医学的適用が意図される。この用語には、哺乳動物、例えばヒト、他の霊長類、ブタ、齧歯類、例えばマウス及びラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジ及びヤギが含まれるが、これらに限定されない。典型的な対象には、ヒト、農場動物、並びにネコ及びイヌなどの家庭用ペットが含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【0075】

「薬学的に許容される」及び「生理学的に許容される」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、1つ以上の投与経路、インビボ送達又は接触に適した、気体、液体若しくは固体の生物学的に許容される製剤を指す。「薬学的に許容される」又は「生理学的に許容される」組成物とは、生物学的またそれ以外で不都合ではない物質であり、例えば、そうした物質は、実質的に望ましくない生物学的作用を引き起こすことなく、対象に投与され得る。従って、このような医薬組成物は、例えば、本明細書に開示のrAAVビリオンを対象に投与するのに使用することができる。

【0076】

「有効量」は、有益又は所望の結果をもたらすのに十分な量を指す。例えば、治療量は、所望の治療効果を達成する量である。この量は、疾患又は疾患症状の発症を予防するのに必要な量である予防有効量と同じであっても異なってもよい。有効量は、1回以上の投与、適用又は用量で投与することができる。治療化合物の「治療有効量」（すなわち、有効用量）は、選択された治療化合物に依存する。組成物は、1日当たり1回以上から週当たり1回以上投与することができ、一日おきを含む。当業者は、疾患又は障害の重症

10

20

30

40

50

度、以前の処置、対象の一般的な健康及び／又は年齢、並びに存在する他の疾患を含むが、これらに限定されない、特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要とされる投与量及びタイミングに影響を及ぼし得ることを認識するであろう。さらに、本明細書に記載される治療化合物の治療有効量による対象の処置は、単一の処置又は一連の処置を含むことができる。

【0077】

本明細書で使用される場合、「インビトロ」で実施されるプロセスは、通常の生物学的環境の外部で実施されるプロセス、例えば、試験管、フラスコ、ペトリ皿、人工培地中で実施される試験を指す。「インビボ」で実施されるプロセスは、生体内又は細胞内で実施されるプロセス、例えば、細胞培地又はマウスで行われる試験を指す。「エクスビボ」で実施される試験は、例えば、自然条件の改変を最小限に抑え、例えば、インビボ実験で可能となるものよりも制御された条件下で、生物の細胞又は組織の操作を可能にする、外部環境で、生物由来の組織内又は組織上で実施される試験を指す。

10

【0078】

本明細書で使用される「ライブラリー」という用語は、複数、即ち、少なくとも2つの、異なるバリエーション線状核酸、プラスミド、ウイルス粒子又はウイルスベクターなどを指す。

【0079】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は同等の方法及び材料を使用して本発明を実施することができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。全ての出版物、特許出願、特許、並びに本明細書に言及されている他の参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。矛盾がある場合、定義を含む本明細書が優先される。加えて、材料、方法、及び実施例は、あくまで例示であり、限定するものではない。

20

【0080】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の記載に示されている。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、詳細な説明及び図面並びに特許請求の範囲から明らかである。

【0081】

AAV VP2 融合ポリペプチド

本明細書には、N末端からC末端に、ポリペプチドリガンド、任意選択でペプチドリンカー、及びAAV VP2 カプシドポリペプチドを含むAAV VP2 融合ポリペプチドが提供される。前記AAV VP2 融合ポリペプチドを含み、その表面にポリペプチドリガンドを提示するrAAV ビリオンは、高い細胞型選択性及び／又は高いターゲティング特異性をもたらす、制限された生体内分布及び安全な遺伝子導入を可能にすることから、治療への適用及び基礎研究における適用時の細胞型特異的遺伝子導入に使用することができる。

30

【0082】

rAAV ビリオンアセンブリのために、典型的には、AAV VP1 及び／又はVP3 カプシドポリペプチドと一緒に使用すると、AAV VP2 融合ポリペプチドは、良好な装飾レベルを示す可能性があり、これは、満足な数のAAV VP2 融合ポリペプチドがrAAV ビリオンに組み込まれることを意味する。驚くべきことに、最大10 kDa の分子量を有するポリペプチドリガンドをAAV VP2 カプシドポリペプチドにN末端融合させることにより、良好な装飾レベルが達成され得ることが判明した。分子量が10 kDa を超えるN末端に位置するポリペプチドリガンドを含むAAV VP2 融合ポリペプチドでは、装飾レベルは低下する。分子量が15 kDa を超えるN末端に位置するポリペプチドリガンド、例えば、分子量約18 kDa 超のdarpin (darpin) などを含むAAV VP2 融合ポリペプチドは、装飾を全く示さないか、又は最小限の装飾しか示さない。理論に束縛されることは望まないが、AAV VP2 カプシドポリペプチドは、

40

50

カプシドのアセンブリに必須ではないため、嵩高いポリペプチドリガンドを含む A A V V P 2 融合ポリペプチドのような、好ましくない構造を有する A A V V P 2 カプシドポリペプチドを提供すると、A A V V P 2 カプシドポリペプチドはカプシドのアセンブリに使用されず、その結果、A A V V P 1 及び V P 3 カプシドポリペプチドのみで、又はそれらから主に構成される A A V V P 2 融合ポリペプチド装飾がないか、又は極めて少ない r A A V ビリオンが得られる可能性がある。

【0083】

本明細書に記載される A A V V P 2 融合ポリペプチドは、前記ポリペプチドリガンドに融合していないが、それ以外は A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる V P 2 カプシドポリペプチドと同一である A A V V P 2 カプシドポリペプチドと比較して、少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の改善及び／又は向性の増加を媒介することができる。少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の改善及び／又は向性の増加は、ポリペプチドリガンドによって媒介されると考えられ、ポリペプチドリガンドは、少なくとも1つの組織又は細胞型に発現する細胞表面分子に結合する能力を有し得る。10 k D a 未満の分子量を有する好適なポリペプチドリガンドとしては、限定されないが、G P 2 及び S s o 7 d リガンド並びにアフィボディが挙げられる。

10

【0084】

本発明は、一部には、高度に多様なポリペプチドリガンドライブラリー、例えば、高度に多様な S s o 7 d ライブラリーを、これらのライブラリーを A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合させることによって、r A A V ビリオンに組み込むことに基づく。カプシド内に A A V V P 2 融合ポリペプチドを含み、且つ前記カプシド内に封入された A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸を含有する複数の r A A V ビリオンを含む A A V ライブラリーを作製した。この A A V ライブラリーは、高い多様性と機能的力価を有し、所望の特徴を備える A A V V P 2 融合ポリペプチドのインビボ選択に使用することができる。本明細書には、特定の細胞型の高い形質導入を有する A A V カプシドを濃縮するインビボ選択によって得られる A A V V P 2 融合ポリペプチドが提供される。

20

【0085】

本明細書で提供される A A V V P 2 融合ポリペプチドは、組換え A A V ベクターの作製に使用することができる。このような組換え A A V ベクターは、治療用導入遺伝子などの異種核酸を標的細胞中に送達するのに適している。

30

【0086】

従って、一態様において、A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むアデノ随伴ウイルス (A A V) V P 2 融合ポリペプチドが本明細書に提供される。ポリペプチドリガンドは、直接又はリンカーを介したいずれかで、A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合される。ポリペプチドリガンドは、最大 9 k D a、最大 8 k D a、最大 6 k D a、又は最大 5 k D a など、最大 10 k D a、例えば 3 ~ 10 k D a、4 ~ 8 k D a、又は 5 ~ 7 k D a の分子量を有する。

【0087】

一態様において、A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む A A V V P 2 融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドが、A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合しており；A A V V P 2 カプシドポリペプチドが、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) 及び／又はシアル酸 (S I A) への結合を消失又は減少させる1つ以上の変異を含む、A A V V P 2 融合ポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリガンドは、最大 10 k D a の分子量を有する。

40

【0088】

「A A V」は、アデノ随伴ウイルスの略語であり、ウイルス自体又はその誘導体を指すために使用され得る。この用語は別の解釈が要求される場合を除き、全てサブタイプ、並びに天然及び組換え型の両方を包含する。用語「A A V」は、例えば、A A V 1 型 (A A

50

V1)、AAV2型(AAV2)、AAV3型(AAV3)、AAV4型(AAV4)、AAV5型(AAV5)、AAV6型(AAV6)、AAV7型(AAV7)、AAV8型(AAV8)、AAV9型(AAV9)、AAV10型(AAV10、AAVrh10を含む)、AAV12型(AAV12)、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVを含む。「霊長類AAV」は、霊長類に感染するAAVを指し、「非霊長類AAV」は、霊長類以外の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を指し、その他も同様である。

【0089】

AAVの様々な血清型のゲノム配列、並びにネイティブ逆方向末端リピート(ITR)、Repタンパク質、及びカプシドサブユニットの配列は、当技術分野において公知である。このような配列は、文献又はGenBankのような公開データベースに見出すことができる。例えば、以下を参照のこと：GenBankアクセッション番号：NC-002077(AAV1)、AF063497(AAV1)、NC-001401(AAV2)、AF043303(AAV2)、NC-001729(AAV3)、NC-001829(AAV4)、U89790(AAV4)、NC-006152(AAV5)、AF513851(AAV7)、AF513852(AAV8)、及びNC-006261(AAV8)；又は国際公開第2005033321号パンフレット(AAV1-9)などの刊行物、これらの開示内容は、参照により本明細書に援用される。さらに、例えば、以下の文献も参照されたい：Srivistava et al. (1983) J. Virology 45:555；Chiorini et al. (1998) J. Virology 71:6823；Chiorini et al. (1999) J. Virology 73:1309；Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73:939；Xiao et al. (1999) J. Virol 73:3994；Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208；Shade et al., (1986) J. Virol. 58:921；Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854；Moris et al. (2004) Virology 33:375-383；国際公開第00/28061号パンフレット、同第99/61601号パンフレット、同第98/11244号パンフレット；及び米国特許第6,156,303号明細書。

【0090】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、少なくとも1つの組織又は細胞型に発現する細胞表面分子に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、前記AAV VP2融合ポリペプチドは、前記ポリペプチドリガンドを含まないが、それ以外はAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるVP2カプシドポリペプチドと同一であるAAV VP2カプシドポリペプチドと比較して、少なくとも1つの組織若しくは細胞型における形質導入の増加及び／又は向性誘導の増加を媒介する。

【0091】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの組織又は細胞型の形質導入は、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%又は1000%増加する。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、前記ポリペプチドリガンドを含まないが、それ以外はAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるVP2カプシドポリペプチドと同一であるAAV VP2カプシドポリペプチドと比較して、少なくとも1つの組織又は細胞型における少なくとも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30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、若しくは1000倍超の形質導入増加を媒介する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの組織又は細胞型における向性は、約10%、20%、30%、40

%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%若しくは1000%増加する。

【0092】

いくつかの実施形態では、前記AAV VP2融合ポリペプチドは、全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、若しくは骨髄、又は多能性前駆細胞(MPP)、例えば多能性造血前駆細胞、若しくは造血幹細胞(HSC)、例えば長期造血幹細胞(LT-HSC)の形質導入の増加、及び／又は向性細胞の増加を媒介する。

【0093】

一態様において、本明細書には、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むAAV VP2融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドが、直接又はリンカーを介して、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合され、これは、GP2ポリペプチド、Sso7dポリペプチド及びアフィボディからなる群から選択される、AAV VP2融合ポリペプチドが提供される。

【0094】

本明細書で使用される「GP2ポリペプチド」という用語は、45残基のT7ファージ遺伝子2タンパク質(Gp2)に由来するポリペプチドスカフォールドを指す。このポリペプチドは、変異に適した2つの隣接ループを有するβシートと向き合うαヘリックスを含む。このスカフォールドの突然変異誘発により、高親和性の標的特異的バインダーを得ることができる。

【0095】

本明細書で使用される「Sso7dポリペプチド」という用語は、超好熱古細菌スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)からのSso7dタンパク質由来のポリペプチドを指す。このタンパク質は、そのサイズが小さく(7kDa)、熱安定性が高く(98℃のTm)、しかもシステイン及びグリコシル化部位がないことから、魅力的な結合スカフォールドである。いくつかの実施形態では、Sso7dポリペプチドは、S.ソルファタリカス(*S. solfataricus*) Sso7dタンパク質の電荷中和バリエーション、特にTraxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314)に記載されている電荷減少Sso7d(rcSso7d)バリエーションに由来する。本明細書で使用される場合、Sso7dポリペプチドはまた、野生型Sso7d又はTraxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314)に記載されたrcSso7dバリエーションと少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%の配列同一性を全長にわたって有するポリペプチドも包含する。

【0096】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、配列番号1のSso7dポリペプチド、及びそれと少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有するSso7dポリペプチドからなる群より選択される。

【0097】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、任意選択で、最大10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1のアミノ酸置換を有する配列番号1のSso7dポリペプチドから選択される。

【0098】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、配列番号1のSso7dポリペプチド(ここで、21位、23位、25位、28位、30位、32位、40位、42位及び44位のアミノ酸残基Xは、独立して、D、R、H、N、A、I、Y及びWから選択される)、並びにそれと少なくとも80%、85%、90%又は95%の配列同一性を有するSso7dポリペプチドからなる群より選択される。

【0099】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、配列番号1のS s o 7 dポリペプチドから選択され、ここで、21位、23位、25位、28位、30位、32位、40位、42位及び44位のアミノ酸残基Xは、独立して、D、R、H、N、A、I、Y、W及びアミノ酸置換から選択され、配列番号1は、任意選択で、最大10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1のアミノ酸置換を有する。

【0100】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、ポリペプチドリガンドとAAV VP2カプシドポリペプチドとの間に位置するペプチドリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記ペプチドリンカーは、グリシン-セリン(GS)リンカー及びアラニン-プロリン-セリン(APS)リンカーからなる群から選択される。GSリンカーは、例えば、式[GGGS]_nであってよく、式中、nは、1~10の範囲の整数であり、例えば、nは、1、2、3、4、5又は6であり、特に、nは、1、2、3又は4である。APSリンカーは、例えば、式[APS]_nであってよく、式中、nは、1~10の範囲の整数であり、例えば、nは、1、2、3、4、5又は6であり、特に、nは、2、3、4又は5である。

【0101】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAVrh. 32. 33、ウシAAV又はトリAAV. 5からなる群から選択されるAAV血清型のものである。特定の実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV1、AAV6、AAV8及びAAV9からなる群から選択されるAAV血清型のものである。

【0102】

一部の実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV VP2カプシドポリペプチドを含むAAVビリオンの標的細胞上に存在する天然の受容体に対する少なくとも1つの結合部位に少なくとも1つの変異を含む。本明細書で使用される場合、「天然の受容体」という用語は、例えば、以下に挙げるものを指す：血清型2のAAVの主要な細胞受容体であることが明らかにされているヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)；血清型1、5及び6のAAVの主要な細胞受容体であることが明らかにされているN-結合型シアル酸含有グリカン；血清型4及び9のAAVの主要な細胞受容体であることが明らかにされているO-結合型シアル酸含有グリカン；血清型2のAAVの二次受容体、或いはむしろ共受容体として作用する、αVβ5インテグリン、α5β1インテグリン、CD9、及び肝細胞増殖因子受容体；血清型2、3、8、及び9のAAVに対する二次受容体、或いはむしろ共受容体として作用する、塩基性線維芽細胞増殖因子受容体及び37/67kDaラミニン受容体(LamR)；並びに/又は血清型AAV-5に対する二次受容体、或いはむしろ共受容体として作用する、血小板由来増殖因子受容体(PDGF-R)。いくつかの実施形態では、AAV VP2カプシドポリペプチドのその天然受容体に対する少なくとも1つの必須結合部位は変異している。いくつかの実施形態では、AAV VP2カプシドポリペプチドの天然受容体に対する前記少なくとも1つの結合部位は、AAV VP2カプシドポリペプチドのVP3領域内、即ちVP1、VP2及びVP3カプシドポリペプチド間で共有される領域内に位置する。VP1及びVP2タンパク質をコードする領域は、VP3タンパク質をコードする領域のN末端伸長を示す。従って、VP1、VP2及びVP3をコードする領域のリーディングフレームは、VP3領域の変異が3つのカプシドタンパク質の全てに存在するように、重複している。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV6のものであり、そのVP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換

10

20

30

40

50

、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV6 のものであり、配列番号3のVP1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：i) K531E 及び V473D；ii) K531E、K459S、V473D 及び N500E；iii) G266A 及び N269Q；iv) G266A、N269Q 及び D590A；v) K531E、V473D、G266A 及び N269Q；又はvi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q 及び D590A を含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV8 のものであり、そのVP3 領域内に、配列番号4のVP1 アミノ酸配列に対して、以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q 及び A592D からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV8 のものであり、配列番号4のVP1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：i) G268E 及び N271Q；ii) S387A；iii) G268E、N271Q 及び S387A；iv) A592Q；又はv) A592D を含む。

【0104】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV9 のものであり、そのVP3 領域内に、配列番号5のVP1 アミノ酸配列に対して、以下：Q590A、W503A、N562A 及び E563A からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV9 のものであり、配列番号5のVP1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：i) W503A；ii) N562A 及び E563A；iii) Q590A 及び W503A；又はiv) Q590A、W503A、N562A 及び E563A を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV2 のものであり、そのVP3 領域内に、配列番号6のVP1 アミノ酸配列に対してアミノ酸置換 R585A を含む。

【0106】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV1 のものであり、そのVP3 領域内に、配列番号7のVP1 アミノ酸配列に対して、以下：V473D、N500E 及び R514A からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV1 のものであり、配列番号7のVP1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：i) V473D 及び N500E；ii) R514A；又はiii) V473D、N500E 及び R514A を含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチドは、それぞれの野生型 AAV VP2 カプシドポリペプチドに対して少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。本発明者らは、AAV VP2 カプシドポリペプチドにおける特定のアミノ酸置換が、受容体結合の改善、例えば、AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれるリガンドの受容体に対する、変異した AAV VP2 カプシドポリペプチドを含む AAV VP2 融合ポリペプチドの結合の改善をもたらし得ることを明らかにした。AAV VP2 カプシドポリペプチドのアミノ酸置換はまた、形質導入も改善し得る。理論に束縛されることは望まないが、本発明者らにより受容体結合及び／又は形質導入を改善するものとして同定されたアミノ酸置換によって、AAV ビリオンに存在する VP2 N 末端のより高い部分がウイルス粒子の外側に面することになると仮定されている。天然の条件下では、AAV ビリオンに存在する VP2 N 末端の大部分は AAV カプシドの内側を向いており、それにより、VP2 N 末端に融合したリガンドによる A

AAVビリオンの装飾レベルが制限される。AAVビリオンに存在するVP2 N末端の、ウイルス粒子の外側に面する部分を増加させることにより、即ちAAVビリオンのVP2露出を増加させることによって、VP2 N末端に融合したリガンドによる装飾レベルを増加させれば、受容体結合及び形質導入レベルの改善につながり得る。

【0108】

従って、いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特定のそのような実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、T162R、及び／又はP191Nを含み、特に、AAV VP2融合ポリペプチドは、3つのアミノ酸置換：D213A、T162R、及びP191Nを全て含む。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、AAV血清型AAV1のAAV VP2融合ポリペプチドは、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：V473D及びN500Eをさらに含む。

【0110】

他の実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV1以外のAAV血清型のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも1つに対応する少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。特定のこのような実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型8のものであり、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R、及びP192Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、AAV VP2融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D214A、K163R及び／又はP192N、特に3つのアミノ酸置換：D214A、K163R及びP192Nを全て含む。

20

【0111】

他のそのような実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型9のものであり、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特定のそのような実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、S162R及び／又はP191N、特に3つのアミノ酸置換：D213A、S162R及びP191Nを全て含む。

30

【0112】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、AAV VP2カプシドポリペプチドの天然開始コドンを含まない。VP2オープンリーディングフレームの転写を阻害することによってネイティブVP2ポリペプチドの発現を回避するために、AAV VP2カプシドポリペプチドの天然開始コドンを変異、例えば、欠失させてもよい。好ましくは、変異は、リーディングフレームを変化させない。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド中に含まれるAAV VP2カプシドポリペプチドは、その最初の天然アミノ酸、例えば、対応する野生型AAV VP2カプシドポリペプチドの最初のトレオニンに欠けている。

40

【0113】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドに含まれるポリペプチドリガンドは、最大3個のシステイン残基、最大2個のシステイン残基、最大1個のシステイン残基を含むか、又はシステイン残基を含まない。

50

【0114】

AAV VP2 融合ポリペプチドをコードする核酸及び AAV カargo 核酸配列

一態様において、本明細書には、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドをコードする核酸が提供される。AAV VP2 融合ポリペプチドをコードする核酸は、mRNA などの RNA、又は cDNA、線状 DNA 若しくは環状 DNA、例えばプラスミド DNA などの DNA であってもよい。

【0115】

また、本明細書には、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドを含む AAV カプシドによってカプセル化され得る核酸、及びそのような核酸を含む rAAV ビリオンも提供される。これらの核酸は、本明細書では「AAV ゲノム」、「AAV ベクターゲノム」、「AAV ベクター」、「AAV ベクター核酸」、「AAV カargo」、又は「カargo プラスミド」と呼ばれ、これらの用語は、本明細書では互換的に使用される。このような AAV カargo 又は AAV ベクターゲノムは、典型的には、2つの AAV 逆方向末端反復配列を含む。AAV カargo は、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドをコードすることができ、且つ／又はレポーター配列及び／若しくはバーコード配列を含んでもよく、或いは AAV カargo は、治療用抗体若しくはそのフラグメントを含め、治療用 RNA 又はタンパク質をコードすることができる。

【0116】

AAV ベクターゲノムは、一本鎖又は自己相補性のいずれでもよい。「自己相補性 AAV」又は「scAAV」は、組換え AAV 核酸配列が担持するコード領域が、分子内二本鎖 DNA テンプレートを形成するように設計された構築物を指す。理論に束縛されるものではないが、感染すると、第2鎖の細胞介在性合成を待つのではなく、scAAV の2つの相補的な半分が会合して、即時複製及び転写の準備が整った1つの二本鎖 DNA (dsDNA) 単位を形成する。例えば、D M McCarty et al, “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254 (その全体が参照により援用される) を参照のこと。自己相補的な AAV は、例えば、米国特許第 6,596,535 号明細書；同第 7,125,717 号明細書；及び同第 7,456,683 号明細書に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に援用される。例えば、5' ITR は、例えば、末端解離部位を欠失させて、ゲノムのヘアピン形成を可能にすることにより変異させることができる。

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される rAAV ベクターは、1つ以上の（例えば、全ての）AAV rep 及び／又は cap 遺伝子を欠いている。AAV ベクターは、任意の好適な AAV 血清型由来の核酸配列（例えば、DNA）を（例えば、その ITR 中に）含み得る。好適な AAV 血清型として、限定されないが、AAV 血清型：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシ AAV 又は トリ AAV.5 が挙げられる。例えば、AAV ベクター、例えば、scAAV ベクターは、AAV-2 由来の核酸配列、例えば、AAV-2 由来の ITR 配列を含み得る。AAV ベクター、例えば、scAAV ベクターはまた、2つ以上の血清型からの核酸を含み得る。AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列は、当技術分野で公知である。例えば、AAV-1 の完全ゲノムは、GenBank アクセッション番号 NC_002077 に提供されており；AAV-2 の完全ゲノムは、GenBank アクセッション番号 NC001401 及び Srivastava et al., Virology, 45:555-564 (1983) に提供されており；AAV-3 の完全ゲノムは、GenBank アクセッション番号 NC_1829 に提供されており；A

10

20

30

40

50

AAV-4の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001829に提供されており；AAV-5のゲノムは、GenBankアクセッション番号AF085716に提供されており；AAV-6の完全ゲノムは、GenBankアクセッション番号NC_001862に提供されており；AAV-7及びAAV-8のゲノムの少なくとも一部は、GenBankアクセッション番号AX753246及びAX753249にそれぞれ提供されており；AAV-9ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78:6381-6388 (2004)に提供されており；AAV-10ゲノムは、Williams, (2006) Mol. Ther., 13(1):67-76に提供されており；AAV-11ゲノムは、Mori et al., (2004) Virology, 330(2):375-383に提供されている。

10

【0118】

いくつかの実施形態では、機能性逆方向末端反復（ITR）配列は、例えば、AAVピリオンのレスキュー、複製及びパッケージングを支持するために使用され得る。従って、本明細書に開示されるAAVベクターは、ウイルスの複製及びパッケージングをシスで可能にする配列（例えば、機能性ITR）を含み得る。ITRは、野生型ヌクレオチド配列であってもよいが、そうである必要はなく、配列が機能的なレスキュー、複製及びパッケージングを可能にする限り、例えばヌクレオチドの挿入、欠失又は置換によって改変されていてもよい。ITRは、組換えウイルスが誘導され得る任意のAAV血清型由来のものであってよく、そうしたものとして、限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシAAV又はトリAAV.5が挙げられる。

20

【0119】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるrAAVベクターは、1つ以上のITR、例えば、2つのITRを含み、一方は異種核酸（例えば、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチド及び／或いはレポータータンパク質又は治療用RNA若しくはタンパク質をコードする）並びに／或いは前述した他の核酸エレメントの上流に、他方は下流に位置する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される核酸は、例えばscAAVベクターにおいて、他方のベクターエレメントの5'に配置される第1のITRと、3'に配置される第2のITRを含み、ここで、ITRは、独立して、他方のエレメントの5'及び／又は3'側の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、50、100、150、200、250ヌクレオチドである。ITR配列は、野生型であってもよいし、又は例えば、野生型ITRの1つ以上の機能を保持している限り、1つ以上の変異を含んでもよい。いくつかの実施形態では、野生型ITRは、末端解離部位の欠失を含むように修飾してもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示されるscAAVは、2つのITR配列を含んでもよく、この場合、両者は独立して、野生型、変異型、又は改変AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのITR配列は、野生型、バリエーション、又は修飾AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、2つのITR配列は、いずれも野生型、バリエーション又は修飾AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、「左側」即ち5'-ITRは、自己相補性ゲノムの産生を可能にする修飾AAV ITR配列であり、「右側」即ち3'-ITRは、野生型AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、「右側」即ち3'-ITRは、自己相補性ゲノムの産生を可能にする修飾AAV ITR配列であり、「左側」即ち5'-ITRは、野生型AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、いずれのITRもAAV2 ITRである（任意選択で、その一方は野生型であり、他方は末端解離部位を除去するように修飾されているか、又は両方が野生型である）。参照によりその全体が本明細書に援用される国際公開第2019/094253号パンフレット（PCT/US2018/058744号明細書）に提供されるAAV ITRの実施形態も、本明細書に開示される任意のAAV ITRに使用することができる。

30

40

50

【0120】

ポリヌクレオチド配列は、デノボ合成（例えば、固相DNA合成）によって、又はテンプレートとして既存の配列を使用するPCRによって産生することができる。核酸の直接化学合成は、Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; the phosphodiester method of Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979、; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981のジエチルホスホルアミダイト法；及び米国特許第4,458,066号明細書の固体支持体方法などの当技術分野で既知の方法によって達成することができる。PCRによるポリヌクレオチド配列への変異の導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N. Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 及び Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991に記載されているように行うことができる。

10

【0121】

また、本明細書には、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸を含み、且つ／又はレポーター配列を含み、且つ／又はバーコード配列を含み、又は治療用抗体若しくはそのフラグメントなどの治療用RNA若しくはタンパク質をコードする核酸を含むベクター（例えば、発現ベクター）も提供される。このようなベクターを用いて、AAV VP2融合ポリペプチドなどの目的のRNA又はタンパク質を、例えば、インビトロ、エキスピボ若しくはインビボで細胞内、例えば、或る生物における目的の1つ若しくは複数の組織内で発現及び／又は産生させることができる。様々な発現ベクターを使用して、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドなど、目的のRNA又はタンパク質を発現させることができる。ウイルスベース及び非ウイルス発現ベクターを用いて、細胞、例えば、哺乳動物細胞において目的のRNA又はタンパク質を産生させることができる。非ウイルス性ベクター及びシステムとしては、プラスミド、エピソードベクター、典型的にはタンパク質又はRNAを発現させるための発現カセットを含むもの、及びヒト人工染色体が挙げられる（例えば、Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997を参照されたい）。このような非ウイルス性ベクターは、当技術分野において公知のトランスフェクション又は形質導入方法を用いて、例えば、脂質（例えば、リポフェクタミン）、電気穿孔、機械的細胞膜変形などを用いて目的の細胞に送達されてもよい。用語「発現ベクター」は、所望のコード配列がそれが発現され得る細胞への導入のために挿入され得る担体核酸分子を指す。ベクターは、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、コスミド、又はウイルスベクター、又は人工染色体であり得る（例えば、Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997を参照されたい）。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞における、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドなどの、目的のRNA及びタンパク質の発現に有用な非ウイルスベクターとしては、pThioHis A、B & C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B & C、(Invitrogen, San Diego, Calif.)、MPSVベクター、及びタンパク質発現用の当技術分野で公知の多数の他のベクターが挙げられる。例えば、1つのクラスのベクターは、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス、MMTV又はMOMLV）又はSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNAエレメントを利用する。別のクラスのベクターは、セムリキ森林ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス及びフラビウイルスなどのRNAウイルスに由来するRNAエレメントを利用する。有用なウイルスベクターとしては、レト

20

30

40

50

ロウイルス（例えば、レンチウイルス）、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV））、SV40に基づくベクター、乳頭腫ウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルス、ワクシニアウイルス、シンビスウイルス、インフルエンザウイルス、レオウイルス、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、麻疹ウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、パルボウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス、セネカバレーウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、粘液腫ウイルス、マラバウイルス又はセムリキフォレストウイルス（SFV）が挙げられる。Brent et al., 前出; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; 及び Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992を参照されたい。一部の実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、例えば、組換えAAV（rAAV）ベクターである。

10

【0122】

一部の実施形態では、ベクターは、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸を含み、且つ／又はレポーター配列を含み、且つ／又はバーコード配列を含み、又は治療用抗体若しくはそのフラグメントなどの治療用RNA若しくはタンパク質をコードする核酸を含む、組換えDNA分子であり得る。本明細書で使用される「組換え」は、ベクター、ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は細胞がクローニング、制限又はライゲーションステップ（例えば、その中に含まれるポリヌクレオチド又はポリペプチドに関連する）、及び／又は天然に見出される産物とは異なる構築物を生じる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。組換えウイルス又はベクターは、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。この用語は、それぞれ、元のポリヌクレオチド構築物の複製及び元のウイルス構築物の子孫を含む。

20

【0123】

組換えベクターは、典型的には、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列を含む。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。当業者であれば、標的細胞におけるベクターの1つ以上の成分の発現は、調節配列を必要とし得ることを容易に認識する。調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現、並びに組織特異的調節配列及び／又は誘導配列を指示するものを含む。発現ベクターにはまた、宿主細胞におけるメッセンジャーRNAの安定性及び翻訳可能性を最適化するように設計されたエレメント、及び／又は本明細書に記載されるとおりのAAV VP2融合ポリペプチドを発現する永久的な安定細胞クローンを樹立するための薬物選択マーカーも含まれ得る。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得る。このような組換え発現ベクターを生成するための一般的な方法は、とりわけ、当技術分野で知られている Sambrook and Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007 with updated through 2010) Current Protocols in Molecular Biologyに見出すことができる。

30

40

【0124】

特定の開始シグナルはまた、コード配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルには、ATG開始コドン及び隣接する配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを提供する必要があるかもしれない。当業者は、これを容易に決定し、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然又は合成のいずれかであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含むことによって増強され得る。

50

【0125】

発現は、当技術分野で既知の任意の適切な宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞などを使用し得る。原核生物及び真核生物の両方の発現系が広く利用可能である。いくつかの実施形態では、発現系はHEK293発現系などの哺乳動物細胞発現である。いくつかの実施形態では、核酸は、所望の宿主細胞における発現を容易にするためにコドン最適化され得る。発現のために選択された細胞型、オルガネラ、及び生物体におけるDNAセグメントの発現を効果的に指示するプロモーター及び／又はエンハンサーを使用することは重要であろう。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、及び細胞型の組み合わせの使用を知っている（例えば、Sambrookら（2001）を参照されたい）。

10

【0126】

真核生物のRNA分子のほとんどは、RNAスプライシングを受けて、一次転写物からイントロンを除去し得る。ゲノム真核生物配列を含むベクターは、タンパク質発現のための転写物の適切なプロセッシングを確実にするために、ドナー及び／又はアクセプタースプライシング部位を必要とし得る（Chandler et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8): 3596-601を参照されたい）。

【0127】

本開示のベクター又は構築物は、一般に、少なくとも1つの終結シグナルを含む。「終結シグナル」又は「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に関与するDNA配列から構成される。従って、特定の実施形態では、RNA転写物の産生を終結させる終結シグナルが意図される。ターミネーターは、望ましいメッセージレベルを達成するためにインピボで必要であり得る。真核生物系において、ターミネーター領域はまた、ポリアデニル化部位を露出させるために、新規転写物の部位特異的切断を可能にする特異的DNA配列を含み得る。これは、転写物の3'末端に約200 A残基（ポリA）のストレッチを付加するように、特殊な内因性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリAテールで修飾されたRNA分子は、より安定であり、より効率的に翻訳されるようである。従って、真核生物を含む他の実施形態では、ターミネーターがRNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネーターシグナルがmRNAのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネーター及び／又はポリアデニル化部位エレメントは、mRNAレベルを増強するため、及び／又はカセットから他の配列への読み取りを最小限にするために役立ち得る。本開示での使用が意図されるターミネーターは、本明細書に記載されるか、又は当業者に既知の転写の任意の既知のターミネーターを含み、例えば、限定されるものではないが、例えば、ウシ成長ホルモントーミネーターのような遺伝子の終結配列、又は例えばSV40ターミネーターのようなウイルス終結配列を含む。特定の実施形態では、終結シグナルは、例えば配列切断による転写可能又は翻訳可能な配列の欠如であってもよい。

20

30

【0128】

発現、特に真核生物発現において、転写物の適切なポリアデニル化をもたらすために、典型的には、ポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化シグナルの性質は、本開示の成功裏の実施に重要であるとは考えられず、及び／又は任意のこのような配列が使用され得る。好ましい実施形態は、SV40ポリアデニル化シグナル及び／又はウシ成長ホルモポリアデニル化シグナルを含み、便利であり、且つ／又は種々の標的細胞においてよく機能することが知られている。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増加させ得るか、又は細胞質輸送を促進し得る。

40

【0129】

宿主細胞内でベクターを増殖させるために、複製が開始される特定の核酸配列である1つ以上の複製起点（しばしば「ori」と呼ばれる）を含むことがある。或いは宿主細胞が酵母である場合、自己複製配列（ARS）を使用することができる。

【0130】

50

本開示の特定の実施形態では、本開示の核酸構築物を含む細胞は、発現ベクターにマーカーを含めることによって、インビトロ又はインビボで同定され得る。このようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を与え、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にする。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。正の選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、一方、負の選択マーカーは、その存在がその選択を妨げるものである。陽性選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

【0131】

通常、薬物選択マーカーの包含は、形質転換体のクローニング及び同定に役立ち、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン及びヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。条件の実施に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析でGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含む他のタイプのマーカーも意図される。或いは、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（HSV-*tk*）又はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などのスクリーニング可能な酵素を利用してよい。当業者はまた、おそらくFACS分析と組み合わせて、免疫学的マーカーをどのように使用するかを知っている。使用されるマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要であるとは考えられない。選択マーカー及びスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0132】

発現ベクターの選択は、ベクターの1つ以上の成分を発現させようとする目的の細胞に依存する。典型的には、ベクターは、AAV VP2 融合ポリペプチドオープンリーディングフレームに作動可能に連結されたプロモーター及び他の調節配列（例えば、エンハンサー）などの1つ以上の調節配列を含む。

【0133】

「プロモーター」は、転写の開始及び速度が制御される核酸配列中の一領域である制御配列である。これは、RNAポリメラーゼ及び他の転写因子などの調節タンパク質及び分子が結合し得る遺伝的要素を含み得る。語句「操作的に配置された」、「操作的に連結された」、「制御下にある」、及び「転写制御下にある」は、プロモーターが核酸配列に対して当該配列の転写開始及び／又は発現を制御するのに正しい機能的な位置及び／又は向きにあることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」（これは核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列を指す）と併せて使用されてもよく、又はそうでなくてもよい。

【0134】

プロモーターは、コードセグメント及び／又はエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られてもよいとおり、遺伝子又は配列と天然で関連性のあるものであってもよい。このようなプロモーターは「内因性」と呼ぶことができる。同様にエンハンサーも、核酸配列と天然で関連性のある、当該配列の下流又は上流のいずれかに位置するものであってもよい。或いは、コード核酸セグメントを組換え又は異種プロモーター（これは、通常はその天然環境で核酸配列と関連性のないプロモーターを指す）の制御下に置くことにより、特定の利点を得られることになる。組換え又は異種エンハンサーもまた、通常はその天然環境で核酸配列と関連性のないエンハンサーを指す。このようなプロモーター又はエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、及び任意の他の原核細胞、ウイルス細胞、又は真核細胞から単離されたプロモーター又はエンハンサー、及び「天然に存在」しないプロモーター又はエンハンサー、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント及び／又は発現を変化させる変異を含むものが含まれ得る。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加え、配列は、本明細書に開示される組成物に関連した組換えクローニング及び／又は核酸増幅技術、例えばPCRを用いて産生されてもよい（米国特許第4683202号明細書、米国特許

10

20

30

40

50

第5928906号明細書を参照されたい)。さらに、ミトコンドリア、葉緑体など、核以外のオルガネラ内での配列の転写及び／又は発現を導く制御配列も同様に利用し得ることが意図される。

【0135】

利用されるプロモーターは、構成的、誘導性、合成、組織特異的又は細胞特異的であり、及び／又は適切な条件下で、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を導くのに有用であって、組換えタンパク質及び／又はペプチドの大規模産生において有利であるようなものであり得る。加えて、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸の発現を改善するために、他の調節エレメント、例えば、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結配列などを組み込むこともできる。

10

【0136】

一部の実施形態では、構成的プロモーターを使用して、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、或いは本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされるレポーター配列又は治療用RNA若しくはタンパク質の一定の発現を達成する。構成的プロモーターの例としては、限定はされないが、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びに限定はされないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子-1プロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターが挙げられる。

20

【0137】

いくつかの実施形態では、ユビキタスプロモーターを使用する。ユビキタスプロモーターの非限定的な例としては、CMV、CBA(誘導体CAG、CBhなどを含む)、EF-1a、PGK、UBC、GUSB(hGBP)、及びUCOE(HNRPA2B1-CBX3のプロモーター)が挙げられる。

【0138】

いくつかの実施形態では、挿入された配列が誘導条件下以外で発現するのを防ぐため、誘導性プロモーターが利用される。誘導性プロモーターを使用すると、それが作動可能に連結されているポリヌクレオチド配列の発現を、そのような発現が望ましいときはオンにし、又は発現が望ましくないときは発現をオフにすることが可能な分子スイッチがもたらされる。誘導性プロモーターとしては、限定はされないが、例えば、アラビノースプロモーター、lacZプロモーター、テトラサイクリンプロモーター、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、又は熱ショックプロモーターが挙げられる。

30

【0139】

いくつかの実施形態では、組織特異的又は細胞特異的プロモーターを用いて、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされるレポータータンパク質、治療用RNA若しくはタンパク質の発現を特定の組織又は細胞だけに達成する。組織特異的又は細胞特異的プロモーター又はエレメントのアイデンティティ、並びにその活性を特徴付けるためのアッセイは、当業者に周知である。例としては、ヒトLIMK2遺伝子(Nomoto et al., 1999, Gene, 236(2): 259-271)、ソマトスタチン受容体2遺伝子(Kraus et al., 1998, FEES Lett., 428(3): 165-170)、マウス精巣上体レチノイン酸結合遺伝子(Lareyre et al., 1999, J. Biol. Chem., 274(12): 8282-8290)、ヒトCD4(Zhao-Emonet et al., 1998, Biochim. Biophys. Acta, 1442(2-3): 109-119)、マウスα2(XI)コラーゲン(Tsumaki, et al., 1998, J. Biol. Chem., 273(3

40

50

6) : 22861-22864)、D1Aドパミン受容体遺伝子 (Lee, et al., 1997, J. Auton. Nerv. Syst., 74 (2-3) : 86-90)、インスリン様成長因子II (Wu et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 233 (1) : 221-226)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendro et al., 1996, J. Immunol., 157 (12) : 5411-5421)、筋クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーター (Wang et al., Gene Ther. 2008 Nov; 15 (22) : 1489-99) が挙げられる。

【0140】

いくつかの実施形態では、細胞特異的でないプロモーターを使用する。いくつかの実施形態では、強いプロモーター又は弱いプロモーター (RNAポリメラーゼ及び／又はシグマ因子に対するその親和性及び他のプロモーターの親和性に従って分類される) を使用する。

【0141】

いくつかの実施形態では、合成プロモーターを使用して、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされる治療用RNA若しくはタンパク質の発現を達成する。合成プロモーターは、天然プロモーターの転写能力を大幅に上回り得る。例えば、内因性細胞機構又は因子による活性の遮断又は低下を受けない合成プロモーターを選択することができる。合成プロモーターには、転写効率を改善するため、トランス作用性因子結合部位及びエンハンサーを含めた他のエレメントが挿入されてもよい。合成プロモーターは、合成プロモーター及び生物学的プロモーターの両方の最良の特徴を組み合わせるように合理的に設計し、化学的に合成することができる。いくつかの工程を通じて合成オリゴがアニーリングされ、ライゲートされることにより、化学的に合成された完全長プロモーターが生成される。合成プロモーターは、誘導性又は細胞型特異的プロモーターであってもよい。

【0142】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドORF、又は治療用核酸若しくはタンパク質をコードする核酸配列、又はレポーター配列に作動可能に連結されたプロモーターは、173CMVプロモーター、HCMVプロモーター、CBhプロモーター、CAGプロモーター、及びmCCTプロモーターから選択される。

【0143】

本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、レポーター配列、又は治療用RNA若しくはタンパク質を標的細胞で発現させるためには、特定のプロモーターが特に適していることは、当業者に容易に認識され、こうしたプロモーターとして、限定されないが、種特異的、誘導性、組織特異的、又は細胞周期特異的なプロモーターが挙げられる (Parr et al., Nat. Med. 3 : 1145-9 (1997) ; これらの内容は、その全体が参照により本明細書に援用される) 。

【0144】

一部の実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、レポーター配列、又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされる治療用RNA若しくはタンパク質に作動可能に連結されたプロモーターは、1kb未満である。プロモーターは、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、又は800bp超の長さを有し得る。プロモーターは、200~300、200~400、200~500、200~600、200~700、200~800、300~400、300~500、300~600、300~700、30

0～800、400～500、400～600、400～700、400～800、500～600、500～700、500～800、600～700、600～800又は700～800bpの長さを有し得る。

【0145】

一実施形態では、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチド、レポーター配列、又は本明細書に記載されるrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされる治療用RNA若しくはタンパク質に作動可能に連結されたプロモーターは、同じ又は異なるプロモーター、例えば、限定されないが、CMV及びCBAなどの2つ以上の構成要素、領域若しくは配列の組み合わせであってもよい。各構成要素は、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、又は800bp超の長さを有し得る。各構成要素は、200～300、200～400、200～500、200～600、200～700、200～800、300～400、300～500、300～600、300～700、300～800、400～500、400～600、400～700、400～800、500～600、500～700、500～800、600～700、600～800又は700～800bpの長さを有し得る。

10

20

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、レポーター配列、又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされる治療用RNA若しくはタンパク質に作動可能に連結されたプロモーターは、CMV-エンハンサー配、例えば、即時型／初期CMVエンハンサー配列（例えば、382ヌクレオチドCMVエンハンサー配列）及びニワトリβ-アクチン（CBA）プロモーター配列（例えば、260ヌクレオチドCBAプロモーター配列）の組み合わせである。

【0147】

プロモーターに加えて、他の調節エレメントも、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチド、又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれる核酸によってコードされるレポータータンパク質、治療用RNA若しくは治療用タンパク質の効率的な発現に必要とされ得るか、又は所望され得る。こうしたエレメントとしては、ATG開始コドン及び隣接するリボソーム結合部位又は他の配列が挙げられる。さらに、発現の効率は、使用する細胞系に適切なエンハンサーを含有させることによって増強され得る（例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; 及び Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987を参照）。例えば、SV40エンハンサー又はCMVエンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞での発現を増加させることができる。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるAAVベクターは、任意選択で、プロモーターエレメントと、発現しようとするポリヌクレオチドとの間に配置されるイントロンを含む。理論に束縛されるものではないが、5'イントロンの含有により、発現したmRNAのレベル及び定常状態を高めることができる。イントロンの非限定的な例としては、SV40由来のイントロン、CBA-MVM由来のイントロン、MVM（67～97bp）、FIX短縮型イントロン1（300bp）、β-グロビンSD／免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプター（250bp）、アデノウイルススプライスドナー／免疫グロブリンスプライスアクセプター（500bp）、SV40後期スプライスドナー／スプライスアクセプター（19S／16S）（180bp）、ハイブリッドアデノウイルススプライスドナー／IgGスプライスアクセプター（230bps）が挙げられる。

40

50

【0149】

一実施形態では、イントロン又はイントロン部分は、100～500ヌクレオチドの長さであってもよい。イントロンは、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490又は500の長さを有し得る。イントロンは、80～100、80～120、80～140、80～160、80～180、80～200、80～250、80～300、80～350、80～400、80～450、80～500、200～300、200～400、200～500、300～400、300～500、又は400～500ヌクレオチド長であってもよい。

10

【0150】

発現ベクターはまた、発現させようとするタンパク質との融合タンパク質を形成するために、分泌シグナル配列位置を付与することもできる。より一般的には、発現させるタンパク質をコードする挿入配列は、ベクターへの組込みの前にシグナル配列に連結させる。

【0151】

発現ベクターの生成は、複数の制限酵素部位を含む核酸領域である複数のクローニング部位(MCS)を含むベクターを利用することができ、その任意の1つを標準的な組換え技術と組み合わせて用いてベクターを消化することができる。Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997を参照されたい。「制限酵素消化」は、核酸分子中の特定の位置でのみ機能する酵素による核酸分子の触媒切断を指す。これらの制限酵素の多くは、市販されている。このような酵素の使用は、当業者に広く理解されている。しばしば、ベクターは、MCS内で切断して外因性配列をベクターに連結できるようにする制限酵素を用いて線状化又は断片化される。「連結」は、2つの核酸断片間にホスホジエステル結合を形成する過程を指し、これは、互いに隣接していてもいなくてもよい。制限酵素及びライゲーション反応を含む技術は、組換え技術の当業者に周知である。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、調節配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、標的細胞での発現を駆動するのに効率的な調節配列、特にプロモーターを含む。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドのオープンリーディングフレームは、前記プロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、HCMVプロモーター、173CMVプロモーター、CAGプロモーター、CBhプロモーター及びmCCTプロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリアデニル化シグナルをさらに含み、これは、例えば、BGH又はSV40ポリアデニル化シグナルから選択され得る。一実施形態では、核酸は、配列番号8の配列を含む。

40

【0154】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、レポーター配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、プロモーター、例えば、第2のプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードする。多数のレポータータンパク質が当技術分野で知られており、以下のものが挙げられる：緑色蛍光タンパク質(GFP)、緑色蛍光タンパク質のバリエーション(GFP10)、強化型GFP(eGFP)、TurboGFP、GFPS66T、TagGFP2、mUKG Emerald GFP、

50

Superfolder GFP、GFPuv、不安定化EGFP (dEGFP)、Azami Green、mWasabi、Clover、mClover3、mNeonGreen、NowGFP、Sapphire、T-Sapphire、mAmetrine、光活性化可能なGFP (PA-GFP)、Kaede、Kikume、mKikGR、tdEos、Dendra2、mEosFP2、Dronpa、青色蛍光タンパク質 (BFP)、eBFP2、azunte BFP、mTagBFP、mKalamal、mTagBFP2、shBFP、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、eCFP、セルリアンCFP、SCFP3A、不安定化ECFP (dECFP)、CyPet、mTurquoise、mTurquoise2、mTFPI、光スイッチ可能なCFP2 (PS-CFP2)、TagCFP、mTFPI、mMidonishi-Cyan、アクアマン (aquamane)、mKeima、mBerFP、LSS-mKate2、LSS-mKatel、LSS-mOrange、CyOFP I、サンダーシアニン (Sander cyanin)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、eRFP、mRaspberry、mRuby、mApple、mCardinal、mStable、mMaroon1、mGarnet2、tdTomato、mTangerine、mStrawberry、TagRFP、TagRFP667、TagRFP675、mKate2、HcRed、t-HcRed、HcRed-Tandem、mPlum、mNeptune、NirFP、Kindling、遠赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、eYFP、不安定化EYFP (dEYFP)、TagYFP、Topaz、Venus、SYFP2、mCherry、PA-mCherry、sfCherry、sfCherry2、Citrine、mCitrine、Ypet、IANRFP-AS83、mPapaya1、mCyRFP1、mHoneydew、mBanana、mOrange、Kusabira Orange、Kusabira Orange 2、mKusabira Orange、mOrange 2、mKov、mKO2、mGrapel、mGrape2、zsYellow、eqFP611、Sirius、Sander cyan m、shBFP-N168S/L1731、近赤外タンパク質、iFP1.4、iRFP713、iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP720、iFP2.0、mIFP、TDsmURFP、miRFP670、ブリリアントバイオレット (BV) 421、BV605、BV510、BV711、BV786、PerCP、PerCP/Cy5.5、DsRed、DsRed2、mRFP1、ポシロポリン (pocilloporin)、Renilla GFP、Monster GFP、paGFP、又は Phycobihprotein、或いはそれらの生物学的に活性なバリエーション若しくは断片。レポータータンパク質は、例えば、以下：EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群から選択され得、特にEGFP及びsfCherry2から選択され得る。

10

20

30

40

50

【0155】

いくつかの実施形態では、ベクター、例えば発現ベクターは、アデノ随伴ベクター (AAV) である。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、片側又は両側に逆方向末端反復 (ITR) 配列が隣接した、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。この核酸はさらに、例えば、プロモーター、エンハンサー、1つ以上のイントロン配列、ポリ(A)配列、スタッパー (stuffer) 配列、例えば、HPRTイントロン由来のスタッパー配列、及びそれらの組み合わせなど、1つ以上の追加エレメントを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、AAVカプシド中に封入された、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドAAVベクターを含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの標的細胞適合性調節配列、例えばプロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペ

プチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは、173CMVプロモーター、HCMVプロモーター、CBhプロモーター、CAGプロモーター及びmCCTプロモーターから選択される。

【0157】

いくつかの実施形態では、AAVベクター中のITRは同じAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、AAVベクター中のITRは異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、ITRは同じである。いくつかの実施形態では、ITRは異なる。

【0158】

いくつかの実施形態では、AAVベクター中のITRは、AAVカプシドと同じAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、AAVベクター中のITRは、AAVカプシドと異なる血清型に由来する。いくつかの実施形態では、ITRは、AAV2に由来し、AAVカプシドは、AAV2以外の血清型、例えばAAV9に由来する。

【0159】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、AAV VP2融合ポリペプチドオープンリーディングフレームの上流及び下流に位置する2つのAAV逆方向末端反復(ITR)配列を含む。いくつかの実施形態では、2つのITR配列は、核酸分子の5'末端及び3'末端に位置する。これらの実施形態の一部において、核酸は、レポーター配列をさらに含む。レポーター配列は、例えば、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードし得る。例えば、レポータータンパク質は、以下：EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼ、特にEGFP及びsfCherry2からなる群から選択され得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、第2のプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、転写後調節エレメント、例えば、WPRE又はその誘導体をさらに含む。いくつかの実施形態では、核酸は、例えば、BGH及びSV40ポリアデニル化シグナルから選択されるポリアデニル化シグナルをさらに含む。一実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、配列番号2の配列を含む。

【0160】

一態様において、本明細書には、前記AAV VP2融合ポリペプチドをコードする単離された核酸を含むキットが提供される。

【0161】

宿主細胞及びAAVの製造

目的のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入するための方法は、細胞宿主の型に応じて変化する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核細胞に一般的に利用され、一方、リン酸カルシウム処理又はエレクトロポレーションは、他の細胞宿主に使用され得る(一般に、Sambrookら、上記を参照されたい)。他の方法としては、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リポソーム媒介形質転換、注射及びマイクロインジェクション、弾道法/遺伝子銃、ビロソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22への融合、DNAの薬剤増強取り込み、エキスピボ形質導入、プロトプラスト融合、レトロウイルス形質導入、ウイルストランスフェクション、脂質ベースのトランスフェクション又は他の従来技術が挙げられる。プロトプラスト融合の場合、細胞を培地中で増殖させ、適切な活性についてスクリーニングする。組換えタンパク質の長期間の高収率産生のために、安定な発現がしばしば所望される。例えば、ポリペプチドを安定に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点又は内因性発現エレメント及び選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて調製することができる。ベクターの導入後、細胞を選択培地に切り替える前に、濃縮培地中で1~2日間増殖させてもよい。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在により、選択培地中で導

入された配列をうまく発現する細胞の増殖が可能になる。耐性の、安定にトランスフェクトされた細胞は、細胞型に適切な組織培養技術を使用して増殖され得る。得られたトランスフェクトされた細胞を培養し、産生された抗体を回収するための方法及び条件は、当業者に既知であり、本明細書に基づいて、使用される特定の発現ベクター及び哺乳動物宿主細胞に応じて変化又は最適化され得る。

【0162】

一態様において、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチド又はそれをコードする核酸を含む細胞が本明細書に提供される。このような細胞は、例えば、宿主細胞又は治療用細胞であり得る。用語「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」は、本明細書で交換可能に使用され、これらは、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫又は潜在的子孫を指す。変異又は環境の影響のいずれかのために、ある種の修飾が次の世代で起こり得るので、このような子孫は、実際には、親細胞と同一ではないかもしれないが、それでもなお、本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

10

【0163】

宿主細胞を用いて、AAV VP2融合ポリペプチドを産生又は発現させ、任意選択で、それを含むAAVビリオンをアセンブリすることができる。従って、本開示はまた、宿主細胞を使用して、AAV VP2融合ポリペプチドを産生する方法、及びAAV VP2融合ポリペプチドを含むAAVビリオンを産生する方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、上記方法は、AAV VP2融合ポリペプチドが産生されるように、宿主細胞（そこに、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする組換え発現ベクターが導入されている）を好適な培地中で培養することを含む。いくつかの実施形態では、本方法はさらに、AAV VP2融合ポリペプチド又はそれを含むAAVビリオンを培地又は宿主細胞から単離することを含む。

20

【0164】

一実施形態では、宿主細胞は、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸を含むように遺伝子操作される。一実施形態では、宿主細胞は、発現カセットを使用することによって遺伝子操作される。用語「発現カセット」は、ヌクレオチド配列を指し、このような配列に適合する宿主における遺伝子の効果的発現が可能である。このようなカセットは、プロモーター、イントロンを伴うか又は伴わないオープンリーディングフレーム、及び終結シグナルを含み得る。発現を達成するのに必要又は有用な追加の因子、例えば、誘導性プロモーターを使用してもよい。

30

【0165】

宿主細胞は、真核細胞、又は細菌細胞、昆虫細胞、又はヒト細胞などの哺乳類細胞のような原核細胞であり得るが、これらに限定されない。大腸菌 (*E. coli*) は、ポリヌクレオチドのクローニング及び発現に有用な1つの原核生物宿主である。使用に適したその他の微生物宿主には、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) といったような桿菌、並びに、サルモネラ (*Salmonella*)、セラチア (*Serratia*) 及び様々なシュードモナス (*Pseudomonas*) 種といったようなその他の腸内細菌種が含まれる。これらの原核生物宿主において、典型的には、宿主細胞と適合性の制御配列（例えば、複製起点）を含む発現ベクターを複製することもできる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、βラクタマーゼプロモーター系又はファージλからのプロモーター系などの、任意の数の様々な周知のプロモーターが存在する。これらのプロモーターは、典型的には、場合により、オペレーター配列を用いて発現を制御し、転写及び翻訳を開始し、完了するためのリボソーム結合部位配列などを有する。酵母のような他の微生物を使用して、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドを発現させることもできる。インタクトな異種タンパク質を分泌することができる真核宿主細胞株が開発されており、こうしたものとして、CHO細胞株、様々なCos細胞株、HeLa細胞、骨髄腫細胞株、形質転換B細胞及びハイブリドーマが挙げられる。好適な真核宿主細胞としては、Vero細胞、HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞及びMDCKII細胞が挙げられるが、これらに限定され

40

50

ない。ポリペプチドを発現するための哺乳動物組織細胞培養物の使用は、一般に、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N. Y., N. Y., 1987において議論される。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、及びエンハンサー（例えば、Queen, et al., Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986参照）などの発現制御配列、及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報処理部位を含み得る。これらの発現ベクターは、通常、哺乳動物遺伝子由来又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーターを含む。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的、及び／又は改変可能若しくは調節可能であり得る。有用なプロモーターには、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP pol IIIプロモーター、構成的MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター（ヒト前初期CMVプロモーターなど）、構成的CMVプロモーター、及び当技術分野で既知のプロモーター-エンハンサーの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0166】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、AAVビリオンのアセンブリに適している。従って、本明細書では、rAAVビリオンを産生する方法も開示する。

【0167】

天然に存在するAAVは、ウイルスDNA複製(rep)、包膜／パッケージング及び宿主細胞の染色体組込みを指令する異なる配列を含む。典型的には、3つのAAVプロモーター（その相対マップ位置からp5、p19、p40と命名される）が、野生型ウイルスのrep及びcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。2つのrepプロモーター（p5とp19）は、単一のAAVイントロン（ヌクレオチド2107及び2227で）の差次的スプライシングと組み合わせて、rep遺伝子から4つのrepタンパク質（rep78、rep68、rep52、及びrep40）の産生をもたらすと考えられる。repタンパク質は、複数の酵素的特性を備え、最終的にウイルスゲノムの複製を担う。cap遺伝子は、典型的に、p40プロモーターから発現される。選択的スプライシング及び非コンセンサス翻訳開始部位が、3つの関連カプシドタンパク質VP1、VP2、VP3の産生を担っている。単一のコンセンサスポリアデニル化部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置している。AAVの生活環及び遺伝学は、Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Imm., 158: 97-129に概説されている。

20

30

【0168】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンを産生するために、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸、例えばプラスミドが使用される。いくつかの実施形態では、AAV rep遺伝子及び／又はAAV cap遺伝子を含む少なくとも1つの別の核酸、例えばプラスミドが、rAAVビリオンの調製に使用される。いくつかの実施形態では、cap遺伝子のVP2開始コドンを変異させ、それにより、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸がVP2サブユニットの唯一の供給源となるため、産生されたrAAVビリオン中の全てのVP2カプシドポリペプチドがポリペプチドリガンドに融合される。本明細書にはまた、少なくとも1つのアデノウイルスヘルパー機能遺伝子を含む核酸配列、例えばプラスミドも開示される。いくつかの実施形態では、AAV rep、AAV cap、及び／又はアデノウイルスヘルパー遺伝子をコードする核酸は、同じ構造、例えば単一のプラスミドに存在してもよく、或いは個別の構造に存在してもよい。いくつかの実施形態では、1つ以上のプラスミドを、カーゴ核酸、即ちrAAVビリオン内に封入しようとする核酸と一緒にコンピテント細胞に共トランスフェクトし、次に、細胞を培養して、rAAVビリオンを産生させる。場合によっては、封入しようとする核酸配列（「AAVゲノム」）を含むカーゴプラスミド、並びにAAV rep及び／又はcap遺伝子を含むプラスミドは、AAVのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、E

40

50

1 欠失アデノウイルス又はヘルペスウイルス) による感染を許容する細胞に移入される。パッケージングしようとするAAVゲノム、rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるrAAV粒子を産生する技術は、当技術分野で知られており、例えば、電気穿孔が挙げられる。いくつかの実施形態では、rAAVの産生は、単一の細胞(本明細書では、パッケージング細胞と呼ぶ)内に存在する以下の構成要素を必要とする:rAAVベクター、rAAVベクターとは別の(即ち、rAAVベクター内ではない)AAV rep及びcap遺伝子、並びにヘルパーウイルス機能。偽型rAAVの産生は、例えば、参照によりその全体が本明細書に援用される国際公開第01/83692号パンフレットに開示されている。様々な実施形態では、AAVカプシドタンパク質を、組換えベクターの送達を増強するように修飾してもよい。カプシドタンパク質に対する修飾は、一般に当技術分野で知られている。例えば、米国特許出願公開第2005/0053922号明細書及び同2009/0202490号明細書を参照されたい。

10

【0169】

様々な実施形態では、ウイルスベクター産生の一般原理を利用して、本明細書に開示されるベクター及びウイルス、例えばrAAVを産生することができる。Carter, (1992) Curr. Opinions Biotech., 1533-539; Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158:97-129。様々な手法が以下の文献に開示されている: Ratschin et al., (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072; Hennon et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466; Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol., 5:3251; McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963; Lebkowski et al., (1988) Mol. Cell. Biol., 7:349; Samulski et al. (1989) J. Virol., 63:3822-3828; 米国特許第5, 173, 414号明細書; 国際公開第95/13365号パンフレット及び対応する米国特許第5, 658, 776号明細書; 国際公開第95/13392号パンフレット; 同第96/17947号パンフレット; PCT/US98/18600号明細書; 国際公開第97/09441号パンフレット(PCT/US96/14423号明細書); 国際公開第97/08298号パンフレット(PCT/US96/13872号明細書); 国際公開第97/21825号パンフレット(PCT/US96/20777号明細書); 国際公開第97/06243号パンフレット(PCT/FR96/01064号明細書); 国際公開第99/11764号パンフレット; Perrin et al., (1995) Vaccine, 13:1244-1250; Paul et al., (1993) Hum. Gene Ther., 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy, 3:1124-1132; 米国特許第5, 786, 211号明細書; 同第5, 871, 982号明細書; 及び同第6, 258, 595号明細書。以上の文献は、rAAV生産に関連する文献のセクションを特に重視して、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

30

【0170】

パッケージング細胞を作製する例示的な方法は、AAV粒子産生に必要な構成要素の一部又は全部を安定して発現する細胞株を作出することである。例えば、AAV rep及びcap遺伝子を欠くrAAVベクター、rAAVベクターとは別のAAV rep及びcap遺伝子、並びにネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能マーカーをコードするプラスミド(又は複数のプラスミド)を細胞のゲノムに組み込む。AAVゲノムは、GCターリング(Samulski et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2077-2081)、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む合成リンカーの付加(Laughlin et al. (1983) Gene, 23:65-73)、又は直接、平滑末端ライゲーション(Senapathy et al. (1984) J. Biol. Chem., 259:4661-4666)などの手順により、

40

50

細胞プラスミドに導入されている。次に、このパッケージング細胞株をアデノウイルスのようなヘルパーウイルス及び／又はヘルパーウイルスをコードするプラスミドに感染させる。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、r A A Vの大規模生産に適していることである。他の好適な方法の例では、プラスミドではなくアデノウイルス又はバキュロウイルスを用いて、r A A Vベクター並びに／又はr e p及びc a p遺伝子をパッケージング細胞に導入する。

【0171】

いくつかの実施形態では、組換えウイルスを産生する方法は、パッケージングしようとする核酸を提供することを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、プラスミドである。他の実施形態では、核酸は、第1のA A V末端反復と第2のA A V末端反復との間に介在する異種核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、異種核酸は、本明細書に記載のA A V V P 2融合ポリペプチド及び／又はレポータータンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、異種核酸は、治療用RNA又は治療用抗体などの治療用タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、異種核酸がA A V V P 2融合ポリペプチドをコードしない場合、組換えウイルスを産生する方法は、A A V V P 2融合ポリペプチドをコードする追加の核酸を提供することを含む。いくつかの実施形態では、組換えウイルスを産生する方法は、1つ以上の追加の核酸を提供することを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の核酸は、A A V r e p遺伝子及び／又はA A V c a p遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の核酸は、以下：A A V血清型1、A A V血清型2、A A V血清型3、A A V血清型4、A A V血清型5、A A V血清型6、A A V血清型7、A A V血清型8、A A V血清型9に由来するA A V r e p遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の核酸は、A A V血清型1、A A V血清型2、A A V血清型3、A A V血清型4、A A V血清型5、A A V血清型6、A A V血清型7、A A V血清型8、又はA A V血清型9由来のA A V c a p遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加の核酸は、1つ以上のアデノウイルスヘルパー機能遺伝子を含む。

【0172】

いくつかの実施形態では、核酸は、コンピテント細胞又はパッケージング細胞に共トランスフェクトされる。共トランスフェクションの方法は、当技術分野で公知であり、限定されないが、リポフェクタミン、エレクトロポレーション、及びポリエチレンジアミンによるトランスフェクションが挙げられる。コンピテント細胞又はパッケージング細胞は、懸濁状態で培養された非接着細胞、又は接着細胞であってもよい。一実施形態では、H e L a細胞、H E K 293細胞及びP e r C. 6細胞（同系293株）など、任意の適切なパッケージング細胞株を使用することができる。一実施形態では、パッケージング細胞はヒト細胞である。一実施形態では、パッケージング細胞はH E K 293細胞である。一実施形態では、パッケージング細胞は昆虫細胞である。一実施形態では、パッケージング細胞はS f 9細胞である。いくつかの実施形態では、本方法は、トランスフェクトされた細胞を培養して、組換えウイルスを産生することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、組換えウイルスを回収することを含む。組換えウイルスを回収する方法には、例えば、米国特許第6,143,548号明細書及び同第9,408,904号明細書に開示されているものがある。いくつかの実施形態では、組換えウイルスは、細胞培養培地中に分泌され、培地から精製される。いくつかの実施形態では、パッケージング細胞を溶解し、内容物を精製して、組換えウイルスを回収する。いくつかの実施形態では、濾過又は遠心分離によってパッケージング細胞からウイルスを回収する。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーによってパッケージング細胞からウイルスを回収する。

【0173】

いくつかの実施形態では、哺乳動物宿主細胞を使用して、A A V V P 2融合ポリペプチドを発現させ、典型的にはA A V V P 1及びV P 3ポリペプチドと一緒に、A A Vピリオンに組み込む。この目的のために、H E K 293若しくはH E K 293 T / 17などのその誘導体又A A V 293細胞を、A A V V P 2融合ポリペプチドをコードする核酸

並びに A A V V P 1、V P 2 及び r e p ポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトすることができる。いくつかの実施形態では、H E K 2 9 3 細胞は、A A V 複製のためのアデノウイルスヘルパー機能、例えば、アデノウイルス E 2、E 4 及び／又は V A 遺伝子産物などをコードする核酸でさらにトランスフェクトする。いくつかの実施形態では、H E K 2 9 3 細胞は、A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする 1 つの核酸分子、A A V V P 1、V P 2 及び r e p ポリペプチドをコードする 1 つの核酸分子（具体的には、A A V V P 1 及び V P 2 ポリペプチドは、A A V c a p 遺伝子によってコードされ、より具体的には、A A V c a p 遺伝子中の A A V V P 2 開始コドンに変異している）、A A V 複製のための少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、又は少なくともアデノウイルスヘルパー機能をコードする 1 つの核酸分子（具体的には、前記核酸分子は、アデノウイルス E 2、E 4 及び V A 遺伝子産物をコードする）、並びに任意選択で、治療用 R N A 又はタンパク質をコードするさらに別の核酸分子で共トランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、治療用 R N A 又はタンパク質をコードする核酸分子は、A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドから構成される A A V カプシドに封入される。これらの実施形態では、治療用 R N A 又はタンパク質をコードする核酸分子は、典型的には、フランキング A A V I T R 配列をさらに含む。他の実施形態では、A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸分子は、A A V V P 2 融合ポリペプチドと A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドとから構成される A A V カプシドに封入される。これらの実施形態では、A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする核酸分子は、フランキング A A V I T R 配列をさらに含む。他の実施形態では、バーコード配列とフランキング A A V I T R 配列を含む核酸分子は、A A V V P 2 融合ポリペプチドと A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドとから構成される A A V カプシドに封入される。

10

20

30

40

【0174】

いくつかの実施形態では、r A A V ビリオンを産生する方法は、昆虫細胞をトランスフェクトすることを含む。好適な昆虫細胞としては、限定されないが、S f 9 細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に開示される核酸を含むバキュロウイルスで昆虫細胞をトランスフェクトすることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、第 1 の A A V 末端反復と第 2 の A A V 末端反復との間に介在する異種核酸配列を有する核酸を含むバキュロウイルスで昆虫細胞をトランスフェクトすることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、1 つ以上の追加の核酸を含むバキュロウイルスで昆虫細胞をトランスフェクトすることを含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上の追加の核酸は、A A V r e p 遺伝子及び／又は A A V c a p 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上の追加の核酸は、1 つ以上のアデノウイルスヘルパー機能遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、異種核酸が本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードしない場合、本方法は、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする追加の核酸で昆虫細胞をトランスフェクトすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、組換えウイルスを産生するのに適した条件下で昆虫細胞を培養する。いくつかの実施形態では、昆虫細胞からウイルスを回収する。いくつかの実施形態では、濾過又は遠心分離によって昆虫細胞からウイルスを回収する。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーによって昆虫細胞からウイルスを回収する。

【0175】

いくつかの実施形態では、細胞は、限定されないが、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞又はヒト細胞などの哺乳動物細胞から選択される。哺乳動物細胞は、肝細胞、脳細胞、脾細胞、腎細胞、血液細胞、肺細胞、筋肉細胞、心臓細胞、骨髄細胞、多能性造血前駆細胞などの多能性前駆細胞（M P P）、及び長期造血幹細胞（L T - H S C）などの造血幹細胞（H S C）からなる群から選択され得る。

【0176】

A A V V P 2 融合ポリペプチドを含む r A A V ビリオン

一態様において、本明細書には、本明細書に記載される A A V V P 2 融合ポリペプチ

50

ドを含む組換え AAV (rAAV) ビリオンが提供される。

【0177】

「rAAV」という略語は、組換えアデノ随伴ウイルスを指す。本明細書で使用される「rAAVベクター」とは、AAV由来でないポリヌクレオチド配列（即ち、AAVに対して異種のポリヌクレオチド）、典型的には細胞の遺伝子形質転換のための目的の配列を含むAAVベクターを指す。いくつかの実施形態では、異種核酸は、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、異種核酸は、治療用核酸、治療用タンパク質、又は治療用抗体若しくは抗体フラグメントをコードする。いくつかの実施形態では、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つ、場合によっては2つのAAV逆方向末端反復（ITR）配列に隣接されていてもよい。rAAVベクターという用語は、rAAVベクター粒子及びrAAVベクター核酸の両方を包含する。rAAVベクターは、一本鎖（ssAAV）又は自己相補性（scAAV）のいずれかであり得る。「AAVウイルス」又は「AAVウイルス粒子」又は「AAVビリオン」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質（典型的には、1つ以上の野生型AAVのカプシドタンパク質、又は1つ以上の野生型AAV由来のカプシドタンパク質の全てによって）と、封入されたポリヌクレオチドrAAVベクターとから構成されるウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド（即ち、哺乳動物細胞に送達される導入遺伝子など、野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、それは典型的には、「rAAVベクター粒子」、「rAAVビリオン」又は単に「rAAVベクター」と呼ばれる。

10

20

【0178】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるAAVビリオンは、1つ以上のAAVカプシドタンパク質を含む。典型的には、AAVでは、3つのカプシドタンパク質、VP1、VP2及びVP3が多量体化してカプシドを形成する。本明細書に開示されるrAAVビリオンは、AAV VP2融合ポリペプチドを含み、任意選択で、さらにAAV VP1及び／又はVP3ポリペプチドを含む。典型的には、本明細書に開示されるrAAVビリオンのカプシドは、VP1、VP3及びVP2融合ポリペプチドサブユニットから構成される。典型的には、本明細書に開示されるrAAVビリオンのカプシドは、ポリペプチドリガンドに融合していないAAV VP2カプシドポリペプチドを含まず、つまり、典型的には、全てのVP2サブユニットが、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチドである。本明細書に開示されるrAAVビリオンに含まれるAAVカプシドポリペプチドは、組換えウイルスを取得することができる任意のAAV血清型に由来するものであってよく、そうしたものとして、限定されないが、以下のAAV血清型：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAVrh. 32. 33、ウシAAV若しくはトリAAV. 5、又はそれらの任意のバリエーション、或いは例えばVP1、VP2及び／又はVP3カプシドポリペプチドの全長にわたって少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するそれらのバリエーションが挙げられる。

30

40

【0179】

カプシドタンパク質のポリペプチド配列は、当技術分野で公知であり、AAVのゲノム由来のものであってもよい。これらは、本明細書に開示されるAAVウイルス組成物において例示的なカプシドとして使用することができる。

【0180】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載されるrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドは、限定されないが、以下：AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6. 1、AAV6. 2、AAV6. 1. 2、AAV7、AAV7. 2、AAV8、AAV9、AAV9. 11、AAV9. 13、AAV9. 16、AAV9. 24、AAV9

50

. 45、AAV9. 47、AAV9. 61、AAV9. 68、AAV9. 84、AAV9
. 9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16. 3、AAV24. 1、AAV
27. 3、AAV42. 12、AAV42-lb、AAV42-2、AAV42-3a、
AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42
-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、A
AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-
12、AAV43-20、AAV43- 21、AAV43-23、AAV43-25、
AAV43-5、AAV44. 1、AAV44. 2、AAV44. 5、AAV223. 1
、AAV223. 2、AAV223. 4、AAV223. 5、AAV223. 6、AAV
223. 7、AAVl-7/rh. 48、AAVl-8/rh. 49、AAV2-15/
rh. 62、AAV2-3/rh. 61、AAV2-4/rh. 50、AAV2-5/r
h. 51、AAV3. 1/hu. 6、AAV3. 1/hu. 9、AAV3-9/rh. 5
2、AAV3-l l/rh. 53、AAV4-8/r 11. 64、AAV4-9/r
h. 54、AAV4-19/rh. 55、AAV5-3/rh. 57、AAV5-22/
rh. 58、AAV7. 3/hu. 7、AAV16. 8/hu. 10、AAV16. 12
/hu. 11、AAV29. 3/bb. 1、AAV29. 5/bb. 2、AAV106.
1/hu. 37、AAV114. 3/hu. 40、AAV127. 2/hu. 41、AA
V127. 5/hu. 42、AAV128. 3/hu. 44、AAV130. 4/hu.
48、AAV145. 1/hu. 53、AAV145. 5/hu. 54、AAV145.
6/hu. 55、AAV161. 10/hu. 60、AAV161. 6/hu. 61、A
AV33. 12/hu. 17、AAV33. 4/hu. 15、AAV33. 8/hu. 1
6、AAV52/hu. 19、AAV52. 1/hu. 20、AAV58. 2/hu. 2
5、AAV A3. 3、AAV A3. 4、AAV A3. 5、AAV A3. 7、AA
VC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAV
F5、AAVH2、AAVrh. 72、AAVhu. 8、AAVrh. 68、AAVrh
. 70、AAVpi. 1、AAVpi. 3、AAVpi. 2、AAVrh. 60、AAV
rh. 44、AAVrh. 65、AAVrh. 55、AAVrh. 47、AAVrh. 6
9、AAVrh. 45、AAVrh. 59、AAVhu. 12、AAVH6、AAVLK
03、AAVH-1/hu. 1、AAVH-5/hu. 3、AAVLG-10/rh. 4
0、AAVLG-4/rh. 38、AAVLG-9/hu. 39、AAVN721-8/
rh. 43、AAVCh. 5、AAVCh. 5Rl、AAVcy. 2、AAVcy. 3、
AAVcy. 4、AAVcy. 5、AAVCy. 5Rl、AAVCy. 5R2、AAVC
y. 5R3、AAVCy. 5R4、AAVcy. 6、AAVhu. 1、AAVhu. 2、
AAVhu. 3、AAVhu. 4、AAVhu. 5、AAVhu. 6、AAVhu. 7、
AAVhu. 9、AAVhu. 10、AAVhu. 11、AAVhu. 13、AAVhu
. 15、AAVhu. 16、AAVhu. 17、AAVhu. 18、AAVhu. 20、
AAVhu. 21、AAVhu. 22、AAVhu. 23. 2、AAVhu. 24、AA
Vhu. 25、AAVhu. 27、AAVhu. 28、AAVhu. 29、AAVhu.
29R、AAVhu. 31、AAVhu. 32、AAVhu. 34、AAVhu. 35、
AAVhu. 37、AAVhu. 39、AAVhu. 40、AAVhu. 41、AAVh
u. 42、AAVhu. 43、AAVhu. 44、AAVhu. 44Rl、AAVhu.
44R2、AAVhu. 44R3、AAVhu. 45、AAVhu. 46、AAVhu.
47、AAVhu. 48、AAVhu. 48Rl、AAVhu. 48R2、AAVhu.
48R3、AAVhu. 49、AAVhu. 51、AAVhu. 52、AAVhu. 54
、AAVhu. 55、AAVhu. 56、AAVhu. 57、AAVhu. 58、AAV
hu. 60、AAVhu. 61、AAVhu. 63、AAVhu. 64、AAVhu. 6
6、AAVhu. 67、AAVhu. 14/9、AAVhu. t 19、AAVrh. 2
、AAVrh. 2R、AAVrh. 8、AAVrh. 8R、AAVrh. 10、AAVr
h. 12、AAVrh. 13、AAVrh. 13R、AAVrh. 14、AAVrh. 1
7、AAVrh. 18、AAVrh. 19、AAVrh. 20、AAVrh. 21、AA

10

20

30

40

50

Vrh. 22、AAVrh. 23、AAVrh. 24、AAVrh. 25、AAVrh. 31、AAVrh. 32、AAVrh. 33、AAVrh. 34、AAVrh. 35、AAVrh. 36、AAVrh. 37、AAVrh. 37R2、AAVrh. 38、AAVrh. 39、AAVrh. 40、AAVrh. 46、AAVrh. 48、AAVrh. 48. 1、AAVrh. 48. 1. 2、AAVrh. 48. 2、AAVrh. 49、AAVrh. 51、AAVrh. 52、AAVrh. 53、AAVrh. 54、AAVrh. 56、AAVrh. 57、AAVrh. 58、AAVrh. 61、AAVrh. 64、AAVrh. 64R1、AAVrh. 64R2、AAVrh. 67、AAVrh. 73、AAVrh. 74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R mutant、AAVrh8R R533A mutant、AAAV、BAAV、caprine AAV、bovine AAV、AAVhE1. 1、AAVhEr1. 5、AAVhER1. 14、AAVhEr1. 8、AAVhEr1. 16、AAVhEr1. 18、AAVhEr1. 35、AAVhEr1. 7、AAVhEr1. 36、AAVhEr2. 29、AAVhEr2. 4、AAVhEr2. 16、AAVhEr2. 30、AAVhEr2. 31、AAVhEr2. 36、AAVhER1. 23、AAVhEr3. 1、AAV2. 5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-pre-miRNA-lol、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV Shuffle 100-1、AAV Shuffle 100-3、AAV Shuffle 100-7、AAV Shuffle 10-2、AAV Shuffle 10-6、AAV Shuffle 10-8、AAV Shuffle 100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh. 50、AAVrh. 43、AAVrh. 62、AAVrh. 48、AAVhu. 19、AAVhu. l、AAVhu. 53、AAV4-8/rh. 64、AAV LG-9/hu. 39、AAV54. 5/hu. 23、AAV54. 2/hu. 22、AAV54. 7/hu. 24、AAV54. 1/hu. 21、AAV54. 4R/hu. 27、AAV46. 2/hu. 28、AAV46. 6/hu. 29、AAV128. 1/hu. 43、真性タイプ (true type) AAV (ttAAV)、UPEN AAV10及び／又は日本型 (Japanese) AAV10カプシドポリペプチド、或いは例えば、VP1、VP2、及び／又はVP3カプシドポリペプチドの全長にわたって少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを含む群から独立して選択される、天然に存在する、又は突然変異型／バリエーションカプシドポリペプチドであり得る。

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドは、米国特許出願公開第20030138772号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるようなAAV血清型、例えば、限定されないが、以下：AAV1（米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号6及び64）、AAV2（米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号7及び70）、AAV3（米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号8及び71）、AAV4（米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号63）、AAV5（米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号114）、

AAV6 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号65)、AAV7 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号1~3)、AAV8 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号4及び95)、AAV9 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号5及び100)、AAV10 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号117)、AAV11 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号)、AAV12 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号119)、AAVrh10 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号81のアミノ酸1~738)、AAV16.3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号10)、AAV29.3/bb.l (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号11)、AAV29.4 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号12)、AAV29.5/bb.2 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号13)、AAV1.3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号14)、AAV13.3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号15)、AAV24.1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号16)、AAV27.3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号17)、AAV7.2 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号18)、AAVC1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号19)、AAVC3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号20)、AAVC5 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号21)、AAVF1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号22)、AAVF3 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号23)、AAVF5 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号24)、AAVH6 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号25)、AAVH2 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号26)、AAV42-8 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号27)、AAV42-15 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号28)、AAV42-5b (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号29)、AAV42-lb (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号30)、AAV42-13 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号31)、AAV42-3a (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号32)、AAV42-4 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号33)、AAV42-5a (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号34)、AAV42-10 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号35)、AAV42-3b (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号36)、AAV42-11 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号37)、AAV42-6b (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号38)、AAV43-1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号39)、AAV43-5 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号40)、AAV43-12 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号41)、AAV43-20 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号42)、AAV43-21 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号43)、AAV43-23 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号44)、AAV43-25 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号45)、AAV44.1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号46)、AAV44.5 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号47)、AAV223.1 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号48)、AAV223.2 (米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号49)、AAV223.4 (米国特許出願公開第20030

138772号明細書の配列番号50)、AAV223.5(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号51)、AAV223.6(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号52)、AAV223.7(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号53)、AAV A3.4(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号54)、AAV A3.5(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号55)、AAV A3.7(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号56)、AAV A3.3(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号57)、AAV42.12(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号58)、AAV44.2(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号59)、AAV42-2(米国特許出願公開第20030138772号明細書の配列番号9)、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

10

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドは、米国特許出願公開第20150159173号明細書(その内容は全体が参照により本明細書に援用される)に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下:AAV2(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号7及び23)、rh20(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号1)、rh32/33(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号2)、rh39(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号3、20及び36)、rh46(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号4及び22)、rh73(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号5)、rh74(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号6)、AV6.1(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号29)、rh.8(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号41)、rh.48.1(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号44)、hu.44(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号45)、hu.29(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号42)、hu.48(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号38)、rh54(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号49)、AAV2(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号7)、cy.5(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号8及び24)、rh.10(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号9及び25)、rh.13(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号10及び26)、AAV1(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号11及び27)、AAV3(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号12及び28)、AAV6(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号13及び29)、AAV7(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号14及び30)、AAV8(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号15及び31)、hu.13(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号16及び32)、hu.26(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号17及び33)、hu.37(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号18及び34)、hu.53(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号19及び35)、rh.43(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号21及び37)、rh2(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号39)、rh.37(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号40)、rh.64(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号43)、rh.48(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配

20

30

40

50

列番号44)、ch.5(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号46)、rh.67(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号47)、rh.58(米国特許出願公開第20150159173号明細書の配列番号48)、或いは、限定されないが、Cy5R1、Cy5R2、Cy5R3、Cy5R4、rh.13R、rh.37R2、rh.2R、rh.8R、rh.48.1、rh.48.2、rh.48.1.2、hu.44R1、hu.44R2、hu.44R3、hu.29R、ch.5R1、rh64R1、rh64R2、AAV6.2、AAV6.1、AAV6.12、hu.48R1、hu.48R2、及びhu.48R3を含むそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドは、米国特許第7198951号明細書(その内容は全体が参照により本明細書に援用される)に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下: AAV9(米国特許第7198951号明細書の配列番号1~3)、AAV2(米国特許第7198951号明細書の配列番号4)、AAV1(配列番号5)、AAV3(米国特許第7198951号明細書の配列番号6)、及びAAV8(米国特許第7198951号明細書の配列番号7)のものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドはAAV血清型に由来するものであってもよく、これは、N Pulicherla et al. (Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011)、その内容は全体が参照により本明細書に援用される)により記載されるようなAAV9配列における変異、例えば、限定されないが、以下: AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84であっても、又はそれを有してもよい。いくつかの実施形態では、AAVカプシドは、血液脳関門を介してベクターを送達するように操作された1つ以上の配列を含む(例えば、以下: B. E. Deverman et al., Nature Biotech, Vol. 34, No. 2, p 204-211(2016年2月1日にオンラインで公開)及びCaltech press release, A. Wetherston, www.neurology-cenfrd.com/2016/02/10/successfd/brain-barrierを参照; さらに、国際公開第2016/0492301号パンフレット及び米国特許第8,734,809号明細書(これら各々の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される)も参照されたい)。

【0185】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチド及び／若しくはAAV VP3ポリペプチドは、米国特許第6156303号明細書(その内容は全体が参照により本明細書に援用される)に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下: AAV3B(米国特許第6156303号明細書の配列番号1及び10、AAV6(米国特許第6156303号明細書の配列番号2、7及び11)、AAV2(米国特許第6156303号明細書の配列番号3及び8)、AAV3A(米国特許第6156303号明細書の配列番号4及び9)、又はそれらの誘導体のものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれ

10

20

30

40

50

る AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 ポリペプチド及び／若しくは AAV VP3 ポリペプチドは、米国特許出願公開第 20140359799 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載される AAV 血清型、例えば、限定されないが、以下：AAV8（米国特許出願公開第 20140359799 号明細書の配列番号 1）、AAVDJ（米国特許出願公開第 20140359799 号明細書の配列番号 2 及び 3）、又はそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 カプシドポリペプチド及び／若しくは AAV VP3 カプシドポリペプチドは、Grimm et al. (Journal of Virology 82 (12): 5887-5911 (2008))、その内容は全体が参照により本明細書に援用される）により記載されるように、AAVDJ 又はそのバリエーション、例えば、AAVDJ8（又は AAV-DJ8）のものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。AAVDJ8 のアミノ酸配列は、ヘパリン結合ドメイン（HBD）を除去するための 2 つ以上の変異を含み得る。非限定的な例として、米国特許第 7,588,772 号明細書（この内容は本明細書において全体が参照により援用される）に配列番号 1 として記載される AAV-DJ 配列は、2 つの変異：（1）アミノ酸 587 のアルギニン（R; Arg）がグルタミン（Q; Gln）に変化している R587Q 及び（2）アミノ酸 590 のアルギニン（R; Arg）がトレオニン（T; Thr）に変化している R590T を含み得る。別の非限定的な例として、3 つの変異：（1）アミノ酸 406 のリジン（K; Lys）がアルギニン（R; Arg）に変化している K406R、（2）アミノ酸 587 のアルギニン（R; Arg）がグルタミン（Q; Gln）に変化している R587Q 及び（3）アミノ酸 590 のアルギニン（R; Arg）がトレオニン（T; Thr）に変化している R590T を含み得る。

【0188】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 カプシドポリペプチド及び／若しくは AAV VP3 カプシドポリペプチドは、国際公開第 1998011244 号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載される AAV 血清型、例えば、限定されないが、AAV4（国際公開第 1998011244 号パンフレットの配列番号 1~20）のものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0189】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 カプシドポリペプチド及び／若しくは AAV VP3 カプシドポリペプチドは、国際公開第 2014144229 号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるように、AAV2G9 を産生するように AAV2 配列における突然変異であるか、又はそれを有し得る AAV 血清型のものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の rAAV ビリオン中に含まれる AAV VP2 融合ポリペプチド及び／又は AAV VP1 カプシドポリペプチド及び／又は AAV VP3 カプシドポリペプチド中に含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチドは、限定はされないが、AAV3-3（国際公開第 2005033321 号パンフレットの配列番号 217）、AAV1（国際公開第 2005033321 号パンフレットの配列番号 219 及び 202）、AAV106.1/hu.37（国際公開第 2005033321 号パンフレットの配列番号 10）、AAV114.3/hu.40（国際公開第 200503

3321号パンフレットの配列番号11)、AAV127.2/hu.41(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号6及び8)、AAV128.3/hu.44(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号81)、AAV130.4/hu.48(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号78)、AAV145.1/hu.53(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号176及び177)、AAV145.6/hu.56(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号168及び192)、AAV16.12/hu.11(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号153及び57)、AAV16.8/hu.10(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号156及び56)、AAV161.10/hu.60(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号170)、AAV161.6/hu.61(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号174)、AAV1-7/rh.48(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号32)、AAVl-8/rh.49(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号103及び25)、AAV2(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号211及び221)、AAV2-15/rh.62(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号33及び114)、AAV2-3/rh.61(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号21)、AAV2-4/rh.50(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号23及び108)、AAV2-5/rh.51(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号104及び22)、AAV3.1/hu.6(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号5及び84)、AAV3.1/hu.9(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号155及び58)、AAV3-l l/rh.53(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号186及び176)、AAV3-3(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号200)、AAV33.12/hu.17(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号4)、AAV33.4/hu.15(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号50)、AAV33.8/hu.16(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号51)、AAV3-9/rh.52(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号96及び18)、AAV4-19/rh.55(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号117)、AAV4-4(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号201及び218)、AAV4-9/rh.54(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号116)、AAV5(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号199及び216)、AAV52.1/hu.20(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号63)、AAV52/hu. l9(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号133)、AAV5-22/rh.58(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号27)、AAV5-3/rh.57(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号105)、AAV5-3/rh.57(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号26)、AAV58.2/hu.25(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号49)、AAV6(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号203及び220)、AAV7(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号222及び213)、AAV7.3/hu.7(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号55)、AAV8(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号223及び214)、AAVH-l/hu.1(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号46)、AAVH-5/hu.3(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号44)、AAVhu.1(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号144)、AAVhu.10(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号156)、AAVhu.11(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号153)、AAVhu.12(国際公開第20050333

10

20

30

40

50

21号パンフレット配列番号59)、AAVhu.13(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号129)、AAVhu.14/AAV9(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号123及び3)、AAVhu.15(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号147)、AAVhu.16(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号148)、AAVhu.17(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号83)、AAVhu.18(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号149)、AAVhu.19(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号133)、AAVhu.2(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号143)、AAVhu.20(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号134)、AAVhu.21(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号135)、AAVhu.22(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号138)、AAVhu.23.2(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号137)、AAVhu.24(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号136)、AAVhu.25(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号146)、AAVhu.27(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号140)、AAVhu.29(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号132)、AAVhu.3(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号145)、AAVhu.31(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号121)、AAVhu.32(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号122)、AAVhu.34(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号125)、AAVhu.35(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号164)、AAVhu.37(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号88)、AAVhu.39(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号102)、AAVhu.4(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号141)、AAVhu.40(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号87)、AAVhu.41(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号91)、AAVhu.42(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号85)、AAVhu.43(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号160)、AAVhu.44(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号144)、AAVhu.45(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号127)、AAVhu.46(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号159)、AAVhu.47(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号128)、AAVhu.48(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号157)、AAVhu.49(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号189)、AAVhu.51(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号190)、AAVhu.52(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号191)、AAVhu.53(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号186)、AAVhu.54(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号188)、AAVhu.55(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号187)、AAVhu.56(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号192)、AAVhu.57(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号193)、AAVhu.58(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号194)、AAVhu.6(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号84)、AAVhu.60(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号184)、AAVhu.61(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号185)、AAVhu.63(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号195)、AAVhu.64(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号196)、AAVhu.66(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号197)、AAVhu.67(国際公開第2

10

20

30

40

50

005033321号パンフレットの配列番号198)、AAVhu.7(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号150)、AAVhu.8(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号12)、AAVhu.9(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号155)、AAVLG-10/rh.40(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号14)、AAVLG-4/rh.38(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号86)、AAVLG-4/rh.38(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号7)、AAVN721-8/rh.43(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号163)、AAVN721-8/rh.43(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号43)、AAVpi.l(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号28)、AAVpi.2(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号30)、AAVpi.3(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号29)、AAVrh.38(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号86)、AAVrh.40(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号92)、AAVrh.43(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号163)、AAVrh.44(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号34)、AAVrh.45(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号41)、AAVrh.47(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号38)、AAVrh.48(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号115)、AAVrh.49(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号103)、AAVrh.50(国際公開第2005033321号パンフレット

の配列番号108)、AAVrh.51(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号104)、AAVrh.52(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号96)、AAVrh.53(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号97)、AAVrh.55(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号37)、AAVrh.56(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号152)、AAVrh.57(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号105)、AAVrh.58(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号106)、AAVrh.59(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号42)、AAVrh.60(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号31)、AAVrh.61(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号107)、AAVrh.62(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号114)、AAVrh.64(国際公開第2005033321号パンフレットの配列番号99)、AAVrh.65(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号35)、AAVrh.68(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号16)、AAVrh.69(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号39)、AAVrh.70(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号20)、AAVrh.72(国際公開第2005033321号パンフレット配列番号9)、又はこれらのバリエーションなど、限定はされないが、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVcy.6、AAVrh.12、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.25/4215、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.44を含めた、国際公開第2005033321号パンフレット(この内容は本明細書において全体が参照により援用される)に記載されるとおりのAAV血清型であるか、又はそれに由来し得る。バリエーションの非限定的な例としては、国際公開第2005033321号パンフレット(この内容は本明細書において全体が参照により援用される)の配列番号13、15、17、19、24、36、40、45、47、48、51~54、60~62、64~

77、79、80、82、89、90、93～95、98、100、101、109～113、118～120、124、126、131、139、142、151、154、158、161、162、165～183、202、204～212、215、219、224～236が挙げられる。

【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、国際公開第2015168666号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、AAVrh8R（国際公開第2015168666号パンフレットの配列番号9）、AAVrh8R A586Rミュータント（国際公開第2015168666号パンフレットの配列番号10）、AAVrh8R R533Aミュータント（国際公開第2015168666号パンフレットの配列番号11）、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

10

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、国際公開第2018/160582号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、AAVhu68（例えば、国際公開第2018/160582号パンフレットの配列番号2）、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

20

【0193】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、米国特許第9233131号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下：AAVhE1.1（米国特許第9233131号明細書の配列番号44）、AAVhEr1.5（米国特許第9233131号明細書の配列番号45）、AAVhEr1.14（米国特許第9233131号明細書の配列番号46）、AAVhEr1.8（米国特許第9233131号明細書の配列番号47）、AAVhEr1.16（米国特許第9233131号明細書の配列番号48）、AAVhEr1.18（米国特許第9233131号明細書の配列番号49）、AAVhEr1.35（米国特許第9233131号明細書の配列番号50）、AAVhEr1.7（米国特許第9233131号明細書の配列番号51）、AAVhEr1.36（米国特許第9233131号明細書の配列番号52）、AAVhEr2.29（米国特許第9233131号明細書の配列番号53）、AAVhEr2.4（米国特許第9233131号明細書の配列番号54）、AAVhEr2.16（米国特許第9233131号明細書の配列番号55）、AAVhEr2.30（米国特許第9233131号明細書の配列番号56）、AAVhEr2.31（米国特許第9233131号明細書の配列番号58）、AAVhEr2.36（米国特許第9233131号明細書の配列番号57）、AAVhEr1.23（米国特許第9233131号明細書の配列番号53）、AAVhEr3.1（米国特許第9233131号明細書の配列番号59）、AAV2.5T（米国特許第9233131号明細書の配列番号42）、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

30

40

【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオ

50

30

40

50

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 カプシドポリペプチド及び／若しくは AAV VP3 カプシドポリペプチドは、米国特許出願公開第 20150376240 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載される AAV 血清型、例えば、限定されないが、以下： AAV-8h（米国特許出願公開第 20150376240 号明細書の配列番号 6）、AAV-8b（米国特許出願公開第 20150376240 号明細書の配列番号 7）を含む。

号5)、AAV-h(米国特許出願公開第20150376240号明細書の配列番号2)、AAV-b(米国特許出願公開第20150376240号明細書の配列番号1)、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。
【0197】

いくつかの実施形態では、本発明のAAV粒子は、限定はされないが、AAV SM 10-2(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号22)、AAV Shuffle 100-1(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号23)、AAV Shuffle 100-3(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号24)、AAV Shuffle 100-7(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号25)、AAV Shuffle 10-2(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号34)、AAV Shuffle 10-6(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号35)、AAV Shuffle 10-8(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号36)、AAV Shuffle 100-2(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号37)、AAV SM 10-1(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号38)、AAV SM 10-8(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号39)、AAV SM 100-3(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号40)、AAV SM 100-10(米国特許出願公開第20160017295号明細書の配列番号41)、又はこれらのバリエーションなど、米国特許出願公開第20160017295号明細書(この内容は本明細書において全体が参照により援用される)に記載されるとおりの配列であってもよい又はそれを有してもよいAAV血清型を含み、又はそれに由来し得る。

【0198】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、米国特許出願公開第20150238550号明細書(その内容は全体が参照により本明細書に援用される)に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下:BNP61 AAV(米国特許出願公開第20150238550号明細書の配列番号1)、BNP62 AAV(米国特許出願公開第20150238550号明細書の配列番号3)、BNP63 AAV(米国特許出願公開第20150238550号明細書の配列番号4)、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、米国特許出願公開第20150315612号明細書(その内容は全体が参照により本明細書に援用される)に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、以下:AAVrh.50(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号108)、AAVrh.43(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号163)、AAVrh.62(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号114)、AAVrh.48(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号115)、AAVhu.19(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号133)、AAVhu.ll(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号153)、AAVhu.53(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号186)、AAV4-8/rh.64(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号15)、AAV LG-9/hu.39(米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号24)、

AAV54.5/hu.23 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号60)、AAV54.2/hu.22 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号67)、AAV54.7/hu.24 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号66)、AAV54.1/hu.21 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号65)、AAV54.4R/hu.27 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号64)、AAV46.2/hu.28 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号68)、AAV46.6/hu.29 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号69)、AAV128.1/hu.43 (米国特許出願公開第20150315612号明細書の配列番号80)、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

10

【0200】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1カプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、国際公開第2015121501号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるAAV血清型、例えば、限定されないが、真性型 (true type) AAV (ttAAV) (国際公開第2015121501号パンフレットの配列番号2)、「UPenn AAV10」(国際公開第2015121501号パンフレットの配列番号8)、「日本型 (Japanese) AAV10」(国際公開第2015121501号パンフレットの配列番号9)、若しくはそれらのバリエーションのものであるか、又はそれに由来するものであってもよい。

20

【0201】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1ポリペプチドカプシドポリペプチド及び／若しくはAAV VP3カプシドポリペプチドは、国際公開第2015191508号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に開示されるカプシドポリペプチドから選択され得る。

【0202】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、目的とする特定の細胞型において形質導入若しくは向性の増強、導入遺伝子の発現延長、及び／又は改善された安全プロファイルを備えるハイブリッド血清型のものであってもよい。ハイブリッド血清型は、トランスカプシド化、カプシド表面への二重特異性抗体の吸着、モザイクカプシド、及びキメラカプシド、及び／又は他のカプシドタンパク質修飾によって作製することができる。

30

【0203】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、カプシドタンパク質の合理的突然変異誘発（例えば、Pulicherla et al, Mol Ther, 2011, 19:1070-1078を参照）、カプシドへのペプチドリガンドの組み込み、及び新たなAAVバリエーションを産生するための指向性進化により、特定の治療用途に向けてさらに修飾してもよい。

40

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、限定されないが、ヒ

50

ト、非ヒト霊長類、鳥類、ウシを含め、様々な種から選択さ得る A A V 血清型のものであってもよい。一実施形態では、A A V は、トリ A A V (A A A V) であってもよい。A A A V 血清型は、米国特許第 9 2 3 8 8 0 0 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載される配列、例えば、A A A V (米国特許第 9, 2 3 8, 8 0 0 号明細書の配列番号 1、2、4、6、8、10、12、及び 14)、若しくはそれらのバリエーションであるか、又はそれを含み得る。

【0205】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、ウシ A A V (B A A V) であるか、又はそれ由来であり得る A A V 血清型のものであってもよい。B A A V 血清型は、米国特許第 9, 1 9 3, 7 6 9 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているような配列、例えば、限定されないが、B A A V (米国特許第 9, 1 9 3, 7 6 9 号明細書の配列番号 1 及び 6)、若しくはそのバリエーションであってもよいし、又はそれを有していてもよい。B A A V 血清型は、米国特許第 7 4 2 7 3 9 6 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているような配列、例えば、限定されないが、B A A V (米国特許第 7 4 2 7 3 9 6 号明細書配列番号 5 及び 6)、若しくはそれらのバリエーションであるか、又はそれを含み得る。

【0206】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、ヤギ A A V であるか、又はそれ由来であり得る A A V 血清型のものであってもよい。ヤギ A A V 血清型は、米国特許第 7 4 2 7 3 9 6 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているような配列、例えば、限定されないが、ヤギ A A V (米国特許第 7 4 2 7 3 9 6 号明細書の配列番号 3)、若しくはそれらのバリエーションであってもよいし、又はそれを有していてもよい。

【0207】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、2 つ以上の親血清型からのハイブリッド A A V として操作され得る A A V 血清型のものであってもよい。いくつかの実施形態では、血清型は、A A V 2 及び A A V 9 からの配列を含む A A V 2 G 9 であってもよい。A A V 2 G 9 A A V 血清型は、その内容全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 0 1 7 0 0 5 号明細書に記載されているような配列であってもよいし、又はそれを有していてもよい。

【0208】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、P u l l i c h e r l a e t a l. (M o l e c u l a r T h e r a p y 1 9 (6) : 1 0 7 0 - 1 0 7 8 (2 0 1 1) ; その内容は全体が参照により本明細書に援用される) に記載されているように、アミノ酸 3 9 0 ~ 6 2 7 (V P 1 番号付け) に変異を有する A A V 9 カプシドライブラリーによって産生され得る A A V 血清型のものであってもよい。血清型並びに対応するヌクレオチド及びアミノ酸置換は、限定されないが、以下のものであり得る: A A V 9 . 1 (G 1 5 9 4 C ; D 5 3 2 H) 、 A A V 6 . 2 (T 1 4 1 8 A 及び T 1 4 3 6 X ; V 4 7 3 D 及び I 4 7 9 K) 、 A A V 9 . 3 (T 1 2 3 8 A ; F 4 1 3 Y) 、 A A V 9 . 4 (T 1 2 5 0 C 及び A 1 6 1 7 T ; F 4 1 7 S) 、 A A V 9 . 5 (A 1 2 3 5 G 、 A 1 3 1 4 T 、 A 1 6 4 2 G 、 C 1 7 6 0 T ; Q 4 1 2 R 、 T 5 4 8 A 、 A 5 8 7 V) 、 A A V 9 . 6 (T 1 2 3 1 A ; F 4 1 1 I) 、 A A V 9 . 9 (G 1 2 0 3 A 、 G 1 7 8 5 T

; W595C)、AAV9.10(A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11(A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13(A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14(T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16(A1775T;Q592L)、AAV9.24(T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26(A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33(A1667C;D556A)、AAV9.34(A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35(A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40(A1694T、E565V)、AAV9.41(A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44(A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45(A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46(G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47(G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48(C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50(A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53(G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54(C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55(T1605A;F535L)、AAV9.58(C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59(T1336C;Y446H)、AAV9.61(A1493T;N498I)、AAV9.64(C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65(C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68(C1510A;P504T)、AAV9.80(G1441A、;G481R)、AAV9.83(C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87(T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90(A1196T;Y399F)、AAV9.91(T1316G、A1583T、C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93(A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94(A1675T;M559L)並びにAAV9.95(T1605A;F535L)。

10

20

30

【0209】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、国際公開第2014160092号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）の配列番号1及び3のカプシド配列を含み得る。

【0210】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、国際公開第2014052789号パンフレット（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）の配列番号1又は配列番号2～4のAAVカプシド配列を含み得る。

40

【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載のrAAVビリオンに含まれるAAV VP1及び／若しくはVP3ポリペプチドは、米国特許第8,927,514号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に開示されているような血液脳関門を通過する能力が増強され得る。このようなカプシドタンパク質の

50

アミノ酸配列及び核酸配列としては、限定されないが、米国特許第 8, 927, 514 号明細書の配列番号 2 ~ 17 及び配列番号 25 ~ 33 を挙げることができる。

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 及び／若しくは VP3 ポリペプチドは、AAV5 カプシドタンパク質又はそのバリエーション、例えば、米国特許第 7, 056, 502 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載のものであってもよい。

【0213】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 及び／若しくは VP3 ポリペプチドは、AAV6 カプシドタンパク質又はそのバリエーションであってよい。

10

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 及び／若しくは VP3 ポリペプチドは、AAV8 カプシドタンパク質又はそのバリエーション、例えば、米国特許第 8, 318, 480 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）の配列番号 2 のアミノ酸配列に記載のものであってもよい。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 及び／若しくは VP3 ポリペプチドは、AAV9 カプシドタンパク質又はそのバリエーションであってよく、これは、例えば、米国特許第 7, 198, 951 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）のアミノ酸配列 2 又は米国特許出願公開第 20130224836 号明細書（その内容は全体が参照により本明細書に援用される）に開示されている配列番号 2、4 若しくは 6 の配列を含み、ここで、上記アミノ酸配列の表面露出チロシン残基の少なくとも 1 つは、別のアミノ酸残基で置換されている。

30

【0216】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれる AAV VP2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の rAAV ビリオンに含まれる AAV VP1 及び／若しくは VP3 ポリペプチドは、特定の特性を獲得するように操作されたバリエーションカプシドタンパク質であってよい。操作されたカプシドを入手するためのそのような方法については、例えば、国際公開第 2011038187 号パンフレット（この内容は全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている。そのような方法及びベクターについてはまた、例えば、国際公開第 2012112832 号パンフレット及び国際公開第 2015054653 号パンフレット（これらの内容は全体が参照により本明細書に援用される）にも記載されている。そのようなバリエーションカプシドとしては、例えば、国際公開第 2015054653 号パンフレットの配列番号 23、又はそのバリエーションが挙げられる。さらなるバリエーションカプシドとしては、例えば、国際公開第 2017 / 019994 号パンフレット（この内容は全体が参照により援用される）に記載されるカプシド配列が挙げられる。実施形態では、AAV カプシドポリペプチドは、Anc80 AAV カプシド配列のカプシド（例えば、国際公開第 2017019994 号パンフレットの配列番号 1）、例えば、Anc80L65（例えば、国際公開第 2017019994 号パンフレットの配列番号 23）、又は、例えば、Anc110（例えば、国際公開第 2017019994 号パンフレットの配列番号 42）を含み得る。

40

【0217】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、A A V 1 0 カプシドタンパク質又はそのバリエーションであってもよく、これは、例えば、欧州特許第 2 3 4 1 0 6 8 号明細書の配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む。

【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の A A V V P 2 融合ポリペプチドに含まれる A A V V P 2 カプシドポリペプチド、並びに／又は本明細書に記載の r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 1 及び／若しくは V P 3 ポリペプチドは、A A V D J カプシドタンパク質、A A V D J / 8 カプシドタンパク質、又はそのバリエーションであってもよい。いくつかの実施形態では、A A V D J カプシドタンパク質及び／又は A A V D J / 8 カプシドタンパク質は、第 1 の A A V 血清型（例えば、A A V 2）に由来する第 1 の領域と、第 2 の A A V 血清型（例えば、A A V 8）に由来する第 2 の領域と、第 3 の A A V 血清型（例えば、A A V 9）に由来する第 3 の領域とを含むアミノ酸配列を含んでもよく、ここで第 1、第 2 及び第 3 の領域は、本明細書に開示される任意のアミノ酸配列を含み得る。

10

【0219】

いくつかの実施形態では、A A V カプシドポリペプチドの血清型は、所望の分布、形質導入効率及び要求される細胞ターゲティングに依存し得る。Sorrentino et al. (comprehensive map of CNS transduction by eight adeno-associated virus serotypes upon cerebrospinal fluid administration in pigs, Molecular Therapy accepted article preview online 07 December 2015; doi:10.1038/mt.2015.212; この内容は本明細書において全体が参照により援用される) らによって記載されるとおり、A A V 血清型は異なる分布、形質導入効率及び細胞ターゲティングをもたらした。所望の有効性をもたらすためには、標的とする細胞のみならず、所望の形質導入効率及び分布にもまた最良に適合する A A V 血清型を選択する必要がある。

20

【0220】

いくつかの実施形態では、r A A V ビリオンは、前記ポリペプチドリガンドに融合していない以外は、同一の A A V V P 2 カプシドポリペプチドを含む r A A V ビリオンと比較して、少なくとも 1 つの組織又は細胞型における形質導入の増加及び／又は向性の増加を示す。

30

【0221】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの組織又は細胞型の形質導入が、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、6 0 0 %、7 0 0 %、8 0 0 %、9 0 0 % 又は 1 0 0 0 % 増加する。いくつかの実施形態では、r A A V ビリオンは、前記ポリペプチドリガンドに融合していない以外は同一の A A V V P 2 カプシドポリペプチドを含む r A A V ビリオンと比較して、少なくとも 1 つの組織若しくは細胞型において少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0、少なくとも 1 0 0 0 倍、又は 1 0 0 0 倍超増加した形質導入を示す。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの組織又は細胞型における向性は、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 5 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 %、6 0 0 %、7 0 0 %、8 0 0 %、9 0 0 % 若しくは 1 0 0 0 % 増加する。

40

【0222】

いくつかの実施形態では、前記 r A A V ビリオンに含まれる全ての A A V V P 2 カプシドポリペプチドは、直接又はリンカーを介して、ポリペプチドリガンドに融合される。

50

【0223】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンは、ノンコーディング核酸、タンパク質又はRNAコード配列、発現カセット、多重発現カセット、相同組換え用配列、及びゲノム遺伝子ターゲティングカセットからなる群から選択される核酸配列をさらに含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンは、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸配列をさらに含む。これらの実施形態の一部では、rAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチドと、rAAVビリオンに含まれる前記核酸配列によってコードされるAAV VP2融合ポリペプチドとは同じである。

【0225】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンは、治療用核酸、治療用タンパク質、又は治療用抗体若しくは抗体フラグメントをコードする核酸配列を含む。

【0226】

治療用核酸は、mRNA、siRNA、miRNA、shRNA、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群から選択され得る。

【0227】

抗体フラグメントは、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単ドメイン抗体(dAb)、及び一本鎖可変フラグメント(scFv)からなる群から選択され得る。

【0228】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオンは、AAV VP1及びVP3ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシAAV又はトリAAVからなる群から独立して選択されるAAV血清型のものである。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV1、AAV6、AAV8及びAAV9からなる群から選択されるAAV血清型のものである。これらの実施形態の一部において、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、同じAAV血清型である。

【0229】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンに含まれるAAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドは、前記AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドから構成されるAAVビリオンの標的細胞上に存在する天然の受容体に対する少なくとも1つの結合部位に少なくとも1つの変異を含む。特定の実施形態では、天然の受容体に対する少なくとも1つの必須結合部位は、AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドにおいて変異している。いくつかの実施形態では、AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドは、各AAVカプシドポリペプチドの共有VP3領域に同じ少なくとも1つの変異を含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV6のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態のいくつかでは、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) K531E及びV473D；ii) K531E、K459S、V473D及びN500E；iii) G266A及びN269Q；iv) G266A、N269Q及びD590A；v) K531E、V473D、G266A及びN269Q；又はvi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q及びD590Aを含む。

10

20

30

40

50

【0230】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV8のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q及びA592Dからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) G268E及びN271Q；ii) S387A；iii) G268E、N271Q及びS387A；iv) A592Q；又はv) A592Dを含む。

10

【0231】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV9のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して以下：Q590A、W503A、N562A及びE563Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) W503A；ii) N562A及びE563A；iii) Q590A及びW503A；又はiv) Q590A、W503A、N562A及びE563Aを含む。

20

【0232】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV2のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号6のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換R585Aを含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して以下：V473D、N500E及びR514Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド、並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) V473D及びN500E；ii) R514A；又はiii) V473D、N500E及びR514Aを含む。

30

【0234】

一態様では、本明細書には、本明細書に記載のrAAVビリオンを含む細胞が提供される。

【0235】

いくつかの実施形態では、細胞は、宿主細胞である。いくつかの実施形態では、rAAVビリオンは、前記宿主細胞中でアセンブリされる。宿主細胞は、昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）及びHEK293細胞又はその誘導体、例えば、HEK293T/17細胞又はAAV293細胞からなる群から選択され得る。

40

【0236】

いくつかの実施形態では、細胞は、限定されないが、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞又はヒト細胞などの哺乳動物細胞から選択される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、肝細胞、脳細胞、脾細胞、腎細胞、血液細胞、肺細胞、筋細胞、心臓細胞、骨髄細胞、多能性造血前駆細胞などの多能性前駆細胞（MPP）、及び長期造血幹細胞（LT-HSC）などの造血幹細胞（HSC）からなる群から選択される。

【0237】

医薬組成物及び治療方法

一態様において、本明細書には、本明細書に記載のrAAVビリオンと、薬学的に許容さ

50

れる賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

【0238】

本明細書に記載される rAAV ビリオンを製剤化して、製剤として有用な組成物を調製することができる。例示的な製剤としては、例えば、米国特許第 9,051,542 号明細書及び同第 6,703,237 号明細書に開示されているものが挙げられ、これらは参照によりその全体が援用される。本開示の組成物は、哺乳動物対象、例えば、ヒトへの投与のために製剤化することができる。いくつかの実施形態では、送達システムは、筋肉内、皮内、粘膜、皮下、静脈内、髄腔内、注射可能なデポタイプのデバイス、又は局所投与のために製剤化され得る。

【0239】

いくつかの実施形態では、送達系が溶液又は懸濁液として製剤化される場合、送達系は許容可能な担体、例えば、水性担体中にある。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.8%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などを使用することができる。これらの組成物は、滅菌及び／又は滅菌濾過してもよい。得られる水溶液は、そのまま使用するために包装してもよいし、凍結乾燥してもよい。いくつかの実施形態では、凍結乾燥製剤は投与前に無菌溶液と合わせる。

【0240】

いくつかの実施形態では、組成物、例えば、医薬組成物は、生理学的条件に近似させるための薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、張力調整剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含有し得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、防腐剤を含む。いくつかの他の実施形態では、医薬組成物は、防腐剤を含まない。

【0241】

医薬組成物は、典型的には、その意図される投与経路に適合するように処方される。投与経路の非限定的な例としては、非経口投与、例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、髄腔内投与、筋肉内投与、又は注射若しくは注入投与が挙げられる。適切な薬学的組成物を製剤化する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、以下を参照されたい：Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed, 2005; 及び Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY)。

【0242】

また、本明細書には、医薬品として使用するための rAAV ビリオン又はそれを含む医薬組成物も提供する。例えば、本明細書に開示される rAAV ビリオンは、治療用 RNA 又はタンパク質をコードする異種核酸を標的細胞に送達するために投与され得る。従って、本明細書で使用される「治療用途」又は「治療」という用語には、疾患の治療又は予防のための遺伝子治療が含まれ、「遺伝子治療」という用語は、患者の臨床状態を改善することを目的とした欠陥遺伝子の修正のために、細胞、組織又は器官への外来遺伝物質の指向性導入の概念として広義に定義することができる。例えば、異種核酸は、遺伝性疾患の原因となる変異又は欠失した標的細胞内の遺伝子を置換することができる。本明細書に開示される rAAV ビリオンの投与は、そのような遺伝性疾患を治療、予防し、遅延させ、緩徐にするか、又は改善するのに役立ち得る。いくつかの実施形態では、「遺伝子治療」は「体細胞治療」のみを指し、世代から世代へと受け継がれる遺伝性の変化を誘発し得る「生殖細胞系列治療」は含まず、ここで、体細胞治療は、治療対象の個体に治療効果を限定する。本明細書に記載の rAAV ビリオンは、インビボ又はエクスピボで投与することができる。本明細書で使用される用語「治療（処置）する」及び「治療（処置）」は、本明細書に開示される rAAV ビリオンを含む組成物を有効用量又は有効な複数用量で、それを必要とする動物（ヒトを含む）に投与するステップを含む。上記用量が障害／疾患の発症前に投与される場合、この投与は予防的である。用量が障害／疾患の発症後に投与さ

10

20

30

40

50

れる場合、この投与は治療的である。いくつかの実施形態では、有効量は、治療される障害／疾患状態に関連する少なくとも1つの症状を検出可能に緩和（排除若しくは軽減のいずれか）する用量、障害／疾患状態への進行を遅らせるか又は予防する用量、障害／疾患状態の進行を遅らせるか若しくは予防する用量、疾患の程度を低減する量、疾患の寛解（部分的若しくは全体的）をもたらす用量、及び／又は生存期間を延長する用量である。この用語は、完全な治療（即ち、治癒）及び／又は予防を包含するが、それを必要とするわけではない。

【0243】

一態様において、本明細書には、導入遺伝子を細胞に送達する方法であって、本明細書に記載のrAAVビリオン又はそれを含む医薬組成物と細胞を接触させることを含む方法が提供される。

10

【0244】

一態様において、本明細書には、導入遺伝子を細胞に送達する方法であって、上記細胞が、前記ポリペプチドリガンドが特異的に結合する細胞表面分子を発現する方法が提供される。

【0245】

いくつかの実施形態では、細胞は、生きている対象中にある。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物対象、例えば、ヒトである。

【0246】

一態様では、本明細書には、本明細書に記載のrAAVビリオン又はそれを含む医薬組成物を治療的治療レジメンで、又はワクチンとして使用する方法が提供される。

20

【0247】

一態様では、本明細書には、治療方法において対象に投与される全rAAVビリオンの量を減少させる方法に、本明細書に記載のrAAVビリオン又はそれを含む医薬組成物を使用する方法が提供され、この方法は、前記ポリペプチドリガンドに融合していない以外は同一のAAV VP2カプシドポリペプチドを含むrAAVの投与量と比較して、より少ない量の全rAAVビリオンを対象に投与することを含み、これにより同様の治療効果を達成することができる。

【0248】

一態様において、本明細書には、治療方法において対象に投与されるrAAVビリオンの形質導入効率を高める方法に、本明細書に記載のrAAVビリオン又はそれを含む医薬組成物を使用する方法が提供され、この方法は、対象に所定量のrAAVビリオンを投与することを含み、ここで、AAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオンは、前記ポリペプチドリガンドに融合していない以外は同一のAAV VP2カプシドポリペプチドを含むrAAVビリオンと比較して、より高速で細胞型又は組織を形質導入することができる。

30

【0249】

AAV VP2融合ポリペプチドライブラリー

一態様において、本明細書には、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから成るAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含むライブラリー構築物が提供され、ポリペプチドリガンドは、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合しており、ポリペプチドリガンドは、10kDaまでの分子量を有する、ライブラリー構築物が提供される。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物によってコードされるポリペプチドリガンドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のアミノ酸位置にランダム化アミノ酸を含む。

【0251】

一態様では、本明細書には、例えば、AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから成るAAV VP2融合ポリペプチドをコー

50

ドする核酸配列を含むライブラリー構築物が提供され、ポリペプチドリガンドは、AAV VP2 カプシドポリペプチドのN末端に融合され、前記ポリペプチドリガンドは、GP2 ポリペプチド、Sso7d ポリペプチド及びアフィボディからなる群から選択される。

【0252】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、配列番号1のSso7d ポリペプチド及びそれと少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有するSso7d ポリペプチドからなる群より選択される。

【0253】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドリガンドは、任意選択で、最大10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸置換を有する、配列番号1のSso7d ポリペプチドから選択される。

【0254】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドリガンドは、21位、23位、25位、28位、30位、32位、40位、42位及び44位のアミノ酸残基Xが、独立して、D、R、H、N、A、I、Y及びWから選択される配列番号1のSso7d ポリペプチド、並びにそれと少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有するSso7d ポリペプチドからなる群から選択される。

【0255】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドリガンドは、21位、23位、25位、28位、30位、32位、40位、42位及び44位のアミノ酸残基Xが、独立して、D、R、H、N、A、I、Y、W及びアミノ酸置換から選択される配列番号1のSso7d ポリペプチドから選択され、ここで、配列番号1は、任意選択で、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1個のアミノ酸置換を有する。

【0256】

いくつかの実施形態では、コードされたAAV VP2 融合物は、ポリペプチドリガンドとAAV VP2 カプシドポリペプチドとの間にペプチドリンカーをさらに含む。これらの実施形態の一部において、前記ペプチドリンカーは、グリシン-セリン(GS) リンカー及びアラニン-プロリン-セリン(APS) リンカーからなる群から選択される。これらの実施形態の一部では、GS リンカーは、式[GGGGS]_nのものであり、ここで、nは、1~10の範囲の整数であり、例えば、nは、1、2、3、4、5又は6であり、特に、nは、1、2、3又は4である。いくつかの実施形態では、APS リンカーは、式[APS]_nのものであり、ここで、nは、1~10の範囲の整数であり、例えば、nは、1、2、3、4、5又は6であり、特に、nは、2、3、4又は5である。

【0257】

いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドをコードする核酸は、AAV VP2 カプシドポリペプチドの天然開始コドンを含まない。AAV VP2 カプシドポリペプチドの天然開始コドンは変異していてもよく、例えば、欠失していてもよい。いくつかの実施形態では、AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2 カプシドポリペプチドは、その最初の天然アミノ酸、例えば、対応する野生型AAV VP2 カプシドポリペプチドの最初のトレオニンが欠失している。

【0258】

一態様において、本明細書には、本明細書に記載の複数のライブラリー構築物を含むライブラリーが提供される。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、本明細書に記載の少なくとも2つの異なるライブラリー構築物を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーに含まれる少なくとも2つの異なるライブラリー構築物は、ポリペプチドリガンドをコードする核酸配列が異なっている。

【0259】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは、少なくとも10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、又は10⁹のユニークなライブラリー構築物を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、10²~10³、10³~10⁴、10⁴~10⁵

10

20

30

40

50

、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、又は $10^8 \sim 10^9$ のユニークなライブラリー構築物を含む。

【0260】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、又は 10^{10} のメンバーを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、 $10^8 \sim 10^9$ 、又は $10^9 \sim 10^{10}$ のメンバーを含む。

【0261】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは、ポリペプチドリガンドの全ての考えられるバリエーションをコードするライブラリー構築物を含む。

【0262】

いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、RNA分子、例えば、mRNA分子、又はDNA分子、例えば、cDNA分子、線状DNA分子又は環状DNA分子、例えば、プラスミドDNA分子である。いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドのオープンリーディングフレームは、前記プロモーターに作動可能に連結される。

【0263】

いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、プロモーターに作動可能に連結された前記AAV VP2融合ポリペプチドをコードする前記核酸配列を含むプラスミドDNA分子である。いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、レポーター配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、レポータータンパク質は、EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群より選択される。

【0264】

いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、バーコード配列をさらに含む。これらの実施形態の一部では、特定のAAV VP2融合ポリペプチド配列の各々に特定のバーコード配列が割り当てられ、これは、特定バーコード配列の各々が1つの特定のAAV VP2融合ポリペプチド配列に対応することを意味する。

【0265】

一部の実施形態では、ライブラリーは、AAVライブラリーであり、つまり、各ライブラリー構築物は、rAAVビリオン内に存在する。

【0266】

いくつかの実施形態では、rAAVビリオンは、例えば、そのカプシド内に、本明細書に記載されるAAV VP2融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、所与のrAAVビリオン、例えば、そのカプシドに含まれるAAV VP2融合ポリペプチドと、前記所与のrAAVビリオン中に存在するライブラリー構築物によってコードされるAAV VP2融合ポリペプチドは、同一である。いくつかの実施形態では、rAAVビリオンの大部分は、所与のrAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチドと同一であるAAV VP2融合ポリペプチドをコードするライブラリー構築物を含む。これは、AAVライブラリーの遺伝子型-表現型連結又はカプシドゲノム相関と呼ばれる。

【0267】

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーは、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は 10^9 のユニークなAAVバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、AAVライブラリーは、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、又は $10^8 \sim 10^9$ のユニークなAAVバリエーションを含む。

【0268】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーは、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、又は 10^{10} のAAVメンバーを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、 $10^8 \sim 10^9$ 、又は $10^9 \sim 10^{10}$ のAAVメンバーを含む。

【0269】

本明細書に記載のAAVライブラリーは、所望の特徴を有するカプシドポリペプチド、例えば、AAV VP2融合ポリペプチドの表現型選択に使用することができる。AAV VP2融合ポリペプチドは、複製AAVゲノムからシスでコードされる。これにより、表現型選択後にカプシドDNAの回収が可能になる。従って、ウイルスライブラリーの生産中に、カプソマーのランダムな混合や、不一致ウイルスゲノム包膜を最小限に抑えることが望まれる。これは、例えば、rAAVビリオン産生用の宿主細胞のトランスフェクションのために、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸分子と、AAV VP1及びVP3カプシドポリペプチドをコードする核酸分子との適切な比を使用するなど、rAAVビリオン産生のための適切な条件を選択することによって達成することができる。典型的には、トランスフェクション反応において、VP1及びVP3をコードする核酸は、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸に比べ過剰に使用される。AAV VP2融合ポリペプチドコード核酸は、平均して各宿主細胞が単一のAAV VP2融合ポリペプチドコード核酸でのみトランスフェクトされるような量で使用される。

【0270】

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーのrAAVビリオンに含まれる全てのAAV VP2カプシドポリペプチドは、直接又はリンカーを介して、ポリペプチドリガンドに融合される。

【0271】

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーの各ライブラリー構築物は、AAV VP2融合ポリペプチドオープンリーディングフレームの上流及び下流、例えば、ライブラリー構築物の5'末端及び3'末端に位置する2つのAAV逆方向末端反復(ITER)配列を含む。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドオープンリーディングフレームは、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ライブラリー構築物は、レポーター配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、レポータータンパク質は、以下：EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群より選択される。いくつかの実施形態では、レポーター配列は、プロモーター、例えば、ライブラリー構築物によって構成される第2のプロモーターに作動可能に連結される。

【0272】

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーのrAAVビリオンは、本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドを含み、さらにAAV VP1及びVP3ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、以下：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシAAV又はトリAAV.5からなる群から独立して選択される。いくつかの実施形態では、rAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、以下：AAV1、AAV6、AAV8及びAAV9からなる群から独立して選択されるAAV血清型のものである。いくつかの実施形態では、rAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、同じAAV血清型のものである。

【0273】

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーのrAAVビリオンに含まれるAAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドは、前記AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドからなるAAVビリオンの標的細胞上に存在する天然の受容体に対する少なくとも1つの結合部位に少なくとも1つの変異を含む。特定の実施形態では、天然の受容体に対する少なくとも1つの必須結合部位は、AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドにおいて変異している。いくつかの実施形態では、AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドは、各AAVカプシドポリペプチドの共有VP3領域に同じ少なくとも1つの変異を含む。

【0274】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV6のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群より選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) K531E及びV473D；ii) K531E、K459S、V473D及びN500E；iii) G266A及びN269Q；iv) G266A、N269Q及びD590A；v) K531E、V473D、G266A及びN269Q；又はvi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q及びD590Aを含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV8のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q及びA592Dからなる群より選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) G268E及びN271Q；ii) S387A；iii) G268E、N271Q及びS387A；iv) A592Q；又はv) A592Dを含む。

【0276】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV9のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して以下：Q590A、W503A、N562A及びE563Aからなる群より選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) W503A；ii) N562A及びE563A；iii) Q590A及びW503A；又はiv) Q590A、W503A、N562A及びE563Aを含む。

【0277】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV2のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号6のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換R585Aを含む。

【0278】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して以下：V473D、N500E及びR514Aからなる群より選択される、少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意

10

20

30

40

50

の組み合わせを含む。これらの実施形態の一部では、AAV VP2 融合ポリペプチド並びに前記 AAV VP1 及び VP3 ポリペプチドは各々、配列番号 7 の VP1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：i) V473D 及び N500E；ii) R514A；又は iii) V473D、N500E 及び R514A を含む。

【0279】

いくつかの実施形態では、AAV ライブラリーの rAAV ビリオンに含まれる AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 AAV1 のものであり、配列番号 7 の VP1 アミノ酸配列に対して以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及び P191N からなる群より選択される、少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、AAV VP2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、T162R、及び／又は P191N、とりわけ 3 つのアミノ酸置換：D213A、T162R、及び P191N の全てを含む。

10

【0280】

他の実施形態では、AAV ライブラリーの rAAV ビリオンに含まれる AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV1 以外の AAV 血清型のものであり、配列番号 7 の VP1 アミノ酸配列に対して以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及び P191N からなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも 1 つに対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。

【0281】

特定のそうした実施形態では、前記 rAAV ビリオンに含まれる前記 AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 8 のものであり、配列番号 4 の VP1 アミノ酸配列に対して以下：E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R、及び P192N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、AAV VP2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D214A、K163R 及び／又は P192N、とりわけ 3 つの置換：D214A、K163R 及び P192N の全てを含む。

20

【0282】

他のそうした実施形態では、前記 rAAV ビリオンに含まれる前記 AAV VP2 融合ポリペプチドは、AAV 血清型 9 のものであり、配列番号 5 の VP1 アミノ酸配列に対して以下：E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R 及び P191N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、AAV VP2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、S162R 及び／又は P191N、とりわけ 3 つのアミノ酸置換 D213A、S162R 及び P191N の全てを含む。

30

【0283】

一態様では、本明細書に記載のバリエーション AAV VP2 融合ポリペプチドを各々含有する複数の rAAV ビリオンを含むライブラリーが本明細書に提供される。

【0284】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは、本明細書に記載の変異型 AAV VP2 融合ポリペプチドを各々含有する少なくとも 2 つの異なる rAAV ビリオンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの異なる rAAV ビリオンは、AAV VP2 融合ポリペプチドに含まれるポリペプチドリガンドが異なる。

40

【0285】

いくつかの実施形態では、AAV ライブラリーは、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は 10^9 のユニークな rAAV ビリオンを含む。いくつかの実施形態では、AAV ライブラリーは、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、又は $10^8 \sim 10^9$ のユニークな rAAV ビリオンを含む。

【0286】

いくつかの実施形態では、AAV ライブラリーは、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4

50

、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、又は 10^{10} のrAAVビリオンメンバーを含む。いくつかの実施形態では、AAVライブラリーは、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^4$ 、 $10^4 \sim 10^5$ 、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^6 \sim 10^7$ 、 $10^7 \sim 10^8$ 、 $10^8 \sim 10^9$ 、又は $10^9 \sim 10^{10}$ のrAAVビリオンメンバーを含む。

【0287】

一部の実施形態では、前記ライブラリーに含まれるrAAVビリオンは、バーコード配列を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、特定のAAV VP2融合ポリペプチドには各々特定のバーコード配列が割り当てられており、これは、所与のアミノ酸配列のAAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオンが、対応するバーコード配列を有する核酸を含むことを意味する。バーコード配列は、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18又はそれ以上のヌクレオチドを含む。

10

【0288】

AAV VP2融合ポリペプチドバリエーションを同定する方法

一態様において、本明細書には、少なくとも1つの所望の特徴を備えるAAV VP2融合ポリペプチドを作製する方法が提供され、この方法は、前記少なくとも1つの所望の特徴を備えるコード化AAV VP2融合ポリペプチドについて本明細書に記載のライブラリーをスクリーニングすることを含む。

【0289】

いくつかの実施形態では、前記少なくとも1つの所望の特徴は、前記ポリペプチドリガンドを含まないが、それ以外はAAV VP2融合ポリペプチドに含まれるAAV VP2カプシドポリペプチドと同一であるAAV VP2カプシドポリペプチドと比較して、前記AAV VP2融合ポリペプチドによって媒介される少なくとも1つの組織又は細胞型における形質導入の増加及び／又は向性の増加である。

20

【0290】

一態様において、本明細書には、少なくとも1つの所望の特徴を備えるAAV VP2融合ポリペプチドを作製する方法であって、以下：b) 本明細書に記載のライブラリーを複数の細胞と接触させるステップと、c) 前記細胞の少なくとも一部から核酸分子を単離するステップと、d) ステップb) で単離された少なくとも1つの核酸分子のポリペプチドリガンド又はその断片をコードする配列の少なくとも一部を決定するステップとを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、ステップb) における複数の細胞は、非ヒトモデル動物、例えば、マウスモデル又は非ヒト霊長類モデル内に存在する。

30

【0291】

いくつかの実施形態では、本方法は、ステップb) の前に、本明細書に記載のAAVライブラリーを提供するステップa) をさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、ヘルパー機能（例えば、E2A、E4、VA、E1A及びE1B）がトランスで供給されるHEK293細胞又はHEK293誘導体細胞にパッケージングされる。いくつかの実施形態では、AAV rep機能は、rep78、rep68、rep52、及びrep40遺伝子産物を含む。いくつかの実施形態では、rep遺伝子は、トランスで供給される。いくつかの実施形態では、rep78及び／又はrep68オープンリーディングフレームの開始コドンにACGからATGに改変して、逆方向末端反復（ITR）を含むカプシドライブラリー構築物の複製を増大し、それによりAAVライブラリー製造収率を改善する。いくつかの実施形態では、cap遺伝子は、トランスで供給される。いくつかの実施形態では、cap遺伝子は、ヘルパーウイルス機能の存在下でHEK293細胞での製造中にのみ発現されるように、p40プロモーターによって制御される。いくつかの実施形態では、トランスで提供されるcap遺伝子のVP2オープンリーディングフレームの開始コドンは変異している。いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸は、AAV製造に際し、生産細胞株にペイロードとして供給される。

40

【0292】

50

いくつかの実施形態では、AAVライブラリーを提供するステップa)は、ai) AAV repをコードする核酸配列、AAV VP1カプシドポリペプチドをコードする核酸配列、AAV VP3カプシドポリペプチドをコードする核酸配列、及び本明細書に記載のAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸のライブラリーで細胞をトランスフェクトすること（ここで、各ライブラリー構築物は、その5'末端及び3'末端に2つのAAV逆方向末端反復（ITR）配列をさらに含む）と、a ii) AAVビリオン形成に適した条件下で細胞をインキュベートすること（任意選択で、細胞は、哺乳動物細胞、特にHEK293細胞、又は昆虫細胞、特にSf9細胞である）を含む。

【0293】

いくつかの実施形態では、前記AAV VP1カプシドポリペプチド及び前記AAV VP3カプシドポリペプチドは、AAV cap遺伝子を含む同じ核酸配列によってコードされ、特にここで、cap遺伝子中のVP2の開始コドンは変異している。

【0294】

いくつかの実施形態では、ステップb)の複数の細胞は、非ヒトモデル動物に存在する。いくつかの実施形態では、動物は、静脈内、頭蓋内、若しくは髄腔内注射、又はいくつかの他の経路（例えば、鼻腔内、肝内、脳室内、大槽内、硝子体内、蝸牛内など）による注射により、AAVライブラリーで処置される。AAVが目的の組織又は器官に移動するのに十分な時間（例えば、7、10、14、18、21、24、28、30日若しくはそれ以上）が経過した後、動物を犠牲にし、目的の組織／器官を採取する。いくつかの実施形態では、採取される目的の組織／器官は、中枢神経系、脳、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、骨髄、胃、脾臓、腸、肝臓、脾臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼球、血液、リンパ、及び口腔粘膜から選択される。いくつかの実施形態では、採取される目的の組織／器官は、全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、及び骨髄から選択される。

【0295】

いくつかの実施形態では、組織中の細胞は、細胞の細胞質又は目的の細胞小器官におけるレポーター配列の発現についてモニターする。いくつかの実施形態では、目的の細胞小器官は核である。いくつかの実施形態では、レポーター配列の発現によって証明されるAAVペイロードを含む細胞小器官を組織から単離する。いくつかの実施形態では、細胞小器官は核である。いくつかの実施形態では、本方法は、前記レポーター配列が発現している細胞を選択するステップをさらに含む。

【0296】

いくつかの実施形態では、ステップc)において、予定される組織又は細胞型の細胞からの核酸を単離する。いくつかの実施形態では、予定される組織の細胞は、中枢神経系、脳、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、骨髄、胃、脾臓、腸、肝臓、脾臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼球、血液、リンパ、及び口腔粘膜の細胞から選択される。いくつかの実施形態では、予定される組織の細胞は、全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、及び骨髄から選択される。いくつかの実施形態では、所定の細胞型の細胞は、多能性造血前駆細胞（MPP）、例えば、多能性造血前駆細胞、及び造血幹細胞（HSC）、例えば、長期造血幹細胞（LT-HSC）から選択される。いくつかの実施形態では、予定される組織又は細胞型の前記細胞は、複数の細胞を前記ライブラリーと接触させてから1～21日後、1～14日後、7～21日後、2～10日後、2～5日後に単離される。

【0297】

いくつかの実施形態では、核酸は、細胞小器官（例えば、核）から抽出される。いくつかの実施形態では、抽出される核酸はRNAであり、いくつかの実施形態では、抽出される核酸はDNAである。いくつかの実施形態では、抽出されたRNAを逆転写に供して、cDNAを産生させた後、これを増幅する。一部の実施形態では、バーコード化領域に特異的なプライマーを増幅に使用する。いくつかの実施形態では、可変ポリペプチドリガンドをコードする配列の少なくとも一部を増幅する。一部の実施形態では、増幅されたcD

NAを配列決定する。一部の実施形態では、インビボでの選択後に、特定の組織／器官における特定のAAVバリエーションの濃縮を観察する。

【0298】

いくつかの実施形態では、ステップc)は、前記細胞の少なくとも一部からRNAを単離することを含み、ステップd)は、サブステップd i)前記単離されたRNAの逆転写、d i i)ステップd i)で生成されたcDNAからのポリペプチドリガンド又はその断片をコードする配列の少なくとも一部のPCR増幅、及びd i i i)ポリペプチドリガンド配列の少なくとも一部を、例えば次世代シーケンシングによって配列決定することを含む。

【0299】

いくつかの実施形態では、本方法はさらに、1つの組織又は細胞型における特定のポリペプチドリガンド配列の、前記組織又は細胞型におけるポリペプチドリガンド配列の総数に対する相対的出現を決定するステップe)を含む。

【0300】

いくつかの実施形態では、AAV VP2融合ポリペプチドバリエーションのインビボ選択は、1、2、3、4、5又はそれ以上のラウンドで実施することができ、いずれの場合でも、前回のラウンドから得られたAAVバリエーションをプールするか、又は濃縮されたバリエーションのサブセットを合成し、インビトロ又はインビボで再選択する。

【0301】

いくつかの実施形態では、本方法は、ステップc)で単離された核酸分子からAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸配列の第2のライブラリーを産生するステップf)と、前記第2のライブラリーを用いて、ステップb)、c)、d)、及び任意選択でa)及びe)を反復すること、をさらに含む。

【0302】

いくつかの実施形態では、所望の回数の選択ラウンドの後、得られたバリエーションを分析する。いくつかの実施形態では、個々のバリエーションは、レポーター遺伝子などの導入遺伝子をインビボで所望の細胞又は器官に送達するために使用される。バリエーションの送達能力を分析した後、最良の候補を将来の使用のために選択する。

【0303】

いくつかの実施形態では、選択された候補は、ランダム変異誘発による機能的成熟、及び特定の細胞型又は組織の細胞の形質導入の改善などの改善された特徴を備えるバリエーションのインビボ又はインビトロでの選択に供する。

【0304】

一態様では、本明細書に記載の方法によって作製されたAAV VP2融合ポリペプチドが本明細書に提供される。

【0305】

また、本明細書に記載の方法によって作製されたAAV VP2融合ポリペプチドを含むrAAVビリオン及びそれを含む医薬組成物も本明細書に提供される。前記rAAVビリオン及び医薬組成物は、医薬品として使用することができる。

【0306】

改善された受容体結合及び／又は形質導入レベルを有するAAV VP2カプシドポリペプチド

一態様では、AAV血清型AAV1のAAV VP2カプシドポリペプチドが本明細書に提供され、これは、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。一部の実施形態では、AAV VP2カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、T162R、及び／又はP191N、特に3つのアミノ酸置換：D213A、T162R、及びP191Nの全てを含む。

【0307】

別の態様では、本明細書には、A A V 1 以外の A A V 血清型の A A V V P 2 カプシドポリペプチドが提供され、これは、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも 1 つに対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。

【0308】

いくつかの実施形態では、A A V V P 2 カプシドポリペプチドは、A A V 血清型 8 のものであり、これは、配列番号 4 の V P 1 アミノ酸配列に対して、E 1 4 7 S、P 1 8 6 G、P 1 6 7 R、M 2 1 2 V、G 2 0 0 R、D 2 1 4 A、K 1 6 3 R、及び P 1 9 2 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、A A V V P 2 カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 4 A、K 1 6 3 R 及び／又は P 1 9 2 N、とりわけ 3 つのアミノ酸置換 D 2 1 4 A、K 1 6 3 R 及び P 1 9 2 N の全てを含む。

10

【0309】

他の実施形態では、A A V V P 2 カプシドポリペプチドは、A A V 血清型 9 のものであり、配列番号 5 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び P 1 9 1 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含む。特に、A A V V P 2 カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び／又は P 1 9 1 N、とりわけ 3 つのアミノ酸置換 D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び／又は P 1 9 1 N の全てを含む。

20

【0310】

また、本明細書には、上に挙げた A A V V P 2 カプシドポリペプチドの 1 つとポリペプチドリガンドとを含む A A V V P 2 融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドが A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合している、A A V V P 2 融合ポリペプチドも提供される。

【0311】

実施形態

1. A A V V P 2 カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから成るアデノ随伴ウイルス (A A V) V P 2 融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドは、A A V V P 2 カプシドポリペプチドの N 末端に融合され、ポリペプチドリガンドは、最大 10 k D a の分子量を有する、A A V V P 2 融合ポリペプチド。

30

【0312】

2. 前記ポリペプチドリガンドが、少なくとも 1 つの組織若しくは細胞型に発現した細胞表面分子に特異的に結合し、且つ／又は前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、前記ポリペプチドリガンドを含まない A A V V P 2 カプシドポリペプチドと比較して、少なくとも 1 つの組織若しくは細胞型における形質導入の増加及び／又は向性の増加を媒介する、実施形態 1 の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0313】

3. 前記ポリペプチドリガンドが、G P 2 ポリペプチド、S s o 7 d ポリペプチド及びアフィボディからなる群から選択される、実施形態 1 又は 2 の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

40

【0314】

4. 前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の S s o 7 d ポリペプチド、及びそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % の配列同一性を有する S s o 7 d ポリペプチドからなる群より選択される、実施形態 3 の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0315】

5. 前記ポリペプチドリガンドが、配列番号 1 の S s o 7 d ポリペプチド（ここで、21 位、23 位、25 位、28 位、30 位、32 位、40 位、42 位及び 44 位のアミノ酸残基 X は、独立して、D、R、H、N、A、I、Y 及び W から選択される）、並びにそれと

50

少なくとも80%、85%、90%又は95%の配列同一性を有するS s o 7 dポリペプチドからなる群より独立して選択される、実施形態4のAAV VP2融合ポリペプチド。

【0316】

6. ポリペプチドリガンドとAAV VP2カプシドポリペプチドとの間にペプチドリンカーをさらに含み、特に、前記ペプチドリンカーが、グリシン-セリン(GS)リンカー及びアラニン-プロリン-セリン(APS)リンカーからなる群から選択され、より具体的には、GSリンカーは、式[G G G G S]_nのものであり、またAPSリンカーは、式[A P S]_nのものであり、式中、nは、1~10の範囲の整数であり、特に、nは、1、2、3、4、5又は6であり、より具体的には、GSリンカーの場合、nは、1、2、3又は4であり、APSリンカーの場合、nは、2、3、4又は5である、実施形態1~5のいずれか1つのAAV VP2融合ポリペプチド。

10

【0317】

7. 前記AAV VP2カプシドポリペプチドが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh. 8、AAVrh. 10、AAVrh. 32. 33、ウシAAV又はトリAAV. 5からなる群、特に、AAV1、AAV6、AAV8及びAAV9からなる群から選択されるAAV血清型のものである、実施形態1~6のいずれか1つのAAV VP2融合ポリペプチド。

【0318】

8. AAV VP2カプシドポリペプチドが、その天然の受容体に対する少なくとも1つの結合部位に少なくとも1つの変異を含み、特にここで、

20

a) AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV6のものであり、そのVP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチドは、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：a i) K531E及びV473D；a i i) K531E、K459S、V473D及びN500E；a i i i) G266A及びN269Q；a i v) G266A、N269Q及びD590A；a v) K531E、V473D、G266A及びN269Q；若しくはa v i) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q及びD590Aを含み；

30

b) AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV8のものであり、そのVP3領域内に、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q及びA592Dからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチドは、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：b i) G268E及びN271Q；b i i) S387A；b i i i) G268E、N271Q及びS387A；b i v) A592Q；若しくはb v) A592Dを含み；

c) AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV9のものであり、そのVP3領域内に、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：Q590A、W503A、N562A及びE563Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチドは、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：c i) W503A；c i i) N562A及びE563A；c i i i) Q590A及びW503A；若しくはc i v) Q590A、W503A、N562A及びE563Aを含み；

40

d) AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV2のものであり、そのVP3領域内に、配列番号6のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換R585Aを含み；或いは

e) AAV VP2融合ポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、そのVP3領域内に、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：V473D、N500

50

E 及び R 5 1 4 A からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：e i) V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E ; e i i) R 5 1 4 A ; 又は e i i i) V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A を含む、実施形態 7 の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0319】

9. a) A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 4 A、K 1 6 3 R 及び／又は P 1 9 2 N を含む；或いは b) A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 1 以外の A A V 血清型のものであり、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも 1 つに対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み、特に、b i) A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 8 のものであり、配列番号 4 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 6 G、P 1 6 7 R、M 2 1 2 V、G 2 0 0 R、D 2 1 4 A、K 1 6 3 R、及び P 1 9 2 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 4 A、K 1 6 3 R 及び／又は P 1 9 2 N を含む、或いは b i i) A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 9 のものであり、配列番号 5 の V P 1 アミノ酸配列に対して E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び P 1 9 1 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、アミノ酸置換：D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び／又は P 1 9 1 N を含む、実施形態 1～8 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0320】

10. A A V V P 2 融合ポリペプチドが、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換 V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E をさらに含む、実施形態 9 a) の A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0321】

11. 前記 A A V V P 2 カプシドポリペプチドが、対応する野生型 A A V V P 2 カプシドポリペプチドの最初のトレオニンを欠いている、実施形態 1～10 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0322】

12. 前記ポリペプチドリガンドが、最大 3 個のシステイン残基、特に最大 2 個のシステイン残基、とりわけ最大 1 個のシステイン残基を含むか、最も具体的にはシステイン残基を含まない、実施形態 1～11 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチド。

【0323】

13. 実施形態 1～12 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードする単離された核酸。

【0324】

14. さらにプロモーターを含む、実施形態 13 の単離された核酸。

【0325】

15. A A V V P 2 融合ポリペプチドのオープンリーディングフレーム (O R F) の上流及び下流に位置する 2 つの A A V 逆方向末端反復 (I T R) 配列をさらに含み、任意選択で、レポーター配列をさらに含み、特に、レポーター配列が蛍光又は発光レポータータンパク質をコードし、より具体的には、レポータータンパク質は、E G F P、m C h e r r y、s f C h e r r y、s f C h e r r y 2、m C l o v e r 3、m R u b y 3、m A

10

20

30

40

50

p p l e、i R F P、t d T o m a t o、m V e n u s、Y F P、R F P、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群から選択される、実施形態 13 又は 14 の単離された核酸。

【0326】

16. 実施形態 1～12 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチド又は実施形態 13～15 のいずれか 1 つの核酸を含む、細胞。

【0327】

17. 細胞が、昆虫細胞（例えば、S f 9 細胞）及び H E K 2 9 3 細胞からなる群から選択される、実施形態 16 の細胞。

【0328】

18. 細胞が、限定されないが、肝細胞、脳細胞、脾細胞、腎細胞、血液細胞、肺細胞、筋肉細胞、心臓細胞、骨髄細胞、多能性造血前駆細胞などの多能性前駆細胞（M P P）、及び長期造血幹細胞（L T-H S C）などの造血幹細胞（H S C）からなる群から選択される、マウス細胞、非ヒト霊長類細胞又はヒト細胞を含む哺乳動物細胞から選択される、実施形態 16 の細胞。

【0329】

19. 実施形態 1～12 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチドを含む、組換え A A V（r A A V）ビリオン。

【0330】

20. 全ての A A V V P 2 カプシドポリペプチドが、前記ポリペプチドリガンドに融合されている、実施形態 19 の r A A V ビリオン。

【0331】

21. ノンコーディング核酸、タンパク質又は R N A コード配列、発現カセット、多重発現カセット、相同組換え用配列、及びゲノム遺伝子ターゲティングカセットからなる群から選択される核酸配列をさらに含む、実施形態 19 又は 20 の r A A V ビリオン。

【0332】

22. 前記発現カセットが、実施形態 1～12 のいずれか 1 つの A A V V P 2 融合ポリペプチドをコードし、特に、r A A V ビリオンに含まれる A A V V P 2 融合ポリペプチドと、前記発現カセットによりコードされる A A V V P 2 融合ポリペプチドが同一である、実施形態 21 の r A A V ビリオン。

【0333】

23. 前記発現カセットが、限定されないが、治療用 R N A、m R N A、s i R N A、m i R N A、s h R N A、及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、治療用タンパク質又は治療用抗体若しくは抗体フラグメントを含む治療用核酸をコードする、実施形態 21 の r A A V ビリオン。

【0334】

24. ビリオンが、A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドをさらに含み、特に、A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドが、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V 13、A A V r h. 8、A A V r h. 10、A A V r h. 32. 33、ウシ A A V 又はトリ A A V からなる群、とりわけ、A A V 1、A A V 6、A A V 8 及び A A V 9 からなる群から選択される同じ A A V 血清型のものである、実施形態 19～23 のいずれか 1 つの r A A V ビリオン。

【0335】

25. A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 ポリペプチドが、A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 カプシドポリペプチドの天然の受容体に対する少なくとも 1 つの結合部位に少なくとも 1 つの変異を含み、特に、A A V V P 1、V P 2 及び V P 3 ポリペプチドは、各 A A V カプシドポリペプチドの共有 V P 3 領域に同じ少なくとも 1 つの変異を含み、より具体的には、

a) A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドは、AAV血清型AAV6のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：a i) K531E及びV473D；a i i) K531E、K459S、V473D及びN500E；a i i i) G266A及びN269Q；a i v) G266A、N269Q及びD590A；a v) K531E、V473D、G266A及びN269Q；若しくはa v i) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q及びD590Aを含み；

10

b) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV8のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q及びA592Dからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：b i) G268E及びN271Q；b i i) S387A；b i i i) G268E、N271Q及びS387A；b i v) A592Q；若しくはb v) A592Dを含み、

c) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV9のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：Q590A、W503A、N562A及びE563Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：c i) W503A；c i i) N562A及びE563A；c i i i) Q590A及びW503A；又はc i v) Q590A、W503A、N562A及びE563Aを含み、

20

d) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV2のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号6のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換R585Aを含み；或いは

30

e) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して以下：V473D、N500E及びR514Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換：e i) V473D及びN500E；e i i) R514A；若しくはe i i i) V473D、N500E及びR514Aを含む、実施形態24のrAAVビリオン。

【0336】

26．実施形態19～21及び23～25のいずれか1つのrAAVビリオンと、薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【0337】

27．医薬品として使用するための実施形態19～21及び23～25のいずれか1つのrAAVビリオン又は実施形態26の医薬組成物。

【0338】

28．細胞に導入遺伝子を送達する方法であって、実施形態19～21及び23～25のいずれか1つのrAAVビリオン又は実施形態26の医薬組成物と細胞を接触させることを含む方法。

【0339】

40

50

29. 細胞が、生きている対象に存在し、特に、対象は、哺乳動物対象、より具体的には、ヒトである、実施形態28の方法。

【0340】

30. 治療的処置レジメンにおいて又はワクチンとして、実施形態19~21及び23~25のいずれか1つのrAAVビリオン又は実施形態26の医薬組成物を使用する方法。

【0341】

31. AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含む、例えば、それらから成るAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸配列を含むライブラリー構築物であって、ポリペプチドリガンドは、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合され、ポリペプチドリンカーは、最大10kDaの分子量を有する、ライブラリー構築物。

10

【0342】

32. ポリペプチドリガンドが、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のアミノ酸位置にランダム化アミノ酸を含む、実施形態31のライブラリー構築物。

【0343】

33. 前記ポリペプチドリガンドが、GP2ポリペプチド、Sso7dポリペプチド及びアフィボディからなる群から選択される、実施形態31又は32のライブラリー構築物。

【0344】

34. 前記ポリペプチドリガンドが、配列番号1のSso7dポリペプチド及びそれと少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有するSso7dポリペプチドからなる群より選択される、実施形態33のライブラリー構築物。

20

【0345】

35. 前記ポリペプチドリガンドが、21位、23位、25位、28位、30位、32位、40位、42位及び44位のアミノ酸残基Xが、独立して、D、R、H、N、A、I、Y及びWから選択される配列番号1のSso7dポリペプチド、並びにそれと少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有するSso7dポリペプチドからなる群から選択される、実施形態34のライブラリー構築物。

【0346】

36. 実施形態31~35のいずれか1つのライブラリー構築物を複数含むライブラリー。

30

【0347】

37. ライブラリーが、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、又は 10^9 のユニークなライブラリー構築物を含む、実施形態36に記載のライブラリー。

【0348】

38. ライブラリー構築物が、プロモーターに作動可能に連結された前記AAV VP2融合ポリペプチドをコードする前記核酸配列を含むプラスミドDNA分子であり、任意選択で、レポーター配列をさらに含み、特に、レポーター配列は、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードし、より具体的には、レポータータンパク質は、EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群より選択される、実施形態36又は37のライブラリー。

40

【0349】

39. 各ライブラリー構築物が、rAAVビリオン内に存在し、特に、前記rAAVビリオンは、実施形態4又は5のAAV VP2融合ポリペプチドを含み、所与のrAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチドと、前記rAAVビリオン内に存在するライブラリー構築物によりコードされるAAV VP2融合ポリペプチドは同一である、実施形態36又は37のライブラリー。

【0350】

50

40. 各ライブラリー構築物が、プロモーターの上流及びAAV VP2融合ポリペプチドをコードする核酸の下流に位置する2つのAAV逆方向末端反復(ITER)配列と、任意選択で、レポーター配列をさらに含み、特に、レポーター配列は、蛍光又は発光レポータータンパク質をコードし、より具体的には、レポータータンパク質は、EGFP、mCherry、sfCherry、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼからなる群より選択される、実施形態39のライブラリー。

【0351】

41. 前記rAAVビリオンが、実施形態4又は5のAAV VP2融合ポリペプチドを含み、さらにAAV VP1及びVP3ポリペプチドを含み、特に、前記rAAVビリオンに含まれるAAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、以下：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、ウシAAV又はトリAAV.5からなる群から、とりわけ、AAV1、AAV6、AAV8及びAAV9からなる群から選択される同じAAV血清型のものである、実施形態39又は40のライブラリー。

【0352】

42. 前記rAAVビリオンに含まれるAAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドが、AAV VP1、VP2及びVP3カプシドポリペプチドの天然の受容体に対する少なくとも1つの結合部位に少なくとも1つの変異を含み、特に、AAV VP1、VP2及びVP3ポリペプチドは、各AAVカプシドポリペプチドの共有VP3領域に同じ少なくとも1つの変異を含み、より具体的には、

a) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV6のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下：K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q、及びD590Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号3のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：a i) K531E及びV473D；a i i) K531E、K459S、V473D及びN500E；a i i i) G266A及びN269Q；a i v) G266A、N269Q及びD590A；a v) K531E、V473D、G266A及びN269Q；又はa v i) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q及びD590Aを含み；

b) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV8のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：G268E、N271Q、S387A、A592Q及びA592Dからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：b i) G268E及びN271Q；b i i) S387A；b i i i) G268E、N271Q及びS387A；b i v) A592Q；又はb v) A592Dを含み；

c) AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは、AAV血清型AAV9のものであり、各々が、共有VP3領域内に、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：Q590A、W503A、N562A及びE563Aからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2融合ポリペプチド並びに前記AAV VP1及びVP3ポリペプチドは各々、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：c i) W503A；c i i) N562A及びE563A；c i i i) Q590A及びW503A；又はc i v) Q590A、W503A、N562A及びE563Aを含み；

d) A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 2 のものであり、各々が、共有 V P 3 領域内に、配列番号 6 の V P 1 アミノ酸配列に対するアミノ酸置換 R 5 8 5 A を含み；或いは

e) A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、各々が、共有 V P 3 領域内に、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、又はそれらの任意の組み合わせを含み、特に、A A V V P 2 融合ポリペプチド並びに前記 A A V V P 1 及び V P 3 ポリペプチドは各々、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下のアミノ酸置換：e i) V 4 7 3 D 及び N 5 0 0 E；e i i) R 5 1 4 A；又は e i i i) V 4 7 3 D、N 5 0 0 E 及び R 5 1 4 A を含む、実施形態 4 1 のライブラリー。

10

【0353】

4 3 . a) 前記 r A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 A A V 1 のものであり、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対する E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び／又は P 1 9 1 N；或いは b) 前記 r A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 1 以外の A A V 血清型のものであり、配列番号 7 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、M 2 1 1 V、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、T 1 6 2 R、及び P 1 9 1 N からなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも 1 つに対応する少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み、特に、b i) 前記 r A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 8 のものであり、配列番号 4 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 6 G、P 1 6 7 R、M 2 1 2 V、G 2 0 0 R、D 2 1 4 A、K 1 6 3 R、及び P 1 9 2 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D 2 1 4 A、K 1 6 3 R 及び／又は P 1 9 2 N を含み、或いは b i i) 前記 r A A V ビリオンに含まれる前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドは、A A V 血清型 9 のものであり、配列番号 5 の V P 1 アミノ酸配列に対して、以下：E 1 4 7 S、P 1 8 5 G、P 1 6 6 R、G 1 9 9 R、D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び P 1 9 1 N からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、A A V V P 2 融合ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D 2 1 3 A、S 1 6 2 R 及び／又は P 1 9 1 N を含む、実施形態 4 1 のライブラリー。

20

30

【0354】

4 4 . 少なくとも 1 つの所望の特徴を備える A A V V P 2 融合ポリペプチドを作製する方法であって、前記少なくとも 1 つの所望の特徴を備えるコード化 A A V V P 2 融合ポリペプチドについて実施形態 3 6 ～ 4 3 のいずれか 1 つのライブラリーをスクリーニングすることを含む方法。

【0355】

4 5 . 前記少なくとも 1 つの所望の特徴が、前記ポリペプチドリガンドを含まない A A V V P 2 カプシドポリペプチドと比較した、前記 A A V V P 2 融合ポリペプチドによって媒介される少なくとも 1 つの組織又は細胞型における形質導入の増加及び／又は向性の増加である、実施形態 4 4 の方法。

40

【0356】

4 6 . 以下：b) 実施形態 3 6 ～ 4 3 のいずれか 1 つのライブラリーを複数の細胞と接触させるステップと、c) 前記細胞の少なくとも一部から核酸分子を単離するステップと、d) ステップ b) で単離された少なくとも 1 つの核酸分子のポリペプチドリガンド又はその断片をコードする配列の少なくとも一部を決定するステップとを含む、実施形態 4 4 又は 4 5 の方法。

50

【0357】

47. ステップb)の前に、以下：a i) A A V r e pを含む核酸配列、A A V V P 1カプシドポリペプチドをコードする核酸配列、A A V V P 1カプシドポリペプチドをコードする核酸配列、A A V V P 3カプシドポリペプチドをコードする核酸配列、及び実施形態36のライブラリーで細胞をトランスフェクトすること（ここで、各ライブラリー構築物は、A A V V P 2融合ポリペプチドをコードする核酸配列の上流及び下流に2つのA A V逆方向末端反復（I T R）配列をさらに含む）と、a i i) A A Vビリオン形成に適した条件下で細胞をインキュベートすること（任意選択で、細胞は、哺乳動物細胞、特にH E K 2 9 3細胞、又は昆虫細胞、特にS f 9細胞である）によって、実施形態39のライブラリーを提供するステップa)をさらに含む、実施形態46の方法。

10

【0358】

48. 前記A A V V P 1カプシドポリペプチド及び前記A A V V P 3カプシドポリペプチドが、A A V c a p遺伝子を含む同じ核酸配列によってコードされ、特にここで、c a p遺伝子中のV P 2の開始コドンに変異している、実施形態47の方法。

【0359】

49. ステップb)の複数の細胞が、非ヒトモデル動物に存在する、実施形態46～48のいずれか1つの方法。

【0360】

50. ステップc)において、予定される組織又は細胞型の細胞からの核酸を単離し、特に、予定される組織又は細胞型の前記細胞は、複数の細胞を前記ライブラリーと接触させてから1～21日後、1～14日後、7～21日後、2～10日後、2～5日後に単離される、実施形態49の方法。

20

【0361】

51. 前記レポーター配列が発現する細胞を選択するステップをさらに含む、実施形態44～50のいずれか1つの方法。

【0362】

52. ステップc)が、前記細胞の少なくとも一部からR N Aを単離することを含み、ステップd)は、以下のサブステップ：d i) 前記単離されたR N Aの逆転写、d i i) ステップd i)で生成されたc D N Aからのポリペプチドリガンド又はその断片をコードする配列の少なくとも一部のP C R増幅、及びd i i i) ポリペプチドリガンド配列の少なくとも一部を、特に次世代シーケンシングによって配列決定することを含む、実施形態46～51のいずれか1つの方法。

30

【0363】

53. 1つの組織又は細胞型における特定のポリペプチドリガンド配列の、前記組織又は細胞型におけるポリペプチドリガンド配列の総数に対する相対的な出現を決定するステップe)を含む、実施形態46～52のいずれか1つの方法。

【0364】

54. ステップc)で単離された核酸分子からA A V V P 2融合ポリペプチドをコードする核酸配列の第2のライブラリーを作製するステップf)と、前記第2のライブラリーを用いて、ステップb)、c)、d)、及び任意選択でa)及びe)を反復すること、をさらに含む、実施形態46～53のいずれか1つの方法。

40

【0365】

55. 実施形態44～54のいずれか1つの方法により作製されるA A V V P 2融合ポリペプチド。

【0366】

56. A A V V P 2融合ポリペプチドを含むA A Vビリオンを作製する方法であって、この方法は、パッケージング細胞を実施形態14又は15の核酸で形質導入することを含み、ここで、前記方法により、A A Vビリオンを産生するパッケージング細胞が得られる、方法。

【0367】

50

57. AAV VP2融合ポリペプチドを含むAAVビリオンを作製する方法であって、この方法は、実施形態16又は17の細胞を培養することを含み、ここで、前記方法により、AAVビリオンを産生するパッケージング細胞が得られる、方法。

【0368】

58. 実施形態56又は57の方法により作製されるAAVビリオン。

【0369】

59. 実施形態53又は58のAAVビリオンを含む医薬組成物を製造する方法であって、AAVビリオンを薬学的に許容される担体と製剤化することを含む方法。

【0370】

60. 実施形態13～15のいずれか1つの単離された核酸を含むキット。

10

【0371】

61. AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むAAV VP2融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドは、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合されており、ポリペプチドリガンドは、最大10kDaの分子量を有する、AAV VP2融合ポリペプチド。

【0372】

62. AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むAAV VP2融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドが、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合しており、AAV VP2カプシドポリペプチドが、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)及び／又はシアル酸(SIA)への結合を消失又は減少させる1つ以上の変異を含む、AAV VP2融合ポリペプチド。

20

【0373】

63. ポリペプチドリガンドが、最大10kDaの分子量を有する、実施形態62のAAV VP2融合ポリペプチド。

【0374】

64. AAV VP2カプシドポリペプチドとポリペプチドリガンドとを含むAAV VP2融合ポリペプチドであって、ポリペプチドリガンドが、AAV VP2カプシドポリペプチドのN末端に融合しており、ここで、a) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D213A、T162R、及び／若しくはP191Nを含むか、又はb) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV1以外のAAV血清型のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも1つに対応する少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、特に、b i) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型8のものであり、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R、及びP192Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D214A、K163R及び／若しくはP192Nを含むか、又はb i i) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型9のものであり、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D213A、S162R及び／又はP191Nを含む、AAV VP2融合ポリペプチド。

30

40

【0375】

50

65. AAV VP2カプシドポリペプチドが、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対するアミノ酸置換：V473D及びN500Eをさらに含む、実施形態64a)のAAV VP2融合ポリペプチド。

【0376】

66. a) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型AAV1のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2カプシドポリペプチドは、アミノ酸置換：D213A、T162R、及び／若しくはP191Nを含むか、又はb) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV1以外のAAV血清型のものであり、配列番号7のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R、及びP191Nからなる群から選択されるアミノ酸置換の少なくとも1つに対応する少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、特に、b i) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型8のものであり、配列番号4のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R、及びP192Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、特に、AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D214A、K163R及び／若しくはP192Nを含むか、又はb i i) AAV VP2カプシドポリペプチドは、AAV血清型9のものであり、配列番号5のVP1アミノ酸配列に対して、以下：E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R及びP191Nからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換、若しくはそれらの任意の組み合わせを含み、とりわけ、AAV VP2カプシドポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：D213A、S162R及び／又はP191Nを含む、AAV VP2カプシドポリペプチド。

【0377】

67. 実施形態66のAAV VP2カプシドポリペプチドを含むrAAVビリオン。

【0378】

特許又は出願ファイルには、少なくとも1つのカラー図面が含まれている。本特許又は特許出願公開公報のコピー（カラー図面付き）は、請求及び必要な手数料の支払い時に、特許庁から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0379】

【図1】実施例1で作製されたAAV VP2融合ポリペプチド発現プラスミドの概略図である。

【図2】カーゴ発現プラスミドpNN001の概略図である。

【図3】CTR w. t. AAV8と比較した、Darpin、VHH及びミニタンパク質装飾AAV8調製物に対するSDS-PAGE（変性）を示す。MSにより確認されたとおり、サンプル4に軽度のVP2 w. t. 混入が観察された（AAV8トランス-VP2産生からのアフィニティー精製流出に起因する可能性が高い）。

【図4】装飾AAV8調製物を用いたEGFR及びTIGIT組換えタンパク質に対するAAVサンドイッチELISAを示す。

【図5】異なるスカフォールドに融合したVP2のAAV8装飾レベルを示す。

【図6】EGFR過剰発現HKB11細胞株に対する装飾AAV8のインビトロ感染力を示す。感染した（EGFP+）細胞のパーセンテージに対するフル粒子の数が示されている。

【図7】GBMニューロスフェア（EGFR増強クローンHF-2927）に対する抗EGFR Sso7d-AAV8 VP2融合物のインビトロ感染力を示す。

【図8】受容体過剰発現細胞株に対する装飾AAV8のインビトロ感染力を示す。

【図9】EGFR過剰発現HKB11及びHKB11w. t. 細胞株に対する装飾AAV

10

20

30

40

50

6 S i l 2 のインビトロ感染力を示す。

【図 10】GBMニューロスフェアに対する抗EGFR S s o 7 V P 2 融合物装飾 A A V 9 のインビトロ感染力を示す。

【図 11】EGFR過剰発現HKB11及びHKB11w. t. 細胞株に対する装飾 A A V 1 S i l 1 のインビトロ感染力を示す。

【図 12】L i b 8 S s o 7 d ファージプラスミドライブラリーの標的位置におけるアミノ酸頻度を示す。結果は、500～700Kフィルターリード (Q>30) に対する M i S e q N G S の結果である。

【図 13】3 回目の選択ラウンド後の L i b 8 S s o 7 d ライブラリーについての出現解析の結果を示す。

【図 14】EGFR過剰発現細胞及びEGFRノックアウト細胞に対する6つのS s o 7 d 構築物のFACS解析の結果を示す。

【図 15】カーゴプラスミドSK0033の概略図である。

【図 16】L i b 8 S s o 7 d - A A V 1 S i l 1 プラスミドライブラリー (SK0037) におけるランダム化位置でのアミノ酸頻度を示す。

【図 17-1】図 17: 図 17 A は、L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 についての出現解析の結果を示す。図 17 B は、L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 プラスミドライブラリーの標的位置におけるアミノ酸頻度を示す。図 17 C は、L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 A A V ライブラリーの標的位置におけるアミノ酸頻度を示す。図 17 D は、標的位置における L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 A A V ライブラリー産生の偏りを示す。

【図 17-2】(上記の通り。)

【図 17-3】(上記の通り。)

【図 17-4】(上記の通り。)

【図 18】ヒト化マウスの様々な組織におけるヒト細胞のパーセンテージを示す。

【図 19】ヒト化マウスにおける L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 と非装飾対照の生体内分布を示す。

【図 20】RT-PCR 反応物 (予想サイズ: 403 bp) のフラッシュゲル分析を示す。

【図 21】L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 注射マウスからの様々な器官／細胞における単一 r c S s o 7 d バリエーション配列の分布を示す。

【図 22】様々な器官における濃縮ヒットの分布を示す。

【図 23】実施例 8 で作製されたバーコード化カーゴプラスミドの概略図である。

【図 24-1】図 24: 図 24 A は、単一バーコード化 S s o 7 d - A A V 1 S i l 1 から得られたフル粒子の収量及びパーセンテージを示す。図 24 B は、単一バーコード化 S s o 7 d - A A V 1 S i l 1 及び非装飾対照での V P 2 融合物と V P 1 の割合を示す。

【図 24-2】(上記の通り。)

【図 25】HEK293 懸濁細胞での S s o 7 d 装飾 A A V 1 S i l 1 のインビトロ感染力を示す。

【図 26】マウス注射に使用した A A V - 4 7 1 調製物におけるライブラリー分布を示す。

【図 27】様々な組織におけるバーコード化 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 ライブラリーの分布を示す。

【図 28】RT-PCR 反応物 (予想サイズ: 403 bp) のフラッシュゲル分析を示す。

【図 29】NGS 用アンプリコン断片 (予想サイズ: 243 bp) のフラッシュゲル分析を示す。

【図 30】L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 ライブラリーを用いたヒト化マウスの3回の選択ラウンド後に同定された、L T - H S C 集団における上位12の強化ヒットの組織分布を示す。

10

20

30

40

50

【図 3 1】実施例 1 0 で作製されたアクセプターカーゴプラスミドの概略図である。

【図 3 2】R T - P C R 反応物のフラッシュゲル分析（予想サイズ：6 0 8 ～ 6 6 8 b p）を示す。

【図 3 3】アンブリコン P C R 反応物のフラッシュゲル分析（予想サイズ：4 8 4 ～ 5 2 9 b p）を示す。

【図 3 4】V - E x p ライブラリーの選択数分布を示す。

【図 3 5】正及び負の選択後の V - E x p 標的位置の変異解析を示す（データは、各所定位置における w . t . アミノ酸のパーセンテージを表す）。

【図 3 6】正の選択後の優先される V P 2 位置におけるアミノ酸分布を示す（データは、優先される上位 9 つの位置におけるアミノ酸のパーセンテージを表し、選択された A A 変異は枠で囲まれている）。

10

【図 3 7】正の選択後の優先 V P 2 位置におけるリンカー及びアミノ酸変異を示す。

【図 3 8】E G F R 過剰発現細胞とノックアウト細胞における E G F P 陽性細胞の E C 5 0 値の倍数変化を表す棒グラフを示す。

【図 3 9】異なる抗 E G F R S s o 7 d 装飾 A A V 1 S i l 1 V P 2 バリエーションの E G F R との結合を表す棒グラフを示す（バックグラウンドから 5 E + 1 1 v p で E L I S A シグナルを除去）。

【図 4 0】H K B 1 1 野生型細胞に対する抗 E G F R S s o 7 d 装飾 s s A A V 1 S i l 1 のインビトロ感染力を示す。

【図 4 1】受容体過剰発現 H K B 1 1 細胞に対する抗 E G F R S s o 7 d 装飾 s s A A V 1 S i l 1 のインビトロ感染力を示す。

20

【実施例】

【0 3 8 0】

実施例 1：V P 2 N 末端に遺伝的に融合した V H H、D A R P I N 及びミニタンパク質 スカフォールドを用いた A A V 8 カプシドにおける A A V V P 2 融合ポリペプチド装飾 レベルの初期評価

M u n c h e t a l . , N a t C o m m u n 6 , 6 2 4 6 (2 0 1 5) に記載されているように、V P 2 N 末端遺伝子融合物が装飾 A A V を生成する実現可能性を評価するために、トレオニンをコードする開始コドンに欠く V P 2 オープンリーディングフレーム（V P 2 D T 1）の N 末端で、様々なスカフォールドを A A V 8 V P 2 発現プラスミド A g C 1 1 5 9 にクローニングした。得られた A A V V P 2 融合ポリペプチド発現プラスミドは、A A V V P 2 融合ポリペプチドオープンリーディングフレームが H C M V プロモーターに作動可能に連結されており、これを図 1 に図式として描く。

30

【0 3 8 1】

V P 2 発現プラスミドへのスカフォールドのクローニング：

表 1 に示すスカフォールド配列は、ギブソン（G i b s o n）に基づくクローニングに好適な 5 ' 及び 3 ' 伸長部を付加したストリング DNA として G e n e A r t に注文した。V H H の場合、内部発現プラスミドを鋳型として用いる P C R により配列を増幅した。この断片を H i n d I I I - A g e I 消化 V P 2 発現プラスミド A g C 1 1 5 9 にクローニングし、サンガーシーケンシングにより正しいアセンブリを確認した。

40

【0 3 8 2】

【表 1】

表 1: 実施例1で使したスカフォールド及びリンカーのリスト。全ての構築物において、N末端に strep-TagII-GS配列、及びC末端にG4Sリンカーが付加された。

スカフォールド ID	参照	*最終スカフォールド配列	最終スカフォールドの 分子量 (kDa)
抗Her2 Darpin (9_29)	https://doi.org /10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGS ~~DLGKKLLEAARAG~~ QDDEVRLMANGADVNAHDFYGITPLHLA ANFGHLEIVEVLLKHGADVNAFDYDNTPL HLAADAGHLEIVEVLLKYGADVNASDRD GHTPLHLAAREGHLEIVEVLLKNGADVNA AQDKFGKTA ~~FDISIDNGNEDLAEILQGGG~~ GS	18.7
抗EGFR (ErbB1) Darpin (E_01)	https://doi.org /10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGS ~~DLGKKLLEAARAG~~ QDDEVRLMANGADVNA ~~DDTWGWTPLH~~ LAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNA ~~YDYIG~~ WTPHLHLA ~~ADGHLEIVEVLLKNGADVNAS~~ DYIGDTPHLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGAD VNAQDKFGKTA ~~FDISIDNGNEDLAEILQG~~ GGGS	18.7
抗MBP Darpin (Off7)	https://doi.org /10.1038/nbt962	MRGSAWSHPQFEKGS ~~DLGRKLLEAARAG~~ QDDEVRLMANGADVNA ~~ADNTGTTPLHL~~ AAYSGHLEIVEVLLKHGADV ~~DASDVFGYT~~ PLHLAAYWGHLEIVEVLLKNGADV ~~NAMD~~ SDGMTPLHLAAKWGYLEIVEVLLKHGAD VNAQDKFGKTA ~~FDISIDNGNEDLAEILQG~~ GGGS	18.5
抗TIGIT VHH (NEG974)	社内		15.6
抗GPR126 VHH (NEG1713)	社内		15.3
抗HA ミニタンパク質	https://doi.org /10.1038/nature23912	MRGSAWSHPQFEKGSTSGV ~~RATSKFAALIA~~ AEIAREFGYTVDVQEKNGE ~~WRVVF~~ DGGG GS	6.4

*太字: N-又はC-末端付加のない元の配列

【0383】

装飾 AAV の産生：

生成したVP2 融合プラスミドを、rep/cap VP2 KOプラスミド（VP2
オープンリーディングフレーム開始コドンに変異を有するAAV2 rep 遺伝子及びA
AV8 cap 遺伝子を含み、そのためAAV8 VP1及びVP3をコードするがVP
2をコードしない）、pHelper（アデノウイルスタンパク質E2A、E4及びVA
RNAをコードする）並びにカーゴとしてのHCMV promoter-EGFP-SV40pA
s cAAV（pNN001；HCMVプロモーターの制御下でeGFPをコードし、AA
V2 ITRにより隣接されており、図2に概略が示されている）と一緒に懸濁HEK2
93T／17F細胞にトランスフェクトした。

【0384】

手短には、100ml（AAV8 w. t. 産生の場合は350ml）のHEK293T
／17F懸濁細胞を1.5E+06細胞／mlまで希釈した後、1E+06細胞当たり0
.8µgのDNAミックスを含むPEI MAX（PEI：DNA比＝3：1）を用いて
トランスフェクトした。プラスミドミックスは、表2に記載される通り、等モル量の3つ
又は4つのプラスミドから構成された。トランスフェクションの6日後、サンプルを40

00rpmで20分間遠心分離し、上清をAKTA Pure計器に取り付けたPOROS GoPure AAVX 1ml 0.5cm^l×5cm^l (ThermoFisher #A36652) に4ml/分でロードした。結合したAAV粒子は、10カラム体積(CV)の洗浄バッファー、pH7.3 (50mM Tris-Cl、0.5M NaCl、0.01% Pluronic F-68) で洗浄した後、5CVのグリシン溶出バッファー、pH2.7 (0.1Mグリシン、0.2M NaCl、0.25M L-アルギニン) で溶出した。溶出画分(0.25ml)を25μlの1M Tris-Cl、pH10で直ちに中和した。AAVを含む画分(UV280シグナルで評価)をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100kDa (Spectrum (商標) #G235071)を用いて、PBS、pH7.4+0.001% Pluronic F-68に対して一晚透析した。

10

【0385】

qPCR法を用いて、フル粒子濃度(vg/ml)を評価した。qPCRは、KAPA Probe Fast qPCRキットと表3に示すSV40pAオリゴセットを用いて、DNaseで前処理したサンプルに対してQiagen RotorGene装置で実施した。標準曲線作成のためにプラスミドpNN001を用いた。qPCR結果を表4にまとめる。

【0386】

【表2】

20

表2: pHelper 及び pNN001 カーゴに加えて、この実施例で使用した rep/cap VP2 KO 及び VP2 発現プラスミドのリスト

サンプル ID	Rep/Cap プラスミド	VP2 発現プラスミド
AAV8 w.t.	pRep2Cap8	なし
AAV8 VP2 KO	*(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	なし
AAV8トランス-VP2	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1159) pR5a_AAV8 VP2 (融合なし)
AAV8- 抗EGFR Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1168) pR5a_抗ErbB1 (E_01) DARPin AAV8 VP2
AAV8- 抗MBP Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1169) pR5a_抗MBP Off7 DARPin AAV8 VP2
AAV8- 抗Her2 Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1170) pR5a_抗HER2 9_29 Darpin AAV8 VP2
AAV8- 抗HA ミニタンパク質	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1171) pR5a_抗HA ミニタンパク質 AAV8 VP2
AAV8- 抗TIGIT VHH	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1172) pR5a_抗TIGIT VHH (NEG974) AAV8 VP2
AAV8- 抗GPR126 VHH	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1173) pR5a_抗GPR126 (NEG1731) VHH AAV8 VP2

30

40

* VP2 KO rep2/Cap8 プラスミド(AgC1157) は、VP2 の最初のトレオニンアラニンに変異させること(T138A)により作製した

【0387】

50

【表 3】

表 3: qPCR による AAV ゲノム濃度(vg/ml) の測定に使用したオリゴセット

オリゴ ID	5'-3' 配列
SV40pA 領域-For	AGCAATAGCATCACAAATTTACAA
SV40pA 領域-Rev	CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT
SV40pA 領域-プローブ	FAM- AGCATTTTTTTCCTGCTTCTAGTTGTGGTTTGTC- BHQ1

10

【0388】

【表 4】

表 4: 装飾 AAV8 の qPCR 結果

サンプル ID	vg/ml	収量 (vg/細胞)
AAV8 w.t.	7.10E+13	1.62E+05
AAV8 VP2 KO	1.61E+13	1.29E+05
AAV8 トランス-VP2	2.39E+13	1.91E+05
AAV8- 抗 EGFR Darpin	1.07E+13	8.56E+04
AAV8- 抗 MBP Darpin	3.03E+12	2.42E+04
AAV8- 抗 Her2 Darpin	4.88E+12	3.90E+04
AAV8- 抗 HA ミニタンパク質	1.12E+13	8.96E+04
AAV8- 抗 TIGIT VHH	3.19E+12	2.55E+04
AAV8- 抗 GPR126 VHH	6.06E+12	4.85E+04

20

【0389】

VP2 の非存在（サンプル AAV8 VP2 KO）及びトランスでの VP2（サンプル AAV8 トランス-VP2）の供給は、AAV 力価にわずかな影響しか及ぼさなかった。様々なスカフォールドを VP2 N 末端に遺伝的に融合させると、AAV 力価の 2～7 倍の減少が起こった。

30

【0390】

装飾レベルの評価

アフィニティー精製した AAV 調製物 20 μl を変性条件下で SDS-PAGE 分析し、VP2 融合物の存在を評価した。SDS page を図 3 に示す。VP2 の分子量シフトは、ミニタンパク質装飾サンプルについてのみ観察することができたのに対して、他のサンプル（VHH 及び Darpin 融合物）のいずれも、検出可能なレベルの VP2 融合物は認められなかった。

40

【0391】

さらに、CE-SDS 分析（Agilent 2200 TapeStation システム、変性条件を用いた P200 タンパク質キット）を実施して、精製したサンプル中の異なる VP タンパク質の相対量を半定量的に評価した。その結果、AAV8-抗-HA ミニタンパク質サンプルに VP2 の分子量シフトが確認され、他のサンプルでは VP2 融合物の検出可能な存在は認められなかった。AAV8-抗-HA ミニタンパク質サンプルは、AAV8 w.t. サンプルと同様の様々な VP タンパク質の相対量を示した。AAV8 トランス-VP2 サンプルでは、わずかに増加した量の VP2 が観察された。結果を表 5 にまとめる。

50

【 0 3 9 2 】

表 5 : D a r p i n、V H H 及びミニタンパク質装飾 A A V 8 調製物の分子量及び推定相対 V P 量 (T a p e s t a t i o n)

【 0 3 9 3 】

【表 5】

表 5a: 観察された VP の MW(kDa)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
AAV8 w.t.	61	70.4	93.5
AAV8 VP2 KO	61.9		94.2
AAV8トランス-VP2	61.5	70.8	94.2
AAV8- 抗 EGFR Darpin	61.9		95.1
AAV8- 抗 MBP Darpin	61.8		94.7
AAV8- 抗 Her2 Darpin	62.3		95.2
AAV8- 抗 HA ミニタンパク質	62.2	78.7	94.2
AAV8- 抗 TIGIT VHH	61.6		94.3
AAV8- 抗 GPR126 VHH	61.6		93.8

10

【 0 3 9 4 】

20

【表 6】

表 5b: VP 分布(AAV 粒子当たり計 60 VP と仮定する)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
AAV8 w.t.	50.6	6.1	3.3
AAV8 VP2 KO	56.8		3.2
AAV8トランス-VP2	48.3	8.6	3.1
AAV8- 抗 EGFR Darpin	56.0		4.0
AAV8- 抗 MBP Darpin	55.7		4.3
AAV8- 抗 Her2 Darpin	56.6		3.4
AAV8- 抗 HA ミニタンパク質	51.7	6.0	2.2
AAV8- 抗 TIGIT VHH	56.6		3.4
AAV8- 抗 GPR126 VHH	55.4		4.6

30

【 0 3 9 5 】

質量分析

VP1 バンドと VHH 及び D a r p i n VP2 融合物が共泳動する可能性があるため、全ての調製物は LC-MS を用いて分析した。5 μ l の非処理 AAV サンプルを、S y n a p t G 2 S (W A T E R S) 四重極飛行時間型質量分析計に接続した UPLC-I クラスに注入した。サンプルをカラム上で変性させ、W a t e r s B i o r e s o l v e R P 1 $\times$ 50 mm カラムでクロマトグラフィーにより分離した。流量 0.1 ml / 分で 40 分かけて 30 から 38 % への有機移動相から成るグラジエントを用いて、80 $^{\circ}$ C でカラムを保持した。水性移動相は水中 0.1 % ギ酸からなり、有機移動相はアセトニトリル中 0.1 % ギ酸からなった。

40

【 0 3 9 6 】

VP1 及び VP3 の予想質量は全ての試験サンプルで確認することができ、VP2 w. t. 又は VP2 融合物の存在は、A V 8 w. t.、A A V 8 トランス-VP2、及び A A V 8 - 抗 - H A ミニタンパク質サンプルでのみ確認され、これは、S D S 及び C E - S D S の結果を確認するものであった。

50

【0397】

AAV8 サンドイッチ ELISA :

VP2 融合スカフォールドの装飾効率と正しい露出をさらに評価するために、より高感度のサンドイッチ ELISA アッセイを実施した。hEGFR 及び hTIGIT 細胞外ドメイン (ECD) 組換えタンパク質を用いて、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 96 ウェルプレートに被覆した。一晚インキュベーションし、3% BSA/TBST バッファーでブロックした後、様々な量の AAV v g をウェルに添加し、RT で 2 時間インキュベートした。洗浄ステップ (3×) の後、ウェルを抗 AAV8 モノクローナル mIgG2 (Origene AM32478SUN) と一緒に室温 (RT) で 1 時間インキュベートした。ウェルを再度洗浄し (3×)、抗マウス IgG-AP コンジュゲート (Sigma-Aldrich A5153) と一緒にインキュベートした後、さらに洗浄し (3×)、Attophos 基質 (Roche 00000011681982001) を用いてシグナルを発生させた。結果を図 4 に示す。

10

【0398】

MS 及び CE-SDS とは対照的に、AAV8 サンドイッチ Elisa では、アセンブリされた AAV の表面に Darpin と VHH が検出された。生成された AAV のごく一部が、これら 2 つのスカフォールドのいずれかに融合した VP2 を含有することが疑われ、これらのスカフォールドはサンドイッチ Elisa でのみ検出可能で、MS 及び CE-SDS では検出できなかった。

20

【0399】

実施例 2 : VP2 N 末端に遺伝子的に融合した小さなスカフォールドを用いた AAV8 の装飾レベルの評価

実施例 1 で観察されたように、AAV8-抗 HA ミニタンパク質は、野生型に近い VP2 装飾レベルを有する唯一の AAV 装飾調製物であると思われる。この現象が、スカフォールドの小さいサイズによるものか否かを評価するために、表 6 に列挙した様々な抗 EGFR 結合ドメインを AAV8 VP2 発現プラスミド AgC1159 にクローニングした。

【0400】

30

40

50

【表 7】

表 6: 本実施例に使用したスカフォールドID及びリンカーのリスト

スカフォールド ID	参照	*最終スカフォールド配列	AAV8-VP2 融合物発現 プラスミド ID	最終スカ フォールド の分子量 (kDa)
抗EGFR Darpin (E_01)	https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGSDLGK KLLEAARAGQDDEVRLM ANGADVNADDTWGWTP HLAAYQGHLEIVEVLLKN GADVNAVYDYIGWTPHLA ADGHLEIVEVLLKNGADV NASDYIGDTPHLAAHNG HLEIVEVLLKHGADVNAQ DKFGKTAFDISIDNGNEDL AEILQGGGGS	(AgC1168) pR5a_抗 ErbB1 (E_01) DARPin_AAV8 VP2	18.5
抗EGFR フィブロ ネクチン (E.6.2.6)	doi:10.1016/j.jmb.2010.06.004	MVSDVPRDLEVVAATPTSL LISWFDYAVTYRITYGET GGNSPVQEFTVPGWISTAT ISGLKPGVDYTITVYAVTD NSRWPFRTPISTNYRTEID KPPQGGGGSGGGSGGGGS	(AgC1275) pRS5a_抗 EGFR_フィブロネクチン_ G4Sx3_AAV8_VP2	11.9
抗EGFR Sso7d (E.18.4.5)	DOI 10.1074/ jbc.M116.7 41314	MATVKLTYQGEEKQVDIS KITVVDRAQQFIWFEYDEG GGALGTGWVSEKDAPKEL LQMLEKQGGGGSGGGSGG GGGS	(AgC1274) pRS5a_抗 EGFR_Sso7d_G4Sx3_ AAV8_VP2	7.8
** 抗EGFR アフィ ボディ (Z _{EGFR} -1907)	doi:10.1016/j.jmb.2007.12.060	MVDNKFNKEMWAAWEEI LHLPNLNGWQMTAFIASL VDDPSQSANLLAEAKKLN DAQAPKGGGGSGGGSGGG GGGS	(AgC1276) pRS5a_抗 EGFR_アフィボディ_G4Sx 3_AAV8_VP2	7.4
抗EGFR GP2 (GaEGFR _{2.2.3})	http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.012	MKFWATVSRGDSYWFEVP VYAETLDEALELAERQYP MYHIYYVTRVRPGGGGSG GGSGGGGS	(AgC1273) pRS5a_抗 EGFR_GP2_G4Sx3_ AAV8_VP2	6.7
抗HA ミニタンパク質	https://doi.org/10.1038/nature23912	MRGSAWSHPQFEKGSTSGV RATSKFAALIAAEIAREFG YTVDVQEKNGEWRVVF GGGS	(AgC1171) pR5a_抗 HA ミニタンパク質_ AAV8 VP2	6.4

*太字: N-又はC-末端付加のない元の配列

** 抗EGFR アフィボディ (Z_{EGFR}-1907) サンプルは、最終産生ステップ中に一部消失した; 正確な収量評価は不可能であった。アフィニティ精製中のピーク高さに基づき、収量が、他の精製プレップと類似していると予想した

【0401】

装飾 AAV の生産

様々な装飾 AAV 8 粒子調製物のクローニング、発現、精製、及びウイルス濃度の評価は、以下の例外を除いて、実施例 1 に記載した通りに実施した:

- ・トランスフェクション量は、各サンプルについて 300 ml とした
- ・トランスフェクションの 4 日後に細胞及び上清を回収した
- ・最終濃度: 0.5% Triton、2 mM MgCl₂ 及び 12.5 U/ml のベンゾナーゼをバルクハーベストに添加し、37℃で 2 時間溶解させ、その後 0.5 M NaCl を添加し、サンプルを 3500 g で 30 分間遠心分離した。ライセートを濾過し、清澄化した後、POROS AAVx 1 ml 樹脂にロードした。

【0402】

対照として、AAV8－抗EGFR Darpin及びAAV8－抗HAミニタンパク質の新しい調製物を同様の方法で並行して作製した。実施例1に記載したqPCRを使用して、フル粒子濃度（vg/ml）を評価した。結果を表7cに要約する。

【0403】

装飾レベル及び総AAV収量の評価：

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析（変性条件下で、Agilent 2100 Bioanalyzerシステム及びProtein 230キットを用いて）を実施した。

【0404】

総AAV粒子/ml（vp/ml）及びVP比の計算

- ・ ng/μl（= μg/ml）値を、実測MWで割り、1E+06を掛けて（μgからgへの換算）、モル/ml値を算出する
- ・ モル/ml値に6.022E+23（アボガドロ数）を掛けて、分子数/mlを算出する
- ・ VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数/mlの値に基づいて算出する
- ・ AAV粒子/ml（vp/ml）：VP1+VP2+VP3分子/mlの総和を60で割る

【0405】

結果を表7及び図5にまとめる。

【0406】

表7：AAV8装飾サンプルのバイオアナライザー結果

【0407】

【表8】

表7a: 観察されたVPのMW (kDa)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
抗EGFR Darpin (E 01)	76.5		108.8
抗EGFR フィブロネクチン (E.6.2.6)	76.8	105.8	109.2
抗EGFR Sso7d (E.18.4.5)	76.7	99.6	109.4
抗EGFR アフィボディ (Z _{EGFR} -1907)	77.3	99.4	109.5
抗EGFR GP2 (GaEGFR _{2.2.3})	76.5	98.5	109.2
抗HA ミニタンパク質	77.3	97.9	109.4
AAV8 w.t.	77.0	91.6	109.8

【0408】

【表 9】

表 7b: VP 分布(AAV 粒子当たり計 60 VP と仮定する)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
抗 EGFR Darpin (E_01)	53.1	*(1)	* 6.9
抗 EGFR フィブロネクチン (E.6.2.6)	50.6	3.5	6.0
抗 EGFR Sso7d (E.18.4.5)	49.6	5.8	4.6
抗 EGFR アフィボディ (Z _{EGFR} -1907)	49.0	5.9	5.1
抗 EGFR GP2 (GaEGFR _{2,2,3})	44.5	10.7	4.7
抗 HA ミニタンパク質	45.8	9.1	5.1
AAV8 w.t.	46.0	9.1	4.9

* Darpin サンプル VP1 及び VP2 融合物は、恐らく共移動していると考えられ、VP2 単位の数について厳密な値を割り当てることはできなかった。AAV 当たり 1 VP2-融合物の任意の値は、VP1 値の若干の増加に基づいて割り当てた。

10

【0409】

【表 10】

20

表 7c: トランスフェクト細胞当たりのウイルスゲノム(vg) 及びウイルス粒子 (vp) 収量

サンプル ID	vg/細胞	vp/細胞
抗 EGFR Darpin (E_01)	2.32E+04	4.04E+04
抗 EGFR フィブロネクチン (E.6.2.6)	2.96E+04	1.20E+05
抗 EGFR Sso7d (E.18.4.5)	2.29E+04	8.54E+04
抗 EGFR GP2 (GaEGFR _{2,2,3})	2.77E+04	1.49E+05
抗 HA ミニタンパク質	1.34E+04	8.20E+04
AAV8 w.t.	3.69E+04	1.20E+05

30

【0410】

AAV カプシドへの VP2 融合ポリペプチドの組込みの成功は、VP2 ポリペプチドと融合したスカフォールドの分子量と相関すると思われる。10 kDa 未満のスカフォールドを用いると、満足のいく装飾レベル (w. t. VP2 レベルの > 60%) が得られた。この閾値を超えると、VP2 融合物の組込みの低下が観察され、特に 18 kDa の darpin の場合には顕著であった。この実験で使用した全ての試験抗 EGFR スカフォールドで、収量のわずかな低下が観察された (w. t. と比較して < 2 倍)。

【0411】

EGFR 過剰発現細胞株に対する装飾 AAV8 のインビトロ感染力：

40

様々な修飾レベルの抗 EGFR 修飾 AAV8 プレップの効果を評価するために、hEGFR (HKB11-EGFR) を安定に過剰発現する HKB11 細胞で感染力アッセイを行った。感染当日、細胞を 5 E + 0 5 細胞 / ml まで DMEM に再懸濁させ、50 µl / ウェルを 96 ウェルプレートに播種した (2.5 E + 0 4 細胞 / ウェル)。AAV8 装飾調製物を DMEM 培地で希釈し、総 vp に基づく 2 E + 0 6 から 1.56 E + 0 4 moi の範囲の様々な濃度を、播種した細胞に適用した (最終体積 100 µl)。導入から 4 日後に細胞を剥離し、FACS 解析を実施して、EGFP 陽性細胞のパーセンテージを算出した。フル粒子 (vg) を逆算した。図 6 は、感染 (EGFP+) 細胞のパーセンテージに対するフル粒子の数を表す。

【0412】

50

高い装飾レベルの抗EGFR VP2融合ポリペプチドは、HKB11—EGFR細胞への取り込みの増加を示した（Sso7d>アフィボディ>GP2）。対照的に、抗EGFR DARPin及びフィブロネクチンスカフォールド融合物は、非装飾AAV8w.t.対照と比較して感染力の増加を示さなかったが、これは、恐らくこれら2つのスカフォールドで得られる装飾レベルが低いためであろう。

【0413】

多形性膠芽腫（GBM）ニューロスフェアに対する装飾AAV8のインビトロ感染力：

GBMニューロスフェア培養物は、Henri Ford Health Systemから入手し、Gibco N2サプリメント（100×；#17202-048）、BSA（Sigma #A4919；最終濃度0.5 mg/ml）、ゲンタマイシン（Gentamicin）（Gibco #15710-064、最終濃度0.025 mg/ml）、抗生物質—抗真菌剤溶液（Antibiotic—Antimycotic）（100×）（Invitrogen #15240-062）、EGF（Peprotech #100-15、最終濃度20 ng/ml）及びFGF（Peprotech #100-18B、最終濃度20 ng/ml）を添加したDMEM/HamF12（Gibco #11039-021）中に37℃及び5%CO₂で懸濁させて増殖させた。EGFR過剰発現HKB11細胞株で得られた感染力の結果を検証するために、抗EGFR Sso7d（E.18.4.5）—AAV8を用いて、EGFR発現が増強されたGBMニューロスフェア細胞株（HF-2927）を感染させた。ニューロスフェアを破碎することなく、GBM細胞を96ウェルプレートに約40,000細胞/ウェルで播種した（細胞数は、細胞濃度を推定するために、200μlの細胞系列を採取し、スフィアを破碎して決定した）。播種したニューロスフェアを1E+06及び1E+05 moiの抗GFRR Sso7d装飾AAV8に感染させ、同じEGFPカーゴを含む非装飾AAV8及びAAV9のw.t.調製物と比較した。形質導入の3日後、ZOE Fluorescent Cell Imager（Bio-Rad）を用いて、EGFPシグナルをモニターした。代表的なニューロスフェアの写真を図7に示す。

【0414】

抗EGFR Sso7d VP2融合ポリペプチドを提示するAAV粒子は、非装飾のAAV8及びAAV9製剤と比較して、EGFR過剰発現細胞株HF-2927のGBMニューロスフェア培養物中に、有意に増加した細胞取込みを示した。

【0415】

実施例3：VP2 N末端に遺伝的に融合した追加のGP2及びアフィボディバインダーを用いたAAV8装飾レベルの評価

概要：

追加の例示的なGP2及びアフィボディ配列を文献から取得し、実施例1に記載した通りにAAV8 VP2発現プラスミドにクローニングした。

【0416】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 8: 本実施例で使用したスカフォールドID及びリンカーのリスト

スカフォールド ID	参照	*最終スカフォールド配列	AAV8-VP2 融合物発現 プラスミド ID	スカフォールドの 分子量 (kDa)
抗Her2 アフィボディ (Z _{HER2:342})	DOI: 10.1158/0008 -5472.CAN- 05-3521	MVDNKFNKEMRNAYWEIAL LPNLNNQKRAFIRSLYDDP SQSANLLAEAKKLNDAPK GGSGGGSGGGS	(SK0046) pR5a_抗 PDGFR_アフィボディ_3x G4S-AAV8_VP2	7.6
抗 PDGFRb アフィボディ (Z02483)	DOI: 10.1016/j.jm b .2011.01.033	MVDNKFNKELVKAAAEIDAL PNLNRQWNAFIKSLVDDPS QSANLLAEAKKLNDAPK GGSGGGSGGGS	(SK0047) pR5a_抗 HER2_アフィボディ_3xG 4S-AAV8_VP2	7.3
抗 InsR GP2 (#1)	doi: 10.1158/1535 -7163.MCT- 16-0685	MKFWATVCSGHDGYCFEVP VYAETLDEALELAEWQYDST YYDYAVTRVRPGGSGGGSG GS	(SK0048) pR5a_GP2_C11_3xG 4S_AA8_VP2	6.7
抗 InsR GP2 (#5)	doi: 10.1158/1535 -7163.MCT- 16-0685	MKFWATVDCLYNDTAFEVP VYAETLDEALELAEWQYDP NYCIVTRVRPGGSGGGSGG GS	(SK0049) pR5a_GP2_C15_3xG 4S_AA8_VP2	6.5

*太字: N-又はC-末端付加のない元の配列

【0417】

装飾 AAV8 の産生：

前述した pHelper、(DL144) CAG-EGFP-NOX-本鎖カーゴ、(AgC1157) pAAV rep2__cap8 VP2 KO 及び AAV8 VP2 融合物発現プラスミドを等モル比で含有する DNA ミックスを調製し、FectoVIR-AAV トランスフェクション試薬 (Polyplus #101000022) ; DNA : FectoVIR = 1 µg : 1 µl を用いて、2E+06 vc/ml の濃度で 200 ml の HEK293 懸濁細胞にトランスフェクトした (1.1 µg の総 DNA / 1E+06 細胞)。トランスフェクション後、最終濃度 2 g/l のグルコースをトランスフェクションミックスに添加し、混合物を 37℃、110 rpm、6% CO₂ でインキュベートした。非装飾 AAV1 Sil1 と、その対応するバーコード化カーゴプラスミド (A02) の組み合わせによる 2 回の追加のトランスフェクションも実施した。トランスフェクションの 3 日後、最終濃度 0.1 U/µl のベンゾナーゼと 20 ml の溶解バッファー (500 mM HEPES、10% Tween 20、20 mM MgCl₂) をトランスフェクション反応物に添加し、混合物を 37℃ で 3 時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、24 ml のスクロース塩溶液 (5 M NaCl、7% スクロース) をライセートに添加し、さらに 20 分間インキュベートした。サンプルを 3500 g で 15 分間遠心分離し、上清を 0.22 µm フィルターで濾過し、EDTA を最終濃度 5 mM で添加した後、AKTA Pure 計器に取り付けた AAVX プレパックカラム (Pre-packed Column)、0.5 × 5 cm、1 ml (Thermo Fisher #A36652) に 1 ml/分 でロードした。結合した AAV 粒子を 10 CV の洗浄バッファー (pH 7.3、50 mM Tris-Cl、0.5 M NaCl、0.01% Pluronic F-68) で洗浄し、5 CV のグリシン溶出バッファー、pH 2.7 (0.1 M グリシン、0.2 M NaCl、0.25 M L-アルギニン) で溶出した。溶出画分 (0.25 ml) を直ちに 25 µl の 1 M Tris-Cl、pH 10 で中和した。AAV を含む画分 (UV280 シグナルにより評価して) をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100 KD (Spectrum (商標) #G235071) を用いて、PBS、pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68 に対して一晩透析した後、0.22 µm フィルターユニットに通過させた。

【0418】

力価及び装飾レベルの決定：

QX200ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) システム (Bio-Rad) を用いて、表3に記載したSV40 pA特異的オリゴセットを用いてAAVベクターの力価を測定した。精製調製物を以下のように前処理した：5 μ lのAAVを、総体積20 μ l中、1単位のDNase及び1×DNaseバッファー (Merck #04716728001) と一緒に37℃で30分間インキュベートした。1 μ lの20mg/mlのプロテイナーゼK (Life technologies #E00491) を混合物に添加し、55℃で1時間インキュベートした後、95℃で15分間不活化ステップに付した。処理した調製物の様々な1/10連続希釈液を、1×PCRバッファーII (Life technologies #N8080010)、2.5mM MgCl₂、0.05% Pluronic F-68 (Sigma Aldrich #K4894)、2ng/ μ lのSheared Salmon Sperm DNA (Invitrogen #15632011) で調製し、PCR増幅の鋳型として使用した。

10

【0419】

液滴を以下のように作製した：5.5 μ lの前処理AAV希釈液、各々900nMのフォワード及びリバースSV40 pAプライマー、125nMのSV40pAプローブ及び11 μ lのプローブ用2×ddPCRスーパーミックス (BioRad #1863024) を最終体積22 μ lで混合した。各サンプルについて技術的反復を行った。各20 μ lのddPCRアッセイ混合物を使い捨てドロップレット生成カートリッジ (Bio-Rad) に充填した。次に、70 μ lのプローブ用ドロップレット生成オイル (BioRad #1863005) を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQX200ドロップレット生成装置 (Bio-Rad) 内に設置した。液滴生成が完了したら、マルチチャンネルピペットを用いて、40 μ lの体積を96ウェルPCRプレートに移した。

20

【0420】

プレートをホイルでヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) 内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りである：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア (Bio-Rad) により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

30

【0421】

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析 (Agilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット) を実施した。

【0422】

AAV粒子/ml (vp/ml) 及びVP比の計算

40

・ng/ μ l (= μ g/ml) 値を実測MWで割り、1E+06を掛けて (μ gからgへの換算)、モル/ml値を算出

・モル/ml値に6.022E+23 (アボガドロ数) を掛けて、分子数/mlを算出する

・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数/mlの値に基づいて算出する

・AAV粒子/ml (vp/ml) : VP1+VP2+VP3分子/mlの総和を60で割る

【0423】

ddPCR及びCE-SDS結果を表9に掲載する。

50

【0424】

【表12】

表 9: アフィボディ及び GP2 装飾 AAV8 プレップに対する QC

サンプル ID	AAV 当たりの VP2 融合物	vg/細胞	vp/細胞
(AAV-701) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-抗 PDGFRb-アフィボディ	15.7	1.04E+04	2.72E+05
(AAV-702) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-抗 HER2-アフィボディ	12.2	2.85E+03	5.65E+04
(AAV-703) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_C11	18.5	7.88E+03	7.77E+04
(AAV-704) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_C15	14.1	9.65E+03	1.19E+05

10

【0425】

受容体過剰発現細胞株に対する装飾 AAV8 のインビトロ感染力：

20

装飾 AAV8 調製物の受容体特異性を評価するために、ヒト PDGFRb (HKB11 PDGFR+) 又はヒト HER2 (HKB11 Her2+) を過剰発現する HKB11 細胞、及びヒトインスリン受容体 (NIH3T3 InsR+) を過剰発現する NIH3T3 細胞に対して感染力アッセイを実施した。感染当日、細胞を 5×10^5 細胞/mL まで DMEM に再懸濁させ、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルを 96 ウェルプレートに播種した (2.5×10^4 細胞/ウェル)。同じカーゴ及び方法を用いた個別の実験で作製した、AAV8 装飾調製物及び非装飾 AAV8 対照を DMEM 培地で希釈し、ウイルスゲノム濃度に基づいて 1×10^6 から $4.57 \times 10^2 \text{ moi}$ の範囲の様々な濃度を、播種した細胞に適用した (最終体積 $100 \mu\text{L}$)。導入から 4 日後に細胞を剥離し、FACS 解析を実施して、EGFP 陽性細胞のパーセンテージと EGFP MFI を算出した。図 8 は、感染 (EGFP+) 細胞のパーセンテージ又は EGFP MFI に対するフル粒子の数を示している。

30

【0426】

AAV8 VP2 に融合した全てのアフィボディ及び GP2 配列は、非装飾対照と比較して、受容体過剰発現細胞株での形質導入の増強を示した。

【0427】

実施例 4：様々な AAV バックボーン上の VP2 融合物としての Sso7d スカフォールドの評価

この実験の目的は、N 末端 VP2 融合物を用いて、異なる AAV 血清型にリガンドスcaフォールドを移植する可能性を評価することであった。この実施例では、機能性抗 EGFR Sso7d 配列をリガンドスcaフォールドとして用いた。

40

【0428】

Sso7d-AAV6 Sil2 の評価：

最初に、AAV6 Sil2 を使用した。このバックボーンは、AAV6 の主要な付着部位として機能するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) とシアル酸 (SIA) への結合を消失又は減少させるために、表 10 にまとめた一連の変異を含有する。表 10 及び 11 に記載されるように、rep2/cap6 VP2 KO プラスミド (T138A) 及び抗 EGFR Sso7d (E.18.4.5) VP2 融合物発現プラスミド (G4S 又は (G4S) 3 を介して VP2 の N 末端に融合した抗 EGFR Sso7d) の両方に、列挙した変異を組み込んだ。様々な調製物のクローニング、発現、精製及びウイルス濃度の評価は、下記の例外を除いて、実施例 2 に記載した通りに実施した：

50

- ・ C A G - E G F P - N O X 一本鎖カーゴ (D L 1 4 4) を使用した
- ・ サンプルはトランスフェクションの3日後に採取した

【 0 4 2 9 】

装飾 A A V 6 S i l 2 調製物の機能性を評価するために、実施例 2 に記載したのと同じプロトコルを用いて、H K B 1 1 野生型 (w . t .) 及び H K B 1 1 _ E G F R 過剰発現細胞株に対して感染力アッセイを実施した (v g 中の出発 m o i として 1 E + 0 5) 。結果を図 9 に記録する。

【 0 4 3 0 】

【表 1 3 】

表 10: AAV6_Sil2 突然変異セットの概要

血清型	サイレンシングされる ID	サイレンシング変異	予想される遮断経路	参照
AAV6	AAV6_Sil2	K531E, K459S, V473D, N500E	HSPG 及び SIA	DOI: 10.1128/JVI.00161-16 及び https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.011

【 0 4 3 1 】

【表 1 4 】

表 11: pHelper 及び DL144 カーゴに加えて本実施例 (AAV6_Sil2) で使用した rep/cap VP2 KO 及び VP2 発現プラスミドのリスト

サンプル ID	Rep/Cap プラスミド	VP2 発現プラスミド
AAV6 w.t.	pRep2Cap6	なし
AAV6 Sil2	(AgC1227) pR2_C6_Sil2	なし
AAV6 Sil2- 抗 EGFR Sso7d G4S	(AgC1248) pR2_C6_VP2KO_Sil2	*(AgC1281)_pRS5a_抗 EGFR_Ssod7_G4Sx1_AAV6_VP2_Sil2_D590A
AAV6 Sil2- 抗 EGFR Sso7d (G4S) ₃	(AgC1248) pR2_C6_VP2KO_Sil2	*(AgC1278)_pRS5a_抗 EGFR_Ssod7_G4Sx3_AAV6_VP2_Sil2_D590A

* D590A 変異は、VP2 発現プラスミド中に意図せず存在し、VP2 のみのタンパク質におけるこの変異は、図 9 に示す HKB11 w.t. 感染カプロファイリングで確認された通り、形質導入に影響を及ぼさない。

【 0 4 3 2 】

A A V 6 バックボーン上の H S P G とシアル酸相互作用の切除 (A A V 6 _ S i l 2 変異セット) は、親配列と比較してインビトロウイルス取り込みをおよそ 1 0 0 倍減少させる。抗 E G F R S s o 7 d スカフォールドによる A A V 6 _ S i l 2 バックボーンの装飾は、E G F R 過剰発現細胞株に対する A A V 6 の w . t . 感染力を回復させる。この実験で試験された S s o 7 d と V P 2 の間の 2 つのリンカーは、感染力に影響を及ぼさないようである。

【 0 4 3 3 】

S s o 7 d - A A V 9 の評価 :

評価した第 2 のバックボーンは A A V 9 であった。ここでも、2 つの異なるカプシド発現プラスミド、r e p 2 / C a p 9 V P 2 K O (T 1 3 8 A) 及び抗 E G F R S s

o 7 d (E. 18. 4. 5) AAV9 VP2 融合物発現プラスミド ((G4S)3 により連結された AAV9 VP2 の N 末端での抗 EGFR Sso7d の融合物) を表 12 に概説したように作製した。様々なプレップのクローニング、発現、精製、及びウイルス濃度の評価は、AAV6 Sil2 についてこの実施例に記載したように行った (採取時間: トランスフェクションの 2 日後)。装飾 AAV9 調製物の機能性を評価するために、GBM 細胞に対する感染力アッセイ (実施例 2 に記載) を実施した。この実験では、それぞれ EGFR 増強発現 (HF-2927) 及び基底 EGFR レベル (HF-2561) を有する 2 つの異なるクローンを使用した。感染力アッセイのために、384 ウェルプレート (Corning、#3830) に 1 ウェル当たり 350 個の HF-2561 細胞又は 500 個の HF-2927 細胞を播種した。様々なニューロスフェア細胞株間の増殖の差を調製するために、細胞株につき 16 の追加ウェルを播種して、播種 2 日後の培養物当たりの平均細胞数をスフィア形成時に測定した。これらのウェルを培養の 2 日後に Hoechst 33342 で染色し、ウェル当たりの細胞を定量した (10 µg/ml で 1 時間; Sigma B2261)。Opera Phenix High-Content Screening System (PerkinElmer) を用いて細胞数を測定してから、細胞株毎に望ましい MOI に達するように (ウイルスなし、MOI 10E4、10E5、10E6)、ウイルス調製物を非染色スフィアの培地に添加した。感染から 5 日後、スフィアを Hoechst で 1 時間染色し、Opera Phenix で Hoechst (細胞数) と GFP (ウイルス感染) を画像化した。画像化は、10 倍の空気対物レンズを用い、共焦点モードで 10mm の Z (18 面) をカバーするように実施した。Harmony ソフトウェアを用いて最大投影で画像解析を行い、核セグメンテーション後に GFP 陽性細胞のパーセンテージを決定した (>1500 の核 GFP シグナルを有する GFP+ 細胞)。結果を図 10 に記録する。

10

20

【0434】

【表 15】

表 12: pHelper 及び DL144 カーゴに加えて、本実施例 (AAV9) で使用した rep/cap VP2 KO 及び VP2 発現プラスミドのリスト

サンプル ID	Rep/Cap プラスミド	VP2 発現プラスミド
AAV9 w.t.	pRep2Cap9	なし
AAV9 - 抗 EGFR Sso7d (G4S) ₃	(NC036) pRep2_p5_Cap9_VP2 KO	(NC043) pRS5a_G4Sx3_抗 EGFR Sso7d AAV9-VP2

30

【0435】

AAV9 の VP2 N 末端に抗 EGFR Sso7d を融合すると、EGFR 高発現の GBM ニューロスフェア (HF-2927) では感染力が高まるが、基底 EGFR 発現を有するクローン (HF-2561) を用いた場合、改善が見られない。

【0436】

Sso7d-AAV1 Sil1 の評価:

40

最後に、VP2 N 末端融合によるリガンド装飾のためのバックボーンとして AAV1 Sil1 を試験した。このバックボーンは、AAV1 の一次付着部位として機能するシアル酸 (SIA) への結合を消失又は減少させるために、表 13 に記載したような一連の変異を含有する。列挙された変異は、rep2/cap1 VP2 KO 発現プラスミド (T138A)、並びにこの実験で使用され、表 14 及び 15 に列挙された様々な抗 EGFR Sso7d-VP2 融合物発現プラスミド ((G4S)3 を介して AAV1 VP2 の N 末端に融合した様々な抗 EGFR Sso7d) のいずれにも組み込まれた。様々なプレップのクローニング、発現、精製及びウイルス濃度の評価は、実施例 2 に記載した通りに実施した。装飾した AAV1 Sil1 調製物の機能性を評価するために、実施例 2 に記載したのと同じプロトコルを用いて、HKB11 w.t. 及び HKB11_EGFR

50

過剰発現細胞株について感染力アッセイを実施した。結果を図 11 にグラフで示す。

【0437】

【表 16】

表 13: AAV1Sil1 変異セットの概要

血清型	サイレンシングされる ID	サイレンシング変異	予想される遮断経路	参照
AAV1	AAV1_Sil1	V473D, N500E	SIA	DOI: 10.1128/JVI.00161-16

10

【0438】

【表 17】

表 14: 本実施例で使用した抗EGFR Sso7d 配列のエピトープ/親和性の特徴;

Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) 及び Salzer et al. (doi.org/10.1038/s41467-020-17970-3)からの配列、エピトープ及び親和性データ:

クローンID	エピトープ	AAV1Sil1 VP2 N末端に融合した最終配列	A431の Kd	Jurkatの Kd
*E18.4.5	セツキシマブ (D3バインダー)と競合する	MATVKLTYQGEEKQVDISKITYVDRAGQFI WFEYDEGGGALGTGWVSEKDAPKELLQM LEKQGGGGSGGGSGGGGS	19 nM	n.a
E11.8	セツキシマブ及びE18.6と 競合しない	MATVKFTYQGEEKQVDISKIKRVDRYGQSI HFNYDEGGGAYGWGWVSEKDAPKELLQM LEKQGGGGSGGGSGGGGS	67 nM	n.a
E18.6	セツキシマブ及びE11.8と 競合しない	MATVKFTYQGEEKQVDISKIKNVLRYGQOI VFSYDEGGGAGGNGFVSEKDAPKELLQML EKQGGGGSGGGSGGGGS	73 nM	n.a
E11.4.1	セツキシマブ (D3バインダー)と 競合する	MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRGGQRI AFGYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELLQML EKQGGGGSGGGSGGGGS	17 nM	13 nM
E11.4.1 G25A	セツキシマブ (D3バインダー)と競合する	MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRAGQRI AFGYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELLQML EKQGGGGSGGGSGGGGS	n.a	125 nM
E11.4.1 G32A	セツキシマブ (D3バインダー)と競合する	MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRGGQRI AFAYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELLQML EKQGGGGSGGGSGGGGS	n.a	877 nM

20

30

* 本実施例では使用しない

【0439】

40

50

【表 18】

表 15: pHelper 及び DL144 カーゴに加えて、本実施例 (AAV1Sil1) で使用した rep/cap VP2 KO 及び VP2 発現プラスミドのリスト

サンプル ID	Rep/Cap プラスミド	VP2 発現プラスミド
AAV1 Sil1	(NC056)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_V473D_N500E	なし
AAV1 Sil1 抗 EGFR Sso7d E11.8	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0004) pRS5a_抗 EGFR Sso7d E11.8_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2
AAV1 Sil1 抗 EGFR Sso7d E18.6	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0005) pRS5a_抗 EGFR Sso7d E18.6_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2
AAV1 Sil1 抗 EGFR Sso7d E11.4.1	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0001) pRS5a_抗 EGFR Sso7d E11.4.1_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2
AAV1 Sil1 抗 EGFR Sso7d E11.4.1 G25A	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0002) pRS5a_抗 EGFR Sso7d E11.4.1 G25A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP
AAV1 Sil1 抗 EGFR Sso7d E11.4.1 G32A	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0003) pRS5a_抗 EGFR Sso7d E11.4.1 G32A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP

10

20

30

【0440】

AAV1Sil1 VP2 に融合した全ての試験抗 EGFR Sso7d スカフォールドバリエーションは、非装飾親細胞と比較して、EGFR 過剰発現細胞株の形質導入の増加を示した。

【0441】

実施例 5：ヒト EGFR に対する Sso7d ファージライブラリーの作製及びファージディスプレイ：

40

実施例 5.1. ライブラリーの調製：

ファージディスプレイベクターとして、アンバーストップ及びアンピシリン耐性を有する pPD7-1__ompA__Sso7d__APP を選択した。

【0442】

Sso7d ライブラリー (Lib8) を以下のように設計した：最初のメチオニンを含む rcSso7d ポリペプチド配列に対する rcSso7d 位置 22、24、26、29、31、33、41、43 及び 45 を、各位置で同等に呈示される 8 個のアミノ酸 (D、R、H、N、A、I、Y 及び W) によって無作為化した。さらに、翻訳後修飾イベント及び非特異的結合を減少させるために、推定グリコシル化 (NxS NxT-x は P ではない)、インテグリン結合 (RGD、RYD、KGD、NGR、LDV、DGE) 及び CD

50

11c / CD18 結合 (GPR) モチーフを回避し、クローニングの理由から Age I、BamHI 及び BsaI 制限部位を設計から除外した。ランダム化に使用した rcSso7d バックボーンを以下に示す：

【化1】

(M)ATVKFTYQGEEKQVDISKIKXVVRXGXIXFXFYDEGGGAXGXGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

下線で示す位置：Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) に記載された w.t. Sso7d 配列と比較した rcSso7d 置換 K7T、K9Q、K28Q、Q40A と、KK C 末端切断。X はランダム化位置を表す。

【0443】

ライブラリーインサートを、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB、M0493L) を用いて、NruI 及び EcoRI 制限部位を導入する PCR により増幅した。

【0444】

PCR 反応物は、25 µl の反応体積当たり 5 µl の 5×Q5 反応バッファー、0.5 µl の 50mM dNTPs、250 pg の Sso7d ライブラリーの鑄型 DNA、10 pmol の各プライマー、及び 0.25 µl の Q5 Hot Start High-Fidelity DNA ポリメラーゼを含有した。以下のサイクリングプロトコルで 265 bp の断片を増幅した：98℃で30秒の初期変性ステップ；98℃で7秒の変性、62℃で15秒のアニーリング、72℃で15秒の伸長を25サイクル；72℃で2分の最終伸長。残存している可能性のある鑄型 DNA とプライマーを除去するために、PCR 反応物を 2% TAE アガロースゲルにロードした。正しいバンドを切除し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System、Promega、A9281 で精製した。

【0445】

増幅した Sso7d ライブラリーを制限酵素 NruI-HF (NEB R3192L) と EcoRI-HF (NEB R3101L) で 37℃にて3時間消化した。消化されたオーバーハングを除去するために、前述した Wizard キットを用いて、さらにクリーンアップステップを行った。

【0446】

ファージディスプレイベクター、即ち、アンバー (Amber) ストップを有する pPD7-1_ompA_Sso7d_APP の調製のために、ベクター DNA を EcoRI-HF / NruI-HF で 37℃にて3時間消化した。ベクターとインサート断片の分離のため、消化ベクターを 1% TAE アガロースゲルにロードし、電気泳動後、4482 bp の正しいサイズのベクターバンドを切除した。融解及びクリーンアップは上記のように行った。

【0447】

2 µg の消化ベクター DNA と 434 ng の消化インサート DNA を、ベクター-DNA 1 µg 当たり 1.6 U の T4 DNA リガーゼ (ThermoFisher Scientific、No. 15224041) (これはインサート DNA の 4 倍モル過剰に相当する) を用いてライゲーションした。ライゲーションは 16℃で16時間行い、その後 65℃で10分間の熱不活性化ステップを行った。

【0448】

グリコーゲン (Ultrapure Glycogen、ThermoFisher、No. 10814-010) と 2-ブタノール (Sigma、No. 19440) 沈殿により、ライゲーション済みライブラリーの脱塩を実施した後、70%エタノールによる洗浄ステップに付した。次いで、ライゲーション済み DNA を ddH₂O に溶解させた。

【0449】

エレクトロコンピテント TG1 [F'traD36 proAB lacIqZ ΔM1

10

20

30

40

50

5] supE thi-1Δ (lac-proAB)Δ (mcrB-hsdSM) 5 (rK-mK-), Lucigen, No. 60502-2を用いた30形質転換反応を、Gene Pulser/MicroPulserエレクトロポレーションキュベット、0.1cmギャップ、No. 1652089、BioRadにおいて、形質転換につき66.7ngのライゲーション済みベクターと25μlの細胞を用い、以下の設定：1.8kV、600Ω、10μsのBioRad Genepulser Xcell装置で実施した。形質転換後、細胞を2.5mlの予熱Terrific Broth Recovery培地（TB改変、1.2%BactoTryptone、2.4%酵母エキス、54mM K₂HPO₄、16mM KH₂PO₄、0.4%グリセロールを含有）に懸濁させた。リカバリ時間は、37℃、振盪インキュベーターで1時間であった。ライブラリーは、100μg/mlカルベニシリンと1%グルコースを含む1.5lのLB培地で、21℃で15時間、220rpmで振盪しながら増幅した。一晚培養の出発OD_{600nm}は、0.23であった；最終的な採取は、15時間後、1.86のOD_{600nm}で実施した。

10

【0450】

品質対照として、インサート断片を含まず、リガーゼのみを用いたベクター断片のライゲーション、及び形質転換によってベクターバックグラウンドを決定した。

【0451】

ライブラリーサイズ及びベクターバックグラウンドは、LB/100μg/ml Carb/Glc寒天プレートにプレーティングし、1時間のリカバリ時間後に希釈系列を行うことにより同定した。最終的なライブラリーサイズは、 2.67×10^9 メンバーであると決定されたが、これは、 1.34×10^8 メンバーのライブラリーの理論多様性の20倍オーバーサンプリングに相当する。0.08%という非常に低いベクターバックグラウンドが決定された。

20

【0452】

ライブラリーの94クローンのサンダーシーケンシングは、94の異なるSso7d配列を示し、ベクターバックボーンの配列は示されなかった。

【0453】

遠心分離ステップによりライブラリーを採取し、ペレットをLB/100μg/ml carb/1%グルコース/20%グリセロールに再懸濁させた。その後、アリコート（ライブラリーの多様性の約8倍を含む）を液体窒素中で瞬間凍結し、-80℃で保存した。

30

【0454】

Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (150サイクル、#MS-102-3001)を用いてMiSeq System (Illumina)でライブラリーをシーケンシングした。作製されたfastqファイルを、最初に品質(Q>30、ここで、Qは、Phredクオリティスコアを示す)と長さ(120~130bp)によってフィルタリングした。クオリティトリミング後、Sso7d特異的な境界(DISKからDAPK)をマッピングする目的で配列をプロセッシングした。最終的フィルタリング済み配列について、標的位置のアミノ酸分布を評価した：約500~700Kリードを評価した。結果を図12に示す。

40

【0455】

ランダム化位置におけるアミノ酸分布は、ランダム化に使用される8つのアミノ酸の各々について約12.5%の頻度を有し、予想通りであった。

【0456】

実施例5.2 Sso7dプラスミドライブラリーを用いたファージの調製：

ライブラリーの約8倍の多様性を含むグリセロールストックを、200mlの2YT/100μg/mlカルベニシリン/1%グルコースに、0.24の出発OD_{600nm}で接種した。細胞を37℃、220rpmで、0.59のOD_{600nm}まで培養した。ヘルパーファージ感染は、Hyperphage、M13 K07ΔpIII、Progen、

50

PRHYPEをMOI（感染多重度）20で、初めは振盪せずに37℃の水浴中に添加し、次に37℃、220rpmで振盪した。感染対照として希釈系列を調製し（Hyperphageは、感染した大腸菌（E. coli）細胞にカナマイシン耐性を付与する）、様々な希釈物をLB/100μg/mlカルベニシリン/1%グルコース及びLB/50μg/mlカナマイシン/1%グルコースの両方の寒天プレートにプレーティングした後、培養物を遠心分離して残存するHyperphageを除去し、ヘルパーファージ感染大腸菌（E. coli）を含むペレットを1lの2×YT/100μg/mlカルベニシリン/50μg/mlカナマイシン/0.25mM IPTGに再懸濁させてから、振盪器内で22℃にて一晚振盪培養した。

【0457】

翌日、対照寒天培地プレートは、いずれの抗生物質耐性に対してもほぼ同数のコロニーを示し、これは、ヘルペファージ感染が効率的であったことを示す。

【0458】

培養物を遠心分離し、1/4体積の氷冷20%PEG6000/2.5M NaCl（ポリエチレングリコール/NaCl）との3時間インキュベーションステップ、遠心分離、さらに再懸濁後、PBSを用いて4℃で一晩かけて溶解させ、2回目の沈殿ステップにより上清からファージを沈殿させた。全てのファージを完全に溶解させるために、PBSで2回目の再懸濁ステップを室温で2時間行った。まだ残留する細胞残屑を除去するため、4℃でもう一回遠心分離ステップを行った。

【0459】

ファージ力価はTG1F⁻の感染によって決定した。力価測定のために、一般的に感染前にM9寒天プレート（200mlの5×M9－最小塩類、780mlのbacto寒天溶液、2mlの1M MgSO₄、0.1mlの1M CaCl₂、20mlの20%グルコース、400μlの1%チアミン塩酸塩を含有する）でTG1F⁻細胞を培養して、ファージ感染に必要なF線毛を発生させる必要がある。次に、力価測定のために指数関数的に増殖（0.6～0.8のOD600nmまで）する必要があるため、2×YT培地での上記細胞の液体培養物をM9プレートから接種した。ファージの希釈系列を調製した後、増殖したTG1F⁻を添加し、37℃で30分の感染時間の後、希釈物をLB/30μg/mlカルベニシリン/1%グルコースプレートにプレーティングする。

【0460】

翌日、異なる希釈物のコロニーをカウントし、力価を算出した。凍結のために20%グリセロールを添加した後、3.5×10¹²ファージ/mlのファージ力価を決定した。アリコートをして-80℃で保存した。

【0461】

実施例5.3 ヒトEGFRに対するファージディスプレイ：

ライブラリー品質を評価するために、ファージディスプレイキャンペーンを実施した。ヒトEGFRを標的として選択した。3ラウンドの差次的セルパンニングを行った。ヒトEGFRを安定的にトランスフェクトしたHKB11懸濁細胞（生存率>98%）を、第1及び第3回パンニングラウンドに使用した。第2回ラウンドでは、Fcに融合したビオチン化ヒトEGFR－タンパク質を用いた。細胞の培養は、200μg/mlのゼオシンと1%FBSを添加した適切な培地で実施し、3×10⁵細胞/mlになるように週3回分割した。

【0462】

セルパンニングラウンド1及び3の場合、1×10⁷細胞を、予冷PBS/5%FBSで3回洗浄及び遠心分離することにより調製した。ファージと標的細胞を同じバッファで2時間ブロックした後、細胞を遠心分離して、ファージと再懸濁させ、さらに2時間インキュベートした。インプットファージの量は、ライブラリーの多様性の少なくとも約500倍、又は前回パンニングラウンドのアウトプットに相当した。ファージインキュベーション後、第1回細胞パンニングラウンドでは、インキュベーション時間なしで細胞を洗浄し、遠心分離を2回行い、第3回ラウンドでは3回の洗浄ステップを実施し、その度

10

20

30

40

50

に5分のインキュベーション時間を伴った。いずれの場合も、100mMグリシン-塩酸／500mM NaCl、pH2.2、及び100mMトリエチルアミン、pH11.5を用い、低及び高pHで溶出を実施した。各ステップの後に直接中和を行った。細胞パンニングの全ステップは4℃で実施したが、ファージの最終溶出はRTで行った。

【0463】

第2回パンニングラウンドは、Fcタグに融合したビオチン化ヒトEGFR-タンパク質を用いて実施した。予めブロックしたファージを500nMビオチン化タンパク質と直接1時間インキュベートした。次に、結合したファージを有するビオチン化hEGFR-Fc-タンパク質を、ニュートラアビジンでコーティングしたプレートでさらに1時間捕捉した。ウェルはPBS+0.05%Tween20で3回洗浄した後、インキュベーション期間なしで、3×PBSで洗浄した。細胞パンニングと同じ方法で溶出を実施した。

【0464】

アウトプットのファージ力価を、ファージ調製物について上述したように決定した。結果を表16に要約する。

【0465】

【表19】

表 16. パンニングラウンドにおけるファージ力価

	第1回ラウンド		第2回ラウンド		第3回ラウンド	
	インプット	アウトプット	インプット	アウトプット	インプット	アウトプット
EGFR	WCP (HKB11-EGFRトランスフェクト)		LP (Neutr.+hsEGFR_hFc1P)		WCP (HKB11-EGFRトランスフェクト)	
ファージ力価	6.9E+10	5.6E+06	1.6E+10	5.4E+06	4.5E+10	3.2E+09
ファージのプレブロック			ニュートラアビジン			
洗浄条件	低ストリンジェント		低ストリンジェント		標準	
	2x FACS バッファー、急速		3x PBST、急速 3x PBS、急速		3x FACS バッファー、5min	

【0466】

アウトプットのファージ感染及び続くパンニングラウンドのための調製：

ファージをさらに増幅するために、指数関数的に増殖したOD600nm：0.6～0.8のTG1F⁻を、溶出量に対するTG1F⁻量の10～20倍過剰量のファージアウトプットに、ウォーターバス中37℃で45分間感染させた。TG1F⁻をペレット化するために遠心分離を行った後、感染菌を含むペレットを100μg/mlのカルベニシリンと1%グルコースを含む100mlの2×YT培地に移し、シェイクフラスコ中、220rpmで振盪しながら25℃で一晩培養した。翌日、遠心分離の後、ペレットをさらに20%グリセロールを含む新鮮な培地に再懸濁することにより、グリセロールストックを調製し、グリセロールストックから新たなファージ調製を開始した。

【0467】

このために、2YT／100μg/ml carb／1%グルコースを含む新しい10ml培養物に、0.2～0.3のOD600nmまでグリセロールストックを接種した。培養物を37℃、220rpmの振盪培養器で30～60分間増殖させた。Hyperphage感染は、5mlの培養物を20のmoiで、振盪せずに37℃のウォーターバス中で30分間、次に37℃及び220rpmのシェーカー中でさらに30分間実施した。このプロセスは、感染液50μlをLB／50μg/mlカナマイシン／1%グルコース寒天プレートにプレーティングすることにより制御した。Hyperphageを除去す

るための遠心分離ステップの後、得られたペレットを10 mlの2×YT／100 μg／mlカルベニシリン／50 μg／mlカナマイシン／0.25 mM IPTG培地に移し、ファージ産生のために22℃及び220 rpmで一晩振盪しながらインキュベートした。

【0468】

翌日、寒天平板上の菌叢によって、感染の成功が実証された。ファージを含む培養上清を遠心分離ステップにより大腸菌（E. coli）細胞から分離し、Sso7dを担持するファージを、約1／4体積の氷冷20%PEG6000／NaClを用いて氷上で30分間沈殿させた。懸濁液を予冷遠心機で4℃、16000×gで30分間遠心分離し、上清を廃棄し、沈殿したファージをPBSに再懸濁した。残った細胞残屑は、エッペンドルフ遠心機における16000 rpmでさらに5分間の遠心分離ステップにより除去した。力価測定は前述したように行った。

【0469】

第3回パンニングラウンドとアウトプットの一晩増幅の後、Qiagen Minikit、No. 27106を用い、推奨プロトコルに従ってDNA-Miniprepを実施した。

【0470】

実施例5.4：NGSによるSso7dライブラリー組成の評価

ILLUMINAのMiSeqでのライブラリー調製及びNGS：

ILLUMINAのアダプターを含むプライマーを用いて、単一のPCR反応物に対する第3回パンニングラウンド後のアウトプットのDNA調製物からアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々のサンプルの同定を可能にするように、ILLUMINA TruSeq インデックスを含むリバースプライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを表17に示す。

【0471】

【表20】

表 17: 本実施例で使用したプライマーのリスト

サンプル ID	プライマー-seq 5'-3'
LC0034 (for プライマー)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTcaggtggacatcagcaagatcaag
LC0086 (rev プライマー)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC

【0472】

PCR反応は、25 μlの総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix（NEB #M0494）、10 pmolの各プライマー、鋳型として第3回パンニングラウンド後の100 ngのDNA調製物を用いて調製した。PCRは、以下のサイクリングプロトコルで実施した：98℃で2分；98℃で10秒、55℃で15秒、72℃で25秒を15サイクル；次に、72℃で2分の最終増幅の後、4℃で保持。Sybr-Safe前染色1.5%アガロースゲルでのアガロースゲル電気泳動（120 Vで30分）により、PCR産物を分離した。予想したサイズのコリドンを切除し、Qiaquick Gel Extraction Kit（Qiagen #28704）を用いて精製し、50 μlの水で溶出した。DNA濃度をQubit

t 計器で測定し、産物の純度とサイズは *Agilent Bioanalyzer 2100* (*Agilent DNA1000* キット) を用いて評価した。定量後、ライブラリーを最終濃度 8 pM で等モルにプールし、*Illumina MiSeq Reagent Kit v3* (150 サイクル、*#MS-102-3001*) を用いて *MiSeq* システム (*Illumina*) でシーケンシングした。

【0473】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析

作製された *fastq* ファイルを、最初に品質 ($Q > 30$ 、ここで、 Q は、*Phred* クオリティスコアを示す) と長さ ($120 \sim 130 \text{ bp}$) によってフィルタリングした。クオリティトリミング後、*Sso7d* 特異的な境界 (*DISK* から *DAPK*) をマッピングする目的で配列を処理した。最終的フィルタリング済み配列について、標的位置の *AA* 分布を評価した。結果を図 13 に示す。

10

【0474】

NGS は、いくつかのライブラリー構築物の高い濃縮を示し、最も濃縮されたものは 4.56% の出現率を示した。*NGS* はまた、9つのランダム化位置のアミノ酸残基が、特にいくつかの位置 (最初のメチオニンを含む *Sso7d* ペプチド配列の 22 、 26 、 33 、 43 及び 45 位に対応する、変異位置の 1 、 3 、 6 、 8 及び 9 位) に比較的保存されていることも実証した。

【0475】

実施例 5.5: *FACS* スクリーニング

20

Agilent、*No. 200131* からの *BL21 (DE3)* 細胞 (遺伝子型大腸菌 (*E. coli*) *B F-dcm ompT hsdS (rB-mB-) gal* λ (*DE3*)) において、*IPTG* 誘導により小規模タンパク質発現を実施した。

【0476】

DNA を、ユーザのプロトコルに従って、ヒートパルスによりケミカルコンピテント *BL21 (DE3)* 細胞に形質転換した。この細胞を、対応する $\text{LB} / 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ カルベニシリン / 1% グルコース寒天プレート上で一晚増殖させた。翌日、 4×96 個の単一コロニーを採取し、マスタープレートにおける $2 \times \text{YT} / 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ *carb* / 1% グルコースに移し、プレートシェーカー内で 37°C にて一晚増殖させた。翌日、 30% グリセロールをさらに含有する同じ培地を保存のために添加し、マスタープレートを -80°C で保存した。

30

【0477】

FACS スクリーニングのためのタンパク質発現を $100 \mu\text{l}$ スケールで実施した。 $2 \times \text{YT} / 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ *carb* 0.1% グルコースを含む培養プレートに、解凍したマスタープレートからのレプリケータを接種し、約 0.6 の $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ までプレートシェーカー内で 37°C にて増殖させた。最終濃度 0.25 mM の *IPTG* で誘導した後、プレートをプレートシェーカー内で 22°C (*RT*) にて一晚さらにインキュベートした。翌日、 $2 \times \text{BBS} / \text{EDTA}$ (*Teknova*、*No. B0205*) 及びリゾチーム (*Merck*、*No. 10837059001*) からなる *BE* *L* バッファーを用いて、溶解を行った。ウェル中の最終濃度は、 200 mM ホウ酸、 150 mM *NaCl*、 2.5 mM *EDTA* 及び $2.5 \text{ mg} / \text{ml}$ リゾチームであった。シェーカーで1時間インキュベートした後、プレートを遠心分離し、分泌した可溶性 *Sso7d* タンパク質を含む *BE* *L* 抽出物を細胞結合について試験した。

40

【0478】

FACS 解析のために、採取したクローンを *EGFR* 陽性細胞株と陰性細胞株で試験した。陽性細胞株は、細胞パンニングの場合と同じ、即ち、ヒト *EGFR* を安定的にトランスフェクションした *HKB11* 細胞である。陰性対照として、*HKB11* 細胞での交差反応性を除外することができるよう、自家製 *HKB11 EGFR* ノックアウト細胞株を用いた (*EGFR* は、*HKB11* 野生型細胞に内因性に発現しているため)。 *FACS* 解析は、 96 ウェルフォーマットのハイスループットサンプラー付き *FACS Calib*

50

ur 計器 (BD Biosciences) を用いて行った。FACS バッファーとして、5% FBS と 0.04% NaN₃ を含む PBS を、全ての洗浄及びインキュベーションステップに使用した。細胞生存率は >98% 以上であった。5 × 10⁵ 細胞 / ウェルを、3 回の洗浄及び遠心分離ステップを伴うパンニングについて記載したのと同様に調製した。全てのステップを 4℃ で行った。

【0479】

最初の染色ステップでは、50 μl の BEL 抽出液を、最終濃度 24 μg / ml の社内生産マウス抗 APP 抗体と、プレートシェーカー上で 1 時間プレインキュベートした。第 2 ステップでは、5 × 10⁵ 細胞 / ウェルを添加し、さらに 1 時間インキュベートした。低温 FACS バッファーで 2 回洗浄した後、ヤギー抗マウス-IgG-RPE-抗体 R-フィコエリスリン AffiniPure F(ab')₂ フラグメントヤギ抗マウス IgG、F(ab')₂ フラグメント特異的 (min X Hu、Bov、Hrs Sr Prot)、Jackson ImmunoResearch、No. 115-116-072 の 1:100 希釈液中に細胞を再懸濁させ、プレートシェーカーでさらに 30 分間インキュベートした。2 回の最終洗浄ステップの後、染色した細胞を低温 PBS 中に再懸濁させ、FACS Calibur 計器でウェル当たり 5000 個の細胞を測定した。

【0480】

384 の試験クローンのうち 81 の主要ヒットが、対照 EGFR ノックアウト細胞株と比較して、EGFR 過剰発現細胞で中央値 >10 を示した (中央値 10~30 を有するものが 55、30~60 のものが 17、中央値 60~887 のものが 9)。配列解析から、一部の配列の最大 10 倍への濃縮が明らかにされた。最終的に 41 の異なる新たな配列を同定することができた。これらの約半分については、別の FACS か、又はビオチン化タンパク質に対する ELISA のいずれかで、結合を確認することができた。

【0481】

選択された Sso7d バリエーションの EGFR トランスフェクト HKB11 細胞への特異的結合を確認するために、6 つの EGFR 結合 Sso7d 構築物の小規模大腸菌 (E. coli) タンパク質発現及び精製を実施した。発現は、20 ml 培養物中の新しく形質転換した BL21 (DE3) を用いて行った。振盪インキュベーター内で細胞を 37℃ で増殖させ、0.25 mM IPTG で誘導し、さらに振盪しながら 22℃ で一晩インキュベートした。翌日、培養物を遠心分離し、ペレットを -80℃ で 2 日間凍結し、ペレットから可溶性画分のみを精製した。

【0482】

タンパク質の精製のために、Poly-Prep クロマトグラフィーカラム (BioRad、No. 731-1550) において、カラム当たり 0.5 ml のカラム体積を用いて抗 APP-カラム (セファロース樹脂に結合した抗 APP 抗体、Novartis が社内生産) を調製した。

【0483】

溶解は、完全 EDTA フリーのプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche、11873580001)、ベンゾナーゼ (Novagen、No. 70746) 及び DNase (Roche、No. 04536282001) を含有する 3.5 ml の Bugbuster Mastermix (Millipore、No. 71456-3) を用い、ローテーター上で RT にて 30 分間行った。遠心分離及び滅菌濾過のステップにより細胞残屑と発現 Sso7d を分離した後、APP カラムへの Bugbuster の損傷作用の可能性を避けるために、カラムにロードする前にサンプルを PBS で 1:10 希釈した。

【0484】

PBS pH 7.4 を用いて、平衡化及び洗浄ステップを実施し、1~1.5 ml の 100 mM グリシン、pH 3 を用いて、溶出を行った。バッファー交換と精製タンパク質の濃縮は、Amicon (登録商標) Ultra-4 遠心フィルターユニット (MWCO 3 kDa、No. UFC800324) を用いて行った。精製タンパク質の品質はタンパク質ゲルで分析した。

10

20

30

40

50

【0485】

6つの精製済みSs07d構築物全ての特異的細胞結合をFACS解析によって確認した。結果を図14に示す。選択したクローンは表18に示す特徴を有する。

【0486】

6つのSs07d構築物全てのFACS解析で、特異的な細胞結合が確認された。

【0487】

【表21】

表 18: FACS 解析用に選択した Ss07d 構築物。第 6 列のアミノ酸位置は、最初のメチオニンがない Ss07d の AS 位置を示す。

精製番号	サンプル名	ヒット名 (MP での位置)	プレート上に見出されたクローン	NGS で見出されたもの (上位 30)	5	20	21	23	25	28	30	32	40	42	44
1	EGFR	4.1A02	1x	なし	F	K	I	D	Y	W	H	N	Y	W	W
2	EGFR	4.1A03	4x	ヒット 番号 3 2.18 %	F	K	I	D	Y	Y	H	R	N	W	W
4	EGFR	4.1H02	2x	なし	F	K	I	D	Y	W	H	R	D	W	W
5	EGFR	4.2A08	4x	1NGS にヒット 4.56 %	F	K	I	D	Y	N	H	Y	N	W	W
6	EGFR	4.2B11	10x	ヒット 番号 24 0.89 %	F	K	I	D	Y	N	H	N	W	W	W
7	EGFR	4.4E10	3x	なし	F	K	I	D	Y	Y	H	Y	D	W	W
10 P C	C201 3	pPD7- 1_Sso7d- EGFR_A PP			L	T	Y	D	A	F	W	E	L	T	W
11 N C	C201 4	pPD7- 1_Sso7d- wt- libr.8_AP P			F	K	K	W	V	M	S	T	T	R	A

【0488】

実施例 6 : Lib8 Ss07d-VP2 AAV1Sil1ライブラリーの作製

実施例 6. 1 : Lib8 Ss07d-AAV1Sil1プラスミドライブラリーの作製

Ss07dスカフォールドのVP2 N末端への遺伝的融合により、インビボ及びインビトロ選択に使用することができるAAVライブラリーを作製する可能性が得られる。最終Ss07dライブラリーを作製する前に、カーゴ構築物SK033を作製した。SK033は、G4Sリンカーを介してAAV1Sil1 VP2のN末端に融合した抗EGFR Ss07d (E. 18. 4. 5.) を含む。細胞発現におけるVP2-融合物を増強するために、CDSの後に小さなバージョンのWPREエレメント (WPRE3) を付加した。融合ポリペプチドを、小さな173CMVプロモーターに作動可能に連結する。加

えて、小さな173CMVプロモーターと短いSV40ポリA (SV40L) の制御下にあるsfCherry2カセットを構築物に付加し、FACSを用いた直接選択／検証を可能にした。SK033カーゴ設計は、他のカーゴ設計と比較して良好な収率、完全AAV粒子のパーセンテージ、及び改善された感染能力プロファイルに基づいて選択した。AAV1Sil1は、HEK293T／17細胞での高いウイルス収量と、シアル酸結合の欠如／減少によるインビボオフターゲット活性の低減の可能性について選択した。SK033のカーゴ設計の概略を図15に示す。

【0489】

アクセプタープラスミドSK0036は、抗EGFR Sso7d (E.18.4.5) 配列全体と、SK0033に存在するAAV1Sil1 VP2の初期配列を、逆方向に配置された二重BsaI制限部位で置換することによって作製した。35pbの相同性アームを、以下に記載するライブラリー断片インサートの両端に付加した。

【0490】

Sso7 (Lib8) 断片は、Twist Bioscienceに注文した。これは、35bpの5' UTR領域、ランダム化rcSso7dスカフォールド (最適化されたヒトコドン使用頻度)、G4Sリンカー、及びAAV1 VP2の最初の182bp (DT1、即ちトレオニンをコードするVP2の開始コドンが欠失されている) を含む。

【0491】

Sso7dライブラリー (Lib8) は次のように設計した：rcSso7d位置22、24、26、29、31、33、41、43及び45 (切断される最初のメチオニンを含むrcSso7dポリペプチド配列に対して) を、各位置で同等に呈示される8つのアミノ酸 (D、R、H、N、A、I、Y及びW) によって無作為化し、さらに、翻訳後修飾イベント及び非特異的結合を減少させるために、推定グリコシル化 (NxS NxT-xはPではない)、インテグリン結合 (RGD、RYD、KGD、NGR、LDV、DGE) 及びCD11c／CD18結合 (GPR) モチーフを回避すると共に、クローニングの理由から、AgeI、BamHI、BsaI制限部位を設計から除外した。ランダム化に使用したrcSso7dバックボーンを以下に示す。

ライブラリー作製に使用したrcSso7dバックボーン配列

【化2】

(M)ATVKFTYQGEEKQVDISKIKXVXR XGQXIXFX YDEGGGAXGXGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

下線で示した位置：Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) に記載されたSso7d配列と比較したrcSso7d置換K7T、K9Q、K28Q、Q40A及びKK C末端切断。Xは、ランダム化された位置を表す。最初のメチオニンは切断される

【0492】

各ランダム化位置にTGAストップコドンを含む断片をライブラリー合成の鋳型として使用し、これにより1.34E+08バリエーションの最終複雑度を有する451bpの断片を得た。断片の両端にあるTwistフランキング配列を除去するために、LC0052 (5' CCCGGGGGA ACTCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC3') とLC0053 (5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG3') プライマーを用いて、ライブラリーをPCR増幅した。Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10pmolの各プライマー、並びに鋳型としてのTWIST断片10ngを用い、総反応物体積25μlで4×PCR反応物を以下のサイクリングプロトコルで調製した：95℃で2分；98℃で10秒を10サイクル；65℃で15秒；72℃で30秒の後、72℃で2分。Lib8 Sso7d-AAV1Sil1プラスミドライブラリーを作製するために、520ngのPCR産物 (403bp) と4μgのBsaI消化SK0036アクセプタープラスミドを、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB；E2621) を用いて、最終体積400μlで

アセンブリングした。反応産物を P l a s m i d S a f e (P S) D N a s e (E p i c e n t r e ; E 3 1 0 5 K) で処理して、非アセンブリング断片を全て消化した後、W i z a r d S V G e l 及び P C R C l e a n - u p S y s t e m (P r o m e g a # A 9 2 8 0) を用いて精製した。この反応により、570 ng のアセンブリング済みプラスミドが得られた (P S D N a s e 消化ステップの後に残った DNA の量により決定)。O n e S h o t T O P 1 0 エレクトロコンピテント大腸菌 (E . c o l i) (T h e r m o F i s h e r ; C 4 0 4 0 - 5 2) を、42×50 µ l バイアル中のアセンブリング済みプラスミドライブラリーで形質転換した (約 10 ng の DNA / バイアル)。プールした形質転換体 100 µ l をフラスコから取り出し、様々な希釈液を L B + カナマイシンプレートにプレーティングした。プレートを 37 °C で一晩インキュベートした。寒天プレート上の C F U 数により決定されるライブラリーの実際のサイズは、4.12 E + 08 であった。次に、コロニーを使用し、N u c l e o S p i n 9 6 P l a s m i d キット (M a c h e r e y - N a g e l # 7 4 0 6 2 5 . 4) を用いてプラスミド DNA (n = 192) を抽出し、V P 2 領域の開始地点でマッピングするリバースオリゴを用いたサンガーシーケンシングにより解析した。結果を表 19 及び図 16 にまとめる。T o p T e n 形質転換サンプルの残りを 500 ml の T B + カナマイシン培地に直接接種し、37 °C で一晩増殖させた後、M a x i p r e p K i t (Q I A G E N # 1 2 1 6 3) を用いてプラスミド DNA を抽出することにより、(S K 0 0 3 7) p C a r g o _ 1 7 3 C M V _ S S o 7 d _ l i b 8 _ A A V 1 s i l 1 - V P 2 _ 1 7 3 C M V _ s f C h e r r y プラスミドライブラリーを得た。

10

20

【0493】

【表 22】

表 19: Lib8 Sso7d-AAV1Sil1 プラスミドライブラリー(SK0037)のサンガーQC 及び AA 頻度

パラメータ	クローン数 (%)
読み取り可能な配列	181
フレーム内/予想配列	173 (95.6%)
SK0036 バックボーン	0 (0%)
ストップ/フレームシフトを有する配列	8 (4.4%)
ユニークな配列	181 (100%)

30

【0494】

サンガーシーケンシングによって、高い割合のフレーム内配列 (95.6%)、ライブラリーに冗長性がないこと、選択された 8 個のアミノ酸がランダムな位置に良好に分布していることが明らかにされた。実施例 5.4 では、N G S シーケンシングを用いてさらに詳細な解析を行った。

【0495】

実施例 6.2 : L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 ライブラリーの作製及び Q C

40

16 リットルの H E K 2 9 3 T / 1 7 懸濁細胞 (1.6 E + 10 の総生存細胞数) を、P E I M a x 試薬 (3 : 1 P E I : D N A) を用い、p H e l p e r (約 30 K プラスミド / 細胞)、(N C 0 5 7) p R e p 2 _ C a p 1 _ A A V 1 S i l 1 _ V P 2 K O (約 30 K プラスミド / 細胞)、及び S K 0 0 3 7 プラスミドライブラリー (420 プラスミド / 細胞) により 0.8 µ g の総 DNA / 1 E + 06 細胞でトランスフェクトした。キメラ現象を回避すると共に、表現型 - 遺伝子型の連結を改善するために、カーゴプラスミドは少量使用した。自社の経験と外部の文献に基づき、細胞当たり約 400 プラスミドが、A A V ライブラリーの良好な品質を達成するための最適用量として同定された。トランスフェクションの 2 日後 (F A C S により測定して、約 35 % の c h e r r y 陽性細胞が得られた)、細胞をペレット化し、5 l の 50 mM T r i s 、p H 7.5、0.5 %

50

Triton、0.01% Pluronic F-68、2mM MgCl₂、12.5 U/mlのヌクレアーゼ (ThermoFisher #88702) で溶解した。37℃で2時間後、NaClを最終濃度0.5Mまで添加し、ライセートをさらに30分インキュベートし、3500gで30分間遠心分離した。清澄化したライセートを0.22 μmフィルターユニットで濾過し、AKTA Pure計器に取り付けたPOROS (商標) GoPure (商標) AAVX Pre-packed Column、0.8×10 cm、5ml (ThermoFisher #A36651) に10ml/分でロードした。結合したAAV粒子を10CVの洗浄バッファー、pH7.3 (50mM Tris-Cl、0.5M NaCl、0.01% Pluronic F-68) で洗浄し、5CVのグリシン溶出バッファーpH2.7 (0.1M グリシン、0.2M NaCl、0.25M L-アルギニン) で溶出した。溶出画分 (0.25ml) を直ちに25 μlの1M Tris-Cl、pH10で中和した。最初のアフィニティー精製後の収率が高かったため、フロースルーを2回再ロードし、追加の画分を収集した。AAV粒子 (UV280シグナルにより評価) を含む画分をプールし (Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1__pool)、フル粒子と空の粒子をイオジキサノール超遠心分離勾配で分離し、Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 Filterユニット (Merck #UFC910008) を用いてPBS、pH7.4+0.001% Pluronic F-68で濃縮/バッファー交換し、0.22 μmフィルターユニットに通過させた (最終体積=1ml)。

10

20

CE-SDS及びddPCRアッセイを使用して、装飾レベル、並びに総粒子及びフル粒子濃度を評価した。手短には、QX200液滴デジタルPCR (ddPCR) システム (Bio-Rad) を用いて、表20に記載のSV40 pA特異的オリゴセットを用いてAAVベクターの力価を測定した。精製調製物を以下のように前処理した：5 μlのAAVを1単位のDNaseと1×DNaseバッファー (Merck #04716728001) と一緒に、20 μlの総体積で、37℃で30分インキュベートした。1 μlの20mg/mlのプロテイナーゼK (Life technologies #E00491) を混合物に添加し、55℃で1時間インキュベートした後、95℃で15分の不活化ステップに付した。処理した調製物の様々な1/10連続希釈物を、1×PCRバッファーII (Life technologies #N8080010)、2.5mM MgCl₂、0.05% Pluronic F-68 (Sigma Aldrich #K4894)、2ng/μl断片処理済みサケ精子 (Sheared Salmon Sperm) DNA (Invitrogen #15632011) で調製し、PCR増幅用の鋳型として使用した。

30

40

【0496】

液滴は以下のように調製した：5.5 μlの前処理AAV希釈物、各々900nMのフォワード及びリバースSV40 pAプライマー、125nMのSV40 pAプローブ、及び11 μlのプローブ用2×ddPCRスーパーミックス (BioRad #1863024) を最終体積22 μlで混合した。各サンプルについて技術的反復を行った。各ddPCRアッセイ混合物20 μlを使い捨てドロップレット生成カートリッジ (Bio-Rad) に充填した。次に、70 μlのプローブ用ドロップレット生成オイル (BioRad #1863005) を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQX200ドロップレット生成装置 (Bio-Rad) 内に設置した。液滴生成が完了したら、マルチチャンネルピペットを用いて、40 μlの体積を96ウェルPCRプレートに移した。

【0497】

プレートをオイルでヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) 内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りである：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲ

50

ノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア(Bio-Rad)により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

【0499】

前述したCE-SDS(Bioanalyzer)を用いて、装飾レベル及び総粒子濃度を評価した。結果を表21にまとめる。

【0500】

【表23】

10

表 20: ddPCRによるAAVゲノム濃度(vg/ml)の測定に使用したオリゴセット

オリゴID	5'-3' 配列
SV40pA133-For	TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT
SV40pA133-Rev	CCCTGAACCTGAAACATAAAATGA
SV40pA133-P	FAM-TGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA-BHQ1

【0501】

20

表 21: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 ライブラリーのバイオアナライザー及びddPCR結果

【0502】

【表24】

表 21a: 観察されたVPのMW (kDa)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (プール)	66.2	89.0	99.1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (フル)	66.5	89.7	99.7
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)	67.2	90.8	100.8

30

【0503】

【表25】

表 21b: VP 分布(AAV 粒子当たり計 60 VPと仮定する)

サンプル ID	VP3	VP2	VP1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (プール)	54.5	0.5	5.0
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (フル)	53.3	1.5	5.2
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)	55.6	0.4	4

40

【0504】

50

【表 2 6】

表 21c: トランスフェクト細胞当たりのウイルスゲノム(vg)及びウイルス粒子 (vp) 収量

サンプル ID	vg/細胞	vp/細胞	%フル
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (プール)	4.29E+02	6.49E+04	0.7%
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (フル)	3.04E+02	1.41E+03	21.5%
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)	1.33E+01	9.19E+03	0.1%

10

【0505】

AAV-260: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (フル)

濃度 = 4.87E+12 vg/ml

装飾レベル = *1.5 Sso7d/AAV

%完全 = 21.5%

UC後のウイルスゲノム回収 = 71%

UC後のフル粒子濃縮 = 32.6倍

*約80%の空の非装飾AAVが存在するため、過小評価されている可能性が高い

【0506】

フル粒子のパーセンテージが低いのは、過剰のrep/Cap VP2 KOプラスミド及びpHelperプラスミドがトランスフェクトされていることにより説明される。細胞の大部分は、これら2つのプラスミドのみを含むが、カーゴプラスミドは含まないため、非装飾の空の粒子の子孫を産生する。CE-SDSは非装飾/空のAAVの存在を考慮せずに平均装飾数を推定するため、このことも観察された比較的低い装飾レベルを説明している。

20

【0507】

実施例 6.3: NGSによるLib8 Sso7d-AAV1Sil1ライブラリー組成物の評価

ILLUMINAのMiSeqでのライブラリー調製及びNGS:

ILLUMINAのアダプターを含む2つの異なるプライマーのセットを用いて、単一のPCR反応物中のプラスミド(SK037)及びAAV(AAV-260)ライブラリーからアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々のサンプルの同定を可能にするように、ILLUMINA TruSeqインデックスを含むリバープライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを表22に示す。

30

【0508】

【表 2 7】

表 22: 本実施例で使用したプライマーのリスト (太字:インデックス、下線:アニーリング領域)

サンプル ID	プライマー seq 5'-3'
LC0034 (for プライマー)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG
LC0038 (rev プライマー/AAV ライブラリー)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCACTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC
LC0042 (rev プライマー/プラス ミドライブラリー)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC

40

【0509】

50

PCR反応は、25 μ lの総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmolの各プライマー、及び鑄型としての100 ngのプラスミドライブラリー又はAAVライブラリー用の5E+10ウイルスゲノム(約123 ngのdsDNAに相当)を用いて調製した。PCRは、以下のサイクリングプロトコルで実施した：98℃で2分；98℃で10秒、55℃で15秒、72℃で25秒を20サイクル；次に、72℃で2分の最終増幅の後、4℃で保持。Sybr-Safe前染色1.5%アガロースゲルでのアガロースゲル電気泳動(120 Vランで30分)により、PCR産物を分離した。予想されるサイズ(243 bp)のバンドを切除し、Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28704)を用いて精製し、50 μ lの水で溶出した。DNA濃度をQubit計器で測定し、産物の純度とサイズはAgilent Bioanalyzer 2100 (Agilent DNA1000キット)を用いて評価した。定量後、ライブラリーを最終濃度8 pMで等モルにプールし、Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (150サイクル、#MS-102-3001)を用いて、MiSeqシステム(Illumina)でシーケンシングした。

10

【0510】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析：

作製されたfastqファイルを、最初に品質(Q>30、ここで、Qは、Phredクオリティスコアを示す)と長さ(120~130 bp)によってフィルタリングした。クオリティトリミング後、Sso7d特異的な境界(DISKからDAPK)をマッピングする目的で配列を処理した。最終フィルタリング済み配列について、標的位置の単一配列出現及びアミノ酸分布を評価した：プラスミドライブラリーについては約400 Kリード、またAAVライブラリーは約700 Kリードを評価した。結果を図17A~Dに示す。

20

【0511】

単一配列出現解析から、約90%の配列がプラスミドとAAVライブラリーの両方でユニークであったことが明らかになり、これは、良好なライブラリー多様性と、AAV産生中の最小限の偏りを示している。

【0512】

NGS解析は、プラスミドライブラリーのランダム化位置に予想されたアミノ酸分布を示した。予想通り、AAVライブラリーはプラスミドライブラリーに比べてやや強い偏りを示したが、これはAAVライブラリーには重要ではないと考えられる。

30

【0513】

実施例7. Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1のインビボ選択

Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1ライブラリーをヒト化(hCD34)マウスに注射し、様々な組織から抽出したDNA/RNAについて生体内分布/NGS分析を実施して、様々な器官で濃縮されたAAVカーゴ配列を同定した。

【0514】

実施例7.1：動員されたヒト化マウスの注射及び組織処理

インビボスクリーニングのために、ヒト臍帯血由来CD34+細胞を移植したNSGマウスを使用した。マウスのヒト化は、生着から12週間後のNSGマウスの末梢血中で、フローサイトメトリーを用いて、総CD45+細胞(マウス及びヒト)に対して少なくとも30%のヒトCD45+細胞を観察することにより確認した。Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1ライブラリー又は非装飾AAV1Sil1(カーゴとしてssCAG-EGFP-HPRE__NOX:DL144)ウイルスを投与する前に、5日投与レジメンを用いてマウスのHSCを動員した。手短には、G-CSFを125 μ g/kgの用量で1日2回、4日間連続して皮下注射した。5日目の朝、AMD3100を5mg/kgの用量で1回皮下注射した。AMD3100注射から1時間以内に、対照(非装飾AAV1Sil1__ssCAG-EGFP__NOX;3匹のマウス)又はライブラリー(Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1;12匹のマウス)ウイルスのいずれ

40

50

かを、 $1.2 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ の用量で尾静脈注射により投与した。

【0515】

ウイルス注射から5日後にマウスを犠牲にし、以下の組織を採取した：全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、骨髄。全血については、同じ群の全マウスからの血液を合わせてプールした（対照 $n=3$ 、ライブラリー $n=12$ ）。プールした血液をRT、500gで10分スピンド、血漿を除去し、ペレットを -80°C でアリコートに保存した。骨髄を除く他の全ての組織について、各組織の小切片（3mm）を切り出し、群毎にプールした。プールした組織を、鋭利なカミソリを用いて小片に切断した後、 -80°C でアリコートに保存した。プールした凍結組織（全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺）各々の1アリコートを、Qiagen TissueLyser II内の5mmステンレススチールビーズを用いてPBS中でホモジナイズした。QIAamp DNA mini-Kit（Qiagen、51306）を用いて、ホモジナイズしたライセートからDNAを精製した。同様に、各組織の1アリコートをTissueLyser IIを用いてRLTバッファー中でホモジナイズし、RNeasy Plus Mini Kit（Qiagen、74134）を用いてRNAを抽出した。骨髄採取のために、清潔な骨端を鋭利なカミソリで切断し、8000g、 4°C で1分間スピンド。同じ群の全てのマウスの骨髄をプールし、FACSバッファー（ $1 \times \text{PBS}$ 、0.5% BSA、2mM EDTA）中で100 μm のストレーナーに通した。プールした骨髄細胞のアリコート（100万個の細胞）をペレット化し、インプットとして -80°C で保存し、残りの細胞（対照は2億個、Sso7dライブラリーは9億個）は、製造者の指示に従ってLSカラムと共に抗ヒトCD34抗体コンジュゲート磁気ビーズ（Miltenyi、130-097-047）を用いるヒトCD34+細胞の精製に使用した。精製CD34+細胞のアリコート（30万個の細胞）をペレット化し、インプットとして -80°C で保存し、残りの細胞（対照は360万個、Sso7dライブラリーは6千4百万個）を細胞100万個当たり以下の抗体カクテルで染色した：20 μL の抗ヒトCD34-FITC（BD Pharmag in、555821）、2.5 μL の抗マウスCD45-eFluor610（Thermo、61045182）、5 μL の抗ヒトCD45-V450（BD Pharmag in、560367）、5 μL の抗ヒトCD90-APC（BD Pharmag in、559869）、5 μL の抗ヒトCD38-PE（BD Pharmag in、555460）、5 μL の抗ヒトCD45RA-BV605（BD Pharmag in、562886）。自動ソーター（BD FACS ARIA II）を用いて以下の集団について細胞を選別した：対照群の2集団1）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+、2）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-；ライブラリー群の4集団1）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+、2）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-、3）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90-、4）mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+（LT-HSC）。選別された集団を350g、 4°C で5分遠心分離した後、乾燥ペレットとして -80°C で保存した。凍結ペレットは、Allprep DNA/RNA Mini Kit（Qiagen、80204）を用いたDNA及びRNA精製の両方に使用した。溶出したDNA/RNAの濃度をUV分光光度計で測定した。結果を表23にまとめる。

【0516】

10

20

30

40

【表 2 8】

表 23: ヒト化マウス組織から抽出された DNA 及び RNA の濃度

組織供給源	組織の記述	細胞の数	RN A 溶 出 (μl)	RNA conc. (ng/μl)	DN A 溶 出 (μl)	DNA conc. (ng/μl)
ライブラリ ー選別細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	2.00E+06	30	37	50	53
ライブラリ ー選別細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	1.26E+05	30	4	50	21
ライブラリ ー選別細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	3.40E+05	30	5	50	21
ライブラリ ー選別細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	8.00E+03	30	0.4	50	1.7
対照選別 細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	1.50E+06	30	40	50	21
対照選別 細胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	1.16E+05	30	1.7	50	30
ライブラリ ー	hCD34+ 全骨髄から精製 (BM_hCD34+)	3.00E+05	30	6.7	50	32
対照	hCD34+ 全骨髄から精製 (BM_hCD34+)	3.00E+05	30	7.8	50	20
ライブラリ ー	全骨髄	1.00E+06	30	50	50	27

【0 5 1 7】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

対照	全骨髄	1.00E+06	30	67	50	28
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた心臓組織	代表的なプールされた組織	30	135	200	43
対照	3匹のマウスのプールされた心臓組織	代表的なプールされた組織	30	35	200	31
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた筋肉組織	代表的なプールされた組織	30	16	200	20
対照	3匹のマウスのプールされた筋肉組織	代表的なプールされた組織	30	4	200	12
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた肺組織	代表的なプールされた組織	30	442	200	44
対照	3匹のマウスのプールされた肺組織	代表的なプールされた組織	30	470	200	18
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた全血	代表的なプールされた組織	30	47	200	82
対照	3匹のマウスのプールされた全血	代表的なプールされた組織	30	358	200	17
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた腎臓組織	代表的なプールされた組織	30	431	200	70
対照	3匹のマウスのプールされた腎臓組織	代表的なプールされた組織	30	157	200	49
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた脾臓組織	代表的なプールされた組織	30	1122	200	132
対照	3匹のマウスのプールされた脾臓組織	代表的なプールされた組織	30	1251	200	557
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた脳組織	代表的なプールされた組織	30	96	200	43
対照	3匹のマウスのプールされた脳組織	代表的なプールされた組織	30	443	200	21
ライブラリ	12匹のマウスのプールされた肝臓組織	代表的なプールされた組織	30	753	200	233
対照	3匹のマウスのプールされた肝臓組織	代表的なプールされた組織	30	1290	200	100

10

20

30

【0518】

実施例 7. 2 : L i b 8 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 注射マウスの生体内分布研究

抽出 DNA サンプルからの ddPCR マルチプレックス :

Q X 2 0 0 ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) システム (B i o - R a d) を用いて、抽出した DNA サンプルについて細胞当たりの A A V ゲノムコピー数を定量し、R P P 3 0 遺伝子に対して正規化した。ヒト及びマウス由来のゲノム DNA が存在するため、マウス又はヒト特異的 R P P 3 0 オリゴセットのいずれかを用いて 2 つの異なる実験を行った。A A V ゲノムの検出には、表 2 0 に記載の S V 4 0 p A 特異的オリゴセットを用いた。正規化には市販の h R P P 3 0 及び m R P P 3 0 H E X アッセイを使用した (それぞれ B i o - R a d # 1 0 0 3 1 2 4 3 及び # 1 0 0 4 2 9 6 2) 。

【0519】

2 5 n g のゲノム DNA、9 0 0 n M のフォワード及びリバース S V 4 0 p A プライマー、1 2 5 n M の S V 4 0 p A プローブ、1 μ l の 2 0 × マウス又はヒト R P P 3 0

40

50

H E Xアッセイ、10 μ lのプローブ用2×ddPCRスーパーミックス（B i o－R a d）、及び0.5単位のS p h I－H F（N E B # R 3 1 8 2）を含有する20 μ lの体積でP C Rを実施した。各サンプルについて技術的反復を行った。R Tで15分のインキュベーション後、各ddPCRアッセイ混合物を使い捨てドロップレット生成カートリッジ（B i o－R a d）に充填した。次に、70 μ lのプローブ用ドロップレット生成オイル（B i o－R a d）を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQ X 2 0 0ドロップレット生成装置（B i o－R a d）内に設置した。液滴生成が完了したら、マルチチャンネルピペットを用いて、液滴を96ウェルP C Rプレートに移した。

【0520】

10

プレートをホイルでヒートシールしてから、C 1 0 0 0 T o u c h T h e r m a l C y c l e r（B i o－R a d）内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りである：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のA A VゲノムDNA配列を標識するF A M蛍光シグナルと、R P P 3 0遺伝子配列を標識するH E X蛍光シグナルを、Q X 2 0 0デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、Q u a n t a S o f t解析ソフトウェア（B i o－R a d）により解析した。

【0521】

データの変換：

20

反応物について、技術的反復の平均値（ヒト及びマウスR P P 3 0については2、S V 4 0 p Aについては4）と標準偏差を算出した。各反応における2倍体細胞の総数は、マウス及びヒトR P P 3 0平均液滴を合計し、2で割ることにより算出した。様々な組織におけるヒト細胞の代表的な数は、ヒト細胞（h R P P 3 0）の平均数を細胞総数（h R P P 3 0 + m R P P 3 0）の平均で割ることにより算出した。様々なサンプルに高いばらつきが観察され、これは、U V分光光度計による最初のDNA定量が正確でなかったことを示す。

【0522】

細胞当たりのA A Vゲノム数は、S V 4 0 p Aの平均液滴数を反応液中の細胞総数（h R P P 3 0 + m R P P 3 0）で割ることにより算出した。

【0523】

30

誤差伝搬を考慮するために、各変換値の標準偏差を、オンラインG r a p h P a dツールを用いて計算した（www.graphpad.com/quickcalcs/ErrorProp1.cfm）。

【0524】

結果を図18及び19に示す。

【0525】

ddPCRにより、S s o 7 dライブラリーの選択に使用したマウスの良好なヒト化レベル（血液及び骨髄のデータによれば50～60%に達する）が確認された。

【0526】

脾臓で観察されたヒト由来細胞（>10%）は、動員後にこの臓器に移動した結果であり得る。

40

【0527】

生体内分布分析により、試験した全ての器官でA A Vゲノムの存在が確認された。A A Vゲノムのレベルは、脾臓と脳では低く（<1コピー／細胞）、腎臓、肝臓及び血液では高かった（10～30コピー／細胞）。肝臓は、シアル酸K O A A V 1（S i l 1）について予想されたように、A A V感染の主要なシンクではないようである。

【0528】

実施例7.3：L i b 8 S s o 7 d－V P 2 A A V 1 S i l 1注射マウスから調製したcDNAのNGS解析

抽出したRNAサンプルからのcDNA調製：

50

cDNAは、50 μ lの総反応物体積中、OneTaq（登録商標）One-Step RT-PCR Kit（NEB #E5315）、実施例6.1に記載のLC0052/LC0053プライマー10 pmolと、鑄型としての10 μ lの全RNA、又はRNA濃度>100 μ g/ μ lのサンプルについては1 μ gの全RNAを用いて（表24参照）調製した。RT-PCRは、以下のサイクリングプロトコルで実施した：48℃で30分、94℃で2分；94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で30秒を40サイクル；次に、68℃で2分の最終増幅の後、4℃で保持。フラッシュゲル（Flash-Gel）システム（Flash-Gel DNAカセット、2.2% Lonza #57031）を用いて、1 μ lのRT-PCR反応物について産物のサイズを評価した。結果を図20に示す。Qiaquick PCR精製キット（Qiagen #28104）を用いて反応物を精製した後、50 μ lの水で溶出した。

10

【0529】

【表30】

表 24: RT-PCR 反応に使用したサンプルの記述及び RNA 量

サンプル ID	記述	使用した量
L1	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	370 ng
L2	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	40 ng
L3	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	50 ng
L4	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	4 ng
L5	BM hCD34+	67 ng
L6	骨髓	500 ng
L7	心臓	1 μ g
L8	筋肉	160 ng
L9	肺	1 μ g
L10	血液	1 μ g
L11	腎臓	1 μ g
L12	脾臓	1 μ g
L13	脳	1 μ g
L14	肝臓	1 μ g

20

30

【0530】

ILLUMINAのMiSeqでのライブラリー調製及びNGS：

ILLUMINAのアダプターを含むプライマーのセットを用いて、単一のPCR反応物中で、前述した通りの抽出RNAから調製したcDNAからアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々のサンプルの同定を可能にするように、ILLUMINA TruSeq インデックスを含むリバースプライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを表25に示す。

40

【0531】

【表 3 1】

表 25: 本実施例で使用したプライマーのリスト (太字:インデックス、下線:アニーリング領域)

名称	プライマー seq 5'-3'
LC0034 (for プライマー)	AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG
LC0076 (rev プライマー/L14)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0077 (rev プライマー/L12)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0078 (rev プライマー/L11)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0079 (rev プライマー/L10)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0080 (rev プライマー/L9)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0081 (rev プライマー/L8)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACGGGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0082 (rev プライマー/L7)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGGACGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0083 (rev プライマー/L6)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTACGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0084 (rev プライマー/L5)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGCCACGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0085 (rev プライマー/L3)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAAACGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0086 (rev プライマー/L2)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTACGGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0087 (rev プライマー/L1)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCACTCGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0088 (rev プライマー/L13)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0089 (rev プライマー/L4)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGAATGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC

10

20

30

【0532】

PCR 反応物は、25 μ l の総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmol の各プライマー、及び鋳型としての10 μ l の精製 cDNA を用いて調製した。PCR は、以下のサイクリングプロトコルで実施した：95℃で2分；98℃で10秒を20サイクル；55℃で15秒；72℃で25秒；次に、72℃で2分のインキュベーションの後、4℃で保持。20サイクルで得られた収量が低かったため、L8及びL13サンプルについてはさらに10サイクルを追加した。Sybr Safe 前染色1.5%アガロースゲルでのアガロースゲル電気泳動（100Vランで30分）により、PCR産物を分離した。予想されるサイズのバンドを切除し、Wizard SV Gel 及び PCR Clean-Up System (Promega #9280) を用いて精製し、30 μ l の水で溶出した。Qubit 計器（L13サンプルの1.6 ng/ μ l を除いて、全サンプルで7~11 ng/ μ l）を用いた定量後、ライブラリーを最終濃度8 pM で等モルにプールし、Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (150サイクル、#MS-102-3001) を用いてMiSeqシステム (Illumina) でシーケンシングした。得られたリード数を表26にまとめる。

40

【0533】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析

作製された fastq ファイルを、最初に品質 (Q>30、ここで、Qは、Phred

50

クオリティスコアを示す) 及び長さ (110~130bp) によってフィルタリングした。クオリティトリミング後、Ssod 特異的な境界 (ISKI から DAPK) をマッピングする目的で配列を処理した。最終フィルタリング済みリードの数を表 26 に記録する。最終フィルタリング済み配列について、様々な器官における単一配の分布を評価した。結果を図 21 (上位 10, 000 ヒット) 及び図 22 にまとめる。実施例 7 でヒット確認のために選択された配列は赤で示す。

【0534】

【表 32】

表 26: 初期及びフィルタリング済み NGS リード数

名称	初期リード	フィルタリング 済みリード
L1-MPP1	875435	688058
L2-MPP2	797296	633132
L3-MPP3	790629	607226
L4-LT_HSC	897598	683457
L5- BM_hCD34+	702645	562366
L6-骨髄	676977	522455
L7-心臓	720362	568901
L8-筋肉	1548187	1271261
L9-肺	1421675	1110392
L10-血液	1167265	895851
L11-腎臓	1122478	868355
L12-脾臓	994747	633132
L13-脳	1059484	862151
L14-肝臓	778890	606519

10

20

30

40

50

【0535】

第 1 回ラウンドのインビボ選択の後、脳、筋肉、LT-HSC 及び MPP1 に明らかな配列の濃縮が観察されたが、他の組織では観察されなかった。脳、筋肉、LT-HSC 及び MPP1 で濃縮された配列は特異的であり、他の試験サンプルでは濃縮されていないと思われる。

【0536】

脳における特定の配列の濃縮は、恐らくこの器官における AAV の透過性が低いために促進されたのであろう。HSC では、選別された細胞の量が少なく (8K)、細胞当たりのゲノム数が少ない (約 1 ゲノム/細胞) ため、低い複雑度が予想された。筋肉では、約 2 ゲノム/細胞という中程度のゲノム数にもかかわらず、cDNA の増幅が困難であることが観察され、これはこれらの細胞における AAV の核内輸送が最適でない可能性を示している。

【0537】

実施例 8. バーコードライブラリーアプローチを用いた、第 1 回選択ラウンドで選択されたヒットのインビボでの確認

実施例 7 に記載されたヒト化マウスにおける第 1 回選択ラウンドからの濃縮 Ssod -AAV1S11 バリエーションの確認は、RNA バーコードと多重化次世代シーケンシングを組み合わせることにより、ハイスループットで、且つ同じ動物において、カーゴバーコード化配列を含む修飾 AAV カプシドを直接並べて比較することによって実施した。手短には、ユビキタスに活性な CAG プロモーターにより駆動される赤色蛍光タンパク質 (sfCherry2) レポーターの 3' 非翻訳領域 (これに転写後制御エレメント HPR

E (NOX) が続く) に、異なる 9-mer バーコードをクローニングした。一本鎖 AAV ゲノムが最大 AAV 容量に近い 4476 塩基のサイズとなるように、上記ゲノムをスタッファー配列 (HPRT イントロン) で埋めた。この実施例で用いたバーコード化カーゴプラスミドを図 23 に概略的に示す。LT-HSC (n=9)、MPP1 (n=2)、脳 (n=2) 及び筋肉 (n=2) からの上位濃縮 Sso7d バリエーションを、AAV1 Sil1 VP2 の N 末端で個別のプラスミドにクローニングし、表 27 に列挙される選択したユニークなバーコード化カーゴプラスミドと組み合わせて AAV アセンブリに使用した。AAV アセンブリ及び精製後、様々な AAV 調製物を等モルで混合することにより、バーコード化 AAV1 Sil1 ライブラリーを作製した。このバーコード化ライブラリーをヒト化マウスに注射し、様々な組織から抽出した DNA/RNA について生体内分布/NGS 解析を行った。このバーコード化ライブラリーアプローチを用いた選択ヒットのインビボでの確認については、以下により詳しく説明する。

10

【0538】

実施例 8.1 バーコードプラスミド設計及び AAV 生産

バーコード化カーゴプラスミドの作製：

CAG プロモーター及び HPRE エlement (NOX) の制御下の sfCherry2 を含む AgC1295 プラスミド (pCargo_CBa_sfcherry2_HP RE_SV40pA) を、sfCherry2 CDS の直後に存在する AgeI 制限部位と R-ITR の前に存在する BglII 制限部位を利用するバーコード化カーゴ作製のためのバックボーンとして使用した。HPRE (NOX)、SV40pA (L) 及び HPRT1 スタッファーを含む 2634 bp の断片を、JKU_1_fw (5'-GAG CCG AGG CCA GAC ACT CTA CAT AAC CGG TNN NNN NNN NAA CAG GCC TAT TGA TTG GAA AGT ATG-3') 及び JKU_2_rev (5'-GAT TAA CCT GAT AGA TCT CTC GAC TTG GGC AAC AAA AGT GAA ACT CCA TC-3') オリゴヌクレオチドを用いて、(AgC1294) pCargo_ss_173 CMVp_EGFP_HP RE_SV40pA スタッファーと呼ばれる内部プラスミドから増幅した。フォワードオリゴヌクレオチドは、AgeI 消化 AgC1295 に相同な 25 塩基の区間、AgeI 制限部位、9 個のランダム化ヌクレオチド (N、バーコード) の区間、これに続いて、鋳型に対するアニーリング領域として機能する 26 塩基を含む。リバースオリゴは、BglII 消化 AgC1295 と相同な 25 塩基の区間、BglII 制限部位、続いて鋳型とのアニーリング領域として作用する 32 塩基を含む。PCR 反応は、50 µl の総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmol の各プライマー、鋳型としての 10 ng の AgC1294 プラスミドを用い、以下のサイクリングプロトコルで調製した：98℃で30秒；98℃で10秒を25サイクル；66℃で15秒；72℃で1分30秒の後、72℃で2分のインキュベーション。バーコード化 sfCherry2 カーゴプラスミドを作製するために、最終体積 20 µl 中、200 ng の PCR 産物 (2634 bp) と 100 ng の AgeI-BglII 消化 AgC1295 アクセプタープラスミドを、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB；E2621) を用いてアセンブリリングしてから、50℃で2時間インキュベートした。One Shot TOP10 Chemically Competent 大腸菌 (E. coli) 細胞 (Thermo-Fisher #C404010) の 1 バイアルを 2 µl のアセンブリ反応物で形質転換し、LB+カナマイシンプレートに広げた。次に、96 個のコロニーを用い、NucleoSpin 96 Plasmid キット (Macherey-Nagel #740625.4) を用いてプラスミド DNA を個別に抽出し、サンガーシーケンシングにより解析した。

20

30

40

【0539】

全配列のバーコード領域を Geneious Prime ソフトウェアを用いてアライメントし、以下のパラメーターを用いて、目的のバーコード領域をフィルタリングして、

50

表 2 7 に示す 4 1 個のバーコードを得た：

- ・ 3 n t より長いホモポリマーを含むーコードは除外した。
- ・ 少なくとも 3 つの位置で他の全てのバーコードから差異を有するバーコードは保持した。

【 0 5 4 0 】

4 1 個の選択したバーコード化カーゴプラスミドを N u c l e o B o n d X t r a M i d i p l u s キット (M a c h e r e y - N a g e l # 7 4 0 4 1 0) を用いてアップスケールしてから、精製した。各プラスミド調製物のバーコードの同一性をサンガーシーケンシングにより確認し、A A V I T R の完全性は、S r f I (N E B # R 0 6 2 9) を用いた制限消化によって確認した。

10

【 0 5 4 1 】

20

30

40

50

【表 3 3】

表 27: 選択したバーコードのリスト

ID	バーコード	以下に割り当てられる
A02	ACAGGTCCGA	非装飾 CTR
A04	CTTGCAATGT	
A06	GCGTGCGAG	HSC-Sso7dL8-001
A07	AGATCAACT	
A08	GGCGCAGTT	HSC-Sso7dL8-002
A09	GGAGTGCGT	
B02	GCTGAGATA	HSC-Sso7dL8-003
B05	TTAAGTTGG	
B06	GCCTCTACG	HSC-Sso7dL8-004
B07	TGGAGAGGC	
B10	TCAGTGGAT	HSC-Sso7dL8-005
B12	TGAACTAAG	
C01	GGTCTTCGG	HSC-Sso7dL8-006
C03	ATTGCTTGG	
C05	CTGCGCTGG	
C08	ACATGCCTG	HSC-Sso7dL8-007
C09	AGGAGAACG	
D02	TCGCCCACA	
D04	ACCATGTGG	
D10	CGGTGGTGT	
E07	GGATTATAC	
E08	TATAGATCT	
E09	CTGCGGCTA	
E10	TACTCGAGT	
E11	GCTCGAAGG	
F04	AATATTATA	
F06	TAGAATTGA	
F10	GGATGTGAG	
F11	GATCTGCGT	
G03	TTAGGCTTA	HSC-Sso7dL8-008
G04	TTCCTGAGG	MPP1-Sso7dL8-001
G06	CAGAATAAG	HSC-Sso7dL8-009
G07	TATGAGCAG	筋肉-Sso7dL8-001
G08	TAATAACGA	MPP1-Sso7dL8-002
G10	ACGTTAAGT	
G11	CGTTGTATG	
G12	AGGATGAAT	筋肉-Sso7dL8-002
H05	TATTGCCAA	脳-Sso7dL8-001
H07	AGTGCGCCG	脳-Sso7dL8-002
H09	GTGACAATT	
H11	TTCGCGCGA	

10

20

30

40

【0542】

選択した S s o 7 d 配列の A A V 1 S i l 1 V P 2 発現プラスミドへのクローニング：

第 1 回インビボ選択ラウンドから選択された 15 ヒットの 22、24、26、29、31、33、41、43 及び 45 位（最初のメチオニンを含む S s o 7 d 配列に対して）で同定された変異を、実施例 6.1 に記載の r c S s o 7 スカフォールド（その C 末端に G 4 S リンカーを含む）にインシリコで移植した。変異配列は、Gene Art（Thermo-Fisher）に、HindIII-AgeI 消化 A A V 1 S i l 1 V P 2 発現プラスミド（NC058）への Gibson によるクローニングに好適な、各末端に 25 b p の相同性を付加する string DNA として注文した。

50

【0543】

Sso7d-AAV1Sil1 VP2発現プラスミドを作製するために、最終体積20 μ l中、10ngの等モルで混合したストリングDNAと100ngのAgeI-HindIII消化NC058アクセプタープラスミドを、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB; E2621)を用いてアセンブリした後、50℃で2時間インキュベートした。One Shot TOP10 Chemically Competent大腸菌(E. coli)細胞(ThermoFisher #C404010)の1バイアルを2 μ lのアセンブリ反応物で形質転換し、LB+カナマイシンプレートに広げた。次に、96個のコロニーを用い、NucleoSpin 96 Plasmid kit (Macherey-Nagel #740625.4)を用いてプラスミドDNAを個別に抽出し、サンガーシーケンシングにより解析した。

10

【0544】

選択した発現プラスミドを、NucleoBond Xtra Midi plusキット(Macherey-Nagel #740410)を用いてアップスケールした後、精製し、各プラスミド調製物の同一性をサンガーシーケンシングにより確認した。

【0545】

バーコード化Sso7d-AV1Sil1ライブラリーの作製:

pHelper、(NC057)pRep2__Cap1__AAV1Sil1__VP2 KO、それぞれのSso7d AAV1Sil1 VP2発現プラスミド、及び対応するバーコード化カーゴ(表27を参照)を等モル比で含有する、第1回選択ラウンドから選択されたヒット各々について個別のDNAミックスを調製し、FectoVIR-AAVトランスフェクション試薬(Polyplus #101000022); DNA:FectoVIR=1 μ g:1 μ lを用いて、2E+06vc/mlの濃度で200mlのHEK293懸濁細胞にトランスフェクトした(1.1 μ gの総DNA/1E+06細胞)。トランスフェクション後、最終濃度2g/lのグルコースをトランスフェクションミックスに添加し、混合物を37℃、110rpm、6%CO₂でインキュベートした。非装飾AAV1Sil1と、その対応するバーコード化カーゴプラスミド(A02)の組み合わせによる2回の追加のトランスフェクションも実施した。

20

【0546】

トランスフェクションの3日後、最終濃度0.1U/ μ lまでのベンゾナーゼと20mlの溶解バッファー(500mM HEPES、10%Tween 20、20mM MgCl₂)をトランスフェクション反応物に添加し、混合物を37℃で3時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、24mlのスクロース塩溶液(5M NaCl、7%スクロース)をライセートに添加し、サンプルをさらに20分間インキュベートした。サンプルを3500gで15分間遠心分離し、上清を0.22 μ Mフィルターで濾過し、EDTAを最終濃度5mMで添加した後、AKTA Pure計器に取り付けたAAVXプレパックカラム(Prep-packed Column)、0.5 $\times$ 5cm、1ml(ThermoFisher #A36652)に1ml/分でロードした。結合したAAV粒子を10 CVの洗浄バッファー(pH7.3、50mM Tris-Cl、0.5M NaCl、0.01%Pluronic F-68)で洗浄し、5CVのグリシン溶出バッファー、pH2.7(0.1Mグリシン、0.2M NaCl、0.25M L-アルギニン)で溶出した。溶出画分(0.25ml)を直ちに25 μ lの1M Tris-Cl、pH10で中和した。AAVを含む画分(UV280シグナルにより評価して)をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100KD(Spectrum(商標)#G235071)を用いて、PBS、pH7.4+0.001%Pluronic F-68に対して一晩透析した後、0.22 μ mフィルターユニットに通過させた。

30

40

【0547】

実施例6.2に記載したCE-SDS(Bioanalyzer)及びddPCRアッ

50

セイを使用して、装飾レベル、並びに総粒子濃度及びフル粒子濃度を評価した。結果を図 24 A 及び図 24 B に示す。

【0548】

HEK293 懸濁細胞に対する Sso7d 装飾 AAV1 Sil1 のインビトロ感染力：

様々なバーコードが mRNA 発現に影響を及ぼさないことを確実にするために、感染力評価を実施した。感染当日、HEK293 細胞を DMEM 培地に再懸濁させ、96 ウェルプレートに播種した (1.5×10^4 細胞/ウェル)。AAV1 Sil1 調製物を DMEM 培地で希釈し、様々な濃度で播種細胞に適用した。形質導入から 3 時間後、最終濃度 5 % の FBS を各ウェルに添加した。AAV の濃度は、ウイルスゲノムに基づいて $5.0 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^1$ moi の範囲であった。形質導入後 3 日目に細胞を剥離し、FACS 分析を実施して、sfCherry2 陽性細胞の割合を算出した。図 25 は、感染細胞 (sfCherry2+) のパーセンテージに対するフル粒子の数 (vg) を示す。

【0549】

プールされた最終バーコードライブラリー (AAV-471) の作製：

各単一バーコード化 Sso7d-AV1 Sil1 調製物 (1.5×10^{11} vg を使用した Sso7dL8-004 及び 005 を除く) の 4×10^{11} vg 及び非装飾対照を混合し、Amicon Ultra-15 MWC0 100, 000 フィルターユニット (Merck #UFC910008) を使用して、濃縮し、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた (最終体積 = 1.1 ml)。

【0550】

実施例 6. 2 に記載した CE-SDS 及び ddPCR アッセイを使用して、装飾レベル、並びに総粒子濃度及びフル粒子濃度を評価した。結果を表 28 に示す。

【0551】

【表 34】

表 28: バーコード化ライブラリー AAV-471 QC

ライブラリー ID	体積 (ml)	vg/ml (ddPCR)	vp/ml (パイオアナライザー)	% フル粒子	AAV 当たりの VP3	AAV 当たりの VP2 融合物	AAV 当たりの VP1
AAV-471	1.1	3.89×10^{12}	3.69×10^{13}	11%	43.9	13.1	3.0

【0552】

実施例 8. 2：動員されたヒト化マウスの注射及び組織処理

バーコード化 Sso7d ライブラリーのインビボ形質導入評価のために、ヒト臍帯血由来 CD34+ 細胞を移植した NSG マウスを使用した。マウスのヒト化は、生着から 12 週間後の NSG マウスの末梢血中で、フローサイトメトリーを用いて、総 CD45+ 細胞 (マウス及びヒト) に対して少なくとも 30 % のヒト CD45+ 細胞を観察することにより確認した。バーコード化 Sso7d AAV1 Sil1 ライブラリーウイルスを投与する前に、5 日投与レジメンを用いてマウスの HSC を動員した。手短には、G-CSF を $125 \mu\text{g} / \text{kg}$ の用量で 1 日 2 回、4 日間連続して皮下注射した。5 日目の朝、AMD3100 を $5 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量で 1 回皮下注射した。AMD3100 注射から 1 時間以内に、ライブラリーウイルスを 1.2×10^{13} vg / kg の用量で尾静脈注射により投与した。計 10 匹のヒト化 NSG マウスにウイルスライブラリーを注射した。

【0553】

ウイルス注射から 5 日後にマウスを犠牲にし、以下の組織を採取した：全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺、及び骨髄。全血については、全てのマウスからの血液をプールした ($n = 10$)。プールした血液を RT、 500 g で 10 分スピンドし、血漿を除去し、ペレットを $100 \mu\text{l}$ アリコートに -80°C で保存した。骨髄を除く他の全ての組織について、各組織の小切片 (3 mm) を切り出し、プールした。プールした組織を、

鋭利なカミソリを用いて小片に切断した後、 -80°C でアリコートに保存した。プールした凍結組織（全血、脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、心臓、肺）各々の1アリコートを、Qiagen TissueLyser II内の5mmステンレススチールビーズを用いてRLTバッファ（Qiagen）中でホモジナイズした。ホモジナイズした組織を1000gで2分スピンド、上清を新しいチューブに移し、次の処理まで -80°C で保存した。骨髄採取のために、清潔な骨端を鋭利なカミソリで切断し、 4°C 、8000gで1分スピンド。全てのマウスからの骨髄をプールし、FACSバッファ（ $1\times\text{PBS}$ 、 $0.5\%\text{BSA}$ 、 2mM EDTA ）中で $100\mu\text{m}$ のストレーナーに通した。プールした骨髄細胞のアリコート（100万個の細胞）をペレット化し、インプットとして -80°C で保存し、残りの細胞2億7千3百万個）は、製造者の指示に従ってLSカラムと共に抗ヒトCD34抗体コンジュゲート磁気ビーズ（Miltenyi、130-097-047）を用いるヒトCD34+細胞の精製に使用した。精製CD34+細胞のアリコート（5万個の細胞）をペレット化し、インプットとして -80°C で保存し、残りの細胞（1200万個）を細胞400万個当たり下記抗体の抗体カクテルで染色した： $10\mu\text{l}$ の抗ヒトCD34-FITC（BD PharmagIn、555821）、 $1\mu\text{l}$ の抗マウスCD45-BV650（BioLegend、563410）、 $1\mu\text{l}$ の抗ヒトCD45-PE-Cy7（BD Biosciences、557748）、 $2\mu\text{l}$ の抗ヒトCD90-APC（R&D Systems、FAB2067A-025）、 $1\mu\text{l}$ の抗ヒトCD38-PE（BD Biosciences、567146）、 $1\mu\text{l}$ の抗ヒトCD45RA-BV605（BD Biosciences、562886）、 $1\mu\text{l}$ のLin-カクテル-V450（カスタム）、及びViability-APC-Cy7（eBioscience、65-0865-14）。自動ソーター（BD FACS ARIA II）を用いて、以下の4つの集団について細胞を選別した：1）Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+（MPP1）、2）Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90-（MPP2）、3）Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90-（MPP3）、4）Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+（LT-HSC）。選別された集団を、350g、 4°C で5分間遠心分離した後、次の処理まで -80°C でRLTバッファ中に保存した。ホモジナイズした組織ライセートからDNA及びRNAを精製し、Allprep DNA/RNA Mini Kit Qiagen、80204）を用いて -80°C で保存した。UV分光光度計を用いて、溶出DNA/RNAの濃度を測定した。結果を表29にまとめる。

【0554】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 29: ヒト化マウス組織から抽出した DNA 及び RNA の濃度

組織供給源	組織の記述	細胞の数	RN A 溶 出 (μ L)	RNA conc. (ng/ μ L)	DN A 溶 出 (μ L)	DNA conc. (ng/ μ L)
ライブラリ ー選別細 胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	5.50E+06	30	41	50	76
ライブラリ ー選別細 胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38-hCD90- (MPP2)	7.76E+03	11	0.5	20	Undet
ライブラリ ー選別細 胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	2.72E+04	11	1.34	20	Undet
ライブラリ ー選別細 胞	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	1.13E+03	11	3.89	20	Undet
ライブラリ ー	hCD34+ 骨髄から精製 (BM_hCD34+)	5.00E+04	30	16	50	10.2
ライブラリ ー	プールされた全骨髄	1.00E+06	30	375	50	250
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 心臓組織	代表的なプー ルされた組織	30	24	50	32
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 筋肉組織	代表的なプー ルされた組織	30	3	50	29.4
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 肺組織	代表的なプー ルされた組織	30	276	50	58
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 全血	代表的なプー ルされた組織	10	5	40	11
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 腎臓組織	代表的なプー ルされた組織	30	18.3	50	126
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 脾臓組織	代表的なプー ルされた組織	30	188	50	488
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 脳組織	代表的なプー ルされた組織	30	70	50	57.7
ライブラリ ー	12 匹のマウスのプールされた 肝臓組織	代表的なプー ルされた組織	30	418	50	71

Undet: 決定されていない

【0555】

実施例 8. 3: バーコード化 S s o 7 d - V P 2 A A V 1 S i l 1 ライブラリー注入マウスからの全 DNA の N G S 解析

I l l u m i n a の M i S e q でのライブラリー調製及び N G S :

I l l u m i n a のアダプターを含むプライマーのセットを用いて、単一の P C R 反応で前述したように抽出された全 DNA からアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々のサンプルの同定を可能にするように、I l l u m i n a T r u S e q インデックスを含むリバースプライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを表 2 3 に示す。

【 0 5 5 6 】

【 表 3 6 】

表 23: 本実施例で使用したプライマーのリスト (太字:インデックス、下線:アニーリング領域)

名称	プライマー seq 5'-3'
JKU_35_F (for プライマー)	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACCGACG CTCTTCCGATCTGGATATCAAGCTGGACATCACC
JKU_11_R1 (rev プライマー/筋肉)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CGTG ATGTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_12_R2 (rev プライマー/心臓)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ACATCG GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_13_R3 (rev プライマー/腎臓)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GCCTA AGTGTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_14_R4 (rev プライマー/脳)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TGGTC AGTGTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_15_R5 (rev プライマー/脾臓)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CACTGT GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_16_R6 (rev プライマー/肺)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ATTGGC GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_17_R7 (rev プライマー/肝臓)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GATCTG GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_18_R8 (rev プライマー/LT-HSC)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TCAAGT GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_19_R9 (rev プライマー/CD38+ CD90-)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CTGATC GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_20_R10 (rev プライマー/CD38- CD90-)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT AAGCTA GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_21_R11 (rev プライマー/CDRA+)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GTA CCGTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_22_R12 (rev プライマー/骨髄)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TACAAG GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_23_R13 (rev プライマー/CD34+)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TTGACT GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_24_R14 (rev プライマー/血液)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GGA ACTGTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_25_R15 (rev プライマー/AAV-471)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TGACAT GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC

【 0 5 5 7 】

25 μ l の総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmol の各プライマー、鋳型としての抽出された全DNA (使用量は表31に示す; AAV-471の場合、5 μ l の精製 AAV 調製物を鋳型として使用した) を用いて、PCR 反応物を調製した。PCR は、以下のサイクリングプロトコルで実施した: 95 $^{\circ}$ C で 2 分; 98 $^{\circ}$ C で 10 秒を 40 サイクル; 55 $^{\circ}$ C で 15 秒; 72 $^{\circ}$ C で 25 秒; 続いて 72 $^{\circ}$ C で 2 分のインキュベーション後、4 $^{\circ}$ C で保持。増幅された産物の存在を確認するために、反応物をアガロースゲルにロードした。肺サンプルを除き、全ての他のサンプルで、非特異的増幅の兆候もなく、約 267 bp の予想されたバンドが観察された。肺サンプルの場合、増幅の不足は、用いたリバースオリゴの低性能によるものであったことが後に判明した。Qiaquick PCR purification kit (#28104) を用いて PCR 産物を精製し、50 μ l の水で溶出した。Quibit 計器を用いて定量した後、ライブラリーを最終濃度 8 pM で等モルにプールし、Illumina MiSeq Reagent Kit v

3 (150 サイクル、#MS-102-3001) を用いて MiSeq システム (Illumina) でシーケンシングした。

【0558】

【表37】

表 31:PCR 増幅に使用したサンプル及び全 DNA のリスト

組織 – DNA サンプル	DNA (ng/μl)	前希釈	PCR のた めの μl	PCR のた めの ng
CD34+ CD45+ CDRA+	76	なし	1	76
CD34+ CD45+ CDRA- CD38- CD90-	0.22	なし	5	1.1
CD34+ CD45+ CDRA- CD38+ CD90-	1.07	なし	5	5.4
LT-HSC	0.06	なし	5	0.3
骨髓	250	10x	1	25
hCD34+	10.2	なし	5	51
血液	11	なし	5	55
筋肉	29.4	なし	1	29.4
心臓	32	なし	1	32
腎臓	126	10x	2	25.2
脳	57.7	なし	1	57.7
脾臓	488	10x	1	48.8
肺	58	なし	1	58
肝臓	71	なし	1	71

【0559】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析

作製された fastq ファイルを、最初に品質 (Q>30、ここで、Q は、Phred クオリティスコアを示す) によりフィルタリングした後、各サンプルについて 100,000 ヒットのバーコード特異的な境界をマッピングする目的で処理した。異なる組織におけるユニークなバーコードのパーセンテージは、まずインプット AAV ライブラリー AAV-417 (図 26 を参照) で判明したパーセンテージで割り、次に各所与の組織について AAV1S11 非装飾対照に対応するバーコードのパーセンテージで割ることによって正規化した。結果を図 27 に示す。

【0560】

NGS 分析では、バーコード化 Sso7d-VP2 AAV1S11 ライブラリー (AAV-471) を作製するために使用された 16 のサンプルについて、同様の分布が確認された。

【0561】

HSC-Sso7dL8-006 は、非装飾対照と比較して、LT-造血幹細胞中で 15 倍の濃縮を示した。同じクローンが他の 2 つの組織 (脳と腎臓) でも部分的に濃縮されていることがわかった。これらのデータを確認するには、さらなる実験が必要である。他の試験したバリエーションでは特異的な濃縮は観察されなかった。

【0562】

実施例 9. Lib8 Sso7d-VP2 AAV1S11 のインビボでの選択 (第 2 回及び第 3 回ラウンド)

概要:

第 1 回選択ラウンドの後、同定されたヒットの大部分は、バーコード化ライブラリーアプローチを用いて確認することができなかったが、これは、LT-HSC 細胞からの最初の RNA インプット量が少なかったこと、及び／又は使用した RT-PCR キットの性能

が最適ではなかったことのいずれかに起因する可能性が高い。さらに2回の選択ラウンドを実施した。

【0563】

実施例9.1：第1回選択ラウンド後の骨髄CD34+細胞全RNAからの濃縮ライブラリーの作製

LT-HSC集団から得られたRNA収量が低いため、濃縮ライブラリー作製の鋳型として、第1回選択ラウンドから得られたバルクCD34+由来RNAを用いた。

【0564】

骨髄CD34+細胞から抽出されたRNAのRT-PCR：

50 μ lの総反応物体積中、LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit (NEB #E1555)、12.5 pmolのLC0052 (5' CCCGGGGA ACTCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC 3') / LC0053 (5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCTGGG 3') プライマー及びBM_hCD34+サンプルからの全RNA約35 ngを用いて、RT-PCRを実施した。RT-PCRは、以下のサイクリングプロトコルを用いて実施した：55℃で10分、98℃で1分；98℃で10秒間、55℃で20秒、72℃で30秒間を40サイクル；続いて72℃で5分の最終増幅の後、4℃で保持。反応物をアガロースゲル上で泳動させ、403 bpで予想したバンドを切除した。続いて、Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega #A9281)を用いてDNAを抽出してから、Qubit測定に基づき最終濃度1.63 ng/ μ lで50 μ lの水に溶出させた。インサート量を増加するために、50 μ lの総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、各々10 pmolのLC052及びLC053プライマー、並びに鋳型としての抽出されたRT-PCR断片を用い、以下のサイクリングプロトコルでのPCRによりインサートを増幅した：98℃で30秒；98℃で10秒を15サイクル；55℃で20秒；72℃で20秒、続いて72℃で2分、その後4℃で保持。PCR産物をQiaquick PCR purification Kit (Qiagen #28104)を用いて精製し、50 μ lの水で溶出した。ナノドロップ分光光度計による測定に基づき、濃度は47 ng/ μ lであることがわかった。

【0565】

プラスミドライブラリークローニング：

第1回ラウンド濃縮Sso7d-AV1Sil1プラスミドライブラリー (NC109) を作製するために、100 μ lの最終体積中、129 ngのPCR産物 (403 bp) と1 μ gのBsaI消化SK0036アクセプタープラスミドを、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB; E2621)を用いてアニーリングし、50℃で3時間インキュベートした。次に、反応産物をPlasmid Safe (PS) DNase (Epicentre; E3105K)で37℃にて1時間処理して、非アセンブリ断片を全て消化し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega #A9280)を用いて精製した。この反応により、約250 ngのアセンブリプラスミド (PS DNase消化ステップ後に残留するDNAの量により定義される) が得られた。One Shot TOP10 Electrocomp大腸菌 (E. coli) (Thermo Fisher; C4040-52) を、5 $\times$ 50 μ lバイアル中のアセンブリプラスミドライブラリーで形質転換した (約20 ngのDNA/バイアル)。反応物をプールし、200 mlのTB+カナマイシン培地を含む1 lの振盪フラスコに移した。次に、フラスコから100 μ lを取り出し、様々な希釈物をLB+カナマイシンプレートにプレーティングし、37℃で一晩培養した。寒天培地上のCFU数から決定されたライブラリーの実際のサイズは2.72 E+08であった。37℃で一晩増殖させた後、200 mlの培養物からMaxiprep Kit (QIAGEN #12163)を用いてプラスミド

DNAを抽出し、(NC109) pCargo__173CMV__SSo7dL8-CD34__AAV1Sil1-VP2__173CMV__sfCherryプラスミドライブラリーを得た。

【0566】

第1回選択ラウンドAAVライブラリーの作製及びQC：

濃度 2×10^6 vc/ml の HEK293 懸濁細胞 2.8 リットルを、pHelper (約 40 K プラスミド/細胞)、(NC080) pAAV__Rep2Cap1__Sil1 [V473D__N500E] VP2 KO [T138A]__KanR (約 40 K プラスミド/細胞) 及び (NC109) pCargo__173CMV__SSo7dL8-CD34__AAV1Sil1-VP2__173CMV__sfCherry プラスミドライブラリー (650 プラスミド/細胞) により、 $1.1 \mu\text{g}$ の全 DNA / 1×10^6 細胞で、FectoVIR-AAV トランスフェクション試薬 (Polyplus #101000022) を用いてトランスフェクトした。DNA:FectoVIR の比は $1 \mu\text{g} : 1 \mu\text{l}$ であった。トランスフェクション後、最終濃度 2 g/l のグルコースをトランスフェクションミックスに添加し、混合物を 37°C 、 110 rpm 、 $6\% \text{ CO}_2$ でインキュベートした。

【0567】

トランスフェクションの2日後、ベンゾナーゼを $0.1 \text{ U}/\mu\text{l}$ の最終濃度、及び溶解バッファー (500 mM HEPES、 10% Tween 20、 20 mM MgCl₂) 中の総体積の 10% に等しい量まで、トランスフェクション反応物に添加した。 37°C で3時間のインキュベーション後、総体積の 10% に等しい量のスクロース塩溶液 (5 M NaCl、 7% スクロース) をライセートに添加し、混合物を 37°C で3時間撹拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、総体積の 10% に等しい塩スクロース溶液 (5 M NaCl、 7% スクロース) の量を添加し、さらに20分間インキュベートした。サンプルを 3500 g で15分間遠心分離し、上清を $0.22 \mu\text{M}$ のフィルターで濾過し、最終濃度 5 mM のEDTAを添加した。次に、清澄化したライセートを AKTA Pure 計器に取り付けた AAVX Pre-packed Column、 $0.5 \times 5 \text{ cm}$ 、 1 ml (ThermoFisher #A36652) に $1 \text{ ml}/\text{分}$ でロードした。結合した AAV 粒子を 10 CV の洗浄バッファー、 $\text{pH} 7.3$ (50 mM Tris-Cl、 0.5 M NaCl、 0.01% Pluronic F-68) で洗浄し、 5 CV のグリシン溶出バッファー、 $\text{pH} 2.7$ (0.1 M グリシン、 0.2 M NaCl、 0.25 M L-アルギニン) で溶出した。溶出画分 (0.25 ml) を直ちに $25 \mu\text{l}$ の 1 M Tris-Cl、 $\text{pH} 10$ で中和した。AAV 粒子 (UV280 シグナルにより評価) を含む画分をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100KD (Spectrum (商標) #G235071) を用いて、PBS、 $\text{pH} 7.4 + 0.001\%$ Pluronic F-68 に対して一晩透析した後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた。フル粒子と空の粒子をイオジキサノール超遠心分離勾配で分離し、Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 Filter ユニット (Merck #UFC910008) を用いて、PBS、 $\text{pH} 7.4 + 0.001\%$ Pluronic F-68 で濃縮/バッファー交換した後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた (最終体積 = 2.2 ml)。

【0568】

AAVライブラリー力価及び装飾レベルの決定：

QX200 液滴デジタルPCR (ddPCR) システム (Bio-Rad) を用いて、表3に記載のSV40 pA 特異的オリゴセットを用いて AAV ベクターの力価を決定した。精製調製物を以下のように前処理した：総体積 $20 \mu\text{l}$ 中、 $5 \mu\text{l}$ の AAV を、1 単位の DNase 及び $1 \times \text{DNase}$ バッファー (Merck #04716728001) と一緒に 37°C で30分インキュベートした。 20 mg/ml のプロテアーゼ K (Life technologies #E00491) $1 \mu\text{l}$ を混合物に添加し、 55°C で1時間インキュベートした後、 95°C で15分間不活化ステップに付した。処理した調製

物の様々な1／10連続希釈物を、1×PCR Buffer II (Life technologies #N8080010)、2.5mM MgCl₂、0.05% Pluronic F-68 (Sigma Aldrich #K4894)、2ng／μlのSheared Salmon Sperm DNA (Invitrogen #15632011)中に調製し、PCR増幅用の鋳型として使用した。

【0569】

ddPCR反応ミックスは、22μlの最終体積中、5.5μlの前処理AAV希釈物に、各々900nMのフォワード及びリバースSV40 pAプライマー、125nMのSV40 pAプローブ、及び11μlのプローブ用2×ddPCRスーパーミックス (BioRad #1863024)を組み合わせてることにより調製した。各サンプルについて技術的反復を行った。各20μlのddPCR反応ミックスを使い捨てドロップレット生成カートリッジ (Bio-Rad)に充填した。次に、70μlのプローブ用ドロップレット生成オイル (BioRad #1863005)を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQX200ドロップレット生成装置 (Bio-Rad)内に設置した。液滴生成の後、マルチチャンネルピペットを用いて、40μlを96ウェルPCRプレートに移した。

【0570】

突き刺し可能なホイルでプレートをヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りであった：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア (Bio-Rad)により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

【0571】

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析 (Agilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット)を実施した。

【0572】

総AAV粒子／ml (vp／ml)及びVP比の計算

・ng／μl (=μg／ml)値を実測MWで割り、1E+06を掛けて (μgからgへの換算)、モル／ml値を算出する

・モル／ml値に6.022E+23 (アボガドロ数)を掛けて、分子数／mlを算出する

・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数／mlの値に基づいて算出する

・AAV粒子／ml (vp／ml)：VP1+VP2+VP3分子／mlの総和を60で割る

【0573】

ddPCR及びCE-SDS結果を表32に掲載する。

【0574】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 32: 第 1 回目ラウンド(BM_ CD34+) 濃縮ライブラリープレップに対する QC

サンプル ID	AAV 当たりの VP2 融合物	vg/ml	vp/ml	% フル粒子
(AAV-583) ssAAV1Sil1_ライブラリー _173CMV_VP2- Sso7dL8- CD34_173CMV_sfCherr y	3.1	7.95E+12	3.65E+13	21.79%

10

【0 5 7 5】

実施例 9 . 2 : 第 2 回ラウンドの動員されたヒト化マウスの注射及び組織処理

(A A V - 5 8 3) s s A A V 1 S i l 1 _ l i b r a r y _ 1 7 3 C M V _ V P 2 - S s o 7 d L 8 - C D 3 4 _ 1 7 3 C M V _ s f C h e r r y を 2.4×10^{13} vg / kg の用量で用いて、NSGマウス (n = 1 5) に第 2 回インビボ選択を実施した。実施例 7 . 1 に記載したのと同じ動員、注射及び組織処理手順を使用した。

【0 5 7 6】

Q u b i t 蛍光光度計を用いて、溶出RNAの濃度を測定した。結果を表 3 3 にまとめる。

20

【0 5 7 7】

30

40

50

【表 3 9】

表 33: ヒト化マウス組織から抽出された RNA の濃度

組織	記述	Qubit Conc [ng/μl]
バルク CD34+	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+	23.5
CD38+ 前駆細胞	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+	35.3
CD38- CD45RA+ CD90- 前駆細胞	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+ hCD90-	43.4
多能性前駆細胞	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90-	<0.1
LT-HSC	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90+	<0.1
全骨髓	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	12.3
血液	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	77.0
筋肉	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	<0.1
肺	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	0.8
肝臓	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	<0.1
腎臓	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	1.14
心臓	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	<0.1
脳	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	7.84
脾臓	(AAV-583) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	10.7

【0578】

実施例 9. 3 : 第 2 回選択ラウンド後の骨髓 LT-HSC 細胞全 RNA からの濃縮ライブラリーの作製

骨髓 LT-HSC 細胞から抽出された RNA に対する RT-PCR :

50 μl の総反応物体積中、LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit (NEB #E1555)、12.5 pmol の LC0052 (5' CCCGGGGA ACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC3') / LC0053 (5' GTTGCTGGAGGTTCTCCGAGAGGTTGTGGGTCTGGG3') プライマー及び BM-LT-HSC サンプル由来の全 RNA 5 μl (<0.5 ng) を用いて、RT-PCR を実施した。RT-PCR は、以下のサイクリングプロトコルを用いて実施した: 55℃で10分、98℃で1分; 98℃で10秒間、55℃で20秒、72℃で30秒間を35 サイクル; 続いて72℃で5分の最終増幅の

後、4℃で保持。反応物をアガロースゲル上で泳動させ、403bpで予想したバンドを切除した。続いて、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega #A9281) を用いてDNAを抽出してから、Qubit測定に基づき最終濃度0.41ng/μlで50μlの水に溶出させた。インサート量を増加するために、50μlの総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、各々10pmolのLC052及びLC053プライマー、並びに鋳型としてのゲル抽出RT-PCR断片8ngと共に、以下のサイクリングプロトコルを用いるPCRによりインサートを増幅した：98℃で30秒；98℃で10秒を15サイクル；55℃で20秒；72℃で20秒、続いて72℃で2分、その後4℃で保持。PCR産物をQiaquick PCR purification Kit (Qiagen #28104) を用いて精製し、50μlの水で溶出した。ナノドロップ分光光度計による測定に基づき、濃度は46ng/μlであることがわかった。

10

【0579】

プラスミドライブラリークローニング：

第2回ラウンド濃縮Sso7d-AV1Sil1プラスミドライブラリー (NC110) を作製するために、100μlの最終体積中、129ngのPCR産物 (403bp) と1μgのBsaI消化SK0036アクセプタープラスミドを、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB; E2621) を用いてアニーリングし、50℃で3時間インキュベートした。次に、反応産物をPlasmid Safe (PS) DNase (Epicentre; E3105K) で37℃にて1時間処理して、非アセンブリ断片を全て消化した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega #A9280) を用いて精製した。この反応により、約200ngのアセンブリプラスミド (PS DNase 消化ステップ後に残留するDNAの量により定義される) が得られた。One Shot TOP10 Electrocomp大腸菌 (E. coli) (Thermo Fisher; C4040-52) を、3×50μlバイアル中のアセンブリプラスミドライブラリーで形質転換した (約14ngのDNA/バイアル)。反応物をプールし、200mlのTB+カナマイシン培地を含む1lの振盪フラスコに移した。次に、フラスコから100μlを取り出し、様々な希釈物をLB+カナマイシンプレートにプレーティングし、37℃で一晩培養した。寒天培地上のCFU数から決定されたライブラリーの実際のサイズは4.34E+07であった。37℃で一晩増殖させた後、200mlの培養物からMaxiprep Kit (QIAGEN #12163) を用いてプラスミドDNAを抽出し、(NC110) pCargo__173CMV__Sso7dL8-LT-HSC-2__AAV1Sil1-VP2__173CMV__sfCherryプラスミドライブラリーを得た。

20

30

【0580】

第2回選択ラウンドAAVライブラリーの作製及びQC：

2E+06vc/mlの濃度のHEK293懸濁細胞2.8リットルを、pHelper (約40Kプラスミド/細胞)、(NC080) pAAV__Rep2Cap1__Sil1 [V473D__N500E] VP2 KO [T138A] __KanR (約40Kプラスミド/細胞) 及び (NC110) pCargo__173CMV__Sso7dL8-LT-HSC-2__AAV1Sil1-VP2__173CMV__sfCherryプラスミドライブラリー (1300プラスミド/細胞) により、1.1μgの全DNA/1E+06細胞で、FectoVIR-AAVトランスフェクション試薬 (Polyplus #101000022) を用いてトランスフェクトした。DNA:FectoVIRの比は1μg:1μlであった。トランスフェクション後、最終濃度2g/lのグルコースをトランスフェクションミックスに添加し、混合物を37℃、110rpm、6%CO2でインキュベートした。

40

【0581】

50

トランスフェクションの2日後、ベンゾナーゼを $0.1 \text{ U} / \mu\text{l}$ の最終濃度、及び溶解バッファー（ 500 mM HEPES、 10% Tween 20、 20 mM MgCl_2 ）中の総体積の 10% に等しい量まで、トランスフェクション反応物に添加した。 37°C で3時間のインキュベーション後、総体積の 10% に等しい量のスクロース塩溶液（ 5 M NaCl、 7% スクロース）をライセートに添加し、混合物を 37°C で3時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、総体積の 10% に等しい塩スクロース溶液（ 5 M NaCl、 7% スクロース）の量を添加し、さらに20分間インキュベートした。次にサンプルを 3500 g で15分間遠心分離し、上清を $0.22 \mu\text{M}$ のフィルターで濾過し、最終濃度 5 mM のEDTAを添加した。次に、清澄化したライセートをAKTA Pure計器に取り付けたAAVX Pre-packed Column、 $0.5 \times 5 \text{ cm}$ 、 1 ml （ThermoFisher #A36652）に $1 \text{ ml} / \text{分}$ でロードした。結合したAAV粒子を 10 CV の洗浄バッファー、 $\text{pH} 7.3$ （ 50 mM Tris-Cl、 0.5 M NaCl、 0.01% Pluronic F-68）で洗浄し、 5 CV のグリシン溶出バッファー、 $\text{pH} 2.7$ （ 0.1 M グリシン、 0.2 M NaCl、 0.25 M L-アルギニン）で溶出した。溶出画分（ 0.25 ml ）を直ちに $25 \mu\text{l}$ の 1 M Tris-Cl、 $\text{pH} 10$ で中和した。AAV粒子（UV280シグナルにより評価）を含む画分をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100 KD （Spectrum（商標）#G235071）を用いて、PBS、 $\text{pH} 7.4 + 0.001\%$ Pluronic F-68に対して一晚透析した後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた。フル粒子と空の粒子をイオジキサノール超遠心分離勾配で分離し、Amicon Ultra-15 MWCO $100,000$ Filterユニット（Merck #UFC910008）を用いて、PBS、 $\text{pH} 7.4 + 0.001\%$ Pluronic F-68で濃縮／バッファー交換した後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた（最終体積 $= 2.2 \text{ ml}$ ）。

10

20

30

40

50

【0582】

AAVライブラリー力価及び装飾レベルの決定：

QX200液滴デジタルPCR（ddPCR）システム（Bio-Rad）を用いて、表3に記載のSV40 pA特異的オリゴセットを用いてAAVベクターの力価を決定した。精製調製物を以下のように前処理した： $20 \mu\text{l}$ の総体積中、 $5 \mu\text{l}$ のAAVを、1単位のDNase及び $1 \times \text{DNase}$ バッファー（Merck #04716728001）と一緒に 37°C で30分インキュベートした。 $20 \text{ mg} / \text{ml}$ のProteinase K（Life technologies #E00491） $1 \mu\text{l}$ を混合物に添加し、 55°C で1時間インキュベートした後、 95°C で15分間不活化ステップに付した。処理した調製物の様々な $1 / 10$ 連続希釈物を、 $1 \times \text{PCR Buffer II}$ （Life technologies #N8080010）、 2.5 mM MgCl_2 、 0.05% Pluronic F-68（Sigma Aldrich #K4894）、 $2 \text{ ng} / \mu\text{l}$ のSheared Salmon Sperm DNA（Invitrogen #15632011）中に調製し、PCR増幅用の鋳型として使用した。

【0583】

ddPCR反応ミックスは、 $22 \mu\text{l}$ の最終体積中、 $5.5 \mu\text{l}$ の前処理AAV希釈物に、各々 900 nM のフォワード及びリバーSV40 pAプライマー、 125 nM のSV40 pAプローブ、及び $11 \mu\text{l}$ のプローブ用 $2 \times \text{ddPCR}$ スーパーミックス（BioRad #1863024）を組み合わせることにより調製した。各サンプルについて技術的反復を行った。各 $20 \mu\text{l}$ のddPCR反応ミックスを使い捨てドロップレット生成カートリッジ（Bio-Rad）に充填した。次に、 $70 \mu\text{L}$ のプローブ用ドロップレット生成オイル（BioRad #1863005）を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQX200ドロップレット生成装置（Bio-Rad）内に設置した。液滴生成の後、マルチチャンネルピペットを用いて、 $40 \mu\text{l}$ を96ウェルPCRプレートに移した。

【0584】

突き刺し可能なホイルでプレートをヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) 内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りであった：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア (Bio-Rad) により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

【0585】

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析 (Agilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット) を実施した。

【0586】

総AAV粒子/ml (vp/ml) 及びVP比の計算

・ng/μl (=μg/ml) 値を実測MWで割り、1E+06 (μgからgへの換算) を掛けて、モル/ml値を算出する

・モル/ml値に6.022E+23 (アボガドロ数) を掛けて、分子数/mlを算出する

・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数/mlの値に基づいて算出する

・AAV粒子/ml (vp/ml) : VP1+VP2+VP3分子/mlの総和を60で割る

【0587】

ddPCR及びCE-SDS結果を表34に掲載する。

【0588】

【表40】

表 34: 第2回ラウンド (BM_LT-HSC) 濃縮ライブラリーブレップに対するQC

サンプル ID	AAV 当たりの VP2 融合物	vg/ml	vp/ml	% フル粒子
(AAV-682) ssAAV1Sil1_ライブラリー _173CMV_VP2- Sso7dL8-LT-HSC- 2_173CMV_sfCherry	3.3	2.05E+13	4.61E+13	44.55%

【0589】

実施例 9.4 : 第3回ラウンドの動員されたヒト化マウスの注射及び組織処理

(AAV-682) ssAAV1Sil1_library_173CMV_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2_173CMV_sfCherryを2.4E+13vg/kgの用量で用いて、NSGマウス (n=15) に3回目のインビゴ選択を実施した。実施例 7.1 に記載したのと同じ動員、注射及び組織処理手順を使用した。

【0590】

Qubit 蛍光光度計を用いて、溶出RNAの濃度を測定した。結果を表35にまとめる。

【0591】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

表 35: ヒト化マウス組織から抽出された RNA の濃度

組織	記述	Qubit Conc ng/μl
バルク CD34+	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+	20
CD38+ 前駆細胞	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+	41.3
CD38- CD45RA+ 前駆細胞	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+	7.1
多能性前駆細胞	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90-	<0.1
LT-HSC	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90+	<0.1
全骨髓	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	86
血液	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	128
筋肉	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	419
肺	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	250
肝臓	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	1370
腎臓	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	4560
心臓	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	890
脳	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	1930
脾臓	(AAV-682) Sso7d ライブラリー選別集団 (15 匹のマウスのプール)	2960

【0592】

実施例 9. 5 : 第 3 回選択ラウンド後に抽出した RNA の NGS 解析

骨髓 LT-HSC 細胞から抽出した RNA に対する RT-PCR :

25 μl の総反応物体積中、LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit (NEB #E1555)、12.5 pmol の C0052 (5' CCCGGGGGA ACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC3') / LC0053 (5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG3') プライマー及び第 3 回選択ラウンド (使用した量については表 36 を参照) 後の様々な組織から抽出された全 RNA を用いて、RT-PCR を実施した。RT-PCR は、以下のサイクリングプロトコルを用いて実施した : 55 °C で 10 分、98 °C で 1 分 ; 98 °C で 10 秒、55 °C で 20 秒、72 °C で 30 秒を 30 サイクル ; 続いて 7

2℃で5分の最終増幅の後、4℃で保持。

【0593】

【表42】

表 36: RT-PCR 反応に使用した総 RNA 量

サンプル ID	RT-PCR 反応に使用した RNA の総 ng
バルク CD34+	20
CD38+ 前駆細胞	41.3
CD38- CD45RA+ 前駆細胞	7.1
多能性前駆細胞	<0.1
LT-HSC	<0.1
全骨髄	86
血液	128
筋肉	419
肺	250
肝臓	1370
腎臓	4560
心臓	890
脳	1930
脾臓	2960

10

20

【0594】

図 28 に示すように、フラッシュゲルシステム (Fast DNA Ladder NEB # N3238S) を用いる Flash-Gel DNA カセット、1.2% Lonza # 57031) を用いて、2 μl の RT-PCR 反応物について産物のサイズを評価した。Qiaquick PCR 精製キット (Qiagen # 28104) を用いて PCR 産物を精製した後、50 μl の H₂O で溶出した。

【0595】

30

ILLUMINA の MiSeq でのライブラリー調製及び NGS :

ILLUMINA のアダプターを含むプライマーのセットを用いて、単一の PCR 反応で前述したように抽出された全 DNA からアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々のサンプルの同定を可能にするように、ILLUMINA TruSeq インデックスを含むリバースプライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを表 37 に示す。加えて、第 3 回選択ラウンドを実施するために用いたインプット AAV 調製物: (AAV-682) ssAAV1Sil1__library__173CMV__VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2__173CMV__sfCherry からアンプリコンライブラリーも調製した。

【0596】

40

50

【表 4 3】

表 37: 本実施例で使用したプライマーのリスト (太字:インデックス、斜体:アニーリング領域)

名称	プライマー seq 5'-3'
LC0034 (ユニバーサル for プライマー)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG
LC0074 (rev プライマー/ 全骨髄)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCT GAT CGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0075 (rev プライマー/ バルク CD34+)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATA AGCT AGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0076 (rev プライマー/ CD38+ 前駆細胞)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTA CGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0077 (rev プライマー/ CD38- CD45RA+ 前駆細胞)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATT ACA AGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0078 (rev プライマー/ 多能性前駆細胞)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATT TGACT GTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0079 (rev プライマー/ LT- HSC)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GAACT GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0080 (rev プライマー/ 筋肉)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATT GACAT GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0081 (rev プライマー/ 肺)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGAC GGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0082 (rev プライマー/ 肝臓)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGGAC GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0083 (rev プライマー/ 腎臓)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TTTCA CGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0084 (rev プライマー/ 心臓)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGCCAC GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0085 (rev プライマー/ 脳)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGAAAC GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0086 (rev プライマー/ 脾臓)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTAC GGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0087 (rev プライマー/ 血液)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CCA CTCGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0088 (rev プライマー/ AAV- 682 インプット)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAT CAGT GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC

【0597】

25 μ l の総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmol の各プライマー、及び鋳型としての10 μ l の精製cDNAサンプルを用いて、PCR反応物を調製した。PCRは、以下のサイクリングプロトコルで実施した：95℃で2分；98℃で10秒を10サイクル；55℃で15秒；72℃で25秒；次に、72℃で2分のインキュベーション後、4℃で保持。L8及びL13サンプルについては、20サイクルで得られた収率が低かったため、さらに10サイクルを追加した。Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen #28104)を用いてPCR産物を精製し、50

μ lの水で溶出した。図29に示すように、フラッシュゲルシステム（Fast DNA Ladder NEB #N3238Sを用いるFlash-Gel DNAカセット、1.2% Lonza #57031）を用いて、2 μ lのRT-PCR反応物について産物のサイズを評価した。

【0598】

Quibit計器を用いて定量した後、ライブラリーを最終濃度8 pMで等モルにプールし、Illumina MiSeq Reagent Kit v3（150サイクル、#MS-102-3001）を用いてMiSeqシステム（Illumina）でシーケンシングした。得られたリード数を表38にまとめる。

【0599】

【表44】

表 38: NGSリード数

名称	初期リード
全骨髓	813307
バルク CD34+	812827
CD38+ 前駆細胞	597680
CD38- CD45RA+ 前駆細胞	716979
多能性前駆細胞	725102
LT-HSC	548883
筋肉	799938
肺	832640
肝臓	706881
腎臓	831601
心臓	838244
脳	922195
脾臓	866037
血液	761597
AAV-682 インプット	700553

【0600】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析：

作製されたfastqファイルを、最初に品質（ $Q > 30$ 、ここで、 Q は、Phredクオリティスコアを示す）及び長さ（110～130 bp）によってフィルタリングした。クオリティトリミング後、Sso7d特異的な境界（ISKIからDAPK）をマッピングする目的で配列を処理し、全サンプルについて100,000を検索した。最終フィルタリング済み配列について、様々な器官における単一配の分布を評価し、結果を図30にまとめるが、これは、LT-HSCサンプルで同定された上位12ヒットに重点をおいている。

【0601】

ほとんどのヒットは、LT-HSCに対して高い特異性を有すると思われるが、それらの一部（例えば、Seq #5、Seq #7、Seq #9及びSeq #11）は、非標的臓器／細胞において非特異的な濃縮を示す。

【0602】

実施例10：N末端露出が増加したVP2バリエーションの同定

概要：

VP1とVP2の両方が、クライオ電子顕微鏡で示されるように、空の及びフルAAV粒子のカプシド内部の小球形成に関与していることが示唆されている。カプシド内部の小球の存在は、カプシドの外側に対するN末端ドメインの接近可能性が低いことと関連して

10

20

30

40

50

いる (Kronenberg et al., Journal of Virology, 2005)。これらの観察結果に照らして、VP2のN末端が天然でカプシド殻の内側に向いているという事実は、それと融合したSso7dスカフォールドの露出を低減し得るという仮説が立てられた。

【0603】

本実施例では、異なるリンカー配列により抗EGFR Sso7dに融合したAAV1Sil1 VP2の最初の79個の非構造アミノ酸に対する部位飽和突然変異誘発を使用した。このAAVライブラリーを、HKB11 EGFR過剰発現細胞の感染による正の選択、及びHKB11 EGFRノックアウト細胞の感染による負の選択に供し、受容体媒介の取り込みを特異的に改善する変異を同定した。

【0604】

実施例10.1 AAV1Sil1 VP2 N末端部位飽和突然変異誘発 (SSM) ライブラリーの作製

アクセプタープラスミドの生成：

第1ステップでは、8つの異なるリンカーの1つ、即ち、可動性リンカー (G4S、(G4S)₂、(G4S)₃、(G4S)₄) 又は剛性リンカー ((APS)₂、(APS)₃、(APS)₄、(APS)₅) のいずれかを含むアクセプタープラスミドを作製した。これらのリンカー配列は、GeneArtに断片DNAとして注文したものであり、これらを、AgeI-BsWIを用いて、以前記載されている通りにバックボーン：SK033_pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_AAV1sil VP2_173_CMV_sfCherryにクローニングし、D270 (AAV1 VP1座標) までのVP2の最初のアミノ酸を除去した。アクセプタープラスミドと、次のセクションに記載するライブラリー断片のいずれも、type IISクローニングに対応するようにBsaI制限部位を含む (図31及び表39を参照)。

【0605】

【表45】

表39: アクセプタープラスミド ID 及び付加されたリンカー

プラスミド ID	使用リンカー
(HS0012) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (APS)x2 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	APSx2
(HS0013) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (APS)x3 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	APSx3
(HS0014) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (APS)x4 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	APSx4
(HS0015) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (APS)x5 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	APSx5
(HS0016) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (G4S) AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	G4S
(HS0017) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (G4S)x2 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	G4Sx2
(HS0018) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (G4S)x3 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	G4Sx3
(HS0019) pCargo 173 CMV Sso7d EGFR (G4S)x4 AAV1sil VP2 173 CMV sfCherry	G4Sx4

【0606】

79AA SSMライブラリーのクローニング (V-Expライブラリー)：

79AA SSMライブラリー断片はTwist Bioscienceに注文した。これは、HS0012-HS0019に存在する異なるリンカーに直接融合するためのその5'におけるBsaI部位と、A139からG217 (AAV1 VP1座標) までの部位飽和ライブラリーと、AAV1のA218からN271をコードする塩基の区間と、前述したアクセプタープラスミドにクローニングするための第2のBsaI部位と、を含む。システインを除く全てのアミノ酸をSSMのために考慮した (79の位置、各々1つのコドンだけによりコードされる19のアミノ酸であり、1501バリエーションという総複雑度をもたらす)。

【0607】

V-Exp プラスミドライブラリーを作製するために、50 μ l の最終体積中、160 ng の 79 AA SSM ライブラリー断片と 80 ng の等モルでプールした HS0012 から HS0019 アクセプタープラスミドを、40 単位の BsaI-HF v2 NEB ; E3733)、2000 単位の T4 DNA Ligase (NEB ; M0202T)、及び 1 $\times$ アセンブリーバッファー (1 $\times$ CutSmart Buffer + 1 mM ATP) と混合した。反応混合物を以下のように処理した：37 $^{\circ}$ C で 30 分間のインキュベーション；37 $^{\circ}$ C で 5 分、続いて 16 $^{\circ}$ C で 5 分を 30 サイクル、及び 37 $^{\circ}$ C で 1 時間の最終ステップ。最終ステップを開始する前に、さらに 20 単位 BsaI-HF v2 をミックスに添加した。次に、反応産物を Plasmid Safe (PS) DNase (Epicentre ; E3105K) で処理して、非アセンブリング断片を消化し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega #A9280) を用いて精製した。この反応により、1.5 ng のアセンブリング済みプラスミドが得られた (PS DNase 消化ステップの後に残留する DNA の量により決定)。2 $\times$ 50 μ l の One Shot TOP10 Electrocomp 大腸菌 (E. coli) (ThermoFisher ; C4040-52) を、各々 0.1 ng のアセンブリング済みプラスミドライブラリーで形質転換した。反応物をプールし、1 時間の SOC インキュベーション後、100 ml の TB + カナマイシン培地に添加した。次に 100 μ l をフラスコから取り出し、様々な希釈液を LB + カナマイシンプレートにプレーティングし、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。寒天プレート上の CFU 数は 1.5×10^5 であり、理論上のライブラリー複雑度： 1.2×10^4 (8 リンカー $\times$ 1501 SSM ライブラリーサイズ) の約 10 倍であった。100 ml の培養物から 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した後、Maxiprep Kit (QIAGEN #12163) を用いてプラスミド DNA を抽出し、(HS0026) pCargo LTM V-Exp library_173_ CMV_ Sso7d_ EGFR_ AAV1sil \ VP2_173_ CMV_ sfCherry を得た。

10

20

【0608】

ssAAV1Sil1 V-Exp ライブラリーの作製及び QC :

2×10^6 v.c./ml 濃度の HEK293 懸濁細胞 1 リットルを、pHelper (約 40 K プラスミド/細胞)、(NC080) pAAV_Rep2Cap1_Sil1 [V473D_N500E] VP2 KO [T138A] _KanR (約 40 K プラスミド/細胞) 及び (HS0026) _pCargo V-Exp lib_ CMV_ Sso7d_ EGFR_ AAV1sil \ VP2_ CMV_ sfCherry プラスミドライブラリー (1300 プラスミド/細胞) により、1.1 μ g の全 DNA / 1×10^6 細胞で、FectoVIR-AAV トランスフェクション試薬 (Polypplus #101000022) を用いてトランスフェクトした。DNA : FectoVIR の比は 1 μ g : 1 μ l であった。トランスフェクション後、最終濃度 2 g/l のグルコースをトランスフェクションミックスに添加し、混合物を 37 $^{\circ}$ C、110 rpm、6% CO₂ でインキュベートした。

30

【0609】

トランスフェクションの 2 日後、溶解バッファー (500 mM HEPES、10% Tween 20、20 mM MgCl₂) 中のベンゾナーゼを 0.1 U/ μ l の最終濃度及び総体積の 10% に等しい量までトランスフェクション反応物に添加した。37 $^{\circ}$ C で 3 時間のインキュベーション後、総体積の 10% に等しい量のスクロース塩溶液 (5 M NaCl、7% スクロース) をライセートに添加し、混合物を 37 $^{\circ}$ C で 3 時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、塩スクロース溶液 (5 M NaCl、7% スクロース) 中の総体積の 10% に等しい量を添加し、さらに 20 分間インキュベートした。サンプルを 3500 g で 30 分遠心分離し、上清を 0.22 μ M のフィルターで濾過し、最終濃度 5 mM の EDTA を添加した。次に、清澄化したライセートを AKTA Pure 計器に取り付けた AAVX Pre-packed Column、0.5 $\times$ 5 cm、1 ml (ThermoFisher #A36652) に 1 ml/分

40

50

でロードした。結合したAAV粒子を10CVの洗浄バッファー、pH7.3(50mM Tris-Cl、0.5M NaCl、0.01%Pluronic F-68)で洗浄し、5CVのグリシン溶出バッファー、pH2.7(0.1Mグリシン、0.2M NaCl、0.25M L-アルギニン)で溶出した。溶出画分(0.25ml)を直ちに25μlの1M Tris-Cl、pH10で中和した。AAV粒子(UV280シグナルにより評価)を含む画分をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100KD(Spectrum(商標)#G235071)を用いて、PBS、pH7.4+0.001%Pluronic F-68に対して一晩透析した後、0.22μmフィルターユニットに通過させた。フル粒子と空の粒子をイオジキサノール超遠心分離勾配で分離し、Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 Filterユニット(Merck #UFC910008)を用いて、PBS、pH7.4+0.001%Pluronic F-68で濃縮/バッファー交換した後、0.22μmフィルターユニットに通過させた(最終体積=1ml)。

10

【0610】

力価及び装飾レベルの決定:

QX200液滴デジタルPCR(ddPCR)システム(Bio-Rad)を使用し、表3に記載のSV40 pA特異的オリゴセットを用いてAAVベクターの力価を決定した。精製調製物を以下のように前処理した:20μlの総体積中、5μlのAAVを、1単位のDNase及び1×DNaseバッファー(Merck #04716728001)と一緒に37℃で30分インキュベートした。20mg/mlのProteinase K(Life technologies #E00491)1μlを混合物に添加し、55℃で1時間インキュベートした後、95℃で15分間不活化ステップに付した。処理した調製物の様々な1/10連続希釈物を、1×PCR Buffer II(Life technologies #N8080010)、2.5mM MgCl₂、0.05%Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894)、2ng/μlのSheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011)中に調製し、PCR増幅用の鋳型として使用した。

20

【0611】

ddPCR反応ミックスは、22μlの最終体積中、5.5μlの前処理AAV希釈物と、各々900nMのフォワード及びリバースSV40 pAプライマー、125nMのSV40 pAプローブ、及び11μlのプローブ用2×ddPCRスーパーミックス(BioRad #1863024)を組み合わせることにより調製した。各サンプルについて技術的反復を行った。各20μlのddPCR反応ミックスを使い捨てドロップレット生成カートリッジ(Bio-Rad)に充填した。次に、70μlのプローブ用ドロップレット生成オイル(BioRad #1863005)を8つのオイルウェルの各々に充填した。続いて、カートリッジをQX200ドロップレット生成装置(Bio-Rad)内に設置した。液滴生成の後、マルチチャンネルピペットを用いて、40μlを96ウェルPCRプレートに移した。

30

【0612】

突き刺し可能なホイルでプレートをヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad)内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りであった:95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア(Bio-Rad)により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

40

【0613】

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析(Ag

50

ilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット）を実施した。

【0614】

総AAV粒子／ml（vp／ml）及びVP比の計算

・ng／μl（=μg／ml）値を実測MWで割り、 1×10^6 を掛けて（μgからgへの換算）、モル／ml値を算出する

・モル／ml値に 6.022×10^{23} （アボガドロ数）を掛けて、分子数／mlを算出する

・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数／mlの値に基づいて算出する

・AAV粒子／ml（vp／ml）：VP1+VP2+VP3分子／mlの総和を60で割る

【0615】

ddPCR及びCE-SDS結果を表40に掲載する。

【0616】

【表46】

表 40: UC 後の ssAAV1Sil1 V-Exp ライブラリーに対する QC

サンプル ID	AAV 当たりの VP2 融合物	vg/ml	vp/ml	% フル粒子
(AAV-540) ssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherry	3.7	6.85E+12	8.65E+12	79%

【0617】

ILLUMINAのMiSeqでのライブラリー調製及びNGS：

LTMLライブラリーが挿入された領域をカバーするプライマーセットを用いて、ナイーブプラスミドとナイーブライブラリーからアンプリコンライブラリーを作製した。この目的のために、50ngプラスミドDNA又は5μlのAAVサンプルのいずれかを、50μlの総体積中、13μlの2×Q5 HiFi Hot Start Ready Mix（NEB #M0494）、10pmolのSme0001f（5' CAGTGAAGCTGACATACCAAGGCG3'）／Sme0002r（5' ATTGTTGTGTGATGAGTCGCTGCG3'）プライマーと混合した。次に、新しく作製されたアンプリコンと、ILLUMINAのアダプターを含むプライマーセットを用いて、2回目のPCR反応を実施した。このセットでは、リバースプライマーは、個々のサンプルを同定できるように、ILLUMINA TruSeqインデックスも含む。この例で使用したプライマーのリストは表41に見出すことができる。

【0618】

10

20

30

40

50

【表 47】

表 41: インデックスPCRのために本実施例で使用したプライマーのリスト (太字:インデックス、斜体:アニーリング領域)

標的	プライマー名	配列 (5'-3')
HS0026	Sme0009_ NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC
	Sme0015_ NGS_r (R5)	GCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGATGGGTGTCC; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGGTGATGACTCTGTCTGC
AAV- 540	Sme0009_ NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC
	Sme0017_ NGS_r (R4)	GCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGATGGGTGTCC; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCACTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGGTGATGACTCTGTCTGC

10

【0619】

実施例 10. 2 N 末端露出の改善についてのインビトロ選択 (NGS 結果を含む)

ssAAV1Sil1_V-Exp_lib-sfCherry ライブラリー形質導入及び RNA 抽出:

HKB11 EGFR 過剰発現細胞 (EGFR+) 及び HKB11 EGFR ノックアウト細胞 (KO) を、1% FBS 及び 200 µg/ml ゼオシン (EGFR+) 又は 2% FBS (EGFR KO) を添加した V3 培地を用いて懸濁培養し、37℃、110 rpm、6% CO₂ でインキュベートした。形質導入の当日、125 ml のシェイクフラスコ (4 フラスコ/細胞株) に、添加剤を含まない V3 培地 20 ml 中に 5E+05 細胞/ml で細胞を播種した。ssAAV1Sil1_V-Exp_lib-sfCherry (AAV-540) ライブラリーを両細胞株に 10、100、1,000、10,000 の感染多重度で添加し、37℃、110 rpm、6% CO₂ で培養した (形質導入から 3 時間後に各フラスコにサプリメントを添加した)。導入から 3 日後に、細胞を計数してから 1E+07 細胞をペレット化し、PBS で洗浄した後、Allprep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen、80204) を用いた DNA 及び RNA の精製の両方に使用した。Qubit 蛍光光度計を用いて RNA 濃度を測定し、サンプル当たり約 100~200 µg を得た。

20

30

【0620】

抽出した RNA サンプルの RT-PCR:

50 µl の総反応物体積中、LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit (NEB #E1555)、12.5 pmol の Sme0001f (5' CAGTGAAGCTGACATACCAGGGC3') / Sme0002r (5' ATTGTTGTTGATGAGTCGCTGC3') プライマー及び 100 ng の全 RNA を用いて、RT-PCR を実施した。RT-PCR は以下のサイクリングプロトコルを用いて実施した: 55℃ で 10 分、98℃ で 1 分; 98℃ で 10 秒、55℃ で 20 秒、72℃ で 30 秒を 30 サイクル; 続いて 72℃ で 5 分の最終増幅後、4℃ で保持。反応物は、MinElute PCR purification Kit (Qiagen #28004) を用いて精製し、30 µl の水で溶出した。濃度は、Nanodrop 分光光度計による測定に基づき、10 ng/µl ~ 30 ng/µl の範囲であった。図 32 に示すように、Flash-Gel システム (Flash-Gel DNA カセット、1.2% Lonza #57031) を用いて、1 µl の RT-PCR 反応物について産物のサイズを評価した。

40

【0621】

Illumina の MiSeq でのライブラリー調製及び NGS:

Illumina のアダプターを含むプライマーのセットを用いて、様々な精製 RT-PCR 反応物からアンプリコンライブラリーを作製した。フォワードプライマーは、個々

50

のサンプルの同定を可能にするように、Illumina TruSeq インデックスを含むリバースプライマーと組み合わせて使用した。この実施例で使用したプライマーのリストを図 42 に示す。

【 0 6 2 2 】

【 表 4 8 】

表 42: アンブリコンライブラリーについて使用されるプライマーのリスト (太字: インデックス, 斜体: アニールリング領域)

標的	プライマー名	配列
EGFR+ MOI 10	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0010_NGS_r (R1)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTCC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CGTG ATGTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR+ MOI 100	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0011_NGS_r (R3)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT GCCTA AGTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR+ MOI 1000	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0017_NGS_r (R4)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TGGT CAGTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR+ MOI 10000	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0015_NGS_r (R5)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CACTG TGTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR KO MOI 10	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0012_NGS_r (R8)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT TCAAG TGTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR KO MOI 100	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0013_NGS_r (R9)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CTGATC GTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR KO MOI 1000	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0016_NGS_r (R6)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT ATTGGC GTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC
EGFR KO MOI 10000	Sme0009_NGS_f	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT
	Sme0014_NGS_r (R10)	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TTGGAACAGGA TGGGTGTTC</i> ; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT AAGCTA GTG ACTGGAGTTTCAACGCTGTGCTCTTCCGATCTGGT GGTGATGACTCTGTTCGC

10

20

30

40

【 0 6 2 3 】

25 μ l の総反応物体積中、Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (NEB #M0494)、10 pmol の各プライマー、及び鋳型としての 5 ng の精製 RT-PCR サンプルを組み合わせることにより PCR 反応物を調製した。PCR は、以下のサイクリングプロトコルで実施した：95 °C で 2 分；98 °C

50

で10秒を15サイクル；55℃で15秒；72℃で25秒；次に、72℃で2分のインキュベーション後、4℃で保持。MinElute PCR purification Kit（Qiagen #28004）を用いて反応物を精製し、30μlの水で溶出した。図33に示すように、フラッシュゲルシステム（Flash-Gel DNAカセット、1.2% Lonza #57031）を用いて、1μlの精製アンプリコンPCR反応物について産物のサイズを評価した。

【0624】

Quibitフルオロメーターを用いて定量した（全て、15～30ng/μl）後、ライブラリーを最終濃度8pMで等モルにプールし、Illumina MiSeq Reagent Kit v3（150サイクル、#MS-102-3001）を用いてMiSeqシステム（Illumina）で配列決定した。

10

【0625】

カスタムスクリプトを用いたデータ解析：

作製されたfastqファイルを、最初に品質（Q>30、ここで、Qは、Phredクオリティスコアを示す）によりフィルタリングし、対応するフォワード及びリバースリードをマージした。このクオリティトリミングの後、Ssod特異的境界（MLEKからADGV）をマッピングする目的で、マージした配列を処理した。最終フィルタリング済みリードの数を表43に示す。

【0626】

【表49】

20

表 43: 初期 NGS 及びフィルタリングされた NGS リード数

名称	フィルタリング済みリード
EGFR+ MOI 10	162628
EGFR+ MOI 100	166839
EGFR+ MOI 1000	126648
EGFR+ MOI 10000	192245
EGFR KO MOI 10	162596
EGFR KO MOI 100	164315
EGFR KO MOI 1000	149681
EGFR KO MOI 10000	153137

30

【0627】

40

出現解析によるMOI選択：

各サンプルにおける出現の分布をプロットして、EGFR+細胞及びEGFR KO細胞におけるssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherryライブラリー形質導入工程中に適用された選択圧のグラフを作成した。図34に描かれているように、両方の細胞株でmoi 10で観察される、より広範な分布は、適用された正しい選択圧の有望な指標となり得るため、次の解析ステップのために選択された。

【0628】

細胞形質導入に影響を及ぼすVP2 N末端バリエーションの同定及び優先順位付け：

変異解析は、moi：10（n=87）のEGFR+細胞におけるV-expライブラリー形質導入で少なくとも0.1%の頻度を示す配列の各標的位置で実施した。所与の位

50

置各々で、親アミノ酸のパーセンテージと各単一バリエーションのパーセンテージを、正（EGFR+）及び負（EGFR KO）の選択の両方について算出した（図35及び図36を参照）。EGFR+とEGFR KOの間に観察された大きな差（濃いボックス）、又は高い絶対濃縮（薄いボックス、図37も参照）に基づいて、9つの位置を優先順位付けした。

【0629】

優先順位付けされたVP2位置での様々なリンカーの明らかな濃縮は観察されなかったが、小さなリンカー（G4S×1、APS×2及びAPS×3）に全般的な優先傾向を認めることができた。

【0630】

実施例10.3：同定された単一VP2 N末端バリエーションのインビトロ検証

概要：

N末端VP2露出の増加を目的とするLTMライブラリーのインビトロ選択によって、9つの単一点突然変異が同定された（セクション10.2に記載される通り）。各点変異を、抗EGFR Sso7dのE18.4.5配列は保存するが、（G4S）×3リンカーを（APS）×2、（APS）×3又は（G4S）×2のいずれかで置換した、NC070_pRS5a_AAV1Sil1 VP2_（G4S）×3_抗EGFR Sso7dのバックボーンにクローニングした（表44参照）。VP2プラスミドのクローニング及びアップスケーリングはGebeArtに外部委託した。AAVサンプルを産生し、EGFR OE細胞及びKO細胞におけるそれらの感染力を評価した。Sso7d標的（EGFR）との結合も同様に評価して、この態様に対する変異の影響を調べた。

【0631】

【表50】

表 44: 同定された点変異を有する VP2 発現プラスミドのリスト

プラスミド ID	点変異
(HS0035)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_N172V_VP2	N172V
(HS0036)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_E147S_VP2	E147S
(HS0037)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P166R_VP2	P166R
(HS0038)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P185G_VP2	P185G
(HS0039)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_G199R_VP2	G199R
(HS0040)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_M211V_VP2	M211V
(HS0041)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_D213A_VP2	D213A
(HS0042)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(G4S)x2_AAV1Sil1_P191N_VP2	P191N
(HS0043)_pRS5a_抗EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_T162R_VP2	T162R

【0632】

装飾AAV1-Sil1の産生：

プラスミドDNAは、pHelper、（AgC1294）173CMV-EGFP-HPRE一本鎖カーゴ、（NC080）pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 KO、上記リストからのAAV1 VP2発現プラスミドを等モル比で混合した。Fec

t o V I R - A A V トランスフェクション試薬 (P o l y p l u s # 1 0 1 0 0 0 0 2 2) を用いて、細胞密度： 2×10^6 細胞 / ml の 200 ml の E x p i 2 9 3 F 細胞をトランスフェクトした ($1.1 \mu\text{g}$ の全 DNA / 1×10^6 細胞) 。 DNA : F e c t o V I R の比は $1 \mu\text{g} : 1 \mu\text{l}$ であった。トランスフェクションステップには、非修飾 V P 2 を含む S s o 7 d 装飾対照も加えた。トランスフェクション後、グルコースを最終濃度 $2 \text{ g} / \text{l}$ まで細胞懸濁液に添加し、混合物を 37°C 、 110 rpm 、 $6\% \text{ CO}_2$ でインキュベートした。トランスフェクションの3日後、溶解バッファー (500 mM H E P E S、 $10\% \text{ Tween } 20$ 、 20 mM M g C l ₂) 中のベンゾナーゼを $0.1 \text{ U} / \mu\text{l}$ の最終濃度、及び総体積の 10% に等しい量まで、トランスフェクト細胞懸濁液に添加した。 37°C で3時間のインキュベーション後、総体積の 10% に等しい量のスクロース塩溶液 (5 M N a C l、 7% スクロース) をライセートに添加し、混合物を 37°C で3時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、塩スクロース溶液 (5 M N a C l、 7% スクロース) 中の総体積の 10% に等しい量を添加し、さらに20分間インキュベートした。サンプルを 3500 g で15分間遠心分離し、上清を $0.22 \mu\text{M}$ のフィルターで濾過し、最終濃度 5 mM の E D T A を添加した。次に、清澄化したライセートを A K T A P u r e 計器に取り付けた A A V X P r e - p a c k e d C o l u m n、 $0.5 \times 5 \text{ cm}$ 、 1 ml (T h e r m o F i s h e r # A 3 6 6 5 2) に $1 \text{ ml} / \text{分}$ でロードした。結合した A A V 粒子を 10 CV の洗浄バッファー、 $\text{pH } 7.3$ (50 mM T r i s - C l、 0.5 M N a C l、 $0.01\% \text{ Pluronic F-68}$) で洗浄し、 5 CV のグリシン溶出バッファー、 $\text{pH } 2.7$ (0.1 M グリシン、 0.2 M N a C l、 0.25 M L - アルギニン) で溶出した。溶出画分 (0.25 ml) を直ちに $25 \mu\text{l}$ の 1 M T r i s - C l、 $\text{pH } 10$ で中和した。A A V (U V 2 8 0 シグナルにより評価) を含む画分をプールし、F l o a t - A - L y z e r D i a l y s i s D e v i c e 1 0 0 K D (S p e c t r u m (商 標) # G 2 3 5 0 7 1) を用いて、製剤用バッファー (20 mM T r i s 塩基、 1 mM M g C l ₂、 200 mM N a C l、 $0.005\% \text{ Pluronic F-68}$ 、 $\text{pH } 8.1$) に対して一晩透析した後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた。

【 0 6 3 3 】

力価及び装飾レベルの決定：

表3に記載の S V 4 0 p A 特異的オリゴセットを用いる Q X 2 0 0 液滴デジタル P C R (d d P C R) システム (B i o - R a d) で、A A V ベクターの力価を決定した。精製調製物の前処理は、下記のものから構成された： $20 \mu\text{l}$ の総体積中、 $5 \mu\text{l}$ の A A V を、1単位の D N a s e 及び $1 \times \text{DNase}$ バッファー (M e r c k # 0 4 7 1 6 7 2 8 0 0 1) と一緒に 37°C で30分インキュベートした。次に、 $20 \text{ mg} / \text{ml}$ の P r o t e i n a s e K (L i f e t e c h n o l o g i e s # E O 0 4 9 1) $1 \mu\text{l}$ を反応ミックスに添加し、 55°C で1時間インキュベートした後、 95°C で15分間不活化ステップに付した。処理したサンプルの様々な $1 / 10$ 連続希釈物を、 $1 \times \text{PCR}$ B u f f e r I I (L i f e t e c h n o l o g i e s # N 8 0 8 0 0 1 0)、 2.5 mM M g C l ₂、 $0.05\% \text{ Pluronic F-68}$ (S i g m a A l d r i c h # K 4 8 9 4)、 $2 \text{ ng} / \mu\text{l}$ の S h e a r e d S a l m o n S p e r m D N A (I n v i t r o g e n # 1 5 6 3 2 0 1 1) 中に調製し、P C R 増幅用の鋳型として使用した。d d P C R 反応ミックスは、 $22 \mu\text{l}$ の最終体積中、 $5.5 \mu\text{l}$ の前処理 A A V 希釈物と、各々 900 nM のフォワード及びリバース S V 4 0 p A プライマー、 125 nM の S V 4 0 p A プロブ及び $11 \mu\text{l}$ のプロブ用 $2 \times \text{ddPCR}$ スーパーミックス (B i o R a d # 1 8 6 3 0 2 4) を組み合わせることにより調製した。各サンプルについて技術的反復を行った。d d P C R 反応ミックスをセミスカート付き 96 ウェルプレート (B i o - R a d # 1 2 0 0 1 9 2 5) にロードし、自動ドロップレット生成装置 (B i o - R a d # 1 8 6 4 1 0 1) 内に配置した。液滴は、B i o - R a d 独自の D G 3 2 自動ドロップレット生成カートリッジ (# 1 8 6 4 1 0 8) とプロブ用自動ドロップレット生成オイル (B i o - R a d # 1 8 6 4 1 1 0) を用いて自動的に生

成した。液滴生成後、上記装置は、生成された液滴を新しいセミスカーフ付き96ウェルプレートに自動的に沈殿させた。

【0634】

突き刺し可能なホイルでプレートをヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) 内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りであった：95℃で10分、次に95℃で30秒及び60℃で1分を40サイクル、続いて98℃で10分のインキュベーションの後、4℃で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア (Bio-Rad) により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

10

【0635】

CE-SDS分析 (Agilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット) を実施して、精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価した。

【0636】

総AAV粒子/ml (vp/ml) 及びVP比の計算：

- ・ng/μl (=μg/ml) 値を実測MWで割り、1E+06を掛けて (μgからgへの換算)、モル/ml値を算出する

20

- ・モル/ml値に6.022E+23 (アボガドロ数) を掛けて、分子数/mlを算出する

- ・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数/mlの値に基づいて算出する

- ・AAV粒子/ml (vp/ml) : VP1+VP2+VP3分子/mlの総和を60で割る

【0637】

ddPCR及びCE-SDS結果を表45に掲載する。

【0638】

30

40

50

【表 5 1】

表 45: 装飾 ssAAV1Sil1 に対する QC

サンプル ID	AAV 当たりの VP2 融合物	vg/細胞	vp/細胞
(AAV-637) ssAAV1Sil1_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(G4S)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	7.1	2.92E+04	5.41E+04
(AAV-674) ssAAV1-Sil1_N172V_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x2- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	8.3	1.31E+04	9.84E+04
(AAV-639) ssAAV1-Sil1_E147S_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x2- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	9.3	3.73E+04	6.34E+04
(AAV-640) ssAAV1-Sil1_P166R_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	9.0	3.14E+04	9.80E+04
(AAV-641) ssAAV1-Sil1_P185G_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	7.1	3.33E+04	9.40E+04
(AAV-647) ssAAV1-Sil1_G199R_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMV eGFP_HRPE	13.8	2.36E+04	1.36E+05
(AAV-648) ssAAV1-Sil1_M211V_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	11.0	1.58E+04	6.05E+04
(AAV-649) ssAAV1-Sil1_D213A_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	13.8	1.99E+04	7.43E+04
(AAV-650) ssAAV1-Sil1_P191N_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(G4S)x2- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	12.7	1.90E+04	7.99E+04
(AAV-651) ssAAV1-Sil1_T162R_抗 EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3- VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	12.2	1.83E+04	9.96E+04

【0639】

受容体過剰発現細胞株及びノックアウト細胞株に対する装飾 A A V 1 S i l 1 のインビトロ感染力：

単一変異が、装飾カプシドが細胞に感染する能力を向上させたか否かを評価するために、EGFR 過剰発現 (OE) 細胞及びノックアウト (KO) 細胞に対する感染力アッセイを実施した。V3 培地で $6.06 \times 10^5 / \text{mL}$ の濃度の細胞を平底 96 ウェルプレートに播種した ($33 \mu\text{L}$ 細胞懸濁液/ウェル)。装飾 AAV を V3 培地で希釈し、 $1 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^1$ の MOI で細胞を感染させた。ウェル内の $100 \mu\text{L}$ の最終体積と共に、プレートを 37°C で 3 時間インキュベートした後、 10% FBS を含む $100 \mu\text{L}$ の V3 培地を添加した。トランスフェクションから 3 日後に細胞を剥離し、FACS により eGFP 蛍光を測定した。EC50 値は、過剰発現細胞とノックアウト細胞の両方で、各 AAV サンプルの eGFP 陽性細胞のパーセンテージに基づいて算出した。次に、EGFR KO 条件からの EC50 値を、EGFR OE 条件からの対応する EC50 値で割った。図 38 に、前述の計算から得られた倍数変化を示す。

【0640】

E L I S Aによる標的結合に対するVP2点変異の影響の評価：

ブラックMaxisorp 384ウェルプレート（Merck #P6366-1CS）を、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のhEGFR細胞外ドメイン組換えタンパク質又はBSAでコーティングした。4℃で一晩インキュベートした後、プレートをTBSTバッファー（TBST + 0.05% Tween20）で洗浄し、3%BSA/TBSTバッファーでブロックした。次のステップでは、無関係な生産ラウンドで生産された、装飾AAV及び非装飾AAV1S11対照の連続希釈液を、コーティングされたプレートに添加した。室温で2時間インキュベートした後、プレートをTBSTで3回洗浄し、抗AAVxビオチン化抗体（ThermoFisher Scientific #7103522100）と一緒に室温で1時間インキュベートした。プレートをTBST（4×）で洗浄し、ストレプトアビジン-APコンジュゲート（Roche #11089161001）と一緒に室温で30分インキュベートした。プレートを再度4回洗浄し、AttoPhos基質（Roche #00000011681982001）を各ウェルに添加した。BSAプレートシグナルをEGFRプレートシグナルから差し引いた。5E+11 vp AAV濃度に注目した結果を図39に示す。

10

【0641】

EGFR過剰発現細胞での形質導入とタンパク質結合の増強は、優先順位をつけた単一VP2バリエーションのほとんどで観察された。理論に束縛されることを望まないが、この改善は、より良好なSso7d暴露と、且つ／又は恐らくこれらのサンプルで観察されたわずかに高い量のSso7d融合と関連することが仮定される。

20

【0642】

実施例10.4 インビトロで結合したVP2 N末端バリエーションの確認概要：

前セクションでは、VP2 M末端変異P191N、T162R及びD213Aが上位候補として同定された。これらのVP2点変異がカプシドの形質導入能力に相加効果を及ぼすか否かを調べるために、3つの変異を全て含む新規のVP2プラスミドを設計した。表46に記載される変異をコードするストリングDNAを、抗EGFR Sso7dのE18.4.5配列は保存するが、(G4S)×3リンカーを(APS)×2、(APS)×3又は(G4S)×2のいずれかで置換した、NC070__pRSS5a__AAV1S11 VP2__ (G4S)×3__抗EGFR Sso7dのバックボーンにクローニングした（表46参照）。さらに、感染力及び標的結合に対するリンカーの影響も検証し、可動性(G4S)×2及び(G4S)×3リンカーと、より剛性の(APS)×2リンカーを比較した。AAVサンプルを作製し、EGFR OE細胞及びKO細胞における感染力を評価した。Sso7d標的(EGFR)への結合も同様に評価して、この態様に対する変異の影響を調べた。

30

【0643】

40

50

【表 5 2】

表 46: それぞれの点変異及びリンカーを備える VP2 発現プラスミドのリスト

プラスミド ID	VP2 変異	リンカー
(NC079) pAAV_rep2cap1_AAV1-Sil1[V473D,N500E]_KanR	なし	Sso7d なし
(NC070) pRS5a_AAV1 Sil1 VP2 (G4S)x3 抗 EGFR Sso7d	なし	(G4S)x3
(SK0050)_pRS5a_抗 EGFR Sso7d E18.4.5 (APS)x2 AAV1 Sil1 VP2	なし	(APS)x2
(SK0058)_pRS5a_抗 EGFR Sso7d E18.4.5 (APS)x2 AAV1Sil1 VP2 P191N	P191N	(APS)x2
(SK0051)_pRS5a_抗 EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1_Sil1_Ra_VP2	P191N, T162R, D213A	(APS)x2
(HS0042)_pRS5a_抗 EGFR Sso7d E18.4.5 (G4S)x2 AAV1Sil1 P191N VP2	P191N	(G4S)x2

10

【0644】

装飾 AAV1-Sil1 産生:

プラスミド DNA は、pHelper、(AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE 一本鎖カーゴ、(NC080) pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 KO、及び上記リストの AAV1 VP2 発現プラスミドを等モル比で混合した。非装飾 AAV 対照には、以下のプラスミドを使用した: pHelper、(AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE 一本鎖カーゴ、及び (NC079) pAAV_rep2cap1_AAV1-Sil1[V473D,N500E]_KanR。Expi293 F 細胞を 2×10^6 細胞/ml の細胞密度で新鮮な培地に再懸濁し、FectoVIR-AAV トランスフェクション試薬 (Polyplus #101000022) を用いてトランスフェクトした ($1.1 \mu\text{g}$ の全 DNA / 1×10^6 細胞)。DNA:FectoVIR の比率は、 $1 \mu\text{g} : 1 \mu\text{l}$ であった。トランスフェクションのすぐ後に、グルコースを最終濃度 2 g/l まで細胞懸濁液に添加し、混合物を 37°C 、 110 rpm 、 $6\% \text{ CO}_2$ でインキュベートした。トランスフェクションの3日後、溶解バッファー (500 mM HEPES、 $10\% \text{ Tween } 20$ 、 20 mM MgCl_2) 中のベンゾナーゼを最終濃度 $0.1 \text{ U}/\mu\text{l}$ 及びの総体積の 10% に等しい量までトランスフェクト細胞懸濁液に添加した。 37°C で3時間のインキュベーション後、総体積の 10% に等しい量のスクロース塩溶液 (5 M NaCl、 $7\% \text{ スクロース}$) をライセートに添加し、混合物を 37°C で3時間攪拌しながらインキュベートした。このインキュベーションステップの後、塩スクロース溶液 (5 M NaCl、 $7\% \text{ スクロース}$) 中の総体積の 10% に等しい量を添加し、さらに20分間インキュベートした。サンプルを 3500 g で15分間遠心分離した。上清を $0.22 \mu\text{M}$ のフィルターで濾過し、最終濃度 5 mM の EDTA を添加した。次に、清澄化したライセートを AKTA Pure 計器に取り付けた AAVX Pre-packed Column、 $0.5 \times 5 \text{ cm}$ 、 1 ml (ThermoFisher #A36652) に $1 \text{ ml}/\text{分}$ でロードした。結合した AAV 粒子を 10 CV の洗浄バッファー、 $\text{pH } 7.3$ (50 mM Tris-Cl、 0.5 M NaCl、 $0.01\% \text{ Pluronic F-68}$) で洗浄し、 5 CV のグリシン溶出バッファー、 $\text{pH } 2.7$ (0.1 M グリシン、 0.2 M NaCl、 0.25 M L-アルギニン) で溶出した。溶出画分 (0.25 ml) を直ちに $25 \mu\text{l}$ の 1 M Tris-Cl、 $\text{pH } 10$ で中和した。AAV (UV280 シグナルにより評価) を含む画分をプールし、Float-A-Lyzer Dialysis Device 100 KD (Spectrum (商標) #G235071) を用いて、製剤用バッファー (20 mM Tris 塩基、 1 mM MgCl_2 、 200 mM NaCl、 $0.005\% \text{ Pluronic F-68}$ 、 $\text{pH } 8.1$) に

20

30

40

50

対して一晚透析した後、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルターユニットに通過させた。

【0645】

力価及び装飾レベルの決定：

表3に記載されるSV40pA特異的オリゴセットを用いるQX200液滴デジタルPCR (ddPCR) システム (Bio-Rad) で、AAVベクターの力価を決定した。精製AAVサンプルの前処理は、下記のものから構成された： $20\text{ }\mu\text{l}$ の総体積中、 $5\text{ }\mu\text{l}$ のAAVを、1単位のDNase及び $1\times$ DNaseバッファー (Merck #04716728001) と一緒に 37°C で30分インキュベートした。次に、 20 mg/ml のProteinase K (Life technologies #E00491) $1\text{ }\mu\text{l}$ を反応ミックスに添加し、 55°C で1時間インキュベートした後、 95°C で15分間不活化ステップに付した。処理したサンプルの様々な $1/10$ 連続希釈物を、 $1\times$ PCR Buffer II (Life technologies #N8080010)、 2.5 mM MgCl_2 、 0.05% Pluronic F-68 (Sigma Aldrich #K4894)、 $2\text{ ng}/\mu\text{l}$ のSheared Salmon Sperm DNA (Invitrogen #15632011) 中に調製し、PCR増幅用の鑄型として使用した。ddPCR反応ミックスは、 $5.5\text{ }\mu\text{l}$ の前処理AAV希釈物と、最終体積 $22\text{ }\mu\text{l}$ 中、各々 900 nM のフォワード及びリバースSV40 pAプライマー、 125 nM のSV40 pAプローブ、及び $11\text{ }\mu\text{l}$ のプローブ用 $2\times$ ddPCRスーパーミックス (BioRad #1863024) を組み合わせることにより調製した。各サンプルについて技術的反復を行った。ddPCR反応ミックスをセミスカート付き96ウェルプレート (Bio-Rad #12001925) にロードし、自動ドロップレット生成装置 (Bio-Rad #1864101) 内に配置した。液滴は、Bio-Rad独自のDG32自動ドロップレット生成カートリッジ (#1864108) とプローブ用自動ドロップレット生成オイル (Bio-Rad #1864110) を用いて自動的に生成した。液滴生成後、上記装置は、生成された液滴を新しいセミスカート付き96ウェルプレートに自動的に沈殿させた。

10

20

30

40

50

【0646】

突き刺し可能なホイルでプレートをヒートシールしてから、C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) 内に配置した。サーマルサイクリング条件は以下の通りであった： 95°C で10分、次に 95°C で30秒及び 60°C で1分を40サイクル、続いて 98°C で10分のインキュベーションの後、 4°C で不定時間の保持。各液滴中のAAVゲノムDNA配列を標識するFAM蛍光シグナルを、QX200デジタル液滴リーダーを用いてカウントし、QuantaSoft解析ソフトウェア (Bio-Rad) により解析した。AAVの力価を計算するために、それぞれの総希釈倍率を掛け、一本鎖ゲノムの再アニーリングの可能性を考慮するためにさらに係数2を掛けることにより、液滴の数を変換した。

【0647】

精製サンプル中のVP分布及び総VP収量を評価するために、CE-SDS分析 (Agilent 2100 Bioanalyzerシステム、変性条件を用いるProtein 230キット) を実施した。

【0648】

総AAV粒子/ ml (vp/ ml) 及びVP比の計算

・ $\text{ng}/\mu\text{l}$ ($=\mu\text{g}/\text{ml}$) 値を実測MWで割り、 $1\text{ E}+06$ を掛けて (μg から g への換算)、モル/ ml 値を算出する

・モル/ ml 値に $6.022\text{ E}+23$ (アボガドロ数) を掛けて、分子数/ ml を算出する

・VP分布：1個のAAVが合計60個のVPから成ると仮定する分子数/ ml の値に基づいて算出する

・AAV粒子/ ml (vp/ ml) : VP1+VP2+VP3分子/ ml の総和を60で割る

【0649】

ddPCR及びCE-SDS結果を表47に掲載する。

【0650】

【表53】

表 47: 装飾 ssAAV1Sil1 に対する QC

サンプル ID	ショート ID	AAV 当 たりの VP2 融 合物	vg/細胞	vp/細胞
(PPB-26864) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP	非装飾	0	2.71E+04	4.93E+04
(PPB-26865) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d E18.4.5 VP2 (G4S)3	w.t. VP2 (G4Sx3)	6.9	1.80E+04	4.48E+04
(PPB-26866) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d E18.4.5 VP2 (APS)2	w.t. VP2 (APSx2)	8.2	1.77E+04	4.82E+04
(PPB-26867) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d E18.4.5 VP2 P191N (APS)2	P191N VP2 (APSx2)	9.5	1.46E+04	4.23E+04
(PPB-26868) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d E18.4.5 VP2 P191N (G4S)2	P191N VP2 (G4Sx2)	9.7	1.59E+04	4.05E+04
(PPB-26869) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-NOX-抗 EGFR-Sso7d E18.4.5 VP2 RA (APS)2	Ra VP2 (APSx2)	10.8	2.04E+04	5.21E+04

10

20

【0651】

受容体過剰発現細胞株及びノックアウト細胞株に対する装飾 AAV1Sil1 のインビトロ感染力：

30

単一変異が、細胞に感染する装飾カプシドの能力を向上させたか否かを評価するために、EGFR 過剰発現 (OE) 細胞及びノックアウト (KO) 細胞に対する感染力アッセイを実施した。V3 培地で $6.06 \times 10^5 / \text{mL}$ の濃度の細胞を平底 96 ウェルプレートに播種した ($33 \mu\text{L}$ 細胞懸濁液/ウェル)。装飾 AAV を V3 培地で希釈し、 $1 \times 10^6 \sim 4.6 \times 10^1$ の MOI で細胞を感染させた。ウェル内の $100 \mu\text{L}$ の最終体積と共に、プレートを 37°C で 3 時間インキュベートした後、 10% FBS を含む $100 \mu\text{L}$ の V3 培地を添加した。トランスフェクションから 3 日後に細胞を剥離し、FACS により eGFP 蛍光を測定した。この実験では高い形質導入レベルが観察されたため、図 40 及び図 41 に示すように MFI レベルで解析を行った。

40

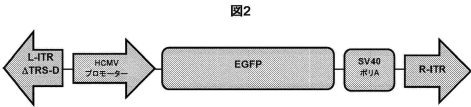
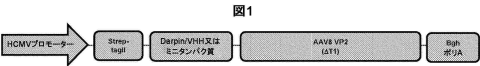
【0652】

VP2 配列上の変異の組み合わせ (P191N、T162R、D213A=Ra) は、w.t. VP2 及び単一 P191N バリエントの両方と比較して、抗 EGFR Sso7d 標的化 AAV1Sil1 の形質導入効率を改善する。使用した様々なリンカーの形質導入への明らかな影響は観察されなかった。

50

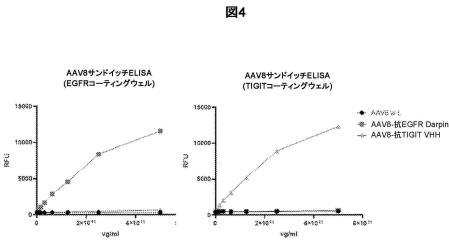
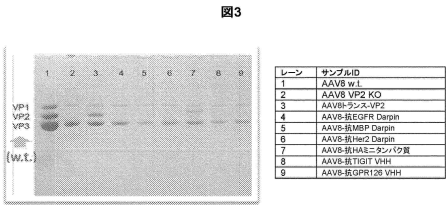
【図面】
【図 1】

【図 2】



【図 3】

【図 4】



10

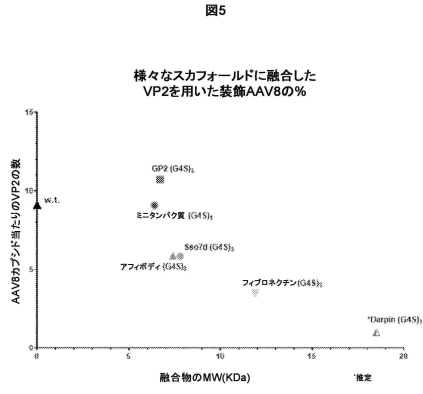
20

30

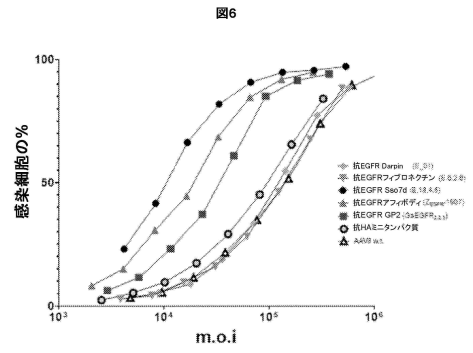
40

50

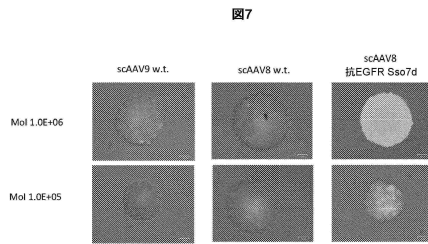
【図 5】



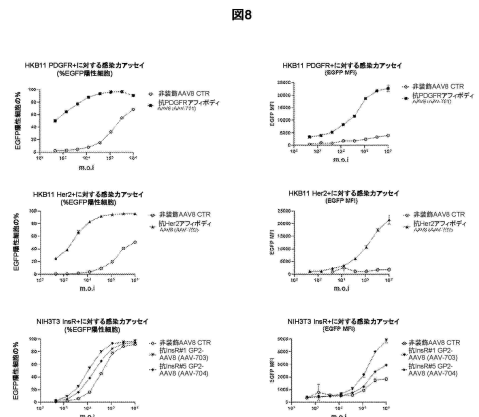
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

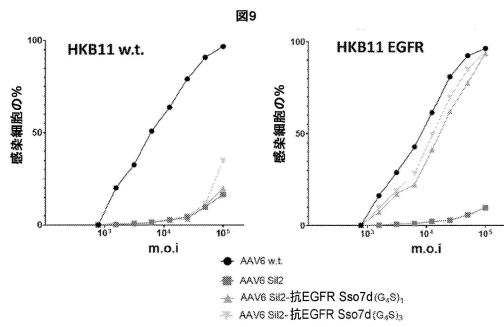
20

30

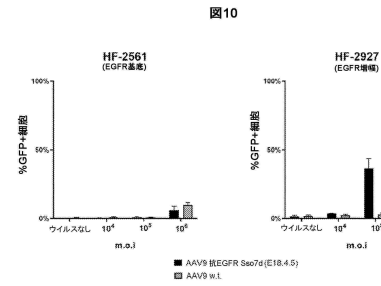
40

50

【図 9】

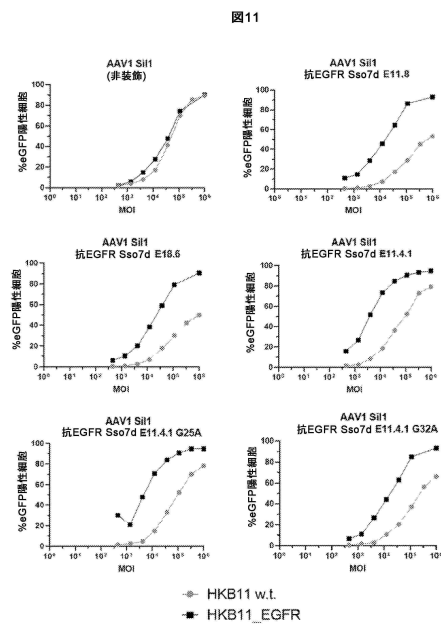


【図 10】

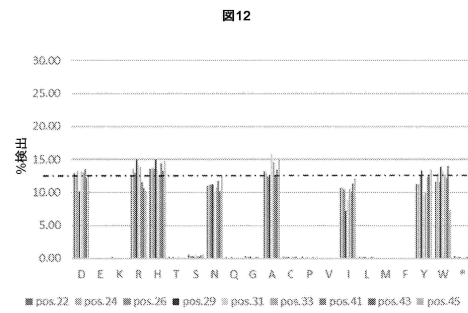


10

【図 11】



【図 12】



30

40

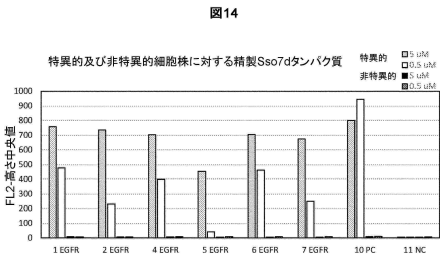
50

【図 1 3】

図13

767937	pos.22	I	D	Y	N	H	Y	N	W	W
767937	pos.24	I	D	Y	Y	H	R	N	W	W
767937	pos.26	I	D	Y	Y	H	R	N	W	W
767937	pos.28	I	D	Y	A	H	R	D	W	W
767937	pos.29	I	D	Y	R	H	N	W	W	W
767937	pos.31	I	N	Y	A	H	N	Y	W	Y
767937	pos.33	W	N	Y	D	D	W	W	N	I
767937	pos.41	I	D	Y	D	H	Y	D	W	W
767937	pos.43	I	N	Y	N	H	N	W	W	W
767937	pos.45	I	D	Y	W	H	N	Y	W	Y
767937	pos.46	I	D	Y	A	H	R	A	W	Y
767937	pos.47	I	N	Y	N	H	N	Y	W	W
767937	pos.48	I	D	Y	W	H	N	Y	W	Y
767937	pos.49	I	D	Y	A	H	R	A	W	Y
767937	pos.50	I	N	Y	N	H	N	Y	W	W
767937	pos.51	I	D	Y	D	H	N	H	W	W
767937	pos.52	I	D	Y	N	H	N	I	W	W
767937	pos.53	I	N	Y	A	H	H	N	W	Y
767937	pos.54	I	D	Y	N	H	R	A	W	W
767937	pos.55	I	D	Y	N	H	W	N	W	W
767937	pos.56	Y	D	A	F	W	E	L	T	W
767937	pos.57	I	D	Y	N	H	N	W	W	Y
767937	pos.58	I	D	Y	W	H	R	D	W	W
767937	pos.59	I	D	Y	D	H	N	Y	W	Y
767937	pos.60	I	D	Y	N	H	N	Y	W	Y
767937	pos.61	I	D	Y	N	H	R	D	W	W
767937	pos.62	I	D	Y	N	H	N	W	W	W
767937	pos.63	I	D	Y	N	H	Y	A	W	W
767937	pos.64	W	N	Y	Y	D	W	W	N	Y
767937	pos.65	I	D	Y	D	H	N	W	W	W
767937	pos.66	R	D	Y	A	H	N	W	W	W
767937	pos.67	I	D	Y	N	H	N	D	W	W
767937	pos.68	R	D	Y	D	H	N	Y	W	W

【図 1 4】



【図 1 5】

図15



【図 1 6】

図16

	pos.22	pos.24	pos.26	pos.28	pos.31	pos.33	pos.41	pos.43	pos.45	平均
D	13.8	14.5	13.8	11.6	14.5	10.9	10.1	10.1	13.8	12.6
R	13.0	14.5	9.4	15.9	8.7	15.9	15.9	6.5	14.5	12.7
H	12.3	10.9	10.9	11.6	13.8	13.0	11.6	15.2	16.7	12.9
N	15.9	8.7	12.3	13.0	10.9	8.7	5.1	13.0	9.4	10.8
A	7.2	11.6	10.1	12.3	13.0	19.6	21.7	16.7	16.7	14.3
I	9.4	13.8	15.2	7.2	12.3	8.0	8.7	13.0	12.3	11.1
Y	18.1	11.6	13.8	13.0	7.2	10.1	15.2	11.6	10.9	12.4
W	10.1	14.5	14.5	15.2	19.6	13.8	11.6	13.8	5.8	13.2

10

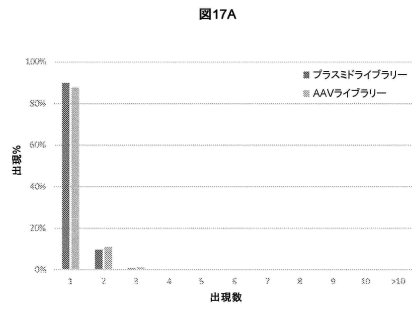
20

30

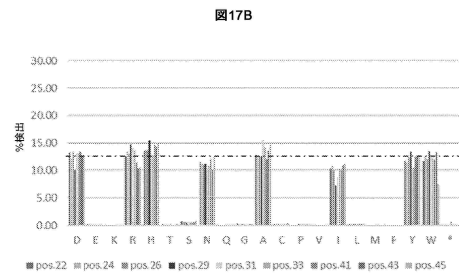
40

50

【図 17-1】

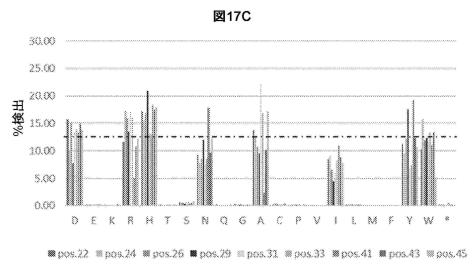


【図 17-2】

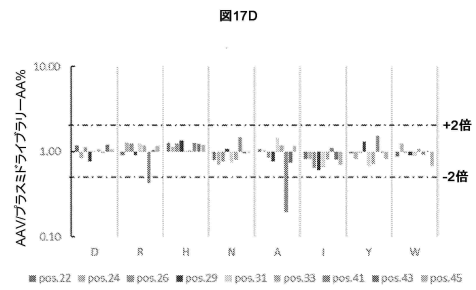


10

【図 17-3】



【図 17-4】



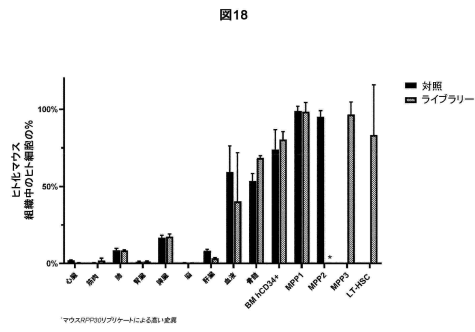
20

30

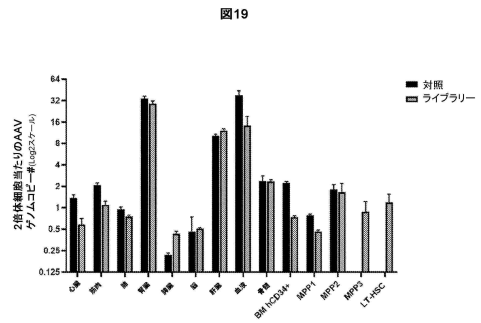
40

50

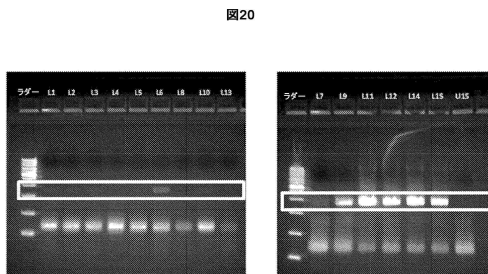
【図 18】



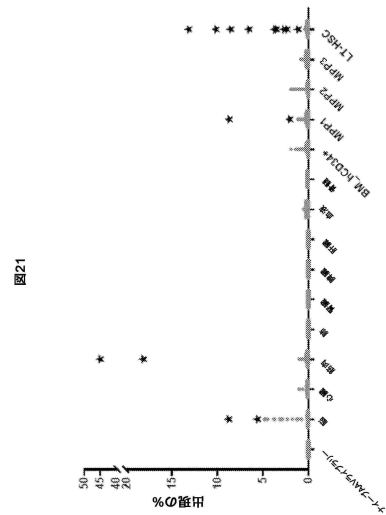
【図 19】



【図 20】



【図 21】

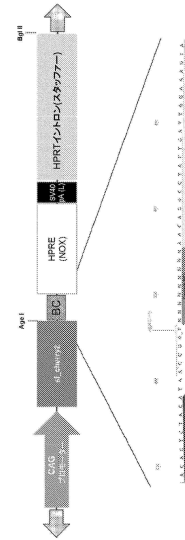


【図 2 2】

【圖 23】

图 22[illegible]

图 23



10

20

【図 24-1】

【圖 24-2】

图24A

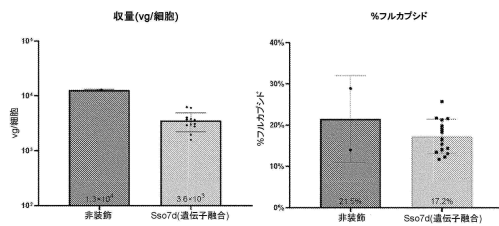
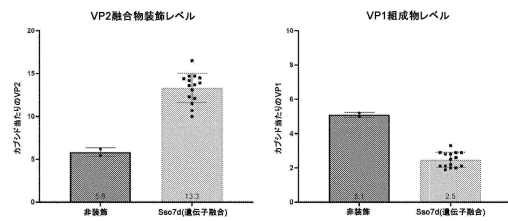


图24B



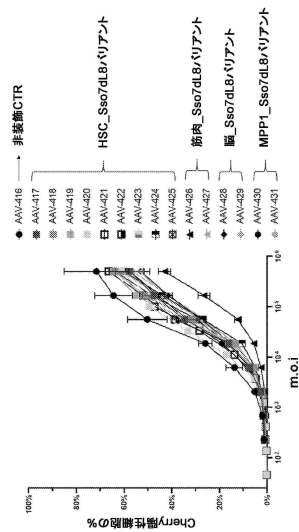
30

40

50

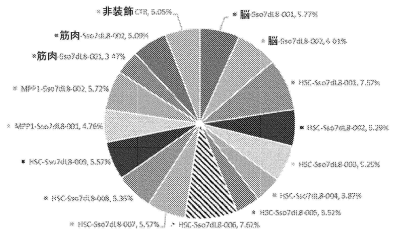
【図 2 5】

図25



【図 2 6】

図26

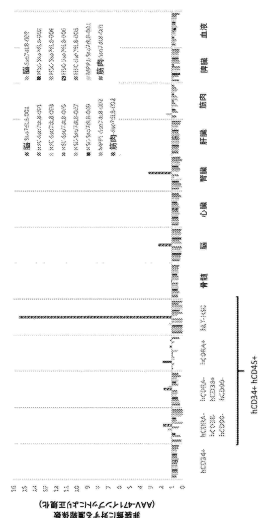


10

20

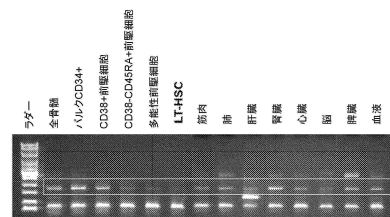
【図 2 7】

図27



【図 2 8】

図28

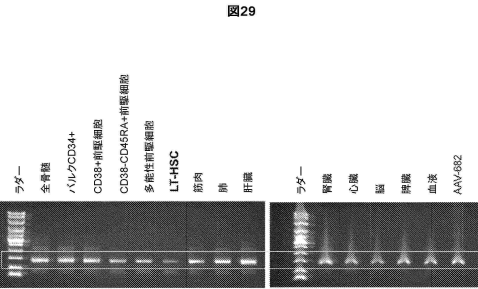


30

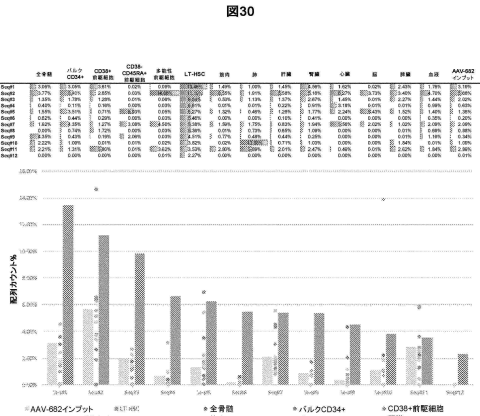
40

50

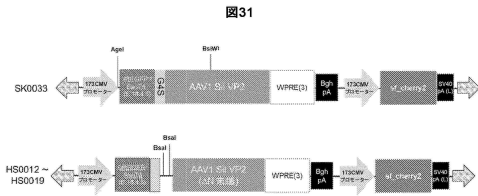
【図 2 9】



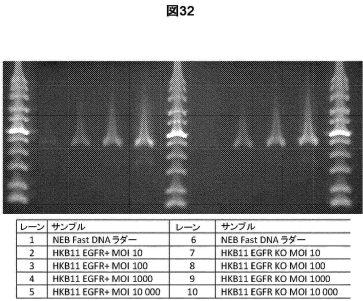
【図 3 0】



【図 3 1】



【図 3 2】



10

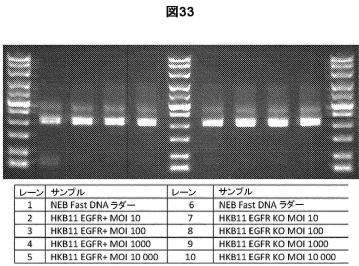
20

30

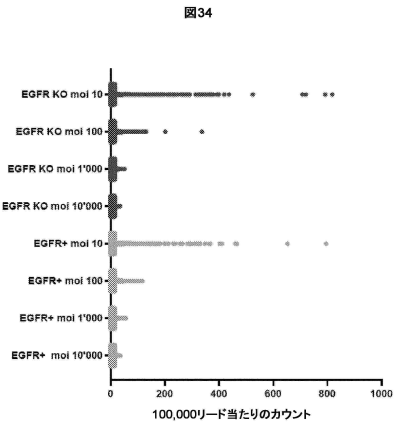
40

50

【図 3 3】

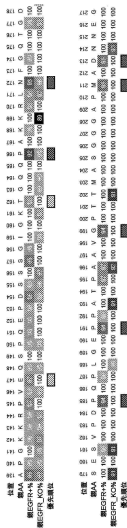


【図 3 4】

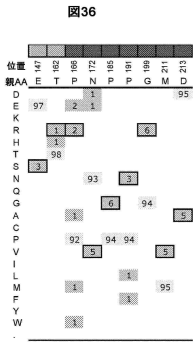


【図 3 5】

図35



【図 3 6】



10

20

30

40

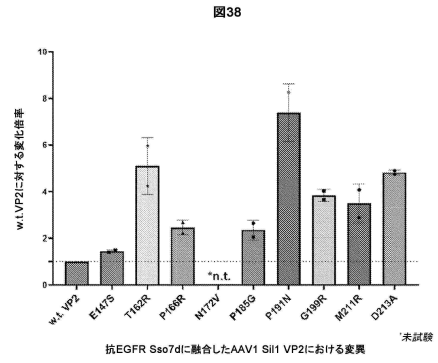
50

【図 3 7】

図37

EGFR +	EGFR KO	リンカ	E147	T162	P188	N172	P185	P191	G199	M211	D213
0.65%	0.00%	(APS)2				V					
0.49%	0.00%	(APS)3		R							
0.41%	0.00%	(APS)2	S								
0.40%	0.00%	(G4S)1	S								
0.35%	0.00%	(APS)2			D						
0.33%	0.00%	(APS)3		R	E						
0.30%	0.00%	(APS)2				G					
0.29%	0.00%	(APS)3		H							
0.24%	0.01%	(APS)5									
0.18%	0.00%	(APS)3						R			
0.18%	0.00%	(G4S)2				G					
0.18%	0.00%	(G4S)3				G					
0.17%	0.00%	(G4S)4	S								
0.16%	0.00%	(G4S)2						V			
0.16%	0.00%	(APS)3						V			
0.15%	0.00%	(G4S)2					N	R			
0.15%	0.00%	(G4S)2									
0.15%	0.00%	(G4S)1				G		R			
0.15%	0.00%	(G4S)1								V	
0.15%	0.00%	(G4S)3						R			
0.14%	0.00%	(G4S)3				G					
0.14%	0.00%	(APS)2			V					V	A
0.14%	0.00%	(G4S)2									
0.14%	0.00%	(G4S)1			V						A
0.14%	0.00%	(APS)3						L			
0.13%	0.00%	(APS)3							R		
0.13%	0.00%	(APS)2			R						
0.13%	0.00%	(G4S)2			H						
0.12%	0.00%	(G4S)1						F			
0.12%	0.00%	(G4S)2				V					
0.12%	0.00%	(G4S)3						N			
0.12%	0.00%	(G4S)1									A
0.12%	0.00%	(G4S)3						N			
0.12%	0.00%	(G4S)3									A
0.11%	0.00%	(G4S)4			A						
0.11%	0.00%	(G4S)4			E						
0.11%	0.00%	(G4S)2			W						
0.10%	0.00%	(G4S)2									

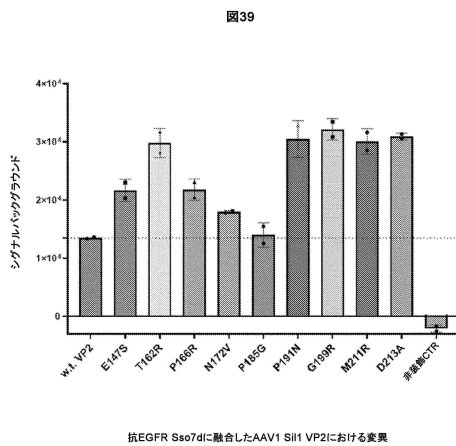
【図 3 8】



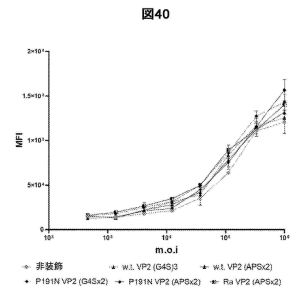
10

20

【図 3 9】



【図 4 0】

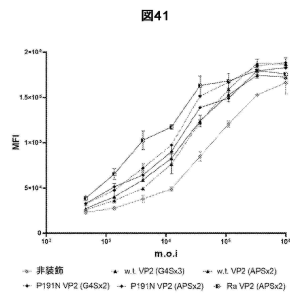


30

40

50

【図 4 1】



10

【配列表】

202551762800001.xml

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和7年1月15日(2025.1.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2025517628000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/054639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6897 C12Q1/70
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WAGNER HANNA J. ET AL: "Synthetic Biology: Emerging Concepts to Design and Advance Adeno-Associated Viral Vectors for Gene Therapy", ADVANCED SCIENCE, vol. 8, no. 9, 26 February 2021 (2021-02-26), page 2004018, XP055945104, ISSN: 2198-3844, DOI: 10.1002/adv.202004018	1, 5-26
Y	abstract, p. 9/22 item 4.2 and Fig. 5	2-4
Y	US 2021/180082 A1 (SCHMIDT DANIEL [US] ET AL) 17 June 2021 (2021-06-17) [0005]-[0009], [0094]	4
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 2023

Date of mailing of the international search report

11/09/2023

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

Authorized officer

Lapopin, Laurence

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/054639

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/030225 A2 (UNIV FLORIDA [US]) 18 February 2021 (2021-02-18) summary of the invention 1 and 10 -----	1-26
Y	WO 2020/231504 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 19 November 2020 (2020-11-19) p. 2 l. 3-22 -----	2, 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/054639

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

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2023/054639

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2021180082 A1	17-06-2021	US 2021180082 A1	17-06-2021
		WO 2019084015 A1	02-05-2019

WO 2021030225 A2	18-02-2021	AU 2020329751 A1	24-02-2022
		CA 3146702 A1	18-02-2021
		EP 4010357 A2	15-06-2022
		JP 2022544237 A	17-10-2022
		US 2022333136 A1	20-10-2022
		WO 2021030225 A2	18-02-2021

WO 2020231504 A1	19-11-2020	US 2020362000 A1	19-11-2020
		WO 2020231504 A1	19-11-2020

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	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 4 0 B	40/08 (2006.01)	C 4 0 B	40/08	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

(72)発明者 エーバースバッハ、ヒルマー

スイス国 シュリーレン 8 9 5 2, ヴァーギシュトラーセ 1 4, イミュノス セラピューティクス アーゲー

(72)発明者 ホセイン、ミール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B065 AA01Y AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA03 AA13 BA03 BA44 NA14
4C086 AA01 AA02 EA16 NA14
4H045 AA10 AA30 BA41 CA01 CA11 EA20 FA74