

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6600624号  
(P6600624)

(45) 発行日 令和1年10月30日(2019. 10. 30)

(24) 登録日 令和1年10月11日(2019. 10. 11)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N</b> 7/01 (2006. 01)	C 1 2 N 7/01 Z N A
<b>C 1 2 N</b> 15/35 (2006. 01)	C 1 2 N 15/35
<b>C 1 2 N</b> 15/864 (2006. 01)	C 1 2 N 15/864 Z
<b>C O 7 K</b> 14/015 (2006. 01)	C O 7 K 14/015
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 20 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-517017 (P2016-517017)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成26年5月29日 (2014. 5. 29)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(65) 公表番号	特表2016-526045 (P2016-526045A)		ティ オブ カリフォルニア
(43) 公表日	平成28年9月1日 (2016. 9. 1)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/040083		607-5200, オークランド, フラン
(87) 国際公開番号	W02014/194132		クリン ストリート 1111, 12番
(87) 国際公開日	平成26年12月4日 (2014. 12. 4)		フロア
審査請求日	平成29年5月26日 (2017. 5. 26)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/829, 735		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成25年5月31日 (2013. 5. 31)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
前置審査		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アデノ随伴ウイルス変異体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 11 または配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス (AAV) カプシドタンパク質、ならびに

(b) 異種核酸

を含み、AAV2 によって示されるヒト中和抗体への耐性と比較して、少なくとも 5 倍高い該抗体への耐性を示す、感染性組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ビリオン。

【請求項 2】

前記 rAAV ビリオンが、AAV2 によって示される耐性よりも少なくとも 10 倍高いヒト中和抗体への耐性を示す、請求項 1 に記載の前記感染性 rAAV ビリオン。

【請求項 3】

前記 rAAV ビリオンが、AAV2 によって示される耐性よりも少なくとも 30 倍高いヒト中和抗体への耐性を示す、請求項 1 に記載の前記感染性 rAAV ビリオン。

【請求項 4】

野生型 AAV 血清型 2 (AAV2) によって示される哺乳類細胞への形質導入と比較して、ヒト中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の前記感染性 rAAV ビリオン。

【請求項 5】

前記哺乳類細胞が、肝臓細胞、膵臓細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞、内皮細胞、また

10

20

は癌細胞である、請求項 4 に記載の前記感染性 r A A V ビリオン。

【請求項 6】

前記幹細胞が、造血幹細胞、造血前駆細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞 (i P S 細胞)、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、脾臓幹細胞、脾臓前駆細胞、筋幹細胞、または網膜幹細胞である、請求項 5 に記載の前記感染性 r A A V ビリオン。

【請求項 7】

前記異種核酸が干渉 R N A を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の前記感染性 r A A V ビリオン。

【請求項 8】

前記異種核酸が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の前記感染性 r A A V ビリオン。

【請求項 9】

配列番号 1 1 または配列番号 1 2 に記載されるアミノ酸配列を含む変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、該コードされた変異体 A A V カプシドタンパク質が、A A V 2 によって示されるヒト抗体による中和への耐性と比較して、少なくとも 5 倍上昇した、該抗体による中和への耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンに与える、単離核酸。

【請求項 1 0】

請求項 9 に記載の前記核酸を含む、単離宿主細胞。

【請求項 1 1】

前記核酸で安定的にトランスフェクトされる、請求項 1 0 に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項 1 2】

A A V r e p タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸をさらに含む、請求項 1 0 または 1 1 に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項 1 3】

組換え A A V ベクターをさらに含む、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンを含む、遺伝子産物の送達剤。

【請求項 1 5】

前記異種核酸が干渉 R N A を含む、請求項 1 4 に記載の前記送達剤。

【請求項 1 6】

前記異種核酸がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 4 に記載の前記送達剤。

【請求項 1 7】

配列番号 1 1 または配列番号 1 2 に記載されるアミノ酸配列を含み、A A V 2 によって示されるヒト抗体による中和への耐性と比較して、少なくとも 5 倍上昇した、該抗体による中和への耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルスビリオンに与える、変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質。

【請求項 1 8】

前記上昇した耐性が、A A V 2 によって示される耐性よりも少なくとも 1 0 倍高い、請求項 1 7 に記載の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 1 9】

前記上昇した耐性が、A A V 2 によって示される耐性よりも少なくとも 3 0 倍高い、請求項 1 7 に記載の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

【請求項 2 0】

A A V 2 によって示される形質導入と比較して、ヒト中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオンに

10

20

30

40

50

与える、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2013年5月31日に提出された米国特許仮出願第61/829,735号の利益を主張し、この出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府委託研究に関する声明

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号HL081527の下で、政府の支持を伴ってなされた。政府は本発明においてある特定の権利を有する。

【0003】

テキストファイルとして提供される配列表の参照による組み込み

配列表は、2014年5月28日に作成され、169KBのサイズを有する「BERK-216WO\_ST25.txt」というテキストファイルとして、本明細書とともに提供される。本テキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

導入

アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づく遺伝子送達ベクターは、前臨床疾患モデル、及び最近ではいくつかの疾患標的についてのヒト臨床試験の両方において、有望性を実証している。野生型AAVは非病原性であり、かついずれの既知の疾患とも病因的関連性を有しないため、AAVに基づくベクターは最高に安全である。さらに、AAVは、肝臓、筋肉、肺、網膜、及び脳を含む多くの組織における、高度に効率的な遺伝子送達及び持続的な導入遺伝子発現の能力を提供する。

【0005】

AAVは、2つのオープンリーディングフレーム、rep及びcapを含有する、1本鎖DNAウイルスである。第1の遺伝子は、ゲノム複製に必要な4つのタンパク質(Rep78、Rep68、Rep52、及びRep40)をコードし、第2の遺伝子は、集合してウイルス性カプシドを形成する3つの構造タンパク質(VP1~3)を発現する。その名が暗示するように、AAVは、活発な複製のために、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスの存在に依存する。ヘルパーの不在下では、AAVは、そのゲノムがエピソームとして維持されるまたは宿主染色体に統合される、潜伏状態を確立する。複数の同種霊長類AAV血清型及び多数の非ヒト霊長類型が特定されている。AAV2は、遺伝子送達ビヒクルとして最もよく特徴がわかっている。

【0006】

2010年時点で、AAVを遺伝子送達ビヒクルとして使用した、75件の進行中臨床試験があった。しかしながら、ヒト母集団内での多数のAAV変異体及び血清型への広範囲にわたる曝露に起因する、抗カプシド中和抗体の高い保有率が、AAV遺伝子療法の効能を低減させる。この既存の免疫、ならびにベクター投与に起因する後続の免疫発達は、AAV遺伝子療法のより広い実施を妨げ得る。例えば、現在までで、AAVは免疫特権領域への送達を含む臨床研究において最も成功してきている。

【0007】

近年の分析は、ヒトにおける抗AAV IgG抗体の保有率は、AAV2(72%)及びAAV1(67%)について最も高いが、AAV9(47%)、AAV6(46%)、AAV5(40%)、及びAAV8(38%)抗体もまた研究された母集団の大部分において存在したことを示した。いくつかの研究は、遺伝子療法中のAAVカプシドへの液性免疫が、送達されるrAAV粒子の量を低下させることによって防止され得ることを見出

10

20

30

40

50

した。残念ながら、低いベクター用量の投与は、低い形質導入、ひいては低い治療的遺伝子発現をもたらす。

#### 【0008】

当該技術分野において、抗AAV抗体による中和に耐性である新規AAV変異体の開発の必要性がある。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

【非特許文献1】Asuri et al., Mol Ther. 2012 Feb; 20(2): 329-38

10

【非特許文献2】Bainbridge et al., N Engl J Med. 2008 May 22; 358(21): 2231-9

【非特許文献3】Excoffon et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 10; 106(10): 3865-70

【非特許文献4】Grimm et al., J Virol. 2008 Jun; 82(12): 5887-911

【非特許文献5】Jang et al., Mol Ther. 2011 Apr; 19(4): 667-75

【非特許文献6】Klimczak et al., PLoS One. 2009 Oct 14; 4(10): e7467

20

【非特許文献7】Koerber et al.; Mol Ther. 2008 Oct; 16(10): 1703-9

【非特許文献8】Koerber et al.; Mol Ther. 2009 Dec; 17(12): 2088-95

【非特許文献9】Maguire et al., N Engl J Med. 2008 May 22; 358(21): 2240-8

【非特許文献10】Maguire et al., Lancet. 2009 Nov 7; 374(9701): 1597-605

【非特許文献11】Maheshri et al., Nat Biotechnol. 2006 Feb; 24(2): 198-204

30

【非特許文献12】Perabo et al., J Gene Med. 2006 Feb; 8(2): 155-62

【非特許文献13】Yang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 10; 106(10): 3946-51

#### 【特許文献】

#### 【0010】

【特許文献1】WO2012145601号

【特許文献2】米国特許公開第US20050053922号

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

40

#### 概要

本開示は、変異体カプシドタンパク質及び異種核酸を含む、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンを提供する。本開示は、感染性rAAVビリオンに、ヒトAAV中和抗体への上昇した耐性を与える、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質(及び/または変異体AAVカプシドタンパク質をコードする核酸)をさらに提供する。本開示は、感染性rAAVビリオン及び/または主題の変異体AAVカプシドタンパク質をコードする核酸を含む、宿主細胞をさらに提供する。本開示は、上記のビリオン、カプシドタンパク質、核酸、及び/または宿主細胞のライブラリをさらに提供し、このライブラリの少なくとも1つのメンバーの変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号10~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と比べて、少なく

50

とも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

【0012】

本開示は、異種核酸を標的細胞に送達する方法をさらに提供し、この標的細胞は主題の感染性rAAVビリオンに接触させられる。本開示は、遺伝子産物を個体に送達する方法をさらに提供し、該方法は概して、有効量の主題のrAAVビリオンを、それを必要とする個体に投与することを含む。本明細書には、主題の方法を実践するための組成物及びキットもまた提供される。

【0013】

特徴

本開示の特徴は、(a)配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質、ならびに(b)異種核酸を含む、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンを含む。いくつかの場合では、変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0014】

本開示の特徴は、(a)配列番号10に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、配列番号2と比べてアミノ酸置換N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質、ならびに(b)異種核酸を含む、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンを含む。いくつかの場合では、変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、rAAVは、AAV2(野生型AAV血清型2)によって示される耐性と比較して、ヒトAAV中和抗体への上昇した耐性を示す。いくつかの場合では、rAAVは、AAV2によって示される耐性よりも、ヒトAAV中和抗体への少なくとも約1.5倍(例えば、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約30倍等)高い耐性を示す。いくつかの場合では、rAAVは、野生型AAV血清型2(AAV2)によって示される哺乳類細胞への形質導入と比較して、ヒトAAV中和抗体の存在下で、哺乳類細胞への増加した形質導入を示す。いくつかの場合では、哺乳類細胞は、肝臓細胞、膵臓細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞(例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、膵臓前駆細胞、筋幹細胞、網膜幹細胞等)、内皮細胞、または癌細胞である。いくつかの場合では、異種核酸は、RNA干渉剤を含む。いくつかの場合では、異種核酸はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0015】

本開示の特徴は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸を含む。いくつかの場合では、コードされた変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、コードされた変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0016】

本開示の特徴は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2と比べてアミノ酸置換N3

10

20

30

40

50

12K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸を含む。

【0017】

いくつかの場合では、コードされた変異体AAVカプシドタンパク質(単離核酸によってコードされた)は、AAV2(野生型AAV血清型2)によって示される耐性と比較して、ヒトAAV中和抗体への上昇した耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンに与える。いくつかの場合では、上昇した耐性は、AAV2によって示される耐性よりも、少なくとも約1.5倍(例えば、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約30倍等)高い。いくつかの場合では、コードされた変異体AAVカプシドタンパク質(単離核酸によってコードされた)は、AAV2によって示される形質導入と比較して、ヒトAAV中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオンに与える。

【0018】

本開示の特徴は、上記の主題の核酸を含む単離宿主細胞を含む。いくつかの場合では、宿主細胞が該核酸で安定的にトランスフェクトされる。いくつかの場合では、宿主細胞は、AAVrepタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸をさらに含む。いくつかの場合では、宿主細胞は組換えAAVベクターをさらに含む。

【0019】

本開示の特徴は、標的細胞を主題のビリオン(上記)に接触させることを含む、異種核酸を標的細胞に送達する方法を含む。いくつかの場合では、標的細胞は、肝臓細胞、膵臓細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞(例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、膵臓前駆細胞、筋幹細胞、もしくは網膜幹細胞等)、内皮細胞、または癌細胞である。いくつかの場合では、標的細胞はインビトロである。いくつかの場合では、標的細胞はインビボである。

【0020】

本開示の特徴は、遺伝子産物を、それを必要とする個体に送達する方法を含み、該方法は、個体に有効量の主題の感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ビリオン(上記)を投与することを含む。いくつかの場合では、rAAVビリオンの異種核酸はRNA干渉剤を含む。いくつかの場合では、rAAVビリオンの異種核酸は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの場合では、投与ステップは感染性rAAVビリオンの間接的送達を含む。いくつかの場合では、投与ステップは感染性rAAVビリオンの直接的送達を含む。

【0021】

本開示の特徴は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質を含む。いくつかの場合では、AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、AAVカプシドタンパク質は、配列番号11~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0022】

本開示の特徴は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2と比べてアミノ酸置換N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質を含む。いくつかの場合では、変異体AAVカプシドタンパク質は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、変異体AAVカプシドタンパク質は、AAV2によって示される耐性と

10

20

30

40

50

比較して、ヒト A A V 中和抗体への上昇した耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ビリオンに与える。いくつかの場合では、上昇した耐性は、A A V 2 によって示される耐性よりも、少なくとも約 1 . 5 倍 ( 例えば少なくとも約 3 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 1 0 倍、少なくとも約 3 0 倍等 ) 高い。いくつかの場合では、変異体 A A V カプシドタンパク質は、A A V 2 によって示される形質導入と比較して、ヒト A A V 中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ビリオンに与える。

#### 【 0 0 2 3 】

本開示の特徴は、( i ) それぞれが変異体アデノ随伴ウイルス ( A A V ) カプシドタンパク質及び異種核酸を含む、2 つ以上の感染性 r A A V ビリオン、( i i ) それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、2 つ以上の単離核酸、( i i i ) それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、2 つ以上の宿主細胞、及び ( i v ) 2 つ以上の変異体 A A V カプシドタンパク質、のうちの少なくとも 1 つを含むライブラリを含み、このライブラリの少なくとも 1 つのメンバーの変異体 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 1 0 ~ 1 3 及び 2 6 ~ 3 3 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

本開示の特徴は、スターターカプシドタンパク質を含むスターター ( 親 ) ビリオンと比べて変化した感染特性を示す、改変感染性 r A A V ビリオンを生成及び特定する方法を含み、該方法は、( a ) スターターカプシドタンパク質から変異体アデノ随伴ウイルス ( A A V ) カプシドタンパク質を生成するステップであって、このスターターカプシドタンパク質が配列番号 1 0 ~ 1 3 及び 2 6 ~ 3 3 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含み、かつそれぞれの変異体 A A V カプシドタンパク質がスターターカプシドタンパク質と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、ステップと、( b ) それぞれがステップ ( a ) で生成された変異体カプシド A A V タンパク質を含む、変異体 A A V ビリオンを生成するステップと、( c ) ステップ ( b ) で生成された変異体 A A V ビリオンを変化した感染特性についてアッセイして、改変感染性 r A A V ビリオンを特定するステップと、を含む。いくつかの場合では、変異体 A A V カプシドタンパク質のライブラリの生成は、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループスワップ突然変異誘発、断片シャフリング突然変異誘発、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、突然変異誘発方法を含む。いくつかの場合では、変化した感染特性は、ヒト中和 A A V 抗体への、スタータービリオンによって示される耐性と比較して上昇した耐性である。いくつかの場合では、変化した感染特性は、ヒト A A V 中和抗体の存在下での哺乳類細胞の、スタータービリオンによって示される形質導入と比較して増加した形質導入である。いくつかの場合では、改変感染性 r A A V ビリオンは、スターターカプシドタンパク質と少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、改変 A A V カプシドタンパク質を含む。

#### 【 0 0 2 5 】

本開示の特徴は、スターターカプシドタンパク質から変異体 A A V カプシドタンパク質を生成する方法を含み、該方法は、スターターカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループスワップ突然変異誘発、断片シャフリング突然変異誘発、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される種類の突然変異誘発に供することを含み、このスターターカプシドタンパク質は、配列番号 1 0 ~ 1 3 及び 2 6 ~ 3 3 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

#### [ 本発明 1001 ]

( a ) 配列番号 11 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸 203 ~ 736 と少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス ( A A V ) カプシドタンパク質、ならびに

10

20

30

40

50

(b) 異種核酸

を含む、感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオン。

[本発明1002]

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1001の前記感染性 r A A V。

[本発明1003]

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む、本発明1001の前記感染性 r A A V。

[本発明1004]

(a) 配列番号10に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2と比べてアミノ酸置換 N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドタンパク質、ならびに

(b) 異種核酸

を含む、感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオン。

[本発明1005]

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が配列番号10に記載されるアミノ酸配列を含む、本発明1004の前記感染性 r A A V。

[本発明1006]

A A V2 (野生型 A A V 血清型2) によって示される耐性と比較して、ヒト A A V 中和抗体への上昇した耐性を示す、本発明1001または本発明1004の前記感染性 r A A V。

[本発明1007]

前記 r A A V ビリオンが、A A V2 によって示される耐性よりも少なくとも約1.5倍高いヒト A A V 中和抗体への耐性を示す、本発明1006の前記感染性 r A A V。

[本発明1008]

前記 r A A V ビリオンが、A A V2 によって示される耐性よりも少なくとも約3倍高いヒト A A V 中和抗体への耐性を示す、本発明1006の前記感染性 r A A V。

[本発明1009]

前記 r A A V ビリオンが、A A V2 によって示される耐性よりも少なくとも約5倍高いヒト A A V 中和抗体への耐性を示す、本発明1006の前記感染性 r A A V。

[本発明1010]

前記 r A A V ビリオンが、A A V2 によって示される耐性よりも少なくとも約10倍高いヒト A A V 中和抗体への耐性を示す、本発明1006の前記感染性 r A A V。

[本発明1011]

前記 r A A V ビリオンが、A A V2 によって示される耐性よりも少なくとも約30倍高いヒト A A V 中和抗体への耐性を示す、本発明1006の前記感染性 r A A V。

[本発明1012]

野生型 A A V 血清型2 (A A V2) によって示される哺乳類細胞への形質導入と比較して、ヒト A A V 中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を示す、本発明1001または1004の前記感染性 r A A V。

[本発明1013]

前記哺乳類細胞が、肝臓細胞、膵臓細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞、内皮細胞、または癌細胞である、本発明1012の前記感染性 r A A V。

[本発明1014]

前記幹細胞が、造血幹細胞、造血前駆細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞 (i P S 細胞)、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、膵臓前駆細胞、筋幹細胞、または網膜幹細胞である、本発明1013の前記感染性 r A A V。

10

20

30

40

50



[本発明1015]

前記異種核酸がRNA干渉剤を含む、本発明1001または本発明1004の前記感染性rAAV。

[本発明1016]

前記異種核酸が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本発明1001または本発明1004の前記感染性rAAV。

[本発明1017]

配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸。

10

[本発明1018]

前記コードされた変異体AAVカプシドタンパク質が、配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1017の前記単離核酸。

[本発明1019]

前記コードされた変異体AAVカプシドタンパク質が、配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む、本発明1017の前記単離核酸。

[本発明1020]

配列番号10に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2と比べてアミノ酸置換N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス(AAV)カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸。

20

[本発明1021]

前記コードされた変異体AAVカプシドタンパク質が、AAV2(野生型AAV血清型2)によって示される耐性と比較して、ヒトAAV中和抗体への上昇した耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ピリオンに与える、本発明1017または本発明1020の前記単離核酸。

[本発明1022]

前記上昇した耐性が、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約1.5倍高い、本発明1021の前記単離核酸。

30

[本発明1023]

前記上昇した耐性が、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約3倍高い、本発明1021の前記単離核酸。

[本発明1024]

前記上昇した耐性が、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約5倍高い、本発明1021の前記単離核酸。

[本発明1025]

前記上昇した耐性が、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約10倍高い、本発明1021の前記単離核酸。

40

[本発明1026]

前記上昇した耐性が、AAV2によって示される耐性よりも少なくとも約30倍高い、本発明1021の前記単離核酸。

[本発明1027]

前記変異体AAVカプシドタンパク質が、AAV2(野生型AAV血清型2)によって示される形質導入と比較して、ヒトAAV中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ピリオンに与える、本発明1017または1020の前記単離核酸。

[本発明1028]

50

本発明1017の前記核酸を含む、単離宿主細胞。

[本発明1029]

本発明1020の前記核酸を含む、単離宿主細胞。

[本発明1030]

前記核酸で安定的にトランスフェクトされる、本発明1028または本発明1029の前記単離宿主細胞。

[本発明1031]

A A V r e p タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸をさらに含む、本発明1028または本発明1029の前記単離宿主細胞。

[本発明1032]

組換え A A V ベクターをさらに含む、本発明1028または本発明1029の前記単離宿主細胞。

[本発明1033]

標的細胞を本発明1001または本発明1004のビリオンに接触させることを含む、異種核酸を前記標的細胞に送達する方法。

[本発明1034]

前記標的細胞が、肝臓細胞、膵臓細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞、内皮細胞、または癌細胞である、本発明1033の前記方法。

[本発明1035]

前記幹細胞が、造血幹細胞、造血前駆細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞 ( i P S 細胞 )、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、膵臓前駆細胞、筋幹細胞、または網膜幹細胞である、本発明1034の前記方法。

[本発明1036]

前記標的細胞がインビトロである、本発明1033の前記方法。

[本発明1037]

前記標的細胞がインビボである、本発明1033の前記方法。

[本発明1038]

個体に、有効量の本発明1001または本発明1004の感染性組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ビリオンを投与するステップを含む、遺伝子産物を、それを必要とする前記個体に送達する方法。

[本発明1039]

前記異種核酸が R N A 干渉剤を含む、本発明1038の前記方法。

[本発明1040]

前記異種核酸がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本発明1038の前記方法。

[本発明1041]

前記投与ステップが前記感染性 r A A V ビリオンの間接的送達を含む、本発明1038の前記方法。

[本発明1042]

前記投与ステップが前記感染性 r A A V ビリオンの直接的送達を含む、本発明1038の前記方法。

[本発明1043]

配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、変異体アデノ随伴ウイルス ( A A V ) カプシドタンパク質。

[本発明1044]

配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1043の前

10

20

30

40

50

記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1045]

配列番号11～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む、本発明1043の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1046]

配列番号10に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203～736と少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号2と比べてアミノ酸置換 N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Qを含む、変異体アデノ随伴ウイルス(A A V)カプシドタンパク質。

[本発明1047]

配列番号10に記載される前記アミノ酸配列を含む、本発明1046の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1048]

前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、A A V2(野生型 A A V 血清型2)によって示される耐性と比較して、ヒト A A V 中和抗体への上昇した耐性を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ピリオンに与える、本発明1043または本発明1046の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1049]

前記上昇した耐性が、A A V2によって示される耐性よりも少なくとも約1.5倍高い、本発明1048の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1050]

前記上昇した耐性が、A A V2によって示される耐性よりも少なくとも約3倍高い、本発明1048の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1051]

前記上昇した耐性が、A A V2によって示される耐性よりも少なくとも約5倍高い、本発明1048の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1052]

前記上昇した耐性が、A A V2によって示される耐性よりも少なくとも約10倍高い、本発明1048の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1053]

前記上昇した耐性が、A A V2によって示される耐性よりも少なくとも約30倍高い、本発明1048の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1054]

A A V2(野生型 A A V 血清型2)によって示される形質導入と比較して、ヒト A A V 中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入を、感染性組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ピリオンに与える、本発明1043または本発明1046の前記変異体 A A V カプシドタンパク質。

[本発明1055]

(i)それぞれが変異体アデノ随伴ウイルス(A A V)カプシドタンパク質及び異種核酸を含む、2つ以上の感染性 r A A V ピリオン、

(ii)それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、2つ以上の単離核酸、

(iii)それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、2つ以上の宿主細胞、ならびに

(iv)2つ以上の変異体 A A V カプシドタンパク質のうちの少なくとも1つを含むライブラリであって、

前記ライブラリの少なくとも1つのメンバーの前記変異体 A A V カプシドタンパク質が、配列番号10～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、前記ライブラリ。

[本発明1056]

10

20

30

40

50

スターターカプシドタンパク質を含むスタータービリオンと比べて変化した感染特性を示す、改変感染性組換えアデノ随伴ウイルス（r A A V）ビリオンを生成及び特定する方法であって、

（a）前記スターターカプシドタンパク質から変異体アデノ随伴ウイルス（A A V）カプシドタンパク質を生成するステップであって、前記スターターカプシドタンパク質が配列番号10～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含み、かつそれぞれの変異体A A Vカプシドタンパク質が前記スターターカプシドタンパク質と比べて少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、ステップと、

（b）それぞれがステップ（a）で生成された変異体カプシドA A Vタンパク質を含む、変異体A A Vビリオンを生成するステップと、

（c）ステップ（b）で生成された変異体A A Vビリオンを変化した感染特性についてアッセイして、前記改変感染性r A A Vビリオンを特定するステップとを含む、前記方法。

[本発明1057]

変異体A A Vカプシドタンパク質の前記ライブラリの生成が、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループスワップ突然変異誘発、断片シャフリング突然変異誘発、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される突然変異誘発方法を含む、本発明1056の前記方法。

[本発明1058]

前記変化した感染特性が、前記スタータービリオンによって示される耐性と比較して、ヒト中和A A V抗体への上昇した耐性である、本発明1056の前記方法。

[本発明1059]

前記変化した感染特性が、前記スタータービリオンによって示される形質導入と比較して、ヒトA A V中和抗体の存在下における哺乳類細胞への増加した形質導入である、本発明1056の前記方法。

[本発明1060]

改変感染性r A A Vビリオンが、前記スターターカプシドタンパク質と少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変A A Vカプシドタンパク質を含む、本発明1056の前記方法。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1 A～Bは、増強された抗体回避のためのA A Vの定向進化を示す。

【図2 A】ヒトI V I Gを使用した抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。

【図2 B】ヒトI V I Gを使用した抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。

【図3 A】A A Vに対する高い中和抗体価の存在に起因して血友病B臨床試験から除外された個人から得られたヒト血清を使用した、抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。

【図3 B】A A Vに対する高い中和抗体価の存在に起因して血友病B臨床試験から除外された個人から得られたヒト血清を使用した、抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。

【図3 C】A A Vに対する高い中和抗体価の存在に起因して血友病B臨床試験から除外された個人から得られたヒト血清を使用した、抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。

【図4】図4 A～Bは、ループスワップ/シャッフル及び飽和突然変異誘発クローンのアミノ酸配列を示す。

【図5】A A V変異体のインビトロ向性を実証する。

【図6】図6 A～Bは、新規A A V変異体のインビボの局在化及び中和を示す。

【図7】図7 A～Dは、ヒト抗体回避体の生成を実証する。

【図8 A】A A V 1～9の野生型カプシドタンパク質配列（配列番号1～9）と整列させたシャッフル100-1のカプシドタンパク質配列（配列番号11）を示す。

【図8 B】A A V 1～9の野生型カプシドタンパク質配列（配列番号1～9）と整列させたシャッフル100-1のカプシドタンパク質配列（配列番号11）を示す。

【図8 C】A A V 1～9の野生型カプシドタンパク質配列（配列番号1～9）と整列させ

10

20

30

40

50

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0027】

## 定義

アデノ随伴ウイルスは、無エンベロープ正二十面体カプシド内の、4.7kbの1本鎖DNAゲノムで構成される、非病原性パルボウイルスである。「AAV」はアデノ随伴ウイルスの短縮形であり、ウイルス自体またはその誘導体を指すために使用され得る。該ゲノムは、複製及びパッケージングシグナルのウイルス起源として機能する逆位末端配列( ITR )が隣接する3つのオープンリーディングフレーム( ORF )を含有する。rep ORFは、ウイルス複製、転写制御、部位特異的統合、及びビリオン集合において役割を果たす、4つの非構造タンパク質をコードする。cap ORFは、集合して60量体ウイルス性カプシドを形成する3つの構造タンパク質( VP1~3 )をコードする。最後に、cap遺伝子内の代替リーディングフレームとして存在するORFは、AAVカプシドタンパク質を核小体に局在化させ、かつカプシド集合プロセスにおいて機能するウイルス性タンパク質である、集合活性化タンパク質( AAP )を生成する。

## 【0028】

いくつかの自然発生の血清型及び100を超えるAAVの変異体があり、これらのそれぞれは、特にカプシドタンパク質の超可変領域内で、アミノ酸配列が異なり、ひいてはその遺伝子送達特性も異なる。どのAAVもヒト疾患と関連付けられておらず、組換えAAVを臨床応用に魅力的にしている。

## 【0029】

本明細書で使用される場合、用語「AAV」は、別途必要とされる場合を除き、全ての亜型ならびに自然発生及び組換え形態の両方を網羅する。用語「AAV」は、AAV型1( AAV-1またはAAV1 )、AAV型2( AAV-2またはAAV2 )、AAV型3( AAV-3またはAAV3 )、AAV型4( AAV-4またはAAV4 )、AAV型5( AAV-5またはAAV5 )、AAV型6( AAV-6またはAAV6 )、AAV型7( AAV-7またはAAV7 )、AAV型8( AAV-8またはAAV8 )、AAV型9( AAV-9またはAAV9 )、鳥類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」は非霊長類哺乳類に感染するAAVを指し、「ウシAAV」はウシ科哺乳類に感染するAAVを指し、以下同様である。

## 【0030】

AAVの様々な血清型のゲノム配列、ならびにネイティブ末端配列( TR )の配列、Repタンパク質、及びカプシドサブユニットは、当業者に既知である。かかる配列は、文献またはGenBank等の公共データベースにおいて見出され得る。例えば、GenBank受託番号NC\_002077.1( AAV-1 )、AF063497.1( AAV-1 )、NC\_001401.2( AAV-2 )、AF043303.1( AAV-2 )、J01901.1( AAV-2 )、U48704.1( AAV-3 )、NC\_001729.1( AAV-3 )、NC\_001829.1( AAV-4 )、U89790.1( AAV-4 )、NC\_006152.1( AAV-5 )、AF085716.1( AAV-5 )、AF028704.1( AAV-6 )、NC\_006260.1( AAV-7 )、AF513851.1( AAV-7 )、AF513852.1( AAV-8 )、NC\_006261.1( AAV-8 )、及びAY530579.1( AAV-9 )を参照されたく、これらの開示は、AAV核酸及びアミノ酸配列を教示するために、参照により本明細書に組み込まれる。例えば、Srivistava 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. Virology 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、国際特許公開第WO00/28061号、WO99/61601号、WO98/11244号、及び米国特許第6,156,303号もまた参照されたい。

【0031】

AAV血清型と関連付けられる、自然に存在するcap(カプシド)タンパク質の配列は当業者に既知であり、AAV1(配列番号1)、AAV2(配列番号2)、AAV3(配列番号3)、AAV4(配列番号4)、AAV5(配列番号5)、AAV6(配列番号6)、AAV7(配列番号7)、AAV8(配列番号8)、及びAAV9(配列番号9)を含む。「変異体AAVカプシドタンパク質」という用語は、配列番号1~9に記載される自然に存在するAAVカプシドタンパク質配列のうちの1つと比べて少なくとも1つの置換(欠失、挿入等を含む)を含むアミノ酸配列を含む、AAVカプシドタンパク質である。

10

【0032】

「AAVビリオン」または「AAVウイルス粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質及びカプシド形成したAAVポリヌクレオチドで構成されるウイルス粒子を指す。

【0033】

ポリヌクレオチドに適用される場合「組換え」は、そのポリヌクレオチドが、クローニング、制限、またはライゲーションステップ、及び自然界で見出されるポリヌクレオチドとは異なる構築物をもたらす他の手順の、様々な組み合わせの産物であることを意味する。組換えウイルスは、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。これらの用語は、それぞれ、元来のポリヌクレオチド構築物の複製物及び元来のウイルス構築物の子孫を含む。

20

【0034】

AAVビリオンが異種ポリヌクレオチド(すなわち、野生型AAVゲノム以外のポリヌクレオチド、例えば標的細胞に送達される導入遺伝子、標的細胞に送達されるRNAiまたはCRISPR剤等)を含む場合、これは典型的に「組換えAAV(rAAV)ビリオン」または「rAAVウイルス粒子」と称される。概して、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つ、及び概して2つのAAV逆位末端配列(ITR)に隣接する。

30

【0035】

「rAAVベクター」という用語は、定義によりrAAVポリヌクレオチドを含むrAAVビリオン(すなわちrAAVウイルス粒子)(例えば感染性rAAVビリオン)を包含し、かつ、rAAVをコードするポリヌクレオチド(例えばrAAVをコードする1本鎖ポリヌクレオチド(ss-rAAV)、rAAVをコードする2本鎖ポリヌクレオチド(ds-rAAV)、例えばrAAVをコードするプラスミド等)もまた包含する。

【0036】

「パッケージング」は、AAV粒子の集合及びカプシド形成をもたらす、一連の細胞内事象を指す。

【0037】

AAV「rep」及び「cap」遺伝子は、アデノ随伴ウイルスの複製及びカプシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。AAV rep及びcapは、本明細書でAAV「パッケージング遺伝子」と称される。

40

【0038】

AAVの「ヘルパーウイルス」は、AAV(例えば野生型AAV)が哺乳類細胞によって複製及びパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。AAVの様々なかかるヘルパーウイルスは当業者に既知であり、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、及びワクシニア等のボックスウイルスを含む。サブグループCのアデノウイルス型5が最も一般的に使用されるものの、アデノウイルスは多数の異なるサブグループを包含する。ヒト、非ヒト哺乳類、及び鳥類由来の多数のアデノウイルスが既知であり、ATCC等の保管所

50

から入手可能である。ヘルペスファミリーのウイルスは、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）及びエプスタインバーウイルス（EBV）、ならびにサイトメガロウイルス（CMV）及び仮性狂犬病ウイルス（PRV）を含み、これらもまたATCC等の保管所から入手可能である。

#### 【0039】

「ヘルパーウイルス機能（複数可）」は、AAV複製及びパッケージを可能にする（本明細書に記載される、複製及びパッケージングのための他の要件と合わせて）、ヘルパーウイルスゲノム内にコードされる機能（複数可）を指す。本明細書に記載されるように、「ヘルパーウイルス機能」は、トランスで生成細胞にヘルパーウイルスを提供すること、または、例えば必要な機能（複数可）をコードするポリヌクレオチド配列を提供することを含む、多数の方法で提供され得る。例えば、1つ以上のアデノウイルス性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドまたは他の発現ベクターは、rAAVベクターと共に生成細胞中にトランスフェクトされる。

#### 【0040】

「感染性」ウイルスまたはウイルス粒子は、有能に集合したウイルス性カプシドを含むものであり、ポリヌクレオチド成分を、そのウイルス性種が向性である細胞に送達することができる。この用語は必ずしもウイルスの任意の複製能力を暗示しない。感染性ウイルス粒子を計数するためのアッセイは、本開示他の箇所及び当該技術分野において記載される。ウイルス性感染力は、感染性ウイルス粒子の、合計ウイルス粒子に対する比率として表すことができる。感染性ウイルス粒子の合計ウイルス粒子に対する比率を決定する方法は、当業者に既知である。例えばGrainger et al. (2005) Mol. Ther. 11: S337 (TCID50感染性力価アッセイを記載)、及びZolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6: 973を参照されたい。実施例もまた参照されたい。

#### 【0041】

「向性」という用語は、本明細書で使用される場合、ウイルス（例えばAAV）による宿主種内の特異的宿主種または特異的細胞種の優先的標的化を指す。例えば、心臓、肺、肝臓、及び筋肉の細胞を感染させることができるウイルスは、肺及び筋細胞のみを感染させることができるウイルスに比べて、より広い（すなわち増加した）向性を有する。向性は、宿主の特定の種類の細胞表面分子への、ウイルスの依存性もまた含むことができる。例えば、いくつかのウイルスは、表面グリコサミノグリカン（糖タンパク質）を有する細胞のみを感染させることができ、一方で他のウイルスはシアル酸を有する細胞のみを感染させることができる（かかる依存性は、ウイルス性感染の潜在的宿主細胞として特定のクラスの分子が欠損した様々な細胞株を使用して試験することができる）。いくつかの場合では、ウイルスの向性はウイルスの相対的優先度を説明する。例えば、第1のウイルスは全ての細胞型を感染させることができ得るが、表面グリコサミノグリカン（糖タンパク質）を有する細胞を感染させることにおいてははるかにより成功する。第2のウイルスもまた同じ特徴をより好む（例えば第2のウイルスもまた表面グリコサミノグリカン（糖タンパク質）を有する細胞を感染させることにおいてより成功する）場合、絶対形質導入効率性が同様でない場合でさえ、第2のウイルスは、第1のウイルスと同様（または同一）の向性を有すると考えられ得る。例えば、第2のウイルスは、第1のウイルスよりも、試験される全ての所与の細胞を感染させることにおいて効率的であり得るが、相対的優先度が同様（または同一）である場合、第2のウイルスはなお第1のウイルスと同様（または同一）の向性を有すると考えられ得る。いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、自然発生ビリオンと比べて変化させられない。いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、自然発生ビリオンと比べて拡大（すなわち拡張）される。いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、自然発生ビリオンと比べて低減される。

#### 【0042】

「複製可能」なウイルス（例えば複製可能AAV）は、感染性であり、また感染した細

10

20

30

40

50



胞内で（すなわちヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス機能の存在下で）複製されることも可能である、表現型が野生型のウイルスを指す。AAVの場合、複製能力は、概して機能的AAVパッケージング遺伝子の存在を必要とする。概して、本明細書に記載されるrAAVベクターは、1つ以上のAAVパッケージング遺伝子の欠如がゆえに、哺乳類細胞内（特にヒト細胞内）で複製不能である。典型的に、かかるrAAVベクターは、複製可能AAVがAAVパッケージング遺伝子と入来rAAVベクターとの間の組換えによって生成される可能性を最小化するために、任意のAAVパッケージング遺伝子配列を欠如する。多くの実施形態では、本明細書に記載されるrAAVベクター調製物は、ある場合はわずかな複製可能AAV（rcAAV、RCAとも称される）を含有する（例えば、 $10^2$  rAAV粒子当たり約1 rcAAV未満、 $10^4$  rAAV粒子当たり約1 rcAAV未満、 $10^8$  rAAV粒子当たり約1 rcAAV未満、 $10^{12}$  rAAV粒子当たり約1 rcAAV未満、または無rcAAV）ものである。

10

#### 【0043】

「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体等の改変ヌクレオチドを含み得、非ヌクレオチド成分によって分断され得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への改変は、ポリマーの集合の前または後に与えられ得る。ポリヌクレオチドという用語は、本明細書で使用される場合、2本鎖及び1本鎖分子を交換可能に指す。別途指定または必要とされない限り、ポリヌクレオチドを含む本明細書の任意の実施形態は、2本鎖形態、及び、2本鎖を構成することが知られるまたは予測される2つの相補的1本鎖形態のそれぞれの、両方を包含する。

20

#### 【0044】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとある特定のパーセントの「配列同一性」を有し、これは、整列される場合、2つの配列を比較するときにそのパーセンテージの塩基またはアミノ酸が同じであることを意味する。配列類似性は、いくつかの異なる様式で決定され得る。配列同一性を決定するために、配列は、ワールドワイドウェブを介してncbi.nlm.nih.gov/BLAST/にて入手可能な、BLASTを含む方法及びコンピュータプログラムを使用して、整列させることができる。別の整列アルゴリズムは、Oxford Molecular Group, Inc.の完全所有子会社である、米国ウィスコンシン州マディソンの、Genetics Computing Group (GCG) パッケージにおいて入手可能な、FASTAである。整列の他の技術は、Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USAに記載される。特に興味深いのは、配列における隙間を許容する整列プログラムである。Smith-Watermanは、配列整列における隙間を許容するアルゴリズムの一種である。Meth. Mol. Biol. 70: 173 - 187 (1997)を参照されたい。Needleman及びWunsch整列方法を使用するGAPプログラムもまた、配列を整列させるのに利用され得る。J. Mol. Biol. 48: 443 - 453 (1970)を参照されたい。

30

40

#### 【0045】

「遺伝子」は、細胞内で何らかの種類の機能を行うポリヌクレオチドを指す。例えば、遺伝子は、転写及び翻訳された後で特定のタンパク質をコードすることができる、オープンリーディングフレームを含み得る。一方で、遺伝子は、翻訳されない機能的RNA産物（例えば、アプタマー、干渉RNA、リボソームRNA (rRNA)、転移RNA (tRNA) 等）をコードすることができる。

#### 【0046】

50

「遺伝子発現産物」または「遺伝子産物」は、上記で定義される、特定の遺伝子の発現から生じる分子である。遺伝子発現産物は、例えばポリペプチド、アプタマー、干渉RNA、メッセンジャーRNA (mRNA)、rRNA、tRNA、非コードRNA (ncRNA) 等を含む。

【0047】

「RNA干渉剤」または「RNAi剤」は、遺伝子(上記に定義の通り)の発現を変化させるために使用され得る任意の剤(またはかかる剤をコードするポリヌクレオチド)を包含する。当業者に既知であるRNAi剤の例としては、(i) siRNA剤、(ii) アンチセンスRNA、(iii) CRISPR剤、(iv) ジンクフィンガーヌクレアーゼ剤、及び(v) 転写活性化剤様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)剤が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0048】

(i) siRNA剤(「低分子干渉」または「短干渉RNA」(またはsiRNA))は、遺伝子対象(「標的遺伝子」)に標的化されるヌクレオチドのRNA2本鎖である。「RNA2本鎖」は、RNA分子の2つの領域の間の相補的対形成によって形成され、2本鎖RNA(dsRNA)の領域を形成する構造を指す。siRNAは、その2本鎖部分のヌクレオチド配列が標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるという点で、その遺伝子に、「標的化」される。いくつかの実施形態では、siRNAの2本鎖の長さは、30ヌクレオチド未満である。いくつかの実施形態では、2本鎖は、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、または10ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの実施形態では、2本鎖の長さは19~25ヌクレオチドの長さである。siRNAのRNA2本鎖部分は、ヘアピン構造の一部であり得る。ヘアピンを含有するsiRNA剤は、「shRNA(短ヘアピンRNA)剤」とも称され得る。2本鎖部分に加え、ヘアピン構造は、2本鎖を形成する2つの配列の間に位置付けられるループ部分を含有し得る。ループは長さが変化し得る。いくつかの実施形態では、ループは、5、6、7、8、9、10、11、12、または13ヌクレオチドの長さである。ヘアピン構造は、3 または5 オーバーハング部分もまた含有し得る。いくつかの実施形態では、オーバーハングは0、1、2、3、4、または5ヌクレオチドの長さの3 または5 オーバーハングである。概して、標的遺伝子の発現産物(例えば、mRNA、ポリペプチド等)のレベルは、5 未翻訳(UT)領域、ORF、または3 UT領域を含む、標的遺伝子転写物の少なくとも19~25ヌクレオチド長セグメント(例えば20~21ヌクレオチド配列)に相補的である特異的2本鎖ヌクレオチド配列を含有する、siRNA剤(例えばsiRNA、shRNA等)によって低減される。いくつかの実施形態では、短干渉RNAは、約19~25ntの長さである。例えば、siRNA技術の説明について、PCT出願WO0/44895号、WO99/32619号、WO01/75164号、WO01/92513号、WO01/29058号、WO01/89304号、WO02/16620号、及びWO02/29858号、ならびに米国特許公開第20040023390号を参照されたい。siRNA及び/またはshRNAは、核酸配列によってコードされ得、核酸配列はプロモーターもまた含み得る。核酸配列は、ポリアデニル化シグナルもまた含み得る。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、合成最小ポリアデニル化シグナルである。

20

30

40

【0049】

(ii) アンチセンスRNAは、遺伝子発現産物に相補的であるRNAである。例えば、特異的mRNAに標的化されるアンチセンスRNAは、mRNAに相補的であるRNA系剤(または改変RNAであり得る)であり、アンチセンスRNAのmRNAへのハイブリダイゼーションは、mRNAの発現を変化させる(例えばRNAの安定性を変化させること、RNAの翻訳を変化させること等によって)。「アンチセンスRNA」内にさらに含まれるのは、アンチセンスRNAをコードする核酸である。

【0050】

(iii) CRISPR剤。CRISPR(規則的な間隔をもってクラスター化された

50

短鎖反復回文配列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / CRISPR 関連 (Cas) システムは、侵入核酸の発現停止を誘導するために CRISPR RNA (crRNA) を使用することによって、ウイルス及びプラスミドに対する適応免疫を有する、細菌及び古細菌を提供する。Cas9 タンパク質 (またはその機能的等価物及び / もしくは変異体、すなわち Cas9 様タンパク質) は、2つの自然発生 RNA 分子または crRNA 及び tracrRNA と呼ばれる (誘導 RNA と呼ばれる) 合成 RNA 分子を有するタンパク質の会合に依存する、DNA エンドヌクレアーゼ活性を自然に含有する。いくつかの場合では、2つの分子は、共有結合され、単一の分子 (単一誘導 RNA (「sgRNA」) と呼ばれる) を形成する。したがって、Cas9 または Cas9 様タンパク質は、DNA 標的 RNA (この用語は、2分子誘導 RNA 構成及び単一分子誘導 RNA 構成の両方を包含する) と会合し、これは、Cas9 または Cas9 様タンパク質を活性化し、このタンパク質を標的核酸配列へと誘導する。Cas9 または Cas9 様タンパク質がその天然酵素機能を保持する場合、それは標的 DNA を切断して 2 本鎖切断を作製し、これは、ゲノム変更 (すなわち、以下のような編集: 欠失、挿入 (ドナーポリヌクレオチドが存在する場合)、交換等) をもたらし、それにより遺伝子発現を変化させ得る。Cas9 のいくつかの変異体 (この変異体は、Cas9 様という用語によって包含される) は、低減した DNA 切断活性を有するように変化させられている (いくつかの場合では、これらは標的 DNA の両方の鎖の代わりに 1 本鎖を切断するが、一方で他の場合では、これらは DNA 切断活性が無くなるまで重度に低減されている)。低減した DNA 切断活性 (さらには無 DNA 切断活性) を有する Cas9 様タンパク質は、なお標的 DNA に誘導されることができ、RNA ポリメラーゼ活性を阻害することができる。したがって、酵素不活性 Cas9 様タンパク質は、標的 DNA の転写を阻害するために、DNA 標的 RNA によって標的 DNA 内の特異的位置に標的化され得る。CRISPR 剤に関する詳細な情報は、例えば、(a) Jinek et al., Science, 2012 Aug 17; 337 (6096): 816-21: "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", (b) Qi et al., Cell, 2013 Feb 28; 152 (5): 1173-83: "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", 及び (c) 米国特許出願第 13/842,859 号及び PCT 出願 PCT/US13/32589 号、において見出され得、該文献の全てはここで参照によりその全体が組み込まれる。したがって、「CRISPR 剤」という用語は、本明細書で使用される場合、Cas9 系システム内で使用され得る自然発生及び / または合成配列 (例えば、Cas9 または Cas9 様タンパク質; DNA 標的 RNA、例えば、crRNA 様 RNA、tracrRNA 様 RNA、単一誘導 RNA 等の、任意の成分; ドナーポリヌクレオチド等) を含む、任意の剤 (かかる剤をコードする核酸) を包含する。

#### 【0051】

(iv) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 剤。ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) は、ジンクフィンガー DNA 結合ドメインを DNA 切断ドメインに融合することによって生成される、人工 DNA エンドヌクレアーゼである。ZFN は、所望の DNA 配列を標的化するように操作され得、これは、ジンクフィンガーヌクレアーゼが固有の標的配列を切断することを可能にする。細胞内に導入される場合、ZFN は、2 本鎖切断を引き起こすことによって細胞内の標的 DNA (例えば細胞のゲノム) を編集するために使用され得る。ZFN の使用に関するより多くの情報については、例えば、Asuri et al., Mol Ther, 2012 Feb; 20 (2): 329-38、Bibikova et al. Science, 2003 May 2; 300 (5620): 764、Wood et al. Science, 2011 Jul 15; 333 (6040): 307、Ochiai et al. Genes Cells, 2010

10

20

30

40

50

Aug; 15 (8): 875 - 85、Takasu et al., Insect Biochem Mol Biol. 2010 Oct; 40 (10): 759 - 65; Ecker et al., Zebrafish 2008 Summer; 5 (2): 121 - 3、Young et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 26; 108 (17): 7052 - 7、Goldberg et al., Cell. 2010 Mar 5; 140 (5): 678 - 91、Geurts et al., Science. 2009 Jul 24; 325 (5939): 433、Flisikowska et al., PLoS One. 2011; 6 (6): e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 2011 Jun 13、Hauschild et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 19; 108 (29): 12013 - 7、及び Yu et al., Cell Res. 2011 Nov; 21 (11): 1638 - 40を参照されたく、該文献の全ては、ZFNに関連するそれらの教示について、参照により本明細書に組み込まれる。「ZFN剤」という用語は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ及び/またはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0052】

(v) 転写活性化剤様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) 剤。転写活性化剤様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) は、TAL (転写活性化剤様) エフェクター DNA 結合ドメインを DNA 切断ドメインに融合することによって生成される人工 DNA エンドヌクレアーゼである。TALEN は、実質的に任意の所望の DNA 配列に結合するように素早く操作されることができ、かつ、細胞内に導入される場合、TALEN は、2 本鎖切断を引き起こすことによって細胞内の標的 DNA (例えば細胞のゲノム) を編集するために使用され得る。TALEN の使用に関するより多くの情報については、例えば、Hockemeyer et al., Nat Biotechnol. 2011 Jul 7; 29 (8): 731 - 4、Wood et al., Science. 2011 Jul 15; 333 (6040): 307、Tesson et al., Nat Biotechnol. 2011 Aug 5; 29 (8): 695 - 6、及び Huang et al., Nat Biotechnol. 2011 Aug 5; 29 (8): 699 - 700を参照されたく、該文献の全ては、TALENに関連するそれらの教示について、参照により本明細書に組み込まれる。「TALEN 剤」という用語は、TALEN 及び/または TALEN をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0053】

「制御要素」または「制御配列」は、ポリヌクレオチドの複製、重複、転写、スプライシング、翻訳、または分解を含む、ポリヌクレオチドの機能的制御に寄与する分子の相互作用に關与するヌクレオチド配列である。制御は、プロセスの頻度、速度、または特異性に影響を与え得、本質が増強的または抑制的であり得る。当業者に既知の制御要素は、例えば、プロモーター及びエンハンサー等の、転写制御配列を含む。プロモーターは、ある特定の条件下で、RNA ポリメラーゼに結合することと、たいていプロモーターから下流 (3 方向) に位置付けられるコード領域の翻訳を開始させることが可能である、DNA 領域である。

#### 【0054】

「作動的に連結される」または「作動可能に連結される」は、遺伝要素の並立を指し、これらの要素は、予測される様式でそれらが作動することを許容する関係にある。例えば、プロモーターは、プロモーターがコード配列の転写を開始させるのを助ける場合、コード領域に作動的に連結されている。この機能的関係が維持される限り、プロモーターとコード領域との間に、介在する残基があってもよい。

#### 【0055】

「発現ベクター」は、目的とするポリペプチドをコードする領域を含むベクターであり、意図される標的細胞内のタンパク質の発現をもたらすために使用される。発現ベクター

は、標的内のタンパク質の発現を容易にするために、コード領域に作動的に連結される制御要素もまた含む。制御要素と、発現のためにそれらが作動可能に連結される遺伝子または遺伝子（複数）との組み合わせは、「発現力セット」と称されることがあり、この多くは当業者において既知かつ入手可能であり、または当業者に入手可能である成分から容易に構築することができる。

【 0 0 5 6 】

「異種」は、それが比較されている残りの実体とは遺伝子型が別個の実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子操作技術によって、異なる種に由来するプラスミドまたはベクターへと導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。そのネイティブコード配列から除去され、かつそれが結合されているのが自然に見出されないコード配列に作動的に連結されるプロモーターは、異種プロモーターである。したがって、例えば、異種遺伝子産物をコードする異種核酸を含む r A A V は、自然発生の野生型 A A V 内に通常含まれない核酸を含む r A A V であり、コードされた異種遺伝子産物は、自然発生の野生型 A A V によって通常コードされない遺伝子産物である。

【 0 0 5 7 】

「遺伝子変更」及び「遺伝子改変」という用語（及びそれらの文法的変形）は、本明細書で交換可能に使用され、遺伝子要素（例えばポリヌクレオチド）が有糸分裂または減数分裂以外によって細胞に導入されるプロセスを指す。要素は細胞に対して異種であり得、または細胞内に既に存在する要素の追加の複製または改良版であり得る。遺伝子変更は、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、またはポリヌクレオチドリポソーム複合体に接触させること等の、当業者に既知の任意のプロセスを通して、細胞を組換えプラスミドまたは他のポリヌクレオチドでトランスフェクトすることによってもたらされ得る。遺伝子変更は、例えば、DNA または RNA ウイルスまたはウイルス性ベクターでの形質導入または感染によってもまたもたらされ得る。概して、遺伝子要素は細胞内の染色体または微小染色体へと導入されるが、該細胞及びその子孫の表現型及び / または遺伝子型を変化させる任意の変更がこの用語に含まれる。

【 0 0 5 8 】

細胞は、外来性 DNA が細胞内部に導入されている場合、外来性 DNA によって（例えば組換えウイルスを通して）「遺伝子改変」または「形質転換」または「トランスフェクト」されている。外来性 DNA の存在は、永久的または一時的遺伝子変化をもたらす。形質転換させる DNA は、細胞のゲノムへ統合（共有結合）されることもされないこともある。「クローン」は、有糸分裂によって単一の細胞または共通の祖先から誘導される細胞の集合である。「細胞株」は、多くの世代にわたって安定的なインビトロ増殖が可能である一次細胞のクローンである。

【 0 0 5 9 】

遺伝子配列が、インビトロでの細胞の長期培養（*extended culture*）中及び / またはインビボでの長期間にわたって、その機能を行うために利用可能である場合、細胞は、その遺伝子配列で「安定的に」変化させられる、形質導入される、遺伝子改変される、または形質転換される、と言われる。概して、かかる細胞は、変化した細胞の子孫によって遺伝可能でもある遺伝子変化が導入されるという点で、「遺伝的に」変化させられている（遺伝子改変されている）。

【 0 0 6 0 】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。この用語は、改変されたアミノ酸ポリマー、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、または標識成分との複合体化も包含する。遺伝子産物を哺乳類対象に送達する文脈で考察される場合、抗血管形成ポリペプチド、神経保護ポリペプチド等のようなポリペプチド、及びそれらの組成物は、それぞれの無傷のポリペプチド、または、無傷のタンパク質の所望の生化学機能を保持するその任意の断片もしくは遺伝子操作された誘導体を指す。同様に、抗血管形成ポリペプチドをコードする核酸、神経保護ポリペプチドをコードする核酸、及び

遺伝子産物の哺乳類対象への送達における使用のための他のかかる核酸（受容体細胞に送達される「導入遺伝子」と称され得る）への参照は、無傷のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは所望の生化学機能を所有する任意の断片もしくは遺伝子操作された誘導体を含む。

#### 【0061】

「単離」プラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、ビリオン、宿主細胞、タンパク質、または他の物質は、その物質が自然発生するまたはそれから初めに調製される場合に存在し得る、他の成分のうちの少なくともいくつかの物質の調製物を指す。したがって、例えば単離物質は、原料混合物からそれを濃縮するために、精製技術を使用することによって調製され得る。濃縮は、溶液の体積当たりの重量等の絶対基準で測定され得るか、または、原料混合物内に存在する、第2の潜在的干渉物質との相対性で測定され得る。本開示の実施形態の濃縮を増加することは、より単離を高めることである。単離プラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、宿主細胞、または他の物質は、いくつかの実施形態では、例えば、純度約80%～約90%、少なくとも純度約90%、少なくとも純度約95%、少なくとも純度約98%、もしくは少なくとも純度約99%、またはそれよりも高い純度に精製される。

10

#### 【0062】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」等の用語は、所望の薬理及び/または生理効果を得ることを指す。効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防するという点で予防的であり得、かつ/または、疾患及び/もしくは該疾患に帰属する有害作用の部分的または完全治療の点で治療的であり得る。「治療」は本明細書で 사용되는場合、哺乳類における、特にヒトにおける疾患の任意の治療を網羅し、(a)疾患にかかりやすくなった可能性があるまたは疾患にかかる危険性があり得るが、それを有するとまだ診断されていない対象において、疾患（及び/または疾患によって引き起こされる症状）を予防すること、(b)疾患（及び/または疾患によって引き起こされる症状）を抑制すること、すなわちその進行を阻止すること、ならびに(c)疾患（及び/または疾患によって引き起こされる症状）を軽減すること、すなわち疾患（及び/または疾患によって引き起こされる症状）の後退を引き起こすことを含む。

20

#### 【0063】

「個体」、「宿主」、「対象」、及び「患者」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、哺乳類を指し、ヒト、サルを含む非ヒト霊長類、哺乳類競技動物（例えば、ウマ）、哺乳類家畜動物（例えば、ヒツジ、ヤギ等）、哺乳類ペット（イヌ、ネコ等）、及びげっ歯類（例えば、ネズミ、ラット等）が挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、個体は、以前にAAVに自然に曝露されたことがあり、結果として抗AAV抗体（すなわちAAV中和抗体）を内部に有するヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、AAVベクターを投与されたことがあり（かつ結果として抗AAV抗体を内部に有し得る）、異なる症状の治療のためまたは同じ症状のさらなる治療のためにベクターの再投与を必要とするヒトである。例えば肝臓、筋肉、及び網膜（このビヒクルに対する中和抗体によって影響を受けた全ての組織）へのAAV遺伝子送達を伴う臨床試験における陽性結果に基づき、多くのかかる治療用途/疾患標的がある。

40

#### 【0065】

「有効量」という用語は本明細書で使用される場合、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1回以上の投与で投与され得る。本開示の目的のために、化合物（例えば感染性rAAVビリオン）の有効量は、特定の疾患状態（例えば癌）の進行（及び/または疾患状態に関連する症状）を緩和、改良、安定化、逆行、予防、減速、または遅延させるのに十分な量である。したがって、感染性rAAVビリオンの有効量は、個人の抗AAV抗体の中和活性を逃れる、よって異種核酸を個人の標的細胞（または標的細胞（複数））に有効に送達することができる、感染性rAAVビリオンの量である。

50

## 【 0 0 6 6 】

本発明をさらに記載する前に、具体的な実施形態は当然のことながら変化し得るため、本発明は記載される具体的な実施形態に限定されないということが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、具体的な実施形態を記載する目的のみのためであり、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲のみによって限定されるため、限定的であるということ

## 【 0 0 6 7 】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間の、文脈が別様を明確に述べない限り、下限の単位の10分の1までのそれぞれの介在値、及びその述べられる範囲の任意の他の述べられるまたは介在する値は、本発明内に包含される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲に独立して含まれ得、本発明内に包含されるが、述べられる範囲の任意の具体的に排除される限度の対象である。述べられる範囲が限度の一方または両方を含む場合、これらの含まれる限度の一方または両方を排除する範囲もまた本発明に含まれる。

## 【 0 0 6 8 】

別様が定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または等価の任意の方法及び物質もまた、本発明の実践及び試験において使用され得るものの、好ましい方法及び物質がこれから記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、刊行物が記載されるものとの関連で方法及び/または物質を開示及び記載するために、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 0 6 9 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「この(the)」は、文脈が別様を明確に述べない限り、複数形の指示物を含むということもまた理解されるべきである。したがって、例えば、「(an) 感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) ビリオン」への言及は、複数のかかるビリオンを含み、「(the) 感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) ビリオン」への言及は、1つ以上のかかるビリオン及び当業者に既知のその均等物等を含む、等である。請求項は、任意の追加の要素を排除するように起草され得るということにさらに留意されたい。したがって、本声明は、請求要素の記載と関連する「単に」「のみ」等の排除的用語の使用、または「否定的」限定の使用の先の記載の役割を果たすことが意図される。

## 【 0 0 7 0 】

明確にするために別個の実施形態の文脈において記載される、本発明のある特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせで提供されてもよいということが理解される。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で記載される本発明の様々な特徴は、別個にまたは任意の好適な下位組み合わせでもまた提供されてよい。本発明に関連する実施形態の全ての組み合わせは、本発明によって具体的に包含され、それぞれの全ての組み合わせが個々に明確に開示されるかのように本明細書で開示される。さらに、様々な実施形態及びその要素の全ての下位組み合わせもまた、本発明により具体的に包含され、それぞれの全てのかかる下位組み合わせが個々に明確に本明細書で開示されるかのように本明細書で開示される。

## 【 0 0 7 1 】

本明細書で考察される刊行物は、本特許出願の出願日の前のその開示についてのみ提供される。本明細書中の全てのものは、本発明が先行発明のためにかかる刊行物に先行する権利が無いという了解として解釈されるべきでない。さらに、提供される刊行物の日付は、独立して確認する必要がある実際の公開日とは異なり得る。

## 【 0 0 7 2 】

詳細な説明

本開示は、変異体カプシドタンパク質及び異種核酸を含む感染性組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) ビリオンを提供する。本開示は変異体アデノ随伴ウイルス(AAV) カ

10

20

30

40

50

プシドタンパク質（及び／または変異体 A A V カプシドタンパク質をコードする核酸）をさらに提供し、これは感染性 r A A V ビリオンに、ヒト A A V 中和抗体への上昇した耐性を与える。本開示は、感染性 r A A V ビリオン及び／または主題の変異体 A A V カプシドタンパク質をコードする核酸を含む宿主細胞をさらに提供する。本開示は上記のビリオン、カプシドタンパク質、核酸、及び／または宿主細胞のライブラリをさらに提供し、このライブラリの少なくとも 1 つのメンバーの変異体 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0073】

本開示は、異種核酸を標的細胞に送達する方法をさらに提供し、この標的細胞は主題の感染性 r A A V ビリオンに接触させられる。本開示は、遺伝子産物を個体に送達する方法をさらに提供し、該方法は有効量の主題の r A A V ビリオンを、それを必要とする個体に投与することを概して含む。本明細書には主題の方法を実践するための組成物及びキットもまた提供される。多くの実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオン、主題の核酸、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質、主題の宿主細胞等が単離される。

#### 【0074】

変異体 A A V カプシドポリペプチド

主題の変異体 A A V カプシドポリペプチド（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、変異体 A A V カプシドポリペプチドを含む感染性 r A A V ビリオンに、野生型 A A V（例えば A A V 2（野生型 A A V 血清型 2））または野生型カプシドタンパク質を含む A A V によって示される耐性と比較して、ヒト A A V 中和抗体への上昇した耐性を与える。いくつかの実施形態では、上昇した耐性は、野生型 A A V（例えば A A V 2（野生型 A A V 血清型 2））または野生型カプシドタンパク質を含む A A V によって示される耐性よりも、少なくとも約 1.5 倍（例えば、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 7.5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 12 倍、少なくとも約 15 倍、少なくとも約 17 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 75 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 150 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 250 倍、少なくとも約 300 倍等）高い。

#### 【0075】

主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、感染性 r A A V ビリオンに、野生型 A A V（例えば A A V 2（野生型 A A V 血清型 2））または野生型カプシドタンパク質を含む A A V によって示される形質導入と比較して、ヒト A A V 中和抗体の存在下で、哺乳類細胞への増加した形質導入を与えることができる。いくつかの実施形態では、増加した形質導入は、野生型 A A V（例えば A A V 2（野生型 A A V 血清型 2））または野生型カプシドタンパク質を含む A A V によって示される形質導入よりも、少なくとも約 1.5 倍（例えば少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 7.5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 12 倍、少なくとも約 15 倍、少なくとも約 17 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 75 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 150 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 250 倍、少なくとも約 300 倍等）多い。

#### 【0076】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、野生型 A A V カプシドタンパク質に結合する中和抗体への低下した結合を示す。例えば、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質は、野生型カプシド A A V タンパク質に結合する中和抗体への少なくとも約 1.5 倍（例えば、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少な



くとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍等)低下した結合(例えば低下した親和性)を、この抗体の野生型AAVカプシドタンパク質への結合親和性と比較して、示し得る。

#### 【0077】

いくつかの実施形態では、抗AAV中和抗体は、約 $10^{-7}$  M未満、約 $5 \times 10^{-6}$  M未満、約 $10^{-6}$  M未満、約 $5 \times 10^{-5}$  M未満、約 $10^{-5}$  M未満、約 $10^{-4}$  M未満、またはより低い親和性で、主題の変異体AAVカプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異体AAVカプシドタンパク質)に結合する。

10

#### 【0078】

「変異体カプシドタンパク質」という用語は、野生型AAVカプシドタンパク質を包含しない。「変異体AAVカプシドタンパク質」は自然発生AAVカプシドタンパク質内に存在するアミノ酸配列を含まない。例えば、主題の変異体カプシドタンパク質は、配列番号1~9に記載される配列のうちのいずれとの100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含まない。換言すると、主題の変異体カプシドタンパク質は、配列番号1~9のうちのいずれかに記載されるアミノ酸配列を含まない。変異体カプシドタンパク質は、「スターター」または「親」AAVカプシドタンパク質とはアミノ酸配列が異なり得、この親AAVカプシドタンパク質は、野生型AAVカプシドタンパク質または非野生型AAVカプシドタンパク質であり得る。

20

#### 【0079】

いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異体AAVカプシドタンパク質)は、配列番号10~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203~736と、少なくとも約90%(例えば少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%)のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0080】

30

いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異体AAVカプシドタンパク質)は、配列番号10~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列と、少なくとも約90%(例えば少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%)のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異体AAVカプシドタンパク質)は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸203~736と少なくとも約95%(例えば少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%)のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、AAV2(例えば配列番号2)のAAVカプシドタンパク質と比べて、アミノ酸置換N312K、N449D、D472N、N551S、I698V、及びL735Q、または別のAAV親血清型における対応する位置を含む。

40

#### 【0082】

いくつかの実施形態では、主題の変異体AAVカプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異体AAVカプシドタンパク質)は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約95%(例えば、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%

50

）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号 2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、D 4 7 2 N、N 5 5 1 S、I 6 9 8 V、及び L 7 3 5 Q、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、配列番号 3 1 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも約 9 5 %（例えば、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 %）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号 2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、N 5 5 1 S、及び I 6 9 8 V、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、配列番号 3 1 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %（例えば少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 %）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号 2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、N 5 5 1 S、及び I 6 9 8 V、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、配列番号 3 2 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも約 9 5 %（例えば、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 %）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号 2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 D 1 8 0 N、N 3 1 2 K、Q 3 8 5 R、N 4 4 9 D、N 5 5 1 S、I 6 9 8 V、及び S 7 2 1 T、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、配列番号 3 2 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %（例えば、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 %）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号 2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 D 1 8 0 N、N 3 1 2 K、Q 3 8 5 R、N 4 4 9 D、N 5 5 1 S、I 6 9 8 V、及び S 7 2 1 T、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質）は、配列番号 3 3 に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 と少なくとも約 9 5 %（例えば、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 %）のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、A A V 2（例えば配列番号：2）の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、T 4 5 0 A、N 5 5 1 S、及び I 6 9 8 V、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質（または主題の核酸

10

20

30

40

50

によってコードされる変異体 A A V カプシドタンパク質) は、配列番号 3 3 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % (例えば、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、少なくとも約 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % ) のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、A A V 2 (例えば配列番号 2 ) の A A V カプシドタンパク質と比べてアミノ酸置換 N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、T 4 5 0 A、N 5 5 1 S、及び I 6 9 8 V、または別の A A V 親血清型における対応する位置を含む。

【 0 0 8 9 】

例示的な変異体 A A V カプシドタンパク質には以下が挙げられるがこれらに限定されない (選択される例示的な配列アライメントについて図 8 ~ 1 0 を参照されたい)。

【 0 0 9 0 】

S M 1 0 - 2 (アミノ酸配列)  
(SEQ ID NO: 10):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA  
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD  
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS  
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL  
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRNQSR  
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPAMASHK  
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL  
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMG  
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS  
KRWNPEVQYTSNYNKS VNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNQ

【 0 0 9 1 】

S M 1 0 - 2 (ヌクレオチド配列)

10

20

30

(SEQ ID NO: 22):

atggctgccgatgggtatcttcagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtgggtggaagctcaa  
acctggcccaccaccaccaaagcccgagagcggcagacagcaggggtcttgcttcctgggtacaagtacctc  
ggaccttcaacggactcgacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaagcctatg  
accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtctcaggaacgcctaaagaag  
atactcttttgggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaagagggtcttgaacctctgggcctggtgaggaaac  
ctgtaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccgggaaagg  
cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttgtcagactggagacgcagactcagctacacccagcctctcgg  
acagccaccagcagccccctctggctcgggaactaatac gatggctacaggcagtggcgccaccaatggcagacaataacga  
gggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggatgggcgacagagtcaccaccagc  
acccgaacctgggcctgccacctacaacaaccacctctacaaacaaatttcagccaatcaggagcctcgaaagacaatca  
ctactttggctacagcacccttgggggtattttgacttcaacagattccactgccactttaccacgtgactggcaagactcat  
caacaacaactggggattccgaccaagagactcaagttcaagctctttaacattcaagtcaaaagggtcacgcagaatgacg  
gtacgacgacgattgccaataaccttaccagcacgggtcaggtgttactgactcggagtaccagctccgtacgtcctcggctc  
ggcgcatcaaggatgcctccgccgttccagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatactcaccctgaacaacggga  
gtcaggcagtaggacgctcttcttactgcctggagtacttctctcagatgctgcgtaccggtaacaactttaccttcagcta  
cacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcaccgaccagtacc  
tgtattacttgagcagaacagacactccaagtgggaaccaccacgcagtcagggttcagttttctcaggccggagcagtgaca  
ttcgggaaccagctaggaactggcttctggaccctgtaccgccagcagcagtatcaaaagacatctcgggataacaacaaca  
gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggcccgccatggcaagc  
cacaaggacgatgaagaaaagttttctcagagcgggggtctcatcttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac  
attgaaaaggctcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccggtgctacggagcagtatggtctgtatctacc  
aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttctccaggcatggtctggcaggac  
agagatgtgtaccttcaggggcccatctgggcaaaagattccacacacggacggacattttacccctctccctcatgggtgga  
ttcggacttaaacacctcctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatcctcgaccaccttcagtgcggcaa  
agtttgcttcttcacacagctactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaa  
cgctggaatccgaagttcagctacattccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattca  
gagcctcgccccattggcaccagatacctgactcgtaatcagtaa

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

シャッフル 1 0 0 - 1 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 11):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE  
FQQRQLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQP  
DSSTGIGKKKGKQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPATPAAVGPTTMASGG  
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRL 10  
NFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQ  
PKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH  
KDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA  
VNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPL  
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE 20  
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 0 9 3 】

シャッフル 1 0 0 - 1 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 23):

atggctgctgatggttatcttcagattggctcgaggacactctctgaagggaataagacagtggagggaagctcaaa  
cctggcccaccaccacaaaagccgcagagcggcagataaggacgacagcaggggtcttgtgcttctgggtacaaagtacctg  
gaccttcaacggactcgacaagggagagccgggtcaacgaggcagacgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga  
ccagcagctcaaggccgggtgacaacccctacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtccagcagcggcttcagggcga  
cacatcgtttgggggcaacctcggcagagcagcttccaggccaaaaagagggttcttgaacctcttggcttgggtgagcaagc  
gggtgagacggctcctggaaagaagagaccgttgattgaatcccccgagcccgactcctccacgggtatcgccaaaaaa  
ggcaagcagccggctaaaaagagactcaattttgtcagactggcgactcagagtcaagtcacccgaccacaacctctcggag  
aacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcaggtgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg  
cgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc  
cgcacctgggcttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacca  
ctacttcggctacagcaccctgggggtattttgactcaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcagcgactca  
tcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaactcttcaacatccaagtcaggaggtcacgacgaatgatg  
gcgtcacaaccatcgctaataaccttaccagcacggttcaagtcttctcgactcagactatcagctcccgtagctgctcgggtc  
gggtcacgaggggtgcctcccgccgttccagcagacgtcttcatgggtccacagtatggatacctcacctgaacaacggga  
gtcaggcagtaggacgctcttcttactgcctggagtacttcttctcagatgctgcgtaccggaaacaactttaccttcagcta  
cacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcagccagagctctggaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacc  
tgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcacaaaacaaggacttgcgttttagccgggggtctccagctggca  
tgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaaacaaaacagacaacaaca  
gcaactttacctggactggtgcttcaaaatataaccttaatggcgctgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacaca  
aagacgacaaaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttgaaaggagagcggcgagcttcaaacactgcattgg  
acaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaaccctgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagtcatt  
ctccagagcagcagcagacacctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagag  
acgtatacctgcaggggtccatttgggcaaaaattcctcacacagatggacactttcacccgtctcctcttatggcgggctttgga  
ctcaagaacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcgagttttagctacaaaatttgc  
ttcattcatcaccctaactccacaggacaagtgagtgtgaaattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaagcgtgga  
atcccgaaagtgcagtacacatccaattatgcaaaatctgccaacgttgattttactgtggacaacaatggactttatactgagcctc  
gccccattggcaccggtacctcacccgtccctgtaa

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

シャッフル 1 0 0 - 3 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 12):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA  
EQQLRQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQP  
DSSTGIGKKKGKQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPPTMASGG  
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRL 10  
NFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLSTVQVFSDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSVQP  
KNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK  
DDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAV  
NLQSSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPL  
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE 20  
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 0 9 5 】

シャッフル 1 0 0 - 3 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 24):

atggctgctgatggttatcttcagattggctcgaggacactctctctgaagggaataagacagtgggtggaagctcaaa  
cctggcccaccaccaccaaagcccgagagcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttctgggtacaagtacctcg  
gaccttcaacggactcgacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga  
ccagcagctcaaggccggtgacaaccttacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtccagcagcggcttcaggcgga  
cacatcgtttgggggcaacctcggcagagcagcttccaggccaaaaagagggttcttgaaccttgggtctggttgagcaagc  
gggtgagacggctcctggaaagaagagaccgttgattgaatccccccagcagccgactcctccacgggtatcgcaaaaaa  
ggcaagcagccggctaaaaagagactcaattttggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcggag  
aacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcagggtggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg  
cgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc  
cgacctgggccttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacca  
ctacttcggctacagcaccctcgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcagcgactca  
tcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaacttcaacatccaagtcaggaggtcacgacgaatgatg  
gcgtcacaaccatcgctaataaccttaccagcacggttcaagtcttctggactcagactatcagctcccgtagctgctcgggtc  
gggtcacgaggggtgcctcccgccgttccagcagacgttctcatggtgccacagtatggatacctcacctgaacaacggga  
gtcaggcagtaggacgtcttcttactgcctggagtacttctctcagatgctgcgtaccggaaacaactttaccttcagcta  
cacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcagccagagctcggaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacc  
tgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcceaaaacaaggacttgcgttttagccgggggtctccaactggca  
tgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaaca  
gcaactttacctggactggtgcttcaaaaataaccttaatggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacaca  
aagacgacaaaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcggcgagcttcaaacactgcattgg  
acaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaacccgtggccactgaaagatttgggactgtggcagtcaat  
ctccagagcagcagcagacacctgcgaccggagatgtgcatgccatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacaga  
gacgtatactcgaggggtcctatttggggccaaaattctcctcacacggatggacacttccaccgtctcctctcatggcggttgg  
actcaagaacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcgagttttcagctacaaagtttg  
cttcattcatcaccagttattccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctgg  
aatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcct  
cgccccattggcacccgttacctcacccgtccctgtaa

10

20

30

40

【 0 0 9 6 】

シャッフル 1 0 0 - 7 ( アミノ酸配列 )



(SEQ ID NO: 13):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVL  
PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA  
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE  
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG  
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLY  
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10  
RLSFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP  
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP  
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS  
HKDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV  
AVNFQSSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSP  
LMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQK 20  
ENSKRWNPEVQYTSNYAKSANIDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPQ

【 0 0 9 7 】

シャッフル 1 0 0 - 7 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 25):

atggctgccgatgggtatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtgggtggcgctgaa  
acctggagccccgaagcccaaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggtctggtgcttctggctacaagtacct  
cggacccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcgatgcagcggccctcgagcacgacaaggcctac  
gaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaa  
gatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagcttccagggcaagaagcgggttctgaacctctcgggtctggtgagga  
aggcgctaagacggctcctggaaagaacgtccggtagagcaatgccacaagagccagactcctcctcgggcacgcgcaa  
gacaggccagcagcccgctaaaaagagactcaattttgtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctc  
ggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacg  
aaggcgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccag  
caccgaacatgggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaatctccagtgttcgacggggccagcaacgac  
aaccactacttcggctacagcaccctcgggggtattttgactttaacagattccactgccacttttcaccacgtgactggcagcg  
actcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgacga  
atgatggcgtcacaaccatcgctaataaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggagtaccagcttccgtacgtcctc  
ggctctgcgcaccagggtgcctccctccgttcccggcgacgtgtcatgattccgcaatacggctacctgacgctcaacaat  
ggcagccaagccgtgggacgttcaccttttactgcctggaatatttcccttctcagatgctgagaacgggcaacaactttaccttc  
agctacacctttgaggaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgat  
caatacctgtattacctgaacagaactcaaaatcagtcgggaagtgcctcaaaacaaaggacttgctgtttagccgtgggtctccag  
ctggcatgtctgttcagcccaaaaactgggtacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaacaaaaacagacaaca  
acaacagcaattttacctggactgggtgcttcaaaatataacctcaatggcggtgaatccatcatcaacctggcactgctatggcc  
tcacataaagacgacgaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttggaaaagagagcggcgagcttcaaacact  
gcattggacaatgtcatgattacagacgaagaggaaattaaagccactaacctgtggccaccgaaagatttgggaccgtggc  
agtcaatttcagagcagcagcagacacctgcgaccggagatgtgcatgctatgggagcattacctggcatggtgtggcaag  
atagagacgtgtacctgcaggggtccatttggccaaaattcctcacacagatggacactttcaccgtctcctcttatggcggg  
ctttggactcaagaaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcgagttttcagctacaa  
agtttgcttcattcatcacccaatactccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaa  
cgctggaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacattgattcactgtggacaacaatggactttatact  
gagcctgcgccattggcacccgttacctcaccgtccccagtaa

10

20

30

40

【 0 0 9 8 】

シャッフル 1 0 - 2 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 26):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVL  
PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA  
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQE  
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVGSMTMASG  
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY  
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10  
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP  
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP  
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV  
QPKNWLPGPCYRQQCVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS  
HKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV  
AVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPS  
PLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ 20  
KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 0 9 9 】

シャッフル 1 0 - 2 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 34):

atggctgccgatggttatcttcagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtgggtgggacttgaa  
acctggagccccgaaacccaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggggtctggtgcttcctggctacaagtacct  
cggaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcgatgcagcggccctcgagcacgacaaggcctac  
gaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtaccttgggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaag  
atacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaaaaagagggttctcgaacctctcgggtctggttgaggaa  
cggctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcattggcaaga  
caggccagcagcccgtaaaaagagactcaattttggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcgg  
agaacctcccgagccccctcaggtgtgggatctcttacaatggcttcaggtggtggcgaccaatggcagacaataacgaag  
gcgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcac  
ccgcacctgggccttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacc  
actactcgggtacagacccccctgggggtatttgacttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgactggcaaaagactc  
atcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaagctcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgat  
ggcgtcacgaccatcgtaataaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggagtaccagttgccgtacgtcctcggct  
ctgcgcaccagggtgcctccctccgttccggcgagcgtgttcattccgcagtacggctacctaacgctcaacaatggca  
gccaggcagtgggagcgtcatccttttactgcctggaatatttccatcgagatgctgagaacgggcaacaactttacctcag  
ctacacctttgaggaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgacca  
gtacctgtattacctgaacagaactcaaatcagtcgggaagtgcacaaaacaaggacttgctgtttagccgtgggtctccagct  
ggcatgtctgttcagcccaaaaactgggtacctggaccctgttaccggcagcagtgctgtttctaaaaacaaaacagacaacaac  
aacagcaactttacctggactggtgcttcaaaaatataaccttaattggcgctgaatctataatcaacctggcactgctatggcctca  
cacaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgatttttgaaaggagagcgccggagcttcaaacactgca  
ttggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaaccctgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagt  
caatctccagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagac  
agagacgtatacctgcagggtcctatttggccaaaattcctcacacagatggacactttcaccgtctcctcttatgggcggcctt  
ggactcaagaacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcgagttttcagctacaaagt  
ttgttcattcatcaccacactccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaagcgc  
tggaatcccgaagtgcagtacacatccaattatgcaaaatctgccaacgttgatttactgtggacaacaatggacttttactga  
gcctcgcctcattggcacccgttacctcaccgctccctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

シャッフル 1 0 - 6 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 27):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKVNQQKQDNARGLVL  
PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA  
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE  
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPTTMASG  
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLY  
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK  
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP  
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSV  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS  
HKDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV  
AVNLQSSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPS  
PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ  
KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

10

20

【 0 1 0 1 】

シャッフル 1 0 - 6 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 35):

atggctgccgatggttatcttcagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgaatggtgggacttgaaa  
cctggagccccgaaacccaaaagtcaaccagcaaaagcaggacaacgctcggggcttctgtctccgggttacaaataacctcg  
gaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgagcgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga  
ccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtaccttcggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaagat  
acgtcttttgggggcaaccttggacgagcagcttccaggccaagaagagggttctcgaaccttttggctctggttgagggaaggt  
gctaagacggctcctggaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcatttggaagaca  
ggccagcagcccgtaaaaagagactcaattttggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcggag  
aacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg  
cgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc  
cgcacctgggccttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacca  
ctacttcggctacagcacccccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcaaagactcat  
caacaacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaagctcttcaacatccaagtaaggaggtcacgacgaatgatg  
gggtcacgaccatcgtaataaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggaggtaccagttgccgtacgtcctcggctc  
tgcgcaccaggggtgcctccctccgttcccggcgagctgttcattgattccgcaatacggctacctgacgtcaacaatggcag  
ccaggcagtgggacgggtcctcttttactgcctggaatatttcccatcgagatgctgagaacggggcaataactttaccttcagct  
acacttttgaggacgttcttccacagcagctacgtcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgaccagta  
cctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtggccaaaacaaggacttgctgtttagccgtgggtctccaactggc  
atgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaacaac  
agcaactttacctggactgggtgttcaaaaatataaccttaattggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacac  
aaagacgacgaagacaagttcttccatgagcgggtgatgattttggaaaggagagcggcgagcttcaaacactgcattg  
gacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaaccccggtggccactgaaagatttgggactgtggcagtcaa  
tctccagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgcatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacaga  
gacgtataacctgcaggggtcctattttggccaaaattctcacacggatggacactttcaccgtctcctctcatggcggttgg  
acttaagcaccggcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctgcgaatcctccggcagagtttctggctacaaagtgtg  
cttcattcatcaccagttattccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgtgg  
aatcccgaagtgcagtatatacttaactatgcaaaatctgccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcct  
cgccccattggcaccggttacctcaccggtccctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

シャッフル 1 0 - 8 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 28):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKVNQQKQDNARGLVL  
PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA  
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE  
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG  
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLY  
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10  
RLNFKLFNQVKETTDVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD  
VFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTSYTFEDVPFHSS  
YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSVQPKN  
WLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDD  
EDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEATNPVATERFGTVAVNLQSS  
PATDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHP  
PPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEV 20  
QYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRP

【 0 1 0 3 】

シャッフル 1 0 - 8 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 36):

atggctgccgatgggtatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgaatgggtgggacttgaaa  
cctggagccccgaaacccaaagtcaaccagcaaaagcaggacaacgctcgggggtcttgcttccgggttacaataacctcg  
gaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcgagcgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga  
ccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtaccttccgtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaagat  
acgtcttttgggggcaaccttggacgagcagcttccaggccaagaagagggttctcgaaccttttggtctggttgagggaaggt  
gctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcattggcaagaca  
ggccagcagccccgtaaaaagagactcaattttggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcggag  
aacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg  
cgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc  
cgaacatgggcttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacca  
ctacttcggctacagcacccccctgggggtattttgattcaacagattccactgccacttttcaccacgtgactggcagcgactcat  
caataacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaaactcttcaantccaagtaaggaggnnacgacgaangatg  
nctcacaaccatcgctaataaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggagtaccagcttccgtactcctcggctct  
gcgcaccaggggtgcctccctccgttccggcgagcgtgttcattgattccgcaatacggctacctgacgctcaacaatggcag  
ccaggcagtgggacgggtcactcttttactgcctggaatatttcccatcgagatgctgagaacgggcaataactttacctncaagt  
acacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcactgaccagta  
cctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtggccaaaacaaggacttgctgtttagccgtgggtctccaactggc  
atgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaacaac  
agcaactttacctggactgggtcgttcaaaatataaccttaattggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacac  
aaagacgacgaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagagcggcggagcttcaaacactgcattg  
gacaatgtcatgatcacagacgaagagannnnaagccactaaccccggtggccactgaaagatttgggactgtggcagtc  
tctccaagcagcacannnacctgcgaccgnagatgtgcatgcatgggagccttacctggaatgggtgtggcaagacagag  
acgtatacctgcagggtcctattttggccaaaattcctcacacggatggacacttccaccgtctcctctcatggcgggctttgga  
cttaagcaccggcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcagagttttcggctacaaagtgtgc  
ttcattcatcaccagttattccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctgga  
atcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcctc  
gccccattggcaccggttacctcaccgtccccngtaa

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

シャッフル 1 0 0 - 2 ( アミノ酸配列 )



(SEQ ID NO: 29):

MASDGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVL  
PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLRAGDNPYLRYNHADA  
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE  
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG  
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLY  
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPK 10  
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP  
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS  
HKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV  
AVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPS  
PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ 20  
KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 1 0 5 】

シャッフル 1 0 0 - 2 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 37):

atggcttccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcatccgcgagtgggtgggacttgaaa  
cctggagccccgaaacccaaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggggtctggtgcttctggttacaagtacctc  
ggaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgatgcagcggccctcagcacgacaaggcctacg  
accagcagctcagagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaag  
atacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaagaagagggttctcgaaccttttggctctggttgagggaag  
gtgctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctgggcattggcaaga  
caggccagcagcccgtataaaagagactcaattttgtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcgg  
agaacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaa  
ggcgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctgggcgacagagtcaccaccagca  
cccgaacatgggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaac  
cactacttcggctacagcaccctcgggggtattttgattcaacagattccactgccatttctaccacgtgactggcagcgact  
catcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatga  
tggcgtcacaaccatcgctaataaccttaccagcaggggtcaagtcttctcggactcggagtcaccagcttcctgtcctcggct  
ctgcgcaccagggctgcctccctccgttcccggcgacgtgttcattgattccgcagtacggctacctaacgtcaacaatggca  
gccaggcagtgaggacgggtaccttttactgcctggaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataactttaccttcagc  
tacaccttcgaggacgtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgacca  
gtacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtggccaaaacaaggacttgcgttttagccgggggtctccagc  
tggcatgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttaccggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaa  
caacagcaactttacctggactgggtgcttcaaaatataaccttaattgggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctc  
acacaaagacgacaaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcggcggagcttcaaacactgc  
attggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaacccgtggccaccgaaagatttgggactgtggca  
gtcaatctccagagcagcagcagaccctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaaga  
cagagacgtatactgcaggggtcccatttgggcaaaaattcctcacacagatggacactttaccctgtcctcttatgggcggc  
tttggacttaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctgcgaatcctccggcagagtttctggctacaaa  
gtttgcttcattcatcaccagttattctactggccaagtcagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacg  
ctggaatcccgaagtgcagtatactataactatgcaaaatctgccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactga  
gcctcgtccattggcaccgttacctcaccctgcccctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

S M 1 0 - 1 ( ア ミ ノ 酸 配 列 )

(SEQ ID NO: 30):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF  
QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEP  
DSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPTTMASSG  
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRL 10  
SFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP  
ADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVFP  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQ  
PKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH  
KDDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA  
VNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPL  
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE 20  
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 1 0 7 】

S M 1 0 - 1 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 38):

atggctgccgatggttatcttcagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtgggtggaagctcaa  
acctgccccaccaccacaaagcccgagagcggcagacagcagcaggggtcttctgcttctgggtacaagtacctc  
ggaccttcaacggactcgacaagggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaggcctacg  
accagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgagggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaaga  
tacgtcttttggggcaacctggggcgagcagcttccaggccaagaagcgggttctcgaacctctcgggtctggttgaggaa  
gcgctaagacggctctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcatcggcaaga  
caggccagcagcccgtataaaagagactcaatttgggtcagactggcgactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcgg  
agaacctccagcaacccccgtgctgtgggacctaactaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaa  
ggcgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagca  
cccgaacatgggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgttcgacggggggccagcaacgacaa  
ccactacttgggtacagcacccccctgggggtatttgaatttaacagattccactgccactttaccacgtgactggcagcgac  
tcatacaataactggggattccggccaagagactcagcttaagctcttaacatccaggtaagggaggtcacgacgaatg  
atggcgtcacaaccatcgtaataacctaccagcacgggtcaagtctctcggactcggagtaccagcttcgtacgtctcgg  
ctctgcgcaccaggggtgcctccctccgttccggcgacgtgttcattgatccgcaatacggctacctgacgtcaacaatgg  
cagccaagccgtgggacgttcatcctttactgcctggaatatttccctctcagatgtgagaacgggcaacaactttaccttcag  
ctacaccttgagggaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcga  
atacctgtattacctgaacagaactcaaatcagtcgggaagtgcacaaaacaggacttgcgttttagccgtgggtctccagct  
ggcatgtctgttcagcccaaaaactgggtacctggaccctgttateggcagcagcgcgtttctaaaaacaaaacagacaacaac  
aacagcaattttacctggactgggtgttcaaatataacctcaatgggcgtgaatccatcatcaacctggcactgctatggcctc  
acacaaagacgacgaagacaagtctttcccatgagcgggtgcatgattttggaaaaagagagcggcggagcttcaaacactgc  
attggacaatgtcatgattacggacgaagaggaaattaaagccactaacctgtggccaccgaaagatttgggaccgtggcag  
tcaatttcagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgctatgggagcattacctggcatggtgtggcaagat  
agagacgtgtacctgcagggtcccatttgggccaattcctcacacagatggacactttaccctctcctcttatggcgggctt  
tggactcaagaacccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcggagtttcagctacaaag  
tttgcctcattcatcactcaatactccacaggacaagtgagcgtggaaattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgc  
tggaaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaatctgccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgag  
cctcgcctccattggcacccgttacctcaccgtccctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 0 8 】

S M 1 0 - 8 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 31):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF  
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD  
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMATGS  
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL  
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR  
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK  
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL  
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG  
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS  
KRWNPEVQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

20

【 0 1 0 9 】

S M 1 0 - 8 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 39):

atggctgccgatggttatcttcagattggctcgaaggacactctctgaaggataagacagtgggtggaagctcaa  
acctggcccaccaccacaaagccgcagagcggcagataaggacgacagcaggggtcttctgcttctgggtacaagtacctc  
ggacccttaacggactcgacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaagcctatg  
accggcagctcgacagcggagacaaccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtctcaggagcgccttaagaag  
atacgtcttttggggcaacctcggacgagcagctctccaggcgaaaaagagggttctgaacctctgggcctgggtgaggaac  
ctgttaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaagg  
cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttgtcagactggagacgcagactcagctacatccccagcctctcggga  
cagccaccagcagccccctctggctcgggaactaatacagtggtctacaggcagtgggcgaccaatggcagacaataacgag  
ggcgccgacggagtgggttaattctcgggaaattggcattgcgattccacatggatggcgacagagtcaccaccagca  
cccgaacctgggcctgccacctacaacaaccacctctacaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac  
tactttggctacagcaccccttgggggtattttgacttaacagattccactgccactttaccacgtgactggcaaagactcatc  
aacaacaactggggattccgaccaagagactcaagttaagctcttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacgggt  
acgacgacgattgccaataaccttaccagcacgggtcaggtgttactgactcggagtaccagctcccgtatgtcctcggctcgg  
cgcatcaaggatgcctcccgccgttcccagcagacgtcttcatgggtccacagtatggatacctcacctgaacaacgggagt  
caggcagtaggacgctcttcttactgcctggagtactttcctctcagatgctgcgtaccggtaacaactttacctcagctaca  
cttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacgccagagcttgaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacctg  
tattacttgagcagaacagacactccaagtgaaccaccacgcagtcgaaggcttcagttttctcaggccggagcagtgacatt  
cgggaccagctaggaactggcttctcggaccctgttaccgccagcagcagtatcaagacatctgcggataacaacaacag  
tgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggccggccatggcaagcc  
acaaggacgatgaagaaaagtttttctcagagcgggggtctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggaca  
ttgaaaaggatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctacca  
acctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatgggtctggcaggaca  
gagatgtgtaccttcaggggcccatctgggcaaagattccacacacggacggacattttaccctctcccctcatgggtggatt  
cggacttaaacacctctctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccttcgaccaccttcagtgcggcaaa  
gtttgcttcttcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaaac  
gctggaatcccgaagttcagctacacttccaactacaacaagctctgtaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattcag  
agcctcgeccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 1 0 】

S M 1 0 0 - 3 ( アミノ酸配列 )

(SEQ ID NO: 32):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA  
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD  
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDANSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS  
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQDWQRLINNNWGFRPKRL  
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSRAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR  
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK  
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL  
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG  
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS  
KRWNPEVQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYTEPRPIGTRYLTRNL

10

20

【 0 1 1 1 】

S M 1 0 0 - 3 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 40):

atggctgccgatggttatcttcagattggctcaggacactctctgaaggaataagacagtggaggaaagctcaa  
acctggcccaccaccacaaagcccgagagcggcagacagcaggggtcttgcttctgggtacaagtacctc  
ggaccttcaacggactcgacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaagcctatg  
accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtctcaggagcgccttaagaag  
atacgtcttttggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaagagggttctgaacctctgggcctgggtgaggaaac  
ctgtaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcggaaccggaaagg  
cggggccagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggtagactggagacgcaaactcagctacacccccagcctctcgga  
cagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacagtggtactagggcagtgccgcaccaatggcagacaataacgag  
ggcgccgacggagtgggtaattctcgggaaattggcattgcgattccacatggatggcgacagagtcaccaccagca  
cccgaacctgggcctgcccacctacaacaaccacctctacaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac  
tactttggctacagcacccttgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttaccacgtgactggcaaagactcatc  
aacaacaactggggattccgaccaagagactcaagtcaagctcttaacattcaagtcaagaggctcagcagaatgacgggt  
acgacgacgattgccaataaccttaccagcagcgggtcaggtgttactgactcggagtaccagctcccgtagctctcggctcg  
gcgcatcaaggatgcctccgccgttccagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatacctcacctgaacaacgggag  
tcgggcagtaggacgctcttcttactgctggagtactttcttctcagatgctgcgtaccggtaacaactttaccttcagctac  
acttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacct  
gtattacttgagcagaacagacactccaagtggaaaccaccacgcagtcgaaggcttcagtttctcaggccggagcagtgacat  
tcgggaccagtctaggaactggcttctggaccctgttaccgccagcagcagtatcaagacatctgcggataacaacaaca  
gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggccggccatggcaagc  
cacaaggacgatgaagaaaagtgttttctcagagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac  
attgaaaaggctcatgattacagacgaagaggaaatcaggacgaccaatcccggtggtacggagcagtatggttctgtatctacc  
aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggac  
agagatgtgtaccttcagggggcccatctgggcaaaagattccacacacggacggacatttaccctctccctcatgggtgga  
ttcggacttaaacacctctctccacagattctcatcaagaacaccccggtagctgcgaatcttcgaccaccttcagtgcggcaa  
agtttgcttcttcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaa  
cgctggaaatcccgaagttcagtagcttccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtataca  
gagcctcgccccattggcaccagatactgactcgtaatctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

S M 1 0 0 - 1 0 ( アミノ酸配列 )



(SEQ ID NO: 33):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF  
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD  
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLTNTMATGS  
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK  
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL  
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP  
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF  
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDAPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR  
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHK  
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL  
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG  
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS  
KRWNPEVQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

20

【 0 1 1 3 】

S M 1 0 0 - 1 0 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 41):

atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtggagggaagctcaa  
acctggcccaccaccacaaagcccgagagcggcagacagcaggggtcttgtgcttctgggtacaagtacctc  
ggacccttaacggactcgacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaagcctatg  
accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtctcaggagcgccttaagaag  
atacgtcttttggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaagagggttctgaacctctgggcctgggtgaggaac  
ctgttaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaagg  
cgggtcagcagcctgcaagaaaaagattgaatttgggtcagactggagacgcagactcagctacacccagcctctcggga  
cagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacagtggtctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacgag  
ggcggcgacggagtgggtaattctcgggaaattggcattgcgattccacatggatggcgacagagtcaccaccagca  
cccgaacctgggcctgcccacctacaacaaccacctctacaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac  
tactttggctacagcacccttgggggtattttgacttaacagattccactgccactttaccacgtgactggcaagactcatc  
aacaacaactggggattccgaccaagagactcaagttaagctcttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacgggt  
acgacgacgattgccaataaccttaccagcagcgggtcaggtgttactgactcggagtaccagctcccgtacgtctcggctcg  
gcgcacaaaggatgcctcccggcgtcccgagcagacgtcttcatgggtccacagtatggatacctcacctgaacaacgggag  
tcaggcagtaggacgctcttcttactgcttgagtagtacttctctcagatgctgcgtaccggtaacaactttaccttcagctac  
acttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcatcaccagctac  
gtattacttgagcagaacagacgctccaagtggaaaccaccacgcagtcagggttcagttttctcaggccggagcagtgacat  
tcgggaccagtctaggaactgggttcttggaccctgttaccgccagcagcaggtatcaaagacatctgcggataacaacaaca  
gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggccggccatggcaagc  
cacaaggacgatgaagaaaagtttttctcagagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac  
attgaaaaggtcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctacc  
aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggac  
agagatgtgtaccttcaggggcccatctgggcaaaagattccacacacggacggacattttacccctctcccctcatgggtgga  
ttcggacttaaacacctctctccacagattctcatcaagaacaccccgtacctgcgaatcttcgaccaccttcagtcgggcaa  
agtttgcttcttcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaa  
cgctggaatcccgaagttcagctacattccaactacaacaagtctgtaaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattca  
gagcctcggccattggcaccagatactgactcgtaatctgtaa

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】

核酸及び宿主細胞

本開示は、変異体 A A V カプシドタンパク質（上記の通り）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸、ならびに主題の核酸を含む宿主細胞を提供する。核酸及び宿主細胞は、r A A V ビリオンの生成（下記の通り）に有用である。

【 0 1 1 5 】

本開示は、主題の核酸を含む宿主細胞例えば単離宿主細胞を提供する。主題の宿主細胞は「遺伝子改変宿主細胞」と称され得、典型的に単離細胞例えばインビトロ培養内の細胞である。主題の宿主細胞は、下記のように主題の r A A V ビリオンの生成に有用である。主題の宿主細胞が主題の r A A V ビリオンを生成するために使用される場合、それは「パ

50

パッケージング細胞」と称される。いくつかの実施形態では、主題の宿主細胞は主題の核酸で安定的に遺伝子改変される（すなわち安定的にトランスフェクトされる）。他の実施形態では、主題の宿主細胞は主題の核酸で一時的に遺伝子改変される（すなわち一時的にトランスフェクトされる）。

#### 【0116】

主題の核酸は、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、リポソーム媒介トランスフェクト等を含むがこれらに限定されない確立された技術を使用して、宿主細胞に安定的にまたは一時的に導入される。安定的形質転換のために、主題の核酸は、概して、選択マーカー、例えばネオマイシン耐性等のいくつかの公知の選択マーカーのいずれかをさらに含むだろう。

10

#### 【0117】

主題の宿主細胞は、主題の核酸を、様々な細胞、例えば、例えばマウス細胞及び霊長類細胞（例えばヒト細胞）を含む、哺乳類細胞のいずれかに導入することによって生成される。好適な哺乳類細胞は、霊長類細胞及び細胞株を含むがこれらに限定されず、好適な細胞株は、293細胞、COS細胞、HeLa細胞、Vero細胞、3T3マウス線維芽細胞、C3H10T1/2線維芽細胞、CHO細胞等を含むがこれらに限定されない。

#### 【0118】

いくつかの実施形態では、主題の宿主細胞は、突然変異カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に加え、1つ以上のAAV repタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。他の実施形態では、主題の宿主細胞は、下記に記載のようにrAAVベクターをさらに含む。下記により詳細に記載されるように、rAAVビリオンは主題の宿主細胞を使用して生成される。

20

#### 【0119】

##### 感染性rAAVビリオン

主題の感染性rAAVビリオンは、変異体AAVカプシドタンパク質及び異種核酸（下記により詳細に記載される）を含み、野生型AAV（例えばAAV2（野生型AAV血清型2））または野生型カプシドタンパク質を含むAAVによって示される耐性と比較して、ヒトAAV中和抗体への上昇した耐性を示す。「上昇した耐性」とは、主題の感染性rAAVビリオンがヒト抗AAV抗体の存在下で上昇した感染性を示すことを意味する。上記のように、ウイルス感染性は、感染性ウイルス粒子の合計ウイルス粒子に対する比率として表現され得る。したがって、上昇した感染性は、感染性ウイルス粒子の合計ウイルス粒子に対する上昇した比率を意味する。ヒト抗AAV抗体へのAAVの耐性を決定するために、AAVの感染性は、遺伝子送達効率性（すなわち感染性）をヒト抗AAV抗体の不在下の50%に低減するために必要とされる抗体濃度（例えば、血清濃度、IVIg濃度等）（mg/mL）を得るために様々な濃度のヒト抗AAV抗体の存在下で測定される。遺伝子送達効率性をヒト抗AAV抗体の不在下におけるその50%に低減するために、より高い抗体濃度を必要とするウイルスは、抗体中和への上昇した耐性を有するとされる。したがって、耐性における2倍の上昇は、遺伝子送達効率性をヒト抗AAV抗体の不在下におけるその50%に低減するために必要とされる抗体濃度における2倍の上昇を意味する。いくつかの実施形態では、主題の感染性rAAVビリオンは、野生型AAV（例えばAAV2（野生型AAV血清型2））または野生型カプシドタンパク質を含むAAVによって示される耐性よりも、ヒトAAV中和抗体への少なくとも約1.5倍（例えば少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍等）高い耐性を示す。

30

40

#### 【0120】

主題の感染性rAAVビリオンは、ヒトAAV中和抗体の存在下で、哺乳類細胞への増

50

加した形質導入を示すと言われ得る。いくつかの実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオンは、野生型 A A V（例えば A A V 2（野生型 A A V 血清型 2））または野生型カプシドタンパク質を含む A A V によって示される形質導入よりも、ヒト A A V 中和抗体の存在下で、哺乳類細胞の少なくとも約 1.5 倍（例えば少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 7.5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 12 倍、少なくとも約 15 倍、少なくとも約 17 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 75 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 150 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 250 倍、少なくとも約 300 倍等）多い形質導入を示す。

10

#### 【0121】

いくつかの実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオンは、野生型 A A V カプシドタンパク質に結合する中和抗体への低下した結合を示す。例えば、主題の感染性 r A A V ビリオンは、抗体の野生型 A A V カプシドタンパク質への結合親和性と比較して、野生型カプシド A A V タンパク質に結合する中和抗体への、少なくとも約 1.5 倍（例えば少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 7.5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 12 倍、少なくとも約 15 倍、少なくとも約 17 倍、少なくとも約 20 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 30 倍、少なくとも約 40 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 75 倍、少なくとも約 100 倍、少なくとも約 150 倍、少なくとも約 200 倍、少なくとも約 250 倍、少なくとも約 300 倍等）低減した結合（例えば低減した親和性）を示し得る。

20

#### 【0122】

いくつかの実施形態では、抗 A A V 中和抗体は、約  $10^{-7}$  M 未満、約  $5 \times 10^{-6}$  M 未満、約  $10^{-6}$  M 未満、約  $5 \times 10^{-5}$  M 未満、約  $10^{-5}$  M 未満、約  $10^{-4}$  M 未満、またはより低い親和性で主題の感染性 r A A V ビリオンに結合する。

#### 【0123】

いくつかの実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオンは、野生型 A A V と比較して増加したインピボ滞留時間を示す。例えば、主題の感染性 r A A V ビリオンは、野生型 A A V の滞留時間よりも少なくとも約 10 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 10 倍、少なくとも約 25 倍、少なくとも約 50 倍、少なくとも約 100 倍以上長い滞留時間を示す。

30

#### 【0124】

所与の主題の感染性 r A A V ビリオンが、中和抗体への低減した結合及び/または中和抗体への上昇した耐性を示すかどうかは、当業者に既知の任意の便利なアッセイを使用して決定することができる。

#### 【0125】

いくつかの実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオンは、野生型 R e p 7 8、R e p 6 8、R e p 5 2、及び R e p 4 0 タンパク質を含む。他の実施形態では、主題の感染性 r A A V ビリオンは、1 つ以上の変異体カプシドタンパク質に加えて、R e p 7 8、R e p 6 8、R e p 5 2、及び R e p 4 0 タンパク質のうちの 1 つ以上における 1 つ以上の突然変異体を含む。

40

#### 【0126】

##### 異種核酸

主題の r A A V ベクター（例えば主題の感染性 r A A V ビリオン）における使用に好適な異種 DNA 分子（本明細書で「異種核酸」とも称される）は、任意の異種核酸であり得る。いくつかの実施形態では、異種核酸は、ポリペプチド（例えば、いくつかの所望の特徴を標的細胞に与えるタンパク質、例えば細胞追跡を可能にする蛍光タンパク質、標的細胞内で欠けているまたは変化した活性を提供する酵素等）をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、異種核酸は RNA 干渉剤（上記に定義の通り）を含む

50

。

## 【0127】

主題の異種核酸は、概して約5キロベース(kb)未満の大きさであり、例えば、受容体個体または標的細胞から不足しているまたは欠けているタンパク質をコードする遺伝子(ヌクレオチド配列)、所望の生物効果または治療効果(例えば、抗細菌、抗ウイルス、または抗腫瘍/抗癌機能)を有するタンパク質をコードする遺伝子、有害あるいは望ましくないタンパク質の生成を抑制または低減するRNAをコードするヌクレオチド配列(例えば上記に定義されるRNA干渉剤をコードするヌクレオチド配列)、及び/または抗原タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むだろう。

## 【0128】

好適な異種核酸は、後天性免疫不全症候群(AIDS)、癌、ハイパーコレステミア(hypercholesterolemia);活性化剤欠損症/GM2ガングリオシドーシス、マンノシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、コレステロールエステル蓄積症、慢性ヘキササミニダーゼA欠損症、シスチン症、ダノン病、ファブリー病、ファーバー病、フコシドーシス、ガラクトシアリドーシス、ゴーシェ病、GM1ガングリオシドーシス、I細胞病/ムコリピドーシスII、乳児遊離シアル酸蓄積症/ISSD、若年性ヘキササミニダーゼA欠損症、クラッペ病、リゾソーマル酸リパーゼ欠損症、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症疾患(偽性ハーラーポリジストロフィー/ムコリピドーシスIIIA、MPSIIハーラー症候群、MPSIシャイエ症候群、MPSIIハーラーシャイエ症候群、MPSIIハンター症候群、サンフィリポ症候群A型/MPSIIIA、サンフィリポ症候群B型/MPSIIB、サンフィリポ症候群C型/MPSIIC、サンフィリポ症候群D型/MPSIID、モルキオA型/MPSIVA、モルキオB型/MPSIVB、MPSIXヒアルロニダーゼ欠損症、MPSVIMacrotrachyria、MPSVIIスライ症候群、ムコリピドーシスI/シアリドーシス、ムコリピドーシスIIIC、及びムコリピドーシスIV型を含む)、多種スルファターゼ欠損症、ニーマンピック病、神経セロイドリポフスチン症、ポンペ病/糖原病II型、濃化異骨症、サンドホフ病/成人発症/GM2ガングリオシドーシス、サンドホフ病/GM2ガングリオシドーシス-乳児性、サンドホフ病/GM2ガングリオシドーシス-若年性、シンドラー病、サラ病/シアル酸蓄積症、テイサックス/GM2ガングリオシドーシス、及びウォルマン病等のリゾソーム蓄積症、糖尿病等のインスリン障害、成長障害、様々な貧血症、地中海貧血症、及び血友病を含む様々な血液障害;嚢胞性線維症、ゴーシェ病、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症、肺気腫等の遺伝的欠損等の、炎症性疾患、自己免疫、慢性、及び感染性疾患等の障害を含む、内分泌、代謝、血液、心循環、神経、筋骨格、泌尿器、肺、及び免疫障害の治療のために使用されるタンパク質をコードするものを含むがこれらに限定されない。

## 【0129】

好適な異種核酸は、インターフェロン(例えばIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\delta$ ;IFN- $\epsilon$ );インスリン(例えばNovolin、Humulin、Humalog、Lantus、Ultralente等);エリスロポエチン(「EPO」;例えばProcrit(登録商標)、Eprex(登録商標)、またはEpogen(登録商標)(エポエチン-);Aranesp(登録商標)(ダルベポエチン-);NeoRecormon(登録商標)、Epoetin(登録商標)(エポエチン-)等);モノクローナル抗体の抗原結合断片(例えばLucentis(登録商標)(ラニズマブ))を含む、抗体(例えばモノクローナル抗体)(例えばRituxan(登録商標)(リツキシマブ)、Remicade(登録商標)(インフリキシマブ)、Herceptin(登録商標)(トラスツズマブ)、Humira(商標)(アダリムマブ)、Xolair(登録商標)(オマリズマブ)、Bexxar(登録商標)(トシツモマブ)、Raptiva(商標)(エファリズマブ)、Erbix(商標)(セツキシマブ)、Avastin(登録商標)(ベバシズマブ)等);血液因子(例えばActivase(登録商標)(アルテプラゼ)組織プラスミノゲン活性化因子、Novose

10

20

30

40

50

ven (登録商標) (組換えヒト因子V I I a)、因子V I I a、因子V I I I (例えばKogenate (登録商標))、因子IX、 $\alpha$ -グロビン、ヘモグロビン等); コロニー刺激因子 (例えばNeupogen (登録商標) (フィルグラスチム; G-CSF)、Neulasta (ペグフィルグラスチム)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-単球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、巨核球コロニー刺激因子等); 成長ホルモン (例えばソマトロピン、例えばGenotropin (登録商標)、Nutropin (登録商標)、Norditropin (登録商標)、Saizen (登録商標)、Serostim (登録商標)、Humatrope (登録商標) 等、ヒト成長ホルモン等); インターロイキン (例えばIL-1、例えばProleukin (登録商標) を含むIL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9等); 成長因子 (例えばRegranex (登録商標) (ベクラペルミン (becclapermin); PDGF)、Fiblast (登録商標) (トラフェルミン; bFGF)、Stemgen (登録商標) (アンセスチム; 幹細胞因子)、ケラチノサイト成長因子、酸性線維芽細胞成長因子、幹細胞因子、塩基性線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子等); 可溶性受容体 (例えば、Enbrel (登録商標) (エタネルセプト) 等のTNF- $\alpha$ 結合可溶性受容体、可溶性VEGF受容体、可溶性インターロイキン受容体、可溶性 $\alpha$ / $\beta$ T細胞受容体等); 酵素 (例えば $\alpha$ -グルコシダーゼ; Cerazyme (登録商標) (イミグルカラーゼ;  $\alpha$ -グルコセレブロシダーゼ、Ceredase (登録商標) (アルグルセラゼ; )); 酵素活性化剤 (例えば組織プラスミノゲン活性化因子); ケモカイン (例えばIP-10; Mig; Gro- $\alpha$ /IL-8、RANTES; MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ ; MCP-1; PF-4等); 血管形成剤 (例えば血管内皮成長因子 (VEGF); 抗血管形成剤 (例えば可溶性VEGF受容体); タンパク質ワクチン; プラジキニン、コレシストキニン、ガスチン (gastin)、セクレチン、オキシトシン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、ベータエンドルフィン、エンケファリン、P物質、ソマトスタチン、プロラクチン、ガラニン、成長ホルモン放出ホルモン、ボンベシン、ダイノルフィン、ニューロテンシン、モチリン、甲状腺刺激ホルモン、ニューロペプチドY、黄体ホルモン、カルシトニン、インスリン、グルカゴン、バソプレシン、アンジオテンシンII、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、血管作用性小腸ペプチド、睡眠ペプチド等の神経活性ペプチド; 血栓溶解剤、心房性ナトリウム利尿ペプチド、骨形態形成蛋白質、トロンボポエチン、リラキシン、グリア線維酸性タンパク質、卵胞刺激ホルモン、ヒト $\alpha$ -1抗トリプシン、白血病抑制因子、形質転換成長因子、インスリン様成長因子、黄体形成ホルモン、マクロファージ活性化因子、腫瘍壊死因子、好中球走化性因子、神経成長因子メタロプロテイナーゼの組織抑制因子等の他のタンパク質; 血管作用性小腸ペプチド、アンジオゲニン、アンジオトロピン、フィブリン; ヒルジン; 白血病抑制因子; IL-1受容体拮抗薬 (例えばKineret (登録商標) (アナキンラ)); イオンチャンネル、例えば嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR); ジストロフィン; ウトロフィン、腫瘍抑制因子; リソソーム酵素酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ (GAA); 等を含むがこれらに限定されない、様々なタンパク質のうちのいずれかをコードするものを含むがこれらに限定されない。好適な核酸は、前述のタンパク質のいずれかの機能的断片をコードするもの、及び前述のタンパク質のいずれかの機能的変異体をコードする核酸もまた含む。

#### 【0130】

好適な異種核酸は抗原タンパク質をコードするものもまた含む。抗原タンパク質をコードする異種核酸を含む主題のrAAVベクターは、哺乳類宿主における抗原タンパク質への免疫応答を刺激するのに好適である。抗原タンパク質は、自己抗原、アレルゲン、腫瘍/癌関連抗原、病原ウイルス、病原細菌、病原原虫、病原蠕虫、または哺乳類宿主に感染する任意の他の病原微生物に由来する。本明細書で使用される場合、「に由来する抗原タンパク質をコードする核酸」という用語は、野生型抗原タンパク質をコードする核酸、例えばウイルス性タンパク質をコードする病原ウイルスから単離された核酸; 自然発生抗原タンパク質とアミノ酸配列が同一である抗原タンパク質をコードする、実験室で生成され

10

20

30

40

50

た合成核酸；自然発生抗原タンパク質とはアミノ酸配列が異なる（例えば1アミノ酸～約15アミノ酸）抗原タンパク質をコードするが、それでもなお対応する自然発生抗原タンパク質への免疫応答を引き起こす、実験室で生成された合成核酸；抗原タンパク質の断片（例えば約5アミノ酸～約50アミノ酸の断片であり、この断片は1つ以上の抗原エピトープを含む）をコードし、この断片が対応する自然発生抗原タンパク質への免疫応答を引き起こす、実験室で生成された合成核酸等を含む。

#### 【0131】

同様に、自己抗原、アレルゲン、腫瘍／癌関連抗原、病原ウイルス、病原細菌、病原原虫、病原蠕虫、または哺乳類宿主に感染する任意の他の病原微生物に「由来する」抗原タンパク質は、自然発生抗原タンパク質とアミノ酸配列が同一であるタンパク質、及び自然抗原タンパク質とはアミノ酸配列が異なる（例えば1アミノ酸～約15アミノ酸）が、それでもなお対応する自然発生抗原タンパク質への免疫応答を引き起こすタンパク質、ならびに、対応する自然発生抗原タンパク質への免疫応答を引き起こす、抗原タンパク質の断片（例えば約5アミノ酸～約100アミノ酸、例えば約5～約50アミノ酸の断片であり、この断片は1つ以上の抗原エピトープを含む）を含む。

#### 【0132】

いくつかの実施形態では、主題のrAAVベクターによってコードされる抗原タンパク質への免疫応答は、哺乳類宿主において抗原タンパク質または抗原エピトープ（またはrAAVコード抗原タンパク質または抗原エピトープと交差反応性のタンパク質またはエピトープ）を呈する病原微生物への保護免疫応答を刺激するだろう。いくつかの実施形態では、rAAVコード抗原タンパク質への細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答は、哺乳類宿主において引き起こされるだろう。他の実施形態では、抗原タンパク質に特異的な抗体が生成されるように、rAAVコード抗原タンパク質への体液性応答は哺乳類宿主細胞において引き起こされるだろう。多くの実施形態では、rAAVコード抗原タンパク質へのTH1免疫応答は哺乳類宿主において引き起こされるだろう。好適な抗原タンパク質は、腫瘍／癌関連抗原、ウイルス性抗原、細菌性抗原、及び原虫性抗原、ならびにその抗原断片を含む。いくつかの実施形態では、抗原タンパク質は細胞内病原体に由来する。他の実施形態では、抗原タンパク質は自己抗原である。さらに他の実施形態では、抗原タンパク質はアレルゲンである。

#### 【0133】

腫瘍／癌特異性抗原は、MAGE1（例えばGenBank受託番号M77481）、MAGE2（例えばGenBank受託番号U03735）、MAGE3、MAGE4等を含む様々なMAGE（メラノーマ関連抗原E）のいずれか；様々なチロシナーゼのいずれか；突然変異ras；突然変異p53（例えばGenBank受託番号X54156及びAA494311）；及びp97メラノーマ抗原（例えばGenBank受託番号M12154）を含むがこれらに限定されない。他の腫瘍／癌特異性抗原は、進行癌に関連するRasペプチド及びp53ペプチド、子宮頸癌に関連するHPV16／18及びE6／E7抗原、乳癌に関連するMUCI1-KLH（例えばGenBank受託番号J03651）、結腸直腸癌に関連するCEA（癌胎児性抗原）（例えばGenBank受託番号X98311）、gp100（例えばGenBank受託番号S73003）またはメラノーマに関連するMART1抗原、及び前立腺癌に関連するPSA抗原（例えばGenBank受託番号X14810）を含む。p53遺伝子配列は既知であり（例えばHarris et al. (1986) Mol. Cell. Biol., 6: 4650-4656を参照）受託番号M14694の下でGenBankに寄託される。したがって、主題のタンパク質、核酸、及び／またはビリオンは、子宮頸癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、肺癌を含むがこれらに限定されない癌、及びメラノーマの免疫療法として使用され得る。

#### 【0134】

ウイルス性抗原は、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、灰白髄炎、肝炎A、B（例えばGenBank受託番号E02707）、及びC（例えばGenBank受託番号E0689

10

20

30

40

50

0)、ならびに他の肝炎ウイルス、インフルエンザ、アデノウイルス(例えば4型及び7型)、狂犬病(例えばGenBank受託番号M34678)、黄熱病、日本脳炎(例えばGenBank受託番号E07883)、デング熱(例えばGenBank受託番号M24444)、ハンタウイルス、及びヒト免疫不全ウイルス(例えばGenBank受託番号U18552)を含むがこれらに限定されない疾患の原因となる既知の病原体に由来する。

#### 【0135】

好適な細菌性及び寄生虫抗原は、ジフテリア、百日咳(例えばGenBank受託番号M35274)、破傷風(例えばGenBank受託番号M64353)、結核、細菌性及び真菌性肺炎(例えばインフルエンザ菌、ニューモシスチスカリニ等)、コレラ、腸チフス、ペスト、細菌性赤痢、サルモネラ症(例えばGenBank受託番号L03833)、在郷軍人病、ライム病(例えばGenBank受託番号U59487)、マラリア(例えばGenBank受託番号X53832)、鉤虫、オンコセルカ症(例えばGenBank受託番号M27807)、住血吸虫症(例えばGenBank受託番号L08198)、トリパノソーマ症、レシュマニアシス(Leishmaniasis)、ジアルジア症(例えばGenBank受託番号M33641)、アメーバ症、フィラリア症(例えばGenBank受託番号J03266)、ボレリア症、及び旋毛虫症を含むがこれらに限定されない疾患の原因となる既知の病原体に由来するものを含む。

#### 【0136】

異種遺伝子産物をコードする好適な異種核酸は、RNAi剤(上記により詳細に記載される通り)(例えばアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、2本鎖RNA(dsRNA)、CRISPR剤、例えばCas9またはCas9様タンパク質、crRNA様RNA、tracrRNA様RNA、単一誘導RNA、及び/またはドナーポリヌクレオチド等)等の未翻訳RNA、リボザイム等を含む。RNAi剤は、遺伝子発現を抑制するために使用され得る。いくつかのRNAi剤は、遺伝子発現を抑制するために後に使用することができるツールを提供する(例えば、cas9またはcas9様タンパク質等のCRISPR剤)。

#### 【0137】

標的遺伝子は有害(例えば病理的)である標的遺伝子産物(RNAまたはタンパク質)、例えば、機能不全の標的遺伝子産物(例えば、コードタンパク質配列における突然変異に起因する、遺伝子産物の定常状態レベルを制御する非コード配列における突然変異に起因する等)をコードする任意の遺伝子を含む。標的遺伝子産物は、ハンチンチン、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アミロイド前駆体タンパク質、タウ、ポリグルタミン反復配列を含むタンパク質、ヘルペスウイルス(例えば水痘帯状疱疹)、任意の病理的ウイルス等を含むがこれらに限定されない。

#### 【0138】

したがって、RNAi剤をコードする異種核酸を含む主題のrAAVは、神経変性疾患、例えば、ポリグルタミン反復配列に関連する疾患であって、例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)等の、ポリグルタミン反復配列に関連する疾患等の、トリヌクレオチド反復配列疾患；ウイルス性感染等の後天性病理(例えば異常な生理、生化学、細胞、構造、または分子生物状態によって明らかになる疾患または症候群)例えばHCV感染の結果として生じるまたは生じ得る肝炎、HIV感染の結果として生じる後天性免疫不全症候群；癌等を含むがこれらに限定されない、様々な障害及び病態の治療に有用である。

#### 【0139】

多くの実施形態では、RNAi剤をコードする異種核酸はプロモーターに作動可能に連結される。好適なプロモーターは、当業者に既知であり、任意のタンパク質コード遺伝子、例えば内因的に制御された遺伝子または構成的に発現された遺伝子のプロモーターを含む。例えば、細胞生理事象、例えば低酸素状態において、例えば熱ショック、酸素レベル、及び/または一酸化炭素レベルによって制御される遺伝子のプロモーターはsiRNA

10

20

30

40

50



コード核酸に作動可能に連結され得る。

【0140】

EPOコードまたは目的とする核酸等の選択された異種ヌクレオチド配列は、インビボのヌクレオチド配列におけるその転写または発現を管理する制御要素に作動可能に連結される。かかる制御要素は、通常選択された遺伝子と関連する制御配列（例えば内因性細胞制御要素）を含み得る。あるいは、異種制御配列が用いられ得る。有用な異種制御配列は概して哺乳類またはウイルス性遺伝子をコードする配列に由来するものを含む。例としては、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス末端反復配列（LTR）プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ad MLP）、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、目的とする遺伝子に対して異種である内因性細胞プロモーター、CMV最初期プロモーター領域（CMV IE）等のサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、マウスメタロチオネイン遺伝子等の非ウイルス性遺伝子由来の配列もまた本明細書において役立ち得る。かかるプロモーター配列は、例えばStratagene（カリフォルニア州サンディエゴ）から商業的に入手可能である。

10

【0141】

いくつかの実施形態では、細胞型特異性または組織特異性プロモーターは、遺伝子産物が具体的な細胞型（複数可）または組織（複数可）内で選択的にまたは優先的に生成されるように、異種遺伝子産物をコードする異種核酸に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、誘導プロモーターは、異種核酸に作動可能に連結され得る。

20

【0142】

例えば、筋肉特異性かつ誘導プロモーター、エンハンサー等は、遺伝子産物の筋細胞への送達に有用である。かかる制御要素は、myoD遺伝子ファミリーから等のアクチン及びミオシン遺伝子ファミリー由来のもの、ミオサイト特異性エンハンサー結合因子MEF-2、ヒト骨格アクチン遺伝子及び心臓アクチン遺伝子由来の制御要素、筋クレアチンキナーゼ配列要素及びマウスクレアチンキナーゼエンハンサー（mCK）要素、骨格速収縮トロポニンC遺伝子、緩徐収縮心臓トロポニンC遺伝子、及び緩徐収縮トロポニンI遺伝子由来の制御要素、低酸素誘導核因子、グルココルチコイド応答要素（GRE）等のステロイド誘導要素及びプロモーター、RU486誘導のための融合コンセンサス要素、テトラサイクリン制御遺伝子発現を提供する要素を含むがこれらに限定されない。

30

【0143】

AAV ITRによって結合される目的とするDNA分子（異種DNA）を内部に有するAAV発現ベクターは、選択された配列（複数可）を、主要なAAVオープンリーディングフレーム（「ORF」）が切除されたAAVゲノムに直接的に挿入することによって構築され得る。ITRの十分な部分が複製及びパッケージング機能を可能にし続ける限り、AAVゲノムの他の部分もまた削除され得る。かかる構築物は、当業者に公知の技術を使用して設計され得る。例えば米国特許第5,173,414号及び同第5,139,941号、国際公開WO92/01070号（1992年1月23日公開）及びWO93/03769号（1993年3月4日公開）、Lebkowski et al.（1988）Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996、Vincent et al.（1990）Vaccines 90（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、Carter, B. J.（1992）Current Opinion in Biotechnology 3:533-539、Muzyczka, N.（1992）Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129、Kotlin, R. M.（1994）Human Gene Therapy 5:793-801、Shelling and Smith（1994）Gene Therapy 1:165-169、ならびにZhou et al.（1994）J. Exp. Med. 179:1867-1875を参照されたい。

40

50

## 【0144】

あるいは、AAV ITRは、ウイルス性ゲノムから、または別のベクター内に存在する選択された核酸構築物の同じかつ融合した5'及び3'を含有するAAVベクターから、当業者に既知の任意の便利な方法を使用して切除され得る。例えば1つの好適なアプローチは、上記のSambrook et al.に記載されるもの等の、標準ライゲーション技術を使用する。例えばライゲーションは、20 mMのTris-Cl pH 7.5、10 mMのMgCl<sub>2</sub>、10 mMのDTT、33 µg/mlのBSA、10 mM~50 mMのNaCl、及び40 µMのATP、0~16の0.01~0.02 (Weiss) ユニットT4 DNAリガーゼ(「付着末端」ライゲーション)、または1 mMのATP、14の0.3~0.6 (Weiss) ユニットT4 DNAリガーゼ(「平滑末端」ライゲーション)のいずれかにおいて、達成され得る。分子内「付着末端」ライゲーションは、たいてい30~100 µg/mlの合計DNA濃度(5~100 nMの合計最終濃度)で行われる。ITRを含有するAAVベクターは、例えば米国特許第5,139,941号に記載されている。特に、該文献において、受託番号53222、53223、53224、53225、及び53226下で米国培養細胞系統保存機関(「ATCC」)から入手可能であるいくつかのAAVベクターが記載される。

10

## 【0145】

さらに、キメラ遺伝子は、1つ以上の選択された核酸配列の5'及び3'を配置したAAV ITR配列を含むために、合成的に生成され得る。哺乳類筋細胞におけるキメラ遺伝子配列の発現に好ましいコドンが使用され得る。完全キメラ配列は、標準方法によって調製される重複オリゴヌクレオチドから構築される。例えば、Edge, Nature (1981) 292:756、Nambair et al. Science (1984) 223:1299、Jay et al. J. Biol. Chem. (1984) 259:6311を参照されたい。

20

## 【0146】

主題の感染性rAAVビリオンの生成

導入として、rAAVベクター複製及びパッケージングのために、宿主または「生成体」細胞を用いるのが典型的である。かかる生成体細胞(たいてい哺乳類宿主細胞)は、概してrAAV生成のためにいくつかの異なる種類の成分を含むか、または含むように改変される。第1の成分は、宿主パッケージング細胞によってベクター粒子に複製及びパッケージングされ得る、組換えアデノ随伴ウイルス性(rAAV)ベクターゲノム(または「rAAVプロベクター」)である。rAAVプロベクターは、通常異種ポリヌクレオチド(または「導入遺伝子」)を含み得、これを用いて、遺伝子療法に関連して別の細胞を遺伝子変化させることが望ましい(かかる導入遺伝子のrAAVベクターへのパッケージングは、導入遺伝子を様々な哺乳類細胞に送達するために有効に使用することができるため)。導入遺伝子は概して、AAVベクターの切除、複製、及びパッケージングの間、ならびにベクターの宿主細胞ゲノムへの統合の間に認識される配列を含む、2つのAAV逆位末端配列(ITR)によって隣接される。

30

## 【0147】

第2の成分は、AAV複製のためのヘルパー機能を提供するヘルパーウイルスである。アデノウイルスが一般的に用いられるものの、当業者に既知のように他のヘルパーウイルスもまた使用され得る。あるいは、必要なヘルパーウイルス機能がヘルパーウイルスから遺伝子単離され得、コード遺伝子がトランスにヘルパーウイルス機能を提供するために使用され得る。AAVベクター要素及びヘルパーウイルス(またはヘルパーウイルス機能)は、同時にまたは任意の順で連続的に、のいずれかで宿主細胞に導入され得る。

40

## 【0148】

AAV生成が提供されるための生成体細胞内の最後の成分は、複製タンパク質及びカプシド形成タンパク質をそれぞれ提供する、AAV rep及びcap遺伝子等の「AAVパッケージング遺伝子」である。AAVパッケージング遺伝子のいくつかの異なるバージョンが提供され得る(rep及び/またはcap遺伝子がネイティブプロモーターの制御

50

下に残され得るかまたは異種プロモーターに作動可能に連結され得る、rep-capカセット及び別個のrep及び/またはcapカセットを含む)。かかるAAVパッケージング遺伝子は、当業者に既知でありかつ下記により詳細に記載されるように、宿主パッケージング細胞に一時的にまたは安定的に導入され得る。

#### 【0149】

##### 1. rAAVベクター

目的とする異種DNA(「目的とする異種DNA」は本明細書で「異種核酸」とも称される)を含む主題のrAAVビリオンは、当業者に既知の標準方法を使用して生成することができる。方法は、(1)主題のrAAVベクターを宿主細胞に導入するステップ、(2)AAVヘルパー構築物を宿主細胞に導入するステップであって、該ヘルパー構築物が、AAVベクターから欠けているAAVヘルパー機能を補償するために、宿主細胞内で発現されることが可能なAAVコード領域を含む、導入するステップ、(3)1つ以上のヘルパーウイルス及び/または付属機能ベクターを宿主細胞に導入するステップであって、該ヘルパーウイルス及び/または付属機能ベクターが、宿主細胞における効率的な組換えAAV(「rAAV」)ビリオン生成を支持することが可能である付属機能を提供する、導入するステップ、ならびに(4)rAAVビリオンを生成するために宿主細胞を培養するステップを概して含む。AAV発現ベクター、AAVヘルパー構築物、及びヘルパーウイルスまたは付属機能ベクター(複数可)は、標準トランスフェクト技術を使用して、同時にまたは連続的に、のいずれかで宿主細胞に導入され得る。

#### 【0150】

AAV発現ベクターは、少なくとも転写の方向で作動的に連結される成分、転写開始領域を含む制御要素、目的とするDNA、及び転写終端領域を提供するために、既知の技術を使用して構築される。制御要素は、哺乳類筋細胞において機能的になるように選択される。作動的に連結される成分を含有する生じた構築物は、機能的AAV ITR配列で結合される(5及び3)。

#### 【0151】

AAV ITR領域のヌクレオチド配列は既知である。例えば、AAV-2配列について、Kotkin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Fundamental Virology, 2nd Edition, (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) 内のBerns, K.I. "Parvoviridae and their Replication"を参照されたい。本発明のベクターにおいて使用されるAAV ITRは、野生型ヌクレオチド配列を有する必要がなく、例えばヌクレオチドの挿入、欠失、または置換によって変化させられ得る。さらに、AAV ITRは、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-7等を含むがこれらに限定されないいくつかのAAV血清型のうちのいずれかに由来し得る。さらに、AAV発現ベクターにおいて選択されたヌクレオチド配列に隣接する5及び3 ITRは、それらが意図されるように機能する、すなわち宿主細胞ゲノムまたはベクターからの目的とする配列の切除及び救出を可能にする、及びAAV Rep遺伝子産物が細胞内に存在する場合DNA分子の受容体細胞ゲノムへの統合を可能にする限り、同一である必要または同じAAV血清型または単離物に由来する必要がない。ITRは、Repタンパク質の適切な混合物の存在下で、ベクター配列の複製を可能にする。ITRは、AAV粒子を生成するための、ベクター配列のカプシドへの組み込みもまた可能にする。

#### 【0152】

rAAVビリオンを生成するために、AAV発現ベクターは、トランスフェクト等の既知の技術を使用して好適な宿主細胞に導入される。多数のトランスフェクト技術は概して当業者に既知である。例えば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、及び Chu et al. (1981) Gene 13: 197 を参照されたい。特に好適なトランスフェクト方法は、リン酸カルシウム共沈殿 (Graham et al. (1973) Virol. 52: 456 - 467)、培養細胞への直接的微量注入 (Capecchi, M. R. (1980) Cell 22: 479 - 488)、電気穿孔 (Shigekawa et al. (1988) BioTechniques 6: 742 - 751)、リボソーム媒介遺伝子移入 (Mannino et al. (1988) BioTechniques 6: 682 - 690)、脂質媒介形質導入 (Feligner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 - 7417)、及び高速微小投射物を使用する核酸送達 (Klein et al. (1987) Nature 327: 70 - 73) を含む。

10

#### 【0153】

本開示の目的のために、rAAV ビリオンの生成に好適な宿主細胞は、異種 DNA 分子の受容体として使用され得るまたは使用されている、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞を含む。この用語は、トランスフェクトされた元来細胞の子孫を含む。したがって、rAAV ビリオンを生成するための「宿主細胞」は、概して外来性 DNA 配列でトランスフェクトされた細胞を指す。安定的ヒト細胞株である 293 (例えば受託番号 ATCC CRL 1573 下で米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) を通して容易に入手可能) からの細胞は多くの実施形態で使用される。特に、ヒト細胞株 293 は、アデノウイルス 5 型 DNA 断片で形質転換されたヒト胎児性腎細胞株であり (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59)、アデノウイルス性 E1a 及び E1b 遺伝子 (Aiello et al. (1979) Virology 94: 460) を発現する。293 細胞株は、容易にトランスフェクトされ、rAAV ビリオンを生成するための特に便利なプラットフォームを提供する。

20

#### 【0154】

##### 2. AAV ヘルパー機能

AAV ITR によって隣接されるヌクレオチド配列を複製及びカプシド形成して rAAV ビリオンを生成するために、上記の AAV 発現ベクターを含有する宿主細胞は、AAV ヘルパー機能を提供することができるようにならなければならない。AAV ヘルパー機能は、概して、順に、生産的 AAV 複製のためにトランスにおいて機能する AAV 遺伝子産物を提供するために発現され得る、AAV 由来コード配列である。AAV ヘルパー機能は、本明細書において、AAV 発現ベクターから欠けている必須 AAV 機能を補償するために使用される。したがって、AAV ヘルパー機能は、主要な AAV ORF、すなわち rep 及び cap コード領域、またはその機能的相同体のうちの 1 つまたは両方を含む。本開示の文脈では、cap 機能は 1 つ以上の突然変異カプシドタンパク質を含み、少なくとも 1 つのカプシドタンパク質は上記のように少なくとも 1 つの突然変異を含む。

30

#### 【0155】

「AAV rep コード領域」とは、複製タンパク質 Rep 78、Rep 68、Rep 52、及び Rep 40 をコードする AAV ゲノムの当業者に認識される領域を意味する。これらの Rep 発現産物は、DNA 複製の AAV 起源の認識、結合、及びニッキング、DNA ヘリカーゼ活性、ならびに AAV (または他の異種) プロモーターからの転写の調節を含む、多くの機能を所有することが示されている。Rep 発現産物は、AAV ゲノムの複製のために集散的に必要とされる。AAV rep コード領域の説明について、例えば Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158: 97 - 129、及び Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5: 793 - 801 を参照されたい。AAV rep コード領域の好適な相同体は、AAV-2 DNA 複製を媒介すると既知である (Thomson et al. (1994) Virology 204: 304 - 311)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) rep 遺伝子を含む。

40

50

## 【0156】

AAV caps タンパク質はVP1、VP2、及びVP3を含み、VP1、VP2、及びVP3のうちの少なくとも1つは、上記のように少なくとも1つの突然変異を含む。

## 【0157】

AAVヘルパー機能は、AAV発現ベクターのトランスフェクトの前またはそれと同時のいずれかで、宿主細胞をAAVヘルパー構築物でトランスフェクトすることによって、宿主細胞に導入される。AAVヘルパー構築物は、したがって、生産的AAV感染に必須である、欠けているAAV機能を補償するために、AAV rep及び/またはcap遺伝子の少なくとも一時的な発現を提供するために使用される。AAVヘルパー構築物はAAV ITRを欠如し、自身を複製することもパッケージングすることもできない。これらの構築物は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、またはビリオンの形態であり得る。Rep及びCap発現産物の両方をコードする、一般的に使用されるプラスミドpAAV/Ad及びpIM29+45等の、多数のAAVヘルパー構築物が説明されている。例えばSamulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828、及びMcCarty et al. (1991) J. Virol. 65:2936-2945を参照されたい。Rep及び/またはCap発現産物をコードする多数の他のベクターが説明されている。例えば米国特許第5,139,941号を参照されたい。

10

## 【0158】

AAV発現ベクター及びAAVヘルパー構築物の両方は、1つ以上の任意の選択マーカ含有するように構築され得る。好適なマーカーは、細胞が適切な選択的媒体において増殖されるとき、選択マーカーを含有する核酸構築物でトランスフェクトされた細胞への抗生物質耐性または感受性を与える、該細胞に色を与える、または該細胞の抗原特徴を変更する、遺伝子を含む。本開示の方法の実践において有用であるいくつかの選択マーカーには、ハイグロマイシン耐性を与えることによって、哺乳類細胞における選択を可能にするハイグロマイシンB耐性遺伝子(アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(phosphotransferase)(APH)をコードする)、G418に耐性を与えることによって、哺乳類細胞における選択を可能にするネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(phosphotransferase)遺伝子(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする)等が挙げられる。他の好適なマーカーは当業者に既知である。

20

30

## 【0159】

## 3. AAV付属機能

rAAVビリオンを生成するために、宿主細胞(またはパッケージング細胞)は、非AAV由来機能または「付属機能」を提供することもできるようにされなければならない。付属機能は、AAVがその複製について依存性である、非AAV由来ウイルス及び/または細胞機能である。したがって、付属機能は、AAV遺伝子転写の活性化、段階特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、Cap発現産物の合成、及びAAVカプシド構築に関与するものを含む、AAV複製において必要とされる少なくともこれらの非AAVタンパク質及びRNAを含む。ウイルス系の付属機能は、既知のヘルパーウイルスのうちの任意のものに由来し得る。

40

## 【0160】

特に、付属機能は、当業者に既知の方法を使用して、宿主細胞内に導入されてそこにおいて発現され得る。一般的に、付属機能は、宿主細胞の無関係のヘルパーウイルスでの感染により提供される。アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス1型及び2型等のヘルペスウイルス、及びワクシニアウイルスを含む、多数の好適なヘルパーウイルスが既知である。任意の様々な既知の剤を使用して細胞同期化によって提供されるもの等の非ウイルス性付属機能もまた本明細書で役立ち得る。例えばBuller et al. (1981) J. Virol. 40:241-247、McPherson et al. (1985) Virology 147:217-222、Schlehofer et al. (1986) Virology 152:110-117を参照されたい。

50

## 【0161】

あるいは、付属機能は付属機能ベクターを使用して提供され得る。付属機能ベクターは、1つ以上の付属機能を提供するヌクレオチド配列を含む。付属機能ベクターは、宿主細胞における効率的なAAVピリオン生成を支持するために、好適な宿主細胞に導入され得る。付属機能ベクターは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、または別のウイルスの形態であり得る。付属ベクターは、適切な制御要素及び酵素と関連付けられると、付属機能を提供するために宿主細胞において転写または発現され得る、1つ以上の直線化DNAまたはRNA断片の形態でもまたあり得る。

## 【0162】

付属機能を提供する核酸配列は、アデノウイルス粒子のゲノムからのように、自然源から得られ得、または、当業者に既知の組換えまたは合成方法を使用して構築され得る。この点に関して、アデノウイルス由来の付属機能は、広範に研究されており、付属機能に關与する多数のアデノウイルス遺伝子が特定及び部分的に特徴付けられている。例えばCRC Handbook of Parvoviruses, vol. I (P. Tijssen, ed.) 内のCarter, B. J. (1990) "Adeno-Associated Virus Helper Functions"、及びMuzyczka, N. (1992) Curr. Topics. Microbiol. and Immun. 158: 97-129を参照されたい。得に、早期アデノウイルス遺伝子領域E1a、E2a、E4、VAI RNA、及びおそらくE1bは、付属プロセスに関わると考えられる。Janik et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1925-1929。ヘルペスウイルス由来の付属機能は説明されている。例えばYoung et al. (1979) Prog. Med. Virol. 25: 113を参照されたい。ワクシニアウイルス由来の付属機能もまた説明されている。例えば上記のCarter, B. J. (1990)、Schlehofer et al. (1986) Virology 152: 110-117を参照されたい。

## 【0163】

宿主細胞のヘルパーウイルスでの感染または宿主細胞の付属機能ベクターでのトランスフェクトの結果として、AAV Rep及び/またはCapタンパク質を生成するために、AAVヘルパー構築物を転写活性化する、付属機能が発現される。Rep発現産物は、AAV発現ベクターから組換えDNA（目的とするDNA、例えば異種核酸を含む）を切除する。Repタンパク質はAAVゲノムを複製する役割もまた果たす。発現されたCapタンパク質はカプシドへと構築し、組換えAAVゲノムはカプシドにパッケージングされる。したがって、生産的AAV複製が結果として生じ、DNAはrAAVピリオンにパッケージングされる。

## 【0164】

組換えAAV複製の後、rAAVピリオンは、CsCl勾配等の様々な従来の精製方法を使用して、宿主細胞から精製され得る。さらに、付属機能を発現するために感染が用いられる場合、既知の方法を使用して残留ヘルパーウイルスが不活性化され得る。例えば、アデノウイルスは、およそ60℃の温度まで例えば20分間以上加熱することによって不活性化され得る。AAVは極めて加熱安定性であり、一方でヘルパーアデノウイルスは熱不安定性であるため、この処置はヘルパーウイルスのみを有効に不活性化する。

## 【0165】

結果として生じるrAAVピリオンは、遺伝子療法用途等におけるDNA送達、または遺伝子産物の哺乳類宿主への送達のための使用に準備が整う。

## 【0166】

## 異種核酸の送達

本開示は、異種核酸を、標的細胞及び/または異種核酸を必要とする個体に送達する方法をさらに提供する。いくつかの実施形態では、異種核酸を必要とする個体は、以前にAAVに自然に曝露されたことがあり、結果として抗AAV抗体（すなわちAAV中和抗体）を内部に有するヒトである。例えば、肝臓、筋肉、及び網膜へのAAV遺伝子送達を含

10

20

30

40

50

む臨床試験における陽性結果（全ての組織がこのビヒクルに対する中和抗体によって影響を受けた）に基づき、多くのかかる治療用途／疾患標的がある。

【0167】

主題の方法は概して（i）有効量の主題のrAAVビリオンを個体に投与すること、及び／または（ii）標的細胞を主題のビリオンに接触させることを含む。概して、rAAVビリオンは、インビボ（「直接的」）またはインビトロ（「間接的」）形質導入技術のいずれかを使用して対象に投与される。インビトロで（「間接的に」）形質導入される場合、所望の受容体細胞（すなわち「標的細胞」）は、個体から除去され得、rAAVビリオンで形質導入され得、個体に再導入され得る。あるいは、同系細胞または異種細胞が個体において不適切な免疫応答を生成し得ない場合、同系細胞または異種細胞を使用することができ

10

【0168】

形質導入された標的細胞の個体への送達及び導入の好適な方法は説明されている。例えば、細胞は、例えば適切な培地内で組換えAAVビリオンを細胞と組み合わせること、及び目的とするDNAを内部に有する細胞について、サザンブロット及び／もしくはPCR等の従来の技術を使用して、または選択マーカーを使用することによりスクリーニングすることによって、インビトロで形質導入され得る。形質導入された細胞は、その後、下記により完全に記載される医薬組成物へと製剤され得、該組成物は、筋肉内、静脈内、皮下、及び腹腔内注射によって等の、様々な技術によって対象へと導入され得る。

【0169】

20

インビボ（すなわち「直接的」）送達については、rAAVビリオンは医薬組成物へと製剤され得、非経口投与され得る（例えば、筋肉内、皮下、腫瘍内、経皮、髄腔内、静脈内投与経路等を介して投与される）。

【0170】

医薬組成物は、治療的に有効な量の目的とする遺伝子発現産物を生成するために十分な遺伝子物質、すなわち、問題になっている疾患状態の症状を低減または改良するために十分な量、または所望の便益を与えるのに十分な量を含み得る。医薬組成物は薬学的に許容される賦形剤もまた含有し得る。かかる賦形剤は、それ自身では組成物を受容する個体に有害な抗体の生成を引き起こさない任意の医薬剤を含み、これは過度の毒性を伴わずに投与され得る。薬学的に許容される賦形剤は、水、生理食塩水、グリセロール、及びエタノール等の液体を含むがこれらに限定されない。薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような鉱酸塩、及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等のような有機酸の塩がそこに含まれ得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質等のような補助物質がかかるビヒクル内に存在し得る。幅広い種類の薬学的に許容される賦形剤が当業者に既知であり、本明細書で詳細に取り上げる必要はない。薬学的に許容される賦形剤は、例えば、A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7<sup>th</sup> ed., Lippincott, Williams, & Wilkins, 及び Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3<sup>rd</sup> ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. を含む様々な刊行物において詳細に説明されている。

30

40

【0171】

適切な投与量は、他の要因の中でもとりわけ、治療されている哺乳類（例えばヒトもしくは非ヒト霊長類、または他の哺乳類）、治療される個体の年齢及び全身状態、治療されている状態の重症度、問題になっている具体的な治療タンパク質、その投与の様態に依存し得る。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。

50

## 【0172】

したがって「治療的に有効な量」は、臨床試験によって決定され得る相対的に広い範囲に収まるだろう。例えば、インビボ注射、すなわち骨格筋または心筋への直接的な注射については、治療的に有効な用量は、約  $10^6$  ~ 約  $10^{15}$  の rAAV ビリオン、例えば約  $10^8$  ~  $10^{12}$  の rAAV ビリオンに類似するだろう。インビトロ形質導入については、細胞に送達される rAAV ビリオンの有効量は、約  $10^8$  ~ 約  $10^{13}$  の rAAV ビリオンに類似するだろう。他の有効な用量は、用量応答曲線を確立するルーチン試験を通して、当業者によって容易に確立され得る。

## 【0173】

用量治療は、単回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールであり得る。さらに、対象は、適切な限り多くの用量を投与され得る。当業者は、用量の適切な回数を容易に決定し得る。

## 【0174】

目的とする細胞（すなわち「標的細胞」）は、典型的に哺乳類であり、この用語は、ヒト、飼育及び家畜動物、ならびに動物園、実験室、競技、またはペット動物を含む、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等の、哺乳類として分類される任意の動物を指す。いくつかの実施形態では、標的細胞はヒト細胞である。

## 【0175】

目的とする標的細胞は、主題の rAAV ビリオンによる感染を受けやすい任意の細胞を含む。いくつかの場合では、例えば方法が異種核酸を標的細胞に送達する方法である場合、標的細胞は個体から除去された細胞（例えば「一次」細胞）であり得、または標的細胞は組織培養細胞（例えば確立された細胞株から）であり得る。

## 【0176】

例示的な標的細胞は、肝臓細胞、膵臓細胞（例えば島細胞：アルファ細胞、ベータ細胞、デルタ細胞、ガンマ細胞、及び/またはエプシロン細胞）、骨格筋細胞、心筋細胞、線維芽細胞、網膜細胞、滑膜関節細胞、肺細胞、T細胞、ニューロン、グリア細胞、幹細胞、造血前駆細胞、神経前駆細胞、内皮細胞、及び癌細胞を含むがこれらに限定されない。例示的な幹細胞の標的細胞は、造血幹細胞、神経幹細胞、神経堤幹細胞、胚幹細胞、誘導多能性幹細胞（iPS細胞）、間葉幹細胞、中胚葉幹細胞、肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、筋幹細胞、及び網膜幹細胞を含むがこれらに限定されない。

## 【0177】

「幹細胞」という用語は、本明細書で、自己再生及び分化子孫を生成の両方の能力を有する哺乳類細胞を指すために使用される（例えば Morrison et al. (1997) Cell 88: 287-298 を参照）。概して幹細胞は、以下の特徴：分裂後の2つの娘細胞が異なる表現型を有し得る場合、非同時性または対称性複製を受ける能力；広範な自己再生能力；有糸分裂的無活動形態における存在の能力；及びそれらが存在する組織全てのクローン再生、例えば造血幹細胞が全ての造血系列を再構成する能力、のうちの1つ以上も有する。当業者によって理解されるように、「前駆細胞」は、それらが典型的に広範な自己再生能力を有せず、それらが由来する組織において系列のより限定されたサブセット、例えばリンパ球のみを、または造血環境では赤血球系統を、生成することができるという点で幹細胞とは異なる。本明細書で使用される場合「幹細胞」という用語は、上記に定義される「幹細胞」及び「前駆細胞」の両方を包含する。

## 【0178】

幹細胞は、抗体によって特定される特異的エピトープに関連するマーカーの存在、及び特異的抗体の結合の欠如によって特定されるある特定のマーカーの不在の両方を特徴とし得る。幹細胞は、インビトロ及びインビボの両方での機能的アッセイ、特に複数の分化子孫を起こす幹細胞の能力に関連するアッセイによっても特定され得る。

## 【0179】

目的とする好適な幹細胞は、造血幹細胞及びそれに由来する前駆細胞（米国特許第5,061,620号）；神経堤幹細胞（Morrison et al. (1999) Ce

10

20

30

40

50



1196:737-749を参照)；神経幹細胞及び神経前駆細胞；胚幹細胞；間葉幹細胞；中胚葉幹細胞；肝臓幹細胞、筋幹細胞、網膜幹細胞、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)等を含むがこれらに限定されない。他の目的とする造血「前駆」細胞は、リンパ系統に特化した細胞、例えば未熟T細胞及びB細胞集団を含む。

#### 【0180】

幹細胞または前駆細胞の精製集団が使用され得る。例えば、ヒト造血幹細胞は、CD34、thy-1に特異的な抗体を使用して陽性選択され得、またはグリコホリンA、CD3、CD24、CD16、CD14、CD38、CD45RA、CD36、CD2、CD19、CD56、CD66a、及びCD66bを含み得る系統特異性マーカー、T細胞特異性マーカー、腫瘍/癌特異性マーカー等を使用して陰性選択され得る。中胚葉幹細胞の分離に有用なマーカーには、FcRII、FcRIII、Thy-1、CD44、VLA-4、LFA-1、HSA、ICAM-1、CD45、Aa4.1、Sca-1等が挙げられる。神経堤幹細胞は、低親和性神経成長因子受容体(LNGFR)に特異的な抗体で陽性選択され得、かつマーカースルファチド、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、ミエリンタンパク質P<sub>0</sub>、ペリフェリン、及び神経フィラメントについて陰性選択され得る。ヒト間葉幹細胞は、マーカーSH2、SH3、及びSH4を使用して正に分離され得る。

#### 【0181】

用いられる標的細胞は、新鮮であっても、凍結していても、あるいは事前培養に供されたものであってもよい。これらは胎児、新生児、成体であってもよい。造血細胞は、胎児性肝臓、骨髓、血液、特にG-CSFまたはGM-CSF動員末梢血液、または任意の他の従来の源から得られてもよい。幹細胞が造血または他の系統の他の細胞から分離される様式は、本開示には重要ではない。上記のように、幹細胞または前駆細胞の実質的に均一な集団は、幹細胞に関連するエピトープ特徴を示しながら分化細胞と関連するマーカーを有しない細胞の選択性単離によって得られてもよい。

#### 【0182】

個体に送達され得る核酸は、上記に定義される異種核酸のいずれかを含む。主題の方法を使用して送達され得るタンパク質は、前述のタンパク質のいずれかの機能的断片及び前述のタンパク質のいずれかの機能的変異体も含む。

#### 【0183】

いくつかの実施形態では、治療的に有効な量のタンパク質は、哺乳類宿主内で生成される。治療的に有効な量の特定のタンパク質が、主題の方法を使用して哺乳類宿主内で生成されるかどうかは、特定のタンパク質に適切なアッセイを使用して容易に決定される。例えば、タンパク質がEPOの場合、ヘマトクリットが測定される。

#### 【0184】

rAAVが抗原タンパク質をコードする場合、主題の方法を使用して個体に送達され得る好適な抗原タンパク質は、腫瘍/癌関連抗原、自己抗原(「自己(self)」抗原)、ウイルス性抗原、細菌性抗原、原虫性抗原、及びアレルゲン、ならびにそれらの抗原断片を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、rAAVコード抗原タンパク質への細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答が哺乳類宿主において引き起こされるだろう。他の実施形態では、抗原タンパク質に特異的な抗体が生成されるように、rAAVコード抗原タンパク質への体液性応答が哺乳類宿主において引き起こされるだろう。多くの実施形態では、rAAVコード抗原タンパク質へのTH1免疫応答が、哺乳類宿主において引き起こされるだろう。抗原タンパク質への免疫応答が生成されたかどうかは、十分に確立された方法を使用して容易に決定される。例えば、酵素結合免疫吸着アッセイは、抗原タンパク質への抗体が生成されたかどうかを決定するために使用され得る。抗原特異性CTLを検出する方法は当業者に公知である。例えば、細胞の表面に抗原タンパク質を発現する、検出可能に標識された標的細胞は、血液試料内の抗原特異性CTLの存在についてアッセイするために使用される。

#### 【0185】

治療的に有効な量の異種核酸（例えばポリペプチドをコードする核酸、RNAi剤等）が、主題の方法を使用して哺乳類宿主に送達されたかどうかは、任意の適切なアッセイを使用して容易に決定される。例えば、遺伝子産物がHIVを抑制するRNAi剤である場合、ウイルス負荷が測定され得る。

#### 【0186】

改変rAAVビリオンを生成及び特定する方法

本開示は、スターターAAVカプシドタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換（欠失、挿入等を含む）を有するアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む、改変感染性組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ビリオンを生成及び特定する方法を提供する。スターターAAVカプシドタンパク質は、配列番号10～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0187】

本方法は、概して、突然変異rAAVビリオンライブラリを生成すること、及びスターターrAAVビリオンと比べて変化した特性を有する改変rAAVビリオンのためにライブラリを選択することを含む。スターターrAAVビリオンは、配列番号10～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体AAVカプシドタンパク質を含む。本開示は、ライブラリ及びライブラリを含む組成物をさらに提供する。

#### 【0188】

いくつかの実施形態では、所与の選択ステップは、変化したビリオン特性のための主題のAAVライブラリを濃縮するために、2、3、4回以上反復される。いくつかの実施形態では、AAVライブラリの選択の後、個々のクローンは単離及び配列決定される。

20

#### 【0189】

突然変異体AAVライブラリの生成

スターターAAV cap遺伝子と比べて1つ以上の突然変異体を含む突然変異体AAVライブラリが生成される。スターターcap遺伝子は、配列番号10～13及び26～33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体AAVカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むcapである。rAAV cap遺伝子における突然変異体は、任意の既知の方法を使用して生成される。スターターAAV cap遺伝子の突然変異誘発のための好適な方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）系方法、オリゴヌクレオチド特異性突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループスワップ突然変異誘発、断片シャフリング突然変異誘発（すなわちDNAシャッフリング）等を含むがこれらに限定されない。突然変異を生成するための方法は、当業者において十分に説明される。例えばZhao et al. Nat Biotechnol. 1998 Mar; 16(3): 234-5、Koerber et al., Mol Ther. 2008 Oct; 16(10): 1703-9、Koerber et al., Mol Ther. 2009 Dec; 17(12): 2088-95、米国特許第6,579,678号、米国特許第6,573,098号、及び米国特許第6,582,914号を参照されたく、該文献の全ては、突然変異誘発に関するそれらの教示について、ここで参照により組み込まれる。

30

#### 【0190】

いくつかの実施形態では、cap遺伝子における突然変異を含む突然変異体AAVライブラリは、付着伸長プロセスを使用して生成され得る。付着伸長プロセスは、PCR系の方法を使用するcap遺伝子の増幅を含む。鋳型cap遺伝子は、特異的なPCRプライマーを使用して予備刺激され、変性と非常に短いアニーリング/ポリメラーゼ触媒伸長との反復される周期が続く。それぞれの周期では、成長する断片が配列相補性に基づき異なる鋳型にアニーリングし、さらに伸長する。変性、アニーリング、及び伸長の周期は、全長配列が形成するまで反復される。結果として生じる全長配列は、野生型AAV cap遺伝子と比較して、cap遺伝子において少なくとも1つの突然変異を含む。

40

#### 【0191】

1つ以上の突然変異を含むAAV cap配列を含むPCR産物は、野生型AAVゲノ

50

ムを含有するプラスミドに挿入される。結果として生じるのは、AAV cap 突然変異体のライブラリである。したがって本開示は、約  $10^1$  ~ 約  $10^{10}$  メンバーを含み、かつ AAV cap 遺伝子における突然変異を含む、突然変異体 AAV cap 遺伝子ライブラリを提供する。ライブラリの所与のメンバーは、AAV cap 遺伝子において約 1 ~ 約 50 の突然変異を有する。主題のライブラリは、 $10^1$  ~ 約  $10^9$  の明確に異なるメンバーを含み、それぞれは AAV cap 遺伝子における異なる突然変異（複数可）を有する。

#### 【0192】

cap 突然変異ライブラリが生成されると、その後変化したカプシド特性に基づいて選択され得るウイルス粒子が生成される。ライブラリプラスミド DNA は、好適な宿主細胞（例えば 293 細胞）中にトランスフェクトされ、その後ヘルパーウイルスの細胞への導入が続く。トランスフェクトされた宿主細胞によって生成されるウイルス粒子（rAAV ライブラリ粒子）が採取される。

10

#### 【0193】

##### ライブラリ選択

ライブラリが生成されると、それは、具体的なビリオン特性（すなわち変化した感染特性）について選択される。ウイルス粒子は上記のように生成され（よって改変 rAAV ビリオンのライブラリを生成する）、変化した感染特性（配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む感染性 rAAV ビリオンと比べて）を有する改変 rAAV ビリオンを特定するための 1 つ以上の選択ステップを経る。そのために選択される感染の特性は、1) AAV 中和抗体への変化した結合（例えば低減した結合）、2) AAV 中和抗体の上昇した回避、3) AAV での感染に耐性である細胞の上昇した感染性、及び 4) 変化したヘパリン結合を含み得るがこれらに限定されない。

20

#### 【0194】

##### 1. AAV 中和抗体への低減した結合についての選択

いくつかの実施形態では、主題の AAV ライブラリは、中和抗体の野生型 AAV ビリオンへの結合及び野生型 AAV ビリオンとの中和と比較して（または配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む感染性 rAAV ビリオンと比べて）、野生型 AAV ビリオンに結合してそれを中和する中和抗体への変化した（例えば低減した）結合について選択される。AAV ライブラリ粒子（AAV ライブラリビリオン）を中和抗体に接触させ、AAV ライブラリ粒子が許容状態の宿主細胞を感染させる能力が試験される。典型的に、AAV ライブラリ粒子は様々な濃度の中和抗体に接触させられる。AAV ライブラリ粒子の感染性を低減するために必要とされる中和抗体の濃度がより高いほど、AAV 粒子は中和に対してより耐性である。AAV ライブラリビリオンの、中和する抗 AAV 抗体への結合を直接的に測定する（例えば結合親和性を測定する）ために当業者に既知の任意の便利なアッセイが使用され得る。

30

#### 【0195】

##### 2. AAV 中和抗体からの上昇した回避についての選択

いくつかの実施形態では、主題の AAV ライブラリは、配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む感染性 rAAV ビリオンと比べて上昇した、中和抗体からの回避（すなわち、上昇したヒト中和 AAV 抗体への耐性）について選択される。AAV ライブラリ粒子は、中和 AAV 抗体（たいていヒト中和抗 AAV 抗体）の存在下で標的細胞に接触させられる。AAV ライブラリ粒子を有する細胞の感染を可能にするための好適な長さの時間の後、ヘルパーウイルスを加え、細胞（複数可）を感染させることに成功した AAV ライブラリ粒子を回収する。いくつかの実施形態では、感染性は感染の成功を示すビリオンについて測定される（例えば上記のように）。いくつかの実施形態では、感染の周期、ヘルパーウイルスの添加、及び AAV 粒子の回収は、1、2、3 回以上反復される。選択は、様々な程度の回避について選択するために、様々な量（濃度）の中和 AAV 抗体を用いて生じ得る（例えば、そ

40

50

れぞれの反復される回は、その前の回と比べて上昇した濃度の抗体を利用し得る)。

【0196】

3. 非許容細胞の上昇した感染性についての選択

いくつかの実施形態では、主題のAAVライブラリは、非許容細胞の上昇した感染性(配列番号10~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む感染性rAAVピリオンと比べて)について選択される。AAVライブラリ粒子を非許容細胞(例えば非許容細胞の集合)に接触させる。AAVライブラリ粒子を有する細胞の感染を可能にするための好適な長さの時間の後、ヘルパーウイルスを加え、非許容細胞(複数可)を感染させることに成功したAAVライブラリ粒子を回収する。いくつかの実施形態では、感染の周期、ヘルパーウイルスの添加、及びAAV粒子の回収は、1、2、3回以上反復される。

10

【0197】

4. 変化したヘパリン結合についての選択

いくつかの実施形態では、主題のライブラリは、野生型AAVピリオンヘパリン結合と比べて(または配列番号10~13及び26~33のうちの1つに記載されるアミノ酸配列を含む変異体カプシドタンパク質を含む感染性rAAVピリオンと比べて)上昇したヘパリン結合及び低減したヘパリン結合を含む、変化したヘパリン結合について選択される。AAVライブラリ粒子をヘパリン親和性マトリックスに接触させる。例えば、AAVライブラリ粒子は、AAVライブラリ粒子のヘパリンへの結合を許容する条件下で、ヘパリン親和性カラムに入れられる。例示的な条件は、pH7.5の0.15MのNaCl及び50mMのTrisを用いたカラムの平衡化を含む。AAVライブラリ粒子がヘパリン親和性マトリックスに結合することを可能にした後、AAVライブラリ粒子/ヘパリン親和性マトリックス複合体は、段階的に上昇する濃度のNaClを含有するある量の緩衝剤で洗浄し、それぞれのNaCl濃度で、溶離したAAVライブラリ粒子を採取する。例えば、結合の後、AAVライブラリ粒子/ヘパリン親和性マトリックス複合体は、200mMのNaClを含有する、pH7.5の、50mMの量のTris緩衝剤で洗浄し、溶離したAAVライブラリ粒子を採取する。溶離ステップは、約250mMのNaCl、約300mMのNaCl、約350mM、約400mMのNaCl、約450mMのNaCl、約500mMのNaCl、約550mMのNaCl、約600mMのNaCl、約650mMのNaCl、約700mMのNaCl、または約750mMのNaClを含有する、pH7.5の50mMのTris緩衝剤を用いて反復される。

20

30

【0198】

約450mMのNaClよりも低いNaCl濃度で溶離するAAVライブラリ粒子は、野生型AAVと比べて低減したヘパリン結合特徴を示す。約550mMのNaClよりも高いNaCl濃度で溶離するAAVライブラリ粒子は、野生型AAVと比べて上昇したヘパリン結合特徴を示す。

【0199】

いくつかの実施形態では、溶離したAAVライブラリ粒子は、許容細胞のヘルパーウイルスでの同時感染によって増幅され、ヘパリン親和性マトリックス上で再分画される。本ステップは、変化したヘパリン結合特徴を有するAAVライブラリ粒子を濃縮するために何回も反復され得る。

40

【0200】

本方法では、1つ以上の選択ステップがAAVライブラリ粒子の生成に後続し得る。例えば、いくつかの実施形態では、方法は、上昇したヘパリン結合について選択すること、その後中和抗体への低減した結合について選択することを含む。他の実施形態では、方法は、中和抗体への低減した結合について選択すること、その後上昇したヘパリン結合について選択することを含む。他の実施形態では、方法は低減したヘパリン結合について選択すること、その後中和抗体への低減した結合について選択することを含む。他の実施形態では、方法は中和抗体への低減した結合について選択すること、その後低減したヘパリン結合について選択することを含む。他の実施形態では、方法は、中和抗体への低減した結

50

合について選択すること、その後幹細胞の上昇した感染性について選択することを含む。他の実施形態では、方法は中和抗体への低減した結合について選択すること、その後中和抗体の上昇した回避について選択することを含む。他の実施形態では、方法は中和抗体の上昇した回避について選択すること、その後中和抗体への低減した結合について選択することを含む。

#### 【0201】

したがって、本開示は、それぞれの核酸が変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む複数の核酸を含む、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ライブラリを提供する。コード変異体 A A V カプシドタンパク質は配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載される配列と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。本開示は、それぞれが配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載される配列と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む A A V カプシドタンパク質を含む複数の A A V 粒子を含む、突然変異アデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子のライブラリを提供する。突然変異体 A A V カプシドタンパク質をコードする核酸は、コード突然変異体 A A V カプシドタンパク質の特徴と同様に上記に記載される。

10

#### 【0202】

本開示は、( i ) それぞれが変異体アデノ随伴ウイルス ( A A V ) カプシドタンパク質及び異種核酸を含む 2 つ以上の感染性 r A A V ビリオン、( i i ) それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む 2 つ以上の単離核酸、( i i i ) それぞれが変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む 2 つ以上の宿主細胞、及び( i v ) 2 つ以上の変異体 A A V カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つを含むライブラリをさらに提供し、ライブラリの少なくとも 1 つのメンバーの変異体 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 10 ~ 13 及び 26 ~ 33 のうちの 1 つに記載されるアミノ酸配列と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0203】

##### 組成物及びキット

本開示の方法における使用のための組成物及びキットもまた提供される。主題の組成物及びキットは、主題の感染性 r A A V ビリオン、主題の r A A V ベクター、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む主題のヌクレオチド酸、主題の核酸 ( すなわち、主題の変異体 A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、主題の遺伝子改変宿主細胞 ) を含む単離宿主細胞、主題のライブラリ ( 例えば上記のライブラリのいずれか ) 、及び主題の変異体 A A V カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つを含む。組成物またはキットは、上記のものの任意の便利な組み合わせを含み得る。組成物またはキットは、ヘルパーウイルス及び/またはヘルパーウイルスをコードするヌクレオチド配列を含む核酸もまた含み得る。キットは、改変変異体 A A V カプシドタンパク質をコードする核酸 ( すなわち「突然変異体」核酸 ) の生成のための試薬もまた含み得る。

30

#### 【0204】

上記の組成物に加え、主題のキットは ( ある特定の実施形態では ) 、主題の方法を実践するための説明書をさらに含み得る。これらの説明書は、様々な形態で主題のキット内に存在し得、このうちの 1 つ以上がキット内に存在し得る。これらの説明書が存在し得る 1 つの形態は、キットの包装内の、包装挿入物内等の、好適な媒体または基材に印刷された情報、例えば情報が印刷された紙である。これらの説明書のさらに別の形態は、情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えば、フロッピーディスク、コンパクトディスク ( C D ) 、フラッシュドライブ等である。これらの説明書の存在し得るさらに別の形態は、離れたサイトで情報にアクセスするためにインターネットを介して使用され得るウェブサイトアドレスである。

40

#### 【0205】

本発明はここで完全に記載されており、当業者には、本発明の趣旨または範囲から逸脱

50

せずに様々な変更及び修正がなされ得ることが明白となるであろう。

#### 【実施例】

##### 【0206】

以下の実施例は、当業者に、本発明を行う及び使用する方法の完全な開示及び説明を提供するために述べられ、発明人が彼らの発明として見なすものの範囲を限定することを意図されず、下記の実験が行われる全てのまたは唯一の実験であることを表すことも意図されない。使用される数（例えば、量、温度等）に関して正確性を確実にするよう努力がなされたが、いくつかの実験誤差及び偏差が把握されるべきである。別途示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはその付近である。標準短縮語、例えばb p、塩基対（複数可）；k b、キロベース（複数可）；m l、ミリリットル（複数可）、μ l、マイクロリットル（複数可）、n l、ナノリットル（複数可）、p l、ピコリットル（複数可）、sまたはs e c、秒（複数可）、m i n、分（複数可）、hまたはh r、時間（複数可）、a a、アミノ酸（複数可）、k b、キロベース（複数可）、b p、塩基対（複数可）、n t、ヌクレオチド（複数可）、i . m .、筋肉内（に）、i . p .、腹腔内（に）、s . c .、皮下（に）、i . v .、静脈内（に）等が使用され得る。

10

##### 【0207】

#### 実施例1：

アデノ随伴ウイルス（A A V）遺伝子療法ベクターは、今日までのいくつかの臨床試験において相当な有望性を実証している。しかしながら、幼少期の曝露またはA A Vベクターの以前の投与から生じる、循環する抗A A V抗体が、多くの潜在的患者のためのA A V遺伝子療法の実施を妨げてきた。本発明者らは、インビトロ及びインビボの両方で増強した抗A A V抗体回避が可能である新規A A V変異体を単離した。低及び高効力ヒト血清プールならびにヒトI V I Gを使用する選択から生じるストリンジेंटな圧力は、個々のヒト血清、ヒトI V I G、及びマウス血清由来の抗体中和からの回避が可能であるA A V変異体を進化させ、これは現在までで最も広範に回避的な変異体である。

20

##### 【0208】

#### 材料及び方法

##### 細胞株

細胞株は37℃で5%のCO<sub>2</sub>で培養し、別途示されない限り、米国培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）（バージニア州マナサス）から得た。HEK293T、HeLa、及びHT1080細胞を、10%ウシ胎仔血清（カリフォルニア州カールスバッド、Gibco）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（カリフォルニア州カールスバッド、Invitrogen）を補充した、ダルベッコ改変イーグル培地で培養した。CHO K1及びCHO pgsA細胞を、10%ウシ胎仔血清（Gibco）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Invitrogen）を補充したF-12K培地（ATCC）で培養した。Pro5及びLecl細胞を、10%ウシ胎仔血清（Gibco）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Invitrogen）を補充したMEM-アルファ培地（Gibco）で培養した。

30

40

##### 【0209】

#### 選択のためのヒト血清プール

18の個々のヒト血清試料をInnovative Research, Inc.（ミシガン州サウスフィールド）から得、野生型A A V2についての中和抗体価をそれぞれの試料について決定した（表2）。個々の試料は、抗体の親和性及びエピトープ特異性の両方において変動を有する可能性が高いため、個々の血清試料の同等量を混合することによって、3つの有効な血清プール（= A + F + G、= B + H + M、及び = I + J + N）を生成した。抗体のこれらの変動の存在下での選択は、多くの既存のヒト抗体への耐性の一般的増強をもたらすはずである。さらにより広い範囲の抗体への耐性について選択するために、後の選択をGamimune N、10%ヒトI V I G（インディアナ州エル

50

クハート、Bayer)の存在下で行った。

【0210】

表2：個々のヒト血清試料の中和抗体価

それぞれの試料についての中和抗体(NAb)力価は、血清の不在下で測定される値の37%まで感染性を低減するのに必要な血清の体積分率の逆数として報告する。その後、3つの血清プール( = A + F + G、 = B + H + M、及び = I + J + N)を3つの個々の血清試料の同等の量を混合することによって生成した。

(表2)

ヒト血清試料	およその NAB力価	ヒト血清試料	およその NAB力価
A	500	J	500
B	275	K	172
C	200	L	<75
D	<75	M	2200
E	<75	N	5000
F	350	O	<75
G	425	P	<75
H	450	Q	<75
I	200	R	120

【0211】

ライブラリ生成及びウイルス産生

飽和突然変異誘発ライブラリを作製するために、エラープローンPCRによって、その後

5'-GCGGAAGCTTCGATCAACTACGC-3'(SEQ ID NO: 14)および5'-

GGGGCGGCCGCAATTACAGATTACGAGTCAGGTATCTGGTG-3'(SEQ ID NO:

15)

をそれぞれ順方向プライマー及び逆方向プライマーとして使用するZhao et al.に記載される付着伸長プロセスによって、AAV2 capライブラリを生成した。プールした個体のヒト血清を使用する選択は、飽和突然変異誘発ライブラリのための基礎としての役割を果たした4つの点突然変異を含有する変異体(結果欄に記載)を明らかにした。この変異体のためのcap遺伝子は、特異的な部位のアミノ酸を変更することによって、さらなる突然変異誘発を受けた。プライマー

5'-cattNNKgaccagtctaggaactgg-3'(SEQ ID NO: 16)

及び対応する逆方向相補体プライマーを、R471アミノ酸部位に突然変異を起こさせるために使用した。プライマー

5'-gccacaaggacgatgaagaaNNKtttttctcagagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcaNNKaaaacaagtgtagacattg-3'(SEQ ID NO: 17)

及び対応する逆方向相補体プライマーを、K532及びE548アミノ酸部位に突然変異を起こさせるために使用した。プライマー

5'-ccaacctccagagagcNNKagacaagcagctacc-3'(SEQ ID NO: 18)

及び対応する逆方向相補体プライマーを、N587アミノ酸部位に突然変異を起こさせるために使用した。プライマー

5'-ccaactacaacaagtctNNKaattgtggactttactgtggacNNKaattggcgtgtatt-3'(SEQ ID NO: 19)

及び対応する逆方向相補体プライマーを、V708及びT716アミノ酸部位に突然変異を起こさせるために使用した。無作為化capループ領域を含有するAAV2から成るライブラリ、及び野生型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9 cap遺伝子からのシャッフルDNAを含有するライブラリは、初期選択ステップのためにパッケージングされ、プールされた。(Koerber et al.; M

10

20

30

40

50

ol Ther. 2008 Oct; 16(10): 1703-9、及び Koerber et al.; Mol Ther. 2009 Dec; 17(12): 2088-95、該文献の両方はここで参照によりその全体が組み込まれる)。

#### 【0212】

進化の第2及び第3の回については、ループスワップ/シャッフルライブラリ及び飽和突然変異誘発ライブラリからの cap 遺伝子を、前述のように、5'-CATGGGAAAGGTGCCAGACG-3'(SEQ ID NO: 20) および 5'-

ACCATCGGCAGCCATACCTG-3'(SEQ ID NO: 21)

をそれぞれ順方向プライマー及び逆方向プライマーとして使用するエラープローンPCR 10  
に供することで、無作為の突然変異誘発ライブラリが生成された。複製可能なAAVライ  
ブラリ及びCMVプロモーターの制御下でGFPを発現する組換えAAVベクターは、リ  
ン酸カルシウムトランスフェクト方法を使用しHEK293T細胞(ATCC)を使用して  
パッケージングされ、ウイルスはイオジキソナル(iodixonal)勾配遠心分  
離によって精製された。インピボでの使用のための、CMVプロモーターの制御下でGFP  
またはルシフェラーゼを発現する組換えAAVベクターは、Amicon濾過によって  
さらに精製された。DNase耐性ゲノム力価は、定量PCRによって決定された(Ex  
coffon et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 20  
09 Mar 10; 106(10): 3865-70、及びMaheshri et al., Nat Biotechnol. 2006 Feb; 24(2): 198-204 20  
、該文献の両方はここで参照によりその全体が組み込まれる。)

#### 【0213】

##### ライブラリ選択及び進化

1回の選択は、AAV開始ライブラリを使用するHEK293T細胞感染として定義され 30  
(プールされた個々のヒト血清については室温で30分間、または感染の前に加熱不活  
性化したIVI Gと共に37で1時間インキュベートし)、その後アデノウイルス救出  
及び成功した変異体の回収が続く。各回の進化は、開始ライブラリを作製するためのcap  
遺伝子の突然変異誘発及び3回の選択から成る。3回の進化を各ライブラリで行い、こ  
のうちクローン分析を各回の進化の間に行なった。各回の進化のための開始ライブラリは  
、上記のように生成された。3回目の選択の後、AAV cap 遺伝子は、成功したAAV 30  
変異体のプールから単離され、PCRによって増幅された。cap 遺伝子は、NotI  
及びHindIIIを使用してpXX2組換えAAVパッケージングプラスミドに挿入され  
た。cap 遺伝子は、その後カリフォルニア大学Berkeley校のDNA配列決定  
施設で配列決定され、Geneiousソフトウェア(ニュージーランドオークランド、  
Biomatters)を使用して分析された。AAV2カプシド(Protein D  
atabank受託番号1LP3)の3次元モデルが、Pymol(カリフォルニア州サ  
ンカルロス、DeLano Scientific)において表された。

#### 【0214】

##### 抗体回避変異体のインピトロ形質導入分析

HEK293Tは、感染の24時間前に $3 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で播種した。変 40  
異体は、感染の前に、加熱不活性化したIVI G、個々のヒト血清、または個々のマウス  
血清と共に37で1時間インキュベートし、細胞はその後ゲノムMOI2000でrA  
AV-GFPで感染させた。GFP陽性細胞のパーセンテージは、ImageXpress  
Micro Cellular Imaging and Analysis System(カリフォルニア州サニーベール、Molecular Devices)及び  
MetaXpress Image Analysis Software、バージョン  
3.1.0, Multi Wavelength Cell Scoring Appl  
ication Module(Molecular Devices)を使用して、感  
染の48時間後に評価した。

#### 【0215】



## インビトロ形質導入分析

相対的な形質導入効率性を決定するために、親野生型 AAV 血清型、HEK293T、CHO K1、CHO pgsA (全ての表面グリコサミノグリカンを欠如する)、CHO Pro5 (Lec1 細胞を含むいくつかのグリコシル化突然変異体のための親系統)、CHO Lec1 (グリコシル化欠損)、HeLa、及び HT1080 細胞 (ヒト線維肉腫細胞株) と比較した、選択された突然変異体を、感染の 24 時間前に、1 つのウェルあたり  $2.5 \times 10^4$  細胞の密度で播種した。細胞を、100 ~ 1000 の範囲の MOI で、rAAV1-GFP、rAAV2-GFP、rAAV6-GFP、シャッフル 100.1-GFP、シャッフル 100.3-GFP、SM10.2-GFP、またはシャッフル 100.7-GFP で感染させた。GFP 陽性細胞のパーセンテージは、Beckman-Coulter Cytomics FC500 フローサイトメーター (カリフォルニア州ブレア、Beckman-Coulter) を使用して感染の 48 時間後に評価した。

10

## 【0216】

## 抗体回避変異体のインビボ分析

インビボでの遺伝子発現の分析のために、8 週齢の雌の Balb/c マウスを、組換えシャッフル 100.3 (配列番号 12 を参照)、SM10.2 (配列番号 10 を参照)、または AAV2 ベクターの投与の 24 時間前に、尾静脈注射を介して、1 匹のマウス当たり 4 mg の IVIG またはリン酸緩衝生理食塩水 (対照マウス) で予備刺激した。マウスは、尾静脈注射を介して、CMV プロモーターの制御下でルシフェラーゼをコードする組換え AAV ベクターの  $10^{11}$  ウイルス性ゲノムで感染させた。生物発光撮像のために、マウスを 2 % のイソフルオラン及び酸素で麻酔した。D-ルシフェリン基質 (ミズーリ州セントルイス、GOLD Biotechnology) を体重の  $500 \mu\text{g/g}$  の投与量で、腹腔内注射した。画像を VivoVision IVIS Lumina 撮像装置 (カリフォルニア州アラメダ、Xenogen) を使用して生成した。それぞれのマウスについて、4 週間にわたり毎週、基質注射の 7 ~ 10 分後に腹側画像を撮った。注射の 5 週間後、血清を、心臓穿刺を介して採取し、マウスをその後 0.9 % の生理食塩水溶液で灌流した。心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、脳、脊髄、及び後肢筋が回収され凍結された。凍結した組織試料は、インビトロルシフェラーゼ分析のために、Reporter Lysis Buffer (ドイツマンハイム、Promega) 内で均質化及び再懸濁させた。ルシフェラーゼを含有する可溶化液を、10,000 g で 10 分間の遠心分離によって浄化した。試料をアッセイするために、20  $\mu\text{L}$  の可溶化液を 100  $\mu\text{L}$  のルシフェラーゼアッセイ緩衝剤に加え、混合し、5 分間インキュベートし、ルミノメーター内に配置した。シグナルは、2 秒の遅延で 30 秒間統合され、TD20/20 ルミノメーター (カリフォルニア州サニーベール、Turner Designs) によって検出される Relative Light Units (RLU) で報告された。ルシフェラーゼシグナルは、ピシンコニン酸アッセイ (Pierce) によって決定される合計タンパク質含量に正規化した。

20

30

## 【0217】

## 結果

40

本発明者らの結果は、AAV が、インビトロ及びインビボの両方で抗 AAV 抗体による中和を有意に克服するために進化し得ることを実証した。野生型 AAV インビトロよりも 2 ~ 35 倍高い中和抗体価を必要とする (ヒト IVIG を使用する) 新規 AAV 変異体を単離した。抗体中和特性はまた、中和抗体の存在下で増強したインビボでの形質導入にも変換された。抗 AAV 抗体に耐性である、かかる新規クローンの単離は、核酸送達ベクターとしての AAV に基づく治療のより広い実施 (AAV 遺伝子療法に現在不適格である高い抗体価を有する個体を含む) を可能にする。

## 【0218】

## 定向進化による AAV ライブラリ生成及び選択

図 1a は、ヒト抗体中和を回避することができる新規 AAV 変異体を単離するために使

50

用される、定向進化アプローチの模式図を示す。ウイルスのライブラリは、以下の段落に記載されるDNA突然変異誘発技術を使用して作製された(図1a、ステップ1及び2)。最初の選択の間、AAV2 cap遺伝子に対するエラーブローンPCR突然変異により作製したウイルス性ライブラリのプールは、様々な希釈の低効力 ヒト血清プールと共に、HEK293T細胞の感染の前に30分間室温でインキュベートした(ステップ3)。低効力 ヒト血清プールに対する3回の選択(図1a、ステップ4及び5)の後、この中和血清プールへの増強した耐性を有するいくつかの変異体を得られた(図1a、ステップ6、図7a)。変異体1.45は、2点突然変異(N312K、N449D)を含有し、これは、野生型AAV2と比較して、プールによる中和に対する10倍を超えるより高い耐性をもたらした。

10

#### 【0219】

変異体1.45からのcap遺伝子は、追加の無作為突然変異誘発に供され、結果として得られたライブラリは、並行して 及び プールに対するさらに3回の選択のために選択された。抗体回避においてわずかな改良のみが観察された(データ表示せず)ため、回収されたcap遺伝子はプールされDNAシャッフリング及びEP-PCRによる追加の多様化を受けた。 及び プールの両方からの血清の増加する量に対するもう3回の選択は、野生型AAV2と比較して、ウイルス性ライブラリから回収されたウイルスの量における、実質的な富化をもたらした(図7b、c)。両方のプールからの成功したcap遺伝子の配列決定は、いくつかの低頻度突然変異体及び単一の優性突然変異体である変異体4.3を明らかにし、変異体4.3は、両方のライブラリ内に存在する4つの点突然変異(N312K、N449D、N551S、及びI698V)を含有した。ヒトIIVIGの存在下で、変異体1.45は、中和への適度な1.2倍増強された耐性を実証し、一方で4.3は中和への3.1倍増強された耐性を実証した(図7d)。この観察は、個々のヒト血清のプールが、一般的ヒト集合において存在する抗体の増強した回避が可能であるAAV変異体を単離させるために使用され得るという仮説を認める。

20

#### 【0220】

抗AAV抗体による中和に抵抗することにおける、変異体4.3の適度な成功は、4.3 cap遺伝子に基づくライブラリの発展を引き起こした。事前にAAV2カプシド上の免疫原性部位であると決定されたアミノ酸部位R471、K532、E548、N587、V708、T716は、4.3の抗体耐性に改良を加え得るアミノ酸突然変異を発見する試みで、飽和突然変異誘発を受けた。この「飽和突然変異誘発」ライブラリは、7つの親AAV血清型の無作為capキメラから成る「シャッフ」ライブラリ及び置換されたループ領域を有するAAV2 capから成る「ループスワップ」ライブラリと共に、追加の3回の選択を受け、ここにおいてウイルス性ライブラリのプールを、様々な希釈のヒトIIVIGと共にHEK293T細胞の感染の前に37で1時間インキュベートした。AAVライブラリでの感染及びアデノウイルス重感染による感染性AAV変異体の増幅の後、選択の成功を決定する方法として、それぞれのライブラリ状態からの、ウイルス性ゲノムの数またはウイルス性力価を定量化し、野生型AAV2の力価と比較した(図1b)。飽和突然変異誘発及びループスワップ/シャッフライブラリを使用する選択のそれぞれの回について、野生型AAV2よりも高いウイルス性力価を生成した1:10及び1:100 IIVIG希釈状態からのウイルス性プールが、選択の後続の回のための開始点として使用された。3回の選択の後、成功したウイルス性cap遺伝子は単離され、最も効率的な遺伝子送達を有するウイルスを決定するために個々に試験された。さらに、3回目の選択から単離されたcap遺伝子は、エラーブローンPCR突然変異誘発の追加の回を受け、このプロセスはウイルスの適応度を繰り返し上昇させるために反復された。

30

40

#### 【0221】

図1は、増強した抗体回避のためのAAVの定向進化を描写する。(a)定向進化の概略。1)いくつかの相補的アプローチを使用してcap遺伝子を遺伝子的に多様化することによって、ウイルス性ライブラリを作製する。2)ウイルスを、プラスミドトランスフェクトを使用してHEK293T細胞内にパッケージングし、次いで回収及び精製する。

50

3) ウイルス性ライブラリをいくつかの濃度のヒト I V I G と共にインキュベートし、インビトロで H E K 2 9 3 T 細胞に導入する。4) 成功したウイルスを、アデノウイルス重感染を介して増幅して回収する。5) 成功したクローンを、より低い M O I での反復される選択によって濃縮する。6) 単離されたウイルス性 D N A は、成功した c a p 遺伝子を明らかにする。7) 成功した c a p 遺伝子を、選択の新規開始点としての役割を果たすために再度突然変異させる。(b) ループスワップ/シャッフル、及び飽和突然変異誘発ライブラリからの抗体回避変異体の選択。H E K 2 9 3 T 細胞を、ウイルス性ライブラリで 2 4 時間感染させた。細胞を生産的に感染させたウイルス粒子をアデノウイルス感染により増幅させ、救出された A A V を q P C R によって定量化した。I V I G の 1 : 1 0 希釈は、1 0 m g の I V I G / m L の濃度に対応する。エラーバーは標準偏差を示す ( n = 3 ) 。

10

#### 【 0 2 2 2 】

図 7 は、A A V 2 に基づくヒト抗体回避体の生成を実証する。(a) 低ストリンジェンシーの プールに対する 3 回の選択の後に選択される 4 つのウイルス性クローンは、1 の M O I の 血清の 1  $\mu$  L への増強した耐性を実証する。さらなる 2 回の多様化 (すなわち突然変異誘発及び D N A シャッフル) 及び選択 (血清量増加を 3 回) は、大量の非常に効力のある (b) 及び (c) プールの存在下で有意に向上したウイルス回収をもたらした。(d) さらに、2 つのウイルス性クローン ( 1 . 4 5 及び 4 . 3 ) は、野生型 A A V 2 と比較して、約 1 0 0 , 0 0 0 の個体由来のプールされたヒト静脈内免疫グロブリン ( I V I g ) と共に存在する既存の抗体の高度に多様なプールに対する 1 . 2 3 倍及び 3 . 1 0 倍増強した耐性を実証した。

20

#### 【 0 2 2 3 】

インビトロでの新規進化 A A V 変異体の上昇した抗体回避

ヒト I V I G に対する 9 回のスクリーニング後の飽和突然変異誘発及びループスワップ/シャッフルライブラリからの、個々の分析のために選択及びパッケージングされた 1 2 のクローンのうち、1 2 全てが、野生型 A A V 1 及び A A V 2 の両方よりも高い中和抗体価を必要とした (図 2 a 及び表 1 )。中和のために野生型 A A V 2 よりも 3 5 倍高いインビトロ I V I G 濃度を必要とした、変異体シャッフル 1 0 0 - 3 (配列番号 1 2 を参照) は、1 m g / m L の I V I G の存在下で、細胞のおよそ 1 0 % に形質導入することがなお可能であった (図 2 b )。さらに、A A V 2 飽和突然変異誘発ライブラリからの変異体 S M 1 0 - 2 は、野生型 A A V 2 よりも 7 . 5 倍高いインビトロ I V I G 濃度を中和に必要とした。さらに、変異体シャッフル 1 0 0 - 3 及び S M 1 0 - 2 (配列番号 1 0 参照) は、血友病 B 臨床試験から排除された個々の患者からの血清試料の存在下で、増強した形質導入を示した (図 3 ) ( N a t h w a n i e t a l . , N E n g l J M e d . 2 0 1 1 D e c 2 2 ; 3 6 5 ( 2 5 ) : 2 3 5 7 - 6 5 ) 。

30

#### 【 0 2 2 4 】

図 2 は、抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。3 回の進化の後に単離された抗体回避突然変異体の c a p 遺伝子を、G F P をコードする組換え A A V をパッケージングするために使用し、H E K 2 9 3 T 細胞の感染の前にヒト I V I G と共にインキュベートした。残っている感染性粒子の割合を、高含量蛍光撮像を使用して決定し、I V I G の不在下で感染性力価に正規化した。I V I G への耐性を有するそれぞれのライブラリからの 2 つのクローンを示す。分析された他のクローンについてのデータは表 1 に示す。(a) 中和曲線。エラーバーは、標準偏差を示す ( n = 3 )。(b) いくつかの I V I G 希釈からの代表的な蛍光画像は、突然変異体が、高濃度の中和抗体の存在下で H E K 2 9 3 T 形質導入が可能であることを示す。

40

#### 【 0 2 2 5 】

図 3 は、抗体回避変異体の中和プロファイルを示す。ヒト血清は、A A V に対する高い中和抗体力価の存在により血友病 B 臨床試験から除外された個人から得られた。G F P をコードする組換え A A V は、H E K 2 9 3 T 細胞の感染の前に、個々のヒト血清試料と共にインキュベートした。残っている感染性粒子の割合を、蛍光顕微鏡法を使用して決定し

50

、ヒト血清の不在下で感染性力価に正規化した。エラーバーは標準偏差を示す (  $n = 3$  )  
。

#### 【 0 2 2 6 】

12のクローンの配列分析は、最も高い中和抗体耐性を有する2つの変異体である、シャッフル100-3 (配列番号12参照) 及びシャッフル100-1 (配列番号11参照) が、AAV1-4、AAV6、及びAAV9の断片を含有するほぼ同一のシャッフルカプシドであることを示した (図4)。2つの変異体の間の、アミノ酸469 (AAV6残基対AAV7残基) 及び598 (AAV6残基対AAV1残基) における差異は、シャッフル100-3 (配列番号12参照) についての中和抗体価におけるほぼ3倍の増加に変換される (表1)。4番目に高い中和抗体耐性 (表1) を有した変異体シャッフル100-7 (配列番号13参照) もまた、AAV1、AAV6、及びAAV8の断片を含有するシャッフルカプシドであり (図4)、野生型AAV1及びAAV8が抗AAV2抗体を回避することに有効であることを示す報告されたデータと良好に合致する。興味深いことに、変異体SM10-2 (配列番号10参照) は変異4.3によって得られる点突然変異を保持し、飽和突然変異誘発部位にて野生型残基も保持した。変異体SM10-2 (配列番号10参照) は、表面残基D472N及び内部残基L735Qにて追加の点突然変異を得た。図4は、ループスワップ/シャッフル及び飽和突然変異誘発クローンのアミノ酸配列を示す。(a) カプシドタンパク質の模式図を、最も高い中和IVI G濃度を有するそれぞれのライブラリからの2つのクローンについて示す。それぞれの領域は、それが由来する親血清型に応じて影が付けられる。黒い矢印は、VP1、VP2、及びVP3カプシドタンパク質の開始コドンを示す (左から右へ)。灰色の矢印は、AAV2カプシドに基づく表面ループ領域I、II、III、IV、及びVを示す (左から右へ)。(b) 溶解構造に基づく完全AAV2カプシドの分子モデルを、最も高い中和IVI G濃度を有するそれぞれのライブラリからの2つのクローンについて示す。それぞれの領域は、それが由来する親血清型に応じて影が付けられる。変異体シャッフル100-3 (配列番号12参照) については、黒い矢印は変異体シャッフル100-1 (配列番号11参照) からの差異を示す。変異体SM10-2 (配列番号10参照) については、突然変異N449D、D472N、N551S、及びI698Vは表面突然変異 (黒) である。

#### 【 0 2 2 7 】

表1：ライブラリクローン及び親血清型のIVI G中和抗体価

野生型AAV1、AAV2、AAV8、ならびにループスワップ/シャッフル及び飽和突然変異誘発ライブラリから回収された変異体からのカプシドを有する組換えAAV-GFPベクターを中和するために、ヒトIVI Gを使用した。遺伝子送達効率性をIVI Gの不在下のものの50%に低減するために必要とされるIVI G濃度 (mg/mL) が示され、AAV2の送達を低減するために必要とされる濃度と比較される。分析された全ての変異体は、野生型AAV1及びAAV2よりも高い濃度のIVI Gを必要とした。中和抗体価は、図2の曲線を指数関数的曲線に当てはめることによって決定された。配列番号は「アミノ酸、ヌクレオチド」として記載される。

(表1)

クローン	配列番号	中和IVIG濃度	AAV2と比べた耐性倍率
		<i>mg/ml</i>	
AAV1	1	0.026	1.757
AAV2	2	0.015	1.000
AAV8	8	0.092	6.113
シャッフル10-2	26, 34	0.037	2.443
シャッフル10-6	27, 35	0.028	1.842
シャッフル10-8	28, 36	0.084	5.583
シャッフル100-1	11, 23	0.183	12.178
シャッフル100-2	29, 37	0.073	4.831
シャッフル100-3	12, 24	0.529	35.227
シャッフル100-7	13, 25	0.090	6.025
SM 10-1	30, 38	0.071	4.732
SM 10-2	10, 22	0.113	7.519
SM 10-8	31, 39	0.051	3.409
SM 100-3	32, 40	0.074	4.941
SM 100-10	33, 41	0.066	4.393

## 【 0 2 2 8 】

変異体シャッフル100-3（配列番号12参照）、シャッフル100-1（配列番号11参照）、及びシャッフル100-7（配列番号13参照）は、親血清型AAV1及びAAV6の形質導入を模倣する形質導入プロファイルを有する（図5）。さらに、SM10-2（配列番号10参照）における突然変異は、ヘパリン依存性を予防せず（親血清型AAV2において見出される通り）、AAV2と同様のプロファイルをもたらす（図5）。

## 【 0 2 2 9 】

図5は、新規aav変異体のインビトロ向性を実証する。緑色蛍光タンパク質を発現する組換えAAVベクターを使用して、細胞株：CHO、pgsA（全ての表面グリコサミノグリカン欠如）、Pro5、Lec1（シアル酸欠如）、HEK293T、HeLa、及びHT1080（ヒト線維肉腫細胞株）、のパネルを形質導入し、新規AAV変異体の形質導入特徴のプロファイルを得た。エラーバーは、標準偏差（n=3）を示す。

## 【 0 2 3 0 】

インビボでの新規進化AAV変異体の上昇した抗体回避

変異体シャッフル100-3及びシャッフル100-7の局在化パターンを決定するために、ルシフェラーゼ酵素活性が、AAV2、シャッフル100-3、またはシャッフル100-7を注射したナীবマウスの様々な組織において試験された（図6a）。変異体シャッフル100-7は、7倍より高い心臓の形質導入、5倍より高い肺の形質導入、及び4.5倍より低い肝臓の形質導入を除き、AAV2と同様のインビボ向性を示した。シャッフル100-3変異体は、AAV2よりも、4倍を超えてより高い脳の形質導入、3倍を超えてより高い肺の形質導入、及び2.7倍より高い筋肉の形質導入を示した。これ

らのマウスからの血清の分析は、変異体シャッフル100-3が、AAV1、AAV2、AAV8、またはシャッフル100-3遺伝子送達ベクターを与えられたマウスからの血清について、中和のために、AAV1及びAAV8よりも同等以上のインビトロ血清濃度を必要としたことを示した(図11)。シャッフル100-7は、AAV1、AAV2、AAV8、シャッフル100-3、またはSM10-2遺伝子送達ベクターを与えられたマウスからの血清について、中和のためにAAV1よりも同等以上のインビトロ血清濃度を必要とした(図11)。さらに、両方の変異体は、AAV2遺伝子送達ベクターを与えられたマウスからの血清によって、試験された全ての野生型AAV血清型よりも、中和されなかった。興味深いことに、さらに、変異体シャッフル100-3は、それに対して免疫化されたマウスの血清によって、試験された他の血清型または変異体のいずれよりも、中和されなかった(図11)。このデータは、複数のベクター投与を必要とする適用において、これらの変異体が、野生型AAV血清型または他の変異体との組み合わせで使用され得る可能性を示す。

10

#### 【0231】

図11は、免疫化マウス血清中のライブラリクローン及び親血清型の中和抗体価を示す。ライブラリクローンまたは野生型AAVを投与されたマウスからの血清は、野生型AAV1、AAV2、AAV8からのカプシド、及びループスワップ/シャッフル及び飽和突然変異誘発ライブラリから回収された変異体を有する、組換えAAV-GFPベクターを中和するために使用された。遺伝子送達効率を血清の不在下での効率の50%に低減するために必要とされる血清希釈を示す。

20

#### 【0232】

インビボで抗体中和を回避する変異体シャッフル100-7及びシャッフル100-3の能力を決定するために、マウスは、AAV注射の前にヒトIVIGで受動的に免疫化された。変異体シャッフル100-7は、ルシフェラーゼ酵素活性によって測定され、AAV2よりも有意に高い心臓、肝臓、及び筋肉での形質導入を有した(図6b)。変異体シャッフル100-3は、AAV2と比較して有意により高い心臓及び筋肉での形質導入を有した(図6b)。

#### 【0233】

図6は、新規AAV変異体のインビボ局在化及び中和を示す。(a)ルシフェラーゼをコードする組換えAAVベクターを、雌のBALB/cマウスに尾静脈注射を介して投与した。5週間後、ルシフェラーゼ活性のレベルを決定し、分析されたそれぞれの試料について、合計タンパク質に正規化した。(b)ルシフェラーゼを発現する組換えAAVベクターを、4mgのヒトIVIGの尾静脈注射の24時間後に、尾静脈注射を介して雌BALB/cマウスに投与した。5週間後、ルシフェラーゼ発現のレベルは、分析されたそれぞれの試料について合計タンパク質に正規化した。エラーバーは標準偏差(n=3)を示し、\* = p < 0.05, RLU、相対的ルシフェラーゼ単位。

30

#### 【0234】

個々のヒト血清のプールに対して選択されるAAV2系のエラーブローンライブラリから単離された変異体4.3は、4つの点突然変異(N312K、N449D、N551S、及びI698V)を含有した。興味深いことに、これらの位置のうちの2つ(N449及びN551)は、ヒト血清の他のプールを使用して免疫原性残基として事前に特定されており、これらの部位を含む抗原性エピトープは多くの異なる中和抗体によって標的とされることを実証した。したがって、これらの部位は、突然変異のための興味深く価値のある標的である。飽和突然変異誘発ライブラリ内で定向進化及び合理的な設計を合わせることで、変異体SM10-2の単離をもたらした。これは、インビトロのAAV1及びAAV2の両方よりも高い抗体耐性が可能であった。変異体SM10-2は、変異4.3上で見られるものに対して2つの追加の点突然変異(D472N及びL735Q)を組み込む。D472N突然変異は、以前に、HEK293細胞内のカプシド合成のレベルを上昇させることが示された。同様に、アミノ酸位置735の正電荷リジン側鎖の、非電荷グルタミン側鎖との交換は、それが集合カプシドの内側に位置付けられるにもかかわらず変

40

50

異体シャッフル100-7内にも存在するため、カプシドを安定化する機能を果たし得る(図4)。

【0235】

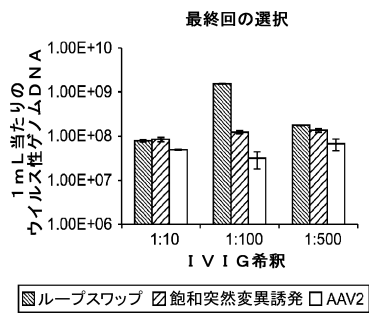
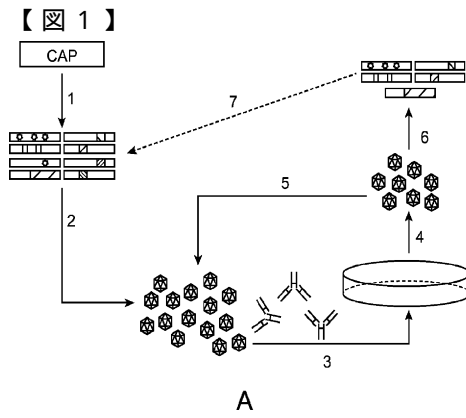
キメラAAVカプシドの作製は、複数のAAV血清型からの望ましい特徴を混合させ得るウイルス性変異体の作製を可能にする。AAV8及びAAV9もまた、IVIgによる中和に対してAAV2よりもはるかに耐性があると示されてきたが、これらのカプシドに特異的なアミノ酸は、本発明者らの選択の間に単離されるシャッフル変異体の表面上の小さいスパン内にのみ存在した(図4)。インビトロで抗体中和のより効率的な回避を示す変異体である、シャッフル100-3は、その親血清型AAV1及びAAV6と同様のインビトロ向性を示したが、どちらの野生型血清型よりも高い率の感染性であった。シャッフル100-1とシャッフル100-3との間のアミノ酸469及び598における差は、シャッフル100-3についての中和抗体価におけるほぼ3倍の上昇に変換される。Lochrie et al.による研究は、ヒト血清及びIVIgによって認識される免疫原性残基は異なることを報告しており、これは様々なヒトがAAVカプシド上の異なるセットのエピトープへの様々な中和抗体を生成することができ、かつ中和からの完全な逃避は容易でないことを示唆した(Lochrie et al., J Virol. 2006 Jan; 80(2): 821-34)。本発明者らの研究は、様々な量及び効力の抗AAV抗体を含有するいくつかの異なる血清プールを使用する複数の回の定向進化の使用が、複数の抗AAV抗体プールの存在下で、インビトロ及びインビボの両方で増強した細胞形質導入が可能である新規AAV変異体の単離をもたらすであろうことを実証する。

【0236】

動物及びヒトにおけるAAVベクター成分への適応免疫応答は、多くの場合、同じ血清型のAAVベクターの再投与を阻み、複数のベクター投与を必要とする遺伝子送達用途を困難にする。生体内分布研究において使用されるマウスからの血清を使用するインビトロ中和アッセイは、変異体が野生型AAVよりもこれらの血清によって中和されないことを実証し(図11)、これはベクター再投与が必要である遺伝子療法戦略に有用であり得る。例えば、シャッフル100-3は、AAV2を注射されたマウスからの血清によって中和されず、AAV2は、シャッフル100-3を注射されたマウスからの血清によって中和されず、この変異体が野生型AAV血清型との組み合わせで、または複数のベクター投与を必要とする用途において、使用され得ることを示唆した。結論として、本発明者らは、インビトロ及びインビボの両方で、個々のヒト患者、プールされたヒト血清、及びマウス血清に由来する抗AAV抗体による低減した中和が可能である、新規AAV変異体を単離するために、定向進化を使用した。

【0237】

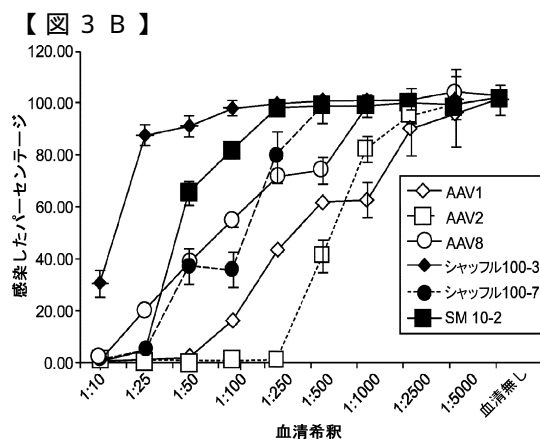
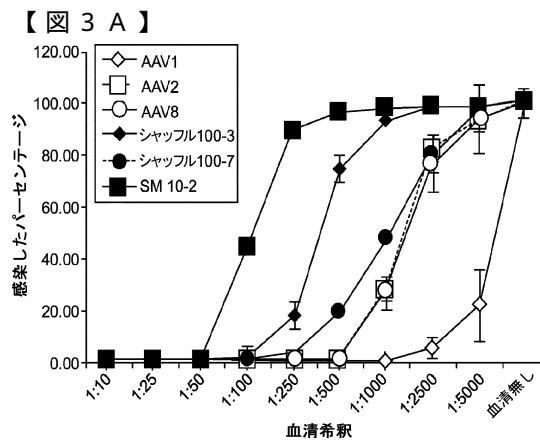
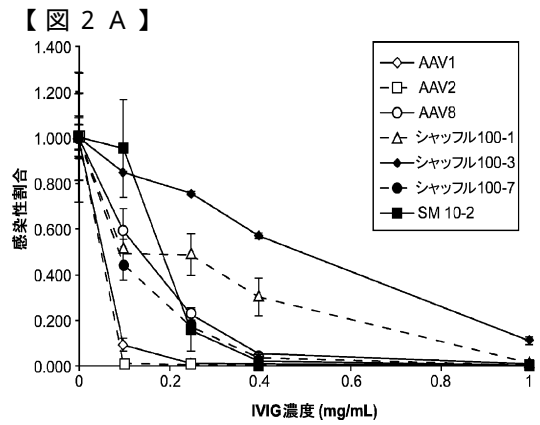
本発明が、その具体的実施形態への参照を伴って記載されてきた一方で、当業者には、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更がなされ得、均等物が置換され得ることが理解されるはずである。さらに、具体的な状況、材料、組成物、プロセス、プロセスステップ(単数または複数)を、本発明の目的、趣旨、及び範囲に適應させるために、多くの修正がなされ得る。全てのかかる修正は、本明細書に添付される特許請求の範囲内であることが意図される。



B

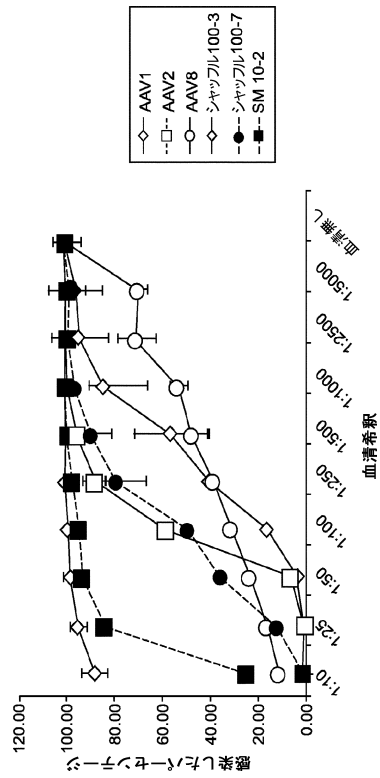
【図 2 B】

SM 10-2			
シャッフル 100-7			
シャッフル 100-3			
シャッフル 100-1			
AAV8			
AAV2			
AAV1			
	1 mg/mL IVIG	0.25 mg/mL IVIG	血清無し

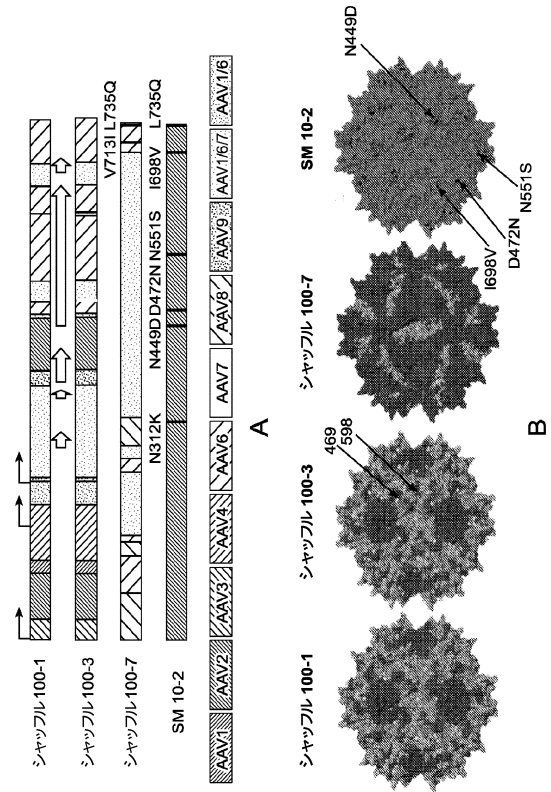




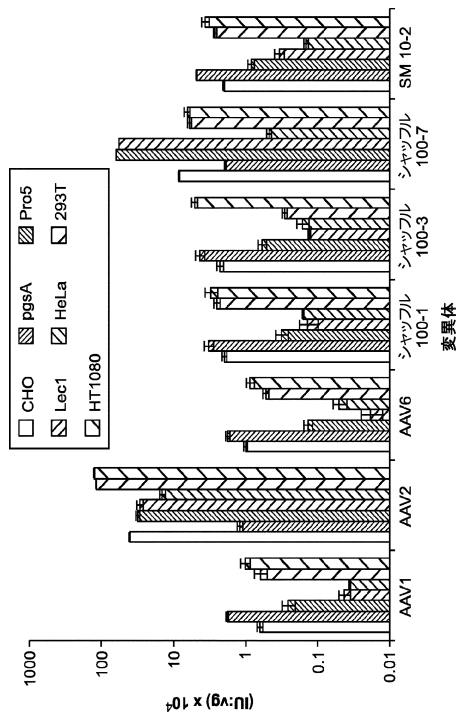
【図3C】



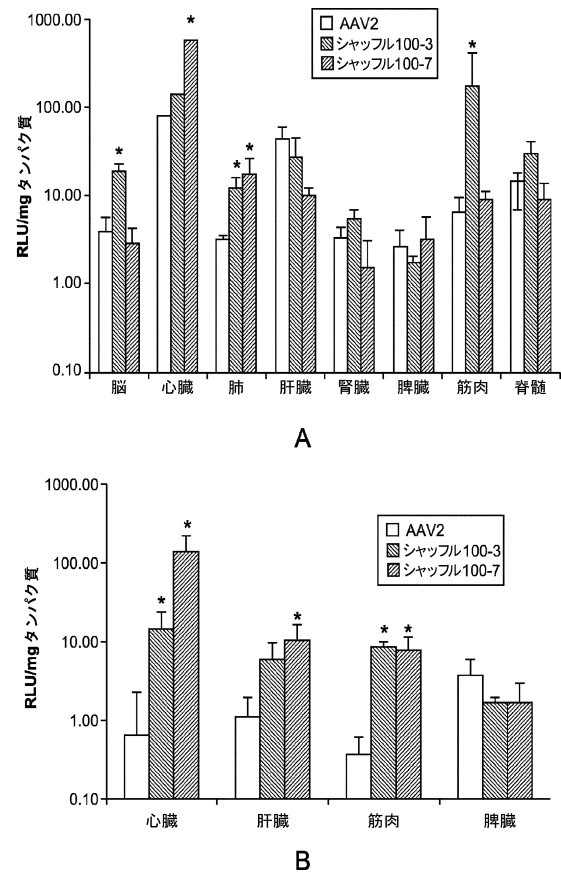
【図4】



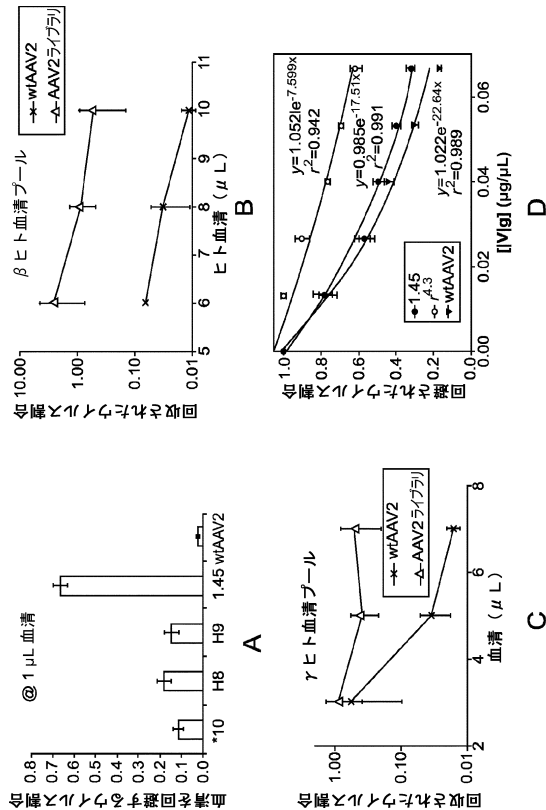
【図5】



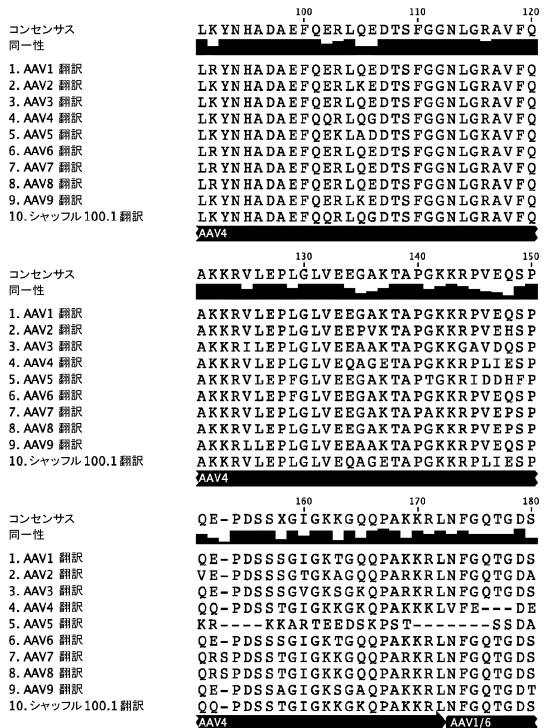
【図6】



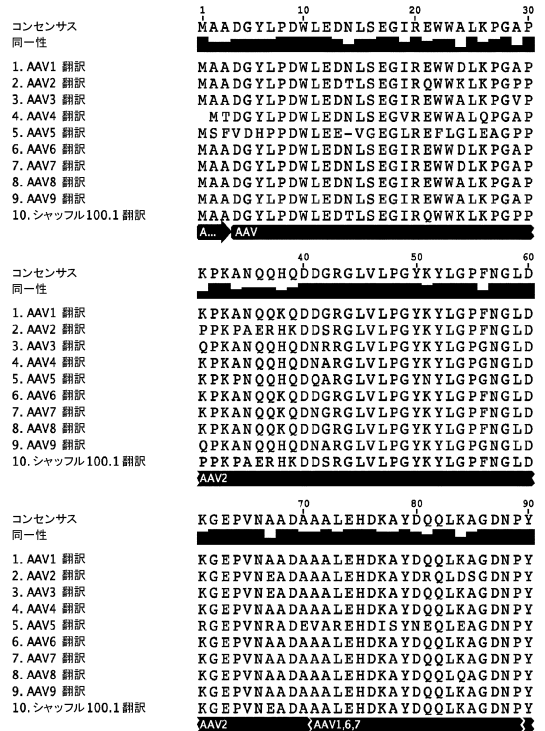
【図 7】



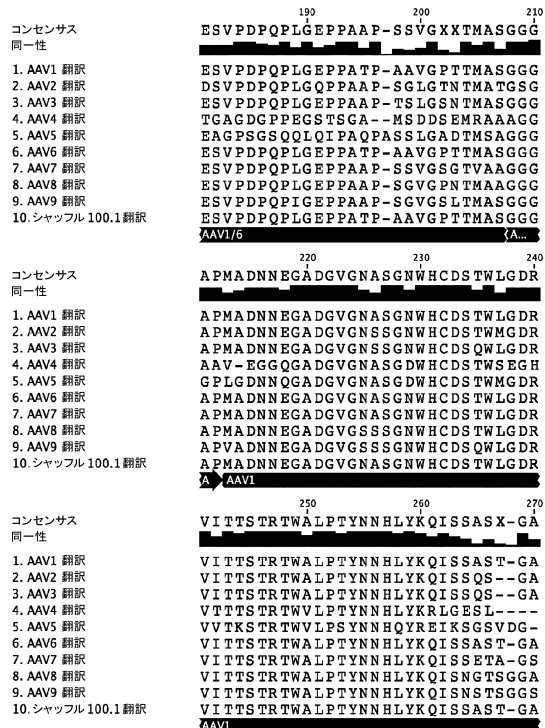
【図 8 B】



【図 8 A】



【図 8 C】



## 【図 8 D】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

280 290 300

SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW

SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
-QSNITYNGFSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
SNANAYFGYSTPWGYFDNRRFHSHWSPRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
TNDNTYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
TNDNTYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
SNDNAYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYFDNRRFHCHFSPRDW

AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

310 320 330

QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN

QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVRGVTTQN  
QRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTQ  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQN

AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

340 350 360

DGVTTIANNLTSTVQVFDDSEYQLPYVLGS

DGVTTIANNLTSTVQVFSDDSEYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTSTVQVFDSEYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTSTVQVFDSEYQLPYVLGS  
NGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYVMDA  
DSTTIANNLTSTVQVFFDDDYQLPYVVG  
DGVTTIANNLTSTVQVFSDDSEYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTSTVQVFSDDSEYQLPYVLGS  
BGTKTIANNLTSTVQVFDSEYQLPYVLGS  
NGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTSTVQVFSDDSDYQLPYVLGS

AAV1 AAV9

## 【図 8 F】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

460 470 480

YLNRTQN-XSGTAXNKXLLFSQGGPXGMSV

YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSV  
YLSRTNT-PSGTTTQSRLOQFSQAGASDIRD  
YLNRTQGTSGTTNQSRLFSQAGPQMSML  
GLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN  
RFVSTNN-----TGGVQFNKNLAGRYAN  
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSV  
YLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE  
YLSRTQT-TGGTANTQTLGFSQGGPNTMAN  
YLSKTIIN-GSGQNQTLKFSVAGPSNMAV  
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSV

AAV1/G AAV6 AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

490 500 510

QXKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFA

QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT  
QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADN-NNSEYS  
QARNWLPGPCYRQQRVLSKTANDN-NNSNFP  
EKKNWLPGPSIKQQGFSKTANQNYKIPATG  
TYKNWLPGPMGRQGWNLGSGVYN-RASVSA  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT  
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFA  
QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQDQ-NNSNFA  
QGRNYYIPGPSYRQQRVSTTVTQDQ-NNSNFA  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT

AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

520 530 540

WTGASKYH----LNGRXSLVNPGPAMASHK

WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK  
WTGATKYH----LNGRDSLVPNGPAMASHK  
WTAASKYH----LNGRDSLVPNGPAMASHK  
SDSLIKYETHSTLDGRWSALTGPPPMATAG  
FATTNRME-----LEGASVQVPPQPNMGMTAN  
WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK  
WTGATKYH----LNGRNSLVNPGVAMATHEK  
WTAGTKYH----LNGRNSLANPGIAMATHEK  
WPGASSWA----LNGRNSLMNPGPAMASHK  
WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK

AAV6

## 【図 8 E】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

370 380 390

AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS

AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
GQEGSLPPFPNDVFMI PQYGYCGLV TGNST  
GTEGCLPAFPQVFTLPQYGYALTNRDNTTE  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--DGS  
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS

AAV9 AAV2

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

400 410 420

QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY

QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QQQTDNRNAYFYLEYFPSQMLRTGNNFEITY  
NP-TERSSFFCYLEYFPSQMLRTGNNFEITY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QS-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY

AAV2

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

430 440 450

TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY

TFEEVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
SFEKVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
NFEVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
SFEVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
BFENVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLY

AAV2

## 【図 8 G】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

550 560 570

DDEDKFFPMGVLIFGKQGAGASNTAL---

DDEDKFFPMGVMIFGKESAGASNTAL---  
DDEKFFFPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDI---  
DDEKFFPMHGNLI FGKEGTTASNAEL---  
PADSKFNSQLIFAGPKQGNATVTP---  
LQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLE  
DDKDKFFPMGVMIFGKESAGASNTAL---  
DDEDRFFPSSGVLI FGKGTGATNKTTL---  
DDEERFFPSNGLIFGKQGNADNADY---  
RGEDEFFPLSGSLIFGKQCTGCDNVDN---  
DDKDKFFPMGVMIFGKESAGASNTAL---

AAV6

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

580 590 600

DNVMI TDEEEIKXTNPVATERFGTVAVNLQ

DNVMI TDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQ  
EKVMI TDEEEIARTNPVATERFGTVAVNLQ  
DNVMI TDEEEIARTNPVATERFGTVAVNLQ  
GTLIFTSEEEELATNATDPTDMWGNLPGGDQ  
GNMLITSESETQPVNRVA YNVGGQMATANNQ  
DNVMI TDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQ  
ENVLMTNEEEIRPTNPVATERFGTVAVNLQ  
SDVMLTSEEEIKTNPVATERFGTVAVNLQ  
DKVMI TNEEEIKTNPVATERFGTVAVNLQ  
DNVMI TDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQ

AAV6 AAV1/6 AAV6

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.1 翻訳

610 620 630

SSXTAPATG DVN XQGALPGMVVQDRDVYLQ

SSSTDPA TGDV HMGALPGMVVQDRDVYLQ  
RGNRQAATADVNTQGVLPGMVVQDRDVYLQ  
SSNTAPTGTGVNHQGALPGMVVQDRDVYLQ  
SNSNLPTVDRLTALCAVPGMVVQNRDIYYQ  
SSTTAPATGTYNLQIIVPGSVVMERDVYLQ  
SSSTDPA TGDV HMGALPGMVVQDRDVYLQ  
AANTAAQTQVVNNQALPGMVVQNRDVYLQ  
QNTTAPQTGVNSQALPGMVVQNRDVYLQ  
SAQAQAQTGWVQNGI LPMGMVVQDRDVYLQ  
SSSTDPA TGDV HMGALPGMVVQDRDVYLQ

AAV6 AAV6



## 【図 9 C】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

ESVDPDPQLGEPFAAP-SSVGXXTMASGGG  
ESVDPDPQLGEPFAATP-AAVGPTTMASGGG  
DSVPDPQLGQPPAAP-SGLGTNTMATGSG  
ESVDPDPQLGEPFAAP-TSLGNTMTASGGG  
TGAGDGPPEGS TSGA--MSDDSEMRAAAGG  
EAGPSGSGQLQIPAPASSLGADTMSAGGG  
ESVDPDPQLGEPFAATP-AAVGPTTMASGGG  
ESVDPDPQLGEPFAAP-SSVGSSTVAAGGG  
ESVDPDPQLGEPFAAP-SGVGPNMTAAGGG  
ESVDPDPQIGEPFAAP-SGVGSLTMSAGGG  
ESVDPDPQLGEPFAATP-AAVGPTTMASGGG  
AAV1/6 A...

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR  
APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR  
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWVGDR  
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGR  
AAV-EGCGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGH  
GPLGDNNOGADGVGNASGDWHCDSTWVGDR  
APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR  
APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR  
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDR  
APMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGR  
APMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR  
AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSASX-GA  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSAST-GA  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSQS--GA  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSQS--GA  
VITTS TRTWLPTYNHLYKRLGESL---  
VTKSTRTWLPSYNNHLYREKKSQSVGD  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSAST-GA  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSETA-GS  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISNGTSSGA  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISNSTSGGS  
VITTS TRTWALPTYNHLYKQISSAST-GA  
AAV1

## 【図 9 E】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
GQEGSLPPFPNDVFMI PQYGYCLVTGNTS  
GTEGCLPAPFPQVFTLPQYGYATLNRDNTS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--DGS  
AHQGLPPFPADVFMI PQYGYLTNL--NGS  
AAV9 AAV2

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSY  
QQQTDRNAFYCLEYFPSQMLRTGNNFEITY  
NP-TERSSFFCLEYFPSQMLRTGNNFEITY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QS-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSY  
QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY  
AAV2

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
TFEEVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
SFEKVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
NFEEDVPFHSSPAPSQNLPLANPLVDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
SFEEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
EFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY  
AAV2

## 【図 9 D】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
-QSN TYNGFSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNANAYFGYSTPWGYDFNRFHSHWS PRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
TNDN TYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
TNDN TYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
SNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFS PRDW  
AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
QRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTN  
AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

DGVTTIANNLTS TVQVFTDS EYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTS TVQVFS DSEYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTS TVQVFTDS EYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTS TVQVFTDS EYQLPYVLGS  
NGETTVANNLTS TVQIFADSSYELPVMDA  
DS TTTIANNLTS TVQVFTDDYQLPYVGN  
DGVTTIANNLTS TVQVFS DSEYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTS TVQVFS DSEYQLPYVLGS  
EGTKTIANNLTS TVQVFTDS EYQLPYVLGS  
NGVKTIANNLTS TVQVFTDS EYQLPYVLGS  
DGVTTIANNLTS TVQVFS DSDYQLPYVLGS  
AAV1 AAV9

## 【図 9 F】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

YLNRTQN-XSGTAXNKXLLFSQGGPSGMSV  
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PACMSV  
YLSRTNT-PSGTTQSRLOFSQAGASDIRD  
YLNRTQGTSTGTTNQSRLFSQAGPQMSL  
GLQSTTTGTTLNAGTATTNFKLRPTNFSN  
RPFVS TNN-----TGGVQFNKNLAGRYAN  
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PACMSV  
YLSRTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE  
YLSRTQT-TGGTANTQTLGFSQAGPNMTAN  
YLSKTIN--GSGQNQOTLFSVAGPSNMAV  
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGS PTCMSV  
AAV1/6 AAV6 AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

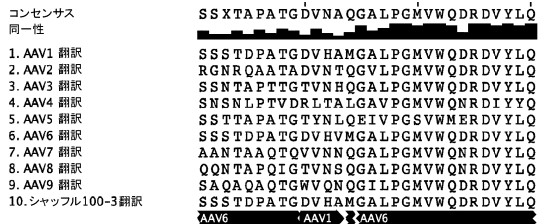
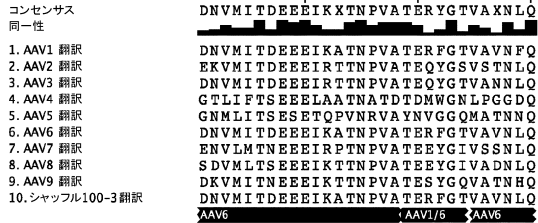
QXKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFA  
QXKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFA  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT  
QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADN-NNSEYS  
QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDN-NNSNFP  
FKKNWLPGPSIKQGGFSKTANQNYKIPATG  
TYKNWFPFGPMGRTOGWNLGSGVY-NRASVSA  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT  
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTLDQN-NNSNFA  
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTLDQN-NNSNFA  
QGRNYPGPSYRQQRVSTTVTQDN-NNSNFA  
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT  
AAV1 A...

コンセンサス  
同一性

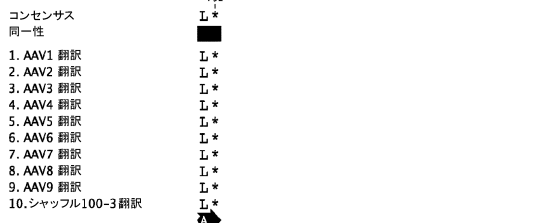
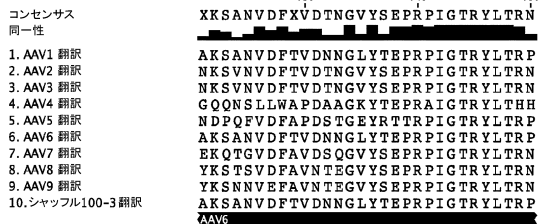
1. AAV1 翻訳
2. AAV2 翻訳
3. AAV3 翻訳
4. AAV4 翻訳
5. AAV5 翻訳
6. AAV6 翻訳
7. AAV7 翻訳
8. AAV8 翻訳
9. AAV9 翻訳
10. シャッフル100-3翻訳

WTGASKYH----LNGRXSLVNPGPAMASHK  
WTGASKYH----LNGRESIINPGTAMASHK  
WTGASKYH----LNGRDSLVNPGPAMASHK  
WTAASKYH----LNGRDSLVNPGPAMASHK  
SDSLIKYETHSLDGRWSALTGPPPMATAG  
PATTNRME----LEGASYQVPPQNGMTNN  
WTGASKYH----LNGRESIINPGTAMASHK  
WTGASKYH----LNGRNSLVNPGVAMATHK  
WTAGTKYH----LNGRNSLANPGIAMATHK  
WPGASSWA----LNGRNSLMNPGPAMASHK  
WTGASKYH----LNGRESIINPGTAMASHK  
AAV6

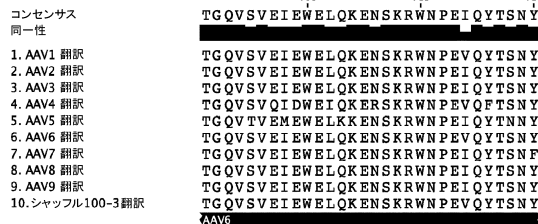
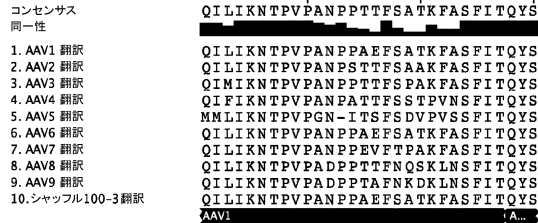
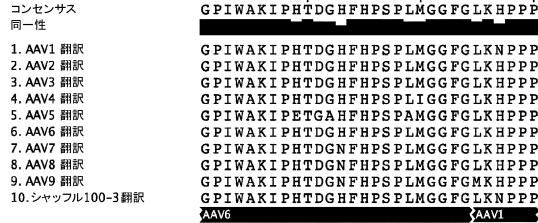
## 【図 9 G】



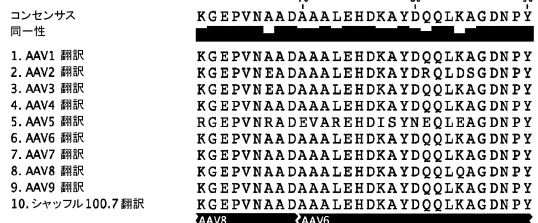
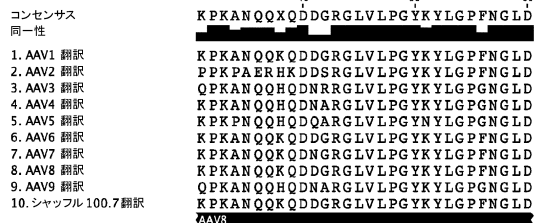
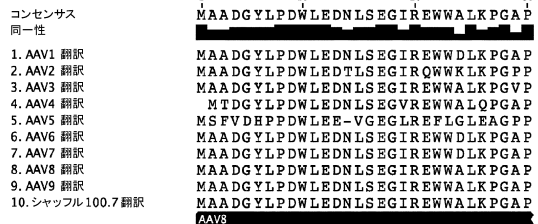
## 【図 9 I】



## 【図 9 H】



## 【図 10 A】



## 【図10B】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

100 110 120  
L X Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q  
L R Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q  
L K Y N H A D A E F Q E R L K E D T S F G G N L G R A V F Q  
L K Y N H A D A E F Q Q R L Q G D T S F G G N L G R A V F Q  
L K Y N H A D A E F Q E K L A D D T S F G G N L G R A V F Q  
L R Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q  
L R Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q  
L R Y N H A D A E F Q E R L K E D T S F G G N L G R A V F Q  
L K Y N H A D A E F Q E R L K E D T S F G G N L G R A V F Q  
L R Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q  
AAV6

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

130 140 150  
A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P  
A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P  
A K K R I L E P L G L V E E A K T A P G K K G A V D Q S P  
A K K R V L E P L G L V E E Q A G E T A P G K K R P L I E S P  
A K K R V L E P F G L V E E G A K T A P T G K R I D D H F P  
A K K R V L E P F G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P  
A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P A K K R P V E P S P  
A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E P S P  
A K K R L L E P L G L V E E A K T A P G K K R P V E Q S P  
A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P  
AAV8 AAV6

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

160 170 180  
Q E - P D S S S G I G K X G Q P A K K R L N F G Q T G D S  
Q E - P D S S S G I G K X G Q P A K K R L N F G Q T G D S  
V E - P D S S S G T G K A G Q P A K K R L N F G Q T G D A  
Q E - P D S S S G V G K S G K Q P A K K R L N F G Q T G D S  
Q Q - P D S S T G I G K K G Q P A K K K L V F - - E D E  
K R - - - K K A R T E E D S K P S T - - - - S S D A  
Q E - P D S S S G I G K T G Q Q P A K K R L N F G Q T G D S  
Q R S P D S S T G I G K K G Q P A K K R L N F G Q T G D S  
Q R S P D S S T G I G K K G Q P A K K R L N F G Q T G D S  
Q E - P D S S A G I G K S G A Q P A K K R L N F G Q T G D T  
Q E - P D S S S G I G K T G Q Q P A K K R L N F G Q T G D S  
AAV1

## 【図10C】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

190 200 210  
E S V P D P Q P L G E P P A A P - S S V G X X T M A S G G G  
E S V P D P Q P L G E P P A T P - A A V G P T T M A S G G G  
D S V P D P Q P L G Q P P A A P - S G L G N T M A T G S G  
E S V P D P Q P L G E P P A A P - T S L G S N T M A S G G G  
T G A G D G P P E G S T S G A - - M S D D S E M R A A A G G  
E A G P S G S Q Q L Q I P A Q P A S S L G A D T M S A G G G  
E S V P D P Q P L G E P P A T P - A A V G P T T M A S G G G  
E S V P D P Q P L G E P P A A P - S S V G S G T V A A G G G  
E S V P D P Q P L G E P P A A P - S G V G P N T M A A G G G  
E S V P D P Q P I G E P P A A P - S G V G S L T M A S G G G  
E S V P D P Q P L G E P P A T P - A A V G P T T M A S G G G  
AAV1 AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

220 230 240  
A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N S S G N W H C D S T W M G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N S S G N W H C D S Q W L G D R  
A A V - E G G Q G A D G V G N A S G D W H C D S T W S E G H  
G P L G D N N Q G A D G V G N A S G D W H C D S T W M G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R  
A P M A D N N E G A D G V G S S S G N W H C D S T W L G D R  
A P V A D N N E G A D G V G S S S G N W H C D S Q W L G D R  
A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R  
AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

250 260 270  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S A S X - G A  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S A S T - G A  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S Q S - - G A  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S Q S - - G A  
V I T T S T R T W V L P T Y N N H L Y K R L G E S - - - -  
V V T K S T R T W V L P S Y N N H Q Y R E T K S G S V D G -  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S A S T - G A  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S E T A - G S  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S N G T S G G A  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S N S T S G G S  
V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S A S T - G A  
AAV1 AAV6

## 【図10D】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

280 290 300  
S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
L Q S N T Y N G F S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
S N A N A Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H S H W S P R D W  
S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
T N D N T Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
T N D N T Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
S N D N A Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P R D W  
AAV1 AAV8

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

310 320 330  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T S  
Q R L I N N Y W G F R P R S L R V K I F N I Q V K E V T T Q  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L N F K L F N I Q V K E V T T N  
Q R L I N N N W G F R P K R L S F K L F N I Q V K E V T T N  
AAV8

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

340 350 360  
D G V T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
D G V T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
D G T T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
D G T T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
N G E T T V A N N L T S T V Q I F A D D S Y E L P Y V M D A  
D S T T T I A N N L T S T V Q V F T D D Y Q L P Y V V G N  
D G V T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
D G V T T I A N N L T S T I Q V F S D S E Y Q L P Y V L G S  
E G T K T I A N N L T S T I Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
N G V K T I A N N L T S T V Q V F T D S D Y Q L P Y V L G S  
D G V T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S  
AAV1

## 【図10E】

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

370 380 390  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
G Q E G S L P P F P N D V F M V P Q Y G Y C G L V T G N T S  
G T E G C L P A F P P Q V F T L P Q Y G Y A T L N R D N T E  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - D G S  
A H Q G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N - - N G S  
AAV1

コンセンサス  
同一性

1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

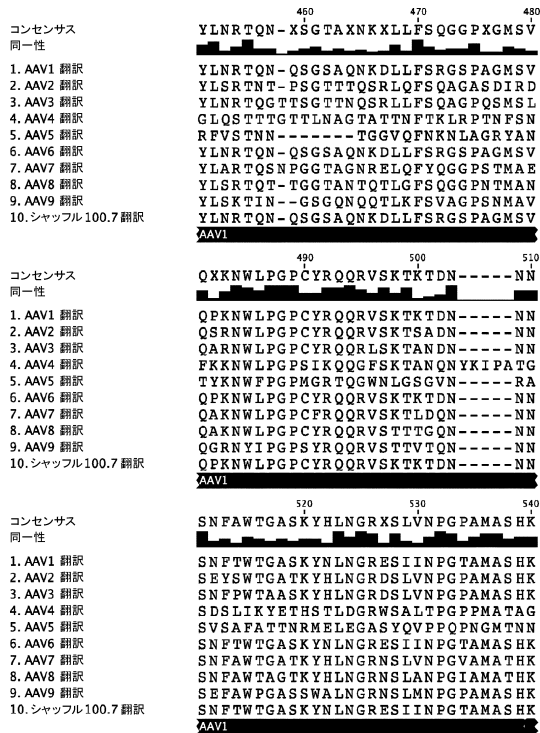
400 410 420  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F T F S Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F T F S Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F Q F S Y  
Q Q Q T D R N A F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F E I T Y  
- N P T E R S S F F C L E Y F P S K M L R T G N N F E F T Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F T F S Y  
- Q S V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F E F S Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F Q F T Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F Q F S Y  
- Q A V G R S S F Y C L E Y F P S Q M L R T G N N F T F S Y  
AAV1

コンセンサス  
同一性

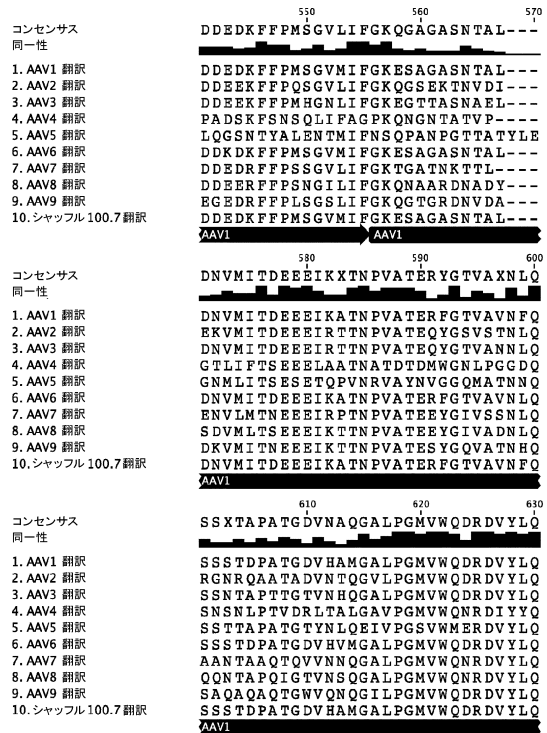
1. AAV1 翻訳  
2. AAV2 翻訳  
3. AAV3 翻訳  
4. AAV4 翻訳  
5. AAV5 翻訳  
6. AAV6 翻訳  
7. AAV7 翻訳  
8. AAV8 翻訳  
9. AAV9 翻訳  
10. シャッフル100.7翻訳

430 440 450  
T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
T F E E V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
S F E K V P F H S M Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
N F E E V P F H S S F A P S Q N L F K L A N F L I D Q Y L Y  
T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
S F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
E F E N V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
T F E E V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N F L I D Q Y L Y  
AAV1 A...

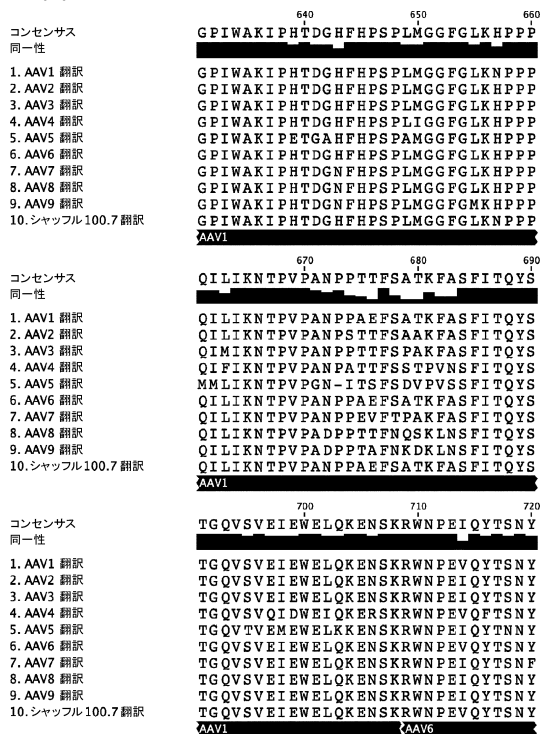
## 【図 10 F】



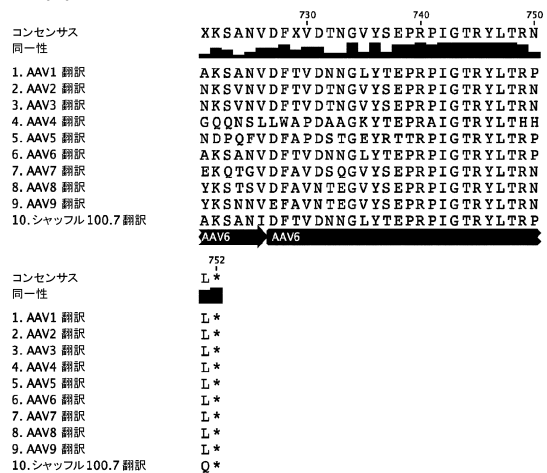
## 【図 10 G】



## 【図 10 H】



## 【図 10 I】





【☒ 1 1】

		中和血清希釈				
血清型	動物	AAV1	AAV2	AAV8	シャットフル100-3	シャットフル100-7
						SM 10-2
AAV1	1	1:1000	なし	1:250	1:250	1:1000
	2	1:1000	1:25	1:250	1:250	1:1000
	3	1:1000	なし	1:250	1:250	1:1000
AAV2	1	1:50	1:500	1:100	なし	なし
	2	1:50	1:500	1:100	なし	1:250
	3	1:1000	1:1000	1:100	なし	1:500
AAV8	1	1:100	なし	1:250	なし	1:100
	2	1:250	なし	1:100	なし	なし
	3	1:250	なし	1:250	なし	なし
シャットフル100-3	1	1:1000	なし	1:500	1:100	1:1000
	2	1:1000	なし	1:500	1:100	1:1000
	3	1:1000	なし	1:100	1:250	なし
シャットフル100-7	1	1:1000	なし	1:100	1:100	なし
	2	1:1000	なし	1:100	1:250	なし
	3	1:1000	なし	1:50	1:100	なし

【配列表】

0006600624000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 4 0 B	40/10 (2006.01)	C 4 0 B 40/10
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シェイファー デイビッド ブイ .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ダンビル リマ コート 19

(72)発明者 コッターマン メリッサ エイ .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パークレー シーニック アベニュー 1635 アパート  
メント 1

(72)発明者 フアン バン ヨル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アルバニー ジャクソン ストリート 1070 アパート  
メント 707

(72)発明者 コーバー ジェームズ ティー .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ テキサス ストリート 171

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0104120 (US, A1)  
国際公開第2011/117258 (WO, A2)  
特表2008-538286 (JP, A)  
Gene Therapy and Regulation, 2010年, Vol. 5, No. 1, pp. 31-55

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00 - 7/08

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/015

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)