

(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 1
C 12 N 7/01	(2006.01)
C 12 N 15/35	(2006.01)
C 12 N 15/864	(2006.01)
C 07 K 14/015	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N	7/01
C 12 N	15/35
C 12 N	15/864
C 07 K	14/015
C 12 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)
(86) (22) 出願日	平成26年5月29日 (2014.5.29)
(65) 公表番号	特表2016-526045 (P2016-526045A)
(43) 公表日	平成28年9月1日 (2016.9.1)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/040083
(87) 國際公開番号	W02014/194132
(87) 國際公開日	平成26年12月4日 (2014.12.4)
審査請求日	平成29年5月26日 (2017.5.26)
(31) 優先権主張番号	61/829,735
(32) 優先日	平成25年5月31日 (2013.5.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94607-5200, オークランド、フランクリン ストリート 1111, 12番 フロア
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(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。 10

【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、脾臓細胞、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、請求項4に記載の前記感染性rAAV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(iPS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rAAVビリオン。

【請求項7】

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

【請求項9】

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AAVカプシドタンパク質が、AAV2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(rAAV)ビリオンに与える、単離核酸。

【請求項10】

請求項9に記載の前記核酸を含む、単離宿主細胞。

10

【請求項11】

前記核酸で安定的にトランスフェクトされる、請求項10に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項12】

AAVrеп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10または11に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項13】

組換えAAVベクターをさらに含む、請求項10～12のいずれか一項に記載の前記単離宿主細胞。

【請求項14】

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(rAAV)ビリオンを含む、遺伝子産物の送達剤。

30

【請求項15】

前記異種核酸が干渉RNAを含む、請求項14に記載の前記送達剤。

【請求項16】

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14に記載の前記送達剤。

【請求項17】

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み、AAV2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(AAV)カプシドタンパク質。

40

【請求項18】

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10倍高い、請求項17に記載の前記変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項19】

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30倍高い、請求項17に記載の前記変異体AAVカプシドタンパク質。

【請求項20】

AAV2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(rAAV)ビリオンに

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日に出願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

10

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】

20

導入

アデノ随伴ウイルス (A A V) に基づく遺伝子送達ベクターは、前臨床疾患モデル、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 A A V 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、A A V に基づくベクターは最高に安全である。さらに、A A V 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】

A A V は、2つのオープンリーディングフレーム、r e p 及びc a p 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 (R e p 7 8 、R e p 6 8 、R e p 5 2 、及びR e p 4 0) 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 (V P 1 ~ 3) を発現する。その名が暗示するように、A A V 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、A A V 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 A A V 血清型及び多数の非ヒト霊長類型が特定されている。A A V 2 は、遺伝子送達ビヒクルとして最もよく特徴がわかっている。

【0006】

2010年時点で、A A V 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A A V 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、A A V 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、A A V 遺伝子療法のより広い実施を妨げ得る。例えば、今までで、A A V 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 A A V Ig G 抗体の保有率は、A A V 2 (72%) 及び A A V 1 (67%) について最も高いが、A A V 9 (47%)、A A V 6 (46%)、A A V 5 (40%)、及び A A V 8 (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 A A V カプシドへの液性免疫が、送達される r A A V 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

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】Perabone 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】WO 2012 145601号

【特許文献2】米国特許公開第US 20050053922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プラリをさらに提供し、このライプラリの少なくとも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。

【 0 0 1 2 】

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、該方法は概して、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。

【 0 0 1 3 】

特徴

本開示の特徴は、(a) 配列番号 1 1 ~ 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、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は、配列番号 1 1 ~ 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少なくとも約 9 5 % 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 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 1 1 ~ 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。

10

【 0 0 1 4 】

本開示の特徴は、(a) 配列番号 1 0 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % 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 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 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は、配列番号 1 0 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの場合では、r A A V は、 A A V 2 (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。いくつかの場合では、r A A V は、 A A V 2 によって示される耐性よりも、ヒト A A V 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 1 0 倍、少なくとも約 3 0 倍等) 高い耐性を示す。いくつかの場合では、r A A V は、野生型 A A V 血清型 2 (A A V 2) 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、脾臓細胞、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、神經幹細胞、神經前駆細胞、神經堤幹細胞、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、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、 R N A 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。

20

【 0 0 1 5 】

本開示の特徴は、配列番号 1 1 ~ 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 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 1 1 ~ 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少なくとも約 9 5 % 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 A A V カプシドタンパク質は、配列番号 1 1 ~ 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。

30

【 0 0 1 6 】

本開示の特徴は、配列番号 1 0 に記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % 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 N 3

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。

10

【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、AAVrеп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、脾臓細胞、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、脾臓幹細胞、脾臓前駆細胞、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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

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 10 倍、少なくとも約 30 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 つを含むライプラリを含み、このライプラリの少なくとも 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。

【 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 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プラリの生成は、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 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。

【 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 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。

[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隨伴ウイルス(r A A V) ピリオン。[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 N312 K、N449 D、D472 N、N551 S、I698 V、及びL735 Q を含む、変異体アデノ隨伴ウイルス(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隨伴ウイルス(r A A V) ピリオン。[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 ピリオンが、 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 ピリオンが、 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 ピリオンが、 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 ピリオンが、 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 ピリオンが、 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、脾臓細胞、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、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、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R N A干渉剤を含む、本発明1001または本発明1004の前記感染性r A A V。

[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r A A V。

[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(A A V)カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸。

10

[本発明1018]

前記コードされた変異体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1017の前記単離核酸。

[本発明1019]

前記コードされた変異体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N 312 K、N 449 D、D 472 N、N 551 S、I 698 V、及びL 735 Q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

20

をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸。

[本発明1021]

前記コードされた変異体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)ビリオンに与える、本発明1017または本発明1020の前記単離核酸。

30

[本発明1022]

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1021の前記単離核酸。

[本発明1023]

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1021の前記単離核酸。

[本発明1024]

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1021の前記単離核酸。

[本発明1025]

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1021の前記単離核酸。

40

[本発明1026]

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1021の前記単離核酸。

[本発明1027]

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、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]

AAVrepタンパク質をコードするス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AAV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、脾臓細胞、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(iPS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、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オである、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(rAAV)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RNA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ス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rAAV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rAAV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(AAV)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の前記方法。

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 N312 K、N449 D、D472 N、N551 S、I698 V、及びL735 Q 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]

10

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) ビリオンに与える、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。

20

[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。

30

[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) ビリオンに与える、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 ビリオン、

40

(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、ならびに

(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つを含むライプラリであって、

前記ライプラリの少なくとも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、前記ライプラリ。

[本発明1056]

50

スターーカプシドタンパク質を含むスター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】

【0 0 2 6】

【図1】図1A～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2A】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2B】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3A】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3B】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3C】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4A～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6A～Bは、新規A A V変異体のインビオの局在化及び中和を示す。

【図7】図7A～Dは、ヒト抗体回避体の生成を実証する。

【図8A】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1 0 0 - 1のカプシドタンパク質配列（配列番号11）を示す。

【図8B】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1 0 0 - 1のカプシドタンパク質配列（配列番号11）を示す。

【図8C】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

【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、4.7 kb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(ITS)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、靈長類AAV、非靈長類AAV、及びヒツジAAVを含む。「靈長類AAV」は、靈長類に感染するAAVを指し、「非靈長類AAV」は非靈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、Srivastava et al.(1983)J.Virology 45:555、Chiорини et al.(1998)J.Virology 71:6823、Chiорини 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.Virology 58:921

10

20

30

40

50

、Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 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。

【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。

【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剤または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(ITER)に隣接する。

【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。

【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ポ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

10

20

30

40

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（H S V）及びエプスタインバーウイルス（E B V）、ならびにサイトメガロウイルス（C M V）及び仮性狂犬病ウイルス（P R V）を含み、これらもまたA T C C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、A A V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。本明細書で記載されるように、「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、r A A Vベクターと共に生成細胞中にトランスフェクトされる。

10

【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G r a i n g e r et a l . (2 0 0 5) M o l . T h e r . 1 1 : S 3 3 7 (T C I D 5 0 感染性力価アッセイを記載)、及びZ o l o t u k h i n et al . (1 9 9 9) G e n e T h e r . 6 : 9 7 3 を参照されたい。実施例もまた参考されたい。

20

【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A A V）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ものと比べて、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（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るとされるが、表面グリコサミノグリカンを有する細胞を感染させることにおいて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A A V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A A V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A A V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。

30

【0042】

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

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1rcAAV未満、 10^4 rAAV粒子当たり約1rcAAV未満、 10^8 rAAV粒子当たり約1rcAAV未満、 10^{12} rAAV粒子当たり約1rcAAV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。3040

【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、オーブ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】

「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。

【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3UT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。

【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

10

20

30

40

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 とも呼ばれる) 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') とも呼ばれる) 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 50

Aug ; 15 (8) : 875 - 85、Takasu et al. , Insect Biochem Mol Biol. 2010 Oct ; 40 (10) : 759 - 65 ; Ekker 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、Filisikowska et al , PLoS One. 2011 ; 6 (6) : e21045. doi : 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 2011 Jun 13、Hauschmidt 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、参考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。TALENs は、実質的に任意の所望のDNA配列に結合するよう素早く操作ことができ、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、参考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関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る得、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できある、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、介在する残基があつてよい。

【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

10

20

30

40

50

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、「発現カセット」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。

【0056】

「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rAAVは、自然発生の野生型AAV内に通常含まれない核酸を含むrAAV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AAVによって通常コードされない遺伝子産物である。

10

【0057】

「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ボ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。

20

【0058】

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)されることもされることもある。「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。

30

【0059】

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/またはインビトロ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)。

40

【0060】

「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、及びこれらの組成物は、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

50

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が欠ける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。

【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」は本明細書で使用される場合、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り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。

【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、サルを含む非ヒト靈長類、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。

【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。

【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。

10

20

30

40

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を意図されないこともまた理解されるべきである。

【 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。

10

【 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、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。

20

【 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 (a n) 」、及び「この (t h e) 」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、「(a n) 感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ビリオン」への言及は、複数のかかるビリオンを含み、「(t h e) 感染性組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 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。

30

【 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て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。

40

【 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り得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 (r A A V) 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 (A A V) カ

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プラリをさらに提供し、このライプラリの少なくとも 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。

【 0 0 7 3 】

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。

10

【 0 0 7 4 】

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。

20

【 0 0 7 5 】

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と言うことができる。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。

30

【 0 0 7 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、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

40

50

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 5×10^{-6} M未満、約 10^{-6} M未満、約 5×10^{-5} M未満、約 10^{-5} M未満、約 10^{-4} M未満、またはより低い親和性で、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。

【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」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。

【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】

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。

【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%)

10

20

30

40

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 カブシドタンパク質)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 カブ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 カブ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):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 GYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLYKYNHADA
 EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP
 VEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNT
 MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNN
 HLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWG
 FRPKRLKFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVL
 GSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
 RTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTDTPSG
 TTTQSRLQFSQAGASDIRNQSRNWLPGPCYRQQRVSCTSADNNNSEY
 SWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQ
 GSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQA
 ATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
 SPLMGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQY
 STGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSYNKSVNV
 DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNQ

【 0 0 9 1 】

S M 1 0 - 2 (ヌクレオチド配列)

10

20

30

(SEQ ID NO: 22):

atggctgccatggatatctccagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtggtggaaagctaa
 acctggcccaccaccaccaaaagccgcagagcgcataaggacacagcagggtctgtcttcctgggtacaagtacctc
 gaccctcaacggactcgacaaggagagccgtcaacgaggcagacgcgcggccctcgagcacgacaaagcctatg
 accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctaagtacaaccacgcccacgcggagttcaggaacgcctaaagaag
 atacgttttggggcaaccteggacgagcagtctccaggcgaaaaagaggggtcttgaacctctggcctgggtgaggaac
 ctgttaagacggctccggaaaaagagggccgttagagcactctgtggagccagactcctcctggaaaccggaaagg 10
 cggccagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggtcagactggagacgcagactcgtacccctggcctggaaagg
 acagccaccacgccccctgtctggaaactaatacgttgcactacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacga
 gggccgcacggagtggttaattcctcggaaattggcattgcgattccacatggatggcgcacagagtcatcaccacc
 acccgaacctggccctgcccacctaacaaccaccttacaaacaattccagccaatcaggcctcgaacgacaatca
 ctactttggctacagcaccccttgggttactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaaagactcat
 caacaacaactgggattccgacccaagagactcaagttcaagcttttaacattcaagtcaagaggtcacgcagaatgacg
 gtacgacgacattgccaataaccttaccagcacgggtttagtactgactcggagtaccagctccgtacgtcctcggctc
 ggcgcaccaaggatgcctcccgcgtcccagcagacgtctcatggccacagtatggataacctcaccctgaacaacggga 20
 gtcaggcagtaggacgccttcattttactgcctggagtacttcctctcagatgtcggtaccggtaacaactttaccc
 cactttgaggacgttcccttccacagcagctacgctcacagccagactctggaccgtctcatgaatccctcatcgacc
 gtaccatgttacttgcagaacacactccaagtggaccaccacgcgtcaaggctcagttctcaggccggagcgagtaca
 ttcggaaccagtcttagaactggcttcctggaccctgttaccgcgcagcagtgatcaagacatctgcggataacaaca 30
 gtaataactctggactggagctaccaagtaccacactcaatggcagactctctgtgaatccggccggcatggcaac
 cacaaggcgtgaagaaaagttttcctcagaggcggttctcatcttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac
 attggaaaaggcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatccgtggctacggaggcgtatgttctgttat
 aacctccagagaggcaacagacaaggcagactaccgcagatgtcaacacacaaggcgttccaggcatggcaggac 40
 agagatgttacccatggggccatggcaaaaggattccacacacggacggacatttcacccctccatgggttgg
 ttcggaacttaacaccctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccgcaccacccatgtcg
 agtttgccttcatcacacagactccacggacaggcgtcagcgtggagatcgagtggagctgcagaaggaaaacag
 cgtggaaatcccgaagttcagttacactccaactacaacaagtctgttaatgtggacttactgtggacactaatgg
 cgtgttca
 gagcctcgccccattggcaccagatacgtactgtaatcgtaa

【 0 0 9 2 】

シャツフル 1 0 0 - 1 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 11):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAE
FQQRLQGDTSGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQP
DSSTGIGKKGKQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGG
GAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYK
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL 10
NFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQ
PKNWLPGPCYRQQRVSKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH
KDDDKKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA
VNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSP
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):

atggctgctgatggtatctccagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtggtaagctcaa
 cctggcccaccaccaccaaagcccgagacgcgcataaggacacgcagggtctgtcttcctggtaactacac
 gaccctcaacggactcgacaaggagagccggtaacgaggacacgcgcggccctcgagcacgacaaggcctac
 ccagcagctcaaggccggtaacaaccctacctaagtacaaccacgcgcacgcggagttccagcagcggctcaggcga
 cacatcgttggggcaacctcggcagcagtcgtctccaggccaaaagagggttctgaacctcttgcggtagcaagc
 gggtagacggctcgtgaaagaagagaccgttattgaatccccccagcagccgactcctccacgggtatcggcaaaaaa
 gcaaggcagccggctaaaaagagactcaatttgcagactggcactcagactcagtcgtccggaccacaacctcggag
 aacctccagcaaccccccgtctgtggacctactacaatggctcagggtgtggcgcaccaatggcagacaataacgaagg
 cggcgcggactggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatgctggcgcacagactcatcaccaccaggcacc
 cgcacctggccttgcacccataaccacctacaatggctcagggtgtggcgcaccaatggcagcaacgacaacca
 ctacttcggctacagcaccctgggtatttgcattcaacagattccactgcccactttcaccacgtgactggcagcactca
 tcaacaacaattgggattccggccaagagactcaacttcaacttcaacatccaagtcaaggagggtcacgacgaatgatg
 gctcacaaccatcgtaataaccctaccagcacgggtcaagtctcggactcagactcagtcgtctcgggt
 ggctcacgagggtgcctccgcgttccaggcagacgtctcatgggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacggga
 gtcaggcagtaggacgttctcatggacttctcaggatgtcgtaaccggaaacaacttacccatcact
 cactttgaggacgttcccttccacagcagctacgctcacagccagactctggaccgtctcatgaatccctcatcaccaggta
 tgtattacctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgcacaaaacaaggacttgcgttttagccggggctccagctggca
 tgtctgttcagccaaaactggctacctggaccctgttateggcagcagcgcgttctaaacaaaacagacaacaacaaca
 gcaactttacctggactggctcaaaatataacccttaatggcgtgaatctataatcaaccctggcactgctatggc
 aacactgacaaagacaagggtttccatgagcgggtcatgattttgaaaggagagcgcggagctcaaaacactgcattgg
 acaatgtcatgatcacagacgaagagaaatcaaagccactaaccctgtggccaccgaaagattggactgtggcagtc
 atctccagagcagcacagaccctgcgaccggagatgtgcattatggagccttacctggaaatgggtggcaagacagag
 acgtataccctcagggtcccattggccaaaattccatcacagatggacacttccaccctcttcatggcggcttgg
 ctcaagaaccgcctcctcagatccatcaaaaacacgcctgtccctgcgaatccctccggagtttcagtc
 ttcatccatcacccatactccacaggacaagtgcgttggaaattgaatggagactgcagaaagaaaacagcaagcgc
 atcccaagtgcagtcacacatccaattatgcacaaatctgcacgttactgtggacaacaatggacttatactgac
 gctccctccatggcaccctgttacccatccaccctgttaa
 10
 20
 30
 40

【 0 0 9 4 】

シャツフル 1 0 0 - 3 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 12):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
FQQRLQGDTSGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQP
DSSTGIGKKGKQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPTTMASGG
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYK
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL 10
NFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHQSLSLRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPGMSVQP
KNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK
DDDKDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAV
NLQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSP 20
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
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):

【 0 0 9 6 】

シャッフル 1 0 0 - 7 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 13):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPPKANQQKQDDGRGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10
RLSFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
FPADVFMIPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
FHSSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
HKDDEDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
AVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSP
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):

atggctgccatgttatcttccagattggctcgaggacaacctctgagggcattcgcagtggtggcgctgaa
 acctggagccccgaagccaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggtctggcttcctggctacaagtacct
 cgaccctcaacggactcgacaaggggagccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcgagcacgacaaggcctac
 gaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgcccacgcccagttcaggagcgtctgcaagaa
 gatacgttttggggcaacctcgccgagcagtctccaggccaagaagcgggtctcgaacctctcggtctggtaggaa
 aggcgctaagacggctctggaaagaaacgtccggtagagcaatgccacaagagccagactcctctcggtcatcgcaaa 10
 gacaggccagcagccgctaaaagagactcaatttggtcagactggcactcagagtcagtccccgacccacaacctctc
 ggagaacctccagcaaccccccgtgtggacactacaatggctcaggcggtggcgcaccaatggcagacaataacg
 aaggcgccgacggagtggtaatgcctcaggaattggatttcgattccacatggctggcgcacagagtcatcaccaccag
 caccgaacatggccctgcccacctataacaaccaccttacaagcaaattccagtgttcgacggggccagcaacgac
 aaccactactcggtcagcacccctggggattttgacttaacagatttcaactgcactttcaccacgtgactggcagc
 actcatcaacaacaactggggattccggccaagagactcagctcaagcttcaacatccaggtaaggaggtaacgca
 atgatggcgtaacaccatcgtataacccttaccagcacggtaacttctcgactcgagttaccagctccgtacgtctc 20
 ggctctgcgcaccaggcgtgcctccctcggtccggcggacgtgtcatgattccgaatacggctacctgacgctcaacaat
 ggcagccaagccgtggacgttcatccctactgcctgaaattccctctcagatgctgagaacggcaacaacttacctc
 agctacacccttgaggaagtgccttccacagcagctacgcgcacagccagacccggctgtatgaatccatcgt
 caataccgtattaccctgaacagaactcaaaatcagtccggaaagtgccttccacagcagctacgcgcacagccag
 ctggcatgtgttcagccaaaaactggctaccctggaccctgttacgcgcacgcgcgtttctaaaacaaaacagacaaca 30
 acaacagcaatttacctggactgggtcgtcaaaatataaccctcaatggcgtgaatccatcatcaaccctggcactgt
 atggccatccataaagacgacgaagacaagtttccatgagcgggtcatgatggaaaagagagcgcggagctcaaact
 gcattggacaatgtcatgattacagacgaagagggaaattaaaggccactaaccctgtggccaccgaaagattgggacc
 gtcgcaattccagagcagcagcacagaccctgcgaccggagatgtcatgtatgggagcattacctggcatgggtggcaag
 atagagacgtgtacctgcagggtcccattggccaaaattccctcacacagatggacacttccatccgtctctttagggcgg
 ctggactcaagaacccgcctcctcagatccatcaaaaacacgcctgtcgaatccctggcggagtttcagctacaa 40
 agttgcttcattcatcaccataactccacaggacaagtggcgtggagattgaatgggagctgcagaaaagaaaacagcaaa
 cgctggaaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacattgatccactgtggacaacaatggact
 gagcctcgccccattggcacccgttacccatccccgtccccagtaa

【 0 0 9 8 】

シャツフル 10 - 2 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 26):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGAPKPKANQQKQDDGRGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQE
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGSLTMASG
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPP
FPADVFMIPQYGYLTNNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNLDLFSRGSPAGMSV
QPKNWLPGPCYRQQCVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
HKDDDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
AVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
PLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ 20
KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 0 9 9 】

シャッフル 10 - 2 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 34):

atggctgccatggtatctccagattggctcgaggacaaccctctgagggcattcgcgagtggggacttga
 acctggagccccgaaacccaaagccaaaccagcaaaaggcaggacgacggccgggtctggcttctggctacaagtac
 cgacccttcaacggactcgacaagggggagccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcgagcacgacaaggcctac
 gaccagcagctaaagcgggtgacaatccgtacccgtataaccacgcccacgcccggatggcttgcggcgtctcaagaag
 atacgttttggggcaacctcgccgagcagtctccaggcaaaaagagggtctgaacctctcggtctggggacttgaag
 cggtcaagacggctcctgaaagaaacgtccggtagagcagtcgcacaagagccagactcctctcgccattggcaaga 10
 cagggccagcagccgctaaaaagagactcaatttggtcagactggcactcagagtcagtcgtcccccacccacaacctctcg
 agaacctcccgcagcccccctcagggtggatcttacaatggctcaggtggcgcaccaatggcagacaataacgaag
 gcgcgcacggagtggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggggacagagtcatcaccaccagcac
 ccgcacctggcctgcccacctacaataaccaccttacaagcaaactccactgtcaacggggccagcaacgacaacc 20
 actacttcggctacagcacccctggggattttgacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaaagactc
 atcaacaacaattgggattccggccaaagagactcaactcaagcttcaacatccaagtcaaggaggtcagcgaatgat
 ggcgtcacgaccatgctaataacettaccagcacggtaacttctcgactcggagtaccagttggcgtacgtcctcgct
 ctgcgcaccaggctgcctccctccgttccggacgtgttcatgattccgcagtcggctacctaagctcaacaatggca
 gccaggcagtggacggcatcctttactgcctggaatattcccatgcagatgctgagaacgggcaacaactttaccc 30
 ctacacccttggagaactgccttccacagcagctacgcgcacagccagagccctggaccggctgtatgaaatccctcatc
 gacactacctgtattacctgaacagaactcaaaaatcagtcggaaacttccatgcggacttgcgttttagccgtggctccagc
 ggcattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 aacagcaactttacctggacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 cacaagacgacaaagacaagttttccatgagcgggtcatgattttggaaaggagagcgcggagcttcaaaacttgc
 ttggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaagccactaaccctggccaccgaaagatttggacttgcgtt 40
 caatctccagagcagcacagaccctgcgaccggagatgtcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 agagacgtatacctgcagggtcttggccaaaattccctcacacagatgacacttccaccgtccctttatggccgtt
 ggactcaagaacccgcctccatcagatccatcaaaaacacgcctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 ttgcattcatcaccataactccacaggacaagtggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 tggaaatcccgaagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt
 gcctggcccttgcacccgttacctcaccgtccctgttaa

【 0 1 0 0 】

シャツフル 10 - 6 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 27):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKVQQKQDNARGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLY
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
FPADVFMIPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV
PFHSSYAHQSLSLRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPGMSV
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
HKDDEDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
AVNLQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ 20
KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRL

【 0 1 0 1 】

シャッフル 10 - 6 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 35):

【 0 1 0 2 】

シャッフル 10 - 8 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 28):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGAPKPKVNQQKQDNARGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASG
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNHLY
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10
RLNFKLFNQVKETTDVTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD
VFMIPQYGYLTLNNGSQAVERSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTSYTFEDVPFHSS
YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPGTGMSVQPKN
WLPGPCYRQQRVSKTKTNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDD
EDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEATNPVATERFGTVAVNLQSS
PATDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHP
PPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEV 20
QYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTERPRPIGTRYLTRP

【 0 1 0 3 】

シャッフル 10 - 8 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 36):

atggctgccgatggttatcttccagatggctcgaggacaacctctgagggcattcgcaatggggacttgaaa
 cctggagccccgaaacccaaagtcaaccagcaaaagcaggacaacgctcggttgcctccgggtacaataccctcg
 gaccctcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcggacgcagcggccctcgagcaacgacaaggcctcg
 ccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctcggtataaccacgcccacgcccggatggcgtctgcaagaagat
 acgtctttggggcaacccgtggacgagcagtctccaggccaagaagagggttctcgaacccttggctggggacttgag
 gctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgcccacaagagccagactcctcctggcattggcaagaca
 gcccagcagccgctaaaaagagactcaatttggcagactggcactcagactcgtccggccaccacaacccctcgag
 aacccctcagcaaccccccgtgtggacctactacaatggctcaggcggtggcgcaccaatggcagacaataacgaagg
 cggcggactggtaatgcctcaggaaattggcattgcgtccacatggctggcggacagactcatcaccaccggcacc
 cgaacatggccttgcaccaaccctacaagcaaactccactgtcaacggggccagcaacgacaacca
 ctacttcggctacagcacccctggggattttgatttcaacagacttccactgcccacttaccacgtgactggcagcactcat
 caataacaattgggattccggcccaagagactcaacttcaacntccaagtcaaggagggnacgacaangatg
 ncgtcacaaccatcgctaataacccttaccagcacgggtcaagtcgtcgactcggttaccagcttcgtacgtcctcggtct
 ggcaccaggcgtccctccgttccggcggacgtgttcatgattccgcataaccggctacctgacgctcaacaatggcag
 ccaggcagtggacggcattttactgcctggaatattcccatcgcagatgctgagaacggcaataacttacctncagct
 acactttgaggacgttcccttccacagcagactcgtccactgcccacttggcggacttgcgtttagccgtggctccaactggc
 atgtctgttgcggccaaaactggctacctggaccctgttacggcagcgcgttctaaaacaaaacagacaacaac
 agcaacttacctggactggctcaaaaataaccctaatggcgtgaatctataatcaaccctggactgctatggcctcacac
 aaagacgacgaagacaagtttcccatgagcgggtcatgatttggaaaggagagcgcggagctcaaaactgcatttgc
 gacaatgtcatgatcacagacgaagagannncnaagccactaaccctggccactgaaagattggactgtggcagtc
 tctccaagcagcacannnaccctgcgaccgnagatgtcatgcccattggcgttacccgtctcatggcggcttgg
 acgtataacctgcaggcatttggccaaaattccctcacacggatggacacttccaccctgtctcatggcggcttgg
 cttaagcaccctgcctcatcagatccatcaaaaacacgcctgtccctgcgaatccctccggcagatggctaca
 ttccattcatcaccctgatccacaggacaagtggcgtggagattgaatggagctgcagaaagaaaacagcaac
 gctggatcccaagtgcaatctactatgcaaaatctgccaacgttactgtggacaacaatggactttata
 ctgagcccttggcaccctgttacccgtccctccngtaa

【 0 1 0 4 】

シャツフル 1 0 0 - 2 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 29):

MASDGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPPKANQQKQDDGRGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLRAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQLGEPPATPAAVGPTTMASG
GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLY
KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK 10
RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPP
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV
PFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
HKDDDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
AVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
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):

atggcttcgatggttatctccagattggctcgaggacaacctctgagggcatccgcgagtggtggactgaaa
 cctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggtctggcttccctggctacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaaggggagccgtcaacgcggatgcagccgcctcggcactgacaaggcctacg
 accagcagctcagagcgggtgacaatccgtacctgcgtataaccacgcccggcggacttccaggagcgtctgcaagaag
 atacgtctttggggcaacctcggcggcggcggactgtacgttccaggccaagaagagggtctcgaacctttggctggtaggaag
 gtgctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgcccacaagagccagactcctcctcggcattggcaaga 10
 cagggccagcagccccgctaaaaagagactcaatttggcagactggcactcagactcgtcccccggcaccacaacctcgg
 agaacctccagcaacccccgctgtggacctactacaatggctcaggcggtggcggcaccatggcagacaataacgaa
 ggcggcggactggtaatgcctcaggaaattggcattgcattccacatggctggcggcaccatggcagactcatcaccacc
 cccgaacatgggccttgcacccataacaaccaccttacaagcaaactccactgctcaacggggccagcaacgacaac
 cactactcgctacagcacccctgggttattttgatttcaacagattccactgcccatttcaccacgtgactggcagcact
 catcaacaacaattgggattccggcccaagagactcaacttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatga 20
 tggcgtcacaaccatcgtaataaccttaccagcacgggtcaagcttcggactcggaggaccggcttgcgtacgttccggct
 ctgcgcaccaggcgtgcctccctccgttccggcggacgtgttcatgattcccgactacggctacctaactgctcaacaatggca
 gccaggcagtgggacggcgtcatcttactgccttgcataattcccatcgccatgtgagaacgggcaataacttacccttgc
 tacaccctcgaggacgtgccttccacagcagctacgcgcacagccagggctggaccggctgtatgaatcctctcatcgacca
 gtacctgtattaccctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgcggaaaacaaggacttgcgttttagccggggctccagc
 tggcatgtctgttgcgtccaaaactgcttccatgacgggttaccggcagcagcgttctaaaacaaaacagacaacaa 30
 caacagcaacttaccctggactggcttcaaaatataacccttaatggcgtaatctataatcaaccctggactgtatggcct
 acacaaaagacgacaaagacaagttccatgacgggttaccggcagcagcgttctaaaacaaaacagacaacactgc
 attggacaatgtcatgatcacagacgaagagggaaatcaaaggccactaaccctggccaccgaaagattggactgtggca
 gtcaatctccagagcagcacagaccctgcgaccggagatgtcatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 cagaagacgtataccctgcagggtcccattggccaaaattcctcacacagatggacacttccacccttgcgttgcgttgcgt
 tttggacttaagcaccgcctcctcagatctcatcaaaaacacgcctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 ctggaaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctggcaacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt
 40

【 0 1 0 6 】

S M 1 0 - 1 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 30):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEP
DSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGG
GAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYK
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL 10
SFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
ADVFMIPQYGYLTLNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPF
HSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQ
PKNWLPGPGCYRQQRVSKTKTNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH
KDDEDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA
VNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSP 20
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

【 0 1 0 7 】

S M 1 0 - 1 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 38):

atggctccatggatcttccagattggctcaggacactctctgaaggaaataagacagtggtggaaagctaa
acctggcccaccaccaccaaaagcccgagagccgcataaggacgacagcaggggtctgtcctcgtggtaactac
ggacccttcaacggactcgacaaggagagccgtcaacgcggcagacgcggccctcgagcacgacaaggcctacg
accagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtaaccacgcggcagcggcagttcaggagcgtctgcaagaaga
tacgtctttggggcaacctcggcgagcagtctccaggccaagaagcgggtctcgaaacctctcggtctggtaggaaag
gcgctaagacggctcggaaagaaacgtccggtagagcagtcggcacaagagccagactcctctcggtcatcgcaaga
caggccagcagccgctaaaaagagactcaatttggtcagactggcactcagactcagtcggccacccacaacctctcg
agaacctccagcaaccccgctgtggacactacaatggctcaggcggtgccgaccaatggcagacaataacgaa
ggcggcggcggagtggtatgcctcaggaaattggcattgcattccacatggctggcgacagagtcattcaccaccagca
cccgaaacatggccttgcacccataacaaccaccttacaagcaaactccagtcggccactttcaccacgtgactggcagc
ccactacttcggctacagcaccctgggtatttgcatttacagattccactgcactttcaccacgtgactggcagc
tcatcaacaataactgggattccggccaagagactcagttcaagcttcaacatccagggtcaaggagggtcacgac
atggcgtacaaccatcgtataaccattaccagcaccgttcaagtcttcggactcggagttccacttcggctacgtc
cttcggcaccaggctgcctccctccgttccggcgacgtgtcatgattccgaaatacggctacctgacgctcaacaatgg
cagccaagccgtggacgttcatcttactgcctggatattcccttcagatgctgagaacggcaacaacttaccc
ctacacccggatggaaactgccttccacagcagctacgacgacagccagagcctggaccggctgtatgaaatcc
ataccgtattacctgaacagaactcaaataactcgttccggacttccatgagcgggtcatgattttggaaag
ggcatgtctgttccatggccaaaactggcttccatggccacttccatggccacttccatggccacttccatgg
aacagcaatttacccatggacttccatggccaaaataacctcaatggccgttcatggccacttccatggcc
acacaaagacgacgaagacaaggatccatggccgttcatgattttggaaag
attgacaatgtcatgatttccatggccacttccatggccacttccatggccacttccatggcc
tcaatttccatggccacttccatggccacttccatggccacttccatggccacttccatggcc
agagacgtgttccatggccacttccatggccacttccatggccacttccatggcc
tggactcaagaacccgccttcagatccatcaaaaacacgcctgttccatggcc
tttgcattcatcaactccacaggacaatgttccatggccacttccatggcc
tggaaatcccgaagtgcagtataactatgcataatgcacgttcatgttcc
ccctgcggccatggccaccctgttaccatccatggccacttccatggcc
40

【 0 1 0 8 】

S M 1 0 - 8 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 31):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLYKYNHADAEF
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
GAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNHLYK
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL 10
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTDTPSGTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
NWLPGPCYRQQRVSCTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPPLMG
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS 20
KRWNPEVQYTSYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

【 0 1 0 9 】

S M 1 0 - 8 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 39):

atggctgccatggatatccagattggctcgaggacactctctgaaggaaataagacagtggtggaaagctaa
 acctggcccaccaccaccaaagcccgcagagcggcataaggacacagcaggggtctgtcttcctgggtacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaaggagagccgtcaacgaggcagacgccgcggccctcggcataacggctatg
 accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctaagtacaaccacgcccacgcggagttcaggagcgcctaaagaag
 atacgtctttggggcaacctcgacgagcagtctccaggcggaaaaagaggggtcttgaaacctctggcctgggtgaggaac
 ctgttaagacggctccggggaaaaagagggccgttagagcactctctgtggagccagactcctctgggaaccggaaagg 10
 cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaatttgcagactggagacgcagactcgtacccatccccagcctctcgga
 cagccaccaggccccctctggtaactaatacgtggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacgag
 ggcgcgcacggagtggtaattctcgggaaattggcattgcgattccacatggatggcgcacagagtcatcaccaccaga
 cccgaacctggccctgcccacctaacaacaaccaccttacaaacaaattccagccaaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 tacttggctacagcacccttgggggtatTTGacttcaacagattccactgcccactttcaccacgtgactggcaaagactcatc
 aacaacaactgggattccgacccaagagactcaagttcaagcttttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacgg 20
 acgacgacgattgccaataaccctaccagcacgggtcagggtttactgactcggagtgaccagctccgtatgtcctcggtcg
 cgcattcaaggatgcctccgcgttccagcagacgtctcatgggtccacagtatggatacctcaccctgaacaacgggagt
 caggcagtaggacgttcttactgcctggagttacttcccttcagatgtcggtaccggtaacaacttaccctttagtaca
 cttttaggacgttcccttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatccctcatcgaccagtacctg
 tattactttagcagaacagacactccaagtggaccaccacgcagtcaggttttcaggccggagcgtgactgacatt
 cgggaccagttaggaactggcttccctggaccctgttaccgcacgcagcgtatcaaaagacatctgcccgtatggcaagcc 30
 tgaataactcggtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtaatccggccatggcaagcc
 acaaggacgatgaagaaaaagttttcctcagagcgggttctcatttggaaagcaaggctcagagaaaaacaagtgtggaca
 ttggaaaaggcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatccctggctacggagcgtatgggtctatctacca
 accctccagagaggcaacagacaaggcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcggttccaggcatggcaggaca
 gagatgtgtacccctcaggggcccatctggcaaaagattccacacacacggacggatttcaccctctccctcatgggtggatt
 cggacttaaacaccctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccctcaccacccctcaggatggcaaaa 40
 gttgcttcctcatcacacagtactccacggacaggtcagcgtggagatcgagtggagctgcagaaggaaaacagcaaac
 gctggaaatcccgaagttcagttacacttccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattcag
 agcctcgccccattggcaccagataccctgactcgtaatctgtaa

【 0 1 1 0 】

S M 1 0 0 - 3 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 32):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLKYNHADAEF
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDANSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL
10 KFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTLNNGSRAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLSRTDTPSGTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQSVIEWELQKENS
20 KRWNPEVQYTSYNKSVNVDFTVDTNGVYTEPRPIGTRYLTRNL

【 0 1 1 1 】

S M 1 0 0 - 3 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 40):

atggctgccatggatatctccagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtggtggaaagctaa
 acctggcccaccaccaccaaagccccagagcggcataaggacagcaggggttgcgttcctgggtacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaagggagagccgtcaacgaggcagacgccgcggccctcggacacaaagcctatg
 accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctaagtacaaccacgcccacgcggagttcaggagcgcctaaagaag
 atacgttttggggcaacctcgacgagcagtctccaggcaaaaaaaaagagggttgcgttcaccctggccgttggagaaac
 ctgttaagacggctccggaaaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctgggaaccggaaagg 10
 cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggcagactggagacgcaaactcagttacccatggccatccctcgg
 cagccaccagcagccccctctgtggactaatacgtggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacgag
 ggcggccacggagtggtaattccctggaaattggcatggcattccacatggatggcgacagagtcatcaccaccagca
 cccgaacctggccctgcccacctaacaaccaccttacaaacaaattccagccaaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 tactttggctacagcacccttgggggtatttgactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaaagactcatc
 aacaacaactgggattccgacccaaagagactcaagttcaagcttttaacattcaagtcaaagagggtcacgcagaatgacgg 20
 acgacgacgattgccaataaccctaccagcacgggtcagggtttactgactcggagtgaccagctccgtacgtcctggctcg
 ggcgcattcaaggatgcctccggcgttccagcagacgtttcatgggtgccacagtatggataacctcaccctgaacaacgggag
 tcggcagtaggacgtttcatggacttgcctggagtacttccctctcagatgtcgtaaccggtaacaacttacccatgactac
 actttgaggacgttcccttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatccctctcatgaccaggac
 gtattacttgcagaacacactccaagtggaaaccaccacgcagtcaggcgttcagttctcaggccggagcgagtgacat 30
 tcgggaccagtcttaggaactggcttctggaccctgttaccgcagcagcgttactcaagatctgcccggataacaacaaca
 gtgaataacttgcggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtaatccggggccggcatggcaagc
 cacaaggacgtgaagaaaaagttttccctcagagcgggggtctcatttggaaagcaaggctcagagaaaaacaagtgtggac
 attgaaaaggcatgattacagacgaagaggaaatcaggacgaccaatccgtggctacggagcgtatggttctgtatctacc
 aacctccagagaggcaacagacaaggcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttccaggcatgtcgacggac
 agagatgtgtacccatggggccatctggcaaaagattccacacacggacggacatttcacccctcccccattgggtgga 40
 ttggacttaaacaccctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccctgaccacccatggcggcaaa
 agtttgccttcatcacacagactccacggacaggtcagcgtggagatcgagtggagcgtcagaaggaaaacagcaaa
 cgctggaaatcccgaagttcagttacactccaactacaacaagtgttaatgtgactttactgtggacactaatggcgtgtataca
 gagectcgccccattggcaccagatacctgactcgttaatctgttaa

【 0 1 1 2 】

S M 1 0 0 - 1 0 (アミノ酸配列)

(SEQ ID NO: 33):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLKYNHADAEF
QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
SSSGTGKAGQQPARKRNLNGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
GAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNHLYK
QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL 10
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTDAPSGTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK
DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPPLMG
GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS 20
KRWNPEVQYTSYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

【 0 1 1 3 】

S M 1 0 0 - 1 0 (ヌクレオチド配列)

(SEQ ID NO: 41):

atggctgccatggtatctccagattggctcgaggacactctctgaaggaataagacagtggtggaaagctaa
 acctggcccaccaccaccaaaagccgcagagcggcataaggacagcagcagggtctgtgttcctgggtacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaaggagagccgtcaacgaggcagacgcggccctcgagcacgacaagcctatg
 accggcagctcgacagcggagacaacccgtacctaagtacaaccacgccgacgcggagttcaggagcgcctaaagaag
 atacgttttggggcaacctcgacgagcagtctccaggcaaaaaaaaagaggggtctgaacctctggccctgggtgaggaac
 ctgttaagacggctccggaaaaaagagggccgttagagcactctctgtggagccagactcctcctgggaaccggaaagg 10
 cggtcagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggcagactggagacgcagactcgtacccctcgga
 cagccaccaggcagccccctctggctggactaatacgtggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaataacgag
 ggcgcgcacggagtggtaattctcgggaaattggcattgcattccacatggatggcgacagagtcacaccaccagca
 cccgaacctggccctgcccacctaacaaccaccttacaaacaaattccagccaaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 tactttggctacagcacccttgggggtatttgcattcaacagattccactgcactttcaccacgtgactggcaaagactcatc
 aacaacaactgggattccgacccaagagactcaagttcaagcttttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacgg 20
 acgacgacgattgccaataaccttaccagcacggltcagggtttactgactcggagtgaccagctccgtacgtcctcg
 ggcgcacggatgcctccggccgttccagcagacgttcatggccacagtatggataccctcaccctgaacaacgggag
 tcaggcagtaggacgcttcatttactgcctggagtacttccttcagatgtcgatccggtaacaacttacccctcagctac
 actttgaggacgttcccttccacagcagctacgctcacagccagactctggaccgtctcatgaatccctcatcgaccag
 gtattacttgcagaacacagacgttcaagttggaaaccaccacgcgtcaaggctcagtttcaggccggagcgagtgacat 30
 tcgggaccagtcttaggaactggcttctggacccttaccgcagcagcgttcatggatccggataacaaca
 gtgaataactcgtaggacttccatccacagcagacttccatggcagacttccatggatccggataacaaca
 cacaaggacgtgaagaaaagtttcctcagagcgggttctcatttggaaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac
 attgaaaaggcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatccgtggctacggagcgtatggatctgtatctacc
 aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttccaggcatgtgcaggac 40
 agagatgttacccatggggccatctggcaaaagattccacacacggacggatttcaccctccatgggtgga
 ttggacttaaacaccctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccgttccaggcatgtgcggcaa
 agtttgccttcatcacacagactccacggacaggtcagcgtggagatcgagtggagctgcagaaggaaaacagcaaa
 cgctggaaatcccgaagttcagttccactacaacaagtctgttaatgtgactttactgtggacactaatggcgtgtattca
 gagcctcgccccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaa

【 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「バ

10

20

30

40

50

「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سف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سف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سف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、マウス細胞及び靈長類細胞（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、靈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 r e pタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む。他の実施形態では、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

【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

40

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

【 0 1 2 1 】

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) 多い形質導入を示す。

20

【 0 1 2 2 】

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 5×10^{-6} M 未満、約 10^{-6} M 未満、約 5×10^{-5} M 未満、約 10^{-5} M 未満、約 10^{-4} M 未満、または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。

【 0 1 2 3 】

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ビボ滞留時間を示す。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

【 0 1 2 4 】

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。

【 0 1 2 5 】

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

【 0 1 2 6 】

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 D N A 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 R N A 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】

10

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、慢性ヘキソサミニダーゼ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/MコリピドーシスII、乳児遊離シアル酸蓄積症/ISSD、若年性ヘキソサミニダーゼA欠損症、クラッベ病、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/MコリピドーシスIII A、MPS Iハーラー症候群、MPS Iシャイエ症候群、MPS Iハーラーシャイエ症候群、MPS IIハンター症候群、サンフィリピ症候群A型/MPS III A、サンフィリピ症候群B型/MPS III B、サンフィリピ症候群C型/MPS III C、サンフィリピ症候群D型/MPS III D、モルキオA型/MPS IVA、モルキオB型/MPS IVB、MPS IXヒアルロニダーゼ欠損症、MPS VIマロトーラミー、MPS VIII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、ティサックス/GM2ガングリオシドーシス、及びウォルマン病等のリソソーム蓄積症、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；囊胞性線維症、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】

30

好適な異種核酸は、インターフェロン(例えばIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ ；IFN- ϵ)；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Epoegen(登録商標)(エポエチン- α)；Aranesp(登録商標)(ダルベポエチン- β)；Neorecombinant(登録商標)、Epoegin(登録商標)(エポエチン- β)等)；モノクローナル抗体の抗原結合断片(例えばLuentis(登録商標)(ラニビズマブ))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)、Erbitux(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)(アルテプラーゼ)組織プラスミノーゲン活性化因子、Novose

40

50

ven (登録商標) (組換えヒト因子VIIa)、因子VIIa、因子VIII (例えばKogenate (登録商標))、因子IX、 - グロビン、ヘモグロビン等) ; コロニ - 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 (例えばソマトロビン、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)、Humatropin (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 (beclapermin); 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- 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 / T細胞受容体等) ; 酵素 (例えば - グルコシダーゼ; Cerazyme (登録商標) (イミグルカラーゼ; - グルコセレブロシダーゼ、Ceredase (登録商標) (アルグルセラーゼ;) ; 酵素活性化剤 (例えば組織プラスミノーゲン活性化因子) ; ケモカイン (例えばIP-10; Mig; Gro / IL-8、RANTES; MIP-1; MIP-1; 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; ブラジキニン、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、パソプレシン、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 - 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、腫瘍壞死因子、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Kiniret (登録商標) (アナキンラ)) ; イオントチャネル、例えば囊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 - 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MUC11-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、レッシュマニアシス(Leishmaniasis)、ジアルジア症(例えばGenBank受託番号M33641)、アーベ症、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、crrRNA様RNA、tracrRNA様RNA、单一誘導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、ハンチング、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(例えば水痘带状疱疹)、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、例えばハンティントン病、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、インビポ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（CMVIE）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、マウスマ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。

【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。

【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。

【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 Microbiology and Immunology 158:97-129、Kotin, 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。

【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-C1 pH 7.5、10 mMのMgCl₂、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。

【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。

【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。

【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。

【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

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* 力セ¹⁰セット及び別個の*rep* 及び / または*cap* 力セ²⁰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ィルス及び / 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、該ヘルパーウィルス及び / 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、及びヘルパーウィルスまたは付属機能ベクター(複数可)は、標準トランسف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、Kotin, 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سف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سف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.

10

20

30

40

50

(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クレオチド配列は、リン酸カルシウム共沈殿 (Graham et al. (1973) *Virology* 52: 456 - 467)、培養細胞への直接的微量注入 (Capecchi, M. R. (1980) *Cell* 122: 479 - 488)、電気穿孔 (Shigekawa et al. (1988) *Biotechniques* 6: 742 - 751)、リポ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 (Fleigner 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、微細物、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞を含む。この用語は、トランスクレオチド配列を有する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配列でトランスクレオチド配列を有する細胞を指す。安定的ヒト細胞株である293 (例えば受託番号ATCC CRL1573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. Virology* 36: 59)、アデノウイルス性E1a及びE1b遺伝子 (Aielo et al. (1979) *Virology* 94: 460) を発現する。293細胞株は、容易にトランスクレオチド配列を有する細胞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クレオチド配列において機能する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Rep78、Rep68、Rep52、及びRep40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合的に必要とされる。AAV repコード領域の説明について、例えば Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiology and Immunology* 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-2DNA複製を媒介するとも既知である (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 cap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McCartay 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ーを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素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

【0159】

3. AAV付属機能

AAV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なればならない。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。

30

【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。

40

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ビ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、付属機能に関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C R C Handbook of Parvoviruses, vol. I (P. Tijsse en, ed.)内のCarter, B. J. (1990) "Adeno-Associated Virus Helper Functions"、及びMuzychuk, N. (1992) Curr. Topics. Microbiol. and Immunol. 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. U.S.A 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。

10

15

20

【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سف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ビリオンにパッケージングされる。

30

【0164】

組換えAAV複製の後、rAAVビリオンは、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。

40

【0165】

結果として生じるrAAVビリオンは、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

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、インビポ（「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る。

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、サザンプロット及び／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

インビポ（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., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins、及びHandbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3rd 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

【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。

40

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、インビオ注射、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 10
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 20
、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、臍臓細胞（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、臍臓幹細胞、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。 30

【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。 40

【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オ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 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 (iPSC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、Fc_{RII}、Fc_{RIII}、Thy-1、CD44、VLA-4、LFA-1、HSA、ICAM-1、CD45、Aa4.1、Scal-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P₀、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。

10

【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、骨髄、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。

20

【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】

30

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。

40

【0185】

50

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】

改变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、改变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ビリオンライプ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变rAAVビリオンのためにライプ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、ライプラリ及びライプ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ライプ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ライプラリの選択の後、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ライプラリの生成

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ライプラリが生成される。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Zha 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ライプラリは、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。鑄型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鑄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 突然変異体のライプラリである。したがって本開示は、約10～約10¹⁰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 遺伝子ライプラリを提供する。ライプ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。主題のライプラリは、10～約10⁹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 突然変異ライプ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。ライプラリプラスミド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ライプラリ粒子）が採取される。

【0193】

ライプラリ選択

ライプ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（よって変化rAAVビリオンのライプラリを生成する）、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）を有する変化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。

【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ライプラリは、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ライプラリ粒子（AAVライプラリビリオン）を中和抗体に接触させ、AAVライプ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ライプラリ粒子は様々な濃度の中和抗体に接触させられる。AAVライプ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ライプラリビリオンの、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。

【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ライプラリは、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ライプラリ粒子は、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ライプ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ライプ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

10

20

30

40

50

そ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ライプラリは、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ビリオンと比べて)について選択される。AAVライプ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ライプ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ライプ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。

【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、主題のライプラリは、野生型AAVビ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ビリオンと比べて)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ライプ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ライプラリ粒子は、AAVライプ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ライプ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ライプラリ粒子/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ライプラリ粒子を採取する。例えば、結合の後、AAVライプラリ粒子/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ライプ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。

【0198】

約450mMのNaClよりも低いNaCl濃度で溶離するAAVライプラリ粒子は、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ライプラリ粒子は、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ライプラリ粒子は、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ライプラリ粒子を濃縮するために何回も反復され得る。

【0200】

本方法では、1つ以上の選択ステップがAAVライプ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

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 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複数の核酸を含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) ライプラリを提供する。コード変異体 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 AAV カプシドタンパク質を含む複数の AAV 粒子を含む、突然変異アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子のライプラリを提供する。突然変異体 AAV 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 AAV カプシドタンパク質の特徴と同様に上記に記載される。

【0202】

本開示は、(i) それぞれが変異体アデノ随伴ウイルス (AAV) 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 rAAV ビリオン、(ii) それぞれが変異体 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 2 つ以上の単離核酸、(iii) それぞれが変異体 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核酸を含む 2 つ以上の宿主細胞、及び(iv) 2 つ以上の変異体 AAV カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つを含むライプラリをさらに提供し、ライプラリの少なくとも 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とも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

【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 rAAV ビリオン、主題の rAAV ベクター、主題の変異体 AAV カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む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 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、主題のライプラリ（例えば上記のライプラリのいずれか）、及び主題の変異体 AAV 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 AAV 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。

【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 (CD)、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。

【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

10

20

30

40

50

せずに様々な変更及び修正がなされ得るという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。

【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エントな圧力は、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、これは現在まで最も広範に回避的な変異体である。

【0208】

材料及び方法

細胞株

細胞株は37で5%のCO₂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（A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n）（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、G i b c o）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、I n v i t r o g e n）を補充した、ダルベッコ変形イーグル培地で培養した。CHO-K1及びCHO-pg5A細胞を、10%ウシ胎仔血清（G i b c o）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（I n v i t r o g e n）を補充したF-12K培地（ATCC）で培養した。Pr o 5及びL e c 1細胞を、10%ウシ胎仔血清（G i b c o）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（I n v i t r o g e n）を補充したMEM-アルファ培地（G i b c o）で培養した。

【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 V 2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な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G a m i m u n e N、10%ヒトI V I G（インディアナ州エル

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

10

【0211】

20

ライプラリ生成及びウイルス產生

飽和突然変異誘発ライプ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Zhaoretal.に記載される付着伸長プロセスによって、AAV2 capライプラリを生成した。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プ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

30

5'-cattNNKgaccagtcttaggaactgg-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'-gccacaaggacgtatagaagaaNNKtttttcctcagagcgggttctcatttggaaagcaaggctcaNNKaaaacaagtgtggacattg-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

40

5'-ccaacctccagagaggcNNKagacaagcagctacc-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'-ccaactacaacaagtctNNKaatgtggactttactgtggacNNKaatggcggttatt-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から成るライプラリ、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を含有するライプラリは、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

50

o 1 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/シャッフルライプラリ及び飽和突然変異誘発ライプラリからのcap遺伝子を、前述のように、5'-CATGGAAAGGTGCCAGACG-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ブローンPCRに供することで、無作為の突然変異誘発ライプラリが生成された。複製可能なAAVライプラリ及び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、リソ酸カルシウムトランスクレクト方法を使用し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ール(iodixonal)勾配遠心分離によって精製された。インビ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(Excoffon et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 10; 106(10): 3865-70、及び Maheshri et al., Nat Biotechnol. 2006 Feb; 24(2): 198-204、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】

ライプラリ選択及び進化

1回の選択は、AAV開始ライプラリを使用するHEK293T細胞感染として定義され(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IVIG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、開始ライプ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回の進化を各ライプラリで行い、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プラリは、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、Not I及びHind III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 Data bank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ビトロ形質導入分析

HEK293Tは、感染の24時間前に 3×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。変異体は、感染の前に、加熱不活性化したIVIG、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MOI 2000でrAAV-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ンベール、Molecular Devices)及び MetaXpress Image Analysis Software, バージョン3.1.0, Multi Wavelength Cell Scoring Application Module(Molecular Devices)を使用して、感染の48時間後に評価した。

【0215】

10

20

30

40

50

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 pg5A（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 2.5×10^4 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（カリフォルニア州プレア、Beckman-Coulter）を使用して感染の48時間後に評価した。

【0216】

抗体回避変異体のインビオ分析

インビオ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4mg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} ウィ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 Luminia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、 $10,000\text{g}$ 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、ビ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。

【0217】

結果

本発明者らの結果は、AAVが、インビトロ及びインビオの両方で抗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オ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ライプラリ生成及び選択

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

10

20

30

30

40

50

用される、定向進化アプローチの模式図を示す。ウイルスのライプラリは、以下の段落に記載されるD N A 突然変異誘発技術を使用して作製された(図1 a、ステップ1及び2)。最初の選択の間、A A V 2 c a p 遺伝子に対するエラープローンP C R 突然変異により作製したウイルス性ライプラリのプールは、様々な希釈の低効力 ヒト血清プールと共に、H E K 2 9 3 T 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1 a、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が得られた(図1 a、ステップ6、図7 a)。変異体1.45は、2点突然変異(N 3 1 2 K、N 4 4 9 D)を含有し、これは、野生型A A V 2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c a p 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プラリは、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c a p 遺伝子はプールされD N A シャッフリング及びE P P C R 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A A V 2と比較して、ウイルス性ライプ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7 b、c)。両方のプールからの成功したc a p 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

20

4.3を明らかにし、変異体4.3は、両方のライプラリ内に存在する4つの点突然変異(N 3 1 2 K、N 4 4 9 D、N 5 5 1 S、及びI 6 9 8 V)を含有した。ヒトI V I G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7 d)。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A A V 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。

【0220】

抗A A V 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 c a p 遺伝子に基づくライプラリの発展を引き起こした。事前にA A V 2 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R 4 7 1、K 5 3 2、E 5 4 8、N 5 8 7、V 7 0 8、T 7 1 6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」ライプラリは、7つの親A A V 血清型の無作為c a p キメラから成る「シャッフル」ライプラリ及び置換されたループ領域を有するA A V 2 c a p から成る「ループスワップ」ライプラリと共に、追加の3回の選択を受け、ここにおいてウイルス性ライプラリのプールを、様々な希釈のヒトI V I Gと共にH E K 2 9 3 T 細胞の感染の前に37で1時間インキュベートした。A A V ライプラリでの感染及びアデノウイルス重感染による感染性A A V 変異体の増幅の後、選択の成功を決定する方法として、それぞれのライプラリ状態からの、ウイルス性ゲノムの数またはウイルス性力値を定量化し、野生型A A V 2 の力値と比較した(図1 b)。飽和突然変異誘発及びループスワップ/シャッフルライプラリを使用する選択のそれぞれの回について、野生型A A V 2 よりも高いウイルス性力値を生成した1:10及び1:100 I V I G 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c a p 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c a p 遺伝子は、エラープローンP C R 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

【0221】

図1は、増強した抗体回避のためのA A V 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c a p 遺伝子を遺伝子的に多様化することによって、ウイルス性ライプラリを作製する。2)ウイルスを、プラスミドトランスフェクトを使用してH E K 2 9 3 T 細胞内にパッケージングし、次いで回収及び精製する。

40

50

3) ウイルス性ライプ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プ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、ウイルス性ライプラリで 24 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 : 10 希釈は、10 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

【0222】

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) 低ストリンジエンシーの 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 μ 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 (1.45 及び 4.3) は、野生型 A A V 2 と比較して、約 100,000 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 1.23 倍及び 3.10 倍増強した耐性を実証した。

20

【0223】

インビトロでの新規進化 A A V 变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 / シャッフルライプラリからの、個々の分析のために選択及びパッケージングされた 12 のクローンのうち、12 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 35 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 100-3 (配列番号 12 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 10 % 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プラリからの変異体 S M 10-2 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 100-3 及び S M 10-2 (配列番号 10 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 (25) : 2 3 5 7 - 6 5)。

30

【0224】

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は、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 の存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プラリからの 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

【0225】

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のクローナーの配列分析は、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ナー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IVIG濃度を有するそれぞれのライプラリからの2つのクローナーについて示す。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IVIG濃度を有するそれぞれのライプラリからの2つのクローナーについて示す。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：ライプラリクローナー及び親血清型のIVIG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プ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IVIGを使用した。遺伝子送達効率性をIVIGの不在下のものの50%に低減するために必要とされるIVIG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IVIGを必要とした。中和抗体価は、図2の曲線を指數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 mg/ml	AAV2と比べた 耐性倍率
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

【0228】

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）。

【0229】

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を欠如する）、Pro5、Lec1（シアル酸を欠如する）、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。

【0230】

インビトロでの新規進化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を注射したナイーブ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と同様のインビトロ向性を示した。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27倍より高い筋肉の形質導入を示した。これ

10

20

30

40

50

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。

【0231】

図 11 は、免疫化マウス血清中のライプラリクローン及び親血清型の中和抗体価を示す。ライプ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プ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。

【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 I V I G 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 变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、4 mg のヒト I V I G 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。

【0234】

個々のヒト血清のプールに対して選択される AAV2 系のエラープローンライプ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プ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、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内に位置付けられるにもかかわらず変

10

20

30

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 AA V カプシドの作製は、複数の AA V 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。AA V 8 及び AA V 9 もまた、IV IG による中和に対して AA V 2 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 AA V 1 及び AA V 6 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 IV IG 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 AA V 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 AA V 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 AA V 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 AA V 変異体の単離をもたらすであろうことを実証する。

10

20

【0236】

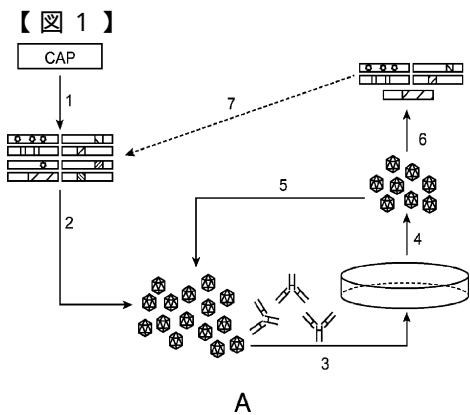
動物及びヒトにおける AA V ベクター成分への適応免疫応答は、多くの場合、同じ血清型の AA V ベクターの再投与を阻み、複数のベクター投与を必要とする遺伝子送達用途を困難にする。生体内分布研究において使用されるマウスからの血清を使用するインビトロ中和アッセイは、変異体が野生型 AA V よりもこれらの血清によって中和されないことを実証し（図 11）、これはベクター再投与が必要である遺伝子療法戦略に有用であり得る。例えば、シャッフル 100-3 は、AA V 2 を注射されたマウスからの血清によって中和されず、AA V 2 は、シャッフル 100-3 を注射されたマウスからの血清によって中和されず、この変異体が野生型 AA V 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 AA V 抗体による低減した中和が可能である、新規 AA V 変異体を単離するために、定向進化を使用した。

30

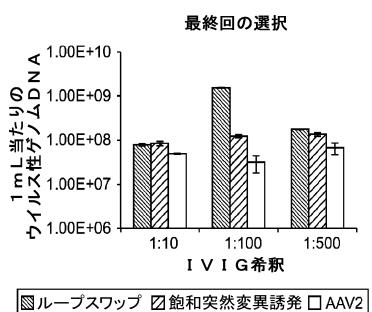
【0237】

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、及び範囲に適応させるために、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。

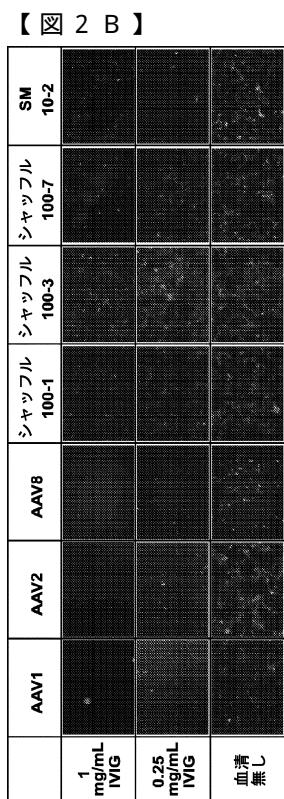
40



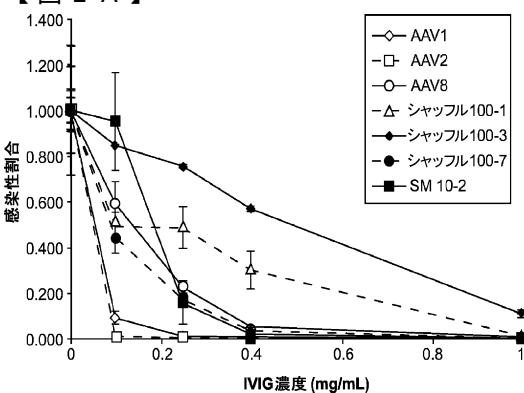
A



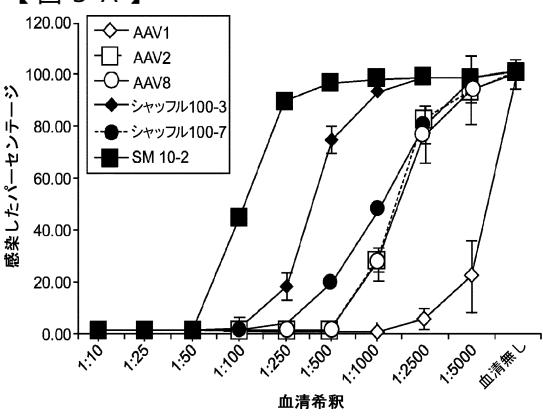
B



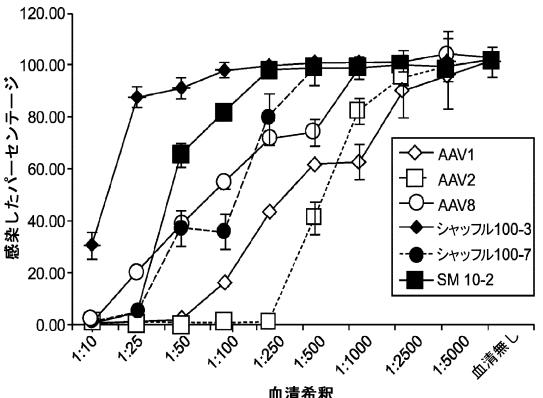
【図2A】



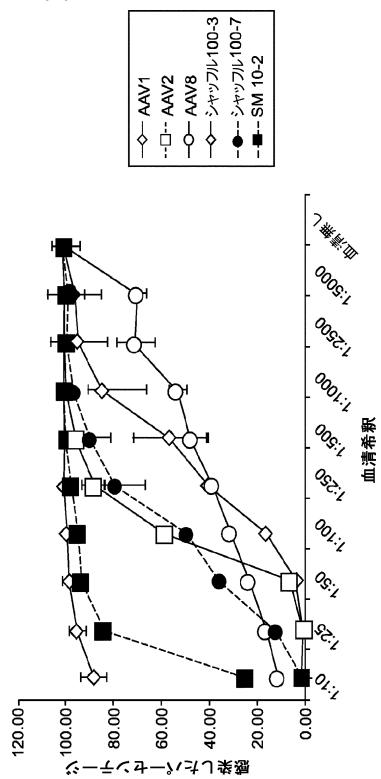
【 図 3 A 】



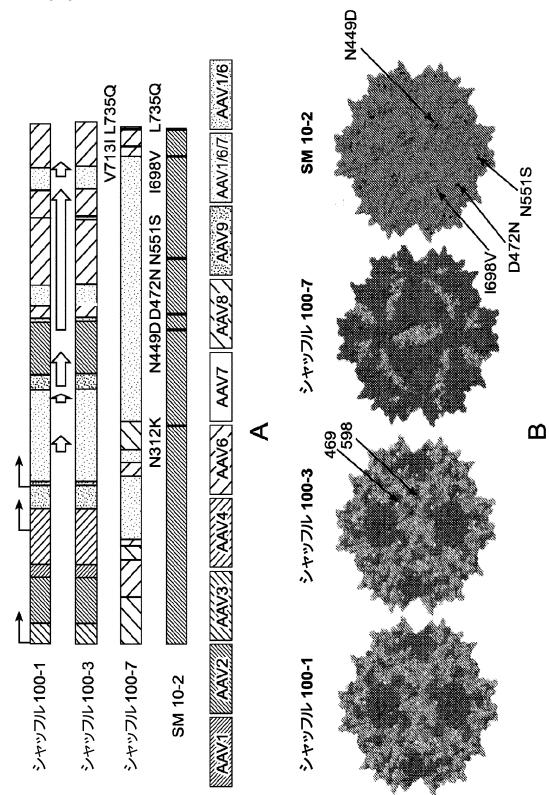
【図3B】



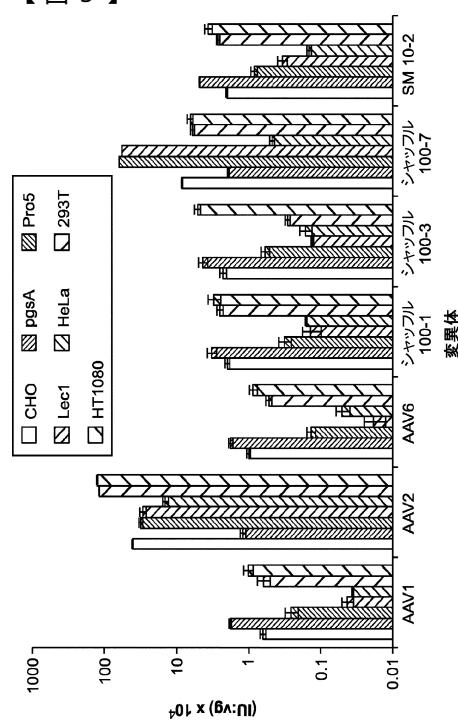
【図3C】



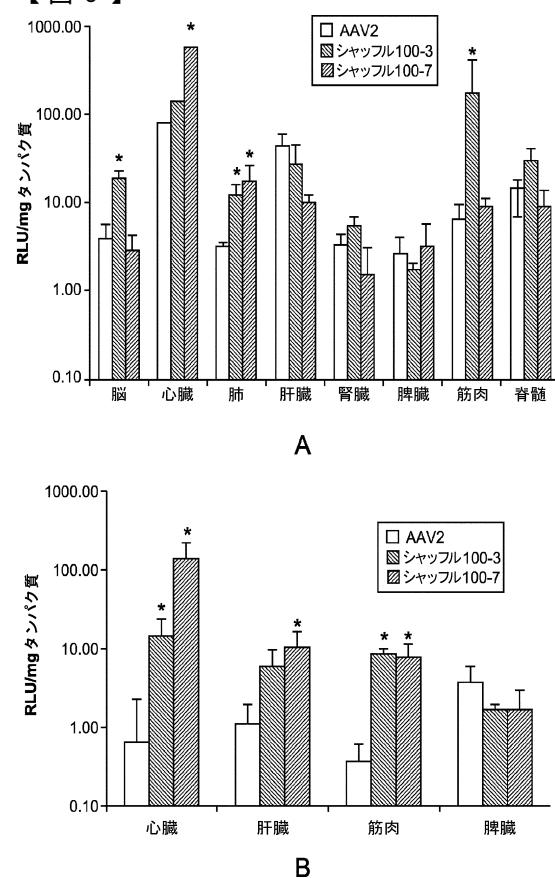
【図4】



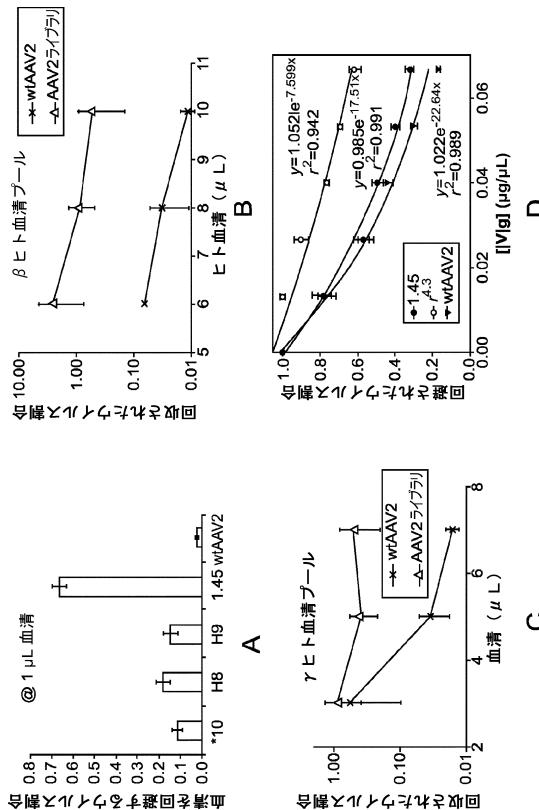
【図5】



【図6】



〔 図 7 〕



【 図 8 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 100.1 翻訳

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

1 MAADGYI 10 PDWIEDNL 20 SEGIR 30 EWWALKPGAP

MAADG YLP DWLEDNLS EGI REW DLK PGAP
MAADG YLP DWLED TLSEGIR QWQ KLK PGPP
MAADG YLP DWLEDNLS EGI REWALK PGVP
MTDG YLP DWLEDNLS EGV REW ALQ PGAP
MS FVHD PWP LEE - VEG GLR EPLG LEAGP
MAADG YLP DWLEDNLS EGI REW DLK PGAP
MAADG YLP DWLEDNLS EGS REW DLK PGAP
MAADG YLP DWLEDNLS EGI REW DLK PGAP
MAADG YLP DWLEDNLS EGI REWALK PGAP
MAADG YLP DWLEDNLS EGI REWALK PGPP
MAADG YLP DWLED TLSEGIR QWQ KLK PGPP

A... AAV

KPKANQQHQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD

KPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
PPKPAEPRHKDDGPGLVLYEGYKVKVLCRNGLD

QPKANQQHQDNRRLVLPGYKYLGPNGLD
KPKANQQHQDNRRLVLPGYKYLGPNGLD

KPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGLD
KPKANQQKODDGRGLVLPGYKYLGPNGLD

KPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
KPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD

QPKANQQHQDNARGLVLPGYRYLGPGNGLD
PPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLD

AAV2 70 80 90

KGE PVNAADAALEHDKA YDQQLKAGDN PY

K G E P V N A A D A A A L E H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y
K G E P V N E A D A A A L E H D K A Y D R Q L D S G D N P Y

K G E P V N E A D A A A L E H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y
K G E P V N A A D A A A L E H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y

RGE PVNRA D E V A R E H D I S Y N E Q L E A G D N P Y
K G E P V N A A D A A A L E H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y

KGE PVNAA DAA LEHD KAY DQQL KAG DNP Y
KGE PVNAA DAA LEHD KAY DQQL QAG DNP Y

KGE PVNEADAALEHDKA YDQQLKAGDN PY
AAV16.7

【図 8 B】

コンセンサス 同一性	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
1. AAV1 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
2. AAV2 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
3. AAV3 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
4. AAV4 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
5. AAV5 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
6. AAV6 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
7. AAV7 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
8. AAV8 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
9. AAV9 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
10. シャッフル-100.1 翻訳	LYN HADAEFQERLQEDTS FGGNLGRAV
コンセンサス 同一性	AAV4
1. AAV1 翻訳	AKKRVL EPLGLVVEEGAKTAPGKKR PVEQS
2. AAV2 翻訳	AKKRVL EPLGLVVEEPVK TAPGKKR PVEHS
3. AAV3 翻訳	AKKRVL EPLGLVVEEAKTAPGKKVQADVS
4. AAV4 翻訳	AKKRVL EPLGLVVEQAGETAPGKKRPLIES
5. AAV5 翻訳	AKKRVL EPLFGLVVEEGAKTAPGKKR PVEQS
6. AAV6 翻訳	AKKRVL EPLFGLVVEEGAKTAPAKKR PVEPS
7. AAV7 翻訳	AKKRVL EPLFGLVVEEGAKTAPGKKR PVEPS
8. AAV8 翻訳	AKKRVL EPLFGLVVEEAKTAPGKKR PVEQS
9. AAV9 翻訳	AKKRVL EPLFGLVVEQAGETAPGKKRPLIES
10. シャッフル-100.1 翻訳	AAV4
コンセンサス 同一性	AAV4
1. AAV1 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
2. AAV2 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
3. AAV3 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
4. AAV4 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
5. AAV5 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
6. AAV6 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
7. AAV7 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
8. AAV8 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
9. AAV9 翻訳	QE-PDSS XGIGKKG QOPAKKR LNLFG QTGD
10. シャッフル-100.1 翻訳	AAV4
コンセンサス 同一性	AAV4

【図8C】

- 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

```

190          200          210
ESVPDPQPLIGEPPAAP-SSVGXXTMASGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-TSLGNTNTMATGSG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-TSLGSNTMASCGG
TGAGDGPPEGESTGA---MSDDERAAAGG
EAGPSGSQQLQIPQAPQSSLGADTMASGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-TAVGPTTMASGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-SSVGSGTVAAGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-SCVGSTMACGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-SCVGSLTMASGGG
ESVPDPQPLIGEPPAAP-TAVGPTTMASGGG
AAV1/6          <A>

```

220	230	240
APMADNN EGADGVGNASGNWNHCDSTWLGDR		
APMADNN EGADGVGNSSGNWNHCDSTWMGDR		
APMADNN EGADGVGNSSGNWNHCDSQWLGDR		
AAV - EGG QGADGVGNASGWHDHCDTSWSEGH		
G PGLDNN QGADGVGNASGWHDHCDSTWMGDR		
APMADNN EGADGVGNASGNWNHCDSTWLGDR		
APMADNN EGADGVGNASGNWNHCDSTWLGDR		
APMADNN EGADGVGNSSGNWNHCDSTWLGDR		
APVADNN EGADGVGSSSGNWNHCDSQWLGDR		
APMADNN EGADGVGNASGNWNHCDSTWLGDR		
AAV1		

【図8D】

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

SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
-QSNTYNGFSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNANAYFCYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
TNDNTYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
TNDNTYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDNFNRFHCHFSPRDW
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

QRLINNNWNGFRPKRLNFKLFIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKRLNFKLFIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKKLFLKFNIQVRGVTTN
QRLINNNWNGMRPKAMRVLKFNIQVKEVTTS
QRLINNNYNGFRPRSLRKVLKFNIQVKEVTVQ
QRLINNNWNGFRPKRKLFLKFNIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKRKLFLKFNIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKRKLFLKFNIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKRKLNFKLFIQVKEVTTN
QRLINNNWNGFRPKRKLNFKLFIQVKEVTTN
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

DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
NGETTVANNLTS TVQIIFADSSYELPYVMDA
DSTTTIANNLTS TVQVFTDDEYQLPYVVG
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
EGTKTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
NGVKTIANNLTS TVQVFTDSDYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSDYQLPYVLGS
AAV1 AAV9

【図8E】

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

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

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 PQYGYLTLN--NGS
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
GQEGLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
GTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNT
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
AHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--NGS
AHEGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--DGS
AHEGCLPPFPADVFMI PQYGYLTLN--DGS
AAV9
AAV2

400 410 420

QA-VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSY
AAV2

430 440 450

TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
SFEKVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
NFEEVVPFHSSFAPSQNLFKLAPLVDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
SFEKVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
AAV2

【図8F】

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-XSGTAXNKKXLFSQGGPXPMSV
YLNRTQN-OSGSAONKDLLFSRGS PAGMSV
YLSRTNT-PSGTTTOSRLQFQSAGASDIRD
YLNRTQGTTGTTQNSRLLFSQAGPQMSL
GLQS TTGTTTTLNAGTATTNFTKLRTPTNFSN
RFVTSN-----TGGVQPNKNNLAGRYAN
YLNRTQN-QSGSAONKDLLFSRGS PAGMSV
YLARTQSNPGTAGNRLQYQGEGSTMAE
YLSRTQ-TGGTANTQTLGFSQGGPNTMAN
YLSKTIN--GSGQNNQTLKFSVAGPSNMAV
YLNRTQN-QSGSAONKDLLFSRGS PAGMSV
AAV1 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

490 500 510

QXKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT
QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADN-NNSEYS
QARNWLPGPCYRQQRVSKTSADN-NNSEYS
FKKNWLPGQCRQQLFSKTNQNYKIPATG
TYKRNWLPGPMGRTOCWNLLGSGVN-RASVSA
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-NNSNFT
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTDN-NNSNFT
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTDN-NNSNFT
QAKNWLPGPCYRQQRVSKTDN-NNSNFT
QGRNWLPGPCYRQQRVSKTDN-NNSNFT
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTDN-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
WTGASKYH---LNGRXSLVNPGPAMASHK
WTGASKYH---LNGRXSLVNPGPAMASHK
SDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATA
FATTNRMEELEGASYVQQPQPNMNTN
WTGASKYH---LNGRESIINPGTAMASHK
WTGASKYH---LNGRESIINPGTAMASHK
WTGASKYH---LNGRNSLVPNGVAMATHK
WTGASKYH---LNGRNSLVPNGVAMATHK
WPGASSW---LNGRNSLMNPGPAMASHK
WTGASKYH---LNGRESIINPGTAMASHK
AAV6

【図8G】

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

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

DDEDKFFPMGSVLI FGKQGAGASNTAL--
DDEDKFFPMGSVMI FGKESAGASNTAL--
DDEEKFFPMQSGVLI FGKQGSEKTNVDI--
DDEEKFFPMHGNLIFGKKEGTTASNAEL--
PADSKFSNSQLIIFAGPKQNGNTATVP---
LQGSNTYALENTMIFNSQSPANEGTTATYLE
DDKDXFFPMGSVMI FGKESAGASNTAL--
DDEDRFFPSGVLIFGKTGATNKTTL--
DDEERFFPSGVLIFGKQNAADRNADY--
EGEDRFFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDA--
DDEDKFFPMGSVMI FGKESAGASNTAL--
AAV6

580 590 600

DNVMITDEEEIKXTNPVATERYGTVAVNQ
DNVMITDEEEIKXTNPVATERYGTVAVNQ
DNVMITDEEEIRTTNPVATEQXGSVSTNLQ
DNVMITDEEEIRTTNPVATEQXGSVSTNLQ
GTLIFSEEEELAATNATDTDWGNLPGCDQ
GMLITSESSTOPVNRVAYNVGGQOMATNQ
DNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQ
ENVLATNEEEIRPTNPVATEEYGIIVSNLQ
SDVMITSEEEIKXTNPVATEEYGIIVADNLQ
DKVMITDEEEIKTTNPVATESXGQVATNQ
DNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQ
AAV6 AAV1/6 AAV6

610 620 630

SSXTAPATGDVN XQGALPGMVWQDRDVYLO
SSSTDPATGDVN XQGALPGMVWQDRDVYLO
RGNRQAAATDVTNQGVLPGMVWQDRDVYLO
SSNTAPTTGTVN HQGALPGMVWQDRDVYLO
SNSN1PTVDRLTALGAVPGMVWQNRD1YYQ
SSTTAPATGTYNLQEEIVPGSVMERDVYLO
SSSTDPATGDVN XQGALPGMVWQDRDVYLO
AANTAAQQTQVNVNQGALPGMVWQDRDVYLO
QONTAPOIGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLO
SAQAQAQATGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLO
SSSTDPATGDVN XQGALPGMVWQDRDVYLO
AAV6 AAV6

【図8H】

	640	650	66
コンセンサス 同一性	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKNPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
1. AAV1 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
2. AAV2 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
3. AAV3 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
4. AAV4 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
5. AAV5 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
6. AAV6 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
7. AAV7 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
8. AAV8 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
9. AAV9 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP
10. シャッフル 100.1 翻訳	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP	GPIWAKI PHTDGFHFPSPLMGGFGLKHPPPP

	670	680	691
コンセンサス同一性	Q I I L I K N T P V P A N P T T F S A T K F A S F I T Q Y S		
1. AAV1 翻訳	Q I I L I K N T P V P A N P P A E F S A T K F A S F I T Q Y S		
2. AAV2 翻訳	Q I I L I K N T P V P A N S P T T F S A A K F A S F I T Q Y S		
3. AAV3 翻訳	Q I M I K N T P V P A N P T T F S P A K F A S F I T Q Y S		
4. AAV4 翻訳	Q I F I K N T P V P A N P A T T F S T P V N S F I T Q Y S		
5. AAV5 翻訳	M M I L I K N T P V P G N - I T S F S D V P V S S F I T Q Y S		
6. AAV6 翻訳	Q I I L I K N T P V P A N P P A E F S A T K F A S F I T Q Y S		
7. AAV7 翻訳	Q I I L I K N T P V P A N P E V F T P A K F A S F I T Q Y S		
8. AAV8 翻訳	Q I I L I K N T P V P A D P P T T F N Q S K L N S F I T Q Y S		
9. AAV9 翻訳	Q I I L I K N T P V P A D P T A F N K D K L N S F I T Q Y S		
10. シャッフル 100.1 翻訳	Q I I L I K N T P V P A N P P A E F S A T K F A S F I T Q Y S		
	AAA		

コマンセンサ 同一性	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
1. AAV1 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNY
2. AAV2 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
3. AAV3 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
4. AAV4 翻訳	TGQVSVEIWELQKENSKRWNPEVQYTSNY
5. AAV5 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
6. AAV6 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNY
7. AAV7 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
8. AAV8 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
9. AAV9 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNY
10. シャッフル 100.1 翻訳	TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNY

【図8】

コンセンサス 同一性	XKSANVDFX V DTNGVYSEPRPIGTRYLTRN
1. AAV1 翻訳	AKSANVDFTV D NNGLYTEPRPIGTRYLTRP
2. AAV2 翻訳	NKSVNVDFTV D TNGVYSEPRPIGTRYLTRN
3. AAV3 翻訳	NKSVNVDFTV D TNGVYSEPRPIGTRYLTRN
4. AAV4 翻訳	GQONSLLWPAADAGKYTEPRFAGTRYLTH
5. AAV5 翻訳	NDPQFVDFAPDTS G YEVRTRPIGTRYLTRP
6. AAV6 翻訳	AKSANVDFTV D NNGLYTEPRPIGTRYLTRP
7. AAV7 翻訳	EKQTGVDFAVDQS G QVYSEPRPIGTRYLTRN
8. AAV8 翻訳	YKSTSDFAVNTG V YSEPRPIGTRYLTRN
9. AAV9 翻訳	YKSNNVFEFAVNTG V YSEPRPIGTRYLTRN
10. シャッフル100.1 翻訳	AKSANVDFTV D NNGLYTEPRPIGTRYLTRP
	XAV

コンセンサス 同一性	L ⁷⁵² L*
1. AAV1 翻訳	L*
2. AAV2 翻訳	L*
3. AAV3 翻訳	L*
4. AAV4 翻訳	L*
5. AAV5 翻訳	L*
6. AAV6 翻訳	L*
7. AAV7 翻訳	L*
8. AAV8 翻訳	L*
9. AAV9 翻訳	L*
10. シャッフル100.1 翻訳	L*

【図 9 A】

コンセンサス 同一性	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWALKPGAF
1. AAV1 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWWDLKPGAF
2. AAV2 翻訳	MAADGYLPDPWLEDLSEGIRQWNLKPGPGF
3. AAV3 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWALKPGAF
4. AAV4 翻訳	MTDGYLPDPWLEDNLSEGIREWALKPGAF
5. AAV5 翻訳	MSFVHDPPDWLEEVGEGEIRFLGLLEAGPAG
6. AAV6 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWWDLKPGAF
7. AAV7 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWWDLKPGAF
8. AAV8 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWALKPGAF
9. AAV9 翻訳	MAADGYLPDPWLEDNLSEGIREWALKPGAF
10. シャッフル100-3 翻訳	MAADGYLPDPWLEDLSEGIRQWNLKPGPGF

コンセンサス 同一性	KGEPVNAAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
1. AAV1 翻訳	KGEPVNAAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
2. AAV2 翻訳	KGEPVNNEADAAALEHDKAYDRLQDSDGDNPY
3. AAV3 翻訳	KGEPVNNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
4. AAV4 翻訳	KGEPVNAAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
5. AAV5 翻訳	RGEPVNRADEBVEREHDISYNEQFLAGDNPY
6. AAV6 翻訳	KGEPVNAAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
7. AAV7 翻訳	KGEPVNAAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
8. AAV8 翻訳	KGEPVNAAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
9. AAV9 翻訳	KGEPVNAAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
10. シャッフル100-3 翻訳	KGEPVNNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY
AAV2 {AAV1, 6}	

【図9B】

	100	110	120
コンセンサス 同一性	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
1. AAV1 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
2. AAV2 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
3. AAV3 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
4. AAV4 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
5. AAV5 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
6. AAV6 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
7. AAV7 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
8. AAV8 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
9. AAV9 翻訳	LKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ		
10. シャッフル100-3翻訳	LKYNHADAEFQQLQGDTSFGGNLGRAVFQ		
	AAV4		

コンセンサス
同一性

	130	140	150
1. AAV1 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEEGAKTA	PGKKR	PVQE
2. AAV2 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEEPVKT	APGKKR	PVHE
3. AAV3 翻訳	AKKRILEPLGLVLEAAKTA	TPGKKG	AVQD
4. AAVA 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEQAGET	ATAPGKKR	PLIES
5. AAVS 翻訳	AKKRVLEPFGLVLEEGAKT	APGKKR	IIDDHF
6. AAVG 翻訳	AKKRVLEPFGLVLEEGAKT	APGKKR	PVEQS
7. AAATV 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEEGAKT	APAKKKR	PVEPS
8. AAWS 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEEGAKT	APGKKR	PVEPS
9. AAAV 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEAAKTA	PGKKR	PVQE
10. シャッフル100-3 翻訳	AKKRVLEPLGLVLEQAGET	APGKKR	PLIES
	AKKRVLEPLGLVLEQAGET	APGKKR	PLIES
	AKKRVLEPLGLVLEQAGET	APGKKR	PLIES

Qエンサンス 同一性	QE-PDSSXGIGKKGQQPAKKRNLNFQGTGDS
1. AAV1 翻訳	QE-PDSSSGIGKGTGQQPAKKRNLNFQGTGDS
2. AAV2 翻訳	VE-PDSSSGTCGACQQPARKRNLNFQGTGDA
3. AAV3 翻訳	QE-PDSSSGVGKSGKQPAKKRNLNFQGTGDS
4. AAV4 翻訳	QQ-PDSSSTGIGKKGKQPAKKRNLNFVFE---DE
5. AAV5 翻訳	KE---KKARTATEEDSKPST-----SSDA
6. AAV6 翻訳	QE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRNLNFQGTGDS
7. AAV7 翻訳	QRS-PDSSSTGIGKKGQPAKKRNLNFQGTGDS
8. AAV8 翻訳	QRS-PSSTGIGKKGQPAKKRNLNFQGTGDS
9. AAV9 翻訳	QE-PDSSAGIGKSGAQPAKKRNLNFQGTGDT
10. シャッフル100-3翻訳	OO-PDSSSTGIGKKGKQPAKKRNLNFQGTGDS
	AAV4
	AAV1/6

【図9C】

- 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

- 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

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

【 図 9 D 】

APMADNNNEGADGVGVNASGNWHCDSTWLGDR
APMADNNNEGADGVGVNASGNWHCDSTWLGDR
APMADNNNEGADGVGVNSGSNWHCDSTWMGDR
APMADNNNEGADGVGVNSGSNWHCDSTWLGDR
AAV - EGGQGADGVGVNASGDNWHCDSTWESEGH
GFLGDDNQGADGVGVNASGDNWHCDSTWMGDR
APMADNNNEGADGVGVNASGDNWHCDSTWLGDR
APMADNNNEGADGVGVNASGDNWHCDSTWLGDR
APMADNNNEGADGVGVSSSGNWHCDSTWLGDR
APVADNNNEGADGVGVSSSGNWHCDSTWLGDR
APMADNNNEGADGVGVNASGDNWHCDSTWLGDR
AAV - AAV

- 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

- 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

- 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

【 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

- 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

- 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

【 図 9 F 】

	370	380	390
AHQGCLPPPFADVFMI PQYGYLTLN--NGS			
AHQGCLPPPFADVFMPV PQYGYLTLN--NGS			
AHQGCLPPPFADVFMPV PQYGYLTLN--NGS			
GQEGS LPPLPPFNDVFMPV PQYGYCGLVTGNTE			
TGETG CLPAFPVQPVTFPLPQYGYATLNRDNT			
AHQGCLPPPFADVFMI PQYGYLTLN--NGS			
AHQGCLPPPFADVFMPV PQYGYLTLN--NGS			
AHQGCLPPPFADVFMI PQYGYLTLN--DGS			
AHEGCLPPPFADVFMPV PQYGYLTLN--DGS			
AHEGCLPPPFADVFMPV PQYGYLTLN--DGS			

TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEEVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
SFEKVPFHSMYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLY
NFEEVPFHSSFAPSQNLFLKPLVQDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
EFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
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

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

- 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

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

SNDNHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
-QSNTYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNANAHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHSHSPRDW
SNDNHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
TNDNTYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
TNDNTYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNAYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWNGYFDNFNRFHCHFSPRDW
AAVI

```

DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
NGETTVANNLTS TVQVFTDSEYQLPVYMDA
DSSTTIANNLTS TVQVFTDDYQLPVYVGN
DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
EGTKTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
NGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
DGVTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPVVLGS
AAV1          AAV9

```

460 470 480
 YLNRTQN-XSGTAXNKXLLFSQGGPSGMSV
 YLNRTQN-QSGSAQNKLDFLRSRGSPGMSV
 YLSRTQT-TSGTTTQSRLFQSQAGSADIRD
 YLNRTOGTTSGTTNQSRLLFQSQAGQPQSMSL
 GLQSSTTGTTLNAGTATTNFTKLRPNTFSL
 R FVSTNN----- TGGVQFKNLA GRAYRN
 YLNRTQN-QSGSAQNKLDFLRSRGSPGMSV
 YLARLTSQNSPFGTAGNRLEQFYQGGPSTMAE
 YLSRTQT-TGGTANTQTLKFSQGGPNTMAN
 YLSKTTIN---GSGSQNQQTTLKFSQGGPSNMAV
 YLNRTOQ-QSGSAQNKLDFLRSRGSPGMSV

QXKNWLPGPCYQRQRVSKTKTDN--NNSNFA
QPKNWLPGPFCYQRQRVSKTSDN--NNSEYS
QSRNWLPGPFCYQRQRLSKTANDN--NNSNFP
FFKNWLPGPSIQCQGFSKTNQYKIPATG
TYKNNWFPGMRTQGWNLSSGVN--RASVSA
QPKNWLPGPFCYQRQRVSKTKTDN--NNSNFT
QAKNWLPGPFCFQRQRVSKTDLQN--NNSNFA
QAKNWLPGPFCYQRQRVSTTGTQN--NNSNFA
QGRNYIIPGFSYQRQRVSTTVTQN--NNSEFA
QPKNWLPGPFCYQRQRVSKTKTDN--NNSNFT
AAV1

```

WTGASKYH----LNGRXLSPGPMASHK
WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK
WTGATKYN----LNGRDSLSPGPMASHK
WTAAASKYH----LNGRDSLSPGPMASHK
SDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATA
FATTNRME----LEGASQYVPPQPNGMTN
WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK
WTGATKYN----LNGRNSLSPGVAAMATHK
WTAGTKYH----LNGRNSLSPGIAAMATHK
WPGASSWA----LNGRNSLSPGPMASHK
WTGASKYN----LNGRESIINPGTAMASHK

```

AAVG

【図9G】

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

550 560 570

D D E D K F F P M S G V M I F G K Q G A G A S N T A L --
D D E D K F F P M S G V M I F G K Q G A G A S N T A L --
D D E E K F F P Q S G V L I F G K Q G S E K T N V D I --
D D E K F F P M H G N L I F G K R G E T T A S N A E L --
P A D S K F S N S O L I F A G P K Q N G N T A T V P --
L Q G S N T Y A L E N T M I F N S Q P A N P G T T A T Y L E --
D D K D F F P F M S G V M I F G K Q G A G A S N T A L --
D D E D R F F P P S G V L I F G K T G A T N T K T T L --
D D E R F F P P S G N L I F G K Q N A R D N A Y D --
E G E D R F F P P L G S L I F G K Q T G R N D V A --
D D K D F F P M S G V M I F G K E S A G A S N T A L --

△N6

コンセンサス 同一性	SSXTAPATGDN QGALPGMVW QDRDVYQ
1. AAV1 翻訳	SSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYQ
2. AAV2 翻訳	RGNRQAAATADVNQTQGVLPGMVWQDRDVYQ
3. AAV3 翻訳	SSNTAPPTCTGVNQGALPGMVWQDRDVYQ
4. AAV4 翻訳	SNSNLPPTDRLTALGAVPGMVWQNDRDVYQ
5. AAV5 翻訳	SSTTAPATGCTYLNQEVPGSVWNERDVYQ
6. AAV6 翻訳	SSSTDPACTGDVHVMGALPGMVWQDRDVYQ
7. AAV7 翻訳	AANTAAQTQVNNNQGALPGMVWQDRDVYQ
8. AAV8 翻訳	QONTAPQCTGVNNQGALPGMVWQDRDVYQ
9. AAV9 翻訳	SAQAQATGCVWQNQGILPGMVWQDRDVYQ
10. シャッフル100-3 翻訳	SSSTDPACTGDVHAMGALPGMVWQDRDVYQ
	AAV6 AAV1 AAV6

【図9H】

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

- 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

- 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

【図9-1】

	730	740	75
コンセンサス同一性	X K S A N V D F X V D T N G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
1. AAV1 翻訳	A K S A N V D F T V D N N G L Y T E P R P I G T R Y L T R N		
2. AAV2 翻訳	N K S V N V D F T V D T N G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
3. AAV3 翻訳	N K S V N V D F T V D T N G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
4. AAV4 翻訳	G Q O N S L L W P D A Q G A Y T E P R P I G T R Y L T R N		
5. AAV5 翻訳	N D P Q F V D F A P D S T G E Y R T T R P I G T R Y L T R P		
6. AAV6 翻訳	A K S A N V D F T V D N N G L Y T E P R P I G T R Y L T R P		
7. AAV7 翻訳	E K Q T G V D F A V D S Q G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
8. AAV8 翻訳	Y K S T S V D F A V N T E G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
9. AAV9 翻訳	Y K S N N V V E F A V N T E G V Y S E P R P I G T R Y L T R N		
10. シャッフル100-3 翻訳	A K S A N V D F T V D N N G L Y T E P R P I G T R Y L T R P		
	▲▲		

コンセンサス 同一性	L*	
1. AAV1 翻訳	L*	
2. AAV2 翻訳	L*	
3. AAV3 翻訳	L*	
4. AAV4 翻訳	L*	
5. AAV5 翻訳	L*	
6. AAV6 翻訳	L*	
7. AAV7 翻訳	L*	
8. AAV8 翻訳	L*	
9. AAV9 翻訳	L*	
10. シャッフル100-3 翻訳	L*	A

【図10A】

- 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. シッփル 100.7 翻訳

- 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

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

640 650 660
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHP
PP

GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKNNPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPAMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKNNPPP

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

1 10 20 30
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAP

70 80 90
K G E P V N A A D A A L E H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y

【図10B】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

100 110 120

LXYN HADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFO
AAV6

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

130 140 150

AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
AKKRVLEPLGLVEAAAKTAPGKKGAVDQSP
AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKRDHHFP
AKKRVLEPLGFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
AAV6

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

160 170 180

QE-PDSSGIGKXGQQPAKRLNFGQTGDS
QE-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDS
VE-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDA
QE-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDS
QQ-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDS
KR---KKARTEEDSKPST-----SSDA
QE-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDS
QRSPDSTSSTGIGKKGQOPARKRLNFGQTGDS
QRSPDSTSSTGIGKKGQOPARKRLNFGQTGDS
QRSPDSTSSTGIGKKGQOPARKRLNFGQTGDS
QE-PDSSAGIGKSGAQPAKRLNFGQTGDT
QE-PDSSGIGKTCQOPAKKRLNFGQTGDS
AAV1

【図10D】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

280 290 300

SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
LQSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNANHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
TNNDTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
TNNDTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNDNAHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW
AAV1 AAV8

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

310 320 330

QRLINNNWGFPRPKRLNFKLFNIVQKEVTTN
AAV8

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

340 350 360

DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
NGTTTVANNLTS TVQI FADSSEYQLPYVMDA
DSTTTIANNLTS TVQVFTDDYQLPYVGN
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSEYQLPYVLGS
EGTGTIANNLTS TIQVFTDSEYQLPYVLGS
NGVKTIANNLTS TVQVFTDSYQLPYVLGS
DGVTTIANNLTS TVQVFTDSYQLPYVLGS
AAV1

【図10C】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

190 200 210

ESVPDPQPLGEPPAAP-SSVGVXXTMASGGG
ESVPDPQPLGEPPAAP-SGLGNTTMATGSG
ESVPDPQPLGEPPAAP-TSLGNTTMASGGG
TGAGDGPPEGS TSGA--MSDDS EMRAAAGG
EAGPSGSQQLOPAQPASSLGADTMSAGGG
ESVPDPQPLGEPPAATP-AAVGFTTMASGGG
ESVPDPQPLGEPPAAT-SSVGSVTAAGGG
ESVPDPQPLGEPPAAT-SGVGNNTMAAGGG
ESVPDPQPLGEPPAAT-SGVGSLTMASGGG
ESVPDPQPLGEPPAATP-AAVGFTTMASGGG
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

220 230 240

APMADNNNEGADGVGNASGNWHCDS TWLGDR
APMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDS TWLGDR
APMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDS QWLGDR
AAV- EGGQGADGVGNASGDWHDCTS TWSEGH
GPLGDNNQGADGVGNASGDWHDCTS TWNGDR
APMADNNNEGADGVGNASGNWHCDS TWLGDR
APMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDS TWLGDR
APMADNNNEGADGVGSSSGNWHCDS QWLGDR
APMADNNNEGADGVGNASGNWHCDS TWLGDR
APMADNNNEGADGVGNASGNWHCDS TWLGDR
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

250 260 270

VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSASX-GA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSQS-GA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSQS-GA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSAS-T-GA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSQS-GA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSSETA-GS
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSNGTSGGA
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSNSTSGGS
VIITTS TR TWALPTYNNHLYKQISSAST-GA
AAV1 AAV6

【図10E】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

370 380 390

AHQGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
GQEGLPFPNDVFMVPOQYGYGLVTGNTS
GTEGCLPFPQVFTLPOQYGYATLNRDNTE
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AHEGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--DGS
AHOGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLN--NGS
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

400 410 420

-QAVGRSSFYCLEYFPS QMLRTGNNFTFSY
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
- シャッフル 100.7 翻訳

430 440 450

TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
SFEKVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
NFEKVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
TFEDVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
EEENVVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
TFEEVPFHSSYAHQSLDRLMNPOLIDQYLY
AAV1 AAV1

【図10F】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

YLNRTQN-XSGTAXNKKXLLFSQGGPKXGMSV
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSV
YLNRTNT-PSGTTTOSRLQFSQAGASDIRD
YLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMSL
GLQSTTGTTLNAGTATTNFTKLRTNFSN
RFTVSTNN-----TGGVQFNKNLAGRYAN
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSV
YLNRTQSNPGTAGNRELQFYQGGPSTMAE
YLSRTQT-TGGTANTQTGLFSQGGPNTMAN
YLSKTN-QSGQNNQTLKFSVAGPSNMAV
YLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSV
AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

QXKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-----NN
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTSADN-----NN
QSRNWLPQPCYRQQRVSKTSADN-----NN
QARNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-----NN
FFKNWLPGPSIKQOQFSKTNQNYKIPATG
TYKNWFPQPMGRTQCGWNLQGSGVN-----RA
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-----NN
QAKRNWLPGPCFRCYRQQRVSKTDQN-----NN
QAKRNWLPGPCYRQQRVSTTGQN-----NN
QGRNYIIPFSYRQQRVSTTQTN-----NN
QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDN-----NN
AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

SNFAWTGASKYHLNGRXLVNPGPAMASHK
SNFTWWTGASKYLNGRESIINPGTAMASHK
SEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHK
SNFPWTGASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHK
SDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATA
SVSFAFATTNRMELEGASQVPPQPNGMNTNN
SNFTWWTGASKYLNGRESIINPGTAMASHK
SNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHK
SNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHK
SEFAWPAGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHK
SNFTWWTGASKYLNGRESIINPGTAMASHK
AAV1

【図10H】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGGMKHKPP
GPIWAKIPIHTDGHFHPSPLMGGFGLKHKPPP
AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

QILIKNTPV PANPPTTFSATKFAFSITQYS
QILIKNTPV PANPAAEFSATKFAFSITQYS
AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
TGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNY
AAV1 AAV6

【図10G】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

DDDEDKFFPMSCVLIFGKQGAGASNTAL---
DDEEKFFPMSCVLIFGKQGSEKTNVDI---
DDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAEL---
FADSKFSNSQLIIFAGFKQNGNTATVPP---
LQGSNTYALENTMIFNFSQ PANPAGTTAYLE
DDKDKFFFPMSCVMI FGKESAGASNTAL---
DDEERFFPMSCVLI FGKGTGATNKTTL---
DDEERFFPMSCVLI FGKQNAARDNADY---
EGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDA---
DDEDKFFPMSCVMI FGKESAGASNTAL---
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

DNVMITDDEEIKATN PVATERFGTVAVN FQ
DNVMITDDEEIRTTN PVATEQXGTVANN LQ
DNVMITDDEEIRTTN PVATEQXGTVANN LQ
GTLIFTS EEEELAATNATD TDWGNLPGCDQ
GNMLITS ESETQPVNRVAYNVGGQMATN NQ
DNVMITDDEEIKATN PVATERFGTVAVN LQ
ENVLMTN EEEELPTN PVATEEYIVSSN LQ
SDVMLTNEEEIKTTN PVATEEYIVSSN LQ
DKVMTNEEEIKTTN PVATESYGVATN HQ
DNVMITDDEEIKATN PVATERFGTVAVN FQ
AAV1 AAV1

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

SSXTAPATGDNQALPGMVWQDRDVYLO
SSSTDPAATGDNQALPGMVWQDRDVYLO
RGNRQATAADVN TOGVLPGMVWQDRDVYLO
SSNATPTGTVN HQGALPGMVWQDRDVYLO
SNSNATPTGTVN HQGALPGMVWQDRDVYLO
SSTTAATPDTGTVN LQEVIPGSVWMMERDVYLO
SSSTDPAATGDNQALPGMVWQDRDVYLO
AANTAAQTVVNNQGALPGMVWQNRDVYLO
QON TAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLO
SAQAQATGTVWQNNQGILPGMVWQDRDVYLO
SSSTDPAATGDNQALPGMVWQDRDVYLO
AAV1 AAV1

【図10H】

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

XKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRN
AKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRN
NKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRN
NKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRN
GQQNSLLWAPDAAGKYTEPRPIGTRYLTHH
NDPQFVDFAFDSTGEYRTTRPIGTRYLTRP
AKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRP
EKTGVDFAVDSDQGVYSEPRPIGTRYLTRN
YKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRN
YKSNVVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRN
AKSANVDFXVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRP
AAV6 AAV6

コンセンサス
同一性

- AAV1 翻訳
- AAV2 翻訳
- AAV3 翻訳
- AAV4 翻訳
- AAV5 翻訳
- AAV6 翻訳
- AAV7 翻訳
- AAV8 翻訳
- AAV9 翻訳
10. シャッフル 100.7 翻訳

L*
L*
L*
L*
L*
L*
L*
L*
L*
Q*
Q*

【図 1 1】

		中和血清希釈					
血清型	動物	AAV1	AAV2	AAV8	シャッフル100-3	シャッフル100-7	SM 10-2
AAV1	1	1:1000	なし	1:250	1:250	1:1000	なし
	2	1:1000	1:25	1:250	1:250	1:1000	なし
	3	1:1000	なし	1:250	1:250	1:1000	なし
AAV2	1	1:50	1:500	1:100	なし	なし	1:250
	2	1:50	1:500	1:100	なし	1:25	1:500
	3	1:1000	1:1000	1:100	なし	1:100	1:500
AAV8	1	1:100	なし	1:250	なし	1:100	なし
	2	1:250	なし	1:100	なし	1:100	なし
	3	1:250	なし	1:250	なし	1:250	なし
シャッフル100-3	1	1:1000	なし	1:500	1:100	1:1000	なし
	2	1:1000	なし	1:500	1:100	1:1000	なし
	3	1:1000	なし	1:100	1:250	1:1000	なし
シャッフル100-7	1	1:1000	なし	1:100	1:100	1:500	なし
	2	1:1000	なし	1:100	1:250	1:1000	なし
	3	1:1000	なし	1:50	1:100	1:1000	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 バークレー シニック 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)

C 1 2 N 7 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 4 / 0 1 5
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)