

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-530457

(P2022-530457A)

(43)公表日 令和4年6月29日(2022.6.29)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/6897(2018.01)	C 1 2 Q 1/6897	Z 4 H 0 4 5
C 4 0 B 40/08 (2006.01)	C 4 0 B 40/08	
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全205頁) 最終頁に続く		

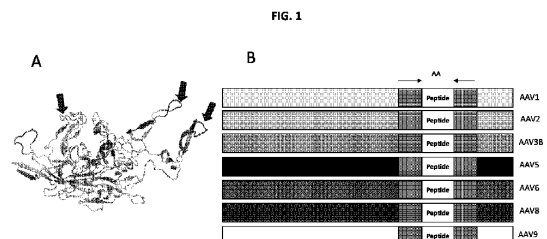
(21)出願番号	特願2021-563281(P2021-563281)	(71)出願人	508241200
(86)(22)出願日	令和2年4月24日(2020.4.24)		サンガモ セラピューティクス, インコ
(85)翻訳文提出日	令和3年12月17日(2021.12.17)		ーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2020/029964		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(87)国際公開番号	WO2020/219988		0 0 5 プリズベン マリーナ ブール
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		バード 7 0 0 0
(31)優先権主張番号	62/939,094	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和1年11月22日(2019.11.22)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/915,386		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和1年10月15日(2019.10.15)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号	62/839,421	(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
	最終頁に続く	(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子操作 A A V

(57)【要約】

本開示は、天然の A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カプシドを開発するための方法および組成物を提供する。これらのカプシドは、例えば、それを必要とする対象の治療のためのゲノム操作分子および遺伝子療法分子の送達に有用である。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

天然 A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特定する方法であって、

(i) 細胞、細胞株、または組織を、 A A V バリエーションのライブラリと接触させることであって、前記ライブラリの各メンバーが、

a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、

b) 前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの 1 つ以上とを含む、接触させることと、

(i i) 前記ライブラリ中の前記 A A V バリエーションを、前記細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、

(i i i) 前記細胞、細胞株、または組織から前記 A A V バリエーションを回収することと、

(i v) 前記所望の特徴を有する前記 A A V カプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法。

【請求項 2】

天然 A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特定する方法であって、

(i) 細胞、細胞株、または組織を、 A A V バリエーションのライブラリと接触させることであって、前記ライブラリの各メンバーが、

a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの 1 つ以上とを含む、接触させることと、

(i i) 前記ライブラリ中の前記 A A V バリエーションを、前記細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、

(i i i) 前記細胞、細胞株、または組織から前記 A A V バリエーションを回収することと、

(i v) 前記所望の特徴を有する前記 A A V カプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法。

【請求項 3】

前記ライブラリの各メンバーが、前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質中の前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ライブラリの各メンバーが、前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ライブラリの各メンバーが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ライブラリの各メンバーが、バーコードを含む核酸を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ライブラリの各メンバーが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ライブラリの各メンバーが、5' I T R 配列と、前記バーコードを含む核酸と、前記レポータータンパク質をコードする核酸と、前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' I T R 配列とを、その順序で含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 A A V バリエーションのライブラリが、2つ以上の A A V 血清型に由来する A A V バリエーションカプシドタンパク質を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 A A V バリエーションのライブラリの前記 A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 8、A A V 9、A A V 3、A A V 4、A A V 7、A A V 11、A A V r h 10、A A V r h 39、および A A V r h 74 のうちの1つ以上から選択される、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記レポータータンパク質をコードする核酸および前記 A A V バリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

天然 A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特定する方法であって、

(i) ペプチドをコードする複数の核酸を、A A V カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に挿入し、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成することと、

(i i) 前記ライブラリ中の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸を、

(a) バーコードを含む核酸、

(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および

(c) 局在化シグナルをコードする核酸のうちの1つ以上に連結することと、

(i i i) アデノウイルスヘルパーおよび A A V r e p 機能を t r a n s で提供することによって、プロデューサー細胞中で A A V バリエーションのライブラリを製造することと、

10

20

30

40

50

(i v) 前記 A A V バリエントのライブラリを精製することと、
 (v) 細胞、細胞株、または組織を、前記 A A V バリエントのライブラリと接触させることと、
 (v i) 標的細胞、細胞株、または組織から前記 A A V バリエントを回収することと、
 (v i i) 前記所望の特徴を有する前記 A A V カプシドバリエントを特定することと、を含む、方法。

【請求項 17】

前記ライブラリ中の A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、バーコードを含む核酸に連結されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ライブラリの各メンバーが、第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とを含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とが異なっている、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸が、配列番号 111 ～ 154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸が、配列番号 111 ～ 154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸が、配列番号 155 ～ 198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸が、配列番号 155 ～ 198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸および前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 18 ～ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol II プロモーターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第 2 のバーコードを含む核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol III プロモーターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol III プロモーターであり、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol III プロモーターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

各 RNA Pol III プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19、unc-45 ミオシンシャペロン B (unc45b) プロモーター、心筋型トロポニン T (cTnT) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) プロモーター、およびメチル CpG 結合タンパク質

10

20

30

40

50

2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から独立して選択される、請求項 25～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

各 R N A P o l I I I プロモーターが、U 6 プロモーター、H 1 プロモーターおよび 7 S K プロモーターからなる群から独立して選択される、請求項 26～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記ライブラリ中の A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、レポータータンパク質をコードする核酸に連結されている、請求項 16～29 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記ライブラリ中の A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、局在化シグナルをコードする核酸に連結されている、請求項 16～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異をさらに含む、請求項 16～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

ステップ (i v) が、2 つ以上の A A V 血清型に基づいてバリエント A A V のライブラリを組み合わせ、単一のプールを生成することをさらに含む、請求項 16～32 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 34】

A A V カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする前記核酸配列の集合体が、2 つ以上の A A V 血清型に由来する配列を含む、請求項 16～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 8、A A V 9、A A V 3、A A V 4、A A V 7、A A V 11、A A V r h 10、A A V r h 39、および A A V r h 74 のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 16～34 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記ヘルパー機能が、E 2 A、E 4、V A、E 1 A、および E 1 B のうちの 1 つ以上を含む、請求項 16～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記 A A V r e p 機能が、r e p 78、r e p 68、r e p 52、および r e p 40 遺伝子を含む、請求項 16～36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記 r e p 78 および／または r e p 68 遺伝子の開始コドンが、A C G から A T G に改変される、請求項 37 に記載の方法。

40

【請求項 39】

前記プロデューサー細胞が、H E K 293 細胞である、請求項 16～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記 A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、前記レポータータンパク質をコードする核酸、および／または局在化シグナルをコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、請求項 16～39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記ライブラリの各メンバーが、5' I T R 配列と、前記バーコードを含む核酸と、前記

50

レポータータンパク質をコードする核酸と、前記 A A V バリアントカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' I T R 配列とを、その順序で含む、請求項 16～40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記レポータータンパク質をコードする核酸および前記 A A V バリアントカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 16～41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である、請求項 16～42 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 44】

前記ペプチドが、4～15 アミノ酸の長さを有する、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記ペプチドが、6～15 アミノ酸の長さを有する、請求項 1～44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記ペプチドが、7、10、または15 アミノ酸の長さを有する、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記ペプチドが、7 アミノ酸の長さを有する、請求項 46 に記載の方法。

20

【請求項 48】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の V R - I、V R - I I、V R - I I I、V R - I V、V R - V、V R - V I、V R - V I I、V R - V I I I および V R - I X 領域からなる群から選択される領域に挿入される、請求項 1～47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記 V R - I に挿入される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記 V R - I V に挿入される、請求項 48 に記載の方法。

30

【請求項 51】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記 V R - V I I I に挿入される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

前記ペプチドが、カプシドタンパク質 V P 1、V P 2、または V P 3 に挿入される、請求項 1～49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸残基 450～600 の間の位置に挿入される、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 54】

(i) 前記 A A V 血清型が、A A V 1 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入されるか、

(i i) 前記 A A V 血清型が、A A V 6 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 もしくは 590 に挿入されるか、

(i i i) 前記 A A V 血清型が、A A V 2 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入されるか、

(i v) 前記 A A V 血清型が、A A V 3 B であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入されるか、

50

(v) 前記 A A V 血清型が、A A V 5 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入されるか、

(v i) 前記 A A V 血清型が、A A V 8 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入されるか、または

(v i i) 前記 A A V 血清型が、A A V 9 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5 もしくは 5 8 9 に挿入され、

前記位置が、前記 A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、請求項 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

前記レポータータンパク質が、E G F P、m C h e r r y、m C l o v e r 3、m R u b y 3、m A p p l e、i R F P、t d T o m a t o、m V e n u s、Y F P、R F P、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸が、p 4 0 プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1)、トランスサイレチンプロモーター (T T R)、サイトケラチン 1 8、サイトケラチン 1 9、u n c - 4 5 ミオシンシャペロン B (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニン T (c T n T) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター、およびメチル C p G 結合タンパク質 2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から選択される、請求項 5 8 に記載の方法。

30

【請求項 6 0】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 h S y n 1 プロモーターである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 T T R プロモーターである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記レポータータンパク質が、前記局在化シグナルに融合される、請求項 1 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方で前記レポータータンパク質に融合される、請求項 6 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

前記局在化シグナルが、核局在化シグナル (N L S)、核エンベロープ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、請求項 1 ～ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 N L S が、S V 4 0 N L S である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記核エンベロープ結合ドメインが、K A S H ドメインである、請求項 6 4 に記載の方法。

50

【請求項 67】

前記ヒストン結合ドメインが、H2Bである、請求項64に記載の方法。

【請求項 68】

前記バーコードを含む核酸が、5～18ヌクレオチド長である、請求項1～67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、請求項1～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、請求項1～68のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 71】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項1～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項1～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記所望の特徴を有する前記AAVカプシドバリエーションが、関連する1つ以上のバーコードの配列決定によって特定される、請求項1～72のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 74】

前記所望の特徴を有する前記AAVカプシドバリエーションが、AAVゲノムの精製および配列決定によって特定される、請求項1～73のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

前記細胞、細胞株または組織が、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、および口腔粘膜からなる群から選択される、請求項1～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記細胞が、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞から選択される、請求項1～74のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 77】

AAVバリエーションのライブラリであって、前記ライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、

b) 前記a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、 40

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーションのライブラリ。

【請求項 78】

AAVバリエーションのライブラリであって、前記ライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記AAVバリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)の前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、 50

- c) 局在化シグナルをコードする核酸、
- d) バーコードを含む核酸、および
- e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーションのライブラリ。

【請求項79】

前記ライブラリの各メンバーが、前記a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中の前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含む、請求項77に記載のライブラリ。

【請求項80】

前記ライブラリの各メンバーが、前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の前記a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異を含む、請求項78に記載のライブラリ。

【請求項81】

前記ライブラリの各メンバーが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、請求項77～80のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項82】

前記ライブラリの各メンバーが、バーコードを含む核酸を含む、請求項77～81のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項83】

前記ライブラリの各メンバーが、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む、請求項77～82のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項84】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸と、前記第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている、請求項83に記載のライブラリ。

【請求項85】

前記第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、請求項84に記載のライブラリ。

【請求項86】

前記第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項84に記載のライブラリ。

【請求項87】

前記第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、請求項84に記載のライブラリ。

【請求項88】

前記第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項84に記載のライブラリ。

【請求項89】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸および前記第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項83～88のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項90】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、請求項89に記載のライブラリ。

【請求項91】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、請求項89に記載のライブラリ。

10

20

30

40

50

【請求項 92】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである、請求項89に記載のライブラリ。

【請求項 93】

前記RNA Pol IIプロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB (unc45b)プロモーター、心筋型トロポニンT (cTnT)プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2 (MeCP2)プロモーターからなる群から選択される、請求項90～91のいずれか一項に記載のライブラリ。

10

【請求項 94】

前記RNA Pol IIIプロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーターおよび7SKプロモーターからなる群から選択される、請求項91～93のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 95】

前記ライブラリの各メンバーが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、請求項77～94のいずれか一項に記載のライブラリ。

20

【請求項 96】

前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、請求項77～95のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 97】

前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、請求項77～95のいずれか一項に記載のライブラリ。

30

【請求項 98】

前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、請求項97に記載のライブラリ。

【請求項 99】

前記ライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、前記バーコードを含む核酸と、前記レポータータンパク質をコードする核酸と、前記AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む、請求項97に記載のライブラリ。

40

【請求項 100】

前記AAVバリエーションが、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上に由来する、請求項77～99のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 101】

前記AAVバリエーションのライブラリが、2つ以上のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む、請求項100に記載のライブラリ。

【請求項 102】

前記ペプチドが、4～15アミノ酸の長さを有する、請求項77～101のいずれか一項

50

に記載のライブラリ。

【請求項 103】

前記ペプチドが、6～15アミノ酸の長さを有する、請求項 102に記載のライブラリ。

【請求項 104】

前記ペプチドが、7、10、または15アミノ酸の長さを有する、請求項 103に記載のライブラリ。

【請求項 105】

前記ペプチドが、7アミノ酸の長さを有する、請求項 104に記載のライブラリ。

【請求項 106】

前記ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、請求項 77～105のいずれか一項に記載のライブラリ。

10

【請求項 107】

前記ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 106に記載のライブラリ。

【請求項 108】

前記ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、請求項 77～106のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 109】

前記ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 108に記載のライブラリ。

20

【請求項 110】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のVR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIおよびVR-IX領域からなる群から選択される領域に挿入される、請求項 77～109のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 111】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記VR-Iに挿入される、請求項 110に記載のライブラリ。

30

【請求項 112】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記VR-IVに挿入される、請求項 110に記載のライブラリ。

【請求項 113】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記VR-VIIIに挿入される、請求項 110に記載のライブラリ。

【請求項 114】

前記ペプチドが、カプシドタンパク質VP1、VP2、またはVP3に挿入される、請求項 77～113のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 115】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される、請求項 77～114のいずれか一項に記載のライブラリ。

40

【請求項 116】

(i) 前記AAV血清型が、AAV1であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、

(ii) 前記AAV血清型が、AAV6であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、

(iii) 前記AAV血清型が、AAV2であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、

(iv) 前記AAV血清型が、AAV3Bであり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパ

50

ク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入されるか、

(v) 前記 A A V 血清型が、A A V 5 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入されるか、

(v i) 前記 A A V 血清型が、A A V 8 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入されるか、または

(v i i) 前記 A A V 血清型が、A A V 9 であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5 もしくは 5 8 9 に挿入され、

前記位置が、前記 A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、請求項 7 7 ~ 1 1 5 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 1 7】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 7 7 ~ 1 1 6 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 1 8】

前記レポータータンパク質が、E G F P、m C h e r r y、m C l o v e r 3、m R u b y 3、m A p p l e、i R F P、t d T o m a t o、m V e n u s、Y F P、R F P、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、請求項 1 1 7 に記載のライブラリ。

【請求項 1 1 9】

前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸が、p 4 0 プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 7 7 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 0】

前記レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 7 7 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 1】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1)、トランスサイレチンプロモーター (T T R)、サイトケラチン 1 8、サイトケラチン 1 9、u n c - 4 5 ミオシンシャペロン B (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニン T (c T n T) プロモーター、グリアル線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター、およびメチル C p G 結合タンパク質 2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から選択される、請求項 1 2 0 に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 2】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 h S y n 1 プロモーターである、請求項 1 2 1 に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 3】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 T T R プロモーターである、請求項 1 2 1 に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 4】

前記レポータータンパク質が、前記局在化シグナルに融合される、請求項 7 7 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 5】

前記局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方で前記レポータータンパク質に融合される、請求項 1 2 4 に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 6】

前記局在化シグナルが、核局在化シグナル (N L S)、核エンベロープ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、請求項 7 7 ~ 1 2 5 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 7】

前記 N L S が、S V 4 0 N L S である、請求項 1 2 6 に記載のライブラリ。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 8】

前記核エンベロープ結合ドメインが、K A S Hドメインである、請求項 1 2 6 に記載のライブラリ。

【請求項 1 2 9】

前記ヒストン結合ドメインが、H 2 Bである、請求項 1 2 6 に記載のライブラリ。

【請求項 1 3 0】

前記バーコードを含む核酸が、5 ～ 1 8ヌクレオチド長である、請求項 7 7 ～ 1 2 9 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 3 1】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 1 1 ～ 1 5 4 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 7 7 ～ 1 3 0 のいずれか一項に記載のライブラリ。

10

【請求項 1 3 2】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 5 5 ～ 1 9 8 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 7 7 ～ 1 3 0 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 3 3】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 1 1 ～ 1 5 4 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 7 7 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 1 3 4】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 5 5 ～ 1 9 8 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 7 7 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載のライブラリ。

20

【請求項 1 3 5】

A A V バリエーションであって、

a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、

b) 前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの 1 つ以上とを含む、A A V バリエーション。

30

【請求項 1 3 6】

A A V バリエーションであって、

a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記 A A V バリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの 1 つ以上とを含む、A A V バリエーション。

40

【請求項 1 3 7】

前記バリエーションが、前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質中の前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異を含む、請求項 1 3 5 に記載のバリエーション。

【請求項 1 3 8】

前記バリエーションが、前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の前記 a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異を含む、請求項 1 3 6 に記載のバリエーション。

【請求項 1 3 9】

50

前記バリエーションが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、請求項 135～136 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 140】

前記バリエーションが、バーコードを含む核酸を含む、請求項 135～139 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 141】

前記バリエーションが、第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とを含む、請求項 138～139 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 142】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とが異なっている、請求項 141 に記載のバリエーション。

【請求項 143】

前記第 1 のバーコード配列を含む第 1 の核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 142 に記載のバリエーション。

【請求項 144】

前記第 1 のバーコード配列を含む第 1 の核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 142 に記載のバリエーション。

【請求項 145】

前記第 2 のバーコード配列を含む第 2 の核酸が、配列番号 155～198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 142 に記載のバリエーション。

【請求項 146】

前記第 2 のバーコード配列を含む第 2 の核酸が、配列番号 155～198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 142 に記載のバリエーション。

【請求項 147】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸および前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 142～146 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 148】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol II プロモーターである、請求項 147 に記載のバリエーション。

【請求項 149】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol III プロモーターである、請求項 147 に記載のバリエーション。

【請求項 150】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol III プロモーターに作動可能に連結されており、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol III プロモーターである、請求項 147 に記載のバリエーション。

【請求項 151】

前記 RNA Pol III プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19、unc-45 ミオシンシャペロン B (unc45b) プロモーター、心筋型トロポニン T (cTnT) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) プロモーター、およびメチル CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) プロモーターからなる群から選択される、請求項 148～150 のいずれか一項に記載のバリエーション。

10

20

30

40

50

【請求項 152】

前記 RNA Pol III プロモーターが、U6 プロモーター、H1 プロモーターおよび 7SK プロモーターからなる群から選択される、請求項 149～151 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 153】

前記バリエーションが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、請求項 135～152 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 154】

前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、請求項 135～153 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 155】

前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、請求項 135～154 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 156】

前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および前記局在化シグナルをコードする核酸、前記バーコードを含む核酸、および／または前記レポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、請求項 155 に記載のバリエーション。

【請求項 157】

前記バリエーションが、5' ITR 配列と、前記バーコードを含む核酸と、前記レポータータンパク質をコードする核酸と、前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR 配列とを、その順序で含む、請求項 156 に記載のバリエーション。

【請求項 158】

前記 AAV バリエーションが、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、および AAVrh74 からなる群に由来する、請求項 135～157 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 159】

前記ペプチドが、4～15 アミノ酸の長さを有する、請求項 135～158 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 160】

前記ペプチドが、6～15 アミノ酸の長さを有する、請求項 159 に記載のバリエーション。

【請求項 161】

前記ペプチドが、7、10、または 15 アミノ酸の長さを有する、請求項 160 に記載のバリエーション。

【請求項 162】

前記ペプチドが、7 アミノ酸の長さを有する、請求項 161 に記載のバリエーション。

【請求項 163】

挿入されたペプチドが、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 135～162 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 164】

前記ペプチドが、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 163 に記載のバリエーション。

【請求項 165】

挿入されたペプチドが、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、請求項135～162のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項166】

前記ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項165に記載のバリエーション。

【請求項167】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のVR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIおよびVR-IX領域からなる群から選択される領域に挿入される、請求項135～166のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項168】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記VR-Iに挿入される、請求項167に記載のバリエーション。

【請求項169】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質の前記VR-IVに挿入される、請求項167に記載のバリエーション。

【請求項170】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のVR-VIIIに挿入される、請求項168に記載のバリエーション。

【請求項171】

前記ペプチドが、カプシドタンパク質VP1、VP2、またはVP3に挿入される、請求項135～170のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項172】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される、請求項135～171のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項173】

(i) 前記AAV血清型が、AAV1であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、

(ii) 前記AAV血清型が、AAV6であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、

(iii) 前記AAV血清型が、AAV2であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、

(iv) 前記AAV血清型が、AAV3Bであり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入されるか、

(v) 前記AAV血清型が、AAV5であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入されるか、

(vi) 前記AAV血清型が、AAV8であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入されるか、または

(vii) 前記AAV血清型が、AAV9であり、前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455もしくは589に挿入され、

前記位置が、前記AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する、請求項135～172のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項174】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項135～173のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項175】

前記レポータータンパク質が、EGFP、mCherry、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、請求項174に記載のバリエーション。

10

20

30

40

50

【請求項 176】

前記 AAV バリエーションタンパク質をコードする核酸が、p40 プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 135～175 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 177】

前記レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 138～176 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 178】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19、unc-45 ミオシンシャペロン B (unc45b) プロモーター、心筋型トロポニン T (cTnT) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) プロモーター、およびメチル CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) プロモーターからなる群から選択される、請求項 177 に記載のバリエーション。

10

【請求項 179】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 hSyn1 プロモーターである、請求項 178 に記載のバリエーション。

【請求項 180】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 TTR プロモーターである、請求項 178 に記載のバリエーション。

20

【請求項 181】

前記レポータータンパク質が、前記局在化シグナルに融合される、請求項 135～180 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 182】

前記局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方で前記レポータータンパク質に融合される、請求項 181 に記載のバリエーション。

【請求項 183】

前記局在化シグナルが、核局在化シグナル (NLS)、核エンベロップ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、請求項 135～182 のいずれか一項に記載のバリエーション。

30

【請求項 184】

前記 NLS が、SV40 NLS である、請求項 183 に記載のバリエーション。

【請求項 185】

前記核エンベロップ結合ドメインが、KASH ドメインである、請求項 183 に記載のバリエーション。

【請求項 186】

前記ヒストン結合ドメインが、H2B である、請求項 183 に記載のバリエーション。

【請求項 187】

前記バーコードを含む核酸が、5～18 ヌクレオチド長である、請求項 135～186 のいずれか一項に記載のバリエーション。

40

【請求項 188】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 135～187 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 189】

前記バーコード配列を含む核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 188 に記載のバリエーション。

【請求項 190】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 155～198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 135～187 のいずれか一項に記載のバリエーション。

50

【請求項 191】

前記バーコード配列を含む核酸が、配列番号 155～198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 190 に記載のバリエーション。

【請求項 192】

前記 AAV バリエーションが、AAV1 に由来する、請求項 135～191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 193】

前記バリエーションが、配列番号 68～配列番号 75 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 192 に記載のバリエーション。

【請求項 194】

前記バリエーションが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 192 に記載のバリエーション。

【請求項 195】

前記バリエーションが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 192 に記載のバリエーション。

【請求項 196】

前記 AAV バリエーションが、AAV2 に由来する、請求項 135～191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 197】

前記バリエーションが、配列番号 90～配列番号 110 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 196 に記載のバリエーション。

【請求項 198】

前記バリエーションが、配列番号 95、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 106、配列番号 91 および配列番号 102 からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む、請求項 196 に記載のバリエーション。

【請求項 199】

前記バリエーションが、配列番号 4～7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 196 に記載のバリエーション。

【請求項 200】

前記 AAV バリエーションが、AAV3B に由来する、請求項 135～191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 201】

前記バリエーションが、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 76 および配列番号 83 からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む、請求項 200 に記載のバリエーション。

【請求項 202】

前記バリエーションが、配列番号 8～配列番号 11 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 200 に記載のバリエーション。

【請求項 203】

前記 AAV バリエーションが、AAV5 に由来する、請求項 135～191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 204】

前記バリエーションが、配列番号 28～配列番号 32 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 203 に記載のバリエーション。

【請求項 205】

前記 AAV バリエーションが、AAV6 に由来する、請求項 135～191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 206】

前記バリエーションが、配列番号 19～配列番号 27 のうちのいずれか 1 つからなるからなる

10

20

30

40

50

群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 205 に記載のバリエーション。

【請求項 207】

前記 AAV バリエーションが、AAV9 に由来する、請求項 135 ～ 191 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 208】

前記バリエーションが、配列番号 12 ～ 配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 207 に記載のバリエーション。

【請求項 209】

前記バリエーションが、配列番号 86 ～ 配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、請求項 207 に記載のバリエーション。

【請求項 210】

前記バリエーションが、配列番号 89 の配列を含むペプチドを含む、請求項 207 に記載のバリエーション。

【請求項 211】

核酸分子であって、

a) AAV バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と

b) 前記バリエーションカプシドタンパク質の前記超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異を含む前記バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列、

c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、

d) バーコードを含む核酸配列、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの 1 つ以上とを含む、核酸分子。

【請求項 212】

前記 AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列が、前記 a) の AAV バリエーションカプシドタンパク質中の前記ペプチド挿入部位に隣接する前記核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異を含む、請求項 211 に記載の核酸分子。

【請求項 213】

前記核酸分子が、局在化シグナルをコードする核酸を含む、請求項 212 に記載の核酸分子。

【請求項 214】

前記核酸分子が、バーコードを含む核酸を含む、請求項 212 に記載の核酸分子。

【請求項 215】

前記核酸分子が、第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とを含む、請求項 211 ～ 214 に記載の核酸分子。

【請求項 216】

前記第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、前記第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とが異なっている、請求項 215 に記載の核酸分子。

【請求項 217】

前記第 1 のバーコード配列を含む第 1 の核酸が、配列番号 111 ～ 154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 216 に記載の核酸分子。

【請求項 218】

前記第 1 のバーコード配列を含む第 1 の核酸が、配列番号 111 ～ 154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 217 に記載の核酸分子。

【請求項 219】

前記第 2 のバーコード配列を含む第 2 の核酸が、配列番号 155 ～ 198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 216 に記載の核酸分子。

【請求項 220】

10

20

30

40

50

前記第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項217に記載の核酸分子。

【請求項221】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸および前記第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項215～220のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項222】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである、請求項221に記載の核酸分子。

10

【請求項223】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターと、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、請求項221に記載の核酸分子。

【請求項224】

前記第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、前記第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結された前記プロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである、請求項221に記載の核酸分子。

20

【請求項225】

前記RNA Pol IIプロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター(hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター(TTR)、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB(unc45b)プロモーター、心筋型トロポニンT(cTnT)プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2(MeCP2)プロモーターからなる群から選択される、請求項222～224のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項226】

前記RNA Pol IIIプロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーターおよび7SKプロモーターからなる群から選択される、請求項223～224のいずれか一項に記載の核酸分子。

30

【請求項227】

前記核酸分子が、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、請求項211～226のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項228】

前記AAVバリエーションが、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上に由来する、請求項211～227のいずれか一項に記載の核酸分子。

40

【請求項229】

前記挿入されたペプチドが、4～15アミノ酸の長さを有する、請求項211～228のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項230】

前記挿入されたペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、請求項229に記載の核酸分子。

【請求項231】

前記挿入されたペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、請求項229に記載の核酸分子。

50

【請求項 2 3 2】

前記レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 2 1 1～2 3 1 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 2 3 3】

前記細胞型および／または組織特異的プロモーターが、前記 h S y n 1 プロモーターである、請求項 2 3 2 に記載の核酸分子。

【請求項 2 3 4】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 1 1～1 5 4 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 2 1 1～2 3 3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 2 3 5】

前記バーコードを含む核酸が、配列番号 1 5 5～1 9 8 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、請求項 2 1 1～2 3 3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 2 3 6】

導入遺伝子を標的細胞または組織に送達するための、請求項 1 3 5～2 1 0 のいずれか一項に記載の A A V バリエーションの使用。

【請求項 2 3 7】

配列番号 1～3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸分子を含む A A V ベクター。

【請求項 2 3 8】

前記核酸が、配列番号 1～3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、請求項 2 3 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 3 9】

前記核酸が、配列番号 1～3 2 のうちの 1 つのいずれかの配列を有するペプチドをコードする、請求項 2 3 7 または 2 3 8 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 0】

配列番号 6 8～1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸分子を含む A A V ベクター。

【請求項 2 4 1】

前記核酸が、配列番号 6 8～1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、請求項 2 4 0 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 2】

前記核酸が、配列番号 6 8～1 1 0 のうちの 1 つのいずれかの配列を有するペプチドをコードする、請求項 2 4 0 または 2 4 1 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 3】

前記核酸が、配列番号 7 1、7 6～8 0、8 3、8 9、9 1、9 4～9 6、1 0 1～1 0 3 および 1 0 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、請求項 2 4 0 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 4】

前記ペプチドが、カプシドタンパク質の一部である、請求項 2 3 7～2 4 3 のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 5】

前記カプシドタンパク質が、V P 1、V P 2、または V P 3 である、請求項 2 4 4 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 6】

前記ペプチドが、前記カプシドタンパク質のアミノ酸残基 4 5 0～6 0 0 の間の位置に挿入される、請求項 2 3 7～2 4 5 のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 7】

前記ペプチドが、

(i) A A V 1 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0、

10

20

30

40

50

(i i) A A V 6 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 4 もしくは 5 9 0、
(i i i) A A V 2 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8、
(i v) A A V 3 B カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9、
(v) A A V 5 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8、
(v i) A A V 8 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1、または
(v i) A A V 9 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5、もしくは 5 8 9 に
挿入され、

前記位置が、前記 A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、請求項 2 4 6 に記載の A A V ベクター。

【請求項 2 4 8】

請求項 2 3 7 ～ 2 4 7 のいずれか一項に記載の A A V ベクターと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 4 9】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 0】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 1】

配列番号 7 1、7 6 ～ 8 0、8 3、8 9、9 1、9 4 ～ 9 6、1 0 1 ～ 1 0 3 および 1 0 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 2】

配列番号 7 1、7 6 ～ 8 0、8 3 および 9 4 ～ 9 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 3】

配列番号 8 9、9 1、1 0 1 ～ 1 0 3 および 1 0 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 4】

配列番号 6 8 ～ 配列番号 7 5 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 5】

配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 6】

配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 7】

配列番号 9 0 ～ 配列番号 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 8】

配列番号 9 5、配列番号 9 4、配列番号 9 6、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 6、配列番号 9 1 および配列番号 1 0 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 5 9】

配列番号 4 ～ 7 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 0】

配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 1】

配列番号 8 ～ 配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 2】

配列番号 2 8 ～ 配列番号 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプ

10

20

30

40

50

チド。

【請求項 2 6 3】

配列番号 1 9 ～ 配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 4】

配列番号 1 2 ～ 配列番号 1 8 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 5】

配列番号 8 6 ～ 配列番号 8 9 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 6】

配列番号 8 9 に示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2 6 7】

前記ペプチドが、A A V ベクターの一部である、請求項 2 4 9 ～ 2 6 6 のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項 2 6 8】

前記ペプチドが、前記 A A V ベクターのカプシドタンパク質の一部である、請求項 2 6 7 に記載のペプチド。

【請求項 2 6 9】

請求項 2 4 9 ～ 2 6 8 のいずれか一項に記載のペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 2 7 0】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含む、カプシドタンパク質。

【請求項 2 7 1】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含む、カプシドタンパク質。

【請求項 2 7 2】

前記ペプチドが、配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 3】

前記ペプチドが、配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 4】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 5】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 6】

前記ペプチドが、配列番号 7 1、7 6 ～ 8 0、8 3、8 9、9 1、9 4 ～ 9 6、1 0 1 ～ 1 0 3 および 1 0 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 7】

前記ペプチドが、配列番号 7 1、7 6 ～ 8 0、8 3、および 9 4 ～ 9 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 8】

前記ペプチドが、配列番号 8 9、9 1、1 0 1 ～ 1 0 3 および 1 0 6 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 7 9】

前記ペプチドが、配列番号 6 8 ～ 配列番号 7 5 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 0】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 1】

前記ペプチドが、配列番号 7 1 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 2】

前記ペプチドが、配列番号 9 0 ～配列番号 1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

10

【請求項 2 8 3】

前記ペプチドが、配列番号 9 5、配列番号 9 4、配列番号 9 6、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 6、配列番号 9 1 および配列番号 1 0 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 4】

前記ペプチドが、配列番号 4 ～7 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 5】

前記ペプチドが、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

20

【請求項 2 8 6】

前記ペプチドが、配列番号 8 ～配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 7】

前記ペプチドが、配列番号 2 8 ～配列番号 3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 8 8】

前記ペプチドが、配列番号 1 9 ～配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

30

【請求項 2 8 9】

前記ペプチドが、配列番号 1 2 ～配列番号 1 8 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 0 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 9 0】

前記ペプチドが、配列番号 8 6 ～配列番号 8 9 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 9 1】

前記ペプチドが、配列番号 8 9 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 2 9 2】

請求項 2 6 9 ～2 9 1 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質をコードする核酸分子。

40

【請求項 2 9 3】

核酸を対象の標的細胞または組織に送達する方法であって、請求項 2 3 7 ～2 4 7 のいずれか一項に記載の A A V ベクターを含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 2 9 4】

前記カプシドタンパク質が、配列番号 1 ～3 2 のうちのいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 3 に記載の方法。

【請求項 2 9 5】

前記カプシドタンパク質が、配列番号 6 8 ～1 1 0 のうちのいずれか 1 つに示されるアミ

50

ノ酸配列を含む、請求項 293 に記載の方法。

【請求項 296】

前記標的細胞、細胞株または組織が、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、および口腔粘膜からなる群から選択される、請求項 293～295 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 297】

前記標的細胞が、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞からなる群から選択される、請求項 293～295 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 298】

前記標的細胞または組織が肝臓由来である、請求項 296 に記載の方法。

【請求項 299】

前記標的細胞または組織がCNS由来である、請求項 296 に記載の方法。

【請求項 300】

請求項 135～211 のいずれか一項に記載のバリエーションと、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 301】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

20

【請求項 302】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 303】

前記ペプチドが、配列番号 68～75 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 302 に記載のライブラリ。

30

【請求項 304】

前記ペプチドが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む、請求項 302 に記載のライブラリ。

【請求項 305】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 301 に記載のライブラリ。

【請求項 306】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

40

【請求項 307】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 308】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 309】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6

50

血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 310】

前記ペプチドが、配列番号 19 ～配列番号 27 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 306 および 308 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 311】

配列番号 1 ～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 312】

配列番号 68 ～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 313】

前記ペプチドが、配列番号 90 ～配列番号 110 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 312 に記載のライブラリ。

【請求項 314】

前記ペプチドが、配列番号 95、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 106、配列番号 91 および配列番号 102 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 312 に記載のライブラリ。

【請求項 315】

前記ペプチドが、配列番号 4 ～7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 311 に記載のライブラリ。

【請求項 316】

配列番号 1 ～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 317】

配列番号 68 ～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 318】

前記ペプチドが、配列番号 76 ～85 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 317 に記載のライブラリ。

【請求項 319】

前記ペプチドが、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 76 および配列番号 83 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 317 に記載のライブラリ。

【請求項 320】

前記ペプチドが、配列番号 8 ～配列番号 11 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 316 に記載のライブラリ。

【請求項 321】

配列番号 1 ～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 322】

配列番号 68 ～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 323】

10

20

30

40

50

前記ペプチドが、配列番号 28～配列番号 32 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 321 に記載のライブラリ。

【請求項 324】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 591 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 325】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 591 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 326】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 266 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 327】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 266 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 328】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 455 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 329】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 455 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 330】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 331】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 116 に記載のライブラリ。

【請求項 332】

前記ペプチドが、配列番号 12～配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 326、328、および 330 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 333】

前記ペプチドが、配列番号 86～配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 327、329、および 331 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 334】

前記ペプチドが、配列番号 89 の配列を含む、請求項 327、329、および 331 のいずれか一項に記載のライブラリ。

【請求項 335】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエーション。

【請求項 336】

10

20

30

40

50

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 337】

前記ペプチドが、配列番号 68～配列番号 75 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 336 に記載の AAV バリエント。

【請求項 338】

前記ペプチドが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む、請求項 336 に記載の AAV バリエント。

【請求項 339】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 335 に記載の AAV バリエント。

【請求項 340】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 341】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 342】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 343】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 344】

前記ペプチドが、配列番号 19～配列番号 27 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 340 および 342 のいずれか一項に記載の AAV バリエント。

【請求項 345】

配列番号 1～32 のアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 346】

配列番号 68～110 のアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 347】

前記ペプチドが、配列番号 90～配列番号 110 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 346 に記載の AAV バリエント。

【請求項 348】

前記ペプチドが、配列番号 95、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 106、配列番号 91 および配列番号 102 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 346 に記載の AAV バリエント。

【請求項 349】

前記ペプチドが、配列番号 4～7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 345 に記載の AAV バリエント。

【請求項 350】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV 3 B 血

10

20

30

40

50

清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 1】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 3 B 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 2】

前記ペプチドが、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 5 1 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 3】

前記ペプチドが、配列番号 8 ～ 配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 5 0 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 4】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 5】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 6】

前記ペプチドが、配列番号 2 8 ～ 配列番号 3 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 5 4 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 7】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 8】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 5 9】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 6 0】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 6 1】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 6 2】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカブシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 1 7 3 に記載の A A V バリエント。

【請求項 3 6 3】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清

10

20

30

40

50

型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 364】

配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 173 に記載の AAV バリエント。

【請求項 365】

前記ペプチドが、配列番号 12 ～ 配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 359、361、および 363 のいずれか一項に記載の AAV バリエント。

【請求項 366】

前記ペプチドが、配列番号 86 ～ 配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 360、362、および 364 のいずれか一項に記載の AAV バリエント。

【請求項 367】

前記ペプチドが、配列番号 89 の配列を含む、請求項 360、362、および 364 のいずれか一項に記載の AAV バリエント。

【請求項 368】

配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 369】

配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 370】

前記ペプチドが、配列番号 68 ～ 配列番号 75 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 369 に記載の AAV ベクター。

【請求項 371】

前記ペプチドが、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む、請求項 369 に記載の AAV ベクター。

【請求項 372】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 368 に記載の AAV ベクター。

【請求項 373】

配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 374】

配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 375】

配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 376】

配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 377】

前記ペプチドが、配列番号 19～配列番号 27 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 373 および 375 のいずれか一項に記載の AAV ベクター。

【請求項 378】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 379】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 380】

前記ペプチドが、配列番号 90～配列番号 110 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 379 に記載の AAV ベクター。

【請求項 381】

前記ペプチドが、配列番号 95、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 106、配列番号 91 および配列番号 102 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 379 に記載の AAV ベクター。

【請求項 382】

前記ペプチドが、配列番号 4～7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 378 に記載の AAV ベクター。

【請求項 383】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 384】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 385】

前記ペプチドが、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 76 および配列番号 83 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 384 に記載の AAV ベクター。

【請求項 386】

前記ペプチドが、配列番号 8～配列番号 11 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 383 に記載の AAV ベクター。

【請求項 387】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 388】

配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される、請求項 247 に記載の AAV ベクター。

【請求項 389】

前記ペプチドが、配列番号 28～配列番号 32 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 387 に記載の AAV ベクター。

【請求項 390】

配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8 血清

10

20

30

40

50

型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 1】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 2】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 3】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 4】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 5】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 6】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 7】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 8】

前記ペプチドが、配列番号 1 2 ～ 配列番号 1 8 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 9 2、3 9 4、および 3 9 6 のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 3 9 9】

前記ペプチドが、配列番号 8 6 ～ 配列番号 8 9 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 9 3、3 9 5、および 3 9 7 のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 4 0 0】

前記ペプチドが、配列番号 8 9 の配列を含む、請求項 3 9 3、3 9 5、および 3 9 7 のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 4 0 1】

挿入されたペプチドを含むカプシドタンパク質であって、前記ペプチドが、

(i) A A V 1 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0、

(i i) A A V 6 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 4 もしくは 5 9 0、

(i i i) A A V 2 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8、

(i v) A A V 3 B カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9、

(v) A A V 5 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8、

(v i) A A V 8 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1、または

(v i) A A V 9 カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5、もしくは 5 8 9 に

10

20

30

40

50

挿入され、

前記位置が、前記 A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、カプシドタンパク質。

【請求項 4 0 2】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 3】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 1 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 4】

前記ペプチドが、配列番号 6 8 ～ 配列番号 7 5 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 0 3 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 5】

前記ペプチドが、配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 4 0 3 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 6】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 0 2 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 7】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 4 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 8】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 4 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 0 9】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 0】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 1】

前記ペプチドが、配列番号 1 9 ～ 配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 0 7 および 4 0 9 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 2】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 3】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 4】

前記ペプチドが、配列番号 9 0 ～ 配列番号 1 1 0 のうちのいずれか 1 つからなる群から選

10

20

30

40

50

択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 3 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 5】

前記ペプチドが、配列番号 9 5、配列番号 9 4、配列番号 9 6、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 6、配列番号 9 1 および配列番号 1 0 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 3 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 6】

前記ペプチドが、配列番号 4 ～ 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 2 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 7】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 8】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 1 9】

前記ペプチドが、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 8 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 0】

前記ペプチドが、配列番号 8 ～ 配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 7 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 1】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 2】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 3】

前記ペプチドが、配列番号 2 8 ～ 配列番号 3 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 2 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 4】

配列番号 1 ～ 3 2 のアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 5】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 6】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 7】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2 8】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 2 9】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 0】

配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 1】

配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、請求項 4 0 1 に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 2】

前記ペプチドが、配列番号 1 2 ～ 配列番号 1 8 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 2 6、4 2 8 および 4 3 0 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 3】

前記ペプチドが、配列番号 8 6 ～ 配列番号 8 9 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 2 7、4 2 9、および 4 3 1 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 4】

前記ペプチドが、配列番号 8 9 の配列を含む、請求項 4 2 7、4 2 9、および 4 3 1 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質。

【請求項 4 3 5】

請求項 4 0 1 ～ 4 3 4 のいずれか一項に記載のカプシドタンパク質をコードする核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 9 年 4 月 2 6 日に提出された米国仮出願 6 2 / 8 3 9、4 2 1 号、2 0 1 9 年 1 0 月 1 5 日に提出された米国仮出願 6 2 / 9 1 5、3 8 6 号、および 2 0 1 9 年 1 1 月 2 2 日に提出された米国仮出願 6 2 / 9 3 9、0 9 4 号の利益およびこれらからの優先権を主張する。前述の出願の各々は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出された、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。上述の A S C I I コピーは、2 0 2 0 年 4 月 1 7 日に作成され、0 0 0 2 2 2 - 0 0 0 2 - W O 1 _ _ S L . t x t という名称であり、サイズが 7 0、8 2 1 バイトである。

【0 0 0 3】

本開示は、ゲノム操作および遺伝子療法に関連する分子の送達分野における開示である。

【背景技術】

【0 0 0 4】

遺伝子操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、遺伝子操作されたcrRNA／tracrRNA（「シングルガイドRNA」）を有するCRISPR／Cas系（RNAガイドヌクレアーゼとも呼ばれる）、および／またはArgonaute系に基づくヌクレアーゼなどの人工ヌクレアーゼは、医学、バイオテクノロジーおよび農業の分野に革命をもたらしつつある。これらの分子ツールは、生物におけるゲノムの遺伝子操作（例えば、編集）を、以前には決して可能ではなかったレベルまで可能にする。加えて、遺伝子療法（染色体外で維持され、導入遺伝子によってコードされる産物を発現する体内の細胞への導入遺伝子の送達）は、眼の障害を治療するために必要な凝固因子およびタンパク質などのタンパク質を送達するために、臨床で研究されている。これらの革新的な技術の将来性は、体内の適切な組織へのヌクレアーゼ系および／または導入遺伝子の効率的な送達に依存する。

10

【0005】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、上述のヌクレアーゼ系および遺伝子療法に関連するベクターを送達するための有望なインビトロおよびインビボでの遺伝子送達ベクターである。天然に存在する（「野生型」）血清型がいくつか存在しており、100種類より多い既知のAAVバリエーションが存在し、各々が、特に、カプシドタンパク質の超可変領域内のアミノ酸配列が異なっており、したがって、その遺伝子送達特性が異なる。AAVは、いずれのヒト疾患にも関連していないため、組換えAAVは臨床用途にとって魅力的である。AAVはまた、病原性が存在しないこと、低い免疫原性、および安定したエピソーム導入遺伝子発現を含む、いくつかの追加の好ましい特徴を示す。しかしながら、AAVの使用には、無差別なウイルス向性、生物学的障壁を回避する能力が限られていること、およびその有効性を潜在的に制限するヒト対象におけるAAVカプシドタンパク質に対する既存の中和抗体の高い普及率を含め、いくつかの課題もある。したがって、これらの新しい系を完全に活用するには、AAV設計の改善が必要である。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドを開発するための方法および組成物を提供する。これらのカプシドは、例えば、それを必要とする対象の治療のためのゲノム操作分子および遺伝子療法分子の送達に有用である。いくつかの実施形態において、カプシドは、所望の組織、細胞またはオルガネラにペイロードを送達するために使用される。

30

【0007】

第1の態様において、本開示は、天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、（i）細胞、細胞株、または組織を、AAVバリエーションのライブラリと接触させることであって、ライブラリの各メンバーが、a）AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、b）a）のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c）局在化シグナルをコードする核酸、d）バーコードを含む核酸、およびe）レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、接触させることと、（ii）上述のライブラリ中のAAVバリエーションを、細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、（iii）細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、（iv）所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法を提供する。

40

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a）AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、b）AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列

50

中の1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

20

30

【0010】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

40

【0011】

第2の態様において、本開示は、天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、(i) 細胞、細胞株、または組織を、AA

50

Vバリエーションのライブラリと接触させることであって、ライブラリの各メンバーが、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異、c)局在化シグナルをコードする核酸、d)バーコードを含む核酸、およびe)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、接触させることと、(ii)上述のライブラリ中のAAVバリエーションを、細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、(iii)細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、(iv)所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法を提供する。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、d)バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、d)バーコードを含む核酸と、e)レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

20

30

【0013】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、d)バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、e)レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するラ

40

50

ライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

【0015】

いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する。他の実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む。

20

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用するAAVバリエーションのライブラリが、2つ以上のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、AAV血清型が、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上から選択される。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、別個のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。

40

【0018】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法によって特定されるAAVカプシドバリエーションの所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である。

【0019】

第3の態様において、本開示は、天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、(i) ペプチドをコードする複数の核酸を、AAVカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に挿入し、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成することと、(ii) 上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質を

50

コードする各核酸を、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および(c) 局在化シグナルをコードする核酸のうちの1つ以上に連結することと、(iii) アデノウイルスヘルパーおよびAAV rep機能をtransで提供することによって、プロドューサー細胞中でAAVバリエーションのライブラリを製造することと、(iv) AAVバリエーションのライブラリを精製することと、(v) 細胞、細胞株、または組織を、AAVバリエーションのライブラリと接触させることと、(vi) 標的細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、(vii) 所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法を提供する。

【0020】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、および(b) レポータータンパク質をコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、および(c) 局在化シグナルをコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および(c) 局在化シグナルをコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、および(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、(c) 局在化シグナルをコードする核酸、および(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異に連結されている。

【0021】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(b) レポータータンパク質をコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および(c) 局在化シグナルをコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(c) 局在化シグナルをコードする核酸に連結されている。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異をさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異に連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用する上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(c) 局在化シグナルをコードする核酸、および(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異に連結されている。いくつかの実施形

態において、本明細書に開示される方法で使用される上述のライブラリ中の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸が、(d) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異に連結されている。

【0022】

いくつかの実施形態において、ステップ (i v) が、2 つ以上の A A V 血清型に基づいてバリエーション A A V のライブラリを組み合わせ、単一のプールを生成することをさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される A A V カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸配列の集合体が、2 つ以上の A A V 血清型に由来する配列を含む。いくつかの実施形態において、A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 8、A A V 9、A A V 3、A A V 4、A A V 7、A A V 11、A A V r h 10、A A V r h 39、および A A V r h 74 のうちの 1 つ以上から選択される。

10

【0023】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるアデノウイルスヘルパー機能が、E 2 A、E 4、V A、E 1 A、および E 1 B のうちの 1 つ以上を含む。いくつかの実施形態において、A A V r e p 機能が、r e p 78、r e p 68、r e p 52、および r e p 40 遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される r e p 78 および／または r e p 68 遺伝子の開始コドンが、A C G から A T G に改変される。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるプロデューサー細胞が、H E K 293 細胞である。

20

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用される A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、バーコードを含む核酸、レポータータンパク質をコードする核酸、および／または局在化シグナルをコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーが、5' I T R 配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' I T R 配列とを、その順序で含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるレポータータンパク質をコードする核酸および A A V バリエーションカプシドをコードする核酸が、別個のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法で使用されるレポータータンパク質をコードする核酸および A A V バリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。

30

【0026】

いくつかの実施形態において、A A V カプシドバリエーションの所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である。

【0027】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションが、関連するバーコードの配列決定によって特定される。本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションが、関連する 1 つ以上のバーコードの配列決定によって特定される。いくつかの実施形態において、プロモーターが特定の細胞集合体でのみ発現するため、プロモーターに作動可能に連結された第 1 のバーコードが、標的細胞集合体（例えば、ニューロンまたは肝細胞）において、バーコードが付けられた転写産物を特定する。いくつかの実施形態において、第 2 のバーコードは、それが普遍的な発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結されているため、全ての細胞型における発現を特定する。

40

【0028】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションが、A A V ゲノムの精製および配列決定によって特定される。

50

【0029】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞または組織が挙げられる。

【0030】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

10

【0031】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上が、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してtransで提供される。本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸が全て、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してtransで提供される。本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上が、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してcisで提供される。本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸が全て、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してcisで提供される。

20

【0032】

第4の態様において、本開示は、AAVバリエーションのライブラリであって、上述のライブラリの各メンバーが、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c)局在化シグナルをコードする核酸、d)バーコードを含む核酸、およびe)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、ライブラリを提供する。

30

【0033】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c)局在化シグナルをコードする核酸と、d)バー

40

50

コードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0034】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

20

【0035】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

30

【0036】

第5の態様において、本開示は、AAVバリエーションのライブラリであって、上述のライブラリの各メンバーが、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、ライブラリを提供する。

40

【0037】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上の

50

サイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

20

【0038】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

30

【0039】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

40

【0040】

いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、

50

および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する。他の実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む。

10

【0041】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションのライブラリが、2つ以上のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、AAV血清型が、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上から選択される。

【0042】

いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、別個のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。

20

【0043】

第6の態様において、本開示は、AAVバリエーションであって、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーションを提供する。

30

【0044】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含

40

50

む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

【0046】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

20

30

【0047】

第7の態様において、本開示は、AAVバリエーションであって、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーションを提供する。

【0048】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) a) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異であって、1つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態

40

50

において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、b) a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異であって、1 つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1 つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、b) a) の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の 1 つ以上のサイレント変異であって、1 つ以上のサイレント変異が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中にある、1 つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

10

【0049】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

20

【0050】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される A A V バリエーションは、a) A A V バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む A A V バリエーションカプシドタンパク質と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

30

40

【0051】

いくつかの実施形態において、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する。他の実施形態において、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1 つの核酸分子中に位置する。いくつかの実施形態において、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、A A V バリエーションが、5' ITR 配

50

列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74からなる群に由来する。

【0053】

いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、別個のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。

【0054】

第8の態様において、本開示は、核酸分子であって、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) バリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接するヌクレオチド配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列、c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、d) バーコードを含む核酸配列、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの1つ以上とを含む、核酸分子を提供する。

【0055】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実

施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0057】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0058】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、バリエーションカプシドタンパク質に挿入されたペプチドは、4～15アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、6～15アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、7、10、または15アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、7アミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質のVR-I、VR-II、VR-IIII、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIまたはVR-IX領域に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質のVR-Iに挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質のVR-IVに挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質のVR-VIIIIに挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質VP1、VP2、またはVP3に挿入される。VP2およびVP3タンパク質がVP1タンパク質の切断形態であることはよく認識されている。

【0060】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される。いくつかの実施形態において、(i) AAV血清型が、AAV1であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、(ii) AAV血清型が、AAV6であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、(iii) AAV血清型が、AAV2であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、(iv) AAV血清型が、AAV3Bであり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置58

9に挿入されるか、(v) AAV血清型が、AAV5であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入されるか、(vi) AAV血清型が、AAV8であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入されるか、または(vii) AAV血清型が、AAV9であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455もしくは589に挿入され、その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する。

【0061】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸が、p40プロモーターの制御下にある。本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸が、p40プロモーターに作動可能に連結されている。

10

【0062】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸が、蛍光タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、EGFP、mCherry、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される。

20

【0063】

いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型特異的RNAポリメラーゼIIプロモーター（例えば、トランスサイレチンまたはhSynapsin1）に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター（hSyn1）、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB（unc45b）プロモーター、心筋型トロポニンT（cTnT）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーターからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、細胞型および／または組織特異的プロモーターが、hSyn1プロモーターである。いくつかの実施形態において、細胞型および／または組織特異的プロモーターが、TTRプロモーターである。

30

【0064】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、レポータータンパク質が、局在化シグナルに融合される。いくつかの実施形態において、局在化シグナルが、N末端、C末端、またはN末端およびC末端の両方でレポータータンパク質に融合される。いくつかの実施形態において、局在化シグナルが、核局在化シグナル（NLS）、核エンベロップ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである。いくつかの実施形態において、NLSが、SV40 NLSである。いくつかの実施形態において、核エンベロップ結合ドメインが、KASHドメインである。いくつかの実施形態において、ヒストン結合ドメインが、H2Bである。

40

【0065】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、バーコードが、5～18ヌクレオチド長である。

【0066】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号111～154または155～19

50

8の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号111～154または155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。

10

【0067】

本明細書に開示される方法、AAVバリエーションのライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーが、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸と、を含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される。本明細書に開示される方法、AAVバリエーションのライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、第2のバーコードを含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択され、第2のバーコードを含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、上述のプロモーターは、第1のバーコードおよび第2のバーコードのそれぞれについて異なる。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2の核酸の各々が独立して、異なるプロモーターの下で制御される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーター（例えば、ヒトシナプシンプロモーター（hSyn1）、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB（unc45b）プロモーター、心筋型トロポニンT（cTnT）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、またはメチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーター（例えば、U6プロモーター、H1プロモーターまたは7SKプロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIプロモーターであり、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、レポーター遺伝子と、核局在化シグナルと、ポリアデニル化シグナルとをさらに含む。

20

30

40

【0068】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実

50

施形態において、各々の挿入されたペプチドコード配列は、全て同じペプチドをコードする複数の異なる核酸配列を用いて合成される。各核酸配列は、同じ挿入されたペプチド配列を用いて2つ以上のバリエーションが特定されたが、異なる核酸配列がその挿入されたペプチドをコードする場合、挿入されたペプチドの性能（例えば、濃縮）を検証することができるように、独自のバーコードに連結されている。

【0069】

本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上が、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してtransで提供される。本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸が全て、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してtransで提供される。本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上が、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してcisで提供される。本明細書に開示される方法、ライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、(i)局在化シグナルをコードする核酸、(ii)バーコードを含む核酸、および(iii)レポータータンパク質をコードする核酸が全て、挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸に関してcisで提供される。

【0070】

第9の態様において、本明細書に開示されるAAVバリエーションは、導入遺伝子を標的細胞または組織に送達するために使用される。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、遺伝子療法において有用である。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、ゲノム編集において有用である。

【0071】

第10の態様において、本開示は、配列番号1~32または68~110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸を含むAAVベクターを提供する。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、配列番号1~32に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸を含む。他の実施形態において、AAVベクターは、配列番号68~110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、配列番号1~32または配列番号68~110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、核酸は、配列番号1~32のいずれか1つであるアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、核酸は、配列番号68~110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、挿入されたアミノ酸配列は、カプシドタンパク質の一部である。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、VP1、VP2、またはVP3である。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、カプシドタンパク質のアミノ酸残基450~600の間の位置に挿入される。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、(i)AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸位置590、(ii)AAV6カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590、(iii)AAV2カプシドタンパク質のアミノ酸位置588、(iv)AAV3Bカプシドタンパク質のアミノ酸位置589、(v)AAV5カプシドタンパク質のアミノ酸位置578、(vi)AAV8カプシドタンパク質のアミノ酸位置591、または(vii)AAV9カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455、もしくは589に挿入され、その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する。

【0072】

第11の態様において、本開示は、本明細書に開示されるAAVベクターと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0073】

第12の態様において、本開示は、配列番号1～32または68～110のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチドを提供する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号1～32に示される配列のいずれかである。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号68～110に示される配列のいずれかである。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAVベクターの一部である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAVベクターのカプシドタンパク質の一部である。

10

【0074】

第13の態様において、本開示は、配列番号1～32または68～110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含むカプシドタンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号1～32に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号68～110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0075】

第14の態様において、本開示は、本明細書に開示されるペプチドまたはカプシドタンパク質をコードする核酸配列を提供する。

【0076】

第15の態様において、本開示は、核酸を対象の標的細胞または組織に送達する方法であって、核酸を含むAAVベクターを含む組成物を投与することを含み、AAVベクターが、配列番号1～32または68～110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含む挿入されたペプチドを含むカプシドタンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号1～32に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む挿入されたペプチドを含む。他の実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号68～110に示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、カプシドタンパク質は、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0077】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞または組織が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、CNS細胞または組織である。他の実施形態において、標的細胞または組織は、肝臓細胞または組織である。

40

【0078】

いくつかの実施形態において、標的細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア

50

細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

【0079】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、肝臓由来である。

【0080】

いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、CNS由来である。

【0081】

これらおよび他の態様は、本開示全体に照らして当業者には容易に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0082】

本特許または出願ファイルには、少なくとも1つのカラーで作られた図面が含まれる。カラー図面を含むこの特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な費用の支払いにより、特許庁より提供される。

【0083】

【図1】カプシドライブラリの組み立てに関する情報を示す。パネルAは、AAVカプシドタンパク質の例示であり、矢印は、ペプチドが挿入される露出ループを示す。パネル1Bは、ペプチドがその中に挿入されたAAV血清型骨格の図である。ペプチド挿入部位の周囲の領域（挿入されたペプチド領域「ペプチド」に隣接する灰色の四角として示される）にサイレント変異が作製され、同じ一般的な次世代配列決定（NGS）プライマーを使用して、多様化領域を増幅し、直接の比較でバリエーション性能を定量化することを可能にした。単一の挿入領域（VR-VIII）が代表例として示されるが、同じ戦略を、多様化のために標的化される他のカプシド領域に一般化することができる。

【図2】高い多様性を有するカプシドライブラリを生成するために使用される方法の一例を示す。パネルAは、カプシドをコードする遺伝子を構築するために使用される断片を示し、ここで、左および右の2つの断片は、2つのPCR像副産物および予め消化されたプラスミド骨格のギブソンアセンブリによって結合した。パネルBは、ギブソンアセンブリによって2つの断片を結合するために使用されるプライマー対（逆方向：配列番号204および順方向：配列番号205）の拡大図であり、RF順方向プライマーに含まれる多様化配列も示しており、ここで、Xは、12~45ヌクレオチド長であり得る。

【図3-1】発現カセットとcisにあるバリエーションカプシドライブラリを含み、両方ともウイルスゲノムのカプシド化のためのウイルスITRに隣接している、種々のライブラリ構築物の図である。パネルAは、バリエーションカプシド遺伝子「キャップ」が、p40プロモーターによって調節され、転写産物が、ポリアデニル化シグナル配列（「ポリA」）によって終結する構築物である。この構築物は、EGFPがそのN末端でSV40核局在化配列（「SV40 NLS」）に連結されているCMVプロモーターによって調節されるEGFPレポーター遺伝子も含む。この構築物はまた、ウシ成長ホルモンポリAシグナル配列BGHと、5'および3'ITR配列とを含む。パネルBは、mCherryレポーターを有するという点を除き、パネルAのものと同様である。パネルCは、バリエーションカプシド遺伝子について同じ設計を示し、さらに、EGFP遺伝子がKASH核エンベロップ結合ドメイン（「KASH」）に融合されているCMVプロモーターによって調節されるEGFPレポーター遺伝子も含む。パネルDは、mCherryレポーターが使用されることを除き、パネルCに類似した構築物を示す。パネルEは、同じバリエーションカプシド発現構築物を有するが、その3'末端でヒストン2B DNA結合ドメイン（「H2B」）に融合されたEGFPレポーターの発現を駆動するシナプシンプロモーター（「hSyn1」）を有する構築物を示す。この構築物は、SV40ポリアデニル化シグナル配列も含む。パネルFおよびGは、パネルFがmClover3レポーターを使用し、パネルGがmRuby3レポーターを使用することを除き、パネルEに類似している。

【図3-2】同上。

【図4-1】ランダムに生成されたか、または指定されたバーコードを有する各バリエーション

10

20

30

40

50

トカプシド配列を生体情報的に連結するための方法1のステップを示す。ステップ1において、ランダムに生成されたか、または指定されたバーコードと、ランダムに生成されたか、または指定されたカプシドバリエーション領域と、ギブソンアセンブリに使用される2つの領域とを含む短いDNA片を合成する。ステップ2は、多様化領域のカプシド配列3'の増幅を含む。ステップ3は、5' ITRおよびSV40ポリAデニル化配列が5'末端でバーコードに融合され、第2のギブソンアセンブリ領域が、カプシド遺伝子の3'末端と、カプシド遺伝子のためのポリAシグナルと、3' ITRとに融合されるギブソンアセンブリ反応である。ステップ4は、バーコードおよびバリエーションカプシド配列にわたってILLUMINA（登録商標）配列決定を行うことを含む。ステップ5は、BsaI制限酵素による消化を含む。ステップ6は、H2B、EGFP、hSyn1およびp40プロモーター、ならびにカプシド遺伝子の5'末端が調製されるPCR増幅ステップである。あるいは、H2B、EGFP、hSyn1、p40プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端を含む断片は、ドナープラスミド中で予め組み立てられ、BsaIで消化され、ゲル精製されてもよい。ステップ7は、最終構築物を作成するための最終的なゴールドゲートクロニングステップである。

10

20

30

40

50

【図4-2】同上。

【図4-3】ランダムに生成されたバーコードを有する各バリエーションカプシド配列を生体情報的に連結するための方法1の代替的なアプローチを示す。ステップ1において、2つのDNA断片が合成される。断片Aは、ギブソンアセンブリ領域1番と、BsaI部位と、可変カプシド領域と、PCRプライマーとして使用されるカプシド遺伝子に相同な領域とを含む。断片Bは、ギブソンアセンブリ領域2番と、ランダムバーコードと、BsaI部位と、ギブソンアセンブリ領域1番とを含む。次に、ステップ1で合成した断片AをPCRプライマーとして使用してカプシド遺伝子の3'配列が増幅されるPCR手順を行う。次に、ギブソンアセンブリによって中間体AAV構築物を生成し、ここで、この構築物は、5'から3'への順序で、5' ITRと、SV40ポリAシグナルと、バーコードと、2つの制限エンドヌクレアーゼ部位と、バリエーションカプシド配列と、カプシドタンパク質の3'領域と、カプシド発現構築物のためのポリA配列と、3' ITRとを含む（ステップ3）。ステップ4は、バーコードおよびバリエーションカプシド配列にわたってILLUMINA（登録商標）配列決定を行うことを含む。ステップ5は、BsaI制限酵素による消化を含む。ステップ6は、H2B、EGFP、hSyn1およびp40プロモーター、ならびにカプシド遺伝子の5'末端が調製されるPCR増幅ステップである。あるいは、H2B、EGFP、hSyn1、p40プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端を含む断片は、ドナープラスミド中で予め組み立てられ、BsaIで消化され、ゲル精製されてもよい。ステップ7は、最終構築物を作成するための最終的なゴールドゲートクロニングステップである。

【図4-4】同上。

【図5】ランダムに生成されたバーコードを有する各変異したカプシド配列を生体情報的に連結するための方法2のステップを示す。まず、2セットのILLUMINA（登録商標）配列決定プライマーを使用して、ランダムバーコードおよび変異したカプシド配列を高い忠実度で別個に配列決定する。次に、OXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定は、構築物全体を配列決定するために実施される。ナノポア配列決定は、ILLUMINA（登録商標）配列決定よりも正確ではないが、バイオフィーマティクス分析を介して2つのILLUMINA（登録商標）配列を1つの分子に連結するために使用することができる。

【図6】AAVバリエーションライブラリによる形質導入後に初代マウス皮質ニューロンから単離されたAAVバリエーションのプロットである。Y軸は、形質導入前の投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入された細胞からの選択および回復後のバリエーション頻度のLog2倍率変化を示す。このデータは、AAV血清型が、他のAAV血清型への挿入に基づくバリエーションと比較して、初代マウスニューロンにおいて最も濃縮されたバリエーションであるAAV1に基づくバリエーションとクラスター化する傾向があったこ

とを示している。

【図 7-1】 A A V 1 バリエント (図 7 A) または A A V 2 バリエント (図 7 B) のいずれかのプロットである。図 7 A において、カプシド配列中の挿入されたペプチドを欠く、野生型 A A V 1 が標識されている。このデータは、挿入されたペプチド配列の多くが、野生型 A A V 1 と比較して、バリエントの濃縮を引き起こしたことを示している。図 7 B において、カプシド配列中の挿入されたペプチドを欠く、野生型 A A V 2 が標識されている。このデータは、挿入されたペプチド配列の多くが、野生型 A A V 2 と比較して、核においてバリエントの濃縮を引き起こしたことを示している。

【図 7-2】 同上。

【図 8】 標的細胞から単離された R N A の逆転写およびバーコードの増幅 (左側のプロット) によって、または治療された細胞からの核の単離およびカプシド遺伝子に挿入されたペプチドをコードする挿入されたヌクレオチドの配列決定 (右側のプロット) のいずれかによってアッセイされる、濃縮された A A V バリエントを示す 2 つのプロットを示す。これらのデータは、両方の分析方法によって非常に類似した結果が得られたことを示している。左プロットおよび右プロットは、それぞれ配列番号 1 9 9 ~ 2 0 3 を表示順に開示する (各パネルにおいて上から下へ)。

【図 9】 異なるレポーター遺伝子構築物で形質導入した H E K 2 9 3 細胞の顕微鏡写真を示す。パネル A は、E G F P レポーターのみを含む A A V バリエントで形質導入された H E K 2 9 3 細胞を示し、一方、パネル B は、E G F P 遺伝子に融合した S V 4 0 核局在化配列 (N L S) を含む構築物で H E K 2 9 3 細胞を形質導入した場合の結果を示し、核内にレポーターの蓄積を引き起こす。パネル C は、K A S H に連結した E G F P 配列を含む A A V 構築物で形質導入した H E K 2 9 3 細胞の結果を示し、パネル D は、m C h e r r y レポーターを含む A A V 構築物で形質導入した H E K 2 9 3 細胞を示す。パネル E は、A A V 構築物が S V 4 0 N L S に融合した m C h e r r y を含む場合の結果を示し、パネル F は、m C h e r r y が K A S H に融合した場合の結果を示す。

【図 10-1】 注射後の E G F P - H 2 B 融合物を含む A A V バリエントライブラリの核に局在化したニューロンレポーター発現 (皮質、海馬、視床) を示すマウス脳組織からの免疫組織化学顕微鏡写真である (パネル A および B)。パネル C は、注射後の m C l o v e r 3 - H 2 B 融合物を含む A A V バリエントライブラリの核に局在化したニューロンレポーター発現 (皮質、海馬、視床) を示すマウス脳組織を示す。パネル D および E は、注射後の E G F P - K A S H 融合物を含む A A V バリエントライブラリの核エンベロープに局在化したニューロンレポーター発現 (皮質、海馬、視床) を示すマウス脳組織を示す。パネル F は、注射後の m R u b y 3 - H 2 B 融合物を含む A A V バリエントライブラリの核に局在化したニューロンレポーター発現 (皮質、海馬、視床) を示すマウス脳組織を示す。パネル F の画像は、固定脳切片における天然蛍光である。

【図 10-2】 同上。

【図 11】 E G F P - H 2 B レポーターを含む A A V バリエントで治療されたマウスにおけるニューロン組織から単離された核の F A C S 分析を示す。製剤緩衝液のみを注射されたマウスにおいて (製剤)、検査した脳組織は、E G F P 蛍光を示さなかった (グラフに示されているのは皮質組織である)。これとは対照的に、A A V バリエントで治療されたマウスから単離された核について、レポーターシグナル伝達は、胸髄 (全事象の 7 . 6 8 %)、視床 (全事象の 1 6 . 5 3 %) および皮質 (全事象の 6 . 5 4 %) で検出することができた。

【図 12】 m C l o v e r 3 レポーター構築物または E G F P - K A S H レポーターを含む A A V バリエントで治療されたマウスから単離された核の F A C S 分析を示す。両方の種類の A A V バリエントを用いる場合、m C l o v e r 3 については視床においてレポーターシグナルがみられ (全事象の 1 4 . 7 2 %)、E G F P - K A S H レポーターについては皮質においてレポーターシグナルがみられた (4 . 8 8 %)。

【図 13】 示されるように (全事象の 7 . 6 2 %) レポーターシグナルが皮質において検出された m R u b y 3 レポーター構築物を含む A A V バリエントで治療されたマウスから

10

20

30

40

50

単離された核の F A C S 分析を示す。

【図 1 4】レポーター遺伝子が h S y n 1 プロモーター（ニューロン特異的）によって駆動されるとき、非 C N S 組織から単離された核の F A C S 分析を示す。パネル A は、製剤緩衝液を用いた場合と比較した、E G F P - H 2 B 構築物を含む A A V バリエーションで治療されたマウスにおける肝臓組織からのシグナルの比較を示し、一方、パネル B は、心臓組織における同じ比較を示す。h S y n 1 プロモーターからのオフターゲット発現は観察されなかった。

【図 1 5 - 1】肝臓特異的 T T R プロモーターによって駆動される E G F P - H 2 B 構築物を含む A A V バリエーションライブラリが、異なる用量（m o c k（パネル A）と比較して、（3 × 1 0³（パネル B）、1 × 1 0⁴（パネル C）、3 × 1 0⁴（パネル D）、1 × 1 0⁵（パネル E）、3 × 1 0⁵（パネル F）および 1 × 1 0⁶（パネル G））で、インビトロで H e p G 2 細胞に導入される場合、E G F P レポーターシグナルの明確な用量応答を裏付ける一連のグラフを示す。

【図 1 5 - 2】同上。

【図 1 5 - 3】同上。

【図 1 6】動物に A A V バリエーションライブラリを注射した後、肝臓組織から単離された N H P（非ヒト霊長類）核で検出されたレポーターシグナルを示す（パネル A）。パネル B は、肝臓組織の免疫組織化学分析を示し、雄および雌の N H P の両方において、核局在性レポーターシグナル（核の褐色染色）が肝臓において検出されることを示す。

【図 1 7 - 1】ペプチド挿入が行われた親血清型に従った、上位の 2 5 0 0 倍濃縮された A A V バリエーションの分布を示す。データは、選別および配列決定から得られた。インビボでのマウス（パネル C）および N H P 肝臓組織（パネル D）と比較した、インビトロでの H e p G 2（パネル A）および初代ヒト肝細胞（パネル B）から単離された E G F P 陽性核。図からわかるように、異なる選択圧で挑戦したときに成功する A A V バリエーションの親血清型には有意な差がある。

【図 1 7 - 2】同上。

【図 1 8】N H P 肝臓組織からの第 2 のラウンドのスクリーニングから特定された、高度に濃縮された A A V バリエーションおよび挿入されたペプチド（「ペプチド」、配列番号 1 ~ 3 2）の配列のサンプリングを示す。ここからわかるように、バリエーションは、A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 9、A A V 6 および A A V 5 血清型への挿入に基づき、ペプチド配列は、示される各血清型において以下のアミノ酸位置に挿入された。A A V 1（5 9 0）、A A V 2（5 8 8）、A A V 3 B（5 8 9）、A A V 5（5 7 8）、A A V 6（4 5 4）、A A V 8（5 9 1）、A A V 9（5 8 9）。このデータは、肝臓組織から単離された A A V ライブラリ由来のバーコード化 m R N A 転写産物（「ラウンド 2 m R N A」）、F A C S を使用した E G F P - H 2 B レポーターシグナルに基づいて単離された核から配列決定されたウイルスゲノム DNA（「ラウンド 2 核」、ラウンド 2 において総肝臓ゲノム DNA から配列決定されたウイルスゲノム DNA（「ラウンド 2 総 g D N A」）、およびラウンド 1 において総肝臓ゲノム DNA から配列決定されたウイルスゲノム DNA（「ラウンド 1 総 g D N A」）の分析によって測定されるような、第 2 のスクリーニングラウンドによる個々のバリエーションの濃縮を示す。H E K 2 9 3 細胞への一過性トランスフェクションによって産生されたときの A A V バリエーションの相対収量もまた示される。注射前のライブラリにおけるそのパーセンテージと比較して、組織から単離したときの個々のバリエーションの濃縮度は、円の大きさによって示される。例えば、挿入されたペプチド配列 Q G A L A Q V（配列番号 8）を有する A A V 3 B 血清型バリエーションは、開始ライブラリと比較して、N H P 組織から単離された場合、m R N A バーコード頻度において 6 . 1 の l o g₂ 濃縮倍率を有する。円の色の暗さは、特定のバリエーションについて複数の動物および組織パンチにわたる性能の相対的変動を示す右下に示されるスケールにも関係する。

【図 1 9】N e u r o 2 A 細胞の感染後に回収された A A V ライブラリバリエーションのバブルプロットである。L o g₂ 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度

と比較して、形質導入された *Neuro2A* 細胞で発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 20】初代マウス皮質ニューロンの感染後に回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 21】ヒト人工多能性幹細胞に由来する *iCell* ヒトニューロンの感染後に回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 22】*AAV* バリエーションライブラリの脳室内投与後に *C57BL/6J* マウス *CNS* 組織から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。分析に含まれる組織領域は、線条体、海馬、小脳、視床、視床下部、中脳、脳幹、運動皮質、体性感覚皮質、皮質の残り、頸髄、胸髄、および腰髄であった。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 23】*AAV* バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類 *CNS* 組織から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。この分析に含まれる組織領域は、海馬、嗅内皮質、側頭皮質、前頭皮質、および頭頂皮質であった。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、組織由来のウイルスゲノム *DNA* の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 24】*AAV* バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類 *CNS* 組織から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。この分析に含まれる組織領域は、橋、延髄、小脳、および運動皮質であった。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、組織由来のウイルスゲノム *DNA* の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 25】*AAV* バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類脊髄から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、組織由来のウイルスゲノム *DNA* の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 26】*AAV* バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類 *CNS* 組織から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。この分析に含まれる組織領域は、海馬、嗅内皮質、側頭皮質、前頭皮質、および頭頂皮質であった。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29A～図 29D に列挙されるバリエーション 1～43（配列番号 68～110）の性能が示される。

【図 27】*AAV* バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類 *CNS* 組織から回収された *AAV* ライブラリバリエーションのバブルプロットである。この分析に含まれる組織

10

20

30

40

50

領域は、橋、延髄、小脳、黒質、および運動皮質であった。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29 に列挙されるバリエーション 1 ~ 43 (配列番号 68 ~ 110) の性能が示される。

【図 28】AAV バリエーションライブラリの脊髄内投与後に非ヒト霊長類脊髄から回収された AAV ライブラリバリエーションのバブルプロットである。Log 2 倍率変化は、投与されたライブラリにおけるバリエーション頻度と比較して、形質導入されたニューロンで発現される転写産物の感染および回収後のバリエーション頻度の変化を表す。野生型血清型の性能、ならびに図 29 に列挙されるバリエーション 1 ~ 43 (配列番号 68 ~ 110) の性能が示される。

10

【図 29-1】NHP CNS 細胞からの第 2 のラウンドのスクリーニングから特定された、高度に濃縮された AAV バリエーションおよび挿入されたペプチド (「ペプチド」、配列番号 68 ~ 110) の配列を示す。バリエーションは、AAV1、AAV2、AAV3B、および AAV9 血清型への挿入に基づき、ペプチド配列は、示される各血清型において以下のアミノ酸位置に挿入された。AAV1 (590)、AAV2 (588)、AAV3B (589)、AAV9 (589)。各バリエーションの左側の数字 (1 ~ 43 (配列番号 68 ~ 110)) は、図 19 ~ 図 28 のプロットに使用されている数に対応している。このデータは、細胞または CNS 組織から単離された AAV ライブラリバーコード化 mRNA 転写産物またはベクターゲノム DNA の定量によって測定されるような、複数の細胞株または種における第 2 のスクリーニングラウンドによる個々のバリエーションの濃縮を示す。注射前のライブラリにおけるそのパーセンテージと比較して、細胞または組織から単離したときの個々のバリエーションの濃縮度は、円の大きさによって示される。円の色の暗さは、特定のバリエーションについて複数の複製物、動物および／組織パンチにわたる性能の相対的変動を示す図 29D の右下に示されるスケールにも関係する。

20

【図 29-2】同上。

【図 29-3】同上。

【図 29-4】同上。

【図 30】バーコード化された AAV バリエーションのプールされた評価に使用されるベクターゲノムカセットの概略図である。カセットは、標的細胞集合体、例えば、ニューロンまたは肝細胞におけるバーコード化転写産物の発現を定量化するための RNA ポリメラーゼ II プロモーターを含有する。加えて、全ての細胞型においてユビキタスな発現を駆動する RNA ポリメラーゼ III プロモーター (例えば、hU6) が存在する。これらのプロモーターの組み合わせは、個々の標的細胞型およびバルク組織の両方における AAV バリエーション形質導入のランク付けを可能にする。

30

【図 31】図 29A ~ 図 29D の AAV バリエーションのサブセット (バリエーション 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、49) のプールされた評価の結果を示す。対照血清型は、野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO を含む。バーコード化された AAV バリエーションを、Neuro2A 細胞 (ATCC CCL-131)、初代マウス脂質ニューロン (Gibco)、およびヒト人工多能性幹細胞に由来する iCell ヒトニューロンにおいて、インビトロで評価した。図 30 に記載される AAV 発現カセットを、プールされた評価に使用し、pol III ニューロン特異的 hSyn1 プロモーターおよび pol III hU6 ユビキタスプロモーターからの別個のバーコード定量を標識した。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、感染に使用したプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

40

【図 32】ヒト人工多能性幹細胞に由来する iCell ヒトアストロサイトおよび内皮細胞

50

胞における、インビトロでのバーコード化された AAV バリエーション（バリエーション 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、49）および対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2__HSPGKO の評価を示す。図 30 に記載されるベクターゲノム発現カセットを、プールされた評価に使用し、pol III hU6 ユビキタスプロモーターについてデータを提示し、hSyn1 バーコード測定は、プロモーターが非ニューロン細胞型において最小限の活性しか有しないために、実施しなかった。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、感染に使用したプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

10

【図 33】 C57BL/6J マウスにおいて片側脳室内投与の後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーション（バリエーション 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、49）および対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2__HSPGKO の評価を示す。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹（脳幹、中脳）、小脳、皮質（運動皮質、感覚皮質、皮質の残り）、深部脳領域（海馬、視床下部、線条体、視床）、および脊髄（頸部、胸部、および腰部）。図 30 に記載される AAV 発現カセットを、プールされた評価に使用し、pol III ニューロン特異的 hSyn1 プロモーターおよび pol III hU6 ユビキタスプロモーターからの別個のバーコード定量を標識した。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、投与されたプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

20

【図 34】 Sprague-Dawley ラットにおいて片側脳室内投与の後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーション（バリエーション 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、49）および対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2__HSPGKO の評価を示す。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹（脳幹、中脳）、小脳、皮質（運動皮質、感覚皮質、皮質の残り）、深部脳領域（海馬、視床下部、線条体、視床）、および脊髄（頸部、胸部、および腰部）。図 30 に記載される AAV 発現カセットを、プールされた評価に使用し、pol III ニューロン特異的 hSyn1 プロモーターおよび pol III hU6 ユビキタスプロモーターからの別個のバーコード定量を標識した。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、投与されたプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

30

40

【図 35】 非ヒト霊長類（カニクイザル）における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーション（バリエーション 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、49）および対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2__HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離された全 RNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹（延髄、中脳、橋、黒質）、小脳（小脳、小脳虫部）、皮質（嗅内皮質、前頭皮質、前眼窩回、紡錘状回、側面眼窩回、内側眼窩回、運動皮質、海馬傍回、頭頂皮質、頭頂視覚野、後帯状皮質、感覚皮質、体性感覚皮質、側頭皮質、視覚野）、深部脳領域（扁桃核、尾状核、海馬、視床下部、被殻、

50

視床) および脊髄 (頸部、胸部、および腰部)。図 30 に記載される AAV 発現カセットを、プールされた評価に使用し、p o l I I ニューロン特異的 h S y n 1 プロモーターおよび p o l I I I h U 6 ユビキタスプロモーターからの別個のバーコード定量を標識した。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、投与されたプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

【図 36】非ヒト霊長類 (カニクイザル) における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーションおよび対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離されたゲノム DNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹 (延髄、橋、黒質)、皮質 (嗅内皮質、前頭皮質、運動皮質、頭頂皮質、体性感覚皮質、側頭皮質)、深部脳領域 (尾状核、海馬、視床下部、被殻、視床)、および脊髄 (頸部、胸部、および腰部)。図 30 に記載される AAV 発現カセットを、プールされた評価に使用し、p o l I I ニューロン特異的 h S y n 1 プロモーターおよび p o l I I I h U 6 ユビキタスプロモーターからの別個のバーコード定量を標識した。ヒートマップ内の値は、各 AAV バリエーションに由来する NGS リードのパーセンテージを表し、パーセントの最も近い 10 分の 1 に四捨五入される。これらの結果を、投与されたプール内の各 AAV バリエーションの頻度によって正規化した。各 AAV バリエーションの親血清型は、添付の図の凡例に従って着色される。

【図 37】非ヒト霊長類 (カニクイザル) における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーションおよび対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離された全 RNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹 (延髄、中脳、橋、黒質)、小脳 (小脳、小脳虫部)、皮質 (嗅内皮質、前頭皮質、前眼窩回、紡錘状回、側面眼窩回、内側眼窩回、運動皮質、海馬傍回、頭頂皮質、頭頂視野、後帯状皮質、感覚皮質、体性感覚皮質、側頭皮質、視野)。プロットされた結果は、野生型 AAV9 と比較した各血清型のリードの正規化されたパーセンテージの倍率の増加を示す。

【図 38】非ヒト霊長類 (カニクイザル) における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーションおよび対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離された全 RNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。深部脳領域 (扁桃核、尾状核、海馬、視床下部、被殻、視床)、および脊髄 (頸部、胸部、および腰部)。プロットされた結果は、野生型 AAV9 と比較した各血清型のリードの正規化されたパーセンテージの倍率の増加を示す。

【図 39】非ヒト霊長類 (カニクイザル) における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーションおよび対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離されたゲノム DNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。脳幹 (延髄、橋、黒質)、小脳、および皮質 (嗅内皮質、前頭皮質、運動皮質、頭頂皮質、体性感覚皮質、側頭皮質)。プロットされた結果は、野生型 AAV9 と比較した各血清型のリードの正規化されたパーセンテージの倍率の増加を示す。

【図 40】非ヒト霊長類 (カニクイザル) における脊髄内投与後のインビボでのバーコード化された AAV バリエーションおよび対照血清型野生型 AAV9、PHP.B、および AAV2_HSPGKO の評価を示す。示されるデータは、NHP 組織から単離されたゲノム DNA の分析から得られたものである。データは、以下の CNS 領域に従って集計される。深部脳領域 (尾状核、海馬、視床下部、被殻、視床)、および脊髄 (頸部、胸部、および腰部)。プロットされた結果は、野生型 AAV9 と比較した各血清型のリードの正規化されたパーセンテージの倍率の増加を示す。

10

20

30

40

50

【図４１】異なる種にわたる血清型性能の概要を示す。データは、hSyn1バーコードRNA分析のために提示され、血清型は、非ヒト霊長類CNSにおける性能に従って順序付けされる。

【図４２】異なる種にわたる血清型性能の概要を示す。データは、hU6バーコードRNA分析のために提示され、血清型は、非ヒト霊長類CNSにおける性能に従って順序付けされる。

【発明を実施するための形態】

【００８４】

本開示は、天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドを開発するための方法および組成物を提供する。これらのカプシドは、例えば、それを必要とする対象の治療のための標的細胞、細胞株、または組織（例えば、インビトロまたはインビボでの）ゲノム操作分子および遺伝子療法分子の送達に有用である。

10

【００８５】

多くの組織は非常に異種であり、アデノ随伴ウイルス（AAV）形質導入を制限する生物学的障壁を含有する。機能選択戦略は、組織内で特定の細胞型に形質導入することが可能なライブラリからのAAVバリエーションの選択を可能にする。さらに、選択圧は、エントリー後のステップを媒介し、導入遺伝子発現を駆動することに優れるバリエーションを特定するように設計されている。全ての種および組織に適用可能な機能選択戦略を確立するために、いくつかの改変をAAVウイルスゲノムに導入した。本明細書では、AAVバリエーションライブラリの生成のための方法ならびに所望の組織、細胞および／またはオルガネラに形質導入することが可能なバリエーションの機能選択の方法を記載する。これらの方法は、全ての種、細胞型、および標的オルガネラに好適なAAVバリエーションの開発に適用可能である。

20

【００８６】

一般論

本明細書に開示される方法、ならびに組成物の調製および使用の実践は、別段の指示がない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えDNAおよび当該技術分野の技術の範囲内にある関連分野における従来の技術を使用する。これらの技術は、文献に完全に説明されている。例えば、Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001, Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates, METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ, Academic Press, San Diego, Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998, METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe編集), Academic Press, San Diego, 1999, および METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P. B. Becker編集) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

30

40

【００８７】

定義

「本明細書に」という用語は、出願全体を意味する。

【００８８】

本明細書で別途定義されない限り、本出願で使用される科学用語および技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。一般

50

に、本明細書に記載される化合物、組成物、および方法と関連して使用される専門用語は、当該技術分野で周知であり、一般的に使用されているものである。

【0089】

本開示の異なる態様の下に記載されるものおよび本明細書の異なる部分（実施例でのみ記載される実施形態を含む）を含む本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかは、明示的に放棄されるか、または不適切でない限り、本発明の1つ以上の他の実施形態と組み合わせることができることが理解されるべきである。実施形態の組み合わせは、複数の従属請求項を介して特許請求されるそれらの特定の組み合わせに限定されない。

【0090】

上の全て、ならびに本出願において参照される任意の他の刊行物、特許、および公開された特許出願は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。矛盾する場合には、本明細書が、その特定の定義を含み、優先される。

【0091】

本明細書全体を通して、「含む (comprise)」という語句、または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などの変化形は、述べられている整数（もしくは構成要素）または整数（もしくは構成要素）の群を包含することを意味するが、任意の他の整数（もしくは構成要素）または整数（もしくは構成要素）の群の除外を意味するものではないことが理解されるであろう。

【0092】

本明細書全体を通して、組成物が、特定の構成要素を有するか、含む (including) か、または含む (comprising)（またはその変化形）と記載される場合、その組成物は、列挙された構成要素から本質的になるか、またはそれからなることもできることが企図される。同様に、方法またはプロセスが、特定の処理ステップを有する、含む (including) か、または含む (comprising) と記載される場合、そのプロセスもまた、列挙された処理ステップから本質的になるか、またはそれからなることもできる。さらに、本明細書に記載の組成物および方法が操作可能なままである限り、上述のステップの順序、または特定の動作を実行するための順序は、重要ではないことが理解されるべきである。さらに、2つ以上のステップまたは動作を同時に実行することができる。

【0093】

「含む (including)」という用語は、「含むが、これらに限定されない」を意味するために使用される。「含む」および「含むが、これらに限定されない」は、互換的に使用される。

【0094】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」は、当業者によって決定される特定の値に対する許容誤差範囲内であることを意味し、それは、その値がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの限界に一部依存する。

【0095】

要素を説明する文脈（特に以下の特許請求の範囲の文脈）における「a」および「an」および「the」という用語および同様の指示物の使用は、本明細書で別途指示されない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を含むと解釈されるべきである。

【0096】

本明細書で使用される「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、「および／または」を意味するものと理解すべきである。

【0097】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書に別段の指示がない限り、その範囲内に収まる各々の別個の値を個別に指す省略法として機能することが意図されているに過ぎず、その各々の別個の値は、本明細書に個別に列挙されるかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈に

10

20

30

40

50

よって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行することができる。本明細書で提供される任意の例および全ての例、または例示的な言語（例えば、「など」）の使用は、単に実施形態をより良く示すことを意図しており、特に断りのない限り、特許請求の範囲の範囲に制限を与えるものではない。本明細書中のいかなる言語も、任意の請求されていない要素を必須として示すものとして解釈されるべきではない。

【0098】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、直鎖状または環状の配置で、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定するものとして解釈されるべきではない。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基、糖、および／またはリン酸部分で改変されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）を包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対合特異性を有する。すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対合する。

10

【0099】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。この用語はまた、1つ以上のアミノ酸が対応する天然に存在するアミノ酸の化学類似体または改変誘導体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0100】

「結合」は、巨大分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的な非共有相互作用を指す。結合相互作用全体が配列特異的である限り、結合相互作用の全ての成分が配列特異的である必要はない（例えば、DNA骨格内のリン酸残基との接触）。そのような相互作用は、一般に、 10^{-6} M^{-1} 以下の解離定数（ K_d ）を特徴とする。「親和性」は、結合の強度を指す。結合親和性の増加は、より低い K_d と相関する。「非特異的結合」とは、標的配列に依存しない、目的の任意の分子（例えば、遺伝子操作ヌクレアーゼ）と巨大分子（例えば、DNA）との間で生じる非共有相互作用を指す。

20

【0101】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合することができるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）、および／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合、自身に結合することができ（ホモ二量体、ホモ三量体などを形成することができる）、および／または異なるタンパク質の1つ以上の分子に結合することができる。結合タンパク質は、1種類より多い結合活性を有し得る。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性、およびタンパク質結合活性を有する。RNAガイドヌクレアーゼ系の場合、RNAガイドは、ヌクレアーゼ成分（Cas9またはCpf1）に対して異種であり、両方を遺伝子操作してもよい。

30

【0102】

「DNA結合分子」は、DNAに結合することができる分子である。かかるDNA結合分子は、ポリペプチド、タンパク質のドメイン、より大きなタンパク質内のドメイン、またはポリヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドはDNAであり、一方、他の実施形態において、ポリヌクレオチドはRNAである。いくつかの実施形態において、DNA結合分子は、ヌクレアーゼのタンパク質ドメイン（例えば、FokIドメイン）であり、一方、他の実施形態において、DNA結合分子は、RNAガイドヌクレアーゼのガイドRNA成分（例えば、Cas9またはCpf1）である。

40

【0103】

「DNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、例えば、1つ以上のジンクフィンガーを介して、またはジンクフィンガータンパク質もしくはTALE内の1つ以上のRVFドとの相互作用を介して、それぞれ配列特異的な方法でDNAに結合するタンパク質、ま

50

たはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記される。

【0104】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、亜鉛イオンの配位を介して構造が安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1つ以上のジンクフィンガーを介して配列特異的な方法でDNAに結合するタンパク質、またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略記される。

【0105】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALE反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEのその同族標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも称される）は、典型的には、33～35アミノ酸長であり、天然に存在するTALEタンパク質内の他のTALE反復配列との少なくともある程度の配列相同性を示す。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,586,526号を参照されたい。

【0106】

「TtAgo」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられている原核生物のArgonauteタンパク質である。TtAgoは、細菌であるThermus thermophilusに由来する。例えば、Swarts, et al., 同書、G. Sheng, et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 652)を参照されたい。「TtAgo系」は、例えば、TtAgo酵素による切断のためのガイドDNAを含む、必要な全ての構成要素である。

【0107】

「切断」は、DNA分子の共有結合骨格の破壊を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含むがこれらに限定されない様々な方法によって開始することができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は、2つの異なる一本鎖切断事象の結果として生じ得る。DNA切断は、鈍末端または交錯末端のいずれかの生成を引き起こす場合がある。特定の実施形態において、融合ポリペプチドは、標的化二本鎖DNA切断のために使用される。

【0108】

本明細書で使用される「編集」という用語は、点変異がDNA鎖に導入されるようにヌクレオチド塩基が改変されるプロセスを指す。DNA中の点変異の導入は、編集されたDNAから転写される任意のmRNAの変化を必ず再現する。アデニンデアミナーゼおよびシチジンデアミナーゼは、それぞれのヌクレオチド標的からアミノ基を除去し、それらをそれぞれイノシンおよびウリジンに変換する。DNA修復または複製の間、イノシンはグアニンとして認識され、ウリジンはポリメラーゼ酵素によってチミンとして認識され、編集された二本鎖DNAにおいて、A:T塩基対がG:C塩基対に、またはC:G塩基対がT:A塩基対に変換される。

【0109】

「配列」という用語は、DNAまたはRNAであり得る任意の長さのヌクレオチド配列を指し、直鎖、環状または分岐であってもよく、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。「導入遺伝子」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。導入遺伝子は、任意の長さ、例えば、2～100,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の整数値もしくはそれより上の任意の整数値）、約100～100,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の整数値）、約2000～20,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の値）、または約5～15kb（またはその間の任意の値）であり得る。

【0110】

「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、その核型によって特徴付けられ、これは、細胞のゲノムを含む全て

10

20

30

40

50

の染色体の集合体である。細胞のゲノムは、1つ以上の染色体を含み得る。

【0111】

「エピソーム」は、複製核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む他の構造である。エピソームの例としては、プラスミド、ミニサークル、および特定のウイルスゲノムが挙げられる。本明細書に記載の肝臓特異的構築物は、エピソーム的に維持されてもよく、あるいは、細胞内に安定的に組み込まれてもよい。

【0112】

「外因性」分子は、細胞内に通常存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法または他の方法によって細胞に導入され得る分子である。「細胞における通常の存在」は、細胞の特定の発達段階および環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生中にのみ存在する分子は、成人筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に関して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全の内因性分子の機能性態様または正常に機能する内因性分子の機能不全態様を含み得る。

【0113】

外因性分子は、特に、コンビナトリアル化学プロセスによって生成されるような小分子、またはタンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上述の分子の任意の改変誘導体、または上述の分子のうちの1つ以上を含む任意の複合体であり得る。核酸は、DNAおよびRNAを含み、一本鎖または二本鎖であってもよく、直鎖、分枝鎖または環状であってもよく、任意の長さであり得る。核酸としては、二本鎖を形成することができるもの、ならびに三本鎖を形成する核酸が挙げられる。例えば、米国特許第5,176,996号および第5,422,251号を参照されたい。タンパク質としては、限定されないが、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メメチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、リガーゼ、デユビキチナーゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼ、およびヘリカーゼが挙げられる。

【0114】

外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または細胞に通常存在しない染色体を含み得る。細胞に外因性分子を導入するための方法は、当業者に既知であり、限定されないが、脂質媒介性移行（すなわち、中性脂質およびカチオン性脂質を含むリポソーム）、エレクトロポレーション、直接注射、細胞融合、粒子爆撃、リン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介性移行、およびウイルスベクター媒介性移行を含む。外因性分子はまた、内因性分子と同じ種類の分子であってもよいが、細胞の由来となるものとは異なる種に由来する。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに元々由来する細胞株に導入されてもよい。

【0115】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発達段階において特定の細胞内に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体もしくは他のオルガネラのゲノム、または天然に存在するエピソーム核酸を含み得る。追加の内因性分子として、タンパク質、例えば、転写因子および酵素を挙げることができる。

【0116】

本明細書で使用される場合、「外因性核酸の産物」という用語は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド産物、例えば、転写産物（RNAなどのポリヌクレオチド）および翻訳産物（ポリペプチド）の両方を含む。

【0117】

「異種」という用語は、それが比較されるエンティティの残りとは遺伝子型が異なるエンティティ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に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドで

10

20

30

40

50

ある。そのネイティブなコード配列から取り出され、天然では連結しているものが見出されないコード配列に作動的に連結されたプロモーターは、異種プロモーターである。したがって、例えば、異種遺伝子産物をコードする異種核酸配列を含む r A A V は、天然に存在する野生型 A A V には通常含まれないポリヌクレオチドを含む r A A V であり、コードされる異種遺伝子産物は、天然に存在する野生型 A A V によって通常はコードされない遺伝子産物である。

【0118】

「融合物」、「融合された」分子という用語、またはその変化形は、2つ以上のサブユニット分子が連結され、好ましくは共有結合的に連結された分子を指す。サブユニット分子は、同じ化学型の分子であってもよく、異なる化学型の分子であってもよい。融合分子の例としては、限定されないが、融合タンパク質（例えば、タンパク質 D N A 結合ドメインと切断ドメインとの間の融合）、切断ドメインと作動可能に会合するポリヌクレオチド D N A 結合ドメイン（例えば、s g R N A）との間の融合、および融合核酸（例えば、融合タンパク質をコードする核酸）が挙げられる。

10

【0119】

細胞における融合タンパク質の発現は、融合タンパク質を細胞に送達すること、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを細胞に送達することによってもたらされてもよく、ポリヌクレオチドは転写され、転写産物は翻訳され、融合タンパク質を生成する。トランススプライシング、ポリペプチド切断、およびポリペプチドライゲーションは、細胞におけるタンパク質の発現にも関与し得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを細胞に送達するための方法は、本開示の他箇所に提示されている。

20

【0120】

「遺伝子」は、本開示の目的のために、遺伝子産物をコードする D N A 領域（以下を参照）、ならびに調節配列がコード配列および／または転写配列に隣接しているか否かにかかわらず、遺伝子産物の産生を調節する全ての D N A 領域を含む。したがって、遺伝子としては、必ずしも限定されないが、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位および内部リボソーム侵入部位などの翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界要素、複製起点、マトリックス結合部位および遺伝子座制御領域が挙げられる。

【0121】

「遺伝子発現」は、遺伝子に含まれる情報を遺伝子産物に変換することを指す。遺伝子産物は、遺伝子（例えば、m R N A、t R N A、r R N A、アンチセンス R N A、リボザイム、構造 R N A、または任意の他の種類の R N A）または m R N A の翻訳によって産生されるタンパク質の直接転写産物であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集などのプロセスによって改変される R N A、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、A D P - リボシル化、ミリスチル化、およびグリコシル化によって改変されるタンパク質も含まれる。

30

【0122】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の活性の変化を指す。発現の調節には、限定されないが、遺伝子活性化および遺伝子抑制が含まれ得る。ゲノム編集（例えば、切断、改変、不活性化、ランダム変異）を使用して、発現を調節することができる。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載の Z F P、T A L E または C R I S P R / C a s 系を含まない細胞と比較した、遺伝子発現の任意の減少を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的であっても完全であってもよい。

40

【0123】

「目的の領域」は、例えば、外因性分子に結合することが望ましい、遺伝子内または遺伝子に隣接する遺伝子または非コード配列などの細胞クロマチンの任意の領域である。結合は、標的化 D N A 切断および／または標的化組換えの目的のためであり得る。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、オルガネラゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染ウイルスゲノムに存在することができる。目的の領域は、遺伝子のコード

50

領域内、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内にあり得る。目的の領域は、単一のヌクレオチド対または最大2,000ヌクレオチド対の長さ、または任意の整数値のヌクレオチド対と同じくらい小さくてもよい。

【0124】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、アッセイにおいて容易に測定されるタンパク質産物（「レポータータンパク質」）を産生する任意の配列を指す。このアッセイは、必ずしも日常の手順ではない。好適なレポーター遺伝子としては、限定されないが、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G418耐性、ピュロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色タンパク質もしくは蛍光タンパク質もしくは発光タンパク質をコードする配列（例えば、緑色蛍光タンパク質、強化緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）、および増強された細胞成長および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）が挙げられる。エピトープタグには、例えば、FLAG、His、Myc、Tap、HA、または任意の検出可能なアミノ酸配列の1つ以上のコピーが含まれる。「発現タグ」は、目的の遺伝子の発現を監視するために所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列を含む。

10

【0125】

「真核生物」細胞としては、限定されないが、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、および幹細胞（多能性および複能性）を含むヒト細胞（例えば、T細胞）が挙げられる。

20

【0126】

「バーコード」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の配列を有する固有のオリゴヌクレオチド配列（例えば、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、50、75、100ヌクレオチド）を指し、これは、それが組み込まれる核酸配列を特定する手段として使用される。バーコードは、ライブラリ中の個々のメンバー（例えば、バリエーション）を区別または特定するための手段として使用される。

【0127】

「作動性連結」および「作動可能に連結された」（または「操作可能に連結された」という用語は、2つ以上の構成要素（配列要素など）の並置に関して互換的に使用され、構成要素は、両方の構成要素が正常に機能し、構成要素のうちの少なくとも1つが、他の構成要素のうちの少なくとも1つに及ぼされる機能を媒介することができる可能性を可能にするように配置される。例示として、転写調節配列が1つ以上の転写調節因子の存在または非存在に応答してコード配列の転写レベルを制御する場合、プロモーターなどの転写調節配列は、コード配列に作動可能に連結されている。転写調節配列は、一般に、コード配列とcisで作動可能に連結されているが、コード配列に直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、コード配列が連続していないにもかかわらず、コード配列に作動可能に連結された転写調節配列である。

30

【0128】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能性断片」は、配列が全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を保持するタンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能性断片は、対応する天然分子よりも多く、より少なく、または同じ数の残基を有することができる、および／または1つ以上のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含有することができる。核酸またはタンパク質の機能（例えば、コード機能、別の核酸へのハイブリダイゼーション能力、酵素活性アッセイ）を決定するための方法は、当該技術分野で周知である。

40

【0129】

ポリヌクレオチド「ベクター」または「構築物」は、遺伝子配列を標的細胞に転写することができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、「発現構築物」、「発現カセット」、および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指示すること

50

が可能であり、遺伝子配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニング、および発現ベヒクル、ならびに統合ベクターを含む。

【0130】

「対象」および「患者」という用語は、互換的に使用され、限定されないが、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびにウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、および他の動物などの実験動物を含む哺乳動物を指す。したがって、本明細書で使用される「対象」または「患者」という用語は、本発明の発現カセットが投与され得る任意の哺乳動物患者または対象を意味する。本発明の対象には、障害を有するものが含まれる。

【0131】

本明細書で使用される「治療すること」および「治療」という用語は、症状の重症度および／または頻度の低下、症状および／または根本原因の排除、症状の発生および／またはそれらの根本原因の予防、ならびに損傷の改善または是正を指す。がん、単一遺伝子疾患および移植片対宿主疾患は、本明細書に記載の組成物および方法を使用して治療され得る状態の非限定的な例である。

【0132】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、有益な臨床結果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することができる。本開示の目的のために、有効量の化合物（例えば、感染性 r A A V ビリオン）は、特定の疾患状態（例えば、筋肉疾患）（および／またはその特定の疾患状態と関連付けられる症状）の進行を軽減、緩和、安定化、逆転、防止、減速、または遅延するのに十分な量である。したがって、感染性 r A A V ビリオンの有効量は、異種核酸を個体の標的細胞（単数または複数）に効果的に送達することができる感染性 r A A V ビリオンの量である。有効量は、当該技術分野において十分に理解されている技術、例えば、R T - P C R、ウエスタンブロッティング、E L I S A、蛍光法、または他のレポーター読出しなどを用いて異種核酸配列によってコードされる遺伝子産物（R N A、タンパク質）を細胞または組織中で検出することによって、前臨床で決定され得る。有効量は、本明細書に記載されているように、また、当該技術分野で既知であるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、6分間の歩行テスト、左室駆出率、ハンドヘルドダイナモメーターによる測定、V i g n o s S c a l e などを使用して、例えば、疾患の発症または進行の変化を検出することによって、臨床的に決定され得る。

【0133】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主に D N A、およびヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大部分は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、ヒストン H 2 A、H 2 B、H 3 および H 4 のそれぞれ 2 つを含む八量体と会合したおよそ 150 塩基対の D N A を含み、（生物に応じて可変長の）リンカー D N A は、ヌクレオソームコア間に延びている。ヒストン H 1 の分子は、一般に、リンカー D N A と会合する。本開示の目的のために、「クロマチン」という用語は、原核生物および真核生物の両方の全ての種類の細胞性核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンには、染色体クロマチンとエピソームクロマチンの両方が含まれる。

【0134】

「ウイルスゲノム」という用語は、核酸のウイルスカプシドへのパッケージングを媒介する c i s 作用核酸配列に隣接する核酸配列を指す。A A V およびパルボウイルスについては、例えば、ウイルスゲノムの 5' 末端および 3' 末端に位置する「反転末端反復」（I T R）が、この機能を有し、I T R が、異種、例えば、非野生型ウイルスゲノムのウイルスカプシドへのパッケージングを媒介することができることが知られている。

【0135】

「要素」という用語は、何かの別個のまたは固有の部分、例えば、より長い核酸配列内の別個の機能を有する核酸配列を指す。「調節要素」および「発現制御要素」という用語は

10

20

30

40

50

、本明細書において互換的に使用され、特定の宿主生物における操作可能に連結されたコード配列の発現に影響を及ぼし得る核酸分子を指す。これらの用語は、プロモーター、RNAポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコア要素、上流要素、エンハンサー、および応答要素を含む、転写を促進または調節する全ての要素を広く含むために使用される（例えば、Lewin, “Genes V” (Oxford University Press, Oxford) pages 847–873を参照されたい）。原核生物における例示的な調節要素としては、プロモーター、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞で使用される調節要素には、コード配列の発現および／または宿主細胞におけるコードされたポリペプチドの産生を提供および／または調節する、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル、内部リボソーム進入要素（IRES）、2A配列などのような、転写および翻訳制御配列が含まれ得るが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0136】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに実質的に類似した配列を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチドの場合、バリエーションは、参照ポリヌクレオチドと比較して、5'末端、3'末端、および／または1つ以上の内部部位における1つ以上のヌクレオチドの欠失、置換、付加を有し得る。バリエーションと参照ポリヌクレオチドとの間の配列の類似性および／または差異は、当該技術分野で知られている従来の技術、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション技術を使用して検出することができる。バリエーションポリヌクレオチドには、例えば、部位特異的変異誘発を使用して生成されるものなどの合成由来のポリヌクレオチドも含まれる。一般に、DNAを含むが、これらに限定されないポリヌクレオチドのバリエーションは、当業者によって知られている配列アラインメントプログラムによって決定される場合、参照ポリヌクレオチドに対して、少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはそれより大きい配列同一性を有し得る。ポリペプチドの場合、バリエーションは、参照ポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し得る。バリエーションと参照ポリペプチドとの間の配列の類似性および／または差異は、当該技術分野で知られている従来の技術、例えば、ウエスタンブロットを使用して検出することができる。一般に、ポリペプチドのバリエーションは、当業者によって知られている配列アラインメントプログラムによって決定される場合、参照ポリペプチドに対して、少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、またはそれより大きい配列同一性を有し得る。いくつかの場合において、「バリエーション」という用語はまた、バリエーションカプシド配列を含むAAVを説明するために用いられ得る。

【0137】

「AAV」または「アデノ随伴ウイルス」という用語は、ウイルスのParvoviridae属内のDependoparvovirusを指す。例えば、AAVは、天然に存在する「野生型」ウイルス由来のAAV、天然に存在するキャップ遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質由来のカプシドにパッケージングされるrAAV由来のAAV、および／または非天然のカプシドキャップ遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質由来のカプシドにパッケージングされるrAAVゲノムであり得る。本明細書の開示の目的のために、「AAV」という用語は、アデノ随伴ウイルスの略称であり、限定されないが、ウイルス自体およびその誘導体を含む。別途示されない限り、この用語は、全てのサブタイプまたは血清型ならびに複製コンピテント形態および組換え形態の両方を指す。「AAV」という用語は、限定されないが、AAV1型（AAV-1またはAAV1）、AAV2型（AAV-2またはAAV2）、AAV3A型（AAV-3AまたはAAV

3 A)、AAV3B型(AAV-3BまたはAAV3B)、AAV4型(AAV-4またはAAV4)、AAV5型(AAV-5またはAAV5)、AAV6型(AAV-6またはAAV6)、AAV7型(AAV-7またはAAV7)、AAV8型(AAV-8またはAAV8)、AAV9型(AAV-9またはAAV9)、AAV10型(AAV-10またはAAV10またはAAVrh10)、鳥AAV、ウシAAV、イヌAAV、ヤギAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVを含む。「霊長類AAV」は、霊長類に感染するAAVを指し、「非霊長類AAV」は、非霊長類哺乳動物に感染するAAVを指し、「ウシAAV」は、ウシ哺乳動物に感染するAAVを指すなど。

【0138】

種々の血清型のAAVのゲノム配列、ならびにネイティブ末端反復(TR)、Repタンパク質、およびカプシドサブユニットの配列が、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献中にまたはGenBankなどの公的データベース中に見出され得る。例えば、GenBank受託番号NC_002077.1(AAV1)、AF063497.1(AAV1)、NC_001401.2(AAV2)、AF043303.1(AAV2)、J01901.1(AAV2)、U48704.1(AAV3A)、NC_001729.1(AAV3A)、AF028705.1(AAV3B)、NC_001829.1(AAV4)、U89790.1(AAV4)、NC_006152.1(AA5)、AF085716.1(AAV-5)、AF028704.1(AAV6)、NC_006260.1(AAV7)、AF513851.1(AAV7)、AF513852.1(AAV8) NC_006261.1(AAV-8)、AY530579.1(AAV9)、AAT46337(AAV10)およびAAO88208(AAVrh10)を参照されたい。これらの開示内容は、AAV核酸およびアミノ酸配列の教示について本明細書に組み込まれている。また、例えば、Srivistava et al. (1983) J. Virology 45:555、Morini et al. (1998) J. Virology 71:6823、Chiorini et al. (1999) J. Virology 73:1309、Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73:939、Xiao et al. (1999) J. Virology 73:3994、Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208、Shade et al. (1986) J. Virology 58:921、Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:11854、Moris et al. (2004) Virology 33:375-383、国際特許公開第00/28061号、同第99/61601号、同第98/11244号、および米国特許第6,156,303号を参照されたい。

【0139】

「rAAV」という用語は、「組換えAAV」を指す。いくつかの実施形態において、組換えAAVは、rep遺伝子およびcap遺伝子の一部または全てが異種配列で置き換えられたAAVゲノムを有する。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、ヌクレアーゼ系、標的細胞に送達されるRNAi剤またはCRISPR剤など）を含む場合、典型的には、「組換えAAV(rAAV)ビリオン」または「rAAVウイルス粒子」と称される。一般に、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも1つ、通常は2つのAAV逆位末端反復配列(ITR)が隣接している。

【0140】

「キャップ遺伝子」または「カプシド遺伝子」という用語は、ウイルスのカプシドまたはタンパク質シェルを形成するか、または形成に寄与するカプシドタンパク質をコードする核酸配列を指す。AAVの場合、カプシドタンパク質は、VP1、VP2、またはVP3であってもよい。他のパルボウイルスに関しては、カプシドタンパク質の名称および数は異なる場合がある。

10

20

30

40

50

【0141】

「rep 遺伝子」という用語は、ウイルスの複製および産生に必要な非構造タンパク質 (rep 78、rep 68、rep 52 および rep 40) をコードする核酸配列を指す。

【0142】

「パッケージング」という用語は、AAV 粒子の組み立ておよびカプシド化を引き起こす一連の細胞内事象を指す。AAV 「rep」および「cap」遺伝子は、アデノ随伴ウイルスの複製およびカプシド化タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。AAV rep および cap は、本明細書では AAV 「パッケージング遺伝子」と称される。

【0143】

AAV の「ヘルパーウイルス」という用語は、AAV (例えば、野生型 AAV) が哺乳類細胞によって複製およびパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクシニアなどのポックスウイルスを含む、様々なそのような AAV のヘルパーウイルスが当該技術分野で既知である。アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含するが、サブグループ C のアデノウイルス 5 型が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳類、および鳥類起源の多数のアデノウイルスが知られており、ATCC などの受託者から入手可能である。ヘルペスファミリーのウイルスは、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) およびエプスタイン・バーウイルス (EBV)、ならびにサイトメガロウイルス (CMV) および仮性狂犬病ウイルス (PRV) を含み、これらもまた ATCC などの受託者から入手可能である。

【0144】

「ヘルパーウイルス機能」という用語は、(本明細書に記載の複製およびパッケージングについての他の要件と併せて) AAV 複製およびパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにおいてコードされる機能を指す。本明細書に記載される場合、「ヘルパーウイルス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、または例えば、必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列を、プロデューサー細胞に trans で提供することによるものを含む、いくつか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タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドまたは他の発現ベクターは、rAAV ベクターと共にプロデューサー細胞にトランスフェクトされる。

【0145】

「感染性」ウイルスまたはウイルス粒子という用語は、コンピテントに組み立てられたウイルスカプシドを含み、かつそのウイルス種が向性である細胞にポリヌクレオチド成分を送達することができるものである。この用語は、必ずしもウイルスの任意の複製能力を暗示するものではない。感染性ウイルス粒子を計数するためのアッセイは、本開示の別の箇所および当該技術分野において説明されている。ウイルス感染性は、全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比率として表すことができる。全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比率を決定する方法は、当該技術分野において既知である。例えば、Granger et al. (2005) Mol. Ther. 11: S337 (TCID 50 感染力価アッセイを記載する)、および Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6: 973 を参照されたい。

【0146】

本明細書で使用される「向性」という用語は、特定の宿主種の細胞または宿主種内の特定の細胞型のウイルス (例えば、AAV) による優先的な標的化を指す。例えば、心臓、肺、肝臓、および筋肉の細胞に感染することができるウイルスは、肺細胞および筋肉細胞のみに感染することができるウイルスと比較して、より広い (すなわち、増大した) 向性を有する。向性はまた、宿主の特定の種類の細胞表面分子に対するウイルスの依存性を含み得る。例えば、ウイルスの中には、表面グリコサミノグリカンを含む細胞のみに感染することができるものがあり、一方、他のウイルスは、シアル酸を含む細胞のみに感染することができる (そのような依存性は、ウイルス感染の可能性のある宿主細胞として特定の種類の分子を欠く様々な細胞株を用いて試験することができる)。いくつかの場合において、ウイルスの向性は、ウイルスの相対的選好を記述するものである。例えば、第 1 の

10

20

30

40

50

ウイルスは、全ての細胞型に感染することができ得るが、表面グリコサミノグリカンをも有する細胞を感染させる点で、はるかに大きな成功を収める。第2のウイルスも同じ特徴を好む場合（例えば、第2のウイルスも、表面グリコサミノグリカンをも有する細胞を感染させる点で、より大きな成功を収める場合）、絶対的な形質導入効率は類似していないとしても、第2のウイルスは第1のウイルスと類似の（または同一の）向性を有するとみなすことができる。例えば、第2のウイルスは、試験した全ての所与の細胞型を感染させる際に、第1のウイルスよりも効率的である可能性があるが、相対的選好が類似している（または同一である）場合、第2のウイルスは、依然として第1のウイルスと類似の（または同一の）向性を有するとみなすことができる。いくつかの実施形態において、主題のバリエーションAAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に存在するビリオンと比べて改変されていない。いくつかの実施形態において、主題のバリエーションAAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に存在するビリオンと比べて拡大されている（すなわち、広げられている）。いくつかの実施形態において、主題のバリエーションAAVカプシドタンパク質を含むビリオンの向性は、天然に存在するビリオンと比べて減少している。

10

20

30

【0147】

「複製コンピテント」ウイルス（例えば、複製コンピテントAAV）という用語は、感染性であり、かつ感染細胞内で（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な表現型的に野生型のウイルスを指す。AAVの場合、複製コンピテンスは、一般に、機能性AAVパッケージング遺伝子の存在を必要とする。一般に、本明細書に記載のrAAVベクターは、1つ以上のAAVパッケージング遺伝子が欠損しているため、哺乳動物細胞（特にヒト細胞）において複製非コンピテントである。典型的には、そのようなrAAVベクターは、AAVパッケージング遺伝子と入ってくるrAAVベクターとの間の組換えによって複製コンピテントAAVが生成される可能性を最小限に抑えるために、任意のAAVパッケージング遺伝子配列を欠損している。多くの実施形態において、本明細書に記載のrAAVベクター調製物は、ごくわずかであれば、複製コンピテントAAV（rcAAV、RCAとも称される）を含有するものである（例えば、102個のrAAV粒子当たり約1個未満のrcAAV、104個のrAAV粒子当たり約1個未満のrcAAV、10個のrAAV粒子当たり約1個未満のrcAAV、1012個のrAAV粒子当たり約1個未満のrcAAV、またはrcAAVを含まない）。

【0148】

「ライブラリ」は、直鎖核酸、プラスミド、ウイルス粒子、またはウイルスベクターなどの多重性の形態であってもよい。ライブラリは、少なくとも2つの核酸、プラスミド、ウイルス粒子、ウイルスベクターなどを含む。

【0149】

AAVバリエーションのライブラリ

一態様において、本明細書に開示される主題は、天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドタンパク質をコードするライブラリの開発に関する。したがって、天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドを開発するために使用されるAAVバリエーションのライブラリが本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、天然のAAV血清型と比較して、細胞または組織の向性の増強である。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、既存の宿主抗体応答の回避である。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、宿主応答を誘発しないように低下した免疫原性である。

40

【0150】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイ

50

レント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上と、を含む。

【0151】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの2つ以上と、を含む。

【0152】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの3つ以上と、を含む。

【0153】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0154】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上と、を含む。

【0155】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの2つ以上と、を含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、および e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの3つ以上と、を含む。

【0157】

いくつかの実施形態において、本開示のライブラリの各メンバーは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含む AAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の a) の AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e)

10

20

30

40

50

レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0158】

いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、局在化シグナルをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、局在化シグナルをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、バーコードを含む核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、2つ以上のバーコードを含む核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、レポータータンパク質をコードする核酸を含む。

【0159】

上の実施形態のいずれかにおいて、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子上に存在する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、単一の核酸分子上に存在する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む。

10

20

【0160】

いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8およびAAV9に由来する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションカプシドタンパク質は、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39およびAAVrh74を含むがこれらに限定されない、あまり特性決定されていないAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションのライブラリは、単一のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションのライブラリは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質は、個々の血清型ライブラリが開発されると、組み合わせられる。いくつかの実施形態において、コンビナトリアルライブラリは、同じプール中の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型由来のAAVカプシドタンパク質をコードする核酸を改変することによって生成される。

30

【0161】

いくつかの実施形態において、変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、カプシドタンパク質中の露出ループをコードするDNA配列に導入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAVカプシド中の露出ループ（例えば、超可変領域）に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、HILループは標的化（変異）され、一方、他の実施形態において、DELループは標的化（変異）される。いくつかの実施形態において、変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、両方のループにおいて行われる。さらなる実施形態において、変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、VR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIおよび／またはVR-IXを含む）表面ループのVR領域に導入される。さらに他の実施形態において、変異（例え

40

50

ば、挿入、欠失および／または置換）は、VR-I、VR-VIIIIおよび／またはVR-IVにおいて行われる。いくつかの実施形態において、変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、AAVカプシドタンパク質VP1、VP2、もしくはVP3に、または任意の組み合わせでのカプシドタンパク質のうちの2つに、または3つ全てに導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP1に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP2に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP3に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP1およびVP2に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP1およびVP3に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP2およびVP3に導入される。いくつかの実施形態において、変異は、VP1、VP2およびVP3に導入される。いくつかの実施形態において、単一の変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、カプシドタンパク質をコードする遺伝子中の単一の部位に導入され、一方、他の実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、10、20、30、40、50、100個より多いか、またはそれより多い（1～100の間の任意の数字、またはそれより多くを含む）変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、カプシドタンパク質をコードする遺伝子に導入される。

10

【0162】

いくつかの例示的な実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質の可変領域VR-I、VR-IV、またはVR-VIIIIに導入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質の位置450～600の間の位置に導入される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV1に対応する場合、ペプチドは、位置590に導入される。いくつかの実施形態において、AAV6カプシドが改変されている場合、ペプチドは、位置454または590に導入される。いくつかの実施形態において、AAV2カプシドが改変されている場合、ペプチドは、位置588に導入される。いくつかの実施形態において、AAV3Bカプシドが使用される場合、ペプチドは、位置589に導入される。いくつかの実施形態において、AAV5カプシドが使用される場合、ペプチドは、位置578に導入される。いくつかの実施形態において、AAV8カプシドが使用される場合、ペプチドは、位置591に導入される。いくつかの実施形態において、AAV9カプシドが使用される場合、ペプチドは、位置266、455、および／または589に導入される。カプシドタンパク質中の他の部位が、挿入のために選択されてもよいことが理解される。

20

30

【0163】

本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号71のアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0164】

本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される。本明細書に開示されるAAVライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配

50

列を含むペプチドは、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 4 に挿入される。本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 1 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される。本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 6 8 ~ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質の位置 4 5 4 に挿入されたペプチドは、配列番号 1 9 ~ 配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 9 0 に挿入されたペプチドは、配列番号 1 9 ~ 配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0165】

本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 1 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される。本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 6 8 ~ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 8 に挿入されたペプチドは、配列番号 9 0 ~ 配列番号 1 1 0 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 8 に挿入されたペプチドは、配列番号 9 5、配列番号 9 4、配列番号 9 6、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 6、配列番号 9 1 および配列番号 1 0 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 8 に挿入されたペプチドは、配列番号 4 ~ 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0166】

本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 1 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される。本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 6 8 ~ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 9 に挿入されたペプチドは、配列番号 7 6 ~ 8 5 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 9 に挿入されたペプチドは、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質の位置 5 8 9 に挿入されたペプチドは、配列番号 8 ~ 配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

40

【0167】

本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 1 ~ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される。本明細書に開示される A A V ライブラリのいくつかの実施形態において、配列番号 6 8 ~ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入

50

10

20

30

40

50

【0170】

いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いアミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、7アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、10アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、15アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、PCRによる挿入部位の3'であるカプシド遺伝子の断片の増幅中に導入される。したがって、いくつかの実施形態において、カプシド遺伝子は、PCRを使用して多様化される。いくつかの実施形態において、導入された配列は、挿入部位の3'であるカプシド遺伝子の断片の増幅中に導入される。

10

【0171】

いくつかの実施形態において、サイレント変異は、全てのカプシド血清型遺伝子が隣接領域中に同じヌクレオチド配列を有するようにペプチドが導入された配列に隣接するカプシド遺伝子の領域に導入される。隣接領域は、ペプチド挿入部位のいずれかの側に10個以上、20個以上、30個以上、40個以上、50個以上、100個以上、150個以上、または200個以上のヌクレオチドを含み得る。このようにして、全ての血清型ライブラリについて、同じプライマー配列をPCR増幅および次世代配列決定(NGS)に使用することができる。これにより、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれよりも多くの血清型に基づくライブラリのより迅速なスクリーニングが可能になる。いくつかの実施形態において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれよりも多くのサイレント変異を導入して、隣接配列を2個の共通配列(1つは多様化領域の5'末端であり、1つは多様化領域の3'末端である)とアラインメントさせる。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV1に対応する場合、サイレント変異は、位置571、612、617のうちの1つ以上に導入される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV2に対応する場合、サイレント変異は、位置568、569、572、573、574、610、611、613、615、616、および617のうちの1つ以上に導入される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV3Bに対応する場合、サイレント変異は、位置569、570、571、573、574、575、612、614、615、および616のうちの1つ以上に導入される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV8に対応する場合、サイレント変異は、位置573、575、576、577、614、および619のうちの1つ以上に導入される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質がAAV9に対応する場合、サイレント変異は、位置571、572、573、574、575、611、612、615、616、および617のうちの1つ以上に導入される。カプシドタンパク質中の他の部位が、挿入のために選択されてもよいことが理解される。

20

30

【0172】

いくつかの実施形態において、ライブラリ中の各AAVバリエーションのペイロードまたはゲノムは、レポーター遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、レポーターによってコードされるタンパク質は、蛍光性である。例示的な非限定的なレポーター遺伝子としては、EGFP、mCherry、mClover3およびmRuby3が挙げられる。他の例示的な非限定的なレポーター遺伝子としては、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼが挙げられる。

40

【0173】

いくつかの実施形態において、カプシド遺伝子およびレポーター遺伝子は、別個のプロモーターの制御下にある。いくつかの実施形態において、カプシド遺伝子およびレポーター遺伝子は、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。

【0174】

いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、細胞型および／または組織特異的プ

50

ロモーターによって制御される。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、細胞型特異的RNAポリメラーゼIIプロモーターに作動可能に連結されている。例示的な細胞型および／または組織特異的プロモーターとしては、ニューロン内でのみ発現されるヒトシナプシンプロモーター（hSyn1）、または肝細胞内で発現されるトランスサイレチンプロモーター（TTR）が挙げられる。本発明の方法および組成物に使用するための他の非限定的な細胞型および／または組織特異的プロモーターとしては、サイトケラチン18および19（上皮細胞特異的、Zhen g and Baum（2008）Methods Mol Biol 434:205-219）、Unc45bまたはUnc-45ミオシンシャペロンB（筋肉特異的、Rudeck et al（2016）Genesis 54（8）:431-8）、心臓トロポニンT（cTnT）（心筋細胞特異的、Ma et al（2004）Am J Physiol Cell Physiol 286（3）:556-64）、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）（アストロサイト特異的、Lee et al（2008）Glia 56（5）:481-93）、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）（オリゴデンドロサイト特異的、Wei et al（2003）Gene 313:161-7）、メチルCpG結合タンパク質2（Mecp2）（ニューロン特異的、Adachi et al（2005）Hum Mol Genetics 14（23）:3709-22）、および他の脳または眼特異的rAAV適合性MiniPromoters（Leu w et al（2016）Molecular Brain 9（1）:52）が挙げられる。

10

20

【0175】

いくつかの実施形態において、ライブラリ中の各AAVバリエーションのペイロードまたはゲノムは、局在化シグナルをコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、局在化シグナルをコードする核酸に融合される。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、レポーターのオルガネラへの移動を増加させるためにドメインに融合される。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、レポーターの核内への移動を増加させるためにドメインに融合される。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子は、核局在化シグナル（NLS）（例えば、SV40大型T抗原核局在化シグナル）をコードする核酸に融合される。NLSの非限定的な例としては、以下に由来するNLS配列が挙げられる。SV40ウイルス大型T抗原のNLS、ヌクレオプラスミン由来のNLS、c-myc NLS、hRNPA1 M9 NLS、インポーチン-アルファ由来のIBBドメイン、筋腫タンパク質NLS、ヒトp53 NLS、マウスc-ab1 IV NLS、インフルエンザウイルスNS1 NLS、肝炎ウイルスデルタ抗原NLS、マウスMx1タンパク質NLS、ヒトポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼNLS、およびステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドNLS。他のNLSは、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、核エンベロップに局在化するタンパク質（例えば、KASHドメイン）に融合されている。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、ヒストン結合ドメイン（例えば、ヒストン2B結合ドメイン、H2B）に融合されている。他の非限定的なヒストンとしては、H1、H2A、H3、およびH4ファミリーのヒストンが挙げられる。レポーター遺伝子へのN末端融合物およびC末端融合物の両方が、核局在化を補助することが理解される。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、1つより多い局在化シグナルに融合されている。いくつかの実施形態において、複数の局在化シグナルは、タンデムである。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、そのN末端で1つ以上の局在化シグナルに融合され、そのC末端で1つ以上の局在化シグナルに融合されている。

30

40

【0176】

いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸を、ライブラリ中の各AAVバリエーションのペイロードまたはゲノムに付加する。いくつかの実施形態において、バーコードは

50

、バリエーションカプシドタンパク質に導入されるペプチドに生体情報的に連結されている。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドをコードするバリエーションDNA配列を含むDNA配列は、ランダムなバーコードまたは指定のバーコードをさらに含むように合成される。バーコードは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、またはそれ以上のヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸は、配列番号111～154または155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸は、配列番号111～154の配列から選択される。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸は、配列番号155～198から選択される。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸は、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸は、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。合成されたDNAはまた、ギブソンアセンブリによる分子クローニングに使用される制限部位および／または核酸配列を含んでもよい。いくつかの実施形態において、配列決定された転写産物がmRNAに由来し、ベクターゲノムDNAに由来しないことを確認するために、イントロンが発現カセットに含まれる。さらなる実施形態において、AAVペイロードまたはゲノムは、ギブソンアセンブリを介してアセンブリされ、カプシド遺伝子の3'末端は、挿入部位でランダムまたは特定の挿入配列に連結され、バーコードは、ポリA配列および5' ITRに連結されている。いくつかの実施形態において、ILLUMINA（登録商標）配列決定（または任意の他の配列決定技術）は、2つのランダム配列を生体情報的に連結するために、カプシド遺伝子内のバーコードおよび挿入された可変領域にわたって実行される。さらなる実施形態において、レポーター構築物、レポーター特異的プロモーター、カプシド特異的プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端をアセンブリし、最終的なペイロード構築物を作製する。いくつかの実施形態において、cap遺伝子に対する発現カセットは、センス方向である。

10

20

30

40

50

【0177】

いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、1つより多いバーコードを含む核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、各々がバーコード配列を含む2つ以上の核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている。いくつかの実施形態において、第1のバーコード配列を含む第1の核酸は、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコード配列は、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第2のバーコード配列を含む第2の核酸は、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のバーコード配列を含む第2の核酸は、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーター（例えば、U6プロモーター、H1プロモーター、および7SKプロモーターの群から選択されるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターは、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA

P o l I I I プロモーター（例えば、ヒトシナプシンプロモーター（h S y n 1）、トランスサイレチンプロモーター（T T R）、サイトケラチン18、サイトケラチン19、u n c - 4 5 ミオシンシャペロンB（u n c 4 5 b）プロモーター、心筋型トロポニンT（c T n T）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（G F A P）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（M B P）プロモーター、およびメチルC p G結合タンパク質2（M e c p 2）プロモーターの群から選択されるプロモーター）である。

【0178】

いくつかの実施形態において、ランダムに生成されたか、または指定されたバーコードと、ランダムに生成されたか、または指定されたカプシドバリエーション領域と、ギブソンアセンブリに使用される2つの領域とを含む短いDNA片を合成する。次に、多様化領域のカプシド配列3'を増幅する。さらなる実施形態において、5' I T RおよびポリAデニル化配列が5'末端でバーコードに融合され、第2のギブソンアセンブリ領域が、カプシド遺伝子の3'末端と、カプシド遺伝子のためのポリAシグナルと、3' I T Rとに融合されるギブソンアセンブリ反応が行われる。さらなる実施形態において、バーコードおよびバリエーションカプシド配列にわたってI L L U M I N A（登録商標）配列決定が実施される。さらなる実施形態において、制限酵素による消化が行われる。さらなる実施形態において、レポーター、局在化シグナル、プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端が調製されるP C R増幅ステップ。あるいは、レポーター、局在化シグナル、プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端を含む断片は、ドナープラスミド中で予め組み立てられ、B s a Iで消化され、ゲル精製されてもよい。さらなる実施形態において、ゴールドエンゲートクローニングステップを実行して、最終構築物を作成する。

10

20

【0179】

いくつかの実施形態において、2つのDNA断片が合成される。断片Aは、ギブソンアセンブリ領域1番と、制限酵素部位と、可変カプシド領域と、P C Rプライマーとして使用されるカプシド遺伝子に相同な領域とを含む。断片Bは、ギブソンアセンブリ領域2番と、ランダムバーコードと、制限酵素部位と、可変カプシド領域と、ギブソンアセンブリ領域1番とを含む。次に、ステップ1で合成した断片AをP C Rプライマーとして使用してカプシド遺伝子の3'配列が増幅されるP C R手順を行う。さらなる実施形態において、ギブソンアセンブリによって中間体A A V構築物を生成し、ここで、この構築物は、5'から3'への順序で、5' I T Rと、S V 4 0ポリAシグナルと、バーコードと、2つの制限エンドヌクレアーゼ部位と、バリエーションカプシド配列と、カプシドタンパク質の3'領域と、カプシド発現構築物のためのポリA配列と、3' I T Rとを含む。さらなる実施形態において、バーコードおよびバリエーションカプシド配列にわたってI L L U M I N A（登録商標）配列決定が実施される。さらなる実施形態において、制限酵素による消化が行われる。さらなる実施形態において、レポーター、局在化シグナル、プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端が調製されるP C R増幅ステップが行われる。あるいは、レポーター、局在化シグナル、プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端を含む断片は、ドナープラスミド中で予め組み立てられ、B s a Iで消化され、ゲル精製されてもよい。さらなる実施形態において、ゴールドエンゲートクローニングステップを実行して、最終構築物を作成する。

30

40

【0180】

いくつかの実施形態において、各々の挿入されたペプチドは、（コドン変性に起因して）各々が異なる配列を有する複数の核酸分子によってコードされ得る。各核酸配列は、同じ挿入されたペプチド配列を有する2つ以上のバリエーションが特定されたが、挿入されたペプチドが、異なる核酸配列によってコードされる場合、挿入されたペプチドの性能（例えば、濃縮）を検証することができるように、独自のバーコードに連結されている。

【0181】

いくつかの実施形態において、バーコードは、標準的なクローニング技術によって、レポーター遺伝子、ポリA配列、および5' I T Rに連結されている。さらなる実施形態において、ペプチドをコードするバリエーション配列は、標準的な技術によってカプシド遺伝子に

50

挿入され、次いで特異的プロモーターが付加され、カプシド遺伝子の5'末端が付加される。次いで、ILLUMINA（登録商標）配列決定（または任意の他の高信頼性配列決定技術）を、バーコードおよび挿入されたヌクレオチド配列が配列決定される2つの別個の反応において行う。最後に、長いリード長の配列がバーコードおよび挿入されたヌクレオチド配列を両方とも含むように、OXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定（または任意の他の長いリード配列決定技術、例えば、PACBIO（登録商標）SMRT配列決定）が行われる。

【0182】

いくつかの実施形態において、各バーコードを、カプシド遺伝子が挿入された各ヌクレオチド配列に連結する「ルックアップ」テーブルが作成される。

【0183】

本開示のライブラリは、102、103、104、105、106、107、または108個、またはもっと多くの固有のAAVバリエーションを含み得る。いくつかの実施形態において、ライブラリは、102～103、103～104、104～105、105～106、106～107、または107～108固有のAAVバリエーションを含み得る。

【0184】

AAVバリエーションの前述のライブラリのいずれかは、本明細書に開示される方法に使用され得る。

【0185】

AAVカプシドバリエーションを特定する方法

本開示は、天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドを開発するための方法および組成物を提供する。これらのカプシドは、例えば、それを必要とする対象の治療のための標的細胞、細胞株、または組織（例えばインビトロまたはインビボでの）ゲノム操作分子および遺伝子療法分子の送達に有用である。いくつかの実施形態において、カプシドは、所望の組織、細胞またはオルガネラにペイロードを送達するために使用される。

【0186】

別の態様において、AAVカプシドタンパク質の指向性進化および天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションの特定のための方法が本明細書に開示される。

【0187】

いくつかの実施形態において、天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法は、(i)細胞、細胞株、または組織を、本明細書に開示されるAAVバリエーションのライブラリのいずれか1つとインビトロまたはインビボで接触させることと、(ii)上述のライブラリ中のAAVバリエーションを、細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、(iii)細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、(iv)所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む。

【0188】

いくつかの実施形態において、天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法は、(i)ペプチドをコードする複数の核酸を、AAVカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に挿入し、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成することと、(ii)上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸を、(a)バーコードを含む核酸、(b)レポータータンパク質をコードする核酸、および(c)局在化シグナルをコードする核酸のうちの1つ以上に連結して、ペイロード構築物を形成することと、(iii)アデノウイルスヘルパーおよびAAV rep機能をtransで提供することによって、プロデューサー細胞中でAAVバリエーションのライブラリを製造することと、(iv)AAVバリエーションのライブラリを精製することと、(v)細胞、細胞株、または組織を、AAVバリエーションのライブラリとインビトロまた

10

20

30

40

50

はインビボで接触させることと、(v i) 標的細胞、細胞株、または組織から A A V バリ
アントを回収することと、(v i i) 所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特
定することと、を含む。

【0189】

いくつかの実施形態において、天然 A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カ
プシドバリエーションを特定する方法は、(i) ペプチドをコードする複数の核酸を、A A V
カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に
挿入し、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成する
ことと、(i i) 上述のライブラリ中の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする
各核酸を、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸
10 酸、および (c) 局在化シグナルをコードする核酸のうちの 2 つ以上に連結して、ペイロ
ード構築物を形成することと、(i i i) アデノウイルスヘルパーおよび A A V r e p
機能を t r a n s で提供することによって、プロデューサー細胞中で A A V バリエーションの
ライブラリを製造することと、(i v) A A V バリエーションのライブラリを精製することと
、(v) 細胞、細胞株、または組織を、A A V バリエーションのライブラリとインビトロまた
はインビボで接触させることと、(v i) 標的細胞、細胞株、または組織から A A V バリ
アントを回収することと、(v i i) 所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特
定することと、を含む。

【0190】

いくつかの実施形態において、天然 A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V カ
プシドバリエーションを特定する方法は、(i) ペプチドをコードする複数の核酸を、A A V
カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に
挿入し、A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成する
ことと、(i i) 上述のライブラリ中の A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする
各核酸を、(a) バーコードを含む核酸、(b) レポータータンパク質をコードする核酸
20 酸、および (c) 局在化シグナルをコードする核酸に連結して、ペイロード構築物を形成
することと、(i i i) アデノウイルスヘルパーおよび A A V r e p 機能を t r a n s
で提供することによって、プロデューサー細胞中で A A V バリエーションのライブラリを製造
することと、(i v) A A V バリエーションのライブラリを精製することと、(v) 細胞、細胞
株、または組織を、A A V バリエーションのライブラリとインビトロまたはインビボで接触
30 させることと、(v i) 標的細胞、細胞株、または組織から A A V バリエーションを回収する
ことと、(v i i) 所望の特徴を有する A A V カプシドバリエーションを特定することと、を
含む。

【0191】

いくつかの実施形態において、天然の A A V 血清型と比較して所望の特徴を有する A A V
カプシドバリエーションを特定するための A A V カプシドタンパク質の指向性進化のためのス
テップは、(i) 各 A A V 血清型について改変されたバリエーションカプシドのライブラリを
作成する、1 つ以上の A A V 血清型由来のカプシドタンパク質中の超可変および／または
表面露出ループへのペプチドの挿入、(i i) アデノウイルスヘルパーおよび A A V r
e p 機能が t r a n s で供給される、プロデューサー細胞中のバリエーション A A V のパッ
40 ケージング、(i i i) ウイルスカプシドライブラリプールの精製、(i v) インビトロまた
はインビボでのプールの投与、(v) 標的組織または細胞株からの A A V バリエーションの
回収、(v i) 操作されたバリエーションカプシド配列の同一性を決定するための次世代配列
決定、(v i i) バリエーションが標的組織または細胞株から単離される、インビトロまたは
インビボでの選択のラウンドの繰り返し、ならびに (v i i i) 濃縮されたバリエーションの
完全な評価を含む。

【0192】

いくつかの実施形態において、所望の特徴は、天然の A A V 血清型と比較して、細胞また
は組織の向性の増強である。これらの方法は、既存の宿主抗体応答を回避する A A V カ
プシドバリエーションの選択、および／または宿主応答を誘発しない A A V バリエーションの開発に
50

も適合し得る。

【0193】

いくつかの実施形態において、例えば、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8およびAAV9由来のカプシドタンパク質が、出発点に選択される。いくつかの実施形態において、あまり特性決定されていないAAV血清型からカプシドタンパク質が選択され、限定されないが、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39およびAAVrh74を含む。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションのライブラリは、単一のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションのライブラリは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質は、個々の血清型ライブラリが開発されると、組み合わせられる。いくつかの実施形態において、コンビナトリアルライブラリは、同じプール中の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、またはそれより多いAAV血清型由来のAAVカプシドタンパク質をコードする核酸を改変することによって生成される。

10

【0194】

いくつかの実施形態において、指向性進化は、AAVカプシドを変異させること（例えば、挿入、欠失、および／または置換）を含む。いくつかの実施形態において、変異（例えば、挿入、欠失および／または置換）は、カプシドタンパク質中の露出ループをコードするDNA配列に導入される。いくつかの実施形態において、指向性進化は、AAVカプシド中の露出ループ（例えば、超可変領域）へのペプチドの挿入を含む。

20

【0195】

いくつかの実施形態において、ライブラリは、ヘルパー機能（例えば、E2A、E4、VA、E1A、およびE1B）がtransで供給されるHEK293細胞内でパッケージングされる。いくつかの実施形態において、AAV rep機能は、rep78、rep68、rep52、およびrep40遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、rep遺伝子は、transで供給される。いくつかの実施形態において、rep78および／またはrep68遺伝子の開始コドンにACGからATGに変化させて、逆方向末端反復（ITR）を含有するカプシドライブラリ構築物の複製を増加させ、それによってAAVライブラリ製造収量を向上させる。いくつかの実施形態において、cap遺伝子は、製造されたAAVにペイロードとして供給される。いくつかの実施形態において、カプシド遺伝子は、p40プロモーターによって制御され、その結果、ヘルパーウイルス機能の存在下で、HEK293細胞での製造中にのみ発現される。

30

【0196】

いくつかの実施形態において、ライブラリは、細胞内で選択される。いくつかの実施形態において、個々の血清型ライブラリを組み合わせ、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれよりも多くの血清型を含む単一のライブラリを生成し、各AAVバリエーションはまた、AAVバリエーションカプシドに挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、単一血清型ライブラリを使用し、その血清型ライブラリ中の各AAVは、AAVバリエーションカプシドに挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、ライブラリで処理され、次いで、細胞の細胞質または目的のオルガネラにおけるレポーター遺伝子の発現について監視される。いくつかの実施形態において、目的のオルガネラは、核である。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子の発現によって証明されるように、AAVペイロードまたはゲノムを含むオルガネラが、細胞から単離される。いくつかの実施形態において、オルガネラは、核である。いくつかの実施形態において、核酸は、オルガネラ（例えば、核）から抽出される。いくつかの実施形態において、抽出される核酸はRNAであり、一方、いくつかの実施形態において、抽出される核酸はDNAである。いくつかの実施形態において、抽出されたR

40

50

N Aを逆転写させてc D N Aを生成し、次いで、バーコード化領域に特異的なプライマーを使用して増幅し、配列決定する。いくつかの実施形態において、抽出されたD N Aは、導入された可変配列に特異的なプライマーを使用して増幅され、配列決定される。いくつかの実施形態において、特定のA A Vバリエーションの濃縮は、細胞における選択の後に観察される。

【0197】

いくつかの実施形態において、使用される細胞としては、限定されないが、C N S、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞が挙げられる。

10

【0198】

いくつかの実施形態において、細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

【0199】

いくつかの実施形態において、ライブラリは、動物において選択される。いくつかの実施形態において、個々の血清型ライブラリを組み合わせ、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれよりも多くの血清型を含む単一のライブラリを生成し、各A A Vはまた、A A Vバリエーションカプシドに挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、単一血清型ライブラリを使用し、その血清型ライブラリ中の各A A Vは、A A Vバリエーションカプシドに挿入されたペプチドを含む。いくつかの実施形態において、動物は、静脈内、頭蓋内、もしくは髄腔内注射を介して、または何らかの他の経路（例えば、鼻腔、肝臓、脳室内、大槽内、硝子体内、蝸牛内など）による注射によってライブラリで治療される。A A Vが所望の組織または臓器に輸送するのに十分な時間（例えば、7、10、14、18、21、24、28、30日以上）の後、動物を安楽死させ、目的の組織／臓器を採取する。いくつかの実施形態において、組織中の細胞は、細胞の細胞質または目的のオルガネラにおけるレポーター遺伝子の発現について監視される。いくつかの実施形態において、目的のオルガネラは、核である。いくつかの実施形態において、レポーター遺伝子の発現によって証明されるように、A A Vペイロードを含むオルガネラが、細胞から単離される。いくつかの実施形態において、オルガネラは、核である。いくつかの実施形態において、核酸は、オルガネラ（例えば、核）から抽出される。いくつかの実施形態において、抽出される核酸はR N Aであり、一方、いくつかの実施形態において、抽出される核酸はD N Aである。いくつかの実施形態において、抽出されたR N Aを逆転写させてc D N Aを生成し、次いで、バーコード化領域に特異的なプライマーを使用して増幅し、配列決定する。いくつかの実施形態において、抽出されたD N Aは、導入された可変配列に特異的なプライマーを使用して増幅され、配列決定される。いくつかの実施形態において、特定のA A Vバリエーションの濃縮は、インビボでの選択の後に観察される。

20

30

【0200】

これらの実施形態のいずれかにおいて、細胞を通じて、またはインビボでのA A Vバリエーションの選択は、1、2、3、4、5またはそれよりも多くのラウンドで行われてもよく、各場合において、前のラウンドから得られたA A Vバリエーションをプールするか、または、細胞内もしくはインビボで濃縮および再選択されたバリエーションのサブセットを合成する。

40

【0201】

いくつかの実施形態において、所望の数の選択ラウンドに続いて、バリエーションを分析する。いくつかの実施形態において、個々のバリエーションは、インビボで所望の細胞または器官に導入遺伝子を送達するために用いられる。バリエーションの送達能力を分析した後、将来の使用に最適な候補を選択する。

【0202】

50

いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、2つのバーコード配列を含む核酸を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーは、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される。本明細書に開示される方法、AAVバリエーションのライブラリ、AAVバリエーション、または核酸のいくつかの実施形態において、第2のバーコードを含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択され、第2のバーコードを含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含むか、または配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、上述のプロモーターは、第1のバーコードおよび第2のバーコードのそれぞれについて異なる。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2の核酸の各々が独立して、異なるプロモーターの下で制御される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーター（例えば、ヒトシナプシンプロモーター（hSyn1）、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB（unc45b）プロモーター、心筋型トロポニンT（cTnT）プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、またはメチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーター（例えば、U6プロモーター、H1プロモーターまたは7SKプロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターであり、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである。いくつかの実施形態において、バーコードを含む核酸が、レポーター遺伝子と、核局在化シグナルと、ポリアデニル化シグナルとをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0203】

AAVバリエーション

天然のAAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドを開発するために使用されるAAVバリエーションが本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、天然のAAV血清型と比較して、細胞または組織の向性の増強である。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、既存の宿主抗体応答の回避である。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、宿主応答を誘発しないように低下した免疫原性である。

【0204】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レ

ポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上と、を含む。

【0205】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの2つ以上と、を含む。

【0206】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの3つ以上と、を含む。

【0207】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸と、を含む。

【0208】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上と、を含む。

【0209】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの2つ以上と、を含む。

【0210】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、c) 局在化シグナルをコードする核酸、d) バーコードを含む核酸、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの3つ以上と、を含む。

【0211】

いくつかの実施形態において、本開示のAAVバリエーションは、a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異と、c) 局在化シグナルをコードする核酸と、d) バーコードを含む核酸と、e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上と、を含む。

10

20

30

40

50

【0212】

上の実施形態のいずれかにおいて、AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子上に存在する。いくつかの実施形態において、AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、単一の核酸分子上に存在する。いくつかの実施形態において、AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている。いくつかの実施形態において、ライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む。

10

【0213】

AAVバリエントの種々の構成要素（例えば、AAVバリエントカプシドタンパク質、挿入されたペプチド、ペプチド挿入部位に隣接するサイレント変異、局在化シグナル、バーコード、レポータータンパク質、プロモーター、または関連する核酸配列など）は、本明細書の他の場所に開示される。

【0214】

別の態様において、本開示は、本明細書に開示されるAAVバリエントをコードする核酸分子を提供する。いくつかの実施形態において、核酸分子は、a) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接するヌクレオチド配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列、c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、d) バーコードを含む核酸配列、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの1つ以上と、を含む。

20

【0215】

いくつかの実施形態において、本開示は、a) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接するヌクレオチド配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列、c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、d) バーコードを含む核酸配列、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの2つ以上と、を含む、核酸分子を提供する。

30

【0216】

いくつかの実施形態において、本開示は、a) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接するヌクレオチド配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列、c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、d) バーコードを含む核酸配列、およびe) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの3つ以上と、を含む、核酸分子を提供する。

40

【0217】

いくつかの実施形態において、本開示は、a) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、b) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可

50

変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接するヌクレオチド配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエーションタンパク質をコードする核酸配列と、c) 局在化シグナルをコードする核酸配列と、d) バーコードを含む核酸配列と、e) レポータータンパク質をコードする核酸配列と、を含む、核酸分子を提供する。

【0218】

いくつかの実施形態において、バーコード核酸配列は、1つより多いバーコード配列を含む。いくつかの実施形態において、バーコード核酸配列は、2つより多いバーコード配列を含む。いくつかの実施形態において、バーコード核酸配列は、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている。いくつかの実施形態において、第1のバーコード配列を含む第1の核酸は、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のバーコード配列は、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第2のバーコード配列を含む第2の核酸は、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のバーコード配列を含む第2の核酸は、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーター（例えば、U6プロモーター、H1プロモーター、および7SKプロモーターの群から選択されるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターは、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーター（例えば、ヒトシナプシンプロモーター（hSyn1）、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB（unc45b）プロモーター、心筋型トロポニンT（cTnT）プロモーター、グリアル線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーターの群から選択されるプロモーター）である。

【0219】

いくつかの実施形態において、AAVバリエーションは、(i) AAV血清型が、AAV1であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、(ii) AAV血清型が、AAV6であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、(iii) AAV血清型が、AAV2であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、(iv) AAV血清型が、AAV3Bであり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入されるか、(v) AAV血清型が、AAV5であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入されるか、(vi) AAV血清型が、AAV8であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入されるか、または(vii) AAV血清型が、AAV9であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455もしくは589に挿入されるかのいずれか1つから選択され、その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する。

【0220】

本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号1～3

2のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号71のアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0221】

本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。ここに開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV6血清型のカプシドタンパク質の位置454に挿入されたペプチドは、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV6血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0222】

本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される。ここに開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV2血清型のカプシドタンパク質の位置588に挿入されたペプチドは、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV2血清型のカプシドタンパク質の位置588に挿入されたペプチドは、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、AAV2血清型のカプシドタンパク質の位置588に挿入されたペプチドは、配列番号4～7のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0223】

本明細書に開示されるAAVバリエーションのいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される。本明細書に開示されるAAVバリエーション

50

のいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 76～85 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 76 および配列番号 83 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 8～配列番号 11 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0224】

本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 578 に挿入される。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV5 血清型のカプシドタンパク質の位置 578 に挿入されたペプチドは、配列番号 28～配列番号 32 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0225】

本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 591 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 591 に挿入される。

【0226】

本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 266 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 266 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 455 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 455 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 1～32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される。本明細書に開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、配列番号 68～110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV9 血清型のカプシドタンパク質の位置 266 に挿入されたペプチドは、配列番号 12～配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される AAV バリエントのいくつかの実施形態において、AAV9 血清型のカプシドタンパク質の位置 266 に挿入されたペプチドは、配列番号 86～配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示さ

30

40

50

れる A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 266 に挿入されたペプチドは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 455 に挿入されたペプチドは、配列番号 12 ~ 配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 455 に挿入されたペプチドは、配列番号 86 ~ 配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 455 に挿入されたペプチドは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 455 に挿入されたペプチドは、配列番号 12 ~ 配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 86 ~ 配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示される A A V バリエーションのいくつかの実施形態において、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む。

10

【0227】

いくつかの実施形態において、A A V 3 B バリエーションは、E Q F R N L A (配列番号 78)、T D F R S P Q (配列番号 80)、T G A F S S T (配列番号 77)、F N S P V I Q (配列番号 79)、P Y A S I T G (配列番号 76) および Y G S R S V D (配列番号 83) からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 3 B バリエーションは、E Q F R N L A (配列番号 78)、T D F R S P Q (配列番号 80)、T G A F S S T (配列番号 77)、F N S P V I Q (配列番号 79)、P Y A S I T G (配列番号 76) および Y G S R S V D (配列番号 83) の配列からなる群から選択されるペプチド配列を含む。

20

【0228】

いくつかの実施形態において、A A V 1 バリエーションは、配列 S V V V S S D S S K R P N L (配列番号 71) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 1 バリエーションは、ペプチド配列 S V V V S S D S S K R P N L (配列番号 71) を含む。

30

【0229】

いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94)、P L R M V N E (配列番号 96)、E N F S K V A (配列番号 101)、L G N G K M T V Q P (配列番号 103)、G R N T V G L S S A (配列番号 106)、T S N S R T E (配列番号 91) および R D A L S G L R P E (配列番号 102) からなる群から選択される配列のいずれか 1 つを含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94)、P L R M V N E (配列番号 96)、E N F S K V A (配列番号 101)、L G N G K M T V Q P (配列番号 103)、G R N T V G L S S A (配列番号 106)、T S N S R T E (配列番号 91) および R D A L S G L R P E (配列番号 102) からなる群から選択されるペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94)、および P L R M V N E (配列番号 96) からなる群から選択される配列のいずれか 1 つを含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、E N F S K V A (配列番号 101)、L G N G K M T V Q P (配列番号 103)、G R N T V G L S S A (配列番号 106)、T S N S R T E (配列番号 91) および R D A L S G L R P E (配列番号 102) からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94)、および P L R M V N E (配列番号 96) からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、A A V 2 バリエーションは、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94)、および P L R M V N E (配列番号 96) からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含むペプチドを含む。

40

50

号 96) からなる群から選択されるペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、ENFSKVA (配列番号 101)、LGNGKMTVQP (配列番号 103)、GRNTVGLSSA (配列番号 106)、TSNSRTE (配列番号 91) および RDALSGLRPE (配列番号 102) からなる群から選択されるペプチド配列を含む。

【0230】

いくつかの実施形態において、AAV9 バリエントは、配列 NIPKAYG (配列番号 89) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV9 バリエントは、ペプチド配列 NIPKAYG (配列番号 89) を含む。

【0231】

いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 EQFRNLA (配列番号 78) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 TDFRSPQ (配列番号 80) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 TGAFFST (配列番号 77) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 FNSPVIQ (配列番号 79) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 PYASITG (配列番号 76) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3B バリエントは、アミノ酸配列 YGSRSD (配列番号 83) を含むペプチドを含む。

【0232】

いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 RPLTAND (配列番号 95) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 PRDTFNG (配列番号 94) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 PLRMVNE (配列番号 96) を含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 ENFSKVA (配列番号 101) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 LGNGKMTVQP (配列番号 103) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 GRNTVGLSSA (配列番号 106) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 TSNSRTE (配列番号 91) を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2 バリエントは、アミノ酸配列 RDALSGLRPE (配列番号 102) を含むペプチドを含む。

【0233】

いくつかの実施形態において、AAV1 バリエントは、KSPQSKV (配列番号 1)、SDLRSKV (配列番号 2)、および TTTVRKV (配列番号 3) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV1 バリエントは、KSPQSKV (配列番号 1)、SDLRSKV (配列番号 2)、および TTTVRKV (配列番号 3) からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0234】

いくつかの実施形態において、AAV1 バリエントは、AALRDIR (配列番号 68)、PAIKTYS (配列番号 69)、TGDRISRTL (配列番号 70)、SVVVS DSSSKRPNL (配列番号 71)、VGARLSA (配列番号 72)、IEKPNTSTKK (配列番号 73)、DTVRSKN (配列番号 74)、および KELNKAR (配列番号 75) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV1 バリエントは、AALRDIR (配列番号 68)、PAIKTYS (配列番号 69)、TGDRISRTL (配列番号 70)、SVVVS DSSSKRPNL (配列番号 71)、VGARLSA (配列番号 72)、IEKPNTSTKK (配列番号 73)、DTVRSKN (配列番号 74)、および KELNKAR (配列番号 75) からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0235】

いくつかの実施形態において、AAV2バリエーションは、GRSDMAG（配列番号4）、LLSSERS（配列番号5）、EQRPNV（配列番号6）およびTRQISSD（配列番号7）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2バリエーションは、GRSDMAG（配列番号4）、LLSSERS（配列番号5）、EQRPNV（配列番号6）およびTRQISSD（配列番号7）からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0236】

いくつかの実施形態において、AAV2バリエーションは、MTLTRQE（配列番号90）、TSNSRTE（配列番号91）、EVRGGPS（配列番号92）、VISDRSS（配列番号93）、PRDTFNG（配列番号94）、RPLTAND（配列番号95）、PLRMVNE（配列番号96）、DVGIRPS（配列番号97）、KDSTAFG（配列番号98）、YPGRNPD（配列番号99）、ISDTRIS（配列番号100）、ENFSKVA（配列番号101）、RDALSGLRPE（配列番号102）、LGNGKMTVQP（配列番号103）、VSNPLNQ（配列番号104）、LNERGLG（配列番号105）、GRNTVGLSSA（配列番号106）、VGHAGNP（配列番号107）、SRAGTVP（配列番号108）、GLVAKLP（配列番号109）、およびAESLRTP（配列番号110）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV2バリエーションは、MTLTRQE（配列番号90）、TSNSRTE（配列番号91）、EVRGGPS（配列番号92）、VISDRSS（配列番号93）、PRDTFNG（配列番号94）、RPLTAND（配列番号95）、PLRMVNE（配列番号96）、DVGIRPS（配列番号97）、KDSTAFG（配列番号98）、YPGRNPD（配列番号99）、ISDTRIS（配列番号100）、ENFSKVA（配列番号101）、RDALSGLRPE（配列番号102）、LGNGKMTVQP（配列番号103）、VSNPLNQ（配列番号104）、LNERGLG（配列番号105）、GRNTVGLSSA（配列番号106）、VGHAGNP（配列番号107）、SRAGTVP（配列番号108）、GLVAKLP（配列番号109）、およびAESLRTP（配列番号110）からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0237】

いくつかの実施形態において、AAV3Bバリエーションは、QGALAQV（配列番号8）、YPSSNTP（配列番号9）、MLNPRTE（配列番号10）およびQMRTRDE（配列番号11）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3Bバリエーションは、QGALAQV（配列番号8）、YPSSNTP（配列番号9）、MLNPRTE（配列番号10）およびQMRTRDE（配列番号11）からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0238】

いくつかの実施形態において、AAV3Bバリエーションは、PYASITG（配列番号76）、TGAFSST（配列番号77）、EQFRNLA（配列番号78）、FNSPVIQ（配列番号79）、TDFRSPQ（配列番号80）、MYSLMKD（配列番号81）、LYLSSAS（配列番号82）、YGSRSVD（配列番号83）、LYSHQVS（配列番号84）、およびISTHSPP（配列番号85）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV3Bバリエーションは、PYASITG（配列番号76）、TGAFSST（配列番号77）、EQFRNLA（配列番号78）、FNSPVIQ（配列番号79）、TDFRSPQ（配列番号80）、MYSLMKD（配列番号81）、LYLSSAS（配列番号82）、YGSRSVD（配列番号83）、LYSHQVS（配列番号84）、およびISTHSPP（配列番号85）からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0239】

いくつかの実施形態において、AAV9バリエーションは、MPGRAPI（配列番号12）、LGRILTAN（配列番号13）、SYSTSR（配列番号14）、TRPSSSTN

(配列番号15)、VPQSSSR (配列番号16)、VSRSYPA (配列番号17) およびQRARPD (配列番号18) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV9バリエーションは、MPGRAP (配列番号12)、LGRLTAN (配列番号13)、SYSTSR (配列番号14)、TRPSSSTN (配列番号15)、VPQSSSR (配列番号16)、VSRSYPA (配列番号17) およびQRARPD (配列番号18) からなる群から選択されるペプチドを含む。

【0240】

いくつかの実施形態において、AAV9バリエーションは、RQP T T I P (配列番号86)、RSTSSLL (配列番号87)、FRLSSPQ (配列番号88)、およびNIPKAYG (配列番号89) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV9バリエーションは、RQP T T I P (配列番号86)、RSTSSLL (配列番号87)、FRLSSPQ (配列番号88)、およびNIPKAYG (配列番号89) からなる群から選択されるペプチドを含む。

10

【0241】

いくつかの実施形態において、AAV6バリエーションは、SQLTPHS (配列番号19)、LGSHLPS (配列番号20)、YTLSSGQ (配列番号21)、SSRIPPD (配列番号22)、WTETIPR (配列番号23)、HGLQGVA (配列番号24)、TMRVSDQ (配列番号25)、GSSKVVM (配列番号26)、およびSALDRGV (配列番号27) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV6バリエーションは、SQLTPHS (配列番号19)、LGSHLPS (配列番号20)、YTLSSGQ (配列番号21)、SSRIPPD (配列番号22)、WTETIPR (配列番号23)、HGLQGVA (配列番号24)、TMRVSDQ (配列番号25)、GSSKVVM (配列番号26)、およびSALDRGV (配列番号27) からなる群から選択されるペプチドを含む。

20

【0242】

いくつかの実施形態において、AAV5バリエーションは、KELGTQR (配列番号28)、RSSDVQR (配列番号29)、PSAPKTF (配列番号30)、HTKRSEY (配列番号31)、およびIKGSNLP (配列番号32) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。いくつかの実施形態において、AAV5バリエーションは、KELGTQR (配列番号28)、RSSDVQR (配列番号29)、PSAPKTF (配列番号30)、HTKRSEY (配列番号31)、およびIKGSNLP (配列番号32) からなる群から選択されるペプチドを含む。

30

【0243】

ペプチド

天然AAV血清型と比較して所望の特徴をAAVバリエーションに付与する本開示の方法を使用して特定される、挿入されたペプチドを本明細書に記載する。いくつかの実施形態において、所望の特徴は、天然のAAV血清型と比較して、細胞または組織の向性の増強である。いくつかの実施形態において、本開示の挿入されたペプチドは、AAVバリエーションが既存の宿主抗体応答を回避することを可能にする。いくつかの実施形態において、本開示の挿入されたペプチドは、宿主応答を誘発しないようにAAVバリエーションの免疫原性を低下させる。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、AAVベクターを特定の標的細胞または組織に指向させることができる。

40

【0244】

挿入されたペプチドは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30個、またはそれよりも多くのアミノ酸長であってもよく、またはこれらの値のうちの任意の2つの間の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、ペプチドは、7アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、10アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、15アミノ酸長である。

【0245】

50

いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、配列番号 1～32 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 1～32 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 5 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 1～32 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 6 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 1～32 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 1～32 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、またはそれより大きい配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドは、配列番号 68～110 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 68～110 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 5 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 68～110 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 6 個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 68～110 に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列番号 68～110 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、またはそれより大きい配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

【0246】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、EQFRNL A（配列番号 78）、TDFRSPQ（配列番号 80）、TGAFSST（配列番号 77）、FNSPVIQ（配列番号 79）、PYASITG（配列番号 76）および YGSRSD（配列番号 83）からなる群から選択される配列のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、EQFRNL A（配列番号 78）、TDFRSPQ（配列番号 80）、TGAFSST（配列番号 77）、FNSPVIQ（配列番号 79）、PYASITG（配列番号 76）および YGSRSD（配列番号 83）の配列からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列 SVVVS S D S S K R P N L（配列番号 71）を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、SVVVS S D S S K R P N L（配列番号 71）である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、RPLTAND（配列番号 95）、PRDTFNG（配列番号 94）、PLRMVNE（配列番号 96）、ENFSKVA（配列番号 101）、LGNGKMTVQP（配列番号 103）、GRNTVGLSSA（配列番号 106）、TSNSRTE（配列番号 91）および RDALSGLRPE（配列番号 102）からなる群から選択される配列のいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、RPLTAND（配列番号 95）、PRDTFNG（配列番号 94）、PLRMVNE（配列番号 96）、ENFSKVA（配列番号 101）、LGNGKMTVQP（配列番号 103）、GRNTVGLSSA（配列番号 106）、TSNSRTE（配列番号 91）および RDALSGLRPE（配列番号 102）からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列 NIPKAYG（配列番号 89）を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、NIPKAYG（配列番号 89）である。

30

40

【0247】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、EQFRNL A（配列番号 78）、TDFRSPQ（配列番号 80）、TGAFSST（配列番号 77）、FNSPVIQ（配列番号 79）、PYASITG（配列番号 76）、YGSRSD（配列番号 83）、SVVVS S D S S K R P N L（配列番号 71）、RPLTAND（配列番号 95）、PRDTFNG（配列番号 94）および PLRMVNE（配列番号 96）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、EQFRNL A（配列番号 78）、TDFRSPQ（配列番号 80）、TGAFSST（配列番号 77）、

50

F N S P V I Q (配列番号 79)、P Y A S I T G (配列番号 76)、Y G S R S V D (配列番号 83)、S V V V S S D S S K R P N L (配列番号 71)、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94) および P L R M V N E (配列番号 96) からなる群から選択される。

【0248】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、E N F S K V A (配列番号 101)、L G N G K M T V Q P、G R N T V G L S S A (配列番号 103)、T S N S R T E (配列番号 91)、R D A L S G L R P E (配列番号 102) および N I P K A Y G (配列番号 89) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、E Q F R N L A (配列番号 78)、T D F R S P Q (配列番号 80)、T G A F S S T (配列番号 77)、F N S P V I Q (配列番号 79)、P Y A S I T G (配列番号 76)、Y G S R S V D (配列番号 83)、S V V V S S D S S K R P N L (配列番号 71)、R P L T A N D (配列番号 95)、P R D T F N G (配列番号 94) および P L R M V N E (配列番号 96) からなる群から選択される。

10

【0249】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 E Q F R N L A (配列番号 78) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 T D F R S P Q (配列番号 80) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 T G A F S S T (配列番号 77) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 F N S P V I Q (配列番号 79) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 P Y A S I T G (配列番号 76) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 Y G S R S V D (配列番号 83) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 R P L T A N D (配列番号 95) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 P R D T F N G (配列番号 94) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 P L R M V N E (配列番号 96) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 E N F S K V A (配列番号 101) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 L G N G K M T V Q P (配列番号 103) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 G R N T V G L S S A (配列番号 106) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 T S N S R T E (配列番号 91) を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、アミノ酸配列 R D A L S G L R P E (配列番号 102) を含む。

20

30

【0250】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、K S P Q S K V (配列番号 1)、S D L R S K V (配列番号 2)、および T T T V R K V (配列番号 3) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、K S P Q S K V (配列番号 1)、S D L R S K V (配列番号 2)、および T T T V R K V (配列番号 3) からなる群から選択される。

【0251】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、A A L R D I R (配列番号 68)、P A I K T Y S (配列番号 69)、T G D R I S S R T L (配列番号 70)、S V V V S S D S S K R P R N L (配列番号 71)、V G A R L S A (配列番号 72)、I E K P N T S T K K (配列番号 73)、D T V R S K N (配列番号 74)、および K E L N K A R (配列番号 75) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、A A L R D I R (配列番号 68)、P A I K T Y S (配列番号 69)、T G D R I S S R T L (配列番号 70)、S V V V S S D S S K R P R N L (配列番号 71)、V G A R L S A (配列番号 72)、I E K P N T S T K K (配列番号 73)、D T V R S K N (配列番号 74)、および K E L N K A R (配列番号 75) からなる群から選択される。

40

【0252】

50

いくつかの実施形態において、ペプチドは、GRSDMAG（配列番号4）、LLSSERS（配列番号5）、EQRPNV（配列番号6）およびTRQISSD（配列番号7）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、GRSDMAG（配列番号4）、LLSSERS（配列番号5）、EQRPNV（配列番号6）およびTRQISSD（配列番号7）からなる群から選択される。

【0253】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、MTLTRQE（配列番号90）、TSNSRTE（配列番号91）、EVRGGPS（配列番号92）、VISDRSS（配列番号93）、PRDTFNG（配列番号94）、RPLTAND（配列番号95）、PLRMVNE（配列番号96）、DVGIRPS（配列番号97）、KDSTAFG（配列番号98）、YPGRNPD（配列番号99）、ISDTRIS（配列番号100）、ENFSKVA（配列番号101）、RDALSGLRPE（配列番号102）、LGNGKMTVQP（配列番号103）、VSNPLNQ（配列番号104）、LNERGLG（配列番号105）、GRNTVGLSSA（配列番号106）、VGHAGNP（配列番号107）、SRAGTVP（配列番号108）、GLVAKLP（配列番号109）、およびAESLRTP（配列番号110）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

いくつかの実施形態において、ペプチドは、MTLTRQE（配列番号90）、TSNSRTE（配列番号91）、EVRGGPS（配列番号92）、VISDRSS（配列番号93）、PRDTFNG（配列番号94）、RPLTAND（配列番号95）、PLRMVNE（配列番号96）、DVGIRPS（配列番号97）、KDSTAFG（配列番号98）、YPGRNPD（配列番号99）、ISDTRIS（配列番号100）、ENFSKVA（配列番号101）、RDALSGLRPE（配列番号102）、LGNGKMTVQP（配列番号103）、VSNPLNQ（配列番号104）、LNERGLG（配列番号105）、GRNTVGLSSA（配列番号106）、VGHAGNP（配列番号107）、SRAGTVP（配列番号108）、GLVAKLP（配列番号109）、およびAESLRTP（配列番号110）からなる群から選択される。

20

【0254】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、QGALAQV（配列番号8）、YPSSNTP（配列番号9）、MLNPRTE（配列番号10）およびQMRTRDE（配列番号11）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、QGALAQV（配列番号8）、YPSSNTP（配列番号9）、MLNPRTE（配列番号10）およびQMRTRDE（配列番号11）からなる群から選択される。

30

【0255】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、PYASITG（配列番号76）、TGAFSST（配列番号77）、EQFRNLA（配列番号78）、FNSPVIQ（配列番号79）、TDFRSPQ（配列番号80）、MYSLMKD（配列番号81）、LYLSSAS（配列番号82）、YGSRSVD（配列番号83）、LYSHQVS（配列番号84）、およびISTHSP（配列番号85）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、PYASITG（配列番号76）、TGAFSST（配列番号77）、EQFRNLA（配列番号78）、FNSPVIQ（配列番号79）、TDFRSPQ（配列番号80）、MYSLMKD（配列番号81）、LYLSSAS（配列番号82）、YGSRSVD（配列番号83）、LYSHQVS（配列番号84）、およびISTHSP（配列番号85）からなる群から選択される。

40

【0256】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、MPGRAPI（配列番号12）、LGRLTAN（配列番号13）、SYSTSR（配列番号14）、TRPSSSTN（配列番号15）、VPQSSSR（配列番号16）、VSRSPYA（配列番号17）およびQRARPD（配列番号18）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、MPGRAPI（配列番号12）、LGRLTAN（配

50

列番号13)、SYSTSR S (配列番号14)、TRPSSSTN (配列番号15)、VPQSSSR (配列番号16)、VSRSYPA (配列番号17) およびQRARPDT (配列番号18) からなる群から選択される。

【0257】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、RQP T T I P (配列番号86)、RST S S L L (配列番号87)、FRLSSPQ (配列番号88)、およびNIPKAYG (配列番号89) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、RQP T T I P (配列番号86)、RST S S L L (配列番号87)、FRLSSPQ (配列番号88)、およびNIPKAYG (配列番号89) からなる群から選択される。

10

【0258】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、S Q L T P H S (配列番号19)、L G S H L P S (配列番号20)、Y T L S S G Q (配列番号21)、S S R I P P D (配列番号22)、W T E T I P R (配列番号23)、H G L Q G V A (配列番号24)、T M R V S D Q (配列番号25)、G S S K V V M (配列番号26)、およびS A L D R G V (配列番号27) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、S Q L T P H S (配列番号19)、L G S H L P S (配列番号20)、Y T L S S G Q (配列番号21)、S S R I P P D (配列番号22)、W T E T I P R (配列番号23)、H G L Q G V A (配列番号24)、T M R V S D Q (配列番号25)、G S S K V V M (配列番号26)、およびS A L D R G V (配列番号27) からなる群から選択される。

20

【0259】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、K E L G T Q R (配列番号28)、R S S D V Q R (配列番号29)、P S A P K T F (配列番号30)、H T K R S E Y (配列番号31)、およびI K G S N L P (配列番号32) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、K E L G T Q R (配列番号28)、R S S D V Q R (配列番号29)、P S A P K T F (配列番号30)、H T K R S E Y (配列番号31)、およびI K G S N L P (配列番号32) からなる群から選択される。

【0260】

いくつかの実施形態において、本開示は、挿入されたペプチドを含むカプシドタンパク質であって、ペプチドが、(i) A A V 1カプシドタンパク質のアミノ酸位置590、(i i) A A V 6カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590、(i i i) A A V 2カプシドタンパク質のアミノ酸位置588、(i v) A A V 3 Bカプシドタンパク質のアミノ酸位置589、(v) A A V 5カプシドタンパク質のアミノ酸位置578、(v i) A A V 8カプシドタンパク質のアミノ酸位置591、または(v i) A A V 9カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455、もしくは589に挿入され、その位置が、A A V 血清型におけるVP1の番号付けに対応する、カプシドタンパク質を提供する。

30

【0261】

本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドは、A A V 1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、A A V 1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、A A V 1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号71のアミノ酸配列を含む。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、A A V 1血清型のカプシドタンパク質の位置590に挿入されたペプチドは、配列番号1

40

50

、配列番号 2 および配列番号 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0262】

本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入される。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV6 血清型のカプシドタンパク質の位置 454 に挿入されたペプチドは、配列番号 19 ～ 配列番号 27 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV6 血清型のカプシドタンパク質の位置 590 に挿入されたペプチドは、配列番号 19 ～ 配列番号 27 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0263】

本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入される。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV2 血清型のカプシドタンパク質の位置 588 に挿入されたペプチドは、配列番号 90 ～ 配列番号 110 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV2 血清型のカプシドタンパク質の位置 588 に挿入されたペプチドは、配列番号 95、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 106、配列番号 91 および配列番号 102 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV2 血清型のカプシドタンパク質の位置 588 に挿入されたペプチドは、配列番号 4 ～ 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0264】

本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 1 ～ 32 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される。本明細書に開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、配列番号 68 ～ 110 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドは、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 589 に挿入される。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 76 ～ 85 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 76 および配列番号 83 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV3B 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 8 ～ 配列番号 11 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択さ

40

50

10

50

パク質の位置 455 に挿入されたペプチドは、配列番号 12 ～配列番号 18 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV9 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 86 ～配列番号 89 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ここに開示されるカプシドタンパク質のいくつかの実施形態において、AAV9 血清型のカプシドタンパク質の位置 589 に挿入されたペプチドは、配列番号 89 のアミノ酸配列を含む。

【0268】

本明細書では、本明細書で開示される挿入されたペプチドを含む AAV カプシドタンパク質も開示される。いくつかの実施形態において、カプシドタンパク質は、VP1、VP2、または VP3 である。いくつかの実施形態において、ペプチドは、カプシドタンパク質の残基 450 ～600 の間の位置に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、(i) AAV1 カプシドタンパク質の位置 590、(ii) AAV6 カプシドタンパク質の位置 454 もしくは 590、(iii) AAV2 カプシドタンパク質の位置 588、(iv) AAV3B カプシドタンパク質の位置 589、(v) AAV5 カプシドタンパク質の位置 578、(vi) AAV8 カプシドタンパク質の位置 591、または (vii) AAV9 カプシドタンパク質の位置 266、455、もしくは 589 に挿入され、その位置が、AAV 血清型における VP1 の番号付けに対応する。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV1 カプシドタンパク質の位置 590 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV6 カプシドタンパク質の位置 454 または 590 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV2 カプシドタンパク質の位置 588 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV3B カプシドタンパク質の位置 589 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV5 カプシドタンパク質の位置 578 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV8 カプシドタンパク質の位置 591 に挿入される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV9 カプシドタンパク質の位置 266、455 または 589 に挿入される。カプシドタンパク質中の他の部位が、挿入のために選択されてもよいことが理解される。また、アミノ酸配列は、VP2 または VP3 の対応する位置に挿入されてもよいことも理解されたい。

【0269】

本明細書では、本明細書で開示されるペプチド、カプシドタンパク質、および AAV バリエーションをコードする核酸配列も開示される。

【0270】

さらに、本明細書では、本明細書で開示される挿入されたペプチドを含む AAV ベクターが開示される。いくつかの実施形態において、ペプチドは、AAV ベクターのカプシドタンパク質の一部である。

【0271】

いくつかの実施形態において、本開示の挿入されたペプチドは、標的細胞または組織のための細胞または組織の向性を有する。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、肝臓由来である。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、CNS 由来である。いくつかの実施形態において、標的細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T 細胞、B 細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

【0272】

本開示の挿入されたペプチドを含むベクターを使用して、核酸を標的細胞または組織に送

達してもよい。一態様において、本開示は、核酸を標的細胞または組織に送達する方法であって、核酸を含む AAV ベクターを投与することを含み、AAV ベクターは、本開示の標的化タンパク質を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、膵臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、肝臓由来である。いくつかの実施形態において、標的細胞または組織は、CNS 由来である。いくつかの実施形態において、標的細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T 細胞、B 細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。

10

【0273】

DNA 結合分子／ドメイン

目的の任意の遺伝子または遺伝子座中の標的部位に特異的に結合する DNA 結合分子／ドメインを含む組成物を本明細書に記載する。限定されないが、ジンクフィンガー DNA 結合ドメイン、TALE DNA 結合ドメイン、CRISPR/Cas ヌクレアーゼの DNA 結合部分（ガイドまたは sgRNA）、またはメガヌクレアーゼ由来の DNA 結合ドメインを含む任意の DNA 結合分子／ドメインを、本明細書に開示される組成物および方法に使用することができる。本明細書に記載の方法および組成物において、「Cas」という用語は、Cas9 および Cpf1 タンパク質の両方を含むことを理解されたい。したがって、本明細書で使用される場合、「CRISPR/Cas 系」は、ヌクレアーゼ、ニッカーゼおよび／または転写因子系の両方を含む、CRISPR/Cas および／または CRISPR/Cpf1 系の両方を指す。

20

【0274】

いくつかの実施形態において、他の Cas タンパク質が使用され得る。いくつかの例示的な Cas タンパク質としては、Cas9、Cpf1 (Cas12a としても知られる)、C2c1、C2c2 (Cas13a としても知られる)、C2c3、Cas1、Cas2、Cas4、CasX および CasY が挙げられ、それらの操作されたバリエーションおよび天然バリエーション (Burstein, et al. (2017) Nature 542: 237-241)、例えば、HF1/spCas9 (Kleinstiver, et al. (2016) Nature 529: 490-495, Cebrian-Serrano and Davies (2017) Mamm Genome (2017) 28 (7): 247-261)、スプリット Cas9 系 (Zetsche, et al. (2015) Nat Biotechnol 33 (2): 139-142)、インテイン-エクステイン系に基づく trans スプライシング Cas9 (Truong, et al. (2015) Nucl Acid Res 43 (13): 6450-8)、ミニ-SaCas9 (Ma, et al. (2018) ACS Synth Biol 7 (4): 978-985) が挙げられる。したがって、本明細書に記載の方法および組成物において、「Cas」という用語は、天然および操作されたものの両方の全ての Cas バリエーションタンパク質を含むことを理解されたい。したがって、本明細書で使用される場合、「CRISPR/Cas 系」は、ヌクレアーゼ、ニッカーゼおよび／または転写因子系の両方を含む任意の CRISPR/Cas 系を指す。

30

40

【0275】

系

本明細書に記載される DNA 編集複合体（またはその構成分子）は、本明細書に記載される方法および組成物によって標的細胞に送達され得る。送達は、単離された細胞（次いで、エクスピボでの細胞療法のために生体対象に投与してもよい）に行ってもよく、または生体対象に行ってもよい。細胞および対象への遺伝子編集分子の送達は、当該技術分野で既知である。

50

【0276】

好適な細胞としては、限定されないが、真核細胞および原核細胞および／または細胞株が挙げられる。かかる細胞またはかかる細胞から生成される細胞株の非限定的な例としては、T細胞、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2／0-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞、ならびに昆虫細胞、例えば、Spodoptera fugiperda（Sf）、または真菌細胞、例えば、Saccharomyces、PichiaおよびSchizosaccharomycesが挙げられる。特定の実施形態において、細胞株は、CHO-K1、MDCKまたはHEK293細胞株である。好適な細胞としては、例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、造血幹細胞、神経幹細胞、および間葉系幹細胞などの幹細胞も挙げられる。

10

【0277】

本明細書に記載されるDNA編集複合体はまた、構成要素（例えば、融合分子）のうちの1つ以上をコードする配列を含有する本発明のベクターを使用して送達されてもよい。さらに、追加の核酸（例えば、ドナー）も、これらのベクターにより送達され得る。さらに、これらのベクターのいずれも、適切な場合、1つ以上のDNA結合タンパク質コード配列および／または追加の核酸を含み得ることが明らかであろう。したがって、本明細書に記載の1つ以上のDNA結合タンパク質が細胞内に導入されるとき、および適切な場合には追加のDNAが導入されるとき、これらは、同じベクター上または異なるベクター上に保有されていてもよい。複数のベクターが使用される場合、各ベクターは、1つまたは複数のDNA結合タンパク質および所望の場合に追加の核酸をコードする配列を含み得る。従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用して、細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織内に操作されたDNA結合タンパク質をコードする核酸を導入し、所望の場合に追加のヌクレオチド配列を共導入することができる。このような方法を使用して、核酸（例えば、DNA結合タンパク質および／またはドナーをコードする）をインビトロで細胞に投与することもできる。特定の実施形態において、核酸は、インビボまたはエクスピボでの遺伝子療法使用のために投与される。

20

【0278】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成する。かかる細胞には、アデノウイルスまたはAAVをパッケージングするHEK293細胞が含まれる。遺伝子療法で使用するウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングするプロデューサー細胞株によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびその後の宿主への組み込み（適用可能な場合）に必要な最小のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられる。欠損しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってtransで供給される。例えば、遺伝子療法で使用するAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージングおよび組み込みに必要なAAVゲノム由来の逆位末端反復（ITR）配列のみを有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわちrepおよびcapをコードするが、ITR配列を欠くヘルパープラスミドを含む細胞株においてパッケージングされる。細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスに感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミド由来のAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列を欠くため、かなりの量でパッケージ化されていない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVよりも感受性が高い熱処理によって低減され得る。いくつかの実施形態において、バキュロウイルス系を使用して、AAVを産生する（例えば、Smith et al（2009）Mol Ther 434：37-54を参照されたい）。

30

40

【0279】

多くの遺伝子療法用途において、遺伝子療法ベクターは、特定の組織型に対して高い程度

50

の特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上にウイルスコートタンパク質を有する融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、所与の細胞型に対する特異性を有するように改変され得る。リガンドは、目的の細胞型に存在することが知られている受容体に対して親和性を有するように選択される。例えば、Han, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751は、Moloneyマウス白血病ウイルスを、gp70に融合されたヒトヘレグリンを発現するように改変することができ、この組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現する特定のヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体のリガンドを含む融合タンパク質を発現する他のウイルス標的細胞対に拡張することができる。例えば、繊維状ファージは、実質的に任意の選択された細胞受容体に対する特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、FABまたはFv）を提示するように操作され得る。上の説明は主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取り込みに有利な特定の取り込み配列を含有するように操作することができる。

10

20

30

40

50

【0280】

CRISPR/Cas系の送達方法は、上述の方法を含むことができる。例えば、動物モデルにおいて、ゲノム編集された動物にガラス針を使用して、mRNAまたは組換えCasタンパク質をコードするインビトロ転写Casを1細胞期の胚に直接注入することができる。インビトロで細胞においてCasおよびガイドRNAを発現させるために、典型的には、それらをコードするプラスミドを、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを介して細胞にトランスフェクトする。また、組換えCasタンパク質を、CasガイドRNAリボ核タンパク質が目的の細胞によって取り込まれるインビトロ転写ガイドRNAと複合体化することができる(Kim, et al. (2014) Genome Res 24(6):1012)。治療目的のために、CasおよびガイドRNAは、ウイルス技術および非ウイルス技術の組み合わせによって送達され得る。例えば、CasをコードするmRNAは、ナノ粒子送達を介して送達されてもよく、一方、ガイドRNAおよび任意の所望の導入遺伝子または修復テンプレートは、AAVを介して送達される(Yin, et al. (2016) Nat Biotechnol 34(3):328)。

【0281】

遺伝子療法ベクターは、以下に記載されるように、個々の患者（対象）への投与、典型的には全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入）または局所適用によって、インビボで送達され得る。あるいは、ベクターは、個々の患者から摘出された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）またはユニバーサルドナー造血幹細胞などの細胞にエクスピボで送達され、続いて、通常、ベクターを組み込んだ細胞の選択後に、細胞を患者に再移植することができる。

【0282】

診断、研究、移植、または遺伝子療法のための（例えば、トランスフェクトされた細胞の宿主生物への再注入を介した）エクスピボ細胞トランスフェクションは、当業者によく知られている。いくつかの実施形態において、細胞は、対象生物から単離され、DNA結合タンパク質核酸（遺伝子またはcDNA）でトランスフェクトされ、対象生物（例えば、患者）に再注入される。エクスピボトランスフェクションに好適な様々な細胞型は、当業者および患者から細胞を単離および培養する方法の議論のためにそこで引用される参考文献によく知られている（例えば、Freshney, et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)を参照されたい）。

【0283】

一実施形態において、幹細胞は、細胞トランスフェクションおよび遺伝子療法のためのエクスピボ手順に使用される。幹細胞を使用する利点は、インビトロで他の細胞型に分化させることができること、またはそれらを骨髄内に移植される哺乳類（細胞のドナーなど）

に導入することができることである。GM-CSF、IFN- γ 、およびTNF- α などのサイトカインを使用して、インビトロでCD34+細胞を臨床的に重要な免疫細胞型に分化させるための方法は既知である(Inaba, et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1693-1702)を参照されたい)。

【0284】

治療用DNA結合タンパク質（またはこれらのタンパク質をコードする核酸）を含む本明細書に記載のベクターはまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することができる。投与は、これらに限定されないが、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションを含む、血液または組織細胞との最終的な接触に分子を導入するために通常使用される経路のうちのいずれかによるものである。そのような核酸を投与する好適な方法が利用可能であり、当業者に周知であり、1つより多い経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時により効果的な反応を提供することができる。

10

【0285】

薬学的に許容される担体は、部分的に、投与される特定の組成物、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、以下に記載されるように、利用可能な薬学的組成物の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照されたい）。

【0286】

上述のように、開示される方法および組成物は、任意の型のT細胞および幹細胞を含め、原核細胞、真菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、およびヒト細胞を含むが、これらに限定されない、任意の型の細胞に使用され得る。タンパク質発現に好適な細胞株は、当業者に既知であり、限定されないが、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、perC6、昆虫細胞、例えば、Spodoptera fugiperda (Sf)、ならびに真菌細胞、例えば、Saccharomyces、PichiaおよびSchizosaccharomycesが挙げられる。これらの細胞株の子孫、バリエーションおよび誘導体も使用されることができる。

20

30

【0287】

用途

操作されたAAVカプシドを、インビボおよびエクスビボでの遺伝子療法およびゲノム編集の多くの異なる用途に使用することができる。本明細書に開示されるAAVバリエーションを、投与後の細胞の使用およびインビボでの選択を伴う指向性進化の使用によって生成した。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるバリエーションカプシドタンパク質は、AAVビリオン中に存在する場合、対応する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVを含むAAVビリオンによる細胞、組織、またはオルガネラの形質導入と比較して、細胞、組織、またはオルガネラの形質導入を増加させる。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるバリエーションカプシドタンパク質は、AAVビリオン中に存在する場合、対応する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンよりも、細胞、組織、またはオルガネラのより効率的な形質導入をもたらす（例えば、細胞、組織、またはオルガネラは、親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVを含むAAVビリオンよりも、バリエーションAAVカプシドタンパク質を含むAAVビリオンをより多く取り込む）。いくつかのこのような実施形態において、AAVバリエーションビリオンまたはバリエーションrAAVは、対応する親AAVカプシドタンパク質を含む野生型AAVビリオンまたはバリエーションrAAVによる細胞、組織、またはオルガネラの形質導入と比較して、細胞、組織、またはオルガネラの少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも

40

50

25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、または50倍より大きな形質導入の増加を示す。いくつかの実施形態において、細胞または組織としては、限定されないが、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、または口腔粘膜由来の細胞または組織が挙げられる。いくつかの実施形態において、細胞または組織は、肝臓由来である。いくつかの実施形態において、細胞または組織は、CNS由来である。いくつかの実施形態において、標的細胞としては、限定されないが、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションまたはバリエーションrAAVは、野生型AAV1、AAV2、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8またはAAV9バリエーションによる細胞、組織、またはオルガネラの形質導入と比較して、細胞、組織、またはオルガネラの少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、または1000倍より大きな形質導入の増加を示す。特定のこのような実施形態において、本明細書に開示されるバリエーションカプシドタンパク質は、AAVバリエーション中に存在する場合、対応する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVカプシドタンパク質を含むAAVバリエーションよりも広範な霊長類CNS細胞の形質導入をもたらす。いくつかの実施形態において、バリエーションAAVバリエーションは、対応する親AAVカプシドタンパク質を含むバリエーションによって形質導入されない細胞型に形質導入し、したがって、対応する親AAVバリエーションよりもCNSにおいて多くの細胞型に形質導入する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションは、CNS細胞に優先的に形質導入し、例えば、rAAVバリエーションは、CNS細胞を、別の細胞よりも2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、または50倍を超える特異性で感染させる。いくつかの実施形態において、形質導入されたCNS細胞は、ニューロンまたはグリア細胞であり、限定されないが、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、または上皮細胞である。

10

20

30

40

50

【0288】

特定のこのような実施形態において、本明細書に開示されるバリエーションカプシドタンパク質は、AAVバリエーション中に存在する場合、対応する親AAVカプシドタンパク質または野生型AAVカプシドタンパク質を含むAAVバリエーションよりも広範な霊長類肝臓細胞の形質導入をもたらす。いくつかの実施形態において、バリエーションAAVバリエーションは、対応する親AAVカプシドタンパク質を含むバリエーションによって形質導入されない細胞型に形質導入し、したがって、対応する親AAVバリエーションよりも肝臓において多くの細胞型に形質導入する。いくつかの実施形態において、AAVバリエーションは、肝臓細胞に優先的に形質導入し、例えば、rAAVバリエーションは、肝臓細胞を、別の細胞よりも2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、または50倍を超える特異性で感染させる。いくつかの実施形態において、形質導入された肝臓細胞は、限定されないが、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、または肝臓内皮細胞である。

【0289】

CNSまたは肝臓細胞の形質導入の増加、例えば、形質導入効率の上昇、より広範な形質導入、より優先的な形質導入などは、遺伝子発現を測定するための当該技術分野における任意の数の方法によってインビトロまたはインビボで容易に評価され得る。例えば、AAVは、ユビキタスまたは細胞型および／または組織特異的プロモーターの制御下で、またはそれらに作動可能に連結されているレポーター遺伝子、例えば、蛍光タンパク質を含む発現カセットを含むゲノムと共にパッケージングされてもよく、形質導入の程度は、例えば、蛍光顕微鏡法によって蛍光タンパク質を検出することによって評価され得る。別の例として、AAVは、バーコード化された核酸配列を含むゲノムと共にパッケージングされてもよく、形質導入の程度は、例えばPCRによって核酸配列を検出することによって評

価され得る。別の例として、AAVは、疾患の治療のための治療用遺伝子を含む発現カセットを含むゲノムと共にパッケージングされてもよく、形質導入の程度は、AAVを投与された治療を必要とする対象における疾患の治療を検出することによって評価され得る。

【0290】

本明細書に記載される組成物および方法によって治療および／または予防され得る例示的な遺伝疾患としては、限定されないが、軟骨無形成症、色覚異常、酸性マルターゼ欠損症、アデノシンデアミナーゼ欠損症（OMIM番号102700）、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、アルファ-1アンチトリプシン欠損症、アルファサラセミア、アンドロゲン不応症、アペール症候群、不整脈原性右室心筋症、異形成、毛細血管拡張性運動失調症、バース症候群、ベーターサラセミア、青色ゴムまり様母斑症候群、カナバン病、慢性肉芽腫症（CGD）、猫鳴き症候群、嚢胞性線維症、デュカム病、外胚葉異形成症、ファンコニ貧血、進行性骨化性線維異形成症、脆弱X症候群、ガラクトース血症、ゴーシェ病、汎発性ガングリオシドーシス（例えば、GM1）、ヘモクロマトーシス、ベーターグロビンの6番目のコドン中のヘモグロビンC変異（HbC）、血友病、ハンチントン病、ハーラー症候群、低ホスファターゼ症、クライنفエルター症候群、クラッペ病、ランガー・ギーディオン症候群、白血球接着不全症（LAD、OMIM番号116920）、白質ジストロフィー、QT延長症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症（MPS）、ネイルパテラ症候群、腎性尿崩症、神経線維腫症、ニーマン・ピック病、骨形成不全症、フェニルケトン尿症（PKU）、ポルフィリン症、プラダー・ウィリ症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・ティビ症候群、サンフィリポ症候群、重症複合免疫不全症（SCID）、シュワッハマン症候群、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血）、スミス・マギニス症候群、スティックラー症候群、テイ・サックス病、血小板減少性骨髄質欠損（TAR）症候群、トリチャー・コリンズ症候群、トリソミー、結節性硬化症、ターナー症候群、尿素回路異常症、フォンヒッペル・リンドウ病、ワールデンブルグ症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウィスコット・アルドリッチ症候群、X連鎖リンパ増殖症候群（XLP、OMIM番号308240）が挙げられる。

【0291】

標的化DNA塩基編集によって治療することができるさらなる例示的な疾患には、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病、GM1、ファブリー病、Tay-Sachs病）、ムコ多糖症（例えば、ハンター病、ヒューラー病）、ヘモグロビン異常症（例えば、鎌状赤血球症、HbC、 α -サラセミア、 β -サラセミア）、および血友病が含まれる。

【0292】

このような方法はまた、宿主における感染症（ウイルスまたは細菌）の治療を可能にする（例えば、ウイルスまたは細菌受容体の発現を遮断し、それによって宿主生物における感染および／または拡散を防止することによって）。標的化され得るウイルスまたはウイルス受容体の非限定的な例としては、HSV-1およびHSV-2などの単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）およびサイトメガロウイルス（CMV）、HHV6およびHHV7が挙げられる。ウイルスの肝炎ファミリーとしては、A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、デルタ肝炎ウイルス（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）、およびG型肝炎ウイルス（HGV）が挙げられる。限定されないが、Picornaviridae（例えば、ポリオウイルスなど）、Caliciviridae、Togaviridae（例えば、風疹ウイルス、デングウイルスなど）、Flaviviridae、Coronaviridae、Reoviridae、Birnaviridae、Rhabdoviridae（例えば、狂犬病ウイルスなど）、Filoviridae、Paramyxoviridae（例えば、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルスなど）、Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルスA型、B型およびC型など）、Bunyaviridae、Ar

enaviridae、Retroviridae、レンチウイルス（例えば、HTLV-I、HTLV-II、HIV-1（HTLV-II、LAV、ARV、HTLRなどとしても知られる）HIV-II）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、インフルエンザウイルスおよびダニ媒介性脳炎ウイルスを含む他のウイルスまたはその受容体が標的化されてもよい。例えば、これらおよび他のウイルスの説明については、Virology, 3rd Edition (W. K. Joklik ed. 1988)、Fundamental Virology, 2nd Edition (B. N. Fields and D. M. Knipe 編集, 1991を参照されたい)。HIVの受容体としては、例えば、CCR-5およびCXCR-4が挙げられる。

【0293】

主題のAAVバリエーションによって送達される遺伝子産物は、筋肉疾患および外傷に直接的もしくは間接的に関連する遺伝子産物または遺伝子産物活性のレベルを変化させるために使用され得る。主題のAAVバリエーションが形質導入された骨格筋、心筋、または平滑筋は、遠隔臓器におけるtransでの疾患の治療のための治療用タンパク質を産生および分泌するバイオ工場としても使用することができる。遺伝子産物が遺伝性疾患に直接的または間接的に関連している遺伝子としては、例えば、以下の遺伝子産物のいずれかをコードする遺伝子が挙げられる。ミニジストロフィンおよびマイクロジストロフィンを含むジストロフィン（DMD、例えば、GenBank受託番号NP 003997.1）、チチン（TTN）、チチンキャップ（TCAP）cc-サルコグリカン（SGCA）、β-サルコグリカン（SGCB）、γ-サルコグリカン（SGCG）またはδ-サルコグリカン（SGCD）、アルファ-1-アンチトリプシン（AL-AT）、ミオシン重鎖6（MYH6）、ミオシン重鎖7（MYH7）、ミオシン重鎖11（MYH11）、ミオシン軽鎖2（ML2）、ミオシン軽鎖3（ML3）、ミオシン軽鎖キナーゼ2（MYLK2）、ミオシン結合タンパク質C（MYBPC3）、デスミン（DES）、ダイナミン2（DNM2）、ラミニンcc2（LAMA2）、ラミンA/C（LMNA）、ラミンB（LMB）、ラミンB受容体（LBR）、ジスフェルリン（DYSF）、エメリン（EMD）、インスリン、因子VIIおよび因子IXを含むがこれらに限定されない血液凝固因子、エリスロポエチン（EPO）、リポタンパク質リパーゼ（LPL）、筋小胞体Ca²⁺+ATPアーゼ（SERCA2A）、S100カルシウム結合タンパク質A1（S100A1）、ミオチュブラリン（MTM）、DM1タンパク質キナーゼ（DMPK、例えば、GenBank受託番号NG_009784.1）、グリコーゲンホスホリラーゼL（PYGL）、グリコーゲンホスホリラーゼ、筋肉関連（PYGM、例えば、GenBank受託番号NP 005600.1）、グリコーゲンシンターゼ1（GYS1）、グリコーゲンシンターゼ2（GYS2）、cc-ガラクトシダーゼA（GLA、例えば、GenBank受託番号NP_000160.1、配列番号67）、α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（NAGA）、酸性cc-グルコシダーゼ（GAA、例えば、GenBank受託番号NP_000143.2、配列番号68）、スフィンゴミエリナーゼホスホジエステラーゼ1（SMPD1）、リソソーム酸性リパーゼ（LIPA）、コラーゲンI型α1鎖（COL1A1）、コラーゲンI型α2鎖（COL1A2）、コラーゲンII型α1鎖（COL3A1）、コラーゲンV型α1鎖（COL5A1）、コラーゲンV型α2鎖（COL5A2）、コラーゲンVI型α1鎖（COL6A1）、コラーゲンVI型α2鎖（COL6A2）、コラーゲンVI型α3鎖（COL6A3）、プロコラーゲン-リジン2-オキシグルタル酸 5-ジオキシゲナーゼ（PLOD1）、リソソーム酸性リパーゼ（LIPA）、フラタキシン（FXN、例えば、GenBank受託番号NP_000135.2）、ミオスタチン（MSTN）、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼA（HEXA）、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼB（HEXB）、β-グルコセレブロシダーゼ（GBA）、アデノシン-リン酸デアミナーゼ1（AMPD1）、β-グロビン（HBB）、イズロニダーゼ（IDUA）、イズロン酸2-サルフェート（IDS）、トロポニン1（TNNT1）、トロポニン2（TNNT2）、トロポニンC（TNNT3）、トロポミオシン1（TPM1）、トロポミオシン3（TPM3）、N-アセチ

10

20

30

40

50

ルー a-グルコサミニダーゼ (NAGLU)、N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ (SGSH)、ヘパランー a-グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ (HGSNAT)、インテグリン a7 (IGTA7)、インテグリン a9 (IGTA9)、グルコサミン (N-アセチル)-6-スルファターゼ (GNS)、ガラクトサミン (N-アセチル)-6-スルファターゼ (GALNS)、β-ガラクトシダーゼ (GLB1)、β-グルクロニダーゼ (GUSB)、ヒアルロノグルコサミニダーゼ1 (HYAL1)、酸性セラミダーゼ (ASAH1)、ガラクトシルセラミダーゼ (GALC)、カテプシンA (CTSA)、カテプシンD (CTSA)、カテプシンK (CTSK)、GM2ガングリオシドアクチベーター (GM2A)、アリアルスルファターゼA (ARSA)、アリアルスルファターゼB (ARSB)、ホルミルグリシン生成酵素 (SUMF1)、ノイラミニダーゼ1 (NEU1)、N-アセチルグルコサミン-1-ホスフェートトランスフェラーゼα (GNPTA)、N-アセチルグルコサミン-1-ホスフェートトランスフェラーゼβ (GNPTB)、N-アセチルグルコサミン-1-ホスフェートトランスフェラーゼγ (GNPTG)、ムコリピン-1 (MCOLN1)、NPC細胞内トランスポーター1 (NPC1)、NPC細胞内トランスポーター2 (NPC2)、セロイドリポフスチン症5 (CLN5)、セロイドリポフスチン症6 (CLN6)、セロイドリポフスチン症8 (CLN8)、パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ1 (PPT1)、トリペプチジルペプチダーゼ1 (TPP1)、バテニン (CLN3)、DNAJ熱ショックタンパク質ファミリー40メンバーC5 (DNAJC5)、主要促進剤スーパーファミリドメイン含有8 (MFSD8)、マンノシダーゼαクラス2Bメンバー1 (MAN2B1)、マンノシダーゼβ (MANBA)、アスパルチルグルコサミニダーゼ (AGA)、c c-ルーフコシダーゼ (FUCA1)、シスチノシン、リソソームシステイントランスポーター (CTNS)、シアリン、溶質キャリアファミリー2メンバー10 (SLC2A10)、溶質キャリアファミリー17メンバー5 (SLC17A5)、溶質キャリアファミリー6メンバー19 (SLC6A19)、溶質キャリアファミリー22メンバー5 (SLC22A5)、溶質キャリアファミリー37メンバー4 (SLC37A4)、リソソーム関連膜タンパク質2 (LAMP2)、ナトリウム電位開口型チャネルαサブユニット4 (SCN4A)、ナトリウム電位開口型チャネルβサブユニット4 (SCN4B)、ナトリウム電位開口型チャネルαサブユニット5 (SCN5A)、ナトリウム電位開口型チャネルαサブユニット4 (SCN4A)、カルシウム電位開口型チャネルサブユニットα1e (CACNA1C)、カルシウム電位開口型チャネルサブユニットε1s (CACNA1S)、ホスホグリセリン酸キナーゼ1 (PGK1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ2 (PGAM2)、アミローα-1,6-グルコシダーゼ、4-c c-グルカノトランスフェラーゼ (AGL)、カリウム電位開口型チャネルISK関連サブファミリーメンバー1 (KCNE1)、カリウム電位開口型チャネルISK関連サブファミリーメンバー2 (KCNE2)、カリウム電位開口型チャネルサブファミリーJメンバー2 (KCNJ2)、カリウム電位開口型チャネルサブファミリーJメンバー5 (KCNJ5)、カリウム電位開口型チャネルサブファミリーHメンバー2 (KCNH2)、カリウム電位開口型チャネルKQT様サブファミリーメンバー1 (KCNQ1)、過分極活性化環状ヌクレオチド開口型カリウムチャネル4 (HCN4)、塩化物電位開口型チャネル1 (CLCN1)、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1A (CPT1A)、リアノジン受容体1 (RYR1)、リアノジン受容体2 (RYR2)、架橋インテグレーター1 (BIN1)、LARGEキシロシル-およびグルクロニルトランスフェラーゼ1 (LARGE1)、ドッキングタンパク質7 (DOK7)、フクチン (FKTN)、フクチン関連タンパク質 (FKRP)、セレノプロテインN (SELENON)、タンパク質O-マンノシルトランスフェラーゼ1 (POMT1)、タンパク質O-マンノシルトランスフェラーゼ2 (POMT2)、タンパク質O結合型マンノースN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ1 (POMGNT1)、タンパク質O結合型マンノースN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ2 (POMGNT2)、タンパク質-O-マンノースキナーゼ (POMK)、イソプレノイドシンターゼドメイン含有 (ISPD)、プレクチン (PLEC)、コリン作動

10

20

30

40

50

性受容体ニコチン性エブシロンサブユニット (CHRENE)、コリンO-アセチルトランスフェラーゼ (CHAT)、コリンキナーゼβ (CHKB)、非対称アセチルコリンエステラーゼのカラーゲン様テールサブユニット (COLQ)、シナプスの受容体関連タンパク質 (RAPSN)、フォー・アンド・ア・ハーフLIMドメイン1 (FHL1)、β-1, 4-グルクロニルトランスフェラーゼ1 (B4GAT1)、β-1-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ2 (B3GALNT2)、ジストログリカン1 (DAG1)、膜貫通タンパク質5 (TMEM5)、膜貫通タンパク質43 (TMEM43)、SECIS結合タンパク質2 (SECISBP2)、グルコサミン (UDP-N-アセチル)-2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ (GNE)、アノクタミン5 (ANO5)、染色体可撓性ヒンジドメイン含有1の構造維持 (SMCHD1)、ラクテートデヒドロゲナーゼA (LDHA)、ラクテートデヒドロゲナーゼB (LDHB)、カルパイン3 (CAPN3)、カベオリン3 (CAV3)、三要素モチーフ含有32 (TRIM32)、CCHC型ジンクフィンガー核酸結合タンパク質 (CNBP)、ネブリン (NEB)、アクチン, ccl, 骨格筋 (ACTA1)、アクチン, ccl, 心筋 (ACTC1)、アクチニンcc2 (ACTN2)、ポリ(A)結合タンパク質核1 (PABPN1)、LEMドメイン含有タンパク質3 (LEMD3)、ジンクメタロプロテインナーゼSTE24 (ZMPSTE24)、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTTP)、コリン作動性受容体ニコチン性cclサブユニット、トコフェロールトランスフェラーゼタンパク質 (TTPA)、キネシンファミリーメンバー21 A (KIF21A)、対合様ホメオボックス2a (PHOX2A)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン2 (HSPG2)、間質相互作用分子1 (STIM1)、ノッチ1 (NOTCH1)、ノッチ3 (NOTCH3)、ジストロブレピンa (DTNA)、タンパク質キナーゼAMP活性化非触媒性j2 (PRKAG2)、システイン-およびグリシン-リッチタンパク質3 (CSRPG3)、ビニキュリン (VCL)、ミオゼニン2 (MyoZ2)、ミオパラジン (MYPN)、ジャンクトフィリン2 (JPH2)、ホスホランバン (PLN)、カルレティキュリン3 (CALR3)、ネキシリンF-アクチン結合タンパク質 (NEXN)、LIMドメイン結合3 (LDB3)、アイズアブセント (eyes absent) 4 (EYA4)、ハンチンチン (HTT)、アンドロゲン受容体 (AR)、タンパク質チロシンホスフェート非受容体型11 (PTPNL1)、ジャンクシヨンプラコグロビン (JUP)、デスモブラキン (DSP)、プラコフィリン2 (PKP2)、デスモグレイン2 (DSG2)、デスモコリン2 (DSC2)、カテニンcc3 (CTNNA3)、NK2ホメオボックス5 (NKX2-5)、A-キナーゼアンカータンパク質9 (AKAP9)、A-キナーゼアンカータンパク質10 (AKAP10)、グアニンヌクレオチド結合タンパク質a阻害活性ポリペプチド2 (GNAI2)、アンキリン2 (ANK2)、シントロフィンcc-1 (SNTA1)、カルモジュリン1 (CALM1)、カルモジュリン2 (CALM2)、HTRAセリンペプチダーゼ1 (HTRA1)、フィブリリン1 (FBN1)、フィブリリン2 (FBN2)、キシロシルトランスフェラーゼ1 (XYLT1)、キシロシルトランスフェラーゼ2 (XYLT2)、タファジン (TAZ)、ホモゲンチジン酸1, 2-ジオキシゲナーゼ (HGD)、グルコース-6-ホスファターゼ触媒性サブユニット (G6PC)、1, 4-アルファ-グルカン酵素1 (GBEL)、ホスホフルクトキナーゼ, 筋肉 (PFKM)、ホスホリラーゼキナーゼ調節サブユニットアルファ1 (PHKA1)、ホスホリラーゼキナーゼ調節サブユニットアルファ2 (PHKA2)、ホスホリラーゼキナーゼ調節サブユニットベータ (PHKB)、ホスホリラーゼキナーゼ触媒性サブユニットガンマ2 (PHKG2)、ホスホグリセリン酸ムターゼ2 (PGAM2)、シスタチオニン-ベーター-シターゼ (CBS)、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ (MTHFR)、5-メチルテトラヒドロ葉酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (MTR)、5-メチルテトラヒドロ葉酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼレダクターゼ (MTRR)、メチルマロン酸酸性尿およびホモシステイン尿症, cblD型 (MMADHC)、ミトコンドリアDNA、限定されないが、ミトコンドリアにコードされたNADH:ユビキノンの酸化還元酵素サブユニット1 (MT-ND1)、

10

20

30

40

50

ミトコンドリアにコードされたNADH：ユビキノンオキシドレダクターゼコアサブユニット5（MT-ND5）、ミトコンドリアにコードされたtRNAグルタミン酸（MT-TE）、ミトコンドリアにコードされたtRNAヒスタジン（MT-TH）、ミトコンドリアにコードされたtRNAロイシン1（MT-TLL）、ミトコンドリアにコードされたtRNAリシン（MT-TK）、ミトコンドリアにコードされたtRNAセリン1（MT-TS1）、ミトコンドリアにコードされたtRNAバリン（MT-TV）を含む、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ1（MAP2K1）、B-Rafがん原遺伝子、セリン／トレオニンキナーゼ（BRAF）、raf-1がん原遺伝子、セリン／トレオニンキナーゼ（RAF1）、成長因子、限定されないが、インスリン成長因子1（IGF-1）、トランスフォーミング増殖因子β3（TGFβ3）、トランスフォーミング増殖因子β受容体，I型（TGFβRI）、トランスフォーミング増殖因子β受容体，II型（TGFβRII）、線維芽細胞成長因子2（FGF2）、線維芽細胞成長因子4（FGF4）、血管内皮細胞増殖因子A（VEGF-A）、血管内皮細胞増殖因子B（VEGF-B）、血管内皮細胞増殖因子C（VEGF-C）、血管内皮細胞増殖因子D（VEGF-D）、血管内皮細胞増殖因子受容体1（VEGFR1）、および血管内皮細胞増殖因子受容体2（VEGFR2）、インターロイキン、イムノアドヘシン、サイトカイン、ならびに抗体が挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫調節物質である産物をコードする遺伝子が送達される。例示的な免疫調節遺伝子としては、サイトカイン、ケモカイン、ならびにそれらおよび／またはそれらの受容体に特異的な融合タンパク質または抗体、例えば、抗IL-6融合タンパク質リロナセプト1、補体因子H特異的抗体ランパミズマブなどが挙げられる。

10

20

【0294】

いくつかの実施形態において、部位特異的エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子が送達される。例示的なエンドヌクレアーゼは、天然に存在する制限酵素などを含む。いくつかの実施形態において、送達されるエンドヌクレアーゼとしては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、メガTALEN、メガヌクレアーゼ、Cas9、CasX、CasYなどを含むCRISPR／Cas系が挙げられる。そのような部位特異的エンドヌクレアーゼを操作して、ゲノム内の特定の位置を切断することができ、次いで、非相同末端結合が、いくつかのヌクレオチド（「INDEL」とも称される）を挿入または欠失する一方で、その破損を修復することができる。次いで、そのような部位特異的エンドヌクレアーゼは、タンパク質を枠外に放り出し、遺伝子を効果的にノックアウトする。

30

【0295】

本明細書に開示されるバリエーションrAAVベクターのいくつかの実施形態において、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、構成的プロモーターに作動可能に連結されている。好適な構成的プロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター（CMV）（Stinski et al. (1985) Journal of Virology 55 (2) : 431-441）、CMV早期エンハンサー／ニワトリβ-アクチン（CBA）プロモーター／ウサギβ-グロビンイントロン（CAG）（Miyazaki et al. (1989) Gene 79 (2) : 269-277、CBSB（Jacobson et al. (2006) Molecular Therapy 13 (6) : 1074-1084）、ヒト伸長因子laプロモーター（EF1a）（Kim et al. (1990) Gene 91 (2) : 217-223）、ヒトホスホグリセレートキナーゼプロモーター（PGK）（Singer-Sam et al. (1984) Gene 32 (3) : 409-417、ミトコンドリア重鎖プロモーター（Loderio et al. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109 (17) : 6513-6518）、ユビキチンプロモーター（Wulff et al. (1990) FEBS Letters 261 : 101-105）が挙げられる。他の実施形態において、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、誘導性プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの場合において、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、組織特異的または細胞型特異的調節要素に作動可

40

50

能に連結されている。例えば、いくつかの場合において、目的の遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列は、肝臓特異的調節要素（例えば、肝臓特異的プロモーター）、例えば、肝臓細胞における作動可能に連結された遺伝子の選択的発現を付与する調節要素に作動可能に連結されている。好適な肝臓特異的調節要素には、例えば、アルブミンプロモーター、アルファ₁-アンチトリプシン、およびトランスサイレチンプロモーター（TTR）が含まれる。いくつかの場合において、目的の遺伝子は、CNS特異的プロモーターまたは調節要素に作動可能に連結されている。好適なCNS特異的プロモーターとしては、限定されないが、GFAPプロモーター（アストロサイト）、SYN1プロモーター（ニューロン）、およびNSE/RU5'プロモーター（成熟ニューロン）が挙げられる。いくつかの場合において、目的の遺伝子は、リガンド応答性プロモーターまたは分子スイッチに作動可能に連結されている（例えば、TetR系（Berens and Hillebrand, 2003）Eur J Biochem 270:3109-3121）。

10

【0296】

上述のように、本明細書に記載の組成物および方法を、遺伝子改変、遺伝子補正、および遺伝子破壊のために使用することができる。

【0297】

本明細書に記載の組成物および方法はまた、幹細胞ベースの療法に適用することもでき、幹細胞ベースの療法としては、限定されないが、体細胞変異の補正、優性陰性対立遺伝子の破壊、病原体の細胞への侵入または産生感染に必要な遺伝子の破壊、組織操作の増強（例えば、機能性組織の分化または形成を促進するための遺伝子活性を編集することによるもの）、および／または機能性組織の分化または形成を促進するための遺伝子活性の破壊、分化を遮断または誘導すること（例えば、特定の系統経路を分化するための幹細胞を促進するための分化を遮断する遺伝子を編集することによるもの）を引き起こす編集が挙げられる。この手順のための細胞型には、限定されないが、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞が含まれる。さらに、患者自身の体細胞からも生成される人工多能性幹細胞（iPSC）を使用してもよい。したがって、これらの幹細胞またはその誘導体（分化した細胞型または組織）は、それらの起源または組織適合性に関係なく、潜在的に任意のヒトに移植され得る。

20

【0298】

本組成物および方法は、体細胞療法にも使用することができ、それによって、それらの生物学的特性を増強するように改変された細胞のストックの産生を可能にする。そのような細胞は、細胞のドナー供給源およびレシピエントに対するそれらの組織適合性とは無関係に、様々な患者に注入され得る。

30

【0299】

治療用途に加えて、本明細書に記載されるDNA編集複合体を、細胞株操作および疾患モデルの構築に使用することができる。

【実施例】

【0300】

実施例1：ライブラリ構築

概要：本明細書に開示される方法および組成物は、組織、細胞、またはオルガネラへの特異的送達を含む様々な用途に使用することが可能なAAVカプシドの設計および特定、ならびにAAVを使用して投与される患者に存在し得る抗AAV中和抗体を回避することができるAAVカプシドの発見に有用である。本方法は、AAVに新しい属性および／または改善された属性を付与するための、AAVカプシドタンパク質中の表面露出ループおよび／または超可変領域の1つへのランダム配列（ライブラリ）の挿入を記載する。本方法はまた、スクリーニングのためのいくつかのAAVライブラリを産生する、多くの天然に存在するAAV血清型のカプシドタンパク質へのランダム配列の挿入を含む。次いで、これらのAAVバリエーションのライブラリを動物に注射するか、または細胞株を感染させるために使用する。所望の組織、細胞またはオルガネラの増強された形質導入が可能なAAVバリエーションの特定に役立たせるために、AAVバリエーションのゲノムは、AAVの送達およ

40

50

び導入遺伝子発現を追跡するための蛍光レポータータンパク質を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、レポータータンパク質は、カプシド遺伝子に挿入されたランダム配列と生体情報的に関連しているバーコードに連結されている。いくつかの実施形態において、AAVライブラリには、所望の組織および／または細胞中の核が、AAVバリエーションライブラリへの曝露後に単離されるインビボ選択が行われる。次いで、挿入された配列は、関連するバーコードの配列決定によって、またはレポーター遺伝子を発現する細胞からのAAVペイロード核酸の精製および配列決定によって特定することができる。次いで、選択されたAAV核酸配列を分析して、挿入された配列を含む親AAV血清型を決定するとともに、挿入されたアミノ酸自体を決定することができる。本プロセスは、2回、3回、またはそれより多いラウンドを繰り返し、第1のラウンドから単離されたAAVバリエーションをプールするか、または合成し、これを使用して、第2のセットの動物または別のセットの細胞に注射して、単離されたAAVバリエーションの特異性および性能における信頼性をさらに高めてもよい。

10

【0301】

構築：カプシドタンパク質の露出ループにペプチドを挿入することによって、カプシドライブラリを構築した。7、10、または15個のアミノ酸ペプチドをコードする挿入を含むライブラリを、AAV1、2、3B、5、6、8、および9のカプシドタンパク質中で作製した。AAVカプシド配列をそれぞれ合成的に製造した(ATUM)。ペプチドをコードする配列の挿入前に、挿入部位に隣接するカプシドタンパク質をコードする領域にサイレント変異を導入した。このようにして、全てのライブラリで同じセットのプライマー（例えば、DO112__MiCap1__VRVIII__FwdおよびDO113__MiCap1__VRVIII__Rev）を使用することができる（図1を参照されたい）。加えて、HindIII、AgeI、およびBsaIを含む分子クロニングに必要な制限酵素部位を、サイレント変異誘発により除去した。以下の表1は、変異が導入された領域における各カプシド遺伝子の野生型配列を示す。変異ヌクレオチドを太字で示す。得られた配列は、保存されたNGSプライマー対で増幅することができる。

20

【0302】

同様のアプローチを使用して、カプシド遺伝子中の他の可変領域または表面露出ループに隣接する保存されたプライマー結合部位を設計した。合成された完全カプシド遺伝子ヌクレオチド配列は、以下に含まれる。

30

表1：VR-VIII挿入領域に隣接するプライマー結合部位のサイレント変異の位置

40

50

【表 1】

カプシド	野生型順方向配列 (太字は変異ヌクレオチド)	アミノ酸位置	野生型逆方向配列 (太字は変異ヌクレオチド)	アミノ酸位置
AAV 1	TAACCCTGTGGCCA CCGAA (配列番号 33)	571	GACGTGTACCTGCAG GGTCCC (配列番号 34)	612、 617
AAV 2	CAATCCCGTGGCTA CGGAG (配列番号 35)	568、 569、 572、 573、 574	GATGTGTACCTTCAG GGGCCC (配列番号 36)	610、 611、 613、 615、 616、 617
AAV 3B	CAATCCTGTGGCAA CAGAG (配列番号 37)	569、 570、 571、 573、 574、 575	GACGTGTACCTTCAA GGACCT (配列番号 38)	612、 614、 615、 616
AAV 6	TAACCCCGTGG CCACCGAA (配列番号 39)	該当なし	GACGTATACCTG CAGGGTCCT (配列番号 40)	該当なし
AAV 8	TAACCCTGTGGCTA CAGAG (配列番号 41)	573、 575、 576、 577	GACGTGTACCTGCAG GGTCCC (配列番号 42)	614、 619
AAV 9	TAACCCGGTAGCAA CGGAG (配列番号 43)	571、 572、 573、 574、 575	GATGTGTACCTGCAA GGACCC (配列番号 44)	611、 612、 615、 616、 617

【0303】

AAV1 合成 VP1 カプシド 遺伝子 (配列番号 45)

ATGGCTGCGGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGGACAA
 ACCTCTCTGAGGGGCAATTCGCGAGTGGTGGGACTTGAAACC
 TGGAGCCCCGAAAGCCCAAAGCCAAACCAGCAAAGAGCAGGAC
 GACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCCCTGGCTACAAGTACCTTCG
 GACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCCGTCAACGC
 GCGGAGCGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCCTACGAC
 CAGCAGCTCAAAGCGGGGTGACAATCCGTACCTGCGGGTATA
 ACCACGCCGACGCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGA
 TACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAG
 GCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGG
 AAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAACGTCCGGGTAGA
 GCAGTCGCCACAAGAGCCAGACTCCTCCTCGGGCATCGGC
 AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTG
 GTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGATCCACAACC
 TCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCCGCTGCTGTGGGACCT
 ACTACAATGGCTTTCAGGCGGGTGGCGCACCAATGGGCAGACA
 ATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAA
 TTGGCATTTGCGATTCCACATGGCTGGGGCGACAGAGTCATC
 ACCACCAGCACCCGCAACCTGGGGCCTTGCCCCACCTACAAATA

A C C A C C T C T A C A A G C A A A T C T C C A G T G C T T C A A C G G G G G C
C A G C A A C G A C A A C C A C T A C T T C G G C T A C A G C A C C C C C T G G
G G G T A T T T T G A T T T C A A C A G A T T C C A C T G C C A C T T T T T C A C
C A C G T G A C T G G C A G C G A C T C A T C A A C A A C A A T T G G G G A T T
C C G G C C C A A G A G A C T C A A C T T C A A A C T C T T C A A C A T C C A A
G T C A A G G A G G T C A C G A C G A A T G A T G G C G T C A C A A C C A T C G
C T A A T A A C C T T A C C A G C A C G G T T C A A G T C T T C T C G G A C T C
G G A G T A C C A G C T T C C G T A C G T C C T C G G C T C T G C G C A C C A G
G G C T G C C T C C C T C C G T T C C C G G C G G A C G T G T T C A T G A T T C
C G C A A T A C G G C T A C C T G A C G C T C A A C A A T G G C A G C C A A G C 10
C G T G G G A C G T T C A T C C T T T T A C T G C C T G G A A T A T T T C C C T
T C T C A G A T G C T G A G A A C G G G C A A C A A C T T T A C C T T C A G C T
A C A C C T T T G A G G A A G T G C C T T T C C A C A G C A G C T A C G C G C A
C A G C C A G A G C C T G G A C C G G C T G A T G A A T C C T C T C A T C G A C
C A G T A C C T G T A T T A C C T G A A C A G A A C T C A A A A T C A G T C C G
G A A G T G C C C A A A A C A A G G A C T T G C T G T T T A G C C G T G G A T C
T C C A G C T G G C A T G T C T G T T C A G C C C A A A A A C T G G C T A C C T
G G A C C C T G T T A C C G G C A G C A G C G C G T T T C T A A A A C A A A A A
C A G A C A A C A A C A A C A G C A A T T T T A C C T G G A C T G G T G C T T C 20
A A A A T A T A A C C T C A A T G G G C G T G A A T C C A T C A T C A A C C C T
G G C A C T G C T A T G G C C T C A C A C A A A G A C G A C G A A G A C A A G T
T C T T T C C C A T G A G C G G T G T C A T G A T T T T T G G A A A A G A G A G
C G C C G G A G C T T C A A A C A C T G C A T T G G A C A A T G T C A T G A T T
A C A G A C G A A G A G G A A A T T A A A G C C A C T A A C C C C G T G G C C A
C C G A A A G A T T T G G G A C C G T G G C A G T C A A T T T C C A G A G C A G
C A G C A C A G A C C C T G C G A C C G G A G A T G T G C A T G C T A T G G G A
G C A T T A C C T G G C A T G G T G T G G C A A G A T A G A G A C G T A T A C C
T G C A G G G T C C T A T T T G G G C C A A A A T T C C T C A C A C A G A T G G
A C A C T T T T C A C C C G T C T C C T C T T A T G G G C G G C T T T G G A C T C 30
A A G A A C C C G C C T C C T C A G A T C C T C A T C A A A A A C A C G C C T G
T T C C T G C G A A T C C T C C G G C G G A G T T T T C A G C T A C A A A G T T
T G C T T C A T T C A T C A C C C A A T A C T C C A C A G G A C A A G T G A G C
G T G G A G A T T G A A T G G G A G C T G C A G A A A G A A A A C A G C A A G C
G C T G G A A T C C C G A A G T G C A G T A C A C A T C C A A T T A T G C A A A
A T C T G C C A A C G T T G A T T T T A C T G T G G A C A A C A A T G G A C T T
T A T A C T G A G C C T C G C C C C A T T G G C A C C C G T T A C C T T A C C C
G T C C C C T G T A A

A A V 2 合成 V P 1 カプシド 遺伝子 (配列番号 46)

A T G G C T G C C G A T G G T T A T C T T C C A G A T T G G C T C G A G G A C A
C T C T C T C T G A A G G A A T A A G A C A G T G G T G G A A G C T C A A A C C 40
T G G C C C A C C A C C A C C A A A G C C C G C A G A G C G G C A T A A G G A C
G A C A G C A G G G G T C T T G T G C T T C C T G G G T A C A A G T A C C T C G
G A C C C T T C A A C G G A C T C G A C A A G G G A G A G C C G G T C A A C G A
G G C A G A C G C C G C G G C C C T C G A G C A C G A C A A A G C C T A C G A C
C G G C A G C T C G A C A G C G G A G A C A A C C C G T A C C T C A A G T A C A
A C C A C G C C G A C G C G G A G T T T C A G G A G C G C C T T A A A G A A G A
T A C G T C T T T T G G G G G C A A C C T C G G A C G A G C A G T C T T C C A G
G C G A A A A A G A G G G T T C T T G A A C C T C T G G G C C T G G T T G A G G
A A C C T G T T A A G A C G G C T C C G G G A A A A A A G A G G C C G G T A G A
G C A C T C T C C T G T G G A G C C A G A C T C C T C C T C G G G A A C C G G A 50

A A G G C G G G C C A G C A G C C T G C A A G A A A A G A C T C A A T T T T G
G T C A G A C T G G C G A C G C A G A C T C A G T A C C T G A C C C C C A G C C
T C T C G G A C A G C C A C C A G C A G C C C C C T C T G G T C T G G G A A C T
A A T A C G A T G G C T A C A G G C A G T G G C G C A C C A A T G G C A G A C A
A T A A C G A G G G C G C C G A C G G A G T G G G T A A T T C C T C G G G A A A
T T G G C A T T G C G A T T C C A C A T G G A T G G G C G A C A G A G T C A T C
A C C A C C A G C A C C C G A A C C T G G G C C C T G C C C A C C T A C A A C A
A C C A C C T C T A C A A A C A A A T T T C C A G C C A A T C A G G A G C C T C
G A A C G A C A A T C A C T A C T T T G G C T A C A G C A C C C C C T G G G G G
T A T T T T G A T T T C A A C A G A T T C C A C T G C C A C T T T T C A C C A C 10
G T G A C T G G C A A A G A C T C A T C A A C A A C A A C T G G G G A T T C C G
A C C C A A G A G A C T C A A C T T C A A G C T C T T T A A C A T T C A A G T C
A A A G A G G T C A C G C A G A A T G A C G G T A C G A C G A C G A T T G C C A
A T A A C C T T A C C A G C A C G G T T C A G G T G T T T A C T G A C T C G G A
G T A C C A G C T C C C G T A C G T C C T C G G C T C G G C G C A T C A A G G C
T G C C T C C C T C C G T T C C C G G C G G A C G T C T T C A T G G T G C C A C
A G T A T G G A T A C C T C A C C C T G A A C A A C G G G A G T C A G G C A G T
A G G A C G C T C T T C A T T T T A C T G C C T G G A G T A C T T T C C T T C T
C A G A T G C T G C G T A C C G G A A A C A A C T T T A C C T T C A G C T A C A
C T T T T G A G G A C G T T C C T T T C C A C A G C A G C T A C G C T C A C A G 20
C C A G A G T C T G G A C C G T C T C A T G A A T C C T C T C A T C G A C C A G
T A C C T G T A T T A C C T G A G C A G A A C A A A C A C T C C A A G T G G A A
C C A C C A C G C A G T C A A G G C T T C A G T T T T C T C A G G C C G G A G C
G A G T G A C A T T C G G G A C C A G T C T A G G A A C T G G C T T C C T G G A
C C C T G T T A C C G G C A G C A G C G A G T A T C A A A G A C A T C T G C G G
A T A A C A A C A A C A G T G A A T A C T C G T G G A C T G G A G C T A C C A A
G T A C C A C C T C A A T G G C A G A G A C T C T C T G G T G A A T C C G G G C
C C G G C C A T G G C A A G C C A C A A G G A C G A T G A A G A A A A G T T T T
T T C C T C A G A G C G G G G T T C T C A T C T T T G G G A A G C A A G G C T C
A G A G A A A A C A A A T G T G G A C A T T G A A A A G G T C A T G A T T A C A 30
G A C G A A G A G G A A A T C A G G A C A A C T A A C C C C G T G G C C A C C G
A A C A G T A T G G T T C T G T A T C T A C C A A C C T C C A G A G A G G C A A
C A G A C A A G C A G C T A C C G C A G A T G T C A A C A C A C A A G G C G T T
C T T C C A G G C A T G G T C T G G C A G G A C A G A G A C G T A T A C C T G C
A G G G T C C T A T T T G G G C A A A G A T T C C A C A C A C G G A C G G A C A
T T T T C A C C C C T C T C C C C T C A T G G G T G G A T T C G G A C T T A A A
C A C C C T C C T C C A C A G A T T C T C A T C A A G A A C A C C C C G G T A C
C T G C G A A T C C T T C G A C C A C C T T C A G T G C G G C A A A G T T T G C
T T C C T T C A T C A C A C A G T A C T C C A C G G G A C A G G T C A G C G T G
G A G A T T G A A T G G G A G C T G C A G A A G G A A A A C A G C A A A C G C T 40
G G A A T C C C G A A A T T C A G T A C A C T T C C A A C T A C A A C A A G T C
T G T T A A T G T G G A C T T T A C T G T G G A C A C T A A T G G C G T G T A T
T C A G A G C C T C G C C C C A T T G G C A C C A G A T A C C T G A C T C G T A
A T C T G T A A

A A V 3 B 合成 V P 1 カプシド 遺伝子 (配列番号 47)

A T G G C T G C T G A C G G T T A T C T T C C A G A T T G G C T C G A G G A C A
A C C T T T C T G A A G G C A T T C G T G A G T G G T G G G C T C T G A A A C C
T G G A G T C C C T C A A C C C A A A G C G A A C C A A C A C A C C A G G A C
A A C C G T C G G G G T C T T G T G C T T C C G G G T T A C A A A T A C C T C G
G A C C C G G T A A C G G A C T C G A C A A A G G A G A G C C G G T C A A C G A 50

GGCGGACGCGGCGAGCCCTCGAACAACGACAAAGCCTACGAC
CAGCAGCTCAAGGCCGGTGACAACCCGTAACCTCAAGTACA
ACCACGCCCGACGCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTTCAAGAAGA
TACGTCTTTTGGGGGGCAACCTTGAGCAGAGTCTTCCAG
GCCAAAAAGAGGATCCTTGAGCCTCTTGGTCTGGTTGAGG
AAGCAGCTAAAAACGGCTCCTGGAAAGAGAGGCCCTGTAGA
TCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCATCATCTGGTGTGGC
AAATCGGGCAAAACAGCCTGCCAGAAAAAGACTCAATTTTG
GTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCAGACCCCTCAACC
TCTCGGAGAAACCACCCAGCAGCCCCCACAAGTTTGGGATCT
AATACAATGGCTTTCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACA
ATAACGAGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAAATTCCTCAGGAAA
TTGGCATTGCGATTCCCAATGGCTGGGCGACAGAGTCATC
ACCACCAGCACCCGAAACCTGGGGCCCTGCCCACTTACAACA
ACCATCTCTACAAGCAAAATCTCCAGCCAATCAGGAGCTTC
AAACGACAACCACTACTTTGGCTACAGCACCCCCCTGGGGG
TATTTTGTATTTC AACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCA
GTGACTGGCAGCGACTCATTAACAACAACCTGGGGGATTCG
GCCCAAGAAACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTT
AAAGAGGTCACGCGAGAACGATGGCACGACGACTATTGCCA
ATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTGTTTACGGGACTCGGA
GTATCAGCTCCC GTACGTGCTCGGGTGGCGCACCAAGGC
TGCCTCCCTCCGTTCCCGGGCGGACGTCTTCAATGGTCCCTC
AGTATGGATACCTCACCCCTGAACAACGGGAAGTCAAGCGGT
GGGACGCTCATCCTTTTACTGCTGGAGTACTTCCCTTTCG
CAGATGCTAAGGACTGGAAATAACTTCCAATTCAGCTATA
CCTTCGAGGATGTACCTTTTTCACAGCAGCTACGCTCACAG
CCAGAGTTTGGATCGCTTGATGAATCCTCTCATCGACCAG
TACCTGTATTACCTGAACAGAAACGCAAGGAACAACCTCTG
GAACAACCAACCAATCACGGGCTGCTTTTTAGCCAGGGCTGG
GCCTCAGTCTATGTCTTTG CAGGCCAGAAATTGGCTACCT
GGACCCTGTTACC GG CAGCAGAGACTTTCAAAGACTGCTA
ACGACAACAACAACAGTAACCTTCTCTTGGACAGCGGCCAG
CAAATATCATCTCAATGGCCGCGACTCGCTGGTGAAATCCA
GGACCAGCTATGGCCAGTCACAAGGACGATGAAGAAAAAT
TTTTTCCCTATGCACGGCAATCTAATAATTTGGCAAAGAAGG
GACAACGGCAAGTAACGCGAGAATTAGATAATGTAATGATT
ACGGATGAAGAAGAGATTCTGTACCACTAACCCCGTGGCCA
CCGAACAGTATGGAACCTGTGGCAAATAACTTTGCAGAGCTC
AAATACAGCTCCCACGACTAGAACTGTCAATGATCAGGGG
GCCTTACCTGGCATGGTGTGGCAAAGATCGTGACGTATACC
TGCAGGGTCCCTATTTGGGGCAAAGATTCTCTCACACGGGATGG
ACACTTTTCATCCTTCTCCTCTGATGGGAGGGCTTTGGACTG
AAACATCCGCGCTCCTCAAATCATGATCAAAAAATACTCCGG
TACCGGCAAAATCCTCCGACGACTTTCAGCCCCGGGCCAAGTT
TGCTTCAATTTATCACTCAGTACTCCA CTGGACAGGT CAGC
GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAACAGCAAAC
GTTGGAATCCAGAGATT CAGTACACTTCCAACCTACAACAA
GTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTAGACACTAATGGTGT
TATAGTGAACCTCGCCCCATTTGGAACCCGGGTATCTCACAC

10

20

30

40

50

G A A A C T T G T G A

A A V 5 合成 V P 1 カプシド 遺伝子 (配列番号 48)

A T G T C T T T T G T T G A T C A C C C T C C A G A T T G G T T G G A A G A A G
T T G G T G A A G G T C T T C G C G A G T T T T T G G G C C T T G A A G C G G G
C C C A C C G A A A C C A A A A C C C A A T C A G C A G C A T C A A G A T C A A
G C C C G T G G T C T T G T G C T G C C T G G T T A T A A C T A T C T C G G A C
C C G G A A A C G G A C T C G A T C G A G G A G A G C C T G T C A A C A G G G C
A G A C G A G G T C G C G C G A G A G C A C G A C A T C T C G T A C A A C G A G
C A G C T T G A G G C G G G A G A C A A C C C C T A C C T C A A G T A C A A C C
A C G C G G A C G C C G A G T T T C A G G A G A A A G C T C G C C G A C G A C A C
A T C C T T C G G G G G A A A C C T C G G A A A G G C A G T C T T T C A G G C C
A A G A A A A G G G T T C T C G A A C C T T T T G G C C T G G T T G A A G A G G
G T G C T A A G A C G G C C C C T A C C G G A A A G C G G A T A G A C G A C C A
C T T T C C A A A A A G A A A G A A G G C T C G G A C C G A A G A G G A C T C C
A A G C C T T C C A C C T C G T C A G A C G C C G A A G C T G G A C C C A G C G
G A T C C C A G C A G C T G C A A A T C C C A G C C C A A C C A G C C T C A A G
T T T G G G A G C T G A T A C A A T G T C T G C G G G A G G T G G C G G C C C A
T T G G G C G A C A A T A A C C A A A G G T G C C G A T G G A G T G G G C A A T G
C C T C G G G A G A T T G G C A T T G C G A T T C C A C G T G G A T G G G G G A
C A G A G T C G T C A C C A A G T C C A C C C G A A C C T G G G T G C T G C C C
A G C T A C A A C A A C C A C C A G T A C C G A G A G A T C A A A A G C G G C T
C C G T C G A C G G A A G C A A C G C C A A C G C C T A C T T T G G A T A C A G
C A C C C C C T G G G G G T A C T T T G A C T T T A A C C G C T T C C A C A G C
C A C T G G A G C C C C C G A G A C T G G C A A A G A C T C A T C A A C A A C T
A C T G G G G C T T C A G A C C C C G G T C C C T C A G A G T C A A A A T C T T
C A A C A T T C A A G T C A A A G A G G T C A C G G T G C A G G A C T C C A C C
A C C A C C A T C G C C A A C A A C C T C A C C T C C A C C G T C C A A G T G T
T T A C G G A C G A C G A C T A C C A G C T G C C C T A C G T C G T C G G C A A
C G G G A C C G A G G G A T G C C T G C C G G C C T T C C C T C C G C A G G T C
T T T A C G C T G C C G C A G T A C G G T T A C G C G A C G C T G A A C C G C G
A C A A C A C A G A A A A T C C C A C C G A G A G G A G C A G C T T C T T C T G
C C T A G A G T A C T T T C C C A G C A A G A T G C T G A G A A C G G G C A A C
A A C T T T G A G T T T A C C T A C A A C T T T G A G G A G G T G C C C T T C C
A C T C C A G C T T C G C T C C C A G T C A G A A C C T G T T C A A G C T G G C
C A A C C C G C T G G T G G A C C A G T A C T T G T A C C G C T T C G T G A G C
A C A A A T A A C A C T G G C G G A G T C C A G T T C A A C A A G A A C C T G G
C C G G G A G A T A C G C C A A C A C C T A C A A A A A C T G G T T C C C G G G
G C C C A T G G G C C G A A C C C A G G G C T G G A A C C T G G G C T C C G G G
G T C A A C C G C G C C A G T G T C A G C G C C T T C G C C A C G A C C A A T A
G G A T G G A G C T C G A G G G C G C G A G T T A C C A G G T G C C C C C G C A
G C C G A A C G G C A T G A C C A A C A A C C T C C A G G G C A G C A A C A C C
T A T G C C C T G G A G A A C A C T A T G A T C T T C A A C A G C C A G C C G G
C G A A C C C G G G C A C C A C C G C C A C G T A C C T C G A G G G C A A C A T
G C T C A T C A C C A G C G A G A G C G A G A C G C A G C C G G T G A A C C G C
G T G G C G T A C A A C G T C G G C G G G C A G A T G G C C A C C A A C A A C C
A G A G C T C C A C C A C T G C C C C G C G A C C G G C A C G T A C A A C C T
C C A G G A A A T C G T G C C C G G C A G C G T G T G G A T G G A G A G G G A C
G T G T A C C T C C A A G G A C C C A T C T G G G C C A A G A T C C C A G A G A
C G G G G G C G C A C T T T C A C C C C T C T C C G G C C A T G G G C G G A T T
C G G A C T C A A A C A C C C A C C G C C C A T G A T G C T C A T C A A G A A C

10

20

30

40

50

ACGCCTGTGCCCGGAATATCACCCAGCTTCTCGGACGTGC
CCGTCAGCAGCTTTCATCACCCAGTACAGCACCCGGGCGAGGT
CACCGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACTCC
AAGAGGTGGAACCCAGAGATCCAGTACACAAACAACCTACA
ACGACCCCCCAGTTTGTGGACTTTGCCCCGGACAGCACCCGG
GGAATACAGAACCACCCAGACCTATCGGAACCCCGATACCTT
ACCCGACCCCTTTAA

AAV6合成VP1カプシド遺伝子（配列番号49）

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGGACA
ACCTCTCTGTAGGGGCATTCGCGAGTGGTGGGACTTTGAAACC
TGGAGCCCCGAAACCCCAAAGCCAAACCAGCAAAGAGCAGGAC
GACGGCCCGGGGTCTGGTGCTTCTCTGGCTACAAGTACCTCG
GACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCCGTCAACGC
GGCGGATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCCTACGAC
CAGCAGCTCAAAGCGGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
ACCACGCCCGACGCCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGA
TACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAG
GCCAAGAAGAGGGTTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTTGAGG
AAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAACGTCCGGGTAGA
GCAGTCGCCACAAGAGCCAGACTCCTCCTCGGGCATTTGGC
AAGACAGGCCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTG
GTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAACC
TCTCGGAGAACCTCCAGCAAACCCCGCTGCTGTGGGGACCT
ACTACAATGGCTTTCAGGCGGGTGGCGCACCAATGGGCAGACA
ATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAAATGCCTCAGGAAA
TTGGCATTTGCGATTCCACATGGCTGGGGCGACAGAGTCATC
ACCACCAGCACCCGAACATGGGGCCTTGCCCCACCTATAACA
ACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGTGGCTTCAACGGGGGGC
CAGCAAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACCCCCCTGG
GGGTATTTTGTATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCAC
CACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTTGGGGATT
CCGGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAA
GTCAAGGAGGTACGACGAATGATGGCGTCAACGACCATCG
CTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTC
GGAGTACCAGTTGCGGTACGTCTCGGGCTCTGCGCACCCAG
GGCTGCTCTCCCTCCGTTCCCGGGCGGACGTGTTTATGATT
CGCAGTACGGCTACCTAACGCTCAACAATGGGCAGCCAGGC
AGTGGGACGGTCACTCTTTTACTGCCCTGGAATATTTCCCA
TCGCAGATGCTGAGAACGGGGCAATAACTTTTACCTTTCAGCT
ACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCA
CAGCCAGAGCCTGGACCGGGCTGATGAATCCTCTCATCGAC
CAGTACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAGAAATCAGTCCG
GAAGTGCCCAACAACAAGGACTTGCTGTTTATAGCCGGGGCTC
TCCAGCTGGGCATGTCTGTTCAGCCCCAAAAACTGGCTACCT
GGACCCCTGTTACCGGGCAGCAGCGCGTTTCTAAAAACA
CAGACAACAACAACAAGCAACTTTTACCTGGACTGGTGCTTC
AAAAATATAACCTTAATGGGGCGTGAAATCTATAATCAACCCCT
GGCACTGCTATGGCCCTCACACAAGAGACAAAGACAAAGT
TCTTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTTTGGAAAGGAGAG
CGCCGGAGCTTCAAAACACTGCATTGGACAATGTGATGATC

10

20

30

40

50

ACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCA
CCGAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAG
CAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGTTATGGGA
GCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACC
TGCAAGGGTCCCTATTTGGGCCCAAATTCCTCACACGGGATGG
ACACTTTTCACCCCGTCTCCTCTCATGGGCGGGCTTTGGACTT
AAGCACCCGCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACGCGCTG
TTCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTTTCGGCTACAAAAGTT
TGCTTCAATTCATCACCCAGTATTCACACAGGACAAGTGAGC
GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCGAGAAAGAAAACAGCAAAC
GCTGGAATCCCGAAGGTGCAGTATACATCTAACTATGCAAA
ATCTGCCAACGTTTGATTTCACTGTGGACAACAATGGACTT
TATACTGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCCGTTACCTCACCC
GTCCCCCTGTAA

10

20

30

40

50

AAV8合成VP1カプシド遺伝子（配列番号50）

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGGACA
ACCTCTCTGAGGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACC
TGGAGCCCCGAAGCCCCAAAGCCCAACCAGCAAAGCAGGGAC
GACGGGCCGGGGTCTGGTGTCTTCCCTGGCTACAAAGTACCTCG
GACCCTTCAACGGGACTCGACAAAGGGGGAGCCCCGTCAACGC
GGCGGACGCGAGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGGCCCTACGAC
CAGCAGCTGCGAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA
ACCACGCCGACGCCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAAGA
TACGTCTTTTGGGGGGCAACCCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAG
GCCAAGAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGG
AAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAGAGGCCGGGTAGA
GCCATCACCCCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGGCATC
GGCAAGAAAGGCCCAACAGCCCCGCCAGAAAAAGACTCAATT
TTGGTCAAGACTGGCGGACTCAGAGTCAAGTTCCAGACCCCTCA
ACCTCTCGGAGAAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGA
CCTAATAACAATGGCTGCGAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAG
ACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCTCGGG
AAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGGCGACAGAGTC
ATCACCAACCAAGCACCCGAACCTGGGGCCCTGCCCACTACA
ACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGGACATCGGG
AGGAGCCACCAACGACAAACACCTACTTGGGCTACAGCACCC
CCCTGGGGGGTATTTTGTATTTCAACAGATTCCACTGCCACT
TTTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTG
GGGATTCCGGGCCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAAC
ATCCAGGTCAAGGAGGTACGCGAGAATGAAGGCCACCAAGA
CCATCGCCAATAACCTCACCAAGCACCATCCAGGTGTTTAC
GGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTTACGTCTCGGGCTCTGCC
CACCAAGGGCTGCCCTCCCTCCGTTCCCGGGCGGACGTGTTCA
TGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGGTAG
TCAGGCCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCTTGGGAATAC
TTTCTTTCGCGAGATGCTGAGAACCGGCAACAACCTTCCAGT
TTACTTACACCTTCGAGGACGTGCCCTTTCCACAGCAGCTA
CGCCCAACAGCCAGAGCTTGGACCGGGCTGATGAATCCTCTC
ATCGACCAGTACCTGTATTACCTGTCTCGGACTCAAACA
CAGGAGGCAACGGCAAATACGCGAGACTCTGGGGCTTCAAGCCA

A G G T G G G C C T A A T A C A A T G G C C A A T C A G G C A A A G A A C T G G
C T G C C T G G A C C C T G T T A C C G G C A G C A G C G C G T C T C A A C G A
C A A C C G G G C A A A A C A A C A A T A G C A A C T T T G C C T G G A C T G C
T G G G A C C A A A T A C C A T C T G A A T G G A A G A A A T T C A T T G G C T
A A T C C T G G C A T C G C T A T G G C A A C A C A C A A A G A C G A C G A G G
A G C G T T T T T T T C C C A G T A A C G G G A T C C T G A T T T T T G G C A A
A C A A A A T G C T G C C A G A G A C A A T G C G G A T T A C A G C G A T G T C
A T G C T C A C C A G C G A G G A A G A A A T C A A A A C C A C T A A C C C C G
T G G C C A C C G A A G A A T A C G G T A T C G T G G C A G A T A A C T T G C A
G C A G C A A A A C A C G G C T C C T C A A A T T G G A A C T G T C A A C A G C
C A G G G G G C C T T A C C C G G T A T G G T C T G G C A G A A C C G G G A C G
T A T A C C T G C A G G G T C C T A T T T G G G C C A A G A T T C C T C A C A C
G G A C G G C A A C T T C C A C C C G T C T C C G C T G A T G G G C G G C T T T
G G C C T G A A A C A T C C T C C G C C T C A G A T C C T G A T C A A G A A C A
C G C C T G T A C C T G C G G A T C C T C C G A C C A C C T T C A A C C A G T C
A A A G C T G A A C T C T T T C A T C A C G C A A T A C A G C A C C G G A C A G
G T C A G C G T G G A G A T T G A A T G G G A G C T G C A G A A G G A A A A C A
G C A A G C G C T G G A A C C C C G A G A T C C A G T A C A C C T C C A A C T A
C T A C A A A T C T A C A A G T G T G G A C T T T G C T G T T A A T A C A G A A
G G C G T G T A C T C T G A A C C C C G C C C C A T T G G C A C C C G T T A C C
T C A C C C G T A A T C T G T A A

10

20

A A V 9 合成 V P 1 カプシド 遺伝子 (配列番号 5 1)

A T G G C T G C C G A T G G T T A T C T T C C A G A T T G G C T C G A G G A C A
A C C T T A G T G A A G G A A T T C G C G A G T G G T G G G C T T T G A A A C C
T G G A G C C C C T C A A C C C A A G G C A A A T C A A C A A C A T C A A G A C
A A C G C T C G A G G T C T T G T G C T T C C G G G T T A C A A A T A C C T T G
G A C C C G G C A A C G G A C T C G A C A A G G G G G A G C C G G T C A A C G C
A G C A G A C G C G G C G G C C C T C G A G C A C G A C A A G G C C T A C G A C
C A G C A G C T C A A G G C C G G A G A C A A C C C G T A C C T C A A G T A C A
A C C A C G C C G A C G C C G A G T T C C A G G A G C G G C T C A A A G A A G A
T A C G T C T T T T G G G G G C A A C C T C G G G C G A G C A G T C T T C C A G
G C C A A A A A G A G G C T T C T T G A A C C T C T T G G T C T G G T T G A G G
A A G C G G C T A A G A C G G C T C C T G G A A A G A A G A G G C C T G T A G A
G C A G T C T C C T C A G G A A C C G G A C T C C T C C G C G G G T A T T G G C
A A A T C G G G T G C A C A G C C C G C T A A A A A G A G A C T C A A T T T T G
G T C A G A C T G G C G A C A C A G A G T C A G T C C C A G A C C C T C A A C C
A A T C G G A G A A C C T C C C G C A G C C C C C T C A G G T G T G G G A T C T
C T T A C A A T G G C T T C A G G T G G T G G C G C A C C A G T G G C A G A C A
A T A A C G A A G G T G C C G A T G G A G T G G G T A G T T C C T C G G G A A A
T T G G C A T T G C G A T T C C C A A T G G C T G G G C G A C A G A G T C A T C
A C C A C C A G C A C C C G A A C C T G G G C C C T G C C C A C C T A C A A C A
A T C A C C T C T A C A A G C A A A T C T C C A A C A G C A C A T C T G G A G G
A T C T T C A A A T G A C A A C G C C T A C T T C G G C T A C A G C A C C C C C
T G G G G G T A T T T T G A T T T C A A C A G A T T C C A C T G C C A T T T C T
C A C C A C G T G A C T G G C A G C G A C T C A T C A A C A A C A A C T G G G G
A T T C C G G C C T A A G C G A C T C A A C T T C A A G C T C T T C A A C A T T
C A G G T C A A A G A G G T T A C G G A C A A C A A T G G A G T C A A G A C C A
T C G C C A A T A A C C T T A C C A G C A C G G T C C A G G T C T T C A C G G A
C T C A G A C T A T C A G C T C C C G T A C G T G C T C G G G T C G G C T C A C
G A G G G C T G C C T C C C T C C G T T C C C G G C G G A C G T T T T C A T G A

30

40

50

TTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCA
GGCCGTGGGTCGTTTCGTCCTTTTACTGCCTGGAATATTTTC
CCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTTCCAGTTCA
GCTACGAGTTTGTAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGC
TCACAGCCAAAGCCTGGACCGACTAATGAATCCACTCATC
GACCAGTACCTGTATTACCTGTCAAAGACTATTAAACGGTT
CTGGACAGAATCAACAACGCTAAAAATTAGTGTGGCCGG
ACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGGAAGAAACTACATACCT
GGACCTGTTAACCGGCAGCAGCGTGTCTCAACCACTGTGA
CTCAAAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCCTGGAGCTTC
TTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCT
GGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAAGGAGAGGACCGTT
TCTTTCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTTTGGCAAACAAGG
AACTGGAAGAGACAACGCTGGATGCGGACAAGTCAATGATA
ACCAACGAAGAAGAAATTA AAAACTACTAACCCCGTGGCCA
CCGAATCCTATGGACAAGTGGCCACAACCAACCAGAGTG
CCAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA
ATACTTCCGGGTATGGTTTGGGCAGGACAGAGACGTATACC
TGCAGGGTCCCTATTTGGGCCAAAAATTCCTCACACGGG
CAACTTTTCAACCTTCTCCTCGCTGATGGGAGGGTTTGG
AAGTGAATG
AAGCACCCGCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTG
TACCTGCGGATCCTCCAACGGCCTTCAACAAGGACAAGCT
GAACTCTTTCATCACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGC
GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGC
GCTGGAACCCGGAGATCCAGTACACTTCCAACCTATTACAA
GTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTA
TATAGTGAACCCCGCCCCATTGGGCACCAGATACCTGACTC
GTAATCTGTAA

10

20

30

40

50

AAV1 VP1カプシドタンパク質（配列番号206）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQD
DGRG LVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKA
YDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAV
FQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSG
IGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDPDQPLGEPPTPAAV
GPTTMASGGGAPMADNNEG DG VGNASGNWHCDSTWLGD
ITTSRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNH YFGYSTP
WGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI
QVKEVT TNDGVT TIANNL TSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAH
QGCLPPFPADVFMIPQYGYLT LNNGSQA VGRSSFYCLEYF
PSQMLRTGNNFTFSYT FEEVPFHSSYAH SQSLDR LMNPLI
DQYLYYLNRTQNQSGSAQNKD L LFSRGSPAGMSVQPKNWL
PGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRES
ITIN
PGTAMASHKDDKFFPMSGVMI FGKESAGASNTALDNVM
ITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAM
GALPGMVWQDRDVYLQGP I WAKIPHTDGHFHPSPLMGGFG
LKNPPPQILIKNTVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNG
LYTEPRPIGTRYLTRPL

AAV2 VP1カプシドタンパク質（配列番号207）

MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKD

DSRG LVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKA
YDRQLDSGDNPYLKYNHADA E F Q E R L K E D T S F G G N L G R A V
FQAKKRVLEPLGLVEEPVK T A P G K K R P V E H S P V E P D S S S G
TGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQP P A A P S G L
GTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSSGNWHCDSTWMGDR
VITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTP
WGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKRLNFKLFNI
QVKEVTQNDGTTTTIANNL T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S A H
QGCLPPFPADVFMVPQYGYLT LNNGSQA V G R S S F Y C L E Y F
PSQMLRTGNNFTTFSYTFEDVPFHSSYAHSQS L D R L M N P L I
DQYLYYLSRTNTPSGTTTTQSRLQFSQA G A S D I R D Q S R N W L
PGPCYRQQRVSKTSADNNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VN
PGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVM
ITDEEEIRT TNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQ
GVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHFHPSP L M G G F G
LKHPPPQILIKNT PVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVD TNG
VYSEPRPIGTRYLTRNL

10

AAV3B VP1カプシドタンパク質（配列番号208）

MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWAL K P G V P Q P K A N Q Q H Q D
NRRG LVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKA
YDQQLKAGDNPYLKYNHADA E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V
FQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQE P D S S S G
VGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPTSL
GSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSSGNWHCDSQWL GDR
VITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTP
WGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKKLSFKLFNI
QVKEVTQNDGTTTTIANNL T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S A H
QGCLPPFPADVFMVPQYGYLT LNNGSQA V G R S S F Y C L E Y F
PSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQS L D R L M N P L I
DQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRL L F S Q A G P Q S M S L Q A R N W
LPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL V
NPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNV
MITDEEEIRT TNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVND
QGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHFHPSP L M G G F
GLKHPPPQIMIKNT PVPANPPPTTFSPAKFASFITQYSTGQ
VSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVD TNG
GVYSEPRPIGTRYLTRNL

20

30

AAV5 VP1カプシドタンパク質（配列番号209）

MSFVDHPPDWLEEVGEG L R E F L G L E A G P P K P K P N Q Q H Q D Q
ARGLVLPGYNYLGPGNGLD R G E P V N R A D E V A R E H D I S Y N E
QLEAGDNPYLKYNHADA E F Q E K L A D D T S F G G N L G K A V F Q A
KKRVLEPFGLVEEGA K T A P T G K R I D D H F P K R K K A R T E E D S
KPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGP
LGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP
SYNNHQYREIKSGSV D G S N A N A Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H S
HWSPRDWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVT V Q D S T
TTIANNL T S T V Q V F T D D D Y Q L P Y V V G N G T E G C L P A F P P Q V
FTLPQYGYATLNRDNTENPTERS S S F F C L E Y F P S K M L R T G N
NFEFTYNFEEVPFHSS F A P S Q N L F K L A N P L V D Q Y L Y R F V S

40

50

TNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSG
VNRAVSASFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNT
YALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESEETQPVNR
VAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERD
VYLQGP IWAKIPETGAHFHPS PAMGGFGLKHPPPMMLIKN
TPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENS
KRWNPEIQYTNNYNNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYL
TRPL

AAV6 VP1カプシドタンパク質（配列番号210）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKKANQQKQD
DGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG
KTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPTPAAVGP
TTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKRLNFKLFNIQ
VKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQSLDRLMNP LID
QYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLP
GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINP
GTAMASHKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMI
TDEEEIKATNPVATERFGTVAVN LQSSSTDPATGDVHVMG
ALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIPH TDGHFHPSPLMGGFGL
KHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVS
VEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGL
YTEPRPIGTRYLTRPL

AAV8 VP1カプシドタンパク質（配列番号211）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKKANQQKQD
DGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQ RSPDSSSTGI
GKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPTAAPS GVG
PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRI
ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYST
PWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNNWGFRPKRLSFKLFN
IQVKEVTQNEGKTIANNL TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY
FPSQMLRTGNNFQFTYTTFEDVPFHSSYAHSSQSLDRLMNP L
IDQYLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW
LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLA
NPGIAMATHKDDDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDV
MLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNS
QGALPGMVWQNRDVYLQGP IWAKIPH TDGNFHPSPLMGGF
GLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQ
VSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKYKSTSVDFAVNTE
GVYSEPRPIGTRYLTRNL

AAV9 VP1カプシドタンパク質（配列番号212）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKKANQQHQD

10

20

30

40

50

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

10

【0304】

NGSプライマーの例示的な選択は、以下の表に示され、可変領域は、プライマー名に示される。

20

表2：次世代配列決定分析に使用されるプライマー

【表2-1】

プライマー名	プライマースクレオチド配列（5' - 3'）	配列番号
DO106__MiCap1__VR I__Fwd	ACACGACGCTCTTCCG ATCTNNNNAGAGTCAT CACCACCAGCACC	52
DO107__MiCap1__VR I__Rev	GACGTGTGCTCTTCCG ATCTNNNNNGAAATCAA AATACCCCCAGGG	53

30

40

50

【表 2 - 2】

DO108_MiCap1_VR IV_Fwd	ACACGACGCTCTTCCG ATCTNNNNATCGACCA GTACCTGTATTACCTG	54
DO109_MiCap1_VR IV_Rev	GACGTGTGCTCTTCCG ATCTNNNNNTGCCGGTA ACAGGGTCCAG	55
DO112_MiCap1_VR VII_Fwd	ACACGACGCTCTTCCG ATCTNNNNNTAACCCCG TGGCCACCGAA	56
DO113_MiCap1_VR VII_Rev	GACGTGTGCTCTTCCG ATCTNNNNAGGACCCT GCAGGTATACGTCT	57
DO319_AAV5_MiCap1_VR VII_Fwd	ACACGACGCTCTTCCG ATCTNNNNNGTGAACCG CGTGCGGTACAAC	58
DO320_AAV5_MiCap1_VR VII_Rev	GACGTGTGCTCTTCCG ATCTNNNNNGGGTCCTT GGAGGTACACGTCC	59

10

20

【0305】

ギブソンアセンブリを使用して、導入されたペプチドが、右断片を増幅するために使用されるプライマーによってコードされたカプシドライブラリを生成した（図2を参照）。ギブソンアセンブリ手順を使用してプラスミド骨格へと組み立てることを容易にするために、重複領域を有するカプシド遺伝子配列（「キャップ」）からの2つのPCR産物（左断片および右断片）を増幅した（例えば、Gibson et al (2009) Nat Meth 6 (5) : 343-345を参照されたい）。具体的には、右断片（「RF順方向」）のためのプライマーは、プライマーに組み込まれた挿入されたペプチドをコードするランダムヌクレオチド配列を含む。このプライマーはまた、この右断片増幅産物が、増幅された左断片と重複するため、重複領域をコードする配列も含む。最後に、RF順方向プライマーは、カプシドをコードする配列の右断片に対して相同性を有する相同性領域を含む。

30

【0306】

ペプチドの挿入位置は、AAV血清型ごとに異なっていた（番号付けは、VP1開始コドンから始まる）。以下の表2は、ペプチド挿入が生じたカプシドタンパク質内のアミノ酸位置を示す。AAV6カプシド中の2つのライブラリを、断片を位置454または590のいずれかに挿入するように構築したことに留意されたい。また、AAV9カプシドに基づく3つのライブラリを、断片を位置266、455または589のいずれかに挿入するように構築したことに留意されたい。

40

表3：ペプチドの挿入部位

50

【表 3】

血清型	挿入部位 (アミノ酸位置)
AAV1	590
AAV2	588
AAV3B	589
AAV5	578
AAV6	454
AAV6	590
AAV8	591
AAV9	266
AAV9	455
AAV9	589

10

【0307】

ギブソンアセンブリ反応を、エレクトロコンピテント *E. coli* に形質変換し、得られたプラスミドライブラリを精製した。プラスミドDNAライブラリを、低い多重度のトランスフェクションでHEK293細胞にトランスフェクトし、カプシド遺伝子型と表現型との間の連結を維持した。

【0308】

次いで、ライブラリを製造して、試験のためのウイルスカプシドのライブラリを生成した。野生型 AAV は、ウイルス核酸の複製に必要であり、アデノウイルスヘルパー機能の存在下でウイルス粒子内にパッケージングするのに必要である「Rep」タンパク質 Rep78、Rep68、Rep52、および Rep40 をコードする遺伝子配列を含む。本明細書に記載の AAV ライブラリは、ウイルス ITR および「キャップ」と cis に「Rep」を含まず、したがって、ウイルスカプシドへのライブラリの効率的なパッケージングを達成し、複製遺伝子（「rep」）およびアデノウイルスヘルパー機能（例えば、E2A、E4、VA、E1A および E1B）は、ウイルス製造中に trans で供給される。例えば、ウイルス製造中に trans で Rep を供給するヘルパープラスミドを構築した。Rep 遺伝子（NC_001401、ヌクレオチド 191～2252）を、以下のプライマーを使用し、標準的な AAV ヘルパープラスミドから増幅した。

20

30

表 4：Rep 遺伝子を増幅するためのプライマー

【表 4】

プライマー名	プライマーヌクレオチド配列 (5' - 3')	配列番号
DO7_Rep_Fwd	GTACTCTAGAGTCCTGTA TTAGAGGTCACGTGA	60
DO8_Rep_Rev	TGCTGTCATGCTGTACCGA ATTAACATGTTTATTGGT ACGATCAGAGAGAGTGTC CTCGAGC	61

40

【0309】

これらのプライマーは、XbaI 部位および SphI 部位をそれぞれ付加し、Rep 遺伝子全体を増幅する。次いで、増幅された Rep 断片を、pUC19 の多重クローニング部位内の XbaI および SphI 部位への制限消化およびライゲーションによってクローニングし、pRepInTrans を生成した。VP1 ACG 開始コドンを ATG 生成 pRepInTrans-ATG に変換するために、以下のプライマーを使用した部位特異的変異誘発によって、追加の改変を導入した。

表 5：Rep 遺伝子の改変のためのプライマー

50

【表 5】

プライマー名	プライマースクレオチド配列 (5' - 3')	配列番号
DO444__QCR e p78__Fwd	ACCCCGCCATGGTGGCTG CGCGTT	62
DO445__QCR e p78__Rev	AACGCGCAGCCACCATGG CGGGGT	63

【0310】

より大きな Rep78 / 68 発現によってカプシド構築物の複製を増加させるために、A C G から A T G への改変を導入して、それによって A A V ライブラリ製造収量を向上させた。Rep の除去は、単純ヘルペスウイルスを含む A A V ヘルパーウイルスを頻繁に保有する非ヒト霊長類における選択のための重要な特徴である A A V 複製欠損をもたらす (M o r t o n e t a l (2008) I L A R J 49 (2) : 137-44 を参照されたい)。これに加えて、Rep の除去は、複製能のある A A V を再構成することができる trans で供給される Rep プラスミドとの組換えの可能性を依然として誘発する単純な遺伝子ノックアウトよりも優れている。

【0311】

次いで、A A V ライブラリを、一過性トランスフェクションによって H E K 2 9 3 産生系にパッケージングし、塩化セシウム密度勾配超遠心分離を使用して精製する (例示的なプロセスについては、X i a o a n d S a m u l s k i (1998) J V i r o l 40 : 241-247 を参照されたい)。

【0312】

この技術の目的は、全ての種、組織、細胞型、および組織処理条件で使用可能な方法を開発することである。したがって、A A V は、上述のカプシドライブラリ、および単一の A A V 中のバリエーションカプシド遺伝子の配列を、バーコードのその後の独立した配列決定が連結したカプシド変異を特定するように A A V によって保有される固有のバーコード識別子に連結するいくつかの種類の特定マーカーを保有するように設計される。さらに、単一の A A V はまた、A A V 粒子の意図された標的 (例えば、臓器 (例えば、肝臓または C N S)、および / または臓器内の特定の細胞型 (例えば、肝細胞またはニューロン) への送達

【0313】

加えて、この実施例において、レポーター遺伝子は、バリエーション A A V カプシドによって細胞が形質導入されると、レポーターを細胞核に局在化させる局在化シグナルを含んでいた。最初に、S V 4 0 大型 T 抗原 (P K K K R K V、配列番号 64) を、E G F P または m C h e r r y の N 末端に導入した。第 2 の方法は、E G F P または m C h e r r y の C 末端に融合した K A S H ドメインを使用した。K A S H ドメインは、タンパク質を核エンベロープに局在化させ、効果的にレポーターを核に繋ぎ、核膜孔複合体からの拡散を防止する。第 3 の方法は、ヒストン H 2 B 遺伝子を E G F P、m C l o v e r 3 または m R u b y 3 レポーターの C 末端に融合させた (図 3 A および図 3 B を参照されたい)。蛍光レポーターの発現を駆動するために使用される h S y n 1 (シナプシン) プロモーターは、ニューロンにおける発現に特異的であるように選択された。他のプロモーターが、肝臓特異的トランスサイレチンプロモーターを含む他の標的組織または細胞のために使用され得る。基礎となる概念は、バリエーション A A V カプシドを含む配列を、標的組織、細胞またはオルガネラ中のレポーターに物理的に連結させることである。このようにして、標的組織、細胞またはオルガネラは、A A V 粒子での形質導入に成功したら、蛍光タンパク質を使用して単離することができ、その結果、使用者は、どのカプシドバリエーションが標的組織、細胞またはオルガネラへの A A V 粒子の形質導入を可能にするかを決定することができる。

【0314】

いくつかの例において、バーコードを、バリエーションカプシドタンパク質を含む各AAVゲノムに挿入し、ライブラリがインビボ選択を通過した後に、ユーザーがバーコードの独立した配列決定分析によってカプシドタンパク質における変異を特定することを可能にする（以下を参照されたい）。基礎となる概念は、バリエーションAAVカプシドを含む配列を、標的組織、細胞またはオルガネラ中のレポーターに物理的に連結させることである。このようにして、標的組織、細胞またはオルガネラは、AAV粒子での形質導入に成功したら、蛍光タンパク質を使用して単離することができ、その結果、使用者は、どのカプシドバリエーションが標的組織、細胞またはオルガネラへのAAV粒子の形質導入を可能にするかを決定することができる。いくつかの例において、各ペプチドコード配列は、複数の異なる核酸配列で合成され、これらは全て同じペプチドをコードする。各核酸配列は、ペプチドバリエーションの性能（例えば、濃縮）が、2つ以上のバリエーションが同じペプチド配列で特定されるときに検証され得るように、固有のバーコードに連結されているが、バリエーションは、そのペプチドをコードする異なる核酸配列を含む。

10

【0315】

DNA合成およびその後の分子クローニングステップによって生成されたライブラリについて、全てのバーコードおよびペプチドコード配列を計算的に設計した。重要なことに、後のクローニングに使用されるであろう制限酵素認識部位を含む配列が除外された。配列を、40～60%のGC含有量を有し、長さが3を超えるホモポリマーを有さず、配列間の類似性（編集距離）が最小限であるように設計した。

20

【0316】

各バーコードを各変異カプシド配列と生体情報的に連結するために、2つのアプローチを行った。

【0317】

方法1は、ILLUMINA（登録商標）配列決定を用いた。まず、図4Aおよび図4Bに概説される発現構築物にバーコードを挿入した。バーコード配列を挿入するために、5'ギブソンアセンブリ領域1番を、カプシド遺伝子中のカ変領域に連結され、次いで、3'ギブソンアセンブリ領域2番に連結されたDNA断片として合成した（図4Aのステップ1を参照されたい）。したがって、合成配列は、可変バーコード領域と、可変カプシド配列とを含む。また、バーコード配列と可変配列との間に2つの制限ヌクレアーゼ部位を含む。IIs型制限部位BsaIを使用して、最終構築物の傷のない組み立てを容易にした。カプシド遺伝子の3'配列が増幅される別個のPCR手順を行った（ステップ2）。次に、ギブソンアセンブリによって中間体AAV構築物を生成し、ここで、この構築物は、5'から3'への順序で、5'ITRと、SV40ポリAシグナルと、バーコードと、2つの制限エンドヌクレアーゼ部位と、バリエーションカプシド配列と、カプシドタンパク質の3'領域と、カプシド発現構築物のためのポリA配列と、3'ITRとを含んでいた（ステップ3）。代替アプローチ（図4C）において、ステップ1～3が改変される。ステップ1において、2つのDNA断片が合成される。断片Aは、ギブソンアセンブリ領域1番と、BsaI部位と、可変カプシド領域と、PCRプライマーとして使用されるカプシド遺伝子に相同な領域とを含む。断片Bは、ギブソンアセンブリ領域2番と、ランダムバーコードと、BsaI部位と、ギブソンアセンブリ領域1番とを含む。次に、ステップ1で合成した断片AをPCRプライマーとして使用してカプシド遺伝子の3'配列が増幅されるPCR手順を行う。次に、ギブソンアセンブリによって中間体AAV構築物を生成し、ここで、この構築物は、5'から3'への順序で、5'ITRと、SV40ポリAシグナルと、バーコードと、2つの制限エンドヌクレアーゼ部位と、バリエーションカプシド配列と、カプシドタンパク質の3'領域と、カプシド発現構築物のためのポリA配列と、3'ITRとを含む（ステップ3）。図4A／図4Bおよび図4C／図4Dに記載される両方のアプローチでは、ステップ4～7は同等である。バーコードおよびバリエーションカプシド配列を両方向にわたるように、ペアエンドILLUMINA（登録商標）配列決定を行う（ステップ4）。このようにして生成された配列は、カプシド遺伝子中の特定のバリエーション配列に特

30

40

50

異的なバーコード配列を連結する。ステップ4でのILLUMINA（登録商標）配列決定は、合成中に指定されたバーコードとバリエーション配列との間の99.6%の正確な一致を示した。ステップ5は、BsaI制限酵素による消化を含んでいた。ステップ6は、H2B、EGFP、細胞型特異的プロモーター（例えば、hSyn1）、p40プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端が調製されるPCR増幅ステップであった。あるいは、H2B、EGFP、細胞型特異的プロモーター（例えば、hSyn1）、p40プロモーター、およびカプシド遺伝子の5'末端は、別個のドナープラスミド中で調製され、BsaIで消化され、ゲル精製されてもよい。ステップ7は、最終構築物を組み立てるための傷のないゴールデンゲートクロニングステップであった。最終ライブラリの試料のSanger配列決定は、88/88個の個々のクローンが、バーコードとバリエーションカプシド配列との間の正しい指定された結合を示したことを示した。

10

【0318】

方法2は、ILLUMINA（登録商標）およびOXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定の両方を用いた。まず、AAVカプシドライブラリを、可変配列をプライマーを使用してカプシド遺伝子に付加する、図2に示す方法によって組み立てた。次に、カプシド遺伝子ライブラリを、レポーター遺伝子およびランダムバーコード配列を含むベクターにクロニングした（図5を参照されたい）。各ランダムバーコード配列を各バリエーションカプシド配列と連結させるために、2種類の配列決定分析を実施した。標準的なILLUMINA（登録商標）配列決定は、核酸の短い伸長部（およそ300bp）に対して非常に正確であり、一方、OXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定は、かなり長い配列リードを得ることができる。しかしながら、OXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定は、およそ12%のエラー率を有し、読み取り配列においてインデルを生成する場合があるため、それ自体はこの目的には適していない。したがって、バーコード領域を配列決定したセットと、可変カプシド配列を配列決定したセットである、ILLUMINA（登録商標）配列決定の2つのセットを最初に実施した。その後、OXFORD NANOPORE（登録商標）配列決定反応を完了して、AAVウイルスゲノム全体にわたる長いリード長を提供した。ILLUMINA（登録商標）配列決定よりも正確さは劣るが、Nanopore配列決定は、既知のバーコード配列と既知のバリエーションカプシド配列とのマッチングを可能にする長いリード長のデータを提供する。

20

【0319】

これらの方法の両方の結果は、各バーコードを各バリエーションカプシド配列に一致させる「ルックアップ」テーブルを作成したことであった。AAVを標的細胞、組織、またはオルガネラから単離したら、ルックアップテーブルを使用することにより、バリエーションカプシドの配列を知ることができるため、核酸バーコードの配列決定のみが必要であった。

30

【0320】

ライブラリを、インビトロで初代マウス皮質ニューロン（Gibco）において試験した。ライブラリは、各血清型における全てのAAVバリエーションの混合物であった。細胞を、細胞当たり 3×10^3 、 1×10^4 、 3×10^4 、 1×10^5 、および 3×10^5 個のベクターゲノムの用量範囲にわたってAAVバリエーションで治療し、以下に記載するようにEGFP陽性核を単離した。別途、感染したニューロンから全RNAを単離し、標準プロトコルに従ってcDNAへの逆転写に使用し、AAV mRNA転写産物に特異的なプライマー、DO441__AAVSpecific__RT: 5'GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC（配列番号65）。次いで、得られたcDNAバーコードを、ILLUMINA（登録商標）配列決定によって、NGSプライマーDO439__RNABarcode__Fwd: 5'ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNGCATCACAAATTTTCAACAAATAAAGC（配列番号66）およびDO440__RNABarcode__Rev: 5'GACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNGCCGTGTCCGAGGGTACTAAG（配列番号67）を用いて配列決定し、バリエーション性能を定量化した。回収されたAAVバリエーションの試料の結果を図6に示す。ここで、log2倍率変化は、投与されたライブラリ中のその頻度と比較して、形質導入

40

50

された細胞から単離されたバリエーションの濃縮を表す。図6のX軸は、試料複製物にわたるバリエーション性能の相対的変動性を表す。ここからわかるように、バリエーション性能は、多くの場合、親血清型に基づくクラスターであり、AAV1にペプチド挿入を含むバリエーションが、最も濃縮され、最も可変性が低い。図7Aは、単独でプロットされたAAV1血清型バリエーションを示し、野生型AAV1血清型（カプシド配列中に挿入されたアミノ酸がない）の性能も示す。ここからわかるように、野生型AAV1血清型と比較して、増加した濃縮を示す多くのバリエーションが存在した。同様に、図7Bは、単独でプロットされたAAV2へのペプチド挿入に基づくバリエーションを示し、野生型AAV2の相対的な性能を示す。本方法は、野生型配列と比較して導入遺伝子発現の濃縮を示したAAV2バリエーションを作製した。濃縮されたAAVバリエーションを特定する異なる方法が同様の結果をもたらすかどうかを見るための比較も行った。図8は、RNA単離、cDNA合成、およびバーコード定量に基づいて評価したバリエーション性能が、EGFP陽性核の単離および可変カプシド領域の配列決定によって評価した性能と類似していたことを示す。さらに、Neuro2A細胞（ATCC CCL-131）およびヒト人工多能性幹細胞に由来するiCellニューロン（NCR-100-010-001、Cellular Dynamics International）においてライブラリ性能を評価した。個々のバリエーションの性能は、異なる選択圧を提示する細胞株間で異なっていた。バリエーションの性能を評価するための本明細書に記載の方法は、一貫して適用可能であり、成功した。バリエーションは以下の通りであった。

表6．評価したAAVバリエーション

【表6-1】

AAVバリエーション	配列番号
KSPHPSV (AAV1)	配列番号199
IKSNLTY (AAV1)	配列番号200

【表6-2】

STSPHAPSKE (AAV2)	配列番号201
HATPQFDPSQ (AAV6)	配列番号202
SALGLQAKAY (AAV9)	配列番号203

【0321】

実施例2：マウスにおけるバリエーションAAVライブラリのインビボ選択

これらのAAVライブラリの構築の目標は、任意の種における任意の組織、細胞またはオルガネラへのAAVの送達を可能にするAAVカプシドバリエーションを特定することであった。

【0322】

CNS送達この技術の潜在的な用途の1つは、ゲノム編集、導入遺伝子、および遺伝子発現の調節因子を特定の細胞型に送達することである。したがって、この特定の用途では、特定の組織内の特定の細胞を標的とするだけでなく、細胞内の核に移動し、導入遺伝子発現を媒介するAAVバリエーションを特定することが重要であった。加えて、組織からの核の単離は、組織からの特定の全細胞体の単離と比較して、わかりやすい。核は、組織にわたって均一な形態を有し、FACS分析を容易にするためにDNA含有量について容易に染色される（例えば、DAPIまたはHoescht染料）。例えば、ニューロンは非常に伸長した細胞体を有し、脳組織から無傷で単離することは困難である。また、リポフスチンおよびミエリン塩基性タンパク質などの脳内のいくつかの構成要素は自家発酵し、レポーター遺伝子の蛍光シグナルに依存する分析を混乱させる（例えば、Hainsworth et al (2017) Neuropathol Appl Neurobiol

44 (4) : 417-426を参照されたい)。したがって、図3Aおよび図3Bに示すように、AAVゲノム中のレポーター遺伝子を核に局在化するための異なるアプローチを採用し、核局在化配列(SV40 NLS)、核エンベロープ結合タンパク質ドメイン(KASH)および核クロマチン(H2B)への組み込みのためのヒストン結合ドメインにそれらを融合することを含む。

【0323】

構築物を作製して、HEK293細胞への送達を試験した。核局在化配列を有しないレポーターのみを含む構築物(EGFPおよびmCherry)を、レポーターがSV40 NLS、またはKASHドメインに融合した構築物と比較した(図9を参照)。全ての構築物が細胞内で蛍光を示し、一方で、NLSタグ付き構築物は、核内の局在化を示し、KASHに連結した構築物は、レポーターが核エンベロープに結合していることを示した。しかしながら、HEK293形質導入細胞から核を単離すると、KASHに連結した構築物のみがシグナルの保持を示した。核単離後のシグナル消失は、繋がれていない構築物における核膜孔カットオフ(60 kDa)に対するレポータータンパク質の小さなサイズ(27 kDa)に起因する可能性が高い。生きている細胞が存在しない場合、レポーターの核内移入のための能動的な輸送機構は失われ、レポーターは核外に拡散する場合がある。レポーターをH2Bドメインに融合させてさらなる試験を行い、単離された核におけるシグナルの強固な保持も観察した。全てのH2B構築物は、細胞および組織の核単離および凍結／解凍処理の両方の後に安定していた核クロマチンへのレポーターの高効率的な組み込みを駆動した。

【0324】

Krishnaswami et al. によるプロトコルに本質的に記載される(Kelder et al (2016) Nat Protoc 11(3):499に記載される)ように、培養細胞および組織から核を単離した。簡潔に言うと、2~3 mm³の組織片を滅菌カミソリ刃で切除した。培養細胞が使用される場合、細胞を収集し、冷たいPBS中で1 mL当たり約1×10⁶個の細胞で再懸濁した。スクロース、MgCl₂、KCl、およびNuPAGE試料還元剤(Thermo)を含むTris緩衝液中のダンスホモジナイザーを使用して、組織または細胞を均質化した。0.1%のTritonおよびHoescht 33352(Molecular Probes)も含まれていた。次いで、ホモジネートを40または70ミクロンのFlowmi細胞ストレーナー(Flowmi)を使用して濾過し、残りの組織断片または高次の核の凝集体を除去した。

【0325】

ニューロン特異的hSynapsin1プロモーターの制御下でEGFP-H2B、mClover3-H2B、mRuby3-H2B、およびEGFP-KASHを含むAAVカプシドライブラリ構築物をC57BL/6Jマウスにおいて評価した。AAVカプシドライブラリを標準的な技術によって製造し、マウス当たり2×10¹¹個のベクターゲノム(群当たりn=3)の用量で尾静脈の静脈内注射によって投与した。試験物品の投与から2週間後、マウスを安楽死させ、発現したレポーターを標的とする免疫組織化学試験のために、4%パラホルムアルデヒド中に脳の左半球を保存し、当該技術分野で既知の技術によって核局在化を確認した。形質導入ニューロン核のFACS選別のために、右半球を急速凍結させた。免疫組織化学試験から得た画像から、組織内の各構築物について核局在化を検証した(図10Aおよび図10Bを参照)が、mRuby3構築物については、核局在化mRuby3天然蛍光の直接的な可視化を使用した。

【0326】

核を、上述のように凍結した中枢神経系マウス組織から単離し、核単離中にHoescht色素で染色し、製造業者の指示に従ってSony SH800細胞選別機を使用してEGFP、mClover3、mRuby3、またはEGFP-KASHシグナルについて選別した。FACS選別のために、70ミクロンチップを、試料圧力5で、半純度モードで使用した。FACSプロットは、ダブレット、トリプレット、または付着した核の高次グループの選別を防止するために、シングレット上にゲーティングした。試料を、スクロ

ースおよびMgCl₂を含むpH7.5のTris緩衝液に選別した。

【0327】

製造業者のプロトコルに従って、Roche High Pure Viral核酸キットを使用して、選別した細胞からDNAを単離した。

【0328】

FACSプロット（図11）は、EGFP-H2B構築物を含むライブラリを注射したマウスの中枢神経組織からEGFP陽性核を単離することができることを示す。さらに、シグナルは、mClover3構築物で治療されたマウスの視床およびEGFP-KASHライブラリで治療されたマウスの皮質において検出することができた（図12および図13）。重要なことに、バックグラウンドを上回るレポーターシグナルは、マウスにEGFP-H2Bライブラリ（EGFP-H2Bは、ニューロン特異的なhSynapsinプロモーターによって駆動された）を注射したときに、肝臓または心臓組織のいずれにおいても検出することができなかった。図14を参照されたい。

10

【0329】

実施例3：非ヒト霊長類におけるインビボ選択

肝臓送達：本明細書に記載の方法および組成物を、ライブラリから肝臓標的化AAVバリエーションを特定するためにも使用した。これらの実験において、肝臓特異的プロモーターラングサイレチン（TTR）を使用して、レポーター遺伝子を発現させた。したがって、ライブラリ構築物を、hSynapsinプロモーターの代わりにTTRプロモーターを含むように改変した。ライブラリを最初に細胞内でインビトロで試験し、用量応答がみられた。HepG2細胞（ATCC HB-8065）を、感染症の多重度（MOI）の範囲にわたってAAVライブラリで形質導入し、次いで、上述のように核を選別して、レポーター遺伝子からの蛍光を測定した。結果（図15A～図15Cを参照）は、以下の表7に要約される用量応答を示した。

20

表7：HepG2細胞における用量応答

【表7】

MOI	EGFP陽性%
Mock	0.2
3e3	0.5
1e4	2.5
3e4	8.6
1e5	36.9
3e5	53.3
1e6	64.3

30

【0330】

用量応答実験を、用量応答も観察された非ヒト霊長類肝細胞（BioIVT）においても行った（以下の表8を参照）。

表8：NHP肝細胞における用量応答

【表8】

MOI	EGFP陽性%
Mock	0.6
3e3	1.3
3e4	3.8
3e5	12.4

40

【0331】

同様の方法で、初代ヒト肝細胞（Corning）において用量応答を測定し、データを以下の表9に示す。

表9：初代ヒト肝細胞における用量応答

50

【表 9】

MOI	E G F P 陽性%
M o c k	0. 4
5 e 4	6. 7
1 e 5	20. 0
2 e 5	35. 4
4 e 5	47. 3
8 e 5	50. 2

【0332】

10

また、レポーター遺伝子が T T R プロモーターによって駆動されたライブラリを使用して、C 5 7 B L / 6 J マウスにおいてライブラリバリエーションの性能を評価した。A A V カプシドライブラリを標準的な技術によって製造し、マウス当たり 2 E 1 1 個のベクターゲノム（n = 3 雄および n = 3 雌）の用量で尾静脈の静脈内注射によって投与した。試験物品の投与から 2 週間後、マウスを安楽死させ、肝臓を除去して、発現された E G F P 導入遺伝子の標的化を評価した。

【0333】

非ヒト霊長類（カニクイザル）においても選択を実施し、ヒト肝臓の形質導入に最も関連性の高い A A V バリエーションを単離した。

【0334】

20

選択ラウンド 1 において、全ての異なる血清型からの A A V バリエーションを含むライブラリプールを、1 キログラム当たり 5 E 1 2 ベクターゲノムの用量で注射した。この第 1 のラウンドにおいて、1 匹の雄および 1 匹の雌の N H P に数百万の固有のバリエーションを注射した。15 日後、N H P を安楽死させ、肝臓を分析した。N H P 肝臓から回収した成功した A A V バリエーションのプールを生成し、配列決定した。次いで、A A V バリエーションを使用して、およそ 500, 000 個の固有のバリエーションを含む単一のライブラリを作製した。次いで、これらを 1 キログラム当たり 1. 6 E 1 3 ベクターゲノムの用量で新しい N H P 対に静脈内注射した。28 日後、N H P を安楽死させ、肝臓を分析した。分析されるエンドポイントは、投与されたライブラリ製剤と比較した、肝臓組織における個々の A A V バリエーションの濃縮、A A V バリエーションによってコードされる E G F P を発現する肝細胞核における濃縮、および投与されたライブラリ製剤と比較した、A A V カプシドバリエーションの濃縮を決定するための m R N A バーコードの配列決定であった。

30

【0335】

上述のように核を肝臓から単離し、E G F P 陽性肝細胞核を F A C S によって選別した。結果（図 16、パネル A）は、E G F P シグナルが、バックグラウンドの上で容易に検出可能であることを示した。各 N H P についての各個々の肝葉の 3 つの試料から単離された E G F P 陽性核の数を以下の表 10 に示す。これに加えて、E G F P の免疫組織化学検出を実施し（図 16、パネル B）、レポーター遺伝子の核局在化を示した。

表 10：雄および雌の N H P 肝臓組織から単離された A A V バリエーションの数

【表 10-1】

40

NHP 1001 (雄)	NHP 1501 (雄)
-----------------	-----------------

50

【表 10-2】

組織領域	GFP+ 核 (%)	選別され た数	GFP+ 核 (%)	選別され た数
外側左葉 1	6.0	133, 043	1.5	28, 7 46
外側左葉 2	4.4	44, 0 44	1.2	24, 6 41
外側左葉 3	4.1	71, 1 23	1.2	18, 7 62
外側右葉 1	2.4	31, 8 72	1.9	31, 8 14
外側右葉 2	4.5	76, 0 13	1.6	34, 7 36
外側右葉 3	4.6	54, 1 85	1.5	24, 6 75
内側左葉 1	3.2	66, 7 51	1.7	18, 4 33
内側左葉 2	3.6	45, 2 89	1.6	17, 6 13
内側左葉 3	2.9	40, 7 57	1.7	17, 9 61
内側右葉 1	3.8	51, 3 26	1.2	21, 4 38
内側右葉 2	3.7	58, 0 40	0.9	12, 9 86
内側右葉 3	3.2	52, 8 32	1.5	16, 6 95
方形葉 1	4.0	57, 7 74	0.8	10, 3 25
方形葉 2	2.7	44, 2 48	1.1	13, 3 33
方形葉 3	3.5	58, 0 53	1.3	15, 1 50

10

20

30

【0336】

興味深いことに、異なる選択圧の適用後に単離された上位2500のAAVバリエーションの比較は、最も重度に濃縮されたAAVバリエーションの親血清型において、有意な差を示す（図17Aおよび図17B）。HepG2および初代ヒト肝細胞をインビトロで評価し、一方、マウスおよびNHPをインビボで評価した。これらの種特異的な有意差は、ヒトに近い動物モデル、例えばNHPにおけるAAV選択を裏付ける。

【0337】

NHP mRNA、NHP EGFP陽性肝臓核、およびNHP肝臓総ゲノムDNAにおけるそれらの一貫した濃縮倍率に基づいて、およそ100種類のAAVバリエーションを徹底分析のために選択した。除外されるバリエーションには、HEK293 AAV製造における収量が低く、Nanopore配列決定によるバーコードのマッピングの信頼性が低いバリエーションが含まれていた。また、選択圧に応答して、固有の物理化学的特性（例えば、再発性アミノ酸モチーフまたは強い疎水性）を含むAAVバリエーションを選択するためのクラスタリング分析も行った。

40

【0338】

この初期分析から得られた上位32の配列を図18および表11に示す。この分析は、非ヒト霊長類での選択後に観察される親血清型ならびに肝臓における濃縮倍率を示す。カプシドループに挿入されたペプチドの配列も示す。重要なことに、HEK293 AAV産

50

生系で各 A A V バリエントを産生する能力を追跡して、本明細書に記載の方法によって特定された任意の A A V が効率的に産生され得ることを保証した。したがって、いくつかの実施形態において、挿入されたペプチド配列および A A V 親血清型は、表 1 1 に記載されるもののいずれか 1 つであり得る。

表 1 1

【表 1 1 - 1】

挿入されたペプチド配列	AAV 親血清型	配列番号	挿入されたペプチド配列	AAV 親血清型	配列番号
KSPQSKV	AAV 1	1	VSRSPYA	AAV 9	1 7
SDLRSKV	AAV 1	2	QRARPD T	AAV 9	1 8
TTTVRKV	AAV 1	3	SQLT PHS	AAV 6	1 9
GRSDMAG	AAV 2	4	LGS HLPS	AAV 6	2 0
LLSSERS	AAV 2	5	YTLSS GQ	AAV 6	2 1
EQRPNV	AAV 2	6	SSRI PPD	AAV 6	2 2
TRQISSD	AAV 2	7	WTET IPR	AAV 6	2 3
QGALAQV	AAV 3 B	8	HGLQ GVA	AAV 6	2 4
YPSSNTP	AAV 3 B	9	TMRV SDQ	AAV 6	2 5
MLNPRTE	AAV 3 B	1 0	GSSK VVM	AAV 6	2 6

10

20

【表 1 1 - 2】

QMRTRDE	AAV 3 B	1 1	SALDRG V	AAV 6	2 7
MPGRAPI	AAV 9	1 2	KELGT QR	AAV 5	2 8
LGRLTAN	AAV 9	1 3	RSSDV QR	AAV 5	2 9
SYSTSR	AAV 9	1 4	PSAPK TF	AAV 5	3 0
TRPSSTN	AAV 9	1 5	HTKR SEY	AAV 5	3 1
VPQSSSR	AAV 9	1 6	IKGS NL P	AAV 5	3 2

30

40

【0 3 3 9】

CNS 送達：本明細書に記載の方法を使用して、CNS の形質導入が改善された A A V バリエントを特定するために追加の実験を行った。これらの実験のために、h S y n a p s i n プロモーター（h S y n 1）を使用して、レポーター遺伝子および m R N A バーコードを発現させた。非ヒト霊長類（カニクイザル）において選択を実施し、ヒト CNS の形質導入に最も関連性の高い A A V バリエントを単離した。

【0 3 4 0】

非ヒト霊長類の選択ラウンド 1 において、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 6、A A V 8、および A A V 9 に基づく A A V バリエントを含むライブラリプールを、1 E 1 3 ベクターゲノムの総用量で腰部髄腔内穿刺によって注射した。この第 1 のラウン

50

ドにおいて、1匹の雄および1匹の雌のNHPに数百万の固有のバリエーションを注射した。15日後、NHPを安楽死させ、CNS組織を分析して、AAVバリエーション性能を評価した。

【0341】

ラウンド1のCNS非ヒト霊長類選択において高い濃縮倍率を有するAAVバリエーションのサブセットを、上述の方法1を使用して合成し、ラウンド2の選択のためのライブラリを生成した。ラウンド2のライブラリの総サイズは、10,818種類のバリエーションであった。同じペプチドをコードする3つの異なるヌクレオチド配列を使用して、各AAVバリエーションを合成した。各ヌクレオチド配列を、ニューロンにおける導入遺伝子発現をランク付けするために、hSyn1プロモーターによって駆動される固有のmRNAバーコードに連結した。3つの複製配列が含まれることで、この3つの配列のそれぞれがバイオインフォマティクス分析中に独立して処理され得るため、バリエーション性能の評価における信頼性の増加を可能にする。

10

【0342】

CNSを標的とするラウンド2の選択のために調製したライブラリを、まず、実施例1に記載されるように、インビトロでNeuro2A細胞(ATCC CCL-131)(図19)、初代マウス皮質ニューロン(Gibco)(図20)、およびヒト人工多能性幹細胞に由来するiCellヒトニューロン(NCR-100-010-001、Cellular Dynamics International)(図21)を評価した。

20

【0343】

次に、ラウンド2のライブラリを、10マイクロリットルの体積で(n=3雄およびn=3雌)、マウス当たり1.59E11個のベクターゲノムの用量での片側脳室内注射により、C57BL/6Jマウスで評価した。試験物品の投与から28日後に、マウスを安楽死させ、CNS組織を除去してライブラリ性能を評価した(図22)。注射された半球の対側の脳領域の分析を完了し、注射経路に関連する混乱した形質導入を回避した。

【0344】

最後に、ラウンド2のライブラリを、動物1匹当たり4.37E13vgの用量で2匹の雄および1匹の雌のカニクイザルに髄腔内投与した。28日後、NHPを安楽死させ、CNS組織を分析した。脳を3mmの冠状スライス厚でスライスした。各スライスを、正中矢状面に沿って半分に切断した。ベクターゲノムDNAの分析のために、左半球からの脳スライスからパンチ試料(3mm)を入手した。右半球をRNAlaterに配置し、RNAの完全性を維持するためにおよそ24時間冷蔵した。保存後、様々な脳領域をサンプリングして3mmのパンチを収集した。脊髄を、分析のために頸部、胸部、腰部に分けた。

30

【0345】

ライブラリAAVバリエーションの性能を、ベクターゲノムDNA頻度の分析(図23~図25)、およびニューロンで特異的に発現されたライブラリmRNA転写産物から逆転写されたcDNAの定量化(図26~図28)によって評価した。これらの2つのデータセットは、それぞれ、DNA分析およびRNA分析と称される。非ヒト霊長類CNS組織の次世代配列決定分析は、親野生型血清型よりも優れた形質導入を示す高性能AAVバリエーションを特定した。これらの上位性能のバリエーションのサブセットを、DNA分析およびRNA分析の両方における濃縮を含む、異なる測定基準にわたるそれらの性能に基づいて、さらなる評価のために選択した。このサブセットのバリエーション性能の概要を図29A~図29Dに示す。この分析は、非ヒト霊長類での選択後に観察される親血清型ならびに組織における濃縮倍率を示す。カプシドループに挿入したペプチドのペプチド配列も示す。バリエーションは、1~43(配列番号68~110、表12を参照されたい)と番号付けされ、この番号付けは、図19~図28のバブルプロットにおけるライブラリの残りに対して、それらの性能に注釈を付けるために使用される。いくつかの実施形態において、挿入されたペプチドおよびAAV親血清型は、表12に記載されるもののいずれか1つであり得る。

40

50

【表 1 2 - 1】

番号	挿入されたペプチド配列	AAV親血清型	配列番号	番号	挿入されたペプチド配列	AAV親血清型	配列番号
1	AALRDIR	AAV1	68	23	MTLTRQE	AAV2	90
2	PAIKTYS	AAV1	69	24	TSNSRTE	AAV2	91
3	TGDRISRTL	AAV1	70	25	EVRGGPS	AAV2	92
4	SVVVSSDSSKRPRNL	AAV1	71	26	VISDRS	AAV2	93
5	VGARLSA	AAV1	72	27	PRDTFNG	AAV2	94
6	IEKPNTSTKK	AAV1	73	28	RPLTAND	AAV2	95
7	DTVRSKN	AAV1	74	29	PLRMVNE	AAV2	96
8	KELNKAR	AAV1	75	30	DVGIRPS	AAV2	97
9	PYASITG	AAV3B	76	31	KDSTAFG	AAV2	98
10	TGAFSST	AAV3B	77	32	YPGRNP	AAV2	99
11	EQFRNLA	AAV3B	78	33	ISDTRIS	AAV2	100
12	FNSPVIQ	AAV3B	79	34	ENFSKVA	AAV2	101
13	TDFRSPQ	AAV3B	80	35	RDALSLRPE	AAV2	102
14	MYSLMKD	AAV3B	81	36	LGNGKMTVQP	AAV2	103
15	LYLSSAS	AAV3B	82	37	VSNPLNQ	AAV2	104
16	YGSRSDV	AAV3B	83	38	LNERGLG	AAV2	105

【表 1 2 - 2】

17	LYSHQVS	AAV3B	84	39	GRNTVGLSSA	AAV2	106
18	ISTHSP	AAV3B	85	40	VGHAGNP	AAV2	107
19	RQPTTIP	AAV9	86	41	SRAGTVP	AAV2	108
20	RSTSSLL	AAV9	87	42	GLVAKLP	AAV2	109
21	FRLSSPQ	AAV9	88	43	AESLRT	AAV2	110
22	NIPKAYG	AAV9	89				

【0346】

実施例 4：ライブラリスクリーンで特定された最高性能の AAV バリエーションの評価

非ヒト霊長類における 2 ラウンドの選択の後、肝臓および CNS 組織において、高濃縮バリエーションのサブセットを特定した（それぞれ、図 18 および図 29）。わずか 1 つまたは

10

20

30

40

50

2つのバリエーションの個々の評価に直接進むのではなく、その代わりに、肝臓およびCNSにおける数十の上位性能バリエーションの直接の比較を可能にするために、バーコード化発現カセットを生成した。このアプローチでは、各AAVバリエーションは、プールする前に別々に製造され、力価測定されるため、各AAVに連結されているバーコードは、確実に既知である。各AAVは、EGFP-H2B導入遺伝子の発現および固有のバーコードヌクレオチド配列を駆動する細胞型特異的RNAポリメラーゼIIプロモーター（例えば、トランスサイレチンまたはhSynapsin1）を含有するベクターゲノム（図30）で製造される。ベクター性能の独立した評価を提供するために、第2のRNAポリメラーゼIIプロモーター（例えば、hU6）も含まれていた。hU6プロモーターは、全ての細胞型において普遍的に発現され、したがって、全ての細胞型および組織型における発現の評価を可能にする。さらに、hU6転写産物は核に限定され、単一核配列決定アプローチに対する利点である。表13に列挙した全てのバーコードは、転写バイアスの可能性を最小限に抑えるように計算的に設計された。

10

表13：プールされたAAVバリエーション評価に使用される固有のバーコード

【表13-1】

カセット番号	RNAポリメラーゼIIバーコード	配列番号	RNAポリメラーゼIIIバーコード	配列番号
1	AAATCACCTGAC	111	CTTGTCGATAAG	155
2	TGATTCTTCTAC	112	GTGGTAAGCACG	156

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

3	GGCCACTGG TTG	1 1 3	AACTGGCTC CCA	1 5 7
4	AATCTATCG CCT	1 1 4	TGCGATCGT ACA	1 5 8
5	AGACGATCA AGG	1 1 5	CAGAGGATA GCT	1 5 9
6	GTGTAAGTGA TCG	1 1 6	GAGGAGTCT CAT	1 6 0
7	TGGTAGTTT CCA	1 1 7	AGTTCCAC GGA	1 6 1
8	GATCAGTTG CGG	1 1 8	CCCTTCAGC AGT	1 6 2
9	CTTGGGACA CAC	1 1 9	CGTACTCCG CGA	1 6 3
1 0	GATGCGGCC TCG	1 2 0	TCACCGACG TGG	1 6 4
1 1	CGCATCCTC GTT	1 2 1	CAACGGTCT TCC	1 6 5
1 2	ACGATGTCT ACG	1 2 2	GTAACAGTC CGG	1 6 6
1 3	GTGTTCCAC CTG	1 2 3	GTCGAGGAT ACC	1 6 7
1 4	GGAGGGAGC TGG	1 2 4	TGCGATGTG ATG	1 6 8
1 5	CATAACTCT TGC	1 2 5	TAACCCGCC GAA	1 6 9
1 6	TGACAGTCT CGC	1 2 6	CGACCAACG ACA	1 7 0
1 7	CTACCAGGA TTC	1 2 7	CTGCTGCCA TCA	1 7 1
1 8	ACACATGAT GGC	1 2 8	CTAGTACAC GCG	1 7 2
1 9	GGTGCTCGC AAT	1 2 9	TAGGTGCTA GTG	1 7 3
2 0	GATTGCACC GCA	1 3 0	TCCTCCCAG GAT	1 7 4
2 1	AACGGAGGC TGC	1 3 1	TAGGCGGCA TTA	1 7 5
2 2	GGGAGAGTT CCG	1 3 2	CTTAGGCTA GCT	1 7 6
2 3	CGGGTAGCC GAA	1 3 3	CGACGTGCG ATA	1 7 7
2 4	TGACCTAAT TGG	1 3 4	ACCATTCCA TCG	1 7 8
2 5	GGGTGAAGG ATT	1 3 5	TGGAAAGGC CTA	1 7 9

10

20

30

40

50

【表 13-3】

26	CTGTGAGAG AAG	136	GGGAACATT GGA	180
27	ACTTGGTTTC CGC	137	AAGTGAACG CGC	181
28	GTTGGCTGT ACC	138	AGCAACGTT GTA	182
29	TGTAAGCTG TAG	139	AAGTGACGG ACC	183
30	AGCTACCCT GGA	140	AGTAACGCC CGT	184
31	CCAAACAAG CGT	141	TGGGCTATG ACA	185
32	GCTTGCCCA TCC	142	CTGCAGTGA AGT	186
33	CATTCCGGG TTA	143	ATTCTGTTC GCA	187
34	CTTTGCCGG TAC	144	CTTCCTCAC CTC	188
35	CATCAACTG TGC	145	GAGAGTCGA AAC	189
36	GCACAGCCG AAT	146	AGTCGTGAA TCG	190
37	ATGCATCGG TCA	147	GGTGACAAC AAT	191
38	GAACCAGAA TGC	148	GCCTAGTAG CAT	192
39	CGGACGGTA TGG	149	ACAGAAGCG CCT	193
40	TCCTATGAA CAA	150	CTAGTTGAG TTC	194
41	TGGGAGTAG AGG	151	AAGTTCAGG ATA	195
42	GCTCAACGA TCG	152	TTGCCTCTA TTC	196
43	GGACTAGGA TAT	153	TGAACGTCT AAG	197
44	CCATTGTGG GAA	154	CGCTATCAC GCA	198

10

20

30

【0347】

この発現カセットを適用して、ライブラリスクリーニングから特定される高性能CNS向性AAVバリエーション（図29A～図29Dに列挙）のサブセットを評価する一例を図31に示す。この作業で開発された操作された血清型に加えて、いくつかの対照血清型が含まれていた。AAV9、PHP.B、およびAAV2_HSPGKO。AAV9は、ヒト臨床試験を含む、そのCNS形質導入特性についての分野で広範囲に評価されており（Lowes et al. *Pediatr Neurol*. 2019; 98: 39-45）、したがって、性能の主要なベンチマークである。PHP.Bは、C57BL/6Jマウスにおいて高い効能を示すことが以前に示された、操作されたAAV9血清型であり（Deverman et al. *Nat Biotechnol*. 2016; 34(2): 204-9）、これらの特性は、非ヒト霊長類には拡張されない（Hordeaux et al. *Mol Ther*. 2018 Mar; 26(3): 664-668）。AAV2_HSPGKOは、ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）への結合が無効にされた、2つの変異（R585AおよびR588A）を有するAAV2のバリエーションである（O

40

50

pie et al. Virol. 2003 Jun; 77 (12) : 6995-7006)。この血清型は、非ヒト霊長類においても以前に評価されている (Naidoo et al. Mol Ther. 2018 Oct 3; 26 (10) : 2418-2430)。この実験では、バーコード化されたAAVバリエーションを、Neuro2A細胞、初代マウス脂質ニューロン、およびヒト人工多能性幹細胞に由来するiCellヒトニューロンにおいて、インビトロで評価した。ウイルスをHEK293T細胞内で産生し、CsCl密度勾配を使用して精製し、当該技術分野で知られる方法に従ってリアルタイムqPCRによって力価決定した。次いで、各々が個々に製造され、バーコード化されたウイルスと一緒に混合して、下流評価のための単一のプールを形成し、このプール内の各バリエーションの頻度を、次世代配列決定(NGS)によって評価した。図30に記載のベクターゲノムカセットを、プールされた評価に使用して、hSyn1 polIIプロモーターおよびhU6 polIIIプロモーターからの異なるバーコード化された転写産物の定量化を可能にした。バーコード化されたウイルスプールを使用して、細胞当たり 3×10^5 、 1×10^5 、 3×10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、および 1×10^3 ベクターゲノムコピーで細胞に感染させた。72時間(Neuro2A)、48時間(初代マウス皮質ニューロン)、または96時間(hiPSC由来ヒトニューロン)のいずれかの後に、全RNAを抽出し、それぞれhSyn1およびhU6転写産物を標的とする遺伝子特異的プライマーを用いてAAV転写産物を逆転写した。次いで、次世代配列決定を適用して、各AAVバリエーションに由来するNGSリードのパーセンテージを定量化した。これらのパーセンテージを、感染に使用したプール内の各AAVバリエーションの頻度によって正規化した。この結果は、AAV1およびAAV2に基づくいくつかのAAVバリエーションが、3つの細胞型全てにわたって高い性能を示す、性能の分布を示す。一般に、AAV3Bに基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。バリエーション性能の観察された傾向は、同じ細胞型で得られたラウンド2のライブラリデータによって首尾良く予測された(図19、図20、図21)。加えて、これらのデータは、デュアルpolIII hSyn1およびpolIII hU6バーコード測定アプローチの適用の成功を示す。Neuro2Aのような均質な細胞株において、hSyn1とhU6の測定値間の一致は高い。初代マウス皮質ニューロンおよびhiPSC由来ニューロンにおいて、ニューロンサブタイプの異質性が大きく、2つの測定値に大きな乖離が生じる。しかしながら、一般に、2つの測定値は依然として相関している。

10

20

30

【0348】

実施例5：非ニューロン細胞の形質導入のためのCNS向性バリエーションのインビトロ評価
CNS向性AAVバリエーションおよび対照の同じサブセットを、インビトロでの非ニューロン細胞型の形質導入について評価した(図32)。この実験において、ヒト人工多能性幹細胞に由来するiCellヒトアストロサイトおよびヒト人工多能性幹細胞に由来するiCellヒト内皮細胞の形質導入について、バーコード化されたAAVバリエーションを評価した。実施例4で上に記載した同一のAAVバーコード化プール試験物品および方法論を、以下の仕様で使用した。hiPSC由来のアストロサイトにおける評価のために、細胞当たり 3×10^5 、 1×10^5 、 3×10^4 、 1×10^4 、 3×10^3 、および 1×10^3 ベクターゲノムコピーを感染に使用した。hiPSC由来の内皮細胞における評価のために、細胞当たり 3×10^5 、 1×10^5 、および 3×10^4 ベクターゲノムコピーを感染に使用した。アストロサイトと内皮細胞の両方を、感染から72時間後に採取した。全RNAを抽出し、hU6転写産物を標的とする遺伝子特異的プライマーを用いてAAV転写産物を逆転写したが、hSyn1プロモーターが非ニューロン細胞型において最小限の活性しか有しないため、hSyn1転写産物をプローブしなかった。次いで、次世代配列決定を適用して、各AAVバリエーションに由来するNGSリードのパーセンテージを定量化した。これらのパーセンテージを、感染に使用したプール内の各AAVバリエーションの頻度によって正規化した。hiPSC由来のアストロサイトにおいて、この結果は、高性能を示すAAV2に基づくいくつかのAAVバリエーションを用いた性能の分布を示す。一般に、AAV1およびAAV9に基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。hiPSC

40

50

由来の内皮細胞において、この結果は、AAV1およびAAV2に基づくいくつかのAAVバリエーションが高い性能を示す、性能の分布を示す。一般に、AAV3BおよびAAV9に基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。

【0349】

実施例6：マウスおよびラットにおけるCNS向性AAVバリエーションのインビボ評価
CNS向性AAVバリエーションの同じサブセットを、C57BL/6JマウスおよびSprague-Dawleyラットにおける中枢神経系のインビボでの形質導入についてさらに評価した（図33および図34）。治療薬の開発に一般的に使用される種にわたるAAV性能の徹底的な評価を完了するために、げっ歯類における形質導入を評価した。C57BL/6Jマウス1E11ベクターゲノムにおける評価のために、10マイクロリットルの体積で、左側脳室（n=3雄およびn=3雌）への片側脳室内注射によって投与した。Sprague-Dawleyラット2E11ベクターゲノムにおける評価のために、20マイクロリットルの体積で、左側脳室（n=3雄およびn=3雌）への片側脳室内注射によって投与した。試験物品を投与した32日後に動物を安楽死させ、CNS組織を切除した。注射された半球の対側の脳領域の分析を完了し、注射経路に関連する形質導入からの混乱を回避した。CNS組織から全RNAを抽出し、それぞれhSyn1転写産物およびhU6転写産物を標的とする遺伝子特異的プライマーを用いてAAV転写産物を逆転写した。次いで、次世代配列決定を適用して、各AAVバリエーションに由来するNGSリードのパーセンテージを定量化した。これらのパーセンテージを、投与されたプール内の各AAVバリエーションの頻度によって正規化した。

10

20

【0350】

C57BL/6Jマウスにおいて、ニューロン細胞内で発現される転写産物のhSyn1バーコード測定値は、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV1およびAAV2へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。予想通り、PHP.B対照血清型は、C57BL/6Jマウスにおいて高性能である。一般に、AAV9およびAAV3Bに基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。C57BL/6Jマウスにおいて、全ての細胞型内で発現される転写産物のhU6バーコード測定値は、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV2および特にAAV1へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。一般に、AAV9およびAAV3Bに基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。図33。

30

【0351】

Sprague-Dawleyラットにおいて、ニューロン細胞内で発現される転写産物のhSyn1バーコード測定値は、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV1およびAAV2へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。予想通り、PHP.B対照血清型は、Sprague-Dawleyラットにおいて、C57BL/6Jマウスよりも性能が悪い。一般に、AAV9およびAAV3Bに基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。Sprague-Dawleyラットにおいて、全ての細胞型内で発現される転写産物のhU6バーコード測定値は、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV1およびAAV2へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。一般に、AAV9およびAAV3Bに基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。図34。

40

【0352】

実施例7：非ヒト霊長類におけるCNS向性AAVバリエーションのインビボ評価
次に、非ヒト霊長類（カニクイザル）における中枢神経系のインビボでの形質導入について、CNS向性AAVバリエーションの同じサブセットをさらに評価した。上述の様々な評価のうち、カニクイザルにおける形質導入の評価は、非ヒト霊長類がヒトCNSの遺伝学および生理学を最もよく例示するため、ヒトに対する臨床的な変換に特に重要である。AAVバリエーションのプールを、動物1匹当たり5.2×10¹³ベクターゲノム（vg）の用

50

量で、1匹の雄および1匹の雌のカニクイザルに髄腔内投与した。髄腔内投与のために、試験物品を頸部および胸部レベルで脳に近くに配置するためにスレッドカテーテルを使用した。試験物品を投与した57日後に動物を安楽死させた。脳を3mmの冠状スライス厚でスライスした。各スライスを、正中矢状面に沿って半分に切断した。AAVゲノムDNAの分析のために、左半球からの脳スライスからパンチ試料(3mm)を入手した。右半球をRNAlaterに配置し、RNAの完全性を維持するためにおよそ24時間冷蔵した。保存後、様々な脳領域をサンプリングして3mmのパンチを収集した。脊髄を、分析のために頸部、胸部、腰部に分けた。ゲノムDNAおよび全RNAをCNS組織から別々に抽出し、その後の分析は、それぞれDNA分析およびRNA分析と称される。DNA分析のために、固有のバーコード、hSyn1およびhU6の各々を、PCRによって別々に増幅した。次世代配列決定を適用して、各AAVバリエーションに由来するNGSリードのパーセンテージを定量化した。DNA分析については、プロモーターによって提供される細胞制限は存在しないので、hSyn1およびhU6バーコードは、等しい可能性で増幅すると予想されることに留意されたい。RNA分析のために、AAV転写産物を、それぞれhSyn1(ニューロン)およびhU6(全ての細胞型)転写産物を標的とする遺伝子特異的プライマーを用いて逆転写した。次いで、次世代配列決定を適用して、各AAVバリエーションに由来するNGSリードのパーセンテージを定量化した。DNAおよびRNA分析の両方について、これらのパーセンテージを、投与されたプール内の各AAVバリエーションの頻度によって正規化した。

10

20

30

40

50

【0353】

カニクイザルにおいて、RNA分析結果(図35)は、ニューロン細胞内で発現される転写産物のhSyn1バーコード測定値に基づき、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV3B、AAV2およびAAV1へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。一般に、AAV9に基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。カニクイザルにおいて、全ての細胞型内で発現される転写産物のhU6バーコード測定値は、AAV9ベンチマークと比較して高い性能を示す本明細書に開示されるAAV3B、AAV2およびAAV1へのペプチド挿入に基づく多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。一般に、AAV9に基づくAAVバリエーションの性能は、より低かった。AAV9ベンチマークと比較した本明細書に開示される血清型の改善倍率を、図37および図38にプロットする。

【0354】

カニクイザルにおいて、CNS組織中のAAVベクターゲノムhSyn1およびhU6バーコード測定値に基づくDNA分析結果(図36)は、野生型AAV9ベンチマークと比較して非常に高い性能を示すAAV9に基づき操作されたバリエーションを含む全ての血清型にわたる多くのAAVバリエーションを伴う性能の分布を示す。AAV9ベンチマークと比較した本明細書に開示される血清型の改善倍率を、図39および図40にプロットする。

【0355】

RNA分析は、どのAAVバリエーションがニューロンおよび全てのCNS細胞において最高レベルの産生導入遺伝子発現を提供したかを示すが、DNA分析は、脳組織において非常に高度に濃縮された追加のAAVが存在することを示唆することが注目される。

【0356】

全ての細胞培養およびインビボ評価にわたる血清型性能の概要は、図41および図42にプロットされる。この結果は、種間の形質導入の差異を示し、非ヒト霊長類において血清型スクリーニングおよび評価を行うことの価値を強調するものである。

【0357】

本明細書で言及される全ての特許、特許出願および刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0358】

本開示は、理解を明確にする目的のために、説明および例示のために、ある程度詳細に提供されてきたが、本開示の精神または範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変

を実施することが可能であることが、当業者には明らかであろう。したがって、前述の説明および実施例は、限定するものとして解釈されるべきではない。

【0359】

本開示の特定の実施形態は、以下の番号を付けた段落に示される。

【0360】

1. 天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、

(i) 細胞、細胞株、または組織を、AAVバリエーションのライブラリと接触させることであって、ライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、

b) a) のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、接触させることと、

(ii) 上述のライブラリ中のAAVバリエーションを、細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、

(iii) 細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、

(iv) 所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法。

【0361】

2. 天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、

(i) 細胞、細胞株、または組織を、AAVバリエーションのライブラリと接触させることであって、ライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、接触させることと、

(ii) 上述のライブラリ中のAAVバリエーションを、細胞、細胞株、または組織へ形質導入させることと、

(iii) 細胞、細胞株、または組織からAAVバリエーションを回収することと、

(iv) 所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定することと、を含む、方法。

【0362】

3. ライブラリの各メンバーが、a) のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態1に記載の方法。

【0363】

4. ライブラリの各メンバーが、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態2に記載の方法。

【0364】

5. ライブラリの各メンバーが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、実施形態1～

10

20

30

40

50

4のいずれか1つに記載の方法。

【0365】

6. ライブラリの各メンバーが、バーコードを含む核酸を含む、実施形態1～5のいずれか1つに記載の方法。

【0366】

7. ライブラリの各メンバーが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、実施形態1～6のいずれか1つに記載の方法。

【0367】

8. AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、実施形態1～7のいずれか1つに記載の方法。

10

【0368】

9. AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、実施形態1～7のいずれか1つに記載の方法。

【0369】

10. AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、実施形態9に記載の方法。

【0370】

20

11. ライブラリの各メンバーが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む、実施形態10に記載の方法。

【0371】

12. AAVバリエーションのライブラリが、2つ以上のAAV血清型に由来するAAVバリエーションカプシドタンパク質を含む、実施形態1～11のいずれか1つに記載の方法。

【0372】

13. AAVバリエーションのライブラリのAAV血清型が、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上から選択される、実施形態1～12のいずれか1つに記載の方法。

30

【0373】

14. レポータータンパク質をコードする核酸およびAAVバリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

15. 所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である、実施形態1～14のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

16. 天然AAV血清型と比較して所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションを特定する方法であって、

40

(i) ペプチドをコードする複数の核酸を、AAVカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸の集合体に挿入し、AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸のライブラリを作成することと、

(ii) 上述のライブラリ中のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする各核酸を、

(a) バーコードを含む核酸、

(b) レポータータンパク質をコードする核酸、および

(c) 局在化シグナルをコードする核酸のうちの1つ以上に連結することと、

(iii) アデノウイルスヘルパーおよびAAV rep機能をtransで提供するこ

50

とによって、プロデューサー細胞中で A A V バリエントのライブラリを製造することと、
 (i v) A A V バリエントのライブラリを精製することと、
 (v) 細胞、細胞株、または組織を、A A V バリエントのライブラリと接触させることと、
 、
 (v i) 標的細胞、細胞株、または組織から A A V バリエントを回収することと、
 (v i i) 所望の特徴を有する A A V カプシドバリエントを特定することと、を含む、方法。

【 0 3 7 6 】

1 7 . 上述のライブラリ中の A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、バーコードを含む核酸に連結されている、実施形態 1 6 に記載の方法。

10

【 0 3 7 7 】

1 8 . ライブラリの各メンバーが、第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とを含む、実施形態 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 3 7 8 】

1 9 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸と、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸とが異なっている、実施形態 1 8 に記載の方法。

【 0 3 7 9 】

2 0 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸が、配列番号 1 1 1 ~ 1 5 4 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、実施形態 1 8 または 1 9 に記載の方法。

20

【 0 3 8 0 】

2 1 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸が、配列番号 1 1 1 ~ 1 5 4 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【 0 3 8 1 】

2 2 . 第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸が、配列番号 1 5 5 ~ 1 9 8 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、実施形態 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【 0 3 8 2 】

2 3 . 第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸が、配列番号 1 5 5 ~ 1 9 8 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【 0 3 8 3 】

2 4 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸および第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 1 8 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【 0 3 8 4 】

2 5 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol II プロモーターである、実施形態 2 4 に記載の方法。

【 0 3 8 5 】

2 6 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第 2 のバーコードを含む核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol III プロモーターである、実施形態 2 4 に記載の方法。

40

【 0 3 8 6 】

2 7 . 第 1 のバーコードを含む第 1 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol II プロモーターであり、第 2 のバーコードを含む第 2 の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol III プロモーターである、実施形態 2 4 に記載の方法。

【 0 3 8 7 】

2 8 . 各 RNA Pol II プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1) 、トランスサイレチンプロモーター (T T R) 、サイトケラチン 1 8 、サイトケラチン 1 9 、u n c - 4 5 ミオシンシャペロン B (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニン T (c T n T) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモ-

50

ター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）プロモーター、およびメチル CpG 結合タンパク質 2（MeCP2）プロモーターからなる群から独立して選択される、実施形態 25～27 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0388】

29. 各 RNA Pol III プロモーターが、U6 プロモーター、H1 プロモーターおよび 7SK プロモーターからなる群から独立して選択される、実施形態 26～27 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0389】

30. 上述のライブラリ中の AAV バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、レポータータンパク質をコードする核酸に連結されている、実施形態 16～29 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0390】

31. 上述のライブラリ中の AAV バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、局在化シグナルをコードする核酸に連結されている、実施形態 16～30 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0391】

32. AAV バリエントカプシドタンパク質をコードする各核酸が、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の 1 つ以上のサイレント変異をさらに含む、実施形態 16～31 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0392】

33. ステップ (iv) が、2 つ以上の AAV 血清型に基づいてバリエント AAV のライブラリを組み合わせ、単一のプールを生成することをさらに含む、実施形態 16～32 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0393】

34. AAV カプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループをコードする核酸配列の集合体が、2 つ以上の AAV 血清型に由来する配列を含む、実施形態 16～33 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0394】

35. AAV 血清型が、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、および AAVrh74 のうちの 1 つ以上から選択される、実施形態 16～34 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0395】

36. ヘルパー機能が、E2A、E4、VA、E1A、および E1B のうちの 1 つ以上を含む、実施形態 16～35 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0396】

37. AAV rep 機能が、rep78、rep68、rep52、および rep40 遺伝子を含む、実施形態 16～36 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0397】

38. rep78 および／または rep68 遺伝子の開始コドンが、ACG から ATG に改変される、実施形態 37 に記載の方法。

【0398】

39. プロデューサー細胞が、HEK293 細胞である、実施形態 16～38 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0399】

40. AAV バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、バーコードを含む核酸、レポータータンパク質をコードする核酸、および／または局在化シグナルをコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、実施形態 16～39 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0400】

10

20

30

40

50

41. ライブラリの各メンバーが、5' ITR 配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAV バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR 配列とを、その順序で含む、実施形態 16～40 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0401】

42. レポータータンパク質をコードする核酸および AAV バリエーションカプシドをコードする核酸が、それぞれ独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 16～41 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0402】

43. 所望の特徴が、細胞または組織の向性の増強である、実施形態 16～42 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0403】

44. ペプチドが、4～15 アミノ酸の長さを有する、実施形態 1～43 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0404】

45. ペプチドが、6～15 アミノ酸の長さを有する、実施形態 1～44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0405】

46. ペプチドが、7、10、または 15 アミノ酸の長さを有する、実施形態 45 に記載の方法。

【0406】

47. ペプチドが、7 アミノ酸の長さを有する、実施形態 46 に記載の方法。

【0407】

48. ペプチドが、カプシドタンパク質の VR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIII および VR-IX 領域からなる群から選択される領域に挿入される、実施形態 1～47 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0408】

49. ペプチドが、カプシドタンパク質の VR-I に挿入される、実施形態 48 に記載の方法。

【0409】

50. ペプチドが、カプシドタンパク質の VR-IV に挿入される、実施形態 48 に記載の方法。

【0410】

51. ペプチドが、カプシドタンパク質の VR-VIII に挿入される、実施形態 48 に記載の方法。

【0411】

52. ペプチドが、カプシドタンパク質 VP1、VP2、または VP3 に挿入される、実施形態 1～49 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0412】

53. ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸残基 450～600 の間の位置に挿入される、実施形態 1～50 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0413】

54.

(i) AAV 血清型が、AAV1 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 590 に挿入されるか、

(ii) AAV 血清型が、AAV6 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 454 もしくは 590 に挿入されるか、

(iii) AAV 血清型が、AAV2 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 588 に挿入されるか、

10

20

30

40

50

(i v) A A V 血清型が、A A V 3 B であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入されるか、

(v) A A V 血清型が、A A V 5 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入されるか、

(v i) A A V 血清型が、A A V 8 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入されるか、または

(v i i) A A V 血清型が、A A V 9 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5 もしくは 5 8 9 に挿入され、

その位置が、A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、実施形態 1 ～ 5 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0 4 1 4】

5 5 . レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、実施形態 1 ～ 5 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 4 1 5】

5 6 . レポータータンパク質が、E G F P、m C h e r r y、m C l o v e r 3、m R u b y 3、m A p p l e、i R F P、t d T o m a t o、m V e n u s、Y F P、R F P、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、実施形態 5 5 に記載の方法。

【0 4 1 6】

5 7 . A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸が、p 4 0 プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 1 ～ 5 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0 4 1 7】

5 8 . レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 1 ～ 5 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 4 1 8】

5 9 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1)、トランスサイレチンプロモーター (T T R)、サイトケラチン 1 8、サイトケラチン 1 9、u n c - 4 5 ミオシンシャペロン B (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニン T (c T n T) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター、およびメチル C p G 結合タンパク質 2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から選択される、実施形態 5 8 に記載の方法。

30

【0 4 1 9】

6 0 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、h S y n 1 プロモーターである、実施形態 5 9 に記載の方法。

【0 4 2 0】

6 1 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、T T R プロモーターである、実施形態 6 0 に記載の方法。

【0 4 2 1】

6 2 . レポータータンパク質が、局在化シグナルに融合される、実施形態 1 ～ 6 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0 4 2 2】

6 3 . 局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方でレポータータンパク質に融合される、実施形態 6 2 に記載の方法。

【0 4 2 3】

6 4 . 局在化シグナルが、核局在化シグナル (N L S)、核エンベロープ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、実施形態 1 ～ 6 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 4 2 4】

6 5 . N L S が、S V 4 0 N L S である、実施形態 6 4 に記載の方法。

【0 4 2 5】

50

66. 核エンベロープ結合ドメインが、KASHドメインである、実施形態64に記載の方法。

【0426】

67. ヒストン結合ドメインが、H2Bである、実施形態64に記載の方法。

【0427】

68. バーコードを含む核酸が、5～18ヌクレオチド長である、実施形態1～67のいずれか1つに記載の方法。

【0428】

69. バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態1～68のいずれか1つに記載の方法。

【0429】

70. バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態1～68のいずれか1つに記載の方法。

【0430】

71. バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態1～68のいずれか1つに記載の方法。

【0431】

72. バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態1～68のいずれか1つに記載の方法。

【0432】

73. 所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションが、関連する1つ以上のバーコードの配列決定によって特定される、実施形態1～72のいずれか1つに記載の方法。

【0433】

74. 所望の特徴を有するAAVカプシドバリエーションが、AAVゲノムの精製および配列決定によって特定される、実施形態1～73のいずれか1つに記載の方法。

【0434】

75. 細胞、細胞株または組織が、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、および口腔粘膜からなる群から選択される、実施形態1～74のいずれか1つに記載の方法。

【0435】

76. 細胞が、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞から選択される、実施形態1～74のいずれか1つに記載の方法。

【0436】

77. AAVバリエーションのライブラリであって、上述のライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、

b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、ライブラリ。

【0437】

78. AAVバリエーションのライブラリであって、上述のライブラリの各メンバーが、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、

10

20

30

40

50

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、ライブラリ。

【0438】

79. ライブラリの各メンバーが、a) のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態77に記載のライブラリ。

【0439】

80. ライブラリの各メンバーが、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa) のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態78に記載のライブラリ。

【0440】

81. ライブラリの各メンバーが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、実施形態77～80のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0441】

82. ライブラリの各メンバーが、バーコードを含む核酸を含む、実施形態77～81のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0442】

83. ライブラリの各メンバーが、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む、実施形態77～82のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0443】

84. 第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている、実施形態83に記載のライブラリ。

【0444】

85. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態84に記載のライブラリ。

【0445】

86. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態84に記載のライブラリ。

【0446】

87. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態84に記載のライブラリ。

【0447】

88. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態84に記載のライブラリ。

【0448】

89. 第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態83～88のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0449】

90. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである、実施形態89に記載のライブラリ。

【0450】

91. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、実施形態89に記載のライブラリ。

【0451】

92. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA

10

20

30

40

50

A P o l I I プロモーターに作動可能に連結されており、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA P o l I I I プロモーターである、実施形態89に記載のライブラリ。

【0452】

93. RNA P o l I I プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1)、トランスサイレチンプロモーター (T T R)、サイトケラチン18、サイトケラチン19、u n c - 4 5 ミオシンシャペロンB (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニンT (c T n T) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター、およびメチルC p G 結合タンパク質2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から選択される、実施形態90～91のいずれか1つに記載のライブラリ。

10

【0453】

94. RNA P o l I I I プロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーターおよび7SKプロモーターからなる群から選択される、実施形態91～93のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0454】

95. ライブラリの各メンバーが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、実施形態77～94のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0455】

96. A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、実施形態77～95のいずれか1つに記載のライブラリ。

20

【0456】

97. A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、実施形態77～95のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0457】

98. A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、実施形態97に記載のライブラリ。

30

【0458】

99. ライブラリの各メンバーが、5' I T R 配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、A A V バリエントカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' I T R 配列とを、その順序で含む、実施形態97に記載のライブラリ。

【0459】

100. A A V バリエントが、A A V 1、A A V 2、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 8、A A V 9、A A V 3、A A V 4、A A V 7、A A V 11、A A V r h 10、A A V r h 39、およびA A V r h 74のうちの1つ以上に由来する、実施形態77～99のいずれか1つに記載のライブラリ。

40

【0460】

101. A A V バリエントのライブラリが、2つ以上のA A V 血清型に由来するA A V バリエントカプシドタンパク質を含む、実施形態100に記載のライブラリ。

【0461】

102. ペプチドが、4～15アミノ酸の長さを有する、実施形態77～101のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0462】

103. ペプチドが、6～15アミノ酸の長さを有する、実施形態102に記載のライブラリ。

50

【0463】

104. ペプチドが、7、10、または15アミノ酸の長さを有する、実施形態103に記載のライブラリ。

【0464】

105. ペプチドが、7アミノ酸の長さを有する、実施形態104に記載のライブラリ。

【0465】

106. ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態77～105のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0466】

107. ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態106に記載のライブラリ。

【0467】

108. ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態77～106のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0468】

109. ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態108に記載のライブラリ。

【0469】

110. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIおよびVR-IX領域からなる群から選択される領域に挿入される、実施形態77～109のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0470】

111. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-Iに挿入される、実施形態110に記載のライブラリ。

【0471】

112. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-IVに挿入される、実施形態110に記載のライブラリ。

【0472】

113. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-VIIIに挿入される、実施形態110に記載のライブラリ。

【0473】

114. ペプチドが、カプシドタンパク質VP1、VP2、またはVP3に挿入される、実施形態77～113のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0474】

115. ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される、実施形態77～114のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0475】

116.

(i) AAV血清型が、AAV1であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、

(ii) AAV血清型が、AAV6であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、

(iii) AAV血清型が、AAV2であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、

(iv) AAV血清型が、AAV3Bであり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入されるか、

(v) AAV血清型が、AAV5であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位

10

20

30

40

50

置 5 7 8 に挿入されるか、

(v i) A A V 血清型が、A A V 8 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入されるか、または

(v i i) A A V 血清型が、A A V 9 であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6、4 5 5 もしくは 5 8 9 に挿入され、

その位置が、A A V 血清型における V P 1 の番号付けに対応する、実施形態 7 7 ~ 1 1 5 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 7 6 】

1 1 7 . レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、実施形態 7 7 ~ 1 1 6 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 7 7 】

1 1 8 . レポータータンパク質が、E G F P、m C h e r r y、m C l o v e r 3、m R u b y 3、m A p p l e、i R F P、t d T o m a t o、m V e n u s、Y F P、R F P、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、実施形態 1 1 7 に記載のライブラリ。

【 0 4 7 8 】

1 1 9 . A A V バリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸が、p 4 0 プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 7 7 ~ 1 1 8 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 7 9 】

1 2 0 . レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 7 7 ~ 1 1 9 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 8 0 】

1 2 1 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (h S y n 1)、トランスサイレチンプロモーター (T T R)、サイトケラチン 1 8、サイトケラチン 1 9、u n c - 4 5 ミオシンシャペロン B (u n c 4 5 b) プロモーター、心筋型トロポニン T (c T n T) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (G F A P) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) プロモーター、およびメチル C p G 結合タンパク質 2 (M e c p 2) プロモーターからなる群から選択される、実施形態 1 2 0 に記載のライブラリ。

【 0 4 8 1 】

1 2 2 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、h S y n 1 プロモーターである、実施形態 1 2 1 に記載のライブラリ。

【 0 4 8 2 】

1 2 3 . 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、T T R プロモーターである、実施形態 1 2 1 に記載のライブラリ。

【 0 4 8 3 】

1 2 4 . レポータータンパク質が、局在化シグナルに融合される、実施形態 7 7 ~ 1 2 3 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 8 4 】

1 2 5 . 局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方でレポータータンパク質に融合される、実施形態 1 2 4 に記載のライブラリ。

【 0 4 8 5 】

1 2 6 . 局在化シグナルが、核局在化シグナル (N L S)、核エンベロープ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、実施形態 7 7 ~ 1 2 5 のいずれか 1 つに記載のライブラリ。

【 0 4 8 6 】

1 2 7 . N L S が、S V 4 0 N L S である、実施形態 1 2 6 に記載のライブラリ。

【 0 4 8 7 】

10

20

30

40

50

128. 核エンベロープ結合ドメインが、KASHドメインである、実施形態126に記載のライブラリ。

【0488】

129. ヒストン結合ドメインが、H2Bである、実施形態126に記載のライブラリ。

【0489】

130. バーコードを含む核酸が、5～18ヌクレオチド長である、実施形態77～129のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0490】

131. バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態77～130のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0491】

132. バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態77～130のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0492】

133. バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態77～132のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0493】

134. バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態77～132のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0494】

135. AAVバリエーションであって、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、

b) a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーション。

【0495】

136. AAVバリエーションであって、

a) AAVバリエーションカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエーションカプシドタンパク質と、

b) ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異、

c) 局在化シグナルをコードする核酸、

d) バーコードを含む核酸、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸のうちの1つ以上とを含む、AAVバリエーション。

【0496】

137. バリエーションが、a)のAAVバリエーションカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態135に記載のバリエーション。

【0497】

138. バリエーションが、ペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中のa)のAAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態136に記載のバリエーション。

【0498】

139. バリエーションが、局在化シグナルをコードする核酸を含む、実施形態135～136のいずれか1つに記載のバリエーション。

10

20

30

40

50

【0499】

140. バリエントが、バーコードを含む核酸を含む、実施形態135～139のいずれか1つに記載のバリエント。

【0500】

141. バリエントが、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む、実施形態138～139のいずれか1つに記載のバリエント。

【0501】

142. 第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている、実施形態141に記載のバリエント。

【0502】

143. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態142に記載のバリエント。

【0503】

144. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態142に記載のバリエント。

【0504】

145. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態142に記載のバリエント。

【0505】

146. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態142に記載のバリエント。

【0506】

147. 第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態142～146のいずれか1つに記載のバリエント。

【0507】

148. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである、実施形態147に記載のバリエント。

【0508】

149. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、実施形態147に記載のバリエント。

【0509】

150. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである、実施形態147に記載のバリエント。

【0510】

151. RNA Pol IIプロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター(hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター(TTR)、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB(unc45b)プロモーター、心筋型トロポニンT(cTnT)プロモーター、グリアル線維性酸性タンパク質(GFAP)プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2(Mecp2)プロモーターからなる群から選択される、実施形態148～150のいずれか1つに記載のバリエント。

【0511】

152. RNA Pol IIIプロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーターおよび7SKプロモーターからなる群から選択される、実施形態149～151のいずれか1つに記載のバリエント。

10

20

30

40

50

【0512】

153. バリエントが、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、実施形態135～152のいずれか1つに記載のバリエント。

【0513】

154. AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、別個の核酸分子中に位置する、実施形態135～153のいずれか1つに記載のバリエント。

【0514】

155. AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、1つの核酸分子中に位置する、実施形態135～154のいずれか1つに記載のバリエント。

【0515】

156. AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸、および局在化シグナルをコードする核酸、バーコードを含む核酸、および／またはレポータータンパク質をコードする核酸が、互いに任意の順序で連結されている、実施形態155に記載のバリエント。

【0516】

157. バリエントが、5' ITR配列と、バーコードを含む核酸と、レポータータンパク質をコードする核酸と、AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸と、3' ITR配列とを、その順序で含む、実施形態156に記載のバリエント。

【0517】

158. AAVバリエントが、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74からなる群に由来する、実施形態135～157のいずれか1つに記載のバリエント。

【0518】

159. ペプチドが、4～15アミノ酸の長さを有する、実施形態135～158のいずれか1つに記載のバリエント。

【0519】

160. ペプチドが、6～15アミノ酸の長さを有する、実施形態159に記載のバリエント。

【0520】

161. ペプチドが、7、10、または15アミノ酸の長さを有する、実施形態160に記載のバリエント。

【0521】

162. ペプチドが、7アミノ酸の長さを有する、実施形態161に記載のバリエント。

【0522】

163. 挿入されたペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態135～162のいずれか1つに記載のバリエント。

【0523】

164. ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態163に記載のバリエント。

【0524】

165. 挿入されたペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態135～162のいずれか1つに記載のバリエント。

【0525】

10

20

30

40

50

166. ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態165に記載のバリエーション。

【0526】

167. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-I、VR-II、VR-III、VR-IV、VR-V、VR-VI、VR-VII、VR-VIIIおよびVR-IX領域からなる群から選択される領域に挿入される、実施形態135～166のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0527】

168. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-Iに挿入される、実施形態167に記載のバリエーション。

【0528】

169. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-IVに挿入される、実施形態167に記載のバリエーション。

【0529】

170. ペプチドが、カプシドタンパク質のVR-VIIIに挿入される、実施形態168に記載のバリエーション。

【0530】

171. ペプチドが、カプシドタンパク質VP1、VP2、またはVP3に挿入される、実施形態135～170のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0531】

172. ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される、実施形態135～171のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0532】

173.

(i) AAV血清型が、AAV1であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入されるか、

(ii) AAV血清型が、AAV6であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590に挿入されるか、

(iii) AAV血清型が、AAV2であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入されるか、

(iv) AAV血清型が、AAV3Bであり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入されるか、

(v) AAV血清型が、AAV5であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入されるか、

(vi) AAV血清型が、AAV8であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入されるか、または

(vii) AAV血清型が、AAV9であり、ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455もしくは589に挿入され、

その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する、実施形態135～172のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0533】

174. レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、実施形態135～173のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0534】

175. レポータータンパク質が、EGFP、mCherry、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、ホタルルシフェラーゼ、およびナノルシフェラーゼからなる群から選択される、実施形態174に記載のバリエーション。

【0535】

176. AAVバリエーションカプシドタンパク質をコードする核酸が、p40プロモーター

10

20

30

40

50

に作動可能に連結されている、実施形態 135～175 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0536】

177. レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 138～176 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0537】

178. 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン 18、サイトケラチン 19、unc-45 ミオシンシャペロン B (unc45b) プロモーター、心筋型トロポニン T (cTnT) プロモーター、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) プロモーター、およびメチル CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) プロモーターからなる群から選択される、実施形態 177 に記載のバリエーション。

【0538】

179. 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、hSyn1 プロモーターである、実施形態 178 に記載のバリエーション。

【0539】

180. 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、TTR プロモーターである、実施形態 178 に記載のバリエーション。

【0540】

181. レポータータンパク質が、局在化シグナルに融合される、実施形態 135～180 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0541】

182. 局在化シグナルが、N 末端、C 末端、または N 末端および C 末端の両方でレポータータンパク質に融合される、実施形態 181 に記載のバリエーション。

【0542】

183. 局在化シグナルが、核局在化シグナル (NLS)、核エンベロープ結合ドメイン、またはヒストン結合ドメインである、実施形態 135～182 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0543】

184. NLS が、SV40 NLS である、実施形態 183 に記載のバリエーション。

【0544】

185. 核エンベロープ結合ドメインが、KASH ドメインである、実施形態 183 に記載のバリエーション。

【0545】

186. ヒストン結合ドメインが、H2B である、実施形態 183 に記載のバリエーション。

【0546】

187. バーコードを含む核酸が、5～18 ヌクレオチド長である、実施形態 135～186 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0547】

188. バーコードを含む核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、実施形態 135～187 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

【0548】

189. バーコード配列を含む核酸が、配列番号 111～154 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される、実施形態 188 に記載のバリエーション。

【0549】

190. バーコードを含む核酸が、配列番号 155～198 の配列のうちのいずれか 1 つから選択される配列を含む、実施形態 135～187 のいずれか 1 つに記載のバリエーション。

10

20

30

40

50

。

【0550】

191. バーコード配列を含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態190に記載のバリエーション。

【0551】

192. AAVバリエーションが、AAV1に由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0552】

193. バリエーションが、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態192に記載のバリエーション。

10

【0553】

194. バリエーションが、配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態192に記載のバリエーション。

【0554】

195. バリエーションが、配列番号71のアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態192に記載のバリエーション。

【0555】

196. AAVバリエーションが、AAV2に由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0556】

197. バリエーションが、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態196に記載のバリエーション。

20

【0557】

198. バリエーションが、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102からなる群から選択される配列のうちのいずれか1つを含むペプチドを含む、実施形態196に記載のバリエーション。

【0558】

199. バリエーションが、配列番号4～7のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態196に記載のバリエーション。

30

【0559】

200. AAVバリエーションが、AAV3Bに由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0560】

201. バリエーションが、配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76および配列番号83からなる群から選択される配列のうちのいずれか1つを含むペプチドを含む、実施形態200に記載のバリエーション。

【0561】

202. バリエーションが、配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態200に記載のバリエーション。

40

【0562】

203. AAVバリエーションが、AAV5に由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエーション。

【0563】

204. バリエーションが、配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態203に記載のバリエーション。

【0564】

205. AAVバリエーションが、AAV6に由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエーション。

50

【0565】

206. バリエントが、配列番号19～配列番号27のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態205に記載のバリエント。

【0566】

207. AAVバリエントが、AAV9に由来する、実施形態135～191のいずれか1つに記載のバリエント。

【0567】

208. バリエントが、配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態207に記載のバリエント。

【0568】

209. バリエントが、配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む、実施形態207に記載のバリエント。

【0569】

210. バリエントが、配列番号89の配列を含むペプチドを含む、実施形態207に記載のバリエント。

【0570】

211. 核酸分子であって、

a) AAVバリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループに挿入されたペプチドを含むAAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列と、

b) バリエントカプシドタンパク質の超可変および／または表面露出ループ中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含むバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列、

c) 局在化シグナルをコードする核酸配列、

d) バーコードを含む核酸配列、および

e) レポータータンパク質をコードする核酸配列のうちの1つ以上とを含む、核酸分子。

【0571】

212. AAVバリエントカプシドタンパク質をコードする核酸配列が、a) のAAVバリエントカプシドタンパク質中のペプチド挿入部位に隣接する核酸配列中の1つ以上のサイレント変異を含む、実施形態211に記載の核酸分子。

【0572】

213. 核酸分子が、局在化シグナルをコードする核酸を含む、実施形態212に記載の核酸分子。

【0573】

214. 核酸分子が、バーコードを含む核酸を含む、実施形態212に記載の核酸分子。

【0574】

215. 核酸分子が、第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とを含む、実施形態211～214に記載の核酸分子。

【0575】

216. 第1のバーコードを含む第1の核酸と、第2のバーコードを含む第2の核酸とが異なっている、実施形態215に記載の核酸分子。

【0576】

217. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態216に記載の核酸分子。

【0577】

218. 第1のバーコード配列を含む第1の核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態217に記載の核酸分子。

【0578】

219. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態216に記載の核酸分子。

【0579】

220. 第2のバーコード配列を含む第2の核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される、実施形態217に記載の核酸分子。

【0580】

221. 第1のバーコードを含む第1の核酸および第2のバーコードを含む第2の核酸の各々が独立して、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態215～220のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0581】

222. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIプロモーターである、実施形態221に記載の核酸分子。

【0582】

223. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターと、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、それぞれ独立して、RNA Pol IIIプロモーターである、実施形態221に記載の核酸分子。

【0583】

224. 第1のバーコードを含む第1の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIプロモーターに作動可能に連結されており、第2のバーコードを含む第2の核酸に作動可能に連結されたプロモーターが、RNA Pol IIIプロモーターである、実施形態221に記載の核酸分子。

【0584】

225. RNA Pol IIプロモーターが、ヒトシナプシンプロモーター (hSyn1)、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、サイトケラチン18、サイトケラチン19、unc-45ミオシンシャペロンB (unc45b)プロモーター、心筋型トロポニンT (cTnT)プロモーター、グリアル線維性酸性タンパク質 (GFAP)プロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)プロモーター、およびメチルCpG結合タンパク質2 (MeCP2)プロモーターからなる群から選択される、実施形態222～224のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0585】

226. RNA Pol IIIプロモーターが、U6プロモーター、H1プロモーターおよび7SKプロモーターからなる群から選択される、実施形態223～224のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0586】

227. 核酸分子が、レポータータンパク質をコードする核酸を含む、実施形態211～226のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0587】

228. AAVバリエントが、AAV1、AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV3、AAV4、AAV7、AAV11、AAVrh10、AAVrh39、およびAAVrh74のうちの1つ以上に由来する、実施形態211～227のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0588】

229. 挿入されたペプチドが、4～15アミノ酸の長さを有する、実施形態211～228のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0589】

230. 挿入されたペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態229に記載の核酸分子。

【0590】

231. 挿入されたペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む、実施形態229に記載の核酸

10

20

30

40

50

分子。

【0591】

232. レポータータンパク質をコードする核酸が、細胞型および／または組織特異的プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態211～231のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0592】

233. 細胞型および／または組織特異的プロモーターが、hSyn1プロモーターである、実施形態232に記載の核酸分子。

【0593】

234. バーコードを含む核酸が、配列番号111～154の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態211～233のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0594】

235. バーコードを含む核酸が、配列番号155～198の配列のうちのいずれか1つから選択される配列を含む、実施形態211～233のいずれか1つに記載の核酸分子。

【0595】

236. 導入遺伝子を標的細胞または組織に送達するための、実施形態135～210のいずれか1つに記載のAAVバリエーションの使用。

【0596】

237. 配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸分子を含むAAVベクター。

【0597】

238. 核酸が、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、実施形態237に記載のAAVベクター。

【0598】

239. 核酸が、配列番号1～32のうちの1つのいずれかの配列を有するペプチドをコードする、実施形態237または238に記載のAAVベクター。

【0599】

240. 配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドをコードする核酸分子を含むAAVベクター。

【0600】

241. 核酸が、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、実施形態240に記載のAAVベクター。

【0601】

242. 核酸が、配列番号68～110のうちの1つのいずれかの配列を有するペプチドをコードする、実施形態240または241に記載のAAVベクター。

【0602】

243. 核酸が、配列番号71、76～80、83、89、91、94～96、101～103および106のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする、実施形態240に記載のAAVベクター。

【0603】

244. ペプチドが、カプシドタンパク質の一部である、実施形態237～243のいずれか1つに記載のAAVベクター。

【0604】

245. カプシドタンパク質が、VP1、VP2、またはVP3である、実施形態244に記載のAAVベクター。

【0605】

246. ペプチドが、カプシドタンパク質のアミノ酸残基450～600の間の位置に挿入される、実施形態237～245のいずれか1つに記載のAAVベクター。

【0606】

247. ペプチドが、

10

20

30

40

50

(i) AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸位置590、
(ii) AAV6カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590、
(iii) AAV2カプシドタンパク質のアミノ酸位置588、
(iv) AAV3Bカプシドタンパク質のアミノ酸位置589、
(v) AAV5カプシドタンパク質のアミノ酸位置578、
(vi) AAV8カプシドタンパク質のアミノ酸位置591、または
(vii) AAV9カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455、もしくは589に
挿入され、
その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する、実施形態246に記載
のAAVベクター。

10

【0607】
248. 実施形態237～247のいずれか1つに記載のAAVベクターと、薬学的に許
容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【0608】
249. 配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチ
ド。

【0609】
250. 配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペ
プチド。

【0610】
251. 配列番号71、76～80、83、89、91、94～96、101～103お
よび106のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

20

【0611】
252. 配列番号71、76～80、83および94～96のうちのいずれか1つに示さ
れるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【0612】
253. 配列番号89、91、101～103および106のうちのいずれか1つに示さ
れるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【0613】
254. 配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含
む、ペプチド。

30

【0614】
255. 配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つに示されるアミ
ノ酸配列を含む、ペプチド。

【0615】
256. 配列番号71に示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【0616】
257. 配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を
含む、ペプチド。

【0617】
258. 配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103
、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つに示される
アミノ酸配列を含む、ペプチド。

40

【0618】
259. 配列番号4～7のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド
。

【0619】
260. 配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76およ
び配列番号83のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【0620】

50

261. 配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0621】
262. 配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0622】
263. 配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0623】
264. 配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0624】
265. 配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0625】
266. 配列番号89に示されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。
【0626】
267. ペプチドが、AAVベクターの一部である、実施形態249～266のいずれか1つに記載のペプチド。
【0627】
268. ペプチドが、AAVベクターのカプシドタンパク質の一部である、実施形態267に記載のペプチド。
【0628】
269. 実施形態249～268のいずれか1つに記載のペプチドをコードする核酸分子。
【0629】
270. 配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含む、カプシドタンパク質。
【0630】
271. 配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含むペプチドを含む、カプシドタンパク質。
【0631】
272. ペプチドが、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。
【0632】
273. ペプチドが、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。
【0633】
274. 配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。
【0634】
275. 配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。
【0635】
276. ペプチドが、配列番号71、76～80、83、89、91、94～96、101～103および106のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。
【0636】
277. ペプチドが、配列番号71、76～80、83、および94～96のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0637】

278. ペプチドが、配列番号89、91、101～103および106のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0638】

279. ペプチドが、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0639】

280. ペプチドが、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0640】

281. ペプチドが、配列番号71に示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0641】

282. ペプチドが、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0642】

283. ペプチドが、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0643】

284. ペプチドが、配列番号4～7のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0644】

285. ペプチドが、配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76および配列番号83のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0645】

286. ペプチドが、配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0646】

287. ペプチドが、配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0647】

288. ペプチドが、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0648】

289. ペプチドが、配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態270に記載のカプシドタンパク質。

【0649】

290. ペプチドが、配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0650】

291. ペプチドが、配列番号89に示されるアミノ酸配列を含む、実施形態271に記載のカプシドタンパク質。

【0651】

292. 実施形態269～291のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質をコードする核酸分子。

【0652】

293. 核酸を対象の標的細胞または組織に送達する方法であって、実施形態237～247のいずれか1つに記載のAAVベクターを含む組成物を投与することを含む、方法。

10

20

30

40

50

【0653】

294. カプシドタンパク質が、配列番号1～32のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態293に記載の方法。

【0654】

295. カプシドタンパク質が、配列番号68～110のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態293に記載の方法。

【0655】

296. 標的細胞、細胞株または組織が、CNS、心臓、肺、気管、食道、筋肉、骨、軟骨、胃、脾臓、腸、肝臓、膀胱、腎臓、尿管、尿道、子宮、卵管、卵巣、精巣、前立腺、眼、血液、リンパ、および口腔粘膜からなる群から選択される、実施形態293～295のいずれか1つに記載の方法。

10

【0656】

297. 標的細胞が、ニューロン、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドログリア、ミクログリア、シュワン細胞、上皮細胞、肝細胞、星細胞脂肪摂取細胞、クッパー細胞、肝臓内皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、T細胞、B細胞、造血幹細胞、および胚性幹細胞からなる群から選択される、実施形態293～295のいずれか1つに記載の方法。

【0657】

298. 標的細胞または組織が肝臓由来である、実施形態296に記載の方法。

【0658】

299. 標的細胞または組織がCNS由来である、実施形態296に記載の方法。

20

【0659】

300. 実施形態135～211のいずれか1つに記載のバリエーションと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【0660】

301. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0661】

302. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

30

【0662】

303. ペプチドが、配列番号68～75のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態302に記載のライブラリ。

【0663】

304. ペプチドが、配列番号71のアミノ酸配列を含む、実施形態302に記載のライブラリ。

【0664】

305. ペプチドが、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態301に記載のライブラリ。

40

【0665】

306. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0666】

307. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0667】

50

308. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0668】

309. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0669】

310. ペプチドが、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態306および308のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0670】

311. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0671】

312. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0672】

313. ペプチドが、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態312に記載のライブラリ。

【0673】

314. ペプチドが、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態312に記載のライブラリ。

【0674】

315. ペプチドが、配列番号4～7のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態311に記載のライブラリ。

【0675】

316. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0676】

317. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0677】

318. ペプチドが、配列番号76～85のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態317に記載のライブラリ。

【0678】

319. ペプチドが、配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76および配列番号83のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態317に記載のライブラリ。

【0679】

320. ペプチドが、配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態316に記載のライブラリ。

【0680】

321. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

10

20

30

40

50

【0681】

322. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0682】

323. ペプチドが、配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態321に記載のライブラリ。

【0683】

324. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0684】

325. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0685】

326. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0686】

327. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0687】

328. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0688】

329. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0689】

330. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0690】

331. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態116に記載のライブラリ。

【0691】

332. ペプチドが、配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態326、328、および330のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0692】

333. ペプチドが、配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態327、329、および331のいずれか1つに記載のライブラリ。

【0693】

334. ペプチドが、配列番号89の配列を含む、実施形態327、329、および331のいずれか1つに記載のライブラリ。

10

20

30

40

50

【0694】

335. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0695】

336. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0696】

337. ペプチドが、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態336に記載のAAVバリエーション。 10

【0697】

338. ペプチドが、配列番号71のアミノ酸配列を含む、実施形態336に記載のAAVバリエーション。

【0698】

339. ペプチドが、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態335に記載のAAVバリエーション。

【0699】

340. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。 20

【0700】

341. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0701】

342. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。 30

【0702】

343. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0703】

344. ペプチドが、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態340および342のいずれか1つに記載のAAVバリエーション。

【0704】

345. 配列番号1～32のアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。 40

【0705】

346. 配列番号68～110のアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0706】

347. ペプチドが、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態346に記載のAAVバリエーション。

【0707】

348. ペプチドが、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態346に記載のAAVバリエーション。

【0708】

349. ペプチドが、配列番号4～7のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態345に記載のAAVバリエーション。

【0709】

350. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

10

【0710】

351. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0711】

352. ペプチドが、配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76および配列番号83のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態351に記載のAAVバリエーション。

【0712】

20

353. ペプチドが、配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態350に記載のAAVバリエーション。

【0713】

354. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0714】

355. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

30

【0715】

356. ペプチドが、配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態354に記載のAAVバリエーション。

【0716】

357. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0717】

358. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

40

【0718】

359. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0719】

360. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0720】

50

361. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0721】

362. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0722】

363. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0723】

364. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態173に記載のAAVバリエーション。

【0724】

365. ペプチドが、配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態359、361、および363のいずれか1つに記載のAAVバリエーション。

【0725】

366. ペプチドが、配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態360、362、および364のいずれか1つに記載のAAVバリエーション。

【0726】

367. ペプチドが、配列番号89の配列を含む、実施形態360、362、および364のいずれか1つに記載のAAVバリエーション。

【0727】

368. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態247に記載のAAVベクター。

【0728】

369. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態247に記載のAAVベクター。

【0729】

370. ペプチドが、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態369に記載のAAVベクター。

【0730】

371. ペプチドが、配列番号71のアミノ酸配列を含む、実施形態369に記載のAAVベクター。

【0731】

372. ペプチドが、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態368に記載のAAVベクター。

【0732】

373. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態247に記載のAAVベクター。

【0733】

374. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態24

10

20

30

40

50

7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 4 】

3 7 5 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 5 】

3 7 6 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 6 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 0 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 6 】

3 7 7 . ペプチドが、配列番号 1 9 ～ 配列番号 2 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 7 3 および 3 7 5 のいずれか 1 つに記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 7 】

3 7 8 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 8 】

3 7 9 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 2 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 8 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 3 9 】

3 8 0 . ペプチドが、配列番号 9 0 ～ 配列番号 1 1 0 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 7 9 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 0 】

3 8 1 . ペプチドが、配列番号 9 5 、配列番号 9 4 、配列番号 9 6 、配列番号 1 0 1 、配列番号 1 0 3 、配列番号 1 0 6 、配列番号 9 1 および配列番号 1 0 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 7 9 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 1 】

3 8 2 . ペプチドが、配列番号 4 ～ 7 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 7 8 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 2 】

3 8 3 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 3 】

3 8 4 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 3 B 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 4 】

3 8 5 . ペプチドが、配列番号 7 8 、配列番号 8 0 、配列番号 7 7 、配列番号 7 9 、配列番号 7 6 および配列番号 8 3 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 8 4 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 5 】

3 8 6 . ペプチドが、配列番号 8 ～ 配列番号 1 1 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 8 3 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 6 】

3 8 7 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、実施形態 2 4 7 に

10

20

30

40

50

記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 7 】

3 8 8 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 5 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 7 8 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 8 】

3 8 9 . ペプチドが、配列番号 2 8 ～ 配列番号 3 2 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 8 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 4 9 】

3 9 0 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 0 】

3 9 1 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 8 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 9 1 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 1 】

3 9 2 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 2 】

3 9 3 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 2 6 6 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 3 】

3 9 4 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 4 】

3 9 5 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 4 5 5 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 5 】

3 9 6 . 配列番号 1 ～ 3 2 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 6 】

3 9 7 . 配列番号 6 8 ～ 1 1 0 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドが、A A V 9 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置 5 8 9 に挿入される、実施形態 2 4 7 に記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 7 】

3 9 8 . ペプチドが、配列番号 1 2 ～ 配列番号 1 8 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 9 2 、 3 9 4 、 および 3 9 6 のいずれか 1 つに記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 8 】

3 9 9 . ペプチドが、配列番号 8 6 ～ 配列番号 8 9 のうちのいずれか 1 つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 9 3 、 3 9 5 、 および 3 9 7 のいずれか 1 つに記載の A A V ベクター。

【 0 7 5 9 】

4 0 0 . ペプチドが、配列番号 8 9 の配列を含む、実施形態 3 9 3 、 3 9 5 、 および 3 9

10

20

30

40

50

7のいずれか1つに記載のAAVベクター。

【0760】

401. 挿入されたペプチドを含むカプシドタンパク質であって、ペプチドが、

(i) AAV1カプシドタンパク質のアミノ酸位置590、

(ii) AAV6カプシドタンパク質のアミノ酸位置454もしくは590、

(iii) AAV2カプシドタンパク質のアミノ酸位置588、

(iv) AAV3Bカプシドタンパク質のアミノ酸位置589、

(v) AAV5カプシドタンパク質のアミノ酸位置578、

(vi) AAV8カプシドタンパク質のアミノ酸位置591、または

(vii) AAV9カプシドタンパク質のアミノ酸位置266、455、もしくは589に挿入され、

その位置が、AAV血清型におけるVP1の番号付けに対応する、カプシドタンパク質。

【0761】

402. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0762】

403. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV1血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0763】

404. ペプチドが、配列番号68～配列番号75のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態403に記載のカプシドタンパク質。

【0764】

405. ペプチドが、配列番号71のアミノ酸配列を含む、実施形態403に記載のカプシドタンパク質。

【0765】

406. ペプチドが、配列番号1、配列番号2および配列番号3のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態402に記載のカプシドタンパク質。

【0766】

407. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0767】

408. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置454に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0768】

409. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0769】

410. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV6血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置590に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0770】

411. ペプチドが、配列番号19～配列番号27のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態407および409のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質。

10

20

30

40

50

【0771】

412. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0772】

413. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV2血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置588に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0773】

414. ペプチドが、配列番号90～配列番号110のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態413に記載のカプシドタンパク質。

【0774】

415. ペプチドが、配列番号95、配列番号94、配列番号96、配列番号101、配列番号103、配列番号106、配列番号91および配列番号102のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態413に記載のカプシドタンパク質。

【0775】

416. ペプチドが、配列番号4～7のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態412に記載のカプシドタンパク質。

【0776】

417. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0777】

418. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV3B血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0778】

419. ペプチドが、配列番号78、配列番号80、配列番号77、配列番号79、配列番号76および配列番号83のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態418に記載のカプシドタンパク質。

【0779】

420. ペプチドが、配列番号8～配列番号11のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態417に記載のカプシドタンパク質。

【0780】

421. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0781】

422. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV5血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置578に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0782】

423. ペプチドが、配列番号28～配列番号32のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態421に記載のカプシドタンパク質。

【0783】

424. 配列番号1～32のアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0784】

10

20

30

40

50

425. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV8血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置591に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0785】

426. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0786】

427. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置266に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

10

【0787】

428. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0788】

429. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置455に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0789】

430. 配列番号1～32のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

20

【0790】

431. 配列番号68～110のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドが、AAV9血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸位置589に挿入される、実施形態401に記載のカプシドタンパク質。

【0791】

432. ペプチドが、配列番号12～配列番号18のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態426、428および430のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質。

30

【0792】

433. ペプチドが、配列番号86～配列番号89のうちのいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態427、429、および431のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質。

【0793】

434. ペプチドが、配列番号89の配列を含む、実施形態427、429、および431のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質。

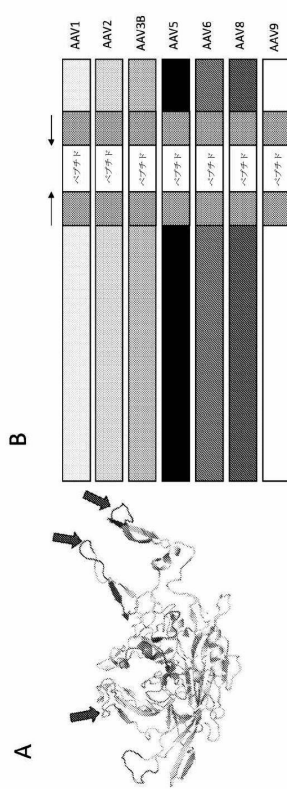
【0794】

435. 実施形態401～434のいずれか1つに記載のカプシドタンパク質をコードする核酸分子。

40

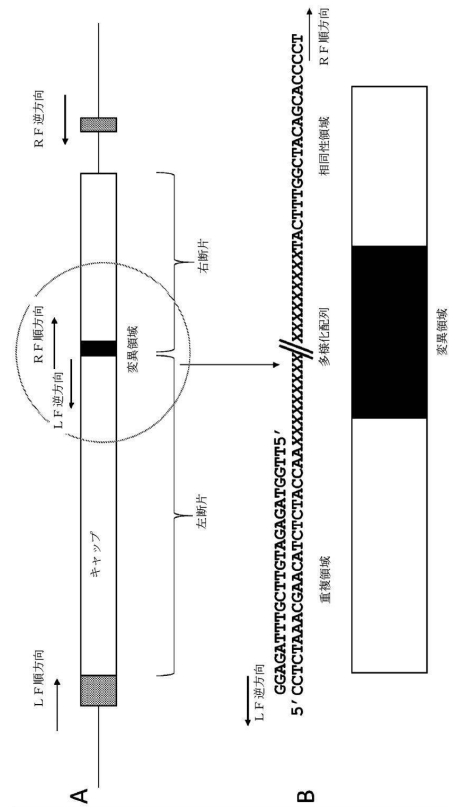
【図面】
【図 1】

【図 1】



【図 2】

【図 2】

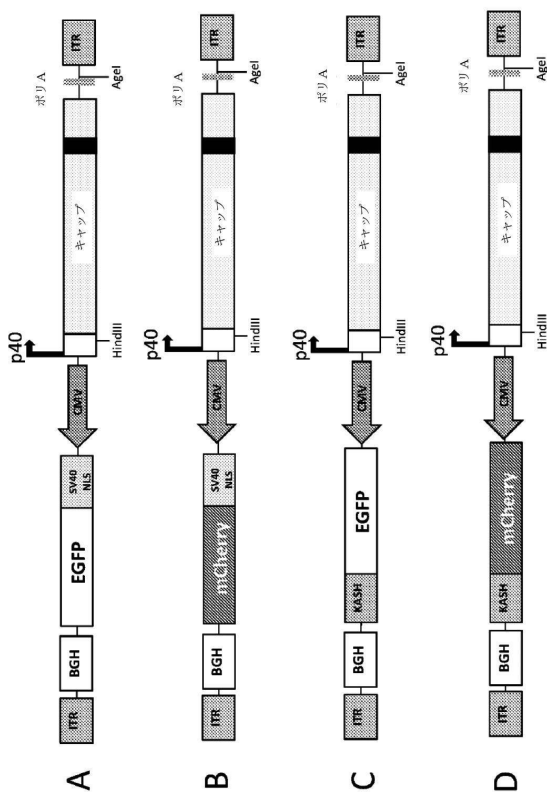


10

20

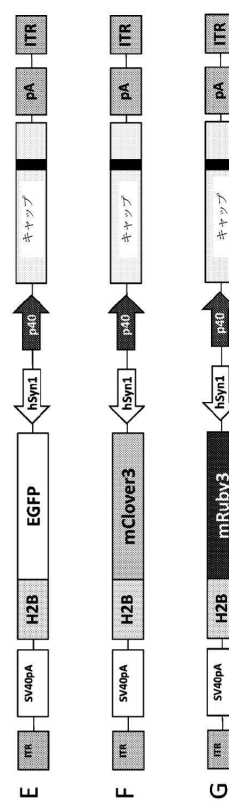
【図 3 - 1】

【図 3 A】



【図 3 - 2】

【図 3 B】



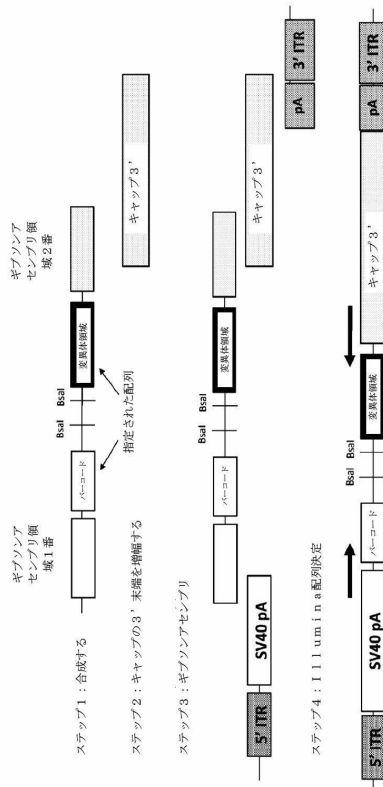
30

40

50

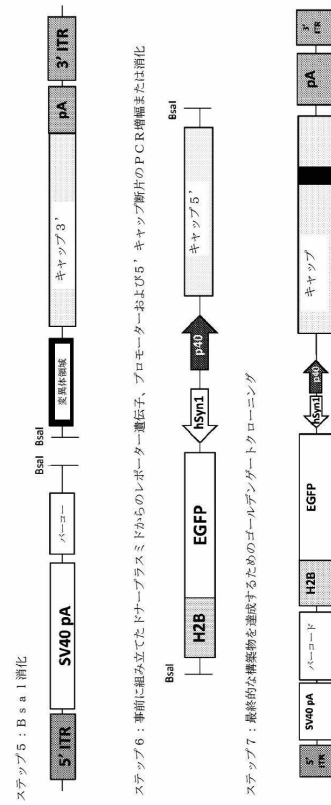
【圖 4 - 1】

【図 4 A】



【圖 4-2】

【図 4 B】

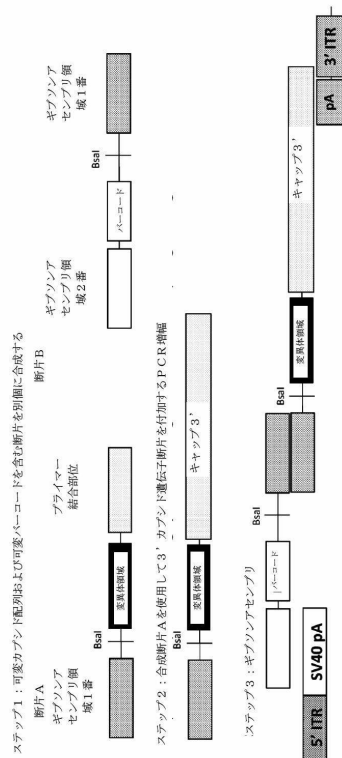


10

20

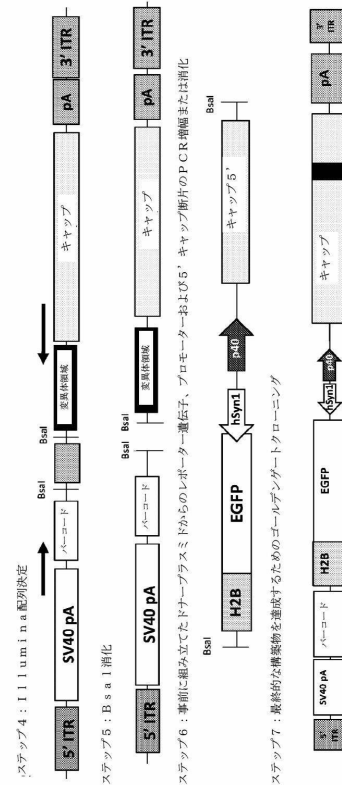
【圖 4-3】

【図 4 C】



【圖 4-4】

【図4D】



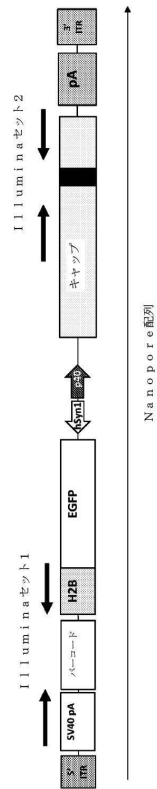
30

40

50

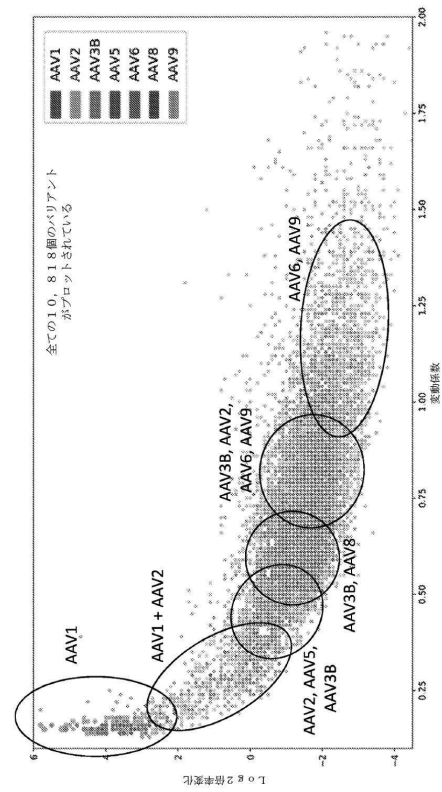
【図 5】

【図 5】



【図 6】

【図 6】

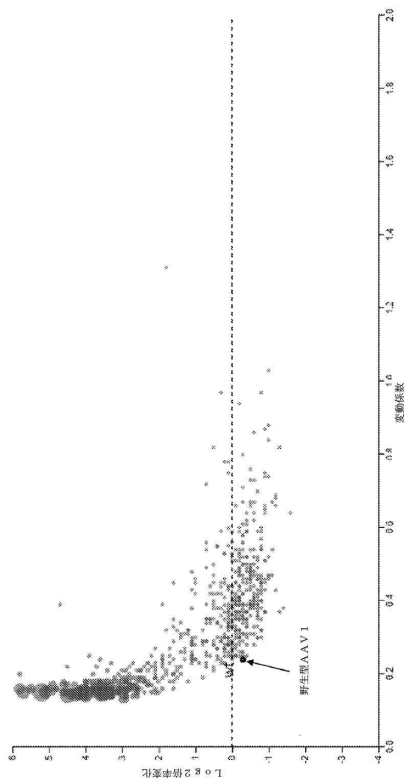


10

20

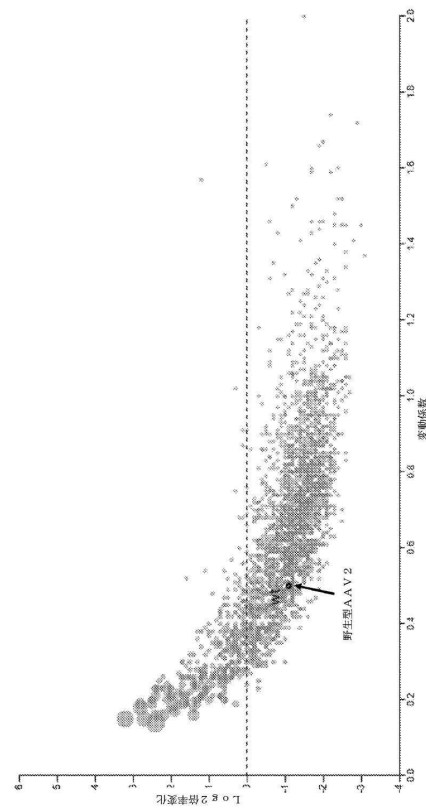
【図 7 - 1】

【図 7 A】



【図 7 - 2】

【図 7 B】



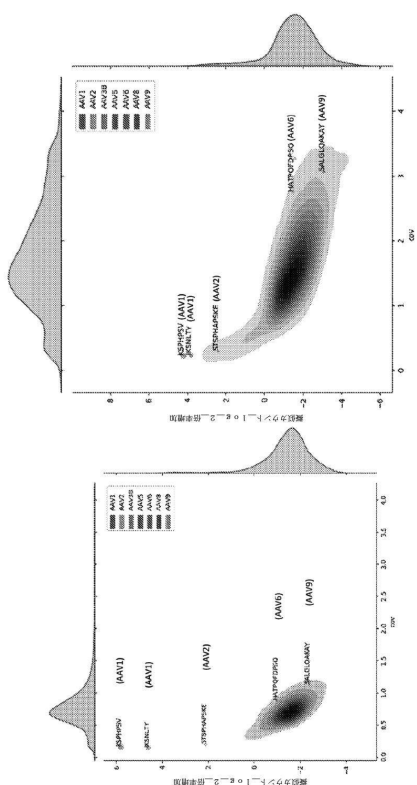
30

40

50

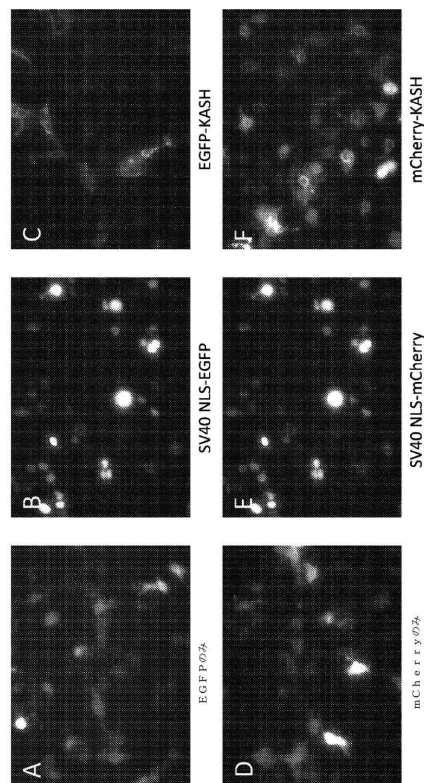
【図 8】

【図 8】



【図 9】

【図 9】

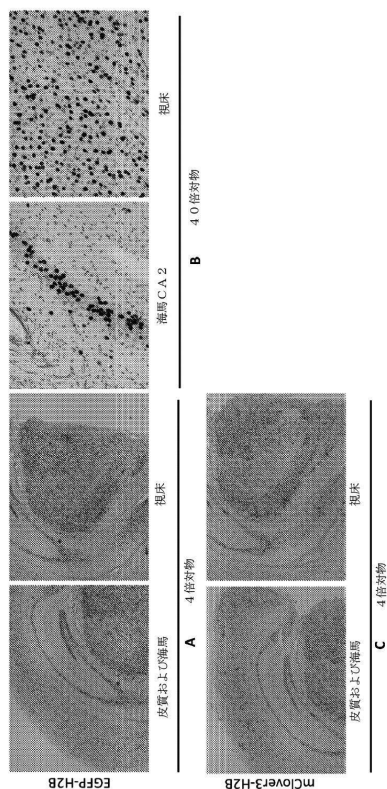


10

20

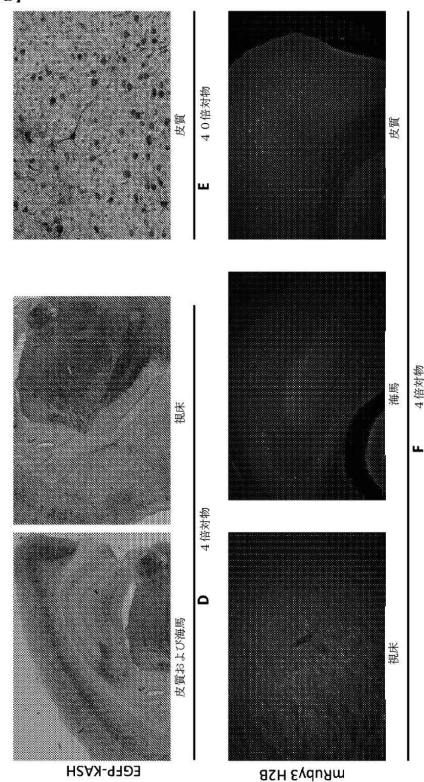
【図 10 - 1】

【図 10A】



【図 10 - 2】

【図 10B】



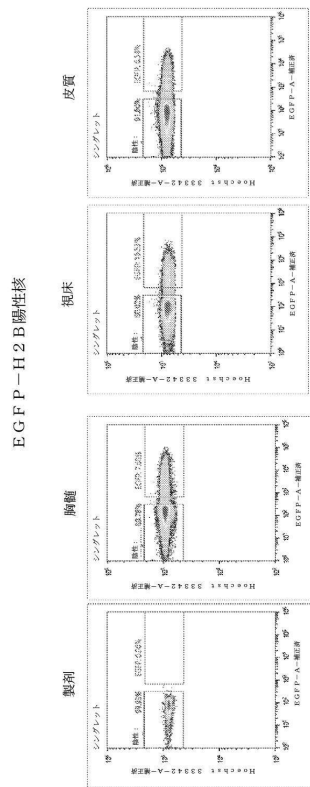
30

40

50

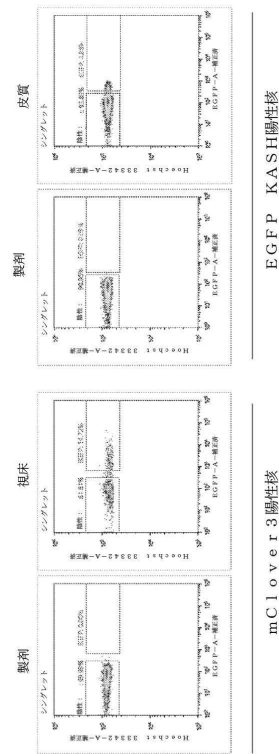
【図 1 1】

【図 1 1】



【図 1 2】

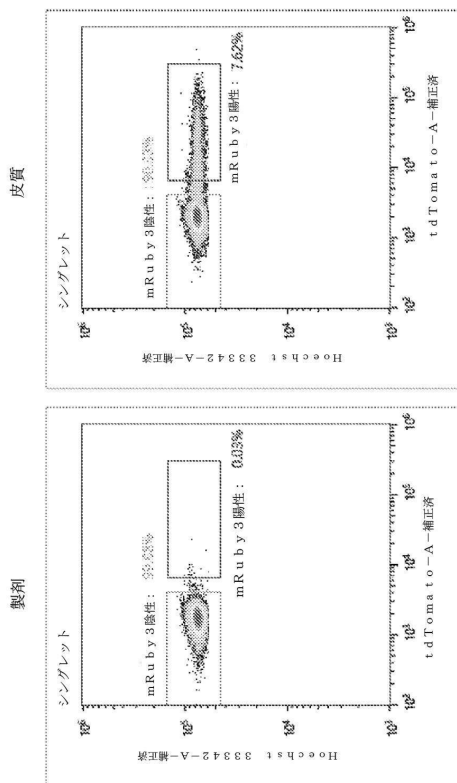
【図 1 2】



10

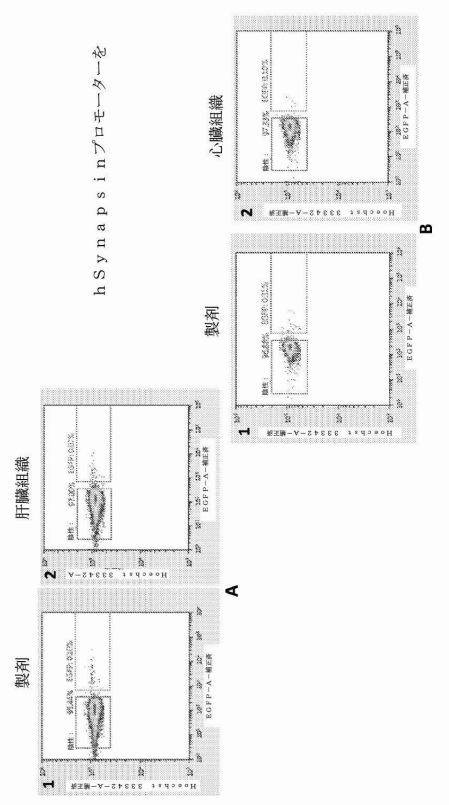
【図 1 3】

【図 1 3】



【図 1 4】

【図 1 4】



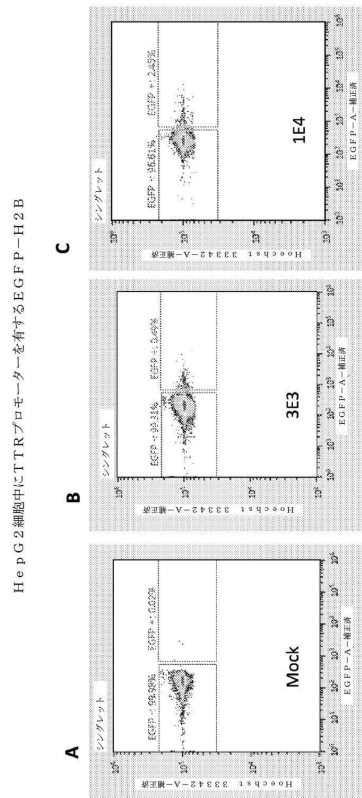
30

40

50

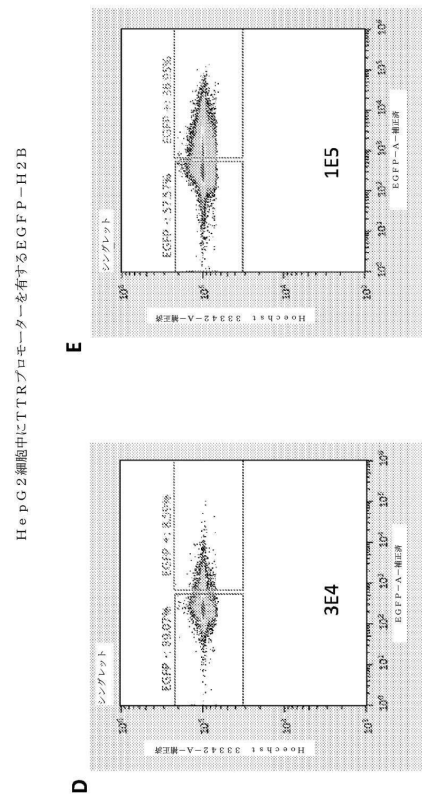
【図 15 - 1】

【図 15 A】



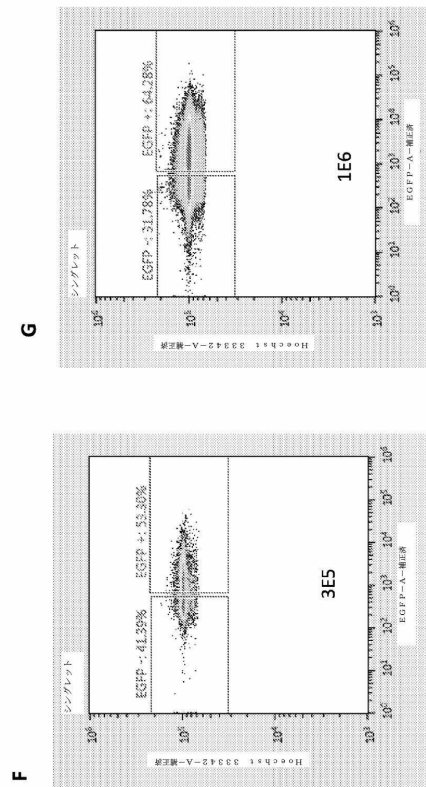
【図 15 - 2】

【図 15 B】



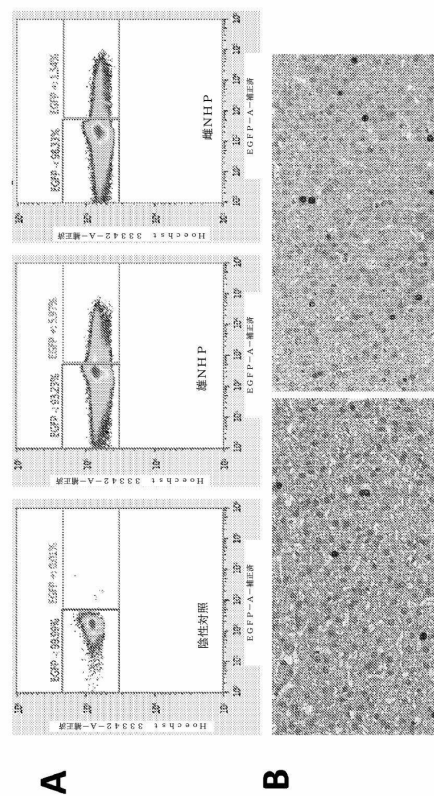
【図 15 - 3】

【図 15 C】



【図 16】

【図 16】



10

20

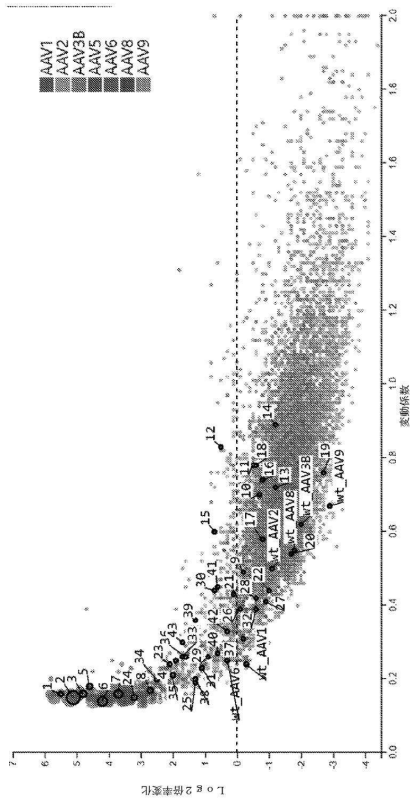
30

40

50

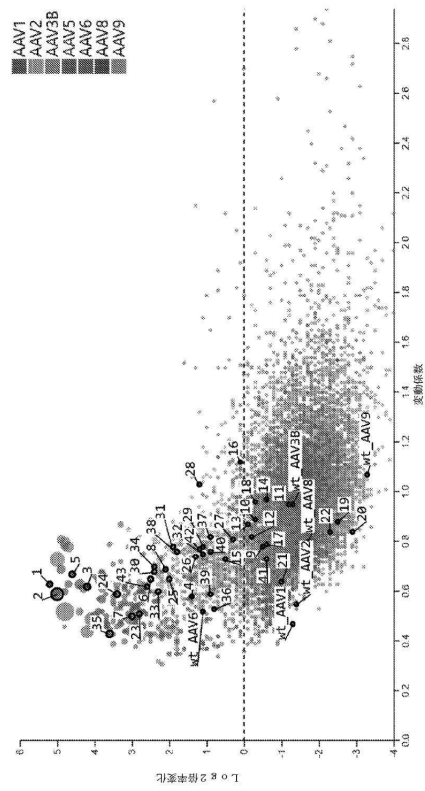
【図 2 0】

【図 2 0】



【図 2 1】

【図 2 1】

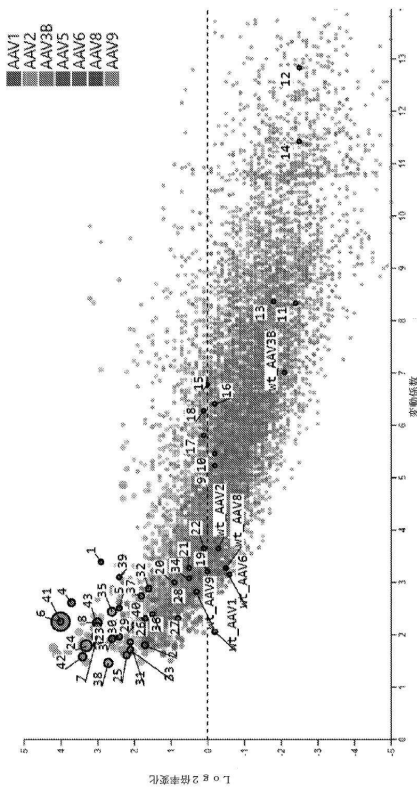


10

20

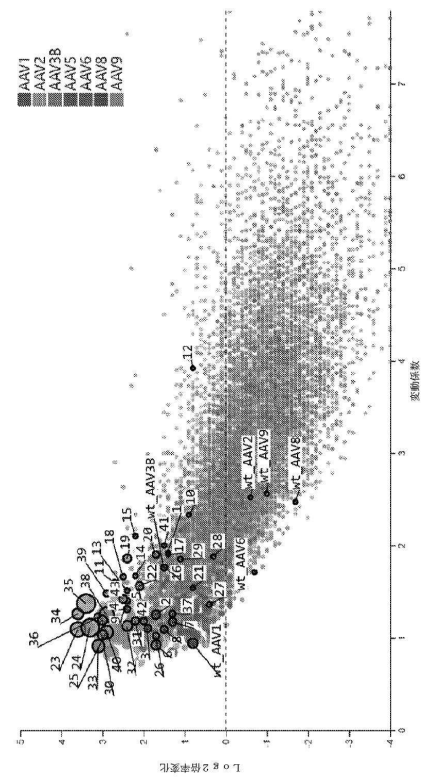
【図 2 2】

【図 2 2】



【図 2 3】

【図 2 3】



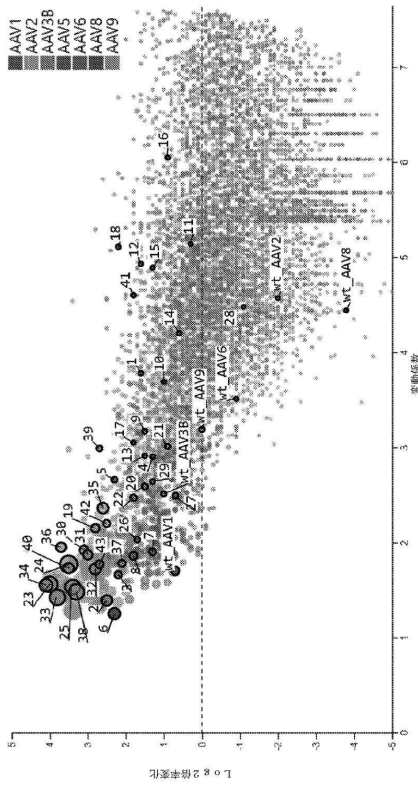
30

40

50

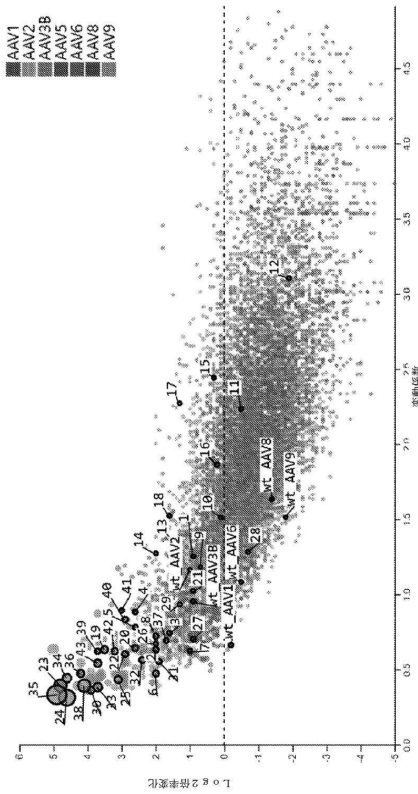
【図 2 4】

【図 2 4】



【図 2 5】

【図 2 5】

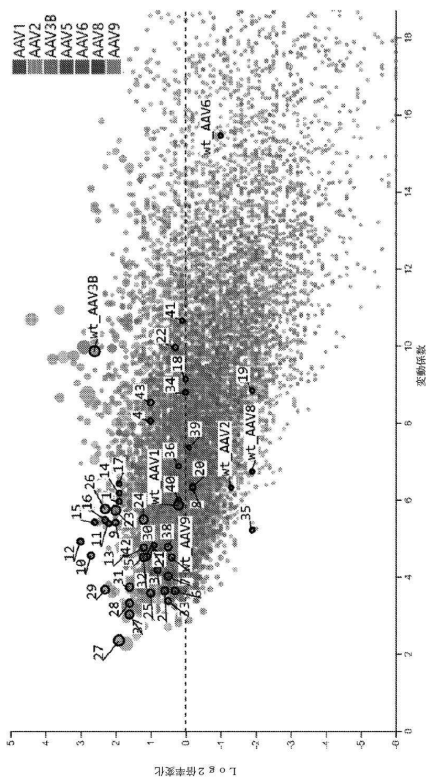


10

20

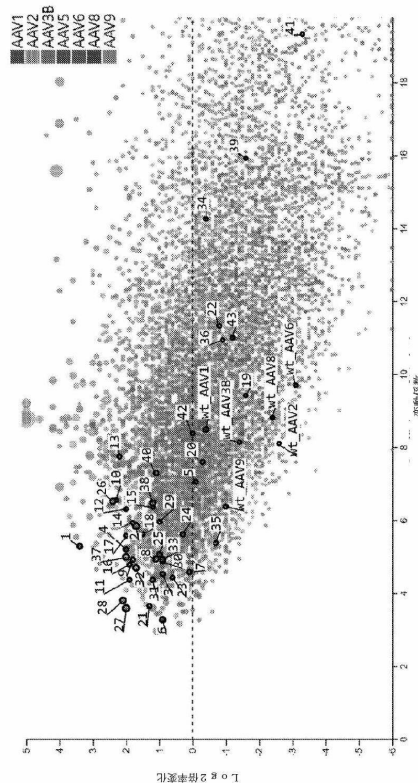
【図 2 6】

【図 2 6】



【図 2 7】

【図 2 7】



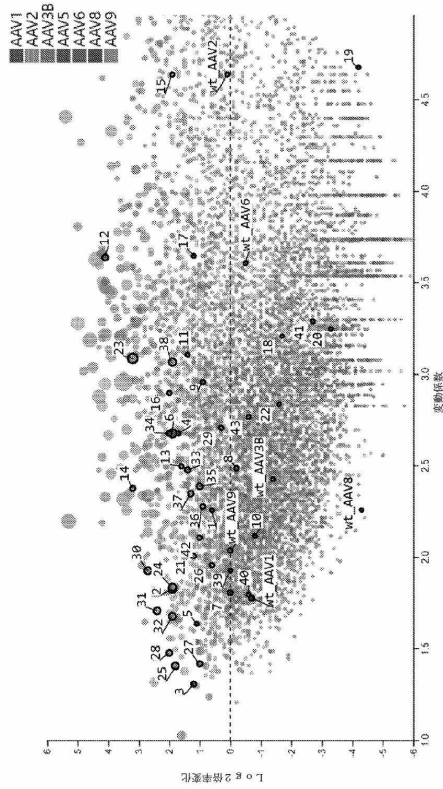
30

40

50

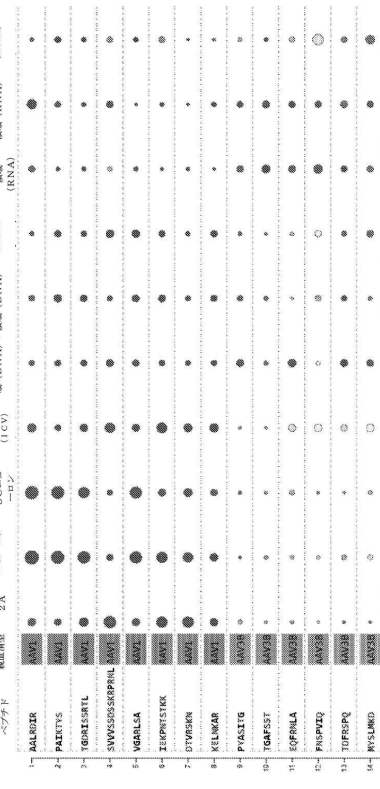
【図 28】

【図 28】



【図 29 - 1】

【図 29A】



10

20

【図 29 - 2】

【図 29B】

ベクター	Neuro マウス初代 2A ニューロン	ETIP SCニム	CS7BL/6Jマウス (ICV)	NHP AD 脳 (DNA)	NHP AD 脳 (RNA)	NHP PSP 脳 (DNA)	NHP PSP 脳 (RNA)
1- L1554S	AAV1	●	●	●	●	●	●
2- YSR6V0	AAV2	●	●	●	●	●	●
3- L1554S	AAV3	●	●	●	●	●	●
4- L1554S	AAV4	●	●	●	●	●	●
5- L1554S	AAV5	●	●	●	●	●	●
6- L1554S	AAV6	●	●	●	●	●	●
7- L1554S	AAV7	●	●	●	●	●	●
8- L1554S	AAV8	●	●	●	●	●	●
9- L1554S	AAV9	●	●	●	●	●	●
10- L1554S	AAV10	●	●	●	●	●	●
11- L1554S	AAV11	●	●	●	●	●	●
12- L1554S	AAV12	●	●	●	●	●	●
13- L1554S	AAV13	●	●	●	●	●	●
14- L1554S	AAV14	●	●	●	●	●	●

【図 29 - 3】

【図 29C】

ベクター	Neuro マウス初代 2A ニューロン	ETIP SCニム	CS7BL/6Jマウス (ICV)	NHP AD 脳 (DNA)	NHP AD 脳 (RNA)	NHP PSP 脳 (DNA)	NHP PSP 脳 (RNA)
1- L1554S	AAV1	●	●	●	●	●	●
2- YSR6V0	AAV2	●	●	●	●	●	●
3- L1554S	AAV3	●	●	●	●	●	●
4- L1554S	AAV4	●	●	●	●	●	●
5- L1554S	AAV5	●	●	●	●	●	●
6- L1554S	AAV6	●	●	●	●	●	●
7- L1554S	AAV7	●	●	●	●	●	●
8- L1554S	AAV8	●	●	●	●	●	●
9- L1554S	AAV9	●	●	●	●	●	●
10- L1554S	AAV10	●	●	●	●	●	●
11- L1554S	AAV11	●	●	●	●	●	●
12- L1554S	AAV12	●	●	●	●	●	●
13- L1554S	AAV13	●	●	●	●	●	●
14- L1554S	AAV14	●	●	●	●	●	●

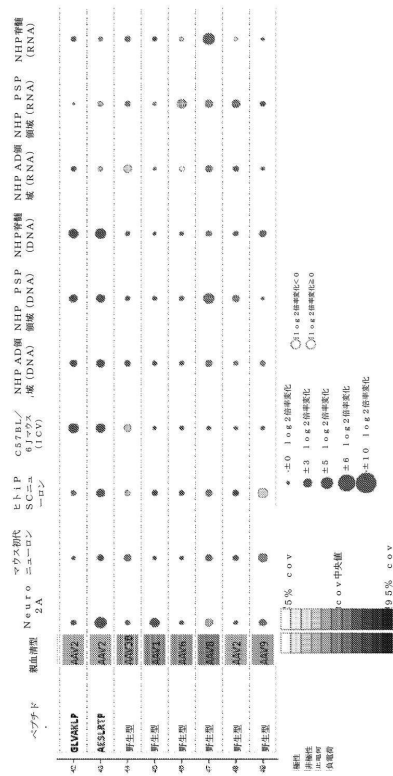
30

40

50

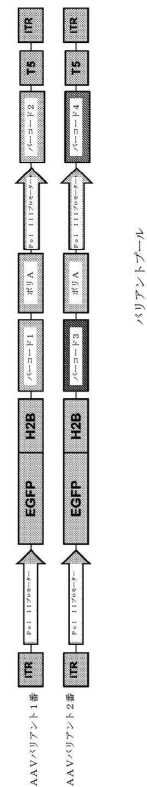
【図 29-4】

【図 29 D】



【図 30】

【図 30】

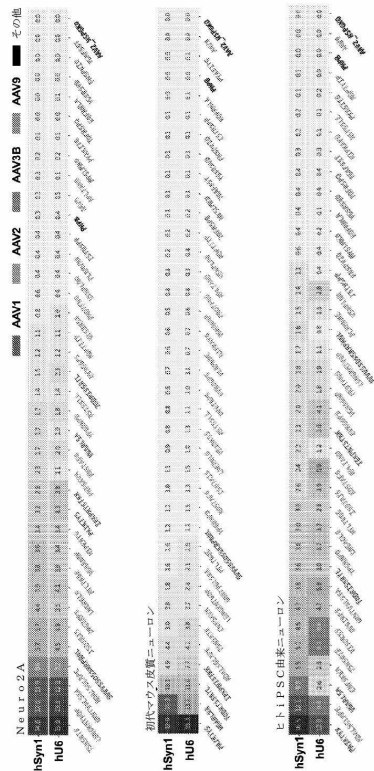


10

20

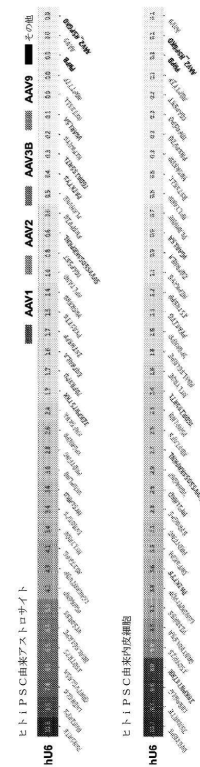
【図 3 1】

【图 3 1】



【図 3 2】

【图 3 2】



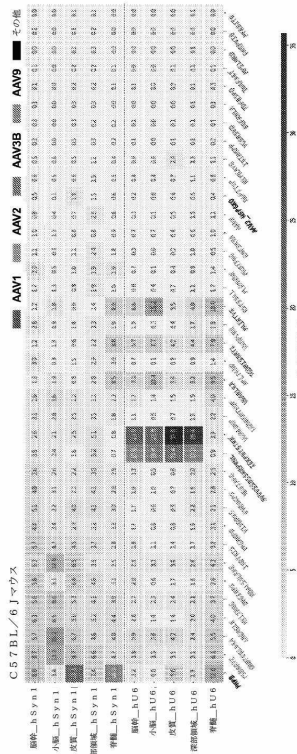
30

40

50

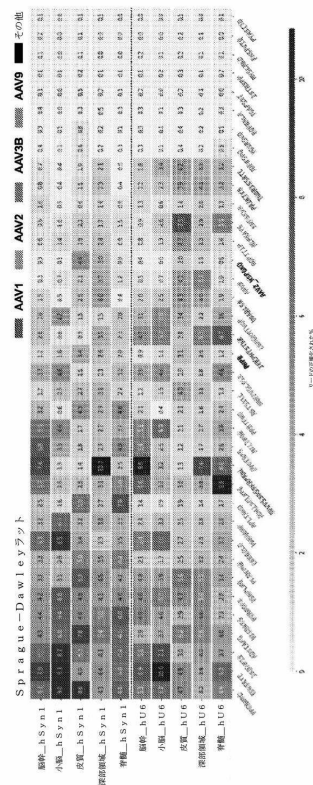
【圖 3 3】

【图 3 3】



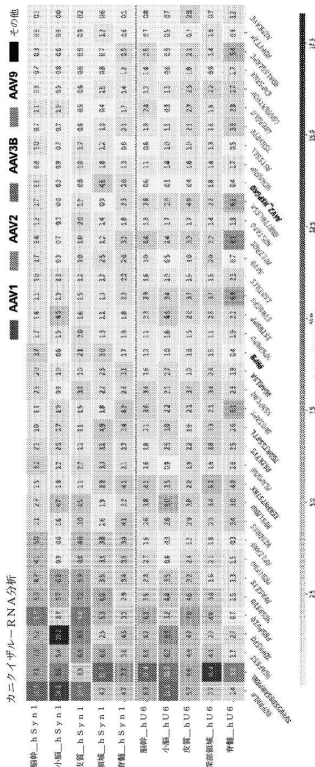
【圖 3 4】

【図 3 4】



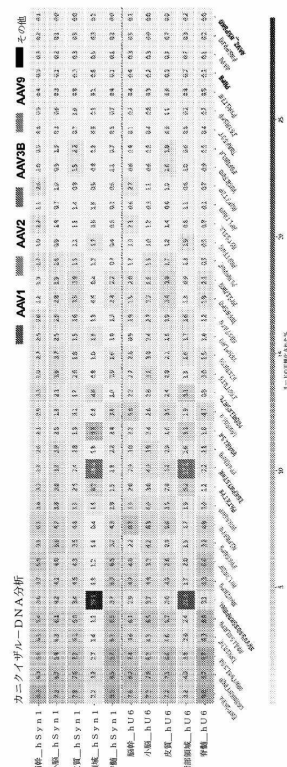
【圖 3 5】

【図 3 5】



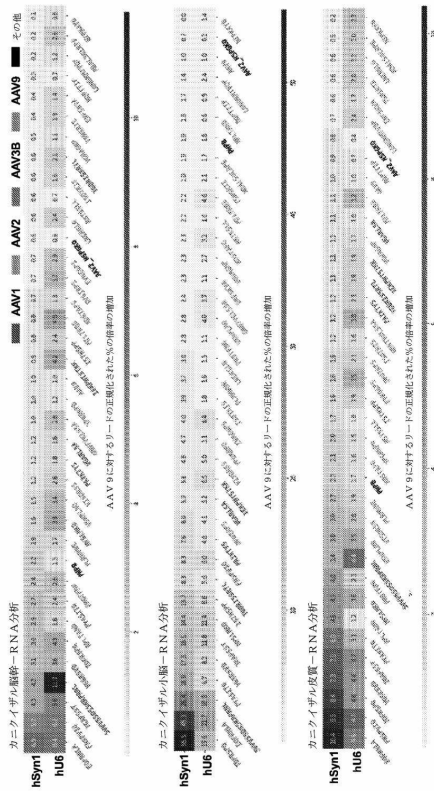
【図 36】

【図 3 6】



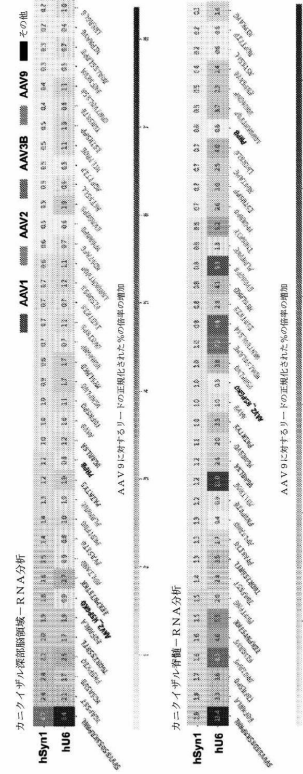
【図 37】

【図 37】



【図 38】

【図 38】

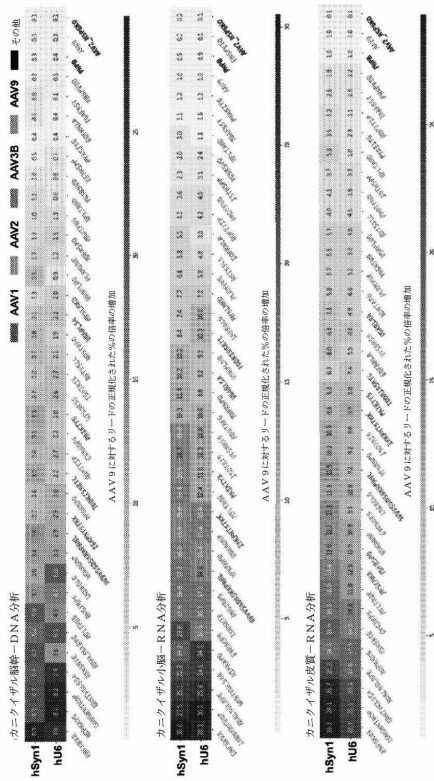


10

20

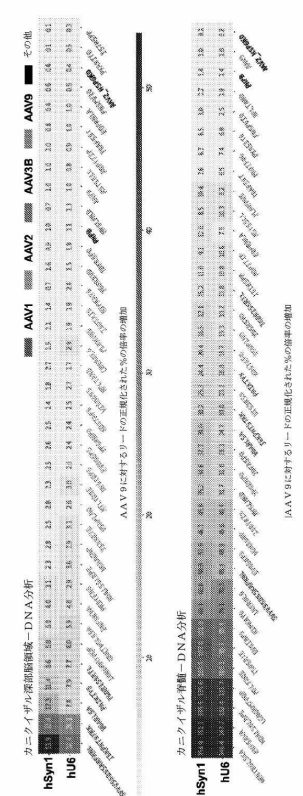
【図 39】

【図 39】



【図 40】

【図 40】



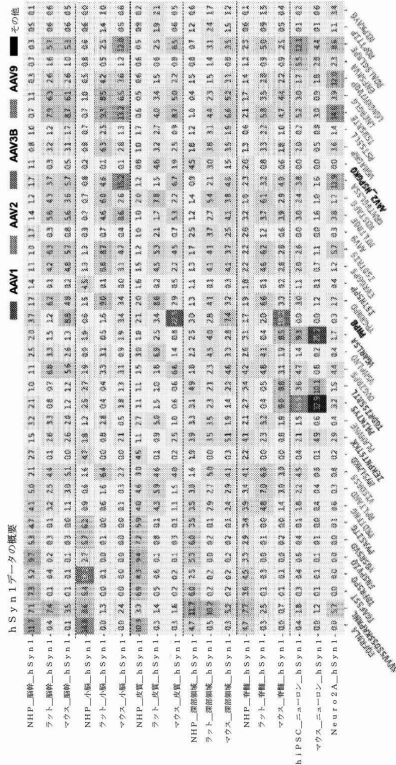
30

40

50

【図 4 1】

【図 4 1】

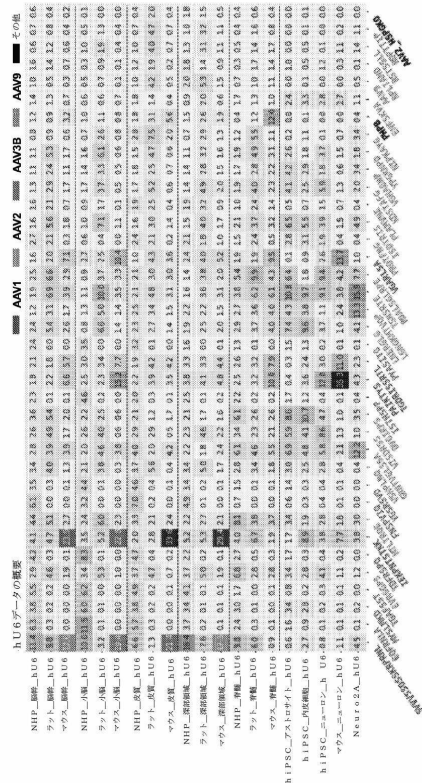


【配列表】

2022530457000001.app

【圖 4 2】

【图 4 2】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/029964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/005 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JAKOB K?RBEIN ET AL: "Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 24, no. 6, 1 June 2016 (2016-06-01), pages 1050-1061, XP055384559, US	1-236, 300-367
Y	ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2016.62 abstract page 1051, left-hand column, line 25 - line 27 page 1051, right-hand column, line 46 - line 48 Vector production and quantification; page 1059 Preparation of the random AAV display -/--	1-236, 300-367
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2020		Date of mailing of the international search report 03/11/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mundel, Christophe

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/029964

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

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

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

10

20

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-236, 300-367(all partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/029964

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	peptide library; page 1059 ----- MICHAEL E. NANCE ET AL: "Perspective on Adeno-Associated Virus Capsid Modification for Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy", HUMAN GENE THERAPY, vol. 26, no. 12, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 786-800, XP055579733, GB	1-236, 300-367
Y	ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2015.107 abstract Engineering to enhance AAV uptake in muscle; page 788 - page 789 page 789, left-hand column, line 12 - line 18 page 789, left-hand column, line 44 - line 49	1-236, 300-367
X	----- HILDEGARD BÜNING ET AL: "Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 12, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 248-265, XP055593479, GB	1-236, 300-367
Y	ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2019.01.008 abstract AAV Peptide Display: High-Throughput Selection Screen to Identify Targeting Ligands; page 256 - page 257 page 256, right-hand column, line 2 - line 4 page 256, right-hand column, line 49 - line 52 ----- -/--	1-236, 300-367

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/029964

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Marina Bechtle ET AL: "AAV CAPSIDS & TRAFFICKING 394. Rational AAV Capsid Engineering Via Peptide Insertion Reveals Critical Roles of the Underlying Vector Serotype 395. Quantitatively Dissecting Viral Trafficking Kinetics at Single Particle Level", Molecular Therapy Volume Copyright The American Society of Gene & Cell Therapy, 31 May 2011 (2011-05-31), XP055718273, Retrieved from the Internet: URL:https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/pdf/S1525-0016(16)36966-0.pdf [retrieved on 2020-07-27]	1-236, 300-367
Y	the whole document	1-236, 300-367
X	----- STEFAN MICHELFELDER ET AL: "Peptide Ligands Incorporated into the Threefold Spike Capsid Domain to Re-Direct Gene Transduction of AAV8 and AAV9 In Vivo", PLOS ONE, vol. 6, no. 8, 5 August 2011 (2011-08-05), pages 1-11, XP055147101, US ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0023101	1-236, 300-367
Y	abstract figure 1 page 1, right-hand column, line 16 - page 2, left-hand column, line 24 Cell culture, vector production and titering; page 2	1-236, 300-367
X	----- WO 2018/189244 A1 (UNIV HEIDELBERG RUPRECHT KARLS [DE]) 18 October 2018 (2018-10-18)	1-236, 300-367
Y	abstract page 1, line 6 - line 10 page 4, line 1 - line 6 page 6, line 26 - page 7, line 12 page 30, line 1 ----- -/--	1-236, 300-367

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2020/029964

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DAMIEN MARSIC ET AL: "High-accuracy biodistribution analysis of adeno-associated virus variants by double barcode sequencing", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 2, 1 January 2015 (2015-01-01), page 15041, XP055718280, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1038/mtm.2015.41 abstract	1,2,6, 8-11, 16-27, 40,41, 68-73, 77,78, 82-92, 96-99, 130-136, 140-149, 154-157, 187-191, 211, 214-224, 234,235
Y	ANNE-KATHRIN HERRMANN ET AL: "A Robust and All-Inclusive Pipeline for Shuffling of Adeno-Associated Viruses", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 8, no. 1, 4 December 2018 (2018-12-04), pages 194-206, XP055718285, Washington, DC, USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.8b00373 abstract DNA Barcoding as a Novel Means to Track Cocktails of AAV Capsid Libraries; page 200 - page 201 page 200, right-hand column, line 35 - line 38 ----- -/--	1,2,6, 8-11, 16-27, 40,41, 68-73, 77,78, 82-92, 96-99, 130-136, 140-149, 154-157, 187-191, 211, 214-224, 234,235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2020/029964

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KEI ADACHI ET AL: "Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 5, no. 1, 17 January 2014 (2014-01-17), XP055548821, DOI: 10.1038/ncomms4075 abstract page 2, left-hand column, line 32 - line 45 -----	1,2,6, 8-11, 16-27, 40,41, 68-73, 77,78, 82-92, 96-99, 130-136, 140-149, 154-157, 187-191, 211, 214-224, 234,235
Y	MARCUS DAVIDSSON ET AL: "A novel process of viral vector barcoding and library preparation enables high-diversity library generation and recombination-free paired-end sequencing", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 22 November 2016 (2016-11-22), XP055478168, DOI: 10.1038/srep37563 abstract -----	1,2,6, 8-11, 16-27, 40,41, 68-73, 77,78, 82-92, 96-99, 130-136, 140-149, 154-157, 187-191, 211, 214-224, 234,235
Y	WO 2013/107778 A1 (UNILEVER PLC [GB]; UNILEVER NV [NL] ET AL.) 25 July 2013 (2013-07-25) paragraph [0006] paragraph [0092] paragraph [0093] - paragraph [0094] paragraph [0097] - paragraph [0098] figure 1 -----	1,2,6, 8-11, 16-27, 40,41, 68-73, 77,78, 82-92, 96-99, 130-136, 140-149, 154-157, 187-191, 211, 214-224, 234,235

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 5 of 5

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/029964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018189244 A1	18-10-2018	EP 3609542 A1	19-02-2020
		WO 2018189244 A1	18-10-2018

WO 2013107778 A1	25-07-2013	AR 089742 A1	17-09-2014
		BR 112014017322 A2	13-06-2017
		CN 104053477 A	17-09-2014
		EA 201491375 A1	30-10-2014
		EP 2804671 A1	26-11-2014
		JP 6185933 B2	23-08-2017
		JP 2015507639 A	12-03-2015
		MX 360325 B	30-10-2018
		PH 12014501548 A1	08-10-2014
		US 2014378362 A1	25-12-2014
		WO 2013107778 A1	25-07-2013
		ZA 201405161 B	23-12-2015

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 029964

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-236, 300-367(all partially)

A method of identifying an AAV capsid variant with a desired characteristic compared to a natural AAV serotype comprising contacting a cell with a library of AAV variants wherein each variant comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid or an AAV variant capsid comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the capsid and one or more silent mutations in the nucleic acid sequence flanking the peptide insertion site in the AAV variant capsid. A method of identifying an AAV capsid variant with desired characteristics comprising generating the library of AAV variant capsid. A library of AAV variants wherein each member of the library comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and one or more silent mutations in the nucleic acid sequence flanking the peptide insertion site in the AAV variant capsid protein. An AAV variant comprising a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and one or more silent mutations in the nucleic acid sequence flanking the peptide insertion site in the AAV variant capsid protein. A nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and comprising one or more silent mutations in the nucleotide sequence flanking the peptide insertion site in the hypervariable and/or surface-exposed loop. Use of the AAV variant to deliver a transgene to a target cell or tissue.

2. claims: 1-236, 300-367(all partially)

A method of identifying an AAV capsid variant with a desired characteristic compared to a natural AAV serotype comprising contacting a cell with a library of AAV variants wherein each variant comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid or an AAV variant capsid comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the capsid and a nucleic acid encoding a localization signal. A method of identifying an AAV capsid variant with desired characteristics comprising generating the library of AAV variant capsid. A library of AAV variants wherein each member of the library comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 029964

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

nucleic acid encoding a localization signal. An AAV variant comprising a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a nucleic acid encoding a localization signal. A nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and comprising a nucleic acid encoding a localization signal. Use of the AAV variant to deliver a transgene to a target cell or tissue.

3. claims: 1-236, 300-367(all partially)

A method of identifying an AAV capsid variant with a desired characteristic compared to a natural AAV serotype comprising contacting a cell with a library of AAV variants wherein each variant comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid or an AAV variant capsid comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the capsid and a nucleic acid encoding a barcode. A method of identifying an AAV capsid variant with desired characteristics comprising generating the library of AAV variant capsid. A library of AAV variants wherein each member of the library comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a nucleic acid encoding a barcode. An AAV variant comprising a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a nucleic acid encoding a barcode. A nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and comprising a nucleic acid encoding a barcode. Use of the AAV variant to deliver a transgene to a target cell or tissue.

4. claims: 1-236, 300-367(all partially)

A method of identifying an AAV capsid variant with a desired characteristic compared to a natural AAV serotype comprising contacting a cell with a library of AAV variants wherein each variant comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid or an AAV variant capsid comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the capsid and a nucleic acid encoding a reporter protein. A method of identifying an AAV capsid variant with desired characteristics comprising generating the library of AAV variant capsid. A library of AAV variants wherein each

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ US2020/ 029964

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

member of the library comprises a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a nucleic acid encoding a reporter protein. An AAV variant comprising a nucleic acid encoding an AAV variant capsid protein or an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and a nucleic acid encoding a reporter protein. A nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding an AAV variant capsid protein comprising a peptide inserted into a hypervariable and/or surface-exposed loop of the variant capsid protein and comprising a nucleic acid encoding a reporter protein. Use of the AAV variant to deliver a transgene to a target cell or tissue.

5. claims: 237-299, 368-400(completely); 301-367, 402-435(partially)

An AAV vector comprising a nucleic acid molecule encoding a peptide that comprises at least 4 contiguous amino acids of SEQ ID NO: 1-32 or 68-110. A pharmaceutical composition comprising the AAV vector. A peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1-32 and 68-110. A capsid protein comprising at least 4 contiguous amino acid of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1-32 and 68-110. A nucleic acid encoding the capsid protein. A method of delivering a nucleic acid to a target cell comprising administering a composition comprising such an AAV vector

6. claims: 401(completely); 402-435(partially)

A capsid protein comprising an inserted peptide wherein the inserted peptide is inserted at amino acid (i) position 590 of an AAV1 capsid protein, (ii) positions 454 or 590 of an AAV6 capsid protein, (iii) position 588 of an AAV2 capsid protein, (iv) position 589 of an AAV3B capsid protein, (v) position 578 of an AAV5 capsid protein, (vi) position 591 of an AAV8 capsid protein or (vii) positions 266, 455 or 589 of an AAV9 capsid protein. A nucleic acid encoding such a capsid protein.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	

(32)優先日 平成31年4月26日(2019.4.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マクガヴァン, カイル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 4, リッチモンド, カナル ブールバード 5 0 1,
スイート エー 1 0 0, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付(72)発明者 オジャラ, デイビッド エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 8 0 4, リッチモンド, カナル ブールバード 5 0 1,
スイート エー 1 0 0, サンガモ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ10 QR72 QR77 QS36 QX01
4B065 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 EA20 FA74