

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6836999号  
(P6836999)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021. 3. 3)

(24) 登録日 令和3年2月10日(2021. 2. 10)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/864 (2006. 01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 7/01 (2006. 01)

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 30 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-547442 (P2017-547442)  
 (86) (22) 出願日 平成28年3月23日(2016. 3. 23)  
 (65) 公表番号 特表2018-514190 (P2018-514190A)  
 (43) 公表日 平成30年6月7日(2018. 6. 7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/023822  
 (87) 国際公開番号 W02016/154344  
 (87) 国際公開日 平成28年9月29日(2016. 9. 29)  
 審査請求日 平成31年3月20日(2019. 3. 20)  
 (31) 優先権主張番号 62/137, 580  
 (32) 優先日 平成27年3月24日(2015. 3. 24)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 The Regents of the  
 University of Calif  
 ornia  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94  
 607-5200, オークランド, フラン  
 クリン ストリート 1111, 12番  
 フロア  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アデノ随伴ウイルス変異体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号 16 に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位及び723位のアミノ酸が、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；またはそれぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、変異型AAVキャプシドタンパク質；ならびに

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ウイルス粒子。

【請求項 2】

前記変異型AAVキャプシドタンパク質が、標的細胞への高い感染性を付与する、請求項1に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項 3】

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、請求項2に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項 4】

野生型AAV血清型キャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子の標的細胞感染性

に比べて少なくとも5倍高い標的細胞感染性を示す、請求項2及び3のいずれか一項に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項5】

前記変異型AAVキャプシドタンパク質が、感染性に関して、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質が付与する標的細胞受容体依存性に比べて変化した標的細胞受容体依存性を付与する、請求項1～4のいずれか一項に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項6】

感染性に関して、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子に比べて低いシアル酸またはヘパリン硫酸プロテオグリカン依存性を有する、請求項5に記載のrAAVウイルス粒子。

10

【請求項7】

前記遺伝子産物がポリペプチドである、請求項1～6のいずれか一項に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項8】

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、請求項7に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項9】

前記分泌ポリペプチドが、リポタンパク質リパーゼ、第IX因子、 $\alpha_1$ アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド1、インスリン様増殖因子1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、グルコシダーゼ、及びN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼからなる群から選択される、請求項8に記載のrAAVウイルス粒子。

20

【請求項10】

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテインN、タンパク質-O-マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、LARGE、O結合型マンノース1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、請求項7に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項11】

前記遺伝子産物がゲノム編集遺伝子産物である、請求項1～6のいずれか一項に記載のrAAVウイルス粒子。

30

【請求項12】

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、及びCas9ノガイドRNAシステムまたはその成分からなる群から選択される、請求項11に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項13】

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、請求項1～6のいずれか一項に記載のrAAVウイルス粒子。

【請求項14】

前記核酸遺伝子産物が、干渉RNA、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、請求項13に記載のrAAVウイルス粒子。

40

【請求項15】

a) 請求項1～13のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ウイルス粒子；及び

b) 薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含む、医薬組成物。

【請求項16】

個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法に用いるための医薬組成物であって、  
a) 請求項1～13のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ウイルス粒子；及び

50

b) 薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含み、  
個体に投与される、  
医薬組成物。

【請求項 17】

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記遺伝子産物がポリペプチドである、請求項 16 及び 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記分泌ポリペプチドが、リボタンパク質リパーゼ、第 I X 因子、及び  $\alpha_1$  アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド 1、インスリン様増殖因子 1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、グルコシダーゼ、及び N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼからなる群から選択される、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、LARGE、O 結合型マンノース 1, 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記遺伝子産物が、ゲノム編集遺伝子産物である、請求項 16 及び 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、及び Cas9 / ガイド RNA システムまたはその成分からなる群から選択される、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、請求項 16 及び 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記核酸遺伝子産物が、干渉 RNA、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

変異型 AAV キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、前記変異型 AAV キャプシドタンパク質が、配列番号 16 に記載の配列に対して少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264 位、448 位、459 位、470 位、495 位、533 位、547 位、555 位、557 位、561 位、563 位、593 位、596 位、661 位、662 位、664 位、718 位及び 723 位のアミノ酸が、それぞれ A、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N 及び S であるか；それぞれ Q、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S 及び S であるか；または、それぞれ A、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S 及び T である、単離された核酸。

【請求項 27】

前記変異型キャプシドタンパク質が、AAV ウイルス粒子中に存在する場合、野生型 AAV キャプシドタンパク質を含む AAV ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べて高い AAV ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性を提供する、請求項 26

10

20

30

40

50

に記載の単離された核酸。

【請求項 28】

請求項 26 及び 27 のいずれか一項に記載の核酸を含む、単離された遺伝子改変宿主細胞。

【請求項 29】

配列番号 16 に記載の配列に対して少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264 位、448 位、459 位、470 位、495 位、533 位、547 位、555 位、557 位、561 位、563 位、593 位、596 位、661 位、662 位、664 位、718 位及び 723 位のアミノ酸が、それぞれ A、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N 及び S であるか；それぞれ Q、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S 及び S であるか；またはそれぞれ A、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S 及び T である、変異型 AAV キャプシドタンパク質。

【請求項 30】

野生型 AAV キャプシドタンパク質を含む AAV ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べてそれぞれ高い筋細胞またはグリア細胞感染性を付与する、請求項 29 に記載の変異型 AAV キャプシドタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2015 年 3 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 137, 580 号の恩典を主張し、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦支援研究に関する声明

本発明は、国立衛生研究所から拠出された助成金番号 H G 0 0 4 4 8 3 及び E Y 0 2 2 9 7 5 の下での政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

諸言

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科及びディペンドウイルス属に属し、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスとの同時感染により複製する。AAV は、ヘルパーの非存在下で潜伏感染を確立することができる。ウイルス粒子は、2 つのオープンリーディングフレーム：rep 及び cap を有する 4.9 kb の一本鎖 DNA ゲノムを包み込む 25 nm の正 20 面体のキャプシドからなる。非構造遺伝子 rep は、ウイルス複製に必須の 4 つの調節タンパク質をコードし、一方、cap は、複合化して 60 mer のキャプシドシェルとなる 3 つの構造タンパク質 (VP1 ~ 3) をコードする。このウイルスキャプシドは、細胞表面受容体への結合、エンドサイトーシス、細胞内輸送、及び核内でのアンパッキングを含む、ウイルス形質導入における生物学的な障壁の多くを克服する AAV ベクターの能力を媒介する。

【発明の概要】

【0004】

概要

本開示は、変異型 AAV キャプシドタンパク質、例えば祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する AAV キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ウイルス粒子を提供する。本開示の rAAV ウイルス粒子は、標的細胞へのより高い感染性を示すことができる。本開示はまた、本開示の rAAV を個体に投与することによる、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法を提供する。本開示はまた、祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する変異型 AAV キャプシドタンパク質を有する rAAV ウイルス粒子の生成方法を提供する。

## 【 0 0 0 5 】

本開示の態様は、以下を含有する r A A V ウイルス粒子を包含する： a ) 配列番号 1 6 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、2 6 4 位、4 4 8 位、4 5 9 位、4 7 0 位、4 9 5 位、5 3 3 位、5 4 7 位、5 5 5 位、5 5 7 位、5 6 1 位、5 6 3 位、5 9 3 位、5 9 6 位、6 6 1 位、6 6 2 位、6 6 4 位、7 1 8 位及び 7 2 3 位のアミノ酸が、それぞれ A、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N 及び S であるか；それぞれ Q、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S、及び S であるか；または、それぞれ A、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S、及び T である、変異型 A A V キャプシドタンパク質；ならびに b ) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含有する異種核酸。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 3 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 4 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 5 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

## 【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、r A A V ウイルス粒子中に存在する場合、高い標的細胞感染性を r A A V ウイルス粒子に付与する。いくつかの場合には、標的細胞は筋細胞またはグリア細胞である。特定の実施形態では、r A A V ウイルス粒子は、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子の標的細胞感染性に比べて少なくとも 5 倍高い標的細胞感染性を示す。

20

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質が付与する標的細胞受容体依存性に比べて変化した標的細胞受容体依存性を付与する。いくつかの実施形態では、r A A V ウイルス粒子は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子に比べて低いシアル酸またはヘパリン硫酸プロテオグリカン依存性を有する。

## 【 0 0 0 8 】

本明細書で論じる任意の実施形態において、遺伝子産物はポリペプチド、例えば分泌ポリペプチドであってもよい。任意の実施形態において、ポリペプチドは、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ様 1 A ( L A R G E 1 としても知られる )、O 結合型マンノース 1 , 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、またはイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質であってもよい。本明細書で論じる任意の実施形態において、分泌ポリペプチドは、リボタンパク質リパーゼ、第 I X 因子、 $\alpha_1$  アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド 1、インスリン様成長因子 1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、グルコシダーゼ、及び N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼであってもよい。

30

40

## 【 0 0 0 9 】

任意の実施形態において、遺伝子産物は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N )、及び C a s 9 / ガイド R N A ( g R N A ) システムまたはその成分を含むゲノム編集遺伝子産物であってもよい。

## 【 0 0 1 0 】

任意の実施形態において、遺伝子産物は、干渉 R N A、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーを含む核酸遺伝子産物であってもよい。

## 【 0 0 1 1 】

本明細書では、a ) 上記または下記に示す任意の実施形態による r A A V ウイルス粒子、及び薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含有する医薬組成物も

50

提供する。

【 0 0 1 2 】

本明細書では、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法も提供し、前記方法は、上記または下記に示す任意の実施形態による r A A V ウイルス粒子を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、標的細胞は、筋細胞またはグリア細胞である。

【 0 0 1 3 】

本開示の他の態様は、変異型 A A V キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する単離された核酸を包含し、前記変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 6 に示す配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、2 6 4 位、4 4 8 位、4 5 9 位、4 7 0 位、4 9 5 位、5 3 3 位、5 4 7 位、5 5 5 位、5 5 7 位、5 6 1 位、5 6 3 位、5 9 3 位、5 9 6 位、6 6 1 位、6 6 2 位、6 6 4 位、7 1 8 位及び 7 2 3 位のアミノ酸が、それぞれ A、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N 及び S であるか；それぞれ Q、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S 及び S であるか；または、それぞれ A、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S 及び T である。いくつかの実施形態では、変異型キャプシドタンパク質は、A A V ウイルス粒子中に存在する場合、野生型 A A V キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べてそれぞれ高い A A V ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性を付与する。

【 0 0 1 4 】

本明細書では、上記または下記のいずれかの実施形態の核酸を含有する、単離された遺伝子改変宿主細胞も提供する。

【 0 0 1 5 】

本明細書ではまた、配列番号 1 6 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、2 6 4 位、4 4 8 位、4 5 9 位、4 7 0 位、4 9 5 位、5 3 3 位、5 4 7 位、5 5 5 位、5 5 7 位、5 6 1 位、5 6 3 位、5 9 3 位、5 9 6 位、6 6 1 位、6 6 2 位、6 6 4 位、7 1 8 位及び 7 2 3 位のアミノ酸が、それぞれ A、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N 及び S であるか；それぞれ Q、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S 及び S であるか；または、それぞれ A、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S 及び T である、変異型 A A V キャプシドタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、変異型キャプシドタンパク質は、野生型 A A V キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べてそれぞれ高い筋細胞またはグリア細胞感染性を付与する。

【 0 0 1 6 】

本開示は、r A A V ウイルス粒子の初期ライブラリを標的細胞における第 1 選択ラウンドに供することを含む、変異型 A A V キャプシドタンパク質を有する r A A V ウイルス粒子の作製方法も含み、ここで、初期ライブラリ中の r A A V ウイルス粒子は、それぞれ A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列を有する初期 A A V キャプシドタンパク質を含有し、前記 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列は、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列の 1 つまたは複数の可変残基が互いに異なる祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列を含有し、それにより、変異型 A A V キャプシドタンパク質を有する r A A V ウイルス粒子の第 2 のライブラリを作製する。いくつかの実施形態では、方法は、i) 複数の野生型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列の系統樹を再構築すること、ii) 系統樹のノードを選択すること、及び iii) そのノードにおいて最も有望なアミノ酸配列を決定することによって、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、系統樹の各ノードにおける信頼値を推定することをさらに含む、かつ選択する段階は、ノードにおける推定された信頼値に基づいて系統樹のノードを選択することを含む。いくつかの場合には、初期 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 7 に記載の配列と少なくとも 9 4 % 同一のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を有する。

【0017】

任意の実施形態において、本方法は、r A A Vウイルス粒子の第2のライブラリを第2選択ラウンドに供することを含み得る。いくつかの実施形態では、第2選択ラウンドは、第1選択ラウンドで使用した標的細胞と同じ標的細胞型で実施する。いくつかの実施形態では、第2選択ラウンドは、第1選択ラウンドに比べて厳密性が高い。

【0018】

任意の実施形態において、標的細胞は、筋細胞、上皮細胞、皮膚細胞、またはグリア細胞であってもよい。いくつかの場合には、標的細胞はヒト胎児由来腎臓細胞である。

【0019】

いくつかの実施形態では、前記供する段階は、a) 標的細胞にr A A Vウイルス粒子のライブラリを感染させること、感染細胞にヘルパーウイルスを重感染させること、及び重感染細胞から放出されたr A A Vウイルス粒子を回収することを含む。

【0020】

任意の実施形態において、本方法は、変異型A A Vキャプシドタンパク質を含有するr A A Vウイルス粒子を単離することを含んでもよく、ここで、単離されたr A A Vウイルス粒子は、野生型A A V血清型キャプシドタンパク質を含有するA A Vウイルス粒子に比べて高い感染性、増強された指向性、またはその両方を有する。

【0021】

本発明のr A A Vウイルス粒子またはr A A Vウイルス粒子のライブラリを含み、本方法の実施において使用するキットも、本明細書において提供する。

[本発明1001]

a) 配列番号16に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位及び723位のアミノ酸が、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；またはそれぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、変異型A A Vキャプシドタンパク質；ならびに

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ウイルス粒子。

[本発明1002]

a) 配列番号13に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型A A Vキャプシドタンパク質；及び

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ウイルス粒子。

[本発明1003]

a) 配列番号14に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型A A Vキャプシドタンパク質；及び

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ウイルス粒子。

[本発明1004]

a) 配列番号15に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型A A Vキャプシドタンパク質；及び

b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)ウイルス粒子。

[本発明1005]

前記変異型A A Vキャプシドタンパク質が、標的細胞への高い感染性を付与する、本発明1001～1004のいずれかのr A A Vウイルス粒子。

[本発明1006]

10

20

30

40

50

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、本発明1005のr A A V ウイルス粒子。

[本発明1007]

野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子の標的細胞感染性に比べて少なくとも5倍高い標的細胞感染性を示す、本発明1005及び1006のいずれかの r A A V ウイルス粒子。

[本発明1008]

前記変異型 A A V キャプシドタンパク質が、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質が付与する標的細胞受容体依存性に比べて変化した標的細胞受容体依存性を付与する、本発明1001～1007のいずれかの r A A V ウイルス粒子。

[本発明1009]

感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子に比べて低いシアル酸またはヘパリン硫酸プロテオグリカン依存性を有する、本発明1008の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1010]

前記遺伝子産物がポリペプチドである、本発明1001～1009のいずれかの r A A V ウイルス粒子。

[本発明1011]

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、本発明1010の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1012]

前記分泌ポリペプチドが、リボタンパク質リパーゼ、第 I X 因子、<sub>1</sub>アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド1、インスリン様増殖因子1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、グルコシダーゼ、及び N - アセチルガラクトサミン4 - スルファターゼからなる群から選択される、本発明1011の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1013]

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、L A R G E、O 結合型マンノース 1, 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、本発明1010の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1014]

前記遺伝子産物がゲノム編集遺伝子産物である、本発明1001～1009のいずれかの r A A V ウイルス粒子。

[本発明1015]

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N )、及び C a s 9 / ガイド R N A システムまたはその成分からなる群から選択される、本発明1014の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1016]

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、本発明1001～1009のいずれかの r A A V ウイルス粒子。

[本発明1017]

前記核酸遺伝子産物が、干渉 R N A、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、本発明1016の r A A V ウイルス粒子。

[本発明1018]

a ) 本発明1001～1016のいずれかの組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ウイルス粒子 ; 及び

b ) 薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含む、医薬組成物。

[本発明1019]

本発明1001～1017のいずれかの組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ウイルス粒子を

10

20

30

40

50



個体に投与することを含む、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法。

[本発明1020]

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記遺伝子産物がポリペプチドである、本発明1019及び1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記分泌ポリペプチドが、リポタンパク質リパーゼ、第ⅠX因子、及び<sub>1</sub>アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド1、インスリン様増殖因子1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、グルコシダーゼ、及びN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼからなる群から選択される、本発明1022の方法。

10

[本発明1024]

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテインN、タンパク質-O-マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、LARGE、O結合型マンノース1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、本発明1021の方法。

[本発明1025]

前記遺伝子産物が、ゲノム編集遺伝子産物である、本発明1019及び1020のいずれかの方法。

20

[本発明1026]

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、及びCas9/ガイドRNAシステムまたはその成分からなる群から選択される、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、本発明1019及び1020のいずれかの方法。

[本発明1028]

前記核酸遺伝子産物が、干渉RNA、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、本発明1027の方法。

30

[本発明1029]

変異型AAVキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、前記変異型AAVキャプシドタンパク質が、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位及び723位のアミノ酸が、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；または、それぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、単離された核酸。

40

[本発明1030]

前記変異型キャプシドタンパク質が、AAVウイルス粒子中に存在する場合、野生型AAVキャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べて高いAAVウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性を提供する、本発明1029の単離された核酸。

[本発明1031]

本発明1029及び1030のいずれかの核酸を含む、単離された遺伝子改変宿主細胞。

[本発明1032]

配列番号16に記載の配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561

50

位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位及び723位のアミノ酸が、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；またはそれぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、変異型AAVキャプシドタンパク質。

[本発明1033]

野生型AAVキャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べてそれぞれ高い筋細胞またはグリア細胞感染性を付与する、本発明1032の変異型AAVキャプシドタンパク質。

[本発明1034]

r AAVウイルス粒子の初期ライブラリを標的細胞における第1選択ラウンドに供することであって、前記初期ライブラリ中の前記r AAVウイルス粒子は、それぞれ、AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を有する初期AAVキャプシドタンパク質を含み、かつ前記AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列は、祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列の1つまたは複数の可変残基が互いに異なる祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を含み、それにより、変異型AAVキャプシドタンパク質を有するr AAVウイルス粒子の第2のライブラリを生成する、前記供することを含む、変異型AAVキャプシドタンパク質を有するr AAVウイルス粒子の生成方法。

[本発明1035]

i) 複数の野生型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列の系統樹を再構築すること

；

i i) 前記系統樹のノードを選択すること；及び

i i i) 前記ノードにおいて最も有望なアミノ酸配列を決定すること

によって、前記祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を決定することを含む、本発明1033の方法。

[本発明1036]

前記方法が、前記系統樹の各ノードにおける信頼値を推定することをさらに含み、かつ前記選択する段階が、前記ノードにおける推定された信頼値に基づいて前記系統樹のノードを選択することを含む、本発明1034の方法。

[本発明1037]

前記初期AAVキャプシドタンパク質が、配列番号7に記載の配列と少なくとも94%同一のアミノ酸配列を有する、本発明1034～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

r AAVウイルス粒子の前記第2のライブラリを第2選択ラウンドに供することを含む、本発明1034～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

前記第2選択ラウンドが、前記第1選択ラウンドで使用した前記標的細胞と同じ標的細胞型で実施される、本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記第2選択ラウンドが、前記第1選択ラウンドに比べて高い厳密性を有する、本発明1038及び1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

前記標的細胞が、筋細胞、上皮細胞、皮膚細胞、グリア細胞、及びヒト胎児由来腎臓細胞からなる群から選択される、本発明1034～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

前記供する段階が、

a) 標的細胞に前記r AAVウイルス粒子のライブラリを感染させること；

b) 感染した細胞にヘルパーウイルスを重感染させること；及び

c) 重感染した細胞から放出されたr AAVウイルス粒子を回収すること

を含む、本発明1034～1041のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

## [本発明1043]

前記方法が、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含む r A A V ウイルス粒子を単離することを含み、単離された r A A V ウイルス粒子が、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子に比べて、高い感染性、増強された指向性、またはその両方を有する、本発明1034～1042のいずれかの方法。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

【図1】祖先型アデノ随伴ウイルス ( A A V ) 配列の再構成を示す画像である。パネル B : h u . 3 1 及び h u . 3 2 - 配列番号 1 ; c y . 6 及び r h . 1 3 - 配列番号 2 ; r h . 2 、 r h . 5 0 、 h u . 6 7 、 r h . 1 0 、 及び r h . 5 5 - 配列番号 3 ; r h . 5 1 - 配列番号 4 ; r h . 4 9 - 配列番号 5 ; c y . 4 - 配列番号 6 。パネル C : 配列番号 1 8 。

10

【図2】祖先型 A A V 配列の再構成のための完全な系統樹を示す。

【図3】本発明の一実施形態による、祖先型 A A V c a p アミノ酸配列 ( 配列番号 7 ) を示す。

【図4 - 1】祖先型 A A V c a p タンパク質と天然血清型とのアライメントを示す ( 祖先型 - 配列番号 7 ; A A V 1 - 配列番号 8 ; A A V 6 - 配列番号 9 ; A A V 7 - 配列番号 1 0 ; A A V 8 - 配列番号 1 1 ; A A V 9 - 配列番号 1 2 ) 。

【図4 - 2】祖先型 A A V c a p タンパク質と天然血清型とのアライメントを示す ( 祖先型 - 配列番号 7 ; A A V 1 - 配列番号 8 ; A A V 6 - 配列番号 9 ; A A V 7 - 配列番号 1 0 ; A A V 8 - 配列番号 1 1 ; A A V 9 - 配列番号 1 2 ) 。

20

【図4 - 3】祖先型 A A V c a p タンパク質と天然血清型とのアライメントを示す ( 祖先型 - 配列番号 7 ; A A V 1 - 配列番号 8 ; A A V 6 - 配列番号 9 ; A A V 7 - 配列番号 1 0 ; A A V 8 - 配列番号 1 1 ; A A V 9 - 配列番号 1 2 ) 。

【図5】本開示の一実施形態による、6 ラウンドの選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質中の可変位置にある優勢アミノ酸を示す。

【図6】選択後の祖先型 A A V 変異体における、相同 A A V 1 の結晶構造にマッピングした A A V c a p アミノ酸の可変残基を示す画像である。

【図7】本開示の一実施形態による、3 ラウンドの選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質中の可変位置における優勢アミノ酸を示す。

30

【図8】本開示の一実施形態による、6 ラウンドの選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質中の可変位置におけるアミノ酸頻度の変化を示す。

【図9】本開示の一実施形態による、3 ラウンドの選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質中の可変位置におけるアミノ酸頻度の変化を示す。

【図10 - 1】本開示の一実施形態による、ベイジアン・ディリクレ多項式モデル比較試験による、選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質における重要な可変残基を示す。

【図10 - 2】本開示の一実施形態による、ベイジアン・ディリクレ多項式モデル比較試験による、選択後の祖先型 A A V 変異体の A A V c a p タンパク質における重要な可変残基を示す。

40

【図11】本開示の一実施形態による、天然 A A V 血清型に対してベンチマーク評価した、進化させた祖先型ライブラリの形質導入効率を示す。

【図12 A】本開示の一実施形態による、祖先型 A A V 変異体のグリカン依存性の試験結果を示す。

【図12 B】本開示の一実施形態による、祖先型 A A V 変異体のグリカン依存性の試験結果を示す。

【図13】本開示の一実施形態による、細胞への進入に関する祖先型 A A V 変異体の糖タンパク質依存性の試験結果を示す。

【図14】ヒト静脈内免疫グロブリン ( I V I G ) による、祖先型 A A V 変異体の形質導入効率に対するインビトロ中和の結果を示す。

50

【図 1 5】本開示の一実施形態による、祖先型 A A V 変異体による腓腹筋への形質導入の評価結果を示す。

【図 1 6】祖先型 A A V 変異体のアミノ酸配列、C 4（配列番号 1 3）、C 7（配列番号 1 4）、及び G 4（配列番号 1 5）を示す。

【図 1 7】祖先型 A A V 変異体 C 4、C 7 及び G 4 のコンセンサスアミノ酸配列（上部、配列番号 1 6）、ならびに祖先型 A A V 変異体 C 4 及び C 7 のコンセンサスアミノ酸配列（下部、配列番号 1 7）を示す。

【図 1 8】選択後の祖先型 A A V 変異体の熱安定性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

10

定義

用語「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはその類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含む場合があり、非ヌクレオチド成分によって中断される場合がある。ヌクレオチド構造への修飾が存在する場合、それは、ポリマー構築の前または後に付与され得る。本明細書中で使用する場合、ポリヌクレオチドという用語は、二本鎖及び一本鎖分子を互換的に指す。特に明記のない限り、または必要のない限り、本明細書に記載する本開示の任意の実施形態のポリヌクレオチドは、二本鎖形態、及び二本鎖形態を構成することが周知または予測される二本の相補的な一本鎖形態の各々、の両方を包含し得る。

20

【0024】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、別のポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対して一定の割合の「配列同一性」を有しており、これはすなわち、アライメントを行い、その2つの配列を比較した場合に、その割合の塩基またはアミノ酸が同一であることを意味する。配列の類似性は、多くの異なる方法で決定することができる。配列同一性を決定するために、ワールドワイドウェブ [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 上で入手可能な B L A S T を含む方法及びコンピュータプログラムを用いて、配列をアライメントすることができる。他のアライメントアルゴリズムは F A S T A であり、これは O x f o r d M o l e c u l a r G r o u p , I n c の完全所有子会社である米国ウィスコンシン州マディソンの G e n e t i c s C o m p u t i n g G r o u p ( G C G ) パッケージで入手可能である。アライメントのための他の技術は、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , v o l . 2 6 6 : C o m p u t e r M e t h o d s f o r M a c r o m o l e c u l a r S e q u e n c e A n a l y s i s ( 1 9 9 6 ) , e d . D o o l i t t l e , A c a d e m i c P r e s s , I n c . , a d i v i s i o n o f H a r c o u r t B r a c e & C o . , S a n D i e g o , C a l i f o r n i a , U S A に記載されている。特に興味深いのは、配列中のギャップを許容するアライメントプログラムである。S m i t h - W a t e r m a n は、配列アライメントのギャップを許容するアルゴリズムの1種である。M e t h . M o l . B i o l . 7 0 : 1 7 3 - 1 8 7 ( 1 9 9 7 ) 参照。また、N e e d l e m a n と W u n s c h のアライメント法を用いる G A P プログラムを利用して配列をアライメントすることができる。J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 - 4 5 3 ( 1 9 7 0 ) 参照。

30

40

【0025】

S m i t h W a t e r m a n の局所相同性アルゴリズム ( A d v a n c e s i n A p p l i e d M a t h e m a t i c s 2 : 4 8 2 - 4 8 9 ( 1 9 8 1 ) ) を用いて配列同一性を決定する B e s t F i t プログラムは興味深い。ギャップ生成ペナルティは、一般的に 1 ~ 5、通常は 2 ~ 4 の範囲にあり、多くの実施形態では 3 である。ギャップ拡張ペナルティは、一般的に約 0 . 0 1 ~ 0 . 2 0 の範囲にあり、多くの場合 0 . 1 0 である。プログラムは、比較すべき入力配列によって決定するデフォルトパラメーターを有する。好ましくは、このプログラムが決定するデフォルトパラメーターを用いて配列同一性を決定する。このプログラムもまた、米国ウィスコンシン州マディソンの G e n e t

50

ics Computing Group (GCG) パッケージから入手可能である。

【0026】

興味深い別のプログラムはFastDBアルゴリズムである。FastDBは、Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127 - 149, 1988, Alan R. Liss, Incに記載されている。配列同一性の割合は、FastDBによって、以下のパラメータに基づいて計算する：

ミスマッチペナルティ：1.00；

ギャップペナルティ：1.00；

ギャップサイズペナルティ：0.33；及び

結合ペナルティ：30.0。

【0027】

「遺伝子」とは、転写、翻訳後に特定のタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指す。

【0028】

「低分子干渉RNA」または「短鎖干渉RNA」すなわちsiRNAは、関心対象の遺伝子（「標的遺伝子」）を標的とする二本鎖RNAヌクレオチドである。「二本鎖RNA」とは、RNA分子の2つの領域間において相補的対形成により形成される構造を指す。siRNAは、siRNAの二本鎖部分のヌクレオチド配列が標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるという点で、遺伝子に「標的指向」されている。いくつかの実施形態では、siRNAの二本鎖の長さは30ヌクレオチド未満である。いくつかの実施形態では、二本鎖は、鎖長29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11または10ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、二本鎖の鎖長は19～25ヌクレオチドである。siRNAのRNA二本鎖部分は、ヘアピン構造の一部であり得る。二本鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二本鎖を形成する2つの配列の間に位置するループ部分を含む場合がある。ループの鎖長はさまざまであり得る。いくつかの実施形態では、ループは、鎖長5、6、7、8、9、10、11、12または13ヌクレオチドである。ヘアピン構造は、3 突出部または5 突出部を含むこともできる。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、鎖長0、1、2、3、4または5ヌクレオチドの3 または5 オーバーハングである。

【0029】

本明細書中で使用する場合、用語「マイクロRNA」とは、内在性マイクロRNA及び人工マイクロRNA（例えば、合成miRNA）を含むが、必ずしもこれらに限定されない任意のタイプの干渉RNAを指す。内在性マイクロRNAとは、ゲノムに天然にコードされており、mRNAの生産的利用を調節することができる短鎖RNAである。人工マイクロRNAとは、内在性マイクロRNA以外の、mRNAの活性を調節可能な任意のタイプのRNA配列であり得る。マイクロRNA配列は、これらの配列の任意の1つまたは複数からなるRNA分子であり得る。マイクロRNA（または「miRNA」）配列は、例えば、Lim, et al., 2003, Genes & Development, 17, 991 - 1008, Lim, et al., 2003, Science, 299, 1540, Lee and Ambrose, 2001, Science, 294, 862, Lau, et al., 2001, Science 294, 858 - 861, Lagos-Quintana, et al., 2002, Current Biology, 12, 735 - 739, Lagos-Quintana, et al., 2001, Science, 294, 853 - 857、及びLagos-Quintana, et al., 2003, RNA, 9, 175 - 179などの刊行物に記載されている。マイクロRNAの例として、長鎖RNAの断片であるか、またはmiRNA、siRNA、stRNA、sncRNA、tnRNA、snRNA、smRNA、shRNA、snRNA、

10

20

30

40

50

もしくは他の小分子非コードRNAである任意のRNAが挙げられる。例えば、米国特許出願20050272923、20050266552、20050142581、及び20050075492参照。「マイクロRNA前駆体」(または「pre-miRNA」)とは、マイクロRNA配列が組み込まれたステムループ構造を有する核酸を指す。「成熟マイクロRNA」(または「成熟miRNA」)は、マイクロRNA前駆体(「pre-miRNA」)から切り出されたか、または合成した(例えば、実験室で無細胞合成によって合成した)、約19ヌクレオチド~約27ヌクレオチドの鎖長を有するマイクロRNAを含む。例えば、成熟マイクロRNAは、19nt、20nt、21nt、22nt、23nt、24nt、25nt、26nt、または27ntの鎖長を有することができる。成熟マイクロRNAは、標的mRNAに結合し、標的mRNAの翻訳を阻害することができる。

10

#### 【0030】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書中では同じ意味で用いられ、これらは任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。これらの用語は、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、または標識化成分との複合体化などにより修飾したアミノ酸ポリマーも包含する。哺乳類対象に遺伝子産物及びその組成物を送達する状況について考察する場合、抗血管新生ポリペプチド、神経保護ポリペプチドなどのポリペプチドは、インタクトなタンパク質の所望の生化学的機能を保持するそれぞれのインタクトなポリペプチド、またはその任意の断片もしくは遺伝子改変誘導体を指す。同様に、抗血管新生ポリペプチドをコードする核酸、神経保護ポリペプチドをコードする核酸、及び哺乳類対象への遺伝子産物の送達に使用する他のそのような核酸(レシピエント細胞に送達するための「導入遺伝子」と呼ばれることもある)を指す場合、それには、所望の生化学的機能を有するインタクトなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または任意の断片もしくは遺伝子改変誘導体が含まれる。

20

#### 【0031】

本明細書中で使用する場合、用語「治療」、「治療する」などは、所望の薬理学的及び/または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、疾患またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であってもよく、及び/または疾患及び/または疾患に起因する有害な影響に対して、部分的または完全に治癒させるという点で治療的であってもよい。本明細書中で使用する「治療」とは、哺乳類、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、以下を含む：(a)疾患にかかりやすいかまたは疾患に罹患するリスクがあるが、まだその疾患を有するとは診断されていない対象における疾患の発症を予防すること；(b)疾患を阻害、すなわちその進展を阻止すること；及び(c)疾患を緩和、すなわち疾患を退縮させること。

30

#### 【0032】

用語「個体」、「宿主」、「対象」、及び「患者」は、本明細書中では同じ意味で用いられ、ヒト及び非ヒト霊長類を含むが必ずしもこれらに限定されない哺乳類を指し、例えば、サル及びヒト；哺乳類の競技用動物(例えば、ウマ)；哺乳類の家畜(例えば、ヒツジ、ヤギなど)；哺乳類のペット(犬、猫など)；ならびにげっ歯類(例えば、マウス、ラットなど)が挙げられる。

40

#### 【0033】

「AAV」は、アデノ随伴ウイルスの略語であり、ウイルス自体またはその誘導体を指すために使用してもよい。この用語は、他に必要な場合を除いて、すべてのサブタイプならびに天然型及び組換え型の両方を包含する。略語「rAAV」は、組換えアデノ随伴ウイルスを指し、組換えAAVベクター(すなわち「rAAVベクター」)をも指す。用語「AAV」は、AAV1型(AAV-1)、AAV2型(AAV-2)、AAV3型(AAV-3)、AAV4型(AAV-4)、AAV5型(AAV-5)、AAV6型(AAV-6)、AAV7型(AAV-7)、AAV8型(AAV-8)、AAV9型(AAV-9)、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVを含む。「霊長類AAV」は、霊長類に感染するAAVを指し、

50

「非霊長類 A A V」は非霊長類哺乳動物に感染する A A V を指し、「ウシ A A V」はウシ哺乳動物に感染する A A V を指す、などである。

【 0 0 3 4 】

本明細書中で使用する「r A A V ベクター」は、A A V 起源ではないポリヌクレオチド配列（すなわち、A A V に対して異種のポリヌクレオチド）を有し、一般的には細胞の遺伝子形質転換のための目的の配列を含む A A V ベクターを指す。一般的に、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つ、通常 2 つの A A V 末端逆位繰り返し配列（I T R）に隣接している。用語 r A A V ベクターは、r A A V ベクター粒子及び r A A V ベクタープラスミドの両方を包含する。

【 0 0 3 5 】

「A A V ウイルス」または「A A V ウイルス粒子」または「r A A V ベクター粒子」または「r A A V ウイルス粒子」とは、少なくとも 1 つの A A V キャプシドタンパク質（通常は、野生型 A A V のすべてのキャプシドタンパク質）と、キャプシド形成したポリヌクレオチド r A A V ベクターとからなるウイルス粒子を指す。粒子が異種ポリヌクレオチド（すなわち、哺乳類細胞に送達するトランスジーンのような野生型 A A V ゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、それは一般的には「r A A V ベクター粒子」または単に「r A A V ウイルス粒子」と呼ぶ。したがって、そのようなベクターが r A A V ウイルス粒子内に含まれるため、r A A V ウイルス粒子の産生は必然的に r A A V ベクターの産生を含む。

【 0 0 3 6 】

「パッケージング」とは、A A V 粒子の構築及びキャプシド形成をもたらす一連の細胞内事象を指す。

【 0 0 3 7 】

A A V 「rep」及び「cap」遺伝子とは、アデノ随伴ウイルスの複製及びキャプシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。A A V rep 及び cap は、本明細書中では A A V 「パッケージング遺伝子」と呼ぶ。

【 0 0 3 8 】

A A V 用の「ヘルパーウイルス」とは、哺乳類細胞が A A V（例えば、野生型 A A V）を複製及びパッケージングす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、及びワクシニアなどのボックスウイルスを含む、そのような様々な A A V 用のヘルパーウイルスが当該分野で公知である。アデノウイルスのサブグループ C のタイプ 5 が最も一般的に使用されるが、アデノウイルスは多数の異なるサブグループを包含する。ヒト、非ヒト哺乳類及びトリ由来の多数のアデノウイルスが公知であり、寄託機関、例えば ATCC より入手可能である。ヘルペスファミリーのウイルスとして、例えば単純ヘルペスウイルス（HSV）及びエプスタイン - バーウイルス（EBV）、ならびにサイトメガロウイルス（CMV）及び仮性狂犬病ウイルス（PRV）が挙げられ；これらは ATCC のような寄託機関からも入手可能である。

【 0 0 3 9 】

「ヘルパーウイルス機能」とは、（本明細書に記載の複製及びパッケージングのための他の要件と併せて）A A V 複製及びパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにコードされた機能を指す。本明細書に記載するように、「ヘルパーウイルス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、または必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列をプロドューサー細胞にトランスに提供することを含む多くの方法で提供してもよい。

【 0 0 4 0 】

「感染性」ウイルスまたはウイルス粒子は、そのウイルス種が指向性を有する細胞に送達可能なポリヌクレオチド成分を含むものである。この用語は、ウイルスの複製能力を必ずしも意味するものではない。本明細書中で使用する場合、「感染性」ウイルスまたはウイルス粒子は、標的細胞にアクセス可能であり、標的細胞に感染可能であり、標的細胞において異種核酸を発現することができる。したがって、「感染性」は、ウイルス粒子が標的細胞にアクセスし、標的細胞に感染し、標的細胞に異種核酸を発現させる能力を指す。

10

20

30

40

50

感染性は、インビトロでの感染性またはインビボでの感染性を意味し得る。感染性ウイルス粒子数を計測するためのアッセイは、本開示及び当該技術分野の他の箇所に記載されている。ウイルス感染性は、全ウイルス粒子に対する感染性ウイルス粒子の比として表すことができる。全ウイルス粒子は、ウイルスゲノムのコピー数として表すことができる。ウイルス粒子が細胞内で異種核酸を発現する能力は、「形質導入」と呼ぶことができる。ウイルス粒子が細胞内で異種核酸を発現する能力は、例えば緑色蛍光タンパク質（GFP）アッセイ（例えば、そこではウイルスはGFPをコードするヌクレオチド配列を含む）においてウイルス粒子に感染した細胞中でGFPを産生し、これを検出及び／または測定するなどのマーカー遺伝子の評価；または、例えば酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）による産生タンパク質の測定を含む多くの技術によって分析することができる。

10

#### 【0041】

「複製可能型」ウイルス（例えば、複製可能型AAV）とは、表現型が野生型の感染性ウイルスを指し、感染細胞（すなわち、ヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス機能の存在下）で複製可能である。AAVの場合、複製能力は、通常、機能的AAVパッケージング遺伝子の存在を必要とする。一般的に、本明細書に記載のrAAVベクターは、1つまたは複数のAAVパッケージング遺伝子が欠如していることにより、哺乳類細胞（特にヒト細胞）において複製不能である。通常、そのようなrAAVベクターは、AAVパッケージング遺伝子と、進入してくるrAAVベクターとの間の組換えによって複製可能型AAVが生成する可能性を最小限に抑えるために、AAVパッケージング遺伝子配列を欠失している。多くの実施形態では、本明細書に記載のrAAVベクター調製物は、複製可能型AAV（rcAAV、RCAとも呼ばれる）をほとんど含まない（例えば、rAAV粒子 $10^2$ 個あたり約1個未満のrcAAV、rAAV粒子 $10^4$ 個あたり約1個未満のrcAAV、rAAV粒子 $10^8$ 個あたり約1個未満のrcAAV、rAAV粒子 $10^{12}$ 個あたり約1個未満のrcAAV、またはrcAAVなし）。

20

#### 【0042】

rAAVウイルス粒子の「ライブラリ」とは、構造（例えば、AAVキャプシドタンパク質の構造）及び／またはそこに含まれる核酸の配列が互いに異なる2つ以上のrAAVウイルス粒子を表す複数のrAAVウイルス粒子を含有する組成物である。

#### 【0043】

用語「指向性」とは、1つまたは複数の他の細胞型に比べて、1つの細胞型に対してより高い感染性を有するウイルス粒子を指す。指向性はまた、ウイルス粒子の組織特異性を指す場合もある。例えば、筋細胞に対する指向性を有するウイルス粒子は、非筋細胞に対する感染性に比べて、筋細胞に対して高い感染性を有する。AAVにおいては、指向性はAAVキャプシド血清型、すなわちAAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列に影響を受ける。対照的に、ウイルス粒子は、ウイルス粒子が広範囲の細胞型に対して感染性を示す場合には、無差別的であると言われる。場合によっては、ウイルス粒子は、1つまたは複数の細胞型に対して指向性を示し、無差別的でもあり得る。

30

#### 【0044】

ポリヌクレオチドに適用する「組換え」は、ポリヌクレオチドが、クローニング、制限酵素切断、またはライゲーション段階、及び天然に見出されるポリヌクレオチドとは異なる構築物をもたらす他の手順の、様々な組合せの産物であることを意味する。組換えウイルスは、組換えポリヌクレオチドを含むウイルス粒子である。これらの用語はそれぞれ、元のポリヌクレオチド構築物の複製物及び元のウイルス構築物の子孫を包含する。

40

#### 【0045】

「調節エレメント」または「調節配列」は、ポリヌクレオチドの複製、倍化、転写、スプライシング、翻訳、または分解を含む、ポリヌクレオチドの機能的調節に寄与する分子の相互作用に関与するヌクレオチド配列である。この調節は、プロセスの頻度、スピード、または特異性に影響を及ぼし、本質的に促進または阻害する場合がある。当該分野で公知の調節エレメントとして、例えば、プロモーター及びエンハンサーなどの転写調節配列が挙げられる。プロモーターは、特定の条件下でRNAポリメラーゼに結合し、通常、プ

50



ロモーターの下流（３ 方向）に位置するコード領域の転写を開始させることが可能な DNA 領域である。

【 0 0 4 6 】

「機能的に連結した」または「作動可能に連結した」とは、遺伝要素が並置されており、これらの要素が期待通りに作用可能な関係にあることを意味している。例えば、プロモーターがコード配列の転写を開始するのを支援する場合、プロモーターはコード領域に機能的に連結している。この機能的関係を維持する限りにおいて、プロモーターとコード領域の間に介在残基が存在していてもよい。

【 0 0 4 7 】

「発現ベクター」は、目的のポリペプチドをコードする領域を含むベクターであり、目的の標的細胞においてタンパク質を発現させるために用いる。発現ベクターはまた、コード領域に機能的に連結した調節エレメントを含み、標的中のタンパク質の発現を促進する。調節エレメントと、それらが発現のために作動可能に連結している遺伝子との組合せは、「発現カセット」と呼ばれることもあり、その多くは当該分野で公知であり、利用可能であるか、または当該技術分野で利用可能な成分から容易に構築することができる。

【 0 0 4 8 】

「異種」とは、それを比較する残りの実体の遺伝子型とは異なる遺伝子型の実体由来することを意味する。例えば、異なる種に由来するプラスミドまたはベクターに対して遺伝子工学技術によって導入したポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。その天然のコード配列から取り出され、それが天然には結合していないコード配列に機能的に連結したプロモーターは、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を含む r A A V は、天然に存在する野生型 A A V に通常は含まれない核酸を含む r A A V であり、コードする異種遺伝子産物は、天然に存在する野生型 A A V が通常であればコードしない遺伝子産物である。

【 0 0 4 9 】

用語「遺伝的改変」及び「遺伝子改変」（及びその文法上の変異形）は、本明細書中では同じ意味で用いられ、遺伝因子（例えば、ポリヌクレオチド）を、有糸分裂または減数分裂以外の方法で細胞内に導入するプロセスを指す。因子は、細胞に対して異種であってもよく、または細胞に既に存在する因子の追加のコピーまたは改良版であってもよい。遺伝的改変は、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、またはポリヌクレオチド - リポソーム複合体との接触のような、当該分野で公知の任意のプロセスを介して、細胞に組換えプラスミドまたは他のポリヌクレオチドを形質移入することによって行ってもよい。遺伝的改変はまた、例えば、DNA もしくは RNA ウイルスまたはウイルスベクターによる形質導入または感染によって行ってもよい。一般的には、遺伝因子は、細胞内の染色体またはミニ染色体に導入するが；この用語には、細胞及びその子孫の表現型及び / または遺伝子型を変化させる任意の改変が含まれる。

【 0 0 5 0 】

インビトロでの細胞の長期培養の間、遺伝子配列がその機能を発現するために利用可能である場合、細胞はその配列によって「安定的に」改変され、形質導入され、遺伝子改変され、または形質転換されていると言われる。一般的に、改変した細胞の子孫にも継承され得る遺伝子改変を導入するという点で、そのような細胞は、「遺伝的に」改変（遺伝子改変）されている。

【 0 0 5 1 】

「単離された」プラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、ウイルス粒子、宿主細胞、または他の物質とは、類似の物質が自然発生するか、または最初に調製されて存在し得る他の成分の少なくともいくつかは欠如した物質の調製物を意味する。したがって、例えば、単離された物質は、精製技術を用いて原料混合物から濃縮することによって調製し得る。濃縮は、溶液の体積当たりの重量のような絶対的な基準で測定可能であり、または原料混合物中に存在する潜在的に干渉する第 2 の物質に関して測定することができる。本発明の実施形態をより濃縮することにより、より単離が促進される。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

単離されたプラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、宿主細胞、または他の物質を、例えば、約 80 % ~ 約 90 % の純度、少なくとも約 90 % の純度、少なくとも約 95 % の純度、少なくとも約 98 % の純度、または少なくとも約 99 %、もしくはそれ以上の純度で精製する。

【0052】

用語「祖先型」とは、オーソログス配列から推定され、オーソログス配列がそれに由来するであろう配列を表すと思われる 1 つまたは複数のアミノ酸配列を指す。場合によっては、オーソログス配列は、自然界のメンバーに見出される野生型配列である。祖先型配列に沿ったいくつかの残基におけるアミノ酸の同一性は、しばしば、信頼度の閾値レベルを上回る（例えば、90 % を上回る）レベルで推定することができない。したがって、祖先型配列のアミノ酸の同一性は、一般的には残基の 90 % ~ 99 %、例えば 92 % ~ 98 %、93 % ~ 97 %、または 94 % ~ 96 % で決定され、一方、閾値信頼度を上回るレベルで推定することができない残基のアミノ酸は可変となる。したがって、祖先型アミノ酸配列は、ある残基が互いに異なる、例えば残基の最大約 5 % まで互いに異なる 2 つ以上の配列の集合であってもよい。

10

【0053】

用語「ゲノム編集」とは、異種ヌクレアーゼを用いて配列を挿入、置換または除去することによって細胞内の遺伝子配列を改変するプロセスを指す。異種ヌクレアーゼは、ジungkフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、Cas9 / ガイド RNA（gRNA）システム、または改変メガヌクレアーゼのメンバーを含む、遺伝子改変したヌクレアーゼであってもよい。

20

【0054】

本発明をさらに説明する前に、本発明は、記載する特定の実施形態に必ずしも限定されるものではなく、当然のことながら変化し得ることは理解されたい。本明細書中で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであって、必ずしも限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されたい。

【0055】

ある範囲の値を提供する場合、文脈上、明確な指示のない限り、その範囲の上限と下限との間における、下限の単位の 10 分の 1 までのそれぞれの介在値、及び任意の他の記載する値またはその記載する範囲内の介在値は、本発明に包含される。これらのより狭い範囲の上限及び下限は、独立してより狭い範囲に含めてもよく、記載する範囲内の任意の特定の除外される限界を前提として、本発明に包含してもよい。記載する範囲が限界の一方または両方を含む場合、含まれる限界の一方または両方を除く範囲も本発明に包含される。

30

【0056】

他に定義のない限り、本明細書中で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同等の意味を有する。本明細書中に記載する方法及び物質と類似または等価な任意の方法及び物質も本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法及び物質を記載する。本明細書中で言及するすべての刊行物は、参照として本明細書に組み入れられ、刊行物の引用に関連する方法及び/または物質を開示及び記載する。

40

【0057】

本明細書中及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「1 つの (a)」、「1 つの (an)」及び「その (the)」は、文脈上他に明確な指定のない限り、複数の指示対象を含むことに留意する必要がある。したがって、例えば、「1 つの rAAV ウイルス粒子」への言及は、複数のそのような rAAV ウイルス粒子を包含し、「その単離された核酸」への言及は、1 つまたは複数の単離された核酸及び当業者に公知のその均等物への言及を包含する、などである。請求項は任意選択的な要素を排除するように作成してもよいことにさらに留意されたい。したがって、この記述は、請求項の要素の列举に関連す

50

る「専ら」、「のみ」などの排他的な用語の使用または「否定的」限定の使用のための先行詞として役立つことを意図している。

【0058】

明確にするために別個の実施形態の文脈で記載する本発明の特定の特徴は、それらを組み合わせる単一の実施形態として提供してもよいことを理解されたい。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で記載する本発明の様々な特徴を、別々にまたは任意の適切な部分的組合せで提供してもよい。本発明に属する実施形態のすべての組合せは、本発明によって具体的に包含され、あたかも各組合せを個々にまたは明示的に開示するかのよう

10

に本明細書に開示する。さらに、様々な実施形態及びその要素のすべての部分的な組合せも、本発明によって具体的に包含され、あたかもそのような各部分的組合せを本明細書に

個々に及び明示的に開示するかのよう

に本明細書に開示する。

【0059】

本明細書に記載する刊行物は、本願の出願日前のそれらの開示に対してのみ提供する。本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明によってそのような刊行物に先行する資格を有さないことを認めるものとして解釈されるものではない。さらに、提供する公開日は、実際に公開された日付とは異なる場合があり、それは独立して確認する必要がある場合がある。

【0060】

詳細な説明

変異型 A A V キャプシドタンパク質、例えば祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する A A V キャプシドタンパク質を含む組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ウイルス粒子を提供する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含む r A A V ウイルス粒子は、筋細胞及びグリア細胞などの標的細胞へのより高い感染性を示す。変異型 A A V キャプシドタンパク質を有する r A A V ウイルス粒子を個体に投与することによる、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法も本明細書において提供する。本開示はさらに、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する変異型 A A V キャプシドタンパク質を有する r A A V ウイルス粒子の生成方法を提供する。

20

【0061】

組換えアデノ随伴ウイルスウイルス粒子

30

本開示は、変異型 A A V キャプシドタンパク質、例えば、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する A A V キャプシドタンパク質を含む r A A V ウイルス粒子を提供する。

【0062】

祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含む A A V ウイルス粒子

本開示の態様は、祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子を包含する。特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質のアミノ酸配列は、ヒト、マカク、アカゲザルなどの異なる宿主種に由来する野生型 A A V 血清型由来 A A V キャプシドタンパク質のアミノ酸配列から推定する。任意の適切な方法、例えば以下にさらに記載する方法などを用いて、祖先型 A A V キャプシドタンパク質のアミノ酸配列を推定してもよい。

40

【0063】

特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 7 に記載の配列に対し、少なくとも 94 %、例えば少なくとも 95 %、例えば少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有する。特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 7 の 264 位、266 位、268 位、448 位、459 位、460 位、470 位、471 位、474 位、495 位、516 位、533 位、547 位、551 位、555 位、557 位、561 位、563 位、577 位、583 位、593 位、596 位、661 位、662 位、664 位、665 位、710 位、717 位、718 位、719 位及び 723 位のアミノ酸

50

残基を除くすべての位置で、配列番号 7 に記載の配列と同一である。

【 0 0 6 4 】

本開示の特定の態様は、複数の r A A V ウイルス粒子、例えば祖先型 A A V ライブラリを含有する組成物を包含し、各 r A A V ウイルス粒子は、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 9 4 %、例えば少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有する祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含む。したがって、特定の実施形態では、祖先型ライブラリは、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 9 4 %、例えば少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有する複数の祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含有する。特定の実施形態では、祖先型ライブラリ中の複数の祖先型 A A V キャプシドタンパク質のアミノ酸残基 2 6 4 位、2 6 6 位、2 6 8 位、4 4 8 位、4 5 9 位、4 6 0 位、4 7 0 位、4 7 1 位、4 7 4 位、4 9 5 位、5 1 6 位、5 3 3 位、5 4 7 位、5 5 1 位、5 5 5 位、5 5 7 位、5 6 1 位、5 6 3 位、5 7 7 位、5 8 3 位、5 9 3 位、5 9 6 位、6 6 1 位、6 6 2 位、6 6 4 位、6 6 5 位、7 1 0 位、7 1 7 位、7 1 8 位、7 1 9 位、及び 7 2 3 位は、異なる祖先型 A A V ライブラリ間で異なっている。いくつかの実施形態では、これらの残基に存在するアミノ酸の種類分布が、野生型 A A V 血清型由来の A A V キャプシドタンパク質のアミノ酸配列から推測される理論的分布を反映するように、祖先型ライブラリを合成して作製する。したがって、そのような実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列中の可変残基のそれぞれに存在する最も一般的なアミノ酸の頻度は、推定される理論的分布における頻度に比べて、平均 - 1 0 % ~ 1 0 %、例えば - 6 % ~ 6 %、- 4 % ~ 4 % といった範囲で異なる。いくつかの実施形態では、これらの残基に存在するアミノ酸の種類分布は、祖先型ライブラリをパッケージングし、パッケージングしたライブラリを宿主細胞に形質移入し、そして複製されたウイルスを回収することによって得られる r A A V ウイルス粒子のライブラリ中の分布である。いくつかの実施形態では、これらの残基に存在するアミノ酸の種類分布は、以下にさらに記載するように、標的細胞における 1 回または複数回の選択後に得られた r A A V ウイルス粒子のライブラリにおける分布である。特定の実施形態では、標的細胞は、筋細胞株 ( C 2 C 1 2 )、肺上皮細胞株 ( I B 3 - 1 )、神経膠芽腫細胞、メラノーマ細胞株 ( B 1 6 ) またはヒト胎児由来腎臓 2 9 3 T 細胞株である。これらの残基に存在するアミノ酸の種類例示的な分布を図 3 に示す表に示す。

【 0 0 6 5 】

特定の実施形態では、上記のような祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含有する複数の r A A V ウイルス粒子を含有する祖先型 A A V ライブラリは、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の感染性に比べて、標的細胞への高い感染性を示す。

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質を有する複数の r A A V ウイルス粒子を含有する祖先型 A A V ライブラリは、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質 (例えば、野生型 A A V 1 または A A V 2 キャプシドタンパク質) を有する A A V ウイルス粒子の依存性に比べて、感染性に関して、標的細胞受容体に対する変化した依存性を示す。標的細胞受容体に対する依存性は、例えば、目的の標的細胞受容体を有する親細胞株に対するウイルス粒子の形質導入効率と、標的細胞受容体を欠く誘導細胞株に対する形質導入効率とを比較することによって決定してもよい。したがって、誘導細胞株に対するウイルス粒子の形質導入効率が親細胞株に比べて低下していない場合、感染性に関してウイルス粒子は標的細胞受容体への依存性を示さない。

【 0 0 6 7 】

したがって、特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質を含有する複数の r A A V ウイルス粒子を含有する祖先型 A A V ライブラリは、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子に比べて、感染性に関して 5 0 % 以上、例

例えば60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上の標的細胞受容体に対する依存性の低下を示す。特定の実施形態では、祖先型AAVライブラリは、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質（例えば、野生型AAV2キャプシドタンパク質）を有するAAVウイルス粒子に比べて、感染性に関して50%以上、例えば60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上のヘパリン硫酸プロテオグリカンに対する依存性の低下を示す。特定の実施形態では、祖先型AAVライブラリは、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質（例えば、野生型AAV1キャプシドタンパク質）を有するAAVウイルス粒子に比べて、感染性に関して50%以上、例えば60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上のシアル酸に対する依存性の低下を示す。

10

#### 【0068】

特定の実施形態では、祖先型AAVキャプシドタンパク質を有する複数のrAAVウイルス粒子を含有する祖先型AAVライブラリは、標的細胞感染性に関して無差別性を示す。特定の実施形態では、祖先型AAVライブラリは、複数の標的細胞型のそれぞれに対して、少なくともバックグラウンドよりも高い感染性を示す。複数の標的細胞型に対して無差別的な感染性を示すそのような祖先型AAVライブラリは、以下にさらに記載するように、定向進化によって、非許容細胞型を含む特定の細胞型に対する指向性を有する変異型rAAVウイルス粒子を誘導するのに適している場合がある。

#### 【0069】

特定の実施形態では、祖先型AAVキャプシドタンパク質を有する複数のrAAVウイルス粒子を含有する祖先型AAVライブラリは、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質を有するAAVウイルス粒子の突然変異耐性及び/または進化性に比べて、より高い突然変異耐性及び/または進化性を有する。突然変異耐性は、ウイルス粒子を一時的に（例えば、10分間）高温に曝露した後の、高温に曝していないウイルス粒子に比べての、標的細胞に対する少なくとも10%、例えば少なくとも20%、または少なくとも30%の感染性を保持する能力として測定されるウイルス粒子の熱処理耐性に反映され得る。理論にとらわれるものではないが、熱安定性を高めたAAVウイルス粒子は、キャプシド全体の安定性を損ねる突然変異に対してより高耐性であり得る。したがって、祖先型AAVライブラリのrAAVウイルス粒子は、75~79、例えば76~78、76.5~78、77~78といった範囲の温度への一時的な曝露（例えば、10分間の曝露）に耐性である。いくつかの例では、祖先型AAVライブラリのrAAVウイルス粒子を一過性に曝露する（例えば、10分）温度であって、高温に曝していないウイルス粒子に対して感染性が50%にまで低下する温度は、野生型AAV血清型キャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子に比べて、2~20、例えば2~15、3~10、3~5といった範囲でより高い。

20

30

#### 【0070】

変異型AAVキャプシドタンパク質を含むAAVウイルス粒子

本開示のさらなる態様は、上記のような祖先型AAVキャプシドタンパク質に由来する変異型AAVキャプシドタンパク質を含むrAAVウイルス粒子を包含する。特定の実施形態では、rAAVウイルス粒子は、a) 配列番号16に記載の配列に対して少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含有し、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位、及び723位のアミノ酸が、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；または、それぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、変異型AAVキャプシドタンパク質、ならびにb) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含有する異種核酸を含む。特

40

50

定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

#### 【 0 0 7 1 】

したがって、本開示の一態様は、a) 配列番号 1 3 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質と、b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含有する異種核酸とを含む r A A V ウイルス粒子を包含する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

10

#### 【 0 0 7 2 】

本開示の別の態様は、a) 配列番号 1 4 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質と、b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含有する異種核酸とを含む r A A V ウイルス粒子を包含する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

20

#### 【 0 0 7 3 】

本開示の別の態様は、a) 配列番号 1 5 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質と、b) 遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含有する異種核酸とを含む r A A V ウイルス粒子を包含する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

30

#### 【 0 0 7 4 】

特定の実施形態では、標的細胞は、インビボでの組織内の細胞、組織片中の細胞、培養物中の解離した初代細胞、不死化細胞株を含む細胞株などである。いくつかの実施形態では、標的細胞は健康な細胞、例えば健康な組織中の細胞、または健康な組織から得られた細胞である。いくつかの場合には、標的細胞は病理学的細胞、例えば病変組織中の細胞、または疾患を有すると診断された個体中の、もしくは個体から得られた細胞である。特定の実施形態では、標的細胞は、肺上皮細胞株（限定されないが、I B 3 - 1 細胞など）；ヒト胎児由来腎臓細胞株（例えば、H E K 2 9 3 T 細胞）；マウス筋芽細胞株（例えば、C 2 C 1 2 細胞）；皮膚メラノーマ細胞株（例えば、B 1 6 - F 1 0 細胞）であり；及び C H O 細胞を含み得る。標的細胞として適切な他の細胞株は、例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（A T C C）から容易に取得し得る。場合によっては、標的細胞は、初代腫瘍細胞（例えば、神経膠芽腫細胞）である。いくつかの場合には、標的細胞は、骨格筋または心筋などの筋肉内；中枢神経系（脳、脊髄、網膜）または末梢神経系などの神経組織内；皮膚（表皮、真皮など）内；免疫系（骨髄、脾臓、胸腺、リンパ節、血液など）内などにおける細胞である。特定の実施形態では、標的細胞はグリア細胞（星状細胞、

40

50

オリゴデンドロサイト、放射状グリア、神経膠芽腫など）、ニューロン、筋細胞、ケラチノサイト、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、軟骨細胞、骨細胞、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、好酸球、好塩基球などが挙げられる。本明細書中で使用する場合、グリア細胞は、インピトロまたはインピボでの健康なグリア細胞または異常なグリア細胞であってもよい。したがって、標的グリア細胞は、健康なグリア細胞または神経膠芽腫細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、健康なグリア細胞または神経膠芽腫細胞は、個体、例えば神経膠腫患者の神経膠芽腫細胞に存在する。

【 0 0 7 5 】

いくつかの場合において、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含む本開示の r A A V ウイルス粒子は、野生型 A A V キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 1 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞への感染性に比べて、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、または 5 0 倍を上回る、高い標的細胞への感染性を示す。標的細胞への感染性は、r A A V ウイルス粒子が保有する核酸によりコードされ、発現される検出可能なマーカータンパク質を検出することによって決定してもよい。例えば、r A A V ウイルス粒子は、ルシフェラーゼをコードする核酸を有してもよく、そして標的細胞への感染性を、標的細胞由来のルシフェラーゼ活性を測定することによって決定してもよい。そのような場合、野生型 r A A V ウイルス粒子に感染した標的細胞で測定したルシフェラーゼ活性に比べて、変異型 r A A V ウイルス粒子に感染した標的細胞で測定したルシフェラーゼ活性が高い場合、それは変異型 r A A V ウイルス粒子が野生型 r A A V ウイルス粒子よりも高い感染性を有することを示す。他の適切な検出可能なマーカータンパク質として、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

【 0 0 7 6 】

したがって、特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含む本発明の r A A V ウイルス粒子は、野生型 A A V キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 1 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子の筋細胞への感染性に比べて、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、または 5 0 倍を上回る、高い筋細胞への感染性を示す。特定の実施形態では、r A A V ウイルス粒子は、野生型 A A V キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 1 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子の筋細胞への感染性に比べて、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 1 5 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 2 5 倍、少なくとも 5 0 倍、または 5 0 倍を上回る、高いグリア細胞または神経膠芽腫細胞への感染性を示す。

【 0 0 7 7 】

変異型 A A V キャプシドタンパク質を有する本発明の r A A V ウイルス粒子は、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 1 または A A V 2 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子に比べて、感染性に関して、変化した標的細胞受容体依存性を示す。特定の実施形態では、ウイルス粒子は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子に比べて、5 0 % 以上、例えば 6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上、または 9 5 % 以上低い標的細胞受容体依存性を示す。特定の実施形態では、ウイルス粒子は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 2 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子に比べて、5 0 % 以上、例えば 6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上、または 9 5 % 以上低いヘパリン硫酸プロテオグリカン依存性を示す。特定の実施形態では、ウイルス粒子は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質（例えば、野生型 A A V 1 キャプシドタンパク質）を有する A A V ウイルス粒子に比べて、5 0 % 以上、例えば 6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上、または 9 5 % 以上低いシアル酸依存性を示す。

【 0 0 7 8 】

## 遺伝子産物

本発明の r A A V ウイルス粒子の異種核酸中のヌクレオチド配列がコードする遺伝子産物は、必ずしも限定するものではないが、ポリペプチド、核酸、またはゲノム編集遺伝子産物のような任意の適切な遺伝子産物であってもよい。

## 【 0 0 7 9 】

ポリペプチド遺伝子産物として、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、L A R G E、O 結合型マンノース 1, 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質などの任意の適切なポリペプチドが挙げられ得るが、必ずしもこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリペプチド遺伝子産物は、分泌ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、分泌ポリペプチドは治療用タンパク質である。適切な分泌ポリペプチドとして、リボタンパク質リパーゼ、第 I X 因子、<sub>1</sub> アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド 1、インスリン様増殖因子 1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、グルコシダーゼ、及び N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

## 【 0 0 8 0 】

リボプロテインリパーゼ ( L P L ) は、トリグリセリド加水分解に関与する脂質代謝酵素である。L P L 欠乏症は高トリグリセリド血症に関係している。本発明の異種核酸がコードする適切な L P L アミノ酸配列として、ヒト L P L ( 遺伝子 I D : 4 0 2 3 )、マウス L P L ( 遺伝子 I D : 1 6 9 5 6 )、ラット L P L ( 遺伝子 I D : 2 4 5 3 9 )、非ヒト霊長類 L P L ( 遺伝子 I D : 4 6 4 0 3 1 )、ニワトリ L P L ( 遺伝子 I D : 3 9 6 2 1 9 )、イヌ L P L ( 遺伝子 I D : 4 0 3 6 2 6 )、ネコ L P L ( 遺伝子 I D : 7 2 7 6 9 6 ) などが挙げられる。

## 【 0 0 8 1 】

第 I X 因子 ( 凝固因子 I X ) は、血液凝固において役割を果たすセリンプロテアーゼである。第 I X 因子欠乏症は血友病 B を引き起こす。本発明の異種核酸がコードする適切な第 I X 因子アミノ酸配列は、ヒト第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 2 1 5 8 )、マウス第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 1 4 0 7 1 )、ラット第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 2 4 9 4 6 )、非ヒト霊長類第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 4 6 5 8 8 7 )、ニワトリ第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 3 7 4 2 5 8 )、イヌ第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 4 0 4 0 1 5 )、ネコ第 I X 因子 ( 遺伝子 I D : 4 9 3 9 7 3 ) などが挙げられる。

## 【 0 0 8 2 】

<sub>1</sub> アンチトリプシンは、炎症において役割を果たすプロテアーゼ阻害剤である。<sub>1</sub> アンチトリプシン欠乏症は、肺気腫及び他の慢性的な組織壊死症状に関係している。本発明の異種核酸がコードする適切な <sub>1</sub> アンチトリプシンアミノ酸配列として、ヒト <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 5 2 6 5 )、マウス <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 2 0 7 0 0 )、ラット <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 2 4 6 4 8 )、非ヒト霊長類 <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 4 6 7 5 4 1 )、ニワトリ <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 4 2 3 4 3 4 )、イヌ <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 4 8 0 4 2 2 )、ネコ <sub>1</sub> アンチトリプシン ( 遺伝子 I D : 1 0 1 0 9 8 1 0 7 ) などが挙げられる。

## 【 0 0 8 3 】

ガラクトシダーゼは、糖脂質及び糖タンパク質からガラクトシル部分を加水分解する酵素である。ガラクトシダーゼ欠乏症はファブリー病に関与し、ファブリー病は組換え産生されたガラクトシダーゼ ( アガルシダーゼ またはアガルシダーゼ ) によって治療し得る。本発明の異種核酸がコードする適切なガラクトシダーゼアミノ酸配列として、ヒトガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 2 7 1 7 )、マウスガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 1 1 6 0 5 )、ラットガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 3 6 3 4 9 4 )、非ヒト霊長類ガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 4 6 5 7 6 1 )、ニワトリガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 4 2 2 1 8 8 )、イヌガラクトシダーゼ ( 遺伝子 I D : 4 8 0 9 8



8)、ネコ ガラクトシダーゼ(遺伝子ID:101091428)などが挙げられる。  
【0084】

イズロニダーゼは、皮膚、血管、心臓弁、腱及び肺に見出されるグリコサミノグリカンであるデルマタン硫酸中の非硫酸化 - L - イズロノシド結合の加水分解を触媒する酵素である。組換え産生されたイズロニダーゼは、ラロニダーゼとして公知である。イズロニダーゼ欠損は、ムコ多糖症(MPS)I型(MPS-I、ハーラー症候群としても知られる)に関与している。本発明の異種核酸がコードする適切なイズロニダーゼアミノ酸配列として、ヒトイズロニダーゼ(遺伝子ID:3425)、マウスイズロニダーゼ(遺伝子ID:15932)、ラットイズロニダーゼ(遺伝子ID:360904)、非ヒト霊長類イズロニダーゼ(遺伝子ID:461056)、ニワトリイズロニダーゼ(遺伝子ID:427294)、イヌイズロニダーゼ(遺伝子ID:100505382)、ネコイズロニダーゼ(遺伝子ID:101095896)などが挙げられる。

10

【0085】

イズロン酸-2-スルファターゼは、ヘパリン硫酸及びデルマタン硫酸に対するリソソーム分解に必要とされるスルファターゼ酵素である。イズロン酸-2-スルファターゼの有害な突然変異は、MPS-II(ハンター症候群としても知られている)に関連している。イズロン酸-2-スルファターゼは、治療に使用するためのイズルスルファターゼとして組換え産生される。本発明の異種核酸がコードする適切なイズロン酸-2-スルファターゼアミノ酸配列として、ヒトイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:3423)、マウスイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:15931)、ラットイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:363513)、非ヒト霊長類イズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:465896)、ニワトリイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:422392)、イヌイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:492194)、ネコイズロン酸-2-スルファターゼ(遺伝子ID:101081450)などが挙げられる。

20

【0086】

グルコシダーゼはデンプン加水分解酵素であり、酵素の欠乏は糖原病II型(ポンペ病としても知られる)に関与している。グルコシダーゼ類似体は、治療用途のために組換え産生され、アルグルコシダーゼとして公知である。本発明の異種核酸がコードする適切なイズロニダーゼアミノ酸配列として、ヒト グルコシダーゼ(遺伝子ID:2548)、マウス グルコシダーゼ(遺伝子ID:14387)、ラット グルコシダーゼ(遺伝子ID:367562)、非ヒト霊長類 グルコシダーゼ(遺伝子ID:454940)、ニワトリ グルコシダーゼ(遺伝子ID:416462)、イヌ グルコシダーゼ(遺伝子ID:483352)、ネコ グルコシダーゼ(遺伝子ID:101086359)などが挙げられる。

30

【0087】

N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼは、コンドロイチン硫酸及びデルマタン硫酸のN-アセチル-D-ガラクトサミン4-硫酸ユニットの4-硫酸基の加水分解を触媒する酵素である。N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ欠損は、MPS-IV(マロー・ラミー症候群としても知られる)に関与している。N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼは、治療に用いるためにガルスルファターゼとして組換え産生される。本発明の異種核酸がコードする適切なN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼアミノ酸配列は、ヒトN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:411)、マウスN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:11881)、ラットN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:25227)、非ヒト霊長類N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:737316)、ニワトリN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:771459)、イヌN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:610364)、ネコN-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼ(遺伝子ID:100216331)などが挙げられる。

40

50

## 【0088】

特定の実施形態では、分泌ポリペプチドを免疫グロブリンFc領域（例えば、ヒトFc）に融合させて、融合複合体（または融合分子）を形成することができる。Fc融合複合体は、分泌タンパク質の産生または全身半減期を高めることが知られている。特定の実施形態では、分泌タンパク質のアミノ酸配列を改変して、内在性シグナルペプチドを、標的細胞由来のポリペプチドの分泌を促進する異種シグナルペプチドで置換してもよい。好適なシグナルペプチドは、例えば、Sun et al., Mol Ther. 2006 14: 822; 及び米国出願公開20070142623、20040115775に記載されており、上記文献は参照として本明細書に組み入れられる。

## 【0089】

10

トロポニン（トロポニンC、トロポニンI、トロポニンT）は、骨格筋及び心筋収縮に関与する調節タンパク質である。トロポニンの欠損は、家族性肥大型心筋症に関与している。本発明の異種核酸がコードする適切なトロポニンアミノ酸配列として、ヒトトロポニン（遺伝子ID: 7134、7137、7139）、マウストロポニン（遺伝子ID: 21954、21956、21957）、ラット<sub>1</sub>トロポニン（遺伝子ID: 24838、24837、29248）、非ヒト霊長類<sub>1</sub>トロポニン（遺伝子ID: 466317、457618、746369）などが挙げられる。

## 【0090】

単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ（HSV-1 Tk）は、神経膠腫などの癌の治療に使用される酵素である。理論にとらわれるものではないが、HSV-1 Tkを発現する細胞は、ガンシクロビル（GCV）などのチミジンキナーゼ基質類似体を、腫瘍細胞などの分裂細胞にとって極めて有毒な代謝産物に変換することができる。本発明の異種核酸がコードする適切なHSV-1 Tkアミノ酸配列として、ヒトHSV-1 Tk（遺伝子ID: 2703374）、ヒトHSV-2 Tk（遺伝子ID: 1487307）などが挙げられる。

20

## 【0091】

本開示で使用する他の例示的なポリペプチド遺伝子産物は、例えば、参照として組み入れられる米国特許出願公開第2006/0276376号に記載されている。

## 【0092】

ゲノム編集遺伝子産物として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及びCas9/gRNAシステムまたはその成分を挙げてもよく、ゲノム編集遺伝子産物は多成分遺伝子産物である。

30

## 【0093】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生成する人工DNAエンドヌクレアーゼである。ZFNは、所望のDNA配列を標的とするように改変することができ、これによってジンクフィンガーヌクレアーゼがユニークな標的配列を切断することが可能になる。細胞に導入した場合、ZFNを用いて二本鎖切断を誘導することにより、細胞内の標的DNA（例えば、細胞ゲノム）を編集することができる。ZFNの使用の詳細については、例えば：Asuri et al., Mol Ther. 2012 Feb; 20(2): 329-38; Bibikova et al., Science. 2003 May 2; 300(5620): 764; Wood et al., Science. 2011 Jul 15; 333(6040): 307; Ochiai et al., Genes Cells. 2010 Aug; 15(8): 875-85; Takasu et al., Insect Biochem Mol Biol. 2010 Oct; 40(10): 759-65; Ekker et al., Zebrafish 2008 Summer; 5(2): 121-3; Young et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 26; 108(17): 7052-7; Goldberg et al., Cell. 2010 Mar 5; 140(5): 678-91; Geurts et al., Science. 2009 Jul 24; 3

40

50

25 (5939) : 433 ; Flisikowska et al , PLoS One . 2011 ; 6 (6) : e21045 . doi : 10 . 1371 / journal . pone . 0021045 . Epub 2011 Jun 13 ; Hauschild et al , Proc Natl Acad Sci U S A . 2011 Jul 19 ; 108 (29) : 12013 - 7 ; 及び Yu et al , Cell Res . 2011 Nov ; 21 (11) : 1638 - 40 参照 ; 上記文献のすべては、ZFNに関連するそれらの記載を参照として本明細書に組み入れられる。用語「ZFN剤」は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ及び/またはジンクフィンガーヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0094】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) は、TAL (転写活性化因子様) エフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生成する人工DNAエンドヌクレアーゼである。TALENは、実質的に任意の所望のDNA配列に結合するように迅速に改変することができ、細胞に導入した場合、TALENを用いて二本鎖切断を誘導することによって細胞内の標的DNA (例えば、細胞ゲノム) を編集することができる。TALENの使用の詳細については、例えば : Hockemeyer et al . Nat Biotechnol . 2011 Jul 7 ; 29 (8) : 731 - 4 ; Wood et al . Science . 2011 Jul 15 ; 333 (6040) : 307 ; Tesson et al . Nat Biotechnol . 2011 Aug 5 ; 29 (8) : 695 - 6 ; 及び Huang et al . , Nat Biotechnol . 2011 Aug 5 ; 29 (8) : 699 - 700 参照 ; 上記文献のすべては、TALENに関連するそれらの記載を参照として本明細書に組み入れられる。用語「TALEN剤」は、TALEN及び/またはTALENをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0095】

Cas9は、クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) 関連 (Cas) タンパク質 (またはその機能的均等物及び/または変異体、例えばCas9様タンパク質) であり、crRNA及びtracrRNAと呼ばれる (ガイドRNA (gRNA) ととも呼ばれる) 2つの天然または合成RNA分子を備えたタンパク質との会合に依存したDNAエンドヌクレアーゼ活性を有する。いくつかの場合では、上記2つの分子は共有結合して単一分子を形成する (単一のガイドRNA (「sgRNA」) ととも呼ばれる)。このように、Cas9またはCas9様タンパク質は、DNA標的指向RNAと会合し (この用語は、二分子ガイドRNA構成と単一分子ガイドRNA構成の両方を包含する)、Cas9またはCas9様タンパク質を活性化し、タンパク質を標的核酸配列へ誘導する。Cas9またはCas9様タンパク質がその天然の酵素機能を保持する場合、上記タンパク質は、標的DNAを切断して二本鎖切断を生成し、ゲノム改変 (すなわち、編集 : 欠失、挿入 (ドナーポリヌクレオチドが存在する場合)、置換など) を誘導し、それによって遺伝子発現を変化させる。Cas9のいくつかの変異体 (これらの変異体はCas9様という用語に包含される) は、DNA切断活性が低下するように改変されている (いくつかの場合には、それらは標的DNAの両方の鎖の代わりに単一の鎖を切断し、一方、他の場合には、DNA切断活性がなくなるほどまで著しく活性が低下している)。DNA切断活性が低下した (またはDNA切断活性が全くない) Cas9様タンパク質は依然として、標的DNAに誘導されてRNAポリメラーゼ活性を阻害することができる。したがって、標的DNAの転写を阻害するために、酵素的に不活性なCas9様タンパク質を、DNA標的指向RNAによって標的DNAの特定の位置に標的指向させることができる。

#### 【0096】

Cas9 / gRNAシステムに関する詳細な情報は、例えば、(a) Jinek et al . , Science . 2012 Aug 17 ; 337 (6096) : 816 - 21 : “ A programmable dual - RNA - guided DNA en

10

20

30

40

50

donuclease in adaptive bacterial immunity”; (b) Qi et al., Cell, 2013 Feb 28; 152(5): 1173-83: “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, 及び (c) WO2013/176772に見出すことができ; その各々は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。したがって、本明細書で使用する用語「CRISPR剤」は、Cas9ベースのシステムにおいて使用し得る、天然に存在する配列及び/または合成配列を含む任意の作用物質(またはそのような作用物質をコードする核酸)(例えば、Cas9またはCas9様タンパク質; 例えば、crRNA様RNA、tracrRNA様RNA、単一のガイドRNAなどのDNA標的指向RNAの任意の成分; ドナーポリヌクレオチドなど)を包含する。

10

#### 【0097】

適切な核酸遺伝子産物として、干渉RNA、アンチセンスRNA、リボザイム、及びアプタマーが挙げられる。遺伝子産物が干渉RNA(RNAi)である場合、適切なRNAiとして、細胞内の疾患関連タンパク質のレベルを低下させるRNAiが挙げられる。例えば、RNAiは、筋細胞におけるFRG1、または神経膠芽腫細胞におけるO<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)のレベルを低下させるmiRNA、shRNA、またはsiRNAであり得る。核酸遺伝子産物の適切な標的は、例えば、Bortolanza et al., Mol Ther, 2011 19:2055; 米国特許公開第2013/0347136号、第2009/0087434号、第2011/0059114号、第2011/0165227号; PCT公開番号WO2006/128063、WO2011/134023に記載されている。

20

#### 【0098】

##### 調節エレメント

上記のように、本開示のrAAVウイルス粒子は、遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸を含むrAAVベクターを含む。異種ヌクレオチド配列は、インピボにおいて、ヌクレオチド配列中のその転写または発現を導く調節エレメントに作動可能に連結することができる。そのような調節エレメントは、通常、選択した遺伝子に関連する調節配列(例えば、内在性細胞調節エレメント)を有し得る。あるいは、異種調節配列を用いることができる。有用な異種調節配列には、一般的に、哺乳類またはウイルス遺伝子をコードする配列に由来するものが含まれる。例として、必ずしも限定するものではないが、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター; アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP); 単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター、目的の遺伝子に対して異種である内在性細胞プロモーター、CMV前初期プロモーター領域(CMV IE)などのサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、合成プロモーター、ハイブリッドプロモーターなどが挙げられる。さらに、マウスのメタロチオネイン遺伝子のような非ウイルス遺伝子に由来する配列を使用することもできる。そのようなプロモーター配列は、例えばStratagene(サンディエゴ、カリフォルニア)から市販されている。

30

40

#### 【0099】

いくつかの実施形態では、細胞型特異的または組織特異的プロモーターは、異種遺伝子産物をコードする異種核酸に作動可能に連結し、その結果、遺伝子産物は特定の細胞型または組織において選択的または優先的に産生される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、異種核酸に作動可能に連結する。

#### 【0100】

##### rAAVウイルス粒子を生成するための方法

異種核酸を含み、rAAVウイルス粒子を生成するために使用するAAV発現ベクターは、当該技術分野で周知の方法を用いて構築することができる。例えば、Koerber et al. (2009) Mol. Ther. 17:2088; Koerber et

50

al. (2008) Mol Ther. 16:1703-1709; 米国特許第7,439,065号、第6,951,758号及び第6,491,907号参照。例えば、異種配列を、そこから切除される主要なAAVオープンリーディングフレーム(「ORF」)を有するAAVゲノムに直接挿入することができる。AAVゲノムの他の部分もまた、複製及びパッケージング機能を可能にするために十分な量のITRが残っている限り、削除することができる。そのような構築物は、当該技術分野で周知の技術を用いて設計することができる。例えば、米国特許第5,173,414号及び第5,139,941号; 国際公開番号WO92/01070(1992年1月23日公開)及びWO93/03769(1993年3月4日公開); Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; ならびにZhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875参照。

#### 【0101】

rAAVウイルス粒子を産生するために、AAV発現ベクターを、形質移入などの公知の技術を用いて適切な宿主細胞に導入する。多くの形質移入技術が当該技術分野において一般的に公知である。例えば、Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier、及びChu et al. (1981) Gene 13:197参照。特に適切な形質移入法として、リン酸カルシウム共沈殿(Graham et al. (1973) Virol. 52:456-467)、培養細胞への直接マイクロインジェクション(Capeocchi, M. R. (1980) Cell 22:479-488)、電気穿孔法(Shigekawa et al. (1988) BioTechniques 6:742-751)、リポソームを介した遺伝子移送(Mannino et al. (1988) BioTechniques 6:682-690)、脂質を介した形質導入(Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417)、及び高速マイクロプロジェクトイルを用いた核酸送達(Klein et al. (1987) Nature 327:70-73)が挙げられる。

#### 【0102】

rAAVウイルス粒子を産生するのに適した宿主細胞として、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞が挙げられ、これらは異種DNA分子のレシピエントとして使用することができる、または使用されてきた。この用語には、形質移入した元の細胞の子孫が含まれる。したがって、本明細書中で使用する「宿主細胞」とは、通常、外来性DNA配列を形質移入した細胞を指す。安定なヒト細胞株293(例えばアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関の受託番号ATCC CRL1573を介して容易に入手可能)由来細胞を使用することができる。例えば、ヒト細胞株293は、アデノウイルス5型DNAフラグメント(Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36:59)で形質転換したヒト胎児由来腎臓細胞株であり、アデノウイルスE1a及びE1b遺伝子を発現する(Aiello et al. (1979) Virology 94:460)。293細胞株は容易に形質移入され、rAAVウイルス粒子を産生するための便利なプラットフォームを提供する。

## 【0103】

昆虫細胞内でA A Vウイルス粒子を産生する方法は、当該分野で公知であり、これを用いて、本発明のr A A Vウイルス粒子を産生することができる。例えば、米国特許公開第2009/0203071号；米国特許第7,271,002号；及びChen(2008)Mol. Ther. 16:924参照。

## 【0104】

## 医薬組成物

本開示は、以下を含む医薬組成物を提供する：a)上記のような本発明のr A A Vウイルス粒子；及びb)薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤は、ヒトにおける使用に適している。

## 【0105】

そのような賦形剤、担体、希釈剤、及び緩衝剤には、過度の毒性を伴わずに投与することができる任意の医薬剤が含まれる。薬学的に許容可能な賦形剤として、必ずしも限定するものではないが、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの液体が挙げられる。薬学的に許容可能な塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの無機酸塩；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩を、そこに含めることができる。さらに、補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などをそのようなビヒクルに存在させてもよい。多種多様な薬学的に許容可能な賦形剤が当該分野で周知であり、本明細書で詳細に論ずる必要はない。薬学的に許容可能な賦形剤は、例えばA. Gennaro(2000)「Remington: The Science and Practice of Pharmacy,」20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C. Ansel et al., eds., 7<sup>th</sup> ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; 及びHandbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H. Kibbe et al., eds., 3<sup>rd</sup> ed. Amer. Pharmaceutical Assocを含む様々な刊行物に詳細に記載されている。

## 【0106】

本発明の組成物は、本発明のr A A Vウイルス粒子を、溶液中、懸濁液中、またはその両方において含有する液体を有し得る。本明細書中で使用する場合、液体組成物にはゲルが含まれる。いくつかの場合には、液体組成物は水性である。いくつかの実施形態では、組成物は、インサイチュでゲル化可能な水性組成物、例えばインサイチュでゲル化可能な水溶液である。水性組成物は、生理学的に適合するpH及び浸透圧を有する。

## 【0107】

## 核酸及び宿主細胞

本開示の他の態様は、変異型A A Vキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を包含し、変異型A A Vキャプシドタンパク質は、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264位、448位、459位、470位、495位、533位、547位、555位、557位、561位、563位、593位、596位、661位、662位、664位、718位及び723位のアミノ酸は、それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；または、それぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである。特定の実施形態では、変異型A A Vキャプシドタンパク質は、野生型A A V血清型キャプシドタンパク質を有するA A Vウイルス粒子の標的細胞感染性に比べて高い標的細胞感染性を付

与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

#### 【 0 1 0 8 】

特定の実施形態では、単離された核酸は、変異型 A A V キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 3 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

10

#### 【 0 1 0 9 】

特定の実施形態では、単離された核酸は、変異型 A A V キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 4 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

20

#### 【 0 1 1 0 】

特定の実施形態では、単離された核酸は、変異型 A A V キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 1 5 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 7 . 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 8 . 5 %、少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 9 . 5 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

30

#### 【 0 1 1 1 】

特定の実施形態では、単離された核酸は、祖先型 A A V キャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、配列番号 7 に記載の配列に対して少なくとも 9 4 %、例えば少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞感染性に比べて高い標的細胞感染性を付与する。特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子の標的細胞受容体依存性に比べて、変化した標的細胞受容体依存性を付与する。

40

#### 【 0 1 1 2 】

本発明はさらに、本発明の核酸を含む宿主細胞、例えば単離された（遺伝子改変した）宿主細胞を提供する。本発明の宿主細胞は、単離された細胞、例えば、インビトロ培養物中の細胞であり得る。本発明の宿主細胞は、以下に記載するように、本発明の r A A V ウイルス粒子の産生に有用である。本発明の宿主細胞を本発明の r A A V ウイルス粒子を産生するために使用する場合、それは「パッケージング細胞」と呼ばれる。いくつかの実施

50

形態では、本発明の核酸を用いて本発明の宿主細胞を安定的に遺伝子改変する。他の実施形態では、本発明の核酸を用いて本発明の宿主細胞を一過性に遺伝子改変する。

【0113】

電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、リポソームを介した形質移入、バキュロウイルス感染などを含むが必ずしもこれらに限定されない確立された技術を用いて、本発明の核酸を宿主細胞に安定的または一過性に導入する。安定な形質転換のために、本発明の核酸は、一般的に、選択マーカー、例えばネオマイシン耐性などのいくつかの周知の選択マーカーのいずれかをさらに含む。

【0114】

本発明の宿主細胞は、例えば、哺乳類細胞、例えば、マウス細胞及び霊長類細胞（例えば、ヒト細胞）を含む様々な細胞のいずれかに本発明の核酸を導入することによって生成する。適切な哺乳類細胞として、必ずしも限定するものではないが、HeLa細胞（例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）番号CCL-2）、CHO細胞（例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096）、293細胞（例えばATCC番号CRL-1573）、Vero細胞、NIH3T3細胞（例えばATCC番号CRL-1658）、Huh-7細胞、BHK細胞（例えばATCC番号CCL10）、PC12細胞（ATCC番号CRL1721）、COS細胞、COS-7細胞（ATCC番号CRL1651）、RAT1細胞、マウスL細胞（ATCC番号CCLI-3）、Sf9細胞、ヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞（ATCC番号CRL1573）、HepG2細胞などが挙げられる。

【0115】

いくつかの実施形態では、本発明の遺伝子改変した宿主細胞は、上記のような変異型AAVキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に加えて、1つまたは複数のAAV repタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む。他の実施形態では、本発明の宿主細胞は、rAAVベクターをさらに含む。本発明の宿主細胞を用いてrAAVウイルス粒子を生成することができる。rAAVウイルス粒子の生成方法は、例えば、米国特許公開第2005/0053922号及び米国特許公開第2009/0202490号に記載されている。

【0116】

方法

本開示は、本開示のrAAVウイルス粒子を個体に投与することによる、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法を提供する。本開示は、疾患の治療方法を提供し、本方法は、それを必要とする個体に、上記のような本発明のrAAVウイルス粒子の有効量を投与することを含む。本開示は、祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する変異型AAVキャプシドタンパク質を含むrAAVウイルス粒子の生成方法をさらに提供する。

【0117】

標的細胞への遺伝子産物の送達方法

本開示は、個体における標的細胞、例えば、筋細胞またはグリア細胞への遺伝子産物の送達方法を提供し、本方法は、上記に記載するように、本開示のrAAVウイルス粒子を個体に投与することを含む。rAAVウイルス粒子は、標的細胞に進入し、rAAVウイルス粒子に存在する異種ポリヌクレオチドがコードする遺伝子産物を標的細胞中で産生する。いくつかの場合には、本方法は、本開示のrAAVウイルス粒子を、標的細胞の近傍部位に導入し、そこにおいて、rAAVウイルス粒子が標的細胞に進入し、そこにおいて、rAAVウイルス粒子中に存在する異種ポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物を標的細胞内で生成する。

【0118】

遺伝子産物を筋細胞に送達する場合、本発明のrAAVウイルス粒子は、任意の適切な方法、例えば、筋肉内注射などの非経口経路によって送達してもよい。rAAVウイルス粒子を用いた筋肉への遺伝子産物の送達方法は、例えば、Wang et al., 20



14 Expert Opin Drug Deliv. 11:345に記載されており、上記文献は参照として本明細書に組み入れられる。

【0119】

遺伝子産物を脳に送達する場合、本発明のrAAVウイルス粒子の投与のための1つの方法は、例えば、直接注射（必要に応じて注射器の定位的な位置決めによって補助して）などの任意の適切な技術によって近傍部位に付着させることによって、または投与のためにオマヤレザバーの先端を空洞または嚢胞に配置することによって、行うことができる。あるいは、対流増加送達カテーテルを、上記部位に、天然または外科的に形成した嚢胞に、または正常な脳塊に、直接移植してもよい（例えば、参照として本明細書に組み入れられる米国特許出願第20070254842号参照）。そのような対流増加医薬組成物送達器具は、組成物の脳塊全体への拡散を大きく改善する。これらの送達器具のうち、移植したカテーテルは、拡散流ではなく、高流量の微小注入（約0.5～15.0μl/分の範囲の流速による）を利用してrAAVウイルス粒子を脳及び/または腫瘍塊に送達する。このような器具は、米国特許第5,720,720号に記載されており、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

10

【0120】

いくつかの場合には、本発明のrAAVウイルス粒子は、個体の標的組織に導入された場合、rAAVがコードする異種遺伝子産物の、標的組織における高レベルの産生を提供する。例えば、rAAVがコードする異種ポリペプチドを、約1μg～約50μg、または50μgを上回るレベルで、標的組織において産生することができる。

20

【0121】

いくつかの場合には、本発明のrAAVウイルス粒子は、個体の標的組織に導入された場合、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または80%超の標的細胞において、rAAVがコードする異種遺伝子産物の産生を提供する。

【0122】

いくつかの実施形態では、本発明のrAAVウイルス粒子は、個体の標的組織に導入された場合、約2日～約6か月の期間、例えば、約2日間～約7日間、約1週間～約4週間、約1か月間～約2か月間、または約2か月間～約6か月間にわたって、rAAVがコードする異種遺伝子産物の産生を提供する。いくつかの実施形態では、本発明のrAAVウイルス粒子は、個体の標的組織に導入された場合、6か月を上回る期間、例えば約6か月間～20年間以上、または1年を上回る期間、例えば約6か月間～約1年間、約1年間～約2年間、約2年間～約5年間、約5年間～約10年間、約10年間～約15年間、約15年間～約20年間、もしくは20年超にわたって、rAAVがコードする異種遺伝子産物の産生を提供する。

30

【0123】

疾患の治療方法

本開示は、疾患の治療方法を提供し、本方法は、それを必要とする個体に、上記のような本発明のrAAVウイルス粒子の有効量を投与することを含む。本発明のrAAVウイルス粒子は、任意の他の簡便な投与様式または投与経路によって、上記のように病理学的組織への局所注射によって投与することができる。特定の実施形態では、個体は、上記のように、疾患、例えば神経膠腫などの癌、または先天的酵素欠損症もしくは変性疾患などの遺伝性障害を有すると診断された患者である。

40

【0124】

「治療有効量」は、比較的広い範囲に収まり、その範囲は実験及び/または臨床試験によって決定することができる。例えば、インビボ注入、例えば筋肉への直接注射の場合、治療有効量は、約 $10^6$ ～約 $10^{15}$ オーダーのrAAVウイルス粒子、例えば、約 $10^8$ ～ $10^{12}$ のrAAVウイルス粒子である。例えば、インビボ注入、例えば、筋肉への直接注射の場合、治療有効量は、約 $10^6$ ～約 $10^{15}$ オーダーの感染単位、例えば約1

50

$10^8 \sim 10^{12}$  の感染単位である。他の有効薬量は、用量反応曲線を確認する慣例的な試験を通して、当業者であれば容易に確立することができる。

【0125】

いくつかの場合では、本発明の rAAV ウイルス粒子の治療有効量とは、1 回または複数回の投与で個体に投与する（例えば、個体の筋肉内注射によって投与する）場合の、個体の筋肉変性の進行を遅らせるのに有効な量である。例えば、本発明の rAAV ウイルス粒子の治療有効量は、1 回または複数回の投与で個体に投与する（例えば、個体に筋肉内注射によって投与する）場合の、rAAV ウイルス粒子による治療の非存在下での筋肉変性の進行に比べて、筋変性の進行を少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、または 80 % 超、遅延させるのに有効な量とすることができる。

10

【0126】

いくつかの場合では、本発明の rAAV ウイルス粒子の治療有効量とは、1 回または複数回の投与で個体に投与する場合の、個体の罹患組織の機能を改善するのに有効な量である。例えば、本発明の rAAV ウイルス粒子の治療有効量は、1 回または複数回の投与で個体に投与する（例えば、筋肉内注射によって投与する）場合の、rAAV ウイルス粒子による治療の非存在下での個体の筋肉機能に比べて、筋肉機能を少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、または 80 % 超、改善するのに有効な量とすることができる。

20

【0127】

いくつかの場合では、本発明の rAAV ウイルス粒子の治療有効量は、1 回または複数回の投与で個体に投与する（例えば、筋肉内注射によって投与する）場合の、罹患した筋肉における筋力低下の速度を減少させるのに有効な量である。

【0128】

変異型 AAV キャプシドタンパク質を有する rAAV ウイルス粒子の生成方法

変異型 AAV キャプシドタンパク質、例えば、祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する AAV キャプシドタンパク質を含有する rAAV ウイルス粒子を、複数ラウンドの選択を通して生成する方法も本明細書で提供する。特定の実施形態では、本方法は、複数の rAAV ウイルス粒子、例えば rAAV ウイルス粒子のライブラリを、標的細胞における第 1 選択ラウンドに供することを含み、ここで、初期ライブラリ中の rAAV ウイルス粒子は、それぞれ、AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列を有する初期 AAV キャプシドタンパク質を含有し、かつ AAV キャプシドタンパク質のアミノ酸配列は、祖先型 AAV キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の 1 つまたは複数の可変残基が互いに異なる祖先型 AAV キャプシドタンパク質のアミノ酸配列を含有し、それにより、変異型 AAV キャプシドタンパク質を有する rAAV ウイルス粒子を生成する。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列は、祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する。このような場合、祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列は、本明細書に記載するように、複数のオーソログ野生型 AAV キャプシドタンパク質配列から推定する。したがって、いくつかの実施形態では、rAAV ウイルス粒子のライブラリは、祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列において可変残基、すなわち、特定のアミノ酸に対して、信頼性の閾値レベルを超えて推定することができない残基を設定することによって得られる複数の AAV キャプシドタンパク質配列のうちの 1 つをそれぞれが表す AAV キャプシドタンパク質の多様な集団を含む。

40

【0130】

任意の適切な方法を使用して、複数のオーソログ野生型 AAV キャプシドタンパク質配列から祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列を推定してもよい。一般的に言えば、複数のオーソログな現存するアミノ酸配列に基づいて祖先型アミノ酸配列を再構成

50

することは、祖先型アミノ酸配列の統計的再構成を含む場合があり、祖先型アミノ酸配列の各残基は、現存するアミノ酸配列に基づくアミノ酸の信頼値に関連する。参照として本明細書に組み入れられる Westesson et al., *Bioinformatics* 2012 28:1170 に記載されているように、統計的再構成には、配列アライメントのマルコフ連鎖モンテカルロサンプリング、系統樹と進化モデルパラメータ、及び既知配列を与えたそれらの事後確率分布の推定が含まれる。

#### 【0131】

通常、1つまたは複数の残基のアミノ酸同一性を信頼度の閾値を超えて決定することがないため、全長の祖先型配列が再構築されることはない。これらの残基を、祖先型配列中の多型部位として表してもよい。したがって、祖先型ライブラリは、各多型部位での残基のアミノ酸同一性が分子間で可変であってもよい複数のポリペプチドを含むが、ライブラリ全体にわたっては、統計的再構成に基づいて予測する確率によって表すアミノ酸の分布に対応する。特定の実施形態では、ライブラリ全体にわたっての各多型部位における残基のアミノ酸同一性は、統計的再構成によって予測する確率によって定義する2つまたは3つのアミノ酸の分布に適合する。特定の例において、推定した可変性の祖先型アミノ酸配列を含む祖先型ライブラリは、本明細書に記載の統計的再構成法に基づいて自動的に（すなわち手動選択なしで）設計してもよい。そのような場合、祖先型ライブラリ中のアミノ酸配列の任意の多型残基におけるアミノ酸の分布は、統計的再構成によって予測する確率を反映するように設計する。

#### 【0132】

したがって、祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を、複数のオーソログ野生型AAVキャプシドタンパク質配列から推定する方法は、複数の野生型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列の系統樹を再構築し、系統樹のノードを選択し、そしてその系統における最も有望なアミノ酸配列を決定することによって達成される。いくつかの場合では、系統樹の各ノードにおける信頼値は、適切な方法、例えばベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションを用いて推定する。各ノードにおける信頼値は、祖先型配列を推定するための系統樹の特定のノードを選択する決定を情報化し得る。系統樹の特定のノードを選択すると、ノードに属する野生型配列を、例えば上述のようにマルコフ連鎖モンテカルロアラインメント法によってアライメントすることによって、祖先型配列を推定してもよい。いくつかの例では、最も有望な祖先型キャプシドタンパク質アミノ酸配列は、所定の閾値よりも高い信頼レベルで特定のアミノ酸に割り当てられていない多型残基を含み得る。祖先型AAVライブラリ中の祖先型キャプシドタンパク質アミノ酸配列のこれらの多型残基のいずれかにおけるアミノ酸の分布は、上記のように野生型AAVキャプシドタンパク質配列に基づく統計的再構成によって予測する確率を反映するように設計してもよい。

#### 【0133】

祖先型配列を推定するための他の方法は、例えば、Stackhouse, J, Presnell, SR, McGeehan, GM, Nambiar, KP, and Bener, SA (1990). The ribonuclease from an extinct bovid ruminant. *FEBS letters* 262:104-106; Gaucher, EA, Govindarajan, S, and Ganesh, OK (2008). *Nature* 451:704-707; Ortlund, EA, Bridgham, JT, Redinbo, MR, and Thornton, JW (2007). *Science* 317:1544-1548; Ugalde, JA, Chang, BS, and Matz, MV (2004). Evolution of coral pigments recreated. *Science* 305:1433; Alcolombri, U, Elias, M, and Tawfik, DS (2011). Directed evolution of sulfotransferases and paraoxonases by ancestral libraries. *Journal of molecular biology* 41

1 : 837 - 853 ; K o t h e , D L , L i , Y , D e c k e r , J M , B i b o l l e t - R u c h e , F , Z a m m i t , K P , S a l a z a r , M G , e t a l . ( 2006 ) . V i r o l o g y 352 : 438 - 449 ; D u c a t e z , M F , B a h l , J , G r i f f i n , Y , S t i g g e r - R o s s e r , E , F r a n k s , J , B a r m a n , S , e t a l . ( 2011 ) . P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f t h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a 108 : 349 - 354 ; R o l l a n d , M , J e n s e n , M A , N i c k l e , D C , Y a n , J , L e a r n , G H , H e a t h , L , e t a l . ( 2007 ) . J o u r n a l o f v i r o l o g y 81 : 8507 - 8514 ; G u l l b e r g , M , T o l f , C , J o n s s o n , N , M u l d e r s , M N , S a v o l a i n e n - K o p r a , C , H o v i , T , e t a l . ( 2010 ) . J o u r n a l o f v i r o l o g y 84 : 9695 - 9708 に記載されており、上記文献は参照として本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、初期の、例えば祖先型のAAVキャプシドタンパク質は、配列番号7に記載の配列に対し、少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0135】

ライブラリの個々のrAAVウイルス粒子が互いに競合して宿主細胞に感染及び複製する場合、選択を達成し得る。理論にとらわれるものではないが、rAAVライブラリに存在する最初の、例えば祖先型のAAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列のいくつかの変異体は、ウイルス粒子に対して異なる感染性を付与し、したがってより高い感染性を付与する変異型AAVキャプシドタンパク質を有するウイルス粒子が、他のすべての変異型AAVキャプシドタンパク質よりもより豊富になる傾向がある。特定の場合には、選択は、例えば複数の細胞型に対して概して高い感染性をウイルス粒子に付与する変異型AAVキャプシドタンパク質を含有するrAAV変異体のライブラリを生成するか、または他の場合には、選択は、1つまたはいくつかの特定の細胞型、例えば、筋細胞及び/またはグリア/神経膠芽腫細胞に対して高い感染性を有するウイルス粒子を含有するrAAV変異体ライブラリを生成する。

20

30

#### 【0136】

いくつかの例では、rAAVウイルス粒子の第2のライブラリは、ライブラリ中の変異型AAVキャプシドタンパク質の集団全体にわたる祖先型AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列の1つまたは複数の可変残基において、初期AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を含有するrAAVウイルス粒子の初期ライブラリとは異なるアミノ酸分布を有する。いくつかの場合には、rAAVウイルス粒子の第2のライブラリは、ライブラリ中の変異型AAVキャプシドタンパク質の集団全体にわたる配列番号7の残基264位、266位、268位、448位、459位、460位、470位、471位、474位、495位、516位、533位、547位、551位、555位、557位、561位、563位、577位、583位、593位、596位、661位、662位、664位、665位、710位、717位、718位、719位及び723位の1つまたは複数において、初期AAVキャプシドタンパク質アミノ酸配列を含有するrAAVウイルス粒子の初期ライブラリとは異なるアミノ酸分布を有する。

40

#### 【0137】

概して、上記の供する段階は、標的細胞に複数のrAAVウイルス粒子を感染させること、感染細胞にヘルパーウイルスを重感染させること、及び重感染した細胞から放出されたrAAVウイルス粒子を回収することを含み得る。感染させる、重感染させる、及び標的細胞からrAAVウイルス粒子を回収する方法は、上記で、宿主細胞内でのrAAVウイルス粒子の生成について記載した通りである。

#### 【0138】

50

選択の厳密性は、任意の適切な方法によって制御してもよい。特定の実施形態では、選択の厳密性は、標的細胞に r A A V ウイルス粒子を感染させる場合に使用する感染多重度 ( M O I ) と相関する。一般的に、 M O I は、標的細胞にウイルス粒子を感染させる際に存在する標的細胞の数に対するウイルス粒子の数の比である。感染多重度が高いほど、選択の厳密性は低くなり、逆もまた同様である。

#### 【 0 1 3 9 】

特定の実施形態では、上記の選択方法に従って生成した r A A V 変異体を、第 2 選択ラウンドに供する。第 2 選択ラウンドは、いくつかの例では、第 1 選択ラウンドと同じかまたはより高い厳密性を有し得る。例えば、第 1 選択ラウンドの M O I が 5 , 0 0 0 である場合、第 2 選択ラウンドは、より高い厳密性の M O I 5 0 0 などを有し得る。このようにして、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子の第三のライブラリを生成する。いくつかの例では、第 2 選択ラウンドの後に生成する r A A V ウイルス粒子の第三のライブラリは、ライブラリ中の変異型 A A V キャプシドタンパク質の集団全体にわたる祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列の 1 つまたは複数の可変残基において、r A A V ウイルス粒子の初期または第 2 のライブラリとは異なるアミノ酸分布を有する。特定の実施形態では、第 2 選択ラウンドの後に生成する r A A V ウイルス粒子の第三のライブラリは、ライブラリ中の変異型 A A V キャプシドタンパク質の集団全体にわたる配列番号 7 の残基 2 6 4 位、2 6 6 位、2 6 8 位、4 4 8 位、4 5 9 位、4 6 0 位、4 7 0 位、4 7 1 位、4 7 4 位、4 9 5 位、5 1 6 位、5 3 3 位、5 4 7 位、5 5 1 位、5 5 5 位、5 5 7 位、5 6 1 位、5 6 3 位、5 7 7 位、5 8 3 位、5 9 3 位、5 9 6 位、6 6 1 位、6 6 2 位、6 6 4 位、6 6 5 位、7 1 0 位、7 1 7 位、7 1 8 位、7 1 9 位及び 7 2 3 位の 1 つまたは複数において、r A A V ウイルス粒子の初期または第 2 のライブラリとは異なるアミノ酸分布を有する。

#### 【 0 1 4 0 】

特定の実施形態では、複数の選択ラウンド、例えば 2 回以上、3 回以上、4 回以上、5 回以上、6 回以上、7 回以上、8 回以上、または 1 0 回以上の選択ラウンドを逐次的に実行して r A A V 変異体を生成する。特定の実施形態では、複数の選択ラウンドを、同じ標的細胞型で実施する。特定の場合には、複数の選択ラウンドは、概して高い感染性、すなわち、複数の細胞型に対してバックグラウンドを超える感染性を r A A V ウイルス粒子に付与する変異型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V 変異体を生成するか、または他の場合には、複数の選択ラウンドは、野生型 A A V キャプシドタンパク質を有する A A V ウイルス粒子に比べて、1 つまたはいくつかの特定の細胞型、例えば、筋細胞及び / またはグリア / 神経膠芽腫細胞に対してより高い感染性を r A A V ウイルス粒子に付与する変異型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V 変異体を生成する。

#### 【 0 1 4 1 】

有用性

上記のように、変異型 A A V キャプシドタンパク質を含む本発明の r A A V ウイルス粒子は、標的細胞内での異種遺伝子産物の発現が所望される多くの応用に用いられる。特定の実施形態では、変異型 A A V キャプシドタンパク質が、特定の細胞型に対するより高い感染性を r A A V ウイルス粒子に付与する場合、すなわち標的細胞型に対する指向性を付与する場合、r A A V ウイルス粒子を使用して、治療を必要とする患者の標的細胞を含む組織の内部または外部で、治療用遺伝子産物を発現させることができる。例えば、本発明の r A A V ウイルス粒子は、筋細胞への指向性を付与する A A V キャプシドタンパク質と、患者の遺伝的欠損を治療するための遺伝子産物とを含み得る。特定の実施形態では、遺伝的欠損は、L P L、第 I X 因子、<sub>1</sub> アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド 1、インスリン様増殖因子 1、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシルトランスフェラーゼ、フクチン、L A R G E、O 結合型マンノース 1 , 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ及びイソプレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質などのコード配列または調節配列における有害な突然変異を含む。特定の例では、

患者は、上記のように、酵素及び他のタンパク質の機能的発現の欠如によって引き起こされる先天的病態と診断される。したがって、特定の例では、本発明の r A A V ウイルス粒子を、筋ジストロフィー、高トリグリセリド血症、血友病 B、遺伝性気腫、家族性肥大型心筋症、嚢胞性線維症、早期発症網膜変性症、筋萎縮性側索硬化症、レーバー先天黒内障、カナパン病、遅発型小児性神経セロイドリポフスチン沈着症などと診断された患者に投与する。

#### 【 0 1 4 2 】

特定の実施形態では、r A A V ウイルス粒子を、遺伝子突然変異によって生じるか、または悪化する病態と診断された患者に投与してもよい。いくつかの例では、この病態は、腫瘍に関連する遺伝子突然変異によって生じるか、または悪化する。いくつかの例では、腫瘍は神経膠腫、悪性黒色腫、前立腺癌などである。特定の実施形態では、r A A V ウイルス粒子を、遺伝的突然変異によって生じるかまたは悪化する神経学的障害（例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかんなど）と診断された患者に投与してもよい。遺伝子治療のための A A V ウイルス粒子の例示的な使用は、例えば参照として本明細書に組み入れられる Santos Coura et al., 2007 Virol J. 4 : 99 に記載されている。

10

#### 【 0 1 4 3 】

特定の実施形態では、患者の病理学的細胞への指向性を付与する A A V キャプシドタンパク質と、患者を治療するための核酸遺伝子産物またはゲノム編集遺伝子産物とを含有する本発明の r A A V ウイルス粒子を投与して、先天性疾患と診断された患者を治療する。いくつかの実施形態では、先天性疾患は、例えば、患者のゲノム中の突然変異遺伝子から発現した欠陥タンパク質によってもたらされるドミナントネガティブ効果によって生じる優性遺伝性障害であり得る。特定の実施形態では、突然変異した遺伝子がコードする m R N A を標的とする核酸遺伝子産物（例えば、干渉 R N A ）によって、欠陥タンパク質の発現を低減または阻害する。いくつかの実施形態では、ゲノム編集遺伝子産物、例えば Z F N 剤、T A L E N、または C a s 9 / g R N A システムを構成して、患者のゲノム中の突然変異遺伝子を標的とし、優性遺伝性疾患を引き起こす遺伝子座の対立遺伝子特異的ノックダウンを達成する。特定の実施形態では、患者は、ハンチントン病、マルファン症候群などを有すると診断される。

20

#### 【 0 1 4 4 】

本開示の r A A V ウイルス粒子及び方法はまた、意図する目的にとって望ましいものとなる、野生型 A A V キャプシドタンパク質に比べてより高い感染性、指向性及び/または変化した宿主細胞受容体依存性を付与する変異型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子を、選択を介して生成するのに使用する。特定の実施形態では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質配列を出発点として使用し、非許容性細胞型、すなわち、野生型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子による感染に対して抵抗性の細胞型に対して高い感染性及び指向性を付与する変異型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子を生成してもよい。特定の実施形態では、非許容性細胞型は、神経膠芽腫細胞、ヒト巨核球性白血病細胞などである。

30

#### 【 0 1 4 5 】

キット

本明細書において、本発明の r A A V ウイルス粒子または r A A V ウイルス粒子のライブラリを含み、開示する方法の実施において使用するキットも提供する。特定の実施形態では、キットは、上記のように、変異型 A A V キャプシドタンパク質と、遺伝子産物をコードする異種核酸とを含有する感染性 r A A V ウイルス粒子を含む。いくつかの場合では、遺伝子産物は、治療用遺伝子産物であってもよい。いくつかの実施形態では、キットはまた、感染性 r A A V ウイルス粒子を保持する容器と同一のまたは別個の容器中に、薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含有する場合がある。

40

#### 【 0 1 4 6 】

特定の実施形態では、キットは、感染性 r A A V ウイルス粒子のライブラリを含有し、

50

ライブラリは、祖先型 A A V キャプシドタンパク質アミノ酸配列に由来する複数の A A V キャプシドタンパク質を含有する。特定の場合では、祖先型 A A V キャプシドタンパク質は、野生型 A A V キャプシドタンパク質を含有する r A A V ウイルス粒子に比べて高い熱安定性及び/または感染の無差別性を r A A V ウイルス粒子に付与する。特定の実施形態では、キットはヘルパーウイルスをさらに含有する。特定の実施形態では、キットは、r A A V ウイルス粒子の複製のために、r A A V ウイルス粒子に感染した宿主細胞内で必要とされる遺伝子を含有する 1 つまたは複数のプラスミドを含有する。

#### 【 0 1 4 7 】

本発明のキットの成分は、別々の容器に入れることができるか；または単一の容器内で組み合わせることができる。

10

#### 【 0 1 4 8 】

上記の成分に加えて、本発明のキットは、キットの成分を使用するための、及び本発明の方法を実施するための指示書をさらに含むことができる。本発明の方法を実施するための指示書は、通常、適切な記録媒体に記録される。例えば、指示書は、紙またはプラスチックなどの基材上に印刷してもよい。したがって、指示書は、キットの容器またはその構成要素（すなわち、パッケージまたはサブパッケージに関連する）のラベルに存在する。他の実施形態では、指示書は、例えば C D - R O M、フレキシブルディスク、フラッシュドライブなどの適切なコンピュータ可読記憶媒体上に存在する電子記憶データファイルとして存在する。さらに他の実施形態では、実際の指示書はキットには存在しないが、例えばインターネットを介したりリモートソースから指示書を得るための手段を提供する。この実施形態の一例は、指示書を閲覧することができ、及び/または指示書をダウンロードできるウェブアドレスを含むキットである。指示書と同じく、指示書を得るためのこの手段は、適切な基材上に記録される。

20

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 4 9 】

以下の実施例は、本発明を製造及び使用する方法の完全な開示及び説明を当業者に提供するために提示するものであり、発明者らが自らの発明とみなす範囲を限定することを意図するものではなく、以下の実験が、実施する実験のすべてまたは唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。使用する数値（例えば、量、温度など）に関して正確さを保つための努力がなされているが、ある程度の実験誤差及び偏差を考慮すべきである。他に指定のない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧またはそれに近い圧力である。標準的な略語、例えば、b p、塩基対；k b、キロベース；p l、ピコリットル；s または s e c、秒；m i n、分；h または h r、時間；a a、アミノ酸；k b、キロベース；b p、塩基対；n t、ヌクレオチド；i . m .、筋肉内（に）；i . p .、腹腔内（に）；s . c .、皮下（に）などを使用する場合がある。

30

#### 【 0 1 5 0 】

実施例 1：A A V 祖先型再構成ライブラリは、広範な感染性を有するウイルス変異体の選択を可能にする

方法

40

祖先型の再構成

ヒト及び非ヒト霊長類起源に由来するものを含む、G e n b a n k から取得したアデノ随伴ウイルス（A A V）c a p 配列（n = 5 2）を、以前の系統発生分析で公開された A A V 配列のリストから出発して本分析に組み入れた。M r B a y e s パッケージを使用して、系統樹空間のベイズアンマルコフ連鎖モンテカルロ（M C M C）シミュレーションを実行し、各内部ノードの信頼度を推定した。次に、マルコフ連鎖モンテカルロアライメントサンプラー H a n d A l i g n を用いてアライメント空間を探索し、ノード 2 7 での最も可能性の高いアライメントについての領域信頼度を推定し、このノードより低い配列を除くすべてを破棄した。H a n d A l i g n は、列内にグループ化した残基が共通の祖先を共有するように、異なる変異体の配列をアライメント「列」に配置する多重配列アライ

50

メントを生成する。各アラインメント列は、アライメントしたタンパク質コード配列のデータベースから推定したアミノ酸及び経験的コドン置換速度行列を用いて、特徴進化の標準系統樹連続時間マルコフ過程の実装としてモデル化した。HandAlignはアラインメントと同時に再構成を行い、配列の挿入、削除、及び文字の置換を考慮する。コドンレベルモデルを用いて、DNAレベルでの表現型を有する同義置換の可能性を考慮し；コドンレベルで両方の祖先型リーディングフレームを再構成することによって、重複リーディングフレーム（「オーバープリント」遺伝子）の二重選択の可能性もチェックした。これらの微妙な影響のいずれも、同義の（サイレントな、DNAレベルの）変異体を、多くの非同義のアミノ酸変異体に優先させるのに十分なほど有意ではないようであった。JalViewプログラムを使用して、組み立て後のキャプシド構造にマッピングした変異体のアミノ酸位置を視覚化した。

10

#### 【0151】

##### ライブラリ構築とベクターのパッケージング

再構成した祖先型AAV cap配列を、 $5.6 \times 10^{11}$ のライブラリサイズで合成し（GeneArt、Life Technologies）、HindIII及びNotIで消化し、複製可能型AAVパッケージングプラスミドpSub2にライゲーションした。得られたライゲーション反応物をプラスミド産生及び精製のために大腸菌（E. coli）に電気穿孔した。次いで、上記のように、複製可能型AAVをパッケージングし、ヨードキサンール密度勾配遠心分離によって精製した。Biorad iCycler（Bio-Rad、ハーキュレーズ、カリフォルニア）及びTaqmanプロブ（Biosearch Technologies、ノバート、カリフォルニア）を用いて定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を介してDNase耐性ゲノム力価を得た。

20

#### 【0152】

##### 細胞培養

C2C12マウス筋芽細胞、B16-F10皮膚メラノーマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1、pgsA、Pro5、Lec1、及びLec2細胞は、カリフォルニア大学バークレー校の組織培養施設から入手した。IB3-1肺上皮及びヒト胎児由来腎臓293T細胞は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（マナサス、バージニア）から入手した。特に明記しない限り、すべての細胞株をダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Gibco）中、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。L0ヒト神経膠芽腫（GBM）腫瘍幹細胞は、ブレント・レイノルズ博士（フロリダ大学、ゲインズビル）によって提供され、これを上皮増殖因子（EGF、20ng/ml、R&D）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF、10ng/ml、R&D）、及びヘパリン（リン酸緩衝生理食塩水で0.2%希釈、Sigma）を含有する無血清培地（Neurocult NS-A増殖キット、Stem Cell Technologies）を用いてニューロスフェアアッセイ増殖条件下で増殖させた。IB3-1細胞を、DMEM/F-12（1:1）（Invitrogen、カールスバッド、カリフォルニア）中で培養した。CHO-K1及びpgsA細胞をF-12K培地（ATCC）中で培養し、Pro5、Lec1、及びLec2細胞をMEMヌクレオシド（Gibco）中で培養した。GBM培養物以外のすべての培地に10%ウシ胎仔血清（Invitrogen）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Invitrogen）を補充した。

30

40

#### 【0153】

##### ライブラリの選択と進化

すべての細胞株を、 $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で6ウェルの組織培養プレートに播種した。播種の1日後、細胞に複製可能型AAVライブラリを感染させた。曝露から24時間後、細胞にアデノウイルス血清型5（Ad5）を重感染させた。約48時間後、細胞変性効果を観察し、ウイルス粒子を3回の凍結/融解段階により回収し、続いてベンゾナーゼヌクレアーゼ（1ユニット/ml）（Sigma-Aldrich）で37℃、30分間処理した。次いでウイルス溶解物を56℃で30分間インキュベートしてAd5を不

50



活化した。ウイルスゲノム力価を上記のように測定した。cap配列を分析するために、パッケージングならびに3及び6ラウンドの選択後に、AAVウイルスゲノムを抽出し、PCRにより増幅し、UC Berkeley DNA Sequencing Facilityで配列決定した。

#### 【0154】

進化させた祖先型ライブラリにおける可変位置の統計解析

各可変アミノ酸位置における2組の可変アミノ酸の比較を実施して、選択中にそのライブラリの割合が有意に変化した可変位置を同定した。2つの異なる確率分布から得られる2組の可変アミノ酸の事後確率を、まばらな観測カウントを反映するための低い擬似カウントを有するディリクレ分布の確率パラメータを仮定して計算した。合成及び理論ライブラリの比較のために、ディリクレ多項式を介して分布する合成後のアミノ酸頻度を、多項分布するライブラリからの理論的確率と比較した。

#### 【0155】

インビトロ形質導入分析

6ラウンドの進化を介して選択した祖先型ライブラリウイルスゲノムを、pXX2組換えAAVパッケージングプラスミドにクローニングした。天然AAV血清型のパネルに対する組換えAAV(rAAVの)祖先型ライブラリの感染性をベンチマークするために、前述の一過性形質移入法を用いて、自己相補的なサイトメガロウイルス緑色蛍光タンパク質(CMV-GFP)カセットによってベクターをパッケージングした。96ウェルプレートに15,000細胞/ウェルの密度で細胞株(293T、C2C12、IB3-1、B16-F10、CHO-K1、pgsA、Pro5、Lec1、及びLec2)を播種した。播種の1日後、ゲノム感染多重度(MOI)2,000(293T、C2C12、IB3-1、B16-F10、GBM)、10,000(Pro5、Lec1、Lec2)、32,000(C2C12)、または50,000(CHO-K1、pgsA)(n=3)で、rAAVを細胞に感染させた。糖タンパク質の使用を研究する実験のために、前述したように形質導入する前にPro5細胞を、0.05%トリプシン(Gibco)で処理するか、またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で擬似処理し、ゲノムMOI5,000(祖先型AAV、AAV2、AAV6)または15,000(AAV5)で細胞を感染させた。抗体回避特性を分析するために、祖先型rAAVライブラリを熱不活化IVIg(Gammagard)の連続希釈液を用いて37で1時間インキュベートし、次いでゲノムMOI2000(n=3)でHEK293T細胞に感染させるために使用した。熱安定性を特徴付けるために、自己相補的CMV-GFPと共にパッケージングしたウイルス粒子を、2%FBSを補充したDMEMで希釈し、37に冷却する前にサーモサイ클ー(Bio-Rad)中で59.6~78の温度で10分間インキュベートし、1,500~16,000のゲノムMOIで293T細胞に感染させるために使用した。MOIは、分析のために十分な数のGFP陽性細胞を確保するように調整した。すべての研究において、感染の72時間後に、Guava EasyCyte 6HTフローサイトメーター(EMD/Millipore)(UC Berkeley Stem Cell Center、バークレー、カリフォルニア)を用いて、GFP発現細胞の画分を定量した。

#### 【0156】

インビボ動物イメージング及びルシフェラーゼ発現の定量

高力価のrAAV dsCAG-ルシフェラーゼベクターをイオジキサノール勾配により精製し、次いで濃縮し、Amicon Ultra-15遠心フィルターユニット(Millipore)を用いてPBSに交換した。骨格筋の形質導入を研究するために、 $5 \times 10^{10}$ のrAAV-Luc DNase耐性ゲノム粒子を、先に記載したように、7週齢のBALB/c雌マウス(Jackson Laboratories、n=3)の各腓腹筋に30µlの容量で注射した。注射から6週間後、動物を殺処分し、腓腹筋を採取し、凍結させた。ルシフェラーゼ活性を測定し、前述のように全タンパク質に対して正規化した。すべての動物取扱手順は、カリフォルニア大学バークレー校の実験動物飼育室

によって承認を受けており、実験動物飼育に関する国立衛生研究所（NIH）ガイドラインに従って実施した。

【0157】

結果

祖先型AAV配列の再構成

祖先型配列再構成の目標は、現存するDNA配列のセットが与えられれば、それらの配列に関係する系統樹及び配列アライメントを生成し、異なる祖先ノードにおける祖先型変異体の配列を推定することである。現存する変異体（系統樹形成段階に影響を及ぼす）間の進化的関係におけるあいまいさ、ならびに非常に可変性の高い残基（配列のアライメント及び祖先型の再構成段階に影響を及ぼす）での配列の相違性に起因して、正確な配列の再構成は困難である。AAV祖先型再構成の出発点として、Genbank（ $n=52$ ）から取得した選択したヒト、マカク及びアカゲザルAAV cap配列の系統発生を再構成した。系統樹空間のベイジアンマルコフ連鎖モンテカルロ（MCMC）シミュレーションを実行するMrBayesを用いて、各内部ノード（図1a及び2の中括弧で示す）の信頼度を推定した。本アプローチは、現存する配列に関連する系統樹を生成するものであり、それは本質的にAAVの進化的履歴に関する仮説である。この系統樹上の各枝は、配列を多様化させる進化過程を記述し、各内部ノードは、2つのAAV系統が分枝する「分枝」イベントを表す。選択対象の多くの祖先ノードに対して、ノード27を、その高い信頼度（1.00）に基づいて選択し（図1、パネルa）、このことは不確実性（配列全体での系統関係のレベルにおける）の潜在的な原因の一つを最小限に抑え、個々のアミノ酸の進化的履歴のより精細な下流再構成における信頼性を向上させる。このノードは、臨床的有效性（AAV1、Glybera）、生物医学的関心（AAV6）、または中和抗体に対する相対的耐性（AAV7）を有する血清型の祖先型でもある。

【0158】

図1．祖先型AAV配列の再構成。a) ノード27に現存するAAV変異体のサブセットを関連付ける系統樹。括弧内の数字はクレードの事後確率を示す。系統樹のグラフィックはDendroscopeで生成した。b) 一桁の数字で最上部に沿って色付けし、アノテーションした列特異的な信頼度を有するAAV変異体サブセットの多重配列アライメント（hu.31及びhu.32 - 配列番号1；cy.6及びrh.13 - 配列番号2；rh.2、rh.50、hu.67、rh.10、及びrh.55 - 配列番号3；rh.51 - 配列番号4；rh.49 - 配列番号5；cy.4 - 配列番号6）。0.9以上から0.3～0.4までの信頼度の範囲を上に行に示す。c) ノード27、残基451～481について予測した祖先型アミノ酸配列の分布。各アミノ酸の文字の高さは事後確率に比例する。

【0159】

図2．AAV祖先型配列の再構成のための完全な系統樹。中括弧の数字はクレードの事後確率を示す。系統樹のグラフィックはDendroscopeで生成した。

【0160】

次いで、マルコフ連鎖モンテカルロアライメントサンプラーHandAlignを用いて、アライメント空間を探索し、ノード27で最も可能性の高いアライメントの祖先型配列を予測した。HandAlignは、多重配列アライメントを生成し、異なる変異体の配列をアライメント「列」に整列させ、それによって、ある列にグループ分けした残基は共通の祖先を共有する（図1、パネルb）。HandAlignは、アライメントと同時に祖先型の再構成を行い、配列の挿入、削除、及び文字の置換を考慮に入れる。図1cは、予測されるアミノ酸の分布を配列ロゴとして示しており、配列ロゴは事後確率に比例した文字の高さを有する。アミノ酸位置の大部分は、高い信頼度（0.90以上）で予測することができ、したがって、進化中に高度に保存された残基を表す。しかしながら、祖先型の再構成に共通する点として、他の位置は進化的に保存されておらず、したがってより低い確率で予測可能であった。

【0161】

10

20

30

40

50

これらの結果に基づいてDNAライブラリを設計し、信頼値が0.90より高い残基は固定する一方で、この信頼水準より低いが閾値0.08より高い残基は、2つまたは3つの最も有望なアミノ酸を導入して多様化させ、その結果として、所与の位置に各アミノ酸を含むライブラリメンバーの割合は、配列再構成において出現するそのアミノ酸の確率を反映したものとなる。32個の変残基の位置、同一性及び合成頻度を表1に示し、すべての祖先型capアミノ酸配列を図3（配列番号7）に示し、図4の現存する血清型とアライメントした。祖先型capライブラリを合成し（GeneArt、Life Technologies）、このライブラリから61個の配列クローンを分析したところ、可変位置のアミノ酸頻度はライブラリからの理論的確率と有意に異なることが明らかとなり（ $P < 0.001$ 、材料及び方法参照）、このことはライブラリ合成の正確さを強く示すものであった。

10

## 【0162】

図3．祖先型AAV capアミノ酸配列。可変残基は、太字の下線付き文字Xでラベル付けされている。

## 【0163】

図4．祖先型AAV capタンパク質の天然血清型とのアライメント。キャプシドのアミノ酸は、Geneiousプログラム（Biomatters）を用いてアライメントした。着色したアミノ酸は、参照祖先型のcap配列との不一致を表す。祖先型ライブラリの変位置を黒でアノテーションし、文字Xで示す。

## 【0164】

20

（表1）

位置	残基1	頻度 (%)	残基2	頻度 (%)	残基3	頻度 (%)
264	T	55	Q	25	A	20
266	A	63	S	37		
268	S	70	A	30		
448	S	71	A	29		
459	T	69	N	31		
460	R	63	Q	20	K	17
467	A	75	G	25		
470	S	85	A	15		
471	N	60	T	32	S	8
474	A	83	E	16		
495	S	75	T	25		
516	D	91	N	9		
533	D	86	E	14		
547	Q	81	E	11	T	8
551	A	50	K	50		
555	T	54	A	46		
557	E	86	D	14		
561	M	62	L	28	I	10
563	S	80	N	19		
577	E	50	Q	50		
583	S	86	D	8	A	6
593	A	45	Q	39	V	16
596	A	81	T	19		
661	A	71	E	19	T	10
662	V	53	T	26	A	22
664	T	66	S	34		
665	P	64	A	26	Q	10
710	T	87	A	13		
717	N	69	D	31		
718	N	60	S	40		
719	E	79	D	21		
723	S	68	T	32		

## 【 0 1 6 5 】

祖先型 A A V ライブラリの遺伝的選択

32 か所の可変位置でのアミノ酸の初期合成分布を確認した後、A A V の自然進化における効果的なウイルス複製適応度についての重要な因子であるパッケージング及び感染性に対する選択圧にさらした場合に、これらの位置がどのように変化するかということについて分析した。祖先型ライブラリを A A V パッケージングプラスミドにクローニングし、前述のようにヒト胎児由来腎臓 293 T 細胞に形質移入することによって、ウイルス粒子を産生した。ウイルスゲノム力価は、現存する A A V 血清型に基づいてライブラリをパッケージングする場合に得られたレベルに匹敵し、祖先型ライブラリが強力なパッケージング力価を支持し得ることを示した。可変位置でのアミノ酸分布は、1 ラウンドのパッケージングではわずかに変化するのみであったが (図 5)、感染性に対するさらなる選択圧によって、各可変位置の重要性がより鮮明になり得ると考えられた。異なる組織を代表する 5 つの細胞株：C 2 C 1 2 マウス筋芽細胞、I B 3 - 1 肺上皮細胞、B 1 6 - F 1 0 皮膚黒色腫細胞、ヒト胎児由来腎臓 293 T 細胞、及び L 0 ヒト神経膠芽腫 (G B M) 腫瘍幹細胞を選び出し、選択ラウンドを開始した。簡潔に述べると、イオジキサノールで精製し

10

20

30

40

50

た複製可能型 A A V ライブラリを、 $1 \times 10^5$  個の細胞に初期ゲノム感染多重度 (M O I)  $10^4$  で感染させた。2 日後、アデノウイルスタイプ 5 で重感染させることにより、有効なウイルス粒子を回収した。各細胞株について 6 ラウンドの選択を実施し、ゲノム M O I を減少させることによって、その後のラウンド中における選択の厳密性を増加させた (表 2)。

#### 【 0 1 6 6 】

図 5 . 6 ラウンドの選択後の可変位置における優勢アミノ酸。異なるライブラリの各位置で最も一般的なアミノ酸の頻度に基づいて、ヒートマップを生成した。個々のクローン  $n = 61$  (合成ライブラリ)、 $n = 23$  (パッケージング後)、及び  $n = 14$  (各細胞株での選択後の祖先型ライブラリ) からの配列決定結果に基づいて、各位置での優勢アミノ酸及び頻度を決定した。

#### 【 0 1 6 7 】

(表 2) 祖先型 A A V ライブラリ選択に適用した選択の厳密性

選択ラウンド	ゲノム感染多重度
1	5,000
2	500
3	250
4	250
5	50
6	25

#### 【 0 1 6 8 】

各可変位置での選択の進行を評価するために、初期ウイルスパッケージング後 (以後、パッケージング後と呼ぶ)、3 ラウンドの選択後、及び 6 ラウンドの選択後に各ライブラリからクローンを配列決定した ( $n = 14$ )。この分析は、異なる細胞株にわたる各可変位置についての成果の範囲を明らかにした。図 6 は、A A V 1 (構造が解明された最も相同な血清型) の結晶構造上にマッピングした可変アミノ酸の位置を示し、図 5 及び 7 は、6 または 3 ラウンドの選択後の、選択した各プールについての優勢アミノ酸を示す。予想通り、細胞株の感染性に関する選択は収束の増加をもたらし、図 8 及び 9 は、パッケージング後に対する、ラウンド 6 及び 3 におけるアミノ酸頻度の変化率をそれぞれ示す。いくつかのアミノ酸位置は、すべての細胞株にわたって、同一の残基への完全な収束へと近づく (268 位、460 位、474 位、516 位、547 位、583 位、665 位、710 位、717 位、719 位) ; これらの位置はキャプシド全体に分布しており、例えば、キャプシドの安定性、非コーティング、またはエンドソーム脱出などのコアウイルス機能にとって重要な場合がある。他のものは、異なる細胞株にわたってより多様な成果を示し (264 位、467 位、593 位、664 位、723 位)、全体の適応度に関して中立的な場合がある。最後に、いくつかの位置 (459 位、470 位、471 位、533 位、555 位、596 位、662 位、718 位) は、所与の細胞株に特異的な同一性を獲得し、それぞれの細胞株に感染性に関する利点を与え得る。これらの特定の残基の大部分は、キャプシドの表面上に露出しており、したがって、例えば、キャプシドと細胞表面受容体との相互作用の親和性を変化させる際に、役割を果たす可能性がある。

#### 【 0 1 6 9 】

図 6 . 相同 A A V 1、すなわち利用可能な構造に相対的に最も近い A A V の結晶構造にマッピングした可変残基。A A V 1 キャプシドの 3 次元分子モデルを P y M O L において生成した。祖先型 A A V 配列と A A V 1 とのアミノ酸アライメントを用いて、強調表示した残基を a) 個々の非対称ユニット及び b) 完全な生物学的組立体にマッピングした。

#### 【 0 1 7 0 】

図 7 . 選択の 3 ラウンド後の可変位置における優勢アミノ酸。異なるライブラリの各位置での最も一般的なアミノ酸の頻度に基づいて、ヒートマップを生成した。個々のクローンからの配列決定結果に基づいて、各位置での優勢アミノ酸及び頻度を決定した ( $n = 1$

4)。

#### 【0171】

図8．6ラウンドの選択後の可変位置におけるアミノ酸頻度の変化。各細胞株における6ラウンドの選択後の、パッケージング後ライブラリと進化ライブラリとの間のアミノ酸頻度の増減率を計算した。優勢アミノ酸の同一性が変化しなかった場合、頻度の増減を示す。選択によって、その位置でのアミノ酸同一性が変化した場合、新しいアミノ酸及び頻度を示す。

#### 【0172】

図9．3ラウンドの選択後の可変位置におけるアミノ酸頻度の変化。各細胞株における3ラウンドの選択後の、パッケージング後ライブラリと進化ライブラリとの間のアミノ酸頻度の増減率を計算した。優勢アミノ酸の同一性が変化しなかった場合、頻度の増減を示す。選択によって、その位置でのアミノ酸同一性が変化した場合、新しいアミノ酸及び頻度を示す。

#### 【0173】

遺伝的選択によって与えられたアミノ酸頻度の変化が初期合成分布と統計的に有意に異なるかどうかを決定するために、ベイズ・ディリクレ多項式モデル比較試験（材料及び方法に記載するように）を実施し、2組の可変アミノ酸が異なる分布に由来する事後確率を計算した。この解析は、選択後に有意に異なるいくつかのアミノ酸位置を同定し（ $P < 0.05$ ）、中程度に異なるより多くのアミノ酸位置を同定した（ $P < 0.5$ ）（図10）。

#### 【0174】

図10．ベイズ・ディリクレ多項式モデル比較試験による主要な可変残基の同定。可変アミノ酸の2つのセットの比較を実施し、選択中に有意に変化した位置を同定した。2つの異なる確率分布に由来する2組のアミノ酸の事後確率を、まばらな観測配列を反映するための低い擬似カウントでディリクレ分布する確率パラメータを仮定して計算した。緑色の結果は、 $> 95\%$ の確率でセットが異なる分布に由来し、黄色は $> 50\%$ の確率、赤色は $> 5\%$ の確率、及び無色は $< 5\%$ の確率であることを示す。Synth：合成ライブラリ；PP：パッケージング後；R3：選択の3ラウンド目；R6：選択の6ラウンド目。

#### 【0175】

進化した祖先型ライブラリの形質導入効率

遺伝的選択は、所与の細胞株への特異的感染性をもたらし得るか、または代わりに、感染性を全体的に、しかしすべての細胞型にわたって無差別的な様式で増加させる場合がある。これらの可能性を、進化した祖先型ライブラリの細胞株パネル上の形質導入効率を評価することによって調べた。選択上の利点を与えない潜在的に中立的な位置が存在したため、6ラウンドの選択では、単一の配列への完全な収束をもたらすことはなかった。したがって、個々のクローンをパッケージングするのではなく、最初に、進化したライブラリ全体を組換えウイルスとしてパッケージングし（モザイクキャプシドを最小限にするために産生細胞あたりのAAVヘルパープラスミドの比率を低くして）、結果は、全体的または平均的なライブラリの感染性を示す。形質導入効率及び指向性の比較のために、祖先型ライブラリ及び天然血清型AAV1～6、8及び9について、緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする高力価のイオジキサノール精製組換えAAV（rAAV）を産生した。ゲノムMOI 2,000（またはC2C12の場合は32,000）での感染は、ある範囲の特性を明らかにした（図11）。進化した祖先型ライブラリは、AAV1及びAAV6に最も匹敵し、概してAAV4、AAV5、AAV8及びAAV9より優れた高い形質導入効率を媒介した。祖先型ライブラリは、天然血清型に比べてC2C12及びGBM細胞株に対する感染において特に効果的であった。重要な点として、合成した祖先型ライブラリと進化した祖先型ライブラリとを比較した場合に、感染性の大幅な増加が観察され、このことは可変位置で有効なアミノ酸が遺伝子選択されたことを示唆している。興味深いことに、進化したライブラリは、概して、すべての細胞株にわたる広範な感染性を示し

、このことは祖先型 AAV が無差別的であったことを示唆するものであり、この性質は自然進化適応性にとって有利なものとして知られる特性である。

【0176】

図11．天然 AAV 血清型に対してベンチマークした進化した祖先型ライブラリの形質導入効率。6 ラウンドの進化の後、ウイルスゲノム DNA を祖先型ライブラリから回収し、野生型 AAV 1 ~ 6、8 及び 9 とともに rAAV - scCMV - GFP としてパッケージングした。細胞株は感染多重度 (MOI) 2,000 (293T、IB3、B16-F10、GBM) または 32,000 (C2C12) で感染させた。72 時間後、GFP 発現細胞の画分をフローサイトメトリーで定量した。データを平均 ± SEM、n = 3 として示す。祖先型：祖先型ライブラリ。

10

【0177】

祖先型 AAV グリカン依存性および中和抗体に対する感受性の特徴付け

本発明者らのインビトロ形質導入実験は、再構成した変異体の広範な感染性を実証した。祖先ノード 27 が AAV 1 及び AAV 6 を生じさせたことを考慮して、祖先クローンが同じグリカン依存性を共有しているかどうか、または後に進化したものかどうかを決定した。AAV 1 及び AAV 6 は、2,3 及び 2,6 N 結合型シアル酸の両方をそれらの主要な受容体として利用し、AAV 6 はヘパラン硫酸プロテオグリカンに対して中程度の親和性を有する。ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HPSG) が使用されていることを調べるために、CHO-K1 親細胞及び HPSG を欠損した pgsA CHO 変異株に形質導入した。シアル酸依存性を調べるために、N 結合型シアル酸及び O 結合型シアル酸の両方を有するグリカンを提示する Pro5 CHO 親細胞、すべての N 結合型シアル酸及び O 結合型シアル酸を欠損した Lec2 CHO 変異細胞株、ならびにシアル酸を有する複合型及びハイブリッド型 N - グリカンを欠損した Lec1 株に形質導入した (図12、パネル b)。興味深いことに、祖先型 AAV は、HPSG または N 及び O 結合シアル酸への依存性を示さなかった (図12、パネル a)。さらに、Pro5 細胞のプロテアーゼ処理は、祖先型 AAV 及び対照血清型の両方における形質導入の低下をもたらし、このことは何らかの種類の糖タンパク質が細胞結合に利用されることを示している (図13)。

20

【0178】

図12．祖先型 AAV 変異体のグリカン依存性。a) ゲノム MOI 2,000 (Pro5、Lec1、Lec2) 及び 50,000 (CHO-K1、pgsA) で感染させてから 72 時間後に、フローサイトメトリーによって scCMV - GFP を保有する祖先型 AAV 変異体 C4、C7、及び G4 の形質導入効率を定量した。CHO-K1 / pgsA の比較はヘパラン硫酸プロテオグリカン依存性を調べるものであり、一方、Pro5 / Lec1 及び Pro5 / Lec2 はシアル酸依存性を調べるものである。データは、平均 ± SEM、n = 3 として示す。b) CHO グリコシル化突然変異体上に存在するグリカン。祖先型：祖先型ライブラリ。

30

【0179】

図13．祖先型 AAV 変異体は、細胞へ進入するために糖タンパク質を使用する。Pro5 細胞をトリプシンで処理するか、または PBS で擬似的に処理した後、祖先型 AAV か、または糖タンパク質を利用することが知られている天然の血清型を用いて、形質導入を行った。ゲノム MOI 5,000 (祖先型 AAV、AAV 2、AAV 6) または 15,000 (AAV 5) での感染から 48 時間後にフローサイトメトリーによって GFP 発現を定量した。トリプシン処理した試料と、同一ウイルスを形質導入した各擬似処理試料との間の差異は、すべて統計的に有意であった ( $P < 0.01$ 、両側学生 t 検定)。データは、平均 ± SEM、n = 3 として示す。祖先型：祖先型ライブラリ。

40

【0180】

現存する血清型に対するポリクローナル抗体を含むヒト静脈内免疫グロブリン (IVIg) によって祖先型 AAV が中和されるか否かを試験した。IVIg 存在下でのインビトロインキュベーションは、祖先型ライブラリ及び AAV 1 対照の形質導入を大幅に低下させた (図14)、祖先型がその子孫と血清学的に高度に異なるわけではないことを示した。

50

## 【0181】

図14．インビトロにおいて祖先型AAV変異体はヒト静脈内免疫グロブリン（IVIg）によって中和される。組換えラウンド6の祖先型AAVライブラリ及びAAV1を、自己相補性CMV-GFPカセットと共にパッケージングし、熱不活化IVIgの連続希釈物とともに37℃で1時間インキュベートし、次にHEK293T細胞にゲノムMOI 2,000（ $n=3$ ）で感染させるために使用した。72時間後、GFP発現細胞の画分をフローサイトメトリーで定量した。データは、平均 $\pm$ SEM、 $n=3$ として示す。祖先型：祖先型ライブラリ。

## 【0182】

マウス腓腹筋におけるインビボ祖先型変異体の特徴決定

10

祖先型AAVライブラリが、代表的な組織由来細胞株のパネル上の現存する血清型に匹敵するか、または場合によってはそれよりも高い効率を示すことを見出したことから、インビボでの感染性について調べた。最も非許容性の高い細胞株（C2C12マウス筋芽細胞）に対する祖先型AAVの高い形質導入効率に基づいて、マウス腓腹筋のインビボ形質導入を評価した。C2C12（クローンC4、C7）及び神経膠芽腫細胞（クローンG4）において進化させたライブラリのコンセンサス配列に最も近い選択したウイルスプール（表3）由来の個々の祖先型変異体クローンを、インビトロでC2C12筋芽細胞に形質導入する際のこれらのライブラリの効率に基づいて選択した。筋肉標的指向遺伝子治療におけるその臨床的有効性を考慮して、変異体をAAV1に対してベンチマークした。ハイブリッドCAG（CMV初期エンハンサー/ニワトリアクチン/グロビン遺伝子のスプライスアクセプター）プロモーターの制御下でホタルルシフェラーゼを発現する自己相補性AAVベクターを作製した。BALB/cマウスの各腓腹筋に30 $\mu$ lのDNase耐性ゲノム粒子（ $5 \times 10^{10}$  ウイルスゲノム（vg））を注入し、6週間後にマウスを殺処分し、組織ルシフェラーゼ活性を分析した（図15）。祖先型変異体は、腓腹筋におけるAAV1よりも19～31倍高い導入遺伝子発現をもたらし、変異体C7は最も高い発現をもたらした。興味深いことに、変異体C7は、C2C12細胞において進化した祖先型ライブラリの可変位置における優勢アミノ酸のコンセンサス配列に正確に一致する。これらの結果は、無差別的な祖先型AAVが、インビボにおいても高い感染性を示し、さらには遺伝子治療応用において最良の天然血清型の性能を超える可能性を提供することを示している。

20

30

## 【0183】

図15．腓腹筋の形質導入の評価。成体マウスの祖先型クローンC4、C7、G4、または野生型AAV1の $5 \times 10^{10}$ 個のウイルス粒子を筋肉内投与してから48日後に、腓腹筋組織ホモジネート中で、タンパク質1mgあたりの相対発光量（RLU）を測定することによってルシフェラーゼ活性を測定した。リン酸緩衝生理食塩水を注入した対照は活性を示さなかった。\*：両側スチューデントt検定による統計的差異が $P < 0.05$ 。

## 【0184】

（表3）インビボで評価した祖先型クローン中に存在する32個の可変アミノ酸の同一性



アミノ酸	祖先型AAVクローン		
	C4	C7	G4
264	A	Q	A
266	S	S	S
268	S	S	S
448	A	S	A
459	N	N	T
460	R	R	R
467	G	G	G
470	S	A	S
471	N	N	N
474	A	A	A
495	S	S	T
516	D	D	D
533	D	E	D
547	E	Q	Q
551	A	A	A
555	A	T	A
557	E	D	D
561	L	M	I
563	N	S	N
577	Q	Q	Q
583	S	S	S
593	A	Q	A
596	A	T	T
661	A	A	T
662	T	V	V
664	T	S	S
665	P	P	P
710	T	T	T
717	N	N	N
718	N	S	S
719	E	E	E
723	S	S	T

10

20

30

## 【 0 1 8 5 】

## 実施例 2：祖先型 A A V の熱安定性

高い熱安定性及び突然変異に対する耐性の向上はまた、祖先型ウイルスキャプシドに進化上の利点を与えることができる特性でもある。再構成プールから選択した A A V 変異体の、天然血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 5、及び A A V 6 と比較しての熱安定性を、熱処理後の形質導入効率をアッセイすることによってベンチマークした。具体的には、初期分析のために、C 2 C 1 2 細胞上で選択した祖先型ライブラリ及びこのライブラリの代表的な変異体 C 7 を選択した。自己相補性 C M V - G F P と共にパッケージングしたウイルス粒子を、温度勾配を用いて異なる温度で 1 0 分間処理した後、3 7 に冷却し、2 9 3 T 細胞に感染させた。各温度で処理した後に得られた G F P 発現細胞画分を、3 7 でインキュベートした試料に対して正規化した (図 1 8)。祖先型変異体は、天然の血清型よりも高い熱安定性を示し、天然血清型による形質導入を消失させる最も高い処理温度である 7 8 においても中等度の形質導入レベルを示した。得られる熱安定性は、A A V 5

40

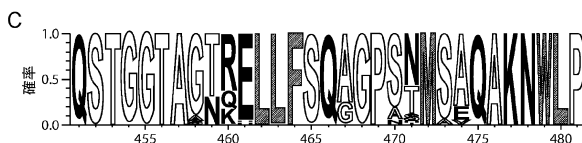
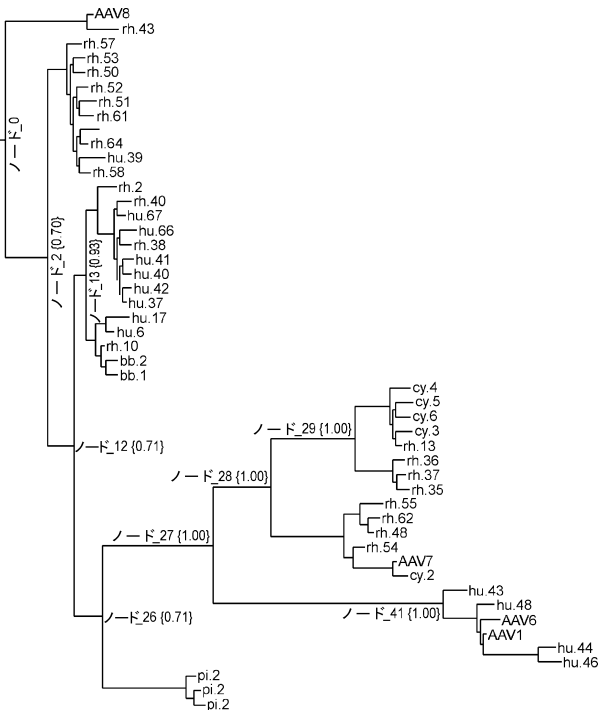
50

**【 0 1 8 6 】**

10

本発明をその特定の実施形態を参照して説明したが、当業者は、本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な変更を行ってもよく、均等物に置換してもよいことを理解すべきである。さらに、特定の状況、材料、組成物、工程、工程段階または段階を本発明の目的、精神及び範囲に適合させるために、多くの改変を行ってもよい。このような改変はすべて、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

【圖 2】



【図 3】

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEP  
VNAADAALAEHDKAYDQQLKAGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEP  
LGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEP  
PAGPSSGLSGGTMAAGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPTYNNH  
LYKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNI  
QVKEVTTNDGVTTIANNLNSTVQVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINN  
GSQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLX  
RTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNFARTGATKYHL  
NGRXSLVNFPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATE  
XVGVAAXNLQSSNTAPXGXVNSQGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFG  
LKHPFPQILIKNTFVPANPPXXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS  
NYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL

【図 4 - 1】

祖先型	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA	90	100	110	120	130	140	150	160	
MAA1	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA									
MAA6	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA									
MAA7	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA									
MAA8	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA									
MAA9	AGDNFYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVPQAKKRVLEPGLIVEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKQQPA									
祖先型	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT	170	180	190	200	210	220	230	240	250
MAA1	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT									
MAA6	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT									
MAA7	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT									
MAA8	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT									
MAA9	KKRLNFSGTQDSSEVPDPQPLGEPFAPPAHMAEHTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTTRWALPT									
祖先型	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN	260	270	280	290	300	310	320	330	
MAA1	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN									
MAA6	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN									
MAA7	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN									
MAA8	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN									
MAA9	YNNHLYQKQISSXSGXTNDNHFGYSTPWGYFDNRFCHCFSPRDWQRLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIAN									

【図 4 - 2】

祖先型	NLTSTVOVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINNNGSAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDV NLTSTVOVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINNNGSAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDV NLTSTVOVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINNNGSAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDV NLTSTVOVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINNNGSAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDV NLTSTVOVPSDSEYQLPVVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQGYLTINNNGSAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNNTFSYTFEDV	340	350	360	370	380	390	400	410	420
祖先型	PPHSSVAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLXRTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNF PPHSSVAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLXRTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNF PPHSSVAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLXRTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNF PPHSSVAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLXRTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNF PPHSSVAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLXRTQSTGGTAGXELLFSQXGFXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNF	510	520	530	540	550	560	570	580	
祖先型	TCATKYHLNGRSLNPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATEXGVVAAXNLQSS TCATKYHLNGRSLNPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATEXGVVAAXNLQSS TCATKYHLNGRSLNPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATEXGVVAAXNLQSS TCATKYHLNGRSLNPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATEXGVVAAXNLQSS TCATKYHLNGRSLNPGVAMATHKDDXRRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXIXNVMTXKEEIKTNTNPVATEXGVVAAXNLQSS	590	600	610	620	630	640	650	660	670
祖先型	NTAATXGQVNSOGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFGXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS NTAATXGQVNSOGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFGXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS NTAATXGQVNSOGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFGXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS NTAATXGQVNSOGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFGXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS NTAATXGQVNSOGALPGMWQRNDVYLGPIWAKIPTHDTGNFHPSPMLGGFGXKXAKFASFITQYSTGQVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTS									

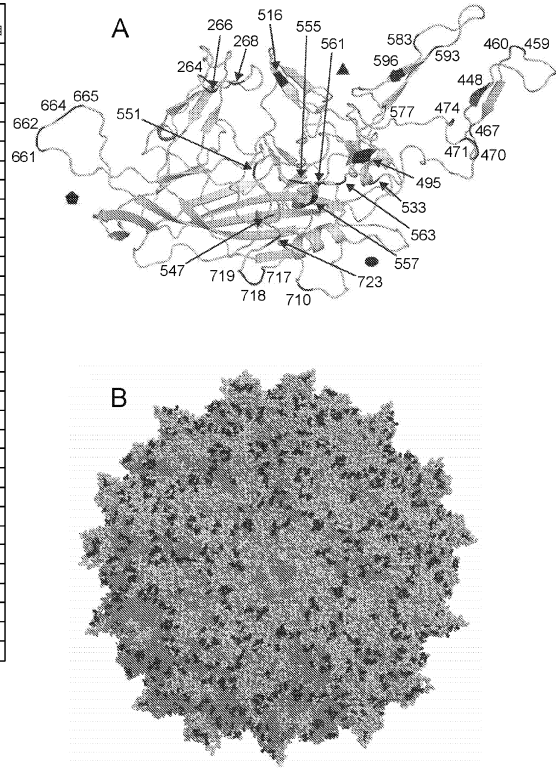
【図 4 - 3】

祖先型	TOYSTGOVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTSYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL TOYSTGOVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTSYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL TOYSTGOVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTSYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL TOYSTGOVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTSYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL TOYSTGOVSVLEIWELOKENSXNWFETQVTSYAKSNVDFAVXXGVYXSPRPIGTIRYLTRNL	680	690	700	710	720	730	738
-----	--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

【図 5】

アミノ酸	理論的分布	合成ライブラリ	パッケージング後	C2C12 6ラウンド目	293T 6ラウンド目	IB3 6ラウンド目	GBM 6ラウンド目	B16 6ラウンド目
264	T, 55%	T, 53%	A, 52%	Q, 86%	A, 79%	A, 71%	A, 79%	Q, 50%
266	A, 63%	A, 54%	S, 57%	S, 100%	S, 86%	S, 100%	S, 86%	A, 56%
268	S, 70%	S, 72%	S, 87%	S, 100%	S, 100%	S, 100%	S, 100%	S, 100%
448	S, 71%	S, 56%	A, 52%	S, 79%	S, 64%	S, 57%	A, 57%	S, 56%
459	T, 69%	T, 79%	T, 61%	N, 100%	T, 100%	T, 100%	T, 100%	T, 88%
460	R, 63%	R, 79%	R, 78%	R, 86%	R, 93%	R, 100%	R, 93%	R, 88%
467	A, 75%	A, 79%	A, 61%	G, 86%	A, 93%	G, 79%	A, 64%	A, 75%
470	S, 85%	S, 96%	S, 87%	A, 79%	S, 77%	S, 93%	S, 79%	S, 94%
471	N, 60%	N, 67%	N, 83%	N, 100%	N, 79%	T, 71%	N, 86%	N, 50%
474	A, 83%	A, 94%	A, 87%	A, 100%	A, 100%	A, 100%	A, 100%	A, 100%
495	S, 75%	S, 89%	S, 87%	S, 100%	S, 67%	S, 100%	S, 50%	S, 81%
516	D, 91%	D, 98%	D, 100%	D, 100%	D, 100%	D, 100%	D, 100%	D, 88%
533	D, 86%	D, 90%	D, 87%	E, 79%	D, 93%	D, 86%	D, 100%	D, 88%
547	Q, 81%	Q, 79%	Q, 83%	Q, 93%	Q, 93%	Q, 100%	Q, 100%	Q, 100%
551	A, 50%	A, 58%	A, 64%	A, 100%	A, 67%	A, 100%	A, 100%	A, 100%
555	T, 54%	T, 52%	T, 59%	T, 79%	A, 60%	A, 57%	A, 71%	A, 56%
557	E, 86%	E, 80%	E, 86%	D, 79%	E, 67%	E, 64%	E, 57%	E, 75%
561	M, 62%	M, 75%	M, 68%	M, 93%	M, 93%	M, 64%	M, 57%	M, 75%
563	S, 80%	S, 65%	S, 73%	S, 79%	S, 87%	N, 86%	S, 50%	S, 69%
577	E, 50%	E, 55%	Q, 59%	Q, 100%	Q, 60%	Q, 100%	Q, 100%	Q, 88%
583	S, 86%	S, 80%	S, 77%	S, 100%	S, 73%	S, 100%	S, 100%	S, 81%
593	A, 45%	Q, 49%	Q, 45%	Q, 79%	A, 60%	V, 86%	A, 71%	Q, 44%
596	A, 81%	A, 69%	A, 68%	T, 93%	A, 80%	T, 64%	T, 79%	T, 56%
661	A, 71%	A, 82%	A, 82%	A, 100%	A, 64%	A, 57%	A, 57%	A, 100%
662	V, 53%	V, 69%	V, 68%	V, 93%	V, 57%	T, 71%	V, 64%	V, 69%
664	T, 66%	T, 87%	T, 82%	S, 71%	S, 50%	T, 93%	T, 86%	T, 88%
665	P, 64%	P, 65%	P, 77%	P, 100%	P, 79%	P, 93%	P, 71%	P, 100%
710	T, 87%	T, 90%	T, 100%	T, 100%	T, 100%	T, 100%	T, 100%	T, 100%
717	N, 69%	N, 81%	N, 77%	N, 100%	N, 100%	N, 79%	N, 79%	N, 100%
718	N, 60%	N, 83%	N, 59%	S, 79%	S, 93%	N, 57%	S, 57%	S, 94%
719	E, 79%	E, 63%	E, 82%	E, 100%	E, 64%	E, 100%	E, 100%	E, 100%
723	S, 68%	S, 79%	S, 77%	S, 100%	T, 57%	S, 86%	T, 71%	S, 81%

【図 6】



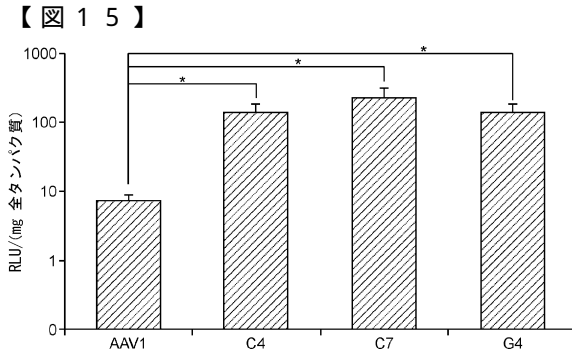
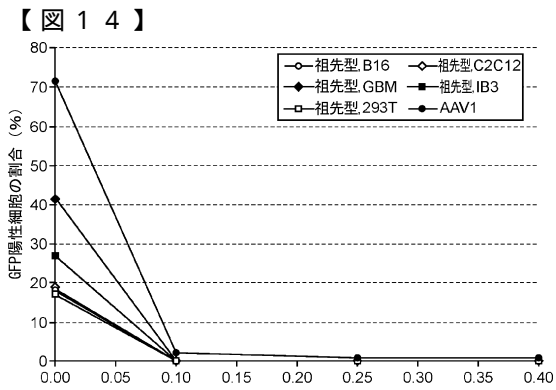
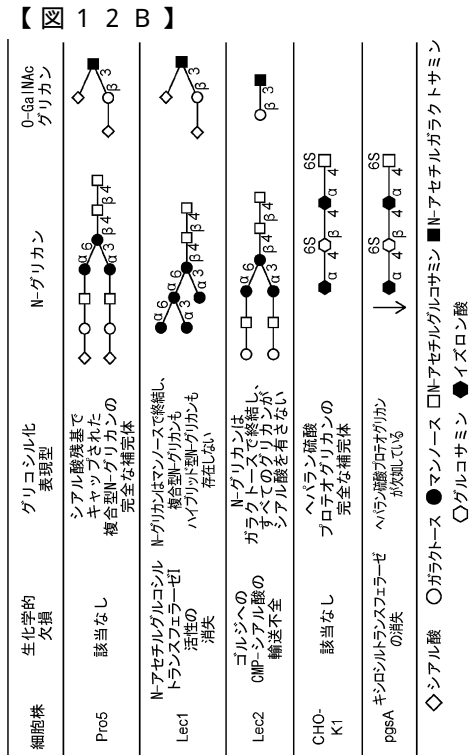
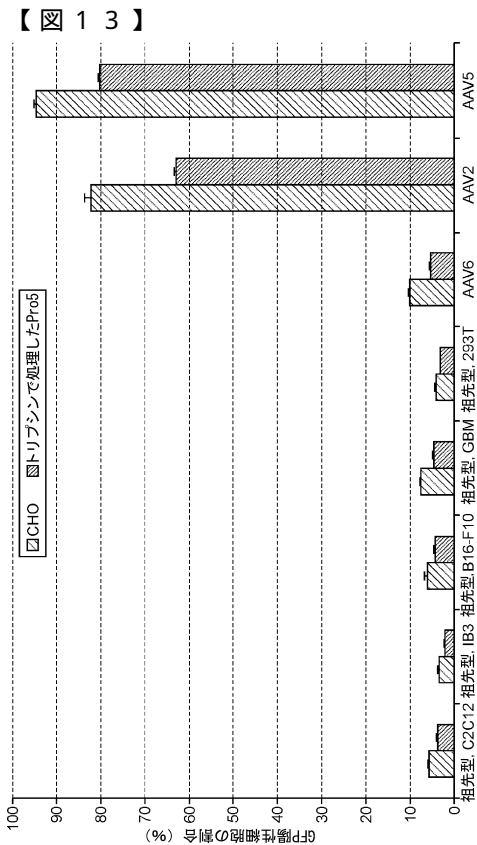
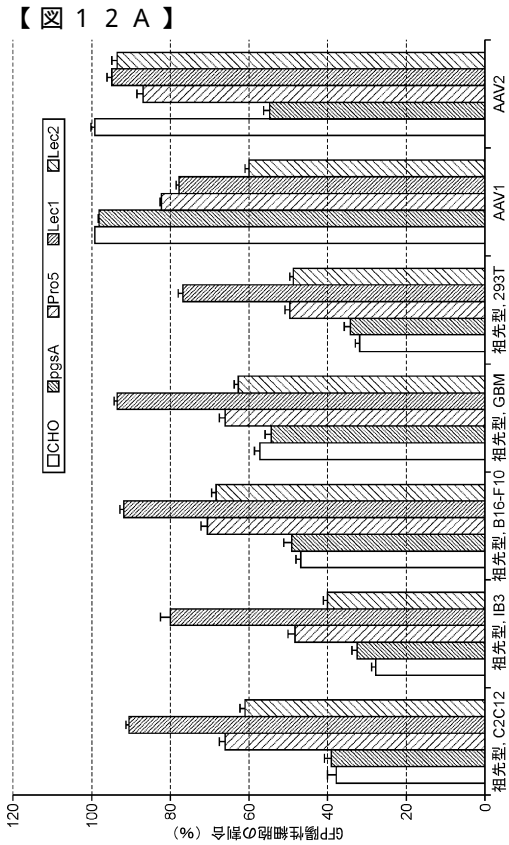
【図 7】

アミノ酸	C2C12 3ラウンド目	293T 3ラウンド目	IB3 3ラウンド目	GBM 3ラウンド目	B16 3ラウンド目
264	Q, 69%	Q, 53%	A, 73%	A, 47%	Q, 50%
266	S, 100%	S, 59%	S, 87%	S, 80%	A, 57%
268	S, 100%	S, 76%	S, 100%	S, 93%	S, 100%
448	S, 56%	S, 50%	A, 53%	A, 67%	A, 71%
459	N, 56%	T, 88%	T, 100%	T, 80%	T, 93%
460	R, 81%	R, 88%	R, 93%	R, 87%	R, 93%
467	A, 69%	A, 53%	A, 67%	A, 73%	A, 79%
470	S, 69%	S, 88%	S, 93%	S, 93%	S, 92%
471	N, 88%	T, 65%	N, 67%	N, 53%	N, 57%
474	A, 100%	A, 100%	A, 93%	A, 100%	A, 86%
495	S, 94%	S, 71%	S, 87%	S, 87%	S, 86%
516	D, 100%	D, 100%	D, 100%	D, 100%	D, 100%
533	D, 50%	D, 94%	D, 80%	D, 100%	D, 86%
547	Q, 100%	Q, 82%	Q, 100%	Q, 93%	Q, 79%
551	A, 75%	A, 82%	A, 87%	A, 80%	A, 93%
555	T, 50%	A, 82%	A, 73%	T, 67%	T, 57%
557	E, 63%	E, 59%	E, 73%	E, 100%	E, 86%
561	M, 94%	M, 82%	M, 100%	M, 73%	M, 57%
563	S, 75%	S, 59%	S, 100%	N, 60%	S, 71%
577	Q, 100%	Q, 88%	Q, 100%	Q, 100%	Q, 86%
583	S, 100%	S, 88%	S, 100%	S, 100%	S, 86%
593	A, 50%	Q, 53%	A, 60%	A, 53%	V, 43%
596	T, 69%	A, 67%	A, 73%	A, 67%	A, 71%
661	A, 69%	A, 53%	A, 67%	A, 80%	A, 86%
662	V, 88%	V, 60%	V, 60%	V, 67%	V, 64%
664	T, 56%	T, 73%	T, 87%	T, 87%	T, 86%
665	P, 88%	P, 73%	P, 73%	P, 73%	P, 71%
710	T, 100%	T, 80%	T, 100%	T, 87%	T, 100%
717	N, 69%	N, 80%	N, 93%	N, 71%	N, 93%
718	N, 50%	N, 47%	S, 67%	N, 60%	S, 71%
719	E, 100%	E, 67%	E, 93%	E, 93%	E, 93%
723	S, 94%	T, 62%	S, 60%	S, 71%	S, 93%

【図 8】

アミノ酸	合成ライブラリ パッケージング後	パッケージング後 C2C12 6ラウンド目	パッケージング後 293T 6ラウンド目	パッケージング後 IB3 6ラウンド目	パッケージング後 GBM 6ラウンド目	パッケージング後 B16 6ラウンド目						
264	T, 53% → A, 52%	A, 52% → Q, 86%	26	A	19	A	26	A	A, 52% → Q, 50%			
266	A, 54% → S, 57%	S, 57% → A, 56%	43	S	29	S	43	S	S, 57% → A, 56%			
268	15	S	13	S	13	S	13	S	13	S		
448	S, 56% → A, 52%	A, 52% → S, 79%	A, 52% → S, 64%	A, 52% → S, 57%	5	A	A, 52% → S, 56%					
459	-18	T	T, 61% → N, 100%	39	T	39	T	39	T	27	T	
460	-1	R	7	R	15	R	22	R	15	R	9	R
467	-18	A	A, 61% → G, 86%	32	A	A, 61% → G, 79%	3	A	14	A	9	A
470	9	S	S, 87% → A, 79%	-10	S	6	S	-8	S	7	S	
471	16	N	17	N	-4	N	N, 83% → T, 71%	3	N	23	N	
474	-7	A	13	A	13	A	13	A	13	A	13	A
495	-2	S	13	S	-20	S	13	S	-37	S	-6	S
516	2	D	0	D	0	D	0	D	0	D	-13	D
533	-3	Q	Q, 87% → E, 79%	6	Q	-1	D	13	Q	1	D	
547	4	Q	10	Q	11	Q	17	Q	17	Q	17	Q
551	6	A	36	A	3	A	36	A	36	A	36	A
555	7	T	19	T	T, 59% → A, 60%	T, 59% → A, 57%	T, 59% → A, 71%	T, 59% → A, 56%				
557	6	E	E, 86% → D, 79%	-20	E	-22	E	-24	E	-11	E	
561	-7	M	25	M	25	M	-4	M	-11	M	7	M
563	8	S	6	S	14	S	S, 73% → N, 86%	-23	S	-4	S	
577	E, 56% → Q, 59%	41	Q	1	Q	41	Q	41	Q	28	Q	
583	-3	S	23	S	-4	S	23	S	23	S	4	S
593	4	Q	33	Q	Q, 45% → A, 60%	Q, 45% → V, 86%	Q, 45% → A, 71%	-2	Q			
596	-1	A	A, 68% → T, 93%	12	A	A, 68% → T, 64%	A, 68% → T, 79%	A, 68% → T, 90%				
661	0	A	18	A	-18	A	-18	A	-24	A	18	A
662	-1	V	25	V	-11	V	V, 68% → T, 71%	-4	V	1	V	
664	5	T	T, 82% → S, 71%	T, 82% → S, 50%	11	T	4	T	6	T		
665	12	P	23	P	1	P	16	P	-6	P	23	P
710	10	T	0	T	0	T	0	T	0	T	0	T
717	4	N	23	N	23	N	1	N	1	N	23	N
718	24	N	N, 59% → S, 79%	N, 59% → S, 90%	-2	N	N, 59% → S, 57%	N, 59% → S, 94%				
719	19	E	18	E	-18	E	18	E	18	E	18	E
723	-2	S	23	S	S, 77% → T, 57%	8	S	S, 77% → T, 71%	-4	S		





## 【図 16】

祖先型AAV変異体のアミノ酸配列

C4

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEFSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPAGPSPGLSGSTMAAGGGA  
PMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSASGSGSTNDNHYFGYSTP  
WGYFDENRFHCHFSFRDWRQLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTINDGVTTIANNLSTVQVFSDEY  
QLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRIMNPLIDQYLYLARTOSTGGTAGNRELLFSQGGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV  
SKTLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDGLVNPQVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKGAGANNNTALENVN  
LTNEEEIKITNFPVATEQYGVVASNLQSSNTAPATGAVNSQALPGMVWQNRDYYLQGPWAKIPHTDGNF  
HPSPLMGFGGLKHPFQILIKNTVPANPPTVTSAPAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEI  
QYTSNYAKSINVDAFVNSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

C7

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEFSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPAGPSPGLSGSTMAAGGGA  
PMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGSGSTNDNHYFGYSTP  
WGYFDENRFHCHFSFRDWRQLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTINDGVTTIANNLSTVQVFSDEY  
QLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRIMNPLIDQYLYLARTOSTGGTAGNRELLFSQGGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV  
SKTLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDGLVNPQVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKGAGANNNTALENVN  
MTSEEEIKITNFPVATEQYGVVASNLQSSNTAPATGAVNSQALPGMVWQNRDYYLQGPWAKIPHTDGNF  
HPSPLMGFGGLKHPFQILIKNTVPANPPTVTSAPAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEI  
QYTSNYAKSINVDAFVNSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

G4

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEFSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPAGPSPGLSGSTMAAGGGA  
PMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSASGSGSTNDNHYFGYSTP  
WGYFDENRFHCHFSFRDWRQLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTINDGVTTIANNLSTVQVFSDEY  
QLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRIMNPLIDQYLYLARTOSTGGTAGNRELLFSQGGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV  
SKTLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDGLVNPQVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKGAGANNNTALENVN  
LTNEEEIKITNFPVATEQYGVVASNLQSSNTAPATGAVNSQALPGMVWQNRDYYLQGPWAKIPHTDGNF  
HPSPLMGFGGLKHPFQILIKNTVPANPPTVTSAPAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEI  
QYTSNYAKSINVDAFVNSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

## 【図 17】

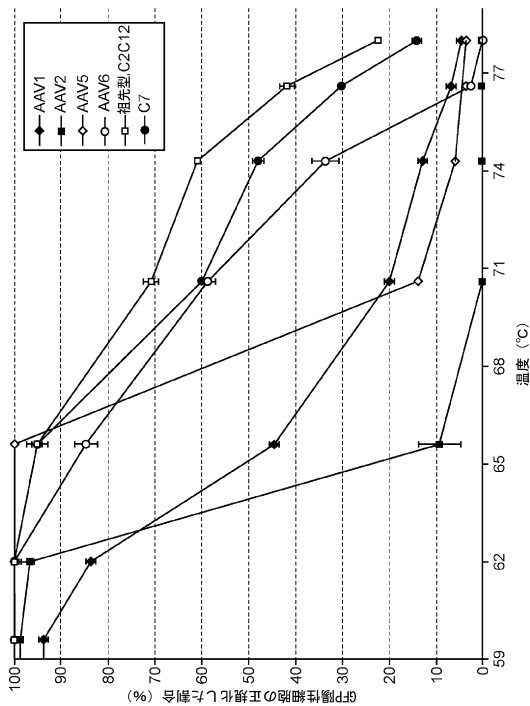
コンセンサス配列 (C4, C7, G4)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEFSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPAGPSPGLSGSTMAAGGGA  
PMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSXSGSGSTNDNHYFGYSTP  
WGYFDENRFHCHFSFRDWRQLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTINDGVTTIANNLSTVQVFSDEY  
QLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRIMNPLIDQYLYLXRTOSTGGTAGXRELLFSQGGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV  
SKTLXQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDGLVNPQVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKGAGANNNTXLENVN  
XIXEEIKITNFPVATEQYGVVASNLQSSNTAPXTXGVNSQALPGMVWQNRDYYLQGPWAKIPHTDGNF  
HPSPLMGFGGLKHPFQILIKNTVPANPPTVTSAPAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEI  
QYTSNYAKSINVDAFVNSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

コンセンサス配列 (C4, C7)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEPQERLQEDTSFGNGLGRAVFOAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEFSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPAGPSPGLSGSTMAAGGGA  
PMADNNEGADGVGNASGNWCHDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSXSGSGSTNDNHYFGYSTP  
WGYFDENRFHCHFSFRDWRQLINNNGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTINDGVTTIANNLSTVQVFSDEY  
QLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFFSYTFEDV  
PFHSSYAHSQSLDRIMNPLIDQYLYLXRTOSTGGTAGNRELLFSQGGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV  
SKTLXQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDGLVNPQVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKGAGANNNTXLENVN  
XIXEEIKITNFPVATEQYGVVASNLQSSNTAPXTXGVNSQALPGMVWQNRDYYLQGPWAKIPHTDGNF  
HPSPLMGFGGLKHPFQILIKNTVPANPPTVTSAPAKFASFITQYSTGQVSVIEWELQKENSKRWNPEI  
QYTSNYAKSINVDAFVNSEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

## 【図 18】



【配列表】

0006836999000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100160923  
弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 オハラ デビッド エス .  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 2 0 3

(72)発明者 サンティアゴ - オルティス ジョージ  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 2 0 3

(72)発明者 ウェステッソン オスカー  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 3 0 6

(72)発明者 シェーファー デビッド ブイ .  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 2 7 4 ビー

(72)発明者 ホームズ イアン エイチ .  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 3 7 4 シー

(72)発明者 ウェインステイン ジョン  
アメリカ合衆国 9 4 7 2 0 カリフォルニア州 バークレー スタンリー ホール 2 0 3

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 5 6 1 0 ( W O , A 2 )  
国際公開第 2 0 0 7 / 1 2 0 5 4 2 ( W O , A 2 )  
国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 3 5 1 2 ( W O , A 2 )  
米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 2 3 6 3 5 3 ( U S , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 7/01

C07K 14/015

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)