

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7498665号
(P7498665)

(45)発行日 令和6年6月12日(2024.6.12)

(24)登録日 令和6年6月4日(2024.6.4)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A
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 25 (全104頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-545159(P2020-545159)	(73)特許権者	502409813
(86)(22)出願日	平成31年2月27日(2019.2.27)		ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバ ーシテイ・オブ・ペンシルベニア
(65)公表番号	特表2021-515548(P2021-515548 A)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191 04フィラデルフィア・ナインスフロア ー・シビックセンターブルバード36 00
(43)公表日	令和3年6月24日(2021.6.24)	(74)代理人	110000741
(86)国際出願番号	PCT/US2019/019861		弁理士法人小田島特許事務所
(87)国際公開番号	WO2019/169004	(72)発明者	ウイルソン, ジェームス・エム
(87)国際公開日	令和1年9月6日(2019.9.6)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191 03フィラデルフィア・デランシースト リート1831
審査請求日	令和4年2月9日(2022.2.9)	(72)発明者	テベ, エイプリル
(31)優先権主張番号	62/677,471		アメリカ合衆国メリーランド州2104
(32)優先日	平成30年5月29日(2018.5.29)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/703,670		
(32)優先日	平成30年7月26日(2018.7.26)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 新規アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、低減されたカプシド脱アミド化を有するAAVベクター、およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)であって、

(A) AAVrh79カプシドであって、

(1) 配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるAAVrh79vp1タンパク質、AAVrh79vp2タンパク質およびAAVrh79vp3タンパク質であって、

前記AAVrh79vp1タンパク質が、配列番号2に基いて67位にグルタミン酸(E)および169位にアルギニン(R)を含み、前記AAVrh79vp2タンパク質は、配列番号2に基いてvp2の169位にアルギニン(R)を含む、

AAVrh79vp1タンパク質、AAVrh79vp2タンパク質およびAAVrh79vp3タンパク質

または

(2) 配列番号2の、各々、アミノ酸1~738(vp1)、138~738(vp2)および204~738(vp3)を含む、AAVrh79vp1タンパク質、vp2タンパク質およびvp3タンパク質の異種集団、

を含むAAVrh79カプシドであって、

前記AAVrh79vp1タンパク質は、配列番号2に基いて67位にグルタミン酸(E)およびvp2の169位にアルギニン(R)を含み、前記AAVrh79vp2タンパク質は、配列番号2に基いてvp2の169位にアルギニン(R)を含み、そして

、前記 AAVrh79 vp1 タンパク質、AAVrh79 vp2 タンパク質および AAVrh79 vp3 タンパク質が、質量分析により決定されたときに、配列番号 2 の N57 位、N263 位、N385 位および N514 位の少なくとも 2 つに 50% ~ 100% の脱アミド化アスパラギン (N) を含み、前記脱アミド化が、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、相互変換アスパラギン酸/イソアスパラギン酸対、またはそれらの組み合わせへのアミノ酸変化をもたらず、AAVrh79 カプシドと、

(B) 前記 AAVrh79 カプシド中のベクターゲノムであって、前記ベクターゲノムが、AAV 逆方向末端反復配列を含む核酸分子、および細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される前記産物をコードする非 AAV 核酸配列を含む、ベクターゲノム、

を含む、組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項 2】

前記 AAVrh79 vp1 タンパク質、AAVrh79 vp2 タンパク質および AAVrh79 vp3 タンパク質が、アセチル化リジン、リン酸化セリン、および/またはトレオニン、異性化アスパラギン酸、脱アミド化グルタミン、酸化トリプトファン、および/またはメチオニン、またはアミド化アミノ酸の 1 以上を更に含む、請求項 1 に記載の rAAV。

【請求項 3】

前記 AAVrh79 カプシドが、

(a) 配列番号 2 の番号付けに基づいて、前記 vp1 タンパク質の N57 位に位置するアスパラギン - グリシン対中の、質量分析により決定されたときに少なくとも 75% のアスパラギン (N) が脱アミド化されること、

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて前記 vp1、v2、および vp3 タンパク質の N263 位のアスパラギン - グリシン対中の、質量分析により決定されたときに少なくとも 75% の N が脱アミド化されること、

(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、前記 vp1、v2、および vp3 タンパク質の N385 位のアスパラギン - グリシン対中の、質量分析により決定されたときに少なくとも 70% の N が脱アミド化されること、ならびに/または

(d) 配列番号 2 のアミノ酸配列の残基番号付けに基づいて、前記 vp1、v2、および vp3 タンパク質の N514 位のアスパラギン - グリシン対中の、質量分析により決定されたときに少なくとも 85% の N が脱アミド化されること、のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 または 2 に記載の rAAV。

【請求項 4】

前記 rAAVrh79 カプシドが、質量分析を使用して決定されたときに、前記 vp1 タンパク質の N57 位で 75% ~ 100% の前記 N が脱アミド化されている、AAVrh79 vp1 を含む、

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の rAAV。

【請求項 5】

前記 rAAVrh79 カプシドが、質量分析を使用して決定されたときに、配列番号 2 の番号付けに基づいて、N263 および/または N385 位で、75% ~ 100% の前記 N が脱アミド化されている AAVrh79 vp1 タンパク質、AAVrh79 vp2 タンパク質、および/または AAVrh79 vp3 タンパク質を含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の rAAV。

【請求項 6】

前記 rAAVrh79 カプシドが、配列番号 2 の番号付けに基づいて、N514 位で、質量分析により決定されたときに 75% ~ 100% の前記 N が脱アミド化されている、vp1 タンパク質、vp2 タンパク質、および/または vp3 タンパク質を含む、

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の rAAV。

【請求項 7】

前記タンパク質をコードする前記核酸配列が、配列番号 1 である、

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 8】

前記 r A A V r h 7 9 カプシドが、N 5 7 位、N 2 6 3 位、N 3 8 5 位およびN 5 1 4 位のそれぞれで、質量分析により決定されたときに 5 0 ~ 1 0 0 % の脱アミド化を含む、配列番号 2 からのアミノ酸修飾を有する、少なくとも v p 1、v p 2、および / または v p 3 タンパク質の亜集団をさらに含む、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 9】

前記 r A A V r h 7 9 カプシドが、質量分析により決定されたときに、N 9 4 位、N 2 5 4 位、N 3 0 5 位、N 4 1 0 位、N 4 7 9 位、N 6 5 3 位、またはそれらの組み合わせのうちの1 つ以上で 1 % ~ 4 0 % の脱アミド化をさらに含む、v p 1、v p 2、および / または v p 3 タンパク質の亜集団を含む、

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の r A A V。

【請求項 1 0】

前記 A A V r h 7 9 v p 1 タンパク質、A A V r h 7 9 v p 2 タンパク質および A A V r h 7 9 v p 3 タンパク質が、N 9 4 位、N 2 5 4 位、N 3 0 5 位、N 4 1 0 位、N 4 7 9 位、N 6 5 3 位における 1 0 % 未満の脱アミド化、5 % 未満のメチル化、および / または 5 % 未満の異性化を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 1 1】

前記カプシドが、() - グルタミン酸、 - グルタミン酸、相互変換 () - グルタミン酸 / - グルタミン酸対、またはそれらの組み合わせに脱アミド化される、1 % 以下の脱アミド化グルタミンをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 1 2】

質量分析が、トリプシンまたはキモトリプシンを用いる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の r A A V。

【請求項 1 3】

A A V I T R 配列が、前記カプシドを提供する前記 A A V 以外の A A V 源からの 5 ' I T R および 3 ' I T R である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の r A A V。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の r A A V、ならびに薬学的担体、賦形剤、および / または希釈剤を含む、組成物。

【請求項 1 5】

所望の遺伝子産物をそれを必要とする対象に送達するのに用いるための、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の r A A V または請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

A A V カプシドを含む組換え A A V を生成する方法であって、
(a) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 7 3 8 をコードする核酸配列、
(b) 機能的 r e p 遺伝子、
(c) A A V 逆方向末端反復 (I T R) および導入遺伝子を含むミニ遺伝子、ならびに
(d) 前記 A A V カプシドに前記ミニ遺伝子をパッケージングすることを可能にするのに十分なヘルパー機能、
を含む宿主細胞を培養するステップを含む、方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の r A A V を含む細胞培養物。

【請求項 1 8】

組換え核酸分子であって、
(a) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 7 3 8 を含むアミノ酸配列をコードするか、または
(b) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 ~ 2 2 1 4、もしくは配列番号 1 のヌクレオチド 1 ~ 2 2 1 4 と少なくとも 9 9 % 同一のヌクレオチド配列を含む、
組換え核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

機能的 r e p 遺伝子をさらに含む、請求項 18 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 20】

前記組換え核酸分子がプラスミドである、請求項 18 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 21】

請求項 18 に記載の組換え核酸分子を用いてトランスフェクトされた、宿主細胞であって、機能的 r e p 遺伝子、A A V 逆方向末端反復 (I T R) および導入遺伝子を含むミニ遺伝子、ならびに A A V カプシドに前記ミニ遺伝子をパッケージングすることを可能にするのに十分なヘルパー機能を含む、宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の組換え A A V を産生するために有用な r A A V 産生システムであって、前記産生システムが、

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする A A V カプシド核酸配列と、

(b) 前記 A A V カプシドへのパッケージングに好適な核酸分子であって、前記核酸分子が、少なくとも 1 つの A A V 逆方向末端反復 (I T R)、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される遺伝子産物をコードする非 A A V 核酸配列を含む、核酸分子と、

(c) 前記組換え A A V カプシド中への前記核酸分子をパッケージングすることを可能にするのに十分な A A V r e p 機能およびヘルパー機能と、を含む、r A A V 産生システム。

【請求項 23】

前記 (a) の核酸配列が、少なくとも配列番号 1 を含む、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 24】

細胞培養物が、ヒト胚性腎臓 293 細胞を含む、請求項 22 または 23 に記載のシステム。

【請求項 25】

前記 A A V r e p が、A A V 2 由来である、請求項 22 ~ 24 のいずれかに記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府支援研究の記述

本発明は、国立衛生研究所により授与された P 0 1 H L 0 5 9 4 0 7 の下で政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0002】

E F S - W E B を介して提出された配列表への参照

2019年2月27日に作成され、本出願と共に E F S - W e b を介して電子的に提出された、「18-8592 P C T _ S e q u e n c e _ L i s t i n g _ S T 2 5」という名称の配列表の出願されたテキストの内容が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

アデノ随伴ウイルス (A A V) カプシドは、二十面体構造であり、1 : 1 : 10 の比率で、60個のウイルスタンパク質 (V P) モノマー (V P 1、V P 2、および V P 3) からなる (X i e Q , e t a l . P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 0 2 ; 9 9 (1 6) : 1 0 4 0 5 - 1 0)。V P 3 タンパク質配列 (~ 5 3 5 a a) の全体は、V P 1 および V P 2 の両方の C 末端内に含まれ、共有 V P 3 配列は、主に全体のカプシド構造に関与する。V P 1 / V P 2 固有領域の構造的柔軟性、ならびに組み立てられたカプシド中の V P 3 モノマーと比較して V P 1 および V P 2 モノマーの低い表現のため、V P 3 は、X 線結晶解析を介して解決される唯一のカプシドタンパク質である (N a m

10

20

30

40

50

HJ, et al. *J Virol.* 2007; 81(22):12260-71)。VP3は、AAV血清型間の配列多様性の主な供給源である9つの超可変領域(HVR)を含む(Govindasamy L, et al. *J Virol.* 2013; 87(20):11187-99)。それらの柔軟性およびカプシド表面上の位置を考慮すると、HVRは、標的細胞、および免疫系との相互作用に大きく関与する(Huang LY, et al. *J Virol.* 2016; 90(11):5219-30、Raupp C, et al. *J Virol.* 2012; 86(17):9396-408)。いくつかの血清型の構造が公開されているが(それぞれ、AAV2、AAVrh.8、AAV6、AAV9、AAV3B、AAV8、およびAAV4の構造エントリについて、Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) データベースからのタンパク質データバンク(PDB) 番号1LP3、4RSO、4V86、3UX1、3KIC、2QA0、2G8G)、これらのカプシドの表面の修飾に関する情報は文献に非常に少ない。研究は、カプシドの細胞内リン酸化が、特定のチロシン残基で生じることを示唆している(Zhong L, et al. *Virology.* 2008; 381(2):194-202)。主要なVP3配列におけるグリコシル化部位が推定されているにもかかわらず、AAV2におけるグリコシル化事象は特定されておらず(Murray S, et al. *J Virol.* 2006; 80(12):6171-6、Jin X, et al. *Hum Gene Ther Methods.* 2017; 28(5):255-267)、他のAAV血清型は、カプシドのグリコシル化についてまだ評価されていない。

【0004】

AAV遺伝子治療ベクターは、通常、組換えタンパク質治療法の開発および製造に伴う分子レベルの精査をあまり受けていない。AAVカプシド翻訳後修飾(PTM)は、ほとんど探索されていないため、それらが機能に影響を与える可能性について、または製造されたAAV療法におけるPTMレベルを制御するための戦略についてほとんど知られていない。

【0005】

非遺伝子療法タンパク質療法の翻訳後修飾の多様性は、それらの薬物としての開発を複雑化させている。Jenkins, N, Murphy, L, and Tyther, R (2008). *Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals.* *Mol Biotechnol* 39:113-118; Houde, D, Peng, Y, Berkowitz, SA, and Engen, JR (2010). *Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding.* *Mol Cell Proteomics* 9:1716-1728。例えば、選択されたアミノ酸の脱アミド化は、組換え保護抗原系炭疽ワクチンの安定性および免疫応答を調節する。(Powell BS, et al. *Proteins.* 2007; 68(2):458-79、Verma A, et al. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(5):396-402)。いくつかの事例では、このプロセスは、ウイルスまたは細菌デアミダーゼによって触媒され、宿主細胞シグナル伝達経路または自然免疫応答を調節する(Zhao J, et al. *J Virol.* 2016; 90(9):4262-8、Zhao J, et al. *Cell Host Microbe.* 2016; 20(6):770-84)。より一般的に、内因性脱アミド化は、酵素に依存しない自発的プロセスである。自発的脱アミド化の目的は完全に解明されていないが、以前の研究では、この事象は、タンパク質の相対的な年齢を示し、その代謝回転を調節するための分子時計の役割を果たすことが示唆されている(Robinson NE and Robinson AB. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(3):944-9)。

【0006】

10

20

30

40

50

脱アミド化は、アスパラギンのアミド基またはそれほど頻繁ではないグルタミンが隣接する窒素原子から求核攻撃を受け、アミド基が失われると生じる。このプロセスは、スクシニミジル中間体 (Yang H and Zubarev RA. Electrophoresis. 2010; 31(11): 1764-72) をもたらし、加水分解を介して、アスパラギン酸およびイソアスパラギン酸 (またはグルタミン酸およびイソグルタミン酸) の混合物に分解される (Catak S, et al. J Phys Chem A. 2009; 113(6): 1111-20)。短い合成ペプチドの研究は、この加水分解が、アスパラギン酸に対するイソアスパラギン酸の3:1混合物をもたらすことを推定する (Geiger T. and Clarke S. J Biol Chem. 1987; 262(2): 785-94)。

10

【0007】

安定した受容体結合および/または安定したカプシドを有し、抗体を中和することを回避し、かつ/または保存時に純度を保持する異種分子を送達するためのAAV系構築物を含む組成物の必要性が引き続き存在する。

【発明の概要】

【0008】

一実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) の混合集団を含む組成物であって、該rAAVの各々が、(a) 約60個のカプシドvp1タンパク質、vp2タンパク質、およびvp3タンパク質を含むAAVカプシドであって、vp1、vp2、およびvp3タンパク質が、選択されるAAV vp1アミノ酸配列をコードする核酸配列から産生されるvp1タンパク質の異種集団、選択されるAAV vp2アミノ酸配列をコードする核酸配列から産生されるvp2タンパク質の異種集団、選択されるAAV vp3アミノ酸配列をコードする核酸配列から産生されるvp3タンパク質の異種集団であり、vp1、vp2、およびvp3タンパク質が、AAVカプシド中のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす、AAVカプシドと、(b) AAVカプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆方向末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される産物をコードする非AAV核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、組成物が提供される。

20

30

【0009】

特定の実施形態では、脱アミド化アスパラギンは、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、相互変換アスパラギン酸/イソアスパラギン酸対、またはそれらの組み合わせに脱アミド化される。特定の実施形態では、カプシドは、() - グルタミン酸、() - グルタミン酸、相互変換() - グルタミン酸/ () - グルタミン酸対、またはそれらの組み合わせに脱アミド化される脱アミド化グルタミン(複数可)をさらに含む。

【0010】

さらなる態様では、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) であって、(A) AAV rh79カプシドであって、(1) 配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるvp1タンパク質、配列番号1から産生されるvp1タンパク質、もしくは配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質から選択されるAAV rh79 vp1タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるvp2タンパク質、配列番号1の少なくともヌクレオチド412~2214を含む配列から産生されるvp2タンパク質、もしくは配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号1の少なくともヌクレオチド412~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質から選択されるAAV rh79 vp2タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列から

40

50

の発現により産生される v p 3 タンパク質、配列番号 1 の少なくともヌクレオチド 6 1 0 ~ 2 2 1 4 を含む配列から産生される v p 3 タンパク質、もしくは配列番号 2 の少なくとも約アミノ酸 2 0 4 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号 1 の少なくともヌクレオチド 6 1 0 ~ 2 2 1 4 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 3 タンパク質から選択される A A V r h 7 9 v p 3 タンパク質の異種集団を含む、A A V r h 7 9 カプシドタンパク質、ならびに / または (2) 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 1 タンパク質の異種集団、配列番号 2 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 8 でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 2 タンパク質の異種集団、および配列番号 2 の少なくともアミノ酸 2 0 4 ~ 7 3 8 をコードする核酸配列の産物である v p 3 タンパク質の異種集団であって、v p 1、v p 2、および v p 3 タンパク質が、配列番号 2 のアスパラギン - グリシン対中の少なくとも 2 つの高度脱アミド化アスパラギン (N) を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす、異種集団、のうちの 1 つ以上を含む、A A V r h 7 9 カプシドと、(B) A A V r h 7 9 カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、A A V 逆方向末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される産物をコードする非 A A V 核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、組換えアデノ随伴ウイルスが提供される。

10

【 0 0 1 1 】

別の態様では、標的組織を形質導入する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、本明細書に記載される A A V r h 7 9 カプシドを有する A A V を投与することを含む。一実施形態では、A A V r h 7 9 カプシドを有する A A V を投与することを含む、肝臓組織を形質導入する方法が提供される。別の実施形態では、A A V r h 7 9 カプシドを有する A A V を投与することを含む、筋肉組織を形質導入する方法が提供される。

20

【 0 0 1 2 】

さらに別の態様では、A A V r h 7 9 カプシドの脱アミド化を低減する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、修飾された A A V r h 7 9 V P コドンを含む核酸配列から A A V r h 7 9 カプシドを産生することを含み、核酸配列は、修飾されたコドンがグリシン以外のアミノ酸をコードするように、配列番号 2 の N 5 7 位、N 2 6 3 位、N 3 8 5 位、および / または N 5 1 4 位に位置するアスパラギン - グリシン対のうちの 1 ~ 4 個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。別の実施形態では、本方法は、修飾された A A V r h 7 9 v p コドンを含む核酸配列から A A V r h 7 9 カプシドを産生することを含み、核酸配列は、配列番号 2 の N 9 4 位、N 2 5 4 位、N 3 0 5 位、N 4 1 0 位、および / または N 4 7 9 位に位置するアスパラギン - グリシン対のうちの 1 ~ 4 個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。

30

【 0 0 1 3 】

さらなる実施形態では、r A A V 8 . A R 2 . 0 8 であって、(A) A A V 8 . A R 2 . 0 8 カプシドであって、(1) 配列番号 1 8 の 1 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生される v p 1 タンパク質、配列番号 1 7 から産生される v p 1 タンパク質、もしくは配列番号 1 8 の 1 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号 1 7 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 1 タンパク質から選択される A A V 8 . A R 2 . 0 8 v p 1 タンパク質の異種集団、配列番号 1 8 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生される A A V 8 . A R 2 . 0 8 v p 2 タンパク質、配列番号 1 7 の少なくともヌクレオチド 4 1 1 ~ 2 2 1 4 を含む配列から産生される v p 2 タンパク質、もしくは配列番号 1 8 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号 1 7 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 1 4 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸配列から産生される v p 2 タンパク質から選択される A A V 8 . A R 2 . 0 8 v p 2 タンパク質の異種集団、配列番号 1 8 の少なくとも約アミノ酸 2 0 4 ~ 7 3 8 の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生される v p 3

40

50

タンパク質、配列番号 17 の少なくともヌクレオチド 607 ~ 2214 を含む配列から産生される v p 3 タンパク質、もしくは配列番号 18 の少なくとも約アミノ酸 204 ~ 738 の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号 17 の少なくともヌクレオチド 607 ~ 2214 と少なくとも 70% 同一の核酸配列から産生される v p 3 タンパク質から選択される AAV8 . AR2 . 08 v p 3 タンパク質の異種集団を含む、AAV8 . 2 . 08 カプシドタンパク質、ならびに / または (2) 配列番号 18 のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 1 タンパク質の異種集団、配列番号 18 の少なくとも約アミノ酸 138 ~ 738 でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物である v p 2 タンパク質の異種集団、および配列番号 18 の少なくともアミノ酸 204 ~ 738 をコードする核酸配列の産物である v p 3 タンパク質の異種集団であって、v p 1、v p 2、および v p 3 タンパク質が、配列番号 18 のアスパラギン - グリシン対中の少なくとも 2 つの高度脱アミド化アスパラギン (N) を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす、異種集団、のうちの 1 つ以上を含む、AAV8 . AR2 . 08 カプシドカプシドと、(B) AAV8 . AR2 . 08 カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV 逆方向末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される産物をコードする非 AAV 核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、r AAV8 . AR2 . 08 が提供される。

10

【0014】

別の態様では、標的組織を形質導入する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、本明細書に記載される AAV8 . AR2 . 08 カプシドを有する AAV を投与することを含む。一実施形態では、AAV8 . AR2 . 08 カプシドを有する AAV を投与することを含む、肝臓組織を形質導入する方法が提供される。別の実施形態では、AAV8 . AR2 . 08 カプシドを有する AAV を投与することを含む、筋肉組織を形質導入する方法が提供される。

20

【0015】

さらに別の態様では、AAV8 . AR2 . 08 カプシドの脱アミド化を低減する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、修飾された AAV8 . AR2 . 08 v p コドンを含む核酸配列から AAV8 . AR2 . 08 カプシドを産生することを含み、核酸配列は、修飾されたコドンがグリシン以外のアミノ酸をコードするように、配列番号 18 の N57 位、N263 位、N385 位、N514 位、および / または N540 位に位置するアスパラギン - グリシン対のうちの 1 ~ 4 個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。別の実施形態では、本方法は、修飾された AAV8 . AR2 . 08 v p コドンを含む核酸配列から AAV8 . AR2 . 08 カプシドを産生することを含み、核酸配列は、配列番号 18 の N94 位、N254 位、N305 位、N521 位、N590 位、Q601 位、N653 位、および / または N665 位に位置するアスパラギン - グリシン対のうちの 1 ~ 4 個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。

30

【0016】

特定の実施形態では、r AAV5 . 5 . 9 であって、(A) AAV5 . 5 . 9 カプシドであって、(1) 配列番号 10 の 1 ~ 736 の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生される v p 1 タンパク質、配列番号 9 から産生される v p 1 タンパク質、もしくは配列番号 1 の 1 ~ 736 の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号 9 と少なくとも 70% 同一の核酸配列から産生される v p 1 タンパク質から選択される AAV5 . 5 . 9 v p 1 タンパク質の異種集団、配列番号 10 の少なくとも約アミノ酸 138 ~ 736 の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生される AAVG5 v p 2 タンパク質、配列番号 9 の少なくともヌクレオチド 412 ~ 2211 を含む配列から産生される v p 2 タンパク質、もしくは配列番号 10 の少なくとも約アミノ酸 138 ~ 736 の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号 9 の少なくともヌクレオチド 412 ~ 2211 と少なくとも 70% 同一の核酸配列から産生される v p 2 タンパク質から選択される AAV5 . 5 . 9 v p 2 タンパク質の異種集団、配列番

40

50

号10の少なくとも約アミノ酸203~736の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV5.5.9 vp3タンパク質、配列番号9の少なくともヌクレオチド607~2211を含む配列から産生されるvp3タンパク質、もしくは配列番号10の少なくとも約アミノ酸203~736の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号9の少なくともヌクレオチド607~2211と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質から選択されるAAV5.5.9 vp3タンパク質の異種集団を含む、AAVG5カプシドタンパク質、ならびに/または(2)配列番号10のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集団、配列番号10の少なくとも約アミノ酸138~736でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集団、および配列番号10の少なくともアミノ酸203~726をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集団であって、vp1、vp2、およびvp3タンパク質が、配列番号10のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化が、アミノ酸変化をもたらす、異種集団、のうちの1つ以上を含む、AAV5.5.9カプシドカプシドと、(B)AAV5.5.9カプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆方向末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される産物をコードする非AAV核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、AAV5.5.9が提供される。

10

【0017】

20

別の態様では、標的組織を形質導入する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるAAV5.5.9カプシドを有するAAVを投与することを含む。一実施形態では、AAV5.5.9カプシドを有するAAVを投与することを含む、肝臓組織を形質導入する方法が提供される。別の実施形態では、AAV5.5.9カプシドを有するAAVを投与することを含む、筋肉組織を形質導入する方法が提供される。

【0018】

さらに別の態様では、AAV5.5.9カプシドの脱アミド化を低減する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、修飾されたAAV5.5.9 vpコドンを含む核酸配列からAAV5.5.9カプシドを産生することを含み、核酸配列は、修飾されたコドンがグリシン以外のアミノ酸をコードするように、配列番号10のN57位、N319位、N442位、および/またはN502位に位置するアスパラギン-グリシン対のうちの1~4個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。別の実施形態では、本方法は、修飾されたAAV5.5.9 vpコドンを含む核酸配列からAAV5.5.9カプシドを産生することを含み、核酸配列は、配列番号10のN35位、N113位、N204位、N217位、N243位、N249位、N293/294位、N304位、N399/400位、N505位、Q589位、N618位、N641位、N653位、N658位、および/またはN699位に位置するアスパラギン-グリシン対のうちの1~4個で独立して修飾されたグリシンコドンを含む。

30

【0019】

別の態様では、本明細書に記載される組換えAAVrh79、AAV8.AR2.08、またはAAV5.5.9の混合集団を含む組成物が提供される。

40

【0020】

さらに別の態様では、所望の遺伝子産物をそれを必要とする対象に送達するための、本明細書に記載される組換えAAV(rAAV)が提供される。

【0021】

別の態様では、本明細書に記載されるrAAVを産生するために有用なrAAV産生システムが提供される。一実施形態では、本システムは、(a)配列番号2、10、もしくは18の予測されたアミノ酸配列をコードするAAVrh79、AAV8.AR2.08、またはAAV5.5.9カプシド核酸配列と、(b)AAVカプシドへのパッケージングに好適な核酸分子であって、該核酸分子が、少なくとも1つのAAV逆方向末端反復(

50

ITR)、および宿主細胞中で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される遺伝子産物をコードする非AAV核酸配列を含む、核酸分子と、(c)組換えAAVカプシド中へ核酸分子をパッケージングするのを可能にするのに十分なAAV rep機能およびヘルパー機能と、を含む。

【0022】

本発明のこれらのおよび他の態様は、以下の本発明の詳細な説明から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】図1A～図1Gは、AAV8 VPアイソフォームの電気泳動分析。(図1A)図は、アスパラギン残基が隣接する窒素原子によって求核攻撃を受け、スクシニミジル中間体を形成するメカニズムを示す。次いで、この中間体は加水分解を受け、アスパラギン酸およびイソアスパラギン酸の混合物に分解する。ベータ炭素は、このように標識される。図は、BIOVIA Draw 2018で生成された。(図1B)1 μ gのAAV8ベクターを変性一次元SDS-PAGEで実行した。(図1C)炭酸脱水酵素pIマーカースポットの等電点を示す。(図1D)5 μ gのAAV8ベクターを二次元ゲル電気泳動によって分析し、Coomassie Blueで染色した。スポット1～20は、カルバミル化炭酸脱水酵素pIマーカーである。ボックス領域は、a = VP1、b = VP2、c = VP3、d = 内部トロポミオシンマーカーである(矢印: MW = 33 kDa、pI = 5.2のトロポミオシンスポット)。等電点電気泳動は、4～8のpI範囲で実行した。図1E～図1G)4～8のpI範囲で実行される等電点電気泳動の結果。1e11 GCのwtAAV8(図1E)または変異(図1Fおよび図1G)ベクターであり、これを2Dゲル電気泳動で分析し、Sypro Rubyで染色した。タンパク質標識: A = VP1、B = VP2、C = VP3、D = ニワトリ卵白コンアルブミンマーカー、E = ターボヌクレアーゼマーカー。等電点電気泳動は、6～10のpI範囲で実行した。主要なVP1/2/3アイソフォームスポットは円で囲まれ、マーカーの主要スポットの移行距離を垂直線(ターボヌクレアーゼ=破線、コナルブミン=固体)で示す。

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】同上。

【図1F】同上。

【図1G】同上。

【図2A】図2A～図2Eは、AAV8カプシドタンパク質におけるアスパラギンおよびグルタミン脱アミド化の分析。(図2A～図2B)Asn-94(図2A)およびAsp-94(図2B)を含む3+ペプチド(93-103)のエレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析、ならびに理論的および観察された質量を示す。(図2C～図2D)Asn-254(図2C)およびAsp-254(図2D)を含む3+ペプチド(247-259)のESI質量分析、ならびに理論的および観察された質量を示す。Asn-94およびAsn-254で観察された質量シフトは、0.984 Daの理論的質量シフトに対して、それぞれ0.982 Daおよび0.986 Daであった。(図2E)目的の特定のアスパラギンおよびグルタミン残基での脱アミド化率は、異なる方法で精製されたAAV8トリプシンペプチドについて示される。N+1グリシンを有するアスパラギン残基における脱アミドを示すバーが、網掛けされている。分析した少なくとも1つの調製物中で少なくとも2%脱アミド化されていると決定された残基が含まれた。データは、平均値 \pm 標準偏差で表される。

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【図2D】同上。

【図2E】同上。

【図3A】図3A～図3Eは、AAV8 VP3モノマーの構造モデリングおよび脱アミド部位の分析。(図3A) AAV8 VP3モノマー(PDB識別子: 3RA8)をコイル表現で示す。リボンの色は、相対的な柔軟性の度合いを示す(青=最も硬い/普通の温度係数、赤=最も柔軟/高い温度係数)。球体は、目的の残基を示す。拡大図は、目的の残基およびその周辺残基のボールおよびスティック表現であり、局所タンパク質構造(青=窒素、赤=酸素)を示す。下線が引かれた残基はNGモチーフのものである。図3B～図3E: N+1グリシンを有する脱アミド化アスパラギンのイソアスパラギン系モデルを示す。2Fo-Fc電子密度マップ(1シグマレベル)は、(図3C) N263、(図3D) N514、および(図3E) N540のイソアスパラギン酸モデルと比較した、(図3B) N410のアスパラギンモデルによるAAV8結晶構造(PDB番号: 3RA8)の精密化から生成される。電子密度マップは、マゼンタグリッドで示す。ベータ炭素は、このように標識される。矢印は、目的の残基のR基に対応する電子密度を示す。

10

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図3D】同上。

【図3E】同上。

【図4A】図4A～4Dは、AAV8カプシド脱アミド化に影響を及ぼす因子の決定。AAV8調製物を(図4A) 70で3日間または7日間インキュベートし、(図4B) pH2またはpH10に7日間曝露し、または(図4C) H₂Oの代わりにD₂Oを使用して質量分析のために調製し、AAVカプシド形成に固有ではない脱アミド化の可能な供給源を特定した。(図4D)カプシドの構造的完全性を評価するためにB1抗体(変性カプシドに反応)およびAAV8構造特異的抗体(無傷のカプシドに反応)を使用して、図4Aのように処理されたベクターのドットプロット。

20

【図4B】同上。

【図4C】同上。

【図4D】同上。

【図5A】図5A～図5Bは、非AAVタンパク質の脱アミド化頻度。脱アミド化率は、AAV脱アミド化率との比較のために、脱アミド化される可能性が高いNGモチーフを含む2つの非AAV組換えタンパク質、ヒト炭素脱水酵素(図5A)およびラットフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(図5B)について示される。

30

【図5B】同上。

【図6】図6は、2つの機関からのデータ分析パイプラインを使用して計算されたAAV8パーセントのアミド分解の比較。目的の特定のアスパラギンおよびグルタミン残基での脱アミド化率は、2つの異なる機関で評価されるAAV8トリプシンペプチドについて示される。

【図7A】図7A～図7Cは、ロット間のばらつきが大きい非NG部位での機能的なアスパラギン置換を例示する。(図7A)定量的PCR(qPCR)で測定された293細胞での小規模なトリプルトランスフェクションによって産生されたwtAAV8および変異ベクターの力価。力価は、wtAAV8対照に対して報告される。形質導入効率は、図8Bに記載されているように測定した。力価および形質導入効率は、wtAAV8対照の値に正規化される。(図7B)注入後14日目の代表的なルシフェラーゼ画像を、wtAAV8.CB7.flucおよびN499Qカプシド変異ベクターを受容するマウスについて示す。(図7C)ルシフェラーゼイメージングによって測定し、総流量単位で報告されるwtAAV8または変異ベクター(n=3または4)を静脈内注入したC57BL/6マウスから、研究期間の14日目のルシフェラーゼ発現。すべてのデータは、平均値+標準偏差として表される。

40

【図7B】同上。

【図7C】同上。

【図8A】図8Aおよび図8Bは、ベクター性能に対する遺伝子脱アミド化の影響のインビトロ分析の結果を示す。(図8A)定量的PCR(qPCR)で測定された293細胞

50

での小規模なトリプルトランスフェクションによって産生された wt AAV8 および遺伝的脱アミド化変異ベクターの力価。力価は、wt AAV8 対照に対して報告される。脱アミドが多い NG 部位（パターン化バー）、脱アミドが少ない部位（白色バー）、および可変性が高い部位（黒色バー）は、wt AAV8 および陰性対照で表示する。（図 8 B）wt AAV8 対称と比較して報告されたホタルルシフェラーゼを産生する変異 AAV8 ベクターの形質導入効率。形質導入効率は、HUH7 細胞に追加された GC ごとに生成された発光単位で測定され、複数の希釈で粗製ベクターを用いて形質導入を行うことによって決定される。形質導入効率のデータは、参照に正規化される。すべてのデータは、平均値 ± 標準偏差として表される。

【図 8 B】同上。

10

【図 9 A】図 9 A ~ 図 9 D は、経時的なベクター活性損失が、進行性脱アミド化と関連していることを例示する。（図 9 A）ルシフェラーゼレポーター遺伝子をパッケージ化する AAV8 ベクターを産生するトリプルトランスフェクト HEK293 細胞の時間経過におけるベクター産生（DNAse I 耐性ゲノムコピー、GC）。GC レベルは、最大観察値に正規化される。（図 9 B）精製された時間経過ベクターを使用して、Hu h7 細胞を形質導入した。形質導入効率（標的細胞に追加された GC あたりの発光単位）は、図 8 B のように、精製された時間経過ベクター試料の複数の希釈液を使用して測定した。誤差バーは、各試料時間の少なくとも 10 の技術的複製の標準偏差を表す。トランスフェクションの 1、2、および 5 日後に収集されたベクターの AAV8 NG 部位（図 9 C）および非 NG 部位（図 9 D）の脱アミド化。

20

【図 9 B】同上。

【図 9 C】同上。

【図 9 D】同上。

【図 10 A】図 10 A ~ 図 10 D は、ベクター性能に対するアスパラギンの安定化の影響を例示する。図 10 A は、定量的 PCR（qPCR）で測定された 293 細胞での小規模なトリプルトランスフェクションによって産生された wt AAV8 および +1 位置変異ベクターの力価を示す。力価は、wt AAV8 対照に対して報告される。図 10 B は、wt AAV8 対照と比較して報告されたホタルルシフェラーゼを産生する変異 AAV8 ベクターの形質導入効率を示す。形質導入効率は、粗ベクター材料を使用して図 8 B のように測定された。2 試料 t 試験（* p < 0.005）を実行して、G264A/G515A および G264A/G541A に関する wt AAV8 と変異形質導入効率との間の有意性を決定した。図 10 C は、ルシフェラーゼイメージングによって測定し、総流量単位で報告される wt AAV8 または変異ベクター（n = 3 ~ 5）を静脈内注入した C57BL/6 マウスからの肝臓領域における、研究期間の 14 日目のルシフェラーゼ発現を示す。図 10 D は、wt AAV8 対照と比較して報告されたホタルルシフェラーゼを産生する複数部位 AAV8 変異ベクターの力価および形質導入効率を示す。すべてのデータは、平均値 ± 標準偏差として表される。

30

【図 10 B】同上。

【図 10 C】同上。

【図 10 D】同上。

40

【図 11 A】図 11 A ~ 図 11 C は、AAV9 カプシドタンパク質におけるアスパラギンおよびグルタミン脱アミド化の分析。（図 11 A）1e11 GC の wt AAV9 は、2D ゲル電気泳動で分析し、Sypro Ruby で染色した。タンパク質標識：A = VP1、B = VP2、C = VP3、D = ニワトリ卵白コンアルブミンマーカー、E = ターボヌクレアーゼマーカー。等電点電気泳動は、6 ~ 10 の pI 範囲で実行した。（図 11 B）目的の特定のアスパラギンおよびグルタミン残基での脱アミド化率は、異なる方法で精製された AAV9 トリプシンペプチドについて示される。N + 1 グリシンを有するアスパラギン残基における脱アミドを示すバーが、網掛けされている。分析した少なくとも 1 つの調製物中で少なくとも 2% 脱アミド化されていると決定された残基が含まれた。データは、平均値 ± 標準偏差で表される。（図 11 C）N512 のイソアスパラギンモデルは、A

50

AAV9結晶構造の非偏向精製によって生成された2FoFc電子密度マップ(PDB番号: 3UX1)。矢印は、残基N512のR基に対応する電子密度を示す。

【図11B】同上。

【図11C】同上。

【図11D】図11D~図11Fは、AAV9カプシド脱アミド化に影響を及ぼす因子の決定。(図11D)2つのAAV9調製物を70℃で3日間または7日間インキュベートし、(図11F)pH2またはpH10に7日間曝露し、AAVカプシド形成に固有ではない脱アミド化の可能な供給源を特定した。データは、平均値±標準偏差で表される。(図11F)カプシド構造の完全性を評価するためにB1抗体(変性カプシドに反応する)を使用して、図11Dのように処理されたベクターのドットプロット。

10

【図11E】同上。

【図11F】同上。

【図11G】図11Gおよび図11Hは、AAV9のベクター性能に対する遺伝子脱アミド化の影響のインビトロ分析を例示する。(図11G)定量的PCR(qPCR)で測定された293細胞での小規模なトリプルトランスフェクションによって産生されたwtAAV9および遺伝的脱アミド化変異ベクターの力価。力価は、wtAAV9対照に対して報告される。脱アミドが多いNG部位(パターン化バー)、脱アミドが少ない部位(白色バー)、および可変性が高い部位(黒色バー)は、wtAAV8および陰性対照で表示する。(図11H)ホタルルシフェラーゼを産生する変異AAV9ベクターの形質導入効率は、wtAAV9対照と比較して報告される。すべてのデータは、平均値±標準偏差として表される。

20

【図11H】同上。

【図11I】図11I~図11Kは、AAV9ベクターのインビトロ効力を経時的に示す。(図11I)ルシフェラーゼレポーター遺伝子をパッケージ化するAAV9ベクターを産生するトリプルトランスフェクトHEK293細胞の時間経過におけるベクター産生(DNAseI耐性ゲノムコピー、GC)。GCレベルは、最大観察値に正規化される。(図11J)粗製時間経過ベクターを使用して、Huh7細胞を形質導入した。(図11K)トランスフェクション1日後対トランスフェクション5日後に収集されたベクターの形質導入効率を、粗製および精製ベクター試料について示す。形質導入効率は、1日目の値に正規化されたルシフェラーゼ活性/GCとして表される。

30

【図11J】同上。

【図11K】同上。

【図12A】図12Aは、整列のためにClustal Omega 1.2.2およびそのデフォルトパラメータを使用して調製した、AAV5.5.9[配列番号10](AAVG5とも呼ばれることがある)、AAV9[配列番号4]、およびAAVPHP.B[配列番号12]のアミノ酸配列の整列を提供する。

【図12B】図12B~12Eは、AAV5.5.9[配列番号9]、PHP.B[配列番号11]、AAV9[配列番号3]、およびAAVhu68[配列番号14]のヌクレオチド配列の整列を提供する。

【図12C】同上。

【図12D】同上。

【図12E】同上。

40

【図13A】図13Aは、整列のためにClustal Omega 1.2.2およびそのデフォルトパラメータを使用して調製した、AAV8トリプル変異(AAV8T)[配列番号16]、AAV8.AR2.08[配列番号18](AAVG3またはAR2またはAAV.AR2とも呼ばれることがある)、およびAAV8[配列番号20]のアミノ酸配列の整列を提供する。

【図13B】図13B~13Dは、AAV8トリプル変異[配列番号15]、AAV8.AR2.08[配列番号17]、AAV8[配列番号19]のヌクレオチド配列の整列を提供する。

50

【図13C】同上。

【図13D】同上。

【図14A】図14Aは、整列のためにClustal Omega 1.2.2およびそのデフォルトパラメータを使用して、AAVrh79 [配列番号2] (AAVG2とも呼ばれることがある)、AAVrh10 [配列番号24]、およびAAVhu37 [配列番号22]の amino acid配列の整列を提供する。

【図14B】図14B~14Dは、AAVrh79 [配列番号1]、AAVrh10 [配列番号22]、およびAAVhu37 [配列番号21]のヌクレオチド配列の整列を提供する。

【図14C】同上。

10

【図14D】同上。

【図15A】図15Aおよび15Bは、参照ベクターの小規模または大規模調整におけるAAV8トリプル、AAVhu68、AAV9、AAV9、およびAAVrh79の産生収率を例示する。

【図15B】同上。

【図16】図16は、図15Bの大規模調整の産生純度を提供する。

【図17A】図17A~17Dは、ホタルルシフェラーゼを発現するベクターを使用して、雄C57BL/6マウス (n = 5 / 群) の腓腹筋への 3×10^{11} GC / マウスの筋肉内 (IM) 投与後の肝臓および筋肉組織におけるルシフェラーゼの発現を示す。

【図17B】同上。

20

【図17C】同上。

【図17D】同上。

【図18A】図18Aは、実施例5のバーコード実験に使用したプラスミドを示す。

【図18B】図18Bは、黒色の6匹のマウスに注入した各AAVバーコードバリエーションの量を示す。動物を犠牲にし、組織試料を採取し、各々からDNAを単離した。3匹の動物の総ベクター分布を図18Cに示す。注入したベクター混合体の実際の頻度対理論的頻度を図18Dに示す。

【図18C】同上。

【図18D】同上。

【図19A】図19A~20Cは、実施例5のバーコード生体分布実験の結果を示す。個々の組織試料は、ゲノムおよびcDNAについての試料対注入混合物中の個々のバーコード頻度について分析した。結果は、筋肉 (図19A、19B)、心臓 (図19Cおよび図19D)、および肝臓 (図19Eおよび図19F) について示される。理論的頻度と比較した倍率変化を図20A~20Cに示す。

30

【図19B】同上。

【図19C】同上。

【図19D】同上。

【図19E】同上。

【図19F】同上。

【図20A】同上。

40

【図20B】同上。

【図20C】同上。

【図21】図21および図22は、AAV8と比較したマウスにおけるAAV8 . AR2 . 08生体分布を示す。結果は、AAV8 . AR2 . 08がAAV8よりも肝臓特異的であることを示す。

【図22】同上。

【図23】図23は、製造性に関する力価および収率について、AAV8対AAV8 . AR2 . 08対AAVrh79を比較する。

【図24】図24は、AAV8 (中央および右のバー) と比較した組織におけるAAV8 . AR2 . 08生体内分布 (左端のバー) を示す。

50

【図25】図25～図28は、非ヒト霊長類へのAAVベクターの投与後の結果を示す。図25は、研究に使用したベクターおよび動物の詳細を提供する。図26は、AAV8、AAVrh79、またはAAV8.AR2.08ベクターを受けた動物からの肝臓で検出したGCおよびGFPのレベルを定量化する。図27は、HNP肝臓におけるGFP発現レベルを要約した。図28は、AAV8、AAVrh79、またはAAV8.AR2.08ベクターを投与したHNP由来の組織において検出したベクターのレベルを示す。

【図26】同上。

【図27A】同上。

【図27B】同上。

【図28】同上。

【図29】図29は、様々な組織で検出したAAVrh79ベクターの生体分布を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本明細書に提供されるのは、組換えAAVのカプシド内に見出される3つのカプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3集団のそれぞれにおける配列および電荷異種性を有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)、ならびにそれらを含む組成物である。本発明で提供されるのは、新規rAAV、ならびに脱アミド化を低減するための方法、および任意で他のカプシドモノマー修飾である。本明細書でさらに提供されるのは、修飾が低減されている修飾rAAVであり、より高い安定性、効力、および/または純度を保持するカプシドを有するrAAVを提供するのに有用である。

【0025】

「組換えAAV」または「rAAV」は、2つの要素、AAVカプシド、およびAAVカプシド内にパッケージされた少なくとも非AAVコード配列を含むベクターゲノムを含むDNAse耐性ウイルス粒子である。特に明記しない限り、この用語は「rAAVベクター」という句と互換的に使用され得る。rAAVは、任意の機能的AAV rep 遺伝子または機能的AAVキャップ遺伝子を欠き、子孫を生成することができないため、「複製欠陥ウイルス」または「ウイルスベクター」である。特定の実施形態では、唯一のAAV配列は、AAV逆方向末端反復配列(ITR)であり、ITR間に位置する遺伝子および調節配列がAAVカプシド内にパッケージされることを可能にするために、典型的にはベクターゲノムの5'および3'最末端に位置する。

【0026】

本明細書で使用される場合、「ベクターゲノム」は、ウイルス粒子を形成するrAAVカプシドの内側にパッケージされる核酸配列を指す。かかる核酸配列は、AAV逆方向末端反復配列(ITR)を含む。本明細書の実施例では、ベクターゲノムは、少なくとも5'から3'に、AAV5'ITR、コード配列(複数可)、およびAAV3'ITRを含む。AAV2からのITR、カプシドとは異なる供給源AAV、または完全長ITR以外が選択され得る。特定の実施形態では、ITRは、産生中のrep機能またはトランス相補AAVを提供するAAVと同じAAV供給源由来である。さらに、他のITRが使用され得る。さらに、ベクターゲノムは、遺伝子産物の発現を指示する制御配列を含む。ベクターゲノムの好適な成分が本明細書でより詳細に考察される。

【0027】

rAAVは、AAVカプシドおよびベクターゲノムからなる。AAVカプシドは、vp1の異種集団、vp2の異種集団、およびvp3タンパク質の異種集団の集合体である。本明細書で使用される、vpカプシドタンパク質を参照するために使用される場合、「異種」という用語またはその任意の文法的変形は、例えば、異なる修飾アミノ酸配列を有するvp1、vp2、またはvp3モノマー(タンパク質)を有する、同じではない要素からなる集団を指す。

【0028】

本明細書で使用される場合、vp1、vp2、およびvp3タンパク質(代替的にアイソフォームと称される)に関連して使用される「異種集団」という用語は、カプシド内の

10

20

30

40

50

v p 1、v p 2、およびv p 3タンパク質のアミノ酸配列の違いを指す。A A Vカプシドは、v p 1タンパク質内、v p 2タンパク質内、およびv p 3タンパク質内に亜集団を含み、予測されるアミノ酸残基からの修飾を有する。これらの亜集団は、少なくとも特定の脱アミド化アスパラギン（NまたはA s n）残基が含まれる。例えば、特定の亜集団は、アスパラギン - グリシン対中の少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つの高度脱アミド化アスパラギン（N）位置を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸をさらに含み、脱アミド化は、アミノ酸変化および他の任意の修飾をもたらす。

【0029】

本明細書で使用される場合、v pタンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、少なくとも1つの定義された共通の特徴を有し、少なくとも1つの群メンバーから参照群のすべてのメンバーよりも少ないメンバーからなるv pタンパク質の群を指す。例えば、v p 1タンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられたA A Vカプシド中の少なくとも1つの（1）v p 1タンパク質であり、すべてのv p 1タンパク質未満であり得る。v p 3タンパク質の「亜集団」は、別途指定されない限り、組み立てられたA A Vカプシド中のすべてのv p 3タンパク質よりも少ない1つ（1）v p 3タンパク質であり得る。例えば、v p 1タンパク質は、v pタンパク質の亜集団であり得、v p 2タンパク質は、v pタンパク質の別個の亜集団であり得、v p 3は、組み立てられたA A Vカプシド中のv pタンパク質のさらなる亜集団である。別の例では、v p 1、v p 2、およびv p 3タンパク質は、例えば、少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つの高度脱アミド化アスパラギン、例えば、アスパラギン - グリシン対で異なる修飾を有する亜集団を含み得る。

【0030】

別途指定されない限り、高度脱アミド化は、参照アミノ酸位置での予測されたアミノ酸配列と比較して、参照アミノ酸位置での少なくとも45%の脱アミド化、少なくとも50%の脱アミド化、少なくとも60%の脱アミド化、少なくとも65%の脱アミド化、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または最大約100%の脱アミド化を指す（例えば、配列番号2のアミノ酸57での少なくとも80%のアスパラギンは、総v p 1タンパク質に基づいて脱アミド化され得、総v p 1、v p 2、およびv p 3タンパク質に基づいて脱アミド化され得る）。かかる割合は、2Dゲル、質量分析技術、または他の好適な技術を使用して決定され得る。

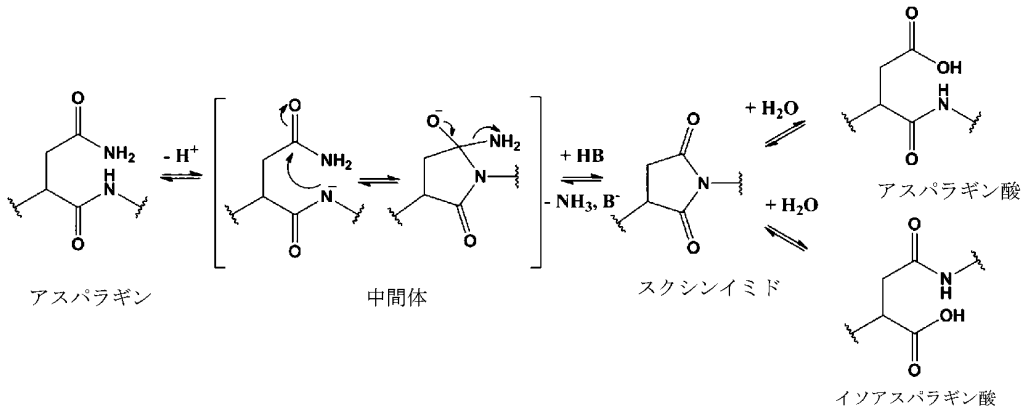
【0031】

理論に束縛されることを意図するものではないが、A A Vカプシド中のv pタンパク質中の少なくとも高度に脱アミドされた残基の脱アミド化は、本質的に主に非酵素的であると考えられ、選択されたアスパラギンを脱アミド化するカプシドタンパク質内の官能基、およびより少ない程度でグルタミン残基によって引き起こされる。大部分の脱アミド化v p 1タンパク質の効率的なカプシド組み立ては、これらの事象がカプシド組み立て後に生じるか、または個々のモノマー（v p 1、v p 2、またはv p 3）における脱アミドが構造的に十分許容され、ほとんどが組み立て動態に影響を及ぼさないことを示す。一般に、細胞侵入前に内部に位置すると考えられるV P 1固有（V P 1 - u）領域（~ a a 1 - 137）における広範な脱アミド化は、カプシド組み立ての前にV P脱アミド化が生じ得ることを示唆する。

【0032】

理論に束縛されることを意図するものではないが、Nの脱アミド化は、そのC末端残基の骨格窒素原子を介して、A s nの側鎖アミド基炭素原子に対して求核攻撃を行うことによって生じ得る。中間環閉鎖スクシンイミド残基が形成されると考えられる。次いで、スクシンイミド残基は、高速加水分解を行って、最終産物であるアスパラギン酸（A s p）またはイソアスパラギン酸（I s o A s p）をもたらす。したがって、特定の実施形態では、アスパラギン（NまたはA s n）の脱アミド化は、A s pまたはI s o A s pをもたらし、例えば、以下に例示するように、スクシンイミド中間体を介して相互変換され得る。

【化1】



10

【0033】

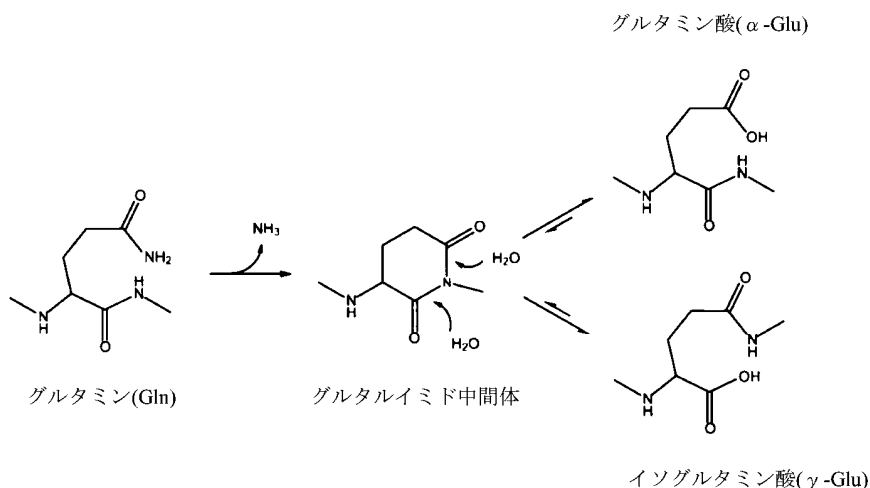
本明細書に提供されるように、VP1、VP2、またはVP3中の各脱アミド化Nは、独立して、アスパラギン酸 (Asp)、イソアスパラギン酸 (isoAsp)、アスパルテート、および/またはAspおよびisoAspの相互変換ブレンド、またはこれらの組み合わせであり得る。 - およびイソアスパラギン酸の任意の好適な比率が存在し得る。例えば、特定の実施形態では、比率は、10:1~1:10のアスパラギン対イソアスパラギン、約50:50のアスパラギン:イソアスパラギン、もしくは約1:3のアスパラギン:イソアスパラギン、または別の選択された比率であり得る。

20

【0034】

特定の実施形態では、1つ以上のグルタミン (Q) は、グルタミン酸 (Glu)、すなわち - グルタミン酸、 - グルタミン酸 (Glu)、または - および - グルタミン酸のブレンドに脱アミド化され得、共通のグルタリミド中間体を介して相互変換され得る。 - および - グルタミン酸の任意の好適な比率が存在し得る。例えば、特定の実施形態では、比率は、10:1~1:10の 対 、約50:50の : 、もしくは約1:3の : 、または別の選択された比率であり得る。

【化2】



30

40

【0035】

したがって、rAAVは、少なくとも、少なくとも1つの高度脱アミド化アスパラギンを含む少なくとも1つの亜集団を含む、脱アミド化アミノ酸を有するvp1、vp2、および/またはvp3タンパク質のrAAVカプシド中に亜集団を含む。さらに、他の修飾は、特に選択されたアスパラギン酸 (DまたはAsp) 残基位置での異性化を含み得る。さらに他の実施形態では、修飾は、Asp位置でのアミド化を含み得る。

【0036】

50

特定の実施形態では、AAVカプシドは、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個から少なくとも約25個の脱アミド化アミノ酸残基位置を有するvp1、vp2、およびvp3の亜集団を含み、そのうちの少なくとも1~10%、少なくとも10~25%、少なくとも25~50%、少なくとも50~70%、少なくとも70~100%、少なくとも75~100%、少なくとも80~100%、または少なくとも90~100%は、vpタンパク質のコードされるアミノ酸配列と比較して脱アミド化される。これらの大部分はN残基であり得る。しかしながら、Q残基は脱アミド化され得る。

【0037】

本明細書で使用される場合、「コードされたアミノ酸配列」は、アミノ酸に翻訳される参照核酸配列の既知のDNAコドンの翻訳に基づいて予測されるアミノ酸を指す。以下の表は、DNAコドンおよび20個の共通アミノ酸を例示し、1文字コード(SLC)および3文字コード(3LC)の両方を示す。

【表1】

アミノ酸	SLC	3 LC	DNA コドン
イソロイシン	I	Ile	ATT、ATC、ATA
ロイシン	L	Leu	CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、TTG
バリン	V	Val	GTT、GTC、GTA、GTG
フェニルアラニン	F	Phe	TTT、TTC
メチオニン	M	Met	ATG
システイン	C	Cys	TGT、TGC
アラニン	A	Ala	GCT、GCC、GCA、GCG
グリシン	G	Gly	GGT、GGC、GGA、GGG
プロリン	P	Pro	CCT、CCC、CCA、CCG
トレオニン	T	Thr	ACT、ACC、ACA、ACG
セリン	S	Ser	TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、AGC
チロシン	Y	Tyr	TAT、TAC
トリプトファン	W	Trp	TGG
グルタミン	Q	Gln	CAA、CAG
アスパラギン	N	Asn	AAT、AAC
ヒスチジン	H	His	CAT、CAC
グルタミン酸	E	Glu	GAA、GAG
アスパラギン酸	D	Asp	GAT、GAC
リジン	K	Lys	AAA、AAG
アルギニン	R	Arg	CGT、CGC、CGA、CGG、AGA、AGG
終止コドン	終止		TAA、TAG、TGA

【0038】

特定の実施形態では、rAAVは、本明細書に提供され、参照により本明細書に組み込まれる表に示される位置に、2、3、4、5個以上の脱アミド化残基の組み合わせを含む亜集団を有するvp1、vp2およびvp3タンパク質を有するAAVカプシドを有する。

【0039】

rAAVの脱アミド化は、2Dゲル電気泳動、および/または質量分析、および/またはタンパク質モデリング技術を使用して決定され得る。オンラインクロマトグラフィーは、NanoFlex source (Thermo Fisher Scientific) を備えたQ Exactive HFに結合されたAcclaim PepMapカラムおよびThermo Ultimate 3000 RSLCシステム (Thermo Fisher Scientific) で実行され得る。MSデータは、Q Exactive HFのデータ依存性Top-20法を使用して取得され、調査スキャン(200~2000m/z)から最も豊富なまだ配列決定されていない前駆体イオンを動的に選択する

。シーケンシングは、予測自動増加制御で決定された 1×10^5 イオンの標的値で、より高いエネルギー衝突解離断片化を介して行われ、 m/z のウィンドウで前駆体の単離を行った。 m/z 200で120,000の解像度で、調査スキャンを取得した。HCDスペクトルの解像度は、最大イオン注入時間が50ms、正規化された衝突エネルギーが30の m/z 200で30,000に設定され得る。S-レンズRFレベルを50に設定して、消化物からのペプチドが占める m/z 領域の透過率を最適化できる。前駆体イオンは、単一、割り当てられていない、または断片化選択から6つ以上の電荷状態で除外され得る。BioPharma Finder 1.0ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific)は、取得したデータの分析に使用され得る。ペプチドマッピングのために、固定変更としてカルバミドメチル化が設定された単一エントリのタンパク質FASTAデータベース、可変修飾として酸化、脱アミド、およびリン酸化の設定、10ppm質量精度、高プロテアーゼ特異性、ならびにMS/MSスペクトルに対する信頼レベル0.8を使用して検索を行う。好適なプロテアーゼの例としては、例えば、トリプシンまたはキモトリプシンが含まれ得る。脱アミド化は、無傷分子の質量+0.984 Da(-OHおよび-NH₂基の質量差)を付加するので、脱アミド化ペプチドの質量分析的同定は比較的簡単である。特定のペプチドの脱アミド化の割合は、脱アミド化ペプチドの質量面積を、脱アミド化および天然ペプチドの面積の合計で割ることによって決定される。考えられる脱アミド化部位の数を考慮すると、異なる部位で脱アミド化されている等張種は、単一のピークで共移行し得る。したがって、複数の潜在的脱アミド部位を有するペプチドに由来する断片イオンを使用して、複数の脱アミド部位を特定または区別することができる。これらの事例では、観察された同位体パターン内の相対強度を使用して、異なる脱アミド化ペプチド異性体の相対的存在量を特異的に決定することができる。この方法は、すべての異性体種についての断片化効率が同じであり、脱アミド化部位において独立していることを想定する。これらの例示的な方法のいくつかの変形が使用され得ることは、当業者によって理解されるであろう。例えば、好適な質量分析器は、例えば、Waters XevoもしくはAgilent 6530などの四重極飛行時間型質量分析計(QTOF)、またはOrbitrap FusionまたはOrbitrap Velos(Thermo Fisher)などのオービトラップ装置を含み得る。好適な液体クロマトグラフィーシステムとしては、例えば、WatersまたはAgilentシステム(1100または1200シリーズ)からのAcquity UPLCシステムが含まれる。好適なデータ分析ソフトウェアとしては、例えば、MassLynx(Waters)、PinpointおよびPeptideFinder(Thermo Fisher Scientific)、Mascot(Matrix Science)、Peaks DB(Bioinformatics Solutions)が含まれる。さらに他の技法は、例えば、2017年6月16日にオンラインで公開されたX. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255 - 267に記載され得る。

【0040】

脱アミド化に加えて、他の修飾が生じ得ても、1つのアミノ酸が異なるアミノ酸残基に変換されることはない。かかる修飾は、アセチル化残基、異性化、リン酸化、または酸化を含み得る。

【0041】

脱アミド化の調節：特定の実施形態では、AAVは、アスパラギン-グリシン対のグリシンを変更し、脱アミド化を低減するように修飾される。他の実施形態では、アスパラギンは、異なるアミノ酸、例えば、より遅い速度で脱アミド化するグルタミン、またはアミド基を欠くアミノ酸(例えば、グルタミンおよびアスパラギンが、アミド基を含む)、および/またはアミン基を欠くアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、およびヒスチジンが、アミン基を含む)に変更される。本明細書で使用される場合、アミドまたはアミン側基を欠くアミノ酸は、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、シスチン、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファン、

10

20

30

40

50

および/またはプロリンを指す。記載されるような修飾は、コードされた A A V アミノ酸配列に見出されるアスパラギン - グリシン対のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つにあり得る。特定の実施形態では、かかる修飾は、アスパラギン - グリシン対の 4 つすべてでは行われ得ない。したがって、A A V および/または操作された A A V バリエーションの脱アミドを低減するための方法は、より低い脱アミド率を有する。加えて、または代替的に、1 つ以上の他のアミドアミノ酸を非アミドアミノ酸に変更して、A A V の脱アミド化を低減し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される変異 A A V カプシドは、グリシンがアラニンまたはセリンに変化するように、アスパラギン - グリシン対において変異を含む。変異 A A V カプシドは、参照 A A V が天然に 4 つの N G 対を含む 1 つ、2 つ、または 3 つの変異を含み得る。特定の実施形態では、A A V カプシドは、参照 A A V が天然に 5 つの N G 対を含む 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つのかかる変異を含み得る。特定の実施形態では、変異 A A V カプシドは、N G 対に単一の変異のみを含む。特定の実施形態では、変異 A A V カプシドは、2 つの異なる N G 対に変異を含む。特定の実施形態では、変異 A A V カプシドは、変異を含む 2 つの異なる N G 対であり、A A V カプシド中の構造的に別個の位置に位置する。特定の実施形態では、変異は、V P 1 固有領域にはない。特定の実施形態では、変異の 1 つは、V P 1 固有領域にある。任意で、変異 A A V カプシドは、N G 対中に修飾を含まないが、N G 対の外側に位置する 1 つ以上のアスパラギンまたはグルタミン中の脱アミド化を最小化または排除するための変異を含む。

10

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態では、野生型 A A V カプシド中の N G の 1 つ以上を排除する A A V カプシドを操作することを含む、r A A V ベクターの効力を増加させる方法が提供される。特定の実施形態では、「N G」の「G」のコード配列は、別のアミノ酸をコードするように操作される。以下の特定の例では、「S」または「A」が置換される。しかしながら、他の好適なアミノ酸コード配列が選択され得る。例えば、A A V 8 の番号付けに基づき、以下の位置のうちの少なくとも 1 つのコード配列についての以下の表を参照されたい：N 5 7 + 1、N 2 6 3 + 1、N 3 8 5 + 1、N 5 1 4 + 1、N 5 4 0 + 1 が修飾されるか、または以下の表に示される。特定の実施形態では、A A V 8 変異は、N 5 7 位、N 9 4 位、N 2 6 3 位、N 3 0 5 位、Q 4 6 7 位、N 4 7 9 位、および/または N 6 5 3 位で N G 対を変更することを回避する。特定の実施形態では、他の A A V は、参照として A A V 8 番号付けを使用して、A A V 8 との整列に基づいて決定される、対応する N 位置での変異を回避する。

20

30

【 0 0 4 3 】

これらのアミノ酸修飾は、従来の遺伝子工学技術によって行われ得る。例えば、修飾 A A V v p コドンを含む核酸配列が生成され得、アルギニン - グリシン対中のグリシンをコードするコドンのうちの 1 ~ 3 個が、グリシン以外のアミノ酸をコードするように修飾される。特定の実施形態では、修飾アルギニンコドンを含む核酸配列は、アルギニン - グリシン対のうちの 1 ~ 3 個が操作され得、その結果、修飾コドンはアルギニン以外のアミノ酸をコードする。各修飾コドンは、異なるアミノ酸をコードし得る。代替的に、改変されたコドンのうちの 1 個以上は、同じアミノ酸をコードし得る。特定の実施形態では、これらの修飾 A A V r h 7 9、A A V 8 . A R 2 . 0 8、または A A V 5 . 5 . 9 核酸配列は、天然 A A V r h 7 9、A A V 8 . A R 2 . 0 8、または A A V 5 . 5 . 9 カプシドよりも低い脱アミド化を有するカプシドを有する変異 r A A V を生成するために使用され得る。かかる変異 r A A V は、免疫原性が低下しており、および/または貯蔵、特に懸濁形態での貯蔵の際の安定性を増加させ得る。

40

【 0 0 4 4 】

本明細書には、低減された脱アミド化を有する A A V カプシドをコードする核酸配列も提供される。D N A (ゲノムまたは c D N A)、または R N A (例えば、m R N A) を含む、この A A V カプシドをコードする核酸配列を設計することは当該技術の範囲内である。かかる核酸配列は、選択されたシステム (すなわち、細胞型) における発現のためにコドン最適化され得、様々な方法によって設計することができる。この最適化は、オンライ

50

ンで利用可能な方法（例えば、GeneArt）、公開された方法、またはコドン最適化サービスを提供する会社、例えば、DNA2.0（Menlo Park, CA）を使用して実行され得る。1つのコドン最適化方法は、例えば、国際特許公開第WO 2015/012924号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。また、例えば、米国特許公開第2014/0032186号および米国特許公開第2006/0136184号を参照されたい。好適には、製品のオープンリーディングフレーム（ORF）の全長を修正する。しかしながら、いくつかの実施形態では、ORFの断片のみが改変され得る。これらの方法のうちの1つを使用することによって、任意の所与のポリペプチド配列に頻度を適用して、ポリペプチドをコードするコドン最適化コード領域の核酸断片を生成することができる。コドンへの実際の変更を実行するため、または本明細書に記載されるように設計されたコドン最適化コード領域を合成するために、いくつかのオプションが利用可能である。かかる修飾または合成は、当業者に周知の標準的かつ日常的な分子生物学的操作を使用して行うことができる。1つのアプローチでは、各80~90ヌクレオチドの長さ、かつ所望の配列の長さにもたがる一連の相補的オリゴヌクレオチド対は、標準的な方法によって合成される。これらのオリゴヌクレオチド対は、アニールすると、凝集末端を含む80~90塩基対の二本鎖断片を形成するように合成され、例えば、対中の各オリゴヌクレオチドは、対中の他のオリゴヌクレオチドと相補的である領域を超えて3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の塩基を伸長するように合成される。オリゴヌクレオチドの各対の一本鎖末端は、オリゴヌクレオチドの別の対の一本鎖末端とアニールするように設計される。オリゴヌクレオチド対をアニールさせ、次いで、これらの二本鎖断片のおよそ5~6個を、凝集性一本鎖末端を介して一緒にアニールさせ、次いで、それらを一緒にライゲーションし、標準的な細菌クローニングベクター、例えば、Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califから入手可能なTOPO（登録商標）ベクターにクローニングする。次いで、構築物を標準的な方法で配列決定する。一緒にライゲーションされた80~90塩基対断片の5~6個の断片、すなわち、約500塩基対の断片からなるこれらの構築物のいくつかを調製し、所望の配列全体が一連のプラスミド構築物で表されるようにする。次いで、これらのプラスミドの挿入物を適切な制限酵素で切断し、一緒にライゲーションして、最終構築物を形成する。次いで、最終構築物を標準的な細菌クローニングベクターにクローニングし、配列決定する。追加の方法は、当業者にはすぐに明らかであろう。さらに、遺伝子合成は、商業的に容易に利用可能である。

10

20

30

【0045】

特定の実施形態では、複数の高度に脱アミド化された「NG」位置を含むAAVカプシドアイソフォーム（すなわち、VP1、VP2、VP3）の異種集団を有するAAVカプシドが提供される。特定の実施形態では、高度に脱アミド化された位置は、予測される完全長のVP1アミノ酸配列を参照して、以下に示す位置にある。他の実施形態では、カプシド遺伝子は、参照される「NG」が除去されるように修飾され、変異「NG」は、別の位置に操作される。

【0046】

特定の実施形態では、rAAVの混合集団は、1つのAAV型の予測されるAAV VP1アミノ酸配列をコードする単一のAAVカプシド核酸配列を使用する産生システムから生じる。しかしながら、製造および製造プロセスは、上記のカプシドタンパク質の異種集団を提供する。

40

【0047】

特定の実施形態では、新規の単離されたAAVrh79カプシドが提供される。AAVをコードする核酸配列は、配列番号1に提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号2に提供される。

【0048】

特定の実施形態では、rAAVは、AAVrh79カプシドを含む。AAVrh79カプシドは、AAVrh79 vp1タンパク質、AAVrh79 vp2タンパク質、およ

50

びAAVrh79 vp3タンパク質の異種集団を含む。一実施形態では、AAVrh79カプシドは、配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列から発現することにより産生される。任意で、vp1固有領域(約aa1~137)またはvp2固有領域(約aa1~203)を除く核酸配列からのvp3タンパク質、配列番号1から産生されるvp1タンパク質、またはvp1タンパク質を共発現する配列は、配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号1と少なくとも70%同一の核酸配列から産生される。他の実施形態では、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAVrh79 vp2タンパク質、配列番号1の少なくともヌクレオチド412~2214を含む配列から産生されるvp2タンパク質、もしくは配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号1の少なくともヌクレオチド412~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質、配列番号2の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAVrh79 vp3タンパク質、配列番号1の少なくともヌクレオチド610~2214を含む配列から産生されるvp3タンパク質、もしくは配列番号2の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号1の少なくともヌクレオチド610~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質。

10

【0049】

特定の実施形態では、AAVrh79カプシドは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集団、および配列番号2の少なくともアミノ酸204~738をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集団を含む。

20

【0050】

AAVrh79 vp1、vp2、およびvp3タンパク質は、配列番号2のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化は、アミノ酸変化をもたらす。配列番号2の数と比較して、N-G対N57、N263、N385、および/またはN51で高いレベルの脱アミド化が観察される。脱アミド化は、以下の表および実施例に示されるように、他の残基において観察されている。特定の実施形態では、AAVrh79は、他の残基が、例えば、典型的には10%未満で脱アミド化され得、かつ/またはメチル化(例えば、~R487)(典型的には、所与の残基で5%未満、より典型的には1%未満)、異性化(例えば、D97で)(典型的には、所与の残基で5%未満、より典型的には1%未満、リン酸化(例えば、存在する場合、約10~約60%、または約10~約30%、または約20~約60%の範囲)(例えば、S149、~S153、~S474、~T570、~S665のうちの一つ以上で)、もしくは酸化(例えば、W248、W307、W307、M405、M437、M473、W480、W480、W505、M526、M544、M561、W621、M637、および/またはW697のうちの一つ以上で)を含む他の修飾を有し得る。任意で、Wは、キヌレニンに酸化し得る。

30

40

【表 2】

表A-AAVrh79脱アミド化

VP1 番号付けに基づく AAVrh79 脱アミド化	脱アミド化%
N57+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
N94+脱アミド化	5~15、約10
~N254+脱アミド化	10~20
~N263+脱アミド化	75~100
~N305+脱アミド化	1~5
~N385+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N410+脱アミド化	1~25
N479+脱アミド化	1~5、1~3
~N514+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~Q601+脱アミド化	0~1
N653+脱アミド化	0~2

10

20

【0051】

特定の実施形態では、AAVrh79カプシドは、トリプシン酵素を用いた質量分析を使用して決定される、上記の表で特定された位置の1つ以上で、以下に示す範囲で修飾される。特定の実施形態では、以下の位置、またはNに続くグリシンのうちの1つ以上は、本明細書に記載されるように修飾される。残基番号は、本明細書に提供されるAAVrh79配列に基づく。配列番号2を参照されたい。

【0052】

特定の実施形態では、AAVrh79 vp1カプシドタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号1に提供される。他の実施形態では、配列番号1と70%~99.9%同一の核酸配列を選択して、AAVrh79カプシドタンパク質を発現し得る。特定の他の実施形態では、核酸配列は、配列番号1と少なくとも約75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%同一、または少なくとも99%~99.9%同一である。しかしながら、配列番号2のアミノ酸配列をコードする他の核酸配列は、rAAVカプシドの産生に使用するために選択され得る。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号1の核酸配列、または配列番号1と少なくとも70%~99%同一、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号2をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号1の核酸配列、または配列番号1の約nt412~約nt2214と少なくとも70%~99.%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号2のvp2カプシドタンパク質(約aa138~738)をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号1の約nt610~約nt2214の核酸配列、または配列番号1のntと少なくとも70%~99.%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号2のvp3カプシドタンパク質(約aa204~738)をコードする。

30

40

【0053】

50

本発明はまた、変異AAVrh79をコードする核酸配列を含み、1つ以上の残基は、本明細書で特定される脱アミド化または他の修飾を低減させるために改変されている。かかる核酸配列は、変異rAAVrh79カプシドの産生において使用することができる。

【0054】

特定の実施形態では、新規AAV8・AR2・08カプシドが提供される。AAVをコードする核酸配列は、配列番号17に提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号18に提供される。一実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)は、AAV8・AR2・08カプシドを有する。AAV8T、AAV8・AR2・08、およびAAV8のアミノ酸配列の整列を図13Aに提供する。AAV8T、AAV8・AR2・08、およびAAV8の核酸配列の整列を図13B~13Dに提供する。

10

【0055】

特定の実施形態では、AAV8・AR2・08カプシドは、配列番号18の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV8・AR2・08 vp1タンパク質、配列番号17から産生されたvp1タンパク質、もしくは配列番号18の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号17と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質、配列番号18の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV8・AR2・08 vp2タンパク質、配列番号17の少なくともヌクレオチド412~2214を含む配列から産生されるvp2タンパク質、もしくは配列番号18の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号17の少なくともヌクレオチド412~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質、配列番号18の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV8・AR2・08 vp3タンパク質、配列番号17の少なくともヌクレオチド610~2214を含む配列から産生されるvp3タンパク質、もしくは配列番号18の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号17の少なくともヌクレオチド610~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質を含む、AAV8・AR2・08カプシドタンパク質を含む。

20

【0056】

追加的に、または代替的に、AAV8・AR2・08カプシドは、配列番号18のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集団、配列番号18の少なくとも約アミノ酸138~738でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集団、および配列番号18の少なくともアミノ酸204~738をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集団を含み、vp1、vp2、およびvp3タンパク質は、配列番号18のアスパラギン-グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化は、アミノ酸変化をもたらす。AAV8・AR2・08は、AAV8・AR2・08 VP1[配列番号18]の番号付けに基づいて、例えばN57位、N263位、N385位、N514、およびN540位に高度脱アミド化残基を有することによって特徴付けされる。追加的に、以下の表および出願における詳細な表の位置にある残基は、AAV8・AR2・08カプシドで観察した脱アミド化を示す。

30

40

【0057】

特定の実施形態では、AAV8・AR2・08カプシドは、トリプシン酵素を用いた質量分析を使用して決定される、以下に提供される範囲で、以下の位置のうちの1つ以上で修飾される。特定の実施形態では、以下の位置、またはNに続くグリシンのうちの1つ以上は、本明細書に記載されるように修飾される。例えば、特定の実施形態では、Gは、例えば、58位、264位、386位、515位、または541位でSまたはAに修飾され得る。NG57/58がNS57/58またはNA57/58に改変される場合、脱アミド化の有意な減少が観察される。しかしながら、特定の実施形態では、NGがNSまたは

50

NAに改変される場合、脱アミド化の増加が観察される。特定の実施形態では、NG対のNは、Gを保持しながらQに修飾される。特定の実施形態では、NG対の両方のアミノ酸が修飾される。特定の実施形態では、N385Qは、その位置における脱アミド化の有意な低減をもたらす。特定の実施形態では、N499Qは、その位置における脱アミド化の有意な増加をもたらす。

【0058】

脱アミド化に加えて、他の修飾は、異性化（例えば、D442および/またはD584のうちの1つ以上で）（1~15%）、リン酸化（例えば、~S149、~T417、~T454、~T493、S600、および/または~T663のうちの1つ以上で）、および/または酸化（例えば、~W22、~M204、~M212、W248、W307、M405、M437、M473、W480、W505、M526、M561、M607、~W609、W621、M637、W697のうちの1つ以上で）を含み得る。さらに他の位置は、これらまたは他の修飾（例えば、アセチル化またはさらなる脱アミド化）を有し得る。

【表3】

表B-AAV8、AR2、08脱アミド化

配列番号18のVP1番号付けに基づく AAV8.AR2.08 脱アミド化	%
N57+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
N94+脱アミド化	1~15
~N254+脱アミド化	1~15
~N263+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N305+脱アミド化	1~15
~N385+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N514+脱アミド化	65~100
~N521+脱アミド化	1~10
~N540+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
N590+脱アミド化	0~5
Q601+脱アミド化	0~5
N653+脱アミド化	0~5
N665+脱アミド化	0~5

【0059】

特定の実施形態では、AAV8、AR2、08 vp1カプシドタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号17に提供される。他の実施形態では、配列番号17と70%~99.9%同一の核酸配列を選択して、AAV8、AR2、08カプシドタンパク質を発現し得る。特定の他の実施形態では、核酸配列は、配列番号17と少なくとも約75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%同一、または少なくとも99%~99.9%同一である。しかしながら、配列番号18のアミノ酸配列をコードする他の核酸配列は、rAAV8、AR2、08カプシドの産生に使用するために選択され得る。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号17の核酸配列、または配列番号17と少なくとも70%~99%同一、少なくとも

75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号18をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号17の核酸配列、または配列番号17の約 nt 412 ~ 約 nt 2214 と少なくともと少なくとも70% ~ 99%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号18のvp2カプシドタンパク質(約 aa 138 ~ 738)をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号17の約 nt 607 ~ 約 nt 2214 の核酸配列、または配列番号17の nt と少なくともと少なくとも70% ~ 99%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号18のvp3カプシドタンパク質(約 aa 204 ~ 738)をコードする。

【0060】

本発明はまた、変異AAV8.2.08をコードする核酸配列を含み、1つ以上の残基は、本明細書で特定される脱アミド化または他の修飾を低減させるために改変されている。かかる核酸配列は、変異rAAV8.2.08の産生において使用することができる。

【0061】

特定の実施形態では、新規AAV5.5.9カプシドが提供される。AAVをコードする核酸配列は、配列番号9に提供され、コードされたアミノ酸配列は、配列番号10に提供される。AAV5.5.9、AAV9、およびAAVPHP.Bのアミノ酸配列の整列を図12Aに示す。AAV5.5.9、AAV9、およびAAVPHP.Bの核酸配列の整列を図12B ~ 12Eに示す。一実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)は、配列番号10の1 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV5.5.9 vp1タンパク質、配列番号9から産生されたvp1タンパク質、もしくは配列番号1の1 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号9と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp1タンパク質の異種集団と、配列番号10の少なくとも約アミノ酸137 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV5.5.9 vp2タンパク質、配列番号9の少なくともヌクレオチド409 ~ 2178を含む配列から産生されるvp2タンパク質、もしくは配列番号10の少なくとも約アミノ酸137 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号9の少なくともヌクレオチド577 ~ 2178と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp2タンパク質の異種集団と、配列番号10の少なくとも約アミノ酸193 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により産生されるAAV5.5.9 vp3タンパク質、配列番号9の少なくともヌクレオチド577 ~ 2178を含む配列から産生されるvp3タンパク質、もしくは配列番号10の少なくとも約アミノ酸193 ~ 726の予測されたアミノ酸配列をコードする、配列番号9の少なくともヌクレオチド577 ~ 2178と少なくとも70%同一の核酸配列から産生されるvp3タンパク質の異種集団と、を含む、AAV5.5.9カプシドタンパク質を含む、AAV5.5.9カプシドを有する。

【0062】

追加的に、または代替的に、AAV5.5.9カプシドは、配列番号10のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp1タンパク質の異種集団、配列番号10の少なくとも約アミノ酸137 ~ 726でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集団、および配列番号10の少なくともアミノ酸193 ~ 726をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集団を含み、vp1、vp2、およびvp3タンパク質は、配列番号10のアスパラギン - グリシン対中の少なくとも2つの高度脱アミド化アスパラギン(N)を含むアミノ酸修飾を有する亜集団を含み、任意で他の脱アミド化アミノ酸を含む亜集団をさらに含み、脱アミド化は、アミノ酸変化をもたらす。

10

20

30

40

50

【表 4】

表C-A A V 5 . 5 . 9 脱アミド化

配列番号 10 の VP1 番号 付けに基づく AAV5.5.9 脱アミド化	%
N35+脱アミド化	0~15、1~10
~N57+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100 、または 90~100
N113+脱アミド化	0~15
~N204+脱アミド化	0~20、1~20
N217+脱アミド化	0~5、1~5
~N243+脱アミド化	0~25、1~25
Q249+脱アミド化	1~20
N293/N294+脱アミド化	10~45、15~40
N304+脱アミド化	1~10
N309+脱アミド化	1~2
Q311+脱アミド化	1~2
~N319+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100 、または 90~100
N399/400+脱アミド化	5~40、10~40、15~35
~N442+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100 、または 90~100
N467+脱アミド化	1~5
N502+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100 、または 90~100
N505+脱アミド化	5~25、10~25
~Q589+脱アミド化	5~30、10~30
N618+脱アミド化	1~15、5~10
~N641+脱アミド化	1~15、5~10
N653+脱アミド化	1~15、5~10
~N658+脱アミド化	5~40、10~30
N694+脱アミド化	0~5
~N699+脱アミド化	1~10

10

20

30

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、A A V 5 . 5 . 9 v p 1 カプシドタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号 9 に提供される。他の実施形態では、配列番号 9 と 7 0 % ~ 9 9 . 9 % 同一の核酸配列を選択して、A A V 5 . 5 . 9 カプシドタンパク質を発現し得る。特定の他の実施形態では、核酸配列は、配列番号 9 と少なくとも約 7 5 % 同一、少なくとも 8 0 % 同一、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 % 同一、または少なくとも 9 9 % ~ 9 9 . 9 % 同一である。しかしながら、配列番号 1 0 のアミノ酸配列をコードする他の核酸配列は、r A A V 5 . 5 . 9 カプシドの産生に使用するために選択され得る。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 1 0 の核酸配列、または配列番号 9 と少なくとも 7 0 % ~ 9 9 % 同一、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を有し、配列番号 1 0 をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号 9 の核酸配列、または配列番号 9 の約 n t 4 0 9 ~ 約 n t 2 1 7 8 と少なくとも 7 0 % ~ 9 9 . %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を有し、配列番号 1 0 の v p 2 カプシドタンパク質 (約 a a 1 3 7 ~ 7 2 6) をコードする。

40

50

特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号9の約 nt 577 ~ 約 nt 2178 の核酸配列、または配列番号9の nt 577 ~ nt 2178 と少なくとも70% ~ 99%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号10のvp3カプシドタンパク質(約 aa 193 ~ 726)をコードする。

【0064】

本発明はまた、変異AAV5.5.9をコードする核酸配列を含み、1つ以上の残基は、本明細書で特定される脱アミド化または他の修飾を低減させるために改変されている。かかる核酸配列は、変異rAAV5.5.9の産生において使用することができる。

【0065】

I. rAAVベクター

上述のように、新規AAV配列およびタンパク質は、rAAVの産生に有用であり、アンチセンス送達ベクター、遺伝子治療ベクター、またはワクチンベクターであり得る組換えAAVベクターにも有用である。加えて、本明細書に記載の操作されたAAVカプシドは、標的細胞および組織へのいくつかの好適な核酸分子の送達のためのrAAVベクターを操作するために使用され得る。

【0066】

AAVカプシドにパッケージングされ宿主細胞に送達されるゲノム配列は、典型的には、最低でもトランス遺伝子、およびその調節配列、およびAAV逆方向末端反復(ITR)から構成される。一本鎖AAVおよび自己相補的(sc)AAVの両方がrAAVに含まれる。導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性RNA分子(例えば、miRNA、miRNA阻害剤)、または他の遺伝子産物をコードするベクター配列とは異種の核酸コード配列である。核酸コード配列は、標的組織の細胞中で導入遺伝子の転写、翻訳、および/または発現を可能にする様式で調節要素に作動可能に連結される。

【0067】

ベクターのAAV配列は、典型的には、シス作用性5'および3'逆方向末端反復配列を含む(例えば、B. J. Carter, 「Handbook of Parvoviruses」, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)を参照されたい)。ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITRをコードする全体配列が分子内で使用されるが、これらの配列のある程度の軽微な修飾が許容される。これらのITR配列を修飾する能力は、当技術分野の範囲内である。(例えば、Sambrook et al, 「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)、およびK. Fisher et al., J. Virol., 70: 520-532 (1996)を参照されたい)。本発明で利用されるかかる分子の一例は、選択された導入遺伝子配列および関連する調節要素が5'および3'AAV ITR配列に隣接する導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドである。一実施形態では、ITRは、カプシドを供給するものとは異なるAAV由来であり、擬似型ベクターをもたらす。一実施形態では、AAV2由来のITR配列である。ITRと称される5'ITRの短縮バージョンが記載されており、D配列および末端分解能部位(trs)が欠損される。他の実施形態では、完全長AAV5'および3'ITRが使用される。しかしながら、他のAAV起源からのITRが選択されてもよい。ITRの供給源がAAV2由来であり、AAVカプシドが別のAAV供給源由来である場合、得られるベクターは、擬似型と称され得る。しかしながら、これらの要素の他の構成が好適であり得る。

【0068】

組換えAAVベクターについて上述した主要要素に加えて、ベクターは、プラスミドベクターでトランスフェクトされた、または本発明により産生されたウイルスに感染した細胞中でその転写、翻訳、および/または発現を可能にするような様式で導入遺伝子と作動可能に連結される必要な従来の制御要素も含む。本明細書で使用される場合、「作動可能

10

20

30

40

50

に連結される」配列は、目的の遺伝子と隣接する発現制御配列、および目的の遺伝子を制御するためにトランスでまたは離れて作用する発現制御配列の両方が含まれる。

【0069】

調節制御要素は、典型的には、発現制御配列の一部として、例えば、選択される5' ITR配列とコード配列との間に位置するプロモーター配列を含む。構成的プロモーター、調節可能なプロモーター [例えば、WO2011/126808およびWO2013/04943を参照されたい]、組織特異的プロモーター、または生理学的ヒントに応答するプロモーターが、本明細書に記載されるベクターに使用され得る。プロモーター（複数可）は、異なる供給源、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期エンハンサー/プロモーター、SV40初期エンハンサー/プロモーター、JCポリオマウイルスプロモーター、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）または神経膠原線維酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV-1）潜伏関連プロモーター（LAP）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）長末端反復（LTR）プロモーター、ニューロン特異的プロモーター（NSE）、血小板由来成長因子（PDGF）プロモーター、hSYN、メラニン濃縮ホルモン（MCH）プロモーター、CBA、マトリックスメタロプロテインプロモーター（MPP）、およびニワトリベータアクチンプロモーターから選択され得る。一実施形態では、プロモーターは、本明細書に例示されるLSPと称されるものなどの肝臓特異的プロモーターである。

【0070】

プロモーターに加えて、ベクターは、1つ以上の他の適切な転写開始、終結、エンハンサー配列、スプライシングおよびポリアダニル化（ポリA）シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、例えばWPRE、翻訳効率を高める配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）、タンパク質の安定性を増強する配列、および必要に応じて、コードされた産物の分泌を増強する配列を含み得る。好適なエンハンサーの例は、CMVエンハンサーである。他の適切なエンハンサーには、所望の標的組織適応症に適切なものが含まれる。一実施形態では、発現カセットは、1つ以上の発現エンハンサーを含む。一実施形態では、発現カセットは、2つ以上の発現エンハンサーを含む。これらのエンハンサーは同じであっても、互いに異なってもよい。例えば、エンハンサーは、CMV前初期エンハンサーを含み得る。このエンハンサーは、互いに隣接して位置する2つのコピーに存在し得る。代替的には、エンハンサーの二重コピーは、1つ以上の配列により分離され得る。さらに別の実施形態では、発現カセットは、イントロン、例えば、ニワトリベータアクチンイントロンをさらに含む。他の好適なイントロンとしては、当該技術分野で既知のものが含まれ、例えば、国際公開第WO2011/126808号に記載される。好適なポリA配列の例には、例えば、SV40、SV50、ウシ成長ホルモン（bGH）、ヒト成長ホルモン、および合成ポリAが含まれる。任意で、1つ以上の配列を選択して、mRNAを安定させてもよい。かかる配列の一例は、修飾WPRE配列であり、これは、ポリA配列の上流およびコード配列の下流で操作され得る [例えば、MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619]。

【0071】

これらのrAAVは、特に、防御免疫を誘導することを含む、治療目的および免疫化のための遺伝子送達に適している。さらに、本発明の組成物は、インビトロで所望の遺伝子産物を産生するために使用され得る。インビトロ産生のために、所望の産物（例えば、タンパク質）は、所望の産物をコードする分子を含むrAAVで宿主細胞をトランスフェクションし、発現を可能にする条件下で細胞培養物を培養した後、所望の培養物から得ることができる。次いで、発現した産物は、所望される場合、精製および単離され得る。トランスフェクション、細胞培養、精製、および単離に好適な技術は、当業者に既知である。

【0072】

治療用導入遺伝子

導入遺伝子によってコードされる有用な産物としては、欠損または欠損遺伝子を置き換

10

20

30

40

50

え、不活性化または「ノックアウト」、または「ノックダウン」または望ましくない高レベルで発現している遺伝子の発現を低下させる、または所望の治療効果を有する遺伝子産物を送達する様々な遺伝子産物が含まれる。ほとんどの実施形態では、治療は、「体細胞遺伝子治療」、すなわち、精子または卵子を産生しない体の細胞への遺伝子の導入である。特定の実施形態では、導入遺伝子発現タンパク質は、天然ヒト配列の配列を有する。しかしながら、他の実施形態では、合成タンパク質が発現される。かかるタンパク質は、ヒトの治療を企図するか、または他の実施形態では、イヌもしくはネコ集団などの同伴動物を含む動物の治療、またはヒト集団と接触する家畜もしくは他の動物の治療のために設計され得る。

【0073】

好適な遺伝子産物の例としては、家族性高コレステロール血症、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、および希少疾患または孤児疾患に関連するものが含まれ得る。かかる希少疾患の例としては、とりわけ、脊髄性筋萎縮症(SMA)、ハンチントン病、レット症候群(例えば、メチル-CpG結合タンパク質2(MeCP2)、UniProtKB-P51608)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症(例えば、フラタキシン)、プログラニューリン(PRGN)(前頭部認知症(FTD)、進行性非流暢性失語症(PNFA)、および意味性認知症を含む非アルツハイマー性脳変性に関連する)などが含まれる。例えば、www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php;rarediseases.info.nih.gov/diseasesを参照されたい。

【0074】

好適な遺伝子の例としては、例えば、インスリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1(GLP1)、成長ホルモン(GH)、副甲状腺ホルモン(PTH)、成長ホルモン放出因子(GRF)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、血管内皮増殖因子(VEGF)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)、エリスロポエチン(EPO)(例えば、ヒト、イヌ、またはネコepoを含む)、結合組織成長因子(CTGF)、好中球因子、例えば塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、上皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン成長因子IおよびII(IGF-IおよびIGF-II)、TGF、アクチビン、インヒピンを含む形質転換成長因子スーパーファミリーのうちのいずれか1つ、または骨形成タンパク質(BMP)BMP1-15のうちのいずれか、成長因子のヘレグルイン/ニューレグリン/ARIA/neu分化因子(NDF)ファミリー、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィンNT-3およびNT-4/5、毛様体神経栄養因子(CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、ニューロリン、アグリンのうちのいずれか1つ、セマフォリン/コラプシン、ネトリン1およびネトリン2、肝細胞増殖因子(HGF)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグ、およびチロシンヒドロキシラーゼのファミリーのうちのいずれか1つを含むがこれらに限定されない、ホルモンならびに成長および分化因子が含まれ得る。

【0075】

他の有用な導入遺伝子産物としては、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン(IL)、IL-1からIL-36(例えば、ヒトインターロイキンIL-1、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、IL-31、IL-35)、単球走化性タンパク質、白血病阻害因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、 Fasリガンド、腫瘍壊死因子 および 、インターフェロン 、 および 、 幹細胞因子、 flk-2/flt3リガンドなどのサイトカインならびにリンホカインを含むがこれらに限定されない免疫系を制御するタンパク質が含まれる。免疫系によって産生される遺伝子産物も本発明において有用である。これらには、免疫グロブリンIgG、

10

20

30

40

50

IgM、IgA、IgD、およびIgE、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T細胞受容体、キメラT細胞受容体、一本鎖T細胞受容体、クラスIおよびクラスII MHC分子、ならびに操作された免疫グロブリンおよびMHC分子が含まれるがこれらに限定されない。例えば、特定の実施形態では、rAAV抗体は、例えば、抗IgE、抗IL31、抗CD20、抗NGF、抗GnRHなどのイヌまたはネコ抗体を送達するように設計され得る。有用な遺伝子産物としては、補体調節タンパク質、膜補因子タンパク質(MCP)、崩壊促進因子(DAF)、CR1、CF2、CD59、およびC1エステラーゼ阻害剤(C1-INH)などの補体制御性タンパク質も含まれる。

【0076】

さらに他の有用な遺伝子産物としては、ホルモン、成長因子、サイトカイン、リンホカイン、制御性タンパク質、および免疫系タンパク質の受容体のうちのいずれか1つが含まれる。本発明は、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、高密度リポタンパク質(HDL)受容体、超低密度リポタンパク質(VLDL)受容体、およびスカベンジャー受容体を含む、コレステロール制御および/または脂質調節のための受容体を包含する。本発明はまた、糖質コルチコイド受容体およびエストロゲン受容体、ビタミンD受容体および他の核受容体を含むステロイドホルモン受容体スーパーファミリーのメンバーなどの遺伝子産物を包含する。加えて、有用な遺伝子産物としては、jun、fos、max、mad、血清応答因子(SRF)、AP-1、AP2、myb、MyoDおよびミオゲニンなどの転写因子、タンパク質を含むETSボックス、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAATボックス結合タンパク質、インターフェロン制御因子(IRF-1)、ウィルムス腫瘍タンパク質、ETS結合タンパク質、STAT、GATAボックス結合タンパク質、例えばGATA-3、ならびに翼状螺旋タンパク質のフォークヘッドファミリーが含まれる。

【0077】

他の有用な遺伝子産物としては、カルバモイルシンターゼI、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)、アルギノコハク酸シンターゼ、アルギノコハク酸リアーゼ欠乏症の治療のためのアルギノコハク酸リアーゼ(ASL)、アルギナーゼ、フマル酢酸ヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、アルファ-1アンチトリプシン、アカゲザルアルファ-フェトプロテイン(AFP)、アカゲザル絨毛性ゴナドトロピン(CG)、グルコース-6-ホスファターゼ、ポルホピリノーゲンデアミナーゼ、シスタチオンベータ-シンターゼ、分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル-coAデヒドロゲナーゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ、インスリン、ベータ-グルコシダーゼ、ピルビン酸カルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、H-タンパク質、T-タンパク質、嚢胞性線維症膜貫通制御因子(CFTR)配列、およびジストロフィン遺伝子産物[例えば、ミニ-またはマイクロ-ジストロフィン]が含まれる。さらに他の有用な遺伝子産物は、酵素補充療法に有用であり得るような酵素を含み、これは酵素の不十分な活性に起因する様々な状態において有用である。例えば、マンノース-6-リン酸を含む酵素は、リソソーム蓄積症の治療に利用され得る(例えば、好適な遺伝子は、-グルクロニダーゼ(GUSB)をコードする遺伝子を含む)。

【0078】

特定の実施形態では、rAAVは、遺伝子編集システムで使用され得、システムは、1つのrAAVまたは複数のrAAVシステムの共投与を伴い得る。例えば、rAAVは、SpCas9、SaCas9、ARCUS、Cpf1、および他の好適な遺伝子編集構築物を送達するように操作され得る。

【0079】

さらに他の有用な遺伝子産物としては、血友病B(第IX因子を含む)および血友病A(第VIII因子およびそのパリアント、例えばヘテロ二量体およびB-欠失ドメインの

10

20

30

40

50

軽鎖ならびに重鎖を含む；米国特許第 6, 200, 560 号および米国特許第 6, 221, 349 号) を含む血友病の治療に使用されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、ミニ遺伝子は、10 個のアミノ酸シグナル配列をコードする第 V I I 因子重鎖の最初の 57 塩基対、ならびにヒト成長ホルモン (hGH) ポリアデニル化配列を含む。代替的な実施形態では、ミニ遺伝子は、A1 および A2 ドメイン、ならびに B ドメインの N 末端からの 5 個のアミノ酸、かつ / または B ドメインの C 末端の 85 個のアミノ酸、ならびに A3、C1、および C2 ドメインをさらに含む。さらに他の実施形態では、第 V I I I 因子重鎖および軽鎖をコードする核酸は、B ドメインの 14 個のアミノ酸をコードする 42 個の核酸によって分離される単一ミニ遺伝子内に提供される [米国特許第 6, 200, 560 号]。

10

【0080】

他の有用な遺伝子産物としては、挿入、欠失、またはアミノ酸置換を含む非天然アミノ酸配列を有するキメラまたはハイブリッドポリペプチドなどの非天然ポリペプチドが含まれる。例えば、一本鎖操作された免疫グロブリンは、特定の免疫不全患者において有用であり得る。他の種類の非天然遺伝子配列としては、アンチセンス分子およびリボザイムなどの触媒核酸が含まれ、標的の過剰発現を低減するために使用され得る。

【0081】

遺伝子の発現の低減および / または調節は、がんおよび乾癬と同様に、過増殖細胞を特徴とする過増殖状態の治療に特に望ましい。標的ポリペプチドとしては、正常細胞と比較して、過剰増殖細胞において排他的またはより高いレベルで産生されるポリペプチドが含まれる。標的抗原としては、myb、myc、fyn などのがん遺伝子、ならびに転座遺伝子 bcr/abl、ras、src、P53、neu、trk、および EGRF によってコードされるポリペプチドが含まれる。標的抗原としてのがん遺伝子産物に加えて、抗がん治療および保護レジメンのための標的ポリペプチドは、B 細胞リンパ腫によって作製された抗体の可変領域および T 細胞リンパ腫の T 細胞受容体の可変領域を含み、いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の標的抗原としても使用される。他の腫瘍関連ポリペプチドは、モノクローナル抗体 17-1A および葉酸結合ポリペプチドによって認識されるポリペプチドを含む腫瘍細胞中でより高いレベルで見出されるポリペプチドなどの標的ポリペプチドとして使用することができる。

20

【0082】

他の好適な治療用ポリペプチドおよびタンパク質としては、細胞受容体および「自己」指向性抗体を産生する細胞を含む自己免疫に関連する標的に対する広範な防御免疫応答を付与することにより、自己免疫疾患および障害に罹患する個体を治療するために有用であり得るものが含まれる。T 細胞媒介性自己免疫疾患としては、関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS)、シェーグレン症候群、サルコイドーシス、インスリン依存性糖尿病 (IDDM)、自己免疫性甲状腺炎、反応性関節炎、強直性脊椎炎、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、乾癬、血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、クローン病、および潰瘍性大腸炎が含まれる。これらの疾患の各々は、内因性抗原と結合し、自己免疫疾患に関連する炎症カスケードを開始する T 細胞受容体 (TCR) を特徴とする。

30

【0083】

rAAV を介して送達され得るさらなる例示的な遺伝子としては、限定されないが、グリコーゲン蓄積症または 1A 型欠乏症 (GSD1) に関連するグルコース-6-ホスファターゼ、PEPCK 欠乏症に関連するホスホエノールピルビン酸-カルボキシキナーゼ (PEPCK)、発作および重度神経発達障害に関連するセリン/スレオニンキナーゼ 9 (STK9) としても知られるサイクリン依存性キナーゼ様 5 (CDKL5)、ガラクトース血症に関連するガラクトース-1リン酸ウリジルトランスフェラーゼ、フェニルケトン尿症 (PKU) に関連するフェニルアラニンヒドロキシラーゼ、メープルシロップ尿症に関連する分枝鎖アルファ-ケト酸デヒドロゲナーゼ、チロシン血症 1 型に関連するフマリルアセト酢酸ヒドラーゼ、メチルマロン酸血症に関連するメチルマロニル-CoA ムターゼ、中鎖アセチル CoA 欠乏症に関連する中鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ、オルニ

40

50

チントランスカルバミラーゼ欠損症に関連するオルニチントランスカルバミラーゼ (O T C)、シトルリン血症に関連するアルギニノコハク酸シンテターゼ (A S S 1)、レシチン - コレステロールアシルトランスフェラーゼ (L C A T) 欠乏症、アメチルマロン酸血症 (M M A)、ニーマンピック病、C 1 型)、プロピオン酸血症 (P A)、家族性高コレステロール血症 (F H) に関連する低密度リポタンパク質受容体 (L D L R) タンパク質、クリグラー・ナジャー病に関連する U D P - グルコウロシルトランスフェラーゼ、重症複合免疫不全症に関連するアデノシンデアミナーゼ、痛風およびレッシュニャン症候群に関連するヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ピオチミダーゼ欠乏症に関連するピオチミダーゼ、ファブリー病に関連するアルファ - ガラクトシダーゼ A (a - G a l A)、ウィルソン病に関連する A T P 7 B、ゴーシェ病 2 型および 3 型 10
 に関連するベータグルコセレブロシダーゼ、ゼルウィガー症候群に関連するペルオキシソーム膜タンパク質 7 0 k D a、異染性白質ジストロフィーに関連するアリアルスルファターゼ A (A R S A)、クラッペ病に関連するガラクトセレブロシダーゼ (G A L C) 酵素、ポンペ病に関連するアルファグルコシダーゼ (G A A)、ニーマンピック病 A 型に関連するスフィンゴミエリナーゼ (S M P D 1) 遺伝子、成人発症 I I 型シトルリン血症 (C T L N 2) 20
 に関連するアルギニノスクシン酸シンターゼ、尿素サイクル障害に関連するカルバモイルリン酸シンターゼ 1 (C P S 1)、脊髄性筋萎縮症に関連する生存運動ニューロン (S M N) タンパク質、ファーバー脂肪肉芽腫症に関連するセラミダーゼ、G M 2 ガングリオシドーシスおよびテイサックスおよびサンドホフ病に関連する b - ヘキソサミニダーゼ、アスパルチル - グルコサミニウリアに関連するアスパルチル - グルコサミニダーゼ、フコシドーシスに関連する a - フコシダーゼ、アルファ - マンノシドーシスに関連する - マンノシダーゼ、急性間欠性ポルフィリン症 (A I P) 30
 に関連するボルホピリノーゲンデアミナーゼ、アルファ - 1 アンチトリプシン欠乏症 (肺気腫) の治療のためのアルファ - 1 アンチトリプシン、サラセミアまたは腎不全による貧血の治療のためのエリスロポエチン、虚血性疾患の治療のための血管内皮増殖因子、アンジオポエチン - 1、および線維芽細胞増殖因子、例えば、アテローム性動脈硬化症、血栓症、または塞栓症に見られる閉塞した血管の治療のためのトロンボモジュリンおよび組織因子経路阻害剤、パーキンソン病の治療のための芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (A A D C)、およびチロシンヒドロキシラーゼ (T H)、うっ血性心不全の治療のためのベータアドレナリン受容体、ホスホランパンに対するアンチセンスまたはその変異体、筋 (小胞体) アデノシントリホスファターゼ - 2 (S E R C A 2)、および心臓アデニル酸シクラーゼ、様々ながんの治療のための p 5 3 などの腫瘍抑制遺伝子、炎症性および免疫障害およびがんの治療のための様々なインターロイキンのうちの 1 つのようなサイトカイン、筋ジストロフィーの治療のためのジストロフィンまたはミニジストロフィンおよびユートロフィンまたはミニトロフィン、ならびに糖尿病の治療のためのインスリンまたは G L P - 1 が含まれる。

【 0 0 8 4 】

さらなる目的の遺伝子および疾患としては、例えば、遺伝性感覚および自律神経失調症 V I 型などのジストニン遺伝子関連疾患 (D S T 遺伝子はジストニンをコードする、タンパク質のサイズ (~ 7 5 7 0 a a) により必要とされ得るデュアル A A V ベクター、痛みを感じることができなくなる機能変異体の欠失、およびエリスロメラギアなどの痛み状態を引き起こす機能変異体の獲得などの S C N 9 A 関連疾患を含む。別の状態は、N E F L 40
 遺伝子 (神経フィラメント軽鎖) における変異による C h a r c o t - M a r i e - T o o t h 1 F 型および 2 E 型である。可変性の臨床的および電気生理学的発現を伴う進行性末梢運動および感覚性ニューロパシーを特徴とする。

【 0 0 8 5 】

特定の実施形態では、本明細書に記載される r A A V は、ムコ多糖症 (M P S) 障害の治療において使用され得る。かかる r A A V は、M P S I (ハーラー、ハーラー・シャイエおよびシャイエ症候群) を治療するための - L - イズロニダーゼ (I D U A) をコードする核酸配列、M P S I I (ハンター症候群) を治療するためのイズロン酸 - 2 - スルファターゼ (I D S) をコードする核酸配列、M P S I I I A、B、C、および D 50

(サンフィリップ症候群)を治療するためのスルファミダーゼ(SGSH)をコードする核酸配列、MPS I V AおよびB(モルキオ症候群)を治療するためのN-アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ(GALNS)をコードする核酸配列、MPS VI(マロー・ラミー症候群)を治療するためのアリアルスルファターゼB(ARSB)をコードする核酸配列、MPS IX(ヒアルロニダーゼ欠損症)を治療するためのヒアルロニダーゼをコードする核酸配列、ならびにMPS VII(スライ症候群)を治療するためのベータグルクロニダーゼをコードする核酸配列を担持することを含み得る。

【0086】

免疫原性導入遺伝子

いくつかの実施形態では、がんに関連する遺伝子産物(例えば、腫瘍抑制因子)をコードする核酸を含むrAAVベクターは、がんを有する対象にrAAVベクターを収容するrAAVを投与することによって、がんを治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、がんに関連する遺伝子産物(例えば、がん遺伝子)の発現を阻害する低分子干渉核酸(例えば、shRNA、miRNA)をコードする核酸を含むrAAVベクターは、がんを有する対象にrAAVベクターを収容するrAAVを投与することによって、がんを治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、がんに関連する遺伝子産物(またはがんに関連する遺伝子の発現を阻害する機能性RNA)をコードする核酸を含むrAAVベクターは、研究目的、例えば、がんを研究するために、またはがんを治療する治療薬を特定するために使用され得る。以下は、がんの発症に関連することが知られている例示的な遺伝子(例えば、がん遺伝子および腫瘍抑制因子)の非限定的なリストである

: AARS、 ABCB1、 ABCC4、 ABI2、 ABL1、 ABL2、 ACK1、 ACP2、 ACY1、 ADSL、 AK1、 AKR1C2、 AKT1、 ALB、 ANPEP、 ANXA5、 ANXA7、 AP2M1、 APC、 ARHGAP5、 ARHGEF5、 ARID4A、 ASNS、 ATF4、 ATM、 ATP5B、 ATP5O、 AXL、 BARD1、 BAX、 BCL2、 BHLHB2、 BLMH、 BRAF、 BRCA1、 BRCA2、 BTK、 CANX、 CAP1、 CAPN1、 CAPNS1、 CAV1、 CBFβ、 CBLB、 CCL2、 CCND1、 CCND2、 CCND3、 CCNE1、 CCT5、 CCYR61、 CD24、 CD44、 CD59、 CDC20、 CDC25、 CDC25A、 CDC25B、 CDC2L5、 CDK10、 CDK4、 CDK5、 CDK9、 CDKL1、 CDKN1A、 CDKN1B、 CDKN1C、 CDKN2A、 CDKN2B、 CDKN2D、 CEBPG、 CENPC1、 CGRRF1、 CHAF1A、 CIB1、 CKMT1、 CLK1、 CLK2、 CLK3、 CLNS1A、 CLTC、 COL1A1、 COL6A3、 COX6C、 COX7A2、 CRAT、 CRHR1、 CSF1R、 CSK、 CSNK1G2、 CTNNA1、 CTNNB1、 CTPS、 CTSC、 CTSD、 CUL1、 CYR61、 DCC、 DCN、 DDX10、 DEK、 DHCR7、 DHRS2、 DHX8、 DLG3、 DVL1、 DVL3、 E2F1、 E2F3、 E2F5、 EGFR、 EGR1、 EIF5、 EPHA2、 ERBB2、 ERBB3、 ERBB4、 ERCC3、 ETV1、 ETV3、 ETV6、 F2R、 FASTK、 FBN1、 FBN2、 FES、 FGFR1、 FGR、 FKBP8、 FN1、 FOS、 FOSL1、 FOSL2、 FOXG1A、 FOXO1A、 FRAP1、 FRZB、 FTL、 FZD2、 FZD5、 FZD9、 G22P1、 GAS6、 GCN5L2、 GDF15、 GNA13、 GNAS、 GNB2、 GNB2L1、 GPR39、 GRB2、 GSK3A、 GSPT1、 GTF2I、 HDAC1、 HDGF、 HMMR、 HPRT1、 HRB、 HSPA4、 HSPA5、 HSPA8、 HSPB1、 HSPH1、 HYAL1、 HYOU1、 ICAM1、 ID1、 ID2、 IDUA、 IER3、 IFITM1、 IGF1R、 IGF2R、 IGFBP3、 IGFBP4、 IGFBP5、 IL1B、 ILK、 ING1、 IRF3、 ITGA3、 ITGA6、 ITGB4、 JAK1、 JARID1A、 JUN、 JUNB、 JUND、 K-ALPHA-1、 KIT、 KITLG、 KLK10、 KPNA2、 KRAS2、 KRT18、 KRT2A、 KRT9、 LAMB1、 LAMP2、 LCK、 LCN2、 LEP、 LITAF、 LRPAP1、 LTF、 LYN、 LZTR1、 MADH1、 MAP2K2、 MAP3K8、 MAPK12、 MAPK13

10

20

30

40

50

、MAPKAPK3、MAPRE1、MARS、MAS1、MCC、MCM2、MCM4、MDM2、MDM4、MET、MGST1、MICB、MLLT3、MME、MMP1、MMP14、MMP17、MMP2、MNDA、MSH2、MSH6、MT3、MYB、MYBL1、MYBL2、MYC、MYCL1、MYCN、MYD88、MYL9、MYLK、NEO1、NF1、NF2、NFKB1、NFKB2、NFSF7、NID、NINE、NMBR、NME1、NME2、NME3、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH4、NPM1、NQO1、NR1D1、NR2F1、NR2F6、NRAS、NRG1、NSEP1、OSM、PA2G4、PABPC1、PCNA、PCTK1、PCTK2、PCTK3、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDPK1、PEA15、PFDN4、PFDN5、PGAM1、PHB、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIM1、PKM2、PKMYT1、PLK2、PPARD、PPARG、PPIH、PPP1CA、PPP2R5A、PRDX2、PRDX4、PRKAR1A、PRKCBP1、PRNP、PRSS15、PSMA1、PTCH、PTEN、PTGS1、PTMA、PTN、PTPRN、RAB5A、RAC1、RAD50、RAF1、RALBP1、RAP1A、RARA、RARB、RASGRF1、RB1、RBBP4、RBL2、REA、REL、RELA、RELB、RET、RFC2、RGS19、RHOA、RHOB、RHOC、RHOD、RIPK1、RPN2、RPS6KB1、RRM1、SARS、SELENBP1、SEMA3C、SEMA4D、SEPP1、SERPINH1、SFN、SFPQ、SFRS7、SHB、SHH、SIAH2、SIVA、SIVATP53、SKI、SKIL、SLC16A1、SLC1A4、SLC20A1、SMO、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1(SMPD1)、SNAI2、SND1、SNRPB2、SOCS1、SOCS3、SOD1、SORT1、SPINT2、SPRY2、SRC、SRPX、STAT1、STAT2、STAT3、STAT5B、STC1、TAF1、TBL3、TBRG4、TCF1、TCF7L2、TFAP2C、TFDP1、TFDP2、TGFA、TGFB1、TGFB1、TGFB2、TGFB3、THBS1、TIE、TIMP1、TIMP3、TJP1、TK1、TLE1、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF6、TNFSF7、TNK1、TOB1、TP53、TP53BP2、TP5313、TP73、TPBG、TPT1、TRADD、TRAM1、TRRAP、TSG101、TUFM、TXNRD1、TYRO3、UBC、UBE2L6、UCHL1、USP7、VDAC1、VEGF、VHL、VIL2、WEE1、WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WT1、XRCC1、YES1、YWHAB、YWHAZ、ZAP70、およびZNF9。

【0087】

rAAVベクターは、導入遺伝子として、アポトーシスを調節するタンパク質または機能的RNAをコードする核酸を含み得る。以下は、本発明の特定の実施形態での導入遺伝子として有用であるこれらの遺伝子およびその相同体の発現を阻害する、アポトーシスに関連する遺伝子、ならびにこれらの遺伝子およびその相同体の産物をコードする、ならびに低分子干渉核酸(例えば、shRNA、miRNA)をコードする核酸の非限定的なリストである：RPS27A、ABL1、AKT1、APAF1、BAD、BAG1、BAG3、BAG4、BAK1、BAX、BCL10、BCL2、BCL2A1、BCL2L1、BCL2L10、BCL2L11、BCL2L12、BCL2L13、BCL2L2、BCLAF1、BFAR、BID、BIK、NAIP、BIRC2、BIRC3、XIAP、BIRC5、BIRC6、BIRC7、BIRC8、BNIP1、BNIP2、BNIP3、BNIP3L、BOK、BRAF、CARD10、CARD11、NLRC4、CARD14、NOD2、NOD1、CARD6、CARDS、CARDS、CASP1、CASP10、CASP14、CASP2、CASP3、CASP4、CASP5、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9、CFLAR、CIDEA、CIDEB、CRADD、DAPK1、DAPK2、DFFA、DFFB、FADD、GADD45A、GDNF、HRK、IGF1R、LTA、LTBR、MCL1、NOL3、PYC

10

20

30

40

50

ARD、RIPK1、RIPK2、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF14、TNFRSF19、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF25、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、TNFRSF9、TNFSF10、TNFSF14、TNFSF18、CD40LG、FASLG、CD70、TNFSF8、TNFSF9、TP53、TP53BP2、TP73、TP63、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、およびTRAF5。

【0088】

有用な導入遺伝子産物としては、miRNAも含まれる。miRNAおよび他の低分子干渉核酸は、標的RNA転写産物の切断/分解または標的メッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳抑制を介して遺伝子発現を制御する。miRNAは、典型的には、最終的な19~25の非翻訳RNA産物として天然に発現される。miRNAは、標的mRNAの3'非翻訳領域(UTR)との配列特異的相互作用を通じてそれらの活性を示す。これらの内因性発現miRNAはヘアピン前駆体を形成し、その後、miRNA二本鎖に、さらに「成熟」一本鎖miRNA分子に処理される。この成熟miRNAは、成熟miRNAとの相補性に基づいて、例えば、3'UTR領域内の標的mRNAの標的部位を特定する、多タンパク質複合体miRISCを誘導する。

【0089】

以下の非限定的なmiRNA遺伝子およびその相同体のリストは、導入遺伝子、または以下の方法の特定の実施形態での導入遺伝子(例えば、miRNAスポンジ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、TuD RNA)によってコードされる低分子干渉核酸の標的として有用である: hsa-let-7a、hsa-let-7a*、hsa-let-7b、hsa-let-7b*、hsa-let-7c、hsa-let-7c*、hsa-let-7d、hsa-let-7d*、hsa-let-7e、hsa-let-7e*、hsa-let-7f、hsa-let-7f-1*、hsa-let-7f-2*、hsa-let-7g、hsa-let-7g*、hsa-let-71、hsa-let-71*、hsa-miR-1、hsa-miR-100、hsa-miR-100*、hsa-miR-101、hsa-miR-101*、hsa-miR-103、hsa-miR-105、hsa-miR-105*、hsa-miR-106a、hsa-miR-106a*、hsa-miR-106b、hsa-miR-106b*、hsa-miR-107、hsa-miR-10a、hsa-miR-10a*、hsa-miR-10b、hsa-miR-10b*、hsa-miR-1178、hsa-miR-1179、hsa-miR-1180、hsa-miR-1181、hsa-miR-1182、hsa-miR-1183、hsa-miR-1184、hsa-miR-1185、hsa-miR-1197、hsa-miR-1200、hsa-miR-1201、hsa-miR-1202、hsa-miR-1203、hsa-miR-1204、hsa-miR-1205、hsa-miR-1206、hsa-miR-1207-3p、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1208、hsa-miR-122、hsa-miR-122*、hsa-miR-1224-3p、hsa-miR-1224-5p、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1226、hsa-miR-1226*、hsa-miR-1227、hsa-miR-1228、hsa-miR-1228*、hsa-miR-1229、hsa-miR-1231、hsa-miR-1233、hsa-miR-1234、hsa-miR-1236、hsa-miR-1237、hsa-miR-1238、hsa-miR-124、hsa-miR-124*、hsa-miR-1243、hsa-miR-1244、hsa-miR-1245、hsa-miR-1246、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1249、hsa-miR-1250、hsa-miR-1251、hsa-miR-1252、hsa-miR-1253、hsa-miR-1254、hsa-miR-1255a、hsa-

10

20

30

40

50

miR - 1255b、hsa - miR - 1256、hsa - miR - 1257、hsa -
miR - 1258、hsa - miR - 1259、hsa - miR - 125a - 3p、hs
a - miR - 125a - 5p、hsa - miR - 125b、hsa - miR - 125b -
1*、hsa - miR - 125b - 2*、hsa - miR - 126、hsa - miR - 1
26*、hsa - miR - 1260、hsa - miR - 1261、hsa - miR - 12
62、hsa - miR - 1263、hsa - miR - 1264、hsa - miR - 126
5、hsa - miR - 1266、hsa - miR - 1267、hsa - miR - 1268
、hsa - miR - 1269、hsa - miR - 1270、hsa - miR - 1271、
hsa - miR - 1272、hsa - miR - 1273、hsa - miR - 127 - 3p
、hsa - miR - 1274a、hsa - miR - 1274b、hsa - miR - 127
5、hsa - miR - 127 - 5p、hsa - miR - 1276、hsa - miR - 12
77、hsa - miR - 1278、hsa - miR - 1279、hsa - miR - 128
、hsa - miR - 1280、hsa - miR - 1281、hsa - miR - 1282、
hsa - miR - 1283、hsa - miR - 1284、hsa - miR - 1285、h
sa - miR - 1286、hsa - miR - 1287、hsa - miR - 1288、h
sa - miR - 1289、hsa - miR - 129*、hsa - miR - 1290、hsa
- miR - 1291、hsa - miR - 1292、hsa - miR - 1293、hsa -
miR - 129 - 3p、hsa - miR - 1294、hsa - miR - 1295、hsa
- miR - 129 - 5p、hsa - miR - 1296、hsa - miR - 1297、h
sa - miR - 1298、hsa - miR - 1299、hsa - miR - 1300、hsa
- miR - 1301、hsa - miR - 1302、hsa - miR - 1303、hsa -
miR - 1304、hsa - miR - 1305、hsa - miR - 1306、hsa - m
iR - 1307、hsa - miR - 1308、hsa - miR - 130a、hsa - mi
R - 130a*、hsa - miR - 130b、hsa - miR - 130b*、hsa - m
iR - 132、hsa - miR - 132*、hsa - miR - 1321、hsa - miR
- 1322、hsa - miR - 1323、hsa - miR - 1324、hsa - miR -
133a、hsa - miR - 133b、hsa - miR - 134、hsa - miR - 13
5a、hsa - miR - 135a*、hsa - miR - 135b、hsa - miR - 13
5b*、hsa - miR - 136、hsa - miR - 136*、hsa - miR - 137
、hsa - miR - 138、hsa - miR - 138 - 1*、hsa - miR - 138 -
2*、hsa - miR - 139 - 3p、hsa - miR - 139 - 5p、hsa - miR
- 140 - 3p、hsa - miR - 140 - 5p、hsa - miR - 141、hsa - m
iR - 141*、hsa - miR - 142 - 3p、hsa - miR - 142 - 5p、h
sa - miR - 143、hsa - miR - 143*、hsa - miR - 144、hsa - m
iR - 144*、hsa - miR - 145、hsa - miR - 145*、hsa - miR
- 146a、hsa - miR - 146a*、hsa - miR - 146b - 3p、hsa -
miR - 146b - 5p、hsa - miR - 147、hsa - miR - 147b、hsa
- miR - 148a、hsa - miR - 148a*、hsa - miR - 148b、hsa
- miR - 148b*、hsa - miR - 149、hsa - miR - 149*、hsa -
miR - 150、hsa - miR - 150*、hsa - miR - 151 - 3p、hsa -
miR - 151 - 5p、hsa - miR - 152、hsa - miR - 153、hsa - m
iR - 154、hsa - miR - 154*、hsa - miR - 155、hsa - miR -
155*、hsa - miR - 15a、hsa - miR - 15a*、hsa - miR - 15
b、hsa - miR - 15b*、hsa - miR - 16、hsa - miR - 16 - 1*、
hsa - miR - 16 - 2*、hsa - miR - 17、hsa - miR - 17*、hsa
- miR - 181a、hsa - miR - 181a*、hsa - miR - 181a - 2*、
hsa - miR - 181b、hsa - miR - 181c、hsa - miR - 181c*、
hsa - miR - 181d、hsa - miR - 182、hsa - miR - 182*、h
sa - miR - 1825、hsa - miR - 1826、hsa - miR - 1827、h
sa - miR - 183、hsa - miR - 183*、hsa - miR - 184、hsa - mi

R - 185、hsa - miR - 185 *、hsa - miR - 186、hsa - miR - 186 *、hsa - miR - 187、hsa - miR - 187 *、hsa - miR - 188 - 3 p、hsa - miR - 188 - 5 p、hsa - miR - 18a、hsa - miR - 18a *、hsa - miR - 18b、hsa - miR - 18b *、hsa - miR - 190、hsa - miR - 190b、hsa - miR - 191、hsa - miR - 191 *、hsa - miR - 192、hsa - miR - 192 *、hsa - miR - 193a - 3 p、hsa - miR - 193a - 5 p、hsa - miR - 193b、hsa - miR - 193b *、hsa - miR - 194、hsa - miR - 194 *、hsa - miR - 195、hsa - miR - 195 *、hsa - miR - 196a、hsa - miR - 196a *、hsa - miR - 196b、hsa - miR - 197、hsa - miR - 198、hsa - miR - 199a - 3 p、hsa - miR - 199a - 5 p、hsa - miR - 199b - 5 p、hsa - miR - 19a、hsa - miR - 19a *、hsa - miR - 19b、hsa - miR - 19b - 1 *、hsa - miR - 19b - 2 *、hsa - miR - 200a、hsa - miR - 200a *、hsa - miR - 200b、hsa - miR - 200b *、hsa - miR - 200c、hsa - miR - 200c *、hsa - miR - 202、hsa - miR - 202 *、hsa - miR - 203、hsa - miR - 204、hsa - miR - 205、hsa - miR - 206、hsa - miR - 208a、hsa - miR - 208b、hsa - miR - 20a、hsa - miR - 20a *、hsa - miR - 20b、hsa - miR - 20b *、hsa - miR - 21、hsa - miR - 21 *、hsa - miR - 210、hsa - miR - 211、hsa - miR - 212、hsa - miR - 214、hsa - miR - 214 *、hsa - miR - 215、hsa - miR - 216a、hsa - miR - 216b、hsa - miR - 217、hsa - miR - 218、hsa - miR - 218 - 1 *、hsa - miR - 218 - 2 *、hsa - miR - 219 - 1 - 3 p、hsa - miR - 219 - 2 - 3 p、hsa - miR - 219 - 5 p、hsa - miR - 22、hsa - miR - 22 *、hsa - miR - 220a、hsa - miR - 220b、hsa - miR - 220c、hsa - miR - 221、hsa - miR - 221 *、hsa - miR - 222、hsa - miR - 222 *、hsa - miR - 223、hsa - miR - 223 *、hsa - miR - 224、hsa - miR - 23a、hsa - miR - 23a *、hsa - miR - 23b、hsa - miR - 23b *、hsa - miR - 24、hsa - miR - 24 - 1 *、hsa - miR - 24 - 2 *、hsa - miR - 25、hsa - miR - 25 *、hsa - miR - 26a、hsa - miR - 26a - 1 *、hsa - miR - 26a - 2 *、hsa - miR - 26b、hsa - miR - 26b *、hsa - miR - 27a、hsa - miR - 27a *、hsa - miR - 27b、hsa - miR - 27b *、hsa - miR - 28 - 3 p、hsa - miR - 28 - 5 p、hsa - miR - 296 - 3 p、hsa - miR - 296 - 5 p、hsa - miR - 297、hsa - miR - 298、hsa - miR - 299 - 3 p、hsa - miR - 299 - 5 p、hsa - miR - 29a、hsa - miR - 29a *、hsa - miR - 29b、hsa - miR - 296 - 1 *、hsa - miR - 296 - 2 *、hsa - miR - 29c、hsa - miR - 29c *、hsa - miR - 300、hsa - miR - 301a、hsa - miR - 301b、hsa - miR - 302a、hsa - miR - 302a *、hsa - miR - 302b、hsa - miR - 302b *、hsa - miR - 302c、hsa - miR - 302c *、hsa - miR - 302d、hsa - miR - 302d *、hsa - miR - 302e、hsa - miR - 302f、hsa - miR - 30a、hsa - miR - 30a *、hsa - miR - 30b、hsa - miR - 30b *、hsa - miR - 30c、hsa - miR - 30c - 1 *、hsa - miR - 30c - 2 *、hsa - miR - 30d、hsa - miR - 30d *、hsa - miR - 30e、hsa - miR - 30e *、hsa - miR - 31、hsa - miR - 31 *、hsa - miR - 32、hsa - miR - 32 *、hsa - miR - 320a、hsa - miR - 320b、hsa - miR - 320c、hsa - miR - 320d、hsa - miR - 323 - 3 p、hsa - miR - 323 - 5 p、hsa - miR - 3

24 - 3 p、hsa - miR - 324 - 5 p、hsa - miR - 325、hsa - miR - 326、hsa - miR - 328、hsa - miR - 329、hsa - miR - 330 - 3 p、hsa - miR - 330 - 5 p、hsa - miR - 331 - 3 p、hsa - miR - 331 - 5 p、hsa - miR - 335、hsa - miR - 335*、hsa - miR - 337 - 3 p、hsa - miR - 337 - 5 p、hsa - miR - 338 - 3 p、hsa - miR - 338 - 5 p、hsa - miR - 339 - 3 p、hsa - miR - 339 - 5 p、hsa - miR - 33a、hsa - miR - 33a*、hsa - miR - 33b、hsa - miR - 33b*、hsa - miR - 340、hsa - miR - 340*、hsa - miR - 342 - 3 p、hsa - miR - 342 - 5 p、hsa - miR - 345、hsa - miR - 346、hsa - miR - 34a、hsa - miR - 34a*、hsa - miR - 34b、hsa - miR - 34b*、hsa - miR - 34c - 3 p、hsa - miR - 34c - 5 p、hsa - miR - 361 - 3 p、hsa - miR - 361 - 5 p、hsa - miR - 362 - 3 p、hsa - miR - 362 - 5 p、hsa - miR - 363、hsa - miR - 363*、hsa - miR - 365、hsa - miR - 367、hsa - miR - 367*、hsa - miR - 369 - 3 p、hsa - miR - 369 - 5 p、hsa - miR - 370、hsa - miR - 371 - 3 p、hsa - miR - 371 - 5 p、hsa - miR - 372、hsa - miR - 373、hsa - miR - 373*、hsa - miR - 374a、hsa - miR - 374a*、hsa - miR - 374b、hsa - miR - 374b*、hsa - miR - 375、hsa - miR - 376a、hsa - miR - 376a*、hsa - miR - 376b、hsa - miR - 376c、hsa - miR - 377、hsa - miR - 377*、hsa - miR - 378、hsa - miR - 378*、hsa - miR - 379、hsa - miR - 379*、hsa - miR - 380、hsa - miR - 380*、hsa - miR - 381、hsa - miR - 382、hsa - miR - 383、hsa - miR - 384、hsa - miR - 409 - 3 p、hsa - miR - 409 - 5 p、hsa - miR - 410、hsa - miR - 411、hsa - miR - 411*、hsa - miR - 412、hsa - miR - 421、hsa - miR - 422a、hsa - miR - 423 - 3 p、hsa - miR - 423 - 5 p、hsa - miR - 424、hsa - miR - 424*、hsa - miR - 425、hsa - miR - 425*、hsa - miR - 429、hsa - miR - 431、hsa - miR - 431*、hsa - miR - 432、hsa - miR - 432*、hsa - miR - 433、hsa - miR - 448、hsa - miR - 449a、hsa - miR - 449b、hsa - miR - 450a、hsa - miR - 450b - 3 p、hsa - miR - 450b - 5 p、hsa - miR - 451、hsa - miR - 452、hsa - miR - 452*、hsa - miR - 453、hsa - miR - 454、hsa - miR - 454*、hsa - miR - 455 - 3 p、hsa - miR - 455 - 5 p、hsa - miR - 483 - 3 p、hsa - miR - 483 - 5 p、hsa - miR - 484、hsa - miR - 485 - 3 p、hsa - miR - 485 - 5 p、hsa - miR - 486 - 3 p、hsa - miR - 486 - 5 p、hsa - miR - 487a、hsa - miR - 487b、hsa - miR - 488、hsa - miR - 488*、hsa - miR - 489、hsa - miR - 490 - 3 p、hsa - miR - 490 - 5 p、hsa - miR - 491 - 3 p、hsa - miR - 491 - 5 p、hsa - miR - 492、hsa - miR - 493、hsa - miR - 493*、hsa - miR - 494、hsa - miR - 495、hsa - miR - 496、hsa - miR - 497、hsa - miR - 497*、hsa - miR - 498、hsa - miR - 499 - 3 p、hsa - miR - 499 - 5 p、hsa - miR - 500、hsa - miR - 500*、hsa - miR - 501 - 3 p、hsa - miR - 501 - 5 p、hsa - miR - 502 - 3 p、hsa - miR - 502 - 5 p、hsa - miR - 503、hsa - miR - 504、hsa - miR - 505、hsa - miR - 505*、hsa - miR - 506、hsa - miR - 507、hsa - miR - 508 - 3 p、hsa - miR - 508 - 5 p、hsa - miR - 509 - 3 - 5 p、hsa - miR - 509 - 3 p、hsa - miR - 509 - 5 p、hsa -

miR - 510、hsa - miR - 511、hsa - miR - 512 - 3p、hsa - miR - 512 - 5p、hsa - miR - 513a - 3p、hsa - miR - 513a - 5p、hsa - miR - 513b、hsa - miR - 513c、hsa - miR - 514、hsa - miR - 515 - 3p、hsa - miR - 515 - 5p、hsa - miR - 516a - 3p、hsa - miR - 516a - 5p、hsa - miR - 516b、hsa - miR - 517*、hsa - miR - 517a、hsa - miR - 517b、hsa - miR - 517c、hsa - miR - 518a - 3p、hsa - miR - 518a - 5p、hsa - miR - 518b、hsa - miR - 518c、hsa - miR - 518c*、hsa - miR - 518d - 3p、hsa - miR - 518d - 5p、hsa - miR - 518e、hsa - miR - 518e*、hsa - miR - 518f、hsa - miR - 518f*、hsa - miR - 519a、hsa - miR - 519b - 3p、hsa - miR - 519c - 3p、hsa - miR - 519d、hsa - miR - 519e、hsa - miR - 519e*、hsa - miR - 520a - 3p、hsa - miR - 520a - 5p、hsa - miR - 520b、hsa - miR - 520c - 3p、hsa - miR - 520d - 3p、hsa - miR - 520d - 5p、hsa - miR - 520e、hsa - miR - 520f、hsa - miR - 520g、hsa - miR - 520h、hsa - miR - 521、hsa - miR - 522、hsa - miR - 523、hsa - miR - 524 - 3p、hsa - miR - 524 - 5p、hsa - miR - 525 - 3p、hsa - miR - 525 - 5p、hsa - miR - 526b、hsa - miR - 526b*、hsa - miR - 532 - 3p、hsa - miR - 532 - 5p、hsa - miR - 539、hsa - miR - 541、hsa - miR - 541*、hsa - miR - 542 - 3p、hsa - miR - 542 - 5p、hsa - miR - 543、hsa - miR - 544、hsa - miR - 545、hsa - miR - 545*、hsa - miR - 548a - 3p、hsa - miR - 548a - 5p、hsa - miR - 548b - 3p、hsa - miR - 548b - 5p、hsa - miR - 548c - 3p、hsa - miR - 548c - 5p、hsa - miR - 548d - 3p、hsa - miR - 548d - 5p、hsa - miR - 548e、hsa - miR - 548f、hsa - miR - 548g、hsa - miR - 548h、hsa - miR - 548i、hsa - miR - 548j、hsa - miR - 548k、hsa - miR - 548l、hsa - miR - 548m、hsa - miR - 548n、hsa - miR - 548o、hsa - miR - 548p、hsa - miR - 549、hsa - miR - 550、hsa - miR - 550*、hsa - miR - 551a、hsa - miR - 551b、hsa - miR - 551b*、hsa - miR - 552、hsa - miR - 553、hsa - miR - 554、hsa - miR - 555、hsa - miR - 556 - 3p、hsa - miR - 556 - 5p、hsa - miR - 557、hsa - miR - 558、hsa - miR - 559、hsa - miR - 561、hsa - miR - 562、hsa - miR - 563、hsa - miR - 564、hsa - miR - 566、hsa - miR - 567、hsa - miR - 568、hsa - miR - 569、hsa - miR - 570、hsa - miR - 571、hsa - miR - 572、hsa - miR - 573、hsa - miR - 574 - 3p、hsa - miR - 574 - 5p、hsa - miR - 575、hsa - miR - 576 - 3p、hsa - miR - 576 - 5p、hsa - miR - 577、hsa - miR - 578、hsa - miR - 579、hsa - miR - 580、hsa - miR - 581、hsa - miR - 582 - 3p、hsa - miR - 582 - 5p、hsa - miR - 583、hsa - miR - 584、hsa - miR - 585、hsa - miR - 586、hsa - miR - 587、hsa - miR - 588、hsa - miR - 589、hsa - miR - 589*、hsa - miR - 590 - 3p、hsa - miR - 590 - 5p、hsa - miR - 591、hsa - miR - 592、hsa - miR - 593、hsa - miR - 593*、hsa - miR - 595、hsa - miR - 596、hsa - miR - 597、hsa - miR - 598、hsa - miR - 599、hsa - miR - 600、hsa - miR - 601、hsa - miR - 602、hsa - miR - 603、hsa - miR - 604、hsa - miR - 605、hsa - miR

- 606、hsa-miR-607、hsa-miR-608、hsa-miR-609、hsa-miR-610、hsa-miR-611、hsa-miR-612、hsa-miR-613、hsa-miR-614、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-615-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-616*、hsa-miR-617、hsa-miR-618、hsa-miR-619、hsa-miR-620、hsa-miR-621、hsa-miR-622、hsa-miR-623、hsa-miR-624、hsa-miR-624*、hsa-miR-625、hsa-miR-625*、hsa-miR-626、hsa-miR-627、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-629、hsa-miR-629*、hsa-miR-630、hsa-miR-631、hsa-miR-632、hsa-miR-633、hsa-miR-634、hsa-miR-635、hsa-miR-636、hsa-miR-637、hsa-miR-638、hsa-miR-639、hsa-miR-640、hsa-miR-641、hsa-miR-642、hsa-miR-643、hsa-miR-644、hsa-miR-645、hsa-miR-646、hsa-miR-647、hsa-miR-648、hsa-miR-649、hsa-miR-650、hsa-miR-651、hsa-miR-652、hsa-miR-653、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-655、hsa-miR-656、hsa-miR-657、hsa-miR-658、hsa-miR-659、hsa-miR-660、hsa-miR-661、hsa-miR-662、hsa-miR-663、hsa-miR-663b、hsa-miR-664、hsa-miR-664*、hsa-miR-665、hsa-miR-668、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-675、hsa-miR-7、hsa-miR-708、hsa-miR-708*、hsa-miR-7-1*、hsa-miR-7-2*、hsa-miR-720、hsa-miR-744、hsa-miR-744*、hsa-miR-758、hsa-miR-760、hsa-miR-765、hsa-miR-766、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-767-5p、hsa-miR-768-3p、hsa-miR-768-5p、hsa-miR-769-3p、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-770-5p、hsa-miR-802、hsa-miR-873、hsa-miR-874、hsa-miR-875-3p、hsa-miR-875-5p、hsa-miR-876-3p、hsa-miR-876-5p、hsa-miR-877、hsa-miR-877*、hsa-miR-885-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-886-5p、hsa-miR-887、hsa-miR-888、hsa-miR-888*、hsa-miR-889、hsa-miR-890、hsa-miR-891a、hsa-miR-891b、hsa-miR-892a、hsa-miR-892b、hsa-miR-9、hsa-miR-9*、hsa-miR-920、hsa-miR-921、hsa-miR-922、hsa-miR-923、hsa-miR-924、hsa-miR-92a、hsa-miR-92a-1*、hsa-miR-92a-2*、hsa-miR-92b、hsa-miR-92b*、hsa-miR-93、hsa-miR-93*、hsa-miR-933、hsa-miR-934、hsa-miR-935、hsa-miR-936、hsa-miR-937、hsa-miR-938、hsa-miR-939、hsa-miR-940、hsa-miR-941、hsa-miR-942、hsa-miR-943、hsa-miR-944、hsa-miR-95、hsa-miR-96、hsa-miR-96*、hsa-miR-98、hsa-miR-99a、hsa-miR-99a*、hsa-miR-99b、およびhsa-miR-99b*。例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に関連するスーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）を発現する第8染色体のオープンリーディングフレーム72（C9orf72）を標的とするmiRNAが興味深い。

【0090】

10

20

30

40

50

miRNAは、標的とするmRNAの機能を阻害し、結果として、mRNAによってコードされるポリペプチドの発現を阻害する。したがって、miRNAの活性を（部分的または完全に）遮断する（例えば、miRNAをサイレンシングする）ことは、発現が阻害されるポリペプチドの発現を効果的に誘導するか、または回復することができる（ポリペプチドの抑制を解除する）。一実施形態では、miRNAのmRNA標的によってコードされるポリペプチドの抑制解除は、様々な方法のいずれか1つを通じて細胞内のmiRNA活性を阻害することによって達成される。例えば、miRNAの活性を遮断することは、miRNAに相補的であるか、または実質的に相補的である低分子干渉核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNAスポンジ、TuD RNA）とのハイブリダイゼーションによって達成され得、それによってmiRNAとその標的mRNAとの相互作用を遮断する。本明細書で使用される場合、miRNAに実質的に相補的である低分子干渉核酸は、miRNAとハイブリダイズし、miRNAの活性を遮断することができる核酸である。いくつかの実施形態では、miRNAに実質的に相補的である低分子干渉核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18塩基を除くすべてでmiRNAと相補的である低分子干渉核酸である。「miRNA阻害剤」は、miRNAの機能、発現、および/またはプロセッシングを遮断する薬剤である。例えば、これらの分子としては、マイクロRNA特異的アンチセンス、マイクロRNAスポンジ、タフなデコイRNA（TuD RNA）、およびDrosophila複合体とのmiRNA相互作用を阻害するマイクロRNAオリゴヌクレオチド（二本鎖、ヘアピン、短いオリゴヌクレオチド）が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0091】

さらに他の有用な導入遺伝子は、病原体に受動免疫を付与する免疫グロブリンをコードするものを含み得る。「免疫グロブリン分子」は、互いに共有結合し、抗原と特異的に組み合わせることができる免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖の免疫学的に活性な部分を含むタンパク質である。免疫グロブリン分子は、任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）、またはサブクラスである。「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

【0092】

「免疫グロブリン重鎖」は、免疫グロブリンの抗原結合ドメインの少なくとも一部分および免疫グロブリン重鎖の変領域の少なくとも一部分または免疫グロブリン重鎖の定常領域の少なくとも一部分を含むポリペプチドである。したがって、免疫グロブリン由来重鎖は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーとのアミノ酸配列相同性の有意な領域を有する。例えば、Fab断片中の重鎖は、免疫グロブリン由来重鎖である。

30

【0093】

「免疫グロブリン軽鎖」は、免疫グロブリンの抗原結合ドメインの少なくとも一部分および免疫グロブリン軽鎖の変領域の少なくとも一部分または定常領域の少なくとも一部分を含むポリペプチドである。したがって、免疫グロブリン由来軽鎖は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーとのアミノ酸相同性の有意な領域を有する。

【0094】

「イムノアドヘシン」は、結合タンパク質、通常は受容体、リガンド、または細胞接着分子の機能ドメインと、通常はヒンジ領域およびFc領域を含む免疫グロブリン定常ドメインとを組み合わせたキメラの抗体様分子である。

40

【0095】

「断片抗原結合」（Fab断片）は、抗原と結合する抗体上の領域である。それは重鎖および軽鎖の各々の一定常ドメインおよび一可変ドメインから構成される。

【0096】

抗病原体構築物は、保護が求められる疾患の原因物質（病原体）に基づいて選択される。これらの病原体は、ウイルス、細菌、または真菌由来であり得、ヒト疾患に対するヒトにおける感染を予防するために、または獣医疾患を予防するために非ヒト哺乳類もしくは

50

他の動物における感染を予防するために使用され得る。

【 0 0 9 7 】

r A A V は、抗体をコードする遺伝子、特にウイルス病原体に対する中和抗体を含み得る。かかる抗ウイルス抗体としては、インフルエンザ A、インフルエンザ B、およびインフルエンザ C のうちの 1 つ以上に対して指向される抗インフルエンザ抗体が含まれ得る。A 型ウイルスは、最も悪性のヒト病原体である。パンデミックに関連しているインフルエンザ A の血清型としては、1918 年にスペインインフルエンザを引き起こした H 1 N 1、2009 年の豚インフルエンザ、1957 年にアジアインフルエンザを引き起こした H 2 N 2、1968 年に香港インフルエンザを引き起こした H 3 N 2、2004 年にトリインフルエンザを引き起こした H 5 N 1、H 7 N 7、H 1 N 2、H 9 N 2、H 7 N 2、H 7 N 3、および H 1 0 N 7 が含まれる。他の標的病原性ウイルスとしては、アレナウイルス (f u n i n、マチュポ、およびラッサを含む)、フィロウイルス (マールブルグおよびエボラを含む)、ハンタウイルス、ピコルナウイルス科 (ライノウイルス、エコーウイルスを含む)、コロナウイルス、パラミクソウイルス、モルビリウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、トガウイルス、コクサッキーウイルス、J C ウイルス、パルボウイルス B 1 9、パラインフルエンザ、アデノウイルス、レオウイルス、水痘ウイルス (大痘瘡 (天然痘))、およびボックスウイルスファミリー由来のワクシニアウイルス (牛痘)、および水痘帯状疱疹 (仮性狂犬病) が含まれる。ウイルス性出血熱は、アレナウイルスファミリー (ラッサ熱) (リンパ球性脈絡髄膜炎 (L C M) にも関連するファミリー)、フィロウイルス (エボラウイルス)、およびハンタウイルス (プレマラ) のメンバーによって引き起こされる。ピコルナウイルス (ライノウイルスの亜科) のメンバーは、ヒトの一般的な風邪に関連している。コロナウイルスファミリーは、伝染性気管支炎ウイルス (家禽)、ブタ伝染性胃腸ウイルス (ブタ)、ブタ血球凝集素脳脊髄炎ウイルス (ブタ)、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (ネコ)、ネコ腸内コロナウイルス (ネコ)、イヌコロナウイルス (イヌ) などの複数の非ヒトウイルスを含む。ヒト呼吸器コロナウイルスは、一般的な風邪、非 A、B、または C 型肝炎、および突然の急性呼吸器症候群 (S A R S) に関連していると推定される。パラミクソウイルスファミリーには、パラインフルエンザウイルス 1 型、パラインフルエンザウイルス 3 型、ウシパラインフルエンザウイルス 3 型、ルブラウイルス (ムンプスウイルス、パラインフルエンザウイルス 2 型、パラインフルエンザウイルス 4 型、ニューカッスル病ウイルス (ニワトリ)、牛痘、麻疹およびイヌジステンパーを含むモルビリウイルス、ならびに呼吸器合胞体ウイルス (R S V) を含む肺炎ウイルスが含まれる。パルボウイルスファミリーとしては、ネコパルボウイルス (ネコ腸炎)、ネコ汎白血球減少症ウイルス、イヌパルボウイルス、およびブタパルボウイルスが含まれる。アデノウイルスファミリーは、呼吸器疾患を引き起こすウイルス (E X、A D 7、A R D、O . B .) を含む。したがって、特定の実施形態では、本明細書に記載される r A A V ベクターは、抗エボラ抗体、例えば、2 G 4、4 G 7、1 3 C 6、抗インフルエンザ抗体、例えば、F I 6、C R 8 0 3 3、および抗 R S V 抗体、例えば、パリビズマブ、モタビズマブを発現するように操作され得る。細菌性病原体に対する中和抗体構築物もまた、本発明で使用するために選択され得る。一実施形態では、中和抗体構築物は、細菌自体に対して指向される。別の実施形態では、中和抗体構築物は、細菌によって産生される毒素に対して指向される。空中浮遊細菌性病原体の例としては、例えば、髄膜炎菌 (髄膜炎)、肺炎桿菌 (肺炎)、緑膿菌 (肺炎)、類鼻疽菌 (肺炎)、鼻疽菌 (肺炎)、アシネトバクター (肺炎)、カタル球菌、モラクセララクナータ、アルカリゲネス、カルジオバクテリウム、インフルエンザ菌 (インフルエンザ)、パラインフルエンザ菌、百日咳菌 (百日咳)、野兔病菌 (肺炎・発熱)、レジオネラ肺炎 (レジオナイレズ病)、オウム病クラミジア (肺炎)、肺炎クラミジア (肺炎)、結核菌 (結核 (T B))、マイコバクテリウム・カンサシ (T B)、マイコバクテリウム・アビウム (肺炎)、ノカルジア・アステロイデス (肺炎)、炭疽菌 (炭疽菌)、黄色ブドウ球菌 (肺炎)、化膿性連鎖球菌 (猩紅熱)、肺炎球菌 (肺炎)、コリネバクテリウムジフテリア (ジフテリア)、肺炎マイコプラズマ (肺炎) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0098】

rAAVは、抗体をコードする遺伝子、特に炭疽菌によって産生される毒素である炭疽病の原因物質などの細菌病原体に対する中和抗体を含み得る。トキシドを形成する3つのペプチドの1つである保護剤(PA)に対する中和抗体が記載されている。他の2つのポリペプチドは、致死因子(LF)および浮腫因子(EF)からなる。抗PA中和抗体は、炭疽菌に対する受動免疫に有効であると記載されている。例えば、米国特許第7,442,373号、R. Sawada-Hirai et al, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2:5. (online 2004 May 12)を参照されたい。さらに他の抗炭疽毒素中和抗体が記載されており、かつ/または生成され得る。同様に、他の細菌および/または細菌毒素に対する中和抗体を使用し、本明細書に記載されるようなAAV送達抗病原体構築物を生成し得る。

10

【0099】

感染症に対する抗体は、寄生虫または真菌によって引き起こされ得、例えば、アスペルギルス、アブシジアコリムピフェラ、クモノスカビ、ムコールプルベウス、クリプトコッカスネオフォルマンズ、ヒストプラズマカプスラーツム、プラストミセスデルマチチジス、コクシジオイデスイミチス、ペニシリウム種、ミクロポリスポーラ-フェニ、テルモアクチノミセス-ブルガリス、アルテルナリアアルテルナータ、クラドスポリウム種、ヘルミントスポリウム、およびスタキボトリス種を含む。

【0100】

rAAVは、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、GBA関連パーキンソン病(GBA-PD)、関節リウマチ(RA)、過敏性腸症候群(IBS)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、がん、腫瘍、全身性硬化症、喘息、および他の疾患などの疾患の病原性因子に対する抗体、特に中和抗体をコードする遺伝子を含み得る。かかる抗体は、限定されないが、例えば、アルファ-シヌクレイン、抗血管内皮成長因子(VEGF)(抗VEGF)、抗VEGFA、抗PD-1、抗PDL1、抗CTLA-4、抗TNF-アルファ、抗IL-17、抗IL-23、抗IL-21、抗IL-6、抗IL-6受容体、抗IL-5、抗IL-7、抗第XIII因子、抗IL-2、抗HIV、抗IgE、抗腫瘍壊死因子受容体-1(TNFR1)、抗ノッチ2/3、抗ノッチ1、抗OX40、抗erbB-2受容体チロシンキナーゼ3(ErbB3)、抗ErbB2、抗ベータ細胞成熟抗原、抗Bリンパ球刺激因子、抗CD20、抗HER2、抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、抗オンコスタチンM(OSM)、抗リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)タンパク質、抗CCL20、抗血清アミロイドP成分(SAP)、抗プロリルヒドロキシラーゼ阻害剤、抗CD38、抗糖タンパク質IIB/IIIIa、抗CD52、抗CD30、抗IL-1ベータ、抗上皮成長因子受容体、抗CD25、抗RANKリガンド、抗補体系タンパク質C5、抗CD11a、抗CD3受容体、抗アルファ-4(4)インテグリン、抗RSV Fタンパク質、および抗インテグリン₄₇であり得る。さらに他の病原体および疾患は、当業者に明らかであろう。他の好適な抗体としては、例えば、とりわけ抗ベータ-アミロイド(例えば、クレネズマブ、ソラネズマブ、アダクナマブ)、抗ベータアミロイド原線維、抗ベータアミロイドブランク、抗タウ、パピネウザマブなど、アルツハイマー病を治療するために有用な抗体を含み得る。様々な適応症を治療するための他の適切な抗体としては、例えば、WO2017/075119A1として公開された、2016年10月27日に出版されたPCT/US2016/058968に記載されているものが含まれる。

20

30

40

【0101】

II. rAAVベクター産生

AAVウイルスベクター(例えば、組換え(r)AAV)の産生における使用のために、発現カセットは、パッケージング宿主細胞に送達される任意の好適なベクター、例えば、プラスミド上に担持され得る。本発明において有用なプラスミドは、とりわけ、原核細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞におけるインビトロでの複製およびパッケージングに適しているように操作され得る。好適なトランスフェクション技術およびパッケージング宿主細胞は、

50

既知であり、かつ/または当業者によって容易に設計することができる。

【0102】

ベクターとしての使用に好適なAAVを生成および単離するための方法は、当該技術分野において既知である。一般に、例えば、Grieger & Samulski, 2005, 「Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,」Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99:119-145、Buning et al., 2008, 「Recent developments in adeno-associated virus vector technology,」J. Gene

10

Med. 10:717-733、および以下に引用される参考文献を参照されたく、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。導入遺伝子をピリオンにパッケージするために、ITRは、発現カセットを含む核酸分子と同じ構築物中でシスに必要とされる唯一のAAV成分である。capおよびrep遺伝子は、トランスで供給され得る。

【0103】

一実施形態では、本明細書に記載される発現カセットは、ウイルスベクターを産生するために、その上に運ばれる導入遺伝子構築物配列をパッケージング宿主細胞に導入する遺伝要素（例えば、シャトルプラスミド）に操作される。一実施形態では、選択される遺伝子要素は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リボソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染、およびプロトプラスト融合を含む任意の好適な方法によってAAVパッケージ細胞に送達され得る。安定したAAVパッケージ細胞も作製することができる。代替的には、発現カセットは、AAV以外のウイルスベクターを生成するために使用され得る。かかる構築物を作製するために使用される方法は、核酸操作における技術者に既知であり、遺伝子工学、組換え工学、および合成技術を含む。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)を参照されたい。

20

【0104】

用語「AAV中間体」または「AAVベクター中間体」は、それにパッケージされた所望のゲノム配列を欠失している組み立てられたrAAVカプシドを指す。これらは、「空の」カプシドと称され得る。そのようなカプシドは、発現カセットの検出可能なゲノム配列をまったく含まないか、または遺伝子産物の発現を達成するには不十分な部分的にパッケージされたゲノム配列のみを含み得る。これらの空のカプシドは、目的の遺伝子を宿主細胞に導入するために非機能的である。

30

【0105】

本明細書に記載される組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)は、既知の技術を使用して生成され得る。例えば、WO2003/042397; WO2005/033321、WO2006/110689; US7588772 B2を参照されたい。かかる方法は、AAVカプシドタンパク質をコードする核酸配列、機能的rep遺伝子、最低限でもAAV逆方向末端反復(ITR)および導入遺伝子からなる発現カセット、ならびに発現カセットをAAVカプシドタンパク質にパッケージングするのを許可する十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを含む。カプシドを産生する方法、そのためのコード配列、およびrAAVウイルスベクターを産生するための方法が記載されている。例えば、Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(10), 6081-6086 (2003)およびUS 2013/0045186A1を参照されたい。

40

【0106】

一実施形態では、組換えAAVを産生するために有用な産生細胞培養物が提供される。

50

かかる細胞培養物は、宿主細胞中でAAVカプシドタンパク質を発現する核酸、AAVカプシド中にパッケージするのに好適な核酸分子、例えば、AAV ITRを含むベクターゲノム、および宿主細胞中の産物の発現を指示する配列と作動可能に連結される遺伝子産物をコードする非AAV核酸配列、ならびに組換えAAVカプシドへ核酸分子をパッケージングを可能にするのに十分なAAV rep機能およびアデノウイルスヘルパー機能を含む。一実施形態では、細胞培養物は、哺乳動物細胞（例えば、とりわけヒト胚性腎臓293細胞）または昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス）で構成される。

【0107】

任意で、rep機能は、カプシドを提供するAAV以外のAAVによって提供される。例えば、repは、これらに限定されないが、AAV1 repタンパク質、AAV2 repタンパク質、AAV3 repタンパク質、AAV4 repタンパク質、AAV5 repタンパク質、AAV6 repタンパク質、AAV7 repタンパク質、AAV8 repタンパク質、またはrep 78、rep 68、rep 52、rep 40、rep 68/78、およびrep 40/52、またはそれらの断片であり得る。任意で、repおよびcap配列は、細胞培養物中の同じ遺伝子要素上にある。rep配列とcap遺伝子との間にスペーサーが存在し得る。これらのAAVまたは変異AAVカプシド配列のいずれかは、宿主細胞中でそれらの発現を指示する外因性制御性調節配列の調節下にあり得る。

【0108】

一実施形態では、細胞は、適切な細胞培養（例えば、HEK293）細胞において製造される。本明細書に記載される遺伝子療法ベクターを製造するための方法は、当該分野においてよく知られている方法、例えば、遺伝子療法ベクターの産生のために使用されるプラスミドDNAの産生、ベクターの産生、およびベクターの精製を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子療法ベクターは、AAVベクターであり、生成されるプラスミドは、目的の遺伝子を含むベクターゲノムをコードするAAVシスプラスミド、AAV repおよびcap遺伝子を含むAAVトランスプラスミド、ならびにアデノウイルスヘルパープラスミドである。ベクター生成プロセスは、細胞培養の開始、細胞の通過、細胞の播種、プラスミドDNAによる細胞のトランスフェクション、トランスフェクション後の無血清培地への交換、ならびにベクター含有細胞および培養培地の採取などの方法ステップを含むことができる。回収したベクター含有細胞および培養培地は、本明細書では粗細胞採取物と称される。さらに別のシステムでは、遺伝子治療ベクターは、バキュロウイルスベクターによる感染によって昆虫細胞に導入される。これらの産生システムに関するレビューについては、概して、例えば、Zhang et al., 2009, 「Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,」 Human Gene Therapy 20: 922-929を参照されたく、各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。これらおよび他のAAV生産システムの製造および使用方法は、以下の米国特許にも記載され、それらの各々の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：5,139,941、5,741,683、6,057,152、6,204,059、6,268,213、6,491,907、6,660,514、6,951,753、7,094,604、7,172,893、7,201,898、7,229,823、および7,439,065。

【0109】

その後、粗細胞採取物は、ベクター採取物の濃度、ベクター採取物のダイア濾過、ベクター採取物のマイクロ流体化、ベクター採取物のヌクレアーゼ消化、マイクロ流体化中間体の濾過、クロマトグラフィーによる粗精製、超遠心分離による粗精製、接線流濾過による緩衝液交換、ならびに/またはバルクベクターを調製するための製剤および濾過などの対象の方法ステップであり得る。

【0110】

10

20

30

40

50

2工程の高塩濃度でのアフィニティークロマトグラフィー精製、続いて、アニオン交換樹脂クロマトグラフィーを用いて、ベクター薬物製品を精製し、空のカプシドを除去する。これらの方法は、国際特許公開第WO2017/160360号にさらに詳細に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。AAV8についての公開第WO2017/100676号、およびrh10についての国際特許公開第WO2017/100704号、およびAAV1についての国際特許公開第WO2017/100674号の精製方法は、すべて参照により本明細書に組み込まれる。

【0111】

空のおよび完全粒子含有量を算出するために、選択された試料（例えば、本明細書の実施例では、イオジキサノール勾配 - 精製された調製物、ここで、GCの数 = 粒子の数）についてのVP3バンド容量が、ロードされたGC粒子に対してプロットされる。得られた線形方程式 ($y = mx + c$) を使用して、試験試料ピークのバンド体積中の粒子数を計算する。次いで、負荷した20 μ Lあたりの粒子の数 (pt) に50を掛けて、粒子 (pt) / mLを得る。 Pt / mL を GC / mL で除算することにより、ゲノムコピーに対する粒子の比 (pt / GC) を得る。 $Pt / mL \sim GC / mL$ は、空の pt / mL を与える。空の pt / mL を pt / mL で除算して、次いで、 $\times 100$ をすることにより、空の粒子のパーセンテージを得る。

【0112】

一般に、空のカプシドおよびパッケージされたゲノムを伴うAAVベクター粒子のためのアッセイ方法は、当該分野において既知である。例えば、Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6: 1322 - 1330、Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7: 122 - 128を参照されたい。変性したカプシドについて試験するために、方法は、例えば、緩衝液中3~8%のTris - アセテートを含む勾配ゲルなどの3つのカプシドタンパク質を分離可能な任意のゲルからなるSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動に処理済みAAVストックを供すること、次いで、試料材料が分離するまでゲルをランさせること、ナイロンまたはニトロセルロースメンブレン、好ましくは、ナイロンにゲルをプロットすることを含む。抗 - AAVカプシド抗体は、次いで、変性したカプシドタンパク質、好ましくは、抗 - AAVカプシドモノクローナル抗体、最も好ましくは、B1抗 - AAV - 2モノクローナル抗体に結合する主要な抗体として使用される (Wobus et al., J. Virol. (2000) 74: 9281 - 9293)。次いで、一次抗体に結合し、一次抗体、より好ましくは、抗体に共有結合した検出分子を含む抗 - IgG抗体、最も好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼに共有結合したヒツジ抗 - マウスIgG抗体との結合を検出するための手段を含む、二次抗体が使用される。一次と二次抗体との間の結合を半定量的に測定するために、結合を検出するための方法、好ましくは、放射性アイソトープ放射、電磁放射、または発色変化を検出可能な検出方法、最も好ましくは、化学発光検出キットが使用される。例えば、SDS - PAGEのために、カラムフラクションからの試料が、採集され、還元剤（例えば、DTT）を含むSDS - PAGEロード用緩衝液中で加熱され、カプシドタンパク質は、プレキャスト勾配ポリアクリルアミドゲル（例えば、Novex）上で分解される。Silver Xpress (Invitrogen, CA) を製造元の指示に従って用いて、銀染色を実施してもよく、または他の適切な染色方法、すなわち、SYPROルビーもしくはクーマシー染色を実施してもよい。一実施形態では、カラムフラクション中のAAVベクターゲノム (vg) の濃度は、定量的リアルタイムPCR (Q-PCR) により測定されることができ、試料は希釈され、DNase I（または別の適切なヌクレアーゼ）で消化されて、外因性DNAが除去される。ヌクレアーゼの不活化後、試料はさらに希釈され、プライマーおよびプライマー間のDNA配列に特異的なTaqMan（商標）蛍光発生プローブを用いて増幅される。規定レベルの蛍光（閾値サイクル、 C_t ）に到達するのに必要とされるサイクル数は、Applied Biosystems Prism 7700配列検出システム上で各試料について測定される。AAVベクター中に含有されるものと同じの配列を含むプラスミドDNAを利用して、Q

10

20

30

40

50

- PCR反応における標準曲線を作成する。試料から得られたサイクル閾値 (Ct) 値を用いて、プラスミド標準曲線の Ct 値に対してそれを正規化することにより、ベクターゲノム力価を決定した。デジタルPCRに基づくエンドポイントアッセイも使用されることが出来る。

【0113】

一態様では、広域スペクトル血清プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼK (例えば、Qiagenから商業的に入手可能なもの) を利用する最適化されたq-PCR方法が使用される。より具体的には、最適化されたqPCRゲノム力価アッセイは、DNase I消化の後に、試料をプロテアーゼK緩衝液で希釈し、プロテアーゼKで処理し、続いて、熱失活させることを除き、標準的なアッセイと同様である。適切には、試料は、試料サイズと等しい量のプロテアーゼK緩衝液で希釈される。プロテアーゼK緩衝液は、2倍以上に濃縮されてもよい。典型的に、プロテアーゼK治療は、約0.2 mg/mLであるが、0.1 mg/mL ~ 約1 mg/mLで変動し得る。治療ステップは、一般に、約55で約15分間、実施されるが、より低い温度 (例えば、約37 ~ 約50) でより長時間 (例えば、約20分間 ~ 約30分間)、またはより高い温度 (例えば、最高約60) でより短時間 (例えば、約5 ~ 10分間) 実施されてもよい。同様に、熱失活は、一般に、約95で約15分間であるが、温度を下げてよく (例えば、約70 ~ 約90)、時間を延ばしてもよい (例えば、約20分間 ~ 約30分間)。次いで、試料は希釈され (例えば、1000倍)、標準アッセイで記載されるように、TaqMan分析に供される。

【0114】

追加的または代替的には、ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) が使用され得る。例えば、ddPCRによる一本鎖および自己相補的なAAVベクターゲノム力価を測定するための方法が記載されている。例えば、M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14を参照されたい。

【0115】

簡潔に言うと、パッケージされたゲノム配列を有するrAAV粒子をゲノム欠損AAV中間体から分離するための方法は、組換えAAVウイルス粒子およびAAVカプシド中間体を含む懸濁液を高性能液体クロマトグラフィーに供することを含み、AAVウイルス粒子およびAAV中間体は、高pHで平衡化された強力アニオン交換樹脂に結合され、約260および約280で紫外吸光度のために溶出液をモニタリングしながら、塩勾配に供される。pHは、選択されたAAVに応じて調整され得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO2017/160360 (AAV9)、WO2017/100704 (AAVrh10)、WO2017/100676 (例えば、AAV8)、およびWO2017/100674 (AAV1)]を参照されたい。この方法では、AAV完全カプシドは、A260/A280の比が感染ポイントに到達した場合に溶出するフラクションから回収される。一実施例では、アフィニティークロマトグラフィーステップのために、ダイアフィльтраーションされた産物を、AAV2血清型を効率的に捕らえるCapture Select (商標) Poros-AAV2/9アフィニティ樹脂 (Life Technologies) に適用してもよい。これらのイオン条件下、残留細胞DNAおよびタンパク質の有意なパーセンテージは、カラムの中を流れ、AAV粒子は効率的に捕捉する。

【0116】

III. 組成物および使用

本明細書では、少なくとも1つのrAAVストック (例えば、rAAVストックまたは変異体rAAVストック) および任意の担体、賦形剤および/または防腐剤を含む組成物を提供する。rAAVストックは、同じである複数のrAAVベクターを指し、例えば、濃度および用量単位の考察において以下に記載される量である。

【0117】

本明細書で使用される場合、「担体」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒体、ビヒ

クル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含む。薬学的活性物質に対するかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補足有効成分を組成物中に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という語句は、宿主に投与されるときにアレルギーまたは類似の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などの送達ビヒクルが、本発明の組成物を好適な宿主細胞に導入するために使用され得る。詳細には、rAAVベクター送達導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフィア、またはナノ粒子などに封入化された送達のいずれかのために製剤化され得る。

【0118】

一実施形態では、組成物は、対象への送達に適した最終製剤を含み、例えば、生理的に適合するpHおよび塩濃度に緩衝される水性液体懸濁液である。任意で、1つ以上の界面活性剤が製剤中に存在する。別の実施形態では、組成物は、対象への投与のために希釈される濃縮物として輸送され得る。他の実施形態では、組成物は、投与時に凍結乾燥され、再構成され得る。

【0119】

好適な界面活性剤、または界面活性剤の組み合わせが、非毒性である非イオン界面活性剤のうちから選択され得る。一実施形態では、例えば、中性pHを有し、平均分子量8400を有するポロキサマー188としても知られているPluronic(登録商標)F68[BASF]などの、一級ヒドロキシル基末端の二機能的ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤および他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン(ポリ(エチレンオキシド))の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン(ポリ(プロピレンオキシド))の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポリマー、SOLUTOL HS 15(マクロゴール-15ヒドロキシステアラート)、LABRASOL(ポリオキシカプリン酸グリセリド)、ポリオキシ10オレイルエーテル、TWEEN(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、エタノール、およびポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含有する。これらのコポリマーは一般に、文字「P」(ポロキサマーについて)に続いて、3桁数字を用いて命名され、初めの2桁数字×100は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与えるものであり、最後の数字×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与えるものである。一実施形態では、ポロキサマー188が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最大約0.0005%~約0.001%の量で存在し得る。

【0120】

ベクターは、細胞をトランスフェクトするのに十分な量で投与され、十分なレベルの遺伝子導入および発現を提供して、過度の悪影響なしに、または医学的に許容される生理学的効果を伴う治療効果を提供し、これは当業者によって決定され得る。従来および薬学的に許容される投与経路には、所望の臓器(例えば、肝臓(任意で肝動脈を介して)、肺、心臓、眼、腎臓)、経口、吸入、鼻腔内、髄腔内、気管内、動脈内、眼への直接送達(任意で眼内送達、網膜下注入、網膜内注入、硝子体内、局所を介して)、静脈内、筋肉内、皮下、皮膚内、および他の親の投与経路への直接送達が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、投与経路は、網膜下または硝子体内注入である。投与経路は、所望される場合、組み合わせられてもよい。

【0121】

ウイルスベクターの用量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重、および健康状態などの要因に依存し、したがって、患者間で異なり得る。例えば、ウイルスベクターの治療有効なヒト投薬量は、概して、約25~約1000マイクロリットル~約100mLの約 1×10^9 ~ 1×10^{16} ゲノムウイルスベクターの濃度を含む溶液の範囲である。任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとるために、投薬量を調整してもよく、そのような投薬量は、組換えベクターが利用されるための治療用途に応じて変化し得る。導入遺伝子の発現レベルをモニタリングして、ウイルスベクター、好ましくはミニ遺伝子を含

10

20

30

40

50

有するAAVベクターをもたらす投薬頻度を決定することができる。任意で、治療目的で記載されるものと同様の投薬レジメンは、本発明の組成物を使用した免疫に利用され得る。

【0122】

複製欠陥ウイルス組成物は、投薬量単位で製剤化され、ヒト患者にとって、約 1.0×10^9 GC ~ 約 1.0×10^{16} GCの範囲にある量の複製欠陥ウイルス（体重70kgの平均対象を治療するため）を含み、その範囲内の全ての整数または分数量、好ましくは 1.0×10^{12} GC ~ 1.0×10^{14} GCの範囲に含むことができる。一実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、または 9×10^9 GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、または 9×10^{10} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、または 9×10^{11} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、または 9×10^{12} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、または 9×10^{13} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、または 9×10^{14} GCを含むように製剤化される。別の実施形態では、組成物は、範囲内のすべての整数または分数量を含む、用量あたり少なくとも 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、または 9×10^{15} GCを含むように製剤化される。一実施形態では、ヒト適用のために、用量は、範囲内の全ての整数または分数量を含む、用量あたり 1×10^{10} ~ 約 1×10^{12} GCの範囲であり得る。

【0123】

これらの上記用量は、治療される領域の大きさ、使用されるウイルス力価、投与経路、および方法の所望の効果に応じて、約25 ~ 約1000マイクロリットルの範囲の様々な容量の担体、賦形剤、もしくは緩衝液製剤、またはその範囲内のすべての数を含むより高い容量で投与され得る。一実施形態では、担体、賦形剤、または緩衝液の容量は、少なくとも約25 μ Lである。一実施形態では、容量は、約50 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約75 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約100 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約125 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約150 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約175 μ Lである。さらに別の実施形態では、容量は、約200 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約225 μ Lである。さらに別の実施形態では、容量は、約250 μ Lである。さらに別の実施形態では、容量は、約275 μ Lである。さらに別の実施形態では、容量は、約300 μ Lである。さらに別の実施形態では、容量は、約325 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約350 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約375 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約400 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約450 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約500 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約550 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約600 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約650 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約700 μ Lである。別の実施形態では、容量は、約700 ~ 1000 μ Lである。

【0124】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、用量は、約 1×10^9 GC / g 脳質量 ~ 約 1×10^{12} GC / g 脳質量の範囲であり得る。特定の実施形態では、用量は、約 3×10^{10} GC / g 脳質量 ~ 約 3×10^{11} GC / g 脳質量の範囲であり得る。特定の実施形態では、用量は、約 5×10^{10} GC / g 脳質量 ~ 約 1.85×10^{11} GC / g 脳質量の範囲であり得る。

【0125】

別の態様では、対象への投与に好適な水性懸濁液が提供される。一実施形態では、懸濁液は、眼疾患の治療または予防のための治療薬として有用な本明細書に記載の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) の水性懸濁液および眼あたり約 1×10^9 ウイルス粒子 ~ 約 1×10^{13} GC またはウイルス粒子を含む。一実施形態では、懸濁液は、網膜下または硝子体内注入に好適である。

10

【0126】

一実施形態では、ウイルス構築物は、少なくとも約 1×10^9 GC ~ 約 1×10^{15} GC、または約 1×10^{11} GC ~ 5×10^{13} GC の用量で送達され得る。これらの用量および濃度の送達に好適な容量は、当業者によって決定することができる。例えば、約 $1 \mu\text{L}$ ~ 150 mL の容量が選択されてもよいが、より高容量が、成人のために選択され得る。典型的に、新生児幼児のために、適切な容量は、約 0.5 mL ~ 約 10 mL 、より年齢の高い乳幼児のためには、約 0.5 mL ~ 約 15 mL が選択され得る。幼児のために、約 0.5 mL ~ 約 20 mL の容量が選択され得る。小児のために、最大約 30 mL の容量が選択され得る。プレティーンおよびティーン世代のために、最大約 50 mL の容量が選択され得る。さらに他の実施形態では、患者は、約 5 mL ~ 約 15 mL が選択される、または約 7.5 mL ~ 約 10 mL の容量で髄腔内投与を受け得る。他の適切な容量および投薬量が決定され得る。任意の副作用に対する治療的利益のバランスをとるために、投薬量を調整してもよく、そのような投薬量は、組換えベクターが利用されるための治療用途に応じて変化し得る。

20

【0127】

上述の組換えベクターは、公開された方法に従って宿主細胞に送達され得る。好ましくは生理学的に適合性のある担体に懸濁された rAAV は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物患者に投与され得る。特定の実施形態では、ヒト患者への投与のために、rAAV は、食塩水、界面活性剤、および生理学的に適合性のある塩、または塩の混合物を含有する水性溶液中に好適に懸濁される。好適には、製剤は、生理学的に許容される pH、例えば、pH 6 ~ 9、または pH 6.5 ~ 7.5、pH 7.0 ~ 7.7、または pH 7.2 ~ 7.8 の範囲に調整される。脳脊髄液の pH は約 7.28 ~ 約 7.32 であるので、髄腔内送達のためには、この範囲内の pH が望ましい可能性があり、静脈内、網膜下または硝子体内送達のためには、約 6.8 ~ 約 7.2 の pH が望ましい可能性がある。しかし、より広範囲にある他の pH、およびこれらの下位範囲が、他の送達経路のために選択され得る。

30

【0128】

別の実施形態では、組成物は、担体、希釈剤、賦形剤および/またはアジュバントを含む。好適な担体は、導入ウイルスが向けられる適応症を考慮して、当業者により容易に選択され得る。例えば、1つの好適な担体は、生理食塩水を含み、様々な緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）と共に製剤化され得る。他の例示的な担体としては、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナツ油、ゴマ油、および水が含まれる。緩衝液/担体は、rAAV が注入チューブに付着するのを防ぐが、インピボで rAAV 結合活性を妨げない成分を含むべきである。好適な界面活性剤、または界面活性剤の組み合わせが、非毒性である非イオン界面活性剤のうちから選択され得る。一実施形態では、例えば、中性 pH を有し、平均分子量 8400 を有するポロキサマー 188 としても知られている Pluronic (登録商標) F68 [BASF] などの、一級ヒドロキシル基末端の二機能的ブロックコポリマー界面活性剤が選択される。他の界面活性剤および他のポロキサマー、すなわち、ポリオキシエチレン (ポリ (エチレンオキシド)) の 2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン (ポリ (プロピレンオキシド)) の中心疎水性鎖からなる非イオン性トリブロックコポ

40

50

リマー、SOLUTOL HS 15 (マクロゴール - 15 ヒドロキシステアラート)、LABRASOL (ポリオキシカプリン酸グリセリド)、ポリオキシ - オレイルエーテル、TWEEN (ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、エタノール、およびポリエチレングリコールが選択され得る。一実施形態では、製剤は、ポロキサマーを含有する。これらのコポリマーは一般に、文字「P」(ポロキサマーについて)に続いて、3桁数字を用いて命名され、初めの2桁数字×100は、ポリオキシプロピレンコアのおおよその分子質量を与えるものであり、最後の数字×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを与えるものである。一実施形態では、ポロキサマー188が選択される。界面活性剤は、懸濁液の最大約0.0005%~約0.001%の量で存在し得る。一実施例では、製剤は、例えば、水中に塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、デキストロース、硫酸マグネシウム(例えば、硫酸マグネシウム7H₂O)、塩化カリウム、塩化カルシウム(例えば、塩化カルシウム2H₂O)、二塩基性リン酸ナトリウム、およびそれらの混合物のうち1つ以上を含む、緩衝化食塩水溶液を含有することができる。好適には、髄腔内送達のためには、モル浸透圧濃度は、脳脊髄液と適合する範囲内(例えば、約275~約290)である、例えば、emedicine.medscape.com/article/2093316-overviewを参照されたい。任意で、髄腔内送達のために、商業的に入手可能な希釈剤は、懸濁化剤として使用され得るか、または別の懸濁化剤および他の任意の賦形剤と組み合わせで使用され得る。例えば、Elliotts B (登録商標)溶液[Lukare Medical]を参照されたい。他の実施形態では、製剤は、1つ以上の浸透促進剤を含有し得る。好適な浸透促進剤の例は、例えば、マンニトール、グリココール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、またはEDTAを含み得る。

10

20

【0129】

任意で、本発明の組成物は、rAAVおよび担体(複数可)に加えて、防腐剤または化学的安定剤などの他の従来の薬学的成分を含み得る。好適な例示的な防腐剤としては、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、およびパラクロロフェノールが含まれる。好適な化学安定剤としては、ゼラチンおよびアルブミンが含まれる。

30

【0130】

本発明による組成物は、上記に定義されるような薬学的に許容される担体を含み得る。好適には、本明細書に記載される組成物は、薬学的に好適な担体に懸濁された、および/または注入、浸透ポンプ、髄腔内カテーテルを介して対象に送達するために、または別のデバイスもしくは経路による送達のために設計された好適な賦形剤と混合された有効量の1つ以上のAAVを含む。一実施例では、組成物は、髄腔内送達用に製剤化される。

【0131】

本明細書で使用される場合、「髄腔内送達」または「髄腔内投与」という用語は、脊柱管への注入による、より詳細には、脳脊髄液(CSF)へ到達するようにクモ膜下腔空間内への注入による、薬物の投与経路を指す。髄腔内送達は、腰部穿刺、脳室内(側脳室内(ICV)を含む)、後頭下/槽内、および/またはC1-2穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺により、クモ膜下腔空間にわたって拡散させるために導入され得る。別の実施例では、注入は、大槽内であり得る。

40

【0132】

本明細書で使用される場合、「槽内送達」または「槽内投与」という用語は、大槽小脳延髄の脳脊髄液への直接的な薬物の投与経路、より詳細には、後頭下穿刺による、または大槽内への直接的な注入による、永久的に配置されたチューブによる、薬物の投与経路を指す。

【0133】

一態様では、本明細書に提供されるベクターは、方法および/またはデバイスを介して

50

髄腔内投与され得る。例えば、WO 2017/181113を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる。代替的には、他のデバイスおよび方法が選択され得る。方法は、脊椎ニードルを患者の大槽内に前進させるステップ、1本の可撓性チューブを脊椎ニードルの近位ハブに連結し、バルブの出口ポートを可撓性チューブの近位端に連結するステップと、その前進および連結工程の後、患者の脳脊髄液を用いてチューブをセルフプライム可能とした後、一定量の等張溶液を含有する第1の容器をバルブのフラッシュ入口ポートに連結し、その後、一定量の薬学的組成物を含有する第2の容器をバルブのベクター入口ポートに連結するステップと、を含む。第1および第2容器をバルブに連結した後、流体流れのための通路は、ベクター入口ポートとバルブの出口ポートとの間に開かれ、薬学的組成物は脊椎ニードルを通して患者に注入され、薬学的組成物の注射後、流体流れのための通路は、フラッシュ入口ポートとバルブの出口ポートを通して開かれ、等張溶液は、薬学的組成物を患者にフラッシュするために脊椎ニードル中に注入される。

10

【0134】

この方法およびこのデバイスは、それぞれ任意で、本明細書で提供される組成物の髄腔内送達のために使用され得る。代替的には、他の方法およびデバイスが、かかる髄腔内送達のために使用され得る。

【0135】

「a」または「an」という用語は、1つ以上を指すことに留意されたい。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上（one or more）」、および「少なくとも1つ（at least one）」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

20

【0136】

「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」という語句は、排他的ではなく包括的に解釈されるべきである。「構成する（consist）」、「構成する（consisting）」という語句、およびその変形は、包括的ではなく排他的に解釈されるべきである。本明細書の様々な実施形態は、「含む（comprising）」という言葉を用いて示されているが、他の状況では、関連する実施形態は、「からなる（consisting of）」または「本質的にからなる（consisting essentially of）」という言葉を用いて解釈および記載されるべきことも意図される。

【0137】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別途指定されない限り、与えられた参照から10%（±10%）の可変性を意味する。

30

【0138】

本明細書で使用される場合、「疾患」、「障害」、および「状態」は、対象における異常な状態を示すために互換的に使用される。

【0139】

本明細書で別段の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、当業者により、および本明細書で使用されている多数の用語に対して当業者に一般的な手引きを提供している公開文書への参照により一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

40

【0140】

「発現」という用語は、本明細書で最も広い意味で使用され、RNAまたはRNAおよびタンパク質の産生を含む。RNAに関して、「発現」または「翻訳」という用語は、特に、ペプチドまたはタンパク質の産生に関する。発現は、一過性または安定であり得る。

【0141】

本明細書で使用される場合、「NA b力価」という用語は、その標的化されたエピトープ（例えば、AAV）の生理学的効果を中和する中和抗体（例えば、抗AAV NA b）がどれだけ産生されるかの測定値である。抗AAV NA b力価は、例えば、Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated

50

Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390に記載されているように測定され得、参照により本明細書に組み込まれる。

【0142】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」は、コード配列、プロモーターを含む核酸分子を指し、それらのための他の調節配列を含み得、そのカセットは、遺伝子要素（例えば、プラスミド）によりパッケージング宿主細胞に送達され得、ウイルスベクターのカプシド（例えば、ウイルス粒子）へパッケージされる。典型的に、ウイルスベクターを産生するためのかかる発現カセットは、ウイルスゲノムのパッケージングシグナルに隣接する本明細書に記載される遺伝子産物のコード配列、および本明細書に記載のものなどの他の発現制御配列を含む。

10

【0143】

省略形「sc」は、自己相補的であることを指す。「自己相補的AAV」は、組換えAAV核酸配列が保有するコーディング領域が、分子内二本鎖DNA鋳型を形成するように設計される構築物を指す。感染時には、第2の鎖の細胞介在合成を待つのではなく、scAAVの2つの相補的片割れが会合して、即時の複製および転写に備えのある1つの二本鎖DNA(dsDNA)ユニットを形成する。例えば、D M McCarty et al, 「Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis», Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254を参照されたい。自己相補的なAAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、第7,125,717号、および第7,456,683号に記載されており、その各々が参照によりそのすべてが本明細書に組み込まれる。

20

【0144】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」という用語は、目的の遺伝子に連続している発現制御配列と、目的の遺伝子に対してトランスに作用するか、または目的の遺伝子を制御する距離で作用する発現制御配列との両方を指す。

【0145】

タンパク質または核酸を参照して使用される場合、「異種性」という用語は、タンパク質または核酸が、天然における互いの関係と同じ関係で見出されない、2つ以上の配列または下位配列を含むことを示す。例えば、新規の機能的核酸を作製するために配置された関連のない遺伝子からの2つ以上の配列を有する核酸は、典型的に、組換えにより産生される。例えば、一実施形態では、核酸は、異なる遺伝子からコーディング配列の発現を導くように配置された1つの遺伝子からのプロモーターを有する。したがって、コーディング配列に関しては、プロモーターは、異種性である。

30

【0146】

「複製欠損ウイルス」または「ウイルスベクター」は、合成または人工ウイルス粒子を指し、目的の遺伝子を含有する発現カセットは、ウイルスカプシドまたはエンベロープ中にパッケージされ、ウイルスカプシドまたはエンベロープ内にパッケージされた任意のウイルスゲノム配列は、複製欠損である、すなわち、それらは、後代ビリオンを産生することができないが、標的細胞に感染する能力を保持することができる。一実施形態では、ウイルスベクターのゲノムは、複製に必要とされる酵素をコードする遺伝子を含まないが（ゲノムは、人工ゲノムの増幅およびパッケージングに必要とされるシグナルに隣接する目的の導入遺伝子のみを含有する「ガットレス(gutless)」であるように操作されることができる）、これらの遺伝子は、産生中に供給され得る。したがって、それは、後代ビリオンによる複製および感染が、複製に必要とされるウイルス酵素の存在下以外で生じることができないために、遺伝子療法における使用のために安全であると考えられる。

40

【0147】

50

多くの事例では、rAAV粒子は、DNase耐性として参照される。しかしながら、このエンドヌクレアーゼ(DNase)に加えて、他のエンド-およびエキソ-ヌクレアーゼが、汚染核酸を除去するために本明細書に記載の精製工程において使用され得る。かかるヌクレアーゼは、一本鎖DNAおよび/または二本鎖DNA、およびRNAを分解するために選択され得る。かかる工程は、単一ヌクレアーゼ、または異なる標的に指向されたヌクレアーゼの混合物を含み得、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼであり得る。

【0148】

「ヌクレアーゼ耐性」という用語は、AAVカプシドが、宿主細胞に導入遺伝子を送達するように設計された発現カセットの周りで完全に構築されていることを示し、産生プロセスから存在し得る汚染核酸を除去するために設計されたヌクレアーゼインキュベーション工程の間の分解(消化)からこれらのパッケージされたゲノム配列を保護する。

10

【0149】

本発明の文脈における「翻訳」という用語は、リボソームでのプロセスに関し、mRNA鎖は、アミノ酸配列の集合を制御して、タンパク質またはペプチドを生成する。

【0150】

本明細書および特許請求の範囲全体を通して使用される場合、「含む(comprising)」および「含む(including)」という用語は、他の構成要素、要素、整数、ステップなどを含む。逆に、「からなる(consisting)」という用語およびその変形は、他の構成要素、要素、整数、ステップなどを除外する。

20

【0151】

上述のように、「約」という用語は、別段の指定がない限り、数値を修正するために使用される場合、±10%の変動を意味する。

【0152】

以下の実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0153】

以下の実施例は、構造、生化学、および質量分析アプローチからの裏付けとなる証拠とともに、AAV8および追加の多様なAAV血清型の広範な脱アミド化を報告する。各部位における脱アミド化の程度は、ベクターの年齢および複数の一次配列および3D構造因子に依存していたが、ベクター回収および精製の条件からほぼ独立していた。ベクター導入活性に影響を与える脱アミド化の可能性を示し、いくつかのAAV8アスパラギンでのベクター活性における初期時点の損失を、急速に進行する自発的な脱アミド化と関連させる。側鎖アミドを安定化し、ベクターの形質導入を改善し、生物製剤製造における重要な懸念であるロット間の分子可変性を低減する変異戦略を探求する。この研究は、AAVカプシド異種性の以前に知られていない態様を示し、遺伝子治療のためのこれらのベクターの開発におけるその重要性を強調する。

30

【0154】

実施例1では、1次元および2次元ゲル電気泳動、質量分析、および新規構造モデリングによる、AAV8ベクターカプシドへの翻訳後修飾の特徴付け。カプシド表面上の複数の推定脱アミド化部位の特定に続いて、インビトロおよびインビボの両方でカプシド構造および機能への影響を評価する。実施例1は、この分析をさらにAAV9に拡張して、この現象がAAV8以外の血清型に適用されるかを特定し、AAVカプシドの脱アミド化が血清型特異的でないことを確認する。実施例2~5は、異なるAAVの脱アミド化を示す。

40

【0155】

実施例1：アデノ随伴ウイルスカプシド表面上のアミノ酸の脱アミド化

A. 材料および方法

1. 1Dおよび2Dゲル電気泳動

1D SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析では、まずA

50

AAVベクターをドデシル硫酸リチウムおよび還元剤の存在下で、80℃で20分間変性した。次に、4~12%のBis-Trisゲル上で、90分間200Vで泳動し、クーマシーブルーで染色した。図1A~図1Dのデータについて、Kendrick Laboratories, Inc. (Madison, WI)が、2Dゲル電気泳動を実行した。その後の実験では、社内で2D SDS-PAGEを実行した。そのために、35mM NaClおよび1mM MgCl₂を含む150μLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で、3×10¹¹ GCのAAVベクターおよび500Uターボヌクレアーゼマーカ(Accelagen, San Diego, CA)を組み合わせ、37℃で10分間インキュベートした。次に、9倍量の無水エタノールを加え、試料をボルテックスし、-80℃で少なくとも2時間インキュベートした後、氷上で5分間インキュベートし、9倍量のesを加え、最大速度で、15℃で30分間遠心分離した。上清をデカントし、ペレットを空気乾燥させ、次いで、再懸濁緩衝液#1[0.15% SDS、50mMジチオスレイトール(DTT)、10mM Tris pH7.5、および1μL pH6~9両性電解質、ThermoFisher ZM0023をddH₂O中に当日追加した]に再懸濁し、室温で静かにインキュベートした。30分後、試料チューブをフリックして混合し、1μgのニワトリコンアルブミンマーカ(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を追加し、試料を37℃で30分間インキュベートし、15分でフリックして混合した。次に、試料を50℃に15~20分間移し、ボルテックスし、95℃で2.5分間インキュベートし、冷却してから、最大速度で1分間遠心分離し、短時間ボルテックスした。次に、各試料10μLを140μLの再懸濁緩衝液#2(9.7M尿素、2% CHAPS、0.002%プロモフェノールブルー、および上述の0.05%両性電解質をddH₂O中に当日追加した)と混合し、室温で10分間インキュベートした。次いで、混合物をpH6~10固定pH勾配(IPG)ストリップ(ThermoFisher Waltham, MA)に適用し、製造元の指示に従ってZOOM IPG Runnerシステム上で実行した。以下の等電点電気泳動パラメータを使用した。ストリップあたり0.1Wおよび0.05mAの制限で、100~1,000Vで120分、1,000~2,000Vで120分、2,000Vで120分泳動した。次いで、IPGストリップを還元し、単一ウェルの4~12% Bis-Trisゲル中に負荷し、上記のように1Dで実行した。内部対照タンパク質ターボヌクレアーゼ(Accelagen, 27kDa)およびニワトリ卵白コナルブミン(Sigma Aldrich, 76kDa, pI 6.0~6.6)と比較して、AAV VPの相対的な移動を決定した。

【0156】

2. ベクター産生

ペンシルバニア大学のベクターコアは、1Dおよび2Dゲル電気泳動ならびに質量分析実験用の組換えAAVベクターを作製し、前述のように塩化セシウムまたはイオジキサノール勾配で精製した。(Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10): 1259-71、Gao GP, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(18): 11854-9)。親和性精製ベクターを以下のように産生した: 10個の36層ハイパースタック容器(Corning)中でHEK293細胞を増殖させ、ベクターゲノムプラスミド(pAAV-LSP-IVS2.hFIXco-WPRE-bGH)、AAV2 repおよびAAV8 cap遺伝子を含むトランスプラスミド、ならびにアデノウイルスヘルパープラスミドの混合物でそれらを共トランスフェクションした。トランスフェクション試薬としてPEI pro (PolyPlus)を使用した。トランスフェクションの5日後、上清を回収し、Sartoguard PES Midicapフィルター(Sartorius Stedim)を通じて清澄化し、ベンゾナーゼ(Millipore)で処理し、その後、塩を添加して0.6Mにした。清澄化したバルク回収材料を、タンジェンシャル流濾過(TFF)によって10倍濃縮し、次いで4体積の親和性カラム充填緩衝液に対してダイア濾過した。POROS Capture Select(ThermoFisher)親和性カラム上でベクターを捕捉し、低pHでベクターピークを中和緩衝液に直接溶出した。中

和溶出液を高pH結合緩衝液に希釈し、陰イオン交換研磨カラム (Cimultus QA-8; Biosaeparations) に負荷し、ゲノム含有 (完全) 粒子について調製物を濃縮した。完全ベクター粒子を浅塩溶出勾配で溶出し、すぐに中和した。最後に、最終濃縮および製剤緩衝液 (PBS + 0.001% プルロニック F-68) への緩衝液交換のために、ベクターを2回目のTFFに供した。

【0157】

6ウェルプレートにおけるHEK293細胞の小規模トリプルトランスフェクションによるインビトロアッセイのための変異ベクターを産生した。プラスミドDNA (90 µLの無血清培地中の0.091 µgシスプラスミド、0.91 µgトランスプラスミド、1.82 µgデルタF6 Adヘルパープラスミド) を5.6 µLの1 mg/mLポリエチレンイミン溶液および90 µLの無血清培地中で混合し、室温で15分間インキュベートし、細胞に追加し、さらに0.8 mLの新鮮な無血清培地を加えた。翌日、0.5 mLの上位培地を全血清培地に交換した。トランスフェクションの3日後に3回の凍結/解凍サイクルでベクターを回収し、その後遠心分離して細胞破片を除去し、上清を回収した。シスプラスミドは、プロメガキメライントロンおよびウサギベータグロビン (RBG) ポリアデニル化シグナルを伴うニワトリベータアクチン (CB7) プロモーターの制御下でホタルシフェラーゼ導入遺伝子をコードする導入遺伝子カセットを含む。トランスプラスミドは、wtAAV8 cap遺伝子をコードし、変異AAV8 capバリエーションを生成するために、Quickchange Lightning Mutagenesisキット (Agilent Technologies, Wilmington, DE) を使用した。ベクターを前述のように力価測定した。(Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10): 1259-71)。

【0158】

時間経過ベクター生成実験のために、15 cmの組織培養皿におけるHEK293細胞の中規模トリプルトランスフェクションによるベクターを生成した。プレートあたり、2 mLの無血清培地中の36 µLの1 mg/mLポリエチレンイミン溶液をプラスミドDNA (0.6 µgシスプラスミド、5.8 µgトランスプラスミド、11.6 µgデルタF6 Ad-ヘルパープラスミド) と混合し、室温で15分間インキュベートし、14 mLの無血清培地でリフレッシュしたプレート上で約60%の集密度で細胞に追加した。翌日、8 mLの上部培地を新鮮で完全な血清培地に交換した。すべての上部培地を収集し、ディッシュから細胞をかき取り、これを-80 で凍結することによってベクターを回収した。3回の凍結/解凍サイクルを適用し、遠心分離により溶解物を清澄化することにより、上清/細胞混合物から粗ベクターを回収した。清澄化溶解物にベンゾナーゼ、1 M Tris pH 7.5、および5 M NaClを追加して、20 mM Trisおよび360 mM NaClの最終濃度にするにより、質量分析用のベクターを精製および濃縮した。1 mL POROS Capture Select 親和性カラム上でベクターを捕捉し、低pHでベクターピークを中和緩衝液に直接溶出した。画分を280 nmで吸収率によって分析し、最も濃縮された画分を質量分析に供した。

【0159】

インビボ実験のために、前述のwtAAV8カプシドまたは6個の脱アミド化変異体のうちの1つを用いてベクターを産生し、導入遺伝子カセットは、CB7プロモーター、PIイントロン、ホタルシフェラーゼ導入遺伝子、およびRBGポリアデニル化シグナルを含む(Lock M, et al. Hum Gene Ther 2010; 21(10): 1259-71)。

【0160】

3. 質量分析の実行/ダイジェスト/分析

材料: Sigma (St. Louis, MO) から炭酸水素アンモニウム、DTT、ヨードアセトアミド (IAM)、および180濃縮水 (97.1%純度)、ならびにThermo Fischer Scientific (Rockford, IL) からアセトニトリル、ギ酸、トリフルオロ酢酸 (TFA)、8 M グアニジン塩酸 (GndHCl)、お

よびトリプシンを購入した。

【0161】

トリプシン消化：1 M DTTおよび1.0 Mヨードアセトアミドのストック溶液を調製した。カプシドタンパク質を変性させ、10 mM DTTおよび2 M GndHClの存在下で90 で10分間還元した。試料を室温に冷却させ、次いで、暗所で30分、室温で30 mM IAMを使用してアルキル化した。1 mL DTTを追加してアルキル化反応をクエンチした。最終GndHCl濃度を200 mMに希釈する量で、変性タンパク質溶液に20 mM炭酸水素アンモニウム (pH 7.5 ~ 8) を追加した。トリプシン対タンパク質の比率が1 : 20になるようにトリプシン溶液を加え、37 で一晩インキュベートした。消化後、TFAを最終濃度0.5%になるように添加し、消化反応をクエンチした。

10

【0162】

180 - 水実験では、最初にカプシド試料を、Zebaスピン脱塩カラム (Thermo Scientific, Rockford, IL) を使用して180 - 水で調製した100 mM重炭酸アンモニウムに緩衝液交換した。試料中の水を完全に除去するために、緩衝液交換を2回行った。180 - 水中で1 M DTTおよび1 M IAMのストック溶液を調製した。180 - 水試薬および緩衝液を用いて、上記と同様の変性、アルキル化、および消化ステップに従った。

【0163】

液体クロマトグラフィータンデム質量分析：Acclaim PepMapカラム (長さ15 cm、内径300 μm) およびNanoFlex source (Thermo Fisher Scientific) を備えたQ Exactive HFと結合したThermo Ultimate 3000 RSLCシステム (Thermo Fisher Scientific) を用いたオンラインクロマトグラフィーを実行した。オンライン分析中、カラム温度を35 の温度で維持した。移動相A (0.1%ギ酸を含むMilliQ水) および移動相B (0.1%ギ酸を含むアセトニトリル) の勾配でペプチドを分離した。15分間にわたって4%Bから6%Bへ、25分間 (合計40分間) で10%Bへ、その後46分間 (合計86分間) で30%Bへと勾配を実行した。試料を直接カラムに負荷した。カラムサイズは、75 cm x 15 μmのIDであり、2ミクロンのC18培地 (Acclaim PepMap) を充填した。負荷、導入、および洗浄ステップにより、各液体クロマトグラフィータンデム質量分析実行の合計時間は約2時間であった。

20

30

【0164】

Q Exactive HF質量分析器におけるデータ依存のtop - 20法を用いて質量分析データを取得し、調査スキャン (200 ~ 2000 m/z) から最も豊富な未配列前駆体イオンを動的に選択した。予測自動利得制御で決定された1e5イオンの標的値で、より高いエネルギー衝突解離断片化を介してシーケンシングを実行し、4 m/zのウィンドウで前駆体の単離を実行した。調査スキャンを200 m/zで、120,000の解像度で取得した。50 msの最大イオン注入時間、30の正規化衝突エネルギーを伴うm/z 200でHCDスペクトルの解像度を30,000に設定した。SレンズのRFレベルを50に設定し、これにより、ダイジェストからのペプチドが占めるm/z領域が最適に伝達される。単一、未割り当て、または6以上の電荷状態を有する前駆体イオンを断片化選択から除外した。

40

【0165】

データ処理：BioPharma Finder 1.0ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を使用して、取得したすべてのデータを分析した。ペプチドマッピングについては、固定修飾としてカルバミドメチル化を設定し、可変修飾として酸化、脱アミド化、およびリン酸化を設定して、単一エントリタンパク質FASTAデータベースを使用して検索を実行した。タンデム質量分析スペクトルには10 ppmの質量精度、高いプロテアーゼ特異性、0.8の信頼レベルを使用した。脱アミド化は、無傷分子の質量 + 0.984 Da (-OHおよび-NH₂基の質量差) を付加するので、脱アミド化ペプチドの質量分析的同定は比較的簡単である。特定のペプチドの脱

50

アミド化の割合は、脱アミド化ペプチドの質量面積を、脱アミド化および天然ペプチドの面積の合計で割ることによって決定した。考えられる脱アミド化部位の数を考慮すると、異なる部位で脱アミド化されている等張種は、単一のピークで共移行し得る。したがって、複数の潜在的脱アミド部位を有するペプチドに由来する断片イオンを使用して、複数の脱アミド部位を特定または区別することができる。これらの事例では、観察された同位体パターン内の相対強度を使用して、異なる脱アミド化ペプチド異性体の相対的存在量を特異的に決定することができる。この方法は、すべての異性体種についての断片化効率と同じであり、脱アミド化部位において独立していることを想定する。このアプローチにより、脱アミド化に關与する特定の部位および脱アミド化に關与する潜在的な組み合わせの定義が可能となる。

10

【0166】

二次データ処理：生の質量分析の二次分析を、メリーランド大学ボルチモア郡で以下の方法を使用して実行した。Peaks Studio v5.3ソフトウェア(Bioinformatics Solutions Inc.)をすべての質量分析に使用した。生データファイルのデータ精密化を、10 ppmの前駆体m/z許容値、最小2、最大4の前駆体の電荷状態のパラメータを使用して実行した。入力スペクトルの新規シーケンシングを、10 ppmの前駆体イオン誤差許容値および0.1 Daの生成物イオン誤差許容値を有するピークスアルゴリズムを使用して実行した。消化酵素をトリプシンとして設定し、可変修飾は酸化、リン酸化、脱アミド化であり、固定修飾はシステインのカルバミドメチル化であった。

20

【0167】

4. AAVカプシドの構造解析

RCSB Protein Data BankからAAV8原子座標、構造因子、および関連するカプシドモデルを取得した(PDB番号:3RA8)。カプシドの3次元(3D)構造解析で使用するために、構造の精密化を実行し、AAV8 VP3の一次アミノ酸配列に依存しない電子密度を生成した。AAV8 VP3の予想される一次配列によって偏らなかったAAV8カプシドのイソアスパラギン酸の電子密度を観察するために、この分析を実行した。得られた構造を使用して、N+1グリシンをイソアスパラギン酸とするAAV8 VP3一次配列中の4つのアスパラギンをモデル化し、次いで、標準的な精製プロトコルを用いてイコサヘドラル非結晶マトリックスを厳密に強制することによって、結晶学およびNMRシステム(CNS)ソフトウェアを使用してAAV8カプシド構造を精製した(Brunger AT, et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1998; 54(Pt 5): 905-21)。HIC-UPデータベースからイソアスパラギン酸の構造モデルを取得し、続いて、構造精製のためのPRODRGにおける分子辞書を生成した(Kleywegt GJ Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2007; 63(Pt 1): 94-100)。次いで、AAV8カプシドの平均電子密度マップ(CNSにおいても)を計算し、COOTソフトウェアを使用して可視化し、その後、モデル化したイソアスパラギン酸残基を電子密度マップに適合させるために得られたモデルの軽微な調整を行った(Emsley P and Cowtan K Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004; 60(Pt 12 Pt 1): 2126-32)。本プロトコルを繰り返し、N+1グリシンを含むAAV8 VP3一次配列中のN512をさらにモデル化した(PDB番号:3UX1)。COOT、PyMol、およびUCSF Chimeraを使用してすべての図を生成した(Emsley P and Cowtan K Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2004; 60(Pt 12 Pt 1): 2126-32、DeLano WL PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool Vol. 40, 2002: 82-92、Pettersen EF, et al. J Comput Chem 2004; 25(13): 1605-12)。以前に特定した脱アミド化タンパク質の複数の構造を取得した脱アミド化イソアス

30

40

50

パラギン酸残基の電子密度マップと、AAV8およびAAV9のモデル化されたイソアスパラギン酸残基を比較するために、以前に特定した脱アミド化タンパク質の複数の構造を取得した(PDB番号: 1DY5、4E7G、1RTU、1W9V、4E7D、および1C9D)(Rao FV, et al. Chem Biol

2005; 12(1): 65-76、Noguchi S, et al. Biochemistry 1995; 34(47): 15583-91、Esposito L, et al. J Mol Biol 2000; 297(3): 713-32)。

【0168】

AAV8またはAAV9結晶構造の原子座標で報告された各アスパラギン残基の各原子の温度係数を平均することにより、脱アミド化残基の温度係数を決定した(PDB番号: 3RA8、3UX1)。

10

【0169】

5. 動物研究

ペンシルベニア大学の施設内動物管理使用委員会は、すべての動物手順を承認した。ベクター性能を評価するために、尾静脈注入を介して8週間齢のC57BL/6マウスに、3e10 GCのwtAAV8またはカプシド変異ベクターを100 µLの容量で静脈内注入した。14日目に全てのマウスを犠牲にした。ルシフェラーゼ発現のインビボ評価のために、マウス(約20g)を麻酔し、200 µLまたは15 mg/mLのルシフェリン基質(Perkin Elmer, Waltham, MA)を腹腔内注入した。ルシフェリン投与の5分後にマウスを画像化し、IVIS Xenogenインビボ画像化システムを介して画像化した。Living Image 3.0ソフトウェアを使用して、目的の領域のシグナルを定量化した。7日目および14日目に測定を行った。

20

【0170】

6. 変異ベクター力価およびインビトロ形質導入効率の評価

DNAse I耐性ゲノムのqPCRによってベクター力価を決定した。qPCRプライマーは、パッケージ化された導入遺伝子のポリアデニル化配列にアニールする。ルシフェラーゼ発現によるベクター形質導入効率のインビトロ評価のために、完全なDMEM(10%胎児ウシ血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン)の黒壁96ウェルプレートに0.9e5 Huh7細胞/ウェルを播種した。翌日、培地を除去し、完全培地で希釈した50 µLの粗または精製ベクターに変更した。各粗ベクター試料について、3倍希釈系列で4回希釈を試験した。48時間後、0.3 µg/µLの完全培地中のルシフェリン(Promega, Madison, WI)を調製し、50 µLの容量で形質導入細胞に追加した。結果をBiotek Clarityルミノメータで読み取った。標的細胞に追加したルシフェラーゼ活性/GCは、広範囲のGCにわたって一定であるが、高いMOIで飽和できることを見出した。したがって、希釈系列データ(発光単位対GC)の直線性を検査し、飽和が明らかな場合の最高点を除外し、各バリエーションの各アッセイの直線範囲内の値について平均ルシフェラーゼ/GCを計算する。これにより、形質導入効率値が得られる。Wt対照を1の値に設定することで比較を簡素化するためにデータを正規化した。

30

【0171】

7. 体内分布

QIAamp DNA Miniキット(Qiagen, Hilden, Germany)を用いて肝臓試料からDNAを抽出し、次いで、導入遺伝子カセットのRBGポリアデニル化シグナルに対して設計されたプライマー/プローブセットで前述のようにリアルタイムPCRによってベクターGCのDNAを分析した(Chen SJ, et al. Hum Gene Ther Clin Dev 2013; 24(4): 154-60)。

40

【表 5 - 1】

AAV8 変異体のプライマー配列

配列番号	配列	説明
配列番号 56	CGACAACCGGGCAAAACcagAATAGCAA CTTTGCCTGG	AAV8 N499 を Q に変更する QC 変異誘発プライマー
配列番号 57	CCAGGCAAAGTTGCTATTCTGGTTTTGC CCGGTTGTCG	AAV8 N499 を Q に変更する QC 変異誘発プライマー
配列番号 58	GACAACCGGGCAAAACgacAATAGCAAC TTTGCCTG	AAV8 N499 を D に変更する QC 変異誘発プライマー
配列番号 59	CAGGCAAAGTTGCTATTGTCGTTTTGCC CGGTTGTC	AAV8 N499 を D に変更する QC 変異誘発プライマー
配列番号 60	GGAGGCACGGCAcagACGCAGACTCTGG G	AAV8 N459 を Q に変更する qc 変異誘発プライマー
配列番号 61	CCCAGAGTCTGCGTCTGTGCCGTGCCTC C	AAV8 N459 を Q に変更する qc 変異誘発プライマー
配列番号 62	CAGGAGGCACGGCAgatACGCAGACTCT GG	AAV8 N459 を D に変更する qc 変異誘発プライマー
配列番号 63	CCAGAGTCTGCGTATCTGCCGTGCCTCC TG	AAV8 N459 を D に変更する qc 変異誘発プライマー
配列番号 64	ctcctcccgatgctcgttgagattg	AAV8 NA263 F
配列番号 65	gcaaatctccaacgcacatcgggaggag	AAV8 NA263 R
配列番号 66	cccacggcctgactagcgttgtagtgta	AAV8 NA385 F
配列番号 67	taacactcaacaacgctagtcaggccgtggg	AAV8 NA385 R
配列番号 68	ggattagccaatgaattcttgcaatcagatggtattggtcc	AAV8 NA514 F
配列番号 69	ggaccaaataccatctgaatgcaagaattcattggctaacc	AAV8 NA514 R
配列番号 70	ttgcacaaaatcaggatcgcgttactgggaaaaaacg	AAV8 NA540 F
配列番号 71	cgttttttcccagtaacgcgacatcctgattttggcaaa	AAV8 NA540 R
配列番号 72	ggaccctcaacgcactcgacaagggg	AAV8 NA57 F
配列番号 73	ccccttgcgagtgctggaaggtcc	AAV8 NA57 R
配列番号 74	tgctcctcccgatgctggttgagattgctg	AAV8 NS263 F
配列番号 75	caagcaaatctccaacagcacatcgggaggagcca	AAV8 NS263 R
配列番号 76	cccacggcctgactactgttgtagtgtagg	AAV8 NS385 F
配列番号 77	cctaactcaacaacagtagtcaggccgtggg	AAV8 NS385 R
配列番号 78	ttagccaatgaattctgctattcagatggtattggtcccagcag	AAV8 NS514 F
配列番号 79	ctgctgggacaaaataccatctgaatagcagaattcattggctaa	AAV8 NS514 R
配列番号 80	ttgttgcacaaaatcaggatgctgttactgggaaaaaacgctc	AAV8 NS540 F
配列番号 81	gagcgtttttcccagtaacagcatcctgattttggcaaaaa	AAV8 NS540 R
配列番号 82	ctcccccttgcgagctgtggaaggtccgag	AAV8 NS57 F
配列番号 83	ctcggaccctcaacagcctcgacaagggggag	AAV8 NS57 R

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

配列番号 84	cagcgactcatcaacGACaactgggattccg	AAV8 N305D に対する QC プライマー
配列番号 85	ggaggcacggcaGATacgcagactctgg	AAV8 N459D に対する QC プライマー
配列番号 86	gacaaccgggcaaacGACaatagcaactttgctg	AAV8 N499D に対する QC プライマー
配列番号 87	ccatctgaatggaagaGATtcattgctaactcctggcatc	AAV8 N517D に対する QC プライマー
配列番号 88	cgaagcccaaagccGACcagcaaaagcagg	AAV8 N35D に対する QC プライマー
配列番号 89	gtacctgggtatGACcagccgcagcgc	AAV8 N94D に対する QC プライマー
配列番号 90	gatgctgagaaccggcGACaactccagttacttac	AAV8 N410D に対する QC プライマー
配列番号 91	cagactctgggcttcagcGATgggtggcctaatacaatg	AAV8 Q467D に対する QC プライマー
配列番号 92	ccaatcaggcaaagGACtggtgccaggac	AAV8 N479D に対する QC プライマー
配列番号 93	cacggacggcGACttccaccctctc	AAV8 N630D に対する QC プライマー
配列番号 94	gatcctgatcaagGACacgcctgtacctgcg	AAV8 N653D に対する QC プライマー
配列番号 95	gtacctggacccttcCAGggactcgacaaggg	AAV8 N57Q に対する QC プライマー
配列番号 96	ctacaagcaaatctccCAGgggacatcgggaggagc	AAV8 N263Q に対する QC プライマー
配列番号 97	gtacctaacactcaacCAGggtagtcaggccgtgg	AAV8 N385Q に対する QC プライマー
配列番号 98	gtgggaccaaatcatctgCAGggaagaattcattggc	AAV8 N514Q に対する QC プライマー
配列番号 99	ggagcgtttttccagtcCAGgggatcctgattttggc	AAV8 N540Q に対する QC プライマー
配列番号 100	cggaatccccagttgtcgttgatgagtcgctg	AAV8 N305D に対する QC プライマー
配列番号 101	ccagagtctgcgtatctgcccgtcctcc	AAV8 N459D に対する QC プライマー
配列番号 102	caggcaaagtgtctattgctgtttgcccggttgtc	AAV8 N499D に対する QC プライマー
配列番号 103	gatgccaggattagccaatgaatctctccattcagatgg	AAV8 N517D に対する QC プライマー
配列番号 104	cctgctttgctggtcggctttgggcttcg	AAV8 N35D に対する QC プライマー
配列番号 105	ggcgtcggcgtgtcataccgcaggtac	AAV8 N94D に対する QC プライマー
配列番号 106	gtaagtaactggaagttgtcggcgttctcagcatc	AAV8 N410D に対する QC プライマー
配列番号 107	cattgtattagcccaccatcgtgaagcccagagtctg	AAV8 Q467D に対する

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

		QC プライマー	
配列番号 108	gtcctggcagccagtcctttgctgattgg	AAV8 N479D に対する QC プライマー	
配列番号 109	gagacgggtggaagtcgcccgtccgtg	AAV8 N630D に対する QC プライマー	
配列番号 110	cgcaggtacagcgtgtccttgatcaggatc	AAV8 N653D に対する QC プライマー	
配列番号 111	gcagcgactcatcaacGACaactggggattccggc	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより長いプライマー	10
配列番号 112	GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGAG TCGCTGC	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより長いプライマー	
配列番号 113	cagcgactcatcaacGACaactggggattccggc	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより長いプライマー	
配列番号 114	GCCGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGAG TCGCTG	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより長いプライマー	20
配列番号 115	gogactcatcaacGACaactggggattccg	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより短いプライマー	
配列番号 116	CGGAATCCCCAGTTGTCGTTGATGAGTC GC	qc 変異誘発により AAV8 N305D を作製するための代替的なより短いプライマー	
配列番号 117	ctctgggcttcagcGAAggtggcctaatac	AAV8 Q467E を作製するための変異誘発 QC プライマー	
配列番号 118	GTATTAGGCCACCTTCGCTGAAGCCCA GAG	AAV8 Q467E を作製するための変異誘発 QC プライマー	30
配列番号 119	cctcgacccttcGACgggactcgacaagg	AAV8 N57D に対する QC プライマー	
配列番号 120	tacaagcaaactccGACgggacatcggaggag	AAV8 N263D に対する QC プライマー	
配列番号 121	ctacctaactcaacGACggtagtcaggccgtg	AAV8 N385D に対する QC プライマー	
配列番号 122	ctgggaccaaataccatctgGATggaagaaattcattggctaac	AAV8 N514D に対する QC プライマー	
配列番号 123	gagcgtttttccagtcGACgggatcctgattttggc	AAV8 N540D に対する QC プライマー	40

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

配列番号 124	cctgtcagtcgagtcgaagggtccgagg	AAV8 N57D に対する QC プライマー
配列番号 125	ctctcccagatgcccgctggagatttgcttga	AAV8 N263D に対する QC プライマー
配列番号 126	cacggcctgactaccgctggtgagtgtagtag	AAV8 N385D に対する QC プライマー
配列番号 127	gattagccaatgaatttctccatccagatggtatttggtcccag	AAV8 N514D に対する QC プライマー
配列番号 128	gccaaaaatcaggatcccgtcactgggaaaaaacgctc	AAV8 N540D に対する QC プライマー

10

【 0 1 7 2】

B. 結果

AAV8 は、そのカプシドタンパク質における実質的な電荷異質性を示す。

【 0 1 7 3】

ベクター性能に影響を及ぼす可能性がある AAV8 ベクターカプシド上の翻訳後修飾の存在を定性的に評価するために、1D および 2D ゲル電気泳動の両方によってイオジキサノール勾配によって精製された AAV8 総カプシドタンパク質を分析した。1D 還元型ドデシル硫酸ナトリウム SDS ゲルでは、VP1、VP2、および VP3 は、適切な分子量で単一バンドとして分解された (図 1B) (Rose JA, et al. J Virol 1971; 8(5): 766-70)。電荷に基づいてタンパク質を分離する 2D ゲル電気泳動でさらに評価すると (図 1C)、カプシドタンパク質の各々は、さらに、VP アイソフォームに依存する pH 6.3 ~ 7.0 の範囲の異なる等電点 (pI) を有する一連の異なるスポットとして分解された (図 1D)。各 VP の個々のスポットは、炭酸脱水酵素アイソフォームの内部等電点標準と比較して移行として測定した場合、0.1 pI 単位の離散間隔で分離されており、単一の残基電荷の変化を示唆した。これらのアイソフォームの存在は、各 VP が多くの修飾を受ける可能性を有し、それによって、等電点電気泳動下で異なる移行をもたらすことを示唆する。

20

【 0 1 7 4】

(典型的にはアスパラギン) 側鎖アミド基の一部がカルボン酸に変換される脱アミド化 (図 1A) は、タンパク質調製物における共通の電荷異性源である。脱アミド化が VP 電荷アイソフォームの異なる集団の原因であるかを判断するために、2つの AAV8 アスパラギン残基を個別に変異させてアスパルテートにした。これらのカプシド変異は、単一の追加のアスパラギン残基の完全な脱アミド化に相当する量の電荷をシフトさせる必要がある。変異体の 2D ゲル分析は、VP1、VP2、および VP3 の主なスポットが、野生型 (wt) AAV8 における等価スポットよりも酸性 (0.1 pH 単位) の 1つのスポット位置をシフトしたことを示す (図 1E ~ 図 1G)。このシフトの大きさは、wt VP 電荷アイソフォーム間の観測された間隔に相当する。したがって、AAV8 カプシドタンパク質の 2D ゲルパターンは、多部位脱アミドと一致する。

30

40

【 0 1 7 5】

AAV8 ベクターカプシドで自発的脱アミド化が生じる

各カプシドタンパク質についての個別のスポット化パターンの原因となる修飾を特定するために、質量分析によって AAV8 ベクターのパネルを分析した。AAV8 カプシドタンパク質の被覆度は、平均して総 VP1 配列の 95% を超えていた (データは示さず)。質量分析によるアスパラギンおよびグルタミン残基のサブセットの広範な脱アミド化を検出し、DNA によってコードされる配列に基づく予測値と比較して、個々のペプチドの観察された質量の約 1 Da の増加を示し、AAV8 ベクターのすべての調製物においてこの脱アミド化パターンを観察した (図 2A ~ 図 2D)。

【 0 1 7 6】

50

一般に使用される精製方法間の脱アミド化の全体的な異質性を評価し、VP1およびVP2固有領域における脱アミド化を調べるために、293細胞においてトリプルトランスフェクションによって産生される9つのロットのAAV8を選択し、塩化セシウム勾配、イオジキサノール勾配、または親和性クロマトグラフィーのいずれかによって精製した。ベクターはまた、プロモーターおよび導入遺伝子カセットに関して様々であった。ベクターゲノムの存在が脱アミド化に影響を及ぼしたかを判断するために、シスプラスミドの不存在下で293細胞においてトリプルトランスフェクションによって産生されたAAV8プレップも評価し（空カプシドのみを産生する）、イオジキサノール勾配によって精製した。

【0177】

検出不可能な範囲から脱アミド化されている個々のアミノ酸の99%を超える範囲で、AAV8カプシドのアスパラギンおよびグルタミン残基にわたって広範囲の脱アミド化が存在した（図2E）。脱アミド化の最高レベル（75%を超える）は、N+1残基がグリシン（すなわち、NG対）であったアスパラギン残基において生じた（表1）。N+1がグリシンではなかった追加のアスパラギン残基において、より低いレベルの脱アミド化（すなわち、最大17%）を検出した。アスパラギンの平均脱アミド化は、調製物間でほぼ一致した。また、グルタミン残基での脱アミド化も検出したが、アスパラギンよりも低い頻度で検出し、観察した最も高いパーセントはQ467で2%未満であった（図7）。この観察は、調製物にわたって矛盾していた（データは示さず）。残基N499（N+1残基はアスパラギンである）で最も大きな調製対調製の違いを観察し、値は1%未満~50%を超える脱アミド化の範囲であった。いずれにせよ、ベクターの調製物間の脱アミド化で観察した変動は、精製方法、導入遺伝子同一性、またはベクターゲノムの存在に関連していないようであり、これらの因子が脱アミド化率に影響を与えないことを示唆した。

【表6】

表1：目的のAAV8脱アミド残基の特徴。アスタリスクは、さらなる分析のために選択した残基を表す。

	N+1 残基	構造形態	構造モチーフ	脱アミド化平均%	温度因子(Å ²)
N35	Q	該当なし	該当なし	1	該当なし
N57	G	該当なし	該当なし	80	該当なし
N94	H	該当なし	該当なし	7	該当なし
N254*	N	露出した表面	割り当てなし	9	35
N255*	H	露出した表面	割り当てなし	該当なし	42
N263	G	露出した表面	HVR I	99	51
N305	N	埋没	アルファヘリックス	8	33
N385	G	露出した表面	HVR III	88	41
N410	N	埋没	割り当てなし	3	33
N459	T	露出した表面	HVR IV	7	65
N499	N	露出した表面	HVR V	17	45
N514*	G	露出した表面	HVR V	84	36
N517*	S	露出した表面	HVR V	4	40
N540*	G	埋没	HVR VII	79	40
N630*	F	埋没	割り当てなし	1	32
N653	T	露出した表面	HI ループ	1	35

【0178】

次に、試料処理がAAV8における脱アミド化の観察したレベルに寄与したかを決定するために一連の実験を行った。極端な温度（70 で7日間）またはpH（pH2または

pH 10で7日間)は、AAV8カプシド中で追加の脱アミド化を有意に誘導しなかった(図4Aおよび図4B)。この抵抗性を考えると、観察した脱アミド化は精製段階でのみ発生した可能性が低く、それよりも短く、比較的軽度であったと考察する。精製前後の脱アミド化の程度を決定するために、未精製ベクターに対して質量分析を行おうとしたが、成功しなかった。同様に、重水対照は、質量分析ワークフローに特有の処理が追加の脱アミド化事象に寄与しないことを示す(図4C)。

【0179】

質量分析ワークフローを検証するために、以前に脱アミド化について評価されている2つの組換えタンパク質を調査し、所見(図5Aおよび図5B)は、公表された結果と一致する[Henderson, LE, Henriksson, D, and Nyman, P O (1976). Primary structure of human carbonic anhydrase C. *The Journal of biological chemistry* 251: 5457 - 5463、およびCarvalho, RN, Solstad, T, Bjorgo, E, Barros, JF, and Flatmark, T (2003). Deamidations in recombinant human phenylalanine hydroxylase. Identification of labile asparagine residues and functional characterization of Asn - -> Asp mutant forms. *The Journal of biological chemistry* 278: 15142 - 1515]。さらに、AAV8からの生データを評価するために二次機関を雇った。この独立した分析は、脱アミド化された部位と同じ部位を特定し、ピーク検出および面積計算におけるソフトウェア間の変動に起因する各部位における修正の程度の変動は最小限であった(図6)。

【0180】

構造形態、温度因子、およびN+1アミノ酸の同一性は脱アミド化頻度に寄与するAAV8の構造が解析され、公開されており(PDB識別子: 2QA0)(Nam HJ, et al. *J Virol* 2011; 85(22): 11791 - 99)、次に、非酵素脱アミドの好条件の証拠についてAAV8カプシド構造を調査し、脱アミド化率を確立された構造特徴と相関させた(Nam HJ, et al. *J Virol* 2007; 81(22): 12260 - 71)。アスパラギン脱アミド化に影響を及ぼす要因は文献でよりよく特徴付けられており、アスパラギン脱アミド化事象はグルタミン脱アミド化事象よりはるかに一般的であるため、アスパラギン残基のみに焦点を当てた(Robinson, NE, and Robinson, AB (2001). *Molecular clocks. Proc Natl Acad Sci USA* 98: 944 - 949)。また、AAV8結晶構造からこれらの残基の各々の温度(またはB)因子を決定し、温度因子は、原子のその平均位置からの変位の測定値であり、より高い値は、より大きな変位、より高い熱振動、したがって柔軟性の増加を示す(Parthasarathy S and Murphy MR. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 1997; 6: 2561 - 7)。目的のアスパラギンの大部分は、表面に露出されたHVR内またはその近くに位置し(表1)、構造的に脱アミド化に有利であり、溶媒に曝露される環境を提供する(Govindasamy L, et al. *J Virol* 2013; 87(20): 11187 - 99)。これらの柔軟性ループ領域に位置する残基は、ベータ鎖およびアルファヘリックスなどの柔軟性の低い領域内の残基よりも平均的に脱アミド化される頻度が高いことを見出した。例えば、N263位のNG残基は、HVR Iの一部であり、高温因子を有し、平均で98%を超えて脱アミド化された(図7Aおよび図6、表1)。約85%の時間を脱アミド化したN514(図3および図6、表1)はまた、N+1グリシンを有するHVR(HVR V)中にあり、しかしながら、局所温度因子は、3倍軸における他のVPモノマー上の残基と相互作用するため、N263と比較して比較的低い。好ましくない+1残基およびより低い局所温度因子は、HVR残基であっても、より低い脱アミドと

10

20

30

40

50

相関している。例えば、N517は、平均して4%のみ脱アミド化されており(表1)、この残基は、高度脱アミド化N514と同等の温度因子を有するが、そのN+1残基はセリンであり、立体障害による脱アミド化事象の可能性を低下させる。これは、いくつかの要因が所与のカプシド位置で脱アミド化の程度を累積的に決定することを示すが、+1残基の同一性は明らかに最も影響力のある要因である。

【0181】

アスパラギン脱アミドにおける+1残基の役割を試験するために、AAV8 NG部位が+1位で個別にアラニンまたはセリンのいずれかに変異した変異ベクターを生成した。モデルペプチド研究は、NGペプチドは半減期が1日ほど短く脱アミド化するのに対し、NAまたはNSペプチドは典型的には、それぞれ25または16倍遅く脱アミド化することを示す(Robinson NE and Robinson AB. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(8): 4367-72)。ベクター変異体の質量分析は、ベクター脱アミド化の程度を決定する+1部位の中心的役割を確認した。このセット中のNG部位(wtで80%を超える脱アミド化)は、+1部位をアラニン(5%未満の脱アミド化)またはセリン(14%未満の脱アミド化)に変更されると、隣接するアスパラギンの選択的安定化を示した(表2)。

【表7】

表2: wtにおける5つのAAV8 NG部位および6つの+1部位変異体での脱アミド化の程度(%)

位置\バリエーション	WT(平均)	G58S	G58A	G264A	G386S	G386A	G515A
N57	81.8	8.4	1.9	89.7	89.7	91.6	93.6
N263	99.3	98.2	98.9	4.8	100.0	94.5	97.2
N385	89.1	96.3	94.8	97.1	13.5	2.5	97.0
N514	85.2	100.0	98.0	98.8	100.0	100.0	2.2
N540	84.5	95.0	92.6	97.9	96.9	86.1	89.5

【0182】

少なくとも部分的に埋没され、溶媒に容易に曝露されない、かつ/または無傷の完全に組み立てられたAAV8カプシドの局所的柔軟性が低い領域に位置した残基は、より好ましい環境に位置するものと比較して、脱アミドの頻度が低かった(表1)。それにもかかわらず、好ましくない状態の残基のいくつかは脱アミド化されていた。例えば、N630は、少なくとも部分的に埋没されるが、依然として検出可能な程度の脱アミド化を有した。この残基について、N+1残基としてのフェニルアラニンの存在は、この領域がAAV8 VP3タンパク質中の非酵素的自己タンパク質分解切断の新規部位である可能性を示唆する。

【0183】

AAV8 VP3の構造モデリングは脱アミド事象を確認する

組み立てられたカプシドの文脈において脱アミド化の直接の証拠を提供するために、AAV8の結晶構造を評価した(Nam H-J, et al. J Virol 2011; 85(22): 11791-9)。この血清型の利用可能な結晶構造(すなわち、2.7Å)の分解能は、R基中の末端原子を特定するのに十分に高くはなく、したがって、アスパラギン、アスパラギン酸、およびイソアスパラギン酸残基を直接区別するのに不十分である。これらの条件下で形成されるアスパラギン酸の異性体の構造の他の態様は、2.7Å構造から脱アミド化を決定する機会を提供した。この分析は、以下の2つの前提に基づく: 1) アスパラギンの自発的脱アミド化の主な生成物は、アスパラギン酸ではなくイソアスパラギン酸であり、3:1の比率で生成される(Geiger T and Clarke S. J Biol Chem 1987; 262(2): 785-94)、および2) アスパラギンまたはアスパラギン酸は、イソアスパラギン酸のR基に対応する電子密度マップの長さが短いため、イソアスパラギン酸と区別できる。このより短いR基は、脱ア

ミド化反応中のサクシニミジル中間体の分解後に、AAV8 VP3 カプシドタンパク質骨格の主鎖に組み込まれるときに、イソアスパラギン酸のR基からのベータ炭素が失われるときに作製される。

【0184】

最初にAAV8構造自体を改良し、既知のAAV8 VP3配列によって偏らなかったAAV8カプシド電子密度を生成した。次いで、イソアスパラギン酸に関連するより短いR基の存在に基づいて、脱アミド化の証拠について、精製されたAAV8結晶構造を調べた(図3A~図3E)。電子密度マップは、質量分析によって検出された脱アミド化を有しなかった410におけるアスパラギンと比較すると、263位(図3C)、385位(示さず)、514位(図3D)、および540位(図3E)における高度脱アミド化N+1グリシン残基についてより短いR基を確認した(図3B)。したがって、電子密度マップによって示される脱アミド化は、これらの部位で質量分析によって生成された、75%を超える脱アミドを伴うデータと一致する。得られたイソアスパラギン酸モデルは、他の既知の脱アミド化タンパク質の結晶構造で観察されたイソアスパラギン酸残基と同等であり、AAV8の分析の妥当性を裏付けた(Rao FV, et al. Chem Biol. 2005; 12(1): 65-76、Noguchi S, et al. Biochemistry 1995; 34(47): 15583-91、Esposito L, et al. J Mol Biol 2000; 297(3): 713-32)。この構造解析は、質量分析を介してAAV8カプシドを解析する際に観察される脱アミド化現象の独立した確認として機能する。

【0185】

AAVカプシドの脱アミド化は血清型特異的ではない

カプシド脱アミド化の証拠として、AAV8を超える血清型を調査した。潜在的なベクター処理効果の対照を含む(図11D~図11F)、2Dゲル電気泳動(図11A)および質量分析(図11B)を使用してAAV9ベクター調製物を調査した。AAV9脱アミド化のパターンおよび程度は、AAV8と同様であった。4つのAAV9 NG部位のすべてが、85%を超えて脱アミド化され、13個の非NG部位は、より少ない程度で脱アミド化され、いくつかの部位は、脱アミド化%における高いロット間可変性を示した。次に、構造解析ワークフローを適用し、既存のAAV9結晶データを再適合した(図11C、表3)。AAV8と同様に、イソアスパラギン酸は、AAV9結晶構造内のいくつかのNG部位の電子密度により適合する。2Dゲル分析(データは図示さず)および質量分析(表4に要約)を、さらに進化学的に多様な5つの血清型(rh32.33、AAV7、AAV5、AAV4、AAV3B、およびAAV1)に拡張した。調査したカプシドのすべては、同様のパターンおよび脱アミド化の程度を含み、この修飾が臨床的に関連するAAVベクターにおいて広範であることを示し、同様の基本的な一次配列および構造的要因によって決定される。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 3. 目的の AAV9 脱アミド残基の特徴。

相同な N+1 残基を有する保存されたアスパラギン残基 (AAV8 と比較して) を斜体で示す (AAV8 および AAV9 VP1 の完全長アミノ酸配列の整列によって決定する)。

	N+1 残基	構造形態	構造モチーフ	脱アミド化平均%	温度因子(Å ²)
<i>N57</i>	G	該当なし	該当なし	97	該当なし
<i>N94</i>	H	該当なし	該当なし	5	該当なし
<i>N253</i>	N	露出した表面	割り当てなし	9	41
<i>N254</i>	H	露出した表面	割り当てなし	2	50
<i>N270</i>	D	露出した表面	HVR I	11	65
<i>N304</i>	N	埋没	アルファヘリックス	23	35
<i>N329</i>	G	露出した表面	HVR II	94	89
<i>N409</i>	N	埋没	割り当てなし	9	36
<i>N452</i>	G	露出した表面	HVR IV	98	64
<i>N477</i>	Y	埋没	割り当てなし	2	33
<i>N512</i>	G	露出した表面	HVR V	89	48
<i>N515</i>	S	露出した表面	HVR V	3	47
<i>N651</i>	T	埋没	HI ループ	1	38
<i>N663</i>	K	露出した表面	HI ループ	4	49
<i>N668</i>	S	露出した表面	HI ループ	13	52
<i>N704</i>	Y	露出した表面	HVR IX	5	68
<i>N709</i>	N	露出した表面	HVR IX	5	55

【表 9】

表 4. 多様な血清型に対して観察される脱アミド化の程度

血清型	分析したベクター調整物	MS による配列被覆度の平均%	NG 数	脱アミド化平均 NG%	脱アミド化を観察した非 NG 部位の数	脱アミド化平均非 NG%
AAV1	3	91.4	4	95.6	19	12.9
AAV3B	1	89.8	4	97.0	9	9.4
AAV4	3	84.7	4	96.2	15	15.3
AAV5	1	88.7	3	88.7	11	15.3
AAV7	1	90.9	4	92.1	9	13
AAV8	21	93.4	5	90.5	37	7.4
AAV9	7	90.2	4	95.5	26	5.3
rh32.33	1	100	3	97.4	14	16.2

【0186】

脱アミド化事象は、カプシド組み立ておよび形質導入効率に影響を及ぼす可能性がある。脱アミド化の機能的影響を試験する 1 つのアプローチは、アスパラギンを遺伝子変異によってアスパルテートに置き換えることである。293 細胞の小規模なトリプルトランスフェクションによって、各脱アミド化 AAV8 アスパラギンについてルシフェラーゼレポ

ーターをコードするアスパルテート変異ベクターを生成し、DNAse I耐性ゲノムコピーのqPCRによってベクターを力価測定した(図8A)。変異は、wtAAV8と比較してカプシド組み換えにほとんど影響を与えず、効果は、wtベクターにおける全体的な脱アミド化が低い、ほとんど埋没された非NG部位に限定された。次に、ヒト肝臓由来Hu h7細胞のインビトロ形質導入効率について変異パネルを評価した(図8B)。いくつかの変異体は、形質導入効率の低下を示し、N57位、N94位、N263位、N305位、Q467位、N479位、およびN653位は、10倍を超える形質導入損失を示した。AAV9について同様の数の感受性部位を観察した(図11Gおよび図11H)。典型的には、所与の位置における残基の一部のみが内因的に脱アミド化されるため、このアプローチは、機能単位がホモマー集合体であるカプシドなどのタンパク質の機能損失を過大評価する可能性を有し、1つのカプシド部位における内因性修飾は、無傷の残基を有する隣接するサブユニットによって補償され得る。それにもかかわらず、この方法は、製造中または変異安定化中の将来のモニタリングのために脱アミド化残基の優先順位付けに役立つ可能性がある」と推論した。この機能損失変異誘発データを適切な文脈に配置するには、内因性脱アミド化ベクターの集団からの機能データが必要であろう。

【0187】

経時によるベクター活性の損失は、進行性脱アミド化と関連する

NGの脱アミドの明らかに短い半減期を考慮すると、年齢がわずかに異なるベクター試料は、異なる脱アミド化プロファイルを示し、内因性脱アミド化を機能と関連させる機会を提供することを推論した。大規模ベクター調製プロトコルでは、293細胞のトリプルトランスフェクション、その後のベクター産生のための5日間のインキュベーション、およびベクター精製のための1~2日間を必要とする。このプロセスに近似するために、wtAAV8を有する293細胞の中規模トリプルトランスフェクション(各10x15cmの細胞培養皿)を調製した。ベクター(2x15cm細胞培養皿/日)を1日間隔で5日間収集し、-80℃でベクターを凍結することによって、5日間期間の終了まで時点を保持した。次に、上述のように粗ベクター力価およびインビトロ形質導入効率を評価した。予想通り、組み立てられたDNAse I耐性ゲノムコピーの数は、経時的に増加した(図9A)。その後、親和性精製による初期(1日目および2日目)および後期(5日目)の時点について粗ベクターを迅速に処理し、hu h7細胞のインビトロ形質導入効率を測定した。ベクターの相対的な形質導入効率は、経時的に徐々に低下した(図9B)。標的細胞に追加したGCあたりの導入遺伝子発現に関して、5日目のベクターは、1日目の物質のわずかに40%であった。この活性低下は、粗物質についても観察され、精製前の分子組成物の変化を示した(図)。5日間にわたるAAV9の活性損失の同様の傾向を観察し、ベクターの効力が約40%減少した(図11I~図11K)。

【0188】

次に質量分析による時間経過試料の脱アミド化を測定した。NG部位脱アミド化は、各間隔にわたって実質的に進行し、1日目で平均25%の脱アミド化、および5日目までに60%を超える部位が変換された(図9C)。非NG部位脱アミド化は、概して5日間にわたって進行したが、2日目から5日目にかけてはるかに低いレベルであり、一貫性が低かった(図9D)。データは、内因性ベクター脱アミド化を特定の活性における早期時点減衰と関連させ、産生サイクルを短縮するか、またはアスパラギンを安定させるカプシド変異を見出すことによって、より活性なベクターを捕捉する潜在的な機会を強調する。

【0189】

図2A~図2Eの質量分析に使用される材料は、精製のためにさらに2日かかるため、トランスフェクション後少なくとも7日であったことに留意されたい。これらの試料中のより高いNG部位脱アミド化(80%を超える)は、脱アミド化が、発現期間の後、ならびに回収および精製プロセス中に、ほぼ同じ速度で、NG部位が完全に脱アミド化されるか、またはベクター試料が凍結されるまで続く可能性が高いことを示す。したがって、脱アミド化は、主にベクターの年齢によって決定され、回収および精製プロセスと排他的であるか、またはそれによって引き起こされるプロセスではない。1日目の物質中のはるか

10

20

30

40

50

に低い脱アミド化値は、5日目の物質（両方とも親和性精製した）と比較して、この点を強調する。

【0190】

NGアスパラギンの安定化は、ベクター性能を向上させることができる
ベクターNG脱アミド化および形質導入効率損失の相関関係を考慮して、NGアミドを+1部位変異誘発によって安定化させることがベクター機能を向上させる可能性があることを推論した。各+1残基をアラニンまたはセリンに個別に変換したAAV8 NG部位変異体について、小規模でベクターを産生した。単一+1変異体は、ベクター組み立て（図10A）および形質導入効率（図10B）の観点で良好に耐性を有した。カプシド表面上の以前に定義された「デッドゾーン」の近くに位置するG386置換（Aydemir F, et al. J Virol July 2016; 90(16): 7196-204）は、インビトロ形質導入について欠陥があった。G386変異体についての機能の損失は、N385での脱アミド化アスパラギンの選択を示し得る。あるいは、+1位置における追加の側鎖バルクは、アミド基安定化から独立して、機能に悪影響を及ぼし得る。単一部位の変異体は、隣接するアスパラギンの劇的な安定化にもかかわらず、インビトロ形質導入を著しく改善しなかった（表2）。インビトロおよびインビボ形質導入活性が一致しない可能性があるため、C57BL/6マウスでの肝臓の形質導入について、単一部位+1変異体のサブセットを試験した。静脈内尾静脈注入（n=3~5）を実施し、2週間にわたって毎週イメージングすることによりルシフェラーゼ発現を調査した（図10C）。インビボおよびインビトロ形質導入データは、各アッセイの関連する誤差（すなわち、誤差範囲内）と一致した。G386置換は、形質導入に欠損があったが、他の位置での+1部位の変異は、ほぼ許容的であり、wtAAV8に等しいがそれを超えないレベルで肝臓に形質導入された。

【0191】

任意の1つのNG部位でアミドを安定化させることは、機能回復に必要であり得るが十分ではないため、次に、+1部位のアラニン置換の組み合わせを有するベクターバリエーションを評価した。+1アラニンが高度に機能的であったすべての3つのAAV8 NG部位（N263、N514、およびN540）を組み換えた。トリプル変異G264A/G515A/G541Aを含むいくつかの組み合わせは、組み立てが悪く、形質導入のために機能不全であった。しかしながら、N263（G246A/G515AおよびG264A/G541A）を伴う両方の対的な組み合わせは、インビトロ形質導入効率（それぞれ、wtAAV8に対して2.0および2.6倍）を向上させ、力価の損失はなかった（図10D）。これらの変異は、少なくとも2つの変異（N-アミド安定化および+1残基側鎖置換）をもたらすため、これらのデータは、NG脱アミド化を機能損失に結論的に結びつけない。しかしながら、データは、NG部位脱アミド化がインビトロ形質導入効率に影響を与えることができる時間経過研究で確立されたモデルと一致する。

【0192】

機能性アスパラギン置換により、ベクター製造におけるロット間再現性が改善する
報告するベクター脱アミド化プロファイルの別の潜在的に問題となる態様は、いくつかの位置における脱アミド化の高いロット間可変性である。wtAAV8については、この可変性は、N459（観察した脱アミドは0%~31%の範囲）およびN499（観察した脱アミドは0%~53%の範囲）で最も顕著であった。翻訳後修飾における可変性は、典型的には、この可変性を示すクローンを完全に回避し、産生株および条件を慎重にモニタリングならびに制御するか、または影響を受ける候補のタンパク質工学によって、生物製剤の開発中に事実上回避される。

【0193】

N459およびN499脱アミド化可変性に寄与する産生または処理因子を決定することができなかったため（図2E）、これらの位置で機能的アミノ酸置換を求めた。まず、各位置でグルタミンへの保存的置換のための小規模ベクター調製物を個別に評価した。N459QおよびN499Qの両方がベクターに効率的に組み込まれ、インビトロ形質導入

効率のための wtAAV8 参照と同等であった (図 7A)。次に、変異体を大規模で産生し、質量分析を実施した。極めて希少なグルタミン脱アミド化の観察と一致して、これらの変異体における 459 位または 499 位におけるグルタミンアミドの選択的かつ完全な安定化を観察した (データは示さず)。これらの変異ロットを上記のように C57BL/6 マウスの尾静脈注射後の肝臓形質導入についてインビボで評価した (図 7B および 図 7C)。この実験で対照として使用した wtAAV8 ベクターロットは、N499 で 16.8% 脱アミド化したが、N459 で脱アミド化は検出しなかった (データは示さず)。両方の変異体の 14 日目の肝臓形質導入は、wtAAV8 に相当した。このデータは、製造される AAV ベクターにおける脱アミド化に関連する分子可変性に対処するタンパク質工学的アプローチの可能性を示す。

【0194】

C. 考察

2D ゲル電気泳動、質量分析、新規タンパク質モデリング、ならびにインビトロおよびインビボの両方の機能研究によって、AAV8 カプシド上のアスパラギンおよびグルタミン残基の非酵素脱アミド化を独立して特定および評価した。脱アミド化は、多種多様なタンパク質で生じ、抗体系治療薬 (Nebija D et al. *Int J Mol Sci* 2014; 15 (4): 6399 - 411) およびペプチド系ワクチン (Verma A et al. *Clin Vaccine Immunol* 2016; 23 (5): 396 - 402) を含む生物製剤の活性に有意な影響を与えることが示されている。ロタウイルスの VP6 タンパク質などの他のウイルスタンパク質は、質量分析によって脱アミド化事象を受けることが示されている (Emslie KR et al. *Funct Integr Genomics* 2000; 1 (1): 12 - 24)。

【0195】

これらの脱アミド化が AAV8 で発生した状況は、それらが自発的な非酵素的な事象の結果であることを示唆した。アスパラギン残基は、グルタミン残基よりも広範囲に脱アミド化されていることが知られており、アスパラギンの下流のアミノ酸は、N+1 のグリシン (すなわち、NG) が最も効率的に脱アミド化されている脱アミド化の比率に実質的に影響を及ぼす。VP1 中に存在するすべての NG が 75% を超えるレベルで脱アミド化され、一方で脱アミド化は、カプシド中の他のアスパラギンまたはグルタミンのいずれにおいても一貫して 20% を超えていなかったという点で、AAV カプシドの脱アミド化における N+1 アミノ酸の役割の顕著な確認を観察した。AAV8 および AAV9 カプシド (すなわち、7/9) 中の実質的にすべての NG モチーフは、高次構造の柔軟性および熱振動に関連する HVR 領域に含まれるカプシドの表面にも存在していた。これは、適切なタンパク質機能のために柔軟性が必要とされ得る領域に位置する他のタンパク質の NG モチーフの以前の報告と一致しており、アルファヘリックスまたはベータシートなどの秩序だった構造ではない (Yan BX and Sun YQ *J Biol Chem* 1997; 272 (6): 3190 - 4)。表面に露出した HVR の NG モチーフの選択は、溶媒露出度および立体構造の柔軟性を提供することによって脱アミド化の比率をさらに向上させ、それによってサクシニミジル中間体の形成を容易にする。予測通り、好ましくない環境は脱アミド化の比率をはるかに低くすることにつながる。

【0196】

AAV の生物学およびそのベクターとしての使用に関する重要な疑問は、これらの脱アミド化の機能的結果である。アスパラギンをアスパラギン酸に変換するカプシド DNA の変異は、特定の部位でのすべてのアミノ酸がアスパラギン酸として表されるカプシドの評価を可能にする。しかしながら、第 2 の部位変異の直接的結果によって混同される、N+1 残基を潜在的に変異させる以外に、変異誘発を使用して脱アミド化を防ぐ容易な戦略は存在しない。アスパラギン残基が、変異誘発によってアスパラギン酸に変換される限られた数のバリエーションを研究した。機能分析は、カプシド組み立てならびにインビトロおよびインビボ形質導入を含む。ベクター機能に対する変異誘発の最も実質的な影響は、ベースラインで不完全に脱アミド化され、表面が露出されていないアスパラギンを含むものであ

10

20

30

40

50

った。しかしながら驚くことに、514での高度脱アミド化アスパラギンのアスパラギン酸への変異誘発は、機能に何らかの影響を及ぼした。この結果は、対応するアミドの残量の存在が機能に影響を及ぼし得ることを示唆する。これは、脱アミド後にこの残基をアスパラギン酸に変換する際に失われる別の3倍関連VP3モノマー(wtAAV8結晶構造において特定される)のN514とD531との間の水素結合相互作用の存在に部分的に起因し得る。

【0197】

これらの脱アミド化が新規治療薬の開発に及ぼす影響を評価する際に、AAVベクターにおける脱アミド化の程度に影響を及ぼす因子をよりよく理解することが重要である。脱アミド化動態を著しく加速させることが知られている極端な条件下でのベクターのインキュベーションは、ほとんど効果がなかった。同位体組み込み研究と併せて、この結果は、脱アミド化がカプシド組み立て中に生じ、ベクター処理または質量分析の人工産物ではないことを示唆する。NG部位における脱アミド化は、評価したすべての試料において反応が事実上完了したため、ベクター性能に実質的な影響を及ぼす可能性は低い。しかしながら、最初の機能研究は、非脱アミド化アスパラギンの残存量が機能に寄与することができることを示唆している。脱アミド化の完全性が低かった部位について懸念されるが、ほとんどの場合、試料間の変動にも関連していた。一例は、17%の平均値を伴う0%~53%の範囲の脱アミド化を示した499位でのアスパラギンである。ベクター産生の条件の微妙な差が、この異質性に寄与する可能性がある。AAV8およびAAV9における脱アミド化の顕著な類似性は、これがこのウイルスファミリー全体の性質であることを示唆している。

【0198】

要約すると、AAV8およびAAV9カプシドタンパク質の一次アミノ酸構造において実質的な異種性を発見した。これらの研究は、いくつかの方法でベクターとしてのAAVの開発に潜在的に影響を及ぼす。第1に、VPタンパク質の実際のアミノ酸配列は、対応するDNA配列によって予測されるものではない。第2に、産生方法の態様は、脱アミド化の変形およびベクター機能の対応する変化につながり得る。非NG部位での脱アミド化比率に影響を及ぼす要因を把握し、その機能的結果をよりよく理解するまで、臨床グレードのAAVベクターの特性評価に脱アミド化を含める必要があり得る。2Dゲル電気泳動は、正味の脱アミド化の全体的な評価を提供できるが、特定の残基での脱アミド化を評価するには質量分析が必要であろう。

【0199】

実施例2：脱アミド化AAV5.5.9

AAV5.5.9の新規配列は、それぞれ、配列番号9および10に提供される。AAV5.5.9ベクターを、AAV9について実施例1に記載されるように脱アミド化について評価した。高度脱アミド化残基は、N57、N319、N442、N502で見られる。

10

20

30

40

50

【表 10】

修飾配列番号 10	WL2019CS
酵素	トリプシン
被覆度%	97.4
N35+脱アミド化	7.8
~N57+脱アミド化	99.7
N113+脱アミド化	3.6
~N204+脱アミド化	13.9
N217+脱アミド化	2.2
~N243+脱アミド化	19.0
Q249+脱アミド化	11.4
N293/294+脱アミド化	37.3
N304+脱アミド化	6.2
N309+脱アミド化	0.7
Q311+脱アミド化	0.3
~N319+脱アミド化	83.9
N399/400+脱アミド化	30.8
~N442+脱アミド化	97.7
N467+脱アミド化	2.6
N502+脱アミド化	100.0
N505+脱アミド化	18.6
~Q589+脱アミド化	21.1
N618+脱アミド化	6.6
~N641+脱アミド化	8.1
N653+脱アミド化	8.3
~N658+脱アミド化	21.7
N694+脱アミド化	0.6
~N699+脱アミド化	8.6

10

20

【0200】

30

実施例 3：脱アミド化 AAVrh79 (クレード E)

AAVrh79 をアカゲザルの小腸組織から抽出した DNA から単離した。それは、系統的にクレード E 内にあるとを特徴付けられる (図 14A ~ 14D)。その配列は本明細書に提供され、ヌクレオチド配列は配列番号 1 にあり、アミノ酸配列は配列番号 2 にある。AAVrh79、AAVrh.10、および AAVhu.37 のアミノ酸配列の整理を図 14A に提供する。AAVrh79、AAVrh.10、および AAVhu.37 の核酸配列の整理を図 14B ~ 14D に提供する。

【0201】

AAVrh79 は、その一次配列に 3 つのアミノ酸差異を有する。AAVhu37 は、その一次 VP1 配列の 67 位に位置する Ala および 169 位に Lys を有するが、AAVrh79 は、67 位にグルタミン酸 (E) および 169 位に Arg を有する。Rh.79、hu.37、および hu.40 の間の VP1 の DNA 配列の差異を図 11B に示す。様々なクレード E バリエーションに基づいて eGFP を発現するベクターを調製し、Huh7 細胞の相対感染性について評価した (図 11C)。C57BL/6 マウスに、eGFP 発現 AAV8 または AAVrh.79 ベクターの 2 つの用量レベル (3×10^{10} および 3×10^{11} GC / マウス) を注入し、蛍光顕微鏡法によって感染性を評価した (データは示さず)。

40

【0202】

AAVrh79 に基づくベクターを、既知の産生技術を使用して、AAVrh79 ヌクレオチド配列を使用して、キャップの産生のために、例えば、AAV8 ベクターについて

50

前述されるように調製した。生産収率および生産純度評価の結果を、それぞれ図15A～図15Bおよび図16に提供する。

【0203】

マーカー遺伝子（ホタルルシフェラーゼ）を含むAAVrh79を使用して発現レベルを評価するために、生後6～8週の雄RAG KOマウスに、Hamiltonシリンジを使用して 3×10^{11} GC/マウスのベクターを筋肉内注入した。ffLucの発現は、前述のように全身生物発光イメージングによって可視化した [Greig JA, Peng H, Ohlstein J, Medina-Jaszek CA, Ahonkhai O, Mentzinger A, et al. (2014) Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression. PLoS ONE 9(11): e112268. doi.org/10.1371/journal.pone.0112268.]。結果を図17A～17Dに示す。

10

【0204】

AAV8トリプル、AAVhu68、AAV9、AAV8、およびAAVrh79ベクターの発現を、 10^{13} GC/kg AAVrh79を雄および雌カニクイザルマカクに筋肉内投与した後に比較した（図17E）。

【0205】

分泌導入遺伝子（201 Ig IA）を発現するベクターを、雄RAG KOマウス（n = 5/群）（ 3×10^{10} または 3×10^{11} GC/マウス）の腓腹筋に筋肉内投与した。結果は、IM注入後にAAV8トリプルがより良好に発現し、試験したより低い用量では、AAV8トリプルからの発現の差が実質的であったことを示した。より高い用量で、AAVrh79は、試験した他のベクターと同等のレベルで発現した（図17F）。

20

【0206】

雌カニクイザル（RA2362）をNAbについて事前スクリーニングし（図18A）、AAVG2.TBG.eGFP.WPRE.bGH（ 1×10^{13} ddGC/kg、静脈内）を注入した。治療7日後に動物を安楽死させ、分析のために肝臓および他の組織を単離するために剖検を行った。肝臓および脾臓におけるGFP発現を7日目に評価した（図18Bおよび18C）。様々な組織で検出したベクターのレベルを図18Dに示す。GFP発現のレベルを、AAVG2（RA2362）またはAAV8およびAAVG3ベクターを受けた肝臓動物において評価した（図18E～図18J）。図18Kは、これらの動物由来の様々な組織で検出したベクターのレベルを示す。

30

【0207】

様々なAAV8およびAAVrh79ベクターを生成し、いくつかの事例において、複数のロットを産生した。これらのAAV9およびAAVrh79ベクターロットの収率を比較した（図19）。

【0208】

AAVrh79ベクターを、AAV8およびAAV9について実施例1に記載されるように脱アミド化について評価した。結果は、ベクターが、AAVrh79（配列番号1）の番号付けに基づいて、アスパラギン-グリシン対中のアスパラギンに対応する、高度に脱アミド化された4つのアミノ酸（N57、N263、N385、N514）を含むことを示す。より低い脱アミド化率を、残基N94、N254、N410で一貫して観察した。

40

【表 1 1 - 1】

配列番号 2 の修飾 AAVrh79	WL1781S	WL1784S	WL1785S	WL1781S	WL1784S	WL1785S
酵素	トリプシン	トリプシン	トリプシン	キモトリプシン	キモトリプシン	キモトリプシン
被覆度%	89.6	93.9	92.4	91.3	88.7	89.9
N57+脱アミド化	99.3	80.9	82.9	99.6	80.1	86.4
N94+脱アミド化	10.4	9.6	9.9	10.5	9.4	10.0
~N254+脱アミド化	16.0	15.8	16.4	15.3	16.3	16.7
~N263+脱アミド化	84.3	93.5	95.3	82.9	89.5	90.6
~N305+脱アミド化	3.2	2.5	2.4	3.2	2.6	2.3
~N385+脱アミド化	79.1	100.0	100.0	76.9	96.6	92.9
~N410+脱アミド化	2.0	17.8	23.9	2.0	17.6	23.0
N479+脱アミド化	2.0	2.0	1.9	2.0	2.0	2.0
~N514+脱アミド化	100.0	97.2	97.0	97.4	94.6	98.1
~Q601+脱アミド化	0.1					
N653+脱アミド化	1.3	1.1	1.4	1.3	1.1	1.5
~R487+メチル化	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
D97+異性化	1.3			1.2		
S149+リン酸化	51.9	49.0	53.2	49.6	46.6	55.8
~S153+リン酸化	59.7	54.3	51.0	59.8	51.7	48.5
~S474+リン酸化		7.3	4.5		7.0	4.3
~T570+リン酸化	46.3	36.4	21.6	45.9	35.9	21.4
~S665+リン酸化	0.5	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4
W248+酸化			0.9			
W307+酸化	1.7	1.2	1.5	1.8	1.3	1.5
W307+キヌレニンへの酸化	0.3		0.4			
M405+酸化	5.8			6.0		
M437+酸化	15.0	5.2	95.4	15.1	5.3	12.0
M473+酸化	16.7	7.4	7.9	16.0	7.6	7.6

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

配列番号 2 の修飾 AAVrh79	WL1781S	WL1784S	WL1785S	WL1781S	WL1784S	WL1785S
酵素	トリプシン	トリプシン	トリプシン	キモトリプシン	キモトリプシン	キモトリプシン
W480+酸化	4.6	0.4	4.6	4.7	0.4	4.6
W480+キヌレニンへの酸化			0.1			
W505+酸化	2.4	2.2	1.3	2.5	2.1	1.3
M526+酸化	19.0			18.6		
M544+酸化	30.9	20.7		31.4	20.3	
M561+酸化	15.6	7.7		16.0	7.5	
W621+キヌレニンへの酸化			0.0			
M637+酸化	6.9	12.5	4.5	6.9	12.6	4.7
W697+酸化		0.5	0.6		0.5	0.6

10

【0209】

実施例 4：AAV8.2.08 の調製

20

WO 2017/180854 (参照により本明細書に組み込まれる) に論じられるように、いくつかの AAV8 変異体を、HVR.VIII領域に変異を有する c41、c42、c46、g110、g113、g115、および g117 で生成した。Gurda らが論じたように、主要な ADK8 エピトープは、HVR.VIII領域 (AAV8 vp1 番号付けを使用するアミノ酸 586 ~ 591) にある。これらの変異体を ADK8 耐性についてインビトロで試験し、それらのうちのいくつかを ADK8 耐性についてインビボで試験した。例えば、上述の Lochrie 2006 を参照されたい。

【0210】

AR2.1-9 を無作為に採取した。AR2.25-61 を頻度に基づいて選択した。無作為に採取したバリエーション、ならびにそれらの高頻度バリエーションは、6 ウェルプレート収率および HuH7 形質導入の観点から生存している。図 24 は、AAV8.AR2.08 の様々な組織における発現を示す (バーの左側のほとんどのセット)。

30

【0211】

実施例 5：AAV8.AR2.08 の脱アミド化

AAV8.AR2.08 の新規配列を、それぞれ配列番号 17 および 18 に提供し、これらを実施例 4 と同様に設計した。

【0212】

A. 修飾 AAV8.AR2.08 ベクターを作製し、AAV8 について実施例 1 に記載されるように修飾について評価した。結果は、ベクターが、AAV8.AR2.08 (配列番号 18) の番号付けに基づいて、アスパラギン - グリシン対中のアスパラギンに対応する、高度に脱アミド化された 5 つのアミノ酸 (N57、N263、N385、N514、および N540) を含むことを示す。より低い脱アミド化率を、残基 N94、N254、N410 で一貫して観察した。AAV8 とは対照的に、脱アミド化は、N459 位 (AAV8 において平均 7%) または N499 位 (AAV8 において平均 17%) では観察されない。

40

50

【表 1 2 - 1】

配列番号 18 の修飾 AAV8.AR2.08	WL1846CS	WL1846CS
酵素	トリプシン	キモトリプシン
被覆度%	97.4	92.3
N57+脱アミド化	90.7	89.5
N94+脱アミド化	9.0	9.3
~N254+脱アミド化	11.8	11.7
~N263+脱アミド化	88.6	86.3
~N305+脱アミド化	5.8	5.5
~N385+脱アミド化	86.1	83.3
~N514+脱アミド化	100.0	99.6
~N521+脱アミド化	2.0	2.1
~N540+脱アミド化	78.6	80.5
N590+脱アミド化	0.4	0.4
Q601+脱アミド化	0.5	0.6
N653+脱アミド化	0.8	0.8
N665+脱アミド化	1.2	1.2
D442+異性化	12.0	
D584+異性化	1.0	
~S149+リン酸化	95.9	15.4
~T417+リン酸化	0.0	
~T454+リン酸化	0.1	
~T493+リン酸化	0.1	
S600+リン酸化	1.1	
~T663+リン酸化	0.0	
~W22+酸化	1.0	1.0
~M204+酸化	0.1	0.1
~M212+酸化	2.9	2.9
W248+酸化	0.7	0.7
W307+酸化	0.6	0.6
M405+酸化	0.3	0.3
M437+酸化	70.3	21.0
M473+酸化	1.7	1.7
W480+酸化	0.3	0.3
W505+酸化	0.6	0.6
M526+酸化	1.0	1.0
M561+酸化	1.0	1.0

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

配列番号 18 の修飾 AAV8.AR2.08	WL1846CS	WL1846CS
酵素	トリプシン	キモトリプシン
被覆度%	97.4	92.3
M607+酸化	2.4	2.5
~W609+酸化	0.1	0.1
W621+酸化	0.8	0.8
M637+酸化	2.9	3.0
W697+酸化	0.2	0.2

10

【0213】

B. 単一細胞 RNA-seq は、AAV8 での治療後に非ヒト霊長類から単離した形質導入肝細胞の組織局在化および転写シグネチャを明らかにする

単一細胞 RNA シーケンシングは、これまでにない単一細胞分解能で細胞トランスクリプトームを特徴付けるための強力な技術であることが証明されている。現在の研究では、単一細胞 RNA-seq を利用して、GFP を発現する AAV8 ベクターでの処理後にアカゲザルから単離した初代肝臓細胞の転写景観を研究する。FACS で選別した GFP + および GFP - 細胞のトランスクリプトーム分析は、肝小葉内の形質導入細胞の組織局在、ならびに肝臓細胞形質導入および導入遺伝子発現の調節に関与する遺伝子および調節経路を明らかにする。

20

【0214】

研究設計のために、アカゲザルマカクを、 1×10^{13} ddGC/kg AAV8.TBG.EGFP.WPRE (n=1) または 1×10^{13} ddGC/kg AAV8.2.08.TBG.EGFP.WPRE (AAV8 バリエント、n=1) のいずれかで治療した。治療の 7 日後に動物を安楽死させ、両方の動物から肝臓を単離するために剖検を行った。コラゲナーゼによる処理および勾配遠心分離の後、単離した肝臓細胞を、GFP 導入遺伝子発現によって BD Precise (商標) 96 ウェルプレート上に FACS ソートした。192 個の単一細胞を各動物から単離し (96 GFP + および 96 GFP -)、その後、標準 BD Precise (商標) プロトコルに従って単一細胞 RNA-seq ライブラリを調製するために使用した。GFP - および GFP + 選別細胞間で差次的に発現した転写産物を決定し、確立した転写発現シグネチャを使用して、肝小葉内で単離した細胞の空間再構築を実行するために、R における Seurat、Scanpy、および Scater パッケージを使用してデータを分析した。

30

【0215】

AAV8.AR2.08 は、AAV8 と比較して、肝臓指向性の増加を有し、形質導入効率の 1.5 倍の増加を示したことが見出した。選別した肝臓細胞の単一細胞トランスクリプトーム分析は、導入遺伝子発現細胞が肝小葉全体に均等に分布し、組織病理学によっても観察した門脈周囲領域がわずかに優先されていることを示すことを明らかにした。興味深いことに、選別した GFP - 細胞の亜集団は、選別した GFP + 細胞に匹敵するレベルで導入遺伝子転写産物を発現することを見出し、これらの細胞が、検出可能なレベルの翻訳タンパク質が存在しないにもかかわらず、実際に形質導入され、導入遺伝子 mRNA を発現することを示唆する。GFP - および GFP + 細胞の転写プロファイルを比較すると、ウイルス mRNA 翻訳に関与する異なる発現転写産物が明らかになり、形質導入細胞における導入遺伝子タンパク質発現の調節に関与する可能性のある経路が解明される。

40

【0216】

C. ヒト肝臓異種移植片モデルを介した指向性進化を伴う非ヒト霊長類において、より良い肝臓形質導入およびより高い肝臓特異性を有するアデノ随伴ウイルス 8 バリエントの

50

単離

より良好な形質導入およびより高い特異性を有するAAVバリエーションを導出するために、肝臓遺伝子療法ベンチマークであるAAV8のカプシド上の表面露出部位を標的とする飽和変異誘発、続いてヒト肝臓異種移植片マウスモデルにおける2ラウンドのインビボ濃縮を使用して、AAV指向性進化を行い、AAV8.2.08と称されるAAV8バリエーションを単離した。1e13ゲノムコピー(GC)/kg体重の用量で非ヒト霊長類に静脈内注入した後、AAV8と比較して肝臓における送達が増加した一方で、様々な臓器(肺、心臓、胃、膵臓、腎臓、および腸間膜リンパ節を含む)においてAAV8.AR2.08によって送達されるベクターゲノムコピーが減少し、これはより良い肝臓形質導入およびより高い組織特異性を意味する。次世代シーケンシングは、インビボ選択中のAAV8.AR2.08の有意な濃縮を示し、新規および改善された指向性でカプシドを単離するためのアプローチの可能性を示した。他の比較を図21~27に示す)。図28は、AAV8.AR2.08およびAAV8の生体分布を示す。

【0217】

D. バーコード化

6匹の黒色マウスに、12個の調製物に由来するrAAVG3の混合物の 2×10^{12} GC/マウスを静脈内注入した(図18B)。各調製物は、ベクターゲノム内に別個のバーコードを含み、特定の調製物の特定を可能にする(図18A)。2週間後、動物を安楽死させ、組織を回収した。予測通り、肝臓におけるrAAVG3発現は、心臓または筋肉よりも高かった。図18C組織分布実験は、実際の頻度が、注入ベクター混合物中のバーコードの理論的頻度(図18D、合計; 図19A、19B、筋肉; 図19C、19D、心臓; および図19E、19F、肝臓)と一致し、BC02およびBC06においてわずかな異常を有することを示す(図20A~20C)。本明細書に引用される全ての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。2018年8月24日に両方とも出願された米国仮特許出願第62/722,388号および同第62/722,382号、2018年7月26日に両方とも出願された米国仮特許出願第62/703,670号および同第62/703,673号、2018年5月29日に両方とも出願された米国仮特許出願第62/677,471号および同第62/677,474号、2018年5月29日に提出された米国仮特許出願第62/667,585号、ならびに2018年2月27日に提出された米国仮特許出願第62/635,964号が参照により本明細書に組み込まれる。2018年5月7日に提出された米国仮特許出願第62/667,881号、2018年5月7日に提出された米国仮特許出願第62/667,888号、2018年5月6日に提出された米国仮特許出願第62/667,587号、2018年4月27日に提出された米国仮特許出願第62/663,797号、2018年4月27日に提出された米国仮特許出願第62/663,788号、2018年2月27日に提出された米国仮特許出願第62/635,968号が参照により組み込まれる。本明細書に参照され、添付の配列表に表示される配列番号は、参照により組み込まれる。本発明は、特定の実施形態を参照して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく修正を行うことができることが理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。

10

20

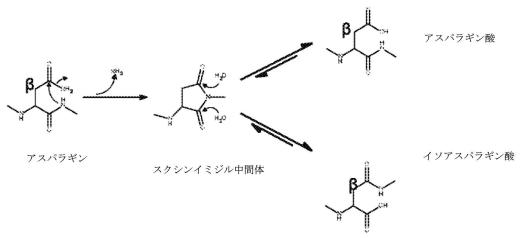
30

40

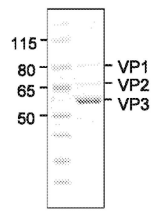
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】

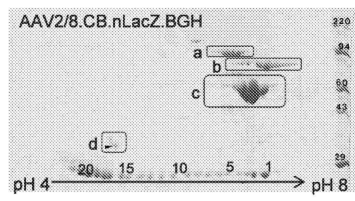


10

【図 1 C】

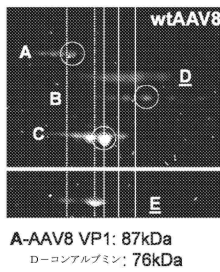
スポット	pI	スポット	pI
1	7.30	11	5.70
2	7.11	12	5.63
3	6.97	13	5.54
4	6.75	14	5.48
5	6.61	15	5.37
6	6.46	16	5.27
7	6.27	17	5.20
8	6.11	18	5.14
9	6.01	19	5.08
10	5.86	20	4.99

【図 1 D】

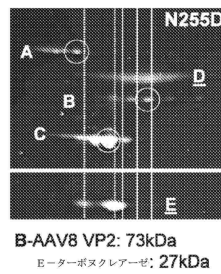


20

【図 1 E】



【図 1 F】

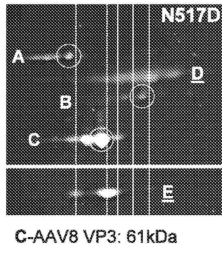


30

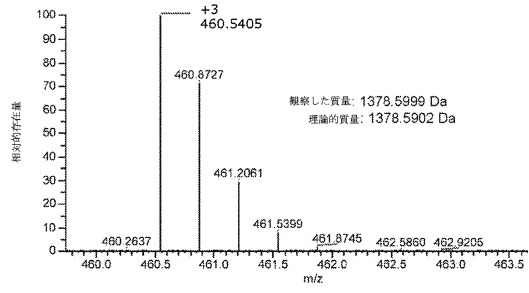
40

50

【 1 G 】

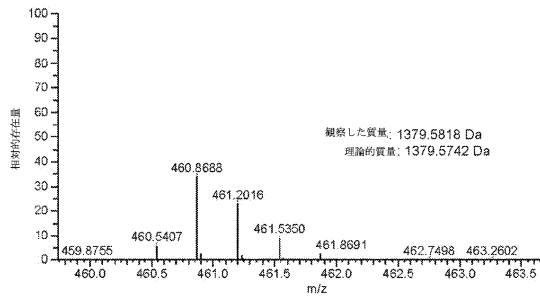


【 2 A 】

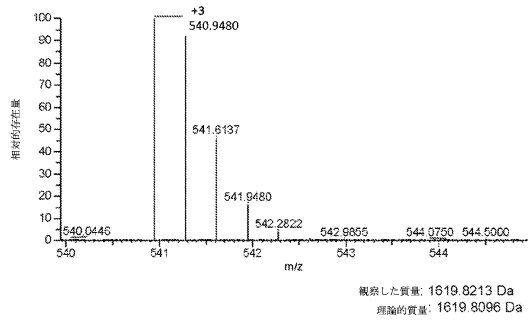


10

【 2 B 】



【 2 C 】



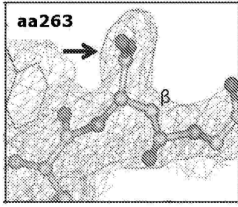
20

30

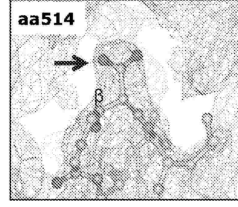
40

50

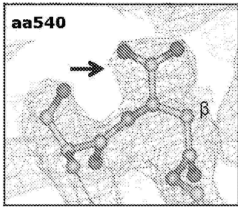
【 3 C 】



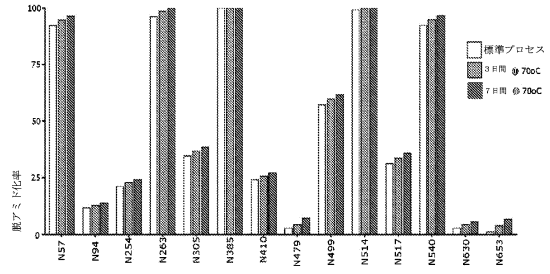
【 3 D 】



【 3 E 】

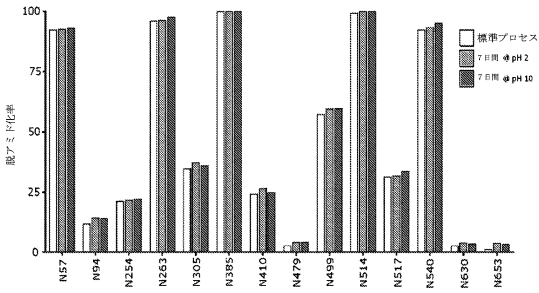


【 4 A 】

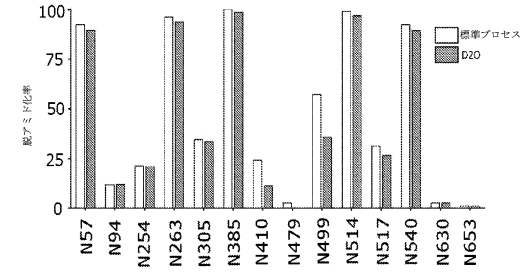


10

【 4 B 】



【 4 C 】



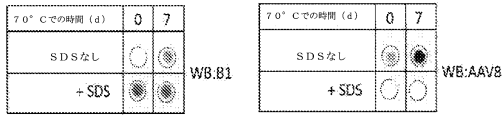
20

30

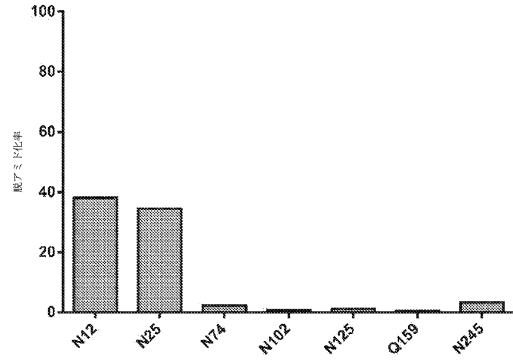
40

50

【 4 D 】

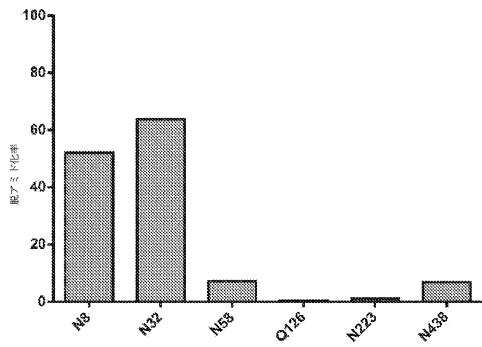


【 5 A 】

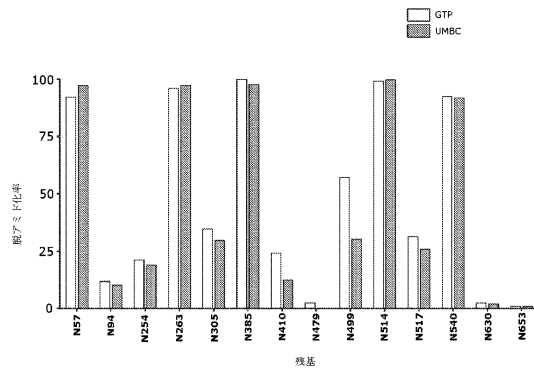


10

【 5 B 】

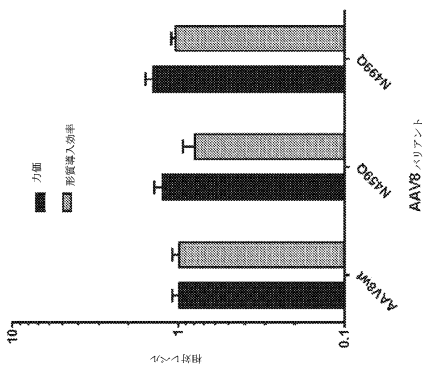


【 6 】

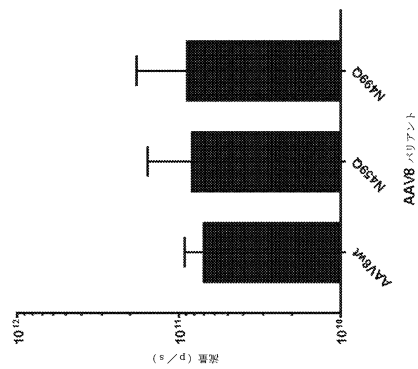


20

【 7 A 】



【 7 B 】

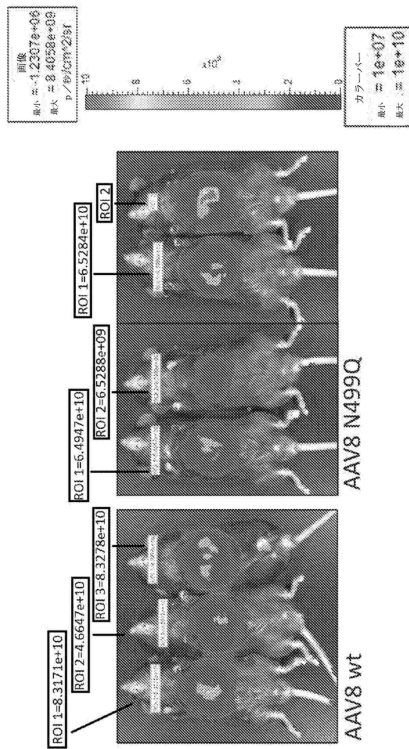


30

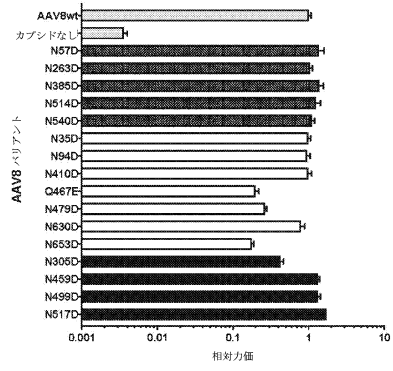
40

50

【 7 C 】



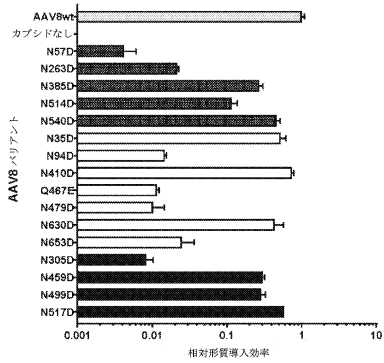
【 8 A 】



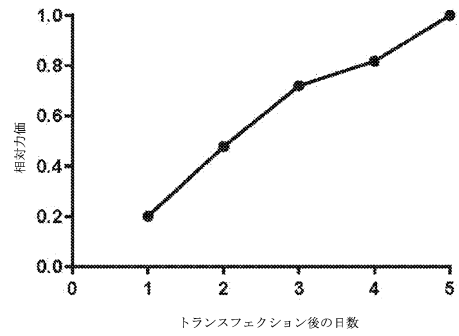
10

20

【 8 B 】



【 9 A 】

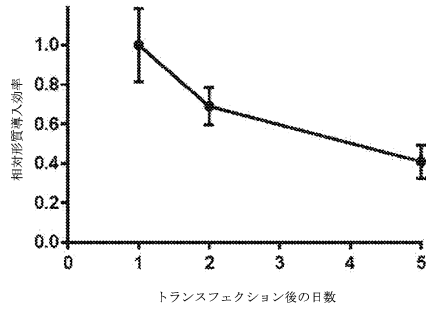


30

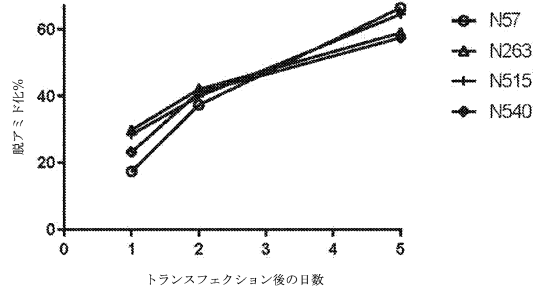
40

50

【 図 9 B 】

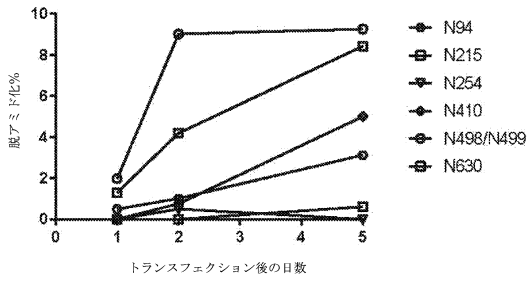


【 図 9 C 】

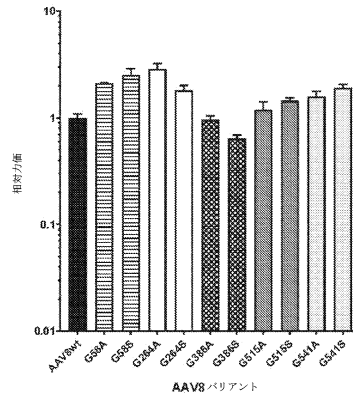


10

【 図 9 D 】

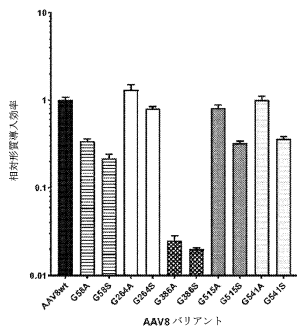


【 図 10 A 】

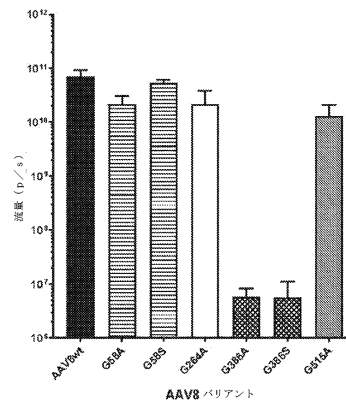


20

【 図 10 B 】



【 図 10 C 】

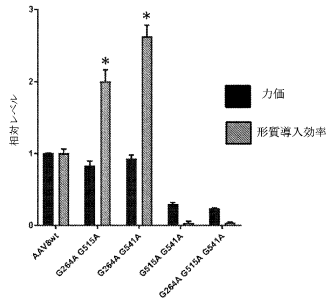


30

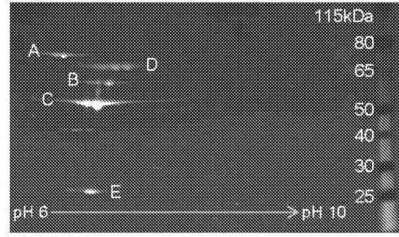
40

50

【 10 D 】

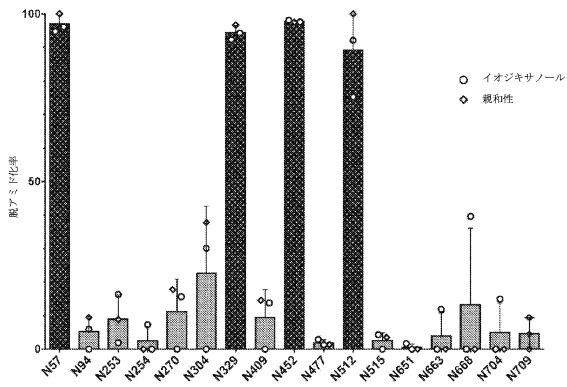


【 11 A 】

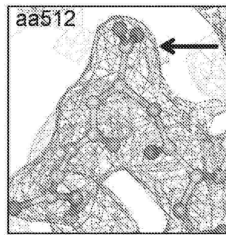


10

【 11 B 】



【 11 C 】



20

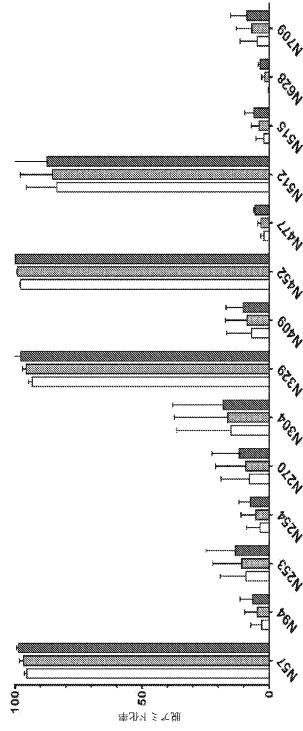
30

40

50

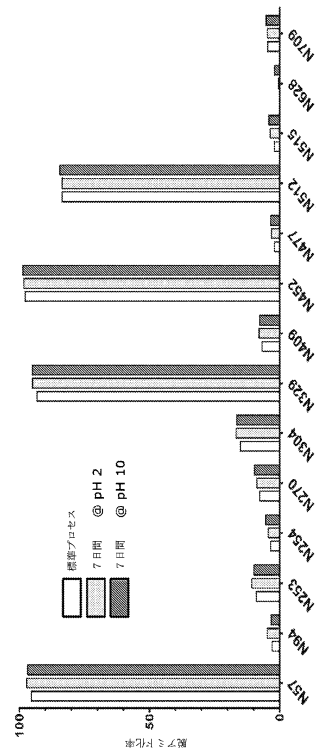
【☑ 1 1 D】

標準プロセス
 3日間 @ 70oC
 3日間 @ 70oC



【☑ 1 1 E】

標準プロセス
 7日間 @ pH 2
 7日間 @ pH 10



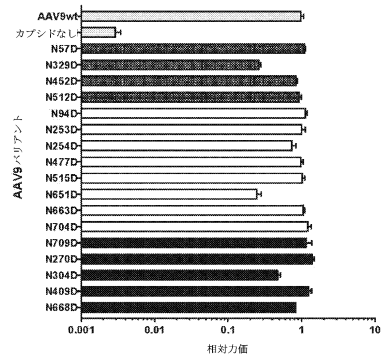
10

20

【☑ 1 1 F】

血清型		AAV9		
70°Cでの時間 (d)	0	7		WB:B1
SDSなし	○	○	○	
+ SDS	●	●	●	


【☑ 1 1 G】

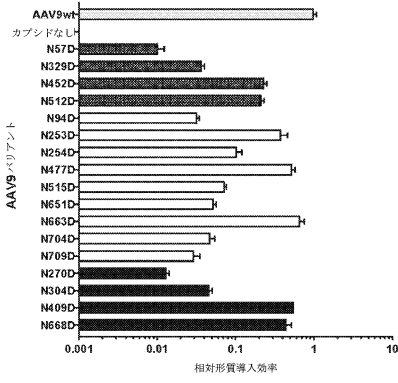



30

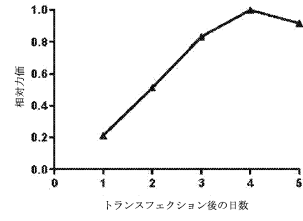
40

50


【 1 1 H】

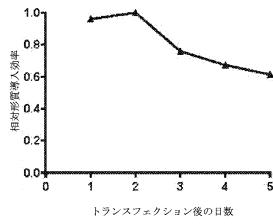



【 1 1 I】

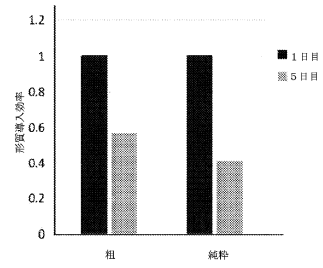


10

【 1 1 J】



【 1 1 K】



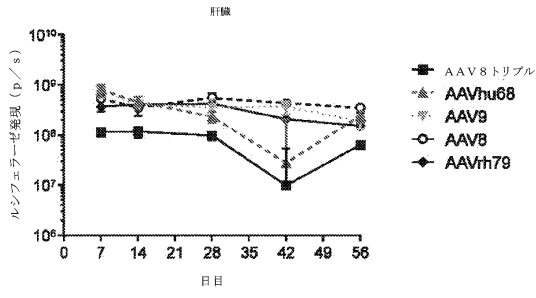
20

30

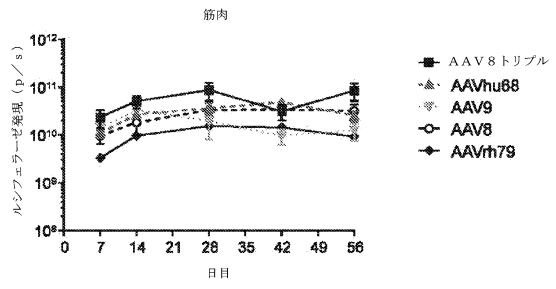
40

50

【図 17 A】

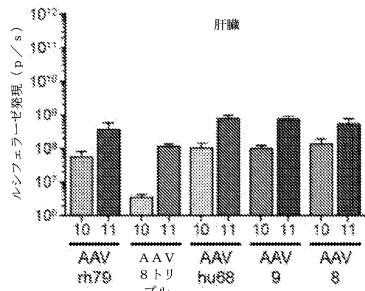


【図 17 B】

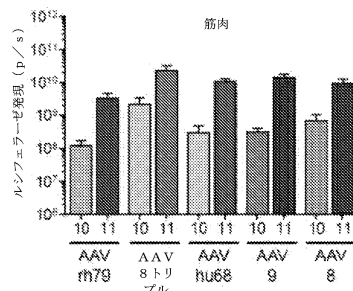


10

【図 17 C】



【図 17 D】



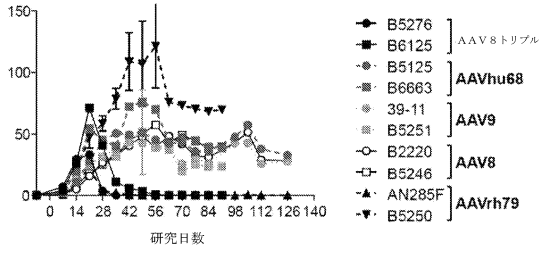
20

30

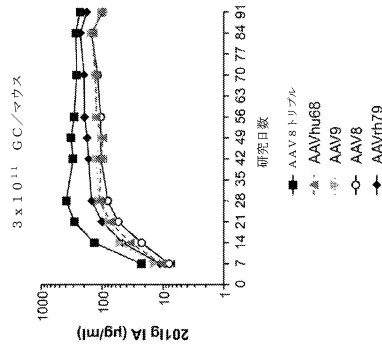
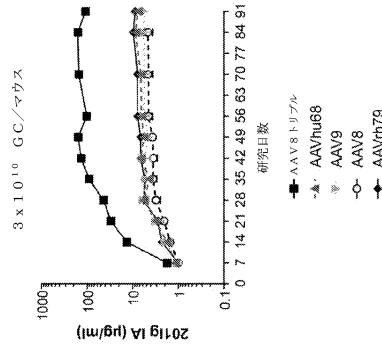
40

50

【 図 1 7 E 】



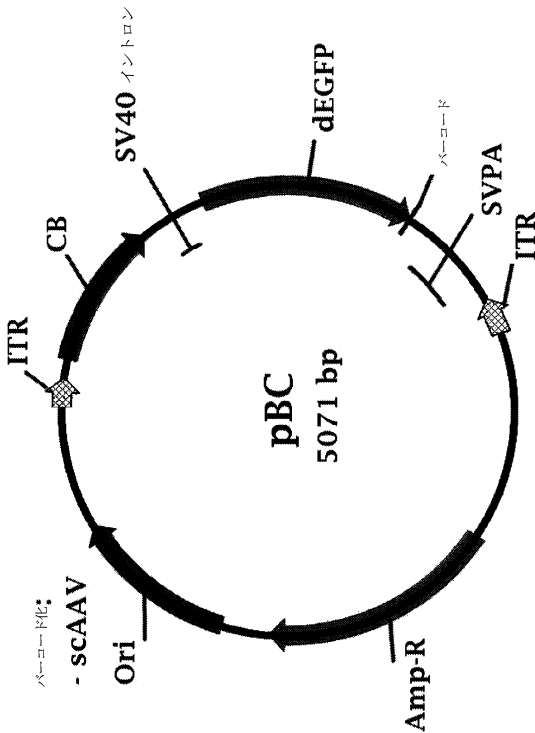
【 図 1 7 F 】



10

20

【 図 1 8 A 】



【 図 1 8 B 】

コード	マウスあたりの量 (GC)
BC01	6.87E+09
BC02	1.04E+10
BC03	1.59E+10
BC04	2.41E+10
BC05	3.67E+10
BC06	5.57E+10
BC07	8.47E+10
BC08	1.29E+11
BC09	1.96E+11
BC10	2.97E+11
BC11	4.52E+11
BC12	6.87E+11

2.00E+12

混合物の総GC

● インヒビタ試験、B6マウス

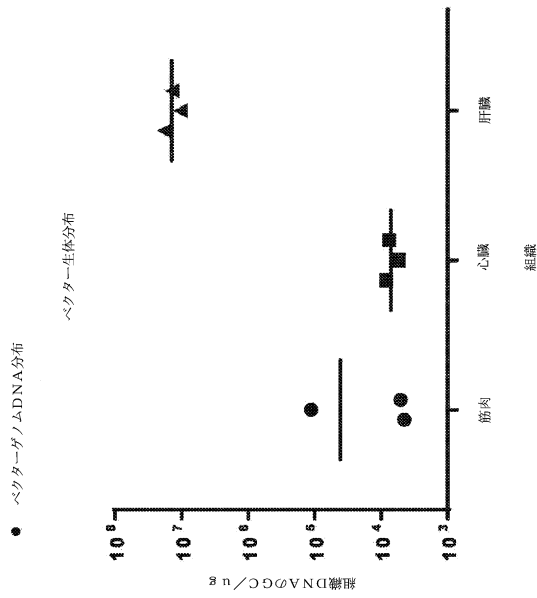
— AAV8、AR2、08、2e12 gc/マウス、2週間、i. v.

30

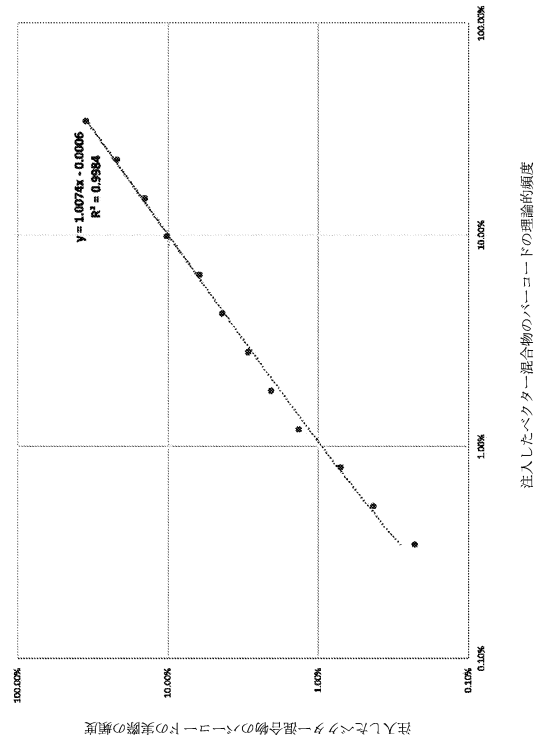
40

50

【☑ 18C】



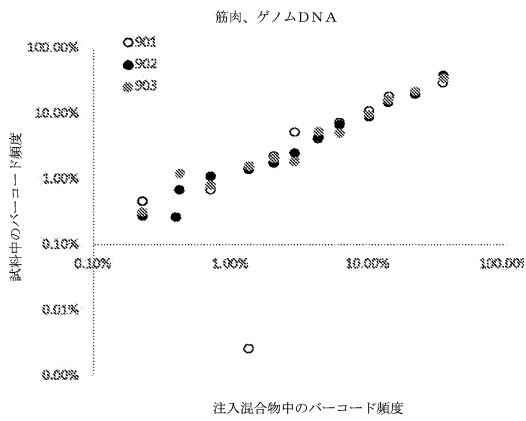
【☑ 18D】



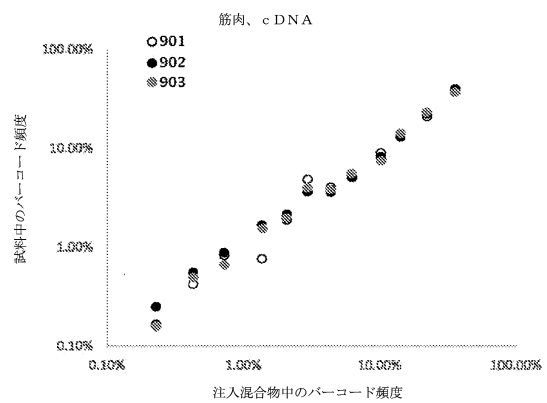
10

20

【☑ 19A】



【☑ 19B】

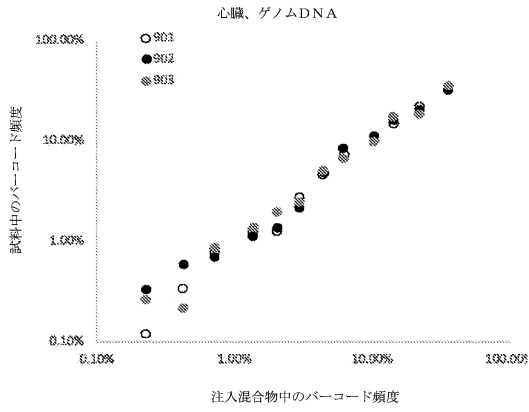


30

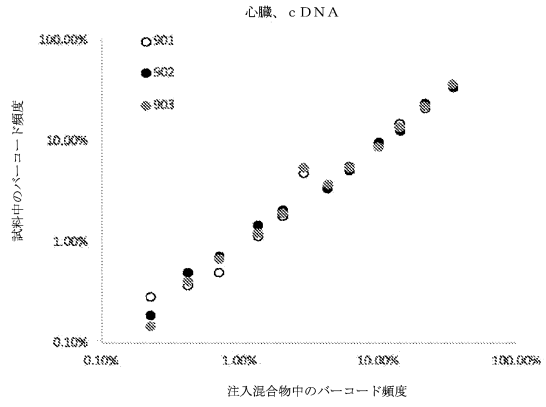
40

50

【 19 C】

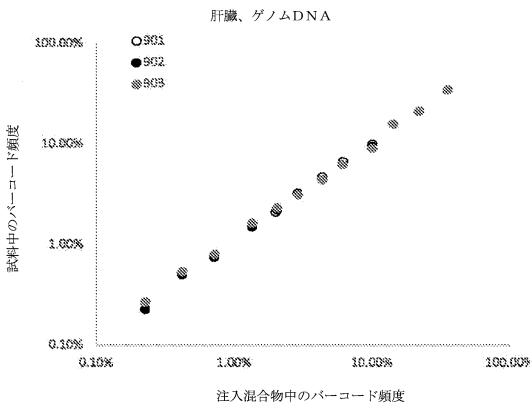


【 19 D】

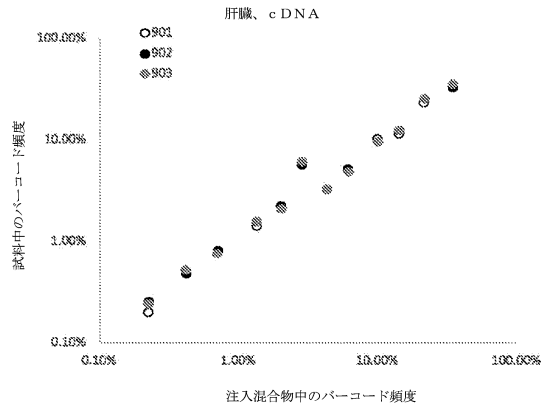


10

【 19 E】



【 19 F】



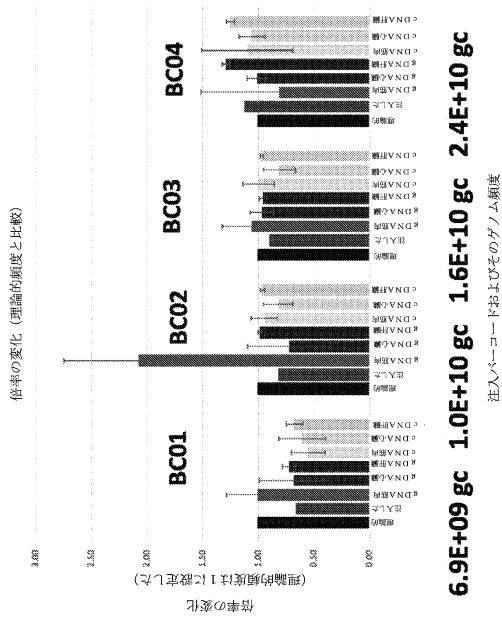
20

30

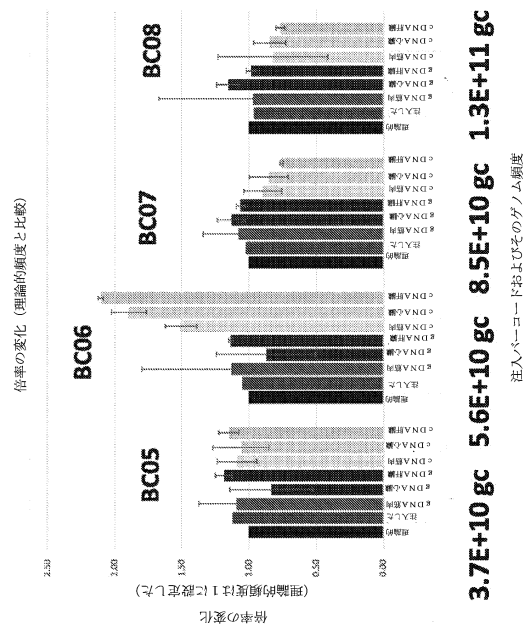
40

50

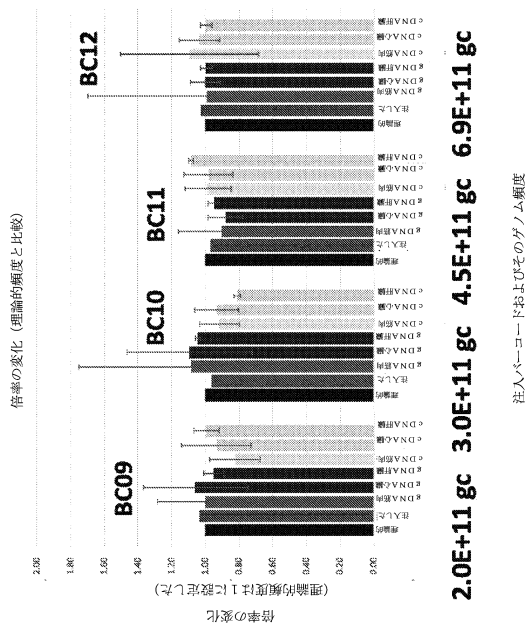
【 20A 】



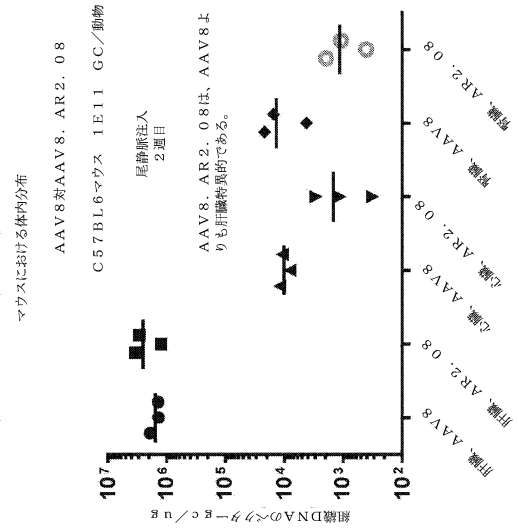
【 20B 】



【 20C 】



【 21 】



10

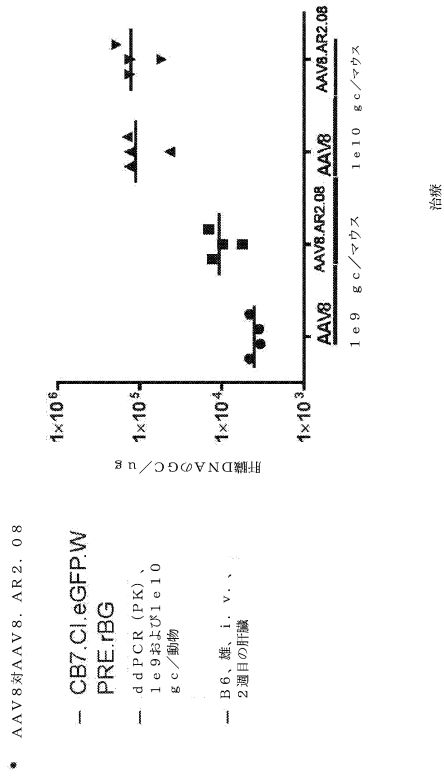
20

30

40

50

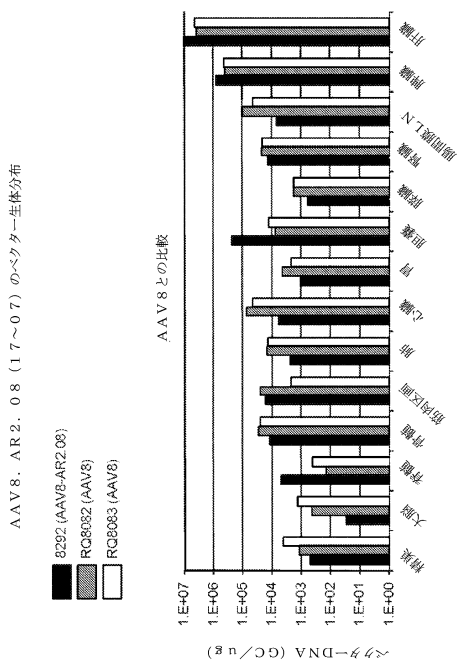
【 2 2 】



【 2 3 】

ロット番号	ベクター名	ゲノム濃度 ddPCR-GC/ml	ddPCR合計効率	純度
WL184C5	AAVG3.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH(p0080:p0146)	1.141e14 GC/ml	6.104e14 GC	100.000
WL1549C5	AAV8.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH	1.11e14	5.578e14	98.9
WL1955C5	AAVh79.TBG.PI.eGFP.WPRE.bGH(p3889:p0146)	1.609e14	6.568e14	

【 2 4 】



【 2 5 】

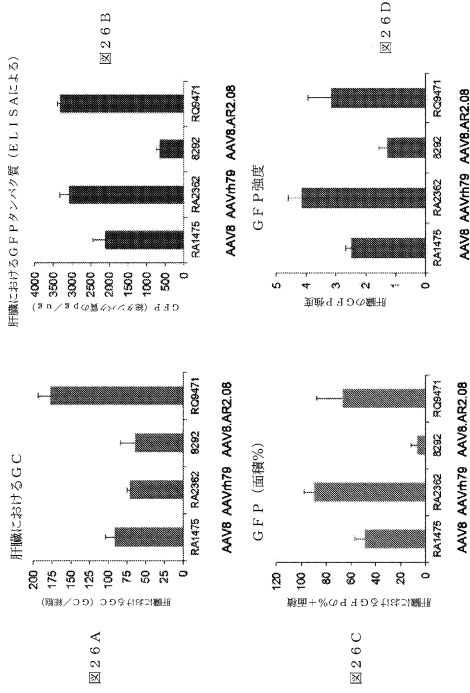
17-07: 新しい血清型による肝臓形質導入

AAV.TBG.EGFP:WPRE (1x10¹³ ddGC/kg), 7日目の別検

血清型	ID	種	性別	重量 (kg)
AAV8	RA1475	アカカザル	F	4.60
AAV/h79	RA2362	カニクイザル	F	4.10
AAV8.AR2.08	8292	カニクイザル	M	8.55
AAV8.AR2.08	RQ9471	アカカザル	F	9.26

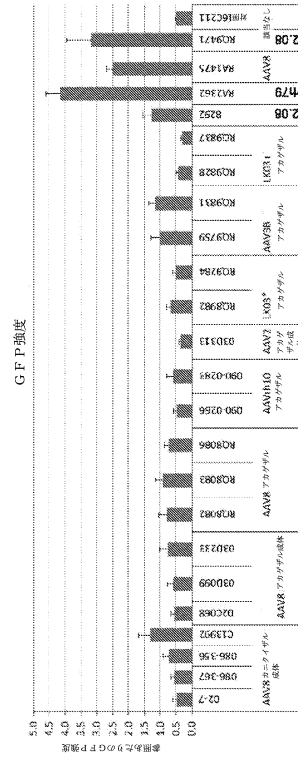
【図 26】

17-07: 新しい血清型による肝臓形態導入



【図 27 A】

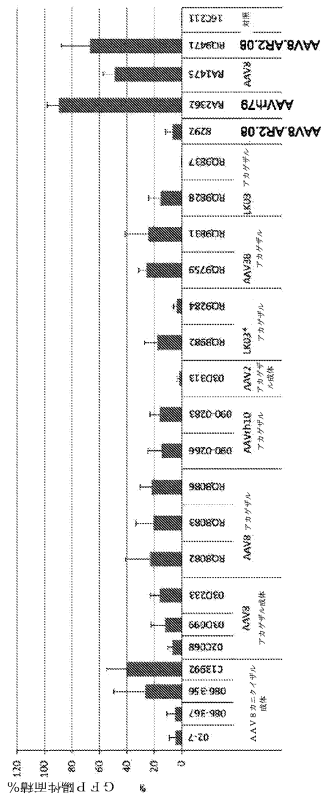
NHP肝臓における GFP 発現



【図 27 B】

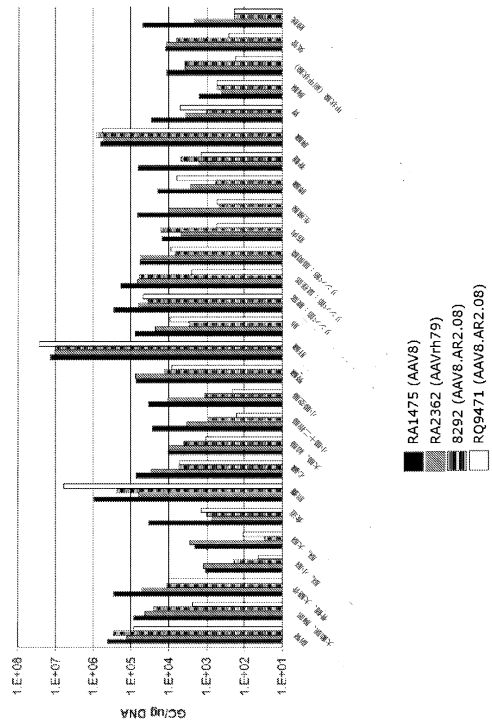
NHP肝臓における GFP 発現

GFP+領域 (肝臓)



【図 28】

17-07: ベクター体内分布



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>		
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/864 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>15/864</i>	<i>1 0 0 Z</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>35/76 (2015.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>35/76</i>		
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>		
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>		

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/722,382

(32)優先日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/677,474

(32)優先日 平成30年5月29日(2018.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/667,888

(32)優先日 平成30年5月7日(2018.5.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/635,964

(32)優先日 平成30年2月27日(2018.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/667,585

(32)優先日 平成30年5月29日(2018.5.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/663,788

(32)優先日 平成30年4月27日(2018.4.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/667,881

(32)優先日 平成30年5月7日(2018.5.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/722,388

(32)優先日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/703,673

(32)優先日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/663,797

(32)優先日 平成30年4月27日(2018.4.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/667,587

(32)優先日 平成30年5月6日(2018.5.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/635,968

(32)優先日 平成30年2月27日(2018.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

4 コロンビア・アパートメント407・スウィフトストリームプレイス10320

(72)発明者 ターナー, ケビン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19073ニュータウンスクエア・ビーチウッドロード124

(72)発明者 シムス, ジョシュア・ジョイナー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19147フィラデルフィア・サウスハンコックストリート839

(72)発明者 ワン, チャン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19144フィラデルフィア・ウエストウィノナストリート228

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表2008-538286(JP, A)

特表2007-507223(JP, A)

国際公開第2017/180854(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/GeneSeq