

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7644026号**  
**(P7644026)**

(45)発行日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(24)登録日 令和7年3月3日(2025.3.3)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	

請求項の数 24 (全60頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-564542(P2021-564542)	(73)特許権者	502409813
(86)(22)出願日	令和2年4月28日(2020.4.28)		ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバ
(65)公表番号	特表2022-530544(P2022-530544		ーシティ・オブ・ペンシルベニア
	A)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1
(43)公表日	令和4年6月29日(2022.6.29)		0 4 フィラデルフィア・ナインスフロア
(86)国際出願番号	PCT/US2020/030266		ー・シビックセンターブールバード 3 6
(87)国際公開番号	WO2020/223231		0 0
(87)国際公開日	令和2年11月5日(2020.11.5)	(74)代理人	110000741
審査請求日	令和5年4月25日(2023.4.25)		弁理士法人小田島特許事務所
(31)優先権主張番号	62/924,095	(72)発明者	ナンピア、カリヤニ
(32)優先日	令和1年10月21日(2019.10.21)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		1 3 9 ケンブリッジ・アパートメント 2
(31)優先権主張番号	62/913,314	(72)発明者	・ウィンザーストリート 2 6 8
(32)優先日	令和1年10月10日(2019.10.10)		ウイルソン、ジェームス・エム
	最終頁に続く		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規AAVカプシドおよびそれを含む組成物

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

AAVrh.91カプシド中にベクターゲノムを含む、AAVrh.91カプシドを有する組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、前記AAVrh.91カプシドは、位置N57、N383およびN512で少なくとも50%脱アミド化されたアスパラギンを含む配列番号2のアミノ酸1～736を含むAAVrh.91vp1タンパク質の異種集団、位置N383およびN512で少なくとも50%脱アミド化されたアスパラギンを含む配列番号2のアミノ酸138～736を含むAAVrh.91vp2タンパク質の異種集団、および位置N383およびN512で少なくとも50%脱アミド化されたアスパラギンを含む配列番号2のアミノ酸203～736を含むAAVrh.91vp3タンパク質の異種集団を含み、脱アミド化のパーセンテージは質量分析によって決定され、前記ベクターゲノムは、標的細胞において異種核酸配列によってコードされる産物の発現を指示する調節配列と作動可能に連結されている異種核酸配列を含む、組換えAAV。

**【請求項2】**

配列番号2のアミノ酸1～736をコードするヌクレオチド配列の発現によって產生されるAAVrh.91vp1、AAVrh.91vp2およびAAVrh.91vp3タンパク質を含むAAVrh.91カプシド中のベクターゲノムを有する組換えAAVであって、前記ベクターゲノムが、標的細胞において異種核酸配列によってコードされる産物の発現を指示する調節配列と作動可能に連結されている異種核酸配列を含む、組換えAAV。

**【請求項 3】**

前記 A A V r h . 9 1 v p 1 、 A A V r h . 9 1 v p 2 および A A V r h . 9 1 v p 3 カプシドタンパク質が、配列番号 1 もしくは 3 によってコードされるか、または配列番号 1 もしくは 3 と少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、もしくは少なくとも 9 9 % の同一性を有する、請求項 1 または 2 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 4】**

前記ベクターゲノムが、5' A A V 逆位末端反復 ( I T R ) 配列および 3' A A V I T R 配列をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え A A V 。

**【請求項 5】**

前記 5' A A V I T R 配列および前記配列 3' A A V I T R 配列が、A A V 2 由来である、請求項 4 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 6】**

( a ) 前記 A A V r h . 9 1 v p 1 タンパク質が、質量分析で決定される、位置 5 7 における 6 5 % ~ 9 0 % の脱アミド化されたアスパラギンを含むか；

( b ) 前記 A A V r h . 9 1 v p 1 タンパク質、 A A V r h . 9 1 v p 2 タンパク質および / または A A V r h . 9 1 v p 3 タンパク質が、質量分析で決定される、位置 N 3 8 3 および / または N 5 1 2 における 8 0 % ~ 1 0 0 % の脱アミド化されたアスパラギンを含むか；および / または

( c ) 前記 A A V r h . 9 1 v p 1 タンパク質、 A A V r h . 9 1 v p 2 タンパク質および / または A A V r h . 9 1 v p 3 タンパク質が、質量分析で決定される、位置 N 9 4 における 2 % ~ 1 5 % の脱アミド化されたアスパラギンか、位置 N 3 0 3 における 2 % ~ 1 5 % の脱アミド化されたアスパラギンか、位置 N 4 9 7 における 2 % ~ 1 5 % の脱アミド化されたアスパラギンか、または位置 N 6 9 1 における 2 % ~ 5 % の脱アミド化されたアスパラギンをさらに含む、

請求項 1 または 2 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 7】**

前記 A A V カプシドが、

配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 7 3 6 をコードする核酸配列からの発現により產生される v p 1 タンパク質、配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列からの発現によって產生される v p 1 タンパク質、または配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列からの発現によって產生される v p 1 タンパク質、から選択される A A V r h . 9 1 v p 1 タンパク質の異種集団、

配列番号 2 のアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 をコードする核酸配列からの発現により產生される v p 2 タンパク質、配列番号 1 もしくは 3 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 0 8 を含む核酸配列からの発現によって產生される v p 2 タンパク質、または配列番号 2 のアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 をコードする配列番号 1 もしくは 3 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 0 8 と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列からの発現によって產生される v p 2 タンパク質、から選択される A A V r h . 9 1 v p 2 タンパク質の異種集団、および

配列番号 2 のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 をコードする核酸配列からの発現により產生される v p 3 タンパク質、配列番号 1 もしくは 3 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 0 8 を含む核酸配列からの発現によって產生される v p 3 タンパク質、または配列番号 2 のアミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 をコードする配列番号 1 もしくは 3 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 0 8 と少なくとも 9 0 % 同一の核酸配列からの発現によって產生される v p 3 タンパク質、から選択される A A V r h . 9 1 v p 3 タンパク質の異種集団を含む、

請求項 1 に記載の組換え A A V 。

**【請求項 8】**

前記 A A V r h . 9 1 v p 1 、 A A V r h . 9 1 v p 2 および A A V r h . 9 1 v p 3 タンパク質をコードする前記核酸配列が、配列番号 1 もしくは 3 であるか、または配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する、請求項 7 に記載の組換

10

20

30

40

50

え A A V。

**【請求項 9】**

前記ベクターゲノムが、5' ITR配列および3' ITR配列をさらに含む、請求項7または8に記載の組換えA A V。

**【請求項 10】**

前記5' ITR配列および前記3' ITR配列が、A A V 2由来である、請求項9に記載の組換えA A V。

**【請求項 11】**

請求項1~10のいずれか一項に記載の組換えA A Vと、生理学的に適合する担体、緩衝液、アジュバント、および／または希釈剤と、を少なくとも含む、組成物。 10

**【請求項 12】**

前記組成物が、

- (a) 髄腔内送達用に製剤化され、前記ベクターゲノムが、中枢神経系への送達用の遺伝子産物をコードする核酸配列を含むか、
- (b) 静脈内送達用に製剤化されるか、
- (c) 鼻腔内送達用または筋肉内送達用に製剤化される、

請求項11に記載の組成物。

**【請求項 13】**

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、請求項1~10のいずれか一項に記載の組換えA A V。 20

**【請求項 14】**

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医薬組成物、薬剤またはキットの製造における、請求項1~10のいずれか一項に記載の組換えA A V、または請求項11または12のいずれか一項に記載の組成物、の使用。 20

**【請求項 15】**

請求項1~10のいずれか一項に記載の組換えA A Vを产生するために有用な組換えA A V产生システムであって、前記产生システムが、

- (a) 配列番号2のアミノ酸1~736をコードする核酸配列と、
- (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逆位末端反復(ITR)配列、および宿主細胞における遺伝子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、を含む細胞培養物であり、 30

前記細胞培養物が、A A Vカプシド中に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を有する、

組換えA A V产生システム。

**【請求項 16】**

前記(a)の核酸配列が、配列番号1もしくは3の核酸配列か、または配列番号1もしくは3の核酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有する配列を含む、請求項15に記載の組換えA A V产生システム。 40

**【請求項 17】**

前記产生システムが、ヒト胎児由来腎臓293細胞を含む、請求項15または16に記載の組換えA A V产生システム。

**【請求項 18】**

組換えA A Vを生成する方法であって、宿主細胞を培養するステップを含み、前記宿主細胞が、(a)配列番号2のアミノ酸1~736をコードする核酸分子と、(b)機能的なr e p遺伝子と、(c)5'A A V ITR配列、3'A A V ITR配列、および導入遺伝子、を含むミニ遺伝子とを含み、前記宿主細胞が、A A Vカプシドへの前記ミニ遺伝子のパッケージングを可能にするのに十分なヘルパー機能を有する、方法。

**【請求項 19】**

10

20

30

40

50

前記核酸分子が、配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列か、または配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

インビトロで細胞に導入遺伝子を送達する方法であって、前記細胞を請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組換え AAV と接触させるステップを含み、前記組換え AAV が、前記導入遺伝子を含む、方法。

**【請求項 2 1】**

配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 736 をコードする核酸配列と、異種核酸配列とを含む、プラスミド。

10

**【請求項 2 2】**

前記配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 736 をコードする核酸配列が、配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列か、または配列番号 1 もしくは 3 の核酸配列と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 1 に記載のプラスミド。

**【請求項 2 3】**

請求項 2 1 または 2 2 に記載のプラスミドを含む、パッケージング細胞株。

**【請求項 2 4】**

組換え AAV の製造のための、請求項 2 3 に記載のパッケージング細胞の使用。

20

**【発明の詳細な説明】**

**【背景技術】**

**【0001】**

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、ヒト遺伝子療法において非常に有望であり、長期的な遺伝子発現を提供する能力および病原性の欠如により、様々な研究において肝臓、筋肉、心臓、脳、眼、腎臓、および他の組織を標的とするために広く使用されている。AAV は、パルボウイルス科に属し、それぞれ、2つの逆位末端反復に隣接する一本鎖 DNA を含む。数十の天然に存在する AAV カプシドが報告されており、その固有のカプシド構造により、異なる細胞型および臓器を認識し、形質導入することができる。

**【0002】**

1981年に最初の試験が開始されて以来、AAV ベクターベースの遺伝子療法の臨床試験において、ベクターに関連する毒性は報告されていない。臨床試験における AAV ベクターのこれまで蓄積してきた安全記録は、実証された有効性と組み合わせて、AAV が遺伝子送達のための有望なプラットフォームであることを示す。別の魅力的な特徴は、AAV が、Rep 遺伝子および Cap 遺伝子とともに、小さなゲノム（約 4.7 kb）および単純な遺伝的成分 - 逆位末端反復 (ITR) を有する一本鎖 DNA ウィルスであるため、比較的容易に操作されることである。AAV ベクターには、ITR および AAV カプシドタンパク質のみが必要であり、ITR は、ベクター産生のための複製およびパッケージングのシグナルとして機能し、カプシドタンパク質は、ベクターゲノム DNA を収容するためのカプシドを形成するだけでなく、ベクターゲノムを標的の細胞および組織に送達するための組織向性 (tissue tropism) を決定する。

30

**【0003】**

AAV は、免疫原性が低く、かつ非病原性の性質であるため、遺伝子療法のための最も効果的なベクター候補のうちの 1 つである。しかしながら、効率的な遺伝子導入を可能にするにもかかわらず、現在診療所で使用されている AAV ベクターは、ウイルスに対する既存の免疫および制限された組織向性によって妨げられ得る。新しいより効果的な AAV ベクターが必要とされている。

40

**【発明の概要】**

**【0004】**

一実施形態では、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むカプシドタンパク質を含む AAV カプシド (AAV rh . 91) を有し、カプシド中に異種核酸配列を含むベクターゲノムが

50

パッケージングされている、組換えアデノ随伴ウイルス( r A A V )が本明細書に提供される。特定の実施形態では、r A A Vは、配列番号1もしくは3のA A Vカプシド配列、または配列番号1もしくは3と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の同一性を共有する配列の発現によって產生されるカプシドタンパク質を含むカプシドを有し、カプシド中に異種核酸配列を含むベクターゲノムがパッケージングされている。

#### 【 0 0 0 5 】

特定の実施形態では、r A A Vが本発明で提供され、A A Vカプシドが、( 1 ) 配列番号2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產生されるv p 1タンパク質、配列番号1もしくは3から產生されるv p 1タンパク質、または配列番号2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1もしくは3と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 1タンパク質から選択されるA A V r h . 9 1 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產生されるv p 2タンパク質、配列番号1もしくは3の少なくともヌクレオチド412～2208を含む配列から產生されるv p 2タンパク質、または配列番号2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1もしくは3の少なくともヌクレオチド412～2208と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 2タンパク質から選択されるA A V r h . 9 1 v p 2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產生されるv p 3タンパク質、配列番号1もしくは3の少なくともヌクレオチド607～2208を含む配列から產生されるv p 3タンパク質、または配列番号2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1もしくは3の少なくともヌクレオチド607～2208と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 3タンパク質から選択されるA A V r h . 9 1 v p 3タンパク質の異種集団、ならびに/あるいは( 2 ) 配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列の產物である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138～736のアミノ酸配列をコードする核酸配列の產物である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203～736をコードする核酸配列の產物であるv p 3タンパク質の異種集団、を含むA A Vカプシドタンパク質を含み、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-グリシン対中に少なくとも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、任意選択的に、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。

#### 【 0 0 0 6 】

別の実施形態では、組成物が本明細書に提供され、少なくともr A A Vと、生理学的に適合する担体、緩衝液、アジュバント、および/または希釈剤とを含む。特定の実施形態では、組成物は、髄腔内送達用に製剤化され、ベクターゲノムは、中枢神経系への送達用の遺伝子産物をコードする核酸配列を含む。さらに別の実施形態では、組成物は、静脈内送達、鼻腔内送達、および/または筋肉内送達用に製剤化される。

#### 【 0 0 0 7 】

特定の実施形態では、r A A Vを產生するために有用なシステムが提供される。そのシステムは、( a ) 配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列と、( b ) 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、核酸分子が、少なくとも1つのA A V逆位末端反復(I T R)、および宿主細胞で産物の発現を指示する配列と作動可能に連結された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 ) r A A Vカプシド中への核酸分子のパッケージングを可能にするのに十分なA A Vのr e p機能およびヘルパー機能と、を含む。

#### 【 0 0 0 8 】

特定の実施形態では、A A Vカプシドを含むr A A Vを生成する方法が提供される。本

10

20

30

40

50

方法は、宿主細胞を培養するステップを含み、宿主細胞が、(a)配列番号2のアミノ酸配列を含むAAVカプシドタンパク質をコードする核酸分子と、(b)機能的なr e p遺伝子と、(c)AAV 5'ITR、AAV 3'ITR、および導入遺伝子を含むミニ遺伝子と、(d)AAVカプシドへの前記ミニ遺伝子のパッケージングを可能にするのに十分なヘルパー機能と、を含む。

#### 【0009】

さらに別の実施形態では、本明細書に記載のr A A V、発現カセット、または核酸分子を含む宿主細胞が提供される。

#### 【0010】

特定の実施形態では、導入遺伝子を細胞に送達する方法が提供される。本方法は、細胞を本明細書に記載されるr A A Vと接触させるステップを含み、r A A Vが、導入遺伝子を含む。

10

#### 【0011】

これらの組成物および方法の他の態様および利点を、以下の詳細な説明においてさらに説明される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】AAV - SGAのワークフローの図を示す。ゲノムDNAを、アカゲザルの組織試料から単離し、AAVカプシド遺伝子の存在についてスクリーニングした。AAV陽性のDNAを、エンドポイント希釈し、さらなるラウンドのPCRに供した。ポアソン分布によれば、ウェルの30%以下でPCR産物を得るDNA希釈は、その時の陽性PCR 80%当たり1つの増幅可能なDNA鑄型を含む。陽性アンプリコンを、 Illumina MiSeq 2x150または2x250ペアエンド配列決定プラットフォームを使用して配列決定し、得られたリードを、SPAdesアセンブリを使用してデノボアセンブリを行った。

20

【図2】新規のAAV天然分離株および代表的なクレード対照のDNAゲノム配列の隣接結合系統樹を示す図である。

【図3A - 3D】AAV r h . 9 1 (配列番号1)、AAV r h . 9 1 e n g (配列番号3)、AAV 6 . 2 (配列番号5)、およびAAV 1 (配列番号7)のカプシドの核酸配列の整列を示す。

30

【図4A - 4B】AAV r h . 9 1 (配列番号2)、AAV 6 . 2 (配列番号6)、およびAAV 1 (配列番号8)のカプシドのアミノ酸配列の整列を示す。

【図5A - 5D】注入14日後のマウス組織におけるe G F P導入遺伝子の生体分布を示す。(図5Aおよび図5B) C57BL / 6マウスに、マウス当たり1e12GCの用量で、CB7.CI.eGFP.WPRE.RBG (n = 5)を含むAAVカプシドをIV注入した。(図5Cおよび図5D) C57BL / 6マウスを、マウス当たり1e11GCの用量で、CB7.CI.EGFP.WPRE.RBG (n = 5)を含む様々なAAVカプシド(クレードAベクター、6.9e10GC / マウスで投与)を脳室内ICV注入した。値は、平均値±SDとして表される。<sup>\*</sup>p < 0.01、<sup>\*\*</sup>p < 0.001。

【図6A - 6B】AAVベクターのIM送達後の筋肉におけるLac Z発現の分析を示す。様々なカプシドを有し、CMVプロモーターの下でLac Zを発現する3e9GCのベクターをマウスに投与した。20日目に筋肉組織を採取し、X-gal染色(より濃い染色)により導入遺伝子の発現を評価した。

40

【図7】様々なAAVベクターのIM送達後の血清中のmAbのレベルを示す。B6マウスに、t MCKプロモーターの下で3D6抗体を発現するベクターを1e11GC投与した。

【図8】3D6またはLac Z導入遺伝子を発現するベクターの(AAV8に対する)収率を示す。

【図9】NHPにおけるプールされたバーコード化ベクター研究の実験設計を示す(図10A ~ 図10Cに示されるデータ)。5つの新規のカプシドおよび5つの対照(AAV r

50

h . 9 0 、 A A V r h 9 . 1 、 A A V r h . 9 2 、 A A V r h . 9 3 、 A A V r h . 9 1 . 9 3 、 A A V 8 、 A A V 6 . 2 、 A A V r h 3 2 . 3 3 、 A A V 7 、 および A A V 9 ) は、 固有の 6 b p バーコードを有する修飾 A T G 枯渇 G F P 導入遺伝子を用いてパッケージングされた。ベクターを、 等量でプールし、 カニクイザルに I V または I C M 注入して ( 総用量 : 2 e 1 3 G C / k g I V および 3 e 1 3 G C I C M ) 。 I V 注入された動物は、 ベースラインでは A A V 6 、 A A V 8 、 および A A V r h 3 2 . 3 3 に対して血清陰性であり、 A A V 7 および A A V 9 に対して、 それぞれ 1 : 5 および 1 : 1 0 の中和抗体力値を有した。

【図 1 0 A - 1 0 C 】は、 I V 送達 ( 図 1 0 A および 図 1 0 B ) および I C M 送達 ( 図 1 0 C ) 後のバーコード化カプシドの R N A 発現の分析を示すグラフである。 I V 投与 - 総用量 2 e 1 3 G C / k g 、 3 0 日目に剖検 ( この動物は、 ベースラインでは低レベルの A A V 7 および A A V 9 N a b を有した ) 。 I C M 投与 - 3 e 1 3 G C / 動物、 3 0 日目に剖検。各組織 R N A 試料中のバーコード頻度は、 各バーコードが混合物中に均等な表現 ( 1 0 % ) を有するように、 注入入力材料の頻度に正規化された。 8 . 5 ~ 1 2 % の範囲の 1 0 個のベクターの入力量。 値は、 平均値 ± S E M として表される。 \*\* p < 0 . 0 0 1 。

【図 1 1 A - 1 1 C 】 C B 7 . C I . e G F P . W P R E . r B G を有する A A V r h . 9 1 、 A A V 1 、 および A A V 9 カプシドを N H P に送達した後の生体分布の検出を示す。 1 . 5 5 7 e 1 3 G C の用量を、 各動物に I C M 注入した。注入の 2 8 ~ 3 1 日後に動物を犠牲にし、 組織を分析のために採取した ( q P C R による e G F P の検出 ) 。 値は、 平均値 ± S D として表されている。 動物 : A A V r h . 9 1 ( 1 4 0 9 2 0 1 および 1 4 0 7 0 8 8 ) 、 A A V 1 ( R A 3 6 5 4 および R A 3 5 8 3 ) 、 A A V 9 ( 1 4 0 8 2 6 6 および 1 4 0 9 0 2 9 ) 。

【図 1 2 】 C N S 組織における生体分布を示す。 示されるデータは、 動物によってグループ化された、 図 1 1 A ~ 図 1 1 C に示される組織の G C 値に対応する。

【図 1 3 A - 1 3 C 】 A A V r h . 9 1 、 A A V 1 、 および A A V 9 ベクターを N H P に送達した後のニューロン形質導入の分析を示す ( 図 1 1 A ~ 図 1 1 C に記載されているとおり ) 。

【図 1 4 A - 1 4 B 】 様々な A A V ベクターの産生のための小規模調製力値を示す。 各ドットは、 個々の小規模調製を表す。 値は、 平均値 ± S D として表されている。

【図 1 5 A - 1 5 B 】 A A V r h . 9 1 ベクター調製物の質量分析の結果を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【 0 0 1 3 】

天然の哺乳類宿主における A A V の遺伝的バリエーションを、 A A V 単一ゲノム増幅 ( 個々の A A V ゲノムをウイルス集団内から正確に単離するために使用される技術 ) を使用することによって探索した ( 図 1 ) 。 本明細書において、 様々なクレードに分類することができるアカゲザル組織由来の新規 A A V 配列の単離が記載される。 我々は、 マウスにおける静脈内 ( I V ) および脳室内 ( I C V ) 送達後、 ならびに N H P における I V および大槽内 ( I C M ) 送達後の、 天然単離由来 A A V ベクターの生物学的特性を評価した。 その結果、 新規の A A V バリアントのクレード特異的形質導入パターンおよび可変形質導入パターンの両方が、 それらの原型的なクレードメンバー対照と比較して特定された。

##### 【 0 0 1 4 】

組換え A A V r h . 9 1 ベクターが本明細書で提供され、 A A V r h . 9 1 カプシドと、 対象への送達後に導入遺伝子の発現を指示する調節配列の制御下にある導入遺伝子をコードする核酸と、 を有する。 r A A V r h . 9 1 カプシドは、 独立して、 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。 これらのベクターを含む組成物が提供される。 本明細書に記載の方法は、 様々な状態の治療のために、 目的の組織を標的とする r A A V の使用を対象とする。

##### 【 0 0 1 5 】

特定の実施形態では、 中枢神経系への送達に非常に好適な A A V r h . 9 1 カプシドを

10

20

30

40

50

含むベクターが、本明細書に提供される。特定の実施形態では、髄腔内送達が望まれ、例えば、ICM送達を介した脳への送達が含まれる。特定の実施形態では、AAVrh.9 1カプシドを含むベクターは、心臓(平滑筋)への送達に非常に好適である。他の実施形態では、AAVrh.9 1カプシドを含むベクターは、骨格(横紋)筋への送達に非常に好適である。rAAVrh.9 1ベクターは、全身に送達され得るか、またはこれらの組織を標的化するのに好適な投与経路を介して標的化され得る。

#### 【0016】

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって、および本出願で使用されている多くの用語に対して当業者に一般的な手引きを提供する公開された文書を参照することによって、一般的に理解されているものと同じ意味を有する。以下の定義は、明確にするために提供されるに過ぎず、特許請求される本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で使用される場合、「a」または「an」という用語は、1つ以上を指し、例えば、「宿主細胞」は、1つ以上の宿主細胞を表すことを留意されたい。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。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%の変動性を意味する。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(consistently 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。10 20

#### 【0017】

以下の説明に関して、本明細書に記載の組成物の各々は、別の実施形態では、本発明の方法で有用であることが意図される。さらに、本方法で有用な本明細書に記載の組成物の各々は、別の実施形態では、それ自体が本発明の実施形態であることも意図される。

#### 【0018】

「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 cap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「複製欠陥ウイルスペクター」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。30

#### 【0019】

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'へ、AAV 5' ITR、コード配列、およびAAV 3' ITRを含む。特定の実施形態では、ITRは、AAV 2由来(カプシドとは異なるAAV供給源)であるか、またはそれ以外の完全長ITRが選択され得る。特定の実施形態では、ITRは、產生中の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。ベクターゲノムは、本明細書では「ミニ遺伝子」と称されることがある。40

#### 【0020】

「発現カセット」という用語は、導入遺伝子配列およびそのための調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリA)を含む核酸分子を指し、そのカセットは、ウイルスペクター(例えば、ウイルス粒子)のカプシドにパッケージングされ得る。典型的に、50

ウイルスベクターを產生するためのそのような発現カセットは、ウイルスゲノムのパッケージングシグナルに隣接する導入遺伝子配列、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。例えば、A A V ウイルスベクターの場合、パッケージングシグナルは、5'逆位末端配列 (I T R) および3' I T R である。特定の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、「発現カセット」と互換的に使用され得る。他の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、選択された遺伝子のコード配列のみを指す。

#### 【0021】

r A A V は、A A V カプシドおよびベクターゲノムからなる。A A V カプシドは、v p 1 の異種集団、v p 2 の異種集団、および v p 3 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、v p 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 v p 1、v p 2、または v p 3 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。

10

#### 【0022】

本明細書で使用される場合、v p 1、v p 2、および v p 3 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 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 - グリシン対中に少なくとも 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、任意選択的に、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選択的な修飾をもたらす。

20

#### 【0023】

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までからなる 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り得る。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サブ集団を含み得る。2019年2月27日に出願された PCT / US19 / 019804、および 2019年2月27日に出願された PCT / US19 / 019861 を参照されたい (これらの各々は、参照により本明細書に援用される)。

30

#### 【0024】

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。かかるパーセンテージは、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。

40

#### 【0025】

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、本質的に非酵素的であると考

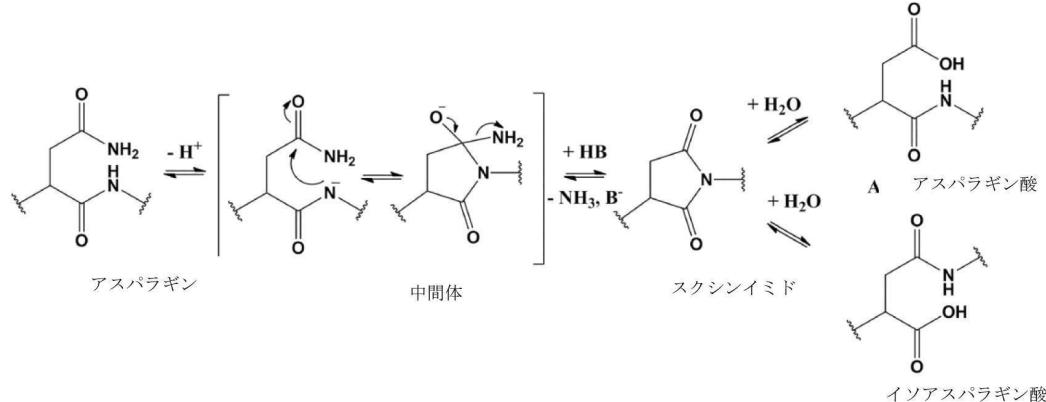
50

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ている V P 1 固有 ( V P 1 - u ) 領域 ( 約 a a 1 ~ 1 3 7 ) における広範な脱アミド化は、カプシドのアセンブリの前に V P 脱アミド化が生じ得ることを示唆する。

### 【 0 0 2 6 】

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

20

30

### 【 0 0 2 7 】

本明細書に提供されるように、V P 1 、 V P 2 、または V P 3 中の各脱アミド化 N は、独立して、アスパラギン酸 ( A s p ) 、イソアスパラギン酸 ( i s o A s p ) 、アスパルテート、および / または A s p および i s o A s p 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、1 0 : 1 ~ 1 : 1 0 のアスパラギン酸対イソアスパラギン酸、約 5 0 : 5 0 のアスパラギン酸 : イソアスパラギン酸、もしくは約 1 : 3 のアスパラギン酸 : イソアスパラギン酸、または別の選択された比率であり得る。

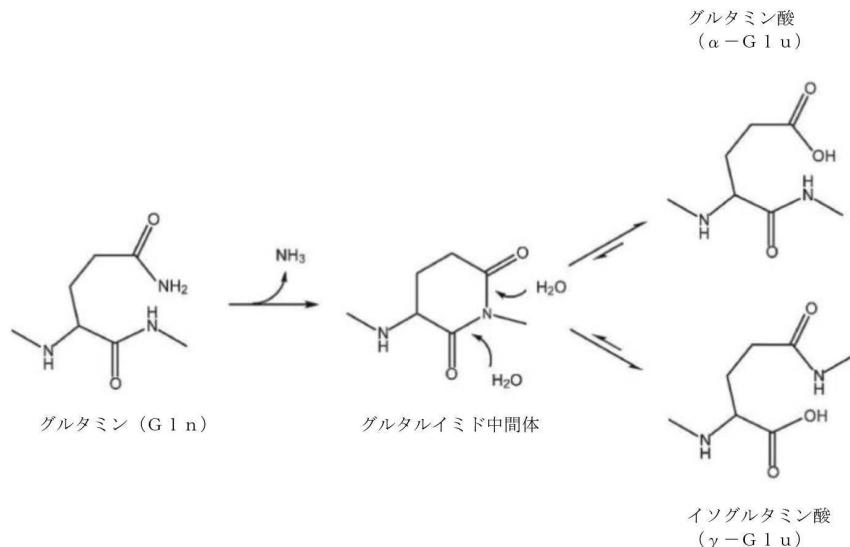
### 【 0 0 2 8 】

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 ( G l u ) 、すなわち - グルタミン酸、 - グルタミン酸 ( G l u ) 、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、共通のグルタルイ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、1 0 : 1 ~ 1 : 1 0 の 対 、約 5 0 : 5 0 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。

40

50

## 【化 2】



## 【0029】

したがって、rAAVは、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。

## 【0030】

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アミノ酸配列と比較して脱アミド化されている。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。

## 【0031】

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。

20

30

40

50

【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
スレオニン	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

## 【0032】

特定の実施形態では、r AAVは、vp1、vp2およびvp3タンパク質を有するAAVカプシドを有し、本明細書に提供される表（参照により本明細書に援用される）に示される位置に、2、3、4、5個、またはそれ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。

## 【0033】

r AAV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ー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ソース(Thermo Fisher Scientific)を備えたQ Exactive HFに結合されたAccelaMap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、最も豊富で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行われ、4m/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

10

20

30

40

50

クトルの解像度は、最大イオン注入時間が 50 ms、正規化された衝突エネルギーが 30 で、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单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、10 ppm 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 -NH<sub>2</sub> 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变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 などの四重飛行質量分析器 (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 製の Acuity UPLC システムまたは Agilent のシステム (1100 または 1200 シリーズ) 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、Mass Lynx (Waters)、Pinpoint、および Pepfinder (Thermo Fisher Scientific)、Mascot (Matrix Science)、Peaks DB (Bioinformatics Solutions) を挙げることができる。さらに他の技術は、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., Human Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267 に記載され得る。

#### 【0034】

脱アミド化に加えて、他の修飾も生じ得るが、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。

#### 【0035】

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、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 AAV 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

10

20

30

40

50

れない。したがって、AAVおよび／または操作されたAAVバリエント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。追加的に、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化させて、AAVの脱アミド化を低減させ得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される変異体AAV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なアスパラギン-グリシン(NG)対における変異を含む。変異AAVカプシドは、参照AAVが天然に4つのNG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、AAVカプシドは、参照AAVが天然に5つのNG対を含む1つ、2つ、3つ、または4つかかる変異を含み得る。特定の実施形態では、変異AAVカプシドは、NG対に单一の変異のみを含む。特定の実施形態では、変異AAVカプシドは、2つの異なるNG対に変異を含む。特定の実施形態では、変異AAVカプシドは、変異を含む2つの異なるNG対であり、AAV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、VP1固有領域にはない。特定の実施形態では、変異の1つは、VP1固有領域にある。任意選択的に、変異体AAVカプシドは、NG対中に修飾を含まないが、NG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。

#### 【0036】

特定の実施形態では、野生型AAVカプシド中のNGの1つ以上を排除するAAVカプシドを操作することを含む、rAAV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、「NG」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。

#### 【0037】

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AAV vpコドンを含む核酸配列が生成され得、アスパラギン-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、修飾アスパラギンコドンを含む核酸配列は、アスパラギン-グリシン対のうちの1～3個が操作され得、その結果、修飾コドンはアスパラギ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、改变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、修飾AAV r h . 9 1 の核酸配列は、天然AAV r h . 9 1 カプシドよりも低い脱アミド化を含むカプシドを有する変異体rAAVを生成するために使用され得る。かかる変異rAAV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。

#### 【0038】

本明細書には、低減された脱アミド化を有するAAVカプシドをコードする核酸配列も提供される。DNA(ゲノムまたはcDNA)、またはRNA(例えば、mRNA)を含む、このAAV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、DNA 2.0(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2015/012924号に記載され、参照によりその全体が本明細書に援用される。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、製品のオープンソースフレーム(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産生することができる。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、長さが各々80～90ヌクレオチド、および所望の配列の長さにま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、アニーリングの際に、付着末端を含む80～90塩基対の二本鎖断片が形成されるように合成され、例えば、対の各オリゴヌクレオチドは、対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、それらと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塩基対の断片の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。

## 【0039】

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。

## 【0040】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」および「標的組織」という用語は、対象となるAAVベクターによって形質導入されることが意図される任意の細胞または組織を指し得る。この用語は、筋肉、肝臓、肺、気道上皮、中枢神経系、ニューロン、眼(視覚細胞)、または心臓のうちのいずれか1つ以上を指し得る。一実施形態では、標的組織は、肝臓である。別の実施形態では、標的組織は、心臓である。別の実施形態では、標的組織は、脳である。別の実施形態では、標的組織は、筋肉である。

## 【0041】

本明細書で使用される場合、「哺乳類対象」または「対象」という用語は、本明細書に記載の治療方法または予防を必要とする任意の哺乳類を含み、特にヒトを含む。かかる治療または予防を必要とする他の哺乳動物としては、非ヒト靈長類を含む、イヌ、ネコ、または他の家畜化動物、ウマ、家畜、実験動物などが挙げられる。対象は、雄または雌であってもよい。

## 【0042】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、プラスミドからrAAVが產生されるパッケージング細胞株を指し得る。代替的に、「宿主細胞」という用語は、導入遺伝子の発現が所望される標的細胞を指し得る。

## 【0043】

## A. AAVカプシド

配列番号2に示されるvp1配列を有する新規のAAVカプシドタンパク質が、本明細書に提供される。AAVカプシドは、3つのオーバーラップするコード配列からなり、これらは、代替的な開始コドン使用により長さが変化する。これらの可変タンパク質は、VP1、VP2、およびVP3として参照され、VP1は最長であり、VP3は最短である

10

20

30

40

50

。 A A V 粒子は、約 1 : 1 : 1 0 ( V P 1 : V P 2 : V P 3 ) の比率で、 3 つすべてのカプシドタンパク質からなる。 N 末端の V P 1 および V P 2 に含まれる V P 3 は、粒子を構築する主要な構造成分である。カプシドタンパク質は、いくつかの異なる番号付けシステムを使用して参照され得る。便宜上、本明細書で使用される場合、 A A V 配列は、 V P 1 の最初の残基の a a 1 で始まる V P 1 の番号付けを使用して参照される。しかしながら、本明細書に記載のカプシドタンパク質には、 V P 1 、 V P 2 、および V P 3 ( 本明細書で v p 1 、 v p 2 、および v p 3 と互換的に使用される ) が含まれる。カプシドの可変タンパク質の番号付けは、以下のとおりである。

#### ヌクレオチド ( n t )

A A V r h . 9 1 : v p 1 - 配列番号 1 の n t 1 ~ 2 2 0 8 、 v p 2 - n t 4 1 2 ~ 2  
2 0 8 、 v p 3 - n t 6 0 7 ~ 2 2 0 8  
A A V r h . 9 1 e n g : v p 1 - 配列番号 3 の n t 1 ~ 2 2 0 8 、 v p 2 - n t 4 1  
2 ~ 2 2 0 8 、 v p 3 - n t 6 0 7 ~ 2 2 0 8

#### 【 0 0 4 4 】

図 3 A ~ 図 3 D に、本明細書に記載のカプシドの核酸配列の整列を示す。

#### アミノ酸 ( a a )

A A V r h . 9 1 および A A V r h . 9 1 e n g : v p 1 - 配列番号 2 の a a 1 ~ 7 3  
6 、 v p 2 - a a 1 3 8 ~ 7 3 6 、 v p 3 - a a 2 0 3 ~ 7 3 6 。

#### 【 0 0 4 5 】

図 4 A および図 4 B に、本明細書に記載のカプシドのアミノ酸配列の整列を示す。

#### 【 0 0 4 6 】

A A V r h . 9 1 ( 配列番号 2 ) の v p 1 、 v p 2 、および v p 3 のうちの少なくとも 1 つ含む r A A V が、本明細書に含まれる。また、 A A V r h . 9 1 ( 配列番号 1 ) または A A V r h . 9 1 e n g ( 配列番号 3 ) の v p 1 、 v p 2 、および v p 3 のうちの少なくとも 1 つによってコードされる A A V カプシドを含む r A A V も、本明細書に提供される。

#### 【 0 0 4 7 】

一実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) の混合集団を含む組成物であって、該 r A A V の各々が、 ( a ) v p 1 タンパク質、 v p 2 タンパク質、および v p 3 タンパク質から構成される約 6 0 個のカプシドタンパク質を含む A A V カプシドであって、 v p 1 、 v p 2 、および v p 3 タンパク質が、選択される A A V v p 1 アミノ酸配列をコードする核酸配列から產生される v p 1 タンパク質の異種集団、選択される A A V v p 2 アミノ酸配列をコードする核酸配列から產生される v p 2 タンパク質の異種集団、選択される A A V v p 3 アミノ酸配列をコードする核酸配列から產生される v p 3 タンパク質の異種集団であり、 v p 1 、 v p 2 、および v p 3 タンパク質が、 A A V 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、任意選択的に、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、 A A V カプシドと、 ( b ) A A V 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 逆位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、組成物が提供される。

#### 【 0 0 4 8 】

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をさらに含む。

#### 【 0 0 4 9 】

特定の実施形態では、新規の単離された A A V r h . 9 1 カプシドが提供される。 A A

10

20

30

40

50

V r h . 9 1 カプシド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。A A V r h . 9 1 (配列番号 2) の v p 1、v p 2、および v p 3 のうちの少なくとも 1 つを含む r A A V が、本明細書に提供される。また、A A V r h . 9 1 (配列番号 1) の v p 1、v p 2、および v p 3 のうちの少なくとも 1 つによってコードされる A A V カプシドを含む r A A V も、本明細書に提供される。A A V r h . 9 1 のアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号 3 に提供され、コードされるアミノ酸配列は、配列番号 2 に提供される。また、A A V r h . 9 1 e n g (配列番号 3) の v p 1、v p 2、および v p 3 のうちの少なくとも 1 つによってコードされる A A V カプシドを含む r A A V も、本明細書に提供される。特定の実施形態では、v p 1、v p 2、および / または v p 3 は、A A V r h . 9 1 (配列番号 2) の完全長カプシドタンパク質である。他の実施形態では、v p 1、v p 2、および / または v p 3 は、N 末端および / または C 末端の切断 (例えば、約 1 ~ 約 10 個のアミノ酸の切断) を有する。

#### 【 0 0 5 0 】

さらなる態様では、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) が提供され、(A) A A V r h . 9 1 カプシドであって、(1) 配列番号 2 の 1 ~ 7 3 6 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產生される v p 1 タンパク質、配列番号 1 から產生される v p 1 タンパク質、もしくは配列番号 2 の 1 ~ 7 3 6 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產生される v p 1 タンパク質から選択される A A V r h . 9 1 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 6 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產生される v p 2 タンパク質、配列番号 1 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 0 8 を含む配列から產生される v p 2 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 1 3 8 ~ 7 3 6 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 4 1 2 ~ 2 2 0 8 と少なくとも 70 % 同一の核酸配列から產生される v p 2 タンパク質から選択される A A V r h . 9 1 v p 2 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 2 0 3 ~ 7 3 6 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產生される 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 0 7 ~ 2 2 0 8 を含む配列から產生される v p 3 タンパク質、もしくは配列番号 1 の少なくとも約アミノ酸 2 0 3 ~ 7 3 6 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 0 7 ~ 2 2 0 8 と少なくとも 70 % 同一の核酸配列から產生される v p 3 タンパク質から選択される A A V r h . 9 1 v p 3 タンパク質の異種集団、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 6 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 3 ~ 7 3 6 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、を含み、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 - グリシン対中に少なくとも 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、任意選択的に、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、A A V r h . 9 1 カプシドタンパク質のうちの 1 つ以上を含む、A A V r h . 9 1 カプシドと、(B) A A V r h . 9 1 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 逆位末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞における産物の発現を指示する配列と作動可能に連結された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。

#### 【 0 0 5 1 】

さらなる態様では、組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) が提供され、(A) A A V r h . 9 1 カプシドであって、(1) 配列番号 2 の 1 ~ 7 3 6 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產生される v p 1 タンパク質、配列番号 3 から產生される v p 1 タンパク質、もしくは配列番号 2 の 1 ~ 7 3 6 の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号 3 と少なくとも 70 % 同一の核酸配列から產生される v p 1 タンパ

10

20

30

40

50

ク質から選択される A A V r h . 9 1 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 6 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 2 タンパク質、配列番号 3 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 0 8 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 2 の少なくとも約アミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 6 の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号 3 の少なくともヌクレオチド 4 1 2 ~ 2 2 0 8 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 r h . 9 1 v p 2 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 2 0 3 ~ 7 3 6 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 タンパク質、配列番号 3 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 0 8 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 3 ~ 7 3 6 の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号 3 の少なくともヌクレオチド 6 0 7 ~ 2 2 0 8 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 . 9 1 v p 3 タンパク質の異種集団、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 6 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 3 ~ 7 3 6 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、を含み、 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 - グリシン対中に少なくとも 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、任意選択的に、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、 A A V r h . 9 1 カプシドタンパク質のうちの 1 つ以上を含む、 A A V r h . 9 1 カプシドと、 ( B ) A A V r h . 9 1 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 逆位末端反復配列を含む核酸分子、および宿主細胞における産物の発現を指示する配列と作動可能に連結された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。

#### 【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、 A A V r h . 9 1 の v p 1 、 v p 2 、および v p 3 タンパク質は、配列番号 2 のアスパラギン - グリシン対中に少なくとも 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、任意選択的に、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。配列番号 2 の数と比較して、 N - G 対の N 5 7 、 N 3 8 3 、および / または N 5 1 2 で、高いレベルの脱アミド化が観察される。以下の表および図 1 5 B に示されるように、脱アミド化は、他の残基において観察されている。特定の実施形態では、 A A V r h . 9 1 は、脱アミド化された他の残基を有し得（例えば、典型的には 1 0 % 未満）、かつ / またはリン酸化（例えば、存在する場合、約 2 ~ 約 3 0 % 、もしくは約 2 ~ 約 2 0 % 、もしくは約 2 ~ 約 1 0 % の範囲で）（例えば、 S 1 4 9 で）、または酸化（例えば、 ~ W 2 2 、 ~ M 2 1 1 、 W 2 4 7 、 M 4 0 3 、 M 4 3 5 、 M 4 7 1 、 W 4 7 8 、 W 5 0 3 、 ~ M 5 3 7 、 ~ M 5 4 1 、 ~ M 5 5 9 、 ~ M 5 9 9 、 M 6 3 5 、および / もしくは W 6 9 5 のうちの 1 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。

10

20

30

40

50

## 【表2】

表-AAVrh.91脱アミド化

VP1番号付けに基づく AAVrh.91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	2~15 または 2~5
N303+脱アミド化	2~15 または 5~10
N383+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
N497+脱アミド化	2~15 または 5~10
N512+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N691+脱アミド化	2~15、2~10、または5~10

## 【0053】

特定の実施形態では、AAVrh.91カプシドは、上記の表で特定される1つ以上の位置、提供される範囲で修飾されており、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。特定の実施形態では、1つ以上の位置、またはNに続くグリシンは、本明細書に記載されるように修飾されている。残基番号は、本明細書に提供されるAAVrh.9配列に基づく。配列番号2を参照されたい。

## 【0054】

特定の実施形態では、AAVrh.91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138~736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2の少なくともアミノ酸203~736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。

## 【0055】

特定の実施形態では、AAVrh.91 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、AAVrh.91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カプシドの产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%~99.9%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%、もしくは少なくとも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nt2208と、少なくとも70%~99.9%、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%、もしくは少なくとも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aa138~736)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nt607~約nt2208の核酸配列、または配列番号1のnt607~約nt2208と少なくとも70%~99.9%、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%、もしくは少なくとも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aa203~736)をコードする。

## 【0056】

特定の実施形態では、AAVrh.91 vp1カプシドタンパク質をコードする核酸

10

20

30

40

50

配列は、配列番号3に提供される。他の実施形態では、配列番号3と70%～99.9%同一の核酸配列を選択して、AAVrh.91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3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カプシドの產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3の核酸配列、または配列番号3と少なくとも70%～99.9%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%、もしくは少なくとも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3の核酸配列、または配列番号3の約nt412～約nt2208と、少なくとも70%～99.9%、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%、もしくは少なくとも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aa138～736)をコードする。特定の実施形態では、核酸配列は、配列番号3の約nt607～約nt2208と少なくとも70%～99.9%、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%、もしくは少なくとも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aa203～736)をコードする。

#### 【0057】

本発明はまた、AAVrh.91カプシド配列(配列番号2)、または変異体AAVrh.91をコードする核酸配列を包含し、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、変異体AAVrh.91カプシドの产生において使用することができる。

#### 【0058】

特定の実施形態では、配列番号1の配列、または本明細書に記載される修飾(例えば、脱アミド化アミノ酸)を有する配列番号2のvp1アミノ酸配列コードする配列番号1と少なくとも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%同一の配列を有する核酸分子が本明細書に提供される。特定の実施形態では、配列番号3の配列、または本明細書に記載される修飾(例えば、脱アミド化アミノ酸)を有する配列番号2のvp1アミノ酸配列コードする配列番号3と少なくとも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%同一の配列を有する核酸分子が本明細書に提供される。特定の実施形態では、vp1アミノ酸配列は、配列番号2に再現される。特定の実施形態では、本明細書に記載の核酸配列を有するプラスミドが提供される。

#### 【0059】

「実質的相同性」または「実質的類似性」という用語は、核酸またはその断片に言及する場合、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を伴って別の核酸(またはその相補鎖)と最適に整列した場合、整列した配列の少なくとも約95～99%においてヌクレオチド配列の同一性がある。好ましくは、相同性は、全長配列、またはそのオープンリーディングフレーム、または少なくとも15ヌクレオチド長である別の好適な断片にわたる。好適な断片の例は、本明細書に記載されている。

#### 【0060】

核酸配列の文脈における「パーセント(%)同一性」、「配列同一性」、「パーセント配列同一性」、または「パーセント同一性」という用語は、対応するように整列させたときに同じである2つの配列中の残基を指す。配列同一性の比較の長さは、ゲノムの全長、遺伝子コード配列の全長、または、望ましくは、少なくとも約500～5000個のヌクレオチドの断片にわたり得る。しかしながら、例えば、少なくとも約9個のヌクレオチド、通常は少なくとも約20～24個のヌクレオチド、少なくとも約28～32個のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、少なくとも約36個以上のヌクレオチドの、より小さい断片間の同一性も望まれ得る。

#### 【0061】

パーセント同一性は、タンパク質の全長、ポリペプチド、約32個のアミノ酸、約330個のアミノ酸、もしくはそのペプチド断片にわたるアミノ酸配列、または配列をコードする対応する核酸配列について容易に決定することができる。好適なアミノ酸フラグメントは、長さが少なくとも約8個のアミノ酸であり得、最大で約700個であり得る。一般に、2つの異なる配列間の「同一性」、「相同性」、または「類似性」を言及する場合、「同一性」、「相同性」、または「類似性」は、「整列された」配列を参照して決定される。「整列された」配列または「整列」とは、複数の核酸配列またはタンパク質（アミノ酸）配列を指し、参照配列と比較して、多くの場合、欠損もしくは追加の塩基またはアミノ酸についての補正を含む。10

#### 【0062】

同一性は、配列の整列を作成することによって、および当該技術分野で既知の、または市販されている様々なアルゴリズムおよび／もしくはコンピュータプログラムを使用することによって〔例えば、BLAST、EXPASy、ClustalO、FASTA、例えば、Needleman-Wunschアルゴリズム、Smith-Watermanアルゴリズムを使用して〕、決定することができる。整列は、公的または商業的に利用可能な様々な多重配列整列プログラムのいずれかを使用して行われる。アミノ酸配列の場合、配列整列プログラム、例えば、「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、および「Match-Box」プログラムが利用可能である。一般に、これらのプログラムのいずれかがデフォルト設定で使用されるが、必要に応じて、当業者は、これらの設定を変更することができる。あるいは、当業者は、参照のアルゴリズムおよびプログラムによって提供されるものと少なくとも同じレベルの同一性または整列を提供する、別のアルゴリズムまたはコンピュータプログラムを利用することができる。例えば、J.D.Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999) を参照されたい。20

#### 【0063】

多重配列整列プログラムもまた、核酸配列に対して利用可能である。かかるプログラムの例としては、インターネット上のウェブサーバを通してアクセス可能な「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「BLAST」、「MAP」、および「MEME」が挙げられる。かかるプログラムの他のソースは、当業者に既知である。あるいは、Vector NTIユーティリティもまた使用される。また、当該技術分野で既知のいくつかのアルゴリズムが存在し、上に記載のプログラムに含まれるものと含め、ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる。別の例として、ポリヌクレオチド配列は、GCGバージョン6.1のプログラムであるFastA（商標）を用いて比較することができる。FastA（商標）は、照会配列（query sequence）および検索配列（search sequence）の間の最良の重複領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、GCGバージョン6.1（参照により本明細書に援用される）に提供されるように、FastA（商標）をそのデフォルトパラメータ（ワードサイズ6およびスコアリングマトリックスのためのNOPAM因子）とともに使用して決定することができる。30

#### 【0064】

##### B. rAAVベクターおよび組成物

別の態様では、異種遺伝子または他の核酸配列の標的細胞への送達に有用なウイルスベクターを产生するために、本明細書に記載のAAVカプシド配列（その断片を含む）を利用する分子が、本明細書に提供される。一実施形態では、本明細書に記載の組成物および

10

20

30

40

40

50

方法に有用なベクターは、少なくとも、本明細書に記載される AAV カプシド（例えば、AAV r h . 91 カプシド）、またはその断片をコードする配列を含む。別の実施形態では、有用なベクターは、少なくとも、AAV 血清型 rep タンパク質、またはその断片をコードする配列を含む。任意選択的に、かかるベクターは、AAV の cap タンパク質および rep タンパク質の両方を含み得る。AAV の rep および cap の両方が提供されるベクターでは、AAV の rep 配列および AAV の cap 配列は、いずれも起源が 1 つの血清型（例えば、すべて AAV r h . 91 起源）であり得る。あるいは、rep 配列が、cap 配列を提供する野生型 AAV とは異なる AAV 由来であるベクターを使用してもよい。一実施形態では、rep 配列および cap 配列は、別個の供給源（例えば、別個のベクター、または宿主細胞およびベクター）から発現される。別の実施形態では、これらの rep 配列を、異なる AAV 血清型の cap 配列とインフレームで融合して、米国特許第 7,282,199 号（参照により本明細書に援用される）に記載されている AAV 2 / 8 などのキメラ AAV ベクターを形成する。任意選択的に、ベクターは、AAV 5' ITR および AAV 3' ITR に隣接する選択された導入遺伝子を含むミニ遺伝子をさらに含む。別の実施形態では、AAV は、自己相補的な AAV (sc-AAV) である。US 2012/0141422 を参照されたい（参照により本明細書に援用される）。自己相補的ベクターは、DNA 合成または複数のベクターゲノム間の塩基対合を必要とせずに、dsDNA に折り畳むことができる逆位反復ゲノムをパッケージングする。scAAV は、発現前に一本鎖 DNA (ssDNA) ゲノムを二本鎖 DNA (dsDNA) に変換する必要がないため、それらはより効率的なベクターである。しかしながら、この効率のトレードオフは、ベクターのコード容量が半分失われることから、scAAV は、小さなタンパク質のコード遺伝子（最大約 55 kDa）に対して有用であり、現在 RNA ベースの療法に利用可能である。

#### 【0065】

1 つの AAV のカプシドが異種カプシドタンパク質に置き換えられている擬似型ベクターは、本発明に有用である。例示的な目的で、本明細書に記載される AAV r h . 91 カプシドを利用する AAV ベクターは、AAV 2 の ITR とともに、以下に記載の実施例で使用される。上で引用された Mu ssolino et al. を参照されたい。別途指定されない限り、AAV ITR、および本明細書に記載の他の選択された AAV 成分は、任意の AAV 血清型の中から個別に選択され得、限定されないが、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、または他の既知もしくは未知の AAV 血清型を含む。望ましい一実施形態では、AAV 血清型 2 の ITR が使用される。しかし、他の好適な血清型由来の ITR が選択されてもよい。これらの ITR または他の AAV 成分は、当業者に利用可能な技術を使用して、AAV 血清型から容易に単離され得る。かかる AAV は、学術的、商業的、または公的資源（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, VA）から単離または取得することができる。あるいは、AAV 配列は、文献またはデータベース（例えば、GenBank、PubMed など）で利用可能であるような公開された配列を参照することによって、合成または他の好適な手段を通して取得され得る。

#### 【0066】

本明細書に記載の rAAV はまた、ベクターゲノムを含む。ベクターゲノムは、少なくとも、以下に記載される非 AAV または異種の核酸配列（導入遺伝子）、およびその調節配列、ならびに 5' および 3' AAV 逆位末端反復（ITR）から構成される。カプシドタンパク質にパッケージングされ、選択された標的細胞に送達されるものが、このミニ遺伝子である。

#### 【0067】

導入遺伝子は、目的のポリペプチド、タンパク質、または他の産物をコードする導入遺伝子に隣接するベクター配列に対して異種の核酸配列である。核酸コード配列は、標的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、調節成分に作動可能に連結される。異種核酸配列（導入遺伝子）は、任意の生物に由来し得る。AAV

10

20

30

40

50

は、1つ以上の導入遺伝子を含み得る。

**【 0 0 6 8 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書に提供され、エリスロポエチン（EPO）をコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコのEPO遺伝子をコードする。かかる組換えベクターは、例えば、循環赤血球の量の減少を特徴とする対象における慢性腎疾患および他の状態を治療するためのレジメンでの使用に好適である。

**【 0 0 6 9 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書に提供され、抗神経成長因子（NGF）抗体をコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコの抗NGF抗体をコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象における変形性関節症疼痛を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

10

**【 0 0 7 0 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書に提供され、抗神経成長因子（NGF）抗体をコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコの抗NGF抗体をコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象における変形性関節症疼痛を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

**【 0 0 7 1 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書で提供され、グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）をコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコのGLP-1をコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象におけるI型糖尿病を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

20

**【 0 0 7 2 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書で提供され、グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）をコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコのGLP-1をコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象におけるI型糖尿病を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

30

**【 0 0 7 3 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書に提供され、インスリンをコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコのインスリンをコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象におけるI型糖尿病またはII型糖尿病を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

**【 0 0 7 4 】**

特定の実施形態では、rAAVrh.91ベクターが本明細書に提供され、例えば、抗体および受容体-IgG融合タンパク質を含む、IgE、IL-32、またはIL-4/IL-13受容体のインターロイキン-4受容体（IL-4R）サブユニットのアンタゴニストをコードする配列を含む導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子は、イヌまたはネコのIgE、IL-32、またはIL-4Rサブユニットのアンタゴニストをコードする。かかる組換えベクターは、例えば、対象におけるアトピー性皮膚炎を治療するためのレジメンで使用するのに好適である。

40

**【 0 0 7 5 】**

導入遺伝子配列の組成は、得られたベクターが用いられる使用に依存する。例えば、あるタイプの導入遺伝子配列は、発現時に検出可能なシグナルを生成するレポーター配列を含む。かかるレポーター配列には、限定されないが、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、増強GFP（EGFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラー

50

ゼ( C A T )、ルシフェラーゼ、膜結合タンパク質( 例えば、C D 2、C D 4、C D 8 を含む)、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質、および当該技術分野で周知の他のもの( それらを対象とする高親和性抗体が存在するか、または従来の手段によって產生され得るもの)、ならびに融合タンパク質( 中でも、ヘマグルチニンまたはM y c 由来の抗原タグドメインに適切に融合された膜結合タンパク質を含む)をコードするD N A 配列が含まれる。

#### 【 0 0 7 6 】

これらのコード配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントに関連する場合、酵素、放射線、比色、蛍光または他の分光学的アッセイ、蛍光活性化細胞選別アッセイ、ならびに免疫学的アッセイ( 酵素結合免疫吸着アッセイ( E L I S A )、ラジオイムノアッセイ( R I A )、および免疫組織化学を含む)を含む従来の手段によって検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列がL a c Z 遺伝子である場合、シグナルを有するベクターの存在は、- ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイによって検出される。導入遺伝子が緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、シグナルを有するベクターは、ルミノメーターで色または光生成によって視覚的に測定することができる。

#### 【 0 0 7 7 】

しかしながら、導入遺伝子は、タンパク質、ペプチド、R N A 、酵素、ドミナントネガティブ変異体、または触媒R N A などの、生物学および医学において有用な産物をコードする非マーカー配列であることが望ましい。望ましいR N A 分子は、t R N A 、d s R N A 、リボソームR N A 、触媒R N A 、s i R N A 、低分子ヘアピンR N A 、トランススプライシングR N A 、およびアンチセンスR N A を含む。有用なR N A 配列の一例は、処置される動物において標的の核酸配列の発現を阻害または失わせる配列である。典型的には、好適な標的配列には、腫瘍標的およびウイルス性疾患が含まれる。そのような標的の例については、免疫原に関連するセクションで後述する腫瘍標的およびウイルスを参照されたい。

#### 【 0 0 7 8 】

導入遺伝子は、遺伝子欠損を修正または改善するために使用され得る。遺伝子欠損は、正常な遺伝子が正常レベルよりも低く発現する欠損、または機能的な遺伝子産物が発現しない欠損を含み得る。代替的に、導入遺伝子は、細胞型または宿主で天然に発現されない生成物を細胞に提供し得る。好ましいタイプの導入遺伝子配列は、宿主細胞で発現される治療用タンパク質またはポリペプチドをコードする。本発明は、複数の導入遺伝子を使用することをさらに含む。ある状況では、異なる導入遺伝子は、タンパク質の各サブユニットをコードするために、または異なるペプチドもしくはタンパク質をコードするために使用することができる。これは、タンパク質サブユニットをコードするD N A のサイズが大きい場合( 例えば、免疫グロブリン、血小板由来成長因子、またはジストロフィンタンパク質)に望ましい。細胞がマルチサブユニットタンパク質を生成するために、異なるサブユニットの各々を含む組換えウイルスを細胞に感染させる。あるいは、タンパク質の異なるサブユニットは、同じ導入遺伝子によってコードされていてもよい。この場合、単一の導入遺伝子は、各サブユニットのD N A が内部リボザイム進入部位( I R E S )によって分離された、各サブユニットをコードするD N A を含む。これは、サブユニットの各々をコードするD N A のサイズが小さい場合( 例えば、サブユニットをコードするD N A およびI R E S の総サイズが5キロベース未満)に望ましい。I R E S の代替として、翻訳後事象において自己切断する2 A ペプチドをコードする配列によってD N A が分離されてもよい。例えば、M . L . D o n n e l l y , et al , J . G e n . V i r o l . , 7 8 ( P t 1 ) : 1 3 - 2 1 ( J a n 1 9 9 7 ) 、 F u r l e r , S . , et al , G e n e T h e r . , 8 ( 1 1 ) : 8 6 4 - 8 7 3 ( J u n e 2 0 0 1 ) 、 K l u m p H . , et al . , G e n e T h e r . , 8 ( 1 0 ) : 8 1 1 - 8 1 7 ( M a y 2 0 0 1 ) を参照されたい。この2 A ペプチドは、I R E S よりも著しく小さく、スペースが制限因子である場合の使用に非常に好適である。より多くの場合、導入遺伝子が大きい場合、マルチサブユニットからなる場合、または2つの導入遺伝子が同時送達される場

10

20

30

40

50

合、所望の導入遺伝子またはサブユニットを有する r A A V を同時投与することで、インビオでそれらをコンカテマー化して、単一のベクターゲノムを形成することが可能になる。そのような実施形態では、宿主細胞での同時発現のために、第 1 の A A V は、単一の導入遺伝子を発現する発現力セットを有し得、第 2 の A A V は、異なる導入遺伝子を発現する発現力セットを有し得る。しかし、選択される導入遺伝子は、任意の生物学的に活性な産物または他の産物（例えば、研究に望ましい産物）をコードすることができる。

#### 【 0 0 7 9 】

好適な導入遺伝子または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、囊胞性線維症、および希少疾患またはみなし疾患（orphan disease）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、中でも、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）、脊髄小脳失調症関連 ATXN2 2 型（SCA2）/ALS；ALS 関連 TDP-43、プログラニュリン（PRGN）（前頭側頭型認知症（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型脳変性に関連する）が挙げられ得る。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。

10

#### 【 0 0 8 0 】

導入遺伝子によってコードされる有用な治療用産物には、ホルモンならびに増殖因子および分化因子が含まれ、限定されないが、インスリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）、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（G-CSF）、エリスロポエチン（EPO）、結合組織増殖因子（CTGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、上皮増殖因子（EGF）、形質転換増殖因子（TGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、インスリン増殖因子 I および II（IGF-I および IGF-II）、形質転換増殖因子 スーパーファミリーのうちのいずれか 1 つ（TGF、アクチビン、インヒビン）、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）ファミリーのいずれか 1 つ、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューロトロphin（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）、ニュールツリン、アグリシン、セマフォリン／コラプシンのファミリーのうちのいずれか 1 つ、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、チロシンヒドロキシラーゼが挙げられる。

20

#### 【 0 0 8 1 】

他の有用な導入遺伝子産物としては、免疫系を制御するタンパク質が含まれ、限定されないが、トロンボポエチン（TPO）、インターロイキン（IL）、IL-1～IL-25（例えば、IL-2、IL-4、IL-12、および IL-18）、単球走化性タンパク質、白血病抑制因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、Fas リガンド、腫瘍壞死因子 および 、インターフェロン 、 、および 、幹細胞因子、f1k-2/f1t3 リガンドなどのサイトカインおよびリノホカインが挙げられる。免疫系によって產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、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。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

30

40

50

質（MCP）、崩壊促進因子（DAF）、CR1、CF2、およびCD59などの補体調節タンパク質も含まれる。

#### 【0082】

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、コレステロール調節のための受容体を包含し、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。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。

10

#### 【0083】

他の有用な遺伝子産物としては、カルバモイルシンテターゼI、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノコハク酸シンテターゼ、アルギノコハク酸リアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセト酢酸ヒドロゲナーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、-1アンチトリプシン、グルコース-6-ホスファターゼ、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、第VII因子、第IX因子、シスタチオンシンターゼ、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、-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、囊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配列、またはそれらの機能的断片が挙げられる。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療法に利用され得る（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）。別の例では、遺伝子産物は、ユビキチンタンパク質リガーゼE3A（UBE3A）である。さらに有用な遺伝子産物としては、UDPGルクロノシリトランスフェラーゼファミリー1メンバーA1（UGT1A1）が挙げられる。

20

#### 【0084】

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。

30

#### 【0085】

遺伝子の発現の低減および/または調節は、癌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產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などの癌遺伝子、ならびに転座遺伝子bcr/abl、ras、src、P53、neu、trk、およびEGFRによってコードされるポリペプチドが含まれる。標的抗原としての癌遺伝子産物に加えて、抗癌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

40

50

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。

#### 【 0 0 8 6 】

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、細胞の受容体および「自己」指向性の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して広範な防御免疫応答を付与することにより、自己免疫性の疾患および障害に罹患してい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 (R A)、多発性硬化症 (M S)、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 (I D D M)、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 (T C R) を特徴とする。

10

#### 【 0 0 8 7 】

さらに他の有用な遺伝子産物としては、血友病 B ( 第 I X 因子を含む ) および血友病 A ( 第 V I I I 因子およびそのバリエント、例えばヘテロ二量体および B - 欠失ドメインの軽鎖ならびに重鎖を含む ; 米国特許第 6 , 2 0 0 , 5 6 0 号および米国特許第 6 , 2 2 1 , 3 4 9 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 I 因子重鎖の最初の 5 7 塩基対、ならびにヒト成長ホルモン ( h G H ) 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、A 1 および A 2 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 8 5 個のアミノ酸、ならびに A 3 、 C 1 、および C 2 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 1 4 個のアミノ酸をコードする 4 2 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 , 2 0 0 , 5 6 0 号 ] 。

20

#### 【 0 0 8 8 】

r A A V を介して送達され得るさらなる例示的な遺伝子にとしては、限定されないが、グリコーゲン蓄積症または 1 A 型欠乏症 ( G S D 1 ) に関連するグルコース - 6 - ホスファターゼ、P E P C K 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 ( P E P C K ) 、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 ( S T K 9 ) としても知られるサイクリン依存性キナーゼ様 5 ( C D K L 5 ) 、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 ( P K U ) に関連するフェニルアラニンヒドロキシラーゼ ( P A H ) 、ヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 ( G O / H A O 1 ) および A G X T を含む原発性高シュウ酸尿症 1 型に関連する遺伝子産物、メープルシロップ尿症に関連する分枝鎖 - - ケト酸デヒドロゲナーゼ ( B C K D H 、 B C K D H - E 2 、 B A K D H - E 1 a 、および B A K D H - E 1 b を含む ) 、チロシン血症 1 型に関連するフマリルアセト酢酸ヒドロゲナーゼ、メチルマロン酸血症に関連するメチルマロニル C o A ムターゼ、中鎖アセチル C o A 欠乏症に関連する中鎖アシル C o A デヒドロゲナーゼ、オルニチントランスクカルバミラーゼ欠損症に関連するオルニチントランスクカルバミラーゼ ( 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 - コレスチロールアシルトランスクフェラーゼ ( L C A T ) 欠損症、アメチルマロン酸血症 ( M M A ) 、ニーマン・ピック病 ( C 1 型 ) に関連する N P C 1 、プロピオニアカデミア ( P A ) 、トランスサイレチン ( T T R ) 関連遺伝性アミロイドーシスに関連する T T R 、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、W O 2 0 1 5 / 1 6 4 7 7 8 に記載の L D L R バリアント、P C S K 9 、認知症に関連する A p o E および A p o C 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クフェラーゼ、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・ナイ

30

40

50

アン症候群に関するヒポキサンチングアニンホスホリボシリトランスフェラーゼ、ビオチミダーゼ欠損症に関するビオチミダーゼ、ファブリー病に関する - ガラクトシダーゼ A ( a - G a 1 A ) ) 、 GM 1 ガングリオシドーシスに関する - ガラクトシダーゼ ( G L B 1 ) 、ウィルソン病に関する A T P 7 B 、ゴーチェ病 2 型および 3 型に関する - グルコセレブロシダーゼ、ツェルウェーガー症候群に関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するアリールスルファターゼ A ( A R S A ) 、クラッベ病に関するガラクトセレブロシダーゼ ( G A L C ) 酵素、ポンペ病に関する - グルコシダーゼ ( G A A ) 、ニーマン・ピック病 A 型に関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 ) に関するアルギニノコハク酸シンターゼ、尿素サイクル障害に関するカルバモイ 10 ルリン酸シンターゼ 1 ( C P S 1 ) 、脊髄性筋萎縮症に関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するセラミダーゼ、GM 2 ガングリオシドーシスおよびティサックス病およびサンドホフ病に関する - ヘキソサミニダーゼ、アスパルチル - グルコサミン尿症に関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する - フコシダーゼ、 - マンノシドーシスに関する - マンノシダーゼ、急性間欠性ポルフィリン症 ( A I P ) に関するポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、 - 1 アンチトリプシン欠損症 ( 気腫 ) の治療のための - 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の経路の阻害剤、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アドレナリン受容体、ホスホランバンに対するアンチセ 20 ンスまたはその変異体、筋小胞体 ( 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、様々な癌の治療のための p 5 3 などの腫瘍抑制遺伝子、炎症性障害および免疫障害および癌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ユートロフィン、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 が挙げられる。

## 【 0 0 8 9 】

代替的に、または追加的に、本発明のベクターは、本発明の A A V 配列および選択された免疫原に対する免疫応答を誘導するペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする導入遺伝子を含み得る。例えば、免疫原が、様々なウイルスファミリーから選択され得る。免疫応答が望まれる望ましいウイルスファミリーの例としては、ピコルナウイルスファミリーが挙げられ、感冒の症例の約 5 0 % を担うライノウイルス属、ポリポリオウイルスオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、および A 型肝炎ウイルスなどのヒトエンテロウイルスを含むエンテロウイルス属、ならびに主に非ヒト動物における口蹄疫を担うアフトウイルス属が含まれる。ウイルスのピコルナウイルスファミリー内で、標的抗原は、 V P 1 、 V P 2 、 V P 3 、 V P 4 、および V P G を含む。別のウイルスファミリーとしては、カルシウイルスファミリーが挙げられ、流行性胃腸炎の重要な原因病原体であるノーウォークウイルス群を包含する。ヒトおよび非ヒト動物における免疫応答を誘導するための標的化抗原で使用するための望ましいさらに別のウイルスファミリーは、トガウイルスファミリーであり、シンドビスウイルス、ロスリバーウイルス、およびベネズエラ、東部、および西部ウマ脳炎ウイルス、ならびに風疹ウイルスを含むルビウイルスを含むアルファウイルス属を含む。フラビウイルス科には、デング熱、黄熱病、日本脳炎、セントルイス脳炎およびダニ媒介性脳炎ウイルスが含まれる。他の標的抗原は、 C 型肝炎ウイルスまたはコロナウイルスのファミリーから生成され得、それらは、伝染性気管支炎ウイルス ( 家禽 ) 、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス ( ブタ ) 、ブタ血球凝集性脳脊髄炎ウイルス ( ブタ ) 、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス ( ネコ ) 、ネコ腸コロナウイルス ( ネコ ) 、イヌコロナウイルス ( イヌ ) 、およびヒト呼吸器コロナウイルスなどのいくつかの非ヒトウ 30 40

10

20

30

40

50

イルスを含み、これらは、感冒および／または非 A 型、B 型、または C 型肝炎を引き起こし得る。コロナウイルスファミリー内の標的抗原としては、E 1 (M またはマトリックスタンパク質とも呼ばれる)、E 2 (S またはスパイクタンパク質とも呼ばれる)、E 3 (HE またはヘマグルチン - エルテロースとも呼ばれる) 糖タンパク質(すべてのコロナウイルスに存在しない)、または N (ヌクレオカプシド) が挙げられる。さらに他の抗原は、ラブドウイルスファミリーを標的にしてもよく、これには、ベシクロウイルス属(例えば、小胞性口内炎ウイルス)、および一般的なリッサウイルス(例えば、狂犬病ウイルス)が含まれる。ラブドウイルスファミリー内で、好適な抗原は、G タンパク質または N タンパク質に由来し得る。フィロウイルス科には、マールブルグウイルスおよびエボラウイルスなどの出血熱ウイルスが含まれ、抗原の好適な供給源であり得る。パラミキ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)、牛痘ウイルス、麻疹ウイルス、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を含むニューモウイルスが含まれる。インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルスファミリー内に分類され、抗原(例えば、HA タンパク質、N 1 タンパク質)の好適な供給源である。ブニヤウイルスファミリーには、ブニヤウイルスブニヤウイルス属(カリフォルニア脳炎、ラクロス)、フレボウイルス属(リフトバレー熱)、ハンタウイルス属(ピュレマラはヘマハギン熱ウイルス)、ナイロウイルス属(ナイロビヒツジ病)、および様々な未分類のブンガウイルスが含まれる。アレナウイルスファミリーは、LCM およびラッサ熱ウイルスに対する抗原の供給源を提供する。レオウイルスファミリーには、レオウイルス属、ロタウイルス属(小児に急性胃腸炎を引き起こす)、オルビウイルス、およびカルチウイルス(コロラドダニ熱、レボンボ(ヒト)、ウマ脳症、ブルータング)が含まれる。

#### 【0090】

レトロウイルスファミリーには、ネコ白血病ウイルス、HTLV I および HTLV II 、レンチウイルス(ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス、およびスプマウイルスを含む)などのヒト疾患および獣医疾患を包含するオンコリウイルス亜科が含まれる。HIV と SIV との間には、多くの好適な抗原が記載されており、容易に選択することができる。好適な HIV および SIV の抗原の例としては、限定されないが、gag、pol、Vif、Vpx、VPR、Env、Tat、および Rev のタンパク質、ならびにそれらの様々な断片が挙げられる。さらに、これらの抗原に対する様々な修飾が記載されている。この目的のための好適な抗原は、当業者に既知である。例えば、他のタンパク質のうち、gag、pol、Vif および Vpr、Env、Tat、ならびに Rev をコードする配列を選択してもよい。例えば、米国特許第 5,972,596 号に記載されている修飾 gag タンパク質を参照されたい。また、D. H. Barouch et al., J. Virol., 75(5):2462-2467 (March 2001), and R. R. Amara, et al., Science, 292:69-74 (6 April 2001) に記載されている HIV および SIV タンパク質も参照されたい。これらのタンパク質またはそのサブユニットは、単独で、または別個のベクターを介してもしくは单一のベクターからの組み合わせで送達され得る。

#### 【0091】

パポバウイルスファミリーには、ポリオーマウイルス亜科(BKU および JCU ウィルス)ならびにパピローマウイルス亜科(癌またはパピローマの悪性進行に関連する)が含まれる。アデノウイルスファミリーには、呼吸器疾患および／または腸炎を引き起こすウイルス(例えば、EX、AD7、ARD、O.B.)が含まれる。パルボウイルスファミリーには、ネコパルボウイルス(ネコ腸炎)、ネコパンロイコペニアウイルス、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。ヘルペスウイルスファミリーには、シンプレックスウイルス属(HSV I、HSV II)、バリセロウイルス属(仮性狂犬病

10

20

30

40

50

、水痘帶状疱疹)を含むアルファヘルペスウイルス亜科、およびサイトメガロウイルス属(HCMV、ムロメガロウイルス)を含むベータヘルペスウイルス亜科、ならびにリンホクリプトウイルス属、EBV(バーキットリンパ腫)、感染性鼻氣管炎、マレック病ウイルス、およびラジノウイルスを含むガンマヘルペスウイルス亜科が含まれる。ポックスウイルスファミリーには、オルソポックスウイルス属(痘瘡(天然痘)およびワクシニア(牛痘))、パラポックスウイルス、トリポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルスを包含するコードポックスウイルス亜科、およびエントモポックスウイルス亜科が含まれる。ヘパドナウイルスファミリーには、B型肝炎ウイルスが含まれる。抗原の好適な供給源であり得る1つの非分類ウイルスは、デルタ型肝炎ウイルスである。さらに他のウイルス源には、トリ伝染性ファブリキウス囊病ウイルスおよびブタ生殖器呼吸器症候群ウイルスが含まれる。アルファウイルスファミリーには、ウマ動脈炎ウイルスおよび様々な脳炎ウイルスが含まれる。

#### 【0092】

本発明はまた、ヒトおよび非ヒト脊椎動物に感染する細菌、真菌、寄生微生物、もしくは多細胞性寄生虫を含む他の病原体に対して、または癌細胞もしくは腫瘍細胞から、ヒトまたは非ヒト動物を免疫化するのに有用な免疫原を包含し得る。細菌病原体の例には、病原性グラム陽性球菌、肺炎球菌、ブドウ球菌、および連鎖球菌が含まれる。病原性グラム陰性球菌には、髄膜炎菌、淋菌が含まれる。病原性腸内グラム陰性桿菌には、腸内細菌科(シードモナス、アシネットバクテリア、およびエイケネラを含む)、類鼻疽、サルモネラ、シゲラ、ヘモフィルス、モラクセラ、*H. ducreyi*(軟性下疳を引き起こす)、ブルセラ、*Francisella tularensis*(野兎病を引き起こす)、エルシニア(バツツレラ属)、ストレプトバチルス、モニリフォルミス、およびスピリラムが含まれる。グラム陽性桿菌には、*Listeria monocytogenes*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Corynebacterium diphtheriae*(ジフテリア)、コレラ、炭疽菌(炭疽病)、ドノヴァン症(鼠径肉芽腫)、およびバルトネラ症が含まれる。病原性嫌気性細菌によって引き起こされる疾患としては、破傷風、ボツリヌス症、他のクロストリジウム、結核、ハンセン病、および他のマイコバクテリアが挙げられる。病原性スピロヘータ疾患には、梅毒、トレポネーマ症(いちご腫、ピンタ、および地方病性梅毒)、およびレプトスピラ症が含まれる。高病原性細菌および病原性真菌によって引き起こされる他の感染症としては、放線菌症、ノーカルジオーシス、クリプトコッカス症、プラストミセス症、ヒストプラズマ症、およびコクチジオイデス症、カンジダ症、アスペルギルス症、およびムコール症、スポロトリクム症、パラコクシジオイデス症、ペトリエリジア症、トルロプシス症、マイセトーマ、およびクロモミセス症、ならびに皮膚糸状菌症が挙げられる。リケッチア感染症には、チフス熱、ロッキー山紅斑熱、Q熱、およびリケッチア痘が含まれる。クラミジア属マイコプラズマおよびクラミジア感染症の例としては、マイコプラズマ肺炎、性病性リンパ肉芽腫、オウム病、および周産期クラミジア感染症が挙げられる。病原性真核生物は、病原性原虫および蠕虫、ならびにそれによって生じる感染症を包含し、アメーバ症、マラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、トキソプラズマ症、*Pneumocystis carinii*、トリチャン、*Toxoplasma gondii*、バベシオーシス、バベシア症、ジアルジア症、旋毛虫症、フィラリア症、住血吸虫症、線虫、吸虫またはフルーチ、および条虫(サンダムシ)感染症が挙げられる。

#### 【0093】

これらの生物および/またはそれによって生成された毒素の多くは、疾患管理センター[(CDC)、保健福祉省、米国]によって、生物攻撃で使用される可能性がある病原体として特定されている。例えば、これらの生物学的薬剤病原体の一部には、以下が含まれる:*Bacillus anthracis*(炭疽病)、*Clostridium botulinum*およびその毒素(ボツリヌス症)、*Yersinia pestis*(ペスト菌)、大痘瘡(天然痘)、*Francisella tularensis*(野兎病)、およびウイルス性出血熱は、現在、これらのすべてがカテゴリーA病原体に分類されて

10

20

30

40

50

おり、*Coxiella burnetii*(Q熱)、*Brucella*種(ブルセラ症)、*Burkholderia mallei*(鼻疽)、*Ricinus communis*およびその毒素(リシン毒素)、*Clostridium perfringens*およびその毒素(イブシロン毒素)、*Staphylococcus*菌種およびその毒素(エンテロトキシンB)は、現在、これらのすべてがカテゴリーB病原体に分類されており、ならびにニパンウイルスおよびハンタウイルスは、カテゴリーC病原体に分類されている。さらに、このように分類されるか、または分類が異なる他の生物は、将来的にかかる目的のために特定および/または使用され得る。本明細書に記載のウイルスペクターおよび他の構築物が、これらの生物、ウイルス、それらの毒素、または他の副産物由来の抗原を送達するのに有用であり、これらの生物学的病原体による感染または他の有害反応を予防および/または治療することが容易に理解されるであろう。

#### 【0094】

T細胞の可変領域に対して免疫原を送達するための本発明のベクターの投与は、それらのT細胞を排除するためのCTLを含む免疫応答を誘発する。関節リウマチ(RA)では、疾患に関するT細胞受容体(TCR)のいくつかの特定の可変領域が特徴付けられている。これらのTCRには、V-3、V-14、V-17およびV-17が含まれる。したがって、これらのポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードする核酸配列の送達は、RAに関するT細胞を標的とする免疫応答を誘発するであろう。多発性硬化症(MS)では、疾患に関するTCRのいくつかの特定の可変領域が特徴付けられている。これらのTCRには、V-7およびV-10が含まれる。したがって、これらのポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードする核酸配列の送達は、MSに関するT細胞を標的とする免疫応答を誘発するであろう。強皮症では、疾患に関するTCRのいくつかの特定の可変領域が特徴付けられている。これらのTCRには、V-6、V-8、V-14、ならびにV-16、V-3C、V-7、V-14、V-15、V-16、V-28、およびV-12が含まれる。したがって、これらのポリペプチドのうちの少なくとも1つをコードする核酸分子の送達は、強皮症に関するT細胞を標的とする免疫応答を誘発するであろう。

#### 【0095】

一実施形態では、導入遺伝子は、光遺伝学療法を提供するように選択される。光遺伝学療法では、人工光受容体は、残りの網膜回路における生存細胞型への光活性化チャネルまたはポンプの遺伝子送達によって構築される。これは、かなりの量の光受容体機能を失ってはいるが、神経節細胞および視神経への双極細胞の回路がそのまま残っている患者に特に有用である。一実施形態では、異種核酸配列(導入遺伝子)は、オプシンである。オプシン配列は、ヒト、藻類、および細菌を含む任意の好適な単細胞生物または多細胞生物に由来することができる。一実施形態では、オプシンは、ロドプシン、フォトプシン、L/M波長(赤/緑)-オプシン、または短波長(S)オプシン(青)である。別の実施形態では、オプシンは、チャネルロドプシンまたはハロロドプシンである。

#### 【0096】

別の実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子増強療法で使用するため、すなわち、欠損しているまたは欠陥のある遺伝子の置換コピーを提供するために選択される。この実施形態では、導入遺伝子は、必要な置換遺伝子を提供するために、当業者によって容易に選択され得る。一実施形態では、欠損/欠陥遺伝子は、眼障害に関連する。別の実施形態では、導入遺伝子は、NYX、GRM6、TRPM1L、またはGPR179であり、眼障害は、先天性停止性夜盲症である。例えば、Am J Hum Genet. 2013 Jan 10; 92(1): 67-75を参照されたい。Epub 2012 Dec 13を参照されたい(参照により本明細書に援用される)。別の実施形態では、導入遺伝子は、RPGRである。

#### 【0097】

別の実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子抑制療法における使用のために選択され、すなわち、1つ以上の天然遺伝子の発現が、転写または翻訳のレベルで、中断または抑制さ

10

20

30

40

50

れる。これは、ショートヘアピンRNA(shRNA)または当該技術分野で周知の他の技術を使用して達成することができる。例えば、Sun et al., Int J Cancer. 2010 Feb 1; 126(3): 764-74およびO'Reilly M, et al. Am J Hum Genet. 2007 Jul; 81(1): 127-35を参照されたい(参照により本明細書に援用される)。この実施形態では、導入遺伝子は、サイレンシングされることが望まれる遺伝子に基づいて、当業者によって容易に選択され得る。

#### 【0098】

別の実施形態では、導入遺伝子は、2つ以上の導入遺伝子を含む。これは、2つ以上の異種配列を有する単一のベクターを使用して、または各々が1つ以上の異種配列を有する2つ以上のAAVを使用して達成され得る。一実施形態では、AAVは、遺伝子抑制(またはノックダウン)併用療法および遺伝子増強併用療法に使用される。ノックダウン/増強併用療法では、目的の遺伝子の欠陥コピーがサイレンシングされ、非変異コピーが供給される。一実施形態では、これは、2つ以上の同時投与ベクターを使用して達成される。Millington-Ward et al., Molecular Therapy, April 2011, 19(4): 642-649を参照されたい(参照により本明細書に援用される)。導入遺伝子は、所望の結果に基づいて、当業者によって容易に選択され得る。

10

#### 【0099】

別の実施形態では、導入遺伝子は、遺伝子修正療法での使用のために選択される。これは、例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)誘導DNA二本鎖切断を、外因性DNAドナー基質と併せて使用して達成され得る。例えば、Ellis et al., Gene Therapy (epub January 2012) 20: 35-42を参照されたい(参照により本明細書に援用される)。導入遺伝子は、所望の結果に基づいて、当業者によって容易に選択され得る。

20

#### 【0100】

一実施形態では、本明細書に記載のカプシドは、CRISPR-Casデュアルベクターシステムにおいて有用であり、米国仮特許出願第61/153,470号、第62/183,825号、第62/254,225号、および第62/287,511号に記載されている(その各々は、参照により本明細書に援用される)。カプシドは、ホーミングエンドヌクレアーゼまたは他のメガヌクレアーゼの送達にも有用である。

30

#### 【0101】

別の実施形態では、本明細書で有用な導入遺伝子は、発現時に検出可能なシグナルを生成するレポーター配列を含む。かかるレポーター配列には、限定されないが、-ラクタマーゼ、-ガラクトシダーゼ(LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、膜結合タンパク質(例えば、CD2、CD4、CD8を含む、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質、および当該技術分野で周知の他のもの(それらを対象とする高親和性抗体が存在するか、または従来の手段によって產生され得るもの)、ならびに融合タンパク質(中でも、ヘマグルチニンまたはMyo由來の抗原タグドメインに適切に融合された膜結合タンパク質を含む)をコードするDNA配列が含まれる。

40

#### 【0102】

これらのコード配列は、それらの発現を駆動する調節エレメントに関連する場合、酵素、放射線、比色、蛍光または他の分光学的アッセイ、蛍光活性化細胞選別アッセイ、ならびに免疫学的アッセイ(酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および免疫組織化学を含む)を含む従来の手段によって検出可能なシグナルを提供する。例えば、マーカー配列がLacZ遺伝子である場合、シグナルを有するベクターの存在は、-ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイによって検出される。導入遺伝子が緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、シグナルを有するベク

50

ターは、ルミノメーターで色または光生成によって視覚的に測定することができる。

#### 【0103】

導入遺伝子は、タンパク質、ペプチド、RNA、酵素、または触媒RNAなどの、生物学および医学において有用な産物をコードすることが望ましい。望ましいRNA分子は、shRNA、tRNA、dsRNA、リボソームRNA、触媒RNA、およびアンチセンスRNAを含む。有用なRNA配列の一例は、処置される動物において標的の核酸配列の発現を失わせる配列である。

#### 【0104】

調節配列は、ベクターでトランスクレプトされた、または本明細書に記載されるように産生されたウイルスで感染された細胞でその転写、翻訳、および/または発現を可能にする様式で、導入遺伝子と作動可能に連結される従来の制御エレメントを含む。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」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。

10

#### 【0105】

タンパク質または核酸を参照して使用される場合、「異種」という用語は、タンパク質または核酸が、天然では互いに同じ関係で見出されない2つ以上の配列またはサブ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しない遺伝子からの2つ以上の配列を有する核酸は、典型的に、組換えにより產生される。例えば、一実施形態では、核酸は、1つの遺伝子由来のプロモーターを有し、異なる遺伝子由来のコード配列の発現を指示するように配置される。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。

20

#### 【0106】

発現制御配列は、適切な転写開始、終結、プロモーター、およびエンハンサーの配列、スプライシングおよびポリアデニル化（ポリA）のシグナルなどの効率的なRNAプロセシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、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させる配列、および必要に応じて、コードされた産物の分泌を増強させる配列を含み得る。プロモーターを含む多数の発現制御配列が当該分野で既知であり、利用することができる。

30

#### 【0107】

本明細書に提供される構築物に有用な調節配列はまた、望ましくはプロモーター/エンハンサー配列と遺伝子との間に位置するイントロンを含み得る。1つの所望のイントロン配列は、SV-40に由来し、SD-SAと称される100bpのミニイントロンスプライスドナー/スプライスアクセプターである。別の好適な配列としては、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後エレメントが挙げられる。（例えば、Wang and I. Verm a, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96: 3906-3910を参照されたい）。PolyAシグナルは、限定されないが、SV-40、ヒト、およびウシを含む多くの好適な種に由来し得る。

#### 【0108】

本明細書に記載の方法に有用なrAAVの別の調節成分は、内部リボソーム進入部位(IRES)である。IRES配列、または他の好適なシステムは、単一の遺伝子転写物から2つ以上のポリペプチドを生成するために使用され得る。IRES（または他の好適な配列）を用いて、2つ以上のポリペプチド鎖を含むタンパク質を产生するか、または同じ細胞からまたは同じ細胞内で2つの異なるタンパク質を発現させる。例示的なIRESは、ポリオウイルス内部リボソーム進入配列であり、光受容器、RPE、および神経節細胞における導入遺伝子の発現を支持する。好ましくは、IRESは、rAAVベクター内の導入遺伝子の3'に位置する。

40

#### 【0109】

一実施形態では、発現カセットまたはベクターゲノムは、プロモーター（またはプロモーターの機能的断片）を含む。rAAVに用いられるプロモーターは、所望の標的細胞に

50

おいて選択された導入遺伝子を発現することができる多数の構成的または誘導性プロモーターの中から、選択がなされ得る。一実施形態では、標的細胞は、視覚細胞である。プロモーターは、ヒトを含む任意の種に由来し得る。望ましくは、一実施形態では、プロモーターは、「細胞特異的」である。「細胞特異的」という用語は、組換えベクターについて選択された特定のプロモーターが、特定の細胞組織において選択された導入遺伝子の発現を導くことができることを意味する。一実施形態では、プロモーターは、筋肉細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、肺における発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、肝細胞における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、気道上皮における導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、ニューロンにおける導入遺伝子の発現に特異的である。別の実施形態では、プロモーターは、心臓における導入遺伝子の発現に特異的である。

#### 【0110】

発現力セットは、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' T R 配列と免疫グロブリン構築物のコード配列との間に位置するプロモーター配列を含む。一実施形態では、肝臓における発現が望ましい。したがって、一実施形態では、肝臓特異的プロモーターが使用される。組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、調節可能なプロモーター [ 例えば、WO 2011 / 126808 および WO 2013 / 04943 を参照されたい ] 、または生理学的手がかりに応答するプロモーターが、本明細書に記載のベクターに使用され得る。別の実施形態では、筋肉における発現が望ましい。したがって、一実施形態では、筋肉特異的プロモーターが使用される。一実施形態では、プロモーターは、d M C K ( 509 b p ) または t M C K ( 720 b p ) のプロモーターなどの M C K ベースのプロモーターである。例えば、Wang et al., Gene Ther. 2008 Nov; 15 ( 22 ) : 1489 - 99 . doi : 10.1038/gt.2008.104 . E pub 2008 Jun 19 を参照されたい ( 参照により本明細書に援用される ) 。別の有用なプロモーターは、S P c 5 - 12 プロモーターである。Rasowo et al., European Scientific Journal June 2014 edition vol. 10 , No. 18 を参照されたい ( 参照により本明細書に援用される ) 。一実施形態では、プロモーターは、C M V プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは、T B G プロモーターである。別の実施形態では、C B 7 プロモーターまたは C A G プロモーターが使用される。C B 7 は、サイトメガロウイルスエンハンサー要素を有するニワトリ アクチンプロモーターである。あるいは、他の肝臓特異的プロモーターが使用され得る [ 例えば、肝臓特異的プロモーターデータベース, Cold Spring Harbor : rulai.schule/LSPD 、 1 抗 - トリプシン ( A 1 A T ) 、ヒトアルブミン : Miyatake et al. , J. Virol. , 71 : 5124 - 32 ( 1997 ) 、 humA1b 、および B 型肝炎ウイルスコアプロモーター : Sandig et al. , Gene Ther. , 3 : 1002 - 9 ( 1996 ) を参照されたい ] 。T T R 最小エンハンサー / プロモーター、 - アンチトリプシンプロモーター、 L S P ( 845 nt ) 25 ( イントロンレス s c A A V を必要とする ) 。

#### 【0111】

プロモーターは、異なる供給源、例えば、ヒトサイトメガロウイルス ( C M V ) 最初期エンハンサー / プロモーター、 S V 40 初期エンハンサー / プロモーター、 J C ポリモマウイルスプロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 ( M B P ) または神経膠原線維酸性タンパク質 ( G F A P ) プロモーター、単純ヘルペスウイルス ( H S V - 1 ) 潜伏関連プロモーター ( L A P ) 、ラウス肉腫ウイルス ( R S V ) 長末端反復 ( L T R ) プロモーター、ニューロン特異的プロモーター ( N S E ) 、血小板由来増殖因子 ( P D G F ) プロモーター、 h S Y N 、メラニン凝集ホルモン ( M C H ) プロモーター、 C B A 、マトリックス金属タンパク質プロモーター ( M P P ) 、およびニワトリ アクチンプロモーターから選択され得る。

10

20

30

40

50

## 【0112】

発現カセットは、少なくとも1つのエンハンサー、すなわち、CMVエンハンサーを含んでもよい。さらに他のエンハンサー要素としては、例えば、アポリポタンパク質エンハンサー、ゼブラフィッシュエンハンサー、GFPエンハンサー要素、およびWO 2013/1555222に記載されているような脳特異的エンハンサー、ウッドチャック肝炎転写後調節エレメントが挙げられ得る。追加的に、または代替的に、他の、例えば、ハイブリッドのヒトサイトメガロウイルス(HCMV) - 最初期(IE) - P D G R プロモーターまたは他のプロモーター・エンハンサー要素が選択されてもよい。本明細書で有用な他のエンハンサー配列としては、IRBPエンハンサー(Nicoud 2007, J Gene Med. 2007 Dec; 9(12): 1015-23)、最初期サイトメガロウイルスエンハンサー、免疫グロブリン遺伝子またはSV40エンハンサーに由来するもの、マウス近位プロモーターで同定されたシス作用性エレメントなどが挙げられる。

## 【0113】

プロモーターに加えて、発現カセットおよび/またはベクターは、好適な転写開始配列、終結配列、エンハンサー配列、スプライシングおよびポリアデニル化(ポリア)シグナルなどの効率的なRNAプロセシングシグナル、細胞質mRNAを安定化させる配列、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させる配列、および必要に応じて、コードされた生成物の分泌を増強させる配列を含み得る。様々な好適なポリアが知られている。一例では、ポリアは、127bpのウサギグロビンポリアデニル化シグナル(GenBank #V00882.1)などのウサギグロビンである。他の実施形態では、SV40ポリアシグナルが選択される。さらに他の好適なポリア配列が選択されてもよい。特定の実施形態では、イントロンが含まれる。1つの好適なイントロンは、ニワトリアクチニントロンである。一実施形態では、イントロンは、875bp(GenBank, #X00182.1)である。別の実施形態では、Promegaから入手可能なキメライントロンが使用される。しかしながら、他の好適なイントロンが選択されてもよい。一実施形態では、スペーサーは、ベクターゲノムが天然のAAVベクターゲノムとほぼ同じサイズ(例えば、4.1~5.2kb)であるように含まれる。一実施形態では、スペーサーは、ベクターゲノムが約4.7kbであるように含まれる。Wu et al., Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1): 80-86を参照されたい(参照により本明細書に援用される)。

## 【0114】

これらおよび他の一般的なベクターおよび調節エレメントの選択は従来行われており、多くのそのような配列が利用可能である。例えば、Sambrook et al., and references cited therein at, for example, pages 3.18-3.26 and 16.17-16.27 and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989を参照されたい。もちろん、すべてのベクターおよび発現制御配列が、本明細書に記載されているように、すべての導入遺伝子を発現するように良好に十分に等しく機能するわけではない。しかしながら、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、これらおよび他の発現制御配列の中から選択することができる。

## 【0115】

特定の実施形態では、発現カセットは、m i R - 183の標的配列である少なくとも1つのmRNA標的配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムまたは発現カセットは、(配列番号13)を含むm i R - 183標的配列を含む

AGTGAATTCTACCAGTGCCATA

10

20

30

40

50

(m i R - 1 8 3 シード配列に相補的な配列には、下線が引かれている)。特定の実施形態では、ベクターゲノムまたは発現力セットは、m i R - 1 8 3 シード配列に 1 0 0 % 相補的な配列を、2 コピー以上(例えば、2 または 3 コピー)含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列は、約 7 ヌクレオチド～約 2 8 ヌクレオチド長であり、m i R - 1 8 3 シード配列に少なくとも 1 0 0 % 相補的な少なくとも 1 つの領域を含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列は、配列番号 1 3 に部分的に相補的な配列を含み、したがって、配列番号 1 3 と整列させた場合、1 つ以上のミスマッチがある。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列は、配列番号 1 3 と整列させた場合、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個のミスマッチを有する配列を含み、ミスマッチは非連続であり得る。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列は、1 0 0 % 相補的な領域を含み、また、m i R - 1 8 3 標的配列の長さの少なくとも 3 0 % を含む。特定の実施形態では、1 0 0 % 相補性の領域は、m i R - 1 8 3 シード配列と 1 0 0 % 相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列の残部は、m i R - 1 8 3 と少なくとも約 8 0 % ～約 9 9 % 相補性を有する。特定の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、m i R - 1 8 3 標的配列を含み、切断された配列番号 1 3 (すなわち、配列番号 1 3 の 5' 末端もしくは 3' 末端のいずれかまたは両方で、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個のヌクレオチドを欠く配列) を含む。特定の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、導入遺伝子と、1 つの m i R - 1 8 3 標的配列とを含む。さらに他の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、少なくとも 2 つ、3 つ、または 4 つの m i R - 1 8 3 標的配列を含む。

#### 【0116】

特定の実施形態では、発現力セットは、m i R - 1 8 2 の標的配列である少なくとも 1 つの m i R N A 標的配列を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムまたは発現力セットは、m i R - 1 8 2 標的配列を含み、A G T G T G A G T T C T A C C A T T G C C A A A (配列番号 1 4) を含む。特定の実施形態では、ベクターゲノムまたは発現力セットは、m i R - 1 8 2 シード配列に 1 0 0 % 相補的である配列を、2 コピー以上(例えば、2 または 3 コピー)含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 2 標的配列は、約 7 ヌクレオチド～約 2 8 ヌクレオチド長であり、m i R - 1 8 2 シード配列に少なくとも 1 0 0 % 相補的な少なくとも 1 つの領域を含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 2 標的配列は、配列番号 1 4 に部分的に相補的な配列を含み、したがって、配列番号 1 4 と整列させた場合、1 つ以上のミスマッチがある。特定の実施形態では、m i R - 1 8 3 標的配列は、配列番号 1 4 と整列させた場合、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個のミスマッチを有する配列を含み、ミスマッチは非連続であり得る。特定の実施形態では、m i R - 1 8 2 標的配列は、1 0 0 % 相補的な領域を含み、また、m i R - 1 8 2 標的配列の長さの少なくとも 3 0 % を含む。特定の実施形態では、1 0 0 % 相補性の領域は、m i R - 1 8 2 シード配列と 1 0 0 % 相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、m i R - 1 8 2 標的配列の残部は、m i R - 1 8 2 と少なくとも約 8 0 % ～約 9 9 % 相補性を有する。特定の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、m i R - 1 8 2 標的配列を含み、切断された配列番号 1 4 (すなわち、配列番号 1 4 の 5' 末端もしくは 3' 末端のいずれかまたは両方で、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個のヌクレオチドを欠く配列) を含む。特定の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、導入遺伝子と、1 つの m i R - 1 8 2 標的配列とを含む。さらに他の実施形態では、発現力セットまたはベクターゲノムは、少なくとも 2 つ、3 つ、または 4 つの m i R - 1 8 2 標的配列を含む。

#### 【0117】

「タンデムリピート」という用語は、2 つ以上の連続する m i R N A 標的配列の存在を指すように本明細書で使用される。これらの m i R N A 標的配列は、連続的であってよい。すなわち、ある配列の 3' 末端が、介在配列なしで、次の配列の 5' 末端の直ぐ上流にあるように、またはその逆でもよく、次々と直に位置している。別の実施形態では、m i R N A 標的配列のうちの 2 つ以上が、短いスペーサー配列によって分離されている。

10

20

30

40

50

## 【0118】

本明細書で使用される場合、「スペーサー」としては、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長の任意の選択された核酸配列であり、2つ以上の連続するmRNA標的配列の間に位置する。特定の実施形態では、スペーサーは、1～8ヌクレオチド長、2～7ヌクレオチド長、3～6ヌクレオチド長、4ヌクレオチド長、4～9ヌクレオチド、3～7ヌクレオチド、またはより長い値である。好適には、スペーサーは、非コード配列である。特定の実施形態では、スペーサーは、4つの(4)ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、スペーサーは、GGATである。特定の実施形態では、スペーサーは、6つの(6)ヌクレオチドである。特定の実施形態では、スペーサーは、CAGTGまたはGCATGCである。

10

## 【0119】

特定の実施形態では、タンデムリピートは、2つ、3つ、4つ以上の同じmRNA標的配列を含む。特定の実施形態では、タンデムリピートは、少なくとも2つの異なるmRNA標的配列、少なくとも3つの異なるmRNA標的配列、または少なくとも4つの異なるmRNA標的配列などを含む。特定の実施形態では、タンデムリピートは、2つまたは3つの同じmRNA標的配列、および異なる第4のmRNA標的配列を含んでもよい。

## 【0120】

特定の実施形態では、発現力セットには、少なくとも2つの異なるセットのタンデムリピートが存在し得る。例えば、3'UTRは、導入遺伝子、UTR配列のすぐ下流にタンデムリピート、およびUTRの3'末端の近くに2つ以上のタンデムリピートを含み得る。別の例では、5'UTRは、1つ、2つ以上のmRNA標的配列を含み得る。別の例では、3'は、タンデムリピートを含んでもよく、5'UTRは、少なくとも1つのmRNA標的配列を含んでもよい。

20

## 【0121】

特定の実施形態では、発現力セットは、2つ、3つ、4つ以上のタンデムリピートを含み、導入遺伝子の終止コドンの約0～20ヌクレオチド以内に開始する。他の実施形態では、発現力セットは、導入遺伝子の終止コドンから少なくとも100～約4000ヌクレオチドのmRNAタンデムリピートを含む。

## 【0122】

2018年12月21日に出願された米国仮特許出願第62/783,956号（参照により本明細書に援用される）に対する優先権を主張する、2019年12月20日に出願されたPCT/US19/67872号を参照されたい。

30

## 【0123】

別の実施形態では、組換えアデノ随伴ウイルスを生成する方法が提供される。好適な組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）は、宿主細胞を培養することによって生成され、宿主細胞は、本明細書に記載されるAAVカプシドタンパク質をコードする核酸配列、またはその断片、機能的rep遺伝子、最低限AAV逆位末端反復（ITR）および所望の導入遺伝子をコードする異種核酸配列からなるミニ遺伝子、ならびにミニ遺伝子をAAVカプシドタンパク質にパッケージングするのを可能にする十分なヘルパー機能を含む。AAVミニ遺伝子をAAVカプシドにパッケージングするために宿主細胞中で培養される必要がある成分は、トランスで宿主細胞に提供され得る。代替的に、必要な成分（例えば、ミニ遺伝子、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能）のうちの任意の1つ以上は、当業者に既知の方法を使用して、必要な成分のうちの1つ以上を含有するように操作された安定な宿主細胞によって提供され得る。カプシド、コーディング配列を生成する方法、したがって、およびrAAVウイルスベクターを产生する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US2013/0045186A1を参照されたい（参照により本明細書に援用される）。

40

## 【0124】

50

また、本明細書に記載される r A A V で形質導入された宿主細胞も、本明細書に提供される。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下で必要な成分を含むであろう。しかしながら、必要な成分は、構成的プロモーターの制御下にあり得る。好適な誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターの例は、導入遺伝子との使用に好適な調節エレメントの以下の考察において、本明細書に提供される。さらに別の代替として、選択された安定な宿主細胞は、構成的プロモーターの制御下にある選択された成分と、1つ以上の誘導性プロモーターの制御下にある他の選択された成分とを含み得る。例えば、293細胞（構成的プロモーターの制御下にある E 1 ヘルパー機能を含む）に由来するが、誘導性プロモーターの制御下にある r e p および / または c a p タンパク質を含む、安定な宿主細胞が生成され得る。さらに他の安定な宿主細胞は、当業者によって生成され得る。別の実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載される核酸分子を含む。特定の実施形態では、記載される新規のベクターは、既知のカブシドと比較して、改善された産生（すなわち、より高い収率）を有する。例えば、A A V r h . 91 ベクターの産生は、A A V 1 および A A V 6 と比較して、改善された収率を示した。

#### 【 0 1 2 5 】

本明細書に記載の r A A V の産生に必要なミニ遺伝子、r e p 配列、c a p 配列、およびヘルパー機能は、それに担持される配列を導入する任意の遺伝要素の形態で、パッケージング宿主細胞に送達され得る。選択される遺伝要素は、任意の好適な方法によって送達され得、本明細書に記載の方法を含む。本発明の任意の実施形態を構築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、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY を参照されたい。同様に、r A A V ピリオンを生成する方法は周知であり、好適な方法の選択は、本発明を限定するものではない。例えば、特に、K. Fisher et al., 1993 J. Virol., 70: 520 - 532 および米国特許第 5,478,745 号を参照されたい。これらの刊行物は、参照により本明細書に援用される。本明細書に記載のベクターの産生に使用するためのプラスミドもまた、本明細書に提供される。

#### 【 0 1 2 6 】

#### C. 医薬組成物および投与

一実施形態では、上で詳述した標的細胞で使用するための所望の導入遺伝子およびプロモーターを含む組換え A A V は、任意選択的に、従来の方法によって汚染について評価され、次いで、医薬組成物に製剤化され、それを必要とする対象への投与が意図される。かかる製剤は、薬学的および / または生理学的に許容されるビヒクリルまたは担体（適切な生理学的レベルで pH を維持するための、緩衝生理食塩水または他の緩衝液（例えば、H E P E S）など）、および任意選択的に、他の薬剤（medicinal agents）、薬剤（pharmaceutical agents）、安定化剤、緩衝液、担体、アジュバント、希釈剤などを含む。注射の場合、担体は、典型的には液体である。例示的な生理学的に許容される担体としては、発熱物質不含の滅菌水および発熱物質不含の滅菌リン酸緩衝生理食塩水が挙げられる。かかる様々な既知の担体は、米国特許公開第 7,629,322 号に提供されている（参照により本明細書に援用される）。一実施形態では、担体は等張塩化ナトリウム溶液である。別の実施形態では、担体は、平衡塩類溶液である。一実施形態では、担体は、T w e e n を含む。ウイルスを長期保存する場合は、グリセロールまたは T w e e n 20 の存在下で凍結してもよい。別の実施形態では、薬学的に許容される担体は、パーフルオロオクタン（P e r f l u o r o n 液）などの界面活性剤を含む。ベクターは、ヒト対象における注入に好適な緩衝液 / 担体中に製剤化される。緩衝液 / 担体は、r A A V が注入チューブに付着するのを防ぐが、インビボで r A A V 結合活性を妨げない成分を含むべきである。

#### 【 0 1 2 7 】

本明細書に記載の方法の特定の実施形態では、上に記載の医薬組成物は、対象に筋肉内

10

20

30

40

50

( I M ) 投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、静脈内 ( I V ) 投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、脳室内 ( I C V ) 注入によって投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、大槽内 ( I C M ) 注入によって投与される。本明細書に記載の方法に有用であり得る他の形態の投与には、これらに限定されないが、網膜下または硝子体内送達を含む所望の臓器 ( 例えは、眼 ) への直接送達、経口、吸入、鼻腔内、気管内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、および他の親の投与経路が含まれる。投与経路は、所望される場合、組み合わされてもよい。

#### 【 0 1 2 8 】

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、より詳細には、脳脊髄液 ( C S F ) へ到達するようにクモ膜下腔空間内への注入を介した、投与経路を指す。髄腔内送達は、腰椎穿刺、脳室内 ( 側脳室内 ( I C V ) を含む ) 、後頭下 / 槽内、および / または C 1 - 2 穿刺を含み得る。例えは、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。

10

#### 【 0 1 2 9 】

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、大槽小脳延髓 ( c i s t e r n a m a g n a c e r e b e l l o m e d u l l a r i s ) の脳脊髄液内への直接的な投与経路、より詳細には、後頭下穿刺を介した、または大槽内への直接的な注入による、または永久的に配置されたチューブを介した、投与経路を指す。

#### 【 0 1 3 0 】

組成物は、治療される領域のサイズ、使用されるウイルス力価、投与経路、および本方法の所望の効果に応じて、範囲内のすべての数値を含めて、約 0 . 1  $\mu$  L ~ 約 1 0 m L の容量で送達され得る。一実施形態では、容量は、約 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 7 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 2 5  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 7 5  $\mu$  L である。さらに別の実施形態では、容量は、約 2 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 2 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 3 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 4 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 5 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 6 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 7 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 8 5 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 0 0  $\mu$  L である。別の実施形態では、容量は、約 1 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 2 m L である。別の実施形態では、容量は、約 2 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 3 m L である。別の実施形態では、容量は、約 3 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 4 m L である。別の実施形態では、容量は、約 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 6 m L である。別の実施形態では、容量は、約 6 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 7 m L である。別の実施形態では、容量は、約 8 m L である。別の実施形態では、容量は、約 8 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 9 m L である。別の実施形態では、容量は、約 9 . 5 m L である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 m L である。

20

#### 【 0 1 3 1 】

調節配列の制御下にある所望の導入遺伝子をコードする核酸配列を有する組換えアデノ随伴ウイルスの有効濃度は、望ましくは、1ミリリットル当たり約 1 0 <sup>7</sup> ~ 1 0 <sup>14</sup> 個のベクターゲノム ( v g / m L ) ( ゲノムコピー / m L ( G C / m L ) とも呼ばれる ) の範囲である。一実施形態では、r A A V ベクターゲノムは、リアルタイム P C R によって測定される。別の実施形態では、r A A V ベクターゲノムは、デジタル P C R によって測定される。L o c k e t a l , A b s o l u t e d e t e r m i n a t i o n o f s i n g l e - s t r a n d e d a n d s e l f - c o m p l e m e n t a r y a d e n o - a s s o c i a t e d v i r a l v e c t o r g e n o m e t i t e r s b y d r o p l e t d i g i t a l P C R , H u m G e n e T h e r

30

40

50

Methods. 2014 Apr; 25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14を参照されたい（参照により本明細書に援用される）。別の実施形態では、rAAV感染性単位は、S.K. McLaughlin et al., 1988 J. Virol., 62: 1963に記載されているように測定される（参照により本明細書に援用される）。

#### 【0132】

好ましくは、濃度は、約 $1.5 \times 10^9$  vg / mL ~ 約 $1.5 \times 10^{13}$  vg / mL であり、より好ましくは、約 $1.5 \times 10^9$  vg / mL ~ 約 $1.5 \times 10^{11}$  vg / mL である。一実施形態では、有効濃度は、約 $1.4 \times 10^8$  vg / mL である。一実施形態では、有効濃度は、約 $3.5 \times 10^{10}$  vg / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 $5.6 \times 10^{11}$  vg / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 $5.3 \times 10^{12}$  vg / mL である。さらに別の実施形態では、有効濃度は、約 $1.5 \times 10^{12}$  vg / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 $1.5 \times 10^{13}$  vg / mL である。本明細書に記載のすべての範囲は、エンドポイントを含む。10

#### 【0133】

一実施形態では、投用量は、約 $1.5 \times 10^9$  vg / kg の体重 ~ 約 $1.5 \times 10^{13}$  vg / kg であり、より好ましくは、約 $1.5 \times 10^9$  vg / kg ~ 約 $1.5 \times 10^{11}$  vg / kg である。一実施形態では、投与量は、約 $1.4 \times 10^8$  vg / kg である。一実施形態では、投与量は、約 $3.5 \times 10^{10}$  vg / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 $5.6 \times 10^{11}$  vg / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 $5.3 \times 10^{12}$  vg / kg である。さらに別の実施形態では、投与量は、約 $1.5 \times 10^{12}$  vg / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 $1.5 \times 10^{13}$  vg / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 $1.0 \times 10^{14}$  vg / kg である。本明細書に記載のすべての範囲は、エンドポイントを含む。20

#### 【0134】

一実施形態では、有効投与量（送達される総ゲノムコピー）は、約 $10^7$  ~  $10^{13}$  ベクターゲノムである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^8$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^9$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{10}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{11}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{12}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{13}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{14}$  ゲノムコピーである。一実施形態では、総投与量は、約 $10^{15}$  ゲノムコピーである。30

#### 【0135】

毒性などの望ましくない効果のリスクを低減するために、ウイルスの最低有効濃度を利用することが望ましい。さらに、これらの範囲の他の投与量および投与容量は、治療される対象（好ましくは、ヒト）の身体状態、対象の年齢、特定の障害、および進行性の場合、発症した障害の程度を考慮して、主治医によって選択され得る。例えば、静脈内送達は、 $1.5 \times 10^{13}$  vg / kg の程度の用量を必要とし得る。

#### 【0136】

##### D. 方法

別の態様では、標的の組織または細胞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AAVrh.91カプシドを有するrAAVを投与することを含む。以下の実施例に示されるように、本発明者らは、AAVrh.91と称されるAAVが、心臓（平滑筋）、CNS細胞、および骨格（横紋）筋を効果的に形質導入することを示している。特定の実施形態では、本方法は、AAVrh.91ベクターの全身投与を含む。特定の実施形態では、AAVrh.91ベクターは、特定の細胞型または組織型を標的とするのに好適な投与経路を介して送達される。

#### 【0137】

特定の実施形態では、AAVrh.91カプシドを有するrAAVを投与することを含40

10

20

30

40

50

む、CNSの細胞（例えば、ニューロン、内皮細胞、グリア細胞、および上衣細胞のうちの1つ以上）を形質導入する方法が、本明細書に提供される。一実施形態では、静脈内投与が用いられる。別の実施形態では、ICV投与が用いられる。さらに別の実施形態では、ICM投与が用いられる。特定の実施形態では、これらに限定されないが、脊髄、海馬、運動皮質、小脳、および運動ニューロンのいずれかを含む、導入遺伝子をCNSの細胞に送達する方法が、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.91カプシドを有するrAAVと接触させることを含み、当該rAAVは、導入遺伝子を含む。別の態様では、導入遺伝子を心臓に送達するための、AAVrh.91カプシドを有するrAAVの使用が提供される。

#### 【0138】

10

本明細書で考察されるように、本明細書に記載のAAVカプシドを含むベクターは、心臓組織を高レベルで形質導入することができる。導入遺伝子を心臓細胞に送達する方法が、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.91カプシドを有するrAAVと接触させることを含み、当該rAAVは、導入遺伝子を含む。別の態様では、導入遺伝子を心臓に送達するための、AAVrh.91カプシドを有するrAAVの使用が提供される。特定の実施形態では、導入遺伝子を心臓の細胞に送達する方法は、AAVrh.91カプシドを有するrAVVの全身送達（例えば、IV投与）を含む。

#### 【0139】

特定の実施形態では、AAVrh.91カプシドを有するrAAVを投与することを含む、骨格筋を形質導入する方法が、本明細書に提供される。特定の実施形態では、本方法は、AAVrh.91カプシドを骨格（横紋）筋に送達することを含む。特定の実施形態では、導入遺伝子を骨格筋に送達する方法が提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.91カプシドを有するrAAVと接触させることを含み、当該rAAVは、導入遺伝子を含む。特定の実施形態では、導入遺伝子骨格筋の送達方法は、AAVrh.91カプシドを有するrAVVの全身送達（例えば、IV投与）を含む。

20

#### 【0140】

##### 単一ゲノム増幅

AAVゲノムは、従来、PCRベースの方法を使用して哺乳類ゲノムDNA全体の中から単離してきた。プライマーは、多様なVP1（カプシド）遺伝子の大部分に隣接する保存領域を検出するために使用される。次いで、PCR産物をプラスミド骨格にクローニングし、個々のクローンを、Sanger法を使用して配列決定する。従来のPCRおよび分子クローニングに基づくウイルス単離方法は、新規のAAVゲノムを回収するのに有効ではあるが、回収されるゲノムが、PCR媒介性の組換えおよびポリメラーゼエラーの影響を受ける可能性がある。さらに、現在利用可能な次世代配列決定技術により、以前に使用されたサンガー技術と比較して、他に類を見ない正確さでウイルスゲノムを配列決定することが可能になった。個々のAAVゲノムをウイルス集団内から正確に単離する新規であり高スループットのPCRおよび次世代配列決定に基づく方法が、本明細書に提供される。本方法、AAV-单一ゲノム増幅（AAV-SGA）は、哺乳類宿主内のAAV多様性に関する我々の知識を向上させるために使用することができる。さらに、それは、遺伝子療法のためのベクターとして使用するための新規のカプシドを同定することを可能にした。

30

#### 【0141】

40

AAV-SGAは、ゲノムの集団を含む試料から個々のAAV配列を効果的に回収するように検証および最適化されている。この技術は、ヒトおよび非ヒト霊長類の宿主内から单一のHIVおよびHCVゲノムを単離するために以前に使用されている。カプシド検出PCRによってAAV陽性をスクリーニングするゲノムDNA試料は、エンドポイント希釈される。PCR増幅が、80%の信頼性を有するポアソン分布によれば、30%未満の陽性反応をもたらす希釈は、单一の増幅可能なAAVゲノムを含む。この手順は、ポリメラーゼの鋳型を切り替えることによって引き起こされるPCR媒介性組換えの可能性が低減されたウイルスゲノムのPCR増幅を可能にする。AAV-SGAのPCRアンプリコ

50

ンは、 $2 \times 150$  または  $2 \times 250$  ペアエンド配列決定を使用して、 Illumina MiSeq プラットフォームを使用して配列決定される。この方法は、高い相同意の領域を有する複数のウイルスを含む単一の試料由来の配列決定リードの収束を憂慮することなく、完全長 AAV VP1 配列の正確なデノボアセンブリを可能にする。

#### 【0142】

AAV - SGA 技術により、アカゲザル組織から複数の新規 AAV カプシド配列を単離することに成功している。単一の試料から、AAV の異なるクレード由来の複数のウイルスが同定されており、これは、AAV の集団が宿主組織に存在し得ることを示す。例えば、クレード D、E、および離れた「フリンジ」ウイルスと配列類似性を有するカプシドは、単一の肝臓組織試料から単離された。

10

#### 【0143】

AAV を発見するための SGA の応用は、以前に記載されていない。このアプローチは、無効な AAV ゲノム配列をもたらす可能性のある鋳型の切り替えおよびポリメラーゼエラーの問題に対処する。さらに、単一の分離株と同じ宿主試料から同じ配列を繰り返し回収すると、単離されたゲノムの質は自明である。

#### 【0144】

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を例示するために提供される。本実施例は、本発明をいかなる方法でも限定することを意図するものではない。

#### 【0145】

##### E. 実施例

20

###### 実施例 1：材料および方法：

###### AAV 配列の検出および単離

###### 非ヒト霊長類組織源

ペンシルベニア大学のコロニーのアカゲザルは飼育下で繁殖され、中国またはインド起源であった。アカゲザルの肝臓組織試料は、遺伝子療法プログラムおよびペンシルベニア大学の Timothy H. Lucas の研究室から好意的に提供された。

#### 【0146】

###### 新規 AAV の単離

ゲノム DNA を抽出し (QIAamp DNA ミニキット、QIAGEN)、PCR 戦略を使用して、NHP 肝臓組織試料から  $3.1\text{kb}$  の全長 Cap 断片を増幅することによって、AAV DNA の存在について分析した。AAV Rep 遺伝子の保存領域内の 5' プライマー (AV1NS、5' - GCTGCGTCAC TGGACCAATGAGAAC - 3') (配列番号 9) を、AAV Cap 遺伝子の下流の保存領域内に位置する 3' プライマー (AV2CAS、5' - CGCAGAGACCAAGTTCAACTGAAACGA - 3') (配列番号 10) と組み合わせて、全長 AAV Cap アンプリコンの増幅に使用した。Q5 High - Fidelity Hot Start DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs) を使用して、以下のサイクル条件を使用して AAV DNA を増幅した：98 度 30 秒間；98 度 10 秒間、59 度 10 秒間、72 度 93 秒間を 50 サイクル；および 72 度 120 秒間の伸長。

30

#### 【0147】

陽性の PCR 反応をもたらした鋳型ゲノム DNA 試料を、AAV - 単一ゲノム増幅 (AAV - SGA) に供した。ゲノム DNA を 96 ウェルプレート中でエンドポイント希釈し、上に記載の同じプライマーを使用して、96 回のうち 29 回未満の PCR 反応が増幅産物を生じるようにした。ポアソン分布によれば、ウェルの 30 % 以下で PCR 産物が得られる DNA 希釈は、その時の 80 % 超の陽性 PCR 当たり 1 つの増幅可能な AAV DNA 鋳型を含む。陽性の PCR 反応からの AAV DNA アンプリコンを、Illumina MiSeq  $2 \times 150$  または  $2 \times 250$  ペアエンド配列決定プラットフォームを使用して配列決定し、得られたリードを、SPADEs アセンブラー (cab.spbu.ru/software/spades) を使用してデノボアセンブリを行った。NCBI BLASTn (blast.ncbi.nlm.nih.gov) および Vector

40

50

N T I A l i g n X ソフトウェア ( T h e r m o F i s h e r ) を使用して配列解析を行った。

#### 【 0 1 4 8 】

新規 A A V カプシドを使用したベクター產生

目的の P C R 産物からの A A V カプシド遺伝子の D N A 配列を、 T O P O クローニングし、増幅した ( I n v i t r o g e n ) 。増幅されたカプシド遺伝子を、 A A V 2 R e p 遺伝子および他の関連するプラスミドエレメントを含む A A V トランスプラスミド骨格にさらにクローニングした。

#### 【 0 1 4 9 】

A A V ベクターを生成し、以前に記載されているように、 P e n n V e c t o r C o r e によって滴定した ( 例えば、 L o c k , M . , et al . ( 2 0 1 0 ) H u m . G e n e T h e r . 2 1 : 1 2 5 9 - 7 1 を参照されたい ) 。 H E K 2 9 3 細胞を三重でトランスフェクトし、細胞培養上清を回収し、濃縮し、イオジキサノール勾配で精製した。精製したベクターを、以前に記載されているように、ウサギ グロビンポリ A 配列を標的とするプライマーを使用して、デジタルドロップレット P C R で滴定した ( 例えば、 L o c k , M . , et al . ( 2 0 1 4 ) H u m . G e n e T h e r . M e t h o d s 2 5 : 1 1 5 - 1 2 5 を参照されたい ) 。

#### 【 0 1 5 0 】

げっ歯類における新規の A A V カプシドのインビボ特徴付け

動物

すべての動物プロトコルは、 t h e I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e and Use Committee of the University of Pennsylvania により認可された。 C 5 6 B L / 6 J マウスは、 J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入した。 G F P レポーター遺伝子実験の場合、成体 ( 6 ~ 8 週齢 ) のオスに注射した。動物を、 1 ケージ当たり 2 ~ 5 匹で、標準的なケージに収容した。バリア施設のケージ、給水瓶、および床敷は、オートクレーブ処理し、ケージは、週に 1 回交換した。自動制御で、 1 2 時間の明暗サイクルを維持した。各暗期は午後 7 時 ( ± 3 0 分 ) に開始した。放射線照射された実験用げっ歯類の餌は、自由摂食で提供された。

#### 【 0 1 5 1 】

被験試料および研究設計

マウスは、マウス 1 匹当たり  $1 \times 1 0 ^ { 1 2 }$  G C の各ベクターを 0 . 1 m L 、外側尾静脈を介して静脈内 ( I V ) 投与されたか、またはマウス 1 匹当たり  $1 \times 1 0 ^ { 1 1 }$  G C の用量で 5 u L 、側脳室に脳室内 ( I C V ) 注入された。各群について、 3 匹または 5 匹のマウスが投薬された。

#### 【 0 1 5 2 】

注入 1 4 日後、 C O <sub>2</sub> の吸入により、マウスを安楽死させた。組織を採取し、生体分布分析のためにドライアイス上でスナップ凍結したか、または 1 0 % 中性ホルマリン中で浸漬固定し、スクロース中で凍結保存し、 O C T 中で凍結し、 G F P 直接観察のためにクライオスタッフで切片化した。剖検後、内皮細胞の形質導入の分析に使用される組織をパラフィン包埋した。

#### 【 0 1 5 3 】

ベクター生体分布

Q I A a m p D N A ミニキット ( Q I A G E N ) で組織ゲノム D N A を抽出し、 A A V ベクターゲノムを、 T a q m a n 試薬 ( A p p l i e d B i o s y s t e m s , L i f e T e c h n o l o g i e s ) とともにベクターの E G F P 配列を標的とするプライマー / プローブを使用して、リアルタイム P C R によって定量化した。

#### 【 0 1 5 4 】

レポーター遺伝子の可視化

直接 G F P 蛍光を観察するために、組織試料を、ホルマリン中で約 2 4 時間固定し、 P

10

20

30

40

50

B S 中で短時間洗浄し、P B S 中の 1 5 % および 3 0 % のスクロースで最大密度に達するまで順次平衡化し、次いで、凍結切片の調製のために、O C T 包埋媒体中で凍結した。核の対比染色としてのD A P I を含むF luoromount G ( E lectron Mi croscopy S ciences, Hatfield, PA ) 中で、切片を載せた。

#### 【 0 1 5 5 】

パラフィン包埋組織試料に対して、G F P 免疫組織化学を実施した。切片を、エタノールおよびキシレンで脱パラフィン化し、抗原賦活化のために 1 0 m M のクエン酸緩衝液 ( p H 6 . 0 ) 中で 6 分間煮沸し、順次、2 % のH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> で 1 5 分間、アビジン / ビオチンプロッキング試薬 ( V ector L aborator i es ) で各々 1 5 分間、およびプロッキング緩衝液 ( P B S 中の 1 % のロバ血清 + 0 . 2 % のT riton ) で 1 0 分間処理した。続いて、一次抗体と 1 時間、プロッキング緩衝液中のビオチン化二次抗体と 4 5 分間インキュベーションした ( J ackson Immuno r esear ch ) 。一次抗体のニワトリ抗G F P ( A bcam ab13970 ) および内皮細胞マーカーのウサギ抗C D 3 1 ( A bcam ab28364 ) を使用した。V ectastain E lite A B C キット ( V ector L aborator i es ) を使用して、製造元の指示に従って、D A B を基質として用いて、結合した抗体を褐色沈殿物として可視化した。

#### 【 0 1 5 6 】

免疫蛍光の場合、パラフィン切片を脱パラフィン化し、抗原賦活化後、P B S 中の 1 % のロバ血清 + 0 . 2 % のT riton で 1 5 分間プロッキングし、続いて、プロッキング緩衝液中で希釈された一次抗体 ( 1 時間 ) および蛍光標識二次抗体 ( 4 5 分間、J ackson Immuno r esear ch ) を用いて、順次インキュベーションした。使用した抗体は、ニワトリ抗G F P ( A bcam ab13970 ) 、ウサギ抗C D 3 1 ( A bcam ab28364 ) 、およびマウス抗N F - 2 0 0 ( クローンR T 9 7 , M il lipore C BL 2 1 2 ) であった。一次抗体と一緒に混合し、G F P 抗体およびN F - 2 0 0 抗体を、それぞれF I T C 標識およびT R I T C 標識の二次抗体により検出した。C D 3 1 に対するウサギ抗体のシグナルを、V ectaFluor ( 商標 ) E x c e 1 A m pl i f i e d D y L i g h t ( 登録商標 ) 4 8 8 抗 - ウサギI g G キットを使用して、製造元のプロトコルに従って ( V ector L abs ) 増強した。蛍光および明視野の顕微鏡画像は、N ikon E clipse T i E 顕微鏡を用いて撮影した。

#### 【 0 1 5 7 】

バーコード化ベクター導入遺伝子の非ヒト靈長類導入の評価

被験試料および研究設計

5 つの新規カプシドおよび 5 つの対照カプシド ( A A V r h 9 0 、 A A V r h 9 1 、 A A V r h 9 2 、 A A V r h 9 3 、 A A V r h 9 1 . 9 3 、 A A V 8 、 A A V 6 . 2 、 A A V r h 3 2 . 3 3 、 A A V 7 、 および A A V 9 ) を使用して、修飾A T G 枯渇自己相補e G F P ( d G F P ) 導入遺伝子をパッケージングした。各固有のカプシド調製物は、ベクターゲノムのポリアデニル化配列の前に、対応する固有の 6 b p バーコードを有するd G F P 導入遺伝子を含んだ。導入遺伝子は、C B 8 プロモーターおよびS V 4 0 ポリアデニル化配列 ( A A V s c . C B 8 . d G F P . Bar code . S V 4 0 ) を含んだ。A A V ベクターを生成し、以前に記載されているように、Penn V ector Coreによって滴定した ( 例えば、L ock , M . , et al . ( 2 0 1 0 ) H um . G ene Ther . 2 1 : 1 2 5 9 - 7 1 を参照されたい ) 。H E K 2 9 3 細胞を三重でトランسفェクトし、細胞培養上清を回収し、濃縮し、イオジキサノール勾配で精製した。精製したベクターを、以前に記載されているように、S V 4 0 ポリA 配列を標的とするプライマーを使用して、デジタルドロップレットP C R で滴定した ( 例えば、L ock , M . , et al . ( 2 0 1 4 ) H um . G ene Ther . Methods 2 5 : 1 1 5 - 2 5 ) を参照されたい ) 。

#### 【 0 1 5 8 】

1 0 種類の精製ベクターを、2 つの別個の動物への注入用に均等なゲノムコピー量でプールした：送達された総用量は、I V 送達を介して 2 e 1 3 G C / k g および 3 e 1 3 G

10

20

30

40

50

C / 動物であり、髄腔内空間への大槽内（ I C M ）送達を介してと送達された。動物は、注射の 30 日後に犠牲にされ、すべての組織は、下流導入遺伝子の R N A 発現分析のために R N A l a t e r ( Q I A G E N ) で回収された。

#### 【 0 1 5 9 】

##### 動物

動物手順はすべて、ペンシルベニア大学の施設内動物実験委員会 ( I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e ) によって承認された。カニクイザルマカク ( M a c a c a f a s c i c u l a r i s ) は、 B r i s t o l M e y e r s S q u i b b ( U S A ) から寄贈された。動物は、国際実験動物管理評価認証協会認定のフィラデルフィア小児病院 ( P h i l a d e l p h i a , P A ) の非ヒト靈長類研究プログラム施設で、ステンレス鋼製スクイーズバックケージ内に収容された。動物は、給餌、視覚および聴覚刺激、操作、および社会的相互作用などの様々な豊かさ ( e n r i c h m e n t s ) を享受した。

#### 【 0 1 6 0 】

I C M 試験には、10 歳齢、雄、8 k g の動物を使用した。I V 試験には、6 歳齢、雄、6 . 9 8 k g の動物を使用した。この動物を、A A V 中和抗体の存在についてスクリーニングし、ベースラインでは、A A V 6 、A A V 8 、および A A V r h 3 2 . 3 3 に対して血清陰性であった。この動物は、ベースラインでは、A A V 7 および A A V 9 に対して、それぞれ 1 : 5 および 1 : 1 0 の中和抗体力値を有した。

#### 【 0 1 6 1 】

##### I C M 注入手順

麻酔されたマカクは、X 線撮影台上に側臥位で、頭部を前方に屈曲させて、配置された。無菌技術を使用して、2 1 G ~ 2 7 G 、1 ~ 1 . 5 インチの Quincke 脊椎針 ( B e c t o n D i c k i n s o n , F r a n k l i n L a k e s , N J , U S A ) を、C S F 流れが観察されるまで、後頭下空間へと前進させた。1 m L の C S F を、ベースライン分析用に採取した。針の正確な配置は、脳幹の損傷の可能性を避けるために、蛍光透視 ( O E C 9 8 0 0 C - a r m ; G E H e a l t h c a r e , L i t t l e C h a l f o n t , U K ) により確認した。C S F 採取の後、ルアーアクセスエクステンションまたは小口径 T ポートエクステンションセットカテーテルを脊椎針に連結して、1 8 0 m g / m L のイオヘキソール造影剤の投与を容易にした ( G E H e a l t h c a r e , L i t t l e C h a l f o n t , U K ) 。針の配置を確認した後、被験試料を含むシリンジ ( 1 m L に加えてシリンジ容量およびリンカーのデッドスペースに等しい容量 ) を可撓性のリンカーに連結して、3 0 ± 5 秒間かけて注入した。針を取り外し、穿刺部位に直接圧力を加えた。

#### 【 0 1 6 2 】

##### I V 注入手順

マカクに、1 0 m L のベクター被験試料を、注入ポンプ ( H a r v a r d A p p a r a t u s , H o l l i s t o n , M A ) を介して 1 m L / 分の速度で末梢静脈に投与した。

#### 【 0 1 6 3 】

##### 導入遺伝子の発現分析

全組織 R N A を、製造元の仕様 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) に従って、T R I z o l を使用して、すべての R N A l a t e r 処理組織から抽出した。抽出した R N A を、製造元のプロトコルに従って D N a s e I で処理した ( R o c h e , B a s e l , S w i t z e r l a n d ) 。R N A を、R Ne a s y ミニキット ( Q I A G E N ) を使用して精製した。c D N A の逆転写合成は、A p p l i e d B i o s y s t e m s の高容量 c D N A 逆転写酵素キット ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用して実施した。1 1 7 b p のアンプリコンを P C R 増幅するために、6 b p の固有のバーコードに隣接する領域を標的とするプライマー ( フォワードプライマー : G G C G A A C A G C G G A C A C C G A T A T G A A ( 配列番号 1 1 ) 、リバースプライマー : G G C T C T C G T C G C G T G A G A A T G A G A A ( 配列番号 1 2 ) ) および Q 5 高忠実度ホットスタ

10

20

30

40

50

ートDNAポリメラーゼ(New England Biolabs)を使用して、以下のサイクリング条件：98で30秒間；98で10秒間、72で17秒間を25サイクル；および72で120秒間の伸長で、反応を行った。アンプリコンを、MiSeq Standard 2×150 bp配列決定プラットフォーム(Illumina)を使用して配列決定した。

#### 【0164】

バーコードリードを、発現分析パッケージ([github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils](https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils))、cutadapt(cutadapt.readthedocs.io/en/stable/)、fastxツールキットパッケージ([hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](https://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/))、およびRバージョン3.3.1.(cran.r-project.org/bin/windows/base.old/3.3.1/)からのfastq-joinプログラムを使用して分析した。組織試料からのバーコード発現カウントデータを、各動物について配列決定された注入用ベクター材料からのバーコードカウントに正規化し、各組織試料からのバーコードの割合を、GraphPad Prismバージョン7.04を使用してプロットした。

10

#### 【0165】

NHPにおけるAAVrh.91のICM形質導入特性の試験

動物および研究設計

動物手順はすべて、ペンシルベニア大学の施設内動物実験委員会( Institutional Animal Care and Use Committee)によって承認された。6匹の成体アカゲザル(*Macaca mulatta*)は、PreLabsを介してOrient Bioresources(Alice, TX)から調達した。動物は、国際実験動物管理評価認証協会認定のフィラデルフィア小児病院(Philadelphia, PA)の非ヒト靈長類研究プログラム施設で、ステンレス鋼製スクイーズバックケージ内に収容された。動物は、給餌、視覚および聴覚刺激、操作、および社会的相互作用などの様々な豊かさ(enrichments)を享受した。

20

#### 【0166】

AAVrh.91、AAV1、およびAAV9カプシドは、以前に記載されている方法を使用してAAV.CB7.CI.eGFP.WPRE.rBG導入遺伝子を用いてパッケージングした(例えば、Lock, M., et al. (2010) Hum. 21: 1259-71 and Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25: 115-25を参照されたい)。1.557e13 GCの用量を、各動物にICMに注入した。ICM注入方法は上に記載されている。注入の28~31日後に動物を犠牲にし、DNAベクター生体分布試験のために組織をドライアイス上で採取した。非臨床一般毒性試験の際の神経系のサンプリングおよび処理のための推奨手順(脳、脊髄、神経、および眼)に従って、脳モールド(brain mold)を使用して、脳全体を採取し、トリミングし、切片化した。Pardo, et. al. (2012). STP Position Paper。また、組織を採取し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋して、組織病理学的分析を行った。

30

#### 【0167】

ベクター形質導入の組織学的分析

GFP免疫組織化学(IHC)の場合、切片を、エタノールおよびキシレンで脱バラフィン化し、抗原賦活化のために10 mMのクエン酸緩衝液(pH 6.0)中で6分間煮沸し、順次、2%のH2O2で15分間、アビジン/ビオチンブロッキング試薬(Vecto or Laboratories)で各々15分間、およびブロッキング緩衝液(PBS中の1%ロバ血清+0.2%のTriton)で10分間処理した。続いて、ブロッキング緩衝液中のGFPに対するヤギ抗体(Novus Biologicals, NB100-1770, 1:500)とともに4度一晩インキュベーションし、PBS中で洗浄した後、ブロッキング緩衝液中のビオチン化抗ヤギ二次抗体(Jackson Immuno

40

50

n o R e s e a r c h , 1 : 5 0 0 ) とともに 4 5 分間インキュベーションした。 P B S 中で洗浄した後、 V e c t a s t a i n E l i t e A B C キット ( V e c t o r L a b o r a t o r i e s ) を適用して、 製造元の指示に従って、 D A B を基質として用いて、 結合した抗体を褐色沈殿物として可視化した。

#### 【 0 1 6 8 】

免疫蛍光 ( I F ) の場合、 パラフィン切片を同様に前処理したが、 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびアビジン / ピオチンのブロッキングは行わなかった。以下の一次抗体を組み合わせ、 切片を 3 7 で 1 時間インキュベートした： ヤギ抗 G F P ( N o v u s B i o l o g i c a l s , N B 1 0 0 - 1 7 7 0 ; 1 : 3 0 0 ~ 5 0 0 ) 、 モルモット抗 N e u N ( M i l l i p o r e , A B N 9 0 ; 1 : 5 0 0 ) 、 ニワトリ抗 G F A P ( A b c a m , a b 4 6 7 4 ; 1 : 1 0 0 0 ) 。これに続いて、 P B S 中で洗浄後、 蛍光色素標識二次抗体 ( F I T C 抗 ヤギ、 C y 5 抗モルモット、 T R I T C 抗 G F A P ; J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 室温で 1 時間、 1 : 2 0 0 ) とインキュベーションした。 P B S 中で洗浄後、 D A P I を含む F l u o r o m o u n t G ( E l e c t r o n M i c r o s c o p y S c i e n c e s ) 中で切片をマウントし、 核の対比染色を行った。

10

#### 【 0 1 6 9 】

ベクターの生体分布の分析

Q I A a m p D N A ミニキット ( Q i a g e n ) で組織ゲノム D N A を抽出し、 A A V ベクターゲノムを、 T a q m a n 試薬 ( A p p l i e d B i o s y s t e m s , L i f e T e c h n o l o g i e s ) とともにベクターの E G F P 配列を標的とするプライマー / プローブを使用して、 リアルタイム P C R によって定量化した。

20

#### 【 0 1 7 0 】

中枢神経系 ( C N S ) の組織における細胞形質導入の定量分析

上に記載のようにスライドを調製し、 A p e r i o V E R S A 走査システムを使用してスキャンした。まず、スライド全体を低倍率で ( 1 . 2 5 倍 ) でスキャンして、 関心領域を定義した。最初の 1 . 2 5 倍のスキャン後、スライドを、 4 つの異なるチャネル D A P I 、 F I T C 、 T R I T C および C y 5 を用いて、 2 0 倍の倍率でスキャンした。 V i s i o p h a r m 画像解析ソフトウェア v . 2 0 1 9 . 0 7 で開発された共染色検出アルゴリズムを使用して、 最終的な 2 0 倍のスキャンから、 形質導入されたニューロンおよび星状細胞を定量した。

30

#### 【 0 1 7 1 】

A A V カプシドのアミノ酸の修飾についての質量分析 ( M S )

試薬

重炭酸アンモニウム、 ジチオスレイトール ( D T T ) 、 ヨードアセトアミド ( I A M ) は、 S i g m a ( S t . L o u i s , M O ) から購入した。アセトニトリル、 ギ酸、 トリフルオロ酢酸 ( T F A ) 、 8 M の塩酸グアニジン ( G n d H C l ) 、 およびトリプシンは、 T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ( R o c k f o r d , I L ) から購入した。

#### 【 0 1 7 2 】

トリプシン消化

1 M の D T T および 1 . 0 M の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、 1 0 m M の D T T および 2 M の G n d H C l の存在下で、 9 0 で 1 0 分間変性させ還元した。試料を室温に冷却し、 次いで、 暗所で、 3 0 m M の I A M を用いて室温で 3 0 分間アルキル化した。 D T T を 1 m L 添加して、 アルキル化反応をクエンチした。最終 G n d H C l 濃度を 2 0 0 m M に希釈する量で、 变性タンパク質溶液に p H 7 . 5 ~ 8 の 2 0 m M 重炭酸アンモニウムを添加する。トリプシン対タンパク質の比率が 1 : 2 0 になるようにトリプシン溶液を加え、 3 7 で 4 時間インキュベートする。消化後、 T F A を最終濃度が 0 . 5 % になるように添加し、 消化反応をクエンチした。

40

#### 【 0 1 7 3 】

L C - M S / M S

50

Accelaclaim Pep Mapカラム(長さ15cm、内径300μm)およびNanoFlex源(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)を用いて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、次いで、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する。カラムサイズは、75cm×15μmの内径であり、2ミクロンのC18媒体(Accelaclaim Pep Map)が充填される。負荷、導入、および洗浄ステップにより、LC-MS/MS実行の合計時間は約2時間であった。

#### 【0174】

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、最も豊富でまだ配列決定されていない前駆体イオンが動的に選択された。配列決定は、予測自動ゲイン制御で決定された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行われ、4m/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に設定された。SレンズのRFレベルを50に設定し、これにより、消化由来のペプチドが占めるm/z領域が最適に透過される。单一、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。

#### 【0175】

##### データ処理

BioPharma Finder 1.0ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific)が、取得したデータの分析に使用された。ペプチドマッピングのために、固定修飾として設定されたカルバミドメチル化、可変修飾として設定された酸化、脱アミド、およびリン酸化、質量精度10ppm、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水準0.8を用いて、單一エントリのタンパク質FASTAデータベースを使用して検索を行う。ペプチドのパーセント修飾は、修飾ペプチドの質量面積を、修飾ペプチド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。考えられる修飾部位の数を考慮すると、異なる部位で修飾されている同種体は、単一のピークで共移動し得る。したがって、複数の潜在的な修飾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、複数の修飾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、異なる修飾ペプチド異性体の相対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、修飾部位において独立していることを想定している。このアプローチにより、特定の修飾部位および関連する潜在的な組み合わせの定義が可能となる。

#### 【0176】

##### 実施例2：AAV-SGA

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、一本鎖DNAバルボウイルスであり、非病原性および弱免疫原性であるため、遺伝子療法のためのベクターとして有効な候補になる。第1世代のAAV(AAV1~6)の発見以来、本発明者らの研究室は、様々な高等靈長類種から多数のウイルスを単離する努力を重ねてきた。本明細書で同定されたこの第2世代のAAVは、靈長類由來のAAVゲノムに特異的である保存領域に対するプライマーを使用して、バルクPCRベースの技術を使用して単離された。AAV-SGAを使用して、本発明者らは、天然の哺乳類宿主におけるAAVの遺伝的バリエーションを探査した(図1)。

#### 【0177】

10

20

30

40

50

AAV-SGAは、単一のウイルスゲノムを混合集団内から高精度に単離するために使用することができる強力な技術である。この研究では、本発明者らは、アカゲザル組織標本から新規のAAVゲノムを同定するためにAAV-SGAを使用した。新規のウイルス分離株は、遺伝的に多様であり、クレードD、E、およびフリンジクレードに分類することができる（図2）。

#### 【0178】

強化GFP（eGFP）遺伝子を含むベクターは、新規カプシドおよび以前に同定された対照カプシドを使用して産生された。様々なカプシドを有するベクターを、静脈内（IV）（図5A）および脳室内（ICV）（図5C）送達経路を介してマウスで試験した。ベクターゲノムの生体分布を、心臓、骨格筋、肝臓、および脳組織においてアッセイした（図5Bおよび図5D）。マウス研究は、新規のカプシドが典型的に、クレード特異的な形質導入パターンを実証することを示した（クレードDカプシドを除く）。AAV6.2およびAAVrh.91に関して、小脳および脳室／脈絡叢の分析により、eGFP検出のパターンは異なるが、ICV送達後の形質導入が明らかになった。クレードAメンバーのIV送達は、心臓、脳、および筋肉組織において高レベルの形質導入をもたらした。

#### 【0179】

IM送達後の筋肉組織の形質導入を評価するために、追加の試験を実施した。様々なカプシドを有し、LacZ（図6A）またはmAbを発現するベクターをIM送達し、導入遺伝子の発現を、筋纖維の染色（LacZの場合）または血清における検出（mAbの場合）を介して分析した。図6Bは、LacZの検出による筋肉形質導入の比較を示す。クレードAのベクターであるAAVrh.91は、高効率で筋纖維を形質導入した（より濃い染色）。AAVrh.91によるIM送達はまた、血清中で、高レベルの検出可能なmAbをもたらした（図7）。図8は、mAbおよびLacZベクターの様々な調製物の収率を示す。両方の導入遺伝子について、AAVrh.91は、AAV1およびAAV6と比較して、高い収率を有した。

#### 【0180】

実施例3：バーコード化導入遺伝子システムを使用した非ヒト霊長類における新規のAAV天然分離株の形質導入の評価

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、臨床応用において安全かつ効果的な遺伝子導入ビヒクリルであることが示されたが、ウイルスに対する既存の免疫によって阻害され得、組織トロピズムが制限され得る。本発明者らは、バーコード化導入遺伝子法が、複数のAAV血清型による単一の動物における様々な組織の形質導入を同時に比較するのに有用であることを実証した。この技術は、使用した動物の数を削減し、外来導入遺伝子関連の免疫応答を防止する。したがって、新規のカプシドおよびそれらのそれぞれの原型的なクレードメンバー対照（AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh32.33、およびAAV9）を、転写物のポリAシグナルの前に、変更eGFP導入遺伝子および固有の6塩基対バーコードを含むベクターへと作製した（図9）。導入遺伝子を、ATG配列モチーフの欠失によって修飾して、ポリペプチドの翻訳および結果としての外来タンパク質に対する免疫応答を防止した。ベクターを、等量でプールし、カニクイザルにIVまたはICM注入して（総用量：2e13GC/kg（IV）および3e13GC（ICM））、新規のカプシドの全身および中枢神経系の形質導入パターンを評価した。IV注入された動物は、ベースラインではAAV6、AAV8、およびAAVrh32.33に対して血清陰性であり、AAV7およびAAV9に対して、それぞれ1:5および1:10の中和抗体力を有した。

#### 【0181】

図10Aに示されるように、試験した他のカプシドと比較して、クレードAベクターであるAAVrh.91のIV送達により、肺、筋肉、および心臓を含む形質導入された末梢器官が、高い効率で導入された。AAVrh.91はまた、ICM送達後のNHPのCNS組織において、高い形質導入レベルを示した（図10C）。

#### 【0182】

10

20

30

40

50

I C M送達を評価するためのその後の研究から、AAV1 (RA3654、RA3583) およびAAV9 (1408266、1409029) と比較して、AAVrh.91 (1409201、1407088) によるNHPの脳および脊髄における形質導入の改善も明らかになった(図11A～図11C、図12)。AAVrh.91は、I C M送達後に、前頭皮質、側頭皮質、および後頭皮質を効果的に形質導入した。AAVrh.91はまた、AAV9と比較して、ニューロンと星状細胞の両方を高レベルで形質導入した(図13A～図13C)。AAVrh.91は、脊髄において運動ニューロンの頑強な形質導入を示した。興味深いことに、IHC染色は、AAVrh.91およびAAV1の両方が、脳の脳室を覆う上衣細胞の効率的な形質導入を示したことを明らかにした。AAVrh.91による肝臓の形質導入のレベルは、I C M送達後の各動物における神経皮質の形質導入レベルと相關した。試験されたすべてのベクターによるI C M送達後、心臓におけるベクターの形質導入のレベルは様々であった。特に、心臓におけるGFPの発現は、I C M送達後のより高いレベルの脳(皮質)発現と相關しなかったが、高レベルの肝臓が観察された。まとめると、これらの結果は、AAVrh.91が、強力な遺伝子療法ベクターであり、産生するのが効率的であり、霊長類におけるI C M送達後、脳および脊髄の様々な細胞型を効果的に形質導入することを実証する。

#### 【0183】

HEK293細胞における三重トランスフェクション法によって製造される場合、AAVrh.91は、そのクレードの対応物であるAAV1よりも2～3倍多量のベクターを得る(図14Aおよび図14B)。AAVrh.91カプシドを、以前に記載されているように、脱アミド化および他の修飾について分析した(PCT/US19/019804およびPCT/US19/2019/019861を参照されたい)。図15Aおよび図15Bに示されるように、結果は、AAVrh.91が、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ている3つのアミノ酸(N57、N383、N512)を有することを示した(配列番号2のようなAAVrh.91の番号付け)。残基N303、N497、およびN691でのより低い脱アミド化率、ならびにS149でのリン酸化が一貫して観察された。

#### 【0184】

##### (配列表フリー テキスト)

以下の情報は、数値識別子<223>の下のフリー テキストを含む配列に関して提供される。

10

20

30

40

50

【表3】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
3	<223> 合成構築物  <220> <221> CDS <222>(1)..(2211)
4	<223> 合成構築物
5	<223> AAV6 変異体  <220> <221> CDS <222>(1)..(2211)
6	<223> 合成構築物
9	<223> プライマー配列
10	<223> プライマー配列
11	<223> プライマー配列
12	<223> プライマー配列
13	<223> miRNA 標的配列
14	<223> miRNA 標的配列

## 【0185】

本明細書に引用されるすべての文書は、参照により本明細書に援用される。2019年10月21日に出願された米国仮特許出願第62/924,095号、2019年10月10日に出願された米国仮特許出願第62/913,314号、および2019年4月29日に出願された米国仮特許出願第62/840,184号は、それらの配列表とともに、それらの全体が参照により援用される。同様に、「19-8901PCT2\_ST25.txt」という名前で本明細書とともに提出された配列表、ならびにその中の配列およびテキストは、参照により援用される。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事が理解されよう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲の範囲内に収まることが意図される。

10

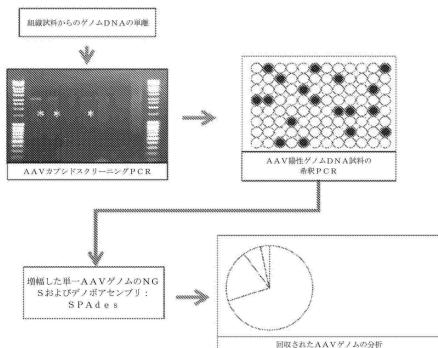
20

30

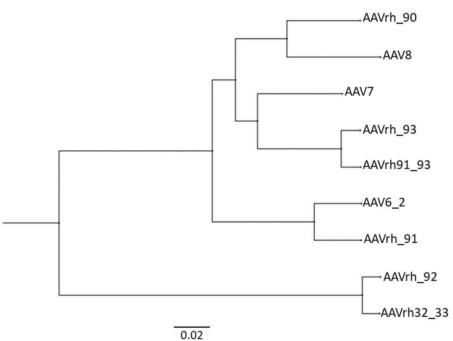
40

50

【図面】  
【図 1】



【 図 2 】



10

【図3A】

【図3B】

20

30

40

50

【図3C】

【図3D】

10

20

【図4A】

V p 1 開始	
AAVrh91	MAADGYL1PDLWEDNLNLSIGEIRREWALKERGQAPFRKANQRQQDGRGVLIPVGKYLGFPGNGLD
AAV6.2	MAADGYL1PDLWEDNLNLSIGEIRREWALKERGQAPFRKANQRQQDGRGVLIPVGKYLGFPGNGLD
AAV1	MAADGYL1PDLWEDNLNLSIGEIRREWALKERGQAPFRKANQRQQDGRGVLIPVGKYLGFPGNGLD
*****	*****
AAVrh91	KGEFPWNAADAILEHDQYDQLKAGDNFVNLYRHNADAEFQEQLQEDTSFGNLLGRAVFQ
AAV6.2	KGEFPWNAADAILEHDQYDQLKAGDNFVNLYRHNADAEFQEQLQEDTSFGNLLGRAVFQ
AAV1	KGEFPWNAADAILEHDQYDQLKAGDNFVNLYRHNADAEFQEQLQEDTSFGNLLGRAVFQ
*****	*****
	↓vp2
AAVrh91	AKKRVLEPLFGLVVEAAKPTGPKKRVRPVEQSPQFDPSSSGIACKRSQQPAAKKRLNFQGDS
AAV6.2	AKKRVLEPLGLVVEGAKTGPCKKRVRPVEQSPQFDPSSSGIACKRSQQPAAKKRLNFQGDS
AAV1	AKKRVLEPLGLVVEGAKTGPCKKRVRPVEQSPQFDPSSSGIACKRSQQPAAKKRLNFQGDS
*****	*****
	↓vp3
AAVrh91	SVPFPQGPPEPPFTTAACVPTTMASSGGAAIMADNGEADGVYGNASNNHCDSTWLGRDVR1
AAV6.2	SVPFPQGPBGPPEPATTAACVPTTMASSGGAAIMADNGEADGVYGNASNNHCDSTWLGRDVR1
AAV1	SVPFPQGP1EPPEPATTAACVPTTMASSGGAAIMADNGEADGVYGNASNNHCDSTWLGRDVR1
*****	*****
AAVrh91	TSTTRTWALPYTNHLYKQ1ISASTGASNDUNHYGYGFTSTPWGYDFDNRFHCFSPRWQRL
AAV6.2	TSTTRTWALPYTNHLYKQ1ISASTGASNDUNHYGYGFTSTPWGYDFDNRFHCFSPRWQRL
AAV1	TSTTRTWALPYTNHLYKQ1ISASTGASNDUNHYGYGFTSTPWGYDFDNRFHCFSPRWQRL
*****	*****
AAVrh91	INNNWGFPKRLNLFKLN1QKVKEVTNTDGVTT1IANNLSTVQWFSDSEYQLPVYLGSQH
AAV6.2	INNNWGFPKRLNLFKLN1QKVKEVTNTDGVTT1IANNLSTVQWFSDSEYQLPVYLGSQH
AAV1	INNNWGFPKRLNLFKLN1QKVKEVTNTDGVTT1IANNLSTVQWFSDSEYQLPVYLGSQH
*****	*****
AAVrh91	GCLPFPPADVFM1PQGYCILJNNSGQAVGRSSFYCLEYFPQSQMLRTCNNTFFSYTTEFDVP
AAV6.2	GCLPFPPADVFM1PQGYCILJNNSGQAVGRSSFYCLEYFPQSQMLRTCNNTFFSYTTEFDVP
AAV1	GCLPFPPADVFM1PQGYCILJNNSGQAVGRSSFYCLEYFPQSQMLRTCNNTFFSYTTEFDVP
*****	*****

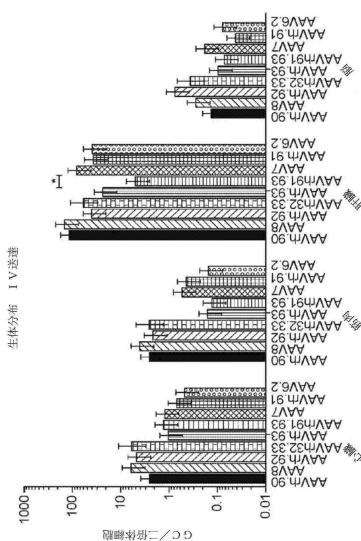
【図4B】

30

【図 5 A】



【図 5 B】

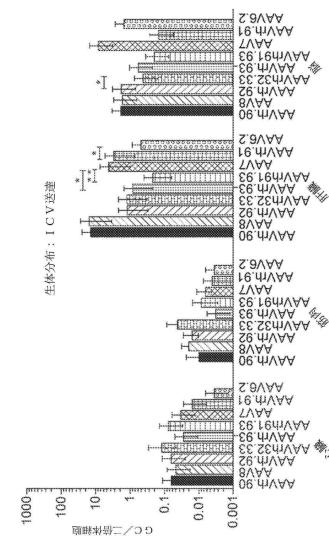


10

【図 5 C】



【図 5 D】



30

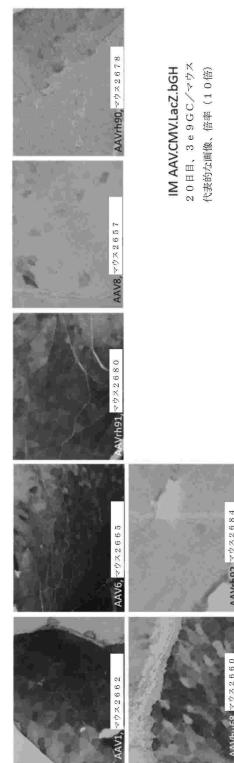
40

50

【図 6 A】



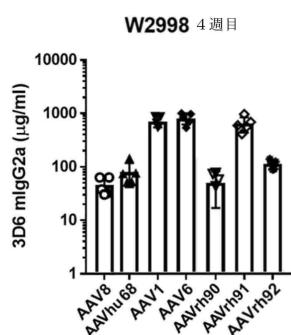
【図 6 B】



10

20

【図 7】



【図 8】

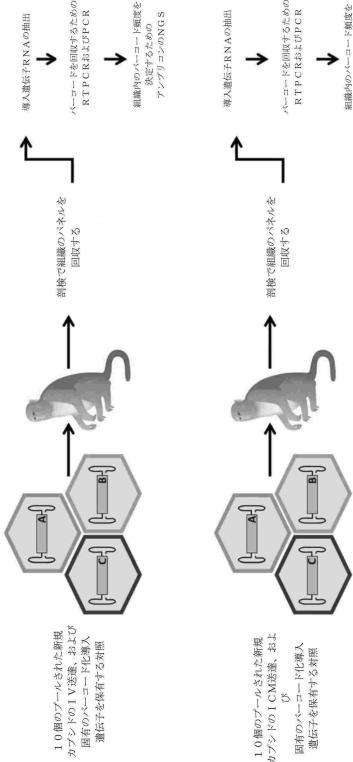
カプシド (mAb導入遺伝子)	収率 (%AAV8)		供給源
	(LacZ導入遺伝子)	100%	
AAV8	100%	100%	天然分離株
AAVhu68	76%	89%	天然分離株
AAV1	26%	28%	天然分離株
AAV6	27%	28%	天然分離株
AAVrh90	105%	118%	天然分離株
AAVrh91	53%	74%	天然分離株
AAVrh92	68%	102%	天然分離株

30

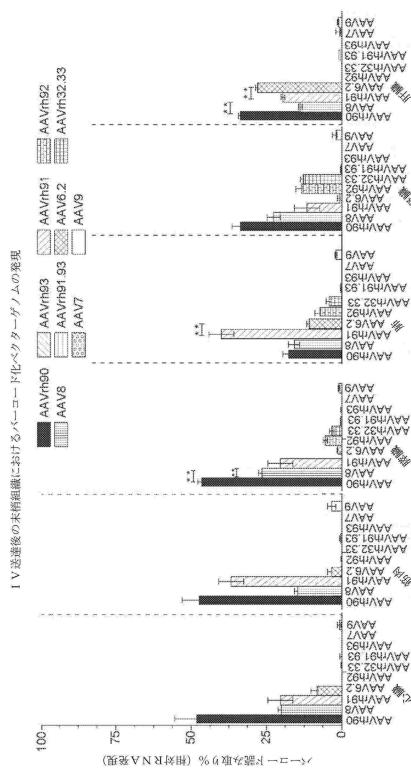
40

50

【図 9】



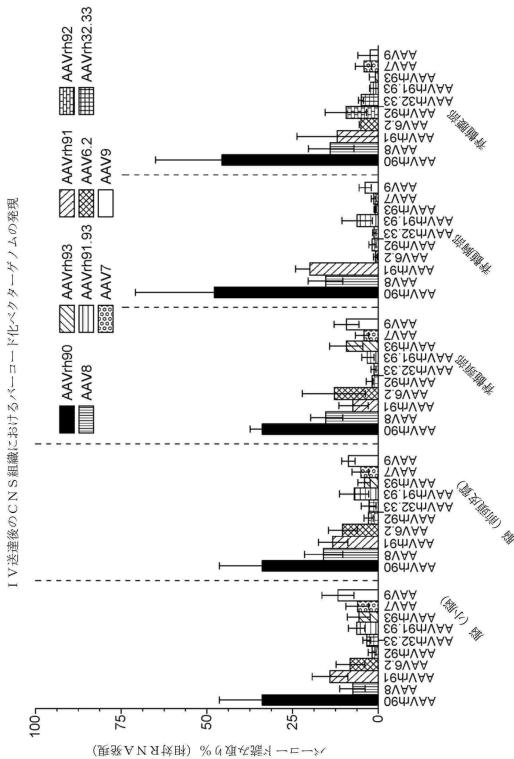
【図 10 A】



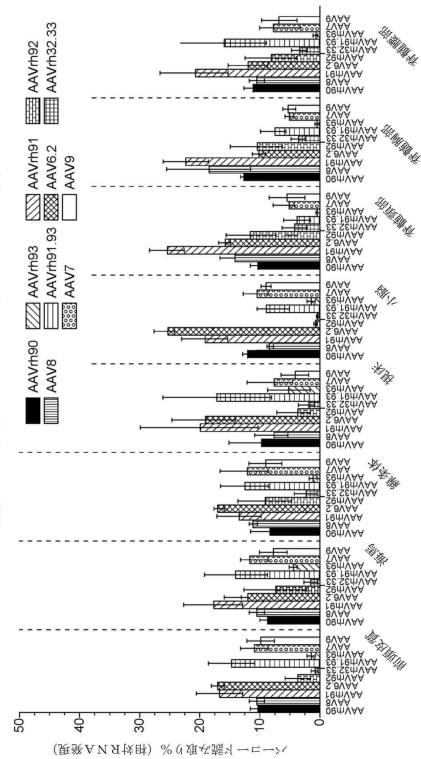
10

20

【図 10 B】



【図 10 C】

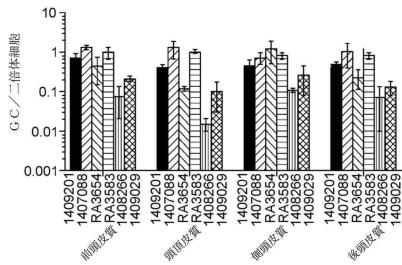


30

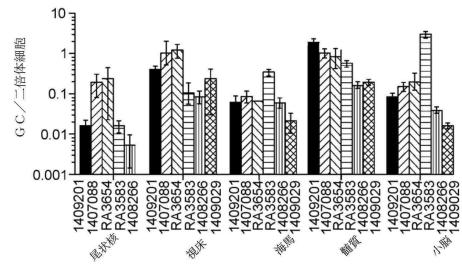
40

50

【図 1 1 A】

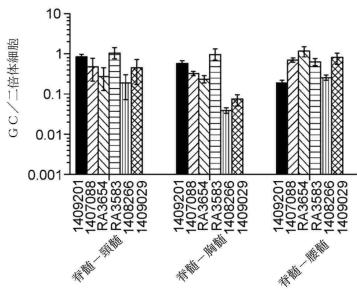


【図11B】

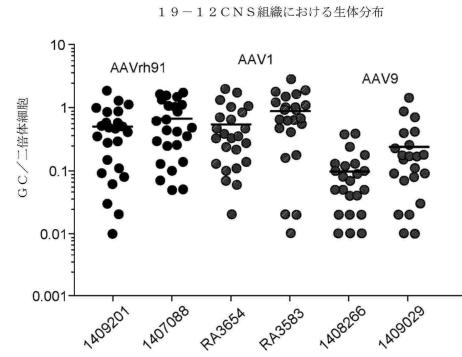


10

【図11C】



【図12】



20

30

40

50

【図 1 3 A - 1 3 B】

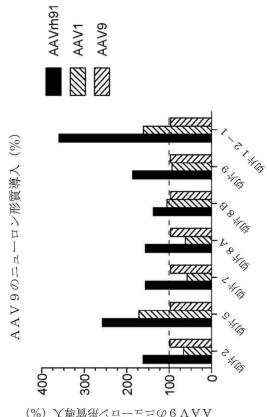


図 1 3 B

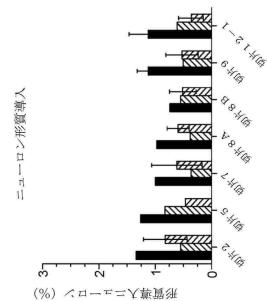
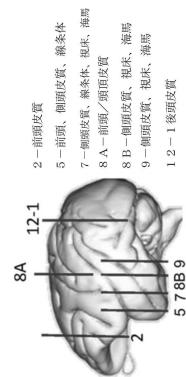
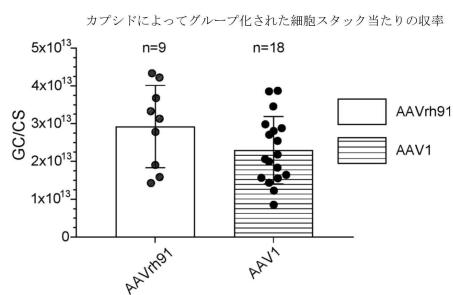


図 1 3 A

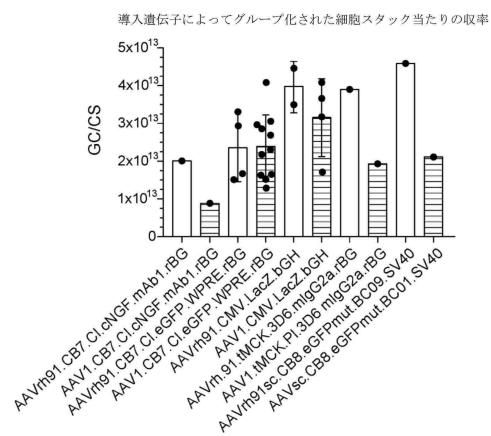
【図 1 3 C】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

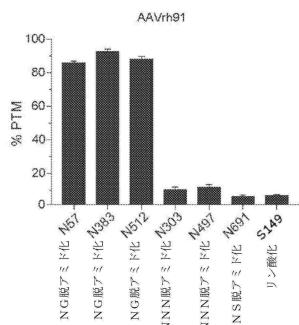
20

30

40

50

【図 15 A】



【図 15 B】

酵素	N+1	WL2656S		WL2259S		WL2655S		WL2491R	
		トリアシン-4時間							
被覆度%		90.6		92.8		91.8		100.0	
N35+脱アミド化	G	85.1	85.6	86.3	87.0	0.8	0.0		
N57+脱アミド化	H	4.3	4.0	3.3	3.5				
N94+脱アミド化	NNN	8.6	9.4	12.0	9.6				
N303+脱アミド化	N				0.0				
N383+脱アミド化	G	欠如	91.7	90.6	95.5				
N497+脱アミド化	NNN	9.6	10.0	12.3	10.5				
N512+脱アミド化	G	87.5	91.3	88.3	86.4				
Q646+脱アミド化				0.0					
N691+脱アミド化	S	5.1	5.8	4.7	5.6				
S149+リン酸化		5.8	6.0	5.6	4.9				
W22+無化			1.2						
M211+無化		0.1				0.5		0.0	
W247+無化		4.9				2.5			
M403+無化			4.8			2.5		2.5	
M435+無化		0.1	0.0			0.0		0.0	
M471+無化		1.4	5.0						
W478+無化		3.1			0.6				
W503+無化		0.8	0.2			0.7			
M537+無化		4.4				6.5		4.9	
M541+無化		5.1							
M559+無化		2.7	0.3					1.7	
M599+無化		0.5							
M635+無化		6.9	9.0	7.6	7.0				
W695+無化		0.2	0.5	0.9					

ロット	ベクター名
WL2655S	AAVrh91.lMCK.3D6.mlgG2a.rBG (p0093; p5229)
WL2656S	AAVrh91.CMV.LacZ.bGH (p0093; p0102)
WL2259S	AAVrh91.CB7.CLeGFP.WPRE.rBG(p0093;p1963)
WL2491R(HIT)	AAVrh91cs.CB8.eGFPmut.BC09.SV40(p0093;p4765)

【配列表】

0007644026000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N	15/35	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/840,184

(32)優先日 平成31年4月29日(2019.4.29)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

0 3 フィラデルフィア・デランシーストリート 1 8 3 1

(72)発明者 ワン, チャン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 4 4 フィラデルフィア・ファーストフロア・ウエストウ  
イノナストリート 2 2 8

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 7 5 3 3 8 (WO , A 2 )

国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 5 5 0 3 (WO , A 1 )

国際公開第 2 0 1 1 / 1 3 3 8 9 0 (WO , A 1 )

国際公開第 2 0 1 9 / 0 2 8 3 0 6 (WO , A 2 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q