

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年5月9日(2019.5.9)

【公表番号】特表2018-514190(P2018-514190A)

【公表日】平成30年6月7日(2018.6.7)

【年通号数】公開・登録公報2018-021

【出願番号】特願2017-547442(P2017-547442)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	7/01	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	14/015	(2006.01)
A 6 1 K	35/76	(2015.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 P	21/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	7/01	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	14/015	
A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	35/00	

【手続補正書】

【提出日】平成31年3月20日(2019.3.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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

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

【請求項 2】

a ) 配列番号 1 3 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質；及び

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

【請求項 3】

a ) 配列番号 1 4 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質；及び

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

【請求項 4】

a ) 配列番号 1 5 に記載の配列に対して少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型 A A V キャプシドタンパク質；及び

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

【請求項 5】

前記変異型 A A V キャプシドタンパク質が、標的細胞への高い感染性を付与する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の r A A V ウイルス粒子。

【請求項 6】

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、請求項 5 に記載の r A A V ウイルス粒子。

【請求項 7】

野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウィルス粒子の標的細胞感染性に比べて少なくとも 5 倍高い標的細胞感染性を示す、請求項 5 及び 6 のいずれか一項に記載の r A A V ウィルス粒子。

【請求項 8】

前記変異型 A A V キャプシドタンパク質が、感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質が付与する標的細胞受容体依存性に比べて変化した標的細胞受容体依存性を付与する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の r A A V ウィルス粒子。

【請求項 9】

感染性に関して、野生型 A A V 血清型キャプシドタンパク質を含む A A V ウィルス粒子に比べて低いシアル酸またはヘパリン硫酸プロテオグリカン依存性を有する、請求項 8 に記載の r A A V ウィルス粒子。

【請求項 10】

前記遺伝子産物がポリペプチドである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の r A A V ウィルス粒子。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、請求項 1 0 に記載の r A A V ウィルス粒子。

【請求項 12】

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

【請求項 13】

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N 、タンパク質 - O - マンノシリルransフェラーゼ、フクチン、LARGE 、O 結合型

マンノース 1, 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソブレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、請求項 10 に記載の rAAV ウィルス粒子。

【請求項 14】

前記遺伝子産物がゲノム編集遺伝子産物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の rAAV ウィルス粒子。

【請求項 15】

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガー・クレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、及び Cas9 / ガイド RNA システムまたはその成分からなる群から選択される、請求項 14 に記載の rAAV ウィルス粒子。

【請求項 16】

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の rAAV ウィルス粒子。

【請求項 17】

前記核酸遺伝子産物が、干渉 RNA、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、請求項 16 に記載の rAAV ウィルス粒子。

【請求項 18】

a) 請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ウィルス粒子；及び

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

【請求項 19】

個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法に用いるための医薬組成物であって、

a) 請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ウィルス粒子；及び

b) 薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、または緩衝剤を含み、

個体に投与される、医薬組成物。

【請求項 20】

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記遺伝子産物がポリペプチドである、請求項 19 及び 20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記分泌ポリペプチドが、リポタンパク質リパーゼ、第 IX 因子、及び  $\alpha_1$  アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド 1、インスリン様増殖因子 1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸 - 2 - スルファターゼ、グルコシダーゼ、及び N - アセチルガラクトサミン 4 - スルファターゼからなる群から選択される、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記ポリペプチドが、トロポニン、ラミニン、コラーゲン、ラミン、セレノプロテイン N、タンパク質 - O - マンノシリルトランスフェラーゼ、フクチン、LARGE、O 結合型マンノース 1, 2 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、及びイソブレノイドシンターゼドメイン含有タンパク質からなる群から選択される、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記遺伝子産物が、ゲノム編集遺伝子産物である、請求項 19 及び 20 のいずれか一項

に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、T A L E N、及びC a s 9 / ガイド R N A システムまたはその成分からなる群から選択される、請求項 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記遺伝子産物が核酸遺伝子産物である、請求項 19 及び 20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記核酸遺伝子産物が、干渉 R N A、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアプタマーである、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

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

【請求項 30】

前記変異型キャプシドタンパク質が、A A V ウィルス粒子中に存在する場合、野生型 A A V キャプシドタンパク質を含む A A V ウィルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べて高い A A V ウィルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性を提供する、請求項 29 に記載の単離された核酸。

【請求項 31】

請求項 29 及び 30 のいずれか一項に記載の核酸を含む、単離された遺伝子改変宿主細胞。

【請求項 32】

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

【請求項 33】

野生型 A A V キャプシドタンパク質を含む A A V ウィルス粒子の筋細胞またはグリア細胞感染性に比べてそれぞれ高い筋細胞またはグリア細胞感染性を付与する、請求項 32 に記載の変異型 A A V キャプシドタンパク質。

【請求項 34】

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

を含む、変異型 AAV キャプシドタンパク質を有する rAAV ウィルス粒子の生成方法。

【請求項 35】

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

i i ) 前記系統樹のノードを選択すること；及び

i i i ) 前記ノードにおいて最も有望なアミノ酸配列を決定すること

によって、前記祖先型 AAV キャプシドタンパク質アミノ酸配列を決定することを含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記方法が、前記系統樹の各ノードにおける信頼値を推定することをさらに含み、かつ前記選択する段階が、前記ノードにおける推定された信頼値に基づいて前記系統樹のノードを選択することを含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記初期 AAV キャプシドタンパク質が、配列番号 7 に記載の配列と少なくとも 94 % 同一のアミノ酸配列を有する、請求項 34 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

rAAV ウィルス粒子の前記第 2 のライプラリを第 2 選択ラウンドに供することを含む、請求項 34 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 2 選択ラウンドが、前記第 1 選択ラウンドで使用した前記標的細胞と同じ標的細胞型で実施される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記第 2 選択ラウンドが、前記第 1 選択ラウンドに比べて高い厳密性を有する、請求項 38 及び 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記標的細胞が、筋細胞、上皮細胞、皮膚細胞、グリア細胞、及びヒト胎児由来腎臓細胞からなる群から選択される、請求項 34 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記供する段階が、

a ) 標的細胞に前記 rAAV ウィルス粒子のライプラリを感染させること；

b ) 感染した細胞にヘルパーウィルスを重感染させること；及び

c ) 重感染した細胞から放出された rAAV ウィルス粒子を回収することを含む、請求項 34 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記方法が、変異型 AAV キャプシドタンパク質を含む rAAV ウィルス粒子を単離することを含み、単離された rAAV ウィルス粒子が、野生型 AAV 血清型キャプシドタンパク質を含む AAV ウィルス粒子に比べて、高い感染性、増強された指向性、またはその両方を有する、請求項 34 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明の rAAV ウィルス粒子または rAAV ウィルス粒子のライプラリを含み、本方法の実施において使用するキットも、本明細書において提供する。

[本発明1001]

a ) 配列番号 16 に記載の配列に対して少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、264 位、448 位、459 位、470 位、495 位、533 位、547 位、555 位、557 位、561 位、563 位、593 位、596 位、661 位、662 位、664 位、718 位及び 723 位のアミノ酸が、

それぞれA、A、N、S、S、D、E、A、E、L、N、A、A、A、T、T、N及びSであるか；それぞれQ、S、N、A、S、E、Q、T、D、M、S、Q、T、A、V、S、S及びSであるか；またはそれぞれA、A、T、S、T、D、Q、A、D、I、N、A、T、T、V、S、S及びTである、変異型AAVキャプシドタンパク質；ならびに

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

[本発明1002]

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

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

[本発明1003]

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

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

[本発明1004]

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

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

[本発明1005]

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

[本発明1006]

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

[本発明1007]

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

[本発明1008]

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

[本発明1009]

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

[本発明1010]

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

[本発明1011]

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

[本発明1012]

前記分泌ポリペプチドが、リポタンパク質リパーゼ、第IX因子、 $\alpha_1$ アンチトリプシン、フォリスタチン、可溶性ミオスタチン受容体、アペリン、グルカゴン様ペプチド1、インスリン様増殖因子1、ガラクトシダーゼ、イズロニダーゼ、イズロン酸-2-スルファーゼ、グルコシダーゼ、及びN-アセチルガラクトサミン4-スルファーゼからなる群から選択される、本発明1011のrAAVウイルス粒子。

[本発明1013]

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

[本発明1014]

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

[本発明1015]

前記ゲノム編集遺伝子産物が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、及びCas9/ガイドRNAシステムまたはその成分からなる群から選択される、本発明1014のrAAVウイルス粒子。

[本発明1016]

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

[本発明1017]

前記核酸遺伝子産物が、干渉RNA、リボザイム、アンチセンス核酸、またはアブタマーである、本発明1016のrAAVウイルス粒子。

[本発明1018]

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

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

[本発明1019]

本発明1001～1017のいずれかの組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ウイルス粒子を個体に投与することを含む、個体における標的細胞への遺伝子産物の送達方法。

[本発明1020]

前記標的細胞が筋細胞またはグリア細胞である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

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

[本発明1022]

前記ポリペプチドが分泌ポリペプチドである、本発明1021の方法。

[本発明1023]

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

[本発明1024]

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

[本発明1025]

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

[本発明1026]

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

[本発明1027]

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

[本発明1028]

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

[本発明1029]

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

[本発明1030]

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

[本発明1031]

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

[本発明1032]

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

[本発明1033]

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

[本発明1034]

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

[本発明1035]

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

ii) 前記系統樹のノードを選択すること；及び

iii) 前記ノードにおいて最も有望なアミノ酸配列を決定すること

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

[本発明1036]

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

[本発明1037]

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

[本発明1038]

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

[本発明1039]

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

[本発明1040]

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

[本発明1041]

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

[本発明1042]

前記供する段階が、

a) 標的細胞に前記rAAVウイルス粒子のライプラリを感染させること；

b) 感染した細胞にヘルパーウイルスを重感染させること；及び

c) 重感染した細胞から放出されたrAAVウイルス粒子を回収することを含む、本発明1034～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

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