

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7690401号
(P7690401)

(45)発行日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(24)登録日 令和7年6月2日(2025.6.2)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/864 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K	35/76 (2015.01)		A 6 1 K	35/76	Z N A
A 6 1 K	48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)		A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)		A 6 1 P	21/00	

請求項の数 20 (全55頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-564269(P2021-564269)
(86)(22)出願日	令和2年4月28日(2020.4.28)
(65)公表番号	特表2022-530633(P2022-530633)
	A)
(43)公表日	令和4年6月30日(2022.6.30)
(86)国際出願番号	PCT/US2020/030273
(87)国際公開番号	WO2020/223232
(87)国際公開日	令和2年11月5日(2020.11.5)
審査請求日	令和5年4月10日(2023.4.10)
(31)優先権主張番号	62/924,095
(32)優先日	令和1年10月21日(2019.10.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/913,314
(32)優先日	令和1年10月10日(2019.10.10)
	最終頁に続く

(73)特許権者	502409813 ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバ ーシティ・オブ・ペンシルベニア アメリカ合衆国ペンシルベニア州 191 04 フィラデルフィア・ナインスフロア ー・シビックセンターブールバード 36 00
(74)代理人	110000741 弁理士法人小田島特許事務所
(72)発明者	ナンピア、カリヤニ アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02 139ケンブリッジ・アパートメント 2 ・ウィンザーストリート 268
(72)発明者	ウイルソン、ジェームス・エム アメリカ合衆国ペンシルベニア州 191 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】**

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)であって、前記AAVが、AAVrh.90カプシド中にベクターゲノムを含む前記AAVrh.90カプシドを有し、前記AAVrh.90カプシドが、N57位、N263位、N385位、およびN514位に脱アミド化アスパラギンを少なくとも50%含む配列番号2のアミノ酸1~738を含むAAVrh.90vp1カプシドタンパク質の異種集団と、N263位、N385位、およびN514位に脱アミド化アスパラギンを少なくとも50%含む配列番号2のアミノ酸138~738を含むAAVrh.90vp2カプシドタンパク質の異種集団と、配列番号2のアミノ酸204~738を含むAAVrh.90vp3カプシドタンパク質の異種集団と、を含み、前記AAVrh.90vp2カプシドタンパク質および前記AAVrh.90vp3カプシドタンパク質が、N263位、N385位、およびN514位に脱アミド化アスパラギンを少なくとも50%含み、脱アミド化の割合が質量分析によって決定され、前記ベクターゲノムが、調節配列と作動可能に連結された異種核酸配列を含み、前記調節配列が、標的細胞において前記異種核酸配列によってコードされる遺伝子産物の発現を指示し、前記脱アミド化アスパラギンが、アスパラギン酸、イソアスパラギン酸、またはそれらの組み合わせである、前記AAV。

【請求項2】

配列番号2のアミノ酸1~738をコードするスクレオチド配列の発現によって產生されるAVVrh.90vp1カプシドタンパク質、AAVrh.90vp2カプシドタ

ンパク質、および A A V r h . 9 0 v p 3 カプシドタンパク質を含む A A V r h . 9 0 カプシド中にベクターゲノムを有する組換え A A V であって、前記 A A V ベクターゲノムが、調節配列と作動可能に連結された異種核酸配列を含み、前記調節配列が、標的細胞において前記異種核酸配列によってコードされる遺伝子産物の発現を指示する、前記組換え A A V 。

【請求項 3】

前記 A V V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質、前記 A A V r h . 9 0 v p 2 カプシドタンパク質、および前記 A A V r h . 9 0 v p 3 カプシドタンパク質が、配列番号 1、または配列番号 1 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 % の同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 2 に記載の組換え A A V 。

10

【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 であって、

前記 5' A A V I T R 配列および前記 3' A A V I T R 配列が、A A V 2 由来である、前記組換え A A V 。

【請求項 5】

(a) 前記 A A V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質が、質量分析によって決定した場合、N 5 7 位に脱アミド化アスパラギンを 6 5 % ~ 9 0 % 含み、

(b) 前記 A A V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質、前記 A A V r h . 9 0 v p 2 カプシドタンパク質、および / もしくは前記 A A V r h . 9 0 v p 3 カプシドタンパク質が、質量分析によって決定した場合、N 2 6 3 位、N 3 8 5 位、および / もしくは N 5 1 4 位に脱アミド化アスパラギンを 8 0 % ~ 1 0 0 % 含み、ならびに / または

(c) 前記 A A V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質、前記 A A V r h . 9 0 v p 2 カプシドタンパク質、および / もしくは前記 A A V r h . 9 0 v p 3 カプシドタンパク質が、質量分析によって決定した場合、さらに N 9 4 位に脱アミド化アスパラギンを 2 % ~ 1 5 % 含むか、さらに N 3 0 5 位に脱アミド化アスパラギンを 1 0 % ~ 2 0 % 含むか、さらに N 4 9 9 位に脱アミド化アスパラギンを 2 % ~ 1 5 % 含むか、もしくはさらに N 5 9 9 位に脱アミド化アスパラギンを 2 % ~ 1 0 % 含む、

請求項 1 または請求項 2 に記載の組換え A A V 。

20

【請求項 6】

前記 A A V r h . 9 0 カプシドが、

配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 7 3 8 をコードする核酸から產生される v p 1 タンパク質、配列番号 1 の核酸から產生される v p 1 タンパク質、もしくは配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 7 3 8 をコードする配列番号 1 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸から產生される v p 1 タンパク質から選択される A A V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質の異種集団、

配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 8 のアミノ酸配列をコードする核酸から產生される 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 1 4 を含む核酸から產生される v p 2 タンパク質、もしくは配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 3 8 ~ 7 3 8 の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 1 4 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸から產生される v p 2 タンパク質から選択される A A V r h . 9 0 v p 2 カプシドタンパク質の異種集団、および、

40

配列番号 2 の少なくともアミノ酸 2 0 4 ~ 7 3 8 のアミノ酸配列をコードする核酸から產生される 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 1 0 ~ 2 2 1 4 を含む核酸から產生される v p 3 タンパク質、もしくは配列番号 2 の少なくともアミノ酸 2 0 4 ~ 7 3 8 のアミノ酸配列をコードする配列番号 1 の少なくともヌクレオチド 6 1 0 ~ 2 2 1 4 と少なくとも 7 0 % 同一の核酸から產生される v p 3 タンパク質から選択される A A V r h . 9 0 v p 3 カプシド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 7】

50

前記 A A V r h . 9 0 v p 1 カプシドタンパク質、前記 A A V r h . 9 0 v p 2 カプシドタンパク質、および / または前記 A A V r h . 9 0 v p 3 カプシドタンパク質をコードする前記核酸配列が、配列番号 1 であるか、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 と少なくとも 8 0 % 同一の核酸配列である、請求項 6 に記載の組換え A A V。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 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。

【請求項 9】

前記組成物が、

10

(a) 隹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、または、

(c) 鼻腔内送達用もしくは筋肉内送達用に製剤化される、

請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

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 ~ 7 のいずれかに一項に記載の組換え A A V。

【請求項 11】

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 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え A A V、または請求項 8 もしくは 9 に記載の組成物、の使用。

20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換え A A V を產生するために有用な組換え A A V 產生システムであって、前記產生システムが、

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする核酸と、

(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 (I T R) 配列、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る遺伝子産物をコードする非 A A V 核酸配列を含む、前記核酸分子と、を含む、細胞培養物であり、

30

前記細胞培養物が、前記 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、

前記組換え A A V 產生システム。

【請求項 13】

前記 (a) の核酸配列が、少なくとも配列番号 1 か、または配列番号 1 と少なくとも 7 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 12 に記載の組換え A A V 產生システム。

【請求項 14】

組換え A A V を生成する方法であって、前記方法が、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 のアミノ酸配列をコードする配列を含む核酸分子と、(b) 機能的な r e p 遺伝子と、(c) 5' A A V I T R 配列、3' A A V I T R 配列、および導入遺伝子を含むミニ遺伝子と、を含み、

40

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、

前記方法。

【請求項 15】

前記配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする配列が、配列番号 1 を含むか、または配列番号 1 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 % の同一性を有する配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

50

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1～7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、前記方法。

【請求項17】

配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列および異種核酸配列を含むプラスミド。

【請求項18】

前記配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列が、配列番号1を含むか、または配列番号1と少なくとも70%の同一性を有する配列を含む、請求項17に記載のプラスミド。

【請求項19】

請求項17または18に記載のプラスミドを含むパッケージング細胞。

10

【請求項20】

組換えAAVの産生のための、請求項19に記載のパッケージング細胞の使用。

【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。

20

【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、Re p遺伝子およびCap遺伝子とともに、小さなゲノム(約4.7kb)および単純な遺伝的成分-逆位末端反復(ITS)を有する一本鎖DNAウイルスであるため、比較的容易に操作されることである。AAVベクターには、ITSおよびAAVカプシドタンパク質のみが必要であり、ITS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(AAVrh.90)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、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)が本明細書に提供される。特定の実施形態では、rAAVは、配列番号1のAAVカプシド配列、または配列番号1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。

50

【0005】

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1～738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生される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1～738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 1タンパク質から選択されるA A V r h . 9 0 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138～738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生される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412～2214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138～738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1の少なくともヌクレオチド412～2214と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 2タンパク質から選択されるA A V r h . 9 0 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204～738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生される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610～2214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2の少なくとも約アミノ酸204～738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1の少なくともヌクレオチド610～2214と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるv p 3タンパク質から選択されるA A V r h . 9 0 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138～738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204～738をコードする核酸配列の産物であるv p 3タンパク質の異種集団を含む、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。

【0006】

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。

【0007】

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 カプシド中に核酸分子をパッケージングすることを可能にするのに十分なA A V r e p 機能およびヘルパー機能と、を含む。

【0008】

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A A V 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)A A V 5' I T R、A A V 3' I T R、および導入遺伝子を含むミニ遺伝子と、(d)A A V カプシドへの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

10

20

30

40

50

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 rAAV と接触させるステップを含み、rAAV が、導入遺伝子を含む。

【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 2 × 150 または 2 × 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 アセンブラを使用して新規に組み立てた。

【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 - 3C】 AAV rh . 90 (配列番号 1) および AAV 8 (配列番号 3) のカプシドの核酸配列の整列を示す。

【図4】 AAV rh . 90 (配列番号 2) および AAV 8 (配列番号 4) 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 eGFP 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 1e12 GC 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 1e11 GC 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、6.9e10 GC / 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。 * p < 0.01, ** p < 0.001.

【図6A - 6B】 AAV ベクターの IM 送達後の筋肉における Lacz 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 Lacz を発現する 3e9 GC 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。

【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、tMCK プロモーターの下で 3D6 抗体を発現するベクターを 1e11 GC 投与した。

【図8】 3D6 または Lacz 導入遺伝子を発現するベクターの (AAV 8 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 rh . 90, AAV rh . 1, AAV rh . 92, AAV rh . 93, AAV rh . 91 . 93, AAV 8, AAV 6 . 2, AAV rh 32 . 33, AAV 7、および AAV 9) は、固有の 6 bp バーコードを有する修飾 ATG 枯渇 GFP 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 IV または ICM 注入した(総用量: 2e13 GC / kg IV および 3e13 GC ICM)。IV 注入された動物は、ベースラインでは AAV 6、AAV 8、および AAV rh 32 . 33 に対して血清陰性であり、AAV 7 および AAV 9 に対して、それぞれ 1 : 5 および 1 : 10 の中和抗体力値を有した。

【図10A - 10C】 IV 送達(図10A および図10B) および ICM 送達(図10C)

10

20

30

40

50

) 後のバーコード化カプシドのRNA発現の分析を示すグラフである。IV投与 - 総用量2e13 GC/kg、30日目に剖検(この動物は、ベースラインでは低レベルのAAV7およびAAV9 Nabを有した)。ICM投与 - 3e13 GC/動物、30日目に剖検。各組織RNA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(10%)を有するように、注入入力材料の頻度に正規化された。8.5~12%の範囲の10個のベクターの入力量。値は、平均値±SEMとして表される。** p < 0.001。

【図11】NHPバーコード研究で使用された様々なAAVカプシドの小規模調製力価を示す棒グラフである。各ドットは、個々の小規模調製を表す。

【図12A-12B】AAVrh.90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】

【0013】

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、AAV単一ゲノム増幅(個々のAAV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AAV配列の単離が記載される。我々は、マウスにおける静脈内(IV)および脳室内(ICV)送達後、ならびにNHPにおけるIVおよび大槽内(ICM)送達後の、天然単離由来AAVベクターの生物学的特性を評価した。その結果、新規のAAVバリエ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。

【0014】

組換えAAVrh.90ベクターが本明細書で提供され、AAVrh.90カプシドと、対象への送達後に導入遺伝子の発現を導く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。rAAVrh.90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rAAVの使用を対象とする。

【0015】

特定の実施形態では、導入遺伝子の中核神経系の細胞への送達に好適なAAVrh.90カプシドを含むベクターが、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送達を介した脳または脊髄への送達が含まれる。特定の実施形態では、AAVrh.90カプシドを含むベクターは、肝臓、心臓、骨格(横紋)筋肉、腎臓、および脾臓を含む末梢器官の細胞への導入遺伝子の送達に非常に好適である。AAVrh.90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(consisting essentially of)」という言葉を用いて解釈および記載されるべきことも意図される。

【0017】

10

20

30

40

50

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。加えて、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 r e p 遺伝子または機能的AAV c a p 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「複製欠陥ウイルスベクター」である。特定の実施形態では、唯一のAAV配列は、AAV逆方向末端反復配列(ITS)であり、ITS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。

10

【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(ITS)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'ITS、コード配列、およびAAV 3'ITSを含む。特定の実施形態では、ITSは、AAV 2由来(カプシドとは異なるAAV供給源)であるか、または別の完全長ITSが選択され得る。特定の実施形態では、ITSは、产生中のr e p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ITS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。

20

【0020】

「発現力セット」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、ウイルスベクター(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、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、AAV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(ITS)および3'ITSである。特定の実施形態では、「導入遺伝子」という用語は、「発現力セット」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。

30

【0021】

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

40

【0022】

本明細書で使用される場合、vp1、vp2、およびvp3タンパク質(代替的にアイソフォームと称される)に関連して使用される「異種集団」という用語は、カプシド内のvp1、vp2、およびvp3タンパク質のアミノ酸配列の違いを指す。AAVカプシドは、vp1タンパク質内、vp2タンパク質内、およびvp3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Asn)残基が含まれる。例えば、特定の亜集団は、アスパラギン-グリシン対中の少なくとも1つ、2つ、3つ、または4つの高度脱アミド化アスパラギン(N)位置を含み、任意選択的に、他の脱アミド化アミノ酸をさらに含み

50

、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。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）。

【0023】

本明細書で使用される場合、vp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vpタンパク質の群を指す。例えば、vp1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AAVカプシド中の少なくとも1つの（1）vp1タンパク質であり、すべてのvp1タンパク質未満であり得る。vp3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AAVカプシド中のすべてのvp3タンパク質よりも少ない1つの（1）vp3タンパク質であり得る。例えば、vp1タンパク質は、vpタンパク質の亜集団であり得、vp2タンパク質は、vpタンパク質の別個の亜集団であり得、vp3は、組み立てられたAAVカプシド中のvpタンパク質のさらなる亜集団であり得る。別の例では、vp1、vp2、およびvp3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。

【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。

【0025】

理論に束縛されることを意図するものではないが、AAVカプシド中のvp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vp1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（vp1、vp2、またはvp3）における脱アミドが構造的に十分許容され、ほとんどが組み立て動態に影響を及ぼさないことを示す。一般に、細胞侵入前に内部に位置すると考えられるVP1固有（VP1-u）領域（～aaa1-137）における広範な脱アミド化は、カプシド組み立ての前にVP脱アミド化が生じることを示唆する。

【0026】

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、Asn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（Asp）またはイソアスパラギン酸（IsoAsp）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Asn）の脱アミド化は、AspまたはIsoAsp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。

10

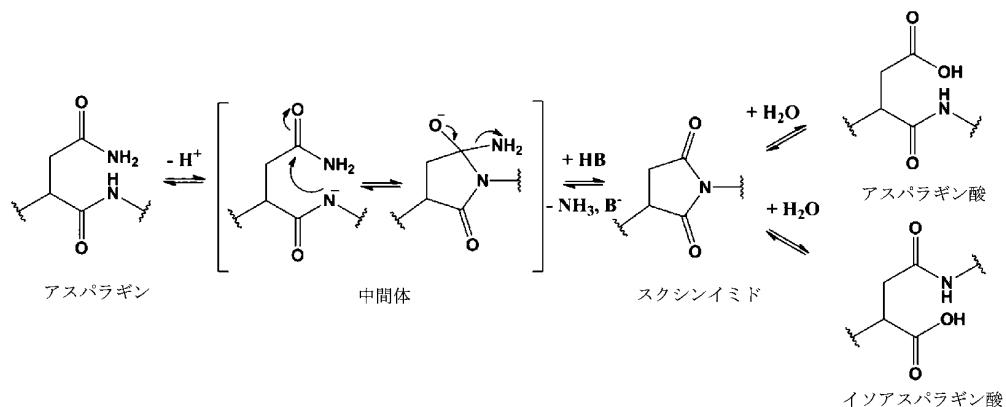
20

30

40

50

【化1】



10

【0027】

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 (Asp)、イソアスパラギン酸 (isoAsp)、アスパルテート、および / または Asp および isoAsp の相互変換ブレンド、またはこれらの組み合わせであり得る。- およびイソアスパラギン酸の任意の好適な比率が存在し得る。例えば、特定の実施形態では、比率は、10 : 1 ~ 1 : 10 のアスパラギン酸対イソアスパラギン酸、約 50 : 50 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。

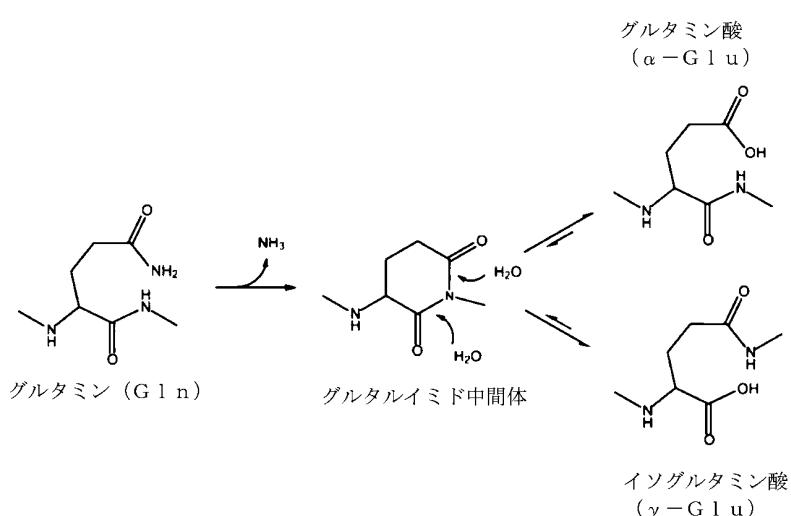
20

【0028】

特定の実施形態では、1つ以上のグルタミン (Q) は、グルタミン酸 (Glu)、すなわち - グルタミン酸、- グルタミン酸 (Glu)、または - および - グルタミン酸のブレンドに脱アミド化され得、共通のグルタ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、10 : 1 ~ 1 : 10 の 対 、約 50 : 50 の : 、もしくは約 1 : 3 の : 、または別の選択された比率であり得る。

20

【化2】



30

【0029】

したがって、r AAV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v p 1、v p 2、および / または v p 3 タンパク質の r AAVカプシド中に亜集団を含む。加えて、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。

40

50

【0030】

特定の実施形態では、A A V 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 v p 1、v p 2、および v p 3 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、v p 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。

【表 1】

アミノ酸	SLC	3LC	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 A A V は、v p 1、v p 2 および v p 3 タンパク質を有する A

10

20

30

40

50

A V 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 A A V の脱アミド化は、2 D ゲル電気泳動、および / または質量分析、および / またはタンパク質モデリング技術を使用して決定され得る。オンラインクロマトグラフィーは、NanoFlexソース(Thermo Fisher Scientific)を備えたQ Exactive HFに結合されたAccelaclaim PepMapカラムおよびThermo UltiMate 3000 RSLCシステム(Thermo Fisher Scientific)で実行され得る。MSデータは、Q Exactive HFのデータ依存性Top - 20法を使用して取得され、調査スキャン(200 ~ 2000 m/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、4 m/z のウィンドウで前駆体の単離を行った。m/z 200 で 120,000 の解像度で、調査スキャンを取得した。HCDスペクトルの解像度は、最大イオン注入時間が 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、单一、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 Fischer 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單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 -NH₂ 基の質量差) を付加するので、脱アミド化ペプチドの質量分析的同定は比較的簡単である。特定のペプチドの脱アミド化の割合は、脱アミド化ペプチドの質量面積を、脱アミド化および天然ペプチドの面積の合計で割ることによって決定される。考えられる脱アミド化部位の数を考慮すると、異なる部位で脱アミド化されている等張種は、単一のピークで共移行し得る。したがって、複数の潜在的脱アミド部位を有するペプチドに由来する断片イオンを使用して、複数の脱アミド部位を特定または区別することができる。これらの事例では、観察された同位体パターン内の相対強度を使用して、異なる脱アミド化ペプチド異性体の相対的存在量を特異的に決定することができる。この方法は、すべての異性体種についての断片化効率が同じであり、脱アミド化部位において独立していることを想定する。これらの例示的な方法のいくつかの変形が使用され得ることは、当業者によって理解されるであろう。例えば、好適な質量分析器は、例えば、Waters Xevo もしくは Agilent 6530などの四重飛行質量分析器(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、MassLynx(Waters)、Pinpoint、および Peppinder(Thermo Fischer Scientific)、Mascot(Matrix Science)、Peaks DB(Bioinformatics Solutions)が含まれ得る。さらに他の技法は、例えば、2017年6月16日にオンラインで公開された X. Jin et al., Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, p. 255 - 267 に記載され得る。

【0034】

10
20
30
40
50

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

【 0 0 3 5 】

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。加えて、または代替え的に、1つ以上の他のアミドアミノ酸を非アミドアミノ酸に変更して、AAVの脱アミド化を低減し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される変異体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に、アスパラギン - グリシン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つの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対に単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。

【 0 0 3 6 】

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。

【 0 0 3 7 】

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 v p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、改変されたコドンのうちの1個以上は、同じアミノ酸をコードし得る。特定の実施形態では、これらの修飾AAV r h . 90の核酸配列は、天然AAV r h . 90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。

【 0 0 3 8 】

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

10

20

30

40

50

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、製品のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長を修正する。しかしながら、いくつかの実施形態では、ORFの断片のみが改変され得る。これらの方法のうちの1つを使用することによって、任意の所与のポリペプチド配列に頻度を適用して、ポリペプチドをコードするコドン最適化コード領域の核酸断片を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、当業者に既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。加えて、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】

10

20

30

40

50

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、雄または雌であつてもよい。

【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 r A A V) 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 . A A V カプシド

配列番号 2 に示される v p 1 配列を有する新規の A A V カプシドタンパク質が、本明細書に提供される。A A V 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、V P 1 、 V P 2 、および V P 3 として参照され、 V P 1 は最長であり、 V P 3 は最短である。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 0 : v p 1 - 配列番号 1 の n t 1 ~ 2 2 1 4 、 v p 2 - n t 4 1 2 ~ 2 2 1 4 、 v p 3 - n t 6 1 0 ~ 2 2 1 4

【0044】

図 3 A ~ 図 3 C に、 A A V r h . 9 0 カプシドと A A V 8 カプシド配列との核酸配列の整列を示す。

アミノ酸(a a)

A A V r h . 9 0 : v p 1 - 配列番号 2 の 1 ~ 7 3 8 、 v p 2 - a a 1 3 8 ~ 7 3 8 、 v p 3 - a a 2 0 4 ~ 7 3 8

【0045】

図 4 に、 A A V r h . 9 0 カプシドと A A V 8 カプシド配列とのアミノ酸配列カプシドの整列を示す。

【0046】

A A V r h . 9 0 (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 0 (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。

【0047】

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つて、該 r A A V の各々が、(a) 約 6 0 個のカプシド v p 1 タンパク質、 v p 2 タンパク質、および v p 3 タンパク質を含む A A V カプシドであつて、 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

10

20

30

40

50

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、AAVカプシドと、(b) AAVカプシド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆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AAV核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む、組成物が提供される。

【0048】

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。10

【0049】

特定の実施形態では、新規の単離されたAAVr h . 90カプシドが提供される。AAVr h . 90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。AAVr h . 90(配列番号2)のvp1、vp2、およびvp3のうちの少なくとも1つを含むrAAVが、本明細書に提供される。また、AAVr h . 90(配列番号1)のvp1、vp2、およびvp3のうちの少なくとも1つによってコードされるAAVカプシドを含むrAAVも、本明細書に提供される。特定の実施形態では、vp1、vp2、および/またはvp3は、AAVr h . 90(配列番号2)の全長カプシドタンパク質である。他の実施形態では、vp1、vp2、および/またはvp3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。20

【0050】

さらなる態様では、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)が提供され、(A) AAVr h . 90カプシドであって、(1)配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生されるvp1タンパク質、配列番号2から產生されるvp1タンパク質、もしくは配列番号2の1~738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるvp1タンパク質から選択されるAAVr h . 90vp1タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生されるvp2タンパク質、配列番号2の少なくともヌクレオチド412~2214を含む配列から產生されるvp2タンパク質、もしくは配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1の少なくともヌクレオチド412~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるvp2タンパク質から選択されるAAVr h . 90vp2タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする核酸配列からの発現により產生されるvp3タンパク質、配列番号2の少なくともヌクレオチド610~2214を含む配列から產生されるvp3タンパク質、もしくは配列番号2の少なくとも約アミノ酸204~738の予測されたアミノ酸配列をコードする配列番号1の少なくともヌクレオチド610~2214と少なくとも70%同一の核酸配列から產生されるvp3タンパク質から選択されるAAVr h . 90vp3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vp1タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるvp2タンパク質の異種集団、および配列番号2の少なくともアミノ酸204~738をコードする核酸配列の産物であるvp3タンパク質の異種集団、を含み、vp1、vp2、およびvp3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、AAVr h . 90カプシドタンパク質のうちの1つ以上を含む、AAVr h . 90カプシドと、(B) AAVr h . 90カブ304050

シド中のベクターゲノムであって、ベクターゲノムが、AAV逆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AAV核酸配列を含む、ベクターゲノムと、を含む。

【0051】

特定の実施形態では、AAVrh.90のVP1、VP2、およびVP3タンパク質は、配列番号2のアスパラギン-グリシン対中に少なくとも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~N57、~N263、~N385、および/または~N514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12B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、AAVrh.90は、脱アミド化された他の残基を有し得(例えば、~N305、~N499、および/もしくは~N599、典型的には20%未満)、かつ/またはリン酸化(例えば、S149で)(例えば、存在する場合、約2~約30%、または約2~約20%、もしくは約2~約10%の範囲で)、または酸化(例えば、~W23、~M204、~M212、W248、W282、M405、M473、W480、W505、M526、~N544、M561、および/もしくは~M607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。

【表2】

表-AAVrh.90脱アミド化

VP1番号付けに基づく AAVrh.90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
~N263+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N305+脱アミド化	5~30、5~20、または10~20
~N385+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N499+脱アミド化	2~15、2~10、または5~10
~N514+脱アミド化	65~90、70~95、80~95、75~100、80~100、または90~100
~N599+脱アミド化	2~15、2~10、または5~10

【0052】

特定の実施形態では、AAVrh.90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.90配列に基づく。配列番号2を参照されたい。

【0053】

特定の実施形態では、AAVrh.90カプシドは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるVP1タンパク質の異種集団、配列番号2の少なくとも約アミノ酸138~738でのアミノ酸配列をコードする核酸配列の産物であるVP2タンパク質の異種集団、および配列番号2の少なくともアミノ酸204~738をコードする核酸配列の産物であるVP3タンパク質の異種集団を含む。

【0054】

特定の実施形態では、AAVrh.90 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%

10

20

30

40

50

同一の核酸配列を選択して、A A V r h . 9 0 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、r A A V 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%、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n t 4 1 2 ~ 約n t 2 2 1 4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%、少なくとも99%同一の配列を有し、配列番号2のv p 2 カプシドタンパク質(約a a 1 3 8 ~ 7 3 8)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n t 6 1 0 ~ 約n t 2 2 1 4の核酸配列、または配列番号1の約n t 6 1 0 ~ 約n t 2 2 1 4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v p 3 カプシドタンパク質(約a a 2 0 4 ~ 7 3 8)をコードする。

【0055】

本発明はまた、A A V r h . 9 0 カプシド配列(配列番号2)、または変異体A A V r h . 9 0 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A A V r h . 9 0 カプシドの產生において使用することができる。

【0056】

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v p 1 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、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。

【0057】

「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。

【0058】

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「パーセント同一な」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。

【0059】

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

10

20

30

40

50

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。

【0060】

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. Thompson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690(1999)を参照されたい。

【0061】

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も含め、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。

【0062】

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方法に有用なベクターは、少なくとも、AAVrh.90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、AAVrh.90の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 capタンパク質およびrepタンパク質の両方を含み得る。AAV repおよびcapの両方が提供されるベクターでは、AAV rep配列およびAAV cap配列は、いずれも起源が1つの血清型（例えば、すべてAAVrh.90起

10

20

30

40

50

源)であり得る。あるいは、*r e p*配列が、*c a p*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、*r e p*配列および*c a p*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*r e p*配列を、異なるAAV血清型の*c a p*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AAV2/8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(s c - AAV)である。US2012/0141422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。s c AAV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、s c AAVは、小さなタンパク質のコード遺伝子(最大約55k d)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。

【0063】

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 . 90カプシドを利用するAAVベクターは、AAV2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Mussolini 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、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、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。

【0064】

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。

【0065】

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は、1つ以上の導入遺伝子を含み得る。

【0066】

特定の実施形態では、rAAV r h . 90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。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 ベクターが本明細書に提供され、抗神経成長因子(N G F)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 N G F 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 6 8 】

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 ベクターが本明細書に提供され、抗神経成長因子(N G F)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 N G F 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 6 9 】

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 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(G L P - 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 G L P - 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 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。

【 0 0 7 0 】

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 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(G L P - 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 G L P - 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 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 1 】

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 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 I 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。

【 0 0 7 2 】

30

特定の実施形態では、r A A V r h . 9 0 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 - I g G 融合タンパク質を含む、I g E 、 I L - 3 2 、または I L - 4 / I L - 1 3 受容体のインターロイキン - 4 受容体(I L - 4 R)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 I g E 、 I L - 3 2 、または I L - 4 R 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。

【 0 0 7 3 】

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(L a c Z)、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(G F P)、増強 G F P (E G F P)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(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既知の他のもの(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産生され得るもの)、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。

40

【 0 0 7 4 】

50

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、β-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。

【0075】

しかしながら、導入遺伝子は、タンパク質、ペプチド、RNA、酵素、ドミナントネガティブ変異体、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非マーカー配列であることが望ましい。望ましいRNA分子は、tRNA、dsRNA、リボソームRNA、触媒RNA、siRNA、低分子ヘアピンRNA、トランススプライシング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。

【0076】

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DNA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DNAが内部リボザイム進入部位（IRES）によって分離された、各サブユニットをコードするDNAを含む。これは、サブユニットの各々をコードするDNA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DNAおよびIRESの総サイズが5キロベース未満）に望ましい。IRESの代替として、翻訳後事象において自己切断する2Aペプチドをコードする配列によってDNAが分離されてもよい。例えば、M. L. Donnelly, et al., J. Gen. Virol., 78 (Pt 1) : 13 - 21 (Jan 1997)、Furler, S., et al., Gene Ther., 8 (11) : 864 - 873 (June 2001)、Klumpp, H., et al., Gene Ther., 8 (10) : 811 - 817 (May 2001) を参照されたい。この2Aペプチドは、IRES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合、所望の導入遺伝子またはサブユニットを有するrAAV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AAV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AAV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。

【0077】

10

20

30

40

50

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。

【0078】

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phins（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。

【0079】

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、腫瘍壊死因子 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ン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。

【0080】

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（V

10

20

30

40

50

L D L)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、j u n、f o s、m a x、m a d、血清応答因子(S R F)、A P - 1、A P 2、m y b、M y o D およびミオゲニンなどの転写因子、タンパク質を含むE T Sボックス、T F E 3、E 2 F、A T F 1、A T F 2、A T F 3、A T F 4、Z F 5、N F A T、C R E B、H N F - 4、C / E B P、S P 1、C C A A Tボックス結合タンパク質、インターフェロン制御因子(I R F - 1)、ウィルムス腫瘍タンパク質、E T S結合タンパク質、S T A T、G A T Aボックス結合タンパク質、例えばG A T A - 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

【0081】

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クカルバミラーゼ、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V I I I I 因子、第I X 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c o A デヒドロゲナーゼ、プロピオニルC o A カルボキシラーゼ、メチルマロニルC o A ムターゼ、グルタリルC o A 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(C F T R)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(G U S B)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E 3 A(U B E 3 A)である。さらに有用な遺伝子産物としては、U D P グルクロノシルトランスフェラーゼファミリー1メンバーA 1(U G T 1 A 1)が挙げられる。

20

【0082】

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

【0083】

遺伝子の発現の低減および/または調節は、がんおよび乾癬と同様に、過増殖細胞を特徴とする過増殖状態の治療に特に望ましい。標的ポリペプチドとしては、正常細胞と比較して、過剰増殖細胞において排他的またはより高いレベルで產生されるポリペプチドが含まれる。標的抗原としては、m y b、m y c、f y nなどの癌遺伝子、ならびに転座遺伝子b c r / a b l、r a s、s r c、P 5 3、n e u、t r k、およびE G R F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。

40

【0084】

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」指向性の抗体を產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

50

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。

【0085】

さらに他の有用な遺伝子産物としては、血友病B（第IX因子を含む）および血友病A（第VII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6,200,560号および米国特許第6,221,349号）を含む血友病の治療に使用されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、ミニ遺伝子は、10個のアミノ酸シグナル配列をコードする第VII因子重鎖の最初の57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、A1およびA2ドメイン、ならびにBドメインのN末端からの5個のアミノ酸、かつ/またはBドメインのC末端の85個のアミノ酸、ならびにA3、C1、およびC2ドメインをさらに含む。さらに他の実施形態では、第VII因子重鎖および軽鎖をコードする核酸は、Bドメインの14個のアミノ酸をコードする42個の核酸によって分離される单一ミニ遺伝子内に提供される[米国特許第6,200,560号]。

10

【0086】

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1A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Co Aムターゼ、中鎖アセチルCo A欠乏症に関連する中鎖アシルCo 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-コレステ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、WO 2015 / 164778に記載のL D L Rバリエント、プロタンパク質変換酵素サブチリシン/ケキシン9型、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・ナイアン症候群に関連するヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスクフェラーゼ、ビオチミダーゼ欠損症に関連するビオチミダーゼ、ファブリー病に関連する-ガラクトシダーゼA（a-G a 1 A）、G M 1 ガングリオシドーシスに関連する-ガラクトシダーゼ（G L B 1）、ウィルソン病に関連するA T P 7 B、ゴーシェ病2型および3型に関連する-グルコセレブロシダーゼ、ツェルウェーガー症候群に関連するペルオキシソーム膜タンパク質70 kDa、異染性白質ジストロフィーに関連するアリールスルファターゼA（A R S A）、クラッベ病に関連するガラクト

20

30

40

50

セレブロシダーゼ (GALC) 酵素、ポンペ病に関連する - グルコシダーゼ (GAA) 、ニーマン・ピック病A型に関連するスフィンゴミエリナーゼ (SMPD1) 遺伝子、成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) に関連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連するカルバモイルリン酸シンターゼ1 (CPS1) 、脊髄性筋萎縮症に関連する生存運動ニューロン (SMN) タンパク質、ファーバー脂肪肉芽腫症に関連するセラミダーゼ、GM2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連するb-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連するアスパルチルグルコサミニダーゼ、フコシドーシスに関連する - フコシダーゼ、 - マンノシドーシスに関連する - マンノシダーゼ、急性間欠性ポルフィリン症 (AIP) に関連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 (AADC) およびチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 、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 (SERCA2) 、および心臓アデニル酸シクラーゼ、様々ながんの治療のためのp53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がんの治療のための様々なインターロイキンのうちの1つのようなサイトカイン、筋ジストロフィーの治療のためのジストロフィンまたはミニジストロフィンおよびユートロフィンまたはミニユートロフィン、ならびに糖尿病の治療のためのインスリンまたはGLP-1が挙げられる。

【0087】

代替的に、または追加的に、本発明のベクターは、本発明のAAV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50%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、VP1、VP2、VP3、VP4、およびVPG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、E1 (Mまたはマトリックスタンパク質とも呼ばれる) 、E2 (Sまたはスパイクタンパク質とも呼ばれる) 、E3 (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

10

20

30

40

50

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、H A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、ブルータンク)が含まれる。

【0088】

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。加えて、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.Virology, 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。

【0089】

パボ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ウイルス)ならびにパピローマウイルス亜科(がん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、水痘帯状疱疹)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)、感染性鼻気管炎、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、

10

20

30

40

50

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。

【0090】

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. ducrey়i*（軟性下疳を引き起こす）、ブルセラ、*Franisella tularensis*（野兎病を引き起こす）、エルシニア（パストレラ属）、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。リケッチャ感染症には、チフス熱、ロッキー山紅斑熱、Q熱、およびリケッチャ痘が含まれる。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、吸虫またはフルーク、および条虫（サンダムシ）感染症が挙げられる。

【0091】

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）、Department of Health and Human Services, USA〕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）、*Franisella 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（イプシロン毒素）、*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

10

20

30

40

50

びに二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。加えて、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ベ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。

【0092】

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。

10

【0093】

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。

20

【0094】

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、Zeitz et al., Am J Hum Genet. 2013 Jan 10; 92(1): 67-75. 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。

30

【0095】

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既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

40

50

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。

【 0 0 9 6 】

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

【 0 0 9 7 】

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

【 0 0 9 8 】

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、同第62/183,825号、同第62/254,225号、および同第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。

【 0 0 9 9 】

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既知の他のもの（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。

30

【 0 1 0 0 】

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。

40

【 0 1 0 1 】

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

50

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失わせる配列である。

【 0 1 0 2 】

調節配列は、ベクターでトランスフェクトされた、または本明細書に記載されるように產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。

【 0 1 0 3 】

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 R N A プロセシングシグナル、細胞質 m R N A 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。

【 0 1 0 4 】

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、S V - 4 0 に由来し、S D - S A と称される 1 0 0 b p 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 , 1 9 9 9 Proc . Nat l . Acad . Sci . , U S A , 9 6 : 3 9 0 6 - 3 9 1 0 を参照されたい）。Poly A シグナルは、限定されないが、S V - 4 0 、ヒト、およびウシを含む多くの好適な種に由来し得る。

【 0 1 0 5 】

本明細書に記載の方法に有用な r A A V の別の調節成分は、内部リボソーム進入部位 (I R E S) である。I R E S 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。I R E S (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產生するか、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 I R E S 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、R P E 、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、I R E S は、r A A V ベクター内の導入遺伝子の 3' に位置する。

【 0 1 0 6 】

一実施形態では、A A V 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。r A A V に用いられるプロモーターは、所望の標的細胞に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。

【 0 1 0 7 】

発現カセットは、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' I T

10

20

30

40

50

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、dMCK (509bp) または tMCK (720bp) のプロモーターなどのMCK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. Epub 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、SPc5-12 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、CMV プロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは、TBG プロモーターである。別の実施形態では、CB7 プロモーターまたは CAG プロモーターが使用される。CB7 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.sch1.edu/LSPD 、 1 抗 - トリプシン (A1AT) 、ヒトアルブミン : Miyatake et al. , J. Virol. , 71: 5124-32 (1997) 、 humAlb 、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] 。 TTR 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、 LSP (845nt) 25 (イントロンレス s c AAV を必要とする) 。

【 0108 】

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 (CMV) 最初期エンハンサー / プロモーター、 SV40 初期エンハンサー / プロモーター、 JC ポリモマウイルスプロモーター、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) または神経膠原線維酸性タンパク質 (GFP) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV-1) 潜伏関連プロモーター (LAP) 、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 長末端反復 (LTR) プロモーター、ニューロン特異的プロモーター (NSE) 、血小板由来増殖因子 (PDGF) プロモーター、 hSYN 、メラニン凝集ホルモン (MCH) プロモーター、 CBA 、マトリックス金属タンパク質プロモーター (MPP) 、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。

【 0109 】

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) - PDGR 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。

【 0110 】

10

20

30

40

50

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A）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Aが知られている。一例では、ポリA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Aシグナルが選択される。さらに他の好適なポリA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）。

【0111】

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。

【0112】

特定の実施形態では、発現カセットは、miR-183の標的配列である少なくとも1つのmiRNA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、AGTGAAATTCTACCAAGTGCCATA（配列番号9）を含むmiR-183標的配列を含む（miR-183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カセットは、miR-183シード配列に100%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、miR-183標的配列は、約7ヌクレオチド～約28ヌクレオチド長であり、miR-183シード配列に少なくとも100%相補的な領域を、少なくとも1つ含む。特定の実施形態では、miR-183標的配列は、配列番号9に部分的に相補的な配列を含み、したがって、配列番号9に整列させた場合、1つ以上のミスマッチがある。特定の実施形態では、miR-183標的配列は、配列番号9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10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、miR-183標的配列は、100%相補的な領域を含み、また、miR-183標的配列の長さの少なくとも30%を含む。特定の実施形態では、100%相補性の領域は、miR-183シード配列と100%相補性を有する配列を含む。特定の実施形態では、miR-183標的配列の残部は、miR-183と少なくとも約80%～約99%相補性を有する。特定の実施形態では、発現カセットまたはベクターゲノムは、miR-183標的配列を含み、切断された配列番号9（すなわち、配列番号9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10個のヌクレオチドを欠

10

20

30

40

50

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。

【0113】

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10)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100%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28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100%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10に部分的に相補的な配列を含み、したがって、配列番号10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10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10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、100%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30%も含む。特定の実施形態では、100%相補性の領域は、m i R - 1 8 2 シード配列と100%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80%～約99%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10(すなわち、配列番号10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10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。

【0114】

「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、連続的であってもよい。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。

【0115】

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m i R N A 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、G G A T 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、C A C G T G またはG C A T G C である。

【0116】

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m i R N A 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m i R N A 標的配列、少なくとも3つの異なるm i R N A 標的配列、または少なくとも4つの異なるm i R N A 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m i R N A 標的配列、および異なる第4のm i R N A 標的配列を含んで

10

20

30

40

50

もよい。

【0117】

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。

【0118】

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。

10

【0119】

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。

【0120】

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。

20

【0121】

また、本明細書に記載されるAAVでトランスフェクトされた宿主細胞も、本明細書で提供される。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E1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repおよび／またはcap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。

30

【0122】

本明細書に記載のrAAVの產生に必要なミニ遺伝子、rep配列、cap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、rAAVビ

40

50

リオンを生成する方法は既知であり、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。

【0123】

本明細書に記載のベクターの產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。かかるプラスミドは、実施例のセクションに記載されている。

【0124】

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AAV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、HEPES）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、Tween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Tween20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（Perfluoron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、rAAVが注入チューブに付着するのを防ぐが、インビボでrAAV結合活性を妨げない成分を含むべきである。

【0125】

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が、対象に筋肉内投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、静脈内投与される。他の実施形態では、医薬組成物は、脳室内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（ICM）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（例えば、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。

【0126】

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（CSF）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（ICV）を含む）、後頭下/槽内、および/またはC1-2穿刺を含み得る。例えば、材料は、腰部穿刺により、クモ膜下腔空間にわたって拡散させるために導入され得る。別の実施例では、注入は、大槽内であり得る。

【0127】

本明細書で使用される場合、「槽内送達」または「槽内投与」という用語は、大槽小脳延髄（cisterna magna cerebellomedularis）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。

【0128】

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

10

20

30

40

50

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 μ L ~ 約 1 0 mL の容量で送達され得る。一実施形態では、容量は、約 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 7 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 2 5 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 7 5 μ L である。さらに別の実施形態では、容量は、約 2 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 2 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 3 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 4 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 5 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 6 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 7 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 8 5 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 0 0 μ L である。別の実施形態では、容量は、約 1 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 2 mL である。別の実施形態では、容量は、約 2 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 3 mL である。別の実施形態では、容量は、約 3 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 4 mL である。別の実施形態では、容量は、約 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 5 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 6 mL である。別の実施形態では、容量は、約 6 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 7 mL である。別の実施形態では、容量は、約 8 mL である。別の実施形態では、容量は、約 8 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 9 mL である。別の実施形態では、容量は、約 9 . 5 mL である。別の実施形態では、容量は、約 1 0 mL である。

【0129】

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 0⁷ ~ 1 0¹⁴ 個のベクターゲノム (v g / mL) (ゲノムコピー / mL (G C / mL) とも呼ばれる) の範囲である。一実施形態では、rAAVベクターゲノムは、リアルタイムPCRによって測定される。別の実施形態では、rAAVベクターゲノムは、デジタルPCRによって測定される。Lock et al, Absolute determination of single-stranded and self-complementary adenovirus-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14を参照されたい(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)。

【0130】

好ましくは、濃度は、約 1 . 5 × 1 0⁹ v g / mL ~ 約 1 . 5 × 1 0¹³ v g / mL であり、より好ましくは、約 1 . 5 × 1 0⁹ v g / mL ~ 約 1 . 5 × 1 0¹¹ v g / mL である。一実施形態では、有効濃度は、約 1 . 4 × 1 0⁸ v g / mL である。一実施形態では、有効濃度は、約 3 . 5 × 1 0¹⁰ v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 5 . 6 × 1 0¹¹ v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 5 . 3 × 1 0¹² v g / mL である。さらに別の実施形態では、有効濃度は、約 1 . 5 × 1 0¹² v g / mL である。別の実施形態では、有効濃度は、約 1 . 5 × 1 0¹³ v g / 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。

【0131】

一実施形態では、投用量は、約 1 . 5 × 1 0⁹ v g / kg の体重 ~ 約 1 . 5 × 1 0¹³ v g / kg であり、より好ましくは、約 1 . 5 × 1 0⁹ v g / kg ~ 約 1 . 5 × 1 0¹¹ v g / kg である。一実施形態では、投与量は、約 1 . 4 × 1 0⁸ v g / kg である。一実施形態では、投与量は、約 3 . 5 × 1 0¹⁰ v g / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 5 . 6 × 1 0¹¹ v g / kg である。別の実施形態では、投与量は、約 5 . 3 × 1 0¹² v g / kg である。さらに別の実施形態では、投与量は、約 1 . 5 × 1 0¹² v

10

20

30

40

50

g / 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 $3.0 \times 10^{13} vg / kg$ 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。

【0132】

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 $10^7 \sim 10^{13}$ 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。

10

【0133】

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。

【0134】

D. 方法

20

別の態様では、標的組織を形質導入する方法が提供される。一実施形態では、本方法は、本明細書に記載される $AAVrh.90$ カプシドを有する AAV 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、 $AAVrh.90$ と称される AAV が CNS（脳）、肝臓、心臓、および筋肉組織を効果的に形質導入することを示している。したがって、 $AAVrh.90$ カプシドを有する $rAAV$ を投与することを含む、筋肉を形質導入する方法が、本明細書に提供される。別の実施形態では、 $AAVrh.90$ カプシドを有する $rAAV$ を投与することを含む、脳を形質導入する方法が、本明細書に提供される。別の実施形態では、 $AAVrh.90$ カプシドを有する $rAAV$ を投与することを含む、肝臓を形質導入する方法が、本明細書に提供される。別の実施形態では、 $AAVrh.90$ カプシドを有する $rAAV$ を投与することを含む、心臓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。

30

【0135】

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、標的組織を高レベルで形質導入することができる。したがって、導入遺伝子を肝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、 $AAVrh.90$ 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、導入遺伝子を肝臓に送達するための、 $AAVrh.90$ 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、本方法は、 $AAVrh.90$ カプシドを有する $rAAV$ を投与して、肝臓の細胞に導入遺伝子を送達することを含み、導入遺伝子は、プロタンパク質変換酵素サブチリシン/ケキシン9型（PCSK9）（コレステロール関連障害）、トランスサイレチン（TTR）（トランスサイレチンアミロイドーシス）、H A O、アボリポタンパク質C-IIII（APOC3）、第VII因子、第IX因子、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）、リポタンパク質リバーゼ（LPL）（リポタンパク質リバーゼ欠損症）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、オルニチントランスカルボミラーゼ（OTC）、カルノシナーゼ（CN1）、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ（SMPD1）（ニーマン・ピック病）、ヒポキサンチン・グアニンホスホシルトランスフェラーゼ（HGPRT）、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体（BCKDC）（マップルー）、およびエリスロポエチン（EPO）から選択される。

40

50

【0136】

また、筋細胞に導入遺伝子を送達する方法も、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.90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、導入遺伝子を筋肉に送達するための、AAVrh.90カプシドを有するrAAVの使用が提供される。

【0137】

また、導入遺伝子を心臓細胞に送達する方法も、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.90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.90カプシドを有するrAAVの使用が提供される。

10

【0138】

また、腎細胞に導入遺伝子を送達する方法も、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.90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.90カプシドを有するrAAVの使用が提供される。

【0139】

また、脾臓細胞に導入遺伝子を送達する方法も、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.90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、導入遺伝子を脾臓に送達するための、AAVrh.90カプシドを有するrAAVの使用が提供される。

20

【0140】

また、脳細胞に導入遺伝子を送達する方法も、本明細書に提供される。本方法は、細胞を、AAVrh.90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、導入遺伝子を脳に送達するための、AAVrh.90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、rAAVは、ICM送達を使用して送達される。

【0141】

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全体の中から単離されてきた。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。加えて、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よ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-単一ゲノム増幅（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可能にした。

30

【0142】

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

40

50

減されたウイルスゲノムのPCR增幅を可能にする。AAV-SGAのPCRアンプリコンは、 2×150 または 2×250 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。

【0143】

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。AAVの異なるクレードからの複数のウイルスが単一の試料から同定されており、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、单一の肝臓組織試料から単離された。

10

【0144】

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ンジニアの問題に対処する。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。

【0145】

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。

E.

20

【実施例】

【0146】

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。

【0147】

新規AAVの単離

30

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 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'-GCTGCCTCAACTGGACCAATGAGAAC-3')（配列番号5）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'-CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA-3')（配列番号6）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。

40

【0148】

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(AA V-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。ボ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 2×150 または 2×250 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

50

/ 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 NTI AlignX ソフトウェア (Thermo Fisher) を使用して配列解析を行った。

【0149】

新規 AAV カプシドを使用したベクター產生

目的の PCR 産物からの AAV カプシド遺伝子の DNA 配列を、TOPO クローニングし、増幅した (Invitrogen)。増幅されたカプシド遺伝子を、AAV2 Rep 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 AAV トランスプラスミド骨格にさらにクローニングした。

10

【0150】

AAV ベクターを生成し、以前に記載されているように、Penn Vector Core によって滴定した (例えば、Lock, M., et al. (2010) Hum. Gene Ther. 21 (1259) : -71)。HEK293 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 PCR で滴定した (例えば、Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25 : 115 - 125 を参照されたい)。

20

【0151】

げっ歯類における新規の AAV 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、the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pennsylvania により認可された。C56BL/6J マウスは、Jackson Laboratory から購入した。GFP 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、12 時間の明暗サイクルを維持した。各暗期は 7 時 p.m. (± 30 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。

30

【0152】

被験試料および研究設計

マウスは、マウス 1 匹当たり 1×10^{12} GC の各ベクターが 0.1 mL 外側尾静脈を介して静脈内 (IV) 投与されたか、またはマウス 1 匹当たり 1×10^{11} GC の用量で 5 uL 脳室内 (ICV) 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。

40

【0153】

注入 14 日後、CO₂ 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 10 % 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、 OCT 中で凍結し、GFP 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。

【0154】

ベクターエネルギー分布

QIAamp DNA ミニキット (QIAGEN) で組織ゲノム DNA を抽出し、AAV ベクターゲノムを、Taqman 試薬 (Applied Biosystems, Life Technologies) とともにベクターの EGFP 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 PCR によって定量化した。

【0155】

50

レポーター遺伝子の可視化

直接 GFP 蛍光を観察するために、組織試料を、ホルマリン中で約 24 時間固定し、PBS 中で短時間洗浄し、PBS 中の 15 % および 30 % 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、OCT 包埋媒体中で凍結した。核の対比染色としての DAPI を含む Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 中で、切片を載せた。

【0156】

パラフィン包埋組織試料に対して、GFP 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 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 / ビオチンプロッキング試薬 (Vector Laboratories) で各々 15 分間、およびプロッキング緩衝液 (PBS 中の 1 % 口バ血清 + 0.2 % の Triton) で 10 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 45 分間インキュベーションした (Jackson Immunoresearch)。一次抗体のニワトリ抗 GFP (Abcam ab13970) および内皮細胞マーカーのウサギ抗 CD31 (Abcam ab28364) を使用した。Vectastain Elite ABC キット (Vector Laboratories) を使用して、製造元の指示に従って、DAB 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。

【0157】

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、PBS 中の 1 % の口バ血清 + 0.2 % の Triton で 15 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 (45 分間、Jackson Immunoresearch) 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 GFP (Abcam ab13970)、ウサギ抗 CD31 (Abcam ab28364)、およびマウス抗 NF-200 (クローン RT97, Millipore CBL212) であった。一次抗体を一緒に混合し、GFP 抗体および NF-200 抗体を、それぞれ FITC 標識および TRITC 標識の二次抗体により検出した。CD31 に対するウサギ抗体のシグナルを、VectaFluor (商標) Excel Amplified Dylight (登録商標) 488 抗 - ウサギ IgG キットを使用して、製造元のプロトコルに従って (Vector Labs) 増強した。蛍光および明視野の顕微鏡画像は、Nikon Eclipse Ti E 顕微鏡を用いて撮影した。

【0158】

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 (AAVrh90、AAVrh91、AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93、AAV8、AAV6.2、AAVrh32.33、AAV7、および AAV9) を使用して、修飾 ATG 枯渇自己相補 eGFP (dGFP) 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 bp バーコードを有する dGFP 導入遺伝子を含んだ。導入遺伝子は、CB8 プロモーターおよび SV40 ポリアデニル化配列 (AAVsc.CB8.dGFPbarcode.SV40) を含んだ。AAV ベクターを生成し、以前に記載されているように、Penn Vector Core によって滴定した (例えば、Lock, M., et al. (2010) Hum. Gene Ther. 21: 1259-71 を参照されたい)。HEK293 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、SV40 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 PCR で滴定した (例えば、Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25: 115-25 を参照されたい)。

【0159】

10

20

30

40

50

10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、IV送達を介して2e13 GC/kgおよび3e13 GC/動物であり、髄腔内空間への大槽内(ICM)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RNA発現分析のためにRNAlater(QIAGEN)で回収された。

【0160】

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(*Institutional Animal Care and Use Committee*)によって承認された。カニケイザルマカク(*Macaca fascicularis*)は、*Bristol Meyers Squibb*(USA)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(*Philadelphia, PA*)の非ヒト霊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。

10

【0161】

ICM試験には、10歳齢、雄、8kgの動物を使用した。IV試験には、6歳齢、雄、6.98kgの動物を使用した。この動物を、AAV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、AAV6、AAV8、およびAAVrh32.33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、AAV7およびAAV9に対して、それぞれ1:5および1:10の中和抗体力値を有した。

20

【0162】

ICM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、21G~27G、1~1.5インチのQuincke脊椎針(*Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA*)を、CSF流れが観察されるまで、後頭下空間へと前進させた。1mLのCSF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(*OEC 9800 C-arm; GE Healthcare, Little Chalfont, UK*)により確認した。CSF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、180mg/mLのイオヘキソール造影剤の投与を容易にした(*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*)。針の配置を確認した後、被験試料を含むシリジング(1mLに加えてシリジング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、30±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。

30

【0163】

IV注入手順

マカクに、10mLのベクター被験試料を、注入ポンプ(*Harvard Apparatus, Holliston, MA*)を介して1mL/分の速度で末梢静脈に投与した。

40

【0164】

導入遺伝子の発現分析

全組織RNAを、製造元の仕様(*Life Technologies*)に従って、TRIZOLを使用して、すべてのRNAlater処理組織から抽出した。抽出したRNAを、製造元のプロトコルに従ってDNase Iで処理した(*Roche, Basel, Switzerland*)。RNAを、RNeasyミニキット(QIAGEN)を使用して精製した。cDNAの逆転写合成は、Applied Biosystemsの高容量cDNA逆転写酵素キット(*Life Technologies*)を使用して実施した。117bpのアンプリコンをPCR増幅するために、6bp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を使用し(フォワードプライマー: GGC GAA C A

50

G C G G A C A C C G A T A T G A A (配列番号7)、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8))、Q5高忠実度ホットスタート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。バーコードリードを、発現分析パッケージ(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/)、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AAVrh90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ペ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。

【0166】

AAVrh90、AAV8、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導入遺伝子とパッケージ化した(例えば、Lock, M., et al. (2010) Hum. Gene Ther. 21:1259-71 and Lock, M., et al. (2014) Hum. Gene Ther. Methods 25:115-25を参照されたい)。3e13
30

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14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。

【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で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 Research)を用いて検出する。

10

20

30

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 】

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。

10

【 0 1 6 9 】

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変性させ、 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 ° C で 1 0 分間還元した。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、変性タンパク質溶液に pH 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 ° C で 4 時間一晩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。

20

【 0 1 7 0 】

L C - M S / M S

A c c l a i m P e p M a p カラム (長さ 1 5 c m 、 内径 3 0 0 μ m) および N a n o F l e x 源 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を備えた Q E x a c t i v e H F と結合した T h e r m o U l t i M a t e 3 0 0 0 R S L C システム (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) 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 3 5 ° C の温度で維持した。移動相 A (0 . 1 % ギ酸を含む M i l l i Q 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。 1 5 分間にわたって 4 % B から 6 % B へ、次いで、 2 5 分間 (合計 4 0 分間) で 1 0 % B へ、その後 4 6 分間 (合計 8 6 分間) で 3 0 % 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、 7 5 c m × 1 5 u m の内径であり、 2 ミクロンの C 1 8 媒体 (A c c l a i m P e p M a p) が充填される。負荷、導入、および洗浄ステップにより、 L C - M S / M S 実行の合計時間は約 2 時間であった。

30

【 0 1 7 1 】

M S データは、 Q E x a c t i v e H F のデータ依存性 T o p - 2 0 法を使用して取得され、調査スキャン (2 0 0 ~ 2 0 0 0 m / 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 1 e 5 イオンの標的値で、より高いエネルギー衝突解離断片化を介して行われ、 4 m / z のウィンドウで前駆体の単離を行った。 m / z 2 0 0 で 1 2 0 , 0 0 0 の解像度で、調査スキャンを取得した。 H C D スペクトルの解像度は、最大イオン注入時間が 5 0 m s 、正規化された衝突エネルギーが 3 0 の m / z 2 0 0 で 3 0 , 0 0 0 に設定された。 S レンズの R F レベルを 5 0 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。

40

【 0 1 7 2 】

データ処理

B i o P h a r m a F i n d e r 1 . 0 ソフトウェア (T h e r m o F i s h e r

50

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10 ppm、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、単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等張種は、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。

【0173】

実施例2：AAV-SGA

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、一本鎖DNAパ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、靈長類由来の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、パルク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)。

【0174】

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)。

【0175】

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)。特に、新規のクレードEベクター、AAVrh.90は、IVおよびICV送達後、強固な末梢臓器の形質導入を示した。これは、AAV8でも明らかであるように、高レベルのGFP検出を示した肝臓切片の組織学によって確認された。筋肉の組織学的分析は、AAVrh.90ベクターのIV注射後の血管系における内皮細胞形質導入を示した(抗GFP、抗CD31(内皮細胞)、および神経纖維(ニューロン)で染色したマウス脳切片の免疫蛍光イメージングによって決定した)。

【0176】

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(AAV1、AAV6、およびAAVrh.91)は、高効率で筋纖維を形質導入した(より濃い染色)が、AAVrh.90については、染色がほとんどまたは全く観察されなかった。AAVrh.90によるIM送達は、AAV8に匹敵する血

10

20

30

40

50

清中の検出可能なmAbのレベルをもたらした(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.90は、AAV8と比較して高い収率を有した。

【0177】

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靈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、組織トロピシ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効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、等量でブールし、カニクイザルにIVまたはICM注入して(総用量：2e13 GC/kg (IV) および3e13 GC (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の中和抗体力値を有した。

10

20

30

【0178】

AAVrh.90およびAAVrh.91の両方は、IV送達後、高効率で末梢臓器を形質導入した(図10A)。IV送達後の組織の分析により、AAVrh.90カプシドが、試験した他のすべてのカプシド(新規および対照)よりも、NHPの肝臓、心臓、骨格筋、腎臓、および膵臓において高いレベルの発現を有することが明らかになった(図10A)。AAVrh.90はまた、IV送達後、試験した他のカプシドよりも高い効率でCNS組織を形質導入した(図10B)。

【0179】

AAVrh.90は、ICM注入後、NHPの脳における形質導入のレベルの増加を示さなかった(AAV8を含む試験した他のベクターと比較して)。また、組織学的試験により、AAVrh.90が、AAV9よりも低いレベルでニューロンおよび星状細胞の両方を形質導入し、3e13 GC/動物の用量では、脳室を覆う上皮細胞を形質導入しなかったことが示された。これは、新規のクレードAバリエントであるAAVrh.91とは対照的であり、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、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。IHC染色はまた、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見た。

【0180】

新規カプシドおよび対照カプシドの小規模調製物からの収率の評価により、AAVrh.90がAAV8と同等の収率を示すことが示された(図11)。AAVrh.90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12Aおよび図12Bに示されるように、結果は、AAVrh.90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4つのアミノ酸(N57、N263、N385、N514)を有することを示した(配列番号2のようなAAVrh.90の番号付け)。残基N94、N305、N499、およびN599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。

40

50

【0181】

(配列表フリーテキスト)

以下の情報は、数値識別子<223>の下でフリーテキストを含む配列を提供する。

【表3】

配列番号	<223>下のフリーテキスト
5	<223>プライマー配列
6	<223>プライマー配列
7	<223>プライマー配列
8	<223>プライマー配列
9	<223>miRNA 標的配列
10	<223>miRNA 標的配列

10

【0182】

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、「19-8901PCT1_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ところが理解されよう。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。

20

30

40

50

【図3C】

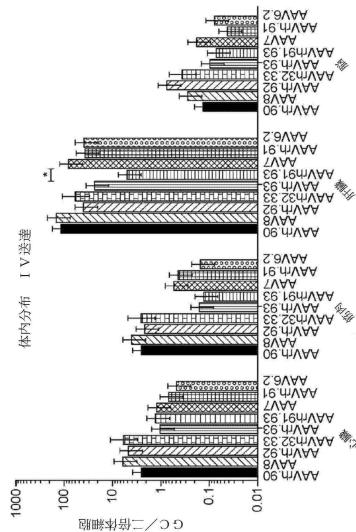
【 四 4 】

V p 1 開始	
MAADGYLPPWLEDLNSBLSEIGIREWWDLKPGAFPKPKANQKQDDGRGLVLPGVYKLGPFGNGLD	60
MAADGYLPPWLEDLNSBLSEIGIREWWALKPGAFPKPKANQKQDDGRGLVLPGVYKLGPFGNGLD	60
*****	*****
KGEFPVNAAAADAELAHDRAYDQQLGNDGFNYLRYNNHADAEFGERLQEDETSFGNGLNLRVFAQ	120
KGEFPVNAAAADAELAHDRAYDQQLGNDGFNYLRYNNHADAEFGERLQEDETSFGNGLNLRVFAQ	120
*****	*****
↓vp2	
AKKRVLVEPLGLVEEAGKATAPGKRRPWFPSFQKSFSSTGIGKGGQPKARRLNFGQTGDS	180
AKKRVLVEPLGLVEEAGKATAPGKRRPWFPSFQKSFSSTGIGKGGQPKARRLNFGQTGDS	180
*****	*****
↓vp3	
ESVPDFPGLPEGPFAAPSSVGSGLNAAGGPMAPNAINNEGADGVSSGSNWHCDSTWLGDVR	240
ESVPDFPGLPEGPFAAPSSVGSGLNAAGGPMAPNAINNEGADGVSSGSNWHCDSTWLGDVR	240
*****	*****
ITSTRTRWLALTYNNHLYQISNTGSGSGNTINNTYFGYSTPWGYYFPFRFHCFSPRDIWQ	300
ITSTRTRWLALTYNNHLYQISNTGSGSGNTINNTYFGYSTPWGYYFPFRFHCFSPRDIWQ	300
*****	*****
RLLNNNGGRFLRKFSLKFNLNIQKVEFTQNGETKTIANNTSTIQTVDSEYQLPVLGSA	360
RLLNNNGGRFLRKFSLKFNLNIQKVEFTQNGETKTIANNTSTIQTVDSEYQLPVLGSA	360
*****	*****
HQGCLPFFPFFADVMIFPQYQLTNNQSQAVGRSSFCYLEYFPQLMRGTGNFNSFSYTFED	420
HQGCLPFFPFFADVMIFPQYQLTNNQSQAVGRSSFCYLEYFPQLMRGTGNFNSFSYTFED	420
*****	*****
VVFPHSSYAHQSOLRMLNPLIDQYLLYLSRTQSTGTTAGTQJLFLSFQAGPNNSMSAQAKNW	480
VVFPHSSYAHQSOLRMLNPLIDQYLLYLSRTQSTGTTAGTQJLFLSFQAGPNNSMSAQAKNW	480
*****	*****
LPGPCYRQRVSTTLSQCNQQNFNFAWTGATKYHLNGRSLSVNPQVAMATNKKDDDRFFPS	540
LPGPCYRQRVSTTLSQCNQQNFNFAWTGATKYHLNGRSLSVNPQVAMATNKKDDDRFFPS	540
*****	*****
GILMFGQRQAGKDNVDSYNVMLSEEIKTTFNPAFTEQGVVAIDLQOQNTAPIVGVNS	600
GILMFGQRQAGKDNVDSYNVMLSEEIKTTFNPAFTEQGVVAIDLQOQNTAPIVGVNS	600
*****	*****
QGALFGWNWQNDRDYLQGIPWAKIHTHDGNFHPSLPMGCGFLKHPHQPILIKNTFVADP	660
QGALFGWNWQNDRDYLQGIPWAKIHTHDGNFHPSLPMGCGFLKHPHQPILIKNTFVADP	660
*****	*****
PFTFNQAKLNSLPTIQYSTGQSVUEWEILOKENSKEBNNEPIQTSNYYKTSNTUDFWANTE	720
PFTFNQAKLNSLPTIQYSTGQSVUEWEILOKENSKEBNNEPIQTSNYYKTSNTUDFWANTE	720
*****	*****
GVYSEERPIGTRYLTNLL	738
GVYSEERPIGTRYLTNLL	738
*****	*****

〔図 5 A〕



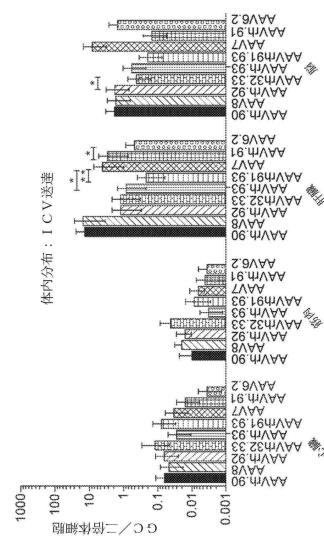
(図 5 B)



【図 5 C】



【図 5 D】



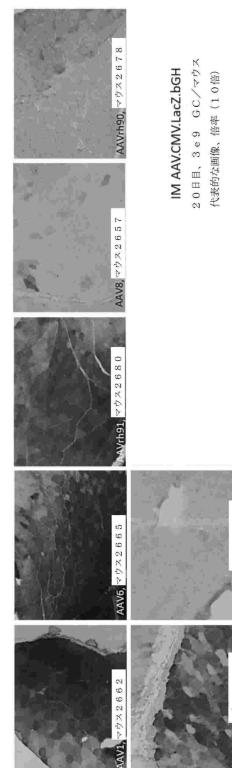
10

20

【図 6 A】



【図 6 B】

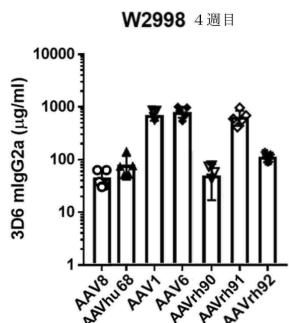


30

40

50

【図 7】



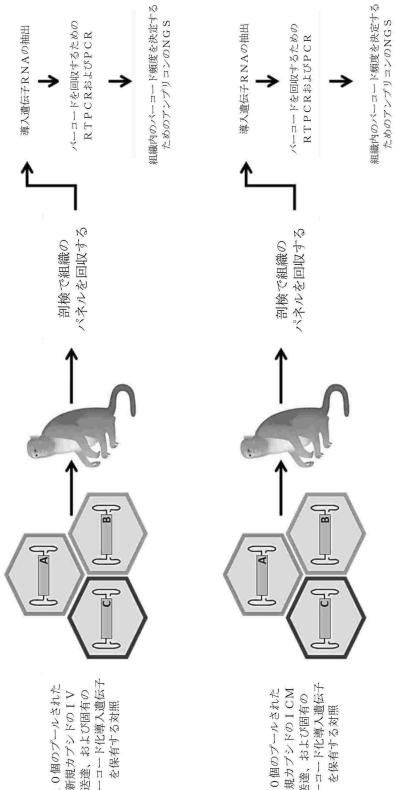
導入遺伝子 3D6 (マウス mAb)
 プロモーター tMCK (筋肉選択性)
 動物 WT B6 マウス (5/カブシド)
 経路 IM
 用量 1e11 gc-/マウス
 読み取り 血清 3 D 6 (週 1 回)

【図 8】

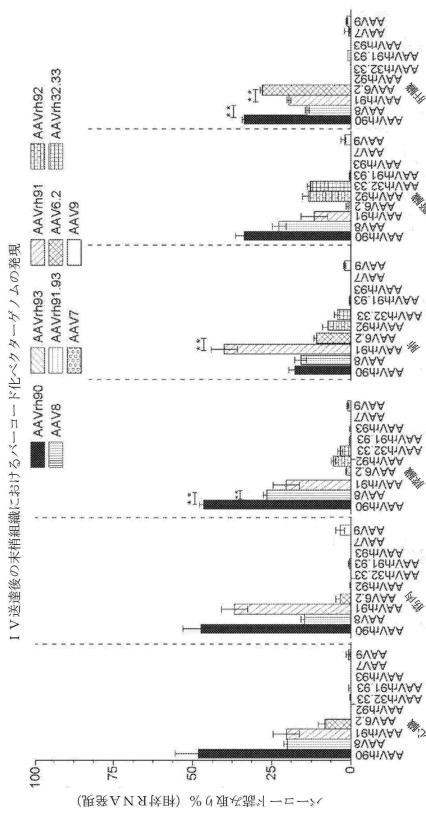
カブシド	収率 (% AAV 8)		供給源
	(mAb 導入遺伝子)	(LacZ 導入遺伝子)	
AAV8	100%	100%	天然分離株
AAVhu68	76%	89%	天然分離株
AAV1	26%	28%	天然分離株
AAV6	27%	28%	天然分離株
AAVrh90	105%	118%	天然分離株
AAVrh91	53%	74%	天然分離株
AAVrh92	68%	102%	天然分離株

10

【図 9】



【図 10 A】



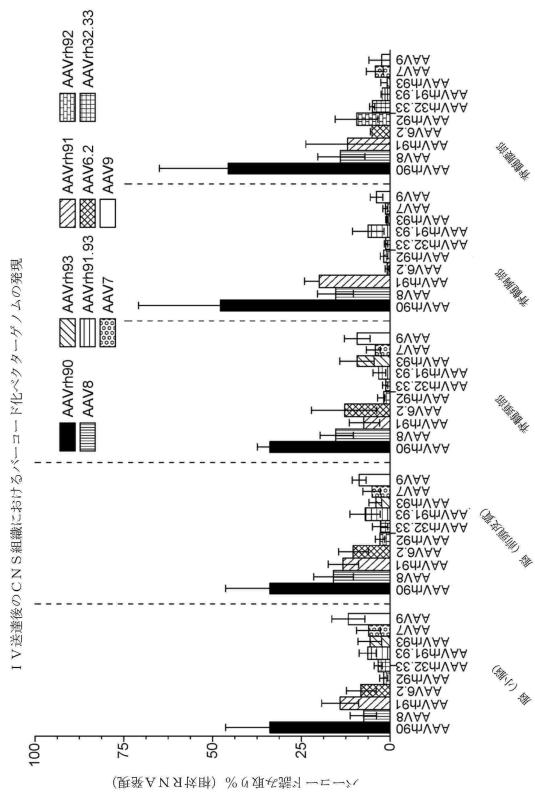
20

30

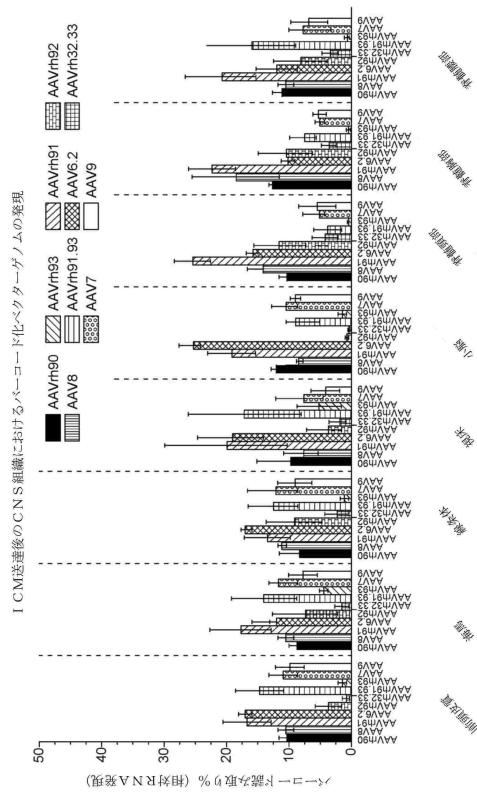
40

50

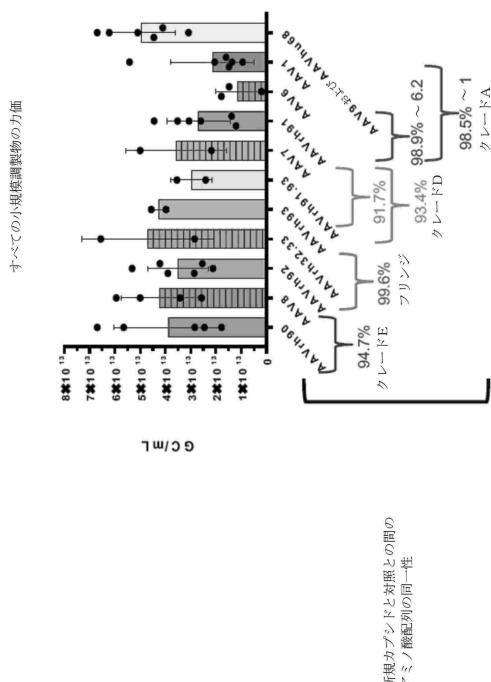
【図10B】



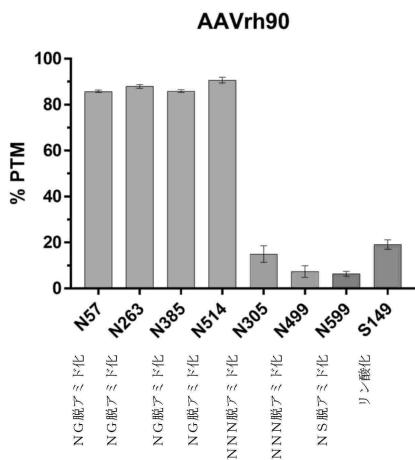
【図 10C】



【 図 1 1 】



【図 1 2 A】



10

20

30

40

50

【図 1 2 B】

酵素 被覆度%	N+1	WL2882CS	WL2640S	WL2258S	WL2639S
		100	100	97.4	100.0
N35+脱アミド化	G	87.2	86.0	84.4	85.7
N57+脱アミド化	H	4.6	5.8	3.7	3.1
N94+脱アミド化	G	85.8	87.6	88.9	89.4
N263+脱アミド化	NNN	18.7	11.0	13.0	17.4
N305+脱アミド化	E			1.6	
N337+脱アミド化	G	86.3	85.2	87.4	84.7
N385+脱アミド化	NNN	5.0	8.4	10.4	5.6
N499+脱アミド化	G	92.3	92.9	90.4	87.3
Q548+脱アミド化	S	0.1			
N599+脱アミド化	F	6.1	7.6	6.9	5.2
N630+脱アミド化		0.1			
Q680+脱アミド化				0.2	
S149+リン酸化		16.6	21.5	19.8	18.6
W23+酸化		1.2	2.3		1.1
M204+酸化		1.0	1.2	1.7	1.8
M212+酸化		0.7	2.9		0.8
W248+酸化		0.3	1.7	2.3	2.0
W282+酸化		0.0	0.0	0.0	
M405+酸化		0.7	0.3	1.1	1.2
M473+酸化		0.4	0.3	0.6	0.58
W480+酸化		2.0	2.1	0.7	1.12
W505+酸化		0.1	0.2	0.2	0.19
M526+酸化		1.0	0.5	1.1	0.20
M544+酸化		3.1	3.3	3.7	4.44
M561+酸化		2.4	3.1	2.4	3.40
M607+酸化		1.4	3.1	2.8	2.97
W621+酸化		0.1	1.5	0.9	0.64
M637+酸化		1.9	1.5	2.1	
W697+酸化		0.6	0.8	0.9	0.74
ロット番号	ベクター名				
WL2882CS(HIT)	AAVrh90.CB7.C1.eGFP.WPRE.rBG(p4698-R2;p1963)				
WL2640S	AAVrh90.CMV.LacZ.bGH (p4698;p0102)				
WL2639S	AAVrh90.tMCK.P1.3D6 mlgG2a.rBG (p4698;p5229)				
WL2258S	AAVrh90.CB7.C1.eGFP.WPRE.rBG(p4698;p1963)				

【配列表】

0007690401000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 12 N	15/35 (2006.01)	F I	C 12 N	15/35
C 12 N	5/10 (2006.01)		C 12 N	5/10

(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 1831

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第 2017 / 075338 (WO , A1)

特表 2007 - 507223 (JP , A)

国際公開第 2018 / 160582 (WO , A1)

特表 2008 - 538286 (JP , A)

特表 2009 - 535339 (JP , A)

国際公開第 2016 / 115503 (WO , A1)

特表 2013 - 531471 (JP , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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