

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-527563

(P2019-527563A)

(43) 公表日 令和1年10月3日(2019.10.3)

| (51) Int.Cl.                    | F 1            | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| <b>C 12 N 15/85</b> (2006.01)   | C 12 N 15/85   | Z 4 B 06 5  |
| <b>A 61 K 48/00</b> (2006.01)   | A 61 K 48/00   | 4 C 08 4    |
| <b>A 61 K 31/7088</b> (2006.01) | A 61 K 31/7088 | 4 C 08 5    |
| <b>A 61 K 45/00</b> (2006.01)   | A 61 K 45/00   | 4 C 08 6    |
| <b>A 61 K 38/16</b> (2006.01)   | A 61 K 38/16   |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

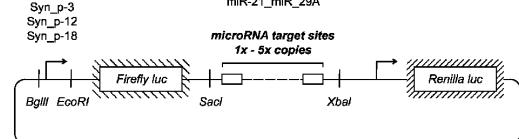
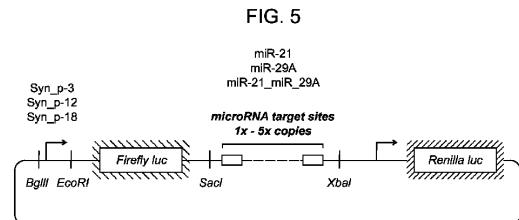
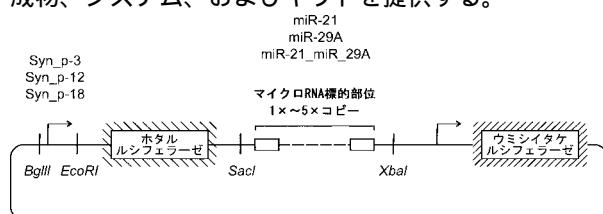
|                    |                              |          |   |
|--------------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号          | 特願2019-526196 (P2019-526196) | (71) 出願人 | 519028678<br>センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド<br>アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイイト ドライブ 2 |
| (86) (22) 出願日      | 平成29年7月26日 (2017.7.26)       | (74) 代理人 | 100102978<br>弁理士 清水 初志  |
| (85) 翻訳文提出日        | 平成31年3月15日 (2019.3.15)       | (74) 代理人 | 100102118<br>弁理士 春名 雅夫  |
| (86) 國際出願番号        | PCT/US2017/043938            | (74) 代理人 | 100160923<br>弁理士 山口 裕孝  |
| (87) 國際公開番号        | W02018/022749                | (74) 代理人 | 100119507<br>弁理士 刑部 俊   |
| (87) 國際公開日         | 平成30年2月1日 (2018.2.1)         |          |   |
| (31) 優先権主張番号       | 62/366,755                   |          |   |
| (32) 優先日           | 平成28年7月26日 (2016.7.26)       |          |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                       |          |   |

最終頁に続く

## (54) 【発明の名称】 時空間調節因子

## (57) 【要約】

本明細書では、いくつかの態様において、改变された細胞における核酸発現の時空間調節を可能にする方法、組成物、システム、およびキットを提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

少なくとも1つの合成プロモーターを含む、改変された遺伝子構築物であって、該少なくとも1つの合成プロモーターが、

非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、

(a)関心対象の生成物をコードするヌクレオチド配列と、

(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む、3'非翻訳領域(UTR)と  
に機能的に連結され、

該少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、該少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性である、

改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2】**

マイクロRNAセンサーが、少なくとも2個のmiRNA結合部位を含む、請求項1記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 3】**

マイクロRNAセンサーが、2~10個のmiRNA結合部位を含む、請求項2記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 4】**

マイクロRNAセンサーが、5~10個のmiRNA結合部位を含む、請求項3記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 5】**

マイクロRNAセンサーが、少なくとも5個のmiRNA結合部位を含む、請求項2記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 6】**

マイクロRNAセンサーが、5~10個のmiRNA結合部位を含む、請求項5記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 7】**

miRNA結合部位が直列に位置する、請求項2~6のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 8】**

miRNA結合部位が互いに同一である、請求項2~7のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 9】**

3'UTRが、異なるmiRNAに各々特異的な少なくとも2つのmiRNAセンサーを含む、請求項1~8のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 10】**

少なくとも1つのmiRNA(miR)が、miR-154、miR-497、miR-29A、miR-720、miR-205、miR-494、miR-224、miR-191、miR-21、miR-96、miR-449A、およびmiR-183から選択される、請求項1~9のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 11】**

標的細胞が、がん性細胞、免疫細胞、またはニューロンである、請求項1~10のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 12】**

合成プロモーターが、100~500ヌクレオチドの長さを有する、請求項1~11のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 13】**

合成プロモーターが、100~125ヌクレオチドの長さを有する、請求項12記載の改変された遺伝子構築物。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 4】**

合成プロモーターが、直列反復ヌクレオチド配列を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 1 5】**

ヌクレオチド配列の各々の長さが12ヌクレオチド未満である、請求項14記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 1 6】**

合成プロモーターが、2～20個の直列反復ヌクレオチド配列を含む、請求項14または15記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 1 7】**

ヌクレオチドスペーサーが、反復ヌクレオチド配列の各々の間に位置付けられている、請求項1～16のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 1 8】**

合成プロモーターの活性が、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも10%さらに高い、請求項1～17のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 1 9】**

合成プロモーターの活性が、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも50%さらに高い、請求項18記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 0】**

合成プロモーターの活性が、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも100%さらに高い、請求項19記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 1】**

関心対象の生成物が、治療用分子、予防用分子、および／または診断用分子である、請求項1～19のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 2】**

関心対象の生成物が、タンパク質、ペプチド、または核酸である、請求項1～21のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 3】**

関心対象の生成物が、RNA、DNA、またはRNAとDNAとの組み合わせから選択される核酸である、請求項22記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 4】**

関心対象の生成物が、短鎖ヘアピンRNA、短鎖干渉RNA、およびマイクロRNAから選択されるRNAである、請求項23記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 5】**

関心対象の生成物が、抗体、酵素、ホルモン、炎症性分子、抗炎症性分子、免疫調節分子、および抗がん分子から選択される治療用および／または予防用分子である、請求項21記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 6】**

関心対象の生成物が、蛍光分子および発光分子から選択される診断用分子である、請求項21記載の改変された遺伝子構築物。

**【請求項 2 7】**

請求項1～26のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物を含む、ベクター。

**【請求項 2 8】**

請求項1～26のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物または請求項27記載のベクターを含む、細胞。

**【請求項 2 9】**

請求項1～26のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物、請求項27記載のベクター、または請求項28記載の細胞を含む、組成物。

**【請求項 3 0】**

少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物を含む、キットであ

10

20

30

40

50

つて、

該少なくとも1つの合成プロモーターが、

非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、

少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)に機能的に連結され、

該少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、該少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性であり、

該構築物が、該プロモーターと3'UTRとの間に位置する制限部位をさらに含む、キット。

10

#### 【請求項31】

請求項1~26のいずれか一項記載の改変された遺伝子構築物または請求項27記載のベクターを細胞に送達する工程を含む、方法。

#### 【請求項32】

請求項1~26のいずれか一項記載の改変された核酸または請求項26記載のベクターを対象に送達する工程を含む、方法。

#### 【請求項33】

対象がヒト対象である、請求項31記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

20

##### 【0001】

##### 関連出願

本出願は、米国特許法第119条(e)項に基づき2016年7月26日に出願された米国仮出願第62/366,755号の恩典を主張するものであり、これは参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

##### 【発明の概要】

##### 【0002】

##### 概要

本明細書では、いくつかの態様において、エクスピボおよびインビボでの細胞機能の時空間制御のための、方法、組成物、システム、およびキットが提供される。本開示の時空間調節因子は、標的細胞（オンターゲット細胞）における選択的な核酸発現を可能にする改変された細胞（オフターゲット細胞）における核酸発現の抑制を可能にするマイクロRNA(miRNA)センサーを組み込む。本明細書において使用される改変された細胞は、天然に存在する改変された細胞と比べてより正確な特異性を示し、かつ、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を示す。miRNAセンサーは、非標的細胞において活性である（非標的細胞において抑制／分解を導く）が標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であるmiRNAに特異的な、少なくとも1つの（1つまたは複数の）miRNA結合部位を含む。この二重機能性は、標的細胞において選択的に増強された核酸発現を可能にする。

30

##### 【0003】

この技術は、次世代のヒト細胞療法の確立、改変、製造、および展開に広範に変革をもたらす。低分子または生物学的製剤に対する時空間制御は困難であり、このことは、局在化、時間調整、または動力学が重要である複雑な疾患を処置することを難しくしている。改変された細胞は、インビボ療法の時空間制御の可能性を提供する。本明細書において提供される通りの改変された遺伝子構築物（時空間調節因子）を、インビボ療法の時空間制御を可能にする、細胞機能の時空間プログラミングに使用してもよい。

40

##### 【0004】

したがって、本開示のいくつかの局面は、少なくとも1つの改変された遺伝子構築物であって、この改変された細胞が、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、(a)関心対象の生成物をコードするヌクレオチド配

50

列と、(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含むmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)とに機能的に連結され、少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性である、改変された遺伝子構築物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】ミクログリアにおいて選択的にNF- $\kappa$ B経路を阻害する(他の細胞タイプでは阻害しない)改変されたウイルスベクターがALSおよび他の神経性疾患において神経炎症を改善し得る一例を示す。遺伝子構築物は、ウイルスベクター(例えば、AAV)を介して脳細胞に送達され、次いでミクログリア特異的プロモーターおよびマイクロRNAセンサーに依存して、ミクログリアにおいてのみNF- $\kappa$ B阻害剤の選択的な発現を達成する。NF- $\kappa$ B阻害剤は、NF- $\kappa$ B誘導プロモーターの制御下で発現されて、構成的抑制よりもむしろ動的抑制を可能にする。

【図2】種々の細胞特異的調節因子(例えば、プロモーター、5'UTR、3'UTR)を評価するために使用されるモジュラー構築物の例を示す。合成プロモーターを、3'UTR、ならびに、いくつかの場合では、改変された5'UTRにおいて、合成miRNA結合部位と組み合わせて、多種多様な用途のために遺伝子発現を評価してもよい。

【図3】個々の構築物をアッセイするために使用されるマイクロRNAセンサーべクターの一例を示す。

【図4】上のパネルは、実施例1に記載の2つの細胞株についてレポーター遺伝子の発現を異なるレベルで阻害するマイクロRNAを示すデータのグラフである。バーの各セットは、左から右へ、MCF-10A、MDA-MB-453。下のパネルは、細胞タイプ間の発現比を示すデータのグラフであり、ある特定のマイクロRNAが細胞タイプ間で5倍超の選択性を有することを示している。バーの各組は、左から右へ、MDA/MCF、MCF/MDA。

【図5】合成プロモーターおよびマイクロRNAセンサーを組み込んでいる構築物の一例を示す。

【図6A】合成プロモーターとマイクロRNAとの組み合わせにおける発現データを示す。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、Syn-12、pSyn-18。

【図6B】同じデータの拡大図である。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、pSyn-12、pSyn-18。

【図7A】合成プロモーターとマイクロRNAとの組み合わせにおける追加の発現データを示す。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、pSyn-12、pSyn-18。

【図7B】同じデータの拡大図である。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、pSyn-12、pSyn-18。

【図8A】合成プロモーターとマイクロRNAとの組み合わせについての発現データの比を示す。合成プロモーターおよびマイクロRNAセンサーを含有する構築物のいくつかにおいて予期しない相乗効果が観察された。一例として、プロモーターpSyn-18単独は約25 $\times$ の選択性を示し、miR-29A(1 $\times$ )は約4 $\times$ であり、組み合わせは約250 $\times$ であった。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、pSyn-12、pSyn-18。

【図8B】合成プロモーターとマイクロRNAとの組み合わせについての発現データの比を示す。合成プロモーターおよびマイクロRNAセンサーを含有する構築物のいくつかにおいて予期しない相乗効果が観察された。一例として、プロモーターpSyn-18単独は約25 $\times$ の選択性を示し、miR-29A(1 $\times$ )は約4 $\times$ であり、組み合わせは約250 $\times$ であった。バーの各セットは、左から右へ、pmirGLO、pSyn-3、pSyn-12、pSyn-18。

【発明を実施するための形態】

【0006】

詳細な説明

本明細書において、エクスピボおよびインビボでの細胞機能に対する改変された(増強された)制御を可能にする、空間的および/または時間的選択性を達成する改変された遺

10

20

30

40

50

伝子構築物が提供される。これらの改変された遺伝子構築物を時空間調節因子と称する場合がある。時空間調節因子を使用して、特定の標的細胞（例えば、卵巣がん細胞またはミクログリアなどのがん細胞）において条件付きで活性化され、非標的細胞タイプ（例えば、非がん性細胞）において抑制される、細胞および遺伝子療法を作製して、治療的アウトプット（例えば、それぞれ、免疫療法または抗炎症メディエーター）をもたらすことができる。加えて、これらの調節因子を使用して、ある特定の病態（例えば、炎症）において条件付きで活性化され、他の病態（例えば、非炎症性）において抑制される、細胞および遺伝子療法を作製することができる。治療的エフェクターの発現を局在化、濃縮、および時間調整する能力は、動力学が重要な役割を果たす複雑な疾患の処置を可能にする。

## 【0007】

10

したがって、本明細書に、次世代の細胞および遺伝子療法を可能にする強力な技術が記載されている。これらの時空間調節因子を使用して、遺伝子構築物の発現を特定の細胞タイプ、特定の条件下、および／または特定の時点で制御することができる。この技術は、インビボおよびエクスピボでの条件付きまたは局在化された治療法の作製を可能にする。時空間調節因子は、細胞タイプ／細胞状態特異的な様式においてのみ活性化される遺伝子発現構築物に急速に収束するハイスループット設計・構築・評価・学習プラットフォームと組み合わせた合理的設計アプローチを活用する。これらの調節因子は、ストリンジエンシーおよび活性を増強するための補完型組み込み機序を使用して、標的細胞において高度に活性かつ特異的な遺伝子発現を達成する。

## 【0008】

20

遺伝子療法における標的特異性は、現在のところ、主に、標的指向性ウイルスベクターまたは天然プロモーターの使用を通して達成されている。前者は、特異的なウイルス targeting に使用することができる固有の細胞表面マーカーが必ずしも存在するとは限らないという理由から困難である。後者は、天然プロモーターが、必ずしもある特定の細胞タイプに完全に特異的であるとは限らないこと、オントーゲット細胞対オフターゲット細胞における低いON-OFF比を有し得ること、ならびに、サイズが極めて巨大であり得るゆえに容量の制約されたウイルスベクター内にコードすることが制限されるという理由から困難である。本明細書に記載の通り、組み込まれた遺伝子構築物において最小標的として>30倍のON-OFF比が達成され、そして、いくつかの態様において、>100倍のON-OFF比が達成される。そのようなON-OFF比は、狭い治療域の薬物が最小有効濃度と最小毒性濃度との間に<2倍の差を有することが多いことを考慮すれば合理的である(26)。

30

## 【0009】

いくつかの態様において、合成プロモーターおよびマイクロRNAセンサーを論理ゲート（ANDゲートなど）および／またはデジタルスイッチに組み入れて、より鋭い遺伝子発現の閾値を設定することができる。アウトプット遺伝子は、例えば、がん適用のための免疫療法アウトプットまたは神経炎症／神経変性適用（例えば、筋萎縮性側索硬化症[ALS]）のための炎症の阻害剤などの治療的ペイロードであってもよい。

## 【0010】

40

例えば、がん適用について、チェックポイント阻害剤、サイトカイン、およびケモカインの分泌、ならびに、T細胞ががん細胞を殺傷するよう誘発する抗CD3 ドメインの表面提示が有用であり得る。正常細胞に対するオフターゲット効果を最小限に抑えるために高ストリンジエンシーが必要である。本明細書において提供される通りの改変された遺伝子構築物を非ウイルスベクターまたはウイルスを介してがん細胞に送達して、腫瘍それ自体の中から腫瘍を殺傷する免疫療法を使ってもよい。このアプローチは、既存の免疫療法の主な制限を克服する。例えば、CAR T細胞および二重特異性T細胞エンゲージャーは、見つけることが困難である可能性がある特定の細胞表面標的を必要とする。また、腫瘍は、従来のアプローチでは克服することが難しい免疫抑制環境を生み出す可能性がある。

## 【0011】

50

加えて、ALSモデルでの最近のデータは、ミクログリアにおけるNF- B媒介経路が運動ニューロン死をもたらすことを示している(1)。炎症の全体的な抑制は、ALSマウスの生存

を改善しない上に、疾患を悪化させる可能性さえある。さらに、NF- Bは、ニューロンにおいて重要なシグナル伝達経路を媒介するため、NF- Bを非標的指向様式で抑制することは望ましくない可能性が高い。しかしながら、ミクログリアにおけるNF- B経路の標的指向阻害は、ALSのモデルであるSOD1-G93Aマウスの生存期間を47%まで延長させることができる。したがって、本明細書に記載され、AAVベクターを介して脳へ送達される構築物を使用した、NF- B経路の空間的/細胞タイプ特異的な阻害は、ALSを含む神経炎症と関連する疾患を処置するための変革的アプローチである(図1)。外因性のFDA承認薬または天然産物で調節されるスイッチを用いたミクログリア特異的NF- B阻害のさらなる時間的制御(9~12)は、そのようなアプローチの安全性およびタイミングに対するさらなる調節を可能にする。

10

## 【0012】

本開示のいくつかの局面は、少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物であって、この合成プロモーターが、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、(a)関心対象の生成物をコードするヌクレオチド配列と、(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含むmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)とに機能的に連結され、少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性である、改変された遺伝子構築物を提供する。

20

## 【0013】

合成プロモーターが機能的に連結されている核酸の発現が非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い(例えば、少なくとも10%)場合に(本明細書において提供される通りのmiRNAセンサーの不在下であっても)、合成プロモーターは非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有すると見なされる。いくつかの態様において、合成プロモーターの活性は、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも10%さらに高い。例えば、合成プロモーターの活性は、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%、1500%、2000%、2500%、3000%、3500%、4000%、4500%、5000%、またはより高い場合がある。いくつかの態様において、合成プロモーターの活性は、非標的細胞と比べて標的細胞において10%~100%、10%~500%、10%~100%、50%~1000%、50%~500%、または50%~100%さらに高い。いくつかの態様において、合成プロモーターの活性は、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも50%さらに高い。いくつかの態様において、合成プロモーターの活性は、非標的細胞と比べて標的細胞において少なくとも100%さらに高い。

30

## 【0014】

miRNAが、非標的細胞において、合成プロモーターが機能的に連結されている核酸の発現を抑制する(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%超)のに十分なレベルで存在する場合に、miRNAは非標的細胞において活性であると見なされる。miRNAが標的細胞(標的細胞は、特定のmiRNAを含有しない)に不在である場合またはmiRNAがmiRNAセンサーに結合しない場合に、miRNAは標的細胞において不活性であると見なされる。mRNAが標的細胞中に存在するが、合成プロモーターが機能的に連結されている核酸の発現を抑制する(翻訳をサイレンシングするまたは転写物を分解する)(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%超)のに十分なレベルでは存在しない場合に、miRNAは標的細胞において低レベルで活性であると見なされる。

40

## 【0015】

## 合成プロモーター

本開示の合成プロモーターは、残りの核酸配列の転写の開始および速度が制御される、核酸配列の制御領域である。合成プロモーターは、典型的には、RNAポリメラーゼ、および他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合し得る下位領域を含有する。合成

50

プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動するかまたは転写を駆動する。合成プロモーターが、それが配列の転写開始および／または発現を制御（「駆動」）するために、調節する核酸配列の関係において、正確な機能的位置および配向にあるとき、合成プロモーターは、機能的に連結されていると見なされる。

#### 【0016】

本開示の合成（天然に存在しない）プロモーターは、いくつかの態様において、100～500ヌクレオチドの長さを有する。例えば、合成プロモーターは、100、200、300、400、または500ヌクレオチドの長さを有してもよい。いくつかの態様において、合成プロモーターは、200～300ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの態様において、合成プロモーターは、100～125ヌクレオチドの長さを有する。

10

#### 【0017】

いくつかの態様において、合成プロモーターは、直列反復ヌクレオチド配列を含む。すなわち、合成プロモーターは、互いに直接隣接して（互いが連続して）位置しているか、または数（例えば、1～5）ヌクレオチドだけ（ヌクレオチドスペーサーによって）互いに分離している、反復（同一）ヌクレオチド配列を含んでもよい。したがって、いくつかの態様において、1～5ヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、または5ヌクレオチド）の長さを有するヌクレオチドスペーサーが、反復ヌクレオチド配列間に位置付けられる。ヌクレオチドスペーサーは、例えば、AGC、ATC、GAC、ACT、AGT、GTC、GAT、およびGCTから選択されてもよい。いくつかの態様において、反復ヌクレオチド配列間のスペーサーは長さが変動する（互いに対して同じ長さでない）。

20

#### 【0018】

合成プロモーターの反復ヌクレオチド配列の長さは、いくつかの態様において、12ヌクレオチド未満である。例えば、反復ヌクレオチド配列の長さは、11、10、9、8、7、6、5、または4ヌクレオチドであってもよい。いくつかの態様において、反復ヌクレオチド配列の長さは、4～11、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、5～11、5～10、5～9、5～8、6～11、6～10、6～9、7～11ヌクレオチドである。いくつかの態様において、反復ヌクレオチド配列の長さは、11ヌクレオチドである。いくつかの態様において、反復ヌクレオチド配列の長さは、8ヌクレオチドである。また、12ヌクレオチドを超える長さを使用してもよい。

30

#### 【0019】

いくつかの態様において、合成プロモーターは、2～20個の直列反復ヌクレオチド配列を含む。例えば、合成プロモーターは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の直列反復ヌクレオチド配列を含んでもよい。いくつかの態様において、合成プロモーターは、2～15、2～10、2～5、5～10、5～15、または5～10個の直列反復ヌクレオチド配列を含む。

#### 【0020】

##### miRNAセンサー

マイクロRNA(miRNA)は、典型的には遺伝子発現のRNAサイレンシングおよび転写後調節で機能する、小さな非コードRNA分子（例えば、約22ヌクレオチドを含有する）である。miRNA分子は、いくつかのmRNA転写物の3'非翻訳領域(UTR)に見いだされる配列に全体的にまたは部分的に相補的な配列を含む。mRNAの3'UTR内のmiRNA結合部位へのmiRNAの結合は、mRNA分解または翻訳の阻止を介して起こり得るサイレンシングを導く。

40

#### 【0021】

本明細書において提供される通り、特定の標的細胞においてダウンレギュレートされるが非標的細胞においてはされないとして同定されるmiRNAが、miRNA結合配列をそれらのmRNA配列内に含有する非標的細胞において関心対象の生成物（例えば、アウトプット遺伝子）をコードする核酸の発現を抑制するために使用される。したがって、miRNAに基づく遺伝子発現の抑制が、いくつかの態様において、非標的細胞においてのみ起こり、結果として、標的細胞と比較して低減された遺伝子発現をもたらす。

#### 【0022】

50

本開示のmiRNAセンサーは、特定のmiRNAが結合して合成プロモーターが機能的に連結されている核酸の発現をサイレンシングする、少なくとも1個または少なくとも2個のmRNA結合部位を含む。例えば、miRNAセンサーは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10個のmiRNA結合部位を含んでもよい。いくつかの態様において、miRNAセンサーは、少なくとも5個（または5個）のmiRNA結合部位を含む。いくつかの態様において、miRNAセンサーは、1～10個のmiRNA結合部位を含む。例えば、miRNAセンサーは、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、3～10、3～9、3～8、3～7、3～6、3～5、3～4、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、4～5、5～10、5～9、5～8、5～7、5～6、6～10、6～9、6～8、6～7、7～10、7～9、7～9、8～10、8～9、または9～10個のmiRNA結合部位を含んでよい。いくつかの態様において、miRNAセンサーは、2～10個のmiRNA結合部位を含む。いくつかの態様において、miRNAセンサーは、5～10個のmiRNA結合部位を含む。

10

#### 【0023】

いくつかの態様において、mRNA結合部位は、直列に位置する。すなわち、miRNA結合部位は、互いに直接隣接（互いが連続）していても、ヌクレオチドスペーサー（例えば、1～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長を有するスペーサー）によって互いに分離されていてもよい。

#### 【0024】

いくつかの態様において、単一のmiRNAセンサー内のmiRNA結合部位は、互いに同一である（同じヌクレオチド配列を有する）。いくつかの態様において、単一のmiRNAセンサー内のmiRNA結合部位は、少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%）のヌクレオチド配列同一性を共有する。

20

#### 【0025】

miRNA結合部位の長さは変動してよい。いくつかの態様において、miRNA結合部位の長さは、15～30ヌクレオチドである。例えば、miRNA結合部位の長さは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドであってもよい。いくつかの態様において、miRNA結合部位の長さは、15～20、20～30、または20～25ヌクレオチドである。

#### 【0026】

いくつかの態様において、miRNA結合部位は、miRNAに全体的に（100%）相補的であるが、一方で他の態様において、miRNA結合部位は、miRNAに部分的に（100%未満）相補的である。

30

#### 【0027】

改変された遺伝子構築物は、単一のmiRNAセンサー（例えば、1つまたは複数のmiRNA結合部位を含む）を含んでも、複数（1より多い）のmiRNAセンサーを含んでもよい。単一のmiRNAセンサーまたは複数のmiRNAセンサー（例えば、異なるmiRNA結合部位を各々含有している）内の複数のmRNA結合部位を、合成プロモーターと組み合わせて使用して、細胞タイプ特異性および細胞状態特異性のストリングエンサーを増強してもよい。したがって、いくつかの態様において、単一のmiRNAセンサーまたは複数の異なるmiRNAセンサー内の複数のmiRNA結合部位を、複数のマイクロRNAが標的細胞において不活性（例えば、不在）であるかまたは低活性を有するときにのみ高レベル遺伝子発現が可能となるように、標的転写物の3'端に直列にコードすることができる。いくつかの態様において、3'UTRは、異なるmiRNAに各々特異的である少なくとも2つ（例えば、少なくとも3、4、または5つ）のmiRNAセンサーを含む。構築物が2以上のmiRNAセンサーを含む態様において、センサーは、異なるmiRNAに特異的なmiRNA結合部位を含む。例えば、改変された遺伝子構築物は、miRNA#1（例えば、miR-54）に特異的な単一のmRNA結合部位または直列反復miRNA結合部位を含む第一のmiRNAセンサーを含んでもよく、かつ、同じ改変された構築物は、miRNA#2（例えば、miR-497）に特異的な単一のmiRNA結合部位または直列反復miRNA結合部位を含む第二の（またはより多い）miRNAセンサーを含んでもよい。本明細書において実証される通り、3倍超の選択性、いくつかの場合では5倍超の選択性が、複数のmRNA結合部位および／ま

40

50

たはセンサーを有する改変された遺伝子構築物を使用して達成される。

【0028】

いくつかの態様において、少なくとも1つのmiRNA(miR)は、miR-154、miR-497、miR-29A、miR-720、miR-205、miR-494、miR-224、miR-191、miR-21、miR-96、miR-449A、およびmiR-183から選択される。

【0029】

関心対象の生成物

本開示の改変された遺伝子構築物によってコードされる生成物は、例えば、治療用分子および/または予防用分子であってよい。いくつかの態様において、関心対象の生成物は、タンパク質またはペプチド（例えば、治療用タンパク質またはペプチド）である。いくつかの態様において、関心対象の生成物は、核酸（例えば、治療用核酸）である。核酸の例は、RNA、DNA、またはRNAとDNAの組み合わせを含む。いくつかの態様において、関心対象の生成物は、DNA（例えば、一本鎖DNAまたは二本鎖DNA）である。いくつかの態様において、関心対象の生成物は、RNAである。例えば、関心対象の生成物は、短鎖ヘアピンRNA、短鎖干渉RNA、およびマイクロRNAなどのRNA干渉(RNAi)分子から選択されてもよい。いくつかの態様において、関心対象の生成物は、ウイルス複製および/または病原性を制御する。

10

【0030】

抗体（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル；キメラ；ヒト化；抗体断片および抗体誘導体（二重特異性、三重特異性、scFv、およびFab）を含む）、酵素、ホルモン、炎症性分子、抗炎症性分子、免疫調節分子、および抗がん分子など、治療用および/または予防用分子の例。前述のクラスの治療用分子の具体例は、当技術分野において公知であり、そのいずれも本開示に従って使用してもよい。

20

【0031】

いくつかの態様において、関心対象の生成物は、免疫調節分子である。免疫調節分子は、免疫応答を調節する分子（例えば、タンパク質または核酸）である。いくつかの態様において、免疫調節分子は、がん性細胞の表面で発現されるか、またはそれから分泌されるか、またはがん性細胞から分泌される。

【0032】

いくつかの態様において、免疫調節分子は、合成T細胞エンゲージャー(STE)である。合成T細胞エンゲージャーは、T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）の表面上の分子に結合する（例えば、リガンド-受容体結合相互作用を通して）か、またはそうでなければ細胞傷害性T細胞応答を引き起こす、分子（例えば、タンパク質）である。いくつかの態様において、STEは、T細胞の表面上のリガンドに結合する受容体である。いくつかの態様において、STEは、抗CD3抗体または抗体断片である。本開示のSTEは、典型的には、STEをコードする核酸が送達されるがん細胞または他の病的細胞の表面で発現されるか、またはそれから分泌される。例えば、参照によって本明細書に組み入れられるInternational Publication Number WO 2016/205737を参照のこと。

30

【0033】

本開示のSTEの例は、T細胞表面抗原に結合する、抗体、抗体断片および受容体を含む。T細胞表面抗原は、例えば、CD3、CD4、CD8、およびCD45を含む。

40

【0034】

いくつかの態様において、関心対象の生成物は、ケモカイン、サイトカイン、およびチエックポイント阻害剤から選択される。

【0035】

免疫調節分子は、免疫刺激分子および免疫阻害分子を含む。免疫刺激分子は、単独か、または別の分子との組み合わせかにかかわらず、対象において免疫応答を刺激する（前から存在する免疫応答を増強することを含む）分子である。例は、抗原、補助剤（例えば、TLRリガンド、メチル化されていないCpGジヌクレオチド、一本鎖または二本鎖RNAを含む核酸、フラジェリン、ムラミルジペプチド）、インターロイキンを含むサイトカイン（例

50

えば、IL-2、IL-7、IL-15（またはスーパーアゴニスト／これらのサイトカインの変異型）、IL-12、IFN-ガンマ、IFN-アルファ、GM-CSF、FLT3-リガンドなど）、免疫刺激抗体（例えば、抗CTLA-4、抗CD28、抗CD3、またはこれらの分子の单鎖／抗体断片）などを含む。

#### 【0036】

免疫阻害分子は、単独か、または別の分子との組み合わせかにかかわらず、対象において免疫応答を阻害する分子である。例は、抗CD3抗体または抗体断片、および他の免疫抑制剤を含む。

#### 【0037】

抗原は、非限定的に、がん抗原、自己抗原、微生物抗原、アレルゲン、または環境抗原であってもよい。

#### 【0038】

がん抗原は、がん細胞によって優先的に発現される抗原であり（例えば、それは、非がん細胞よりもがん細胞においてより高いレベルで発現される）、いくつかの場合、それは、がん細胞によってのみ発現される。がん抗原は、がん細胞内またはがん細胞の表面上で発現され得る。がん抗原は、MART-1/Melan-A、gp100、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質(ADAbp)、FAP、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胎児性抗原(CEA)、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前立腺特異的抗原(PSA)、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、T細胞受容体/CD3-ゼータ鎖、およびCD20であってもよい。がん抗原は、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5からなる群より選択されてよい。がん抗原は、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9からなる群より選択されてよい。がん抗原は、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、-フェトタンパク質、E-カドヘリン、-カテニン、-カテニン、-カテニン、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質(APC)、フォドリン、コネクシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2ガングリオシド、GD2ガングリオシド、ヒトパピローマウイルスタンパク質、腫瘍抗原のSmadファミリー、Imp-1、P1A、EBVにコードされた核抗原(EBNA)-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1およびCT-7、CD20、ならびにc-erbB-2からなる群より選択されてもよい。

#### 【0039】

いくつかの態様において、関心対象の生成物は、診断用分子である。診断用分子は、例えば、検出可能な分子（例えば、顕微鏡検査によって検出可能）であってもよい。いくつかの態様において、診断用分子は、蛍光タンパク質などの蛍光分子である。蛍光タンパク質は、当技術分野において公知であり、そのいずれも本開示に従って使用してもよい。いくつかの態様において、診断用分子は、対象（例えば、ヒト対象）においてイメージングすることができるレポーター分子である。例えば、レポーター分子は、ナトリウム・ヨウ素共輸送体であってもよい（例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、Galanis, E. et al. Cancer Research, 75(1): 22-30, 2015を参照のこと）。

#### 【0040】

#### 改変された核酸

改変された核酸（例えば、改変された遺伝子構築物）は、自然界に存在しない核酸である。しかしながら、改変された核酸が総じて天然に存在しない一方で、それは、自然界に存在するヌクレオチド配列を含んでよいことが理解されるべきである。いくつかの態様において、改変された核酸は、異なる生物由来の（例えば、異なる種由来の）ヌクレオチド配列を含む。例えば、いくつかの態様において、改変された核酸は、ネズミ科のヌクレオチド配列、細菌のヌクレオチド配列、ヒトのヌクレオチド配列、および／またはウイルスのヌクレオチド配列を含む。用語「改変された核酸」は、組換え核酸および合成核酸を含

10

20

30

40

50

む。「組換え核酸」は、核酸分子を合わせることによって構築された分子を指し、いくつかの態様においては、生細胞において複製できる分子を指す。「合成核酸」は、増幅された分子、または、化学的にもしくは他の手段によって合成された分子を指す。合成核酸は、化学的に修飾されているかまたはその他の方法で修飾されているが、天然に存在する核酸分子と塩基対合できるものを含む。組換え核酸および合成核酸はまた、前述のいずれかの複製から生じる分子も含む。本開示の改変された核酸は、単一分子（例えば、同じプラスミドまたは他のベクターに含まれる）によって、または複数の異なる分子（例えば、複数の異なる、独立して複製する分子）によってコードされてよい。

#### 【0041】

本開示の改変された核酸は、標準的な分子生物学の方法を使用して生産されてよい（例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2012, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと）。いくつかの態様において、改変された核酸構築物は、GIBSON ASSEMBLY（登録商標）クローニングを使用して生産される（例えば、Gibson, D.G. et al. Nature Methods, 343-345, 2009; およびGibson, D.G. et al. Nature Methods, 901-903, 2010を参照のこと、その各々は、参照によって本明細書に組み入れられる）。GIBSON ASSEMBLY（登録商標）は、典型的には、単管反応において3つの酵素活性、5'エキソヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼのY伸長活性、およびDNAリガーゼ活性を使用する。5'エキソヌクレアーゼ活性は、5'端配列をつなぎ合わせ、アニーリングのための相補的配列を露出させる。次いで、ポリメラーゼ活性が、アニールされた領域のギャップを埋める。次いで、DNAリガーゼが、ニックをふさぎ、DNA断片を互いに共有結合する。隣接した断片の重複配列は、Golden Gate Assemblyで使用されるものよりはるかに長く、それ故、正確なアセンブリの割合がより高くなる。いくつかの態様において、改変された核酸構築物は、IN-FUSION（登録商標）クローニング（Takara Bio USA）を使用して生産される。

#### 【0042】

プロモーターは、核酸配列の残部の転写の開始および速度がそれで制御される、核酸配列の制御領域を指す。プロモーターはまた、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合し得る下位領域を含有してもよい。プロモーターは、構成的、誘導性、活性化可能、抑制性、組織特異的、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動するか、または転写を駆動する。本明細書において、プロモーターが、その配列の転写開始および/または発現を制御（「駆動」）するためにそれが調節する核酸配列に対して、正確な機能的位置および配向にある場合、プロモーターは機能的に連結されているとみなされる。

#### 【0043】

構成的プロモーターは、転写を継続的に活性化する、アップレギュレートされたプロモーターである。構成的プロモーターの非限定例は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、伸長因子1-アルファ(EF1a)プロモーター、伸長因子(EFS)プロモーター、MNDプロモーター（骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを有する修飾されたMoMuLV LTRのU3領域を含有する合成プロモーター）、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、およびユビキチンC(UbC)プロモーターを含む。

#### 【0044】

誘導性プロモーターは、シグナルが存在するとき、それによって影響されるとき、またはそれによって接触されたときに、転写活性を調節する（例えば、開始または活性化すること）ことを特徴とする、プロモーターである。シグナルは、内在性であってもよく、通常は外因性であるが、誘導性プロモーター由来の転写活性を調節する際に活性となるような様式で誘導性プロモーターに接触する、条件（例えば、光）、化合物（例えば、化学系または非化学系の化合物）またはタンパク質（例えば、サイトカイン）であってもよい。転写の活性化は、プロモーターに直接作用して転写を駆動するか、または、プロモーターが転写を駆動することを防止するリプレッサーを不活性化することによってプロモーターに間

10

20

30

40

50

接的に作用することを含んでもよい。反対に、転写の脱活性化は、プロモーターに直接作用して転写を防止するか、または、その後プロモーターに作用するリプレッサーを活性化することによってプロモーターに間接的に作用することを含んでもよい。プロモーターは、シグナルの存在下でプロモーターからの転写が活性化、脱活性化、増加、または減少される場合に、そのシグナルに応答性であるとみなされる。

#### 【0045】

また、本明細書において、本開示の改変された遺伝子構築物を含むベクターが提供される。いくつかの態様において、ベクターは、エピソームベクター、例えばプラスミドまたはウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、および／またはキメラウイルスベクター）である。

10

#### 【0046】

##### 細胞

本開示の改変された遺伝子構築物を、全身に送達して、特定の標的細胞において条件付きで（入力シグナルの存在または不在に基づいて）活性化（構築物の転写を活性化）させてよい。

#### 【0047】

標的細胞と非標的細胞の違いは、例えば、疾患状態（例えば、疾患対非疾患）、細胞タイプ（例えば、神経細胞対神経膠細胞）、または環境状態（例えば、炎症誘発状態のT細胞対抗炎症性状態のT細胞）であり得る。本明細書において提供される通り、標的細胞（および非標的細胞）の選択は、特定の細胞タイプまたは条件に限定されない。

20

#### 【0048】

いくつかの態様において、標的細胞は、がん性細胞、良性腫瘍細胞、または他の疾患細胞である。したがって、いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、腫瘍細胞またはがん細胞を有する対象に送達され、改変された遺伝子構築物は、腫瘍細胞またはがん細胞において発現される。

#### 【0049】

がん性細胞は、前悪性新生物、悪性腫瘍、転移、または、がん性もしくは前がん性と見なされる未制御の細胞成長を特徴とする任意の疾患もしくは障害を含むが、これらに限定されない任意のタイプのがん性細胞であってよい。がんは、原発がんまたは転移がんであり得る。がんは、眼がん、胆道がん、膀胱がん、胸膜がん、胃がん（stomach cancer）、卵巣がん、髄膜がん、腎臓がん、脳がん（神経膠芽腫および髄芽腫を含む）、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、結腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん（gastric cancer）、血液学的新生物（急性リンパ性および骨髄性白血病、多発性骨髄腫、AIDS関連白血病、ならびに成人T細胞白血病リンパ腫を含む）、上皮内新生物（ボーエン病およびページェット病を含む）、肝臓がん、肺がん、リンパ腫（ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含む）、神経芽腫、口腔がん（扁平上皮がんを含む）、卵巣がん（上皮細胞、間質細胞、生殖細胞、および間葉細胞から生じるものを含む）、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫（平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および骨肉腫を含む）、皮膚がん（黒色腫、カポジ肉腫、基底細胞がん、および扁平上皮細胞がんを含む）、精巣がん（胚腫瘍（germinal tumor）、例えば、精上皮腫、非精上皮腫、奇形腫、絨毛がん、間質腫瘍、および生殖細胞腫瘍を含む）、甲状腺がん（甲状腺腺がんおよび髄様がんを含む）、ならびに腎臓がん（腺がんおよびウィルムス腫瘍を含む）を含むが、これらに限定されない。一般に遭遇するがんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん、および脳がんを含む。いくつかの態様において、腫瘍は、黒色腫、癌腫、肉腫、またはリンパ腫である。

30

#### 【0050】

本開示の改変された遺伝子構築物は、広範な宿主細胞タイプにおいて発現され得る。いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）において発現される。本開示の改変された遺伝子構築物は、例えばヒト対象などの対象において、インビオ発現され得る。

40

50

## 【0051】

いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、間葉系幹細胞(MSC)、誘導多能性幹細胞(iPSC)、胚性幹細胞(ESC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、T細胞、造血幹細胞(HSC)、および／または他の免疫細胞(例えば、エクスピボで改変される細胞の場合)において発現される。いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、免疫細胞、筋細胞、肝細胞、ニューロン、眼細胞、耳細胞、皮膚細胞、心細胞、臍細胞、および／または脂肪細胞(例えば、インビボで標的とされる細胞の場合)において発現される。

## 【0052】

いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、哺乳動物細胞において発現される。例えば、いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物は、ヒト細胞、靈長類細胞(例えば、ベロ細胞)、ラット細胞(例えば、GH3細胞、OC23細胞)またはマウス細胞(例えば、MC3T3細胞)において発現される。ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、HeLa細胞、National Cancer Institute's 60がん細胞株(NCI60)由来のがん細胞、DU145(前立腺がん)細胞、Lncap(前立腺がん)細胞、MCF-7(乳がん)細胞、MDA-MB-438(乳がん)細胞、PC3(前立腺がん)細胞、T47D(乳がん)細胞、THP-1(急性骨髓性白血病)細胞、U87(膠芽細胞腫)細胞、SHSY5Yヒト神経芽細胞腫細胞(骨髓腫からクローニング)およびSaos-2(骨がん)細胞を非限定期に含む、様々なヒト細胞株がある。いくつかの態様において、改変された核酸は、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞(例えば、HEK293またはHEK293T細胞)において発現される。いくつかの態様において、改変された核酸は、例えば、多能性幹細胞(例えば、ヒト誘導多能性幹細胞(hiPSC)を含むヒト多能性幹細胞)などの幹細胞(例えば、ヒト幹細胞)において発現される。「幹細胞」は、培養中に無期限に分裂して特殊化された細胞を生じる能力を有する細胞を指す。「多能性幹細胞」は、生物の全ての組織に分化できるが、単独では完全な生物発生を持続できない幹細胞の一種を指す。「ヒト誘導多能性幹細胞」は、胚性幹細胞を決定付ける特徴を維持するために重要な遺伝子および因子を強制的に発現させることによって胚性幹細胞様状態に再プログラミングされている体細胞(例えば、成熟細胞または成体細胞)を指す(例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、Takahashi and Yamanaka, Cell 126 (4): 663-76, 2006を参照のこと)。ヒト誘導多能性幹細胞は、幹細胞マーカーを発現し、3つの胚葉(外胚葉、内胚葉、中胚葉)全てを特徴とする細胞を生成することができる。

## 【0053】

本開示に従って使用してもよい細胞株の追加の非限定期例は、293-T、293-T、3T3、4T1、721、9L、A-549、A172、A20、A253、A2780、A2780ADR、A2780cis、A431、ALC、B16、B35、BCP-1、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C2C12、C3H-10T1/2、C6、C6/36、Cal-27、CGR8、CHO、CML T1、CMT、COR-L23、COR-L23/5010、COR-L23/CPR、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、E14Tg2a、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、Hepa1c1c7、High Five細胞、HL-60、HMEC、HT-29、HUVEC、J558L細胞、Jurkat、JY細胞、K562細胞、KCL22、KG1、Ku812、KYO1、LNCap、Ma-Mel 1、2、3....48、MC-38、MCF-10A、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MDCK II、MG63、MONO-MAC 6、MOR/0.2R、MRC5、MTD-1A、MyEnd、NALM-1、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NW-145、OPCN/OPCT Peer、PNT-1A/PNT 2、PTK2、Raji、RBL細胞、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、S2、Saos-2細胞、Sf21、Sf9、SiHa、SKBR3、SKOV-3、T-47D、T2、T84、THP1、U373、U87、U937、VCaP、WM39、WT-49、X63、YAC-1、およびYAR細胞を含む。

## 【0054】

## 組成物およびキット

本開示はまた、少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物を含む組成物であって、この合成プロモーターが、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、(a)関心対象の生成物をコードするヌクレオチド配列と、(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)とに機能的に連結され、少なくとも1

10

20

30

40

50

つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性である、組成物を提供する。

#### 【0055】

本開示は、少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物を含むキットであって、この合成プロモーターが、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)に機能的に連結され、少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において不活性であるかまたは低レベルで活性であり、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで活性であり、構築物が、プロモーターと3'UTRとの間に位置する制限部位をさらに含む、キットをさらに提供する。

10

#### 【0056】

本開示の組成物および/またはキットは、本明細書に記載の通りの合成プロモーターおよび/またはmiRNAセンサーのいずれかを含む、改変された遺伝子構築物のいずれかを含んでよい。

#### 【0057】

##### 方法

また、本明細書において、少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物を細胞に送達する工程を含む方法であって、この合成プロモーターが、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、(a)関心対象の生成物をコードするスクレオチド配列と、(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)とに機能的に連結され、少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において発現されないかまたは標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出不可能なレベルで発現され、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで発現される(改変された遺伝子構築物が、標的細胞において発現され、かつ、非標的細胞においてサイレンシングおよび/または分解されるように)、方法が提供される。

20

#### 【0058】

また、改変された遺伝子構築物を含むベクターを、いくつかの態様において、細胞に送達してもよい。

30

#### 【0059】

さらになお、本開示は、少なくとも1つの合成プロモーターを含む改変された遺伝子構築物の対象への送達であって、この合成プロモーターが、非標的細胞と比べて標的細胞においてより高い活性を有し、かつ、(a)関心対象の生成物をコードするスクレオチド配列と、(b)少なくとも1つのマイクロRNA(miRNA)が結合する少なくとも1つのmiRNA結合部位を含む少なくとも1つのmiRNAセンサーを含む3'非翻訳領域(UTR)とに機能的に連結され、少なくとも1つのmiRNAが、標的細胞において発現されないかまたは標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出不可能なレベルで発現され、かつ、少なくとも1つのmiRNAが、非標的細胞においてmiRNAセンサーによって検出可能なレベルで発現される、送達を提供する。

40

#### 【0060】

また、改変された遺伝子構築物を含むベクターを、いくつかの態様において、対象に送達してもよい。

#### 【0061】

いくつかの態様において、対象は、哺乳動物対象である。いくつかの態様において、対象は、ヒト対象である。

#### 【0062】

本開示の方法は、本明細書に記載の通りの合成プロモーターおよび/またはmiRNAセンサーのいずれかを含む、改変された遺伝子構築物のいずれか(その使用)を含んでよい。

50

## 【0063】

改変された遺伝子構築物を、ウイルス送達システム（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ隨伴、ヘルパー依存型アデノウイルスシステム、ハイブリッドアデノウイルスシステム、単純ヘルペス、ポックスウイルス、レンチウイルス、エプスタイン・バーウイルス）または非ウイルス送達システム（例えば、物理的：裸のDNA、DNA衝撃、電気穿孔法、流体力学、超音波、もしくはマグネットフェクション；または化学的：カチオン性脂質、異なるカチオン性ポリマー、もしくは脂質ポリマー）を使用して、細胞に送達してもよい（Nayerossadat N et al. *Adv Biomed Res.* 2012; 1: 27、参照によって本明細書に組み入れられる）。いくつかの態様において、非ウイルスに基づく送達システムは、ヒドロゲルに基づく送達システムである（例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、Brandl F, et al. *Journal of Controlled Release*, 2010, 142(2): 221-228を参照のこと）。

10

## 【0064】

改変された遺伝子構築物および／または細胞を、当技術分野において公知の任意のインビオ送達法によって、対象（例えば、ヒト対象などの哺乳動物対象）に送達してもよい。例えば、改変された遺伝子構築物および／または細胞を静脈内に送達してもよい。いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物および／または細胞は、送達ビヒクル（例えば、非リポソームナノ粒子またはリポソーム）中で送達される。いくつかの態様において、改変された遺伝子構築物および／または細胞は、がんまたは他の疾患を有する対象に全身に送達され、対象のがん細胞または病的細胞において特異的に活性化される（転写が活性化される）。

20

## 【0065】

## 追加の態様

1. 特定の細胞タイプにおいて活性であるが他の細胞タイプでは活性でない、1つまたは複数の核酸分子に機能的に連結されて、その発現を駆動する1つまたは複数の人工プロモーターを含み、特定のオンターゲット細胞においてダウンレギュレートされるがオフターゲット細胞ではされない1つまたは複数のmiRNAを検出するmiRNAセンサー成分をさらに含む、空間的および／または時間的選択性を達成し、miRNAに基づく核酸分子の発現の抑制が、核酸分子の発現がオフターゲット細胞と比較してオフターゲット細胞において低減されるように、オフターゲット細胞において行われる、合成遺伝子回路（構築物）。

30

## 【0066】

2. 1つまたは複数の人工プロモーターが、治療用またはマーカーポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子に機能的に連結されて、その発現を駆動する、態様1の合成遺伝子回路。

## 【0067】

3. 1つまたは複数の人工プロモーターの各々が、200～300塩基対を含む、態様1または態様2の合成遺伝子回路。

## 【0068】

4. 1つまたは複数の人工プロモーターが、オフターゲット細胞に対してオンターゲット細胞内で少なくとも10倍増強された活性、好ましくは、オフターゲット細胞に対してオンターゲット細胞内で少なくとも50倍増強された活性を含む、態様1のいずれか1つの合成遺伝子回路。

40

## 【0069】

5. 複数のマイクロRNAがオンターゲット細胞において不在であるときにのみ高レベルの遺伝子発現が可能となるように、標的転写物の3'端に直列にコードされる複数のマイクロRNAセンサーを含む、態様1～4のいずれか1つの合成遺伝子回路。

## 【実施例】

## 【0070】

## 実施例1

この実施例では、5コピーのマイクロRNA標的部位をホタルルシフェラーゼの3' -UTRに

50

クローニングした：マイクロRNA標的部位は、154、497、29A、720、205、494、224、191、21、96、449A、または183で指定される。図3を参照のこと。ホタルルシフェラーゼは実験レポーターとしての役割を果たし、ウミシイタケ(*Renilla*)ルシフェラーゼは制御レポーターとしての役割を果たした。ウミシイタケルシフェラーゼ発現に対するホタルルシフェラーゼ発現の正規化は、トランスフェクション効率および非特異的細胞応答の制御を助ける。マイクロRNA標的部位およびレポーターを担持するプラスミドをMCF-10AおよびMDA-MB-453細胞株にトランスフェクトし、翌日ルシフェラーゼ発現を測定した。マイクロRNAは、2つの細胞株についてレポーター遺伝子の発現を異なるレベルで阻害した。図4の上のパネルを参照のこと。ある特定のマイクロRNA (miR-191、miR-21、およびmiR-183)は、細胞タイプ間で5倍超の選択性を有した。図4の下のパネルを参照のこと。

10

#### 【0071】

##### 実施例2

この実施例では、3つの異なる合成プロモーターを、2つの異なるマイクロRNA標的部位(1~5コピー)と組み合わせてアッセイした。図5を参照のこと。発現データを図6A~8Bに示す。多数の組み合わせが、非悪性細胞株に対して悪性細胞株について50倍超の選択性を示した。合成プロモーターとマイクロRNAセンサーの両方を含有する時空間調節因子構築物のいくつかにおいて予期しない相乗効果が観察された。例えば、合成プロモーター-pSyn-3、12、18のみを含有する(miRNAセンサーなし)構築物は、25×の細胞選択性(MDA-MB-453/MCF-10A細胞におけるレポーター発現の比)を示したが、一方でmiRNA-29Aのみを含有する(合成プロモーターなし)構築物は、4×の細胞選択性を示した。(1)pSyn-3、pSyn-12、またはpSyn-18と(2)miRNA-29Aの両方を含む時空間調節因子構築物は、それぞれ、約100×、約150×、および約250×の細胞選択性を示す。

20

#### 【0072】

##### 参考文献

1. Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- $\kappa$ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. 2014;81(5):1009-23. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.013. PubMed PMID: 24607225; PMCID: PMC3978641.
2. Xie Z, Wroblewska L, Prochazka L, Weiss R, Benenson Y. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science*. 2011;333(6047):1307-11. Epub 2011/09/03. doi: 10.1126/science.1205527. PubMed PMID: 21885784.
3. Saxena P, Heng BC, Bai P, Folcher M, Zulewski H, Fussenegger M. A programmable synthetic lineage-control network that differentiates human iPSCs into glucose-sensitive insulin-secreting beta-like cells. *Nature communications*. 2016;7:11247. doi: 10.1038/ncomms11247. PubMed PMID: 27063289; PMCID: PMC4831023. 10
4. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68. PubMed PMID: 9488723.
5. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspasia P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603-7. doi: 10.1038/nature11003. PubMed PMID: 22460905; PMCID: PMC3320027. 20
6. Huang WY, Hsu SD, Huang HY, Sun YM, Chou CH, Weng SL, Huang HD. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D856-61. doi: 10.1093/nar/gku1151. PubMed PMID: 25398901; PMCID: PMC4383953.
7. Gure AO, Tureci O, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jager E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer*. 1997;72(6):965-71. PubMed PMID: 9378559. 30
8. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Soccia ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based

- on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-14. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.040. PubMed PMID: 17604727; PMCID: PMC2681231.
9. Gitzinger M, Kemmer C, El-Baba MD, Weber W, Fussenegger M. Controlling transgene expression in subcutaneous implants using a skin lotion containing the apple metabolite phloretin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10638-43. doi: 10.1073/pnas.0901501106. PubMed PMID: 19549857; PMCID: PMC2700147.
10. Fux C, Moser S, Schlatter S, Riman M, Bailey JE, Fussenegger M. Streptogramin- and tetracycline-responsive dual regulated expression of p27Kip1 sense and antisense enables positive and negative growth control of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(4):e19. doi: 10.1093/nar/29.4.e19.
11. Fussenegger M, Morris RP, Fux C, Riman M, von Stockar B, Thompson CJ, Bailey JE. Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nat Biotech*. 2000;18(11):1203-8.
12. Weber W, Fux C, Daoud-El Baba M, Keller B, Weber CC, Kramer BP, Heinzen C, Aubel D, Bailey JE, Fussenegger M. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotech*. 2002;20(9):901-7. doi: [http://www.nature.com/nbt/journal/v20/n9/supplinfo/nbt731\\_S1.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v20/n9/supplinfo/nbt731_S1.html).
13. Gitzinger M, Kemmer C, Fluri DA, El-Baba MD, Weber W, Fussenegger M. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(5):e37. doi: 10.1093/nar/gkr1251. PubMed PMID: 22187155; PMCID: PMC3300003.
14. Hirrlinger J, Requardt RP, Winkler U, Wilhelm F, Schulze C, Hirrlinger PG. Split-CreERT2: temporal control of DNA recombination mediated by split-Cre protein fragment complementation. *PLoS One*. 2009;4(12):e8354. doi: 10.1371/journal.pone.0008354. PubMed PMID: 20016782; PMCID: PMC2791205.
15. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):752-7. doi: 10.1006/bbrc.1997.7124. PubMed PMID: 9299439.
16. Sharma N, Moldt B, Dalsgaard T, Jensen TG, Mikkelsen JG. Regulated gene insertion by steroid-induced PhiC31 integrase. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(11):e67. doi: 10.1093/nar/gkn298. PubMed PMID: 18499713; PMCID: PMC2441784.
17. Hunter NL, Awatramani RB, Farley FW, Dymecki SM. Ligand-activated Flpe for temporally regulated gene modifications. *Genesis*. 2005;41(3):99-109. doi: 10.1002/gene.20101. PubMed PMID: 15729687.
- 30 18. Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, Herman JP. Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(21):e131. PubMed PMID: 14576331; PMCID: PMC275488.
19. Yang L, Nielsen AA, Fernandez-Rodriguez J, McClune CJ, Laub MT, Lu TK, Voigt CA. Permanent genetic memory with >1-byte capacity. *Nat Methods*. 2014. doi: 10.1038/nmeth.3147. PubMed PMID: 25344638.
20. Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw BH, Orkin SH. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2014;289(31):21312-24. doi: 10.1074/jbc.M114.564625. PubMed PMID: 24907273; PMCID: PMC4118095.
- 40 21. Negroni L, Samson M, Guigonis J-M, Rossi B, Pierrefite-Carle V, Baudoin C. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system

- induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90 $\beta$  phosphorylation. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(10):2747-56. doi: 10.1158/1535-7163.mct-07-0040.
22. Kievit E, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res*. 1999;59(7):1417-21. PubMed PMID: 10197605.
23. Beck C, Cayeux S, Lupton SD, Dorken B, Blankenstein T. The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Human gene therapy*. 1995;6(12):1525-30. doi: 10.1089/hum.1995.6.12-1525. PubMed PMID: 8664377.
24. Deans TL, Cantor CR, Collins JJ. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. *Cell*. 2007;130(2):363-72. Epub 2007/07/31. doi: S0092-8674(07)00684-8 [pii] 10.1016/j.cell.2007.05.045. PubMed PMID: 17662949.
25. Wroblewska L, Kitada T, Endo K, Siciliano V, Stillo B, Saito H, Weiss R. Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery. *Nat Biotechnol*. 2015;33(8):839-41. doi: 10.1038/nbt.3301. PubMed PMID: 26237515; PMCID: PMC4532950.
26. Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):751-61. doi: 10.1038/nrd3801. PubMed PMID: 22935759.
27. Capelli C, Pedrini O, Valgardsdottir R, Da Roit F, Golay J, Introna M. Clinical grade expansion of MSCs. *Immunol Lett*. 2015;168(2):222-7. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.006. 20 PubMed PMID: 26092523.

#### 【0073】

本明細書に開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、各々が引用される主題に関して参照することによって組み入れられ、これらは、いくつかの場合では、文書の全体を包含し得る。

#### 【0074】

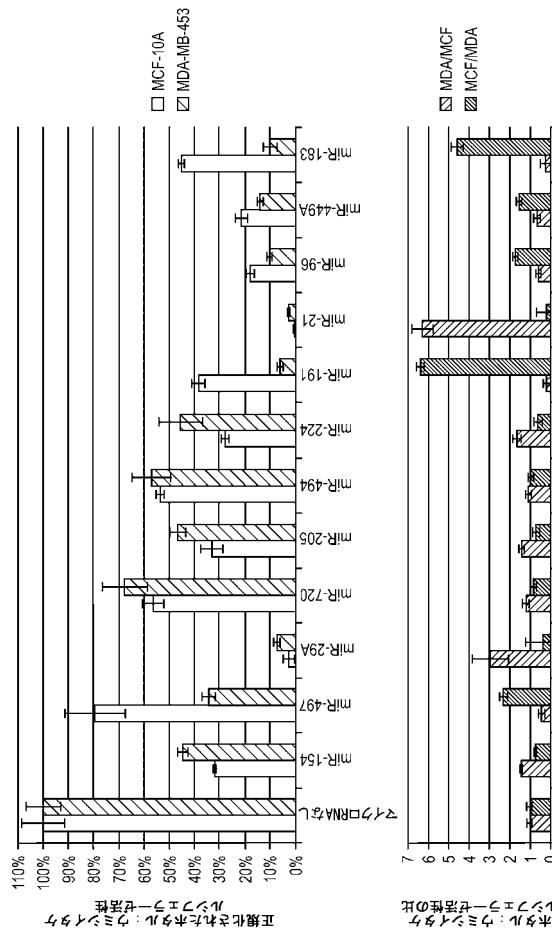
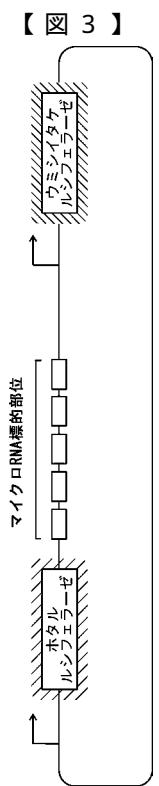
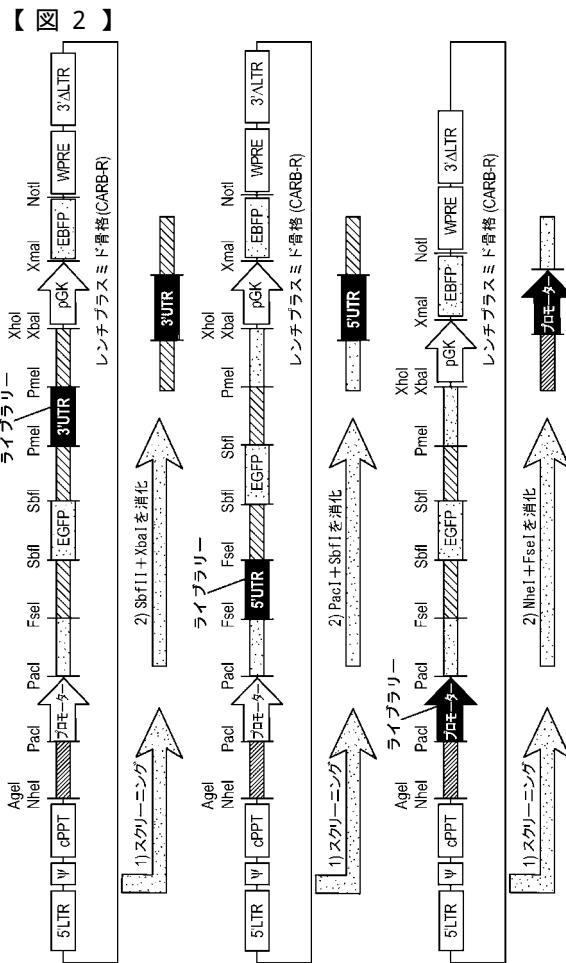
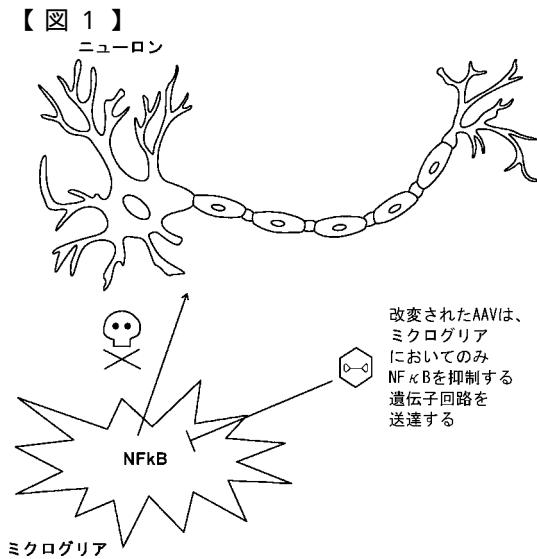
不定冠詞 (a, an) は、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、それとは反対の明確な指示のない限り、「少なくとも1つ」を意味するものと理解すべきである。

#### 【0075】

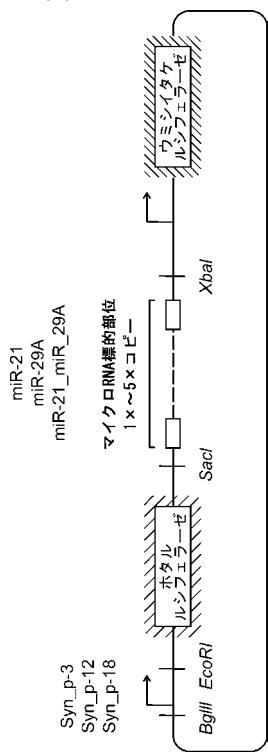
また、それとは反対の明確な指示のない限り、1より多い工程または行為を含む本明細書において請求されるあらゆる方法において、その方法の工程または行為の順序は、その方法の工程または行為が列挙された順序に必ずしも限定されないことを理解すべきである。

#### 【0076】

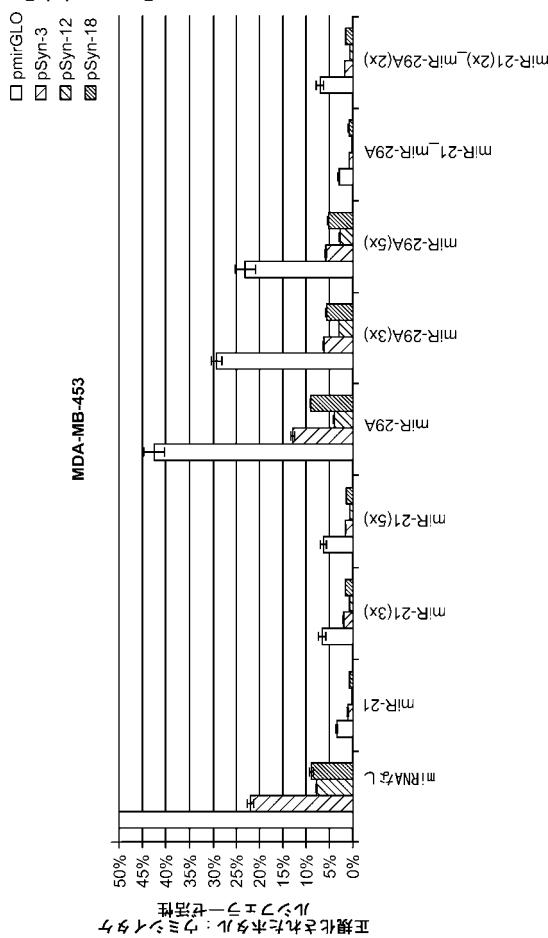
先の明細書だけでなく特許請求の範囲においても、「～を含む (comprising)」、「～を含む (including)」、「～を担持する (carrying)」、「～を有する (having)」、「～を含有する (containing)」、「～を含む (involving)」、「～を保持する (holding)」、「～から構成される (composed of)」などの全ての移行句は、制限のない、すなわち、「～を含むがこれらに限られない」ことを意味するものと理解すべきである。「～からなる (consisting of)」および「～から本質的になる (consisting essentially of)」という移行句のみを、米国特許庁マニュアルの特許審査手続きのセクション2111.0 30 40 3に述べられている通り、それぞれ、制限または半制限のある移行句とすべきである。



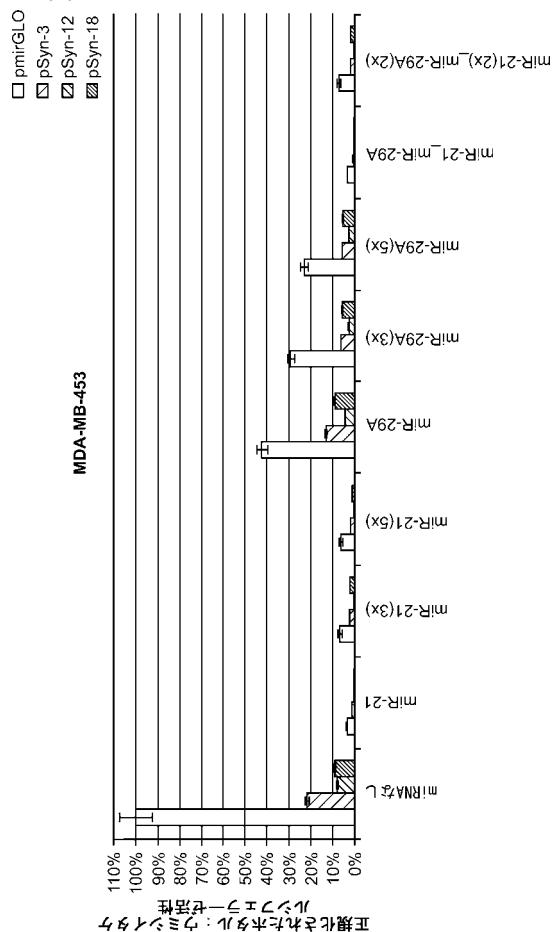
【図5】



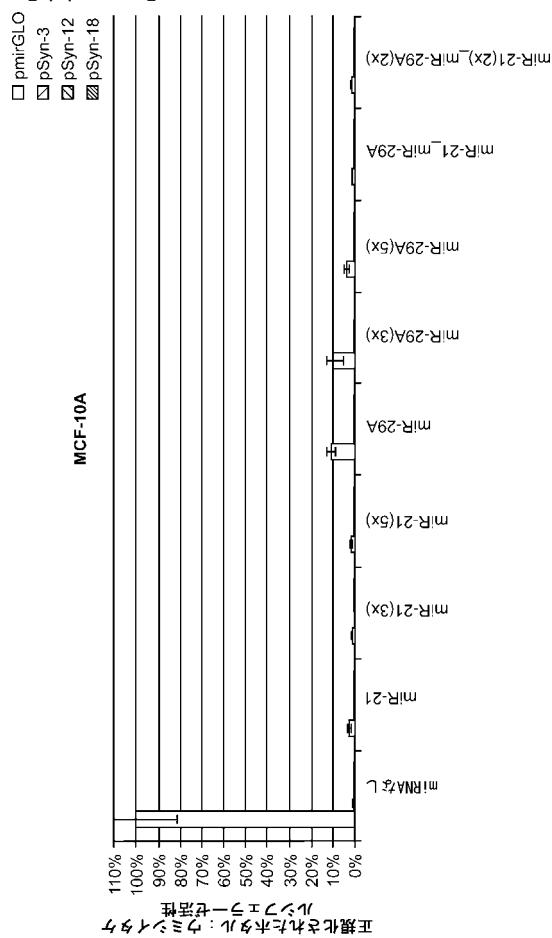
【図6 B】



【図6 A】



【図7 A】



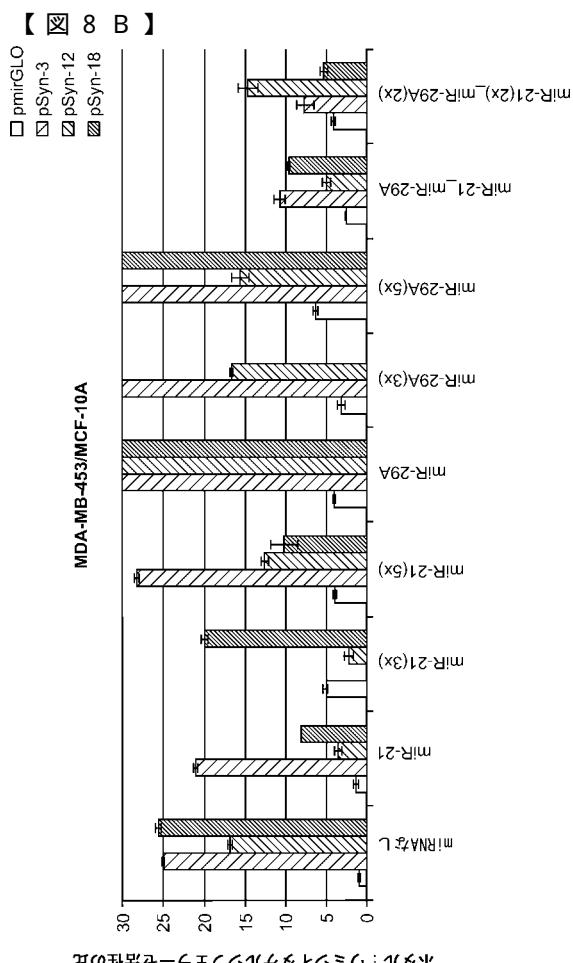
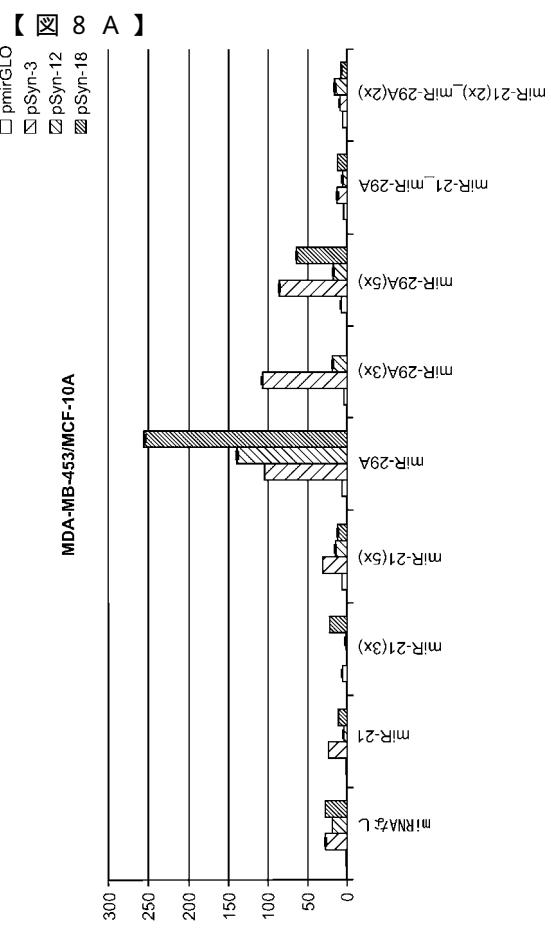
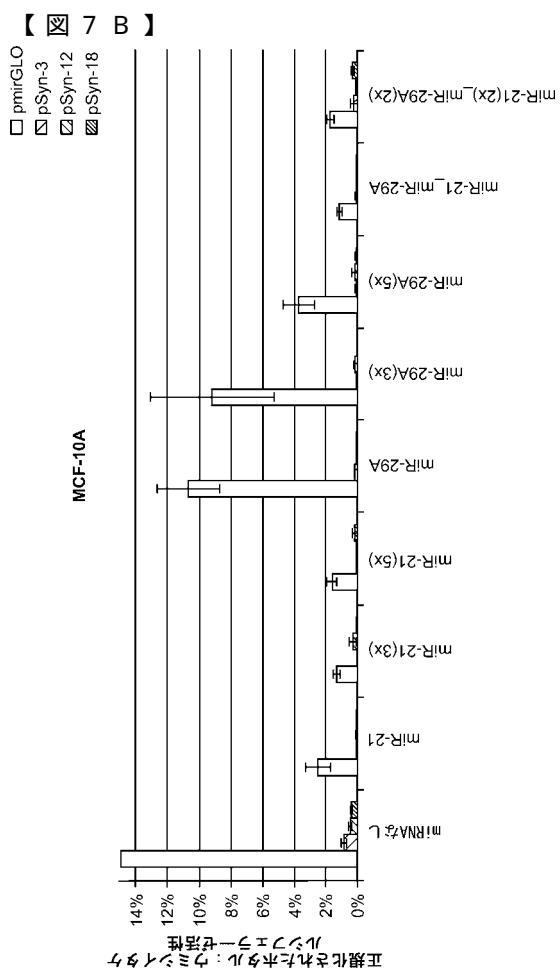


表4: がん細胞に対する各miRNAの活性化効率

表4: がん細胞に対する各miRNAの活性化効率

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No<br>PCT/US2017/043938                    |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
|--|---|--|-----------|--|-----------------------|---|---|------|---|---|------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C12N15/63 C12N15/86<br>ADD.   |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N   |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS   |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 2007/054872 A1 (REPPEN THOMAS W [US] ET AL) 8 March 2007 (2007-03-08)<br/>paragraphs [0011], [0012], [0016], [0028], [0029], [0036] - [0038], [0048]; claims 1-19; figures 1-7; examples 1-4<br/>-----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">A. CHAUDHURY ET AL: "A piggyBac-based reporter system for scalable in vitro and in vivo analysis of 3' untranslated region-mediated gene regulation", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 10, 20 April 2014 (2014-04-20), pages e86-e86, XP055403039, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku258 abstract; figures 1,2<br/>-----<br/>-/-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> </tbody> </table> |   |  | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | US 2007/054872 A1 (REPPEN THOMAS W [US] ET AL) 8 March 2007 (2007-03-08)<br>paragraphs [0011], [0012], [0016], [0028], [0029], [0036] - [0038], [0048]; claims 1-19; figures 1-7; examples 1-4<br>----- | 1-33 | X | A. CHAUDHURY ET AL: "A piggyBac-based reporter system for scalable in vitro and in vivo analysis of 3' untranslated region-mediated gene regulation", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 10, 20 April 2014 (2014-04-20), pages e86-e86, XP055403039, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku258 abstract; figures 1,2<br>-----<br>-/- | 1-33 |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| X  | US 2007/054872 A1 (REPPEN THOMAS W [US] ET AL) 8 March 2007 (2007-03-08)<br>paragraphs [0011], [0012], [0016], [0028], [0029], [0036] - [0038], [0048]; claims 1-19; figures 1-7; examples 1-4<br>-----   | 1-33   |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| X  | A. CHAUDHURY ET AL: "A piggyBac-based reporter system for scalable in vitro and in vivo analysis of 3' untranslated region-mediated gene regulation", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 10, 20 April 2014 (2014-04-20), pages e86-e86, XP055403039, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku258 abstract; figures 1,2<br>-----<br>-/- | 1-33   |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.   |   | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.         |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family   |   |  |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>14 September 2017   |   | Date of mailing of the international search report<br><br>25/09/2017 |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><br>Schmidt-Yodlee, H                          |           |  |                       |   |   |      |   |   |      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                              |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/US2017/043938            |

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | CN 102 719 556 A (BEIJING FIVEPLUS MOLECULAR MEDICINE INST CO LTD) 10 October 2012 (2012-10-10) paragraphs [0003], [0455]; claims 1-9; figures 1,3,4,16,18,19<br>----- | 1-33                  |
| X         | US 2006/265771 A1 (LEWIS DAVID L [US] ET AL) 23 November 2006 (2006-11-23) paragraph [0044] - paragraph [0046]; claims 1-19; figures 1,2; table 1<br>-----             | 1-33                  |
| X         | US 2009/286242 A1 (HANNON GREGORY J [US] ET AL) 19 November 2009 (2009-11-19) paragraphs [0183] - [0197]; claims 1-18<br>-----   | 1-33                  |
| X         | WO 2011/133901 A2 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; GAO GUANGPING [US]; XIE JUN [US]; ZAMORE PLIL) 27 October 2011 (2011-10-27) claims 36-54; figure 1; examples 1-3<br>-----  | 1-33                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2017/043938

| Patent document cited in search report |    | Publication date | Patent family member(s)   |  | Publication date |
|--|----|------------------|---|--|------------------|
| US 2007054872                          | A1 | 08-03-2007       | NONE  |  |                  |
| CN 102719556                           | A  | 10-10-2012       | NONE  |  |                  |
| US 2006265771                          | A1 | 23-11-2006       | NONE  |  |                  |
| US 2009286242                          | A1 | 19-11-2009       | NONE  |  |                  |
| WO 2011133901                          | A2 | 27-10-2011       | CA 2833912 A1<br>EP 2561075 A2<br>JP 2013533847 A<br>US 2013101558 A1<br>US 2016208257 A1<br>WO 2011133901 A2 | 27-10-2011<br>27-02-2013<br>29-08-2013<br>25-04-2013<br>21-07-2016<br>27-10-2011 |                  |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                    | F I            | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| <b>A 6 1 K 38/43 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 38/43  |            |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 | D          |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>   | A 6 1 K 39/395 | N          |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 1/15   |            |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 1/19   |            |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 5/10   |            |
| <b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b> | C 1 2 N 1/21   |            |
| <b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 15/113 | Z          |
| <b>C 1 2 N 15/52 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 15/13  |            |
| <b>C 1 2 N 15/16 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 15/52  | Z          |
| <b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 15/16  |            |
|                                 | C 1 2 N 15/12  |            |

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

|                           |  |
|---------------------------|--|
| (74) 代理人 100142929        | 弁理士 井上 隆一  |
| (74) 代理人 100148699        | 弁理士 佐藤 利光  |
| (74) 代理人 100128048        | 弁理士 新見 浩一  |
| (74) 代理人 100129506        | 弁理士 小林 智彦  |
| (74) 代理人 100205707        | 弁理士 小寺 秀紀  |
| (74) 代理人 100114340        | 弁理士 大関 雅人  |
| (74) 代理人 100114889        | 弁理士 五十嵐 義弘   |
| (74) 代理人 100121072        | 弁理士 川本 和弥  |
| (72) 発明者 ルー ティモシー クアン - タ | アメリカ合衆国 0 2 1 4 1 マサチューセッツ州 ケンブリッジ スプリング ストリート 3<br>6    |
| (72) 発明者 ウォン レムス          | アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州 レッドウッド シティ フラー ストリート<br>3 2 3 |

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AB01 AC14 AC20 BA02 CA23  
CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA13 AA17  
4C085 AA13 AA14 CC23 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14