

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2024-536908  
(P2024-536908A)

(43)公表日 令和6年10月8日(2024.10.8)

|                          |                |                   |
|--------------------------|----------------|-------------------|
| (51)国際特許分類               | F I            | テーマコード (参考)       |
| C 1 2 N 15/867 (2006.01) | C 1 2 N 15/867 | Z Z N A 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N 15/113 | Z                 |
| C 1 2 N 7/01 (2006.01)   | C 1 2 N 7/01   |                   |

| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全290頁) |                                    |         |                     |
|-----------------------------|------------------------------------|---------|---------------------|
| (21)出願番号                    | 特願2024-521765(P2024-521765)        | (71)出願人 | 306034996           |
| (86)(22)出願日                 | 令和4年10月12日(2022.10.12)             |         | オックスフォード バイオメディカ (ユ |
| (85)翻訳文提出日                  | 令和6年6月7日(2024.6.7)                 |         | ーケー) リミテッド          |
| (86)国際出願番号                  | PCT/GB2022/052586                  |         | イギリス国 オーエックス4 6エルティ |
| (87)国際公開番号                  | WO2023/062367                      |         | ー オックスフォードシャー オックスフ |
| (87)国際公開日                   | 令和5年4月20日(2023.4.20)               |         | ード, トランスポート ウェイ, ウィ |
| (31)優先権主張番号                 | 2114529.7                          |         | ンドラッシュ コート          |
| (32)優先日                     | 令和3年10月12日(2021.10.12)             | (74)代理人 | 100107984           |
| (33)優先権主張国・地域又は機関           | 英国(GB)                             |         | 弁理士 廣田 雅紀           |
| (81)指定国・地域                  | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA      | (74)代理人 | 100182305           |
|                             | ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(   |         | 弁理士 廣田 鉄平           |
|                             | AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A   | (74)代理人 | 100096482           |
|                             | T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR |         | 弁理士 東海 裕作           |
|                             | ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, | (74)代理人 | 100131093           |
|                             | 最終頁に続く                             |         | 弁理士 堀内 真            |
|                             |                                    |         | 最終頁に続く              |

(54)【発明の名称】 レンチウイルスベクター

(57)【要約】  
本発明は、レンチウイルスベクターの生成に関する。より詳しくは、本発明は、改変された3'LTR、改変された5'LTR、ベクターイントロン、少なくとも1つのシス作用性配列、及び／又は干渉RNAのうち任意の1つ又は2つ以上を含むレンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列に関する。このようなヌクレオチド配列の方法及び使用も、本発明に包含される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、

a) 前記レンチウイルスベクターゲノムの 3'LTR が、改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変されたポリアデニル化配列が、3'LTR の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含み、

b) 前記レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 5'LTR をさらに含み、前記改変された 5'LTR の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含み、

c) 前記レンチウイルスベクターゲノムが、導入遺伝子発現カセットをさらに含み、前記導入遺伝子発現カセットの 3'UTR が、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／又は (b) シス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも 1 つのシス作用性配列を含み、並びに

d) 前記レンチウイルスベクターゲノムが、ベクターイントロンをさらに含む、  
前記ヌクレオチド配列。

10

## 【請求項 2】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノムの 3'LTR が、改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変されたポリアデニル化配列が、前記 3'LTR の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含む、前記ヌクレオチド配列。

20

## 【請求項 3】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 5'LTR を含み、前記改変された 5'LTR の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含む、前記ヌクレオチド配列。

## 【請求項 4】

導入遺伝子発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、前記導入遺伝子発現カセットの 3'UTR が、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列及び／又は (b) シス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも 1 つのシス作用性配列を含む、前記ヌクレオチド配列。

30

## 【請求項 5】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、前記ヌクレオチド配列。

## 【請求項 6】

レンチウイルスベクターゲノムが、

a) 改変された 5'LTR であって、前記改変された 5'LTR の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含む、前記改変された 5'LTR、

b) 導入遺伝子発現カセットであって、前記導入遺伝子発現カセットの 3'UTR が、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／若しくは (b) シス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも 1 つのシス作用性配列を含む、前記導入遺伝子発現カセット、並びに／又は

40

c) 導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン  
をさらに含む、請求項 2 に記載のヌクレオチド配列。

## 【請求項 7】

レンチウイルスベクターゲノムが、

a) 改変された 5'LTR であって、前記改変された 5'LTR の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含む、前記改変された 5'LTR、

50

b) 導入遺伝子発現カセットであって、前記導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、  
(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／又は (b) シス作用性 ZCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、前記導入遺伝子発現カセット、並びに

c) 導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン  
をさらに含む、請求項2又は6に記載のヌクレオチド配列。

【請求項8】

レンチウイルスベクターゲノムが、

a) 改変された3' LTRであって、前記レンチウイルスベクターゲノムの前記3' LTRが、改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変されたポリアデニル化配列が、前記3' LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む、前記改変された3' LTR、

10

b) 導入遺伝子発現カセットであって、前記導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、  
(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／若しくは (b) シス作用性 ZCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、前記導入遺伝子発現カセット、並びに／又は

c) 導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン  
をさらに含む、請求項3に記載のヌクレオチド配列。

【請求項9】

レンチウイルスベクターゲノムが、

20

a) 改変された3' LTRであって、前記レンチウイルスベクターゲノムの前記3' LTRが、改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変されたポリアデニル化配列が、前記3' LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む、前記改変された3' LTR、

b) 導入遺伝子発現カセットであって、前記導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、  
(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／又は (b) シス作用性 ZCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、前記導入遺伝子発現カセット、並びに

c) 導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン  
をさらに含む、請求項3又は8に記載のヌクレオチド配列。

30

【請求項10】

レンチウイルスベクターゲノムが、導入遺伝子発現カセットをさらに含み、前記導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／又は (b) シス作用性 ZCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、請求項2又は3に記載のヌクレオチド配列。

【請求項11】

a) レンチウイルスベクターゲノムが、改変された3' LTRをさらに含み、前記レンチウイルスベクターゲノムの前記3' LTRが、改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変されたポリアデニル化配列が、前記3' LTR R領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含み、

40

b) レンチウイルスベクターゲノムが、改変された5' LTRをさらに含み、前記改変された5' LTRのR領域が、少なくとも1つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含み、並びに／又は

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／若しくは (b) シス作用性 ZCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、  
請求項5に記載のヌクレオチド配列。

【請求項12】

a) レンチウイルスベクターゲノムが、改変された3' LTRをさらに含み、前記レンチウイルスベクターゲノムの前記3' LTRが、改変されたポリアデニル化配列を含み、

50

前記改変されたポリアデニル化配列が、前記 3' LTR R 領域の 5' にあるポリアデニル化シグナルを含み、

b) レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 5' LTR をさらに含み、前記改変された 5' LTR の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含み、並びに

c) 導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列；及び／又は (b) シス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列から選択される少なくとも 1 つのシス作用性配列を含む、

請求項 5 又は 11 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 13】

a) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある、又は

b) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである、

請求項 1 及び 5～12 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 14】

a) ベクターイントロンが、1 つ若しくは 2 つ以上の導入遺伝子 mRNA 自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子 mRNA 自己崩壊エレメント、又は 1 つ若しくは 2 つ以上の導入遺伝子 mRNA 核内保持シグナルを含み、好ましくは、前記ベクターイントロンが、1 つ又は 2 つ以上の導入遺伝子 mRNA 自己不安定化エレメント又は導入遺伝子 mRNA 自己崩壊エレメントを含み、

b) ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに／又は

c) 導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、ベクターイントロンを含む、

請求項 1、5～9 及び 11～13 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 15】

レンチウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されており、好ましくは、ヌクレオチド配列が、配列番号 2、3、4、6、7 及び／若しくは 8 のいずれかに示される配列並びに／又は配列 CAGACA 並びに／又は GTGGAGACT を含む、

請求項 1～3 及び 5～14 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 16】

レンチウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位の 3' 末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、請求項 1～3 及び 5～15 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 17】

レンチウイルスベクターゲノムが、rev 応答エレメント (RRE) を含まない、請求項 1～3 及び 5～16 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 18】

ネイティブ 3' ポリアデニル化配列が、変異又は欠失している、好ましくは、前記ネイティブ 3' ポリアデニル化シグナルが、変異又は欠失している、請求項 1、2 及び 6～17 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 19】

改変されたポリアデニル化配列が、異種ポリアデニル化配列であり、好ましくは、前記改変されたポリアデニル化配列が、異種ポリアデニル化シグナルを含む、請求項 1、2 及び 6～18 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 20】

改変されたポリアデニル化配列が、ポリアデニル化上流エンハンサーエレメント (USE) をさらに含み、好ましくは、前記 USE が、ポリアデニル化シグナルの 5' にある、請求項 1、2 及び 6～19 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 21】

10

20

30

40

50

改変されたポリアデニル化配列が、G Uリッチ下流エンハンサーエレメントをさらに含み、好ましくは、前記G Uリッチ下流エンハンサーエレメントが、ポリアデニル化シグナルの3'にある、請求項1、2及び6～20のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項22】

3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルが、センス鎖にあり、好ましくは、前記3'LTRが、(i)前記センス鎖中の前記ポリアデニル化シグナルの5'にあり、かつ(ii)前記3'LTRのアタッチメント配列の3'にあるポリアデニル化シグナルをアンチセンス鎖中にさらに含む、請求項1、2及び6～21のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項23】

a) 改変されたポリアデニル化配列の3'LTRのR領域が、最小R領域である、及び／又は

b) 前記改変されたポリアデニル化配列の前記3'LTRのR領域が、レンチウイルスベクターゲノムのネイティブ5'LTRのR領域に対して相同である、  
請求項1、2及び6～22のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項24】

改変されたポリアデニル化配列が、ポリアデニル化切断部位をさらに含み、好ましくは、前記ポリアデニル化切断部位が、ポリアデニル化シグナルの3'にある、請求項1、2及び6～23のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項25】

改変された5'LTRの最初の55ヌクレオチドが、ポリアデニル化DSEを含み、好ましくは、前記改変された5'LTRの最初の40ヌクレオチドが、前記少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む、請求項1、3及び6～24のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項26】

ポリアデニル化DSEが、改変された5'LTRのステムループ構造内に含まれる、請求項1、3及び6～25のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項27】

ポリアデニル化DSEが、G Uリッチ配列であり、好ましくは、前記G Uリッチ配列が、RSV若しくはMMTVに由来する、又は前記G Uリッチ配列が合成である、請求項1、3及び6～26のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項28】

改変された5'LTRのネイティブポリアデニル化シグナルが、変異又は欠失している、請求項1、3及び6～27のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項29】

改変された5'LTRの5'R領域が、ポリアデニル化切断部位をさらに含む、請求項1、3及び6～28のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項30】

CAR配列が、複数のCARe配列を含み、好ましくは、前記複数のCARe配列がタンデムに並んでいる、請求項1、4及び6～29のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項31】

CAR配列が、少なくとも2個、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個、少なくとも18個又は少なくとも20個のCARe配列を含み、任意選択で、前記CARe配列がタンデムに並んでいる、請求項1、4及び6～30のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項32】

CAR配列が、タンデムに並んでいる少なくとも6個のCARe配列、タンデムに並んでいる少なくとも8個のCARe配列、タンデムに並んでいる少なくとも10個のCARe配列、タンデムに並んでいる少なくとも12個のCARe配列又はタンデムに並んでい

10

20

30

40

50

る少なくとも16個のCARE配列を含む、請求項31に記載のヌクレオチド配列。

【請求項33】

CAREヌクレオチド配列が、BMWGHWSWS（配列番号92）又はBMWRHWSWS（配列番号243）であり、好ましくは、前記CAREヌクレオチド配列が、CMAGHWSSTG（配列番号96）である、請求項1、4及び6～32のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項34】

CAREヌクレオチド配列が、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCAGATCCTG（配列番号97）、CCAGTTCCTC（配列番号99）、TCAGATCCTG（配列番号100）、CCAGATGGTG（配列番号101）、CCAGTTCCAG（配列番号102）、CCAGCAGCTG（配列番号103）、CAAGCTCCTG（配列番号104）、CAAGATCCTG（配列番号105）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CAAGAACGTG（配列番号107）、TCAGTTCCTG（配列番号227）、GCAGTTCCTG（配列番号228）、CAAGTTCCTG（配列番号229）、CCTGTTCTG（配列番号230）、CCTGCTCCTG（配列番号231）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTGCTG（配列番号233）、CCTGTTCTG（配列番号234）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCTGTTCCTC（配列番号236）、CCAATTCCTG（配列番号237）及びGAAGCTCCTG（配列番号238）；からなる群から選択され、好ましくは、前記CAREヌクレオチド配列が、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCTGTTCTG（配列番号230）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCAATTCCTG（配列番号237）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CCAGTTCCTC（配列番号99）及びCCAGTTCCAG（配列番号102）である、請求項1、4及び6～33のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項35】

導入遺伝子発現カセットの3'UTRが、追加の転写後調節エレメント（PRE）を含まない、請求項1、4及び6～34のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項36】

導入遺伝子発現カセットの3'UTRが、少なくとも1つの追加の転写後調節エレメント（PRE）を含み、好ましくは、前記追加のPREが、ウッドチャック肝炎ウイルスPRE（wPRE）である、請求項1、4及び6～35のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項37】

シス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列が、PRE $\alpha$ エレメント断片であり、好ましくは、前記シス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列が、

- a) HBV PRE $\alpha$ エレメントの断片、又は
- b) HCMV RNA 2.7の断片、又は
- c) wPRE  $\alpha$ エレメントの断片

である、請求項1、4及び6～36のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項38】

PRE $\alpha$ エレメント断片の長さが、200ヌクレオチド以下であり、好ましくは、前記PRE $\alpha$ エレメント断片の長さが、90ヌクレオチド以下である、請求項37に記載のヌクレオチド配列。

【請求項39】

CNGGN型ペントループ配列が、

- (i) TCCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGA（配列番号108）；及び
- (ii) GCCCGCTGCTGGACAGGGGC（配列番号109）

からなる群から選択される配列を有するステムループ構造内に含まれる、請求項1、4及び6～38のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項40】

CNGGN型ペントループ配列が、異種ステムループ構造内に含まれる、請求項1、4

10

20

30

40

50

及び 6 ～ 39 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 41】

Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列が、

(i) TGCCGTCGCCACCGCGTTATCCGTTCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGGAACGG  
GTCGGCGGGCCGGTCGGCTTCT (配列番号 110) ; 及び

(ii) CTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAG  
GGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT (配列番号 111)

からなる群から選択される配列を含む、請求項 1、4 及び 6 ～ 40 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 42】

導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、シス作用性 CAR 配列及びシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含み、任意選択で、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列が、前記 CAR 配列の 3' に位置づけられる、請求項 1、4 及び 6 ～ 41 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 43】

導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、少なくとも 2 つの空間的に別個のシス作用性 CAR 配列及び／又は少なくとも 2 つの空間的に別個のシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含む、請求項 1、4 及び 6 ～ 42 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 44】

導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、シス作用性 CAR 配列及び／又はシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列の 3' に位置づけられるポリ A 配列をさらに含む、請求項 1、4 及び 6 ～ 43 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 45】

導入遺伝子発現カセットが、前記導入遺伝子に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項 1 及び 4 ～ 44 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 46】

レンチウイルスベクターゲノムが、トリプトファン RNA 結合転写減衰タンパク質 (TRAP) 結合部位をさらに含む、請求項 1、2 及び 4 ～ 45 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 47】

ヌクレオチド配列が、改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、前記改変された U1 snRNA が、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されており、好ましくは、前記レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列が、前記改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、請求項 1 ～ 46 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 48】

レンチウイルスベクターゲノムが、少なくとも 1 つの改変されたウイルスシス作用性配列を含み、前記ウイルスシス作用性配列中の少なくとも 1 つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されており、好ましくは、前記少なくとも 1 つのウイルスシス作用性配列が、ウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WPRE) 及び／又は Rev 応答エレメント (RRE) である、請求項 1、2 及び 4 ～ 47 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 49】

レンチウイルスベクターゲノムが、gag をコードする改変されたヌクレオチド配列を含み、前記 gag をコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも 1 つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されている、請求項 1、2 及び 4 ～ 48 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 50】

少なくとも 1 つの内部 ORF が、ヌクレオチド配列内の少なくとも 1 つの ATG 配列を

10

20

30

40

50

変異させることによって破壊されており、好ましくは、前記ヌクレオチド配列内の最初の A T G 配列が変異している、請求項 48 又は 49 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 51】

レンチウイルスベクターゲノムが、(i) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片を欠き、好ましくは、前記 Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片が、p17 不安定性エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1、2 及び 4～50 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 52】

レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列が、Gag-p17 又はその断片を発現せず、好ましくは、前記 Gag-p17 の断片が、p17 不安定性エレメントを含む、請求項 1、2 及び 4～51 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 53】

レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットであって、

(i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含む核酸配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセットを含む、前記核酸配列、及び

(ii) 前記導入遺伝子をコードする mRNA に対して特異的である干渉 RNA をコードする少なくとも 1 つの核酸配列を含む、前記ヌクレオチド配列のセット。

【請求項 54】

レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットであって、

(i) 請求項 1～3 及び 5～52 のいずれかに記載のヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセットをさらに含む、前記ヌクレオチド配列、並びに

(ii) レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列を含む、前記ヌクレオチド配列のセット。

【請求項 55】

レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットであって、

(i) 請求項 1～3 及び 5～52 のいずれかに記載のヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセットをさらに含む、前記ヌクレオチド配列、及び

(ii) 前記導入遺伝子をコードする mRNA に対して特異的である干渉 RNA をコードする少なくとも 1 つの核酸配列を含む、前記ヌクレオチド配列のセット。

【請求項 56】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列が、干渉 RNA をコードする核酸配列を含まない、請求項 53 又は 55 に記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 57】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列が、ベクターイントロンを含み、前記ベクターイントロンが、導入遺伝子をコードする mRNA に対して特異的である干渉 RNA をコードする核酸配列を含む、請求項 53 又は 55 に記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 58】

ヌクレオチド配列のセットが、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、好ましくは、前記レンチウイルスベクター構成成分が、gag-pol 及び env であり、並びに任意選択で、rev である、請求項 53 及び 55～57 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 59】

導入遺伝子発現カセットが、請求項 4 及び 30～44 のいずれかに記載の少なくとも 1 つのシス作用性配列を含む、請求項 53～58 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 60】

導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 又は 5' UTR が、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含む、請求項 53～59 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 61】

導入遺伝子発現カセットが、3' UTR 又は 5' UTR 内に少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含むように遺伝子操作されている、請求項 53～60 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

10

【請求項 62】

干渉 RNA が、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列に対して特異的である、請求項 60 又は 61 に記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 63】

複数の標的ヌクレオチド配列に対して特異的な複数の干渉 RNA をコードする複数の核酸配列を含む、請求項 53 及び 55～62 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 64】

干渉 RNA が、導入遺伝子をコードする mRNA の切断を促進する、請求項 53 及び 55～63 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

20

【請求項 65】

干渉 RNA が、切断のために導入遺伝子をコードする mRNA を標的とする、好ましくは、干渉 RNA が、RISC による切断のために導入遺伝子をコードする mRNA を標的とする、請求項 53 及び 55～64 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 66】

干渉 RNA が、siRNA、siRNA、tsiRNA、RNA-DNA キメラ二本鎖、tkRNA、Dicer-基質 dsRNA、shRNA、tRNA-shRNA、aiRNA、miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA ミミック、pri-miRNA ミミッククラスター、転写遺伝子サイレンシング (TGS) 及び／又はそれらの組合せであり、好ましくは、前記干渉 RNA が、siRNA、shRNA 及び／又は miRNA である、請求項 53 及び 55～65 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

30

【請求項 67】

miRNA のガイド鎖が、導入遺伝子 mRNA の標的配列と完全に相補的である、請求項 66 に記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 68】

miRNA が、レトロウイルスベクターの RNA ゲノム内のその相補配列と少なくとも 1 つのミスマッチを含むパッセンジャー鎖を含む、請求項 66 又は 67 に記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 69】

レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 3' LTR 及び改変された 5' LTR を含み、前記改変された 3' LTR が、前記改変された 3' LTR 内の R 領域の 5' にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変された 5' LTR が、前記改変された 5' LTR 内の R 領域の 5' にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含む、前記ヌクレオチド配列。

40

【請求項 70】

レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 3' LTR 及び改変された 5' LTR を含み、前記改変された 3' LTR 内の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化 DSE を含み、前記改変さ

50

れた 5'LTR 内の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化 DSE を含む、前記ヌクレオチド配列。

【請求項 71】

レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列であって、前記レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 3'LTR 及び改変された 5'LTR を含み、前記改変された 3'LTR が、前記改変された 3'LTR 内の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、前記 3'LTR 内の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化 DSE を含み、前記改変された 5'LTR が、前記 5'LTR 内の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、前記改変された 5'LTR 内の R 領域が、少なくとも 1 つのポリアデニル化 DSE を含む、前記ヌクレオチド配列。

10

【請求項 72】

レンチウイルスベクターゲノムが、

a) 請求項 4 及び 30～44 のいずれかに記載の導入遺伝子発現カセット及び／又は

b) 請求項 5 又は 14 に記載の導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン

をさらに含む、請求項 69～71 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 73】

レンチウイルスベクターゲノムが、請求項 15～29、46、48 及び 52 のいずれかに記載のものである、請求項 69～72 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 74】

導入遺伝子が、治療効果をもたらす、請求項 4～52 及び 69～73 のいずれかに記載のヌクレオチド配列又は請求項 53～68 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

20

【請求項 75】

レンチウイルスベクターが、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV 又はヒスナレンチウイルスに由来する、請求項 4～52 及び 69～74 のいずれかに記載のヌクレオチド配列又は請求項 53～68 及び 74 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット。

【請求項 76】

請求項 1～52 及び 69～75 のいずれかに記載のヌクレオチド配列によってコードされるレンチウイルスベクターゲノム。

30

【請求項 77】

請求項 1～3 及び 5～75 のいずれかに記載のレンチウイルスベクターゲノム。

【請求項 78】

請求項 1～52 及び 69～75 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、又は請求項 53 及び 55～68 のいずれかに記載の導入遺伝子をコードする mRNA に対して特異的である干渉 RNA をコードする核酸配列を含む、発現カセット。

【請求項 79】

請求項 53～68 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセットを含むウイルスベクター生成システム。

40

【請求項 80】

請求項 1～52 及び 69～75 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、請求項 53～68 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット、請求項 78 に記載の発現カセット、又は請求項 79 に記載のウイルスベクター生成システムを含む、細胞。

【請求項 81】

レンチウイルスベクターを生成するための細胞であって、

(a)

(i) gag-pol 及び env を含み、並びに任意選択で、rev を含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、並びに請求項 1～52 及び 69～75 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、若しくは請求項 78 に記載の発現カセット、若しくは請求

50

項 5 3 ～ 6 8 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット、又は

(ii) 請求項 7 9 に記載のウイルスベクター生成システム、並びに

(b) 任意選択で、改変された U 1 s n R N A をコードするヌクレオチド配列及び／又は任意選択で、T R A P をコードするヌクレオチド配列を含む、前記細胞。

【請求項 8 2】

レンチウイルスベクターを生成するための方法であって、

(a)

(i) g a g - p o l 及び e n v を含み、並びに任意選択で、r e v を含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、並びに請求項 1 ～ 5 2 及び 6 9 ～ 7 5 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、若しくは請求項 7 8 に記載の発現カセット、若しくは請求項 5 3 ～ 6 8 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット、又は

10

(ii) 請求項 7 9 に記載のウイルスベクター生成システムを細胞中に導入するステップ、並びに

(b) 任意選択で、レンチウイルスベクターのベクター構成成分及び R N A ゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む細胞を選択するステップ、並びに

(c) 前記レンチウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で前記細胞を培養するステップ

を含む、前記方法。

【請求項 8 3】

20

請求項 8 2 に記載の方法によって生成されるレンチウイルスベクター。

【請求項 8 4】

レンチウイルスベクターを生成するための、請求項 1 ～ 5 2 及び 6 9 ～ 7 5 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、請求項 5 3 ～ 6 8 のいずれかに記載のヌクレオチド配列のセット、請求項 7 8 に記載の発現カセット、請求項 7 9 に記載のウイルスベクター生成システム、又は請求項 8 0 若しくは 8 1 に記載の細胞の使用。

【請求項 8 5】

請求項 1 ～ 3 及び 5 ～ 7 5 のいずれかに記載のレンチウイルスベクターゲノム、又は請求項 7 6 若しくは 7 7 に記載のレンチウイルスベクターゲノムを含む、レンチウイルスベクター。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、その生成の効率、導入遺伝子の容量 (transgene capacity)、安全性プロファイル及び標的細胞における有用性を改善するように設計されたレンチウイルスベクターに関する。より詳しくは、本発明は、改変された 3' L T R、改変された 5' L T R、ベクターイントロン、少なくとも 1 つのシス作用性 (cis-acting) 配列及び／又は干渉 R N A のうち任意の 1 つ又は 2 つ以上を含むレンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列に関する。本発明はまた、上記の改変のうち任意の 1 つ又は 2 つ以上を含むレンチウイルスベクターゲノムにも関する。このようなヌクレオチド配列又はレンチウイルスベクターゲノムを含む方法及び使用も、本発明に包含される。

40

【背景技術】

【0002】

過去数十年にわたるワクチン及びヒト遺伝子療法に向けたウイルスベクターの開発及び製造は、科学雑誌において、及び特許において十分に実証されている。治療効果のために導入遺伝子を送達するための操作されたウイルスの使用は、広範囲にわたっている。γ-レトロウイルス及びレンチウイルスなどの R N A ウイルス (Muhlebach, M.D. et al., 2010, Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis, 13: 347-370; Antoniou, M.N., Skipper, K.A. & Anakok, O., 2013, Hum. Gene Ther., 24:363-374)、並びにアデノウイルス (Capasso, C. et al., 2014, Virus

50

es, 6:832-855) 及びアデノ随伴ウイルス (AAV) (Kotterman, M.A. & Schaffer, D.V., 2014, Nat. Rev. Genet., 15:445-451) などのDNAウイルスをベースとする現代の遺伝子療法ベクターは、ますます多くのヒト疾患適応症において有望であると示してきた。これらには、血液学的状態のための患者細胞のエクスピボ改変 (Morgan, R.A. & Kakarla, S., 2014, Cancer J., 20:145-150; Touzot, F. et al., 2014, Expert Opin. Biol. Ther., 14:789-798)、及び眼の疾患 (Balaggan, K.S. & Ali, R.R., 2012, Gene Ther., 19:145-153)、心血管疾患 (Katz, M.G. et al., 2013, Hum. Gene Ther., 24:914-927)、神経変性性疾患 (Coune, P.G., Schneider, B.L. & Aebischer, P., 2012, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 4:a009431) のインスピボ治療及び腫瘍療法 (Pazarentzos, E. & Mazarakis, N.D., 2014, Adv. Exp. Med Biol., 818:255-280) が含まれる。

10

#### 【0003】

多数の遺伝病の根底にある原因が明らかになるにつれ、ベクターゲノム内の遺伝子ペイロード (単一の遺伝子ではなく) により多くの機能を送達することが極めて望ましいものになっていることは明らかである。したがって、導入遺伝子カセットがより複雑になり、例えば、より多くの遺伝子の送達においてより多くの機能、導入遺伝子制御 (例えば、遺伝子スイッチシステム又は逆向きの (invert) 導入遺伝子発現カセット) 又は自殺スイッチの送達を必要とすることが予想される。

#### 【0004】

レンチウイルスベクターの容量の現在の「限界」は、過去20年にわたって大きく変化しておらず、標準ゲノムシス作用性配列、例えば、通常のパッケージング (packaging) 配列、rev応答エレメント (RRE, rev-response element) 及び転写後調節エレメント (PRE, post-transcriptional regulatory elements)、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルスに由来するもの (wPRE) を利用する場合に、約7kbの導入遺伝子スペースの領域に留まっている。本質的に、この制限の一部の態様は、これらのベクターシステムが由来する約9.5kbの野生型HIV-1ゲノムのサイズによって規定される。一般に、レンチウイルスベクターの特異的力価は、この「限界」を超えるそのペイロードサイズに比例して実質的に減少する。レンチウイルスベクター学 (virology) のいくつかの態様は、限界の一因となる可能性が高い: [1] 生成細胞におけるベクターゲノムRNA (vRNA) の定常状態プール、[2] 逆転写酵素によるvRNAのdsDNAへの変換の効率並びに [3] 核内移行及び／又は宿主DNA中への統合の効率。レンチウイルスベクター骨格配列を最小にするという要望が、最近、既存のシスエレメントの配置を変更する試み (Sertkaya et al., 2021; Vink et al., 2017) 並びにRRE及びパッケージングシグナルを最小にするための新規ゲノム構成の作製 (国際公開第2021/181108号パンフレット) につながった。

20

30

#### 【0005】

上記で論じられたように、逆向きの導入遺伝子発現カセットは望ましいものであり得る。ベクター生成の間に活性である逆向きの導入遺伝子カセットを保持するレトロウイルスベクターを用いる場合の主な問題は、ウイルスRNAゲノム (vRNA) と導入遺伝子をコードするmRNAの間の塩基対形成によって形成される長いdsRNAの生成である。生成細胞内のdsRNAの存在は、生得的dsRNA感知経路、例えば、オリゴアデニル酸合成酵素-リボヌクレアーゼL (OAS-RNase L)、タンパク質キナーゼR (PKR)、及びインターフェロン (IFN) / 黒色腫分化関連タンパク質5 (MDA-5) が関与するものを誘発する。この応答を回避するための1つの解決策として、実際に他者が可能であると示したように (Hu et al. (2018) Gene Ther, 25: 454-472; Maetzig et al. (2010), Gene Ther. 17: 400-411; 及びPoling et al. (2017), RNA Biol. 14: 1570-1579)、LV生成細胞において内因性PKRをノックダウン若しくはノックアウトすること、又はdsRNA感知機構を阻害すると示されたタンパク質因子を過剰発現させることがある。しかし、これらの因子のノックダウン／ノックアウトは、骨の折れるものである場合も、困難である場合もあり、活性の必要とされる低減／喪

40

50

失を達成することが不可能である場合もあり、タンパク質因子の過剰発現は、ベクター生成細胞の他の態様、例えば、生存力／活力を変更し、全般的にあまり健全ではないベクター生成細胞につながる場合がある。

【0006】

レトロウイルスは、LTRの配列が同一であるにもかかわらず、5'LTRから駆動される転写活性と3'LTRでの効率的なポリアデニル化のバランスをとる必要があるので、通常、強いポリA配列を利用しない。U3が欠失したLTRは、野生型のU3が欠失していないLTRと比較してポリアデニル化活性をあまり有さないと示されており（Yang et al. (2007), *Retrovirology* 4:4）、これは、LV内のSIN-LTRが同じ様式で制限されるであろうということを示す。

【0007】

SIN-LTR含有LVなど、LVのLTR内の弱いポリアデニル化部位のいくつかの結果がある。手短には、3'LTR内のポリA配列を介したベクターゲノム発現カセット及び／又は導入遺伝子発現カセットの下流配列への転写リードアウトは、vRNA段階（すなわち、ベクター生成細胞において）でも、導入遺伝子mRNA転写段階（すなわち、形質導入された細胞において）でも効率的に阻止されない。さらに、5'LTR内のポリA配列を介した細胞遺伝子からベクターゲノム発現カセットへの転写リードインは、導入遺伝子mRNA転写段階（すなわち、形質導入された細胞において）で効率的に阻止されない。転写リードアウト及びリードインは各々有害な結果をもたらす。

【0008】

上記を考慮して、患者への投与（例えば、ワクチン接種及び遺伝子療法との関連で）における安全性プロファイルが改善されたウイルスベクターに対する、及び／又はより大きなペイロード（適切な力価及び安全性プロファイルを維持しながら）について改善されたウイルスベクターに対する、及び／又は生成の効率が改善されたウイルスベクターに対する必要性が当技術分野では常に存在する。特に、安全性プロファイルが改善された、ペイロード容量が増大した、及び生成の効率が改善されたウイルスベクターが緊急に必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2021／181108号パンフレット

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Muhlebach, M.D. et al., 2010, *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*, 13:347-370

【非特許文献2】Antoniou, M.N., Skipper, K.A. & Anakok, O., 2013, *Hum. Gene Ther.*, 24:363-374

【非特許文献3】Capasso, C. et al., 2014, *Viruses*, 6:832-855

【非特許文献4】Kotterman, M.A. & Schaffer, D.V., 2014, *Nat. Rev. Genet.*, 15:445-451

【非特許文献5】Morgan, R.A. & Kakarla, S., 2014, *Cancer J.*, 20:145-150

【非特許文献6】Touzot, F. et al., 2014, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 14:789-798

【非特許文献7】Balaggan, K.S. & Ali, R.R., 2012, *Gene Ther.*, 19:145-153

【非特許文献8】Katz, M.G. et al., 2013, *Hum. Gene Ther.*, 24:914-927

【非特許文献9】Coune, P.G., Schneider, B.L. & Aebischer, P., 2012, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4:a009431

【非特許文献10】Pazarentzos, E. & Mazarakis, N.D., 2014, *Adv. Exp. Med Biol.*, 818:255-280

【非特許文献11】Sertkaya et al., 2021

【非特許文献12】Vink et al., 2017

10

20

30

40

50

【非特許文献 13】Hu et al. (2018) Gene Ther, 25: 454-472

【非特許文献 14】Maetzig et al. (2010), Gene Ther. 17: 400-411

【非特許文献 15】Poling et al. (2017), RNA Biol. 14: 1570-1579

【非特許文献 16】Yang et al. (2007), Retrovirology 4:4

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、安全性プロファイルが改善された、ペイロード容量が増大した及び／又は生成の効率が改善されたレンチウイルスベクター（LV）の開発に基づいている。

【0012】

本明細書において以下にさらに記載されるように、本発明によるレンチウイルスベクターの態様の1つ又は2つ以上を、同じベクターに組み合わせることができるということが対象となる。また、本発明の態様の1つ又は2つ以上を、同じレンチウイルスベクターの生成の際に組み合わせることができるということも対象となる。態様の各々は、例えば、特定の効果若しくは改善を達成するために単独で、又は、必要に応じて、例えば、1つ若しくは2つ以上の特定の効果若しくは改善を達成するために組み合わせて使用することができる。

【0013】

改善された安全性プロファイル

第1の態様では、本発明者らは、驚くべきことに、LVゲノム発現カセット内で改変されたポリアデニル化（ポリA）配列を利用することによって、パッケージングのためのベクターゲノムRNAの生成の簡素化、導入遺伝子発現の改善並びに形質導入された細胞における転写リードイン及びリードアウト（ベクターゲノム発現カセット及び導入遺伝子発現カセットの両方）の低減がもたらされることを見出した。本発明の改変されたポリA配列の使用は、SIN-LTRにおけるポリアデニル化活性の低減のため、SIN-LTRに挟まれたLVにとって特に有利である。本発明の改変されたポリA配列は、効率的なポリアデニル化、ひいては、LVゲノム発現カセットの転写リードイン及びリードアウトの低減につながる。ポリアデニル化配列を改変し、それによって、LVゲノム発現カセットの転写リードイン及びリードアウトを低減する能力は、現在のLVシステムを上回る安全性の利点を提供する。

【0014】

本発明の基本的要素は、実質的に、3'LTR内でU3/R境界を越えてポリアデニル化シグナル（PAS, polyadenylation signal）を再配置することであり、その結果、PASは、LVの統合の際に3'LTRから5'LTRにコピーされる。したがって、R領域は、改変されたポリA配列内に埋め込まれる。結果として生じる改変されたポリアデニル化配列での効率的なポリアデニル化は、埋め込まれたR領域配列の3'末端に位置するvRNA 3'ポリA切断部位で生じる。vRNAの5'及び3'末端の両方のR領域間の十分な相同性（約20ヌクレオチドの相同性）が提供され、逆転写の際の効率的な第1の鎖転移（strand transfer）が可能となる。

【0015】

本発明者らは、驚くべきことに、この改変されたポリA配列構成を利用して、3'LTRでの転写終結を改善でき、同時に、vRNA切断（ポリアデニル化の前）によって、第1鎖合成を保持するのに十分な5'R領域とのR相同性が可能になることが保証されることを見出した。このような改変されたポリA配列がこの状況で使用される場合には、vRNA発現カセットの下流のバックアップ異種ポリA配列の必要性が回避されることがわかる。これによって、ベクター生成の際に使用されるLVゲノムコンストラクト（例えば、プラスミド）の最小化及び／又は簡素化が可能となる。

【0016】

本発明の改変されたRが埋め込まれた異種ポリA配列のさらなる合成バージョンは、PAS及び埋め込まれたR配列の上流の挿入された種々のUSEを、埋め込まれたR配列の

10

20

30

40

50

下流の挿入された種々のG UリッチD S Eエレメントと対にすることによって作製することができる。統合の際に3' U3領域内に存在するU S E - P A S配列は5' L T Rにコピーされ、異種G UリッチD S Eはコピーされない。したがって、統合されたL VゲノムカセットのL T R内の近接した位置でP A Sに効率的なD S Eを提供するために、v R N Aの5' R領域は、再現されたL T RにおいてD S Eとして機能するG Uリッチ配列を含有するように操作される。したがって、逆転写及びL T Rコピープロセス後、5' 及び3' L T Rの両方中のU3領域内に存在するU S E - P A S配列は、この新規D S Eによって「サービス (service)」される (すなわち、D S Eは、U S E - P A S配列に対して作用する)。任意選択で、D S Eが改変されたR配列も、合成のRが埋め込まれた異種ポリA配列の一部として3' L T Rで利用でき、同様に3' ポリA配列のD S Eとして機能する。 10

【0017】

まとめると、これらの改善は、本明細書において「配列がアップグレードされたp A L T R (s u p A - L T R)」と呼ばれる。s u p A - L T Rは、標的細胞において導入遺伝子カセットに転写終結の改善 (すなわち、転写「リードアウト」の低減) 及び上流細胞プロモーターからの転写「リードイン」の低減を付与し、v R N A骨格配列の動員の低減及び導入遺伝子カセット干渉の可能性の低減につながる。配列の好ましい組合せでは、s u p A - L T R内の転写終結は、もはや存在するいかなるH I V - 1配列にも依存しないので、ネイティブ (native) H I V - 1 P A Sを機能的に変異させることができる。これによって、s u p A - L T Rを利用するL V発現カセットにおいて、早期転写終結があり得ないことが確実となる。 20

【0018】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' L T Rは、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列は、3' L T R R領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された5' L T Rを含み、改変された5' L T RのR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (D S E, downstream enhancer element) を含む。 30

【0020】

ペイロード容量の増大

第2の態様では、本発明者らは、導入遺伝子発現カセットの3' U T R中に新規の短いシス作用性配列を有するウイルスベクターを作製した。彼らは、導入遺伝子発現カセットの3' U T R中に単独で、又は組み合わせて導入することができる2つの新規の短いシス作用性配列を同定した。これらの新規の短いヌクレオチド配列 (及びそれらの組合せ) を、伝統的な転写後調節エレメント (P R E、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス由来の; w P R E) に加えて使用して、標的細胞において導入遺伝子発現をブーストすることもでき、又はこれらのより長いP R Eを完全に置き換えて、標的細胞における高レベルの導入遺伝子発現を維持しながら、導入遺伝子の容量の増大を可能にすることもできる。 40

【0021】

本発明者らは、驚くべきことに、異種m R N Aの5' U T R配列内で機能するとこれまでに同定された細胞質蓄積領域 (C A R, Cytoplasmic Accumulation Region) 配列は、ウイルスベクター導入遺伝子発現カセットの3' U T R中に組み込まれると遺伝子発現の増強を提供することを見出した。さらに、導入遺伝子発現カセット3' U T R内に位置づけられる場合には、最初に報告された160bpのC A R配列 (10bpのコア配列の16x反復から構成される) を、導入遺伝子発現の利益を喪失することなく16反復よりも少なくさらに最小化できる可能性がある。驚くべきことに、これらのC A R配列は、イントロンを利用する導入遺伝子カセットからの導入遺伝子発現を増強し、並びに全長w P R Eをすでに含有するカセットからの発現をブーストすると示された。 50

## 【0022】

本発明者らはまた、導入遺伝子発現を改善するために導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に組み込まれることができる最小のZ C C H C 1 4タンパク質結合配列を同定した。本発明者らは、導入遺伝子発現をさらに増強するために、最小のZ C C H C 1 4タンパク質結合配列を本明細書で記載されるC A R配列と組み合わせることができることを示した。

## 【0023】

本明細書で記載される新規シス作用性配列を使用して、すべてのウイルスベクターの機能的シス作用性配列のサイズを最小化することができ、その結果、ペイロードを増大することができる、及び／又は標的細胞における導入遺伝子発現レベルを維持しながら、より大きなペイロードを含有するベクターの力価を改善することができる。したがって、本発明を、[1]「カーゴ(cargo)」スペースが制限されておらず、その結果、新規シス作用性配列が、別の3' UTRエレメント、例えば、wPREを含有する導入遺伝子カセットの発現をさらに増強するウイルスベクターゲノム内で、又は[2]カーゴスペースが制限されており(すなわち、利用されるウイルスベクターシステムのパッケージング「限界」で、又はそれを超えて、又はそれより実質的に超えて)、より大きな3' UTRエレメント、例えば、wPREの代わりに新規シス作用性配列を使用でき、したがって、ベクターゲノムサイズを低減し、一方でまた、任意の3' UTRシス作用性エレメントを欠くベクターゲノムと比較して標的細胞における導入遺伝子発現に増大を付与するウイルスベクターゲノム内で利用できる。

## 【0024】

したがって、さらなる態様では、本発明は、導入遺伝子発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、(a)シス作用性細胞質蓄積領域(CAR)配列及び／又は(b)シス作用性Z C C H C 1 4タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

## 【0025】

第3の態様では、本発明は、ウイルス骨格配列の低減を可能にするためにイントロンをベクターゲノム発現カセット中に導入する概念に基づいている。この関連で、本発明者らは、驚くべきことに、このようなイントロンの導入がrev応答エレメント(RRE)の除去を促進し、これによってベクター中のより多くの導入遺伝子の容量が可能になることを見出した。

## 【0026】

ベクタービリオン中にパッケージングされた結果として生じたベクターゲノムRNA(vRNA)は、イントロン配列を含有しないので、このいわゆる「ベクター-イントロン」(VI)は、vRNA上の利用可能な「スペース」に対してカウントされない。したがって、導入遺伝子配列のためにより多くのスペースが利用可能である。この新規レンチウイルス(LV)ゲノム構成は、利用しやすく、驚くべきことに、rev又は外因性vRNA輸出因子を必要とせず、LVゲノム生物学のほとんどの他の態様が同じままであるので、現在のLVゲノムから移行する、より魅力的な選択肢であり得る。したがって、VIは、最終の統合されたLVゲノム中に存在しないので、vRNAの動員の可能性が、RRE含有LVと比較して低減され、それによって、ベクターの安全性プロファイルが改善されると予測されるので、VIはさらに有益であり得る。

## 【0027】

本明細書で記載されるように、dsRNA種が、逆向きの導入遺伝子発現カセットを含むウイルスベクターの生成の際に形成され得る。本発明は、LVゲノム発現カセットが逆向きの導入遺伝子発現カセットを含む場合に形成されるdsRNAの量を低減するように機能する、導入遺伝子mRNA自己不安定化(self-destabilization)エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊(self-decay)エレメント、又は導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含むLVゲノム発現カセットを提供することによってこの問題を解決する。導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊

エレメント、又は導入遺伝子mRNA核内保持シグナルは、LVゲノム発現カセット中のVI内に位置づけられる。

【0028】

本発明者らは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット内のHIV-1パッケージング配列のステムループ2 (SL2) 中のMSD及び潜在的 (cryptic) スプライスドナー (crSD) は、極めて見境がなく、導入遺伝子配列への異常なスプライシングにつながり、全長vRNAの生成の低減をもたらす場合があることをこれまでに示している (国際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい)。驚くべきことに、vRNA生成を駆動する外部プロモーターに由来する検出可能な細胞質mRNAの95%程もが、内部配列に応じてスプライシングされる。効率的なベクター生成のために、スプライシングされないパッケージング可能なvRNAが最も望ましい生成物である。さらに、形質導入された (患者) 細胞における送達されたベクター骨格中のMSDの存在が、上流細胞プロモーターからのリードスルー転写が生じる場合に (レンチウイルスベクターは活性転写部位を標的とする)、スプライシング機構によって利用され、細胞エクソンを有する潜在的な異常なスプライス生成物につながると他者によって示されている。MSD及びcrSDの機能的除去は、この異常なスプライシングのほとんどを除去すると思われた。

10

【0029】

本発明においてこの異常なスプライシングの同じ機能的除去を利用して、不要なスプライシング生成物 (例えば、VISプライスアクセプターに対するMSD) を回避できる。さらに、驚くべきことに、VIの、LVゲノムの完全RRE非依存性を付与する能力は、MSD変異によって改善されることを見出した。

20

【0030】

このような変異と関連する潜在的な力価喪失は、vRNAのパッケージング配列を標的とする改変されたU1 snRNAを供給することによって回復させることができることがこれまでに見出されている (国際公開第2021/160993号パンフレット)。驚くべきことに、本発明者らはまた、VIは、改変されたU1 snRNAを利用する必要なく、LV力価を回復させるのに十分であることを示す。したがって、本発明はまた、MSDが変異したLVの力価を増大するためのVIの使用を包含する。驚くべきことに、したがって、VI特徴及びMSD/crSD変異は、RREが欠失したLVの作製において機能的に相利共生であると思われる。さらに、MSDが変異したLVは、統合部位での細胞性遺伝子転写から転写リードインが起こりにくいというこれまでの知見は、最終の統合されたカセット中に存在していないVIの結果としてのVI-LV配列の動員のための能力の低減と相乗作用する可能性が高い。

30

【0031】

したがって、さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0032】

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、

40

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャー (major) スプライスドナー部位は、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0033】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は

50

、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、*rev* 応答エレメントを含まない

、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに

iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合には、ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない。

【0034】

別の態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、*rev* 応答エレメントを含まない

、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに

iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合には、ヌクレオチド配列は、配列番号：配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列並びに／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む。

【0035】

別の態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、*rev* 応答エレメントを含まない、及び

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに

iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合には、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

【0036】

別の態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位及びメジャースプライスドナー部位の3' 末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位は、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、*rev* 応答エレメントを含まない

、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0037】

生成の効率の改善

第4の態様では、本発明者らは、驚くべきことに、所望のヌクレオチド（NOI）を標的とするRNA干渉（RNAi）を、標的細胞におけるNOIの有効な発現、ビリオン組み立てのネイティブ経路及びウイルスベクター粒子の結果として生じる機能性を妨害することなく、NOIを含むレトロウイルスベクターの生成の際にレトロウイルスベクター生成細胞において利用できることを見出した。ビリオン中にパッケージングされるNOI発

10

20

30

40

50

現カセット及びベクターゲノム分子は作動可能に連結している (operably linked) ので、これは簡単なことではない。したがって、NOI発現カセットの改変は、細胞においてベクターゲノム分子を生成する能力に対して有害な結果を有する場合がある。

【0038】

上記のように、レトロウイルスベクター生成の際の導入遺伝子タンパク質の発現は、ベクタービリオン組み立て、ベクタービリオン活性、プロセスの収率及び／又は最終生成物の品質に対して不要な効果を有する場合がある。さらに、二本鎖 (ds) RNA (通常、細胞内の反対の転写に起因する) の形成は、細胞内の生得的 ds RNA 感知経路を誘発し、新規タンパク質合成の喪失につながる。レトロウイルスベクター生成の際にこれが生じる場合 (例えば、レトロウイルスベクターゲノムが、逆向きの導入遺伝子発現カセットを含む場合) には、これは、ベクター構成成分 (component) の発現の喪失、結果として、力価の喪失につながる。

10

【0039】

本発明者らは、ベクタービリオン組み立て、ベクタービリオン活性、プロセス収率及び／又は最終生成物の品質に対する導入遺伝子タンパク質の不要な効果を最小にするために、RNAiをレトロウイルスベクター生成細胞において利用して、レトロウイルスベクター生成の際にNOI (すなわち導入遺伝子) の発現を抑制できることを示す。有利なことに、レトロウイルスベクター生成細胞におけるRNAiの使用によってまた、活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセット (導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対してすべて又は一部が逆向きである) を保有するレトロウイルスベクターの力価の救済が可能になる。本発明者らは、驚くべきことに、パッケージングに必要とされるベクターゲノムRNA (vRNA) ではなく導入遺伝子mRNAを最小化／排除するために、ベクター生成の際にRNAiを利用できることを見出した。したがって、本発明は、活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセットを保有するレトロウイルスベクターの改善された生成にとって特に有利である。

20

【0040】

したがって、本発明は、レトロウイルスベクター生成の際の導入遺伝子mRNAを標的とするRNAiの使用によって、導入遺伝子抑制を媒介すること及び活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価を救済することの両方に向けた単一アプローチを提供する。

30

【0041】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列は、3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む。

【0042】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された5'LTRを含み、改変された5'LTRのR領域は、ポリアデニル化下流エンハンサーエレメント (DSE) を含む。

40

【0043】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変された3'LTRであり、レンチウイルスベクターゲノムの5'LTRは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRである。

【0044】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された3'LTR及び改変された5'LTRを含み、改変された3'LTRは、3'LTR内のR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、3'LTR内のR領域は、ポリア

50

デニル化 D S E を含み、改変された 5' L T R は、5' L T R 内の R 領域の 5' にあるポリ  
アデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、5' L T R 内の R 領域  
は、ポリアデニル化 D S E を含む。

【0045】

安全性プロファイルの改善、ペイロード容量の増大及び／又は生成の効率の改善

本発明者らは、驚くべきことに、本発明の上記の態様のすべてを組み合わせるこ  
とを見出した。特に、本発明の2つ又は3つ以上の態様を、レンチウイルスベク  
タ生成の際の適切な力価及び標的細胞における高レベルの導入遺伝子発現を維持し  
ながら組み合わせることができる。有利なことに、これは、利用される本発明の個  
々の態様と関連する改善を有する各々レンチウイルスベクター、すなわち、本発明  
の関連態様と関連する対応する改善された特性を有するレンチウイルスベクターを  
提供する。したがって、本発明は、安全性プロファイルが改善された、及びペイ  
ロード容量が増大した、安全性プロファイルが改善された、及び生成の効率が改  
善された、及び安全プロファイルが改善された、ペイロード容量が増大した、及  
び生成の効率が改善されたレンチウイルスベクターを提供する。

10

【0046】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' L T R  
は、本明細書に記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レン  
チウイルスベクターゲノム発現カセッとは、導入遺伝子発現カセットを含み、  
導入遺伝子発現カセットの3' U T R は、本明細書に記載されるような少なく  
とも1つのシス作用性配列を含む。

20

【0047】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本  
明細書に記載されるような改変された5' L T R を含み、レンチウイルスベク  
ターゲノム発現カセッとは、導入遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子  
発現カセットの3' U T R は、本明細書に記載されるような少なくとも1つの  
シス作用性配列を含む。

【0048】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' L T R  
は本明細書に記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レン  
チウイルスベクターゲノム発現カセッとは、本明細書に記載されるような導  
入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

30

【0049】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本  
明細書に記載されるような改変された5' L T R を含み、レンチウイルスベク  
ターゲノム発現カセッとは、本明細書に記載されるような導入遺伝子発現  
カセット及びベクターイントロンを含む。

【0050】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' L T R  
は、本明細書に記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レン  
チウイルスベクターゲノム発現カセッとは、本明細書に記載されるような導  
入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロン  
は、本明細書に記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子 m R N A  
自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子 m R N A 自己崩壊エレメント  
又は本明細書に記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子 m R N A  
核内保持シグナルを含む。

40

【0051】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセッ  
トを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本  
明細書に記載されるような

50

改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0052】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

10

【0053】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0054】

20

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0055】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

30

【0056】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0057】

40

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0058】

50

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0059】

10

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含む。

【0060】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

20

【0061】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0062】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

30

【0063】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

40

【0064】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、

50

本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0065】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

10

【0066】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明の干渉RNAをコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

【0067】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、本発明のヌクレオチド配列及び本発明の干渉RNAをコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

【0068】

一部の実施形態では、核酸配列のセットは、レンチウイルスベクターゲノムをコードする第1の核酸配列及び干渉RNAをコードする少なくとも第2の核酸配列を含む。好ましくは、第1の及び第2の核酸配列は、別個の核酸配列である。適宜、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含まない場合がある。

20

【0069】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含む。

【0070】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター構成成分は、gag-pol、env、及び任意選択で、revを含む。

30

【0071】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列によってコードされるレンチウイルスベクターゲノムを提供する。

【0072】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムを提供する。

【0073】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含む発現カセットを提供する。

【0074】

40

したがって、さらなる態様では、本発明は、

(i) 導入遺伝子発現カセット、及び

(ii) 本明細書で記載されるような少なくとも1つの干渉RNAを含むベクターイントロン

を含むレンチウイルスベクターゲノムをコードする発現カセットを提供する。

【0075】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列のセットを含むウイルスベクター生成システムを提供する。

【0076】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列、本発明の発現カセット、本

50

発明のヌクレオチド配列のセット又は本発明のベクター生成システムを含む細胞を提供する。

【0077】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための細胞であって、

(a) (i) gag-pol及びenvを含み、並びに任意選択で、revを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明のヌクレオチド配列若しくは本発明の発現カセット若しくは本発明のヌクレオチド配列のセット、又は

(ii) 本発明のウイルスベクター生成システム、並びに

(b) 任意選択で、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列及び／又は任意選択で、TRAPをコードするヌクレオチド配列を含む、細胞を提供する。

10

【0078】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための方法であって、

(a)

(i) gag-pol及びenvを含み、並びに任意選択で、revを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明のヌクレオチド配列若しくは本発明の発現カセット若しくは本発明の核酸配列のセット、又は

20

(ii) 本発明のウイルスベクター生成システムを細胞中に導入するステップ、並びに

(b) 任意選択で、レンチウイルスベクターのベクター構成成分及びRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む細胞について選択するステップ、並びに

(c) レンチウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法を提供する。

【0079】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法によって生成されるレンチウイルスベクターを提供する。

【0080】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための、本発明のヌクレオチド配列、本発明の発現カセット、本発明のヌクレオチド配列のセット、本発明のウイルスベクター生成システム又は本発明の細胞の使用を提供する。

30

【0081】

さらなる態様では、本発明は、本明細書に記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムを含むレンチウイルスベクターを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】典型的なポリアデニル化配列を含む一般的なヌクレオチドドメインと、並びにそれらを介して、ポリAテールの切断及びmRNAへの負荷をもたらすタンパク質複合体を示す図である。切断及びポリアデニル化特異的因子(CPSF)タンパク質複合体は、ポリ(A)シグナル(PAS; AAUAAA)に結合し、これは、CPSF1-4及び関連する因子FIP1L及びSymplekin(SYMPK)を含有する。CPSF3サブユニットは、切断部位で作用するエンドヌクレアーゼである。切断因子1複合体(CFIm)は上流エレメント(USE)を認識し、これは、NUDT21、CPSF6、及びCPSF7から構成される。CPSF複合体は、GU又はUに富む下流エレメント(DSE)を認識する。CPSF、CSTF、SYMPK、及びCFImは、タンパク質レベルで相互作用し、RNA結合を安定化させ、よって、正しい切断(典型的には、PASの15~30nt下流であって、多くの場合「CA」ジヌクレオチドで)、並びにポリ(A)ポリメラーゼ(PAPOLA又はPAPOLG)のPAS認識及び動員を促進する。核内ポリ(A)結合タンパク質(PABPN1)は、CFIm及びPAPOLAと相互作用し、

40

50

ポリアデニル化の効率に寄与する。

【図2】本発明の標準的な又は新規のSIN LTR (supA-LTR) を保有するレンチウイルスベクター内のLTRの構成(上のパネル)及び逆転写後のLTRの分解能(下のパネル)を示す図である。典型的な第三世代レンチウイルスベクターのゲノムRNA (vRNA) は、強力なプロモーターからの転写により生成細胞内で生成される; 3' LTRは、典型的には、U3プロモーター領域( $\Delta$ )内で欠失しており、その結果、形質導入細胞内でLTRからの転写は起こらない。明確化のために「内部(internal)」配列は示されていない。[A] 標準的なレンチウイルスベクターのLTR。SIN改変を除けば、標準的なレンチウイルスベクターLTRは一般に野生型HIV-1からそれ以上改変されていない。逆転写の過程で、示された配列がコピーされ、組み込まれたカセット中の導入遺伝子カセットを挟む2つの同一のLTRとなり、5' LTRでは、R領域の最初のヌクレオチド(点線のロリポップ)からプライマー結合部位(pbs)までの配列が3' LTRにコピーされ、3' LTRでは、ポリプリントラクト(ppu)とR領域の最初のヌクレオチド(点線のロリポップ)との間の配列が5' LTRにコピーされる。この結果、5' pA部位は3' LTRに有効にコピーされる。HIV-1のポリA部位は一部の細胞内ポリAほど強くないが、U3配列の欠失によりポリA USE配列が除去され、HIV-1のpA部位はさらに弱くなる。レンチウイルスベクターは転写活性のある遺伝子領域に組み込まれるため、5' LTR内に弱いpAを保有することの結果は、組み込まれたカセットに転写リードスルー(「リードイン」)が起こる可能性である。3' LTR内に弱いpAを保有することの結果は、下流のクロマチンへの転写リードスルー(「リードアウト」)である。[B] 本発明の配列がアップグレードされたポリAを含むレンチウイルスベクターのLTR。フランキングLTR内に「配列がアップグレードされた」pA(「supA」)を作製し、レンチウイルスベクターを転写的により「ステルス性」にするために、本発明は、3' pAとポリA切断部位との間に最小限の「R」配列を挿入することで3' LTRを改変することができ、この改変は、強力な異種ポリA(例えばSV40 pA)内又は合成ポリAで行うことができ、したがって、野生型のR-U5領域は3' LTRから完全に欠失させることができる。この結果、3' pA部位はR領域の最初のヌクレオチド(点線のロリポップ)の上流 - U3又は $\Delta$ U3/SIN領域内 - に効果的に再配置され、逆転写の間に3' LTRから5' LTRにコピーされる。ポリアデニル化効率を高めるために、U3又は $\Delta$ U3/SIN領域内のUSEの使用が含まれてもよい。 $\Delta$ U3/SIN領域内の新しいpA部位をDSE(GUリッチボックス)に結合させるために、5' LTRは、vRNAの第1の(TAR)ループ内に新しいGUリッチボックスを含むようにさらに改変される。この新しいDSE/GUボックスは逆転写の際に3' LTRにコピーされ、その結果、フランキングLTR内のpAがより強力になり、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットの転写リードイン又はリードアウトが低減する。5' LTRのR領域内の内因性5' pA部位は、もはや必要とされないもので、機能的に変異させてもよい。

【図3】supA-LTRゲノムにおける3' (SIN) LTRに対する改変及び最小「R」領域の重要性を示す図である。[A] 典型的な第3世代レンチウイルスベクターのゲノムRNA (vRNA) は、強力なプロモーターからの転写によって生成細胞内で生成され、vRNAは、5' R領域の最初のヌクレオチド(点線のロリポップ)から3' R領域の末端へ、ポリA切断部位(及び切断された3'末端に付加されたポリAテールを含む)に至るまでを含む。vRNAは、内因性(endogenous) tRNAをプライマー結合部位(pbs)に誘引し、逆転写の第1のステップとしてcDNA合成のプライマーとして使用する。得られたDNA:RNAハイブリッド産物のRNA配列はRT酵素のRNAse Hドメインによって分解され、「遊離」cDNAの、vRNAの3'末端への第1の鎖転移が可能になり、ここでcDNAは相補的な3' R領域にアニールする。ここで、残りのマイナス鎖cDNA合成が進行する。[B] 異種pAシグナル(AATAAA)と3' (SIN) LTR内のポリA切断部位との間にR領域の最小配列を「埋め込み」、本発明に従って「supA-LTR」を与える例を示す図である。非常に効率的なポリアデニル化

を可能にするために報告されたポリA配列（USE、pAシグナル、切断部位、DSE／GUボックス）のおよその距離許容差（distance tollerances）を考慮すると、本発明以前は、効率的なポリアデニル化とRTステップ中の第1の鎖転移との両方を可能にするために、pAシグナルと切断部位との間に十分な「R」配列を挿入できるかどうかは知られていなかった。

【図4】新規supA-LTRの試験中にポリアデニル化効率を評価するために使用されるLTRレポーターコンストラクトを示す図である。単純なGFプレポーターコンストラクトは、ポリA配列を含有する試験LTRと、その下流に挿入された内部リボソーム進入部位（IRES）及びルシフェラーゼレポーターORFとを含むように3'末端で改変された（上のパネル）。したがって、レポーターコンストラクトをトランスフェクトされた細胞で検出されたルシフェラーゼの発現レベルは、試験ポリA配列の強度と逆相関した。試験したLTRの一般的な構造は、R配列の上流（点線の口リポップで表されたRの最初のヌクレオチド）及びSIN-U3配列（Δ）の下流に位置づけられた異種pAシグナルの配置を反映した。他の異種ポリA配列はpAシグナルとR領域、すなわちUSE及びGUリッチDSEとに挟まれていた（中央のパネル）。「Rバリエーション」の例が示されており、ポリA活性を維持しながら挿入され得る様々な長さのRを特定するためにこれらを試験した；R. 1-20はR領域の最初の20ヌクレオチドを含み、R. 1-60はR領域の最初の60ヌクレオチドを含み、R. 1-20cは安定なヘアピンが生成され得るように下流が相補的であるように生成された。矢印は、ポリA切断領域である可能性がある／可能性が高い領域を示す。

【図5】3' supA-LTR改変を標準的な5' LTR又は5' supA-LTR改変のいずれかと組み合わせた結果を示す図である。[A] 模式図は、生成中の標準的なレンチウイルスベクターの5' LTRの配列順序（すなわち、未改変の野生型HIV-1 RU5配列）を示し、R領域の最初のヌクレオチド（点線の口リポップ）、ループ1（TARステムループ）、ループ2（ポリAステムループ）、ポリA切断部位（CACA）及びGUリッチDSEを示す（上のパネル）。この標準的な5' LTRを保有するレンチウイルスベクターを本発明の改変3' LTRと組み合わせた場合（改変3' LTRは上のパネルに示さず）、逆転写後のLTRの分解能は示されている通りであり（形質導入後）；すなわち、この構成は組み込まれたカセットの両端に存在する（下のパネル）。supA-SIN/U3領域の再配置されたpAシグナル（現在はRの上流）は、ネイティブR-U5配列の内因性GUリッチDSEの100ヌクレオチド超上流にある。[B] 再配置された3' pAシグナルにDSEを会合させるために、新たな切断部位とGUリッチDSEとがループ1内に操作されるように5' LTRを改変することができ、その結果、ループ1のステムループ構造が維持される（上のパネル）。したがって、逆転写によるLTR分解の後、（任意の）USE、pAシグナル、切断部位及びGUリッチDSEのすべてが互いに対して最適な配置に強力なポリA配列が生成される（下のパネル）。結果的に、ループ2内のネイティブ5' pAシグナルを機能的に変異させることができる。

【図6】野生型HIV-1ゲノムの5' UTR内のRNAの機能的ドメインを示す概略図である。[i] R領域とU5領域との間に埋め込まれたGUリッチDSEの位置を示すHIV-1 5' UTRの簡略図（プライマー結合部位[矢印]及びコアパッケージング領域が示されている）。[ii] 機能的配列のブロックについてのより詳細な説明；tatが結合し、転写伸長を促進するトランス活性化応答（TAR）エレメント；ポリA領域[およそのpA切断部位が表示されている]；プライマー結合部位（PBS）にtRNAプライマーをロードするtRNA様エレメント（TLE）；ステムループ1（SL1）は二量体化開始配列（DIS）を含有する；ステムループ2（SL2）はメジャースプライドナー（MSD）を含有し、ステムループ3（SL3）は「G×G」ヌクレオカプシド結合配列（Ψ）を含有する-AUGはGag/Gag polの開始コドンである。[iii] 「二量体化された」立体構造を近似する5' UTR全体の一般化された構造。

【図7】レンチウイルスベクターゲノム発現カセット内にコードされた本発明の改良された5' 及び3' LTRの一般的特徴を示す概略図である。プロモーター（Pro）の配置は

5'LTRに示され、転写開始部位(TSS)は点線のロリポップで示されているようにR領域のヌクレオチド1にある。5'R領域は、ポリA切断領域の下流に新たなGUリッチボックス(DSE)を含むように改変されている。この非限定的な例では、1~20ntを含むR領域は、TSSと切断領域との間の配列を含むハッシュドボックス領域である(これと同じ配列は、3'LTRの異種pA配列に埋め込まれている)。ループ2領域は、ネイティブpAシグナルを含有し、これは変異/欠失していてもよい。3'LTRでは、3'ポリプリン(ppu)トラクトの下流にU3領域への自己不活化(SIN)改変が示されている。SIN-U3の下流には、異種pA配列(すなわち、ネイティブR-U5配列は欠失している)が配置され、1~20ヌクレオチドのR領域配列 - 5'末端のRの1~20ヌクレオチドと同一 - は、異種pAシグナルと切断領域/GUリッチボックス(DSE)ゾーンとの間に配置される。上流のpAエンハンサーエレメントをSIN-U3と異種pAシグナルとの間に配置してもよい。事実、標準的なLV 3'LTRと比較して、3'pAシグナルはR領域の最初のヌクレオチドの上流に再配置され、これは、逆転写中に3'pAシグナルが5'LTRにコピーされることを意味する。新たなGUリッチボックス(DSE)は3'LTRにコピーされ、両方のLTRのpAシグナルに「サービスする(service)」。新たなLTRは、メジャースプライスドナー領域/潜在的スプライスドナー領域(MSD/crSD)内に変異を保有するレンチウイルスベクターにおいて使用されてもよい。

10

【図8】GFP/ルシフェラーゼレポーターを使用する、ポリアデニル化効率に関するSV40後期ポリA配列内に埋め込まれた3つのR領域の長さについての試験を示す図である。図4に記載のポリAレポータープラスミドを使用して、「Rが埋め込まれた」SV40ポリA配列のポリアデニル化効率を試験した。各SINLTR配列が、Rバリエーション「R. 1-20」、「R. 1-60」、「R. 1-20c」若しくは「Rなし」(すなわち、SV40 pAのみ)、又はU5中にそれ自身のpA及びGUリッチDSEを含有する標準的なRU5のみを保有する、EF1aに駆動されるGFP-wPRE-SINLTR-IRES-Gluc含有プラスミドを、HEK293T細胞にトランスフェクトした。

【A】GFP発現スコアは、GFP陽性のパーセントにMFIを乗じて作製し、Gluc活性は細胞溶解液で測定した。【B】Gluc活性をGFP発現スコアで割って、SINLTR領域の転写リードスルーを反映した正規化Gluc値を作製した。

20

【図9-1】~

30

【図9-2】GFP/ルシフェラーゼLVゲノムレポーターを使用する、ポリアデニル化効率及びLV力価に関するSV40後期ポリA配列に埋め込まれた3つのR領域の長さについての試験を示す図である。Rバリエーション「R. 1-20」、「R-160」及び「R. 1-20c」、並びに非R含有バリエーション「SV40(Rなし)」及びネイティブHIV-1 pAノックアウトRU5バリエーションを、LVゲノムポリAレポーターコンストラクトにクローニングした。このコンストラクトは、LVベクターを生成することができ、GlucアッセイによってポリA活性を報告することもできる。HEK293T細胞に、記載したLVゲノムレポーター、及びLV-GFP/VSVGベクター粒子を生成するためのLVパッケージング構成成分をトランスフェクトした。pPGK-DsRedXプラスミドをすべてのトランスフェクションミックスにスパイクインして、トランスフェクション効率を測定した。「通常の(normal)」LVベクターゲノムを対照として使用した(IRES-Gluc-SV40pA配列を欠く)。【A】生成後の細胞をGFP及びDsRedXの発現についてフローサイトメトリーによって測定し、細胞溶解液をGluc活性について測定した；Gluc活性をDsRedX発現で正規化した。【B】清澄化した粗LV採取物をHEK293T細胞でフローサイトメトリーにより力価測定して、TU/mL力価を作製し、次いで、「RU5」バリエーション(標準的な3'LTRを保有する)を100%と設定して正規化した。

40

【図10-1】~

【図10-4】本発明において試験した操作されたレンチウイルスベクターゲノムのものと比較した、レトロウイルスの5'末端に見られるステムループ(SL)の予測RNA構

50

造を示す図である。H I V - 1 のゲノム R N A は、5 ' 末端に t a t と結合するトランス活性化応答 ( T A R ) エlementと呼ばれるステムループを含有する。他のレトロウイルスも 5 ' 末端にステムループ構造を保有し、R S V 及び M M T V は、U 3 T A T A ボックスと転写開始部位との間にコードされるポリ A シグナルに「サービスする」G U リッチ D S E を保有する S L を含有する。ハイブリッド T A R / S L は、R S V 若しくは M M T V 、又はベータグロビンポリ A に基づく G U リッチ D S E を H I V - 1 の T A R システムに組み込むように設計され、転写開始に重要であると思われる配列を維持し、相同性に駆動される第 1 の鎖転移のための少なくとも 18 ヌクレオチドを確保するために、H I V - 1 の R の最初の 18 ~ 20 ヌクレオチドが保持された。ハイブリッド構造は、ゲノム R N A の一次パッケージ形態と考えられる「1 G」配列に基づいて描かれている (表 1 を参照されたい)。G U リッチな D S E に改変された T A R ループの位置は、L V パッケージングシグナル ( P s i ) の二次構造との関連で描かれている。

【図 1 1】異なる発現に関連して異なる L T R バリエーションのポリアデニル化を評価するための P o l y A レポーターコンストラクトを示す図である。模式図は、異なる設定においてポリ A 活性を評価するために使用された、本研究で使用された微妙に異なるポリ A レポーターコンストラクトを示す。元のポリ A レポーター (全体を示す) により、生成細胞において L V ゲノムカセットの 3 ' 末端でのポリアデニル化を反映する 3 ' s u p A - ( S I N ) L T R バリエーション / 構成が試験される。「R が埋め込まれた」異種ポリ A 配列は、U S E 及び G U リッチ D S E と共に示されている。この上には、S I N - U 3 領域 [ i ] 内の U S E が含まれるかどうか (例えば、( 2 ) ) 、又は L V ゲノムの 5 ' R 領域のループ 1 ( 3 ' L T R にコピーされる) が、R 領域の上流に新たな p A シグナルに「サービスする」新たな G U リッチ D S E [ i i ] を含むように改変されているかどうか (例えば ( 1 ) ) に応じて、逆転写及び標的細胞への組み込み後の 5 ' 又は 3 ' L T R のいずれかを反映する代替 L T R バリエーション / 構成が示され; ネイティブ H I V - 1 p A は、バリエーション L T R から欠失していてもよい。5 ' L T R レポーターコンストラクトはまた、メジャースプライスドナー領域 ( S D ) を含むパッケージング領域に L V ゲノムから伸長した配列も含有した。よって、5 ' L T R レポーターは上流の細胞プロモーターからの転写「リードイン」をモデル化し、3 ' L T R レポーターは導入遺伝子カセット (transene cassette) からの転写「リードアウト」をモデル化した。

【図 1 2】異なるレトロウイルスからの異なる R 領域配列を含有する異なる S I N - L T R バリエーションのポリアデニル化を評価するためのポリ A レポーターコンストラクトを示す図である。ポリ A レポーターカセット (図 1 1 を参照されたい) を、細胞プロモーターからの転写「リードイン」 ( 5 ' S I N - L T R ) 又は組み込まれたカセットに関連して導入遺伝子プロモーターからの「リードアウト」 ( 3 ' S I N - L T R ) のいずれかをモデル化し、左のグリッドで示されているような機能的配列を含有する S I N - L T R バリエーションに関して試験した。バリエーションを、U 3 に欠失を有し、その後に T A R / S L 1 (登録商標) 及びネイティブポリ A シグナル (灰色の口リポップ) / G U リッチ D S E ( R - U 5 ) を含むネイティブ R - U 5 が続くだけである、標準的な S I N - L T R ( S T D S I N - L T R ) と比較した。バリエーションは R が埋め込まれた S V 40 ポリ A 配列であり、p A シグナル ( P A S ; 黒い口リポップ) ) と G U リッチ D S E との間の配列は、[ 1 ] H I V - 1 R 領域 ( T A R / S L 1 ) の n t 1 ~ 20 、又は [ 2 ] R S V R 領域 (独自の G U リッチ D S E を含有する) の n t 1 ~ 45 、又は [ 3 ] M M T V R 領域 (独自の G U リッチ D S E を含有する) の n t 1 ~ 44 で置換された。後者の 2 つのバリエーションは、下流の H I V p A シグナル変異の有無に関しても試験した。転写開始部位 ( T S S ; U 3 - R U 5 境界を定義) の位置は点線の口リポップで示されている。相対的なリードスルー活性は、正規化されたルシフェラーゼ単位 (任意単位) で測定した。

【図 1 3】3 ' s u p A - L T R と対合した G U リッチ D S E で改変された 5 ' T A R / S L 1 配列を保有するベクターゲノムの相対的 L V 力価を示す図である。高力価 L V を作製するために最小 n t 1 ~ 20 の R が埋め込まれた S V 40 ポリ A 配列を使用することができ、以前に示したので、5 ' 及び 3 ' L T R 変化の L V 力価への影響を評価するため

10

20

30

40

50

に、R S V又はM M T V R領域に基づくG UリッチD S Eで改変されたハイブリッドT A R／S L 1バリエーションの一部（図10、表1を参照されたい）をL Vゲノムの5'末端にクローニングした。G F PがコードされたL Vを接着H E K 2 9 3 T細胞で生成し、フローサイトメトリーによって力価を測定した。力価は標準的なL Vベクター対照（非改変5' T A R／S L 1及びS I N－L T Rを含む）に対して正規化し、log－10スケールでプロットした。

【図14】本発明の組み込まれたs u p A－L T R L Vバリエーションへの転写リードインの評価を示す図である。図13で生成及び力価測定したs u p A－L T RバリエーションL Vを使用して、一致したM O IでH E K 2 9 3 T細胞を形質導入し、組み込まれていないc D N Aが確実に希釈除去されるように細胞を10日間継代し、5' S I N／s u p A－L T Rの上流の細胞遺伝子プロモーターからの転写リードインを、パッケージング領域でのプライマー／プローブ結合を使用してR T－q P C Rによって測定した。R N Aシグナルは、総「動員R N Aシグナル」として、又は組み込まれたコピー数に対して正規化したものとして、標準的なL Vに対して示された。

【図15】異なるT A R／S L 1－G U／D S Eハイブリッドを含有する異なるs u p A－L T Rバリエーションのポリアデニル化を評価するためのポリAレポーターコンストラクトを示す図である。ポリAレポーターカセット（図11を参照されたい）を、細胞プロモーターからの転写「リードイン」（5' s u p A－L T R）又は組み込まれたカセットに関連して導入遺伝子プロモーターからの「リードアウト」（3' s u p A－L T R）のいずれかをモデル化し、左のグリッドで示されているような機能的配列を含有するs u p A－L T Rバリエーションに関して試験した。バリエーションを、U3に欠失を有し、その後にT A R／S L 1（登録商標）及びネイティブポリAシグナル（灰色の口リポップ）／G UリッチD S E（R－U5）を含むネイティブR－U5が続くだけである、標準的なS I N－L T R（S T D S I N－L T R）と比較した。バリエーションは、Rが埋め込まれたS V 4 0ポリA配列（S V 4 0－R．1－2 0 3' L T R）であり、p Aシグナル（P A S；黒い口リポップ）とG UリッチD S Eとの間の配列が、記載されたT A R／S L 1－G U／D S Eバリエーションに置き換えられていた（図10、表1）。バリエーションは、下流のH I V p Aシグナル変異の有無に関しても試験した。転写開始部位（T S S；U3－R U5境界を定義）の位置は点線の口リポップで示されている。相対的なリードスルー活性は、正規化されたルシフェラーゼ単位（任意単位）で測定した。

【図16】s u p A－L T Rに導入された異なる改変によるポリアデニル化活性の相対的寄与を評価するためのポリAレポーターコンストラクトを示す図である。ポリAレポーターカセット（図11を参照されたい）を、細胞プロモーターからの転写「リードイン」（5' s u p A－L T R）又は組み込まれたカセットに関連して導入遺伝子プロモーターからの「リードアウト」（3' s u p A－L T R）のいずれかをモデル化し、左のグリッドで示されているような機能的配列を含有するs u p A－L T Rバリエーションに関して試験した。バリエーションを、U3に欠失を有し、その後にT A R／S L 1（登録商標）及びネイティブポリAシグナル（灰色の口リポップ）／G UリッチD S E（R－U5）を含むネイティブR－U5が続くだけである、標準的なS I N－L T R（S T D S I N－L T R）と比較した。3'改変のみを含有するバリエーション（m o d S I Nのみ）を、1 G R－G U 2バリエーションを含有する完全な再構成s u p A－L T R（m o d S I N + m o d 5' R）と比較した。これらは、下流のH I V p Aシグナル変異の有無に関しても試験した。転写開始部位（T S S；U3－R U5境界を定義）の位置は点線の口リポップで示されている。相対的なリードスルー活性は、正規化されたルシフェラーゼ単位（任意単位）で測定した。

【図17】s u p A－L T Rの構成の一部として改変された3' S I N－L T Rにおける、改変された5' R領域及び3'側にRが埋め込まれた異種（heterologous）ポリアデニル化配列を示す詳細図である。ヌクレオチド1～59までのH I V－1 R領域が示されており、最初の3つのヌクレオチドに3つの代替のT S Sを示す。下線を引いた配列はステムループ1（T A Rループ）で塩基対合したヌクレオチドを示し、薄灰色の配列はルー

10

20

30

40

50

ブを示す。本発明において例示される改変された5' R領域は、最初のHIV-1 Rの1~20ヌクレオチドの18~20ヌクレオチドを保持し、下流に追加の「CA」モチーフを導入して切断部位を「提供する (offer)」。バリエント「GU2」のGUリッチDSE (表1を参照されたい) は、ボックスで囲んだ配列として示されている。また、LV発現カセットの一部として、SIN-U3、任意のUSE、R. 1-20の保持された約20ヌクレオチドの上流のPAS (斜体) 位置、及びDSEを含有する3' supA-LTRの一般的な構造/配列が示されている。典型的なLV発現カセットはTSSに3×Gを保持しているため、3G、2G及び1GのvRNAの発現が生成中に生じ得る。HIV-1では、1GのvRNAが優先的に二量体化し、3つのバリエントの中で最も効率的にパッケージングされることが示されているが、本発明は、3×GがPASの下流に保持されるのを確実にすることによって、3つのベクターvRNA種のすべてがパッケージングとそれに続く逆転写 (RT) ステップとの基質となることを可能にする。しかしながら、本発明は、1GのvRNAだけの転写を可能にする新規プロモーターも開示しており、この場合、5' R領域の最初の18ヌクレオチド (すなわち、HIV-1のヌクレオチド3~20) をPASの後に直接挿入することができる。この特定の場合には、PASの下流の2つの追加のG (縦矢印) は必ずしも必要ではない。よって、新たなマイナス鎖ssDNAの第1の鎖転移の間に、5' と3' R領域との間の18~20ヌクレオチドの相同性により、ssDNAとvRNAとの間のアニーリングを可能にするのに十分な相補性もたらされ、プライマー伸長点でミスマッチのないプラス鎖合成が開始される。この図は、5' R領域にコードされた新たなDSE (ボックスで囲まれている) が、RTステップの結果としてどのように配置され、DNAにコピーされ、USE-PAS-clv-DSE配列 - (すべてが5' supA-LTRと3' supA-LTRとの両方で互いに対して所望の配置にある) になるかをさらに明確にしている。

【図18】「1G」LVゲノムvRNAを生成する新規CMV/RSVハイブリッドプロモーターの開発を示す図である。[A] 野生型HIV-1 (上の配列)、野生型RSV (下の配列)、及び本発明の一部として操作された新規バリエントのコアプロモーターの配列と転写開始部位 (TSS) の配列との比較。コアTATAボックスは、すぐ上流と下流とのフランキング配列と共に示されている。LVゲノムのvRNAの5' 末端における3×G又は1×Gの存在がそれぞれの場合で示されている。斜体の配列はHIV-1由来であり、太字の配列はRSV由来である。その他の配列はすべて、CMVプロモーター由来であり、空白はダッシュで示されている。バリエント「CMV-RSV1-G」及び「CMV-RSV2-1G」は、大部分がCMVプロモーターを含むが、示されたコア領域ではRSVプロモーターと配列が交換されている2つのハイブリッドプロモーターである。バリエント「RSV-3G」は、完全なRSVプロモーターによって駆動される発現カセットであり、すなわち、LVゲノムの標準的な「3G」5' R領域を有する。バリエント「RSV-1G [RSV SL1]」もまた、全長RSVプロモーターによって駆動されるが、RSV R領域はHIV-1の5' R領域を置き換え；これは、第1の鎖転移が起こり得るように、HIV-1からのRの代わりにRSV R. 1-44が埋め込まれた「Rが埋め込まれた」SV40後期ポリA配列を保有する代替の3' supA-LTRカセットにクローニングされた。他のすべてのバリエントは、HIV-1 R. 1-20が埋め込まれたSV40後期ポリAを含有する3' supA-LTRと共にLVゲノム発現カセットにクローニングされた。\*これらのバリエントゲノムカセットはすべて、3' SIN-LTR領域の後に「IRES-Luc」レポーターも含有したため、標準的な非改変対照 (黒色のバー) と比較してより長いコンストラクトであったことに留意されたい。したがって、相対的なLV力価は、標準的なCMVプロモーター - LTR構成を含有した「CMV-3G」バリエントと比較される。[B] 「CMV-3G」バリエントと比較した相対的なLV力価。

【図19-1】 ~

【図19-2】 supA-LTR LVゲノム発現カセットのさらなる最適化を示す図である。[A] supA-LTR LVゲノム発現カセットを生成するために標準的なSI

10

20

30

40

50

N-LTR LVゲノム発現カセットに導入される改変の種類／配置を示す概略図。典型的なSIN-LTRをコードするLVゲノムカセットは、[1]「3G」のTSS、標準的な5'／3'R U5配列及び「バックアップ」ポリアデニル化配列(SV40後期ポリAが示されている)からvRNAゲノムの発現を駆動するCMVプロモーターと共に示されている。一連の3つの独立した実験を実施し、supA-LTRの特徴の一部又はすべてを用いるゲノム発現カセットを使用してLVを生成した。新規CMV-RSV2-1Gハイブリッドプロモーターは、「1G」のTSS、GUリッチ配列を有する5'R領域改変(1GR-GU2及び1GR-GU5バリエーションが試験された)、USEを有するか又は有さない3'supA-LTR(R.1-20が埋め込まれたSV40後期ポリA)、及び任意に、バックアップポリA配列を生成するために用いられる。[B]3つの別々の実験のそれぞれにおいて(黒色のバーはSTD SIN-LTR)、記載されたバリエーションの特徴を有するLVゲノム発現カセットを使用することから生成されたベクター力価(線形スケール上にプロットされたlog10値)。

10

【図20】supA-LTR LVゲノムは、ネイティブ5'LTR PAS部位の変異を可能にし、「MSD2-KO」LVゲノムと対合され得ることを示す図である。5'及び3'LTRの構成は、本発明の異なるエレメントの有無で示され；すべてのコンストラクトはCMVプロモーター(「3G」TSSを有する)によって駆動され、「バックアップ」ポリアデニル化配列は、標準対照(3'SIN-LTRの下流にSV40後期ポリAを有する - 図示せず)を除いて存在しなかった。「1GR-GU2」DSEエレメントは5'の配置に配置され、3'supA-LTR配列において埋め込まれた「R」配列として使用されてもよい場合、SV40後期ポリA GUリッチDSEは、機能的にそれを置き換える「1GR-GU2」DSEの能力を評価するために欠失していた。欠失は白色のX／黒色のボックスで示される。エレメントのすべての組合せは、パッケージング領域からの異常なスプライシングが排除された「MSD-2KO」LVゲノムでも評価され；このようなゲノムはより低い力価を生成するが、改変されたU1 snRNA(256U1)の同時発現によって回復される。

20

【図21】LVゲノム内で用いられる「supA-2pA-LTR」の概要を示す図である。この概略図は、転写後に5'SIN-LTRにコピーされるように、ΔU3領域とRが埋め込まれた異種ポリA配列との間の3'SIN領域内に、アンチセンス方向で追加のポリアデニル化配列がどのように挿入され得るかを説明する。

30

【図22】3'supA-LTRの異種ポリアデニル化配列内に埋め込まれた最小R領域配列の定義：ポリアデニル化／転写リードスルーへの影響を示す図である。異種SV40後期ポリアデニル化シグナルを、EF1a-GFPレポーターカセット内の3'ppt／ΔU3領域の下流、及びIRES-ルシフェラーゼレポーター配列の上流に配置した。最大20ヌクレオチドのHIV-1 R領域から構成されるR領域配列は、異種PASと切断部位／GUリッチDSEエレメントとの間に挿入された。「3G-R20」配列は、本発明の他の箇所では言及された「R.1-20」と同じである。短縮化されたバリエーションは、異種PASのすぐ下流に3倍のG又は単一のG('1G)のいずれかを含むことに基づいて生成された(「3G」又は「1G」vRNAを有するゲノムの使用をモデル化)。埋め込まれたR配列の配列が示される。リードスルーデータはルシフェラーゼ活性を正規化したものであり、3G-R20／R.1-20対照に対して示される。

40

【図23】3'supA-LTRの異種ポリアデニル化配列内に埋め込まれた最小R領域配列の定義：LV力価への影響を示す図である。5'及び3'LTRの構成は、本発明の異なるエレメントの有無で示され；すべてのコンストラクトはCMVプロモーター(「3G」TSSを有する)によって駆動され、「バックアップ」ポリアデニル化配列は、標準対照(3'SIN-LTRの下流にSV40後期ポリAを有する - 図示せず)を除いて存在しなかった。すべての5'LTRは、ネイティブHIV-1の5'PAS及び内部のEFS-GFP-wPREカセット(示さず)で変異したが、メジャースプライスドナーは保持された。5'R領域は野生型の／標準的なTAR／SL1か、又は3GR-GU2バリエーションを含む改変5'R SL1であった。異種SV40後期ポリアデニル化シグナル

50

は 3' p p t / Δ U 3 領域の下流に配置された。最大 20 ヌクレオチドの HIV-1 R 領域から構成される R 領域配列は、異種 P A S と切断部位 / G U リッチ D S E エlement との間に挿入された。「3 G-R 20」配列は、本発明の他の箇所而言及された「R. 1-20」と同じである。短縮化されたバリエーションは、異種 P A S のすぐ下流に 3 倍の G 又は単一の G ( ' 1 G ) のいずれかを含むことに基づいて生成された ( 「 3 G 」 又は 「 1 G 」 v R N A を有するゲノムの使用をモデル化 ) 。埋め込まれた R 配列の配列が図 22 に示される。ベクター上清を接着 H E K 293 T 細胞で力価測定し、続いてフローサイトメトリーを行い、データを log 10 スケールでプロットした。

【図 24-1】 ~

【図 24-2】 sup A-LTR の使用により、標的細胞における導入遺伝子の発現を増加させることができることを示す図である。生成中に使用された LV ゲノム発現カセットの 5' 及び 3' LTR の構成 - 並びに標的細胞で生成して得られた最終的な SIN-LTR - を、本発明の異なる Element の有無で示す。すべてのコンストラクトは CMV プロモーター ( 「 3 G 」 T S S を有する ) によって駆動され、 「バックアップ」 ポリアデニル化配列は、標準対照 ( 3' SIN-LTR の下流に SV40 後期ポリ A を有する - 図示せず ) を除いて存在しなかった。ネイティブ HIV-1 の 5' P A S 及びメジャースプライスドナー ( M S D ) は変異してもよく、内部の E F S - G F P - w P R E カセットも変異していてもよかった ( 図示せず ) 。 5' R 領域は野生型の / 標準的な T A R / S L 1 か、又は 3 G R - G U 2 バリエーションを含む改変 5' R S L 1 であった。 3' sup A ( S I N ) - L T R 、異種 SV40 後期ポリアデニル化シグナルは 3' p p t / Δ U 3 領域の下流に配置された。 20 ヌクレオチドの HIV-1 R 領域から構成される R 領域配列は、異種 P A S と切断部位 / G U リッチ D S E Element との間に挿入された。「3 G-R 20」配列は、本発明の他の箇所而言及された「R. 1-20」と同じである。あるいは、 3' sup A-LTR では 3 G R - G U 2 配列も用いられ、埋め込まれた R 配列、切断部位 ( 図示せず ) 及び G U リッチ D S E を効果的に提供した。LV は、懸濁 ( 無血清 ) H E K 293 T 細胞において生成され、接着 H E K 293 T 細胞を形質導入するのに使用され、その後、フローサイトメトリーで G F P 発現を解析して、力価の値 ( G F P T U / m L ) を得た。次いで、一致した M O I で接着 H E K 293 T 細胞を形質導入し、10 日間継代培養した後、インテグレーションアッセイ及びフローサイトメトリーを行った。G F P 発現スコア ( E S ) は、陽性細胞のパーセントに蛍光強度の中央値 ( 任意単位 ) を乗じて得られた。これらを細胞あたりの平均パッケージング ( Ψ ) コピー数で正規化し、次いで、100% に設定した標準的な LV と比較した。

【図 25】 レンチウイルスベクターのゲノム内で Z C C H C 14 ステムループ及び / 又は P R E と単独又は組み合わせて使用するための C A R e シス作用性 Element の配置的使用の概要を示す図である。模式図は、R R E 又はベクターイントロン ( すなわち、R R E が欠失した ) 、及び目的の遺伝子 ( G O I ) をコードする内部導入遺伝子発現カセットを含有するレンチウイルスベクターゲノムの一般化された構造を示し ; このようなゲノムは、典型的には、導入遺伝子 3' U T R 内で P R E ( w P R E など ) を利用する。P R E は、導入遺伝子カセットのサイズを低減するために、3' p p t の上流又は下流において、最小限の C A R e 配列単独又は Z C C H C 14 ステムループ ( Z C ' 14 S L ) との組合せで、完全に置き換えられてもよい。ベクターゲノム RNA の順方向性に対して逆方向きの導入遺伝子カセットでは、考慮すべき 3' p p t が無いことを除けば、導入遺伝子 3' U T R において、同じシス作用性 Element のオプションを用いることができる。

【図 26】 C A R e 及び Z C C H C 14 ステムループ配列の詳細と、ウイルスベクター内の導入遺伝子カセットの 3' U T R 領域への組込みを示す図である。A. 10 b p の C A R e コア配列 ( 又は本明細書において言及される 「タイル ( tile ) 」 ) のコンセンサス配列。B. H C M V ( R N A 2.7 ) 及び W H V ( w P R E ) 内に見られる Z C C H C 14 結合ステムループの非限定的な 2 つの例。Z C C H C 14 の誘引により、T e n t 4 との複合体が形成され、m R N A のポリ A テールにおいて混合テーリングを促進し、それらを安定化させる。C. 任意選択で Z C C H C 14 ステムループと一緒に、レトロ / レ

ンチウイルスベクターにおいて逆転写及び組込みにそれぞれ必要とされる 3' p p t 又は a t t (「Δ」[すなわち、Δ U 3]) 組込み配列を破壊しないように注意しながら、C A R e 配列をウイルスベクター導入遺伝子カセットの 3' U T R に挿入する概念 (DNA が上、RNA は DNA の下に曲線として示されている)。C A R e 配列及び任意選択で Z C C H C 1 4 ステムループは、合理的に、又はライブラリー設計によって設計することができ、標的細胞で経験的にスクリーニングすることができる。例えば、スクリーニングは、ウイルスベクターの形質導入、それに続く高発現細胞の選択 (例えば G F P F A C S)、それに続く R T - P C R 及び標的 m R N A のシーケンシングによって行い、より大きな導入遺伝子発現と m R N A 定常状態プールとをもたらすシス作用性エレメントの組合せを含有する転写物を特定することができる。このプロセスを繰り返すことで、最良のバリアントを濃縮することができ、また、配列を微調整するためにエラーを起こしやすい R T - P C R を含んでもよい。

10

【図 27-1】～

【図 27-3】3' U T R シス作用性エレメントと組み合わせた異なる導入遺伝子プロモーターを保有するレンチウイルスベクターの懸濁 (無血清) H E K 2 9 3 T 細胞における生成力価。A 及び B は、異なる 3' U T R シス作用性エレメント: w P R E、Δ w P R E (w P R E 欠失)、センス (C A R e . 1 6 t) 若しくはアンチセンス (C A R e . i n v 1 6 t) の 1 6 × 1 0 b p C A R e 配列、及び/又は H C M V R N A 2 . 7 (H C M V . Z S L 1) 由来の Z C C H C 1 4 ステムループの単一コピーを含有する L V - R R E - E F S - G F P ベクターについての 2 つの独立した実験からのデータを表す。C は、L V - R R E - E F 1 a - G F P (E F 1 a はイントロンを含有する) 及び L V - R R E - h u P G K - G F P の出力力価のデータを表す。力価は、接着 H E K 2 9 3 T 細胞に形質導入した後、3 日後にフローサイトメトリーに基づくアッセイ (G F P T U / m L)、又は 10 日後に L V D N A に対する q P C R (組込み T U / m L) によって測定した。このデータは、L V の組込み力価はシス作用性エレメントのいずれかの存在/非存在にかかわらず同等であるが、G F P 力価は形質導入された接着 H E K 2 9 3 T 細胞における発現レベルを反映して変化することを示している。センス方向の 1 6 × 1 0 b p C A R e タイル (のみ) は、w P R E を欠く L V の G F P T U / m L 力価を増大させた。

20

【図 28-1】～

【図 28-2】1 6 × 1 0 b p C A R e タイルは、T 細胞株において w P R E を欠くレンチウイルスベクターからの導入遺伝子発現を増大させることを示す図である。懸濁 (無血清) H E K 2 9 3 T で生成した L V - R R E - E F S - G F P 及び L V - R R E - E F 1 a - G F P ベクターストックを、一致した感染多重度 (M O I) で Jurkat 細胞を形質導入するために使用した: M O I 1 [A]、M O I 0 . 2 5 [B]、及び M O I 0 . 1 [C]。形質転換された細胞をフローサイトメトリーによって解析して、G F P 陽性値の % と蛍光強度の中央値とを得た (任意単位)。D は、形質導入細胞から抽出した m R N A の正規化 R T - P C R からのデータを表し、ここで 100 % レベルは、それぞれの場合に w P R E を含有する各 E F S - G F P 又は E F 1 a - G F P カセットに対して設定される。データは、センス方向の 1 6 × 1 0 b p C A R e タイル (のみ) が、w P R E のみで観察されたものまで導入遺伝子発現レベルを回復させ、E F 1 a - G F P では驚くべきことに、w P R E のみよりも導入遺伝子発現レベルが増大することを示す。1 6 × 1 0 b p の C A R e タイル (のみ) は、すべての条件において w P R E のみよりも導入遺伝子 m R N A のレベルを増加させる。

30

40

【図 29】3' U T R シス作用性エレメントと組み合わせた異なる導入遺伝子プロモーターを保有する「M S D - 2 K O」/「U 1 依存性」レンチウイルスベクターの懸濁 (無血清) H E K 2 9 3 T 細胞における生成力価を示す図である。パッケージングシグナルの S L 2 ループに変異を含有する L V - R R E - P r o - G F P ベクター (よって、この領域からの異常スプライシングを除去する) を、ベクターゲノム R N A に結合して力価を回復させる改変 U 1 s n R N A である 2 5 6 U 1 + / - で生成した。3 つの異なる導入遺伝子プロモーター (E F S、E F 1 a、及び h u P G K) 及び異なる 3' U T R シス作用性

50

エレメントを用いた：wPRE、 $\Delta$ wPRE（wPRE欠失）、及びセンス（CARE. 16t）又はアンチセンス（CARE. inv16t）の16 × 10bp CARE配列。力価は、接着HEK293T細胞に形質導入した後、3日後にフローサイトメトリーに基づくアッセイ（GFP TU/mL）、又は10日後にLV DNAに対するqPCR（組込み TU/mL）によって測定した。

【図30】異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有する「MSD-2KO」／「 $\Delta$ RRE」レンチウイルスベクターの懸濁（無血清）HEK293T細胞における生成力価及び標的細胞における導入遺伝子の発現を示す図である。パッケージングシグナルのSL2ループに変異を含有するLV-VI（ $\Delta$ RRE）-EFS-GFPベクター（よって、この領域からの異常スプライシングを除去する）を生成した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを用いた：wPRE、 $\Delta$ wPRE（wPRE欠失）、センス（CARE. 16t）若しくはアンチセンス（CARE. inv16t）の16 × 10bp CARE配列、及び／又はHCMV RNA2.7（HCMV. ZSL1）若しくはWHV wPRE（WPRE. ZSL1）由来のZCCHC14ステムループの単一コピー。A. 接着HEK293T細胞の形質導入と、その後の3日後のフローサイトメトリーに基づくアッセイ（GFP TU/mL）又は10日後のLV DNAに対するqPCR（組込み TU/mL）によって力価を測定した。B. 形質導入した接着HEK293T細胞又はHEPG2細胞における導入遺伝子の発現を、一致するMOIで形質導入の3日後にフローサイトメトリーによって測定した。

【図31-1】～

【図31-2】異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有するRRE／rev依存性レンチウイルスベクターで形質導入した初代細胞における導入遺伝子発現レベルを示す図である。懸濁（無血清）HEK293Tにおいて生成したLV-RRE-EFS-GFP [A] 又はLV-RRE-EF1a-GFP [B] ベクターストックを使用して、初代細胞（92BR）を一致した感染多重度（MOI）：MOI 2、1又は0.5で形質導入した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを用いた：wPRE、wPRE3（短縮型wPRE）、 $\Delta$ wPRE（wPRE欠失型）、16 × 10bp CARE配列のセンス（CARE. 16t）若しくはアンチセンス（CARE. inv16t）、及び／又はHCMV RNA2.7（HCMV. ZSL1）若しくはWHV wPRE（WPRE. ZSL1）のZCCHC14ステムループの単一コピー。形質導入された接着92BR細胞における導入遺伝子の発現を、一致するMOIでの形質導入の3日後にフローサイトメトリーで測定した。

【図32】一致したMOIで異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有するRRE／rev依存性レンチウイルスベクターで形質導入した接着HEK293T細胞における導入遺伝子発現レベルを示す図である。懸濁（無血清）HEK293Tにおいて生成したLV-RRE-EFS-GFPベクターストックを、接着HEK293T細胞で最初に力価測定して、組込み力価（TU/mL）を作製した。ベクターストックを使用して、新鮮な接着HEK293T細胞を、一致した感染多重度（MOI）：MOI 2、1又は0.5で形質導入した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを「スタンドアローン」エレメント：wPRE、16 × 10bp CAREタイル（CARE. 16t）、又はZCCHC14ステムループの単一のコピー（HCMV. ZSL1）として使い、エレメントなし（ $\Delta$ wPRE）と比較した。さらに、wPREが欠失したがZCCHC14ステムループの単一コピーを含有するバリエーションも、1 × ～20 × の10bpコピーまで、増加するCAREタイルと対合した。形質導入された接着HEK293T細胞における導入遺伝子（GFP）の発現を、形質導入の3日後にフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値（任意単位）を、標準的なwPRE含有LVで達成されたもの（100%に設定）に対して正規化した。

【図33】LVゲノムとそこから転写されるmRNAとを含有する標準的な及びベクターイントロンを含有するLVゲノムのDNA発現カセットを比較を示す概略図である。典型的な標準的第三世代のLVゲノムの一般的構造を示し、転写を駆動するU3欠失、tat

非依存性異種プロモーター (Pro)、R-U5 から gag 領域までの幅広いパッケージング配列、RRE、中央ポリプリントラクト (c p p t、central polypurine tract)、内部導入遺伝子発現カセット (Pro-GOI)、転写後調節エレメント (PRE、post-transcriptional regulatory element)、及び自己不活化 3'LTR を含有する。ブロードパッケージング配列の SL1 ループには、MSD と隣接する crSD とが含有される。コアパッケージングモチーフ ( $\Psi$ ) は SL3 内にある。保持される gag 配列の量は様々であるが、典型的には gag の一次 ATG コドンから約 340 ~ 約 690 nt であり、p17 不安定性エレメント (p17-INS) を含む。RRE は、典型的には、780 bp の領域内にあり、HIV-1 のスプライスアクセプター「7」部位 (sa7) を含む。標準的な LV ゲノムカセットでは、メジャーな導入遺伝子 mRNA (生成細胞で内部プロモーターが活性であると仮定する) とは別に、rev によって細胞質で定常レベルまで生成及び排出されるメジャーな転写物は全長 vRNA であると考えられていた。しかしながら、本発明者らは、SL2 ループの MSD 又は crSD からの乱雑な又は異常なスプライシングが、rev の存在下であっても、sa7 の下流の (潜在的) スプライスアクセプターに起こることを別の場所で示した。特に導入遺伝子カセットが EF1a プロモーターに存在するような強力なスプライスアクセプターを含有する場合、全長 vRNA と比較したスプライス産物の量は 20 : 1 になり得る。本発明の新規 LV ゲノムは、イントロン配列が全長 vRNA には存在しないため、導入遺伝子のペイロードを増加させるために、RRE を単一のイントロンと完全に置き換える。MSD / crSD 変異は、V スプライスアクセプターによる SL2 からの異常なスプライシングが起こらないことを保証する。驚くべきことに、VI からのスプライシングアウトの作用により、vRNA が rev / RRE 非依存的に安定化されるだけでなく、LV 力価に対する MSD / crSD 変異の減弱効果も抑制される。さらに、RRE を欠失した VI ゲノムは、MSD / crSD が変異した場合、rev 非依存的に最大の力価を達成することが示されている。新規の LV ゲノムは p17-INS の欠失も組み込んでいる可能性があり、したがって、導入遺伝子容量も合計約 1 kb 増加する。

10

20

30

40

50

【図 34-1】 ~

【図 34-2】 ベクター-イントロンを含有する Rev / RRE 非依存性 HIV-1 ベースの LV は、パッケージングシグナルの SL2 におけるメジャースプライスドナー部位及び潜在的スプライスドナー部位の変異により改善されることを示す図である。標準的な又は変異 / 欠失したシス作用性エレメント (STD-MSD 又は MSD-2KO、 $\pm$ RRE、 $\pm$ ベクター-イントロン; 図 33 を参照されたい) の様々な組合せを含有する HIV-1 ベースの LV ゲノム (内部に CMV-GFP カセットを有する) を作製した。これらのゲノムプラスミドを使用して、接着 (A) 又は懸濁 [無血清] (B) HEK293T 細胞において、rev 発現プラスミドの存在下又は非存在下で、LV-CMV-GFP ベクターを生成した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着 HEK293T 細胞で力価測定し、ベクター力価を log10 スケールでプロットした。

【図 35-1】 ~

【図 35-2】 他のシスエレメント / 変異と組み合わせてベクター-イントロンを含有するバリエーションゲノムについての、接着生成細胞及び得られたベクター粒子中のベクターカセット由来の RNA の分析を示す図である。図 34A で記載したベクター-イントロン (VI\_v1.1) ゲノムの接着細胞生成ランに由来する生成細胞及びベクター粒子から抽出した総 RNA を RT-PCR に供して、各ゲノムバリエーションによって生成される種を評価した (パネル B)。これら 4 つのベクター-イントロンゲノムバリエーションの DNA、pre-RNA、及び主なスプライシング産物をパネル A に模式的に示す。ベクター-イントロンのスプライシングは、V スプライスアクセプターへの MSD の潜在的な異常スプライシングと同様に示されている。RRE の任意選択での存在、及び RT-PCR 解析に使用した PCR プライマー (灰色の矢印) の配置も示されている (オリゴ dT プライマーは cDNA ステップに使用された)。

【図 36】 スプライシングに重要なエクソン-イントロン-エクソン配列の本質的特徴を

示す概略図である。この模式図は2つのエクソン（黒いブロック）の間の代表的な単一のイントロン（灰色のブロック）を示し、イントロンのスプライシングアウトに必要な重要なコンセンサス配列の配置とエンハンサーの配置とを示す。イントロンの末端は、それぞれ5'と3'末端とのGT-AGジヌクレオチドによって定義される。GTジヌクレオチドは、より広いスプライスドナーのコンセンサス配列のうちの最も可変性の低い配列であり；コンセンサス配列はU1 snRNAの標的であり、エクソン／イントロンの境界認識中の初期段階でドナー部位にアニールする。AGジヌクレオチドは、より広いスプライスアクセプターコンセンサス配列のうちの最も可変性の低い配列であり、典型的には、約12～20 nt上流のポリプリントラクトを含む。分岐部位（コンセンサス＝TNCTRA C、ここで「N」は任意のヌクレオチドを意味し、「R」はA又はGを意味する）はスプライシングされたアクセプター部位の20～35 nt上流に位置し、スプライシング反応中に分岐部位にアニールするU2 snRNAの標的である。分岐部位はまた、イントロンの5'末端に連結してラリアット構造を形成するためのアンカーポイントでもある。イントロンの長さは短くても、何千ヌクレオチドであってもよく、他のシス作用性因子を含有していてもよく、スプライシング効率の向上又は調節に関与しているものもある。イントロンスプライシングエンハンサー（ISE, intronic splicing enhancer）は、上記のコアエレメントに近接するように、イントロンの末端寄りに位置することがある。エクソン内スプライシング促進配列（ESE, exonic splicing enhancer）はまた、効果を媒介するためにエクソン－イントロン接合部の近くに位置してもよい。本発明では、ベクターイントロンアプローチの最適化に向けて、様々な生物に由来するいくつかのこれらの機能的要素を評価した。

【図37】接着HEK293T生成細胞におけるHIV-1に基づくLVの初期ベクター－イントロンバリエーションの評価を示す図である。EFS-GFP導入遺伝子カセットを保有するがRREを欠くゲノムプラスミドを、表7により、MSD-2 KO変異と6つのバリエーションベクター－イントロンとを含有するように構築した。これらは、EF1a又はユビキチン（UBC）プロモーターイントロンのネイティブイントロン、又はPromega社のpCIシリーズの発現プラスミドからのCAGプロモーターイントロン若しくはスモールキメライントロン（Syn）に基づくものであった。これらのゲノムプラスミドを使用して、接着HEK293T細胞において、rev発現プラスミドの非存在下で、LV-EFS-GFPベクターを生成したが、一方、標準的なLVベクターは、+/-revで作製した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着HEK293T細胞で力価測定し、ベクター力価をlog10スケールでプロットした。

【図38】懸濁（無血清）HEK293T生成細胞におけるHIV-1に基づくLVのキメライントロンに基づくベクター－イントロンバリエーションのさらなる開発を示す図である。EFS-GFP導入遺伝子カセットを保有するがRREを欠くゲノムプラスミドを、表7により、MSD-2 KO変異と7つのバリエーションベクター－イントロン VI\_v4.2-4.8とを含有するように構築した。これらはPromega社のpCIシリーズの発現プラスミドからのスモールキメライントロンに基づくが、主に上流のESE及び／又はスプライスドナー配列の存在／種類が異なっていた。これらのゲノムプラスミドを使用して、懸濁（無血清）HEK293T細胞において、rev発現プラスミドの非存在下で、LV-EFS-GFPベクターを生成したが、一方、標準的なLVベクターは、+/-revで作製した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着HEK293T細胞で力価測定し、ベクター力価をlog10スケールでプロットした。

【図39】懸濁（無血清）HEK293T生成細胞におけるHIV-1に基づくLVのヒトβ-グロビンイントロン-2に基づくベクター－イントロンバリエーションのさらなる開発を示す図である。EFS-GFP導入遺伝子カセットを保有するがRREを欠くゲノムプラスミドを、表7により、MSD-2 KO変異とヒトβ-グロビン遺伝子の第2の（短縮化された）イントロンに基づく2つのベクター－イントロン VI\_v5.1/5.2を含有するように構築した。これらをpCIシリーズのPromega社のプラスミド（VI\_v4.2/4.8）からのキメライントロンに基づく以前のベクター－イントロンバリエーションの

2つと比較した。これらのゲノムプラスミドを使用して、懸濁（無血清）HEK293T細胞において、rev発現プラスミドの存在／非存在下で、LV-EFS-GFPベクターを生成したが、一方、標準的なLVベクターは、+revで作製した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着HEK293T細胞で力価測定し、ベクター力価をlog10スケールでプロットした。

【図40】異なるMSD変異及びp17-INS(gag)欠失と組み合わせたベクターイントロンによるLVゲノムの試験を示す図である。2つのシリーズ(v4[pCI]及びv5[huβ-グロビン])からのベクターイントロンバリエーションを、2つの異なるMSD変異バリエーション(「MSD-2KO」及び「MSD-2KOM5」)、さらにパッケージング配列のgag領域から欠失したp17-INSに関連して、LVゲノムで試験した。これらのゲノムプラスミドを使用して、懸濁（無血清）HEK293T細胞において、rev発現プラスミドの非存在下で、LV-EFS-GFPベクターを生成したが、一方、標準的なLVベクターは、+/-revで作製した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着HEK293T細胞で力価測定し、力価をrevにより作製した標準的なLV-GFPベクターprepに対して正規化した。

【図41】ベクターイントロンLVゲノムのプロストラチンによる力価上昇の評価を示す図である。標準的な又はベクターイントロン/MSD-2KO/ΔRREΔp17-INSゲノムプラスミドを使用して、懸濁（無血清）HEK293T細胞において、rev発現プラスミド非存在下で、LV-EFS-GFPベクターを生成したが、一方、標準的なLVベクターは+/-revで作製した。ベクターは、11μMのプロストラチンの存在下又は非存在下でトランスフェクションの約20時間後に（酪酸ナトリウム誘導ステップで）作製した。清澄化したベクター上清をフローサイトメトリーを使用して接着HEK293T細胞で力価測定し、ベクターの力価をリニアスケールでプロットした。

【図42】異なる導入遺伝子プロモーターを含有するベクターイントロンLVのRev非依存性生成。標準的な又はベクターイントロン骨格内のCMV/EFSに駆動される導入遺伝子カセットを含有するHIV-1に基づくLVを、懸濁（無血清）HEK293T細胞において、それぞれrevの存在下又は非存在下で高力価まで生成した。ベクターの力価をlog10スケールでプロットした。

【図43】LV生成中に発現した逆向きの導入遺伝子カセットを含有するLVゲノムカセットの利用は、細胞質dsRNA感知機構を介したデノボベクター構成成分タンパク質発現の抑制につながることを示す図である。標準的なRRE含有LVゲノムプラスミド(STD RRE-LV)又はベクターイントロンゲノムプラスミド(MSD-2KOM5/ΔRRE/Δp17-INS+VI\_v5.5)〔指示がない限り両方とも3GTS Sコンストラクト〕を、順方向(Fwd)又は逆方向(Invert; 逆向き)のEFS-GFP導入遺伝子カセットと共に生成し、懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLV採取上清を生成するために使用した。パッケージングプラスミド(pGagPol及びpVSVG)を、pRevと共に、又はpRevなしで同時にトランスフェクトしたことが示された。上清はVSVGとp24(カプシド)とに対するSDS-PAGE/免疫ブロッキングによって解析した。このデータは、逆向きの遺伝子カセットがデノボLV構成成分合成の抑制を誘導することを示しており、細胞質dsRNA感知機構、例えばPKRと一致している。

【図44】逆向きの導入遺伝子カセットを有するベクターイントロンLVゲノムの例を示す概略図である。イントロンを含有する逆向きの導入遺伝子カセットを有するベクターイントロンLVゲノムが示されている。VIはvRNA(上のコピーされた鎖)からのみイントロン消失を刺激するため、導入遺伝子カセットはそれ自身のイントロンを保持することになる。導入遺伝子カセットプロモーターの強度によっては、LV生成中にvRNAと導入遺伝子mRNAとの間にかなりの量の二本鎖RNAが形成される可能性がある。これはPKR応答、Dicerによる切断又はADARによる脱アミノ化を引き起こす可能性があり、ありとあらゆるこれらの機構はベクターの力価低下の原因となる可能性がある。これは、VIのユニークな特徴を利用し、逆向きの遺伝子カセットの3'UTR内に

10

20

30

40

50

シス作用性エレメント (X) を挿入することによって回避できる。このようなシス作用性エレメントは、導入遺伝子 mRNA、例えば AU リッチ [不安定性] エレメント (ARE)、miRNA、及び／又は自己切断リボザイムのみ存在量を低減するエレメントである。これらの作用により、dsRNA を生成するために相補的な vRNA と対合することができ導入遺伝子 mRNA の量が低減する。加えて、導入遺伝子 mRNA (及び結果として生じるタンパク質) の低減は、LV 生成に有利となり得る。重要なことは、VI のアウトスプライシングにより、シス作用性エレメントが最終的に組み込まれた導入遺伝子カセット内に存在しなくなり、したがって、形質導入細胞における導入遺伝子 mRNA の安定性が効率的になることである。

【図 45】 逆向きの導入遺伝子カセットを有するベクター-イントロン LV ゲノムの例と、導入遺伝子 mRNA 分解を媒介する導入遺伝子カセットの 3' UTR 内のシス作用性エレメントのさらなる詳細とを示す概略図である。イントロンを含有する逆向きの導入遺伝子カセットを含むベクター-イントロン LV ゲノムが LV 生成中に示されている。導入遺伝子カセットの 3' UTR 内 - 及びアンチセンス VI 配列内に位置する - 「機能的な」シス作用性エレメント (「X」) の使用は、導入遺伝子の抑制を達成し、LV 生成中の dsRNA 応答を回避するために使用することができる。機能的なシス作用性配列の 2 つの例が示されている。第 1 に、1 又は複数の自己切断リボザイム (「Z」) を 3' UTR のアンチセンス VI 配列内に挿入することができ、pre-mRNA の自己切断を引き起こし、その結果 RNA はポリ A テールを欠き、核内で分解される。第 2 に、1 又は複数の pre-miRNA (「m」) を 3' UTR のアンチセンス VI 配列内に挿入することができ、pre-mRNA の切断をもたらす pre-miRNA の切断／プロセッシングをもたらす。重要なことは、miRNA を導入遺伝子 mRNA に標的化することで、細胞質に位置する任意の mRNA がマイクロ RNA に媒介される切断の標的になることである (ガイド鎖はその標的に 100% 一致するべきである)。vRNA はガイド鎖の標的にはならない。パッセンジャー鎖が正当なマイクロ RNA エフェクターとなった場合に vRNA の切断を避けるために、パッセンジャー鎖は vRNA の配列に対してミスマッチであるべきである。よって、これらの機能的シス作用性エレメントは、VI の消失によりパッケージ化された vRNA から失われるため、これらの例はいずれも LV 生成においてのみ導入遺伝子 mRNA (及び dsRNA) を低減／排除するために使用することができる。

【図 46】 LV ビリオン生成を促進するための、逆向きの導入遺伝子カセットの 3' UTR 内の自己切断リボザイムの使用を示す図面である。「機能化された」3' UTR を有するか、又は有さない逆向きの EF1a-GFP 導入遺伝子を含有する LV ゲノムカセットを使用して、懸濁 (無血清) HEK293T において LV を生成し、清澄化した採取物中のベクタータンパク質構成成分を解析した (パネル A)。vRNA のレベルは、生成後の細胞 (「C」) とベクター上清採取物 (「V」) との両方において RT-PCR によって評価した。LV 生成中に逆向きの遺伝子カセットを発現させると、mRNA が LV vRNA の大部分と相補的になるため、二本鎖 (ds) RNA になる。dsRNA は生成中に少なくとも 1 つの感知機構 (例えば PKR) を誘発すると考えられ、採取物 (パネル A) 及び vRNA (パネル C) 中の検出可能な VS VG 及び p24 (カプシド) の大幅な低減をもたらす - 「空」のレーンを参照されたい。逆向きの導入遺伝子カセットの 3' UTR のベクター-イントロン (VI) 領域内で 4 つの異なる自己切断リボザイムを試験した：ハンマーヘッドリボザイム (HH-RZ)、肝炎デルタウイルスリボザイム (HDV-AG)、及び改変された Manson 住血吸虫 (Schistosoma mansoni) のハンマーヘッドリボザイム (T3H38/T3H48) (概略図のパネル [B] 及び [データの A、C] を参照されたい。さらに、これらが mRNA に不安定化作用を与えることが示されたため、RSV からの「スプライシングの負の調節因子 (NRS, negative regulator of splicing)」エレメント、又はスプライスドナー部位を保有するバリエーションを作製した。他のバリエーションは同じ 3' UTR にこれらのシス作用性エレメントをいくつか含み、上流／下流の配置をそれぞれ [1] 又は [2] と記した。(RT-PCR 解析のためのフォワードプライマー [f] とリバースプライマー [r] との配置はパネル B に示されている；

10

20

30

40

50

c p p t 及び w P R E などの他の特徴は示されていない)。これらのエレメントを、V I \_ 5 . 7 バリエーション、M S D - 2 K O m 5 改変体、並びに g a g - P s i 及び R R E ( 完全欠失) 領域の欠失を含有する L V ゲノムにクローニングした。カセットを順方向に含有する標準的な R R E / r e v 依存性 L V ゲノムと共にベクターを生成したが、これにより異常スプライス産物が生成した(パネル C を参照されたい)。このデータは、自己切断リボザイムを使用することにより、L V 上清により V S V G、p 2 4 及び v R N A が回収され得ることを示す。

【図 4 7】L V 力価を増強するための、逆向きの導入遺伝子カセットの 3' U T R 内の自己切断リボザイムの使用を示す図である。実施例 2 0 及び図 4 6 に記載の L V 採取上清を、H E K 2 9 3 T 細胞における組み込みアッセイにより力価測定した。このデータは、活性な逆向きの導入遺伝子カセットを保有する V L L V ゲノムの力価が、順方向 ( f w d ) に同じ導入遺伝子を含有する S T D R R E - L V よりも約 1 0 0 0 分の 1 低いことを実証した(「空」を参照されたい)。しかし、逆向きの導入遺伝子カセットの 3' U T R 内に自己切断リボザイムを使用することで、力価を約 1 0 0 倍回復させることができる。他のシスエレメント N S R とスプライスドナー部位との存在は、力価に影響を与えなかった／最小限の影響を与えた。

【図 4 8】ベクターイントロン L V ゲノム内のパッケージングシグナルの一部としての最小 g a g 配列の使用を示す図である。ベクターイントロンゲノムのパッケージング領域内の保持された g a g 配列(他の実施例では 8 1 に低減)をさらに最小化し、5 7、3 1、1 4 又はゼロヌクレオチドの g a g を保有するコンストラクトを得た。すべてのコンストラクトは、保持された g a g 配列の最初の開始コドンに A T G > A C G 変異を保有した。すべてのバリエーションは、R R E の代わりに V I \_ 5 . 5 を含有する M S D - 2 K O m 5 L V ゲノム内で提示された。標準的な L V ゲノムは、M S D、R R E 及び g a g の最初の 3 4 0 ヌクレオチド ( p 1 7 I N S を含む) を含有した。L V は、一過性トランスフェクションにより懸濁(無血清) H E K 2 9 3 T 細胞において生成され、清澄化された採取物は接着 H E K 2 9 3 T 細胞でフローサイトメトリーによって力価測定した。

【図 4 9 - 1】～

【図 4 9 - 2 - 2】ベクターイントロン L V の r e v 非依存性生成の最適化：ベクター構成成分投入レベルの微調整を示す図である。A . 清澄化した標準的な ( S T D ) 又はベクターイントロン ( V I ) L V ベクター上清 ( 二連) を、V S V G ( 白色) 又は p 2 4 / カプシド ( 黒色) に対する抗体を使用して免疫ブロットした。M = 分子量マーカー ( k D a ) 。B . E F S - G F P をコードする M S D - 2 K O m 5 / Δ p 1 7 I N S / V I \_ 5 . 5 L V ゲノムを使用して、実験計画 ( D o E , Design-of-Experiment ) 多変量解析実験を行った。対照／中心点の比率セット ( ゲノム : g a g P o l : V S V G が 9 5 0 : 1 0 0 : 7 0 n g / m L ) は、標準的な R R E / r e v 依存性 L V ( 及び V I L V を評価する以前のすべての例) に使用された最適化された比率であった。L V は懸濁(無血清) H E K 2 9 3 T 細胞で一過性トランスフェクションにより生成され、ベクターを酪酸ナトリウムで誘導後、記載された時点(時間)で採取した。清澄化した採取物を接着 H E K 2 9 3 T 細胞でフローサイトメトリーによって力価測定した。

【図 5 0】逆向きの導入遺伝子カセットを含有するレンチウイルスベクター ( L V ) の導入遺伝子 m R N A に対して標的化されたマイクロ R N A が、d s R N A の生成を回避し、導入遺伝子の発現を低下させるためにどのように使用され得るかを示す概略図である。L V ゲノム発現カセットを有する順向きの導入遺伝子カセットと逆向きの導入遺伝子カセットとの両方の構成が示されており、それぞれの場合のパッケージングされた v R N A ( Ψ ) と導入遺伝子 m R N A とも示されている。レトロウイルスベクター内で逆向きの導入遺伝子カセットを使用すると、典型的には、長い d s R N A が生成されるため、ベクターの生成が低減し；これは、典型的には、細胞内の d s R N A 感知経路 ( P K R に媒介される翻訳抑制など) を誘導し、ベクター構成成分タンパク質の発現を低下させる。これを回避するために、ベクター生成中に 1 又は 2 以上のマイクロ R N A を同時発現させることができ(例えば s i R N A 又はマイクロ R N A 発現カセットとの同時トランスフェクションに

10

20

30

40

50

よって)、マイクロRNAは切断のために導入遺伝子mRNAを標的とする。ミスマッチしたパッセンジャー鎖を使用することで、RISC内のガイドとしてパッセンジャー鎖が低レベルで負荷されることによるvRNAの消失を回避することができる。導入遺伝子mRNAの切断(及びその結果としての分解)は、LV生成中の導入遺伝子タンパク質発現の低下につながり、これは最大力価及び/又は産物の回収/純度を達成する上で有利となり得る。

【図51】本発明で採用することができる異なるマイクロRNAの「モダリティ(modality)」を示す概略図である。導入遺伝子を標的化するマイクロRNAは、それぞれ細胞トランスフェクション又は安定細胞株を使用する「一過性(transient)」又は「安定(stable)」ベクタープロセスの一部となり得る。一過性のトランスフェクションアプローチでは、マイクロRNAはsiRNA又はshRNAとして、あるいはmiR発現カセットとして送達することができ、ここでマイクロRNAは、例えばU6などのポリメラーゼIIIプロモーター又はtRNAプロモーターからデノボ転写される。miRカセットは別々のプラスミドであってもよく、あるいはベクターゲノムプラスミド又はパッケージングプラスミド内に挿入されてもよい。miRはまた、生成細胞に安定的に組み込まれることもあり、この生成細胞自体もベクター構成成分のすべて又は一部を含有してもしなくてもよい。

【図52】順向き又は逆向きの導入遺伝子カセットからの導入遺伝子発現を阻止するsiRNAを使用するLVの生成を示す図である。EFSプロモーターに駆動されるGFPカセットを順方向(Fwd)又は逆方向(逆向き)のいずれかで含有するLVを、懸濁(無血清)HEK293T細胞において生成した。生成細胞は、DsRed-Xprレポータープラスミド対照と同様に、記載されたsiRNAの有無にかかわらず、LVゲノム及びパッケージングプラスミドを同時トランスフェクトされ、生成後の細胞を、GFP/DsRed-Xpr発現レベルについてフローサイトメトリーによって解析した(%陽性ゲート×蛍光強度の中央値;任意単位)。清澄化したベクター上清を、接着HEK293T細胞への形質導入後、フローサイトメトリーにより力価測定した(TU/mLでの力価)。対照siRNAはルシフェラーゼ(存在しない)に向けられ、DsRed-Xprレポーターはデノボタンパク質合成に対するdsRNA生成の影響を評価するために存在した。

【図53】supA-2pA-LTRの構築:組み込まれたLVの3'末端からの転写リードインを低減するための、SINΔU3領域内への逆向きのポリアデニル化シグナルと逆向きのGUリッチDSEとの挿入を示す図である。SINΔU3(attΔU3)配列の下流に異なる長さのSV40ポリアデニル化配列を配置し、RU5(示された場所)又はネイティブHIV-1ポリAシグナル(示された場所)の上流に存在する異なるポリAシグナル(pAm1)に変異を保有することに基づいて、SIN-LTR様複合配列のいくつかのバリエーションを生成した。SV40ポリアデニル化配列は双方向性であり、矢印は後期配列の方向を示し、この配列には後期USE及びポリAシグナルが含まれるが、後期GUリッチDSEは含まれない。改変された(5')R-最適なGUリッチDSEを含有する-が、原理的には、ここで示されているようにポリアデニル化を改善するためにTARの代わりに使用されたが、この最初の例では使用しなかったことに留意された。supA-LTR配列の以前の例では、後期SV40ポリA配列(後期USE-PAS配列を含有する)は、初期SV40ポリA配列の2つのポリAシグナルを下の鎖に含む(すなわち、逆向きの)が、初期のGUリッチDSEは省略されている。コンストラクト2~7は「上の鎖(top-strand)」の方向(すなわち、上流の細胞プロモーターからの転写リードイン)をモデル化し、コンストラクト8-12は「下の鎖(bottom-strand)」の方向(すなわち、下流の細胞プロモーターからの転写リードイン)をモデル化するが、この実施例では、これらの逆向きのバリエーションには逆向きのRU5配列は存在しなかった。初期SV40ポリA配列のGUリッチDSEを提供するために、ネイティブSV40初期ポリA配列をネイティブGUリッチDSEを含むように単に伸長させるか(コンストラクト6、10、11)、又はMMTV GUリッチDSEに基づくバリエーションGUリ

10

20

30

40

50

ッチDSEを2つの初期PASの下流に挿入した（コンストラクト7、12）。これらの配列をルシフェラーゼポリAレポーターに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞にトランスフェクトした後、細胞溶解液のルシフェラーゼアッセイにより、転写リードイン／アウトを測定した。標準的なSIN-LTR対照と配列なしの対照とが、それぞれ陽性対照及び陰性対照として含まれた。ルシフェラーゼ活性をコンストラクト4の活性（1.0とした）に対して正規化し、データはlog10スケール（任意単位）で示した。

【図54】インタクトな「supA-2pA-LTR」の下鎖における転写リードインのモデル化を示す図である。図53と同様に、supA-LTR配列を逆向きにし、ルシフェラーゼレポーターカセットに挿入したが、ただし、supA-2pA-LTR全体が存在するように逆向きのRU5も含まれた。すべてのコンストラクト2～9は、「下の鎖」の方向（すなわち、下流の細胞プロモーターからの転写リードイン）をモデル化する。本コンストラクト1は、図53のコンストラクト1（実施例7）と同一であり；本コンストラクト2、4は、改変された（5'）RU5又は最適なGUリッチDSE（「GU2」）を含有する改変された（5'）RU5が、これらの配列の影響を評価するために示された場所に含まれていることを除いて、図53のコンストラクト8（実施例7）に対応し；本発明のコンストラクト3、5及び9は、改変された（5'）RU5又は最適なGUリッチDSE（「GU2」）を含有する改変された（5'）RU5が、これらの配列の影響を評価するために示された場所に含まれていることを除いて、図53のコンストラクト9（実施例7）に対応する。初期SV40ポリA配列のGUリッチDSEを提供するために、ネイティブSV40初期ポリA配列を、ネイティブGUリッチDSEを含むように単に伸長させた（コンストラクト6～9）。表2にあるように、GUボックスは「GU-1」であることに留意されたい。これらの配列をルシフェラーゼポリAレポーターに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞にトランスフェクトした後、細胞溶解液のルシフェラーゼアッセイにより、転写リードイン／アウトを測定した。ルシフェラーゼ活性をコンストラクト2の活性（1.0とした）に対して正規化し、データはlog10スケール（任意単位）で示した。

【図55-1】～

【図55-2】LV発現カセットの一部としての例、supA-2pA-LTR及び標的細胞において得られたLTRを示す詳細な概略図である。示された配列は、表9に示されているように、配列番号200[A]及び201[B]に適合する。[A]は、5' R-otto-PBS、及び3' ppt-otto-Rが埋め込まれた異種ポリアデニル化配列（この場合、SV40ポリA）を与え、その間にLV骨格及び導入遺伝子配列が「省略されている（abbreviated）」（カセットを駆動するプロモーター配列は示されていない）。灰色の特徴は、RU5領域、PBS及び3' pptの典型的なHIV-1に基づくLV配列である。結合部位（組込みのため）は黒色で示されている（「att」）。本発明の改変された配列は白色で示し、その方向は矢印で示し、配列が上の鎖（右向き）で機能するか、又は下の鎖（左向き）で機能するかを示す。ポリAシグナル（PAS）、上流エンハンサー（USE）、ポリA切断ゾーン／領域（pAn Clvゾーン）及び下流エンハンサー／GUリッチボックス（DSE、GU）を示した。[B]は、逆転写／cDNA合成の完了後に、標的細胞において得られたLTRを示し、LVを挟むLTRは両方とも同じになるため、簡単に、1つのLTRのみを示す。パネル[A]と同じ特徴的慣例が使用される。

【図56-1】～

【図56-2】「supA-2pA-LTR」の下鎖における転写リードインのさらなるモデル化；代替的なGUボックスの評価を示す図である。図54と同様に、supA-LTR配列を逆向きにし、ルシフェラーゼレポーターカセットに挿入し、supA-2pA-LTR全体が存在するようにした。すべてのコンストラクト2～19は、「下の鎖」の方向（すなわち、下流の細胞プロモーターからの転写リードイン）をモデル化する。下の鎖のバリエーションは、表2に示されているように、異なる供給源からの7つの異なるGUボックスを含み、逆向きのRU5は、示される場合、GU2の改変を多様にコードした。

これらの配列をルシフェラーゼポリAレポーターに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞にトランスフェクトした後、細胞溶解液のルシフェラーゼアッセイにより、転写リードイン／アウトを測定した。ルシフェラーゼ活性をコンストラクト2の活性（1.0とした）に対して正規化し、データはlog10スケール（任意単位）で示した。

【図57-1】～

【図57-2】逆向きのGUボックスが「上の鎖」の転写終結に与える影響の評価を示す図である。表10に記載され、図56において逆向きの方向（すなわち下の鎖の終結）で試験したsupA-2pA-LTRバリエーションは、ルシフェラーゼレポーターカセット内で裏返され、その結果、これらの新規LTRを順方向（すなわち上の鎖）の転写終結効率について評価できるようにした。これによって、逆向きのGUボックス（下の鎖のSV40初期ポリA配列にサービスする）の、上の鎖の転写終結に与える何らかの影響を評価することができた。これらのバリエーションを、それぞれネイティブHIV-1ポリAシグナルを有するか、又は有さない標準的なSIN-LTR（コンストラクト1及び2）又は最適なsupA-LTR（コンストラクト5及び6）と比較した。これらの配列をルシフェラーゼポリAレポーターに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞にトランスフェクトした後、細胞溶解液のルシフェラーゼアッセイにより、転写リードイン／アウトを測定した。ルシフェラーゼ活性をコンストラクト3の活性（1.0とした）に対して正規化し、データはlog10スケール（任意単位）で示した。

【図58-1】～

【図58-2】バリエーションsupA-2pA-LTRを含有するレンチウイルスベクターの生成を示す図である。5'及び3'LTRの構成（発現カセット生成用）は、本発明の異なるエレメントの有無で示され；すべてのコンストラクトはCMVプロモーター（「3G」TSSを有する）によって駆動され、「バックアップ」ポリアデニル化配列は、標準的なSIN-LTRを使用する標準的な／MSD対照（3'SIN-LTRの下流にSV40後期ポリAを有する — 図示せず）を除いて存在しなかった。変異したネイティブHIV-1 5'PAS（5'pA）及び／又はメジャースプライスドナー部位（MSD）は十字で示されている。内部EFS-GFP-wPREカセットが存在した（図示せず）。5'R領域は野生型の／標準的なTAR／SL1か、又は3GR-GU2バリエーションを含む改変5'R SL1であった。異種SV40後期ポリアデニル化シグナルは3'ppt／ΔU3領域の下流に配置された。最大20ヌクレオチドのHIV-1 R領域から構成されるR領域配列は、異種PASと切断部位／GUリッチDSEエレメントとの間に挿入された。「3G-R20」配列は、本明細書の他の箇所で言及した「R.1-20」配列と同じである。逆向きのポリA配列にDSEを提供するための逆向きのGUボックス（iGU-1～iGU-7；表10を参照されたい）の任意選択での存在が記載されている。「標的」細胞における最終的なSIN／supA／supA-2pA LTRの構造が提供される。LVは、本発明の他の箇所に記載されているように、無血清、懸濁HEK293T細胞で生成され、MSD変異LVにはトランスでp256U1が提供された。ベクター上清を接着HEK293T細胞でフローサイトメトリー（GFP陽性細胞）及び組み込みアッセイにより力価測定し、データをlog10スケールでプロットした。

【図59-1】～

【図59-2】supA-2pA-LTRを含有する異なる種類のレンチウイルスベクターの生成を示す図である。5'及び3'LTRの構成は、本発明の異なるエレメントの有無で示され；すべてのコンストラクトはCMVプロモーター（「3G」TSSを有する）によって駆動され、「バックアップ」ポリアデニル化配列は、標準的なSIN-LTRを使用する標準的な／MSD対照（3'SIN-LTRの下流にSV40後期ポリAを有する — 図示せず）を除いて存在しなかった。変異したネイティブHIV-1 5'PAS（5'pA）及び／又はメジャースプライスドナー部位（MSD）は十字で示されている。内部EF1α — 又はhUPGKプロモーターに駆動されるGFPカセットが存在した。5'R領域は野生型の／標準的なTAR／SL1か、又は3GR-GU2バリエーションを含む改変5'R SL1であった。異種SV40後期ポリアデニル化シグナルは3'ppt／

Δ U 3 領域の下流に配置された。最大 20 ヌクレオチドの H I V - 1 R 領域から構成される R 領域配列は、異種 P A S と切断部位 / G U リッチ D S E エLEMENT との間に挿入された。「3 G - R 20」配列は、本明細書の他の箇所で言及した「R. 1 - 20」配列と同じである。逆向きのポリ A 配列に D S E を提供するために逆向きの G U ボックス「G U - 7」（表 10 を参照されたい）を使用した。L V は、無血清、懸濁 H E K 293 T 細胞で生成され、M S D 変異 L V にはトランスで p 256 U1 が提供された。ベクター上清を接着 H E K 293 T 細胞でフローサイトメトリー（G F P 陽性細胞）及び組込みアッセイにより力価測定し、データを l o g 10 スケールでプロットした。

【図 60 - 1】～

【図 60 - 2】S I N -、s u p A 又は s u p A - 2 p A - L T R を有する組込み L V の 5' L T R のリードスルーの測定を示す図である。実施例 26（図 58）で生成した L V を使用して、M O I 1 で接着 H E K 293 T 細胞又は初代口バ線維芽細胞（92 B R）を形質導入し、次いで 10 日間継代培養し、ベクターコピー数を得るために組込みアッセイを行った（H I V P s i q P C R）。総 R N A を抽出し、H I V - P s i R N A と G A P D H m R N A とを R T - q P C R で定量し、G A P D H m R N A に対する相対的な H I V - P s i R N A 比を作製して、各培養における動員された H I V - P s i R N A（すなわち、5' L T R をリードスルー）の尺度を提供した。次いで、この値を細胞あたりの平均コピー数で割ったところ、両方の細胞型で 0.8 ～ 3.6 コピーの範囲であった。

【図 61 - 1】～

【図 61 - 2】標準的な S I N - L T R 又は s u p A (2 p A) - L T R を有する組み込まれた L V カセットへの 5' L T R 上流のクロマチンからの転写リードインの比較を示す図である。メジャースプライスドナーの任意選択での変異（両方の種類）及び／又はネイティブ H I V - 1 p A シグナルの任意選択での変異（s u p A (2 p A) - L T R のみ）を有する、S I N - L T R 又は s u p A (2 p A) - L T R のいずれかを有する組み込まれた L V の構成。L V を使用して、付着 H E K 293 T 細胞を M O I 1 で形質導入し、10 日間継代した後に宿主細胞のゲノム D N A を抽出して組込みアッセイを行って、ベクターコピー数を決定した（H I V - P s i に対する q P C R）。ポリ A で選択した R N A を精製し、R N A s e q にかけた。各ゲノムについて、組み込まれたカセットのテンプレートにリードカバレッジをマッピングした。示された領域（M S D [c o r e - P s i]、G a g - P s i、R R E）からのリードカウントは、初めに G F P 導入遺伝子全体の総リードカウントに対して正規化した。データをベクターコピー数に対してさらに正規化した。データは、対照ゲノム（S T D - L V (M S D +) - S I N）の M S D リード深度の % として最終的に表した。検出されたリードスルー R N A の倍数低下（S T D - L V (M S D +) - S I N 対照の相対的な M S D リード数）を表にした（L O D = 検出限界）。

【図 62】導入遺伝子 3' U T R 内に自己切断エレメントを保有するベクターイントロン L V：生成細胞由来のマイクロ R N A 標的部位の使用を示す図である。逆向きの導入遺伝子カセットは、上の鎖のベクターイントロン配列に包含される 3' U T R 配列内に自己切断エレメントを含んでいるため、このようなエレメントはパッケージングされた v R N A からスプライシングされ、標的細胞には送達されない。自己切断エレメント（リボザイム [Z] など）は導入遺伝子 m R N A を排除するため、そうでなければ L V の力価を低下させる d s R N A 感知経路の誘発を回避し、及びそうでなければ L V 力価に影響を与える可能性のある導入遺伝子のタンパク質発現の抑制をもたらすのを回避する。この場合、1 又は 2 以上のマイクロ R N A 標的配列は、任意選択でリボザイムなどの他の自己切断エレメントと共に、3' U T R に挿入される。これらの標的配列は合成であってもよく、外来的に（例えば、生成細胞に導入された U 6 に駆動されるカセットによって）発現された m i R N A 又は内因性 m i R N A によって標的化されてもよい。

【図 63】導入遺伝子 3' U T R 内に自己切断エレメントを保有するベクターイントロン L V の生成細胞の導入遺伝子発現及びアウトプット力価：生成細胞由来のマイクロ R N A 標的部位の使用を示す図である。逆向きの E F 1 a - G F P カセットを保有するベクター

10

20

30

40

50

ーイントロンLVを、図62と同様のフォーマットで生成した。具体的には、上の鎖のVIによって包含される逆向きの導入遺伝子の3'UTRは、HEK293(T)細胞において内因的に発現することが見出されたmiRNAの3つの異なる標的配列(miR17-5p、miR20a及びmi106a)の1×又は3×のコピーを有した。VIを包含する3'UTR領域(それぞれ配置[1]及び[2])内にリボザイムT3H38及びHDV\_\_AGが付加的に存在する2つのバリエーションセットを生成した。リボザイムとmiRNA標的配列との両方を含有するバリエーションでは、miRNA標的配列は2つのリボザイムの間に配置されていた。3つすべてのmiRNAの単一のコピーがリボザイムの間に存在する(17-5p/20a/106a)、3つ目のバリエーション型を作製した。標準的なLVと一緒に、EF1a-GFPカセットを順方向に含有するLVを、懸濁(無血清)HEK293T細胞において生成した。生成後の細胞をフローサイトメトリーで解析し、GFP発現スコア(%GFP×MFI)を作製し、得られたベクター上清を接着HEK293T細胞でフローサイトメトリーによって力価測定して、GFP TU/mL値を得た。力価値及びGFP発現スコアは、標準的なLV(100%に設定)で得られたスコアに対して正規化した。

10

【図64】導入遺伝子3'UTR内に自己切断エレメントを保有するベクターーイントロンLV：ベクターーイントロンが埋め込まれたマイクロRNAの使用を示す図である。この図は、図44及び45に記載したものと同様のLV生成システムを示す。逆向きの導入遺伝子カセットは、上の鎖のベクターーイントロン配列に包含される3'UTR配列内に自己切断エレメントを含んでいるため、このようなエレメントはパッケージングされたvRNAからスプライシングされ、標的細胞には送達されない。自己切断エレメント(リボザイム[Z]など)は導入遺伝子mRNAを排除するため、そうでなければLVの力価を低下させるdsRNA感知経路の誘発を回避し、及びそうでなければLV力価に影響を与える可能性のある導入遺伝子のタンパク質発現の抑制をもたらすのを回避する。この場合、1又は2以上のマイクロRNAカセットが3'UTRに挿入され(そのプロセッシングにより導入遺伝子mRNAが切断される)、任意選択で、導入遺伝子mRNA(この場合は3'UTR配列)内の標的部位をプロセッシングして生成されたmiRNAが挿入される。任意選択で、これらのmiR/miRNA標的はリボザイムなどの他の自己切断エレメントと組み合わせられる。

20

【図65】一致したMOIで異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有するRRE/rev依存性レンチウイルスベクターで形質導入した懸濁Jurkat細胞(T細胞株)における導入遺伝子発現レベルを示す図である。懸濁(無血清)HEK293Tにおいて生成したLV-RRE-EFS-GFPベクターストックを、接着HEK293T細胞で初めに力価測定して、組込み力価(白抜きのバー; TU/mL)を作製した。ベクターストックを使用して、新鮮なJurkat細胞を、一致した感染多重度(MOI): MOI 1又は0.5で形質導入した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを「スタンドアローン」エレメント:wPRE、16×10bp CAREタイル(CARE.16t)、又はZCHC14ステムループの単一のコピー(HCMV.ZSL1)として用い、エレメントなし(ΔwPRE)と比較した。さらに、wPREが欠失したがZCHC14ステムループ(配置2に)の単一コピーを含有するバリエーションも、1×~20×の10bpコピーまで、増加するCAREタイル数と対合した(配置1、すなわち、配置2の上流に)。形質導入されたJurkat細胞における導入遺伝子(GFP)の発現を、形質導入の3日後にフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値(任意単位)を、標準的なwPRE含有LVで達成されたもの(100%に設定)に対して正規化した。

30

40

【図66-1】~

【図66-2】一致したMOIで異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有するRRE/rev依存性レンチウイルスベクターで形質導入した懸濁Jurkat細胞(T細胞株)における導入遺伝子発現レベルを示す図である。懸濁(無血清)HEK293Tにおいて生成したLV-RRE-EFS-GFPベクターストックを、接着HEK293T細胞で初めに力価測定して、組込み力価を作製した(図示せず)。ベクターストックを使用して

50

、新鮮なJurkat細胞を、一致した感染多重度1で形質導入した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを「スタンドアローン」エレメント:wPRE(黒色のバー)、16×10bp CAREタイル(CARE.16t;暗灰色のバー)、又はZCCHC14ステムループの単一のコピー(HCMV.ZSL1;ストライプの薄灰色のバー)として用い、エレメントなし(ΔwPRE;白色のバー)と比較した。さらに、wPREが欠失したがZCCHC14ステムループの単一コピーを含有するバリエーション(配置2に)も、示されているように(灰色のバー)コンセンサスのネイティブバリエーション配列を含有した16×10bpのCAREタイルと対合した(CARE.16t\_vX;配置1、すなわち、配置2の上流に)。形質導入したJurkat細胞における導入遺伝子(GFP)の発現を、形質導入の10日後にフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値(任意単位)を、抽出した宿主細胞のDNA上のHIV-psiに対するqPCRで測定したベクターコピー数(VCN)に対して正規化した。横線の実線は、より大きなwPREエレメントによって達成された発現レベルを示し、横線の点線は、3'UTRエレメントなしの発現レベルを示す。

10

【図67】一致したMOIで異なる3'UTRシス作用性エレメントを保有するRRE/rev依存性レンチウイルスベクターで形質導入した懸濁Jurkat細胞(T細胞株)における導入遺伝子発現レベルを示す図である。懸濁(無血清)HEK293Tにおいて生成したLV-RRE-EFS-GFPベクターストックを、接着HEK293T細胞で初めに力価測定して、組込み力価を作製した(図示せず)。ベクターストックを使用して、新鮮なJurkat細胞を、一致した感染多重度1で形質導入した。異なる3'UTRシス作用性エレメントを「スタンドアローン」エレメント:wPRE(黒色のバー)、16×10bp CAREタイル(CARE.16t;暗灰色のバー)、又はZCCHC14ステムループの単一のコピー(HCMV.ZSL1;ストライプの薄灰色のバー)として用い、エレメントなし(ΔwPRE;白色のバー)と比較した。さらに、wPREが欠失したがZCCHC14ステムループの単一コピーを含有するバリエーション(配置2に)も、示されているように(灰色のバー)コンセンサスのネイティブバリエーション配列を含有した16×10bpのCAREタイルと対合した(CARE.16t\_vX;配置1、すなわち、配置2の上流に)。これらはc-Jun、HSPB3、IFN-α及びIFN-β mRNAからのものであった。形質導入したJurkat細胞における導入遺伝子(GFP)の発現を、形質導入の10日後にフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値(任意単位)を、抽出した宿主細胞のDNA上のHIV-psiに対するqPCRで測定したベクターコピー数(VCN)に対して正規化した。横線の実線は、より大きなwPREエレメントによって達成された発現レベルを示し、横線の点線は、3'UTRエレメントなしの発現レベルを示す。

20

30

【図68】標的細胞における導入遺伝子の発現を増強するために、3'UTRエレメントを含有しない(空)か、又は含有するrAAVベクターゲノムの例を示す図である。「CAZL」エレメント(タンデムCARE 10bpコンセンサスタイル[CARE.xt]とZCCHC14ステムループ[ZSL1]との複合体)の長さは約140~260ntである(4×~16× CAREタイルの使用による)。wPREの長さは約590ntであり、したがってrAAVベクターゲノムの多くを占めており、サイズはrAAVに対する重大な制限である。符号 — 逆方向末端反復(ITR)、プロモーター(Pro)、目的の遺伝子(GOI)、ポリアデニル化シグナル(ポリA)。

40

【図69】長さ約140~260ntのバリエーションCARE/ZSL1(「CAZL」)エレメント、又は配置「x」(すなわち、3'UTRにおける)のwPRE(約590nt)と対合した、CMV-又はEFS-プロモーターに駆動されるGFPを含有するrAAVベクターの実験結果を示す図である。CARE/ZSL1の対照は、全ゲノムにわたり2.0~2.6kb(CMV)及び1.6~2.2kb(EFS)の範囲に及ぶ異なるゲノムサイズの潜在的な影響の対照に対して逆向きのエレメント(「inv」)であった。空のrAAVベクターを陰性対照として使用した。rAAVは、HEK293T懸濁細胞をpGenome/pRepCap/pHelperプラスミドで1:1:1の比率で

50

同時に形質導入し、トランスフェクションの72時間後に採取することによって作製した。ベクター採取物をGFP配列に対してqPCRで力価測定して、vg/mLの物理的力価を作製した。HEPG2細胞を表記のMOIで形質導入し、形質導入72時間後の細胞をフローサイトメトリーで解析し、GFP発現スコア(%GFP+×MFI;ArbU)を作製した。

【図70】パッケージングされたvRNAから効率的にスプライシングして最適化されたベクターイントロンを使用するキメラ抗原受容体(CAR)導入遺伝子カセットをコードするLVの高力価生成。[A]4つ異なる種類のLVベクター骨格発現カセットに対する生成細胞内のvRNA由来種(全体及び細胞質)及び得られたLVビリオン(V)のRT-PCR解析。「STD」は、メジャースプライズドナー(MSD)及びrev応答エレメント(RRE)を含む、すべての典型的なシス作用性エレメントを保有する、標準的な第3GenLVを指す。「2KO」は、MSDが変異した新たな世代のLVを指し；これらはRREも含有し、出力力価を完全に回復させるために、改変されたU1snRNA(256U1)分子の発現を必要とする。256U1をSTDLVと共に使用すると、パッケージングされたvRNAと力価とも増加する。[B]を参照されたい。「MaxPax」LVは、本発明のベクターイントロンのv5.6バリエーションを含有し、MSDの変異とRRE及びgag-p17INS配列の欠失との両方を保有する。使用したプロモーターはEF1a又はショートEF1a(EFS)のいずれかであった。RT-PCRでは、MSDの上流(fwd)とGFP導入遺伝子内の下流とにプライマーを使用し、異常な又は「正しい」VISプライシングがモニターされ得る。パッケージング可能な／パッケージングされたvRNAの存在が示されており(Ψ-vRNA)；RT-PCR産物のサイズは、プロモーターのサイズ(EFSはEF1aより約1kb短い；2KO-EF1a対2KO-EFSを参照されたい)と、VI由来のvRNAの容量の約1kbの増加(2KO-EFS対MaxPax-EFSを参照されたい)とを反映することに留意されたい。アクチンmRNAに対するRT-PCRを陽性対照として使用した。パネルBは、Aで記述したベクターの出力力価を示し；アッセイ参照対照(ストライプ)に対する組込み力価と「生物学的」(scFV)力価との両方が示されている。VI由来のMaxPaxLVはrevの非存在下で生成された。

【図71-1】～

【図71-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pALTR、及び代替の3'UTRエレメントを保有する標準的なLV-GFPの生成力価を示す図である。この図は、それぞれの場合のLVDNA発現カセットの構造を5'から3'LTRまで示す。5'LTRの配置では、CMVプロモーターが転写開始部位の3Gと共に使用され(CMV-3G)、標準的なR領域(TAR)又はsupA(2pA)-LTR5'改変'GU2'のいずれかを有し、ネイティブ5'ポリA(白色のX)に対して変異していてもよい。すべての標準的なLVは、インタクトなメジャースプライズドナー(MSD)とrev応答エレメント(RRE)とを含有した。GFP導入遺伝子は、EF1a、EFS(短いEF1a、すなわちイントロンAを欠く)又はヒトPGKプロモーターのいずれかによって駆動された。3'UTRは、wPRE若しくはZCCHC14タンパク質結合ステムループへのCARe10bpコンセンサスエレメント連結の8×タイルを含有するCARe/ZSL1エレメントのいずれかであるか、又はエレメントを含有しなかった(白色のX)。3'LTRは、標準的な自己不活化(SIN)であるか、又は3'Rに埋め込まれた異種ポリAアデニル化配列(この場合はSV40後期ポリA)を使用し、上流のエンハンサー(USE；この場合はSV40後期ポリA)の上流に逆向きのポリA(図示せず；この場合はSV40初期ポリA)とGUボックス(iGU7；この場合はベータグロビンポリAに基づく「SPA」ポリAからの)とを有する。SIN-LTRを使用するコンストラクトが、下流の「バックアップ」ポリA(この場合はSV40pA)も利用したが、supA(2p)-LTRは利用しなかったことに留意されたい。埋め込まれたR領域は、異種ポリAシグナル(PAS)の下流にあり、3G(3G-R20)を含むR領域の最初の20ヌクレオチドで構成されていた。異種ポリA切断ゾーンと下流のDSE

／GUリッチ配列とも示した（c l v－D S E／G U）。L Vは懸濁（無血清）H E K 2 9 3 T細胞で生成され、形質導入の3日後と10日後にフローサイトメトリー（G F P－F A C S；灰色のバー）及び組込みアッセイ（宿主細胞DNA上のH I V－P s iに対するq P C R；黒色のバー）によって、接着H E K 2 9 3 T細胞で力価測定した。

【図72－1】～

【図72－2】異なる導入遺伝子プロモーター、S I N又はs u p A－2 p A L T R、及び代替の3' U T Rエレメントを保有する「2 K O」－L V－G F Pの生成力価を示す図である。この図は、それぞれの場合のL V DNA発現カセットの構造を5' から3' L T Rまで示す。5' L T Rの配置では、C M Vプロモーターが転写開始部位の3 Gと共に使用され（C M V－3 G）、標準的なR領域（T A R）又はs u p A（2 p A）－L T R 5' 改変「G U 2」のいずれかを有し、ネイティブ5' ポリA（白色のX）に対して変異しているてもよい。すべての2 K O－L Vは、変異したメジャースプライスドナー（M S D；突然変異体「2 K O m 5」を使用した）とr e v応答エレメント（R R E）とを含有した。G F P導入遺伝子は、E F 1 a、E F S（短いE F 1 a、すなわちイントロンAを欠く）又はヒトP G Kプロモーターのいずれかによって駆動された。3' U T Rは、w P R E若しくはZ C C H C 1 4タンパク質結合ステムループへのC A R e 1 0 b pコンセンサスエレメント連結の8×タイルを含有するC A R e／Z S L 1エレメントのいずれかであるか、又はエレメントを含有しなかった（白色のX）。3' L T Rは、標準的な自己不活化（S I N）であるか、又は3' Rに埋め込まれた異種ポリAアデニル化配列（この場合はS V 4 0後期ポリA）を使用し、上流のエンハンサー（U S E；この場合はS V 4 0後期ポリA）の上流に逆向きのポリA（図示せず；この場合はS V 4 0初期ポリA）とG Uボックス（i G U 7；この場合はベータグロビンポリAに基づく「S P A」ポリAからの）とを有する。S I N－L T Rを使用するコンストラクトが、下流の「バックアップ」ポリA（この場合はS V 4 0 p A）も利用したが、s u p A（2 p）－L T Rは利用しなかったことに留意されたい。埋め込まれたR領域は、異種ポリAシグナル（P A S）の下流にあり、3 G（3 G－R 2 0）を含むR領域の最初の2 0ヌクレオチドで構成されていた。異種ポリA切断ゾーンと下流のD S E／G Uリッチ配列とも示した（c l v－D S E／G U）。L Vは懸濁（無血清）H E K 2 9 3 T細胞で生成され、形質導入の3日後と10日後にフローサイトメトリー（G F P－F A C S；灰色のバー）及び組込みアッセイ（宿主細胞DNA上のH I V－P s iに対するq P C R；黒色のバー）によって、接着H E K 2 9 3 T細胞で力価測定した。

【図73－1】～

【図73－2】異なる導入遺伝子プロモーター、S I N又はs u p A－2 p A L T R、及び代替の3' U T Rエレメントを保有する「M a x P a x」（ベクター－イントロン）L V－G F Pの生成力価を示す図である。この図は、それぞれの場合のL V DNA発現カセットの構造を5' から3' L T Rまで示す。5' L T Rの配置では、C M Vプロモーターが転写開始部位の3 Gと共に使用され（C M V－3 G）、標準的なR領域（T A R）又はs u p A（2 p A）－L T R 5' 改変「G U 2」のいずれかを有し、ネイティブ5' ポリA（白色のX）に対して変異しているてもよい。すべてのM a x P a x－L Vは、変異したメジャースプライスドナー（M S D；突然変異体「2 K O m 5」を使用した）及びベクター－イントロン（V I）バリエーションv 5. 5、並びに短縮化されたg a g－P s i領域を含有した（図示せず）。G F P導入遺伝子は、E F S（短いE F 1 a、すなわちイントロンAを欠く）又はヒトP G Kプロモーターのいずれかによって駆動された。3' U T Rは、w P R E若しくはZ C C H C 1 4タンパク質結合ステムループへのC A R e 1 0 b pコンセンサスエレメント連結の8×タイルを含有するC A R e／Z S L 1エレメントのいずれかであるか、又はエレメントを含有しなかった（白色のX）。3' L T Rは、標準的な自己不活化（S I N）であるか、又は3' Rに埋め込まれた異種ポリAアデニル化配列（この場合はS V 4 0後期ポリA）を使用し、上流のエンハンサー（U S E；この場合はS V 4 0後期ポリA）の上流に逆向きのポリA（図示せず；この場合はS V 4 0初期ポリA）とG Uボックス（i G U 7；この場合はベータグロビンポリAに基づく「S P A」

ポリAからの)とを有する。SIN-LTRを使用するコンストラクトが、下流の「バックアップ」ポリA(この場合はSV40 pA)も利用したが、supA(2p)-LTRは利用しなかったことに留意されたい。埋め込まれたR領域は、異種ポリAシグナル(PAS)の下流にあり、3G(3G-R20)を含むR領域の最初の20ヌクレオチドで構成されていた。異種ポリA切断ゾーンと下流のDSE/GUリッチ配列とも示した(c lv-DSE/GU)。LVは懸濁(無血清)HEK293T細胞で生成され、形質導入の3日後と10日後にフローサイトメトリー(GFP-FACS;灰色のバー)及び組込みアッセイ(宿主細胞DNA上のHIV-Psiに対するqPCR;黒色のバー)によって、接着HEK293T細胞で力価測定した。

【図74-1】～

10

【図74-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3'UTRエレメントを保有する組み込まれた標準的なLV-GFPの5'LTRへの転写リードインを示す図である。この図は、図71のLVの逆転写及び組込みから得られた、5'から3'LTRまでの、それぞれの場合の組み込まれたLV DNAカセットの構造を示す。したがって、5'LTRと3'LTRとは同一である。標準的なSIN LTRは、欠失したU3領域( $\Delta U3$ )、及びネイティブHIV-1ポリAシグナルを含有するR-U5を含有する。supA(2pA)LTRは、上流エンハンサー(USE;この場合はSV40後期ポリA)の上流に逆向きのポリA(図示せず;この場合はSV40初期ポリA)とGU-ボックス(iGU7;この場合はベータグロビンポリAに基づく「SPA」ポリAからの)とを保有する。USEの下流には異種ポリAシグナル(SV40後期PAS)、GU2により改変されたR領域があり、U5領域(白色のX)のネイティブHIV-1ポリAシグナルが変異していてもよい。LTR間の他のすべての態様は、図71に記載したものと同一であった。LVを使用して、MOI 1で接着HEK293T細胞を形質導入し、次いで10日間継代培養し、ベクターコピー数を得るために組込みアッセイを行った(HIV-Psi qPCR)。総RNAを抽出し、HIV-Psi RNAとGAPDH mRNAとをRT-qPCRによって定量した。各培養において動員されたHIV-Psi RNA(すなわち、5'LTRのリードスルー)の尺度を提供するために生成されたGAPDH mRNAに対する相対的なHIV-Psi RNA比(ベクターコピー数に対して正規化);これらは、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーターを有する各LVについて、標準的なwPRE/SIN-LTRバリエーションを保有するLVのリードイン値との比較でプロットされている(100%に設定、黒色のバー)。

20

30

【図75-1】～

【図75-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3'UTRエレメントを保有する組み込まれた「2KO」LV-GFPの5'LTRへの転写リードインを示す図である。この図は、図72のLVの逆転写及び組込みから得られた、5'から3'LTRまでの、それぞれの場合の組み込まれたLV DNAカセットの構造を示す。したがって、5'LTRと3'LTRとは同一である。標準的なSIN LTRは、欠失したU3領域( $\Delta U3$ )、及びネイティブHIV-1ポリAシグナルを含有するR-U5を含有する。supA(2pA)LTRは、上流エンハンサー(USE;この場合はSV40後期ポリA)の上流に逆向きのポリA(図示せず;この場合はSV40初期ポリA)とGU-ボックス(iGU7;この場合はベータグロビンポリAに基づく「SPA」ポリAからの)とを保有する。USEの下流には異種ポリAシグナル(SV40後期PAS)、GU2により改変されたR領域があり、U5領域(白色のX)のネイティブHIV-1ポリAシグナルが変異していてもよい。LTR間の他のすべての態様は、図72に記載したものと同一であり、変異したMSDを含んだ。LVを使用して、MOI 1で接着HEK293T細胞を形質導入し、次いで10日間継代培養し、ベクターコピー数を得るために組込みアッセイを行った(HIV-Psi qPCR)。総RNAを抽出し、HIV-Psi RNAとGAPDH mRNAとをRT-qPCRによって定量した。各培養において動員されたHIV-Psi RNA(すなわち、5'LTRのリードスルー)の尺度を提供するために生成されたGAPDH mRNAに対する相対的なHI

40

50

V-Ps i RNA比（ベクターコピー数に対して正規化）；これらは、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーターを有する各LVについて、標準的なwPRE/SIN-LTRバリエーションを保有するLVのリードイン値との比較でプロットされている（100%に設定、黒色のバー）。

【図76-1】～

【図76-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3' UTRエレメントを保有する組み込まれた「Max Pax」（ベクターイントロン）LV-GFPの5' LTRへの転写リードインを示す図である。この図は、図73のLVの逆転写及び組み込みから得られた、5'から3' LTRまでの、それぞれの場合の組み込まれたLV DNAカセットの構造を示す。したがって、5' LTRと3' LTRとは同一である。標準的なSIN LTRは、欠失したU3領域（ΔU3）、及びネイティブHIV-1ポリAシグナルを含有するR-U5を含有する。supA（2pA）LTRは、上流エンハンサー（USE；この場合はSV40後期ポリA）の上流に逆向きのポリA（図示せず；この場合はSV40初期ポリA）とGU-ボックス（iGU7；この場合はベータグロビンポリAに基づく「SPA」ポリAからの）を保有する。USEの下流には異種ポリAシグナル（SV40後期PAS）、GU2により改変されたR領域があり、U5領域（白色のX）のネイティブHIV-1ポリAシグナルが変異していてもよい。LTR間の他のすべての態様は、図73に記載したものと同一であり、変異したMSD及びRREのVIによる置き換え、並びに短縮化されたgag-Psiを含んだ（図示せず）。LVを使用して、MOI 1で接着HEK293T細胞を形質導入し、次いで10日間継代培養し、ベクターコピー数を得るために組み込みアッセイを行った（HIV Psi qPCR）。総RNAを抽出し、HIV-Psi RNAとGAPDH mRNAとをRT-qPCRによって定量した。各培養において動員されたHIV-Psi RNA（すなわち、5' LTRのリードスルー）の尺度を提供するために生成されたGAPDH mRNAに対する相対的なHIV-Psi RNA比（ベクターコピー数に対して正規化）；これらは、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーターを有する各LVについて、標準的なwPRE/SIN-LTRバリエーションを保有するLVのリードイン値との比較でプロットされている（100%に設定、黒色のバー）。

【図77-1】～

【図77-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3' UTRエレメントを保有する組み込まれた標準的なLV-GFPの相対的な導入遺伝子発現を示す図である。この図は、図74に記載されている組み込まれたLVの構成を再掲したものである。MOI 1でLVを形質導入した接着HEK293T細胞（図71及び74による）を、形質導入の3日後にフローサイトメトリーによって解析し、%GFP陽性細胞と中央蛍光値（MFI）とを乗じることによりGFP発現スコアを作製した。これらのESスコアを、形質導入の10日後に生成したベクターコピー数で割った（HIV Psiに対するqPCRによる）。得られた「相対的なGOI Exprn」値を、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーター（100に設定、黒色のバー）を有する各LVについて、標準的なwPRE/SIN-LTRを保有するLVの値と比較してプロットする。

【図78-1】～

【図78-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3' UTRエレメントを保有する組み込まれた標準的なLV-GFPの相対的な導入遺伝子発現を示す図である。この図は、図75に記載されている組み込まれたLVの構成を再掲したものである。MOI 1でLVを形質導入した接着HEK293T細胞（図72及び75による）を、形質導入の3日後にフローサイトメトリーによって解析し、%GFP陽性細胞と中央蛍光値（MFI）とを乗じることによりGFP発現スコアを作製した。これらのESスコアを、形質導入の10日後に生じたベクターコピー数で割った（HIV Psiに対するqPCRによる）。得られた「相対的なGOI Exprn」値を、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーター（100に設定、黒色のバー）を有す

る各LVについて、標準的なwPRE／SIN-LTRを保有するLVの値と比較してプロットする。

【図79-1】～

【図79-2】異なる導入遺伝子プロモーター、SIN又はsupA-2pA LTR、及び代替の3' UTRエレメントを保有する組み込まれた標準的なLV-GFPの相対的な導入遺伝子発現を示す図である。この図は、図76に記載されている組み込まれたLVの構成を再掲したものである。MOI 1でLVを形質導入した接着HEK293T細胞（図73及び76による）を、形質導入の3日後にフローサイトメトリーによって解析し、%GFP陽性細胞と中央蛍光値（MFI）とを乗じることによりGFP発現スコアを作製した。これらのESスコアを、形質導入の10日後に生じたベクターコピー数で割った（HIV Psiに対するqPCRによる）。得られた「相対的なGOI Exprn」値を、導入遺伝子を駆動する同じ内部プロモーター（100に設定、黒色のバー）を有する各LVについて、標準的なwPRE／SIN-LTRを保有するLVの値と比較してプロットする。

10

【図80】「機能化された3' UTR」を有するベクター-イントロンゲノムの逆向きの導入遺伝子カセット内でのCARE／ZSL1 3' UTRエレメントの使用を示す図である。この図は、図68及び69の構造に対する代替的な構造を提供する。イントロンを含有するカセットのオンボーディングを可能にするために、ベクター-イントロンLV内の逆向きの導入遺伝子の構成が望ましい。この事例では、機能化された3' UTRは2つの自己切断リボザイム（Z）を含有する。この場合、導入遺伝子はCARE.8t／ZSL1エレメント（CAZL）と共に使用され、CARE.8t／ZSL1エレメントはVIを切除された配列の外側に配置されるため、送達されたLV導入遺伝子カセットに残ることになる。

20

【図81】「機能化された3' UTR」を有するベクター-イントロンゲノムの逆向きの導入遺伝子カセット内でのCARE／ZSL1 3' UTRエレメントの使用によりアウトプット力価が改善されることを示す図である。図80に基づくベクター-イントロンLVを、+／- CARE／ZSL1 3' UTRエレメント（別名「CAZL」）及び上の鎖にコードされたVI内の3' UTRを機能化する+／-二重リボザイムで作製した。LVは懸濁（無血清）HEK293T細胞で生成し、生成後のGFP発現レベルをフローサイトメトリーによって測定した（%GFP×MFI）。ベクター上清を接着HEK293T細胞でフローサイトメトリー及び組込みアッセイ（HIV Psiに対するqPCR）によって、それぞれ形質導入の3日後及び10日後に力価測定した。データは、順向きの導入遺伝子カセット（EF1a-GFP）及びwPRE（100％に設定）を含有する標準的なLVに対して正規化した。

30

【発明を実施するための形態】

【0083】

ヌクレオチド配列及びヌクレオチド配列のセット

本発明者らは、驚くべきことに、

1) LVゲノム発現カセット内の改変されたポリアデニル化（ポリA）配列を利用することは、形質導入された細胞において、パッケージングのためのベクターゲノムRNAの簡素化された生成、導入遺伝子発現の改善及び転写リードイン及びリードアウト（ベクターゲノム発現カセット及び導入遺伝子発現カセットの両方）の低減をもたらすこと、

40

2) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に新規の短いシス作用性配列を、伝統的なPREに加えて有する、標的細胞において導入遺伝子発現をブーストし、又はこれらのより長いPREを完全に置き換えて、標的細胞における高レベルの導入遺伝子発現を維持しながら、導入遺伝子の容量の増大を可能にするための、ウイルスベクター、

3) イントロンのベクターゲノム発現カセット中への導入によって、rev応答エレメント（RRE）の除去が促進され、これによって、ベクター中のより多くの導入遺伝子の容量が可能になること、並びに

4) 導入遺伝子タンパク質の不要な効果を最小にするために、及び活発に転写される逆

50

向きの導入遺伝子カセット（導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対してすべて又は一部が逆向きである）を保有するレトロウイルスベクターの力価を救済するために、RNAiをレトロウイルスベクター生成細胞において利用して、レトロウイルスベクター生成の際にNOI（すなわち導入遺伝子）の発現を抑制できること

を見出した。

【0084】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列は、3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む。

10

【0085】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された5'LTRを含み、改変された5'LTRのR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント(DSE)を含む。

【0086】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセットを含む。

【0087】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

20

【0088】

一部の実施形態では、ベクターイントロンは、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0089】

さらなる態様では、本発明は、導入遺伝子発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、(a)シス作用性細胞質蓄積領域(CAR)配列及び／又は(b)シス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

30

【0090】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0091】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されている。

【0092】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメント(RRE)を含まない。

40

【0093】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位は、不活化されている。

【0094】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある。したがって、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンは、転写的に反対ではない場合がある。

【0095】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現

50

カセットに対して逆向きである。したがって、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンは、転写的に反対である。

【0096】

一部の実施形態では、

a) ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに／あるいは

b) ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに／あるいは

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

10

【0097】

一部の実施形態では、ベクターイントロンは、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0098】

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含み、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位及びメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、

20

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに

iv) a) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、

i. ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに

ii. ヌクレオチド配列が、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列及び／又は配列CAGACA及び／又はGTGGAGACTを含む、並びに

30

iii. 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、ベクターイントロンを含み、並びに

b) ベクターイントロンが、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0099】

上記のように、本明細書で記載される本発明の態様のうち任意の1つ又は2つ以上を組み合わせることができる。これは、各態様の驚くべき、有益な効果は、組合せで達成され得る、すなわち、各態様を含むことは、相加及び／又は相乗作用を有するという利点を提供する。

【0100】

適宜、本明細書で記載される本発明の態様のうち任意の2つを組み合わせてもよい。適宜、本明細書で記載される本発明の態様のうち任意の3つを組み合わせてもよい。適宜、本発明の態様のうち任意の4つを組み合わせてもよい。適宜、本明細書で記載される本発明のすべての態様を組み合わせてもよい。したがって、本発明の1つの態様に関する本明細書で記載される本発明の実施形態のすべてはまた、本発明のありとあらゆる他の態様に関する。

40

【0101】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノ

50

ム発現カセットは、導入遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0102】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改造された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0103】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改造されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0104】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改造された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0105】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改造されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0106】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改造された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0107】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改造されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0108】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改造された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

10

20

30

40

50

## 【0109】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

## 【0110】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

10

## 【0111】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

20

## 【0112】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

30

## 【0113】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

40

## 【0114】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含む。

## 【0115】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノ

50

ム発現カセットは、導入遺伝子発現カセットを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0116】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0117】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0118】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0119】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRは、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列を含み、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された5' LTRを含み、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書で記載されるような導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのシス作用性配列を含み、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は本明細書で記載されるような1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0120】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメント(RRE)を含まない。

【0121】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されており、任意選択でメジャースプライスドナー部位の3'の、潜在的スプライスドナー部位が不活化されている。不活化されたメジャースプライスドナー部位は、配列番号4に示される配列を有し得る。

【0122】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、トリプトファンRNA結合転写減衰タンパク質(TRAP, tryptophan RNA-binding attenuation protein)結合部位をさらに含む。

10

20

30

40

50

## 【0123】

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、前記改変されたU1 snRNAは、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている。

## 【0124】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している。

## 【0125】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列を含み、ウイルスシス作用性配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム（ORF, open reading frame）は破壊されている。

10

## 【0126】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列は、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV, Woodchuck hepatitis virus）転写後調節エレメント（WPRE）及び／又はRev応答エレメント（RRE）である。

## 【0127】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含み、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム（ORF）は破壊されている。

20

## 【0128】

一部の実施形態では、少なくとも1つの内部ORFは、ヌクレオチド配列内の少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊されている、好ましくは、ヌクレオチド配列内の最初のATG配列が変異している。

## 【0129】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、(i) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片（fragment）を欠く。

## 【0130】

一部の実施形態では、Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片は、p17不安定性エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む。

30

## 【0131】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列は、Gag-p17又はその断片を発現しない。

## 【0132】

一部の実施形態では、前記Gag-p17の断片は、p17不安定性エレメントを含む。

## 【0133】

一部の好ましい実施形態では、導入遺伝子は治療効果をもたらす。

## 【0134】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV又はビスナレンチウイルスに由来する。

40

## 【0135】

本発明者らは、驚くべきことに、ベクター生成の際の導入遺伝子タンパク質の不要な効果を最小にするために、及び／又は活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセットを保有するレンチウイルスベクターの力価を救済するために、RNAiをレンチウイルスベクター生成細胞において利用して、レンチウイルスベクター生成の際にNOI（すなわち導入遺伝子）の発現を抑制できることを見出した。導入遺伝子mRNAに対して特異的な干渉RNAの使用によって、新規タンパク質合成阻害及び／又は他のdsRNA感知経路の結果を回避するための機構が提供され、逆向きの導入遺伝子レンチウイルスベクター力価の

50

救済が可能になる。干渉RNAは、本明細書で記載されるような干渉RNAである。そのようなものとして、干渉RNAは、導入遺伝子mRNAに標的化され、その結果、細胞質に位置するmRNAのいずれもが、RNAi媒介性分解及び／又は切断、好ましくは、切断の標的となる。

#### 【0136】

干渉RNAは、レンチウイルスベクター生成の際にトランスで又はシスで提供され得る。したがって、干渉RNA発現カセットは、レンチウイルスベクター生成の際にレンチウイルスベクター構成成分と同時発現され得る（その結果、干渉RNAは、トランスで提供される）。あるいは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、ベクターイントロンをさらに含み、ベクターイントロンは、干渉RNAをコードする核酸配列を含む（その結果、干渉RNAは、シスで提供される）。

10

#### 【0137】

したがって、一態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明の干渉RNAをコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

#### 【0138】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

#### 【0139】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列及び本発明の干渉RNAをコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

20

#### 【0140】

一部の実施形態では、核酸配列のセットは、レンチウイルスベクターゲノムをコードする第1の核酸配列及び干渉RNAをコードする少なくとも第2の核酸配列を含む。好ましくは、第1の及び第2の核酸配列は、別個の核酸配列である。適宜、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含まない場合がある。

30

#### 【0141】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含む。

#### 【0142】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクター構成成分は、gag-pol、env、及び任意選択で、revを含む。

#### 【0143】

配列がアップグレードされたポリアデニル化LTR

真核生物では、ポリアデニル化は、翻訳のためのmRNAの成熟の一部であり、mRNA転写物へのポリアデニン（ポリ（A））テールの付加を含む。ポリ（A）テールは、複数のアデノシンリン酸を含み、mRNAの核外輸送、翻訳及び安定性にとって重要である。ポリアデニル化のプロセスは、遺伝子の転写が終結すると始まる。細胞タンパク質のセットは、ポリA配列エレメントに結合し、その結果、転写されたpre-mRNAの3'セグメントがまず切断され、続いて、mRNAの3'末端でポリ（A）テールが合成される。代替ポリアデニル化では、ポリ（A）テールは、いくつかのあり得る部位のうち1つに付加され、単一遺伝子から複数の転写物を生成する。

40

#### 【0144】

ネイティブレトロウイルスベクターゲノムは、通常、3'及び5'長い末端反復配列（LTR）と隣接している。ネイティブレトロウイルスLTRは、U3領域（転写に必要なエンハンサー／プロモーター活性を含有する）、並びにパッケージング、スプライシング、

50

ポリアデニル化及び翻訳を含むいくつかの機能を調節する重要なシス作用性配列を含む R-U5 領域を含む。効率的な転写終結に必要とされるレトロウイルスポリアデニル化（ポリ A）配列もまた、ネイティブレトロウイルスLTR内に存在する（図1及び図6を参照されたい）。

#### 【0145】

pol-II 転写を終結するためのポリアデニル化配列の機能的エレメントの通常の構造及び間隔は、十分に特性決定されており（Proudfoot (2011), Genes & Dev. 25: 1770-1782）、以下を有すると簡単にまとめることができる：[1] コアポリアデニル化シグナル（PAS；カノニカル配列AAUAAA）、[2] 通常PASの15～30ヌクレオチド下流の切断部位（多くは「CA」モチーフで）、[3] 下流GUリッチ下流エンハンサー（DSE）、広くPASの約100ヌクレオチド内（通常、強力なポリアデニル化配列について20ヌクレオチドを有する）及び[4] 上流エンハンサー（USE）、広くPASの約60ヌクレオチド内（図1を参照されたい）。

10

#### 【0146】

宿主細胞及びウイルス遺伝子発現レベルは、USE及び／又はDSEの存在／非存在又は強度によって調節することができ、そのため、ポリアデニル化配列の例には大きな多様性があることが認識される。極めて強いウイルスポリアデニル化配列、例えば、サルウイルス40（SV40）後期ポリAは、130ヌクレオチド未満の配列内にこれらのエレメントのうち4つすべてを含有する、また、USEを完全に欠き、全体で50ヌクレオチド未満であるウサギベータグロビンポリアデニル化配列に基づく強力な合成ポリA配列が記載されている（Proudfoot (2011), Genes & Dev. 25: 1770-1782）。それにもかかわらず、これら4つの共通のエレメントは、転写終結効率に寄与すると広く受け入れられており、HIV-1を含むレトロウイルスLTRにおいて利用されると示されている。

20

#### 【0147】

上記で概説されるように、HIV-1ポリアデニル化のためのPAS、切断部位及びDSEはすべて、LTRのR-U5領域中に位置づけられ、これはまた、ゲノムvRNAのビリオンへの組み立てのためのより広いパッケージングシグナルの一部を形成する（図6を参照されたい）。レトロウイルスは、LTRの配列が同一であるにもかかわらず、5'LTRから駆動される転写活性と3'LTRでの効率的なポリアデニル化のバランスをとる必要性のために、通常、極めて強力なポリアデニル化配列を利用しない。これは、5'LTR vRNA配列は、すぐ下流のRNAの存在（終結のために3'LTRの下流には存在しないであろう）、及び3'LTR転写RNA中に存在する、5'LTRのU3によってコードされるRNAがないことのために3'LTRと比較してわずかに異なる構造をとる場合があるという事実によって部分的に対処され得る（Das et al. (1999), Journal of virology 73: 81-91；及びKlasens et al. (1999), Nucleic Acids Res. 27: 446-54）。実際、HIV-1 U3はまた、プロモーター配列をオーバーレイするポリAエンハンサー配列を含有するということがわかっている（DeZazzo et al. (1991), Mol. Cell. Biol. 11:1624-30；及びGilmartin et al. (1995) Genes Dev. 9: 72-83）。

30

40

#### 【0148】

自己不活化LTR（SIN-LTR）特徴は、本質的にU3領域内に欠失を導入し、その結果、逆転写の際のLTRコピー機構のためにエンハンサー／プロモーター活性が消失し、これは5'又は3'LTRのいずれかで（それらの配列が同一であるので）、転写活性のない、又は極めて最小の転写活性を有する統合されたLVゲノム発現カセットをもたらす。これは、SIN-LTRを含有するLVの転写的に活性な構成成分のみが、統合されると、導入遺伝子カセット由来であることを意味する。U3が欠失したLTRは、野生型、非U3欠失LTRと比較してより少ないポリアデニル化活性を有すると示されており（Yang et al. (2007), Retrovirology 4:4）、これは、LV内のSIN-LTRが同じ様式で制限されるであろうということを示す。

50

## 【0149】

以下に記載され、図2Aに提示されるように、LV、特に、SIN-LTR含有LV内の弱いPASのいくつかの結果がある；

1) ベクター生成の際のLV発現カセットの3'LTR (例えば、3' SIN-LTR) の転写リードスルー。これは、パッケージングするには長すぎる、又はvRNAの低い定常状態存在量をもたらす場合がある伸長されたベクターゲノムRNA (vRNA) につながる。この問題の現在の解決策は、バックアップとして3'LTRの下流数百ヌクレオチド以内に、強力な異種ポリアデニル化配列 (例えば、後期SV40ポリA) を利用し、このようにして、3'LTRの転写リードスルーの事象においてvRNAのサイズを低減することである。

10

## 【0150】

2) 形質導入された細胞における導入遺伝子カセットの転写リードスルー。これは、導入遺伝子mRNAの伸長された3'UTRにつながり、導入遺伝子mRNAのより低い定常状態レベルにつながる場合がある。

## 【0151】

3) 転写リードスルーによる、形質導入された細胞における3'LTR (例えば、3' SIN-LTR) の下流の細胞遺伝子の転写。これは、機能的RNAの不適当な発現又は(「ダーク」) プロテオームの翻訳をもたらす。通常、「ダーク」プロテオームによって、「ジャンク」オープンリーディングフレーム (機能を有せず、ミスフォールディング応答を誘発する可能性が高い) 又はもはやRNAに転写されない (例えば、その上流プロモーターの変異のために) ORFのいずれかを意味する。不要な転写リードスルーは、したがって、このような「ジャンク」ORFの機能獲得型の発現をもたらす可能性がある。

20

## 【0152】

4) 形質導入された細胞における細胞遺伝子からの5'LTR (例えば、5' SIN-LTR) による転写リードイン。これは、LVパッケージングシグナル及びRRE配列をコードするRNAの生成、並びに内部導入遺伝子プロモーターの干渉の可能性につながる。同じ機構が、形質導入された細胞における、例えば、導入遺伝子発現が組織特異的プロモーターによってそうでなければ制限されるであろう形質導入された細胞における導入遺伝子タンパク質の不適当な発現をもたらす場合がある。

## 【0153】

5) 形質導入された細胞におけるLVゲノム内のメジャースプライスドナー部位への5'LTR (例えば、5' SIN-LTR) による転写リードイン。(環状(すなわち、プラスミド) DNAを使用する場合に、転写「リードアラウンド」が生じる可能性があるので、これはまたLV生成の際にあり得る可能性がある)。これによって、導入遺伝子RNAの下流の不適当なスプライシング及び/又は他の細胞性pre-mRNA転写物へのトランススプライシングが可能になる場合がある。

30

## 【0154】

本発明者らは、驚くべきことに、改変されたポリA配列を、LV LTRによる転写リードアウト及び/又はリードインを低減する(例えば、大きく最小化する) 及び/又は排除するように設計できることを見出した。したがって、本発明は、改変されたポリA配列を提供する。図2Bは、SIN-LTRを本発明の簡単な概要と対比させる。手短には、記載された問題を克服するために、本発明は、新規の改変されたLTR(「配列がアップグレードされたポリA」LTR又は「supA-LTR」と称する) をもたらす4つの主要な側面によって定義され得る：

40

## 【0155】

1. 新規PASをSIN/U3領域中に導入し、その結果、それがポリアデニル化のための主に機能的なPASになるステップ。これを記載する別の方法は、主に機能的なPASを転写開始部位(TSS)境界(TSSは、U3/R境界としても定義される)を超えて「移動させる」ことである。改変を説明するさらに別の方法は、改変された3' SIN-LTRでは(現在のHIV-1ベースのLVとは異なり)、すべての保持されるR領域

50

配列が、主に機能的な P A S の下流に位置づけられていることである。

【0156】

2. 主に機能的な P A S (1に従って配置される)とポリアデニル化切断部位の間に、最小であるが「十分な」長さの R 領域配列をコードし、その結果、[1] ポリアデニル化活性が高く(又は転写リードスルーが極めて低いと実証される)、[2] 第1の鎖転移のプロセスが効率的に保持され(図3を参照されたい)、高力価ベクター生成につながる(すなわち、維持される)ステップ。

【0157】

3. S I N / U 3 領域内へ U S E を含む配列を挿入し、したがって、U S E を新規の主な P A S に近接して配置するステップ。

【0158】

4. 5' R 領域—好ましくは、第1のステムループ(すなわち、T A R ループ)—を、切断領域及び G U リッチ D S E をコードするように操作し、その結果、L V の形質導入／統合後に、D S E が、5' 及び 3' L T R の両方内の新規の主な P A S に近接して配置される(すなわち、それらは両方とも s u p A - L T R となる)ステップ。新規 D S E 配列は、第1のステムループ内に配置されなくてはならず、その結果、R 領域配列の少なくとも同じ「最小であるが十分な」長さが保持され、その結果、第1の鎖転移が効率的に起こることができ、理想的には、操作された 5' R 領域がステムループ構造を保持すると予測される。

【0159】

図7は、本発明の4つの主要な側面を利用する、新規 L V ゲノム発現カセットの一般的な特徴を示す。本発明を使用して、上記の4つの側面に従って既知又は合成 U S E / D S E を使用することによって、いかなる数の「s u p A - L T R」も作製できる可能性がある。

【0160】

したがって、一態様では、本発明は、本明細書で記載されるような改変されたポリA配列を含む改変された 3' L T R を提供する。改変されたポリA配列は本質的に、3' U 3 / R 境界を越えて P A S を再配置し(すなわち、P A S を 3' R 領域から 3' U 3 領域に再配置し)、その結果、P A S は、統合された L V において 3' L T R から 5' L T R にコピーされるように改変されている。例示的な例として、これは、L V v R N A 発現カセットの 3' L T R から 3' R - U 5 領域全体を欠失させ、この配列をサルウイルス 40 (S V 40) 後期ポリA配列(すなわち、S V 40 U S E、P A S 及び G U リッチ D S E 配列)と置き換えることによって最も容易に達成され、L V v R N A の 5' R 領域からヌクレオチド 1 ~ 20 と同一であるヌクレオチドが、S V 40 P A S のすぐ下流(6ヌクレオチド以内)に挿入され、したがって、この R 領域配列が、P A S と切断部位 / G U リッチ D S E 配列の間に位置づけられる。P A S と切断部位 / G U リッチ D S E の間の異種配列の一部が、欠失し、前記 R 領域配列と置き換えられてもよい。改変されたポリA配列は、本明細書において、「R が埋め込まれた異種ポリアデニル化配列」と呼ばれる。これらの改変の結果として、効率的なポリアデニル化が、L V v R N A 3' 切断部位で生じ、これは、通常、埋め込まれた R 配列の 3' 末端に位置づけられ、v R N A の 5' 及び 3' 末端の両方で(R 領域中の)、約 20ヌクレオチドの相同性をもたらし、これによって、逆転写の際の効率的な第1の鎖転移が可能になる。

【0161】

本発明者らは、驚くべきことに、この改変されたポリA配列構成を利用して、3' L T R で転写終結を改善でき、同時に、v R N A 切断(ポリアデニル化の前)によって、第1鎖合成を保持するのに十分な 5' R 領域との 3' R 領域相同性が可能になることが保証されることを見出した。有利なことに、本発明者らは、改変されたポリA配列が使用される場合には、v R N A 発現カセットの下流にバックアップ異種ポリアデニル化配列が必要とされないことを見出した。本明細書で記載されるような改変されたポリA配列を含むレンチウイルスベクターゲノム発現カセットの転写リードイン及び／又はリードアウトは、本明

10

20

30

40

50

細書で記載されるような改変されたポリA配列を含まない対応するレンチウイルスベクターゲノム発現カセットと比較して低減され得る。

【0162】

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列は、3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む。

【0163】

一実施形態では、レンチウイルスベクターをコードするヌクレオチド配列は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列である。

【0164】

したがって、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列は、3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む。

【0165】

好ましくは、レンチウイルスベクターは、SINレンチウイルスベクターである。したがって、好ましくは、レンチウイルスベクターゲノム（例えば、統合されたレンチウイルスベクターゲノム）は、5'及び3'SIN-LTRを含む。

【0166】

一部の実施形態では、3'LTRは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対してセンス方向に、ポリA配列（例えば、本明細書で記載されるような改変されたポリアデニル化配列）を含む。

【0167】

一部の実施形態では、3'LTRは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対してアンチセンス方向にポリA配列をさらに含む。したがって、3'LTRは、ポリA配列をセンス方向に、及びポリA配列をアンチセンス方向に含む得る。

【0168】

本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化配列」又は「ポリA配列」という用語は、mRNAの切断及びポリアデニル化に必要とされる配列を指す。したがって、ポリA配列は、転写終結シグナルとして効果的に作用する。ポリA配列は、通常、ポリアデニル化シグナル(PAS)、ポリA下流エンハンサーエレメント(DSE)及びポリアデニル化切断部位を含む。適宜、ポリA配列が機能的である（すなわち、ポリアデニル化／終結を促進する）ことを確実にするために、六量体PASがPASに対して正しく配置される。適宜、機能的ポリA配列はまた、ポリA上流エンハンサーエレメント(USE)を含み得る。

【0169】

本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化シグナル」又は「PAS」という用語は、mRNAのポリアデニル化／終結にとって必要とされるネイティブポリA配列内の中心の六量体配列モチーフを意味する。PASは、RNA切断複合体内の切断及びポリアデニル化特異性因子(CPSF)によって認識される配列モチーフである。この配列モチーフは、真核生物の間で変わるが、主にAAUAAAである。CPSFは、ポリアデニル化mRNAの3'プロセッシング機構の中心構成成分であり、PASを認識し、それによって、pre-mRNA切断及びポリアデニル化の両方において配列特異性を提供し、pre-mRNA切断を触媒する。

【0170】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、異種ポリアデニル化配列である。

【0171】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、異種ポリアデニル化シグナル

10

20

30

40

50

を含む。

【0172】

異種ポリA配列又はPASは、任意の適切な供給源に由来し得る。このような供給源は、ネイティブである、すなわち、生物に直接由来する場合も、又は合成である、すなわち、部分的若しくは完全に非ネイティブである場合もある。例えば、合成配列は、ネイティブ配列のバリエーション（例えば、キメラ配列、改変された配列など）である場合も、又はネイティブ配列をベースとしない配列である場合もある。本発明に従って使用するための適切な異種ポリアデニル化配列及びポリアデニル化シグナルは、SV40、ウサギベータグロビン遺伝子及びヒト又はウシ成長ホルモン遺伝子中に見出すことができる。

【0173】

例示的な異種ポリA配列を以下に提供する：

SV40後期ポリアデニル化配列（USE、イタリック体で、PAS、太字で、GURリッチDSE、下線が引かれている）

TTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCT  
TTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAAC  
AACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGT（配列番  
号86）

【0174】

ウサギベータグロビンポリアデニル化配列（PAS、太字で、GURリッチDSE、下線が引かれている）

GAATTCACCTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAA  
TACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT  
GGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC  
ATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATAT  
GCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTC  
CTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTT  
AACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCAT  
AGCTGTCCCTCTTCTCTTAT（配列番号87）

【0175】

ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（PAS、太字で、GURリッチDSE、下線が引かれている）

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA  
CTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG  
GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG  
GGCTCTATGG（配列番号88）

【0176】

ヒト成長ホルモンポリアデニル化配列（PAS、太字で、GURリッチDSE、下線が引かれている）

CTAGCTGCCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGT  
GCCCACCAGCCTTGTCTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTA  
TGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATT

GGGAACCAAG（配列番号 8 9）

【0177】

一部の実施形態では、異種ポリ A 配列は、配列番号 8 6 ～ 8 9 のいずれか 1 つに示される通りである。

10

【0178】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、サルウイルス 4 0（SV40）、ウサギベーターグロビン遺伝子、ヒト若しくはウシ成長ホルモン遺伝子に由来する、又はそのバリエーションである。適宜、異種ポリ A 配列は、本発明による改変されたポリ A 配列に到達するように本明細書に記載されるように改変されている（例えば、ポリ A 配列内に埋め込まれた R 領域に）。

【0179】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、合成配列である。

【0180】

一部の実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、DNA 発現カセットにコードされる配列 AATAAA を有する。

20

【0181】

一部の実施形態では、PAS は、配列 AAUAAA を有する。他の PAS、例えば、AUUAAA、AGUAAA、UAUAAA、CAUAAA、GAUAAA、AAUUAU、AAUACA、AAUAGA、AAAAAG 及び ACUAAA（Beaudoing et al. (2000), Genome Res. 10: 1001-1010）が公知である。

【0182】

本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化切断部位」又は「ポリ A 切断部位」という用語は、ポリアデニル化の際の mRNA の 3' 末端切断の部位及びポリアデニンが付加される部位のヌクレオチドを意味する。通常、ポリ A 切断部位は、PAS と DSE の間に配置される。

30

【0183】

本明細書で使用される場合、「上流エンハンサーエレメント」又は「USE」という用語は、「上流配列エレメント」という用語と同義的に使用され、3' 末端プロセッシング効率の増強エレメントとして作用するヌクレオチド配列を意味する。通常、ネイティブポリ A 配列では、USE は、PAS のすぐ上流近傍にある。

【0184】

本明細書で使用される場合、「下流エンハンサーエレメント」又は「DSE」という用語は、「下流配列エレメント」という用語と同義的に使用され、3' 末端形成を増強する GT/U リッチヌクレオチド配列（又は「GU-ボックス」）を意味する。「GT/U リッチヌクレオチド配列」とは、GT リッチ DNA 配列又は GU リッチ RNA 配列を意味する。通常、ネイティブポリ A 配列では、DSE は、3' LTR 中の mRNA の 3' 末端の下流近傍に位置づけられる。

40

【0185】

逆転写の際にコピーされ、その結果、5' 及び 3' LTR の両方内に存在する、改変されたポリ A 配列の使用の結果として、5' 及び 3' R 領域内のネイティブレトロウイルスポリ A シグナルを機能的に変異又は欠失させることができる。適宜、内因性（すなわち、ネイティブ）ポリ A シグナルを、ポリアデニル化を促進するようにはや機能しないように変異させてもよい。

【0186】

50

一部の実施形態では、ネイティブ 3' ポリアデニル化配列は、変異又は欠失している。

【0187】

一部の実施形態では、ネイティブ 3' ポリアデニル化シグナル又はネイティブ 5' ポリアデニル化シグナルは、変異又は欠失している。

【0188】

強力なポリ A 配列は、mRNA の効率的なポリアデニル化を媒介する、すなわち、効率的なポリアデニル化を媒介しないポリ A 配列に対してポリ A 配列の転写リードスルーを低減又は最小にする。通常、強力なポリ A 配列は、本明細書で記載されるようなポリアデニル化を増強するために、適当に配置された、カノニカル AAUAAA PAS 並びに明確に定義された USE 及び／又は DSE の両方を有する (DSE については、これは切断部位の約 100 ヌクレオチド内であり得る、通常、強力なポリアデニル化配列については、20 ヌクレオチドである)。

【0189】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、強力なポリアデニル化配列である。

【0190】

一部の実施形態では、3' LTR の R 領域の 5' にあるポリアデニル化シグナルは、センス鎖にある。適宜、3' LTR の R 領域の 5' にあるポリアデニル化シグナルは、レンチウイルスベクターゲノムに対してセンス方向にある。

【0191】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、ポリアデニル化上流エンハンサーエレメント (USE) をさらに含む。

【0192】

一部の実施形態では、USE は、ポリアデニル化シグナルの 5' にある。

【0193】

一部の実施形態では、USE は、配列番号 83 で示される配列を含む。

【0194】

一部の実施形態では、USE は、配列番号 83 で示される配列を有する。

【0195】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、GT/U リッチ下流 エンハンサーエレメントを含む。

【0196】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、CFIm25/68 によって結合される下流エンハンサーエレメントを含む。

【0197】

一部の実施形態では、GT/U リッチ下流エンハンサーエレメントは、ポリアデニル化シグナルの 3' である。

【0198】

一部の実施形態では、エンハンサーエレメントは、強力なエンハンサーエレメントである。USE について、これらは、PAS の上流近傍に配置される場合に、PAS でポリアデニル化／終結に強力な増強を付与すると知られるネイティブ又は合成 RNA 配列であり得る、また CFIm 複合体に結合すると知られている RNA 配列に由来し得る (Yang et al. (2011), Structure 19: 368-377)。DSE について、これらは、PAS の上流近傍に配置される場合に、PAS でポリアデニル化／終結に強力な増強を付与すると知られるネイティブ又は合成 RNA 配列であり得る、また CSTF-64 に結合すると知られている RNA 配列に由来し得る (Takagaki and Manley (1997), Molecular and Cellular Biology 17: 3907-3914)。

【0199】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列の 3' LTR R 領域は、最小の R 領域である。

10

20

30

40

50

## 【0200】

本明細書で使用される場合、「R領域」及び「埋め込まれたR領域」という用語は、本発明の改変された3'LTR及び／又は改変された5'LTRの文脈において、PASとポリA切断部位の間の配列を意味する。好ましくは、R領域は、5'ベクターゲノムの末端ヌクレオチド内に適切な相同性を有する。適宜、R領域は、PASとポリA切断部位の間に存在する内因性配列であっても、又は異種配列であってもよい。適宜、本発明の改変された3'LTR又は改変された5'LTR内のR領域は、ネイティブR領域であっても、その一部分であってもよい。ネイティブR領域の一部分は、最小R領域であり得る。R領域は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット内の転写開始部位の50nt内の配列であり得る。

10

## 【0201】

本明細書で使用される場合、「最小の機能的R領域」又は「最小のR領域」という用語は、全長R領域配列の機能を保持する短縮化された3'R領域配列を意味する。したがって、最小の機能的R領域は、ネイティブ5'R領域又は本発明の改変された5'R領域のいずれかを利用する場合に第1の鎖転移が生じるための、3'と5'LTR R領域の間の十分な相同性（すなわち、十分な長さ）を保持する。例えば、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、全長ネイティブ5'R領域を、10、12、14、16、18又は20ヌクレオチドの最小の（埋め込まれた）R領域を含有する改変された3'supA-LTRと組み合わせて利用できる。例えば、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、GUリッチDSEを含有する改変された5'R領域を、10、12、14、16、18

20

## 【0202】

逆転写の際、tRNAプライマーは、5'R-U5領域の下流に位置づけられるプライマー結合部位（PBS）と呼ばれるウイルスゲノム内の相補的配列とハイブリダイズする。次いで、逆転写酵素が、vRNAの5'R-U5領域に対する相補的DNA（cDNA；第1のマイナス鎖DNA）を合成し、続いて、逆転写酵素のRNase HドメインによってvRNA上の5'R-U5領域を分解する。次いで、第1のマイナス鎖DNAがvRNAの3'末端に転移し、vRNAの3'R-U5領域内の相補的R領域とハイブリダイズする。次いで、逆転写酵素が、vRNAの3'R領域からvRNAの5'末端に向けて相補的DNA（cDNA）を合成する。vRNAの大部分は、RNase Hドメインによって分解され、3'PPT及びcPPT配列のみが残る。残存するPPT断片は、PPT断片から始まりvRNAの3'末端で終了する第2鎖合成のプライマーとして機能する。次いで、第2の転移が起こり、新規に合成された第2鎖からのPBSが、第1鎖上の相補的PBSとハイブリダイズし、続いて、両鎖が伸長してcDNA（すなわち、dsDNA）が形成される。

30

## 【0203】

vRNAの逆転写の際の第1の転移の結果として、5'R-U5領域（5'PASを含む）が、vRNAの5'LTRからcDNAの3'LTRにコピーされる。vRNAの逆転写の際の第2の転移の結果として、3'U3領域が、vRNAの3'LTRからcDNAの5'LTRにコピーされる。したがって、cDNAは、5'及び3'末端に同一のLTRを含み、各々は、vRNAの3'U3領域及び5'R-U5領域を含む。

40

## 【0204】

逆転写の正しいプロセスを維持するために、レンチウイルスベクターの3'及び5'LTR内のR領域は、mRNAの末端ヌクレオチド配列が、vRNAの5'末端から生成されたcDNAの第1鎖にアニールすることを可能にするのに十分な長さのものである。ポリアデニンの付加の前にmRNAの切断が、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、マウス乳房腫瘍ウイルス（MMTV）及び同様のレトロウイルスのPASの15～30ヌクレオチド以内であるポリA切断部位で起こることが知られているので、第1の鎖転移（逆転写プロセスの一部としての、LTRをコピーする）に必要とされる5'及び3'R領域相同性の長さ

50

は、＜20ヌクレオチドに制限されなくてはならない。今日まで、効率的な第1の鎖転移を可能にすると示されている相同性の最も短い長さは、マウス白血球ウイルス（MLV）においてのみvRNAの5'及び3'末端の両方のR領域の12ヌクレオチドであると実証されている（Dang and Hu (2001), J. Virol. 75: 809-20）。野生型HIV-1について、野生型3' R領域の長さ（97 nt）及び短縮化されたバージョン（37及び15 nt）を評価する研究が実施され、短縮化されたバージョンの両方が、野生型ウイルスと比較して、それぞれ50%及び5%の漸進的により大きく減衰されたウイルス増殖速度論をもたらした（Berkhaut et al (1995), J. Mol. Biol. 252: 59-69）。他者は、R領域のサイズを、力価に対して明らかな負の影響を及ぼさずに、3' R領域の下流に異種ポリA配列を利用する場合にレンチウイルスベクター内で47ヌクレオチドに低減した（Koldej and Anson (2009), BMC Biotechnol 9:86）。したがって、本発明の以前には、PASと切断部位の間（すなわち、約20ヌクレオチド又はそれより小さい）の3' R領域の短縮化が第1の鎖転移を可能にするのに十分であるか、又は逆転写の一部の他の態様に負の影響を及ぼすか否かは知られていなかった。本発明者らは、驚くべきことに、20ヌクレオチド又はさらには14ヌクレオチドほどへのR領域の短縮化が、逆転写の減衰をもたらさないことを見出した。特に、本発明者らは、予期しないことに、なおさらに10ヌクレオチドへのR領域の短縮化が、標準LVと比較して2～10倍低い力価であるものの、実行可能なレベルのLVの生成を依然として可能にすることを見出した。

10

【0205】

一部の実施形態では、最小R領域は、

- (a) 少なくとも10ヌクレオチド、
- (b) 少なくとも12ヌクレオチド、
- (c) 少なくとも14ヌクレオチド、
- (d) 少なくとも16ヌクレオチド、
- (e) 少なくとも18ヌクレオチド、又は
- (f) 少なくとも20ヌクレオチド

20

の長さである。

【0206】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも10ヌクレオチドの長さである。

【0207】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも12ヌクレオチドの長さである。

30

【0208】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも14ヌクレオチドの長さである。

【0209】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも16ヌクレオチドの長さである。

【0210】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも18ヌクレオチドの長さである。

【0211】

一実施形態では、最小R領域は、少なくとも20ヌクレオチドの長さである。

【0212】

一部の実施形態では、最小R領域は、ネイティブR領域に由来する配列を含む。適宜、最小R領域は、ネイティブR領域の一部である。

40

【0213】

一部の実施形態では、R領域は、配列番号25～36のいずれか1つに示される配列又は配列GTCTCTCTを含む。

【0214】

一実施形態では、R領域は、配列番号25に示される配列を含む。

【0215】

一実施形態では、R領域は、配列番号26に示される配列を含む。

【0216】

50

一実施形態では、R領域は、配列番号27に示される配列を含む。

【0217】

一実施形態では、R領域は、配列番号28に示される配列を含む。

【0218】

一実施形態では、R領域は、配列番号29に示される配列を含む。

【0219】

一実施形態では、R領域は、配列番号30に示される配列を含む。

【0220】

一実施形態では、R領域は、配列番号31に示される配列を含む。

【0221】

一実施形態では、R領域は、配列番号32に示される配列を含む。

【0222】

一実施形態では、R領域は、配列番号33に示される配列を含む。

【0223】

一実施形態では、R領域は、配列番号34に示される配列を含む。

【0224】

一実施形態では、R領域は、配列番号35に示される配列を含む。

【0225】

一実施形態では、R領域は、配列番号36に示される配列を含む。

【0226】

一実施形態では、R領域は、配列GTCTCTCTを含む。

【0227】

一部の実施形態では、R領域は、配列番号25～36のいずれかに示される配列又は配列GTCTCTCTを有する。

【0228】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、レンチウイルスベクターゲノムの5'LTR R領域に対して相同である。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、5'LTR R領域に対して少なくとも60%（適宜、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%）の配列同一性を有し得る。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、ネイティブ5'LTR R領域と5つ未満（適宜、4つ未満、3つ未満、2つ未満又はなし）のミスマッチを有し得る。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、5'LTR R領域と同一である場合がある。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、5'LTR R領域と同一である場合がある。

【0229】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、レンチウイルスベクターゲノムのネイティブ5'LTR R領域に対して相同である。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、ネイティブ5'LTR R領域に対して少なくとも60%（適宜、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%）の配列同一性を有し得る。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、ネイティブ5'LTR R領域と5つ未満（適宜、4つ未満、3つ未満、2つ未満又はなし）のミスマッチを有する場合がある。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、ネイティブ5'LTR R領域と同一である場合がある。改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域は、ネイティブ5'LTR R領域と同一である場合がある。

【0230】

本明細書で使用される場合、「ミスマッチ」という用語は、相補的ではない塩基の存在を指す。したがって、「ミスマッチ」とは、5' R領域内の相補的配列とワトソン-クリ

10

20

30

40

50

ック塩基対形成できない 3' R 領域中の相補的ではない塩基を指す、又は逆もまた同様である。

【0231】

本明細書で記載されるように、R 領域は、ポリ A 配列内に埋め込まれる場合がある。

【0232】

一部の実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 37～54 のいずれか 1 つに示される配列を含む。

【0233】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 37 に示される配列を含む。

【0234】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 38 に示される配列を含む。

【0235】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 39 に示される配列を含む。

【0236】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 40 に示される配列を含む。

【0237】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 41 に示される配列を含む。

【0238】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 42 に示される配列を含む。

【0239】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 43 に示される配列を含む。

【0240】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 44 に示される配列を含む。

【0241】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 45 に示される配列を含む。

【0242】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 46 に示される配列を含む。

【0243】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 47 に示される配列を含む。

【0244】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 48 に示される配列を含む。

【0245】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 49 に示される配列を含む。

【0246】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 50 に示される配列を含む。

【0247】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 51 に示される配列を含む。

【0248】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 52 に示される配列を含む。

【0249】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 53 に示される配列を含む。

【0250】

一実施形態では、3' 改変されたポリ A 配列は、配列番号 54 に示される配列を含む。

【0251】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列の 3' LTR R 領域は、ポリアデニル化シグナルの 0～6 のヌクレオチド下流である。

【0252】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列の 3' LTR R 領域は、ポリアデニル化シグナルのすぐ下流である。

【0253】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、ポリアデニル化切断部位をさらに含む。

【0254】

一部の実施形態では、ポリアデニル化切断部位は、少なくとも1つのCAジヌクレオチドモチーフを含む。適宜、ポリA切断部位は、2つのCAジヌクレオチドモチーフを含む、すなわち、配列CACAを有する。

【0255】

一部の実施形態では、ポリアデニル化切断部位は、ポリアデニル化シグナルの3'である。

【0256】

一部の実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号55～60又は200～208のいずれか1つに示される配列を含む。

【0257】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号55に示される配列を含む。

【0258】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号56に示される配列を含む。

【0259】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号57に示される配列を含む。

【0260】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号58に示される配列を含む。

【0261】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号59に示される配列を含む。

【0262】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号60に示される配列を含む。

【0263】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号200に示される配列を含む。

【0264】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号201に示される配列を含む。

【0265】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号202に示される配列を含む。

【0266】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号203に示される配列を含む。

【0267】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号204に示される配列を含む。

【0268】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号205に示される配列を含む。

【0269】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号206に示される配列を含む。

【0270】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号207に示される配列を含む。

【0271】

一実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号208に示される配列を含む。

【0272】

一部の実施形態では、3'改変されたポリA配列は、配列番号55～60、200又は201のいずれか1つに示される配列を有する。

【0273】

一実施形態では、改変された3'LTRは、U3（例えば、SIN-U3又はΔU3）とRが埋め込まれた異種ポリアデニル化配列の間の改変された3'LTR中にアンチセンス方向でポリアデニル化配列をさらに含む。適宜、アンチセンス方向のポリアデニル化配列は、機能的ポリアデニル化配列である。さらなるポリアデニル化配列は、レンチウイルス

10

20

30

40

50

スペクターゲノムに対してアンチセンス方向である。適宜、さらなるポリアデニル化配列は、センス鎖中のポリアデニル化配列の5'（すなわち、センス鎖中の異種ポリアデニル化配列を含む埋め込まれたR領域の5'）及び3'LTRの（例えば、SIN-LTRの）アタッチメント（attachment）配列の3'、すなわち、U3、SIN-U3又はΔU3の3'（図53を参照されたい）にある。したがって、改変された3'LTRは、センス鎖中の3'LTRのR領域の5'にある第1のポリアデニル化シグナルと、3'LTRのU3（例えば、ΔU3）とRが埋め込まれた異種ポリアデニル化配列の間のアンチセンス鎖中の第2のポリアデニル化配列を含み得る。

【0274】

一実施形態では、改変された3'LTRは、ΔU3とRが埋め込まれた異種ポリアデニル化配列の間の改変された3'LTR中にアンチセンス方向でポリアデニル化配列をさらに含む。適宜、アンチセンス方向のポリアデニル化配列は、機能的なポリアデニル化配列である。

10

【0275】

別の態様では、本発明は、本明細書で記載されるようなGUリッチDSEを含有するように操作されている改変された5'LTRを提供する。本発明者らは、驚くべきことに、統合されたLVゲノムカセットのLTR内の近接した位置でPASに効率的なDSEを提供するために、vRNAの5'R領域を、再現されたLTRにおいて（すなわち、逆転写後のLTRにおいて）DSEとして機能するGUリッチ配列を含有するように操作できることを見出した。逆転写及びLTRコピープロセス後、5'及び3'LTRの両方中のU3領域内に存在するUSE-PAS配列は、この新規DSEによって「サービス」される（すなわち、DSEは、USE-PAS配列に対して作用する）。例示的な例として、改変された5'LTRの5'R領域は、ネイティブHIV-1 5'R領域の最初の20ヌクレオチドを保持するように（その結果、本明細書で記載されたRが埋め込まれた異種ポリアデニル化配列を使用するポリアデニル化に起因するvRNAの3'末端に存在する最小で14~20ヌクレオチドとの第1の鎖転移に関与できる）、並びに、vRNAパッケージング及び／又は安定性にとって重要であり得るステムループ構造を保持するように設計されている。

20

【0276】

任意選択で、DSEが改変されたR配列をまた、合成のRが埋め込まれた異種ポリA配列の一部として3'LTRで利用でき、同様に3'ポリA配列のDSEとして機能する。

30

【0277】

したがって、さらなる態様では、本発明は、レンチウイルススペクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルススペクターゲノムは、改変された5'LTRを含み、改変された5'LTRのR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント（DSE）を含む。適宜、改変された5'LTRは、R領域内に2つ又は3つのDSEを導入するように操作される。

【0278】

一実施形態では、レンチウイルススペクターをコードするヌクレオチド配列は、レンチウイルススペクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列である。

40

【0279】

したがって、本発明のレンチウイルススペクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では、レンチウイルススペクターゲノムは、改変された5'LTRを含み、改変された5'LTRのR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化下流エンハンサーエレメント（DSE）を含む。

【0280】

R領域は、本明細書で記載されるようなR領域又は最小R領域であり得る。

【0281】

一部の実施形態では、改変された5'LTRの最初の55ヌクレオチドは、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む。好ましくは、改変された5'LTRの最初の40ヌ

50

クレオチドは、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む。

【0282】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリアデニル化DSEは、改変された5'LTRのステムループ構造内に含まれる。

【0283】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリアデニル化DSEは、改変された5'LTRのループ1ループ1（すなわち、TARループ）内に含まれる。

【0284】

一部の実施形態では、ポリアデニル化DSEは、GT/Uリッチ配列である。

【0285】

一部の実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号75～82のいずれか1つに示される配列を含む。

【0286】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号75に示される配列を含む。

【0287】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号76に示される配列を含む。

【0288】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号77に示される配列を含む。

【0289】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号78に示される配列を含む。

【0290】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号79に示される配列を含む。

【0291】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号80に示される配列を含む。

【0292】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号81に示される配列を含む。

【0293】

一実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号82に示される配列を含む。

【0294】

一部の実施形態では、ポリアデニル化DSEは、配列番号75～82のいずれか1つに示される配列を有する。

【0295】

一部の実施形態では、GT/Uリッチ配列は、RSV若しくはMMTVに由来する、又はGUリッチ配列は、合成である。好ましくは、GT/Uリッチ配列は、MMTVに由来する。

【0296】

一部の実施形態では、GT/Uリッチ配列は、CSTF-64によって結合される。

【0297】

一部の実施形態では、改変された5'LTRのネイティブポリアデニル化シグナルは、変異又は欠失している。

【0298】

一部の実施形態では、改変された5'LTRは、ネイティブポリアデニル化シグナルを含まない。

【0299】

一部の実施形態では、改変された5'LTRの5'R領域は、ポリアデニル化切断部位をさらに含む。

【0300】

一部の実施形態では、ポリアデニル化切断部位は、少なくとも1つのCAジヌクレオチドモチーフを含む。適宜、ポリA切断部位は、2つのCAジヌクレオチドモチーフを含む、すなわち、配列CACAを有する。

10

20

30

40

50

## 【0301】

一部の実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号61～74又は186～199のいずれか1つに示される配列を含む。

## 【0302】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号61に示される配列を含む。

## 【0303】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号62に示される配列を含む。

## 【0304】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号63に示される配列を含む。

## 【0305】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号64に示される配列を含む。

## 【0306】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号65に示される配列を含む。

## 【0307】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号66に示される配列を含む。

## 【0308】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号67に示される配列を含む。

## 【0309】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号68に示される配列を含む。

## 【0310】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号69に示される配列を含む。

## 【0311】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号70に示される配列を含む。

## 【0312】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号71に示される配列を含む。

## 【0313】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号72に示される配列を含む。

## 【0314】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号73に示される配列を含む。

## 【0315】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号74に示される配列を含む。

## 【0316】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号186に示される配列を含む。

## 【0317】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号187に示される配列を含む。

## 【0318】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号188に示される配列を含む。

## 【0319】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号189に示される配列を含む。

## 【0320】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号190に示される配列を含む。

## 【0321】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号191に示される配列を含む。

## 【0322】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号192に示される配列を含む。

## 【0323】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号193に示される配列を含む。

## 【0324】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号194に示される配列を含む。

## 【0325】

10

20

30

40

50

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号195に示される配列を含む。

【0326】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号196に示される配列を含む。

【0327】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号197に示される配列を含む。

【0328】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号198に示される配列を含む。

【0329】

一実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号199に示される配列を含む。

【0330】

一部の実施形態では、改変された5'LTRは、配列番号61～74又は186～199のいずれか1つに示される配列を有する。

【0331】

HIV-1について、特定の転写開始部位(TSS)でのvRNA転写開始は、5'R領域の最初の3つの「G」ヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチド1～3)にわたって変わる場合があり、「3G」、「2G」又は「1G」vRNA種をもたらす(図17を参照されたい)。野生型HIV-1感染について、特定のTSSが3G/2Gから1Gへシフトし、生成されるvRNAの運命に影響を及ぼし、感染の後に、構成成分の発現の必要条件をgagpol翻訳のみ(3G/2G vRNA)からvRNAパッケージングを含むように(1G vRNA)変更すると考えられている(Kharytonchyk et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 113: 13378-13383; 及びBrown et al (2020) Science 368: 413-417)。1G vRNAのみの生成は、3'supA-LTR(すなわち、本明細書で記載される改変された3'LTR)中のより短い埋め込まれたR領域を利用するという選択肢を提供し、野生型HIV-1について、1G vRNAは、3G/2G vRNAと比較して優先的に二量体化するとわかっているため、LV生成の際にすべての転写事象から1G vRNAを合成できることに一般的に幾分かの利益をもたらす可能性がある。

【0332】

したがって、本発明はまた、1G vRNAのみの生成を可能にするプロモーターを提供し、TSSは、単一の「G」のみをコードする。野生型RSVは、単一の「G」をそのTSSに、結果的に、vRNAゲノム上の5'末端に保有し、このプロモーターが、転写開始複合体を正確な「G」ヌクレオチド上に配置することができることを示す。CMVプロモーターは、RSVよりも強力であり、そのため本発明者らは、CMVエンハンサー/プロモーター配列の力を残すが、HIV-1に基づくLVの単一の「G」での正確な転写開始を可能にするRSVからのコア配列を含有するプロモーターを作製しようとした。したがって、2つのCMV-RSVハイブリッドプロモーターが設計された：CMV TATAボックスとTSSの間の配列が、RSV U3からの類似配列と置き換えられたもの(「CMV-RSV1-1G」)、及びRSV TATAボックス(上流の6ntを含む)が追加で交換された第2のもの(「CMV-RSV2-1G」) - 図18Aを参照されたい。

【0333】

1G vRNAのみの生成を可能にするプロモーター(「CMV-RSV1-1G」)の例示的な例は、以下の通りである(下線なし=CMV、下線が引かれたもの=RSV U3、太字=1G TSS、イタリック体=例5'R[HIV-1のnt3～22]-非プロモーター配列)：

10

20

30

40

50

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAAT  
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC  
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG  
GCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT  
CATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG  
ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCGCCC  
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACG

10

*TCTCTCTGGTTAGACCACA* (配列番号 8 4)

【0334】

1 G v RNA のみの生成を可能にするプロモーター (「CMV-RSV2-1G」) のさらなる例示的な例は、以下の通りである (下線なし = CMV、下線が引かれたもの = RSV U3、太字 = 1G TSS、イタリック体 = 例 5' R [HIV-1 の nt 3 ~ 22] - 非プロモーター配列) :

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAAT  
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC  
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG  
GCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT  
CATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG  
ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCGCCC  
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACG

20

30

*TCTCTCTGGTTAGACCACA* (配列番号 8 5)

【0335】

プロモーター配列は、本明細書で記載されるような R 領域又は最小 R 領域のすぐ上流に配置できる。

【0336】

本発明の改変された 3' LTR 及び／又は改変された 5' LTR は、本明細書で記載されるような 1 G v RNA のみの生成を可能にするプロモーターと組み合わせて使用できる。

【0337】

一部の実施形態では、改変された 5' LTR は、配列番号 8 4 又は配列番号 8 5 に示される配列を含むプロモーターをさらに含む。

40

【0338】

本発明の改善された R が埋め込まれた異種ポリ A 配列のさらなる合成バージョンは、PAS 及び埋め込まれた R 配列の上流の挿入された種々の USE を、埋め込まれた R 配列の下流の挿入された種々の GT / URICH DSE エLEMENT と対にすることによって作製することができる。これは、統合の際に 3' U3 領域内に存在する USE-PAS 配列は、5' LTR にコピーされながら、異種 3' GU RICH DSE はコピーされないためである。したがって、本明細書で記載される改変された 3' LTR と改変された 5' LTR を組み合わせることは、改変された 5' LTR 中の改善された DSE が、逆転写後に両 LTR にお

50

いて使用される点で有利である。

【0339】

したがって、さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変された3'LTRであり、レンチウイルスベクターゲノムの5'LTRは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRである。

【0340】

したがって、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムの3'LTRは、本明細書で記載されるような改変された3'LTRであり、レンチウイルスベクターゲノムの5'LTRは、本明細書で記載されるような改変された5'LTRである。

【0341】

一部の実施形態では、改変された5'LTRのR領域は、改変された3'LTRのR領域に対して相同であり、改変された3'LTRのR領域は、改変された3'LTR内の3'ポリアデニル化シグナルのすぐ下流である。

【0342】

一部の実施形態では、改変された5'LTRのR領域は、改変された3'LTRのR領域と同一であり、改変された3'LTRのR領域は、改変された3'LTR内の3'ポリアデニル化シグナルのすぐ下流である。

【0343】

本明細書で記載されるように、vRNAの逆転写の際に、5'R-U5領域(5'PASを含む)は、vRNAの5'LTRからcDNAの3'LTRにコピーされ、3'U3領域(例えば、3'SIN-U3領域)は、vRNAの3'LTRからcDNAの5'LTRにコピーされる。したがって、形質導入された細胞中の統合されたLVゲノム発現カセットは、5'及び3'末端に同一のLTRを含み、各々は、vRNAの3'U3領域(例えば、3'SIN-U3領域)及び5'R-U5領域を含む。したがって、本発明は、逆転写後のレンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列を包含する。

【0344】

したがって、さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された3'LTR及び改変された5'LTRを含み、改変された3'LTRは、改変された3'LTR内にR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、改変された5'LTRは、改変された5'LTR内にR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含む。

【0345】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された3'LTR及び改変された5'LTRを含み、改変された3'LTR内のR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含み、改変された5'LTR内のR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む。

【0346】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノムは、改変された3'LTR及び改変された5'LTRを含み、改変された3'LTRは、改変された3'LTR内にR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、3'LTR内のR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含み、改変された5'LTRは、5'LTR内にR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、改変された5'LTR内のR領域は、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む。

【0347】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ネイティブ 3' LTR ポリアデニル化配列は、変異又は欠失している。

【0348】

一部の実施形態では、ネイティブ 3' LTR ポリアデニル化シグナル及び／又はネイティブ 5' LTR ポリアデニル化シグナルは、変異又は欠失している。

【0349】

一部の実施形態では、改変されたポリアデニル化配列は、異種ポリアデニル化配列である。

【0350】

一部の実施形態では、改変された 3' LTR 及び改変された 5' LTR は、同一である。 10

【0351】

本明細書で記載される supA-LTR アプローチは、機能的ポリアデニル化配列をアンチセンス方向で 3' supA-LTR 中、ΔU3 と R に埋め込まれた異種ポリアデニル化配列の間に挿入することによってさらに開発された。この特徴の結果及び目的は、統合部位の下流の細胞プロモーターからの転写リードインを低減することであり、さらに、単独で、又は双方向性導入遺伝子カセットの一部として利用される場合には、逆向きの導入遺伝子カセットに「バックアップ」ポリアデニル化配列を提供するであろう。改変された LTR は、「配列がアップグレードされたポリ A-2 ポリ A」LTR 又は「supA-2 pA-LTR」と称される。したがって、このアプローチの結果は、統合後に 5' 及び 3' 「supA-2 pA-LTR」を作製することであり、LTR は効果的に、強力な双方向性ポリアデニル化配列を含有する。これは、上流及び／又は下流両方の細胞プロモーターからの、すなわち、統合された LV の両側での転写リードイン及びリードアウトからのインスレーションをもたらす。 20

【0352】

したがって、一部の実施形態では、改変された 3' LTR は、第 2 のポリアデニル化配列をアンチセンス方向で 3' supA-LTR 中、ΔU3 と R が埋め込まれた異種ポリアデニル化配列の間にさらに含み得る。

【0353】

一部の実施形態では、逆向きのポリ A 配列にサービスする逆向きの DSE / GU リッチ配列は、配列番号 202 ~ 208 のいずれか 1 つに示される配列を含む。 30

【0354】

一部の実施形態では、逆向きのポリ A 配列にサービスする逆向きの DSE / GU リッチ配列は、配列番号 202 ~ 208 のいずれか 1 つに示される配列を有する。

【0355】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列によってコードされるレンチウイルスベクターゲノムを提供する。

【0356】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムを提供する。適宜、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された 3' LTR 及び／又は改変された 5' LTR を含む。好ましくは、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような supA-LTR を含む。 40

【0357】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含む発現カセットを提供する。

【0358】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を含むレンチウイルスベクターを提供する。適宜、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された 3' LTR 及び／又は改変された 5' LTR を含む。好ましくは、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような supA-LTR を含む。 50

【0359】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムを含むレンチウイルスベクターを提供する。適宜、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変された3'LTR及び／又は改変された5'LTRを含む。好ましくは、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるようなsupA-LTRを含む。好ましくは、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるようなsupA-2pA-LTRを含む。

【0360】

例示的なsupA-LTR配列

本発明に従って使用するための例示的な配列は、以下の表2に提供される：

10

以下の配列の鍵：

小文字 = 3'ppt

大文字のみ = ΔU3領域

下線が引かれたもの = 異種ポリA配列

濃灰色で強調されたもの = USE

イタリック体 = PAS

太字 = R領域

黒色／赤色で強調されたもの（すなわち、白色の文字） = 推定切断部位

淡灰色で強調されたもの = DSE

四角で囲まれたもの = アンチセンスPAS-DSE

20

【表1】

表2

30

40

50

| 説明                                          | 配列                                                                                                           | 配列<br>番号 |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| ネイティブ HIV-1<br>R 領域[TAR/SL1]                | [GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC<br>TAACTAGGGAACCC] ACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA<br>GTGCTTC | 24       |
| R.1-60                                      | GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CAGATCA</b><br>AACTAGGGAACCC <b>CA</b>                                               | 25       |
| R. 1-24                                     | GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CAGATCA</b>                                                                          | 26       |
| R.1-20 [3G-R20]<br>及び R. 1-20b              | GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CA</b>                                                                               | 27       |
| R.1-20c                                     | GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CACACACATGGTCTAACCA</b> GAGAGACCC                                                    | 28       |
| R.3-20 [R.1-18]<br>[1G-R18]                 | GTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CA</b>                                                                                 | 29       |
| R.1-16 [3G-R16]                             | GGGTCTCTCTCTGGTTAG                                                                                           | 30       |
| R.3-16 [R.1-14]<br>[1G-R14]                 | GTCTCTCTCTGGTTAG                                                                                             | 31       |
| R.1-14 [3G-R14]                             | GGGTCTCTCTCTGGTT                                                                                             | 32       |
| R.3-14 [R.1-12]<br>[1G-R12]                 | GTCTCTCTCTGGTT                                                                                               | 33       |
| R.1-12 [3G-R12]                             | GGGTCTCTCTCTGG                                                                                               | 34       |
| R.3-12 [R.1-10]<br>[1G-R10]                 | GTCTCTCTCTGG                                                                                                 | 35       |
| R.1-10 [3G-R10]                             | GGGTCTCTCT                                                                                                   | 36       |
| R.3-10 [R.1-8]<br>[1G-R8]                   | GTCTCTCT                                                                                                     | -        |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-20 配列         | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CACAA</b> GTTAA <b>CAA</b>                                             | 37       |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-20b 配列        | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CAAGTTAA</b> CAA                                                       | 38       |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-20c 配列        | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CACACACATGGTCTAACCA</b> GAG<br>AGACCC <b>CAAGTTAA</b> CAA              | 39       |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.3<br>-20 [R.1-18]配列 | <u>AATAAA</u> GTCTCTCTCTGGTTAGAC <b>CACAA</b> GTTAA <b>CAA</b>                                               | 40       |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-16 配列         | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTCTGGTTAG <b>CAAGTTAA</b> CAA                                                         | 41       |

10

20

30

40

50

|                                               |                                               |    |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----|
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.3<br>-16 [R.1-14]配列   | <u>AATAAA</u> GTCTCTCTGGTTAGCAA GTTAA CAA     | 42 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-14 配列           | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGTTCAA GTTAA CAA     | 43 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.3<br>-14 [R.1-12]配列   | <u>AATAAA</u> GTCTCTCTGGTTCAA GTTAA CAA       | 44 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-12 配列           | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGCAA GTTAA CAA       | 45 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.3<br>-12 [R.1-10]配列   | <u>AATAAA</u> GTCTCTCTGGCAA GTTAA CAA         | 46 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.1<br>-10 配列           | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTCAA GTTAA CAA         | 47 |
| SV40 ポリ A に<br>埋め込まれた R.3<br>-10 [R.1-8]配列    | <u>AATAAA</u> GTCTCTCTCAA GTTAA CAA           | 48 |
| ウサギベータグ<br>ロビンポリ A に<br>埋め込まれた R.<br>1-24 配列  | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCATTGCAA | 49 |
| ウサギベータグ<br>ロビンポリ A に<br>埋め込まれた R.<br>1-20 配列  | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGTTAGACCACATTGCAA    | 50 |
| ウサギベータグ<br>ロビンポリ A に<br>埋め込まれた R.<br>1-20b 配列 | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGTTAGACCATTGCAA      | 51 |
| ウサギベータグ<br>ロビンポリ A に<br>埋め込まれた R.<br>1-16 配列  | <u>AATAAA</u> GGGTCTCTCTGGTTAGCATTGCAA        | 52 |

10

20

30

40

50

|                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ウサギベータグロビンポリ A に埋め込まれた R. 1-14 配列                                              | <u>AATAAA</u> <b>GGGTCTCTCTGGTT</b> <u>CATTGCAA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 53 |
| ウサギベータグロビンポリ A に埋め込まれた R. 1-12 配列                                              | <u>AATAAA</u> <b>GGGTCTCTCTGGC</b> <u>ATTGCAA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 54 |
| 「R.1-60」が埋め込まれた SV40 後期ポリ A 配列を含有する 3' supA-LTR                                | <u>aaaagaaaagggggg</u> ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGTAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT<br><u>ATTGCTTTATTTGTAA</u> CCATTATAAGCTGCAATAAA <b>GGGTCTCTCT</b><br><b>GGTTAGAC</b> <u>CA</u> <b>GATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAA</b><br><b>CC</b> <u>CACAA</u> GTTAA <u>CAACAACA</u> TTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTT<br><u>CAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAA</u>                                                                                                | 55 |
| 「R.1-20c」が埋め込まれた SV40 後期ポリ A 配列を含有する 3' supA-LTR                               | <u>aaaagaaaagggggg</u> ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGTAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT<br><u>ATTGCTTTATTTGTAA</u> CCATTATAAGCTGCAATAAA <b>GGGTCTCTCT</b><br><b>GGTTAGAC</b> <u>CACACACATGGTCTAAC</u> <u>CA</u> <b>GAGAGACCC</b> <u>CAAGTTAA</u> <u>CA</u><br><u>ACAACA</u> TTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGGAGGTGTG<br><u>GGAGGTTTTTTAA</u>                                                                                                      | 56 |
| 「R.1-20」が埋め込まれた SV40 後期ポリ A 配列を含有する 3' supA-LTR                                | <u>aaaagaaaagggggg</u> ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGTAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT<br><u>ATTGCTTTATTTGTAA</u> CCATTATAAGCTGCAATAAA <b>GGGTCTCTCT</b><br><b>GGTTAGAC</b> <u>CACAA</u> GTTAA <u>CAACAACA</u> TTGCATTCAATTTATGTTT<br><u>CAGGTTCAAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAA</u>                                                                                                                                                                  | 57 |
| 「R.1-20」が埋め込まれたウサギベータグロビンポリ A 配列を含有する 3' supA-LTR                              | <u>aaaagaaaagggggg</u> ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGTGAATTCACCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGA<br>AGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTG<br>AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCC<br>CTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAA <b>GGGTCTCTCTGGTTAGAC</b><br><b>CAGAT</b> <u>CATTG</u> <u>CAA</u> <u>TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCG</u><br><u>GAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTA</u><br><u>TTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGC</u> | 58 |
| 「R.1-20」が埋め込まれた、アンチセンスで SV40 初期ポリ A 配列を有する SV40 後期ポリ A 配列を含有する 3' supA-2pA-LTR | <u>aaaagaaaagggggg</u> ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGTCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG <u>ACA</u><br><u>AACCACA</u> ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATT<br><u>TGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAA</u> CCATTATAAGCTGCAATAA <b>G</b><br><b>GGTCTCTCTGGTTAGAC</b> <u>CACAA</u> GTTAA <u>CAACAACA</u> TTGCATTCA<br><u>TTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAA</u>                                                                                         | 59 |

10

20

30

40

50

|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 「R.1-20」が埋め込まれた、アンチセンスで合成ポリ A 配列を有する SV40 後期ポリ A 配列を含有する 3' supA-2pA-LTR | aaaagaaaaggggggACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGA<br>CAAGATACTAGT[CACACAAAAACCAACACACAGATGTAATGAAAA<br>TAAAGATCTTTATT]TGTGAAATTGTGATGCTATTGCTTTATTTGT<br>AACCATTTATAAGCTGCAATAAAGGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACAAG<br>TTAA[CACAACAA]TTGCATTTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGA<br>GGTGTGGGAGGTTTTTTAAA | 60 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU1                                                   | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TTGGTGTGCACCTGGCTAACTA<br>GGGAACCC                                                                                                                                                                                                                        | 61 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2                                                   | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCT<br>AACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                   | 62 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.1                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]CTTCGTGTGTTTGTGTCTGTTC<br>TAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                  | 63 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.2                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]CATTCGTGTGTTTGTGTCTGTT<br>CTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                 | 64 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.3                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]CAGTTCGTGTGTTTGTGTCTGT<br>TCTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                | 65 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.4                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]CAATTCGTGTGTTTGTGTCTGT<br>TCTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                | 66 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.5                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]CAGATTCGTGTGTTTGTGTCTG<br>TTCTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                               | 67 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU2.6                                                 | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TTCCAGATTCGTGTGTTTGTGT<br>CTGTTCTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                            | 68 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU3                                                   | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TGGTGTGCACCTGGGTTCTAAC<br>TAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                      | 69 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU4                                                   | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TTGGTGTGCACCTGTGGTTCTA<br>ACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                    | 70 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU5                                                   | GGGTCTCTCTGGTTAGAC[CACACA]TGTCTCGTGTGTTTGTGTCTGT<br>TCGCTAACTAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU6                                                   | GGGTCTCTCTGGTTA[CACCACAA]TTGGTGTGCACCTGGGTTTAACT<br>TAGGGAACCC                                                                                                                                                                                                                      | 72 |

10

20

30

40

50

|                          |                                                                        |     |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU7   | GGGTCTCTCTGGTTAGACCGGCGCAGCGTCATTGGTGTGCACCTGG<br>GTTCTAACTAGGGAACCC   | 73  |
| 5' DSE 改変 R 領域 3GR-GU8   | GGGTCTCTCTGGTTAGACGCACAACACAAACCGTGTGTGGTTTT<br>TTGTGTGCTAACTAGGGAACCC | 74  |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU1   | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATTGGTGTGCACCTGGCTAACTAGG<br>GAAC                 | 186 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2   | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATTCTGTGTTTGTGTCTGTTCTAA<br>CTAGGGAAC             | 187 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.1 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACACTTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCTA<br>ACTAGGGAAC           | 188 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.2 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACACATTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCT<br>AACTAGGGAAC          | 189 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.3 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACACAGTTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCT<br>TAACTAGGGAAC        | 190 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.4 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACACAATTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCT<br>TAACTAGGGAAC        | 191 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.5 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACACAGATTCGTGTGTTTGTGTCTGTT<br>CTAACTAGGGAAC        | 192 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU2.6 | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATTCCAGATTCGTGTGTTTGTGTCT<br>GTTCTAACTAGGGAAC     | 193 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU3   | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATGGTGTGCACCTGGGTTCTAACTA<br>GGGAAC               | 194 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU4   | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATTGGTGTGCACCTGTGGTTCTAAC<br>TAGGGAAC             | 195 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU5   | GTCTCTCTGGTTAGACCACACATGTCTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCT<br>GCTAACTAGGGAAC      | 196 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU6   | GTCTCTCTGGTTACACCACAATTGGTGTGCACCTGGGTTTAACTA<br>GGGAAC                | 197 |
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU7   | GTCTCTCTGGTTAGACCGGCGCAGCGTCATTGGTGTGCACCTGGGT<br>TCTAACTAGGGAAC       | 198 |

10

20

30

40

50

|                        |                                                                   |     |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5' DSE 改変 R 領域 1GR-GU8 | GTCTCTCTGGTTAGACGCACAACACAAACCCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCTAACTAGGGAAC | 199 |
| DSE1                   | TTGGTGTGCACCTGG                                                   | 75  |
| DSE2                   | GTGTGTTTGTGTCTGTT                                                 | 76  |
| DSE3                   | TGGTGTGCACCTGGGTT                                                 | 77  |
| DSE4                   | TTGGTGTGCACCTGTGGTT                                               | 78  |
| DSE5                   | GTGTGTTTGTGTCTGTTCG                                               | 79  |
| DSE6                   | TTTGGTGTGCACCTGGGTTT                                              | 80  |
| DSE7                   | TTGGTGTGCACCTGGGTT                                                | 81  |
| DSE8                   | GTGTGTTGGTTTTTTGTG                                                | 82  |
| USE                    | ATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAA                             | 83  |

【 0 3 6 1 】

例示的な s u p A − 2 p A − L T R 配列

本発明に従って使用するための例示的な配列は、以下の表 9 に提供される：

以下の配列の鍵：

- ・ ( n ) 2 0 − T R A N S G − ( n ) 1 9 = P B S と 3 ' p p t の間の L V ゲノム／導入遺伝子配列を示す
- ・ 太字 = 逆向きのポリ A 配列にサービスする逆向きの D S E ／ G U リッチ配列
- ・ 太字のイタリック体 = 逆向きの G U ボックス
- ・ 下線が引かれたもの Y = C ／ T （任意選択のネイティブ 5 ' p A H I V シグナルを示す；この他の変異／欠失はこの例の提示から排除されない）

【表 2】  
表 9

| 説明                                                                                                                                           | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 配列<br>番号 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU1」：<br><br>LV-supA-2pA-LTR 発現<br>カセット(「R が埋め込<br>まれた」異種ポリ A 配<br>列の 5'R)[図 27 上部パ<br>ネルを参照されたい]                     | GGGTCTCTCTGGTTAGACCACACATTCGTGTGTTTGTGTCTG<br>TTCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAAYAAAGCTTG<br>CCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGAC<br>TCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGG<br>AAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACnnnnnnnnnn<br>nnnnnnnnnnTRANSGnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnAAAAGAA<br>AAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAA<br>GATACTAGT <b>TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAA</b><br><b>CTAGAATG</b> CAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG<br>ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAAG<br>GGTCTCTCTGGTTAGACCACAAGTTAACAACAACAATTGCAT<br>TCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTT<br>TTAAA | 200      |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU1」：<br><br>LV-supA-2pA-LTR が統<br>合された LTR(5'から 3'<br>att 部位へ-2 つの LTR<br>が統合された LV を挟<br>む) [図 27 上部パネル<br>を参照されたい] | ACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATACTAG<br><b>TTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC</b> <b>CTAGAATG</b><br>CAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATT<br>GCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAAGGGTCTCTC<br>TGGTTAGACCACACATTCGTGTGTTTGTGTCTGTTCTAACTA<br>GGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAAYAAAGCTTGCCTTGAGTG<br>CTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC<br>TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAATCTCT<br>AGCAGT                                                                                                                                                                                            | 201      |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU2」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列                                                                                      | <b>AGCGAACAGACACAAACACACGAGACATGTGTG</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 202      |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU3」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列                                                                                      | <b>ACACAAAAAATTC</b> <b>CAACACAC</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 203      |

10

20

30

40

50

|                                                         |                                                   |     |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----|
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU4」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列 | <b>GAACAAACGACCCAACACCC</b>                       | 204 |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU5」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列 | <b>CCAACACACCACACAGA</b>                          | 205 |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU6」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列 | <b>CCAATGCTTATGAATAACACAGGCGA</b>                 | 206 |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU6」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列 | <b>AAAAACCAACACACGTTTTGTGT</b>                    | 207 |
| supA-2pA-LTR バリア<br>ント「GU1」の逆向き<br>の DSE/GU ボックスの<br>配列 | <b>TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATG</b> | 208 |

【 0 3 6 2 】

配列番号 2 0 2 ～ 2 0 7 のいずれか 1 つを、配列番号 2 0 0 又は配列番号 2 0 1 で示される太字の配列（太字のイタリック体の配列を含む）と置き換えることができる。

【 0 3 6 3 】

グラフによる概要については図 5 3 を参照されたい。

【 0 3 6 4 】

C A R e

本発明は、新規ヌクレオチド配列及びこのようなヌクレオチド配列を含むウイルスベクター又は細胞を提供する。

【 0 3 6 5 】

導入遺伝子発現カセットを含むヌクレオチド配列が提供され、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR は、（a）シス作用性細胞質蓄積領域（CAR）配列及び／又は（b）シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列から選択される少なくとも 1 つのシス作用性配列を含む。

【 0 3 6 6 】

したがって、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子

発現カセットを含み、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列及び／又は (b) シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0367】

「ヌクレオチド配列」という用語は、「ポリヌクレオチド」という用語及び／又は「核酸配列」という用語と同義である。「ヌクレオチド配列」は、二本鎖の分子である場合も、一本鎖の分子である場合もあり、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、RNA及びキメラDNA／RNA分子が含まれる。ポリヌクレオチドは、組換えによって、合成によって、又は当業者に利用可能な任意の手段によって生成され得る。それらはまた、標準技術によってクローニングすることもできる。

10

【0368】

ヌクレオチド配列は、導入遺伝子発現カセットを含み得る。発現カセットは、トランスフェクトされた、形質導入された又は感染した細胞によって発現されるべき遺伝子（この場合には、導入遺伝子）及び調節配列を含むベクターの別個の構成成分である。本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」とは、ある生物から単離されている遺伝子配列を含有するDNA若しくはRNAのセグメントを指し、異なる生物中に導入され、DNA若しくはRNAの非ネイティブセグメントであり、又は遺伝子工学技術を使用して作製された組換え配列である。「導入遺伝子」、「導入遺伝子コンストラクト」、「GOI」（所望の遺伝子）及び「NOI」（所望のヌクレオチド）という用語は、本明細書で同義的に使用される。

20

【0369】

本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットは、好ましくは、レンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットである。適切なレンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットは、本明細書において別の場所でより詳細に記載される。

【0370】

本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、本明細書で記載される新規シス作用性配列のうち少なくとも1つを含み得る。シス作用性配列は、同じヌクレオチド配列中にコードされる遺伝子（すなわち、シス作用性配列も存在するもの）の発現に影響を及ぼす。ウイルスベクターとの関連では、シス作用性配列は、通常の転写後調節エレメント (PRE) 例えば、ウッドチャック肝炎ウイルスに由来するもの (wPRE) を含む。シス作用性配列の一般例は、本明細書において別の場所で提供される。「シス作用性エレメント」及び「シス作用性配列」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

30

【0371】

一実施形態では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、(a) シス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列及び／又は (b) シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む。

【0372】

本明細書で使用される場合、「細胞質蓄積領域 (CAR) 配列」は、mRNAに転写されるヌクレオチド配列であり、mRNA輸送機構の配列依存性動員によって、mRNAの安定性及び／又は細胞質への輸送並びに細胞の細胞質におけるmRNAの蓄積を増大する。CAR配列は、これまでに記載されている、例えば、ネイティブにイントロンのない遺伝子の上流（すなわち、5'末端での）のCAR配列の挿入によって、mRNA転写物の細胞質蓄積を促進できることを記載するLei et al., 2013を参照されたい。

40

【0373】

本発明者らは、驚くべきことに、導入遺伝子発現カセットの3' UTR中へのCAR配列の挿入が、遺伝子発現を増強することを見出した。驚くべきことに、これらのCAR配列は、イントロンを利用する導入遺伝子カセットからの、並びにイントロンのない導入遺伝子カセットからの導入遺伝子発現を増強し、並びに、全長wPREをすでに含有するカセットからの発現をブーストすると示された。

50

## 【0374】

本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3'UTR中に挿入するための適切なCAR配列は、一般的な一般知識と一緒に本明細書で提供される開示内容に基づいて当業者によって容易に同定可能であり得る（例えば、その全体で本明細書に組み込まれる、Lei et al., 2013における開示内容を参照されたい）。

## 【0375】

本明細書で記載されるCAR配列は、少なくとも1つのCARエレメント（CARE）配列を含む。当業者に理解されるように、CARE配列は、CAR配列内に存在するコア配列である（通常、CARE配列は、CAR配列内でいくつかの回数反復される）。CARE配列の例は、図26に示され、Lei et al., 2013に記載されている。

## 【0376】

例えば、CARE配列は、BMWGHWSWS（配列番号92）又はBMWRRHWSWS（配列番号243）によって表される配列である場合があり、以下である：

## 【表3】

表3: ヌクレオチド記号

| ヌクレオチド記号 | フルネーム                    |
|----------|--------------------------|
| A        | アデニン                     |
| C        | シトシン                     |
| G        | グアニン                     |
| T        | チミン                      |
| U        | ウラシル                     |
| R        | グアニン / アデニン (プリン)        |
| Y        | シトシン / チミン (ピリミジン)       |
| K        | グアニン / チミン               |
| M        | アデニン / シトシン              |
| S        | グアニン / シトシン              |
| W        | アデニン / チミン               |
| B        | グアニン / チミン / シトシン        |
| D        | グアニン / アデニン / チミン        |
| H        | アデニン / シトシン / チミン        |
| V        | グアニン / シトシン / アデニン       |
| N        | アデニン / グアニン / シトシン / チミン |

## 【0377】

BMWGHWSWS（配列番号92）又はBMWRRHWSWS（配列番号243）によって

包含される例証的CARE配列として、CMAGHWSSTG（表3の命名法を使用して、配列番号96）によって表される配列を有するものが挙げられる。このようなCARE配列には、Lei et al., 2013においてこれまでに同定されたCARE配列（CARE配列は、HSPB3、c-Jun、IFN $\alpha$ 1及びIFN $\beta$ 1遺伝子の5'領域において同定された）が含まれる。

【0378】

CARE配列は、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCAGATCCTG（配列番号98）、CCAGTTCCTC（配列番号99）、TCAGATCCTG（配列番号100）、CCAGATGGTG（配列番号101）、CCAGTTCCAG（配列番号102）、CCAGCAGCTG（配列番号103）、CAAGCTCCTG（配列番号104）、CAAGATCCTG（配列番号105）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CAAGAACGTG（配列番号107）、TCAGTTCCTG（配列番号227）、GCAGTTCCTG（配列番号228）、CAAGTTCCTG（配列番号229）、CCTGTTCTG（配列番号230）、CCTGCTCCTG（配列番号231）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTGCTG（配列番号233）、CCTGTTCGTG（配列番号234）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCTGTTCTC（配列番号236）、CCAATTCCTG（配列番号237）及びGAAGCTCCTG（配列番号238）からなる群から選択され得る。

【0379】

特定の例では、CAREヌクレオチド配列は、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCTGTTCTG（配列番号230）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCAATTCCTG（配列番号237）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CCAGTTCCTC（配列番号99）及びCCAGTTCCAG（配列番号102）からなる群から選択される。

【0380】

適宜、CAREヌクレオチド配列は、CCAGTTCCTG（配列番号97）であり得る。この配列はまた、本明細書では「コンセンサス」タイルとも呼ばれる。以下の実施例10～13において本発明を例証するために使用されるものはCARE配列である。

【0381】

特定の例では、CARE配列は、CCAGTTCCTG（配列番号97）であり得る。これは、以下の実施例10～13において本発明を例証するために使用される配列である。

【0382】

一例では、CARE配列は、CCAGATCCTG（配列番号98）であり得る。これは、図26Aにおいて同定されるコンセンサス配列である。

【0383】

一例では、CARE配列は、CCAGTTCCTC（配列番号99）であり得る。この配列はまた、本明細書においてHSPB3 v2とも呼ばれる（例えば、図67を参照されたい）。

【0384】

例えば、CARE配列は、TCAGATCCTG（配列番号100）であり得る。

【0385】

一例では、CARE配列は、CCAGATGGTG（配列番号101）であり得る。この配列はまた、本明細書においてHSPB3 v3とも呼ばれる（例えば、図67を参照されたい）。

【0386】

一例では、CARE配列は、CCAGTTCCAG（配列番号102）であり得る。この配列はまた、本明細書においてIFN $\alpha$ 1 v1とも呼ばれる（例えば、図67を参照されたい）。

【0387】

例えば、CARE配列は、CCAGCAGCTG（配列番号103）であり得る。

【0388】

10

20

30

40

50

一例では、C A R e 配列は、CAAGCTCCTG（配列番号 1 0 4）であり得る。

【0 3 8 9】

一例では、C A R e 配列は、CAAGATCCTG（配列番号 1 0 5）であり得る。

【0 3 9 0】

例えば、C A R e 配列は、CCTGAACCTG（配列番号 1 0 6）であり得る。この配列はまた、本明細書において c - J u n v 2 とも呼ばれる（例えば、図 6 7 を参照されたい）。

【0 3 9 1】

一例では、C A R e 配列は、CAAGAACGTG（配列番号 1 0 7）であり得る。この配列はまた、本明細書において c - J u n v 4 とも呼ばれる（例えば、図 6 7 を参照されたい）。 10

【0 3 9 2】

一例では、C A R e 配列は、TCAGTTCCTG（配列番号 2 2 7）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 1 とも呼ばれる。

【0 3 9 3】

一例では、C A R e 配列は、GCAGTTCCTG（配列番号 2 2 8）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 2 とも呼ばれる。

【0 3 9 4】

一例では、C A R e 配列は、CAAGTTCCTG（配列番号 2 2 9）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 3 とも呼ばれる。 20

【0 3 9 5】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTTCCTG（配列番号 2 3 0）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 4 とも呼ばれる。

【0 3 9 6】

一例では、C A R e 配列は、CCTGCTCCTG（配列番号 2 3 1）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 6 とも呼ばれる。

【0 3 9 7】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTACCTG（配列番号 2 3 2）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 7 とも呼ばれる。

【0 3 9 8】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTTCCTG（配列番号 2 3 3）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 8 とも呼ばれる。 30

【0 3 9 9】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTTCGTG（配列番号 2 3 4）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 9 とも呼ばれる。

【0 4 0 0】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTTCAG（配列番号 2 3 5）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 1 0 とも呼ばれる。

【0 4 0 1】

一例では、C A R e 配列は、CCTGTTCCTC（配列番号 2 3 6）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 1 1 とも呼ばれる。 40

【0 4 0 2】

一例では、C A R e 配列は、CCAATTCCTG（配列番号 2 3 7）であり得る。この配列はまた、図 6 6 においてバリエーション 1 2 とも呼ばれる。

【0 4 0 3】

一例では、C A R e 配列は、GAAGCTCCTG（配列番号 2 3 8）であり得る。この配列はまた、図 6 7 において I F N b 1 v 1 とも呼ばれる。

【0 4 0 4】

言い換えれば、本明細書に記載される導入遺伝子発現カセット（通常、レンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセット）は、本明細書に記載される C A R エlement（C A R 50

e) 配列のうち少なくとも1つを含むシス作用性細胞質蓄積領域 (CAR) 配列を含み得る。

【0405】

CAR 配列は、通常、複数の CAR e 配列を含む。例えば、本明細書で記載される CAR 配列は、複数の CAR e 配列、例えば、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、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個又は少なくとも20個の CAR e 配列を含み得る。

【0406】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも2個の CAR e 配列を含む。

【0407】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも4個の CAR e 配列を含む。

【0408】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも6個の CAR e 配列を含む。

【0409】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも8個個の CAR e 配列を含む。これに関連して、特に、導入遺伝子発現カセットはまた、本明細書で提供される少なくとも1つのシス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列を含み得る。

【0410】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも10個の CAR e 配列を含む。

【0411】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも12個の CAR e 配列を含む。

【0412】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも14個の CAR e 配列を含む。

【0413】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも16個の CAR e 配列を含む。これに関連して、特に、導入遺伝子発現カセットはまた、本明細書で提供される少なくとも1つのシス作用性 ZCCHC14 タンパク質結合配列を含み得る。

【0414】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも18個の CAR e 配列を含む。

【0415】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、少なくとも20個の CAR e 配列を含む。

【0416】

できる限り短い CAR 配列を使用することが望ましい場合がある。したがって、一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、複数の CAR e 配列、例えば、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、11個以下、12個以下、13個以下、14個以下、15個以下、16個以下、17個以下、18個以下、19個以下又は20個以下の CAR e 配列を含み得る。

【0417】

一例では、本明細書で記載される CAR 配列は、2個以下の CAR e 配列を有する。

【0418】

10

20

30

40

50

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、4 個以下の C A R e 配列を有する。これに関連して、特に、導入遺伝子発現カセットはまた、本明細書で提供される少なくとも 1 つのシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含み得る。

【0 4 1 9】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、6 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 0】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、8 個以下の C A R e 配列を有する。これに関連して、特に、導入遺伝子発現カセットはまた、本明細書で提供される少なくとも 1 つのシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含み得る。

【0 4 2 1】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、10 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 2】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、12 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 3】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、14 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 4】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、16 個以下の C A R e 配列を有する。これに関連して、特に、導入遺伝子発現カセットはまた、本明細書で提供される少なくとも 1 つのシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含み得る。

【0 4 2 5】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、18 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 6】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、20 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 7】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 4 個であるが、20 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 8】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 8 個であるが、20 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 2 9】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 12 個であるが、20 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 3 0】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 16 個であるが、20 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 3 1】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 4 個であるが、16 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 3 2】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 8 個であるが、16 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 3 3】

一例では、本明細書で記載される C A R 配列は、少なくとも 12 個であるが、16 個以下の C A R e 配列を有する。

【0 4 3 4】

適宜、本明細書で記載される C A R 配列は、2 個の C A R e 配列からなる、又は 4 個の C A R e 配列からなる、又は 6 個の C A R e 配列からなる、又は 8 個の C A R e 配列からなる、又は 10 個の C A R e 配列からなる、又は 12 個の C A R e 配列からなる、又は 14 個の C A R e 配列からなる、又は 16 個の C A R e 配列からなる、又は 18 個の C A R e 配列からなる、又は 20 個の C A R e 配列からなる場合がある。

10

20

30

40

50

## 10

20

## 30

40

## 50

50

## 50

50

50

## 50

50

## 50

50

## 50

50

## 50

50

## 50

50

## 50

50

**【 0 4 4 5 】**

同様に、C A R 配列が導入遺伝子発現カセットの3' U T Rに導入される本発明との関連では、少なくとも10個のC A R e 配列（例えば、C A R e 配列のうち少なくとも1個（又はすべて）がCCAGTTCCTG（配列番号97）である）を含むC A R 配列はまた、したがって、本明細書において特に企図される。

【0446】

6個以下のC A R e 配列（例えば、C A R e 配列のうち少なくとも1個（又はすべて）がCCAGTTCCTG（配列番号97）である）を有するC A R 配列は、したがって、本明細書において特に企図される。このような配列は、C A R 配列が導入遺伝子発現カセットの3' U T Rに挿入される場合において特に企図される。

【0447】

10個以下のC A R e 配列（例えば、C A R e 配列のうち少なくとも1個（又はすべて）がCCAGTTCCTG（配列番号97）である）を有するC A R 配列は、したがって、本明細書において特に企図される。上記のように、このような配列は、C A R 配列が導入遺伝子発現カセットの3' U T Rに挿入される場合において特に企図される。

【0448】

C A R 配列は、同じである複数のC A R e 配列を含む場合がある（すなわち、C A R 配列は、同じC A R e 配列のいくつかの反復を含む場合がある）。例えば、C A R 配列は、少なくとも2個、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個、少なくとも18個又は少なくとも20個の同じC A R e 配列を含む場合がある。

【0449】

一例では、C A R 配列は、2個以下、4個以下、6個以下、8個以下、10個以下、12個以下、14個以下、16個以下、18個以下又は20個以下の同じC A R e 配列を有する場合がある。

【0450】

あるいは、C A R 配列は、C A R e 配列のうち少なくとも2個が異なっている、少なくとも2個、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個、少なくとも18個又は少なくとも20個のC A R e 配列を含む場合がある。

【0451】

一例では、C A R 配列は、C A R e 配列のうち少なくとも2個が異なっている、2個以下、4個以下、6個以下、8個以下、10個以下、12個以下、14個以下、16個以下、18個以下又は20個以下のC A R e 配列を有する場合がある。

【0452】

実際、C A R 配列が複数のC A R e 配列を含む本明細書で記載される実施形態の各々では、C A R e 配列は各々、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号227、配列番号228、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号233、配列番号234、配列番号235、配列番号236、配列番号237及び配列番号238からなる群から独立に選択され得る。C A R 配列が複数のC A R e 配列を含む特定の例では、C A R e 配列は各々、配列番号97、配列番号230、配列番号232、配列番号235、配列番号237、配列番号106、配列番号99及び配列番号102からなる群から独立に選択され得る。

【0453】

C A R e 配列の適当な組合せは、当業者によって同定され得る。

【0454】

C A R 配列内の複数のC A R e 配列は、タンデムに並んでいる場合がある（すなわち、それらは「タンデムC A R e 配列」と呼ばれる場合がある）。

【0455】

例えば、C A R 配列内の少なくとも 2 個、少なくとも 4 個、少なくとも 6 個、少なくとも 8 個、少なくとも 10 個、少なくとも 12 個、少なくとも 14 個、少なくとも 16 個、少なくとも 18 個又は少なくとも 20 個の C A R e 配列は、タンデムに並んでいる場合がある。

【0456】

適宜、C A R 配列は、タンデムに並んでいる少なくとも 6 個の C A R e 配列、又はタンデムに並んでいる少なくとも 10 個の C A R e 配列を含み得る。

【0457】

適宜、C A R 配列は、タンデムに並んでいる少なくとも 8 個の C A R e 配列、タンデムに並んでいる少なくとも 12 個の C A R e 配列又はタンデムに並んでいる少なくとも 16 個の C A R e 配列を含み得る。

【0458】

一例では、C A R 配列内の 2 個以下、4 個以下、6 個以下、8 個以下、10 個以下、12 個以下、14 個以下、16 個以下、18 個以下又は 20 個以下の C A R e 配列が、タンデムに並んでいる場合がある。

【0459】

タンデム C A R e 配列は、ヌクレオチド配列中で互いに直接隣接して位置づけられる。例として、C A R 配列が、タンデムに並んでいる 2 個の C A R e 配列（各々、配列 CCAG TTCCTG（配列番号 97）を有する）を含む場合には、配列 CCAG TTCCTGCCAG TTCCTG（配列番号 116）を含むことになる。同様に、C A R 配列が、タンデムに並んでいる 3 個の C A R e 配列（各々、配列 CCAG TTCCTG（配列番号 97）を有する）を含む場合には、配列 CCAG TTCCTGCCAG TTCCTGCCAG TTCCTG（配列番号 117）を含むことになるなど。

【0460】

C A R 配列がタンデム C A R e 配列を含む実施形態では、タンデム配列は各々同じ C A R e 配列を有する場合がある。

【0461】

C A R 配列は、そのサイズによって説明できる。例えば、C A R 配列が、タンデムに並んでいる複数の C A R e 配列を含む場合には、そのサイズは、存在する C A R e 配列の数を反映する。例えば、本明細書において具体的に列挙された C A R e 配列（すべて、10 ヌクレオチドの配列を有する）を使用すると、C A R 配列は、タンデムに並んでいる 2 個の C A R e 配列を含む場合には少なくとも 20 ヌクレオチド、タンデムに並んでいる 3 個の C A R e 配列を含む場合には少なくとも 30 ヌクレオチド、タンデムに並んでいる 4 個の C A R e 配列を含む場合には少なくとも 40 ヌクレオチドであり得るなど。

【0462】

したがって、C A R 配列は、少なくとも 10 ヌクレオチド、少なくとも 20 ヌクレオチド、少なくとも 30 ヌクレオチド、少なくとも 40 ヌクレオチド、少なくとも 50 ヌクレオチドなどであり得る。

【0463】

少なくとも 60 ヌクレオチドであり得る（例えば、タンデムに並んでいる少なくとも 6 個の C A R e 配列を有する）。

【0464】

少なくとも 80 ヌクレオチドであり得る（例えば、タンデムに並んでいる少なくとも 8 個の C A R e 配列を有する）。

【0465】

少なくとも 100 ヌクレオチドであり得る（例えば、タンデムに並んでいる少なくとも 10 個の C A R e 配列を有する）。

【0466】

少なくとも 160 ヌクレオチドであり得る（例えば、タンデムに並んでいる少なくとも 16 個の C A R e 配列を有する）。

## 【0467】

CAR配列は、10ヌクレオチド以下、20ヌクレオチド以下、30ヌクレオチド以下、40ヌクレオチド以下、50ヌクレオチド以下などであり得る。

## 【0468】

60ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大6個のCARe配列を有する）。

## 【0469】

80ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大8個のCARe配列を有する）。

## 【0470】

100ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大10個のCARe配列を有する）。

## 【0471】

160ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大16個のCARe配列を有する）。

## 【0472】

200ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大20個のCARe配列を有する）。

## 【0473】

240ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大24個のCARe配列を有する）。

## 【0474】

290ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大29個のCARe配列を有する）。

## 【0475】

300ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大30個のCARe配列を有する）。

## 【0476】

350ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大35個のCARe配列を有する）。

## 【0477】

400ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大40個のCARe配列を有する）。

## 【0478】

410ヌクレオチド以下であり得る（例えば、タンデムに並んでいる最大41個のCARe配列を有する）。

## 【0479】

あるいは、CAR配列内の複数のCARe配列は、介在配列によって空間的に分離されている場合がある（すなわち、CAR配列内の隣接しているCARe配列の間に1個又は2個以上のヌクレオチドが存在し得る）。一例では、CAR配列内の隣接しているCARe配列の間の介在配列は、20個以下のヌクレオチドである、例えば、CAR配列内の隣接しているCARe配列の間に2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、11個以下、12個以下、13個以下、14個以下、15個以下、16個以下、17個以下、18個以下、19個以下又は20個以下の介在ヌクレオチドがある。

## 【0480】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARe配列の間の介在配列は、2個以下のヌクレオチドである。

## 【0481】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARe配列の間の介在配列は、4個以下のヌ

10

20

30

40

50

クレオチドである。

【0482】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、6個以下のヌクレオチドである。

【0483】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、8個以下のヌクレオチドである。

【0484】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、10個以下のヌクレオチドである。

【0485】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、12個以下のヌクレオチドである。

【0486】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、14個以下のヌクレオチドである。

【0487】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、16個以下のヌクレオチドである。

【0488】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、18個以下のヌクレオチドである。

【0489】

一例では、CAR配列内の隣接しているCARE配列の間の介在配列は、20個以下のヌクレオチドである。

【0490】

導入遺伝子発現カセットは、少なくとも1つのシス作用性ZCHC14タンパク質結合配列を含み得る（本明細書で記載されるCARE配列の代替物として、又は本明細書で記載されるCARE配列に加えて）。

【0491】

本明細書で使用される場合、ZCHC14タンパク質結合配列は、ZCHC14タンパク質と相互作用可能である／それによって結合され得るヌクレオチド配列である。「ZCHC14」とは、ヒトジンクフィンガーCCHCドメイン含有タンパク質14（BDG-29とも呼ばれる）を指し、UniProtKB識別子：Q8WYQ9及びNCBI遺伝子番号：23174、2021年7月4日に更新を有する。ZCHC14を導入遺伝子mRNAの3'領域へ動員すると、結果としてZCHC14-Tent4の複合体が生じ、これによって、ポリアデニル化mRNAのポリAテール内の混合テーリングが可能になる。混合テーリングは、標的細胞における導入遺伝子mRNAの安定性を増大する。

【0492】

特定のヌクレオチド配列がZCHC14タンパク質によって結合され得るか否かを決定する方法は、当技術分野で周知である；例えば、「試験管内進化法」（SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment）の方法又はRNA電気泳動移動度シフト解析の方法又はRNAプルダウン（架橋／免疫沈降）の方法又はこれらの方法の組合せ（Mol Biol (Mosk). May-Jun 2015;49(3):472-81）を参照されたい。ヌクレオチド：タンパク質相互作用を検出するための日常的な方法、例えば、ヌクレオチドプルダウンアッセイ、ELISAアッセイ、レポーターアッセイなども使用できる。したがって、適当なZCHC14タンパク質結合配列は、当業者によって容易に同定できる。

【0493】

10

20

30

40

50

本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、少なくとも 1 つの C N G G N 型ペントループ配列を含む。C N G G N 型ペントループ配列を含むいくつかの Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列が当技術分野で公知である。例えば、H B V 及び H C M V RNA 2. 7 の P R E 並びに w P R E は、C N G G N 型ペントループ配列を有する Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を含むと知られている。ペントループは、A ヘリカル領域に挟まれた、単一のバルジ G 残基を有する G N G G (N) ファミリーループコンホメーションをとり（例えば、Kim et al., 2020 を参照されたい）、N は、任意のヌクレオチドであり得る。

【0494】

本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、任意の適当な C N G G N 型ペントループ配列を含み得る。

10

【0495】

例えば、それらは C T G G T ペントループ配列（H C M V RNA 2. 7 において見出されたステムループにおいて見られるような；また、H C M V RNA 2. 7 の S L α としても知られる）を含み得る。

【0496】

あるいは、それらは、C T G G A ペントループ配列（w P R E の α エLEMENT において見出されたステムループにおいて見られるような；また、w P R E の S L α としても知られる）を含み得る。

【0497】

さらにあるいは、それらは、C A G G T ペントループ配列（H B V の P R E α エLEMENT において見出されたステムループにおいて見られるような；また、H B V の S L α としても知られる）を含み得る。

20

【0498】

H C M V RNA 2. 7、w P R E 及び H B V の S L α 内で見出される C N G G N 型ペントループ配列は、通常、ステムループ構造の一部であり、これは、T E N T 4 依存性テール調節を促進する。

【0499】

したがって、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列はまた、ステムループ配列の一部として C N G G N 型ペントループ配列を含み得る。当業者には明らかであろうが、任意の適当なステムループ配列を使用できる。ステムループ配列にとって必要な相補性の必要とされるレベルは公知であるので、適切なステムループ配列は、当業者によって容易に同定できる。

30

【0500】

異なるステムの長さも使用できる。本明細書における実施例では、7 又は 8 ヌクレオチドのステムが使用されたが、最大で追加の 9 ヌクレオチドを有する（合計 18 nt、各側で 9 が付加される）より長いステムも作動すると示されている（示されていないデータ）。

【0501】

ステムループ配列の限定されない例を以下に提供する。

40

【0502】

例えば、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、ステムループ配列 T C C T C G T A G G C T G G T C C T G G G G A（配列番号 108；ペントループ配列 C T G G T を含み、H C M V RNA 2. 7 の S L α の配列に対応する）を含み得る。

【0503】

あるいは、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、ステムループ配列 G C C C G C T G C T G G A C A G G G G C（配列番号 109；ペントループ配列 C T G G A を含み、w P R E の S L α の配列に対応する）を含み得る。

【0504】

さらにあるいは、それらは、ステムループ配列 T T G C T C G C A G C A G G T C T G G A G C A A（

50

配列番号 118 ; ペンターループ配列 CAGGT を含み、HBV の SL $\alpha$  の配列に対応する) を含み得る。

【0505】

あるいは、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、C N G G N 型ペンターループ配列を異種ステムループ配列の一部として含み得る。適当な異種ステムループ配列は、当業者によって容易に同定できる。

【0506】

本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、C N G G N 型ペンターループ配列をステムループ配列の一部として、より長い配列内に含み得る (すなわち、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、ステムループ配列自体を挟む追加の配列を含む)。

【0507】

フランキング配列の例は、配列番号 110 (追加のフランキング配列を有する、配列番号 108 で示されるステムループ構造の配列を示す) 及び配列番号 111 (追加のフランキング配列を有する、配列番号 109 で示されるステムループ構造の配列を示す) に与えられている:

TGCCGTCGCCACCGCGTTATCCGTTCCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGAACGGGTCGGCGGCCGGTTCGGCTTC

T

(配列番号 110 : Z C C H C 1 4 ステムループ (H C M V RNA 2.7 の転写後調節エレメント (PRE) に由来する) (下線が引かれているフランキング配列、太字の Z C C H C 1 4 相互作用性ループ)

CTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACT

GACAATTCCGTGGTGTGT

(配列番号 111 - Z C C H C 1 4 ステムループ (ウッドチャック肝炎ウイルス (WPRE) の PRE に由来する - (下線が引かれているフランキング配列、太字の Z C C H C 1 4 相互作用性ループ)

【0508】

フランキング配列のさらなる例は、配列番号 142 (追加のフランキング配列を有する、配列番号 118 に示されるステムループ構造の配列を示す) に与えられている:

CGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAA  
ACCTCATCGGGACCGACAATTCTGTCTGTACTCT (HBV ステムループ + フランキン  
グ配列: ステムループは下線が引かれている) (配列番号 142)

【0509】

フランキング配列は、対応する PRE 中のこれらの位置にネイティブに存在するヌクレオチドであり得る (例えば、配列番号 111 について、フランキング配列は、wPRE の SL $\alpha$  配列の周囲にネイティブに存在するものである)。あるいは、異種フランキング配列を使用してもよい。本明細書で提供されるフランキング配列は、単に例としてであり、代替のフランキング配列及び異なる長さを有するフランキング配列も使用してもよい。

【0510】

一例では、本明細書で記載されるような Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、少なくとも 1 つの C N G G N 型ペンターループ配列及びステムループ配列を含み得るが、フランキング配列を含まない。

【0511】

一例では、本明細書で記載されるような Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、少なくとも 1 つの C N G G N 型ペンターループ配列を含むが、ステムループ配列又はフランキング配列を含まない。

## 【0512】

本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、全長転写後調節エレメント (PRE) αエレメントを含まない。さらに、それらは、全長 PRE γエレメント (例えば、wPRE 又は wPRE 3 において見られるもの) を含まない。そのようなものとして、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、全長転写後調節エレメント (PRE) αエレメントも、全長 PRE γエレメントも有さない。この理由は、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 中のシス作用性配列のサイズをできる限り最小にし、より大きな導入遺伝子の容量を提供することを目的とするからである。本発明者らは、驚くべきことに、PRE αエレメントの全長配列及び PRE γエレメントの全長配列は、本明細書で観察された効果を得るためには必要ではないことを見出した。

10

## 【0513】

したがって、本明細書で記載される Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、wPRE 又は wPRE 3 ではない。

## 【0514】

全長 PRE αエレメント、βエレメント及び γエレメント配列は、当業者によって容易に同定可能である。例として、wPRE の全長 PRE αエレメント、βエレメント及び γエレメント配列は、それぞれ配列番号 114、配列番号 115 及び配列番号 113 として本明細書において提供される：

20

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGT  
TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGC  
TTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTT (配列番号 113  
; wPRE γエレメントの全長配列)

## 【0515】

GCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCA  
CTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC  
CTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCC  
TGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT  
GTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGC (配列番号 114 ; wPRE αエレ  
メントの全長配列)

30

## 【0516】

TGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTT  
CGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTC  
TTCCGCGTCTTTCGCTTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCC  
CGCCTG (配列番号 115 ; wPRE βエレメントの全長配列)

## 【0517】

PRE αエレメントは、そのようなものとして HCMV RNA 2.7 内で同定されていないが、同等の機能を有する「最小エレメント」が見出されている：

40

ACCGCGTTATCCGTTCTCGTAGGCTGCTGCTGGGGAACGGGTCGGCGGCCGGTCTG  
GCTTCTGTTTTATTTTTTTTTTTTATTTTTTATCTTCTCCTTTC (配列番号 141) (ス  
テムループは下線が引かれている) (HCMV-RNA 2.7 PRE α「様」エレ  
メント (Kim et al., 2020 における断片 1E) )。

## 【0518】

さらに、HBV の全長 PRE αエレメント配列はまた、配列番号 95 として提供される (HBV は、γエレメントを含まない)：

CTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGG  
GGCTTGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGTCTCCTCTGCCGAT  
CCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACC  
TCATCGGGACCGACAATTCTGTCGTACTCT (配列番号 95)

## 【0519】

50

したがって本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、以下の配列のうちいずれも含まない：配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 3、配列番号 9 5 又は配列番号 1 4 1。

【0520】

一例では、本明細書で提供されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、P R E α エlement断片に対応する配列を有する場合がある（言い換えれば、P R E α エlementの一部と同一であるが、全長 P R E α エlement配列のすべてを含まない（すなわち、それより短い）配列を有する場合がある）。言い換えれば、本明細書で提供されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、P R E α エlementの一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列であり得る。

10

【0521】

例えば、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、H B V P R E α エlementの断片（その一部分）である場合がある。この文脈では、H B V P R E α エlement断片として記載され得る。また、H B V P R E α エlementの一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列として記載され得る。この文脈では、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 9 5 の断片（その一部分）である場合がある。言い換えれば、配列番号 9 5 の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列である場合がある。この例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 1 8 又は配列番号 1 4 2 の配列を含み得る。

【0522】

20

例えば、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、H C M V R N A 2 . 7 配列の断片（その一部分）である場合がある。例えば、配列番号 1 4 1 に示される配列の断片（その一部分）である場合がある。H C M V R N A 2 . 7 断片（例えば、配列番号 1 4 1 に示される配列の断片）として記載され得る。また、H C M V R N A 2 . 7 配列の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列として記載され得る。この例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 0 8 又は 1 1 0 の配列を含み得る。例えば、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 4 1 に示される配列の断片であり、配列番号 1 0 8 又は 1 1 0 の配列を含む場合がある。

【0523】

30

例えば、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、w P R E P R E α エlementの断片（その一部分）である場合がある。この文脈では、w P R E α エlement断片として記載され得る。また、w P R E α エlementの一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列として記載され得る。この文脈では、シス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 1 4 の断片（その一部分）である場合がある。言い換えれば、配列番号 1 1 4 の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列である場合がある。この例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 0 9 又は 1 1 1 の配列を含み得る。

【0524】

40

本発明者らは、公知の P R E（具体的には、H C M V R N A 2 . 7 中に存在する Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列及び／又はウッドチャック肝炎ウイルスの P R E（w P R E）中に存在する Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列）に由来する Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を使用することによって本発明を例証した。これらの Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、本明細書において特に企図されるが、他の適当な Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列（例えば、他の P R E に由来する）を代わりに（又は追加で）使用することもできる。

【0525】

本明細書で記載される Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、ウイルスベクターの「骨格」配列を最小にしながら導入遺伝子発現を増強するために使用され、その結果、より大きなペイロードを含有するベクターの力価を維持又は増大することができる。したがって、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、通常小さい。

50

## 【0526】

例えば、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に挿入されるZ C C H C 1 4タンパク質結合配列は、最大240ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108、109、110、111、118又は142の配列を含み得る。

## 【0527】

一例では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に挿入されるZ C C H C 1 4タンパク質結合配列は、最大200ヌクレオチド（すなわち、200ヌクレオチド以下の長さ）であり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108、109、110、111、118又は142の配列を含み得る。

10

## 【0528】

さらなる例では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に挿入されるZ C C H C 1 4タンパク質結合配列は、最大150ヌクレオチド（すなわち、150ヌクレオチド以下の長さ）であり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108、109、110、111、118又は142の配列を含み得る。

## 【0529】

一例では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に挿入されるZ C C H C 1 4タンパク質結合配列は、最大100ヌクレオチド（すなわち、100ヌクレオチド以下の長さ）であり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108、109、110、111、118又は142の配列を含み得る。

20

## 【0530】

例えば、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの3' UTR中に挿入されるZ C C H C 1 4タンパク質結合配列は、最大90ヌクレオチド（すなわち、90ヌクレオチド以下の長さ）であり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108、109、110、111、118又は142の配列を含み得る。

## 【0531】

シス作用性Z C C H C 1 4タンパク質結合配列が、HBV PRE αエレメントの断片（その一部分）（すなわち、配列番号95の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列）である例では、シス作用性Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号95の最大240ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号118又は142の配列を含み得る。

30

## 【0532】

一例では、配列番号95の最大200ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号118又は142の配列を含み得る。

## 【0533】

例えば、配列番号95の最大150ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号118又は142の配列を含み得る。

## 【0534】

さらなる例では、配列番号95の最大100ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号118又は142の配列を含み得る。

40

## 【0535】

例えば、配列番号95の最大90ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号118又は142の配列を含み得る。

## 【0536】

シス作用性Z C C H C 1 4タンパク質結合配列が、HCMV RNA 2.7配列の断片（その一部分）（例えば、配列番号141の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列）である例では、シス作用性Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号141の最大240ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列は、配列番号108又は110の配列を含み得る。

## 【0537】

50

一例では、配列番号 141 の最大 200 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 108 又は 110 の配列を含み得る。

【0538】

例えば、配列番号 141 の最大 150 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 108 又は 110 の配列を含み得る。

【0539】

さらなる例では、配列番号 141 の最大 100 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 108 又は 110 の配列を含み得る。

【0540】

さらなる例では、配列番号 141 の最大 90 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 108 又は 110 の配列を含み得る。

【0541】

シス作用性 Z C C H C 14 タンパク質結合配列が、w P R E α エLEMENT の断片（その一部分）（すなわち、配列番号 114 の一部を構成する短縮化されたヌクレオチド配列）である例では、シス作用性 Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 114 の最大 240 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 109 又は 111 の配列を含み得る。

【0542】

一例では、配列番号 114 の最大 200 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 109 又は 111 の配列を含み得る。

【0543】

例えば、配列番号 114 の最大 150 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 109 又は 111 の配列を含み得る。

【0544】

さらなる例では、配列番号 114 の最大 100 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 109 又は 111 の配列を含み得る。

【0545】

さらなる例では、配列番号 114 の最大 90 ヌクレオチドであり得る。この例では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、配列番号 109 又は 111 の配列を含み得る。

【0546】

本明細書で提供される一例では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 中に挿入される Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、最大 90 ヌクレオチド（すなわち、最大 90 ヌクレオチド長）である。例えば、w P R E 由来の Z C C H C 14 ステムループの配列を提供し、90 ヌクレオチドの長さである配列番号 111 を参照されたい。

【0547】

本明細書で提供される一例では、本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 中に挿入される Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、最大 72 ヌクレオチド（すなわち、最大 72 ヌクレオチド長）である。例えば、H C M V RNA 2.7 由来の Z C C H C 14 ステムループの配列を提供し、72 ヌクレオチドの長さである配列番号 112 を参照されたい。これらの例は、比較的短い配列が機能的であり得ることを実証する。

【0548】

本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 中に挿入される Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、Z C C H C 14 タンパク質によって結合され得る最小配列であり得る（すなわち、最小 Z C C H C 14 タンパク質結合配列であり得る）。言い換えれば、所望の機能性を依然として提供する最小の配列であり得る。P R E においてネイティブに見出される Z C C H C 14 タンパク質結合配列との関連では、Z C C H C 14 タンパク質結合配列は、したがって、Z C C H C 14 タンパク質によって結合され得る最小 P R E 配列であり得る。このような最小配列を決定するための方法は、当技術分野で公知である（例えば、ヌクレオチドプルダウンアッセイ、E L I S A アッセイ、レポーターアッセ

10

20

30

40

50

イなどを使用できる)。

【0549】

一例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 0 8 又は 1 0 9 の配列を含む、又はそれからなる場合がある。Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、Z C C H C 1 4 に結合可能である配列番号 1 0 8 又は 1 0 9 の断片を含む、又はそれからなる場合がある。

【0550】

一例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 1 0 又は 1 1 1 の配列を含む、又はそれからなる場合がある。Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、Z C C H C 1 4 に結合可能である配列番号 1 1 0 又は 1 1 1 の断片を含む、又はそれからなる場合がある。

10

【0551】

一例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 1 8 又は 1 4 2 の配列を含む、又はそれからなる場合がある。Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、Z C C H C 1 4 に結合可能である配列番号 1 1 8 又は 1 4 2 の断片を含む、又はそれからなる場合がある。

【0552】

Z C C H C 1 4 に結合可能である特定の配列の断片を対象とする実施形態の場合には、当業者は、所与の所望の断片が、このタンパク質結合活性を保持するか否かを容易に決定でき(例えば、本開示において別の場所で記載されるアッセイによって)、そのため、過度の負担又は過剰の実験の必要性を伴わずにこの要件が満たされるか否かを評価できる。

20

【0553】

適宜、本明細書で記載されるような Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、P R E β エlementを含まない。一部の例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列は、配列番号 1 1 5 の P R E β エlementに対して特異的であるいかなる配列も含まない。言い換えれば、w P R E の P R E β エlementのいかなるものも含まない。さらに、配列番号 1 1 3 の P R E γ エlementに対して特異的であるいかなる配列も含まない場合がある。言い換えれば、w P R E の P R E γ エlementのいかなるものも含まない場合があり、また w P R E の P R E β エlementのいかなるものも含まない場合がある。

【0554】

これまでのところ、本明細書で提供されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列及びシス作用性 C A R 配列は、別個に論じられてきた。しかし、以下の実施例の節において示されるように(図 2 5 も参照されたい)、これらの配列の両方とも、導入遺伝子発現カセットの 3' U T R 内に存在し得る。したがって、導入遺伝子発現カセットを提供するために、本明細書で記載されるシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列のいかなる態様も、本明細書で記載されるシス作用性 C A R 配列のいかなる態様とも組み合わせることができ、3' U T R は、シス作用性 C A R 配列及びシス作用性 Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列の両方を含む。

30

【0555】

このような例では、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を、C A R 配列の 3' に位置づけることができる。

40

【0556】

あるいは、Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列を、導入遺伝子発現カセットの 3' U T R 内の C A R 配列の 5' に位置づけることができる。

【0557】

本明細書で記載される新規シス作用性配列の適切な位置は、当業者によって例えば、図 2 5 を考慮して同定できる。

【0558】

一部の例では、導入遺伝子発現カセットの 3' U T R は、少なくとも 2 つ空間的に別個のシス作用性 C A R 配列及び／又は少なくとも 2 つ空間的に別個のシス作用性 Z C C H C

50

1 4 タンパク質結合配列を含む。

【0559】

一部の例では、導入遺伝子発現カセットの3' UTR中のシス作用性配列は、配列番号240、配列番号241又は配列番号242の配列を含み得る。

【0560】

一部の例では、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、シス作用性CAR配列及び／又はシス作用性ZCHC14タンパク質結合配列の3'に位置づけたポリA配列をさらに含む。ポリA配列の詳細は、本明細書において別の場所で提供される。

【0561】

導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、追加のPRE配列（本明細書で記載される新規シス作用性CAR配列及び／又はシス作用性ZCHC14タンパク質結合配列に加えて）を含み得る。例えば、3' UTRは、全長PRE配列、例えば、wPREを有し得る。

10

【0562】

ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）転写後調節エレメント（wPRE）は、転写されると、発現を増強する三次構造を作出するヌクレオチド配列である。この配列は、ウイルスベクターによって送達された遺伝子の発現を増大するために分子生物学においてよく使用される。wPREは、所与の順序でγ、α及びβ構成成分（本明細書においてエレメントとも呼ばれる）を有する3部からなる調節エレメントである。wPREは、協同的であり得るいくつかの代替経路によって媒介されるRNAの核細胞質間輸送を促進する。さらに、wPREは、異種cDNAの発現を刺激する追加の転写後機構に対して作用すると示されている。wPREに関するさらなる詳細は、本明細書において別の場所で提供されている。

20

【0563】

本発明者らは、3' UTRが新規シス作用性CAR配列及び／又はシス作用性ZCHC14タンパク質結合配列の両方及び追加のPRE、例えば、wPREを含む導入遺伝子発現カセットは、細胞における導入遺伝子発現の著しい上昇を達成できることを実証した。

【0564】

他の例では、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、追加のPRE配列を含まない（このような例では、本明細書で記載される新規シス作用性CAR配列及び／又はシス作用性ZCHC14タンパク質結合配列は、導入遺伝子発現を十分に増強すると考えられ、例えば、追加のPRE配列（例えば、wPRE配列）を省くことによって達成される追加の導入遺伝子の容量が望ましい）。

30

【0565】

本明細書で記載される導入遺伝子発現カセットは、導入遺伝子に作動可能に連結したプロモーターをさらに含み得る。いくつかの適当なプロモーターは、本明細書において別の場所で詳細に論じられている。

【0566】

例えば、プロモーターは、そのネイティブイントロンを欠くもの（例えば、EFSプロモーター、PGKプロモーター及びUBCsプロモーターからなる群から選択されるプロモーター）であり得る。

40

【0567】

あるいは、プロモーターは、イントロンを含む場合がある（例えば、プロモーターは、EF1αプロモーター及びUBCプロモーターからなる群から選択され得る）。これらのプロモーターは、本明細書において別の場所で詳細に論じられている。

【0568】

本明細書で記載されるヌクレオチド配列は、導入遺伝子発現カセット（本明細書において導入遺伝子カセットとも呼ばれる）を含み得る。本発明は、本明細書で記載される新規シス作用性配列が、レンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットの3' UTR内に存在する場合に特に有用性を有する。したがって、導入遺伝子発現カセットのいかなる考察

50

も、レンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットと特に関連する。

【0569】

レンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットは、任意の適切なレンチウイルスベクター導入遺伝子発現カセットであり得る。適当なレンチウイルスベクターは、本明細書において別の場所で詳細に論じられている。

【0570】

本明細書で提供されるヌクレオチド配列は、ウイルスベクターゲノムの一部であり得る。言い換えれば、本明細書で提供される導入遺伝子発現カセットは、ウイルスベクターゲノムを作り上げるために必要とされる追加の要素をさらに含む、より大きなヌクレオチド配列の一部であり得る。これは、例えば、レンチウイルスベクターゲノムとの関連では、通常のパッケージング配列及び *rev* 応答要素 (RRE) を含む得る。適切な実施形態では、これらは、追加の転写後調節要素 (PRE)、例えば、上記で考慮されるようなウッドチャック肝炎ウイルスに由来するもの (wPRE) をさらに含む得る。これらの要素の各々は、本明細書において別の場所でより詳細に論じられている。

10

【0571】

したがって、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列もまた本明細書で提供され、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、本明細書において別の場所で記載される導入遺伝子発現カセットを含む。

【0572】

一例では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある（その結果、導入遺伝子発現カセットは、センス方向でコードされる）。

20

【0573】

あるいは、導入遺伝子発現カセットは、ベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合がある、すなわち、内部導入遺伝子プロモーター及び遺伝子配列は、ベクターゲノムカセットプロモーターと対向している。

【0574】

当業者には公知であろうが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットの 3' UTR は、通常、3' ポリプリミン管 (3' ppt) 及び DNA 結合 (att) 部位をさらに含む。通常、3' ppt は、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットの 3' UTR 内の att 部位の 5' に位置づけられる。本発明が、ゲノム発現カセットに対して順方向（センス方向）である導入遺伝子発現カセットとの関連で企図される場合には、3' ppt 及び att 部位に対して本明細書で提供される新規シス作用性配列を配置することを、考慮する必要がある場合がある。これのさらなる詳細は、実施例 10 に提供される。

30

【0575】

例えば、3' ppt 及び att 部位の両方（例えば、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノム発現カセットの）を含むコア配列は、配列番号 93 の配列を有する場合がある（3' ppt は太字であり、att は下線が引かれている）：

5'-AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCAC-3'（配列番号 93）

40

【0576】

したがって、導入遺伝子カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある場合には、上記の配列（配列番号 93 の）が本明細書で記載される新規シス作用性配列によって破壊されないことが好ましい。

【0577】

一例では、配列番号 94 の配列を使用して、3' ppt 及び att 部位（例えば、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノム発現カセットの）、（3' ppt は太字であり、att は下線が引かれている）を提供する：

50

5'-CCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCT  
AATTCACTCCCAA-3' (配列番号 9 4)

【0578】

したがって、導入遺伝子カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある場合には、上記の配列（配列番号 9 4 の）が本明細書で記載される新規シス作用性配列によって破壊されないことが好ましい。

【0579】

好ましくは、導入遺伝子カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある場合には、導入遺伝子カセットの 3' UTR 内のシス作用性エレメントは、上記の中断されていない配列の上流及び／又は下流に配置され得る。図 25 はまた、CARE 及び／又は ZCHC14 結合ループが、PRE と共に、又は伴わずに、順方向又は逆方向の導入遺伝子と共に、LV ゲノム発現カセット内にどのように不定に配置され得るかを示す。

【0580】

例えば、導入遺伝子発現カセットが、ゲノム発現カセットに対して順方向にある場合には、本明細書で記載されるシス作用性配列を、3' ppt の 5' 及び／又は att 部位の 3' に位置づけることができる。好ましくは、この例では、本明細書で記載されるシス作用性配列は、配列番号 9 3 又は配列番号 9 4 の配列の 5' に位置づけられる。

【0581】

あるいは、本明細書で記載されるシス作用性配列は、配列番号 9 3 又は配列番号 9 4 の配列の 3' に位置づけることができる。

【0582】

いずれかの例でも、配列番号 9 3 又は配列番号 9 4 の配列は破壊されない。

【0583】

本明細書で記載されるヌクレオチド配列は、本明細書において別の場所でより詳細に記載される追加の特徴を含み得る。例えば、ヌクレオチド配列がレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含む場合には、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され得る。さらに、メジャースプライスドナー部位の 3' の潜在的スプライスドナー部位も不活化され得る。本明細書において別の場所でより詳細に記載される一例では、不活化されたメジャースプライスドナー部位は、GGGGAAGGCAACAGATAAATATGCCTTAAAT (配列番号 4、MSD-2KOM5) の配列を有し得る。

【0584】

ヌクレオチド配列が、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含む場合には、ヌクレオチド配列は、改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列をさらに含む場合があり、改変された U1 snRNA は、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている。例えば、ウイルスベクターゲノム発現カセットは、改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結し得る。この特徴は、本明細書において別の場所でより詳細に記載されている。

【0585】

標的細胞において導入遺伝子発現を改善する 1 つ又は 2 つ以上のシス作用性配列を同定するための方法も提供され、方法は、

(a) 標的細胞に本明細書で記載されるウイルスベクターを形質導入するステップ、

(b) 高レベル導入遺伝子発現を有する標的細胞を同定するステップ、及び

(c) 任意選択で、これらの標的細胞内に存在する導入遺伝子 mRNA の 3' UTR 内に位置づけられる 1 つ又は 2 つ以上のシス作用性配列を同定するステップを含む。

10

20

30

40

50

## 【0586】

この方法を使用して、本明細書で記載される特定のシス作用性配列のうち1つ又は2つ以上が、特定の標的細胞において導入遺伝子発現を改善するか否かを決定することができる。したがって、本方法は、ウイルスベクター、導入遺伝子及び標的細胞の特定の組合せに対する本明細書で記載される特定のシス作用性配列の選択を目的に合わせるための機構を提供する。

## 【0587】

したがって、

(i) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR中の異なるシス作用性配列、及び

(ii) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR内の異なるシス作用性配列位置、及び／又は 10

(iii) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR中の異なるシス作用性配列組合せ

を有する複数のウイルスベクターを使用して本方法を有利に実施して、標的細胞において導入遺伝子発現を改善する1つ又は2つ以上のシス作用性配列を同定できる。

## 【0588】

これらの標的細胞内に存在する導入遺伝子mRNAの3' UTR内に位置づけられる1つ又は2つ以上のシス作用性配列を同定するためのいかなる適当な手段も、本方法内で使用できる。一例では、本方法のステップ(c)は、RTPCRを実施すること、及び任意選択で、導入遺伝子mRNAをシーケンシングすることを含む。

## 【0589】

ベクターイントロン

20

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロン(VI)を含む。

## 【0590】

したがって、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では：

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメントを含まない、

30

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

## 【0591】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接している潜在的スプライスドナー部位は、不活化されている。

## 【0592】

本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では：

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位及びメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接している潜在的スプライスドナー部位は、不活化されている、

40

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

## 【0593】

ベクターイントロンは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対してセンス方向(すなわち、順方向)にある。

## 【0594】

50

一部の実施形態では、ベクターイントロンは、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0595】

一実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある、すなわち、その結果、導入遺伝子発現カセットは、センス方向でコードされる。

【0596】

一実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである。

【0597】

一部の実施形態では：

a) ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに／又は

b) ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列、及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに／又は

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

【0598】

一部の実施形態では：

a) ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに

b) ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列、及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

【0599】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きであり、並びに

a) ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに／又は

b) ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列、及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに／又は

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

【0600】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きであり、並びに：

a) ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに

b) ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列、及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに

c) 導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、ベクターイントロンを含む。

【0601】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットの3' UTRは、導入遺伝子発現カセットに対してアンチセンスにコードされるベクターイントロンを含む。したがって、導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きであり、導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、ベクターイントロンを含む場合には、ベクターイントロンは、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対してアンチセンス方向

10

20

30

40

50

にある。

【0602】

レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列の一部の実施形態では：

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位及びメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接している潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに

iv) a) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合には

i. ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、並びに

ii. ヌクレオチド配列は、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列、及び／又は配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含む、並びに

iii. 導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、ベクターイントロンを含む、並びに

b) ベクターイントロンは、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。

【0603】

本明細書で記載されるように、本発明者らは、驚くべきことに、VIが、RREの欠失を可能にし、rev/RRE非依存性LVゲノムをもたらす（実施例14を参照されたい）ことを見出した。VI配列は細胞質において出現する前にLV vRNAから除去されるので、これによって、LVの導入遺伝子の容量の約780ntの増大が可能になる。本明細書における他の例では、本発明者らは、パッケージング配列の一部として通常保持されるgag配列からのgag-p17不安定性（p17-INS）エレメントの欠失によって、少なくともさらに約260ntが解放され得ることを示す。

【0604】

さらにより驚くべきことは、RREが欠失したLVゲノムにおいてVIを使用して最高のLV力価を達成するために、MSD-2KO特徴が有益であると思われる（図14を参照されたい）ことであった。したがって、rev/RRE非依存性LVゲノムのこれらの新規クラスのMSD-2KO及びVI特徴は、分子レベルで相互に「相利共生」、すなわち、相互に有益であり得る。VIは、LV vRNA生成／力価に対するMSD-2KO変異の負の影響を救済する可能性があり、MSD-2KO変異は、内部スプライスアクセプター（VIのものを含む）への異常なスプライシングを停止し、VI含有RRE欠失LVゲノムの最大力価を可能にする可能性がある。

【0605】

本発明によるVIは、任意の適切な機能的イントロンであり得る。

【0606】

そのようなものとして、VIは、イントロンとして認識可能な任意のヌクレオチド配列を含み得る。イントロンは、当技術分野で周知である。通常、イントロンは、RNA分子がタンパク質に翻訳される前に、スプライシングで切り出される、すなわち、RNAスプライシングによって除去される遺伝子内のヌクレオチド配列である。イントロンは、いくつかの特徴、例えば、スプライス部位及び／又はランチポイントの存在によって同定され得る。

【0607】

したがって、本発明によるVIは、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部

10

20

30

40

50

位及びブランチポイントを含み得る。

【0608】

本明細書で使用される場合、「ブランチポイント」という用語は、RNAスプライシングの際にスプライスドナー部位に対して求核攻撃を開始するヌクレオチドを指す。結果として生じた上流エクソンの遊離3'末端が次いで、スプライスアクセプター部位に対して第2の求核攻撃を開始でき、RNAラリアットとしてイントロンを放出し、イントロンを挟む2つの配列（例えば、上流及び下流エクソン）を共有結合する。

【0609】

本発明に従って使用するのに適切な例示的スプライスドナー及びスプライスアクセプター配列は、以下の表4に提供されている。

【表4】

10

20

30

40

50

表4. 例示的スプライスドナー及びスプライスアクセプター配列

| 説明                                                            | 配列                                        | 配列<br>番号 |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|
| コアスプライ<br>スドナーコン<br>センサス                                      | MAGGURR; 式中、M は、A 又は C であり、R は、A 又は G である | -        |
| U1 snRNA に<br>対するさらな<br>る相補性を有<br>するスプライ<br>スドナーコン<br>センサス    | MAGGUAAGU; 式中、M は、A 又は C である。             | -        |
| U1 snRNA に<br>対する最大相<br>補性を有する<br>スプライスド<br>ナーコンセン<br>サス      | MAGGUAAGUAU; 式中、M は、A 又は C である。           | 119      |
| EF1a スプラ<br>イスドナー(下<br>線が引かれた<br>もの = エクソ<br>ン/イントロ<br>ン)     | GAACACAG/GTAAGTGCCGTGTGTGG                | 120      |
| ユビキチンス<br>プライスドナ<br>ー(下線が引か<br>れたもの = エ<br>クソン/イント<br>ロン)     | GTCAC <u>TTG</u> /GTGAGTAGCGGGCTGCT       | 121      |
| ニワトリアク<br>チンスプライ<br>スドナー(下線<br>が引かれたも<br>の = エクソン<br>/イントロン)  | GGGCGGGA/GTCGCTGCGTTGCCTTC                | 122      |
| ウサギβ-グロ<br>ビンスプライ<br>スドナー(下線<br>が引かれたも<br>の = エクソン<br>/イントロン) | CTGGGCAG/GTAAGTATCAAGGTTAC                | 123      |

10

20

30

40

50

|                                                         |                                                                                          |     |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HIV-1 主要スプライスドナー(下線が引かれたもの = エクソン/イントロン)                | GGCGA <u>CTG</u> /GTGAGTACGCC                                                            | 124 |
| HIV-1 スプライスドナー1a(下線が引かれたもの = エクソン/イントロン)                | TAGGACAG/GTAAGAGATCAGGCTGA                                                               | 125 |
| HIV-1 スプライスドナー4(下線が引かれたもの = エクソン/イントロン)                 | TCAAAGCA/GTAAGTAGTACATGTAA                                                               | 126 |
| ヒト $\beta$ -グロビンスプライスドナー(下線が引かれたもの = エクソン/イントロン)        | CTGGGCAG/GTGAGTCTATGGGACCC                                                               | 127 |
| コアスプライスアクセプターコンセンサス                                     | YYYYYYNCAGR; 式中、Y は、C 又は T/U であり、N は、任意のヌクレオチド(すなわち、G, C, A 又は T/U) であり、R は、G 又は A である   | 128 |
| EF1a スプライスアクセプター(下線が引かれたもの = イントロン/エクソン; 太字 = ブランチ部位領域) | <b>GGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG</b> <u>TTTTTTTCTTCCATTT</u><br><u>CAG/GTGTCTGA</u> | 129 |

10

20

30

40

50

|                                                                                            |                                                                                             |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ユビキチンス<br>プライスアク<br>セプター(下線<br>が引かれたも<br>の = イントロ<br>ン/エクソン;<br>太字 = ブラン<br>チ部位領域)         | <b>CAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGG</b> <u>CTTTTCTCCGTCGC</u><br><u>AG/GACGCAG</u>      | 130 |
| IgG 重鎖スプ<br>ライスアクセ<br>プター(下線が<br>引かれたもの<br>= イントロン/<br>エクソン; 太<br>字 = ブランチ<br>部位領域)        | <b>TGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACAT</b> <u>TCCACTTTGCCTTTCTCTCCAC</u><br><u>AG/GTGTCCACTC</u>  | 131 |
| ウサギβ-グロ<br>ビンスプライ<br>スアクセプタ<br>ー(下線が引か<br>れたもの = イ<br>ントロン/エク<br>ソン; 太字 =<br>ブランチ部位<br>領域) | <b>GCGGCTTTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATG</b> <u>CCTTCTTCTTTTCCTA</u><br><u>CAG/CTCCTGGGC</u>   | 132 |
| ヒトβ-グロビ<br>ンスプライス<br>アクセプター<br>(下線が引かれ<br>たもの = イン<br>トロン/エクソ<br>ン; 太字 = ブ<br>ランチ部位領<br>域) | <b>CCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATA</b> <u>CCTCTTATCTTCCTCCC</u><br><u>ACAG/GTGTCCACT</u> | 133 |

10

20

30

40

## 【0610】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、MAGGURR、MAGGUAA GU及び配列番号119～127から選択される配列を含む。

## 【0611】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号128～133から選択される配列を含む。

## 【0612】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、MAGGURR、MAGGUAA GU及び配列番号119～127から選択される配列並びに配列番号128～133から

50

選択される配列を含む。

【0613】

1つの好ましい実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号126に示される配列及び配列番号132に示される配列を含む。

【0614】

ネイティブスプライスドナー配列は、本明細書で記載されるコアスプライスドナーコンセンサス配列に（すなわち、MAGGURRに；Mは、A又はCであり、Rは、A又はGである）完全に忠実ではない場合がある。例えば、配列番号126のスプライスドナー配列は、コアスプライスドナーコンセンサス配列に完全に忠実ではない。このようなネイティブスプライスドナー配列は、結果として生じる改変されたスプライスドナー配列及び／又は結果として生じる改変されたスプライスドナー配列を含むベクターイントロンの機能に対して有害な効果を及ぼさずに、コアスプライスドナーコンセンサス配列との一致を増大するように、又はそれと完全に一致するように改変できる。ヌクレオチド配列を改変する方法は、当技術分野で公知である。コアスプライスドナーコンセンサス配列との一致を増大するように上記のようにスプライスドナー配列を改変することは、当業者の範囲内である。

10

【0615】

本発明によるVIは、ネイティブに存在するイントロンであり得る。

【0616】

本発明によるVIは、合成である場合も、又は任意の適切な生物に全体的若しくは部分的に由来する場合もある。

20

【0617】

一実施形態では、ベクターイントロンは、EF1 $\alpha$ に由来する。一実施形態では、ベクターイントロンは、EF1 $\alpha$ のイントロンである。

【0618】

一実施形態では、ベクターイントロンは、ヒト $\beta$ -グロビンイントロン-2に由来する。一実施形態では、ベクターイントロンは、ヒト $\beta$ -グロビンイントロン-2である。

【0619】

さらに、VIを、以下の配列の使用によってベクター力価を改善するように最適化できる：[1] VIsプライスドナー部位の上流の短いエクソン性スプライシングエンハンサー（ESE）、[2] 最適スプライスドナー部位（通常、U1 snRNAに対して最大アニーリング能力を有する）、[3] 最適ブランチ及びスプライスアクセプター部位の使用、並びに[4] VIsプライスアクセプター部位の下流の短いエクソン性スプライシングエンハンサー（ESE）の使用。最も最適なVIバリエーションの例として、HIV-1と細胞性イントロン、例えば、ヒト $\beta$ -グロビンイントロン-2（実施例18）に由来する複合配列があった。

30

【0620】

本発明によるVIは、異なるイントロン由来の機能的配列などの配列を含むキメラ又はモジュラーイントロンであり得る。したがって、本発明のVIは、1つより多いイントロン由来の機能的配列などの異なる配列の複合物を含むように設計される場合があり、このような配列は、例えば、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、ブランチポイント配列を含む場合がある（表7を参照されたい）。ブランチポイント及びスプライスアクセプター部位配列と一緒に、本明細書において「ブランチースプライスアクセプター配列」とも呼ばれる場合もある。

40

【0621】

本発明によるVIには、上流のエクソン性スプライシングエンハンサー（ESE）エレメント、例えば、HIV-1由来のhESE、hESE2及びhGARが提供される場合がある（表7を参照されたい）。hESE、hESE2及びhGARの配列を以下に提供する。

【0622】

50

h E S E（下線が引かれたもの＝h E S E）：

GTCGACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGATGCATCTCG  
AGC（配列番号 1 3 4）

【0 6 2 3】

c p p t／C T Sの下流に示されるh E S E 2（下線が引かれたもの＝h E S E 2；太字＝c p p t／C T S）：

AAATTGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAT  
AGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTC  
GGGTTTCACGTGACGCGTCTGCAGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGACAGAGACCTGCAG

ACG（配列番号 1 3 5）

【0 6 2 4】

G A R（下線が引かれたもの＝G A R）：

TGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAA（配列番号 1 3 6）

【0 6 2 5】

一実施形態では、本発明のV Iは、配列番号 1 3 4、1 3 5又は1 3 6に示される配列を含む。

【0 6 2 6】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、MAGGURR、MAGGUAA GU及び配列番号 1 1 9～1 2 7から選択される配列並びに配列番号 1 3 4～1 3 6から選択される配列を含む。

【0 6 2 7】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号 1 2 8～1 3 3から選択される配列及び配列番号 1 3 4～1 3 6から選択される配列を含む。

【0 6 2 8】

一部の実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、MAGGURR、MAGGUAA GU及び配列番号 1 1 9～1 2 7から選択される配列並びに配列番号 1 2 8～1 3 3から選択される配列及び配列番号 1 3 4～1 3 6から選択される配列を含む。

【0 6 2 9】

1つの好ましい実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号 1 2 6、配列番号 1 3 2及び配列番号 1 3 5に示される配列を含む。

【0 6 3 0】

1つの好ましい実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号 1 2 6、配列番号 1 3 2及び配列番号 1 3 6に示される配列を含む。

【0 6 3 1】

1つの好ましい実施形態では、本発明によるベクターイントロンは、配列番号 1 2 6、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 5及び配列番号 1 3 6に示される配列を含む。

【0 6 3 2】

一実施形態では、本発明のV Iは、上流のエクソン性スプライシングエンハンサー（E S E）エレメント、例えば、h E S E、h E S E 2又はh G A Rに作動可能に連結している。

【0 6 3 3】

一実施形態では、本発明のV Iは、H I V－1グアノシン－アデノシンリッチ（G A R）スプライシングエレメントを含む合成ベクターイントロンである。

【0 6 3 4】

一実施形態では、本発明のV Iは、スプライスドナー配列の上流にH I V－1グアノシン－アデノシンリッチ（G A R）スプライシングエレメントを含む合成ベクターイントロンである。

10

20

30

40

50

## 【0635】

一実施形態では、本発明のV Iは、スプライスアクセプターの下流にh E S E 2を含む合成ベクターイントロンである。

## 【0636】

一実施形態では、本発明のV Iは、スプライスアクセプター及びベクターゲノムのc p p t / C T S配列の下流にh E S E 2を含む合成ベクターイントロンである。

## 【0637】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、h G A R上流エンハンサーエレメント並びにH I V S D 4スプライスドナー配列及びブランチースプライスアクセプター配列を含有するヒトβ-グロビンイントロン-2由来配列を含む、又はそれからなるV Iを含む。

10

## 【0638】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、h G A R上流エンハンサーエレメント並びにH I V S D 4スプライスドナー配列、ブランチースプライスアクセプター配列を含有するヒトβ-グロビンイントロン-2由来配列、及びc p p t / C T Sの下流のh E S E 2を含む、又はそれからなるV Iを含む。

## 【0639】

一実施形態では、本発明のV Iは、表7に開示される特徴のいずれも含む。別の実施形態では、本発明のV Iは、イントロン及び（適用可能な場合には）上流エンハンサーエレメントを含み、V I\_\_v 1. 1、V I\_\_v 1. 2、V I\_\_v 2. 1、V I\_\_v 2. 2、V I\_\_v 3. 1、V I\_\_v 4. 1、V I\_\_v 4. 2、V I\_\_v 4. 3、V I\_\_v 4. 4、V I\_\_v 4. 5、V I\_\_v 4. 6、V I\_\_v 4. 7、V I\_\_v 4. 8、V I\_\_v 4. 9、V I\_\_v 4. 10、V I\_\_v 4. 11、V I\_\_v 4. 12、V I\_\_v 5. 1、V I\_\_v 5. 2、V I\_\_v 5. 3、V I\_\_v 5. 4、V I\_\_v 5. 5又はV I\_\_v 5. 7のいずれか1つに記載される特徴の組合せを有する。好ましい実施形態では、本発明のV Iは、V I\_\_v 5. 5の特徴を含む。

20

## 【0640】

ベクターイントロン配列の例示的な例を以下に提供する。

## 【0641】

V I\_\_4. 12（太字=G A R；下線が引かれたもの=H I V-1スプライスドナー4；イタリック体=キメライントロン-ブランチースプライスアクセプター配列；標準文字=エクソン/イントロン/エクソン）：

30

TTTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACTAGTCAGACT  
CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA/GTAAGTAGTACATGTAA CAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAA  
TAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATC  
CACTTTGCCTTTCTCTCCACAG/GTGTCCTACTCCAGTTC（配列番号137）

## 【0642】

40

V I\_\_5. 5（太字=G A R；下線が引かれたもの=H I V-1スプライスドナー4；イタリック体=ヒトβ-グロビン[イントロン2]スプライスアクセプター；標準文字=エクソン/イントロン/エクソン）

TTTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAG**GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA**GCTCATCAGAACTAGTCAGACT  
 CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA/GTAAGTAGTACATGTAA GAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC  
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCA  
GGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCT  
AATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCAATTCTAA  
AGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAATTTCTGCATATAAAAT  
TGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAATTCTGCTTTTATTTTAT  
GGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCT  
TCCTCCACAG/GTGTCCACTCCAGTTC (配列番号 1 3 8)

10

## 【 0 6 4 3 】

V I \_ 5 . 6 (太字 = G A R ; 下線が引かれたもの = H I V - 1 スプライスドナー 4 ; イ  
 タリック体 = ヒト β - グロビン [イントロン 2] スプライスアクセプター ; 標準文字 = エ  
 クソン / イントロン / エクソン ; 四角で囲まれたもの = c p p t / C T S ; 太字でイタリ  
 ック体 = h E S E 2 )

20

TTTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAG**GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA**GCTCATCAGAACTAGTCAGACT  
 CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCA/GTAAGTAGTACATGTAA GAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC  
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCA  
GGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCT  
AATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCAATTCTAA  
AGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAATTTCTGCATATAAAAT  
TGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAATTCTGCTTTTATTTTAT  
GGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCT  
TCCTCCACAG/GTGTCCACTCCAGTTC AAATTGGCAGTATTCATCCACAATTTTAA  
AAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAA  
CTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTT CACGTGACGCGTCTGCAG **CCGAA**  
**GGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGAC**CTGCAGACGCGT (配列番号 1 3 9)

30

40

## 【 0 6 4 4 】

一実施形態では、本発明のベクターイントロンは、配列番号 1 3 7 に示される配列を含  
 む。

## 【 0 6 4 5 】

好ましい実施形態では、本発明のベクターイントロンは、配列番号 1 3 8 に示される配  
 列を含む。

## 【 0 6 4 6 】

一実施形態では、本発明のベクターイントロンは、配列番号 1 3 9 に示される配列を含

50

む。

【0647】

レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列の例示的な例として、本発明のベクターイントロンを含む配列を以下に提供する：

【0648】

L V - M S D 2 K O m 5 - Δ p 1 7 I N S - Δ R R E - V I \_ 5 . 6 (内部導入遺伝子カセットの5' Rが示されている：太字のイタリック体 = M S D 2 K O m 5 ; 下線が引かれたもの = g a g Δ p 1 7 I N S ; 太字 = V I \_ 5 . 6 ; 四角で囲まれたもの = c p p t / C T S ) :

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT

10

CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCC

CTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGA

AACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAG ***GGGAAGGCA***

***ACAGATAAATATGCCTTAAAA***TTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGACGGGTGCGAGAGCGTCAGT

ATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGACTCGAGCAAT

TTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACTAGTCAGACTC

20

ATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAAGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCC

CTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCA

GGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTT

TAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCT

AAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATA

AATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATT

30

TTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCT

TATCTTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCCTGCAGGCACGTG

AAATTGGCAGTATTCATCCACAATT

TTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA

CAAACATAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTT

CACGTGACGCGTCTGCAGC

CGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACCTGCAGACGCGT (配列番号 140)

40

【0649】

導入遺伝子配列と、それに続く3'SIN-LTRは、配列番号140の3'末端に位置づけることができる。

【0650】

一実施形態では、本発明のレンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、配列番号140に示される配列を含む。

【0651】

VIの存在(及びrev/RREシステムの非存在)によって他のイントロンのアウトスプライシングが刺激されるので、その自身のイントロン(例えば、EF1aプロモーター)をコードする導入遺伝子カセットは、これらのイントロンをvRNAから失うことと

50

なる。これを回避するために、導入遺伝子カセットが逆向きになる場合がある。導入遺伝子カセットを逆向きにすることによって、埋め込まれたイントロンが、それらがLVゲノム発現カセット内でイントロンとして機能しないので、結果として生じたvRNAから失われないことが可能になる。この構成の欠点は、vRNAと導入遺伝子mRNAの間のアニーリングの結果として形成される二本鎖RNA (dsRNA) 種の生成によるLV力価の低減である。dsRNAの感知は、PKR応答、Dicerの切断又はADARによる脱アミノ化などの細胞性応答を誘発する場合がある。これは、LV生産細胞、例えば、HEK293T細胞では最小にしか活性ではない組織特異的プロモーターによって駆動される導入遺伝子カセットにとっては当てはまらない。

【0652】

10

したがって、一態様では、本発明のレンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、組織特異的プロモーターを利用して、負の作用、例えば、dsRNA種の形成の結果として陥る力価低減を低減できる。

【0653】

本発明のVイントロンは、追加の望ましい特徴、例えば、MSD-2KO及びRRE欠失を含むLVゲノムの使用を促進する。したがって、VIを含有する、MSD-2KO、RRE欠失LVゲノムの使用によって、有利なことに、[1] 導入遺伝子の容量の増大、[2] パッケージング配列からの異常なスプライシングの除去、[3] 生成システムからのrevの除去、[4] 標的細胞における転写リードインの低減、及び[5] LV生成の際に導入遺伝子発現を抑制するための3' UTRシスエレメントを有する逆向きの導入遺伝子カセットの使用が可能になる。前記のすべてが、本発明のベクターゲノム発現カセットの安全性の改善に寄与する。

20

【0654】

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位は、不活化されている；レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、rev応答エレメントを含まない；及びレンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【0655】

一態様では、ベクターイントロンは、合成ベクターイントロンである。

30

【0656】

一態様では、合成ベクターイントロンは、HIV-1 GARスプライシングエレメントを含む。

【0657】

一態様では、ベクターイントロンは、スプライスドナー配列を含み、前記スプライスドナー配列は、U1 snRNA配列の一部分と相補的である7~11ヌクレオチドを含む。

【0658】

さらなる態様では、合成ベクターイントロンは、スプライスドナー配列の上流にHIV-1グアノシン-アデノシンリッチスプライシングエレメントを含む。

【0659】

40

一態様では、合成ベクターイントロンは、ブランチ部位及びヒトベクターグロビンイントロン-2のスプライスアクセプターを含む。

【0660】

本発明によるVIなどのイントロンは、所与のヌクレオチド配列、例えば、本発明によるレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列からスプライシングアウトされる場合があるので、このようなヌクレオチドの生成物、例えば、ヌクレオチド生成物及びそれを含む細胞又は粒子は、VIを含まない場合があるということは理解されるべきである。このようなヌクレオチド、細胞及び／又は粒子は、VIのスプライシングにより、残存配列、例えば、スプライスジャンクション配列を含む場合がある。ジャンクション配列は、配列番号19に対応する場合がある。

50

## 【0661】

「EF1 $\alpha$ 」及び「EF1 $\alpha$ 」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

## 【0662】

## 導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメント

dsRNA種の形成は、望ましくない力価低減作用を有する。本明細書で記載されるような、dsRNA種は、逆向きの導入遺伝子発現カセットを含むウイルスベクターの生成の際に形成され得る。本発明は、LVゲノム発現カセットが逆向きの導入遺伝子発現カセットを含む場合に形成されるdsRNAの量を低減するように機能する、導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含むLVゲノム発現カセットを提供することによってこの問題を解決する。好ましくは、このような機能的シス作用性導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は機能的シス作用性導入遺伝子mRNA核内保持シグナルは、導入遺伝子カセットの3'UTR内及びVI配列内に配置され、力価に対して有害な作用を有するLV生成の際のdsRNA応答を回避するために導入遺伝子抑制を達成するために使用される。

10

## 【0663】

好ましくは、ベクターイントロンは、導入遺伝子発現カセットに対してアンチセンス方向にある。適宜、VIは、導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメントを、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向又は逆（すなわち、アンチセンス）方向で含み得る。適宜、導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントがmiRNAである場合には、VIは、miRNAを、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順（すなわち、センス）方向又は逆（すなわち、アンチセンス）で含み得る。miRNAの逆方向は、miRNAプロセッシングステップが使用され、その結果、pre-miRNAの作製において導入遺伝子mRNAが切断され、さらにその後、miRNA媒介性導入遺伝子mRNA切断が行われるという利点を提供する。レンチウイルスベクターゲノムカセットに対してVI内で順方向の、miRNAカセットを標的とする導入遺伝子mRNAを使用すると、導入遺伝子mRNAではなく、pre-miRNAがVI RNA内でプロセッシングされることになる（すなわち、（pre-）vRNAに由来する）。したがって、miRNAは、VI内で順方向又は逆方向のいずれかで提供され得る。

20

30

## 【0664】

したがって、本発明者らは、dsRNAの形成と関連する問題の解決策、すなわち、導入遺伝子発現カセットに対してVIの構成又は方向を改変することを本明細書において提供する。逆向きの導入遺伝子カセットの3'UTRを、VIがその中に位置するように配置することによって、シスエレメントをVIによって包含される3'UTR配列内に挿入することができ（好ましくは、シスエレメントがmiRNAではない限り、ベクターゲノム発現カセットに対してアンチセンス方向で、miRNAはいずれの方向であってもよい）、これが、導入遺伝子mRNAを不安定化する、又はその崩壊若しくは分解を誘導する。これらは、公知の不安定化エレメント又は自己不安定化若しくは自己崩壊エレメントであり、AUリッチエレメント（ARE）、自己切断性リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA標的配列及びpre-miRなどのエレメントを含む場合があり、これは、プロセッシングされて、導入遺伝子mRNAを「自己標的とすること」ができる。

40

## 【0665】

使用できるエレメントの代替種類又は追加の種類として、レンチウイルスベクター生成の際に発現されるmiRNAの標的配列があり、レンチウイルスベクター生成の際に発現されるこれらのmiRNAは、宿主細胞によって内因的に発現されたmiRNAである場合も、又は外因的に発現されたmiRNAである場合もある（例えば、U6駆動mi/shRNAカセットの同時トランスフェクションによって）。この概念は、図62に記載されている。

## 【0666】

50

miRNAは、数キロベースの長さであり得る一次miRNA (pri-miRNA) として転写されている。これらの転写物は、マイクロプロセッサ複合体によって核中で60～90 nt長の前駆体-miRNAヘアピン (pre-miR又はpre-miRNA、本明細書において同義的に使用される) にプロセッシングされる。したがって、pre-miRとは、DCGR8及びDroshaによる一次miRNAの切断によって形成されたmiRNAのヘアピン前駆体を指す。

【0667】

逆向きの導入遺伝子カセットを保有するベクター-イントロンレンチウイルスベクターを使用する場合の、導入遺伝子mRNAを分解するためのmiRNAの使用のさらなる例として、1つ又は2つ以上のpre-miRを含有するトップ鎖上のVIによって包含される3' UTR配列の使用があり、その結果、このようなpre-miRのプロセッシングが、Drosha/Pashaによる3' UTRの切断につながる。任意選択で、このようなpre-miRカセットによって作製されたmiRNAは、次いで、導入遺伝子mRNA全体にわたる他の配列を標的とする可能性がある。やはり、重要なことに、これらの自己切断性配列は、VIからのスプライシングアウトによって除去されて、パッケージングされたvRNAが生じ、したがって、標的細胞中に存在しない。この概念は、図64に提示され、図44及び45に提示される概念をさらに詳しく説明するものである。

【0668】

あるいは、シスエレメントは、機能的核内保持シグナル、例えば、長い非コーディングRNA (lncRNA, long non-coding RNAs) 中のもの、例えば、転移関連肺腺がん転写物1 (MALAT1, Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) (Miyagawa et al. (2012), RNA 18: 738-751)、母性発現遺伝子3 (MEG3, maternally expressed gene 3) (Azam et al. (2019), RNA Biol. 16: 1001-1009) 及びSINE由来核RNA局在性 (SIRLION, SINE-derived nuclear RNA Localization) エレメント (Lubelsky and Ulitsky (2018), Nature 555: 107-111; Lubelsky et al. (2021), EMBO J. 40: e106357) であり得る。

【0669】

本発明のLVゲノム発現カセットにおいてこのようなエレメントを利用することによって、vRNAとdsRNAを形成するために利用可能であるように生成される導入遺伝子mRNAの量を低減して、LV力価に対する影響を最小にできる。重大なことにこれらのエレメントは、VIからのスプライシングアウトによってパッケージングされたvRNAからは失われるので、LV生成の間のみ活性である。

【0670】

したがって、これらのシス作用性エレメントは、VIのアウトスプライシングのために最終の統合された導入遺伝子カセット内には存在せず、したがって、形質導入された細胞における導入遺伝子mRNA安定性及び／又は局在化は影響を受けない。

【0671】

「自己不安定化」及び「自己崩壊」という用語は、前記のシス作用性エレメントに関連して使用される場合、前記エレメントをコードする配列を含むヌクレオチド、すなわち導入遺伝子mRNAに対して作用する前記エレメントの能力を指す。例えば、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きであるイントロンは、イントロンをコードする導入遺伝子mRNAの不安定化又は崩壊を促進するシス作用性エレメントをコードする場合がある。

【0672】

AUリッチエレメント (ARE) は、それらが存在するmRNAを不安定化するRNA結合タンパク質の動員を直接的に、又は追加の因子の動員を介して促進し得る。

【0673】

自己切断性リボザイムは、当技術分野で周知である (Jimenez, R., M., et al. "Chemistry and Biology of Self-Cleaving Ribozymes." Trends in biochemical s

10

20

30

40

50

ciences vol. 40,11 (2015): 648-661. doi:10.1016/j.tibs.2015.09.001)。  
リボザイムは、広範囲の生物における多様なゲノム状況において見出すことができ、それらは、構造及び活性部位によって定義されるファミリーに属する。リボザイムは、エステル交換反応を触媒し、通常、一般的な酸-塩基触媒作用を介して自己切断を媒介する。このような自己切断反応は、リボザイムを含むヌクレオチドの切断をもたらす。

【0674】

干渉RNAもまた、当技術分野で周知である。干渉RNA（例えば、miRNA）は、標的RNAの切断を促進し得る（van den Berg et al. (2008), Biochim Biophys Acta 1779: 668-677）。

【0675】

「自己不安定化」及び「自己崩壊」という用語は、本明細書で使用される場合、プロセス、例えば、リボザイム媒介性又は酵素媒介性切断の、例えば、それを介した標的RNAの全体的な定量的低減又は機能的減衰に寄与する機構を包含する。

【0676】

核内保持シグナルは、最初の転写後の核から細胞質への標的RNAの輸送の低減につながるRNA配列である。標的RNA（例えば、導入遺伝子mRNA）を、核スペckルにさらに位置づけることができる。したがって、本発明に従って使用するための1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルは、導入遺伝子をコードするmRNAの核内保持を促進する。

【0677】

この新規特徴のさらなる利点は、毒性又は「問題になる」導入遺伝子タンパク質をコードするゲノムのLV力価を救済する有効な方法であるといこれまでわかっている、LV生成の際の導入遺伝子抑制のための機構も提供するということである。

【0678】

一部の実施形態では、逆向きの導入遺伝子発現カセットの3'UTRは、ベクターイントロンを含む。したがって、1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルが、3'UTR配列内に存在する場合があります、3'UTR配列は、導入遺伝子発現カセットに対してアンチセンス方向でコードされるベクターイントロンを包含する。

【0679】

一態様では、合成ベクターイントロンは、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント若しくは導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント又は1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含む。1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント、自己崩壊エレメント又は核内保持シグナルは、同一種類のものである場合も異なる種類のものである場合もある。

【0680】

一態様では、本発明の1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントは、標的ヌクレオチドの切断を促進する。別の態様では、前記切断は、細胞性メディエーター、好ましくは、RISC複合体によって実施される。

【0681】

さらなる態様では、ベクターイントロンは、以下を含むリストから選択される1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントを含む：

(a) 自己切断性リボザイム、及び／又は

(b) AUリッチエレメント、及び／又は

(c) 導入遺伝子mRNAを標的とする干渉RNA、好ましくは、miRNA、siRNA又はshRNA、及び／又は

(d) 干渉RNAの、好ましくは、miRNAの標的配列、及び／又は

(e) pre-miR。

【0682】

10

20

30

40

50

一実施形態では、ベクターイントロンは、以下を含むリストから選択される1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントを含む：

(a) 自己切断性リボザイム、及び／又は

(b) 導入遺伝子mRNAを標的とする干渉RNA、好ましくは、miRNA、siRNA又はshRNA。

【0683】

したがって、一態様では、1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントは、本明細書において別の場所で記載されるような干渉RNAである。

【0684】

一部の好ましい実施形態では、干渉RNAは、導入遺伝子をコードするmRNAに対して特異的である。

【0685】

1つ又は2つ以上のpre-miRを、アンチセンスVI配列、すなわち、逆向きのVI内に挿入できる。miRNAは、導入遺伝子mRNAに標的化されることができ、その結果、細胞質に局在する任意のmRNAがmiRNA媒介性分解／切断の標的である。この場合には、ガイド鎖は、好ましくは、標的に対して100%マッチしている、すなわち、100%相補性である。vRNAは、ガイド鎖によって標的化されない。パッセンジャー鎖が正当なマイクロRNAエフェクターになった場合には、vRNAの切断を回避するために、パッセンジャー鎖はvRNA配列に対してミスマッチでなくてはならない、すなわち、100%相補性ではない。

【0686】

一態様では、1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントは、干渉RNA、好ましくは、miRNAを含み、miRNAのガイド鎖は、標的導入遺伝子mRNA配列とのミスマッチを含まない。

【0687】

別の態様では、本発明によるmiRNAのパッセンジャー鎖は、その標的ベクターゲノム配列と不完全にマッチし、結果として中央にバルジが生じる。

【0688】

別の態様では、1つ又は2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントは、干渉RNA、好ましくは、miRNAを含み、パッセンジャー鎖は、その標的ベクターゲノム配列との一好ましくは、2、9、10又は11位の少なくとも1つのミスマッチ（適宜、少なくとも2つ又は少なくとも3つ）を含む。

【0689】

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクター生成細胞において使用するためのヌクレオチド発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供し、発現カセットは、miRNAをコードするイントロン（又はVI）をコードする配列を含み；miRNAは、ガイド鎖とその標的mRNAの間にミスマッチを有さず；miRNAは、本発明による逆向きの導入遺伝子に対応するmRNAを標的とするが、ベクターゲノムRNAを標的としない。

【0690】

前記の導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメント（例えば、miRNA）は、複数の核酸配列も標的とし得る、複数のRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントを含み得る。逆に、前記のRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメント（例えば、miRNA）は、単一の核酸配列を標的とする単一のRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントを含み得る。

【0691】

「マイクロRNA」及び「miRNA」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

【0692】

一実施形態では、本発明のVIは、表11に開示される特徴のいずれをも含む。

【0693】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明の V I は、配列番号 2 0 9 ~ 2 2 6 のいずれかに示される配列を含む。

【 0 6 9 4 】

逆向きの導入遺伝子カセットの、埋め込まれた「自己切断性／標的化」エレメント（アンチセンスで示される）と組み合わせた例示的ベクター－イントロン配列

本発明に従って使用するための例示的配列を、以下の表 1 1 に提供する：

以下の配列の鍵：

・逆向きの導入遺伝子カセットの 3 ' U T R 内に存在する包含されたエレメントを含む配列は、5 ' から 3 ' へ、ベクター R N A センス（トップ鎖）構成ですべて提示されている（すなわち「機能付与された」、「自己切断性」、「自己標的化」エレメントはアンチセンスで示されている）。 10

・ベクター－イントロンスプライスドナー及びスプライスアクセプターコア配列は四角で囲まれている。

・グアノシン－アデノシンリッチ上流スプライシングエンハンサー（G A R）は、太字／下線で示されている。

・ H D V \_ A G リボザイムは、イタリック体で示されている。

・ T 3 H 3 8 リボザイムは、下線が引かれ、イタリック体である。

・ c P P T 配列は、太字のイタリック体で示されている。

・下流スプライスエンハンサー配列は、太字の下線が引かれたイタリック体で示されている。 20

・太字のみで強調された配列は、m i R N A 標的部位と置き換えられた。

・ p r e - m i R N A カセットは、下線が引かれた角括弧で囲まれた領域に挿入された。

【表 5】

表 11

30

40

50

| 説明                   | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 配列番号 |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 親 VI_5.7             | <p><u>GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA</u>GCTCAATCAGAACTAGTCAGACTCAATCAAGCTTCTCTATCAAC<u>CAGGT</u>AAGTATTACATGTAAGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTTCTAGATATGGTTAAGTTCAATCGATTGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTTAAATAATGCTTCTCTTTTAATATACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACCTTCCCTAATCTCTTCTTTTCAGGGCAATAATGAGCTAAGCTACAATGTATCATGCCTAGGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAATATTTCTGCATATA<u>TAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTATGCAT</u> [pre-miRNA カセット] TTATTTTATGGTTGGATCCGGGATAAGGCTGGA TTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTCATA<u>CC</u> TCTTATCTTCTCCCTCCACAGG TGTCCACTCCAGTTCCTGCAGGCACGTG<u>AAATTGGCAGTATTCAATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACAATAATAGCAACAGACAATACAACTAAAAGAAATTACAAAAACAAATTACAAAAATCAAATTTTCGGGTTTCACGTGACGCGTG</u> <u>CCGAAGGAATAGAAGAA</u> <u>GAAGGTGGAGAGAGACAGAGAC</u></p>                                                                                                                                              | 209  |
| リボザイムを有する VI_5.7     | <p><u>GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA</u>GCTCAATCAGAACTAGTCAGACTCAATCAAGCTTCTCTATCAAC<u>CAGGT</u>AAGTATTACATGTAAGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTTCTAGATATGGTTAAGTTCAATCGATTGTCGTTGGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCTCCTTCGGATGCCAGGTTCGGACCGGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTTAAAAATGCTTCTCTTTTAATATACTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTCTTTTCAGGGCAATAATGAGCTAAGCTACAAATGTATCATGCCTAGGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATA<u>TAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTATGCAT</u> [pre-miRNA カセット] TTATTTTATGGTTGCGCGTTTCGTCTATTGGGACTCTGTCAGCTGGATGTACCCGAAGTGGAATCCAGGACGCGCGGATCCGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATA<u>CCTCTTATCTTCTCCACAGG</u> TGTCCACTCCAGTTCCTGCAGGCACGTG<u>AAATTGGCAGTATTCAATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACAATAATAGCAACAGACAATACAACTAAAAGAAATTACAAAACAAATTTACAAAAATCAAATTTTCGGGTTTCACGTGACGCGTG</u> <u>CCGAAGGAATAGAAGAAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGAC</u></p> | 210  |
| GAR (グアニン-アデニンリッチ領域) | <u>GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 211  |
| cPPT バリエーション 1       | <u>AAATTGGCAGTATTCAATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACAATAATAGCAACA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 212  |

10

20

30

40

50

|                                         |                                                                                                                                                                                |     |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                                         | <b>GACAATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAA<br/>AATTTTCGGGTTT</b>                                                                                                         |     |
| cPPT バリエント<br>2                         | <b>AAATTGGCAGTATTTCATCCACAATTTTAAAAAGAAAAGGGGGGATTG<br/>GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGA<br/>CATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAT<br/>TTTCGGGTTT</b>     | 213 |
| HDV AG RZ<br>(アンチセンス)                   | <b>GGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCTTCGGATG<br/>CCCAGGTCCGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCC</b>                                                                                     | 214 |
| T3H38 RZ<br>(アンチセンス)                    | <b>GCGCGTTTCGTCCTATTTGGGACTCGTCAGCTGGATGTACCCGAAG<br/>TGGAATCCAGGACGCGC</b>                                                                                                    | 215 |
| miRNA 標的挿入<br>部位<br>(置き換えられる<br>配列)     | <b>TAAATTGTAAGTATGTAA</b>                                                                                                                                                      | 216 |
| miR-17-5p 標的<br>部位(1x; アンチ<br>センス)      | <b>CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGAATT</b>                                                                                                                                             | 217 |
| miR-17-5p 標的<br>部位(3x; アンチ<br>センス)      | <b>CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGAATTAAATTGTAAACAAAGTGCT<br/>TACAGTGCAGGTAGAATTCTGATGTAAACAAAGTGCTTACAGTGCAG<br/>GTAGAATT</b>                                                         | 218 |
| miR-20a 標的部<br>位(1x; アンチセ<br>ンス)        | <b>TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGAATT</b>                                                                                                                                             | 219 |
| miR-20a 標的部<br>位(3x; アンチセ<br>ンス)        | <b>TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGAATTAAATTGTAAATAAAGTGCT<br/>TATAGTGCAGGTAGAATTCTGATGTAAATAAAGTGCTTATAGTGCAG<br/>GTAGAATT</b>                                                         | 220 |
| miR-106a 標的部<br>位(1x; アンチセ<br>ンス)       | <b>AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGAATT</b>                                                                                                                                             | 221 |
| miR-106a 標的部<br>位(3x; アンチセ<br>ンス)       | <b>AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGAATTAAATTGTAAAAAAGTGCT<br/>TACAGTGCAGGTAGAATTCTGATGTAAAAAAGTGCTTACAGTGCAG<br/>GTAGAATT</b>                                                           | 222 |
| miR-GE インサー<br>ト(アンチセンス)<br>[標的配列]      | <b>GATATC [TCATAGATTGGACTTGACACTT] GATATCGTAGAGTATG<br/>GTCAACCTTACTTGCATAGATTGGGCTTGACACTTCATCTGTGGCT<br/>TCACAAGTGTCAAGTCCAATCTATGAAGGCACTGCTGACATTGCTA<br/>TCACCATGCAAT</b> | 223 |
| miR-GE $\Delta$ 標的イ<br>ンサート<br>(アンチセンス) | <b>GATATCGTAGAGTATGGTCAACCTTACTTGCATAGATTGGGCTTGA<br/>CACTTCATCTGTGGCTTCACAAGTGTCAAGTCCAATCTATGAAGGC<br/>ACTGCTGACATTGCTATCACCATGCAAT</b>                                      | 224 |
| CCR5 miRNA 標<br>的部位                     | <b>[TCATAGATTGGACTTGACACTT]</b>                                                                                                                                                | 225 |

10

20

30

40

|        |                                                                                                   |            |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| miR-GE | <b>GTCAACCTTACTTGCATAGATTGGGCTTGACACTTCATCTGTGGCT<br/>TCACAAGTGTCAAGTCCAATCTATGAAGGCACTGCTGAC</b> | <b>226</b> |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

【 0 6 9 5 】

RNA 干渉 (RNAi)

二本鎖 RNA (dsRNA) によって媒介される転写後遺伝子サイレンシング (PTG

50

S) は、外来遺伝子の発現を制御するための保存された細胞防御機構である。トランスポゾン又はウイルスなどのエレメントのランダム統合は、相同一本鎖 mRNA 又はウイルスゲノム RNA の配列特異的分解を活性化する dsRNA の発現を引き起こすと考えられる。サイレンシング効果は、RNA 干渉 (RNAi) として公知である。RNAi はまた、標的ヌクレオチド配列の発現をモジュレートするために利用されてきた。

【0696】

RNAi は、標的化された mRNA 分子を阻害することによって RNA 分子が遺伝子発現又は翻訳を阻害する生物学的方法である (Ralph et al. 2005, Nat. Medicine 11: 429-433)。RNAi の機構は、長い dsRNA の約 21~25 ヌクレオチド (nt) の RNA の二重鎖へのプロセッシングを含む。これらの生成物は、mRNA 分解の配列特異的メディエーターである、低分子干渉又はサイレンシング RNA (siRNA) と呼ばれる。

10

【0697】

shRNA は、小さいループ配列によって分割された短い逆向きの RNA 反復からなる。これらは、細胞機構によって 19~22 nt の siRNA に迅速にプロセッシングされ、それによって、標的遺伝子発現を抑制する。

【0698】

マイクロ RNA (miRNA) は、その 3' 非翻訳領域 (UTR) への結合によって標的 mRNA の翻訳を効果的に低減できる、小さい (22~25 ヌクレオチドの長さ) 非コード RNA である。マイクロ RNA は、生物においてネイティブに生成される低分子 RNA の極めて大きな群であり、それらのうち少なくとも一部は、標的遺伝子の発現を調節する。マイクロ RNA ファミリーの創始メンバーは、let-7 及び lin-4 である。let-7 遺伝子は、蠕虫の発達の際に内因性タンパク質コード遺伝子の発現を調節する小さい高度に保存された RNA 種をコードする。活性 RNA 種は、約 70 nt の前駆体として最初に転写され、これは転写後に、成熟した約 21 nt の形態にプロセッシングされる。let-7 及び lin-4 の両方とも、ヘアピン RNA 前駆体として転写され、これらが、Dicer 酵素によってその成熟形態にプロセッシングされる。その後、成熟形態は、RISC 複合体に負荷されることができ、その結果、標的 mRNA のさらなる切断が生じ得る。

20

【0699】

標的ヌクレオチド配列の発現をモジュレートする干渉 RNA を設計するための方法は、当技術分野で周知である。

30

【0700】

干渉 RNA は、例えば、siRNA、sisRNA、tsiRNA、RNA-DNA キメラ二重鎖、tkRNA、Dicer 基質 dsRNA、shRNA、tRNA-shRNA、aiRNA、pre-miRNA、pri-miRNA ミミック、pri-miRNA ミミッククラスター、転写遺伝子サイレンシング (TGS) 及びそれらの組合せであり得る。適宜、本発明に従って使用するための干渉 RNA は、siRNA、shRNA 又は miRNA である。好ましくは、本発明に従って使用するための干渉 RNA は、miRNA である。

40

【0701】

Rev 応答エレメント (RRE)

HIV-1 における rev 応答エレメント (RRE) は、普通、ウイルス複製にとって必須である、およそ 350 ヌクレオチドの高度に構造化されたシス作用性 RNA エレメントである。ウイルスゲノムの env コーディング領域中に位置づけられており、種々の HIV-1 分離株にわたって極めて良好に保存されている。部分的にスプライシングされた及びスプライシングされていないウイルス mRNA 転写物のすべてに存在し、ウイルスタンパク質 Rev の複数の分子が組み立てられる RNA フレームワークとして働く。Rev-RRE オリゴマー複合体は、核から細胞質へのこれらのメッセージの輸送を媒介し、そこでそれらは翻訳されて必須ウイルスタンパク質を生成する、及び／又は新規ビリオンの

50

ゲノムとしてパッケージングされる。RREは、特有のホモオリゴマーリボ核タンパク質（RNP）複合体の組み立てを調整して、必須のイントロン含有ウイルスメッセージの核外輸送を媒介する特定のRNA足場として働く。Revタンパク質は、HIV-1（及び他のレンチウイルス）タンパク質発現の調節にとって必須であるトランス活性化タンパク質である。核局在性シグナルは、rev遺伝子にコードされ、Revタンパク質が核に局在化されることを可能にし、そこで、スプライシングされていない及び不完全にスプライシングされたmRNAの輸送に関与する。

【0702】

本明細書で記載されるように、本発明者らは、驚くべきことに、ベクター-イントロンを含めることによって、RREがレンチウイルスベクターゲノム発現カセット中に存在する必要性が否定されることを見出した。

10

【0703】

そのようなものとして、一態様では、本発明によるレンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列は、rev応答エレメントを含まない。

【0704】

一態様では、rev応答エレメントは、除去又は欠失している、又はそうではなくヌクレオチド配列中で不活化されている場合がある。このような除去、欠失又は不活化のための適切な方法は、当業者に公知であろう。

【0705】

干渉RNA

20

導入遺伝子発現カセット内のイントロン（例えば、内部導入遺伝子プロモーターとして利用される場合にはEF1 $\alpha$ プロモーター内のイントロン）は、ある特定の標的細胞における発現をブーストする。しかし、導入遺伝子発現カセット内のこのような追加のイントロンは、転写の際にスプライシングで切り出される場合がある。vRNA内の導入遺伝子イントロン保持を確実にする方法として、導入遺伝子カセットを逆向きになることがあり、その結果、そのようなものとしてレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対してアンチセンス方向にあるので導入遺伝子発現カセット内のイントロンが認識されない。

【0706】

したがって、導入遺伝子発現カセットを、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きになることができる。言い換えれば、内部導入遺伝子プロモーター及び導入遺伝子配列は、レトロウイルスベクターゲノムカセットプロモーターと対向し、その結果、レトロウイルスベクターゲノムと導入遺伝子は、反対の転写方向にある。したがって、導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対してアンチセンス方向にある（すなわち、アンチセンス鎖／ボトム鎖にコードされる）場合がある。

30

【0707】

あるいは、導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある場合がある。言い換えれば、内部導入遺伝子プロモーター及び導入遺伝子配列は、レトロウイルスベクターゲノムカセットプロモーターと同じ方向にあり、その結果、レトロウイルスベクターゲノム及び導入遺伝子は、同じ転写方向にある。したがって、導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対してセンス方向にある（すなわち、センス鎖に／トップ鎖にコードされる）場合がある。

40

【0708】

したがって、導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノムカセットに対して逆向きになっている場合も、逆向きになっていない（すなわち、順方向にある）場合もある。

【0709】

組織特異的プロモーターが、レトロウイルスベクター生成の際に活性でない／最小にしか活性でない内部導入遺伝子プロモーターとして利用される場合には、逆向きの導入遺伝子アプローチは、さらなる考慮を必要としない。しかし、導入遺伝子プロモーターがレト

50

ロウイルスベクター生成の際に十分なレベルの導入遺伝子mRNAを生じさせる場合には、vRNA:mRNAアニリングを介して長いdsRNA産物を生じさせる可能性が増大し、これは、生得的dsRNA感知経路、例えば、オリゴアデニル酸合成酵素ーリボヌクレアーゼL(OAS-RNase L)、タンパク質キナーゼR(PKR)及びインターフェロン(IFN)／黒色腫分化関連タンパク質5(MDA-5)が関与するものが誘発される。いくつかのこれらの経路は、HEK293(T)細胞において(部分的に)欠陥がある可能性が高い(Ferreira, C., B., et. al., Mol Ther Methods Clin Dev. (2019);17:209-219)が、ここで本発明者らは、細胞質dsRNAが生じた結果、新規タンパク質合成が抑制されるという証拠を提供する(図2を参照されたい)。

【0710】

本発明者らは、驚くべきことに、ベクター生成の際の導入遺伝子タンパク質の不要な効果を最小にするために、及び／又は活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセットを保有するレトロウイルスベクターの力価を救済するために、レトロウイルスベクター生成の際に、レトロウイルスベクター生成細胞においてRNAiを利用してNOI(すなわち、導入遺伝子)の発現を抑制できることを見出した。本発明者らは、驚くべきことに、ベクター生成の際にRNAiを利用して、導入遺伝子をコードするがパッケージングに必要とされるベクターゲノムRNA(vRNA)をコードしないmRNAを最小にできる、及び／又は排除できることを見出した。したがって、vRNAとdsRNAを形成するために利用可能であるように生成される導入遺伝子mRNAの量が低減され、活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセットを保有するレトロウイルスベクターの力価に対する影響が最小に抑えられる。この特徴はまた、毒性又は「問題になる」導入遺伝子タンパク質をコードするゲノムの力価を救済する有効な方法であるとこれまでにわかっている、LV生成の際の導入遺伝子抑制のための機構も提供する。

【0711】

言い換えれば、導入遺伝子mRNAに対して特異的な干渉RNAの使用によって、新規タンパク質合成阻害及び／又は他のdsRNA感知経路の結果を回避するための機構が提供され、逆向きの導入遺伝子レトロウイルスベクター力価の救済が可能になる。干渉RNAは、導入遺伝子mRNAに標的化され、その結果、細胞質に位置するmRNAのいずれもが、RNAi媒介性分解及び／又は切断、好ましくは、切断の標的となる。

【0712】

利用された干渉RNAは、dsRNAの形成を最小にする、及び／又は排除するために導入遺伝子をコードするmRNAの切断をもたらすことが好ましい。適宜、干渉RNAは、導入遺伝子をコードするmRNAを切断のための標的とする。干渉RNAは、導入遺伝子をコードするmRNAを、RNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)による切断のための標的とする場合がある。

【0713】

本明細書で使用される場合、「に対して特異的である」という用語は、干渉RNAが導入遺伝子をコードしないmRNA分子を上回って導入遺伝子をコードするmRNAに優先的に結合することを意味する。したがって、干渉RNAは、導入遺伝子をコードするmRNAを標的とする。

【0714】

本明細書で使用される場合「干渉RNA」という用語は、RNA干渉(RNAi)を媒介可能であるRNAを意味する。

【0715】

干渉RNAは、例えば、siRNA、sisiRNA、tsiRNA、RNA-DNAキメラ二重鎖、tkRNA、Dicer基質dsRNA、shRNA、tRNA-shRNA、aiRNA、pre-miRNA、pri-miRNAミミック、pri-miRNAミミッククラスター及びそれらの組合せであり得る。

【0716】

干渉は、合成であり得る。合成干渉RNAは、レンチウイルスベクター生成の際の一過

10

20

30

40

50

性の同時トランスフェクションによる使用に適切である、すなわち、レトロウイルスベクター生成細胞中のウイルスベクターゲノム発現カセットに対してトランスで提供され得る。

【0717】

適宜、干渉RNAは、レトロウイルスベクター生成細胞中のウイルスベクターゲノム発現カセットに対してシスで提供される場合がある、すなわち、ベクターイントロンは、干渉RNAを含む場合がある。シスで提供され得る干渉RNAの例として、siRNA、shRNA、tRNA-shRNA、pre-miRNA、pri-miRNAミミック、pri-miRNAミミッククラスター及びそれらの組合せが挙げられる。

【0718】

好ましくは、干渉RNAは、siRNA、shRNA又はmiRNAである。好ましくは、干渉RNAは、shRNA又はmiRNAである。好ましくは、本発明に従って使用するための干渉RNAは、miRNAである。

【0719】

一部の実施形態では、干渉RNA（好ましくは、miRNA）のガイド鎖は、導入遺伝子mRNAの標的配列と完全に相補的である（fully complementary）（図6）。この場合には、ガイド鎖は、標的に対して100%マッチしている、すなわち、100%相補性である。したがって、ガイド鎖は、RISC複合体を導入遺伝子をコードするmRNA（すなわち、導入遺伝子mRNA）ワトソン-クリック塩基対形成の標的配列に標的化できる。vRNAは、パッケージングに必要とされるvRNAの分解及び／又は切断を回避するためにガイド鎖によって標的とされない。

【0720】

一実施形態では、干渉RNA、好ましくは、miRNAのガイド鎖は、導入遺伝子をコードするmRNA内に標的配列とのミスマッチを含まない。

【0721】

本明細書で使用される場合、「ミスマッチ」という用語は、非相補的塩基の存在を指す。したがって、「ミスマッチ」とは、それぞれ、導入遺伝子をコードするmRNA又はvRNA内の相補的配列とワトソン-クリック塩基対形成可能ではない、ガイド鎖又はパッセンジャー鎖中の非相補的塩基を指す。

【0722】

好ましくは、干渉RNAを利用して、逆向きの導入遺伝子カセットに由来する導入遺伝子をコードするmRNAを標的とする場合、干渉RNA（好ましくは、miRNA）は、パッセンジャー鎖がvRNA中のその相補的配列に対してミスマッチしている（すなわち、100%相補的ではない）ように設計される（図6）。この方法では、パッセンジャー鎖がRISCにおいてガイド鎖として使用される場合には、vRNAの切断につながらないが、そうでなければ、パッケージングに利用可能なvRNAの低減につながるであろう。

【0723】

一部の実施形態では、干渉RNA（好ましくは、miRNA）は、レトロウイルスベクターのRNAゲノム内のその相補配列との一好ましくは、パッセンジャー鎖の2、9、10又は11位の少なくとも1つのミスマッチ（適宜、少なくとも2つ、又は少なくとも3つ）を含むパッセンジャー鎖を含む。

【0724】

別の態様では、干渉RNA（好ましくは、miRNA）のパッセンジャー鎖は、その標的ベクターゲノム配列と不完全にマッチし、結果として中央にバルジが生じる。

【0725】

一部の実施形態では、核酸配列のセットは、複数の（multiple）標的ヌクレオチド配列に対して特異的な複数の（plurality）干渉RNAをコードする複数の（multiple）核酸配列を含む。好ましくは、各干渉RNAは、異なる標的ヌクレオチド配列に対して特異的である。

## 【0726】

干渉RNAは、レンチウイルスベクター生成の際にトランスで提供される場合も、シスで提供される場合もある。シスエレメントは、それらが影響を及ぼす遺伝子と同じDNAの分子上に存在し、トランスエレメントは、それらが転写された遺伝子から遠位の遺伝子に影響を及ぼし得る。

## 【0727】

したがって、干渉RNA発現カセットは、レンチウイルスベクター生成の際にレンチウイルスベクター構成成分と同時発現させることができる。干渉RNAは、本明細書で記載されるような干渉RNAである。したがって、干渉RNAは、導入遺伝子をコードするmRNAを標的とし、mRNA分解及びdsRNAと導入遺伝子発現の同時低減につながる。このような干渉RNA発現カセットは、当業者は容易に構築でき、例えば、U6 promoter又はtRNA promoterによって駆動される。干渉RNAの標的は、VIによって包含される導入遺伝子mRNAの3' UTRの配列であり得る。

## 【0728】

一部の代替実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットは、ベクターイントロンをさらに含む。適宜、ベクターイントロンは、干渉RNAをコードする核酸配列を含む。したがって、干渉RNAは、レンチウイルスベクター生成の際にシスで提供される場合がある。

## 【0729】

逆向きの導入遺伝子発現カセットは、導入遺伝子カセット内にイントロン（本明細書において、「ベクターイントロン」（VI）と称される）を保持できる。対照的に、逆向きになっていないカセットでは、導入遺伝子カセットは、VIと一緒にスプライシングアウトされるであろうが、これは望ましくない。したがって、VIは、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向で（すなわち、センス鎖上に）提供される。これによって、レンチウイルスベクターゲノムの転写の際のVIのアウトスプライシングが可能になる。本発明の逆向きの導入遺伝子発現カセットは、導入遺伝子をコードするmRNAに対して特異的である干渉RNAを、逆向きの導入遺伝子発現カセット3' UTR内に挿入でき、その結果、干渉RNAもセンス鎖上でVIによって包含されるので、VIを使用してベクター生成の際に導入遺伝子mRNA発現を低減できる。したがって、導入遺伝子mRNAは、ベクター生成細胞内で不安定化及び／又は分解される。対照的に、VIからのスプライシングアウトの際、干渉RNAもまた、レンチウイルスベクターのパッケージングされたゲノム（例えば、vRNA）から除去され、その結果、導入遺伝子mRNAは、形質導入された細胞において干渉RNAを欠くことになる（図44を参照されたい）。そのようなものとして、重大なことに、干渉RNAは、VIからのスプライシングアウトによってパッケージングされたvRNAからは失われるので、レンチウイルスベクター生成の間のみ活性である。

## 【0730】

1つ又は2つ以上の干渉RNAを、アンチセンスVI配列、すなわち、逆向きのVI内に挿入できる。

## 【0731】

例示的な例として、干渉RNAは、導入遺伝子発現カセットの3' UTR内に位置づけられる1つ又は2つ以上の「自己切断性」miRNAであり得る。1つ又は2つ以上のmiRNA（すなわち、pre-miRNA）はしたがって、導入遺伝子をコードするmRNAの3' UTRから切断され（したがって、mRNAのポリAテールを除去し、導入遺伝子をコードするmRNAの不安定化につながる）、次いで、DROSHA/Dicerによってプロセッシングされて成熟miRNAとなり、RISC中に負荷されて、導入遺伝子mRNA内の配列を標的とし、その結果、さらなる切断が生じ得る。dsRNA断片は、RISC中に負荷され、各鎖は、非対称ルール現象に基づいて異なる運命を有し、ガイド鎖としての一方の鎖の選択が、熱力学的安定性に基づいてもう一方を上回る。新規に作製されたmiRNA又はsiRNAは、RISCの一本鎖ガイド配列として作用し、分解

10

20

30

40

50

のために mRNA を標的とする。熱力学的にあまり安定でない 5' 末端を有する鎖がタンパク質アルゴノート (Argonaute) によって選択され、RISC 中に統合される。鎖はガイド鎖として知られ、分解のために mRNA を標的とする。パッセンジャー鎖として知られるもう一方の鎖は、RISC によって分解される。

【0732】

「自己切断性」とは、miRNA が、導入遺伝子をコードする mRNA の 3' UTR 内に位置づけられ、導入遺伝子をコードする mRNA を標的とするので、miRNA は、切断について自己を標的としていることを意味する。

【0733】

干渉 RNA は、導入遺伝子発現カセットの 5' UTR 及び／又はコーディング領域及び／又は 3' UTR 内の配列に対して特異的であり得る (すなわち、導入遺伝子発現カセットの 5' UTR 及び／又はコーディング領域及び／又は 3' UTR は、標的ヌクレオチド配列を含む)。適宜、標的ヌクレオチド配列は、導入遺伝子発現カセットの 5' UTR 内であり得る。あるいは、標的ヌクレオチド配列は、3' UTR 内であり得る。複数の干渉 RNA が利用される場合には、標的ヌクレオチド配列は、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 及び 5' UTR 内であり得る。

【0734】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 又は 5' UTR は、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含む。

【0735】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、3' UTR 又は 5' UTR 内に少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含むように遺伝子操作される。少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列は、効率的な干渉 RNA がすでに利用可能である少なくとも 1 つの所定の異種標的ヌクレオチド配列であり得る。

【0736】

ヌクレオチド配列を標的配列中に導入するための分子クローニング法は、当技術分野で公知である。例えば、分子生物学の従来技術 (本明細書において別の場所に記載される) を利用できる。

【0737】

一部の実施形態では、干渉 RNA は、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列に対して特異的である。

【0738】

本明細書で使用される場合、「標的ヌクレオチド配列」とは、干渉 RNA が結合する導入遺伝子発現カセット内の配列を意味する。適宜、標的ヌクレオチド配列は、好ましくは、miRNA である干渉 RNA のガイド鎖と 100% 相補的である。

【0739】

本明細書で記載されるように、干渉 RNA は、レトロウイルスベクター生成の際にシスで提供される場合がある。

【0740】

したがって、さらなる態様では、本発明は、

(i) 導入遺伝子発現カセット、及び

(ii) 本明細書で記載されるような少なくとも 1 つの干渉 RNA を含むベクターイントロンを含むレトロウイルスベクターゲノムをコードする発現カセットを提供する。

【0741】

さらなる態様では、本発明は、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含むレトロウイルスベクターゲノムを提供し、ベクターイントロンは、本明細書で記載されるような少なくとも 1 つの干渉 RNA を含む。

【0742】

一部の実施形態では、導入遺伝子発現カセットは、レトロウイルスベクターゲノム発現

10

20

30

40

50

カセットに対して逆向きである。

【0743】

さらなる態様では、本発明は、本発明の発現カセットを含むヌクレオチド配列を提供する。

【0744】

〔1〕レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子発現を低減する、及び〔2〕ベクターゲノムカセットに対して逆向きである活性転写ユニットを含有する導入遺伝子カセットを利用し、したがってそうでなければベクター生成にとって有害な dsRNA 感知経路につながる（図50を参照されたい）場合に、dsRNAの生成を回避するために、RISC複合体による切断のために導入遺伝子 mRNA を標的とするための1つ又は2つ以上の干渉RNAの使用の例示的な例を以下に提供する。

10

【0745】

例示的な例

このアプローチを実行するプロセスの流れの例示的な例は、以下の通りに要約することができる：

【0746】

1. 効率的な mRNA 切断を可能にし、mRNA の定常状態レベルの低減、導入遺伝子タンパク質発現の低減及び力価（逆向きの導入遺伝子の）の救済につながる、導入遺伝子 mRNA 配列内の1つ又は2つ以上の標的部位を同定する。

【0747】

これは、いくつかの方法で達成できる。最初に、導入遺伝子 mRNA 配列を、マイクロRNAの良好な標的であると予測される潜在的な部位についてコンピュータでスクリーニングできる（このようなサービスは市販されている、例えば：

20

- ・ i S c o r e ([http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i\\_Score/i\\_score.html](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html))、

- ・ I n v i t r o g e n (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/design.do>)、

- ・ T h e r m o F i s h e r (<http://www.thermoscientificbio.com/design-center/>)、

- ・ s i S P O T R (<https://sispotr.icts.uiowa.edu/sispotr/tools/sispotr>)

30

。

【0748】

この方法は以下を含む：

I. 標的配列分析

II. ガイド鎖の熱力学的プロファイリング

III. 必要な場合にはパッセンジャー鎖ミスマッチの付加

IV. マイクロRNA二次構造の評価（例えば、m-f o l d による）

V. 選択された siRNA 候補は、以下の設定を使用してヒトトランスクリプトームに対してブラスト（例えば、NCBI B L A S T）を実行することによってオフターゲット効果について試験された：ワードサイズ7；閾値1000；ミスマッチペナルティー1又は0；ギャップオープン3；伸長2。（デフォルト B L A S T 設定を使用する場合とは異なり、このような緩い基準によって、siRNA オフターゲットの効果的な検索が保証される。）

40

【0749】

いくつかの（例えば、最大10）siRNA又はshRNAを作製し、生成細胞内の単純な導入遺伝子発現カセットに対してスクリーニングでき、このようにして、本発明で利用できる1つ又は2つ以上のsiRNA/shRNAを同定できる。

【0750】

あるいは、すでに利用可能な効率的なsiRNA/shRNAがある、所定の異種標的配列を、導入遺伝子カセットの5'又は3'UTR内にクローニングし、同時トランスフェ

50

クション実験においてこれらの *siRNA* / *shRNA* を供給することによって、*mRNA* 切断及び導入遺伝子タンパク質ノックダウンについて実験的に試験することができる。

【0751】

あるいは、生成細胞を、構成的に、及び／又はベクター生成条件下で高度に発現される内因性マイクロRNAについて特性決定できる（例えば、酪酸ナトリウム誘導によって上方制御されるマイクロRNA）。これらの内因性マイクロRNAの標的配列を、導入遺伝子カセットの5'又は3'UTR中にクローニングし、*mRNA* 切断及び導入遺伝子タンパク質ノックダウンについて実験的に試験することができる。

【0752】

1つ又は2つ以上のマイクロRNAの複数の標的部位を、任意選択で、導入遺伝子カセットの5'及び／又は3'UTR中にクローニングしてもよい。 10

【0753】

マイクロRNAのガイド鎖について、得られた活性RISCが導入遺伝子*mRNA*切断を媒介するように設計されること、すなわち、ガイド鎖が標的配列と完全に相補的であることが望ましい。任意選択で、マイクロRNAを、パッセンジャー鎖がRISC中に負荷される場合に*vRNA*のいかなる可能性ある切断も最小に抑えるために、パッセンジャー鎖がミスマッチしているように、逆向きの導入遺伝子カセットと共に使用するために設計してもよい。

【0754】

2. マイクロRNAモダリティーの選択（図51を参照されたい） 20

所望のレベルの導入遺伝子抑制及び／又は*mRNA*切断を誘導すると同定された *siRNA* / *shRNA* / *miRNA* を、レトロウイルスベクターの同時トランスフェクション生成において直接使用できる。あるいは、干渉RNAを、例えば、ポリメラーゼIIIプロモーター、例えば、U6又は*tRNA*プロモーターによって、ベクター生成の際に新規に転写されるために発現カセットの一部として設計できる。したがって、*miRNA* カセットをコードするプラスミドを、ベクター構成成分プラスミドと一緒に生成細胞中に同時トランスフェクトできる。*miRNA* プラスミドは、複数の単一*miRNA* 発現カセットを含有する場合も、又は単一転写物からプロセシングされた複数のタンデム*miRNA* をコードする単一の発現カセットを含有する場合もある。あるいは、*miRNA* 発現カセットは、宿主細胞DNA中に安定に統合される場合も、又はエピソームとして安定に維持される場合もある。 30

【0755】

あるいは、このような*miRNA* 発現カセットを、ベクターゲノム又はパッケージングプラスミド中にシスでクローニングすることができる。

【0756】

3. ベクター生成の最適化

ベクター生成の際の導入遺伝子*mRNA*ノックダウンの実施のために利用されているマイクロRNAの様式に応じて、最大効果、すなわち、効率的な導入遺伝子抑制及び／又は逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価の回復を達成するようにプロセスを最適化できる。 40

【0757】

*siRNA* / *shRNA* / *miRNA* を利用する一過性の生成のために、これには、ベクター構成成分をコードするプラスミド及びトランスフェクション試薬に対する種々の量及び比率の干渉RNAエフェクター、並びに採取時間及び／又は酪酸ナトリウム誘導レベル／タイミングを実験的に試験することが含まれる。

【0758】

*miRNA* カセットが、ベクター構成成分をコードする1つ又は2つ以上のプラスミドにシスで挿入されるアプローチのために、*miRNA* の数、配置及び方向が実験的に試験されなければならない。

【0759】

m i R N Aを発現する安定な細胞株の開発のために、スクリーニングプロセスによって、実験的に試験され、導入遺伝子レベルが低く、ベクター力価が高いクローンが同定される。

【0760】

干渉RNAの使用

さらなる態様では、本発明は、レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子の発現を抑制する及び／又はレトロウイルス力価を増大するための、本明細書で記載されるような干渉RNAをコードする核酸配列の使用を提供する。

【0761】

さらなる態様では、本発明は、レトロウイルスベクター生成細胞において導入遺伝子の発現を抑制する及び／又はレトロウイルス力価を増大するための、本明細書で記載されるような干渉RNAをコードする核酸配列の使用を提供する。

【0762】

適宜、本明細書で記載されるような干渉RNAをコードする核酸配列は、レトロウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列と共に使用される。言い換えれば、干渉RNAをコードする核酸配列は、本明細書で記載されるような核酸配列のセットの一部として使用され得る。

【0763】

活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価は、上記のように新規タンパク質合成の喪失につながる細胞内での生得的dsRNA感知経路の誘発のために負の影響を受ける場合がある。したがって、レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子mRNAを標的とする本明細書で記載されるような干渉RNAを使用し、それによって、生得的dsRNA感知経路の誘発及び新規タンパク質合成の喪失を防ぐことによって、活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価を増強することができる。

【0764】

さらに、ある特定の導入遺伝子は、細胞において発現された場合に細胞にとって毒性である、又は他の有害な特性を有する場合がある。したがって、レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子mRNAを標的とする本明細書で記載されるような干渉RNAを使用することによって、このような導入遺伝子を保有するベクターの力価をさらにブーストできる。

【0765】

適宜、レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子mRNAを標的とする本明細書で記載されるような干渉RNAを使用することによって、活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価を、レポーター遺伝子コンストラクト（例えば、GFP導入遺伝子）を保有するレトロウイルスベクターの生成の際に見られる力価レベルに回復させることができる。

【0766】

したがって、本明細書で記載されるような干渉RNAの使用は、本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下で対応するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター生成と比較して、レトロウイルスベクター生成の際に活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するレトロウイルスベクターの力価を増強できる。したがって、本明細書で記載されるような干渉RNAの存在下での活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するレトロウイルスベクターの生成は、本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下での対応するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター生成と比較して、レトロウイルスベクター力価を増強する。本発明は、活発に転写される逆向きの導入遺伝子カセット及び例えば、細胞にとって毒性である導入遺伝子を保有するレトロウイルスベクターの力価を増強するために特に有利である。

【0767】

レトロウイルスベクター力価の測定のための適切なアッセイは、本明細書で記載される

通りである。適宜、レトロウイルスベクター生成は、前記干渉RNAの、gag、env、rev及びレトロウイルスベクターのゲノムを含むベクター構成成分との同時発現を含む。あるいは、レトロウイルスベクター生成は、前記干渉RNAのシスでの提供を含む。

【0768】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるような干渉RNAの使用は、レトロウイルスベクター生成の際に活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター力価を、本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下での対応するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター生成に対して少なくとも30%増大できる。適宜、本明細書で記載されるような干渉RNAの使用は、レトロウイルスベクター生成の際に活発に発現される逆向きの導入遺伝子カセットを含有するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター力価を、本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下での対応するレトロウイルスベクターのレトロウイルスベクター生成に対して少なくとも35%（適宜、少なくとも40%、45%、50%、60%、70%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%又は1000%）増大できる。

【0769】

上記のように、レトロウイルスベクター生成の際の導入遺伝子タンパク質の発現は、ベクタービリオン組み立て、ベクタービリオン活性、プロセス収率及び／又は最終生成物の品質に対して不要な効果を有する場合がある。したがって、ウイルスベクター生成細胞において導入遺伝子の発現を抑制することが望ましい。適宜、導入遺伝子をコードするmRNAの翻訳が抑制される場合がある。

【0770】

NOI（すなわち、導入遺伝子）の翻訳の抑制又は防止は、同等の時点で本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下で翻訳される量と比較した、ウイルスベクター生成の際に翻訳されるNOIによってコードされる生成物（例えば、導入遺伝子タンパク質）の量の変更として理解されなくてはならない。

【0771】

一実施形態では、導入遺伝子の発現は、レトロウイルスベクター生成細胞において抑制又は防止される。

【0772】

ベクター生成の間の任意の所与の時間での導入遺伝子からのタンパク質の発現は、ベクター生成における同じ時点での本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下で発現される量の90%に（適宜、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%又は0.1%に）低減され得る。

【0773】

ベクター生成の間の任意の所与の時間での導入遺伝子からのタンパク質の発現は、ベクター生成における同じ時点での本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下で発現される量の90%未満に（適宜、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%又は0.1%未満に）低減され得る。

【0774】

一実施形態では、導入遺伝子の翻訳は、レトロウイルスベクター生成細胞において抑制又は防止される。

【0775】

導入遺伝子からのタンパク質の発現を防止することは、実質的にゼロへ（適宜、ゼロへ）発現されるタンパク質の量を低減することと理解されなくてはならない。

【0776】

ベクター生成の間の任意の所与の時間での導入遺伝子の翻訳は、ベクター生成における同じ時点での本明細書で記載されるような干渉RNAの非存在下で翻訳される量の90%

10

20

30

40

50

に（適宜、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%又は0.1%に）低減され得る。

【0777】

ベクター生成の間の任意の所与の時間でのNOIの翻訳は、ベクター生成における同じ時点での本明細書に記載されるような干渉RNAの非存在下で翻訳される量の90%未満に（適宜、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%又は0.1%未満に）低減され得る。

【0778】

NOIの翻訳を防止することは、実質的にゼロへ（適宜、ゼロへ）翻訳の量を低減することと理解されなくてはならない。

【0779】

導入遺伝子の翻訳を分析及び／又は定量化するための方法は、当技術分野で周知である。

【0780】

溶解細胞からのタンパク質産物は、クマシー又は銀染色による可視化を伴うSDS-PAGE分析などの方法を使用して分析できる。あるいは、タンパク質産物は、タンパク質産物に結合する抗体プローブを用いるウエスタンブロッティング又は酵素結合免疫吸着測定法（ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay）を使用して分析できる。インタクトな細胞中のタンパク質産物は、免疫蛍光によって分析できる。

【0781】

RNAスプライシング

本発明は、本明細書に開示されるように、主要スプライスドナー（MSD）部位ノックアウトレンチウイルスベクターゲノムと組み合わせることができる。本発明は、メジャースプライスドナー部位、及び任意選択で、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位が不活化されているレンチウイルスベクターゲノムを利用できる。

【0782】

したがって、一部の実施形態では、レンチウイルスベクターのゲノム中のメジャースプライスドナー部位、及び任意選択で、レンチウイルスベクターのゲノム中のメジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位が不活化されている。

【0783】

一部の実施形態では、不活化されたメジャースプライスドナー部位は、配列番号4に示される配列を有する。

【0784】

本発明に従って使用するための適切な不活化されたスプライス部位は、国際公開第2021/160993号パンフレットに記載され、参照により本明細書に組み込まれる。

【0785】

RNAスプライシングは、5つの小さい核リボタンパク質（snRNP）から構成される、スプライセオソームと呼ばれる大きなRNA-タンパク質複合体によって触媒される。イントロンとエクソンの間の境界は、pre-mRNA内の特定のヌクレオチド配列によって印がつけられており、これはスプライシングが生じる場所を描写する。このような境界は、「スプライス部位」と呼ばれる。「スプライス部位」という用語は、真核細胞のスプライシング機構によって、切断される及び／又は別のスプライス部位にライゲートされるのに適切であると認識されることが可能なポリヌクレオチドを指す。

【0786】

スプライス部位によって、pre-mRNA転写物中に存在するイントロンの切除が可能になる。通常、5'スプライス境界は、「スプライスドナー部位」又は「5'スプライス部位」と呼ばれ、3'スプライス境界は、「スプライスアクセプター部位」又は「3'スプライス部位」と呼ばれる。スプライス部位には、例えば、ネイティブに存在するスプライス部位、操作された又は合成のスプライス部位、カノニカル又はコンセンサススプライス部位及び／又は非カノニカルスプライス部位、例えば、潜在性スプライス部位が含まれる

10

20

30

40

50

。

## 【0787】

スプライスアクセプター部位は、一般に、3つの別個の配列エレメント：ブランチポイント又はブランチ部位、ポリピリミジン管及びアクセプターコンセンサス配列からなる。真核生物におけるブランチポイントコンセンサス配列は、YNYTRAC（Yはピリミジンであり、Nは、任意のヌクレオチドであり、Rは、プリンである）である。3'アクセプタースプライス部位コンセンサス配列は、YAG（Yはピリミジンである）である（例えば、Griffiths et al., eds., Modern Genetic Analysis, 2nd edition, W.H. Freeman and Company, New York (2002)を参照されたい）。3'スプライスアクセプター部位は通常、イントロンの3'末端に位置づけられる。

10

## 【0788】

「カノニカルスプライス部位」又は「コンセンサススプライス部位」という用語は、同義的に使用でき、種全体にわたって保存されているスプライス部位を指す。

## 【0789】

真核生物のRNAスプライシングに使用される5'ドナースプライス部位及び3'アクセプタースプライス部位のコンセンサス配列は、当技術分野で周知である。これらのコンセンサス配列には、イントロンの各末端にほぼ不変のジヌクレオチド：イントロンの5'末端のGT及びイントロンの3'末端のAGが含まれる。

## 【0790】

カノニカルスプライスドナー部位コンセンサス配列は、(DNAについて) AG/GTRAGT（Aはアデノシンであり、Tはチミンであり、Gはグアニンであり、Cはシトシンであり、Rはプリンであり、「/」は切断部位を示す）であり得る。これは、本明細書で記載されるより一般的なスプライスドナーコンセンサス配列MAGGURRに従う。例えば、vRNAパッケージング領域内の二次構造などの他の制約が同じ配列に関係する場合に、特に、ウイルスゲノムでは、スプライスドナーがこのコンセンサスから逸脱する場合があるということは当技術分野で周知である。カノニカルスプライスドナーコンセンサス配列と比較して稀に生じるが、非カノニカルスプライス部位もまた、当技術分野で周知である。

20

。

## 【0791】

「メジャースプライスドナー部位」とは、通常、ウイルスベクターヌクレオチド配列の5'領域中に位置づけられる、ネイティブウイルスRNAパッケージング配列内にコードされ、埋め込まれるウイルスベクターゲノム中の第1の（ドミナント）スプライスドナー部位を意味する。

30

## 【0792】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、活性なメジャースプライスドナー部位を含有しない、すなわち、スプライシングはメジャースプライスドナー部位から生じず、メジャースプライスドナー部位からのスプライシング活性は、除去される。

## 【0793】

メジャースプライスドナー部位は、レンチウイルスゲノムの5'パッケージング領域中に位置づけられる。

40

## 【0794】

HIV-1ウイルスの場合には、メジャースプライスドナーコンセンサス配列は、(DNAについて) TG/GTRAGT（Aはアデノシンであり、Tはチミンであり、Gはグアニンであり、Cはシトシンであり、Rはプリンであり、「/」は切断部位を示す）である。

## 【0795】

一実施形態では、スプライスドナー領域、すなわち、メジャースプライスドナー部位を含むベクターゲノムの領域は、変異の前に、以下の配列を有する場合がある：

GGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAT（配列番号1）

## 【0796】

一実施形態では、変異したスプライスドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

50

GGGGCGGCGACTGCAGACAACGCCAAAAAT (配列番号 2-MSD-2KO)

【0797】

一実施形態では、変異したスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GGGGCGGCGAGTGGAGACTACGCCAAAAAT (配列番号 3-MSD-2KOv2)

【0798】

一実施形態では、変異したスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GGGGAAGGCAACAGATAAATATGCCTTAAAT (配列番号 4-MSD-2KOM5)

【0799】

一実施形態では、改変の前に、スプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GGCGACTGGTGAGTACGCC (配列番号 5)

【0800】

この配列はまた、「ステムループ 2」領域 (SL2) とも呼ばれる。この配列は、ベクターゲノムのスプライドナー領域においてステムループ構造を形成し得る。本発明の一態様では、この配列 (SL2) は、本明細書に記載されるような本発明によるヌクレオチド配列から欠失している場合がある。

【0801】

そのようなものとして、本発明は、SL2 を含まないレンチウイルスベクターゲノムの使用を包含する。本発明は、配列番号 5 による配列を含まないレンチウイルスベクターゲノムの使用を包含する。

【0802】

本発明の一態様では、メジャースプライドナー部位は、以下のコンセンサス配列を有する場合があり、R はプリンであり、「/」は切断部位である：

TG/GTRAGT

【0803】

一態様では、R は、グアニン (G) であり得る。

【0804】

本発明の一態様では、メジャースプライドナー及び潜在的スプライドナー領域は、以下のコア配列を有する場合があり、メジャースプライドナー及び潜在的スプライドナー部位で「/」は切断部位である：

/GTGA/GTA

【0805】

本発明の一態様では、MSD が変異したベクターゲノムは、メジャースプライドナー及び潜在的スプライドナー「領域」 (/GTGA/GTA) 中に少なくとも 2 つの変異を有する場合があり、第 1 及び第 2 の「GT」ヌクレオチドは、それぞれメジャースプライドナー及び潜在的スプライドナーヌクレオチドのすぐ 3' にある。

【0806】

本発明の一態様では、メジャースプライドナーコンセンサス配列は、CTGGT である。メジャースプライドナー部位は、配列 CTGGT を含有し得る。

【0807】

一態様では、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、スプライス部位の不活化の前に、配列番号 1、5 のいずれかに示されるような配列並びに / 又は配列 TG/GTRAGT、CTGGT、TGAGT 及び / 又は /GTGA/GTA を含む。

【0808】

一態様では、ヌクレオチド配列は、不活化されたメジャースプライドナー部位を含み、そうでなければ配列番号 1 のヌクレオチド 13 と 14 に対応するヌクレオチドの間に切断部位を有する。

【0809】

本明細書に記載されるような本発明によれば、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列はまた、不活性の潜在的スプライドナー部位を含有する。一態様

10

20

30

40

50

では、ヌクレオチド配列は、メジャースプライドナー部位（の3'）に隣接する活性な潜在的スプライドナー部位を含有しない、すなわち、スプライシングは隣接する潜在的スプライドナー部位から生じず、潜在的スプライドナー部位からのスプライシングは除去される。

【0810】

「潜在的スプライドナー部位」という用語は、スプライドナー部位として正常に機能しない、又は隣接する配列の状況（例えば、近くの「好ましい」スプライドナーの存在）のためにスプライドナー部位としてあまり効率的ではなく利用される核酸配列を指すが、隣接する配列の変異（例えば、近くの「好ましい」スプライドナーの変異）によって活性化されて、より効率的に機能するスプライドナー部位になることができる。

10

【0811】

一態様では、潜在的スプライドナー部位は、メジャースプライドナーの3'の最初の潜在的スプライドナー部位である。

【0812】

一態様では、潜在的スプライドナー部位は、メジャースプライドナー部位の3'側にメジャースプライドナー部位の6ヌクレオチド内にある。好ましくは、潜在的スプライドナー部位は、メジャースプライドナー切断部位の4又は5、好ましくは、4ヌクレオチド内にある。

【0813】

本発明の一態様では、潜在的スプライドナー部位は、コンセンサス配列TGAGTを有する。

20

【0814】

一態様では、不活化された、そうでなければ配列番号1のヌクレオチド17と18に対応するヌクレオチドの間に切断部位を有するであろう、潜在的スプライドナー部位。

【0815】

本発明の一態様では、メジャースプライドナー部位及び／又は隣接する潜在的スプライドナー部位は、「GT」モチーフを含有する。本発明の一態様では、メジャースプライドナー部位及び隣接する潜在的スプライドナー部位の両方が、変異している「GT」モチーフを含有する。変異しているGTモチーフは、メジャースプライドナー部位及び隣接する潜在的スプライドナー部位の両方からのスプライス活性を不活化し得る。このような変異の例は、本明細書において「MSD-2KO」と呼ばれる。

30

【0816】

一態様では、スプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

CAGACA

【0817】

例えば、一態様では、変異しているスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GGCGACTGCAGACAACGCC（配列番号6）

【0818】

不活化変異のさらなる例は、本明細書において「MSD-2KO v2」と呼ばれる。

40

【0819】

一態様では、変異しているスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GTGGAGACT

【0820】

例えば、一態様では、変異しているスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

GGCGAGTGGAGACTACGCC（配列番号7）

【0821】

例えば、一態様では、変異しているスプライドナー領域は、以下の配列を含む場合がある：

50

AAGGCAACAGATAAATATGCCTT (配列番号 8)

【0822】

一態様では、上記のようなステムループ2領域が、スプライスドナー領域から欠失し、メジャースプライスドナー部位及び隣接する潜在的スプライスドナー部位の両方の不活化をもたらす場合がある。このような欠失は、本明細書において「ΔSL2」と呼ばれる。

【0823】

様々な異なる種類の変異を核酸配列中に導入して、メジャースプライスドナー部位及び隣接する潜在的スプライスドナー部位を不活化できる。

【0824】

一態様では、変異は、スプライス領域においてスプライシング活性を除去又は抑制する機能的変異である。ヌクレオチド配列は、配列番号1、5並びに／又は配列TG/GTRAGT、CTGGT、TGAGT及び／若しくは/GTGA/GTAのいずれか中のヌクレオチドのいずれかに変異又は欠失を含有し得る。適切な変異は、当業者に公知であり、本明細書に記載される。

【0825】

例えば、核酸配列中に点変異を導入できる。「点変異」という用語は、本明細書で 사용되는場合、単一ヌクレオチドへの任意の変更を指す。点変異には、例えば、欠失、転移及びトランスポゾンが含まれ、これらは、タンパク質コーディング配列内に存在する場合には、ナンセンス突然変異、ミスセンス変異又はサイレント変異と分類され得る。「ナンセンス」変異は、終止コドンをもたらす。「ミスセンス」変異は、異なるアミノ酸をコードするコドンをもたらす。「サイレント」変異は、同じアミノ酸又はタンパク質の機能を変更しない異なるアミノ酸のいずれかをコードするコドンをもたらす。1つ又は2つ以上の点変異は、潜在的スプライスドナー部位を含む核酸配列中に導入できる。例えば、潜在的スプライス部位を含む核酸配列は、2つ又は3つ以上の点変異をその中に導入することによって変異され得る。

【0826】

少なくとも2つの点変異を、メジャースプライスドナー及び潜在的スプライスドナー部位を含む核酸配列内のいくつかの位置に導入して、スプライスドナー領域からのスプライシングの減衰を達成できる。一態様では、変異は、 $A^1G^2/G^3T^4$  (「/」は切断部位である) であるカノニカルスプライスドナーコンセンサス配列中のスプライスドナー切断部位の4つのヌクレオチド内であり得る。例えば、vRNAパッケージング領域内の二次構造などの他の制約が同じ配列に関係する場合に、特に、ウイルスゲノムでは、スプライスドナー切断部位がこのコンセンサスから逸脱する場合があるということは当技術分野で周知である。 $G^3T^4$ ジヌクレオチドは、一般に、カノニカルスプライスドナーコンセンサス配列内で最小に変異の配列であり、 $G^3$ 及び又は $T^4$ の変異は、最大の減衰効果を達成する可能性が最も高いことは周知である。例えば、HIV-1 ウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位について、これは、 $T^1G^2/G^3T^4$  (「/」は切断部位である) であり得る。例えば、HIV-1 ウイルスベクターゲノム中の潜在的スプライスドナー部位について、これは、 $G^1A^2/G^3T^4$  (「/」は切断部位である) であり得る。さらに、点変異をスプライスドナー部位に隣接して導入できる。例えば、点変異を、スプライスドナー部位の上流又は下流に導入できる。メジャー及び／又は潜在的スプライスドナー部位を含む核酸配列が、複数の点変異をその中に導入することによって変異される態様では、点変異を潜在的スプライスドナー部位の上流及び／又は下流に導入できる。

【0827】

本明細書に記載されるように、本発明に従って使用するためのレンチウイルスベクターのRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列は、任意選択で、パッケージング配列のSL4ループ内の潜在的スプライスドナー部位中に変異をさらに含む場合がある。一態様では、パッケージング配列のSL4ループ内の前記潜在的スプライスドナー部位中のGTジヌクレオチドが、GCに変異される。

10

20

30

40

50

## 【0828】

一態様では、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、ベクター生成のためのU3又はtat-非依存性システムにおいてレンチウイルスベクター中で使用するのに適切であり得る。本明細書で記載されるように、第3世代レンチウイルスベクターは、U3／tat-非依存性であり、本発明によるヌクレオチド配列は、第3世代レンチウイルスベクターとの関連で使用され得る。本発明の一態様では、tatは、レンチウイルスベクター生成システム中に提供されない、例えば、tatは、トランスで提供されない。一態様では、本明細書で記載されるような細胞又はベクター又はベクター生成システムは、tatタンパク質を含まない。本発明の一態様では、HIV-1 U3は、レンチウイルスベクター生成システム中に存在しない、例えば、HIV-1 U3は、ベクターゲノム発現カセットの転写を駆動するためにシスで提供されない。

10

## 【0829】

一態様では、レンチウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、tat-非依存性レンチウイルスベクターにおいて使用するためのものである。

## 【0830】

一態様では、レンチウイルスベクターのRNAゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、tatの非存在下で生成される。

20

## 【0831】

一態様では、レンチウイルスベクターのRNAゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、tat非依存性に転写されている。

## 【0832】

一態様では、レンチウイルスベクターのRNAゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、U3-非依存性レンチウイルスベクターにおいて使用するためのものである。

## 【0833】

一態様では、レンチウイルスベクターのRNAゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、U3プロモーターとは独立に転写されている。

30

## 【0834】

一態様では、レンチウイルスベクターのRNAゲノム中のメジャースプライスドナー部位は、不活化され、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位は、不活化され、前記ヌクレオチド配列は、異種プロモーターによって転写されている。

## 【0835】

一態様では、本明細書で記載されるようなヌクレオチド配列の転写は、U3の存在に依存しない。ヌクレオチド配列は、U3-非依存性転写事象に由来する場合がある。ヌクレオチド配列は、異種プロモーターに由来する場合がある。本明細書で記載されるようなヌクレオチド配列は、ネイティブU3プロモーターを含まない場合がある。

40

## 【0836】

スプライス部位変異体の構築

本発明のスプライス部位変異体は、様々な技術を使用して構築できる。例えば、ネイティブ配列の断片へのライゲーションを可能にする制限部位に挟まれた変異体配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、変異を特定の遺伝子座に導入できる。ライゲーション後、結果として生じた再構築された配列は、所望のヌクレオチド挿入、置換又は欠失を有する派生物を含む。さらなる例として、国際公開第2021/160993

50

号パンフレット（その全体で参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようにスプライス部位変異体を構築できる。

【0837】

DNA配列の変更を可能にする他の公知の技術として、組換えアプローチ、例えば、 Gibson アセンブリー（Gibson assembly）、ゴールデンゲート（Golden-gate）クローニング及びインフュージョン（Infusion）が挙げられる。

【0838】

あるいは、オリゴヌクレオチドに向けられた部位特異的（又はセグメント特異的）突然変異誘発手順を利用して、必要とされる置換、欠失又は挿入により変更された配列を提供できる。スプライス部位変異体の欠失又は短縮化派生物も、所望の欠失に隣接する従来の制限エンドヌクレアーゼ部位を利用することによって構築できる。制限後、オーバーハングを埋め、DNAを再ライゲートできる。上記で示される変更を行う例証的方法は、 Sambrook et al. (Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)によって開示されている。

【0839】

スプライス部位変異体はまた、PCR突然変異誘発、化学的突然変異誘発、強制ヌクレオチド誤取り込みによる（例えば、Liao and Wise, 1990）、又はランダムに突然変異誘発されたオリゴヌクレオチドの使用による（Horwitz et al., 1989）化学的突然変異誘発（Drinkwater and Klinedinst, 1986）の技術を利用して構築できる。

【0840】

本発明はまた、レンチウイルスベクターヌクレオチド配列を生成するための方法であって、

本明細書に記載されるようなレンチウイルスベクターのRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列を提供するステップ、並びに前記ヌクレオチド配列中の本明細書に記載されるようなメジャースプライスドナー部位及び潜在的スプライスドナー部位を変異させるステップ

を含む方法を提供する。

【0841】

ベクター力価を改善するための改変されたU1 snRNAとの組合せ

MSDが変異しているレンチウイルスベクターは、LV生成の際及び標的細胞においての両方で異常なスプライシング事象に参加する能力の低減のために、遺伝子療法ベクターとして使用するのに現在の標準的なレンチウイルスベクターよりも好ましい。しかし、MSDが変異しているベクターの生成は、HIV-1 tatタンパク質の供給に頼っていた（第1及び第2世代U3依存性レンチウイルスベクター）、ベクターRNAレベルでMSDを変異することの不安定化効果のために低効率のものであった（第3世代ベクターにおいて）、又は、本発明者らによって発見されたように、改変されたU1 snRNAの同時発現によって改善される。本発明者らはこれまでに、MSDが変異している第3世代（すなわち、U3/tat-非依存性）LVを、生成の際にベクターゲノムRNAの5'パッケージング領域に結合するように向けられた改変されたU1 snRNAの同時発現によって高力価に生成できることを見出した（参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2021/014157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい）。

【0842】

いわゆるMSDが変異している（又はMSD-2KO）レンチウイルスベクターゲノムから生成されるvRNAの量は通常、実質的に低減され、低いベクター力価につながる。MSD及びU1 snRNAとの「初期」相互作用（スプライシング決定の前）は、外部プロモーターからの転写伸長にとって重要であることが理論づけられている。本発明者らはこれまでに、この問題の解決策は、LV生成の際に改変されたU1 snRNAをトランスで提供して、vRNAを安定化することであると見出した（国際公開第2021/0

14157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい)。

【0843】

これらの改変されたU1 snRNAは、MSDが変異しているLVの生成力価を、5' R領域内の5' ポリアシグナルの存在に非依存性である方法で増強でき、これは、他のポリアデニル化を抑制するための改変されたU1 snRNAの使用(いわゆるU1-干渉、[Ui])を上回る新規機構を示す。改変されたU1 snRNAをパッケージング領域の重大な配列に標的化することによって、MSDが変異しているLV力価の最大の増強がもたらされた。

【0844】

本発明者らはこれまでに、内因性配列(スプライスドナー部位)をもはや標的とせず、vRNA分子内の配列を標的とするように改変されている、U1 snRNAに基づく非コーディングRNAを同時発現させることによってレンチウイルスベクターのアウトプット力価を増強できることを示した。国際公開第2021/014157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットにおいて実証されるように、前記の改変されたU1 snRNAによるメジャースプライスドナー領域(メジャースプライスドナー及び潜在的スプライスドナー部位を含有する)内に減衰変異を保有するレンチウイルスベクターのアウトプット力価の相対的な増強は、変異していないメジャースプライスドナー領域を含有する標準レンチウイルスベクターよりも大きい。

【0845】

力価の低減につながる、メジャースプライスドナー領域内の広範囲の変異の種類(点変異、領域欠失及び配列置換)を保有するベクターゲノムを、改変されたU1 snRNAと組み合わせて使用できる。このアプローチは、ベクター生成の際に改変されたU1 snRNAの、他のベクター構成成分と一緒に同時発現を含み得る。改変されたU1 snRNAは、コンセンサススプライスドナー部位への結合が、それをベクターゲノムvRNA内の標的配列と相補的である異種配列と置き換えることによって除去されているように設計される。

【0846】

一部の実施形態では、本発明のヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAと組み合わせて使用される。

【0847】

一部の実施形態では、本発明のヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0848】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAをさらにコードする。

【0849】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列は、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している。

【0850】

一部の実施形態では、前記の改変されたU1 snRNAは、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている。

【0851】

一実施形態では、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列は、異なるヌクレオチド配列上で、例えば、異なるプラスミド上で提供される場合がある。言い換えれば、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列は、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターの生成の際にトランスで提供される場合がある。

【0852】

スプライシング及びポリアデニル化は、特に、ほとんどのタンパク質をコードする転写物が複数のイントロン含有する高等真核生物において、mRNA成熟にとって重要なプロ

10

20

30

40

50

セスである。スプライシングに必要とされる *pre-mRNA* 内のエレメントは、5' スプライスドナーシグナル、ブランチポイントの周囲の配列及び 3' スプライスアクセプターシグナルを含む。これらの3つのエレメントと相互作用するものがスプライセオソームであり、これは、U1 snRNA 及び関連核タンパク質 (snRNP) を含む5つの核内低分子RNA (snRNA) によって形成される。U1 snRNA は、ポリメラーゼIIプロモーターによって発現され、ほとんどの真核細胞中に存在する (Lund et al., 1984, J. Biol. Chem., 259:2013-2021)。ヒトU1 snRNA (核内低分子RNA) は、164 nt 長であり、4つのステムループからなる十分に定義された構造を有する (West, S., 2012, Biochemical Society Transactions, 40:846-849)。U1 snRNA は、エクソンイントロン接合部の5' スプライスドナー部位と広く相補的である、その5' 末端の短い配列を含有する。U1 snRNA は、5' スプライスドナー部位への塩基対形成による、スプライス部位選択及びスプライセオソーム組み立てに参与する。スプライシング以外のU1 snRNA の公知の機能は、3' 末端mRNA プロセシングの調節においてであり、初期ポリAシグナルで (特に、イントロン内) 未熟ポリアデニル化 (ポリA) を抑制する。

10

#### 【0853】

ヒトU1 snRNA (核内低分子RNA) は、164 nt 長であり、4つのステムループからなる十分に定義された構造を有する。内因性非コーディングRNAであるU1 snRNA は、イントロンスプライシングの初期ステップの際にネイティブスプライスドナーアニーリング配列 (例えば、5'-ACUUACCUG-3') を介してコンセンサス5' スプライスドナー部位 (例えば、5'-MAGGURR-3'、MはA又はCであり、RはA又はGである) に結合する。ステムループIは、ポリA抑制にとって重要であるとわかっているU1A-70Kタンパク質に結合する。ステムループIIは、U1Aタンパク質に結合し、5'-AUUUGUGG-3' 配列はSmタンパク質に結合し、ステムループIVと一緒にU1 snRNA プロセシングにとって重要である。本明細書に定義されるように、本発明に従って使用するための改変されたU1 snRNA は、ベクターゲノムvRNA分子内の標的配列と相補的である異種配列を、ネイティブスプライスドナー標的化／アニーリング配列の部位に導入するように改変される。

20

#### 【0854】

本発明に従って使用するための適切な改変されたU1 snRNA は、国際公開第2021/014157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットに記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0855】

改変されたU1 snRNA は、当技術分野で一般的に知られる方法に従って製造できる。例えば、改変されたU1 snRNA を、化学合成又は組換えDNA/RNA技術によって製造できる。さらなる例として、本明細書に記載されるような改変されたU1 snRNA を、国際公開第2021/014157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットに記載されるように製造できる。

#### 【0856】

従来の分子生物学及び細胞生物学技術を使用する本明細書に記載されるような改変されたU1 snRNA をコードするヌクレオチド配列の細胞への導入は、当業者の能力の範囲内である。

40

#### 【0857】

#### TRIPシステム

本発明を、本明細書に開示されるように、「TRIP」システムと組み合わせることができる。

#### 【0858】

ウイルスベクター生成の際の導入遺伝子の発現は、生成段階の1つ又は2つ以上の態様に負の影響を及ぼすことによってベクター収率及び／又は品質にとって有害である場合がある。例えば、導入遺伝子タンパク質は、細胞傷害性である場合がある、又はベクタービ

50

リオン組み立て及び／若しくは感染力を直接的若しくは間接的に損なう場合がある、又は下流プロセッシングの際の若しくは最終生成物におけるその存在が問題になる場合がある。したがって、ウイルスベクター生成細胞内でのNOIによってコードされるタンパク質の発現は、治療用ベクター力価に悪影響を及ぼし得る（国際公開第2015／092440号パンフレットに示されるように）。さらに、膜貫通POIをコードするNOIは、例えば、ウイルスベクタービリオンにおける膜貫通タンパク質の高い表面発現につながり、ビリオンの物理的特性を潜在的に変更する可能性がある。さらに、この組み込みは、送達の部位で患者の免疫系にPOIを提示する場合があり、これは、インビボでの治療用遺伝子の形質導入及び／又は長期発現に負の影響を及ぼす場合がある。

【0859】

参照により全体で本明細書に組み込まれる、国際公開第2015／092440号パンフレット及び同2021／094752号パンフレットには、ウイルスベクター生成の際にNOIの翻訳を抑制し（導入遺伝子発現を抑制し）、したがって、NOIによってコードされるタンパク質の発現を抑制又は防止するための真核細胞培養物における異種翻訳制御システムの使用が開示されている。このシステムは、ベクター生成細胞における導入遺伝子抑制システム又はTRIPシステムと呼ばれる。

【0860】

一形態では、TRIPシステムは、細菌trpオペロン調節タンパク質、トリプトファンRNA結合転写減衰タンパク質（TRAP）及びTRAP結合部位／配列（tbs）を利用して、導入遺伝子抑制を媒介する。このシステムの使用は、パッケージング可能なベクターゲノム分子の生成もベクタービリオンの活性も妨害せず、標的細胞におけるNOIの長期発現に干渉しない。

【0861】

「結合部位」という用語は、ある特定のタンパク質と相互作用可能である核酸配列と理解されるべきである。

【0862】

「相互作用可能な」とは、核酸結合部位（例えば、tbs又はその部分）が、細胞、例えば、真核細胞のウイルスベクター生成細胞において遭遇される条件下でタンパク質、例えば、TRAPに結合可能であることと理解されるべきである。RNA結合タンパク質、例えば、TRAPとのこのような相互作用は、核酸結合部位（例えば、tbs又はその一部分）が作動可能に連結しているNOIの翻訳の抑制又は防止をもたらす。

【0863】

TRAPに結合可能であるコンセンサSTRAP結合部位配列は、複数回（例えば、6、7、8、9、10、11、12回又はそれより多く）反復された[KAGNN]であり、このような配列は、ネイティブtrpオペロンに見出される。ネイティブの状況では、時にはAAGNNが許容され、時には、追加の「間隔をあける」Nヌクレオチドが機能的配列をもたらす。インビトロ実験によって、TRAP-RNA結合にとって少なくとも6回又はそれより多いコンセンサ反復が必要であることが実証されている（Babitzke P, Y. J., Campanelli D. (1996) Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163）。したがって、好ましくは、一態様では、tbs内に6又はそれより多い連続[KAGN<sub>≥2</sub>]配列が存在し、「K」はDNAではT又はG、RNAではU又はGであり得る、「N」は、配列中のその配置で特定される任意のヌクレオチドと理解されるべきである（例えば、「N」は、G、A、T、C又はUであり得る）。

【0864】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、tbsをさらに含む。

【0865】

一部の実施形態では、本発明のヌクレオチド配列は、TRAP結合部位（tbs）をさらに含む。

【0866】

一部の実施形態では、TRAPをコードするヌクレオチド配列は、本明細書で記載され

10

20

30

40

50

るようなレンチウイルスベクターの生成の際に存在する。

【0867】

適切な t b s は、国際公開第 2015/092440 号パンフレット及び国際公開第 2021/094752 号パンフレットに記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。適宜、ヌクレオチド配列は、t b s をさらに含む場合があり、Kozak 配列も含む場合があり、前記 t b s は、Kozak 配列と重複するか、又は前記 Kozak 配列は、t b s の一部分を含む。適宜、ヌクレオチド配列は、多重クローニング部位及び Kozak 配列をさらに含む場合があり、前記多重クローニング部位は、t b s の 3' K A G N 2-3 反復の下流及び Kozak 配列の上流と重複しているか、又はそこに位置づけられる。

【0868】

本明細書で使用される場合、「多重クローニング部位」は、互いに極めて近接したいくつかの制限酵素認識部位（制限酵素部位）を含有する DNA 領域と理解されるべきである。一態様では、RE 部位は、本発明において使用するための MCS において重複している場合がある。

【0869】

本明細書で使用される場合、「制限酵素部位」又は「制限酵素認識部位」は、4～8 ヌクレオチドの長さであるヌクレオチドの特異的配列を含有する DNA 分子上の位置であり、制限酵素によって認識される。制限酵素は、特異的 RE 部位（すなわち、特異的配列）を認識し、RE 部位内、又はその近くの DNA 分子を切断する。

【0870】

本発明の一部の態様では、所望のヌクレオチド（すなわち、導入遺伝子）は、t b s に作動可能に連結している。一部の態様では、所望のヌクレオチドは、TRAP を発現する標的細胞において翻訳される。一部の態様では、所望のヌクレオチドは、TRAP を欠く標的細胞において翻訳される。

【0871】

「作動可能に連結している」とは、記載される構成成分が、それらがその意図される方法で機能することを可能にする関係にあると理解されるべきである。したがって、NOI に作動可能に連結した本発明において使用するための t b s 又はその一部分は、TRAP が t b s 又はその一部分に結合すると NOI の翻訳が改変されるような方法で配置される。

【0872】

t b s は、ウイルスベクター生成細胞において所望のヌクレオチドの翻訳が抑制又は防止されるように TRAP と相互作用可能であり得る。

【0873】

ウイルスシス作用性配列

形質導入された（例えば、患者）細胞に送達されたベクター骨格中に存在する ORF は、例えば、上流細胞プロモーターからのリードスルー転写が生じる（レンチウイルスベクターが、活性転写部位を標的とする）場合に転写され、患者細胞中のベクター骨格中に位置づけられた遺伝物質の潜在的な異常な転写につながる可能性がある。リードスルー転写後のベクター骨格中に位置づけられた遺伝物質のこの潜在的な異常な転写もまた、生成細胞におけるレンチウイルスベクター生成の際に生じる可能性がある。

【0874】

レンチウイルスベクターゲノム内に存在するウイルスシス作用性配列は、複数の内部 ORF を含有し得る。これらの内部 ORF は、ウイルスシス作用性配列の内部 ATG 配列と ATG 配列のすぐ 3' の終止コドンの間に見出すことができる。

【0875】

例えば、少なくとも 1 つの内部 ORF の開始を意味する ATG 配列を変異することによって少なくとも 1 つの内部 ORF を破壊するウイルスシス作用性配列中の改変が許容される。したがって、本明細書に記載される改変されたウイルスシス作用性配列は、その機能を保持する。

## 【0876】

したがって、本発明の一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、ウイルスシス作用性配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム（ORF）が破壊されている、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列を含む（その全体で参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2021/181108号パンフレットを参照されたい）。少なくとも1つの内部ORFは、少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊できる（ATG配列は、翻訳開始コドンとして機能し得る）。

## 【0877】

本発明の一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部ORFが破壊されている、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含む（その全体で参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2021/181108号パンフレットを参照されたい）。gagをコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部ORFは、本明細書で記載されるような少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊できる。

10

## 【0878】

本発明に従って使用するための適切な改変されたウイルスシス作用性配列及びgagをコードする改変されたヌクレオチド配列は、国際公開第2021/181108号パンフレットに記載され、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0879】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、少なくとも2（適宜、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7）の改変されたウイルスシス作用性配列を含む。

20

## 【0880】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列中及び／又はgagをコードするヌクレオチド配列中の少なくとも2（適宜、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19又は少なくとも20）の内部ORFが破壊され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列中及び／又はgagをコードするヌクレオチド配列中の少なくとも3の内部ORFが破壊され得る。

30

## 【0881】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列中及び／又はgagをコードするヌクレオチド配列中の1（適宜、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20）の内部ORFが破壊され得る。

## 【0882】

一部の実施形態では、少なくとも1つの内部ORFが、内部ORFが発現されないように破壊され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つの内部ORFが、内部ORFが翻訳されないように破壊され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つの内部ORFが、タンパク質が内部ORFから発現されないように破壊され得る。一部の実施形態では、少なくとも1つの内部ORFが、タンパク質が内部ORFから翻訳されないように破壊され得る。したがって、形質導入された細胞に送達された改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はベクター骨格中のgagをコードする改変されたヌクレオチド配列中に存在する少なくとも1つの内部ORFが、上流細胞プロモーターからのリードスルー転写があると内部ORFの異常な転写が防止されるように破壊され得る。

40

## 【0883】

一実施形態では、少なくとも1つの内部ORFが、少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊され得る。ATG配列の「変異」は、1つ又は2つ以上のヌクレオチド欠失、付加又は置換を含み得る。

50

## 【0884】

一実施形態では、少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中で、

- a) A T T G配列、
- b) A C G配列、
- c) A - G配列、
- d) A A G配列、
- e) T T G配列及び／又は
- f) A T T配列

からなる群から選択される配列に変異され得る。

10

## 【0885】

少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でA T T G配列に変異され得る。少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でA C G配列に変異され得る。少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でA - G配列に変異され得る。少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でA A G配列に変異され得る。少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でT T G配列に変異され得る。少なくとも1つのA T G配列は、改変されたウイルスシス作用性配列中及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列中でA T T配列に変異され得る。

20

## 【0886】

一実施形態では、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性エレメント及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列は、A T G配列を欠く場合がある。

## 【0887】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノム中のウイルスシス作用性配列及び／又はg a gをコードするヌクレオチド配列内のすべてのA T G配列が変異している。

## 【0888】

レンチウイルスベクターは通常、複数のウイルスシス作用性配列を含む。例としてのウイルスシス作用性配列として、g a g - p 1 7、R e v 応答エレメント (R R E)、中央ポリプリン管 (c p p t) 及びウッドチャック肝炎ウイルス (W H V) 転写後調節エレメント (W P R E) が挙げられる。

30

## 【0889】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列は、少なくとも1つのレンチウイルスシス作用性配列であり得る。例としてのレンチウイルスシス作用性配列には、R R E及びc p p tが含まれる。

## 【0890】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列は、少なくとも1つの非レンチウイルスシス作用性配列であり得る。

40

## 【0891】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列は、少なくとも1つのレンチウイルスシス作用性配列及び少なくとも1つの非レンチウイルスシス作用性配列であり得る。

## 【0892】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列は、

- a) g a g - p 1 7及び／又は
- b) R e v 応答エレメント (R R E) 及び／又は
- c) ウッドチャック肝炎ウイルス (W H V) 転写後調節エレメント (W P R E)

50

である。

【0893】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列はR R Eである。

【0894】

一部の実施形態では、少なくとも1つのウイルスシス作用性配列はW P R Eである。

【0895】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、少なくとも2（適宜、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5）の改変されたウイルスシス作用性配列を含む。

【0896】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変されたR R E及び本明細書で記載されるような改変されたW P R Eを含む。

10

【0897】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変されたR R E、本明細書で記載されるような改変されたW P R E及び本明細書で記載されるようなg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列を含む。

【0898】

一実施形態では、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムは、ベクターゲノムの骨格中のA T G配列を欠く。一実施形態では、本明細書で記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムは、N O I（すなわち、導入遺伝子）においてを除いてA T G配列を欠く。

20

【0899】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、ウイルスシス作用性配列中又はg a gをコードするヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム（O R F）が除去されている、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列を含む。

【0900】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、ウイルスシス作用性配列中又はg a gをコードするヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム（O R F）がサイレンシングされている、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列及び／又はg a gをコードする改変されたヌクレオチド配列を含む。

30

【0901】

改変されたg a g及びウイルスG a g－p 17タンパク質

本発明のさらに好ましいが任意の特徴として、上記の特徴と組み合わせて使用されるパッケージング配列内に含まれるg a g配列を最小化することがある。H I V－1レンチウイルスベクターパッケージング配列内に含まれるg a gの量は通常、少なくとも270ヌクレオチド低減できるが、最大で全g a g配列を低減できる。欠失するg a gヌクレオチド配列は、g a g－p 17不安定性配列のものであり得る。g a g－p 17不安定性配列の欠失は通常、残存するg a g配列の最初のA T Gコドンが変異していない限り、ベクター力価の低減をもたらす。

【0902】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失したg a g配列を含み、g a gの最初の80ヌクレオチドのみが残存している。

40

【0903】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失したg a g配列を含み、g a gの最初の70ヌクレオチドのみが残存している。

【0904】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失したg a g配列を含み、g a gの最初の60ヌクレオチドのみが残存している。

【0905】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失したg a g配列を含み、g a

50

g の最初の 50ヌクレオチドのみが残存している。

【0906】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失した g a g 配列を含み、g a g の最初の 40ヌクレオチドのみが残存している。

【0907】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失した g a g 配列を含み、g a g の最初の 30ヌクレオチドのみが残存している。

【0908】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失した g a g 配列を含み、g a g の最初の 20ヌクレオチドのみが残存している。

【0909】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失した g a g 配列を含み、g a g の最初の 10ヌクレオチドのみが残存している。

【0910】

一部の態様では、低減されたパッケージング配列は、欠失した g a g 配列を含み、g a g のヌクレオチドは、残存していない。

【0911】

一部の態様では、本発明のヌクレオチド配列は、除去された g a g 配列を含み、g a g 配列は、最大で最初の 10 だけ、最大で最初の 20、最大で最初の 30、最大で最初の 40、最大で最初の 50、最大で最初の 60、最大で最初の 70 又は最大で最初の 80ヌクレオチドの g a g を含む。

【0912】

g a g をコードするヌクレオチド配列は、g a g の一部をコードする短縮化されたヌクレオチド配列であり得る。g a g をコードするヌクレオチド配列は、g a g の一部をコードする最小の短縮化されたヌクレオチド配列であり得る。g a g の一部は、連続配列であり得る。g a g の一部をコードする短縮化されたヌクレオチド配列又は最小の短縮化されたヌクレオチド配列はまた、少なくとも 1つのフレームシフト変異を含有し得る。

【0913】

例としての g a g の一部をコードする、45～46 位にフレームシフト変異を含有する短縮化されたヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAA  
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGC  
AAGCAGGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAG  
GCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAA  
CTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGA  
GATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGGAGAGCAAAACAAAAGTA  
AGA (配列番号 9)

【0914】

例としての g a g の一部をコードする、45～46 位にフレームシフト変異を含有する最小の短縮化されたヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAA  
ATTCGGTTAAGGCCAGGGGGGAAAGA (配列番号 10)

【0915】

g a g をコードするヌクレオチド配列は、例えば、以下を含み得る：

a) 配列番号 9 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列、又は

b) 配列番号 10 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少

10

20

30

40

50

なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列。

【0916】

g a g をコードする改変されたヌクレオチド配列は、以下を含み得る：

a) 配列番号 9 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列、又は

b) 配列番号 10 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列。

【0917】

g a g をコードする改変されたヌクレオチド配列は、配列番号 9 若しくは配列番号 10 に示される配列、又はそれに対して少なくとも 80% の同一性 (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) を有する配列を含む場合があり、(a) ~ (c) から選択される少なくとも 1 つの A T G 配列が変異している：

a) 配列番号 9 の 1 ~ 3 位に対応する A T G、

b) 配列番号 9 の 47 ~ 49 位に対応する A T G 及び／又は

c) 配列番号 9 の 107 ~ 109 位に対応する A T G。

【0918】

例としての g a g の一部をコードし、フレームシフト変異を含有する改変された短縮化されたヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ACGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGGAGAATTAGATCGCGATTGGGAAAA  
AATTCGGTTAAGGCCAGGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAACATATAGTATTGG  
GCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGA  
AGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAG  
AACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATA  
GAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGGAGAGCAAAACAAAAG  
TAAGA (配列番号 11)

【0919】

例としての g a g の一部をコードし、フレームシフト変異を含有する改変された最小の短縮化されたヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ACGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGGAGAATTAGATCGCGATTGGGAAAA  
AATTCGGTTAAGGCCAGGGGGGAAAGA (配列番号 12)

【0920】

g a g をコードする改変されたヌクレオチド配列は、配列番号 11 に示される配列又はそれに対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列を含み得る。配列は、3 未満 (適宜、2 未満又は 1 未満) の A T G 配列を含み得る。

【0921】

g a g をコードする改変されたヌクレオチド配列は、配列番号 12 に示される配列又はそれに対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列を含み得る。配列は、2 未満 (適宜、1 未満) の A T G 配列を含み得る。

## 【0922】

g a gをコードする改変されたヌクレオチド配列は、3未満のA T G配列を含み得る。適宜、g a gをコードする改変されたヌクレオチド配列は、2未満又は1未満のA T G配列を含み得る。g a gをコードする改変されたヌクレオチド配列は、A T G配列を欠く場合がある。

## 【0923】

G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はその断片を欠くレンチウイルスベクターゲノムは、その全体で参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2021/181108号パンフレットに記載されている。国際公開第2021/181108号パンフレットに記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムは、本発明による使用にとって適切である。

10

## 【0924】

本明細書に記載されるようなレンチウイルスベクターゲノムは、G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はその断片を欠く場合がある。レンチウイルスベクターゲノムは、例えば、G a g - p 1 7又はその断片を発現しない場合がある。一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、配列番号13に示されるような配列を欠く場合がある。

## 【0925】

ウイルスタンパク質G a g - p 1 7は、レンチウイルスベクター粒子のカプシドを取り囲み、順に、エンベロープタンパク質によって取り囲まれている。G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列は、歴史的に、治療用レンチウイルスベクターの生成のためにレンチウイルスベクターゲノム中に含まれてきた。レンチウイルスベクターゲノム内に存在するG a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列は通常、高度に構造化されたRNAを含有するパッケージング領域内に、RNAの5'領域(5'UTR)に向けて埋め込まれている。G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列は通常、本明細書においてp 1 7 - I N Sと呼ばれるRNA不安定性配列(I N S)を含む。

20

## 【0926】

レンチウイルスベクターゲノムの骨格からのp 1 7 - I N Sの欠失は、レンチウイルスベクター生成の際にベクター力価に重大な影響を及ぼさない。

## 【0927】

G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを欠くレンチウイルスベクターゲノムは、G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを含むレンチウイルスベクターゲノムと比較してより小さいサイズのものである。したがって、G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを欠くレンチウイルスベクターゲノムが使用されると、形質導入された細胞に送達されるウイルスベクター骨格内に含有されるウイルスDNAの量は、低減される。さらに、G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを欠くレンチウイルスベクターゲノムを使用して、G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを含有するレンチウイルスベクターゲノムを使用して送達され得る導入遺伝子よりも大きなサイズの導入遺伝子を送達できる。したがって、ベクター骨格内のG a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又はp 1 7 - I N Sを欠失することが望ましいものであり得るいくつかの理由がある。レンチウイルスベクターゲノム配列のサイズを低減するためのg a g配列の欠失が報告されている(Sertkaya, H., et al., Sci Rep 11:12067 (2021))。

30

40

## 【0928】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、(i) G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列又は(ii) G a g - p 1 7をコードするヌクレオチド配列の断片のいずれかを欠く。

## 【0929】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、p 1 7 - I N S又はその断片をコードするヌクレオチド配列を欠く。

## 【0930】

50

例としての p 1 7 - I N S は以下の通りである：

AAAAATATAAATTA AAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCA  
GTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCT  
ACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG  
CAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTA  
GACAAGATAGAGGGAGAGCAAAACAAAAGTA（配列番号 1 3）

【 0 9 3 1 】

一実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、配列番号 1 3 に示されるような配列を欠く場合がある。

【 0 9 3 2 】

一実施形態では、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、全長の G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の一部である。一実施形態では、断片は、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド（適宜、少なくとも約 2 0、少なくとも約 3 0、少なくとも約 4 0、少なくとも約 5 0、少なくとも約 1 0 0、少なくとも約 1 5 0、少なくとも約 2 0 0、少なくとも約 2 5 0、少なくとも約 3 0 0、少なくとも約 3 5 0 ヌクレオチド）を含む、又はそれからなる。

【 0 9 3 3 】

一実施形態では、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、G a g - p 1 7 をコードする全長ヌクレオチド配列の 1 % から 9 9 % の間である長さを有する場合がある。適宜、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、全長の G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列、例えば、ネイティブの G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の少なくとも約 1 0 %（適宜、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %）である長さを有する場合がある。断片は、全長の G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列、例えば、ネイティブの G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の連続領域であり得る。

【 0 9 3 4 】

一実施形態では、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、p 1 7 - I N S をコードする全長ヌクレオチド配列の 1 % から 9 9 % の間である長さを有する場合がある。適宜、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、p 1 7 - I N S をコードする全長ヌクレオチド配列、例えば、p 1 7 - I N S をコードするネイティブヌクレオチド配列（例えば、配列番号 1 3）の少なくとも約 1 0 %（適宜、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %）である長さを有する場合がある。断片は、p 1 7 - I N S をコードする全長ヌクレオチド配列、例えば、p 1 7 - I N S をコードするネイティブヌクレオチド配列（例えば、配列番号 1 3）の連続領域であり得る。

【 0 9 3 5 】

一実施形態では、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片は、G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列中に位置づけられた I N S を含む、又はそれからなる。

【 0 9 3 6 】

一実施形態では、（ i ） G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列又は（ ii ） G a g - p 1 7 をコードするヌクレオチド配列の断片のいずれかを欠くレンチウイルスベクタ

10

20

30

40

50

ーゲノムは、少なくとも1つの本明細書で記載されるような改変されたウイルスシス作用性配列を含む。

【0937】

一実施形態では、(i) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片のいずれかを欠くレンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変されたRRE、改変されたWPRE及び/又はgagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含み得る。

【0938】

一実施形態では、(i) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片のいずれかを欠くレンチウイルスベクターゲノムは、本明細書で記載されるような改変されたRRE、本明細書で記載されるような改変されたWPRE及び本明細書で記載されるようなgagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含み得る。

【0939】

改変されたRev応答エレメント(RRE)

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、改変されたRev応答エレメント(RRE)を含み、RRE中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム(ORF)が、本明細書で記載されるように破壊されている。

【0940】

RREは、レンチウイルスベクターにわたって、及び種々の野生型HIV-1分離株にわたって良好に保存されている必須ウイルスRNAエレメントである。レンチウイルスベクターゲノム内に存在するRREは、複数の内部ORFを含有し得る。これらの内部ORFは、RREの内部ATG配列とATG配列のすぐ3'の終止コドンの間に見出すことができる。

【0941】

レンチウイルスベクターゲノム内に存在するRREは通常、高度に構造化されたRNAを含有するパッケージング領域内に、RNAの5'領域(5'UTR)に向けて埋め込まれている。5'UTR構造は、小さいリンカーによって繋がれた一連のステムループ構造からなる。これらのステムループには、RREが含まれる。したがって、RRE自体が複雑な二次構造を有し、Revが結合する相補的塩基対形成に参与する。

【0942】

例えば、少なくとも1つの内部ORFの開始を意味するATG配列を変異することによって、少なくとも1つの内部ORFを破壊するRRE中の改変は、許容される。したがって、本明細書で記載される改変されたRREは、Rev結合能を保持する。

【0943】

改変されたRREは、8未満のATG配列を含み得る。

【0944】

したがって、一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、改変されたRev応答エレメント(RRE)を含み、改変されたRREは、8未満のATG配列を含む。

【0945】

適宜、改変されたRREは、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、2未満又は1未満のATG配列を含む場合がある。改変されたRREは、ATG配列を欠く場合がある。

【0946】

RREは、最小の機能性RREであり得る。例としての最小の機能性RREは以下の通りである：

```
AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGT
CAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAG
AACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTG
GGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATC
```

AACAGCTCCT (配列番号 14)

【0947】

「最小の機能性 RRE」又は「最小 RRE」とは、全長 RRE の機能を保持する短縮化された RRE 配列を意味する。したがって、最小の機能性 RRE は、Rev 結合能を保持する。

【0948】

RRE は、コア RRE であり得る。例としてのコア RRE は以下の通りである：

GGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTC  
AATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGACAGCAGCAGA  
ACAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG  
GGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCA  
ACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGC  
CTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACC  
TGGATGGAGTGGGAC (配列番号 90)

【0949】

RRE は、全長 RRE であり得る。例としての全長 RRE は以下の通りである：

TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATAT  
AAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAG  
AAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTTCCTTGGGT  
TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAG  
GCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGACAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTAT  
TGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGG  
CAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGG  
GGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGGAATGCTAGTTGGAG  
TAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAG  
AAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAG  
CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAA  
TTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAG  
GAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTT  
AGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGAC (配列番号 15)

【0950】

RRE は、以下を含み得る：

a) 配列番号 14 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列、

b) 配列番号 90 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列及び／又は

c) 配列番号 15 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列。

【0951】

改変された RRE は、以下を含み得る：

a) 配列番号 14 に対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列、

99%)の同一性を有する配列、

b) 配列番号90に対して少なくとも80% (適宜、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)の同一性を有する配列及び／又は

c) 配列番号15に対して少なくとも80% (適宜、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)の同一性を有する配列。

【0952】

改変されたRREは、配列番号14、配列番号90若しくは配列番号15に示される配列又はそれに対して少なくとも80%の同一性 (適宜、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)を有する配列を含む場合があり、群(a)～(h)から選択される少なくとも1つのATG配列が変異している：

- a) 配列番号15の27～29位に対応するATG、
- b) 配列番号15の192～194位に対応するATG、
- c) 配列番号15の207～209位に対応するATG、
- d) 配列番号15の436～438位に対応するATG、
- e) 配列番号15の489～491位に対応するATG、
- f) 配列番号15の571～573位に対応するATG、
- g) 配列番号15の599～601位に対応するATG及び／又は
- h) 配列番号15の663～665位に対応するATG。

【0953】

例としての改変されたRRE配列は以下の通りである：

AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATTGGGCGCAGCG  
TCAATTGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGC  
AGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTC  
TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGA  
TCAACAGCTCCT (配列番号16)

【0954】

さらなる例としての改変されたRRE配列は以下の通りである：

GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATTGGGCGCAGCGT  
CAATTGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCA  
GAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCT  
GGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGAT  
CAACAGCTCCTGGGGATTGTTGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGT  
GCCTTGGGAATTGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACG  
ACCTGGATTGGAGTGGGAC (配列番号91)

【0955】

さらなる例としての改変されたRRE配列は以下の通りである：

TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATTGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATA  
TAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA  
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGG  
TTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATTGGGCGCAGCGTCAATTGACGCTGACGGTA  
CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGC  
TATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC  
AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATT  
TGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGGAATTGCTAGTT

GGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATTGGAGTGGGA  
CAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAA  
ACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTG  
TGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATTGA  
TAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAAT  
AGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAG  
GGGAC (配列番号 17)

【0956】

ATG 配列を欠く改変された RRE 配列の例は、以下の通りである：

TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATTGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATA  
TAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA  
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGG  
TTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATTGGGCGCAGCGTCAATTGACGCTGACGGTA  
CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGC  
TATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCC  
AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATT  
TGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGGAATTGCTAGTT  
GGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATTGGAGTGGGA  
CAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAA  
ACCAGCAAGAAAAGAATtGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATtGGGCAAGTTT  
GTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATTG  
ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAA  
TAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGA  
GGGGAC (配列番号 18)

【0957】

改変された RRE は、配列番号 16、配列番号 91、配列番号 17 若しくは配列番号 18 に示される配列又はそれに対して少なくとも 80% (適宜、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列を含み得る。配列は、8 未満 (適宜、7 未満、6 未満、5 未満、4 未満、3 未満、2 未満又は 1 未満) の ATG 配列を含み得る。

【0958】

改変されたウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WP RE)

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、改変されたウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WP RE) を含み、WP RE 中の少なくとも 1 つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) は、本明細書中に記載されているように破壊される。

【0959】

WP RE は、レンチウイルスベクターを含むいくつかの異なるベクタータイプからの発現を増強することができる (米国特許第 6, 136, 597 号明細書；同第 6, 287, 814 号明細書；Zufferey, R., et al. (1999) J. Virol. 73: 2886-92)。理論に拘束されることを望まないが、この増強は転写後レベルでの RNA プロセッシングが改善され、核内転写物のレベルが増加したためであると考えられている。mRNA の安定性が 2 倍に増加することも、この増強に寄与している (Zufferey, R., et al. 同上)。WP RE を有さない転写物に対して WP RE を含有する転写物からのタンパク質発現の増強レベルは 2~5 倍程度と報告されており、転写物レベルの増加と十分に相関する。これは、いくつかの異なる導入遺伝子で実証されている (Zufferey, R., et al. 同上)。

【0960】

WP RE は、発現レベルを増強する機能にとって重要な 3 つのシス作用性配列を含有する。さらに、WP RE は、WHV X タンパク質 ORF (ORF の全長は 425 bp であ

10

20

30

40

50

る)の5'末端を含むおよそ180bpの断片を、それに関連するプロモーターと一緒に含有する。完全長のXタンパク質は腫瘍形成に関与している(Flajolet, M. et al, (1998) J. Virol. 72: 6175-6180)。Xプロモーターから開始された転写物からの翻訳により、Xタンパク質のNH<sub>2</sub>末端の60アミノ酸に相当するタンパク質が形成される。この短縮化されたXタンパク質は、特に短縮化されたXタンパク質配列が特定の遺伝子座で宿主細胞ゲノムに組み込まれた場合、腫瘍形成を促進する可能性がある(Balsano, C. et al, (1991) Biochem. Biophys Res. Commun. 176: 985-92; Flajolet, M. et al, (1998) J. Virol. 72: 6175-80; Zheng, Y.W., et al, (1994) J. Biol. Chem. 269: 22593-8; Runkel, L., et al, (1993) Virology 197: 529-36)。したがって、短縮化されたXタンパク質の発現は、目的の細胞に送達された場合、腫瘍形成を促進する可能性があり、野生型WP RE配列の安全な使用を妨げる。

10

#### 【0961】

米国特許出願第2005/0002907号明細書は、Xタンパク質ORFに対応するWP REの領域の変異がXタンパク質の腫瘍形成活性を減少させ、それによってWP REがレトロウイルス及びレンチウイルス発現ベクターにおいて安全に使用されて、目的の異種遺伝子又はヌクレオチドの発現レベルを増強することが可能であることを開示する。

#### 【0962】

本明細書で使用される場合、WP REの「X領域」は、翻訳開始コドンを含むXタンパク質ORFの少なくとも最初の60アミノ酸、及びそれに関連するプロモーターを含むと定義される。「機能的な」Xタンパク質は、目的の細胞において発現される場合に、腫瘍形成、又は形質転換された表現型を促進することが可能な短縮化されたXタンパク質として定義される。本出願の文脈における「非機能的な」Xタンパク質は、目的の細胞において腫瘍形成を促進することができないXタンパク質として定義される。

20

#### 【0963】

本明細書に記載の改変されたWP REは、レンチウイルスベクターからの発現を増強する能力を保持する。

#### 【0964】

改変されたWP REは、7個未満のATG配列を含み得る。改変されたWP REは、6個未満のATG配列を含み得る。

#### 【0965】

したがって、一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムは、改変されたウッドチャック肝炎ウイルス(WHV)転写後調節エレメント(WP RE)を含み、改変されたWP REは、7個未満のATG配列、好ましくは6個未満のATG配列を含む。

30

#### 【0966】

好適には、改変されたWP REは、7個未満、6個未満、5個未満、4個未満、3個未満、2個未満又は1個未満のATG配列を含み得る。改変されたWP REはATG配列を欠いていてもよい。

#### 【0967】

一部の実施形態では、WP REのX領域中の少なくとも1つのATG配列が変異し、それによって機能的なXタンパク質の発現が妨げられる。好ましい実施形態では、変異は、X領域の翻訳開始コドン内にある。少なくとも1つのATG配列の変異の結果として、Xタンパク質は発現されない可能性がある。

40

#### 【0968】

一部の実施形態では、改変されたWP REは、WP REのX領域におけるATG配列の変異を含まない。

#### 【0969】

WP RE配列の例は以下の通りである：

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGT  
TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGC  
TTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA

50

TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG  
ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT  
TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC  
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAA  
GCTGACGTCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA  
CGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC  
TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA  
TCTCCCTTTGGGCGCCTCC (配列番号 19)

【0970】

破壊された X タンパク質 ORF を含有する WPRE 配列の例は以下の通りである：

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGT  
TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGC  
TTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA  
TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG  
ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT  
TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC  
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAA  
ATCATCGTCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC  
GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCT  
GCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGAT  
CTCCCTTTGGGCGCCTCC (配列番号 20)

【0971】

WPRE は、

a) 配列番号 19 に対して少なくとも 80% (好適には、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列；及び／又は

b) 配列番号 20 に対して少なくとも 80% (好適には、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列  
を含んでもよい。

【0972】

改変された WPRE は、

a) 配列番号 19 に対して少なくとも 80% (好適には、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列；及び／又は

b) 配列番号 20 に対して少なくとも 80% (好適には、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) の同一性を有する配列  
を含んでもよい。

【0973】

改変された WPRE は、配列番号 19 若しくは配列番号 20 に示される配列、又は配列番号 19 若しくは配列番号 20 に対して少なくとも 80% の同一性 (好適には、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%) を有する配列を含んでもよく、群 (a) ~ (g)：

a) 配列番号 19 の 53 ~ 55 位に対応する ATG；

- b) 配列番号 19 の 72 ～ 74 位に対応する A T G ;
- c) 配列番号 19 の 91 ～ 93 位に対応する A T G ;
- d) 配列番号 19 の 104 ～ 106 位に対応する A T G ;
- e) 配列番号 19 の 121 ～ 123 位に対応する A T G ;
- f) 配列番号 19 の 170 ～ 172 位に対応する A T G ; 及び / 又は
- g) 配列番号 19 の 411 ～ 413 位に対応する A T G

から選択される少なくとも 1 つの A T G が変異している。

【0974】

W P R E は、典型的には、保持された P o l O R F を含有する。保持された P o l O R F 配列の例は以下の通りである：

ATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGC  
TGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACT  
GTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCT  
TTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTG  
CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT  
TGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT  
TGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTT  
CCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA  
CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCGCTCC (配列番号 21)

【0975】

一実施形態では、W P R E において保持された P o l O R F 配列内の少なくとも 1 つ (好適には少なくとも 2 つ又は少なくとも 3 つ) の A T G 配列が変異している。一実施形態では、W P R E において保持された P o l O R F 配列内のすべての A T G 配列が変異している。

【0976】

一実施形態では、改変された W P R E は、W P R E において保持された P o l O R F 配列中に 3 個未満 (好適には、2 個未満又は 1 個未満) の A T G 配列を含む。一実施形態では、改変された W P R E は、W P R E において保持された P o l O R F 配列中に A T G 配列を欠く。

【0977】

保持された P o l O R F 内のすべての A T G コドンが変異している改変された W P R E 配列の例は以下の通りである：

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGT  
TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATTGCTATTG  
CTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT  
ATTGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC  
TGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGA  
CTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCC  
GCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTTGTCGGGG  
AAATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGG  
ACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC  
CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG  
ATCTCCCTTTGGGCGCGCTCC (配列番号 22)

【0978】

A T G 配列を欠く改変された W P R E 配列の例は以下の通りである：

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATtGT  
TGCTCCTTTTACGCTATtGTGGATACGCTGCTTTAATtGCCTTTGTATCATtGCTATT  
GCTTCCCGTATtGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT  
TTATtGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC  
CTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG

ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC  
CGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTCGGG  
GAAATCATCGTCCTTTCTTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGG  
GACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG  
CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCG  
GATCTCCCTTTGGGCGCGCTCC (配列番号 23)

【0979】

改変されたWPREは、配列番号22若しくは配列番号23に示される配列、又は配列番号22若しくは配列番号23に対して少なくとも80%（好適には、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なく

10

【0980】

ベクター／発現カセット

ベクターは、ある環境から別の環境への実体の移動を可能にするか、又は容易にするツールである。本発明に従い、及び例として、組換え核酸技法で使用されるいくつかのベクターは、核酸のセグメント（例えば、異種cDNAセグメントなどの異種DNAセグメント）などの実体が標的細胞に移入され、標的細胞によって発現されるのを可能にする。ベクターは、標的細胞内でウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及びその発現を維持するために、ウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列の組み込みを促進することができる。

20

【0981】

ベクターは、発現カセット（発現コンストラクトとも呼ばれる）であってもよく、それを含んでもよい。本明細書に記載されている発現カセットは、転写可能な配列を含有する核酸の領域を含む。よって、mRNA、tRNA及びrRNAをコードする配列は、この定義内に含まれる。

【0982】

ベクターは、1又は2以上の選択可能なマーカーの遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子）及び／又は追跡可能なマーカーの遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子）を含有してもよい。ベクターは、例えば、標的細胞に感染及び／又は形質導入するために使用されてもよい。ベクターは、問題の宿主細胞におけるベクターの複製を可能にするヌクレオチド配列、例えば条件付きで腫瘍溶解性ベクターの複製を可能にするヌクレオチド配列をさらに含んでもよい。

30

【0983】

「カセット」という用語は、「コンジュゲート」、「コンストラクト」、及び「ハイブリッド」などの用語と同義であり、プロモーターに直接的又は間接的に結合したポリヌクレオチド配列を含む。好ましくは、カセットは、プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列を少なくとも含む。例えば、本発明で使用するための発現カセットは、ウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列の発現のためのプロモーター、及び任意選択で、ウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列の調節因子を含んでもよい。

40

【0984】

発現カセット、例えばプラスミド、コスミド、ウイルス又はファージベクターの選択は、それが導入される宿主細胞に依存することが多い。発現カセットは、DNAプラスミド（スーパーコイル、ニック又は直鎖）、ミニサークルDNA（直鎖又はスーパーコイル）、制限酵素消化及び精製によってプラスミド骨格を除去することによって、目的の領域だけを含むプラスミドDNA、酵素的DNA増幅プラットフォームを使用して生成されたDNA、例えば最終的に使用されるDNAが閉じたライゲーション形態であるか又は切

50

断末端がオープンになるように調製された（制限酵素消化など）ものであるドギーボーン DNA（d b DNA（商標））であり得る。

【0985】

ヌクレオチド配列のセット

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットであって、

（i）レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸配列であって、レンチウイルスベクターゲノムが導入遺伝子発現カセットを含む、核酸配列；及び

（ii）導入遺伝子をコードする mRNA に特異的である干渉 RNA をコードする少なくとも 1 つの核酸配列

を含む、ヌクレオチド配列のセットを提供する。

10

【0986】

一態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットであって、

（i）レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含む核酸配列であって、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが導入遺伝子発現カセットを含む、核酸配列；及び

（ii）導入遺伝子をコードする mRNA に特異的である干渉 RNA をコードする少なくとも 1 つの核酸配列

を含む、ヌクレオチド配列のセットを提供する。

20

【0987】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

【0988】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列及び本発明の干渉 RNA をコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

【0989】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、本発明のヌクレオチド配列及び本発明の干渉 RNA をコードする核酸配列を含むヌクレオチド配列のセットを提供する。

30

【0990】

一実施形態では、レンチウイルスベクターを生成するためのヌクレオチド配列のセットは、レンチウイルスベクターの生成に必要な構成成分をコードする。したがって、ヌクレオチド配列のセットは、ウイルスベクター粒子を生成するのに必要なレンチウイルスベクター構成成分をコードし得る。好適には、ウイルスベクター粒子を生成するのに必要なレンチウイルスベクター構成成分は、g a g、e n v、レンチウイルスベクターのゲノム（すなわち、レンチウイルスベクターの RNA ゲノム）及び／又は任意選択で、r e vを含む。

【0991】

一部の実施形態では、核酸配列のセットは、G a g／p o l 及び e n v をコードする核酸配列又はその機能的代替物をさらに含む。

40

【0992】

一部の実施形態では、核酸配列のセットは、r e v をコードする核酸配列又はその機能的代替物をさらに含む。本明細書の他の箇所に記載されているように、本発明のベクターイントロンの使用は、R R E がレンチウイルスベクターゲノムから省略され得る（すなわち、レンチウイルスベクターの生成が r e v の非存在下で進行し得る）という利点をもたらす。したがって、ヌクレオチド配列のセットは、特にレンチウイルスベクターゲノムが本明細書に記載されているベクターイントロンを含む場合に、R e v タンパク質をコードするヌクレオチド配列、又はその機能的代替物を欠いていてもよい。

【0993】

50

干渉RNAは、レンチウイルスベクター生成中にトランスでもシスでも提供することができる。シスエレメントは影響を及ぼす遺伝子と同じDNA分子上に存在するが、トランスエレメントは転写された遺伝子から離れた遺伝子に影響を及ぼし得る。

【0994】

よって、干渉RNA発現カセットは、レンチウイルスベクター生成中にレンチウイルスベクター構成成分と同時に発現され得る。干渉RNAは、本明細書に記載されている干渉RNAである。よって、干渉RNAは導入遺伝子をコードするmRNAを標的とし、mRNAの分解とそれに伴うdsRNA及び導入遺伝子の発現の低下とをもたらす。このような干渉RNA発現カセットは、当業者によって容易に構築され、例えばU6 promoter又はtRNA promoterによって駆動され得る。干渉RNAの標的は、VIに包含される導入遺伝子mRNAの3' UTRの配列であり得る。

10

【0995】

したがって、一部の実施形態では、核酸配列のセットは、レンチウイルスベクターゲノムをコードする第1の核酸配列と、干渉RNAをコードする少なくとも第2の核酸配列とを含む。好ましくは、第1及び第2の核酸配列は別々の核酸配列である。好適には、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含まなくてもよい。

【0996】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターゲノムをコードする核酸は、干渉RNAをコードする核酸配列を含む。

20

【0997】

レンチウイルスベクター生成システム及び細胞

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列のセットを含むウイルスベクター生成システムを提供する。

【0998】

さらなる態様では、本発明は、ヌクレオチド配列のセットを含むウイルスベクター生成システムを提供し、ヌクレオチド配列は、gag-pol、env、任意選択でrevを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、及び本発明のヌクレオチド配列を含む。

【0999】

さらなる態様では、本発明は、本発明のヌクレオチド配列、本発明の発現カセット、本発明のヌクレオチド配列のセット、又は本発明のベクター生成システムを含む細胞を提供する。

30

【1000】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための細胞であって、

(a)

(i) gag-pol及びenvを含み、並びに任意選択で、revを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、及び本発明のヌクレオチド配列若しくは本発明の発現カセット、若しくは本発明のヌクレオチド配列のセット；又は

40

(ii) 本発明のウイルスベクター生成システム；並びに

(b) 任意選択で、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列及び／又は任意選択で、TRAPをコードするヌクレオチド配列を含む、細胞を提供する。

【1001】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターのRNAゲノムのメジャースプライスドナー部位及び／又はスプライスドナー領域からのスプライシング活性は、抑制されるか又は減少する。

【1002】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターのRNAゲノムのメジャースプライスド

50

ナー部位及び／又はスプライドナー領域からのスプライシング活性は、レンチウイルスベクター生成中に抑制されるか又は減少する。

【1003】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための方法であって、

(a)

(i) gag-pol及びenvを含み、並びに任意選択で、revを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、及び本発明のヌクレオチド配列若しくは本発明の発現カセット、若しくは本発明のヌクレオチド配列のセット；又は

(ii) 本発明のウイルスベクター生成システム

を細胞中に導入するステップ；並びに

(b) 任意選択で、レンチウイルスベクターのベクター構成成分及びRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む細胞を選択するステップ；並びに

(c) レンチウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法を提供する。

【1004】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法によって生成されるレンチウイルスベクターを提供する。

【1005】

一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、本明細書に記載されているレンチウイルスベクターのRNAゲノムを含む。好適には、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書に記載されている改変された3'LTR及び／又は改変された5'LTRを含む。好ましくは、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書に記載されているsupA-LTRを含む。好適には、レンチウイルスベクターゲノムは、本明細書に記載されている導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む。

【1006】

さらなる態様では、本発明は、レンチウイルスベクターを生成するための、本発明のヌクレオチド配列、本発明の発現カセット、本発明の核酸配列のセット、本発明のウイルスベクター生成システム、又は本発明の細胞の使用を提供する。

【1007】

レンチウイルスベクター生成システムは、レンチウイルスベクターの生成に必要な構成成分をコードするヌクレオチド配列のセットを含む。したがって、ベクター生成システムは、レンチウイルスベクター粒子の生成に必要なウイルスベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列のセットを含む。

【1008】

「ウイルスベクター生成システム」又は「ベクター生成システム」又は「生成システム」は、レンチウイルスベクター生成に必要な構成成分を含むシステムとして理解されるべきである。

【1009】

ある態様では、ウイルスベクター生成システムは、Gag及びGag/Polタンパク質、並びにEnvタンパク質をコードするヌクレオチド配列及びベクターゲノム配列を含む。生成システムは、Revタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又はその機能的代替物を含んでもよい。本明細書の他の箇所に記載されているように、本発明のベクターイントロンの使用は、RREがレンチウイルスベクターゲノムから省略され得る（すなわち、レンチウイルスベクターの生成がrevの非存在下で進行し得る）という利点をもたらす。したがって、この生成システムは、特にレンチウイルスベクターゲノムが本明細書に記載されているベクターイントロンを含む場合に、Revタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又はその機能的代替物を欠いていてもよい。

【1010】

ある態様では、ウイルスベクター生成システムはモジュラー核酸コンストラクト（モジ

10

20

30

40

50

ュラーコンストラクト)を含む。モジュラーコンストラクトは、レンチウイルスベクターの生成に使用される2又は3以上の核酸を含むDNA発現コンストラクトである。モジュラーコンストラクトは、レンチウイルスベクターの生成に使用される2又は3以上の核酸を含むDNAプラスミドであり得る。プラスミドは細菌プラスミドであってもよい。核酸は、例えば、gag-pol、rev、env、ベクターゲノムをコードし得る。さらに、パッケージング細胞株及びプロデューサー細胞株の生成用に設計されたモジュラーコンストラクトは、転写調節タンパク質(例えば、TetR、CymR)及び／又は翻訳抑制タンパク質(例えば、TRAP)並びに選択可能なマーカー(例えば、Zeocin(商標)、ハイグロマイシン、プラスチジン、ピューロマイシン、ネオマイシン耐性遺伝子)をコードする必要がある場合がある。本発明において使用するのに適したモジュラー

10

#### 【1011】

本発明に従って使用するためのモジュラーコンストラクトは、1つのコンストラクトに2又は3以上のレトロウイルス構成成分をコードする核酸配列を含有するため、これらのモジュラーコンストラクトの安全性プロファイルが考慮され、追加の安全性特徴がコンストラクトに直接的に操作される。これらの特徴には、レトロウイルスベクター構成成分の複数のオープンリーディングフレームに対するインスレーターの使用、並びに／又はモジュラーコンストラクトにおけるレトロウイルス遺伝子の特定の方向及び配置が含まれる。これらの特徴を使用することにより、複製コンピテントウイルス粒子を生成するための直接的なリードスルーが防止されることが考えられる。

20

#### 【1012】

ウイルスベクター構成成分をコードする核酸配列は、モジュールコンストラクトにおいて、逆方向及び／又は交互の転写方向であってもよい。よって、ウイルスベクター構成成分をコードする核酸配列は、ウイルスベクター構成成分を同じmRNA分子から生成することができないように、同じ5'から3'の方向には示されない。逆方向は、異なるベクター構成成分の少なくとも2つのコード配列が、「ヘッドトゥヘッド」及び「テイルトゥテイル」の転写方向で示されることを意味し得る。これは、1つのベクター構成成分、例えばenvのコード配列を一方の鎖に、別のベクター構成成分、例えばrevのコード配列をモジュールコンストラクトの反対側の鎖に提供することによって達成され得る。好ましくは、3以上のベクター構成成分のコード配列がモジュラーコンストラクト中に存在する場合、コード配列の少なくとも2つは逆転写方向に存在する。したがって、3以上のベクター構成成分のコード配列がモジュールコンストラクト中に存在する場合、各構成成分は、それが隣接する他のベクター構成成分の隣接するコード配列のすべてに対して反対の5'から3'方向で存在するように、すなわち、各コード配列のための交互の5'から3'(又は転写)方向が採用され得るように、配向され得る。

30

#### 【1013】

本発明に従って使用するためのモジュラーコンストラクトは、以下のベクター構成成分：gag-pol、rev、env、ベクターゲノムのうちの2又は3以上をコードする核酸配列を含んでもよい。モジュラーコンストラクトは、ベクター構成成分の任意の組合

40

- i) レトロウイルスベクターのRNAゲノム及びrev、若しくはその機能的代替物；
- ii) レトロウイルスベクターのRNAゲノム及びgag-pol；
- iii) レトロウイルスベクターのRNAゲノム及びenv；
- iv) gag-pol及びrev、若しくはその機能的代替物；
- v) gag-pol及びenv；
- vi) env及びrev、若しくはその機能的代替物；
- vii) レトロウイルスベクターのRNAゲノム、rev若しくはその機能的代替物、及びgag-pol；
- viii) レトロウイルスベクターのRNAゲノム、rev若しくはその機能的代替物、及

50

びenv;

ix) レトロウイルスベクターのRNAゲノム、gag-pol及びenv;又は

x) gag-pol、rev、若しくはその機能的代替物、env、

をコードする核酸配列を含んでもよく、

核酸配列は、逆方向及び／又は交互方向にある。

【1014】

一態様では、レンチウイルスベクターを生成するための細胞は、上記の組合せi) からx) のいずれか1つをコードする核酸配列を含んでいてもよく、核酸配列は同じ遺伝子座に位置し、逆方向及び／又は交互方向にある。同じ遺伝子座は、細胞内の単一の染色体外遺伝子座、例えば単一のプラスミド、又は細胞のゲノム内の単一の遺伝子座（すなわち単一の挿入部位）を指してもよい。細胞は、レンチウイルスベクターを生成するための安定な細胞であっても一過性の細胞であってもよい。一態様では、細胞はtatを含まない。

10

【1015】

DNA発現コンストラクトは、DNAプラスミド（スーパーコイル、ニック又は直鎖）、ミニサークルDNA（直鎖又はスーパーコイル）、制限酵素消化及び精製によってプラスミド骨格を除去することによって、目的の領域だけを含むプラスミドDNA、酵素的DNA増幅プラットフォームを使用して生成されたDNA、例えば最終的に使用されるDNAが閉じたライゲーション形態であるか又は切断末端がオープンになるように調製された（例えば、制限酵素消化）ものであるドギーボーンDNA（dbDNA（商標））であり得る。

20

【1016】

一態様では、レンチウイルスベクターは、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV又はビスナレンチウイルス由来である。

【1017】

「ウイルスベクター生成細胞」、「ベクター生成細胞」又は「生成細胞」は、レンチウイルスベクター又はレンチウイルスベクター粒子を生成することが可能な細胞として理解されるべきである。レンチウイルスベクター生成細胞は、「プロデューサー細胞」又は「パッケージング細胞」であってもよい。ウイルスベクターシステムの1又は2以上のDNAコンストラクトは、ウイルスベクター生成細胞内に安定的に組み込まれるか、エピソーム的に維持されるかのいずれかであってもよい。あるいは、ウイルスベクターシステムのすべてのDNA構成成分は、ウイルスベクター生成細胞に一過的にトランスフェクトされてもよい。さらに別の代替法では、構成成分の一部を安定的に発現している生成細胞に、ベクター生成に必要な残りの構成成分を一過的にトランスフェクトしてもよい。

30

【1018】

本明細書で使用される場合、「パッケージング細胞」という用語は、レンチウイルスベクター粒子の生成に必要なエレメントを含むが、ベクターゲノムを欠く細胞を指す。このようなパッケージング細胞は、ウイルス構造タンパク質（gag、gag/pol及びenvなど）を発現することが可能な1又は2以上の発現カセットを含むしてもよい。

【1019】

プロデューサー細胞／パッケージング細胞は、任意の適切な細胞型であり得る。プロデューサー細胞は一般に哺乳動物細胞であるが、他の生物、例えば昆虫細胞に由来してもよい。

40

【1020】

本明細書で使用される場合、「プロデューサー細胞」又は「ベクター生成／プロデューサー細胞」という用語は、レンチウイルスベクター粒子の生成に必要なすべてのエレメントを含む細胞を指す。プロデューサー細胞は、安定なプロデューサー細胞株であっても、一過的に由来するものであってもよく、又はレンチウイルスゲノムが一過的に発現される安定なパッケージング細胞であってもよい。

【1021】

本発明の方法では、ベクター構成成分は、ウイルスベクターがレンチウイルスベクター

50

である場合、g a g、e n v、r e v及び／又はレンチウイルスベクターのRNAゲノムを含み得る。ベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列は、任意の順序で同時に又は順次に細胞内に導入され得る。

#### 【1022】

ベクター生成細胞は、組織培養細胞株などのインビトロで培養された細胞であってもよい。本発明の方法及び使用の一部の態様では、レンチウイルスベクターを生成するのに適した生成細胞又は細胞は、適切な条件下で培養された場合にウイルスベクター又はウイルスベクター粒子を生成することが可能な細胞である。よって、細胞は典型的にはベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列を含み、これにはg a g、e n v、r e v及びレンチウイルスベクターのRNAゲノムが含まれ得る。適切な細胞株としては、マウス線維芽細胞由来細胞株又はヒト細胞株などの哺乳動物細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。それらは一般に、ヒト細胞、例えばH E K 2 9 3 T、H E K 2 9 3、C A P、C A P-T又はC H O細胞を含む哺乳動物であるが、例えばS F 9細胞などの昆虫細胞であってもよい。好ましくは、ベクター生成細胞はヒト細胞株に由来する。したがって、このような適切な生成細胞は、本発明の方法又は使用のいずれにも用いることができる。

10

#### 【1023】

ヌクレオチド配列を細胞に導入するための方法は当技術分野で周知であり、以前に記載されている。よって、g a g、e n v、r e v及びレンチウイルスベクターのRNAゲノムを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列を、分子生物学及び細胞生物学における従来技術を使用して細胞に導入することは、当業者の能力の範囲内である。

20

#### 【1024】

安定な生成細胞は、パッケージング細胞であってもプロデューサー細胞であってもよい。パッケージング細胞からプロデューサー細胞を生成するために、ベクターゲノムDNAコンストラクトを安定的に又は一過的に導入することができる。パッケージング／プロデューサー細胞は、国際公開第2004／022761号パンフレットに記載されているように、ベクターの構成成分、すなわちゲノム、g a g-p o l構成成分及びエンベロープのうちの1つを発現するレトロウイルスベクターで適当な細胞株に形質導入することによって生成することができる。

#### 【1025】

あるいは、ヌクレオチド配列を細胞内にトランスフェクトすることができ、次いで、生成細胞ゲノムへの組込みを低い頻度かつランダムに行う。トランスフェクション法は、当技術分野で周知の方法を使用して行うことができる。例えば、安定なトランスフェクションプロセスは、コンカテマー化を助けるように操作されたコンストラクトを用いることができる。別の例では、トランスフェクションプロセスは、リン酸カルシウム、又はLipofectamine（商標）2000CD（Invitrogen、CA）、FuGENE（登録商標）HD又はポリエチレンジイミン（PEI）などの市販の製剤を使用して行うことができる。あるいは、ヌクレオチド配列を電気穿孔によって生成細胞内に導入することもできる。当業者は、ヌクレオチド配列の生成細胞への組込みを促す方法を知っているであろう。例えば、核酸コンストラクトがネイティブでは環状である場合に、直鎖化することで助けとなり得る。ランダム性の低い組込み方法論は、内因性ゲノム内の選択された部位への組込みを導くように、哺乳動物宿主細胞の内因性染色体と相同性を共有する領域を含む核酸コンストラクトに閥与し得る。さらに、組換え部位がコンストラクトに存在する場合、これらを標的組換えに使用することができる。例えば、核酸コンストラクトは、C r eリコンビナーゼと組み合わせた場合に（すなわち、P1バクテリオファージ由来のC r e／l o xシステムを使用して）、標的組込みを可能にするl o x P部位を含有し得る。代替的又は付加的に、組換え部位はa t t部位（例えばλファージ由来）であり、a t t部位は、ラムダイнтеグラーゼの存在下で部位特異的組込みを可能にする。これにより、レンチウイルス遺伝子を、高発現及び／又は安定な発現を可能にする宿主細胞ゲノム内の遺伝子座に標的化することが可能になる。

30

40

50

## 【1026】

標的組込みの他の方法は当技術分野で周知である。例えば、ゲノムDNAの標的切断を誘導する方法は、選択された染色体遺伝子座での標的組換えを促進するために使用することができる。これらの方法は、非相同末端結合（NHEJ）などの生理学的機構による切断の修復を誘導するために、内因性ゲノムの二本鎖切断（DSB）、例えばニックを誘導する方法又はシステムの使用に関与することが多い。切断は、特異的切断をガイドするために操作されたcrRNA/tracrRNA（「シングルガイドRNA」）を用いるCRISPR/Cas9を使用して、及び／又はアルゴノートシステム（例えば、T.サーモフィルス（*T. thermophilus*）由来）に基づくヌクレアーゼを使用して、特異的ヌクレアーゼ、例えば、操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）の使用により起こり得る。

10

## 【1027】

パッケージング／プロデューサー細胞株は、レンチウイルスによる形質導入のみ、若しくは核酸トランスフェクションのみの方法を使用するヌクレオチド配列の組込みによって生成することができ、又は両方の組合せを使用することもできる。

## 【1028】

生成細胞からレトロウイルスベクターを生成する方法、特にレトロウイルスベクターの処理は、国際公開第2009/153563号パンフレットに記載されている。

## 【1029】

一態様では、生成細胞は、RNA結合タンパク質（例えば、トリプトファンRNA結合減衰タンパク質（TRAP））及び／又はTetリプレッサー（TetR）タンパク質又は代替調節タンパク質（例えば、CymR）を含み得る。

20

## 【1030】

生成細胞からのレンチウイルスベクターの生成は、トランスフェクション法によるものであっても、誘導ステップ（例えば、ドキシサイクリン誘導）を含むことができる安定細胞株からの生成に由来しても、又は両方の組合せによるものであってもよい。トランスフェクション法は、当技術分野で周知の方法を使用して行うことができ、その例は以前に記載されている。

## 【1031】

生成細胞、パッケージング細胞株若しくはプロデューサー細胞株、又は構成成分をコードするレンチウイルスベクターを一過的にトランスフェクトされた細胞は、細胞数及びウイルス数並びに／又はウイルス力価を増加させるために培養される。細胞の培養は、本発明による目的のウイルスベクターの代謝、及び／又は増殖、及び／又は分裂、及び／又は生成を可能にするために行われる。これは、当業者に周知の方法によって達成することができ、例えば適切な培養培地中で細胞に栄養を供給することを含むが、これらに限定されない。方法は、表面に接着させる増殖、懸濁液中での増殖、又はこれらの組合せを含む。培養は、例えば組織培養フラスコ、組織培養マルチウェルプレート、ディッシュ、ローラーボトル、ウェーブバッグ、又はバッチ、フェドバッチ、連続システムなどを使用するバイオリアクターで行うことができる。細胞培養によるウイルスベクターの大規模生成を達成するためには、懸濁液中で増殖可能な細胞を有することが当技術分野では好ましい。細胞を培養するための適切な条件は公知である（例えば、Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)、及びR.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley- Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9を参照されたい））。

30

40

## 【1032】

好ましくは、細胞は、初めに組織培養フラスコ又はバイオリアクター中で「バルクアップ」され、その後、多層培養ベッセル又は大型バイオリアクター（50Lを超える）中で増殖し、本発明において使用するためのベクター生成細胞を生じる。

## 【1033】

好ましくは、本発明において使用するためのベクター生成細胞を生成するために、細胞

50

を懸濁モードで増殖させる。

【1034】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスはレトロウイルスという大きな群の一部である。レンチウイルスの詳細なリストは、Coffin et al (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763) に見られる。簡単に説明すると、レンチウイルスは霊長類及び非霊長類の群に分けることができる。霊長類のレンチウイルスの例としては、ヒト自己免疫不全症候群 (AIDS, auto-immunodeficiency syndrome) の原因物質であるヒト免疫不全ウイルス (HIV, human immunodeficiency virus)、及びサル免疫不全ウイルス (SIV, simian immunodeficiency virus) が挙げられるが、これらに限定されない。非霊長類レンチウイルス群には、プロトタイプの「スローウイルス」であるビスナ／マエディウイルス (VMV, Visna/maedi virus)、並びに関連するカプリン関節炎－脳炎ウイルス (CAEV, caprine arthritis-encephalitis virus)、ウマ感染性貧血ウイルス (EIAV, equine infectious anaemia virus)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV, feline immunodeficiency virus)、マエディビスナウイルス (MVV, Maedi visna virus) 及びウシ免疫不全ウイルス (BIV, bovine immunodeficiency virus) が含まれる。一態様では、レンチウイルスベクターは、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV又はビスナレンチウイルス (Visna lentivirus) 由来である。

10

20

【1035】

レンチウイルスファミリーは、レンチウイルスが分裂細胞と非分裂細胞の両方にも感染する能力を有するという点でレトロウイルスと異なる (Lewis et al (1992) EMBO J 11(8):3053-3058及びLewis and Emerman (1994) J Virol 68 (1):510-516)。対照的に、MLVなどの他のレトロウイルスは、例えば筋肉、脳、肺及び肝臓組織を構成するものなどの非分裂細胞又はゆっくりと分裂する細胞には感染することができない。

【1036】

レンチウイルスベクターは、本明細書で使用される場合、レンチウイルスから誘導可能な少なくとも1つの構成成分の一部を含むベクターである。好ましくは、その構成成分の一部は、ベクターが標的細胞に感染又は形質導入し、目的のヌクレオチド (NOI) を発現する生物学的機構に関与する。

30

【1037】

レンチウイルスベクターは、インビトロで適合性の標的細胞においてNOIを複製するために使用することができる。よって、本明細書中に記載されるのは、インビトロで適合性の標的細胞に本発明のベクターを導入し、NOIの発現をもたらす条件下で標的細胞を増殖させることによって、インビトロでタンパク質を作製する方法である。タンパク質及びNOIは、当技術分野で周知の方法によって標的細胞から回収することができる。適切な標的細胞としては、哺乳動物細胞株及び他の真核細胞株が挙げられる。

【1038】

一部の態様では、ベクターは、「インスレーター」－プロモーターとエンハンサーとの相互作用をブロックし、隣接遺伝子からのリードスルーを低減するバリアとして作用する遺伝子配列、を有し得る。

40

【1039】

一態様では、インスレーターは、レンチウイルス核酸配列の1又は2以上の間に存在して、プロモーター干渉及び隣接遺伝子からのリードスルーを防止する。インスレーターがベクター中でレンチウイルス核酸配列の1又は2以上の間に存在する場合、これらのインスレートされた遺伝子の各々は個々の発現ユニットとして配置され得る。

【1040】

レトロウイルスゲノムとレンチウイルスゲノムとの基本構造には、5'LTR及び3'LTR

50

TRなどの多くの共通した特徴を共有し、5'LTRと3'LTRとの間又はその中には、ゲノムをパッケージングできるようにするためのパッケージングシグナル、プライマー結合部位、標的細胞ゲノムへの組込みを可能にする組込み部位、並びにパッケージング構成成分をコードするgag/pol遺伝子及びenv遺伝子 – これらはウイルス粒子のアセンブリーに必要なポリペプチドである – が位置する。レンチウイルスは、HIVにおけるrev遺伝子及びRRE配列などの、組み込まれたプロウイルスのRNA転写物の、核から感染標的細胞の細胞質への効率的な輸送を可能にする追加の特徴を有する。

【1041】

プロウイルスでは、これらの遺伝子の両端は長い末端反復(LTR)と呼ばれる領域で挟まれている。LTRはプロウイルスの組込み、及び転写を担っている。LTRはエンハンサー–プロモーター配列としても機能し、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。

10

【1042】

LTR自体は同一の配列であり、U3、R及びU5と呼ばれる3つのエレメントに分けることができる。U3は、RNAの3'末端に固有の配列に由来する。Rは、RNAの両端で繰り返される配列に由来し、U5はRNAの5'末端に固有の配列に由来する。この3つのエレメントのサイズは、レトロウイルスによってかなり異なり得る。

【1043】

本明細書に記載されている典型的なレトロウイルスベクターでは、複製に必須な1又は2以上のタンパク質コード領域の少なくとも一部がウイルスから除去されることがあり；例えば、gag/pol及びenvは存在しないか又は機能しないことがある。これにより、ウイルスベクターは複製欠陥となる。

20

【1044】

レンチウイルスベクターは、霊長類レンチウイルス(例えば、HIV-1)又は非霊長類レンチウイルス(例えば、EIAV)のいずれかに由来し得る。

【1045】

一般的な用語では、典型的なレトロウイルスベクター生成システムは、ウイルスゲノムを必須のウイルスパッケージング機能から分離することを含む。これらのウイルスベクター構成成分は通常、別々のDNA発現カセット(あるいは、プラスミド、発現プラスミド、DNAコンストラクト又は発現コンストラクトとしても公知)で生成細胞に供給される。

30

【1046】

ベクターゲノムはNOIを含む。ベクターゲノムは、典型的には、パッケージングシグナル( $\Psi$ )、NOIを保有する内部発現カセット、(任意選択で)転写後エレメント(PRE)、典型的にはセントラルポリプリン配列(cppt)、3'-ppu及び自己不活化(SIN)LTRを必要とする。R-U5領域は、ベクターゲノムRNAとNOI mRNAとの両方の正しいポリアデニル化、及び逆転写のプロセスに必要である。ベクターゲノムは、国際公開第2003/064665号パンフレットに記載されているように、オープンリーディングフレームを含んでもよく、これは、revの非存在下でのベクター生成を可能にする。

40

【1047】

パッケージング機能にはgag/pol遺伝子及びenv遺伝子が含まれる。これらは生成細胞によるベクター粒子の生成に必要である。これらの機能をトランスでゲノムに与えることで、複製欠陥ウイルスベクターの生成が容易になる。

【1048】

ガンマレトロウイルスベクターの生成システムは、典型的には、ゲノム、gag/pol及びenv発現コンストラクトを必要とする3構成成分システムである。HIV-1に基づくレンチウイルスベクターの生成システムは、アクセサリ遺伝子revが提供され、ベクターゲノムがrev応答性エレメント(RRE)を含むことをさらに必要とする場合がある。EIAVに基づくレンチウイルスベクターは、オープンリーディングフレー

50

ム (ORF) がゲノム内に存在する場合には、トランスで rev が提供されることを必要としない (国際公開第 2003/064665 号パンフレットを参照されたい)。

#### 【1049】

通常、ベクターゲノムカセット内にコードされる「外部」プロモーター (ベクターゲノムカセットを駆動する) と「内部」プロモーター (NOIカセットを駆動する) との両方は、他のベクターシステム構成成分を駆動するものと同様に、強力な真核生物又はウイルスのプロモーターである。このようなプロモーターの例としては、CMV、EF1 $\alpha$ 、PGK、CAG、TK、SV40 及びユビキチンプロモーターが挙げられる。DNAライブラリーによって生成されたプロモーター (例えば JeT プロモーター) などの強力な「合成」プロモーターもまた、転写を駆動するために使用され得る。あるいは、ロドプシン (Rh $\rho$ )、ロドプシンキナーゼ (Rh $\rho$ K)、錐体-杆体ホメオボックス含有遺伝子 (CRX)、神経網膜特異的ロイシンジッパータンパク質 (NRL)、卵黄状黄斑ジストロフィー 2 (VMD2)、チロシンヒドロキシラーゼ、神経特異的エノラーゼ (NSE) プロモーター、アストロサイト特異的グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター、ヒト  $\alpha$ 1-アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)、肝脂肪酸結合タンパク質プロモーター、Flt-1 プロモーター、INF- $\beta$  プロモーター、Mb プロモーター、SP-B プロモーター、SYN1 プロモーター、WASP プロモーター、SV40/hAlb プロモーター、SV40/CD43、SV40/CD45、NSE/RU5' プロモーター、ICAM-2 プロモーター、GPIIb プロモーター、GFAP プロモーター、フィブロネクチンプロモーター、エンドグリンプロモーター、エラスターゼ-1 プロモーター、デスミンプロモーター、CD68 プロモーター、CD14 プロモーター及び B29 プロモーターなどの組織特異的プロモーターが転写を駆動するために使用され得る。

10

20

#### 【1050】

レトロウイルスベクターの生成は、生成細胞へのこれらの DNA 構成成分の一過性同時トランスフェクション、又はすべての構成成分が生成細胞ゲノム内に安定的に組み込まれた安定生成細胞株の使用のいずれかに関与する (例えば、Stewart HJ, Fong-Wong L, Strickland I, Chipchase D, Kelleher M, Stevenson L, Thoree V, McCarthy J, Ralph GS, Mitrophanous KA and Radcliffe PA. (2011). Hum Gene Ther. Mar; 22 (3):357-69)。代替的アプローチは、安定なパッケージング細胞 (パッケージング構成成分が安定に組み込まれた細胞) を使用し、その後、必要に応じてベクターゲノムプラスミドに一過的にトランスフェクトすることである (例えば、Stewart, H. J., M. A. Leroux-Carlucci, C. J. Sion, K. A. Mitrophanous and P. A. Radcliffe (2009). Gene Ther. Jun; 16 (6):805-14)。また、完全なパッケージング細胞株ではなく、代替的なパッケージング細胞株を生成し (1又は2以上のパッケージング構成成分だけが細胞株に安定的に組み込まれる)、ベクターを生成するために、欠落している構成成分を一過的にトランスフェクトすることも可能である。生成細胞はまた、転写調節因子の tetrプレッサー (TetR) タンパク質群のメンバー (例えば、T-Rex、Tet-On、及び Tet-Off)、転写調節因子のクミン酸誘導性スイッチシステム群のメンバー (例えば、クミン酸リプレッサー (CymR) タンパク質)、又は RNA 結合タンパク質 (例えば、TRAP - トリプトファン活性化 RNA 結合タンパク質) などの調節タンパク質を発現し得る。

30

40

#### 【1051】

本発明の一態様では、ウイルスベクターは EIAV に由来する。EIAV は、レンチウイルスの中で最も単純なゲノム構造を有し、本発明において使用するのに特に好ましい。gag/pol 及び env 遺伝子に加えて、EIAV は 3 つの他の遺伝子: tat、rev 及び S2 をコードする。tat はウイルスLTRの転写活性化因子として作用し (Derse and Newbold (1993) Virology 194(2):530-536 及び Maury et al (1994) Virology 200(2):632-642)、rev は rev 応答エレメント (RRE) を介してウイルス遺伝子の発現を調節及び調整する (Martarano et al. (1994) J Virol 68(5)

50

:3102-3111)。これら2つのタンパク質の作用機構は、霊長類ウイルスの類似機構と大まかに類似していると考えられている (Martarano et al. (1994) J Virol 68(5):3102-3111)。S2の機能は不明である。さらに、膜貫通タンパク質の開始点でenvコード配列にスプライシングされたtatの最初のエクソンによってコードされるEIAVタンパク質である、Ttmが同定されている。本発明の代替的な態様では、ウイルスベクターはHIVに由来し：HIVはS2をコードしない点でEIAVと異なるが、EIAVとは異なり、vif、vpr、vpu及びnefをコードする。

#### 【1052】

「組換えレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクター」(RRV)という用語は、パッケージング構成成分の存在下で、標的細胞を形質導入可能なウイルス粒子にRNAゲノムをパッケージングすることを可能にするのに十分なレトロウイルス遺伝情報を有するベクターを指す。標的細胞の形質導入には、逆転写と標的細胞ゲノムへの組込みが含まれ得る。RRVは、ベクターによって標的細胞に送達される非ウイルス性コード配列を有する。RRVは、標的細胞内で感染性レトロウイルス粒子を生成するための独立した複製ができない。通常、RRVは機能的なgag/pol遺伝子及び/又はenv遺伝子、及び/又は複製に不可欠な他の遺伝子を欠いている。

#### 【1053】

好ましくは、本発明のRRVベクターは最小ウイルスゲノムを有する。

#### 【1054】

本明細書で使用される場合、「最小ウイルスゲノム」という用語は、ウイルスベクターが、標的細胞に感染し、形質導入し、及びNOIを送達するために必要な機能を提供するために不可欠な要素を保持する一方で、不可欠ではないエレメントを除去するように操作されていることを意味する。この戦略のさらなる詳細は、国際公開第1998/17815号パンフレット及び国際公開第99/32646号パンフレットに見ることができる。最小限のEIAVベクターは、tat、rev及びS2遺伝子を欠き、これらの遺伝子は生成システムにおいてトランスで提供されない。最小限のHIVベクターはvif、vpr、vpu、tat及びnefを欠いている。

#### 【1055】

生成細胞内でベクターゲノムを生成するために使用される発現プラスミドは、生成細胞/パッケージング細胞におけるゲノムの転写を指示するために、レトロウイルスゲノムに作動可能に連結した転写調節制御配列を含むことができる。すべての第三世代レンチウイルスベクターは、5' U3エンハンサープロモーター領域が欠失しており、ベクターゲノムRNAの転写は、後述するように、別のウイルスプロモーター、例えばCMVプロモーターなどの異種プロモーターによって駆動される。この特徴は、tatに依存しないベクター生成を可能にする。いくつかのレンチウイルスベクターゲノムは、効率的なウイルス生成のために追加の配列を必要とする。例えば、特にHIVの場合、RRE配列が含まれることがある。しかし、(別々の)GagPolカセットのRREの必要性(及びトランスで提供されるrevへの依存性)は、GagPol ORFのコドンの最適化によって低減又は排除され得る。この戦略のさらなる詳細は国際公開第2001/79518号パンフレットに記載されている。

#### 【1056】

rev/RREシステムと同じ機能を果たす代替配列も公知である。例えば、rev/RREシステムの機能的類似体がメイソンサルウイルスに見られる。これは構成的輸送エレメント(CTE)として知られ、感染細胞内の因子と相互作用すると考えられているゲノム中のRRE型配列を含む。この細胞内因子はrev類似体と考えることができる。よって、CTEは、rev/RREシステムの代替として使用され得る。Revタンパク質の任意の他の機能的等価体として知られているもの、あるいは利用可能になったものは、本発明に関連し得る。例えば、HTLV-IのRexタンパク質がHIV-1のRevタンパク質を機能的に置き換えることができることも知られている。Rev及びRREは、本発明の方法において使用するためのベクター中に存在しないか、又は非機能的であって

もよく；代替的に、rev及びRRE、又は機能的に等価なシステムが存在してもよい。

【1057】

したがって、「rev」は、HIV-1 Revタンパク質をコードする配列又はその任意の機能的等価物をコードする配列を指し得ることが理解される。したがって、ある態様では、本発明は、ヌクレオチド配列のセットを含むウイルスベクター生成システム及び／又は細胞を提供し、ヌクレオチド配列は、gag-pol、env、任意にrev、及び本発明のヌクレオチド配列を含むベクター構成成分をコードする。

【1058】

本明細書で使用される場合、「機能的代替物」という用語は、別のタンパク質又は配列と同じ機能を果たす代替的配列を有するタンパク質又は配列を意味する。「機能的代替物」という用語は、本明細書において「機能的等価物」及び「機能的類似体」と同じ意味で互換的に使用される。

【1059】

SINベクター

本明細書に記載されているレンチウイルスベクターは、ウイルスエンハンサー及びプロモーター配列が欠失した自己不活化(SIN)構成で使用する事ができる。SINベクターは、インピボ、エクスピボ又はインピトロで、非SINベクターと同様の有効性で、非分裂標的細胞を生成及び形質導入することができる。SINプロウイルスにおける長い末端反復(LTR)の転写不活化は、vRNAの移動を妨げることになり、複製コンピテントウイルスの形成の可能性をさらに減少させる特徴がある。これはまた、任意のLTRのシス作用性効果を排除することによって、内部プロモーターからの遺伝子発現の調節を可能にする。

【1060】

例として、3'LTRのU3領域の転写エンハンサー又はエンハンサーとプロモーターとを欠失させることによって、自己不活化レトロウイルスベクターシステムが構築されてきた。1ラウンドのベクターの逆転写及び組込みの後、これらの変化は5'LTRと3'LTRとの両方にコピーされ、転写不活性プロウイルスとなる。しかしながら、このようなベクター中のLTRに内在する任意のプロモーターは、依然として転写活性である。この戦略は、ウイルスLTRのエンハンサー及びプロモーターが、内部に配置された遺伝子からの転写に及ぼす影響を排除するために用いられてきた。このような効果には転写の増加及び転写の抑制が含まれる。この戦略はまた、3'LTRからゲノムDNAへの下流の転写を排除するためにも使用できる。これは、任意の内因性発癌遺伝子の不顕性活性化を防ぐことが重要であるヒト遺伝子治療において、特に懸念されることである。Yu et al., (1986) PNAS 83: 3194-98; Marty et al., (1990) Biochimie 72: 885-7; Naviaux et al., (1996) J. Virol. 70: 5701-5; Iwakuma et al., (1999) Virol. 261: 120-32; Deglon et al., (2000) Human Gene Therapy 11: 179-90。SINレンチウイルスベクターは、米国特許第6,924,123号明細書及び米国特許第7,056,699号明細書に記載されている。

【1061】

複製欠陥レンチウイルスベクター

複製欠陥レンチウイルスベクターのゲノムでは、gag-pol及び／又はenvの配列が変異されているか及び／又は機能的ではない可能性がある。

【1062】

本明細書に記載されている典型的なレンチウイルスベクターでは、ウイルス複製に必須なタンパク質の1又は2以上のコード領域の少なくとも一部がベクターから除去されることがある。これにより、ウイルスベクターは複製欠陥となる。ウイルスゲノムの一部はまた、非分裂標的細胞を形質導入及び／又は標的細胞ゲノムへのそのゲノムの組込みが可能なNOIを含むベクターを生成するために、NOIによって置き換えられてもよい。

【1063】

一態様では、レンチウイルスベクターは、国際公開第2006/010834号パンフ

10

20

30

40

50

レット及び同第2007/071994号に記載されているような非組込みベクターである。

#### 【1064】

さらなる態様では、ベクターはウイルスRNAを含まないか、又は欠く配列を送達する能力を有する。さらなる態様では、送達されるRNAに位置する異種結合ドメイン（gagと異種）及びGag又はGagPol上の同族結合ドメインを使用して、送達されるRNAのパッケージングを確実にすることができる。これらのベクターはいずれも国際公開第2007/072056号パンフレットに記載されている。

#### 【1065】

アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスベクター

アデノウイルスは二本鎖の直鎖DNAウイルスであり、RNA中間体を介して複製しない。アデノウイルスには50種類を超えるヒト血清型があり、遺伝子配列に基づいて6つのサブグループに分けられる。

#### 【1066】

アデノウイルスは二本鎖DNAの非エンベロープウイルスであり、ヒト及びヒト以外を起源とする広範な範囲の細胞型をインビボ、エクスピボ、及びインビトロで形質導入することが可能である。これらの細胞には、呼吸気道上皮細胞、肝細胞、筋肉細胞、心筋細胞、滑膜細胞、初代乳腺上皮細胞、及びニューロンなどの有糸分裂後に終末分化した細胞が含まれる。

#### 【1067】

アデノウイルスベクターは、非分裂細胞にも形質導入可能である。これは、嚢胞性線維症などの、肺上皮の罹患細胞のターンオーバー速度が遅い疾患にとっては非常に重要である。実際、嚢胞性線維症輸送体（CFTR）の、嚢胞性線維症に罹患した成人患者の肺へのアデノウイルスに媒介される移入を利用するいくつかの臨床試験が進行中である。

#### 【1068】

アデノウイルスは、遺伝子治療及び異種遺伝子の発現のためのベクターとして使用されている。この大きな（36kb）ゲノムは、最大8kbの外来挿入DNAを収容することができ、相補的細胞株で効率的に複製して、1ml当たり最大1012導入単位という非常に高い力価を生成することができる。よって、アデノウイルスは一次非複製細胞における遺伝子の発現を研究するのに最適なシステムの1つである。

#### 【1069】

アデノウイルスゲノムからのウイルス遺伝子又は外来遺伝子の発現は、複製細胞を必要としない。アデノウイルスベクターは受容体に媒介されるエンドサイトーシスによって細胞に進入する。いったん細胞内に入ると、アデノウイルスベクターが宿主染色体に組み込まれることはほとんどない。その代わりに、これらは、宿主核内で線状ゲノムとしてエピソーム的に（宿主ゲノムとは独立して）機能する。

#### 【1070】

遺伝子治療のための組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）及びアデノウイルスに基づくウイルスベクターの使用は広く行われており、その製造については十分に文書化されている。典型的には、AAVに基づくベクターは、哺乳類細胞株（例えばHEK293に基づく）又はバキュロウイルス/Sf9昆虫細胞システムの使用によって生成される。AAVベクターは、典型的にはアデノウイルス又は単純ヘルペスウイルス（HSV）からのヘルパー機能と一緒に、ベクター構成成分をコードするDNAの一過性トランスフェクションによって、又はAAVベクター構成成分を安定に発現する細胞株の使用によって生成することができる。アデノウイルスベクターは、典型的には、アデノウイルスE1機能を安定に発現する哺乳動物細胞株（例えばHEK293に基づく）において生成される。

#### 【1071】

アデノウイルスベクターはまた、典型的には、生成細胞株を使用する「感染」の連続ラウンドを通じて、ヘルパー機能依存性複製によって「増幅」される。アデノウイルスベクター及びその生成システムは、アデノウイルスゲノムのすべて又は一部を含むポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含む。アデノウイルスは、限定されるものではないが、A d 2、A d 5、A d 12 及び A d 4 0 に由来するアデノウイルスであることが周知である。アデノウイルスベクターは、典型的には、アデノウイルスの被膜中に封入されたDNAの形態、又は別のウイルス若しくはウイルス様形態（単純ヘルペス、及びAAVなど）にパッケージされたアデノウイルスDNAの形態である。

#### 【1072】

AAVベクターとは、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するベクターであると一般に理解されており、限定されないが、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、及びAAV-8を含む。AAVベクターは、AAV野生型遺伝子の1又は2以上の全部又は一部、好ましくはrep及び／又はcap遺伝子を欠失させることができるが、機能的フランキングITR配列は保持する。機能的なITR配列は、AAVビリオンの救済、複製及びパッケージングに必要である。よって、AAVベクターは、ウイルスの複製及びパッケージングにシスで必要とされる配列（例えば、機能的ITR）を少なくとも含むように本明細書で定義される。ITRは野生型のヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的な救済、複製及びパッケージングを提供する限り、例えばヌクレオチドの挿入、欠失又は置換によって変更されてもよい。「AAVベクター」はまた、標的細胞の核にベクター核酸を送達するための効率的なビヒクルを提供する、そのタンパク質シェル又はカプシドを指す。AAV生成システムにはヘルパー機能が必要であり、これは、典型的には、AAV遺伝子産物を提供するために発現させることができるAAV由来のコード配列を指し、代わりに、生産的なAAV複製のためにトランスで機能する。このように、AAVヘルパー機能には、メジャーAAVオープンリーディングフレーム（ORF）であるrepとcapとの両方が含まれる。Rep発現産物は、とりわけ：DNA複製のAAV起点の認識、結合及びニッキング；DNAヘリカーゼ活性；並びにAAV（又は他の異種）プロモーターからの転写のモジュレーションなど、多くの機能を有することが示されている。Cap発現産物は必要なパッケージング機能を提供する。AAVヘルパー機能は、AAVベクターに欠けているAAV機能をトランスで補完するために本明細書で使用される。AAVヘルパーコンストラクトは、一般に、目的のヌクレオチド配列を送達するための形質導入ベクターを生成するために使用されるAAVベクターから欠失したAAV機能を提供するヌクレオチド配列を含む核酸分子を指すと理解される。AAVヘルパーコンストラクトは、AAV複製に必要な欠失したAAV機能を補完するために、AAV rep及び／又はcap遺伝子の一過性発現を提供するために一般的に使用されるが；ヘルパーコンストラクトはAAV ITRを欠き、それら自体を複製もパッケージングもすることができない。AAVヘルパーコンストラクトは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、又はビリオンの形態であり得る。RepとCapとの両方の発現産物をコードする、一般的に使用されているプラスミドpAAV／Ad及びpLM29+45など、いくつかのAAVヘルパーコンストラクトが記載されている。例えば、Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828；及びMcCarty et al. (1991) J. Virol. 65:2936-2945を参照されたい。Rep及び／又はCap発現産物をコードするいくつかの他のベクターが記載されている。例えば、米国特許第5,139,941号明細書及び同第6,376,237号明細書を参照されたい。さらに、「アクセサリ機能」という用語は、AAVがその複製のために依存する非AAV由来のウイルス及び／又は細胞機能を指すことは一般に知られている。よって、この用語は、AAV遺伝子転写の活性化、ステージ特異的なAAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、Cap発現産物の合成、及びAAVカプシドアセンブリーに関与する部分を含む、AAV複製に必要なタンパク質及びRNAを捕捉する。ウイルスに基づくアクセサリ機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外）、及びワクシニアウイルスなどの公知のヘルパーウイルスのいずれかに由来し得る。

#### 【1073】

NOI及びポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドはDNA又はRNAを含む。これらは、一本鎖であっても又は二本鎖であってもよい。目的のヌクレオチドは、一般にNOIと呼ばれる。遺伝暗号の縮退の結果として、多数の異なるポリヌクレオチドが同じポリペプチドをコードし得ることは、当業者に理解されるであろう。さらに、当業者は、日常的な技術を使用して、本発明のポリペプチドが発現される任意の特定の宿主生物のコードン使用を反映するために、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列に影響を与えないヌクレオチド置換を行い得ることを理解されたい。

#### 【1074】

ポリヌクレオチドは、当技術分野で利用可能な任意の方法によって改変され得る。このような改変は、本発明のポリヌクレオチドのインビボ活性又は寿命を増強するために行われてもよい。

#### 【1075】

DNAポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドは、組換え的に、合成的に、又は当業者が利用可能な任意の手段によって生成されてもよい。また、これらは、標準的な技術によってクローニングされてもよい。

#### 【1076】

より長いポリヌクレオチドは、一般に、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）クローニング技術を使用して、組換え手段を使用して生成される。これには、クローニングが所望される標的配列を挟む一対のプライマー（例えば約15～30ヌクレオチド）を作製し、プライマーを動物又はヒト細胞から得たmRNA又はcDNAと接触させ、所望の領域の増幅をもたらす条件下でPCRを行い、増幅断片を単離し（例えば反応混合物をアガロースゲルで精製することによって）、増幅DNAを回収することが含まれる。プライマーは、増幅されたDNAを適切なベクターにクローニングできるように、適切な制限酵素認識部位を含有するように設計されてもよい。

#### 【1077】

一般的なレトロウイルスベクターエレメント  
プロモーター及びエンハンサー

NOI及びポリヌクレオチドの発現は、例えば、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節シグナル（例えば、tetリプレッサー（TetR）システム）又はTransgene Repression In vector Production細胞システム（TRIP）又は本明細書に記載のNOIの他の調節因子を含む、転写調節エレメント又は翻訳抑制エレメントの制御配列を使用して制御され得る。

#### 【1078】

原核生物プロモーター及び真核細胞で機能するプロモーターが使用され得る。組織特異的又は刺激特異的プロモーターが使用され得る。また、2又は3以上の異なるプロモーターからの配列エレメントを含むキメラプロモーターも使用され得る。

#### 【1079】

適切な促進配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、レトロウイルス及び類人猿ウイルス40（SV40）などのウイルスのゲノム由来のもの、又はアクチンプロモーター、EF1 $\alpha$ 、CAG、TK、SV40、ユビキチン、PGK若しくはリボソームタンパク質プロモーターなどの異種哺乳動物プロモーター由来のものを含む強力なプロモーターである。あるいは、ロドプシン（Rh $\phi$ ）、ロドプシンキナーゼ（Rh $\phi$ K）、錐体-杆体ホメオボックス含有遺伝子（CRX）、神経網膜特異的ロイシンジッパータンパク質（NRL）、卵黄状黄斑ジストロフィー2（VMD2）、チロシンヒドロキシラーゼ、神経特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター、アストロサイト特異的グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター、ヒト $\alpha$ 1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）、肝脂肪酸結合タンパク質プロモーター、Flt-1プロモーター、INF- $\beta$ プロモーター、Mbプロモーター、SP-Bプロモーター、SYN1プロモーター、WASPプロモーター、S

10

20

30

40

50

V40/hAlbプロモーター、SV40/CD43、SV40/CD45、NSE/RU5'プロモーター、ICAM-2プロモーター、GPIIbプロモーター、GFAPプロモーター、フィブロネクチンプロモーター、エンドグリンプロモーター、エラスターゼ-1プロモーター、デスミンプロモーター、CD68プロモーター、CD14プロモーター及びB29プロモーターなどの組織特異的プロモーターが転写を駆動するために使用され得る。

#### 【1080】

NOIの転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって、さらに増加させることができる。エンハンサーは、比較的方向及び位置に依存しないが；SV40エンハンサー及びCMV初期プロモーターエンハンサーなどの真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを用いてもよい。エンハンサーは、プロモーターに対して5'又は3'の位置でベクター内にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから5'の部位に位置する。

10

#### 【1081】

プロモーターはさらに、適切な標的細胞における発現を確実にするため、又は発現を増加させるための特徴を含み得る。例えば、その特徴は保存領域、例えばPribnowボックス又はTATAボックスであり得る。プロモーターは、ヌクレオチド配列の発現レベルに影響を与える（例えば、維持するか、増強するか又は減少させる）ための他の配列を含有し得る。適切な他の配列としては、Sh1イントロン又はADHイントロンが挙げられる。他の配列には、温度、化学的、光又はストレス誘導性エレメントなどの誘導性エレメントが含まれる。また、転写又は翻訳を増強する適切なエレメントが存在してもよい。

20

#### 【1082】

##### NOIの調節因子

レトロウイルスのパッケージング／生成細胞株の生成及びレトロウイルスベクターの生成を複雑にする要因は、ある特定のレトロウイルスベクター構成成分及びNOIの構成的発現には細胞毒性があり、これらの構成成分を発現する細胞を死滅させ、したがってベクターを生成できなくなることである。したがって、これらの構成成分（例えばgag-pol及びVSV-Gなどのエンベロープタンパク質）の発現を調節することができる。他の非細胞毒性ベクター構成成分、例えばrevの発現も、細胞への代謝負担を最小限にするために調節することができる。本明細書に記載されているモジュラーコンストラクト及び／又は細胞は、少なくとも1つの調節エレメントに関連する細胞毒性及び／又は非細胞毒性ベクター構成成分を含み得る。本明細書で使用される場合、「調節エレメント」という用語は、関連する遺伝子又はタンパク質の発現を増加させるか又は減少させるかの影響を与え得る任意のエレメントを指す。調節エレメントには、遺伝子スイッチシステム、転写調節エレメント及び翻訳抑制エレメントが含まれる。

30

#### 【1083】

いくつかの原核生物調節因子システムが、哺乳動物細胞における遺伝子スイッチの生成に適応されてきた。多くのレトロウイルスパッケージング及びプロデューサー細胞株は、遺伝子スイッチシステム（例えば、テトラサイクリン及びクミン酸誘導性スイッチシステム）を使用して制御されており、よって、ベクター生成時にレトロウイルスベクター構成成分の1又は2以上の発現をスイッチオンすることを可能にしている。遺伝子スイッチシステムには、転写調節因子の（TetR）タンパク質群のもの（例えばT-Rex、Tet-On、及びTet-Off）、転写調節因子のクミン酸誘導性スイッチシステム群のもの（例えば、CymRタンパク質）、及びRNA結合タンパク質を含むもの（例えばTRAP）が含まれる。

40

#### 【1084】

このようなテトラサイクリン誘導性システムの1つは、T-REx（商標）システムに基づくテトラサイクリンリプレッサー（TetR）システムである。例として、このようなシステムでは、テトラサイクリンオペレーター（TetO2）を、最初のヌクレオチドがヒトサイトメガロウイルス主要前初期プロモーター（hCMVp）のTATATAAエレメントの最後のヌクレオチドの3'末端から10bpの位置になるように配置すると、T

50

e t R 単独でリプレッサーとして作用することができる (Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. 1998. Hum Gene Ther; 9: 1939-1950)。このようなシステムでは、T e t O 2 配列の 2 つのコピーがタンデムに挿入された C M V プロモーターによって N O I の発現を制御することができる。T e t R ホモダイマーは、誘導剤 (テトラサイクリン又はその類似体であるドキシサイクリン [d o x]) が存在しない場合、T e t O 2 配列に結合し、上流の C M V プロモーターからの転写を物理的にブロックする。存在する場合、誘導剤は T e t R ホモダイマーに結合し、T e t O 2 配列に結合できなくなるようなアロステリック変化を引き起こし、遺伝子発現をもたらす。T e t R 遺伝子は、翻訳効率を改善し、T e t O 2 制御遺伝子の発現をより厳密に制御することができるように、コドン最適化され得る。

10

20

30

40

50

#### 【1085】

T R i P システムは、国際公開第 2015/092440 号パンフレットに記載されており、ベクター生成中に生成細胞における N O I の発現を抑制する別の方法を提供する。T R A P 結合配列 (例えば、T R A P - t b s) 相互作用は、導入遺伝子を駆動する組織特異的プロモーターを含む構成的及び／又は強力なプロモーターが望ましい場合、及び特に、生成細胞における導入遺伝子タンパク質の発現が、導入遺伝子由来タンパク質のウイルスベクター送達に起因して、ベクター力価の低下をもたらす、及び／又はインビボでの免疫応答を誘発する場合、レトロウイルスベクターの生成のための導入遺伝子タンパク質抑制システムの基礎を形成する (Maunder et al, Nat Commun. (2017) Mar 27; 8)。

#### 【1086】

簡単に言えば、T R A P - t b s 相互作用は翻訳ブロックを形成し、導入遺伝子タンパク質の翻訳を抑制する (Maunder et al, Nat Commun. (2017) Mar 27; 8)。翻訳ブロックは生成細胞においてのみ有効であり、それ自体 D N A 又は R N A に基づくベクターシステムを阻害しない。T R i P システムは、導入遺伝子タンパク質が、単一又は複数のシストロニック m R N A からの組織特異的プロモーターを含む、構成的及び／又は強力なプロモーターから発現される場合に、翻訳を抑制することができる。導入遺伝子タンパク質の発現が制御されないと、ベクター力価を低減させ、ベクター産物の品質に影響を与えることが実証されている。一過性の P a C L / P C L ベクター生成システムと安定な P a C L / P C L ベクター生成システムとの両方での導入遺伝子タンパク質の発現抑制は、毒性又は分子負荷の問題が細胞ストレスにつながる可能性がある場合；導入遺伝子由来タンパク質のウイルスベクター送達により、導入遺伝子タンパク質がインビボで免疫応答を誘発する場合；遺伝子編集導入遺伝子の使用がオン／オフ標的影響をもたらす可能性がある場合；導入遺伝子タンパク質がベクター及び／又はエンベロープ糖タンパク質の排除に影響を及ぼす可能性がある場合に、ベクター力価の低下を防ぐために生成細胞にとって有益である。

#### 【1087】

エンベロープ及びシュードタイピング

好ましい一態様では、本明細書に記載されているレンチウイルスベクターはシュードタイプ化されている。これに関して、シュードタイピングは 1 又は 2 以上の利点を与え得る。例えば、H I V に基づくベクターの e n v 遺伝子産物は、これらのベクターが C D 4 と呼ばれるタンパク質を発現する細胞のみに感染することを制限する。しかし、これらのベクターの e n v 遺伝子が他のエンベロープウイルスの e n v 配列で置換されている場合、より広い感染スペクトルを有する可能性がある (Verma and Somia (1997) Nature 389(6648):239-242)。例として、研究者らは、H I V に基づくベクターを V S V 由来の糖タンパク質でシュードタイプ化した (Verma and Somia (1997) Nature 389(6648):239-242)。したがって、H I V に基づくベクターの e n v 遺伝子産物と同等の機能を果たす代替配列も知られている。

## 【1088】

別の代替案では、Envタンパク質は、突然変異体又は操作されたEnvタンパク質などの改変されたEnvタンパク質であってもよい。改変は、標的化能力を導入するため、又は毒性を低減するため、又は別の目的で、作製又は選択され得る (Valsesia-Wittman et al 1996 J Virol 70: 2056-64; Nilson et al (1996) Gene Ther 3(4):280-286; 及びFielding et al (1998) Blood 91(5):1802-1809、並びにそこで引用された参考文献)。

## 【1089】

ベクターは、選択した任意の分子でシュードタイプ化されていてもよい。

## 【1090】

本明細書で使用される場合、「env」は、本明細書に記載される、内因性レンチウイルスエンベロップ又は異種エンベロップを意味する。好適には、envは、HIVに基づくベクターのEnv又はその機能的代替物であり得る。

## 【1091】

## VSV-G

ラウドウイルスである水疱性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロップ糖タンパク質 (G) は、ある特定のエンベロップウイルス及びウイルスベクターのビリオンをシュードタイプ化する能力があることが示されているエンベロップタンパク質である。

## 【1092】

レトロウイルスエンベロップタンパク質の非存在下でMoMLVベースのレトロウイルスベクターをシュードタイプ化できることは、Emi et al. (1991) Journal of Virology 65:1202-1207によって最初に示された。国際公開第1994/294440号パンフレットは、レトロウイルスベクターがVSV-Gでうまくシュードタイプ化されることを教示する。これらのシュードタイプ化VSV-Gベクターは、広範囲の哺乳動物細胞を形質導入するために使用され得る。より最近では、Abe et al. (1998) J Virol 72(8) 6356-6361が、非感染性レトロウイルス粒子をVSV-Gの添加によって感染性にすることができることを教示している。

## 【1093】

Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-7は、レトロウイルスMLVをVSV-Gでシュードタイプ化することに成功し、その結果、本来の形態のMLVと比較して宿主範囲が変化したベクターを得た。VSV-Gシュードタイプ化ベクターは哺乳類細胞だけでなく、魚類、爬虫類及び昆虫由来の細胞株にも感染することが示されている (Burns et al. (1993) 同上)。また、種々の細胞株に対して、従来の両親媒性エンベロップよりも効率的であることも示されている (Yee et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568、Emi et al. (1991) Journal of Virology 65:1202-1207)。VSV-Gタンパク質は、その細胞質尾部がレトロウイルスのコアと相互作用することが可能であるため、ある特定のレトロウイルスをシュードタイプ化するために使用され得る。

## 【1094】

VSV-Gタンパク質などの非レトロウイルス性のシュードタイプエンベロップを提供することで、感染性を失うことなく高力価にベクター粒子を濃縮できるという利点がある (Akkina et al. (1996) J. Virol. 70:2581-5)。レトロウイルスエンベロップタンパク質は、おそらくそれらが2つの非共有結合的に連結したサブユニットからなるため、超遠心分離中のせん断力に耐えることができないようである。サブユニット間の相互作用は遠心分離によって破壊される場合がある。それと比較して、VSV糖タンパク質は単一のユニットから構成される。したがって、VSV-Gタンパク質のシュードタイプ化は、効率的な標的細胞感染／形質導入と製造プロセス中との両方に潜在的な利点をもたらし得る。

## 【1095】

国際公開第2000/52188号パンフレットは、膜関連ウイルスエンベロップタン

10

20

30

40

50

パク質として水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（VSV-G）を有する、安定なプロデューサー細胞株からのシュードタイプ化レトロウイルスベクターの生成について記載し、VSV-Gタンパク質の遺伝子配列を提供する。

【1096】

#### ロスリバーウイルス

ロスリバーウイルスエンベロープは、非霊長類レンチウイルスベクター（FIV）のシュードタイプ化に使用され、全身投与後に肝臓を優先的に形質導入した（Kang et al., 2002, J. Virol., 76:9378-9388）。効率は、VSV-Gシュードタイプ化ベクターで得られたものより20倍高く、肝毒性を示唆する肝酵素の血清レベルで測定したよりも低い細胞毒性をもたらしたことが報告されている。

【1097】

#### バキュロウイルスGP64

バキュロウイルスGP64タンパク質は、臨床適用及び商業適用に必要な高力価ウイルスの大規模生成に使用されるウイルスベクターのVSV-Gの代替案であることが示されている（Kumar M, Bradow BP, Zimmerberg J (2003) Hum Gene Ther. 14(1):67-77）。VSV-Gシュードタイプ化ベクターと比較すると、GP64シュードタイプ化ベクターは、同様の広範な向性と同様のネイティブの力価を有する。GP64発現は細胞を死滅させないため、GP64を構成的に発現するHEK293Tに基づく細胞株が生成され得る。

【1098】

#### 代替的エンベロープ

EIAVをシュードタイプ化するために使用される場合に妥当な力価を与える他のエンベロープには、Mokola、Rabies、Ebola及びLCMV（リンパ球性絨毛膜炎ウイルス）が含まれる。4070Aでシュードタイプ化したレンチウイルスをマウスに静脈内注入すると、肝臓で最大の遺伝子発現がもたらされた。

【1099】

#### パッケージング配列

本発明の文脈内で利用されるように、「パッケージングシグナル」という用語は、互換的に「パッケージング配列」又は「psi」と呼ばれ、ウイルス粒子形成中のレトロウイルスRNA鎖のカプセル化に必要な非コード、シス作用性配列に関して使用される。HIV-1では、この配列はメジャースプライスドナー部位（SD）の上流から少なくともgag開始コドンまで伸長する遺伝子座にマッピングされている（ヌクレオチド688までのgagの5'配列の一部又はすべてが含まれ得る）。EIAVでは、パッケージングシグナルはGagの5'コード領域へのR領域を含む。

【1100】

本明細書で使用される場合、「伸長したパッケージングシグナル」又は「伸長したパッケージング配列」という用語は、psi配列の周辺に、gag遺伝子にさらに伸長した配列を使用することを指す。このような追加のパッケージング配列を含むことにより、ベクターRNAのウイルス粒子への挿入効率を高めることができる。

【1101】

ネコ免疫不全ウイルス（FIV）のRNAカプシド形成決定因子は、別々であり非連続的であることが示されており、ゲノムmRNAの5'末端の1つの領域（R-U5）と、gagの近位311nt内にマッピングされた別の領域とを含む（Kaye et al., J Virol. Oct;69(10):6588-92 (1995)）。

【1102】

#### 配列内リボソーム進入部位（IRES）

IRESエレメントの挿入により、単一のプロモーターから複数のコード領域の発現が可能になる（Adam et al(上記); Koo et al(1992) Virology 186:669-675; Chen et al 1993 J. Virol 67:2142-2148）。IRESエレメントはピコルナウイルスの非翻訳5'末端で最初に発見され、そこで、これらはウイルスタンパク質のキャップ非

10

20

30

40

50

依存性翻訳を促進する (Jang et al (1990) Enzyme 44: 292-309)。RNAのオープンリーディングフレーム間に位置する場合、IRESエレメントは、IRESエレメントでリボソームの進入を促進し、その後下流で翻訳を開始することにより、下流のオープンリーディングフレームの効率的な翻訳を可能にする。

【1103】

IRESに関する総説はMountfordとSmithによって発表されている (TIG May 1995 vol 11, No 5:179-184)。脳心筋炎ウイルス (EMCV) 由来のもの (Ghattas, I.R., et al., Mol. Cell. Biol., 11:5848-5859 (1991)) ; BiPタンパク質 [Macejak and Sarnow, Nature 353:91 (1991)] ; ショウジョウバエのアンテナペディア遺伝子 (エクソンd及びe) [Oh, et al., Genes & Development, 6:1643-1653 (1992)] 及びポリオウイルス (PV) のもの [Pelletier and Sonenberg, Nature 334: 320-325 (1988); Mountford and Smith, TIG 11, 179-184 (1985)も参照されたい] を含むいくつかの異なるIRES配列が知られている。

【1104】

PV、EMCV、豚水疱症ウイルスのIRESエレメントは、以前にレトロウイルスベクターで使用されたことがある (Coffin et al、上記)。

【1105】

「IRES」という用語には、IRESとして作用する、又はIRESの機能を改善する配列又は配列の組合せが含まれる。IRESは、ウイルス起源 (EMCV IRES、PV IRES、又はFMDV 2A様配列など) であっても、細胞起源 (FGF2 IRES、NRF IRES、Notch 2 IRES又はEIF4 IRESなど) であってもよい。

【1106】

IRESが各ポリヌクレオチドの翻訳を開始できるようにするために、モジュールコンストラクト中のポリヌクレオチド間又は前に位置する必要がある。

【1107】

安定な細胞株の開発に利用されるヌクレオチド配列は、安定な組込みが起こった細胞を選択するために、選択可能なマーカーの付加を必要とする。これらの選択可能なマーカーは、ヌクレオチド配列内の単一転写ユニットとして発現させることもでき、又はIRESエレメントを使用してポリシストロニックメッセージで選択可能なマーカーの翻訳を開始させることもできる (Adam et al 1991 J.Virol. 65, 4985)。

【1108】

遺伝子の方向及びインスレーター

核酸には方向性があり、このことは最終的に細胞内の転写及び複製などの機構に影響を与えることがよく知られている。よって、遺伝子は、同じ核酸コンストラクトの一部である場合、互いに対して相対的な方向を有し得る。

【1109】

本発明のある特定の態様では、細胞又はコンストラクト中の同じ遺伝子座に存在する少なくとも2つの核酸配列は、逆方向及び／又は交互方向に存在し得る。言い換えれば、この特定の遺伝子座における本発明のある特定の態様では、連続する遺伝子の対は同じ方向を有さない。これは、この領域が宿主細胞の同じ物理的位置内で発現される場合、転写リードスルーと翻訳リードスルーとの両方を妨げるのに役立つ。

【1110】

ベクター生成に必要とされる核酸が細胞内の同じ遺伝子座に基づく場合、方向を交互に変えることはレトロウイルスベクター生成に有利である。これはまた、複製コンピテントレトロウイルスベクターの生成を妨げるという点で、得られたコンストラクトの安全性を向上させる。

【1111】

核酸配列が逆方向及び／又は交互方向に存在する場合、インスレーターを使用することにより、NOIの不適切な発現又は遺伝的周囲からのサイレンシングを妨げることができ

10

20

30

40

50

る。

#### 【1112】

「インスレーター」という用語は、インスレーター結合タンパク質と結合すると、周囲の調節シグナルから遺伝子を保護する能力を有する、ヌクレオチド、例えばDNAの配列エレメントの分類を指す。インスレーターには、エンハンサーブロッキング機能及びクロマチンバリア機能の2種類がある。インスレーターがプロモーターとエンハンサーとの間に位置する場合、インスレーターのエンハンサーブロッキング機能は、エンハンサーの転写を増強する影響からプロモーターを保護する (Geyer and Corces 1992; Kellum and Schedl 1992)。クロマチンバリアインスレーターは、近傍の凝結クロマチンの、転写活性のあるクロマチン領域が転写不活性なクロマチン領域へと変化し、結果として遺伝子発現をサイレンシングするような進行を妨げることによって機能する。ヘテロクロマチンの拡散、及びそれによる遺伝子サイレンシングを阻害するインスレーターは、ヒストン改変に関与する酵素を動員してこのプロセスを妨げる (Yang J, Corces VG. 2011;110:43-76; Huang, Li et al. 2007; Dhillon, Raab et al. 2009)。インスレーターは、これらの機能の1つ又は両方を有する可能性があり、ニワトリβ-グロビンインスレーター (cHS4) はこのような例の1つである。このインスレーターは、脊椎動物のインスレーターの中で最も広く研究されており、G+Cに非常に富み、エンハンサーブロッキング機能と異質染色性バリア機能との両方を有する (Chung J H, Whitely M, Felsenfeld G. Cell. 1993;74:505-514)。エンハンサーブロッキング機能を有する他のこのようなインスレーターは、以下に限定されないが：ヒトβ-グロビンインスレーター5 (HS5)、ヒトβ-グロビンインスレーター1 (HS1)、及びニワトリβ-グロビンインスレーター (cHS3) を含む (Farrell CM1, West AG, Felsenfeld G., Mol Cell Biol. 2002 Jun;22(11):3820-31; J Ellis et al. EMBO J. 1996 Feb 1; 15(3): 562-568)。不要な遠位相互作用を低減することに加えて、インスレーターは隣接するレトロウイルス核酸配列間のプロモーター干渉 (すなわち、ある転写ユニットのプロモーターが隣接する転写ユニットの発現を損なう) を妨げるのにも役立つ。レトロウイルスベクター核酸配列の各々の間でインスレーターを使用する場合、直接リードスルーの低減が複製コンピテントレトロウイルスベクター粒子の形成を妨げるのに役立つ。

#### 【1113】

インスレーターは、レトロウイルス核酸配列の各々の間に存在してもよい。一態様では、インスレーターの使用は、ベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列において、1つのNOI発現カセットが別のNOI発現カセットと相互作用することによるプロモーター-エンハンサー相互作用を妨げる。

#### 【1114】

ベクターゲノムと gag-pol 配列との間にはインスレーターが存在してもよい。このため、複製コンピテントレトロウイルスベクターと「野生型」様RNA転写物が生成される可能性が制限され、コンストラクトの安全性プロファイルが改善される。安定的に組み込まれた多遺伝子ベクターの発現を改善するためのインスレーターエレメントの使用については、Moriarty et al, Nucleic Acids Res. 2013 Apr;41(8):e92に引用される。

#### 【1115】

##### ベクター力価

当業者は、レンチウイルスベクターの力価を決定するいくつかの異なる方法があることを理解する。力価は形質導入単位/mL (TU/mL) として記載されることが多い。力価は、ベクター粒子の数を増加させ、ベクター調製物の比活性を増加させることによって増加し得る。

#### 【1116】

##### 治療的使用

本明細書に記載されているレンチウイルスベクター、又は本明細書に記載されているレ

10

20

30

40

50

レンチウイルスベクターで形質導入された細胞若しくは組織は、医薬に使用することができる。

【1117】

さらに、本明細書に記載されているレンチウイルスベクター、本発明の生成細胞、又は本明細書に記載されているレンチウイルスベクターで形質導入された細胞若しくは組織は、目的のヌクレオチドを必要とする標的部位に送達する医薬の調製に使用され得る。本発明のレンチウイルスベクター又は形質導入細胞のこのような使用は、先に記載されたように、治療目的又は診断目的であり得る。

【1118】

したがって、本明細書に記載されているレンチウイルスベクターによって形質導入された細胞が提供される。

10

【1119】

「ウイルスベクター粒子によって形質導入された細胞」とは、ウイルスベクター粒子によって運ばれた核酸が移入した細胞、特に標的細胞として理解されるべきである。

【1120】

目的のヌクレオチド

本発明の一実施態様では、目的のヌクレオチド（すなわち導入遺伝子）は、TRAPを欠く標的細胞において翻訳される。

【1121】

「標的細胞」は、NOIを発現することが望まれる細胞として理解されるべきである。NOIは、本発明のウイルスベクターを使用して標的細胞内に導入され得る。標的細胞への送達は、インビボ、エクスピボ又はインビトロで実施することができる。

20

【1122】

好ましい実施形態では、目的のヌクレオチドは治療効果をもたらす。

【1123】

NOIは、治療適用又は診断適用を有することができる。好適なNOIとしては、酵素、補因子、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、抗酸化分子、操作された免疫グロブリン様分子、単鎖抗体、融合タンパク質、免疫共刺激分子、免疫調節分子、キメラ抗原受容体、標的タンパク質のトランスドメイン陰性変異体、毒素、条件付き毒素、抗原、転写因子、構造タンパク質、レポータータンパク質、細胞内局在化シグナル、腫瘍抑制タンパク質、成長因子、膜タンパク質、受容体、血管作動性タンパク質及びペプチド、抗ウイルスタンパク質及びリボザイム、並びにこれらの誘導体（関連レポーター基を有する誘導体など）をコードする配列が挙げられるがこれらに限定されない。NOIはまた、マイクロRNAをコードしていてもよい。

30

【1124】

一実施形態では、NOIは、神経変性障害の治療において有用であり得る。

【1125】

別の実施形態では、NOIは、パーキンソン病及び／又は多系統萎縮症の治療において有用であり得る。

【1126】

別の実施形態では、NOIは、ドーパミン合成に関与する酵素をコードし得る。例えば、酵素は、以下の1又は2以上であり得る：チロシンヒドロキシラーゼ、GTP-シクロヒドロラーゼI及び／又は芳香族アミノ酸ドーパデカルボキシラーゼ。3つの遺伝子すべての配列を利用可能である（それぞれ、GenBank（登録商標）受託番号X05290、U19523及びM76180）。

40

【1127】

別の実施形態では、NOIは、小胞モノアミン輸送体2（VMAT2）をコードし得る。代替的な実施形態では、ウイルスゲノムは、芳香族アミノ酸ドーパデカルボキシラーゼをコードするNOI及びVMAT2をコードするNOIを含んでもよい。このようなゲノムは、パーキンソン病の治療において、特にL-DOPAの末梢投与と併せて使用するこ

50

とができる。

【1128】

別の実施形態では、NOIは、治療用タンパク質又は治療用タンパク質の組合せをコードすることができる。

【1129】

別の実施形態では、NOIは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、インターロイキン-1ベータ(IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- $\alpha$ )、インスリン成長因子-2、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C/VEGF-2、VEGF-D、VEGF-E、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-A及びPDGF-Bのヘテロダイマー及びホモダイマーからなる群から選択されるタンパク質をコードし得る。

10

【1130】

別の実施形態では、NOIは、アンジオスタチン、エンドスタチン、血小板因子4、色素上皮由来因子(PEDF)、胎盤成長因子、レスティン、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン誘導性タンパク質、gro-ベータ及びtubedown-1、インターロイキン(IL)-1、IL-12、レチノイン酸、アフリベルセプトなどの抗VEGF抗体又はその断片/バリエーション、トロンボスポンジン、米国特許第5,952,199号明細書及び米国特許第6,100,071号明細書に記載されているようなVEGF受容体タンパク質、及び抗VEGF受容体抗体からなる群から選択される抗血管新生タンパク質をコードし得る。

20

【1131】

別の実施形態では、NOIは、NF- $\kappa$ B阻害剤、IL1ベータ阻害剤、TGFベータ阻害剤、IL-6阻害剤、IL-23阻害剤、IL-18阻害剤、腫瘍壊死因子アルファ及び腫瘍壊死因子ベータ、リンパ毒素アルファ及びリンパ毒素ベータ、LIGHT阻害剤、アルファシヌクレイン阻害剤、タウ阻害剤、ベータアミロイド阻害剤、IL-17阻害剤、IL-33阻害剤、IL-33受容体阻害剤及びTSLP阻害剤からなる群から選択される抗炎症性タンパク質、抗体又はタンパク質若しくは抗体の断片/バリエーションをコードし得る。

30

【1132】

別の実施形態では、NOIは、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子(CFTR)をコードし得る。

【1133】

別の実施形態では、NOIは、眼球細胞において通常発現するタンパク質をコードし得る。

【1134】

別の実施形態では、NOIは、光受容細胞及び/又は網膜色素上皮細胞において通常発現されるタンパク質をコードし得る。

【1135】

別の実施形態では、NOIは、RPE65、アリール炭化水素相互作用受容体タンパク質様1(AIPL1)、CRB1、レシチン網膜アセチルトランスフェラーゼ(LRAT)、光受容体特異的ホメオボックス(CRX)、網膜グアニル酸シクラーゼ(retinal guanylate cyclase)(GUCY2D)、RPGR相互作用タンパク質1(RPGRIP1)、LCA2、LCA3、LCA5、ジストロフィン、PRPH2、CNTF、ABCR/ABCA4、EMP1、TIMP3、MERTK、ELOVL4、MYO7A、USH2A、VMD2、RLBP1、COX-2、FPR、ハルモニン、Rabエスコートタンパク質1、CNGB2、CNGB3、CEP290、RPGR、RS1、RP1、PRELP、グルタチオン経路酵素及びオプチンを含む群から選択されるタンパク質をコードし得る。

40

50

## 【1136】

他の実施形態では、NOIは、ヒト血液凝固第VIII因子又は第IX因子をコードし得る。

## 【1137】

他の実施形態では、NOIは、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）、メチルマロニルCoAムターゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、イソバレリルCoAデヒドロゲナーゼ、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体、グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、3メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、カルバモイルーホスフェート合成酵素アンモニア、オルニチントランスカルバミラーゼ、グルコシルセラミダーゼベータ、アルファガラクトシダーゼA、グルコシルセラミダーゼベータ、シスチノシン、グルコサミン（N-アセチル）-6-スルファターゼ、N-アセチル-アルファ-グルコサミニダーゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、ATP7B、ATP8B1、ABCB11、ABCB4、TJP2、N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、ガラクトサミン-6スルファターゼ、アリルスルファターゼA、シトクロムB-245ベータ、ABCD1、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、アルギニノスクシネート合成酵素、アルギニノスクシネートリザーゼ、アルギナーゼ1、アラニングリオキシレートアミノトランスフェラーゼ（alanine glycoxhylate amino transferase）、ATP結合カセット、サブファミリーBメンバーを含む群から選択される代謝に参与するタンパク質をコードし得る。

## 【1138】

他の実施形態では、NOIは、キメラ抗原受容体（CAR）又はT細胞受容体（TCR）をコードし得る。一実施形態では、CARは、抗5T4 CARである。他の実施形態では、NOIは、B細胞成熟抗原（BCMA）、CD19、CD22、CD20、CD138、CD30、CD33、CD123、CD70、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、ルイスY抗原（LeY）、チロシン-タンパク質キナーゼ膜貫通受容体（ROR1）、ムチン1、細胞表面関連（Muc1）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、内皮成長因子受容体（EGFR）、インスリン、タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体22型、インターロイキン2受容体、アルファ、ヘリカーゼドメイン1で誘導されたインターフェロン、ヒト上皮成長因子受容体（HER2）、グリピカン3（GPC3）、ジシアロガングリオシド（GD2）、メシオセリン、小胞内皮成長因子受容体2（VEGFR2）、スミス抗原、Ro60、二本鎖DNA、リン脂質、プロインスリン、インスリノーマ抗原2（IA-2）、グルタミン酸デカルボキシラーゼの65kDaアイソフォーム（GAD65）、クロモグラニンA（CHGA）、膵島アミロイドポリペプチド（IAPP）、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質（IGRP）、亜鉛輸送体8（ZnT8）をコードし得る。

## 【1139】

他の実施形態では、NOIは、ULBP1、2及び3、H60、Raee-1a、b、g、d、MICA、MICBを含む群から選択されるNKG2Dリガンドに対するキメラ抗原受容体（CAR）をコードし得る。

## 【1140】

さらなる実施形態では、NOIは、SGSH、SUMF1、GAA、共通ガンマ鎖（CD132）、アデノシンデアミナーゼ、WASタンパク質、グロビン、アルファガラクトシダーゼA、δ-アミノレブリン酸（ALA）合成酵素、δ-アミノレブリン酸デヒドラターゼ（ALAD）、ヒドロキシメチルピラン（HMB）合成酵素、ウロポルフィリノーゲン（URO）合成酵素、ウロポルフィリノーゲン（URO）デカルボキシラーゼ、コプロポルフィリノーゲン（COPRO）オキシダーゼ、プロトポルフィリノーゲン（PROTO）オキシダーゼ、フェロケラターゼ、α-レイズロニダーゼ、イズロン酸スルファターゼ、ヘパランスルファミダーゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ、ヘパラン-α-グルコサミニドN-アセチルトランスフェラーゼ、3-N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、ガラクトース-6-硫酸スルファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、N-ア

セチルガラクトサミン-4-スルファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ及びヒアルロニダーゼをコードし得る。

【1141】

NOIに加えて、ベクターはまた、siRNA、shRNA、又は調節shRNAを含むか、又はコードし得る (Dickins et al. (2005) Nature Genetics 37: 1289-1295、Silva et al. (2005) Nature Genetics 37:1281-1288)。

【1142】

適応症

本発明によるレトロウイルスベクター及びAAVベクターを含むベクターは、国際公開第1998/05635号パンフレット、同第1998/07859号パンフレット、及び同第1998/09985号パンフレットに列挙された障害の治療に有用な1又は2以上のNOIを送達するために使用され得る。目的のヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよい。このような疾患の例を以下に示す：

【1143】

サイトカイン及び細胞増殖／分化活性；免疫抑制剤又は免疫刺激薬の活性（例えば、ヒト免疫不全ウイルスによる感染を含む免疫不全の治療、リンパ球増殖の調節；がん及び多くの自己免疫疾患の治療、並びに移植拒絶の予防又は腫瘍免疫の誘導のため）；造血の調節（例えば、骨髄性疾患又はリンパ性疾患の治療）；骨、軟骨、腱、靱帯及び神経組織の成長促進（例えば、創傷治癒、火傷、潰瘍及び歯周病及び神経変性の治療のため）；卵胞刺激ホルモンの阻害又は活性化（生殖能力のモジュレーション）；走化性／化学運動活性（傷害又は感染部位に特定の細胞型を動員するため）；止血及び血栓溶解活性（例えば、血友病及び脳卒中の治療のため）；抗炎症活性（例えば、敗血症性ショック又はクローン病の処置のため）；マクロファージ阻害活性及び／又はT細胞阻害活性、及びそれによる抗炎症活性；抗免疫活性（すなわち、炎症に関連しない応答を含む、細胞及び／又は体液性免疫応答に対する阻害効果）；マクロファージ及びT細胞が細胞外マトリックス構成成分及びフィブロネクチンに接着する能力の阻害、並びにT細胞におけるfas受容体発現の上方調節に応答する障害。

【1144】

がん、白血病、良性及び悪性の腫瘍増殖、浸潤及び拡大、血管新生、転移、腹水及び悪性胸水を含む悪性障害。

【1145】

関節リウマチを含む関節炎、過敏症、乾癬、シェーグレン症候群、アレルギー反応、喘息、慢性閉塞性肺疾患、全身性エリテマトーデス、1型真性糖尿病、クローン病、潰瘍性大腸炎、膠原病及び他の疾患を含む自己免疫疾患。

【1146】

動脈硬化、アテローム性心疾患、再灌流傷害、心停止、心筋梗塞、血管炎症性障害、呼吸窮迫症候群、心血管作用、末梢血管疾患、片頭痛及びアスピリン依存性抗血栓症、脳卒中、脳虚血、虚血性心疾患又は他の疾患を含む血管疾患。

【1147】

消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病及び他の疾患を含む消化管の疾患。

【1148】

肝線維症、肝硬変、アミロイドーシスを含む肝疾患。

【1149】

フェニルケトン尿症PKU、ウィルソン病、有機酸血症、グリコーゲン貯蔵性疾患、尿素サイクル障害、胆汁うっ滞及び他の疾患を含む遺伝性代謝障害。

【1150】

甲状腺炎又は他の腺疾患、糸球体腎炎、ループス腎炎又は他の疾患を含む腎臓及び泌尿器の疾患。

【1151】

耳炎又は他の耳鼻咽喉科疾患、皮膚炎又は他の皮膚疾患を含む耳鼻咽喉科障害。

## 【1152】

歯周病、歯周炎、歯肉炎又は他の歯科／口腔疾患を含む歯科及び口腔の障害。

## 【1153】

睾丸炎又は睾丸上膜炎、不妊症、睾丸外傷又は他の精巣疾患を含む精巣疾患。

## 【1154】

胎盤機能不全、胎盤不全、習慣性流産、子癇、子癇前症、子宮内膜症及び他の婦人科疾患を含む婦人科疾患。

## 【1155】

LCA10を含むレーバー先天性黒内障(LCA)、後部ぶどう膜炎、中間ぶどう膜炎、前部ぶどう膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ぶどう膜炎、視神経炎、開放隅角緑内障及び若年性先天性緑内障を含む緑内障、眼内炎症、例えば網膜炎又は囊胞様黄斑浮腫、交感神経性眼症、強膜炎、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症(AMD)及び若年性黄斑変性症を含む黄斑変性症、例えばベスト病、ベスト硝子体黄斑変性症、シュタルガルト病、アッシャー症候群、ドインのハニカム網膜ジストロフィー(Doyne's honeycomb retinal dystrophy)、ソルビーの黄斑ジストロフィー(Sorby's Macular Dystrophy)、若年性網膜分離症、コーンロッドジストロフィー(Cone-Rod Dystrophy)、角膜ジストロフィー、フックのジストロフィー(Fuch's Dystrophy)、レーバー先天性黒内障、レーバー遺伝性視神経障害(Leber's hereditary optic neuropathy、LHON)、アディー症候群、小口病、変性眼底病(degenerative fondus disease)、眼外傷、感染症によって引き起こされる眼炎症、増殖性硝子体網膜症、急性虚血性視神経障害、例えば緑内障濾過手術後の過剰な瘢痕、眼球移植に対する反応、角膜移植片拒絶、及び他の眼科疾患、例えば糖尿病黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症、RLBP1関連網膜ジストロフィー、脈絡膜血症及び色覚異常などの眼科障害。

## 【1156】

パーキンソン病、パーキンソン病の治療による合併症及び／又は副作用、AIDSに関連する認知症、複合HIVに関連する脳症、デビック病、シデナム舞踏病、アルツハイマー病及び他の変性疾患、CNSの状態又は障害、脳卒中、ポリオ後症候群、精神障害、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性全脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ファブリー病、ゴーシェ病、シスチン症、ポンペ病、多色性白質ジストロフィー、ウィスコット・アルドリッチ症候群、アドレノロイコジストロフィー、ベーターサラセミア、鎌状赤血球症、ギラン・バレー症候群、シデナム舞踏病、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン病、前頭側頭型認知症、CNS圧迫又はCNS外傷又はCNSの感染症、筋萎縮症及び筋ジストロフィー、中枢神経系及び末梢神経系の疾患、状態又は障害、筋萎縮性側索硬化症を含む運動ニューロン疾患、脊髄性筋萎縮症、脊髄及び剥離傷害を含む神経障害及び神経変性障害。

## 【1157】

嚢胞性線維症、ムコ多糖症(サンフィリポ症候群A、サンフィリポ症候群B、サンフィリポ症候群C、サンフィリポ症候群Dを含む)、ハンター症候群、ハーラー・シャイエ症候群、モルキオ症候群、ADA-SCID、X連鎖性SCID、X連鎖性慢性肉芽腫性疾患、ポルフィリン症、血友病A、血友病B、外傷後炎症、出血、凝固及び急性期反応、悪液質、食欲不振、急性感染症、敗血症性ショック、感染症、真性糖尿病、手術の合併症又は副作用、骨髄移植又は他の移植の合併症及び／又は副作用、遺伝子治療の合併症及び副作用(例えばウイルス担体の感染による)又はAIDS(液性及び／又は細胞性の免疫応答を抑制又は阻害するため、角膜、骨髄、器官、水晶体、ペースメーカー、ネイティブ又は人工皮膚組織などのネイティブ又は人工の細胞、組織及び器官を移植する場合の移植片拒絶を予防及び／又は治療するため)などの他の疾患及び状態。

## 【1158】

s iRNA、マイクロRNA及びs hRNA

ある特定の他の実施形態では、NOIは、マイクロRNAを含む。NOIであるマイクロRNA(すなわち、導入遺伝子)は、本明細書に記載の自己不安定化又は自己崩壊エレ

10

20

30

40

50

メントとは異なる。よって、導入遺伝子であるマイクロRNAは、典型的には、導入遺伝子をコードするmRNAを標的としない。導入遺伝子であるマイクロRNAは、例えば遺伝子スイッチシステムの一部として、第2の導入遺伝子のmRNAを調節するために、別の導入遺伝子（すなわち第2の導入遺伝子）をコードするmRNAを標的とし得る。

【1159】

NOIに加えて、ベクターはまた、miRNA、siRNA、shRNA、又は調節shRNAを含むか又はコードし得る（Dickins et al. (2005) Nature Genetics 37:1289-1295、Silva et al. (2005) Nature Genetics 37:1281-1288）。好ましくは、ベクターは、NOIに加えて、miRNA又はshRNAを含むか又はコードし得る。追加のmiRNA、siRNA、shRNA、又は調節されたshRNAは、本明細書に記載の自己不安定化又は自己崩壊エレメントとは異なる。よって、追加のmiRNA、siRNA、shRNA、又は調節されたshRNAは、導入遺伝子をコードするmRNAを標的としない。

10

【1160】

医薬組成物

本開示は、本明細書に記載されているレンチウイルスベクター、又は本明細書に記載されているウイルスベクターで形質導入された細胞若しくは組織を、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。

【1161】

本開示は、遺伝子治療によって個体を治療するための医薬組成物であって、治療有効量のレンチウイルスベクターを含む、医薬組成物を提供する。医薬組成物は、ヒト用又は動物用であり得る。

20

【1162】

組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又はアジュバントを含んでもよい。薬学的担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図される投与経路及び標準的な薬学的慣行を考慮して行うことができる。医薬組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤に加えて、任意の適切な結合剤、滑沢剤、懸濁化剤、コーティング剤、可溶化剤、及び標的部位へのベクターの進入を補助又は増加させ得る他の担体剤（例えば、脂質送達システムなど）を含み得るか、それであり得る。

【1163】

適切な場合、組成物は、吸入；坐剤又はペッサリーの形態で；ローション剤、溶液剤、クリーム剤、軟膏剤又は散剤の形態で局所的に；皮膚パッチの使用によって；経口的には、デンプン又はラクトースなどの賦形剤を含有する錠剤の形態で、又は単独若しくは賦形剤と混合してカプセル剤若しくは卵剤の形態で、又は香味剤若しくは着色剤を含有するエリキシル剤、溶液剤若しくは懸濁剤の形態のいずれか1又は2以上で投与することができ；あるいは組成物は、非経口的に、例えば陰茎海綿体内、静脈内、筋肉内、頭蓋内、眼内、腹腔内又は皮下に注射することができる。非経口投与では、組成物は、他の物質、例えば、溶液を血液と等張にするのに十分な塩又は単糖を含有し得る無菌水溶液の形態で使用するのが最適であり得る。頬投与又は舌下投与では、組成物は、通常の方法で製剤化することができる錠剤又はロゼンジの形態で投与することができる。

30

【1164】

本明細書に記載されているレンチウイルスベクターは、標的細胞又は標的組織を、それを必要とする患者に移入する前に、エクスピボで前記標的細胞又は組織に形質導入するために使用することもできる。このような細胞の例は自己T細胞であり、このような組織の例はドナー角膜であり得る。

40

【1165】

バリエーション、誘導体、類似体、相同体及び断片

本明細書で言及される特定のタンパク質及びヌクレオチドに加えて、本発明はまた、それらのバリエーション、誘導体、類似体、相同体及び断片の使用を包含する。

【1166】

50

本発明の文脈において、任意の所与の配列のバリエーションは、残基の特定の配列が（アミノ酸残基であっても核酸残基であっても）、問題のポリペプチド又はポリヌクレオチドがその内因性機能の少なくとも1つを保持するような様式で改変された配列である。バリエーションの配列は、ネイティブに存在するタンパク質中に存在する少なくとも1つの残基の付加、欠失、置換、改変、置換及び／又は変異によって得ることができる。

【1167】

「誘導体」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明のタンパク質又はポリペプチドに関連して、結果として生じるタンパク質又はポリペプチドがその内因性機能の少なくとも1つを保持することを条件として、配列からの、又は配列への1つ（又は2以上）のアミノ酸残基のいずれかの置換、変異、改変、置き換え、欠失、及び／又は付加を含む。

10

【1168】

「類似体」という用語は、本明細書で使用される場合、ポリペプチド又はポリヌクレオチドに関連して、任意の模倣物、すなわち、模倣するポリペプチド又はポリヌクレオチドの内因性機能の少なくとも1つを有する化学的化合物を含む。

【1169】

典型的には、アミノ酸置換は、例えば1、2又は3～10又は20置換まで、改変された配列が要求される活性又は能力を保持することを条件として行うことができる。アミノ酸置換には、ネイティブに存在しない類似体の使用が含まれ得る。

【1170】

本発明で使用されるタンパク質は、アミノ酸残基の欠失、挿入又は置換を有していてもよく、これらのアミノ酸残基はサイレント変化を生じ、機能的に等価なタンパク質をもたらす。計画的なアミノ酸置換は、内因性の機能が保持される限り、極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び／又は残基の両親媒性の類似性に基づいて行われ得る。例えば、負に荷電したアミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられ、正に荷電したアミノ酸としては、リジン及びアルギニンが挙げられ、同様の親水性値を有する非荷電極性頭部基を有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン及びチロシンが挙げられる。

20

【1171】

保存的置換は、例えば以下の表に従って行うことができる。第2列の同じブロックのアミノ酸、好ましくは第3列の同じ行のアミノ酸は、互いに置換されてもよい：

30

【表6】

|     |        |         |
|-----|--------|---------|
| 脂肪族 | 非極性    | G A P   |
|     |        | I L V   |
|     | 極性-非荷電 | C S T M |
|     |        | N Q     |
|     | 極性-荷電  | D E     |
|     |        | K R H   |
| 芳香族 |        | F W Y   |

40

【1172】

「相同体」という用語は、野生型アミノ酸配列及び野生型ヌクレオチド配列と一定の相同性を有する実体を意味する。「相同性」という用語は、「同一性」と同一視することができる。

【1173】

本発明の文脈において、相同配列とは、対象の配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%又は90%同一、好ましくは少なくとも95%、97%又は99%同

50

一であり得るアミノ酸配列を含むものとする。典型的には、相同体は、対象のアミノ酸配列と同じ活性部位などを含む。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的性質／機能を有するアミノ酸残基）の観点でも考えられ得るが、本発明の文脈では、配列同一性の観点で相同性を表現することが好ましい。

#### 【1174】

本発明の文脈において、相同配列とは、対象の配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%又は90%同一、好ましくは少なくとも95%、97%、98%又は99%同一であり得るヌクレオチド配列を含むものとする。相同性は類似性の観点でも考えられ得るが、本発明の文脈では、配列同一性の観点で相同性を表現することが好ましい。

10

#### 【1175】

相同性比較は目視で行うこともできるが、通常は容易に入手可能な配列比較プログラムの助けを借りて行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2又は3以上の配列間の相同性又は同一性のパーセンテージを計算することができる。

#### 【1176】

相同性のパーセンテージは、連続的配列に対して計算され得る、すなわち、一方の配列を他方の配列とアラインし、一方の配列の各アミノ酸を、他方の配列の対応するアミノ酸と、一度に1残基ずつ直接比較する。これは「ギャップなしの」アライメントと呼ばれる。典型的には、このようなギャップなしのアライメントは、比較的短い残基数にわたってのみ実施される。

20

#### 【1177】

これは非常に簡単で一貫性のある方法であるが、例えば、それ以外は同一の配列の対において、ヌクレオチド配列の1つの挿入又は欠失が、後続のコドンのアライメントから外す可能性があり、その結果、全体的アライメントを実施した場合に、相同性パーセントが大きく低下する可能性があることを考慮していない。その結果、ほとんどの配列比較方法は、全体的な相同性スコアに過度のペナルティを与えることなく、可能な挿入及び欠失を考慮した最適なアライメントを生成するように設計される。これは、配列アライメントに「ギャップ」を挿入して、局所的な相同性を最大化しようとすることによって達成される。

#### 【1178】

しかし、これらのより複雑な方法では、同じ数の同一アミノ酸について、比較される2つの配列間のより高い関連性を反映する、可能な限りギャップの少ない配列アライメントが、ギャップの多いものよりも高いスコアを達成するように、アライメントに存在する各ギャップに「ギャップペナルティ」が割り当てられる。典型的には、ギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、ギャップ内の各後続の残基に対してより小さいペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が使用される。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然のことながらギャップの少ない最適化されたアライメントを生成する。ほとんどのアライメントプログラムでは、ギャップペナルティを改変することができる。しかし、このようなソフトウェアを配列比較に使用する場合は、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティは、ギャップが-12、各伸長が-4である。

30

#### 【1179】

したがって、最大相同性パーセントの計算には、ギャップペナルティを考慮した最適なアライメントを作製することがまず必要である。このようなアライメントを実行するのに適したコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージである（University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12:387）。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ（Ausubel et al. (1999) ibid - Ch. 18を参照されたい）、FASTA（Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410）及びGENEWORKS社の一連

40

50

の比較ツールが挙げられるがこれらに限定されない。B L A S TとF A S T Aはいずれも、オフライン及びオンラインの検索に利用可能である (Ausubel et al. (1999) *ibid*, pages 7-58 to 7-60を参照されたい)。しかし、一部の適用では、G C G Bestfitプログラムを使用することが好ましい。B L A S T 2 Sequencesと呼ばれる別のツールもタンパク質とヌクレオチド配列とを比較するために利用可能である (FEMS Microbiol Lett (1999) 174(2):247-50 ; FEMS Microbiol Lett (1999) 177(1):187-8を参照されたい)。

#### 【1180】

最終的な相同性パーセンテージは同一性の観点から測定することができるが、アライメントプロセス自体は、典型的には、全か無かの対比較に基づくものではない。代わりに、化学的類似性又は進化距離に基づいて各ペアワイズ比較に対してスコアが割り当てられるスケールリングされた類似性スコアマトリックス (scaled similarity score matrix) が一般に使用される。このような通常使用されるマトリックスの例は、B L A S Tの一連のプログラムのデフォルトマトリックスであるB L O S U M 6 2マトリックスである。G C G Wisconsinプログラムでは、一般に、公開デフォルト値か、又は供給されている場合はカスタムのシンボル比較表を使用する (さらなる詳細はユーザーマニュアルを参照されたい)。一部の適用では、G C G パッケージの公開デフォルト値、又は他のソフトウェアの場合には、B L O S U M 6 2などのデフォルトマトリックスを使用することが好ましい。

10

#### 【1181】

ソフトウェアが最適アライメントを作製すると、相同性のパーセンテージ、好ましくは配列同一性のパーセンテージを計算することができる。ソフトウェアは通常、配列比較の一部としてこれを行い、数値結果を生じる。

20

#### 【1182】

「断片」もまたバリエーションであり、この用語は、典型的には、機能的又は例えばアッセイにおいて目的のポリペプチド又はポリヌクレオチドの選択された領域を指す。よって、「断片」は、全長ポリペプチド又はポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸又は核酸配列を指す。

#### 【1183】

このようなバリエーションは、部位特異的突然変異誘発などの標準的な組換えD N A技術を使用して調製されてもよい。挿入を行われる場合には、挿入部位の両側のネイティブに存在する配列に対応する5'及び3'フランキング領域と共に挿入をコードする合成D N Aが作製され得る。フランキング領域は、ネイティブに存在する配列にある部位に対応する都合のよい制限部位を含有し、その結果、適切な酵素で配列を切断し、その切断に合成D N Aをライゲーションすることができる。次いで、D N Aは本発明に従って発現されて、コードされたタンパク質を作製する。これらの方法は、D N A配列を操作するための当技術分野で公知の多数の標準的な技術の例示にすぎず、他の公知技術が使用されてもよい。

30

#### 【1184】

本発明の細胞及び／又はモジュールコンストラクトにおいて使用するのに適した調節タンパク質のすべてのバリエーション、断片又は相同体は、ウイルスベクター生成細胞においてN O Iの翻訳が抑制されるか又は妨げられるように、N O Iの同族結合部位に結合する能力を保持する。

40

#### 【1185】

結合部位のすべてのバリエーション断片又は相同体は、ウイルスベクター生成細胞においてN O Iの翻訳が抑制されるか又は妨げられるように、同族R N A結合タンパク質と結合する能力を保持する。

#### 【1186】

#### コドン最適化

本発明で使用されるポリヌクレオチド (N O I及び／又はベクター生成システムの構成成分を含む) は、コドン最適化されていてもよい。コドンの最適化は、以前に国際公開第

50

1999／41397号パンフレット及び同第2001／79518号パンフレットに記載されている。異なる細胞は特定のコドンの使用において異なる。このコドンの偏りは、細胞型における特定のtRNAの相対的存在量の偏りに対応する。対応するtRNAの相対的存在量に合うように配列中のコドンを変更することで、発現を増加させることができる。同様に、特定の細胞型では対応するtRNAが稀であることが知られているコドンを意図的に選択することで、発現を減少させることも可能である。よって、さらに高度な翻訳制御が可能である。

#### 【1187】

レトロウイルスを含む多くのウイルスは、多数の希少コドンを使用し、これらを一般的に使用される哺乳動物のコドンに対応するように変更することにより、哺乳動物生成細胞における目的の遺伝子、例えばNOI又はパッケージング構成成分の発現を増加させることができる。コドン使用表は、哺乳動物細胞、及び種々の他の生物について当技術分野で公知である。

#### 【1188】

ウイルスベクターのパッケージング構成成分のコドン最適化には、他にもいくつかの利点がある。その配列の変更により、プロデューサー細胞／パッケージング細胞におけるウイルス粒子のアセンブリーに必要なウイルス粒子のパッケージング構成成分をコードするヌクレオチド配列は、RNA不安定性配列(INS)がそれらから排除される。同時に、パッケージング構成成分のアミノ酸配列コード配列は、配列によってコードされるウイルス構成成分が同一であるか、又は少なくとも、パッケージング構成成分の機能が損なわれない程度に十分に類似するように保持される。レンチウイルスベクターのgag/pol発現カセットでは、コドンの最適化によって、Rev/RREの輸出要件も克服され、最適化された配列はRevに依存しない。コドン最適化はまた、ベクターシステム内の異なるコンストラクト間(例えば、gag-polとenvのオープンリーディングフレームの重複領域間)の相同組換えを低減する。したがって、コドン最適化の全体的な効果は、ウイルス力価の顕著な増加と安全性の改善である。

#### 【1189】

一態様では、INSに関するコドンのみがコドン最適化される。しかしながら、さらにより好ましく実用的な態様では、配列は、いくつかの例外、例えばgag-polのフレームシフト部位を包含する配列を除いて、その全体がコドン最適化されている(下記を参照されたい)。

#### 【1190】

レンチウイルスベクターのgag-pol遺伝子は、gag-polタンパク質をコードする2つの重複するリーディングフレームを含む。両タンパク質の発現は翻訳中のフレームシフトに依存する。このフレームシフトは翻訳中のリボソームの「滑り」の結果として起こる。このスリップは、少なくとも部分的には、リボソームがRNAの二次構造を剥がすことによって起こると考えられる。このような二次構造はgag-pol遺伝子のフレームシフト部位の下流に存在する。HIVでは、オーバーラップ領域はgagの始まり(ヌクレオチド1はgagのATGのAである)の下流のヌクレオチド1222からgagの終わり(nt1503)まで拡張する。その結果、フレームシフト部位と2つのリーディングフレームの重複領域とにまたがる281bpの断片は、好ましくはコドン最適化されていない。この断片を保持することで、Gag-Polタンパク質をより効率的に発現させることができる。EIAVでは、オーバーラップの始まりはnt1262(ヌクレオチド1はgagATGのA)、オーバーラップの終わりはnt1461とした。フレームシフト部位とgag-polの重複とが保存されることを確実にするために、野生型の配列はnt1156～1465まで保持されている。

#### 【1191】

例えば、都合のよい制限部位に対応するために、最適なコドン使用法からの誘導体が作製されてもよく、保存的なアミノ酸変化がGag-Polタンパク質に導入されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【1192】

一態様では、コドン最適化は軽発現の哺乳動物遺伝子に基づく。3番目の塩基、時には2番目と3番目の塩基が変更されてもよい。

## 【1193】

遺伝暗号の退化した性質のために、当業者により多数の gag-pol 配列が達成され得ることが認識される。また、コドン最適化された gag-pol 配列を生成するための出発点として使用することができる多くのレトロウイルスバリエーションが記載されている。レンチウイルスゲノムはかなり変化しやすい可能性がある。例えば、HIV-1には依然として機能的な多くの準種が存在する。これはEIAVの場合も同様である。これらのバリエーションは、形質導入プロセスの特定の部分を増強するために使用されてもよい。HIV-1バリエーションの例は、Los Alamos National Security, LLCが運営するHIV Databases (<http://hiv-web.lanl.gov>)で見ることができる。EIAVクローンの詳細は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) database located at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>で見ることができる。

10

## 【1194】

コドンを最適化した gag-pol 配列の戦略は、任意のレトロウイルスに関連して使用され得る。これはEIAV、FIV、BIV、CAEV、VMR、SIV、HIV-1及びHIV-2を含むすべてのレンチウイルスに適用されるであろう。さらにこの方法は、HTLV-1、HTLV-2、HFV、HSRV及びヒト内因性レトロウイルス (HERV)、MLV及び他のレトロウイルスからの遺伝子の発現を増加させるために使用することができる。

20

## 【1195】

コドン最適化により、gag-pol 発現をRev非依存にすることができる。しかしながら、レンチウイルスベクターにおいて抗rev因子又はRRE因子を使用できるようにするために、ウイルスベクター生成システムを完全にRev/RRE非依存にする必要がある。よって、ゲノムも改変される必要がある。これは、ベクターのゲノム構成成分を最適化することによって達成される。有利なことに、これらの改変は、プロデューサーにおいても形質導入細胞においても、すべての追加のタンパク質を含まない、より安全なシステムの生成にもつながる。

## 【1196】

本明細書に開示された特徴は、互いに組み合わせて使用することができることを理解されたい。さらに、このような特徴は、それらを含むヌクレオチド配列によって異なる機能性を有し得ることが理解されるべきである。

30

## 【1197】

本発明の実践は、別段に断らない限り、化学、分子生物学、微生物学及び免疫学の従来技術を用いるが、これらは当業者の能力の範囲内である。このような技術は文献において説明されている。例えば、J.Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements) Current Protocols in Molecular Biology, Ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, NY; B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn (1996) DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee (1990) In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; 及び D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg (1992) Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Pressを参照されたい。これらの一般的なテキストの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

## 【1198】

50

本開示は、本明細書に開示された例示的な方法及び材料によって限定されるものではなく、本明細書に記載のものに対して類似するか又は同等である任意の方法及び材料を、本開示の態様の実践又は試験に使用することができる。数値範囲は、その範囲を規定する数値を包含する。別段に示されない限り、任意の核酸配列を5'から3'の方向で左から右に書き；アミノ酸配列はアミノからカルボキシの方向でそれぞれ左から右に書く。

#### 【1199】

値の範囲が与えられている場合、文脈上明らかに別段の指示がない限り、その範囲の上限と下限との間に、下限値の単位の10分の1まで、各介在値も具体的に開示されていることが理解される。指定範囲における任意の規定値又は介在値と、その指定範囲に含まれるいずれかの他の規定値又は介在値との間の各小範囲は、本開示に包含される。これらの小さい範囲の上限と下限とは、独立して、範囲に含まれても除外されてもよく、いずれか、どちらも、又は両方の限界がより小さい範囲に含まれる各範囲も、記載された範囲内の特に除外された上限を条件として、本開示に包含される。記載された範囲が限界値の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限界値の一方又は両方を除いた範囲も本開示に含まれる。

#### 【1200】

本明細書中及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈がそうでないことを明らかに指示しない限り、複数形の参照を含むことが留意されなければならない。

#### 【1201】

用語「含むこと(comprising)」、「含む(comprises)」、及び「を含む(comprised of)」は、本明細書で使用される場合、「含むこと(including)」、「含む(includes)」、又は「含有すること(containing)」、「含有する(contains)」と同義であり、包括的又はオープンエンドであり、追加の非再現メンバー、エレメント、又は方法ステップを除外しない。「含むこと(comprising)」、「含む(comprise s)」及び「を含む(comprised of)」という用語は、「からなる(consisting of)」という用語も含む。

#### 【1202】

本明細書で議論される刊行物は、本出願の出願日前の開示のためにのみ提供される。本明細書では、このような刊行物が本明細書に添付された特許請求の範囲の先行技術を構成することの自認として解釈されるものではない。

#### 【1203】

ここで、本発明を実施例によってさらに説明するが、これらの実施例は、当業者が本発明を実施する際の助けとなることを意味し、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

#### 【1204】

本明細書において開示される任意のヌクレオチド配列は、DNA配列又はRNA配列であり得ることが理解されるべきである。このように、チミンヌクレオチドを含むと記載された配列は、前記チミンヌクレオチドの代わりにウラシルヌクレオチドを含む対応するRNA配列として開示されると考えられ、逆もまた同様である。したがって、対応する配列のリスト内に含有されるDNA配列は、同一配列のRNA(チミンがウラシルで置き換えられている)も表すと理解され、逆もまた同様である。

#### 【実施例】

#### 【1205】

#### 材料及び方法

#### 細胞培養条件

HEK293T(HEK293T)懸濁細胞を、0.1%のコレステロール脂質濃縮物(Gibco社)を補充したFreeStyle(商標)293 Expression Medium(Gibco社)中で増殖させ、振盪インキュベーター(190RPMに設定した25mm軌道)中5%CO<sub>2</sub>で37℃にてインキュベートした。

## 【1206】

HEK293T 接着細胞を、完全培地（10%の熱不活化ウシ胎仔血清（Gibco社）、2mMのL-グルタミン（Sigma社）及び1%の非必須アミノ酸（NEAA）（Sigma社）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（Sigma社））中で、5%CO<sub>2</sub>で37℃にて維持した。

## 【1207】

懸濁細胞培養、トランスフェクション及びレンチウイルスベクター生成

示されている場合、ベクター生成は、懸濁適合（無血清）HEK293T細胞において行った。細胞を、無血清培地中に $8 \times 10^5$ 個の細胞/mLで播種し、ベクター生成中は、5%CO<sub>2</sub>で37℃にて振盪培養した。播種のおよそ24時間後に、以下のトランスフェクション時の培養最終有効量あたりのプラスミドの質量比を使用して、細胞にトランスフェクトした：0.95 µg/mLのゲノム、0.1 µg/mLのGag-Pol、0.06 µg/mLのRev、0.07 µg/mLのVSV-G及び0.18 µg/mLの256U1プラスミド。製造業者のプロトコール（Life Technologies社）に従って、Opti-MEM中でDNAをLipofectamine 2000CDと混合することによってトランスフェクションが媒介された。約18時間後に酪酸ナトリウム（Sigma社）を最終濃度10mMになるように添加した。典型的には、ベクター上清を20～24時間後に採取し、次いで、濾過（0.22 µm）して-80℃で凍結させた。

## 【1208】

実施例23では、ベクター生成はすべてHEK293T細胞において、24ウェルプレート（1mL容量、振盪台上）中で行った。1.65s細胞を無血清培地中に $8 \times 10^5$ 個の細胞/mLで播種し、ベクター生成中は、5%CO<sub>2</sub>で37℃にて振盪しながらインキュベートした。播種のおよそ24時間後に、以下のトランスフェクション時の培養最終有効量あたりのプラスミドの質量比を使用して、細胞にトランスフェクトした：0.95 µg/mLのゲノム、0.1 µg/mLのGag-Pol、0.06 µg/mLのRev、0.07 µg/mLのVSV-G、0.150 µg/mLのpTK-dsRed、及び54 pmol/mLのsiRNA。製造業者のプロトコール（Life Technologies社）に従って、Opti-MEM中でDNAをLipofectamine 2000CDと混合することによってトランスフェクションが媒介された。約18時間後に酪酸ナトリウム（Sigma社）を最終濃度10mMになるように添加した。典型的には、ベクター上清を20～24時間後に回収し、次いで、濾過（0.22 µm）して-80℃で凍結させた。

## 【1209】

フローサイトメトリー（生成細胞）

ベクター採取時に、200 µLの生成終了細胞をAttune NxTフローサイトメーター（Thermo社）を使用してフローサイトメトリーによってGFP及びdsRedの発現をアッセイした。GFP及びdsRedの発現は、蛍光強度の中央値に陽性細胞の%を乗じてスコア化した。

## 【1210】

GFP／フローサイトメトリーによるレンチウイルスベクターの力価測定

LVの「生物学的」力価測定では、1：10～1：150に希釈した適切な容量のベクター上清を使用して、8 µg/mLのポリブレン存在下で、96ウェルスケールで $2 \times 10^4$ 個のHEK293T細胞に形質導入した。培養物を3日間（2～3日ごとに1：5分割）インキュベートした後、フローサイトメトリーを実施して、陽性値（パーセンテージ）を得て、これを、希釈倍率と使用容量を使用するGFP TU/mL力価の計算に使用した。

## 【1211】

組込みアッセイによるレンチウイルスベクター力価測定

組込みアッセイによるレンチウイルスベクター力価測定では、1：10～1：50に希釈した0.25mL容量のベクター上清を使用して、8 µg/mLのポリブレン存在下で、24ウェルスケールで $4.5 \times 10^4$ 個のHEK293T細胞に形質導入した。培養物

を10日間継代(2~3日ごとに1:5分割)した後、QIAextractor (Qiagen社)を製造業者の使用説明書に従って使用し、宿主DNAを約 $1 \times 10^6$ 個の細胞ペレットから抽出した。HIVパッケージングシグナル( $\psi$ )とRRP1とに対して設定したFAMプライマー/プローブを使用して、二重定量PCRを行い、以下の因子を使用してベクター力価(TU/mL)を算出した: 形質導入量、ベクター希釈率、反応あたり検出されたRRP1-正規化HIV-1  $\psi$ コピー。

#### 【1212】

L V形質導入細胞の転写リードスルー(「リードイン」)解析

示したレンチウイルスベクターを、懸濁無血清HEK293T細胞の一過性トランスフェクションによって生成し、前述のように生物学的力価を得るために力価測定した。その後、GFP力価を適宜使用して、 $4.5 \times 10^4$ 個の接着HEK293Tに感染多重度(MOI)1のLVで形質導入した。形質導入細胞を、10日間にわたって3回継代して採取し、2つのアリコートに分割し; 1つを総RNA抽出のために処理し、1つをゲノムDNA抽出のために処理した。200 ng (293T)の総RNAをDNase I処理し、SSIV VILO RTシステム(Life Technologies社)を使用するRT-PCRに供した。cDNAを1 ng/ulに希釈し、5 ulを、HIV Psi及び細胞性GAPDHを対象とするプライマーセットを使用するSYBR qPCRに供した。デルタCt法を使用して、HIV PsiコピーをGAPDHコピーに対して正規化し、試料間の発現スコアを得た。ゲノムDNA抽出物をQiacube抽出システム(Qiagen社)を使用して調製し、5 ulの溶出DNAをqPCRを使用するHIVベクター組込みアッセイに供した。HIV Psiコピーを細胞標的RPPH1に対して正規化して、細胞あたりの組み込まれたベクターゲノムの平均を算出した。次いで、導入効率を考慮するために、試料のHIV RNA発現スコアを細胞あたりの組み込まれたベクターコピー数に対して正規化した。この最終値は相対的HIV Psi RNA発現スコアであり、値を標準ベクターに対して正規化した。

#### 【1213】

あるいは、(例えば、実施例27で使用される)示されたHIVベクターを、24ウェルプレートスケールでの256 U1 snRNAの存在下又は非存在下で、懸濁モードのHEK293-1.65s細胞の一過性トランスフェクションによって生成した。上清を、2日後に採取した後、HEK293T細胞でフローサイトメトリーを使用し、GFP発現によって力価測定した。次に、HEK293T細胞で組込みアッセイを行い、細胞を10日間維持した。形質導入の10日後に形質導入細胞を採取した。ゲノムDNA抽出物をQiacube抽出システム(Qiagen社)を使用して調製し、5 ulの溶出DNAをqPCRを使用するHIVベクター組込みアッセイに供した。その後、組込み力価を適宜使用して、 $4.5 \times 10^4$ 個のHEK293T又は92BR細胞(口バ初代線維芽細胞)に感染多重度(MOI)1で形質導入した。形質導入細胞を、10日間にわたって3回継代して回収し、2つのアリコートに分割し; 1つを総RNA抽出のために処理し、1つをゲノムDNA抽出のために処理した。200 ng (293T)又は180 ng (92BR)の総RNAをDNase I処理し、SSIV VILO RTシステム(Life Technologies社)を使用するRT-PCRに供した。cDNAを10分の1に希釈し、5 ulを、HIV Psi及び細胞性GAPDHを対象とするプライマーセットを使用するTAQman qPCRに供した。デルタCt法を使用して、HIV PsiコピーをGAPDHコピーに対して正規化し、試料間の発現スコアを得た。ゲノムDNA抽出物をQiacube抽出システム(Qiagen社)を使用して調製し、5 ulの溶出DNAをqPCRを使用するHIVベクター組込みアッセイに供した。HIV Psiコピーを細胞標的RPPH1に対して正規化し、細胞あたりの組み込まれたベクターゲノムの平均を算出した。次いで、導入効率を考慮するために、試料のHIV RNA発現スコアを細胞あたりの組み込まれたベクターコピー数に対して正規化した。この最終値は相対的HIV Psi RNA発現スコアであり、試験した各細胞株について、すべての値を256 U1 snRNAの非存在下で作製した標準ベクター(インタクトMSD)に対して正規化した。

10

20

30

40

50

## 【1214】

## ルシフェラーゼアッセイ

すべてのアッセイは複製培養で行った。トランスフェクトされた接着293T細胞では、上清を除去し、アッセイまでドライアイス上で凍結させた。次いで、残りの単層をトリプシン処理し、Attune NxTフローサイトメーターを使用して、フローサイトメトリーでdsRed発現をアッセイした。トランスフェクトされた懸濁293T細胞では、200  $\mu$ lの細胞懸濁液を取り除き、上記のようにdsRedアッセイを行った。残りの細胞は最初に、低速での遠心分離によりペレット化させ、次いで、上清を除去し、ドライアイス上で凍結させた。

## 【1215】

アッセイ時、細胞上清を室温まで解凍させた後、5  $\mu$ lの各上清をPierce Gaussialルシフェラーゼアッセイ検出システムを使用し、製造業者の使用説明書に従ってアッセイした。Spectromax i3xシステムの個々のウェルディスペンサーを使用してアッセイを実施した。以下のプロトコルを使用してウェルを一度に1つずつアッセイした：50  $\mu$ lの基質をウェルに分注し、プレートを2秒間振盪させた。読み取り前にさらに2秒のタイムラグがあった。その後、Gaussialルシフェラーゼ活性を10秒間測定し、総RLUを記録した。所与の試料について、dsRed発現スコア（ゲート% $\times$ MFI）を使用して、総RLUをトランスフェクション効率に対して正規化した。その後、正規化したスコアを、対照のスコアと比較して表示した。

## 【1216】

## 生成終了細胞及びレンチウイルスベクタービリオンからの総RNA抽出

ベクター採取時に、0.5 mlのFreestyle無血清培地中およそ1e6個の1.65細胞を、500 gで3分間の遠心分離によってペレット化させた。上清を除去し、遠心分離により0.22  $\mu$ mのSpin-Xフィルターで濾過し、ベクター力価測定とビリオンRNA抽出とまで-80°Cで保存した。細胞ペレットを0.5 mlのPBSで洗浄し、細胞を遠心分離により再度ペレット化させた。新鮮な細胞ペレット又は125  $\mu$ lの粗ベクター濾液から、それぞれRNAeasy及びQIAamp Viral RNA Mini Kitを使用し、製造業者の使用説明書（Qiagen社）に従って、RNAを抽出した。

## 【1217】

## 逆転写

細胞からの500 ngの総RNA又は5  $\mu$ lのビリオンRNA溶出液を逆転写のインプットとして使用した。RNA試料を1  $\mu$ lのEZDNase（Life Technologies社）と共に37°Cで2分間インキュベートした。次いで、試料あたり1.1  $\mu$ lの0.1 M DTTを添加し、反応物を、55°Cでさらに5分間インキュベートした。次いで、DNase処理したRNAを、Superscript IV第一鎖合成システム（Life Technologies社）を使用して逆転写に供し、OligodTプライマーを使用して、製造業者の使用説明書に従って第1の鎖の合成を行った。逆転写の完了後、試料を1  $\mu$ lのRNase H（Life Technologies社）と共に37°Cで20分間インキュベートした。完了後、ヌクレアーゼを含まない水を使用して、試料を10倍に希釈した。

## 【1218】

## ポリメラーゼ連鎖反応

CloneAmpポリメラーゼ（Takara社）を使用してPCR反応を実施した。1  $\mu$ lの希釈したcDNAを鋳型として使用した。プライマーは、HIVのパッケージング配列からGFPオープンリーディングフレームまで、又はwPREまでを網羅するような設計とした。細胞内RNAの内因性対照として、ヒトのアクチンcDNAを標的とするプライマーを用いた。すべてのプライマーを最終濃度200 nMで使用し、サイクル条件は以下の通りであった：

## 【1219】

## HIVベクターゲノムプライマー

98°Cで3分、（98°Cで10秒；53.9°Cで15秒；72°Cで60秒）を30サイ

10

20

30

40

50

クル、続いて72℃で5分間最終インキュベーション。

【1220】

ヒトアクチンcDNAプライマー

98℃で3分、(98℃で10秒；68℃で15秒；72℃で30秒)を30サイクル、続いて72℃で5分間最終インキュベーション。

【表7】

表5-本研究において使用されるプライマー

| プライマー               | 配列 5'-3'                            |
|---------------------|-------------------------------------|
| HIV ベクターのフォワード      | AAAGCGAAAGGGAAACCAGAG               |
| HIV ベクターのリバーズ(GFP)  | CTTGTGGCCGTTTACGTC                  |
| HIV ベクターのリバーズ(wPRE) | AGCAGCGTATCCACATAG                  |
| ヒトアクチン cDNA のフォワード  | TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCAT<br>CTA  |
| ヒトアクチン cDNA のリバーズ   | CTAGAAGCATTGTGCGGTGGACGATGGA<br>GGG |

10

20

【1221】

反応の完了後、PCR産物を1%のアガロースゲル電気泳動で可視化した。

【1222】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタンブロット

45 u lの粗ベクターを、25%のβ-メルカプトエタノールを含有する15 u lの4× Laemmliバッファー (BioRad社) と100℃で5分間インキュベートした後、氷上に置いた。20 u lの試料を、4~20%のTGX Pre-castゲル (BioRad社) 及び関連するCriterionゲルランニングシステムを使用するポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。Turbo Transblotシステム (BioRad社) を使用して、タンパク質をニトロセルロース膜にブロットした。膜をブロッキング緩衝液 (25 mMのTris、150 mMのNaCl、0.1% v/vのTween 20、5% w/vの粉乳) 中でブロックした後、製造業者の使用説明書に従って、VSVG (Thermo社、PA1-30138) 及びHIV p24 (Abcam社、ab9071) に対する一次抗体でプローブした。検出は、Starbright Blue 520及びStarbright Blue 700蛍光抗体 (BioRad社、12005870及び12004158) を使用して行った。可視化はChemiDoc MPイメージャー (BioRad社) を使用して行った。

30

40

【1223】

一致した感染多重度 (MOI) での形質導入

2~0.1の範囲のMOIを達成するためのベクターu lの計算は、HEK293T細胞で計算された組込み力価に基づいた。HEK293T細胞を12ウェルプレートに1ウェルあたり9E4個の細胞で播種した。Jurkat細胞を12ウェルプレートに1ウェルあたり2E5個の細胞で播種した。翌日、細胞を再カウントし、ウェルあたりの組込み力価及び細胞数に基づいてMOIを算出した。細胞を、2~3日ごとに分割しながら10日間継代した。Attune-NxT (登録商標) (Thermofisher社) を使用するフローサイトメ

50

トリーを分割ごとに行い、導入遺伝子（GFP）の平均蛍光強度（MFI）を決定した。10日後に、細胞あたりのHIV-1 ψコピーを確認するため、Duplex定量PCR（上記を参照されたい）を行った。必要に応じて、MFI値を細胞あたりのHIV-1 ψコピー数に対して正規化した。

【1224】

#### 細胞質mRNA定量

低張緩衝液（20mMのTris-HCL+150mMのNaCl）で細胞を溶解させ、最終濃度0.2%のIgepalで補うことにより、核画分と細胞質画分とへの細胞内分画を行った。細胞質画分からのRNA抽出は、RNeasyキット（Qiagen社）、続いてDNAse処理（ezDNase（商標）、Invitrogen社）及び逆転写酵素（SuperScript（商標）IV VILO（商標）、Invitrogen社）を使用して行った。細胞質導入遺伝子mRNAの定量は、正規化対照としてGFP及びGAPDHを標的とするプライマーとプローブとを用いるqPCRで行った。解析はデルタCT法を使用する比較定量で行った。

【1225】

#### rAAVベクター生成

AAV-MAX Helper-Free AAV Production System（ThermoFisher社）を用いてAAVベクターを生成した。使用した生成細胞が1.65s細胞であることを除き、製造業者のプロトコールに従った。細胞を総容量20mlのFreestyle+0.1%のコレステロール（以下、FS+0.1%のCLC）中に、3E+06個の生細胞/mlで播種し、トランスフェクションミックスの準備が整うまで、37℃、5%のCO<sub>2</sub>及び200rpmに設定したMultitron内でインキュベートした。合計1.5ug/mlのDNAを1:1:1（トランスファー:AAV2Rep/Cap:Helper）のモル比で細胞中にトランスフェクトした。使用したトランスフェクタープラスミドはpscAAV2-CMV-GFPとpscAAV2-EFS-GFPとであった。トランスフェクション後、細胞をMultitronに戻し、72時間インキュベートした後、製造業者のプロトコールに従ってAAV-MAX溶解緩衝液（ThermoFisher社）を用いて採取した。

【1226】

#### rAAVベクター力価測定

AAV調製物中に存在するゲノム含有粒子の数を、TaqManリアルタイムPCRアッセイによって決定した。qPCRの前に、ベクターをDNAseとエキソヌクレアーゼとで処理し、残存DNAを除去した。次いで、これらの酵素を95℃のステップで熱不活化し、同時にAAVカプシドを溶解させてベクターゲノムを遊離させ、PCRによる解析を可能にした。TaqManプライマーとプローブとはGFPを標的とするように設計した。

【1227】

#### 一致した感染多重度（MOI）でのrAAV形質導入

HepG2細胞を、10%のFBS、L-glut（2mM）、1%のNEAAを補充したMEM中、2E5個の細胞/ウェルで12ウェルプレートに播種した。翌日、細胞を再カウントし、qPCRで決定したゲノムコピー数/mlと細胞数に基づいてMOIを算出した。HepG2細胞はMOI 250及び500で形質導入された。感染のおよそ72時間後、Attune-NxT（登録商標）（Thermofisher社）を使用してフローサイトメトリーを行い、GFP陽性細胞のパーセンテージと導入遺伝子（GFP）の平均蛍光強度（MFI）とを測定した。

【実施例1】

【1228】

SV40後期ポリアデニル化配列を使用する、3'SIN-LTRに配置された「Rに埋め込まれた」異種ポリアデニル化配列の例示。

上記の本発明の4つの主要な側面のうち最初の3つを達成するために、本発明者らは、当技術分野で公知の強力な異種ポリアデニル化配列（例えば、ウサギベータグロビンポリA、SV40後期ポリA、ヒト/ウシ成長ホルモンポリA）を入手し、その配列をLVゲノム発現カセット内の3'SIN-U3領域の下流に挿入し、3'R-U5配列を完全に

10

20

30

40

50

置き換えた。次に、5' R領域の最初の18~20ヌクレオチドをPASのすぐ下流に挿入する。HIV-1 vRNAでは、特定の転写開始部位(TSS)での転写開始は、最初の3つの「G」ヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチド1~3)にわたって変化し、その結果「3G」、「2G」又は「1G」vRNA種が生じることに注意すべきである(図17を参照されたい)。野生型HIV-1感染では、特異的TSSが3G/2Gから1Gにシフトし、vRNAの運命に影響を与え、gag pol(3G/2G vRNA)又はパッケージング(1G vRNA)の発現要件を変化させると考えられている(Kharytonchyk et al. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 113: 13378-13383; 及びBrown et al (2020) Science 368: 413-417)。本発明の別の箇所では、1G vRNAのみの正確な生成を可能にする新規プロモーターが開発されている(実施例4、図18を参照されたい)。したがって、1G vRNAのみが生成されるLV発現カセットを利用する場合、PASのすぐ下流に挿入される配列は、HIV-1のヌクレオチドR. 3-20を最小限にコードする可能性があり、これは採用される5' R領域のヌクレオチド1~18に対応する。したがって、Rの「約20ヌクレオチド」という用語は、どちらのシナリオも意味することができる。実際にしかし、これはプライマー伸長点でミスマッチをもたらさない第1の鎖転移時にバリエーションのいずれかのアニーリングを可能にするため、1G vRNAだけ、又は3つすべてのバリエーション(3G、2G及び1G)のいずれかを生成するLVゲノム発現カセット内に、PASの下流にヌクレオチド1~20(3つすべてのGを含む)を含めるのが最も簡単である。実際に、このような方法で本明細書に記載されているような長さのR領域を使用することも簡単である。また、「R. 1-20」又はより一般的には「組込みR領域」(例えば、14ヌクレオチド長のR領域)として使用される特定の配列は、[1] RTステップでのアニーリングを可能にするために、R領域配列が5' R領域の配置と「埋め込まれた」3' R領域の配置との両方で使用され、[2] 5' R領域配列がGUリッチDSEに作動可能に連結し、及び好ましくは[3] 5' R領域+DSE配列がステムループを形成する限り、HIV-1 Rに対して異種であり得ることも認識される(これがRSV由来のR領域配列で実証された実施例4を参照されたい)。

10

20

30

40

50

#### 【1229】

次に、埋め込まれたR. 1-20の下流に「CA」又は「CA」モチーフのタンデムセットを挿入して、ポリアデニル化切断部位として「提供」することができ；よって、この切断部位はR. 1-20配列の下流でDSEの上流に位置することになり、ヌクレオチドR. 1-20の後に切断が可能になり、この切断部位は、第1の鎖転移時にssDNAにアニーリングするために保持される。

#### 【1230】

図3は、上記の概要を提示し、本発明以前には未解決であった2つの主要な関連問題を整理したものである。それらは以下の通りである：[1] 効率的なポリアデニル化効率を達成するために、異種ポリアデニル化配列内にR領域からの配列をどれだけ埋め込むことができるか(すなわち、PASと切断部位/DSEとの間にR領域配列をどれだけ保持できるか?)、及び[2] 効率的な第1の鎖転移を維持しながら[1]を可能にするために必要なR領域配列相同性の最小量は何か? よって、非常に効率的なポリアデニル化を可能にするために報告されたポリA配列(USE、pAシグナル、切断部位、DSE/GUボックス)のおよその距離許容差(distance tolerances)を考慮すると、本発明以前は、効率的なポリアデニル化とRTステップ中の第1の鎖転移との両方を可能にするために、pAシグナルと切断部位との間に十分な「R」配列を挿入できるかどうかは知られていなかった。本実施例では、SV40後期ポリアデニル化配列をレポーターカセット内に配置した3つのわずかに異なるバリエーションを生成して、これを試験した(図4)。SV40後期ポリA配列はよく特徴付けられており、USEとDSEとの両方を含有する。SV40後期ポリA配列は、プロモーター-GFP-3' SIN-U3配列の下流及びIRES-シフエラーゼオープンリーディングフレームの上流に配置された。3つの「Rに埋め込まれた」バリエーションは以下の通りであった：[1] HIV-1 Rのヌクレオチド1~

20 (R. 1-20)、[2] HIV-1 Rのヌクレオチド1~60 (R. 1-60)、及び[3] HIV-1 Rのヌクレオチド1~20に、ステムループが形成されるように設計された下流配列を付加したもの (R. 1-20c) (これは、pAシグナルとGUリッチDSEとを空間的により近付け、ポリアデニル化効率を向上させる可能性があるかどうかを評価するために行われた)。「R. 1-20c」バリエーションを、GUリッチDSEに空間的に近接したまま、この領域に追加配列を挿入できるかどうかを評価するために生成した。そこで、これらのRに埋め込まれたSV40後期ポリA配列の転写リードスルーのレベルをルシフェラーゼ活性で測定した。これらのバリエーションをSIN-LTR (「RU5」) 及び変更されていないSV40後期ポリA配列と比較した (図8)。これらのデータから、SV40後期ポリAが標準的なSIN-LTRよりも約50倍効率的であり、R. 1-20に埋め込まれたSV40後期ポリAは20倍効率的であることが実証された。他の2つのバリエーションは標準的なSIN-LTRより5倍以下でより効率的であった。よって、このデータは、標準的なRU5配列の転写リードスルーが、強力なSV40後期ポリA配列よりもほぼ50倍大きく、SV40 pAのpAシグナルと切断部位/GUリッチDSEとの間の配列をHIV-1 R領域のヌクレオチド1~20で置換しても、標準的なRU5配列よりも20倍効果的なポリA配列が得られることを示す。したがって、異種ポリアデニル化配列にR配列を埋め込んでも、SIN-LTRよりも実質的に改善された効率的なポリアデニル化活性が得られることが実証された。

10

#### 【実施例2】

##### 【1231】

20

「Rに埋め込まれた」SV40後期ポリA含有SIN-LTRを用いるLV発現カセットは、高力価のLVストックを生じ得る。

適切な文脈でポリアデニル化を評価し、LV力価への影響 (すなわち、第1の鎖転移ステップの代用尺度) を評価できるようにするために、次いで、実施例1に記載したものと同一Rに埋め込まれたSV40後期ポリAバリエーションを、完全LVゲノム発現カセットにクローニングした。したがって、これらのLVゲノム発現カセットの下流にIRES-Lucレポーター配列を付加した (図9)。3' SIN' LTRのネイティブHIV-1 PAsを変異させた追加のLVゲノムコンストラクト (「RU5-pA\_KO」) を生成した。HEK293T細胞にこれらのコンストラクトをLVパッケージングプラスミドと共にトランスフェクトして、力価測定用の清澄化ベクターを生成し、生成後の細胞をルシフェラーゼアッセイしてリードスルー (ポリA活性) を測定した。興味深いことに、「RU5-pA\_KO」対照のリードスルー活性は2~3倍を超えて増加せず、SIN-LTRが乏しいポリアデニル化活性しか含有しないという前提を支持した。よって、このデータは、標準的な3' RU5配列がLV生成時に弱い活性であることを示し、これは、pAノックアウトRU5バリエーションが2倍しかリードスルーが大きくならなかったからである。

30

##### 【1232】

驚くべきことに、かつ対照的に、変更されていないSV40後期ポリAコンストラクトは、この実験ではリードスルーが約100分の1倍低かった。重要なことに、Rに埋め込まれた3種類のSV40後期ポリAバリエーションはすべて、標準的なSIN-LTRよりも10分の1~50分の1倍低いリードスルーを示したことであり、R. 1-20バリエーションは変更されていないSV40後期ポリAの2分の1~3分の1倍以内であった (図9A)。LV力価への影響という点では、R. 1-20に埋め込まれたバリエーションは、生成されたすべてのLVの中で最も高い力価を示し (図9B)、IRES-Lucレポーターを下流に有さない標準的なSIN-LTRカセット (「RU5 [ΔLuc]」) であるもう一つの対照と同等であった。このことは、R. 1-20に埋め込まれたバリエーションでは、すべての転写終結事象が操作されたSIN-LTRで起こっているのに対して、標準的なSIN-LTR対照 (RU5) では、ほとんどがLucレポーターの下流で利用されているSV40ポリAまで読み込まれており、vRNAが長くなっている (したがって、「RU5 [ΔLuc]」対照と比較して力価がより低い) ことを示す強力な証拠となった。予想されたように、変更されていないSV40後期ポリAバリエーションは、効率的な第1の鎖

40

50

転移に利用可能な R 配列がないため、予想されたように実質的に低い力価を生じ、R・1-20c バリエーションも、活性のある LV をより低いレベルで生じ（すなわち、R・1-20c バリエーションは効率的に LV を生成しなかった）、これはおそらく、人工ステムループが第 1 の鎖ステップ又は逆転写の他の態様に影響を与えたためであろう。R・1-20 バリエーション及び R・1-60 バリエーションは高い LV 力価を生成したが、ポリ A 活性の点では R・1-20 バリエーションが優れていた。とはいえ、R・1-60 バリエーションはポリ A 活性と LV 力価との両方を改善したが、R・1-20 で観察されたレベルには達していなかった。これらのデータは、R に埋め込まれた異種ポリ A デニル化配列が、3' RU5 を完全に置き換えるために使用され、LV ゲノムの転写終結が、標準的な SIN-LV ゲノム発現プラスミドで典型的に用いられる「バックアップ」ポリ A デニル化配列（この場合、IRES-Luc レポーターの下流のポリ A 部位によってモデル化される）を必要とすることから「解放」され得るという最初の証拠を与えた。よって、本発明のレンチウイルスベクターゲノムでは、3' LTR の下流に追加のポリ A 部位を使用する必要はない。挿入される R 領域の長さは 60 ヌクレオチドまで可能であるが、ちょうど 20 ヌクレオチドが「最適な」長さに近いようである。実施例 8 は、効率的なポリ A デニル化活性とのバランスにおいて、第 1 の鎖転移に必要な正確な長さに関する詳細な情報を提供する。

10

#### 【実施例 3】

##### 【1233】

GU リッチ DSE を LV ゲノム vRNA の 5' R 領域の最初のステムループ中に操作するための設計上の考慮点。

20

図 5A は、本発明の 3' SIN-LTR 改変（R に埋め込まれたポリ A）を、5' R 領域に何ら改変を有さない LV ゲノム発現カセット内に用いられた結果を実証する。要約すると、組み込まれたカセットを挟む改質 SIN-LTR は、SIN-U3 領域に PAS（+/-USE）を保有するが、ネイティブの HIV-1 GU リッチ DSE は約 100 ヌクレオチド下流に存在する（図 6 も参照されたい）。USE（SV40 後期ポリ A 由来など）の使用は、この距離からネイティブ HIV-1 PAS からのポリ A デニル化を促進するように作用するかもしれないが、GU リッチ DSE を異種 PAS の近くに配置するためには、LV ゲノム発現カセットの 5' R 領域は必然的に改変を必要とする（図 5B を参照されたい）。RSV 及び MMTV などの他のレトロウイルスの 5' 末端の最初のステムループは GU リッチ配列があり、その U3 コアプロモーター配列内の PAS に「サービス」している可能性が高いことが注目された。「サービス」とは、GU リッチ配列がその U3 コアプロモーター配列内で PAS のエンハンサーとして機能することを意味する。一般的に、レトロウイルスには、5' 末端にステムループ構造（例えば HIV-1 の TAR ループ）を維持する選択圧があるようであり、これはおそらく vRNA の安定性を確保するか、パッケージング配列内の下流の二次構造が正しく形成されるようにするためであろう。このことは、tat に依存しないように操作された HIV-1（すなわち、TAR ループは転写誘導にもはや必要とされない）でも同様であることが他の研究者によって示されており、さらにこれらの tat 非依存性 HIV-1 は継代後に 5' ステムループを「再生」し、このループは複製の改善と関連している（Das et al. (2007) J. Virol. 81: 7742-8）。したがって、GU リッチ DSE を含有するように TAR ループを操作すると、やはりステムループ構造を形成すると予測される配列になることが好ましい。操作は、R に埋め込まれた異種ポリ A 配列に利用される好ましい配列に応じて、さらに制約を受けてもよく、又は制約を受けなくてもよく、この配列は、第 1 の鎖転移を可能にするために、好ましくは同じである。

30

40

##### 【1234】

したがって — 非限定的な例であるが — HIV-1 R の最初の 18/20 ヌクレオチドは保持されるが（ステムの反対側で塩基対合を形成するヌクレオチドも保持される）、TAR ループは RSV、MMTV 又はベータグロビンの DSE に基づく GU リッチ配列を含む異種配列で置き換えられるように、いくつかの「ハイブリッド」TAR ループをインシリコで設計した（表 1 及び図 10）。図 10 に表示したステムループ構造は、

50

明確化のために 1 G v RNA のバリエーションに基づく。これらのバリエーションを R S V 又は M M T V の R 領域の 4 4 ~ 4 5 ヌクレオチドを H I V - 1 の R と入れ替えたバージョンと共に異なるコンテキストを反映するポリ A / ルシフェラーゼレポーターコンストラクトにクローニングした (図 1 1)。異なるレポーターは、パッケージングシグナルに存在する (組み込まれた 5 ' S I N - L T R をモデル化する)、又は存在しない (組み込まれた 3 ' S I N - L T R をモデル化する) 追加の下流配列、並びに S I N - U 3 内の U S E の存在 / 非存在及び / 又は変異したネイティブ H I V - 1 P A S などの他の任意の特徴を含有した。図 1 2 は、標準的な S I N - L T R、改変されていない S V 4 0 後期ポリ A、R . 1 - 2 0 に埋め込まれた S V 4 0 後期ポリ A (3 ' s u p A - L T R)、及び R S V 又は M M T V の R . 1 - 4 4 / 4 5 を含有するいくつかのバリエーションのポリ A デニル化活性の初期比較を提示する。これらのデータは、S V 4 0 U S E のみを使用すると S I N - L T R のポリ A デニル化活性が改善される一方で (Schambach et al. (2007) Molecular Therapy 15:1167-1173 及び米国特許出願公開第 2 0 1 9 0 2 7 6 8 4 4 号明細書によって示されている)、S V 4 0 後期ポリ A 配列や、S V 4 0 後期ポリ A G U リッチ D S E の上流に埋め込まれた R . 1 - 2 0 を含有する 3 ' s u p A - L T R 構成 (L V 生成にのみ関連する) ほど効率的ではなかったことを示す。このことから、G U リッチ D S E を S I N - U 3 を含有する P A S の近くに配置することで、ポリ A デニル化活性をさらに改善できることが示された。R S V 又は M M T V の R . 1 - 4 4 / 4 5 配列のいずれかを配置した結果、M M T V の R 配列がポリ A デニル化活性に最大の利益をもたらすことが示されたが、R S V の場合は、下流のネイティブ H I V - 1 P A S / D S E の存在も完全な活性に必要なようであった。M M T V の R 配列は、ネイティブ H I V - 1 の P A S / D S E 配列が下流に存在するかどうかにかかわらず、非常に効率的なポリ A デニル化活性 (改変されていない S V 4 0 後期ポリ A と同等) を可能にした。

10

20

30

40

50

#### 【1 2 3 5】

次に、新規の G U リッチ配列 (R S V 及び M M T V の D S E に基づく) が D S E として機能するかどうかを評価するために、T A R / ハイブリッド R の 4 つのバリエーション (表 1 及び図 1 0 を参照されたい) を同じポリ A / ルシフェラーゼレポーターカセットで試験した。図 1 5 にこの実験の結果を示すが、4 つのバリエーションすべてが標準的な S I N - L T R と比較してポリ A デニル化活性が改善されている一方で、バリエーション「1 G R - G U 2」及び「1 G R - G U 5」は、下流の H I V - 1 P A S / D S E 配列の存在に依存しない形で、実質的に優れたポリ A デニル化活性を生成した。このように、ここで比較したバリエーションのうち、「1 G R - G U 2」又は「1 G R - G U 5」バリエーションのいずれかを含有する再現された s u p A - L T R は、転写リードスルーが最も少なく、この終結活性は、5 ' s u p A - L T R をモデル化した場合、ネイティブ H I V - 1 p A の存在にほとんど依存しなかった。

#### 【1 2 3 6】

これらの s u p A - L T R 配列で利用されるシス作用性エレメントのさらに深い解析は、M M T V の G U リッチ D S E 配列に基づく「1 G R - G U 2」バリエーションに焦点を当てて、ポリ A / ルシフェラーゼレポーターカセットで行われた。図 1 6 は、R . 1 - 2 0 に埋め込まれた S V 4 0 後期ポリ A (m o d S I N のみ) の使用だけをモデル化したバリエーション、すなわち図 5 A をモデル化したバリエーションを、完全な、再現された s u p A - L T R をモデル化したバリエーション、すなわち図 5 B をモデル化したバリエーションと比較した、この実験の結果を示す。U S E、P A S、及び下流のネイティブ H I V - 1 P A S のノックアウトを様々な組み合わせたサブバリエーションを生成し、試験した。この実験から得られた主な結論は、U S E は単独でもポリ A デニル化活性に実質的な利益をもたらすが、最も効率的なポリ A デニル化活性は、下流のネイティブ H I V - 1 P A S を不活化した場合に完全に再現された s u p A - L T R を利用した場合にのみ達成されるということである。

#### 【1 2 3 7】

【表 8】

表1. 野生型 HIV-1 TAR. 他的レトロウイルス SL1 及び合成ポリ A 配列と比較した、本発明の一態様を例示するために使用した操作された TAR/スチムルプ1の配列。HIV-1 TAR/SL1 配列が示されており(HIV-1 ポリ A シグナルは下流にある。図示せず)。矢印は当技術分野で公知の代替の転写開始部位を示す。黒色の矢印は「3G/2G」vRNA を表し、これは vRNA 翻訳(gagpol)の錐型と考えられるが、一方、灰色の矢印は「1G」vRNA であり、HIV-1 ゲノム RNA の最も効果的なパッケージング形態と考えられる。RSV 及び MMTV SL1 の配列は、関連する上流のポリ A シグナルとともに示されている。LV 力を換うことなく GU リッチ DSE を TAR に操作することができるかどうかを試験するために、示されたハイブリッド TAR/SL1 配列を使用した。薄灰色で示したスクロチドは、予測された SL 構造内で dsRNA を形成する可能性はないが(図10 を参照してください)。一方、下線で示したスクロチドは形成する。太字かつ大きなフォントサイズで示したスクロチドは GU リッチ DSE の位置を示す。より小さなフォントサイズで示したスクロチドはポリアデニル化切断の潜在的な領域を示す。合成ポリ A (SPA)配列はベータ-グロブリンの GU リッチ DSE に基づいており、pA シグナル、切断部位及び DSE の相対的な位置を示す。

| 名称        | 8'リAの7'位  | 10'G(2'N)の7'位                            | R領域15-7'12又は合成9'A配列                      |
|-----------|-----------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| HIV-1     | N/A       | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAGACTGCAGC</u>      | <u>GCCTCTTGGCTAACTAGGGAAC</u>            |
| RSV       | AATATAAG  | <u>GCCATTCTTAAGATTCAAC</u>               | <u>GGTGTCACCACTGGTTATGGG</u>             |
| MMTV      | AATATACTT | <u>GCACAGCTCTCAATTATCAAG</u>             | <u>TGTTGTTGTGCTGTGGG</u>                 |
| SFA       | AATAAA    | AGACTTTATTTCATATCATCTGTGTGGTTTTTGTGTG    |                                          |
| 3'/GR-GU1 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACA</u>            | <u>TGTGCACCTGGCTAACTAGGGAAC</u>          |
| 3'/GR-GU2 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACACAT</u>         | <u>GTGTTCTGTCTCACTTAGBGAAC</u>           |
| 3'/GR-GU3 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACAATGGTG</u>      | <u>ACTCGGTTCTCAACTAGGGAAC</u>            |
| 3'/GR-GU4 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACAATGGTG</u>      | <u>ACTCGGTTCTCTCAACTAGGGAAC</u>          |
| 3'/GR-GU5 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACAATG</u>         | <u>CGTGTGTTCTGTGCTGTCACTTAGSGAAC</u>     |
| 3'/GR-GU6 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACAATGGTG</u>      | <u>ACTCGGTTCTCTCAACTAGBGAAC</u>          |
| 3'/GR-GU7 | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACGGGACAGC</u>     | <u>TGSTGTGCTCACTTGGGTTCTCAACTAGGGAAC</u> |
| 3'/GR-GUR | AATAAA    | <u>GGGTCTCTCTGGTTAGACAACAACAAGAAGCTG</u> | <u>TGGTTTTTGTGTGCTCACTTAGGGAAC</u>       |

### 【实施例 4】

**【 1 2 3 8 】**

転写開始部位に単一のGヌクレオチドを有するLVゲノム発現カセットの転写を駆動するための新規CMV／RSVハイブリッドプロモーターの開発。

再現された  $supA-LTR$  のポリアデニル化活性を改善するために  $5'R$  領域を操作できることを実証する際に、 $LV$  力価に対するこれらの変化の影響を評価する前に、本発明者らは  $1G-vRNA$  の生成だけを可能にするプロモーターを操作しようとした。これは、 $3'supA-LTR$  においてより短い埋め込まれた  $R$  領域を用いる選択肢を提供するためでもあるが、野生型  $HIV-1$  では、 $1G-vRNA$  が  $3G/2G-vRNA$  と比較して優先的に二量化することが示されているため、 $LV$  生成中のすべての転写事象から  $1G-vRNA$  を合成できることに一般的に何らかの利点があるかもしれないからである。本発明者らは、野生型  $RSV$  が（コアプロモーターにその  $PAS$  を用いているのと同様に） $vRNA$  ゲノムの  $5'$  末端に単一の「 $G$ 」を有しており、このプロモーターが転写開始複合体を正確な「 $G$ 」ヌクレオチド上に配置することができることを示していることに注目した。 $1G-TSS$  を有する  $CMV$  プロモーターを生成すると、驚くべきことに標準的な  $LV$  ゲノムカセット内の力価は  $3$  分の  $1 \sim 4$  分の  $1$  倍低くなり、 $TSS$  がわずかな変化に非常に敏感であることが示された（データは示さず）。 $CMV$  プロモーターは  $RSV$  よりも強力であるため、本発明者らは、 $CMV$  エンハンサー／プロモーター配列のパワーを保持しつつ、 $HIV-1$  に基づく  $LV$  の単一の「 $G$ 」での正確な転写開始を可能にする  $RSV$  からのコア配列も含有するプロモーターを生成しようとした。したがって、 $2$  つの  $CMV-RSV$  ハイブリッドプロモーターを設計した： $1$  つは  $CMV$  の  $TATA$  ボックスと  $TSS$  との間の配列を  $RSV-U3$  の類似配列に置き換えたもの（「 $CMV-RSV1-1G$ 」）、もう  $1$  つは  $RSV$  の  $TATA$  ボックス（上流の  $6nt$  を含む）を追加的に入れ替えたもの（「 $CMV-RSV2-1G$ 」）である。図  $18A$  を参照されたい。これらの  $2$  つのバリエーションは、ヌクレオチド番号  $3$ 、すなわち単一の「 $G$ 」ヌクレオチドから始まる  $5'R$  配列を含有した。さらに、 $CMV$  プロモーター全体を  $RSV-U3$  と入れ替えたバリエーション（「 $RSV-3G$ 」）も作製し、 $2$  つのプロモーターの相対的なパワーを評価するために使用した。これら  $3$  つのバリエーションはすべて、 $SV40$  後期ポリに埋め込まれた  $R-1-20$  を有する  $3'supA-LTR$  配列を含有する  $LV$  ゲノム発現カセットにクローニングした。第  $4$  のコンストラクトは、 $CMV-TAR$  配列の代わりに  $RSV-U3$  及び  $RSV-5'R$  領域のステムループ  $1$  の全体が使用され、これが、第  $1$  の鎖転

移を可能にするために同じ RSV R 配列が SV40 後期ポリ A に埋め込まれた代替の 3' supA-LTR LV ゲノムカセット中にクローニングされる場合に作製した (「RSV-1G [RSV SL1]」)。これらの LV ゲノム発現カセットは、下流に IRES-Luc レポーターカセットも含有した。コンストラクトは、標準的な LV コンストラクト (IRES-Luc レポーター配列を欠く) と共に、HEK293T 細胞で LV を作製するために使用した。ベクターの力価は、3' supA-LTR を有する改変されていない「CMV-3G」カセットと比較した相対力価として図 18B で報告されており、両方の CMV-RSV ハイブリッドプロモーターが対照の 2 倍以内の LV 力価を生じることができたことを示し; 実際に、CMV-RSV2-1G バリエントは対照よりもわずかに多くの力価を生成した。興味深いことに、RSV-1G [RSV SL1] / 3' supA-LTR [RSV R. 1-44] 発現カセットは、対照の 4 倍以内の LV 力価を生じ、利用した特定の「R」配列がネイティブ HIV-1 配列と異なり得ることを実証した。よって、新規の CMV-RSV ハイブリッドプロモーターは、TSS に単一の「G」ヌクレオチドを有するだけで、LV vRNA を特異的に生じるといふ、この種のものとしては初めてのものである。

10

#### 【実施例 5】

##### 【1239】

GUリッチ配列の 5' R への挿入が形質導入細胞における LV 力価及び転写リードインに及ぼす影響の初期評価。

20

LV の vRNA R 領域の最初のステムループが GUリッチ配列を含有するように操作されることが LV の力価に影響するかどうかを評価するために、バリエントのいくつかを、EFS-GFP 導入遺伝子と 3' supA-LTR の特徴 (SIN-U3+R. 1-20 に埋め込まれた SV40 後期ポリ A) とを含有する LV ベクターゲノムカセットにクローニングした。これらの LV ゲノム発現カセットは CMV-RSV-1G ハイブリッドプロモーターによって駆動された (実施例 4)。ベクターは最初に接着 HEK293T 細胞で生成され、形質導入及びフローサイトメトリーにより清澄化ベクター採取物を力価測定した。図 13 はこの実験の結果を表示したもので、バリエント 1GR-GU1 (影響はわずか) 及び 1GR-GU4 (影響はなし) に例示されるように、LV 力価に影響を与えることなく、実際に TAR ループをこのような方法で操作できることを実証する。

##### 【1240】

30

これらのバリエントを、標的細胞における 5' supA-LTR を介した転写リードインの評価に利用した。HEK293T 細胞を一致した感染多重度 (MOI) で形質導入し、10 日間継代して、組み込まれていない LV cDNA に由来する可能性のある RNA を希釈除去した。Psi 領域に対するプライマーを使用して、動員された vRNA を RT-qPCR で測定し、正規化した相対値又は組み込まれたコピーに対する正規化値で表示した (図 14)。これらのデータは、すべてのバリエントが 5' supA-LTR を介した転写リードインから組み込まれた LV カセットを保護したことを示す。

#### 【実施例 6】

##### 【1241】

本発明の様々な組合せが LV 力価に及ぼす影響のさらなる特徴。

40

GUリッチ DSE を含有する最初の改変された 5' R バリエントのうち、バリエント「1GR-GU2」及び「1GR-GU5」は、再現された組み込まれた SIN-LTR 内で評価した場合、最高のポリアデニル化活性を生成した (図 15 を参照されたい)。しかしながら、懸濁無血清 HEK293T 細胞中で生成した LV の力価に対するこれらの改変の影響を最初に評価したところ、これらは力価に減衰を与えることが示された (図 14 のこれらのバリエントの転写リードインの評価ができなかった主な理由である)。様々な調査を通して、これらのバリエントの力価で観察された損失の大きさの一部又はすべては、特に 3' SIN LTR 内に USE を用いた場合、バックアップポリアデニル化配列の存在によるものであることが驚くべきことに発見された。これは図 19 に提示したデータから明らかであり、USE を用いただけで力価が約 5 分の 1 倍低下したが、これは下流のバツ

50

クアップSV40後期ポリA配列を利用したLVゲノムプラスミドでのみ起こった。バックアップポリAを欠失させると、LVの力価はUSEを保有するLVゲノムでのみ上昇した。よって、このデータは、3'supA-LTRにSV40後期ポリA USEを用いる場合、バックアップポリA配列を欠失させることが可能であり、欠失させることさえ好ましいことと示す。これは、3GR-GU2又は1GR-GU2の5'で改変されたR領域とバックアップポリA配列を有さない3'supA-LTRとを用いるLVゲノムカセットの生成をもたらし、最大LV力価を生成することができた。

#### 【1242】

次いで、5'及び3'supA-LTRの特徴を、バックアップポリA配列のないコンストラクト、及び他の可変的／任意的態様、すなわち5'LTR PAS変異及び「MSD-2K0m5」改変との関連で評価した（図20）。MSD-2K0m5改変は、パッケージングシグナルのメジャースプライドナー（MSD）領域からの異常スプライシングを、その中のSL2ループを操作することによって効果的に除去する。MSDの変異はLV力価の低下をもたらすが、パッケージング領域内の配列にアニールすることができる改変されたU1 snRNAの同時発現によってこれを回復することができる。バリエーション256U1を使用して、試験したすべてのMSD-2K0 LVゲノムの力価を救済した。変異したネイティブ5'LTR PASを保有するすべてのゲノムは、3'supA-LTR PASが変異しているものを除いて、高力価のLVを生じ、このことは、LV SIN-LTRを操作するこの新たなアプローチが、ネイティブの5'LTR PASの存在とは全く無関係に、導入遺伝子カセットに効率的な転写終結シグナルを供給するのに十分有効であることを実証する。この実験ではまた、GUリッチDSEを含有する操作された5'R配列が、LV生成中に3'supA-LTR配列の「埋め込まれた」R配列としても用いることができること、及び新規のGUリッチDSEが、埋め込まれた異種ポリA配列（この場合はSV40後期ポリA GUリッチDSE）のDSEと機能的に置き換えることができること、さらにLVゲノム発現カセットの下流のいかなる「バックアップ」ポリAにも依存しないことが実証された。このことは、「Rに埋め込まれた」異種ポリA配列が、十分に特徴付けられたポリアデニル化配列、又は機能的な構成部分（すなわち合成）から構成され得ることを実証する。

#### 【実施例7】

#### 【1243】

#### 「supA-2pA-LTR」の開発

LVゲノムの逆転写中にLTRが行う分子運動は、その中にコードされるポリアデニル化配列を改良する別の機会を提供する。組み込まれたLVカセットへの細胞プロモーター由来の転写は、上流から起こり得る（すなわち、5'SIN-LTRへのリードイン）だけでなく、原理的には下流から3'SIN-LTRへのリードインも起こり得る（これは本質的に、LVが最も近い活性細胞プロモーターに対していずれかの方向で組み込まれたことから生じる）。したがって、組み込まれたLVカセットを近くの「外部」転写開始事象から完全にインスレートするためには、アンチセンス方向に有効なポリアデニル化配列をコードすることも望ましい。これは、LV導入遺伝子カセットが、例えば双方向カセットの一部として、導入遺伝子プロモーター干渉及び／又はLV／導入遺伝子配列の望ましくない動員を避けるために、逆向きになる（すなわち、vRNAに対してアンチセンスにコードされる）場合に特に望ましいであろう。実際、活性細胞プロモーターに「面する（face）」組み込まれたLVはすべて、dsRNAを生成する確率が高くなるため、dsRNA感知機構に従うことが考えられる。よって、かなりの数の形質導入標的細胞が、さらにPKRに媒介されるアポトーシスにさらされる可能性がある。図21は解決策を提供し、それによってsupA-LTRアプローチは、ΔU3とRに埋め込まれた異種ポリアデニル化配列との間の3'supA-LTRに、アンチセンス方向の機能的ポリアデニル化配列を挿入することによってさらに開発される。この特徴の結果及び目的は、組込み部位の下流にある細胞プロモーターからの転写リードインを低減させることであり、さらに、単独又は双方向性導入遺伝子カセットの一部として用いられる場合には、逆向きの導入

遺伝子カセットに「バックアップ」ポリアデニル化配列を提供することである。よって、この結果は、組み込み後に5'及び3'の「supA-2pA-LTR」が生成され、効果的に、LTRは強力な双方向ポリアデニル化配列を含むことになる。この結果、組み込まれたLVの両側のクロマチンからの転写リードインとリードアウトとから「保護」されることになる。

#### 【1244】

図53は、実際に効率的な双方向ポリアデニル化配列をsupA-LTR配列中に操作して、上流及び／又は下流の細胞プロモーターからの転写「インスレーション」をモデル化した新規な構成を生成できることを示す最初の実験について報告している。SV40後期ポリアデニル化配列を利用した以前の実施例では、後期USE-PAS配列を含むこの双方向ポリA配列の「後期」方向を使用する。この配列は「初期」方向（すなわち下の鎖）の2つのPASも包含しているが、この配列は初期ポリAのGUリッチDSEを欠いている。したがって、このネイティブ配列は後期USEの上流に延長され、初期ポリA配列にそのネイティブDSEを逆向きの方向に効果的に提供した。さらに、別のバリエーションは、ネイティブのSV40初期DSEの代わりに、MMTVのGUリッチDSEに基づいたGUリッチDSEを利用した。これらのデータは、標準的なSIN-LTRと比較して、本明細書に記載の改変により、上流（すなわち、上の鎖上）からの転写リードインを10分の1倍まで停止させるだけでなく、下流（すなわち、下の鎖上）からの転写リードインも、「ポリAなし」（標準的なSIN-LTRが下の鎖上に認識可能なポリA配列をもたらさないことを考慮）と比較して、約100分の1倍まで低減させることもできることを示す。コンストラクト6/7に基づく配列を、5'R改変を含むLVゲノム発現カセット（3GR-GU2）の3'supA-LTRにクローニングして、supA-2pA-LTR-LVストックを標準的なLVと同じに（又は2分の1倍以内で）生成し（データは示さず）、このことは、supA-2pA-LTR内のこれらの追加の逆向きの配列が、ベクター生物学の他の態様、例えば、第1の鎖転移／逆転写に対して有害ではないことを実証した。

#### 【実施例8】

#### 【1245】

効率的なポリアデニル化／転写終結及びLVアウトプット力価を可能にする3'supA-LTRの一部として、異種ポリアデニル化配列内に埋め込まれた最小R配列を定義する。

効率的なポリアデニル化／転写終結を可能にし、効率的な第1の鎖転移（LV力価で測定）を可能にする、3'supA-LTRの一部として異種ポリアデニル化配列内に埋め込むことができる最小のR配列を経験的に決定した。SIN-U3領域（ΔU3）のすぐ下流のSV40後期ポリアデニル化配列を含有する3'supA-LTRに、ヌクレオチド1からヌクレオチド20までのHIV-1R領域配列を埋め込み、すなわち、これらのR配列は、異種PASと切断部位／GUリッチDSEとの間に挿入した。これらの3'supA-LTRをポリアデニル化ルシフェラーゼポーターカセットに挿入して試験し（図4及び11を参照されたい）、配列長要件を経験的に試験した（図3Bに示す）。バリエーションは10～20ヌクレオチドで全長が異なり、また「3G」又は「1G」の文脈のいずれかが試験された群に形成された。3G/1G配列は、vRNAが5'LTRから転写されるため、3G又は1Gの転写開始部位のいずれかが用いられるシナリオを反映したものであり、そのため最初の鎖転移中にアニーリングすると一致することになる。懸濁（無血清）HEK293T細胞に、トランスフェクション効率対照としてpDsRed-Expressと共にこれらのコンストラクトをトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を正規化した。これらのデータは、本発明の他の箇所で使用される「R.1-20」配列と同じであり、標準的なSIN-LTRと比較して約20～100倍改善されたポリアデニル化／終結活性を媒介することが以前に示された「3G-R20」バリエーションに対して正規化し、図22に提示する（図8、9、12、15を参照されたい）。これらのデータは、3G-R20/R.1-20バリエーションよりも、埋め込まれたR配列の長さをさらに

短くすることによって、2～3倍改善されたポリアデニル化／終結が達成されたことを示しており、PASを下流の切断部位／GUリッチDSEにより近い位置に配置することが望ましかったことを示す。

#### 【1246】

これらの3' supA-LTRバリエーションをLVゲノム発現カセットに用いて、実用的な出力力価を得られるかどうかを評価するために、EFS-GFPレポーターをコードするベクターカセット内に用いた(図23)。すべてのゲノムはCMVプロモーターと3GTSとによって駆動される5'LTRを使用し、ネイティブHIV-1の5'PASは変異した。このデータは、埋め込まれたR配列が、LV力価に影響を与えることなく、12～14ヌクレオチドに低減できることを示す。10ヌクレオチドのR配列の使用は、LV力価を最大10分の1まで低減させた。

10

#### 【1247】

したがって、最適な3' supA-LTRは、異種ポリアデニル化配列内に埋め込まれたR配列のわずかに14ヌクレオチドを含有し、高力価のLV生成を可能にする一方で、転写の非常に効率的なポリアデニル化／終結を可能にする(すなわち、第1の鎖転移は影響を受けない)。

#### 【実施例9】

#### 【1248】

supA-LTRを保有するレンチウイルスベクターの使用により、標的細胞における導入遺伝子の発現を増加させることができる。

20

本発明の改善されたポリアデニル化配列が、導入遺伝子タンパク質発現の増加にもつながるかどうかを調べるために(すなわち、転写終結を改善することによって間接的に、翻訳のためのmRNA利用可能性の増加につながる)、本発明のいくつかのLVゲノム発現カセットを使用して、懸濁(無血清)HEK293T細胞から清澄化LV採取物質を生成した。図24は、用いたLVゲノム発現カセット(すなわち、主に5'及び3'で改変されたLTR)の主な特徴、逆転写(及び組込み)時に生じた結果としてのsupA-(SIN)-LTR、並びに標的細胞における正規化導入遺伝子発現データの要約を表示する。すべてのsupA-LTR LVゲノム発現カセットは、3' supA-LTRの一部としてΔU3の下流にRに埋め込まれたSV40後期ポリアデニル化配列を含有した。埋め込まれたRは、3GR-20配列又は本発明における5'R改変として利用される3GR-GU2配列のいずれかであり；後者はGUリッチDSEも提供したので、SV40後期ポリA GUリッチDSEはこれらのコンストラクトから欠失した。5'LTRにおいて、CMV-3Gプロモーターを、改変されていない5'R(TAR/SL1ループ)又は使用した3GR-GU2配列のいずれかで使用した。ネイティブHIV-1の5'ポリAシグナルとメジャースプライスドナー(MSD)とは任意に変異し；MSD変異LVゲノム(すなわち、MSD-2KO LV)は、生成力価を高めるために256U1の存在下で生成した。LVストックを、フローサイトメトリーにより、接着HEK293T細胞の形質導入によって力価測定し、生物学的力価(GFP TU/mL)を得た。次に、新鮮な接着HEK293T細胞を、すべてのベクターについてMOI 2で形質導入し、続いて10日間継代し、パッケージングシグナル(Ψ)に対してqPCRによる組込みアッセイを行った。細胞はフローサイトメトリーでも解析されて、陽性パーセントと蛍光強度の中央値とを得て、これらに乗じてGFP発現スコアを得た。これらをLVのコピー数に従って正規化し、標準的なSIN-LTRを100%に設定した対照LVと比較した。このデータは、supA-LTRを含有するLVの導入遺伝子発現が、標準的なLVと比較して最大140%まで増加し得ることを示し、かつ最大の増加が、下流のネイティブHIV-1が変異したUSE-PAS-3GR-GU2配列を含有するLVで観察されたことを示す。

30

40

#### 【1249】

これらの初期実施例は、LV内のネイティブHIV-1ポリアデニル化配列が、supA-LTR LVを生成するために、5'LTRと3'LTRとの両方において、特定の正

50

確な構成で、より効率的な異種配列と置き換えることによって、欠失させ、及び／又は機能的も冗長にさせることができることを実証する。これらの新規ベクターは高いアウトプット力価まで生成することができ、組み込まれたLVの転写リードイン／アウトを減少させ、導入遺伝子の発現を改善する。

#### 【実施例10】

##### 【1250】

レトロウイルスベクターゲノム（例えばレンチウイルスベクターゲノム）内の導入遺伝子カセットの3'UTRにおける新規シス作用性配列の配置

本発明は、ウイルスベクター導入遺伝子カセットの3'UTR内に、コンセンサス配列BMWGHWSWS（配列番号92）、例えばCCAGATCCTG（配列番号98）に基づく複数の「細胞質蓄積領域」（CAR）エレメント（CARE）又は「タイル」を、単独で、又は転写後調節エレメント（PRE）及び／若しくはZCHC14結合ループなどの他のシス作用性エレメントと組み合わせて使用することを記載する。本発明は、主に2つの文脈で使用することができる：[1]「カーゴ」スペースが制限されないウイルスベクターゲノム内で、したがって標的細胞において、CARエレメントは、wPREなどの別の3'UTRエレメントを含有する導入遺伝子カセットの発現をさらに増強する、又は[2]カーゴスペースが制限されるウイルスベクターゲノム内で（すなわち、用いられるウイルスベクター系のパッケージング「限界」で、又はそれを超えて、又はそれを実質的に超えて）、したがって、CARエレメントがwPREなどのより大きな3'UTRエレメントの代わりに使用され得、よって、ベクターゲノムサイズを低下させる一方で、いずれかの3'UTRシス作用性エレメントを欠くベクターゲノムと比較して標的細胞における導入遺伝子発現も増加させる。単純化すれば、当業者はこれら2つの選択肢のいずれかを追求する際の「正味の」利益を経験的に決定する。正味の利益とは、本質的に、治療効果を媒介するために標的細胞において望ましいレベルの導入遺伝子発現をもたらす一方で、上記のシス作用性エレメントの組合せの有無にかかわらず達成され得る実用的な最大ベクター力価に対するベクターゲノム総サイズの影響を決定することである。例えば、レンチウイルスベクターが、ベクターゲノムサイズが約9.5kb（野生型HIV-1のサイズ）を超えるような大きな導入遺伝子を送達するために用いられる場合 — 例えば10～13kb — ウイルスベクターの力価は著しく低下する可能性が高い（Sweeney and Vink, 2021）。アウトプット力価は、9.5kb未満のベクターゲノムの力価よりも桁違いに低い場合がある。このような場合、wPREなどの大きなエレメントではなく、CARE及び／又はZCHC14結合ループなどの小さなシス作用性エレメントを用いることによってベクターゲノムのサイズを低減する方が、たとえ標的細胞における導入遺伝子の発現がwPREの使用と比較してわずかに、あるいは小幅に低下したとしても、より有利である可能性がある（したがって、正味の利点はベクターの力価と標的細胞における導入遺伝子の発現のバランスをとることである）。AAV及びAdVなどのウイルスベクター系では、ベクターゲノムパッケージングの閾値はもっと厳しく、AAVの最適サイズは4.7～5.3kbの範囲（場合によっては約6）である（Wu et al., 2010）。AdVでは、ベクターゲノムの最大サイズは34～37kbと考えられ、導入遺伝子配列に利用可能なスペースは、「ガット化」ベクターが用いられるか第一／第二世代ベクターが用いられるかによって異なる（Ricobaraza et al., 2020）。

##### 【1251】

一般的に、レンチウイルスベクターゲノムなどのレトロウイルスベクターゲノム内にコードされた導入遺伝子カセットの3'UTRは、逆転写と組み込みに必要なエレメント；すなわち、それぞれ3'ポリプリン鎖（3'ppt）とDNAアタッチメント（att）部位とも保有する。3'pptは、逆転写中にRTプラス鎖DNAのRNase H活性によってウイルスRNAから生成され、15ヌクレオチドのプライマーとなる。3'pptはほとんどのレトロウイルスで高度に保存されており、プラス鎖開始部位として選択的に使われることが示されている（Rausch and Grice, 2004）。att部位は、組み込みに重要な末端配列として定義される。att部位は5'LTR末端のU3配列と3'LTR

10

20

30

40

50

末端の U 5 配列とを含む (Brown et al., 1999)。ある特定の状況下では、レトロウイルスウイルスベクターを使用する場合、導入遺伝子カセットの 3' UTR における追加エレメントの配置は、これらの構成成分に対して考慮されるべきである。例えば、ベクターゲノムと同じ方向の導入遺伝子カセットを含有する組込み機能が保たれているレトロ／レンチウイルスベクターゲノムでは、導入遺伝子カセットとベクターゲノムカセットとの両方が 3' LTR 内に同じポリアデニル化 (転写ターミネーター) 配列を利用するので、導入遺伝子 3' UTR は必然的に 3' p p t 及び U 3 a t t 配列を含有することになる。

#### 【1252】

したがって、導入遺伝子カセットがレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向である場合、本明細書に記載の新規シス作用性配列 (例えば、C A R 配列、及び／又は Z C C H C 1 4 タンパク質結合配列) が、3' p p t 及び a t t 部位が破壊されないように導入遺伝子カセットの 3' UTR 内に配置されるように特別な注意を払うべきである。適切な配置を図 25 に示す。他の適切な配置もまた、本明細書で提供される開示に基づいて、当業者によって特定され得る。

10

#### 【1253】

例えば、3' p p t 部位及び a t t 部位の両方を含むコア配列 (例えば、本明細書に記載されているレンチウイルスベクターゲノム発現カセットの) は、配列番号 93 の配列を有し得る (3' p p t は太字であり、a t t は下線である) :

5'-AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCAC-3' (配列番号 93)

20

#### 【1254】

したがって、導入遺伝子カセットがレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向である場合、上記の配列 (配列番号 93 の) が本明細書に記載の新規シス作用性配列によって破壊されないことが好ましい。

#### 【1255】

一例では、配列番号 94 の配列は、3' p p t 及び a t t 部位 (例えば、本明細書に記載されているレンチウイルスベクターゲノム発現カセットの) を提供するために使用され得る (3' p p t は太字であり、a t t は下線である) :

5'-CCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCT

AATTCACTCCCAA-3' (配列番号 94)

30

#### 【1256】

したがって、導入遺伝子カセットがレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向である場合、上記の配列 (配列番号 94 の) が本明細書に記載の新規シス作用性配列によって破壊されないことが好ましい。

#### 【1257】

好ましくは、導入遺伝子カセットがレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向である場合、導入遺伝子カセットの 3' UTR 内のシス作用性エレメントは、上記の中断されていない配列の上流及び／又は下流に配置され得る。図 25 はまた、C A R e 及び／又は Z C C H C 1 4 結合ループが、P R E の有無にかかわらず、導入遺伝子配列が順方向又は逆方向の L V ゲノム発現カセット内にどのように可変的に配置され得るかを示す。

40

#### 【1258】

ウイルスゲノム発現カセットの 3' p p t 及び a t t 部位に対する新規シス作用性配列の配置に関する上記の考察は、導入遺伝子カセットがレトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順向きにある場合にのみ適用される。このような新規シス作用性エレメントを用いる導入遺伝子カセットがレトロウイルス／レンチウイルスベクターゲノムカセットに対して逆向きである場合 (図 25 を参照されたい、「逆向きの」導入遺伝子カセットが示されている)、導入遺伝子の 3' UTR はレトロウイルスベクターゲノム発現カセ

50

ットの3' p p t及びa t t部位から空間的に離れており、その結果、新規シス作用性配列が導入遺伝子3' U T R内のどの位置に置かれても3' p p t及びa t t部位を破壊することはできない。

#### 【実施例11】

##### 【1259】

経験的試験のための導入遺伝子カセットの3' U T Rにおける、他のシス作用性エレメントを伴うか又は伴わないC A R配列の一般的配置

図26は、C A R配列を単独で、又はZ C C H C 1 4タンパク質結合配列と組み合わせ、ウイルスベクターの導入遺伝子カセットの3' U T R内にP R Eを伴って、又は伴わずに、どのように使用することができるかについて、より詳細に示す。図26Aは、C A Rエレメントのコンセンサス配列を示す(Lei et al., 2013からの改案)。H M C V R N A 2. 7とW H V w P R EとのZ C C H C 1 4結合ループのヌクレオチド配列と構造とを図26Bに示す。Z C C H C 1 4の、導入遺伝子m R N Aの3'領域への誘引により、Z C C H C 1 4-T e n t 4の複合体が得られ、ポリアデニル化m R N AのポリAテール内での混合テーリングが可能になる。混合テーリングは、標的細胞における導入遺伝子m R N Aの安定性を高める。複数のC A R e配列、例えば6個又は8個又は10個又は16個のC A R e配列(タンデムに繰り返される)を3' U T R全体に配置し、任意でポリA配列の上流に1又は2以上のZ C C H C 1 5結合ループと混合して、導入遺伝子タンパク質の発現を増加させる複合配列を生成することができる。これは合理的な設計によって行うことができ、例えば、C A R e配列の数を増やし、任意で異なる位置に1又は2以上のZ C C H C 1 4タンパク質結合配列と組み合わせたものを含む異なる導入遺伝子カセットを試験することができる。あるいは、導入遺伝子カセットの(セミ)ランダムライブラリーを作製して、数千から数千万以上のバリエーションを、例えば核酸バーコード化と組み合わせてゴールドゲートクロニングを使用して生成することもできる。このようなカセットを選択したウイルスベクターに直接挿入し、標的細胞で導入遺伝子の発現レベルを評価することができる。図26Cは、候補複合シス作用性エレメントを同定するために、このようなバリエーションが標的細胞において高い導入遺伝子発現を示すかどうかを試験し、スクリーニングし、選択する方法の概要を与える。

#### 【実施例12】

##### 【1260】

異なる標的細胞における導入遺伝子発現を増加させるためのレンチウイルスベクター導入遺伝子カセット内の新規C A R e含有3' U T Rの使用

レンチウイルスベクターゲノムを、種々の異なるプロモーターによって駆動されるG F P発現カセットを含有するように設計した；すなわち、E F 1 a(それ自身のイントロンを含有する)、E F S(イントロンを欠くE F 1 a)、ヒトホスホグリセレートキナーゼ(h u P G K)、ユビキチン(U B C；それ自身のプロモーターを含有する)及びU B C(イントロンを欠くU B C)。一般的に、w P R Eを欠失させ、この位置(「P o s 1」)のタンデム16× C A R e配列(C A R e. 16 t)から構成されるC A R配列(サイズ160 b p)を付加し、任意で、Z C C H C 1 4タンパク質結合配列(H M C V R N A 2. 7及びW H V w P R E由来)を位置1の下流(「P o s 2」)に挿入することにより導入遺伝子カセット3' U T Rバリエーションを作製した。w P R Eのみ、Δ w P R E、又は160 b pのC A R配列が逆向きのもの(C A R e. 16 t)で対照を作製した。パッケージングプラスミド(g a g p o l、V S V G、及びR R E／r e v依存性ゲノムのr e v)を用いて、一過性同時トランスフェクションにより懸濁(無血清)H E K 2 9 3 T細胞において、L Vを生成した。標準的なL Vゲノムを使用した研究もあれば、パッケージングシグナルのステムループ2(S L 2)内のメジャースプライスドナー(M S D)部位と隣接する潜在的スプライスドナー(c r S D)部位とが変異したL Vゲノムを使用した研究もある。この特徴により、S L 2領域からの異常なスプライシングはなくなったが、L V力価は低下した。これらの「M S D-2 K O」ゲノムの力価は、[1]パッケージングシグナルのS L 1にアニールする改変されたU 1 s n R N A(本明細書で使用

10

20

30

40

50

される「256U1」の例)の同時発現(参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2021/014157号パンフレット及び国際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい)、又は[2]RREをイントロン又はいわゆる「ベクターイントロン」(上記実施例を参照されたい)で置き換えることのいずれかを使用することにより回復させることができる。

#### 【1261】

LV生成からの清澄化した粗採取物を、形質導入細胞のフローサイトメトリー(「生物学的力価GFP TU/mL」)及び/又は組込みアッセイ(「組込みTU/mL」)のいずれかによって、接着HEK293T細胞上で力価測定した。LV prepの組込みTU/mLを達成した際に、Jurkat(T細胞株)、HEPG2(ヒト肝細胞癌細胞株)及びウマ初代細胞「92BR」(精巢線維芽細胞)などの代替細胞を、MOI 0.1~2の範囲の一致した感染多重度(MOI)で形質導入した。これらの形質導入細胞における導入遺伝子発現レベルをフローサイトメトリーで測定し、(GFP)導入遺伝子発現スコア(ES)は、%GFP陽性細胞に蛍光強度の中央値(任意単位)を乗じて得た。

10

#### 【1262】

表6及び8はこれらの実験の初期データを示し、図27~31はこれらのデータの一部をグラフ化して示す。

#### 【1263】

表6及び8。生成されたレンチウイルスベクターと、選択された形質導入標的細胞内での導入遺伝子発現の要約。表は、生成されたレンチウイルスベクターの種類を示す：標準的なRRE/rev依存性(STD RRE-LV)、U1/RRE依存性MSD変異LV(MSD-2K0m5-RRE-LV [+256U1])又はMSD変異、RRE/rev非依存性ベクターイントロン( $\Delta$ RRE) LV(MSD-2K0m5- $\Delta$ RRE-LV)；導入遺伝子プロモーター及び記載された3'UTRシス作用性エレメントは、2つのシス作用性エレメントを用いる場合、互いの上流(Pos1)又は下流(Pos2)のいずれかに用いた。懸濁(無血清)HEK293T細胞からの生成力価は、生物学的力価(GFP TU/mL)又は組込み(組込みTU/mL)力価として記載されている(粗採取物)。蛍光強度の中央値(Arb単位)は、記載された標的細胞(92BRはロバ初代細胞)への形質導入から、示された一致したMOIで表示される。データからわかるように、本明細書に記載の新規エレメントは、 $\Delta$ wPRE対照と比較して発現を高める。ND - 行っていない、NT - 試験していない。異なる3'UTRシス作用性エレメントを用いた：wPRE、wPRE3(短縮型wPRE)、 $\Delta$ wPRE(wPRE欠失型)、 $16 \times 10$ bp CARE配列のセンス(CARE.16t)若しくはアンチセンス(CARE.inv16t)、及び/又はHCMV RNA2.7(HCMV.ZSL1)若しくはWHV wPRE(WPRE.ZSL1)のZCCHC14ステムループの単一コピー。

20

30

40

50

【表 9】

表 6

| ゲノム         | プロモーター | 3' UTR シスエレメント |           | HEK293T 力価 |             | 導入遺伝子発現スコア(一致した MOI) |        |         |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|-------------|--------|----------------|-----------|------------|-------------|----------------------|--------|---------|--------|---------|-------|---------|-------|---------|----|----|--|
|             |        | Pos1           | Pos2      | 組込み T U/mL | 生物学的 T U/mL | HEK293T              |        |         | Jurkat |         | HEPG2 |         |       | 92BR    |    |    |  |
|             |        |                |           |            |             | MOI 2                | MOI 1  | MOI 0.5 | MOI 1  | MOI 0.5 | MOI 1 | MOI 0.5 | MOI 1 | MOI 0.5 |    |    |  |
| STD RR E-LV | EFS    | wPRE           | -         | 1.6E+07    | 3.6E+07     | 1247591              | 632491 | 326565  | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | [ΔwPRE]        | -         | 9.9E+05    | 1.8E+07     | 471374               | 251913 | 130829  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 7.0E+06    | 4.9E+07     | 548194               | 285569 | 153949  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.inv16t    | -         | 9.5E+05    | 2.0E+07     | 355941               | 183557 | 101639  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
| STD RR E-LV | EFS    | wPRE           | -         | 8.8E+07    | 3.8E+07     | 262597               | 129870 | 49713   | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | [ΔwPRE]        | -         | 6.7E+07    | 9.7E+06     | 46958                | 25353  | 12868   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 8.8E+07    | 1.6E+07     | 96291                | 38012  | 21264   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.inv16t    | -         | 4.4E+07    | 4.4E+06     | 63591                | 25186  | 12632   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | -              | HCMV.ZSL1 | 6.6E+07    | 1.4E+07     | 95801                | 47076  | 21788   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.16t       | HCMV.ZSL1 | 9.0E+07    | 2.4E+07     | 125717               | 62443  | 30446   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.inv16t    | HCMV.ZSL1 | 4.1E+07    | 7.0E+06     | 101672               | 44098  | 23779   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | wPRE           | -         | 1.7E+07    | 1.3E+07     | 804059               | 352343 | 154514  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             | EF1a   | [ΔwPRE]        | -         | 2.8E+07    | 1.7E+07     | 484176               | 179367 | 94673   | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 3.0E+07    | 1.7E+07     | 478505               | 222793 | 110931  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.inv16t    | -         | 2.1E+07    | 1.1E+07     | 373779               | 168468 | 78228   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | wPRE           | -         | 6.1E+07    | 1.6E+07     | 162333               | 86049  | 45760   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             | huPGK  | [ΔwPRE]        | -         | 4.8E+07    | 2.7E+06     | 49647                | 24658  | 12371   | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 4.5E+07    | 4.4E+06     | 72519                | 35050  | 16763   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.inv16t    | -         | 4.8E+07    | 2.5E+06     | 41151                | 19484  | 9020    |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | wPRE           | -         | 1.3E+08    | 5.1E+07     | 1089273              | 618520 | 304897  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
| STD RR E-LV | EFS    | [ΔwPRE]        | -         | 8.4E+07    | 6.5E+06     | 183232               | 115109 | 55733   | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 1.1E+08    | 1.3E+07     | 292693               | 167590 | 90756   |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | wPRE           | -         | 4.5E+07    | 2.6E+07     | 2698168              | 0      | 831648  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | [ΔwPRE]        | -         | 6.9E+07    | 3.0E+07     | 1410002              | 761009 | 369706  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             | EF1a   | CARE.16t       | -         | 5.6E+07    | 2.9E+07     | 1935064              | 1      | 473344  | NT     | NT      | NT    | NT      | NT    | NT      | NT | NT |  |
|             |        | wPRE           | -         | 4.5E+07    | 2.6E+07     | 2698168              | 0      | 831648  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | [ΔwPRE]        | -         | 6.9E+07    | 3.0E+07     | 1410002              | 761009 | 369706  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |
|             |        | CARE.16t       | -         | 5.6E+07    | 2.9E+07     | 1935064              | 1      | 473344  |        |         |       |         |       |         |    |    |  |

10

20

|  |       |          |   |         |         |        |        |        |    |    |    |
|--|-------|----------|---|---------|---------|--------|--------|--------|----|----|----|
|  | huPGK | wPRE     | - | 9.6E+07 | 2.8E+07 | 293234 | 160592 | 82787  | NT | NT | NT |
|  |       | [ΔwPRE]  | - | 9.8E+07 | 5.0E+06 | 75645  | 36622  | 18074  |    |    |    |
|  |       | CARE.16t | - | 8.7E+07 | 7.4E+06 | 109503 | 57776  | 27314  |    |    |    |
|  |       | wPRE     | - | 3.7E+07 | 1.5E+07 | 294101 | 150325 | 77648  |    |    |    |
|  | UBC   | [ΔwPRE]  | - | 4.0E+07 | 7.2E+06 | 58695  | 27648  | 13270  | NT | NT | NT |
|  |       | CARE.16t | - | 5.6E+07 | 1.3E+07 | 91615  | 48088  | 20619  |    |    |    |
|  |       | wPRE     | - | 9.3E+07 | 1.4E+07 | 500992 | 271560 | 138104 |    |    |    |
|  |       | [ΔwPRE]  | - | 8.2E+07 | 1.3E+06 | 297049 | 180390 | 78617  |    |    |    |
|  | UBCs  | CARE.16t | - | 1.0E+08 | 4.2E+06 | 291721 | 159021 | 71591  | NT | NT | NT |
|  |       | wPRE     | - | 9.6E+07 | 2.8E+07 | 293234 | 160592 | 82787  |    |    |    |
|  |       | [ΔwPRE]  | - | 9.8E+07 | 5.0E+06 | 75645  | 36622  | 18074  |    |    |    |
|  |       | CARE.16t | - | 8.7E+07 | 7.4E+06 | 109503 | 57776  | 27314  |    |    |    |

【表 10】

表 8

| ゲノム                          | プロモーター | 3' UTR シス-エレメント |           | HEK293T 力価 |            | 導入遺伝子発現スコア(一致した MOI) |        |         |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|------------------------------|--------|-----------------|-----------|------------|------------|----------------------|--------|---------|--------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|--|
|                              |        | Pos1            | Pos2      | 組込み TU /mL | 生物学的 TU/mL | HEK293T              |        |         | Jurkat |         | HEPG2 |       |         | 92BR  |       |         |  |
|                              |        |                 |           |            |            | MOI 2                | MOI 1  | MOI 0.5 | MOI 1  | MOI 0.5 | MOI 2 | MOI 1 | MOI 0.5 | MOI 2 | MOI 1 | MOI 0.5 |  |
| STD R RE-LV                  | EFS    | wPRE            | -         | 7.0E+06    | ND         | NT                   | NT     | NT      | 58539  | 33937   | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 6.5E+06    |            |                      |        |         | 31186  | 16991   |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | -         | 1.0E+07    |            |                      |        |         | 59192  | 29766   |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | -               | HCMV.ZSL1 | 6.1E+06    |            |                      |        |         | 31338  | 15096   |       |       |         |       |       |         |  |
|                              | EF1a   | CARE.16t        | HCMV.ZSL1 | 8.7E+06    | ND         | NT                   | NT     | NT      | 67576  | 33899   | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | wPRE            | -         | 1.1E+06    |            |                      |        |         | 204898 | 115583  |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 1.9E+06    |            |                      |        |         | 182003 | 87831   |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | -         | 1.9E+06    |            |                      |        |         | 391180 | 201930  |       |       |         |       |       |         |  |
| STD R RE-LV                  | EFS    | wPRE            | -         | 3.6E+07    | 1.9E+07    | 610142               | 317856 | 166677  | NT     | NT      | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 3.5E+07    | 4.9E+06    | 103810               | 48948  | 25026   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | -         | 2.8E+07    | 5.6E+06    | 181922               | 94507  | 48215   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | -               | HCMV.ZSL1 | 2.2E+07    | 4.6E+06    | 218375               | 108976 | 48470   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | HCMV.ZSL1 | 2.0E+07    | 6.4E+06    | 318723               | 142312 | 67325   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | -               | WPRE.ZSL1 | 3.9E+07    | 8.2E+06    | 136401               | 67219  | 35293   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | WPRE.ZSL1 | 3.6E+07    | 1.1E+07    | 268334               | 136131 | 69600   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | wPRE3           | -         | 9.0E+06    | 8.1E+06    | 322180               | 151409 | 69671   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              | EF1a   | wPRE            | CARE.16t  | 1.3E+07    | 1.4E+07    | 563406               | 308401 | 141266  | NT     | NT      | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | wPRE            | -         | 1.4E+07    | 8.1E+06    | 1914297              | 987455 | 475178  |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 1.3E+07    | 8.0E+06    | 971945               | 418188 | 190283  |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | -         | 1.4E+07    | 1.0E+07    | 1182561              | 547375 | 251970  |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | -               | WPRE.ZSL1 | 2.5E+07    | 1.0E+07    | 1188685              | 508016 | 236951  |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | CARE.16t        | WPRE.ZSL1 | 2.2E+07    | 1.1E+07    | 1501211              | 687257 | 339840  |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | wPRE            | -         | 3.4E+07    | 1.1E+07    | 26690                | 19101  | 26690   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 3.0E+07    | 2.4E+06    | 5036                 | 4554   | 5036    |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
| MSD-2 KDM5-RRE-LV [+ 256 U1] | EFS    | CARE.16t        | -         | 3.1E+07    | 4.1E+06    | 7875                 | 6994   | 7875    | NT     | NT      | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | CARE.inv16t     | -         | 1.8E+07    | 1.3E+06    | 4626                 | 4338   | 4626    |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | wPRE            | -         | 2.0E+07    | 1.3E+07    | 92944                | 69371  | 92944   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | [ΔwPRE]         | -         | 2.3E+07    | 1.1E+07    | 40945                | 32043  | 40945   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              | EF1a   | CARE.16t        | -         | 2.7E+07    | 1.6E+07    | 50331                | 42087  | 50331   | NT     | NT      | NT    | NT    | NT      | NT    | NT    | NT      |  |
|                              |        | CARE.inv16t     | -         | 2.1E+07    | 1.0E+07    | 32043                | 27103  | 32043   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | wPRE            | -         | 3.3E+07    | 6.5E+06    | 12822                | 11259  | 12822   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |
|                              |        | huPGK           | -         | 3.3E+07    | 6.5E+06    | 12822                | 11259  | 12822   |        |         |       |       |         |       |       |         |  |



）における発現の増加をもたらした。発現の増加は、短縮化されたwPREエレメント「WPRE3」で観察されたものと類似した。EF1a-GFPを含有するLVゲノムでは、CARE.16tとZCHC14タンパク質結合配列との両方を一緒に使用すると、発現の増加は最大となった。

#### 【1268】

これらのエレメントは、標準的なRRE/rev依存性LVゲノムを用いる場合にも、MSD-2KOベクターゲノム - U1/rev依存性バージョン（図29）とRRE/rev非依存性ベクターイントロン（ΔRRE）（図30）バージョンとのいずれかを使用する場合にも、同様に使用することができる。

#### 【実施例13】

#### 【1269】

ZCHC14タンパク質結合配列と複数のCAREタイルとの対合は、形質導入細胞における導入遺伝子発現の増加をもたらす

3'UTRに新規の最小導入遺伝子発現エンハンサー配列を生成するために、ZCHC14タンパク質結合配列と複数のCAREタイルとの対合をさらに例示するために、単一コピーから最大20コピーの範囲の、単一の（下流の）ZCHC14タンパク質結合配列が10bpのCARE配列のタンデムアレイと対合したいくつかのバリエーションを構築した。これらを標準的なRRE/rev依存性LVゲノムカセット内のEFS-GFP発現カセットに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLVを生成するために使用した。wPRE、シス作用性エレメントなし（ΔwPRE）、16×10bpのCAREバリエーション（CARE.16t）、又は単一のZCHC14タンパク質結合配列を含有する対照LVも生成した。清澄化されたLV上清を、接着HEK293T細胞上で組込み力価（TU/mL）を得るために力価測定した。この後、新鮮な接着HEK293T細胞を、0.5、1又は2の一致したMOIで形質導入し、培養物を3日間インキュベートした。形質導入細胞におけるGFP発現をフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値を得た（任意単位）。これらはwPREを含有する対照（100%に設定）に対して正規化した。これらのデータは図32に示されており、単一のZCHC14タンパク質結合配列とCARE.16tエレメントとの両方が、単独で発現を増強したことを示す。単一のZCHC14タンパク質結合配列と複数のCAREタイルとの対合は、一般的に相関的な方法で導入遺伝子の発現をさらに増加させた（すなわち、CAREタイルの数が増えるほど、導入遺伝子の発現がより増加した）が、おそらく発現の最大の増加はCAREタイルの8コピーで実現した。CARE.8tエレメントと単一のZCHC14タンパク質結合配列との組合せは約152bpであり、wPREの20%のサイズしかないにもかかわらず、wPRE対照の約60%の導入遺伝子発現を生じた。

#### 【実施例14】

#### 【1270】

パッケージングシグナルのSL2ループ内に機能的変異を保有するLVゲノム内でベクターイントロンを使用して、異常スプライシングを除去することで、rev/RRE非依存性を可能にする。

図33は、ベクターイントロンLVゲノム発現カセットの基本的構成を、現在の「標準的な」LVゲノムと比較して示す。両タイプのゲノム発現カセットは、HIV-1tatとは無関係に強力な構成的プロモーターによって駆動されるが、本発明者らは、HIV-1tatがMSDに変異を有するLVゲノムの力価を完全に回復できることを以前に示している。しかしながら、現代の第三世代LV生成システムは、この強力な転写活性化因子に関連する安全性の懸念から、tat依存性を除去するように意図的に開発されている。LV生成システムにtatを再導入することは、ベクター開発における実質的な逆行とみなされ、臨床応用への使用を認可するために規制当局に正当化することは難しいかもしれない。標準LVゲノムとVILVゲノムとはともに、5'RからSL1（二量体化ループ）までのパッケージング配列は同じであるが、その後、主にMSDを含有するSL2ループで分岐する。VIゲノムでは、MSDとそれに隣接する潜在的スプライスドナ

10

20

30

40

50

ー (c r S D) 部位とはともに、下流の配置への異常スプライシングを阻止するために変異している。本発明者らは、H I V-1 配列の大部分を「M S D-2 K O m 5」と呼ばれるスプライスドナー部位を持たない異種ステムループに置き換えるという、S L 2 ループの実質的な改変を開発した。M S D-2 K O m 5 バリエーションは、M S D 部位及び c r S D 部位に G T > C A 変異を保有する「M S D-2 K O」変異と比較して、L V 力価に対する影響が低いので、本発明において好ましい。さらに、M S D-2 K O m 5 バリエーションは、パッケージングシグナルの S L 4 ループにある別の潜在的スプライスドナー部位からの異常スプライシングも抑制するようである。

#### 【1271】

選択肢ではあるが、V I を含有する L V ゲノムは、標準的な L V ゲノムでは典型的には、より広いパッケージング配列の一部として保持されている g a g 領域の p 1 7- I N S 配列も欠失させることができる。標準的な L V ゲノムと同様に、V I を含有する L V ゲノムは中央ポリプリン体 (c p p t) 及び自己不活化 (S I N) 3' L T R を保有する。導入遺伝子カセットは、典型的には、p o l- I I プロモーターと導入遺伝子 O R F とを含有し、S I N L T R の 3' ポリ A 部位はベクターゲノム v R N A と導入遺伝子 m R N A との両方に使用される。V I を含有する L V ゲノムは標準的な L V ゲノムとはさらに異なり、R R E の代わりに機能的なイントロンをコードする。現代の L V はまた、(典型的にはイントロンを含まない) 導入遺伝子カセットの発現を増強するために、w P R E などの転写後調節エレメント (P R E) を含むのが典型的である。p o l- I I I で駆動されるマイクロ RNA 又は C R I S P R- c a s 9 アプローチのための g R N A など、他のトランスジェニック配列もベクター上にコードされることがある。V I を含有する L V ゲノムは標準的な L V ゲノムとはさらに異なり、R R E の代わりに機能的なイントロンをコードする。野生型 H I V-1 ゲノムの長さが約 9.5 k b であることを考慮すると、V I を含有する L V の基本形は、標準的な L V ゲノムと比較して、およそ 1 k b の追加の導入遺伝子配列をパッケージすることができる。

#### 【1272】

図 3 4 は、M S D-2 K O の特徴とベクター-イントロンとの両方を組み合わせることが、r e v / R R E に依存しない方法で最大 L V 力価を達成するのに有益であるという証拠を示す。H I V- C M V- G F P ベクターは、野生型パッケージングシグナル (インタクトな M S D) と R R E とを含有する標準的な L V ゲノムから作出した。ベクターは H E K 2 9 3 T 細胞で接着 (図 3 4 A) と懸濁 [無血清] (図 3 4 B) との両方の様式で生成され、効率的なアウトプット力価は r e v の存在に依存することが示された。標準的な M S D 機能が保たれている L V ゲノムから R R E を欠失させると、(予想通り) r e v 応答性が失われたが、興味深いことに、r e v 非存在下で生成された力価は 10 倍に増加し、R R E が本質的に v R N A に対して不安定であることが確認された。欠失した R R E の代わりに V I (最初のバリエーション V I\_1.1、E F 1 a イントロン - 下記表 7 を参照されたい) を挿入しても、L V 力価に実質的な影響はなかった。しかしながら、M S D-2 K O L V ゲノムの文脈で試験された同じ改変は、驚くほど異なる結果をもたらした。M S D-2 K O 変異の減弱の影響は、R R E を含有するゲノムでは劇的であり、力価は r e v の存在下で 3 桁低下した。この R R E を含有する L V ゲノムに V I を加えると、ベクターの力価は r e v の存在とは無関係に劇的に増加したが、最も高い力価は r e v の存在下でのみ実現した。先に観察された R R E の明らかな不安定化効果を考慮し、V I を含有する M S D-2 K O L V ゲノムから R R E を欠失させたところ、ベクター力価は標準的な L V ゲノム (+ r e v) の 2 倍以内に増加しただけでなく、これは r e v の存在に依存しなかった。このように、M S D-2 K O で改変された L V ゲノムの力価を救済するベクター-イントロンの能力は、R R E が欠失した場合に最大になることが示された。

#### 【1273】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 7. 本発明を例示し、最適化するために設計及び使用されたベクターイントロンバリエーションのリストと、各バリエーションにおいて利用された機能的配列の視覚的表示。

試験したベクターイントロンには、EF1a(v1 シリーズ)及びユビキチン(v2 シリーズ)イントロンのネイティブ配列のほか、CAG(ニワトリアクチン+ウサギベータ-グロビン;v3 シリーズ)、及び Promega 社から販売されている発現プラスミドの pCI/pSI シリーズで使用されているウサギベータ-グロビン+ヒト IgG キメライントロン;v4 シリーズ)などの、広く使用されているキメラ/合成イントロンが含まれる。イントロンの異なる機能部分、すなわち、スプライスドナー配列、分枝スプライスアクセプター配列、及び HIV-1 由来の上流エクソンスプライシングエンハンサーエレメント(hESE、hESE2、hGAR)を付加するように、さらなるベクターイントロンを設計した。これらの新規ベクターイントロンでは、「きれいに」スプライスする能力、及び/又は LV 力価を増加させる能力のいずれかが改善された。

| ベクターイントロンの番号 | 上流エクソンエンハンサー      | SD       | イントロン                | 分枝         | SA | [cppt] | 下流エクソンエンハンサー |
|--------------|-------------------|----------|----------------------|------------|----|--------|--------------|
| VI_v1.1      | hESE              |          | EF1a-全長              |            |    |        |              |
| VI_v1.2      | hESE              |          | EF1a-短縮化             |            |    |        |              |
| VI_v2.1      |                   |          | ユビキチン                |            |    |        |              |
| VI_v2.2      | hESE              |          | ユビキチン                |            |    |        |              |
| VI_v3.1      |                   |          | ニワトリアクチン             | ウサギ B-グロビン |    |        |              |
| VI_v4.1      |                   |          | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.2      | hESE              |          | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.3      | hESE              | HIV SD1a | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.4      | hESE              | HIV SD1a | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.5      | HIV エクソン1a        | HIV SD1a | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.6      | HIV エクソン1a (ATTG) |          | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.7      | hESE              | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.8      | hESE/hGAR         | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.9      | hESE/hGAR         | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.10     | hESE/hGAR         | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.11     | hGAR              | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v4.12     | hGAR              | HIV SD4  | ウサギ B-グロビン           | hG (重鎖)    |    |        |              |
| VI_v5.1      | hESE              |          | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        |              |
| VI_v5.2      | hGAR              | HIV SD4  | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        |              |
| VI_v5.3      | hESE/hGAR         | HIV SD4  | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        |              |
| VI_v5.4      | hESE/hGAR         | HIV SD4  | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        |              |
| VI_v5.5      | hGAR              | HIV SD4  | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        |              |
| VI_v5.6      | hGAR              | HIV SD4  | ヒト B-グロビン (IVS2 切断型) |            |    |        | hESE2        |

## 【実施例 1 5】

## 【1 2 7 4】

MSD-2 KO 及び RRE 欠失は、VI を含有する LV ゲノム発現カセットに適用した場合、正しくスプライシングされパッケージングされた LV vRNA を生成するために相乗的に働く。

細胞内及びビリオン内の VI 「由来」 LV vRNA の生成に対する MSD-2 KO、RRE 及び rev の影響を理解するために、図 3 4 A のデータを作製する際に行った実験からの試料を使用した (VI が LV ゲノムに存在する試料のみ)。図 3 5 A に示されているように、生成後の細胞溶解物及び粗 LV 採取物からの総ポリ A 選択 RNA を、適切に配置したフォワードプライマー及びリバースプライマーを使用する RT-PCR 解析に供した。同図は、VI を含有する LV の DNA 発現カセットと、外部プロモーターからの転写から生成される潜在的スプライス産物に関する関連シス作用性配列の配置とを示す (ここでは、明瞭化のため導入遺伝子 mRNA は示していない)。よって、RRE の存在、及び MSD、crSD、及び代替 crSD 2 (MSD-2 KO では活性であるが、MSD-2 KO m5 バリエーションでは活性でない; 後の実施例を参照されたい) から下流のスプライスアクセプター (VI sa を含む) へのスプライシングの可能性に依存して、異なるサイ

ズの R T - P C R 産物が検出されるかもしれない。

【1275】

図35Bはこの解析結果を示したもので、図34に示したデータをさらに裏付けるものである。まず注目すべきは、RREがゲノム上に常在する場合にのみ、revによってより長いパッケージ可能なvRNAが刺激されることである。興味深いことに、rev/RREはVIのスプライシングアウトを約50%阻害し、その結果、LV vRNAがVIを保持するかしなが50:50で混在するようであった。このこと自体が、VI-LVゲノムのrev/RRE非依存性を追求する二次的な理由となったが、なぜなら、均質なvRNAを有するLV集団を生成することが望ましいからである。次に、この結果は、EF1aプロモーター（それ自身のイントロンを有する）を内部導入遺伝子プロモーターとして含有する標準的なLVゲノム（VI\_\_v1.1はEF1aイントロンである）で典型的に観察されるものに類似する、MSDからVISプライスアクセプターへの極めて大量の異常スプライシングを示す。MSD-2KO変異はこの異常スプライシングを消失させたが、これはパッケージングシグナルのSL4のcrSD2部位からVISプライスアクセプターへの異常スプライシングを刺激した。興味深いことに、RREの欠失はこの特異的な異常スプライシング活性の量を最小化した、明らかに効率的にパッケージングされていない他の産物が細胞内で検出された。最後に、MSD-2KO/ΔRRE VI-LVゲノムは細胞及びベクターピリオンの両方においてVIスプライシングされたLV vRNAを最も高いレベルで生成し、これはrevとは無関係に生じた。これらのデータに基づいて、以下の実施例で報告されているように、ネイティブ及び合成の他のイントロンを本発明のベクターイントロンとして使用するために評価した。

【実施例16】

【1276】

ベクターイントロンとして使用するための様々なイントロンの初期評価

RNAスプライシングの原理はよく特徴付けられており、必要なシス作用性エレメントは、それらと相互作用する因子と同様によく理解されている（Bates et al. (2017), Pharmacological Reviews 69: 63-79）。図36は、スプライシング効率をモジュレートすることが知られている隣接エクソン領域と同様に、イントロン内に埋め込まれたコアシス作用性配列の基本的な概要を提供する。イントロン配列はタンパク質をコードする配列の制約を受けないので、類似種の相同遺伝子を比較した場合、エクソン配列より乖離する傾向がある。ベクターイントロンとして使用される特定のイントロン配列を変化させた場合の影響を評価するために、十分に特徴付けられたイントロン及び／又は広く使用されているイントロンに基づいて、いくつかの初期バリエーションを生成した。様々なイントロンとキメライントロンとの概要を表7に示す。初期バリエーションは、ヒトユビキチン遺伝子（UBC）のネイティブイントロン、CAGプロモーターの合成／キメライントロン、及びPromega社が独自に開発した発現プラスミドの「pCI」シリーズに基づくもので、これらは以前の実施例（VI\_\_v1.1）で使用されたEF1aプロモーターのネイティブイントロンと比較した。

【1277】

図37は、接着HEK293T細胞における、標準的なMSD/RREを含有するLVベクターとこれらのVI-LVベクターとの、同様に記載した以前の比較の結果を示す。このデータセットでは、VI\_\_v1.1バリエーションはベクター力価を図34Aに見られるようなレベルまで回復させなかったが（おそらく技術的なばらつきのため）、この実験は、VIによる力価増強の一般的な効果は、一般的に特定のイントロンに依存しないようであること、すなわちスプライシングの作用が最も重要な態様であることを示した。UBCイントロンは最小限の活性しか示さなかったが、pCIからのキメライントロンはこの実験で力価を最も上昇させた。RREを含有するLVゲノムのUBCイントロンのスプライシングは、他のイントロン（EF1aなど；Cooper A., R., et al., Nucleic Acids Research, Volume 43, Issue 1, 9 January 2015, Pages 682-690）とは異なる挙動を示すことが報告されている。UBCイントロンの結果が変動する可能性があるため

、さらなる最適化は行わなかった。むしろ、pCIからのキメライントロンに基づくV I \_\_ v 4 . 2 が、さらなる最適化のために選択され、その後のすべての評価は、より頑健な比較が得られた懸濁（無血清）H E K 2 9 3 T細胞で行った。

#### 【実施例 1 7】

##### 【1 2 7 8】

#### ベクターイントロンの最適化

以下の例は、ベクターイントロン配列（及びそれを挟む配列）が、より優れた力価増強効果を達成するためにどのように改良され得るかを実証する。バリエーション V I \_\_ v 4 . 1 は、Promega社が開発したpCIシリーズの発現プラスミドからのキメライントロン（スプライスドナー及びイントロン配列の大部分）とヒトI g G重鎖イントロンの分岐とスプライスアクセプター配列との間の融合を含有する。バリエーション V I \_\_ v 4 . 2 はさらに、クローニングの制約により保持されたR R Eからの3 9 b pの「レガシー」配列を含んでおり；インシリコ解析の際、この配列は、いくつかのスプライシングエンハンサーと結合することが予測され、それゆえに、V I スプライシングを増強する潜在的な役割において、目的の配列となった。この配列は、実施例 1 7（図 3 7）においてV I \_\_ 4 . 1 の力価増強効果を改善することが見出され、本明細書では「h E S E」と呼ぶ。さらなる改善がどのように得られるかを評価するために、図 3 6 に示した典型的な配列に他の配列を追加又はスワップインし、懸濁（無血清）H E K 2 9 3 T細胞においてr e vの非存在下でE F S - G F P導入遺伝子を含有するM S D - 2 K O / Δ R R E V L L Vゲノムを生成した（表 7 及び図 3 8 を参照されたい）。最初に、V I \_\_ 4 . 2 のウサギベクターグロビンイントロンのスプライスドナーを、バリエーション V I \_\_ v 4 . 3 のH I V - 1 のメジャースプライスドナー（M S D [ 1 ] ）に置き換えたが、これは確かに力価上昇を刺激した。代替的なH I V - 1 スプライスドナー配列を、任意でその上流のエクソン配列（V I \_\_ v 4 . 4 / 4 . 5 / 4 . 6 ）と共に評価し；このエクソンは、H I V - 1 v R N Aを安定化することが以前に示されている（Lutzelberger, M., et al. Journal of Biological Chemistry, Volume 281, Issue 27, 18644 - 18651）。V I \_\_ v 4 . 6 はさらに、H I V - 1 配列が翻訳されないようにA T G変異を保有し、ウサギベクターグロビンスプライスドナー配列で試験した。しかし、これらの特徴はいずれもV I L Vゲノムにさらなる利点をもたらさないようであり、新規h E S Eが力価上昇に実質的な利点をもたらすことを実証した。次に、ウサギベクターグロビンスプライスドナー配列の代わりに、H I V - 1 由来のスプライスドナー 4（S D 4）を使用し、任意で「G A R」と呼ばれるH I V - 1 由来の別のE S Eも併用し（Kammler, S., et al. RNA. 2001;7(3):421-434.及びCaputi, M, et al., J Virol. 2004; 78(12):6517-6526）；G A R - S D 4 配列は主に野生型H I V - 1 のエクソン5である。V I \_\_ v 4 . 8 バリエーションの力価は、試験したバリエーションのセットの中で最も高く、G A R E S Eが何らかの利益をもたらしたことを示した。

#### 【実施例 1 8】

##### 【1 2 7 9】

#### ヒトベクターグロビンイントロン-2に基づくベクターイントロンバリエーション

ヒトベクターグロビン遺伝子の転写ユニットには、十分に特徴付けられ、効率的にスプライシングされたイントロン（第2のイントロン、「I V S 2」としても知られる）が含有される。このイントロンは、順方向に挿入されるとレンチウイルスベクターゲノムから効率的にスプライシングされ、R R Eがイントロン配列内に挿入された場合にのみ保持されることが知られている（Uchida, N., et al. Nat Commun 10, 4479. 2019）。したがって、このイントロン（本明細書では「h u B - G l o」と呼ぶ）は、ベクターイントロンとして最適化するための代替物を形成する可能性があるという仮説が立てられた。したがって、h u B - G l oイントロン全体とh E S Eを合わせたV I \_\_ 5 . 1 を作製した。さらに、h u B - G l oスプライスドナーをH I V - 1 S D 4に、h E S Eをh G A Rに置き換えたV I \_\_ 5 . 2 も作製した。これらをクローニングし、M S D - 2 K O / Δ R R E L V - E F S - G F Pゲノム内で試験して、V I \_\_ v 4 . 2 / 4 .

8を含有するバリエーションと比較して、懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLVを生成した（図39）。これらのデータは、hu B-Gloに基づくVIがrev非依存的に高力価のMSD-2KO/ΔRRE LVを生成し、VI\_5.2が最も力価を高めたことを示す。

【1280】

次に、これらのバリエーションVIを、好ましいMSD/crSD変異体「MSD-2KO m5」が存在し、保持されたgag配列中のp17-INS配列が（パッケージング配列の一部として）欠失して容量をさらに増加させた代替LVバックボーンに導入した（「Δp17INS」又は「gag81」；実施例21を参照されたい）。これらのバリエーションゲノムを、revの非存在下で懸濁（無血清）HEK293T細胞において、以前のバリエーションと比較した（図40）。これらの結果は、バリエーションVIが、MSDの除去変異のタイプに関係なく、rev/RRE非依存的にMSD変異ゲノムのLV力価を生じ得ることを示す。

10

【実施例19】

【1281】

MSD-2KO/ΔRREベクター-イントロンLV生成はプロストラチンにより刺激される

MSD-2KO/ΔRREベクター-イントロンLV生成がプロストラチンによって刺激されるかどうかを評価するために、懸濁（無血清）HEK293T細胞にLVパッケージング構成成分、及び標準的なLVゲノムプラスミド+/- revプラスミド、又はMSD-2KO/ΔRRE VI LVゲノムプラスミドを、トランスフェクション後のプロストラチンの添加の有無にかかわらずトランスフェクトした（図41）。このデータは、MSD-2KO/ΔRRE VI LVのrev/RRE非依存的生成が、標準的なLVで観察されたのと同程度に、プロストラチンによって刺激され得ることを実証する。

20

【実施例20】

【1282】

ベクター-イントロンLVゲノムカセット内に含有される逆向きの遺伝子カセットの3' UTR内の「自己切断」シスエレメントの使用により、dsRNA感知機構からLV構成成分発現を救済し、LV生成中の効率的な導入遺伝子抑制を可能にする。

ベクター-イントロンゲノムのユニークな特徴により、ベクター設計に有利な他の新規な態様が可能になる。VIのアウトスプライシングは、導入遺伝子カセット内にコードされた他のイントロンのスプライシングを刺激するので、導入遺伝子カセットが正面を向いている（すなわち、トップ鎖にコードされている）場合、導入遺伝子イントロン（EF1aプロモーターイントロンなど）の保持は効率的でなく、不可能である。LVで導入遺伝子イントロンを使うべきでない理由（主に、細胞遺伝子へのスプライシングが起こり得るため）は十分にあるが、それにもかかわらず、特定の標的細胞での発現を促進する。VILLV vRNA内で導入遺伝子イントロンを確実に保持する方法は、導入遺伝子カセットを逆向きにし、導入遺伝子イントロンがアンチセンス方向でそのように認識されないようにすることである。生成中に活性がない/低い組織特異的プロモーターを利用する場合、このアプローチにそれ以上の検討は必要ない。しかしながら、導入遺伝子プロモーターがLV生成中に十分なレベルの導入遺伝子mRNAを生成する場合、vRNA:mRNAのアニーリングにより長いdsRNA産物を生成する可能性が高まり、オリゴアデニル酸シテターゼ-リボヌクレアーゼL（OAS-RNase L）、プロテインキナーゼR（PKR）、及びインターフェロン（IFN）/メラノーマ分化関連タンパク質5（MDA-5）などの本来のdsRNA感知経路を誘発することになる。これらの経路のいくつかは、HEK293（T）細胞において（部分的に）欠損している可能性が高いが（Ferreira, C., B., et. al., Mol Ther Methods Clin Dev. (2019);17:209-219.）、ここで本発明者らは、細胞質dsRNAの生成がデノボタンパク質合成の抑制をもたらすという証拠を提供する。図43は、逆向きのEFS-GFP-ポリAカセットを含有する標準的なrev/RRE依存性LVが、revの有無にかかわらずHEK293T細胞で生

30

40

50

成された単純な実験を示す。revが存在した — したがって全長vRNAが細胞質に輸送され、そこで導入遺伝子mRNAとアニールできた — 場合にのみ、VSV-G/p24のデノボ発現が抑制され、細胞質dsRNA応答（例えば、PKR）が引き起こされた可能性が高いことを示した。同じ実験で、VILVゲノムを同じ導入遺伝子カセットで順方向又は逆方向でrevなしで試験したところ、逆方向バリエーションでは同じ表現型を示した。したがって、この応答を回避する1つの解決策は、実際に他者が可能であると示したように、LV生成細胞で内因性PKRをノックダウン若しくはノックアウトするか、又はdsRNA感知機構を阻害することが示されているタンパク質因子を過剰発現させることである（Hu, P., et. al., Gene Ther. 2018 Oct;25(7):454-472及びMaetzig T., et. al., Gene Ther. (2010);17(3):400-11）。

10

【1283】

ベクター—イントロンアプローチに完全に依存する上記の解決策に代わる方法として、機能的なシスエレメントを逆向きの遺伝子カセットの3'UTR内に挿入し、上の鎖にコードされるVI配列内に配置し、したがってパッケージングされたvRNAとその結果得られる組み込まれたLVカセットから失わせる方法がある（図44）。シスエレメントは「自己切断」あるいは脱安定化エレメントであり、LV生成中の導入遺伝子pre-mRNAの定常状態プールが低減し、したがって生成できるdsRNAの量が制限される。

【1284】

例えば、シスエレメントは、導入遺伝子mRNAの3'UTRから切断され（したがって、mRNAのポリAテールを除去し、不安定化をもたらす）、次いでDROSHA/Dicerによって処理され、RISC複合体にロードされて、さらなる切断が起こり得るように、導入遺伝子mRNA内の5'UTR及び／又はコード領域及び／又は3'UTR配列を標的とする、1又は2以上の「自己標的化」マイクロRNAカセットであり得る。好ましくは、マイクロRNAは、ガイド鎖が導入遺伝子mRNA内の標的配列に完全に一致し（さらなる効率的な切断を可能にする）、パッセンジャー鎖がミスマッチするように設計され、パッセンジャー鎖が時折ガイド鎖としてロードされた場合、vRNAにアニールするだけで、効率的に切断しない（図45）。

20

【1285】

例えば、シスエレメントは1又は2以上の「自己切断型」リボザイムとすることができ、pre-mRNAに転写されると、3'UTRの切断とポリAテールの消失とを効率的に引き起こし、したがって細胞質に輸送される導入遺伝子mRNAの量を制限する（図45）。本発明は、自己切断リボザイムがどのようにこれを達成するために使用できるかのいくつかの例を図46に提示する。逆向きのEF1a-GFP-ポリAカセット、及びMSD-2K0m5改変、Psiのgag-p17欠失、及びRREの代わりにVILV5.7を含有するVILVゲノムを、逆向きの導入遺伝子カセットの3'UTR内にシス作用性エレメントの様々な組合せを保有し、及びアンチセンスVI配列内に埋め込まれるように作製した（図46Bを参照されたい）。以下に基づくリボザイムが存在した：ハンマーヘッドリボザイム（HH-RZ）、肝炎デルタウイルスリボザイム（HDV-AG）、及び2つの改変されたマンソン住血吸虫ハンマーヘッドリボザイム（T3H38/T3H48）（De la Pena, M., et. al., EMBO J. (2003);22(20):5561-70; Webb, C., H., & Luptak, A., RNA Biol. (2011);8(5):719-27; 及びZhong, G., et. al., Nat Biotechnol. (2020);38(2):169-175.）。さらに、試験した他のシスエレメントは、RSVからの「スプライシングのネガティブ調節因子」（NRS）エレメント、又はスプライスドナー部位であり、これらはU1 snRNAの誘引を介してmRNAの安定性及び／又は核内保持をモジュレートすることが示されているからである（Cochrane, A., W., et. al., Retrovirology 3, 18 (2006); oyobiLee, E., S., et. al., PLoS One. (2015);10(3):e0122743）。これらのゲノムプラスミドを使用して、懸濁（無血清）HEK293T細胞でLVを作製し、採取上清中のVSV-G/p24レベル又はvRNAレベルを評価した（それぞれ図46A及び46C）。要約すると、図46Aは、逆向きの導入遺伝子カセットの3'UTR内に挿入された単一、好ましくは2つのリ

30

40

50

ボザイムが、採取上清中のLVビリオン構成成分タンパク質発現レベルに対するdsRNA感知の効果を完全に逆転させることを可能にすることを示す。図46Cは、逆向きの導入遺伝子の3'UTR内の1×リボザイムと2×リボザイムとの両方が、LVにパッケージされた相当量のvRNAをもたらすだけでなく、予想されるサイズの単一のRT-PCRバンドが生成されることから、VIが依然としてvRNAから「きれいに」スプライシングアウトされることを実証する。自己切断リボザイムの影響は、LV力価の約100倍の増加であった(図47)。

#### 【1286】

「ベクター生成における導入遺伝子抑制」(TRIP、Transgene Repression In vector Production)システムは、LV生成中のベクターアウトプット力価に対する導入遺伝子タンパク質の望ましくない影響を阻止するために以前に開発された。これは、細菌タンパク質TRAPを同時発現させ、その標的配列(tbs)を導入遺伝子のKozak配列の近くに挿入することによって達成され; TRAP/tbs複合体が機能して、翻訳開始をブロックする。このシステムを用いる際、LV力価は、それらがコードする導入遺伝子タンパク質の影響から実質的に救済され得る。本発明では、「センス」コードされたVIの新規な構成と、逆向きの導入遺伝子カセットの3'UTR内の自己切断リボザイムの使用とにより、タンパク質にコードされた因子に依存しないように、LV生成中に非常に効率的な導入遺伝子の抑制が可能になる。記載されたVI-LVゲノムの生成中、生成後の細胞でGFP発現をフローサイトメトリーで評価し、GFP陽性%に蛍光強度の中央値(Arb単位)を乗じて発現スコア(ES、Expression Score)を得た。図47はこのデータも示しており、これらの新規な逆向きの遺伝子VI-LVゲノムカセットを利用すると、導入遺伝子の発現が1000分の1倍を超えて抑制されることを示す。

#### 【実施例21】

##### 【1287】

ベクター-イントロンと組み合わせたパッケージング領域内の最小gag配列のさらなる切断

以前の例では、保持されたgag配列内のp17不安定性エレメントが除去された(約80ヌクレオチドのgagを残す)「Δp17INS」の特徴を利用し、この改変がベクター-イントロンを保有するゲノムのLV力価に影響を与えないことを示した。ここで、VI-5.5を保有するMSD-2KO-LVゲノムのさらなるバリエーションを作製し、(拡張パッケージングシグナルの一部として)保持されたgag配列を57、31、14、及び実質的にゼロのgag配列にさらに低減した。これらの配列(Δp17INS/gag81を含む)はまた、gagの一次開始コドンにATG>ACG変異を保有しており-これはベクターバックボーン配列が細胞プロモーターからの転写リードインによって動員された場合に、形質導入細胞におけるgagペプチドの発現の可能性を排除するためのさらなる安全性の特徴である。図48は、懸濁(無血清)HEK293T細胞でこれらのベクターを作製した結果を示しており、LVゲノムカセットを含有するベクター-イントロンのアウトプット力価に影響を与えることなく、保持されるgag配列を約30ヌクレオチドに最小化できることを示している。

#### 【実施例22】

##### 【1288】

実験計画法による懸濁(無血清)HEK293T細胞におけるrevの非存在下でのベクター-イントロンLV生成の最適化

以前の実施例では、最適化されたVIを使用することで、標準的なRRE/rev依存性LVの60~100%以内まで、revの非存在下でのRRE欠失LVの生成が可能であることが実証された。これらの研究では、VI-LVのトランスフェクションにpRevを含めなかった以外は、標準的なLVとVI-LVの生成に同じプラスミド比を使用した(pBluescriptは、トランスフェクトされた全DNAが比較において同じであることを保証するために使用された)。興味深いことに、かつ驚くべきことに、VI-LVと標準的なベクターの濃縮調製物(両者ともCMV-GFP導入遺伝子カセットをコードする

）をイムノブロットングによりVSVG及びカプシド（p24）レベルについて評価したところ、両ベクター試料がそれぞれ $2.2 \times 10^7$ と $1.7 \times 10^7$  TU/mLという非常に類似する組込み力価を有しているにもかかわらず、VILVベクター試料は標準的なLV試料と比較して、VSVGとカプシドタンパク質とをかなり多く含有するようであった（図49A）。このことは、標準的なRRE／rev依存性LVに対して以前に最適化されたプラスミド比が、rev非依存性VILVには最適でない可能性を示した。標準的なRRE／rev依存性LVでは、pRevは最適化された比率のpDNAミックスのわずか5%であることを考慮すると、rev依存性LVゲノムRNAと同様に、revがGagPolとVSVGとの発現レベルに直接的／間接的に何らかの影響を与えていることも示唆された。理論に拘束されることを望まないが、revがイントロンを含有する発現カセット（本研究ではpGagPolとpVSVGとの両方）に対していくらか低いレベルの抑制効果を有し、revの非存在下（すなわち、VILV生成中）では、同じpGagPol／pVSVGインプットレベルが使用されたにもかかわらず、GagPol／VSVGの発現レベルが標準的なLVに比べて大きくなることが考えられる。

10

【1289】

したがって、本発明者らは、VILVゲノムプラスミド、pGagPol及びpVSVGのプラスミドインプット比レベルを最適化し、さらに多因子アプローチ（実験計画（DoE、Design-of-Experiment））を使用して酪酸ナトリウム誘導後の最適な採取時間を評価しようとした。図49Bは、リポフェクタミンを使用して懸濁（無血清）HEK293T細胞において行ったこの最適化実験の結果を示したもので、解析の「中央点」は以前の例で使用した標準的なプラスミド比（950 ng/mLのpVILV Genome、100 ng/mLのpGagPol、及び70 ng/mLのpVSVG）であった。VILVを含有するRRE／rev非依存性LVゲノムの生成に最適な比率は、標準的なRRE／rev依存性LVについて以前に最適化された比率と比較して、実質的に異なることが驚くべきことに判明した。VILVの力価は、中央点と比較して2～3倍に増加し、したがって、VILVの力価が標準的なLVよりわずかに低い（すなわち2分の1倍以内）と思われる以前の例では、これはVILVゲノム自体の欠陥というよりも、最適でないプラスミド比率の使用によるものである可能性が高いことが示された。

20

【1290】

よって、最適なプラスミド比率を使用することで、ベクター－イントロンLVゲノムは標準的なLVと比較して同等のアウトプット力価に作製することができるが、以下のような利点を有する：[1] 1 kbの容量増加（RREが排除され、gagが約30ヌクレオチドに低減）、[2] 簡素化された生成（最適化／実施にpRevプラスミドが不要）、及び[3] MSD-2 KO変異の利点、すなわち生成中の異常スプライシングがなく、上流クロマチンからのリードインが低下することが、他で実証されている。

30

【実施例23】

【1291】

一過性同時トランスフェクションにおける導入遺伝子mRNA標的化siRNAの使用により、導入遺伝子発現を低下させ、逆向きの導入遺伝子カセットを含有するベクターの力価を回復させる。

40

EFS-GFPレポーターを保有する標準的なRRE／rev依存性LVゲノム発現カセットは、導入遺伝子カセットを順方向又は逆方向のいずれかで作製した。逆向きの導入遺伝子カセットには、効率的な転写終結を可能にするため、異種ポリアデニル化配列を与えた（図50を参照されたい）。ベクター上清は、懸濁（無血清）HEK293T細胞のベクター構成成分プラスミドによるトランスフェクション、任意でeGFP（導入遺伝子；IDT カタログ番号51-01-05-07）又はルシフェラーゼ（対照；IDT カタログ番号51-01-08-22）のいずれかを対象とする「Dicer-基質短鎖干渉RNA」（DsRNA [27-mer]；IDT）を34 pmol/mL（培地中の最終濃度）によるトランスフェクションにより生成した。pTK-DsRed-Xpr sプラスミドもまた、LV生成中のデノボタンパク質合成に対するdsRNA感知効果の

50

代用マーカーとして、DNAミックスにスパイクした。生成後の細胞をフローサイトメトリーで解析し、GFP導入遺伝子の発現レベルとDsRed-XprSのレベルを評価した。清澄化したベクター上清を、接着HEK293T細胞への形質導入後、フローサイトメトリーにより力価測定した。

#### 【1292】

図43は、逆向きのEFS-GFP-ポリAカセットを含有する標準的なrev/RRE依存性LVが、revの有無にかかわらずHEK293T細胞で生成された単純な実験を示す。revが存在しなかったがって全長vRNAが細胞質に輸送され、そこで導入遺伝子mRNAとアニールできた場合にのみVSV-G/p24のデノボ発現が抑制され、細胞質dsRNA応答（例えば、PKR）が引き起こされた可能性が高いことを示した。

10

#### 【1293】

図52に示した結果から、驚くべきことに、GFP-siRNAが、LVの力価に大きな影響を与えることなく、正面を向いたLVゲノムの導入遺伝子発現を実質的に低下させた（100分の1倍）ことが示された。さらに、逆向きの導入遺伝子LVゲノムの力価は、正面を向いたLVゲノムに比べて実質的に低下し、DsRed-XprSレベルも低下した（dsRNAが感知され、翻訳が抑制される可能性があることを示す）。しかし、GFP-siRNAの使用により、力価は100倍回復し、DsRed-XprSレベルも回復した。驚くべきことに、逆向きの導入遺伝子LVゲノムとGFP-siRNAとをトランスフェクトした細胞におけるGFP発現のレベルは、正面を向いたLVゲノム単独よりも10,000分の1倍低かった。このことから、マイクロRNAを利用すると、逆向きの導入遺伝子カセットを含有するLVの力価を救済するだけでなく、LV生成中の導入遺伝子発現を効率的に抑制することが実証された。

20

#### 【実施例24】

#### 【1294】

「supA-2pA-LTR」のさらなる開発

実施例7に続いて、組み込まれたLVカセットの下流の細胞プロモーターからの転写リードイン（すなわち、下の鎖の「リードイン」）の効率をよりよくモデル化するために、GUボックス（5'R改変から生じる）を有するか又は有さない逆向きのRU5配列をsupA-2pA-LTRの上流に導入した第2ラウンドのコンストラクトを作製した。図54は、ルシフェラーゼがリードスルー活性を報告するレポーターカセットアッセイ内で試験された配列を示す。実施例7と同様に、データは、SV40初期ポリA配列内の2つのポリAシグナルの存在が、「ポリAなし」対照及びポリA変異バリエーション（pAm1）よりも約10倍転写終結を増加させたことを実証する（図54、コンストラクト2対1及び3を参照されたい）。図53で同様の効果（「ポリAなし」に対して）が観察されたので、これは逆向きのRU5配列が下の鎖のポリアデニル化／終結リードインに影響を与えないことを実証した。興味深いことに、かつ驚くべきことに、3R-GU2配列を逆向きのRU5内に含めると（すなわち、上の鎖のsupA-LTR改変をモデル化）、下の鎖の転写終結がわずかに刺激された（図54、コンストラクト4対2を参照されたい）。コンストラクト2～5にSV40初期ポリA-DSE配列（GUボックスを含む）を付加してコンストラクト6～9を作製し、GURIT-DSEの使用により下の鎖の転写終結をさらに4～5倍刺激できたことを示す。全体として、図54のコンストラクト8によってモデル化された、増強された「supA-2pA-LTR」のこの最初の実証は、ポリAシグナルを全く有さない場合（すなわち、現在のSIN-LTR）と比較して、下の鎖での転写リードインが約75分の1倍低下したことを示した。これらのコンストラクトは、supA-2pA-LTRを逆向きの導入遺伝子カセットの一次又は「バックアップ」ポリアデニル化／終結シグナルとして使用し、5'LTRから隣接クロマチンへの「リードアウト」を最小化する可能性もモデル化することに留意されたい。

30

40

#### 【1295】

図55は、supA-2pA-LTRバリエーション「GU1」の詳細な配列情報を提供し

50

、これは、逆向きのポリA配列に「サービス」するために、逆方向のSV40初期ポリA DSE配列（GUボックスを含有する）を含む（図54で試験された同じバリエーション）。さらに、本発明をさらに明確にするために、図55[A]は、（例として）5' R（すなわち、プロモーター配列は示されていない）から、発現カセットの3'末端の「Rに埋め込まれた」異種ポリAデニル化配列（この場合、SV40ポリA）までの完全なLV-supA-2pA-LTR発現カセットを提供する。この場合、「GU2」バリエーションDSE/GUボックス（表1による）による5' R改変が示されている。3'末端では、逆向きのSV40初期ポリA DSE/GUボックスが、Rに埋め込まれたSV40ポリA配列に関連して示されている。本発明の主要な態様の1つにしたがって、ポリAシグナル（PAS）は3' R配列の上流に配置され、R-1-20配列は切断ゾーンとDSE/GUボックスとの両方の上流に配置される。本開示の別の箇所では、LV力価（すなわち第1の鎖転移）を維持するには、このRの配置が12ヌクレオチドもあれば十分であることが示されている。図55[B]は、図55[A]のLV配列上の逆転写/cDNA形成により形成された結果のLTRを表示する（同一になるためLTRのみを示し、組み込まれたLVを挟む）。これは、5' R GU-boxの改変を与えることの結果をより明確に示しており；すなわち、Rに埋め込まれた異種ポリA配列のDSE/GUボックスはDNAに変換されないため、このDSE/GUボックスは上の鎖のPASの下流に配置される。このように、上下のPASがDSE/GUボックスに「サービス」され、上の鎖のPASもUSEにサービスされた、完全に双方向のポリA配列が提供される。

10

20

30

40

50

【実施例25】

【1296】

「supA-2pA-LTR」内の逆向きの／下の鎖のDSE/GUボックスの最適化。supA-2pA-LTRのさらなる最適化は、逆向きのSV40初期ポリAデニル化配列の下流にある異なるGUボックスを評価することによって追求された。表2は、作出され試験された各コンストラクトについて生成されたコア配列を示し、「下の鎖」に関して5'～3'を提供する。代替GUボックスは、細胞性（例えばβ-グロビン、MC4R）、ウイルス性（例えばHSV-TK）及び合成配列を含む多様な供給源から得られた。図55、表9及び表10を合わせると、これらのバリエーションがどのように異なるかが示される。これらのバリエーションは、転写リードスルーが細胞プロモーターからの「下の鎖」のリードインをモデル化するように、ルシフェラーゼレポーターカセットに挿入された。よって、完全なLTRが存在し、SV40初期配列及びGUボックスを挟む逆向きのRU5（R-GU2改変の有無にかかわらず）及びSINΔA3（att）が試験された。コンストラクトをHEK293T懸濁細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼを測定して転写終結の程度を評価した（図56）。これらのデータは、以前の結果（コンストラクト2～7）を確認し、逆向きのRU5配列もGU2配列もSV40初期ポリA終結活性に悪影響を与えず、DSE/GUボックスを保有する伸長したSV40初期配列がこの活性を改善することを示した。ポリAシグナルの存在はこの活性にとって最も重要であった。「GU2」ボックス（5' R改変の「GU5」と同じ）をSV40初期配列の下流に使用する場合、実験で測定された転写終結のレベルは最大となった（図56、コンストラクト8）。しかし、これが上流の逆向きのGU2に埋め込まれたRU5配列（反対（上）の鎖のポリAデニル化を改善するために必要であろう）と対合すると、SV40初期配列の下流にGU2ボックスを有する利点は失われた（コンストラクト9対1及び8）。これは2つのGUボックス配列が配列の類似性によって塩基対合し、おそらくDSE因子の結合が損なわれたためであろう。一般に、試験した他のGUボックスバリエーションは、「GUボックスなし」対照と比較して、転写終結を改善することができた（コンストラクト10～19を1及び3と比較）。最も優れたsupA-2pA-LTRバリエーションはGU1、GU5又はGU7を保有し、対照（例えば、コンストラクト19対1）に対して50～100倍、逆向きのsupA-LTR（例えば、コンストラクト19対2）に対して10倍、転写終結が改善された。

【1297】

これらの新たな s u p A - 2 p A - L T R の順方向の転写終結能を評価するために、これらのバリエーションをルシフェラーゼレポーターカセット内で逆向きにした（図 5 7）。S V 4 0 初期ポリ A 配列の下流に代替 G U ボックスを含有する各 s u p A - 2 p A - L T R バリエーションは、R 境界の上流にある S V 4 0 後期ポリ A デニル化シグナルに D S E / G U ボックスを供給する 3 G R - G U 2 改変の有無にかかわらず、変異した H I V - 1 ネイティブポリ A を含有する R U 5 に関連して作製された。コンストラクトを H E K 2 9 3 T 懸濁細胞にトランスフェクトし（前と同様）、ルシフェラーゼを測定して転写終結の程度を評価した。その結果、すべての s u p A - 2 p A - L T R が標準的な S I N - L T R を上回ったが、重要なことは、下の鎖で最大の転写終結活性を示したバリエーション（図 5 6）が上の鎖でも最大の結果を示したことである。s u p A - 2 p A - L T R の最良のバージョンは、下の鎖にサービスする G U 7 配列を含有し、上の鎖にサービスする R 領域への G U 2 改変と組み合わせると、転写終結活性は上の鎖で 6 5 倍、下の鎖で 9 5 倍増加した。

10

**【 1 2 9 8 】**

【表 1 2】

代替 GUボックスを有する逆向きの supA-2pA-LTR のバリアント配列。配列(左から右へ読む)は、組み込まれた LV カセットに対して下の鎖(5'から 3')に存在するであろう supA-2pA-LTR 配列を示す。コンストラクト番号は図 56/ 実施例 25 で試験したものを指す。GU ボックスは 1~7 までとし、括弧内は配列の供給源を示す。SV40 初期ポリ A アデニル化配列は、隣接する上流配列との関係で示され、逆向きの R 領域の始まり(表 1 による「GU2」領域の有無)、及び試験した GU ボックス配列を含む下流配列、及び逆向きの SIN 領域を示す。下線を引いた太字の配列は R 領域に埋め込まれた逆向きの GU2 配列を示し、下線を引いた斜体の配列は「順向き」鎖上の逆向きのポリ A シグナルを示す。太字の斜体の配列は SV40 初期ポリ A デニル化配列のポリ A シグナルを示す。GU ボックスの配列は、下流に挿入された DSE の一部として太字配列で示されている。

| 2537 音聲文字 | 漢語  | 50 字母 (大、小、雙、零) | 50 字母 (大、小、雙、零) | 50 字母 (大、小、雙、零) | 50 字母 (大、小、雙、零) |
|-----------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 001       | 001 | 001             | 001             | 001             | 001             |
| 002       | 002 | 002             | 002             | 002             | 002             |
| 003       | 003 | 003             | 003             | 003             | 003             |
| 004       | 004 | 004             | 004             | 004             | 004             |
| 005       | 005 | 005             | 005             | 005             | 005             |
| 006       | 006 | 006             | 006             | 006             | 006             |
| 007       | 007 | 007             | 007             | 007             | 007             |
| 008       | 008 | 008             | 008             | 008             | 008             |
| 009       | 009 | 009             | 009             | 009             | 009             |
| 010       | 010 | 010             | 010             | 010             | 010             |
| 011       | 011 | 011             | 011             | 011             | 011             |
| 012       | 012 | 012             | 012             | 012             | 012             |
| 013       | 013 | 013             | 013             | 013             | 013             |
| 014       | 014 | 014             | 014             | 014             | 014             |
| 015       | 015 | 015             | 015             | 015             | 015             |
| 016       | 016 | 016             | 016             | 016             | 016             |
| 017       | 017 | 017             | 017             | 017             | 017             |
| 018       | 018 | 018             | 018             | 018             | 018             |
| 019       | 019 | 019             | 019             | 019             | 019             |
| 020       | 020 | 020             | 020             | 020             | 020             |
| 021       | 021 | 021             | 021             | 021             | 021             |
| 022       | 022 | 022             | 022             | 022             | 022             |
| 023       | 023 | 023             | 023             | 023             | 023             |
| 024       | 024 | 024             | 024             | 024             | 024             |
| 025       | 025 | 025             | 025             | 025             | 025             |
| 026       | 026 | 026             | 026             | 026             | 026             |
| 027       | 027 | 027             | 027             | 027             | 027             |
| 028       | 028 | 028             | 028             | 028             | 028             |
| 029       | 029 | 029             | 029             | 029             | 029             |
| 030       | 030 | 030             | 030             | 030             | 030             |
| 031       | 031 | 031             | 031             | 031             | 031             |
| 032       | 032 | 032             | 032             | 032             | 032             |
| 033       | 033 | 033             | 033             | 033             | 033             |
| 034       | 034 | 034             | 034             | 034             | 034             |
| 035       | 035 | 035             | 035             | 035             | 035             |
| 036       | 036 | 036             | 036             | 036             | 036             |
| 037       | 037 | 037             | 037             | 037             | 037             |
| 038       | 038 | 038             | 038             | 038             | 038             |
| 039       | 039 | 039             | 039             | 039             | 039             |
| 040       | 040 | 040             | 040             | 040             | 040             |
| 041       | 041 | 041             | 041             | 041             | 041             |
| 042       | 042 | 042             | 042             | 042             | 042             |
| 043       | 043 | 043             | 043             | 043             | 043             |
| 044       | 044 | 044             | 044             | 044             | 044             |
| 045       | 045 | 045             | 045             | 045             | 045             |
| 046       | 046 | 046             | 046             | 046             | 046             |
| 047       | 047 | 047             | 047             | 047             | 047             |
| 048       | 048 | 048             | 048             | 048             | 048             |
| 049       | 049 | 049             | 049             | 049             | 049             |
| 050       | 050 | 050             | 050             | 050             | 050             |
| 051       | 051 | 051             | 051             | 051             | 051             |
| 052       | 052 | 052             | 052             | 052             | 052             |
| 053       | 053 | 053             | 053             | 053             | 053             |
| 054       | 054 | 054             | 054             | 054             | 054             |
| 055       | 055 | 055             | 055             | 055             | 055             |
| 056       | 056 | 056             | 056             | 056             | 056             |
| 057       | 057 | 057             | 057             | 057             | 057             |
| 058       | 058 | 058             | 058             | 058             | 058             |
| 059       | 059 | 059             | 059             | 059             | 059             |
| 060       | 060 | 060             | 060             | 060             | 060             |
| 061       | 061 | 061             | 061             | 061             | 061             |
| 062       | 062 | 062             | 062             | 062             | 062             |
| 063       | 063 | 063             | 063             | 063             | 063             |
| 064       | 064 | 064             | 064             | 064             | 064             |
| 065       | 065 | 065             | 065             | 065             | 065             |
| 066       | 066 | 066             | 066             | 066             | 066             |
| 067       | 067 | 067             | 067             | 067             | 067             |
| 068       | 068 | 068             | 068             | 068             | 068             |
| 069       | 069 | 069             | 069             | 069             | 069             |
| 070       | 070 | 070             | 070             | 070             | 070             |
| 071       | 071 | 071             | 071             | 071             | 071             |
| 072       | 072 | 072             | 072             | 072             | 072             |
| 073       | 073 | 073             | 073             | 073             | 073             |
| 074       | 074 | 074             | 074             | 074             | 074             |
| 075       | 075 | 075             | 075             | 075             | 075             |
| 076       | 076 | 076             | 076             | 076             | 076             |
| 077       | 077 | 077             | 077             | 077             | 077             |
| 078       | 078 | 078             | 078             | 078             | 078             |
| 079       | 079 | 079             | 079             | 079             | 079             |
| 080       | 080 | 080             | 080             | 080             | 080             |
| 081       | 081 | 081             | 081             | 081             | 081             |
| 082       | 082 | 082             | 082             | 082             | 082             |
| 083       | 083 | 083             | 083             | 083             | 083             |
| 084       | 084 | 084             | 084             | 084             | 084             |
| 085       | 085 | 085             | 085             | 085             | 085             |
| 086       | 086 | 086             | 086             | 086             | 086             |
| 087       | 087 | 087             | 087             | 087             | 087             |
| 088       | 088 | 088             | 088             | 088             | 088             |
| 089       | 089 | 089             | 089             | 089             | 089             |
| 090       | 090 | 090             | 090             | 090             | 090             |
| 091       | 091 | 091             | 091             | 091             | 091             |
| 092       | 092 | 092             | 092             | 092             | 092             |
| 093       | 093 | 093             | 093             | 093             | 093             |
| 094       | 094 | 094             | 094             | 094             | 094             |
| 095       | 095 | 095             | 095             | 095             | 095             |
| 096       | 096 | 096             | 096             | 096             | 096             |
| 097       | 097 | 097             | 097             | 097             | 097             |
| 098       | 098 | 098             | 098             | 098             | 098             |
| 099       | 099 | 099             | 099             | 099             | 099             |
| 100       | 100 | 100             | 100             | 100             | 100             |

20

30

40

表 10

【实施例 26】

50

## 【1299】

supA-2pA-LTRを有するLVの生成力価。

supA-2pA-LTRがルシフェラーゼレポーターアッセイ内で最適化できることを実証した後、7つの異なる逆向きのDSE/GUボックスを保有するsupA-2pA-LTRバリエントを、EFS-GFPカセットを含有するLVゲノム発現カセットにクローニングした。図58は、生成DNA発現カセット中の5'及び3'LTRの構造と、組み込み後に形成される最終的なLTR構造（組み込まれた配列を挟む2つのLTR）との両方を開示する。バリエントLTR配列は、パッケージング領域からの異常スプライシングを排除するメジャースプライスドナー（MSD）変異LVバックボーンにクローニングした。DNA発現カセットの5'R領域にはGU2バリエント配列が含有されて、上の鎖のポリAシグナルにDSE/GUボックスを提供し、3'LTRの配置にはR（1-20）に埋め込まれたSV40ポリA配列が使用された。SIN-LTRバリエントはSV40ポリA配列を「バックアップ」として利用したが、supA/supA-2pA-LTRバリエントは利用しなかった（示さず）。LVゲノムプラスミドは、無血清懸濁細胞でベクターを作製するために使用され、接着HEK293T細胞で清澄化した採取物を力価測定し、その後フローサイトメトリーでGFP陽性細胞をカウントし、さらに10日間継代して、組み込みアッセイのために宿主細胞DNAを採取した。データは、すべてのsupA-2pA-LTRバリエントが、標準的なSIN-LTRを保有するMSD変異LVと同様に、実用的な力価まで生成できることを示し、supA/supA-2pA-LTRに操作された配列がアウトプット力価に悪影響を及ぼさないことを実証した。

10

20

## 【1300】

さらに、SPA合成ポリA配列（GU7）の逆向きのGUボックスを保有するsupA-2pA-LTRバリエントを、標準的なLV又はMSD変異LVのいずれかで、EF1a又はPGKプロモーターに駆動されるGFPカセットを含有するLVゲノム発現カセットにクローニングした（図59）。LVゲノムプラスミドは、無血清懸濁細胞でベクターを作製するために使用され、接着HEK293T細胞で清澄化した採取物を力価測定し、その後フローサイトメトリーでGFP陽性細胞をカウントし、さらに10日間継代して、組み込みアッセイのために宿主細胞DNAを採取した。これらのデータは、supA/supA-2pA-LTR改変を用いるために必要な配列は、ネイティブの5'pA、MSD又は内部プロモーターを含むレンチウイルスベクターカセット内部の配列に影響を与えない（また、影響を受けない）ことを実証する。よって、supA/supA-2pA-LTRは、既存の第三世代のLV又は次世代のLVに適用することができる。

30

## 【実施例27】

## 【1301】

supA-2pA-LTRを有する組み込まれたLVは、5'LTRを介した転写リードインが少ない。

supA-2pA-LTRは、プラスミドを有するレポーター（転写活性が非常に高い）の転写リードスルーを大幅に低減させ、これらのアップグレードされたポリA配列を有するLVが高力価で生成できることを実証し、これらのベクターを使用して、接着HEK293T細胞（不死化）及び初代口バ線維芽細胞（92BR）を標的MOI 1で形質導入し、その後10日間の継代と組み込みアッセイ（細胞あたりの実際のコピーを得る）を行い、次いで、総RNAを抽出してHIV-psi RNA及びGAPDH mRNAレベル（後者は正規化のため）を測定した。これらの結果を図60に示し、標準的なSIN-LTRと比較した組み込まれた5'LTRの相対的リードスルーを示す。最初に、MSD変異はリードインを最大2.5分の1倍低下させた（本発明者らが以前に示した通り）。さらに、supA-LTRバリエントはHEK293T細胞においてリードインをさらに低下させた。驚くべきことに、supA-2pA-LTRバリエントの大部分は、転写リードインを最も低下させ、これは、下の鎖での終結のためのポリアデニル化因子の誘引が、上の鎖での局所的終結を助けるかもしれないことを示す。これらのsupA-2pA-LTRバリエントは、標準的なSIN-LTRと比較して、転写リードインを8分の1

40

50

～33分の1倍低下させた。これらのデータはまた、プラスミドトランスフェクション（エピソードカセット）レポーターリードスルーアッセイと比較して、実際の組み込まれたLVにおけるsupA／-2pA-LTRバリエーションのスクリーニングが、より優れたバリエーションを明らかにする可能性があることを示す。

#### 【実施例28】

##### 【1302】

supA-supA2pA-LTRを有する組み込まれたLVは、5'LTRの上流からの転写リードインが桁違いに少ない。

supA及びsupA-2pAのLTRが標準的なSIN-LTRよりも高い感度で提供する転写インスレーションの改善度を評価するために、supA又はsupA2pA-LTRを有する組み込まれたLVの転写リードイン解析をRNAseqで測定した。図61に概説した7つのLVゲノムコンストラクトを作製し、懸濁（無血清）HEK293T細胞でLVを生成するために使用した。2つの標準的なSIN-LTRを有するLVを作製し、1つはインタクトなメジャースプライスドナーを有し、もう1つは2K0m5変異を有する（すなわち、それは「2K0-LV」であり、vRNAのパッケージングシグナルに結合して力価を回復させることができる改変されたU1 snRNAの存在下で生成された - 国際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい）。supA-LTR（3GR-GU2 5'改変、及び3'LTR中のSV40後期ポリA USE-pASを保有する）を含有する4つのバリエーションを、+/-2K05m変異、及びネイティブHIV-1 pAシグナルの+/-変異により生成した。単一のsupA-2pA-LTRバリエーション（supA-LTRと同様であるが、USE領域の2つのSV40初期pAシグナルにサービスするための、さらに逆向きのSPA GUボックス〔バリエーション「iGU7」〕を有する）が、2K0m5とネイティブHIV-1 pAシグナルとの両方の変異を伴って生成された。すべてのLVは同一のEFS-GFP-WPRE発現カセットを有した。

##### 【1303】

LVを使用して、接着HEK293T細胞をMOI 1で形質導入し、10日間継代した後宿主細胞のゲノムDNAを抽出して組み込みアッセイを行い、ベクターコピー数を決定した（HIV-Psiに対するqPCR）。ポリAで選択したRNAを精製してRNAseqに供し、MSD-Psi領域（MSD）、gag-Psi領域（Ga）、RRE領域（RRE）に対するリードの量を評価した。R-U5リードも測定したが、3'R-U5リードもSIN-LTRコンストラクトの導入遺伝子mRNAリードとして含まれるため（少なくともポリA切断部位へのリード） - また実際はsupA（2pA）-LTRはこれらの領域でわずかに配列が異なる - R-U5データは表示していない。RNA調製、RNAseq、バイオインフォマティクスの詳細は、材料及び方法に記載されている。

##### 【1304】

図61は、これらの解析結果も示しており、「MSD」リード（100%に設定）について、標準的な（MSD+）-LV-SINベクターと比較した全コンストラクトの5'LTRへの相対的リードインを示す。標準的なLV-SINベクターでは、5'から3'（MSDからRRE）にかけてリードカバレッジが減少し、RRE領域へのリード数がMSD-Psi領域と比較して約5分の1倍減少していることがわかる；これは、MSDから導入遺伝子カセット内の暗号化されたスプライスアクセプターへのスプライシングによるものと考えられ、その結果、MSDリードがgagやRREよりも増加する。この効果は、MSDが変異していないすべてのLVで見られる。2K0-LVゲノム内のMSDを変異させると、MSDリードが約3分の1倍低下したが、これはMSD変異によってリードインが少なくなることを示す他のデータと一致している（国際公開第2021/160993号パンフレット）。supA-LTRバリエーションは、MSD領域への転写リードインを約6倍、MSD変異及びネイティブHIV-1 pAシグナル変異と組み合わせると約122倍保護した。Ga領域とRRE領域が全くリードを生成しない場合もあったが、

一般に約36分の1～約174分の1倍低下した。

【1305】

まとめると、これらのデータは、supA/supA-2pA-LTRが組み込まれたLVに実質的な転写のインスレーションを与え、遺伝子治療ベクターとして使用されるLVにさらなる安全性を提供する大きなステップであることを示す。

【実施例29】

【1306】

逆向きの遺伝子カセットを保有するベクター-イントロンLV由来の導入遺伝子mRNAを標的化するための生成細胞由来miRの使用。

本発明の他の実施例では、LVのアウトプット力価を回復させるために、リボザイムをベクター-イントロンLVに搭載された逆向きの導入遺伝子カセットの3'UTRの「自己切断」エレメントとして使用できることを実証する。逆向きの導入遺伝子を含むこれらのタイプのベクターのアウトプット力価が低いのは、dsRNAの生成と、その結果生じるdsRNA感知経路、例えばPKRのトリガーにつながるものが原因と思われる。よって、自己切断型3'UTRエレメントの使用により、導入遺伝子mRNAの分解によるdsRNAの否定が、この潜在的シグナル伝達をブロックする。このようなエレメントを、上の鎖のベクター-イントロンに包含される逆向きの導入遺伝子の3'UTR内に埋め込むことで、パッケージングされたvRNAがこれらの自己切断エレメントを含有しないことが保証される。LV生成中に発現されるmiRNAの標的配列は、宿主細胞によって内因的に発現されるmiRNAか、あるいは外因的に発現されるmiRNA（例えばU6に駆動されるmi/shRNAカセットの同時トランスフェクション）のいずれかである。この概念を図62に記載する。このアプローチの実現可能性は、3'UTR内に内因性miRNA標的配列（1×の又は3×のコピーとして）を有する、逆向きのEF1a-GFPカセットを保有するベクター-イントロンLV（具体的には、MSD-2KOm5/ΔRRE/Δp17INS+VI\_v5.5）を生成することによって行われた。リボザイムT3H38とHDV\_AGとが存在してもよい2セットのバリエーションを作製した（存在する場合、miRNA標的配列は2つのリボザイムの間にあった）。第3のバリエーション（+リボザイム）は、miRNA標的配列の各タイプの単一コピーが存在するように作製した。懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLVを生成し、GFP発現スコア（%GFP×MFI）を得て、ベクター上清を接着HEK293T細胞で力価測定した。これらのデータは図63に示されており、リボザイムよりも低い程度ではあるが、内因性miRNA標的配列を使用して、逆向きの導入遺伝子LVのアウトプット力価を救済できることを示す。アウトプット力価の最大回復はリボザイム単独で観察されたが（すなわち、リボザイムと対合したmiRNAは力価をそれ以上上昇させなかった）、このことから、配列、構造、機能クラスが全く異なる他のエレメントを、力価を上昇させるために逆向きの3'UTRのVI包含部分内で使用できることが示された。

【実施例30】

【1307】

治療に関連する導入遺伝子をコードする標準的なLV、「2KO-LV」、及び「Max Pax」LV（ベクター-イントロン依存性）を並べて比較した：生成細胞及びビリオンにおけるスプライシングプロファイル、及びアウトプット力価。

実施例30は、本発明の以下の特徴を実証し；

【1】パッケージング領域におけるメジャースプライスドナー部位の変異による減弱効果を緩和するためにベクター-イントロンを使用する、

【2】ベクター-イントロンをgag-Psi領域のさらなる欠失と組み合わせて使用することで、LVベクターの容量を増加させる、及び

【3】MSD変異を使用し、パッケージング領域から異常なスプライシングを除去し、ベクター-イントロンの清澄なスプライシングを可能にする、

CAR-T療法に使用されるキメラ抗原受容体（CAR）をコードする導入遺伝子カセットと並べて比較した。説明を簡単にするために、上記の新たな構造を含有するLVを「M

ax Pax」LVと呼んだ。したがって、標準的なLVとEF1a-CAR-wPRE導入遺伝子カセットをコードする「2KO-LV」(2KOm5変異のみを保有)とを作製した。さらに、EFS-CAR-wPRE導入遺伝子をコードする2KO-LVとMax Pax-LVを作製し；これは、Max Pax／ベクター-イントロンを含有するLV発現カセットが、EF1aプロモーター内に存在するイントロン(すなわちイントロンA)を含む、5'から3'方向にコードされるイントロンを保持できないvRNAゲノムを生じるためである。したがって、Max Pax LVは、スペースが限られ、イントロンなどのシスエレメントが不要と考えられる遺伝子治療アプローチに適している。導入遺伝子カセット内にイントロンを保持することが望ましい場合には、逆向きの導入遺伝子アプローチ(本発明の他の部分に記載)がとられる可能性があり、この場合、「自己切断」エレメントがベクター-イントロン配列に包含される3'UTR内で利用される可能性があることに留意されたい。これは導入遺伝子プロモーターの活性に依存し、例えば生成細胞で(あまり)活性の低い組織特異的プロモーターが使用される場合、dsRNAが生成されない／最小限にしか生成されないため、自己切断エレメントは必要ないかもしれない。いずれにせよ、vRNAによってコードされる逆向きの導入遺伝子カセットは、vRNAの5'から3'へのセンス方向には機能しないので、イントロンを保持することができる。

10

【1308】

これらのLVを懸濁(無血清)HEK293T細胞及び生成後細胞で生成し、得られたLVビリオンをRT-PCRで解析して、全長vRNA及び短縮化されたvRNA生成を評価した。これらのデータを図70[A]に、生成されたLVのアウトプット力価を図70[B]に示す。この結果から、Max Pax LVは(2KO LVと同様に)、短縮化された型を生成／パッケージングする標準的なLVとは異なり、単一のメジャーなvRNA種としてパッケージングされることが実証される。しかし、Max Pax LVは、高力価を生じるためにrevも改変されたU1 snRNAも必要とせず、また、RREを欠くため、他のベクターに比べて約1kbの追加スペースを搭載することができる(図70[A]の2KO-LV-EFS-CARとMax Pax-EFS-CAR vRNAのサイズの違いを参照されたい)。

20

【実施例31】

【1309】

ZCCHC14タンパク質結合配列と対合してよい複数のCAReタイルを有する導入遺伝子3'UTRは、形質転換されたJurkat細胞において導入遺伝子発現の増加をもたらす。

30

3'UTRに新規の最小導入遺伝子発現エンハンサー配列を生成するために、ZCCHC14タンパク質結合配列(ZSL1)と複数のCAReタイルとの対合をさらに例示するために、単一コピーから最大20コピーの範囲の、単一の(下流の)ZCCHC14タンパク質結合配列が10bpのCARe配列のタンデムアレイと対合したいくつかのバリエーションを構築した。これらを標準的なRRE／rev依存性LVゲノムカセット内のEFS-GFP発現カセットに挿入し、懸濁(無血清)HEK293T細胞においてLVを生成するために使用した。wPRE、シス作用性エレメントなし( $\Delta$ wPRE)、 $16 \times 10$ bpのCAReバリエーション(CARe.16t)、又は単一のZCCHC14タンパク質結合配列を含有する対照LVも生成した。清澄化されたLV上清を、接着HEK293T細胞上で組込み力価(TU/mL)を得るために力価測定した(図65)。この後、新鮮なJurkat細胞を、0.5、1又は1の一致したMOIで形質導入し、培養物を3日間インキュベートした。形質導入細胞におけるGFP発現をフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値を得た(任意単位)。これらはwPREを含有する対照(100%に設定)に対して正規化した。これらのデータは図65に表示されており、図32のHEK293T細胞と比較して、T細胞株において同様の発現パターンを示す。3'UTRエレメントを有さない( $\Delta$ wPRE)ことは、Jurkat細胞における導入遺伝子発現にあまり影響を与えず、導入遺伝子発現はwPREと比較して40%に低下した。しかし、HEK293T細胞と同様に、CAReタイルをより多く、特に8×から20×まで使用すると

40

50

、導入遺伝子の発現が増加した。さらに、少なくとも12のタイルを使用した場合、導入遺伝子の発現レベルはwPRE対照よりも高かった。加えて、ZSL1配列と対合した場合、16×のCAREタイルで最も高い導入遺伝子発現が観察され、ZSL1と8×のCAREタイルと対合しただけでwPREに匹敵する発現が得られた。このように、CARE・8t又はCAR・16tエレメントと単一のZCHC14タンパク質結合配列との組合せは、それぞれ約150bpと約230bpとであり、それぞれ約590bpのwPRE対照と同じか又はその160%の導入遺伝子発現を生じた。

#### 【実施例32】

##### 【1310】

形質導入Jurkat細胞における導入遺伝子発現に対する、ZCHC14タンパク質結合配列と組み合わせた16×のタイルとしてのCAREコンセンサス配列バリエーションの評価。

Lei et al., 2013によって生成されたCAREコンセンサス配列 — 及び本発明では導入遺伝子3'UTR内で試験された — は、コンセンサス内の変異を反映するように操作されて、代替の「合成」タイルを生成した。これらは図66に示されており、各バリエーションがこの半減期コンセンサス配列内でどのように異なっているかを示す。本発明では、生成されたCAREコンセンサスタイルの8×から16×のコピーにより、種々の異なる細胞型／細胞株で導入遺伝子の発現が増加することが示されているので、これらの合成バリエーションを16×タイルとしてタンデム化し、HCMV・ZSL1ループと組み合わせて試験した。CAREコンセンサスの16×のタイル断片を1つおきに変異させて、CARE16t断片全体の変異の影響を評価する別のバリエーションも試験した (cons/mut5)。これらを標準的なRRE／rev依存性LVゲノムカセット内のEFS-GFP発現カセットに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLVを生成するために使用した。wPRE、シス作用性エレメントなし ( $\Delta$ wPRE)、16×10bpのCAREバリエーション (CARE・16t)、又は単一のZCHC14タンパク質結合配列を含有する対照LVも生成した。清澄化されたLV上清を、接着HEK293T細胞上で組込み力価 (TU/mL) を得るために力価測定した (データは示さず)。この後、新鮮なJurkat細胞を、1の一致したMOIで形質導入し、培養物を10日間インキュベートした。形質導入細胞におけるGFP発現をフローサイトメトリーで測定し、蛍光強度の中央値を得た (任意単位)。宿主細胞のDNAを抽出し、HIV-1 Psiに対するqPCRを行って、ベクターのコピー数を得た。よって、図10はベクターコピー数 (VCN) に対して正規化した導入遺伝子発現を表示する。これらのデータ同一性バリエーション4、7、10、及び12は、3'UTRエレメントがない場合と比較して、T細胞株での導入遺伝子発現を高めることができ、バリエーション4はwPREと比較して同様の発現レベルである。交互に変異したCAREタイルを含有するバリエーション (cons/mut5) は、ZSL1ループのないCARE・16tコンセンサス対照 (wPREよりわずかに高いレベルの発現を生成した) と同様の性能を示した。まとめると、このデータは、CAREコンセンサスタイルが最も最適な「バージョン」であり、各タイルが累積的に発現活性に寄与していることを示しており、これは、いくつかのコンセンサスタイルだけが「活性」である場合、他のタイルが「スペーサー」として作用しているのであれば、cons/mut5 + ZSL1バリエーションはCARE・16t + ZSL1対照と同様に活性があると予想されるからである。しかしながら、cons/mut5バリエーションはCARE・16t + ZSL1対照の2/3までしか発現を高められず、これは図65のCARE・8t + ZSL1バリエーションの活性に近い。言い換えれば、cons/mut5バリエーション内のCAREコンセンサスの8コピーだけが完全に活性化した。このことはまた、導入遺伝子の発現に対するエレメントの総累積効果に影響を与えることなく、タンデムCAREコンセンサスタイルの間に長さ8までのスペーシングヌクレオチドを挿入することができるという強力な証拠を提示する。この理由から、また、本発明の一態様が遺伝子治療ベクター導入遺伝子カセットに使用するために配列長を最小化することであることを考慮すると、本発明者らは、CAREコンセンサスタイル間にスペーサーを含有するさらなるバリエーション

10

20

30

40

50

を追求しなかった、なぜならこれは不必要に総エレメントサイズを増加させるためである。

#### 【1311】

さらなるCAREコンセンサスバリエーションは、Lei et al., 2013に従った「ネイティブ」配列、すなわちc-Jun、HSPB3、IFNアルファ及びIFNベータに見られる配列に基づいて生成した。これらを図11に表示する。これらのバリエーションは16×のCAREエレメントにタンデム化され、HCMV/ZSL1ループと対合した。これらを標準的なRRE/rev依存性LVゲノムカセット内のEFS-GFP発現カセットに挿入し、懸濁（無血清）HEK293T細胞においてLVを生成するために使用した。上記のJurkat細胞における実験と同じ設定を実施し、図67にデータを報告した。この場合、c-Junのバリエーション2及びIFNα1のバリエーション1は、wPREと比較して同程度の発現レベルを提供した。

10

#### 【実施例33】

#### 【1312】

rAAVベクター内の3'UTRエレメントとしてのCARE/ZSL1バリエーションの使用。

新規CARE/ZSL1（「CAZL」）複合エレメントの他のウイルスベクターシステムにおける有用性を示すために、rAAVベクターゲノムを例のCAZLエレメントを含有するように操作し、wPREを使用する「空」又はカセット（長さ約590nt）と比較できるようにした。CAZLエレメントの使用は、ゲノムパッケージングサイズの制限が約5kbと「ハード」なrAAVにおいて特に有用であろう。図68は、これらの例のrAAVベクターと、例証のために作製したベクターとの模式図を示し、試験したCAZLエレメントのサイズは141nt（CARE.4tZSL1）、181nt（CARE.8t/ZSL1）、及び261nt（CARE.16t/ZSL1）である。これらのバリエーションは、タンデム化されたCAREタイルとZSL1配列との間に、クロニング部位のために「スタッパー」配列を含有し、よって、実際にはさらにサイズが小さくなる可能性があることに留意されたい。逆向きのエレメントは機能的であることが期待されないため、rAAVゲノムのサイズとCAZLの機能性との両方を制御するために、各タイプの逆向きのCAZLエレメントを追加の対照として含んだ。GFP導入遺伝子をCMVプロモーター又はEFSプロモーターで駆動する2セットのrAAVを作製した。rAAVは、HEK293T細胞に一過性トランスフェクションを行い、その後qPCR力価測定を行うことで生成した（詳細は図69及び材料と方法を参照されたい）。HEPG2細胞を、異なるrAAVベクターストックで、一致したMOI（250及び500；図69及び材料と方法の詳細を参照されたい）で形質導入した。導入遺伝子発現データを図69に示しており、CAZLエレメントがHEPG2細胞における導入遺伝子発現を空の対照と比較して増加できたことを実証し、CMV-GFPカセットでは、CARE.8t/ZSL1及びCARE.16t/ZSL1 CAZLバリエーションが、wPREの半分以下のサイズであるにもかかわらず、wPREより約2倍高い発現を可能にした。異なるプロモーターを用いる場合、一部の相違が観察され、CARE.4t/ZSL1は、EFSプロモーターを使用する場合、他の2つのCAZLバリエーションと同レベルまで発現を増加させた。重要なことに、逆向きのCAZLバリエーションは、すべての場合に、空の対照と同程度のレベルで導入遺伝子を発現し、このことは、CAZLエレメントの順方向への配向が必要であること（すなわち、これらは機能的な配列であること）、及び観察された発現の改善は、空の対照と比較して、ベクターゲノムサイズや導入遺伝子カセットサイズの増加だけでは説明できないことを実証する。

20

30

40

#### 【1313】

これらのデータは、これらの新規の短いCARE-ZSL1複合エレメントが、カーゴスペースが限られているrAAVベクター内で3'UTR導入遺伝子発現エンハンサーとして機能すること、及びwPREを含有するrAAVで観察されたのと同様又はそれ以上のレベルまで発現が高められる可能性があることを実証する。

50

## 【1314】

A A Vで試験した配列。太字はC A R e 10 n tのコンセンサスタンデム化 (tando mized) タイル。下線はZ S L 1配列。これらは非限定的な例であり、タンデム化C A R e タイルとZ S L 1との間に介在する配列は、異なる制限酵素部位に対応するために欠失しているか又は長さが短い場合がある。

C A R e . 4 t / Z L 1 (配列番号240) :

CCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGACTAGGTACCTCGAGCGGATCCCATCGATTG  
CCGTCGCCACCGCGTTATCCGTTCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGAACGGGTCGGCGGCCGGTCGGCTTCT

10

C A R e . 8 t / Z L 1 (配列番号241) :

CCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGC  
CAGTTCCTGACTAGGTACCTCGAGCGGATCCCATCGATTGCCGTCGCCACCGCGTTATCCGTTCTCGTAG  
GCTGGTCCTGGGGAACGGGTCGGCGGCCGGTCGGCTTCT

C A R e . 16 t / Z L 1 (配列番号242) :

CCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGC  
CAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCCAGTTCCTGCC  
AGTTCCTGCCAGTTCCTGACTAGGTACCTCGAGCGGATCCCATCGATTGCCGTCGCCACCGCGTTATCCGT  
TCCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGAACGGGTCGGCGGCCGGTCGGCTTCT

20

## 【実施例34】

## 【1315】

C A R e / Z S L 1 3' UTRエレメントとsupA-LTRをRRE依存性又はベク  
ター-イントロン依存性LV内で組み合わせる - 生成力価。

30

本発明の3つの態様、すなわち、ベクター-イントロン、supA (2pA) - LTR  
、及び3' UTR C A R e / Z S L 1エレメントを、レンチウイルスベクターバックボ  
ーン内で一部又は全部試験した。これらのLV DNA発現カセットの構造を図71~7  
3に示し、標準的なLV内、又はメジャースプライスドナー内の2K O m 5変異を保有す  
るLV内で、これらのシス作用性エレメントを単独又は組み合わせて試験した (P C T国  
際公開第2021/160993号パンフレットを参照されたい)。2K O m 5変異のう  
ち、このファミリーの2つのメンバーは「2K O - L V」及びいわゆる「M a x P a x」  
LVである。2K O - L Vはrev応答エレメントを含有し、高いLVアウトプット力価  
を得るために、revと改変されたU1 snRNA分子との両方を必要とする (国際公  
開第2021/160993号パンフレットを参照されたい)。M a x P a x LVは  
- 生成に改変されたU1 snRNAを必要としないが - RREの代わりにベクタ  
ー-イントロンを含有し (しかし、これは導入遺伝子の「スペース」にはカウントされな  
い)、さらにgag-Psiで短縮化され (わずかに約30nt)、約1kbの追加導入遺  
伝子のスペースが解放される。さらに、M a x P a x LVをC A R e / Z S L 1エレメ  
ントと共に使用して、大きなwPREを置き換えることができ、よって合計約1.5kb  
まで導入遺伝子容量を増加させることができる。

40

## 【1316】

したがって、標準的なLV、2K O - L V、及びM a x P a x (ベクター-イントロン  
) LVを、上記及び図71~73で詳述したように構築し、懸濁 (無血清) H E K 293  
T細胞のトランスフェクションによってベクター材料を生成するために使用し、次いでフ

50

ローサイトメトリー及び組込みアッセイによって接着HEK293Tで力価測定した。これらのアウトプット力価も図71～73に表示されている。(2KOLVは256U1を発現するプラスミドとの同時トランスフェクションで生成されたことに留意されたい)。これらの結果は、前述の新規シス作用性エレメントの異なる組合せを含有するすべてのベクター型が、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^8$  TU/mL の間の高力価で生成可能であったことを示す。

【実施例35】

【1317】

CARE/ZSL1 3'UTRエレメントとsupA-LTRをRRE依存性又はベクターイントロン依存性LV内で組み合わせる。転写リードスルーが組み込まれたLTR。

10

実施例34からのベクター調製物を使用して、接着HEK293T細胞をMOI 1で形質導入し、次いで、組み込まれたLVカセットからの測定のみが実施されることを確実にするために、形質導入の10日後の培養物において、5'LTRへの転写リードインの解析を行った。総RNAを抽出し、HIV-Psi RNAとGAPDH mRNAとのシグナルをRT-qPCRで測定した。これにより、「培養物」あたりの転写リードインの比率が得られたが、これらの値は実際のベクターコピー数に対して正規化され、各内部プロモーターGOIカセットバリエーションについて、wPRE/SIN-LTRの組合せ(すなわち標準的な構成)を保有するLVと比較した相対値として示した。これらのデータ、及び各場合の組み込まれたLVの最終的な立体構成を図74～76に表示する。

20

【1318】

これらの結果は、新規のsupA(2pA)-LTR技術が、組み込まれたLVカセットへの転写リードインから実質的に保護されることを明確に実証し、これは組み込まれたLTRの内部の配列に関係なく、また現在の標準的なLVに存在するネイティブのHIV-1ポリAシグナルに依存しない方法で、普遍的に当てはまる。

【実施例36】

【1319】

CARE/ZSL1 3'UTRエレメントとsupA-LTRとをRRE依存性又はベクターイントロン依存性LV内で組み合わせる。導入遺伝子発現。

実施例34及び35に記載した同じ実験の一部として、形質導入細胞内のGFP発現をフローサイトメトリーで評価し、GFP発現スコア(%GFP陽性細胞×蛍光強度の中央値)を得た。このスコアを細胞あたりのベクターコピー数(実施例35で決定した)で割り、異なる内部プロモーターを含有する各LVについてwPRE/SIN-LTRバリエーション(100に設定)と比較した。これらのデータは、図77～79に示され、接着HEK293T細胞において、supA(2pA)-LTRは、wPRE/SIN-LTR対照と比較して116%～150%増加した発現を提供することを示す。さらに、supA(2pA)-LTRの使用は、ベクターバックボーン、内部プロモーター又はCARE/ZSL1エレメントを含む3'UTRエレメントに関係なく、組み込まれたLVからの導入遺伝子発現を増加させ、それ自体が「エレメントなし」対照よりも発現を約2倍増加させた。CARE/ZSL1エレメントと一緒にsupA(2pA)-LTRを使用すると、CARE/ZSL1エレメントはwPREの40%以下のサイズであるにもかかわらず、wPREの導入遺伝子レベルの約50%を達成した(「エレメントなし」はwPREの約20%)。

30

40

【1320】

実施例71～73を要約すると、データは、導入遺伝子容量の増加(最大1.5kb)、導入遺伝子発現の増加(supA-2pA-LTR及び/又はCARE/ZSL1)、及び上流クロマチンからの転写リードインの減少(supA(2pA)-LTR)によって示される安全性の改善を伴う新世代のLVの生成において、本発明の異なる態様を組み合わせる強力な効果を得ることができることを示す。

【実施例37】

50

## 【1321】

CARe/ZSL1 3' UTRエレメントを、ベクターイントロン依存性LV内の逆向きの導入遺伝子3' UTR内で組み合わせると、リボザイムに媒介されるアウトプット力価の救済が高められる。

本発明の以前の実施例では、ベクターイントロンの構成／概念は、逆向きの導入遺伝子ペイロードのためにさらに開発され得ることを実証した。これは、ベクターイントロンLVゲノムを使用する場合、vRNA（すなわち上の鎖の転写産物）内に他のイントロンを保持することができないので望ましい。導入遺伝子カセットを逆向きにすることで、イントロンを保持することができる。しかし、dsRNAの生成（導入遺伝子mRNAとvRNAの塩基対合）により、dsRNA感知経路（PKRなど）がLV生成中にトリガーされ、力価が実質的に低下する可能性が高い。導入遺伝子の3' UTR内（上の鎖のVIに包含される部分）に自己切断配列及び／又は不安定配列を挿入するという概念は、リボザイムの使用によって実証された。自己切断リボザイムの効果は導入遺伝子mRNAを分解することであり、よって、dsRNAは生成されず、LV力価はある程度回復する。これらの自己切断／不安定配列は最終的にパッケージングされたvRNAから取り除かれるため、標的細胞には存在しない。この方法のもう一つの利点は、LV生成中に導入遺伝子発現が実質的に抑制され、生成細胞及び／又はLVアウトプット力価に対する導入遺伝子産物の潜在的な悪影響が否定されることである。

## 【1322】

このアプローチをさらに発展させるために、CARe.ZSL1 3' UTRエレメントを、図80のように、機能化された3' UTRを含有するベクターイントロンLVゲノムに用いた。LVは、逆向きのEF1a-GFPカセット、+／-リボザイムT3H38及びHDV\_\_AG（上の鎖のVIに包含される配列内に存在）、及び+／- CARe.ZSL1 3' UTRエレメント（上の鎖のVIに包含される配列の外側（この場合、逆向きのポリA配列とVIとの間）に配置）を保有するように構築した。LVは懸濁（無血清）HEK293T細胞で生成され、導入遺伝子の抑制を測定するために、生成終了細胞でGFP発現スコア（%GFP × MFI）を得た。LVを、GFP／フローサイトメトリー及び形質導入された接着HEK293T細胞の組込みアッセイによって力価測定した。これらのデータを図81に示すが、驚くべきことに、CARe.8t/ZSL1エレメントの存在により、LVの力価は標準的なLV（EF1a-GFP-wPREカセットを順方向に含有する）の2.5倍以内にまで回復した。さらに、生成細胞内でのGFP発現は、標準的なLV生成細胞と比較して、依然として非常に低いレベル（3桁以上）に抑制されていた。

## 【1323】

本発明の種々の好ましい特徴及び実施形態を、以下の番号づけされた項セットAを参照して以下に記載する：

## 【1324】

1. レンチウイルスベクターゲノムをコードする、又はレンチウイルスゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノムの3' LTRが、改変されたポリアデニル化配列を含み、改変されたポリアデニル化配列が、3' LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルを含む、ヌクレオチド配列。

## 【1325】

2. ネイティブ3' ポリアデニル化配列が、変異又は欠失している、項1のヌクレオチド配列。

## 【1326】

3. ネイティブ3' ポリアデニル化シグナルが、変異又は欠失している、項2のヌクレオチド配列。

## 【1327】

4. 改変されたポリアデニル化配列が、異種ポリアデニル化配列である、項1～3のいずれかのヌクレオチド配列。

10

20

30

40

50

【1328】

5. 改変されたポリアデニル化配列が、異種ポリアデニル化シグナルを含む、項1～4のいずれかのヌクレオチド配列。

【1329】

6. ポリアデニル化シグナルが、配列AATAAAを有する、項1～5のいずれかのヌクレオチド配列。

【1330】

7. 改変されたポリアデニル化配列が、強力なポリアデニル化配列である、項1～6のいずれかのヌクレオチド配列。

【1331】

8. 改変されたポリアデニル化配列が、ポリアデニル化上流エンハンサーエレメント (USE) をさらに含む、好ましくは、USEが、ポリアデニル化シグナルの5'にある、請求項1～7のいずれかのヌクレオチド配列。

【1332】

9. 改変されたポリアデニル化配列が、GUリッチ下流エンハンサーエレメントを含む、好ましくは、GUリッチ下流エンハンサーエレメントが、ポリアデニル化シグナルの3'である、請求項1～8のいずれかのヌクレオチド配列。

【1333】

10. エンハンサーエレメントが、強力なエンハンサーエレメントである、請求項8又は請求項9のヌクレオチド配列。

【1334】

11. 3'LTRのR領域の5'にあるポリアデニル化シグナルが、センス鎖にある、請求項1～10のいずれかのヌクレオチド配列。

【1335】

12. 3'LTRが、(i) センス鎖中のポリアデニル化シグナルの5'にあり、かつ(ii) 3'LTRのアタッチメント配列の3'にある、ポリアデニル化シグナルをアンチセンス鎖中にさらに含む、請求項11のヌクレオチド配列。

【1336】

13. 改変されたポリアデニル化配列が、サルウイルス40 (SV40)、ウサギペーターゲットロビン遺伝子、ヒト成長ホルモン遺伝子又はウシ成長ホルモン遺伝子に由来する配列である、項1～12のいずれかのヌクレオチド配列。

【1337】

14. 改変されたポリアデニル化配列が、合成配列である、項1～13のいずれかのヌクレオチド配列。

【1338】

15. 改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域が、最小R領域である、項1～14のいずれかのヌクレオチド配列。

【1339】

16. 最小R領域の長さが、

- (a) 少なくとも10ヌクレオチド、
- (b) 少なくとも12ヌクレオチド、
- (c) 少なくとも14ヌクレオチド、
- (d) 少なくとも16ヌクレオチド、
- (e) 少なくとも18ヌクレオチド、又は
- (f) 少なくとも20ヌクレオチド

である、項15のヌクレオチド配列。

【1340】

17. 最小R領域が、ネイティブR領域に由来する配列を含む、項15又は項16のヌクレオチド配列。

【1341】

10

20

30

40

50

18. 改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域が、レンチウイルスベクターゲノムのネイティブ5'LTR R領域に対して相同である、項1～17のいずれかのヌクレオチド配列。

【1342】

19. 改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域が、3'ポリアデニル化シグナルの0～6ヌクレオチド下流にある、項1～18のいずれかのヌクレオチド配列。

【1343】

20. 改変されたポリアデニル化配列の3'LTR R領域が、3'ポリアデニル化シグナルのすぐ下流にある、項1～19のいずれかのヌクレオチド配列。

【1344】

21. 改変されたポリアデニル化配列が、ポリアデニル化切断部位をさらに含む、項1～20のいずれかのヌクレオチド配列。

【1345】

22. ポリアデニル化切断部位が、少なくとも1つのCAジヌクレオチドモチーフを含む、項21のヌクレオチド配列。

【1346】

23. ポリアデニル化切断部位が、ポリアデニル化シグナルの3'である、項21又は項22のヌクレオチド配列。

【1347】

24. レンチウイルスベクターゲノムをコードする、又はレンチウイルスゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノムが、改変された5'LTRを含み、改変された5'LTRのR領域が、ポリアデニル化下流エンハンサーエレメント(DSE)を含む、ヌクレオチド配列。

【1348】

25. 改変された5'LTRの最初の55ヌクレオチドが、ポリアデニル化DSEを含む、好ましくは、改変された5'LTRの最初の40ヌクレオチドが、少なくとも1つのポリアデニル化DSEを含む、項24のヌクレオチド配列。

【1349】

26. ポリアデニル化DSEが、改変された5'LTRのステムループ構造内に含まれる、項24又は項25のヌクレオチド配列。

【1350】

27. ポリアデニル化DSEが、改変された5'LTRのループ1内に含まれる、項24～26のいずれかのヌクレオチド配列。

【1351】

28. ポリアデニル化DSEが、GUリッチ配列である、項24～27のいずれかのヌクレオチド配列。

【1352】

29. GUリッチ配列が、RSV若しくはMMTVに由来する、又はGUリッチ配列が合成である、項28のヌクレオチド配列。

【1353】

30. 改変された5'LTRのネイティブポリアデニル化シグナルが、変異又は欠失している、項24～29のいずれかのヌクレオチド配列。

【1354】

31. 改変された5'LTRが、ネイティブポリアデニル化シグナルを含まない、項24～30のいずれかのヌクレオチド配列。

【1355】

32. 改変された5'LTRの5'R領域が、ポリアデニル化切断部位をさらに含む、項24～31のいずれかのヌクレオチド配列。

【1356】

33. レンチウイルスベクターゲノムをコードする、又はレンチウイルスゲノム発現カ

10

20

30

40

50

セットを含むヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノムの 3'LTR が、項 1～23 のいずれかに定義される改変された 3'LTR であり、レンチウイルスベクターゲノムの 5'LTR が、項 24～32 のいずれかに定義される改変された 5'LTR である、ヌクレオチド配列。

【1357】

34. 改変された 5'LTR の R 領域が、改変された 3'LTR の R 領域に対して相同であり、改変された 3'LTR の R 領域が、改変された 3'LTR 内の 3'ポリアデニル化シグナルのすぐ下流にある、項 34 のヌクレオチド配列。

【1358】

35. 改変された 5'LTR の R 領域が、改変された 3'LTR の R 領域と同一であり、改変された 3'LTR の R 領域が、改変された 3'LTR の 3'ポリアデニル化シグナルのすぐ下流にある、項 33 又は項 34 のヌクレオチド配列。

【1359】

36. レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノムが、改変された 3'LTR 及び改変された 5'LTR を含み、改変された 3'LTR が、3'LTR 内の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、3'LTR 内の R 領域が、ポリアデニル化 DSE を含み、改変された 5'LTR が、5'LTR 内の R 領域の 5'にあるポリアデニル化シグナルを含む改変されたポリアデニル化配列を含み、5'LTR 内の R 領域が、ポリアデニル化 DSE を含む、ヌクレオチド配列。

【1360】

37. ネイティブ 3'LTR ポリアデニル化配列が、変異又は欠失している項 36 のヌクレオチド配列。

【1361】

38. ネイティブ 3'LTR ポリアデニル化シグナル及び／又はネイティブ 5'LTR ポリアデニル化シグナルが、変異又は欠失している、項 37 のヌクレオチド配列。

【1362】

39. 改変されたポリアデニル化配列が、異種ポリアデニル化配列である、項 36～38 のいずれかのヌクレオチド配列。

【1363】

40. 改変された 3'LTR 及び改変された 5'LTR が同一である、項 36～39 のいずれかのヌクレオチド配列。

【1364】

41. レンチウイルスベクターゲノム中のメジャースプライドナー部位が不活化されており、任意選択で、メジャースプライドナー部位の 3'の潜在的スプライドナー部位が、不活化されている、項 1～40 のいずれかのヌクレオチド配列。

【1365】

42. 不活化されたメジャースプライドナー部位が、配列番号 4 に示される配列を有する、項 41 のヌクレオチド配列。

【1366】

43. レンチウイルスベクターゲノムが、トリプトファン RNA 結合転写減衰タンパク質 (TRAP) 結合部位をさらに含む、項 1～42 のいずれかのヌクレオチド配列。

【1367】

44. ヌクレオチド配列が、改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、前記改変された U1 snRNA が、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている、項 1～43 のいずれかのヌクレオチド配列。

【1368】

45. レンチウイルスベクターゲノムをコードするヌクレオチド配列が、改変された U1 snRNA をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、項 44 のヌ

10

20

30

40

50

レオチド配列。

【1369】

46. レンチウイルスベクターゲノムが、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列を含み、ウイルスシス作用性配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されている、項1～45のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1370】

47. 少なくとも1つのウイルスシス作用性配列が、ウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WPRE) 及び／又は Rev 応答エレメント (RRE) である、項46に記載のヌクレオチド配列。

10

【1371】

48. レンチウイルスベクターゲノムが、gag をコードする改変されたヌクレオチド配列を含み、gag をコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されている、項1～47のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1372】

49. 少なくとも1つの内部 ORF が、ヌクレオチド配列内の少なくとも1つの ATG 配列を変異させることによって破壊されている、好ましくは、ヌクレオチド配列内の最初の ATG 配列が変異している、項46～48のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1373】

20

50. レンチウイルスベクターゲノムが、(i) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列又は (ii) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片を欠く、項1～49のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1374】

51. Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片が、p17 不安定性エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む、項50に記載のヌクレオチド配列。

【1375】

52. レンチウイルスベクターゲノムを含むヌクレオチド配列が、Gag-p17 又はその断片を発現しない、項1～51のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1376】

30

53. Gag-p17 の前記断片が、p17 不安定性エレメントを含む、項52に記載のヌクレオチド配列。

【1377】

54. 項1～35又は41～53のいずれかのヌクレオチド配列によってコードされるレンチウイルスベクターゲノム。

【1378】

55. 項1～54のいずれかに定義されるレンチウイルスベクターゲノム。

【1379】

56. 項1～53のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含む発現カセット。

【1380】

40

57. ヌクレオチド配列が、gag-pol、env、任意選択で、rev を含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列のセット、及び項1～53のいずれかのヌクレオチド配列を含むウイルスベクター生成システム。

【1381】

58. 項1～53のいずれかのヌクレオチド配列、項56の発現カセット又は項57のベクター生成システムを含む、細胞。

【1382】

59. レンチウイルスベクターを生成するための細胞であって、

(a) gag-pol 及び env を含み、並びに任意選択で、rev を含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、及び項1～53のいずれかのレンチウイルス

50

ベクターのRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列若しくは項56の発現カセット、又は

b. 項57のウイルスベクター生成システム、並びに

(b) 任意選択で、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列及び／又は任意選択で、TRAPをコードするヌクレオチド配列を含む、細胞。

【1383】

60. レンチウイルスベクターのRNAゲノムのメジャースプライスドナー部位及び／又はスプライスドナー領域からのスプライシング活性が抑制又は除去される、項58又は項59の細胞。

【1384】

61. レンチウイルスベクター生成の際に、レンチウイルスベクターのRNAゲノムのメジャースプライスドナー部位及び／又はスプライスドナー領域からのスプライシング活性が抑制又は除去される、項60の細胞。

【1385】

62. レンチウイルスベクターを生成するための方法であって、

(a) a. gag-pol及びenvを含み、並びに任意選択で、revを含むベクター構成成分をコードするヌクレオチド配列、及び項1～53のいずれかのレンチウイルスベクターのRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列若しくは項56の発現カセット、又は

b. 項57のウイルスベクター生成システム

を細胞中に導入するステップ、並びに

(b) 任意選択で、レンチウイルスベクターのベクター構成成分及びRNAゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む細胞を選択するステップ、並びに

(c) レンチウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法。

【1386】

63. 項62の方法によって生成されるレンチウイルスベクター。

【1387】

64. レンチウイルスベクターが、項1～53のいずれかに定義されるレンチウイルスベクターのRNAゲノムを含む、項63のレンチウイルスベクター。

【1388】

65. レンチウイルスベクターを生成するための、項1～53のいずれかのレンチウイルスベクターのRNAゲノム、項56の発現カセット、項57のウイルスベクター生成システム又は項58若しくは項59の細胞の使用。

【1389】

66. 項54又は項55のレンチウイルスベクターゲノムを含むレンチウイルスベクター。

【1390】

本発明の種々の好ましい特徴及び実施形態を、以下の番号づけされた項セットBを参照して以下に記載する：

【1391】

1. 導入遺伝子発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、導入遺伝子発現カセットの3'UTRが、

a) 少なくとも1つのCARエレメント(CARe)配列を含むシス作用性細胞質蓄積領域(CAR)配列、及び／又は

b) 少なくとも1つのCNGGN型ペントループ配列を含むシス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列であって、全長転写後調節エレメント(PRE)αエレメントを含まず、全長PREγエレメントを含まないシス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列から選択される少なくとも1つのシス作用性配列を含む、ヌクレオチド配列。

10

20

30

40

50

【1392】

2. CAR配列が、複数のCARe配列を含む、項1のヌクレオチド配列。

【1393】

3. 複数のCARe配列が、タンデムに並んでいる、項1又は項2のヌクレオチド配列。

【1394】

4. CAR配列が、少なくとも2個、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個、少なくとも18個又は少なくとも20個のCARe配列を含み、任意選択で、CARe配列がタンデムに並んでいる、項2又は3のヌクレオチド配列。

【1395】

5. CAR配列が、タンデムに並んでいる少なくとも6個のCARe配列又はタンデムに並んでいる少なくとも10個のCARe配列を含む、項4のヌクレオチド配列。

【1396】

6. CAR配列が、タンデムに並んでいる少なくとも8個のCARe配列、タンデムに並んでいる少なくとも12個のCARe配列又はタンデムに並んでいる少なくとも16個のCARe配列を含む、項5のヌクレオチド配列。

【1397】

7. CAReヌクレオチド配列が、BMWGHWSWS（配列番号92）又はBMWRHWSWS（配列番号243）である、項1～6のいずれかのヌクレオチド配列。

【1398】

8. CAReヌクレオチド配列が、CMAGHWSSTG（配列番号96）である、項7のヌクレオチド配列。

【1399】

9. CAReヌクレオチド配列が、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCAGATCC TG（配列番号97）、CCAGTTCCTC（配列番号99）、TCAGATCCTG（配列番号100）、CCAGATGGTG（配列番号101）、CCAGTTCCAG（配列番号102）、CCAGCAGCTG（配列番号103）、CAAGCTCCTG（配列番号104）、CAAGATCCTG（配列番号105）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CAAGAACGTG（配列番号107）、TCAGTTCCTG（配列番号227）、GCAGTTCCTG（配列番号228）、CAAGTTCCTG（配列番号229）、CCTGTTCCTG（配列番号230）、CCTGCTCCTG（配列番号231）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTGCTG（配列番号233）、CCTGTTCGTG（配列番号234）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCTGTTCCTC（配列番号236）、CCAATTCCTG（配列番号237）及びGAAGCTCC TG（配列番号238）；からなる群から選択され、任意選択で、CAReヌクレオチド配列が、CCAGTTCCTG（配列番号97）、CCTGTTCCTG（配列番号230）、CCTGTACCTG（配列番号232）、CCTGTTCCAG（配列番号235）、CCAATTCCTG（配列番号237）、CCTGAACCTG（配列番号106）、CCAGTTCCTC（配列番号99）及びCCAGTTCCAG（配列番号102）からなる群から選択される、項7のヌクレオチド配列。

【1400】

10. CAReヌクレオチド配列が、CCAGTTCCTG（配列番号97）である、項9のヌクレオチド配列。

【1401】

11. 導入遺伝子発現カセットの3'UTRが、追加の転写後調節エレメント（PRE）を含まない、項1～10のいずれかのヌクレオチド配列。

【1402】

12. 導入遺伝子発現カセットの3'UTRが、少なくとも1つの追加の転写後調節エレメント（PRE）を含む、項1～10のいずれかのヌクレオチド配列。

【1403】

13. 追加のPREが、ウッドチャック肝炎ウイルスPRE (wPRE) である、項12のヌクレオチド配列。

【1404】

14. シス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列が、PRE  $\alpha$  エlement断片である、項1～13のいずれかのヌクレオチド配列。

【1405】

15. シス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列が、

a) HBV PRE  $\alpha$  Elementの断片、又は

b) HCMV RNA 2.7の断片、又は

c) wPRE  $\alpha$  Elementの断片

である、項14のヌクレオチド配列。

【1406】

16. PRE  $\alpha$  Element断片の長さが、200ヌクレオチド以下である、項14又は15のヌクレオチド配列。

【1407】

17. PRE  $\alpha$  Element断片の長さが、90ヌクレオチド以下である、項16のヌクレオチド配列。

【1408】

18. CNGGN型ペントループ配列が、

(i) TCCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGA (配列番号108) ; 及び

(ii) GCCCGCTGCTGGACAGGGGC (配列番号109)

からなる群から選択される配列を有するステムループ構造内に含まれる、項1～17のいずれかのヌクレオチド配列。

【1409】

19. CNGGN型ペントループ配列が、異種ステムループ構造内に含まれる、項1～18のいずれかのヌクレオチド配列。

【1410】

20. ZCCHC14タンパク質結合配列が、

(i) TGCCGTCGCCACCGCGTTATCCGTTCTCGTAGGCTGGTCCTGGGGAACGGGTCGGCGGGCGGTCGGCTTCT (配列番号110) ; 及び

(ii) CTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT (配列番号111)

からなる群から選択される配列を含む、項18又は19のヌクレオチド配列。

【1411】

21. 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、シス作用性CAR配列及びシス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列を含み、任意選択で、ZCCHC14タンパク質結合配列が、CAR配列の3' に位置づけられる、項1～20のいずれかのヌクレオチド配列。

【1412】

22. 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、少なくとも2つ空間的に別個のシス作用性CAR配列及び／又は少なくとも2つ空間的に別個のシス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列を含む、項1～21のいずれかのヌクレオチド配列。

【1413】

23. 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、シス作用性CAR配列及び／又はシス作用性ZCCHC14タンパク質結合配列の3' に位置づけられるポリA配列をさらに含む、項1～22のいずれかのヌクレオチド配列。

【1414】

24. 導入遺伝子発現カセットが、導入遺伝子に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、項1～23のいずれかのヌクレオチド配列。

【1415】

25. プロモーターが、ネイティブイントロンを欠き、任意選択で、プロモーターが、

10

20

30

40

50

E F Sプロモーター、P G Kプロモーター及びU B Cプロモーターからなる群から選択される、項24のヌクレオチド配列。

【1416】

26. プロモーターが、イントロンを含み、任意選択で、プロモーターが、E F 1 aプロモーター及びU B Cプロモーターからなる群から選択される、項24のヌクレオチド配列。

【1417】

27. 導入遺伝子発現カセットが、ウィルスベクター導入遺伝子発現カセットである、項1～26のいずれかのヌクレオチド配列。

【1418】

28. ウィルスベクター導入遺伝子発現カセットが、レトロウィルスベクター導入遺伝子発現カセット、アデノウィルスベクター導入遺伝子発現カセット、アデノ随伴ウィルスベクター導入遺伝子発現カセット、単純ヘルペスウィルスベクター導入遺伝子発現カセット及びワクシニアウィルスベクター導入遺伝子発現カセットからなる群から選択される、項27のヌクレオチド配列。

【1419】

29. ウィルスベクター導入遺伝子発現カセットが、レトロウィルスベクター導入遺伝子発現カセット又はアデノ随伴ウィルスベクター導入遺伝子発現カセットである、項28のヌクレオチド配列。

【1420】

30. レトロウィルスベクター導入遺伝子発現カセットが、レンチウィルスベクター導入遺伝子発現カセットである、項29のヌクレオチド配列。

【1421】

31. ウィルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、ウィルスベクターゲノム発現カセットが、項1～30のいずれかのヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド配列。

【1422】

32. ウィルスベクターゲノム発現カセットが、レトロウィルスベクターゲノム発現カセット、アデノウィルスベクターゲノム発現カセット、アデノ随伴ウィルスベクターゲノム発現カセット、単純ヘルペスウィルスベクターゲノム発現カセット及びワクシニアウィルスベクターゲノム発現カセットからなる群から選択される、項31のヌクレオチド配列。

【1423】

33. ウィルスベクターゲノム発現カセットが、レトロウィルスベクターゲノム発現カセット又はアデノ随伴ウィルスベクター導入遺伝子発現カセットである、項32のヌクレオチド配列。

【1424】

34. レトロウィルスベクターゲノム発現カセットの3' UTRが、DNA結合 (a t t) 部位の5' に位置づけられる3' ポリプリン管 (3' p p t) をさらに含み、導入遺伝子発現カセットが、ゲノム発現カセットに対して順方向にある場合には、シス作用性配列が、3' p p tの5' 及び／又はa t t部位の3' に位置づけられる、項33のヌクレオチド配列。

【1425】

35. レトロウィルスベクターゲノム発現カセットが、レンチウィルスベクターゲノム発現カセットである、項33又は項34のヌクレオチド配列。

【1426】

36. レンチウィルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が不活化されている、任意選択で、メジャースプライスドナー部位の3' の潜在的スプライスドナー部位も不活化されている、項35のヌクレオチド配列。

【1427】

10

20

30

40

50

37. 不活化されたメジャースプライドナー部位が、GGGGAAGGCAACAGATAAA TATGCCTTAAAT (配列番号4) の配列を有する、項36のヌクレオチド配列。

【1428】

38. ヌクレオチド配列が、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、改変されたU1 snRNAが、レンチウイルスベクターゲノムのパッケージング領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている、項35～37のいずれかのヌクレオチド配列。

【1429】

39. ウイルスベクターゲノム発現カセットが、改変されたU1 snRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している、項38のヌクレオチド配列。

【1430】

40. 項31～39のいずれかのヌクレオチド配列によってコードされるウイルスベクターゲノムを含むウイルスベクター。

【1431】

41. 項1～39のいずれかに記載のヌクレオチド配列及びウイルスベクター構成成分をコードする1つ又は2つ以上の追加のヌクレオチド配列を含むウイルスベクター生成システム。

【1432】

42. 1つ又は2つ以上の追加のヌクレオチド配列が、gag-pol及びenvをコードし、並びに任意選択で、revをコードする、項41のウイルスベクター生成システム。

【1433】

43. 項1～39のいずれかに記載のヌクレオチド配列、項40に記載のウイルスベクター又は項41若しくは42に記載のウイルスベクター生成システムを含む、細胞。

【1434】

44. ウイルスベクターを生成するための方法であって、

(a) 項41又は42のウイルスベクター生成システムを細胞中に導入するステップ、及び

(b) ウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法。

【1435】

45. 項44の方法によって生成されるウイルスベクター。

【1436】

46. ウイルスベクターを生成するための、項1～39のいずれかのヌクレオチド配列、項41又は42のウイルスベクター生成システム又は項43の細胞の使用。

【1437】

47. 標的細胞において導入遺伝子発現を改善する1つ又は2つ以上のシス作用性配列を同定する方法であって、

(a) 標的細胞に項40又は45のウイルスベクターを形質導入するステップ、

(b) 高レベル導入遺伝子発現を有する標的細胞を導入するステップ、及び

(c) 任意選択で、これらの標的細胞内に存在する導入遺伝子mRNAの3'UTR内に位置づけられる1つ又は2つ以上のシス作用性配列を同定するステップを含む、方法。

【1438】

48. ステップ(c)が、RT-PCRを実施するステップ、及び任意選択で、導入遺伝子mRNAをシーケンシングするステップを含む、項47の方法。

【1439】

49. 標的細胞における導入遺伝子発現を改善する1つ又は2つ以上のシス作用性配列を同定するために、

(i) 導入遺伝子発現カセットの3'UTR中の異なるシス作用性配列、及び／又は

10

20

30

40

50

(ii) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR内の異なるシス作用性配列位置、及び／又は  
(iii) 導入遺伝子発現カセットの3' UTR中の異なるシス作用性配列組合せ  
を有する複数のウイルスベクターを使用して実施される、項47又は48の方法。

【1440】

本発明の種々の好ましい特徴及び実施形態を、以下の番号づけされた項セットCを参照して以下に記載する：

【1441】

1. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、  
i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されており、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、並びに

iv) a) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に

i. ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられず、及び／又は

ii. ヌクレオチド配列が、配列番号2、3、4、6、7及び／若しくは8のいずれかに示される配列及び／若しくは配列CAGACA及び／若しくはGTGGAGACTを含み、及び／又は

iii. 導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、ベクターイントロンを含み、並びに／あるいは

b) ベクターイントロンが、1つ若しくは2つ以上の導入遺伝子mRNA自己不安定化エレメント、導入遺伝子mRNA自己崩壊エレメント若しくは導入遺伝子mRNA核内保持シグナルを含み、並びに／あるいは

c) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位の3'末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、ヌクレオチド配列。

【1442】

2. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されており、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、並びに

iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、ヌクレオチド配列。

【1443】

3. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、

i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されず、

ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev応答エレメントを含まない、

iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含み、並びに

iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対し

10

20

30

40

50

て逆向きである場合に、ヌクレオチド配列が、配列番号 2、3、4、6、7 及び／若しくは 8 のいずれかに示される配列及び／又は配列 CAGACA 及び／若しくは GTGGAGACT を含む、ヌクレオチド配列。

【1444】

4. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、  
i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されている、  
ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev 応答エレメントを含まない、並びに  
iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、並びに  
iv) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、ベクターイントロンを含む、  
ヌクレオチド配列。

10

【1445】

5. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、  
i) レンチウイルスベクターゲノム発現カセット中のメジャースプライスドナー部位及びメジャースプライスドナー部位の 3' 末端に隣接する潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、  
ii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、rev 応答エレメントを含まない、  
iii) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含む、  
ヌクレオチド配列。

20

【1446】

6. 前記ベクターイントロンが、1つ又は2つ以上の導入遺伝子 mRNA 自己不安定化エレメント、導入遺伝子 mRNA 自己崩壊エレメント又は導入遺伝子 mRNA 核内保持シグナルを含む、項 2～5 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1447】

7. 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、項 3～6 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

30

【1448】

8. 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、ヌクレオチド配列が、配列番号 2、3、4、6、7 及び／若しくは 8 のいずれかに示される配列並びに／又は配列 CAGACA 及び／若しくは GTGGAGACT を含む、項 2 又は 4～6 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1449】

9. 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、導入遺伝子発現カセットの 3' UTR が、ベクターイントロンを含む、項 2、3、5 又は 6 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

40

【1450】

10. ベクターイントロンが、導入遺伝子発現カセットのプロモーターと導入遺伝子の間に位置づけられない、項 1～9 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1451】

11. ヌクレオチド配列が、配列番号 2、3、4、6、7 及び／若しくは 8 のいずれかに示される配列並びに／又は配列 CAGACA 及び／若しくは GTGGAGACT を含む、項 1～10 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1452】

50

12. (a) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである場合に、導入遺伝子発現カセットの3' UTRが、ベクターイントロンを含み、又は

(b) 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある場合に、ベクターイントロンが、導入遺伝子の5' 若しくは導入遺伝子発現カセットに位置づけられる、項1～11のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1453】

13. 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである、項1～12のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1454】

14. 導入遺伝子発現カセットが、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある、項1～13のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1455】

15. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列を含み、ウイルスシス作用性配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム(ORF)が破壊されている、項1～14のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1456】

16. 少なくとも1つのウイルスシス作用性配列が、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHV) 転写後調節エレメント(WPRE)である、項1～15のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1457】

17. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含み、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム(ORF)が破壊されている、項1～16のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1458】

18. 改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部ORFが、ヌクレオチド配列内の少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊されている、項15～17のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1459】

19. 改変されたヌクレオチド配列内の最初のATG配列が変異している、項18に記載のヌクレオチド配列。

【1460】

20. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、(i) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片を欠く、項1～19のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1461】

21. Gag-p17をコードするヌクレオチド配列の断片が、p17不安定性エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む、項20に記載のヌクレオチド配列。

【1462】

22. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列が、Gag-p17又はその断片を発現しない、項1～21のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【1463】

23. Gag-p17の前記断片が、p17不安定性エレメントを含む、項22に記載のヌクレオチド配列。

【1464】

24. 前記ベクターイントロンが、合成ベクターイントロンである、項1～23のいずれかのヌクレオチド配列。

【1465】

10

20

30

40

50

25. 前記合成イントロンが、HIV-1 グアノシン-アデノシンリッチ (GAR) スプライシングエレメントを含む、項1～24のいずれかのヌクレオチド配列。

【1466】

26. 前記ベクターイントロンが、スプライスドナー配列を含み、前記スプライスドナー配列が、U1 snRNA配列の一部分と相補的である7～11ヌクレオチドを含む、項1～25のいずれかのヌクレオチド配列。

【1467】

27. 前記ベクターイントロンが、スプライスドナー配列の上流にHIV-1 グアノシン-アデノシンリッチ (GAR) スプライシングエレメントを含む合成ベクターイントロンである、項26のヌクレオチド配列。

【1468】

28. 前記ベクターイントロンが、ヒトベクターグロビンイントロン-2のブランチ部位及びスプライサクセプターを含む合成イントロンである、項1～27のいずれかのヌクレオチド配列。

【1469】

29. 前記導入遺伝子mRNA自己不安定化又は自己崩壊エレメントが、以下：

(a) 自己切断性リボザイム

(b) AUリッチエレメント、及び／又は

(c) 逆向きの導入遺伝子mRNAを標的とする干渉RNA、好ましくは、miRNA又はshRNA

のうち少なくとも1つを含む、項1、6～8又は10～28のいずれかのヌクレオチド配列。

【1470】

30. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列であって、レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、

(a) レンチウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである導入遺伝子発現カセット、及び

(b) miRNAをコードするヌクレオチド発現カセットを含むベクターイントロンを含み、

miRNAが、導入遺伝子をコードするmRNAを標的とし、好ましくは、miRNAのガイド鎖が、導入遺伝子をコードするmRNAと完全に相補的である、任意選択で、ヌクレオチド配列が、レンチウイルスベクター生成細胞において使用するものである、ヌクレオチド配列。

【1471】

31. miRNAのパッセンジャー鎖が、ベクターゲノムRNA中にその標的配列との少なくとも1つのミスマッチを含み、好ましくは、miRNAが、ベクターゲノムRNAを標的としない、項30のヌクレオチド配列。

【1472】

32. ヌクレオチド配列が、gag-pol及びenvをコードするヌクレオチド配列のセット、及び項1～31のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含むウイルスベクター生成システム。

【1473】

33. ウイルスベクター生成システムが、revをコードするヌクレオチド配列を含まない、項32に記載のウイルスベクター生成システム。

【1474】

34. 項1～31のいずれかに記載のヌクレオチド配列又は項32若しくは項33に記載のウイルスベクター生成システムを含む、細胞。

【1475】

35. レンチウイルスベクターを生成するための細胞であって、

(i) a) gag-pol及びenvをコードするヌクレオチド配列及び項1～31の

10

20

30

40

50

いずれかに記載のヌクレオチド配列、又は

b) 項 3 2 若しくは項 3 3 に記載のウイルスベクター生成システム、並びに

(ii) 任意選択で、T R A P をコードするヌクレオチド配列

を含む、細胞。

【1 4 7 6】

3 6 . r e v をコードするヌクレオチド配列を含まない、項 3 5 に記載の細胞。

【1 4 7 7】

3 7 . レンチウイルスベクターを生成するための方法であって、

( i ) a )

i . ヌクレオチド配列 g a g - p o l 及び e n v 及び項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、又は

ii . 項 3 2 若しくは項 3 3 に記載のウイルスベクター生成システム、及び

b ) 任意選択で、T R A P をコードするヌクレオチド配列

を細胞中に導入するステップ、

(ii) 任意選択で、g a g - p o l 及び e n v をコードするヌクレオチド配列及び項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含む細胞について選択するステップ、並びに

(iii) レンチウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法。

【1 4 7 8】

3 8 . 細胞が、r e v をコードするヌクレオチド配列を含まない、項 3 7 に記載の方法。

【1 4 7 9】

3 9 . 項 3 7 又は項 3 8 に記載の方法によって生成されるレンチウイルスベクター。

【1 4 8 0】

4 0 . レンチウイルスベクターが、スプライスジャンクション配列を含み、好ましくは、スプライスジャンクション配列が、配列番号 1 9 に示される配列を有する、項 3 9 に記載のレンチウイルスベクター。

【1 4 8 1】

4 1 . レンチウイルスベクターを生成するための、項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載のヌクレオチド配列、項 3 2 若しくは項 3 3 に記載のウイルスベクター生成システム又は項 3 4 ~ 3 6 のいずれかに記載の細胞の使用。

【1 4 8 2】

本発明の種々の好ましい特徴及び実施形態を、以下の番号づけされた項セット D を参照して以下に記載する：

【1 4 8 3】

1 . レトロウイルスベクターを生成するための核酸配列のセットであって、

( i ) レトロウイルスベクターゲノムが導入遺伝子発現カセットを含む、レトロウイルスベクターゲノムをコードする核酸配列、及び

(ii) 導入遺伝子をコードする m R N A に対して特異的である干渉 R N A をコードする少なくとも 1 つの核酸配列を含む、核酸配列のセット。

【1 4 8 4】

2 . G a g / p o l 及び e n v をコードする核酸配列又はその機能的代替物をさらに含む、項 1 の核酸配列のセット。

【1 4 8 5】

3 . r e v をコードする核酸配列又はその機能的代替物をさらに含む、項 1 又は項 2 の核酸配列のセット。

【1 4 8 6】

4 . 導入遺伝子発現カセットが、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して

10

20

30

40

50

逆向きである、項 1 ～ 3 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 8 7 】

5. 導入遺伝子発現カセットが、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して順方向にある、項 1 ～ 4 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 8 8 】

6. 導入遺伝子発現カセットの 3' UTR 又は 5' UTR が、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含む、項 1 ～ 5 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 8 9 】

7. 導入遺伝子発現カセットが、3' UTR 又は 5' UTR 内の少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列を含むように遺伝子操作されている、項 1 ～ 6 のいずれかの核酸配列のセット。

10

【 1 4 9 0 】

8. 干渉 RNA が、少なくとも 1 つの標的ヌクレオチド配列に対して特異的である、項 6 又は項 7 の核酸配列のセット。

【 1 4 9 1 】

9. 複数の標的ヌクレオチド配列に対して特異的な複数の干渉 RNA をコードする複数の核酸配列を含む、項 6 又は項 7 の核酸配列のセット。

【 1 4 9 2 】

10. 干渉 RNA が、導入遺伝子をコードする mRNA の切断を促進する、項 1 ～ 9 のいずれかの核酸配列のセット。

20

【 1 4 9 3 】

11. 干渉 RNA が、切断のために導入遺伝子をコードする mRNA を標的とする、項 1 ～ 10 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 9 4 】

12. 干渉 RNA が、RISC による切断のために導入遺伝子をコードする mRNA を標的とする、項 1 ～ 11 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 9 5 】

13. 干渉 RNA が、siRNA、siRNA、tsiRNA、RNA-DNA キメラ二本鎖、tkRNA、Dicer 基質 dsRNA、shRNA、tRNA-shRNA、aiRNA、miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA ミミック、pri-miRNA ミミッククラスター、転写遺伝子サイレンシング (TGS) 及び／又はそれらの組合せである、項 1 ～ 12 のいずれかの核酸配列のセット。

30

【 1 4 9 6 】

14. 干渉 RNA が、siRNA、shRNA 及び／又は miRNA である、項 1 ～ 13 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 9 7 】

15. 干渉 RNA が miRNA である、項 1 ～ 14 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 4 9 8 】

16. miRNA のガイド鎖が、導入遺伝子 mRNA の標的配列と完全に相補的である、項 13 ～ 15 のいずれかの核酸配列のセット。

40

【 1 4 9 9 】

17. miRNA が、レトロウイルスベクターの RNA ゲノム内にその相補配列との少なくとも 1 つのミスマッチを含むパッセンジャー鎖を含む、項 14 の核酸配列のセット。

【 1 5 0 0 】

18. レトロウイルスベクターゲノムをコードする核酸が、干渉 RNA をコードする核酸配列を含む、項 1 ～ 17 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 5 0 1 】

19. レトロウイルスベクターゲノム発現カセットが、ベクターイントロンをさらに含む、項 1 ～ 18 のいずれかの核酸配列のセット。

【 1 5 0 2 】

50

20. ベクターイントロンが、干渉RNAをコードする核酸配列を含む、項19の核酸配列のセット。

【1503】

21. レトロウイルスベクターゲノムをコードする第1の核酸配列及び干渉RNAをコードする少なくとも第2の核酸配列を含む、項1～17のいずれかの核酸配列のセット。

【1504】

22. レトロウイルスベクターゲノムをコードする核酸が、干渉RNAをコードする核酸配列を含まない、項1～17又は21のいずれかの核酸配列のセット。

【1505】

23. レトロウイルスベクターゲノムが、トリプトファンRNA結合転写減衰タンパク質 (TRAP) 結合部位をさらに含む、項1～22のいずれかの核酸配列のセット。

【1506】

24. レトロウイルスベクターゲノム中のメジャースプライスドナー部位が、不活化されている、任意選択で、メジャースプライスドナー部位の3'の潜在的スプライスドナー部位が、不活化されている、項1～23のいずれかの核酸配列のセット。

【1507】

25. 不活化されたメジャースプライスドナー部位が、配列番号4に示される配列を有する、項24の核酸配列のセット。

【1508】

26. 核酸配列のセットが、改変されたU1 snRNAをコードする核酸配列をさらに含み、改変されたU1 snRNAが、レトロウイルスベクターゲノム配列のパッケージ領域内のヌクレオチド配列に結合するように改変されている、項1～26のいずれかの核酸配列のセット。

【1509】

27. 導入遺伝子が、治療効果をもたらす、項1～26のいずれかの核酸配列のセット。

【1510】

28. レトロウイルスベクターが、レンチウイルスベクターであり、好ましくは、レンチウイルスベクターが、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、BIV、EIAV、CAEV又はビスナレンチウイルスに由来する、項1～27のいずれかの核酸配列のセット。

【1511】

29. レンチウイルスベクターゲノムが、少なくとも1つの改変されたウイルスシス作用性配列を含み、ウイルスシス作用性配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されている、項28の核酸配列のセット。

【1512】

30. 少なくとも1つのウイルスシス作用性配列が、(a) Rev応答エレメント (RRE) 及び／又は (b) ウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WPRES) である、項29の核酸配列のセット。

【1513】

31. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列を含み、gagをコードする改変されたヌクレオチド配列中の少なくとも1つの内部オープンリーディングフレーム (ORF) が破壊されている、項28～30のいずれかの核酸配列のセット。

【1514】

32. 少なくとも1つの内部ORFが、少なくとも1つのATG配列を変異させることによって破壊されている、項29～31のいずれかの核酸配列のセット。

【1515】

33. (a) 改変されたRREが、8未満のATG配列を含み、及び／又は (b) 改変されたWPRESが、7未満のATG配列を含む、項30～32のいずれかに記載の核酸配

10

20

30

40

50

列のセット。

【1516】

34. gag をコードするヌクレオチド配列内の最初の ATG 配列が変異している、項31の核酸配列のセット。

【1517】

35. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットが、(i) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列又は(ii) Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片を欠く、好ましくは、Gag-p17 をコードするヌクレオチド配列の断片が、p17 不安定性エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む、項28～34のいずれかの核酸配列のセット。

【1518】

36. レンチウイルスベクターゲノム発現カセットを含むヌクレオチド配列が、Gag-p17 又はその断片を発現しない、好ましくは、Gag-p17 の前記断片が、p17 不安定性エレメントを含む、項28～35のいずれかの核酸配列のセット。

【1519】

37. 項1～36のいずれかの核酸配列のセットを含むレトロウイルスベクター生成システム。

【1520】

38. ウイルスベクター生成細胞が、項1～36のいずれかの核酸配列のセットを含む、ウイルスベクター生成細胞を含むレトロウイルスベクター生成システム。

【1521】

39. レトロウイルスベクターゲノムをコードする発現カセットであって、

(i) 導入遺伝子発現カセット、及び

(ii) 項1～36のいずれかに定義される少なくとも1つの干渉RNAを含むベクターイントロンを含む、発現カセット。

【1522】

40. 導入遺伝子発現カセットが、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きである、項39の発現カセット。

【1523】

41. 項39又は項40の発現カセットを含むヌクレオチド配列。

【1524】

42. 導入遺伝子発現カセット及びベクターイントロンを含むレトロウイルスベクターゲノムであって、任意選択で、導入遺伝子発現カセットが、レトロウイルスベクターゲノム発現カセットに対して逆向きになっており、ベクターイントロンが、項1～36のいずれかに定義される少なくとも1つの干渉RNAを含む、レトロウイルスベクターゲノム。

【1525】

43. 項1～36のいずれかの核酸配列のセット、項37のレトロウイルスベクター生成システム、項39若しくは項40の発現カセット、項41のヌクレオチド配列又は項42のレトロウイルスベクターゲノムを含む、細胞。

【1526】

44. レトロウイルスベクターを生成するための細胞であって、

a) 項1～36のいずれかの核酸配列のセット、項37のレトロウイルスベクター生成システム、項39若しくは項40の発現カセット、項41のヌクレオチド配列又は項42のレトロウイルスベクターゲノム、及び

b) 任意選択で、改変されたU1 snRNA をコードする核酸配列及び／又はTRAP をコードする核酸配列を含む、細胞。

【1527】

45. レトロウイルスベクターを生成するための方法であって、

10

20

30

40

50

(i) a) 項 1～36 のいずれかの核酸配列のセット、項 37 のレトロウイルスベクター生成システム、項 39 若しくは項 40 の発現カセット、項 41 のヌクレオチド配列又は項 42 のレトロウイルスベクターゲノム、及び

b) 任意選択で、改変された U1 snRNA をコードする核酸配列及び／又は TRAP をコードする核酸配列を細胞中に導入するステップ、並びに

(ii) 任意選択で、ベクター構成成分をコードする核酸配列を含む細胞について選択するステップ、並びに

(iii) レトロウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で細胞を培養するステップを含む、方法。

10

【1528】

46. レトロウイルスベクターを生成するための方法であって、項 43 又は項 44 の細胞を、レトロウイルスベクターの生成にとって適切な条件下で培養するステップを含む、方法。

【1529】

47. 項 45 又は項 46 の方法によって生成されるレトロウイルスベクター。

【1530】

48. レトロウイルスベクターを生成するための、項 1～36 のいずれかの核酸配列のセット、項 37 若しくは項 38 のレトロウイルスベクター生成システム、項 39 若しくは項 40 の発現カセット、項 41 のヌクレオチド配列、項 42 のレトロウイルスベクターゲノム又は項 43 若しくは項 44 の細胞の使用。

20

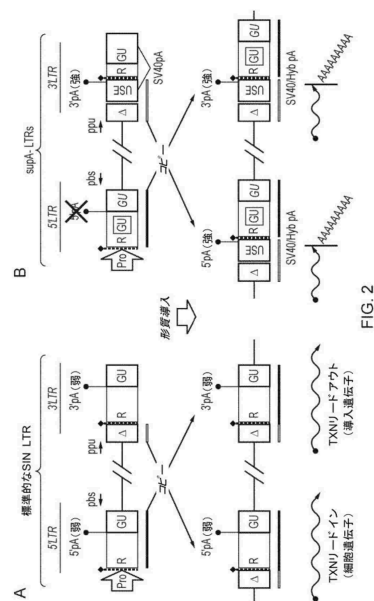
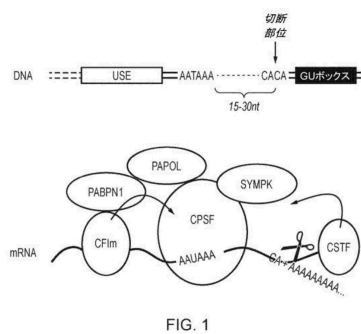
【1531】

49. レトロウイルスベクター生成の際に導入遺伝子の発現を抑制する、及び／又はレトロウイルスベクター力価を増大させるための、項 1～36 のいずれかに定義される干渉 RNA をコードする少なくとも 1 つの核酸配列の使用。

【図面】

【図 1】

【図 2】



30

40

50

【図 3】

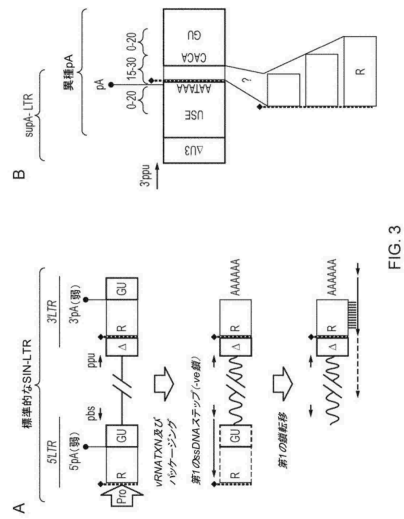


FIG. 3

【図 4】

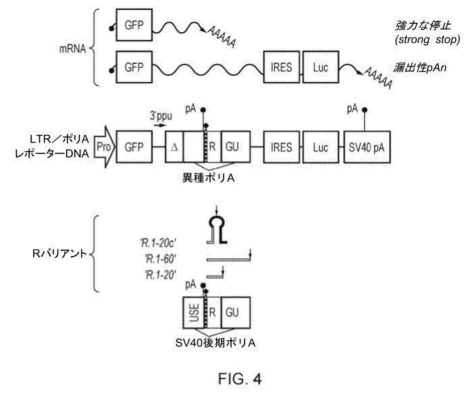


FIG. 4

【図 5】

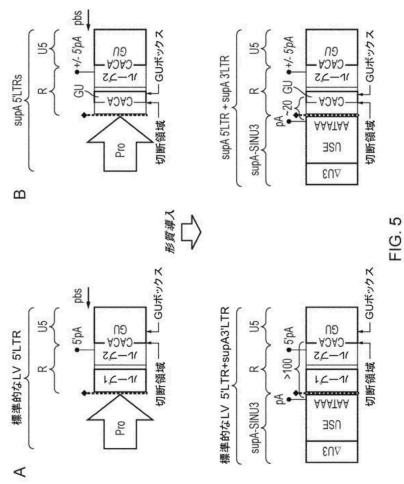


FIG. 5

【図 6】

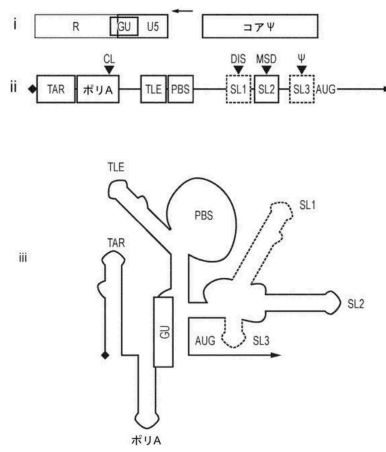


FIG. 6

10

20

30

40

50



【図 10-2】

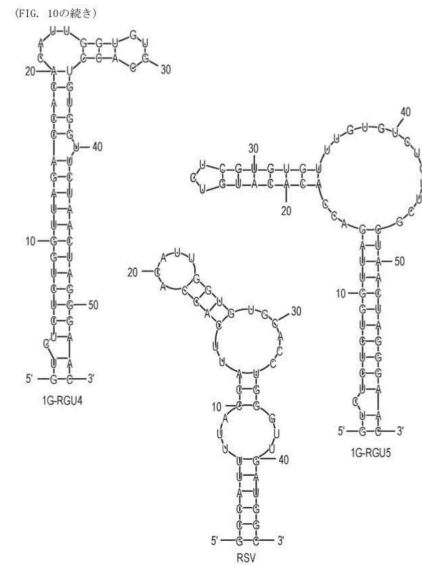


FIG. 10 (continued)

20

【図 10-4】

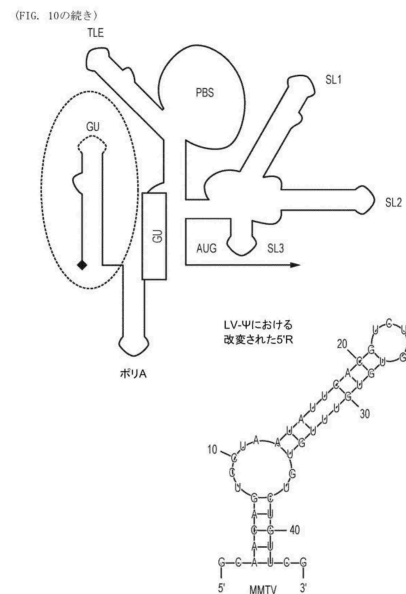
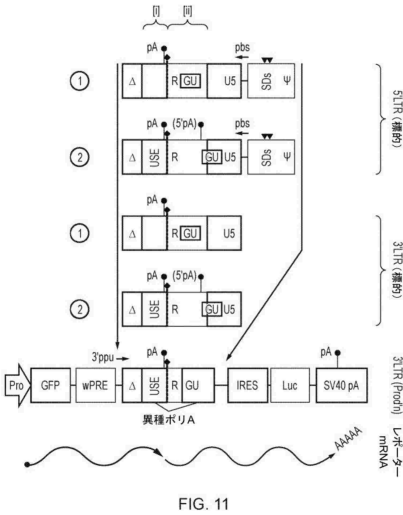


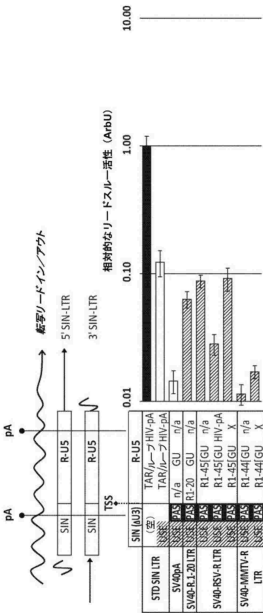
FIG. 10 (continued)

40

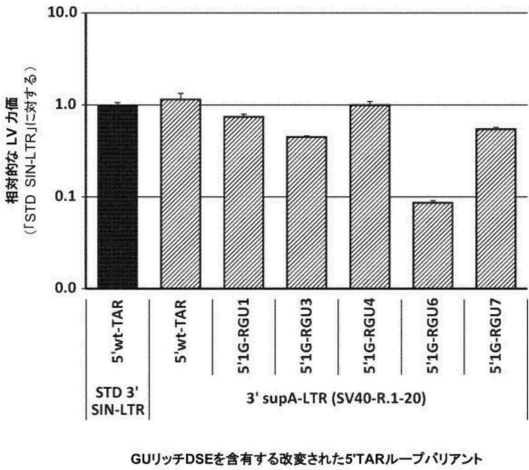
【図 1 1】



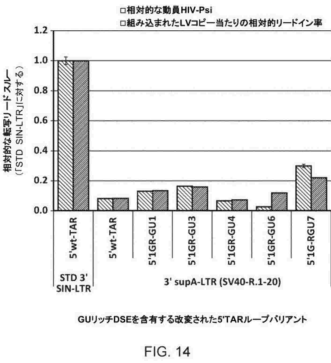
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

30

40

50

【図 15】

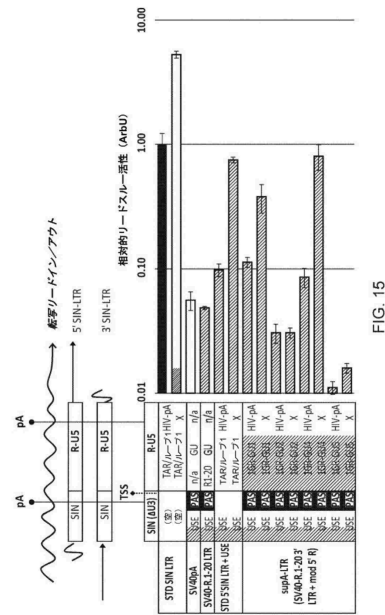


FIG. 15

【図 16】

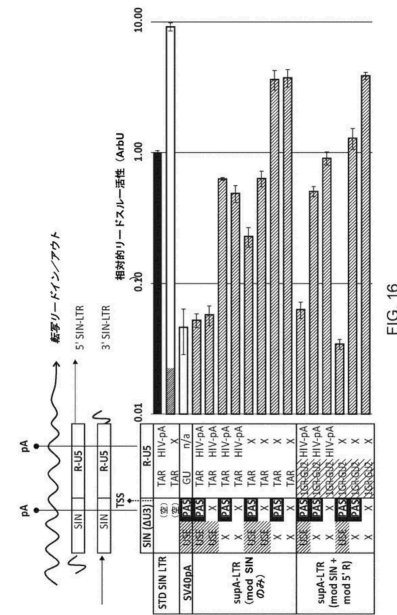


FIG. 16

【図 17】

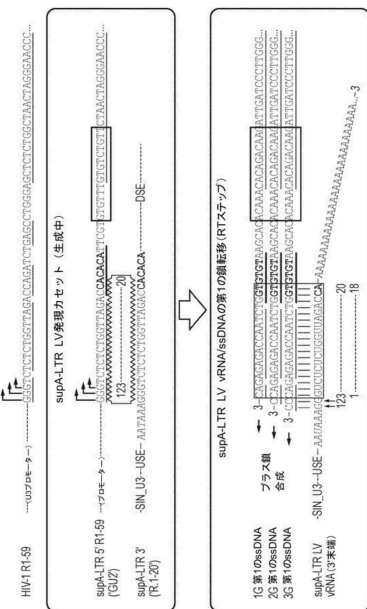


FIG. 17

【図 18】

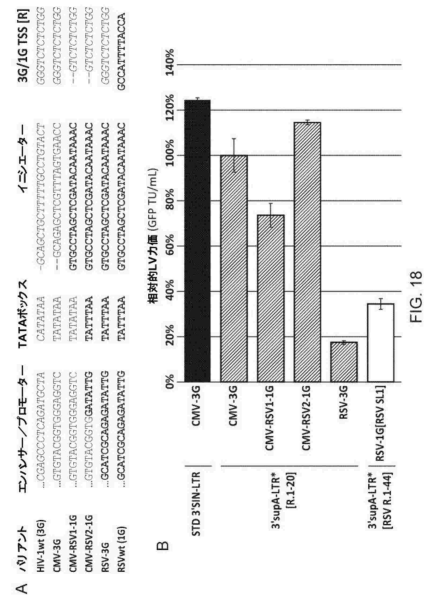


FIG. 18

10

20

30

40

50

【圖 19-1】

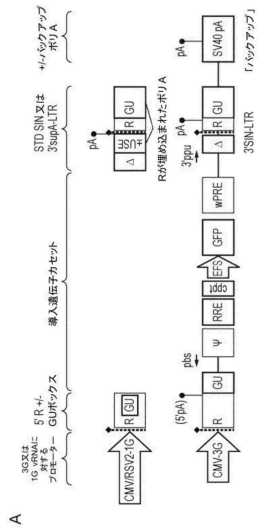


FIG. 19

【圖 19-2】

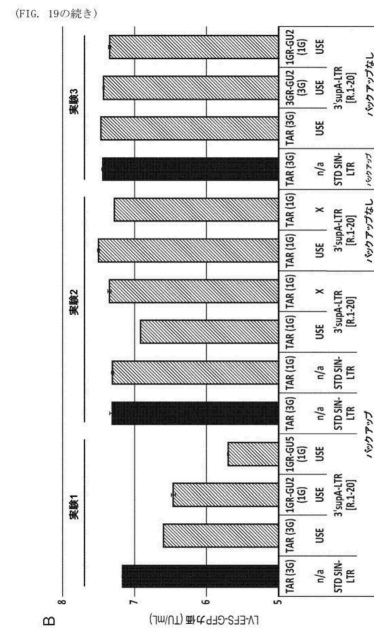


FIG. 19 (Continued)

10

20

【図 20】

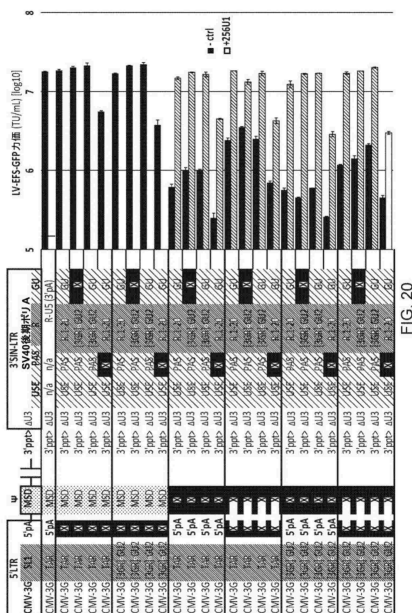


FIG. 20

【図 2 1】

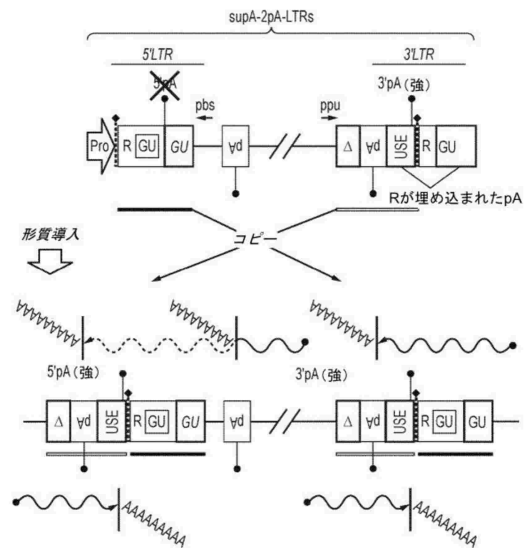


FIG. 21

30

40

50

【圖 2 2】

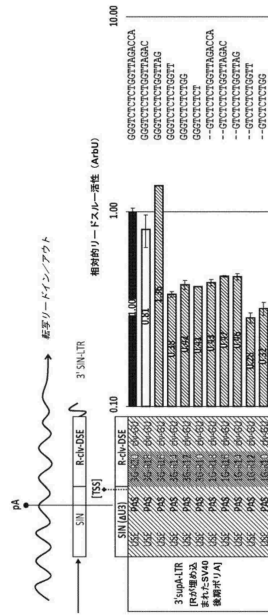


FIG. 22

【圖 23】

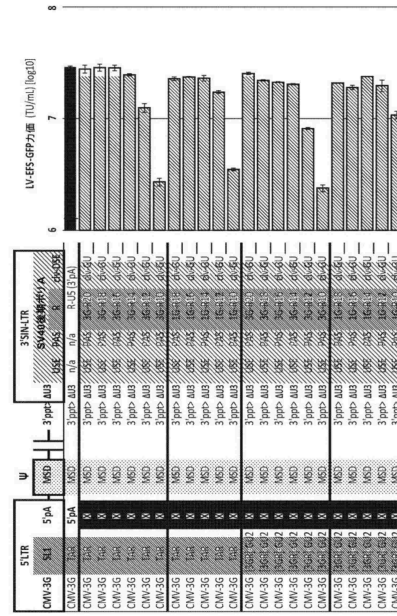


FIG. 23

【図 24-1】

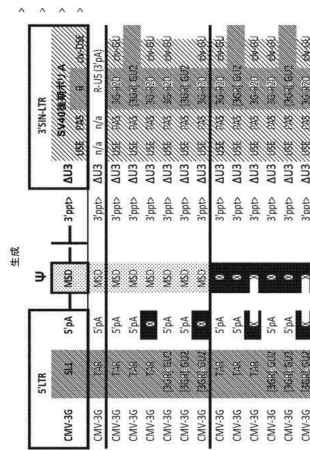


FIG. 24

【図 24-2】

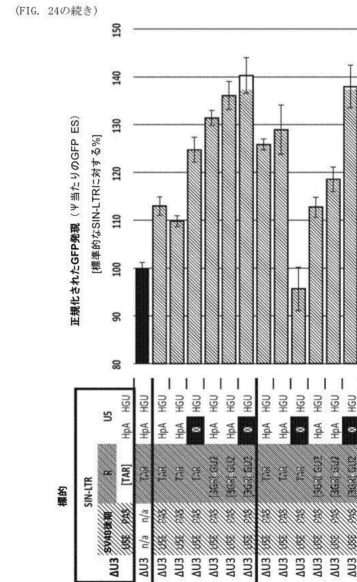


FIG. 24 (Continued)

【図 25】

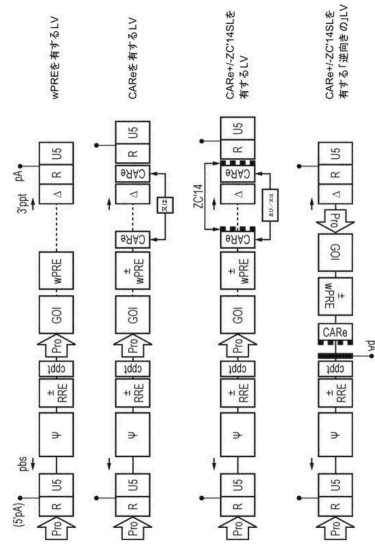


FIG. 25

【図 26】

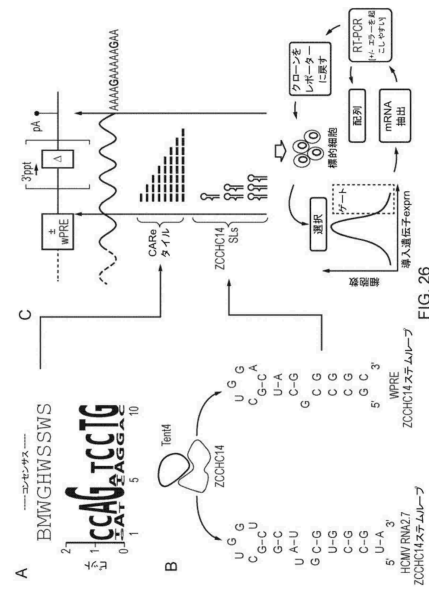


FIG. 26

【図 27 - 1】

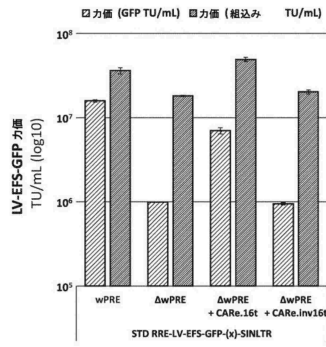


FIG. 27A

【図 27 - 2】

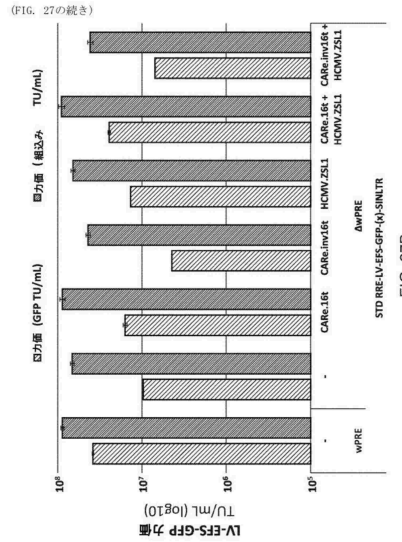


FIG. 27B

10

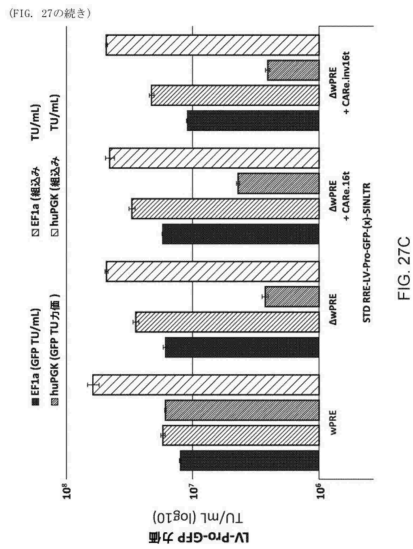
20

30

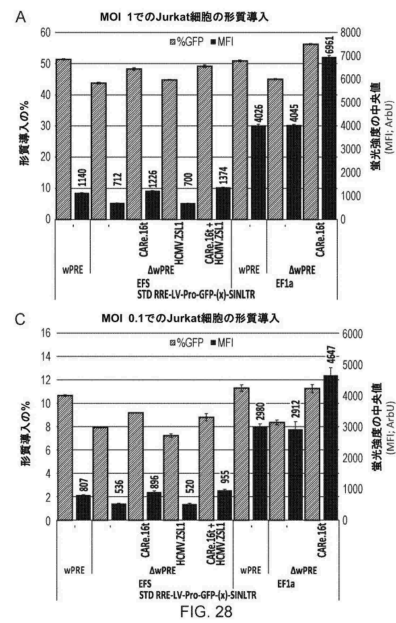
40

50

【図 27 - 3】



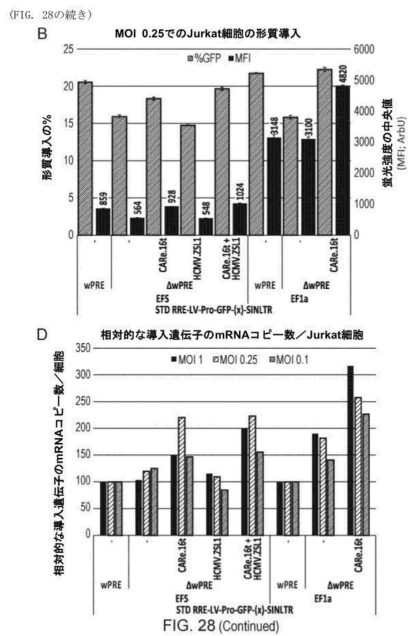
【図 28 - 1】



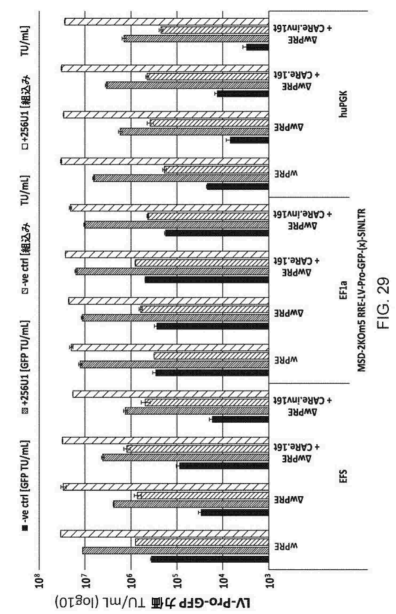
10

20

【図 28 - 2】



【図 29】



30

40

50



【図 3 3】

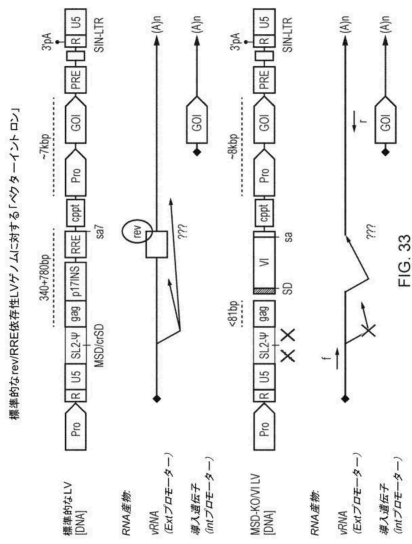


FIG. 33

【図 3 4 - 1】

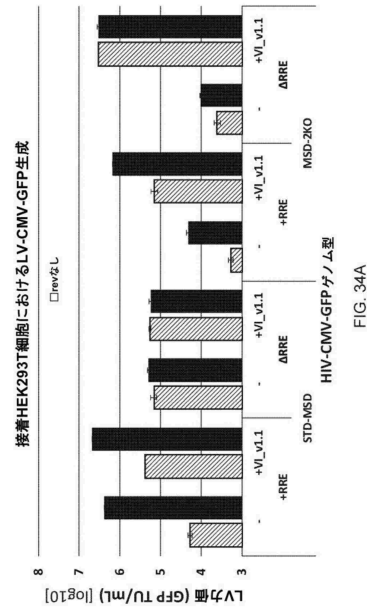


FIG. 34A

【図 3 4 - 2】

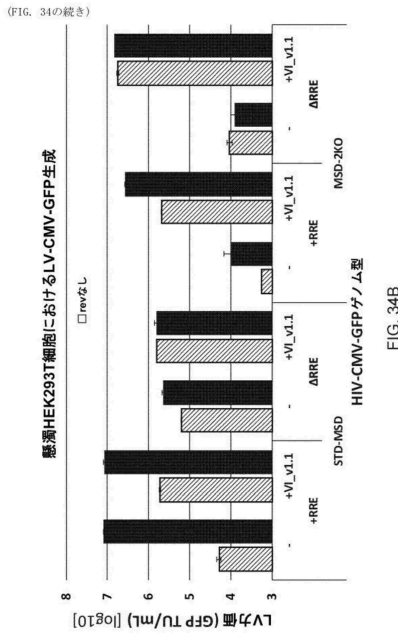


FIG. 34B

【図 3 5 - 1】

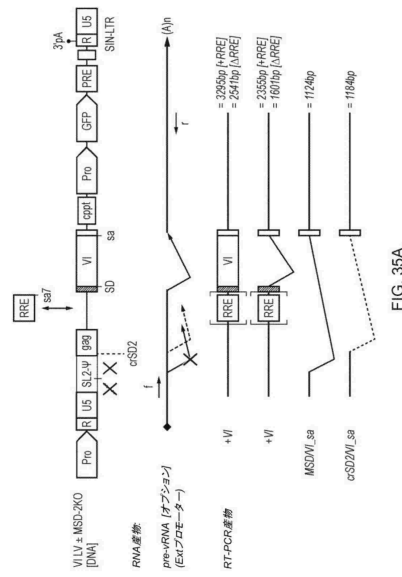


FIG. 35A

10

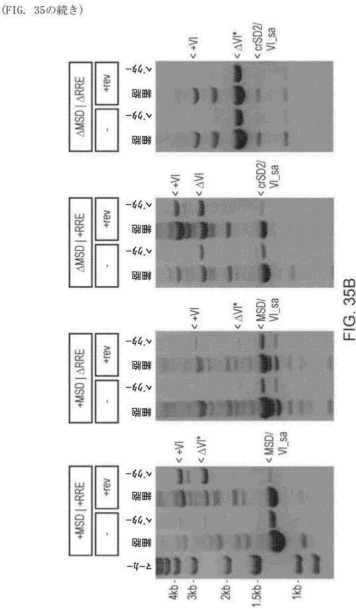
20

30

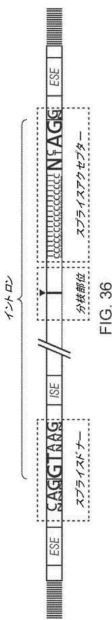
40

50

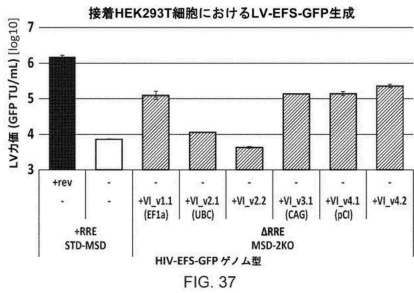
【図 3 5 - 2】



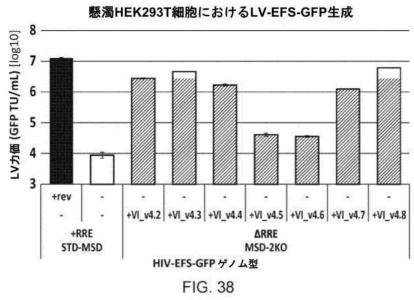
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



【図 3 9】

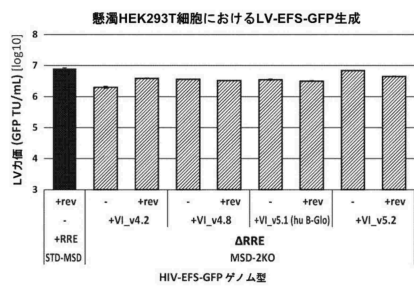


FIG. 39

【図 4 0】

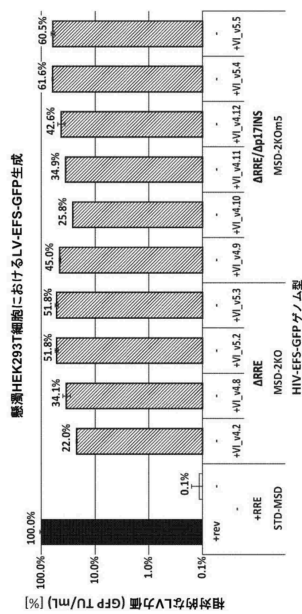


FIG. 40

【図 4 1】

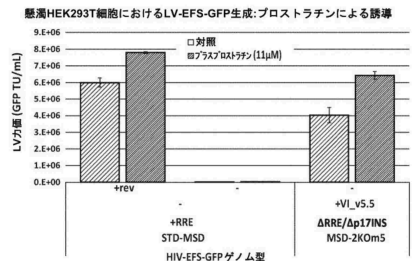


FIG. 41

【図 4 2】

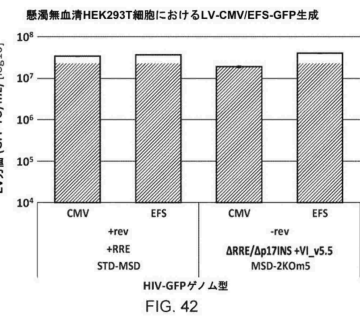
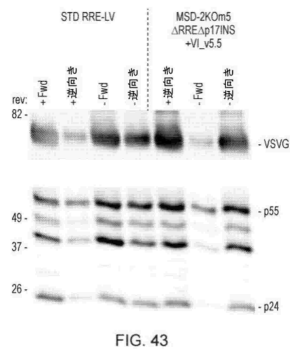


FIG. 42

【図 4 3】



【図 44】

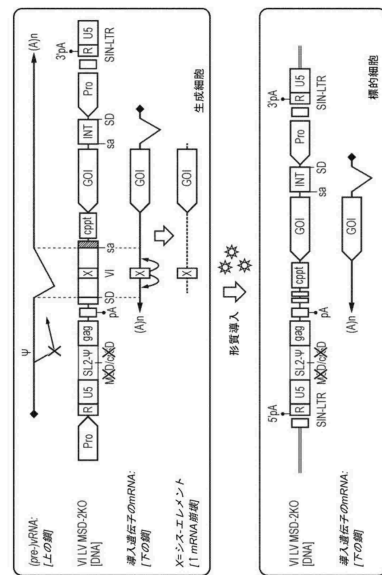


FIG. 44

10

20

【図 45】

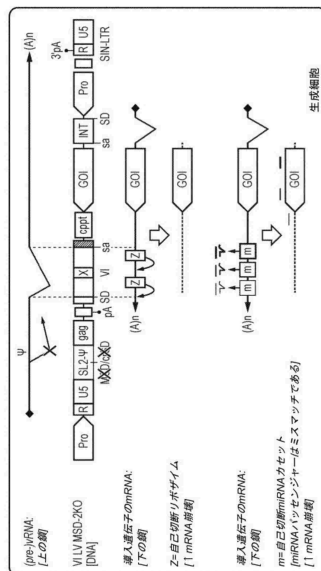


FIG. 45

【図 46】

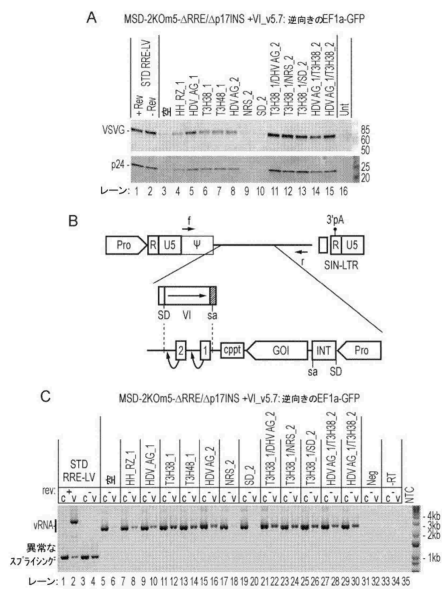


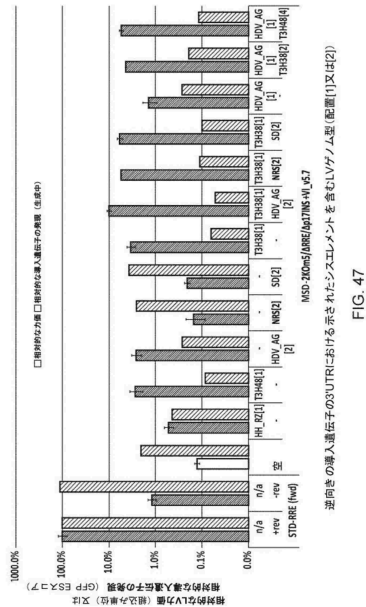
FIG. 46

30

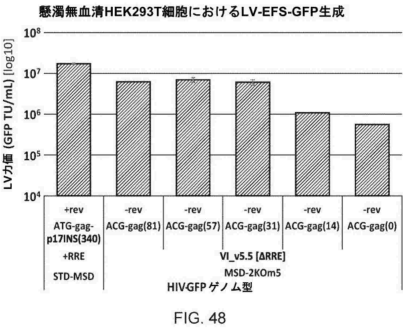
40

50

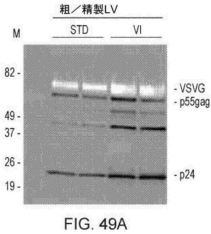
【図 4 7】



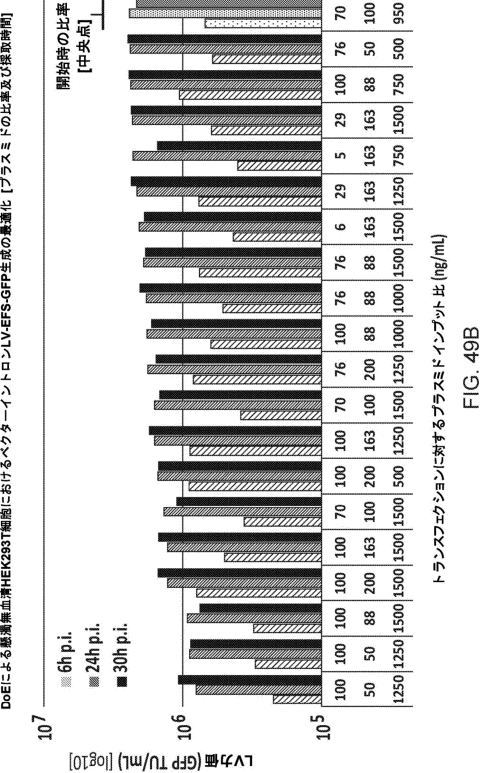
【図 4 8】



【図 4 9 - 1】



【図 4 9 - 2 - 1】



10

20

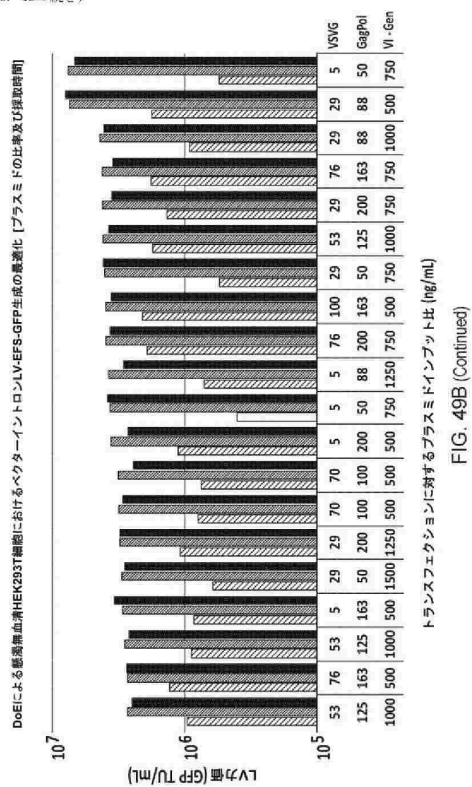
30

40

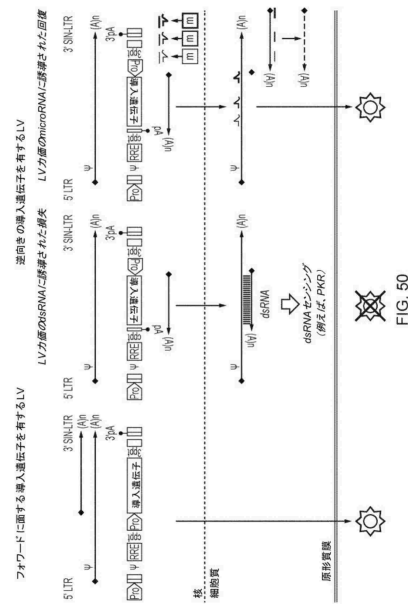
50

【図 49-2-2】

(FIG. 49の続き)



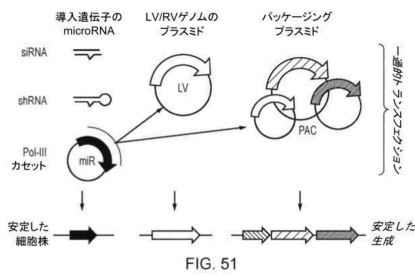
【圖 50】



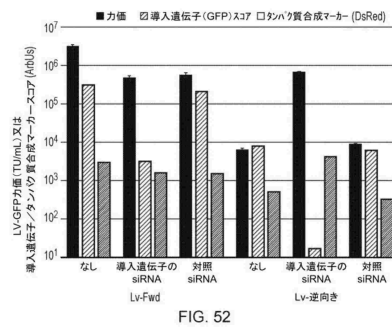
10

20

【図 5 1】



【圖 5 2】



30

40

50

【図 5 3】

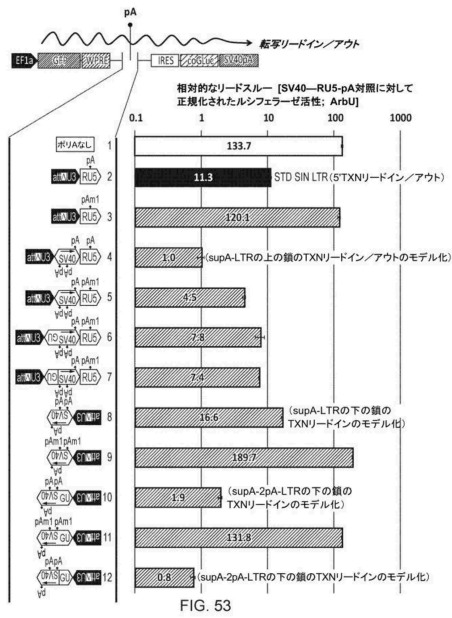


FIG. 53

【圖 5 4】

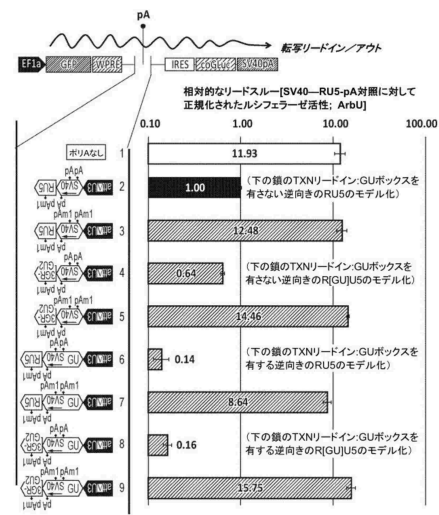


FIG. 54

10

20

【図 5 5 - 1】

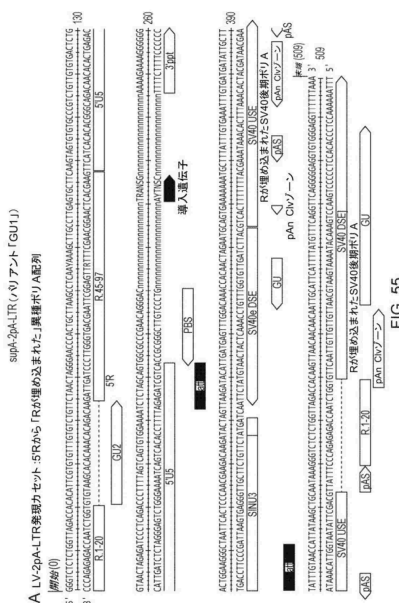


FIG. 55

【圖 5 5 - 2】

(FIG. 55の続き)

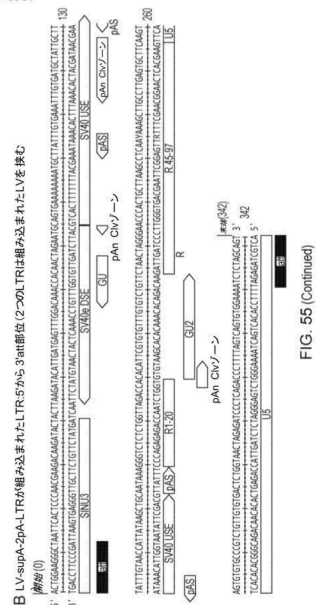


FIG. 55 (Continued)

30

40

50

【図 56 - 1】

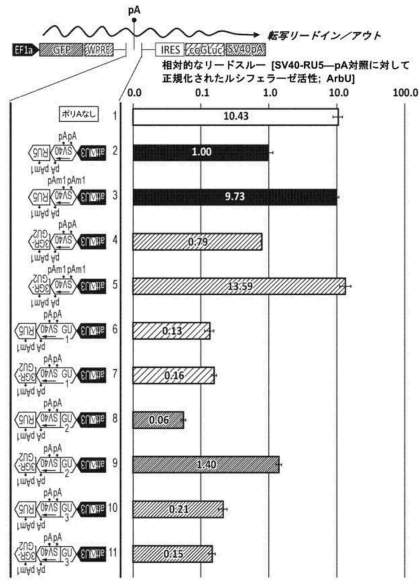


FIG. 56

【図 56 - 2】

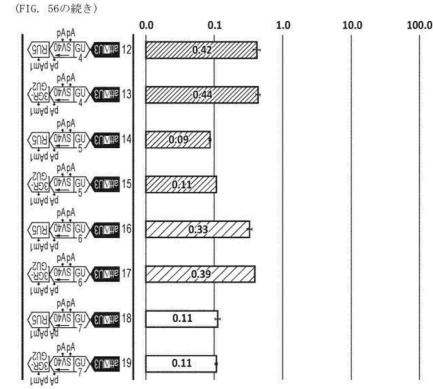


FIG. 56 (Continued)

【図 57 - 1】

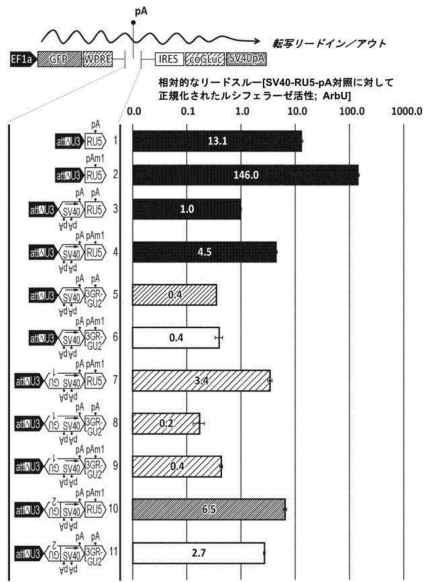


FIG. 57

【図 57 - 2】

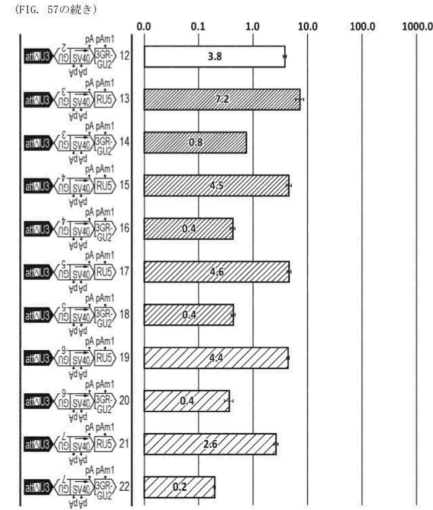


FIG. 57 (Continued)

【図 5 8 - 1】

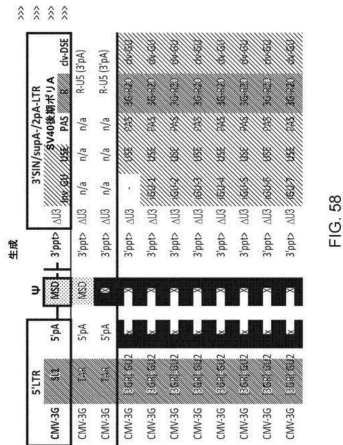


FIG. 58

【圖 5 8 - 2】

(FIG. 58の続き)

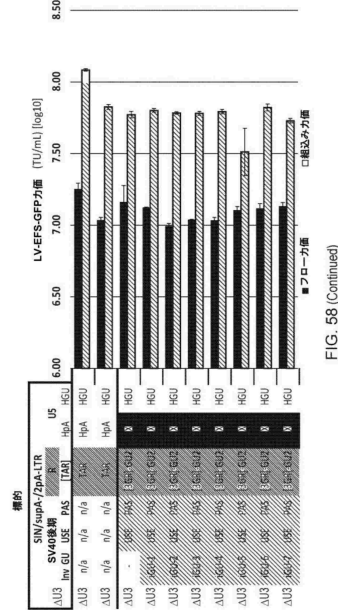


FIG. 58 (Continued)

10

20

【図 5 9 - 1】

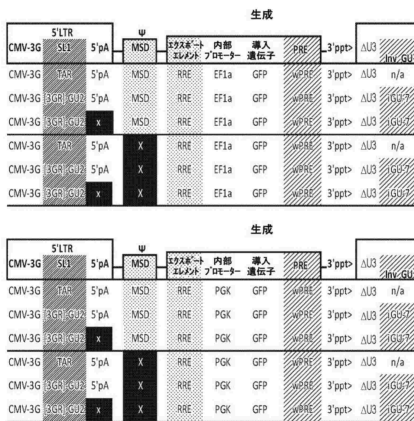


FIG. 59

【圖 5 9 - 2】

(FIG. 59の続き)

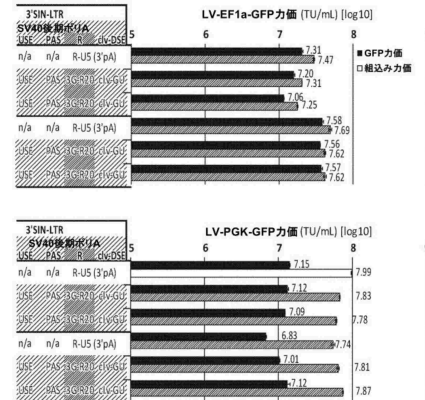


FIG. 59 (Continued)

30

40

50





【圖 6 6 - 1】

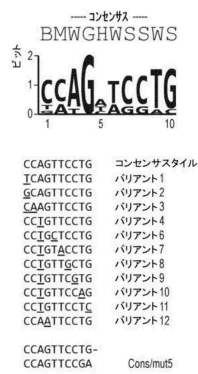
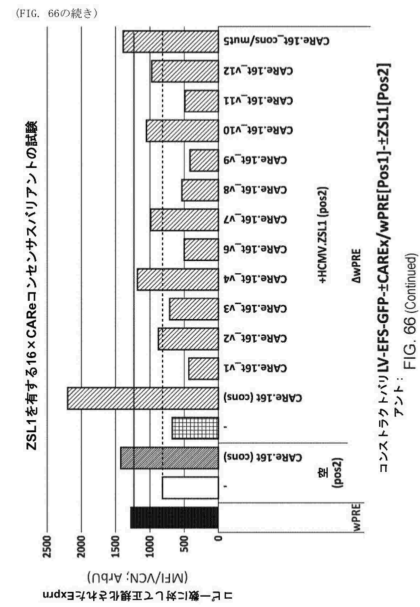


FIG. 66

【圖 6 6 - 2】



10

20

【図 67】

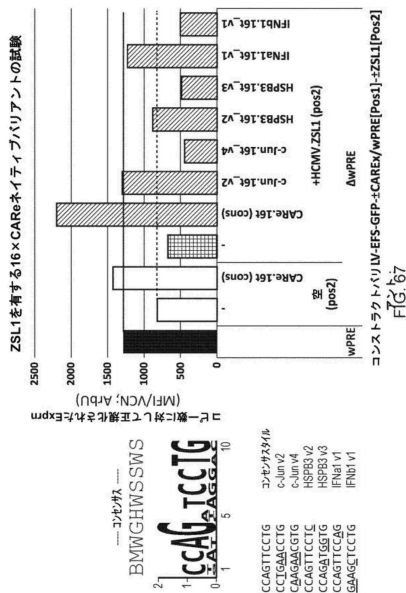


FIG. 67

【図 68】

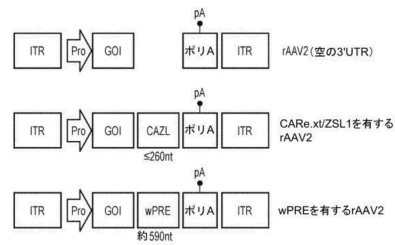


FIG. 68

30

40

50

【図 69】

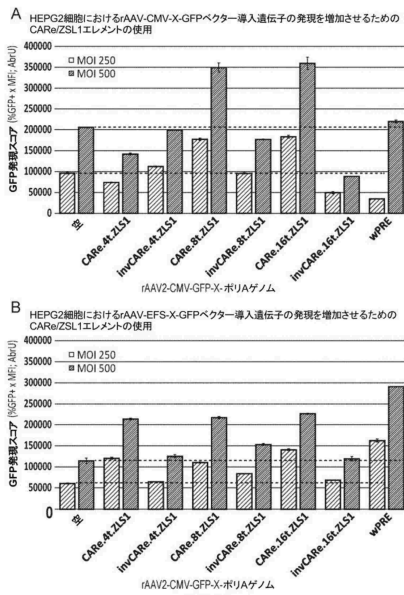


FIG. 69

【圖 70】

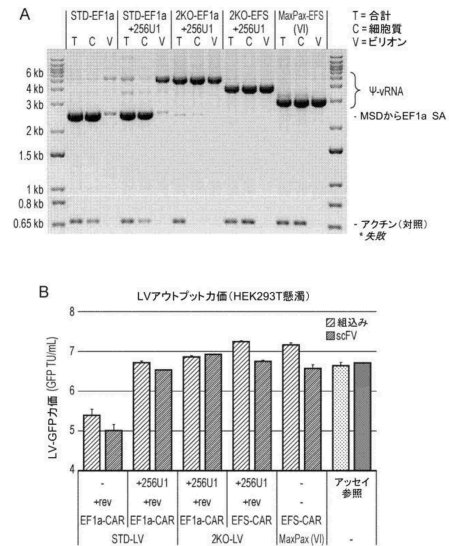


FIG. 70

10

20

【図 7 1 - 1】

【圖 7 1 - 2】

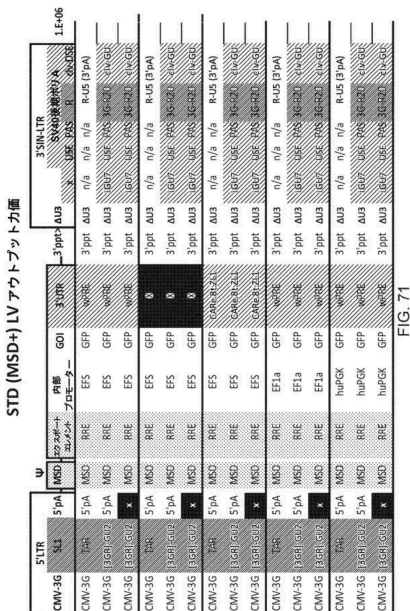


FIG. 71

(FIG. 71の続き)

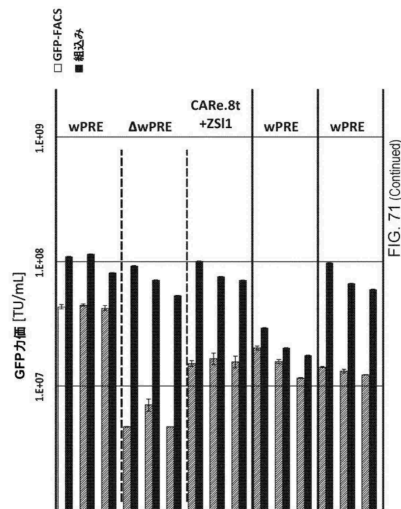


FIG. 71 (Continued)

30

40

50

【図 7 2 - 1】

【圖 7 2 - 2】

2KO-LVアウトプットカバ

| 517R   |     | 518R |     | 519R |     | 520R |     | 521R |     | 522R |     | 523R |     | 524R |     | 525R |     | 526R |     | 527R |     | 528R |     | 529R |     | 530R |     | 531R |     | 532R |     | 533R |     | 534R |     | 535R |     | 536R |     | 537R |     | 538R |     | 539R |     | 540R |     | 541R |     | 542R |     | 543R |     | 544R |     | 545R |     | 546R |     | 547R |     | 548R |     | 549R |     | 550R |     | 551R |     | 552R |     | 553R |     | 554R |     | 555R |     | 556R |     | 557R |     | 558R |     | 559R |     | 560R |     | 561R |     | 562R |     | 563R |     | 564R |     | 565R |     | 566R |     | 567R |     | 568R |     | 569R |     | 570R |     | 571R |     | 572R |     | 573R |     | 574R |     | 575R |     | 576R |     | 577R |     | 578R |     | 579R |     | 580R |     | 581R |     | 582R |     | 583R |     | 584R |     | 585R |     | 586R |     | 587R |     | 588R |     | 589R |     | 590R |     | 591R |     | 592R |     | 593R |     | 594R |     | 595R |     | 596R |     | 597R |     | 598R |     | 599R |     | 600R |     | 601R |     | 602R |     | 603R |     | 604R |     | 605R |     | 606R |     | 607R |     | 608R |     | 609R |     | 610R |     | 611R |     | 612R |     | 613R |     | 614R |     | 615R |     | 616R |     | 617R |     | 618R |     | 619R |     | 620R |     | 621R |     | 622R |     | 623R |     | 624R |     | 625R |     | 626R |     | 627R |     | 628R |     | 629R |     | 630R |     | 631R |     | 632R |     | 633R |     | 634R |     | 635R |     | 636R |     | 637R |     | 638R |     | 639R |     | 640R |     | 641R |     | 642R |     | 643R |     | 644R |     | 645R |     | 646R |     | 647R |     | 648R |     | 649R |     | 650R |     | 651R |     | 652R |     | 653R |     | 654R |     | 655R |     | 656R |     | 657R |     | 658R |     | 659R |     | 660R |     | 661R |     | 662R |     | 663R |     | 664R |     | 665R |     | 666R |     | 667R |     | 668R |     | 669R |     | 670R |     | 671R |     | 672R |     | 673R |     | 674R |     | 675R |     | 676R |     | 677R |     | 678R |     | 679R |     | 680R |     | 681R |     | 682R |     | 683R |     | 684R |     | 685R |     | 686R |     | 687R |     | 688R |     | 689R |     | 690R |     | 691R |     | 692R |     | 693R |     | 694R |     | 695R |     | 696R |     | 697R |     | 698R |     | 699R |     | 700R |     | 701R |  | 702R |  | 703R |  | 704R |  | 705R |  | 706R |  | 707R |  | 708R |  | 709R |  | 710R |  | 711R |  | 712R |  | 713R |  | 714R |  | 715R |  | 716R |  | 717R |  | 718R |  | 719R |  | 720R |  | 721R |  | 722R |  | 723R |  | 724R |  | 725R |  | 726R |  | 727R |  | 728R |  | 729R |  | 730R |  | 731R |  | 732R |  | 733R |  | 734R |  | 735R |  | 736R |  | 737R |  | 738R |  | 739R |  | 740R |  | 741R |  | 742R |  | 743R |  | 744R |  | 745R |  | 746R |  | 747R |  | 748R |  | 749R |  | 750R |  | 751R |  | 752R |  | 753R |  | 754R |  | 755R |  | 756R |  | 757R |  | 758R |  | 759R |  | 760R |  | 761R |  | 762R |  | 763R |  | 764R |  | 765R |  | 766R |  | 767R |  | 768R |  | 769R |  | 770R |  | 771R |  | 772R |  | 773R |  | 774R |  | 775R |  | 776R |  | 777R |  | 778R |  | 779R |  | 780R |  | 781R |  | 782R |  | 783R |  | 784R |  | 785R |  | 786R |  | 787R |  | 788R |  | 789R |  | 790R |  | 791R |  | 792R |  | 793R |  | 794R |  | 795R |  | 796R |  | 797R |  | 798R |  | 799R |  | 800R |  | 801R |  | 802R |  | 803R |  | 804R |  | 805R |  | 806R |  | 807R |  | 808R |  | 809R |  | 810R |  | 811R |  | 812R |  | 813R |  | 814R |  | 815R |  | 816R |  | 817R |  | 818R |  | 819R |  | 820R |  | 821R |  | 822R |  | 823R |  | 824R |  | 825R |  | 826R |  | 827R |  | 828R |  | 829R |  | 830R |  |
|--------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|------|--|
| CMW-3G | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  | 5PA | 5PA  |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |      |  |

FIG. 72

(FIG. 72の続き)

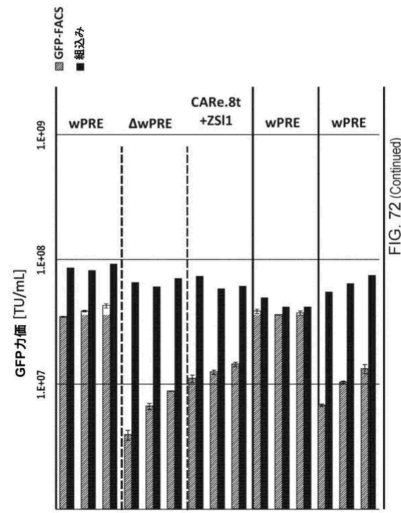


FIG. 72 (Continued)

10

20

【図 7 3 - 1】

【圖 7 3 - 2】

MaxPax (ベクターイントロン) LVアウトプットカバレッジ

[illegible]

FIG. 73

(FIG. 73の続き)

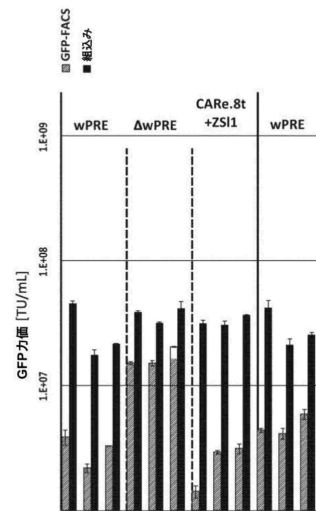


FIG. 73 (Continued)

30

40

50

【圖 7 4 - 1】

【圖 7 4 - 2】

[illegible]

FIG. 74

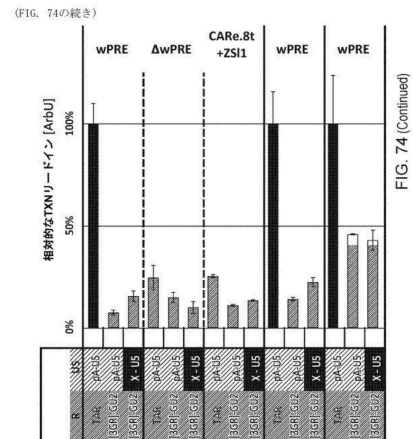


FIG. 74 (Continued)

10

20

【圖 7 5 - 1】

【圖 7 5 - 2】

[illegible]

FIG. 75

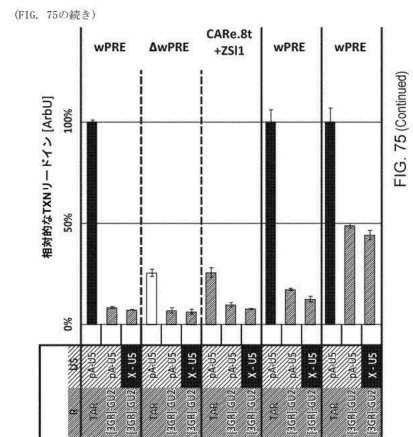


FIG. 75 (Continued)

30

40

50

【圖 7 6 - 1】

【圖 7 6 - 2】

[illegible]

FIG. 76

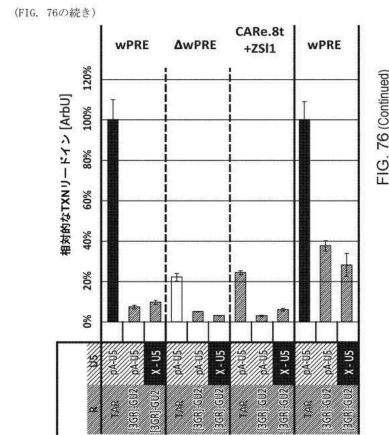


FIG. 76 (Continued)

10

20

【圖 7 7 - 1】

【圖 7 7 - 2】

[illegible]

FIG. 77

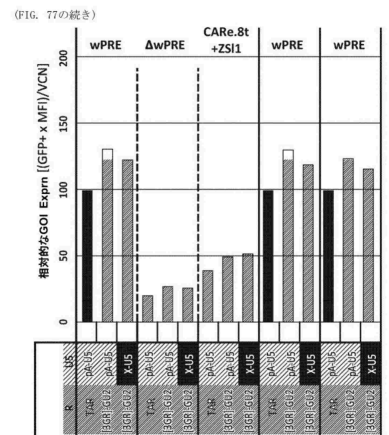


FIG. 77 (Continued)

30

40

50

【圖 7 8 - 1】

【圖 7 8 - 2】

## 2KO-LV導入遺伝子の発現

[illegible]

FIG. 78

(FIG. 78の続き)

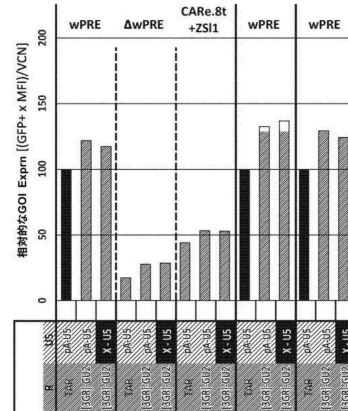


FIG. 78 (Continued)

10

20

【圖 7 9 - 1】

【圖 7 9 - 2】

**MaxPax (ベクターイントロン) LV導入遺伝子の発現**

[illegible]

FIG. 79

(FIG. 79の続き)

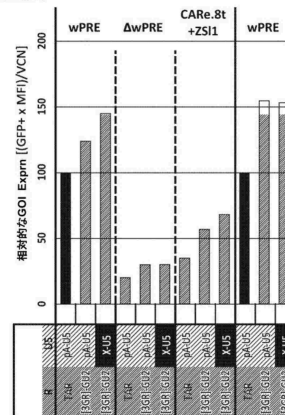


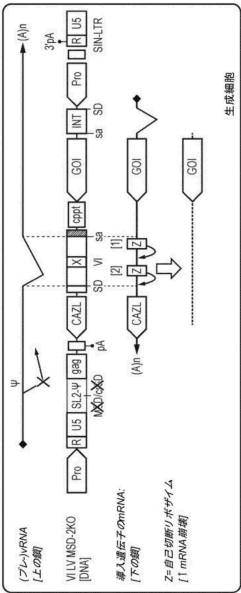
FIG. 79 (Continued)

30

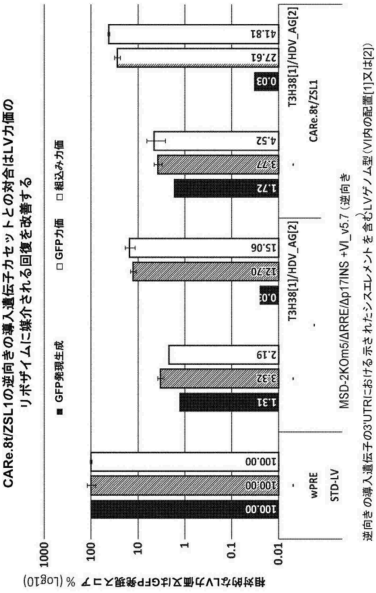
40

50

【図 8 0】



【図 8 1】



【配列表】

2024536908000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/GB2022/052586**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**INV. C12N15/867**  
**ADD.**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
**C12N C07K**

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)

**EPO-Internal**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No.         |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>A</b>  | <b>MICHAEL D MÜHLEBACH ET AL: "Chapter 13: Gammaretroviral and Lentiviral Vectors for Gene Delivery", 1 January 2010 (2010-01-01), RETROVIRUSES: MOLECULAR BIOLOGY, GENOMICS AND PATHOGENESIS, CAISTER ACADEMIC PRESS, PAGE(S) 347 - 370, XP009536782, ISBN: 978-1-912530-97-7 the whole document in particular figures 13.1 to 13.5</b><br>-----<br>-/-- | <b>1, 13-52, 54-68, 72-85</b> |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**16 December 2022**

Date of mailing of the international search report

**06/03/2023**

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

**Strobel, Andreas**

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2022/052586

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No.        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| A         | ADAM S COCKRELL ET AL: "Gene delivery by lentivirus vectors",<br>MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, SPRINGER US, NEW YORK,<br>vol. 36, no. 3, 1 July 2007 (2007-07-01),<br>pages 184-204, XP002739139,<br>ISSN: 1073-6085, DOI:<br>10.1007/S12033-007-0010-8<br>[retrieved on 2007-04-17]<br>the whole document<br>----- | 1, 13-52,<br>54-68,<br>72-85 |
| A         | US 2011/294114 A1 (VAN DER LOO JOHANNES<br>CHRISTIAAN MARIA [US] ET AL)<br>1 December 2011 (2011-12-01)<br>paragraph [0016] - paragraph [0019];<br>figures 1,2<br>paragraph [0007]<br>-----                                                                                                                    | 1, 13-52,<br>54-68,<br>72-85 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2022/052586

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2022/052586

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see additional sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:  
**1 (completely); 13-52, 54-68, 72-85 (partially)**

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2022 /052586

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(completely); 13-52, 54-68, 72-85(partially)

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome expression cassette as defined in items a)-d) of claim 1

---

2. claims: 2, 6, 7(completely); 10, 14-52, 54-68, 72-85(partially)

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome expression cassette with a 3' LTR comprising a modified polyadenylation seequence comprising a polyadenylation signal which is 5' of the 3' LTR R region

---

3. claims: 3, 8, 9(completely); 10, 14-52, 54-68, 72-85(partially)

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome expression cassette wherein the lentiviral vector genome comprises a modified 5' LTR with its R region comprising at least one polyadenylation downstream enhancer element (DES).

---

4. claims: 4(completely); 30-52(partially)

A nucleotide comprising a transgene expression cassette, wherein the 3' UTR of the transgene expression cassette, wherein the 3' UTR of the transgene expression cassette comprises at least one cis-acting sequence selected from (a) a cis-acting Cytoplasmic Accumulation Region (CAR) sequence or (b) a cis-acting ZCCHC14 protein-binding sequence

---

5. claims: 5, 11, 12(completely); 13-52, 54-68, 72-85(partially)

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome expression cassette, wherein the lentiviral vector genom expression cassette comprises a transgene expression cassette and a vector intron.

---

6. claim: 53

A set of nucleotide sequences for producing a lentiviral vector comprising  
(i) a lentiviral vector genome expression cassette which comprises a transgene expression cassette and (ii) at least one nucleic acid sequence encoding an interfering RNA which is specific for the mRNA encoding the transgene.

---

7. claim: 69

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/GB2022 /052586

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome,  
wherein this genome comprises a modified 3' LTR and a  
modified 5' LTR as defined in claim 69

---

8. claim: 70

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome,  
wherein this genome comprises a modified 3' LTR and a  
modified 5' LTR as defined in claim 70.

---

9. claim: 71

A nucleotide sequence comprising a lentiviral vector genome,  
wherein this genome comprises a modified 3' LTR and a  
modified 5' LTR as defined in claim 71

---

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International application No

PCT/GB2022/052586

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2011294114 A1                          | 01-12-2011          | US 2011294114 A1           | 01-12-2011          |
|                                           |                     | US 2013302898 A1           | 14-11-2013          |
|                                           |                     | US 2015315611 A1           | 05-11-2015          |
|                                           |                     | US 2017327844 A1           | 16-11-2017          |
|                                           |                     | US 2019276844 A1           | 12-09-2019          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,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,  
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J  
M,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,ST,SV,SY,T  
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. I G E P A L

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100221958

弁理士 篠田 真希恵

(74)代理人 100192441

弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 ファーレイ ダニエル

イギリス国 オーエックス4 6エルティー オックスフォードシャー オックスフォード トランス  
ポート ウェイ ウィンドラッシュ コート オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテ  
ッド シー／オー

(72)発明者 ライト ジョーダン

イギリス国 オーエックス4 6エルティー オックスフォードシャー オックスフォード トランス  
ポート ウェイ ウィンドラッシュ コート オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテ  
ッド シー／オー

(72)発明者 ノゲイラ クリスティーナ

イギリス国 オーエックス4 6エルティー オックスフォードシャー オックスフォード トランス  
ポート ウェイ ウィンドラッシュ コート オックスフォード バイオメディカ (ユーケー) リミテ  
ッド シー／オー

Fターム (参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA44 CA45