(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年8月2日(02.08.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/139637 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 7/01 (2006.01)　　*C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2018/002687

(22) 国際出願日：　2018年1月29日(29.01.2018)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-014461　2017年1月30日(30.01.2017)　JP

(71) 出願人：学校法人日本医科大学 **(NIPPON MEDICAL SCHOOL FOUNDATION)** [JP/JP]；〒1138602 東京都文京区千駄木１－１－５ Tokyo (JP)．タカラバイオ株式会社 **(TAKARA BIO INC.)** [JP/JP]；〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目４番３８号 Shiga (JP)．

(72) 発明者：岡田 尚巳 **(OKADA, Takashi)**；〒1138602 東京都文京区千駄木一丁目１番５号 日本医科大学内 Tokyo (JP)．岡田 浩典 **(OKADA, Hironori)**；〒1138602 東京都文京区千駄木一丁目１番５号 日本医科大学内 Tokyo (JP)．宮川 世志幸 **(MIYAGAWA, Yoshitaka)**；〒1138602 東京都文京区千駄木一丁目１番５号 日本医科大学内 Tokyo (JP)．峰野 純一 **(MINENO, Junichi)**；〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目４番３８号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP)．蝶野 英人 **(CHONO, Hideto)**；〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目４番３８号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP)．

(74) 代理人：鮫島 睦，外 **(SAMEJIMA, Mutsumi** et al.)；〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP)．

(81) 指定国（表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能）：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW．

(84) 指定国（表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能）：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)．

WO 2018/139637 A1

(54) Title: NUCLEIC ACID-ENCAPSULATING AAV EMPTY PARTICLES

(54) 発明の名称： 核酸封入ＡＡＶ中空粒子

(57) Abstract: The present invention provides a method for manufacturing nucleic acid-encapsulating empty particles of the adeno-associated virus (AAV), the method comprising the following steps: (1) a step in which linear nucleic acid fragments are prepared, the nucleic acid fragments comprising (i) the sequence of the A region of an AAV inverted terminal repeat sequence (ITR), (ii) the sequence of the A' region of the AAV ITR, and (iii) the sequence of the D region and/or the sequence of the D' region of the AAV ITR; (2) a step in which the nucleic acid fragments from (1) are introduced into cells that generate AAV empty particles; and (3) a step in which the cells from (2) are cultured.

(57) 要約：本発明は、以下の工程を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の核酸封入中空粒子の製造方法；（１）（ｉ）ＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）のＡ領域の配列、（ｉｉ）ＡＡＶ ＩＴＲのA'領域の配列、及び（ｉｉｉ）ＡＡＶ ＩＴＲのＤ領域の配列及び／又はD'領域の配列、を含む直鎖状核酸断片を調製する工程、（２）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（１）の核酸断片を導入する工程、および（３）（２）の細胞を培養する工程、を提供する。

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 核酸封入ＡＡＶ中空粒子

技術分野

[0001] 本発明は、核酸が封入されたＡＡＶ中空粒子を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] ヒトを含む哺乳動物細胞、組織又は個体に目的の遺伝子を導入し、発現させるために、様々な遺伝子導入技術が開発されている。ウイルスベクターも、その一つであり、レンチウイルス、オンコレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等に由来する種々のベクターが知られている。

[0003] 中でも、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ：Ａｄｅｎｏ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ｖｉｒｕｓ）ベクターは、近年、遺伝子治療において有用な遺伝子導入ベクターとして期待されている。ＡＡＶは、パルボウイルスに属する非病原性のウイルスで、自己複製能を欠損しているため自律的増殖ができず、増殖にはアデノウイルスやヘルペスウイルスの共感染を必要とするため伝搬性が低いとされている。また宿主において免疫原性が低い性質も有する。そのような特徴から遺伝子導入ベクターとして、安全性が高いという利点を有している。加えて、宿主域が広いことから種々の細胞に感染可能であり、各血清型ＡＡＶ（例えば、ＡＡＶ１～ＡＡＶ９）に由来するベクターも開発されていることから、それぞれの血清型における感染標的細胞の特異性を応用して、神経細胞、筋細胞、肝細胞等、特定の細胞、組織及び器官への遺伝子導入に利用されている。しかし、ＡＡＶをはじめとする従来のウイルスベクターは、自己複製能の獲得や、野生型ウイルス混入等の様々な問題点があった。

[0004] 上記問題点を解決するため、Ｓａｍｕｌｓｋｉらは、ＡＡＶの外殻タンパク質を構成するキャプシドを調製し、これを薬剤の送達担体として利用することを提唱した（特許文献１）。キャプシドで形成され、内部にＡＡＶウイルスゲノムを含まないＡＡＶ中空粒子は、標的細胞の特異的認識、細胞への吸着と侵入、脱穀等のウイルスの初期感染活性は有するが、自己複製に必要

なウイルス由来の遺伝子を有さないためウイルスの増殖活性はない。したがって、中空粒子は、タンパク質や核酸等の薬剤を標的細胞に特異的に送達させることが可能であり、投与個体に対する安全性を兼ね備えた理想的な薬剤送達系（ＤＤＳ：Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ）の担体である。

[0005] Ｓａｍｕｌｓｋｉらは、中空粒子を尿素、熱やｐＨの条件によって一旦変性させ、薬剤を内部に取り込ませた後に再構成させる導入方法を提示している（特許文献１）。しかし、尿素等の変性剤を中空粒子に作用させると、キャプシドが有する初期感染活性が低下し、送達担体としての機能が損なわれる問題があった。また、Ｏｋａｄａらは、界面活性剤を用いて中空粒子にタンパク質や核酸を導入する方法を開示している（特許文献２）。

[0006] ＡＡＶの複製過程において、ＤＮＡゲノムが環状の２本鎖ＤＮＡ（ｃＡＡＶ）の形態を取りうることが知られている。この２本鎖ＤＮＡは、逆位末端反復（ＩＴＲ）配列を１つ有している。Ｍｕｓａｔｏｖらは、ＡＡＶのゲノムＤＮＡの複製及び封入には、ＩＴＲのＡ領域の配列及びＤ’領域の配列からなる配列が必要であることを報告している（非特許文献１）。Ｍｕｓａｔｏｖらは、Ａ領域－Ｄ’領域の配列を含む環状２本鎖ＤＮＡを細胞に導入させて、ＤＮＡが封入されたＡＡＶ中空粒子を製造することを開示する。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：米国特許第５，８６３，５４１号公報

特許文献2：国際公開第２０１２／１４４４４６号パンフレット

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｍｕｓａｔｏｖ，ｅｔ　ａｌ．，２００２，ｖｏｌ．７６，Ｎｏ．２４，　ｐ．１２７９２－１２８０２

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、より簡便で効率的な中空粒子内への核酸封入方法を開発し、それを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、より簡便かつ効率的な方法で、ウイルスの初期感染活性を維持したまま核酸が封入された中空粒子を製造することに成功した。また、この核酸封入中空粒子と標的細胞を混合することにより、中空粒子に内包された核酸を該標的細胞内に効果的に導入できることも確認した。本発明は、これらの知見と結果に基づくものであり、以下を提供するものである。

[0011] すなわち、本発明は、

［１］ 以下の工程を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の核酸封入中空粒子の製造方法；

（１）（ｉ）ＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）のＡ領域の配列、

（ｉｉ）ＡＡＶ ＩＴＲのA’領域の配列、及び

（ｉｉｉ）ＡＡＶ ＩＴＲのＤ領域の配列及び／又はＤ’領域の配列、を含む直鎖状核酸断片を調製する工程、

（２）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（１）の核酸断片を導入する工程、および

（３）（２）の細胞を培養する工程。

［２］ 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、A’領域の配列、Ａ領域の配列及びD’領域の配列を含む、［１］記載の方法。

［３］ 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、A’領域の配列及びＡ領域の配列を含む、［１］記載の方法。

［４］ 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、A’領域の配列、Ａ領域の配列及びD’領域の配列を含む、［１］記載の方法。

［５］ 核酸断片を調製する工程が、核酸増幅反応による核酸断片の増幅を含む工程である、［１］記載の方法。

［６］　中空粒子を産生する細胞が、ＡＡＶのＣａｐ遺伝子、Ｒｅｐ遺伝子及びＡＡＶのヘルパー機能が導入された細胞である、［１］記載の方法。

［７］　以下の工程を含むＡＡＶの核酸封入中空粒子の製造方法；

（ａ）（ｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域－Ｄ’領域の配列を少なくとも３つ、又は

（ｉｉ）Ａ領域－Ｄ’領域に相補的な配列、

を含む核酸を調製する工程、

（ｂ）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（ａ）の核酸を導入する工程、

（ｃ）（ｂ）の細胞を培養する工程。

［８］　核酸がプラスミドである、［７］記載の方法。

［９］　中空粒子を産生する細胞が、ＡＡＶのＣａｐ遺伝子、Ｒｅｐ遺伝子及びＡＡＶのヘルパー機能が導入された細胞である、［７］記載の方法。

発明の効果

[0012]　本発明により、より簡便で効率的に、核酸が封入された中空粒子を製造する方法が提供される。本発明における「核酸が封入されたＡＡＶ中空粒子」は、完全なＡＡＶゲノムを保持していないＡＡＶ様粒子であり、通常のＡＡＶとは相違する。

[0013]　本発明の中空粒子の製造方法によれば、ウイルスに由来する配列を少なくし、簡便かつ効率的に目的の核酸を中空粒子に封入することができる。それによって安全性が高く、かつ標的細胞特異性を有する中空粒子を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]Ａ領域－Ｄ’領域の配列を含むプラスミドの構造を示す図である。

[図2]Ａ領域－Ｄ’領域の配列を含むプラスミドを用いて調製したＡＡＶ中空粒子を接触させたＣＨＯ－Ｋ１細胞の蛍光を観察した図である。

[図3]Ａ領域－Ｄ’領域の配列を含む直鎖状核酸断片の構造を示す図である。

[図4]Ａ領域－Ｄ’領域の配列を含む直鎖状核酸断片を用いて調製したＡＡＶ中空粒子力価を測定した図である。

[図5]ＡＡＶのＩＴＲの領域を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本明細書において「逆方向末端反復（ＩＴＲ：ｉｎｖｅｒｔｅｄ　ｔｅｒｍｉｎａｌ　ｒｅｐｅａｔ）」は、ＡＡＶのゲノムＤＮＡの両端に存在するシス要素を意味する。ＩＴＲはＡＡＶゲノムＤＮＡの複製、増幅、封入に必須である。ＩＴＲにはＲｅｐ結合部位（ＲＢＳ、ＲＢＥとも記載される）および末端分離部位（ＴＲＳ）ならびにヘアピン形成を可能にする回文配列が含まれる。ＩＴＲは末端から順に、Ａ領域、Ｂ領域、Ｂ’領域、Ｃ領域、Ｃ’領域、Ａ’領域を含む。Ａ領域とＡ’領域、Ｂ領域とＢ’領域、Ｃ領域とＣ’領域はそれぞれ逆方向の相補配列であり、それぞれの領域がアニーリングして２本鎖となり図５に示すようなハンマーヘッド構造を形成する。Ａ’領域の末端のうち、Ｃ’領域の反対側（３’末端側又は５’末端側）にＤ領域が存在する。

[0016] 本明細書において「３’末端側」とは、ある配列（領域）の３’末端部分の、さらに３’末端の方向に位置することを意味する。同様に、「５’末端側」とは、ある配列（領域）の５’末端部分の、さらに５’末端の方向に位置することを意味する。したがって、本明細書において「３’末端側」または「５’末端側」と記載されている場合、ある配列（領域）の３’末端部分または５’末端部分に接して目的の配列等が配置されること、およびある配列（領域）の３’末端部分または５’末端部分に接しないで目的の配列等が配置される（すなわち、ある配列（領域）の３’末端部分または５’末端部分と目的の配列等の間に任意の配列が介在する）ことの両方を包含する。

[0017] 本発明において「キャプシド（ｃａｐｓｉｄ）」は、ウイルス粒子（ｖｉｒｉｏｎ）を構成する要素の１つで、ゲノムＤＮＡ又はコアを取り囲む複数の単位タンパク質（カプソメア：ｃａｐｓｏｍｅｒｅ）からなる外皮（ｃｏａｔ）又は殻（ｓｈｅｌｌ）を意味する。キャプシドの内部にウイルス核酸、コア又は他の物質を何も含まないキャプシドタンパク質のみから構成された粒子を、本明細書では「中空粒子（ｅｍｐｔｙ　ｐａｒｔｉｃｌｅ）」と

呼び、「中空キャプシド粒子（ｅｍｐｔｙ　ｃａｐｓｉｄ　ｐａｒｔｉｃｌｅ）」と呼ぶ場合もある。

[0018] 本発明において「目的の遺伝子」は、中空粒子に封入され標的細胞に導入されることが望まれる任意の遺伝子を意味する。目的の遺伝子は、構造遺伝子（例えば、酵素、転写因子、レポーター分子、増殖因子等の機能性タンパク質の遺伝子）および調節遺伝子（例えば、アンチセンスＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、リボザイム等の機能性核酸をコードする遺伝子）を含む。さらに、目的の遺伝子は、転写や翻訳を制御する調節エレメント、例えばプロモーター配列、エンハンサー配列、ポリＡ付加シグナル配列、ターミネーター配列等を含んでいてもよい。

[0019] 以下に本発明について詳細に説明する。

[0020] １つの態様として、本発明は以下の工程を含むＡＡＶの核酸封入中空粒子の製造方法である；

（１）（ｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域の配列、

（ｉｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのA’領域の配列、及び

（ｉｉｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＤ領域の配列及び／又はD’領域の配列、を含む直鎖状核酸断片を調製する工程、

（２）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（１）の核酸断片を導入する工程、および

（３）（２）の細胞を培養する工程。

[0021]（Ａ）核酸を調製する工程

前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、（ｉ）ＩＴＲのＡ領域の配列、（ｉｉ）ＩＴＲのA’領域の配列、及び（ｉｉｉ）Ｄ領域の配列及び／又はD’領域の配列を含む。これらの配列は、公知の天然ＡＡＶ血清型のゲノムＤＮＡの配列（例えば、血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１）が使用できる。各血清型のＩＴＲにおいて、Ａ領域、Ｂ領域、Ｂ’領域、Ｃ領域、Ｃ’領域、Ａ’領域が特定されている。Ｄ領域は、ＩＴＲのＡ’領域の末端のうち、Ｃ’領域の反対側（３’末端側又は５’末端側）に

存在する。各血清型のＤ領域の配列及びそのＤ領域の配列に相補的で逆方向の配列であるＤ’領域の配列も特定されている。Ａ領域、Ａ’領域、Ｄ領域、及びＤ’領域は、異なる血清型に由来してもよい。さらに、Ｒｅｐとの結合能及びヘアピン形成能を保持する範囲内において、天然のＡ領域の配列の変異体も使用でき、その場合のＡ’領域の配列は変異体のＡ領域の配列と相補的である。また、本発明は天然のＤ領域の配列の変異体も使用でき、その場合のＤ’領域の配列は変異体のＤ領域の配列と相補的である。

[0022] 本発明の一態様として、前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、５’末端から３’末端に向かって、Ａ’領域の配列、Ａ領域の配列及びＤ’領域の配列を含む。また、別の態様の直鎖状核酸断片は、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、Ａ’領域の配列及びＡ領域の配列を含む。さらに、別の態様の直鎖状核酸断片は、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、Ａ’領域の配列、Ａ領域の配列及びＤ’領域の配列を含む。

[0023] 前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、Ａ’領域の配列とＡ領域の配列の間にループ配列（スペーサー配列）を含んでも良い。ループ配列はＡ’領域とＡ領域の配列と共にステムループ構造（ヘアピン構造）を形成し得る配列であればよい。ループ配列の鎖長は３～５００ｂｐ、好ましくは５～２００ｂｐ、より好ましくは７～１００ｂｐである。

[0024] 前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、さらに目的の遺伝子を含むことができる。目的の遺伝子はＡＡＶに対して外来性であり得る。目的の遺伝子は、Ａ’領域の配列の５’末端側、Ａ’領域の配列とＡ領域の配列の間、Ａ領域の配列の３’末端側のいずれにも配置することができ、１カ所又は複数の箇所に配置することができる。

[0025] 前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、少なくとも１組の（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）の配列を含む。本発明は、前記の配列を１組含む核酸断片、２組含む核酸断片、３組含む核酸断片、４組含む核酸断片又は５組以上含む核酸断片が使用できる。

[0026] 前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、ＤＮＡ又はＲＮＡであり、好ましく

はＤＮＡである。さらに当該核酸断片は、相補的な２分子の核酸がアニールした２本鎖の核酸でもよく、１分子の１本鎖の核酸でもよい。なお、直鎖状の核酸とは、核酸の両端が共有結合により結合していないことを意味する。

[0027] 前記（１）工程の直鎖状核酸断片は、公知の核酸調製方法により調製することができる。当該核酸断片は、ＰＣＲ等の核酸増幅反応、化学合成によりインビトロで調製することができる。また当該核酸は、真核細胞内、原核細胞内などのインビボで、ポリメラーゼ反応、複製及び転写により生成した核酸を細胞から抽出して調製することができる。

[0028] １つの態様として、本発明は以下の工程を含むＡＡＶの核酸封入中空粒子の製造方法である；

（ａ）（ｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域－Ｄ’領域の配列を少なくとも３つ、又は

（ｉｉ）Ａ領域－Ｄ’領域に相補的な配列（Ｄ領域－Ａ’領域の配列）、

を含む核酸を調製する工程、

（ｂ）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（ａ）の核酸を導入する工程、

（ｃ）（ｂ）の細胞を培養する工程。

[0029] 前記（ａ）工程の核酸は、（ｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域－Ｄ’領域の配列を少なくとも３つ、又は（ｉｉ）Ａ領域－Ｄ’領域に相補的な配列を含む。ここで、「Ａ領域－Ｄ’領域の配列」とは、ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域からＤ’領域にわたる連続的な配列又はＡ領域及びＤ’領域を断続的に含む配列を意味する。同様に、「Ｄ領域－Ａ’領域の配列」とは、ＡＡＶ　ＩＴＲのＤ領域からＡ’領域にわたる連続的な配列又はＤ領域及びＡ’領域を断続的に含む配列を意味する。Ａ領域－Ｄ’領域の配列、この領域に相補的な配列（Ｄ領域－Ａ’領域の配列）は、公知の天然ＡＡＶ血清型のゲノムＤＮＡの配列（例えば、血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１）が使用できる。Ａ領域、Ａ’領域、Ｄ領域、及びＤ’領域は、異なる血清型に由来してもよい。さらに、Ｒｅｐ結合活性及びヘアピン形成を保持する範囲内において、天然のＡ領域の配列の変異体も使用でき、その場合のＡ

’領域の配列は変異体のＡ領域の配列と相補的である。また、本発明は天然のＤ領域の配列の変異体も使用でき、その場合のＤ’領域の配列は変異体のＤ領域の配列と相補的である。

[0030] 前記（ａ）工程の核酸のうちＡ領域－Ｄ’領域の配列（以下、「ＡＤ’配列」ともいう）を少なくとも３つ含む核酸は、１のＡＤ’配列と別のＡＤ’配列が隣接しても良く、又は１のＡＤ’配列と別のＡＤ’配列の間にスペーサー配列を含んでも良い。スペーサー配列は、３～５００ｂｐ、好ましくは５～２００ｂｐ、より好ましくは７～１００ｂｐ塩基長である。

[0031] 前記（ａ）工程の核酸は、さらに目的の遺伝子を含むことができる。目的の遺伝子はＡＡＶに対して外来性であり得る。目的の遺伝子は、Ａ領域－Ｄ’領域の配列の５’末端側、又は３’末端側のいずれにも、１カ所又は複数の箇所に配置することができる。

[0032] 前記（ａ）工程の核酸は、ＤＮＡ又はＲＮＡであり、好ましくはＤＮＡである。相補的な２分子の核酸がアニールした２本鎖の核酸でもよく、１分子の１本鎖の核酸でもよい。さらに、環状の核酸でもよく、直鎖状の核酸でもよい。本発明の一態様として、前記（ａ）工程の核酸は、環状の２本鎖ＤＮＡであり、好ましくはプラスミドである。

[0033] 前記（ａ）工程の核酸を細胞内で複製させることが望まれる場合は、当該核酸はさらに宿主細胞で機能する複製起点を含みうる。例えば、原核細胞の複製起点（ＣｏｌＥ１　ｏｒｉ、ｆ１　ｏｒｉ等）及び／又は真核細胞の複製起点（ＳＶ４０　ｏｒｉ、ＥＢＶ　ｏｒｉ等）が挙げられる。前記複製起点を有する核酸は、宿主細胞内にエピソーマルで維持され得る。

[0034] 本発明の一態様として、前記（１）工程の核酸断片及び前記（ａ）工程の核酸はＡＡＶ２由来の配列であり、そのＡ’領域の配列を配列番号８に、Ａ領域の配列を配列番号９に示す。さらに、Ｄ領域の配列を配列番号７に、Ｄ’領域の配列を配列番号１０に示す。

[0035] 前記（１）工程の核酸断片及び前記（ａ）工程の核酸は、天然型核酸、化学修飾核酸、人工核酸、核酸類似体及びそれらの組合せを含む。天然型核酸

は、自然界に存在する天然型ヌクレオチドのみが連結してなるＤＮＡ及びＲＮＡである。化学修飾核酸は、人工的に化学修飾をされた核酸であり、例えば、メチルホスホネート型ＤＮＡ／ＲＮＡ、ホスホロチオエート型ＤＮＡ／ＲＮＡ、ホスホルアミデート型ＤＮＡ／ＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル型ＤＮＡ／ＲＮＡ等が例示される。人工核酸は、天然型核酸の一部に非天然型ヌクレオチドを含む核酸又は非天然型ヌクレオチドのみが連結してなる核酸である。ここでいう「非天然型ヌクレオチド」とは、前記天然型ヌクレオチドに類似の性質及び／又は構造を有する人工的に構築された又は人工的に化学修飾された自然界に存在しないヌクレオチドをいう。核酸類似体は、天然型核酸に類似の構造及び／又は性質を有する人工的に構築された高分子化合物である。例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ：Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ）、ホスフェート基を有するペプチド核酸（ＰＨＯＮＡ）、架橋化核酸（ＢＮＡ／ＬＮＡ：Ｂｒｉｄｇｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ／Ｌｏｃｋｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ）、モルフォリノ核酸（ホルフォリノオリゴを含む）等が例示される。

[0036] 前記核酸は、必要に応じて、リン酸基、糖及び／又は塩基が標識されていてもよい。標識には、当該分野で公知の標識物質を利用することができる。例えば、放射性同位元素（例えば、３２Ｐ、３Ｈ、１４Ｃ）、ＤＩＧ、ビオチン、蛍光色素（例えば、ＦＩＴＣ、Ｔｅｘａｓ、ｃｙ３、ｃｙ５、ｃｙ７、ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＶＩＣ、ＪＯＥ、Ｒｏｘ、ＴＥＴ、Ｂｏｄｉｐｙ４９３、ＮＢＤ、ＴＡＭＲＡ）、又は発光物質（例えば、アクリジニウムエステル）が挙げられる。

[0037] 前記（１）工程の核酸断片及び前記（ａ）工程の核酸は、公知の精製方法や市販の製品を使用して精製・抽出した核酸を使用することができる。公知の精製方法としては、フェノール／クロロホルム混合液による抽出、アルコール沈澱、カラム精製、フィルター濾過、アガロースゲル電気泳動等による精製方法が例示される。

[0038] 前記核酸断片及び核酸のサイズは、ＡＡＶ中空粒子に包含可能なサイズで

あれば限定はされないが、通常は５ｋｂ以下である。また、前記（１）工程の核酸断片及び前記（ａ）工程の核酸は天然の完全なＡＡＶゲノムの配列を含まず、ＡＡＶのＲｅｐ遺伝子及び／又はＡＡＶのＣａｐ遺伝子の配列を欠損している。好適には、前記核酸断片及び核酸は天然の完全なＩＴＲの配列を保持しておらず、前記（１）工程及び前記（ａ）工程に記載した範囲内でＡ領域、Ａ’領域、Ｂ領域、Ｂ’領域、Ｃ領域、Ｃ’領域、Ｄ領域からなる群より選択される少なくとも１つの領域の配列を欠損している。より好適には、前記核酸断片及び核酸はＢ領域、Ｂ’領域、Ｃ領域及びＣ’領域の配列を欠損している。

[0039] （Ｂ）核酸を細胞に導入する工程

前記（１）工程の核酸断片又は前記（ａ）工程の核酸を、ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に導入する。核酸断片又は核酸を導入する細胞は、例えば、マウス細胞、及び霊長類細胞（例えば、ヒト細胞）などを含む哺乳類細胞、昆虫細胞などの様々な真核細胞が使用できる。本明細書において、ＡＡＶや核酸封入中空粒子を産生する細胞をパッケージング細胞又はプロデューサー細胞ともいうことがある。適当な哺乳類細胞は、初代細胞及び細胞株を含むがこれらに限定されるものではなく、適当な細胞株として、ＨＥＫ２９３細胞、２９３ＥＢ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、Ｖｅｒｏ細胞、３Ｔ３マウス線維芽細胞、Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２線維芽細胞、ＣＨＯ細胞やこれらの細胞から派生した細胞などが挙げられる。適当な昆虫細胞は、初代細胞及び細胞株を含むがこれらに限定されるものではなく、適当な細胞株として、Ｓｆ９細胞やこれらの細胞から派生した細胞などが挙げられる。

[0040] 中空粒子を産生する細胞は、ＡＡＶ　ｒｅｐ遺伝子産物およびｃａｐ遺伝子産物を発現する細胞が使用される。これらの遺伝子産物は、細胞のゲノムに安定に組み込まれたＡＡＶ　ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子によりコードされていてもよく、前記核酸断片又は核酸の導入前、導入と同時に、または導入後に細胞中に導入されるベクターによりコードされてもよい。ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子がベクターによりコードされている場合、ｒｅｐ

遺伝子およびｃａｐ遺伝子は同一のベクターにコードされていてもよく、それぞれが別のベクターにコードされていてもよい。ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子はいずれの血清型のＡＡＶの配列（例えば、血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１）であっても使用できる。さらに、ｒｅｐ遺伝子及びｃａｐ遺伝子は同じ血清型由来の配列であってもよく、異なる血清型由来の配列であってもよい。

[0041] ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子をコードするベクターには、中空粒子を産生し得る限りにおいて導入する細胞に適した発現ベクターを用いることができ、ウイルスベクター、プラスミドベクター、コスミドベクター、及び人工染色体が例示される。プラスミドベクターは、必要に応じて、エピソーマルで維持され得るものを使用できる。さらに、ベクターは、ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子が細胞内で発現可能なように、適当な発現システム内のプロモーターとターミネーターの制御下に配置してもよい。核酸発現システムとは、遺伝子の発現に必要な発現調節エレメントを、機能可能な状態で少なくとも１組有する系である。発現調節エレメントには、プロモーター及びターミネーターの他、必要に応じてエンハンサー及びポリＡ付加シグナルが含まれる。

[0042] 中空粒子を産生する細胞には、さらにヘルパー機能が導入され得る。ヘルパー機能は、ヘルパーウイルス機能、アクセサリー機能とも呼ばれる。ヘルパー機能の導入には一般にアデノウイルスが使用されるが、例えば１型又は２型単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどのウイルスも使用することができる。ウイルスを使用する場合は、細胞にウイルスをヘルパーウイルスとして感染させる。例えば、アデノウイルスの初期遺伝子の発現のみがＡＡＶ粒子のパッケージングに必要なので、後期遺伝子発現を呈さないアデノウイルスを用いてもよい。後期遺伝子発現を欠損するアデノウイルス変異体（例えばｔｓ１００Ｋ又はｔｓ１４９アデノウイルス変異体）を使用することができる。あるいは、ヘルパーウイルスから単離したヘルパーウイルス機能に必要な核酸を使用し、ヘルパーウイルス機能を提供する核酸構築物を

作製して細胞に導入することができる。ヘルパーウイルス機能を提供する構築物はＥ１遺伝子領域、Ｅ２Ａ遺伝子領域、Ｅ４ｏｒｆ６遺伝子及びＶＡＲＮＡをコードする遺伝子を含む、１種又は複数種のヘルパーウイルス機能を提供するヌクレオチド配列を含み、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド又は他のウイルスの形で宿主細胞に提供される。

[0043] 前記（１）工程の核酸断片及び前記（ａ）工程の核酸を細胞に導入する方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、ＤＥＡＥデキストラン法、ポリエチレンイミン法、エレクトロポレーション法、直接的微量注入法、高速微粒子銃などが使用可能である。また市販の試薬、例えばＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）－２９３ Ｒｅａｇｅｎｔ、ＴｒａｎｓＩＴ（登録商標）－２０２０（以上、Ｍｉｒｕｓ社製）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ Ｒｅａｇｅｎｔ、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００ ＣＤ Ｒｅａｇｅｎｔ（以上、ライフテクノロジーズ社製）、ＦｕＧｅｎｅ（登録商標）Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（プロメガ社製）、ＰＥＩ ｍａｘ（コスモバイオ社製）などを用いてもよい。

[0044] 前記（１）工程の核酸断片は、10^6細胞あたり、１ｎｇ～１０μｇ、好ましくは５ｎｇ～１μｇ、より好ましくは１０ｎｇ～５００ｎｇ導入する。前記（ａ）工程の核酸は、10^6細胞あたり、１００ｎｇ～１０００μｇ、好ましくは１μｇ～１００μｇ、より好ましくは５μｇ～５０μｇ導入する。

[0045] （Ｃ）細胞を培養する工程

前記（Ｂ）で核酸断片又は核酸を導入した細胞の培養は、細胞に応じて公知の培養条件で行うことができる。例えば温度３０～３７℃、湿度９５％、CO_2濃度５～１０％での培養が例示されるが、本発明はこのような条件に限定されるものではない。所望の細胞の増殖、核酸封入中空粒子の産生が達成できるのであれば前記の範囲以外の温度、湿度、CO_2濃度で実施してもよい。

[0046] 培養用培地は公知の培地を使用することができ、例えばＤＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ハムＦ１２、ＲＰＭＩ－１６４０などを使用してもよく、これらはＬｏ

ｎｚａ社、ライフテクノロジーズ社、シグマ・アルドリッチ社などから市販品として入手することができる。培地は無血清培地でもよく、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）やヒト血清由来のアルブミン等を添加した培地でもよい。

[0047] 培養器材としてシャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽又はバイオリアクター等の細胞培養用器材（容器）を使用することができる。なお、バッグとしては、細胞培養用CO_2ガス透過性バッグが好適である。大量の細胞を必要とする場合には大型培養槽を使用してもよい。

[0048] 培養期間は特に限定はなく、例えば１２時間～１０日間、好適には２４時間～７日間が好ましい。培養中に、細胞内及び／又は培養上清に核酸封入中空粒子、すなわち内部に核酸を保持するＡＡＶ様の粒子が産生される。

[0049] さらに本発明では、細胞の培養上清や回収した細胞を適当な緩衝液に再懸濁して破砕したもの（細胞破砕液）の遠心上清から、核酸が封入された中空粒子を取得する工程を実施し得る。本発明では、こうして得られた培養上清や細胞破砕液上清は、そのまま、あるいは更に、例えばフィルターろ過、ＣｓＣｌ密度勾配遠心分離など公知の方法や市販の製品により中空粒子の濃縮、精製等を実施した後、適切な方法、例えば凍結して所望の用途に使用するまで保存することができる。

[0050] （Ｄ）核酸封入中空粒子及び組成物

本発明は、前記（１）工程の核酸断片又は前記（ａ）工程の核酸が封入された中空粒子を提供する。本発明の中空粒子は天然の完全なＡＡＶゲノムを保持しておらず、ＡＡＶのＲｅｐ遺伝子及び／又はＡＡＶのＣａｐ遺伝子の配列を含む核酸を保持していない。好適には、本発明の中空粒子はさらに、天然の完全なＩＴＲを保持しておらず、Ａ領域、Ａ’領域、Ｂ領域、Ｂ’領域、Ｃ領域、Ｃ’領域、Ｄ領域からなる群より選択される少なくとも１つの領域の配列を保持していない。さらに、本発明は前記の核酸封入中空粒子を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、本発明の方法で得られる核酸封入中空粒子の少なくとも一つを含むことを特徴とする。

[0051] 本発明の組成物は、核酸封入中空粒子を有効成分として含む他、担体、及

び／又は他の薬剤を含むことができる。組成物中に含まれる核酸封入中空粒子は、異なる２以上のものであってもよい。この場合、異なる２以上の核酸封入中空粒子は、キャプシド等が互いに異なるウイルス由来であってもよいし、及び／又は封入された核酸が互いに異なる種類であってもよい。例えば、標的細胞の異なる複数の核酸封入中空粒子を含んでいてもよい。担体は、組成物の製剤化や生体への適用を容易にし、その作用を阻害又は抑制しない範囲で添加される物質であり、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤又は潤滑沢剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。好適には、本発明の組成物には薬学的に許容される担体が使用される。

[0052] 本発明の組成物における核酸封入中空粒子の含有量には特に限定はない。その粒子に包含される核酸の種類及び／又はその有効量、適用される細胞又は個体、適用の方法・経路、適用の目的、組成物の形態（形態、大きさを含む）、並びに前記の担体の種類などを勘案し、適宜定められる。

[0053] 前記の、本発明の核酸封入中空粒子ならびに当該中空粒子を含む組成物を使用することにより、細胞や動物個体に遺伝子を導入することができる。このような遺伝子導入方法も本発明の一態様である。細胞への遺伝子導入は、インビトロで中空粒子と細胞を接触することにより実施することができる。また、ヒトを含む動物個体への遺伝子導入は本発明の核酸封入中空粒子、好ましくは当該中空粒子を含む適切な組成物を、組織内（例えば筋肉内）、静脈内、皮下及び腹腔内投与等の経路で投与することにより実施される。

実施例

[0054] 以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0055] 実施例１　ＡＡＶ中空粒子に対するプラスミドＤＮＡのパッケージング

（１）ＡＤ’搭載プラスミドの構築

ＡＡＶ２ゲノムＤＮＡのＩＴＲに存在するＡＤ’配列（Ａ領域－Ｄ’領域にわたる６１ｂｐ：配列番号１）を含み、その両端に制限酵素Ａｆｌｌｌ

の認識配列を有する二本鎖ＤＮＡを、それぞれ化学合成した両鎖をアニーリングさせることにより調製した。この二本鎖ＤＮＡをｐＡｃＧＦＰ１－Ｎ１Ｖｅｃｔｏｒ（クロンテック、タカラバイオＵＳＡ社製）のＣＭＶプロモーターの上流にあるＡｆｌｌｌサイトに、ＡＤ’配列が５’から３’に順向き挿入されたプラスミドＡＤ－Ｆ、逆向きに挿入されたプラスミドＡＤ－Ｒを調製した。さらに、３つのＡＤ’配列が順向きに挿入されたプラスミドＡＤ－３Ｆを調製した。また、陰性コントロールとして人工遺伝子を挿入しないプラスミドＡＤ（－）を調製した。さらに、陽性コントロールとして、ＡｃＧＦＰ遺伝子を搭載するＡＡＶゲノムを生成するプラスミドｓｓ－ＡＡＶ、プラスミドｄｓ－ＡＡＶを調製した。プラスミドｓｓ－ＡＡＶは、ＡＡＶ Ｈｅｌｐｅｒ－Ｆｒｅｅ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）のｐＡＡＶ－ＭＳＣベクターのマルチクローニングサイトにＡｃＧＦＰ遺伝子が挿入されている。プラスミドｄｓ－ＡＡＶは、Ａｒｕｎ Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ博士より供与されたプラスミドｐｄｓＡＡＶ－ＣＢ－ｅＧＦＰのｅＧＦＰ遺伝子をＡｃＧＦＰに置換している。各プラスミドの概略図を図１に示す。図１中、ＡＤ’配列は「ＡＤ」と記載している。

[0056] （２）２９３ＥＢ細胞へのプラスミド導入

実施例１－（１）で得た各プラスミドを１μｇ／μＬに調製し、ＡＡＶ９のＣａｐとＡＡＶ２のＲｅｐを発現するｐＡＡＶ２／９ Ｖｅｃｔｏｒ（配列番号１１）及びｐＡｄ５Ｎ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）とともに、Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ”Ｍａｘ”（コスモバイオ社製）を用いて２９３ＥＢ細胞（国際公開第２０１２／１４４４４６号パンフレット）にトランスフェクションした。トランスフェクション後、２９３ＥＢ細胞を１／１００容量のＧｌｕｔａＭａｘ（Ｇｉｂｃｏ社製）を含むＤＭＥＭ培地中で、３７℃、５％CO_2で３日間培養した。

[0057] （３）核酸封入ＡＡＶ中空粒子の回収

実施例１－（２）で培養した２９３ＥＢ細胞の培養上清から、塩化セシウ

ム密度勾配遠心法にて核酸封入ＡＡＶ中空粒子（ＡＡＶ様粒子）を精製した。

[0058] こうして得られた精製ＡＡＶ様粒子溶液２μＬ、ｄH_2O １１６μＬ、５０ｍＭ $MgCl_2$ １５μＬ、０．１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００ １５μＬ、２５０Ｕ／μＬ Ｂｅｎｚｏｎａｓｅ ２μＬを混合し、３７℃で３０分インキュベートし、遊離のゲノムＤＮＡやプラスミドＤＮＡを分解した。次にＡＬ ｂｕｆｆｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ社製） １００μＬを加えてＡＡＶキャプシドを溶解し、中空粒子にパッケージングされたＤＮＡを抽出した。このＤＮＡを鋳型として、ＡｃＧＦＰ－ｆプライマー（配列番号２）とＡｃＧＦＰ－ｒプライマー（配列番号３）、及びＳＹＢＲ（登録商標） Ｐｒｅｍｉｘ ＤｉｍｅｒＥｒａｓｅｒ（商標） （Ｐｅｒｆｅｃｔ Ｒｅａｌ Ｔｉｍｅ）（タカラバイオ社製）を使用して、キットに添付の説明書に従い、ＡＡＶ中空粒子に含まれるベクターコピー数（ｖｅｃｔｏｒ ｇｅｎｏｍｅ：ｖ．ｇ．／μＬ）を測定した。

[0059] （４）標的細胞への導入

実施例１－（３）で培養上清から得られたそれぞれのＡＡＶ様粒子を、ＣＨＯ－Ｋ１細胞に以下のごとく感染させた。感染前日、２．８×10^4ｃｅｌｌのＣＨＯ－Ｋ１細胞を４８ウェルプレート上に播種した。翌日、実施例１－（３）で得たそれぞれのＡＡＶ様粒子を４．０×10^5ｖ．ｇ．／ｃｅｌｌで感染させた。感染後、ＣＨＯ－Ｋ１細胞を３７℃、５％CO_2で３日間した後、ＡｃＧＦＰの発現を蛍光顕微鏡で観察した（図２）。図２に示すように、ＡＤ’配列が逆向きに搭載されたプラスミドおよび３つのＡＤ’配列が順向きに搭載されたプラスミドは、順向きのＡＤ’配列搭載プラスミドに比べて、効果的に中空粒子に取り込まれ、感染細胞におけるＡｃＧＦＰの発現が確認された。ＡＤ’配列を含むプラスミドが導入された細胞からＡｃＧＦＰ遺伝子を含有するＡＡＶ様粒子が産生されたことが示された。

[0060] 実施例２ ＤＮＡ断片の導入によるＡＡＶゲノムのパッケージング

（１）ＡＤ配列を含むＤＮＡ断片の調製

配列番号４に記載するオリゴヌクレオチドＦｕｌｌ、配列番号５に記載するオリゴヌクレオチドＰｌｕｓ、配列番号６に記載するオリゴヌクレオチドＭｉｎｕｓを化学合成し、さらに、それぞれの相補鎖も化学合成し、それぞれアニーリングさせることにより二本鎖ＤＮＡを調製した。図３に各二本鎖ＤＮＡの構成を示す。ＡＡＶのＩＴＲのＡ領域の配列、Ｄ’領域の配列、Ａ’領域の配列（Ａ領域に相補的な配列）、Ｄ領域の配列（Ｄ’領域に相補的な配列）をそれぞれＡ配列、Ｄ’配列、Ａ’配列、Ｄ配列と称し、図３中ではそれぞれＡ、Ｄ（＋）、Ａ’、Ｄ（－）と示す。図３に示すように、オリゴヌクレオチドＦｕｌｌは５’末端から順に、Ｄ配列及びＡ’配列、ループ配列、Ａ配列、Ｄ’配列からなる。オリゴヌクレオチドＰｌｕｓは５’末端から順に、Ａ’配列、ループ配列、Ａ配列、Ｄ’配列からなる。オリゴヌクレオチドＭｉｎｕｓは５’末端から順に、Ｄ配列、Ａ’配列、ループ配列、Ａ配列からなる。Ｄ配列を配列番号７に、Ａ’配列を配列番号８に、Ａ配列を配列番号９に、Ｄ’配列を配列番号１０にそれぞれ示す。

[0061] 前記ＤＮＡ断片をＺｅｒｏ　Ｂｌｕｎｔクローニングキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）のｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔベクターにそれぞれ連結し、説明書に従ってプラスミドＤＮＡを調製した。これらのプラスミドＤＮＡを鋳型に、Ｍ１３　Ｆｏｒｗａｒｄ（－２０）プライマー及びＭ１３　Ｒｅｖｅｒｓｅプライマー（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）を用いたＰＣＲを実施し、ＤＮＡ断片Ｆｕｌｌ、ＤＮＡ断片Ｐｌｕｓ、ＤＮＡ断片Ｍｉｎｕｓの増幅を行った。また、陰性コントロールとして介在配列を含むｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔベクターを鋳型にＰＣＲを実施し、ＤＮＡ断片Ｍｏｃｋを増幅した。

[0062] ＰＣＲ反応液を１．５％アガロースゲル電気泳動に供し、前記ＤＮＡ断片を泳動後のゲルより抽出、精製した。ＤＮＡ断片Ｆｕｌｌからは２本のバンドが生じ、ＤＮＡ断片Ｆｕｌｌ－Ｈ、ＤＮＡ断片Ｆｕｌｌ－Ｍとして別々に抽出した。

[0063] （２）２９３ＥＢ細胞への導入

実施例２－（１）で得た各ＤＮＡ断片７５ｎｇを、ｐＡＡＶ２／９　Ｖｅ

ｃｔｏｒ及びｐＡｄ５Ｎ（ｐＨｅｌｐｅｒ　Ｖｅｃｔｏｒ）とともに、Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ”Ｍａｘ”を用いて２９３ＥＢ細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション２日後、２９３ＥＢ細胞をグルコース、重炭酸ナトリウム、１／１００容量のＧｌｕｔａＭａｘを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社）培地に交換した。その後、３７℃、５％CO_2で５日間培養した。

[0064] （３）ＡＡＶ様粒子の回収

実施例２－（２）で培養した２９３ＥＢ細胞の培養上清を回収後、上清にＤＮａｓｅＩを添加し、遊離ＤＮＡの分解を行った。分解後、上記同様にＡＬ　ｂｕｆｆｅｒ　（Ｑｉａｇｅｎ社製）を加えて、ＡＡＶキャプシドを溶解し、パッケージングされたＤＮＡの抽出を行った。ＡＡＶ様粒子に含まれるＤＮＡ断片コピー数は、３’ｓｅｎｓｅプライマー（配列番号１２）と３’ａｎｔｉｓｅｎｓｅプライマー（配列番号１３）を使用した定量ＰＣＲにより解析した（図４）。図４に示すように、ＡＡＶのＩＴＲ由来する配列を含むＤＮＡ断片を導入することにより、当該ＤＮＡ断片のＡＡＶ中空粒子へのパッケージングが起こることが示された。このようなＤＮＡ断片はＰＣＲにより大量に調製することができ、ＡＡＶ様粒子をより簡便に調製することができる。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明により、より簡便で効率的な中空粒子内への核酸封入方法が提供される。本発明の方法を用いて製造された核酸封入中空粒子や当該核酸封入中空粒子を有効成分とする組成物は、遺伝子治療の研究又は臨床の分野における遺伝子導入方法として有用である。

配列表フリーテキスト

[0066] ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１：　ＡＤ’　ｒｅｇｉｏｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２：　ＡｃＧＦＰ－ｆ

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　３：　ＡｃＧＦＰ－ｒ

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　４：　Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｆｕｌｌ

SEQ ID NO: 5: Oligonucleotide Plus

SEQ ID NO: 6: Oligonucleotide Minus

SEQ ID NO: 7: D region sequence

SEQ ID NO: 8: A' region sequence

SEQ ID NO: 9: A region sequence

SEQ ID NO: 10: D' region sequence

SEQ ID NO: 11: pAAV2/9 Vector

SEQ ID NO: 12: 3' sense primer

SEQ ID NO: 13: 3' antisense primer

請求の範囲

[請求項1] 以下の工程を含むアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の核酸封入中空粒子の製造方法；

（１）（ｉ）ＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）のＡ領域の配列、

（ｉｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ’領域の配列、及び

（ｉｉｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＤ領域の配列及び／又はＤ’領域の配列、を含む直鎖状核酸断片を調製する工程、

（２）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（１）の核酸断片を導入する工程、および

（３）（２）の細胞を培養する工程。

[請求項2] 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ａ’領域の配列、Ａ領域の配列及びＤ’領域の配列を含む、請求項１記載の方法。

[請求項3] 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、Ａ’領域の配列及びＡ領域の配列を含む、請求項１記載の方法。

[請求項4] 核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ｄ領域の配列、Ａ’領域の配列、Ａ領域の配列及びＤ’領域の配列を含む、請求項１記載の方法。

[請求項5] 核酸断片を調製する工程が、核酸増幅反応による核酸断片の増幅を含む工程である、請求項１記載の方法。

[請求項6] 中空粒子を産生する細胞が、ＡＡＶのＣａｐ遺伝子、Ｒｅｐ遺伝子及びＡＡＶのヘルパー機能が導入された細胞である、請求項１記載の方法。

[請求項7] 以下の工程を含むＡＡＶの核酸封入中空粒子の製造方法；

（ａ）（ｉ）ＡＡＶ　ＩＴＲのＡ領域－Ｄ’領域の配列を少なくとも３つ、又は

（ｉｉ）Ａ領域－Ｄ’領域に相補的な配列、

を含む核酸を調製する工程、

（ｂ）ＡＡＶの中空粒子を産生する細胞に（ａ）の核酸を導入する工

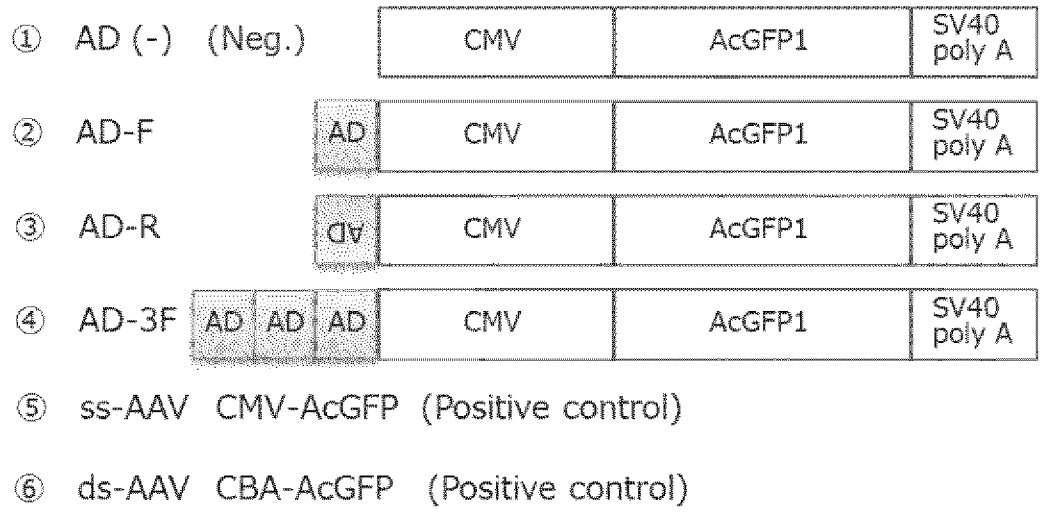
程、

（ｃ）（ｂ）の細胞を培養する工程。

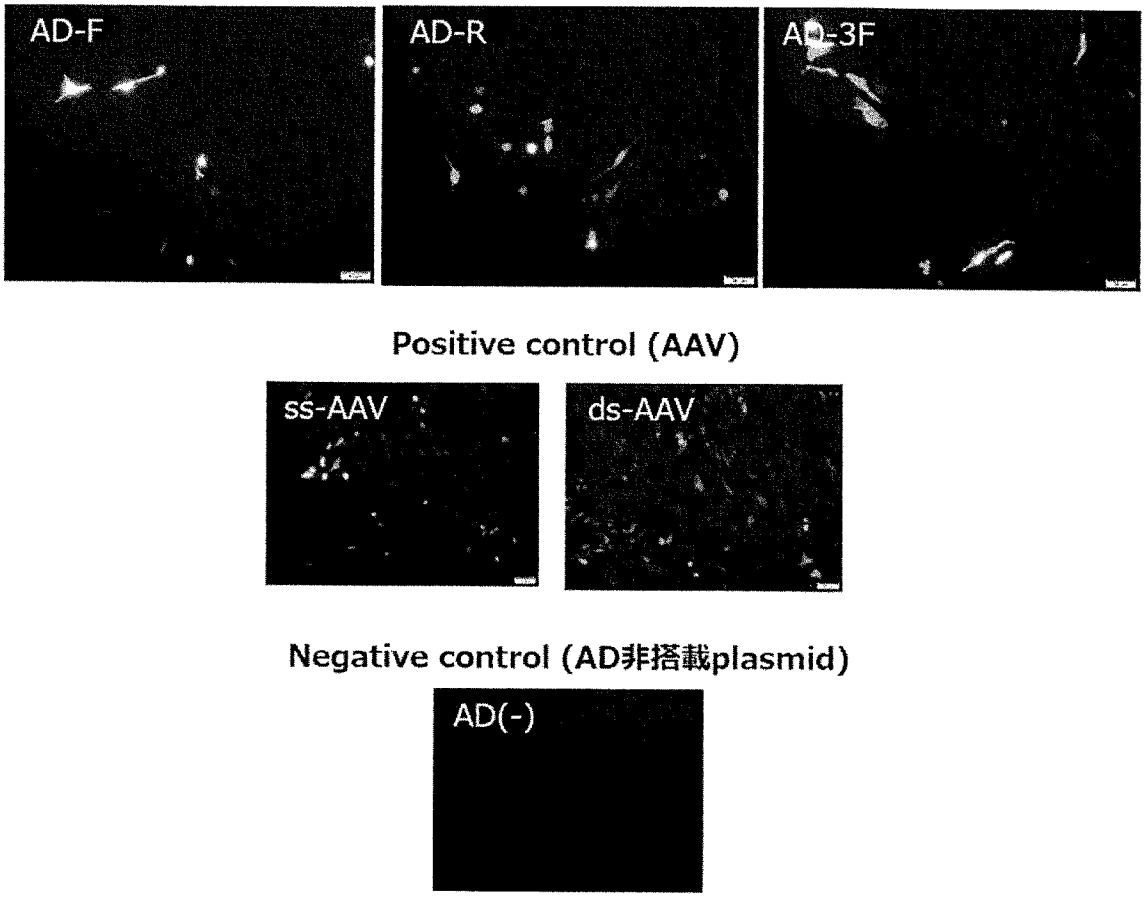
[請求項8] 核酸がプラスミドである、請求項７記載の方法。

[請求項9] 中空粒子を産生する細胞が、ＡＡＶのＣａｐ遺伝子、Ｒｅｐ遺伝子及びＡＡＶのヘルパー機能が導入された細胞である、請求項７記載の方法。

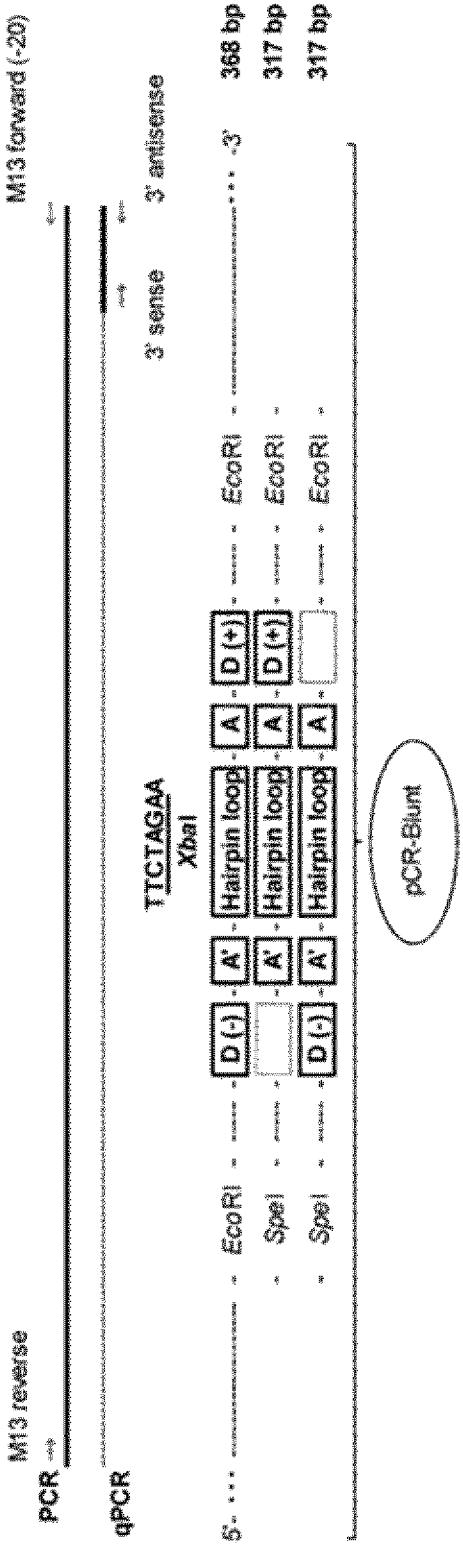
[図1]


① AD (-) (Neg.)
CMV
AcGFP1
SV40 poly A
② AD-F
AD
CMV
AcGFP1
SV40 poly A
③ AD-R
AD
CMV
AcGFP1
SV40 poly A
④ AD-3F
AD
AD
AD
CMV
AcGFP1
SV40 poly A
⑤ ss-AAV CMV-AcGFP (Positive control)
⑥ ds-AAV CBA-AcGFP (Positive control)

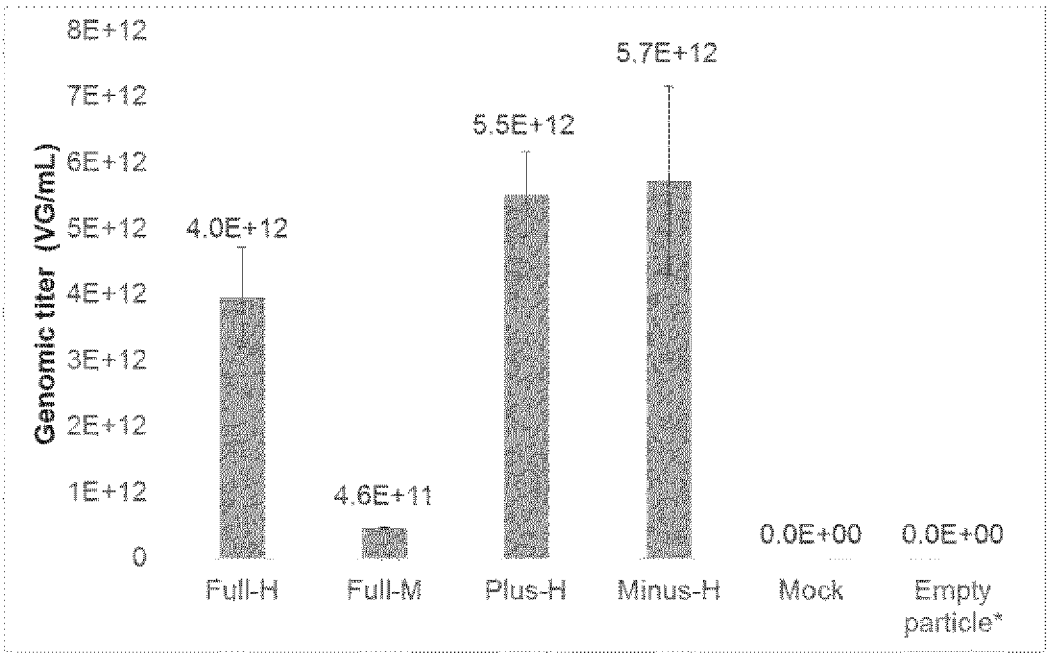
[図2]


AD-F
AD-R
AD-3F
Positive control (AAV)
ss-AAV
ds-AAV
Negative control (AD非搭載plasmid)
AD(-)

[図3]

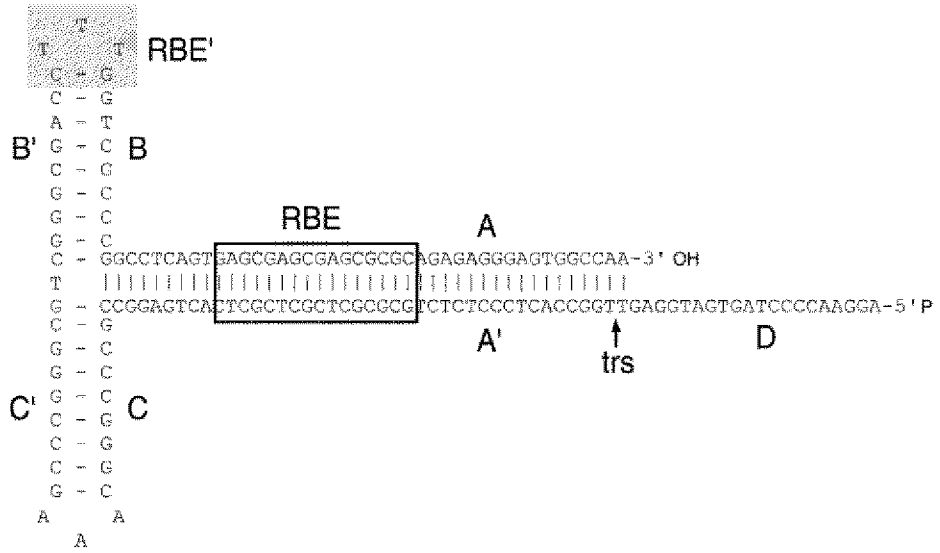

M13 forward (-20)
M13 reverse
PCR
qPCR
3' sense
3' antisense
TTCTAGAA
XbaI
Insert
Full
Plus
Minus
5'
EcoRI
SpeI
D (-)
A'
Hairpin loop
A
D (+)
EcoRI
3'
368 bp
317 bp
317 bp
pCR-Blunt

[図4]



* Empty particle（中空粒子）:
カプシド内にベクターゲノムがないもの

[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/002687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N7/01(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)
Int.Cl. C12N7/01, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2007/0280906 A1 (PETRAS, Ognjen) 06 December 2007, paragraph [0033], claims (Family: none)	1, 3, 6, 7, 9/1-7, 9
Y	CHIORINI, A. John et al., "Adena-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes", J. Virol., 1999, vol. 73, no. 5, pp. 4293-4298, ISSN 1098-5514, fig. 2.	1-7, 9

☒ 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	Date of mailing of the international search report
20 April 2018 (20.04.2018)	01 May 2018 (01.05.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/002687

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAHREINI, Piruz et al., "Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome", Gene, 1992, vol. 119, pp. 265-272, ISSN 0378-1119, fig. 1, 2.	1-7, 9
Y	CHIORINI, A. John, "Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection", J. Virol., 1995, vol. 69, no. 11, pp. 7334-7338, ISSN 1098-5514, fig. 2.	1-7, 9
X	MUSATOV, Sergei et al., "A cis-acting element that directs circular adeno-associated virus replication and packaging", J. Virol., 2002, vol. 76, no. 24, pp. 12792-12802, ISSN 1098-5514, fig. 1., table 1., MATERIALS AND METHODS	7-9
A	PETRAS, Ognjen, "748. Generation of Novel Double-Stranded AAV Vectors with an Expanded Packaging Capacity Using Linearized 1-AAV ITR DNA Molecules", Molecular Therapy, vol. 9, supplement 1, 2004, pp. S284-S285, ISSN 1525-0016, entire text	1-7, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/002687

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 extra 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 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.:

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/002687

(Invention 1) Claims 1-6

Claim 1 lacks novelty in light of document 1, and thus does not have a special technical feature. However, claim 2, which is dependent on claim 1, has the special technical feature in which the nucleic acid fragment comprises a sequence of region A', a sequence of region A, and a sequence of region D', going from the 5' terminal toward the 3' terminal". Accordingly, claims 1 and 2 are classified as invention 1.

In addition, claims 3-6 are dependent on claim 1 and are related to the invention in claim 1, and thus are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 7-9

Claim 7 does not share an identical or corresponding special technical feature with claim 2 classified as invention 1.

In addition, claim 7 is not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claim 7 cannot be classified as invention 1, and thus is classified as invention 2.

In addition, claims 8 and 9 are dependent on claim 7, and are related to the invention in claim 7, and thus are classified as invention 2.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００２６８７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N7/01(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N7/01, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/Y	US 2007/0280906 A1 (PETRAS, Ognjen) 2007.12.06, 段落［００３３］、Claims (ファミリーなし)	1,3,6,7,9/1-7,9
Y	CHIORINI, John A. et al., Adeno-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes, J. Virol., 1999, Vol. 73, No. 5, p. 4293-4298, ISSN 1098-5514, FIG. 2.	1-7,9

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２０．０４．２０１８	０１．０５．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４５０４
小倉　梢
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	NAHREINI, Piruz et al., Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome, Gene, 1992, Vol. 119, p. 265-272, ISSN 0378-1119, Fig. 1, 2.	1-7,9
Y	CHIORINI, John A., Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection, J. Virol., 1995, Vol. 69, No. 11, p. 7334-7338, ISSN 1098-5514, FIG. 2.	1-7,9
X	MUSATOV, Sergei et al., A cis-acting element that directs circular adeno-associated virus replication and packaging, J. Virol., 2002, Vol. 76, No. 24, p. 12792-12802, ISSN 1098-5514, FIG. 1., TABLE 1., MATERIALS AND METHODS	7-9
A	PETRAS, Ognjen, 748. Generation of Novel Double-Stranded AAV Vectors with an Expanded Packaging Capacity Using Linearized 1-AAV ITR DNA Molecules, Molecular Therapy, Vol. 9, Supplement 1, 2004, p. S284-S285, ISSN 1525-0016, 全文	1-7,9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００２６８７

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

（発明１）請求項１－６
　請求項１は、文献１により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項１の従属請求項である請求項２は「核酸断片が、５’末端から３’末端に向かって、Ａ’領域の配列、Ａ領域の配列及びＤ’領域の配列を含む」という特別な技術的特徴を有している。したがって、請求項１、２を発明１に区分する。
　また、請求項３－６は請求項１の従属請求項であり、請求項１に対して発明の連関を有しているので、発明１に区分する。

（発明２）請求項７－９
　請求項７は、発明１に区分された請求項２と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しない。
　また、請求項７は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
　したがって、請求項７は発明１に区分できないから、発明２に区分する。
　また、請求項８、９は請求項７の従属請求項であり、請求項７に対して発明の連関を有しているので、発明２に区分する。