

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6878299号
(P6878299)

(45) 発行日 令和3年5月26日 (2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年5月6日 (2021.5.6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 13 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-553005 (P2017-553005)	(73) 特許権者	500034653
(86) (22) 出願日	平成28年4月7日 (2016.4.7)		ジェンザイム・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2018-510648 (P2018-510648A)		アメリカ合衆国02142マサチューセツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート
(43) 公表日	平成30年4月19日 (2018.4.19)		50番
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/026486	(74) 代理人	100127926
(87) 国際公開番号	W02016/164609		弁理士 結田 純次
(87) 国際公開日	平成28年10月13日 (2016.10.13)	(74) 代理人	100140132
審査請求日	平成31年3月29日 (2019.3.29)		弁理士 竹林 則幸
(31) 優先権主張番号	62/220,067	(72) 発明者	シルッカ・キョスティオーム・ア
(32) 優先日	平成27年9月17日 (2015.9.17)		アメリカ合衆国ニュージャージー州088
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		07.ブリッジウォーター. メールコード
(31) 優先権主張番号	62/144,862		: 55エー-505エー. コーポレートド
(32) 優先日	平成27年4月8日 (2015.4.8)		ライブ55. サノフィ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オーバーサイズアデノ随伴ベクターの産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ゲノムを含むアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子を産生するための方法であって、該方法は、

a) r A A V 粒子を生成するような条件下で、

i) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸、ならびに

i i) オーバーサイズ r A A V ゲノムであって、該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、約 5 . 4 k b ~ 約 9 . 4 k b の間である、前記オーバーサイズ r A A V ゲノム、を含む A A V 産生細胞株を培養する工程と、

b) A A V ヘルパー機能を提供する工程であって、場合により、該 A A V ヘルパー機能は、アデノウイルス、H S V、またはバキュロウイルスによって提供される、前記工程と、

c) オーバーサイズ r A A V ゲノムを含む r A A V 粒子を回収する工程であって、場合により、該 r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間 ~ 約 9 6 時間で回収される、前記工程とを含み、

該 A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、該産生細胞株のゲノムに安定的に組み込まれている前記方法。

【請求項2】

オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現を強化するための方法であって、該方法は、産生

10

20

細胞株に A A V ヘルパー機能を提供することによって、該産生細胞株において r A A V 粒子を産生させる工程を含み、場合により、該 A A V ヘルパー機能は、アデノウイルス、H S V、またはバキュロウイルスによって提供され、該産生細胞株は、

a) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸、ならびに

b) オーバーサイズ r A A V ゲノムであって、該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、約 5 . 4 k b ~ 約 9 . 4 k b の間である、前記オーバーサイズ r A A V ゲノムを含み、

該 A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、該産生細胞株のゲノムに安定的に組み込まれており、

該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、該産生細胞株を使用して A A V 粒子にパッケージングされた場合、細胞の一過性トランスフェクションによって調製された A A V 粒子と比較して強化された発現を呈し、

場合により、該方法はさらに、オーバーサイズ r A A V ゲノムを含む r A A V 粒子を回収する、場合により、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間 ~ 約 9 6 時間で該 r A A V 粒子を回収する工程を含む、前記方法。

【請求項 3】

(i) オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現よりも、約 1 . 2 5 倍、約 1 . 5 倍、約 1 . 7 5 倍、約 2 . 0 倍、約 2 . 5 倍、約 2 . 7 5 倍、約 3 倍、または約 5 倍多い；

(i i) 産生細胞株によって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態と比較して速い発現動態である；および / または

(i i i) 産生細胞株によって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態よりも、約 5 % 速い、約 1 0 % 速い、約 2 5 % 速い、約 5 0 % 速い、約 7 5 % 速い、または約 9 0 % 速い；

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

オーバーサイズ r A A V ゲノムは、異種導入遺伝子、および、1 つまたはそれ以上の：

(i) 1 つまたはそれ以上の A A V 逆位末端反復配列 (I T R)、または 2 つの I T R であって、該 I T R は、場合により、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 1 0、A A V r h 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V D J、ヤギ A A V、ウシ A A V、またはマウス A A V 血清型 I T R である、前記 A A V I T R ；

(i i) イントロン、場合により、合成イントロン；および

(i i i) ポリアデニル化シグナル、場合により、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

異種導入遺伝子は、

(i) 治療的導入遺伝子産物をコードする；

(i i) 第 V I I I 因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) をコードする；

(i i i) ヒト導入遺伝子である；および / または

(i v) プロモーターに作動可能に連結されており、場合により、該プロモーターは、マウストランスチレチン (m T T R) プロモーターである；

請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

r A A V 粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 10、A A V r h 10、A A V 11、A A V 12、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V 2 / 2 - 7 m 8、A A V D J、A A V 2 N 5 8 7 A、A A V 2 E 5 4 8 A、A A V 2 N 7 0 8 A、A A V V 7 0 8 K、ヤギ A A V、A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V、またはマウス A A V キャプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型キャプシドを含み、場合により、

(i) 該 r A A V 粒子の I T R およびキャプシドは、同じ A A V 血清型に由来し、場合により、該 A A V 血清型は、A A V 2 である；または

(i i) 該 r A A V 粒子の I T R およびキャプシドは、異なる A A V 血清型に由来し、場合により、A A V 2 I T R および A A V r h 8 R キャプシドまたは A A V 8 キャプシドである；

請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

産生細胞株は、霊長類細胞、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、A 5 4 9 細胞、または P e r c . 6 細胞に由来し、場合により、該産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

r A A V 粒子の精製をさらに含み、場合により、該精製は、1 つまたはそれ以上のクロマトグラフィー工程を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

r A A V 粒子を含む組成物であって、

r A A V 粒子は、産生細胞株において産生され、

A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに オーバーサイズ r A A V ゲノムは、該産生細胞株のゲノムに安定に組み込まれており、該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、約 5 . 4 ~ 約 9 . 4 k b の間であり、r A A V 粒子は、該産生細胞株に A A V ヘルパー機能を提供することによって産生され、場合により、該 A A V ヘルパー機能は、アデノウイルス、H S V、またはバキュロウイルスによって提供され、

そして場合により、

(i) 該産生細胞株は、霊長類細胞、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、A 5 4 9 細胞、または P e r c . 6 細胞に由来する；および / または

(i i) 該産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている；

前記組成物。

【請求項 10】

オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ゲノムを含むアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子を産生するための細胞株であって、該細胞株は、

a) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸、ならびに

b) オーバーサイズ r A A V ゲノムであって、該オーバーサイズ r A A V ゲノムは、約 5 . 4 k b ~ 約 9 . 4 k b の間である、前記オーバーサイズ r A A V ゲノム、を含み、そして、

A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに オーバーサイズ r A A V ゲノムは、該細胞株のゲノムに安定に組み込まれており；そして場合により、

(i) 該細胞株は、霊長類細胞、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、A 5 4 9 細胞、または P e r c . 6 細胞に由来する；および / または

(i i) 該細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている；

前記細胞株。

【請求項 11】

オーバーサイズ r A A V ゲノムは、異種導入遺伝子、および、1 つまたはそれ以上の：

(i) 1 つまたはそれ以上の A A V 逆位末端反復配列 (I T R)、または 2 つの I T R であって、該 I T R は、場合により、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V

10

20

30

40

50

10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型ITRである、前記AAV ITR

；
(ii)イントロン、場合により、合成イントロン；および

(iii)ポリアデニル化シグナル、場合により、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；

を含む、請求項10に記載の細胞株。

【請求項12】

異種導入遺伝子は、

(i)治療的導入遺伝子産物をコードする；

(ii)第VII因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)をコードする；

(iii)ヒト導入遺伝子である；および/または

(iv)プロモーターに作動可能に連結されており、場合により、該プロモーターは、マウストランスチレチン(mTTR)プロモーターである；

請求項11に記載の細胞株。

【請求項13】

rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含み、場合により、

(i)該rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、同じAAV血清型に由来し、場合により、該AAV血清型は、AAV2である；または

(ii)該rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来し、場合により、AAV2 ITRおよびAAVrh8RキャプシドまたはAAV8キャプシドである；

請求項11または12に記載の細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年4月8日に出願された米国仮出願第62/144,862号および2015年9月17日に出願された米国仮出願第62/220,067号の優先権を主張し、これらのそれぞれの内容は、あらゆる目的で、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

以下のASCIIテキストファイルでの提出の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形式(CRF)の配列表(ファイル名：159792013240SEQLIST.txt、データ記録日：2016年4月6日、サイズ：27kb)。

【0003】

本発明は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを有するAAV粒子を産生するための方法および細胞株に関する。

【背景技術】

【0004】

組換えAAV(rAAV)ベクターは、遺伝子疾患および慢性疾患に関して、遺伝子導入のための魅力的な送達ビヒクルになっている。rAAVベクターの使用に関する制限の

10

20

30

40

50

1つは、パッケージング容量が小さいことであり、このため、大きなcDNA、例えば、第VII因子(FVII)、ジストロフィン、ジスフェリン、および嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)を必要とする多数の臨床用途での遺伝子療法を妨げている。初期の研究では、パッケージング限度は4.7~4.8kbと定義されていた(非特許文献1)。より最近の研究では、パッケージングされるベクターゲノムの限度は、AAV2、AAV5、またはAAV8キャプシドでは、およそ5.0~5.2kbのサイズであることが確認された。これらの研究において、オーバーサイズの(または「フラグメント化された」)ゲノムは、いずれの向きのものも、典型的には、5'末端で欠失しており、パッケージングされたゲノムの大半は、約5.2kbを上回らなかった(非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Dong, J.-Y.ら(1996年) Human Gene Therapy 7: 2101~2112頁

【非特許文献2】Lu, H.ら(2008年) Human Gene Therapy 19: 648~654頁

【非特許文献3】Wu, Z.ら(2010年) Molecular Therapy 18: 80~86頁

【非特許文献4】Grose, W.E.ら(2012年) PLoS One 7: e39233 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、十分な品質を高い収率で生成することを可能にする、オーバーサイズベクターのためのより優れた産生プラットフォームが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

産生細胞株(PCL)プラットフォームによるオーバーサイズベクターの産生に関する包括的な分析が、本明細書に記載される。以下に記載されるように、このPCLプラットフォームは、高品質のオーバーサイズアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを高収率で生成する。生成されたrAAVベクターは、標準的なトリプルトランスフェクション方法によって作製されたベクターにおいて観察されるものよりも、キャプシド化された大きなゲノムを多くの量で含有する。加えて、細胞株は安定しており、ベクターは、異常な混入DNAをほとんど含有しない。ベクターは、インビボでの遺伝子導入の際に完全な発現カセットを生成し、機能性タンパク質の産生をもたらす。

30

【0008】

本発明は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを含むAAV粒子を産生するための方法であって、a) rAAV粒子を生成するような条件下において、i) AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸、ならびにii) 約4.7kbを上回るrAAVゲノムを含むAAV産生細胞株を培養する工程と; b) AAVヘルパー機能を提供する工程と; c) オーバーサイズrAAVゲノムを含むrAAV粒子を回収する工程とを含む方法を提供する。一部の実施形態において、AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸ならびに/またはrAAVゲノムは、産生細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸ならびに/またはrAAVゲノムは、産生細胞株のゲノムに安定に組み込まれている。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、1つまたはそれ以上のAAV逆位末端反復配列(ITR)および異種導入遺伝子を含む。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、2つのAAV ITRを含む。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb~約9.4kb、場合によっては約4.7kb~6.7

40

50

k bである。一部の実施形態において、工程 c) で回収された A A V 粒子は、約 4 . 7 k b を上回る r A A V ゲノムを含む。一部の実施形態において、工程 c) で回収された A A V 粒子は、約 4 . 7 k b ~ 約 9 . 4 k b、場合によっては約 4 . 7 k b ~ 6 . 7 k b の r A A V ゲノムを含む。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 4 . 7 k b ~ 約 5 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 6 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 7 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 8 k b、または約 4 . 7 k b ~ 約 9 k b である。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 4 . 7 k b ~ 6 . 7 k b または約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 7 k b である。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、長さが、およそ、5 . 0 k b、5 . 1 k b、5 . 2 k b、5 . 3 k b、5 . 4 k b、5 . 5 k b、5 . 6 k b、5 . 7 k b、5 . 8 k b、5 . 9 k b、6 . 0 k b、6 . 1 k b、6 . 2 k b、6 . 3 k b、6 . 4 k b、6 . 5 k b、6 . 6 k b、6 . 7 k b、6 . 8 k b、6 . 9 k b、7 . 0 k b、8 . 0 k b、もしくは 9 . 0 k b のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【 0 0 0 9 】

上述の方法の一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、治療的導入遺伝子産物をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第 V I I I 因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。さらなる実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン (m T T R) プロモーターである。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、イントロンを含む。さらなる実施形態において、イントロンは、合成イントロンである。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。さらなる実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

【 0 0 1 0 】

上述の方法の一部の実施形態において、r A A V 粒子は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 1 0、A A V r h 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V 2 / 2 - 7 m 8、A A V D J、A A V 2 N 5 8 7 A、A A V 2 E 5 4 8 A、A A V 2 N 7 0 8 A、A A V V 7 0 8 K、ヤギ A A V、A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V、またはマウス A A V キャプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、A A V 血清型は、A A V 1、A A V 2、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 1 0、または A A V r h 1 0 である。上述の方法の一部の実施形態において、A A V I T R は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V r h 8、A A V r h 8 R、A A V 9、A A V 1 0、A A V r h 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 2 R 4 7 1 A、A A V D J、ヤギ A A V、ウシ A A V、またはマウス A A V 血清型 I T R である。一部の実施形態において、A A V I T R は、A A V 2 I T R である。一部の実施形態において、r A A V 粒子の I T R およびキャプシドは、同じ A A V 血清型に由来する。一部の実施形態において、I T R およびキャプシドは、A A V 2 に由来する。他の実施形態において、r A A V 粒子の I T R およびキャプシドは、異なる A A V 血清型に由来する。一部の実施形態において、A A V 粒子は、A A V 2 I T R および A A V r h 8 R キャプシドを含む。一部の実施形態において、A A V 粒子は、A A V 2 I T R および A A V 8 キャプシドを含む。

【 0 0 1 1 】

上述の方法の一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、A 5 4 9 細胞、または P e r c . 6 細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。一部の実施形態において、A A V ヘルパー機能は、アデノウイルスまたは H S V によって提供される。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能

10

20

30

40

50

の提供後、約４８時間～約９６時間で回収される。一部の実施形態において、本方法は、*rAAV*粒子の精製をさらに含む。一部の実施形態において、精製は、１つまたはそれ以上のクロマトグラフィー工程を含む。一部の態様において、本発明は、本明細書に記載される方法によって産生されたオーバーサイズ*rAAV*ゲノムを含む*rAAV*粒子を提供する。

【００１２】

一部の態様において、本発明は、*rAAV*粒子を含む組成物であって、*rAAV*粒子のうちの少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、または少なくとも約７０％が、約４．７ｋｂを上回る*rAAV*ゲノムがキャプシド化されている、組成物を提供する。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、１つまたはそれ以上の*AAV*逆位末端反復配列（*ITR*）および異種導入遺伝子を含む。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、２つの*AAV ITR*を含む。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、約４．７ｋｂ～約９．４ｋｂである。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、約４．７ｋｂ～約５ｋｂ、約４．７ｋｂ～約６ｋｂ、約４．７ｋｂ～約７ｋｂ、約４．７ｋｂ～約８ｋｂ、または約４．７ｋｂ～約９ｋｂである。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、約４．７ｋｂ～６．７ｋｂまたは約５．２ｋｂ～約８．７ｋｂである。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、長さが、およそ、５．０ｋｂ、５．１ｋｂ、５．２ｋｂ、５．３ｋｂ、５．４ｋｂ、５．５ｋｂ、５．６ｋｂ、５．７ｋｂ、５．８ｋｂ、５．９ｋｂ、６．０ｋｂ、６．１ｋｂ、６．２ｋｂ、６．３ｋｂ、６．４ｋｂ、６．５ｋｂ、６．６ｋｂ、６．７ｋｂ、６．８ｋｂ、６．９ｋｂ、７．０ｋｂ、８．０ｋｂ、もしくは９．０ｋｂのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【００１３】

上述の組成物の一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、治療的導入遺伝子産物をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第ⅤⅠⅠⅠ因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（*CFTR*）をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。さらなる実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン（*mTTR*）プロモーターである。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、イントロンを含む。さらなる実施形態において、イントロンは、合成イントロンである。一部の実施形態において、*rAAV*ゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。さらなる実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

【００１４】

上述の組成物の一部の実施形態において、*rAAV*粒子は、*AAV1*、*AAV2*、*AAV3*、*AAV4*、*AAV5*、*AAV6*、*AAV7*、*AAV8*、*AAVrh8*、*AAVrh8R*、*AAV9*、*AAV10*、*AAVrh10*、*AAV11*、*AAV12*、*AAV2R471A*、*AAV2/2-7m8*、*AAV DJ*、*AAV2 N587A*、*AAV2 E548A*、*AAV2 N708A*、*AAV V708K*、ヤギ*AAV*、*AAV1/AAV2*キメラ、ウシ*AAV*、またはマウス*AAV*キャプシド*rAAV2/HBoV1*血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、*AAV*血清型は、*AAV1*、*AAV2*、*AAV5*、*AAV6*、*AAV7*、*AAV8*、*AAVrh8*、*AAVrh8R*、*AAV9*、*AAV10*、または*AAVrh10*である。上述の方法の一部の実施形態において、*AAV ITR*は、*AAV1*、*AAV2*、*AAV3*、*AAV4*、*AAV5*、*AAV6*、*AAV7*、*AAV8*、*AAVrh8*、*AAVrh8R*、*AAV9*、*AAV10*、*AAVrh10*、*AAV11*、*AAV12*、*AAV2R471A*、*AAV DJ*、ヤギ*AAV*、ウシ*AAV*、またはマウス*AAV*血清型*ITR*である。一部の実施形態において、*AAV ITR*は、*AAV2 ITR*である。一部の実施形態において、*rAAV*粒子の*ITR*およびキャプシ

ドは、同じ A A V 血清型に由来する。一部の実施形態において、I T R およびキャプシドは、A A V 2 に由来する。他の実施形態において、r A A V 粒子の I T R およびキャプシドは、異なる A A V 血清型に由来する。一部の実施形態において、A A V 粒子は、A A V 2 I T R および A A V r h 8 R キャプシドを含む。一部の実施形態において、A A V 粒子は、A A V 2 I T R および A A V 8 キャプシドを含む。

【 0 0 1 5 】

上述の組成物の一部の実施形態において、オーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子は、産生細胞において産生される。一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、A 5 4 9 細胞、または P e r c . 6 細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。一部の実施形態において、A A V ヘルパー機能は、アデノウイルスまたは H S V によって提供される。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間 ~ 約 9 6 時間で回収される。

【 0 0 1 6 】

一部の態様において、本発明は、オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現を強化するための方法であって、細胞株に A A V ヘルパー機能を提供することによって、産生細胞株において r A A V 粒子を産生させる工程を含み、産生細胞株は、a) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸、ならびに b) 約 4 . 7 k b を上回る r A A V ゲノムを含む、方法を提供する。一部の実施形態において、オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現よりも、約 1 . 2 5 倍、約 1 . 5 倍、約 1 . 7 5 倍、約 2 . 0 倍、約 2 . 5 倍、約 2 . 7 5 倍、約 3 倍、または約 5 倍多い。一部の実施形態において、産生細胞株によって産生される粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態と比較して速い発現動態である。一部の実施形態において、産生細胞株によって産生されるオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態よりも、約 5 % 速い、約 1 0 % 速い、約 2 5 % 速い、約 5 0 % 速い、約 7 5 % 速い、または約 9 0 % 速い。

【 0 0 1 7 】

オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現強化の一部の実施形態において、A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに / または r A A V ゲノムは、産生細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸ならびに / または r A A V ゲノムは、産生細胞株のゲノムに安定に組み込まれている。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、1 つまたはそれ以上の A A V 逆位末端反復配列 (I T R) および異種導入遺伝子を含む。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、2 つの A A V I T R を含む。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 4 . 7 k b ~ 約 9 . 4 k b である。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 4 . 7 k b ~ 約 5 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 6 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 7 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 8 k b、または約 4 . 7 k b ~ 約 9 k b である。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 4 . 7 k b ~ 6 . 7 k b または約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 7 k b である。

【 0 0 1 8 】

オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現強化の一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、治療的導入遺伝子産物をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第 V I I I 因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。一部の実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン (m T T R) プロモーターである。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、イン

トロンを含む。一部の実施形態において、イントロンは、合成イントロンである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

【0019】

オーバーサイズrAAVゲノムの発現強化の一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。一部の実施形態において、AAVIDTRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型IDTRである。一部の実施形態において、AAVIDTRは、AAV2IDTRである。一部の実施形態において、rAAV粒子のIDTRおよびキャプシドは、同じAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、IDTRおよびキャプシドは、AAV2に由来する。一部の実施形態において、rAAV粒子のIDTRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2IDTRおよびAAVrh8Rキャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2IDTRおよびAAV8キャプシドを含む。

【0020】

オーバーサイズrAAVゲノムの発現強化の一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、HeLa細胞、293細胞、A549細胞、またはPerC.6細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。一部の実施形態において、AAVヘルパー機能は、アデノウイルス、HSV、またはバキュロウイルスによって提供される。一部の実施形態において、rAAV粒子は、ヘルパー機能の提供後、約48時間～約96時間で回収される。一部の実施形態において、本方法は、rAAV粒子の精製をさらに含む。一部の実施形態において、精製は、1つまたはそれ以上のクロマトグラフィー工程を含む。

【0021】

一部の態様において、本発明は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを含むAAV粒子を産生するための細胞株であって、a)AAVrep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸と、b)約4.7kbを上回るrAAVゲノムとを含む、細胞株を提供する。一部の実施形態において、AAVrep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸ならびに/またはrAAVゲノムは、産生細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、AAVrep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸ならびに/またはrAAVゲノムは、産生細胞株のゲノムに安定に組み込まれている。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、1つまたはそれ以上のAAV逆位末端反復配列(IDTR)および異種導入遺伝子を含む。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb～約9.4kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb～約5kb、約4.7kb～約6kb、約4.7kb～約7kb、約4.7kb～約8kb、または約4.7kb～約9kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb～6.7kbまたは約5.2kb～約8.7kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、長さが、およそ、5.0kb、5.1kb、5.2kb、5.3kb、5.4kb、5.5kb、5.6kb、5.7k

b、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、8.0 kb、8.7 kb、もしくは9.0 kbのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【0022】

細胞株の一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、治療的導入遺伝子産物をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第ⅤⅠⅠⅠ因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。さらなる実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン(mTTR)プロモーターである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、イントロンを含む。さらなる実施形態において、イントロンは、合成イントロンである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。さらなる実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

【0023】

上述の細胞株の一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。上述の方法の一部の実施形態において、AAVITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型ITRである。一部の実施形態において、AAVITRは、AAV2ITRである。一部の実施形態において、rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、同じAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、ITRおよびキャプシドは、AAV2に由来する。他の実施形態において、rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2ITRおよびAAVrh8Rキャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2ITRおよびAAV8キャプシドを含む。

【0024】

上述の細胞株の一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、HeLa細胞、293細胞、A549細胞、またはPerc.6細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAVヘルパー機能を提供することによって、細胞株において産生される。一部の実施形態において、AAVヘルパー機能は、アデノウイルスまたはHSVによって提供される。一部の実施形態において、rAAV粒子は、ヘルパー機能の提供後、約48時間～約96時間で回収される。

【0025】

一部の態様において、本発明は、アデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドによってキャプシド化されたrAAVゲノムを含むAAV粒子であって、rAAVゲノムは、約4.7 kbを上回る、AAV粒子を提供する。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、1つまたはそれ以上のAAV逆位末端反復配列(ITR)および異種導入遺伝子を含む。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、2つのAAVITRを含む。一部の実施

10

20

30

40

50

形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb~約9.4kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb~約5kb、約4.7kb~約6kb、約4.7kb~約7kb、約4.7kb~約8kb、または約4.7kb~約9kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約4.7kb~6.7kbまたは約5.2kb~約8.7kbである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、長さが、およそ、5.0kb、5.1kb、5.2kb、5.3kb、5.4kb、5.5kb、5.6kb、5.7kb、5.8kb、5.9kb、6.0kb、6.1kb、6.2kb、6.3kb、6.4kb、6.5kb、6.6kb、6.7kb、6.8kb、6.9kb、7.0kb、8.0kb、8.7kb、もしくは9.0kbのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

10

【0026】

一部の実施形態において、本発明は、オーバーサイズrAAVゲノムを含むAAV粒子であって、異種導入遺伝子が、治療的導入遺伝子産物をコードする、AAV粒子を提供する。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第VII因子、ジストロフィン、ジスフェリン、または囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)をコードする。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。さらなる実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン(mTTR)プロモーターである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、イントロンを含む。さらなる実施形態において、イントロンは、合成イントロンである。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。さらなる実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。

20

【0027】

上述の細胞株の一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、またはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。上述の方法の一部の実施形態において、AAVITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型ITRである。一部の実施形態において、AAVITRは、AAV2ITRである。一部の実施形態において、rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、同じAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、ITRおよびキャプシドは、AAV2に由来する。他の実施形態において、rAAV粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2ITRおよびAAVrh8Rキャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2ITRおよびAAV8キャプシドを含む。

30

40

【0028】

本発明の一部の実施形態において、オーバーサイズAAVゲノムを含むAAV粒子は、産生細胞において産生される。一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、HeLa細胞、293細胞、A549細胞、またはPerC.6細胞に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。一部の実施形態において、AAVヘルパー機能は、アデノウイルスまたはHSVによって提供される。一部の実施形態において、rAAV粒子は

50

、ヘルパー機能の提供後、約48時間～約96時間で回収される。

【0029】

一部の実施形態において、本発明は、オーバーサイズrAAVゲノムを含むAAV粒子であって、rAAVゲノムが、5'から3'に、AAV2 ITR、mTTRプロモーター、合成イントロン、ヒトFVIIIIをコードする導入遺伝子、合成ポリアデニル化配列、およびAAV2 ITRを含む、AAV粒子を提供する。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、5'から3'に、AAV2 ITR、mTTRプロモーター、合成イントロン、ヒトFVIIIIをコードする導入遺伝子、ウシ成長ホルモン合成ポリアデニル化配列、およびAAV2 ITRを含む。一部の実施形態において、FVIIIIは、Bドメインのすべてまたは一部の欠失を含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAVrh8Rキャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV8キャプシドを含む。

10

【0030】

一部の態様において、本発明は、rAAVゲノムを含むrAAVベクターであって、rAAVゲノムが、5'から3'に、AAV2 ITR、mTTRプロモーター、合成イントロン、ヒトFVIIIIをコードする導入遺伝子、合成ポリアデニル化配列、およびAAV2 ITRを含む、rAAVベクターを提供する。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、5'から3'に、AAV2 ITR、mTTRプロモーター、合成イントロン、ヒトFVIIIIをコードする導入遺伝子、ウシ成長ホルモン合成ポリアデニル化配列、およびAAV2 ITRを含む。一部の実施形態において、FVIIIIは、Bドメインのすべてまたは一部の欠失を含む。

20

【0031】

一部の実施形態において、本発明は、疾患または障害を有する個体を治療する方法であって、個体に、疾患または障害を治療するのに好適な治療的導入遺伝子をコードするオーバーサイズrAAVゲノムを含むAAV粒子を投与する工程を含む方法を提供する。一部の実施形態において、個体は、哺乳動物（例えば、ヒト）である。一部の実施形態において、疾患または障害は、血友病Aである。一部の実施形態において、治療的導入遺伝子は、第VIIII因子；例えば、Bドメイン欠失型ヒト第VIIII因子を含む、ヒト第VIIII因子をコードする。

【0032】

一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるオーバーサイズrAAVゲノムを含むAAV粒子を含むキットを提供する。

30

【0033】

特許出願および刊行物を含む、本明細書に引用されるすべての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】マウストランスチレチン(mTTR)プロモーターに基づく、5.1～5.4 kbベクターゲノムサイズ(示す通り)の範囲のhFVIIII発現カセットを示す略図である。HNF4結合部位(白丸)およびHNF3結合部位(黒丸)の配列改変、ならびにそれらの位置を示す。図1A、1Bおよび1Cでの略号：ITR、rAAV逆位末端反復配列；mTTR、マウストランスチレチンプロモーター(202または482bp)；HI、ハイブリッドイントロン；FVIIII、B-ドメイン欠失ヒトFVIIII cDNA；syn pA、合成(syn pA)；BGHまたはウシ成長ホルモン(BGH)ポリA(pA)。

40

【図1B】本明細書に記載される実験で使用されるmTTRプロモーター配列のアライメントを示す図である。

【図1C】インビボでの、mTTR-FVIIII発現カセット由来のFVIIIIレベルを示すグラフである。C56BL/6マウスへの大量注射によりプラスミドベクターを静脈内注射し、ELISAアッセイにより血漿中の第VIIII因子レベルを測定した。

50

【図1D】5.1 kbのFV I I I発現カセットの構造を示す図である。このカセットは、r A A V逆位末端反復配列（I T R）、マウストランスチレチン（m T T R）プロモーター、ハイブリッドイントロン（H I）、B - ドメイン欠失ヒトF V I I I c D N A、および合成ポリA配列を含む。

【図1E】F V I I Iベクターゲノム、A A V r e pおよびc a p遺伝子、ならびにピュロマイシンおよびカナマイシン薬物耐性に関する遺伝子を含む、T r i p l e P l a yプラスミドを示す図である。

【図2】図2 Aおよび図2 Bは、選択されたマスターウェルクロン（M W）由来のゲノムD N Aのサザンブロット分析を示す図である。（図2 A）F V I I I T r i p l e P l a yプラスミドを、13 kb直鎖状フラグメントを生成するS p e Iで切断した。これを、単位長さのT r i p l e P l a yプラスミドについてのサイズ対照、および組み込まれたコピー数の基準として使用した。（図2 B）B g l I IおよびH i n c I Iでの消化により、組み込まれたベクターゲノムの完全性を分析した。これらの酵素はF V I I I発現カセット内を切断し、1.8および2.8 kbフラグメントを生じる。両方の図で、ベクターおよび制限部位を示す略図が与えられる。

【図3】図3 Aおよび図3 Bは、A A V r h 8 R / 5.1 kb m T T R - F V I I Iベクターの産生収量および安定性についての分析を示すグラフである。（図3 A）A A V r h 8 R / 5.1 kbベクター産生の経時変化。振とう培養物に野生型アデノウイルス（w t A d）を感染させ、サンプルを2日目、3日目および4日目に回収し、q P C Rによりベクター収量を1 mlあたりのベクターゲノム（V G / m l）として定量化した。（図3 B）選択された高産生マスターウェルの安定性。r A A Vベクター産生レベルを、M W # 287（A A V 8 / 5.1 kb）、M W # 35（A A V r h 8 R / 5.1 kb）およびM W # 163（A A V r h 8 R / 5.4 kb）について示す。マスターウェルを継代数20または26まで継代し、r A A V産生能（D R P / m l）をq P C Rで定量化した。

【図4 A】オーバーサイズ5.1 kb r A A V r h 8 R / F V I I Iベクターの質についての分析を示すグラフである。P C LおよびT X Nにより産生された5.1 kbベクターロットを、A U C分析により比較した。M W # 35を使用して、A A V r h 8 R / 5.1 kb F V I I Iを3回生成させ（図4 A）、T X N法によって産生された同じベクターと比較した（図4 B）。ウイルスの質量差を測定する分析用超遠心分離分析（A U C）により、ベクターの質を評価した。挿入部は、異なる沈降（S）値を有するキャプシドの%を示す。空キャプシドは通常、S値63～66を有し、野生型のサイズのベクターゲノムを有するキャプシドは通常、S100～103である。

【図4 B】オーバーサイズ5.1 kb r A A V r h 8 R / F V I I Iベクターの質についての分析を示すグラフである。P C LおよびT X Nにより産生された5.1 kbベクターロットを、A U C分析により比較した。M W # 35を使用して、A A V r h 8 R / 5.1 kb F V I I Iを3回生成させ（図4 A）、T X N法によって産生された同じベクターと比較した（図4 B）。ウイルスの質量差を測定する分析用超遠心分離分析（A U C）により、ベクターの質を評価した。挿入部は、異なる沈降（S）値を有するキャプシドの%を示す。空キャプシドは通常、S値63～66を有し、野生型のサイズのベクターゲノムを有するキャプシドは通常、S100～103である。

【図5】図5 Aおよび図5 Bは、オーバーサイズ5.4 kb r A A V r h 8 R / F V I I Iベクターの質についての分析を示すグラフである。P C L（図5 A）およびT X N（図5 B）により産生された5.4 kbベクターロットをA U C分析により比較した。挿入部は、異なる沈降（S）値を有するキャプシドの%を示す。空キャプシド（64 S / 63 S）およびより大きいゲノムを有する粒子（101 S / 99 S）のパーセンテージを丸で囲んである。

【図6】図6 Aおよび図6 Bは、サザンブロットによる、P C LまたはT X Nにより生成されたr A A V r h 8 R / 5.1 kbベクター中の、パッケージングされたベクターゲノムの特徴を示す図である。精製されたビリオンからベクターゲノムを単離し、アルカリゲル電気泳動でサイズについて分析し、その後、ベクターに特異的なプローブを使用してサ

10

20

30

40

50

ザンブロットを行った。(図6A) 4.0 kb F V I I I プローブ (F V I I I ドメイン A 1、A 2、A 3 および C 1) を使用するサザン分析。V G を 1.1×10^9 V G / レーン および 6.0×10^9 V G / レーン で 1 % アルカリゲルにローディングし、分離した。P C L (M W # 35) またはトリプルトランスフェクションにより生成された 5.1 kb F V I I I ベクターを、4.6 kb サイズベクター (通常のサイズのベクターを作り出すために C 1 ドメインを欠失させてあることを除いて、r h 8 R / 5.1 kb ベクターと同一である) と比較した。(図6B) それぞれの明確な V G サイズのシグナル強度を定量化し、各レーンでの総シグナルに対する % としてグラフにした。

【図7】図7A、図7B および図7C は、DNA ドットプロット分析による、P C L または T X N により生成された r A A V r h 8 R / 5.1 kb ベクター中の、パッケージングされたベクターゲノムの 5' 末端の特徴を示す図である。図5で使用されたベクターロットを、各ベクターの2倍段階希釈液を膜にアプライすることで (2.4×10^9 から開始; 計8回ベクター濃度を減少させ、さらに陰性対照としてゲノム無しのものでアプライする) 分析した。ベクターゲノム (プラスまたはマイナスの向き) の中間部または 5' 末端に特異的な 3' 末端標識オリゴヌクレオチドプローブで各プロットをハイブリダイズした。シグナル強度を定量化し、4.6 kb ベクター (完全にパッケージングされている) に正規化した。濃度3つを使用して標準誤差を生成させた。(図7A) 使用されたオリゴヌクレオチドプローブの位置を示す略図。値はヌクレオチドでの各 3' 末端からの距離を示す。(図7B) マイナス鎖の分析。(図7C) プラス鎖の分析。

【図8-1】図8A、図8B、図8C および図8D は、P C L または T X N により生成された r A A V r h 8 R / 5.1 kb ベクター中の、パッケージングされたベクターゲノムの 5' および 3' 末端の特徴を示す図である。(図8A) 使用されたベクターゲノムのプラスおよびマイナス鎖の 5' および 3' 末端に対するオリゴヌクレオチドプローブの位置を示す略図。(図8B) 各ロットにおける 5.1 kb ベクターゲノムのプラスおよびマイナス鎖の定量化。分析されたベクターは、4.6 kb または 5.1 kb m T T R - F V I I I ゲノムを含んでいた。ベクター産生方法 (P C L または T X N) を示す。ベクターは全て同様の様式で精製した。図5に記載されるように、各ベクターの2倍段階希釈液を膜にアプライすることで (3.0×10^9 から開始; 計8回ベクター濃度を減少させた) 分析を行った。F I X (陰性対照) または F V I I I (陽性対照) c D N A を含むプラスミドを、シグナルの特異性についての対照として使用した。(図8C) 5.1 kb ベクターに対する 3' および 5' 末端オリゴヌクレオチドプローブを使用するサザン分析。V G を 1.5×10^9 V G / レーン および 7.5×10^9 V G / レーン で 1 % アルカリゲルにローディングし、分離した。P C L (M W # 35) またはトリプルトランスフェクション (T X N) により生成された 5.1 kb F V I I I ベクターを、4.6 kb サイズベクターと比較した。サイズマーカー (2.7、4.7 および 5.1 kb) を示す。上のパネル、プラス鎖分析; 下のパネル、マイナス鎖分析。各パネルに使用されたオリゴヌクレオチドを示す。白色矢印は失われたシグナルを示す。(図8D) 各ベクターにおけるゲノムサイズの定量化。3' 末端オリゴヌクレオチドプローブ (パッケージングされたゲノムを全て検出する) でプローブされたパネルのシグナル強度を Image J で定量化した。それぞれの明確な V G サイズ (4.7 kb 超、4.7 kb および 4.7 kb 未満) の強度を定量化して、各レーンでの総シグナルに対する % としてグラフにした。

【図8-2】図8-1の続き。

【図9-1】図9A、図9B および図9C は、P C L または T X N により生成された r A A V r h 8 R / 5.4 kb ベクター中の、パッケージングされたベクターゲノムの 5' および 3' 末端の特徴を示す図である。(図9A) 使用されたベクターゲノムのプラスおよびマイナス鎖の 5' および 3' 末端に対するオリゴヌクレオチドプローブの位置を示す略図。(図9B) ドットプロット分析による、各ロットの 5.4 kb ベクターゲノムのプラスおよびマイナス鎖の定量化。図8に記載されるように分析を行った。(図9C) 3' および 5' 末端オリゴヌクレオチドプローブを使用する、5.4 kb ベクターのサザン分析。図8に記載されるように実験を行った。

【図9 - 2】図9 - 1の続き。

【図10】図10Aおよび図10Bは、血友病A KOマウスにおける、PCLにより産生されたrAAVrh8R/5.1kbベクターのインピボでの効能を示すグラフである。ベクターを、マウスに尾静脈から 3×10^{11} および 4×10^{10} DRP/マウスで投与し、血漿FVIIレベルを56日目まで分析した。(図10A)血漿FVIIタンパク質活性。Coatestアッセイにより、7日目、14日目、28日目、42日目および56日目の血漿サンプルにおける活性を測定した。(図10B)28日目および56日目の凝固時間。活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)で凝固時間を分析した。各治療群はn = マウス7 ~ 10匹/群を含んでいた。統計的有意性を以下の通り示す: Studentのt検定により、*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 。

10

【図11】図11A、図11Bおよび図11Cは、血友病A KOマウスを使用した、PCLおよびTXNにより産生された5.1kb AAVrh8R/FVIIベクターのインピボでの比較を示すグラフである。ベクターを、マウスに尾静脈から 4×10^{10} DRP/マウスで投与した。(図11A)血漿FVIIタンパク質活性。Coatestアッセイにより、21日目、35日目、56日目、70日目および84日目のサンプルにおける活性を測定した。(図11B)21日目の血漿凝固時間。(図11C)56日目の血漿凝固時間。血漿凝固時間はaPTTアッセイで測定した。比較のため、マウス系統(129SおよびBALB/c)の凝固時間を示す。(図11D)84日目の、肝臓におけるベクターゲノム(VG)コピー。VGコピーをqPCRで定量化し、コピー/肝臓の総DNA500ngで示す。各治療群はn = マウス8匹/群を含んでいた。統計的有意性を以下の通り示す: Studentのt検定により、*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 。各パネルにウイルス産生方法を示す(PCLまたはTXN)。

20

【図12】図12A、図12Bおよび図12Cは、血友病A KOマウスを使用した、PCLおよびTXNにより産生された5.4kb AAVrh8R/FVIIベクターのインピボでの比較を示すグラフである。ベクターを、マウスに尾静脈から 4×10^{10} DRP/マウスで投与し、ベクター投与から24日および43日後に血漿サンプルを回収した。(図12A)血漿FVII活性。Coatestアッセイにより、24日目および43日目の血漿サンプルにおける活性を測定した。(図12B)aPTTアッセイによる、24日目の血漿凝固時間。(図12C)3日目および43日目の、肝臓におけるベクターゲノム(VG)コピー。ベクター投与から3日および43日後に動物を屠殺して、qPCRでVGコピーを定量化し、コピー/肝臓総DNA500ngで示す。各治療群はn = マウス6 ~ 8匹/群を含んでいた。統計的有意性を以下の通り示す: Studentのt検定により、*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.01$ 、***、 $p < 0.001$ 。

30

【図13】図13Aは、5.1、5.9および6.7kb AAV2/SEAPベクターを示す略図である。図13Bは、相対的および固有産生(n = 2)アッセイでのベクター収量に関する、個々のマスターウェル(MW)のデータを示すグラフである。ベクター収量をDRP/mlで示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

40

本明細書に詳細に考察されるように、本発明者らは、高品質のオーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクターを高収率で生成することができる産生細胞株プラットフォームを開発した。このプラットフォームは、例示的な構築物としてヒト第VII因子cDNAを含有するrAAVベクターを使用して特徴付けられた。標準的なトリプルトランスフェクション方法を使用した産生と比較して、このプラットフォームは、より大きなゲノムがより多くキャプシド化されたrAAVベクターを生成した。このプラットフォームを使用して生成されたrAAVベクターはまた、インピボでの遺伝子導入にも適しており、機能的第VII因子の産生をもたらした。

【0036】

したがって、本発明は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを

50

含有するAAV粒子を産生するための方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、a) rAAV粒子を生成するような条件下において、i) AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸、ならびにii) 約4.7 kb～約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb～6.7 kbであるrAAVゲノムを含有するAAV産生細胞株を培養する工程と；b) AAVヘルパー機能を提供する工程と；c) オーバーサイズrAAVゲノムを含有するrAAV粒子を回収する工程とを含む。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kbを上回る。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、長さが、およそで、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、8.0 kb、もしくは9.0 kbのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。さらに、本明細書には、本開示の方法によって産生されたオーバーサイズ組換えAAVゲノムを含有するrAAV粒子が提供される。

【0037】

なおもさらに、本明細書には、rAAV粒子を含む組成物であって、rAAV粒子のうちの少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、または少なくとも約70%が、約5 kbを上回るrAAVゲノムがキャプシド化されている、組成物が提供される。

【0038】

なおもさらに、本明細書には、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを含有するAAV粒子を産生するための細胞株であって、a) AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸と、b) 約4.7 kb～約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb～6.7 kbであるrAAVゲノムとを含む、細胞株が提供される。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kbを上回る。

【0039】

なおもさらに、本明細書には、アデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドによってキャプシド化された、約4.7 kb～約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb～6.7 kbであるrAAVゲノムを含有するAAV粒子が、提供される。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kbを上回る。

【0040】

I. 一般的技法

本明細書に記載または参照される技法および手順は、一般に、従来的な手法、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012年)；Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、2003年)；Methods in Enzymology シリーズ (Academic Press, Inc.)；PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. HamesおよびG. R. Taylor編、1995年)；Antibodies, A Laboratory Manual (HarlowおよびLane編、1988年)；Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R. I. Freshney、第6版、J. Wiley and Sons、2010年)；Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編、1984年)；Methods in Molecular Biology, Humana Press；Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis編、Academic Press、1998年)；Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Matherおよ

10

20

30

40

50

びP. E. Roberts、Plenum Press、1998年) ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J. B. Griffiths、およびD. G. Newell編、J. Wiley and Sons、1993~8年) ; Handbook of Experimental Immunology (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1996年) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. MillerおよびM. P. Calos編、1987年) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullisら編、1994年) ; Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1991年) ; Short Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、J. Wiley and Sons、2002年) ; Immunobiology (C. A. Janewayら、2004年) ; Antibodies (P. Finch、1997年) ; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty、編、IRL Press、1988~1989年) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. ShepherdおよびC. Dean編、Oxford University Press、2000年) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. HarlowおよびD. Lane、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999年) ; The Antibodies (M. Zanetti およびJ. D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995年) ; ならびにCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVitaら編、J. B. Lippincott Company、2011年) に記載されている広く利用されている手法などを使用して、当業者により十分に理解され、一般的に利用されている。

【0041】

II. 定義

「ベクター」は、本明細書に使用されるとき、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞に送達されるべき核酸を含む組換えプラスミドまたはウイルスを指す。

【0042】

本明細書に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかであるヌクレオチドの任意の長さのポリマー形態を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリン塩基およびピリミジン塩基、または他の天然のヌクレオチド塩基、化学的もしくは生化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化ヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれるがこれらに限定されない。ポリヌクレオチドの骨格は、糖およびリン酸基(RNAもしくはDNAにおいて典型的に見出すことができるような)、または修飾もしくは置換された糖もしくはリン酸基を含み得る。代替として、ポリヌクレオチドの骨格は、ホスホロアミデートなどの合成サブユニットのポリマーを含み得、したがって、オリゴデオキシヌクレオシドホスホロアミデート($P-NH_2$)または混合ホスホロアミデート-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。加えて、二本鎖ポリヌクレオチドは、相補的な鎖を合成し、これらの鎖を適切な条件下でアニーリングすること、またはDNAポリメラーゼを適切なプライマーとともに使用して相補的な鎖をデノボ合成することのいずれかによって、一本鎖ポリヌクレオチドの化学合成産物から得ることができる。

【0043】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指して互換的に使用され、最小の長さのものに限定されない。アミノ酸残基のこのようなポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含有し得、これらには、ペプチド、オリゴペ

10

20

30

40

50

プチド、アミノ酸の二量体、三量体、および多量体が含まれるがこれらに限定されない。全長タンパク質およびそのフラグメントの両方が、この定義に包含される。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本発明の目的で、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望される活性を維持する限り、天然の配列に対する欠失、付加、および置換（一般に、保存的な性質）などの修飾を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位指向的変異生成によるもののよう意図的なものであってもよく、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅に起因するエラーによるもののよう偶発的なものであってもよい。

【0044】

「組換えウイルスベクター」は、1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、ウイルス起源ではない核酸配列）を含む、組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えAAVベクターの場合、組換え核酸には、少なくとも1つの逆位末端反復配列（ITR）が隣接している。一部の実施形態において、組換え核酸には、2つのITRが隣接している。

【0045】

「組換えAAVベクター（rAAVベクター）」は、少なくとも1つまたは2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）が隣接した1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、AAV起源ではない核酸配列）を含む、ポリヌクレオチドベクターを指す。このようなrAAVベクターは、好適なヘルパーウイルスに感染している（または好適なヘルパー機能を発現している）宿主細胞、ならびにAAV rep 遺伝子産物およびcap 遺伝子産物（すなわち、AAV Repタンパク質およびCapタンパク質）を発現している宿主細胞に存在する場合、感染性ウイルス粒子において複製され、そこにパッケージングされる。rAAVベクターが、より大きなポリヌクレオチド（例えば、染色体、またはクロニングもしくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター）に組み込まれると、rAAVベクターは、「プロベクター」と称することができ、これは、AAVパッケージング機能および好適なヘルパー機能の存在下において複製およびキャプシド化によって「レスキュー」することができる。rAAVベクターは、プラスミド、線状人工染色体、脂質との複合体、リボソーム内に封入されたもの、およびウイルス粒子、例えばAAV粒子にキャプシド化されたものを含むがこれらに限定されない、多数の形態のうちのいずれかであり得る。rAAVベクターは、AAVウイルスキャプシドにパッケージングされて、「組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV粒子）」を生成することができる。

【0046】

本明細書に使用されるとき、「産生細胞株」は、AAV粒子を産生することができる安定な細胞株である。一部の実施形態において、AAV複製遺伝子および/またはキャプシド遺伝子は、宿主細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、1つまたはそれ以上のAAV ITRおよび異種核酸（例えば、異種導入遺伝子）を含むAAVベクターゲノムは、宿主細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、AAV複製遺伝子および/またはキャプシド遺伝子、ならびに1つまたはそれ以上のAAV ITRおよび異種核酸（例えば、異種導入遺伝子）を含むAAVベクターゲノムは、宿主細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、AAV複製遺伝子、キャプシド遺伝子、または1つもしくはそれ以上のAAV ITRを含むAAVベクターゲノムのうちの1つまたはそれ以上は、宿主細胞株のゲノムに安定に組み込まれている。当業者であれば、安定に維持されている核酸は、複数回の継代（例えば、5回、10回、15回、25回、またはそれ以上の継代）時、宿主細胞株において維持されていることを理解するであろう。

【0047】

「異種」とは、比較される実体または導入もしくは組み込まれる実体の残りの部分の遺伝子型とは、遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子操作技法によって異なる細胞型に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（

10

20

30

40

50

また、発現された場合、異種ポリペプチドをコードし得る)。同様に、ウイルスベクターに組み込まれた細胞の配列(例えば、遺伝子またはその部分)は、そのベクターに対して異種のヌクレオチド配列である。

【0048】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写することができ、場合によっては、適切な条件下で翻訳および/または発現することができる、ポリヌクレオチドを指す。いくつかの態様において、導入遺伝子は、導入された細胞に所望される特性を付与するか、またはそうでなければ、所望される治療結果または診断結果をもたらす。別の態様では、導入遺伝子は、RNA干渉を媒介する分子、例えば、miRNA、siRNA、またはshRNAに転写される。

10

【0049】

「トランスチレチン(TTR)プロモーター」という用語は、トランスチレチン遺伝子に由来する遺伝子発現を作動させることができるポリヌクレオチド配列を指す。一部の実施形態において、トランスチレチンプロモーターは、マウストランスチレチン(mTTR)遺伝子(例えば、GenBank Entrez Gene ID 22139によって表されるMus筋トランスチレチン(Mus musculus transthyretin))に由来し得る。TTRプロモーターの例は、図1Bに示される。

【0050】

ウイルス力価に関して使用される「ゲノム粒子(gp)」、「ゲノム等価物」、または「ゲノムコピー」という用語は、感染力または機能性に関係なく、組換えAAV DNAゲノムを含有するピリオンの数を指す。特定のベクター調製物におけるゲノム粒子の数は、本明細書の実施例に記載されているか、または例えばClarkら(1999年)Hum. Gene Ther., 10:1031~1039頁; Veldwijkら(2002年)Mol. Ther., 6:272~278頁に記載されているものなどの手順によって測定することができる。

20

【0051】

本明細書に使用される「ベクターゲノム(vg)」という用語は、ベクター、例えば、ウイルスベクターのポリヌクレオチド配列のセットを含む、1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドを指し得る。ベクターゲノムは、ウイルス粒子にキャプシド化されている。具体的なウイルスベクターに応じて、ベクターゲノムは、一本鎖DNA、二本鎖DNA、または一本鎖RNA、または二本鎖RNAを含み得る。ベクターゲノムは、特定のウイルスベクターに関連する内在性配列および/または組換え技法を通じて特定のウイルスベクターに挿入された任意の異種配列を含み得る。例えば、組換えAAVベクターゲノムは、プロモーターに隣接する少なくとも1つのITR配列、目的の配列(例えば、異種導入遺伝子)、場合によってはイントロン、およびポリアデニル化配列を含み得る。完全なベクターゲノムは、ベクターの完全なポリヌクレオチド配列セットを含み得る。一部の実施形態において、ウイルスベクターの核酸力価は、vg/mL単位で測定することができる。この力価を測定するのに好適な方法は、当該技術分野で既知である(例えば、定量的PCR)。

30

【0052】

「オーバーサイズ組換えAAVゲノム」という用語は、サイズ(ヌクレオチド塩基対で測定される)が、当該技術分野において4.7~4.8 kbと定義されているAAVゲノムの従来のパッケージング限度を上回る、組換えAAVゲノムを指し得る(例えば、Dong, J-Yら(1996年)Human Gene Therapy 7:2101~2112頁を参照されたい)。一部の実施形態において、オーバーサイズ組換えAAVゲノムは、約4.7 kbを上回る。一部の実施形態において、オーバーサイズ組換えAAVゲノムは、約5 kbを上回る。一部の実施形態において、オーバーサイズ組換えAAVゲノムは、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbである。

40

【0053】

50

ウイルス力価に関して使用される「感染単位 (i u)」、「感染性粒子」、または「複製単位」という用語は、例えば、McLaughlinら (1988年) J. Virol., 62: 1963~1973 頁に記載されているような、複製中心アッセイとしても知られている感染中心アッセイによって測定された、感染性および複製適合性の組換え AAV ベクター粒子の数を指す。

【0054】

ウイルス力価に関して使用される「形質導入単位 (t u)」という用語は、本明細書の実施例に記載されているか、または例えば、Xiaoら (1997年) Exp. Neurol., 144: 113~124 頁; もしくは Fisherら (1996年) J. Virol., 70: 520~532 頁 (LFUアッセイ) に記載されているような、機能性アッセイにおいて測定された、機能的導入遺伝子産物の産生をもたらす感染性組換え AAV ベクター粒子の数を指す。

10

【0055】

「逆位末端反復」または「ITR」配列とは、当該技術分野で十分に理解されている用語であり、ウイルスゲノムの末端に見られる、逆向きの比較的短い配列を指す。

【0056】

当該技術分野で十分に理解されている用語である「AAV 逆位末端反復 (ITR)」配列とは、天然の一本鎖 AAV ゲノムの両方の末端に存在するおよそ 145 ヌクレオチドの配列である。ITR の一番外側の 125 個のヌクレオチドは、2 つの交互の配向のうちのいずれかで存在し得、異なる AAV ゲノム間における異種性、および単一の AAV ゲノムの 2 つの末端間における異種性をもたらす。一番外側の 125 個のヌクレオチドはまた、自己相補的な複数の短い領域 (A、A'、B、B'、C、C'、および D 領域と示される) を含有し、鎖内塩基対合が ITR のこの部分で生じることが可能である。

20

【0057】

「末端分離配列 (terminal resolution sequence)」または「trs」は、ウイルスの DNA 複製時に AAV rep タンパク質によって切断される、AAV ITR の D 領域内の配列である。変異体末端分離配列は、AAV rep タンパク質による切断に不応性である。

【0058】

「AAV ヘルパー機能」とは、AAV が宿主細胞によって複製され、パッケージングされることを可能にする機能を指す。AAV ヘルパー機能は、AAV 複製およびパッケージングを補助するヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス遺伝子を含むがこれらに限定されない、多数の形式のうちのいずれかで提供される。遺伝毒性物質などの他の AAV ヘルパー機能が、当該技術分野において既知である。

30

【0059】

AAV の「ヘルパーウイルス」とは、AAV (欠損パブウイルスである) が、宿主細胞によって複製され、パッケージングされるのを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、例えばワクシニア、およびバキュロウイルスを含む、多くのこのようなヘルパーウイルスが、特定されている。アデノウイルスは、多数の異なる下位群を包含するが、下位群 C のアデノウイルス 5 型 (Ad5) が、最も一般的に使用されている。ヒト起源、非ヒト哺乳動物起源、および鳥類起源の多数のアデノウイルスが既知であり、ATCC などの受託機関から入手可能である。これも ATCC などの受託機関から入手可能なヘルペスファミリーのウイルスとしては、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、および偽性狂犬病ウイルス (PRV) が挙げられる。AAV の複製のためのアデノウイルスヘルパー機能の例としては、E1A 機能、E1B 機能、E2A 機能、VA 機能、および E4orf6 機能が挙げられる。受託機関から入手可能なバキュロウイルスとしては、オートグラフィカリフォルニアニュークリア多角体ウイルスが挙げられる。

40

【0060】

50

r A A V の調製物は、感染性 A A V 粒子の感染性ヘルパーウイルス粒子に対する比が、少なくとも約 $10^2 : 1$ 、少なくとも約 $10^4 : 1$ 、少なくとも約 $10^6 : 1$ 、または少なくとも約 $10^8 : 1$ 、またはそれ以上である場合に、ヘルパーウイルスを「実質的に含まない」と言われる。一部の実施形態において、調製物はまた、相当量のヘルパーウイルスタンパク質（すなわち、上述のヘルパーウイルス粒子の混入物が破壊された形式で存在していたとして、このようなレベルのヘルパーウイルスの結果として存在するようなタンパク質）を含まない。ウイルスおよび/または細胞のタンパク質混入は、一般に、SDSゲルにおけるクーマシー染色バンドの存在（例えば、A A V キャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、および V P 3 に対応するバンド以外のバンドの出現）として観察することができる。

10

【0061】

参照ポリペプチド配列または核酸配列に関する「配列同一性パーセント (%)」とは、配列をアライメントし、必要に応じてギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを達成した後に、参照ポリペプチド配列または核酸配列におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一である、候補配列におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドの割合として定義され、任意の保存的置換は配列同一性の一部とは見なさない。アミノ酸または核酸の配列同一性パーセントを判定する目的でのアライメントは、当業者の技能の範囲内の様々な手段で、例えば、例として *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 編、1987 年)、Supp. 30, 節 7.7.18、表 7.7.1 に記載されているもの、ならびに BLAST、BLAST-2、ALIGN、または Megalign (DNASTAR) ソフトウェアを含む、公的に入手可能なコンピュータソフトウェアプログラムを使用して、達成することができる。アライメントプログラムの一例は、ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania) である。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含め、アライメントを測定するための適切なパラメーターを決定することができる。本明細書の目的で、所与のアミノ酸配列 B に対する所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性 % (これは、代替として、所与のアミノ酸配列 B に対して、ある特定のアミノ酸配列同一性 % を有するまたは含む、所与のアミノ酸配列 A と言い換えることができる) は、次のように計算される：分率 X/Y を 100 倍し、式中、X は、配列アライメントプログラムによって、そのプログラムの A と B とのアライメントで同一な一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Y は、B におけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列 A の長さが、アミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、B に対する A のアミノ酸配列同一性 % は、A に対する B のアミノ酸配列同一性 % とは等しくならないことが、理解される。本明細書の目的で、所与の核酸配列 D に対する所与の核酸配列 C の核酸配列同一性 % (これは、代替として、所与の核酸配列 D に対して、ある特定の核酸配列同一性 % を有するまたは含む、所与の核酸配列 C と言い換えることができる) は、次のように計算される：分率 W/Z を 100 倍し、式中、W は、配列アライメントプログラムによって、そのプログラムの C と D とのアライメントで同一な一致としてスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Z は、D におけるヌクレオチドの総数である。核酸配列 C の長さが、核酸配列 D の長さとは等しくない場合、D に対する C の核酸配列同一性 % は、C に対する D の核酸配列同一性 % とは等しくならないことが、理解される。

20

30

40

【0062】

「単離された」分子（例えば、核酸もしくはタンパク質）または細胞とは、それが、その天然の環境の成分から特定および分離されており、かつ/または回収されていることを意味する。

【0063】

「有効量」とは、臨床結果（例えば、症状の緩和、臨床エンドポイントの達成など）を含む、有益な結果または所望される結果を達成するのに十分な量である。有効量は、1 回またはそれ以上の投与で投与することができる。疾患状態に関しては、有効量は、疾患を

50

緩和、安定化、または疾患の発症を遅延させるのに十分な量である。

【0064】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えば、サル）、ウサギ、ならびにげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0065】

本明細書に使用されるとき、「治療」は、有益な臨床結果または所望される臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的で、有益な臨床結果または所望される臨床結果としては、検出可能か検出不可能かに関係なく、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化（例えば、悪化しないこと）、疾患の拡散（例えば、転移）の防止、疾患進行の遅延もしくは緩慢化、疾患状態の緩和または軽減、ならびに寛解（部分的または完全に関係なく）が挙げられるがこれらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けなかった場合に予測される生存と比較して、生存を延長させることも意味し得る。

10

【0066】

本明細書に使用されるとき、「予防的治療」という用語は、個体が、障害を有するかまたは有する危険性にあることがわかっているかまたはその疑いがあるが、疾患の症状を呈していないかまたは最低限の症状しか呈していない場合の治療を指す。予防的治療を受ける個体は、症状の発症前に治療を受ける場合がある。

20

【0067】

本明細書に使用されるとき、「治療用」薬剤（例えば、治療的ポリペプチド、核酸、または導入遺伝子）は、上述の臨床結果例など、有益な臨床結果または所望される臨床結果をもたらすものである。そのため、治療用薬剤は、上述のような治療に使用することができる。

【0068】

本明細書に使用されるとき、「微分係数分布値」または「 $C(S)$ 」は、例えば、超遠心分離の際に、沈降する粒子の分布を表す、 $Lamm$ 方程式の解の分布の変化形である。

【0069】

本明細書に使用されるとき、「スベドベリ単位」は、沈降速度の単位を指す。所与のサイズおよび形状の粒子の沈降速度は、粒子がどれくらいの速度で沈降するかを測定する。1スベドベリ単位は、 10^{-13} 秒に等しい。例えば、スベドベリ単位は、遠心分離装置の遠心力下で分子が移動する速度を反映して使用されることが多い。

30

【0070】

本明細書に使用されるとき、「沈降速度条件」または「境界沈降速度条件」とは、サンプル溶液が沈降速度分析に供される、任意の実験条件を指し得る。沈降速度法は、広範なpH条件およびイオン強度条件、ならびに4～40の温度での粒子の研究が可能である。沈降境界が移動する速度が、沈降する種の沈降係数の尺度である。沈降係数は、分子量に依存し（大きな分子ほど速く沈降する）、また分子の形状にも依存する。沈降境界の最小限の幅は、分子の拡散係数と関連し、類似の沈降係数を有する複数の種が存在すると、拡散だけに基づいて予測されるものよりも広い境界が生じる。沈降速度条件としては、限定することなく、ロータ速度、サンプルとロータ中心との間の距離、温度、溶媒、サンプル、緩衝液、超遠心分離時間、検出の時間間隔、セクターおよび光学窓特徴、AUC機器（超遠心分離装置および検出装置を含む）、参照溶媒の平衡透析、ならびにデータ分析アルゴリズムに関する任意の条件を挙げることができる。

40

【0071】

本明細書に使用されるとき、「解析用密度勾配沈降平衡法(analytical density gradient sedimentation equilibrium)」は、粒子の浮遊密度を測定するため、または浮遊密度の差を使用して様々な種の粒子を分離するための方法に関する。これらの方法は、例えば、AUC沈降均衡技法を使用

50

し得る。これらの方法では、粒子溶液（例えば、限定することなく、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはウイルスキャプシドの溶液）を、勾配溶媒和物、例えば勾配塩化セシウムまたは勾配硫酸セシウムにおいて、溶媒和物との平衡に達するまで、超遠心分離に供してもよい。平衡時、粒子溶液は、粒子の密度が溶媒和物のものと等しくなる勾配内の位置で、濃縮するかまたはバンドが出る。バンドの位置を使用して、粒子の密度を計算してもよく、またはバンドを抽出して、単一の粒子種を単離してもよい。

【0072】

本明細書に使用されるとき、「SEDFITアルゴリズム」は、沈降速度などの流体力学的データを分析することを可能にするアルゴリズムである（Schuck（2000年）Biophys. J., 78:1606~19頁）。SEDFITアルゴリズムでは、予測範囲にわたり沈降係数の格子が作成される。各沈降係数についてLamm方程式の解を使用して、沈降境界をシミュレーションするが、粒子形状および溶媒の摩擦比は一定と仮定する。

【0073】

本明細書に使用されるとき、「F統計量（F statistic）」または「F比」とは、信頼性レベルを指す。このパラメータは、使用される正規化の量を制御する。これは、異なる範囲では異なる意味を有する：0~0.5では、正規化が使用されていない。0.5~0.999の値は、確率P（信頼性レベル）に対応する。これらのP値から、正規化の削減制約に対して許容される所望のカイ二乗増加を、F統計量とともに計算する。0.51の値は、正規化をほとんど引き起こさず、0.68~0.90の値は、一般的に使用される信頼性レベルに対応し（通常、50回またはそれ以上のスキャンで、0.7の確率に対応するカイ二乗増加は、約0.1%である）、一方で0.99に近い値は、非常に高い正規化を引き起こす。これらの値と確率との関係性は、F統計量計算装置を使用して調べることができる。1を上回る数が入力されると、それらは、直接、カイ二乗比としてとられる（1を上回る確率がないため）。例えば、1.1という値は、10%のカイ二乗増加で正規化をもたらす。

【0074】

本明細書における値またはパラメータへの「約」への言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ記載する）。例えば、「約X」に言及する記述は、「X」の記述を含む。

【0075】

本明細書に使用されるとき、冠詞の単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」、および「その（the）」には、別途示されない限り、複数形の参照物が含まれる。

【0076】

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態を「含むこと」、「それらからなること」、および/または「本質的にそれらからなること」を含むことが理解される。

【0077】

III. ウイルス粒子

本開示のある特定の態様は、（例えば、本明細書に開示される方法および/または細胞株によって産生される）オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ゲノムを含有するアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子に関する。本開示のある特定の態様は、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbのrAAVゲノムを含有するアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子に関する。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kbを上回り、AAVキャプシドによってキャプシド化されている。一部の実施形態において、rAAV粒子は、rAAVベクターを含む。一部の実施形態において、rAAVベクターは、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbのrAAVゲノムを含有する。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kbを上回る。一部の実施形態において、rAAVゲノムは、約5 kb~約7.0 kb、約4.7 kb~約9.4 kb、または約4.7 kb~約6.7 kbである。一部の

実施形態において、rAAVゲノムは、長さが、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、7.1 kb、7.2 kb、7.3 kb、7.4 kb、7.5 kb、7.6 kb、7.7 kb、7.8 kb、7.9 kb、8.0 kb、8.1 kb、8.2 kb、8.3 kb、8.4 kb、8.5 kb、8.6 kb、8.7 kb、8.8 kb、8.9 kb、9.0 kb、9.2 kb、9.3 kb、もしくは9.4 kbのうちのいずれかより大きく、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【0078】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、1つまたは2つのAAV逆位末端反復配列(ITR)が隣接した異種核酸(例えば、異種導入遺伝子)を含む核酸を含む、組換えAAV粒子である。核酸は、AAV粒子にキャプシド化されている。AAV粒子はまた、キャプシドタンパク質を含む。一部の実施形態において、核酸は、目的のコード配列(例えば、異種導入遺伝子)、転写の方向に作動可能に連結された成分、転写開始配列および転写終結配列を含む制御配列を含み、それによって発現カセットが形成される。発現カセットは、5'末端および3'末端で、少なくとも1つの機能的AAV ITR配列に隣接している。「機能的AAV ITR配列」とは、ITR配列が、AAVビリオンのレスキュー、複製、およびパッケージングに意図されるように機能することを意味する。Davidsonら、PNAS、2000年、97(7)3428~32頁; Passiniら、J. Virol., 2003年、77(12):7034~40頁; およびPechanら、Gene Ther., 2009年、16:10~16頁を参照されたく、これらのすべては、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。本発明の一部の態様を実施する目的で、組換えベクターは、キャプシド化に必須のAAVの配列の少なくともすべておよびrAAVによる感染のための物理的構造を含む。本発明のベクターにおいて使用するためのAAV ITRは、野生型ヌクレオチド配列(例えば、Kotkin, Hum. Gene Ther., 1994年、5:793~801頁に記載されている)を有する必要はなく、ヌクレオチドの挿入、欠失、もしくは置換によって改変させてもよく、またはAAV ITRは、複数のAAV血清型のうちのいずれかに由来してもよい。40種類を上回るAAVの血清型が現時点で既知であり、新しい血清型および既存の血清型の変化形が、特定され続けている。Gaoら、PNAS、2002年、99(18):11854~6頁; Gaoら、PNAS、2003年、100(10):6081~6頁; およびBossisら、J. Virol., 2003年、77(12):6799~810頁を参照されたい。いずれのAAV血清型の使用も、本発明の範囲内と見なされる。一部の実施形態において、rAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAVなどを含むが、これに限定されないAAV血清型に由来するベクターである。例えば、一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。一部の実施形態において、AAV ITRの核酸は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型のITRなどである。ある特定の実施形態において、AAVの核酸は、AAV2 ITRを含む。

【0079】

さらなる実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシド、AAV2キャプシド、AAV3キャプシド、AAV4キャプシド、AAV5キャプシド、AAV6キャプシド(例えば、野生型AAV6キャプシド、もしくは米国付与前公開第2012/0164

10

20

30

40

50

106号に記載されている、ShH10などの変化形AAV6キャプシド)、AAV7キャプシド、AAV8キャプシド、AAVrh8キャプシド、AAVrh8Rキャプシド、AAV9キャプシド(例えば、野生型AAV9キャプシド、もしくは米国付与前公開第2013/0323226号に記載されている修飾AAV9キャプシド)、AAV10キャプシド、AAVrh10キャプシド、AAV11キャプシド、AAV12キャプシド、チロシンキャプシド変異体、ヘパリン結合キャプシド変異体、AAV2R471Aキャプシド、AAVAAV2/2-7m8キャプシド、AAV DJキャプシド(例えば、AAV-DJ/8キャプシド、AAV-DJ/9キャプシド、もしくは米国付与前公開第2012/0066783号に記載されている任意のその他のキャプシド)、AAV2 N587Aキャプシド、AAV2 E548Aキャプシド、AAV2 N708Aキャプシド、AAV V708Kキャプシド、ヤギAAVキャプシド、AAV1/AAV2キメラキャプシド、ウシAAVキャプシド、マウスAAVキャプシド、rAAV2/HBoV1キャプシド、または米国特許第8,283,151号もしくは国際公開第WO/2003/042397号に記載されているAAVキャプシドを含む。一部の実施形態において、変異体キャプシドタンパク質は、AAVキャプシドを形成する能力を維持する。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV5チロシン変異体キャプシド(Zhong L.ら(2008年)Proc Natl Acad Sci U S A 105(22):7827~7832頁)を含む。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、クレードA~FのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む(Gaoら、J. Virol. 2004年、78(12):6381頁)。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシドタンパク質またはその変異体を含む。他の実施形態において、rAAV粒子は、AAV2キャプシドタンパク質またはその変異体を含む。一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型1(AAV1)キャプシドを含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型2(AAV2)キャプシドを含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAVrh8Rキャプシドまたはその変異体を含む。

【0080】

特定の標的細胞の形質導入を最適化するため、または特定の標的組織(例えば、肝臓またはCNS組織)内の特定の細胞型を標的とするために、異なるAAV血清型が使用される。rAAV粒子は、同じ血清型に由来するかまたは異なる血清型に由来する(例えば、混合血清型の)ウイルスタンパク質およびウイルス核酸を含み得る。例えば、一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV2 ITRを含み得るか、またはAAV2キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV1 ITRを含み得る。rAAV粒子の産生のためのAAV血清型の任意の組み合わせは、各組合せが明示的に本明細書に記載されているかのように、本明細書に提供される。一部の実施形態において、本発明は、少なくとも1つのAAV2 ITRが隣接した、本開示のAAV1キャプシドおよびrAAVベクター(例えば、異種核酸を含む発現カセット)を含む、rAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、AAV2キャプシドを含むrAAV粒子を提供する。一部の実施形態において、ITRおよびキャプシドは、AAV2に由来する。他の実施形態において、ITRは、AAV2に由来し、キャプシドは、AAVrh8Rに由来する。

【0081】

本開示のさらなる態様は、rAAV粒子を含む組成物であって、rAAV粒子のうちの少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、または少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、約4.7kb~約9.4kb、場合によっては約4.7kb~6.7kbのrAAVゲノムがキャプシド化されている

、組成物に関する。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、約 5 k b を上回るゲノムがキャプシド化されている。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、長さが、およそ、5 . 0 k b、5 . 1 k b、5 . 2 k b、5 . 3 k b、5 . 4 k b、5 . 5 k b、5 . 6 k b、5 . 7 k b、5 . 8 k b、5 . 9 k b、6 . 0 k b、6 . 1 k b、6 . 2 k b、6 . 3 k b、6 . 4 k b、6 . 5 k b、6 . 6 k b、6 . 7 k b、6 . 8 k b、6 . 9 k b、7 . 0 k b、8 . 0 k b、もしくは 9 . 0 k b のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回るゲノムがキャプシド化されている。一部の実施形態において、パッケージングされた A A V ゲノムは、5 ' 末端の短縮を含んでいなかった。一部の実施形態において、パッケージングされた A A V ゲノムは、3 ' 末端の短縮を含んでいなかった。r A A V ゲノムのサイズをアッセイするための方法は、当該技術分野で既知であり、以下に記載されるように、限定することなくサザンブロットおよび解析用超遠心分離法が挙げられる。

10

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態において、本開示の組成物は、r A A V 粒子であって、r A A V 粒子のうちの少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、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 %、または少なくとも約 9 5 % が、約 4 . 7 k b を上回る、約 5 . 0 k b を上回る、約 5 . 1 k b を上回る、約 5 . 2 k b を上回る、約 5 . 3 k b を上回る、約 5 . 4 k b を上回る、約 5 . 5 k b を上回る、約 5 . 6 k b を上回る、約 5 . 7 k b を上回る、約 5 . 8 k b を上回る、約 5 . 9 k b を上回る、約 6 . 0 k b を上回る、約 6 . 5 k b を上回る、約 7 . 0 k b を上回る、約 7 . 5 k b を上回る、約 8 . 0 k b を上回る、約 8 . 5 k b を上回る、約 9 . 0 k b を上回る、または約 9 . 4 k b を上回る r A A V ゲノムがキャプシド化されている、r A A V 粒子を含有する。一部の実施形態において、パッケージングされた A A V ゲノムは、5 ' 末端の短縮を含んでいなかった。一部の実施形態において、パッケージングされた A A V ゲノムは、3 ' 末端の短縮を含んでいなかった。

20

【 0 0 8 3 】

本発明の一部の実施形態において、組成物中の組換えウイルス粒子は、高度に精製され、好適に緩衝され、濃縮されている。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、少なくとも約 1×10^7 v g / m L ~ 約 9×10^{13} v g / m L、またはこの範囲内の任意の濃度に、濃縮されている。

30

【 0 0 8 4 】

本明細書に記載されるように、ウイルス粒子の調製物（例えば、ベクターゲノムのサイズおよび/または組込みに関連する 1 つまたはそれ以上の特性）を特徴付けるための 1 つの技法は、サザンブロットの使用によるものである。例えば、以下の実施例により詳細に記載されるように、r A A V 粒子の調製物（場合によっては、本明細書に記載されるように精製されている）は、キャプシド化されていないすべての核酸を除去するために D N a s e で処理し、D N a s e 消化を停止させるために薬剤（例えば、E D T A）で処理し、プロテイナーゼで消化させた後、パッケージングされたベクターゲノムを取り出すために D N A 抽出に供してもよい。ベクターゲノムを、次いで、電気泳動を使用して分離し、膜に架橋させ、ベクターゲノムに特異的にハイブリダイズする 1 つまたはそれ以上の標識化プローブでプローブしてもよい。標識化プローブへのハイブリダイゼーションによって標識された D N A フラグメントのサイズ（例えば、1 つまたはそれ以上の特定のサイズのマーカーと比較して）が、ベクターゲノムのサイズを表す。加えて、ベクターゲノムの既知のセグメント（例えば、5 ' 末端または 3 ' 末端）にハイブリダイズする 1 つまたはそれ以上のプローブを使用してもよい。これらのプローブのうちの 1 つまたはそれ以上が、ベクターゲノムにハイブリダイズできなかった場合、これは、調製物のベクターゲノムが、短縮されているか、そうでなければ欠失しており、そのため、予測された全長よりも短くなっていることを示す。A A V ゲノムのパッケージングは、3 ' 末端で開始して生じるこ

40

50

とが既知であるため (King, J. A. ら (2001年) EMBO J. 20:3282~3291頁)、オーバーサイズベクターは、ゲノムサイズが4.7 kbを超える場合に、マイナス鎖およびプラス鎖の5'末端において配列が欠如している可能性がある。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、約5.0 kbを上回るオーバーサイズ rAAV ゲノムを含み、ここで、rAAV 粒子内にキャプシド化されているウイルスゲノムは、例えば、5'末端および/または3'末端に特異的なプローブへのハイブリダイゼーションによって測定した場合に、比較的無傷な5'末端および3'末端を含む。ハイブリダイゼーションは、サザンブロット分析またはPCRなどであるがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の方法によって測定することができる。一部の実施形態において、パッケージングされたAAVゲノムは、5'末端の短縮を含んでいなかった。一部の実施形態において、パッケージングされたAAVゲノムは、3'末端の短縮を含んでいなかった。

10

【0085】

解析用超遠心分離法

本明細書に記載されるように、ウイルス粒子の調製物 (例えば、ベクターゲノムのサイズおよび/または組込みに関連する1つまたはそれ以上の特性) を特徴付けるための1つの技法は、解析用超遠心分離法 (AUC) の使用によるものである。例えば、一部の実施形態において、AUCは、完全な無傷のゲノムを有するウイルス粒子、空のウイルスキャプシド、および変形 (例えば、短縮形、凝集物、不純物など) ウイルスゲノムを有するウイルス粒子を区別するために、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子の調製物へのrAAV粒子のベクターゲノム組込みを評価するために使用される。ウイルス (例えば、AAV) 粒子を特徴付けるための解析用超遠心分離法の使用に関するさらなる説明は、2015年1月20日に出願された、米国仮特許出願第62/105,714号「Analytical Ultracentrifugation for Characterization of Recombinant Viral Particles」に見出すことができ、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0086】

解析用超遠心分離法は、タンパク質または他の巨大分子の分子量ならびに流体力学的および熱力学的特性を評価するための手段である。沈降速度によるタンパク質または巨大分子の不均質性は、濃度、温度、イオン強度、およびpHを含む条件範囲にわたる。例えば、タンパク質は、臨床的に関連する製剤において分析することができる。アデノウイルス調製物を特徴付けるための解析用超遠心分離法の使用は、Berkowitz, SA & Philo JS (2007年) Anal. Biochem., 362:16~37頁に提供されている。

30

【0087】

AUC分析は、粒子 (例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、およびウイルスキャプシド) の遠心力場における溶媒を通じた移行を測定することによって、粒子の生物物理学的特性を特徴付けるための定量的方法を指す。AUC分析は何十年にも間にわたって十分に特徴付けられており、多用途性が高い。AUC分析は、第一原理の流体力学的および熱力学的情報に依存するため、AUCを適用して、広範な粒子の濃度およびサイズにわたり、多くの種類の粒子の生物学的特性を決定することができる。AUC分析は、典型的に、次の2つの基本的な種類の実験を含む：沈降速度法および沈降均衡法。沈降均衡分析により、粒子の熱力学的特性が得られ、これを使用して、化学量論および結合定数などの特徴を測定することができる。沈降速度法により、粒子の流体力学的特性が得られ、これを使用して、サイズ、形状、および濃度などの特徴を測定することができる。ウイルス調製物のAUC分析の特徴は、ウイルスゲノムのヌクレオチド配列にもキャプシドの血清型にも関係なく、同じアッセイ条件を使用して、様々なウイルス粒子調製物を分析することができることである。

40

【0088】

本開示のある特定の態様は、ウイルスキャプシドの特性を特徴付けるために沈降速度分析を使用することに関する。一部の実施形態において、沈降速度分析は、それぞれが、光

50

がコンパートメントを透過するのを可能にする2つの光学窓を含む、透析平衡状態の2つのセクター（1つが、実験サンプル用であり、もう1つが溶媒のみの参照サンプル用である）を有する、超遠心分離装置の速度セルを使用する。超遠心分離法は、セルに角速度を適用し、溶質粒子をセクターの底部に向かって急速に沈降させる。沈降が起こると、溶質は、セル上部のメニスカスでは枯渇され、枯渇領域と沈降している溶質との間に沈降境界が生じる。沈降境界の移動または移行の速度は、サンプルセクターと参照セクターとの特性を比べる測定値を、特定の時間間隔（沈降速度法では、これらの間隔は、典型的に、約数分である）で取得することによって、測定される。複数の溶質種が存在している場合、これは、それぞれが分解可能な種に対応した複数の沈降境界の形成につながり得る。

【0089】

10

光学的に沈降境界を検出し、その移動または移行の速度を測定するためのいくつかの方法が、当該技術分野で既知である（参考については、Coleら（2008年）Methods Cell Biol., 84:143~79頁を参照されたい）。一部の実施形態において、参照セクターおよびサンプルセクターは、吸光度検出法を使用してアッセイすることができる。この検出方法では、特定の波長における吸光度を、サンプルセクターおよび参照セクターについて、各セクター内で異なる半径方向位置で測定することができる。代替として、単一の半径方向位置における経時的な吸光度を測定してもよい。ベールの法則により、吸光度と溶質の吸光係数との間の数学的関連性が得られる。

【0090】

一部の実施形態において、参照セクターおよびサンプルセクターは、干渉検出法（例えば、レイリー干渉検出法）を使用してアッセイしてもよい。レイリー干渉検出法では、干渉光学系は、2つの並列スリットを含んでいる。単一のコヒーレント光線は、両方の窓を通過するように分離され、その後、2つの光線は再び交わる。これらの2つの光波が交わると、明と暗が交互になった縞模様の干渉パターンが形成される。サンプルおよび参照サンプルが、同一の屈折率を有していた場合、結果として得られる干渉縞は、完全にまっすぐになる。溶質の濃度が増加すると、溶液の屈折率が高くなり、それによって、サンプル光線が妨害され、垂直な縞シフトをもたらす。この縞シフトを測定することによって、サンプル中の溶質濃度を測定することができる。サンプルおよび参照の絶対値を測定する吸光度検出法とは異なり、干渉検出法は、サンプルと参照との間の相対差を測定する。しかしながら、干渉検出法は、統合されたピークをもたらす、これは、濃度に正比例し、吸光度が低い種類のサンプルに使用することができる。レイリー干渉光学系をAUCとともに使用することに関する参考文献については、Furst（1997年）Eur. Biophys. J. 35:307~10を参照されたい。

20

30

【0091】

沈降境界が移動する速度の測定値を使用して、溶質粒子の多数の物理的特性を導くことができる。境界の移動速度により、粒子の質量および形状（摩擦係数）に基づいて沈降係数が決まる。粒子の沈降係数 s は、遠心力場によって適用される、粒子の速度の加速度に対する比を指す。沈降係数は、スベドベリ単位 S で表される（1スベドベリ単位は、 10^{-13} 秒に等しい）。粒子または粒子溶液の沈降係数は、その特性、例えば、分子量（浮力に関して補正される）、および溶媒の特性に依存する。

40

【0092】

超遠心分離中の経時的な溶質の濃度境界の変化は、Lamm方程式を使用して判定することができる（Schuck（2000年）Biophys. J., 78:1606~19頁）。簡単に述べると、Lamm方程式は、沈降（溶質を濃縮させる）と拡散（溶質を分散させる）との競合力に応答した経時的な溶質の濃度境界の変化を、セクター形状のセルおよびロータによって生じる遠心力場を考慮して計算する。Lamm方程式は、次のように表すことができる：

方程式1：
$$c / t = D [(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2}) + 1 / r (\frac{\partial c}{\partial r})] - s \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} [r (\frac{\partial c}{\partial r}) + 2 c]$$

式中、 c は溶質濃度であり、 D は溶質拡散定数を表し、 s は沈降係数を表し、 $\frac{\partial}{\partial r}$ はロータ

50

の角速度を表し、 r は半径であり、 t は時間である。

【0093】

未加工のAUCデータを、Lamm方程式の解に当てはめることによって、沈降係数および濃度分布における変化といった、溶質の特徴を決定することが可能である。例えば、沈降境界の変化速度に関する実験的に決定された値は、Lamm方程式を使用して、沈降係数、分子量、または境界を形成する溶質の濃度を導くことで、モデリングすることができる。SEDFIT (Schuck (2000年) Biophys. J., 78: 1606 ~ 19頁) など、当該技術分野で既知のいくつかのプログラムを使用して、Lamm方程式をAUCデータにモデリングすることができる。これらのプログラムはまた、Lamm方程式を、複数の溶質または複数の沈降境界を含む溶液に適用することもできる。

10

【0094】

溶質の特徴を判定するのに好適なプログラムの一例は、SEDFITアルゴリズムである。一部の実施形態において、SEDFITアルゴリズムは、粒子種の混合物を含有する溶液からのAUCデータを使用して、微分係数分布値、すなわち $C(S)$ を計算するために使用することができる (参考文献については、Schuck (2000年) Biophys. J., 78: 1606 ~ 19頁を参照されたい)。SEDFITアルゴリズムでは、予測範囲にわたり沈降係数の格子が作成される。各沈降係数についてLamm方程式の解を使用して、沈降境界をシミュレーションするが、粒子形状および溶媒の摩擦比は一定と仮定する。実際のAUCデータを、次いで、これらのLammの解に当てはめて、微分係数分布値、すなわち $C(S)$ が導かれる。AUCデータを分析するのに有用な多数の他のプログラムは、ColeおよびHansen (1999年) J. Biomol. Tech. 10: 163 ~ 76頁に見出すことができる。

20

【0095】

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、好適な宿主細胞において生成され、精製される。一部の実施形態において、ウイルス粒子は、親和性クロマトグラフィーによって精製される。AAV粒子を精製するための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、クロマトグラフィー媒体に固定化したウイルスキャプシドタンパク質の抗体またはウイルスキャプシドタンパク質の結合リガンドを利用するものである。

【0096】

一部の実施形態において、解析用沈降速度超遠心分離 (SV-AUC) 分析は、生物学的に関連する溶液条件下において、サンプルをその天然の状態の特徴付けることができる解析用超遠心分離装置を使用して行われる (例えば、ProteomeLab (商標) XL-I (Beckman Coulter))。ProteomeLab (商標) XL-1を使用する場合、サンプルは、セクターが2つある速度セルのうちのサンプルセクターに充填され、ピヒクル対照 (例えば、組換えウイルスを含まないPBS) は、対応する参照セクターに充填される。サンプルを、4つ穴ロータに入れ、約20 の温度および完全な真空が維持されるまで、約1時間、機器において均衡させる。例示的な実施形態において、沈降速度遠心分離は、約20,000 RPM、約20 、および半径約0.003 cmの段階の設定で、遅延なし、複製なしで行われる。以下に留意されるように、遠心分離には異なるパラメーターを使用してもよい。一部の実施形態において、吸光度 (260 nm) および/または干渉光学系 (例えば、レイリー干渉光学系) を使用して、半径方向濃度を、最も小さい沈降成分が光学窓から見えなくなるまで、時間の関数として同時に記録する。一部の実施形態において、半径方向の濃度は、最も密度が低い沈降種がセクターからなくなるまで、記録される。一部の実施形態において、沈降は、最も低い密度を有する組換えウイルス粒子が、超遠心分離装置のセクターの底部に沈降するまで、監視される。セクターは、超遠心分離装置の一部、例えば、超遠心分離装置の速度セルであってもよい。一部の実施形態において、セクターは、サンプルが検出される超遠心分離装置の一部であってもよい。一部の実施形態において、超遠心分離法は、超遠心分離装置速度セルを備える超遠心分離装置を利用する。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子が超遠心分離装置の速度セルの底部に沈降するまで、監視される。一部の実施形態において、沈降

30

40

50

は、最も密度が低い組換えウイルス粒子が沈降し、光学窓から見えなくなるまで、監視される。一部の実施形態において、半径方向濃度は、少なくとも、およそ、0.5時間、0.75時間、1.0時間、1.5時間、2.0時間、3.0時間、4.0時間、または5.0時間のうちのいずれかの間、記録される。一部の実施形態において、半径方向濃度は、約1.2時間記録される。実行条件の最適化としては、例えば、沈降している種のすべてが完全にセクターの底部に沈降するまで、20 の一定に保った温度および18,000rpm~20,000rpmの速度で、実行を継続することが挙げられる。以下に留意されるように、その他の温度および速度を使用してもよい。

【0097】

完全キャプシドパーセントは、SEDFITの連続サイズC(S)分布モデルを使用して、各検出法からの複数回のスキャン(例えば、75回)を分析することによって決定される。二次導関数正規化を当てはめに適用する。一部の実施形態において、F統計量の信頼性レベルは、約0.68である。一部の実施形態において、F統計量の信頼性レベルは、およそ、0.68、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、もしくは0.99のいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。一部の実施形態において、以下のC(S)パラメーターは一定に保たれる：分解能は約200S~約5000Sであり、Sminは約1S~約100Sであり、Smaxは約100S~約5000Sであり、摩擦比は約1.0であるか、または浮動して遠心分離ソフトウェアによって決定される値に委ねられる。一部の実施形態において、分解能は、およそ、200S、300S、400S、500S、600S、700S、800S、900S、もしくは1000Sのいずれか、またはこれらの間の任意の値である。一部の実施形態において、分解能は、約200Sである。一部の実施形態において、Smaxは、およそ、100S、200S、300S、400S、500S、600S、700S、800S、900S、もしくは1000Sのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値である。一部の実施形態において、Smaxは、約200Sである。一部の実施形態において、摩擦比は、浮動して遠心分離ソフトウェアによって決定される値に委ねられる。一部の実施形態において、摩擦比は、約1.0である。一部の実施形態において、半径方向不変量(RI)および時間不変量(TI)のノイズ減算を適用する。一部の実施形態において、メニスカス位置の浮動を可能にし、ソフトウェアに最適な位置を選択させる。一部の実施形態において、摩擦比の浮動を可能にし、ソフトウェアに最適な位置を選択させる。モデルにより、データをLamm方程式に当てはめ、結果として得られるサイズ分布は、各ピーク下の面積が縞単位またはOD₂₆₀単位の濃度に比例したクロマトグラムのような「沈降係数の分布」である。沈降係数(スベドベリ単位)および相対濃度(OD単位)を、分布内の各成分に関して判定する。一部の実施形態において、複数回のAUC実施は独立したアッセイであり、各分析において以下の属性を監視して、結果の品質を確保する：当てはめの良好さ(rmsd)、各ピークについての縞のOD_{260nm}/干渉シグナルの比(A₂₆₀/IF比)、実施間でのそれぞれの種の沈降係数の一貫性、およびスキャンの全体的な品質。

【0098】

本発明の一部の実施形態において、消散係数を使用して、吸光度データから無傷なベクターピークのモル濃度および実際のパーセント値を計算する。空キャプシドのモル吸光度の消散係数($\epsilon_{260}/\text{capsid} = 3.72 \times 10^6$)および無傷なベクターのモル吸光度の消散係数($\epsilon_{260}/\text{vector} = 3.00 \times 10^7$)のいずれも、公開済みの式に基づいて計算することができる(Sommerら(2003年)Mol Ther., 7: 122~8頁)。消散係数は、空キャプシドおよび無傷なベクターのピークに利用可能である。C(S)値は、Schuck(2000年)Biophys. J., 78: 1606~19頁に記載されているSEDFITアルゴリズムを使用して決定することができる。無傷なベクターおよび空キャプシドの両方のモル濃度は、ベールの法則を使用して計算することができ、完全キャプシドの割合は、これらの値から計算される。一部の実施形態において、値は、完全キャプシドの割合に関して報告される。

【 0 0 9 9 】

一部の実施形態において、特定の種の組換えウイルス粒子（例えば、サイズおよび配列が未知のフラグメント化ゲノムを有するウイルス粒子）の消散係数を、経験的に決定することは不可能である。S値とゲノムサイズとの関係は、既知のヌクレオチドサイズのキャプシド化ウイルスゲノムを有する組換えウイルスベクター調製物を分析することによって確立することができ、対応するS値は、本明細書に記載されるように決定される。計算されたS値をプロットして標準曲線を生成することができ、これと、分子量またはゲノムサイズが未知の組換えウイルス種とを比較して、未知の種の分子量を決定することができる。

【 0 1 0 0 】

一部の態様において、組換えウイルス粒子（例えば、r A A V粒子）の調製物は、以下の工程を行うことによって特徴付けることができる：a）調製物を、境界沈降速度条件下において解析用超遠心分離法に供し、組換えウイルス粒子の沈降を時間間隔（例えば、1回またはそれ以上）で監視する工程、b）微分沈降係数分布値（ $C(s)$ ）をスベドベリ単位での沈降係数（ S ）に対してプロットする工程、c） $C(s)$ 分布における各ピーク下面積を積分して、各ピークの相対濃度を決定し、各ピークが、組換えウイルス粒子の種を表す工程。一部の実施形態において、特定される組換えウイルス粒子の種としては、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：無傷な組換えウイルスゲノムを含む完全組換えウイルス粒子、空組換えウイルスキャプシド粒子、および変形組換えウイルスゲノムを含む組換えウイルス粒子。一部の実施形態において、変形ゲノムは、無傷な組換えウイルスゲノムよりも小さい（例えば、短縮型ゲノム）。一部の実施形態において、変形ゲノムは、無傷な組換えウイルスゲノムよりも大きい（例えば、凝集体、組換え体など）。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子（例えば、r A A V粒子）の調製物は、以下の工程を行うことによって特徴付けられる：a）調製物を境界沈降速度条件下において解析用超遠心分離法に供し、組換えウイルス粒子の沈降を時間間隔（例えば、1回またはそれ以上）で監視する工程、b）微分沈降係数分布値 $C(s)$ をスベドベリ単位での沈降係数（ S ）に対してプロットする工程、c）プロットにおけるS値に対応するピークの存在によって調製物中の組換えウイルス粒子の種を特定し、特定の種の組換えウイルス粒子のゲノムサイズが、その種のS値を、様々な既知のサイズのキャプシド化ウイルスゲノムを含む組換えウイルス粒子のS値によって生成された標準曲線と比較することによって計算される工程。一部の実施形態において、本方法は、さらに、 $C(S)$ 分布における各ピーク下面積を積分して、それぞれの種の組換えウイルス粒子の相対濃度を決定する工程を含む。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降は、1つの時間間隔で監視される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降は、1つを上回る時間間隔で監視される。

【 0 1 0 1 】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子（例えば、r A A V粒子）の沈降は、光学密度または約260nmでの吸光度を測定することによって監視される。吸光度を測定する手段は、当該技術分野で既知である。一部の実施形態において、AUCに使用される超遠心分離装置は、吸光度を測定するための手段を備える。他の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降は、干渉によって監視される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降は、レイリー干渉によって監視される。干渉を測定する手段は、当該技術分野で既知である（Furster（1997年）Eur. Biophys. J. 35: 307~10頁）。一部の実施形態において、AUCに使用される超遠心分離装置は、干渉を測定するための手段を備える。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降は、吸光度および干渉の両方によって監視される。一部の実施形態において、吸光度および/または干渉は、参照標準を使用して測定される。一部の実施形態において、参照標準は、組換えウイルス調製物の溶液と一致するが、組換えウイルスが存在していない場合を除く。例えば、組換えウイルス調製物は、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液中の組換えウイルスを含み得る。この例では、参照標準は、組換えウイルス粒子を含まないリン酸緩衝食塩

10

20

30

40

50

水であり得る。

【0102】

一部の実施形態において、超遠心分離中のウイルス粒子の沈降速度は、超遠心分離中に継続的にウイルス粒子の沈降を監視することによって測定される。異なる種類のウイルス粒子のAUCのパラメーターを最適化することは、当業者の趣旨内である。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ取得は、約3,000~約20,000rpmのAUC速度で行われる。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ分析は、約1Sの S_{min} および約1000Sの S_{max} で行われる。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ分析は、約200S~約1,000Sの分解能で行われる。一部の実施形態において、分解能は、およそ、200S、300S、400S、500S、600S、700S、800S、900S、もしくは1000Sのいずれか、またはこれらの間の任意の値である。一部の実施形態において、分解能は、約200Sである。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ分析は、およそ、100S、200S、300S、400S、500S、600S、700S、800S、900S、もしくは1000Sのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値の S_{max} で行われる。一部の実施形態において、 S_{max} は、約200S~約5000Sである。一部の実施形態において、 S_{max} は、約200Sである。一部の実施形態において、半径方向不変量(RI)および時間不変量(TI)のノイズ減算を適用する。一部の実施形態において、メニスカス位置の浮動を可能にし、ソフトウェアに最適な位置を選択させる。一部の実施形態において、摩擦比の浮動を可能にし、ソフトウェアに最適な位置を選択させる。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ分析は、1に一定に保たれる。一部の実施形態において、rAAV粒子のデータ分析は、FITコマンドを、非線形回帰を使用して最適化した値で使用する

10

20

【0103】

組換えウイルス粒子(例えば、rAAV粒子)に関して、一部の実施形態において、超遠心分離中の組換えウイルスの沈降速度は、組換えウイルス粒子の沈降を、およそ、15秒間、30秒間、45秒間、1分間(60秒間)、2分間、3分間、4分間、5分間、6分間、7分間、8分間、9分間、10分間、15分間、20分間、25分間を上回る毎に1回、監視(例えば、スキャン)することによって、判定される。スキャンは、光学系が許容できる限り迅速に、遅延することなく連続的に取得することができる。干渉のスキャンは、高速であり、1回のスキャンは、約10~15秒以内に完了し、一方で、吸光度のスキャンは、約60秒間かかる。二重検出が使用される場合、両方のスキャン取得速度は、吸光度系によって決定される。本発明の一部の実施形態において、およそ、5回、10回、15回、20回、25回、30回、35回、40回、45回、50回、55回、60回、65回、70回、75回、80回、85回、90回、95回、または100回を上回るスキャンを使用して、超遠心分離中の組換えウイルス粒子の沈降を監視する。一部の実施形態において、分析には最低30回のスキャンが必要であり、スキャンは、沈降プロセスが完了するまで収集される。一部の実施形態において、沈降プロセスは、典型的に、40回~75回のスキャンによって表すことができる。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、約75回のスキャンに基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、約55回のスキャン~約75回のスキャンに基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、約55回のスキャン~約60回のスキャンに基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、約60回のスキャン~約75回のスキャンに基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、約60回のスキャン~約70回のスキャンに基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、複数回の超遠心分離(実施)に基づいて決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の沈降速度は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、またはそれ以上の超遠心分離実施のうちのいずれかに基づいて、決定される。一部の実施形態において、沈降速度は、SEDFITアルゴリ

30

40

50

ズムを使用してC (S) 値を決定するために使用される。一部の実施形態において、二次導関数正規化を、約 0 . 6 8 の F 統計量の信頼性レベルで当てはめレベルに適用する。一部の実施形態において、以下のC (S) パラメーターは一定に保たれる：分解能は1 0 0 S ~ 約 2 0 0 S であり、S m i n は約 1 であり、S m a x は約 2 0 0 S ~ 3 0 0 S であり、摩擦比は約 1 . 0 ~ 1 . 2 S である。一部の実施形態において、半径方向不変量 (R I) および時間不変量 (T I) のノイズ減算を適用する。

【 0 1 0 4 】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子調製物中の組換えウイルス粒子（例えば、r A A V 粒子）の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、およそ、5 , 0 0 0 r p m ; 1 0 , 0 0 0 r p m ; 1 5 , 0 0 0 r p m ; 2 0 , 0 0 0 r p m ; 2 5 , 0 0 0 r p m ; 3 0 , 0 0 0 r p m ; 3 5 , 0 0 0 r p m ; 4 0 , 0 0 0 r p m ; 4 5 , 0 0 0 r p m ; もしくは 5 0 , 0 0 0 r p m のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る値で超遠心分離することによって決定される。本発明の一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の調製物中の組換えウイルス粒子の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、約 2 0 , 0 0 0 r p m で超遠心分離することによって決定される。本発明の一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の調製物中の組換えウイルス粒子の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、約 1 5 , 0 0 0 r p m ~ 約 2 0 , 0 0 0 r p m で超遠心分離することによって決定される。

【 0 1 0 5 】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子（例えば、r A A V 粒子）の調製物中の組換えウイルス粒子の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、約 4 もしくはそれを上回る、約 1 0 もしくはそれを上回る、約 1 5 もしくはそれを上回る、約 2 0 もしくはそれを上回る、約 2 5 もしくはそれを上回る、または約 3 0 もしくはそれを上回る温度で、またはこれらの間の任意の温度で超遠心分離することによって決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の調製物中の組換えウイルス粒子の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、約 2 0 で超遠心分離することによって決定される。一部の実施形態において、組換えウイルス粒子の調製物中の組換えウイルス粒子の境界沈降速度は、組換えウイルス粒子の調製物を、約 1 5 ~ 約 2 0 で超遠心分離することによって決定される。

【 0 1 0 6 】

発現が強化されたウイルス粒子

一部の態様において、本発明は、発現が強化された、オーバーサイズベクターゲノムを含むウイルス粒子を提供する。一部の実施形態において、オーバーサイズ r A A V ゲノムは、産生細胞株を使用して A A V 粒子にパッケージングされた場合、細胞の一過性トランスフェクションによって調製された A A V 粒子と比較して強化された発現を呈する。一部の実施形態において、本発明は、オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現を強化するための方法であって、産生細胞株に A A V ヘルパー機能を提供することによって、産生細胞株において r A A V 粒子を産生させる工程を含み、産生細胞株は、a) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子をコードする核酸、ならびに b) 約 4 . 7 k b を上回る r A A V ゲノムを含む、方法を提供する。一部の実施形態において、オーバーサイズ r A A V ゲノムの発現は、一過性トランスフェクションによって産生された場合のオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現よりも、約 1 . 2 5 倍、約 1 . 5 倍、約 1 . 7 5 倍、約 2 . 0 倍、約 2 . 2 5 倍、約 2 . 5 倍、約 2 . 7 5 倍、約 3 倍、約 3 . 2 5 倍、約 3 . 5 倍、約 3 . 7 5 倍、約 4 倍、約 4 . 2 5 倍、約 4 . 5 倍、約 4 . 7 5 倍、または約 5 倍多い。一部の実施形態において、オーバーサイズ r A A V ゲノムの強化された発現は、一過性トランスフェクションによって産生される A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態と比較して速い発現動態である。一部の実施形態において、より速い発現動態とは、オーバーサイズ r A A V ゲノムを含む A A V 粒子を細胞に送達した後の、より速いオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現の経時的な増加である。一部の実施形態において、より速い発現動態とは、一過性トランスフェクションによって調製された r A A V 粒子由来のオーバーサ

10

20

30

40

50

イズ r A A V ゲノムを含む A A V 粒子の送達後のオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現レベルと比較して、オーバーサイズ r A A V ゲノムを含む A A V 粒子を細胞に送達した後の、オーバーサイズ r A A V ゲノムの最大または安定な発現レベルに達するまでの時間がより速いことである。一部の実施形態において、産生細胞株によって産生されるオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態は、一過性トランスフェクションによって産生される r A A V 粒子からのオーバーサイズ r A A V ゲノムの発現動態よりも、およそ、5 % 速い、10 % 速い、15 % 速い、20 % 速い、25 % 速い、30 % 速い、35 % 速い、40 % 速い、45 % 速い、50 % 速い、55 % 速い、60 % 速い、65 % 速い、70 % 速い、75 % 速い、80 % 速い、85 % 速い、90 % 速い、95 % 速い、または 100 % 速いのうちのいずれかである。一部の実施形態において、オーバーサイズベクターゲノムは、長さが、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、7.1 kb、7.2 kb、7.3 kb、7.4 kb、7.5 kb、7.6 kb、7.7 kb、7.8 kb、7.9 kb、8.0 kb、8.1 kb、8.2 kb、8.3 kb、8.4 kb、8.5 kb、8.6 kb、8.7 kb、8.8 kb、8.9 kb、9.0 kb、9.2 kb、9.3 kb、もしくは 9.4 kb のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

10

【0107】

異種導入遺伝子

20

一部の実施形態において、ウイルス粒子は、1つまたは2つの A A V 逆位末端反復配列 (I T R) が隣接した異種核酸 (例えば、異種導入遺伝子) を含むオーバーサイズベクターゲノムを含む、組換え A A V 粒子である。核酸は、A A V 粒子にキャプシド化されている。一部の実施形態において、本開示の r A A V ゲノムは、1つまたはそれ以上の A A V 逆位末端反復配列 (I T R) および異種導入遺伝子を含有する。例えば、一部の実施形態において、本開示の r A A V ゲノムは、2つの A A V 逆位末端反復配列 (I T R) を含有する。ある特定の実施形態において、本開示の r A A V ゲノムは、2つの A A V 逆位末端反復配列 (I T R) および異種導入遺伝子を含有する。一部の実施形態において、ベクターゲノムは、約 4.7 kb ~ 約 9.4 kb、場合によっては約 4.7 kb ~ 6.7 kb である。一部の実施形態において、ベクターゲノムは、約 5 kb を上回る。一部の実施形態において、ベクターゲノムは、約 5 kb ~ 約 7 kb、約 4.7 kb ~ 約 9.4 kb、もしくは約 4.7 kb ~ 6.7 kb、またはこれらの間の任意の値である。一部の実施形態において、ベクターゲノムは、長さが、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、7.1 kb、7.2 kb、7.3 kb、7.4 kb、7.5 kb、7.6 kb、7.7 kb、7.8 kb、7.9 kb、8.0 kb、8.1 kb、8.2 kb、8.3 kb、8.4 kb、8.5 kb、8.6 kb、8.7 kb、8.8 kb、8.9 kb、9.0 kb、9.2 kb、9.3 kb、もしくは 9.4 kb のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

30

40

【0108】

一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、治療的導入遺伝子産物をコードする。一部の実施形態において、治療的導入遺伝子産物は、治療的ポリペプチドである。治療的ポリペプチドは、例えば、細胞または生物に存在しないかまたは低減されたレベルで存在するポリペプチドおよび/または酵素活性を提供することができる。代替として、治療的ポリペプチドは、細胞または生物における不均衡に間接的に対抗するポリペプチドおよび/または酵素活性を提供することができる。例えば、代謝酵素または代謝活性の欠如によって引き起こされる代謝産物の蓄積と関連する障害のための治療的ポリペプチドは、欠如している代謝酵素もしくは代謝活性を提供することができるか、または代謝産物の低減をもたらす代替的な代謝酵素もしくは代謝活性を提供することができる。治療的ポリペプチド

50

はまた、例えば、ドミナントネガティブポリペプチドとして作用することによって、ポリペプチド（例えば、過剰発現するもの、機能獲得変異によって活性化されるもの、またはそうでなければ活性が誤制御されるもの）の活性を低減させるために使用することができる。

【0109】

一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、第VII因子をコードする。一部の実施形態において、第VII因子は、限定することなく、ヒト第VII因子遺伝子によって発現される任意のコード配列を含む、ヒト第VII因子コード配列である。ヒト第VII因子遺伝子（例えば、GenBank Entrez Gene ID 2157）は、AHF、F8、F8B、F8C、HEMA、FVII、およびDXS1253Eとしても知られている。一部の実施形態において、第VII因子は、ヒト第VII因子のアミノ酸配列を有する（例えば、GenBank 受託番号AA52484によって表される）。第VII因子をコードする異種導入遺伝子は、例えば、第VII因子の欠損と関連する劣性X連鎖型凝固障害である血友病Aを患う個体において第VII因子を発現させるために使用することができる。第VII因子は、内在性血液凝固経路の一部として血液凝固に関与することが既知であり、通常、肝臓類洞細胞および全身の内皮細胞によって発現される。

【0110】

一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ジストロフィンをコードする。一部の実施形態において、ジストロフィン（Dystrophin）は、限定することなく、ヒトジストロフィン遺伝子によって発現される任意のコード配列を含む、ヒトジストロフィンコード配列である。ヒトジストロフィン遺伝子（例えば、GenBank Entrez Gene ID 1756）はまた、DMD、BMD、CMD3B、MRX85、DXS142、DXS164、DXS206、DXS230、DXS239、DXS268、DXS269、DXS270、およびDXS272としても知られている。一部の実施形態において、ジストロフィンは、ヒトジストロフィンのアミノ酸配列を有する（例えば、GenBank 受託番号AA53189によって表される）。ジストロフィンをコードする異種導入遺伝子は、例えば、ジストロフィンにおける変異と関連する劣性X連鎖型筋ジストロフィーであるDuchenne型またはBecker型筋ジストロフィーを患う個体においてジストロフィンを発現させるために、使用することができる。Becker型筋ジストロフィーは、ジストロフィンにおける機能喪失型変異によって引き起こされる重症度の低い障害であり、一方、Duchenne型筋ジストロフィーは、ジストロフィンにおける重症度の高い機能喪失型変異または無発現型変異（例えば、ナンセンス変異またはフレームシフト変異）と関連している。ジストロフィンは、ジストロフィン-糖タンパク質複合体（DGC）において機能することが知られており、これは、筋細胞のFアクチンを細胞外マトリックスに結合させ、それによって、筋収縮および筋弛緩中に筋線維鞘を安定化させるのに必要である。

【0111】

一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）をコードし、これは、ATP結合カセットサブファミリーCメンバー7としても知られている。一部の実施形態において、CFTRは、限定することなく、ヒトCFTR遺伝子によって発現される任意のコード配列を含む、ヒトCFTRコード配列である。ヒトCFTR遺伝子（例えば、GenBank Entrez Gene ID 1080）はまた、CF、MRP7、ABC35、ABCC7、CFTR/MRP、TNR-CFTR、またはdj760C5.1としても知られている。一部の実施形態において、CFTRは、ヒトCFTRのアミノ酸配列を有する（例えば、GenBank 受託番号NP_000483として表される）。CFTRをコードする異種導入遺伝子は、例えば、肺、膵臓、腸、および多数の他の器官を冒す、CFTRにおける変異と関連する常染色体劣性障害である嚢胞性線維症を患う個体においてCFTRを発現させるために使用することができる。CFTRは、Cl⁻イオン輸送に関与するATP開口型イオンチャネルとし

10

20

30

40

50

て機能することが知られている。十分なCFTR機能がないことにより、複数の病理が生じるが、その一例としては、上皮細胞を越えるイオン輸送が破壊され、細胞の水分吸収が増加し、肺および他の組織において粘液の病的粘度増加および蓄積がもたらされることである。

【0112】

一部の実施形態において、治療的導入遺伝子産物は、治療的核酸である。一部の実施形態において、治療的核酸としては、限定することなく、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、またはDNAザイムを挙げることができる。このように、治療的核酸は、ベクターの核酸から転写されると、障害と関連する異常または過剰なタンパク質の翻訳または転写に干渉することによって障害を治療することができる、RNAをコードし得る。例えば、異種導入遺伝子は、異常および/または過剰なタンパク質をコードするmRNAの高度に特異的な排除または低減によって障害を治療する、RNAをコードする。治療的RNA配列としては、異常および/または過剰なタンパク質をコードするmRNAの高度に特異的な排除または低減によって障害を治療することができる、RNAi、小型阻害性RNA(sRNA)、マイクロRNA(miRNA)、および/またはリボザイム(ハンマーヘッド型およびヘアピン型リボザイム)が挙げられる。

【0113】

一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、ヒト導入遺伝子である。一部の実施形態において、異種導入遺伝子は、プロモーターに連結されている。一部の実施形態において、導入遺伝子(例えば、本明細書に記載される異種核酸)は、プロモーターに作動可能に連結されている。例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、GUSBプロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーターおよびCK6プロモーター、トランスチレチンプロモーター(TTR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター(LSP)、E2Fプロモーター、テロメラゼ(hTERT)プロモーター;サイトメガロウイルスエンハンサー/トリペプタイドアクチン/ウサギ-グロビンプロモーター(CAGプロモーター、Niwaら、Gene、1991年、108(2):193~9頁)および伸長因子1-アルファプロモーター(EF1-アルファ)プロモーター(Kimら、Gene、1990年、91(2):217~23およびGuoら、Gene Ther.、1996年、3(9):802~10頁)が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、プロモーターは、ヒト-グルクロニダーゼプロモーター、またはトリ-アクチン(CBA)プロモーターに連結されているサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または抑制性プロモーターであり得る。一部の実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチンプロモーターである。

【0114】

構成的プロモーターの例としては、限定することなく、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(場合によっては、RSVエンハンサーを伴う)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(場合によっては、CMVエンハンサーを伴う)(例えば、Boshartら、Cell、41:521~530頁(1985年))、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、13アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、およびEF1aプロモーター(Invitrogen)が挙げられる。

【0115】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の制御を可能にし、外来的に供給される化合物、温度などの環境要因、または特定の生理学的状態の存在によって、例えば、急性期、細胞の特定の分化状態、もしくは複製細胞のみにおいて、制御することができる。誘導性プロモ

10

20

30

40

50

ーターおよび誘導系は、限定することなく、Invitrogen、Clontech、およびAriadを含む、様々な商業的供給源から入手することができる。多数の他の系も説明されており、当業者によって容易に選択することができる。外来的に供給されるプロモーターによって制御される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン（MT）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系（WO98/10088）；エクジソン昆虫プロモーター（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、93：3346～3351頁（1996年））、テトラサイクリン抑制系（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、89：5547～5551頁（1992年））、テトラサイクリン誘導系（Gossenら、Science、268：1766～1769頁（1995年）、またHarveyら、Curr. Opin. Chem. Biol.、2：512～518頁（1998年）を参照されたい）、RU486誘導系（Wangら、Nat. Biotech.、15：239～243頁（1997年）およびWangら、Gene Ther.、4：432～441頁（1997年））、およびラパマイシン誘導系（Magariら、J. Clin. Invest.、100：2865～2872頁（1997年））が挙げられる。この文脈において有用であり得る誘導性プロモーターのさらなる他の種類は、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期、細胞の特定の分化状態によって、または複製細胞のみにおいて制御されるものである。

【0116】

別の実施形態において、導入遺伝子の天然のプロモーターまたはそのフラグメントが、使用される。導入遺伝子の発現が天然の発現を模倣すべきであることが所望される場合には、天然のプロモーターが好ましい場合がある。天然のプロモーターは、導入遺伝子の発現を、一時的もしくは発生的に、または組織特異的様式で、または特定の転写刺激に応答して、制御しなければならぬ場合に、使用することができる。さらなる実施形態において、他の天然の発現制御エレメント、例えば、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位、またはKozakコンセンサス配列もまた、天然の発現を模倣するために使用することができる。

【0117】

一部の実施形態において、制御配列は、組織特異的遺伝子発現能力を与える。一部の事例において、組織特異的制御配列は、組織特異的様式で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。例えば、肝臓、肺、筋肉、腸、脾臓、および/または他の組織における組織特異的発現が、所望される場合がある。適切な組織特異的制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）は、当該技術分野で周知である。例えば、一部の実施形態において、プロモーターは、マウストランスチレチン（mTTR）プロモーターであり、これは、肝臓における遺伝子発現を作動させることが知られている。

【0118】

一部の実施形態において、rAAVゲノムは、イントロンを含む。一部の実施形態において、イントロンは、ハイブリッドイントロンである。

【0119】

一部の実施形態において、rAAVゲノムは、ポリアデニル化シグナルを含む。多数のポリアデニル化シグナルが、当該技術分野で既知である。一部の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、合成ポリアデニル化シグナルである。他の実施形態において、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアデニル化シグナルである。BGHポリアデニル化シグナルのより詳細な説明については、例えば、Goodwin, E. C. および Rottman, F. M. (1992年) J. Biol. Chem. 267：16330～16334頁を参照されたい。

【0120】

一部の実施形態において、本発明は、オーバーサイズAAVゲノムを含むAAV粒子であって、AAVゲノムが、5'から3'に、AAV2 ITR、mTTR202プロモ-

10

20

30

40

50

ター、ハイブリッドイントロン、Bドメイン欠失型第V I I I因子導入遺伝子、合成ポリ
 アデニル化シグナル、およびA A V 2 I T Rを含む、A A V粒子を提供する。一部の実
 施形態において、オーバーサイズA A Vゲノムは、5'から3'に、A A V 2 I T R、
 m T T R 2 0 2 o p tプロモーター、ハイブリッドイントロン、Bドメイン欠失型第V I
 I I因子導入遺伝子、合成ポリアデニル化シグナル、およびA A V 2 I T Rを含む。一
 部の実施形態において、オーバーサイズA A Vゲノムは、5'から3'に、A A V 2 I
 T R、m T T R 4 8 2プロモーター、ハイブリッドイントロン、Bドメイン欠失型第V I
 I I因子導入遺伝子、合成ポリアデニル化シグナル、およびA A V 2 I T Rを含む。一
 部の実施形態において、オーバーサイズA A Vゲノムは、5'から3'に、A A V 2 I
 T R、m T T R 4 8 2プロモーター、ハイブリッドイントロン、Bドメイン欠失型第V I
 I I因子導入遺伝子、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、およびA A V 2 I T
 Rを含む。

【0121】

上述のr A A Vゲノムのエレメント（例えば、プロモーター、イントロン、およびポリ
 アデニル化シグナル）は、単独で存在してもよく、または本開示の異種導入遺伝子との任
 意の組合せで存在してもよい。r A A Vゲノムは、異種導入遺伝子の発現を確立させるた
 めの任意のエレメント、例えば、プロモーター、異種核酸、I T R、リボソーム結合エレ
 メント、終結因子、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリアデニル化（p o l
 y A）シグナル、および/または複製起点を含み得る。例えば、一部の実施形態において
 、r A A Vゲノムは、異種導入遺伝子、ならびに本開示のプロモーター、本開示のイント
 ロン、および本開示のポリアデニル化シグナルから選択される1つまたはそれ以上のエレ
 メントを含有する。一部の実施形態において、r A A Vゲノムは、異種導入遺伝子、なら
 びに本開示のプロモーター、本開示のイントロン、および本開示のポリアデニル化シグナ
 ルから選択される1つまたはそれ以上のエレメントに隣接した、少なくとも1つのI T R
 配列を含み得る。

【0122】

一部の実施形態において、オーバーサイズr A A Vベクターは、自己相補的r A A Vベ
 クター、例えば、組換え自己相補性（「自己相補的」という用語は、本明細書において互
 換的に使用することができる）ゲノムを含むものである。自己相補性ゲノムを有するA A
 Vウイルス粒子、および自己相補性A A Vゲノムの使用法は、米国特許第6, 596, 535号；
 同第7, 125, 717号；同第7, 465, 583号；同第7, 785, 888号；同第7, 790, 154号；同第7, 846, 729号；同第8, 093, 054号；
 および同第8, 361, 457号；ならびにWang Z.ら（2003年）Gene Ther 10: 2105~2111頁に記載されており、これらのそれぞれは、
 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。自己相補性ゲノムを含むr A A Vは、そ
 の部分的に相補性の配列（例えば、導入遺伝子の相補性コード鎖および非コード鎖）に基
 づき、二本鎖DNA分子を急速に形成する。一部の実施形態において、ベクターは、異種
 核酸をコードする第1の核酸配列、およびこの核酸の相補体（c o m p l e m e n t）を
 コードする第2の核酸配列を含み、ここで、第1の核酸配列は、その長さのほとんどまた
 は全てに沿って、第2の核酸と鎖内塩基対を形成することができる。

【0123】

一部の実施形態において、第1の異種核酸配列および第2の異種核酸配列は、変異型I
 T R（例えば、右I T R）によって連結されている。一部の実施形態において、I T Rは
 、ポリヌクレオチド配列5'-C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C
 T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C A C G C C C G G G C
 T T T G C C C G G G C G-3'（配列番号24）を含む。変異型I T Rは、末端分離配
 列を含むD領域の欠失を含む。結果として、A A Vウイルスゲノムの複製時に、repタ
 ンパク質は、ウイルスゲノムを変異型I T Rにおいて切断せず、そのため、5'から3'
 の順に次のものを含む組換えウイルスゲノムが、ウイルスキャプシドにパッケージングさ
 れる：A A V I T R、制御配列を含む第1の異種ポリヌクレオチド配列、変異型A A V

ITR、第1の異種ポリヌクレオチドとは逆の配向の第2の異種ポリヌクレオチド、および第3のAAV ITR。一部の実施形態において、scAAVベクターゲノムは、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、もしくは7.0 kbのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【0124】

IV. ウイルス粒子を産生する方法

本開示のある特定の態様は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを含有するAAV粒子を産生するための方法に関する。一部の実施形態において、本方法は、a) rAAV粒子を生成するような条件下において、i) AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする核酸、ならびにii) 約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbであるrAAVゲノムを含むAAV産生細胞株を培養する工程と；b) AAVヘルパー機能を提供する工程と；c) オーバーサイズrAAVゲノムを含有するrAAV粒子を回収する工程とを含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする安定に維持されている核酸を含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbである安定に維持されているrAAVゲノムを含んでいた。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする安定に維持されている核酸、ならびに約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbである安定に維持されているrAAVゲノムを含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている核酸を含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbである、細胞株ゲノムに安定に組み込まれているrAAVゲノムを含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする核酸、ならびに約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbである、細胞株ゲノムに安定に組み込まれているrAAVゲノムを含む。上述の実施形態の一部の実施形態では、rAAVゲノムは、長さが、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、7.1 kb、7.2 kb、7.3 kb、7.4 kb、7.5 kb、7.6 kb、7.7 kb、7.8 kb、7.9 kb、8.0 kb、8.1 kb、8.2 kb、8.3 kb、8.4 kb、8.5 kb、8.6 kb、8.7 kb、8.8 kb、8.9 kb、9.0 kb、9.2 kb、9.3 kb、もしくは9.4 kbのうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。一部の実施形態において、パッケージングされたAAVゲノムは、5'末端の短縮を含んでいなかった。一部の実施形態において、パッケージングされたAAVゲノムは、3'末端の短縮を含んでいなかった。

【0125】

本開示の他の態様は、オーバーサイズ組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムを含むAAV粒子を産生するための細胞株であって、a) AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする核酸と、b) 約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~6.7 kbであるrAAVゲノムとを含む、細胞株に関する。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする安定に維持されている核酸を含む。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約4.7 kb~約6.7 kbまたは約5.2 kb~約8.7 kbである、安定に維持されているrAAVゲノムを含んでいた。一部の実施形態において、AAV産生細胞株は、AAV rep 遺伝子およびcap 遺伝子をコードする安定に維持されている核酸、ならびに約4.7 kb~約9.4 kb、場合によっては約

4.7 kb ~ 約 6.7 kb または 約 5.2 kb ~ 約 8.7 kb である安定に維持されている rAAV ゲノムを含む。一部の実施形態において、AAV 産生細胞株は、AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子をコードする、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている核酸を含む。一部の実施形態において、AAV 産生細胞株は、約 4.7 kb ~ 約 9.4 kb、場合によっては約 4.7 kb ~ 約 6.7 kb または 約 5.2 kb ~ 約 8.7 kb である、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている rAAV ゲノムを含む。一部の実施形態において、AAV 産生細胞株は、AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子をコードする核酸、ならびに約 4.7 kb ~ 約 9.4 kb、場合によっては約 4.7 kb ~ 約 6.7 kb または 約 5.2 kb ~ 約 8.7 kb である、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている rAAV ゲノムを含む。一部の実施形態において、rAAV ゲノムは、長さが、およそ、5.0 kb、5.1 kb、5.2 kb、5.3 kb、5.4 kb、5.5 kb、5.6 kb、5.7 kb、5.8 kb、5.9 kb、6.0 kb、6.1 kb、6.2 kb、6.3 kb、6.4 kb、6.5 kb、6.6 kb、6.7 kb、6.8 kb、6.9 kb、7.0 kb、7.1 kb、7.2 kb、7.3 kb、7.4 kb、7.5 kb、7.6 kb、7.7 kb、7.8 kb、7.9 kb、8.0 kb、8.1 kb、8.2 kb、8.3 kb、8.4 kb、8.5 kb、8.6 kb、8.7 kb、8.8 kb、8.9 kb、9.0 kb、9.2 kb、9.3 kb、もしくは 9.4 kb のうちのいずれか、またはこれらの間の任意の値を上回る。

【0126】

トランスフェクション、安定な細胞株産生、ならびにアデノウイルス - AAV ハイブリッド、ヘルペスウイルス - AAV ハイブリッド (Conway, JE ら (1997 年) J. Virology 71 (11): 8780 ~ 8789 頁)、およびバキュロウイルス - AAV ハイブリッドを含む感染性ハイブリッドウイルス産生系を含む、rAAV ベクターの産生のための多数の方法が、当該技術分野で既知である。rAAV ウイルス粒子の産生のための rAAV 産生培養物はすべてが、1) 好適な宿主細胞、2) 好適なヘルパーウイルス機能、3) AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子ならびに遺伝子産物、4) 少なくとも 1 つの AAV ITR 配列 (例えば、オーバーサイズ rAAV ベクターゲノム) が隣接した核酸 (治療的核酸など)、ならびに 5) rAAV 産生を補助するのに好適な培地および培地成分を必要とする。一部の実施形態において、好適な宿主細胞は、霊長類宿主細胞である。一部の実施形態において、好適な宿主細胞は、HeLa 細胞、A549 細胞、293 細胞、または Perc.6 細胞などのヒト由来細胞株である。一部の実施形態において、好適なヘルパーウイルス機能は、野生型または変異体アデノウイルス (温度感受性アデノウイルスなど)、ヘルペスウイルス (HSV)、バキュロウイルス、またはヘルパー機能を提供するプラスミド構築物によって提供される。一部の実施形態において、AAV rep 遺伝子産物および cap 遺伝子産物は、任意の AAV 血清型に由来し得る。強制ではないが、一般には、AAV rep 遺伝子産物は、rep 遺伝子産物が rAAV ゲノムを複製し、パッケージングするように機能し得る限り、rAAV ベクターゲノムの ITR と同じ血清型のものである。当該技術分野で既知の好適な培地を、rAAV ベクターの産生に使用することができる。これらの培地としては、限定することなく、HyClone Laboratories および JRH 製の培地、例えば、変法イーグル培地 (MEM)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、米国特許第 6,566,118 号に記載のものなどの特注の配合物、および米国特許第 6,723,551 号に記載されている Sf-900 IISFM 培地が挙げられ、これらの文献のそれぞれは、特に、組換え AAV ベクターの産生において使用するための特注の培地配合物に関して、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、AAV ヘルパー機能は、アデノウイルスまたは HSV によって提供される。一部の実施形態において、AAV ヘルパー機能は、バキュロウイルスによって提供され、宿主細胞は、昆虫細胞 (例えば、スポドブレタ・フルギベルダ (Sf9) 細胞) である。

【0127】

rAAV 粒子を産生するための 1 つの方法は、トリプルトランスフェクション法である

。簡単に述べると、*rep* 遺伝子およびキャプシド遺伝子を含有するプラスミドを、ヘルパーアデノウイルスプラスミドとともに、細胞株（例えば、HEK-293細胞）にトランスフェクトしてもよく（例えば、リン酸カルシウム法を使用して）、ウイルスを、回収し、場合によっては精製してもよい。このように、一部の実施形態において、*rAAV* 粒子は、宿主細胞への、*rAAV* ベクターをコードする核酸、*AAV rep* および *cap* をコードする核酸、ならびに *AAV* ヘルパーウイルス機能をコードする核酸のトリプルトランスフェクションによって產生したが、この場合、宿主細胞への核酸のトランスフェクションにより、*rAAV* 粒子を產生することができる宿主細胞が生成される。

【0128】

一部の実施形態において、*rAAV* 粒子は、以下に提供される例示的な產生細胞株法などの產生細胞株法によって產生することができる（Martinら（2013年）*Human Gene Therapy Methods* 24:253~269頁；米国付与前公開第2004/0224411号；およびLiu, X. L.ら（1999年）*Gene Ther.* 6:293~299頁も参照されたい）。簡単に述べると、細胞株（例えば、HeLa細胞株、293細胞株、A549細胞株、またはPerC.6細胞株）に、*rep* 遺伝子、キャプシド遺伝子、およびプロモーター-異種核酸配列を含むオーバーサイズゲノムを含有するプラスミドを安定にトランスフェクトすることができる。細胞株をスクリーニングして、*rAAV* 產生のためのリードクローンを選択し、これを、次いで、產生バイオリアクターに展開し、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルスまたはHSV）を感染させて、*rAAV* 產生を開始させることができる。続いて、ウイルスを採取してもよく、アデノウイルスを不活性化（例えば、熱により）および/または除去してもよく、*rAAV* 粒子を精製してもよい。このように、一部の実施形態において、*rAAV* 粒子は、*rAAV* ベクターをコードする核酸、*AAV rep* および *cap* をコードする核酸、ならびに *AAV* ヘルパーウイルス機能をコードする核酸のうちの1つまたはそれ以上を含む、產生細胞株によって產生させた。本明細書に記載されるように、產生細胞株法は、トリプルトランスフェクション法と比較して、オーバーサイズゲノムを有する *rAAV* 粒子の產生に有利であり得る。

【0129】

一部の実施形態において、*AAV rep* 遺伝子および *cap* 遺伝子をコードする核酸ならびに/または *rAAV* ゲノムは、產生細胞株において安定に維持されている。一部の実施形態において、*AAV rep* 遺伝子および *cap* 遺伝子ならびに/または *rAAV* ゲノムをコードする核酸を、1つまたはそれ以上のプラスミドで細胞株に導入して、產生細胞株を生成する。一部の実施形態において、*AAV rep*、*AAV cap*、および *rAAV* ゲノムは、同じプラスミドで細胞に導入される。他の実施形態において、*AAV rep*、*AAV cap*、および *rAAV* ゲノムは、異なるプラスミドで細胞に導入される。一部の実施形態において、プラスミドが安定にトランスフェクトされている細胞株は、複数回の細胞株継代（例えば、5回、10回、20回、30回、40回、50回、または50回を上回る細胞の継代）にわたり、プラスミドを維持する。例えば、プラスミドは、細胞複製物として複製されるか、またはプラスミドは、細胞ゲノムに組み込まれる。プラスミドが細胞（例えば、ヒト細胞）において自律的に複製するのを可能にする様々な配列が、特定されている（例えば、Krysan, P. J.ら（1989年）*Mol. Cell Biol.* 9:1026~1033頁を参照されたい）。一部の実施形態において、プラスミドは、プラスミドを維持する細胞の選択を可能にする、選択的マーカー（例えば、抗生物質耐性マーカー）を含有し得る。哺乳動物細胞において一般的に使用される選択的マーカーとしては、限定することなく、プラストサイジン、G418、ハイグロマイシンB、zeocin、ピューロマイシン、およびこれらの誘導体が挙げられる。核酸を細胞に導入するための方法は、当該技術分野で既知であり、これらには、限定することなく、ウイルス形質導入、カチオン性トランスフェクション（例えば、DEAE-デキストランなどのカチオン性ポリマーまたはリポフェクタミンなどのカチオン性脂質を使用する）、リン酸カルシウムトランスフェクション、マイクロ注入、微粒子銃、電気泳動、な

10

20

30

40

50

らびにナノ粒子トランスフェクションが挙げられる（さらなる詳細については、例えば、Kim, T. K. および Eberwine, J. H. (2010年) Anal. Bioanal. Chem. 397: 3173 ~ 3178 頁を参照されたい）。

【0130】

一部の実施形態において、AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子をコードする核酸ならびに / または rAAV ゲノムは、産生細胞株のゲノムに安定に組み込まれている。一部の実施形態において、AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子ならびに / または rAAV ゲノムをコードする核酸を、1 つまたはそれ以上のプラスミドで細胞株に導入して、産生細胞株を生成する。一部の実施形態において、AAV rep、AAV cap、および rAAV ゲノムは、同じプラスミドで細胞に導入される。他の実施形態において、AAV rep、AAV cap、および rAAV ゲノムは、異なるプラスミドで細胞に導入される。一部の実施形態において、プラスミドは、プラスミドを維持する細胞の選択を可能にする、選択的マーカー（例えば、抗生物質耐性マーカー）を含有し得る。様々な宿主細胞株に核酸を安定に組み込むための方法は、当該技術分野で既知である（例えば、核酸の安定な組み込みによって作製される例示的な産生細胞株のより詳細な説明については、以下の実施例を参照されたい）。例えば、反復選択（例えば、選択的マーカーの使用を通じて）を、選択的マーカーを含有する核酸（AAV cap 遺伝子および rep 遺伝子ならびに / または rAAV ゲノム）が組み込まれている細胞を選択するために使用してもよい。他の実施形態において、核酸が、部位特異的方式で細胞株に組み込まれて、産生細胞株が生成される。FLP / FRT（例えば、O' Gorman, S. ら (1991年) Science 251: 1351 ~ 1355 頁）、Cre / loxP（例えば、Saue r, B. および Henderson, N. (1988年) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5166 ~ 5170 頁）、ならびに phi C31 - att（例えば、Groth, A. C. ら (2000年) Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 5995 ~ 6000 頁を参照されたい）など、いくつかの部位特異的組換え系が、当該技術分野で既知である。

【0131】

一部の実施形態において、産生細胞株は、霊長類細胞株（例えば、Vero 細胞株または FRhL - 2 細胞株などの非ヒト霊長類細胞株）に由来する。一部の実施形態において、細胞株は、ヒト細胞株に由来する。一部の実施形態において、産生細胞株は、HeLa 細胞、293 細胞、A549 細胞、または PERC. 6（登録商標）（Crucell）細胞に由来する。例えば、AAV rep 遺伝子および cap 遺伝子ならびに / またはオーバーサイズ rAAV ゲノムをコードする核酸を細胞株に導入ならびに / または安定に維持 / 組み込んで産生細胞株を生成する前、細胞株は、HeLa 細胞株、293 細胞株、A549 細胞株、もしくは PERC. 6（登録商標）（Crucell）細胞株、またはこれらの誘導体である。

【0132】

一部の実施形態において、産生細胞株は、懸濁液での増殖に適合されている。当該技術分野で既知のように、足場依存性細胞は、典型的に、マイクロ担体ビーズなどの基質なしに懸濁液で増殖することができない。細胞株を、懸濁液での増殖に適合させることには、例えば、攪拌パドルを使用してかき混ぜ培養で細胞株を増殖させること、集塊化を防止するためにカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを含まない培養培地（および場合によっては消泡剤）を使用すること、ケイ化合物でコーティングした培養容器を使用すること、ならびに各継代で培養物中（大きな集塊物中または容器の側面ではなく）の細胞を選択することが含まれる。さらなる説明については、例えば、ATCC のよくある質問文書（www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx で入手可能）およびその引例を参照されたい。

【0133】

一部の態様において、本明細書に開示される任意の rAAV 粒子を産生するための方法

であって、(a) rAAV粒子が産生される条件下で、(i)それぞれがAAV複製タンパク質および/またはキャプシド化タンパク質をコードする1つまたはそれ以上のAAVパッケージ遺伝子；(ii)少なくとも1つのAAV ITRが隣接した、本明細書に記載される異種核酸をコードする核酸を含むrAAVプロベクター、ならびに(iii)AAVヘルパー機能を含む、宿主細胞を培養する工程と；(b)宿主細胞によって産生されたrAAV粒子を回収する工程とを含む方法が、提供される。一部の実施形態において、この少なくとも1つのAAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型ITRなどからなる群から選択される。例えば、一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。ある特定の実施形態において、AAVの核酸は、AAV2 ITRを含む。一部の実施形態において、このキャプシド化タンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAVDJ、AAV2N587A、AAV2E548A、AAV2N708A、AAVV708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAV、もしくはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドタンパク質、またはこれらの変異体からなる群から選択される。一部の実施形態において、キャプシド化タンパク質は、チロシンキャプシド変異を有するAAV5キャプシドタンパク質を含む、AAV5キャプシドタンパク質である。一部の実施形態において、キャプシド化タンパク質は、チロシンキャプシド変異を有するAAV5キャプシドタンパク質を含む、AAV5キャプシドタンパク質であり、ITRは、AAV2 ITRである。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、クレードA~FのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む。一部の実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型1(AAV1)キャプシドを含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型2(AAV2)キャプシドを含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAVrh8Rキャプシドまたはその変異体を含む。一部の実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシド、ならびにAAV2 ITR、変異体AAV2 ITRを含む組換えゲノム、および治療的導入遺伝子/核酸をコードする核酸を含む。一部の実施形態において、AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型ITRである。ある特定の実施形態において、AAV ITRは、AAV2 ITRである。一部の実施形態において、ITRは、AAV2に由来し、キャプシドは、AAV2に由来する。一部の実施形態において、ITRは、AAV2に由来し、キャプシドは、AAVrh8Rに由来する。

【0134】

本発明の好適なrAAV産生培養培地には、血清または血清由来の組換えタンパク質が0.5%~20%(体積/体積または重量/体積)のレベルで補充される。あるいは、当該技術分野で既知のように、rAAVベクターは、血清不含条件において産生することができ、これは、動物由来産物不含培地とも称することができる。当業者であれば、rAAVベクターの産生を補助するように設計された市販または特注の培地にはまた、産生培養物におけるrAAVの力価を増加させるために、限定することなくグルコース、ビタミン類、アミノ酸、および/または成長因子を含む、当該技術分野で既知の1つまたはそれ以上の細胞培養成分が補充されることを、理解することができる。

【 0 1 3 5 】

r A A V 産生培養物は、特定の宿主細胞を利用するのに好適な様々な条件下（広い温度範囲にわたって、様々な長さの時間など）において増殖させることができる。当該技術分野で既知のように、r A A V 産生培養物は、例えば、ローラーボトル、中空繊維フィルター、マイクロ担体、および充填床もしくは流動床バイリアクターなどの好適な付着依存性容器で培養することができる、付着依存性培養物を含む。r A A V ベクター産生培養物はまた、例えば、かき混ぜフラスコ、攪拌槽バイリアクター、および Wave バッグ系などの使い捨て系を含む様々な手段で培養することができる、H e L a 細胞、2 9 3 細胞、および S F - 9 細胞などの懸濁液適合宿主細胞も含み得る。

【 0 1 3 6 】

本開示のある特定の態様は、オーバーサイズ r A A V ゲノムを含有する r A A V 粒子を回収する工程に関する。本発明の r A A V ベクター粒子は、産生培養物の宿主細胞の溶解によって、または産生培養物からの使用済み培養物の回収によって、r A A V 産生培養物から回収することができるが、ただし、米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 号により詳細に記載されているように、細胞を、無傷な細胞から培地中に r A A V 粒子を放出させるような当該技術分野で既知の条件下で培養することを条件とする。細胞を溶解させる好適な方法はまた、当該技術分野で既知であり、例えば、複数回の凍結 / 解凍サイクル、超音波処理、マイクロ流体化、ならびに界面活性剤および / またはプロテアーゼなどの化学物質での処理を含む。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態において、回収された A A V 粒子は、約 5 . 0 k b を上回る r A A V ゲノムを含有している。一部の実施形態において、回収された r A A V 粒子は、長さが、およそ、5 . 0 k b 、 5 . 1 k b 、 5 . 2 k b 、 5 . 3 k b 、 5 . 4 k b 、 5 . 5 k b 、 5 . 6 k b 、 5 . 7 k b 、 5 . 8 k b 、 5 . 9 k b 、 6 . 0 k b 、 6 . 1 k b 、 6 . 2 k b 、 6 . 3 k b 、 6 . 4 k b 、 6 . 5 k b 、 6 . 6 k b 、 6 . 7 k b 、 6 . 8 k b 、 6 . 9 k b 、 もしくは 7 . 0 k b 、 8 . 0 k b 、 もしくは 9 . 0 k b 、 またはこれらの間の任意の値を上回る、r A A ゲノムを含有する。一部の実施形態において、回収された r A A V 粒子は、約 5 . 0 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 7 . 0 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 6 . 5 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 6 . 0 k b 、 約 5 . 0 k b ~ 約 5 . 5 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 7 . 0 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 6 . 5 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 6 . 0 k b 、 約 5 . 2 k b ~ 約 5 . 5 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 7 . 0 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 6 . 5 k b 、 約 5 . 5 k b ~ 約 6 . 0 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 7 . 0 k b 、 約 6 . 0 k b ~ 約 6 . 5 k b 、 約 6 . 5 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 6 . 5 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 6 . 5 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 6 . 5 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 6 . 5 k b ~ 約 7 . 0 k b 、 約 7 . 0 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 7 . 0 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 7 . 0 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 7 . 0 k b ~ 約 7 . 5 k b 、 約 7 . 5 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 7 . 5 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 約 7 . 5 k b ~ 約 8 . 0 k b 、 約 8 . 0 k b ~ 約 9 . 0 k b 、 約 8 . 0 k b ~ 約 8 . 5 k b 、 または 約 8 . 5 k b ~ 約 9 . 0 k b のうちのいずれかの r A A V ゲノムを含有する。一部の実施形態において、回収された r A A V 粒子は、約 4 . 7 k b ~ 約 9 . 4 k b 、 場合によっては 約 4 . 7 k b ~ 約 6 . 7 k b または 約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 7 k b の r A A V ゲノムを含有する。

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間 ~ 約 9 6 時間で回収される。例えば、一部の実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間、約 6 0 時間、約 7 2 時間、約 8 4 時間、または約 9 6 時間で回収される。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約 4 8 時間

～約96時間、約48時間～約84時間、約48時間～約72時間、約48時間～約60時間、約60時間～約96時間、約60時間～約84時間、約60時間～約72時間、約72時間～約96時間、約72時間～約84時間、または約84時間～約96時間で回収される。

【0139】

さらなる実施形態において、rAAV粒子は、精製される。本明細書に使用される「精製された」という用語は、rAAV粒子が天然に生じるか場合または最初に調製される場合に存在する可能性のある他の成分のうちの少なくともいくつかを含まない、rAAV粒子の調製物を含意する。したがって、例えば、単離されたrAAV粒子は、それを富化するように精製技法を使用して、培養溶解物または産生培養上清などの原料混合物から調製することができる。富化は、例えば、溶液中に存在するDNase耐性粒子(DRP)もしくはゲノムコピー(gc)の比率によって、または感染力によってなど、様々な手段で測定することができるか、あるいは、富化は、原料混合物中に存在する第2の潜在的な干渉物質、例えば、産生培養混入物質またはプロセス内混入物質を含む混入物質、例えば、ヘルパーウイルス、培地成分などに関連して測定することもできる。

【0140】

一部の実施形態において、rAAV産生培養採取物は、宿主細胞片を取り除くために、浄化される。一部の実施形態において、産生培養採取物は、例えば、グレードDOHCのMillipore Millistak+ HC Pod Filter、グレードA1HCのMillipore Millistak+ HC Pod Filter、および0.2μmのFilter Opticap XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membraneフィルターを含む、一連のデプスフィルターを通じた濾過によって、浄化される。浄化は、遠心分離または当該技術分野で既知の細孔サイズが0.2μmもしくはそれ以上の任意の酢酸セルロースフィルターを通した濾過など、当該技術分野で既知の様々な他の標準的な技法によって達成することもできる。

【0141】

一部の実施形態において、rAAV産生培養採取物は、産生培養物中に存在する任意の高分子量DNAを消化するために、さらに、Benzonase(登録商標)で処理される。一部の実施形態において、Benzonase(登録商標)消化は、例えば、30分間～数時間の期間、周囲温度から37℃範囲の温度における最終濃度1～2.5単位/mlのBenzonase(登録商標)を含む、当該技術分野で既知の標準的な条件下において行われる。

【0142】

rAAV粒子は、以下の精製工程のうちの1つまたはそれ以上を使用して、単離または精製することができる：平衡遠心分離；フロースルーアニオン交換濾過；rAAV粒子を濃縮するためのタンジェント流濾過(TFF)；アパタイトクロマトグラフィーによるrAAV捕捉；ヘルパーウイルスの熱不活性化；疎水性相互作用クロマトグラフィーによるrAAV捕捉；サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による緩衝液交換；ナノ濾過；ならびにアニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、または親和性クロマトグラフィーによるrAAV捕捉。一部の実施形態において、精製は、1つまたはそれ以上のクロマトグラフィー工程(例えば、上述のクロマトグラフィー工程のうちの1つまたはそれ以上)を含む。これらの工程は、単独、様々な組合せ、または異なる順序で、使用することができる。一部の実施形態において、本方法は、以下に記載される順序ですべての工程を含む。rAAV粒子を精製するための方法は、例えば、Xiaoら(1998年)Journal of Virology 72:2224～2232頁；米国特許第6,989,264号および同第8,137,948号；ならびにWO2010/148143に見出される。

【0143】

一部の実施形態において、rAAV粒子は、医薬組成物中にある。一部の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、r A A V 粒子は、医薬上許容される賦形剤を含む医薬組成物中にある。当該技術分野で周知のように、医薬上許容される賦形剤は、薬理学的に有効な物質の投与を容易にする、比較的不活性な物質であり、液体の溶液もしくは懸濁液として、エマルジョンとして、または使用前に液体中に溶解もしくは懸濁するのに好適な固体形態として、提供することができる。例えば、賦形剤は、形状もしくは稠度をもたすか、または希釈剤として作用し得る。好適な賦形剤としては、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、オスモル濃度を変化させるための塩、封入剤、pH 緩衝物質、ならびに緩衝液が挙げられるがこれらに限定されない。このような賦形剤は、過度の毒性を伴わずに投与することができる、標的組織への送達に好適な任意の医薬用薬剤を含む。医薬上許容される賦形剤としては、ソルビトール、様々な T W E E N 化合物のうちのいずれか、ならびに水、生理食塩水、グリセリン、およびエタノールなどの液体が挙げられるがこれらに限定されない。医薬上許容される塩、例えば、塩酸酸、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などといった鉱酸塩；ならびに酢酸、プロピオン酸、マロン酸、安息香酸などの有機酸の塩が、中に含まれる。医薬上許容される賦形剤の詳細な考察は、R E M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S (M a c k P u b . C o . , N . J . 1 9 9 1 年) で入手可能である。

10

【 0 1 4 4 】

このような医薬上許容される担体は、水および油など、例えば、石油、動物、植物、もしくは合成起源のもの、例えば、ピーナツ油、ダイズ油、鉱油などといった、滅菌液体であってもよい。生理食塩水、ならびにデキストロース水溶液、ポリエチレングリコール (P E G) 水溶液、およびグリセリン水溶液もまた、特に注射用溶液のための液体担体として用いることができる。医薬組成物は、追加の成分、例えば、保存剤、緩衝液、等張剤、抗酸化剤および安定化剤、非イオン性湿潤剤または清澄剤、増粘剤などをさらにも含むことができる。本明細書に記載される医薬組成物は、単回単位剤形または複数回剤形でパッケージングすることができる。本組成物は、一般に、滅菌または実質的に等張性の溶液として製剤化される。

20

【 0 1 4 5 】

V . 治療の方法

一部の態様において、本発明は、疾患または障害の治療を、それを必要とする個体において行う方法であって、個体に、A A V 粒子を投与する工程を含む方法を提供する。A A V 粒子は、特定の目的組織に投与してもよく、または全身に投与してもよい。一部の実施形態において、有効量の A A V 粒子は、非経口投与される。非経口の投与経路としては、限定することなく、静脈内、骨内、動脈内、脳内、筋肉内、髄腔内、皮下、脳室内などを挙げることができる。一部の実施形態において、有効量の A A V 粒子は、1 つの投与経路を通じて投与してもよい。一部の実施形態において、有効量の A A V 粒子は、1 つを上回る投与経路の組合せを通じて投与してもよい。一部の実施形態において、個体は、哺乳動物である。一部の実施形態において、個体は、ヒトである。

30

【 0 1 4 6 】

オーバーサイズ A A V ゲノムを含む有効量の A A V 粒子は、治療の目的に応じて、投与される。例えば、低い割合の形質導入により、所望される治療効果を達成することができる場合、治療の目的は、概して、このレベルの形質導入を満たすか、それを上回ることである。一部の事例において、このレベルの形質導入は、所望される組織型の標的細胞のうちの約 1 ~ 5 % のみの形質導入、一部の実施形態では所望される組織型の細胞のうちの少なくとも約 2 0 % 、一部の実施形態では所望される組織型の細胞のうちの少なくとも約 5 0 % 、一部の実施形態では所望される組織型の細胞のうちの少なくとも約 8 0 % 、一部の実施形態では所望される組織型の細胞のうちの少なくとも約 9 5 % 、一部の実施形態では所望される組織型の細胞のうちの少なくとも約 9 9 % の形質導入によって達成することができる。指標として、1 回の注入で投与される粒子の数は、概して、約 1×10^6 ~ 約 1×10^{14} 個の粒子、約 1×10^7 ~ 1×10^{13} 個の粒子、約 1×10^9 ~ 1×10^{11} 個の粒子、または約 1×10^9 個の粒子、約 1×10^{10} 個の粒子、または約 1×10

40

50

¹ ¹ 個の粒子である。r A A V 組成物は、同じ治療の間に、または数日間、数週間、数カ月間、もしくは数年間の間を空けてのいずれかで、1 回またはそれ以上の投与で投与してもよい。本明細書に記載される投与経路のうちのいずれかの 1 つまたはそれ以上を使用することができる。一部の実施形態において、ヒトを治療するために、複数のベクターを使用してもよい。

【 0 1 4 7 】

A A V ウイルス粒子によって形質導入された細胞を特定するための方法は、当該技術分野で既知であり；例えば、免疫組織化学もしくは高感度緑色蛍光タンパク質などのマーカーの使用を、ウイルス粒子；例えば、アミノ酸の 1 つまたはそれ以上の置換を有する r A A V キャプシドを含むウイルス粒子の形質導入を検出するために用いてもよい。

10

【 0 1 4 8 】

一部の実施形態において、オーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V ウイルス粒子は、1 つを上回る位置に、同時または逐次的に投与される。一部の実施形態において、r A A V ウイルス粒子の複数回の注射は、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、9 時間、1 2 時間、または 2 4 時間以下で間が空いている。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態において、本発明は、個体における疾患または障害の治療の方法であって、オーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子を投与する工程を含み、オーバーサイズ A A V ゲノムは、疾患または障害の治療に好適な導入遺伝子を含む、方法を提供する。一部の実施形態において、本発明は、血友病 A を、第 V I I I 因子導入遺伝子（例えば、ヒト第 V I I I 因子導入遺伝子）をコードするオーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子で治療するための方法を提供する。一部の実施形態において、本発明は、筋ジストロフィーを、ジストロフィン導入遺伝子（例えば、ヒトジストロフィン導入遺伝子）をコードするオーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子で治療するための方法を提供する。一部の実施形態において、本発明は、ジスフェリン異常症を、ジスフェリン導入遺伝子（例えば、ヒトジスフェリン導入遺伝子）をコードするオーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子で治療するための方法を提供する。一部の実施形態において、本発明は、嚢性線維症を、C F T R 導入遺伝子（例えば、ヒト C F T R 導入遺伝子）をコードするオーバーサイズ A A V ゲノムを含む A A V 粒子で治療するための方法を提供する。本発明は、しかしながら、4 . 8 k b の A A V ベクターゲノムに適合するものを上回る導入遺伝子の発現を必要とする疾患または障害に限定されない。例えば、一部の実施形態において、本発明は、1 つまたはそれ以上の異種導入遺伝子を含む A A V ゲノムを含む A A V 粒子であって、異種導入遺伝子と制御因子（プロモーター、エンハンサー、イントロンなど）との組み合わせが、結果として約 5 . 0 k b を上回る A A V ゲノムをもたらす、A A V 粒子を提供する。

20

30

【 0 1 5 0 】

V I . キット

一部の実施形態において、本発明は、本発明のオーバーサイズゲノムを含む A A V 粒子を含む、キットを含む。一部の実施形態において、キットは、r A A V 粒子の組成物の送達（例えば、非経口投与）のためのデバイスをさらに含む。一部の実施形態において、使用のための指示書には、本明細書に記載されている方法のうちの 1 つによる指示書が含まれる。一部の実施形態において、指示書は、容器に提供される（例えば、貼り付けられる）ラベルに印刷されている。一部の実施形態において、使用のための指示書には、疾患または障害の治療のための指示書が含まれる。

40

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態において、キットは、単一の流体（例えば、有効量のベクターを含む医薬上許容される流体）を含む。一部の実施形態において、キットは、2 つ以上の流体を含む。流体としては、希釈剤、緩衝液、賦形剤、または本明細書に記載されるかもしくは当該技術分野で既知の本開示の A A V 粒子の送達、希釈、安定化、緩衝化、もしくはそれ以外では輸送に好適な任意の他の液体を挙げることができる。一部の実施形態において、系

50

は、1つまたはそれ以上の緩衝液、例えば、pH緩衝水溶液を含む。緩衝液の例としては、限定することなく、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、T r i s 緩衝液、H E P E S 緩衝液、および任意の他の有機酸緩衝液を挙げることができる。

【0152】

一部の実施形態において、キットは、容器を含む。好適な容器としては、例えば、バイアル、バッグ、シリンジ、およびボトルを挙げることができる。容器は、ガラス、金属、またはプラスチックなど、1種類またはそれ以上の物質でできていてもよい。一部の実施形態において、容器は、本開示のr A A V 組成物を保持するために使用される。一部の実施形態において、容器は、流体および/または他の治療剤も保持し得る。

【実施例】

【0153】

本発明は、以下の実施例に言及することにより十分に理解されるであろう。しかしこれらは、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載される実施例および実施形態は例示のためだけのものであり、その観点から当業者は各種改変または変更を思いつくものであり、各種改変または変更が、本出願の意図および趣旨ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。

【実施例1】

【0154】

5 . 1 k b および 5 . 4 k b のオーバーサイズF V I I I ベクターを有する産生細胞株の生成

先に論じられたように、収量が大きく、産物が均一でゲノムの質が高い、オーバーサイズのゲノムを有するr A A V ベクターを産生することができるプラットフォームが必要とされている。本実施例では、大きい構築物（例えば5 k b 超）を含むゲノムを有するr A A V ベクターを産生するのに特に有利な、産生細胞株（P C L）プラットフォームの生成について記載する。

【0155】

方法

5 . 1 および 5 . 4 k b のオーバーサイズF V I I I ベクター用のp T P プラスミドの構築

F V I I I 発現カセットを、p U C 5 7 ベースのプラスミドにおいて生成させた。F V I I I 発現カセットは、マウストランスチレチン（m T T R）プロモーター（C o s t a , R H ら、M o l C e l l B i o l 1 9 8 6 , 6 : 4 6 9 7 ~ 4 7 0 8 頁）（1 0 0 b p エンハンサー配列有りおよび無しの2 0 2 b p コア配列）、ハイブリッドイントロン（J i a n g , H . ら、B l o o d 2 0 0 6 1 0 8 : 1 0 7 ~ 1 1 5 頁）、コドン最適化されたヒトB - ドメイン欠失F V I I I c D N A、合成またはB G H ポリA、およびr A A V 2 逆位末端反復配列からなるものであった。これらは、5 . 1 ~ 5 . 4 k b の範囲のベクターゲノムサイズを有するr A A V ベクターを生成した（図1 A）。

【0156】

F V I I I 発現カセットを有するプラスミドベクターを、正常なC 5 7 B L / 6 マウスに大量注射することにより、インピボでのF V I I I 産生について試験した。A A V r h 8 R / 5 . 1 k b F V I I I ベクター用の産生細胞株（P C L）を生成するため、T r i p l e P l a y プラスミド、p A F T G E N - S E A P - c a p r h 8 R を B g l I I で消化し、平滑末端化させた。隣接する5 ' および3 ' A A V 2 I T R を有するF V I I I ベクターゲノムを、P v u I およびS a p I 部位を使用して、p U C 5 7 - m T T R - h F V I I I c o (p I T R - m T T R - h F V I I I S Q c o - S p A) から切り取った。P v u I / S a p I で平滑末端化された5 . 5 k b フラグメントをT r i p l e P l a y プラスミドにライゲーションし、5 . 1 k b のF V I I I ベクターおよびA A V r h 8 R c a p 遺伝子を有するプラスミドを生成させた。A A V 8 c a p 遺伝子を含む同様の構築物を生成させた。合成ポリA領域をウシ成長ホルモン（B G H）ポリAで置換することにより、A A V r h 8 R c a p 遺伝子および5 . 4 k b ベクターを有するT r i p l

10

20

30

40

50

e P l a y プラスミドを作製した。生じたカナマイシン抵抗性クローンを H u h 7 細胞にトランスフェクトし、F V I I I タンパク質産生について試験した。

【 0 1 5 7 】

標準的な E L I S A アッセイによる、培地での F V I I I レベルの定量化により、選択された T r i p l e P l a y プラスミドからの F V I I I 産生を確認した。選択された T r i p l e P l a y プラスミド (p T G E N / A A V r h 8 R / m T T R h F V I I I または p T G E N / A A V 8 / m T T R h F V I I I) からの r A A V ベクター生成について、293細胞に p A d h e l p e r をコトランスフェクションすることによって試験した。細胞ライセートを収集し、F V I I I プライマー/プローブによる q P C R を行って、パッケージングされたゲノムの量を定量化した。

10

【 0 1 5 8 】

本明細書で提示する実施例で使用されるプライマーおよびプローブを表 1 に記載する。

【 0 1 5 9 】

5 . 1 k b および 5 . 4 k b の F V I I I ベクター用の産生細胞株の生成

プラスミド p T G E N / A A V r h 8 R / m T T R - h F V I I I (5 . 1 または 5 . 4 k b ベクターを有する) またはプラスミド p T G E N / A A V 8 / m T T R - h F V I I I を、リポフェクタミンおよび P l u s 試薬を用いて H e L a S 3 細胞にトランスフェクトした。細胞を 6 0 × 9 6 ウェルプレートにプレーティングし、プレートを毎週洗浄および給餌した。選択後、コロニーの増殖についてプレートを採点した。マスターウェル (M W) を収集して 2 4 ウェルディッシュに移し、サイズに基づいて 2 4 ウェルディッシュに収集した。

20

【 0 1 6 0 】

次いで、相対的産生 (R P) スクリーニングのため、マスターウェルを 9 6 ウェルプレートにプレーティングし、次いで、R P スクリーニングからベクター産生について陽性であった M W を、例えば q P C R によるベクター産生により、固有産生 (s p e c i f i c p r o d u c t i o n) (S P) レベルについて試験した (M a r t i n , J . ら、2013 Hum . G e n e T h e r . M e t h . 2 4 : 2 5 3 ~ 2 6 9 頁) 。

【 0 1 6 1 】

5 . 1 k b および 5 . 4 k b の F V I I I ベクターを有する産生細胞株のゲノム DNA の特徴

30

各配列に特異的なプライマーおよびプローブを使用する q P C R により、ベクター、r e p およびピューロマイシン配列のコピー数についてゲノム DNA を分析した。さらに、組み込まれた「T r i p l e P l a y」プラスミドのサイズおよび完全性をサザンブロットにより分析した。これに関しては、ゲノム DNA を S p e I (T r i p l e P l a y プラスミドにおけるシングルカッター) で消化して、組み込まれた T r i p l e P l a y プラスミドのサイズを決定し、また、B g l I I / H i n c I I で消化して、ベクター発現カセットの完全性を探った。B g l I I / H i n c I I 消化により m T T R プロモーター内が切断され、F V I I I c DNA および合成ポリ A が 1 . 8 および 2 . 8 k b のフラグメントを生成する。消化されたゲノム DNA および T r i p l e P l a y プラスミド (ゲノム DNA にスパイクとして加えて、コピー数およびサイズマーカーとして使用される) を 0 . 8 % アガロースゲルで泳動した。DNA をナイロン膜に転写し、D I G 標識 F V I I I N c o I フラグメントでプローブした。

40

【 0 1 6 2 】

産生細胞株からの A A V / m T T R - h F V I I I ベクター産生の特徴

選択された M W を、r A A V ベクター産生について分析した。比較のため、プラスミド p U C 5 7 - m T T R - h F V I I I c o を 2 9 3 細胞にトランスフェクトすることによるトリプルトランスフェクション産生法で、5 . 1 および 5 . 4 k b の F V I I I ベクターを作製した。細胞を収集、溶解させ、産生細胞株法と同様に精製を行った。両方法由来のサンプルを q P C R によりベクターゲノムコピーについて定量化し、ウイルス回収率および収量を算出した。キャプシドの S D S - P A G E 分析、A U C 分析により、パッケー

50

ジグザグされたゲノムサイズについてベクターロットを特徴付けた（以下を参照のこと）。

【0163】

産生細胞株から生成された rAAV/mTTR-hFVIIII ベクターゲノムの特徴
以下の通り、パッケージングされたベクターゲノム (VG) を、精製されたキャプシドから抽出した。ウイルスを DNA 分解酵素 110U (Promega) とともに 37 で 1 時間インキュベートした。EDTA を添加して消化を停止させ、その後、N-ラウリルサルコシルの存在下で、50 で 45 分間、プロテイナーゼ K で消化させながらインキュベートした。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で DNA を 2 回抽出し、14,000 rpm、4 で 10 分間遠心処理した。温度 -80 で 1 時間、100% エタノールおよび 3 M 酢酸ナトリウムで DNA を沈殿させ、1 時間遠心処理した。DNA およびペレットを TE 中で再懸濁させた。

10

【0164】

サザン分析のため、30 mM NaOH および 1 mM EDTA からなる泳動緩衝液中で、1% アルカリゲル電気泳動によりゲノムを分離した。Hybond 膜 (Amersham) にサンプルを転写および架橋結合させ、FVIIII 発現カセットに特異的な各種フラグメントでプローブした。これらは、C2 を除く FVIIII ドメイン全てを含む、4.0 kb NheI-XcmI フラグメントを含んでいた。さらに、各種 25~30 mer の鎖に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用した。より大きいプローブは AlkPhos Direct Labeling システム (Amersham) で標識した。製造業者の説明書に従い DIG Oligo 3'-End Labeling Kit (Roche) を使用して、オリゴヌクレオチドプローブを 3' 末端で標識した。

20

【0165】

DNA ドットプロット分析のため、VG を 100 で 5 分間加熱することにより TE 緩衝液 pH 7.0 中で変性させ、その後 5 分間氷上で冷却し、マルチチャンネルピペットを使用してナイロン膜に手でアプライした。UV 架橋結合により DNA を膜に固定した。各 DIG 標識オリゴヌクレオチドプローブについて、Easy Hyb 緩衝液中で、50 で 6 時間ハイブリダイゼーションを実施し、その後、高ストリンジェンシー洗浄、ブロッキングステップ (30 分間)、アルカリホスファターゼ結合抗 DIG Fab フラグメントによる検出 (30 分間)、さらなる洗浄、CDP-Star 基質との反応 (5 分間) および 3'-End labeling kit 説明書 (Roche) に従っての X 線フィルムへの曝露を行った。Image J ソフトウェア (rsb.info.nih.gov/ij) で入手可能) を使用して、サザンプロットおよびドットプロットでのシグナル密度を定量化した。

30

【0166】

【表 1】

表 1. プライマーおよびプローブ

摘要	配列	配列番号
FVIII ベクターゲノム定量化		
FVIII A1-フォワードプライマー	GACGTGGTGCGCTTCGA	5
FVIII A1-リバースプライマー	GGGCGTAATCCCAGTCCTCT	6
FVIII A1 プローブ	AAGCGTGGCCAAGAAGCACCCC	7
アンピシリン ^R 遺伝子定量化		
Amp-フォワードプライマー	GTTGCCATTGCTACAGGCATC	8
Amp-リバースプライマー	ACTCGCCTTGATCGTTGGG	9
Amp-プローブ	FAM-ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC-TAMRA	10
ピューロマイシン ^R 遺伝子定量化		
ピューロマイシン-フォワードプライマー	GGACCGCCACATCGAGC	11
ピューロマイシン-リバースプライマー	CCCCGCTTCGACGCT	12
ピューロマイシン-プローブ	FAM-TCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCAC-TAMRA	13
Rep 遺伝子定量化		
Rep-フォワードプライマー	GACCAGGCCTCATACATCTCCTT	14
Rep-リバースプライマー	GGCAGCCTTGATTTGGGA	15
Rep-プローブ	FAM-AATGCGGCCTCCAACCTCGCG-TAMRA	16
E6 遺伝子定量化		
E6-フォワードプライマー	CAACACGGCGACCCTACAA	17
E6-リバースプライマー	TCCAATACTGTCTTGCAATATACACAGG	18
E6-プローブ	FAM-TGCACGGAACCTGAACACTTCACTGCAAG-TAMRA	19
ベクターゲノム分析		
Oligo#4768 (+)	CCGTCGTGAATAGCCTGGACCCTC	20
Oligo#4924 (+)	ATCTGTGTGTGGTTTTTGTGTGCGGC	21
Oligo#3342 (-)	AATCCCAGTCCTCTTCCTCGGCGCGATA	22
Oligo#4900 (-)	AGTATCGGAACACTCGCTCTACGAAATGT	23

【 0 1 6 7 】

インビボで産生細胞株から生成された AAV/mTTR-hFVIIIベクターの評価
 rAAVベクターを、8~12週齢の、オスの血友病A KOマウス(C56BL/6
 、129S-F8^{tm1Kaz} [エクソン16にneo遺伝子]) (Jackson Laboratories) で評価した。ベクター(4、10および30×10¹⁰ DRP
 /マウス)を、尾静脈から静脈内経路で投与した。後眼窩洞(retro-orbital
 sinus)から血液をクエン酸ナトリウム試験管に回収し、分析まで血漿を凍結保

10

20

30

40

50

存した。製造業者のプロトコール（96ウェルの様式に改変）に従い、Coatestアッセイ（Dipharma）を使用して、FVII活性レベルについて血漿サンプルを分析した。値を正常血漿中に存在するFVII活性%として測定し、ng/ml（FVII100% = FVII150ng/ml）に変換した。一部のサンプルは、部分トロンボプラスチン時間（PTT、IDEXX）についても試験した。基準として、プールされた正常なヒト血漿（Innovative Research）を使用する、標準的なELISA（Enzyme Research Laboratories）によりFVIITANパク質レベルを定量化した。

【0168】

各研究終了時に肝臓サンプルを回収した。 -メルカプトエタノール10μlおよび1 / 4インチのジルコニア1mmビーズを加えたRLTplus1mL中で、肝臓（50～400mg）をビーズビーター-16でホモジナイズした。ホモジネートの一部をトリゾール（RNAの場合）またはDNA Stat-60（DNAの場合）に入れた。Trimegaのプロトコールを使用してRNAを精製し、その後、製造業者に従いスピンカラム（Promega Z3100）で精製した。RNAをヌクレアーゼ不含の水で溶出させ、15,000×gで1分間遠心処理した。RNAを使用してcDNA（Invitrogen）を生成させた。製造業者の説明書に従って、DNA抽出PureLinkカラム（Invitrogen）によりDNAを精製した。次いで、cDNAおよびDNA両方を使用して、FVIIA2領域に特異的なプライマーおよびプローブ（表1）を使用するqPCRにより、それぞれFVIImRNAおよびベクターゲノムコピーを定量化した。

【0169】

結果

オーバーサイズrAAVベクター産生用のPCLプラットフォームを生成するため、FVIIを発現させるための新規のカセットを構築した。これらのカセットはAAV ITRと隣接しており、5.1～5.4kbベクターゲノムの範囲であった（図1A）。各カセットはmTTRプロモーター由来のプロモーターを含んでおり、発現に対する効果を試験するため様々なmTTRバリエーションが構築された（図1Bで与えるバリエーションのアライメントおよび説明を参照のこと）。

【0170】

マウスにおいてインビボで試験したところ、プラスミドにおけるこれらの発現カセットは全てFVIIを産生した（図1C）。図1Aおよび1Bに示す、HNF3およびHNF4結合部位の改変により、コアmTTRプロモーター（「202」）を上回ってFVII産生が増加したが、mTTRエンハンサーおよびBGHポリAなどのさらなる改変では増加しなかった（図1C）。図1DはFVII発現カセットの略図を示す。図1EはTriple Playプラスミドの設計を示す。

【0171】

コアmTTRを有する発現カセット（5.1kb）、ならびにエンハンサー、mTTRおよびBGHポリAを有する発現カセット（5.4kb）を、それぞれについてTriple Playプラスミドを生成させた後、PCLによるオーバーサイズFVIIベクター産生についてのその後の試験に使用した。FVIIのELISA結果から、トランスフェクトされたTriple Play / FVIIプラスミドが、HuH7細胞にトランスフェクトされると、インビトロでFVIIを産生することが確認された。FVIIプラスミドは、小規模パッケージング実験でもrAAVを生成することができた。

【0172】

要約すれば、インビボで、コアmTTRプロモーターからの発現を増加させるmTTRプロモーター改変が生成された。全てのTriple PlayプラスミドがインビトロでFVIIを発現し、小規模パッケージング実験でウイルスを生成することができた。

【0173】

オーバーサイズ5.1kb mTTR - FVIIベクターを有する産生細胞株を生成

するため、rAAVrh8R/FVIIII産生レベルについてMWを分析した。これらのうち、高産生株、中産生株、および低産生株を特定した。したがって、オーバーサイズrAAV/mTTR-FVIIIIベクター用のPCLを生成させることができることが示された。

【実施例2】

【0174】

mTTR-FVIIIIベクターを有する産生細胞株のゲノムDNAの特徴

TriplePlayプラスミドの組み込まれたコピー、および実施例1に記載されるFVIIII発現カセットの完全性を評価するため、AAVrh8R/5.1kb、AAVrh8R/5.4kb、またはAAV8/5.1kb FVIIIIベクターを含むMWをゲノムDNA分析用に選択した。

【0175】

高産生MW(MW#35)では、サザン分析により、細胞株ゲノム中のベクターが約50コピーであったことが明らかとなり、中産生MW#272は、サザンによりそれぞれ10コピー未満を有していた(図2A)。

【0176】

mTTR-FVIIIIを有するAAVrh8R/5.1kb、AAVrh8R/5.4kbまたはAAV8/5.1kbの産生について、高産生および中産生MWをqPCRでも分析した(表2)。FVIIII、repおよびpuroR遺伝子のコピー数を、それぞれに特異的なプライマー/プローブを使用して決定し、コピー数を、HeLaS3細胞に存在するE6遺伝子(HeLaS3ゲノムあたり11コピー)に正規化した。高産生MW(MW#35)では、qPCR分析により、ベクター、repおよびピューロマイシンが約59~67コピーであった(表2)ことが明らかとなり、中産生MW#272では、qPCRによりそれぞれ15~18コピーを有していた(表2)。これらの値は、サザンで得られた結果と比較してわずかに高かったが、同様の順位を有していた(図2A)。比較のため、SEAPを発現する通常のサイズのベクター(4.3kb)をAAV2またはAAV8キャプシドにパッケージングして分析した。

【0177】

【表2】

表2.組み込まれたTriplePlayプラスミドのコピーについての、選択されたMWのゲノム分析。

細胞株	マスターウェル	コピー/細胞			産生レベル
		FVIII (stdev)	REP (stdev)	ピューロ マイシン (stdev)	
AAVrh8R/FVIII 5.1kb	MW#35	67 (2)	65 (0)	59 (1)	H
AAVrh8R/FVIII 5.1kb	MW#272	15	16	18	M
AAVrh8R/FVIII 5.1kb	MW#418	229	195	260	H
AAVrh8R/FVIII 5.4kb	MW#61	235 (13)	256 (1)	196 (12)	M
AAVrh8R/FVIII 5.4kb	MW#163	253 (40)	265 (1)	237 (5)	H
AAV8/FVIII 5.1kb	MW#287	270 (38)	294 (6)	266 (13)	H
AAV8/FVIII 5.1kb	MW#342	101 (5)	126 (2)	108 (4)	H
AAVrh8R/FVIIIOpt 5.1KB	MW#14	1362 (48)	1499 (22)	1343 (42)	H
AAVrh8R/FVIIIOpt 5.1KB	MW#27	77 (4)	82 (3)	73 (73)	M
AAV2/SEAP	対照 (MW#156 SEAP)	0	73 (1)	70 (2)	H
	HeLaS3	0	0	0	

【0178】

Triple Play / FV III プラスミドを 1 回だけ切断すると予測される制限酵素 (Spe I) で消化されたゲノム DNA のサザンブロット分析により、ゲノム DNA にスパイクとして加えた直鎖状 Triple Play / FV III プラスミドと同様に泳動された約 13 kb のバンドの生成が示された。したがって、全てのクローンが、HeLa S3 ゲノムに組み込まれたプラスミド全体を含んでいた。

【0179】

図 2 A に示すように、全ての MW が、組込み部位に隣接するゲノム DNA を表す、様々なサイズの低コピー (1 コピー) バンドも有していた。272 (中産生株) および 35 (高産生株) は、組込み部位が 1 つ (隣接フラグメントが 2 つだけ観察された) であることを示すパターンを有していたが、MW 418 は、複数の隣接フラグメント、ならびに組み込まれたプラスミドのフォワードおよびリバース方向のタンデムを表す可能性のあるより大きい (約 $2 \times 14 = 24 \text{ kb}$) フラグメントを有していた。このことは、複数の組込みパターンとともに、MW 418 がクロンの混合物であったことを示唆している。

【0180】

図 2 B に示すように、FV III 発現カセット内を切断する酵素 (Hinc II、Bgl II) で消化することにより、FV III ベクターゲノムの完全性を分析した。対照と比較して、元の Triple Play プラスミドを消化することで得られた同様の結果に基づき、適切なサイズフラグメントが観察された。これらの結果は、組込みの際、ベクターの再構成が発生しないことを実証した。5.4 kb ベクターを有する産生細胞株、および AAV8 キャプシドを伴う 5.1 kb ベクターを有する産生細胞株について同様の分析を行い、同等の結果を得た。要約すれば、組み込まれた 5.1 または 5.4 kb ベクター配列における再構成または欠失は、産生細胞株から単離されたゲノム DNA では観察されなかった。このことは、オーバーサイズ AAV ベクターゲノムを含む産生細胞株の生成が実行可能であることを示した。

【実施例 3】

【0181】

産生細胞株を使用してのオーバーサイズベクター産生、およびベクター分析

次に、上記の MW35 細胞株を使用して、rAAV ベクター産生について試験した。AAVrh8R / 5.1 kb FV III ベクターの高産生クローン (MW35) を、小規模培養物における rAAV ベクター産生について試験した。rAAV 産生ピークは 3 日目および 4 日目に見られ、培養スケールアップ中、高い産生レベルが維持された (図 3 A) 。

【0182】

このことは、以下の表 3 に示す結果でさらに実証された。MW # 35 による産生をスケールアップしてベクター産生レベルを比較した。さらに、細胞ペレット (細胞) および培養培地 (CM) におけるベクターレベルを定量化した。比較のため、通常のサイズの AAV2 / SEAP ベクターについて示す。

【0183】

【表 3】

表 3. MW#35 による AAVrh8R/5.1kb ベクター産生。

FVIII MW#35	SP: VG/ml	細胞 (%)	CM (%)
20 ml (4×10^6 細胞)	2.41×10^{10}	39	61
250 ml (5×10^7 細胞)	2.64×10^{10}	45	55
1000 ml (2×10^8 細胞)	3.17×10^{10}	35	64
MW156 (SEAP): 20 mls	4.15×10^{10}	NT	NT

【0184】

使用したベクター血清型では、細胞ペレットおよび培養培地でベクターが等しく検出された。MW 35および418はともに、数回の継代にわたって安定であった。MW 35は、継代数5～継代数20にかけて高レベルの産生 (1×10^{10} DRP/ml以上)を維持した(図3B)。同様に、MW 418(中産生株に分類される)は、継代数5～継代数21にかけて安定な中レベルの産生 (1×10^9 drp/ml以上)を維持した。異なるキャプシド血清型(AAV8)を有する5.1kbベクターを生成するMW 287についても、安定なベクター産生が実証された(図3B)。

【0185】

これらのデータは、以前に通常のサイズのベクターで示されたもの(Martin, J.ら(2013) Molecular Therapy 21:2205~2216頁)と同様に、キャプシド血清型とは無関係に、オーバーサイズベクターから高く安定な産生が得られることを実証している。5.4kb mTTR-FVIIIベクターを有するPCL、およびAAV8キャプシドを伴う5.1kbベクターを有するPCLでも強力なベクター産生が得られ、同等の結果を生じた。

【0186】

次に、高産生マスターウェル(AAVrh8R/5.1kb FVIIIのMW#35、AAV8/5.1kb FVIIIのMW#287、およびAAVrh8R/5.4kb FVIIIのMW#163)を使用するベクター産生をスケールアップし、ベクターの収量および質を評価した(表4および図4A)。ベクター産生を、トリプルトランスフェクション法により生成されたベクターと比較した(表4および図4B)。PCL3種およびTXN2種のロットをAAVrh8R/5.1kb FVIIIベクターの比較に含めた。例として、5.1kbゲノムを有するAAVrh8Rキャプシドのデータを示す。

【0187】

【表4】

表4.PCLまたはトリプルトランスフェクション法により生成されたAAVrh8R/5.1kb FVIIIベクターの比較。

分析	産生細胞株	トリプルトランスフェクション
細胞/産生	2×10^9 細胞	3×10^9 細胞
総ベクター収量	2×10^{14} DRP	6×10^{13} DRP
収量/細胞	1×10^5 DRP/細胞	2×10^4 DRP/細胞
VGを含むウイルス%	44-50 %	24-30 %
VG>4.7kbのウイルス%	59-61 %	43-50 %

【0188】

AUC分析で評価したところ、MW 35によるPCL産生実行によって、一貫性のある産物プロファイルが生じた(図4A)。上記表4に要約するように、この分析で決定された、ベクターゲノムを含むキャプシドのパーセンテージは、PCLにより生成されたウイルスでは44~50%であり、トリプルトランスフェクション物質はより小さいレベルを有していた(30%；大きい骨格のベクタープラスミドであるHLP19ではわずか1~5%)。さらに、PCLにより生成された物質中には、より大きいゲノム(4.7kb以上)を有するウイルスがより高い割合で存在していた。ベクター収量/細胞は、高産生PCLで 1×10^5 DRP/細胞、TXNで $1 \sim 3 \times 10^4$ DRP/細胞であった(HLP19および大きいベクター骨格ではより小さく、 1×10^3 DRP/細胞)。

【0189】

【表 5】

表 5. PCL またはトリプルトランスフェクション法により生成された AAVrh8R/5.4kb FVIII ベクターの比較。

分析	産生細胞株	トリプルトランスフェクション
細胞/産生	2×10^9 細胞	2×10^9 細胞
総ベクター収量(粗収量)	2×10^{13} DRP	2×10^{14} DRP
収量/細胞	2×10^4 DRP/細胞	7×10^4 DRP/細胞
VGを含むウイルス%	24 %	23 %
VG>4.7kbのウイルス% _s	68 %	39 %

10

【0190】

MW163を使用する、5.4kbベクターについての同様の分析により、トリプルトランスフェクションと比較して、PCLによるDRP/細胞レベルがわずかに小さいことが示された(上記の表5)。VGを含むキャプシドの総パーセンテージは同等であったが、PCLにより生成されたウイルスは、より大きいゲノムを有するウイルスをより高いレベルで有していた(図5B)。

【0191】

PCL物質およびトリプルトランスフェクション物質をAUC分析により特徴付けると、トリプルトランスフェクション物質(図5B)と比較して、PCL物質ではより大きいゲノムの割合が2倍大きかった(図5A)。

20

【0192】

【表 6】

表 6. PCL およびトリプルトランスフェクションにより産生されたベクター中の異常なパッケージングの分析。

PCLによるベクター	ベクター力価(DRP/ml)		
	FVIII	ピューロマイシン	%ピューロマイシン
AAVrh8R/5.1-FVIII	1.2E+12	5.40E+09	0.44
AAVrh8R/5.4-FVIII	7.6E+12	1.54E+10	0.20
AAV8/5.1-FVIII	5.1E+12	1.21E+10	0.24

TXNによるベクター	FVIII	アンピシリン	%アンピシリン
AAVrh8R/5.1-FVIII	2.3E+13	4.76E+11	2.10
AAVrh8R/5.4-FVIII	1.6E+13	5.38E+11	3.40
AAVrh8R/FVIII 4.6kb	1.2E+13	2.47E+11	2.00

30

【0193】

パッケージングされたウイルス中の、プラスミド由来の抗生物質抵抗性遺伝子(PCLではピューロマイシン、TXNではアンピシリン)の存在により測定される、異常な望ましくないDNAパッケージングのレベルは、PCLにより生成されたウイルスでは低かった(1%未満)(表6)。対照的に、TXNにより生成されたウイルスは、異常なパッケージングを約10倍高いレベルで有していた。

40

【0194】

要約すれば、選択された産生細胞株が、オーバーサイズベクターを高レベルで生成可能であることがデータにより示された(100,000DRP/細胞超)。さらに、これらの細胞株は、製造のための大規模スケールアップに必要なベクター産生能力を、数回の継代(20超)にわたって維持していた。PCLにより産生されたベクターを、標準的なトリプルトランスフェクション方法により生成されたベクターと比較すると、PCL物質は

50

、ウイルスを含むベクターゲノムをより多く、また、野生型サイズまたはより大きいベクターゲノムをより高い割合で含み、さらに望ましくない非ベクター関連DNAをより少なく含むことが示された。

【実施例 4】

【0195】

PCLにより産生されたオーバーサイズベクター中の、パッケージングされたベクターゲノムの特徴

次に、PCLプラットフォームにより産生されたオーバーサイズrAAVベクター中の、キャプシド化されたベクターゲノムを分析した。精製されたピリオンからベクターゲノムを単離し、アルカリゲル電気泳動で一本鎖ゲノムサイズについて分析し、その後、ベクターに特異的なプローブを使用してサザンブロット分析を行った(図6A)。FVIIII発現カセットの4.0 kbフラグメントでプローブしたサザンブロットにより、いずれの方法でも、生成されたベクター中のVGサイズの大部分が、約4.6 kbまたはそれよりも大きいことが示された(図6B)。ImageJソフトウェア(<http://rsb.info.nih.gov/ij>)を使用して、サザンブロットでのシグナル密度を定量化した。

【0196】

鎖特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによってもVGを分析し、欠失した5'末端の割合を定量化した。AAVゲノムのパッケージングは、3'末端から開始して起こることが知られている(King, J. A.ら(2001)EMBO J. 20:3282~3291頁)ため、ゲノムサイズが4.7 kbを上回る場合、オーバーサイズベクターはマイナスおよびプラス鎖の5'末端の配列を欠いている可能性がある。図4Aおよび4Bで使用されたベクターロットを、各ベクターの2倍段階希釈液を膜にアプラインすることで(2.4×10^9 から開始; 計8回ベクター濃度を減少させ、さらに陰性対照としてゲノム無しのもをアプラインする)分析した。ベクターゲノム(プラスまたはマイナスの向き)の3'または5'末端に特異的な3'末端標識オリゴヌクレオチドプローブで各ブロットをハイブリダイズした。シグナル強度を定量化し、4.6 kbベクター(完全にパッケージングされたもの)に正規化した。濃度3つを使用して標準誤差を生成させた。

【0197】

4.7 kbを超える領域に相補的なオリゴヌクレオチドを両方の向きの一本鎖ゲノムに使用すると、完全にパッケージングされた4.6 kbベクター(FVIIIIのC1ドメインをコードする領域を除き、5.1 kbベクターと同等の配列を有する)と比較して、5.1 kbベクターはより小さいシグナル強度を有することがデータにより示された(図7Aおよび7Bおよび7C)。この差は、使用された5'プローブのほとんどで、PCLベクターと比較してトリプルトランスフェクトによる物質でより大きかった。

【0198】

PCLおよびトリプルトランスフェクションにより生成されたベクターの5'末端における差が、+または-鎖に相補的なオリゴヌクレオチドプローブでサザンブロットをプローブした場合でも観察された。各3'末端からの各オリゴヌクレオチドプローブの距離を示す(図8A)。まず、PCLおよびトリプルトランスフェクション(TXN)により生成されたウイルスが等しく検出されるかについて、鎖特異的なオリゴヌクレオチドプローブによるDNAドットブロット分析で比較し、これにより各鎖で各ウイルス量が同等であることが示された(4.6 kbウイルスを、完全にパッケージングされたウイルスについての対照として使用した; FIXおよびFVIIIIを含むプラスミドを、検出特異性についての陰性および陽性対照として使用した)(図8B)。3'末端に対するオリゴヌクレオチドプローブでサザンブロットをプローブすると、PCLおよびTXNにより生成されたウイルスはともに、+および-鎖の存在を実証した(図8C、左パネル)。図6Aで示された観察結果と同様に、PCLウイルスで、4.6 kbより大きいベクターゲノムがより高いレベルで検出された。5'末端に特異的なオリゴヌクレオチドでサザンブロットを

プローブすると、PCLベクターは、4.6 kbより大きいパッケージングされたゲノムの存在を示したが、トリプルトランスフェクションにより生成されたウイルスは、これらのより大きいゲノムのシグナルを明らかに欠いていることを示した（使用されたプローブは、3'末端から4.9 kbの領域を検出した）（図8C）。サザンプロット（3'末端に対するプローブを使用）における各種サイズのパッケージングされたゲノムのシグナル強度を定量化することによっても、4.7 kbよりも大きいゲノムがより高い割合で確認された（図8D）。定量化により、TXNベクターと比較して、PCLベクターではフラグメント化されたより小さいゲノム（4.7 kb未満）がより少ないことも示された。

【0199】

次に発明者らは、同様の方法で、PCLおよびTXNにより生成された5.4 kb FVIIベクターのベクターゲノムパッケージングを評価した。5.4 kbゲノムの各3'末端からの、各オリゴヌクレオチドプローブに対する相補的配列の位置を示す（図9A）。5.1 kbベクターでの結果と同様に、5.4 kbベクターの+および-鎖が、ゲノムの3'末端に対するオリゴヌクレオチドプローブと同等のレベルで検出された（図9B）。しかし、TXN法により生成されたベクターでは、3'末端から4.7 kbよりも遠くに位置する領域に特異的なプローブはゲノムを検出しなかった（図9C）。対照的に、PCL法により生成されたベクターは、4.7 kbよりも大きい（しかし5.4 kbほど大きくはない）ゲノムの存在を示した。

【0200】

要約すれば、TXN法と比較して、PCL法により生成されたベクターでは、より大きいベクターゲノムパッケージングがより高いレベルで存在することがデータにより実証された。

【実施例5】

【0201】

オーバーサイズrAAV/mTTR-FVIIベクターのインビボでの効能

次に、PCLプラットフォームにより産生されたオーバーサイズrAAVベクターを、インビボでの効能について試験した。ベクターを、マウスに尾静脈から 3×10^{11} および 4×10^{10} DRP/マウスで投与し、56日目まで分析した。PCLにより産生されたAAVrh8R/5.1 kb mTTR-FVIIベクターは、治療された血友病A

KOマウスの血漿中で、検出可能な活性FVIIタンパク質を用量反応様式で生成した（図10A）。Coatest活性アッセイに加え、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイを使用して、凝固時間による機能についてもFVII活性を評価した。このアッセイにより、試験された低用量および高用量で凝固時間が同等であったことが示され、したがって、臨床的に意義のある低用量が、血友病A KOマウスでの凝固時間を正規化するのに十分であることが示された（図10B）。

【0202】

次いで、臨床的に意義のあるベクター用量（ 2×10^{12} DRP/kg、 4×10^{10} DRP/マウス）を使用して、PCLにより生成されたベクターをトリプルトランスフェクションにより産生されたベクターと比較した。ベクターを、血友病A KOマウスに尾静脈から投与した。Coatest活性アッセイにより決定したところ、PCLにより生成されたウイルスは、TXNにより産生されたウイルスよりも活性なFVIIタンパク質を産生した（図11A）。このことは、PCLにより生成されたベクターでは、aPTTアッセイによる21日目の凝固時間が有意により短かったこととも相関していた（図11B）。56日目のPCLおよびTXN物質間ではほとんど差が観察されず、PCL物質がより迅速な発現動態をもたらしたことが示唆される（図11C）。肝臓ベクターゲノムコピーの定量化により、PCLにより生成されたベクターで治療された動物では、TXN物質で観察されたものよりもベクターゲノムが持続することが示された（図11D）。

【0203】

PCLおよびTXNにより生成された、より大きい5.4 kb FVIIベクターについても、血友病Aノックアウトマウスで試験した。5.1 kbベクターと同様に、PCL

Lにより生成された5.4 kbベクターは、24日目に、Coatestアッセイでより高いFVIII活性、およびより短い凝固時間を示した(図12A、B)。肝臓におけるベクターゲノムレベルの動態を分析するため、ベクター投与から3日および43日後の両方でベクターゲノムコピーを定量化した。両日ともに、PCLにより生成されたベクターで治療された動物では、TXN物質で治療された動物と比較して約2倍のベクターゲノムが存在していたことがデータにより実証された(図12C)。

【0204】

要約すれば、血友病A KO疾患モデルにおいてインビボで試験すると、PCL法により生成されたオーバーサイズrAAV/mTTR-FVIIIベクターは、TXN法と比較して2倍高いFVIII活性およびより短い凝固時間をもたらした。これらの結果は、治療された動物の肝臓に存在する、持続するベクターゲノムが2倍高いレベルであったことと相関していた。したがって、これらの結果は、オーバーサイズrAAVベクターのベクター産生方法2つの間で、パッケージングされたゲノムの質において観察された差は、PCLにより生成されたベクターのインビボでの効力がより高いことを意味し、これらの差は、標的器官における転写的に活性なベクターゲノムの生成効率が増大したことに基づくことを実証している。

【実施例6】

【0205】

オーバーサイズ5.1、5.9、および6.7 kb SEAPベクターを有する産生細胞株の生成

方法：5.1 kbから5.9および6.7 kbの範囲のベクターサイズ(図13Aを参照のこと)で段階的に増加させつつ、オーバーサイズAAV2-SEAPベクターゲノムを生成させた。3種類の長さ(0.8、1.6および2.4 kb)のAATスタッファーDNAフラグメントを、AAVsp70プラスミドを鋳型として使用するPCRで増幅させ、各スタッファーフラグメントを、AAV2 capおよびrep遺伝子ならびに各SEAPベクターゲノムを有するTriple Playプラスミドにクローニングして、一連のpAF-SEAPプラスミドを生成させた。

【0206】

オーバーサイズSEAPベクター用の細胞株を生成させるため、ベクターゲノムならびにAAV2 repおよびcap遺伝子を含む対応するプラスミドを、24ウェルハイスルーブット分析的トランスフェクションで、高産生細胞株を生成する能力について並行して比較した。HeLaS3細胞のT75フラスコ2組に、標準的なプロトコールに準拠して各構築物をトランスフェクトした。トランスフェクション翌日、トランスフェクション1回につき8×24ウェルプレートに75,000細胞/ウェルを播種し、薬物選択を開始した。相対的産生能スクリーニングの準備として、サンプルを培養し、コロニーサイズおよびコンフルエンスについて評価した。

【0207】

結果：まず、5.1、5.9および6.7 kbオーバーサイズベクタープラスミド(図13A)を、HeLaS3細胞(+wtAd5)への一過性トランスフェクションによるパッケージングについて確認した。結果により、各プラスミドがベクターパッケージングを促進することが示された(データは示さない)。

【0208】

相対的産生スクリーニングで、各構築物についてマスターウェル約100~170個をスクリーニングした。相対的産生スクリーニングで、陽性マスターウェル(1×10^7 DRP/ml超を産生)パーセントは全体的に高く(80%超)、6.7 kb構築物のみが量の減少を示した(65.7%)。さらに、5.1 kb構築物のみが、高い(1×10^{10} DRP/ml超)範囲で産生するマスターウェルを生じた(合計で3つ)が、全ての場合で、中~高い範囲(1×10^9 DRP/ml超)で産生するマスターウェルが特定された。中~高のパーセンテージは予期されたパターンに従い、5.1 kbで20%、5.9 kbで15.4%および6.7 kbで10.7%であった。

【0209】

次いで、より高産生のマスターウェル全てに、固有産生能についての分析を行った。2回の固有産生能スクリーニングの結果を図13B（灰色および白いバー）に示し、各マスターウェルでの相対的産生能値（黒いバー）と比較した。結果により、多くの場合で、ベクター収量が固有産生能スクリーニングにおいて安定なままであることが示された。

【0210】

要約すれば、少なくとも6.7kbサイズのベクター用の産生細胞株が生成可能であることがデータにより実証された。

【0211】

配列

10

別途注記されない限り、ポリペプチド配列は全てN末端～C末端で提示される。

【0212】

別途注記されない限り、核酸配列は全て5'～3'で提示される。

mTTR202 - HI - hFVIIICo - spA (5097bp)

GAGCTCTTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
CTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTT
TGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG
GGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTACGCGTGTCT
TGTCCTGCAACATTTCTGTAGAGCGAGTGTTCTCGATACTCTAA
TCTCCCTTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTTATT
CTCCTTTTGTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGT
TTGGAGTCAAGCTTGGCAGGGGATCAGCAGCCTGGGTTTGGAA
GGAGGGGGTATAAAGCCCCCTTCAACAGGAGAAAGCCGTCAC
CACAGATCCACAAGCTCCTGTAGCAGGTAAGTGCCGTGT
GTGGTTTCCCGCGGGCCTGGGCTCTTTACGGGTTATGGCCCC
TTGCGTGCCTTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTTTC
TTTTTCTCCACAGGTATCGATTCTCTAGAGCCACCATGCA
GATCGAGCTGTCTACCTGTCTTCTTCTGTGCTGTGCGG
TTCTGTCTTCAGCGCCACCCAGACGGTACTATCTGGGCGCCG
TGGAACCTGAGCTGGGACTACATGCAAGAGCGACCTGGGCGA
GCTGCCCGTGGATGCCAGATTCCCTCCAAGAGTGCCCAAG
AGCTTCCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTAACAAGAAAACCC
TGTTCTGTGGAATTCACCGACCCACCTGTTCATAATCGCCAA
GCCCCAGACCCCCCTGGATGGGCTGTGCTGGGACCTACAATT
CAGGCCGAGGTGTACGACACCGTCTGTGATCACCTTGAAAG
ACATGGCCAGCCACCCCGTGTCTCTGCATGCCGTGGGAGT
GTCCTACTGGAAGGCCCTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGAT
CAGACCAGCCAGCGCGAGAAAGAGGACGACAAAGGTGTTCC
CTGGCGGGCAGCCACACCTACGTGTGGCAGGTGCTGAAAGA
AAACGGCCCCCATGGCCTCCGACCCCTCTGTGCTGTGACATAC
AGCTACCTGAGCCACGTGGACCTCGTGAAAGGACCTGAACA
GCGGCCCTGATCGGAGCCCTGTCTGTGTAGAGAGGGCAG
CCTGGCCCAAAGAGAAACCCAGACCCCTGCACAAAGTTTCATC
CTGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGGACA
GCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACGCCGC
CTCTGTCTAGAGCCTGGCCCCAAATGCACACCGTGAAACGGC
TACGTGAACAGAAAGCCTGCCCGGACTGATCGGCTGCCACC
GGAAGTCTGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCAACCAC
CCCTGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGACACACCTTT
CTCGTGC GGAAACCACCGGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGCC

20

30

40

50

CTATCACCTTCTGTGACCGCCAGACACTGTGTGATGGACCT
GGGCCAGTTTCTGTGTCTGTCCACATCAGCTCCCCACCAAG
CACGACGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCC
CCGAGGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGGAAGC
CGAGGACTACGACGACGACCTGTACCGACAGCGAGATGGAC
GTGGTGCCTTCTGACGACGATAACAGCCCCAGCTTTCATCC
AGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGT
GCACTATATCGCCGCGCGAGGAAGAGGACTGGGATTACGCC
CCTCTGGTGTGTGCCCCCGACGACAGAAAGCTACAAAGAGCC
AGTACCTGAACAATGGCCCCCAGCGGATCGGCCGGAAGTA 10
TAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCAGACGAGACATTC
AAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGG
GCCCTCTGTGTATGGCGAAGTGGGCGACACCCTGTGTAT
CATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCCTACAAACATCTAC
CCTCACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTACTCCAGAA
GGCTGCCCAAGGGCGTGAACAACCTGAAGGACTTCCCCAT
CCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGGTGACC
GTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCCGAGATGCCCTGA
CACGGTACTACAGCAGCTTCTGTGAACATGGAACGGGACCT
GGCCTCCGGCCTGATTGGCCCCACTGTGTATCTGTCTACAAA 20
GAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACA
AGCGGAACGTGATCCTGTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCG
GTCCTGGTATCTGACCGAGAAATATCCAGCGGTTCCTGCC
AACCCCTGCCGCGGTGCAGCTGTGAAGATCCTGAGTTCCAGG
CCTCCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTCGA
CAGCCTGCAAGCTGAGCGTGTGCTGCAAGAGGTGGCCTAC
TGGTACATCCTGAGCATCGGGGGCCCCAGACCGACTTCTCTGT
CCGTGTCTTCTCTCCGGCTACACCCTTCAAGCACAAAGATGGT
GTACGAGGATACCCTGACCCCTGTTCCTTTAGCGGGCGAA
ACCGTGTTCATGAGCATGGAAACAACCCCGGCCTGTGGATCC 30
TGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGGAAACAGAGGCATGAC
CGCCCTGTGTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGC
GACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACC
TGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCCAGAAGCTTTCAG
CCAGAACCCTCCCGTGTGTGAAGCGGCAACCAGAGAGAGATC
ACCCGGACCAACCCTGCAGTCCGACCAAGGAAGAGATCGATT
ACGACGACACCATCAGCGTGGAAATGAAGAAAGAAAGATTT
CGACATCTACGACGAGGACGAGAAACCAGAGCCCCCGGTCC
TTTCAGAAAAAGACCCGGGCACTACTTCAATTGCCGCTGTGG 40
AACGGCTGTGTGGGACTACGGCATGAGCAGCAGCCCTCACGT
GCTGAGAAACAGGGGCCAGAGCGGCAAGCGTGGCCCCAGTTT
AAGAAAGTGGTGTTCAGGAATTCACAGACGGCAGCTTCA
CCCAGCCTCTGTACCGCGGCGAGCTGAATGAGCACCTGGG
ACTGCTGGGGCCCCCTATATCAGAGCCGAAGTGGAAAGATAAT
ATCATGGTCACTTCCGGAAATCAGGCCCTCCCGGCCCTACA
GCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAAGAG
ACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAAGAACTTCGTGAAGCCCCAAC
GAGACTAAGACCTACTTTTGGAAAGGTGCAGCACCAACATGG
CCCCCTACAAAGGACGAGTTTCGACTGCAAGGCCTGGGGCTA 50
CTTCTCCGATGTGGACCTGGAAAGGACGTGCACCTCTGGG

CTGATCGGGCCCCCTGCTCGTGTTGCCACACCAACACCCCTGA
ATCCCGCCCCACGGCAGACAAGTGACAGTGACAGGAATTTCGC
CCTGTTCTTTCACCATCTTTCGACGAAACAAGAGCTGGGTAC
TTCACCGAAAACATGGAAAGAAACTGCCCGGGCTCCCTGCA
ACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAAAGAGAACTACCG
GTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCC
GGCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATCCGGTGGTATC
TGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAAACATCCACAGCATCCA
CTTCAGCGGGCCACGTGTTTCACCGTGCAGGAAAAAGAAAGAG
TACAAAAATGGCCCCGTGTACAACCTGTACCCCTGGGGTGTTCG
AGACAGTGGAAATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCG
GGTGGAAATGTCTGATCGGCGAGCATCTGCACGCTGGGATG
AGCACACTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACAC
CTCTGGGCAATGGCCTCTGGCCACATCCGGGACTTTTCAGAT
CACAGCCAGCGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAAACTG
GCCAGACTGCCTACAGCGGCCAGCATCAACGCCCTGGTCCA
CCAAAGAGCCCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGC
TCCCATGATCATCCACGGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGA
CAGAAAGTTTCAGCAGCCCTGTACATCAGCCAGTTTCATCATCA
TGTACAGCCTGGACGGCAAGAAAGTGGCAGACCTACCGGGG
CAATAGCACCCGGCACCCCTGATGGTGTCTTTCGGCAACGTG
GACTCCAGCGGCCATTAAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCA
TCATTGCCCGGTACATCCGGGCTGCACCCCACTTACAG
CATCCGGTCCACCCCTGAGAAATGGAACCTGATGGGCTGCGAC
CTGAACCTCCTGCAGCATGCCCCCTGGGGATGGAAAGCAAGG
CCATCTCCGACGCCCAGATCACCGCCTCCAGCTACTTTCAC
CAACATGTTTCGCCACCTGGTCCCCATCCAAGGCCCGGGCTG
CATCTGCAGGGGCAAGAAAGCAATGCTTGGAGGGCCCCAAGTGA
ACAACCCCCAAAGAAATGGCTGCAAGGTGGACTTCCAGAAAAAC
CATGAAAGTGACCGGCGGTGACCAACCCAGGGCGTGAAAGTCT
CTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCTCTGATCTCCA
GCAGCCAGGACGGCCACCCAGTGGACCCCTGTTTTTCCAGAA
CGGCAAAAGTGAAAGTGTTTTCAGGGGAACCAAGGACTCCTTC
ACCCCCGTCGTGAATAGCCTGGACCCCTCCACTGCTGACCA
GATACCTGCGGATCCACCCCTCAGAGTTGGGTGCACCCAGAT
TGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGGGATGCGAGGGCCCAGGAC
CTGTACTGACACTAGTAATAAAGATCAGAGCTGTAGAGA
TCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCGGCCGGTACCAGGAAC
CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG
CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAAGGTGCCCCGACGC
CCGGGCTTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
GCAGAGAGGGAGTGGCC (配列番号1)

mTTR202opt

TGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACT
CTAATCTCCCGGGGCAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACT
TATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAAATCAGC
AGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTT
GGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCCTTCAACCAGGAGAAAGCC
GTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGC (配列番号2)

mTTR482opt

CTACCTGCTGATCGCCCCGGCCCCCTGTTCAAACATGTCCTA
 ATACTCTGTGCGGGGCAAGGTCGGCAGTAGTTTTCATCT
 TACTCAACATCCTCCCAGTGTAAGTAGGATCCTGTCTGTCT
 TGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTAATCTC
 CCGGGGCAAGGTCGTATTGACTTAGGTTACTTATTCTCTC
 TTTTGTGTGACTAAGTCAATAATCAGGAATCAGCAGGTTTGG
 AGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTGGGAAGGAG
 GGGGTATAAAAGCCCCCTTCACCAAGGAGAAGCCGTCACACA
 GATCCACAAGCTCCTGCTAGC (配列番号3)

10

pTGENcaprh8R-ITRmTTRFVIIII(AAVrh8Rキャプシドおよ
 び5.1kb ITR-mTTR-hFVIIIIcoを有するTriplePlayブラ
 スミド)13524bp

GAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTTGTTTATTGCAGCTTAT
 AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTTCACAA
 ATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCT
 CAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTAG
 AACTAGGAATTTCGCTAGCGGTACCGATATCCTAGTGGATC
 CCGCGTACACAGGAAGTGACAAATTTTCGCGCGGTTTTAGG
 CGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGTAAGATTT
 GGGTGGTCAACGCTGGGTATTTAAGCCCCGAGTGAGCACGCA
 GGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCG
 CCATGCCCGGGGTTTACGAGATTGTGATTAAAGGTCCCCAG
 CGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTT
 GTGAACCTGGGTGGCCGAGAAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAG
 ATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCCACCCCT
 GACCGTGGCCGAGAAAGCTGCAAGCGCGACTTTCTGACGGAA
 TGGCGCCCGTGTGAGTAAGGCCCCCGGAGGCCCTTTTCTTTG
 TGCAATTTGAGAAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGT
 GCTCGTGGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTGTGGGA
 CGTTTCTCTGAGTCAAGATTTCGCGAAAAACTGATTTCAGAGAA
 TTTACCGCGGGGATCGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTTCGC
 GGTCACAAAGACCAGAAATGGCGCCCGGAGGCGGGGAACAAG
 GTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCA
 AAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGA
 ACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTA
 CCGGTGGTGGCGCAGCATCTGACGCGACGTGTCGCAGACGC
 AGGAGCAGAACAAAGAGAAATCAGAAATCCCAATTCTGATGC
 GCCGGTGGATCAGATCAAAAACTTTCAGCCAGGTACATGGAG
 CTGGTCTGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCAGGAGA
 AGCAGTGGATCCAGGAGGACCAAGGCCCTCATACATCTCCTT
 CAATGCGGCCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAAATCAAGGCTGCC
 TTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAAACCG
 CCCCCGACTACCTGGTGGGCGCAGCCCGTGGAGGACAT
 TTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGG
 TACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGG
 CCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTT
 TGGGCTTGCAACTACCGGGAAAGACCAACATCGCGGAGGCC

20

30

40

50

A T A G C C C A C A C T G T G C C C T T C T A C G G G T G C G T A A A C T G G A
C C A A T G A G A A C T T T C C C T T C A A C G A C T G T G T C G A C A A G A T
G G T G A T C T G G T G G G A G G A G G G G A A G A T G A C C G C C A A G G T C
G T G G A G T C G G C C A A A G C C A T T C T C G G A G G A A G C A A G G T G C
G C G T G G A C C A G A A A T G C A A G T C C T C G G C C C A G A T A G A C C C
G A C T C C C G T G A T C G T C A C C T C C A A C A C C A A C A T G T G C G C C
G T G A T T G A C G G G A A C T C A A C G A C C T T C G A A C A C C A G C A G C
C G T T G C A A G A C C G G A T G T T C A A A T T T G A A C T C A C C C G C C G
T C T G G A T C A T G A C T T T G G G A A G G T C A C C A A G C A G G A A G T C
A A A G A C T T T T T C C G G T G G G C A A A G G A T C A C G T G G T T G A G G
T G G A G C A T G A A T T C T A C G T C A A A A A G G G T G G A G C C A A G A A
A A G A C C C G C C C C C A G T G A C G C A G A T A T A A G T G A G C C C A A A
C G G G T G C G C G A G T C A G T T G C G C A G C C A T C G A C G T C A G A C G
C G G A A G C T T C G A T C A A C T A C G C A G A C A G G T A C C A A A A C A A
A T G T T C T C G T C A C G T G G G C A T G A A T C T G A T G C T G T T T C C C
T G C A G A C A A T G C G A G A G A A T G A A T C A G A A T T C A A A T A T C T
G C T T C A C T C A C G G A C A G A A A G A C T G T T T A G A G T G C T T T C C
C G T G T C A G A A T C T C A A C C C G T T T C T G T C G T C A A A A A G G C G
T A T C A G A A A C T G T G C T A C A T T C A T C A T A T C A T G G G A A A G G
T G C C A G A C G C T T G C A C T G C C T G C G A T C T G G T C A A T G T G G A
T T T G G A T G A C T G C A T C T T T G A A C A A T A A A T G A T T T A A A T C
A G G T A T G G C T G C C G A T G G T T A T C T T C C A G A T T G G C T C G A G
G A C A A C C T C T C T G A G G G C A T T C G C G A G T G G T G G G A C C T G A
A A C C T G G A G C C C C G A A A C C C A A A G C C A A C C A G C A A A A G C A
G G A C G A C G G C C G G G G T C T G G T G C T T C C T G G C T A C A A G T A C
C T C G G A C C C T T C A A C G G A C T C G A C A A G G G G G A G C C C G T C A
A C G C G G C G G A C G C A G C G G C C C T C G A G C A C G A C A A G G C C T A
C G A C C A G C A G C T C A A A G C G G G T G A C A A T C C G T A C C T G C G G
T A T A A C C A C G C C G A C G C C G A G T T T C A G G A G C G T C T G C A A G
A A G A T A C G T C T T T T G G G G G C A A C C T C G G G C G A G C A G T C T T
C C A G G C C A A G A A G C G G G T T C T C G A A C C T C T C G G T C T G G T T
G A G G A A G G C G C T A A G A C G G C T C C T G G A A A G A A G A G A C C G G
T A G A G C A G T C A C C C C A A G A A C C A G A C T C A T C C T C G G G C A T
C G G C A A A T C A G G C C A G C A G C C C G C T A A A A A G A G A C T C A A T
T T T G G T C A G A C T G G C G A C T C A G A G T C A G T C C C C G A C C C A C
A A C C T C T C G G A G A A C C T C C A G A A G C C C C C T C A G G T C T G G G
A C C T A A T A C A A T G G C T T C A G G C G G T G G C G C T C C A A T G G C A
G A C A A T A A C G A A G G C G C C G A C G G A G T G G G T A A T T C C T C G G
G A A A T T G G C A T T G C G A T T C C A C A T G G C T G G G G G A C A G A G T
C A T C A C C A C C A G C A C C C G A A C C T G G G C A T T G C C C A C C T A C
A A C A A C C A C C T C T A C A A G C A A A T C T C C A A T G G A A C A T C G G
G A G G A A G C A C C A A C G A C A A C A C C T A C T T T G G C T A C A G C A C
C C C C T G G G G G T A T T T T G A C T T C A A C A G A T T C C A C T G C C A C
T T C T C A C C A C G T G A C T G G C A G C G A C T C A T C A A C A A C A A C T
G G G G A T T C C G G C C A A A G A G A C T C A A C T T C A A G C T G T T C A A
C A T C C A G G T C A A G G A G G T T A C G A C G A A C G A A G G C A C C A A G
A C C A T C G C C A A T A A C C T T A C C A G C A C C G T C C A G G T C T T T A
C G G A C T C G G A G T A C C A G C T A C C G T A C G T C C T A G G C T C T G C
C C A C C A A G G A T G C C T G C C A C C G T T T C C T G C A G A C G T C T T C
A T G G T T C C T C A G T A C G G C T A C C T G A C G C T C A A C A A T G G A A

10

20

30

40

50

GTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTTCTACTGTCTGGAATA
CTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACCTTTTCAG
TTCAGCTACACTTTTCGAGGACGTGCCCTTTCACAGCAGCT
ACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACTGATGAACCCCTT
CATCGACCAGTACCTATACTACCTGGTCAGAACACAGACA
ACTGGAACCTGGGGGAACTCAAACCTTTGGGCATTTCAGCCAAG
CAGGCCCTAGCTCAATGGCCAATCAGGCTAGAAACTGGGT
ACCCGGGGCCTTGCTACCGTTCAGCAGCGCGTCTCCACAACC
ACCAACC AAAATAACAACAGCAACTTTGCGTGGACGGGAG
CTGCTAAATTCAAGCTGAACGGGAGAGACTCGCTAATGAA
TCCTGGCGTGCGCTATGGCATCGCACAAAGACGACGAGGAC
CGCTTCTTTCCATCAAGTGGCGTTCTCATATTTGGCAAGC
AAGGAGCCGGGAACGATGGAGTTCGACTACAGCCAGGTGCT
GATTACAGATGAGGAAGAAATTAAGCCACCAACCCTGT
GCCACAGAGGAATACGGAGCAGTGGCCATCAACAACCAAGG
CCGCTAACACGCAAGGCGCAAACTGGACTTGTGCATAACCA
GGGAGTTATTCTCTGGTATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTG
TACCTGCAAGGGCCCTATTTGGGCTAAAAATACCTCACACAG
ATGGCAACTTTTCACCCGTCTCTCTCTGATGGGTGGATTTGG
ACTGAAACACCCACCTCCACAGATTCTAATTA AAAAATACA
CCAGTGCCGGCAGATCCTCCTCTTACCTTCAATCAAGCCA
AGCTGAACCTCTTTTCATCACGCAGTACAGCACGGGACAAGT
CAGCGTGGAAATCGAGTGGGAGCTGCAAGAAAGAAAACAGC
AAGCGCTGGAATCCAGAGATCCAGTATACTTCAAACCTACT
ACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCGAAGG
TGTTTACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGTACTCGTTACCTC
ACCCGTAAATTTGTAATTGCTGTAAATCAATAAACCGGTT
AATTCGTTTTCAGTTGAACCTTTGGTCTCTGCGGGCCGGCCT
TAATTAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAA
CCGTAAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG
ACCTTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA
TCTCAGTTTCGGTGTAAGGTCTGTTCTGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTAT
CCGGTAACCTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGTAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTTGAAGT
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGAACAGTATTTGG
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCAACCGCTGGTA
GCGGTGGTTTTTTTGTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
GGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGA
TTTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTTCACCTAGAT
CCTTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCGAGAAACGGTGCTGA
CCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAAGGG
AAAAACGCAAGCGCAAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGG

10

20

30

40

50

G C T T A C A T G G C G A T A G C T A G A C T G G G C G G T T T T A T G G A C A
G C A A G C G A A C C G G A A T T G C C A G C T G G G G C G C C C T C T G G T A
A G G T T G G G A A G C C C T G C A A A G T A A A C T G G A T G G C T T T C T T
G C C G C C A A G G A T C T G A T G G C G C A G G G G A T C A A G A T C C G A T
C A A G A G A C A G G A T G A G G A T C G T T T C G C A T G A T T G A A C A A G
A T G G A T T G C A C G C A G G T T C T C C G G C C G C T T G G G T G G A G A G
G C T A T T C G G C T A T G A C T G G G C A C A A C A G A C A A T C G G C T G C
T C T G A T G C C G C C G T G T T C C G G C T G T C A G C G C A G G G G C G C C
T G G T T C T T T T T G T C A A G A C C G A C C T G T C C G G T G C C C T G A A
T G A A C T G C A A G A C G A G G C A G C G C G G C T A T C G T G G C T G G C C 10
A C G A C G G G C G T T C C T T G C G C A G C T G T G C T C G A C G T T G T C A
C T G A A G C G G G A A G G G A C T G G C T G C T A T T G G G C G A A G T G C C
G G G G C A G G A T C T C C T G T C A T C T C A C C T T G C T C C T G C C G A G
A A A G T A T C C A T C A T G G C T G A T G C A A T G C G G C G G C T G C A T A
C G C T T G A T C C G G C T A C C T G C C C A T T C G A C C A C C A A G C G A A
A C A T C G C A T C G A G C G A G C A C G T A C T C G G A T G G A A G C C G G T
C T T G T C G A T C A G G A T G A T C T G G A C G A A G A G C A T C A G G G G C
T C G C G C C A G C C G A A C T G T T C G C C A G G C T C A A G G C G A G C A T
G C C C G A C G G C G A G G A T C T C G T C G T G A C C C A T G G C G A T G C C
T G C T T G C C G A A T A T C A T G G T G G A A A A T G G C C G C T T T T C T G 20
G A T T C A T C G A C T G T G G C C G G C T G G G T G T G G C G G A C C G C T A
T C A G G A C A T A G C G T T G G C T A C C C G T G A T A T T G C T G A A G A G
C T T G G C G G C G A A T G G G C T G A C C G C T T C C T C G T G C T T T A C G
G T A T C G C C G C T C C C G A T T C G C A G C G C A T C G C C T T C T A T C G
C C T T C T T G A C G A G T T C T T C T G A A T T A A T T A A G C G G C C G C T
C A T G A G C G G A T A C A T A T T T G A A T G T A T T T A G A A A A T A A A
C A A A T A G G G G T T C C G C G C A C A T T T C C C C G A A A A G T G C C A C
C T G A C G T C A G A T C C G G T G C G G G C C T C T T C G C T A T T A C G C C
A G C T G G C G A A A G G G G G A T G T G C T G C A A G G C G A T T A A G T T G
G G T A A C G C C A G G G T T T T C C C A G T C A C G A C G T T G T A A A A C G 30
A C G G C C A G T G A A T T C G C G A G C T C T T G G C C A C T C C C T C T C T
G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C
G C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G
A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G
G G G T T C C T A C G C G T G T C T G T C T G C A C A T T T C G T A G A G C G A
G T G T T C C G A T A C T C T A A T C T C C C T A G G C A A G G T T C A T A T T
T G T G T A G G T T A C T T A T T C T C C T T T T G T T G A C T A A G T C A A T
A A T C A G A A T C A G C A G G T T T G G A G T C A G C T T G G C A G G G A T C
A G C A G C C T G G G T T G G A A G G A G G G G G T A T A A A A G C C C C T T C
A C C A G G A G A A G C C G T C A C A C A G A T C C A C A A G C T C C T G C T A 40
G C A G G T A A G T G C C G T G T G T G G T T C C C G C G G G C C T G G C C T C
T T T A C G G G T T A T G G C C C T T G C G T G C C T T G A A T T A C T G A C A
C T G A C A T C C A C T T T T T C T T T T T C T C C A C A G G T A T C G A T T C
T C T A G A G C C A C C A T G C A G A T C G A G C T G T C T A C C T G C T T C T
T C C T G T G C C T G C T G C G G T T C T G C T T C A G C G C C A C C A G A C G
G T A C T A T C T G G G C G C C G T G G A A C T G A G C T G G G A C T A C A T G
C A G A G C G A C C T G G G C G A G C T G C C C G T G G A T G C C A G A T T C C
C T C C A A G A G T G C C C A A G A G C T T C C C C T T C A A C A C C T C C G T
G G T G T A C A A G A A A C C C T G T T C G T G G A A T T C A C C G A C C A C
C T G T T C A A T A T C G C C A A G C C C A G A C C C C C C T G G A T G G G C C 50

TGCTGGGACCTACAATTTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGT
CGTGATCACCCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGTCT
CTGCATGCCGTGGGAGTGTCTTACTGGAAGGCCCTCTGAGG
GCGCCGAGTACGACGATCAGACCAGCCAGCGCGAGAAAGA
GGACGACAAAGGTGTTCCCTGGCGGGCAGCCACACCTACGTG
TGGCAGGTGCTGAAAGAAAACGGCCCCATGGCCTCCGACC
CTCTGTGCCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCT
CGTGAAAGGACCTGAACAGCGGCCCTGATCGGAGCCCTGCTC
GTGTGTAGAGAGGGCAGCCCTGGCCAAAGAGAAACCCAGA
CCCTGCAACAAGTTTCATCCTGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGA
GGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATG
CAGGACCGGGACGCCGCCCTCTGCTAGAGCCTGGCCCCAAAA
TGCACACCGTGAAACGGCTACGTGAACAGAAAGCCTGCCCGG
ACTGATCGGCTGCCACCCGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTG
ATCGGCATGGGCGACCAACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTTC
TGGAAAGGACACACCTTTCTCTCGTGGGAACCAACCGGCAGGC
CAGCCTGGAAATCAGCCCCATCACCCTTCTGACCGCCCCAG
ACACTGCTGATGGACCTGGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCC
ACATCAGCTCCCCACCAAGCACGACGGCATGGAAGCCTACGT
GAAGGTGGACAGCTGCCCCGAGGAACCCAGCTGCGGGATG
AAGAACAAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACGACCTGA
CCGACAGCGAGATGGACGTGGTGGCTTCGACGACGATAA
CAGCCCCAGCTTTCATCCAGATCAGAAAGCGTGGCCAAGAAAG
CACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCCGAGGAAG
AGGACTGGGATTACGCCCCCTCTGGTGCTGGCCCCCGACGA
CAGAAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAG
CGGATCGGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGGCGGTTCATGGCCT
ACACCGACGAGACATTCAGAGACCAGAGAGGCCATCCAGCA
CGAGAGCGGCATCCTGGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTG
GGCGACACCCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAAGGCCAGCA
GACCCTACAACATCTACCCCTCACGGGCATCACCGACGTGCG
GCCCCCTGTACTCCAGAAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAACAC
CTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCCGGCGAGATCTTCAAGT
ACAAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAG
CGACCCCAAGATGCCCTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTG
AACATGGAACGGGACCTGGCCTCCGGCCCTGATTGGCCCCAC
TGCTGATCTGCTACAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGGCAA
CCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTTATAGC
GTGTTTCGATGAGAACCGGTCCTGGGTATCTGACCGAGAAATA
TCCAGCGGTTTCTGCCCAACCCCTGCCCGGCGTGACAGCTGGA
AGATCCTGAGTTCCAGGCCCTCCAACATCATGCACTCCATC
AATGGCTATGTGTTTCGACAGCCTGACAGCTGAGCGTGTGCC
TGACACGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGGGC
CCAGACCGACTTCTCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGCTACACC
TTCAAGCACAAAGATGGTGTACGAGGATACCCCTGACCCCTGT
TCCCCCTTTAGCGGCGAAACCGTGTTTCATGAGCATGGAAAA
CCCCCGGCCCTGTGGATCCTGGGGCTGCCACAACAGCGACTTC
CGGAACAGAGGCATGACCGGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCT
GCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGA
GGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAAATGCCATC

10

20

30

40

50

G A G C C C A G A A G C T T C A G C C A G A A C C C C C C G T G C T G A A G C
G G C A C C A G A G A G A T C A C C C G G A C C A C C C T G C A G T C C G A
C C A G G A A G A G A T C G A T T A C G A C G A C A C C A T C A G C G T G G A A
A T G A A G A A A G A A G A T T T C G A C A T C T A C G A C G A G G A C G A G A
A C C A G A G C C C C C G G T C C T T T C A G A A A A A G A C C C G G C A C T A
C T T C A T T G C C G C T G T G G A A C G G C T G T G G G A C T A C G G C A T G
A G C A G C A G C C C T C A C G T G C T G A G A A A C A G G G C C C A G A G C G
G C A G C G T G C C C C A G T T C A A G A A A G T G G T G T T C C A G G A A T T
C A C A G A C G G C A G C T T C A C C C A G C C T C T G T A C C G C G G C G A G
C T G A A T G A G C A C C T G G G A C T G C T G G G C C C C T A T A T C A G A G 10
C C G A A G T G G A A G A T A A T A T C A T G G T C A C C T T C C G G A A T C A
G G C C T C C C G G C C C T A C A G C T T C T A C A G C T C C C T G A T C A G C
T A C G A A A G A G G A C C A G A G A C A G G G C G C T G A G C C C C G G A A G A
A C T T C G T G A A G C C C A A C G A G A C T A A A G A C C T A C T T T T G G A A
G G T G C A G C A C C A C A T G G C C C C T A C A A A G G A C G A G T T C G A C
T G C A A G G C C T G G G C C T A C T T C T C C G A T G T G G A C C T G G A A A
A G G A C G T G C A C T C T G G G C T G A T C G G C C C C C T G C T C G T G T G
C C A C A C C A A C A C C C T G A A T C C C G C C C A C G G C A G A C A A G T G
A C A G T G C A G G A A T T C G C C C T G T T C T T C A C C A T C T T C G A C G
A A A C A A A G A G C T G G T A C T T C A C C G A A A A C A T G G A A A G A A A 20
C T G C C G G G C T C C C T G C A A C A T C C A G A T G G A A G A T C C C A C C
T T C A A A G A G A A C T A C C G G T T C C A C G C C A T C A A C G G C T A C A
T C A T G G A C A C A C T G C C C G G C C T C G T G A T G G C T C A G G A T C A
G C G G A T C C G G T G G T A T C T G C T G T C C A T G G G C T C C A A C G A G
A A C A T C C A C A G C A T C C A C T T C A G C G G C C A C G T G T T C A C C G
T G C G G A A A A A A G A A G A G T A C A A A A T G G C C C T G T A C A A C C T
G T A C C C T G G G G T G T T C G A G A C A G T G G A A A T G C T G C C C A G C
A A G G C C G G C A T C T G G C G G G T G G A A T G T C T G A T C G G C G A G C
A T C T G C A C G C T G G G A T G A G C A C A C T G T T T C T G G T G T A C A G
C A A C A A G T G C C A G A C A C C T C T G G G C A T G G C C T C T G G C C A C 30
A T C C G G G A C T T T C A G A T C A C A G C C A G C G G C C A G T A T G G C C
A G T G G G C C C C A A A A C T G G C C A G A C T G C A C T A C A G C G G C A G
C A T C A A C G C C T G G T C C A C C A A A G A G C C C T T C A G C T G G A T C
A A G G T G G A C C T G C T G G C T C C C A T G A T C A T C C A C G G A A T C A
A G A C C C A G G G C G C C A G A C A G A A G T T C A G C A G C C T G T A C A T
C A G C C A G T T C A T C A T C A T G T A C A G C C T G G A C G G C A A G A A G
T G G C A G A C C T A C C G G G G C A A T A G C A C C G G C A C C C T G A T G G
T G T T C T T C G G C A A C G T G G A C T C C A G C G G C A T T A A G C A C A A
C A T C T T C A A C C C C C C A T C A T T G C C C G G T A C A T C C G G C T G 40
C A C C C C A C C C A C T A C A G C A T C C G G T C C A C C C T G A G A A T G G
A A C T G A T G G G C T G C G A C C T G A A C T C C T G C A G C A T G C C C C T
G G G G A T G G A A A G C A A G G C C A T C T C C G A C G C C C A G A T C A C C
G C C T C C A G C T A C T T C A C C A A C A T G T T C G C C A C C T G G T C C C
C A T C C A A G G C C C G G C T G C A T C T G C A G G G C A G A A G C A A T G C
T T G G A G G C C C C A A G T G A A C A A C C C C A A A G A A T G G C T G C A G
G T G G A C T T C C A G A A A A C C A T G A A A G T G A C C G G C G T G A C C A
C C C A G G G C G T G A A G T C T C T G C T G A C C T C T A T G T A C G T G A A
A G A G T T C C T G A T C T C C A G C A G C C A G G A C G G C C A C C A G T G G
A C C C T G T T T T T C C A G A A C G G C A A A G T G A A A G T G T T T C A G G
G G A A C C A G G A C T C C T T C A C C C C C G T C G T G A A T A G C C T G G A 50

CCCTCCACTGCTGACCAAGATACCTGCGGATCCACCCCTCAG
AGTTGGGTGCACCAGATTGCTCTGCGGATGGAAGTGCTGG
GATGCGAGGCCCCAGGACCTGTACTGACAACCTAGTAATAAA
AGATCAGAGCTGTAGAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGT
GCGGCCGGTACCCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG
ACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGGTCGGGCGGGCC
TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCCGGAA
GCTTGCGGTAAATCATGGTTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAA
TTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAGAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCT
AACTCACATTAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCA
GTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTT
CCGCTGATCTCATACTAGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCC
CAGCGCGTTCGGCCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGG
AGATGGCGGACGCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGT
TTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAAATTGATTGGCTCCA
ATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCCTG
CTTCATCCCCGTGGCCCCGTTGCTCGCGTTTTGCTGGCGGTG
TCCCCGGAAGAAATATATTTGCAATGTCTTTAGTTCTATGA
TGACACAAACCCCCGCCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTC
CGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTTGGAAGAGTCCC
CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAGCATGCATCT
CAATTAGTCAAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCC
CCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGT
CAGCAACCATAGTCCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCC
CCTAACTCCGCCCCAGTTCCCGCCCCATTCTCCGCCCCCATGGC
TGACTAATTTTTTTTATTTATGCAAGAGGCCGAGGCCGCCCT
CGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTT
TGGAGGCCCTAGGCTTTTGC AAAAGCTTTGCATGCCCTGCAG
GTCGGCCGCCACGACCGGTGCCGCCACCATCCCCCTGACCC
ACGCCCCCTGACCCCTCACAAAGGAGACGACCTTCCATGACC
GAGTACAAGCCCCACGGTGCGGCCTCGCCACCCGCGACGACG
TCCCCCGGGGCCGTACGCAACCTCGCCGCGCGGTTTCGCCGA
CTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGACCCGGACCCGCCAC
ATCGAGCGGGTCAACGAGCTGCAAGAACTCTTCTCTACGC
GCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGGGACGA
CGGCGCGCGCGGTGGCGGTCTGGACCAACGCCGGAGAGCGTC
GAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGG
CCGAGTTGAGCGGTTCGCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGAT
GGAAGGCCCTCCTGGCGCCGCAACCGGCCCAAGGAGCCCGCG
TGGTTCTCTGGCCACCGTCGGCGGTCCTCGCCCGACCAACAGG
GCAAGGGTCTGGGCAGCGCGCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGA
GGCGGCCGAGCGCGCGCGGGGTGCCCGCCTTCTTGAGACC
TCCGCGCCCCCGCAACCTCCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCT
TCACCGGTCACCGCCGACGTGAGGGTGCCCGAAGGACCGCG
CACCTGGTGATGACCCGCAAGCCCGGTGCTTGACGCCCG
CCCCACGACCCCGCAGCGCCCCGACCGAAAGGAGCGCACGAC
CCCATGGCTCCGACCGAAAGCCACCCGGGGCGGGCCCCCGCG

10

20

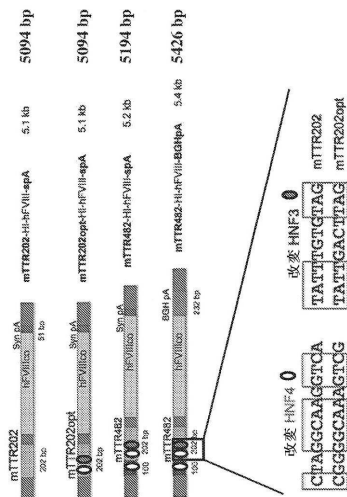
30

40

50

A C C C C G C A C C C G C C C C C G A G G C C C A C C G A C T C T A G A G G A T
C A T A A T C A G C C A T A C C A C A T T T T G T A G A G G T T T T A C T T G C T
T T A A A A A A C C T C C C A C A C C T C C C C C T G A A C C T G A A A C A T A
A A A T (配列番号 4)

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

HTR202 (ab ⁺)	1	C T A C C T C G T A C G C G G C C T C T T C A A C A G T C T C A T A C T C T G C G G G C A A G G	60
HTR202 (ab ⁻)	1	0
HTR202 (a)	1	0
HTR202 (b)	1	0
HTR202 (wt)	1	0
HTR202 (ab ⁺)	61	T G G G C A G T A G T T T C C A T T T A C T C A A C A C T C C C A G T A G T A G T A G C T C T G T G	120
HTR202 (ab ⁻)	1	0
HTR202 (a)	1	0
HTR202 (b)	1	0
HTR202 (wt)	1	0
HTR202 (ab ⁺)	121	T G C A A C T T G T A G A G C A G T T G T C G A T C A T T A A T C T C C G G G G A A A G G T C A T T	180
HTR202 (ab ⁻)	9	T G C A A C T T G T A G A G C A G T T G T C G A T C A T T A A T C T C C G G G G A A A G G T C A T T	68
HTR202 (a)	9	T G C A A C T T G T A G A G C A G T T G T C G A T C A T T A A T C T C C G G G A A A G G T G A T T T	68
HTR202 (b)	9	T G C A A C T T G T A G A G C A G T T G T C G A T C A T T A A T C T C C G G G A A A G G T G A T T T	68
HTR202 (wt)	9	T G C A A C T T G T A G A G C A G T T G T C G A T C A T T A A T C T C C G A A G G T C A T T T	68

HTR202 (ab ⁺)	181	A C T T A G T A C T A T T C T T C T T T T G G T A G T C A A T A A C A G A T C A C A G G T T G	240
HTR202 (ab ⁻)	49	A C T T A G T A C T A T T C T T T T T T G T A G T C A A T A A C A G A T C A C A G G T T G	128
HTR202 (a)	49	A C T T A G T A C T A T T C T T T T T T G T A G T C A A T A A C A G A T C A C A G G T T G	128
HTR202 (b)	49	A C T T A G T A C T A T T C T T T T T T G T A G T C A A T A A C A G A T C A C A G G T T G	128
HTR202 (wt)	49	G T A G A G T A C T A T T C T T T T T T G T A G T C A A T A A C A G A T C A C A G G T T G	128
HTR202 (ab ⁺)	241	A C T A C A G T T G C A A G G A T C A C A G C T G G T T G A A G A G G G G G T A A A A G C C C T C A	300
HTR202 (ab ⁻)	119	A C T A C A G T T G C A A G G A T C A C A G C T G G T T G A A G G G G G G G T A A A A G C C C T C A	128
HTR202 (a)	119	A C T A C A G T T G C A A G G A T C A C A G C T G G T T G A A G G G G G G G T A A A A G C C C T C A	128
HTR202 (b)	119	A C T A C A G T T G C A A G G A T C A C A G C T G G T T G A A G G G G G G G T A A A A G C C C T C A	128
HTR202 (wt)	119	A C T A C A G T T G C A A G G A T C A C A G C T G G T T G A A G G A G G G G T A A A A G C C C T C A	128

HTR202 (ab ⁺)	381	C C A G C A A G G C C T C A C A C A G A T C C A C A G C T C T C T A C A A G T A A G C C G T G T G	440
HTR202 (ab ⁻)	189	C C A G C A A G G C C T C A C A C A G A T C C A C A G C T C T C T A C A A G T A A G C C G T G T G	248
HTR202 (a)	189	C C A G C A A G G C C T C A C A C A G A T C C T C T C T A C A A G T A A G C C T G T G T G T G	248
HTR202 (b)	189	C C A G C A A G G C C T C A C A C A G A T C C T C T C T A C A A G T A A G C C T G T G T G T G	248
HTR202 (wt)	189	C C A G C A A G C C T C A C A C A G A T C C T C T C T A C A A G T A A G C C G T T G T G	248
HTR202 (ab ⁺)	361	T T C C C G G C C G G C T T T A C G G T T A G G C C C T G G T G C T T G A A T A T G A C A G	420
HTR202 (ab ⁻)	249	T T C C C G G C C G G C T T T T A C G G T T A G G C C C T G G T G C T T G A A T A T G A C A G	328
HTR202 (a)	249	T T C C C G G C C G G C T T T T A C G G T T A G G C C C T G G T G C T T G A A T A T G A C A G	328
HTR202 (b)	249	T T C C C G G C C G G C T T T T A C G G T T A G G C C C T G G T G C T T G A A T A T G A C A G	328
HTR202 (wt)	249	T T C C C G G C C G G C T T T A C G G T T A G G C C C T G G T G C T T G A A T A T G A C A G	328
HTR202 (ab ⁺)	421	T G A C A C A C A C T T T T T T T T T C C T	440
HTR202 (ab ⁻)	309	T G A C A C A C A C T T T T T T T T T C C T	333
HTR202 (a)	309	T G A C A C A C A C T T T T T T T T T C C T	333
HTR202 (b)	309	T G A C A C A C A C T T T T T T T T T C C T	333
HTR202 (wt)	309	T G A C A C A C A C T T T T T T T T T C C T	333

mTTR202(ab)+ = “482”: HNF-3 および HNF-4ドメイン変更ならびに160bpの遠位 mTTR
エンハンサー

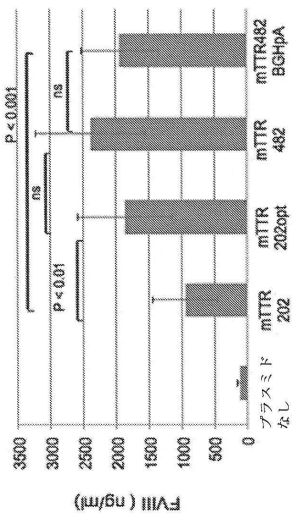
mTTR202(ab) = HNF-3 および HNF-4ドメイン変更

mTTR202(a) = HNF-4 ドメイン変更

mTTR202(b) = HNF-3 ドメイン変更

mTTR202(wt) = 野生型マウストランススチレチンプロモーター配列

【図 1 C】



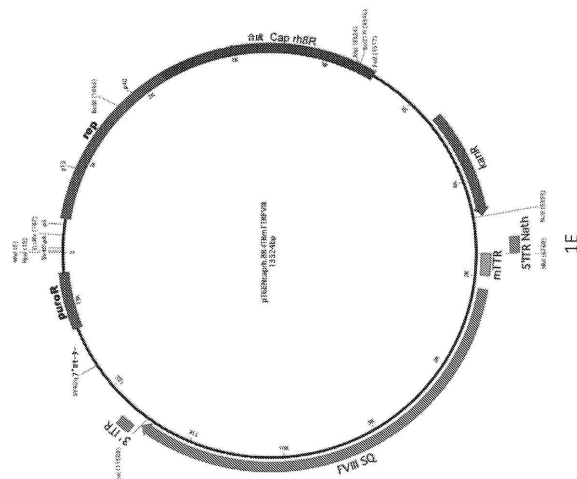
1C

【図 1 D】



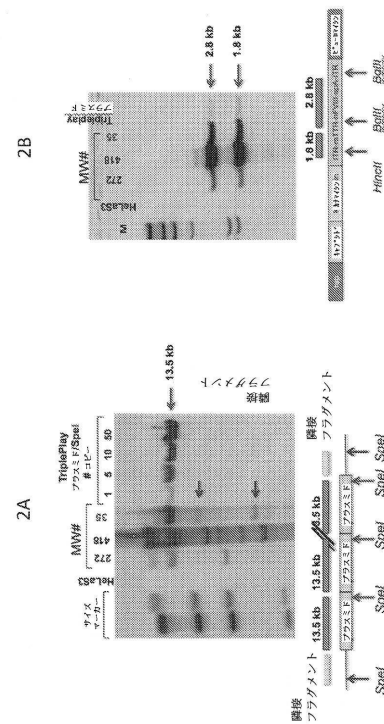
1D

【図 1 E】

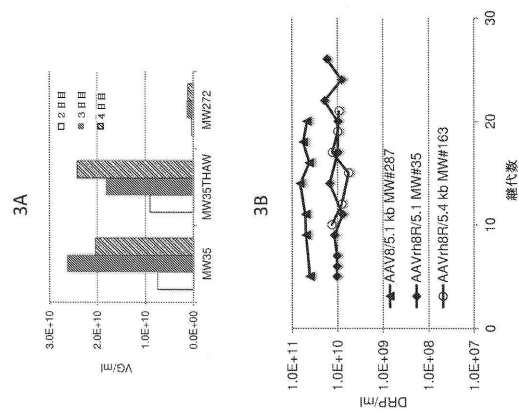


1E

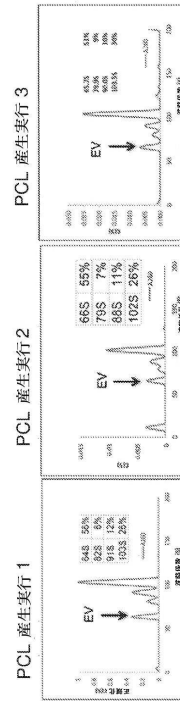
【図 2】



【図 3】

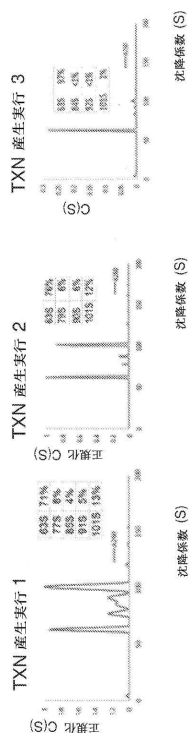


【図 4 A】



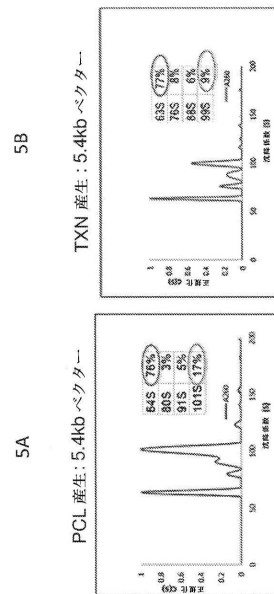
4A

【図 4 B】

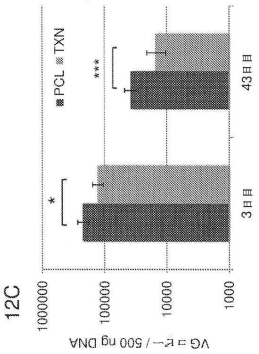
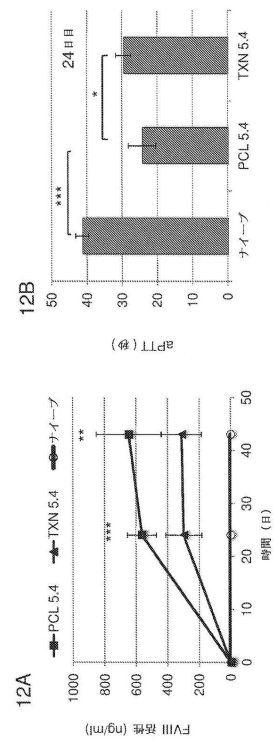


4B

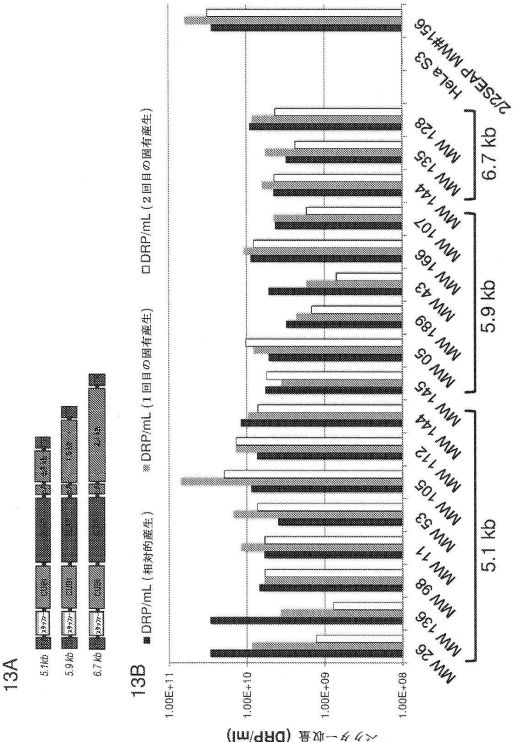
【図 5】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0006878299000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

(72)発明者 デーヴィッド・スーザ
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 .ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

(72)発明者 カレン・ヴィンセント
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 .ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 3 8 6 2 5 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 6 4 2 7 7 (W O , A 1)
ZHENHUA YUAN ; ET AL , A VERSATILE ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR PRODUCER CELL LINE METHOD FOR SCALABLE VECTOR PRODUCTION OF DIFFERENT SEROTYPES , HUMAN GENE THERAPY , 米国 ,
2 0 1 1 年 5 月 , V22 N5 , P613-624 , U R L , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081441/>
LU H ; ET AL , COMPLETE CORRECTION OF HEMOPHILIA A WITH ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS CONTAINING A FULL-SIZE EXPRESSION CASSETTE , HUMAN GENE THERAPY , 米国 , 2 0 0 8 年 6 月 , V19 N6 , P648-654 , U R L , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18500941>

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)