

(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 1

C 12 N	15/864	(2006.01)	C 12 N	15/864	1 O O Z
C 12 N	7/01	(2006.01)	C 12 N	7/01	Z N A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 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)
(86) (22) 出願日	平成28年4月7日(2016.4.7)
(65) 公表番号	特表2018-510648 (P2018-510648A)
(43) 公表日	平成30年4月19日(2018.4.19)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/026486
(87) 國際公開番号	W02016/164609
(87) 國際公開日	平成28年10月13日(2016.10.13)
審査請求日	平成31年3月29日(2019.3.29)
(31) 優先権主張番号	62/220,067
(32) 優先日	平成27年9月17日(2015.9.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/144,862
(32) 優先日	平成27年4月8日(2015.4.8)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	500034653 ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国O 2 1 4 2 マサチューセット ツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート 50番
(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(72) 発明者	シルッカ・キヨスティオームー <sup>ア</sup> アメリカ合衆国ニュージャージー州O 8 8 0 7. ブリッジウォーター. メイルコード : 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

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產生

## (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)粒子を產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產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48時間 ~ 約96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、該產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、產生

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、該產生細胞株において r A A V 粒子を產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、該產生細胞株は、

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、該產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、該產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產生される 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 ) 產生細胞株によって產生される 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產生される 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 ) 產生細胞株によって產生される 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產生される 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、または囊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、マウストランスクレッチ ( 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】

產生細胞株は、 靈長類細胞、 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、 該產生細胞株は、 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、 產生細胞株において產生され、  
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、 該產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、 該產生細胞株に A A V ヘルパー機能を提供することによって產生され、 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 ) 該產生細胞株は、 靈長類細胞、 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 ) 該產生細胞株は、 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隨伴ウイルス ( r A A V ) ゲノムを含むアデノ隨伴ウイルス ( A A V ) 粒子を產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あり； そして場合により、

( i ) 該細胞株は、 靈長類細胞、 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、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、前記AAV ITR；

(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；

(i i) 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；

(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(mTRR)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、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

(i i) 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】

ASCIITキストファイルでの配列表の提出

以下のASCIIT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粒子を产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VIII因子（FVIII）、ジストロフィン、ジスフェリン、および囊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】Große, 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 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 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 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、およそで、 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。  
10

## 【 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、または囊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、マウストラヌスチレチン ( 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。  
20

## 【 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 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。  
30  
40

## 【 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、靈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  
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產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(ITS)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 ITS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、およそで、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、マウストラヌチレチン(mTRT)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、AAVITS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ITSである。一部の実施形態において、AAVITSは、AAV2ITSである。一部の実施形態において、rAAV粒子のITS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、AAV2 IT RおよびAAV r h 8 Rキャプシドを含む。一部の実施形態において、AAV粒子は、AAV2 IT RおよびAAV8キャプシドを含む。

【0015】

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、靈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Peric.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、ヘルパー機能の提供後、約48時間～約96時間で回収される。

10

【0016】

一部の態様において、本発明は、オーバーサイズrAAVゲノムの発現を強化するための方法であって、細胞株にAAV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rAAV粒子を産生させる工程を含み、産生細胞株は、a) AA 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4.7kbを上回るrAAV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rAAV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rAAV粒子からのオーバーサイズrAAVゲノムの発現よりも、約1.25倍、約1.5倍、約1.75倍、約2.0倍、約2.5倍、約2.75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rAAV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rAAV粒子からのオーバーサイズrAAV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rAAV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rAAV粒子からのオーバーサイズrAAVゲノムの発現動態よりも、約5%速い、約10%速い、約25%速い、約50%速い、約75%速い、または約90%速い。

20

【0017】

30

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、AA 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、AA 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。

40

【0018】

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、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、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、マウストラヌスチレチン(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

50

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、AAV DJ、AAV2N587A、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。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。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、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、AAV2 ITR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、AAV2 ITR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、靈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Peric.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)AAV rep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、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、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、およそで、5.0kb、5.1kb、5.2kb、5.3kb、5.4kb、5.5kb、5.6kb、5.7kb

10

20

30

40

50

b、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。

【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、マウストラヌスチレチン(mTR)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、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、AAV2-ITR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、AAV2-ITR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、靈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Peric.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4.7kb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AAV-ITR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、およそで、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、マウストラヌチレチン(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、AAV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、AAV2-ITR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、AAV2-ITRおよびAAV8キャプシドを含む。

30

#### 【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、產生細胞において產生される。一部の実施形態において、產生細胞株は、靈長類細胞に由来する。一部の実施形態において、產生細胞株は、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、產生細胞株は、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

40

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FVII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FVII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、FVII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、AAV10rh8R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。

【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FVII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FVII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、FVII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VII因子；例えば、Bドメイン欠失型ヒト第VII因子を含む、ヒト第VII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】マウストラヌスチレチン（mTTR）プロモーターに基づく、5.1～5.4kbベクターゲノムサイズ（示す通り）の範囲のhFVIII発現カセットを示す略図である。HN F4結合部位（白丸）およびHN F3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、マウストラヌ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FVIIICDNA；syn pA、合成（syn pA）；BGHまたはウシ成長ホルモン（BGH）ポリア（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】インビオでの、mTTR-FVIII発現カセット由来のFVIII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VII因子レベルを測定した。50

【図1D】5.1kbのFVII発現カセットの構造を示す図である。このカセットは、rAAV逆位末端反復配列(ITS)、マウストラヌチレチン(mTR)プロモーター、ハイブリッドイントロン(HI)、B-ドメイン欠失ヒトFVIIICDNA、および合成ポリA配列を含む。

【図1E】FVIIベクターゲノム、AAV repおよびcap遺伝子、ならびにピュー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、Triple P1a yプラスミドを示す図である。

【図2】図2Aおよび図2Bは、選択されたマスター・ウェルクローン(MW)由来のゲノムDNAのサザンプロット分析を示す図である。(図2A) FVIIITriple P1a yプラスミドを、13kb直鎖状フラグメントを生成するSPEIで切断した。これを、単位長さのTriple P1a 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2B) BglIIおよびHincII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FVII発現カセット内を切断し、1.8および2.8kb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3Aおよび図3Bは、AAVrh8R/5.1kb mTR-FVIIベクターの产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3A) AA Vrh8R/5.1kbベクター产生の経時変化。振とう培養物に野生型アデノウイルス(wt Ad)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、qPCRによりベクター収量を1mlあたりのベクターゲノム(VG/ml)として定量化した。(図3B) 選択された高产生マスター・ウェルの安定性。rAAVベクター产生レベルを、MW#287(AAV8/5.1kb)、MW#35(AAVrh8R/5.1kb)およびMW#163(AAVrh8R/5.4kb)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、rAAV产生能(DRP/ml)をqPCRで定量化した。

【図4A】オーバーサイズ5.1kb rAAVrh8R/FVIIベクターの質についての分析を示すグラフである。PCLおよびTXNにより产生された5.1kbベクターロットを、AUC分析により比較した。MW#35を使用して、AAVrh8R/5.1kb FVIIを3回生成させ(図4A)、TXN法によって产生された同じベクターと比較した(図4B)。ウイルスの質量差を測定する分析用超遠心分離分析(AUC)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4B】オーバーサイズ5.1kb rAAVrh8R/FVIIベクターの質についての分析を示すグラフである。PCLおよびTXNにより产生された5.1kbベクターロットを、AUC分析により比較した。MW#35を使用して、AAVrh8R/5.1kb FVIIを3回生成させ(図4A)、TXN法によって产生された同じベクターと比較した(図4B)。ウイルスの質量差を測定する分析用超遠心分離分析(AUC)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5Aおよび図5Bは、オーバーサイズ5.4kb rAAVrh8R/FVIIベクターの質についての分析を示すグラフである。PCL(図5A)およびTXN(図5B)により产生された5.4kbベクターロットをAUC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(64S/63S)およびより大きいゲノムを有する粒子(101S/99S)のパーセンテージを丸で囲んである。

【図6】図6Aおよび図6Bは、サザンプロットによる、PCLまたはTXNにより生成されたrAAVrh8R/5.1kb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

ザンプロットを行った。(図6A) 4.0 kb F VII I I プローブ(F VII I I ドメインA1、A2、A3およびC1)を使用するサザン分析。VGを $1.1 \times 10^9$  VG/レーンおよび $6.0 \times 10^9$  VG/レーンで1%アルカリゲルにローディングし、分離した。PCL(MW#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 VII 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C1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VG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、PCLまたはTXNにより生成されたrAAVrhh8R / 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<sup>9</sup>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をアプライする)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、PCLまたはTXNにより生成されたrAAVrhh8R / 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 mTTR-F VII I I ゲノムを含んでいた。ベクター產生方法(PCLまたはTXN)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<sup>9</sup>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。FIX(陰性対照)またはF VII I I(陽性対照)cDNA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。VGを $1.5 \times 10^9$  VG/レーンおよび $7.5 \times 10^9$  VG/レーンで1%アルカリゲルにローディングし、分離した。PCL(MW#35)またはトリプルトランスフェクション(TXN)により生成された5.1 kb F VII 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ImageJで定量化した。それぞれの明確なVG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、PCLまたはTXNにより生成されたrAAVrhh8R / 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。

10

20

30

40

50

【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により產生されたrAAVrh8R/5.1kbベクターのインビポ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 $3 \times 10^{11}$ および $4 \times 10^{10}$ DRP/マウスで投与し、血漿FVIIIレベルを56日目まで分析した。(図10A)血漿FVIII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、\*、 $p < 0.05$ ; \*\*、 $p < 0.01$ 、\*\*\*、 $p < 0.001$ 。

【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により產生された5.1kb rAAVrh8R/FVIIIベクターのインビポ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 $4 \times 10^{10}$ DRP/マウスで投与した。(図11A)血漿FVIII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DNA 500ng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產生方法を示す(PCLまたはTXN)。

【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により產生された5.4kb rAAVrh8R/FVIIIベクターのインビポ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 $4 \times 10^{10}$ 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FVIII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DNA 500ng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、\*、 $p < 0.05$ ; \*\*、 $p < 0.01$ 、\*\*\*、 $p < 0.001$ 。

【図13】図13Aは、5.1、5.9および6.7kb rAAV2/SEAPベクターを示す略図である。図13Bは、相対的および固有產生(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】

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隨伴ウイルス(rAAV)ベクターを高収率で生成することができる產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VIII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產生と比較して、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、インビポでの遺伝子導入にも適しており、機能的第VIII因子の產生をもたらした。

【0036】

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

10

20

30

40

50

含有するAAV粒子を产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4.7kb～約9.4kb、場合によつては約4.7kb～6.7kbであるrAAVゲノムを含有するAAV产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5kb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、5.0kb、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。さらに、本明細書には、本開示の方法によって產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つて、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5kb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隨伴ウイルス(AAV)ゲノムを含有するAAV粒子を产生するための細胞株であつて、a) AAV rep遺伝子およびcap遺伝子をコードする核酸と、b) 約4.7kb～約9.4kb、場合によつては約4.7kb～6.7kb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5kbを上回る。

## 【0039】

なおもさらに、本明細書には、アデノ隨伴ウイルス(AAV)キャプシドによってキャプシド化された、約4.7kb～約9.4kb、場合によつては約4.7kb～6.7kb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5kb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 Techniques 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. Celliis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 10 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】

##### I I . 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)、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、オリゴデオキシリヌクレオシドホスホロアミデート (P - NH<sub>2</sub>) 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に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に偶発的なものであってもよい。

## 【0044】

10

「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 rrep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、またはクロー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、リポ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。

20

## 【0046】

30

本明細書に使用されるとき、「產生細胞株」は、AAV粒子を產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、カプシド遺伝子、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。

40

## 【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（

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נס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 transthymetic））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ゲノムを含有するビリオンの数を指す。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）Human. 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と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4.7~4.8kb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4.7kb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5kb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4.7kb~約9.4kb、場合によっては約4.7kb~6.7kb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 . Virology , 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、Xiaolai( 1997年 ) Expert Review of Biologics and Immunotherapeutics , 144 : 113 ~ 124 頁；もしくはFisherら( 1996年 ) J . Virology , 70 : 520 ~ 532 頁( L F Uアッセイ )に記載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產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( 欠損パブロウイルスである )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、オートグラファカリフォルニアニューカレ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<sup>2</sup> : 1、少なくとも約 10<sup>4</sup> : 1、少なくとも約 10<sup>6</sup> : 1、または少なくとも約 10<sup>8</sup> : 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、S D S 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

#### 【 0 0 6 1 】

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ら編、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

#### 【 0 0 6 2 】

「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。

#### 【 0 0 6 3 】

「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）、靈長類（例えば、ヒトおよび非ヒト靈長類、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形である。

【0069】

本明細書に使用されるとき、「スペドベリ単位」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スペドベリ単位は、 $10^{-13}$ 秒に等しい。例えば、スペドベリ単位は、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。これらの方針では、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、单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、「S E D F I T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（S ch u c k ( 2 0 0 0 年 ) B i o p h y s . J . , 7 8 : 1 6 0 6 ~ 1 9 頁）。S E D F I T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 L a m m 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。

10

#### 【0073】

本明細書に使用されるとき、「F統計量（F s t a t i s t i c ）」または「F比」とは、信頼性レベルを指す。このパラメーターは、使用される正則化の量を制御する。これは、異なる範囲では異なる意味を有する：0 ~ 0 . 5 では、正則化が使用されていない。0 . 5 ~ 0 . 9 9 9 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、正則化の削減制約に対して許容される所望のカイニ乗増加を、F統計量とともに計算する。0 . 5 1 の値は、正則化をほとんど引き起こさず、0 . 6 8 ~ 0 . 9 0 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ニ乗増加は、約 0 . 1 % である）、一方で 0 . 9 9 に近い値は、非常に高い正則化を引き起こす。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、カイニ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 % のカイニ乗増加で正則化をもたらす。

20

#### 【0074】

本明細書における値またはパラメーターへの「約」への言及は、その値またはパラメーター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。

30

#### 【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（a n）」、および「その（t h e）」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】

##### I I I . 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產生される）オーバーサイズ組換えアデノ隨伴ウイルス（r A A V）ゲノムを含有するアデノ隨伴ウイルス（A A V）粒子に関する。本開示のある特定の態様は、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 ゲノムを含有するアデノ隨伴ウイルス（A A V）粒子に関する。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 5 k b を上回り、A A V 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、r A A V 粒子は、r A A V ベクターを含む。一部の実施形態において、r A A V ベクターは、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 ゲノムを含有する。一部の実施形態において、r A A V ゲノムは、約 5 k b ~ 約 7 . 0 k b、約 4 . 7 k b ~ 約 9 . 4 k b、または約 4 . 7 k b ~ 約 6 . 7 k b である。一部の

40

50

実施形態において、rAAVゲノムは、長さが、およそで、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、7.1kb、7.2kb、7.3kb、7.4kb、7.5kb、7.6kb、7.7kb、7.8kb、7.9kb、8.0kb、8.1kb、8.2kb、8.3kb、8.4kb、8.5kb、8.6kb、8.7kb、8.8kb、8.9kb、9.0kb、9.2kb、9.3kb、もしくは9.4kb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】

10

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(ITS)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、それによって発現力セットが形成される。発現力セットは、5'末端および3'末端で、少なくとも1つの機能的AAV ITS配列に隣接している。「機能的AAV ITS配列」とは、ITS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 ITSは、野生型ヌクレオチド配列(例えば、Kotin, 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 ITS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 ITS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ITSなどである。ある特定の実施形態において、AAVの核酸は、AAV2 ITS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

20

30

40

50

106号に記載されている、S h H 1 0などの変形AAV 6キャプシド)、AAV 7キャプシド、AAV 8キャプシド、AAV r h 8キャプシド、AAV r h 8 Rキャプシド、AAV 9キャプシド(例えば、野生型AAV 9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AAV 9キャプシド)、AAV 1 0キャプシド、AAV r h 1 0キャプシド、AAV 1 1キャプシド、AAV 1 2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、AAV 2 R 4 7 1 Aキャプシド、AAV A A V 2 / 2 - 7 m 8キャプシド、AAV - D Jキャプシド(例えば、AAV - D J / 8キャプシド、AAV - D J / 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)、AAV 2 N 5 8 7 Aキャプシド、AAV 2 E 5 4 8 Aキャプシド、AAV 2 N 7 0 8 Aキャプシド、AAV V 7 0 8 Kキャプシド、ヤギAAVキャプシド、AAV 1 / AAV 2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、r A A V 2 / H B o V 1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、r A A V 粒子は、AAV 5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、r A A V 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、r A A V 粒子は、AAV 1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、r A A V 粒子は、AAV 2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、AAV 1、AAV 2、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV r h 8、AAV r h 8 R、AAV 9、AAV 10、またはAAV r h 1 0である。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、AAV血清型1(AAV 1)キャプシドを含む。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、AAV血清型2(AAV 2)キャプシドを含む。一部の実施形態において、r A A V 粒子は、AAV r h 8 R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C N S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。r A A V 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、r A A V 粒子は、AAV 1キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV 2 ITRを含み得るか、またはAAV 2キャプシドタンパク質および少なくとも1つのAAV 1 ITRを含み得る。r A A V 粒子の產生のための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AAV 2 ITRが隣接した、本開示のAAV 1キャプシドおよびr A A V ベクター(例えば、異種核酸を含む発現力セット)を含む、r A A V 粒子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、AAV 2キャプシドを含むr A A V 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、AAV 2に由来する。他の実施形態において、ITRは、AAV 2に由来し、キャプシドは、AAV r h 8 Rに由来する。

#### 【0081】

本開示のさらなる態様は、r A A V 粒子を含む組成物であって、r A A V 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4.7 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 kb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プロットおよび解析用超遠心分離法が挙げられる。  
10

#### 【0082】

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%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、約4.7 kbを上回る、約5.0 kbを上回る、約5.1 kbを上回る、約5.2 kbを上回る、約5.3 kbを上回る、約5.4 kbを上回る、約5.5 kbを上回る、約5.6 kbを上回る、約5.7 kbを上回る、約5.8 kbを上回る、約5.9 kbを上回る、約6.0 kbを上回る、約6.5 kbを上回る、約7.0 kbを上回る、約7.5 kbを上回る、または約9.4 kb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

#### 【0083】

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 $1 \times 10^7$  vg / mL ~ 約 $9 \times 10^{13}$  vg / mL、またはこの範囲内の任意の濃度に、濃縮されている。  
30

#### 【0084】

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、サザンプ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DNaseで処理し、DNase消化を停止させるために薬剤（例えば、EDTA）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DNA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DNA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クーと比較して）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) E M B O 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 r A A V ゲノムを含み、ここで、r A A V 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、サザンプロット分析または P C R 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 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。 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 (A U C) 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、A U C は、完全な無傷のゲノムを有するウイルス粒子、空のウイルスキヤプシド、および変形形（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 (r A A V) 粒子の調製物への r A A V 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、A A V）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 6 2 / 1 0 5 , 7 1 4 号「A n a l y t i c a l U l t r a c e n t r i f u g a t i o n f o r C h a r a c t e r i z a t i o n o f R e c o m b i n a n t V i r a l P a r t i c l e s」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、B e r k o w i t z , S A & P h i l o J S (2007年) A n a l . B i o c h e m . , 3 6 2 : 1 6 ~ 3 7 頁に提供されている。 30

#### 【0087】

A U C 分析は、粒子（例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、およびウイルスキヤプシド）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。A U C 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。A U C 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、A U C 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。A U C 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、これを用いて、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 A U C 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、ウイルスキヤ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】

20

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し、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、First（1997年）Eur. Biophys. J., 35: 307~10を参照されたい。

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、スペドベリ単位 $S$ で表される（1スペドベリ単位は、 $10^{-13}$ 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： $c / t = D [ ( ^2 c / r^2 ) + 1 / r ( c / r ) ] - s ^2 [ r ( c / r ) + 2 c ]$

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、 $r$  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. Biomed. Technol. 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 (S V - 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で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、ビヒクル対照（例えば、組換えウイルスを含まない PBS）は、対応する参考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、およそで、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18,000 rpm ~ 20,000 rpm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。二次導関数正則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、およそで、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、およそで、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、およそで、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、半径方向不变量(RI)および時間不变量(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OD<sub>260</sub>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(スペドベリ単位)および相対濃度(OD単位)を、分布内の各成分について判定する。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<sub>260nm</sub>/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(<sub>260</sub>/capsid = 3.72e6)および無傷なベクターのモル吸光度の消散係数(<sub>260</sub>/vector = 3.00e7)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ついて報告される。

10

20

30

40

50

## 【0099】

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。

## 【0100】

一部の態様において、組換えウイルス粒子（例えば、rAAV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)）をスペ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、rAAV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)をスペ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。

## 【0101】

一部の実施形態において、組換えウイルス粒子（例えば、rAAV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（First (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 20,000 rpm 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、およそで、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、およそで、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、半径方向不变量 (RI) および時間不变量 (TI) のノイズ減算を適用する。一部の実施形態において、メン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ことによって、浮動にことができる。

### 【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、およそで、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、およそで、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 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

10

20

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、二次導関数正則化を、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 <sub>min</sub> は約 1 であり、 S <sub>max</sub> 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、半径方向不变量 ( R I ) および時間不变量 ( 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、およそで、 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سفエ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سفエ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سفエ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سفエ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、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、およそで、5 %速い、10 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、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。

#### 【0107】

##### 異種導入遺伝子

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 (ITR) 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 (ITR) 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 (ITR) 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 (ITR) 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、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。

#### 【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

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、FVIII、およびDXS1253 10 E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AAA52484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を患有個体において第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AAA53189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有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、囊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d j 760C5.1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、脾臓、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囊胞性線維症を患有個体においてCFTRを発現させるために使用することができる。CFTRは、Cl<sup>-</sup>イオン輸送に関与するATP開口型イオンチャネルとし 40 50

て機能することが知られている。十分な C F T R 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。

【 0 1 1 2 】

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、s i R N A、s h R N A、R N A i、m i R N A、アンチセンスR N A、リボザイム、またはD N A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、R N A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m R N A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、R N Aをコードする。治療的R N A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m R N A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、R N A i、小型阻害性R N A ( s i R N A )、マイクロR N A ( m i R N A )、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。

【 0 1 1 3 】

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 ( C M V ) 最初期プロモーター、G U S B プロモーター、R S V L T R 、M o M L V L T R 、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、シミアンウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) プロモーターおよびC K 6 プロモーター、トランスチレチンプロモーター ( T T R ) 、T K プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター ( T R E ) 、H B V プロモーター、h A A T プロモーター、L S P プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター ( L S P ) 、E 2 F プロモーター、テロメラーゼ ( h T E R T ) プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー／トリベータアクチン／ウサギ - グロビンプロモーター ( C A G プロモーター、N i w a ら、G e n e 、1 9 9 1 年、1 0 8 ( 2 ) : 1 9 3 ~ 9 頁 ) および伸長因子 1 - アルファプロモーター ( E F 1 - アルファ ) プロモーター ( K i m ら、G e n e 、1 9 9 0 年、9 1 ( 2 ) : 2 1 7 ~ 2 3 および G u o ら、G e n e T h e r . 、1 9 9 6 年、3 ( 9 ) : 8 0 2 ~ 1 0 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 ( C B A ) 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。

【 0 1 1 4 】

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 ( R S V ) L T R プロモーター（場合によっては、R S V エンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス ( C M V ) プロモーター（場合によっては、C M V エンハンサーを伴う）（例えば、B o s h a r t ら、C e l l , 4 1 : 5 2 1 ~ 5 3 0 頁 ( 1 9 8 5 年 ) ）、S V 4 0 プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、1 3 アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ ( P G K ) プロモーター、および E F 1 a プロモーター ( I n v i t r o g e n ) が挙げられる。

【 0 1 1 5 】

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

30

40

50

ーターおよび誘導系は、限定することなく、*In vitro*、*Clontech*、および*Arriad*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ニン(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】

20

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ない場合に、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、エンハンサー要素、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】

30

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、臍臓、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、マウストラヌスチレチン(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】

40

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-

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AA V 2 I T R を含む、AA 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AA V ゲノムは、5'から3'に、AA 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AA 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AA V ゲノムは、5'から3'に、AA 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AA 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AA V ゲノムは、5'から3'に、AA 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AA V 2 I T R を含む。  
10

#### 【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（pol 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。  
20

#### 【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AA V ウィルス粒子、および自己相補性AA V ゲノムの使用方法は、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（complement）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。  
30  
40

#### 【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、AA V ウィルスゲノムの複製時に、r e p タンパク質は、ウィ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ィルスゲノムが、ウィルスキャプシドにパッケージングされる：AA 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AA V  
50

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、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. ウィルス粒子を产生する方法

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隨伴ウイルス(AAV)ゲノムを含有するAAV粒子を产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产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产生細胞株は、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产生細胞株は、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产生細胞株は、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产生細胞株は、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产生細胞株は、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产生細胞株は、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、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隨伴ウイルス(AAV)ゲノムを含むAAV粒子を产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产生細胞株は、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产生細胞株は、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产生細胞株は、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

10

20

30

40

50

4 . 7 k b ~ 約 6 . 7 k b または約 5 . 2 k b ~ 約 8 . 7 k b である安定に維持されている r A A V ゲノムを含む。一部の実施形態において、 A A V 產生細胞株は、 A A V r e p 遺伝子および c a p 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、 A A V 產生細胞株は、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 である、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている r A A V ゲノムを含む。一部の実施形態において、 A A V 產生細胞株は、 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 である、細胞株ゲノムに安定に組み込まれている 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、長さが、およそで、 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 、 7 . 1 k b 、 7 . 2 k b 、 7 . 3 k b 、 7 . 4 k b 、 7 . 5 k b 、 7 . 6 k b 、 7 . 7 k b 、 7 . 8 k b 、 7 . 9 k b 、 8 . 0 k b 、 8 . 1 k b 、 8 . 2 k b 、 8 . 3 k b 、 8 . 4 k b 、 8 . 5 k b 、 8 . 6 k b 、 8 . 7 k b 、 8 . 8 k b 、 8 . 9 k b 、 9 . 0 k b 、 9 . 2 k b 、 9 . 3 k b 、もしくは 9 . 4 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。

#### 【 0126 】

トランスフェクション、安定な細胞株產生、ならびにアデノウイルス - A A V ハイブリッド、ヘルペスウイルス - A A V 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 - A A V ハイブリッドを含む感染性ハイブリッドウイルス產生系を含む、 r A A V ベクターの產生のための多数の方法が、当該技術分野で既知である。 r A A V ウィルス粒子の產生のための r A A V 產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 ) A A V r e p 遺伝子および c a p 遺伝子ならびに遺伝子産物； 4 ) 少なくとも 1 つの A A V I T R 配列 ( 例えば、オーバーサイズ r A A V 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 ) r A A V 產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、靈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、 H e L a 細胞、 A 5 4 9 細胞、 2 9 3 細胞、または P e r c . 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 ( H S V ) 、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、 A A V r e p 遺伝子産物および c a p 遺伝子産物は、任意の A A V 血清型に由来し得る。強制ではないが、一般には、 A A V r e p 遺伝子産物は、 r e p 遺伝子産物が r A A V 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、 r A A V ベクターゲノムの I T R 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、 r A A V ベクターの產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、 H y c lone L a b o r a t o r i e s および J R H 製の培地、例えば、変法イーグル培地 ( M E M ) 、ダルベッコ変法イーグル培地 ( D M E M ) 、米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 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 , 7 2 3 , 5 5 1 号に記載されている S f - 9 0 0 I I S F M 培地が挙げられ、これらの文献のそれぞれは、特に、組換え A A V ベクターの產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、 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、 A A V 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、スプドプテラ・フルギペルダ ( S f 9 ) 細胞 ) である。

#### 【 0127 】

r A A V 粒子を產生するための 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、*r e p*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سف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、*r A A V*粒子は、宿主細胞への、*r A A V*ベクターをコードする核酸、*A A V r e p*および*c a p*をコードする核酸、ならびに*A A V*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سفェクションによって産生したが、この場合、宿主細胞への核酸のトランسفェクションにより、*r A A V*粒子を産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、*r A A V*粒子は、以下に提供される例示的な産生細胞株法などの産生細胞株法によって産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Peric. 6細胞株）に、*r e p*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سفェクトすることができる。細胞株をスクリーニングして、*r A A V*産生のためのリードクローンを選択し、これを、次いで、産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、*r A A V*産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、*r A A V*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、*r A A V*粒子は、*r A A V*ベクターをコードする核酸、*A A V r e p*および*c a p*をコードする核酸、ならびに*A A V*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、産生細胞株によって産生させた。本明細書に記載されるように、産生細胞株法は、トリプルトランسف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*r A A V*粒子の産生に有利であり得る。

## 【0129】

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*遺伝子ならびに／または*r A A V*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、*A A V r e p*、*A A V c a p*、および*r A A V*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、*A A V r e p*、*A A V c a p*、および*r A A V*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سف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سف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سف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、Sauer, 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、靈長類細胞株（例えば、Vero 細胞株またはFRhL-2 細胞株などの非ヒト靈長類細胞株）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%20suspenion-40.asp](http://www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspenion-40.asp)で入手可能）およびそこ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粒子が產生される条件下で、(i)それが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)宿主細胞によって產生された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、AAV-DJ、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、AAV-DJ、AAV2-N587A、AAV2-E548A、AAV2-N708A、AAV-V708K、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、AAV-DJ、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產生培養培地には、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產生することができ、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ベクターの產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、產生培養物における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 產生培養物は、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 產生培養物は、例えば、ローラーボトル、中空纖維フィルター、マイクロ担体、および充填床もしくは流動床バイオ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 ベクター產生培養物はまた、例えば、かき混ぜフラスコ、攪拌槽バイオリアクター、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、HeLa 細胞、293 細胞、およびSf-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、產生培養物の宿主細胞の溶解によって、または產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 產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 6,566,118 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 AAV 粒子は、約 5.0 kb を上回る rAAV 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 rAAV 粒子は、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、もしくは 7.0 kb、8.0 kb、もしくは 9.0 kb、またはこれらの間の任意の値を上回る、rAAV ゲノムを含有する。一部の実施形態において、回収された rAAV 粒子は、約 5.0 kb ~ 約 9.0 kb、約 5.0 kb ~ 約 8.5 kb、約 5.0 kb ~ 約 8.0 kb、約 5.0 kb ~ 約 7.5 kb、約 5.0 kb ~ 約 7.0 kb、約 5.0 kb ~ 約 6.5 kb、約 5.0 kb ~ 約 6.0 kb、約 5.0 kb ~ 約 5.5 kb、約 5.2 kb ~ 約 9.0 kb、約 5.2 kb ~ 約 8.5 kb、約 5.2 kb ~ 約 8.0 kb、約 5.2 kb ~ 約 7.5 kb、約 5.2 kb ~ 約 7.0 kb、約 5.2 kb ~ 約 6.5 kb、約 5.2 kb ~ 約 6.0 kb、約 5.2 kb ~ 約 5.5 kb、約 5.5 kb ~ 約 9.0 kb、約 5.5 kb ~ 約 8.5 kb、約 5.5 kb ~ 約 8.0 kb、約 5.5 kb ~ 約 7.5 kb、約 5.5 kb ~ 約 7.0 kb、約 5.5 kb ~ 約 6.5 kb、約 5.5 kb ~ 約 6.0 kb、約 6.0 kb ~ 約 9.0 kb、約 6.0 kb ~ 約 8.5 kb、約 6.0 kb ~ 約 8.0 kb、約 6.0 kb ~ 約 7.5 kb、約 6.0 kb ~ 約 7.0 kb、約 6.0 kb ~ 約 6.5 kb、約 6.0 kb ~ 約 5.5 kb、約 6.5 kb ~ 約 7.5 kb、約 6.5 kb ~ 約 7.0 kb、約 6.5 kb ~ 約 6.0 kb、約 7.0 kb ~ 約 8.5 kb、約 7.0 kb ~ 約 8.0 kb、約 7.0 kb ~ 約 7.5 kb、約 7.0 kb ~ 約 7.0 kb、約 7.0 kb ~ 約 6.5 kb、約 7.0 kb ~ 約 6.0 kb、約 7.5 kb ~ 約 9.0 kb、約 7.5 kb ~ 約 8.5 kb、約 7.5 kb ~ 約 8.0 kb、約 8.0 kb ~ 約 9.0 kb、約 8.0 kb ~ 約 8.5 kb、または約 8.5 kb ~ 約 9.0 kb のうちのいずれかの rAAV ゲノムを含有する。一部の実施形態において、回収された rAAV 粒子は、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 の rAAV ゲノムを含有する。

[ 0 1 3 8 ]

一部の実施形態において、 $r_{AAV}$ 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。例えば、一部の実施形態において、 $r_{AAV}$ 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約48時間、約60時間、約72時間、約84時間、または約96時間で回収される。一部の実施形態において、 $r_{AAV}$ 粒子は、ヘルパー機能の提供後、約48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、培養溶解物または產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、產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。

10

【0140】

一部の実施形態において、rAAV產生培養採取物は、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、產生培養採取物は、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。

20

【0141】

一部の実施形態において、rAAV產生培養採取物は、產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。

30

【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)；アバ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、Xiaola(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。

40

【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

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らすか、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、p H 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 glycol (PEG) 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、非イオン性湿润剤または清澄剤、増粘剤などをさらに含んでもよい。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、AAV粒子を投与する工程を含む方法を提供する。AAV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AAV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AAV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AAV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 AAV ゲノムを含む有効量の AAV 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 20 %、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 50 %、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 80 %、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 95 %、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 99 % 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  $1 \times 10^6$  ~ 約  $1 \times 10^{14}$  個の粒子、約  $1 \times 10^7$  ~  $1 \times 10^{13}$  個の粒子、約  $1 \times 10^9$  ~  $1 \times 10^{12}$  個の粒子、または約  $1 \times 10^9$  個の粒子、約  $1 \times 10^{10}$  個の粒子、または約  $1 \times 10^{10}$

40

<sup>1 1</sup> 個の粒子である。rAAV組成物は、同じ治療の間に、または数日間、数週間、数ヶ月間、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。

【0147】

AAV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rAAV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

【0148】

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、rAAV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、12時間、または24時間以下で間が空いている。

【0149】

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つて、オーバーサイズAAVゲノムを含むAAV粒子を投与する工程を含み、オーバーサイズAAV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VIII因子導入遺伝子（例えば、ヒト第VIII因子導入遺伝子）をコードするオーバーサイズAAVゲノムを含むAAV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AAVゲノムを含むAAV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AAVゲノムを含むAAV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、囊胞性線維症を、CFTR導入遺伝子（例えば、ヒトCFTR導入遺伝子）をコードするオーバーサイズAAVゲノムを含むAAV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、4.8kbのAAV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AAVゲノムを含むAAV粒子であつて、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5.0kbを上回るAAVゲノムをもたらす、AAV粒子を提供する。

20

【0150】

VII. 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AAV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、rAAV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。

30

【0151】

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もしくは当該技術分野で既知の本開示のAAV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

40

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、Tris緩衝液、HEPES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もよい。一部の実施形態において、容器は、本開示のrAAV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】

10

#### 【0153】

本発明は、以下の実施例に言及することで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】

5.1kbおよび5.4kbのオーバーサイズFVIIIベクターを有する產生細胞株の生成

20

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rAAV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5kb超）を含むゲノムを有するrAAVベクターを産生するのに特に有利な、產生細胞株（PCL）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5.4kbのオーバーサイズFVIIIベクター用のpTPプラスミドの構築

FVIII発現力セットを、pUC57ベースのプラスミドにおいて生成させた。FVIII発現力セットは、マウストラヌスチレチン（mTTR）プロモーター（Costa, R.Hら、Mol Cell Biol 1986、6:4697~4708頁）（100bpエンハンサー配列有りおよび無しの202bpコア配列）、ハイブリッドイントロン（Jiang, H.ら、Blood 2006 108:107~115頁）、コドン最適化されたヒトB-ドメイン欠失FVIIIcDNA、合成またはBGHポリア、およびrAAV2逆位末端反復配列からなるものであった。これらは、5.1~5.4kbの範囲のベクターゲノムサイズを有するrAAVベクターを生成した（図1A）。

30

#### 【0156】

FVIII発現力セットを有するプラスミドベクターを、正常なC57BL/6マウスに大量注射することにより、インビオでのFVIII産生について試験した。AAVrh8R/5.1kb FVIIIベクター用の產生細胞株（PCL）を生成するため、Tripl e Playプラスミド、pAFTGEN-SEAP-caprh8RをBglIIで消化し、平滑末端化させた。隣接する5'および3'AAV2 ITTRを有するFVIIIベクターゲノムを、PvuIおよびSapI部位を使用して、pUC57-mTTR-hFVIIIISQco-SpA）から切り取った。PvuI/SapIで平滑末端化された5.5kbフラグメントをTripl e Playプラスミドにライゲーションし、5.1kbのFVIIIベクターおよびAAVrh8Rcap遺伝子を有するプラスミドを生成させた。AAV8cap遺伝子を含む同様の構築物を生成させた。合成ポリア領域をウシ成長ホルモン（BGH）ポリアで置換することにより、AAVrh8Rcap遺伝子および5.4kbベクターを有するTripl

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 ベクター用の產生細胞株の生成

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 60 × 96 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 24 ウェルディッシュに移し、サイズに基づいて 24 ウェルディッシュに収集した。

20

【 0 1 6 0 】

次いで、相対的產生 ( R P ) スクリーニングのため、マスター ウェルを 96 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產生について陽性であった M W を、例えば q P C R によるベクター產生により、固有產生 ( 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 H u m . G e n e T h e r . M e t h . 24 : 253 ~ 269 頁 ) 。

【 0 1 6 1 】

5.1 k b および 5.4 k b の F V I I I ベクターを有する產生細胞株のゲノム D N A 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 D N A 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プロットにより分析した。これに関しては、ゲノム D N A 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 D N A 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 D N A および T r i p l e P l a y プラスミド ( ゲノム D N A 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。 D N A 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 】

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

選択された M W を、 r A A V ベクター產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 293 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產生法で、 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、產生細胞株法と同様に精製を行った。両方法由來のサンプルを 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。キャブシドの S D S - P A G E 分析、 A U C 分析により、パッケー

50

ジン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 / mTTT R - hFVIIIB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、14,000rpm、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3M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、30mM NaOHおよび1mM 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、FVIIIB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FVIIIBドメイン全てを含む、4.0kb NheI-XcmIフラグメントを含んでいた。さらに、各種25~30mer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11kPhos 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pH7.0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動でアプライした。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、プ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。ImageJソフトウェア（rsb.info.nih.gov/v/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	GACGTGGTGCCTTCGA	5
FVIII A1-リバース プライマー	GGCGTAATCCCAGTCCTCT	6
FVIII A1 プローブ	AAGCGTGGCCAAGAACCCCC	7
アンピシリン <sup>R</sup> 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-ACGCTCGTCGTTGGTATGGCTTCATTCTAMRA	10
ピューロマイシン <sup>R</sup> 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-TCACCGAGCTGCAAGAACTTTCCCTCAC-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	GGCAGCCTTGATTGGGA	15
Rep-プローブ	FAM-AATGCGGCCTCCAACTCGCG-TAMRA	16
E6 遺伝子定量化		
E6-フォワードプライマー	CAACACGGCGACCCCTACAA	17
E6-リバースプライマー	TCCAATACTGTCTGCAATATACACAGG	18
E6-プローブ	FAM-TGCACGGAACACTTCACTGCAAG-TAMRA	19
ベクターゲノム分析		
Oligo#4768 (+)	CCGTCGTGAATAGCCTGGACCCCTC	20
Oligo#4924 (+)	ATCTGTGTGTTGGTTTTGTGTGCGGC	21
Oligo#3342 (-)	AATCCCAGTCCTCTCCTCGCGGCGATA	22
Oligo#4900 (-)	AGTATCGAACACTCGCTACGAAATGT	23

## 【0167】

インビボで産生細胞株から生成された A A V / m T T R - h F V I I I ベクターの評価  
r A A V ベクターを、8~12週齢の、オスの血友病 A K O マウス ( C 5 6 B L / 6  
、1 2 9 S - F 8 t m 1 K a z [ エクソン 1 6 に n e o 遺伝子 ] ) ( J a c k s o n L  
a b o r a t o r i e s ) で評価した。ベクター ( 4 、 1 0 および 3 0 × 1 0 <sup>1 0</sup> D R P  
/ マウス ) を、尾静脈から静脈内経路で投与した。後眼窩洞 ( r e t r o - o r b i t a  
1 s i n u s ) 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（Diapharma）を使用して、FVIII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FVIII活性%として測定し、ng/ml（FVIII 100% = FVIII 150ng/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、ブル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FVIIIタン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RLTplus 1mL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。Tri mega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ニカラム（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、FVIII A2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FVIII mRNA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ベクター產生用のPCLプラットフォームを生成するため、FVIII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バリエントが構築された（図1Bで与えるバリエント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ピ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FVIIIを產生した（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FVIII產生が増加したが、mTTRエンハンサーおよびBGHポリアなどのさらなる改変では増加しなかった（図1C）。図1DはFVIII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ポリアを有する発現カセット（5.4kb）を、それについて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FVIIIベクター產生についてのその後の試験に使用した。FVIIIのELISA結果から、トランسفェクトされたTriple Play/FVIIIプラスミドが、Hu h 7細胞にトランسفェクトされると、インピトロでFVIIIを產生することが確認された。FVIII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、インピボで、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プラスミドがインピトロでFVIII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-FVIIIベクターを有する產生細胞株を生成

10

20

30

40

50

するため、r A A V r h 8 R / F V I I I 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 r A A V / m T T R - F V I I I ベクター用の P C L を生成させることができることが示された。

【実施例 2】

【0174】

m T T R - F V I I I ベクターを有する産生細胞株のゲノム D N A の特徴

T r i p l e P l a y 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 F V I I I 発現カセットの完全性を評価するため、A A V r h 8 R / 5 . 1 k b 、 A A V r h 8 R / 5 . 4 k b 、または A A V 8 / 5 . 1 k b F V I I I ベクターを含む MW をゲノム D N A 分析用に選択した。

10

【0175】

高産生 MW ( M W # 3 5 ) では、サザン分析により、細胞株ゲノム中のベクターが約 5 0 コピーであったことが明らかとなり、中産生 M W # 2 7 2 は、サザンによりそれぞれ 1 0 コピー未満を有していた ( 図 2 A ) 。

【0176】

m T T R - F V I I I を有する A A V r h 8 R / 5 . 1 k b 、 A A V r h 8 R / 5 . 4 k b または A A V 8 / 5 . 1 k b の産生について、高産生および中産生 MW を q P C R でも分析した ( 表 2 ) 。 F V I I I 、 r e p および p u r o R 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、 H e L a S 3 細胞に存在する E 6 遺伝子 ( H e L a S 3 ゲノムあたり 1 1 コピー ) に正規化した。高産生 MW ( M W # 3 5 ) では、 q P C R 分析により、ベクター、 r e p およびピューロマイシンが約 5 9 ~ 6 7 コピーであった ( 表 2 ) ことが明らかとなり、中産生 M W # 2 7 2 では、 q P C R によりそれぞれ 1 5 ~ 1 8 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 2 A ) 。比較のため、 S E A P を発現する通常のサイズのベクター ( 4 . 3 k b ) を A A V 2 または A A V 8 キャプシドにパッケージングして分析した。

20

【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。

30

細胞株	マスター ウエル	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	

40

【0178】

50

Triple Play / FVIII 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のサザンプロット分析により、ゲノムDNAにスパイクとして加えた直鎖状Triple Play / FVIII プラスミドと同様に泳動された約13kb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2A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(中產生株)および35(高產生株)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、MW418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 $2 \times 14 = 24$ 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、MW418がクローンの混合物であったことを示唆している。

10

【0180】

図2Bに示すように、FVIII発現カセット内を切断する酵素(Hinc II、Bg I II)で消化することにより、FVIII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。5.4kbベクターを有する產生細胞株、およびAAV8キャプシドを伴う5.1kbベクターを有する產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5.4kbベクター配列における再構成または欠失は、產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產生細胞株の生成が実行可能であることを示した。

20

【実施例3】

【0181】

產生細胞株を使用してのオーバーサイズベクター產生、およびベクター分析

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

30

【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による產生をスケールアップしてベクター產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】

40

表3.MW#35によるAAVrh8R/5.1kbベクター產生。

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

【0184】

50

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。MW35および418はともに、数回の継代にわたって安定であった。MW35は、継代数5～継代数20にかけて高レベルの産生( $1 \times 10^{10}$  DRP / ml以上)を維持した(図3B)。同様に、MW418(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( $1 \times 10^9$  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MW287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 mTTT-R-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	$2 \times 10^9$ 細胞	$3 \times 10^9$ 細胞
総ベクター収量	$2 \times 10^{14}$ DRP	$6 \times 10^{13}$ DRP
収量/細胞	$1 \times 10^5$ DRP/細胞	$2 \times 10^4$ 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、MW35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 $1 \times 10^5$  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、 $1 \times 10^3$  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	產生細胞株	トリプルトランスフェクション
細胞/產生	$2 \times 10^9$ 細胞	$2 \times 10^9$ 細胞
総ベクター収量(粗収量)	$2 \times 10^{13}$ DRP	$2 \times 10^{14}$ DRP
収量/細胞	$2 \times 10^4$ DRP/細胞	$7 \times 10^4$ DRP/細胞
VGを含むウイルス%	24 %	23 %
VG>4.7kbのウイルス% <sup>s</sup>	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產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

30

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

## 【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、選択された產生細胞株が、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產生能力を、数回の継代(20超)にわたって維持していた。PCLにより產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產生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により產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產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プロット分析を行った(図6A)。FVIII発現カセットの4.0kbフラグメントでプローブしたサザンプロットにより、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4.6kb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、サザンプ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4.7kb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することで(2.4×10<sup>9</sup>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をアプライする)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、4.6kb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】

4.7kb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4.6kbベクター(FVIIIのC1ドメインをコードする領域を除き、5.1kbベクターと同等の配列を有する)と比較して、5.1kb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により大きかった。

【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プ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ドットプ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(4.6kb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FVIII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プ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、4.6kb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プロットを

10

20

30

40

50

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 FVIIIB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/mTTT-R-FVIIIB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產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 $3 \times 10^{11}$ および $4 \times 10^{10}$ DRP/マウスで投与し、56日目まで分析した。PCLにより產生されたAAVrhh8R/5.1 kb mTTT-R-FVIIIB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FVIIIT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FVIIIT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（ $2 \times 10^{12}$  DRP/kg、 $4 \times 10^{10}$  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產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により產生されたウイルスよりも活性なFVIIITタンパク質を產生した（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 FVIIIB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

10

20

30

40

50

Lにより生成された5.4kbベクターは、24日目に、Coatestアッセイにより高い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/mTTT-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關していた。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6.7kb SEAPベクターを有する産生細胞株の生成

方法：5.1kbから5.9および6.7kb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2.4kb)のAAATスタッフア-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、各スタッフアーフラグメントを、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ウェルハイスループ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6.7kb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<sup>7</sup>DRP/ml超を産生)パーセントは全体的に高く(80%超)、6.7kb構築物のみが量の減少を示した(65.7%)。さらに、5.1kb構築物のみが、高い(1×10<sup>10</sup>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<sup>9</sup>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、5.1kbで20%、5.9kbで15.4%および6.7kbで10.7%であった。

10

20

30

40

50

## 【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6.7 kb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 (5097 bp)  
 GAGCTCTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA  
 CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCGGGCTT  
 TGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGAGAGAG  
 GGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTACGCGTGTG  
 TGTCTGCACATTCTGAGAGCGAGTGTCTCCGATACTCTAA  
 TCTCCCTAGGCAAGGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATT  
 CTCCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGT  
 TTGGAGTCAGCTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAA  
 GGAGGGGGTATAAAAGCCCCCTTCACCAAGGAGAAGCCGTC  
 CACAGATCCACAAGCTCCCTGCTAGCAGGTAAGTGCCGTGT  
 GTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCC  
 TTGCGTGCCTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTTC  
 TTTTCTCCACAGGTATCGATTCTCTAGAGCCACCATGCA  
 GATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGCGG  
 TTCTGCTTCAGCGCCACCAAGACGGTACTATCTGGCGCCG  
 TGGAACTGAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGCGA  
 GCTGCCCGTGGATGCCAGATTCCCTCCAAAGAGTGCCAAG  
 AGCTTCCCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACC  
 TGTTCGTGGAAATTCAACCGACCACTGTTCAATATCGCCA  
 GCCCAGACCCCCCTGGATGGGCTGCTGGGACCTACAATT  
 CAGGCCGAGGTGTACGACACCGTCGTGATCACCCCTGAAGA  
 ACATGGCCAGCCACCCCGTGTCTCTGCATGCCGTGGAGT  
 GTCCTACTGGAAAGGCCCTCTGAGGGCGCGAGTACGACGAT  
 CAGACCAAGCCAGCGAGAAAGAGGGACGACAAAGGTGTTCC  
 CTGGCGGCAGCCACACCTACGTGTGGCAGGTGCTGAAAGA  
 AACCGGCCCATGGCCTCCGACCCCTCTGTGCTGACATAC  
 AGCTACCTGAGCCACGTGGACCTCGTGAAGGACCTGAACA  
 GCGGCCCTGATCGGAGGCCCTGCTCGTGTGAGAGAGGGCAG  
 CCTGGCCAAGAGAAAACCCAGACCCCTGCAACAAGTTCATC  
 CTGCTGTTGCCGTGTTCGACGAGGGCAAGAGAGCTGGCACA  
 GCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACGCCGC  
 CTCTGCTAGAGCCTGGCCAAAATGCACACCGTGAACGGC  
 TACGTGAACAGAACAGCCTGCCGGACTGATCGGCTGCCACC  
 GGAAGTCTGTGACTGGCACGTGATCGGCATGGGACACACCTT  
 CCTGAGGTGCAAGCATCTTCTGGAAGGACACACCTT  
 CTCGTGCGGAACCACCGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGCC 50

CTATCACCTTCCCTGACCGCCAGACACTGCTGATGGACCT  
 GGGCCAGTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCCCACCAAG  
 CACGACGGCATGGAAAGCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCC  
 CCGAGGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAAACGAGGAAGC  
 CGAGGAACCTACGACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGAC  
 GTGGTGCCTCGACGACGATAACAGCCCCAGCTTCATCC  
 AGATCAGAACAGCTGGCCAAGAACGACCCCCAAGACCTGGGT  
 GCACATATATGCCGCCGAGGAAGAGAGGACTGGGATTACGCC  
 CCTCTGGTGCCTGGCCCCGACGACAGAACAGCTACAAAGAGCC  
 AGTACCTGAACAAATGGCCCCCAGCGGATCGGGCGGAAGTA 10  
 TAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGGAGACATT  
 AAGACCAAGAGAGGGCCATCCAGCAGCAGAGAGCGGGCATCCTGG  
 GCCCTCTGCTGTATGGCGAACGTGGCGACACCCCTGCTGAT  
 CATCTTCAAGAACCAAGGCCAGCAGACCCCTACAAACATCTAC  
 CCTCACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTACTCCAGAA  
 GGCTGCCCAAGGGCGTGAAACACCTGAAGGACTTCCCCAT  
 CCTGCCCGGCGAGATCTCAAGTACAAGTGGACCGTGACC  
 GTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGACCCCCAGATGCCTGA  
 CACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACAGGGACCT  
 GGCCTCCGGCCTGATTGGCCCACTGCTGATCTGCTACAAA 20  
 GAAAGCGTGGACCCAGCGGGGCAACCAAGATCATGAGCGACA  
 AGCGGAACGTGATCCTGTTAGCGTGTGATGAGAACCG  
 GTCCTGGTATCTGACCGAGAATATCCAGCGGTTCCCTGCC  
 AACCTGCCGGCGTGAGCTGGAAAGATCCTGAGTTCCAGG  
 CCTCCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTG  
 CAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCCTGCAAGGAGTGGCCTAC  
 TGGTACATCCTGAGCATCGGGGCCAGACCGGACTTCCCTGT  
 CGTGTGTTCTTCTCCGGTACACCTTCAAGCACAAGATGGT  
 GTACGAGGATAACCTGACCCCTGTTCCCTTTAGCGGGGAA 30  
 ACCGTGTTCATGAGCATGGAAAACCCCGGCCCTGTGGATCC  
 TGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGGCATGAC  
 CGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGC  
 GACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTACC  
 TGCTGAGCAAGAACAAATGCCATCGAGCCCAGAAGCTTCAG  
 CCAGAACCCCCCGTGCCTGAAGCGGCCACCAGAGAGAGATC  
 ACCCGGACCAACCTGCAAGTCGACCAAGGAAGAGATCGATT  
 ACGACGACACCATCAGCGTGGAAATGAAGAAAGAAAGATT  
 CGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAAGAGGCCCCGGTCC  
 TTTCAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCTGTGG  
 AACGGCTGTGGACTACGGCATGAGCAGCAGGCCCTCACGT 40  
 GCTGAGAAACAGGGCCAGAGCGGGCAGCGTGGCCCTAGTT  
 AAGAAAGTGGTGTCCAGGAATTACAGACGGCAGCTTCA  
 CCCAGCCTCTGTACCGCGGGAGCTGAATGAGCAGCTGGG  
 ACTGCTGGGCCCTATATCAGAGCCGAAGTGGAAAGATAAT  
 ATCATGGTCACCTTCCGGAAATCAGGGCTCCCGGCCCTACA  
 GCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGAGGACCAAG  
 ACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAAGAACCTCGTGAAGGCCAAC  
 GAGACTAAGACCTACTTTGGAAAGGTGCAGCACCAACATGG  
 CCCCTACAAAGGACGAGTTGACTGCAAGGCCCTGGGCTA  
 CTTCTCCGATGTGGACCTGGAAAAGGACGTGCACCTCTGGG 50

CTGATCGGCCCTGCTCGTGTGCCACACCAACACCCCTGA  
 ATCCC GCCCACGGCAGACAAAGT GACAGTGCAGGAATT CGC  
 CCTGTTCTTACCCATCTCGACGAAACAAAGAGACTGGTAC  
 TTCACCGAAAACATGGAAAGAAAACTGCGGGCTCCCTGCA  
 ACATCCAGATGGAAAGATCCCACCTTCAAAAGAGAACTACCG  
 GTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACACTGCC  
 GGCCTCGT GATGGCTCAGGATCAGCGGATCCGGTGGTATC  
 TGCTGTCCATGGGCTC CAACGAGAACATCCACAGCATCCA  
 CTTCAGCGGCCACGTGTTCACCGTGC GGAAAAAGAAGAG  
 TACAAAATGGCCCTGTACAAACCTGTACCCCTGGGGTGGT 10  
 AGACAGTGGAAATGCTGCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCG  
 GGTGGAATGTCTGATCGGCAGCATTCTGCACTGCACGCTGGGATG  
 AGCACACTGTTCTGGTGTACAGCAACAAAGTGCCAGACAC  
 CTCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCCGGGACTTCAAGAT  
 CACAGCCAGCGGCCAGTATGCCAGTGGGCCCCAAAAGTG  
 GCCAGACTGC ACTACAGCGGCAGCATTCAACGCCCTGGTCCA  
 CCAAAGAGGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGC  
 TCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGA  
 CAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCA  
 TGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGG 20  
 CAATAGCACCGGCACCCCTGATGGTGTCTTCGGCAACGTG  
 GACTCCAGCGGCATTAAGCACAACATCTTCAACCCCCCA  
 TCATTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCCCACCCACTACAG  
 CATCCGGTCCACCCCTGAGAATGGAACTGATGGGCTGCGAC  
 CTGAACCTCTGCAGCATGCCCTGGGGATGGAAAGCAAGG  
 CCATCTCCGACGCCAGATCACCGCCTCCAGCTACTTCAC  
 CAACATGTTGCCACCTGGTCCCCATCCAAGGCCCGGCTG  
 CATCTGCAGGGCAGAAGCAATGCTTGGAGGCCAGTGA  
 ACAACCCCCAAAGAATGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAAAC  
 CATGAAAGT GACCGGGCGTGACCAACCCAGGGCGTGAAGTCT 30  
 CTGCTGACCTCTATGTACGTGAAAGAGTTCTGATCTCCA  
 GCAGCCAGGACGCCACCAAGTGGACCCCTGTTTCCAGAA  
 CGGCAAAGT GAAAGTGTGTTCAAGGGGAAACCAGGACTCCTTC  
 ACCCCCCGTCGTGAATAGCCTGGACCCCTCCACTGCTGACCA  
 GATACCTGCGGATCCACCCCTCAGAGTTGGGTGCAACAGAT  
 TGCTCTGCGGATGGAAGTGTGCTGGGATGCGAGGCCAGGAC  
 CTGTACTGACACTAGTAATAAAAGATCAGAGCTGTAGAGA  
 TCTGTGTGTTGGTTTTGTGTGCGGCCGGTACCAAGGAAC  
 CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCG 40  
 CTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGC  
 CGGGCTTGGCCGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCG  
 GCAGAGAGGGAGTGGCC (配列番号1)

m T T R 2 0 2 o p t  
 TGTCTGTCTGCACATTTCTGCTAGAGCGAGTGTCCGATACT  
 CTAATCTCCGGGGCAAAGGTGTTGACTTGTGATCTAGGTTACT  
 TATTCTCCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAACATCAGC  
 AGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGTT  
 GGAAGGGAGGGGTATAAAAGCCCCCTTCACCAAGGAGAACCC  
 GTCACACAGATCCACAAAGCTCCGTAGC (配列番号2) 50



ATAGCCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGA  
CCAATGAGAACCTTCCCTTCACGACTGTGTCGACAAGAT  
GGTGATCTGGTGGGAGGGAGGGAAAGATGACCGCCAAGGTC  
GTGGAGTCGGCCAAGGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGC  
GCGTGGACCAAGAACATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCC  
GACTCCC GTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCC  
GTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAACACCAAGCAGC  
CGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTGAACCTCACCCGCCG  
TCTGGATCATGACTTTGGGAAAGGTACCCAAGCAGGAAGTC  
AAAGACTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGG 10  
TGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAA  
AAGACCCGCCCGAGTCAGTGACGCAGATATAAGTGAGGCCAAA  
CGGGTGCAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACG  
CGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAA  
ATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCC  
TGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCT  
GCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTAGAGTGCTTTCC  
CGTGTCAAGAATCTCAACCCGTTCTGTCGTCAAAAAGGC  
TATCAGAAACTGTGCTACATTCATATCATGGGAAAGG  
TGCCAGACGCTTGCACTGCCCTGCGATCTGGTCAATGTGGA 20  
TTTGGATGACTGCATCTTGAACAATAATGATTAAATC  
AGGTATGGCTGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAG  
GACAACCTCTCTGAGGGCATTGCGAGTGTTGGGACCTGA  
AACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAAGC  
GGACGACGGCCGGGTCTGGTGCTTCCTGGCTACAAAGTAC  
CTCGGACCCCTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCA  
ACGCGGCCGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA  
CGACCAGCAGCTCAAAGCAGGTGACAATCCGTACCTGCGG  
TATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAAGGAGCGTCTGCAAG  
AAGATACGTCTTTGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTT 30  
CCAGGCCAAGAACGCGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTT  
GAGGAAGGGCGCTAACGACGGCTCCTGGAAAGAACGAGACCG  
TAGAGCAGTCACCCCAAGAACCCAGACTCATCCTCGGGCAT  
CGGCAAATCAGGCCAGCAGCCGCTAAAAAGAGAGACTCAAT  
TTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCAC  
AACCTCTCGGAGAACCTCCAGAACGCCCCCTCAGGTCTGGG  
ACCTAATAACAATGGCTTCAGGGCGTGGCGCTCCAATGGCA  
GACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGTAATTCTCGG  
GAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGGACAGAGT  
CATCACCAACCAGCACCGAACCTGGCATTGCCACCTAC 40  
AACAAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAATGGAACATCGG  
GAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTTGGCTACAGCAC  
CCCCCTGGGGTATTTGACTTCACACAGATTCCACTGCCAC  
TTCTCACCAACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAAACACT  
GGGGATTCCGGCAAAGAGAGACTCAACTTCAAGCTGTTCAA  
CATCCAGGTCAAGGGAGGTTACGACGAACGAAGGCACCAAG  
ACCATCGCCAATAACCTTACCGACCGTCCAGGTCTTTA  
CGGACTCGGAGTACCGAGCTACCGTACGTCCTAGGCTCTGC  
CCACCAAGGATGCCCTGCCACCGTTCTGCAGACGTCTTC  
ATGGTTCTCAGTACGGTACCTGACGCTCAACAAATGGAA 50

GTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTCTACTGTCTGGAATA  
CTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACTTTCAG  
TTCAGCTACACTTCGAGGACGTGCCTTCCACAGCAGCT  
ACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACTGATGAACCCCC  
CATCGACCAGTACCTATACTACCTGGTCAGAACACAGACA  
ACTGGAACTGGGGAACTCAAACCTTGGCATTCAAGCCAAG  
CAGGCCCTAGCTCAATGGCCAATCAGGCTAGAAACTGGGT  
ACCCGGGCCCTGCTACCGTCAGCAGCGGTCTCCACAACC  
ACCAACCAAAAATAACAACAGCAACTTGCCTGGACGGGAG  
CTGCTAAATTCAAGCTGAACGGGAGAGACTCGCTAATGAA 10  
TCCTGGCGTGGCTATGGCATCGCACAAAGACGACGAGGAC  
CGCTTCTTCCATCAAGTGGCGTTCTCATATTGGCAAGC  
AAGGAGCCGGAACGATGGAGTCGACTACAGCCAGGTGCT  
GATTACAGATGAGGAAGAAATTAAAGCCACCAACCTGTA  
GCCACAGAGGAATACGGAGCAGTGGCCATCAACAAACAGG  
CCGCTAACACACGCAAGCGCAAACCTGGACTTGTGCATAACCA  
GGGAGTTATTCTGGTATGGCTGGCAGAACCGGGACGTG  
TACCTGCAGGGCCCTATTTGGCTAAAATACCTCACACAG  
ATGGCAACTTTCACCCGTCTCCTCTGATGGTGGATTGG  
ACTGAAACACCCACCTCCACAGATTCTAATTAAAAATACA 20  
CCAGTGCCGGCAGATCCTCCCTTACCTTCATCAAGCCA  
AGCTGAACTCTTCATCACGCAGTACAGCACGGACAAGT  
CAGCGTGGAAATCGAGTGGAGCTGCAGAAAGAAAAACAGC  
AAGCGCTGGAAATCCAGAGATCCAGTATACTTCAAACACT  
ACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCGAAGG  
TGTTTACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGTACTCGTTACCTC  
ACCCGTAATTGTAATTGCCCTGTTAATCAATAAACCGGTT  
AATTCTGTTCAAGTTGAACCTTGGTCTCTGCGGGCCGGCCT  
TAATTAAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA  
CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTCCATAGGCTC 30  
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC  
AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGGC  
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG  
ACCCCTGCCGCTTACCGGATAACCTGTCCGCCCTTCTCCCT  
CGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTA  
TCTCAGTTGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAAGCTGGCTGT  
GTGCACGAACCCCCCGTTCAAGCCGACCGCTGCGCCTTAT  
CCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA  
CTTATGCCACTGGCAGTAGCCACTGGTAACAGGATTAGC  
AGAGCGAGGTATGTAGGCAGGTGCTACAGAGTTCTGAAAGT 40  
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAACAGTATTGG  
TATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTGGAAAAAGA  
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGAAACAAACCAACCGCTGGTA  
CGGGTGGTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG  
AAAAAAAGGATCTCAAGAACGATCCTTGTATCTTTCTACG  
GGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGA  
TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGAT  
CCTTTCACTGAGAACGCCAGTCCGCAGAAACGGTGTGA  
CCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAAGGG  
AAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGG 50

GCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTATGGACA  
GCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTA  
AGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTCTT  
GCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCCGAT  
CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTGCATGATTGAACAAG  
ATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG  
GCTATTGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGC  
TCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCGCC  
TGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCTGGTGCCTGAA  
TGAAC TGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCC 10  
ACGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTC  
CTGAAGCGGGAAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGCC  
GGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTGCTCCTGCCGAG  
AAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATA  
CGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCCACCAAGCGAA  
ACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGGCCGGT  
CTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGC  
TCGCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGAGCAT  
GCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCC  
TGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTCTG 20  
GATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTA  
TCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG  
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGTGCTTACG  
GTATCGCCGCTCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCG  
CCTCTTGACGAGTTCTCTGAATTAAATTAGCGGCCGCT  
CATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAAA  
CAAATAGGGGTTCCCGCGCACATTCCCGAAAAAGTGCCAC  
CTGACGTCAGATCCGGTGCGGGCCTCTCGCTATTACGCC  
AGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG  
GGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAACAG 30  
ACGGCCAGTGAATTGCGAGCTTGGCCACTCCCTCT  
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTC  
GCCCGACGCCGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCG  
AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCATCACTAG  
GGGTTCTACGCGTGTCTGTCTGCACATTCTGTAGAGCGA  
GTGTTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTCATATT  
TGTGTAGGTTACTTATTCTCTTTGTTGACTAAGTCAAT  
AATCAGAATCAGCAGGTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATC  
AGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGTATAAAAGCCCCCTTC  
ACCAGGAGAAGCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTA 40  
GCAGGTAAGTGCCGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTC  
TTTACGGGTTATGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTGACA  
CTGACATCCACTTTCTTTCTCCACAGGTATCGATT  
TCTAGAGCCACCATGCAAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCT  
TCCTGTGCCCTGCTGCAGGTTCTGCTTCAAGCGCACCAGACG  
GTACTATCTGGCGCCGTGGAACGTGAGCTGGGACTACATG  
CAGAGCGACCTGGCGAGCTGCCCGTGGATGCCAGATTCC  
CTCCAAGAGTGCCTAAGAGCTTCCCTCAACACCTCCGT  
GGTGTACAAGAAAACCCCTGTTCGTGGATTCAACCAGACCAC  
CTGTTCAATATGCCAAGCCAGACCCCCCTGGATGGGCC 50

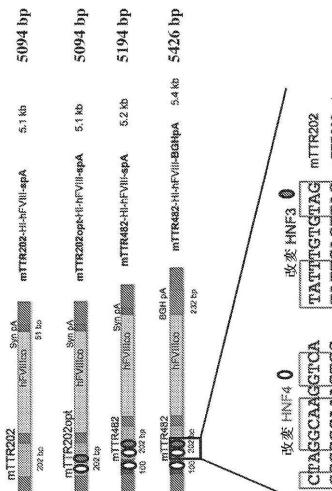
TGCTGGGACCTACAATTCAAGGCCGAGGTGTACGACACCGT  
 CGTGATCACCCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGTCT  
 CTGCATGCCGTGGGAGTGTCTACTGGAAAGGCCCTCTGAGG  
 GCGCCGAGTACGACGATCAGACCAAGCCAGCAGCAGAAAGA  
 GGACGACAAGGTGTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTACGTG  
 TGGCAGGTGCTGAAAGAAAAACGGCCCATGGCCTCCGACC  
 CTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGGCCACGTGGACCT  
 CGTGAAGGACCTGAACAGCAGCAGCCTGATCGGAGGCCCTGCTC  
 GTGTGTAGAGAGGGCAGCCTGGCCAAAGAGAGAAACCCAGA  
 CCCTGCACAAAGTTCATCCTGCTGTTGCCGTGTTGACGA 10  
 GGGCAAGAGACTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATG  
 CAGGACCGGGACGCCCTCTGCTAGAGCCTGGCCAAAA  
 TGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAACAGCCTGCCGG  
 ACTGATCGGCTGCCACCGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTG  
 ATCGGCATGGCACCAACCCCTGAGGTGCACAGCATTTC  
 TGGAAAGGACACACCTTCTCGTGCAGAACACCAGGCAAGG  
 CAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCCTGACCGCCAG  
 ACACGTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCTGCTGTTCTGCC  
 ACATCAGCTCCCACCAGCACGACGGCATGGAAGCCTACGT  
 GAAGGTGGACAGCTGCCCGAGGAACCCAGCTGCGGATG 20  
 AAGAACAAACGAGGAAGGCCGAGGACTACGACGACACTGA  
 CCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCCTCGACGACGATAAA  
 CAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAACAGCTGGCCAGAAC  
 CACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAG  
 AGGACTGGGATTACGCCCTCTGGTGCTGGCCCCGACGA  
 CAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAAATGGCCCCAG  
 CGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGCCTGTTCATGGCCT  
 ACACCGACGAGACATTCAAGACCAAGAGAGAGGCCATCCAGCA  
 CGAGAGCGGCATCCTGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTG 30  
 GCGACACCCCTGCTGATCATCTCAAGAACCAAGGCCAGCA  
 GACCCCTACAAACATCTACCCCTCACGGCATTACCGACGTGCG  
 GCCCTGTACTCCAGAACGGCTGCCCAAGGGCGTGAACAC  
 CTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCGGCGAGATCTCAAGT  
 ACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAAGATGGCCCCACCAAGAG  
 CGACCCCAAGATGCCCTGACACCGTACTACAGCAGCTCGTG  
 AACATGGAACGGGACCTGGCTCCGGCTGATTGGCCCCAC  
 TGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAAGCAGGGCAA  
 CCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTAGC  
 GTGTTGATGAGAACCGGTCCCTGGTATCTGACCGAGAATA  
 TCCAGCGGTTCCCTGCCCAACCCCTGCCGGCGTGCAGCTGGA 40  
 AGATCCTGAGTTCCAGGCCCTCCAACATCATGCACCTCCATC  
 AATGGCTATGTGTTCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCC  
 TGCACGAGGTGGCTACTGGTACATCCTGAGCGATCGGGGC  
 CCAGACCGACTTCCCTGTCCGTGTTCTCCGGCTACACC  
 TTCAAGCACAAGATGGTGTACGAGGGATACCCCTGACCCCTGT  
 TCCCCCTTACGGCGAACCGTGTTCATGAGCGATGGAAAA  
 CCCCCGGCCTGTGGATCCTGGCTGCCACAACAGCGACTTC  
 CGGAACAGAGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCT  
 GCGACAAGAACACCGGGGACTACTACGAGGGACAGCTATGA  
 GGACATCAGCGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAAATGCCATC 50

GAGCCCAGAAGCTTCAGCCAGAACCCCCCGTGTGAAGC  
 GGCACCCAGAGAGAGATCACCCGGACCAACCTGCAGTCCGA  
 CCAGGAAGAGATCGATTACGACGACACCATCAGCGTGGAA  
 ATGAAGAAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGA  
 ACCAGAGCCCCGGTCTTCAAGAAAAAGACCCGGCACTA  
 CTTCATTGCCGCTGTGGAACCGGCTGTGGACTACGGCAGT  
 AGCAGCAGCCCTCACGTGCTGAGAAACAGGGCCAGAGCG  
 GCAGCGTCCCCAGTTCAAGAAAGTGGTGTCCAGGAATT  
 CACAGACGGCAGCTTCACCCAGCCTCTGTACCGCGGCGAG  
 CTGAATGAGCACCTGGGACTGCTGGCCCTATATCAGAG 10  
 CCGAAGTGGAAAGATAATATCATGGTCACCTTCCAGGAATCA  
 GGCCTCCGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGC  
 TACGAAGAGGGACCAAGAGACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAGA  
 ACTTCGTGAAGCCTAACGAGACTAACGACCTACTTTGGAA  
 GGTGCAGCACCATGGCCCTACAAAGGACGAGTTCGAC  
 TGCAAGGCCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAAA  
 AGGACGTGCACTCTGGGCTGATCGGCCCTGCTCGTGTG  
 CCACACCAACACCCCTGAATCCGCCACGGCAGACAAGTG  
 ACAGTGCAGGAATTGCCCTGTTCTTACCCATTTGACG  
 AAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAAAACATGGAAAGAAA 20  
 CTGCCGGGCTCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCACC  
 TTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACA  
 TCATGGACACACTGCCCGGCCCTCGTGTGATGGCTCAGGATCA  
 GCGGATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGCTCCAACGAG  
 AACATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCG  
 TGCGGAAAAAGAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAACCT  
 GTACCTGGGTGTTCGAGACAGTGGAAATGCTGCCAGC  
 AAGGCCGGCATCTGGCGGGTGGAAATGTCGTGATCGGCGAGC  
 ATCTGCACGCTGGGATGAGCACACTGTTCTGGTGTACAG 30  
 CAACAAAGTGCCAGACACCTCTGGCATGGCCCTCTGGCAC  
 ATCCGGGACTTCAAGATCACAGCCAGCGGCCAGTATGCC  
 AGTGGGCCCCAAACTGGCCAGACTGCACACTACAGCGGCAG  
 CATCAAACGCCCTGGTCCACCAAAAGAGGCCCTTCAGCTGGATC  
 AAGGTGGACCTGCTGGCTCCCATGATCATCCACGGAAATCA  
 AGACCCAGGGGCCAGACAGAAGTTCAAGCAGCCCTGTACAT  
 CAGCCAGTTCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAG  
 TGGCAGACCTACCGGGCAATAGCACCGGCACCCCTGATGG  
 TGTTCTTGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAA  
 CATCTTCAACCCCCCATCATTGCCCGGTACATCCGGCTG  
 CACCCACCCACTACAGCATCCGGTCCACCCCTGAGAATGG 40  
 AACTGATGGGCTGCGACCTGAACTCCTGCAGCATGCC  
 GGGGATGGAAAGCAAGGCCATCTCCGACGCCAGATCACCC  
 GCCTCCAGCTACTTCACCAACATGTTCGCCACCTGGTCCC  
 CATCCAAGGCCCCGGCTGCATCTGCAGGGCAGAAGCAATGC  
 TTGGAGGGCCCCAAGTGAACAAACCCAAAGAATGGCTGCA  
 GTGGACTTCCAGAAAACCATGAAAGTGAACCGGGCGTGA  
 CCCAGGGCGTGAAGTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAA 50  
 AGAGTTCCGTACCTCAGCAGCCAGGACGGCCACCAAGTGG  
 ACCCTGTTTCCAGAACGGCAAAGTGAAGTGTGTTTCAGG  
 GGAACCAGGACTCCCTCACCCCCGGTGTGAATAGCCTGGA

CCCTCCACTGCTGACCAAGATAACCTGCGGATCCACCCCTCAG  
 AGTTGGGTGCACCAAGATTGCTCTGCGGATGGAAGTGTGCTGG  
 GATGCGAGGCCAGGACCTGTACTGACAACTAGTAATAAA  
 AGATCAGAGCTGTAGAGATCTGTGTGTTGGTTTTGTGT  
 GCGGCCGGTACCCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA  
 CTCCCTCTCTGCGCCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCG  
 ACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGCTTTGGTCGGCGGCC  
 TCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGAGGGAGTGGCCGGAA  
 GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTGTGTGAAA  
 TTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAAACATACGAGGCCGGA 10  
 AGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT  
 AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCA  
 GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC  
 CAACGCGCGGGGAGAGGCCGGTTGCGTATTGGCGCTCTT  
 CCGCTGATCTCATACTAGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCC  
 CAGCGCGTCGGCCCGAGATGCGCCGCGTGCCTGCTGG  
 AGATGGCGGACCGATGGATATGTTCTGCCAAGGGTTGGT  
 TTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCTCCA  
 ATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCCTG  
 CTTCATCCCCGTGGCCCGTTGCTCGCGTTGCTGGCGGTG 20  
 TCCCCCGGAAGAAATATATTGCAATGCTTTAGTTCTATGA  
 TGACACAAACCCGCCAGCGTCTTGTCAATTGGCGAATT  
 CGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCC  
 CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCT  
 CAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGGCTCC  
 CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGT  
 CAGCAACCATAGTCCGCCCTAACTCCGCCATCCGCC  
 CCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCATGGC  
 TGACTAATTTTTATTGCAAGGAGGCCGAGGCCGCT 30  
 CGGCCCTGTAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCCCTT  
 TGGAGGCCCTAGGCTTTGCAAAAAGCTTGCATGCCCTGCA  
 GTCGGCCGCCACGACCGGGTGCCGCCACCATCCCTGACCC  
 ACGCCCTGACCCCTCACAAAGGAGACGACCTTCCATGACC  
 GAGTACAAGCCCACGGTGCGCCCTGCCACCCGGACGACG  
 TCCCCCGGGCGTACGCACCCCTGCCGCCGGCTTCGCCGA  
 CTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGACCCGGACCGCCAC  
 ATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAAACTCTTCCTCACGC  
 GCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGGGACGA  
 CGGCCGCCGGTGGCGGTCTGGACCAAGGCCGGAGAGCGTC  
 GAAGCGGGGGCGGTGTTGCCAGATCGGCCGCCGCATGG 40  
 CCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCCAGCAACAGAT  
 GGAAGGCCCTCCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGGCCCG  
 TGGTTCCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCAACAGG  
 GCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGG  
 GCGGGCCGAGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCC  
 TCCGCGCCCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGCTCGGGCT  
 TCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCCGAAGGAGCC  
 CACCTGGTGCATGACCCGCAAGGCCGGTGCCTGACGCC  
 CCCCACGACCCGCAGCGCCGGACCGAAAGGAGCGCACGAC  
 CCCATGGCTCCGACCGAAGGCCACCCGGGGCGGCCCG 50

A C C C C G C A C C C G C C C C G A G G 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 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 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1A】



【図1B】

mTTR202(ab)+ 1 CTACCTGGTGAATGCCCGGCCCTGTTAACACATGTCCTAAATCTGTCGGGCAAAGG 68  
 mTTR202(ab) 1   
 mTTR202(a) 1   
 mTTR202(b) 1   
 mTTR202(wt) 1

mTTR202(ab)+ 61 TGGCCAGTAGTTTCACATCTACTCACACATCTCCAGTGTAGCTAGCTGTC 128  
 mTTR202(ab) 1   
 mTTR202(a) 1   
 mTTR202(b) 1   
 mTTR202(wt) 1

mTTR202(ab)+ 121 TGGACATTCCTAGACCCAGTGCTGATCTAAATCCGGGGAAGCTCTATTC 180  
 mTTR202(ab) 9 TGGACATTCCTAGACCCAGTGCTGATCTAAATCCGGGGAAGCTCTATTC 68  
 mTTR202(a) 9 TGGACATTCCTAGACCCAGTGCTGATCTAAATCCGGGGAAGCTCTATTC 68  
 mTTR202(b) 9 TGGACATTCCTAGACCCAGTGCTGATCTAAATCCGGGGAAGCTCTATTC 68  
 mTTR202(wt) 9 TGGACATTCCTAGACCCAGTGCTGATCTAAATCCGGGGAAGCTCTATTC 68

mTTR202(ab)+ 181 ACTAGTGTACTTTCTCTTTGTGACTAGTCAATAATCAGAACTCAGAGTTGG 248  
 mTTR202(ab) 69 ACTAGTGTACTTTCTCTTTGTGACTAGTCAATAATCAGAACTCAGAGTTGG 128  
 mTTR202(a) 69 ACTAGTGTACTTTCTCTTTGTGACTAGTCAATAATCAGAACTCAGAGTTGG 128  
 mTTR202(b) 69 ACTAGTGTACTTTCTCTTTGTGACTAGTCAATAATCAGAACTCAGAGTTGG 128  
 mTTR202(wt) 69 ACTAGTGTACTTTCTCTTTGTGACTAGTCAATAATCAGAACTCAGAGTTGG 128

mTTR202(ab)+ 241 ACTGACCTTCAGGGATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 368  
 mTTR202(ab) 129 ACTGACCTTCAGGGATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(a) 129 ACTGACCTTCAGGGATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(b) 129 ACTGACCTTCAGGGATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(wt) 129 ACTGACCTTCAGGGATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168

mTTR202(ab)+ 381 CAGCGGAACGCTTCAGCAACATCAACACCTCTCTACAGCACTAACTGCTGTC 368  
 mTTR202(ab) 189 CAGCGGAACGCTTCAGCAACATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(a) 189 CAGCGGAACGCTTCAGCAACATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(b) 189 CAGCGGAACGCTTCAGCAACATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168  
 mTTR202(wt) 189 CAGCGGAACGCTTCAGCAACATCAACACCTCTGGCTTGAAGGAGGGCTATAAAAGCCCTTCA 168

mTTR202(ab)+ 363 TTGGCCCGGGCTGGCTTCTTACGGGTATGGCCCTGGCTTGAATTAATGACAC 428  
 mTTR202(ab) 249 TTGGCCCGGGCTGGCTTCTTACGGGTATGGCCCTGGCTTGAATTAATGACAC 208  
 mTTR202(a) 249 TTGGCCCGGGCTGGCTTCTTACGGGTATGGCCCTGGCTTGAATTAATGACAC 208  
 mTTR202(b) 249 TTGGCCCGGGCTGGCTTCTTACGGGTATGGCCCTGGCTTGAATTAATGACAC 208  
 mTTR202(wt) 249 TTGGCCCGGGCTGGCTTCTTACGGGTATGGCCCTGGCTTGAATTAATGACAC 208

mTTR202(ab)+ 421 TGGATCCACATTTCTTTCTTCTC 445  
 mTTR202(ab) 389 TGGATCCACATTTCTTTCTTCTC 233  
 mTTR202(a) 389 TGGATCCACATTTCTTTCTTCTC 233  
 mTTR202(b) 389 TGGATCCACATTTCTTTCTTCTC 233  
 mTTR202(wt) 389 TGGATCCACATTTCTTTCTTCTC 233

mTTR202(ab)+ = "482" HNF-3 および HNF-4 ドメイン変更ならびに100bpの遠位mTTR  
 エンハンサー

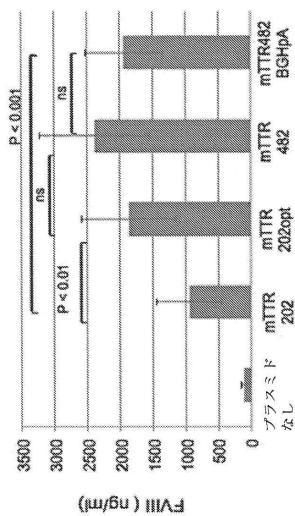
mTTR202(ab) = HNF-3 および HNF-4 ドメイン変更

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クレーピングモーター配列

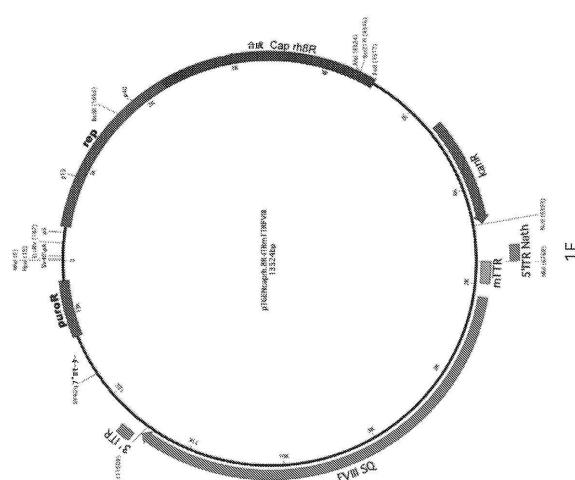
【図1C】



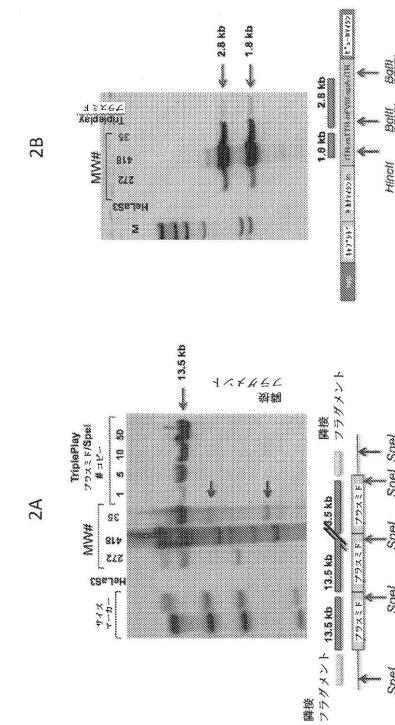
## 【 図 1 D 】



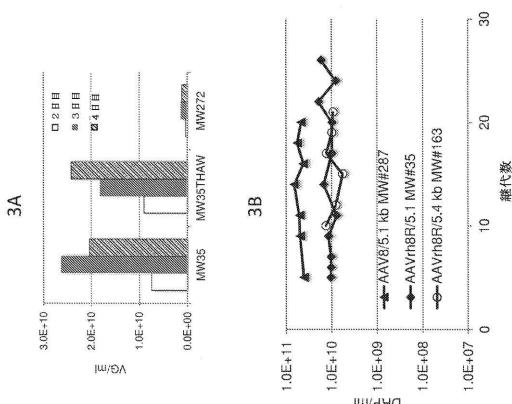
【 図 1 E 】



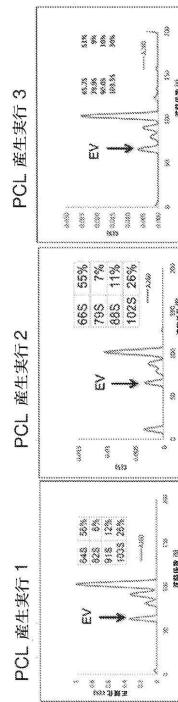
【 図 2 】



【図3】

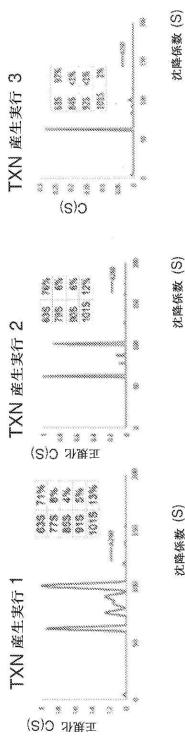


【図4 A】

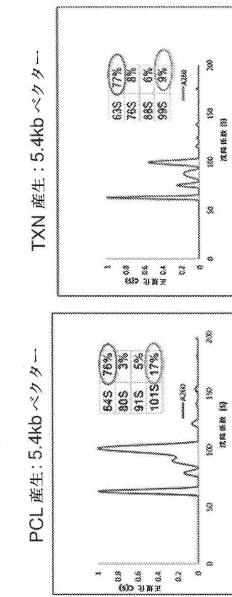


4A

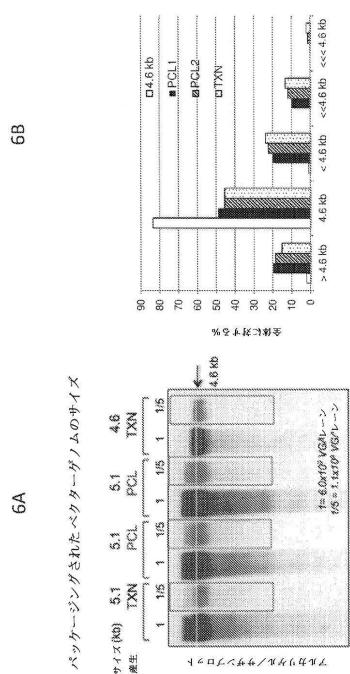
【図4 B】



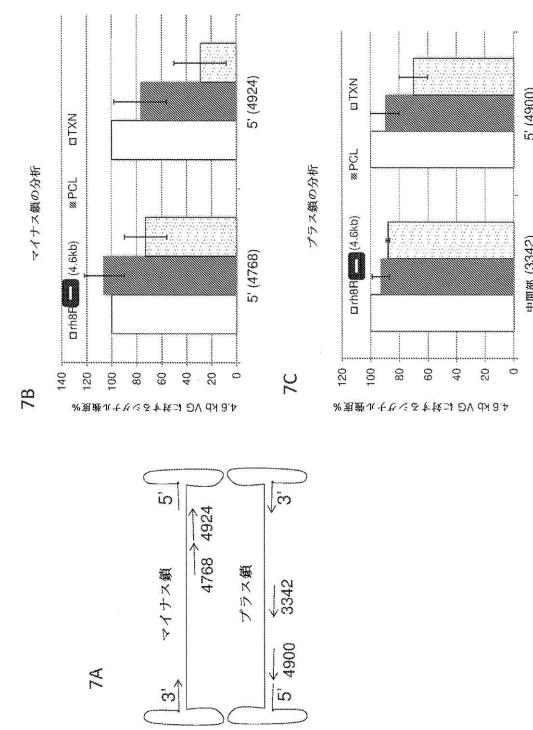
【図5】



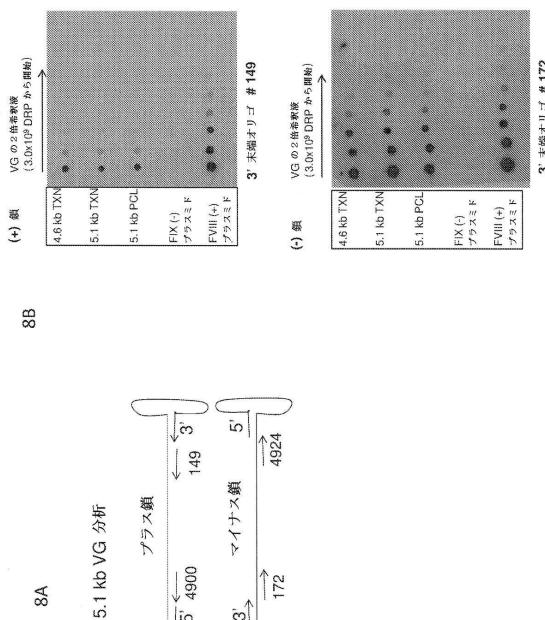
【図6】



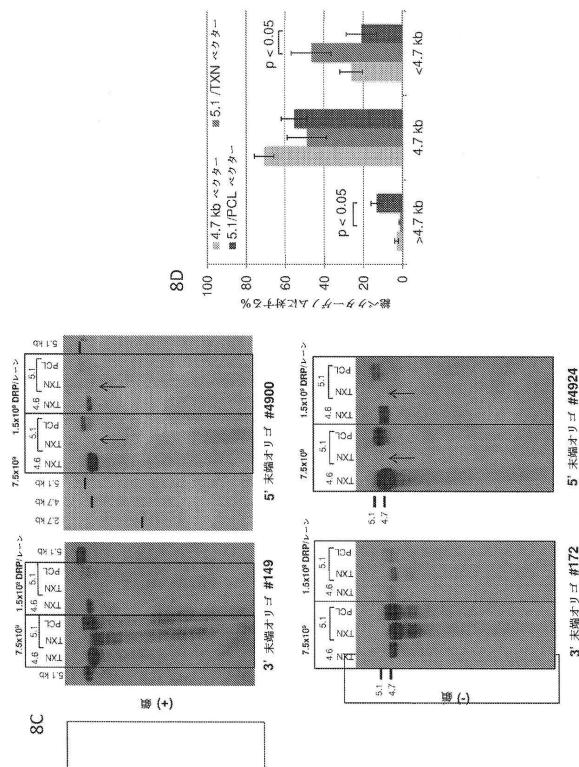
【図7】



【図8-1】



【図8-2】

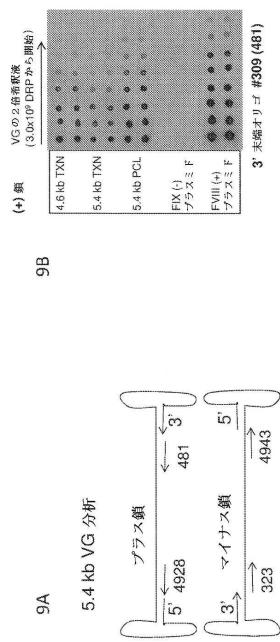


5' 末端オリゴ #4900

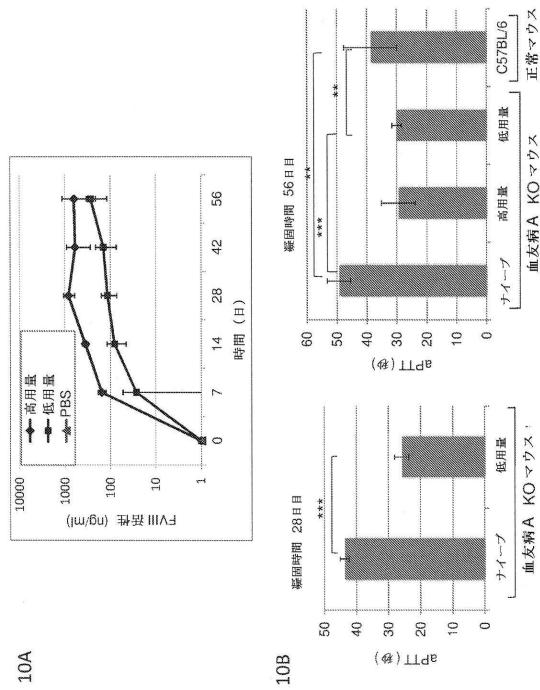
3' 末端オリゴ #119

3' 末端 #172

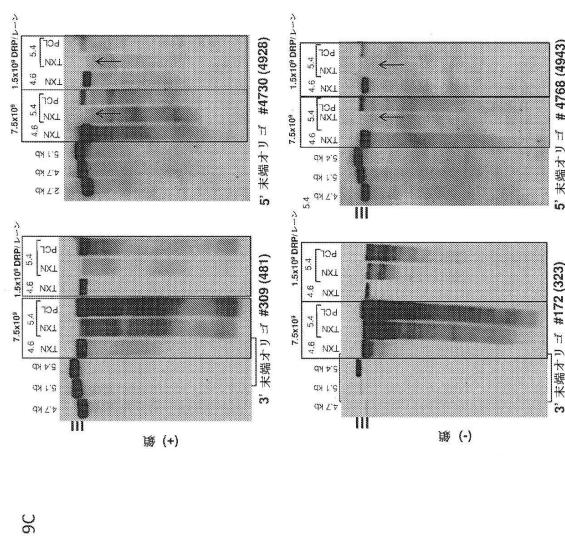
【 図 9 - 1 】



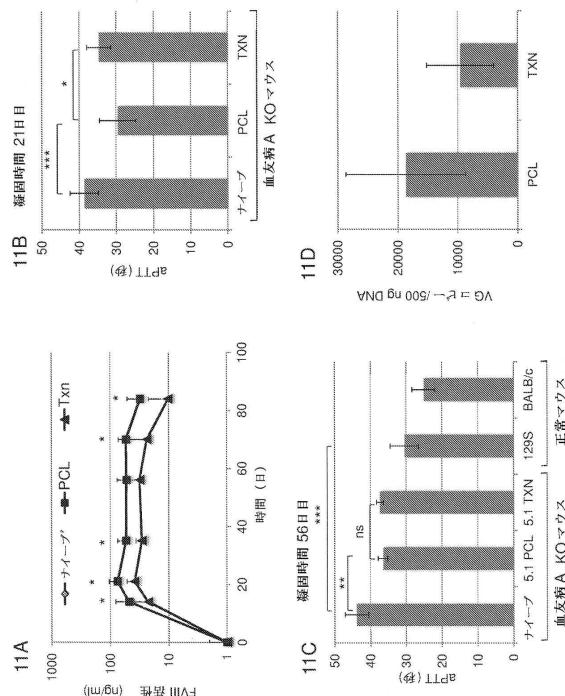
【 図 1 0 】



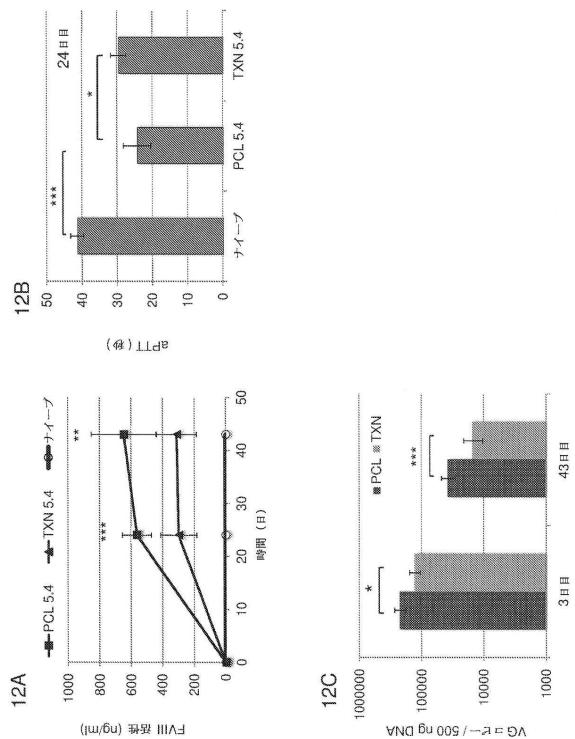
【図9-2】



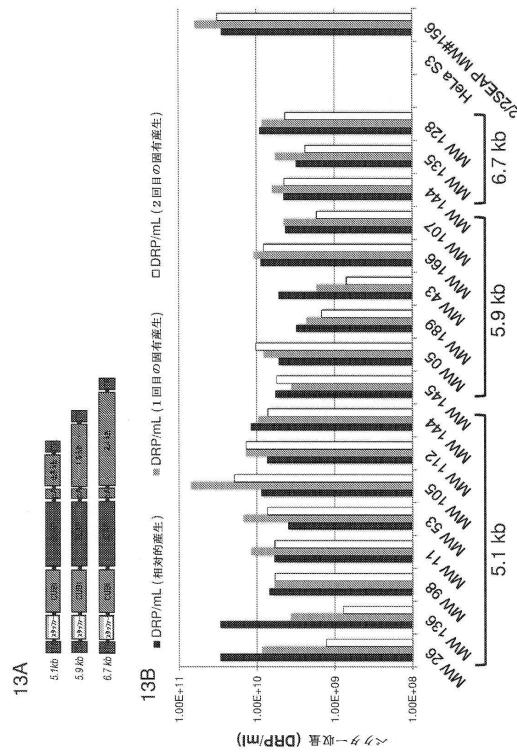
【 図 1 1 】



【図12】



【図13】



【配列表】

[0006878299000001.app](http://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08807.プリッジウォーター.メイルコード:55エー-  
505エー.コーポレートドライブ55.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08807.プリッジウォーター.メイルコード:55エー-  
505エー.コーポレートドライブ55.サノフィ

審査官 斎藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第2015/038625 (WO, A1)  
国際公開第2014/064277 (WO, A1)  
ZHENHUA YUAN ; ET AL, A VERSATILE ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR PRODUCER CELL LINE MET  
HOD FOR SCALABLE VECTOR PRODUCTION OF DIFFERENT SEROTYPES, HUMAN GENE THERAPY, 米国,  
2011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, 2008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., DB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 )