

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6737714号  
(P6737714)

(45) 発行日 令和2年8月12日 (2020.8.12)

(24) 登録日 令和2年7月20日 (2020.7.20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 Z

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

請求項の数 42 (全 68 頁)

(21) 出願番号 特願2016-575630 (P2016-575630)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月13日 (2015.3.13)  
 (65) 公表番号 特表2017-510293 (P2017-510293A)  
 (43) 公表日 平成29年4月13日 (2017.4.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/020369  
 (87) 国際公開番号 W02015/138852  
 (87) 国際公開日 平成27年9月17日 (2015.9.17)  
 審査請求日 平成30年3月13日 (2018.3.13)  
 (31) 優先権主張番号 61/953, 419  
 (32) 優先日 平成26年3月14日 (2014.3.14)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/068, 226  
 (32) 優先日 平成26年10月24日 (2014.10.24)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 514104933  
 ユニヴァーシティ オブ ワシントン  
 アメリカ合衆国 98105 ワシントン  
 州 シアトル ルーズベルト ウェイ ノ  
 ースイースト 4545 スイート 40  
 O  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノムインスレーターエレメントおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーを含むウイルスベクターであって、該ゲノムインスレーターエレメントが、CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1)、CCACCAGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2)、TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3)、CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4)、CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5)およびCAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6)からなる群より選択される14bpのCTCF結合部位コア配列を含み、該ゲノムインスレーターエレメントが、119~284ヌクレオチドを含み、該ゲノムインスレーターエレメントが、該14bpのCTCF結合部位コア配列および該コア配列に隣接して存在するゲノム配列を含む、ウイルスベクター。

【請求項 2】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項1記載のウイルスベクター。

【請求項 3】

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項2記載のウイルスベクター。

【請求項 4】

ウイルスベクターが遺伝子治療用ベクターである、請求項1記載のウイルスベクター。

【請求項 5】

治療物質をコードする配列をさらに含む、請求項1記載のウイルスベクター。

## 【請求項 6】

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、請求項1記載のウイルスベクター：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

## 【請求項 7】

10

ベクターが少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントを含む、請求項1記載のウイルスベクター。

## 【請求項 8】

ウイルスベクターが、エンハンサーによって調節されるプロモーターによって駆動される治療用遺伝子をコードする核酸配列を含むカセットを含み、該カセットが、前記ゲノムインスレーターエレメントによってブラケット状に挟まれている、請求項1記載のウイルスベクター。

## 【請求項 9】

ベクターが同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを2つ含む、請求項8記載のウイルスベクター。

20

## 【請求項 10】

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントが2種の異なるゲノムインスレーターエレメントである、請求項8記載のウイルスベクター。

## 【請求項 11】

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、請求項8記載のウイルスベクター：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

30

## 【請求項 12】

ゲノムインスレーターエレメントがベクターを含むウイルスのウイルス力価を有意には変化させない、請求項1記載のウイルスベクター。

## 【請求項 13】

ゲノムインスレーターエレメントの配列が300bp未満である、請求項1記載のウイルスベクター。

## 【請求項 14】

ゲノムインスレーターエレメントがサイレンサー活性を実質的に含まない、請求項1記載のウイルスベクター。

40

## 【請求項 15】

以下のうち1つまたは複数を含む、請求項1記載のウイルスベクター：

- (a) プロモーター、
- (b) エンハンサー、
- (c) 制限部位、
- (d) 非翻訳領域、
- (e) DNアーゼI高感受性部位、
- (f) 多重クローニング部位、
- (g) 末端反復配列、または

50

(h) ポリA尾部をコードする配列。

【請求項 1 6】

治療物質が、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA 干渉物質、またはmiRNAを含む、請求項5記載のウイルスベクター。

【請求項 1 7】

強力なゲノムインスレーターがcHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す、請求項1記載のウイルスベクター。

【請求項 1 8】

請求項1記載のベクターを含む、疾患を治療するための薬学的組成物であって、該ベクターが治療物質をコードする配列をさらに含み、かつ該治療物質が疾患の治療を媒介する、薬学的組成物。

10

【請求項 1 9】

治療物質がタンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、請求項18記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

(a) 治療物質をコードする核酸、および

(b) ゲノムインスレーターエレメントが、CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1)、CCACCAGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2)、TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3)、CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4)、CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5)およびCAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6)からなる群より選択される14bpのCTCF結合部位コア配列を含み、該ゲノムインスレーターエレメントが、119～284ヌクレオチドを含み、該ゲノムインスレーターエレメントが、該14bpのCTCF結合部位コア配列および該コア配列に隣接して存在するゲノム配列を含む、強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピー

20

を含むウイルスベクターを含む、治療物質をコードする核酸を投与するための薬学的組成物。

【請求項 2 1】

ベクターが、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、対象における腫瘍形成を少なくとも50%減少させる、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

ベクターが、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、腫瘍発生率を少なくとも10分の1に低下させる、請求項20記載の薬学的組成物。

30

【請求項 2 3】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 4】

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項23記載の薬学的組成物。

【請求項 2 5】

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、請求項20記載の薬学的組成物：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

40

【請求項 2 6】

ベクターが少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントを含む、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 2 7】

ウイルスベクターが、エンハンサーによって調節されるプロモーターによって駆動され

50

る治療物質をコードする核酸を含むカセットを含み、該カセットが、前記ゲノムインスレーターエレメントによってブラケット状に挟まれている、請求項26記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

ベクターが同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを2つ含む、請求項27記載の薬学的組成物。

【請求項 29】

ゲノムインスレーターエレメントが2種の異なるゲノムインスレーターエレメントである、請求項27記載の薬学的組成物。

【請求項 30】

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、請求項27記載の薬学的組成物：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

【請求項 31】

ゲノムインスレーターエレメントがベクターを含むウイルスのウイルス力価を有意には変化させない、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 32】

ゲノムインスレーターエレメントの配列が300bp未満である、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 33】

ゲノムインスレーターエレメントがサイレンサー活性を実質的に含まない、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 34】

ベクターが以下のうち1つまたは複数を含む、請求項20記載の薬学的組成物：

- (a) プロモーター、
- (b) エンハンサー、
- (c) 制限部位、
- (d) 非翻訳領域、
- (e) DNアーゼI高感受性部位、
- (f) 多重クローニング部位、
- (g) 末端反復配列、または
- (h) ポリA尾部をコードする配列。

【請求項 35】

治療物質が、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 36】

強力なゲノムインスレーターがcHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項 37】

14bpのCTCF結合部位コア配列が、CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO. : 1)である、請求項1記載のウイルスベクター。

【請求項 38】

14bpのCTCF結合部位コア配列が、CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO. : 2)、TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO. : 3)、CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO. : 4)、CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO. : 5)またはCAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO. : 6)である、請求項1記載のウイルスベクター。

【請求項 39】

10

20

30

40

50

請求項37記載のベクターを含む疾患を治療するための薬学的組成物であって、該ベクターが治療物質をコードする配列をさらに含み、かつ該治療物質が疾患の治療を媒介する、薬学的組成物。

【請求項40】

治療物質がタンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、請求項39記載の薬学的組成物。

【請求項41】

14bpのCTCF結合部位コア配列が、CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1)である、請求項20記載の薬学的組成物。

【請求項42】

14bpのCTCF結合部位コア配列が、CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2)、TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3)、CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4)、CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5)またはCAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6)である、請求項20記載の薬学的組成物。

【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、米国特許法第119条(e)(35 U.S.C. § 119(e))の下で、2014年3月14日に提出された米国仮出願第61/953,419号、および2014年10月24日に提出された第62/068,226号の恩典を主張し、それらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府の援助

本発明は、米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって授与された助成金番号P01 HL53750の下で、米国政府の援助を受けて行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

開示の分野

本開示の分野は、ゲノムインスレーターを含む遺伝子治療用ベクター組成物およびその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

造血幹細胞遺伝子治療は、いくつかの遺伝性疾患の治療に既に影響を与えている。X連鎖性SCID(1)、アデノシンデアミナーゼ欠損症(2)、X連鎖性副腎白質ジストロフィー(X-linked adeno-leukodystrophy)(3)およびサラセミア(4)を有する患者では、その疾患が治癒したり、またはその臨床状態が劇的に改善したりしている。しかし、ベクター媒介性の挿入性突然変異誘発に続発する遺伝毒性副作用が患者のある割合に出現しており、これには、X連鎖性SCID遺伝子治療の治験で治療を受けた患者のほぼ25%におけるT細胞白血病が含まれる(1)。遺伝毒性は、ウイルスベクター中のエンハンサーによる細胞の癌遺伝子の活性化によって生じる(5,6に総説がある)。挿入性突然変異誘発のリスクを減少させるために、さまざまなアプローチが試みられている。

【発明の概要】

【0005】

概要

本明細書に記載の組成物および方法は、一部には、外来性核酸配列を投与する時に強いインスレーター活性をもたらす強力なゲノムインスレーターを同定するための方法の発見に基づく。そのような強いインスレーター活性は、例えば、癌遺伝子の活性化を防止することができる。したがって、本明細書では、ゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーをコードする遺伝子治療用ベクターを含む組成物、およびその使用を

10

20

30

40

50

提供する。本明細書に記載の組成物および方法は、本明細書に記載の強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く遺伝子治療用ベクターと比較して、腫瘍形成を低下させる利点がある。加えて、本明細書に記載の強力なゲノムインスレーターエレメントはサイズが小さく、その結果、それらを、ウイルス力価に有意に影響を与えることなく、遺伝子治療用ベクター中に容易に組み入れることができる。

#### 【 0 0 0 6 】

本明細書において提供される1つの局面は、強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーをコードするウイルスベクター組成物であって、ゲノムインスレーターエレメントが400bp未満の配列およびCTCF結合部位コア配列を含む、ウイルスベクター組成物に関する。CTCFとは、ニワトリc-myc遺伝子の負の転写調節因子として当初発見された、CCCTC結合因子に与えられた名称である (Lobanenkov, W. et al., (1990) *Oncogene* 5;1743-1752)。

10

#### 【 0 0 0 7 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面の1つの態様において、ウイルスベクターはレトロウイルスベクターである。

#### 【 0 0 0 8 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、レトロウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

#### 【 0 0 0 9 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである。

20

#### 【 0 0 1 0 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ウイルスベクターは遺伝子治療用ベクターである。

#### 【 0 0 1 1 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは、治療物質をコードする配列をさらに含む。

#### 【 0 0 1 2 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、コア配列は、以下からなる群より選択される14bp配列である：

30

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID

NO.: 1), CCACCAGGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2), TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3),

CCACTAGGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4), CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5),

CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6), CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7),

GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

#### 【 0 0 1 3 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントは、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

40

#### 【 0 0 1 4 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは、ゲノムインスレーターエレメントを少なくとも2つ含む。

#### 【 0 0 1 5 】

50

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントは、それらがベクター中でベクタープロウイルスの両側に位置するように配置されている。

【0016】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを2つ含む。

【0017】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントは2種の異なるゲノムインスレーターエレメントである。

10

【0018】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントはそれぞれ、以下からなる群より選択される14bp配列である：

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

20

【0019】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントはそれぞれ、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

30

【0020】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、CTCF結合部位コア配列は、ヒトゲノム中の高占有率CTCF結合部位である。

【0021】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、高占有率部位は、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%のCTCF占有率を構成する。1つの態様において、高占有率部位はK562骨髄性白血病不死化細胞株において決定される。

【0022】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、遺伝子インスレーターエレメントはベクターのウイルス力価を有意には変化させない。

40

【0023】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントの配列は300bp未満である。この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントの配列は400bp未満である。

【0024】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントはサイレンサー活性を実質的に含まない。

【0025】

50

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは任意で、以下のうち1つまたは複数を含む：(a) プロモーター、(b) エンハンサー、(c) 制限部位、(d) 非翻訳領域、(e) DNアーゼI高感受性部位、(f) 多重クローニング部位、(g) 末端反復配列、または(h) ポリA尾部をコードする配列。

#### 【0026】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、治療物質は、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む。もう1つの態様において、治療物質はジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、CRISPR、またはメガヌクレアーゼである。

#### 【0027】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す。1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも少なくとも50%高いエンハンサー遮断活性を示す。他の態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのもの少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍高い(またはそれを上回る)エンハンサー遮断活性を示す。

#### 【0028】

もう1つの局面において本明細書において同じく提供されるのは、強力なゲノムインスレーターを同定するための方法であって、(a) ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフのCTCFタンパク質による占有率を決定する段階、および(b) エンハンサー遮断活性に関して試験し、それによって強力なゲノムインスレーターを同定する段階、を含む方法である。

#### 【0029】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面の1つの態様において、本方法は、段階(a)の後に、以下の段階をさらに含む：(i) CTCFによる占有があると判定された1つまたは複数のCTCF結合モチーフを、それぞれが固有のCTCFコア配列を有するクラスに分類する段階、(ii) 段階(i)において同定されたCTCF結合モチーフのクラスを、それらのCTCF占有率に応じて、占有率が最も高いものから最も低いものまでにランク付けする段階、および(iii) 高くランク付けされたクラスの中で、1つまたは複数のCTCF結合モチーフを選択する段階、を含む。

#### 【0030】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフの占有率を決定する段階(a)は、以下の段階を含む：(i) 実質的に完全なゲノム配列を含むデータベースを1つまたは複数のCTCF結合モチーフに関してスキャンすることによって、ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフの事例の数を決定する段階、(ii) ChIP-シーケンシング技術を用いて決定されたCTCFと結合する配列を含むデータベースを用いて、CTCFと結合するように働くゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフを同定する段階、(iii) 段階(i)の1つまたは複数のCTCF結合モチーフの各事例と、段階(ii)のCTCF結合データとのアラインメントを行う段階、および(iv) CTCFと結合するように働くCTCF結合モチーフ事例のパーセンテージを計算し、それによって占有率を決定する段階。

#### 【0031】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、コア配列は、以下からなる群より選択される14bp配列である：

10

20

30

40

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),  
 TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),  
 CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),  
 CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および  
 CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

#### 【 0 0 3 2 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、CTCF結合モチーフは、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

10

#### 【 0 0 3 3 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、試験のために選択されるCTCF結合モチーフの占有率は、樹立細胞株または初代細胞において、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%のCTCF占有率を示す。疑義を避けるために、CTCF占有率は、K562細胞において決定された占有率を基準として決定することができる。

20

#### 【 0 0 3 4 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、CTCF結合モチーフの配列は300bp未満である。この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、CTCF結合モチーフの配列は400bp未満である。

#### 【 0 0 3 5 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す。1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも少なくとも50%高いエンハンサー遮断活性を示す。他の態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのもの少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍高い（またはそれを上回る）エンハンサー遮断活性を示す。

30

#### 【 0 0 3 6 】

もう1つの局面において本明細書において同じく提供されるのは、疾患を治療するための方法であって、本明細書に記載の通りのベクターを投与する段階を含み、ベクターが治療物質をコードする配列をさらに含み、治療物質が疾患の治療を媒介する、方法である。

#### 【 0 0 3 7 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面の1つの態様において、治療物質はタンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む。

40

#### 【 0 0 3 8 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す。1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも少なくとも50%高いエンハンサー遮断活性を示す。他の態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのもの少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なく

50

とも100倍高い（またはそれを上回る）エンハンサー遮断活性を示す。

【 0 0 3 9 】

本明細書において提供されるもう1つの局面は、治療物質をコードする核酸を投与するための方法であって、対象に対して、以下のもの：（a）治療物質、および（b）400bp未満の配列およびCTCF結合部位コア配列を含む強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピー、をコードするウイルスベクターを投与する段階を含む方法に関する。

【 0 0 4 0 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面の1つの態様において、本遺伝子治療用ベクターは、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く遺伝子治療用ベクターと比較して、対象における腫瘍形成を少なくとも50%減少させる。

10

【 0 0 4 1 】

もう1つの態様において、本ベクターは、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、腫瘍発生率を少なくとも10分の1に低下させる。他の態様において、ベクターは、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、腫瘍発生率を少なくとも15分の1、少なくとも20分の1、少なくとも25分の1、少なくとも30分の1、少なくとも40分の1、少なくとも50分の1、少なくとも100分の1に、またはそれを以上に低下させる。

【 0 0 4 2 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ウイルスベクターはレトロウイルスベクターである。

20

【 0 0 4 3 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、レトロウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

【 0 0 4 4 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである。

【 0 0 4 5 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、コア配列は、以下からなる群より選択される14bp配列である：

30

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),  
TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),  
CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),  
CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および  
CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

【 0 0 4 6 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントは、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

40

【 0 0 4 7 】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは、ゲノムインスレーターエレメントを少なくとも2つ含む。

【 0 0 4 8 】

50

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントは、それらがベクター中でベクタープロウイルスの両側に位置するように配置されている。

#### 【0049】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクターは、同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを少なくとも2つ含む。

#### 【0050】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントは、少なくとも2種類のゲノムインスレーターエレメントである。

#### 【0051】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントはそれぞれ、以下からなる群より選択される14bp配列である：

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

#### 【0052】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントはそれぞれ、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

#### 【0053】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、CTCF結合部位コア配列は、ヒトゲノム中の高占有率CTCF結合部位である。

#### 【0054】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、高占有率部位は、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のCTCF占有率を含む。

#### 【0055】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、遺伝子インスレーターエレメントは、ベクターのウイルス力価を有意には変化させない。

#### 【0056】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントの配列は300bp未満である。この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントの配列は400bp未満である。

#### 【0057】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントはサイレンサー活性を含まない。

#### 【0058】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、ベクタ

10

20

30

40

50

ーは任意で以下のうち1つまたは複数を含む：(a) プロモーター、(b) エンハンサー、(c) 制限部位、(d) 非翻訳領域、(e) DNアーゼI高感受性部位、(f) 多重クローニング部位、および(g) ポリA尾部をコードする配列。

【0059】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、治療物質は、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む。

【0060】

この局面および本明細書に記載の他のすべての局面のもう1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す。1つの態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも少なくとも50%高いエンハンサー遮断活性を示す。他の態様において、強力なゲノムインスレーターは、cHS4インスレーターエレメントのものよりも少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍高い(またはそれを上回る)エンハンサー遮断活性を示す。

10

[本発明1001]

強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーをコードするウイルスベクター組成物であって、ゲノムインスレーターエレメントが400bp未満の配列およびCTCF結合部位コア配列を含む、ウイルスベクター組成物。

20

[本発明1002]

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、本発明1001の組成物。

[本発明1003]

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、本発明1002の組成物。

[本発明1004]

ウイルスベクターが遺伝子治療用ベクターである、本発明1001の組成物。

[本発明1005]

治療物質をコードする配列をさらに含む、本発明1001の組成物。

[本発明1006]

コア配列が、以下からなる群より選択される14bp配列である、本発明1005の組成物：  
CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),  
TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),  
CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),  
CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および  
CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

30

。

[本発明1007]

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、本発明1001の組成物：

40

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、  
SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、  
SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、  
SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、  
SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、  
SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

[本発明1008]

ベクターが少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントを含む、本発明1001の組成物。

50

[本発明1009]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントが、それらがベクター中でベクター  
プロウイルスの両側に位置するように配置されている、本発明1008の組成物。

[本発明1010]

ベクターが同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを2つ含む、本発明1008の組  
成物。

[本発明1011]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントが2種の異なるゲノムインスレータ  
ーエレメントである、本発明1008の組成物。

[本発明1012]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントがそれぞれ、以下からなる群より選  
択される14bp配列である、本発明1010または1011の組成物：

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

。

[本発明1013]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントがそれぞれ、以下からなる群より選  
択される配列を含む、本発明1008の組成物：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、

SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、

SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、

SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、

SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、

SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

[本発明1014]

CTCF結合部位コア配列がヒトゲノム中の高占有率CTCF結合部位である、本発明1001の組  
成物。

[本発明1015]

高占有率部位が、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%のCTC  
F占有率を含む、本発明1014の組成物。

[本発明1016]

遺伝子インスレーターエレメントがベクターのウイルス力価を有意には変化させない、  
本発明1001の組成物。

[本発明1017]

ゲノムインスレーターエレメントの配列が300bp未満である、本発明1001の組成物。

[本発明1018]

ゲノムインスレーターエレメントがサイレンサー活性を実質的に含まない、本発明1001  
の組成物。

[本発明1019]

任意で以下のうち1つまたは複数を含む、本発明1001の組成物：

(a) プロモーター、

(b) エンハンサー、

(c) 制限部位、

(d) 非翻訳領域、

(e) DNアーゼI高感受性部位、

10

20

30

40

50

- (f) 多重クローニング部位、
- (g) 末端反復配列、または
- (h) ポリA尾部をコードする配列。

[本発明1020]

治療物質が、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、本発明1001の組成物。

[本発明1021]

強力なゲノムインスレーターがcHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す、本発明1001の組成物。

[本発明1022]

強力なゲノムインスレーターを同定するための方法であって、

(a) ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフのCTCFタンパク質による占有率を決定する段階、および

(b) エンハンサー遮断活性に関して試験し、それによって強力なゲノムインスレーターを同定する段階を含む、方法。

[本発明1023]

段階(a)の後に、以下の段階をさらに含む、本発明1022の方法：

(i) CTCFによる占有があると判定された1つまたは複数のCTCF結合モチーフを、それぞれが固有のCTCFコア配列を有するクラスに分類する段階、

(ii) 段階(i)において同定されたCTCF結合モチーフのクラスを、それらのCTCF占有率に応じて、占有率が最も高いものから最も低いものまでにランク付けする段階、および

(iii) 高くランク付けされたクラスの中で、1つまたは複数のCTCF結合モチーフを選択する段階。

[本発明1024]

ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフの占有率を決定する段階(a)が、以下の段階を含む、本発明1022の方法：

(i) 実質的に完全なゲノム配列を含むデータベースを1つまたは複数のCTCF結合モチーフに関してスキャンすることによって、1つまたは複数のCTCF結合モチーフの事例の数を決定する段階、

(ii) ChIP-シーケンシング技術を用いて決定されたCTCFと結合する配列を含むデータベースを用いて、CTCFと結合するように働く、ゲノム中の1つまたは複数のCTCF結合モチーフを同定する段階、

(iii) 段階(i)の1つまたは複数のCTCF結合モチーフの各事例と、段階(ii)のCTCF結合データとのアラインメントを行う段階、および

(iv) CTCFと結合するように働くCTCF結合モチーフの事例のパーセンテージを計算し、それによって占有率を決定する段階。

[本発明1025]

コア配列が、以下からなる群より選択される14bp配列である、本発明1023の方法：  
CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

。

[本発明1026]

CTCF結合モチーフが、以下からなる群より選択される配列を含む、本発明1023または1024の方法：

10

20

30

40

50

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、  
 SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、  
 SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、  
 SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、  
 SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、  
 SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

[本発明1027]

試験のために選択されるCTCF結合モチーフの占有率が、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%のCTCF占有率を示す、本発明1022の方法。

[本発明1028]

CTCF結合モチーフの配列が300bp未満である、本発明1022の方法。

[本発明1029]

強力なゲノムインスレーターがcHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す、本発明1022の方法。

[本発明1030]

疾患を治療するための方法であって、本発明1001のベクターを投与する段階を含み、該ベクターが治療物質をコードする配列をさらに含み、かつ該治療物質が疾患の治療を媒介する、方法。

[本発明1031]

治療物質がタンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、本発明1030の方法。

[本発明1032]

治療物質をコードする核酸を投与するための方法であって、

(a) 治療物質、および

(b) ゲノムインスレーターエレメントが400bp未満の配列およびCTCF結合部位コア配列を含む、強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーをコードするウイルスベクターを対象に投与する段階を含む、方法。

[本発明1033]

ベクターが、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、対象における腫瘍形成を少なくとも50%減少させる、本発明1032の方法。

[本発明1034]

ベクターが、強力なゲノムインスレーターエレメントを欠く同じベクターと比較して、腫瘍発生率を少なくとも10分の1に低下させる、本発明1032の方法。

[本発明1035]

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、本発明1032の方法。

[本発明1036]

レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、本発明1035の方法。

[本発明1037]

コア配列が、以下からなる群より選択される14bp配列である、本発明1032の方法：  
 CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),  
 TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),  
 CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),  
 CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および  
 CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

。

[本発明1038]

ゲノムインスレーターエレメントが、以下からなる群より選択される配列を含む、本発明1032の方法：

10

20

30

40

50

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、  
 SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、  
 SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、  
 SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、  
 SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、  
 SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

[本発明1039]

ベクターが少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントを含む、本発明1032の方法。

[本発明1040]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントが、それらがベクター中でベクター  
 プロウィルスの両側に位置するように配置されている、本発明1039の方法。

[本発明1041]

ベクターが同じゲノムインスレーターエレメントのコピーを2つ含む、本発明1039の方法。

[本発明1042]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントが2種の異なるゲノムインスレーター  
 エレメントである、本発明1039の方法。

[本発明1043]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントがそれぞれ、以下からなる群より選  
 択される14bp配列である、本発明1041または1042の方法：

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

。

[本発明1044]

少なくとも2つのゲノムインスレーターエレメントがそれぞれ、以下からなる群より選  
 択される配列を含む、本発明1039の方法：

SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、

SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、

SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、

SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、

SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、

SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

[本発明1045]

CTCF結合部位コア配列がヒトゲノム中の高占有率CTCF結合部位である、本発明1032の方法。

[本発明1046]

高占有率部位が少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%のCTCF  
 占有率を有する、本発明1045の方法。

[本発明1047]

遺伝子インスレーターエレメントがベクターのウィルス力価を有意には変化させない、  
 本発明1032の方法。

[本発明1048]

ゲノムインスレーターエレメントの配列が300bp未満である、本発明1032の方法。

[本発明1047]

10

20

30

40

50

ゲノムインスレーターエレメントがサイレンサー活性を実質的に含まない、本発明1032の方法。

[本発明1049]

ベクターが任意で以下のうち1つまたは複数を含む、本発明1032の方法：

(a) プロモーター、

(b) エンハンサー、

(c) 制限部位、

(d) 非翻訳領域、

(e) DNアーゼI高感受性部位、

(f) 多重クローニング部位、

(g) 末端反復配列、または

(h) ポリA尾部をコードする配列。

10

[本発明1050]

治療物質が、関心対象の遺伝子、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAを含む、本発明1032の方法。

[本発明1051]

強力なゲノムインスレーターがcHS4インスレーターエレメントのものよりも高いエンハンサー遮断活性を示す、本発明1032の方法。

【図面の簡単な説明】

【0061】

20

【図1】ゲノムプロファイリングによる、インスレーターと推定されるものの同定。CTCF部位は、配列モチーフの存在（右上）およびChIP-seq占有率によって明示される（ヒトK562赤白血病細胞で示されている）。部位を、同一の14bpコア配列を共通に有することに基づいて複数のクラスにグループ分けした。続いて、クラス毎のゲノムワイド占有率に従ってクラスをランク付けした。各クラスに関する候補部位を、本文中に記載した通りに、エンハンサー遮断活性に関して試験した。

【図2A】エンハンサー遮断性インスレーターの機能的同定。アッセイのデザイン。レポータープラスミドpJC5-4/P4-P2Kは、A<sup>-</sup>-グロビン遺伝子プロモーター（pro）から転写されたGFP用の発現カセット、および赤芽球特異的HS2エンハンサー（HS2）を含有する。候補断片を2つの場所に挿入した：A<sup>-</sup>-グロビン-グロビン遺伝子プロモーターの上流、およびneo遺伝子（Neo）とHS2エンハンサーとの間。この配置では、3'挿入部位により、インスレーター候補が、HS2エンハンサーとA<sup>-</sup>-グロビン-グロビン遺伝子プロモーターとの間の情報交換を物理的に遮断することが可能になる。

30

【図2B】エンハンサー遮断性インスレーターの機能的同定。中立対照に対するパーセントとしてのG418耐性コロニーの頻度。ヒストグラムは4回の独立した実験による平均±標準偏差を表しており、スパーサー対照を用いて得られた平均コロニー形成（100%に設定）に対するパーセンテージとして報告されている。

【図2C】エンハンサー遮断性インスレーターの機能的同定。cHS4対照との比較による変化倍数として表されたインスレクションの度合い。変化倍数は、表2に列記されているコロニー数の平均値を用いて計算した。

40

【図2D】エンハンサー遮断性インスレーターの機能的同定。インスレータークラスの間数としてのインスレーター活性。データはパネル（図2B）におけるものと同じであるが、インスレータークラス別に並べられている。

【図3A】サイレンサー活性、およびレンチウイルスベクター力価に対する影響に関するエンハンサー遮断性インスレーターの評価。サイレンサーアッセイのデザイン。レポータープラスミドは、エンハンサー遮断アッセイ（図3A）に用いたものとほぼ同じであるが、ただし3'挿入部位がHS2エンハンサーの遠位側に位置しており、それにより、HS2エンハンサーとA<sup>-</sup>-グロビン遺伝子プロモーターとの間の情報交換が妨げられることなく可能になる。

【図3B】サイレンサー活性、およびレンチウイルスベクター力価に対する影響に関する

50

エンハンサー遮断性インスレーターの評価。中立対照に対するパーセントとしてのG418耐性コロニーの頻度。ヒストグラムは3回またはそれを上回る独立した実験による平均±標準偏差を表しており、スパーサー対照を用いて得られた平均コロニー形成（100%に設定）に対するパーセンテージとして報告されている。サイレンサーとして用いた321bpエレメント（T39と呼ばれる）は、関連した諸研究で同定されており、chrX:11551258-11551578（hg19）にマッピングされる。cHS4およびすべてのインスレーター候補については対照との比較で $p > 0.05$ （ボンフェローニ補正）、サイレンサーT39については対照との比較で $p = 3 \times 10^{-11}$ 。

【図3C】サイレンサー活性、およびレンチウイルスベクター力価に対する影響に関するエンハンサー遮断性インスレーターの評価。レンチウイルスベクター力価アッセイのデザイン。この第三世代レンチウイルスレポーターベクターは内部Pgk遺伝子プロモーターからGFPを発現し、3'LTRの「二重コピー」位置への挿入により、インスレーター候補がその両側に位置している。

10

【図3D】サイレンサー活性、およびレンチウイルスベクター力価に対する影響に関するエンハンサー遮断性インスレーターの評価。ベクター上清の量を漸増させながらHT1080細胞の形質導入を行った後の、インサートなし対照に対するパーセンテージとしてのGFP陽性細胞の割合。ヒストグラムは3回の独立した実験による平均±標準偏差を表しており、インサートなし対照を用いて得られたGFP陽性細胞の割合（100%に設定）に対するパーセンテージとして報告されている。試験したインスレーターは図2のエレメントに対応するが、ただしC4についてはレンチウイルスベクターのみの中にクローニングした。

20

【図4A】遺伝毒性アッセイ。インスレーターがベクター媒介性遺伝毒性の比率を低下させる能力を評価するためのアッセイのデザイン。インスレーターA1をレトロウイルスベクターの3'LTRの近位端に挿入した。ベクタープロウイルスの作製時に、このインサートは5'LTRにもコピーされ、その結果、内部発現カセットの両側にうまく位置する。力価を一致させた同種指向性ベクター産生株からの上清を、IL-3依存性細胞株32Dの形質導入に用いた。独立したサブプールを続いて増殖させて、コンジェニックマウス（マウス1匹当たり1つの独立したサブプール）に移植した。レシピエントをその後腫瘍形成（典型的には脾腫として顕在化する）に関してモニターした（24）。

【図4B】遺伝毒性アッセイ。モック形質導入を受けた、またはインスレーターA1、もしくは1.2kb cHS4、もしくはマウスG6PD遺伝子のcDNAの一部由来の790bp断片（中性対照として）を含有するか、もしくはインサートを含有しないベクターによる形質導入を受けた32D細胞を移植されたマウスに関するKaplan-Myer無腫瘍生存曲線。

30

【図4C】遺伝毒性アッセイ。基礎となる形質転換の比率（プロウイルス $10^5$ 個当たりの腫瘍）は、記載の通りに（24）、28週時点での無腫瘍動物の割合およびボウソン分布に基づいて形質転換イベントの数をまず推定し、続いてこれらを元の培養物において形質導入された細胞の推定数で除算することによって算出した。P値は2つの比率に関するz検定を基にした。

【図5】特異的CTCF結合モチーフとインビボ占有率との相関。（図5A）各CTCF占有率クラスに関するCTCFによる結合を受けたかまたは受けていないCTCF部位の数を、上位1000個のCTCF占有率クラスのそれぞれについて示している。同一の14bpコア配列を共通に有するCTCF占有率クラスを、50を上回る部位を有するように選択した。（図5B）各CTCF占有率クラスに関するCTCFによる結合を受けたCTCF部位の相対的比率を示している同様の分析。両方のパネルのデータは、K562細胞におけるChIP-seq試験に基づく。

40

【図6】複数の細胞種におけるCTCF占有率クラスとCTCF占有率との相関。1000個のCTCF占有率クラスの各メンバーのCTCF占有率を19種類の細胞種においてChIP-seqによって評価し、続いて各CTCF占有率クラスの占有を示す細胞の平均数を決定するために用いた（1000個のクラスのそれぞれについて1つのデータポイント）。細胞種の一覧については図7を参照されたい。傾向線はLOESSフィットを表している。高占有率クラスA~Fおよび低占有率クラスG、HおよびJの場所を指し示している。R値は全データセットについて示されている。

【図7】複数の細胞種における高占有率インスレーター候補のDNアーゼI高感受性。指し

50

示された高占有率インスレーター候補のゲノム領域にわたるDNアーゼI高感受性プロファイル、19種類の細胞株について示している。Y軸：DNアーゼI-seq分析に基づく読み取り値密度の軌跡；X軸：インスレーター候補配列の両側に1000bp広がるウィンドウ（インスレーター座標については表2を参照されたい）。DNアーゼIプロファイルはENCODEから導き出した。

【図8】遺伝子間インスレーターのゲノム構成。各パネルの上方のグラフは、2つの遺伝子間に位置するインスレーター候補のゲノム構成を示している。各インスレーターに関して染色体番号およびhg19に基づく座標を上に表示し、周囲の遺伝子を基準とするインスレーターの場所をインスレーターIDに隣接する矢印によって指し示している。また、以下に列記する遺伝子記号を用いて、側方配置遺伝子のゲノム配置も提示している。各パネルの

10

下方のグラフは、K562細胞におけるDNアーゼI-seq試験に基づく、対応するゲノム領域にわたるDNアーゼI高感受性プロファイルを示している。

【図9】遺伝子内インスレーターのゲノム構成。各パネルの上方のグラフは、遺伝子体の内部に位置するインスレーター候補のゲノム構成を示している。各インスレーターに関して染色体番号およびhg19に基づく座標を上に表示し、特定の遺伝子を基準とするインスレーターの場所をインスレーターIDに隣接する矢印によって指し示している。また、以下に列記する遺伝子記号を用いて、特定の遺伝子のゲノム配置も提示している。各パネルの下方のグラフは、K562細胞におけるDNアーゼI-seq試験に基づく、対応するゲノム領域にわたるDNアーゼI高感受性を示している。

【図10】CTCF占有率クラスとCTCF密度との関係。K562細胞におけるChIP-seq試験に基づく各CTCF占有率クラスについて、CTCF結合の平均密度を示している（1000個のクラスのそれぞれについて1つのデータポイント）。傾向線はLOESSフィットを表している。高占有率クラスA~Fおよび低占有率クラスG、HおよびJの場所を矢印によって指し示している。占有率の高いインスレーターほど高密度のCTCF結合を示す傾向があることに留意されたい。R、ピアソン相関係数。

20

【図11】高占有率インスレーター候補に伴ってみられる転写因子認識配列。転写因子が結合する可能性の高い部位を、機能性試験のためにクローニングされたインスレーターエレメント候補の配列（表3）を、プログラムFIMOを用いて（Grant et al. 2011）、閾値 $P = 10^{-4}$ で合致する認識配列に関してスキャンすることによって同定した。位置重み付け行列は、4種の主な転写因子結合モチーフの収集物：TRANSFAC（Matys et al. 2006）；JASPAR（Portales-Casamar et al. 2010）；UniPROBE（Newburger et al. 2009）；および既発表のSELEXデータセット（Jolma et al. 2013）から入手した。続いて、同様のモチーフを複数のファミリーとしてまとめた。41種のヒト細胞種にわたるゲノムワイドDNアーゼIフットプリンティングによってデノボで導き出された位置重み付け行列も含めた；これには他のモチーフと合致しないもののみを含めた（\*）（Neph et al. 2012）。転写因子認識配列には、K562細胞においてDNアーゼIフットプリントを、少なくとも3bpずつ、0.95未満のフットプリント占有率スコアで（すなわち、より強く）重ね合わせることを要求し（Neph et al. 2012）、それらがCTCF認識配列と重ね合わさる場合には除外した。データは、5つまたはそれを上回るエレメントが存在する転写因子認識配列について示されている。少なくとも1つの認識モチーフの存在はグレーによって指し示されており、一方、認識モチーフが存在しないことは白によって指し示されている。認識配列およびインスレーターエレメントは階層的クラスタリングによって順序づけられている。転写因子認識配列と特定のCTCF占有率クラスとの間、または強力なインスレーター機能との間には相関が存在しないことに留意されたい。

30

40

【図12】CTCF占有率クラスとコヒーシンの相関。（図12A）コヒーシンは、占有率が高いCTCFクラスほどより高い頻度で認められる。各CTCF占有率クラスにおいてコヒーシン（Rad21）結合が重なり合うメンバーの比率を、K562細胞におけるChIP-seqによって評価した（1000個のクラスのそれぞれについて1つのデータポイント）。CTCF ChIP-seq占有率を有する事象のみを含めた。傾向線はLOESSフィットを表している。高占有率クラスA~Fの場所を矢印によって指し示している。R、ピアソン相関係数。（図12B~12C）コヒー

50

シンと重なり合うCTCF部位(+)は、K562細胞におけるChIP-seqによるCTCF占有率のレベルがより高く(図12B)(16)、重なり合わない部位(-)よりも、DNアーゼI-seq(47)によればより到達可能なクロマチンを有した(図12C)。ボックスプロットの説明:白抜きボックス部、第1および第3の四分位数;ウィスカー、四分位数間領域の1.5倍;黒丸印、集団中央値;白抜き丸印、個々の外れデータポイント。

【図13A】CTCF占有率クラスとCTCF結合様式との関係。CTCFコア配列および拡張認識配列に関するコンセンサス配列を示している略図。拡張上流モチーフとコアモチーフとの間隔は異なってよく(+0または+1bp)、その結果、考えられる結合様式は3通りとなる(Nakahashi et al. 2013)。

【図13B】CTCF占有率クラスとCTCF結合様式との関係。各CTCF結合部位について3通りの結合様式のうち最も合致するものを決定し(FIMO P値により)、続いてこれらのデータを用いて、各CTCF占有率クラスについて、重なり合う拡張上流モチーフを含む事例の比率を決定した(1000個のクラスのそれぞれについて1つのデータポイント)。傾向線は、LOESSフィットによる決定で+0の間隔、+1の間隔、またはいずれかの間隔を有する、重なり合う拡張上流モチーフを伴う事例の比率について示されている。上流モチーフを伴う結合様式とCTCF占有率クラスのランクとの間の逆相関に注目されたい。R、ピアソン相関係数。

【図14】CTCF占有率クラスと長距離ゲノム相互作用との関係。(図14A) K562細胞におけるCTCFクラス事例にわたってのRNAポリメラーゼII媒介相互作用の平均数;2回の反復試験の合計(31)。(図14B) K562細胞におけるクラス事例の25kb以内でのCTCF媒介相互作用の平均数(31)。(図14C) IMR90トポロジカル関連ドメイン(TAD)の50kb以内での各クラスにおける事例の比率(25)。各パネル中、インスレーター候補が試験のために選択された高親和性モチーフクラス。高占有率クラスA~Fは強調している。傾向線はLOESSフィットを表している。(図14A)および(図14B)に関するChIA-PETに基づく相互作用は、UCSC Genome Browserからダウンロードした;染色体内相互作用のみを考慮した(31)。Rは、上位400個のCTCF占有率クラスにわたってのSpearmanの相関係数を指し示している。

【図15】レンチウイルスベクターのGFP発現に対するインスレーターの影響。インスレーターエレメントを、GFPを発現するレンチウイルスベクターの「二重コピー」位置に挿入して、ヒトHT1080細胞の形質導入に用いた。3日後に、GFP陽性細胞におけるベクターGFP発現の量を決定するために、培養物をフローサイトメトリーによって分析した。形質導入率の低い培養物(12.4±9.2パーセントがGFP陽性)を用いて、GFP陽性細胞のほとんどが1個または少数のベクターコピーを有していたことを確かめた。発現データは、インサートなし対照に対するパーセンテージとして示されている。ヒストグラムは4回の独立した実験による平均±標準偏差を表しており、インサートなし対照で決定された発現(GFP陽性細胞の平均蛍光単位)(100%に設定)に対するパーセンテージとして報告されている。複数の試験に対するボンフェローニ補正後に、対照と統計的に異なる試料はなかった。

【図16】レンチウイルスベクター環境下でインスレーターエレメントがCTCFと結合する能力。インスレーター候補A2(高親和性)およびG2(低親和性)を、レンチウイルスベクターベクターの末端反復配列中に、二重コピー配置を用いて挿入した。その結果得られたベクターを、細胞1個当たり1個のベクタープロウイルスのみを標的とする目的で、低い感染多重度(5% GFP(+)細胞)で用いてK562細胞に形質導入し、形質導入細胞のプールをGFPに関する細胞分取法によって選択した。その結果得られたプール(ほぼ98% GFP(+))、細胞1個当たりおよそ1個のベクタープロウイルス)を、続いて、従来のクロマチン免疫沈降(ChIP)により、A2またはG2でのCTCF結合に関して分析した。CTCF結合係数kは以下の通りに算出した: $k = [x1/x2]2^{[Ctin-Ctch]}$ 、式中、x1は投入試料に関するDNA量であり、x2はChIP産物の生成のために用いたDNA量であり、Ctinは投入DNAに関する閾値サイクルであり、CtchはChIP DNAに関する閾値サイクルである。これらの試験において、x1/x2の比は、CTCF結合係数を $k = 2^{[Ctin-Ctch]}$ によって推定しうるように、ベクター形質導入細胞および対照細胞に関して同じであるように設定した。Ct値は二重反復決定による平均とし

10

20

30

40

50

た。データは、内在性遺伝子座のみでのCTCF結合（具体的な候補による形質導入を受けていないK562細胞を用いる）を、内在性遺伝子座＋レンチウイルスベクターにより移入された遺伝子座の両方での結合の合計と比較した上で提示している。高親和性インスレーター候補A2は、レンチウイルスベクター環境下の方が、そのネイティブ性遺伝子座の環境下よりも効率的にCTCFと結合するように考えられ、一方、低親和性インスレーター候補G2はレンチウイルスベクター環境下の方がそのネイティブ性遺伝子座の環境下よりも低い効率でCTCFと結合するように考えられたことに注目されたい。

【発明を実施するための形態】

【0062】

詳細な説明

10

本明細書では、必要とする対象に投与された時に、例えば、癌原遺伝子などの隣接遺伝子の望まれない発現を防止するために有用である、ベクター組成物中に用いることのできる強力なゲノムインスレーターエレメントを同定するための方法を提供する。また、本明細書では、そのようなエレメントを含むベクター、そのようなベクターを用いて、疾患を治療するための方法、および核酸を対象に投与するための方法も提供する。

【0063】

定義

「ベクター」という用語は、導入遺伝子の発現を導くための組換えDNA配列構成要素の組み合わせを含む核酸ビヒクルのことを指す。1つの態様において、ベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）、アデノウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクターを非限定的に含むウイルスベクターである。もう1つの態様において、ベクターは遺伝子治療用ベクターである。

20

【0064】

本明細書で用いる場合、「レトロウイルス」という用語は、そのゲノムRNAを直鎖状の二本鎖DNAコピーへと逆転写し、その後そのゲノムDNAを宿主ゲノム中に共有結合性に組み込むRNAウイルスのことを指す。レトロウイルスはレトロウイルス科（Retroviridae）に属し、これは、短い二量体化領域を有する一本鎖RNAゲノムの2つのコピーを保有する、非正二十面体でエンベロープを有する多数のウイルスで構成される。レトロウイルスは、遺伝子送達のための一般的なツールである（Miller, 2000, Nature. 357: 455-460）。ウイルスが宿主ゲノム中に組み込まれると、それは「プロウイルス」と称される。プロウイルスはRNAポリメラーゼIIのテンプレートとしての役割を果たし、新たなウイルス粒子を産生するために必要とされる構造タンパク質および酵素をコードするRNA分子の発現を導く。例示的なレトロウイルスには、モロニー Maus 白血病ウイルス（M-MuLV）、モロニー Maus 肉腫ウイルス（MoMSV）、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳癌ウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ネコ白血病ウイルス（FLV）、スプマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV）およびレンチウイルスが非限定的に含まれる。「レトロウイルス」または「レトロウイルスベクター」という用語は、本明細書で用いる場合、それぞれ「レンチウイルス」および「レンチウイルスベクター」を含むものとする。

30

【0065】

本明細書で用いる場合、「レンチウイルス」という用語は、複合的なレトロウイルスの群（または属）のことを指す。例示的なレトロウイルスには、HIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV 1型およびHIV 2型を含む）；ピスナ・マエディウイルス（VMV）ウイルス；ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）；ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；およびサル免疫不全ウイルス（SIV）が非限定的に含まれる。1つの態様においては、HIVに基づくベクター骨格（すなわち、HIVシス作用性配列エレメント）が好ましい。

40

【0066】

本明細書で用いる場合、「ゲノムインスレーターエレメント」という用語は、ある遺伝子（例えば、隣接遺伝子）の読み過ごし発現を防止する核酸配列のことを指す。そのよう

50

なゲノムインスレーターエレメントは、染色体ドメインが異質染色質化 (heterchromatinization) するのを防ぐためのバリアー機能、および/または異なるクロマチンドメインの調節因子間の相互作用を防止するエンハンサー遮断機能を形づることができる。ゲノムインスレーターエレメントは、例えば、CTCFコア配列、またはCTCFコア配列を含むCTCF結合モチーフを含みうる。1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントはCTCF結合モチーフを含む。もう1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントは、少なくともCTCF結合部位コア配列を含む。

#### 【0067】

本明細書で用いる場合、「強力なゲノムインスレーターエレメント」という用語は、ベクタープロモーターからの隣接遺伝子またはゲノム配列の読み過ごし発現を、(本明細書において実施例に記載されたようなエンハンサー遮断アッセイを用いた判定で)ゲノムインスレーターエレメントを欠く同一のベクターと比較して少なくとも50%防止するゲノムインスレーターエレメントのことを指す。いくつかの態様において、強力なゲノムインスレーターエレメントは、ゲノムインスレーターエレメントを欠く同一のベクターと比較して、読み過ごし発現を少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらには100%(すなわち、読み過ごし発現が全く検出されないように)防止する。

#### 【0068】

「CTCF結合部位コア配列」または「コア配列」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、少なくとも、CTCFのジンクフィンガー4~8のうち少なくとも1つと係合するのに十分なGCリッチ領域を含む14bpの核酸配列のことを指す。この14bpコア配列に基づいて、ゲノム中のCTCF結合モチーフを、ゲノムインスレーターエレメントのサブグループまたは「クラス」に分類することができる。すなわち、CTCF結合モチーフを、CTCFが結合する固有の14bpコア配列に基づいて分類することができる。

#### 【0069】

本明細書で用いる場合、「高占有率CTCF結合部位」という用語は、ある所与のゲノム(例えば、ヒトゲノム、K562細胞ゲノム、など)中のコア配列の事例の総数にわたって、少なくとも85%の頻度でCTCFによって占有されるCTCF結合部位コア配列を含む核酸配列のことを指す。すなわち、例えば、ChIP-シーケンシングデータを用いた判定で、ある所与のゲノム中にその所与のCTCFコア配列が出現する機会のうち少なくとも85%で、それはCTCFによる結合を受けている。他の態様において、高占有率CTCF結合部位は、90%占有され、少なくとも95%占有され、少なくとも96%占有され、少なくとも97%占有され、少なくとも98%占有され、少なくとも99%占有され、またはさらには100%占有されている(すなわち、コア配列が検出されるゲノム中のあらゆる事例にCTCFが結合する)。いくつかの態様において、「高親和性CTCF結合部位」という用語は、「高占有率CTCF結合部位」という用語と互換的に用いられる。対照的に、「低親和性CTCF結合部位」または「低占有率CTCF結合部位」とは、機会のうち10%未満の頻度で占有される部位のことを指す。「中親和性CTCF結合部位」または「中占有率CTCF部位」とは、機会のうち10%~85%、例えば、15~85%、25~85%、50~85%、75~85%、15~75%、15~50%、15~25%、25~75%、25~50%、50~75%、またはそれらの間の任意の範囲の頻度で占有される部位のことを指す。

#### 【0070】

本明細書で用いる場合、「ベクターのウイルス力価を有意には変化させない」という語句は、少なくとも1つのゲノムインスレーターエレメントを含むベクターが、1つの態様において、例えば、本明細書に記載されたようなレンチウイルスベクター力価アッセイにおいて、その少なくとも1つのゲノムインスレーターエレメントを欠く同一のベクターと実質的に同じウイルス力価を有することを指し示している。他の態様において、ゲノムインスレーターエレメントを含むベクターのウイルス力価は、ゲノムインスレーターエレメントを欠く同一のベクターと比較して、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、2%未満、または1%未満、モジュレートされる(すなわち、力価が増加する、または力価が減少

10

20

30

40

50

する)。

【0071】

本明細書で用いる場合、「サイレンサー活性」という用語は、核酸配列がリプレッサーと結合して、遺伝子からのタンパク質発現を防止する能力のことを指す。1つの態様において、サイレンサー活性は、その挿入がエンハンサーおよびプロモーターを遮断するのではなくブラケット状に挟む(bracket)ように、インスレーター候補をneoレポーターコンストラクト中にクローニングすることによって評価することができる。続いてコンストラクトを、K652細胞においてG418選択下でのコロニー形成率に関して分析する。

【0072】

本明細書で用いる場合、「サイレンサー活性を実質的に含まない」という用語は、ゲノムインスレーターエレメントが陰性対照インサートと実質的に同じサイレンサー活性を含むことを指し示している。

10

【0073】

本明細書で用いる場合、「治療物質」という用語は、投与された時に疾患または障害の治療を媒介する分子または組成物のことを指す。分子または組成物は、タンパク質、タンパク質をコードする核酸配列、または活性をそれ自体が持つ核酸(例えば、miRNA)であってよい。治療物質は、疾患と関連のあるタンパク質(すなわち、ミスフォールディング、切り詰め、活性障害、タンパク質分解増加などに起因する)の機能を増強するため、または代替するために用いることができる。または、治療物質を、インビボ標的の機能を阻害するため、低下させるため、または抑止するために用いることもできる。したがって、治療物質は、いくつか例を挙げるならば、抗体、抗体断片、タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質(例えば、siRNA、shRNA)、またはmiRNAであってよく、これらのそれぞれを本明細書に記載のウイルスベクターから発現させることができる。当業者は、疾患または障害の治療に用いるための多くの治療物質を想起することができよう。

20

【0074】

本明細書で用いる場合、「高くランク付けされたクラス」という用語は、それらを占有率が最も高いものから最も低いものまでにランク付けした場合に、クラスのうち上位20%(例えば、上位15%、上位10%、上位5%、上位2%、上位1%)にある、固有の14bpコア配列によって分類されるCTCF結合モチーフのセットのことを指す。または、「高くランク付けされたクラス」という用語は、それらを占有率が最も高いものから最も低いものまでにランク付けした場合に、CTCF結合モチーフの上位5つ、4つ、3つ、2つまたは1つのクラスのことを指すこともできる。

30

【0075】

「機能的に連結された」とは、機能的転写単位を生成するために、別個のDNA分子またはDNA配列を接続することを指す。

【0076】

「遺伝子」、「関心対象の遺伝子」、「導入遺伝子」および「治療物質をコードする核酸配列」という用語は、本明細書において互換的に用いられる。一般に、これらの用語は、特定のポリペプチド、例えば、治療用抗体または補充用酵素といった関心対象の組換えタンパク質のコード配列を含む核酸配列(例えば、DNA)のことを指す。また、導入遺伝子が、融合タンパク質をコードする異種配列を含むこともできる。「遺伝子」、「関心対象の遺伝子」、「導入遺伝子」および「治療物質」という用語は、ポリアデニル化部位、プロモーター、エンハンサー、およびインスレーターを含むことを意図している。

40

【0077】

「プロモーター」という用語は、典型的にはある遺伝子の上流に位置し、RNAポリメラーゼおよび関連因子などの転写機構を動員して、ひいてはその遺伝子の転写を開始させる核酸配列のことを指す。

【0078】

「エンハンサー」という用語は、遺伝子の転写活性化を本質的には位置および配向に非

50

依存的な様式で強化するために、転写活性化因子などの転写調節タンパク質を動員することのできる核酸配列のことを指す。したがって、プロモーターとは異なり、エンハンサーは、転写単位の上流、下流、またはさらにはイントロン中にも位置することができる。異種供給源由来のエンハンサーエレメントを、本明細書に記載の組成物および方法の態様に相当する発現ベクター中の構成要素として用いることができる。

【0079】

「側方に位置する (flanking)」とは、1つの核酸配列のもう1つの核酸配列に対する相対位置のことを指す。側方に位置する配列は、側方配置を受けた配列 (flanked sequence) の前方または後方にあるが、側方配置を受けた配列と連続していたり直に隣接していたりする必要はない。例えば、ゲノムインスレーターエレメントと導入遺伝子とを含む転写単位の環境下では、ゲノムインスレーターエレメントを、治療物質をコードする核酸のいずれかの (または両方の) 末端に配置することができる。

【0080】

「相同性」、「同一性」および「類似性」という用語は、配列アラインメントによって比較される2つのポリペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性の度合いのことを指す。比較される2つの別個の核酸配列間の相同性の度合いは、同等の位置にある同一な、または一致するヌクレオチドの数の関数である。比較される2つの別個のアミノ酸配列間の相同性の度合いは、同等の位置にある同一な、または一致するアミノ酸の数の関数である。

【0081】

「RNA干渉物質」および「RNA干渉」という用語は、それらが本明細書で用いられる場合、RNA干渉物質がsiRNA、miRNA、shRNAまたは他の二本鎖RNA分子を含むかどうかに関係なく、二本鎖RNAによって媒介される遺伝子サイレンシングの形態を範囲に含むことを意図している。「短鎖干渉RNA」(siRNA)は、本明細書では「低分子干渉RNA」とも呼ばれ、例えばRNAiによって標的遺伝子の発現を阻害するように働くRNA作用物質と定義される。siRNAは、化学的に合成すること、インビトロ転写によって生成させること、または宿主細胞内で産生させることができる。1つの態様において、siRNAは、約15～約40ヌクレオチド長、好ましくは約15～約28ヌクレオチド、より好ましくは約19～約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、22または23ヌクレオチド長の二本鎖RNA (dsRNA) 分子であり、各鎖上に約0、1、2、3、4または5ヌクレオチドの長さを有する3'および/または5'オーバーハングを含むことができる。オーバーハングの長さは2本の鎖間で独立であり、すなわち、一方の鎖上のオーバーハングの長さは、他方の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA (mRNA) の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) を介してRNA干渉を促進することができる。

【0082】

「薬学的に許容される」という用語は、過度の毒性を伴わずに哺乳動物に投与しうる化合物および組成物のことを指す。

【0083】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、有効成分と組み合わせられた時に、成分が生物活性を保つことを可能にし、かつ対象の免疫システムとは反応しない任意の材料を含む。例としては、標準的な薬学的担体のいずれか、例えば、リン酸緩衝食塩液、水、油中水型エマルジョンなどのエマルジョン、およびさまざまな種類の湿潤剤などが非限定的に含まれる。エアロゾルまたは非経口的投与用の好ましい希釈剤には、リン酸緩衝食塩水または生理的 (0.9%) 食塩水がある。そのような担体を含む組成物は、従来の方法 (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990を参照) によって製剤化される。

「薬学的に許容される担体」という用語からは、組織培養基は除外される。

【0084】

本明細書で用いる場合、「1つの (a)」または「1つの (an)」は、別様に明確に指示されている場合を除き、少なくとも1つを意味する。本明細書で用いる場合、病状または

10

20

30

40

50

疾患を「予防する」または「防ぐ」とは、病状または疾患の発症または進行を妨げること、軽減すること、または遅らせることを意味する。

【0085】

「減少する」、「低下した」、「低下」、または「阻害する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量の減少を意味する。いくつかの態様において、「低下させる」、「低下」または「減少する」または「阻害する」は、典型的には、参照基準レベル（例えば、所与の治療の非存在下）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、これには例えば、少なくとも約10%、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%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の、またはそれを上回る減少が含まれる。本明細書で用いる場合、「低下」または「阻害」は、参照基準レベルと比較した完全な阻害または低下を範囲に含まない。「完全阻害」は、参照基準レベルと比較した100%阻害である。減少は、好ましくは、ある所与の障害を有しない個体に関する正常範囲内にあると受け入れられているレベルまで下がることでありよい。

10

【0086】

「増加した」、「増加する」または「強化する」または「活性化する」という用語はすべて、本明細書において、統計的に有意な量での増加を意味する；疑義を避けるため、「増加した」、「増加する」または「強化する」または「活性化する」という用語は、参照基準レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、参照基準レベルと比較して少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%の、もしくは最大100%までの増加、もしくは10~100%の任意の増加、または参照基準レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、少なくとも約20倍の増加、少なくとも約50倍の増加、少なくとも約100倍の増加、少なくとも約1000倍の増加、もしくはそれを上回ることを意味するものとする。

20

【0087】

「統計的に有意な」または「有意に」という用語は、統計的有意性のことを指し、これは一般に、正常値または参照基準値よりも2標準偏差（2SD）またはそれを上回って上または下にあることを意味する。この用語は、差があるという統計的証拠を指す。これは、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却する判断を下す確率として定義される。この判断は多くの場合、p値を用いて行われる。

30

【0088】

本明細書で用いる場合、「含む（comprising）」という用語は、提示された所定の要素に加えて他の要素も存在しうることを指す。「含む」の使用は、限定ではなく包含を示している。

【0089】

本明細書で用いる場合、「から本質的になる」という用語は、ある所与の態様のために必要な要素のことを指す。この用語は、本発明のその態様の基本的なかつ新規または機能的な特徴に実質的に影響を及ぼさない追加の要素の存在を許容する。

40

【0090】

「からなる」という用語は、態様のその記載に列記されていない要素を全く含まない、本明細書に記載される組成物、方法、および各々の構成要素のことを指す。

【0091】

さらに、文脈に特別の規定のない限り、単数形の実語は複数形も含むものとし、複数形の実語は単数形も含むものとする。

【0092】

操作例における場合以外、または別様に指定される場合を除き、本明細書で用いられる

50

成分の数量または反応条件を表す数字はすべて、いかなる場合にも「約」という用語によって修飾されると理解されるべきである。「約」という用語は、パーセンテージとともに用いられる場合は $\pm 1\%$ を意味しうる。

#### 【0093】

本明細書において別様に定める場合を除き、本出願とともに用いられる科学用語および技術用語は、本開示が属する当業者によって一般的に理解されている意味を有するはずである。本発明は、本明細書に記載された特定の方法、プロトコルおよび試薬などには限定されず、これらは異なってもよいことが理解されるべきである。本明細書で用いられる用語は、特定の態様を説明することのみを目的としており、本発明の範囲を限定することを意図したものではなく、それは特許請求の範囲のみによって規定される。分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 19361 13414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385)、および Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005 (ISBN 0471142735)に見ることができ、これらの内容はすべて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0094】

ゲノムインスレーターエレメント

クロマチンインスレーターは、ベクター中のエンハンサーと細胞癌遺伝子の調節因子との間の相互作用を妨害することによって、挿入性突然変異誘発のリスクを減少させることができる(6,7)。クロマチンインスレーターには2種類ある：染色体ドメインが異質染色質化するのを防ぐバリアーインスレーターと、異なるクロマチンドメインの調節因子間の相互作用を防止するエンハンサー遮断性インスレーターである(8)。ある種のエレメントはバリアー活性とエンハンサー遮断活性を兼ね備える。最も詳細に研究されているクロマチンインスレーターは、ニワトリ グロビン遺伝子座の遺伝子座領域のDNアーゼI高感受性部位4(cHS4)に位置する(9,10)。詳細な試験により、cHS4インスレーターのエンハンサー遮断活性は、転写因子CTCFの結合に依存することが実証されている(11~14)。ゲノムワイドでのCTCFによる占有率が多数の細胞種にわたって調査されたところ(15,16)、その結合部位は種を通じて驚くほど保存されていた(17)。ゲノムワイドでCTCF結合部位の多くの割合はコヒーシタンパク質と重なり合い、cHS4でのインスレーター機能はコヒーシに依存することが報告されている(18)。その上、CTCF部位はトポロジカルなドメイン境界を多く含む(19)。

#### 【0095】

いくつかの試験により、遺伝子治療におけるクロマチンインスレーターの役割について取り組まれているが、ほとんどはcHS4またはその構成要素をウイルスベクター中に組み入れることによってである。cHS4は、そのバリアー機能によってベクターサイレンシングの確率を低下させ(20,21)、そのエンハンサー遮断機能によって近位調節因子の活性化の確率を低下させ(22~24)、かつエクスピボおよびインスピボアッセイにおいて遺伝毒性の

リスクを低下させる（24～26）。しかし、cHS4インスレーターには目立った欠点が2つある：十分に活性のあるcHS4エレメントは極めて長く（1.2kb）、ウイルスベクター中の貴重な空間を消費する；および完全長cHS4の組み入れは多くの場合、ベクター力価の低下をもたらす。

#### 【0096】

本明細書において提供されるゲノムインスレーターエレメントは、近位調節因子の活性化の確率を低下させるためのエンハンサー遮断を形づくる。しかし、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは活性cHS4エレメントよりも短く、ウイルス力価の実質的な損失を伴わずにウイルスベクター中に容易に組み入れることができる。

#### 【0097】

1つの態様において、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは長さが600bp未満である。他の態様において、ゲノムインスレーターエレメントは、550bp未満、500bp未満、450bp未満、400bp未満、350bp未満、325bp未満、300bp未満、290bp未満、280bp未満、270bp未満、260bp未満、250bp未満、240bp未満、230bp未満、220bp未満、210bp未満、200bp未満、190bp未満、180bp未満、170bp未満、160bp未満、150bp未満、125bp未満、100bp未満、50bp未満、25bp未満、15bp未満、またはより小さい。1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントは長さが14bpである。

#### 【0098】

他の態様において、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは長さが100～600bp、100～500bp、100～400bp、100～300bp、100～250bp、100～200bp、100～175bp、100～150bp、150～600bp、200～600bp、300～600bp、400～600bp、500～600bp、125～300bp、150～300bp、175～300bp、200～300bp、225～300bp、250～300bp、275～300bp、およびそれらの間の任意の範囲である。

#### 【0099】

1つの態様において、本明細書において提供されるゲノムインスレーターエレメントは、以下からなる群より選択される14bpコア配列を含む：

CACCAGGTGGCGCT (SEQ ID NO.: 1), CCACCAGGGGGAGC (SEQ ID NO.: 2),

TCAGTAGAGGGCGC (SEQ ID NO.: 3), CCACTAGGGGGCAG (SEQ ID NO.: 4),

CAGCAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 5), CAGTAGAGGGCGCT (SEQ ID NO.: 6),

CCCTCTCCTGGGCA (SEQ ID NO.: 7), GCAGCAGAGAGCAA (SEQ ID NO.: 8), および

CCCTCTGCTGACTG (SEQ ID NO.: 9)

#### 【0100】

もう1つの態様において、本明細書において提供されるようなゲノムインスレーターエレメントは、以下からなる群より選択される配列を含む：SEQ ID NO.: 10、SEQ ID NO.: 11、SEQ ID NO.: 12、SEQ ID NO.: 13、SEQ ID NO.: 14、SEQ ID NO.: 15、SEQ ID NO.: 16、SEQ ID NO.: 17、SEQ ID NO.: 18、SEQ ID NO.: 19、SEQ ID NO.: 20、SEQ ID NO.: 21、SEQ ID NO.: 22、SEQ ID NO.: 23、SEQ ID NO.: 24、SEQ ID NO.: 25、SEQ ID NO.: 26、SEQ ID NO.: 27、SEQ ID NO.: 28、SEQ ID NO.: 29、SEQ ID NO.: 30、SEQ ID NO.: 31、SEQ ID NO.: 32、SEQ ID NO.: 33、SEQ ID NO.: 34、SEQ ID NO.: 35、およびSEQ ID NO.: 36（例えば、表7を参照）。

#### 【0101】

同じく本明細書において想定しているのは、表7に列記されたゲノムインスレーターエレメントの変異体またはホモログであるが、ただし、変異体またはホモログが、（例えば、実施例に記載されたようなエンハンサー遮断アッセイを用いた判定で）ゲノムインスレーターエレメントのエンハンサー遮断活性の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらには100%を保っていることを条件とする。いくつかの態様においては、表7に列記されたゲノムインスレーターエレメントの変異体またはホモログが、表7に提示された配列よ

10

20

30

40

50

りも高いエンハンサー遮断活性を有する可能性も想定している。例えば、変異体および/またはホモログは、表7に列記されたゲノムインスレーターエレメント配列の活性よりも少なくとも20%高い活性を有しうる。他の態様において、変異体および/またはホモログは、表7に列記されたゲノムインスレーターエレメントの活性と比較して、少なくとも50%高い、少なくとも60%高い、少なくとも70%高い、少なくとも80%高い、少なくとも85%高い、少なくとも90%高い、少なくとも95%高い、少なくとも98%高い、少なくとも99%高い、少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも50倍高い、少なくとも75倍高い、少なくとも100倍高い、少なくとも150倍高い、少なくとも200倍高い、少なくとも500倍高い、少なくとも1000倍高いか、またはそれを上回る活性を有しうる。

10

#### 【0102】

1つの態様において、ゲノムインスレーターエレメントの変異体は、以下からなる群より選択される配列に対して少なくとも80%同一な配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。他の態様において、本明細書に記載されたようなゲノムインスレーターエレメントの配列は、以下からなる群より選択される配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一な配列を含む：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

20

#### 【0103】

いくつかの態様において、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは、14bpコア配列の内部では100%の同一性を保っているが、コア配列の外側（例えば、コア配列のいずれかの側）の配列は、以下からなる群より選択される配列中の14bpコア配列の外側の領域に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を含みうる：SEQ ID NO. : 10、SEQ ID NO. : 11、SEQ ID NO. : 12、SEQ ID NO. : 13、SEQ ID NO. : 14、SEQ ID NO. : 15、SEQ ID NO. : 16、SEQ ID NO. : 17、SEQ ID NO. : 18、SEQ ID NO. : 19、SEQ ID NO. : 20、SEQ ID NO. : 21、SEQ ID NO. : 22、SEQ ID NO. : 23、SEQ ID NO. : 24、SEQ ID NO. : 25、SEQ ID NO. : 26、SEQ ID NO. : 27、SEQ ID NO. : 28、SEQ ID NO. : 29、SEQ ID NO. : 30、SEQ ID NO. : 31、SEQ ID NO. : 32、SEQ ID NO. : 33、SEQ ID NO. : 34、SEQ ID NO. : 35、およびSEQ ID NO. : 36。

30

#### 【0104】

本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは、例えば、遺伝子治療を生じさせるため、および/または疾患を治療するためのベクター組成物の設計に用いることができる。最小限でも、本明細書に記載のウイルスベクターは、強力なゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つのコピーを含む。しかし、単一のゲノムインスレーターエレメントの複数のコピー（すなわち、2つまたはそれを上回る）を含むウイルスベクター、または複数の異なるゲノムインスレーターエレメントを含むウイルスベクターも、本明細書において想定している。

40

#### 【0105】

したがって、いくつかの態様において、ベクターは、単一のゲノムインスレーターエレメントの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5

50

つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、またはそれを上回るコピーを含む。他の態様において、ベクターは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、またはそれを上回る、異なるゲノムインスレーターエレメントを含む。少なくとも2つの異なるゲノムインスレーターエレメントを含むベクターが、ゲノムインスレーターエレメントのうち1つまたは複数の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、またはそれを上回るコピーを含むこともできる。当業者は、ベクターのエンハンサー遮断活性とウイルスベクター制約条件に貢献する全インサートサイズとのバランスをとりうる、複数のコピーまたは複数のゲノムインスレーターエレメントを含むようにベクターを容易に設計することができる。

10

#### 【0106】

##### ベクター

当業者には明白であろうが、「ウイルスベクター」という用語は、典型的には核酸分子の移入もしくは細胞のゲノム中への組み込みを容易にするウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、移入プラスミド）、または核酸の移入を媒介するウイルス粒子のいずれかを指して、広く用いられる。ウイルス粒子は、典型的には、さまざまなウイルス構成要素を含み、時には核酸に加えて宿主細胞の構成要素も含む。

#### 【0107】

本質的にあらゆるウイルスベクターを本明細書に記載の組成物および方法とともに用いることができるが、これは特に、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントの使用により、発現の不適切な読み過ぎを防止することができ、それ故に対象におけるウイルスベクターの発癌作用を軽減しうるためである。

20

#### 【0108】

1つの態様において、本明細書に記載されたようなゲノムインスレーターエレメントを含むウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。「レトロウイルスベクター」という用語は、主にレトロウイルスに由来する構造的遺伝要素および機能的遺伝要素を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。レトロウイルスという用語は、レンチウイルスベクターを範囲に含むことを意図している。

#### 【0109】

同じく本明細書において使用を企図しているのは、「ハイブリッドベクター」である。「ハイブリッド」という用語は、レトロウイルス性（例えば、レンチウイルス配列）および非レンチウイルス性のウイルス配列の両方を含有するベクター、LTRまたは他の核酸のことを指す。そのようなウイルス配列は、例えば、配列の逆転写、複製、組み込みおよび/もしくはパッケージングのための配列、非構造タンパク質、ならびに/またはポリメラーゼ認識部位を含みうる。

30

#### 【0110】

ゲノムインスレーターエレメントの使用は、ゲノム中に組み入れられるベクター（例えば、レトロウイルスベクター）では特に重要であるが、しかし、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）またはそれらの構成要素の使用にゲノムインスレーターエレメントを含めることもできる。AAVベクターは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9および10、またはそれらに由来するキメラ性AAVからなる群より選択しうる（Wu et al., 2006, Mol Therapy 14:316-27; Bowles et al., 2012, Mol Therapy 20:443-455）。一般に、マウスにおける形質導入のためには、AAV血清型6およびAAV血清型9が特に適しており、一方、ヒトへの遺伝子移入のためには、AAV血清型1、6、8および9が好ましい。

40

#### 【0111】

組換えウイルスベクターは、標準的な手法に従って作製することができる。それらのインビボ適用の前に、ウイルスベクターをセファロースカラムなどのゲル濾過法によって脱塩し、その後の濾過によって精製することができる。精製により、ベクターが投与される対象における有害な恐れのある影響が軽減される。投与されるウイルスは、野生型で複製

50

能のあるウイルスを実質的に含まない。ウイルスの純度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の後に銀染色を行うといった適した方法によって証明しうる。

#### 【0112】

当業者には理解されるであろうが、当技術分野において、対象（例えば、ヒト）への核酸配列の投与のためにはウイルスベクターが典型的には好ましいが、しかし、本明細書に記載のゲノムインスレーターエレメントは、任意の適した遺伝子治療用ベクターとともに、またはさらにはプラスミドもしくは裸の核酸配列とともに用いることも想定している。

#### 【0113】

ベクター構成要素

10

本明細書に記載のベクターは、当業者に公知であるいくつかの配列のうち任意のもの、例えば、プロモーター（例えば、構成性または誘導性）、エンハンサー、末端反復配列 (LTR)、多重クローニング部位、制限配列などを含みうる。例えば、対象における治療物質の発現を強化するために、随意選択的ないくつかの配列のうち任意のものを含むようにベクターを設計しうることは当業者には理解されるであろう。本明細書において「ウイルス構成要素」と称される、これらの配列のいくつかの非限定的な例は、本明細書中に記載されている。

#### 【0114】

本明細書に記載のベクターは、以下の構成要素のうち0個、1個または複数を含むしうる：プロモーターおよび/またはエンハンサー、非翻訳領域 (UTR)、コザック配列、ポリ

20

アデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、配列内リボソーム進入部位 (IRES)、リコンビナーゼ認識部位（例えば、LoxP、FRTおよびAtt部位）、終結コドン、転写終結シグナル、および自己切断性ポリペプチド、またはエピトープタグをコードするポリヌクレオチド。

#### 【0115】

本明細書に記載のベクター組成物とともに用いられるプロモーターは、構成性、誘導性、または組織特異的であってよい。

#### 【0116】

本明細書で用いる場合、「構成性プロモーター」という用語は、機能的に連結された配列の転写を継続的または連続的に可能にするプロモーターのことを指す。構成性プロモーターは、多種多様な細胞種および組織型における発現を可能にする「ユビキタスプロモーター」、または制限された種々の細胞種および組織型における発現を可能にする「組織特異的プロモーター」であってよい。例示的なユビキタスプロモーターには、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター、ウイルス性シミアンウイルス40 (SV40)（例えば、初期または後期）、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR、単純ヘルペスウイルス (HSV)（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5プロモーター、P7.5プロモーターおよびP11プロモーター、伸長因子1- (EF1a)プロモーター、初期増殖応答1 (EGR1)、フェリチンH (FerH)、フェリチンL (FerL)、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、真核生物翻訳開始因子4A1 (EIF4A1)、熱ショック70kDaタンパク質5 (HSPA5)、熱ショック

30

40

#### 【0117】

タンパク質90kDa、メンバー1 (HSP90B1)、熱ショックタンパク質70kDa (HSP70)、-キネシン (-KIN)、ヒトROSA26遺伝子座 (Irons et al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007))、ユビキチンCプロモーター (UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ -アクチン (CAG)プロモーター、および -アクチンプロモーターが非限定的に含まれる。

1つの態様において、所望のポリヌクレオチド配列の細胞種特異的、系列特異的、または組織特異的発現を実現するために、組織特異的プロモーターを用いることが望ましいことがある。組織特異的プロモーターの実例には、B29プロモーター (B細胞での発現)、runx2転写因子 (CBFa2)プロモーター (幹細胞特異的発現)、CD14プロモーター (単核球細胞

50

胞での発現)、CD43プロモーター(白血球および血小板での発現)、CD45プロモーター(造血細胞での発現)、CD68プロモーター(マクロファージでの発現)、CYP450 3A4プロモーター(肝細胞での発現)、デスミンプロモーター(筋肉での発現)、エラストアーゼ1プロモーター(膵腺房細胞での発現)、エンドグリンプロモーター(内皮細胞での発現)、線維芽細胞特異的タンパク質1プロモーター(FSP1)プロモーター(線維芽細胞での発現)、フィブロネクチンプロモーター(線維芽細胞での発現)、fms関連チロシンキナーゼ1(FLT1)プロモーター(内皮細胞での発現)、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター(アストロサイトでの発現)、インスリンプロモーター(膵細胞での発現)、インテグリン 2b(ITGA2B)プロモーター(巨核球)、細胞内接着分子2(ICAM-2)プロモーター(内皮細胞)、インターフェロン (IFN-)プロモーター(造血細胞)、ケラチン5プロモーター(ケラチノサイトでの発現)、ミオグロビン(MB)プロモーター(筋肉での発現)、筋分化1(MYOD1)プロモーター(筋肉での発現)、ネフリンプロモーター(有足細胞での発現)、骨 -カルボキシグルタミン酸タンパク質2(OG-2)プロモーター(骨芽細胞での発現)、3-オキシ酸CoAトランスフェラーゼ2B(Oxct2B)プロモーター(一倍体-精子細胞での発現)、サーファクタントタンパク質B(SP-B)プロモーター(肺での発現)、シナプシンプロモーター(ニューロンでの発現)、ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質(WASP)プロモーター(造血細胞での発現)が非限定的に含まれる。

#### 【0118】

本明細書で用いる場合、「条件的発現」は、誘導性発現；抑圧可能な発現；特定の生理的、生物学的または疾患状態を有する細胞または組織における発現などを非限定的に含む任意の種類の条件的発現のことを指しうる。この定義は、細胞種または組織特異的な発現を除外するものではない。本明細書における方法および組成物のある態様は、例えば、細胞、組織、生物体などを、ポリヌクレオチドの発現を引き起こす処理もしくは条件、または関心対象のポリヌクレオチドによってコードされるポリヌクレオチドの発現の増加もしくは減少を引き起こす処理もしくは条件に供することによって発現が制御される、関心対象のポリヌクレオチドの条件的発現を提供する。

#### 【0119】

誘導性プロモーター/システムの実例には、ステロイド誘導性プロモーター、例えば、グルココルチコイドまたはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のプロモーターなど(対応するホルモンによる処理によって誘導される)、メタロチオネイン(metallothionein)プロモーター(種々の重金属による処理によって誘導される)、MX-1プロモーター(インターフェロンによって誘導される)、「GeneSwitch」ミフェプリストン調節可能システム(Sirin et al., 2003, Gene, 323:67)、クメート(cumate)誘導性遺伝子スイッチ(WO 2002/088346号)、テトラサイクリン依存性調節システムなどが非限定的に含まれる。

#### 【0120】

また、条件的発現を、部位特異的DNAリコンビナーゼを用いることによって実現することもできる。ある態様によれば、ベクターは、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのための部位を少なくとも1つ(典型的には2つ)含む。本明細書で用いる場合、「リコンビナーゼ」または「部位特異的リコンビナーゼ」という用語には、1つまたは複数の組換え部位(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、7つ、10、12、15、20、30、50など)がかかわる組換え反応に関与する切除的または統合的なタンパク質、酵素、補因子または関連するタンパク質が含まれ、これは野生型タンパク質であってもよく(Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)を参照)、またはその突然変異体、誘導体(例えば、組換えタンパク質配列またはその断片を含有する融合タンパク質)、断片および変異体であってもよい。特定の態様に用いるために適したリコンビナーゼの実例には、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、C31、Cin、Tn3リゾルパーゼ、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1、およびParAが非限定的に含まれる。

#### 【0121】

ベクターは、多種多様な部位特異的リコンビナーゼのいずれかのための1つまたは複数

の組換え部位を含みうる。部位特異的リコンビナーゼの標的部位は、ベクター、例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターの組み込みのために必要な任意の部位に加えたものであることが理解されるべきである。本明細書で用いる場合、「組換え配列」、「組換え部位」または「部位特異的組換え部位」という用語は、リコンビナーゼが認識して結合する特定の核酸配列のことを指す。

#### 【0122】

例えば、Creリコンビナーゼのための1つの組換え部位はloxPであり、これは、8塩基対のコア配列の両側に位置する、13塩基対の逆方向反復配列（リコンビナーゼ結合部位としての役を果たす）を2つ含む34塩基対の配列である（例えば、Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)を参照）。他の例示的なloxP部位には、lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997)、lox5171 (Lee and Saito, 1998)、lox2272 (Lee and Saito, 1998)、m2 (Langer et al., 2002)、lox71 (Albert et al., 1995)、およびlox66 (Albert et al., 1995) が非限定的に含まれる。

#### 【0123】

FLPリコンビナーゼのために適した認識部位には、FRT (McLeod, et al., 1996)、F1、F2、F3 (Schlake and Bode, 1994)、F4、F5 (Schlake and Bode, 1994)、FRT (LE) (Senecoff et al., 1988)、FRT (RE) (Senecoff et al., 1988) が非限定的に含まれる。認識配列の他の例には、attB配列、attP配列、attL配列、およびattR配列があり、これらはリコンビナーゼ酵素 インテグラーゼ、例えば -c31によって認識される。C31 SSRは、ヘテロタイプ部位attB（長さ34bp）とattP（長さ39bp）との間の組換えのみを媒介する (Groth et al., 2000)。

#### 【0124】

1つの態様において、本明細書に記載のベクターは「配列内リボソーム進入部位」または「IRES」を含むことができ、これはATGなどの開始コドンへのシストロン（タンパク質コード領域）の直接的な内部リボソーム進入を促進し、それにより、その遺伝子のキャップ非依存的な翻訳を導くエレメントのことを指す。特定の態様において、本明細書において想定しているベクターは、1つまたは複数のポリペプチド（例えば、治療用タンパク質）をコードする、1つまたは複数の関心対象の遺伝子を含みうる。複数のポリペプチドのそれぞれの効率的な翻訳を実現するために、ポリヌクレオチド配列を、1つまたは複数のIRES配列または自己切断性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分離することができる。

#### 【0125】

本明細書で用いる場合、「コザック配列」という用語は、リボソームの小サブユニットに対するmRNAの初期結合を大きく促して、翻訳を増加させる、短いヌクレオチド配列のことを指す。コンセンサスコザック配列は (GCC) RCCATGGであり、ここでRはプリン (AまたはG) である (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92、およびKozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48)。

#### 【0126】

特定の態様において、ベクターは、発現させようとするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの3'側にあるポリアデニル化配列を含む。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端にポリA尾部を付加することによってmRNAの安定性を促進し、それ故に翻訳効率の増大に寄与しうる。認知されているポリアデニル化部位には、理想的なポリA配列（例えば、AATAAA、ATTAAGTAAA）、ウシ成長ホルモンポリA配列 (BGHpA)、ウサギ - グロビンポリA配列 (rgpA)、または当技術分野で公知の別の適切な異種性または内在性のポリA配列が含まれる。

#### 【0127】

所望であれば、本明細書に記載のベクターは、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含みうる。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、ハイグロマイシン、メトトレキセート、ゼオシン、ブラストサイジン、またはテトラサイクリンに対する耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補完する、

10

20

30

40

50

または(c)複合培地からは入手不可能な重大な栄養分を供給する、例えば、バチルス属(Bacilli)の場合にはD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子。いくつかの選択システムの任意のものを用いて、形質転換された細胞株を回収することができる。これらには、それぞれtk細胞またはaprt細胞において使用しうる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wigler et al., 1977. Cell 11:223-232)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowy et al., 1990. Cell 22:817-823)が非限定的に含まれる。

#### 【0128】

1つの態様において、本明細書に記載のベクター組成物は、末端反復配列を含む。「末端反復配列(LTR)」という用語は、典型的には、レトロウイルスDNAの末端に位置する塩基対のドメインのことを指し、これはその天然の配列環境下では直列反復配列であり、U3、RおよびU5領域を含む。LTRは一般に、レトロウイルス遺伝子の発現(例えば、遺伝子転写物の促進、開始およびポリアデニル化)およびウイルス複製の基礎となる機能をもたらす。LTRは、転写調節因子、ポリアデニル化シグナル、ならびにウイルスゲノムの複製および組み込みのために必要な配列を含む、多数の調節シグナルを含む。本明細書に記載のベクターは、LTR全体を含むこともでき、またはU3、RおよびU5領域からなる群より選択される1つもしくは複数の領域を含むこともできる。

#### 【0129】

他の態様において、ベクターは改変された5'および/または3'LTRを含みうる。3'LTRの改変は、多くの場合、ウイルスを複製欠損性にすることによってレンチウイルスシステムまたはレトロウイルスシステムの安全性を改善するために行われる。本明細書で用いる場合、「複製欠損性」という用語は、完全な有効な複製ができず、そのために感染性ビリオンが産生されないウイルスを指す(例えば、複製欠損性レンチウイルス子孫)。「複製能がある」という用語は、複製することができ、そのためにウイルスのウイルス複製により感染性ビリオン(例えば、複製コンピテントレンチウイルス子孫)を産生することができる野生型ウイルスまたは突然変異ウイルスのことを指す。

#### 【0130】

本明細書に記載のベクターが、「自己不活性化」(SIN)ベクター、例えば、1回目のウイルス複製を超えてウイルスが転写されることを防ぐために、U3領域として知られる右側の(3')LTRのエンハンサー-プロモーター領域が改変された(例えば、欠失または置換によって)複製欠損性ベクターであってもよい。1つのさらなる態様において、3'LTRは、U5領域が、例えば、理想的なポリ(A)配列に置き換えられるように改変される。

#### 【0131】

5'LTRのU3領域を、ウイルス粒子の産生の間にウイルスゲノムの転写を駆動するために異種プロモーターで置き換えることによって、さらなる安全性の強化がもたらされる。用いる異種プロモーターの例には、例えば、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター(例えば、初期または後期)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(例えば、最初期)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、および単純ヘルペスウイルス(HSV)(チミジンキナーゼ)プロモーターが含まれる。典型的なプロモーターは、Tatに依存しない様式で高レベルの転写を駆動することができる。この置き換えにより、ウイルス産生システムに完全なU3配列が存在しなくなるため、複製能のあるウイルスが生じる組換えの可能性が低下する。

#### 【0132】

加えて、ベクターが、いくつか例を挙げるならば、パッケージング配列(例えば、配列)、「トランス活性化反応」遺伝要素、「R領域」、逆転写部位、FLAPエレメント、輸送エレメント、転写後調節因子、および/またはポリアデニル化部位をさらに含むこともできる。当業者はそのようなエレメントの使用を認識していると考えられ、必要に応じて、本明細書に記載されたようなベクターのデザインにそれらを組み入れることができる。

#### 【0133】

1つの態様において、ベクターは、異種遺伝子発現を増加させるために異種核酸転写物

10

20

30

40

50

の効率的な終結およびポリアデニル化を導く少なくとも1つのエレメントをさらに含むことができる。転写終結シグナルは一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に見いだされる。本明細書で用いる「ポリA部位」または「ポリA配列」という用語は、RNAポリメラーゼIによる新生RNA転写物の終結およびポリアデニル化の両方を導くDNA配列のことを指す。ポリA尾部を欠く転写物は不安定であり、急速に分解されるので、組換え転写物の効率的なポリアデニル化が望ましい。ベクター中に用いるポリAシグナルの実例には、理想的なポリA配列（例えば、AATAAA、ATTAAA AGTAAA）、ウシ成長ホルモンポリA配列（BGHpA）、ウサギ -グロビンポリA配列（r gpA）、または当技術分野で公知の別の適した異種性または内在性のポリA配列が含まれる。

#### 【0134】

本明細書に記載のベクターは、遺伝子治療のために用いられた場合に、治療物質の発現を可能にすることができる。治療物質は、生物活性タンパク質、治療用タンパク質、ドミナントネガティブ突然変異体、RNA干渉物質、またはmiRNAであってよい。1つの態様において、治療物質をコードする配列は核酸カセット内に含まれる。

#### 【0135】

本明細書で用いる「核酸カセット」という用語は、RNAを発現し、その後にタンパク質を発現することができるベクター中の遺伝子配列のことを指す。核酸カセットは、カセット内の核酸をRNAに転写し、必要に応じてタンパク質またはポリペプチドに翻訳し、形質転換された細胞中の活性に必要な適切な翻訳後修飾を受け、適切な細胞内区画へのターゲティングまたは細胞外区画内への分泌によって生物活性に適切な区画にトランスロケーションすることができるようにベクター内に位置的および順序的に配向されている。好ましくは、カセットは、ベクター中への容易な挿入に適したその3'末端および5'末端を有し、例えば、各末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。1つの態様において、核酸カセットは、疾患を治療するために用いられる治療用遺伝子の配列を含む。カセットを取り出して、単一の単位としてベクターまたはプラスミドに挿入することができる。

#### 【0136】

妥当なウイルス力価を実現するためには、多くの場合、大規模なウイルス粒子の産生が必要である。ウイルス粒子は、移入ベクターをウイルスの構造遺伝子および/またはアクセサリ遺伝子、例えば、gag遺伝子、pol遺伝子、env遺伝子、tat遺伝子、rev遺伝子、vif遺伝子、vpr遺伝子、vpu遺伝子、vpx遺伝子、またはnef遺伝子または他のレトロウイルスの遺伝子を含むパッケージング細胞系列にトランスフェクトすることによって産生される。

#### 【0137】

本明細書で用いる場合、「パッケージングベクター」という用語は、パッケージングシグナルを欠き、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多くのウイルスの構造遺伝子および/またはアクセサリ遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターまたはウイルスベクターのことを指す。典型的には、パッケージングベクターはパッケージング細胞に含まれ、トランスフェクション、形質導入または感染によって細胞に導入される。トランスフェクション、形質導入または感染のための方法は当業者に周知である。本発明のレトロウイルス/レンチウイルス移入ベクターを、トランスフェクション、形質導入または感染によってパッケージング細胞系列に導入して、産生細胞または産生細胞系列を作製することができる。本発明のパッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクションまたは電気穿孔を含む標準の方法によってヒト細胞または細胞系列に導入することができる。いくつかの態様において、パッケージングベクターを、優性選択マーカー、例えば、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、ゼオシン、チミジンキナーゼ、DHFR、Gln合成酵素またはADAなどと一緒に細胞に導入し、その後、適切な薬物の存在下でクローンを選択し、単離することができる。選択マーカー遺伝子は、コード遺伝子に、パッケージングベクターによって、例えば、IRESまたは自己切断性ウイルスペプチドによって物理的に連結させることができる。

10

20

30

40

50

## 【0138】

ウイルスエンベロープタンパク質 (env) により、細胞系列から生成される組換えレトロウイルスによって最終的に感染させ、形質転換することができる宿主細胞の範囲が決定される。レンチウイルス、例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、FIVおよびEIVなどの場合、envタンパク質にはgp41およびgp120が含まれる。以前に記載されている通り、本発明のパッケージング細胞によって発現されるウイルスenvタンパク質は、ウイルスのgag遺伝子およびpol遺伝子とは別のベクター上にコードされることが好ましい。

## 【0139】

本発明において使用しうるレトロウイルス由来env遺伝子の実例には、MLVエンベロープ、10A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、エボラ (Ebola)、センダイ (Sendai)、FPV (家禽ペストウイルス)、およびインフルエンザウイルスのエンベロープが非限定的に含まれる。同様に、RNAウイルス (例えば、ピコルナウイルス (Picornaviridae) 科、カリシウイルス (Caliciviridae) 科、アストロウイルス (Astroviridae) 科、トガウイルス (Togaviridae) 科、フラビウイルス (Flaviviridae) 科、コロナウイルス (Coronaviridae) 科、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae) 科、ラブドウイルス (Rhabdoviridae) 科、フィロウイルス (Filoviridae) 科、オルソミクソウイルス (Orthomyxoviridae) 科、ブニヤウイルス (Bunyaviridae) 科、アレナウイルス (Arenaviridae) 科、レオウイルス (Reoviridae) 科、ビルナウイルス (Birnaviridae) 科、レトロウイルス (Retroviridae) 科のRNAウイルス) 由来のエンベロープ、ならびにDNAウイルス (ヘパドナウイルス (Hepadnaviridae) 科、シルコウイルス (Circoviridae) 科、パルボウイルス (Parvoviridae) 科、パポバウイルス (Papovaviridae) 科、アデノウイルス (Adenoviridae) 科、ヘルペスウイルス (Herpesviridae) 科、ポックスウイルス (Poxviridae) 科、およびイリドウイルス (Iridoviridae) 科) 由来のエンベロープをコードする遺伝子を利用することができる。代表的な例には、FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10、およびEIAVが含まれる。

## 【0140】

他の態様において、本発明のウイルスをシュードタイピングするためのエンベロープタンパク質には、以下のウイルスのいずれかが非限定的に含まれる：A型インフルエンザ、例えば、H1N1、H1N2、H3N2およびH5N1 (トリインフルエンザ) など、B型インフルエンザ、C型インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群の任意のウイルス、腸内アデノウイルス、パルボウイルス、デング熱ウイルス、サル痘、モノネガウイルス目、リッサウイルス、例えば、狂犬病ウイルス、ラゴスコウモリウイルス、モコラウイルス、ドゥベンヘイジウイルス、ヨーロッパコウモリウイルス1&2およびオーストラリアコウモリウイルスなど、エフェメロウイルス、ベシクロウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV)、ヒトヘルペスウイルス6型および8型など、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、パピローマウイルス、マウスガンマヘルペスウイルス、アレナウイルス、例えば、アルゼンチン出血熱ウイルス、ポリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス、ベネズエラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュポウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) など、ブニヤウイルス (Bunyaviridae) 科、例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ハンタウイルス、腎症候群を伴う出血熱を引き起こすウイルス、リフトバレー熱ウイルスなど、エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱を含むフィロウイルス (Filoviridae) 科 (フィロウイルス)、キャサヌール森林病ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介脳炎を引き起こすウイルスを含むフラビウイルス (Flaviviridae) 科ならびにパラミクソウイルス (Paramyxoviridae) 科、例えば、ヘンドラウイルスおよびニパーウイルスなど、大痘瘡、小痘瘡 (天然痘)、アルファウイルス、例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、SARS関連コロナウイル

10

20

30

40

50

ス（SARS-CoV）、西ナイルウイルス、任意の脳炎（encephalitis）を引き起こすウイルスなど。

【0141】

1つの態様においては、ベクター粒子の表面上での抗体または抗原結合断片の発現によって、ベクター指向性を改変することができる。

【0142】

強力なゲノムインスレーターエレメントの同定

本明細書において提供されるのは、強力なゲノムインスレーターエレメントを同定するための方法である。手短に述べると、本方法は、ゲノム中のCTCF結合モチーフの事例の数を評価する段階、およびそれらを、占有率の高いCTCF結合モチーフを決定するためのCTCFに関するChIPシーケンシングからのデータとアラインメントする段階、任意で14bpコア配列の存在によってCTCF結合モチーフを分類する段階、任意で占有率が最も高いものから最も低いものまでに（またはその反対に）ランク付けする段階、機能性試験のための候補を選択する段階、およびエンハンサー遮断活性に関して試験する段階、を含む。1つの態様において、強力なゲノムインスレーターエレメントを同定するための方法は、図1に概要を示す諸段階を含む。

10

【0143】

もう1つの態様において、強力なゲノムインスレーターエレメントを同定するための方法は、実施例に概要を示す方法を含む。

【0144】

20

遺伝毒性

ヒトにおける遺伝子治療用ベクターの使用は、その毒性、特にウイルスベクター中に存在するエンハンサーによる細胞の癌遺伝子の活性化のために遺伝毒性が生じる傾向によって制限されている。そのような遺伝毒性は、例えば、遺伝子治療用ベクターによって治療されたヒトにおける造血器悪性腫瘍の出現、および例えば、ウイルスベクターを投与された実験動物における腫瘍数の増加が証拠となっている。いかなるレベルの遺伝毒性も一般に望ましくないが、本明細書に記載のベクターの遺伝毒性と関連のある腫瘍を有する動物の発生率は、ゲノムインスレーターエレメントを欠く点以外は同一なベクターと比較して、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%に、またはそれを上回って低下した。いくつかの態様において、本明細書に記載のベクターの遺伝毒性と関連のある腫瘍の発生率は、ゲノムインスレーターエレメントを欠く点以外は同一なベクターと比較して、少なくとも1分の1、少なくとも2分の1、少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも15分の1、少なくとも20分の1、少なくとも25分の1、少なくとも30分の1、少なくとも35分の1、少なくとも40分の1、少なくとも45分の1、少なくとも50分の1、少なくとも100分の1、少なくとも200分の1に、またはそれを上回って低下した。

30

【0145】

遺伝毒性は、ベクター投与に伴う腫瘍の数または程度を測定することを含む、さまざまなインビトロ方法およびインビボ方法によって決定することができる。

【0146】

40

1つの態様において、遺伝毒性は、腫瘍移植遺伝毒性アッセイを用いて決定される。このアッセイでは、レトロウイルスベクターによる形質導入を受けた細胞株をマウスに移植して、腫瘍の数または無腫瘍生存率をマウスにおいて決定する。このアッセイにより、例えば、無腫瘍生存率または全体的な腫瘍形成率を評価することによって、遺伝毒性作用の定量化が可能になる。

【0147】

遺伝子治療の投与および有効性

本明細書で用いる場合、「治療する」、「治療」、「治療すること」または「改善」という用語は、疾患または障害に関連する病状の進行または重症度を好転させること、緩和すること、改善すること、阻害すること、緩徐化すること、または停止させることを目的

50

とする治療的処置のことを指す。「治療すること」という用語は、炎症性皮膚障害に関連する病状、疾患、または障害の有害作用または症状の少なくとも1つを軽減または緩和することを指す。治療は一般に、1つまたは複数の症状または臨床的マーカーが軽減される場合に「有効」である。

#### 【0148】

または、治療は、疾患の進行が軽減されるかまたは停止する場合に「有効」である。すなわち、「治療」は、症状またはマーカーの改善だけでなく、治療が行われない場合に予想される症状の進行または悪化の停止または少なくとも緩徐化も含みうる。有益なまたは所望の臨床的結果には、検出可能であるか検出不能であるかを問わず、炎症性皮膚疾患の1つまたは複数の症状の緩和、炎症性皮膚疾患の程度の減少、炎症性皮膚疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の進行の遅延または緩徐化、炎症性皮膚疾患状態の改善または一時的緩和、および寛解（部分的であるか完全であるかを問わず）が非限定的に含まれる。疾患の「治療」には、疾患の症状または副作用を和らげること（姑息的治疗を含む）も含まれる。

10

#### 【0149】

1つの態様において、本明細書で用いる場合、「予防」または「予防すること」という用語は、対象に関連して用いられる場合、炎症性皮膚疾患に関連する免疫疾患および症状の発症を停止させること、妨げること、および／または緩徐化することを指す。

#### 【0150】

本明細書で用いる場合、「治療的有效量」という用語は、少なくとも部分的に、所望の効果を達成するため、治療される特定の疾患もしくは障害の症状発現を遅らせるため、その進行を阻害するため、または症状発現もしくは進行を完全に停止させるために必要な量を意味する。そのような量は、当然ながら、治療される特定の病状、病状の重症度、ならびに年齢、身体状態、体格、体重、および併用治療を含む個々の患者パラメーターに依存すると考えられる。これらの要因は当業者には周知であり、日常的程度の実験によって対処することができる。いくつかの態様においては、治療用物質の最大用量、すなわち適切な医学的判断による最大の安全用量が用いられる。しかし、当業者には、医学的理由、心理学的な理由、またはほぼすべての他の理由から、より低用量または耐容量が投与されることが理解されるであろう。

20

#### 【0151】

1つの態様において、ある所与の疾患または障害を治療する方法のための本明細書に記載の薬学的製剤または組成物の治療的有效量は、疾患または障害の少なくとも1つの症状のレベルを、化合物、化合物の組み合わせ、薬学的組成物／製剤、または組成物の非存在下におけるレベルと比較して低下させるのに十分な量のことである。他の態様において、投与される組成物の量は、安全であり、かつ疾患を治療するのに、その発症を遅らせるのに、および／または疾患の症状発現を遅らせるのに十分であることが好ましい。いくつかの態様において、その量はそれ故に、疾患を治癒させること、その症状の改善をもたらすこと、疾患の経過を緩徐化すること、疾患の症状を緩徐化するかもしれない阻害すること、または疾患の続発性症状の確立もしくは発症を緩徐化するかもしれない阻害することができる。有効な治療が、必ずしも疾患の完全な縮退を惹起する必要はないものの、そのような効果は有効な治療であると考えられる。ある所与の治療物質の有効量は、その物質の性質、投与経路、治療物質を投与される動物の体格または種、および投与の目的といった要因に応じて異なると考えられる。このため、正確な「治療的有效量」を特定することは可能でなく賢明でもない。しかし、あらゆる所与の場合に、適切な「有効量」は、当業者により、当技術分野において確立された方法に従って日常的な実験のみを用いて決定される。

30

40

#### 【0152】

##### 薬学的組成物

本明細書において提供されるのは、対象における種々さまざまな疾患および／または障害を治療および予防するために有用なベクター組成物である。1つの態様において、組成

50

物は薬学的組成物である。組成物は、ポリヌクレオチドまたは治療物質をコードするベクターの治療的または予防的な有効量を含みうる。

【0153】

組成物は任意で、担体、例えば薬学的に許容される担体などを含みうる。薬学的に許容される担体は、一部には、薬学的に許容される担体は、一部には、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するのに用いられる特定のの方法によって決まる。したがって、薬学的組成物の適した製剤は非常にさまざまである。非経口投与のために適した製剤は、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路用として製剤化することができる。担体には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質を含有しうる水性等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、保存料を含みうる水性および非水性の滅菌懸濁液、リポソーム、ミクロスフェアならびにエマルションが含まれうる。

10

【0154】

治療用組成物は、生理的に耐容される担体を、有効成分としてその中に溶解または分散された本明細書に記載のベクターとともに含有する。本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される」、「生理的に耐容される」、およびそれらの文法的変形物は、それらが組成物、担体、希釈剤、および試薬を指す場合には互換的に用いられ、これらの物質を、悪心、めまい、急性胃蠕動などの望ましくない生理的作用を生じることなく哺乳動物に投与できることを表す。薬学的に許容される担体は、所望されない限り、それと混合される作用物質に対する免疫応答の惹起を促進しないと考えられる。溶解または分散されている有効成分を含有する薬理学的組成物の調製は当技術分野で十分に了解されており、製剤に基づいて限定される必要はない。典型的には、そのような組成物は溶液または懸濁液のいずれかとして注入可能なように調製されるが、使用前に液体によって溶液または懸濁液にするのに適した固体剤形を調製することもできる。また、調製物を乳化させること、またはリポソーム組成物として提示することもできる。有効成分は、薬学的に許容されかつ有効成分と適合性がある賦形剤と、本明細書に記載の治療方法に用いるのに適した量で混合することができる。適切な賦形剤には、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組み合わせが含まれる。さらに、必要に応じて、組成物は、有効成分の有効性を強化する、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤などの少量の補助物質を含んでもよい。本明細書に記載の方法とともに用いるための治療用組成物は、その中の構成要素の薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される塩には、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸により形成される（ポリペプチドの遊離アミノ基と形成される）酸付加塩が含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩を、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または第二鉄の水酸化物などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から導き出すこともできる。生理的に耐容される担体は当技術分野において周知である。例示的な液体担体は、有効成分および水のほかに何の物質も含有しないか、または緩衝剤、例えば生理的pH値のリン酸ナトリウム、生理食塩水もしくはその両方、例えばリン酸緩衝食塩水などを含む滅菌水溶液である。さらになお、水性担体は、複数の緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどの塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、および他の溶質を含有することができる。液体組成物はまた、水に加えてまたは水を除外して液相を含むことができる。そのような追加の液相の例には、グリセリン、綿実油などの植物油、および水-油エマルションがある。特定の障害または病状の治療に有効と考えられる本発明に記載の方法に用いられる有効作用物質の量は、その障害または病状の性質に依存すると考えられ、標準的な臨床的手法によって決定することができる。

20

30

40

【0155】

当業者に公知の任意の適した担体を本発明の薬学的組成物において使用しうるが、担体の種類は投与様式に応じて異なるであろう。本明細書に記載されたように用いるための組成物は、任意の適切な投与様式のために製剤化しうると考えられ、これには例えば、局所

50

、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、皮内、または筋肉内投与が含まれる。皮下注射などの非経口投与のための担体には好ましくは水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、または緩衝剤が含まれる。経口投与のためには、以上の担体または固体担体の任意のもの、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウムを用いる。生分解性マイクロスフェア（例えば、乳酸グリコール酸重合体）を、本発明の薬学的組成物のための担体として用いることもできる。適切な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号および第5,075,109号に開示されている。そのような組成物は、緩衝液（例えば、中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水）、糖質（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化物質、EDTAもしくはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、および/または保存料も含みうる。または、本発明の組成物を凍結乾燥物として製剤化することもできる。周知の技術を用いて化合物をリポソーム中に封入することもできる。本明細書に記載した組成物を、持続放出製剤（すなわち、投与後に化合物の緩徐な放出を生じるカプセルまたはスポンジなどの製剤）の一部として投与することもできる。そのような製剤は公知の技術を用いて一般に調製され、例えば、経口的、直腸内、もしくは皮下移植によって、または腫瘍の外科的切除部位のような所望の標的部位への移植によって投与される。持続放出製剤は、ペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体を、担体マトリックス中に分散された状態、および/または律速性の膜に囲まれている貯蔵部に包含された状態で含みうる。そのような製剤の内部に用いるための担体は生体適合性があり、さらに生分解性であってもよい；製剤により、有効成分の比較的一定したレベルの放出が得られることが好ましい。持続放出製剤内に含まれる活性化合物の量は、移植の部位、放出の速度および予想される持続期間、ならびに治療または予防しようとする状態の性質に依存する。

#### 【0156】

##### 用法、用量

治療は予防処置および治療法を含む。予防処置または治療は、単一時点もしくは複数時点での単回直接注射によって達成することができる。投与は、複数部位へほぼ同時にもできる。患者または対象には、哺乳動物、例えばヒト、ウシ科動物、ウマ科動物、イヌ科動物、ネコ科動物、ブタおよびヒツジ、ならびに他の獣医学的対象が含まれる。好ましくは、患者または対象はヒトである。

#### 【0157】

1つの局面において、本明細書に記載の方法は、対象における疾患または障害を治療するための方法を提供する。1つの態様において、対象は哺乳動物であってよい。もう1つの態様において、哺乳動物はヒトであってよいが、このアプローチはすべての哺乳動物に関して有効である。本方法は、本明細書に記載のベクターを薬学的に許容される担体中に含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する段階を含む。

#### 【0158】

作用物質に関する投与量の範囲はその効力、治療物質の発現レベルに依存し、所望の効果、例えば、治療しようとする疾患の少なくとも1つの症状の軽減を生じさせるのに十分に多い量を含む。投与量は、許容されない有害な副作用を引き起こすほどは多くないべきである。一般に、投与量は、ベクターから発現される阻害物質（例えば、抗体または断片、小分子、siRNAなど）または活性化物質（例えば、組換えポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣体、小分子など）の種類、ならびに患者の年齢、状態および性別に応じて異なると考えられる。投与量は当業者によって決定可能であり、また、合併症の場合には個々の医師によっても調整されうる。典型的には、治療物質および/またはベクター組成物の投与量は、0.001mg/kg体重～5g/kg体重の範囲である。いくつかの態様において、投与量の範囲は0.001mg/kg体重～1g/kg体重、0.001mg/kg体重～0.5g/kg体重、0.001mg/kg体重～0.1g/kg体重、0.001mg/kg体重～50mg/kg体重、0.001mg/kg体重～25mg/kg体重、0.001mg/kg体重～10mg/kg体重、0.001mg/kg体重～5mg/kg体重、0.001mg/kg体重

～1mg/kg体重、0.001mg/kg体重～0.1mg/kg体重、0.001mg/kg体重～0.005mg/kg体重である。または、いくつかの態様において、投与量の範囲は、0.1g/kg体重～5g/kg体重、0.5g/kg体重～5g/kg体重、1g/kg体重～5g/kg体重、1.5g/kg体重～5g/kg体重、2g/kg体重～5g/kg体重、2.5g/kg体重～5g/kg体重、3g/kg体重～5g/kg体重、3.5g/kg体重～5g/kg体重、4g/kg体重～5g/kg体重、4.5g/kg体重～5g/kg体重、4.8g/kg体重～5g/kg体重である。1つの態様において、用量の範囲は5μg/kg体重～30μg/kg体重である。

【0159】

いくつかの態様において、ベクターは、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも500の、またはそれを上回る感染多重度(MOI)で投与される。

10

【0160】

他の態様において、ベクターは、少なくとも $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、またはそれを上回る力価で投与される。

【0161】

治療有効性を維持するために、必要に応じて反復投与を行うことができる。

【0162】

治療的有效量とは、疾患の少なくとも1つの症状の統計的に有意で測定可能な変化を生じさせるのに十分な、ベクターまたは発現された治療物質の量のことである(以下の「有効性測定」を参照)。または、治療的有效量とは、対象における疾患と関連のあるバイオマーカーの発現レベルの統計的に有意で測定可能な変化を生じさせるのに十分な、作用物質の量のことである。そのような有効量は、ある所与の作用物質に関して、臨床試験ならびに動物試験において正確に測定することができる。

20

【0163】

ベクター組成物は、特定の部位に直接投与することもでき(例えば、筋肉内注射、静脈内、特定臓器内に)、または経口投与することもできる。また、作用物質を、静脈内に(ボラス注入または持続注入により)、吸入により、鼻腔内に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、体腔内に投与しうることも想定しており、必要に応じて蠕動手段によって、または当業者に公知の他の手段によって送達することもできる。所望であれば、作用物質を全身投与することもできる。

30

【0164】

少なくとも1種の作用物質を含む治療用組成物を、従来通りに単位用量で投与することができる。治療用組成物に言及して用いられる「単位用量」という用語は、対象に対する単位投与量として適する物理的に離散的な単位量のことを指し、各単位は、所望の治療効果を生じるように算出された活性物質の所定量を、必要な生理的に許容される希釈剤、すなわち担体、またはビヒクルとともに含有する。

【0165】

投与されることが必要な有効成分の正確な量は医師の判断に依存し、各個体に対して特有である。しかし、全身適用のために適した投与量の範囲は、本明細書に開示されており、投与経路に依存する。投与のための適したレジメンもさまざまであるが、初期投与の後に、1つまたは複数の間隔において、その後の注射または他の投与による反復投与を行うことが典型的である。または、血中濃度をインビボ治療法に関して指定された範囲に維持するのに十分な持続的静脈内注入も想定している。

40

【0166】

有効性測定

ある疾患に対する所与の治療の有効性は、熟練した臨床医によって判定されうる。しかし、治療は、本明細書に記載されたようなベクターによる治療後に、治療しようとする疾患の徴候もしくは症状のいずれか1つもしくはすべてが有益な様式で変更され、疾患の臨床的に認められた他の症状もしくはマーカーが向上するか、またはさらには例えば少なくとも10%改善される場合に、本明細書で使用される用語である「有効な治療」と判断され

50

る。また、有効性を、疾患、入院、または医学的介入の必要性の安定化（すなわち、疾患の進行が停止するか、または少なくとも緩徐化する）による評価で、個体が悪化しないことに関して測定することもできる。これらの指標を測定する方法は当業者に公知であり、かつ／または本明細書に記載されている。治療には、個体または動物（いくつかの非限定的な例にはヒトまたは哺乳動物が含まれる）における疾患の任意の治療が含まれ、これには以下が含まれる：（１）疾患を阻害すること、例えば、疾患の進行を停止させるかもしくは緩徐化すること；または（２）疾患を和らげること、例えば、症状の縮退を引き起こすこと；および（３）疾患の発症を予防するかもしくはその見込みを低下させること、または疾患に伴う続発性結果を予防すること。

#### 【 0 1 6 7 】

前記の詳細な説明および以下の実施例は単なる例示であり、本発明の範囲の限定として解釈されるべきではないことを理解されたい。開示された態様に対するさまざまな変更および改変は、当業者には明らかであり、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく行うことができる。さらに、示されたすべての特許、特許出願、および刊行物は、例えば、本発明に関連して使用されうるそのような刊行物に記載の方法を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日以前のそれらの開示のためだけに提供される。これに関連して何ごと、先行発明であるという理由でまたはその他の理由で、そのような開示に先行する権利が本発明者らにはないことを承認するものとして解釈されるべきでない。これらの文書の日付に関する記述または内容に関する表記はすべて、本出願人らにとって入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性に関していかなる承認も与えない。

#### 【実施例】

#### 【 0 1 6 8 】

本発明者らは、本明細書において、ヒトゲノムのCTCF部位をそれらのCTCF占有率に従って分類するためにゲノムインフォマティクスとCTCF ChIP-seqを組み合わせ、ヒトゲノム中のクロマチンインスレーターを同定するためのアプローチについて述べた。本発明者らは、CTCFによって占有されているのはヒトゲノムのCTCF部位のごく少数に過ぎないこと、および、占有頻度によってその部位がエンハンサー遮断性インスレーターとして働くと考えられる確率が決まることを見いだした。機能分析を行ったCTCF占有率が98%～100%の部位はすべて、強固なエンハンサー遮断性インスレーターであった。これらのインスレーターの大半は、cHS4インスレーターのものよりも優れたエンハンサー遮断活性を示す。それらの配列は短く（119～284bp）、それ故に遺伝子治療用ベクター中に容易に収容することができる；その上、それらはレンチウイルスベクターの力価に対しても有害な影響を及ぼさない。本発明者らはまた、これらのエレメントがマウスモデルにおけるレンチウイルスベクター媒介性発癌のリスクを減少させうるという原理の証明も提示する。

#### 【 0 1 6 9 】

クロマチンインスレーターに関するヒトゲノムのマイニング

本発明者らは、K562細胞におけるCTCFのゲノムワイドインビボ占有率プロファイリングに基づき、インスレーター候補配列を同定した（図1）。CTCF結合部位の大半を保存的な配列モチーフによって識別したものの（15）、ゲノムワイドでこの配列のほとんどの事例はCTCFによる結合を受けていない（図5）。ゲノムをスキャンするためのインフォマティクスアプローチを用いて、本発明者らは、CTCFモチーフの22,579,591件の事例を同定した（ $P < 10^{-2}$ ）。これらのうちCTCF結合に関するChIP-seqピークと重なり合ったのは205,227件（0.9%）のみであり、このことは、CTCFモチーフと一致するほとんどの配列エレメントが、インビボで結合を受けている確率が低いことを指し示している。

#### 【 0 1 7 0 】

CTCFに対する高親和性と関連のある配列特徴を同定するために、本発明者らは、ゲノムワイドでのこれらの有望な認識配列を、正確な配列同一性を有する複数のクラスにグループ分けした（図1）。本発明者らは、ジンクフィンガー4～8と係合するのに十分なことが示されているGCリッチ領域であるCTCFモチーフの情報量の多いコアにある14bp配列に注目

した(27)。CTCFモチーフを、同一の14bp CTCFコア配列を持つクラスにグループ分けした。本発明者らは、ゲノム全体を通じて、同じ14-merの50件を上回る事例を有する82,234個のクラスを見いだした(平均=105件の事例)。

#### 【0171】

各クラスの本来の親和性を評価するために、本発明者らは、インピボでCTCFによって占有されているそのゲノム部位の比率を測定した。K562細胞における占有率には、100%(14-mer配列のゲノム部位のすべてがインピボで結合を受けている)から0%(14-mer配列のゲノム部位がインピボで全く結合を受けていない)までと、大きな違いがあった。ゲノムワイドで159個のCTCF部位がCTCF占有率100%として同定された；1624個の部位ではCTCF占有率が95%を上回った；3499個の部位ではCTCF占有率が90%を上回った；77316個の部位ではCTCF占有率が1%またはそれを上回った(データは提示せず)。(CTCF占有率が1%よりも高いすべての部位のCTCF配列およびゲノム座標は、Liu et al. "Genomic discovery of potent chromatin insulators for human gene therapy" Nature (2015) 33(2): 198-203の補遺の表2に列記されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。10%以上のCTCF占有率を示すクラスは、ゲノムワイドでのCTCF結合のうち少数(16%)に相当した。図6に概要を示した試験により、K562細胞における上位1000個のCTCF占有率クラスのランク付けと、18種の他の細胞株における占有率との間に直接的な相関が実証され、このことは高占有率CTCF部位に関するユビキタス活性プロファイルを指し示している。

#### 【0172】

この方法を通じて同定された高親和性CTCF部位がエンハンサー遮断性インスレーターとして働くか否かを明らかにするために、本発明者らは、CTCF占有率の高い部位または低い部位から代表的なゲノム配列を選択した(表1および2)。

#### 【0173】

(表1) 機能アッセイに用いたCTCFクラスおよび配列

	ランク	クラス	コア配列	ヒトゲノム 中での 出現数	CTCF 占有率*
高親和性	1	A	CACCAGGTGGCGCT	52	100.0%
	2	B	CCACCAGGGGGAGC	52	100.0%
	3	C	TCAGTAGAGGGCGC	55	100.0%
	4	D	CCACTAGGGGGCAG	86	98.8%
	5	E	CAGCAGAGGGCGCT	84	98.8%
	6	F	CAGTAGAGGGCGCT	71	98.6%
低親和性	932	G	CCCTCTCCTGGGCA	102	9.8%
	943	H	GCAGCAGAGAGCAA	72	9.7%
	950	J	CCCTCTGCTGACTG	52	9.6%

\* K562細胞におけるChIP-seqにより判定

#### 【0174】

(表2) 機能試験に用いたCTCFエレメントの染色体hg18およびhg19座標、CTCF配列ならびにエンハンサー遮断活性

クラス/ 因子	hg18座標		CTCF 配列	コロニー 平均 ± SD*	hg19 座標	
A1	chr1	76229933	76230115	CACCAGGTGGCGCT	0.081 ± 0.041	chr1 76457345 76457527
A2	chr19	46342254	46342440	CACCAGGTGGCGCT	0.022 ± 0.011	chr19 41650414 41650600
A3	chr5	90557806	90557925	CACCAGGTGGCGCT	0.058 ± 0.016	chr5 90522050 90522169
A4	chr7	39526144	39526307	CACCAGGTGGCGCT	0.030 ± 0.022	chr7 39559619 39559782
A5	chr9	123122258	123122485	CACCAGGTGGCGCT	0.087 ± 0.025	chr9 124082437 124082664
B1	chr1	57070274	57070473	CCACCAGGGGGAGC	0.057 ± 0.006	chr1 57297686 57297885
B2	chr12	106525547	106525690	CCACCAGGGGGAGC	0.038 ± 0.010	chr12 108001417 108001560
B3	chr14	76320982	76321216	CCACCAGGGGGAGC	0.215 ± 0.120	chr14 77251229 77251463
B4	chr20	61411429	61411552	CCACCAGGGGGAGC	0.151 ± 0.060	chr20 61940984 61941107
B5	chr22	33876597	33876817	CCACCAGGGGGAGC	0.141 ± 0.042	chr22 35546597 35546817
C1	chr1	30038520	30038763	TCAGTAGAGGGCGC	0.378 ± 0.270	chr1 30265933 30266176
C2	chr16	74063175	74063459	TCAGTAGAGGGCGC		chr16 75505674 75505958
C3	chr2	16570154	16570340	TCAGTAGAGGGCGC	0.040 ± 0.016	chr2 16706673 16706859
C4	chr8	10168897	10169034	TCAGTAGAGGGCGC		chr8 10131487 10131624
C5	chrX	149602730	149602938	TCAGTAGAGGGCGC	0.250 ± 0.150	chrX 149852072 149852280
D1	chr1	161084397	161084593	CCACTAGGGGGCAG	0.065 ± 0.044	chr1 162817773 162817969
D2	chr11	61948886	61949071	CCACTAGGGGGCAG		chr11 62192310 62192495
D3	chr12	121910863	121911035	CCACTAGGGGGCAG	0.203 ± 0.086	chr12 123344910 123345082
D4	chr17	16207878	16208078	CCACTAGGGGGCAG	0.281 ± 0.149	chr17 16267153 16267353
D5	chr17	24468364	24468528	CCACTAGGGGGCAG	0.256 ± 0.108	chr17 27444238 27444402
E1	chr1	176768124	176768329	CAGCAGAGGGCGCT	0.066 ± 0.016	chr1 178501501 178501706
E2	chr13	20397008	20397240	CAGCAGAGGGCGCT	0.032 ± 0.008	chr13 21499008 21499240
E3	chr14	68665824	68666051	CAGCAGAGGGCGCT	0.140 ± 0.072	chr14 69596071 69596298
E4	chr5	64116126	64116362	CAGCAGAGGGCGCT	0.062 ± 0.022	chr5 64080370 64080606
E5	chr5	170702087	170702300	CAGCAGAGGGCGCT	0.098 ± 0.029	chr5 170769482 170769695
F1	chr12	55856009	55856202	CAGTAGAGGGCGCT	0.053 ± 0.015	chr12 57569742 57569935
F2	chr12	57793909	57794148	CAGTAGAGGGCGCT	0.110 ± 0.106	chr12 59507642 59507881
F3	chr12	102550590	102550826	CAGTAGAGGGCGCT	0.081 ± 0.028	chr12 104026460 104026696
F4	chr7	95383976	95384189	CAGTAGAGGGCGCT	0.173 ± 0.099	chr7 95546040 95546253
F5	chr8	71163374	71163613	CAGTAGAGGGCGCT	0.404 ± 0.111	chr8 71000820 71001059
G1	chr1	149974115	149974543	CCCTCTCCTGGGCA	1.000 ± 0.411	chr1 151707491 151707919
G2	chr10	103022102	103022247	CCCTCTCCTGGGCA	1.040 ± 0.425	chr10 103032112 103032257
H1	chr14	59501614	59502000	GCAGCAGAGAGCAA	0.705 ± 0.341	chr14 60431861 60432247
H2	chr16	6071437	6071557	GCAGCAGAGAGCAA	0.382 ± 0.216	chr16 6131436 6131556
H3	chr16	65242354	65242777	GCAGCAGAGAGCAA	0.753 ± 0.342	chr16 66684853 66685276
J1	chr1	204477048	204477285	CCCTCTGCTGACTG	0.855 ± 0.422	chr1 206310425 206310662
J2	chr15	72402104	72402201	CCCTCTGCTGACTG	0.690 ± 0.285	chr15 74615051 74615148

\* コロニー平均 ± SDは、1とした非インスレーター対照との比較

#### 【 0 1 7 5 】

高親和性部位について、本発明者らは、CTCF占有率が100%である3つのCTCFクラスを選択してA、BおよびCと名づけ、CTCF占有率が98.6~98.8%である3つのクラスをD、E、Fと名づけた（表1および2）。さらに2つの基準を用いて、各クラスから機能アッセイのために5つの配列を選択した：（i）CTCF部位は、K562細胞および他の細胞種におけるDNアーゼI高感受性部位（DHS）と一致しなければならない（図7）；および（ii）CTCFモチーフは、本発明者らの研究室でChIP-seqを用いて試験した細胞種のうち16種でCTCFによって占有されていなければならない（図6）。CTCF部位と重なり合うDHSに対応する配列のサイズは119~284ヌクレオチドの範囲であり、インスレーターエレメントの考えられるサイズに対応すると判断された。対照として、本発明者らは、CTCF占有率がそれぞれ9.6%、9.7%および9.8%であるクラスG、HおよびJから、いくつかの配列を選択した（表1）。

#### 【 0 1 7 6 】

エンハンサー遮断性インスレーターの発見

10

20

30

40

50

上記のアプローチによって同定された候補を、 $\beta$ -グロビン遺伝子座のDNアーゼI高感受性部位2のエンハンサーによって調節される $\beta$ -グロビン遺伝子(HBG1)プロモーターによって薬剤耐性neo遺伝子が駆動されるプラスミドレポーターコンストラクト中にクローニングした(図2Aおよび表3)。

【0177】

(表3) 機能試験のためのインスレーター候補のクローニングのために用いた染色体hg19座標およびプライマー配列

候補	プライマー		ゲノム配列 (hg19)		
	順方向	逆方向	Chr	Chr_開始	Chr_終止
A1	CCAATCGTGGCATATCCTCT	CCTTCCTTTCTAAATGACGAGA	1	76457269	76457568
A2	AGAGCGAGATTCCGTCTCAA	ACAATGGCTGGCCCATAGTA	19	41650330	41650595
A3	AGGGGTTGGTCTCCCTATGT	GGGAGAGGTGGTTCAACAAA	5	90521970	90522221
A4	TGCTTGTCTTCTTCTCTGT	GAACCTCTGACCCCTCACAA	7	39559582	39559824
A5	CATCCCACTCCATCACCTTC	GTAGAGACGGGGTTTCACCA	9	124082406	124082759
B1	AGGCATGACTGGGAAGAAC	AGCCATGGAATAAAGTGCATC	1	57297616	57297963
B2	CAGGGCTCTCTGCAAAATAG	AAGAGCCCCAAGAAGTGGAT	12	108001333	108001655
B3	CCTCCACAACCCATGAAGTC	CCATCCACCTGCTCTTCATT	14	77251132	77251467
B4	CTCCCGTGTGGTACCTGAG	GGATGCTGGAGGAGGTCAC	20	61940925	61941184
B5	ACAGGGCTGCTTGTACCACT	GCGGAAACTGAACCAAAAAGA	22	35546561	35546869
C1	GTCTGAATGGTGGCCGTAGT	AGGATGGGCTATGAGGTGGT	1	30265903	30266227
C3	GTTTCGCATCCACCTTTTCAT	GTTAGCCCTGAGTGCCATA	2	16706630	16706937
C4	TGAGGCAGCAGCTATCCTAA	TGCTCCAAACCTACCCTTCTT	8	10131406	10131674
C5	AGAAGCACTGCCTGGTAGG	TGGGCCTAGCTCAAAAGAAA	X	149851977	149852362
D1	TCTTTTGAATGCTCTTTGG	AGTGGTTTTGGGGTTTTTCC	1	162817733	162818013
D3	GAGACCCTCCACCCCTAC	CTGTTGAACCCCAACTGCT	12	123344828	123345140
D4	GGCGTGTTTGATTGCTTTT	AATGAGGCCTGCCACATAAG	17	16267031	16267486
D5	CCCTTTCCCTAAACTGGAG	GTTTTCCCCAGTCTCTTCC	17	27444171	27444418
E1	GCCACCTTTGGTCTTGACAT	ATCAGCGGTGTCAGTCTTCC	1	178501476	178501802
E2	AGTTTGCAGGTGGCTTGACT	TTTGATTCTCTTCACTCTGGAA	13	21498993	21499294
E3	CACCCCTTACTCCACTCAA	GGCTGGCTTAAATGGTCTGA	14	69596017	69596396
E4	TGGAATTTGTGTTGACATTG	TCAAAAGAATGTGCCAATGC	5	64080190	64080657
E5	TGCATTTCAGGACACAGTGA	ACACTTGGGCTGAGAGTGGT	5	170769377	170769887
F1	CCTTCAAGCCGTTTCATCATT	GAACAGAAGTGTGGGGGATG	12	57569695	57570014
F2	TGCCCTTTCAGTCCAAATCT	GGGCCACAGTGAGGTGATTA	12	59507608	59507907
F3	GGTCAGCCACTGAGGAAC	CAATCTCACCCAACCTTTC	12	104026406	104026728
F4	TCGGACATTTCCCTGTCTCT	TATTGATGCCTTTGGGGAAA	7	95545997	95546256
F5	TGGCTCAGTCATGGCTACTG	TTTCCCTACTTCTCCACCA	8	71000655	71001197
G1	TGGAATTGCTGCTCAGATTG	AAAATTAGCTGGGCATGGTG	1	151707437	151708096
G2	GCAGCAAAGAAAAGCAAAG	AACCCTGTCACTGCAGCTC	10	103031950	103032407
H1	TACCCATCAGGAAGCTCACC	CCATCCTGAATGTGATCGTG	14	60431707	60432274
H2	TCCGGAGTTTCAGGTCTCTGT	CACACGGCTGTTCACTTTGT	16	6131354	6131789
H3	GGAAGCTCATTTACCCAGCA	ATGGAAGCCGTTGTTATTCTG	16	66684731	66685322
J1	AAGCCTGGGCTCAGTAACAA	GAGCACCTGGCACTAAAAGC	1	206310373	206310770
J2	GGCAATCTCTGCACCTCTC	GGGATGCATAGGGGAGGTAT	15	74614873	74615392

【0178】

このコンストラクトをトランスフェクトしたK562細胞をG418の存在下で増殖させた。インスレーターエレメントが $\beta$ -neo発現カセットをブラケット状に挟むと、それはエンハンサーとプロモーターとの相互作用を妨害し、その結果、G418培養物におけるneo発現が減少し、コロニー数が減少した。コロニー数の減少率は、インスレーターエレメントがエンハンサーとプロモーターとの相互作用を遮断する効率に対応する。陰性対照には、インサートなしのレポーターコンストラクトのほかに、機能的に中立なDNAを用いて $\beta$ -neo発現カセットをブラケット状に挟んだレポーターコンストラクトを含めた。陽性対照としては、 $\beta$ -neoカセットをcHS4インスレーターでブラケット状に挟んだ。

【0179】

クラスA~Fから選択した30種のインスレーター候補のうち、27種はクローニングに成功し、エンハンサー遮断アッセイで分析した；17種の配列は遺伝子間に位置しており、10種はイントロンに位置していた(図8および9)。すべてがエンハンサー遮断活性を示した(図2Bおよび表2)。エンハンサー遮断活性を示した27種のうち20種は、cHS4のものよりも優れていた(図2C)。エレメントA2のエンハンサー遮断活性はcHS4よりも10倍の強さであり、一方、他の15種のエレメントはcHS4と比較して2~7倍の強さのエンハンサー遮断活性

10

20

30

40

50

を示した（図2C）。これらの結果から、本明細書に記載のゲノムアプローチにより、エンハンサー遮断性インスレーターが高占有率CTCF部位にて100%の精度で同定されたことが示された。

#### 【0180】

これらのエレメントがエンハンサー遮断性インスレーターではなくてサイレンサーであるという可能性を否定するために、本発明者らは、試験するエレメントをエンハンサー・プロモーターカセットの外側に配置するサイレンサーアッセイを用いた。サイレンサーは、プロモーター活性を抑制するか、またはエンハンサー／プロモーター複合体の形成を阻害し、それ故に結果として、neo発現の減少およびコロニー数の減少がもたらされると予想される（図3A）。サイレンサーアッセイを、エンハンサー遮断活性がcHS4と等しいかまたはより高い19種のエレメントを用いて行った（図3Bおよび表4）。これらのアッセイにおいて陽性サイレンサー対照ではコロニー形成が23分の1に減少したが、一方、どのケースでもコロニー数は陰性対照と統計的に差がなく、このことは19種のエレメントがいずれもサイレンサー活性を保有していないことを指し示している。

#### 【0181】

（表4）サイレンサー活性に関するインスレーターエレメントの試験

インスレーター	コロニー収量 <sup>(a)</sup>
	平均 ± s.d.
対照	1.000 ± 0.411
cHS4	0.657 ± 0.286
サイレンサーT39	0.044 ± 0.020
A1	0.474 ± 0.326
A2	1.154 ± 0.329
A3	0.649 ± 0.301
A4	1.009 ± 0.283
B1	0.773 ± 0.593
B2	0.505 ± 0.435
B3	0.896 ± 0.293
B4	0.972 ± 0.354
C1	0.947 ± 0.461
C3	0.856 ± 0.497
D1	0.792 ± 0.238
D3	0.942 ± 0.340
D4	0.602 ± 0.387
E1	0.964 ± 0.534
E4	1.052 ± 0.398
F1	1.305 ± 0.193
F2	0.588 ± 0.390
F3	0.762 ± 0.149
F4	0.700 ± 0.388

<sup>(a)</sup> 平均 ± 標準偏差は、1（100%）とした外側「サイレンサー」位置にある中立スパーサー対照との比較。これらの値のうち対照と統計的に差のあるものはなかった。

#### 【0182】

CTCF部位のうちごく少数がインスレーターである

CTCF占有率とエンハンサー遮断機能との関係についてさらに検討するために、CTCF占有率が9.6%、9.7%および9.8%である3つのCTCF低占有率クラスG、HおよびJからの7種のエレメント（表1、2および3）を、エンハンサー-ブロッカーアッセイのために用いた。中程度のエンハンサー遮断活性を示したのは1種のみであり、コロニー数が、インスレーターを挿入していない対照のレベルの38.1%に減少した（図2D）。これらの結果は、CTCFエレメントのエンハンサーブロッカーとしての機能を決定づけるのはCTCFモチーフの構造とCTCF占有率の度合いの両方であることのさらなる証拠を与えている。CTCF部位の大多数はCTCF低占有率が低いことからみて（データは提示せず）、本発明者らは、エンハンサー遮断性インスレーターとして働くのはヒトゲノムのCTCF部位のうちごく少数であると結論づける。

10

#### 【0183】

エンハンサー遮断性インスレーターのクロマチン環境

図2Dのインスレーターエレメントの間には、同じクラスに属するエレメント間でも、異なるクラス同士の間でも、エンハンサー遮断活性の度合いにかなりの違いがある。クラスA～Fにおける占有率は100%～98.6%の範囲であることからみて、この差異がCTCF占有率クラスの違いに起因する可能性は非常に考えにくい。エンハンサー遮断活性の差異は、同じクラスに属するエレメントの特徴でもある（図2DのエレメントD1とD4、またはF1とF5を比較されたい）。CTCF占有率クラスはCTCF結合の密度と直接的な相関関係にある（図10）。同じクラスのエレメントは同じ14bp CTCFコア配列を含むが、機能アッセイのためにクロニングされた断片中に含まれる100～200bpの側方に位置する配列によって付与されるさらなる機能特性を示す可能性がある（表3）。事実、高占有率クラスおよび低占有率クラスのCTCF部位のインスレーター活性を評価するために用いた断片は、K562細胞におけるDNアーゼIフットプリントにおいて他のいくつかの転写因子認識配列も含んでおり、これには特にEボックス、Sp1および核内ホルモン受容体配列が含まれる（図11）。しかし、本発明者らは、いかなる特定の転写因子認識配列または配列パターンと、いずれか特定のCTCF占有率ランクまたはインスレーター活性レベルとの間にも直接的な相関を認めなかった。本発明者らは、CTCF占有率と、インスレーター機能において重要な役割を果たすと考えられているコヒーシンのサブユニット（28）であるRad21結合の重なり合いとの間に直接的な相関を認めた（図12A）。コヒーシンとの重なり合いは、CTCF結合の増加およびDNアーゼIへの到達可能性とも相関していた（図12B、12C）。CTCFは多価性であることから、コア配列と上流配列の組み合わせへのジンクフィンガーの動員の違いによって結合部位機能の調節が可能になることが示唆されている（29,30）。高占有率CTCFクラスは拡張認識配列が選択的に欠けていることが見いだされており、このためにジンクフィンガー8～11が遊離されて他のタンパク質またはDNA配列と相互作用する可能性がある（図13）。既発表のクロマチン相互作用分析データに基づき、本発明者らは、高占有率CTCF部位を交差するPol II相互作用が幾分減少していること（31）、ならびに、高占有率CTCF部位と、他のCTCF部位との相互作用およびトポロジカル会合ドメイン（TAD）との会合の両方との間に弱い相関を認めた（19）（図14）。これらの後者の所見はエンハンサー遮断性インスレーターのモデルに一致するものの、非常に効率的なクロマチンインスレーターを同定する一助として、CTCF占有率クラスよりも優れる特定のクロマチン環境を指摘するものではない。

20

30

40

#### 【0184】

新たなインスレーターはウイルスベクター安定性に影響を及ぼさない

これらのインスレーターエレメントのベクター力価に対する影響を評価するために、本発明者らは、構成性P<sub>gk</sub>プロモーターからGFPを発現する第三世代レンチウイルスベクターの二重コピー領域に各インスレーターを導入して、ウイルス力価およびGFP発現を測定した（図3C）。順方向または逆方向の配向のいずれにおいても、試験した26種のインスレーターのうちベクター力価に有意に影響を及ぼしたのは2種のみであった（図3D、表5）。ベクターGFP発現に負の影響を及ぼしたエレメントは皆無であった（図16および表6）。加え

50

て、クロマチン免疫沈降試験によっても、高占有率クラスのインスレーターが、K562細胞におけるこのレンチウイルスベクター環境下で、CTCFと効率的に結合しうることが実証された（図16）。続いて配向について検討したところ、試験した高効率インスレーターの95%超（52種のうち50種）はウイルス力価にほとんどまたは全く負の影響を及ぼさなかった。生体システムが予測不能であると広く見なされていることからすると、これは驚くほど高度の予測性である。臨床的使用に際して、本明細書に記載されたような任意の所与のエレメントに関して、インスレーターとしてウイルス力価および効率に対する影響がわずかであることが典型的には確認されるであろう。

【 0 1 8 5 】

（表5）レンチウイルスベクター力価に対するインスレーターエレメントの影響

10

レンチウイルスベクター力価 <sup>(a,b)</sup>		
インスレーター	順方向 <sup>(c)</sup>	
	平均 ± s.d.	逆方向 <sup>(c)</sup> 平均 ± s.d.
対照	1.000 ± 0.161	
A1	0.817 ± 0.227	1.080 ± 0.472
A2	1.335 ± 0.472	1.071 ± 0.371
A3	1.223 ± 0.364	1.258 ± 0.533
A4	* 0.343 ± 0.258	0.772 ± 0.090
A5	1.080 ± 0.373	0.717 ± 0.503
B1	1.092 ± 0.358	* 0.116 ± 0.100
B2	1.055 ± 0.414	1.075 ± 0.359
B3	1.333 ± 0.544	0.934 ± 0.257
B4	0.868 ± 0.150	1.193 ± 0.450
B5	0.891 ± 0.629	1.217 ± 0.367
C1	1.085 ± 0.525	0.989 ± 0.193
C3	1.175 ± 0.438	1.165 ± 0.409
C4	0.923 ± 0.149	0.835 ± 0.600
C5	0.931 ± 0.167	1.181 ± 0.587
D1	1.209 ± 0.372	1.239 ± 0.301
D3	1.100 ± 0.505	1.074 ± 0.434
D5	1.027 ± 0.602	1.047 ± 0.636
E1	1.402 ± 0.448	0.696 ± 0.034
E2	1.051 ± 0.474	1.459 ± 0.685
E4	1.151 ± 0.447	1.221 ± 0.308
E5	1.038 ± 0.272	0.860 ± 0.755
F1	0.561 ± 0.471	0.734 ± 0.639
F2	1.438 ± 0.530	1.377 ± 0.528
F3	1.701 ± 0.019	1.182 ± 0.032
F4	1.455 ± 0.152	0.863 ± 0.302
F5	1.529 ± 0.513	1.221 ± 0.399

20

30

40

<sup>(a)</sup> 平均 ± 標準偏差は、1（100%）としたインスレーターを挿入していないレンチウイルスベクターと比較。

50

(b) 漸増量のベクターによる形質導入を受けたGFP(+)細胞のパーセンテージに基づく力価。

(c) 星印によって示したものを除き、値はすべて対照と統計的に差がない。

【 0 1 8 6 】

(表 6) レンチウイルスベクター発現に対する新規インスレーターエレメントの影響

レンチウイルスベクター発現 (a,b)			10
インスレーター	順方向 (c)	逆方向 (c)	
	平均 ± s.d.	平均 ± s.d.	
対照	1.000 ± 0.134		20
A1	0.780 ± 0.140	0.734 ± 0.171	
A2	0.875 ± 0.113	0.833 ± 0.145	
A3	0.866 ± 0.145	0.910 ± 0.143	
A4	0.494 ± 0.378	0.790 ± 0.127	
A5	0.905 ± 0.155	0.883 ± 0.108	
B1	0.853 ± 0.099	0.452 ± 0.358	
B2	0.811 ± 0.112	0.830 ± 0.127	
B3	0.804 ± 0.148	0.834 ± 0.182	
B4	0.585 ± 0.410	0.654 ± 0.453	
B5	0.713 ± 0.196	0.903 ± 0.085	30
C1	0.974 ± 0.219	0.855 ± 0.167	
C3	0.966 ± 0.118	0.884 ± 0.151	
C4	0.803 ± 0.103	0.689 ± 0.219	
C5	0.742 ± 0.153	0.673 ± 0.190	
D1	0.808 ± 0.128	0.891 ± 0.118	
D3	0.855 ± 0.082	0.905 ± 0.088	
D5	0.834 ± 0.109	0.731 ± 0.188	
E1	0.902 ± 0.113	0.859 ± 0.113	
E2	0.820 ± 0.141	0.757 ± 0.156	
E4	0.829 ± 0.117	0.910 ± 0.073	
E5	0.830 ± 0.141	0.971 ± 0.154	40
F1	0.633 ± 0.261	0.844 ± 0.142	
F2	0.860 ± 0.149	0.979 ± 0.021	
F3	1.002 ± 0.307	0.889 ± 0.077	
F4	1.013 ± 0.227	0.893 ± 0.231	
F5	0.832 ± 0.234	0.726 ± 0.198	

(a) 平均 ± 標準偏差は、1 (100%) として採用したインスレーターを挿入していないレンチウイルスベクターとの比較。

(b) 漸増量のベクターによる形質導入を受けたGFP(+)細胞の平均蛍光に基づく発現。

(c) 値はすべて対照と統計的に差がない。

【 0 1 8 7 】

ベクター媒介性遺伝毒性の低下

本発明者らは、インスレーターA1を用いて、腫瘍移植片遺伝毒性アッセイにおけるベク

ター媒介性遺伝毒性に対する影響について検討した(24)。このアッセイでは、レトロウイルスベクターによる形質導入を受けた細胞株をマウスに移植して腫瘍を生じさせ、無腫瘍生存率を測定することによって遺伝毒性作用の定量を行う。インスレーターA1を3' LTRの近位部分に挿入し、逆転写およびベクター組み込みの際にそこから5' LTRへとコピーさせた。その結果得られるトポロジー(図4A)は、ベクタープロウイルスの両端にインスレーターを配置し、それによって5' LTRが周囲のゲノム領域と十分に相互作用することおよび3' LTRが部分的に相互作用することを妨げることによって、遺伝毒性を減少させる。A1インスレーターまたは対照断片を側方に配置させたベクターを用いて、増殖因子依存性細胞株32Dへの形質導入を行い、各ベクター毎に10個ずつの独立したサブクローンを同系C3H/HeJマウスに移植した。モック形質導入細胞を移植したマウス10匹はすべて無腫瘍のままであったが、インサートなしのベクターまたは790bp中立スペーサーを含有するベクターによる形質導入を受けた32D細胞を移植されたマウスではほぼすべてで、中央値16週で腫瘍が発生した(図4B)。このベクターでcHS4インスレーターを側方に配置した場合には、腫瘍形成の発症が数週間遅れ、腫瘍が発生した動物の頻度が10匹中6匹に低下した。対照的に、インスレーターA1を側方に配置したベクターによる形質導入を受けた32D細胞による移植後に腫瘍が発生したのは動物10匹中2匹のみであった(図4B)。腫瘍を有する動物の頻度および元のサブプールにおけるベクター形質導入イベントの数に基づいて、本発明者らは、ベクターにインスレーターA1を側方配置することにより、プロウイルス $10^5$ 個当たりの腫瘍数は約47個近くから、プロウイルス $10^5$ 個当たりの腫瘍数3個未満となり、全体的な腫瘍形成率が15.7分の1に低下したと推定した(図4C)。これに比して、cHS4インスレーターは全体的な腫瘍形成率を2.8分の1に低下させ(プロウイルス $10^5$ 個当たりの腫瘍数は約17個に)、一方、中立スペーサーは腫瘍形成率に対して統計的に識別可能な影響を及ぼさなかった。

#### 【0188】

癌原遺伝子の挿入活性化によって引き起こされ、造血器悪性腫瘍として表れる遺伝毒性は、レトロウイルスベクターによる治療を受けた数人の免疫不全患者で起こっている(1,2,32~36)。遺伝毒性の機序に関する推察が、SCID-X1患者およびADA患者のリンパ系細胞および他の造血細胞におけるゲノム組み込みパターンの詳細分析によって得られている(37~41)。この発癌過程の第一段階は、ベクターの強力なエンハンサー/プロモーターによる癌原遺伝子および他の細胞増殖遺伝子の活性化であることが今日では明らかである(37~41)。この第一段階は罹患細胞に増殖上の優位性を与え、クローン性増殖をもたらす。遺伝毒性のリスクを減少させるためにはこの第一段階の予防が必要であり、これはクロマチンインスレーターの使用によって達成することができる(6,7)。クロマチンインスレーターを、自己不活性化レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターのLTR内に配置することにより、ベクターの調節因子がブラケット状に挟まれて、それ故に近傍遺伝子の活性化の確率が低下する。本発明者らは今回、本発明者らが同定したインスレーターのすべてが、エンハンサーとプロモーターとの間の相互作用を遮断しうることを同定した。レトロウイルスベクターをインスレーターA1によってインスレーションを行った場合の腫瘍の有意な低下により(図4)、これらのインスレーターは臨床状況下で遺伝毒性のリスクを減少させるであろうことが指し示される。現在までの大部分の試験からは、マウスで分析されたすべての造血幹性/始原部分集団を含めて(42、probe set 1418330\_at)、CTCF遺伝子が極めて広範に発現されることが示唆されている(ENCODE発現データ、UCSC Genome Browser)。そのため、CTCFに基づくインスレーターは造血の多くの段階で活性で、防御を担っているはずである。

#### 【0189】

Felsenfeldらによる先駆的な研究(8~12)以来、多数の文献が、ゲノムにおけるインスレーターエレメントの機能における転写因子CTCFの役割を指摘している(43,44)。CTCFは多機能性ゲノム調節因子(13)であり、その機能の1つは長距離相互作用の途絶にある。本発明者らの研究は、CTCFとインスレーターとしてのその機能との関係を明らかにするものである。本発明者らは、ゲノムワイドでCTCF部位がCTCFによって占有される頻度によ

ってその部位がインスレーターとして働く確率が決まり、およびインスレーターとして働くのはCTCF部位のごく少数であるという証拠を提示した。類似のアプローチを用いて、他の転写因子モチーフとそれらの生物学的機能との関係をゲノムレベルで詳しく検討することが可能である。

# 【 0 1 9 0 】

これらのデータは、ヒトゲノム中の強力なインスレーターの発見のための資源として役立てることができる。機能分析を行った27種のエレメントが、高占有率クラスA~Fの400種のエレメントの中でもっと強力なインスレーターであった可能性は低い。CTCFは唯一知られている脊椎動物エンハンサー遮断性タンパク質であるが、他のエレメントの結合もインスレーターエレメントの機能にとっては同じく重要である(19,45)。理論に拘束されることは望まないが、インスレーター機能をモジュレートするエレメントの同時結合により、本明細書に記載の同一のCTCF配列であってもエンハンサー遮断効力に差異がみられたことを説明しうる可能性がある。このことからみて、CTCF部位のクロマチン環境もそのインスレーター効力に寄与する。

# 【 0 1 9 1 】

(表7) ゲノムインスレーターエレメントの全配列

#	SEQ ID NO.	配列	ゲノム配列		
			Chr	Chr_開始	Chr_終了
A1	10	CTGGTTCTACTCATTACATTCCAATCGTGGCATATCCTCTAAACTTTCTTTT CCCTTCATAAATCCTCTTTCTTTTTCCTCCCTCAGTTCCTGAACAG GTTGACTATTAAATTGTGTCTGCTGTGATGTGGACACAGGTGGCGCTGGACAT CAGATTGGAGAGGCAGTTGTCTAGGGAACCGGGCTCTGTGCCAGCGCAGGA GGCAGGCTGGCTCTCCTATTCCAGGGATGCTCATCCAGGAAGGAAAGTTGC ATGCTGGACACACTAACCTTGAAGAATTCTTCTGTCTCTCTCGTCATTTAGA AAGGAAGG	1	75991564	75991883
A2	11	AGAGCGAGATTCCGTCTCAAAGAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGA GTCTTAGAGCCAGTAAATGTCGTAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAGTAAAG GTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAATTCAGGGCTGTTGTGATG CCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACCTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTG ACGTGGAAGAACAGCAACTAACACACTAACACGGCATTTACTATGGGCCAGC CATTGT	19	41144425	41144690
A3	12	AGGGGTTGGTCTCCCTATGTTCCCCAGGCTGGTCTCCAACCCCTGGGCTCAA GCAATGCTCCTGCCTCAACCAACCAAGTGTGAGATTACAGGTGTGAACCA CTGCGCCCGGCTTCAGAGGAGTTTGTGATGCACAGGTGGCGCTGGTAATTTA AGGTTCTCTCTGTGAAATTGGTCTTTTCACCTGGCCAGCATCTTATTCCTTCT TCTGGTAACAGCATCCCATTTGTTCTTTGTTGAACCACTCTCCC	5	91226153	91226404
A4	13	TGCTTGTCCTTCCTTCCTGTAACACAGCCATTAAACCAGGAGCATCGCCCTT CCCCGGCCCTCAGGTAAGAGGACCAATACCGTAGCCGTTTCCAATTCAGT CCTTTAGCGCCACCTGGTGCTAACTACTCTATCAGCTTTTATCCAATAACT ACCTTTGTAAATTTCTTTTCAAAGTTCTGGCCGGCGCGGTGGCTCACGCT TGTAATCCCAGCACTTTGTGAGGGGTGAGGAGTTC	7	39519983	39520225
A5	14	TCCACATCCATCACCTTCAAGAATGTTCAAATCCAGAGATTCTAGGATTCT GTTTCCAGGACTTGGACGACTCCGTGTCTCCATAGCTCCACCAGGTGGCGC TGCCGGGCTCGTGACCACTTGGAAGAGCAGTGTACACAGAACGCTGCGGA GACCTGCCAGAGGGGTCACTGAGGTTGCTCGTGGTGTCCCTGCCTCTG CAGGTGACCTATGAAATTCCTGGCAGGCCAGCACAGTGGCTCACGCCTGTA ATCCCAGCACTTTGGGTGGCCAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTT CGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCGTCCTAC	9	121320130	121320481

B1	15	AGGCATGACTGGGAAGAACAATCACATTTCTGTGTACTTAGGGGAGAAA GAATTAATTCAAATGCAGGCTCTGCCGCTTCAGGTCCATTTACGGAAGCCGC AATCCTGCACATATGACCACCAGGGGGAGCGTAGGCCCATCCCTGCACAGGT AGCTATTTTTAGAGGTTGCTTCTAGCCTGGAGGAAGAAACGAAAGAAATAAA AGACTATGATACTTTTTTTTTTTAAACGGACCACTTATAAATATTGTAA GTCCAATAAAAGGCAATTATCAACATTTCCTACTATTTAGGAGTAATATAT TCTATGTTAGAAAAAGATGCACTTTATTCATGGCT	1	56831943	56832290	
B2	16	CAGGGCTCTCCTGCAAAATAGGCCCTTGAGGGCTGGCCTGACGTTTAGGTCC TGAGACAGGTGTGCAGATCAGACCCCTCATGGCAACACCAGGCTTCTGGCTC CAGTCCTTGGAGTCCGTCTGCGTCCCAGCAGCTCCCCCTGGTGGCCAGAAGC AAACGCTTCATGTCTTGCATCTAGAGCCAAAGCATCTCCTACCCCTGGATTCT CCATTCCGGAATAGTTTTTACACCAAGGCTCCTCCGCAAAATATGAGTGATGT GTCAGATGAGTGATGAGGACAGGCCAGGGGCACACACGTCGCATCCACTTC TTGGGGCTCTT	12	107607556	107607878	
B3	17	CCTCCACAACCCATGAAGTCCACATTCTCTTGCTTCCAGCAGATCTGCACCC TCACCACCATGCTGCCATCTGGCTGGCCCATACCTGGAACAGTCTTGTCTAG CACATTTGCTCAGGAGGGAGAGGAGAGGGGATGGACCAGAGTGATGGGAGCC CAGGGCTGCAGGGCAGCTCCCCCTGGTGGACCTAGAGGTGGCCCTTCCAC TCCTGGGAGAAGAGAAGCCACACTGTGCATTTTCGAGCCAATCAAAACACAA CCCTCCAATAGAGGCGGAATGGGGTTACCAGAAGCTGGGAAAAGCAGGGGA GGAGAATGAAGAGCAGGTGGATGG	14	76784789	76785124	
B4	18	CTCCCGTGTGGTACCTGAGGCCGGCTCCTGTGGCTCTGAGGGGTCTGCAGC ACCCCTTACATCTGTCCACAGAAGGCTGGGGAGCAGCTTCTGTCCCTC CTGTGAGTGGCCACCAGGGGAGCGTGGACACAGCTGCCGTGCAGTGACCA CCTGCCCCCCTACTCCGCTACTCCAGCAGCAGCGGCTCCAGCCCTGGACACC CTCCCTGCCCCACCAGCCTGGTCTGAGCCAGGTGACCTCTCCAGCATCC	20	63309573	63309832	
B5	19	ACAGGGCTGCTTGTACCACTCTGCTGCCCTCTGAACCTGGGGTCTGGATTGT GCCAGTGACCGGGTGGGAAGCCCTGGCTTGCCCGAGCAGGTCTGGCTTCT GCAGTGGGGCCAGAAATATGAGCTCTGGCTCCCCCTGGTGGCAAGACCAGAA ACGAGCTCAGCGTGACTGTCCAGTGTCAAAGATGTGGGAGGAAGCAGCGGAG AAACCAAAGGAGGAGGAAGACGCCACCATCACTGTCCCAGCCATGCAGCCT AAAAGTCACTATCCCTTCTCTTCTTAGAGTCTTTTGGTTTCACTTTCCGC	22	35150568	35150876	
C1	20	GTCTGAATGGTGGCCGTAGTTTGCAGAGCCCTGGTTTCTTCTTGCCCTCTCAG CTTCCAACTTCCCCGTGAGTGCCTGCTCCTTGATGGACTGGACTCTAAGCCC TCTTTTCAGCAAGCACGATATCAAGCTTTGTCTAGTAGAGGGCGCCGAGGG ACACTGTGGAGGAAGGGGCCCTTTTCATGGTCCACAGAGCTCTGTTGTGCAAT TCTTGTTCCTGTTGCATCTTCTCTTAGGGTATGAACGCGGGGGGACATCCT CTGGGGCTTTTCTCAGCTGTGCACCCAGAATGCATGGTCCCTCGACCACCT CATAGCCCATCCT	1	29793056	29793380	
C3	21	GTTTCGCATCCACCTTTTCATTGCTTGCTCTGTGATAATGGAGAGGGACCCTG TAAACGTGTCCGCTTGCCACTTTGTGCAATATTAGCTCCTTCAGTAGAGG GCCTGCAGGAACATGTCTAGGAGGGGGCCTTCTCTCCGGATTCTGGATTCT GGTATACACTTGGAGCGTGGCATTGTTGGGGACAGCCACTGGTGCGCAGCCCC ATCAAGTTTTTGGTGGCATCCCTGTGGACCATATTCTATTAATCTTCAGTGGT ACCCCTGTGGCAGATCCCCAGTGATTCTTATGGGCACTCAGGGCTAAC	2	16525362	16525669	
C5	22	AGAAGCACTGCCTGGTAGGATTTCTGAGGAGGAATTCAATCATCAAGTGGGA TGTGGATTGGAAATAGGAAGACATTAGATTAGCGTTTCTTTCAACCCAGTAA GTCTGTGAGTGTCCACGCCACTTATCAATGCATTCTCAGTCCAAAGGCATC CTCCTTTAACTGCTCTGTGATAATGGAGATGGGCTTTGTAAATATTTCTTAC CAGCTGGCATAATGTAAATCCTTGTCTAGTAGAGGGCGCTAGAGAGAGAGA CCAGAGGAGAAAAAAGTTTTATCTTCCAGATTCTGGGGTGCCTCATCTTTT GCCTCTCCAGAGCACAGCTTGTCTTCTCTGTGTGGGCTCCTATGCACAT GCTTTCTTTTGAAGTAGGCCA	X	150683504	150683889	
D1	23	TCTTTTGCATGCTCTTTTGGGAAATTATATTAGCCTAATTACTAATTTCTCTG GCCCTCAAGGTGACTTGCTTGAACCTTGCCACCTTCGCCACTAGGGGGCAGCA TTGGTTTACACAGGGTGAACAAACGTTCAATTCTAACTAATATTTCTTGGT GGGAAAGTGTGTTTCTTTTGGTTTGTGTTTGAAGAAGTCACTTCATACCTTTG AACTGGGGTTAAGCTGGTTAACTCCCAAAATTCACCAGTTCCAATATCCTA TGAAAAAACCCAAAACCACT	1	162847943	162848223	

10

20

30

40

D3	24	GAGACCCTCCACCCCTACCACAGGGAGGCCTCAGGGATGCGCCCTATGGCC AGAGTGAGGGGGAGAGGGCCCTTGAGGGCCACTTTCCACCTTTGGTGTCTT GACTGGCATGTCTGCCCCGTCTTCTCCCGTCGCCACTAGGGGGCAGCCACGCA GCAGGAATTTTACGCCAAGAACTCGCGCTGGACCGAAGGCCTCATCTCGGCC TCCAAGGCTGTGGGCTGGGGAGCCACACAGCTGGTGTAGGTTGCCCTGGGTG GGGGGGGCGAGGGGCTGCTTCTGCCAGTTGGAGCAGTTGGGGTTCAACA G	12	122860281	122860593	
D4	25	GGCGTGTGTTGATTTGCTTTTCTCTAAAGCACTGCTCTGTAAGTTCTATGGG GGGGCGGGCAGAGCTGCTAGAAATACAGAAGCATAAGAGAGTAAATAATGG TACCTTCATATGCAAATGTGCTTTTCAGATTGGATCTGTCTGTGCTTGTTTT GAGCTATACCCGGTAAGGCTCCCTCCAGAAACAGAATTCCTGTTTAGCTCCT GGGAGTGTGCAGAAATCCACAACAGCCACTAGGGGGCAGGAGGCATGTGTCT ATATACCGGGCAGTGAGAAAGAGTTAATGCAATTAAGGGGCACATATTT TGTACCTCTCAGGCTTGAGAGGCCGCCAAGCTACTCCAGCCTCATACAAGTGG GGAAAGACTTTGACGGAGTTAGGGTGGACTGGCAGGCTCTCAACCATAGCA GGAGCACTCAAATTTCTCAGCTTATGTGGCAGGCCTCATTT	17	16363717	16364172	10
D5	26	CCCCTTTCCCTAAACTGGAGAAAAAGGGGTGAAGAGGTGCTCGAATCGCCA TCCTCCAACGTAAGTCATCTTGAAGGATGGAGCAGAGCTCCTCCAAGCCAGG CCAAGTCCCCGAGCGCAAGTGCCAAAGCTGCAGCCATTCTGTTACACGGTG CCTGTGCCCCCTAGTGGCCGCCACCCTGACATGCAAGAGGAAGATACGGAG CTACCCAACCACTGGAGAAGGGAAGAGGACTGGGGAAAAAC	17	29117153	29117400	
E1	27	GCCACCTTTGGTCTTGACATTCACTAAGGAGTGGGCCTGGAATAAAACCAGA AATCCCCATTCTCAGTCTGCCCCAAGCCCTCCAATTCCGAGGGCGCTGTATG TATAAGTCTCGGGCAGGCAAAAGTCGACTGTGAGAACACGCCAGCAGAGGGCG CTGTGGCCCCATCAGTCCCTGCCCACTGAACTCTCCAGAAGGAAAAGCGGCA AGGATGCAACAAGAAAAATCAGACCAGACTGGGAGTCTAGACCTCGCTCCC ACGCGGTCCCAACCATGGCTTCTCTTTGGAATTTTCAGGGGGACCCAGGAAG ACTGACACCGCTGAT	1	178532341	178532667	20
E2	28	AGTTTGACAGGTGGCTTGACTGAAAAAAGAAAAAGAAAAACACCTACTT TCCTCTCCATTGAAACAGCATGCCAGAAAAATTTTGTGGACCCTTGAAATGAG CACACATCTCACTTGCAAAAGCACAGCACCAGCGCCCTCTGCTGTTTCTGG TTTGATTAGAACTCAGAGAAGCTACAGTACTTTCTAGACTAAAATACCATG TAGAGTTTCAGATAAATTATTTCTAGATTAGACATAGGCAAGCACATTTATA TTAGTACATTCTGTAGTATATTCCAGAGTGAAGGAATCAAA	13	20924854	20925155	
E3	29	CACCCCTTACTCCACTCAACCCCTCATTCCTTTAGGCAAGGTATTAAGAGC CCTATGCAAAAGGCAATCTTCAAGTATGCGTTGGCAGAAAAACAACAGTACA AATTGAGGCATAATGTAAAAACCGTTAGGCTGCTTTTACCCAGCAGAGGGCG CTAAACAGCTGTGCCCAAGCCTCTGATTCAACAAAGCAAAACGAGGGCTGGTG AAGCAAGGGAAAGTCAGTTCAGACGCAAAAGCAGCTCTACAATTGTCTCCCT TAATCTCCTAGTCAGTTCAGAAAGGCAGAGATTTATTGTTTAGTTCCACAGA GAGAGACTGACCTGCAAAATAATCCAAGTGAAGAATATTTAGGATCATTTTCAG ACCATTTAAGCCAGCC	14	69129300	69129679	30
E4	30	TGGAATTTGTGTTGACATTGAACTTCTTACTGTAAATATTACTTTGAATAG TACCTATTTAATCCTGCTCACATTTAATGTATATTAGGGAACGTCCTTTCT ATAGAATTTTAAACAATTCCTTTAAAAAGGGATTCTGAAGGTTTCTTCTC TCACTCTTCTCCATTCTCATAAATATGTTTCTATATGTTTTAAGTCTTAGGC ATATCGGACATCACTAGTGCATCAGCGCCCTCTGCTGGTTCAGTAAGAATGG TTTCCCCATATACTGGGCAAACTGGATTTTGTGGTGATGAAAGGGAAAAA AACAAATTCAGTACAATTGAAAAGCTGGTGTGTTTTAAACTCTTGAAAAA CACTGAATGAAAGGAATCACACTAAACTATATGTTGCAATGTTGTTGGTTA ATACTTATTAATAACAGTGGGTTAGGAAATATGCATTGGCACATTTCTTTGA	5	64784363	64784830	

E5	31	TGCATTTTCAGGACACAGTGATATTTCAAGGTAAATATTACAGATTCTGTTT TATTTTCAGGTTATAAGCCAAGATATGGTGTAGACCCCTTTCTCAATTATTTTA CTATGTTTTAAGCTGAAATCCACCCAGCATATCACAAACCTTTCTGCGCTT TAGGACCTTTAGATTGACAGCGCCCTCTGCTGTAACCTCTGAGTTTGTACACT ATTCTAAACCTCACTAAGAGTCAGCACGGAGACAGACACATCCCTGCTGAAA CGGATCTCCAGGTACAGGATCAGCTCCTCAGCTTTTAGGGTTTGAAACCCAAAT ACTGACAGTAACCTCAAAATCCGGGCAGGCTCTGGGGACAGTGTTCACTGACT GACTGCCAGGATTTTCTTTCCATCCCACCTCTCCCCTGAGTTCCTGGGCG CCTGCATTCAGACCCCTTAGACGATATATAATGGGCATTTTAAATTTAGCACT TCCCAACCCGACCTCTTGACTCCACCCTCTCAGCCCAAGTGT	5	171342373	171342883	
F1	32	CCTTCAAGCCGTTTCATCATTTTCTCCAACCGCCATGAAATCCGGCGCATCGA TCTTCACAAAGGAGACTACAGCGTCTGGTGCCCGGCTGCGCAACACCATC GCCCTGGACTTCCACCTCAGCCAGAGCGCCCTCTACTGGACCGACGTGGTGG AGGACAAGATCTACCGCGGGAAGCTGCTGGACAACGGAGGTGACCACCGATT GCTGCCAGGCAGGATGCACACAGGCGGAGCGCTCAGGCGCTAGGGGCCACAG GTCCCATCCAAGTGGCCCCAAAGCAGAGGCTTGGCTCCCCCATCCCCACAC TTCTGTTTC	12	57175912	57176231	10
F2	33	TGCGTTTCAGCTCCAAATCTACCCTTATATTACCTGTTCTGAAATAACAGAC AAGACTCTTTGAAGTCTTTCTCTGTAGTAAGCATGATGCTAAGTTTGTGAG TAGAGGGCGCTGGAGGGCCGTGGCAGGAGGAAGAGTTTCTTTTCACGGTTC CAGTAAGTTGCAGGTTTTTTTGCTTCTTGCTCTTTCTGCGTTGCTGCCAAACT GCACTGTCCCAGCCATGCACCCAGACTGTGCTGCTGACTTCTTGCAAACTC AAGGCCCCATCTTAGCTCAGTAATCACCTCACTGTGGCCC	12	59113827	59114126	
F3	34	GGTCAGCCACTGAGGAACCTCTGGGTGCACCGCTGGGGCAGAGCATCCCTGAA CAGACCCCTGCAGCAGCAGCAAAGGAACACGCAGCAGCAGCAGCAGTGCAC CCTGGAGGCAGAAAGAGGAGTTCCCGCCTCCACCGTGTCCCGCCAGCGCCC TCTACTGGCAAACTTAACATCGACCTGTGAAGGAGAACTCACAGGATGGC AGAGCCGGGGAGCTGAGATGTTAAGAAATCGACCATTTCTGCCTCTGCCACTA GCCTCATTTAACTTATCCTCGGGACTTTAGTCTCCTGTAAAATGAAAGGTT GGTGAGATTG	12	103632628	103632950	20
F4	35	TCGGACATTTCCCTGTCTCTTAAACCCAGTTTTTGCGCTTTGTCTGTCTTG GATTCGCACGCTGCACAAAAATGGCCAGTAGAGGGCGCTGTGGCTTACT TTTTAGAAAACTGCTCACAGCCTGATTTTCAGCACTTTCAAAAACATGGAAAT TATCTTAATTAGTCAAAGCAATCAGAACGAGAAAACGTCTTAAATTCATC AAAGTTGTTTCTTTGTGTCTTTTCTATTTTCGTTTCCCCAAAGGCATCAATA	7	95916685	95916944	
F5	36	TGGCTCAGTCATGGCTACTGAACGGCGGACAAAGTTGCTGTGATGCCATAATG GTGAAACTTGCTAGAAATCAGTCTGTAGGGTGCTGGGGAAAGCTGTTTATG GGAAGAFTGCTCACTACCGCGCCTTGGCTACAAACCACCTTAGGAGGTTGCA GGGGAAGCCACTGGCCACTGAGTGTTGCTGGCTGTGTATGGCAGCAGGAGG GCCCTGGAGAACCTGTGAGCCAAAGCGCTGGGGGCCAGCGAAACACGCGC CCCTGCCAACCCCGCTGAGACTCCACCGAGCCGGAGGCCAAAACCTCTTTCTCC TGCAATGTTTCTCGAGCGCCCTCTACTGGCAAACTTCGGTGCCAAACGGCAA ATTCTTGAAAAGGTTTCAGATTTATTTTCGCAAAGCAGTCAAATAAGGTGAAT TCAGAGGTGAGAGGCAATAAATCAATAACTGGTATAGAGTCCACAGGTAAA TAAACCCAAACCTTTTATTCTTGCAAACTTAGGCTTCGTTTCTTGTTTTAA AAATGGTGGGAGAAGTAGGGAAA	8	70088420	70088962	30

## 【 0 1 9 2 】

## 参考文献

1. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Efficacy of Gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **363**, 355-364 (2010).
2. Aiuti, A. *et al.* Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **360**, 447-458 (2009).

3. Cartier, N. *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. **326**, 818-823 (2009).
4. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*. **467**, 318-322 (2010).
5. Baum, C., Modlich, U., Göhring, G. & Schlegelberger, B. Concise review: managing genotoxicity in the therapeutic modification of stem cells. *Stem Cells*. **29**, 1479-1484 (2011). 10
6. Nienhuis, A.W., Dunbar, C.E. & Sorrentino, B.P. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **13**, 1031-1049 (2006).
7. Emery, D.W. The use of chromatin insulators to improve the expression and safety of integrating gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* **22**, 761-774 (2011).
8. Gaszner, M. & Felsenfeld, G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 703-713 (2006). 20
9. Chung, J.H., Bell, A.C. & Felsenfeld, G. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 575-580 (1997).
10. Chung, J.H., Whiteley, M. & Felsenfeld, G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*. **74**, 505-514 (1993).
10. Bell, A.C., West, A.G. & Felsenfeld, G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. **98**, 387-396 (1999). 30
11. Burgess-Beusse, B. *et al.* The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 16433-16437 (2002).
12. Phillips, J.E. & Corces, V.G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*. **137**, 1194-1211 (2009).
13. Giles, K.E., Gowher, H., Ghirlando, R., Jin, C. & Felsenfeld, G. Chromatin boundaries, insulators, and long-range interactions in the nucleus. *Cold Spring Harb. Sym.* **75**, 79-85 (2010). 40
14. Kim, T.H. *et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*. **128**, 1231-1245 (2007).

15. Wang, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680-1688 (2012).
16. Schmidt, D. *et al.* Waves of retrotransposon expansion remodel genome organization and CTCF binding in multiple mammalian lineages. *Cell.* **148**, 335-348 (2012).
17. Parelho, V. *et al.* Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell.* **132**, 422-433 (2008).
18. Dixon, J.R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* **485**, 376-380 (2012).
19. Emery, D.W., Yannaki, E., Tubb, J. & Stamatoyannopoulos, G. A chromatin insulator protects retro-virus vectors from chromosomal position effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 9150-9155 (2000).
20. Arumugam, P.I. *et al.* Improved human  $\beta$ -globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element. *Mol. Ther.* **15**, 1863-1871 (2007).
21. Ryu, B.Y., Persons, D.A., Evans-Galea, M.V., Gray, J.T. & Nienhuis, A.W. A chromatin insulator blocks interactions between globin regulatory elements and cellular promoters in erythroid cells. *Blood Cell. Mol. Dis.* **39**, 221-228 (2007).
22. Uchida, N, Hanawa, H, Yamamoto, M., & Shimada, T. The chicken hypersensitivity site 4 core insulator blocks promoter interference in lentiviral vectors. *Hum. Gene. Ther. Meth.* **24**, 117-124 (2013).
23. Li, C.L., Xiong, D., Stamatoyannopoulos, G., & Emery, D.W. Genomic and functional assays demonstrate reduced gammaretroviral vector genotoxicity associated with use of the cHS4 chromatin insulator. *Mol. Ther.* **17**, 716-724 (2009).
24. Ryu, B.Y. *et al.* An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation. *Blood.* **111**, 1866-1875 (2008).
25. Evans-Galea, M.V. *et al.* Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol. Ther.* **15**, 801-809 (2007).

10

20

30

40

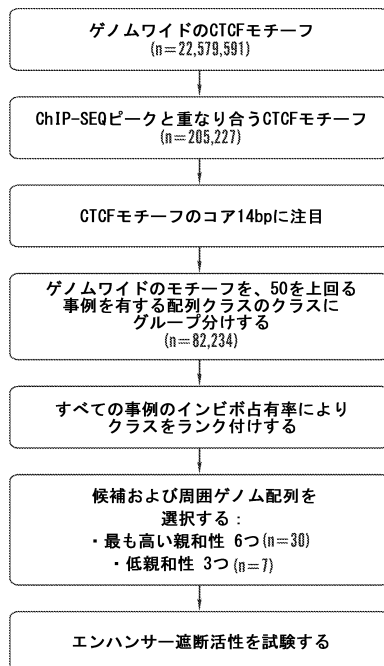
26. Renda, M. *et al.* Critical DNA binding interactions of the insulator protein CTCF: a small number of zinc fingers mediate strong binding, and a single finger-DNA interaction controls binding at imprinted loci. *J. Biol. Chem.* **282**, 33336-33345 (2007).
27. Wendt, K.S. *et al.* Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature.* **451**, 796-801 (2008).
28. Ohlsson, R., Renkawitz, R. & Lobanenkov, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* **17**, 520-527 (2001). 10
29. Nakahashi, H. *et al.* A genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.* **3**, 1678-1698 (2013).
30. Li, G. *et al.* Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell.* **148**, 84-98 (2012).
31. Baum, C. Gene therapy for SCID-X1: focus on clinical data. *Mol. Ther.* **19**, 2013-2014 (2011). 20
32. Kohn, D.B. & Candotti, F. Gene therapy fulfilling its promise. *N. Engl. J. Med.* **360**, 518-521 (2009).
33. Stein, S. *et al.* Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* **16**, 198-204 (2010).
34. Dunbar, C.E. & Larochelle, A. Gene therapy activates EVI1, destabilizes chromosomes. *Nat. Med.* **16**, 163-165 (2010). 30
35. Galy, A. & Thrasher, A.J. Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Opin. Allergy CL.* **11**, 545-550 (2011).
36. Schwarzwaelder, K. *et al.* Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J. Clin. Invest.* **117**, 2241-2249 (2007).
37. Deichmann, A. *et al.* Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J. Clin. Invest.* **117**, 2225-2232 (2007). 40
38. Aitui, A. *et al.* Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J. Clin. Invest.* **117**, 2233-2240 (2007).

39. Howe, S.J. *et al.* Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Invest.* **118**, 3143-3150 (2008).
40. Hacein-Bay-Abina, S.H. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132-3142 (2008).
41. Seita, J. *et al.* Gene Expression Commons: an open platform for absolute gene expression profiling. *PLoS One.* **7**, e40321 (2012). 10
42. Song, L. *et al.* Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res.* **21**, 1757-1767 (2011).
43. Xi, H. *et al.* Identification and characterization of cell type-specific and ubiquitous chromatin regulatory structures in the human genome. *PLoS Genet.* **3**, 1377-1388 (2007).
44. Dickson, J. *et al.* VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation. *PLoS Genet.* **6**, e1000804 (2010). 20
45. Kharchenko, P.V., Tolstorukov, M.Y., Park, P.J. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1351-1359 (2008).
46. Neph, S. *et al.* BEDOPS: high-performance genomic feature operations. *Bioinformatics.* **28**, 1919-1920 (2012).
47. Thurman, R.E. *et al.* The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature.* **489**, 75-82 (2012). 30
48. Tubb, J., Groth, A.C., Leong, L., Emery, D.W. Simultaneous sequence transfer into two independent locations of a reporter vector using MultiSite Gateway technology. *Biotechniques.* **39**, 553-557 (2005).
49. Aker, M. *et al.* Core sequences from the cHS4 insulator are necessary for protecting retroviral vectors from silencing position effects. *Hum. Gene. Ther.* **18**, 333-343 (2007).
50. Grant, C.E., Bailey, T.L., Noble, W.S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics.* **27**, 1017-1018 (2011). 40
51. Jolma, A. *et al.* DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell.* **152**, 327-339 (2013). Matys, V. *et al.* TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **34**, D108-110 (2006).

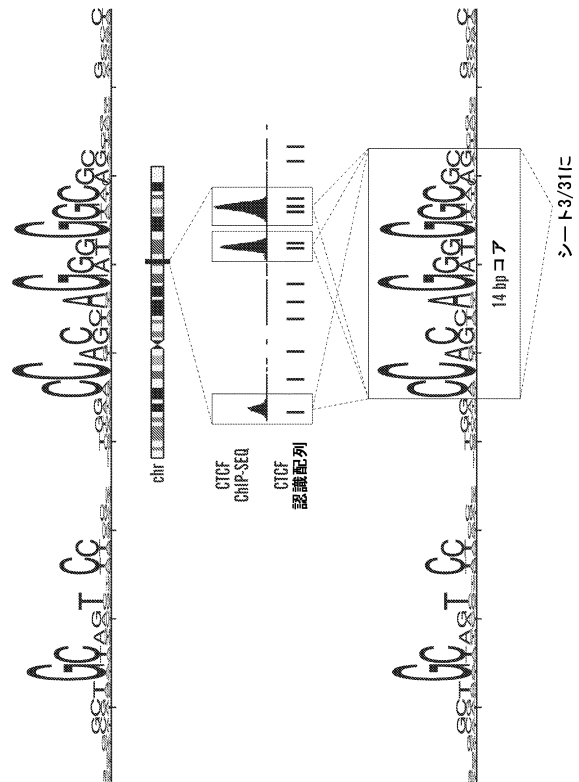
52. Nakahashi, H. et al. A genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.* 3, 1678-1698 (2013).
53. Neph, S. et al. An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature.* 489, 83-90 (2012).
54. Newburger, D.E. & Bulyk, M.L. UniPROBE: an online database of protein binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 37, D77-82 (2009).
55. Portales-Casamar, E. et al. JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 38, D105-110 (2010).

10

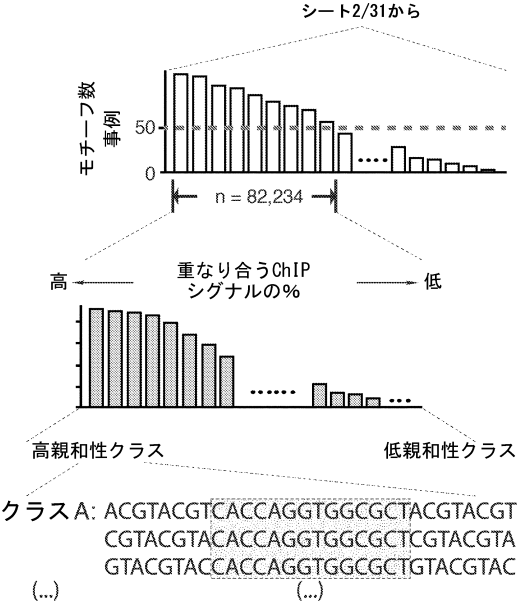
【図 1 - 1】



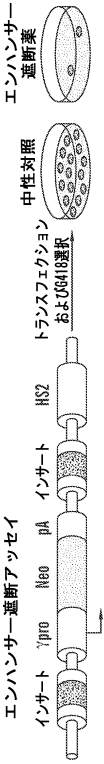
【図 1 - 2】



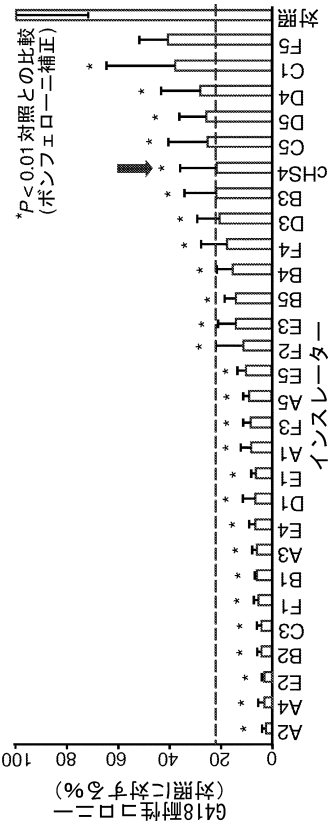
【図 1 - 3】



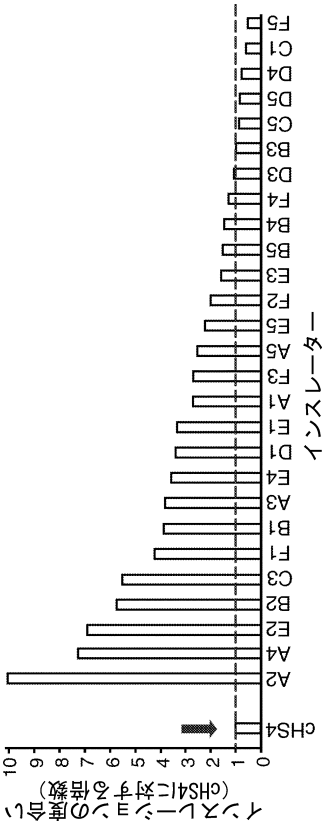
【図 2 A】



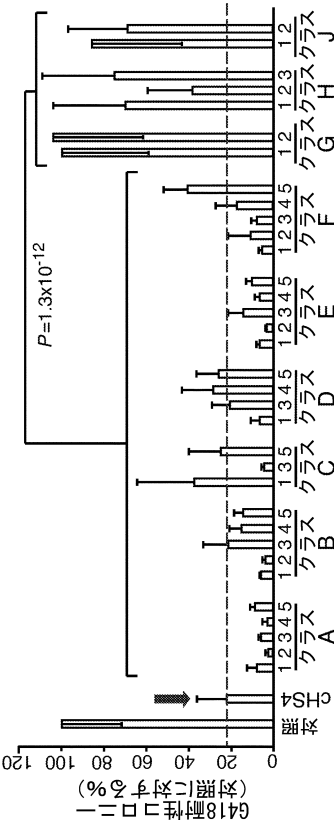
【図 2 B】



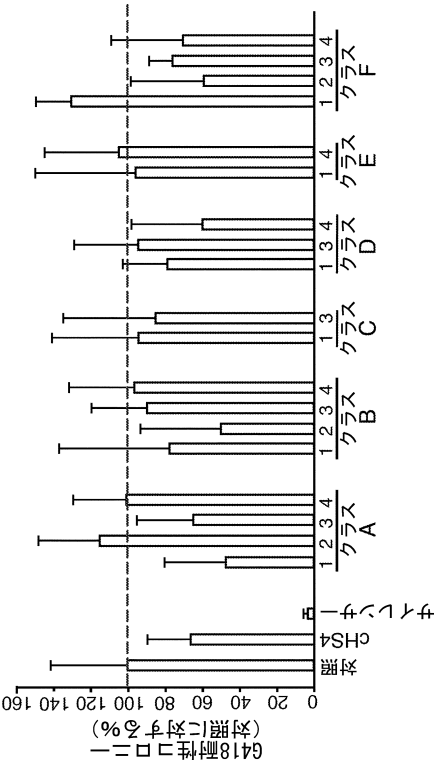
【図 2 C】



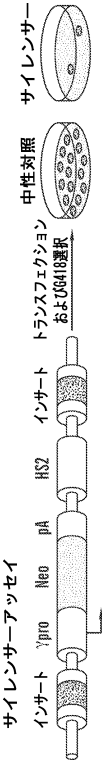
【図 2 D】



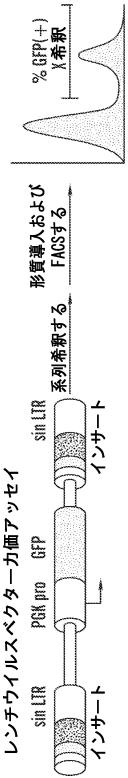
【図 3 B】

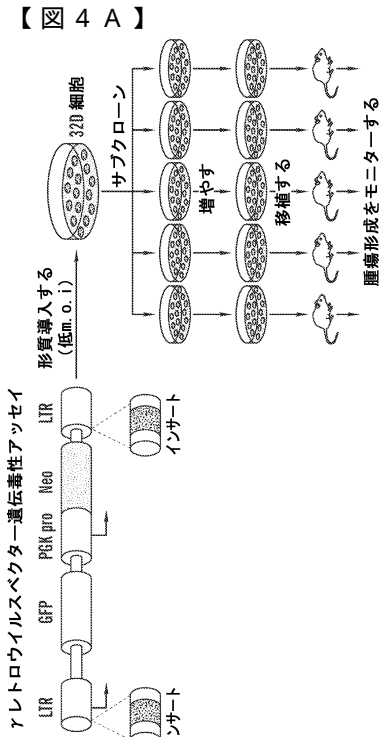
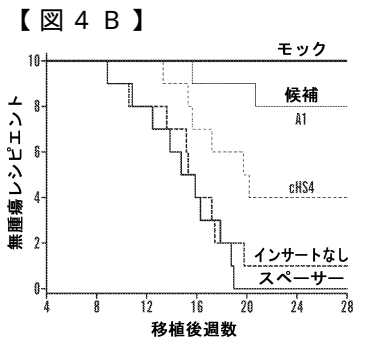
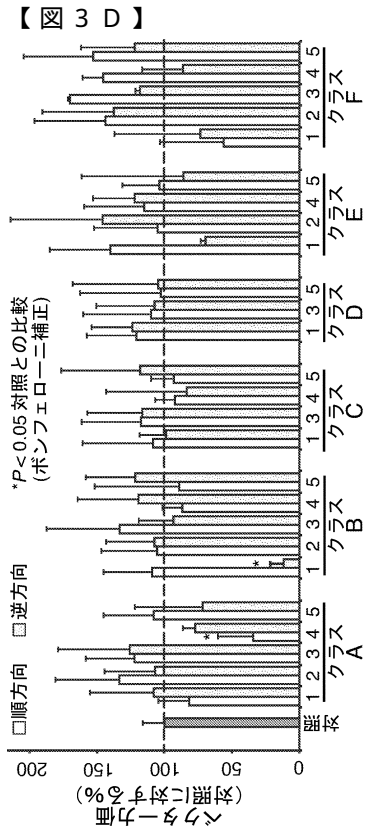


【図 3 A】



【図 3 C】



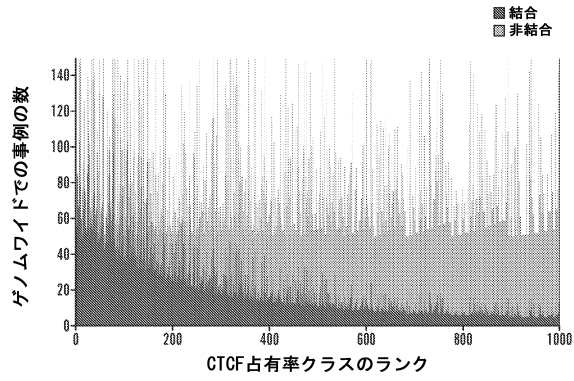
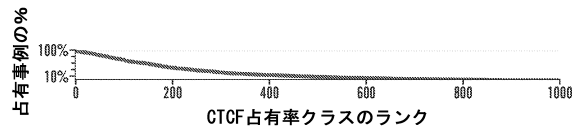


【図 4 C】

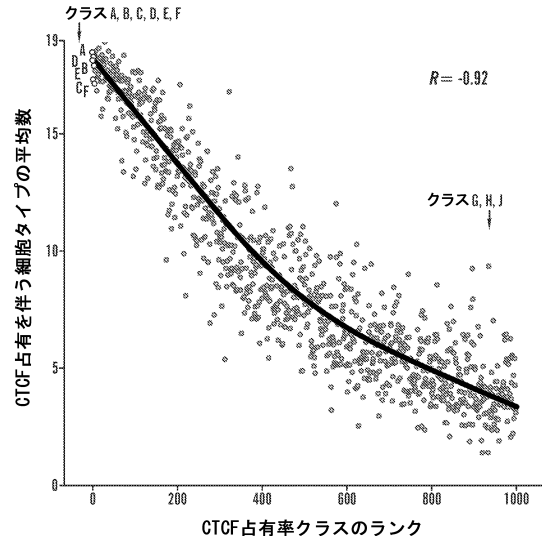
ベクター	推定腫瘍数 (a)	推定プロウイルス数 (b)	推定プロウイルス数 $10^5$ 個当たりの腫瘍比較による確率 (c)	cHS4 との比較による確率 (c)
モック	0	0	0	$< 0.001$
インサートなし	23.0	$0.49 \times 10^5$	46.9	$< 0.001$
スペース	$\geq 30$	$0.67 \times 10^5$	$\geq 44.7$	$< 0.001$
cHS4	9.15	$0.54 \times 10^5$	16.9	$< 0.001$
A1	2.23	$0.64 \times 10^5$	3.9	$< 0.05$

(a) 腫瘍を有しないレシピエントの割合に関するポワソン分布に基づく； (b) 初期細胞数および初期形質導入率に基づく； (c) 2つの比率に関する Z 検定に基づく。

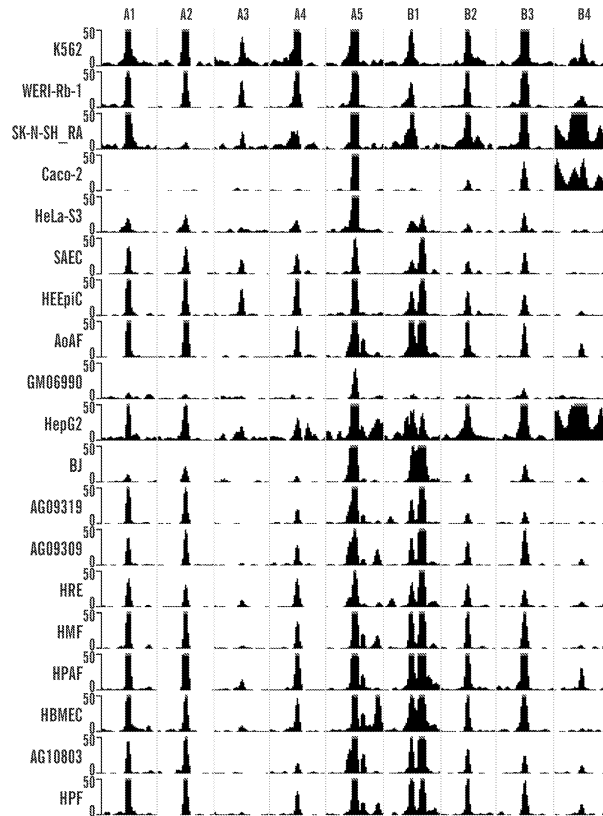
【図 5】

**A****B**

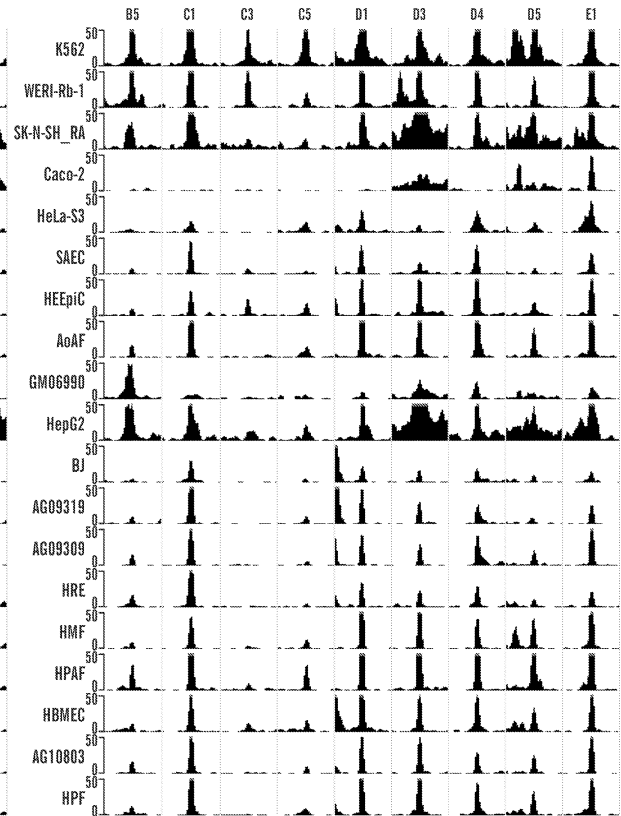
【図 6】



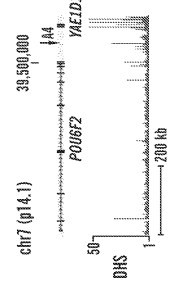
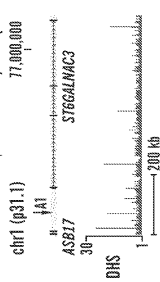
【図 7 - 1】



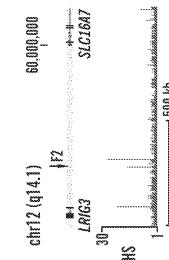
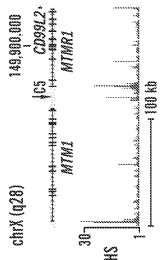
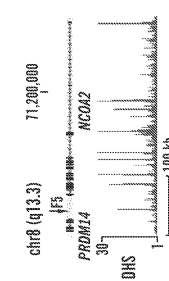
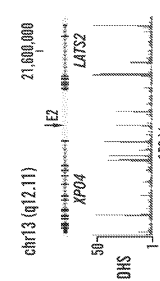
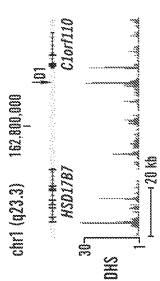
【図 7 - 2】



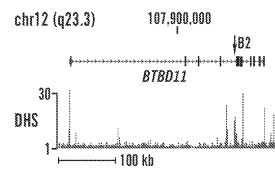
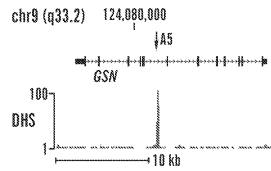
【 図 8 - 1 】



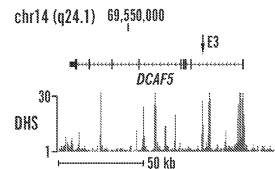
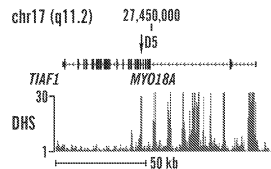
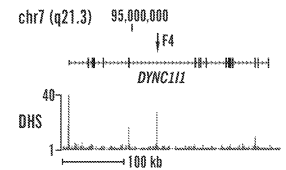
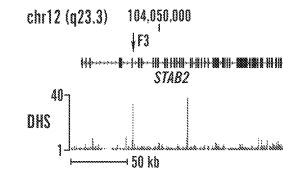
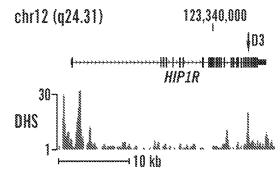
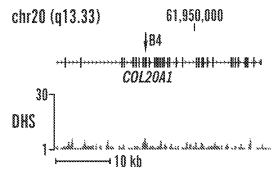
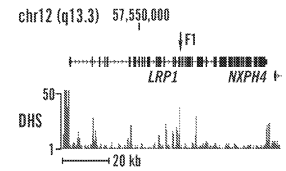
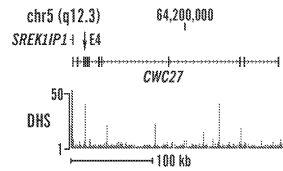
【 図 8 - 3 】



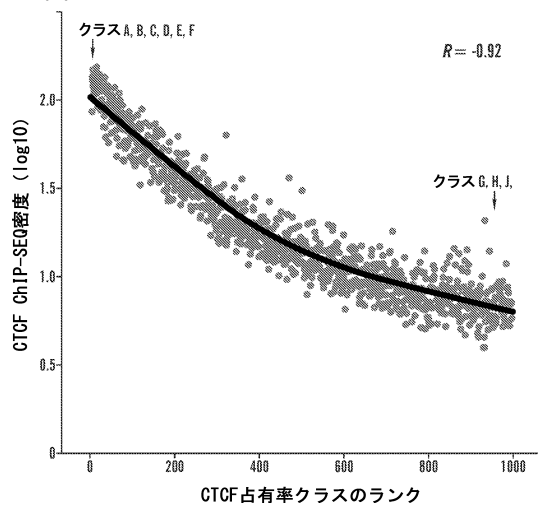
【図 9 - 1】



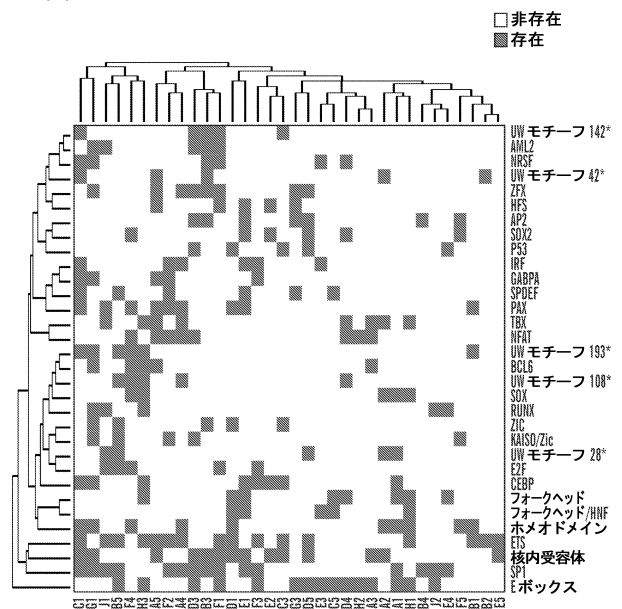
【図 9 - 2】

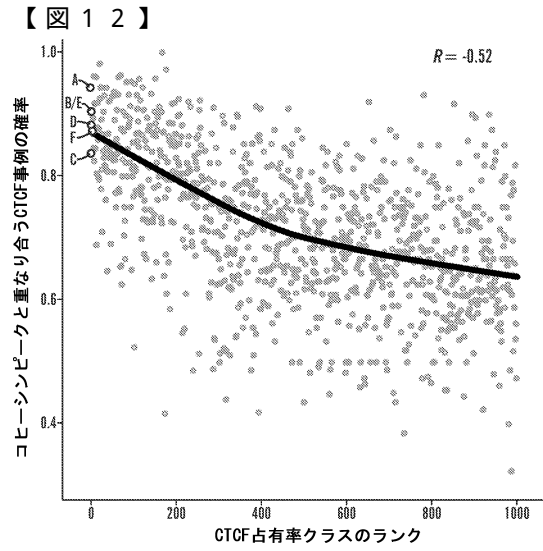


【図 10】

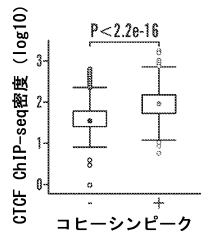


【図 11】

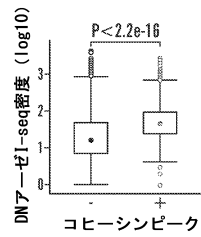




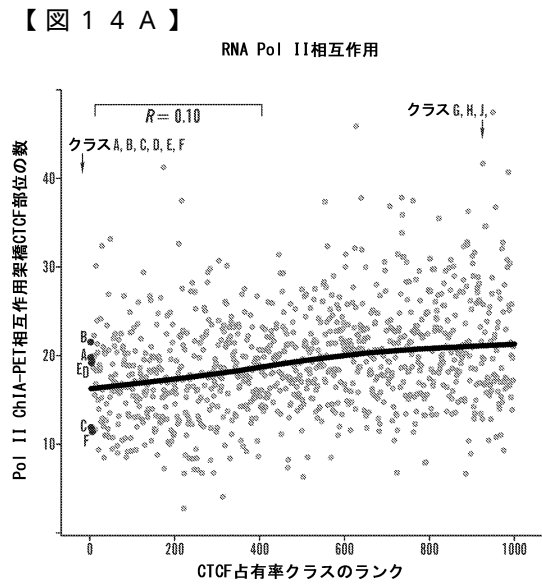
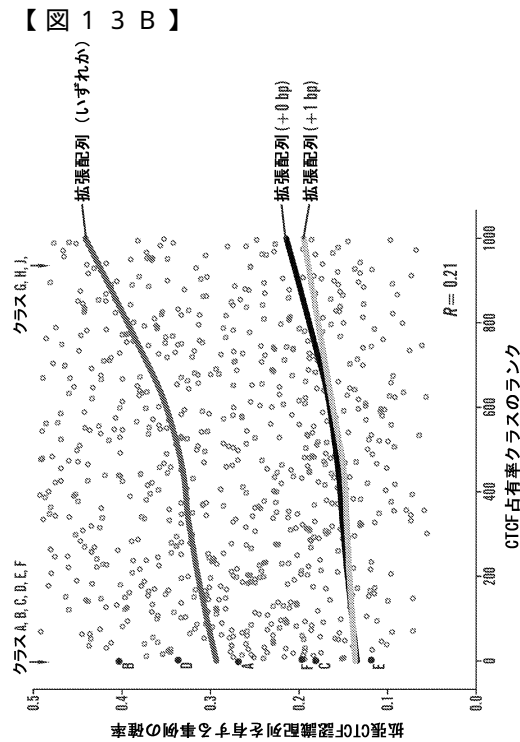
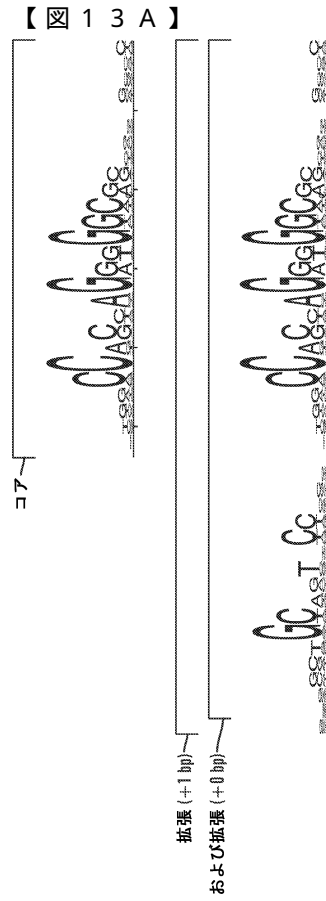
A



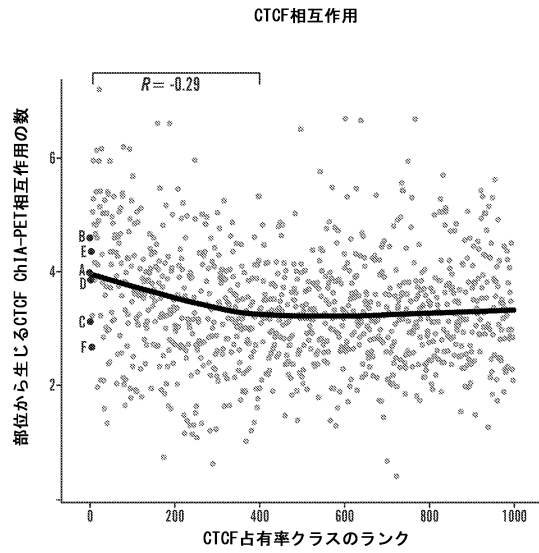
B



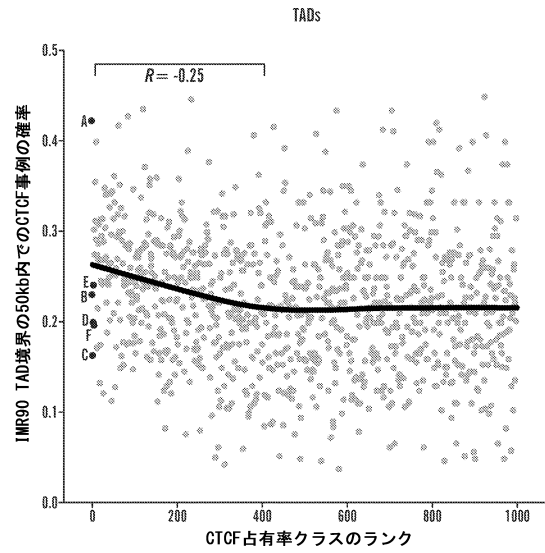
C



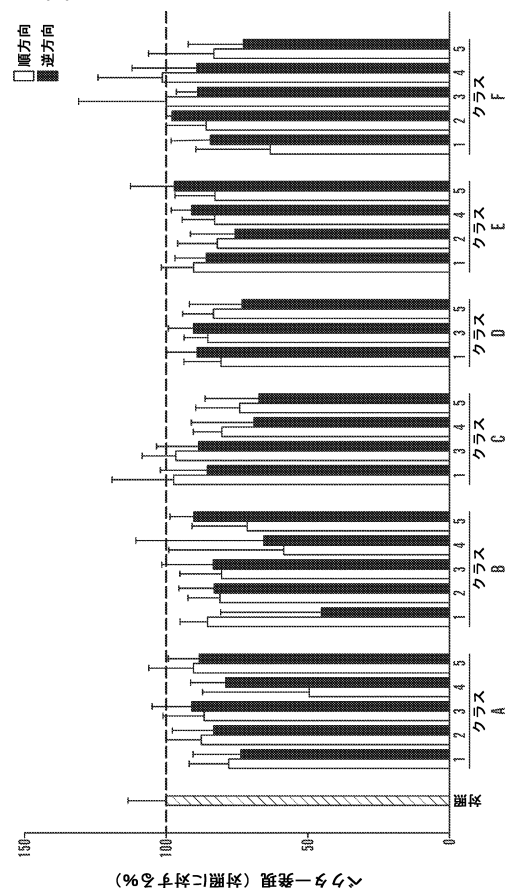
【図 14 B】



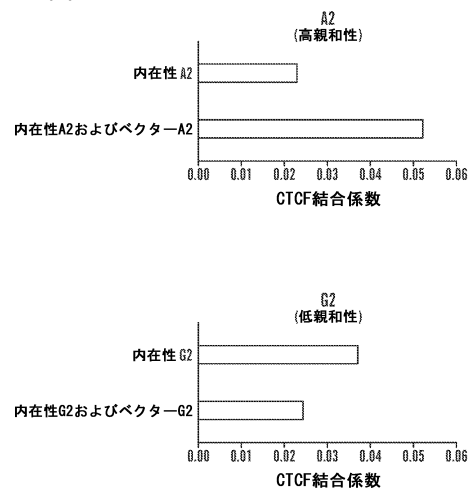
【図 14 C】



【図 15】



【図 16】



【配列表】

0006737714000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 スタマトヤンノブロス ジョージ  
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル イレヴンス アベニュー ノースイース  
ト 4311 スイート 500
- (72)発明者 スタマトヤンノブロス ジョン  
アメリカ合衆国 98105 ワシントン州 シアトル イレヴンス アベニュー ノースイース  
ト 4311 スイート 500

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0115227 (US, A1)  
Gene Therapy, 2012, Vol.19, p.15-24

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)