



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I859216 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：109112259

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 10 日

(51)Int. Cl. : C12N15/11 (2006.01)

C12N15/113 (2010.01)

C12N15/86 (2006.01)

C12N7/00 (2006.01)

C12Q1/6869 (2018.01)

(30)優先權：2019/04/12 美國

62/833,548

2019/04/26 美國

62/839,207

2020/02/21 美國

62/979,483

(71)申請人：美商奧崔基尼克斯製藥公司(美國) ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.

(US)

美國

(72)發明人：泰南 奧伯利 R TIERNAN, AUBREY R. (US)；理查茲 尼可拉斯 RICHARDS,

NICHOLAS (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 105980551A

US 2016/0297855A1

WO 99/11764A2

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：9 共 83 頁

(54)名稱

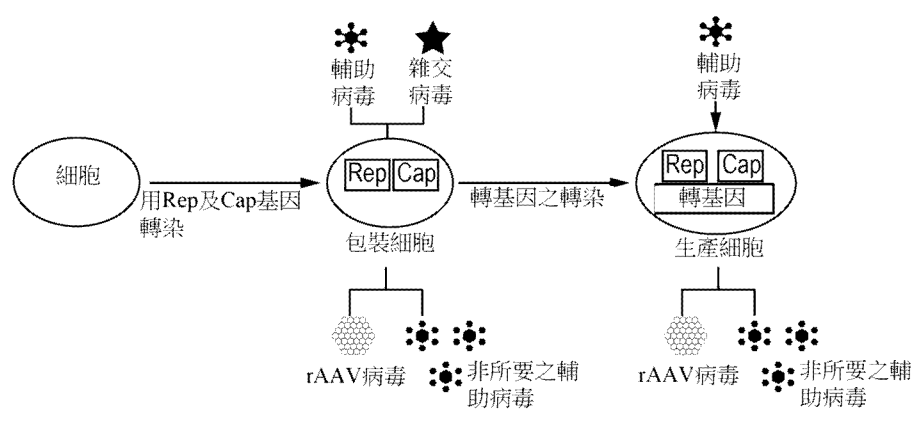
工程化生產細胞株以及製造及使用該細胞株之方法

(57)摘要

本發明係關於重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus；rAAV)包裝及/或生產細胞株，其經工程化以降低一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性來增加 rAAV 效價。本發明亦描述產生該等工程化細胞株之方法。

This application relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) packaging and/or producer cell lines which have been engineered to reduce expression and/or activity of one or more genes and/or proteins to increase rAAV titers. The methods of generating the engineered cell lines have also been described herein.

指定代表圖：



【圖1】



I859216

【發明摘要】

【中文發明名稱】

工程化生產細胞株以及製造及使用該細胞株之方法

【英文發明名稱】

ENGINEERED PRODUCER CELL LINES AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME

【中文】

本發明係關於重組腺相關病毒 (recombinant adeno-associated virus ; rAAV) 包裝及/或生產細胞株，其經工程化以降低一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性來增加rAAV效價。本發明亦描述產生該等工程化細胞株之方法。

【英文】

This application relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) packaging and/or producer cell lines which have been engineered to reduce expression and/or activity of one or more genes and/or proteins to increase rAAV titers. The methods of generating the engineered cell lines have also been described herein.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

工程化生產細胞株以及製造及使用該細胞株之方法

【英文發明名稱】

ENGINEERED PRODUCER CELL LINES AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本申請案大體上係關於工程化生產及/或包裝細胞株及產生工程化生產及/或包裝細胞株以用於增加重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus ; rAAV)效價之方法。

【先前技術】

【0002】 基於rAAV之載體為人類基因療法之最有前景的媒劑之一。rAAV載體考慮用於廣泛多種基因療法應用。特定言之，rAAV載體可將治療性基因遞送至分裂及非分裂細胞，且此等基因可在不整合至所靶向之細胞之基因組中的情況下保持延長週期。儘管用於產生rAAV之系統在過去二十年不斷演變，但若干問題仍然待解決。rAAV生產系統之一個限制為rAAV粒子之效價產率較低。基於rAAV之基因產物之醫藥研發在臨床前階段需要大量rAAV載體以用於較大物種之研究，以能夠實現有助於預測人類之劑量的完整毒理學及生物分佈研究。此外，由於當前rAAV生產系統導致低效價產率，製造用於人類試驗及商業應用之足夠水準之rAAV具有挑戰性。研究人員已探索許多方式以產生足夠高效價之rAAV粒子，但仍存在對解決此問題之較大需求。特定言之，需要能夠產生具有高效價產率之高品質rAAV之高效細胞株。藉由本文中所描述之工程化細胞株生

產高效價rAAV加速將此載體系統應用於活體內基因療法用途。

【發明內容】

【0003】 本發明藉由提供包含其中已修飾一或多個基因及/或蛋白質之細胞的rAAV包裝及/或生產細胞株解決對獲得用於基因療法應用之改良rAAV效價之需求。本文亦描述鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因及/或蛋白質的方法及產生工程化rAAV包裝及/或生產細胞株之方法。

【0004】 本文描述產生rAAV包裝及/或生產細胞株之組合物及方法，該等rAAV包裝及/或生產細胞株包含與對照親本細胞相比可產生較高效價之rAAV的細胞。更特定言之，本文提供rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含其中與對照親本細胞相比，調節一或多個基因及/或蛋白質之表現從而產生較高rAAV效價之細胞。在一個態樣中，本發明提供rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含其中與對照親本細胞相比一或多個基因及/或蛋白質之表現經降低的細胞。舉例而言，與對照親本細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低。

【0005】 在一些實施例中，本發明提供rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含其中與對照親本細胞相比降低KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3表現之細胞。

【0006】 在某些實施例中，本發明提供一種rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含與對應未經修飾之親本細胞相比經工程化以降低由以下表現之基因產物之表現及/或活性的細胞：ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1。在某些實施例中，本發明提供一種rAAV包裝

及/或生產細胞株，其與對應親本細胞株相比展現由以下中之至少一者表現之多肽之表現及/或活性降低：ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及NALCN-AS1。

【0007】 在一個態樣中，本發明提供一種rAAV包裝及/或生產細胞株，其中一或多個基因之表現使用核酸酶、雙股RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、微RNA (miRNA)或反義RNA寡核苷酸(ASO)來降低。在某些實施例中，用於降低一或多個基因表現之核酸酶選自由以下組成之群：鋅指核酸酶(Zinc Finger nuclease；ZFN)、巨核酸酶(meganuclease)、轉錄活化因子樣效應物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease；TALEN)或成簇規律間隔短回文重複序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat；CRISPR)相關蛋白。在某些實施例中，一或多個基因之表現用包含選自序列SEQ ID NO: 1至11中之任一者的核苷酸序列之siRNA來降低。

【0008】 在某些實施例中，一或多個基因之表現使用CRISPR基因組編輯來降低。在一些實施例中，導引RNA對用於靶向基因以降低及/或消除彼基因之表現。在某些實施例中，一或多個基因之表現使用選自SEQ ID NO: 12至15之導引RNA對或用於靶向選自SEQ ID NO: 16至31之序列中之任一者的目標DNA序列之導引RNA對來降低。在某些實施例中，一個導引RNA對用於降低一個基因之表現。在某些其他實施例中，多個導引RNA對用於降低一或多個基因之表現。在某些實施例中，與對照親本細胞株相比，一或多個基因之基因表現及/或一或多個基因及/或蛋白質之活性在rAAV包裝及/或生產細胞株中經降低及/或消除。在某些實施例

中，與對照親本細胞相比，基因表現及/或活性在rAAV包裝及/或生產細胞中經消除。

【0009】 在本文中所描述之一些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為真核細胞株。在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為人類細胞株。在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為昆蟲細胞株。在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為HeLa細胞株。在某些其他實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為人類胚腎(human embryonic kidney；HEK) 293細胞株。

【0010】 在本文中所描述之一些實施例中，本發明之rAAV包裝及/或生產細胞株產生比對照親本細胞株較高之rAAV效價。在某些實施例中，與由包含對照親本細胞之細胞株產生之rAAV效價相比，由本發明之rAAV生產細胞株之細胞產生的rAAV效價增加約1.5至約7倍。本文亦描述工程化細胞株之裂解物。在某些實施例中，自裂解物收集較高效價rAAV。本文亦描述來自工程化細胞株之細胞培養上清液。在某些實施例中，自細胞培養上清液收集較高效價rAAV。

【0011】 本文亦描述一種產生生產細胞株之方法，其中該方法包括將rAAV載體遞送至包裝細胞株之細胞，其中與對照親本細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低。在某些實施例中，本發明提供一種產生生產細胞株之方法，其中該方法包括將rAAV載體遞送至包裝細胞株之細胞，其中與對照親本細胞相比，KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現經降低。

【0012】 本文亦描述一種藉由用輔助病毒感染生產細胞株之(由包裝

細胞株產生)細胞來產生rAAV的方法，其中與對照親本細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現在包裝細胞株中經降低。在某些實施例中，與對照親本細胞相比，KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現在包裝細胞株中經降低。

【0013】 在一個態樣中，本發明提供一種藉由用輔助病毒感染生產細胞株之細胞來產生rAAV的方法，其中與對照親本細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現在生產細胞株中經降低。在某些實施例中，本發明提供一種藉由用輔助病毒感染生產細胞株之細胞來產生rAAV的方法，其中與對照親本細胞相比，KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現在生產細胞株中經降低。

【0014】 本文亦描述一種自生產細胞株收集rAAV之方法，其中與對照親本細胞株相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低。亦描述一種自生產細胞株收集rAAV之方法，其中與對照親本細胞株相比，KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現經降低。在某些實施例中，與對照親本細胞株相比，增強由本發明之生產細胞株產生rAAV。

【0015】 本文亦描述一種鑑別與rAAV之產生有關之一或多個基因的方法，其中該方法包括i.)添加增加細胞株中之rAAV效價之一或多種補充劑；ii.)量測補充及非補充細胞株中轉錄組上之全局基因表現；iii.)獲得

在補充與非補充細胞株之間差異性表現之基因之清單；及iv.)鑑別與rAAV之產生有關之一或多個基因。在一些實施例中，一或多個鑑別基因負責降低rAAV之產生。

【0016】 本文亦描述一種產生rAAV包裝及/或生產細胞株以促進rAAV產生增加之方法。在一些實施例中，rAAV產生藉由調節自在補充與非補充rAAV生產細胞株之間差異性表現之基因清單鑑別之一或多個基因及/或蛋白質之表現來增加。在某些實施例中，rAAV效價藉由調節自在補充與非補充rAAV生產細胞株之間差異性表現之基因清單鑑別之一或多個基因及/或蛋白質之表現來增加。在一些實施例中，與未經調節之細胞株之rAAV效價相比，調節一或多個基因及/或蛋白質使rAAV效價增加至少1.5倍。在某些實施例中，調節表現為降低一或多個基因之表現。在某些實施例中，調節表現為降低一或多個蛋白質之表現。在某些實施例中，調節表現為消除一或多個基因之表現。在某些實施例中，調節表現為消除一或多個蛋白質之表現。

【0017】 在一些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株為真核細胞株。在某些實施例中，細胞株為人類細胞株。在某些實施例中，細胞株為昆蟲細胞株。在某些實施例中，細胞株為HeLa細胞株。在某些實施例中，細胞株為人類胚腎(HEK) 293細胞株。

【0018】 本發明之其他特徵及優勢將自以下詳細描述及申請專利範圍顯而易見。

【0019】 除非相反地指出，否則出於所有目的，本文中引用之所有公開案、參考文獻、專利及/或專利申請案均以全文引用之方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

【0020】 參考以下內容可更完全地理解本發明。

【0021】 圖1為展示產生本文中所描述之rAAV包裝及生產細胞之方法的示意圖。

【0022】 圖2A至2D展示根據HPRT1 siRNA阻斷基因表現實驗之最佳化及發展產生之實驗資料。圖2A至2B展示由24孔中執行之HPRT1 siRNA阻斷基因表現實驗產生之阻斷基因表現% (圖2A)及蛋白質表現% (圖2B)資料。圖2C至2D展示由6孔中執行之HPRT1 siRNA阻斷基因表現實驗產生之阻斷基因表現% (圖2C)及蛋白質表現% (圖2D)資料。

【0023】 圖3A至3B展示自PGA5 (圖3A)及SPANXN3 (圖3B)之RNA-Seq資料之生物資訊學分析獲得之基因表現的對數倍變化值，其表示為培養於未補充細胞培養基中之細胞相對於未經感染之細胞(未用輔助病毒感染之細胞)的基因表現之對數倍變化，及相對於未補充細胞培養基培養於補充細胞培養基中之細胞之基因表現的對數倍變化。圖3C至3D展示相對於未經感染之細胞，培養於未補充及補充細胞培養基中之細胞中PGA5 (圖3C)及SPANXN3 (圖3D)之表現之RT-qPCR倍數變化值。

【0024】 圖4A至4B展示當由RT-qPCR測定時，培養於未補充細胞培養基及補充細胞培養基中之生產細胞株純系相對於未經感染之細胞(未用輔助病毒感染的細胞)中PGA5 (圖4A)及SPANXN3 (圖4B)表現之倍數變化值。21C5、3C6、2B6表示HeLa生產細胞株之不同純系。圖4C至4D展示與培養於非補充細胞培養基中之純系相比，培養於補充細胞培養基中之生產細胞株純系21C5、3C6、2B6中PGA5 (圖4C)及SPANXN3 (圖4D)表現之相對倍數增加。

【0025】 圖5A至5F展示降低個別基因於不同生產細胞株中之表現對rAAV效價之影響。各圖式展示每毫升(mL)生產細胞株#1 (圖5A)、生產細胞株#2 (圖5B)及生產細胞株#3 (圖5C)之基因組複本(genome copy ; GC)中所產生之rAAV的效價。圖5D至5F展示由生產細胞株#1 (圖5D)、生產細胞株#2 (圖5E)及生產細胞株#3 (圖5F)產生之rAAV之效價的倍數變化。圖5A至5B展示3個生物重複實驗中之平均值。圖5C至5F展示4個生物重複實驗中之平均值。

【0026】 圖6為展示例示性基因篩選方法論之說明性流程圖。

【0027】 圖7A展示最前19個2H5基因剔除純系之24深孔效價。效價報導為基因組複本/毫升。對照樣品為未經修飾之2H5。圖7B展示與2H5對照相比，效價之倍數變化。2H5效價設定為1且其他效價以相對於2H5對照之倍數增加顯示。圖7C展示最前19個7B12基因剔除純系之24深孔效價。效價報導為基因組複本/毫升。對照樣品為未經修飾之7B12。圖7D展示與7B12對照相比，效價之倍數變化。7B12效價設定為1且其他效價以相對於7B12對照之倍數增加顯示。

【0028】 圖8A展示最前五個2H5基因剔除純系之ambr® 15效價。效價報導為基因組複本/毫升。對照樣品為未經修飾之2H5。圖8B展示與2H5對照相比，效價之倍數變化。2H5效價設定為1且其他效價以相對於2H5對照之倍數增加顯示。圖8C展示最前四個7B12基因剔除純系之ambr® 15效價。效價報導為基因組複本/毫升。對照樣品為未經修飾之7B12。圖8D展示與7B12對照相比，效價之倍數變化。7B12效價設定為1且其他效價以相對於7B12對照之倍數增加顯示。

【0029】 圖9A至9B展示對藉由降低多個基因組合於兩個生產細胞

株中之表現而產生之rAAV效價的影響。各圖式展示與經誤義siRNA處理之對照相比，rAAV效價之倍數變化。**圖9A**展示與2H5誤義對照相比，效價之倍數變化。2H5誤義效價設定為1且其他效價以相對於2H5誤義對照之倍數增加顯示。**圖9B**展示與7B12誤義對照相比，效價之倍數變化。7B12誤義效價設定為1且其他效價以相對於7B12誤義對照之倍數增加顯示。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0030】 本申請案主張2019年4月12日申請之美國臨時專利申請案第62/833,548號；2019年4月26日申請之美國臨時專利申請案第62/839,207號；及2020年2月21日申請之美國臨時專利申請案第62/979,483號的優先權及權益，出於所有目的，該等申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

序列表

【0031】 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式以電子方式提交且以全文引用之方式併入本文中。創建於2020年3月26日之該ASCII複本命名為ULP-005WO_SL.txt且大小為11,023個位元組。

【0032】 本發明描述一種重組腺相關病毒(rAAV)包裝及/或生產細胞株，其包含其中一或多個基因及/或蛋白質之表現經調節之細胞。與其中一或多個基因及/或蛋白質之表現未經調節之細胞株相比，調節基因表現導致增加之效價產率。

【0033】 除非另外指出，否則根據習知用途使用技術術語。分子生物學中之共用術語之定義可在以下中找到：**Benjamin Lewin, *Genes V***,

Oxford University Press出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等人(編), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 及Robert A. Meyers (編), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc.出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

【0034】出於理解本發明主題及建構隨附專利申請專利範圍之目的, 包括以下定義。本文中所使用之縮寫具有其在化學及生物學領域內之習知含義。

定義

【0035】如本文中所使用, 「調節(modulation/modulate)」係指調節基因及/或蛋白質之表現或活性之更改。調節可增加、降低(reducing/decreasing)或消除一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性。在多個基因及/或蛋白質經調節之情況下, 可增加基因及/或蛋白質之所有表現及/或活性, 或可降低基因及/或蛋白質之所有表現及/或活性, 或可增加一或多個基因及/或蛋白質且可減少其他基因及/或蛋白質。

【0036】如本文中所使用, 術語「細胞」係指能夠產生重組腺相關病毒(rAAV)之任何一或多種細胞。在一些實施例中, 細胞為哺乳動物細胞, 例如HeLa細胞、COS細胞、HEK293細胞、A549細胞、BHK細胞或Vero細胞。在其他實施例中, 細胞為昆蟲細胞, 例如Sf9細胞、Sf-21細胞、Tn-368細胞或BTI-Tn-5B1-4 (High-Five)細胞。術語「細胞株」係指能夠繼續分裂且尚未經歷衰老之細胞之純系群體。除非另外指示, 否則術語「細胞」或「細胞株」應理解為包括所指示細胞或細胞株之經修飾或工程化變體。

【0037】如本文中所使用，術語「工程化細胞株」係指已藉由一或多種手段修飾以降低一或多個內源性表現之基因及/或蛋白質(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1)之表現或其他特性(例如，生物活性)以便擴大rAAV產生的細胞株。

【0038】如本文中所使用，術語「對照親本細胞」係指尚未藉由一或多個手段修飾以降低一或多個內源性表現之基因及/或蛋白質(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1)之表現或其他特性(例如，生物活性)以便擴大rAAV產生的細胞。

【0039】如本文中所使用，術語「對照親本細胞株」係指能夠繼續分裂且尚未經歷衰老之對照親本細胞之純系群體。

【0040】「裂解」係指通常藉由損害其完整性之病毒、酶促或滲透機制分解細胞。「經裂解細胞」為已經歷實質性裂解之細胞。如本文中所使用，術語「裂解物」係指含有經裂解細胞之內含物之流體。

【0041】如本文中所使用，術語「較高效價」表示相較於由未經修飾之對照親本細胞株及/或對照親本細胞產生之效價而增加之效價。

【0042】如本文中所使用，術語「細胞培養上清液」係指其中懸浮及/或培養細胞之細胞培養基。

【0043】如本文中所使用，術語「基因」係指轉錄單元及與轉錄單元相鄰(例如位於上游及下游)且可操作地連接之調節區。轉錄單元為轉錄至RNA分子中之一系列核苷酸。轉錄單元可包括編碼區。「編碼區」為編碼隨後加工至mRNA之未經加工之preRNA(亦即，包括外顯子及內含子

兩者之RNA分子)的核苷酸序列。轉錄單元可編碼非編碼RNA。非編碼RNA為未轉譯成蛋白質之RNA分子。非編碼RNA之實例包括微RNA。轉錄單元之邊界通常藉由在其5'端之起始位點及在其3'端之轉錄終止子來測定。「調節區」為調節可操作地連接之轉錄單元之表現的核苷酸序列。調節序列之非限制性實例包括啟動子、強化子、轉錄起始位點、轉譯開始位點、轉譯終止位點、轉錄終止子及poly(A)信號。位於轉錄單元上游之調節區可稱作5' UTR，且位於轉錄單元下游之調節區可稱作3' UTR。調節區可經轉錄且為未經加工之preRNA之一部分。

【0044】 在本文檔之上下文中，術語「目標」或「目標基因」係指當調節時更改病毒產生之一些態樣之任何基因，包括蛋白質編碼基因及非編碼RNA (例如miRNA)。目標基因包括內源基因、病毒基因及轉基因。

【0045】 關於基因標示，單個基因通常由多個符號表示。在本文檔之上下文中，基因符號不論其為人類或非人類，可藉由大寫字母或小寫字母來指定。在此等揭示內容之上下文中，既不使用一個特定符號亦不採用小寫或大寫符號意欲限制基因之範疇。除非另外鑑別，否則本文中所鑑別之所有基因鑑別號(GeneID)來源於美國國家生物技術資訊中心「英特茲基因(Entrez Gene)」或KEGG網站。

【0046】 術語「約」在本文中用於意謂大致、大約、大概或約。當術語「約」與數值範圍結合使用時，其藉由向上或向下擴展所闡述數值之邊界來修改其範圍。

【0047】 如本發明中所使用，不論在過渡片語中抑或在申請專利範圍之正文中，術語「包含(comprise/comprising)」應解釋為具有開端式含義。亦即，術語應與片語「至少具有」或「至少包括」同義地解釋。當用

於方法之上下文中時，術語「包含」意謂方法至少包括所敘述之步驟，但可包括額外步驟。當用於組合物之上下文中時，術語「包含」意謂組合物至少包括所敘述之特徵或組分，但亦可包括額外特徵或組分。

【0048】 出於促進對本文中所描述之實施例之理解之目的，作出對較佳實施例及特定語言之參考用於描述相同者。本文中所使用之術語僅出於描述特定實施例之目的，且不意欲限制本發明之範疇。如本發明通篇所使用，除非上下文另外明確指定，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個參考物。除非另外指指示，否則本文中所使用之所有百分比及比率均以重量計。

【0049】 除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬之一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。儘管與本文中所描述之方法及材料類似或等效之方法及材料可用於本發明之實踐或測試中，但下文描述適合之方法及材料。另外，材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲為限制性的。本文中所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均以引用之方式併入。

腺相關病毒(AAV)

【0050】 AAV為感染人類及一些其他靈長類物種之小型、複製缺乏型、無包膜病毒。未知AAV會引起疾病且引發極輕度之免疫反應。利用AAV之基因療法載體可感染分裂及靜止細胞兩者且可以染色體外狀態保持而不整合至宿主細胞之基因組中。此等特徵使AAV成為用於基因療法之有吸引力的病毒載體。AAV包括許多血清學上可識別之類型(包括血清型AAV-1至AAV-12)以及超過100種來自非人類靈長類動物之血清型(參見例如 Srivastava, J. Cell Biochem., 105(1): 17-24 (2008) 及 Gao 等人, J.

Virol., 78(12), 6381-6388 (2004))。AAV為非自主複製的，且具有含潛伏期及感染期之生命週期。在潛伏期中，在細胞用AAV感染之後，AAV位點作為原病毒特異性整合至宿主之基因組中。除非細胞亦經輔助病毒(例如，腺病毒(AV)或單純疱疹病毒(*herpes simplex virus*))感染，從而允許AAV複製，否則感染期不會發生。

【0051】 野生型AAV基因組含有兩種145個核苷酸之反向末端重複序列(*inverted terminal repeat*；ITR)，其含有導引AAV複製、基因組包裹及整合之信號序列。除ITR以外，三個AAV啟動子p5、p19及p40驅動兩個編碼rep及cap基因之開放閱讀框架之表現。與單個AAV內含子之差異剪接偶合之兩個rep啟動子使得自rep基因產生四個rep蛋白(Rep 78、Rep 68、Rep 52及Rep40)。Rep蛋白負責基因組複製。cap基因由p40啟動子表現，且編碼三種為cap基因之剪接變體之衣殼蛋白(VP1、VP2及VP3)。此等蛋白質形成AAV粒子之衣殼。

【0052】 由於用於複製、包裹及整合之順式作用信號含於ITR內，所以4.3 kb內部基因組之一些或所有可經外源DNA (例如用於所關注之外源蛋白質之表現卡匣)置換。在此情況下，rep及cap蛋白以反式形式提供於例如質體上。為產生AAV載體，容許AAV複製之細胞株必須表現rep及cap基因、ITR側接之表現卡匣及由輔助病毒(例如AV基因E1a、E1b55K、E2a、E4orf6及VA)提供之輔助功能(Weitzman等人, *Adeno-associated virus biology. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*, 第1-23頁, 2011)。產生AAV載體亦可導致在使用AAV載體之前必須移除或不活化之輔助病毒粒子產生。許多細胞類型適合於產生AAV載體，包括HEK293細胞、COS細胞、HeLa細胞、BHK細胞、Vero細胞以及昆蟲細

胞(參見例如美國專利第6,156,303號、第5,387,484號、第5,741,683號、第5,691,176號、第5,688,676號、第8,163,543號；美國公開案第20020081721號；PCT公開案第WO00/47757號、第WO00/24916號及第WO96/17947號)。AAV載體通常由含有ITR側接之表現卡匣之一個質體及提供額外AAV及輔助病毒基因之一或多個額外質體在此等細胞類型中產生。

【0053】 任何血清型之AAV可用於本發明中。類似地，設想可使用任何AV類型，且熟習此項技術者將能夠鑑別適合於產生其所需重組AAV載體(rAAV)之AAV及AV類型。AAV及AV粒子可例如藉由親和力層析法、碘克沙醇梯度(iodixonal gradient)或CsCl梯度來純化。

【0054】 野生型AAV之基因組為單股DNA且為4.7 kb。AAV載體可具有大小為4.7 kb或大於或小於4.7 kb之單股基因組，包括與5.2 kb一樣大或與3.0 kb一樣小之過尺寸基因組。此外，載體基因組可實質上為自身互補型，使得在病毒內基因組實質上為雙股的。含有所有類型之基因組的AAV載體適用於本發明之方法中。

【0055】 如上文所論述，AAV需要與輔助病毒共感染以便進入其生命週期之感染期。輔助病毒包括腺病毒(AV)及單純疱疹病毒(HSV)，且存在使用桿狀病毒在昆蟲細胞中產生AAV的系統。亦已提議乳頭狀瘤病毒亦可向AAV提供輔助功能(參見例如Hermonat等人, *Molecular Therapy* 9, S289-S290 (2004))。輔助病毒包括能夠產生且允許AAV複製之任何病毒。AV為非包膜(nonenveloped)核DNA病毒，其中雙股DNA基因組為大致36 kb。AV能夠藉由提供E1a、E1b55K、E2a、E4orf6及VA基因來拯救細胞中之潛伏AAV原病毒，從而允許AAV複製及包裹。HSV為具有包裹

於二十面體衣殼中之相對較大的雙股直鏈DNA基因組之病毒家族，該二十面體衣殼纏繞於脂質雙層包膜中。HSV具有感染性及高度傳染性。以下HSV-1複製蛋白經鑑別為AAV複製所必需的：解螺旋酶/引物酶複合物(UL5、UL8及UL52)及將由UL29基因編碼之蛋白質ICP8與增強輔助功能之其他蛋白質結合之DNA。AAV包裝系統服務兩個目的：其規避轉染過程之問題及提供基於使用一種或若干種輔助功能之生產技術。

rAAV之產生

【0056】可在其他處綜述rAAV之一般原理(參見例如Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 3:533-539；及Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.*, 158:97-129)。一般而言，為允許產生rAAV，細胞必須具備可例如側接所關注之異源核苷酸序列之AAV ITR、AAV rep及cap基因功能以及額外輔助功能。可使用任何數目之適當質體或載體向細胞提供此等功能。額外輔助功能可由例如腺病毒(AV)感染、由攜帶所有所需AV輔助功能基因之質體或由其他病毒(諸如HSV或桿狀病毒)提供。利用細胞產生rAAV所必需之任何基因、基因功能或基因物質可短暫地存在於細胞內或穩定地插入至細胞基因組中。適合與本發明之方法一起使用之rAAV產生方法包括揭示於以下中之彼等：Clark等人, *Human Gene Therapy* 6:1329-1341 (1995)、Martin等人, *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269 (2013)、Thorne等人, *Human Gene Therapy* 20:707-714 (2009)、Fraser Wright, *Human Gene Therapy* 20:698-706 (2009)及Virag等人, *Human Gene Therapy* 20:807-817 (2009)。用於AAV產生系統之兩種主要途徑為重組腺相關病毒(rAAV)包裝細胞株及腺相關病毒(rAAV)生產細胞株。

重組腺相關病毒(rAAV)包裝及/或生產細胞株

【0057】 rAAV包裝細胞株可藉由允許本文中所描述之AAV基因元件之細胞表現來產生。用編碼AAV *rep*及*cap*基因之質體穩定轉染細胞株(例如, HEK293、HeLa)可導致包裝細胞株之產生。此rAAV包裝細胞株可與兩種不同腺病毒(輔助病毒及含有AAV基因療法元件之雜交病毒)共感染以產生rAAV粒子。替代地, 用含有rAAV載體之質體穩定轉染包裝細胞或其用rAAV載體之感染導致rAAV生產細胞株。用輔助病毒感染生產細胞導致rAAV產生。圖1說明包裝及生產細胞株。

【0058】 在本發明之某些實施例中, 包含AAV *rep*及*cap*基因功能之rAAV包裝細胞株經工程化以增加rAAV效價。

【0059】 在一個態樣中, 本發明提供rAAV包裝細胞株, 其包含其中與對照親本細胞相比一或多個基因及/或蛋白質之表現經降低的細胞。舉例而言, 與對照親本細胞相比, ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低。

【0060】 在一些實施例中, 本發明提供rAAV包裝細胞株, 其包含其中與對照親本細胞相比KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現經降低的細胞。

【0061】 在其他實施例中, 本發明提供rAAV生產細胞株, 其包含其中與對照親本細胞相比一或多個基因及/或蛋白質之表現經降低的細胞。舉例而言, 與對照親本細胞相比, ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低。在一些實施例中, 本發明之

rAAV 生產細胞株經工程化以降低 KCNN2、LINC00319、RGMA 及 SPANXN3 之基因表現。

【0062】 在某些實施例中，本發明之細胞株可呈黏附或懸浮形式。

【0063】 在某些實施例中，本發明之細胞株(例如，rAAV 包裝及/或生產細胞株)為哺乳動物細胞株(例如 HeLa、人類胚腎(HEK) 293、COS、A549 或 Vero 細胞株)。在某些實施例中，細胞株為昆蟲細胞株(例如，Sf9、Sf-21、Tn-368 或 BTI-Tn-5B1-4)。

產生 rAAV 生產細胞株之方法

【0064】 在一些實施例中，本發明提供一種藉由將 rAAV 載體遞送至工程化 rAAV 包裝細胞株來產生生產細胞株之方法，該工程化 rAAV 包裝細胞株包含其中與對照細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2 及/或 NALCN-AS1 之表現經降低的細胞。

【0065】 在某些實施例中，本發明提供一種藉由將 rAAV 載體遞送至工程化 rAAV 包裝細胞株來產生生產細胞株之方法，該工程化 rAAV 包裝細胞株包含其中與對照親本細胞相比，KCNN2、LINC00319、RGMA 及 SPANXN3 之表現經降低的細胞。

補充劑

【0066】 如本文中所使用，術語「補充劑」係指任何化合物或其他材料，不論來源為化學的或生物學的，其可用於細胞培養之培養基中以增加 rAAV 效價或對 rAAV 效價之增加進行分析。補充劑之非限制性實例包括胺基酸、鹽、金屬、糖、脂質、核酸、激素、維生素、脂肪酸、蛋白質、酶類、核苷、代謝物、界面活性劑、乳化劑、無機鹽及聚合物。在某些實

施例中，添加至本發明之rAAV包裝及/或生產細胞株中之一或多種補充劑為糖皮質激素類似物。在某些實施例中，添加至rAAV包裝及/或生產細胞株中之一或多種補充劑包括地塞米松(dexamethasone)、氫化可體松(hydrocortisone)、潑尼松龍(prednisolone)、甲基潑尼松龍(methylprednisolone)、倍他米松(betamethasone)、可體松(cortisone)、潑尼松(prednisone)、布地奈德(budesonide)及/或曲安西龍(triamcinolone)。

【0067】 在某些實施例中，溶液中用於增加rAAV效價之糖皮質激素類似物之濃度可大於或等於1 μM 、大於或等於0.1 μM 、大於或等於0.01 μM 、在0與1 μM 之間、在0與0.1 μM 之間、在0與0.01 μM 之間、在0.01與1 μM 之間或在0.01與0.1 μM 之間。

【0068】 如本文中所使用，「補充細胞株」係指其中添加一或多種補充劑(例如糖皮質激素類似物)以增加rAAV效價之細胞株(例如，rAAV包裝及/或生產細胞株)。如本文中所使用，「非補充細胞株」係指未暴露於用於增加rAAV效價之一種或多種補充劑之細胞株(例如，rAAV包裝及/或生產細胞株)。如本文中所使用，術語「非補充」及「未補充」可互換地使用以指代細胞株(例如，rAAV包裝及/或生產細胞株)未暴露於用於增加rAAV效價之一種或多種補充劑的培養條件。

鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因之方法

【0069】 在某種程度上，本發明係關於一種藉由比較補充及非補充細胞株中之全局基因表現模式來鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因的方法。

【0070】 術語「全局基因表現」為此項技術中所熟知(參見Wang Z.

等人, *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63 (2009))。術語「全局基因表現」係指含有關於基因表現之不同態樣之資訊之一或多個資料集。資料集視情況包括關於以下之資訊：細胞或細胞衍生之樣品中目標轉錄物之存在；目標轉錄物之相對及絕對豐度水準；多個處理(例如，添加補充劑)調節特定基因表現之能力；及多個處理(例如，添加補充劑)將特定基因之表現變為不同水準之能力。

【0071】術語「差異性表現」為此項技術中所熟知(參見Wang Z.等人, *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63 (2009)、Ozsolak, F.等人 *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 87-98 (2011)、Han, Y.等人 *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 29-46 (2015))。

【0072】在某些實施例中，本發明之細胞株(例如，rAAV包裝及/或生產細胞株)補充有增大rAAV產生之一或多種補充劑。在一些實施例中，使用熟知程序中之任一者自一或多種細胞株(補充及非補充)萃取RNA樣品。舉例而言，總RNA可使用呈自動相容性、96孔格式之基於矽石之分離，諸如Rneasy® 純化平台(Qiagen, Inc.; Valencia, Calif.)自細胞純化。

【0073】所表現RNA樣品中之基因表現模式可藉由定性及定量量測任一者(或兩者)來評價。在一些實施例中，其適用於定量相對於其他表現產物及/或相對於對照序列之基因表現量。一個測定相對表現之適宜且可廣泛適用的方法係將所關注之一或多個基因之表現與對照基因，諸如管家基因(例如，HPRT1、HSP70或 β -肌動蛋白)之表現進行比較。

【0074】為確定所觀測之表現資料，例如基因表現譜回應於生物樣品(例如，補充及非補充細胞株)之一或多個處理(例如，添加補充劑)的變

化是否為顯著的，且例如不僅實驗雜訊或群體異源性之結果，對於各生物樣品中之各基因及表現型終點，可建構機率分佈之估算。建構所估算之群體分佈涉及對各處理進行多個獨立實驗，例如將所有實驗進行重複兩次、重複三次、重複四次或其類似者。來自多個生物樣品(例如，補充及非補充細胞株)之表現資料可使用多變量統計來分組或成簇。資料分析可產生回應於處理，例如在補充與非補充細胞株之間差異性表現之基因之清單。差異性表現之基因之清單可使用多個基因篩選方法篩選以鑑別適用於增大rAAV產生之一或多個基因。

【0075】 在一些實施例中，本發明係關於自在補充與非補充細胞株之間差異性表現之基因清單鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因之方法。在某些實施例中，細胞株為真核細胞株。在某些實施例中，細胞株為人類細胞株。在某些實施例中，細胞株為HeLa細胞株或HEK293細胞株。在某些實施例中，全局基因表現在不同細胞株(例如，在非補充HeLa與補充HeLa細胞株之間、在非補充HEK 293與補充HEK 293細胞株之間、在非補充HeLa與補充HEK 293細胞株之間、在非補充HeLa與非補充HEK 293細胞株之間、在補充HeLa與補充HEK 293細胞株之間)中量測以鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因。在某些實施例中，來自補充HEK 293及補充HeLa之全局基因表現資料可與來自非補充HEK 293及非補充HeLa細胞株之組合全局基因表現資料組合且比較以鑑別與rAAV產生有關之一或多個基因。

【0076】 在某些實施例中，本發明提供一種產生rAAV包裝及/或生產細胞株以促進rAAV產生增加之方法。在一些實施例中，rAAV產生藉由調節自在補充與非補充rAAV生產細胞株之間差異性表現之基因清單鑑別

之一或多個基因及/或蛋白質之表現來增加。在某些實施例中，rAAV之效價藉由調節自在補充與非補充rAAV生產細胞株之間差異性表現之基因清單鑑別之一或多個基因及/或蛋白質之表現來增加。在一些實施例中，與在不調節對應基因及/或蛋白質之表現的情況下由細胞株產生之rAAV效價相比，rAAV效價增加至少1.5倍(例如2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍或30倍)。

經調節基因及/或蛋白質

【0077】 在某些實施例中，本發明提供當在rAAV包裝及/或生產細胞株中(單獨地或組合地)調節時增強rAAV產生之基因之清單。

【0078】 ATP合成酶F1次單元 ϵ 假基因2 (亦已知為ATP5EP2)編碼ATP合成酶次單元 ϵ 樣蛋白、粒線體。ATP5EP2為在由呼吸鏈之電子傳遞複合物產生之跨膜質子梯度存在下由ADP產生ATP的粒線體膜ATP合成酶。人類ATP5EP2序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_006886.4或NR_022162.1獲得。

【0079】 長基因間非蛋白質編碼RNA 319 (亦已知為LINC00319)為RNA基因且附屬於非編碼RNA類別。長非編碼RNA (lncRNA)經展示以在多種癌症之致病機制及進展中發揮重要調節作用。LINC00319序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_194309或NR_026960.1獲得。

【0080】 細胞色素P450家族3子族A成員7 (亦已知為CYP3A7)為編碼參與藥物代謝及膽固醇、類固醇及其他脂質之合成之酶類之細胞色素P450超家族之成員的基因。此酶使甾固酮及去氫表雄固酮3-硫酸酯羥基化，其在妊娠期間參與雌三醇之形成。此基因為染色體7q21.1上之一簇有

關基因之一部分。CYP3A7序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_000765獲得。

【0081】 ATP結合卡匣子族A成員10 (亦已知為ABCA10)編碼屬於ATP結合卡匣(ABC)轉運體之超家族之成員的膜相關蛋白。ABC蛋白質跨越胞外膜及胞內膜轉運各種分子。ABC基因劃分成七個相異的子族(ABC1、MDR/TAP、MRP、ALD、OABP、GCN20及White)。ABCA10為ABC1子族之成員。ABC1子族之成員包含多細胞真核生物中排他性發現之唯一主要ABC子族。此基因在17q24上成簇於四個其他ABC1家族成員中。ABCA10序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_080282.3獲得。

【0082】 諾金(Noggin) (亦已知為NOG)編碼結合且不活化轉化生長因子- β (TGF- β)超家族信號傳導蛋白，諸如骨形態生成蛋白-4 (BMP4)之成員的分泌多肽。在不受理論束縛之情況下，咸信藉由經由胞外基質漫射比TGF- β 超家族之成員更有效，此蛋白質可在產生形態形成梯度方面具有主要作用。NOG似乎在發展早期以及後階段兩者均具有多效性效果。NOG序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_005450.4獲得。

【0083】 反義導向分子BMP共受體A (亦已知為RGMA)為編碼反義導向分子家族成員之基因。所編碼蛋白質為在發育及成年中樞神經系統中充當軸突導向蛋白之糖基化磷脂醯肌醇錨定之糖蛋白。此蛋白質亦可充當一些癌症中之腫瘤抑制劑。RGMA序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_020211.2或NM_001166283.1獲得。

【0084】 SPANX (與X染色體上之細胞核相關之精子蛋白)家族成員

N3 (亦已知為SPANXN3)為蛋白質編碼基因。SPANXN3序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_001009609獲得。

【0085】胃蛋白酶原-5 I族(亦已知為PGA5或胃蛋白酶原A)編碼消化酶胃蛋白酶(內肽酶之肽酶A1家族之成員)之蛋白質前驅體。經編碼前驅體由胃主要細胞分泌且在酸性條件下經歷自催化裂解以形成在膳食蛋白質之消化中起作用之活性酶。此基因發現於染色體11上之一簇有關基因中，其中之每一者編碼多個胃蛋白酶原中之一者。PGA5序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_014224.4獲得。

【0086】肌凝蛋白VIIA及Rab相互作用蛋白(亦已知為MYRIP)編碼參與黑素體轉運之Rab效應蛋白，該Rab效應蛋白用作黑素體結合之RAB27A與運動蛋白MYO5A及MYO7A之間的連接。此Rab效應蛋白充當蛋白激酶A錨定蛋白(protein kinase A-anchoring protein；AKAP)且可充當將PKA連接至胞外分泌機構之組分的骨架蛋白，由此促進胞外分泌(包括胰島素釋放)。MYRIP序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_015460或NM_001284423.1獲得。

【0087】鉀鈣活化通道子族N成員2 (亦已知為KCNN2)基因為鉀通道基因之KCNN家族之成員。所編碼蛋白質為與三種其他調鈣蛋白結合次單元形成與電壓無關之鈣活化通道(voltage-independent calcium-activated channel)的完整膜蛋白。此基因之選擇式剪接(alternate splicing)產生多種轉錄變異體。KCNN2序列之實例可根據NCBI核苷酸資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NM_170775.2或NM_001278204.1獲得。

【0088】NALCN反義RNA 1 (亦已知為NALCN-AS1)為RNA基因且附屬於非編碼RNA類別。NALCN-AS1序列之實例可根據NCBI核苷酸

資料庫(核苷酸序列)中之參考序列NC_000013.11或NR_047687.1獲得。

【0089】 在某些實施例中，本發明提供rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含其中與對照親本細胞相比，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現經降低的細胞。

【0090】 在某些實施例中，本發明提供rAAV包裝及/或生產細胞株，其包含其中與對照親本細胞相比，KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現經降低的細胞。

【0091】 在某些實施例中，本發明提供當在rAAV包裝及/或生產細胞株中單獨地調節時與對照親本細胞株相比，增強rAAV產生之基因之清單。在一些態樣中，調節rAAV包裝及/或生產細胞株中之不同基因組合增加了rAAV之產生。在一些態樣中，與對照親本細胞株相比，調節rAAV包裝及/或生產細胞株中至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個或至少11個基因之表現導致rAAV產生增加。

調節一或多個基因及/或蛋白質之方法

【0092】 調節(例如降低)基因(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1)之表現或活性可藉由不同機制，包括(但不限於)更改以下中之一或多者來達成：1)基因複本數、2)基因之轉錄或轉譯、3)轉錄物穩定性或耐久性、4) mRNA或miRNA之複本數、5)非編碼RNA或非編碼RNA目標位點之可用性、6)蛋白質上之轉譯後修飾之位置或程度、7)蛋白質之活性。可用於調節基因表現之工具包括(但不限於)核酸酶、雙

股RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、微RNA (miRNA)、反義RNA寡核苷酸(ASO)、基因破壞或部分或完全基因缺失。

核酸酶

【0093】 在某些實施例中，基因調節使用鋅指核酸酶(ZFN)來達成。合成ZFN由與例如FokI DNA裂解域融合之鋅指結合域組成。ZFN可經設計/工程化以用於在廣泛範圍之生物體中編輯細胞之基因組，包括(但不限於)基因剔除或基因嵌入基因表現。巨核酸酶、轉錄活化因子樣效應物核酸酶(TALEN)或成簇規律間隔短回文重複序列(CRISPR)相關蛋白及三顯體亦可用於一大批細胞類型之基因組工程。所描述之試劑可用於靶向啟動子、蛋白質編碼區(外顯子)、內含子、5'及3' UTR以及更多。

用於調節之雙股RNA (dsRNA)分子

【0094】 在某些實施例中，雙股RNA (dsRNA)分子可用於調節本文中所述之細胞株(例如，rAAV包裝及/或生產細胞株)中一或多個基因之表現。dsRNA分子可經設計以藉由對對應RNA序列之基於序列同源性之靶向來拮抗一或多個基因。此等dsRNA可為小干擾RNA (siRNA)、小髮夾RNA (shRNA)或微RNA (miRNA)。此等dsRNA之序列將包含編碼待調節之一或多個基因之mRNA之互補部分。此部分可與mRNA內之目標部分100%互補，但亦可使用較低水準之互補(例如，90%或更高或95%或更高)。通常，在一段相鄰核酸殘基上測定互補百分比。本發明之dsRNA分子可例如與在至少10個、至少20個、至少30個、至少40個、至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90個或更多個核酸殘基上量測之mRNA內的目標部分具有至少80%互補。在一些情況下，dsRNA分子在dsRNA分子之整個長度上與mRNA之目標部分具有至少80%互補。

【0095】 使用RNA干擾(RNAi)路徑之另一基因靶向試劑為小髮夾RNA (亦稱作shRNA)。經由例如表現構築體(例如，質體、慢病毒)向細胞遞送之shRNA具有視所採用之啟動子類型而以組成性或調節方式提供基因表現長期降低的能力。在一個實施例中，慢病毒粒子之基因組經修飾以包括靶向所關注之一個基因(或多個基因)之一或多個shRNA表現卡匣。此等慢病毒可感染細胞，將其病毒基因組穩定整合至宿主基因組中且以組成性、調節或(在正表現多個shRNA之情況下)組成性及調節方式表現shRNA。因此，在一些實施例中，shRNA可經設計以靶向單個基因或多個緊密相關之基因家族成員之個別變體。個別shRNA可調節具有類似或冗餘功能或序列基序之目標之集合。熟習此項技術者應認識到慢病毒構築體亦可併入經選殖DNA或ORF表現構築體。

【0096】 在本文所描述之實施例中，包括小干擾RNA (siRNA)以及微RNA (miRNA)之基因靶向試劑可用於調節基因功能。siRNA及miRNA可併入廣泛範圍之化學修飾、與所關注之目標轉錄物之互補水準及設計(參見美國專利第8,188,060號)以增強穩定性、細胞遞送、特異性及功能性。另外，此等試劑可經設計以靶向基因之不同區域(包括5' UTR、開放閱讀框架、mRNA之3' UTR)或(在一些情況下)編碼所關注之基因的基因組DNA之啟動子/強化子區域。基因調節(例如，降低基因表現、阻斷基因表現)可藉由引入(至細胞中)單個siRNA或miRNA或靶向相同mRNA轉錄物之不同區域的多個siRNA或miRNA庫來達成。合成siRNA/miRNA遞送可藉由包括(但不限於)以下之任何數目個方法來達成：1)自動遞送、2)脂質介導之遞送、3)電穿孔或4)基於載體/質體之表現系統。所引入之RNA分子可稱作外源核苷酸序列或聚核苷酸。在一些實施例中，siRNA可經設

計以靶向單個基因或多個緊密相關之基因家族成員之個別變體。

【0097】 siRNA 可用於降低一或多個基因(例如, ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1)之表現。在一些實施例中,用於降低目標基因表現之siRNA選自SEQ ID NO: 1至11或其變體。

【0098】

表1：用於降低基因表現之siRNA序列。

SEQ ID NO:	目標基因	siRNA序列*
SEQ ID NOS 1及32	ATP5SEP2	正義：GCAACAGCGUAAAAAUUGUtt (SEQ ID NO: 1) 反義：ACAAUUUUUACGCUGUUGCca (SEQ ID NO: 32)
SEQ ID NOS 2及33	LINC00319	正義：CGGUGUCCACAGUCCUUGAtt (SEQ ID NO: 2) 反義：UCAAGGACUGUGGACACCGgt (SEQ ID NO: 33)
SEQ ID NOS 3及34	CYP3A7	正義：CAAGAAAAGUUUAUAAGUUUtt (SEQ ID NO: 3) 反義：AAACUUAUAACUUUUCUUGga (SEQ ID NO: 34)
SEQ ID NOS 4及35	NOG	正義：CGGAGGAAGUUACAGAUGUtt (SEQ ID NO: 4) 反義：ACAUCUGUAACUCCUCCGca (SEQ ID NO: 35)
SEQ ID NOS 5及36	SPANXN3	正義：AGAUGCAAGAGGUACCAAAtt (SEQ ID NO: 5) 反義：UUUGGUACCUCUUGCAUCUca (SEQ ID NO: 36)
SEQ ID NOS 6及37	MYRIP	正義：GGUGUCGGAUGAUUUAUCAtt (SEQ ID NO: 6) 反義：UGAUAAAUCAUCCGACACctg (SEQ ID NO: 37)
SEQ ID NOS 7及38	KCNN2	正義：GAAGCUAGAACUUACCAAAtt (SEQ ID NO: 7) 反義：UUUGGUAAGUUCUAGCUUCct (SEQ ID NO: 38)
SEQ ID NOS 8及39	NALCN-AS1	正義：GGAUGUCUUUCCUAGGAGAtt (SEQ ID NO: 8) 反義：UCUCCUAGGAAAGACAUCcCaa (SEQ ID NO: 39)

SEQ ID NO:	目標基因	siRNA序列*
SEQ ID NOS 9及40	RGMA	正義：CGCUCAUCGACAAUAAUUA _{tt} (SEQ ID NO: 9) 反義：UAAUUAUUGUCGAUGAGCG _{gc} (SEQ ID NO: 40)
SEQ ID NOS 10及41	PGA5	正義：CACUUUAGAUGUAUCUAAU _{tt} (SEQ ID NO: 10) 反義：AUUAGAUACAUCUAAAGUG _{gg} (SEQ ID NO: 41)
SEQ ID NOS 11及42	ABCA10	正義：GGAGCAUAAAGUAGACCGA _{tt} (SEQ ID NO: 11) 反義：UCGGUCUACUUUAUGCUC _{tt} (SEQ ID NO: 42)

*用於降低基因表現之siRNA序列(正義及反義)。序列中之小寫核苷酸表示3'突出物。

【0099】 在一些實施例中，用於降低ATP5EP2表現之siRNA為SEQ ID NO: 1或其變體。在一些實施例中，用於降低LINC00319表現之siRNA為SEQ ID NO: 2或其變體。在一些實施例中，用於降低CYP3A7表現之siRNA為SEQ ID NO: 3或其變體。在一些實施例中，用於降低NOG表現之siRNA為SEQ ID NO: 4或其變體。在一些實施例中，用於降低SPANXN3表現之siRNA為SEQ ID NO: 5或其變體。在一些實施例中，用於降低MYRIP表現之siRNA為SEQ ID NO: 6或其變體。在一些實施例中，用於降低KCNN2表現之siRNA為SEQ ID NO: 7或其變體。在一些實施例中，用於降低NALCN-AS1表現之siRNA為SEQ ID NO: 8或其變體。在一些實施例中，用於降低RGMA表現之siRNA為SEQ ID NO: 9或其變體。在一些實施例中，用於降低PGA5表現之siRNA為SEQ ID NO: 10或其變體。在一些實施例中，用於降低ABCA10表現之siRNA為SEQ ID NO: 11或其變體。

反義RNA寡核苷酸(ASO)

【0100】反義RNA寡核苷酸(ASO)可用於調節rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個基因之表現。通常，ASO用於降低一或多個基因之表現。使用已知技術及基於對待調節之一或多個基因之序列之瞭解，ASO分子可經設計以藉由對對應RNA之基於序列同源之靶向來拮抗一或多個基因。ASO序列可包含與由一或多個基因產生之mRNA或lncRNA之目標部分互補的核苷酸序列。此部分可與mRNA或lncRNA內之目標部分100%互補，但亦可使用較低水準之互補(例如，90%或更高或95%或更高)。

【0101】在一些實施例中，ASO可為反義RNA寡核苷酸，其中序列之至少一個核苷鍵為硫代磷酸酯鍵、二硫代磷酸酯鍵、磷酸三酯鍵、烷基磷酸酯鍵、胺基烷基磷酸三酯鍵、磷酸伸烷基酯鍵、亞磷酸酯鍵、胺基磷酸酯鍵及胺基烷基胺基磷酸酯鍵、硫代胺基磷酸酯鍵、硫代烷基磷酸酯鍵(thionoalkylphosphonate linkage)、硫代烷基磷酸三酯鍵(thionoalkylphosphotriester linkage)、硫代磷酸酯鍵、硒磷酸酯鍵或硼烷磷酸酯鍵。在一特定實施例中，反義RNA寡核苷酸序列之至少一個核苷間鍵為硫代磷酸酯鍵。在一些實施例中，反義RNA寡核苷酸序列之所有核苷間鍵為硫代磷酸酯鍵。

CRISPR基因組編輯

【0102】在一些實施例中，調節rAAV包裝及/或生產細胞株中之基因表現使用CRISPR基因組編輯來進行。CRISPR基因組編輯通常包含兩個相異組分：(1)導引RNA及(2)核酸內切酶，特定言之CRISPR相關(Cas)之核酸酶(例如，Cas9)。導引RNA為進入至單個嵌合導引RNA (gRNA)轉錄物中的內源性細菌crRNA及tracrRNA之組合。在不受理論束縛之情況下，咸信當gRNA及Cas表現於細胞中時，可修飾或持久性破環基因組目

標序列。

【0103】 gRNA/Cas複合物藉由gRNA序列與基因中目標DNA序列之互補序列之間的鹼基配對經募集至目標序列以用於降低(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1)。對於Cas之成功結合，基因組目標序列亦必須含有緊接著目標序列之正確的前間隔序列相鄰基序(Protospacer Adjacent Motif；PAM)序列。gRNA/Cas複合物之結合將Cas局域化至本發明之一或多個基因中之基因組目標序列以使得野生型Cas可剪切DNA之兩股從而造成雙股斷裂。此可經由兩個通用修復路徑中之一者來修復：(1)非同源末端連接DNA修復路徑或(2)同源定向修復路徑。非同源修復路徑可導致雙股斷裂處之插入/缺失，此可引起框移及/或過早終止密碼子，從而有效地破壞目標基因之開放閱讀框架。同源定向修復路徑需要用於固定雙股斷裂之修復模板之存在。

【0104】 任何適當gRNA對可用於CRISPR基因組編輯。通常，gRNA對用於降低一或多個基因(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及NALCN-AS1)之表現。在本文中所描述之一些實施例中，gRNA對用於調節(例如降低或消除/基因剔除)ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之表現。

【0105】 gRNA對可使用已知技術及基於對待調節之一或多個基因之序列的瞭解，通常使用任何可公開獲得之適當電腦程式來設計。基因剔除包裝及/或生產細胞可使用任何適當技術來產生，其中標準技術為此項

技術中已知的且適合之套組為可商購的。

【0106】 gRNA對可藉由任何適當手段遞送至本發明之生產細胞株。適合之技術為此項技術中已知的，且包括使用將gRNA對遞送至生產細胞株之質體、病毒及細菌載體。通常，使用質體DNA遞送gRNA對。

【0107】 gRNA對可用於降低基因(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及NALCN-AS1)中之一或多者之表現。多個gRNA對可用於調節基因之表現。在本文中所描述之一些實施例中，gRNA對用於降低ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1中之至少一者之表現。多個gRNA對可用於調節KCNN2、LINC00319、RGMA及SPANXN3之表現。在一些實施例中，gRNA可經修飾以藉由增加與目標位點之結合且抑制核酸酶降解來增強編輯效率。在某些實施例中，此等修飾可為gRNA之5'及3'端兩者上之三個末端核苷酸中之2' O-甲基類似物及3'硫代磷酸酯核苷酸間鍵。由用於調節一或多個基因之基因表現之gRNA對靶向的例示性目標DNA序列可包含選自列於表2中之SEQ ID NO: 16至31之核苷酸序列中之任一者，或其變體。

表2：例示性gRNA對及目標DNA序列

SEQ ID NO:	序列
KCNN2	
SEQ ID NO: 12	UUGCCACUACAGCUACCACC
SEQ ID NO: 13	CCAAUGUACUCAGGGAAACA
SEQ ID NO: 14	AGUCCACCAAAGUGUUUGCU
SEQ ID NO: 15	AAAGGAGUCUGCUUACUAC
KCNN2	
SEQ ID NO: 16	TTGCCACTACAGCTACCACC
SEQ ID NO: 17	CCAAUGUACUCAGGGAAACA

SEQ ID NO: 18	AGUCCACCAAAGUGUUUGCU
SEQ ID NO: 19	AAAGGAGUCUGCUUACUAC
RGMA	
SEQ ID NO: 20	CTTCTCGTAATGGCAGATCT
SEQ ID NO: 21	GCACTTGAGGATCTTGCACG
SEQ ID NO: 22	GAGGTCCTCTATGCCATGGA
SEQ ID NO: 23	CCATACCCATCCATCCAGCT
SPANXN3	
SEQ ID NO: 24	CCCATGTGAAGGACCTTCAA
SEQ ID NO: 25	GTTCTTCAAACCTCTGTTCGG
SEQ ID NO: 26	GAAGGCGTAGACTTATCTGA
SEQ ID NO: 27	AGCCAACCTCCAGCACCAAT
LINC00319	
SEQ ID NO: 28	GGGCAATGGACCTTCTGCCT
SEQ ID NO: 29	GGCTGCGGGGCAGAGGGCAA
SEQ ID NO: 30	CGGGCAGGCTGCGGGGCAGA
SEQ ID NO: 31	ACGGGCAGGCTGCGGGGCAG

【0108】 變體gRNA序列可與在任何適當長度之序列上所量測之本發明之序列具有至少80%序列一致性。通常，在一段相鄰核酸上測定序列一致性百分比。本發明之變體gRNA序列可例如與在至少10個、至少11個、至少12個、至少13個、至少14個、至少15個、至少16個、至少17個、至少18個、至少19個、至少20個、至少21個、至少22個、至少23個、至少24個或更多個核酸殘基上所量測之本發明之序列具有至少80%序列一致性。在一些實施例中，變體gRNA分子在變體gRNA分子之整個長度上與本發明之gRNA分子具有至少80%序列一致性。在一些實施例中，本發明之變體gRNA分子可為SEQ ID NO:16至30之目標序列之gRNA分子中之一或多者的變體。本發明之gRNA對可包含靶向選自以下之基因之gRNA序列中之一或兩者的變體：ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及NALCN-AS1。舉例而言，SEQ ID NO: 12及13之gRNA對之變體可包含

SEQ ID NO: 12之變體、SEQ ID NO: 13之變體或SEQ ID NO: 12及13之變體。

蛋白質水準下之調節

【0109】在另一實施例中，調節基因之表現及/或活性在蛋白質(例如，多肽)水準下發生。舉例而言，在蛋白質水準下降低基因功能可藉由包括(但不限於)利用小分子、肽、適體、不穩定域靶向蛋白質的方法，或可例如下調基因產物之活性或增強基因產物之降解速率的其他方法來達成。替代地，所表現蛋白質可經修飾以經由定點突變誘發及/或誤義或無義突變之併入來降低或消除生物活性。在一些實施例中，結合例如活性位點且抑制目標蛋白功能之小分子可添加至例如細胞培養基中且藉此引入至包裝及/或生產細胞中。替代地，目標蛋白功能可藉由將例如肽引入至例如防止蛋白質-蛋白質相互作用之細胞(例如包裝及/或生產細胞)中來調節(參見 Shangary 等人，(2009) *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49:223)。此等肽可藉由例如轉染或電穿孔或經由表現構築體引入至細胞(例如包裝及/或生產細胞)中。替代地，肽可藉由添加(例如經由結合)一或多個促進細胞遞送之部分或增強自動遞送之增壓分子(supercharging molecule)來引入至細胞(例如包裝及/或生產細胞)中。用於表現肽之技術包括(但不限於)將肽融合至骨架或連接信號序列以分別將肽穩定或引導至所關注之位置或腔室。在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株包含使用前述方法中之任一者工程化以降低由以下表現之基因產物之表現及/或活性的細胞：ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1。

調節對一或多個基因及/或蛋白質表現之影響

【0110】 在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可用以生成產生rAAV之高效價的rAAV包裝及/或生產細胞株。在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可導致一或多個基因(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1)之表現顯著降低及/或由一或多個基因表現之蛋白質之活性顯著降低(例如，降低至少5%、至少10%、至少20%或更大之降低)。在某些實施例中，目標基因之表現降低約40%至約100% (例如，約40%至約95%、約40%至約90%、約40%至約85%、約40%至約80%、約40%至約75%、約40%至約70%、約40%至約65%、約40%至約60%、約40%至約55%、約40%至約50%、約40%至約45%、約45%至約100%、約50%至約100%、約55%至約100%、約60%至約100%、約65%至約100%、約70%至約100%、約75%至約100%、約80%至約100%、約85%至約100%、約90%至約100%、約95%至約100%；或約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%)。

【0111】 在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可導致由目標基因(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1)表現之蛋白質之活性顯著降低。舉例而言，本文中所描述之方法可導致由目標基因表現之蛋白質之活性降低至少5%、至少10%、至少20%或更大。在某些實施例中，目標基因蛋白活性降低約40%至約100% (例如，約40%至約95%、約40%至約90%、約40%至約85%、約40%至約80%、約40%至

約75%、約40%至約70%、約40%至約65%、約40%至約60%、約40%至約55%、約40%至約50%、約40%至約45%、約45%至約100%、約50%至約100%、約55%至約100%、約60%至約100%、約65%至約100%、約70%至約100%、約75%至約100%、約80%至約100%、約85%至約100%、約90%至約100%、約95%至約100%；或約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%)。此外，一或多個基因之調節可導致多個基因之調節(例如藉由miRNA)。

【0112】 在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可導致基因產物(例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1之基因產物)之表現顯著降低(例如，至少5%、至少10%、至少20%或更大之降低)。在某些實施例中，基因產物之表現降低約40%至約100% (例如，約40%至約95%、約40%至約90%、約40%至約85%、約40%至約80%、約40%至約75%、約40%至約70%、約40%至約65%、約40%至約60%、約40%至約55%、約40%至約50%、約40%至約45%、約45%至約100%、約50%至約100%、約55%至約100%、約60%至約100%、約65%至約100%、約70%至約100%、約75%至約100%、約80%至約100%、約85%至約100%、約90%至約100%、約95%至約100%；或約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%)。

【0113】 在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可導致由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1中之至少一者表現的多肽之表現顯著降低(例如，至少5%、至少10%、至少20%或更大之

降低)。在某些實施例中，多肽之表現降低約40%至約100% (例如，約40%至約95%、約40%至約90%、約40%至約85%、約40%至約80%、約40%至約75%、約40%至約70%、約40%至約65%、約40%至約60%、約40%至約55%、約40%至約50%、約40%至約45%、約45%至約100%、約50%至約100%、約55%至約100%、約60%至約100%、約65%至約100%、約70%至約100%、約75%至約100%、約80%至約100%、約85%至約100%、約90%至約100%、約95%至約100%；或約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%)。

【0114】 在某些實施例中，本發明中所描述之調節方法可導致由 ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2及/或NALCN-AS1中之至少一者表現的多肽之活性顯著降低(例如，至少5%、至少10%、至少20%或更大之降低)。在某些實施例中，經表現多肽之活性降低約40%至約100% (例如，約40%至約95%、約40%至約90%、約40%至約85%、約40%至約80%、約40%至約75%、約40%至約70%、約40%至約65%、約40%至約60%、約40%至約55%、約40%至約50%、約40%至約45%、約45%至約100%、約50%至約100%、約55%至約100%、約60%至約100%、約65%至約100%、約70%至約100%、約75%至約100%、約80%至約100%、約85%至約100%、約90%至約100%、約95%至約100%；或約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%)。

【0115】 在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性的降低維持約5天(例如約6小時、約12小時、約1天、約2天、約3天、約4天、約5天、約6天、約7天、約8天、

約9天、約10天或更長)。

【0116】 在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性的降低意欲例如經由使用基因破壞或部分或完全基因缺失來無限地或持久性地維持。

【0117】 在某些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個基因及/或蛋白質之表現及/或活性的降低在培養中維持rAAV包裝及/或生產細胞株之至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次、至少十次、至少20次、至少30次、至少40次或更多次繼代。

調節對rAAV產生之影響

【0118】 rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個基因及/或蛋白質之調節導致rAAV之效價增加。在一些實施例中，調節導致由rAAV包裝及/或生產細胞株產生之rAAV之效價增加約1.5至約7倍(例如約1.5至約6.5、約1.5至約6、約1.5至約5.5、約1.5至約5、約1.5至約4.5、約1.5至約4、約1.5至約3.5、約1.5至約3.0、約1.5至約2.5、約1.5至約2.0、約2至約7、約2.5至約7、約3至約7、約3.5至約7、約4至約7、約4.5至約7、約5至約7、約5.5至約7、約6至約7、約6.5至約7；或約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、或約7.0)的增加。在一些實施例中，由rAAV包裝及/或生產細胞株產生之rAAV之效價增加至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍或更大。由調節一或多個基因及/或蛋白質造成之rAAV效價之任何增加可與由對照親本細胞株產生之rAAV效價相比較。

【0119】 在一些實施例中，rAAV包裝及/或生產細胞株中一或多個

基因及/或蛋白質之調節可使rAAV效價產生增大至少2天、至少5天、至少20天、至少30天、至少40天、至少50天、至少60天、至少70天、至少80天、至少90天、至少100天或更長。

產生rAAV之方法

【0120】 在某些實施例中，本發明描述一種由經工程化以調節一或多個基因及/或蛋白質表現之rAAV包裝及/或生產細胞株產生rAAV的方法。在某些實施例中，藉由感染將rAAV載體遞送至工程化rAAV包裝細胞株所產生之rAAV生產細胞株的細胞來產生rAAV。在某些實施例中，藉由感染其中已調節一或多個基因及/或蛋白質表現之rAAV生產細胞株之細胞來產生rAAV。在某些實施例中，與對照親本細胞株相比，由工程化rAAV包裝及/或生產細胞株產生rAAV經增強。

【0121】 在某些實施例中，工程化包裝細胞株之細胞用輔助病毒(例如，腺病毒(AV)或單純疱疹病毒)感染，從而允許rAAV複製。在一些實施例中，工程化生產細胞株之細胞用輔助病毒(例如，腺病毒(AV)或單純疱疹病毒)感染。

收集rAAV之方法

【0122】 rAAV粒子可藉由裂解細胞自工程化rAAV包裝及/或生產細胞獲得。工程化rAAV包裝及/或生產細胞之裂解可由以化學方式或以酶方式處理細胞以便釋放感染性病毒粒子之方法實現。此等方法包括使用核酸酶(諸如核酸酶(benzonase)或DNase)、蛋白酶(諸如胰蛋白酶)或清潔劑或界面活性劑。亦可使用物理破壞(諸如均勻化或研磨)或經由微流化床壓力細胞施加壓力或凍融循環。在某些實施例中，來自工程化rAAV包裝及/或生產細胞之裂解物可用於收集rAAV粒子。

【0123】 在某些實施例中，細胞培養上清液可自工程化rAAV包裝及/或生產細胞收集而無需細胞裂解。在本發明之某些實施例中，工程化rAAV包裝及/或生產細胞分泌可自細胞培養上清液收集而無需細胞裂解之rAAV粒子。在某些實施例中，工程化rAAV包裝及/或生產細胞株具有比對照親本細胞株之rAAV效價較高之rAAV效價以使得與對照親本細胞株相比，自工程化rAAV包裝及/或生產細胞株收集更多的rAAV。

【0124】 在收集rAAV粒子之後，可能有必要純化含有rAAV之樣品，以移除例如由細胞裂解造成之細胞殘渣。AAV粒子之最小純化方法為此項技術中已知的。兩種例示性純化方法為基於氯化銫(CsCl)及碘克沙醇之密度梯度純化。兩種方法描述於Strobel等人, *Human Gene Therapy Methods.*, 26(4): 147-157 (2015)中。最小純化亦可使用親和力層析法，使用例如AVB瓊脂糖凝膠親和力樹脂(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)來實現。使用AVB瓊脂糖凝膠親和力樹脂之AAV純化方法描述於例如Wang等人, *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2:15040 (2015)中。純化後，rAAV粒子可經篩選且儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下。

【0125】 在某些實施例中，本發明提供一種收集rAAV粒子的方法，該等rAAV粒子係在細胞經兩種不同腺病毒共感染之後由工程化rAAV包裝細胞株產生的。

【0126】 在某些實施例中，本發明提供一種收集rAAV粒子之方法，該等rAAV粒子係在感染由工程化rAAV包裝細胞株產生之rAAV生產細胞株之後產生的。

【0127】 在某些實施例中，本發明提供一種收集rAAV粒子之方法，該等rAAV粒子係在用輔助病毒感染工程化rAAV生產細胞株之後產生

的。

rAAV 粒子之定量

【0128】 AAV 感染並不導致活體外細胞病變效應之事實使 rAAV 粒子之定量複雜化，且因此菌斑檢定(plaque assay)無法用於測定感染性效價。然而，rAAV 粒子可使用多種方法，包括定量聚合酶鏈反應(quantitative polymerase chain reaction；qPCR) (Clark 等人, Hum. Gene Ther. 10, 1031-1039 (1999)) 或 斑 點 雜 交 (dot-blot hybridization) (Samulski 等人, J. Virol. 63, 3822-3828 (1989)) 或 藉 由 高 度 純 化 載 體 製 劑 之 光 密 度 (Sommer 等人, Mol. Ther. 7, 122-128 (2003)) 來 定 量。DNase 抗 性 粒 子 (DRP) 可 藉 由 熱 循 環 儀 (例 如 iCycler iQ 96 孔 阻 斷 格 式 熱 循 環 儀 (Bio-Rad, Hercules, CA)) 中 之 即 時 定 量 基 因 表 現 降 低 之 聚 合 酶 鏈 反 應 (qPCR) (DRP-qPCR) 來 定 量。含 有 rAAV 粒 子 之 樣 品 可 在 DNase I (100 U/ml；Promega, Madison, WI) 存 在 下 在 37°C 下 培 育 60 min，隨 後 在 50°C 下 蛋 白 酶 K (Invitrogen, Carlsbad, CA) 消 化 (10 U/ml) 60 min，且 接 著 在 95°C 下 改 性 30 min。所 使 用 之 引 子 探 針 集 應 對 rAAV 載 體 基 因 組 之 非 原 生 部 分，例 如 所 關 注 之 蛋 白 質 之 poly(A) 序 列 具 有 特 異 性。可 基 於 引 子 之 長 度 及 組 成、探 針 及 經 擴 增 序 列，使 用 任 何 適 當 的 循 環 參 數 集 來 擴 增 PCR 產 物。替 代 方 案 揭 示 於 例 如 Lock 等 人, Human Gene Therapy Methods 25(2): 115-125 (2014) 中。

【0129】 亦 可 使 用 與 上 文 所 描 述 類 似 之 qPCR 技 術 來 量 測 病 毒 基 因 組 擴 增。然 而，為 定 量 生 產 細 胞 內 之 總 基 因 組 擴 增，僅 收 集 胞 內 樣 品 且 樣 品 不 經 DNase I 處 理 以 便 量 測 包 裝 及 未 包 裝 病 毒 基 因 組 兩 者。病 毒 基 因 組 擴 增 可 在 每 宿 主 細 胞 基 礎 上 藉 由 同 時 量 測 宿 主 細 胞 管 家 基 因 (例 如 RNase

P)來計算。

【0130】 rAAV粒子之感染性可使用TCID₅₀ (50%之組織培養感染劑量)分析，如例如Zhen等人, *Human Gene Therapy* 15:709-715 (2004)中所描述來測定。在此分析中，rAAV載體粒子經連續稀釋且用於共感染96孔盤中之Rep/Cap表現細胞株以及AV粒子。感染後48小時，萃取來自感染及對照孔之總細胞DNA。接著，使用具有轉基因特異性探針及引子之qPCR來量測rAAV載體複製。用Kärber方程式，使用對10倍連續稀釋之AAV呈陽性之孔的比率來計算TCID₅₀感染性/毫升(TCID₅₀/ml)。

治療性應用

【0131】 由本文中所描述之工程化rAAV包裝及/或生產細胞株產生之rAAV可用於哺乳動物之基因療法。由本文中所描述之工程化細胞產生之rAAV可用於活體外及活體內基因療法應用兩者。由本文中所描述之工程化細胞產生之rAAV可用於遞送小分子、肽及/或蛋白質。

【0132】 在一些實施例中，由本文中所描述之工程化細胞株產生的rAAV可用於治療有需要之人類個體之疾病或病症。在某些實施例中，由本文中所描述之工程化細胞株產生之rAAV可與醫藥學上可接受之載劑組合投與。

【0133】 任何適合的方法或途徑可用於投與由本文中所描述之工程化包裝及/或生產細胞株產生之rAAV或含有rAAV之組合物。投與途徑包括例如全身性、經口、吸入、鼻內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內及其他非經腸投與途徑。在一些實施例中，靜脈內投與rAAV或包含由工程化包裝及/或生產細胞株產生之rAAV的組合物。

【0134】 將根據僅出於說明性目的而呈現於本文中之前述實例更充

分地理解本發明之實踐，且不應視為以任何方式限制本發明。

實例

實例1：阻斷基因表現方案之研發

【0135】 siRNA阻斷基因表現實驗藉由阻斷管家基因HPRT1之基因表現來最佳化且研發以用於6孔及24孔格式。24孔中執行之實驗基於許多因素，諸如接種密度、細胞培養條件(例如二氧化碳(CO₂)百分比、胎牛血清(FBS)之百分比)、轉染劑(Lipofectamine® RNAiMax)與siRNA之間的比率(「Ratio」)、培育時間及siRNA濃度來評價。經設計用於HPRT1基因阻斷基因表現之可商購之siRNA用於使實驗條件最佳化。根據製造商說明書，使用Lipofectamine® RNAiMax用變化濃度之siRNA轉染HeLa生產細胞。HPRT1表現之降低%藉由即時PCR來測定。與基線對照相比，經最佳化之24孔siRNA阻斷基因表現方法能夠阻斷高度表現基因HPRT1之基因表現超過80%。如圖2A至D中所展示，以 1×10^5 個細胞/孔、轉染劑與siRNA之間的1:5比率、8 nM之siRNA接種之細胞展示最高阻斷基因表現效率。圖2A展示改變所使用之siRNA濃度/比率對HPRT1之阻斷基因表現%之影響。圖2B展示改變siRNA濃度/比率對HPRT1之表現%之影響。為了6孔方案之最佳化，測試兩種不同siRNA濃度。測試 5×10^4 、 8×10^4 及 1×10^5 之接種密度以用於圖2A及2B中所繪製之資料。圖2C展示改變siRNA濃度對HPRT1之阻斷基因表現%之影響。圖2D展示改變siRNA之濃度對HPRT1之表現%之影響。所有實驗均重複執行三次。

實例2：RNA測序

【0136】 在兩種不同HeLaS3生產細胞株中，在補充及非補充生產條件下運行八個三公升生物反應器。在無作為未感染對照之腺病毒5

(Ad5)之情況下運行兩個額外生物反應器。表3列舉生物反應器條件及生產水準上之細節。

表3：生物反應器條件及生產水準。

條件	細胞株	生產水準	接種密度	基礎培養基	補充劑	Ad5
1	21C5	無生產對照	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	-	無
2	21C5	低	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	-	200 MOI
3	21C5	低	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	-	200 MOI
4	21C5	中等	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	+	200 MOI
5	21C5	中等	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	+	200 MOI
6	21C5	高	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	+	200 MOI
7	2B6	無生產對照	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	-	無
8	2B6	低	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	-	200 MOI
9	2B6	中等	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	+	200 MOI
10	2B6	高	0.7×10^6 個 細胞/毫升	90% DMEM/10% 例示性細胞	+	200 MOI

表3中所使用之縮寫：添加一或多種補充劑由(+)指示；不存在一或多種補充劑由(-)指示；MOI-感染倍率。

【0137】 用Ad5感染後三十小時，抽取樣品以用於RNA-Seq。樣品用PBS洗滌一次且將細胞集結粒儲存於-80°C下直至準備運送。RNA萃取及經萃取RNA之cDNA合成藉由此項技術中熟知之方法來執行。在測序之

前，使用可商購之RNA-Seq庫製備套組進行庫製備。使用可商購之Illumina測序平台進行RNA測序。將所產生之讀數使用此項技術中熟知之映射方法映射至人類基因組、Ad5基因組及AAV2基因組。丟棄映射至Ad5基因組之任何讀數。執行另一輪測序以富集映射至人類基因組之讀數。使用由RNA測序產生之資料執行差異分析(參見表4)。

表4：差異分析

差異分析編號	對照條件	實驗條件
1	PCL1；未產生(No Production)	PCL1*；產生(N.S.)
2	PCL1；未產生	PCL2；未產生
3	PCL1；未產生	PCL1；產生(S)
4	PCL1；產生(N.S.)	PCL1；產生(S)
5	PCL1；產生(N.S.)	PCL1；產生(S)
6	PCL1；產生(N.S.)	PCL2；產生(N.S.)
7	PCL2；未產生	PCL2；產生(N.S.)
8	PCL2；未產生	PCL2；產生(S)
9	PCL2；未產生	PCL2；產生(S)
10	PCL1；產生(S)	PCL2；產生(S)
11	PCL2；產生(S)	PCL2；產生(S)
12	PCL1；產生(S)	PCL1；產生(S)
13	PCL1；產生(S)	PCL1；產生(S)

*PCL1-生產細胞株1；PCL2-生產細胞株2；未產生(No Production)-未經感染之對照細胞；產生(N.S.)-在非補充條件下培養之Ad5感染細胞；產生(S)-在補充條件下培養之Ad5感染細胞。

【0138】 在此實例中，差異表現分析經計算為實驗條件相較於對照條件之mRNA水準之對數倍變化(LogFC)。經上調之基因表示為正的LogFC且經下調之基因表示為負的LogFC。具有p值 ≤ 0.05 之差異性表現之基因視為統計學上顯著。在各差異分析內，顯著向上或向下調節數百至數千個基因。建立(參見例如圖6)且應用篩選準則以使資料集減少至用於評估之基因之可管理數目。將基因集進行比對且如實例6中所描述移動至篩

選準則。

實例3：藉由RT-qPCR驗證自RNA測序獲得之結果

【0139】 選擇少量基因以用於驗證RNA測序資料。遵循此項技術中熟知之方法，使用RT-qPCR分析確認RNA-Seq結果。 $\Delta\Delta C_t$ 方法用於分析資料。RT-qPCR獨立地確認RNA-Seq資料中觀測到之趨勢。圖3A至B展示自針對PGA5 (圖3A)及SPANXN3 (圖3B)之RNA-Seq資料之生物資訊學分析獲得的基因表現之對數倍變化值。X軸展示其中使生產細胞株生長之條件(補充(如表4中所描述之差異分析#5)對比於非補充(如表4中所描述之差異分析#1))，且y軸展示基因表現之對數倍變化(LogFC)。培養於未補充細胞培養基中之細胞中之PGA5 (圖3A)及SPANXN3 (圖3B)表現的對數倍變化相對於未經感染之細胞(未用輔助病毒感染之細胞)之對應基因表現來繪製。培養於補充細胞培養基中之細胞中之PGA5 (圖3A)及SPANXN3 (圖3B)表現的對數倍變化相對於培養於未補充細胞培養基中之細胞之對應基因表現來繪製。

【0140】 在補充及非補充條件下生長之生產細胞株中之PGA5及SPANXN3基因表現亦藉由RT-qPCR，藉由使用此項技術中熟知的方法來評價。圖3C至D展示相對於未經感染之細胞(未用輔助病毒感染之細胞)，培養於未補充及補充細胞培養基中之細胞中的PGA5 (圖3C)及SPANXN3 (圖3D)之表現之RT-qPCR倍數變化值。圖3A至D展示自qPCR及RNA測序獲得之資料遵循相同趨勢。

實例4：在生產細胞株之不同純系中藉由RT-qPCR驗證自RNA測序獲得之結果

【0141】 RNA測序結果藉由對自HeLa S3生產細胞株之不同純系萃

取之RNA進行RT-qPCR實驗來進一步驗證。圖4A至B展示當由RT-qPCR測定時，培養於未補充細胞培養基及補充細胞培養基中之生產細胞株純系相對於未經感染之細胞(未用輔助病毒感染的細胞)中之PGA5 (圖4A)及SPANXN3 (圖4B)表現之倍數變化值。21C5、3C6、2B6表示HeLa生產細胞株之不同純系。圖4C至D展示與培養於非補充細胞培養基中之純系相比，培養於補充細胞培養基中之生產細胞株純系21C5、3C6、2B6中之PGA5 (圖4C)及SPANXN3 (圖4D)表現的相對倍數增加。此等結果進一步驗證實例3中所描述之生物資訊學RNA測序及RT-qPCR資料。

實例5：基因阻斷基因表現對rAAV效價之影響

【0142】藉由基於實例1中所論述之最佳化方案，單獨地阻斷HeLa生產細胞株中之基因之基因表現來執行阻斷基因表現實驗。針對各基因，設計siRNA核苷酸序列(參見表1)。

【0143】條件確定為 1×10^5 接種密度及 8 nM siRNA 及 1:5 之 siRNA:RNAiMAX 比率。在降低基因之表現後 24 小時誘導 AAV 產生，且感染後 72 小時收集 rAAV。對於各樣品，測定效價且與非靶向誤義 siRNA 對照進行比較。此實驗獨立地執行三次，將結果平均化，且執行統計分析。圖 5A 至 5C 分別展示生產細胞株 1 至 3 中之個別基因之 siRNA 對絕對 rAAV 效價(GC/mL；GC=基因組複本)的結果。圖 5D 至 5F 分別展示不同生產細胞株 1 至 3 中之個別基因之 siRNA 對 rAAV 效價之倍數增加。

【0144】如圖 5A 至 5F 中所展示，降低生產細胞株中 KCNN2、LINC00319、RGMA 或 SPANXN3 之表現使得 rAAV 效價相比於誤義對照高統計學上顯著之 2-4 倍。在三個生產細胞株中，此等四個基因在阻斷基因表現時展示對效價的統計上正相關之影響。此等結果指示此等基因係更

持久性修飾，諸如CRISPR/Cas9基因剔除之極佳目標。

實例6：基因篩選方法論

【0145】對於篩選1，比對來自差異分析1及7之基因(如表3中所描述)。1及7之差異分析界定在非補充條件下添加腺病毒5後上調或下調的基因。分析1檢查來自21C5生產細胞株(生產細胞株1，PCL1)之細胞。分析7檢查來自2B6 (生產細胞株2，PCL2)之細胞。在此篩選1之後，基因之清單鑑別出不具有細胞株特異性之基因，且此比對提供兩種生產細胞株之間共用之總共9149個基因。

【0146】對於篩選2，將來自篩選1之基因與存在於差異分析5中之基因進行比對。分析5檢查與非補充條件相比，在補充條件下來自21C5生產細胞株(PCL1)之細胞中上調及下調的基因。此差異分析之目的為界定在補充條件下生產相對於在非補充條件下生產之效果。用差異分析5比對來自篩選1之基因集之目的為鑑別在改良生產力條件下之基因，該等基因1)不為改良生產條件之副產物，2)與兩種不同細胞株可能有關。在比對之後，向前移動374個基因。

【0147】對於篩選3，僅向前移動具有 $>2 \text{ LogFC} \pm$ 之較大LogFc臨限值的基因。此進行以確保正向前移動之基因中之上調/下調之高水準，且得到所選擇之基因不為RNA-Seq之假影(artifact)的置信度。在篩選之後，向前移動77個基因。

【0148】對於篩選4，僅保持展示差異分析1及差異分析5中之上調或差異分析1及差異分析5中之下調兩者的基因。舉例而言，77個基因中之一者必須展示來自差異分析1之上調及分析5差異中之另一上調或差異分析1中之下調及差異分析5中之另一下調。此篩選之目的為確保針對將評價

之基因，與低效價條件相比，高效價條件對彼特定基因之調節不具有拮抗效應。在篩選之後，保留十一個基因以待評價。展示例示性基因篩選方法論之說明性流程圖展示於圖6 (所使用之縮寫：LogFC=對數倍變化)中。

【0149】 表5提供在向下篩選重要之生產力基因之過程期間來自各比較之Log2FC資料。

表5：Log2FC資料

基因	差異分析7	差異分析1	差異分析5
ATP5EP2	2.409	-1.1	-7.511
LINC00319	-4.382	-1.432	-6.58
CYP3A7	-8.018	-3.149	-2.814
ABCA10	-4.257	-2.025	-3.131
NOG	-5.585	-1.468	-2.814
SPANXN3	4.99	6.238	2.423
PGA5	8.153	6.019	2.519
MYRIP	2.045	2.771	2.175
KCNN2	3.656	2.807	2.066
NALCN-AS1	4.558	2.639	2.024
RGMA	2.764	2.303	2.03

實例7：KCNN2之基因剔除

【0150】 在此實例中，兩個現有的高度最佳化之單株HeLa生產細胞株(PCL) (2H5及7B12)經基因修飾以基因剔除編碼鈣活化鉀通道蛋白SK2之KCNN2基因(在本文中所描述之RNA-Seq篩檢中預先鑑別)。

【0151】 使用eGFP可選標記物在2H5或7B12 HeLa細胞中基因剔除KCNN2。疑似之KCNN2基因剔除物經富集以用於eGFP表現且接種於96孔盤中。使細胞群落形成，收集基因組DNA，且執行PCR以擴增含有基因剔除物之區域。對PCR產物進行桑格測序且針對插入/缺失之存在，分析測序文件。按比例增大具有較高基因剔除可能性的2H5及7B12純系以用於進一步測試。

【0152】 將最前的純系轉移至無血清之懸浮培養物中。經由24深孔

rAAV生產評估與親本株相比之純系生產力。將純系以 2×10^5 個細胞/毫升接種於3 mL之培養物中，且用Ad5以50之感染倍率(MOI)感染。感染後四天，收集rAAV且對效價進行評估。將效價之倍數增加標準化為親本對照。最佳純系顯示與對照樣品相比效價之1.5至2.7倍增加。2H5效價範圍介於 2.46×10^9 至 4.98×10^{10} 個GC/mL (圖7A)。當效價標準化為親本對照時，看出範圍介於1.2至2.7倍之倍數增加(圖7B)。7B12效價範圍介於 4.33×10^8 至 1.88×10^{10} 個GC/mL (圖7C)。當效價標準化為親本對照時，看出範圍介於1.5至2.6倍之倍數增加(圖7D)。接著將具有最小1.5倍增加的純系按比例調整至搖瓶培養物中且接種至ambr® 15中以用於高接種密度、補充之rAAV生產。將細胞以 1.5×10^6 個細胞/毫升接種且用Ad5以50之MOI感染。在感染後四天收集rAAV且對效價進行評估。將效價之倍數增加標準化為親本對照。最佳純系顯示與對照樣品相比效價之1.5至2.3倍增加。2H5效價範圍介於 1.5×10^{11} 至 3.82×10^{11} 個GC/mL (圖8A)。當效價標準化為親本對照時，看出範圍介於1.3至2.3倍之倍數增加(圖8B)。7B12效價範圍介於 2.62×10^{10} 至 1.35×10^{11} 個GC/mL (圖8C)。當效價標準化為親本對照時，看出範圍介於1.2至1.5倍之倍數增加(圖8D)。

【0153】 此等資料確定在AAV產生細胞中降低或消除本文中所描述之一或多個基因之表現(例如，經由基因剔除)可用於增大由工程化細胞產生rAAV。

實例8：多組合性siRNA阻斷基因表現

【0154】 在此實例中，執行在本文中所描述之RNA-seq篩檢中使用siRNA預先鑑別之基因的多組合性阻斷基因表現以測定同時靶向多個基因是否將對效價產生累加效應。

【0155】 使用描述於實例5中之方法之修改執行多組合性阻斷基因表現。簡言之，使用8 nM之各siRNA且維持siRNA:RNAiMAX之比率為1:5對細胞進行轉染。在降低基因之表現後24小時誘導AAV產生，且感染後72小時收集rAAV。對於各樣品，測定效價且與非靶向誤義siRNA對照進行比較。

【0156】 在此實例中，將KCNN2與先前所描述之一組其他siRNA組合進行阻斷基因表現。另外，將RGMA及SPANXN3彼此組合進行阻斷基因表現。在2H5中，組合阻斷基因表現顯示與誤義對照相比效價增加之範圍為4.6至11.4倍(圖9A)。在7B12中，組合阻斷基因表現顯示與誤義對照相比效價增加之範圍為3.4至9.7倍(圖9B)。每種組合顯示效價增加；然而，並非所有組合相比於阻斷單獨KCNN2之基因表現有所改良。KCNN2阻斷基因表現導致2H5之5.3倍增加(圖9A)及7B12之5.1倍增加(圖9B)。

【0157】 此等資料確定rAAV產生之額外增加可經由直接靶向所建立之產生較高rAAV效價的單株PCL中之多個基因組區域來獲得。

以引用方式併入

【0158】 本文中所提及之專利文件及科學論文中之每一者之全部揭示內容出於所有目的以引用之方式併入。

等效物

【0159】 本發明可在不脫離其精神或基本特徵之情況下以其他特定形式來實施。因此，前述實施例應在所有態樣中視為說明性的而非限制本文中所描述之本發明。因此，本發明之範疇由隨附申請專利範圍而非前述描述指示，且本文意欲涵蓋申請專利範圍等效物之含義及範圍內出現之所有變化。

【序列表】

<110> 美商奧崔基尼克斯製藥公司(ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.)

<120> 工程化生產細胞株以及製造及使用該細胞株之方法

<140> 109112259

<141> 2020-04-10

<150> 62/979,483

<151> 2020-02-21

<150> 62/839,207

<151> 2019-04-26

<150> 62/833,548

<151> 2019-04-12

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 1

gcaacagcgu aaaaauugut t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 2

cgguguccac aguccuugat t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 3

caagaaaagu uuaaaguut t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 4

cggaggaagu uacagaugut t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
<221> source
<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 5
agaugcaaga gguaccaa t 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
<221> source
<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 6
ggugucggau gauuuauca t 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
<221> source
<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 7
gaagcuagaa cuuaccaa t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 8
 ggauugucuuu ccuaggagat t 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 9
 cgcucaucga caauaauuat t 21

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 10
 cacuuuagau guaucuaaut t 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 11

ggagcauaaa guagaccgat t

21

<210> 12

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 12

uugccacuac agcuaccacc

20

<210> 13

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 13

ccaauquacu cagggaaca

20

<210> 14

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 14

aguccaccaa aguguuugcu

20

<210> 15

<211> 20
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 15
 aaaggagucu gcuuacuuac 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 16
 ttgccactac agctaccacc 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> 智人

<400> 17
 ccaauguacu cagggaaaca 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> 智人

<400> 18
 aguccaccaa aguguuugcu 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> 智人

<400> 19
 aaaggagucu gcuuacuuac 20

<210> 20
 <211> 20

<212> DNA
 <213> 智人

<400> 20
 cttctcgtaa tggcagatct 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 21
 gcacttgagg atcttgacg 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 22
 gaggtcctct atgccatgga 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 23
 ccatacccat ccatccagct 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 24
 cccatgtgaa ggacattcaa 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 25
 gttcttcaaa ctctgttcgg 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 26
gaaggcgtag acttatctga 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
agccaacttc cagcaccaat 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 28
gggcaatgga ccttctgcct 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
ggctgcgggg cagagggcaa 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 30
cgggcaggct gcggggcaga 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA

<213> 智人

<400> 31

acgggcaggc tgcggggcag

20

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 32

acaauuuuuu cgcuguugcc a

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 33

ucaaggacug uggacaccgg t

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 34

aaacuuauaa cuuuucuugg a

21

<210> 35

<211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 35
 acaucuguaa cuuccuccgc a 21

<210> 36
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 36
 uuugguaccu cuugcaucuc a 21

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 37
 ugauaaauca uccgacacct g 21

<210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> source
 <223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>
<221> source
<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 38
uuugguaagu ucuagcuucc t 21

<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 39
ucuccuagga aagacaucca a 21

<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 40
uaauuuuugu cgaugagcgg c 21

<210> 41
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 41
auuagauaca ucuaaagugg g 21

<210> 42
<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註釋=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<220>

<221> source

<223> /註釋=「經組合之DNA/RNA分子之描述：合成寡核苷酸」

<400> 42

ucggucuacu uuauaucuct t

21

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺相關病毒(recombinant adeno-associated virus ; rAAV)包裝及/或生產細胞株，其包含複數個工程化細胞，該等工程化細胞與對應未經修飾之親本細胞相比，具有由KCNN2表現之基因產物之降低表現及/或活性，或具有由KCNN2及一或多種選自由以下組成之群之基因表現之基因產物之降低表現及/或活性：RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及NALCN-AS1。

【請求項2】

如請求項1之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中由以下表現之基因產物之表現及/或活性無限地或持久性地降低：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及/或NALCN-AS1。

【請求項3】

如請求項2之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該複數個工程化細胞包含由以下中之至少一者之基因破壞或部分或完全基因缺失：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及/或NALCN-AS1。

【請求項4】

如請求項3之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該複數個工程化細胞包含由以下中之至少一者之基因破壞：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP

及/或NALCN-AS1。

【請求項5】

如請求項3之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該複數個工程化細胞包含由以下中之至少兩者之基因破壞：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及NALCN-AS1。

【請求項6】

如請求項3之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該複數個工程化細胞包含由以下中之至少一者之部分或完全基因缺失：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及/或NALCN-AS1。

【請求項7】

如請求項3之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該複數個工程化細胞包含由以下中之至少兩者之部分或完全基因缺失：KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及NALCN-AS1。

【請求項8】

如請求項1之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該表現及/或活性係使用成簇規律間隔短回文重複序列(*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*；CRISPR)基因組編輯來降低。

【請求項9】

如請求項8之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該CRISPR基因組編輯使用導引RNA(gRNA)對，其中各gRNA：

(a) 包含選自SEQ ID NO: 12至15之核苷酸序列之序列，及/或

(b) 靶向選自SEQ ID NO: 16至31之核苷酸序列中之任一者的目標DNA序列。

【請求項10】

如請求項9之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該gRNA對為用於靶向複數個細胞中的KCNN2，並包含第一gRNA分子及第二gRNA分子，該第一gRNA分子包含SEQ ID NO: 12序列且該第二gRNA分子包含SEQ ID NO: 13序列；或

其中該gRNA對為用於靶向複數個細胞中的KCNN2，並包含第一gRNA分子及第二gRNA分子，該第一gRNA分子包含SEQ ID NO: 14序列且該第二gRNA分子包含SEQ ID NO: 15序列。

【請求項11】

如請求項10之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中各gRNA分子為在5'及3'端其中一或兩者上之三個末端核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸間鍵的2' O-甲基類似物。

【請求項12】

一種重組腺相關病毒(rAAV)包裝及/或生產細胞株，其包含複數個工程化細胞，該等工程化細胞與對應親本細胞株相比，展現由KCNN2表現之多肽或多核肽酸之降低表現及/或活性，或展現由KCNN2及一或多種選自由以下組成之群之基因表現之多肽或多核肽酸之降低表現及/或活性：RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP及NALCN-AS1。

【請求項13】

如請求項12之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該表現及/或活性係使用核酸酶、雙股RNA (dsRNA)、小干擾RNA (siRNA)、小髮夾RNA (shRNA)、微RNA(miRNA)或反義RNA寡核苷酸(ASO)來降低。

【請求項14】

如請求項13之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中：

- (a) 使用siRNA來降低ATP5EP2在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 1及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 32；
- (b) 使用siRNA來降低LINC00319在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 2及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 33；
- (c) 使用siRNA來降低CYP3A7在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 3及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 34；
- (d) 使用siRNA來降低NOG在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 4及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 35；
- (e) 使用siRNA來降低SPANXN3在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 5及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 36；
- (f) 使用siRNA來降低MYRIP在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 6及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 37；

- (g) 使用siRNA來降低KCNN2在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 7及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 38；
- (h) 使用siRNA來降低NALCN-AS 1在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 8及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 39；
- (i) 使用siRNA來降低RGMA在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 9及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 40；
- (j) 使用siRNA來降低PGA5在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 10及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 41；及/或
- (k) 使用siRNA來降低ABCA10在複數個細胞中的表現及/或活性，且該siRNA包含有義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 11及反義股中的核苷酸序列SEQ ID NO: 42。

【請求項15】

如請求項1之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該細胞株為人類細胞株。

【請求項16】

如請求項15之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該細胞株為HeLa細胞株。

【請求項17】

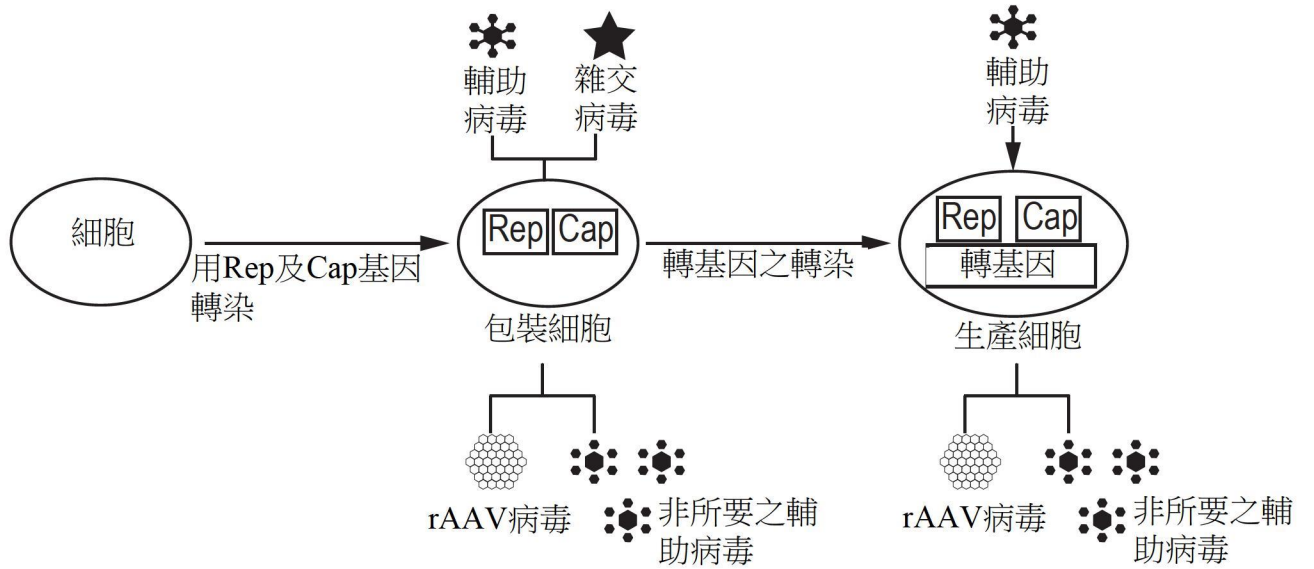
如請求項15之rAAV包裝及/或生產細胞株，其中該細胞株為人類胚

腎(human embryonic kidney ; HEK) 293細胞株。

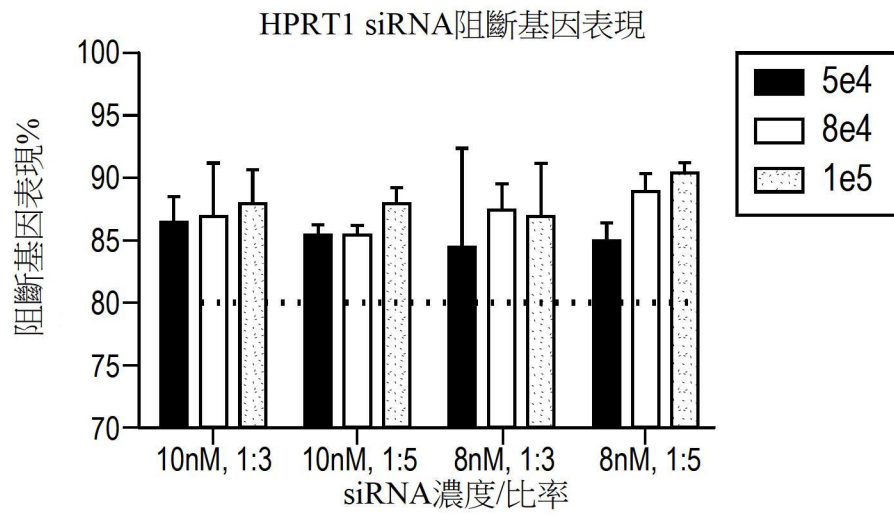
【請求項18】

一種如請求項1至17中任一項之rAAV包裝及/或生產細胞株的裂解物
或細胞培養上清液。

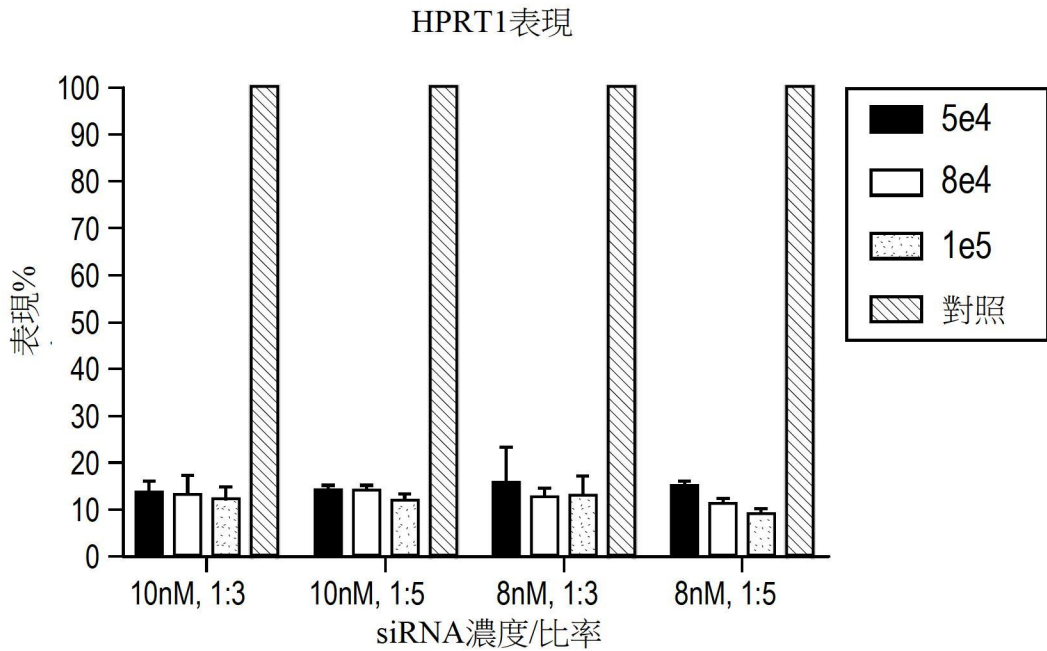
【發明圖式】



【圖1】

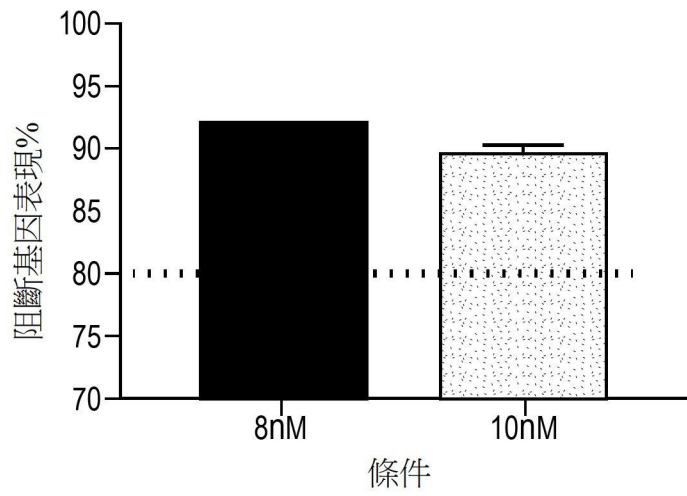


【圖2A】



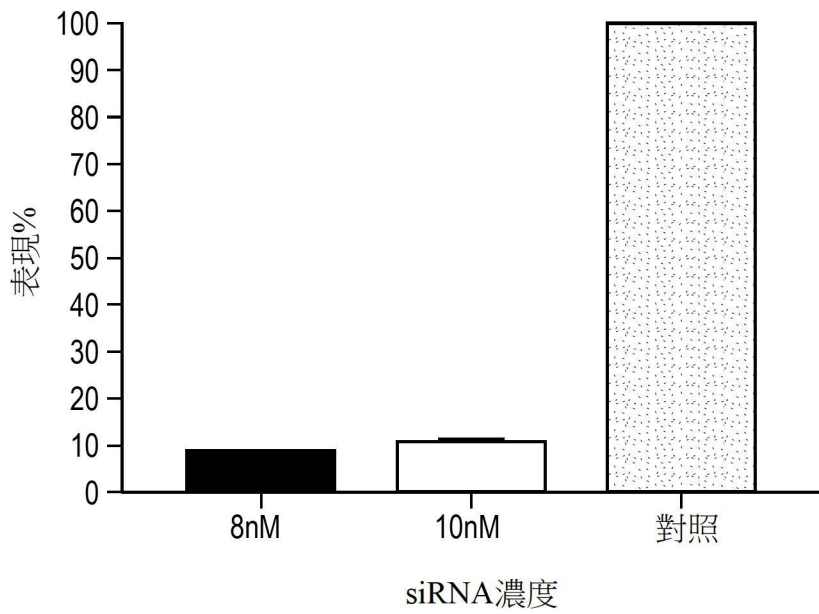
【圖2B】

6孔HPRT1阻斷基因表現%

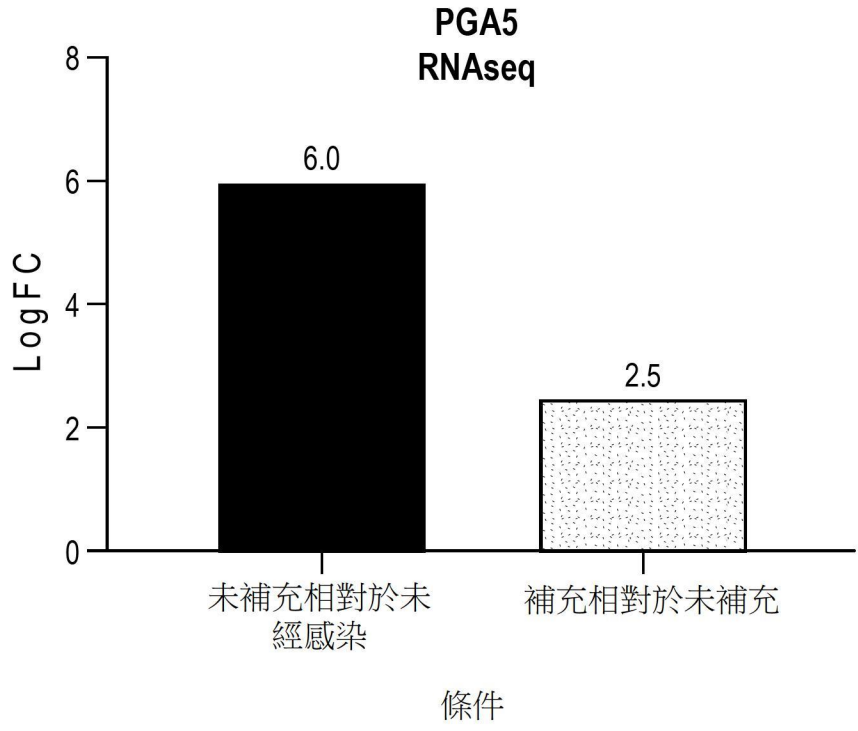


【圖2C】

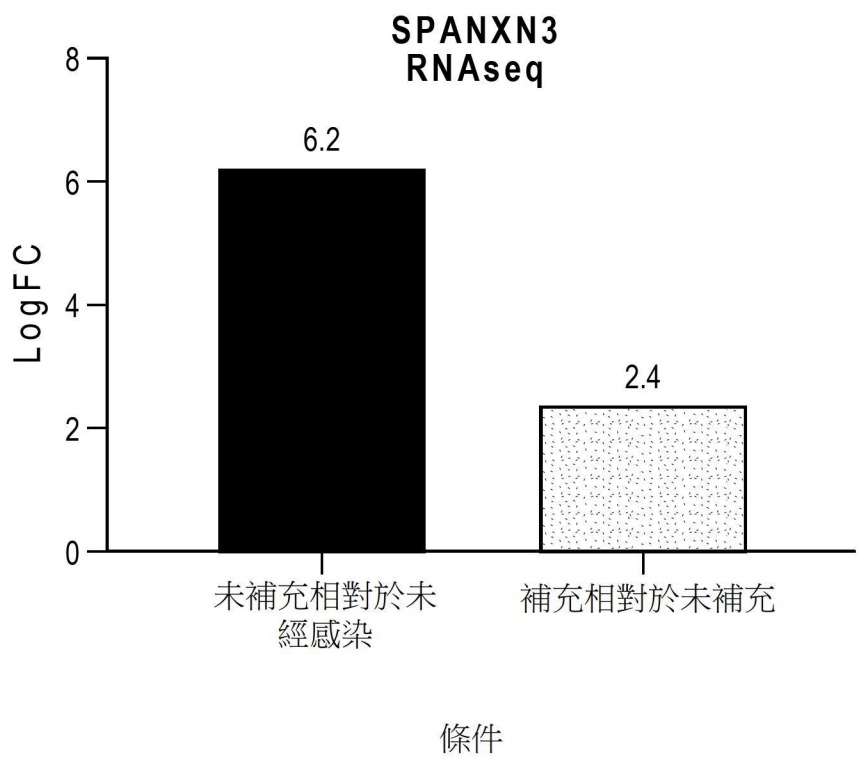
6孔HPRT1表現%



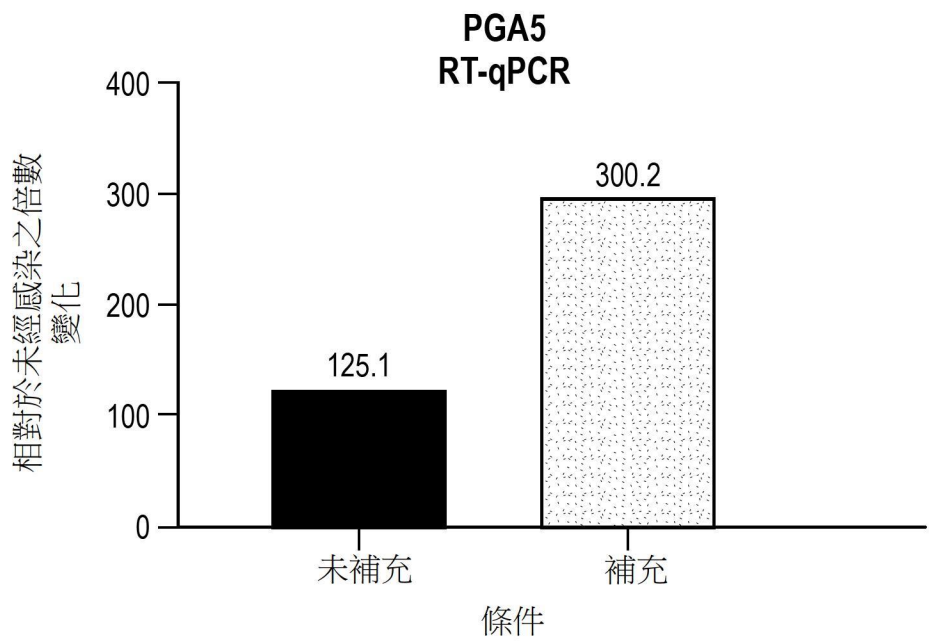
【圖2D】



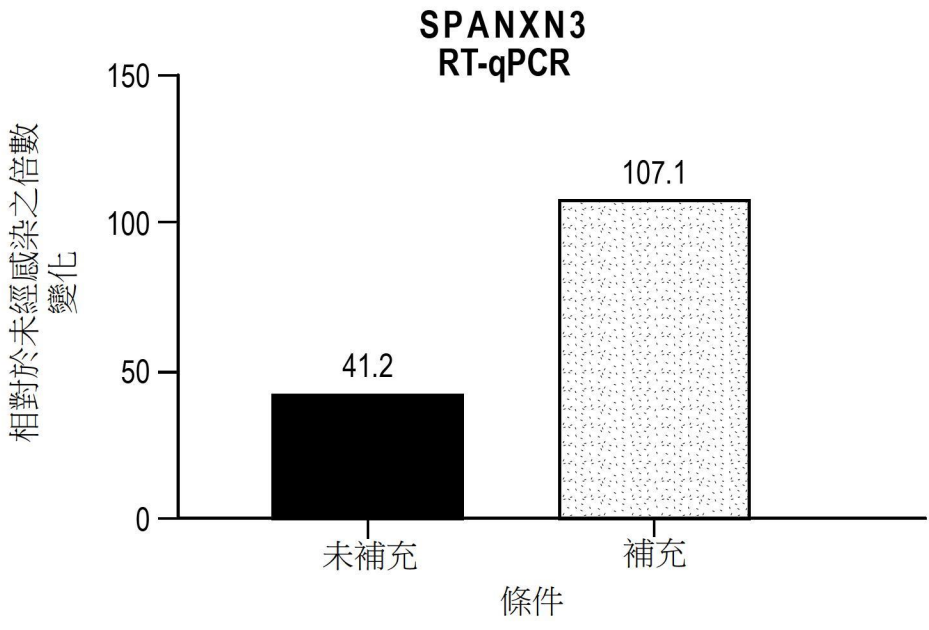
【圖3A】



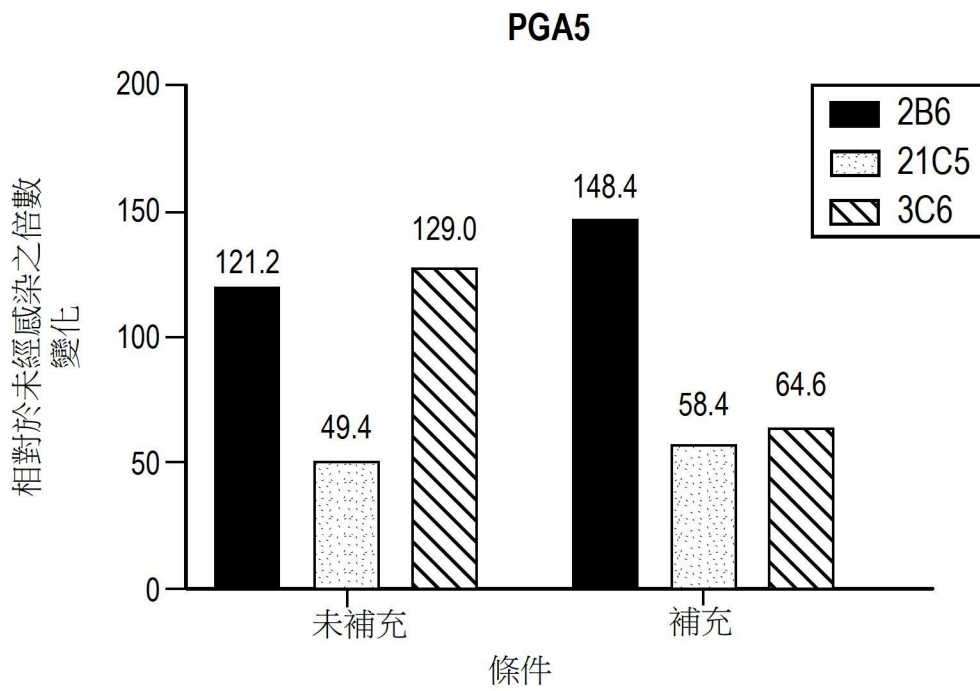
【圖3B】



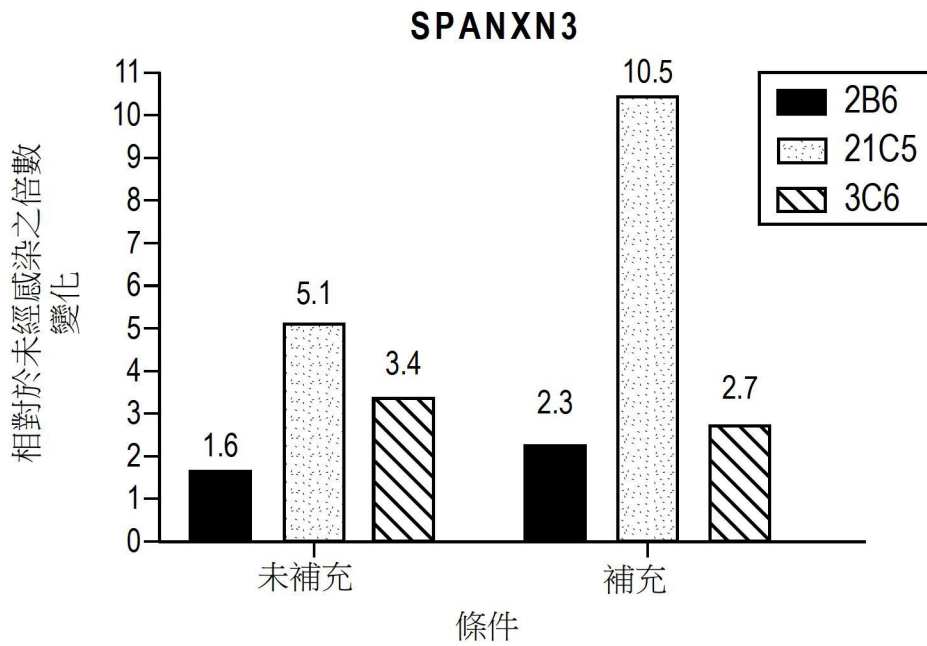
【圖3C】



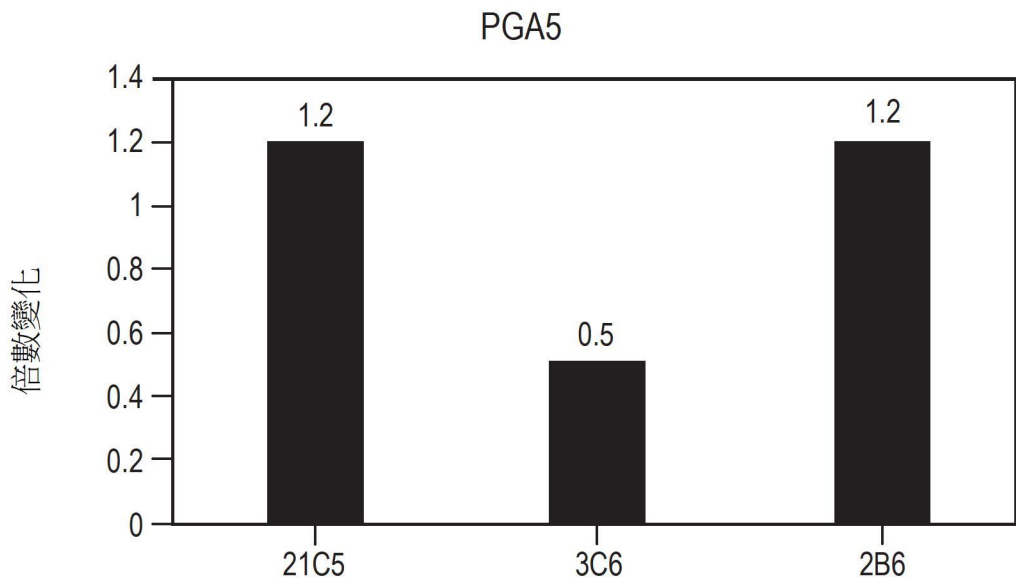
【圖3D】



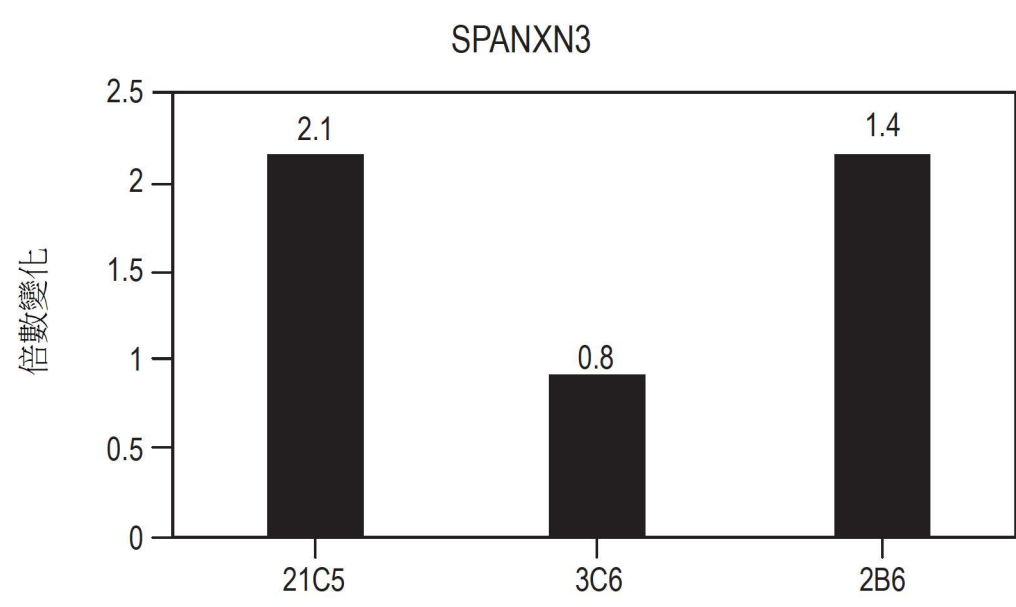
【圖4A】



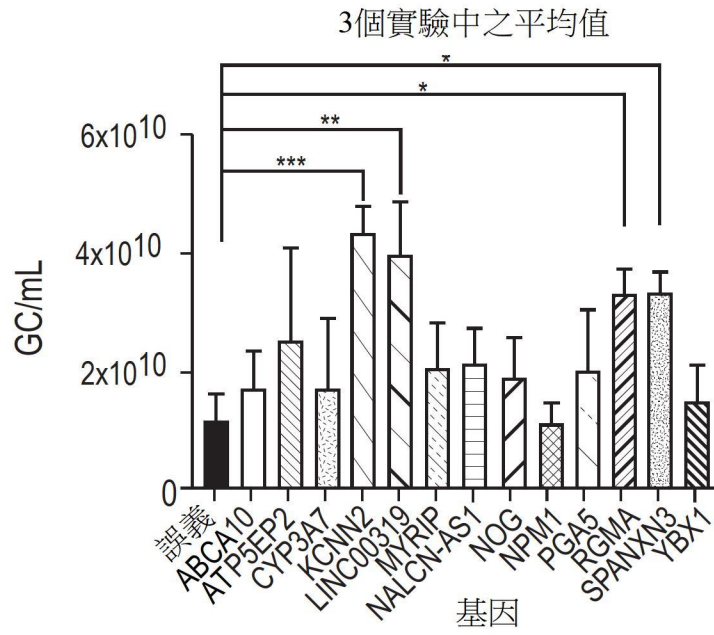
【圖4B】



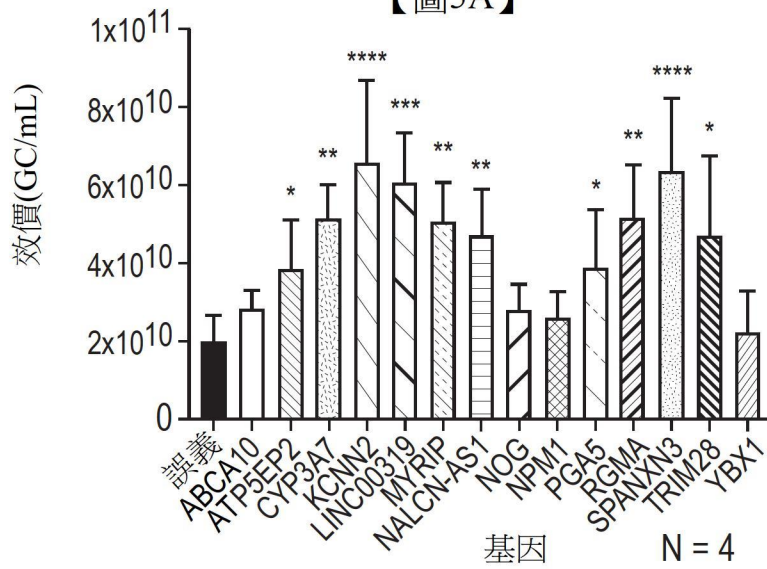
【圖4C】



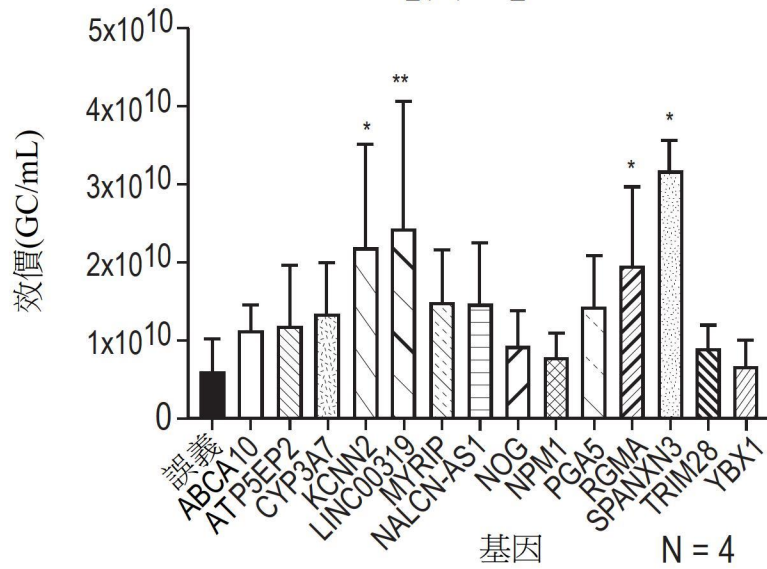
【圖4D】



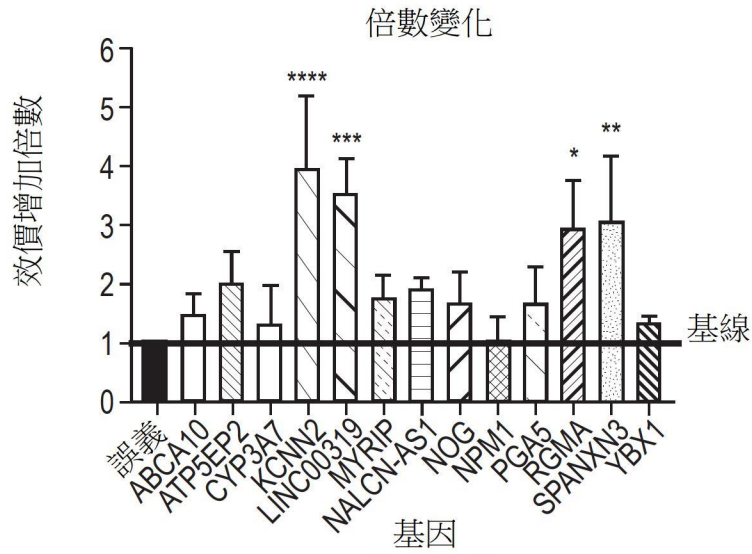
【圖5A】



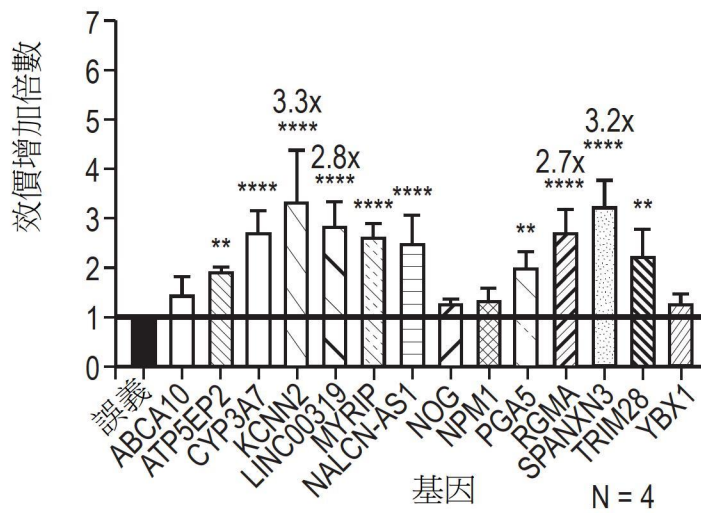
【圖5B】



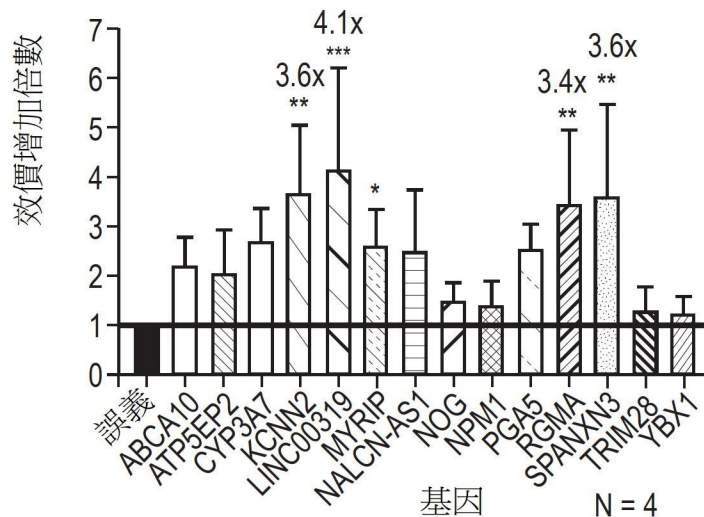
【圖5C】



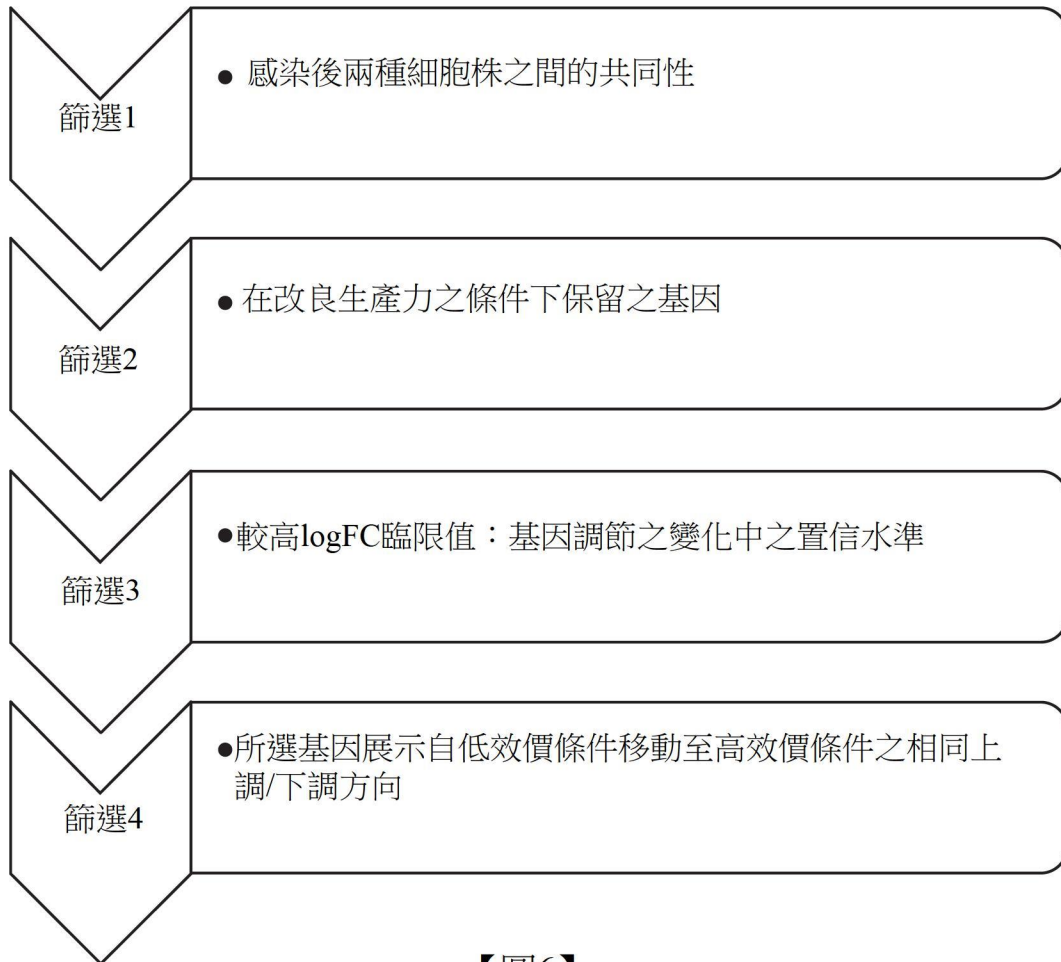
【圖5D】



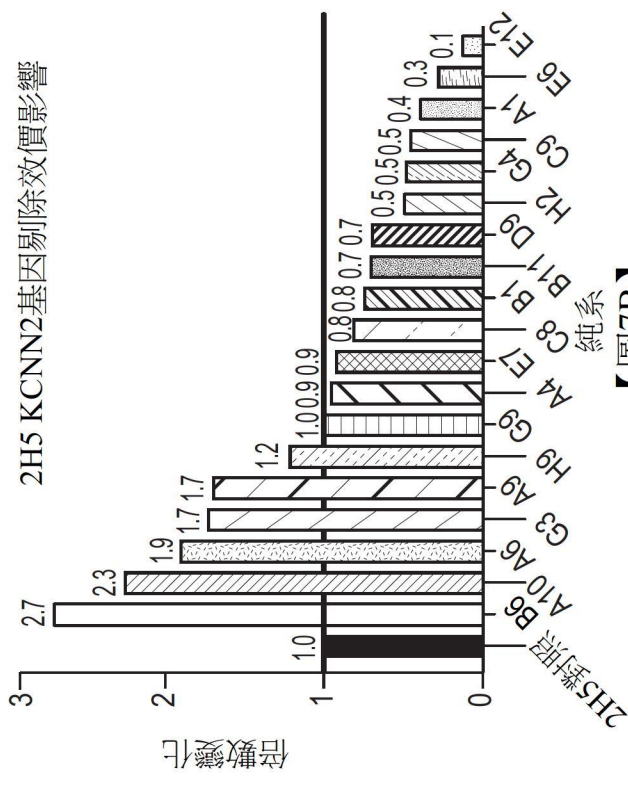
【圖5E】



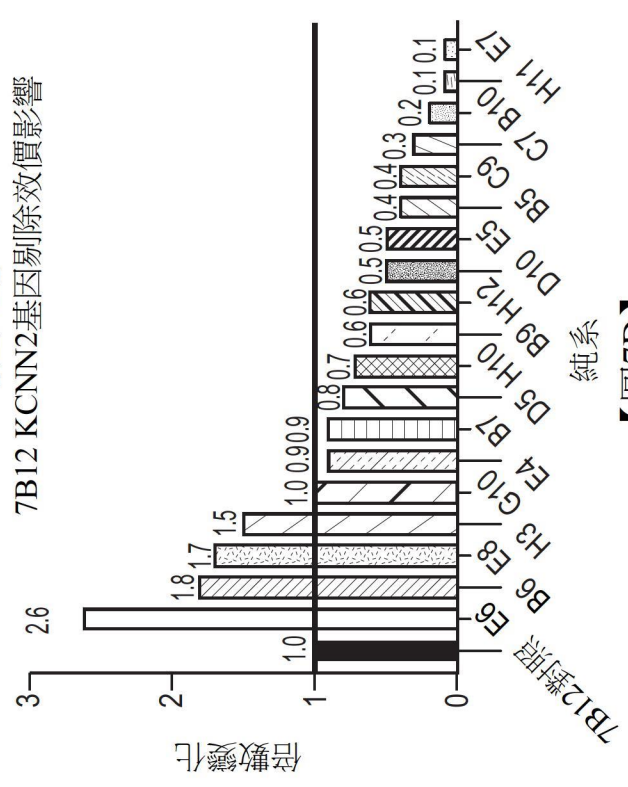
【圖5F】



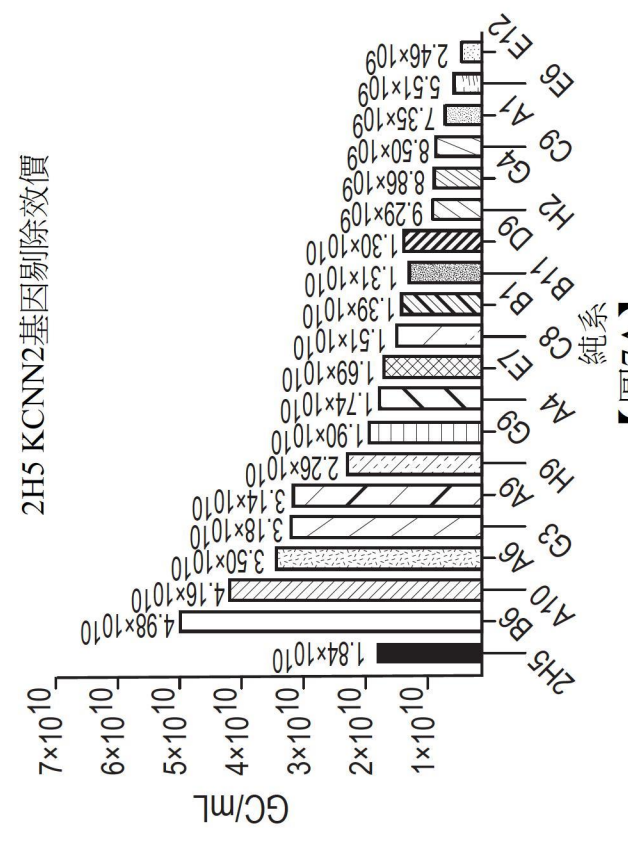
【圖6】



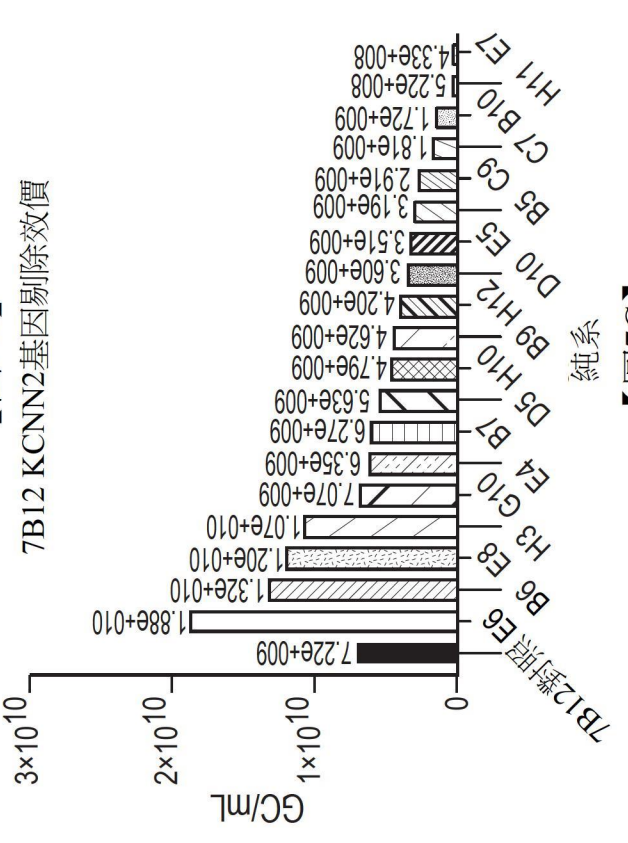
【圖7B】



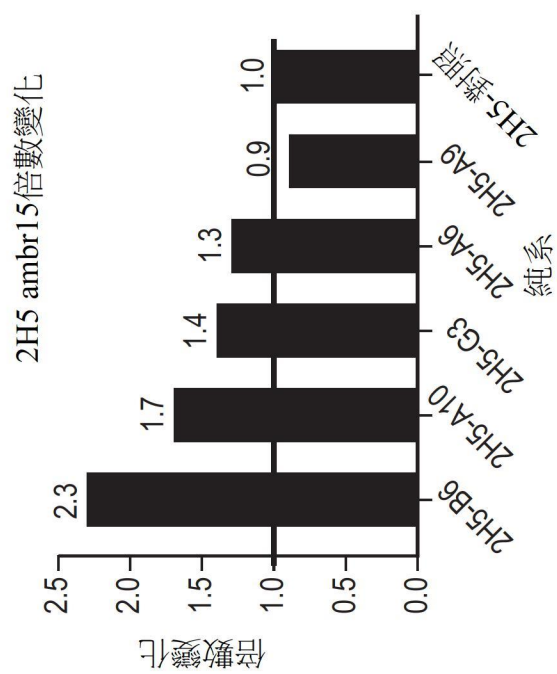
【圖7D】



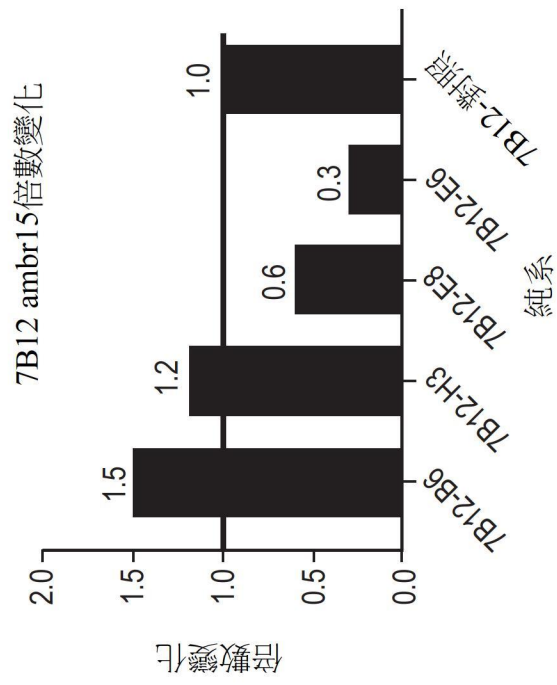
【圖7A】



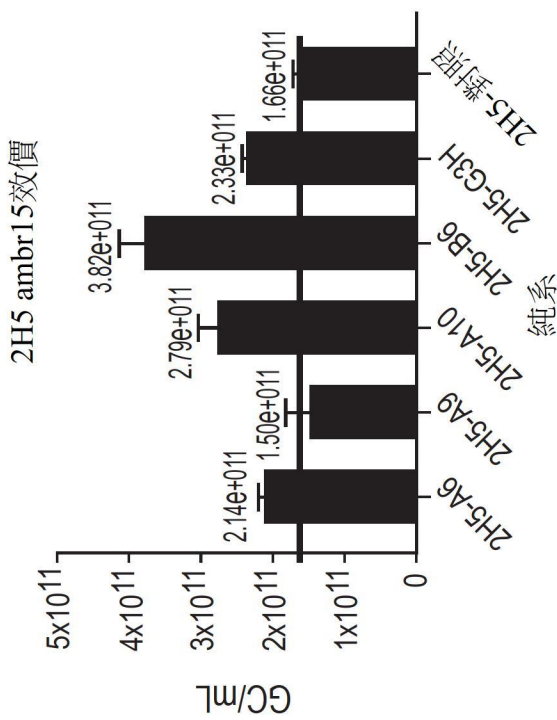
【圖7C】



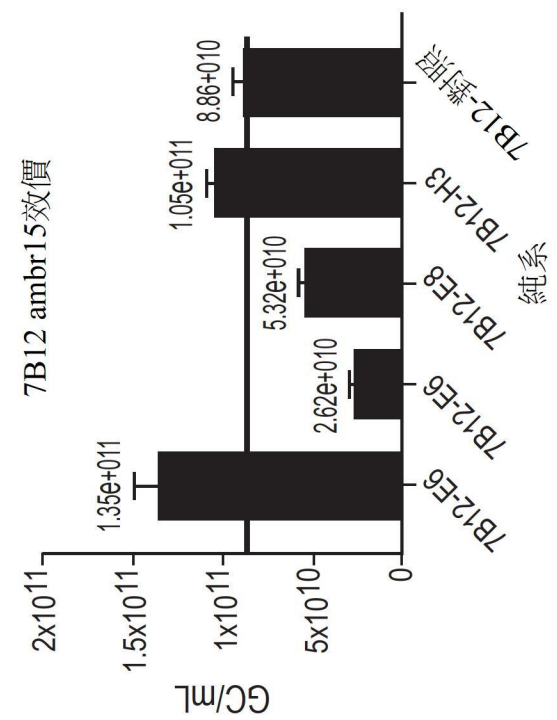
【圖8B】



【圖8D】

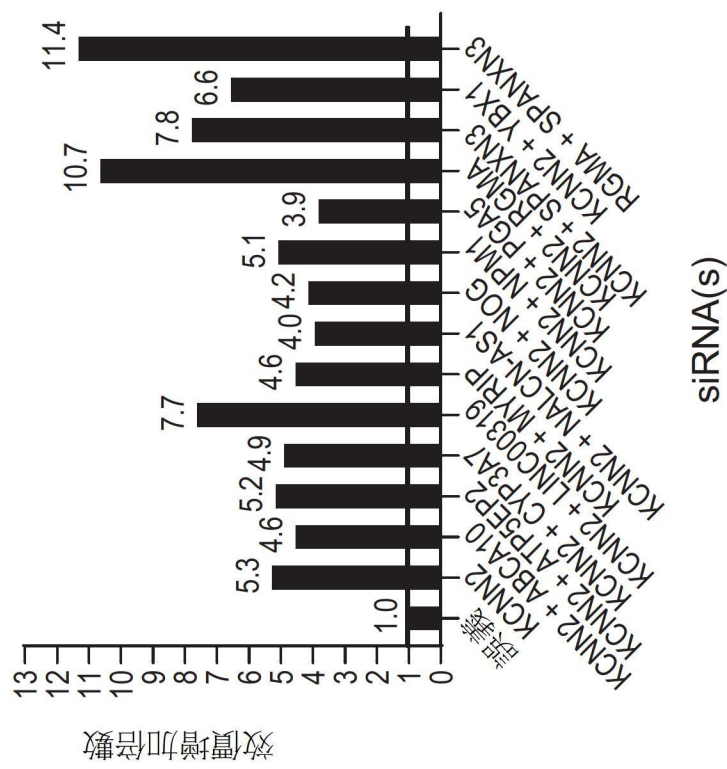


【圖8A】



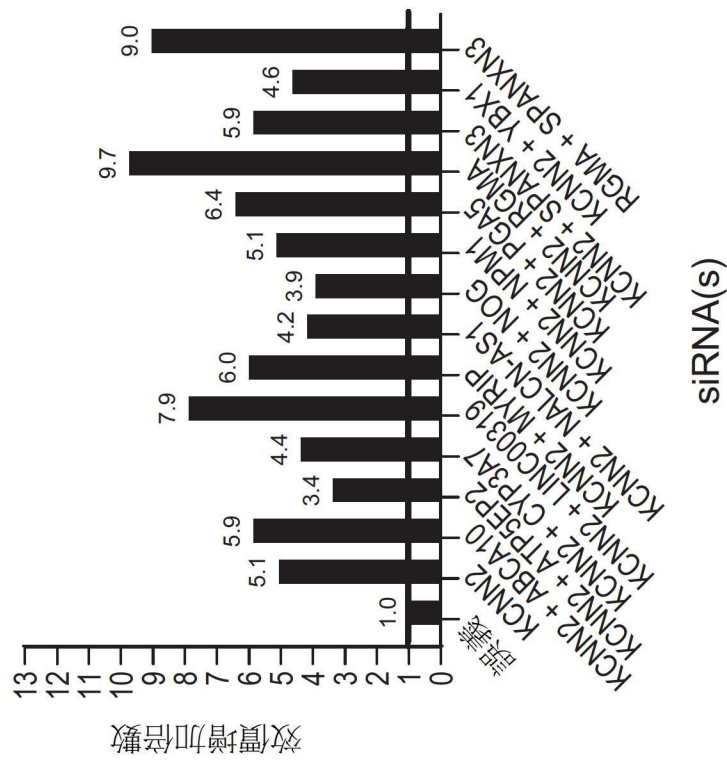
【圖8C】

2H5 siRNA組合阻斷基因表現



【圖9A】

7B12 siRNA組合阻斷基因表現



【圖9B】