

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-519294

(P2020-519294A)

(43) 公表日 令和2年7月2日 (2020.7.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-562556 (P2019-562556)
 (86) (22) 出願日 平成30年5月11日 (2018.5.11)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年1月14日 (2020.1.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/032291
 (87) 国際公開番号 W02018/209216
 (87) 国際公開日 平成30年11月15日 (2018.11.15)
 (31) 優先権主張番号 62/505,540
 (32) 優先日 平成29年5月12日 (2017.5.12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507088266
 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2108、ボストン、ワン ビーコン ス
 トリート、31ス フロア
 One Beacon Street, 3
 1st Floor, Boston, Ma
 ssachusetts 02108
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 シュエ, ジュン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1545、シュールズベリー、フィスク
 ストリート 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスベクター産生

(57) 【要約】

いくつかの側面において、本開示は、ウイルスベクター産生の力価および収率を改善するための方法に関する。いくつかの態様において、方法は、ウイルスベクターのパッケージングの間の、導入遺伝子発現の一過的なサイレンシングを含む。

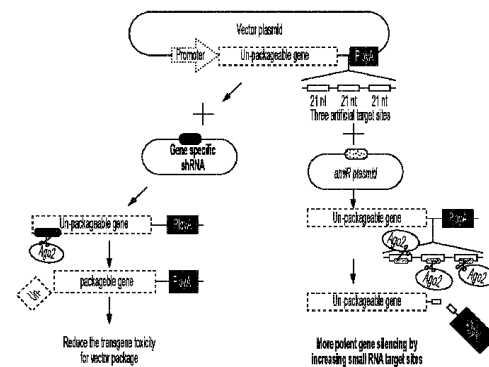


FIG. 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組み換えウイルス産生収率を制御するための方法であって、以下：

- (i) 宿主細胞に導入遺伝子を含む第 1 核酸を導入すること；
- (i i) 宿主細胞に干渉核酸を発現することができる第 2 核酸を導入すること、ここで、干渉核酸は導入遺伝子の発現を特異的に阻害する；
- (i i i) 宿主細胞内で導入遺伝子を含む核酸を複製すること；および
- (i v) 任意に、宿主細胞から第 1 核酸を含むウイルス粒子を単離することを含む、前記方法。

【請求項 2】

宿主細胞は、ウイルスベクターパッケージング細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

宿主細胞は、哺乳動物細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

宿主細胞は、ヒト細胞、任意に H E K 2 9 3 T 細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

宿主細胞は、昆虫細胞、任意に *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

第 1 核酸は、レンチウイルス導入プラスミド、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、アデノウイルス (A d) ベクター、またはレトロウイルスベクターである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

第 1 核酸は、レンチウイルス導入ベクターであり、少なくとも 1 つの末端反復配列 (L T R) を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 核酸は、A A V ベクターであり、少なくとも 1 つの逆位反復配列 (I T R) を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

I T R は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、または A A V 9 I T R である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

A A V ベクターは、少なくとも 1 つの I T R または m T R を含む自己相補的な A A V ベクターである、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

第 1 核酸は、レトロウイルス導入プラスミドであり、少なくとも 1 つの末端反復配列 (L T R) を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

導入遺伝子の発現は、宿主細胞中のウイルスベクターパッケージングと干渉する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

導入遺伝子は、細胞傷害性であるか、または、宿主細胞のフィットネスに有害な生理化学的特徴 (例として、導入遺伝子は、高い熱安定性を有する 2 次構造を形成するタンパク質をコードする) を 1 以上含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

第 1 核酸によってコードされる転写産物は、阻害性核酸のための 1 以上の結合部位を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

阻害性核酸は、マイクロ RNA (m i R N A) または人工の m i R N A (a m i R N A

10

20

30

40

50

）であり、任意に 1 以上の結合部位は、配列番号 3 および 4 から選択される配列を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

1 以上の結合部位の各々の配列は、宿主細胞の内在性の *miRNA* によって認識されない、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

1 以上の結合部位は、転写産物の最終コドンとポリ A テールとの間に位置する、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

1 以上の結合部位は、転写産物の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に位置する、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

第 2 核酸は、低分子ヘアピン RNA、*miRNA*、または *amiRNA* を発現する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

第 2 核酸は、導入遺伝子をコードする核酸に結合する *miRNA* または *amiRNA* を発現する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

miRNA または *amiRNA* は、非ヒト細胞中で発現される *miRNA* 配列を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

miRNA または *amiRNA* は、昆虫細胞または植物細胞中で発現される *miRNA* 配列を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

miRNA または *amiRNA* は、植物細胞中で発現される *miRNA* 配列を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

miRNA または *amiRNA* は、*miR-333* 配列 (配列番号 1) または *miR-856* 配列 (配列番号 2) を含み、任意に *amiRNA* は、*miR-30* 足場を含む、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

宿主細胞は、1 以上のアクセサリプラスミドをさらに含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

1 以上のアクセサリプラスミドの各々は、パッケージングプラスミド、Env コーディングプラスミド、Rev コーディングプラスミド、Rep コーディングプラスミド、または Cap コーディングプラスミドから選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

第 1 核酸および第 2 核酸は、宿主細胞に同時に導入される、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

第 1 核酸および第 2 核酸は、宿主細胞に個別に導入される、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

第 1 核酸および第 2 核酸は、同じプラスミド上に位置する、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

導入遺伝子発現の阻害は、一過的である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

導入遺伝子発現の阻害は、持続性である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

宿主細胞から単離されたウイルス粒子から発現された導入遺伝子が、機能的である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願

本出願は、2017年5月12日に提出された米国仮出願第62/505,540号の出願日の35 U.S.C. § 119(e)下の利益を主張する。この関連出願の内容の全体は、本明細書に援用される。

10

【0002】

背景

ウイルスベクター媒介遺伝子導入は、遺伝子機能および遺伝子治療を研究するための価値のあるツールである。しかしながら、ある導入遺伝子を含むウイルスベクターの産生（例として、パッケージング細胞に毒性であるか、または、ウイルスベクターのパッケージング系と非適合性である導入遺伝子産物）は、いくつかの課題（例えば、極めて低い力価またはウイルスベクターの非産生）に直面している。

【発明の概要】

【0003】

概要

いくつかの側面において、本開示は、細胞傷害性および/またはウイルスベクターパッケージング系と不適合性である導入遺伝子産物を含むベクター（例として、ウイルスベクター）の効率的な産生を可能にするために、ベクターパッケージングプロセスの間に、RNA分解（例として、低分子-ヘアピンRNA（shRNA）、人工のmiRNA（amiRNA）等々によって媒介されるような）により導入遺伝子発現を消失させることに関する。

20

【0004】

結果的にいくつかの側面において、本開示は、組み換えウイルス産生収率を制御または改善するための方法を提供し、宿主細胞に導入遺伝子を含む第1核酸を導入すること；宿主細胞に、干渉核酸を発現することができる第2核酸を導入することであって、ここで、干渉核酸は、導入遺伝子の発現を特異的に阻害する；宿主細胞内で導入遺伝子を含む核酸を複製すること；および、任意に、宿主細胞から第1核酸を含むウイルス粒子を単離することを含む。

30

【0005】

いくつかの態様において、第1核酸および第2核酸は、宿主細胞に同時に導入される。いくつかの態様において、第1核酸および第2核酸は、宿主細胞に個別に導入される。いくつかの態様において、第1核酸および第2核酸は、同じプラスミドに位置することが理解されるべきである。いくつかの態様において、第2核酸による導入遺伝子発現の阻害は、一過的である。いくつかの態様において、第2核酸による導入遺伝子発現の阻害は、持続性である。

40

【0006】

いくつかの態様において、宿主細胞は、ウイルスベクターパッケージング細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は、哺乳動物の細胞である。いくつかの態様において、哺乳動物の細胞は、ヒト細胞、例えばHEK293T細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は、昆虫細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は、昆虫細胞、例えばSpodoptera frugiperda(Sf9)細胞である。

【0007】

いくつかの態様において、第1核酸は、レンチウイルス導入プラスミド、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、アデノウイルス（Ad）ベクター、またはレトロウイルスベ

50

クターである。いくつかの態様において、第 1 核酸は、レンチウイルス導入プラスミドであり、少なくとも 1 の末端反復配列 (LTR) を含む。いくつかの態様において、第 1 核酸は、AAV ベクターであり、少なくとも 1 の末端逆位配列 (ITR) を含む。いくつかの態様において、第 1 核酸は、レトロウイルス導入プラスミドであり、少なくとも 1 の末端反復配列 (LTR) を含む。

【0008】

いくつかの態様において、AAV ITR は、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、または AAV 9 ITR である。いくつかの態様において、AAV ベクターは、少なくとも 1 の ITR または突然変異体 ITR (mTR) を含む自己相補的な AAV (scAAV) ベクターである。

10

【0009】

いくつかの態様において、導入遺伝子の発現は、宿主細胞において、ウイルスベクターのパッケージングに干渉する (例として、導入遺伝子の産物を介して)。いくつかの態様において、導入遺伝子は、細胞傷害性であるかまたは高い熱安定性を有する 2 次構造を形成する (例として、宿主細胞のフィットネスに有害な 1 以上の物理化学的特性を有する)。

【0010】

いくつかの態様において、第 1 核酸によってコードされる転写産物は、阻害性核酸について 1 以上の結合部位を含む。いくつかの態様において、1 以上の結合部位は、転写産物の最終コドンとポリ A テールとの間に位置している。いくつかの態様において、1 以上の結合部位は、転写産物の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に位置している。いくつかの態様において、1 以上の結合部位は、転写産物の最終コドンとポリ A テールとの間に位置し、かつ、1 以上の結合部位は、転写産物の 5' UTR に位置している。いくつかの態様において、1 以上の結合部位は、miR-333 結合部位 (配列番号 3)、miR-865 結合部位 (配列番号 4)、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、1 以上の結合部位は、1、2、または 3 の結合部位である。

20

【0011】

いくつかの態様において、阻害性核酸は、マイクロ RNA (miRNA) または人工 miRNA (amiRNA) である。いくつかの態様において、阻害性核酸結合部位の配列は、宿主細胞の内在性の miRNA によって認識されない。

30

【0012】

いくつかの態様において、第 2 核酸は、低分子ヘアピン RNA、miRNA、または amiRNA を発現する。いくつかの態様において、第 2 核酸は、miRNA または amiRNA を発現する。いくつかの態様において、miRNA または amiRNA は、非ヒト細胞において発現される miRNA 配列 (例として、非ヒト細胞においてのみ自然に発現される miRNA 配列) を含む。いくつかの態様において、miRNA または amiRNA は、昆虫細胞または植物細胞において発現される miRNA 配列 (例として、昆虫細胞または植物細胞においてのみ自然に発現される miRNA 配列) を含む。いくつかの態様において、miRNA または amiRNA は、植物細胞において発現される miRNA 配列 (例として、植物細胞においてのみ自然に発現される miRNA 配列) を含む。いくつかの態様において、miRNA または amiRNA は、miR-333 配列 (配列番号 1) または miR-856 配列 (配列番号 2) を含む。いくつかの態様において、amiRNA は、miR-30 足場 (例として、pri-miR30a 骨格配列 (backbone sequence) などの骨格配列) を含む。いくつかの態様において、転写産物は、miR-333 配列または miR-856 配列についての 1 以上の結合部位を含む。

40

【0013】

いくつかの態様において、宿主細胞は、1 以上のアクセサリプラスミドをさらに含む。いくつかの態様において、1 以上のアクセサリプラスミドは、パッケージングプラスミド、Env コーディングプラスミド、Rev コーディングプラスミド、Rep コーディングプラスミド、または Cap コーディングプラスミドである。

50

いくつかの態様において、宿主細胞から単離されたウイルス粒子から発現される導入遺伝子は、機能的である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、ウイルスおよび非ウイルスのベクターの非限定例を示す。いくつかの態様において、図1で示されるベクターは、1以上の導入遺伝子の対象（例として、対象の細胞）への送達に有用である。

【0015】

【図2】図2A～2Cは、rAAVゲノム均一性および収率を損なう回文配列を示す。図2Aは、CMVエンハンサー/ニワトリ-アクチンプロモーター(CB)、EGFPレポーター遺伝子、およびベータ-グロビンポリA配列(PA)を含む自己相補的なAAV(scAAV)プラスミドの概略図を示す。H1プロモーターによって駆動されるApoBを標的とするshRNAカセット、または、U6プロモーターによって駆動されるホタルルシフェラーゼ遺伝子(Fluc)を標的とするshRNAカセットは、イントロン(イントロン-Rおよびイントロン-F)内にmTR(m-Rおよびm-F)に隣接して、またはwtTR(Wt-RおよびWt-F)に隣接して、挿入された。図2Bは、H1プロモーターによって駆動されるshApoB保有の、または、U6プロモーターによって駆動されるshFluc(データは示さず)保有の、自己相補的なAAVベクターゲノムのアガロースゲル分析を示す。カセットは各々、図の左側に示されるように6つの位置/配向で試験された。切断型ウイルスゲノムは、全てのshRNAカセットについてのレーンにおいて観察されたが、対照口スカセットでは観察されなかった(shRNAなし)。図2Cは、(図2A)において記載されたベクターが、AAV9カプシドにパッケージングされ、EGFPプライマー/プローブセットを使用するqPCRによって収率が査定された。同じshRNAカセットを保有する構築物は、公平な比較を保証するために、パッケージングされ、(同じ時間における)セットとして滴定された。2つのセットの構築物(U6-shFlucおよびH1-shApoB)は、異なる時間にパッケージングされた。

10

20

【0016】

【図3】図3は、第3世代のレンチウイルスベクター産生の概略図を示す。この態様において、4つの構築物(パッケージングプラスミド、Revコーディングプラスミド、Envコーディングプラスミド、導入遺伝子コーディングプラスミド)は、ベクターを産生するために、許容細胞株(例として、HEK293)にトランスフェクトされる。

30

【0017】

【図4】図4は、GFP(Lenti-GFP、上図)または80マーのグリシン-アルギニン(Lenti-GFP-GR₈₀)ジアミノ酸反復ペプチドに融合されたGFPのいずれかを発現するレンチウイルスベクターで感染された細胞を示す。GR₈₀は、細胞傷害性筋萎縮性側索硬化症(ALS)および前頭側頭型認知症(FTD)関連ペプチドである。蛍光イメージングは、Lenti-GFPと比較して低い、Lenti-GFP-GR₈₀による細胞の形質導入を示し、GFPを含むベクターと比べて低い、細胞傷害性タンパク質(GR₈₀)を含むベクターの複製またはパッケージング効率を指示する。

40

【0018】

【図5】図5は、パッケージングに耐性の導入遺伝子(例として、細胞傷害性導入遺伝子または宿主細胞のフィットネスを低減させる導入遺伝子)を含むウイルスベクターの複製および/またはパッケージングを増加させるための手法の概略図を示す。パッケージング細胞は、ウイルスベクター産生プラスミド(単数または複数)およびパッケージングに耐性のある導入遺伝子(例として、細胞傷害性導入遺伝子または宿主細胞のフィットネスを低減する導入遺伝子)に特異的な干渉RNA分子(例として、shRNA、dsRNA、等々)を発現することができるプラスミドでコトランスフェクトされる。パッケージングの間の導入遺伝子発現の一過的なサイレンシング(例として、AgO2などのRNAi機構によって媒介される)は、ウイルスベクター複製およびパッケージングを増加させ、収

50

率の増加を導く。

【0019】

【図6】図6は、Lenti-GFP-GR₈₀-特異的shRNA(shRNA-GFP)を発現するプラスミドによる一過的な遺伝子発現サイレンシングの間にパッケージングされたGFP(Lenti-GFP、上図)、Lenti-GFP-GR₈₀、またはLenti-GFP-GR₈₀のいずれかを発現するレンチウイルスベクターで感染された細胞を示す。蛍光イメージングは、Lenti-GFPと比較して低い、Lenti-GFP-GR₈₀による細胞の形質導入を示し、GFPを含むベクターと比べて低い、細胞傷害性タンパク質(GR₈₀)を含むベクターの複製またはパッケージング効率を指示する。しかしながら、有意に増加した感染およびGFP-GR₈₀の発現が、Lenti-GFP-GR₈₀が形質導入された細胞で観察され、ベクターパッケージングの間の導入遺伝子発現の一過的なサイレンシングが、高い力価および機能的ウイルスベクターをもたらすことを指示する。

10

【0020】

【図7】図7は、パッケージングに耐性がある導入遺伝子(例として、細胞傷害性導入遺伝子または宿主細胞のフィットネスを低減する導入遺伝子)を含むウイルスベクターの複製および/またはパッケージングを増加させるための2つの手法の概略図を示す。左側では、パッケージング細胞は、ウイルスベクター産生プラスミド(単数または複数)および導入遺伝子に特異的なshRNAを発現することができるプラスミドでコトランスフェクトされる。パッケージングの間の導入遺伝子発現の一過的なサイレンシング(例として、Ago2などのRNAi機構によって媒介される)は、ウイルスベクター複製およびパッケージングを増加させ、収率の増加を導く。右側では、1以上(例として、3)の人工のmiRNA(amRNA)結合部位は、パッケージングに耐性がある導入遺伝子(例として、細胞傷害性導入遺伝子または宿主細胞のフィットネスを低減させる導入遺伝子)を含むプラスミド内に操作される。パッケージング細胞は、ウイルスベクター産生プラスミド(単数または複数)および産生プラスミド内へ操作される結合部位に特異的なamRNAを発現することができるプラスミドでコトランスフェクトされる。

20

【0021】

【図8】図8は、漸増数のmiRNA結合部位が導入遺伝子構築物に組み込まれるときに、RNAi効率が増加することを実証する例示のデータを示す。この例において、0、1または3つのmiR-122結合部位がnLucZ発現構築物に組み込まれた。Huh7細胞は、各構築物でトランスフェクトされ、nLucZ発現は測定された。データは、1または3つのmiR-122結合部位を有する構築物でトランスフェクトされた細胞における減少した導入遺伝子(nLucZ)発現を指示する。導入遺伝子発現の同様の減少が、マウス肝臓においても観察された。

30

【0022】

【図9】図9は、人工のmiRNA(amRNA)とそれらの標的部位との間の相互作用による特定のおよび効率的な遺伝子サイレンシングを示す。細胞は、333Tまたは856Tのいずれかに特異的である複数のmiRNA結合部位(これは、公知の哺乳動物miRNAによって結合されない配列である)を含むEGFP構築物およびmiR-333またはmiR-856 amRNAのいずれかを発現するプラスミドでコトランスフェクトされた。データは、miR-856 amRNAまたはshRNA対照プラスミドではなく、miR-333 amRNAでコトランスフェクトされた細胞におけるEGFP-333T発現のサイレンシングを指示する。データは、miR-333 amRNAまたはshRNA対照プラスミドではなく、miR-856 amRNAでコトランスフェクトされた細胞におけるEGFP-856T発現のサイレンシングを指示する。

40

【0023】

【図10】図10は、アポリタンパク質L1(ApoL1)を発現することができるレンチウイルスベクターについての力価およびベクターパッケージングを改善するための方法に関する代表的なデータを示し、このタンパク質は、典型的には、従来のウイルスベク

50

ター産生手順を使用してパッケージングすることが困難である。3つのmiR-856結合部位(3×856T)は、Apol1発現構築物に組み込まれた。パッケージング細胞は、Apol1発現構築物およびamiR-856を発現するプラスミドでコトランスフェクトされた。データは、ベクター力価が漸増濃度のamiR-856とともに増加することを示し、パッケージングの間の導入遺伝子(例として、Apol1)発現の増加したサイレンシングが、Lenti-Apol1ベクター産生の効率を増加させることを指示する。

【0024】

【図11】図11は、対照Lenti-GFPベクターではなく、Lenti-Apol1ベクターに感染した細胞の死滅によって示される、導入遺伝子発現のサイレンシングの間にパッケージングされたベクターによって発現されるアポリタンパク質L1(例として、Apol1)が機能的であることを指示する代表的なデータを示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な記載

本開示の側面は、部分的に、ベクターパッケージング(例として、宿主細胞中の組み換えウイルス粒子のパッケージング)の間に、RNA干渉または同様の経路(shRNAまたは人工のmiRNA、amiRNAのいずれか)によって導入遺伝子発現を消滅させることが、効率的なベクター産生を生じるという発見に関する。以下の例に記載されるとおり、細胞傷害性導入遺伝子(例として、EGFP-(GR)80またはApol1)を保有するレンチウイルスベクターは、ウイルスベクターパッケージングの間に導入遺伝子特異的阻害性核酸(例として、shRNAまたはmiRNA)を発現するプラスミドのコトランスフェクションを実施することによって産生された。本明細書に記載の方法を使用する、これらの例示の遺伝子を含むウイルス粒子の効率的な産生は、細胞傷害性遺伝子が通常、従来のウイルス粒子産生方法によってパッケージングすることが困難であるので、驚くべきことである。

20

【0026】

ウイルスベクター産生のための第2の手法はまた、本明細書に記載されている。簡潔には、shRNAまたは人工のmiRNAのいずれかについての3コピーの標的部位が、Lenti-Apol1プラスミド中のApol1導入遺伝子の3'UTRに組み込まれた。これらの標的部位は、任意の公知の哺乳動物の内在性の低分子RNA(例として、miRNA結合部位は、宿主細胞に対して直交性である)によって認識されないが、パッケージングプロセス中にコトランスフェクトされたプラスミドから発現されるshRNAまたはamiRNA(例として、直交性shRNAまたはamiRNA)に特異的に感受性であるように設計された。「直交性(orthogonal)」阻害性核酸または核酸結合部位は、宿主細胞において自然に発現されないが、宿主細胞によって内在的に発現されるmiRNA(またはmiRNA結合部位)と相互作用しない阻害性核酸(または、その同族の結合部位)の配列を指す。人工の低分子RNA標的分子が包埋した導入遺伝子を有するウイルスベクターの産生は損なわれないことが観察された。その代わりに、導入遺伝子発現は、対応するshRNAまたはamiRNAの存在下で効率的にサイレンシングされる(例として、ウイルス粒子のパッケージングの間に一過的にサイレンシングされる)。結果的に、細胞傷害性導入遺伝子を含むウイルス粒子は、高い力価で首尾よく産生された。加えて、HEK293細胞のウイルス粒子での感染は、大規模な細胞死を引き起こすことが観察され、パッケージングされたウイルスベクターの感染力および導入遺伝子機能の維持が指示された。

30

40

【0027】

要約すると、一過的なRNAサイレンシングによるベクター産生の間の細胞傷害性または非適合性の導入遺伝子の抑制は、高い力価および機能的なウイルスベクターの産生を可能にする。いくつかの態様においては、本開示によって記載される方法は、細胞傷害性または非適合性の導入遺伝子(例として、宿主細胞のフィットネスに有害な導入遺伝子)を

50

保有するアデノウイルス、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）、等々などのウイルスベクターのパッケージングに有用である。

【0028】

核酸

本明細書において用いられる場合、用語「核酸」とは、DNA、RNAなどの連結されたヌクレオチドのポリマーを指す。いくつかの態様において、本開示のタンパク質および核酸は、単離されている。いくつかの態様において、導入遺伝子のDNAは、メッセンジャーRNA（mRNA）転写産物に翻訳される。本明細書において用いられる場合、用語「単離される」とは、人工的に産生されることを意味する（例として、人工的に産生された核酸、または人工的に産生されたタンパク質（カプシドタンパク質など））。核酸に関して本明細書において用いられる場合、用語「単離される」とは、以下を意味する：（i）in vitroで、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、増幅される；（ii）クローニングにより組み換え的に生成される；（iii）切断およびゲル分離などにより、精製される；または（iv）例えば化学合成により、合成される。単離された核酸は、当該分野において周知の組み換えDNA技術により、容易に操作可能であるものである。したがって、5'および3'制限部位が知られているか、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のプライマー配列が開示されているベクター中に含まれるヌクレオチド配列は、単離されていると考えられるが、その天然の宿主中でそのネイティブな状態において存在する核酸配列はそうではない。単離された核酸は、実質的に精製されていてもよいが、必ずしもその必要はない。例えば、クローニングまたは発現ベクター内で単離されている核酸は、それが存在する細胞中の材料のうちのわずかなパーセンテージのみを含んでもよいという点において、純粋ではない。しかし、当該用語が本明細書において用いられる場合、かかる核酸は単離されている。なぜならば、それは当業者に公知の標準的な技術により容易に操作可能であるからである。タンパク質またはペプチドに関して本明細書において用いられる場合、用語「単離される」とは、人工的に（例えば、化学合成により、組み換えDNA技術などにより）産生されたタンパク質またはペプチドを指す。

【0029】

本明細書に使用されるとき、「導入遺伝子」は、目的のポリペプチド、タンパク質、機能的RNA分子（例として、miRNA、miRNAインヒビター）または他の遺伝子産物をコードするベクター配列に相同的ではない核酸配列である。いくつかの態様において、導入遺伝子は、治療用タンパク質または治療用機能的RNAをコードする。治療用タンパク質の例は、毒素、酵素（例として、キナーゼ、ホスホリラーゼ、プロテアーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、等々）成長因子、インターロイキン、インターフェロン、抗アポトーシス因子、サイトカイン、抗糖尿病因子、抗アポトーシス剤、凝固因子、抗腫瘍因子、および抗増殖性タンパク質を包含する。核酸コーディング配列は、標的組織の細胞中での導入遺伝子の転写、翻訳、および/または発現を可能にする様式で、調節因子に操作可能に連結される。

【0030】

いくつかの側面において、本開示は、細胞傷害性または宿主細胞のフィットネスに有害な1以上の導入遺伝子をコードするウイルスベクターに関する。「細胞傷害性」導入遺伝子は、生細胞に毒性である遺伝子産物（例として、タンパク質）をコードする導入遺伝子を指す。毒性の導入遺伝子の例は、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、リボソーム不活性化タンパク質（例として、リシン）、細胞溶解素、ポリリン（例として、アクチノポリリン）、アポリボタンパク質、あるプロテアーゼ、等々を包含する。いくつかの態様において、タンパク質は、細胞において過剰発現されると、細胞傷害性となる。「宿主細胞の健康に有害な導入遺伝子」は、導入遺伝子を発現しない宿主細胞と比べて減少した、導入遺伝子を発現する宿主細胞のフィットネス（生存能力）を生じる、ある生理化学的特徴（例として、高い熱安定性を有する2次構造、凝集傾向、等々）を有するタンパク質をコードする導入遺伝子を指す。

【0031】

10

20

30

40

50

本明細書に使用されるとき、用語「ベクター」は、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ビリオン、等々などの任意の遺伝子要素を包含し、これは、適切な制御要素と関連して複製することができ、細胞間で遺伝子配列を移送する(transfer)ことができる。よって、この用語は、クローニングおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを包含する。いくつかの態様において、有用なベクターは、転写される核酸セグメントがプロモーターの転写制御下に位置するベクターであることが企図される。「プロモーター」は、細胞の合成機構によって認識されるかまたは合成機構に導入されて、遺伝子の特定転写を開始することが要求されるDNA配列を指す。句「操作可能に位置する」、「制御下」、または「転写制御下」は、プロモーターが、核酸に関連して、遺伝子のRNAポリメラーゼの開始および発現を制御するのに正しい場所および配向で存在することを意味する。

10

【0032】

用語「発現ベクターまたは構築物」は、核酸コーディング配列の一部または全部が転写されることができる、核酸を含有する任意の型の遺伝子構築物を意味する。いくつかの態様において、発現は、例えば、生物学的に活性なポリペプチド産物(例として、治療用タンパク質または治療用ミニ遺伝子)または転写された遺伝子からの阻害性RNA(例として、shRNA、miRNA、amiRNA、miRNAインヒビター)を産生するための、核酸の転写を包含する。

【0033】

用語「干渉核酸」は、本明細書に使用されるとき、導入遺伝子に結合し、その発現を特異的に阻害する、連結されたオリゴヌクレオチドのポリマーを指す。干渉核酸は、例えば、低分子干渉RNA(shRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、または人工のマイクロRNA(amiRNA)であり得る。

20

【0034】

低分子ヘアピンRNA(shRNA)

低分子ヘアピンRNA(shRNA)は、堅固なヘアピンターンを有する人工のRNA分子である。一般に、shRNAは、ループ配列によってアンチセンス鎖(例として、ガイド鎖)に接続されるセンス鎖(例として、パッセンジャー鎖)含む二重鎖を有するステム部分をコードする単一核酸を包含する、自己相補的な「ステム-ループ」構造に配置される。パッセンジャー鎖およびガイド鎖は、相補性を共有する。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖およびガイド鎖は、100%の相補性を共有する。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖およびガイド鎖は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の相補性を共有する。パッセンジャー鎖およびガイド鎖は、塩基対のミスマッチに起因して相補性を欠いていてもよい。いくつかの態様において、ヘアピン形成RNAのパッセンジャー鎖およびガイド鎖は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10のミスマッチを有する。一般に、ステム(ループと比べて)の最初の2~8ヌクレオチドは、「シード」残基と称され、標的の認識および結合において重要な役割を果たす。ステム(ループと比べて)の最初の残基は、「アンカー」残基と称される。いくつかの態様において、ヘアピン形成RNAは、アンカー残基においてミスマッチを有する。

30

40

【0035】

ヘアピン形成RNAは、RNAi経路を介する翻訳抑制および/または遺伝子サイレンシングに有用である。共通の2次構造を有することに起因して、ヘアピン形成RNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)にロードされる前に、タンパク質DrosshaおよびDicerによってプロセシングされる特徴を共有する。ヘアピン形成RNA間で、二重鎖の長さは変化し得る。いくつかの態様において、二重鎖は、約19ヌクレオチド長と約200ヌクレオチド長との間である。いくつかの態様において、二重鎖は、約14ヌクレオチド長と約35ヌクレオチド長との間である。いくつかの態様において、二

50

重鎖は、約 19ヌクレオチド長と約 150ヌクレオチド長との間である。いくつかの態様において、ヘアピン形成RNAは、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、または33ヌクレオチド長である二重鎖領域を有する。いくつかの態様において、二重鎖は、約 19ヌクレオチド長と約 33ヌクレオチド長との間である。いくつかの態様において、二重鎖は、約 40ヌクレオチド長と約 100ヌクレオチド長との間である。いくつかの態様において、二重鎖は、約 60ヌクレオチド長と約 80ヌクレオチド長との間である。

【0036】

本開示の方法は、干渉核酸を発現する核酸を記載し、ここで、干渉核酸は、導入遺伝子の発現を特異的に阻害する。いくつかの態様において、核酸は、導入遺伝子に結合しその転写をブロックするshRNAを発現する。

10

【0037】

マイクロRNA(miRNA)および人工のマイクロRNA(amRNA)

マイクロRNA(miRNA)は、転写後のサイレンシングによって細胞内遺伝子発現を調節する、低分子の非コーディングRNAである。miRNAが標的mRNA配列に部分的に相補的であるとき、これらは、典型的には、標的mRNAの安定性を低減し、翻訳を阻害する。対照的に、miRNAは、mRNA標的にほぼ完全に相補的であるとき、mRNAは切断され、その大規模な破壊を引き起こす。miRNAは、転写後レベルで、全身送達され、普遍的に発現される導入遺伝子の組織特異的調節を達成できる。miRNAは、異なる組織および細胞型において、別個の発現プロファイルを有し、細胞内遺伝子および細胞内機能の転写後プロファイルを差示的に調節する。したがって、本明細書に提供される方法は、細胞における導入遺伝子発現をサイレンシングするためにmiRNAを使用する。

20

【0038】

miRNAは、それが標的とするmRNAの機能を阻害し、結果として、mRNAによってコードされるポリペプチドの発現を阻害する。よって、miRNAの活性を(部分的にまたは全体的に)ブロックすること(例としては、miRNAをサイレンシングすること)は、その発現が阻害される(ポリペプチドを抑制する)ポリペプチドの発現を有効に誘導または回復させることができる。一態様において、miRNAのmRNA標的にによってコードされるポリペプチドの抑制は、様々な方法のいずれか1つを通して、細胞中のmiRNA活性を阻害することによって達成される。例えば、miRNAの活性のブロックは、miRNAに相補的であるかまたは実質的に相補的である低分子干渉核酸(例として、アンチセンスオリゴヌクレオチド、miRNAスポンジ、TuD RNA)とのハイブリダイゼーションによって達成され得、これにより、miRNAのその標的mRNAとの相互作用をブロックする。本明細書に使用されるとき、miRNAに実質的に相補的である低分子干渉核酸は、miRNAとハイブリダイズすることができ、miRNAの活性をブロックするものである。いくつかの態様において、miRNAに実質的に相補的である低分子干渉核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18塩基を除きmiRNAと完全に相補的である低分子干渉核酸である。いくつかの態様において、miRNAに実質的に相補的である低分子干渉核酸配列は、miRNAと少なくとも1塩基相補的である低分子干渉核酸である。

30

40

【0039】

人工のマイクロRNA(amRNA)は、miRNA遺伝子骨格を利用して人工的に設計された低分子RNAを産生するために、上に記載されたmiRNA生合成経路を利用する。amRNAの細胞内プロセッシングは、同じ選択的核酸配列(これは、一般に、21塩基対の長さである)を全て保有する、単一型の低分子RNA集団を産生する。それにより、amRNAは、個々の導入遺伝子をサイレンシングするため、または、密接に関連する遺伝子アイソフォームを同時にサイレンシングするための実行可能な方法を提供する。amRNAは時折、より高い遺伝子サイレンシング特異性およびより低いオフター

50

ゲットサイレンシング効果のために、伝統的なmiRNAを超える利点を有する。

【0040】

いくつかの態様において、人工のマイクロRNA (amiRNA) は、pre-mRNAの自然の標的化領域を目的の標的化領域と置き換えるために、天然のmiRNAを改変することによって誘導される。例えば、天然に存在する発現されたmiRNAは、足場または骨格 (例として、pri-miRNA足場) として使用され得、ステム配列は、目的の遺伝子 (例として、宿主細胞に対して直交性のmiRNA、例えば、miR-333またはmiR-856) を標的とするmiRNAのものと置き換えられている。人工の前駆体マイクロRNA (pre-amiRNA) は、通常、単一の安定な低分子RNAが優先的に産生されるようにプロセッシングされる。いくつかの態様において、本明細書に開示のウイルスベクターおよび粒子 (例として、本明細書に記載のscAAVベクターおよびscAAV) は、amiRNAをコードする核酸を含む。いくつかの態様において、AmiRNAのpri-miRNA足場は、pri-MIR-21、pri-MIR-22、pri-MIR-26a、pri-MIR-30a、pri-MIR-33、pri-MIR-122、pri-MIR-375、pri-MIR-199、pri-MIR-99、pri-MIR-194、pri-MIR-155、およびpri-MIR-451からなる群から選択されるpri-miRNAから誘導される。

10

【0041】

いくつかの態様において、導入遺伝子は、目的のタンパク質、例として、治療用タンパク質、および阻害性核酸 (例として、shRNA、miRNA、amiRNA、等々) についての1以上の結合部位を発現するように操作されてもよい。いくつかの態様において、導入遺伝子はまた、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のmiRNA結合部位を含む。かかるタンパク質を発現する転写産物は、1以上の阻害性miRNA (例として、宿主細胞中で発現されないmiRNA) を含有するように操作されてもよい。このように、宿主細胞中で発現される場合、転写産物は、宿主細胞中での転写によって発現される阻害性核酸 (例として、miRNA、amiRNA、等々) を介して分解されてもよい。

20

【0042】

本開示は、宿主細胞において内在的に発現されないmiRNAまたはamiRNA (例として、直交性のmiRNA) にハイブリダイズするように構成されたmiRNAまたはamiRNA結合部位を有する転写産物を発現するように操作された導入遺伝子に部分的に基づく。例えば、いくつかの態様において、ヒト細胞などの哺乳動物細胞中に導入遺伝子が発現するように操作された構築物は、植物細胞または昆虫細胞中に内在的にのみ発現される阻害性核酸 (例として、miRNA、amiRNA、等々) について1以上の結合部位を有する導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、Sf9細胞などの昆虫細胞中で導入遺伝子が発現するように操作された構築物は、哺乳動物細胞または植物細胞中に内在的にのみ発現される阻害性核酸 (例として、miRNA、amiRNA、等々) についての1以上の結合部位を有する導入遺伝子を含む。

30

【0043】

いくつかの態様において、転写産物は、miR-333 (配列番号1) またはmiR-856 (配列番号2) から選択されるmiRNAについての1以上の結合部位を含む。いくつかの態様において、miR-333についての結合部位は、配列番号3に示される配列によって表される。いくつかの態様において、miR-856についての結合部位は、配列番号4に示される配列によって表される。

40

【0044】

転写産物中の阻害性核酸 (例として、shRNA、miRNA、amiRNA、等々) 結合部位の位置は、変化し得る。いくつかの態様において、阻害性核酸についての1以上の結合部位は、転写産物の5'非翻訳領域 (5'UTR) に位置する。いくつかの態様において、阻害性核酸についての1以上の結合部位は、イントロン中に位置する。いくつかの態様において、阻害性核酸についての1以上の結合部位は、転写産物の最終コドンの最

50

後のコドンとポリ A テールとの間に位置する。いくつかの態様において、阻害性核酸についての 1 以上の結合部位は、5' UTR に位置し、かつ、阻害性核酸についての 1 以上の結合部位は、転写産物の最終コドンの最後のコドンとポリ A テールとの間に位置する。

【0045】

ウイルスベクター

ウイルスベクターは、プラスミドおよび遺伝子材料の細胞への送達のための強力なツールを提供する。ウイルス媒介送達を用いる用途のためにプラスミド DNA を適応させることは、神経細胞などの伝統的にトランスフェクトが困難な細胞中の遺伝子情報の送達を包含する、研究のための多数の利点を提供している。ウイルスは、自然に、宿主細胞に感染し、これらにウイルスゲノムを複製するように指示する。科学者は、代替的なゲノム（例として、核酸または導入遺伝子をコードするプラスミド）（これらは、一旦ウイルスが宿主細胞に感染すると、複製され得る）をウイルスに提供することによって、このプロセスを利用してきた。要するに、研究者は、組み換えウイルスを産生するために、宿主細胞にプラスミドを導入することができる。

10

【0046】

安全性の理由から、研究で使用されるウイルスのゲノムは、ウイルス複製に必要な、ある遺伝子の除去を通して改変されている。これらの遺伝子は通常、ウイルス粒子が産生されるために存在しなければならない、多数の「アクセサリープラスミド」に分けられる。宿主細胞による、ウイルスゲノムと一緒に、目的の核酸を含むウイルス粒子の産生は、本明細書において「パッケージング」と称される。核酸のウイルスゲノムへの送達およびパッケージングは、核酸がコードされるウイルスゲノムによって変化し、以下の各ウイルスベクターについて、詳細に考察されるだろう。

20

【0047】

宿主細胞中でのパッケージングのためのウイルスゲノムから発現される導入遺伝子は、毒性（例として、細胞傷害性または宿主細胞のフィットネスに有害）であり得、従って、宿主細胞中でのウイルスパッケージングと干渉し得る。いくつかの態様において、第 1 核酸から発現される導入遺伝子は、宿主細胞に対して細胞傷害性である。いくつかの態様において、発現された導入遺伝子は、高い熱安定性を有する 2 次構造を形成する。

【0048】

本明細書に使用されるとき、用語「組み換えウイルス」または「組み換えウイルス粒子」は、宿主細胞ゲノムに挿入された外来性 DNA から産生され、導入された核酸を被包する宿主細胞中で産生される粒子を指す。

30

【0049】

いくつかの側面において、本開示は、トランスフェクトされた宿主細胞を提供する。用語「トランスフェクション」は、細胞による外来 DNA の取り込みを指すために使用され、細胞は、外来性 DNA が細胞膜の内側に導入されているときに「トランスフェクトされている」。数多のトランスフェクション技法は、一般に当該技術分野において知られている。例として、Graham et al. (1973) Virology, 52:456、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier and Chu et al. (1981) Gene 13:197を参照。かかる技法は、1 以上の外来性核酸（ヌクレオチド組み込みベクターおよび他の核酸分子など）を適切な宿主細胞へ導入するために使用され得る。当業者は、本開示によって記載される方法において、宿主細胞が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の単離された核酸でトランスフェクトされてもよいことを理解するだろう。

40

【0050】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス - 1 (HIV - 1) に由来する。レンチウイルスゲノムは、DNA に逆転写され、次いで、宿主細胞ゲノムに組み込まれる一本鎖 RNA からなる。レンチウイルスは、分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染するこ

50

とができ、これらを遺伝子治療のための魅力的なツールとしている。

【0051】

レンチウイルスゲノムは、ほぼ9kbの長さであり、3つの主要な構造遺伝子：gag、pol、およびenvを含有する。gag遺伝子は、3つのウイルスコアタンパク質に翻訳される：マトリックス(MA)タンパク質、これは、ビリオンのアセンブリおよび非分裂細胞の感染に必要である；カプシド(CA)タンパク質、これは、ビリオンの疎水性コアを形成する；およびヌクレオカプシド(NC)タンパク質、これは、コーティングによってウイルスゲノムを保護し、RNAと密接に会合する。pol遺伝子は、ウイルス複製に不可欠なウイルスプロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼ酵素をコードする。env遺伝子は、ウイルス表面の糖タンパク質をコードし、これは、細胞受容体への結合および細胞膜との融合を可能にすることによる、宿主細胞へのウイルス侵入に不可欠である。いくつかの態様において、ウイルス糖タンパク質は、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)由来である。ウイルスゲノムはまた、tatおよびrevを包含する調節遺伝子を含有する。tatは、ウイルス転写を活性化するのに重大なトランスアクチベーターをコードするが、revは、ウイルス転写産物のスプライシングおよび搬出を調節するタンパク質をコードする。tatおよびrevは、ウイルス組み込み後に合成される最初のタンパク質であり、ウイルスmRNAの産生を加速するのに必要とされる。

10

【0052】

レンチウイルスの安全性を改善するために、ウイルスの産生に必要な構成要素は、複数のベクターにわたって分かれている。本開示の方法は、末端反復配列(LTR)が隣接する1以上の目的の導入遺伝子をコードする組み換えレンチウイルス導入ベクターを記載する。これらのLTRは、数百回または数千回反復されて、宿主細胞ゲノムへの導入プラスミド配列の組み込みを容易にする、同一のヌクレオチド配列である。本開示の方法はまた、1以上のアクセサリープラスミドを記載する。これらのアクセサリープラスミドは、1以上のレンチウイルスパッケージングプラスミドを包含してもよく、これは、複製、スプライシング、およびウイルス粒子の搬送に必要なpolおよびrev遺伝子をコードする。アクセサリープラスミドはまた、レンチウイルスのエンベローププラスミドを包含してもよく、これは、ウイルス粒子が宿主細胞と融合するのを許可するウイルス糖タンパク質を産生するのに必要な遺伝子をコードする。

20

【0053】

アデノ随伴ウイルス

本開示の単離された核酸は、組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(rAAVベクター)であってもよい。いくつかの態様において、本開示によって記載されるような単離された核酸は、第1のアデノ随伴ウイルス(AAV)末端逆位配列(ITR)またはそのバリエーションを含む領域(例として、第1領域)を含む。単離された核酸(例として、組み換えAAVベクター)は、カプシドタンパク質へパッケージングされて、対象へ投与され、および/または選択された標的細胞へ送達されてもよい。「組み換えAAV(rAAV)ベクター」は、典型的には、最小限には、導入遺伝子およびその調節配列、および5'および3' AAV末端逆位配列(ITR)から構成される。導入遺伝子は、本明細書の他に開示されるように、阻害性核酸(例として、shRNA、miRNA、等々)につ

30

40

【0054】

一般に、ITR配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にITRをコードする配列全体が、分子中に使用されるが、これらの配列のある程度のマイナーな改変が許容される。これらのITR配列を改変する能力は、当業者の技術の範囲内である(within the skill of the art)(例として、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989);およびK. F

50

isher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照のこと)。本発明において使用される、かかる分子の例は、導入遺伝子を含む「シス作用」プラスミドであり、ここで、選択された導入遺伝子配列および関連する調節エレメントは、5'および3' AAV ITR配列に隣接している。AAV ITR配列は、現在同定されている哺乳動物AAV型を含む任意の公知のAAVから得てもよい。いくつかの態様において、単離された核酸(例として、rAAVベクター)は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAVrh10、AAVrh39、AAVrh43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、AAV2/2-125、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する少なくとも1のITRを含む。いくつかの態様において、単離された核酸は、AAV2 ITRをコードする領域(例として、第1領域)を含む。

10

【0055】

いくつかの態様において、単離された核酸はさらに、1以上のAAV ITRを含む。いくつかの態様において、AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAV9、AAVrh10、AAVrh39、AAVrh43、AAV2/2-66、AAV2/2-84、AAV2/2-125、およびそれらのバリエーションから選択される血清型を有する。いくつかの態様において、AAV ITRは、機能的な末端溶解部位(functional terminal resolution site)(TRS)を欠く突然変異体ITR(mTR)である。用語「末端溶解部位を欠く」は、ITRの末端溶解部位(TRS)の機能を抑制する(abrogate)突然変異(例として、非同義突然変異などのセンス変異またはミスセンス)を含むAAV ITR、または、機能的TRS(例として、TRS ITR)をコードする核酸配列を欠く切断型AAV ITRを指す。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、機能的TRSを欠くITRを含むrAAVベクターは、例えばMcCarthy (2008) Molecular Therapy 16(10):1648-1656に記載されるような自己相補的なrAAVベクターを産生する。

20

【0056】

本明細書に使用されるとき、用語「自己相補的なAAVベクター」(scAAV)は、AAVのITRの1つからの末端溶解部位(TR)の非存在によって産生される二本鎖ベクターゲノムを含むベクターを指す。TRの非存在は、TRが存在していないベクター末端における複製の開始を妨げる。一般に、scAAVベクターは、野生型(wt)AAV TRが各末端に存在し、変異TR(mTR)が中央に存在する、一本鎖の逆方向反復ゲノムを産生する。いくつかの態様において、単離された核酸は、ウイルスゲノム複製の間に突然変異体逆方向反復配列(mTR)と同様の機能を果たし得るRNAヘアピン構造(例として、shRNA、miRNA、およびamiRNA)をコードするDNA配列を含み、自己相補的なAAVベクター(scAAV)ゲノムを産生する。例えば、いくつかの態様において、本開示は、2つの末端の各々において逆方向反復配列(ITR)を有する一本鎖自己相補的な核酸、および、ヘアピン形成RNA(例として、shRNA、miRNA、amiRNA、等々)をコードする配列に操作可能に連結されたプロモーターを含むある部分、を含むrAAV(例として、自己相補的なAAV; scAAV)ベクターを提供する。いくつかの態様において、ヘアピン形成RNA(例として、shRNA、miRNA、amiRNA、等々)をコードする配列は、突然変異体ITRによって通常占有される自己相補的な核酸の位置で置換される。

30

40

【0057】

「組み換えAAV(rAAV)ベクター」は、典型的には、最小限では、導入遺伝子およびその調節配列、および5'および3' AAV逆位反復配列(ITR)から構成される。カプシドタンパク質にパッケージングされ、選択された標的細胞に送達されるのは、この組み換えAAVベクターである。いくつかの態様において、導入遺伝子は、ポリペプチド、タンパク質、機能的RNA分子(例として、miRNA、miRNAインヒビター)または目的の他の遺伝子産物をコードする、ベクター配列に異種性の核酸配列である。核

50

酸コーディング配列は、標的組織の細胞中での導入遺伝子の転写、翻訳、および／または発現を可能にする様式で、調節因子に操作可能に連結されている。

【0058】

本開示は、単一のシス作用性野生型 I T Rを含むベクターを提供する。いくつかの態様において、I T Rは、5' I T Rである。いくつかの態様において、I T Rは、3' I T Rである。一般に、I T R配列は、約145bpの長さである。好ましくは、実質的にI T R（単数または複数）をコードする配列全体は、分子中で使用されるが、これらの配列のいくらかの程度のマイナーな改変が許可される。I T R配列を改変する能力は、当業者の能力の範囲内(within the skill of the art)である（例として、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989);およびK. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)などのテキストを参照のこと）。例えば、I T Rは、その末端溶液部位(T R)において変異されてもよく、これは、T Rが変異されており、かつ、自己相補的なA A Vの形成を生じるベクター末端での複製を阻害する。本開示において使用されるかかる分子の別の例は、導入遺伝子を含む「シス作用性」プラスミドであり、ここで、選択された導入遺伝子配列および関連する調節因子は、5' A A V I T R配列および3' ヘアピン形成RNA配列に隣接する。A A V I T R配列は、現在同定されている哺乳動物A A V型を含む、任意の公知のA A Vから得てもよい。

【0059】

いくつかの態様において、本開示のr A A Vは、シュードタイプ化したr A A Vである。例えば、Yのタンパク質でカプシド形成された血清型XのI T Rを含むシュードタイプ化したA A Vベクターは、A A V X / Yとして命名されるであろう（例えば、A A V 2 / 1は、A A V 2のI T RおよびA A V 1のカプシドを有する）。いくつかの態様において、シュードタイプ化したr A A Vは、1つのA A V血清型からのカプシドタンパク質の組織特異的ターゲティング能力を、別のA A V血清型からのウイルスDNAと組み合わせて、それにより、標的組織への導入遺伝子のターゲティングされた送達を可能にするために有用であり得る。

【0060】

所望されるカプシドタンパク質を有する組み換えA A Vを得るための方法は、当該分野において周知である（例えば、US 2003 / 0138772を参照；その内容は、本明細書においてその全体において参考として援用される）。典型的には、方法は、A A Vカプシドタンパク質をコードする核酸配列；機能的rep遺伝子；A A V末端逆位反復配列(I T R)および導入遺伝子から構成される組み換えA A Vベクター；ならびにA A Vカプシドタンパク質中への組み換えA A Vベクターパッケージングを可能にするために十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを含む。いくつかの態様において、カプシドタンパク質は、A A Vのcap遺伝子によってコードされる構造タンパク質である。A A Vは、3つのカプシドタンパク質であるポリオンタンパク質1~3(V P 1、V P 2およびV P 3と命名される)を含み、その全ては、選択的スプライシングを介して、単一のcap遺伝子から転写される。いくつかの態様において、V P 1、V P 2およびV P 3の分子量は、夫々約87kDa、約72kDaおよび約62kDaである。いくつかの態様において、翻訳の際、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムのまわりの球状の60マーのタンパク質シェルを形成する。いくつかの態様において、カプシドタンパク質の機能は、ウイルスゲノムを保護し、ゲノムを送達し、宿主と相互作用することである。いくつかの側面において、カプシドタンパク質は、ウイルスゲノムを組織特異的様式で宿主に送達する。

【0061】

いくつかの態様において、A A Vカプシドタンパク質は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 6.2、A A V 7、A A V 8、A A V rh 8、A A V 9、A A V rh 10、A A V rh 39、A A V rh 43、A A V 2 / 2 - 66、A A V 2 / 2 - 84、A A V 2 / 2 - 125からなる群から選択されるA A V血清型であ

る。いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、非ヒト霊長目の動物由来の血清型、例えばscAAV.rh8、AAV.rh39、またはAAV.rh43血清型である。いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、AAV9血清型である。

【0062】

rAAVベクターをAAVカプシド中にパッケージングするために宿主細胞において培養されるべき成分は、宿主細胞にトランスで提供してもよい。あるいは、必要とされる成分（例えば、組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、および/またはヘルパー機能）のうちの任意の1以上を、当業者に公知の方法を用いて必要とされる成分のうちの1以上を含むように操作された、安定な宿主細胞により提供させることができる。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、必要とされる成分を誘導性プロモーターの制御下に含むであろう。しかし、必要とされる成分は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。好適な誘導性および構成的プロモーターの例は、本明細書において、導入遺伝子と共に用いるために好適な調節エレメントの議論において提供される。なお別の選択肢において、選択される安定な宿主細胞は、選択される成分を構成的プロモーターの制御下に、他の選択される成分を1以上の誘導性プロモーターの制御下に含んでもよい。例えば、293細胞（これは、E1ヘルパー機能を構成的プロモーターの制御下に含む）に由来するが、repおよび/またはcapタンパク質を誘導性プロモーターの制御下に含む、安定な宿主細胞を作製することができる。当業者は、なお他の安定な宿主細胞を作製することができる。

10

【0063】

本開示のrAAVを生成するために必要とされる組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、任意の適切な遺伝子エレメント（ベクター）を用いて、パッケージング宿主細胞に送達することができる。選択される遺伝子エレメントは、本明細書において記載されるものを含む任意の好適な方法により送達することができる。本開示の任意の態様を構築するために用いられる方法は、核酸操作における技術を有する当業者に公知であり、遺伝子工学、組み換え工学および合成技術を含む。例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)を参照。同様に、rAAVビリオンを作製する方法は、周知であり、好適な方法の選択は、本開示に対する限定ではない。例えば、K. Fisher et al, J. Virol., 70:520-532 (1993)および米国特許第5,478,745号を参照。

20

30

【0064】

アデノウイルスベクター

アデノウイルスゲノムは、複数の重度にスプライシングされた転写産物を含む、非エンベロープの大きな(36-kb)二本鎖DNA(dsDNA)分子である。アデノウイルスは、高いパッケージング能力(~8キロベース)を有し、分裂および非分裂細胞の広範な範囲を標的とすることができる。アデノウイルスは、宿主ゲノムには組み込まれず、よって宿主細胞中で一過的な導入遺伝子発現を生成するのみである。アデノウイルスゲノムのいずれかの末端において、末端反復配列(ITR)が存在する。アデノウイルスゲノムによってコードされる遺伝子は、初期(E1-E4)および後期(L1-L5)転写産物に分けられる。ほとんどのヒトアデノウイルスベクターは、細胞に侵入するのにコクサッキーアデノウイルス受容体を使用する、Ad5ウイルス型に基づいている。

40

【0065】

組み換えアデノウイルスは、そのゲノムからE1およびE3遺伝子が欠失している。E1の欠失は、ウイルス複製を不完全とする；E1は、HEK293細胞などのアデノウイルスパッケージング細胞株によって提供される。E3は、宿主細胞免疫の回避に関与しており、ウイルス産生に必須ではない。これら2つの構成要素の欠失は、>8キロベースの導入遺伝子パッケージング能力を生じる。

【0066】

本開示の方法は、目的の核酸（単数または複数）をコードする組み換えアデノウイルスベクターを記載する。組換えアデノウイルスベクターの産生は、導入ベクターおよびアデ

50

ノウイルスベクターの両方を包含する。アデノウイルスにおいてパッケージングされる導入遺伝子は、最初に、導入ベクターに配置される。アデノウイルスゲノム中の挿入部位における配列に相補的である左側および右側の隣接配列を含有する組み換え導入ベクターは、相同組み合わせ（HR）によるアデノウイルスプラスミドへの導入遺伝子の挿入を容易にする。左側および右側の配列は、HRにおけるDNA DSBを修復するために鋳型として使用され、それにより、アデノウイルスプラスミドへの導入遺伝子の誤りのない挿入を容易にする。本開示の方法は、宿主細胞中の1以上のアクセサリプラスミドの使用を記載する。レトロウイルス系において、アクセサリプラスミドは、E1およびE3遺伝子以外のウイルスパッケージングに必要な全ての構成要素をコードするパッケージングプラスミドである。さらなるアクセサリプラスミドは、パッケージング細胞にE1遺伝子を提供することが必要とされる。

10

【0067】

レトロウイルスベクター

レトロウイルス（ほとんど一般に - レトロウイルス）は、ウイルスゲノムおよびいくつかの構造タンパク質および酵素タンパク質（逆転写酵素およびインテグラーゼを包含する）から構成されるRNAウイルスである。一旦宿主細胞の内側へ入ると、レトロウイルスは、ウイルスゲノムからDNAプロウイルスを産生するために逆転写酵素を使用する。次いで、インテグラーゼタンパク質は、目的の核酸（単数または複数）をコードするウイルスゲノムの産生のために、このプロウイルスを宿主ゲノムに組み込む。レトロウイルスは、相対的に高い量のDNA（8キロベースまで）をパッケージングすることができるが、非分裂細胞に感染することはできず、宿主細胞ゲノムに無作為に挿入する。

20

【0068】

レトロウイルスの導入およびパッケージングベクターは、上に記載のレンチウイルス系と同様である。レトロウイルス導入ベクターは、典型的には、LTRに隣接して目的の核酸をコードし、これは、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）またはマウス幹細胞ウイルス（MSCV）配列に由来する。本開示の方法は、1以上のアクセサリプラスミドの使用を記載する。レトロウイルスについては、アクセサリプラスミドは、gagおよびpol遺伝子をコードするパッケージングプラスミドおよびenv遺伝子をコードするエンベローププラスミドである。レンチウイルス系におけるように、gag遺伝子は、3つのウイルスコアタンパク質に翻訳される：マトリックス（MA）タンパク質、これは、ビリオンアセンブリおよび非分裂細胞の感染に必要である；カプシド（CA）タンパク質、これは、ビリオンの疎水性コアを形成する；およびヌクレオカプシド（NC）タンパク質、これは、コーティングによってウイルスゲノムを保護し、RNAと密接に会合する。pol遺伝子は、ウイルス複製に不可欠な、ウイルスプロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼ酵素をコードする。

30

【0069】

細胞

「宿主細胞」とは、目的の物質を内部に持つか、またはこれを内部に持つことができる、または、目的の核酸をウイルス粒子にパッケージングすることができる、任意の細胞を指す。しばしば、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。宿主細胞の例は、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、イヌ細胞、ネコ細胞、ハムスター細胞、サル細胞、昆虫細胞、植物細胞、または細菌細胞を包含する。昆虫細胞の例は、これらに限定されないが、*Spodoptera frugiperda*（例として、Sf9、Sf21）、*Spodoptera exigua*、*Heliothis virescens*、*Helicoverpa zea*、*Heliothis subflexa*、*Anticarsia gemmatalis*、*Trichopulsia ni*（例として、High-Five細胞）、*Drosophila melanogaster*（例として、S2、S3）、*Antheraea eucalypti*、*Bombyx mori*、*Aedes albopictus*、*Aedes aegyptii*、およびその他を包含する。細菌細胞の例は、これらに限定されないが、*Escherichia coli*、*Corynebacterium glutamicum*、および*Pseudomonas fluorescens*を包含する。酵母細胞の例は、これらに限定されないが、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Bacillus* sp.、*Aspergillus* sp.、*Trichoderma* sp.、および*Myceliophthora thermophila*

40

50

la C1を包含する。植物細胞の例は、これらに限定されないが、*Nicotiana* sp.、*Arabidopsis thaliana*、*Mays zea*、*Solanum* sp.、または*Lemna* spを包含する。

【0070】

いくつかの態様において、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞の例は、ヘンリエッタラックス腫瘍（HeLa）細胞およびベイビーハムスター腎臓（BHK-21）細胞を包含する。いくつかの態様において、宿主細胞は、ヒト細胞、例えばHEK293T細胞である。宿主細胞は、1以上のウイルス導入ベクターおよび1以上のアクセサリプラスミドのレシピエントとして使用され得る。この用語は、それがトランスフェクトされた元の細胞の子孫を含む。したがって、「宿主細胞」とは、本明細書において用いられる場合、外因性DNA配列でトランスフェクトされた細胞を指し得る。単一の親細胞の子孫は、天然の、偶発的な、または計画的な変異に起因して、形態学において、またはゲノムもしくは全DNAの補完物（complement）において、元の親と必ずしも完全に同一でなくともよい。

10

【0071】

本明細書において用いられる場合、用語「細胞株」は、*in vitro*での持続的または長期の増殖および分裂が可能な細胞の集団を指す。しばしば、細胞株は、単一の前駆細胞に由来するクローンの集団である。さらに、当該分野において、かかるクローン集団の貯蔵またはトランスファーの間に、核型において自発的なまたは誘導される変化が起こり得ることが知られている。したがって、言及される細胞株に由来する細胞は、祖先の細胞または培養物と正確に同一でない場合があり、言及される細胞株は、かかるバリエーションを含む。

20

本明細書において用いられる場合、用語「組み換え細胞」とは、生物学的に活性なポリペプチドの転写またはRNAなどの生物学的に活性な核酸の産生をもたらすDNAセグメントなどの外因性DNAセグメントが導入されている細胞を指す。

【0072】

本開示の側面は、ベクター収率、ウイルス力価、および/または組み換えウイルス粒子（例として、rAAV粒子）の産生を宿主細胞において改善するための組成物および方法に関する。いくつかの態様において、本開示によって記載される方法は、ベクター収率、ウイルス力価、および/または組み換えウイルス粒子（例として、rAAV粒子）を、直交性（宿主細胞に関して）阻害性核酸および同族結合部位のペアを使用しないウイルス粒子産生の方法と比較して、約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上（例として、20倍、100倍、200倍、1000倍、またはそれ以上）改善する。

30

【実施例】

【0073】

例1

本開示は、一般に、遺伝子発現ベクターの力価を改善するための、および、産生（例として、パッケージング）効率を増加させるための方法に関する。図1は、遺伝子発現ベクターのいくつかの非限定例を提供する。

【0074】

ある導入遺伝子（例として、パッケージング細胞に毒性であるかまたはウイルスベクターパッケージング系と非親和性である導入遺伝子産物）を含むウイルスベクターの産生は、いくつかの課題（例えば、極めて低い力価またはウイルスベクターの非産生）に直面している。低い力価またはウイルスベクターの非産生の可能性のある原因は、例えば、ベクター構築物の悪い品質、ベクター構築物におけるパッケージングシグナル/複製起源の変異または欠失、ベクターゲノム複製を妨げる高い熱安定性を有する2次構造、または他の因子（例として、細胞傷害性導入遺伝子またはベクターゲノム複製またはパッケージングと干渉する導入遺伝子）を包含する。

40

【0075】

例えば、回文配列がrAAVゲノム均一性および収率を損なうことが観察されている（図2A-2C）。図2Aは、H1プロモーターによって駆動されてApoBを標的とする

50

か、または、U6プロモーターによって駆動されてホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Fluc) を標的とする、shRNAカセットを含む自己相補的なAAV (scAAV) プラスミドの概略図を示す。手短に言うと、細胞は、発現構築物で形質転換されて、アガロース分析が実施された。切断型ウイルスゲノムは、全てのshRNAカセットについてのレーンで観察されたが、対照カセットでは観察されなかった (shRNAなし) (図2B)。ベクターは、AAV9カプシドにパッケージングされ、EGFPプライマー/プローブセットを使用するqPCRによって収率について査定された。データは、shRNAコーディング配列が構築物の野生型ITR (wtITR) に非常に近接しているときに、低いAAV収率を示すことを指示する (図2C)。よって、いくつかの態様において、導入遺伝子の2次構造は、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターのパッケージングまたは収率を損なう。

10

【0076】

第3世代のレンチウイルスベクターの産生の概略図が、図3に提供される。手短に言うと、パッケージング細胞 (例として、HEK293T) は、4つのプラスミドで形質転換される: gag遺伝子を含むパッケージングプラスミド、Envコーディングプラスミド、Revコーディングプラスミド、および導入遺伝子を含むベクタープラスミド。

【0077】

導入遺伝子の細胞傷害性は、例えば、レンチウイルスベクターの文脈において、減少したウイルス複製および/またはパッケージング効率を生じ得る。したがって、細胞傷害性導入遺伝子 (例として、EGFP-(GR)₈₀ (ALS/FTD関連ジペプチド反復タンパク質) またはApoL1 (アポリポタンパク質L1) を保有する2つのレンチウイルスベクターの産生が調査された。細胞は、GFP (Lenti-GFP、上図) または80マーのグリシン-アルギニン (Lenti-GFP-GR₈₀) ジアミノ酸反復ペプチドに融合されたGFPのいずれかを発現するレンチウイルスベクターで感染された。蛍光イメージングは、Lenti-GFPと比べて低い、Lenti-GFP-GR₈₀ による細胞の形質導入を示し、GFPを含むベクターと比べて低い、細胞傷害性タンパク質 (GR₈₀) を含むベクターの複製またはパッケージング効率を指示する (図4)。

20

【0078】

パッケージング不可能な(unpackagable) (例として、細胞傷害性) 導入遺伝子を含むウイルスベクターの複製および/またはパッケージングを増加させるための手法が開発された (図5)。手短に言うと、パッケージング細胞は、ウイルスベクター産生プラスミド (単数または複数) およびパッケージング不可能な (例として、細胞傷害性) 導入遺伝子に特異的な干渉RNA分子 (例として、shRNA、dsRNA、等々) を発現することが可能なプラスミドでコトランスフェクトされる。パッケージングの間の導入遺伝子発現の一過的なサイレンシング (例として、Ago2などのRNAi機構によって媒介される) は、ウイルスベクター複製およびパッケージングを増加させて、増加した収率を導く。

30

【0079】

細胞は、Lenti-GFP-GR₈₀ 特異的shRNAを発現するプラスミドによる一過的な遺伝子発現サイレンシングの間にパッケージングされた、GFP (Lenti-GFP、図6 上図)、Lenti-GFP-GR₈₀ (図6、中央図)、またはLenti-GFP-GR₈₀ のいずれかを発現するレンチウイルスベクターで感染させた (図6、下図)。蛍光イメージングは、Lenti-GFPと比較して低い、Lenti-GFP-GR₈₀ による細胞の形質導入を示し、GFPを含むベクターと比べて低い、細胞傷害性タンパク質 (GR₈₀) を含むベクターの複製またはパッケージング効率を指示する。しかしながら、GFP-GR₈₀ の有意に増加した形質導入および発現が、Lenti-GFP-GR₈₀ + shRNA-GFPで形質導入された細胞で観察され、ベクターパッケージング間の導入遺伝子発現の一過的なサイレンシングは、高い力価および機能的なウイルスベクターを生じる。

40

【0080】

漸増数のmiRNA結合部位が導入遺伝子構築物に組み込まれるとき、RNAi効力が

50

増加することが観察されている。例えば、0、1、または3つのmiR-122結合部位が、nLacZ発現構築物に組み込まれた。Huh7細胞は、各構築物でトランスフェクトされて、nLacZ発現が測定された。データは、1または3つのmiR-122結合部位を有する構築物でトランスフェクトされた細胞中での減少した導入遺伝子(nLacZ)発現を指示する(図8)。導入遺伝子発現における同様の減少がまた、マウス肝臓において観察された(図8)。

【0081】

図9は、人工miRNA(amiRNA)とそれらの標的部位との間の相互作用による特定および効率的な遺伝子サイレンシングを示す。細胞は、333Tまたは856Tのいずれかに特異的な複数のmiRNA結合部位(これらは、公知の哺乳動物miRNAによって結合されない配列である)を含むEGFP構築物およびmiR-333またはmiR-856 amiRNAのいずれかを発現するプラスミドでコトランスフェクトされた。miR-333およびmiR-856ならびにそれらの各結合部位の配列は、以下の表1に示される。

【0082】

【表1】

表1

名称	配列	配列番号
miR-333	UCGAGAAGGUAAUUGCUGUUGACAGUGAGCGAAGCAGUUC AUCGCACAGGUUAGUGAAGCCACAGAUGUAACCGUGCGAU GAACUGCUGUGCCUACUGCCUCGG	1
miR-856	UCGAGAAGGUAAUUGCUGUUGACAGUGAGCGAUAAUCCUA CCAAUAACUUCAGCUAGUGAAGCCACAGAUGUAGCUGAAGU UAUUGGUAGGAUUAGUGCCUACUGCCUCGG	2
miR-333 結合部位	CGATCGTCGACATTCTGAGATCGATCGTCGACATTCTGAGAT CGATCGTCGACATTCTGAGAT	3
miR-856 結合部位	GCTGAAGTTATTGGTAGGATTATGCTGAAGTTATTGGTAGGATT ATGCTGAAGTTATTGGTAGGATTAT	4

【0083】

データは、miR-856 amiRNAまたはshRNA対照プラスミドではなく、miR-333 amiRNAでコトランスフェクトされた細胞におけるEGFP-333T発現のサイレンシングを指示する。データは、miR-333 amiRNAまたはshRNA対照プラスミドではなく、miR-856 amiRNAでコトランスフェクトされた細胞におけるEGFP-856T発現のサイレンシングを指示する。

【0084】

上に記載のデータに基づいて、パッケージング不可能である(例として、細胞傷害性)導入遺伝子を含むウイルスベクターの複製および/またはパッケージングを増加させるための第2の手法もまた開発された(図7)。手短に言うと、1以上(例として、3)の人工miRNA(amiRNA)結合部位は、パッケージング不可能である(例として、細胞傷害性)導入遺伝子を含むプラスミド中に操作される。パッケージング細胞は、ウイルスベクター産生プラスミド(単数または複数)および産生プラスミド中に操作される結合部位に特異的なamiRNAを発現することができるプラスミドでコトランスフェクトされる。パッケージング期の間、amiRNAは、導入遺伝子上に位置する標的部位に結合し、導入遺伝子発現を一過的にサイレンシングし、改善されたウイルス力価およびパッケージング効率を生じる。

【 0 0 8 5 】

アポリタンパク質 L 1 (A p o l 1) を発現できるレンチウイルスベクター (これは、典型的には、従来のウイルスベクター産生手順を使用してパッケージングすることができない) は、図 7 に概略される手法を用いて産生された。手短かに言うと、3 つの m i R - 8 5 6 結合部位 (3 × 8 5 6 T) は、A p o l 1 レンチウイルス発現構築物に組み込まれた。パッケージング細胞は、A p o l 1 発現構築物および a m i R - 8 5 6 を発現するプラスミドでコトランスフェクトされた (図 1 0、左側)。データは、ベクター力価が漸増 a m i R - 8 5 6 濃度とともに増加することを示し、パッケージングの間の導入遺伝子 (例として、A p o l 1) 発現の増加したサイレンシングが、L e n t i - A p o l 1 ベクター産生の効率を増加させることを指示する (図 1 0、右側)。加えて、データは、導入

10

【 0 0 8 6 】

要するに、例に記載されるデータは、ウイルスベクター産生のパッケージング期の間の、コトランスフェクションの導入遺伝子発現の一過的な抑制が、(かかるベクターが細胞傷害性または他にパッケージング不可能な導入遺伝子を含んでいたとしても) 首尾よく、高い力価および機能的なウイルス (例として、レンチウイルス) ベクターを産生したことを実証している。

20

【 図 1 】

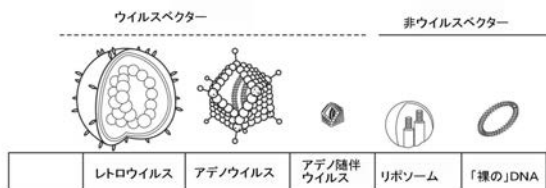


図 1

【 図 2 A 】

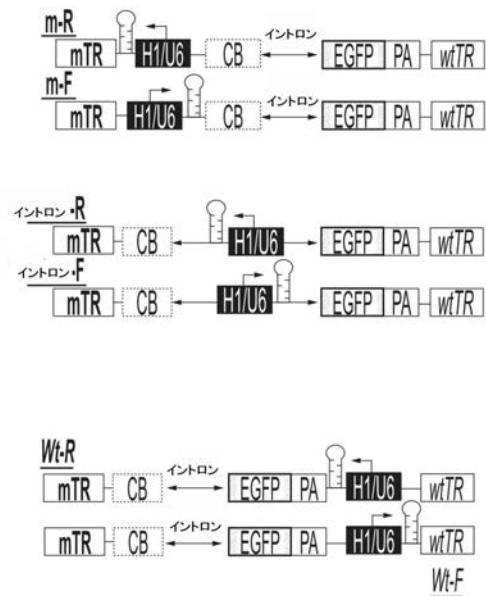
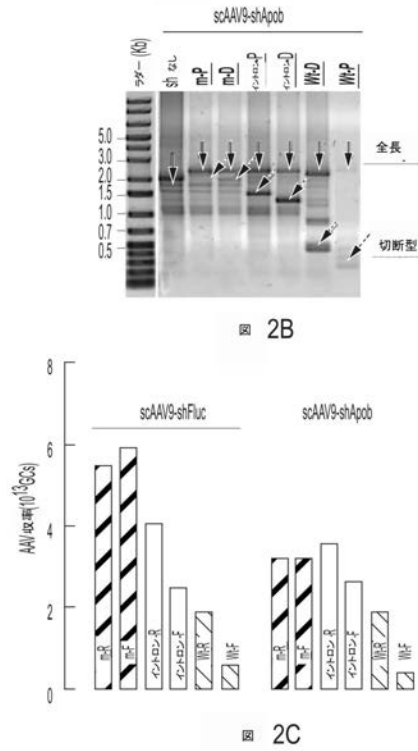
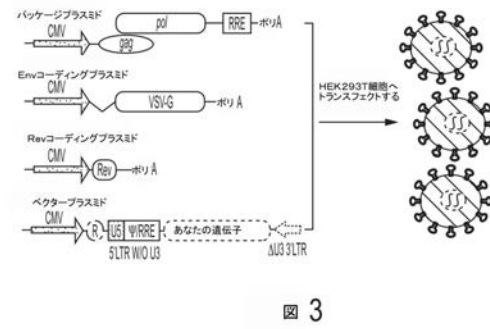


図 2A

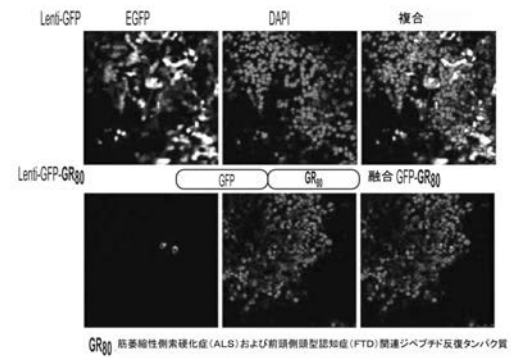
【図 2 B - C】



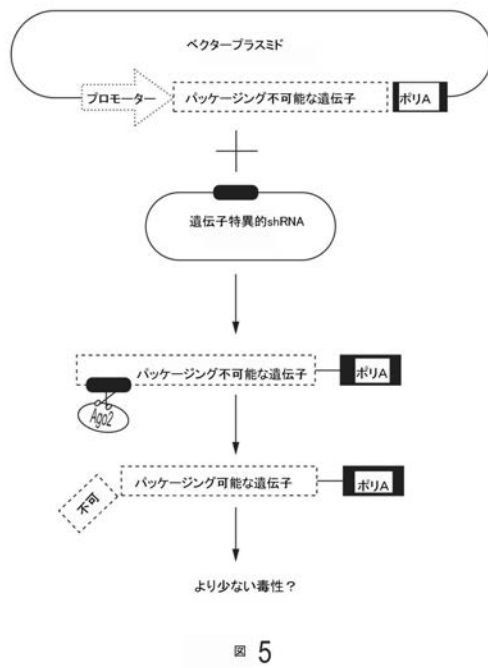
【図 3】



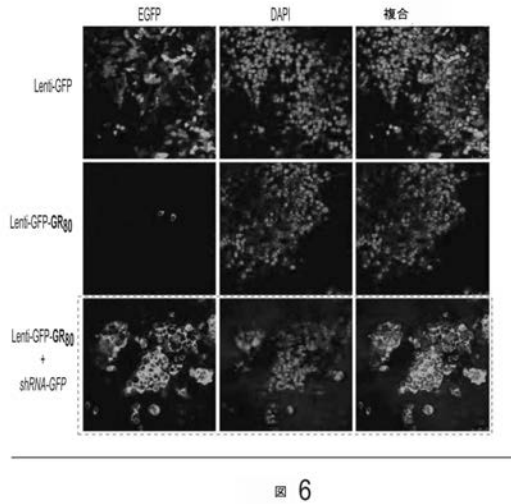
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2020519294000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/32291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C07K 14/075; C12N 15/09, 15/86, 15/63; A61K 35/76 (2018.01) CPC - C07K 14/005; C12N 15/79; C12N 15/113, 15/69, 15/86, 15/8509; A61K 48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(PALMER, DJ et al.) Helper virus-mediated downregulation of transgene expression permits production of recombinant helper-dependent adenoviral vector. Molecular Therapy: Methods and Clinical Development. 8 June 2016, Vol. 3, No. 16039; abstract; page 5, 1st and 2nd column, 2nd and 4th paragraph; DOI: 0.1038/mtn.2016.39	1-3 5
Y	(MIETZSCH, M et al.) OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsulation of Foreign DNA. Human Gene Therapy. October 2015, Epub 6 August 2015, Vol. 26, No. 10; pages 688-697; abstract; DOI: 10.1089/hum.2015.050	5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2018 (12.07.2018)		Date of mailing of the international search report 19 JUL 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/32291

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4, 6-32
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/867 (2006.01)		C 1 2 N 15/867	Z	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10		
C 1 2 N 7/02 (2006.01)		C 1 2 N 7/02		
C 1 2 N 15/86 (2006.01)		C 1 2 N 15/86	Z	
C 1 2 N 15/33 (2006.01)		C 1 2 N 15/33		

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 ガオ, グワンピン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01581、ウェストボロウ、エドワード ダン ウェイ
4

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AA95X AA95Y AA97X AA97Y AB01 AC14
BA02 CA43 CA44