

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6454352号
(P6454352)

(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/33 (2006. 01)
 C 1 2 N 7/01 (2006. 01)
 C 0 7 K 14/005 (2006. 01)
 A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/33
 C 1 2 N 7/01
 C 0 7 K 14/005
 A 6 1 K 48/00

請求項の数 13 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2016-552426 (P2016-552426)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
 (65) 公表番号 特表2016-535602 (P2016-535602A)
 (43) 公表日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/062011
 (87) 国際公開番号 W02015/069469
 (87) 国際公開日 平成27年5月14日 (2015. 5. 14)
 審査請求日 平成28年10月5日 (2016. 10. 5)
 (31) 優先権主張番号 61/900, 232
 (32) 優先日 平成25年11月5日 (2013. 11. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500481499
 タカラ バイオ ユーエスエー, インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 43, マウンテン ビュー, テラ ベラ
 アベニュー 1290
 (74) 代理人 100114557
 弁理士 河野 英仁
 (74) 代理人 100078868
 弁理士 河野 登夫
 (72) 発明者 クイン, トーマス パトリック
 アメリカ合衆国 94086 カリフォル
 ニア, サニーベール, バイン アベニュー
 463

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乾燥トランスフェクション組成物、乾燥トランスフェクション組成物を生成する方法、及び乾燥トランスフェクション組成物を使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリ(- アミノエステル)又はその塩若しくは誘導体を含むポリマートランスフェク
 ション剤、

ウイルスベクターのウイルスタンパク質をコードする塩基配列を有する発現カセットを
 含んでいる核酸、並びに

リン酸カリウム緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、マレイン酸緩衝剤、酢酸塩緩衝剤、トリス
 - (ヒドロキシメチル) - アミノメタン(トリス)緩衝剤、トリシン緩衝剤、HEPES 緩衝
 剤及びMOPS緩衝剤からなる群から選択されている緩衝剤

を含んでいることを特徴とする乾燥組成物。

10

【請求項 2】

凍結乾燥された組成物であることを特徴とする請求項 1 に記載の乾燥組成物。

【請求項 3】

凍結防止剤を含まないことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の乾燥組成物。

【請求項 4】

2 以上のウイルスタンパク質をコードする核酸を含んでいることを特徴とする請求項 1
 乃至 3 のいずれかに記載の乾燥組成物。

【請求項 5】

ウイルス粒子を生成するために必要な全てのタンパク質をコードする核酸を含んでいる
 ことを特徴とする請求項 4 に記載の乾燥組成物。

20

【請求項 6】

前記核酸は同一のベクター又は異なるベクターに存在していることを特徴とする請求項 5 に記載の乾燥組成物。

【請求項 7】

前記ウイルス粒子はレトロウイルス粒子であることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の乾燥組成物。

【請求項 8】

対象の核酸を細胞にインビトロで導入する方法であって、

a) 請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の組成物を対象の核酸を含む溶媒と混ぜ合わせて、液体トランスフェクション溶液を生成し、

b) 該液体トランスフェクション溶液を細胞とインビトロで接触させて、前記核酸を前記細胞に導入することを特徴とする方法。

【請求項 9】

ポリ(- アミノエステル) 又はその塩若しくは誘導体を含むポリマートランスフェクション剤、

核酸、並びに

リン酸カリウム緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、マレイン酸緩衝剤、酢酸塩緩衝剤、トリス - (ヒドロキシメチル) - アミノメタン (トリス) 緩衝剤、トリシン緩衝剤、HEPES 緩衝剤及びMOPS緩衝剤からなる群から選択されている緩衝剤

を含む乾燥組成物を夫々含んでいる複数の個別の反応チャンバを有する容器を備えていることを特徴とするキット。

【請求項 10】

前記ウイルスタンパク質は、TAT , REV , NEF , VPU , VPR , VPX , VIF , GAG , GAG-POL , VSG-G 及びこれらの融合物からなる群から選択されているレトロウイルスタンパク質であることを特徴とする請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の乾燥組成物。

【請求項 11】

前記液体トランスフェクション溶液中の緩衝剤の濃度は、少なくとも 250 mMであることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

対象の核酸は、mRNA、タンパク質又は活性RNA 分子をコードすることを特徴とする請求項 8 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

調節要素に操作可能に連結されたクローニング部位を含むプロ発現カセットを有するベクターを更に備えていることを特徴とする請求項 9 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

DNA、siRNA、タンパク質などの異質分子を生体細胞に効率的に導入し得ることは、生物学及びバイオテクノロジーで非常に重要である。トランスフェクションは、核酸の細胞への導入を指す。核酸分子を用いた生体細胞の効率的なトランスフェクションは、遺伝子が複雑な細胞状況でどのように機能するかと、遺伝子の活性が治療介入でどのように調節され得るかとを解明する際に重要な必要条件である。細胞のトランスフェクションは、基礎的な生物学研究及び医薬開発で日常的に使用されている。

【0002】

核酸を荷電脂質、リポイド、ペプチド、ポリマー又はこれらの混合物と予め結合することにより、核酸をインビトロ及びインビボの両方で細胞に与えることができる。このようなトランスフェクション試薬は市販されており、核酸を培養物の細胞に与えるために広く使用されている。トランスフェクション試薬及び核酸の複合体に晒された細胞は、エンドサイトーシス又は他の手段によってこのような複合体を取り込む場合がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2005/055979号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

乾燥した、例えば凍結乾燥されたポリマートランスフェクション剤組成物を提供する。乾燥組成物はポリマートランスフェクション剤及び緩衝剤を含む。場合によっては、組成物は一又は複数の核酸を更に含む。組成物を生成する方法、組成物を使用する方法、及び組成物を備えたキットを更に提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】トランスフェクション効率を決定するための、トランスフェクション後72時間後のトランスフェクトされた細胞の蛍光活性化細胞選別（FACS）分析の結果を示す図表である。％陽性細胞が棒グラフ（左のY軸）として表されており、平均蛍光強度（MFI）が折れ線グラフ（右のY軸）として表わされている。

【図2】生成されたレンチウイルスの量を決定するための、凍結乾燥されたパッケージング成分を用いて生成されたレンチウイルスのストックの定量的なRT-PCR（qRT-PCR）の結果を示す図表である。

20

【図3】生成されたレンチウイルスの力価を決定するための、凍結乾燥されたパッケージング成分を用いて生成されたレンチウイルスのストックのml当たりの感染単位（IFU/ml）の決定結果を示す図表である。

【図4】追加の試料（N=8液体；N=13乾燥）で再度試験したときの、凍結乾燥されたパッケージング成分で生成されたレンチウイルスのストックのトランスフェクション効率（上部のパネル：％陽性細胞及びMFI）及びウイルスのコピー/ml（底部のパネル：qRT-PCR）の決定結果を示す図表である。

【図5】本発明の一実施形態に係るマルチウェル基材を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0006】

30

乾燥した、例えば凍結乾燥されたポリマートランスフェクション剤組成物を提供する。乾燥組成物はポリマートランスフェクション剤及び緩衝剤を含む。場合によっては、組成物は一又は複数の核酸を更に含む。組成物を生成する方法、組成物を使用する方法、及び組成物を備えたキットを更に提供する。

【0007】

本開示の方法を更に詳細に説明する前に、本方法は、言うまでも無くそれ自体が変わり得るように、説明された特定の実施形態に限定されないことを理解すべきである。更に、本方法の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書で使用されている用語は単に特定の実施形態を説明するために用いられており、限定することを意図していないことを理解すべきである。

40

【0008】

ある範囲の値が与えられる場合、その範囲の上限及び下限の間の、文脈が別段に明示しない限りは下限の単位の10分の1までの各介在値、及びその記載された範囲内の任意の他の記載された値又は介在する値が本方法の範囲内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限度を条件として本方法の範囲内に更に包含される。記載された範囲が限度のうち的一方又は両方を含む場合、これらの含まれた限度の一方又は両方を除外した範囲も本方法に更に包含される。

【0009】

ある範囲は、本明細書では用語「約」から始まる数値と共に示されている。用語「約」

50

は、本明細書では「約」から始まる正確な数、及び「約」から始まる数に近い数又は「約」から始まる数に近似した数のための文字通りのサポートを提供するために用いられている。数が具体的に述べられた数に近いかな否か又は近似しているかな否かを判断する際に、述べられていない近い数又は近似した数は、その数が示されている文脈では、具体的に述べられた数に略相当する数であってもよい。

【0010】

特に定義されていない限り、本明細書で使用されている全ての技術的用語及び科学的用語は、本方法が属する技術分野の当業者によって共通して理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は同等である全ての方法を、本方法の実施又は試験に更に使用することができるが、代表的な実例となる方法及び材料を本明細書に記載している。

10

【0011】

本明細書に引用されている全ての刊行物及び特許は、個々の刊行物又は特許が、具体的に且つ個別に参照によって組み込まれると示されているかのように参照によって本明細書に組み込まれ、刊行物の引用に関連する方法及び/又は材料を開示して記載すべく、参照によって本明細書に組み込まれる。任意の刊行物の引用は、出願日前のその開示に関するものであって、先行発明を理由として、本方法がそのような刊行物に先行する権限がないことを認めるものであるとみなされるべきではない。更に、提供される刊行物の日付は、実際の公開日とは異なる場合があり、個別に確認する必要があるかもしれない。

【0012】

20

単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」が、本明細書及び添付の特許請求の範囲に用いられている場合、文脈が別段に明示しない限り、複数の指示対象を含むことを留意すべきである。更に、特許請求の範囲がいかなる選択的な要素も排除して記載されていることを留意すべきである。従って、この記述は、請求項の要素の記載に関する「唯一の(solely)」、「のみの(only)」等の排他的用語の使用、又は「否定的な(negative)」限定の使用のための先行記載として機能すべく意図される。

【0013】

明瞭化のために別々の実施形態の内容に述べられている本方法の特徴が、1つの実施形態に組み合わせ提供されてもよいことが認識される。逆に、簡潔さのために1つの実施形態の内容に述べられている本方法の様々な特徴が、別々に又はあらゆる適切なサブ組み合わせで更に提供されてもよい。本実施形態の全ての組み合わせは、本発明によって具体的に包含されており、各々の及びあらゆる組み合わせが個別に且つ明示的に開示されているかのように、このような組み合わせが操作可能な工程及び/又はデバイス/システム/キットを包含する範囲まで本明細書に開示されている。更に、このような可変性について述べている実施形態に記載されている全てのサブ組み合わせも、本方法によって具体的に包含されており、各々の及びあらゆるこのようなサブ組み合わせが個別に且つ明示的に本明細書に開示されているかのように、本明細書に開示されている。

30

【0014】

当業者が本開示を読むと明らかであるように、本明細書に説明され例示された個々の実施形態は夫々、別々の構成要素及び特徴を有しており、別々の構成要素及び特徴は、本方法の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他の複数の実施形態のいずれかの特徴から容易に分離されてもよく、又はいずれかの特徴と容易に組み合わせられてもよい。全ての記載された方法は、記載された事象の順序で、又は論理的に可能な任意の他の順序で実行され得る。

40

【0015】

乾燥したトランスフェクション剤組成物

上記に要約されているように、本発明の態様は乾燥したポリマートランスフェクション剤組成物を含む。組成物が乾燥すると、組成物は、完全ではないにしても混ざっていない水を実質的に含まない。混ざっていない水を実質的に含まないということは、組成物が0.001重量%以下を含む0.01重量%以下のような0.1重量%以下の混ざっていない水を含む

50

ことを意味し、場合によっては混ざっていない水を含まないことを意味する。乾燥組成物は粒子状の組成物であってもよい。粒子状の組成物は粒子から構成された組成物であり、粒子の大きさは、場合によっては50～400 nmを含む10～500 nmのような5～1000 nmの範囲内で異なってもよい。

【0016】

場合によっては、乾燥したポリマートランスフェクション剤は凍結乾燥された組成物である。凍結乾燥されたとは、組成物が凍結乾燥された組成物として記載されてもよいように、組成物に凍結乾燥条件を与えたことを意味する。適切な凍結乾燥条件の例を以下に述べる。

【0017】

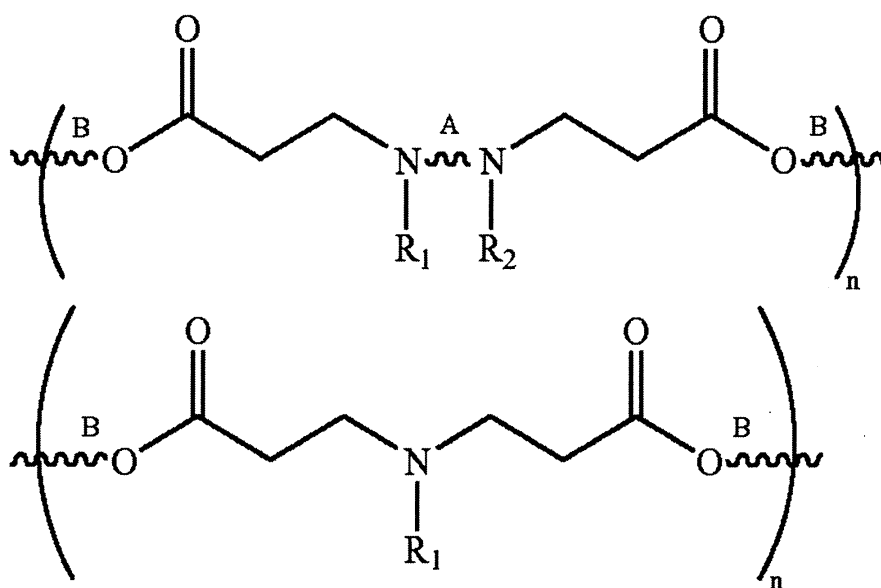
本明細書に記載されている乾燥組成物はポリマートランスフェクション剤を含む。ポリマートランスフェクション剤とは、トランスフェクション活性を有する一又は複数のポリマーを意味し、つまり、ポリマートランスフェクション剤が核酸と結合して細胞と接すると、核酸の細胞への移動を高める。高める程度は異なってもよく、場合によっては、例えばトランスフェクション剤が存在しない適切な対照と比較して、10倍以上を含む、3倍以上又は5倍以上のような2倍以上である。

【0018】

トランスフェクション剤がポリマーであるので、トランスフェクション剤は、より小さなユニット、つまりモノマー残基の複数の反復から構成された大きな分子である。場合によっては、ポリマートランスフェクション剤はヘテロポリマーであり、場合によってはポリ(アミノエステル)並びにその塩及び誘導体である。対象のポリマートランスフェクション剤は生分解性及び生体適合性を有する。場合によっては、ポリマートランスフェクション剤のポリマーは、ポリマーのバックボーンに一又は複数の第三級アミン、例えば反復バックボーンユニット当たり1つ又は2つの第三級アミンを有する。ポリマーは、複数の成分の内の1つがポリ(アミノエステル)であるコポリマーであってもよい。本発明のポリマーは以下の式のいずれかによって表される。

【0019】

【化1】



【0020】

ここで、A及びBは、炭素原子又はヘテロ原子のあらゆる置換されているか若しくは置換されておらず、分岐しているか若しくは分岐していない鎖であってもよいリンカーである。ポリマーの分子量は、5000g/mol～15,000g/molのような1000g/mol～20,000g/mol

であってもよい。ある実施形態では、Bは1～12個の炭素原子のアルキル鎖である。他の実施形態では、Bは合計1～12個の炭素原子及びヘテロ原子を含むヘテロ脂肪族鎖である。基 R_1 及び基 R_2 は幅広い種類の置換基のいずれかであってもよい。ある実施形態では、基 R_1 及び基 R_2 は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、水酸基及びアルコキシ基を含んでもよい。ある実施形態では、ポリマーはアミン末端であり、他の実施形態では、ポリマーはアクリレート末端である。場合によっては、基 R_1 及び/又は基 R_2 はリンカーAと共に環状構造を形成する。このような環状部分を含むポリマーは、より低いpHで更に可溶であるという特性を有する。対象のポリマーは、生理学的pH (pH 7.2～7.4) の水溶液で不溶性を有し、生理学的pH (pH < 7.2) 未満の水溶液で可溶性を有する。他の対象のポリマーは、生理学的pH (pH 7.2～7.4) 以下の水溶液で可溶性を有するポリマーである。場合によっては、ポリマートランスフェクション剤は、米国特許第6998115号明細書及び米国特許第7427394号明細書に記載されているポリマーであり、その開示内容は参照によって本明細書に組み込まれる。これらの特許に記載されている対象の1つの特定のトランスフェクション剤はXFECT (商標) トランスフェクション剤 (Clontech、マウンテンビュー、カリフォルニア) である。

10

【0021】

乾燥組成物中のポリマートランスフェクション剤の量は異なってもよい。組成物中のポリマートランスフェクション剤の量は異なってもよく、(これらに限定されないが、組成物中の特定のタイプのトランスフェクション剤、あるタイプの核酸、あるタイプの標的細胞、他の成分などの複数の要因に基づいてもよい) 一方、場合によっては、乾燥組成物中のポリマートランスフェクション剤の量は、10～30重量%を含む5～50重量%のような5～75重量%の範囲内であり、例えば25～27.5重量%の範囲内である。

20

【0022】

本明細書に記載されている乾燥組成物は、ポリマートランスフェクション剤に加えて緩衝成分を更に含む。緩衝成分は異なってもよく、対象の緩衝剤は、リン酸カリウム、例えばリン酸ナトリウム若しくはリン酸カリウム、クエン酸塩、例えばクエン酸ナトリウム若しくはクエン酸カリウム、マレイン酸、酢酸塩、例えば酢酸ナトリウム、酢酸カリウム若しくは酢酸アンモニウム、トリス-(ヒドロキシメチル)-アミノメタン(トリス)、トリシン、HEPES、MOPSなどを含むがこれらに限定されない。乾燥組成物中の緩衝剤の量は異なってもよい。場合によっては、1 μ g の乾燥組成物を10 μ l の水と混ぜ合わせると、生じた水性組成物中の緩衝剤の濃度が約225～275 mMを含む約75～350 mMのような50～500 mMの範囲内であり、例えば250 mMであるように緩衝剤の量を選択する。乾燥組成物中の緩衝成分の量は異なってもよく、場合によっては50～80重量%を含む25～90重量%のような10～95重量%の範囲内であってもよく、例えば72.5重量%であってもよい。ある実施形態では、緩衝剤は、水と混ぜ合わせる際に乾燥組成物から調製された水性組成物のpHが6.0～9.5のような約5.0～10.0になるのに十分な量で存在する。

30

【0023】

場合によっては、乾燥組成物は凍結防止剤を含む。凍結防止剤とは、乾燥中、例えば凍結乾燥工程中に組成物の成分を保持すべく機能する物質を意味する。場合によっては、凍結防止剤は緩衝剤として更に機能しない化合物である。適切な凍結防止剤は、グリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール及びグリセロール、一又は複数の砂糖(例えばトレハロース、メレジトース、ラフィノースのような一又は複数の二糖類)を含むが、これらに限定されず、砂糖は一又は複数のポリアルコール(例えばマンニトール、ソルビトール)などと混ぜ合わせられてもよい。凍結防止剤を含むこのような実施形態では、凍結防止剤は様々な量で存在してもよく、場合によっては0.1～10重量%を含む0.05～50重量%のような0.01～90重量%の範囲内で存在してもよい。場合によっては、組成物が、少なくとも組成物の成分に関して凍結防止剤として機能する量で凍結防止剤を含まないという点で組成物は凍結防止剤を含まない。このような場合、組成物中の凍結防止剤の量は、たとえあったとしても0.1重量%以下を含む0.5重量%以下のような1.0重量%以下である。

40

50

【0024】

乾燥組成物は、ポリマートランスフェクション剤及び緩衝剤に加えて複数の異なる成分を更に含んでもよく、このような成分として、結合剤、賦形剤、充填剤、等張化剤、安定剤、界面活性剤、可溶化剤、酸化防止剤、キレート剤、保存剤などを含むが、これらに限定されない。これらの成分が存在する場合、これらの成分は、組成物の2～10重量%を含む1～50重量%のような0.1重量%～99重量%を構成してもよい。場合によっては、乾燥組成物はトランスフェクション剤成分及び緩衝成分のみから構成されている。

【0025】

場合によっては、乾燥組成物は一又は複数の核酸を含んでいる。対象の核酸は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はこれらの組合せから構成されたある長さのポリマーを含んでおり、核酸の長さは異なってもよく、例えば10塩基以上、20塩基以上、50塩基以上、100塩基以上、500塩基以上、1000塩基以上、2000塩基以上、3000塩基以上、4000塩基以上、5000塩基以上又は更に多くの塩基であってもよく、ある実施形態における上限は、50,000塩基以下のような150,000塩基以下である。ある態様では、核酸は、長さが2,000～15,000塩基を含む1,000～50,000塩基のような10～150,000塩基であるデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はこれらの組合せから構成されたポリマーである。

【0026】

対象の核酸はデオキシリボ核酸(DNA)を含んでおり、例えばゲノムDNA又はその断片、相補的DNA(又は対象のあらゆるRNA若しくはDNAから合成された「cDNA」)、組換えDNA(例えばプラスミドDNA)などを含むがこれらに限定されない。対象の核酸はリボ核酸(RNA)を更に含んでおり、リボ核酸はあらゆるタイプ(又はそのサブタイプ)のRNAであってもよく、メッセンジャRNA(mRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、トランス作用性低分子干渉RNA(ta-siRNA)、天然の低分子干渉RNA(nat-siRNA)、リボソームRNA(rRNA)、転移RNA(tRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、長い非コードRNA(lncRNA)、非コードRNA(ncRNA)、転移-メッセンジャRNA(tmRNA)、前駆体メッセンジャRNA(pre-mRNA)、カハール小体特異的なRNA(scaRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、エンドリボヌクレアーゼ調製siRNA(esiRNA)、小分子RNA(stRNA)、信号認識RNA、テロメアRNA、リボザイム、又はこれらのRNAタイプ若しくはこれらのサブタイプのあらゆる組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0027】

核酸成分が乾燥組成物中に存在する場合、核酸成分は1つのタイプの核酸を含んでもよく(つまり、全ての核酸が同一の長さ及び同一の配列を有する)、或いは核酸成分は、少なくとも異なる長さ及び/又は配列の4以上を含む3以上のような2以上、例えば5、6、7、8、9、10若しくはそれ以上の別個の核酸を含んでもよい。乾燥組成物中の核酸成分の総量は異なってもよく、場合によっては0.01～2重量%を含む0.01～5重量%のような0.001～10重量%の範囲内であってもよい。

【0028】

場合によっては、核酸の内の少なくとも1つは発現カセットを含む。対象の発現カセットは、コード配列に操作可能に連結された調節配列を有する。調節配列は、(センス鎖の5'末端又はアンチセンス鎖の3'末端のいずれかに付着した)プロモータ、エンハンサ、ターミネータ、オペレータ、リプレッサ及び誘導物質を含むことができる。

【0029】

「プロモータ」は、RNAポリメラーゼを細胞に結合して下流側の(3'方向の)コード配列の転写を開始させることができるDNA調節領域である。プロモータは、転写開始部位によってその3'末端で結合して、上流側に(5'方向に)伸長し、バックグラウンドより高い検出可能なレベルで転写を開始させるのに必要な最小限の数の塩基又は成分を含んでもよい。プロモータの配列内に、転写開始部位と、RNAポリメラーゼの結合に關与するタンパク結合領域とがある。真核生物プロモータは、「TATA」ボックス及び「CAT」ボックスを

10

20

30

40

50

含むことが多いが、常に含むわけではない。誘導可能プロモータを含む様々なプロモータを、発現を行うために使用してもよい。

【 0 0 3 0 】

プロモータは調節され得るか又は構成性を有することができ、場合によっては調節されている（例えば、条件付きで活性である）。ある状況では、条件付きで活性なプロモータを使用することが望ましい場合があり、条件付きで活性なプロモータとして、組織特異的なプロモータ、細胞型特異的なプロモータ、発生段階特異的なプロモータ、細胞周期によって制御されるプロモータ、概日リズムによって制御されるプロモータ、及び外部信号又は内部信号に応じてその活性が増加する（例えば有効にされる）か又は減少する（例えば抑制される）プロモータを含むが、これらに限定されない。

10

【 0 0 3 1 】

プロモータの活性に影響する外部信号及び内部信号は、細菌（例えばマイコバクテリウム菌、赤痢菌、クラミジアなど）、原生動物（例えばトリパノソーマ属菌、マラリア原虫、トキソプラズマ菌など）、真菌、酵母（例えばカンジダ菌）若しくはウイルス（ヒト免疫不全ウイルス、口蹄疫ウイルス、エプスタイン - バーウイルスなどのような哺乳類の細胞を感染させるウイルス、植物細胞を感染させるウイルスなどを含む）が、これらに限定されない微生物による細胞の感染、細胞が保持される媒体のpHの変化若しくは内部pHの変化、細胞若しくは多細胞生物の正常範囲に対する過度の加熱、細胞若しくは多細胞生物の正常範囲に対する過度の冷却、ホルモン、サイトカイン、ケモカイン、神経伝達物質のようなエフェクタ分子、内服薬又は外用薬、細胞表面にある受容体のためのリガンド、細胞の内部に存在する受容体のためのリガンド、例えば核受容体、低酸素、明るさ、暗さ、リポ多糖類（LPS）、アメリカヤマゴボウマイトジェンを含むが、これらに限定されないマイトジェン、抗原、睡眠パターン、電荷、細胞が保持される媒体のイオン濃度若しくは内部イオン濃度（典型的なイオンとして、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオン、カルシウムイオンなどを含む）、栄養素の有無、金属イオン、転写因子、腫瘍抑圧因子、細胞間接触などを含むが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 2 】

細胞周期が制御されたプロモータは、E2F 1プロモータ、サイクリンAプロモータ、サイクリンBプロモータ、サイクリンCプロモータ、サイクリンDプロモータ、サイクリンEプロモータなどを含むが、これらに限定されない。細胞周期が制御されたプロモータは本技術分野では公知であり、あらゆるこのようなプロモータが使用され得る。多くのこのようなプロモータのヌクレオチド配列は公に利用可能であり、ヒトサイクリンA1遺伝子プロモータ（AF124143）、ヒトサイクリンB1遺伝子プロモータ（U22364；S74452；U36838）、マウスサイクリンCプロモータ（U49050）、マウスサイクリンD1プロモータ（AF212040；AF182716）、ラットサイクリンD1プロモータ（AF 148946）、ヒトサイクリンD1プロモータ（Z29078）、ヒトサイクリンD2プロモータ（U47284）、ヒトサイクリンD3プロモータ（U47285）が含まれる（GenBank Accession Noが括弧内に示されている）。

30

【 0 0 3 3 】

典型的な組織特異的なプロモータ又は細胞型特異的なプロモータは、筋特異的な発現のためのミオシン重鎖プロモータ、Madsen等著、1998年、「Circ Res」、82(8):908 917と、リソソーム酸リパーゼプロモータ、Du等著、1998年、「Gene」、208(2):285 295と、アミラーゼプロモータを用いた脾臓での発現、Dematteo等著、1997年、「J Surg Res」、72(2):155 161と、心臓特異的な過剰発現、Kubota等著、1997年、「Circ Res」、81(4):627 635と、ホルリポリ - ガンマ - グルタメート合成酵素プロモータ、Freemantle等著、1997年、「J Biol Chem」、272(40):25373 25379と、神経制限的サイレンサ要素を用いた組織特異的な発現、Kallunki等著、1997年、「J Cell Biol」、138(6):1343 1354と、HGHプロモータを用いたプラセンタ特異的な発現、Nogues等著、1997年、「Endocrinology」、138(8):3222 3227と、プロラクチンプロモータを用いた妊娠中の発現、Schuler等著、1997年、「Endocrinology」、138(8):3187 3194と、アルファ 1 (VI) コラーゲンプロモータを用いた組織特異的な発現、Braghetta等著、1997年、「Eur J Biochem」、247(1):200 2

40

50

08と、B細胞特異的な発現、Lennon等著、1997年、「Immunogenetics」、45(4):266 273と、内皮特異的な発現、Ronicke等著、1996年、「Circ Res」、79(2):277 285と、ケラチンプロモータ（例えばヒトケラチン14プロモータ（Wang等著、1997年、「Proc Natl Acad Sci」、US 94:219 26））と、ウシサイトケラチン遺伝子プロモータ、BKIII 及びBKVI（Alexander等著、1995年、「Hum Mol Genet」、4:993 9）と、ケラチン10遺伝子プロモータ（Bailleul等著、1990年、「Cell」、62:697 708）と、（メラノサイトに特異的な）チロシナーゼプロモータとを含むが、これらに限定されない。表皮特異的なプロモータがFuchs 等著、1994年（「Princess Takamatsu Symp」、24:290 302）に記載されている。更なる細胞型特異的なプロモータ及び/又は組織特異的なプロモータは、アルブミン（肝臓特異的なプロモータ、Pinkert 等著、1987年、「Genes Dev.」、1:268 277）、リンパ特異的なプロモータ（Calame等著、1988年、「Adv. Immunol.」、43:235 275）、特にT細胞受容体のプロモータ（Winoto等著、1989年、「EMBO J.」、8:729 733）及び免疫グロブリン、Banerji 等著、1983年、「Cell」、33:729 740; Queen and Baltimore, ibid. 741 748）、ニューロン特異的なプロモータ（例えばニューロフィラメントプロモータ、Byrne 等著、1989年、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、86:5473 5477）、膵特異的なプロモータ（Edlunch 等著、1985年、「Science」、230:912 916）及び乳腺特異的なプロモータ（乳漿プロモータ、米国特許第4873316号明細書及び欧州出願公開第264166号明細書）のようなプロモータを含む。

【0034】

発生的に調節されるプロモータは、notch 遺伝子、numb遺伝子、ホメオティック遺伝子、マウスホメオボックスプロモータ（Kessel 等著、1990年、「Science」、249:374 379）などを含むが、これらに限定されない。

【0035】

プロモータ、及び任意には一又は複数の更なる調節要素が、ベクターに結合するために上記の技術を用いて所望のヌクレオチド配列に連結される。本技術分野で公知のあらゆる技術を使用することができる。言い換えれば、発現ベクターは、誘導可能であってもよく又は構成性を有してもよい転写・翻訳開始領域を与え、コード領域が転写開始領域及び転写・翻訳終了領域の転写制御下で操作可能に連結される。

【0036】

発現カセットは、異種タンパク質をコードする核酸配列を挿入するために、プロモータ配列の近くに位置する便利な制限部位を有してもよい。発現宿主で作用する選択可能なマーカが存在してもよい。転写開始領域、そのコード配列又は断片と転写終了領域とを有する発現カセットを調製してもよい。

【0037】

上述したように、場合によっては、発現カセットは誘導可能な発現カセットであってもよい。対象の誘導可能な発現カセットは、コード配列に操作可能に連結された転写モジュレータ応答プロモータを含む。対象の誘導可能な発現カセットの転写モジュレータ応答プロモータは、互いに操作可能に連結された転写モジュレータ応答成分及び最小のプロモータ成分の両方を含み、転写モジュレータ応答成分は、発現カセットの特定の構成に応じて最小のプロモータ成分の上流側又は下流側のいずれかに存在してもよい。転写モジュレータ応答成分として対象のものは、原核生物のオペロンオペレータ配列、例えばtet オペレータ配列である。場合によっては、転写モジュレータ応答成分は少なくとも1つのtet オペレータ配列を有する。一実施形態では、転写モジュレータ応答成分は、2以上のtet オペレータ配列の複数のコピー（例えば、多量体化されたコピー又はコンカテマー化されたコピー）を含む。対象の一構成では、一又は複数のtet オペレータ配列は、調節タンパク質（例えば調節融合タンパク質）をtet オペレータ配列に結合する際に標的ヌクレオチド配列の転写を可能にするために、適切な距離で結合されたホスホジエステルによって最小のプロモータ配列の上流側（つまり5'）に操作可能に連結される。転写モジュレータ応答成分の長さは異なってもよく、場合によっては、この要素の長さは、15～35の塩基対を含む10～100塩基対のような5～1000塩基対の範囲内である。対象の特定のtet オペレータ

10

20

30

40

50

配列は、全てカリフォルニア州マウンテンビューのClontech Laboratoriesから入手可能な P_{TRE} プロモータ、 $P_{TRE-Tight}$ プロモータ及び P_{TRE-G3} プロモータのようなtet 転写モジュレータ応答プロモータにあるオペレータ配列を含むが、これらに限定されない。

【0038】

上記に要約されているように、転写モジュレータ応答プロモータは、転写モジュレータ応答成分に操作可能に連結された最小のプロモータ成分を更に含む。対象の最小のプロモータ配列は、それ自体は転写されないが（少なくとも部分的に）転写のために転写機器を配置すべく機能する配列である。「最小のプロモータ」という用語は、転写される連結されたコード配列のための転写の開始部位を定めるが、たとえそうであるにしても転写を効率的に開始することがそれ自体でできない部分的なプロモータ配列を含む。従って、このような最小のプロモータの活性は、（一又は複数のtet オペレータ配列のような）操作可能に連結された転写モジュレータ応答成分への転写モジュレータ（例えば、以下に記載する転写モジュレータタンパク質）の結合によって決まる。対象の最小のプロモータは、ヒトサイトメガロウイルスからの最小のプロモータ（例えば+75~-53間のヌクレオチド位置、+75~-31間のヌクレオチド位置など）、ヒトHSV チミジンキナーゼプロモータ、ヒトU6プロモータなどを含むが、これらに限定されない。対象のプロモータは、例えばGossen, M.及びBujard, H.著、1992年、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、89:5547-5551に記載されているプロモータを含む。最小のプロモータ成分の長さが異なってもよい一方、場合によっては、この要素の長さは、50~100塩基対のような25~1000塩基対の範囲内である。

【0039】

場合によっては、tet 応答成分及び最小のプロモータは、あらゆる便利な配列であってもよいリンカー配列によって分離されてもよい。このような実施形態では、転写モジュレータ応答成分（例えば一又は複数のtet オペレータ配列）及び最小のプロモータ間の距離が異なってもよく、場合によっては一又は複数のtet オペレータ配列は、最小のプロモータの上流側に300塩基対を含む400塩基対のような500塩基対、例えば200塩基対の範囲内に位置する。

【0040】

対象の特定の転写モジュレータ応答プロモータの構成は、10個のtet オペレータ配列に連結されたサイトメガロウイルスの最小のプロモータ、10個のtet オペレータ配列に連結された単純ヘルペスウイルスの最小のtkプロモータなどを含むが、これらに限定されない。対象の特定の転写モジュレータ応答プロモータは、全てカリフォルニア州マウンテンビューのClontech Laboratoriesから入手可能な P_{TRE} プロモータ、 $P_{TRE-Tight}$ プロモータ及び P_{TRE-G3} プロモータの市販の製品にある転写モジュレータ応答プロモータを含むが、これらに限定されない。

【0041】

上記に要約されているように、発現カセットは、調節要素、例えばコード配列に操作可能に連結されたプロモータを含む。発現カセットの「コード配列」は、対象のタンパク質又は対象の核酸（例えば抑制RNA）をコードすることができる。従って、発現カセットのコード配列の転写の誘導、及び生じたmRNAの翻訳の際に、ある実施形態では、対象のタンパク質が宿主細胞又は動物で生成される。或いは、転写されるコード配列は、活性RNA分子（タンパク質をコードしないRNA分子）、例えばアンチセンスRNA、siRNA、shRNA、リボザイム、miRNAなどに関してコードされ得る。宿主細胞又は動物における活性RNA分子の発現を用いて、宿主内の機能を調節することができ、（例えば、タンパク質をコードするmRNAの翻訳を抑制することにより対象のタンパク質の生成を防ぐことができ、コードmRNAの安定性を変えることにより対象のタンパク質の生成を低減することなどができる）。コード配列の長さが異なってもよい一方、場合によっては、コード配列の長さは、100bp~1000bpを含む50bp~5,000bpのような10bp~15,000bpの範囲内である。

【0042】

発現カセットのコード配列は外因性を有してもよく、内因性を有してもよい。「外因性

」のコード配列は、宿主細胞内に、例えば宿主のゲノム内に導入されるヌクレオチド配列である。外因性のコード配列は、宿主のゲノム内の他の部位（例えば異質ヌクレオチド配列）に存在しなくてもよく、又は宿主のゲノム内に存在するが、ゲノム内の異なる部位で組み込まれる配列の追加のコピーであってもよい。「外因性」のコード配列は、宿主のゲノム内に存在するヌクレオチド配列である。内因性遺伝子は、オペレータ配列組換えベクター及び内因性遺伝子の配列間の相同組換えにより本発明の発現カセットを生成するために一又は複数のオペレータ配列に操作可能に連結され得るため、天然プロモータが調節タンパク質応答成分と置換され、内因性遺伝子が誘導可能な発現カセットの一部になる。

【0043】

場合によっては、発現カセットはベクター、例えばプラスミド、人工染色体、例えばBACなどに存在する。発現カセットの長さ及び発現カセットが存在するベクターの長さは異なってもよく、場合によっては、その長さは、5～10kbを含む1～10kbのような0.1 kb～150 kbの範囲内である。

【0044】

場合によっては、発現カセットは、ウイルスタンパク質をコードするコード配列を含む。このような場合、ウイルスタンパク質はウイルスベクターの成分であってもよい。対象のウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）ベクター、狂犬病ウイルスベクター、トリ肉腫白血病ウイルス（ASLV）ベクターなどを含むが、これらに限定されない。このような実施形態における対象の発現カセットは、ウイルスパッケージング細胞にトランスで与えられ得る一又は複数のウイルスタンパク質をコードしてもよい。このようなタンパク質は、酵素、例えばポリメラーゼ、カプシドタンパク質、エンベロープタンパク質、調節タンパク質などを含むが、これらに限定されない。

【0045】

場合によっては、乾燥組成物の核酸成分は、一又は複数のウイルスタンパク質（例えば、レンチウイルスタンパク質、アデノウイルスタンパク質、AAVタンパク質、FIVタンパク質、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）タンパク質、狂犬病ウイルスタンパク質、ASLVタンパク質、マウス白血病ウイルス（MLV）など）をコードする一又は複数の発現カセットを含んでもよく、ウイルスタンパク質は、例えばパッケージング細胞（例えばレンチウイルスパッケージング細胞、例えば293（HEK293T）パッケージング細胞株、HeLaパッケージング細胞株、D17パッケージング細胞株、MDCKパッケージング細胞株、BHKパッケージング細胞株及びCf2Thパッケージング細胞株）に存在してもよいようなベクター粒子（例えばレンチウイルスベクター粒子）を生成するためにトランスで用いられる。ウイルスタンパク質は、あらゆる便利な核酸（例えば線形発現構成体、ミニサークル又はミニサークル状の構成体、プラスミドなど）に含まれ得る。

【0046】

レンチウイルスゲノム及びプロウイルスDNAはレトロウイルスで見つけられる3つの遺伝子、つまり、2つの末端反復（LTR）配列によって隣接するgag、pol及びenvを有する。gag遺伝子は、内部構造（マトリックス、カプシド及びヌクレオカプシド）タンパク質をコードし、pol遺伝子は、RNA依存性のDNAポリメラーゼ（逆転写酵素）、プロテアーゼ及びインテグラーゼをコードし、env遺伝子はウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードする。5'LTR及び3'LTRは、ビリオンRNAの転写及びポリアデニル化を促進すべく機能する。LTRはウイルス複製に必要な他の全てのシス作用配列を有する。レンチウイルスは、vif、vpr、tat、rev、vpu、nef及びvpxを含む追加のアクセサリ遺伝子を有する。

【0047】

発現カセットによってコードされ得る対象のレトロウイルス（例えばレンチウイルス、HIV、FIV、トリ肉腫白血病ウイルス（ASLV）、マウス白血病ウイルス（MuLV若しくはMLV）など）タンパク質は、プロテアーゼ、逆転写酵素（RT）、インテグラーゼ（IN）、例

10

20

30

40

50

例えば機能性インテグラーゼ又は非機能性インテグラーゼ、tat、rev、nef、vpu、vpr、vpx、vif、GAG、GAG-POL（前駆体ポリタンパク質）、POL（RT及びIN）、エンベロープタンパク質（Env）（例えば、ビリオンをシュードタイプ化するエンベロープタンパク質）、並びにこれらの融合物、断片及び／又は組み合わせを含むが、これらに限定されない。対象のエンベロープタンパク質は、水疱性口内炎ウイルス（VSV-G）からのエンベロープ糖タンパク質、gp70のようなエコトロピックエンベロープタンパク質、RD114、（マウス白血病ウイルスをシュードタイプ化する）10A1、アンフォトロピックタンパク質などを含むが、これらに限定されない。

【0048】

場合によっては、ビリオンのエンベロープタンパク質がウイルス粒子の親和性を決定する（つまり、エンベロープタンパク質がウイルス粒子をシュードタイプ化する）。例えば、VSV-Gでシュードタイプ化されたビリオンは、哺乳類細胞及び哺乳類以外の細胞の両方を感染させることができる一方、MLV糖タンパク質gp70（mCAT-1エンベロープ糖タンパク質）でシュードタイプ化されたビリオンはマウス細胞及びラット細胞を感染させることができる。その理由は、gp70が主としてマウス細胞及びラット細胞で発現されるmCAT-1受容体を認識するからである。

【0049】

発現カセットが非機能性インテグラーゼをコードする場合、インテグラーゼをコードする配列は酵素を欠損させる突然変異体を有し得る。そのため、非機能性インテグラーゼで生成された標的細胞の形質導入により、宿主ゲノムに組み込まれない（対象の遺伝子の一時的な発現を可能にする）円形のレンチウイルスエピソームが形成される。

【0050】

発現カセットによってコードされ得る対象のアデノウイルスタンパク質並びに／又は核酸は、E1（E1a及び／若しくはE1b）、E2、E3、E4並びに／又はVA RNA（例えばVA RNA Iとしても知られているVAI及び／若しくはVA RNA IIとしても知られているVAIIなど）並びにこれらの融合物、断片及び／若しくは組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0051】

発現カセットによってコードされ得る対象のアデノウイルス随伴ウイルス（AAV）タンパク質及び／又は核酸は、rep（例えばRep78、Rep68、Rep52、Rep40）、cap（例えばVP1、VP2、VP3）、アデノウイルスE1（例えばE1a、E1b）、E2、E3、E4を含むヘルパーウイルスタンパク質、及び／又はアデノウイルスVA RNA、並びにこれらの融合物、断片及び／又は組み合わせを含むが、これらに限定されない。AAVウイルス粒子はアデノウイルスヘルパーを必要とするか、又は代わりにヘルパーを含まないことも可能である。

【0052】

発現カセットによってコードされ得る対象の狂犬病ウイルスタンパク質は、核タンパク質（N）、リンタンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）、糖タンパク質（G）及びウイルスRNAポリメラーゼ（L）並びにこれらの融合物、断片及び／又は組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0053】

必要に応じて、発現カセットは、異質核酸の組み込み、選択及び核酸の宿主細胞への導入のために重要な配列を保持するように構成され得る。例えば、レトロウイルスゲノムでは、必要なシス作用成分を全て更に含む1つの核酸分子が全てのコード配列を保持する。従って、ベクター生成システムのバイオセーフティーは、自身の様々な成分をコードする配列を個々のユニットに亘って分散させて、複製可能な組換え体を再度生成するために必要なクロスオーバーの数を増やすことにより達成され得る。

【0054】

増殖を弱めた（Multiply attenuated）パッケージングシステム（例えばレンチウイルスに基づくパッケージングシステム、例えばHIVに基づくパッケージングシステム）は典型的には、ウイルス遺伝子、つまりビリオンの主要な構造タンパク質をコードするGAG、

10

20

30

40

50

レトロウイルス特異的な酵素に關与するPOL、並びに効率的なgag及びpolの発現のために必要な転写後の調節因子をコードするrevの約3分の1のみ含む(DeII等著、1998年)。親ウイルスのゲノムの約60%が完全に除かれたので、このような広範囲に亘って除去されたパッケージングシステムから、親ウイルスは再構成され得ない。HIVに基づくパッケージングシステムの一状態では、Gag / Pol、Rev、VSV-G及びベクターは、4つの別個のDNAユニットから生成される。更に、ベクター配列及びヘルパー配列間の重複が数十ヌクレオチドまで減ったので、相同組換えの機会が最小限度に抑えられる。

【0055】

ウイルス粒子は、いわゆるプロデュース細胞、例えば293Tヒト胎児腎臓細胞でビリオンパッケージング成分及びベクターゲノムを同時発現させることにより生成され得る。この
10
ような細胞は、複数の核酸で一時的にトランスフェクトされてもよい。場合によっては、3~4個の別々の核酸(例えばプラスミド)が使用されるが、その数は、複数の成分(例えばレンチウイルス成分)が別個のユニットに細分化される程度に応じてより大きくてもよい。場合によっては、1つの核酸が、(例えばHIV-1由来の)ビリオンのコア成分及び酵素成分をコードする。この核酸はパッケージング核酸と称され得る。別の核酸は一又は複数のエンベロープタンパク質(例えばVSV-G)をコードし、エンベロープ発現核酸と称され得る。更に別の核酸は、標的細胞に導入される核酸をコードし、導入ベクターと称され得る。

【0056】

オンコレトロウイルスベクターで処置されると、「自己不活性化」するあるベクター(例えばあるレンチウイルスベクター)が生成され、ベクターは、標的細胞に導入されるとウイルスの末端反復(LTR)の転写能力を失う(Zufferey等、1998年)。この修飾により、複製可能な組換体(RCR)の発生の危険性が更に減り、プロモータ干渉に関連する問題が回避される。このようなベクター、又はその成分はSINベクター又はベクターを含むSINとして知られている。SINの設計は、Zufferey等著、1998年及び米国特許第5994136号
20
明細書に更に詳細に記載されており、これら両方の文献が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0057】

対象の所与のウイルス粒子を生成するために、乾燥したトランスフェクション剤組成物は、タンパク質のいずれかが若しくは全てをコードする核酸、及び/又は所望のウイルス粒子の生成に必要な(トランスで与えられ得る)核酸を含んでもよい。例えば、ウイルス粒子(例えばレンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子、AAV粒子など)を生成するために、所与の乾燥したトランスフェクション剤組成物は、上記に挙げたウイルスタンパク質及び/又は核酸のいずれかのための一又は複数のコード配列を含んでもよく(例えば、レトロウイルス、例えばレンチウイルス、ASLV、MuLV、HIV、FIVなどのためにプロテアーゼ、RT、IN、gag、pol、env、Tat、Rev、nef、vpu、vpr、vpx、vifなどを含んでもよく、アデノウイルスのためにE1(例えばE1a及び/又はE1b)、E2、E3、E4、VA RNAなどを含んでもよく、AAVのためにrep(例えばRep78、Rep68、Rep52、Rep40)、cap(例えばVP1、VP2、VP3)並びにアデノウイルスE1(例えばE1a、E1b)、E2、E3、E4及び/又はアデノウイルスVA RNAを含むヘルパーウイルスタンパク質を含んでもよく、
30
40
狂犬病ウイルスのためにN、P、M、G、Lを含んでもよく)、このような配列は同一のベクターに存在してもよく、又は4以上を含む3以上のような2以上の核酸(例えばベクター)に分散してもよい。

【0058】

従って、所与の乾燥組成物は、3、4又は5以上のウイルスタンパク質を含む2以上のウイルスタンパク質のような1以上のウイルスタンパク質をコードする一又は複数の核酸を含んでもよく、このような一又は複数のタンパク質のためのコード配列が同一の核酸、例えば核酸ベクターに存在してもよく、又は4以上を含む3以上のような2以上の異なる核酸、例えば異なる核酸ベクターに分散してもよい。場合によっては、乾燥組成物の核酸成分は、対象のウイルス粒子を生成するためにトランスで必要な全ての必須タンパク質の
50

ためのコード配列を含む。

【0059】

場合によっては、1つのウイルスタンパク質をコードする核酸が、別のウイルスタンパク質をコードする核酸に対して程度の差はあるが表される。従って、（他のウイルスタンパク質に対して）生成された所与のウイルスタンパク質の量は、乾燥組成物中に存在する（そのタンパク質をコードする）核酸分子の相対数によって影響される場合がある。場合によっては、ウイルスタンパク質（あらゆる便利なウイルスタンパク質）をコードする核酸が、異なるウイルスタンパク質（あらゆる便利なウイルスタンパク質）をコードする核酸に対して制御された比率（例えば、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.25:1、2.5:1、2.75:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1など）で乾燥組成物中に存在する。

10

【0060】

対象の発現カセットによってコードされ得る（様々なタイプの発現カセットの様々な組み合わせにおける）様々な典型的なウイルスタンパク質及び/又は核酸について記載する公報では、（レンチウイルス）に関して米国特許第5665577号明細書、米国特許第5981276号明細書、米国特許第5994516号明細書、米国特許第5994136号明細書、米国特許第679568号明細書、米国特許第6521457号明細書、米国特許第6740524号明細書、米国特許第6013516号明細書、米国特許第8298826号明細書、（アデノウイルス）に関して米国特許第8398968号明細書、米国特許第8263067号明細書、米国特許第8163544号明細書、（AAV）に関して米国特許第8163543号明細書、米国特許第8524678号明細書、米国特許第7022519号明細書、米国特許第7229823号明細書、米国特許第6953690号明細書、米国特許第6482634号明細書、（狂犬病ウイルス）に関して米国特許第7863041号明細書、（レンチウイルス）に関して米国特許出願公開第20100137412号明細書、米国特許出願公開第2010022179号明細書、米国特許出願公開第20100098664号明細書、米国特許出願公開第20130096370号明細書、（アデノウイルス）に関して米国特許出願公開第20100143304号明細書、米国特許出願公開第20100120155号明細書、米国特許出願公開第20100008889号明細書、（AAV）に関して米国特許出願公開第20130136729号明細書に記載されているものが含まれ、これら全ての公報全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0061】

場合によっては、発現カセットは、検出可能なタンパク質、例えば蛍光タンパク質（例えば緑の蛍光タンパク質、赤の蛍光タンパク質、黄色の蛍光タンパク質、シアンの蛍光タンパク質、青の蛍光タンパク質など）をコードするコード配列、及び、蛍光又は発光のような検出可能な信号を生成することができる酵素（例えばルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、分泌アルカリホスファターゼなど）などを含む。場合によっては、このため、（例えば顕微鏡検査法、FACSなどによる）トランスフェクション効率の評価を容易にすることができる。場合によっては、コード配列が検出可能なタンパク質をコードする発現カセットを有する核酸が、凍結乾燥されたトランスフェクション組成物の成分である。

30

【0062】

上記の乾燥したトランスフェクション剤組成物はあらゆる便利なプロトコルを使用して生成されてもよい。場合によっては、乾燥組成物の様々な成分の水性製剤、例えばトランスフェクション剤、緩衝剤、任意の凍結防止剤などをまず調製する。この水性組成物をあらゆる便利なプロトコルを使用して調製することができ、様々な成分を、あらゆる便利な順序又は望ましい順序で、例えば逐次的に又は同時に結合してもよい。この前駆体水性組成物を調製するための代表的なプロトコルを、実験のセクションで以下に述べる。その後、混ざっていない水を、乾燥組成物の生成に十分なように水性組成物から分離する。混ざっていない水を、あらゆる便利なプロトコルを使用して組成物から分離してもよい。例えば、混ざっていない水を、蒸発、凍結乾燥などによって組成物から分離してもよい。凍結乾燥プロトコルに関して、混ざっていない水の分離を、あらゆる便利な凍結乾燥プロトコルを使用して行ってもよい。場合によっては、組成物の温度を、例えば液体窒素などとの接触により、例えばデバイスを瞬時に凍結すべく急速に下げる。その後、瞬時に凍結され

40

50

た組成物を標準プロトコルを使用して凍結乾燥した結果、デバイスの夫々のウェルに存在する組成物から実質的に全ての自由水が除去される。実質的に全ての自由水が組成物から除去されると、組成物が凍結乾燥された組成物として正確に特徴付けられるように、凍結乾燥工程後の組成物の夫々に存在する水の量は、約0.001 %w/w 未満を含む、約0.01 %w/w 未満のような約0.1 %w/w 未満であってもよい。場合によっては、ポリマーのみ、又はポリマー及び核酸が液体の形態で（例えば緩衝液に）存在する。3Mの酢酸ナトリウム（pH 5.5）又は酢酸アンモニウム（pH 5.5）を1/10容積追加し、その後、エタノール又はイソプロパノールを2容積追加して遠心分離によってペレット化され得る沈殿物を生成することができる。真空遠心分離を使用してもよい。その後の乾燥試料を乾燥剤と共に - 20 で保存することができる。

10

【0063】

方法

本発明の態様は、核酸を細胞に導入する方法を更に含む。「核酸を細胞に導入する」とは、核酸が細胞膜の一側の第1の位置から細胞膜の他側の第2の位置に移動するように、細胞の外側の位置から細胞の内側の位置に核酸を移すことを意味する。従って、本発明の態様は、対象の一又は複数の核酸を標的細胞の外側の位置から標的細胞に移動させる方法を含む。

【0064】

本方法の態様は、例えば上述したような乾燥したトランスフェクション剤組成物、及び細胞に導入される対象の一又は複数の核酸から液体トランスフェクション組成物を生成することを含む。液体トランスフェクション組成物は水性組成物であってもよい。液体トランスフェクション組成物中に存在する対象の核酸は異なってもよく、場合によっては150 ng ~ 50 µg を含む10ng ~ 100 µg のような1 ng ~ 500 µg の範囲内であってもよい。液体トランスフェクション組成物中に存在するトランスフェクション剤の量は異なってもよく、場合によっては4 ng ~ 1,400 µg を含む2 ng ~ 2,500 µg のような1 ng ~ 5,000 µg の範囲内であってもよい。

20

【0065】

液体トランスフェクション組成物をあらゆる便利なプロトコルを使用して生成してもよい。場合によっては、例えば上述したようなある量の乾燥したトランスフェクション剤組成物を、対象の一又は複数の核酸を含むある容積の水性液体と混ぜ合わせて液体トランスフェクション組成物を生成する。液体トランスフェクション組成物を生成するために混ぜ合わせられる固体の液体に対する重量比は異なってもよく、場合によっては、固体の液体に対する重量比は5.65対1を含む7.5 対1のような10対1の範囲内である。混ぜ合わせを、かき混ぜ、攪拌などを含むあらゆる便利なプロトコルを使用して行ってもよく、混ぜ合わせを様々な温度で行ってもよく、温度は、場合によっては20 ~ 25 のような16 ~ 30 の範囲内である。

30

【0066】

液体トランスフェクション組成物を生成した後、生じた液体トランスフェクション組成物を、対象の核酸が標的細胞に導入されるのに十分な条件下で標的細胞と接触させる。このような実施形態では、標的細胞をトランスフェクション条件下で液体トランスフェクション組成物と接触させる。場合によっては、ある量の液体トランスフェクション組成物を細胞培養条件下である量の標的細胞と接触させ、形質導入が生じるのに十分な時間培養する。場合によっては、1個の細胞当たり 7×10^7 個の分子 ~ 1個の細胞当たり 7×10^8 個の分子のような1個の細胞当たり1分子 ~ 1個の細胞当たり 1×10^{12} 個の分子の範囲内のある量の核酸を与えるある量の液体トランスフェクション剤を、10,000 ~ 100,000 個の細胞のような1 ~ 5000万個の細胞の範囲内のある量の標的細胞と接触させる。あらゆる便利な培地を使用してもよく、対象の培地は、RPMI、DMEM、OptiMEM などを含むが、これらに限定されない。細胞及び液体トランスフェクション組成物を、例えば1 ~ 4時間のような5分 ~ 5日の様々な時間で、例えば30 ~ 37 のような4 ~ 42 の様々な温度で培養してもよい。

40

50

【0067】

標的細胞に導入される対象の核酸は大幅に異なってもよい。対象の核酸は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はこれらの組合せから構成されたある長さのポリマーを含んでおり、核酸の長さは異なってもよく、例えば10塩基以上、20塩基以上、50塩基以上、100塩基以上、500塩基以上、1000塩基以上、2000塩基以上、3000塩基以上、4000塩基以上、5000塩基以上又は更に多くの塩基であってもよく、ある実施形態における上限は、50,000塩基以下のような150,000塩基以下である。ある態様では、核酸は、長さが2,000 ~ 15,000塩基を含む1,000 ~ 50,000塩基のような10 ~ 150,000塩基であるデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はこれらの組合せから構成されたポリマーである。

【0068】

対象の核酸はデオキシリボ核酸 (DNA) を含んでおり、例えばゲノムDNA 又はその断片、相補的DNA (又は対象のあらゆるRNA 若しくはDNA から合成された「cDNA」)、組換えDNA (例えばプラスミドDNA) などを含むがこれらに限定されない。対象の核酸はリボ核酸 (RNA) を更に含んでおり、リボ核酸はあらゆるタイプ (又はそのサブタイプ) のRNA であってもよく、メッセンジャRNA (mRNA)、マイクロRNA (miRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、トランス作用性低分子干渉RNA (ta-siRNA)、天然の低分子干渉RNA (nat-siRNA)、リボソームRNA (rRNA)、転移RNA (tRNA)、核小体低分子RNA (snoRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、長い非コードRNA (lncRNA)、非コードRNA (ncRNA)、転移-メッセンジャRNA (tmRNA)、前駆体メッセンジャRNA (pre-mRNA)、カハール小体特異的なRNA (scaRNA)、piwi相互作用RNA (piRNA)、エンドリボヌクレアーゼ調製siRNA (esiRNA)、小分子RNA (stRNA)、信号認識RNA、テロメアRNA、リボザイム、又はこれらのRNA タイプ若しくはこれらのサブタイプのあらゆる組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0069】

対象の核酸は、例えば上述したような発現カセットを含んでもよい。例えば核酸は、コード配列に操作可能に連結された調節配列を有してもよい。調節配列は、例えば上述したような (センス鎖の5'末端又はアンチセンス鎖の3'末端のいずれかに付着した) プロモータ、エンハンサ、ターミネータ、オペレータ、リプレッサ及び誘導物質を含むことができる。場合によっては、発現カセットはベクター、例えばプラスミド、人工染色体、例えばBACなどに存在する。発現カセット及び発現カセットが存在するベクターの長さは異なってもよく、場合によっては、その長さは、5 ~ 10kbを含む1 ~ 10kbのような0.1 kb ~ 150 kbの範囲内である。

【0070】

発現カセットのコード配列は外因性を有してもよく、又は内因性を有してもよい。「外因性」のコード配列は、宿主細胞内に、例えば宿主細胞の核、宿主細胞のゲノムなどに導入されるヌクレオチド配列である。外因性のコード配列は、宿主のゲノム内の他の部位 (例えば異質ヌクレオチド配列) に存在しなくてもよく、宿主のゲノム内に存在するが、ゲノム内の異なる部位に組み込まれている配列の追加のコピーであってもよく、又は、宿主のゲノム内に存在する配列の (例えば突然変異、例えば挿入、欠失、置換などを含む、融合タンパク質をコードするなどの) 変異体であってもよい。「内因性」のコード配列は、宿主のゲノム内に存在するヌクレオチド配列である。内因性遺伝子は、オペレータ配列組換えベクター及び内因性遺伝子の配列間の相同組換えにより本発明の発現カセットを生成するために一又は複数のオペレータ配列に操作可能に連結され得るため、天然プロモータが調節タンパク質応答成分と置換され、内因性遺伝子が誘導可能な発現カセットの一部になる。

【0071】

場合によっては、対象の核酸は、ウイルス粒子にパッケージされた核酸を含む。このような場合、核酸はパッケージング配列と、対象のコード配列を含む発現カセットとを含んでもよい。パッケージング配列 (例えばPsi 部位、Psi 配列) は、核酸のウイルス粒子への効率的なカプシド形成に使用される配列を意味する。従って、対象の核酸がパッケージ

10

20

30

40

50

ング配列と対象のコード配列を含む発現カセットとを含む場合、対象の核酸は生成されたウイルス粒子にパッケージされる。例えばパッケージング配列がレンチウイルスゲノムから失われる場合、シス欠損がゲノムRNA のカプシド形成を防ぐ。しかしながら、生じる突然変異体は、全てのビリオンタンパク質の合成を依然として指示することができる。

【 0 0 7 2 】

場合によっては、液体トランスフェクション組成物を生成するために乾燥したトランスフェクション剤と混ぜ合わせられる対象の核酸は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、泡沫状ウイルスなどの群から選択されたウイルスのウイルスゲノムから選択されたベクター領域を含み、このようなウイルスは、遺伝子導入の用途で一般に使用されている。場合によっては、ベクター領域は、レトロウイルス由来の領域であるようにレトロウイルスベクター領域である。レトロウイルスは、2つの固有の特徴によって特徴付けられる一本鎖RNA 動物ウイルスを含むレトロウイルス科に属するあらゆるウイルスである。まずレトロウイルスのゲノムはRNA の2つのコピーから構成された二倍体である。次にこのRNA は、ビリオン関連酵素逆転写酵素によって二本鎖DNA に転写される。その後、この二本鎖DNA 又はプロウイルスは宿主ゲノムに組み込まれ、宿主ゲノムの安定して組み込まれる成分として親細胞から子孫細胞に移され得る。場合によっては、レトロウイルスベクター領域は、レンチウイルスベクター領域、例えばレンチウイルス由来のベクターである。レンチウイルスはレトロウイルス科のメンバーである。レンチウイルスベクターはVSV-G でシュードタイプ化されてもよく、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原体、ヒツジの脳炎 (ピスナ) 又は肺炎を引き起こすピスナマエディ、ヤギの免疫不全、関節炎及び脳障害を引き起こすヤギ関節炎脳炎ウイルス、ウマの自己免疫性溶血性貧血及び脳障害を引き起こすウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ネコの免疫不全を引き起こすネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシのリンパ節腫脹及びリンパ球増加症を引き起こすウシ免疫不全ウイルス (BIV)、並びにヒト以外の霊長類の免疫不全及び脳障害を引き起こすサル免疫不全ウイルス (SIV) に由来している。HIV に基づくベクターは、5 %未満の親ゲノムを保持してもよく、25%未満のゲノムはパッケージング構成体に組み込まれてもよく、このため、復帰突然変異体の複製可能なHIV を生成する可能性が最小限度に抑えられる。ベクター領域は、レンチウイルスの5'LTR 及び3'LTR からの配列を含んでもよい。場合によっては、ベクター領域は、レンチウイルスの5'LTR からのR 配列及びU5配列を含み、レンチウイルスからの不活性化される、又は自己不活性化する3'LTR を含む。

【 0 0 7 3 】

「末端反復」、つまり「LTR」という用語は、反復するDNA の配列であって、レトロウイルスRNA の逆転写によって形成されたプロウイルスDNA のいずれかの末端にあるDNA の配列を指す。LTR は、その遺伝物質を宿主ゲノムに挿入するためにウイルスによって使用される (例えば、LTR の末端は宿主ゲノムへのプロウイルスの組込みに関与する)。逆転写の複数の工程の処理の結果、LTR がプロウイルスDNA のいずれかの末端に配置される。プロウイルスが宿主ゲノムに組み込まれると、5'末端のLTR はレトロウイルスゲノムのためのプロモータとして通常機能する。

【 0 0 7 4 】

LTR 配列はあらゆる種からのあらゆるレンチウイルスからのLTR 配列であってもよい。例えば、LTR 配列はHIV、SIV、FIV 又はBIV からのLTR 配列であってもよい。必要に応じて、エフェクティブライブラリは、下流側の末端反復配列における調節要素の欠失を含む自己不活性化するベクターから構成されてもよく、ベクター動員に必要なパッケージング信号の転写を省く。従って、ベクター領域は不活性化されるか、又は自己不活性化する3'LTR を含んでもよい。3'LTR はあらゆる便利な方法によって自己不活性化してもよい。例えば、3'LTR のU3配列は、TATAボックス部位、Sp1 部位及びNF- κ B 部位のようなそのエンハンサ配列の欠失を含んでもよい。自己不活性化する3'LTR の結果、宿主細胞ゲノムに組み込まれるプロウイルスは不活性化された5'LTR を含む。任意には、レンチウイルス5'LTR からのU3配列は、ウイルス構成体のプロモータ配列と置換されてもよい。このため、パ

パッケージング細胞株から回収されるウイルスの力価が増加し得る。エンハンサ配列が更に含まれてもよい。

【 0 0 7 5 】

このような実施形態における対象の方法は、パッケージされる核酸（例えば上述したパッケージング配列を有する核酸）を、例えば上述したようにウイルス粒子を生成するためトランスで与えられるウイルスタンパク質の全てを含む一又は複数をコードする一又は複数の発現カセットを更に含む乾燥したトランスフェクション剤組成物と混ぜ合わせる方法である。

【 0 0 7 6 】

このような実施形態では、パッケージされる核酸は、乾燥したトランスフェクション剤組成物と接するとき液体の形態であり（例えば水又は緩衝液に溶解する）ため、ウイルス粒子でパッケージされる核酸を含み、必要なウイルスタンパク質をトランスで生成するためにコード配列の全てを含む一又は複数を任意に含む液体トランスフェクション剤が生成される。液体トランスフェクション剤を標的細胞と接触させて、ウイルス粒子生成条件下で保持する。標的細胞は、パッケージング細胞であってもなくてもよいように、トランスで与えられるウイルスタンパク質のための一又は複数のコード配列を有してもよいし有さなくてもよい。

【 0 0 7 7 】

従って、場合によってはその後、所望のウイルス粒子を生成するために、乾燥したトランスフェクション剤組成物から生成された液体トランスフェクション組成物を用いて適切な標的細胞株、例えばパッケージング細胞株をトランスフェクトしてもよい。細胞株が、トランスで与えられるウイルスタンパク質のための一又は複数のコード配列を有する細胞株である場合、標的細胞株はパッケージング細胞株であってもよい。パッケージング細胞株は、ウイルスゲノムRNA をウイルス粒子にパッケージするためにトランスで必要なウイルスタンパク質の全てを含む一又は複数を与える。パッケージング細胞株は、293（例えばHEK293T）、HeLa、D17、MDCK、BHK 及びCf2Thを含む、ウイルスタンパク質を発現することができるあらゆる細胞株であってもよい。ある実施形態では、構成プロモータ又は条件的な（調節可能な）プロモータの制御下で一又は複数のレポータ遺伝子を含んでもよいウイルスレポータ構成体と共にエフェクタ構成体を使用する。一実施形態では、レポータ遺伝子の内の少なくとも1つがシグナル経路に特有の（条件的な）プロモータによって制御され、第2のレポータ遺伝子が構成プロモータによって制御される。パッケージング細胞株は必要なウイルスタンパク質を安定して発現してもよい。このようなパッケージング細胞株は、例えば米国特許第6218181号明細書に記載されている。或いは、パッケージング細胞株は、必要なウイルスタンパク質をコードする核酸を含むプラスミドで一時的にトランスフェクトされてもよい。別の実施形態では、必要なウイルスタンパク質を安定して発現しないパッケージング細胞株が2以上のプラスミドで同時にトランスフェクトされる。プラスミドの内の1つは、対象のコード配列を有するウイルス構成体を含む。他の一又は複数のプラスミドは、所望の宿主細胞を感染させ得る機能的なウイルスを細胞が生成することを可能にするのに必要なタンパク質をコードする核酸を含む。パッケージング細胞株はエンベロープ遺伝子生成物を発現しなくてもよい。この場合、パッケージング細胞株は、ウイルスゲノムをエンベロープタンパク質を欠く粒子にパッケージする。エンベロープタンパク質がある程度ウイルス粒子の宿主領域に関与しているので、ウイルスは好ましくはシュードタイプ化される。「シュードタイプ化」されるレトロウイルスは、RNAゲノム由来のウイルス以外のウイルスからのエンベロープタンパク質を有するレトロウイルス粒子である。エンベロープタンパク質は異なるレトロウイルス又は非レトロウイルス由来であってもよい。1つのエンベロープタンパク質は水疱性口内炎ウイルスG（VSV-G）タンパク質である。従って、パッケージング細胞株は、ウイルスの宿主細胞への侵入を可能にするVSV-Gのような膜関連タンパク質をコードする配列を有するプラスミドでトランスフェクトされてもよい。当業者は、使用される宿主細胞の適切な偽型を選択することができる。選択される偽型は、特定の宿主範囲の付与に加えて、ウイルスが非常に高い力価

10

20

30

40

50

に濃縮されることを可能にしてもよい。或いは、ウイルスは、特定の種への感染を制限するエコトロピックエンベロープタンパク質でシュードタイプ化され得る。

【0078】

ある実施形態では、本方法は、例えば分離によって細胞から生成されたウイルス粒子を得る工程を更に有する。あらゆる便利な分離プロトコルを使用してもよい。適切な分離プロトコルの例として、濾過、遠心分離、沈澱、表面及び/又は抗体に基づく捕捉などが含まれるが、これらに限定されない。場合によっては、トランスフェクション後の細胞上清からウイルス粒子を採取する。ある場合には、細胞残屑を除去するために簡単な遠心分離（例えば10分間で500 xg）によってウイルス粒子を分離（つまり、採取）してもよい。任意には、この採取の後、（例えば0.45 μm のポアフィルタ、例えば酢酸セルロースフィルタ、ポリスルホン（低タンパク結合）フィルタ、PVDFフィルタなどでの）濾過を行うことができる。採取されたウイルス粒子は、短期間（数時間から数日）では4 で保存されてもよいが、長期保存では - 20 又は - 80 で冷凍されるべきである。

【0079】

キット

本開示の態様はキットを更に含む。本キットは、例えば上述したような一又は複数の乾燥したトランスフェクション剤組成物を含んでもよい。場合によっては、本キットは、プロ発現カセットを含むベクターを更に含んでもよく、プロ発現カセットは、対象のコード配列を受けるべく構成された調節要素、例えばプロモータに操作可能に連結されたクローニング部位を含む。場合によっては、このプロ発現カセットは、例えば上述したようなウイルスベクター領域であり、パッケージング配列と、例えば上述したような他の所望のウイルスゲノム配列とを有してもよい。

【0080】

キットは、（例えば高処理の適用を容易にし得る）マルチウェル基材、又は複数の液体貯蔵手段を含む同様の構造に分散した、例えば上述したような凍結乾燥されたトランスフェクション組成物を含むことができ、基材は、そのウェルの内の少なくとも一又は複数の少なくとも1つの凍結乾燥されたトランスフェクション試薬を含む。対象の基材は、（例えば少なくとも2、少なくとも6、少なくとも24、少なくとも96、少なくとも384、少なくとも1536などの）複数の反応チャンバ又はウェルを有することが可能である。例えば、基材は、2ウェルプレート、6ウェルプレート、24ウェルプレート、96ウェルプレート、384ウェルプレート、1536ウェルプレートなどであってもよい。ウェル又は反応チャンバはベースホルダに一体化されてもよく（従って、ベースホルダから着脱可能若しくは分離可能ではなく）、又は例えば以下に述べるように別個の貯蔵構造として存在してもよい。基材の実施形態として、例えば現在市販されているマルチウェルPCR プレートのようなPCR プレートがある。基材の全体的なサイズ及び構成は、簡単な手動又は自動による取扱いを可能にするサイズ及び構成であり、基材は円盤状、スライド状、矩形状などであってもよい。基材の長さは、10～1000mm（例えば20～200 mm、100～150 mmなど）の範囲内であり得る。基材の高さは、1～50 mm（例えば5～30 mm、10～25 mmなど）の範囲内であり得る。基材の幅は、10～1000mm（例えば20～200 mm、50～150 mmなど）の範囲内であり得る。基材の反応チャンバは夫々、上部が開いて、流体容器の形成に十分のように構成された少なくとも1つの壁を有する容器であり、別個の壁の数は容器の断面形状によって決まり、例えば円形の断面形状を有する容器では1つであり、正方形の断面形状を有する容器では4つである。ウェルの構造はあらゆる便利な形状であってもよく、例えば、一又は複数の壁がウェルの底部のポイントに徐々にマージするように円錐形状であってもよい。しかしながら、別個の底面、例えば平面の底面を有するウェルのような他の構成が更に包含される。反応チャンバは、不規則な形状を含む円形、三角形、矩形、正方形、五角形、六角形などの様々な断面形状を有してもよく、多くの実施形態では、円形、矩形又は正方形の断面形状を有する。従って、ウェルの別個の壁の数は断面形状に応じて少なくとも1つであり、2、3、4、5、6又はそれ以上であり得る。

【0081】

反応チャンバ又はウェルに含まれ得る流体の体積は、約0.0001～10ml（例えば0.001～1ml、0.005～0.1mlなど）の範囲内であり得る。壁の高さは一般に均一であり、（例えば液体が凍結乾燥されたトランスフェクション試薬組成物に追加された後）所望の量の流体、例えばトランスフェクション試薬組成物を液体の形態で保持することができる反応チャンバの形成に十分である。例えば、反応チャンバの各壁の高さは、0.1mm以上（例えば1mm以上、10mm以上、20mm以上、50mm以上、100mm以上など）である。

【0082】

マルチウェル基材が形成される材料は、基材に物理的な支持体及び構造を与えることができる剛性材料であり得る。適切な材料として、ガラス（ガラス又はシリコン）、プラスチック、例えばポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオリド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、これらの組合せ又は修飾体（例えば熱安定性材料）など、金属、例えばアルミニウム、金、チタン又は合金などが含まれるが、これらに限定されず、多くの実施形態では、材料は少なくともある光波長に透過であり得る。基材を構成する反応チャンバの壁及び底面は、同一の材料又は異なる材料から形成されてもよい。

10

【0083】

マルチウェル基材はあらゆる便利な方法を用いて形成されてもよい。基材が形成される材料の性質に応じて、形成には射出成形、微細加工又は他の適切な形成技術が含まれてもよい。基材が単一のユニットとして調製されてもよく、又は基材の底部分が壁とは別に形成されてもよく、そのため基材は、プレートの表面に壁を安定して置くことにより組み立てられる。

20

【0084】

ある実施形態では、各ウェルの凍結乾燥された組成物が使用前に基材の周囲環境と接しないように、マルチウェル基材のウェルは密閉され得る。密閉工程及び密閉手段を用いるための手順が凍結乾燥された組成物の性質に悪影響を及ぼさない限り、あらゆる便利な密閉手段が基材に存在してもよい。水蒸気が外部の環境からシールを通過してウェルに通じ抜けることができないように、密閉手順（及びシール）は完全ではないにしても実質的に防湿性を有すべきである。密閉のため、乾燥剤の材料がウェルに存在せず、凍結乾燥された組成物の活性を維持するために必要ではない。典型的なシールとして、着脱可能な要素、例えば着脱可能なキャップ、ヒートシール、マルチウェルシール要素、例えば2以上の別個のウェルを密閉する1つの要素であるキャップなどがある。

30

【0085】

図5は、本発明の一実施形態に係るマルチウェル基材を示す図である。図5では、マルチウェル基材は、本発明に従って凍結乾燥された組成物が夫々充填された複数の個別の着脱可能な容器（例えば反応チャンバ又はウェル）を保持するように構成されたホルダを含んでいる。容器は夫々、容器を密閉する個々の着脱可能なキャップ構造を有する。例えば、この実施形態では、マルチウェル基材は、ベースホルダと一体化されていない複数の着脱可能な容器を保持するように構成されたベースホルダを含み、着脱可能な容器は、この実施形態では着脱可能なキャップ構造で密閉可能なバイアルである。

40

【0086】

対象のキット、要素及び方法により、核酸のライブラリ/収集の高処理パッケージングのためのパッケージング工程の自動化が容易になる。例えば、凍結乾燥されたトランスフェクション試薬組成物が（上述したような、例えば386ウェル、1536ウェルなどの）マルチウェルの形態で存在することができ、液体の形態の核酸（標的細胞に与えられる核酸）のライブラリは、液体トランスフェクション試薬組成物を生成するために液体の形態でウェルに加えられる。或いは、標的細胞に与えられる核酸は、凍結乾燥の前にトランスフェクション試薬組成物に混合され得る。このような場合、水をウェルに加えてトランスフェクション試薬組成物を液体の形態で生成することができる。

【0087】

その後、（例えばマルチウェルの形態の）トランスフェクション試薬組成物を（未だマ

50

ルチウセルの形態である) 標的細胞と接触させ得る。トランスフェクション試薬組成物が (例えばウイルス粒子を生成するために) ウイルスタンパク質を含んでいる場合、標的細胞はパッケージング細胞であり得る。その後、生成されたウイルス粒子を (例えば未だマルチウセルの形態で) 収集 (つまり採取) することができる。

【0088】

従って、与えられる核酸を用いてトランスフェクション試薬組成物を生成する工程 (及び核酸をウイルス粒子にパッケージする任意の工程) が、高処理生成のために容易に自動化され得る。

【0089】

本キットの要素は別々の容器に存在してもよく、又は複数の要素が1つの容器に存在してもよい。例えば、乾燥した核酸組成物及びプロ発現カセットは、必要に応じて異なる容器に存在してもよく、又は1つの容器に混ぜ合わせられてもよい。場合によっては、一又は複数の容器は無菌のパッケージング容器である。全ての要素は1つのパッケージング要素を含んでもよく、例えば取扱いを容易にするようなボックス、トレイ、バッグを含んでもよい。

【0090】

上述した要素に加えて、対象のキットは、例えば本方法を実行するためにキットの要素を使用するための説明書を更に備えている。説明書は一般に、適切な記録媒体に記録されている。例えば、説明書は紙又はプラスチックのような基材に印刷されてもよい。従って、説明書は、キット内に添付文書としてキット又はその要素の容器のラベルなどに (つまり包装体又は補助包装体に付随して) 存在してもよい。他の実施形態では、説明書は、例えば携帯用フラッシュドライブ、CD-ROM、ディスクット、ハードディスクドライブ (HDD) などの適切なコンピュータ可読記憶媒体に存在する電子保存データファイルとして存在する。更に他の実施形態では、実際の説明書がキット内に存在しないが、リモートソースから、例えばインターネット経由で説明書を得る手段が設けられている。本実施形態の一例は、説明書を閲覧及び/又はダウンロードできるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を得るこの手段が適切な基材に記録されている。

【0091】

有用性

対象の方法及び組成物は様々な研究及び臨床応用に使用される。本方法及び組成物は、核酸 (例えば凍結乾燥された試薬及び与えられる核酸) を細胞に直接与えるために使用されることができ、並びに/又は核酸 (例えば凍結乾燥された試薬、与えられる核酸、及び、ウイルスタンパク質及び/若しくはウイルスゲノムをコードする一又は複数の核酸) を細胞に間接的に与えるために使用され得る。間接的に与える場合、対象の核酸をウイルス粒子 (例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、AAV など) にパッケージされた後に標的細胞に与える。場合によっては、一又は複数のウイルス成分をコードする一又は複数の核酸は、凍結乾燥されたトランスフェクション組成物の一部ではなく液体の形態で存在する。場合によっては、少なくとも1つのウイルス成分 (場合によっては全てのウイルス成分) をコードする少なくとも1つの核酸を、凍結乾燥されたトランスフェクション組成物に含まれる一又は複数の核酸によってコードする。

【0092】

核酸の細胞への付与は、あらゆる所望のタンパク質及び/又はペプチド、並びにあらゆる所望の非コードRNA (例えばmiRNA、siRNA、shRNA など) をインビトロ又はインビボで発現させるために使用され得る。従って、核酸の付与は、あらゆる所望の種 (例えば哺乳動物、昆虫、魚など) からのあらゆる所望の細胞型で、あらゆる所望の状況 (例えば組織片、細胞培養、3D細胞培養、インビボなど) であらゆる所望の遺伝子/タンパク質の機能を増大又は減少させるために使用され得る。

【0093】

核酸の細胞への付与は幅広い種類の研究及び臨床用途に有用である。例えば、(本技術分野では「遺伝子療法」と称されることもある) 核酸の個体へのインビボでの付与を使用

して、ほとんどあらゆる疾患並びに／又は状態（例えば癌、糖尿病、肝障害／肝不全、腎障害及び／若しくは腎不全、脾障害及び／若しくは脾不全、消化状態、造血状態など）を治療することができる。エキスピボでの遺伝子療法のために、核酸を細胞に導入して細胞を対象に移植することができる。

【 0 0 9 4 】

あらゆるタイプの核酸を対象の方法及び／又は組成物を使用して標的細胞に付与することができる。典型的な核酸のリストには、ゲノム修飾タンパク質をコードする核酸（DNA修飾酵素）（例えばCRE リコンビナーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、Cas-9 ヌクレアーゼ、TAL エフェクタヌクレアーゼなど）、RNA 及び／又はタンパク質修飾酵素（例えばCsy4ヌクレアーゼ）、蛍光タンパク質、細胞周期制御タンパク質、キナーゼ、構造タンパク質、シグナルタンパク質、分泌タンパク質、受容体タンパク質、アポトーシスタンパク質、翻訳調節因子、ペプチド抗原、細胞プログラミング因子（例えばOct4/Sox2/Klf4/Myc）、細胞分化因子（例えばmiRNA、転写因子など）、核タンパク質（例えば転写因子、細胞周期タンパク質）、細胞質タンパク質（例えばペプチド修飾酵素、アポトーシス因子、蛍光タンパク質、キナーゼ）及びワクチン開発に重要なタンパク質、並びにあらゆる所望の標的タンパク質（及び例えば上記のタンパク質）を調節する非コードRNA（例えばmiRNA、siRNA、shRNA）をコードする核酸が含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 9 5 】

以下の例は例示のために提供されており、制限のために提供されているわけではない。

20

【 0 0 9 6 】

実験

実施例 1

標準トランスフェクションプロトコルによって利用される工程を簡略化するために、適切に分散したトランスフェクション試薬を調製して、生じた混合物を凍結乾燥した。その後、単にDNAの溶液を加えて凍結乾燥された粉末を再構成することにより、この乾燥した試薬をトランスフェクションのために直接使用することができた。

【 0 0 9 7 】

XFECT（商標）ポリマーをDMSOの溶液として調製した。液体の形態の試薬が通常供給されるXFECT（商標）トランスフェクション緩衝剤は、pH 5.0の25mMの酢酸ナトリウム緩衝剤である。場合によっては、更に濃縮された250 mMの酢酸ナトリウム緩衝剤を凍結乾燥のために使用した。

30

【 0 0 9 8 】

6ウェルプレートの1つのウェルでのトランスフェクションのために、XFECT（商標）ポリマー1.5 μ lを、3MのNaOAc（酢酸ナトリウム）1.66 μ l（pH 5.0）及び16.84 μ Lの水に加えて攪拌して混合することにより、凍結乾燥された混合物を調製した。その後、この混合物を凍結乾燥機で乾燥した。トランスフェクションで使用するために、5 μ gのDNAを100 μ lの水に溶解して、乾燥した凍結乾燥試薬（XFECT（商標）シングルショット）に加えて、溶液が透明で均質になるまで高速の攪拌により混合した。生じた溶液を、ナノ粒子を形成するために室温で10分間培養し、その後細胞に加えた。トランスフェクション試薬の凍結乾燥状態に関するトランスフェクション効率及び毒性プロファイルは、トランスフェクション試薬の液体状態に関するトランスフェクション効率及び毒性プロファイルに匹敵した。

40

【 0 0 9 9 】

実施例 2

様々な凍結乾燥された混合物を、HEK293T細胞（293T細胞）（パッケージング細胞）をトランスフェクトする能力及びHEK293T細胞を誘導してウイルスを生成する能力に関して試験した。

【 0 1 0 0 】

試験された凍結乾燥混合物は、

50

(3) (液体のLENTI-X (商標) パッケージング混合物及びZsGreen1蛍光タンパク質 (LXZsG) を発現する液体導入ベクターに加えられた) 凍結乾燥されたXFECT (商標) トランスフェクション試薬、

(2) (液体のLXZsG に加えられた) 凍結乾燥されたLENTI-X (商標) パッケージング混合物を有する凍結乾燥されたXFECT (商標) 試薬、及び

(1) LENTI-X (商標) パッケージング混合物及び凍結乾燥されたLXZsG を有する凍結乾燥されたXFECT (商標)

を含有した。

【0101】

上記の凍結乾燥された製剤を、

(4) (液体のLENTI-X (商標) パッケージング混合物及び液体のLXZsG に加えられた) XFECT (商標) の液体状態

の対照に対して試験した。

【0102】

従って、4つ全ての条件は、(i) XFECT (商標) トランスフェクション試薬、(ii) LENTI-X (商標) パッケージング混合物、及び(iii) LXZsG を含んだ。図1~3のX軸のラベルは、トランスフェクション前に凍結乾燥された成分を指し(「液体」は凍結乾燥された成分がないことを示す)。

【0103】

図1に示されているように、HEK293T細胞は上記の混合物でトランスフェクトされ、トランスフェクトされた細胞の蛍光活性化細胞選別(FACS)の分析結果は、トランスフェクション試薬の全ての試験された混合物が高効率でトランスフェクトされたことを実証した。平均蛍光強度における僅かな変化のみを観察した。従って、凍結乾燥された製剤は、新鮮な液体製剤と比較して同様のレベルの効率で細胞をトランスフェクトした。

【0104】

図2に示されているように、ウイルスを含む上清をトランスフェクトされた293T細胞から収集して、レンチウイルスRNAゲノムの特定の部分を増幅して既知の量のテンプレートに対して測定するqRT-PCRアッセイであるLENTI-X (商標) qRT-PCR力価測定キット(cat# 631235)を上清に与えた。凍結乾燥された全てのパッケージング製剤は、液体製剤のレンチウイルスに匹敵する十分な量のレンチウイルスを生成した(図2)。

【0105】

図3に示されているように、凍結乾燥されたパッケージング製剤を使用して生成されたウイルスが細胞を感染させる能力を試験するために、ウイルスを含む上清をトランスフェクトされた293T細胞から収集して、上清をHT1080細胞に晒した。その後、機能的なウイルスの力価を決定した(図3)。一時的に、HT1080細胞を播き、ウイルスを含む上清の段階希釈で形質導入した。48時間後、形質導入された細胞を、FACSによる緑の蛍光に関して分析して、陽性細胞の割合を決定した。1個の細胞当たりウイルスの1つのコピーを確実にするために、20%未満の陽性細胞を有する培養物のみを、ml当たりの感染単位(IFU/ml)を計算するために用いた。凍結乾燥されたパッケージング製剤は相当量のレンチウイルスを生成し、20%及び67%以上のIFUが、乾燥XFECT (商標) + パッケージングDNA、及び乾燥XFECT (商標) + DNAなしで夫々生成された。

【0106】

図4に示されているように、追加の試料(N=8液体; N=13乾燥)を、凍結乾燥されたトランスフェクション・レトロウイルスのパッケージング混合物の性能を確認するために試験した。トランスフェクション効率をFACS分析によって決定し(図4の上のグラフ: %陽性細胞及び平均蛍光強度(MFI))、ウイルスのコピー/mlを、上述したようにqRT-PCRによって決定した(図4の下グラフ)。凍結乾燥されたパッケージング混合物は液体製剤と同様の効率でトランスフェクトしたが、qRT-PCRによって測定されるようにウイルス粒子を更に多く生成した。

【0107】

10

20

30

40

50

添付の特許請求の範囲に関わらず、本開示は下記の付記により更に定義される。

【0108】

付記1．ポリマートランスフェクション剤、及び緩衝剤を含んでいることを特徴とする乾燥組成物。

【0109】

付記2．凍結乾燥された組成物であることを特徴とする付記2に記載の乾燥組成物。

【0110】

付記3．前記ポリマートランスフェクション剤はヘテロポリマーを含んでいることを特徴とする付記1又は2に記載の乾燥組成物。

10

【0111】

付記4．前記ポリマートランスフェクション剤はポリ(- アミノエステル)並びにその塩及び誘導体を含んでいることを特徴とする付記3に記載の乾燥組成物。

【0112】

付記5．凍結防止剤を含まないことを特徴とする付記1乃至4のいずれかに記載の乾燥組成物。

【0113】

付記6．核酸を含んでいることを特徴とする付記1乃至5のいずれかに記載の乾燥組成物。

【0114】

付記7．前記核酸は発現カセットを含んでいることを特徴とする付記6に記載の乾燥組成物。

20

【0115】

付記8．前記発現カセットはタンパク質コード配列を有することを特徴とする付記7に記載の乾燥組成物。

【0116】

付記9．前記タンパク質はウイルスタンパク質を含んでいることを特徴とする付記8に記載の乾燥組成物。

【0117】

付記10．2以上のウイルスタンパク質をコードする核酸を含んでいることを特徴とする付記9に記載の乾燥組成物。

30

【0118】

付記11．ウイルス粒子を生成するために必要な全てのタンパク質をコードする核酸を含んでいることを特徴とする付記10に記載の乾燥組成物。

【0119】

付記12．前記核酸は同一のベクターに存在していることを特徴とする付記11に記載の乾燥組成物。

【0120】

付記13．前記核酸は異なるベクターに存在していることを特徴とする付記12に記載の乾燥組成物。

40

【0121】

付記14．前記ウイルス粒子はレトロウイルス粒子であることを特徴とする付記11乃至13のいずれかに記載の乾燥組成物。

【0122】

付記15．前記発現カセットは誘導可能であることを特徴とする付記7乃至14のいずれかに記載の乾燥組成物。

【0123】

付記16．核酸を細胞に導入する方法であって、

- a) i) ポリマートランスフェクション剤及び緩衝剤を含む乾燥組成物、
- ii) 溶媒、及び

50

iii) 核酸

を組み合わせ、液体トランスフェクション溶液を生成し、

b) 該液体トランスフェクション溶液を細胞と接触させて、前記核酸を前記細胞に導入することを特徴とする方法。

【0124】

付記17．前記ポリマートランスフェクション剤はヘテロポリマーを含んでいることを特徴とする付記16に記載の方法。

【0125】

付記18．前記ポリマートランスフェクション剤はポリ(- アミノエステル)並びにその塩及び誘導体を含んでいることを特徴とする付記17に記載の方法。

10

【0126】

付記19．前記乾燥組成物は凍結防止剤を含まないことを特徴とする付記16乃至18のいずれかに記載の方法。

【0127】

付記20．前記核酸はコード配列を有することを特徴とする付記16乃至19のいずれかに記載の方法。

【0128】

付記21．前記核酸はウイルスパッケージング配列を有することを特徴とする付記20に記載の方法。

【0129】

20

付記22．前記乾燥組成物は第2の核酸を含んでいることを特徴とする付記16乃至21のいずれかに記載の方法。

【0130】

付記23．前記第2の核酸は発現カセットを含んでいることを特徴とする付記22に記載の方法。

【0131】

付記24．前記発現カセットはタンパク質コード配列を有することを特徴とする付記23に記載の方法。

【0132】

付記25．前記タンパク質はウイルスタンパク質を含んでいることを特徴とする付記24に記載の方法。

30

【0133】

付記26．前記乾燥組成物は、2以上のウイルスタンパク質をコードする核酸を含んでいることを特徴とする付記25に記載の方法。

【0134】

付記27．前記乾燥組成物は、ウイルス粒子を生成するために必要な全てのタンパク質をコードする核酸を含んでいることを特徴とする付記26に記載の方法。

【0135】

付記28．前記核酸は同一のベクターに存在していることを特徴とする付記26又は27に記載の方法。

40

【0136】

付記29．前記核酸は異なるベクターに存在していることを特徴とする付記26又は27に記載の方法。

【0137】

付記30．前記ウイルス粒子はレトロウイルス粒子であることを特徴とする付記27乃至29のいずれかに記載の方法。

【0138】

付記31．前記細胞からウイルス粒子を得ることを特徴とする付記27乃至30のいずれかに記載の方法。

【0139】

50

付記 3 2 . 容器、及び

該容器に存在する付記 1 乃至 1 5 のいずれかに記載の乾燥組成物を備えていることを特徴とするキット。

【 0 1 4 0 】

付記 3 3 . プロモータに操作可能に連結されたクローニング部位を有するベクターを更に備えていることを特徴とする付記 3 2 に記載のキット。

【 0 1 4 1 】

付記 3 4 . 前記ベクターはウイルスパッケージング配列を更に有することを特徴とする付記 3 3 に記載のキット。

【 0 1 4 2 】

上記の発明は、理解の明瞭化のために、図示及び例示によりある程度詳しく説明されているが、ある変更及び調整が、本発明の趣旨又は添付の特許請求の範囲から逸脱することなく本発明になされてもよいことが、本発明の教示を考慮すると当業者に容易に明らかとなる。

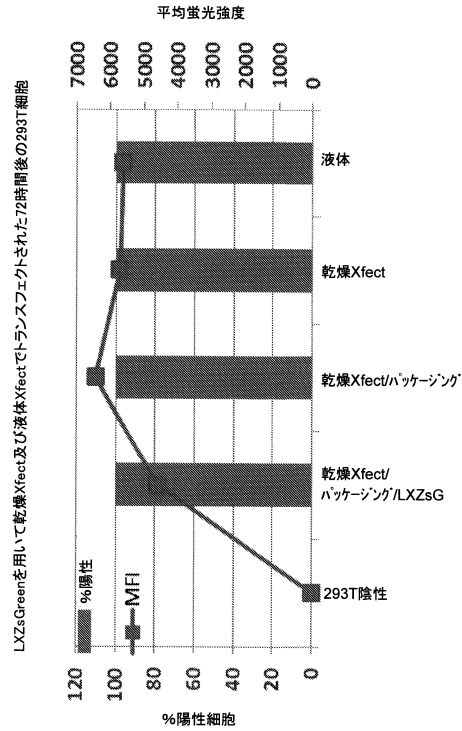
【 0 1 4 3 】

従って、前述の内容は本発明の本質を単に示しているに過ぎない。本明細書に明示的に説明されていないか又は示されていないが、本発明の本質を具体化して本発明の趣旨及び範囲に含まれる様々な構成を当業者が考案することが可能であることが明らかである。更に、本明細書に述べられている全ての例及び条件的な用語は、本発明の本質と、本技術分野を進展させるために本発明者により与えられた概念とを理解する際に読者を支援することを本質的に意図するものであり、このように具体的に述べられた例及び条件に限定するものではないと解釈されるべきである。更に、本発明の本質、態様及び実施形態だけでなく、本発明の具体的な例を述べている本明細書における全ての記載は、本発明の構造的且つ機能的な等価物の両方を含むことを意図するものである。加えて、このような均等物は、現時点で既知の均等物及び今後開発される均等物の両方、すなわち構造に関わらず同一の機能を有する開発された全ての要素を含むことを意図するものである。従って、本発明の範囲は、本明細書に示され説明された例示的な実施形態に制限されることを意図するものではない。むしろ、本発明の範囲及び趣旨は添付の特許請求の範囲により具体化される。

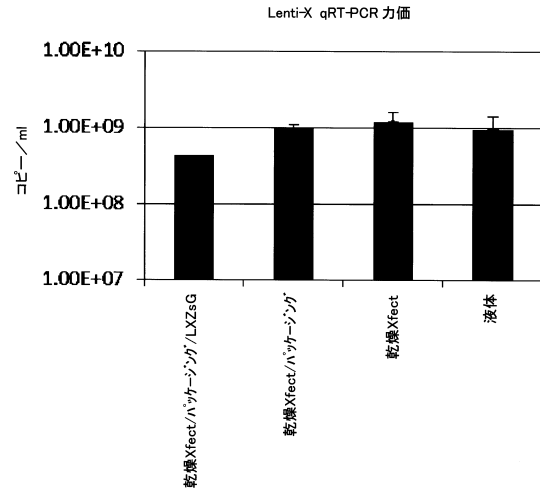
【 0 1 4 4 】

本出願は、米国特許法第119 条(e) に従って、2013年11月 5 日に出願された米国仮特許出願第61 / 900232号明細書の出願日の優先権を主張しており、その開示内容が参照によって本明細書に組み込まれる。

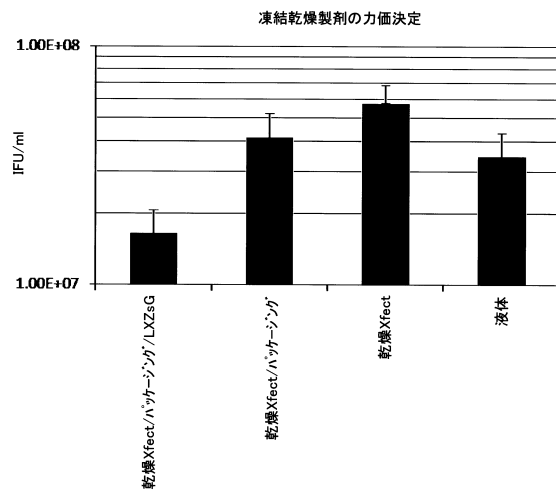
【図 1】



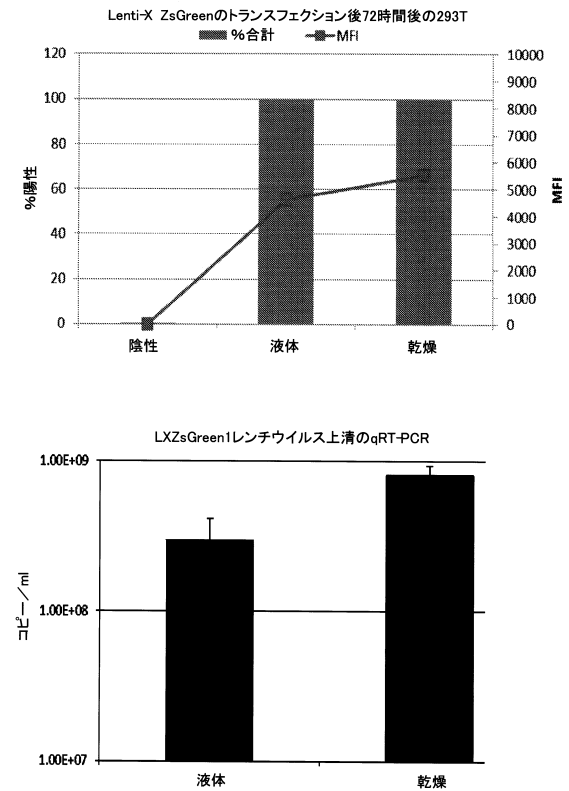
【図 2】



【図 3】

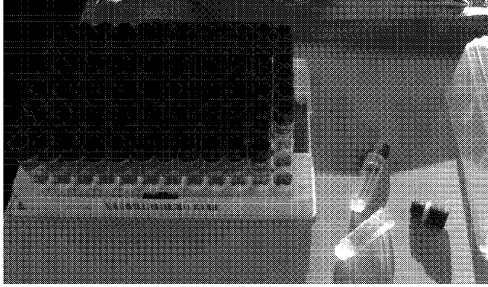


【図 4】



【図 5】

FIG. 5



フロントページの続き

(72)発明者 ミトラ, サヤンタン

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア, マウンテン ヴュー, テラ ベラ アヴェニュー
1 2 9 0

審査官 福岡 信子

(56)参考文献 国際公開第2005/055979(WO, A1)

米国特許出願公開第2011/0008894(US, A1)

特表2004-511596(JP, A)

特表2007-504353(JP, A)

PLoS ONE, 2012, vol.7, no.5, e37543

タカラバイオ, Xfect™ mESCトランスフェクション試薬, 2012, J-1

Clontech, Xfect™ Transfection Reagent, 2013, May 21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)