

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6975980号
(P6975980)

(45) 発行日 令和3年12月1日 (2021. 12. 1)

(24) 登録日 令和3年11月11日 (2021. 11. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/40 (2006. 01)
 C O 7 K 14/08 (2006. 01)
 C 1 2 N 7/00 (2006. 01)
 C 1 2 N 5/10 (2006. 01)
 C 1 2 N 5/07 (2010. 01)

C 1 2 N 15/40 Z N A
 C O 7 K 14/08
 C 1 2 N 7/00
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 5/07

請求項の数 38 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-554398 (P2018-554398)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月16日 (2017. 4. 16)
 (65) 公表番号 特表2019-513403 (P2019-513403A)
 (43) 公表日 令和1年5月30日 (2019. 5. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/027832
 (87) 国際公開番号 W02017/181162
 (87) 国際公開日 平成29年10月19日 (2017. 10. 19)
 審査請求日 令和2年4月9日 (2020. 4. 9)
 (31) 優先権主張番号 62/323, 684
 (32) 優先日 平成28年4月16日 (2016. 4. 16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 507371168
 ユニバーシティ オブ フロリダ リサー
 チ ファンデーション インコーポレーテ
 ィッド
 アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
 ル グリントー ホール 2 2 3
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100138911
 弁理士 櫻井 陽子
 (74) 代理人 100165892
 弁理士 坂田 啓司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バキュロウイルス系で産生される組換えアデノ随伴ウイルスの生物学的力価を増強する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変型 K o z a k 配列ならびにアデノ随伴ウイルス (A A V) V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸であって、該改変型 K o z a k 配列が配列番号 2 - 1 1 から選択され、該 V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質が A A V 5 血清型由来である、核酸。

【請求項 2】

改変型 K o z a k 配列が配列番号 8 または配列番号 9 で示される配列である、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

改変型 K o z a k 配列が配列番号 9 で示される配列である、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 4】

プロモーター配列をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5】

プロモーター配列がポリヘドリン (p o l h) プロモーター配列である、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

改変型 K o z a k 配列が、V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 7】

10

20

VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンがAUGである、請求項6に記載の核酸。

【請求項8】

核酸が、ウイルス粒子内に、場合によりバキュロウイルス粒子内にパッケージされている、請求項1から7のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項9】

請求項1から8のいずれか一項に記載の核酸を含む、昆虫細胞。

【請求項10】

核酸が、昆虫細胞のゲノム中に挿入されている、請求項9に記載の昆虫細胞。

【請求項11】

昆虫細胞において組換えAAV(rAAV)を産生する方法であって、該rAAVがAAV5血清型由来であり、該方法が、

a) 昆虫細胞を、

i) 請求項1に記載の核酸を含むバキュロウイルス；

ii) AAVRepタンパク質をコードする核酸を含むバキュロウイルス；および

iii) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのAAV逆位末端反復(ITR)ヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルス

でトランスフェクトし、

b) 該昆虫細胞を、rAAVを産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞からrAAVを回収すること

を含む、方法。

【請求項12】

昆虫細胞において組換えAAV(rAAV)を産生する方法であって、該rAAVがAAV5血清型由来であり、該方法が、

a) 請求項9または請求項10に記載の昆虫細胞を、場合によりバキュロウイルス内で、プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのAAV逆位末端反復(ITR)ヌクレオチド配列を含む核酸でトランスフェクトし；

b) 該昆虫細胞を、rAAVを産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞からrAAVを回収すること

を含む、方法。

【請求項13】

昆虫細胞がSf9細胞である、請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

改変型Kozak配列およびアデノ随伴ウイルス(AAV)VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸であって、該改変型Kozak配列が配列番号13-32から選択され、該VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質がAAV8血清型由来である、核酸。

【請求項15】

改変型Kozak配列が、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31または配列番号32で示される配列である、請求項14に記載の核酸。

【請求項16】

プロモーター配列をさらに含む、請求項14または15に記載の核酸。

【請求項17】

プロモーター配列が、ポリヘドリン(polh)プロモーター配列である、請求項16に記載の核酸。

【請求項18】

改変型Kozak配列が、VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む、請求項14から17のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項19】

10

20

30

40

50

VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンがAUGである、請求項18に記載の核酸。

【請求項20】

核酸が、ウイルス粒子内に、場合によりバキュロウイルス粒子内にパッケージされている、請求項14から19のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項21】

請求項14から20のいずれか一項に記載の核酸を含む、昆虫細胞。

【請求項22】

核酸が、昆虫細胞のゲノム中に挿入されている、請求項21に記載の昆虫細胞。

【請求項23】

昆虫細胞において組換えAAV(rAAV)を産生する方法であって、該rAAVがAAV8血清型由来であり、該方法が、

a) 昆虫細胞を、

i) 請求項14に記載の核酸を含むバキュロウイルス；

ii) AAVRepタンパク質をコードする核酸を含むバキュロウイルス；および

iii) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのAAV逆位末端反復(ITR)ヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルス

でトランスフェクトし、

b) 該昆虫細胞を、rAAVを産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞からrAAVを回収すること

を含む、方法。

【請求項24】

昆虫細胞において組換えAAV(rAAV)を産生する方法であって、該rAAVがAAV8血清型由来であり、該方法が、

a) 請求項21または請求項22に記載の昆虫細胞を、場合によりバキュロウイルス内で、プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのAAV逆位末端反復(ITR)ヌクレオチド配列を含む核酸でトランスフェクトし；

b) 該昆虫細胞を、rAAVを産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞からrAAVを回収すること

を含む、方法。

【請求項25】

昆虫細胞がSf9細胞である、請求項23または24に記載の方法。

【請求項26】

改変型Kozak配列およびアデノ随伴ウイルス(AAV)VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸であって、該改変型Kozak配列が配列番号34-45から選択され、該VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質がAAV9血清型由来である、核酸。

【請求項27】

改変型Kozak配列が、配列番号35、配列番号36、配列番号38または配列番号42で示される配列である、請求項26に記載の核酸。

【請求項28】

改変型Kozak配列が、配列番号42で示される配列である、請求項26に記載の核酸。

【請求項29】

プロモーター配列をさらに含む、請求項26から28のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項30】

プロモーター配列が、ポリヘドリン(polh)プロモーター配列である、請求項29に記載の核酸。

【請求項31】

改変型Kozak配列が、VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む

10

20

30

40

50

、請求項 2 6 から 3 0 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 2】

V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンが A U G である、請求項 3 1 に記載の核酸。

【請求項 3 3】

核酸が、ウイルス粒子内に、場合によりバキュロウイルス粒子内にパッケージされている、請求項 2 6 から 3 2 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 4】

請求項 2 6 から 3 3 のいずれか一項に記載の核酸を含む、昆虫細胞。

【請求項 3 5】

核酸が、昆虫細胞のゲノム中に挿入されている、請求項 3 4 に記載の昆虫細胞。

【請求項 3 6】

昆虫細胞において組換え A A V (r A A V) を産生する方法であって、該 r A A V が A A V 9 血清型由来であり、該方法が、

a) 昆虫細胞を、

i) 請求項 2 6 に記載の核酸を含むバキュロウイルス；

i i) A A V R e p タンパク質をコードする核酸を含むバキュロウイルス；および

i i i) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する 2 つの A A V 逆位末端反復 (I T R) ヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルスでトランスフェクトし、

b) 該昆虫細胞を、r A A V を産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞から r A A V を回収すること

を含む、方法。

【請求項 3 7】

昆虫細胞において組換え A A V (r A A V) を産生する方法であって、該 r A A V が A A V 9 血清型由来であり、該方法が、

a) 請求項 3 4 または請求項 3 5 に記載の昆虫細胞を、場合によりバキュロウイルス内で、プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する 2 つの A A V 逆位末端反復 (I T R) ヌクレオチド配列を含む核酸でトランスフェクトし；

b) 該昆虫細胞を、r A A V を産生するのに適する条件下で培養し；そして

c) 該昆虫細胞から r A A V を回収すること

を含む、方法。

【請求項 3 8】

昆虫細胞が S f 9 細胞である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、米国特許法第 1 1 9 条 (e) の定めにより、2 0 1 6 年 4 月 1 6 日出願の、“METHOD OF ENHANCING BIOLOGICAL POTENCY OF BACULOVIRUS SYSTEM-PRODUCED RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS” と題する米国仮出願第 6 2 / 3 2 3 , 6 8 4 号に基づく優先権の利益を主張し、その内容全体を引用により本明細書中に包含させる。

【0 0 0 2】

政府のサポート

本発明は、国立衛生研究所 (N I H) により付与された H L 0 9 7 0 8 8 に基づく政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

アデノ随伴ウイルス (A A V) は、ヒト遺伝子治療のための最も有望なウイルスベクタ

10

20

30

40

50

一の1つとして注目されている。組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)は、血友病B、悪性黒色腫、嚢胞性線維症および他の疾患に対する遺伝子治療臨床試験において評価されている。哺乳動物細胞培養系を用いたrAAVの大規模産生は歴史的に問題があったが、昆虫細胞を用いたAAV産生システムは、実行可能な代替法であることが示されている。しかしながら、異なる細胞環境が、いくつかのAAV血清型のウイルス粒子の組み立て(assembly)に関する課題を提供している。

【発明の概要】

【0004】

概要

本発明は、プロデューサー宿主細胞(例えば、昆虫細胞)におけるrAAVの産生に関連する組成物および方法を提供する。rAAV粒子の生物学的効力(例えば、感染力)は、ピリオン(ウイルス粒子)カプシド組成物、例えばカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3の化学量論比に部分的に依存する。昆虫細胞(例えば、Sf9細胞)などの異種系で製造された幾つかのrAAV血清型(例えば、AAV5、AAV8およびAAV9)は、異常なVP1発現レベルにより特徴付けられる。ウイルスの組み立て時に、異常なVP1発現は、不適切なカプシドタンパク質比から成るウイルス粒子の産生をもたらし、それは、該粒子の効率的な細胞形質導入能力を妨げる。有用な化学量論比のカプシドタンパク質を得る方法は、VP1過剰では、ウイルス粒子を効率的にパッケージする昆虫細胞の能力を損なうことがあり、低レベルのVP1では、粒子の非効率的な形質導入となり得ることを示す結果によって複雑化される。従って、昆虫細胞のrAAV産生システムに関しては、現行の技術を用いて、粒子の組み立てに悪影響を及ぼすことなく増量された感染性粒子を産生するという課題が依然としてある。

【0005】

本明細書に記載の方法および組成物は、VP1翻訳開始部位に関連する改変型コザック(Kozak)配列を含む組換えVP1遺伝子を提供する。本明細書に記載の組換えVP1遺伝子は、目的の遺伝子を含む感染性rAAV粒子を産生するために(例えば、その後の研究および/または治療用途のために)有用である。ある態様において、本明細書に記載の組換えVP1遺伝子を用いて、昆虫細胞において1以上の血清型のrAAV粒子を産生させることができる。ある態様において、本明細書に記載の方法および組成物を、昆虫細胞および/または目的の他のプロデューサー細胞(例えば、哺乳動物細胞)において1以上の血清型のrAAV粒子を産生するのに有用な1以上の血清型の組換えVP1遺伝子をスクリーニングおよび同定するために用いることができる。ある態様において、1以上の組換えVP1遺伝子は、比較的高頻度で目的の組換えゲノムを含む、および/または誤ってパッケージされた核酸の割合が比較的低い、安定なかつ/または感染性rAAV粒子を産生するために有用であり得る。

【0006】

いくつかの側面において、本発明は、AAV5血清型に由来するrAAVの産生に有用な組成物および方法を提供する。いくつかの側面において、本発明は、AAV8血清型に由来するrAAVの産生に有用な組成物および方法を提供する。さらに他の側面において、本発明は、AAV9血清型に由来するrAAVの産生に有用な組成物および方法を提供する。

【0007】

いくつかの側面において、本発明は、改変型Kozak配列ならびにAAV VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここで、該改変型Kozak配列は、配列番号2-11から選択される(表1)。ある態様において、該改変型Kozak配列は、配列番号8または配列番号9である。ある態様において、VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質は、AAV5血清型に由来する。ある態様において、VP1、VP2および/またはVP3カプシドタンパク質は、変異体AAV5カプシドタンパク質である(例えば、それらは、1以上の変異を含む配列によってコードされ、対応する野生型カプシドタンパク質と比べて1以上のアミノ酸置

換を有するカプシドタンパク質をコードする)。

【0008】

ある態様において、核酸は、プロモーター配列をさらに含む。ある態様において、該プロモーター配列は、ポリヘドリン (polh) プロモーター配列である。ある態様において、改変型 Kozak 配列は、VP1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む。ある態様において、VP1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンは、AUG である。ある態様において、核酸は、ウイルス粒子 (例えば、バキュロウイルス粒子) 中にパッケージされる。ある態様において、本発明は、核酸を含む昆虫細胞を提供する。

【0009】

いくつかの側面において、本発明は、昆虫細胞において rAAV を産生する方法であって、ここで、該 rAAV が AAV5 血清型に由来する方法に関し、該方法は、(a) 昆虫細胞を：(i) 改変型 Kozak 配列ならびに AAV5 VP1、VP2 および VP3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルスであって、ここで、該改変型 Kozak 配列が配列番号 2 - 11 から選択される、バキュロウイルス、(ii) AAV Rep タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、および (iii) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する 2 つの AAV 逆位末端反復 (ITR) ヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、でトランスフェクトし；(b) 該昆虫細胞を、rAAV を産生するのに適した条件下で培養し；そして、(c) 該昆虫細胞から rAAV を回収することを含む。ある態様において、昆虫細胞は Sf9 細胞である。

【0010】

いくつかの側面において、本発明は、改変型 Kozak 配列ならびに AAV VP1、VP2 および VP3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここで、該改変型 Kozak 配列は、配列番号 13 - 32 から選択される (表 2)。ある態様において、改変型 Kozak 配列は、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31 または配列番号 32 である。ある態様において、VP1、VP2 および VP3 カプシドタンパク質は、AAV8 血清型に由来する。ある態様において、VP1、VP2 および / または VP3 カプシドタンパク質は、変異体 AAV8 カプシドタンパク質である (例えば、それらは、1 以上の変異を含む配列によってコードされ、対応する野生型カプシドタンパク質と比べて 1 以上のアミノ酸置換を有するカプシドタンパク質をコードする)。

【0011】

ある態様において、核酸は、プロモーター配列をさらに含む。ある態様において、該プロモーター配列は、ポリヘドリン (polh) プロモーター配列である。ある態様において、改変型 Kozak 配列は、VP1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む。ある態様において、VP1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンは、AUG である。ある態様において、核酸は、ウイルス粒子 (例えば、バキュロウイルス粒子) 中にパッケージされる。ある態様において、本発明は、該核酸を含む昆虫細胞を提供する。

【0012】

いくつかの側面において、本発明は、昆虫細胞において rAAV を産生する方法であって、ここで、該 rAAV が AAV8 血清型に由来する方法に関し、該方法は、(a) 昆虫細胞を：(i) 改変型 Kozak 配列ならびに AAV8 VP1、VP2 および VP3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルスであって、ここで、該改変型 Kozak 配列が配列番号 13 - 32 から選択される、バキュロウイルス、(ii) AAV Rep タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、および (iii) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する 2 つの AAV ITR ヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、でトランスフェクトし；(b) 該昆虫細胞を、rAAV を産生するのに適した条件下で培養し；そして、(c) 該昆虫細胞から rAAV を回収することを含む。ある態様において、昆虫細胞は Sf9 細胞である。

【 0 0 1 3 】

いくつかの側面において、本発明は、改変型 K o z a k 配列ならびに A A V V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供し、ここで、該改変型 K o z a k 配列は、配列番号 3 4 - 4 5 から選択される（表 3）。ある態様において、改変型 K o z a k 配列は、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 8 または配列番号 4 2 である。ある態様において、V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質は、A A V 9 血清型に由来する。ある態様において、V P 1、V P 2 および / または V P 3 カプシドタンパク質は、変異体 A A V 9 カプシドタンパク質である（例えば、それらは、1 以上の変異を含む配列によってコードされ、対応する野生型カプシドタンパク質と比べて 1 以上のアミノ酸置換を有するカプシドタンパク質をコードする）。 10

【 0 0 1 4 】

ある態様において、核酸は、プロモーター配列をさらに含む。ある態様において、該プロモーター配列は、ポリヘドリン（p o l h）プロモーター配列である。ある態様において、改変型 K o z a k 配列は、V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む。ある態様において、V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンは、A U G である。ある態様において、核酸は、ウイルス粒子（例えば、バキュロウイルス粒子）中にパッケージされる。ある態様において、本発明は、該核酸を含む昆虫細胞を提供する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの側面において、本発明は、昆虫細胞において r A A V を産生する方法であって、ここで、該 r A A V が A A V 9 血清型に由来する方法に関し、該方法は、（ a ）昆虫細胞を：（ i ）改変型 K o z a k 配列ならびに A A V 9 V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルスであって、ここで、該改変型 K o z a k 配列が配列番号 3 4 - 4 5 から選択される、バキュロウイルス、（ i i ）A A V R e p タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、および（ i i i ）プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する 2 つの A A V I T R ヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、でトランスフェクトし；（ b ）該昆虫細胞を、r A A V を産生するのに適した条件下で培養し；そして、（ c ）該昆虫細胞から r A A V を回収することを含む。ある態様において、昆虫細胞は S f 9 細胞である。 20

【 0 0 1 6 】

いくつかの側面において、本発明は、A A V V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンならびに V P 1 翻訳開始コドンのすぐ上流の 1 ~ 6 個のヌクレオチドにおけるヌクレオチド配列変異体および / または V P 1 翻訳開始コドンのすぐ下流の 1 ~ 2 個のヌクレオチドにおけるヌクレオチド配列変異体を含む改変型 K o z a k 配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸のライブラリーを提供する。ある態様において、核酸は、X X X X X X（A T G）を含み、ここで、（A T G）は V P 1 開始コドンである。ある態様において、核酸は X X X X X X（A U G）を含み、ここで、（A U G）は、V P 1 開始コドンである。ある態様において、X は任意のヌクレオチドを示し、例えば、目的の A A V 血清型の野生型 V P 1 遺伝子におけるその位置での天然ヌクレオチドとは異なる任意のヌクレオチドを表す。 30 40

【 0 0 1 7 】

これらおよび他の側面は、以下の明細書の記載ならびに実施例および添付の図面においてより詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

図面の簡単な説明

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の側面をさらに説明するために包含され、それは、本明細書に記載の特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の 1 つまたは複数を参照することにより、よりよく理解され得る。

【 0 0 1 9 】

【図 1】図 1 は、V P 1、V P 2 および V P 3 をコードするカプシドヘルパーヌクレオチドならびにコードされるカプシドタンパク質の限定されないデザインを示す。

【図 2 A】図 2 A は、S f 9 細胞にパッケージされた r A A V 5 のウェスタンブロッティング分析の一例を示す。

【図 2 B】図 2 B は、S f 9 細胞にパッケージされた r A A V 8 のウェスタンブロッティング分析の一例を示す。

【図 2 C】図 2 C は、S f 9 細胞にパッケージされた r A A V 9 のウェスタンブロッティング分析の一例を示す。

【図 3】図 3 は、昆虫細胞における発現のために設計された V P 1 カプシド遺伝子の上流の弱毒型(attenuated) K o z a k コンセンサス配列の非限定的なヌクレオチド配列を示す。

【図 4 A】図 4 A - 4 D は、S f 9 細胞で産生された r A A V 粒子のカプシドタンパク質組成物の非限定的な例を示す。図 4 A は、r e p および c a p 遺伝子発現カセットの設計の非限定的な例を示す。図 4 B は、r A A V 5 V P 1 タンパク質発現とその相対的 V P 1 K o z a k 翻訳開始部位(T I S) 効率との直接的相関の例を示す：安定して挿入された c a p 発現カセットを組み込んだ 10 個の別個の細胞株から単離されたカプシドタンパク質のウェスタンブロッティング分析。各カプシド V P 1 遺伝子構築物の相対的な T I S 効率(%) を、それぞれのレーンの下に示す。図 4 C は、H E K 2 9 3 細胞および S f 9 細胞から精製した r A A V 5 のカプシドタンパク質組成物の例を示す：短波 U V 光活性化(ステインフリー技術、Bio-Rad) で直接可視化された二重イオジキサノール精製 r A A V 5 - G F P の S D S - タンパク質ゲル分析。(*) は、H E K 2 9 3 細胞から精製された r A A V 5 サンプルで観察されることが多く、V P 2 定量分析から除かれた、移動の遅いバンドを示す。図 4 D は、H E K 2 9 3 細胞および S f 9 細胞から精製された r A A V 9 のカプシドタンパク質組成物の例を示す。分析は、図 4 C のパネルと同じである。

【0 0 2 0】

【図 5 A】図 5 A - 5 D は、A A V 5 V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質の化学量論的 M A L D I - T O F 分析を示す。図 5 A は、破線で示される V P 1 ユニーク N 末端、一点短鎖線(dot-dashed line) で示されるユニーク V P 2、および黒線で示される通常の V P 3 C 末端を有する A A V 5 カプシドのアミノ酸配列(配列番号 5 5) を示す。下向きの矢印は、それぞれのタンパク質を示す。M S 分析のために選択されたトリプシンペプチドに下線を付し、それぞれの観察された質量を下に示した。トリプシンペプチドは、上から下へ、配列番号 5 6、4 8 および 5 7 に対応する。図 5 B は、 $H_2^{18}O$ で消化された r A A V 5 の全てのトリプシンペプチドの M A L D I - T O F - M S スペクトルを示す。丸で囲まれたペプチドは、分析した 3 つのうち代表的な 1 つである。図 5 C は、 ^{16}O 水中で調製したトリプシンで消化した V P 1 ゲルバンド由来の、または同じトリプシンペプチド T W V L P S Y N N H Q Y R (配列番号 4 8)、または ^{18}O 水中で調製したトリプシンで消化した V P 3 ゲルバンド由来の同じトリプシンペプチド T W V L P S Y N N H Q Y R (配列番号 4 8) の 2 つのオーバーレイされた M A L D I - T O F M S スペクトルを示す。 ^{18}O 水は、ペプチドの C 末端に 2 つの ^{18}O 原子を組み込み、それにより質量を 4 原子質量単位(amu) シフトさせる。これらの消化産物を別個にスポット/分析し、スペクトルを重ね合わせて、2 つの ^{18}O が V P 3 ペプチドに完全に取り込まれることを示した。図 5 D は、消化産物を 1 : 1 の比で混合して相対含量を計算した後の V P 1 または V P 3 由来の同じペプチドの同位体“フィンガー”を示す。

【図 6】図 6 A - 6 F は、H E K 2 9 3 細胞(図 6 A、6 D)または S f 9 細胞(図 6 B、6 E)において作製された r A A V 9 (図 6 A - C)または r A A V 5 (図 6 D - F) のサイズおよび力価のナノ粒子トラッキング解析を示す。図 6 A、6 B、6 C および 6 D は、各サンプルについて 30 秒間記録された、r A A V / ナノ - 金粒子複合体の 3 つの独立したビデオキャプチャの平均である、Finite Track Length Adjustment (FTLA) アルゴリズムのグラフを示す。図 6 C および 6 F は、各調製物についての完全(full) / 総(total) 粒子の計算された比を示す。ピークに付した

10

20

30

40

50

数字は、計算された $rAAV$ / ナノ金粒子複合体のサイズを示す。より大きい直径のより小さいピークは、凝集した、 $rAAV$ 粒子の二量体および三量体を表す。図 6 C および 6 F は、各ウイルスストック中の $rAAV$ 粒子の総数に対する DNA 含有 $rAAV$ 粒子の計算された比率を示す。

【0021】

【図 7】図 7 A - 7 C は、HEK293 由来または Sf9 B8 由来の $rAAV5$ の線条体内注入後のルシフェラーゼおよび mApple 発現を示す。図 7 A は、 $rAAV$ 注入の 3 週間後に検出された生物発光 (BLI) シグナルを示すヒートマップ画像を提供する。疑似カラスケールは、カウントされた発光強度を表す。Max および Min は、それぞれカウント数の最大値および最小値である。図 7 B は、平均 $\pm$ SEM (1 群あたり、 $n = 4$) として、総カウント数として表される BLI 強度を示すグラフを提供する。マンホイットニー検定分析は、群間での有意差を示す ($p = 0.0286$ 、片側検定)。図 7 C は、可変モードレーザースキャナー (白黒、B/W 画像) または蛍光顕微鏡 (カラー画像) によって検出された脳の冠状断面における mApple 蛍光を示す。

【図 8】図 8 A - 8 D は、 $rAAV$ - Bac - UF26 カセットおよびその直近の接合部の NGS リード (read) の分布を示す。図 8 A は、参照された配列の総リード数で各ヌクレオチド位置でのリード数を割ることにより数値的に正規化された HEK293 細胞中にパッケージされた $rAAV5$ - Bac - UF26 カセットの Illumina リードのカバー率 (coverage) を示す。重複サンプルの配列カバー率グラフは、PCR フリー (PCR フリー 1 および PCR フリー 2) ならびに PCR ベース (PCR 1 および PCR 2) の矢印で示されている。 $rAAV$ カセットと隣接配列との間のカバー率の低下は、配列カバー率の実際の減少を示すのではなく、バイオフィォマティクス解析限界のグラフ表示を反映する。パネル (図 8 A) および (図 8 B) 中の配列のスケールに描かれた参照された $rAAV$ - Bac - UF26 カセットの注釈付きのマップを、グラフの下に表示している。細菌プラスミド DNA 中の $rAAV$ カセットのすぐ隣に隣接する配列は、薄灰色で陰影付けされている。図 8 B は、Sf9 B8 細胞中にパッケージされた $rAAV5$ - Bac - UF26 カセットの Illumina リードのカバー率を示す。 $rAAV$ カセット内の GC 富化配列は、濃い灰色で陰影付けされている。図 8 C は、HEK293 細胞および Sf9 B8 細胞の両方における左の $rAAV$ ITR のすぐ隣に隣接する配列の、図 8 A および図 8 B のパネルからの拡大図を示す。図 8 D は、HEK293 細胞および Sf9 B8 細胞の両方における右の $rAAV$ ITR のすぐ隣に隣接する配列の、図 8 A および図 8 B のパネルからの拡大図を示す。

【0022】

【図 9】図 9 A - 9 B は、HEK293 細胞または Sf9 B8 細胞によってカプシド封入された $rAAV5$ - Bac - UF26 カセットにおいて同定された一塩基多型 (SNP) の分布を示す。図 9 A は、対照 pTR - Bac - UF26 データベース配列と比べて所定の位置で読み取られた場合に、4 つの残基 A、G、C および T の置換を累積的にプロットしたものを示す。相対的 SNP 比 (Y 軸) は、所定の位置における配列決定 (シーケンシング) された総深度 (読まれた回数) に対する、置換を有する同じ位置における総リード数の割合として定義された。配列決定深度 (読まれた回数) は、挿入 / 欠失 (indel) を除く所定の位置における対照および代替ヌクレオチドの配列リードの合計である。SNP 変異体の分析には、陽性対照、プラスミド pTR - Bac - UF26 サンプルが含まれた。従って、ゼロ値の SNP 率は、データベース対照と同一の残基を表し、正の値は、親プラスミドデータベース配列と比較して新たに獲得された SNP を意味する。高 GC 含量の領域に陰影を付している。図 9 B は、図 9 A 中の配列のスケールに描かれた参照された $rAAV$ - Bac - UF26 カセットの注釈付きのマップを示す。

【図 10】図 10 A - 10 B は、 $rAAV5$ および $rAAV9$ カプシドにパッケージされた $rAAV$ カセットの注釈付き図式マップを示す。

【図 11】図 11 は、SDS - PAGE 電気泳動によって分離された $rAAV5$ 調製物の走査プロファイルを示す (図 4 C)。網掛け領域は、定量化のために描かれた曲線下面積

10

20

30

40

50

(AUC)を示す。(＊)は、分析から除外したピークを示す。

【図12】図12A-12Bは、rAAV5またはrAAV9カプシド内にパッケージされたrAAV-UF50-BCのインビトロ形質導入アッセイを示す。図12Aは、rAAV5-UF50-BCの蛍光活性化細胞選別(FACS)およびその定量化図を示す。図12Bは、rAAV9-UF50-BCの蛍光活性化細胞選別(FACS)およびその定量化図を示す。

【図13】図13は、NGSのrAAV5ベクターDNA調製物の概略フローチャートの非限定的な例を示す。

【図14】図14A-14Cは、DNA断片サイズのNGSライブラリーの分布を示す。NGSライブラリーの分析は、High Sensitive D5000 ScreenTapeによって行った。図14Aは、NGSによって直接配列決定されたPCRフリーライブラリーを示す：1, 2 - rAAV5/Sf9；3, 4 - rAAV5/HEK293。図14Bは、低サイクルPCR濃縮に用いられるPCRフリーライブラリーを示す：5, 6 - rAAV5/Sf9、7, 8 - rAAV5/HEK293。図14Cは、PCR富化ライブラリーを示す：9, 10 - rAAV5/Sf9；11, 12 - rAAV5/HEK293。ライブラリー9-12は、NGSによって直接配列決定された。

【図15】図15は、NGSデータ処理の概略フローチャートの非限定的な例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

詳細な説明

本発明の側面は、宿主プロデューサー細胞（例えば、昆虫プロデューサー細胞）においてrAAV粒子を産生する方法および組成物を提供する。ある態様において、改変型翻訳開始配列(TIS、Kozak配列とも言う)は、VP1開始コドン（例えば、VP1カプシドタンパク質をコードする組換え遺伝子のATG/AUG開始コドン）と連結され、目的のAAV血清型のVP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードする組換え核酸に挿入されている。ある態様において、本明細書に記載の方法および組成物は、宿主プロデューサー細胞において有効なrAAV粒子（例えば、高収率で産生されるrAAV粒子、感染性であるrAAV粒子、DNA含有rAAV粒子、安定なrAAV粒子など、またはそれらの任意の組み合わせ）を産生するのに有用なVP1 Kozak配列を同定するために用いられ得る。ある態様において、本明細書に記載の方法および組成物を用いて産生されたrAAV粒子は、目的の遺伝子（例えば、治療遺伝子）を含んでいてよく、治療目的で使用され得る。

【0024】

rAAVは、遺伝子治療/DNAワクチン送達のためのベクターとして広く使用されているが、臨床適用のための感染性rAAVの大量産生は、現在の技術に基づいて依然として困難である。3つのカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3からなるAAVカプシドは、AAVゲノム中の単一のカプシド遺伝子の選択的スプライシングおよび差異的コドン使用によってもたらされる。VP3配列は3つすべてのスプライス変異体間で共通であり、VP2およびVP1はより長いN末端配列を有し、VP1が最も長いカプシドタンパク質である（例えば、図1に例示される）。一般的なカプシド粒子におけるVP1/VP2/VP3の比は、1/1/10と推定される。さらに、VP1/VP2/VP3化学量論は定義されておらず、かつ、組み立て（アセンブリ）が、カプシドに取り込まれるVP1/VP2/VP3の相対量が主に宿主プロデューサー細胞における（またはインビトロ産生システムにおける）それらの相対的発現レベルに依存するように確率論的であることが明らかである。本明細書に記載の組成物および方法は、目的の組換え遺伝子を含む感染性rAAV粒子を産生するのに有用な相対量でプロデューサー細胞においてVP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質に翻訳される改変型VP1 Kozak配列（例えば、ATG/AUG翻訳開始コドンの周辺の）を有する組換えカプシド遺伝子を提供する。ある態様において、組換えカプシド遺伝子は、カプシド遺伝子の天然スプライシングを可能にする適切なスプライスドナーおよび/またはアクセプター部位を有さない（例え

ば、いくつかの態様において、組換えカプシド遺伝子の転写産物は、プロデューサー細胞において適当にまたは完璧にスプライシングされない)。ある態様において、リボソームの読み漏らし (leaky ribosomal scanning) を増加させ、カプシド遺伝子からの V P 1 / V P 2 / V P 3 の所望の比を産生するために、弱毒型 K o z a k 配列に関連する標準を V P 1 翻訳開始部位に用いた。カプシド遺伝子から産生され、目的の遺伝子をカプシド形成する r A A V 粒子を、研究、臨床治験および治療目的のために用いることができる。ある態様において、本明細書に記載の改変型カプシド遺伝子は、r A A V 粒子の大量生産のために用いられ得る。

【 0 0 2 5 】

ある側面において、本発明はまた、感染性 r A A V 粒子を産生するのに有用な配列を同定するための A A V カプシド遺伝子発現構築物をスクリーニングおよび評価する方法および組成物も提供する。ある態様において、複数の異なる r A A V カプシド遺伝子発現構築物が、目的の宿主細胞における r A A V 粒子の組み立てについて評価される。ある態様において、異なる r A A V カプシド遺伝子発現構築物は、同じプロモーター、同じ A A V カプシドをコードする (例えば、目的の任意の血清型の V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質をコードする、場合により 1 以上のカプシド変異体を含んでよい) 配列を含むが、V P 1 の翻訳開始コドン (例えば、A T G / A U G) に関連する異なる K o z a k 配列を有する。一般的に、V P 2 および V P 3 の翻訳コドンおよび周囲の開始配列は変えられない (例えば、それらは天然野生型配列として維持される)。しかしながら、ある態様において、これらの配列において 1 以上の改変を行うことができる。ある態様において、異なる K o z a k 配列は、V P 1 の翻訳開始コドンのすぐ上流の 6 つのヌクレオチド内の配列変異を示す。ある態様において、異なる K o z a k 配列は、V P 1 の翻訳開始コドンのすぐ下流の 2 つのヌクレオチド内の配列変異を含む。従って、ある態様において、異なる K o z a k 配列は、V P 1 の翻訳開始コドンのすぐ上流の 6 つのヌクレオチド内の 1 以上の位置 (例えば、1、2、3、4、5 または 6 つの位置) に、および / または V P 1 の翻訳開始コドンのすぐ下流の 2 つのヌクレオチド内の 1 以上の位置 (例えば、1 または 2 つの位置) にヌクレオチド配列変異を表す異なる K o z a k 配列のライブラリーから選択される。ある態様において、異なる K o z a k 配列は、V P 1 の K o z a k 配列の全ての可能な変異体の全てまたはサブセットを表し得る。ある態様において、変異体は、A A V カプシド血清型 (例えば、血清型 1、2、3、3 B、4、5、6、7、8、9、10、11、12 など) の天然 V P 1 K o z a k 配列と比べて、遺伝子が改変されている。ある態様において、(例えば、対照翻訳効率と比べて、例えば天然またはコンセンサス K o z a k 配列に関連する翻訳効率と比べて) 選択された割合の翻訳効率を有する異なる K o z a k 配列が評価される。ある態様において、異なる K o z a k 配列は、25% から 50%、例えば 25% から 45%、例えば 30% から 40% の範囲、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50% または他の値 (例えば、上記の何れかの中間値) の翻訳効率を表す。ある態様において、所望の翻訳効率または翻訳効率の範囲を有する全ての K o z a k 配列が評価される。ある態様において、所望のパーセント範囲内の翻訳効率を有する K o z a k 配列のサブセットが評価される。ある態様において、翻訳効率の目標範囲内のパーセンテージ増分 (例えば、1 - 5% 増分、例えば約 1%、2%、3%、4% または 5% 増分) を表す K o z a k 配列が評価される。ある態様において、異なる K o z a k 配列は、他のヘルパー遺伝子 (例えば、R e p および他のヘルパー遺伝子) もまた発現し、かつ (I T R 配列に隣接する目的の遺伝子が、組換えカプシド遺伝子から発現されたカプシドタンパク質を含む r A A V 粒子内にパッケージされ得るように) I T R 配列に隣接する目的の標的遺伝子 (例えば、検出可能なマーカーまたは目的の治療遺伝子をコードする制御遺伝子) を有する目的の組換え A A V ゲノムもまた含む、宿主細胞中に異なる K o z a k 配列 (例えば、V P 1 開始コドンに関連する) を有する組換えカプシド遺伝子をそれぞれ含む組換え核酸を導入することにより評価される。宿主細胞は、任意のタイプの細胞であり得る (例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞または他のタイプの宿主細胞)。宿主細胞は、プラスミドトランスフェクション (例えば、他のヘルパー遺伝子を発現する

10

20

30

40

50

、および／または目的の r A A V ゲノムを含む、1 以上のプラスミドを用いて)、ウイルス形質導入(例えば、他のヘルパー遺伝子を発現する、および／または目的の r A A V ゲノムを含む組換えウイルスゲノムを有する、組換えバキュロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、または他の組換えウイルスのような 1 以上の組換えウイルスを用いて)、またはゲノムインテグレーション(integration)(例えば、1 以上のヘルパー遺伝子および／または目的の r A A V ゲノムとの)の結果として、他のヘルパー遺伝子を発現し得る、および／または目的の r A A V ゲノムを含み得る。異なるカプシド遺伝子構築物を宿主細胞に導入した後、r A A V 粒子を産生する条件下で細胞をインキュベートし、r A A V 粒子を単離および／または精製して、評価する。単離および／または精製された r A A V 粒子は、限定されるものではないが、以下の 1 つ以上を含む 1 つまたは複数の要因に基づいて評価することができる:

10

【0026】

a) r A A V 粒子の収量。ある態様において、例えば同じ血清型の(例えば、H E K 2 9 3 細胞または S f 9 細胞において、例えば対照方法(reference methodology)を用いて産生される)対照 r A A V と同様またはより良い収量が選択される。

b) r A A V 粒子中の V P 1 / V P 2 / V P 3 タンパク質の比。ある態様において、V P 1 / V P 2 / V P 3 の比が $> 0.5 / > 0.5 / 1.0$ であるものが選択される。従って、ある態様において、V P 1 / V P 3 の比はおおよそ $> 0.5 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 0.75 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.25 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.5 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.75 / 1.0$ 、または約 $2 / 1.0$ 、あるいは任意の中間の比である。同様に、ある態様において、V P 2 / V P 3 の比は、独立しておおよそ $> 0.5 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 0.75 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.25 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.5 / 1.0$ 、例えばおおよそ $> 1.75 / 1.0$ 、または約 $2 / 1.0$ 、あるいは任意の中間の比である。

20

c) 完全(full) / 空(empty)の r A A V 粒子の比率。ある態様において、対照比(例えば H E K 2 9 3 細胞または S f 9 細胞において対照方法を用いて産生される、例えば同じ血清型の r A A V 粒子について完全 / 空の比)と同じかまたはそれより大きい、完全 / 空の粒子比が選択される。

d) r A A V 粒子の形質導入効率。ある態様において、例えば同じ血清型(例えば、H E K 2 9 3 細胞または S f 9 細胞において、対照方法を用いて産生される)の対照 r A A V と同様のまたはより良い形質導入効率が選択される。ある態様において、形質導入効率は、インビトロで(例えば、培養物中で増殖させた細胞において、例えば H e L a 細胞において)評価される。ある態様において、形質導入効率は、インビボで(例えば、動物モデルにおいて、例えばマウスモデルのような齧歯動物モデルにおいて)評価される。

30

e) r A A V 粒子中の D N A パッケージの精度(precision)。ある態様において、対照 r A A V と同様のまたはそれより高い精度の D N A パッケージ(例えば、他の D N A、例えば宿主 D N A あるいは宿主細胞中のプラスミドまたはウイルスベクター上の r A A V ゲノムに隣接する D N A と比べて、r A A V ゲノム D N A)が選択される。ある態様において、対照 r A A V は、例えば H E K 2 9 3 細胞または S f 9 細胞において、対照方法を用いて産生される、例えば同じ血清型の r A A V であり得る。ある態様において、D N A パッケージの精度は、パッケージされる非 r A A V ゲノムの割合を決定することによって評価され得る。これは、例えば、r A A V 粒子中のパッケージされた D N A を(例えば、N G S または他の技術を用いて)配列決定することによって、任意の適切な方法を用いて決定することができる。

40

【0027】

この評価の結果として、1 以上の K o z a k 配列(および／または V P 1 翻訳開始コードの上流の K o z a k 配列を含む C a p 発現構築物)は、特定の細胞タイプにおいて目的の r A A V を産生するために選択され使用され得る。

【0028】

従って、本発明の側面は、昆虫細胞における r A A V の産生に有用な方法および組成物

50

に関する。いくつかの側面において、本発明は、i) 改変型 K o z a k 配列、および i i) A A V V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸組成物を提供する。ある態様において、カプシドタンパク質は、A A V 5 血清型カプシドタンパク質に由来する。ある態様において、カプシドタンパク質は、A A V 8 血清型カプシドタンパク質に由来する。ある態様において、カプシドタンパク質は、A A V 9 血清型カプシドタンパク質に由来する。ある態様において、ヌクレオチド配列は、プロモーター配列をさらに含む。ある態様において、プロモーターは、改変型 K o z a k 配列および A A V カプシドタンパク質をコードする配列に作動可能に連結されている。

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載の核酸を含む一般的な構造の非限定的な例を図 1 に示す。核酸 1 0 0 は、改変型 K o z a k 配列 1 2 0 ならびに A A V V P 1、V P 2 および V P 3 カプシドタンパク質 1 1 0 をコードするヌクレオチド配列を含む。野生型 (w t) A A V において、哺乳動物細胞において、カプシドタンパク質は、スプライシングされて 2 つの m R N A イソ型を生成し得る単一の m R N A として転写される。この転写後プロセッシングおよびリボソームの読み漏らしは、3 つの別個のカプシドタンパク質の産生を可能にする：A A V V P 1 カプシドタンパク質 1 1 1、代替開始コドン A C G から開始される A A V V P 2 カプシドタンパク質 1 1 2、および A A V V P 3 カプシドタンパク質 1 1 3。さらに、ある態様において、同じヌクレオチド配列内の別個のオープンリーディングフレームは、組み立て - 活性化タンパク質 (assembly-activating protein) (A A P) 1 1 4 をコードする。ある態様において、プロモーター配列 1 3 0 は、ヌクレオチド配列に作動可能に連結される。ある態様において、核酸はエンハンサーを含む。ある態様において、ヌクレオチド配列は、2 以上のプロモーターを含む。ある態様において、r A A V カプシドにパッケージされた r A A V カセットは、図 1 0 A および 1 0 B に見出されるものに似ている。

【 0 0 3 0 】

プロモーターは、該プロモーター配列がヌクレオチド配列の転写を調節および / または制御するとき、該ヌクレオチド配列に “ 作動可能に ” されている。ある態様において、昆虫細胞において活性なプロモーターを利用するのが有利である。ある態様において、プロモーターは、ポリヘドリン (p o l h) プロモーターである。ある態様において、プロモーターは、p 1 0、p 3 5 および I E - 1 からなる群より選択される。昆虫宿主細胞において外来遺伝子を発現させるための方法および技術は、当技術分野で公知である。昆虫細胞における分子工学およびポリペプチドの発現のための方法は、例えば、Summers and Smith, 1986、A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow, 1991、Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee, 1992、The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W.H. Freeman and Richardson, C. D., 1995、Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39; 米国特許第 4, 7 4 5, 0 5 1 号; U S 2 0 0 3 1 4 8 5 0 6; および W O 0 3 / 0 7 4 7 1 4 に記載されている。しかしながら、プロデューサー細胞として用いられる細胞タイプ (例えば、昆虫細胞、哺乳動物細胞またはそれ以外の細胞) によって任意の適当なプロモーター (例えば、任意の天然、変異体、合成、キメラ、短縮型 (truncated)、構成的、誘導性、組織特異的、種特異的など、プロモーターまたは上記の 2 以上の組合せ) が使用可能である。

【 0 0 3 1 】

ある態様において、本明細書に記載の改変型 K o z a k 配列は、V P 1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンを含む。ある態様において、開始コドンは A U G である。ある態様において、本明細書に記載の核酸は、ウイルス粒子をさらに含む。ある態様において、核酸は、ウイルス粒子内に含まれる (例えば、ウイルス粒子によってカプセル化さ

10

20

30

40

50

れる)。ある態様において、ウイルス粒子はA A V粒子である。ある態様において、ウイルス粒子はバキュロウイルス粒子である。

【0032】

いくつかの側面において、本発明は、昆虫細胞においてr A A Vを産生する方法であって、(a) 昆虫細胞を、(i) 改変型K o z a k配列ならびにA A V V P 1、V P 2およびV P 3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むバキュロウイルス(ここで、該改変型K o z a k配列は、配列番号2 - 1 1、1 3 - 3 2または3 3 - 4 5から選択される)、(i i) A A V R e pタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むバキュロウイルス、および(i i i) プロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのA A V I T Rヌクレオチド配列を含むバキュロウイルスでトランスフェクトする工程；(b) 該昆虫細胞を、r A A Vを産生するのに適する条件下で培養する工程；および、(c) 該昆虫細胞からr A A Vを回収する工程、を含む方法を提供する。

10

【0033】

ある態様において、本発明は、改変型K o z a k配列ならびにA A V V P 1、V P 2およびV P 3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む昆虫細胞を提供する(ここで、改変型K o z a k配列は、配列番号2 - 1 1、1 3 - 3 2または3 3 - 4 5から選択される)。ある態様において、核酸は、昆虫細胞ゲノムに組み込まれる。ある態様において、R e pタンパク質をコードする遺伝子は、昆虫細胞ゲノムに組み込まれる。従って、ある態様において、本発明は、(a) 昆虫細胞にプロモーター配列に作動可能に連結された目的の遺伝子に隣接する2つのA A V I T Rヌクレオチド配列を含むバキュロウイルスをトランスフェクトする工程(ここで、昆虫細胞のゲノムは、本明細書に記載のヌクレオチドを含む)；(b) 該昆虫細胞を、r A A Vを産生するのに適する条件下で培養する工程；および、(c) 昆虫細胞からr A A Vを回収する工程、を含む昆虫細胞においてr A A Vを産生する方法を提供する。

20

【0034】

昆虫細胞におけるr A A Vの産生は既報である(例えば、米国特許出願公開番号第U S 2 0 1 2 0 1 0 0 6 0 6号を参照のこと。その内容全体を引用により本明細書中に包含させる)。本明細書に記載の方法および組成物は、A A Vの複製を可能にし、かつ培養中に維持され得る、任意の昆虫細胞において利用され得る。例えば、用いる細胞株は、ヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞株、ショウジョウバエ細胞株、または蚊細胞株(例えば、ヒトスジシマカ(Aedes albopictus)由来の細胞株)由来であり得る。ある態様において、昆虫細胞は、バキュロウイルス感染(例えば、S e 3 0 1、S e I Z D 2 1 0 9、S e U C R 1、S f 9、S f 9 0 0 +、S f 2 1、B T I - T N - 5 B 1 - 4、M G - 1、T n 3 6 8、H z A m 1、H a 2 3 0 2およびH z 2 E 5)に感受性であり得る。従って、本明細書に記載の方法および組成物は、バキュロウイルス発現ベクター(B E V)を用いてr A A Vを産生するのに有用である。

30

【0035】

B E Vは、タンパク質産生のための最も汎用性の高いシステムの1つとして明らかになってきた。基本的なタンパク質産生に加えて、B E Vは、異種多タンパク質複合体の合成およびA A Vなどの遺伝子治療ベクターのアセンブリなどのより複雑な作業に利用されている。ある態様において、後者の戦略は、各々がヘルパー機能を提供する3つのB E Vで同時感染した昆虫細胞を利用する。例えば、昆虫細胞は、A A V逆位末端反復(I T R)配列に隣接する目的の遺伝子を含む第1のバキュロウイルス、A A V r e pを含む第2のバキュロウイルス、およびA A V c a pを含む第3のバキュロウイルスで同時に感染される。A A V c a pは、組み立て活性化タンパク質(A A P)ならびにウイルスカプシドタンパク質V P 1、V P 2およびV P 3をコードする。カプシドタンパク質V P 1、V P 2およびV P 3は、同じm R N A転写物から翻訳され、それらは、2つの異なるサイズのm R N Aイソ型のいずれかに転写後にスプライシングされ得る。哺乳動物細胞における転写後スプライシングは、V P 1 : V P 2 : V P 3カプシドタンパク質の適切な化学量

40

50

論比の発現をもたらすmRNA形態の分布を生成するのに適当な割合で生じる。また、昆虫細胞においていくつかの血清型（例えば、AAV5、AAV8およびAAV9）の産生が、細胞の形質導入において非効率的な粒子を生じる。従って、組成物および方法は、昆虫細胞または任意の他の目的の宿主細胞タイプ（例えば、哺乳動物宿主プロデューサー細胞または他のタイプの細胞）におけるrAAV産生を改善するためにVP1発現レベルを改変するために有用である。

【0036】

いくつかの側面において、本発明は、改変型Kozak配列ならびにAAV VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸組成物を提供する（ここで、該カプシドタンパク質は、AAV5血清型に由来する）。ある態様において、Kozak配列は、AAV5 VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンおよび該開始コドンの上流のさらなるヌクレオチドを含む。ある態様において、Kozak配列は、該開始コドンの下流のヌクレオチドをさらに含む。ある態様において、Kozak配列は、配列RNXTXT(ATG)NY（配列番号1）のヌクレオチドを含み、ここで、(ATG)は、VP1開始コドンであり；RはCまたはTヌクレオチドであり；Nは、A、T、GまたはCから選択されるヌクレオチドであり；XはGまたはTヌクレオチドであり；および、Yは、A、TまたはCから選択されるヌクレオチドである。ある態様において、Kozak配列は、表1に記載のヌクレオチド配列を含む。

【0037】

【表1】

表1. AAV5 VP1Kozak配列

配列番号	配列
2	CAUUGUAUGUC
3	UCGUUUAUGGA
4	CAGUUUAUGGU
5	CAUUGUAUGGU
6	UAGUGUAUGCU
7	CAUUGUAUGCU
8	UCUUUUAUGUC
9	UGUUUUAUGUC
10	UAGUUUAUGUC
11	UAGUGUAUGUC

【0038】

いくつかの側面において、本発明は、改変型Kozak配列ならびにAAV VP1、VP2およびVP3カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸組成物を提供し、ここで、該カプシドタンパク質は、AAV8血清型に由来する。ある態様において、Kozak配列は、AAV8 VP1カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンおよび該開始コドンの上流のさらなるヌクレオチドを含む。ある態様において、Kozak配列は、該開始コドンの下流のヌクレオチドをさらに含む。ある態様において、Kozak配列は、配列YNXRNR(ATG)XZ（配列番号12）のヌクレオチドを含み、ここで、(ATG)は、VP1開始コドンであり；Yは、A、TまたはCから選択されるヌクレオチドであり；NはA、T、GまたはCから選択されるヌクレオチドであり；Xは、GまたはTヌクレオチドであり；Rは、CまたはTヌクレオチドであり；および、Zは、GまたはCヌクレオチドである。ある態様において、Kozak配列は、表2に記載のヌクレオチド配列を含む。

【0039】

【表 2】

表 2. AAV8 VP1 Kozak 配列

配列番号	配列
13	UAGCGCAUGGC
14	UGGUAUAUGGC
15	UAGUUUAUGGC
16	CAGUGUAUGGC
17	UAGUGUAUGGC
18	UAUUGUAUGGC
19	CAUUGUAUGGC
20	CCGUUUUAUGGG
21	ACUUGUAUGGG
22	CAUUUUUAUGGG
23	UAGUGUAUGUC
24	UAGUUUAUGUC
25	UGUUUUUAUGUC
26	UCUUUUUAUGUC
27	UAGUGUAUGGG
28	UAGUUUAUGGG
29	UGUUUUUAUGGG
30	UCUUUUUAUGGG
31	UAGUGUAUGUC
32	UAGUUUAUGUC

10

20

【0040】

いくつかの側面において、本発明は、改変型 Kozak 配列ならびに AAV VP1、VP2 および VP3 カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸組成物を提供し、ここで、該カプシドタンパク質は、AAV9 血清型に由来する。ある態様において、Kozak 配列は、AAV9 VP1 カプシドタンパク質の翻訳のための開始コドンおよび該開始コドンの上流のさらなるヌクレオチドを含む。ある態様において、Kozak 配列は、該開始コドンの下流のヌクレオチドをさらに含む。ある態様において、Kozak 配列は、配列 TNXTXT(ATG)XZ(配列番号 33)のヌクレオチドを含み、ここで、(ATG)は、VP1 開始コドンであり；Nは、A、T、C または G から選択されるヌクレオチドであり；XはGまたはTヌクレオチドであり；および、ZはGまたはCヌクレオチドである。ある態様において、Kozak 配列は、表 3 に記載のヌクレオチド配列を含む。

30

【0041】

【表 3】

表3. AAV9 VP1 Kozak配列

配列番号	配列
34	UAGUGUAUGUC
35	UAGUUUAUGUC
36	UGUUUUAUGUC
37	UCUUUUAUGUC
38	UAGUGUAUGGG
39	UAGUUUAUGGG
40	UGUUUUAUGGG
41	UCUUUUAUGGG
42	UAGUGUAUGGC
43	UAGUUUAUGGC
44	UGUUUUAUGGC
45	UCUUUUAUGGC

10

【0042】

言及される核酸がRNA分子であるかDNA分子であるかによって、UヌクレオチドまたはTヌクレオチドが言及され得ることが理解されるべきである。

20

【0043】

野生型AAVゲノムは、陽性または陰性のセンス鎖のいずれかの、一本鎖デオキシリボ核酸(ssDNA)である。ゲノムは、DNA鎖の両端に1つずつの2つの逆方向末端反復配列(ITR)と、2つのオープンリーディングフレーム(ORF)：ITR間のrepおよびcapを含む。rep ORFは、AAV生活環に必要とされるRepタンパク質をコードする4つの重複遺伝子を含む。cap ORFは、カプシドタンパク質：VP1、VP2およびVP3(それらは、相互作用してウイルスカプシドを形成する)をコードする重複遺伝子を含む。VP1、VP2およびVP3は、1つのmRNA転写物から翻訳され、それらが2つの異なる様式でスプライシングされ得る：より長いまたはより短いイントロンのいずれかを切り取ることにより、2つのアイソフォームのmRNA：~2.3 kbおよび~2.6 kbのmRNAイソ型、を形成することができる。カプシドは、約60個の個々のカプシドタンパク質サブユニットの超分子集合体を、AAVゲノムを保護することができる非エンベロープのT-1二十面体格子に形成する。成熟カプシドは、約1：1：10の凡その比でVP1、VP2およびVP3(それぞれ約87、73および62 kDaの分子量)から構成される。VP2およびVP3に対するVP1のレベルは、昆虫細胞における感染性粒子の効率的な産生を得るために、本明細書に記載の通りに調節することができる。ある態様において、VP1：VP2：VP3の比は、(0.5-2)：(0.5-2)：10の範囲内である。ある態様において、VP1：VP2：VP3の比は、(0.5-1.5)：(0.5-1.5)：10の範囲内である。

30

【0044】

40

組換えAAV(rAAV)粒子は、核酸ベクターを含んでいてよく、それは、少なくとも、(a)目的のタンパク質またはポリペプチドあるいは目的のRNA(例えば、siRNAまたはマイクロRNA)をコードする目的の遺伝子を含む1以上の異種核酸領域；および(b)該1以上の核酸領域(例えば、異種核酸領域)に隣接する逆方向末端反復(ITR)配列(例えば、野生型ITR配列または操作されたITR配列)を含む1以上の領域を含んでいてよい。ある態様において、核酸ベクターは、2 kbから7 kbのサイズである。ある態様において、核酸ベクターは、4 kbから5 kbのサイズ(例えば、4.2から4.7 kbのサイズ)である。ある態様において、核酸ベクターは環状である。ある態様において、核酸ベクターは一本鎖である。ある態様において、核酸ベクターは二本鎖である。ある態様において、二本鎖核酸ベクターは、例えば、核酸ベクターの別の領域に

50

相補的であり、二本鎖 (double - strandedness) の核酸ベクターの形成を開始する、核酸ベクターの領域を含む自己相補的ベクターである。

【 0 0 4 5 】

I T R 配列は、任意の A A V 血清型 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10) から誘導され得るか、または 2 以上の血清型に由来し得る。I T R 配列および I T R 配列を含むプラスミドは、当該分野で公知であり、市販されている (例えば、Vect or Biolabs、Philadelphia、PA; Cell Biolabs、San Diego、CA; Agilent Technologies、Santa Clara、Ca; および、Addgene、Cambridge、MA; および、Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26;93(24):14082-7; および、Curtis A. Machida. Methods in Molecular Medicine (商標). Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols. 10.1385/1-59259-304-6:201 (著作権) Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young Jr., Toni Cathomen and Richard Jude Samulski; 米国特許第 5, 139, 941 号および同第 5, 962, 313 号の製品およびサービス、それらは全て引用により本明細書中に包含される)。

【 0 0 4 6 】

ある態様において、r A A V 粒子または r A A V 調製物内の粒子は、任意の誘導体または偽型を含む任意の A A V 血清型 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、2 / 1、2 / 5、2 / 8、2 / 9、3 / 1、3 / 5、3 / 8 または 3 / 9) のものであり得る。本明細書で用いる、r A A V ウイルスベクターの血清型 (例えば、r A A V 粒子) は、組換えウイルスのカプシドタンパク質の血清型を意味する。誘導体および偽型の限定されない例としては、r A A V 2 / 1、r A A V 2 / 5、r A A V 2 / 8、r A A V 2 / 9、A A V 2 - A A V 3 ハイブリッド、A A V r h . 10、A A V h u . 14、A A V 3 a / 3 b、A A V r h 3 2 . 33、A A V - H S C 15、A A V - H S C 17、A A V h u . 37、A A V r h . 8、C H t - P 6、A A V 2 . 5、A A V 6 . 2、A A V 2 i 8、A A V - H S C 15 / 17、A A V M 4 1、A A V 9 . 45、A A V 6 (Y 4 4 5 F / Y 7 3 1 F)、A A V 2 . 5 T、A A V - H A E 1 / 2、A A V クローン 3 2 / 83、A A V S h H 10、A A V 2 (Y - > F)、A A V 8 (Y 7 3 3 F)、A A V 2 . 15、A A V 2 . 4、A A V M 4 1 および A A V r 3 . 45 が挙げられる。かかる A A V 血清型および誘導体 / 偽型、およびそのような誘導体 / 偽型を産生する方法は、当該技術分野で公知である (例えば、Mol Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287, Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ. を参照のこと)。ある態様において、r A A V 粒子は、(a) 1 つの血清型 (例えば、A A V 2、A A V 3) 由来の I T R を含む核酸ベクター、ならびに (b) 別の血清型 (例えば、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9 または A A V 10) 由来のカプシドタンパク質を含むカプシドを含む、偽型の r A A V 粒子である。ある態様において、本明細書に記載の方法は、昆虫細胞において、任意の血清型、または誘導体 / 偽型 (例えば、A A V 5、A A V 8、A A V 9 または他の血清型もしくはそれに基づく誘導体 / 偽型) の A A V を産生するために用いられ得る。偽型の r A A V ベクターを産生および使用するための他の方法は、当該技術分野で公知である (例えば、Duan et al., J. Virol., 75:7662-7671, 2001; Halbert et al., J. Virol., 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin et al., Methods, 28:158-167, 2002; および、Auricchio et al., Hum. Molec. Genet., 10:3075-3081, 2001 を参照のこと)。ある態様において、1 以上のカプシド置換 (例えば、対応する野生型配列と比べて) が、組換えカプシド遺伝子 (例えば、本明細書に記載の組換え V P 1 遺伝子) 中にコードされていてもよい。

【 0 0 4 7 】

r A A V 粒子および核酸ベクターを産生する方法は、本明細書に記載されている。他の

方法もまた、当技術分野で公知であり、購入可能である（例えば、Zolotukhin et al. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28 (2002) 158-167；および、米国特許出願公開第US 2007 0015238号および同第US 20120322861号（引用により本明細書中に包含させる）を参照；ならびに、ATCCおよびCell Biolabs, Inc.より利用可能なプラスミドおよびキット）。例えば、核酸ベクターを含むプラスミドは、例えば、rep遺伝子（例えば、Rep78、Rep68、Rep52およびRep40をコードする）およびcap遺伝子（VP1、VP2およびVP3をコードする、本明細書に記載のとおり改変型VP3領域を含む）を含む1以上のヘルパープラスミドと組み合わせられて、rAAV粒子がパッケージされ、続いて精製され得るようにプロデューサー細胞株にトランスフェクトされ得る。

10

【0048】

ある態様において、プロデューサー細胞株は、昆虫細胞に由来する。昆虫細胞の例としては、Sf9細胞（例えば、ATCC（登録商標）CRL-1711（商標））が挙げられるが、これに限定されない。プロデューサー細胞は、本明細書に記載の方法に使用するためのRepタンパク質および/またはCapタンパク質をコードする、repおよび/またはcap遺伝子（例えば、本明細書に記載のAAV VP1、VP2およびVP3をコードする核酸）を含み得る。ある態様において、パッケージはインビトロで実施される。

【0049】

本明細書で提供される方法のいくつかの態様において、核酸ベクターを含むプラスミドは、例えば、第1の血清型のrep遺伝子および同じ血清型または異なる血清型のcap遺伝子を含む1以上のヘルパープラスミドと組み合わせられて、rAAV粒子がパッケージされるようにヘルパー細胞株にトランスフェクトされる。

20

【0050】

ある態様において、1以上のヘルパープラスミドは、rep遺伝子およびcap遺伝子を含む第1のヘルパープラスミドならびにE1a遺伝子、E1b遺伝子、E4遺伝子、E2遺伝子およびVA遺伝子を含む第2のヘルパープラスミドを含む。ある態様において、rep遺伝子は、AAV2に由来するrep遺伝子である。ヘルパープラスミド、およびかかるプラスミドを作製する方法は、当技術分野で公知であり、市販されている（例えば、PlasmidFactory, Bielefeld, Germanyの、pDM、pDG、pDP1rs、pDP2rs、pDP3rs、pDP4rs、pDP5rs、pDP6rs、pDG(R484E/R585E)およびpDP8.apεプラスミド；Vector Biolabs, Philadelphia, PA；Cell Biolabs, San Diego, CA；Agilent Technologies, Santa Clara, Ca；および、Addgene, Cambridge, MAから提供されている他の製品およびサービス；pXX6；Grimm et al. (1998), Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors, Human Gene Therapy, Vol. 9, 2745-2760；Kern, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, Journal of Virology, Vol. 77, 11072-11081.；Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, Molecular Therapy, Vol. 7, 839-850；Kronenberg et al. (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini, Journal of Virology, Vol. 79, 5296-5303；および、Moullier, P. and Snyder, R.O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, Molecular Therapy, Vol. 16, 1185-1188を参照のこと）。

30

40

【0051】

ある態様において、1以上の宿主細胞（例えば、プロデューサー細胞）は、1以上のヘルパー機能（例えば、宿主細胞ゲノムに組み込まれた組換え核酸によりコードされる、または宿主細胞内のプラスミドもしくはウイルス核酸ベクターによりコードされる）を有し

50

得る。ある態様において、本明細書に記載の改変型 K o z a k 配列を含む組換えカプシド遺伝子（例えば、V P 1 遺伝子）は、プラスミド、ウイルスゲノム（例えば、バキュロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルスまたは他のウイルスゲノム）上に提供されてよい、あるいは宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞または例えば S f 9 細胞などの昆虫細胞）のゲノムに組み込まれてもよい。

【 0 0 5 2 】

ある態様において、目的の遺伝子（例えば、r A A V 粒子内にパッケージされる遺伝子）は、酵素、ホルモン、抗体、受容体、リガンドまたは他のタンパク質をコードする。ある態様において、目的の遺伝子は、治療的に有用なタンパク質をコードする。ある態様において、目的の遺伝子は、対照またはマーカータンパク質（例えば、検出可能マーカー、例えば G F P ）をコードする。ある態様において、目的の遺伝子は、R N A、例えば s i R N A もしくは他の調節 R N A などの調節 R N A （例えば、治療的 R N A ）をコードする。ある態様において、治療薬は、ポリペプチド、ペプチド、抗体またはその抗原結合断片、リボザイム、ペプチド - 核酸、s i R N A、R N A i、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはアンチセンスポリヌクレオチドである。ある態様において、目的の遺伝子は、治療タンパク質をコードする。ある態様において、治療遺伝子は、抗体、ペプチボディ、増殖因子、凝固因子、ホルモン、膜タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面受容体またはイオンチャネルに作用する活性化または阻害ペプチド、細胞内プロセスを標的とする細胞透過性ペプチド、血栓溶解、酵素、骨形成タンパク質、遺伝子編集に使用されるヌクレアーゼまたは他のタンパク質、F c 融合タンパク質、抗凝固剤、ヌクレアーゼ、ガイド R N A または遺伝子編集のための他の核酸もしくはタンパク質をコードする。ある態様において、治療用タンパク質は、リソソーム蓄積症の治療剤である。ある態様において、治療用タンパク質は、神経学的障害、神経障害、神経骨格障害または神経筋疾患の治療剤である。ある態様において、治療用タンパク質は、筋障害または筋ジストロフィー、ミオパチーまたは心筋症の治療剤である。ある態様において、目的の遺伝子は、ワクチン（例えば、核酸またはペプチドワクチン）をコードする。

【 0 0 5 3 】

ある態様において、（例えば、治療剤をコードする）目的の遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結される。プロモーターは、天然プロモーター、合成または組換えプロモーター、キメラプロモーター、短縮型プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、種特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、あるいは上記の 2 つまたはそれ以上の組み合わせであり得るが、それらに限定されない。ある態様において、プロモーターは、調節可能であり得る（例えば、プロモーターからの発現レベルは、外部条件を変化させることによって、または調節分子を添加もしくは除去することによって増加または減少させ得る）。ある態様において、目的の遺伝子は、その天然プロモーターに、あるいは別のプロモーターに作動可能に連結され得る。

【 0 0 5 4 】

ある態様において、本明細書に記載の r A A V を含む組成物は、哺乳動物対象（例えば、ヒト）を処置するために使用できる。ある態様において、対象は、癌、糖尿病、自己免疫疾患、腎疾患、心血管疾患、膵臓疾患、腸疾患、肝臓疾患、神経疾患、神経筋疾患、バッテン病（Bratten's disease）、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、肺疾患、 $\alpha 1$ - アンチトリプシン欠乏症、神経障害、神経運動損傷、神経骨格障害、虚血、脳卒中、リソソーム蓄積症、ボンベ病、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症、カナパン病、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素欠損症、血友病 A / B または他の疾患、あるいはそれらの何れかの組合せを有する。

【 0 0 5 5 】

さらなる詳述を要せず、当業者は、上記の説明に基づいて、本発明を最大限に利用することができると考えられる。従って、以下の特定の態様は、単なる例示として解釈されるべきであり、決して本開示の後半部分の記載を限定するものではない。本明細書に引用される全ての刊行物は、参考とすべき目的または主題のために引用により本明細書に包含さ

10

20

30

40

50

せる。

【実施例】

【0056】

実施例

実施例1：弱毒型Kozak配列を用いた安定な細胞株におけるVP1：VP2：VP3比の調節

rAAV粒子の生物学的効力（例えば、感染力）は、ビリオンカプシド組成に部分的に依存し、例えば、カプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3の化学量論比に部分的に依存する。昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）などの異種システムで製造された幾つかのrAAV血清型（例えば、AAV5、AAV8およびAAV9）は、異常なVP1発現レベルにより特徴付けられる。ウイルスの組み立て時に、異常なVP1発現は結果として、不適切なカプシドタンパク質比からなるウイルス粒子の産生をもたらし、それは、該粒子の効率的な細胞形質導入能力を妨げる。有用な化学量論比のカプシドタンパク質を得る方法は、過剰量のVP1が、ウイルス粒子を効率的にパッケージする昆虫細胞の能力を損なうことがあり、VP1のレベルが低いと、形質導入が非効率的な粒子になる可能性があること示す結果によって複雑になる。従って、現在のシステムを用いた昆虫細胞rAAV産生に関して、粒子の組み立てに有害な影響を及ぼすことなく感染性粒子の収量を増加させる方法を見出すことは依然として課題である。

【0057】

現在の研究は、Sf9昆虫細胞で発現されたrAAVにおけるVP1の翻訳開始速度を修飾することによってカプシドタンパク質比を改善することを目指している。具体的には、標準的ATG開始コドンを中心に保ちながら、AAV5、AAV8およびAAV9におけるVP1のKozak配列を弱毒化し、形質導入効率を測定して、組み立てられた粒子を評価した。

【0058】

一組の弱毒型KozakエレメントをAAV5について設計し、これらのエレメントをコードする核酸を作製した。コードされたKozak配列を表4に示す。4つのKozakエレメントのサブセットは、図2Aに示すウェスタンブロット分析によって示されるように、野生型AAV5 VP1：VP2：VP3比が1：1：10に近いカプシドタンパク質をコードすることが見いだされた。これらのエレメント（AAV5 Kozak配列7-10）については、（VP1）：（VP2）：（VP3）のそれぞれの比は、（0.5-2）：（0.5-1）：10の範囲内であった。翻訳開始配列（TIS、Kozak配列とも称する）のインピットの相対効率は、それぞれの組み立てられた粒子について測定された（表4）。これらの数字は、図4Bのウェスタンブロットパネルの下に数字に対応する。AAV5 Kozak配列7（配列番号8）および8（配列番号9）は、最大の効率を示し、さらなる分析のために選択されたrAAVを産生した。

【0059】

10

20

30

【表 4】

表 4. AAV5 VP1 Kozak 配列

配列	Kozak 配列	効率 (%)
1	CAUUGUAUGUC (配列番号 2)	32
2	UCGUUUAUGGA (配列番号 3)	30
3	CAGUUUAUGGU (配列番号 4)	20
4	CAUUGUAUGGU (配列番号 5)	16
5	UAGUGUAUGCU (配列番号 6)	14
6	CAUUGUAUGCU (配列番号 7)	12
7	UCUUUUAUGUC (配列番号 8)	43
8	UGUUUUAUGUC (配列番号 9)	40
9	UAGUUUAUGUC (配列番号 10)	37
10	UAGUGUAUGUC (配列番号 11)	33

10

【0060】

AAV5 Kozak 配列 7 は、VP1 : VP2 : VP3 比をそれぞれ 2 : 1 : (8 - 9) とした。HEK293 細胞から単離された AAV5 と比較して、昆虫細胞で産生された配列 7 の粒子は、2 倍高い形質導入効率を示した。AAV5 Kozak 配列 8 は、VP1 : VP2 : VP3 比をそれぞれ (1 - 1.5) : 1 : 10 とした。HEK293 細胞から単離された AAV5 と比較して、配列 8 の粒子は、3 から 5 倍高い形質導入効率を示した。配列 8 のパッケージされた rAAV5 変異体の収量は、配列 7 の rAAV5 変異体の収量の約 10 倍高いことが示された。

20

【0061】

一組の弱毒型 Kozak エlement を AAV8 について設計し、これらの Element をコードする核酸を作製した。コードされた Kozak 配列を表 5 に示す。

【0062】

【表 5】

表 5. AAV8 VP1 Kozak 配列

配列	Kozak 配列	効率 (%)
1	UAGCGCAUGGC (配列番号 13)	70
2	UGGUAUAUGGC (配列番号 14)	60
3	UAGUUUAUGGC (配列番号 15)	50
4	CAGUGUAUGGC (配列番号 16)	46 - 47
5	UAGUGUAUGGC (配列番号 17)	45
6	UAUUGUAUGGC (配列番号 18)	44
7	CAUUGUAUGGC (配列番号 19)	43
8	CCGUUUAUGGG (配列番号 20)	41 - 42
9	ACUUGUAUGGG (配列番号 21)	40
10	CAUUUUAUGGG (配列番号 22)	37
11	UAGUGUAUGUC (配列番号 23)	34
12	UAGUUUAUGUC (配列番号 24)	31
13	UGUUUUAUGUC (配列番号 25)	33
14	UCUUUUAUGUC (配列番号 26)	37
15	UAGUGUAUGGG (配列番号 27)	40
16	UAGUUUAUGGG (配列番号 28)	43
17	UGUUUUAUGGG (配列番号 29)	33
18	UCUUUUAUGGG (配列番号 30)	38
19	UAGUGUAUGUC (配列番号 31)	42
20	UAGUUUAUGUC (配列番号 32)	43

10

20

【0063】

AAV8 Kozak 配列 1 - 12 は、図 2 B に示されるウェスタンブロッティング分析によって示されるように、VP1 の過剰発現ならびに VP2 および VP3 の低発現を示した。これらの配列は、その後の試験から除外した。残りのエレメント (配列 13 - 20) は、VP1 : VP2 : VP3 の発現を、HEK293 細胞から単離した AAV8 と同様の比率でもたらしめた。

30

【0064】

一組の弱毒型 Kozak エレメントを AAV9 について設計し、これらのエレメントをコードする核酸を作製した。コードされた Kozak 配列を表 6 に示す。

【0065】

【表 6】

表 6. AAV9 VP1 Kozak配列

配列	Kozak配列	効率 (%)
1	UAGUGUAUGUC (配列番号34)	33
2	UAGUUUAUGUC (配列番号35)	37
3	UGUUUUAUGUC (配列番号36)	40
4	UCUUUUAUGUC (配列番号37)	43
5	UAGUGUAUGGG (配列番号38)	33
6	UAGUUUAUGGG (配列番号39)	38
7	UGUUUUAUGGG (配列番号40)	42
8	UCUUUUAUGGG (配列番号41)	43
9	UAGUGUAUGGC (配列番号42)	45
10	UAGUUUAUGGC (配列番号43)	50
11	UGUUUUAUGGC (配列番号44)	54
12	UCUUUUAUGGC (配列番号45)	57

10

【0066】

AAV9 Kozak配列2 (配列番号35)、3 (配列番号36)、5 (配列番号38) および9 (配列番号42) は、図2Cに示されるウェスタンブロッティング分析によって示されるように、満足できるVP1:VP2:VP3比のAAV9カプシドをもたらした。各AAV血清型を用いて行った実験を考慮すると、“コンセンサス”の弱毒型Kozakエレメントが得られた。図3に示すように、-5 (開始コドンから5ヌクレオチド上流) の位置は、AAV血清型5、8および9から選択された所与のカプシドについてのVP1:VP2:VP3発現比の正確な調節のために最もフレキシブルである。

20

【0067】

実施例2: rAAVの評価

rAAV製造のためのパキューロウイルス/Sf9システムの主な欠点は、Bac由来のrAAVベクター血清型のほとんどが、ほとんど例外なく、変更されたカプシド組成およびより低い生物学的効力を示すことである。AAVカプシドタンパク質の化学量論的血清型特異的調節を達成するための、弱毒型Kozak配列およびリボソームの読み漏らしを利用した新しい昆虫細胞ベースの生産プラットフォームが記載されている。例として、rAAV5およびrAAV9が産生され、HEK293由来のベクターと並行して、総合的に特徴付けられた。質量分析は、ヒト細胞由来のベクターと比較して、VP1およびVP2カプシドタンパク質含量の両方において3倍の増加を証明した。さらに、次世代シーケンシングを用いて、カプシド化された一本鎖ウイルスDNAの広範な分析を行い、昆虫細胞で産生されたrAAV5について、副次的にパッケージされた混入DNAの6倍の減少が示された。その結果、再設計されたrAAVは、rAAV5の場合、マウスにおける脳組織の4倍高い形質導入を仲介するHEK293により製造されたrAAVとの比較においてさえ、有意に高い生物学的効力を示した。従って、記載されたシステムは、優れた感染性かつ例外的な純度のrAAVベクターをもたらす、GMPグレードのベクター産生のための増産可能な (scalable) プラットフォームを提供する。

30

40

【0068】

rAAVは、遺伝子治療/DNAワクチン送達のためのベクターとして広く使用されているが、臨床試験のための高度に感染性のrAAVのスケールアップ産生は依然として課題である。AAVカプシドは、AAVゲノム中の単一カプシド遺伝子の選択的スプライシングおよび異なるコドン使用を介して誘導された3つのカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3からなる。VP3配列は、3つ全てのスプライス変異体間で共通であり、VP2およびVP1は、ウイルス感染に重要なホスホリパーゼドメインA2を含むVP1のユニークな領域を有するN末端の長い配列を有する¹。カプシドにおけるVP1/VP

50

2 / V P 3 の正確な量は、未知であるが、S D S - P A G E で決定されたカプシドタンパク質のデンストメトリー分析に基づいて、1 / 1 / 1 0 であると推定される^{2 - 4}。さらに、V P 1 / V P 2 / V P 3 化学量論は定義されておらず、組み立て（アセンブリ）は、カプシドに組み込まれるV P 1 / V P 2 / V P 3 の相対量が主としてそれらの相対的発現レベルによって変わるように確率論的(stochastic)であると考えられる⁵。従って、所与のr A A V 産生システムにおけるカプシドタンパク質発現ユニットの設計は、生物学的に強力な遺伝子治療ベクターの構築に必須である。

【 0 0 6 9 】

この目的のために、元のスケラブルなシステムの1つは、r A A V 遺伝子導入カセット、A A V r e p およびc a p ヘルパー遺伝子をそれぞれコードするオートグラフィア・カリフォルニカ・マルチカプシド核多角体病ウイルス（A c M N P V ）に由来する3つの組換えバキュロウイルスを同時感染させたS f 9 昆虫細胞の懸濁培養液を利用した⁶。しかしながら、このシステムで産生されたA A V 血清型の大部分は、V P 1 カプシドタンパク質の不適切な含有量およびそのホスホリパーゼA 2 活性によって、H E K 2 9 3 由来のベクターと比較して低い形質導入率によって特徴付けられた^{7 - 1 0}。この欠点は、V P 1 についての非標準的なA C G 開始コドンを利用するリボソームの読み漏らしを誘導する、カプシド遺伝子ヘルパーベクター設計の結果であった⁶。他のグループが、異なる開始コドンC U G^{1 1}または人工イントロン^{1 2}を利用してこの問題をある程度解決したとしても、その解決策は、血清型特異的配列調整に必要な柔軟性を欠くことが明らかであった。調整可能なリボソームの開始コドンスキニング漏れによる相対的V P 1 / V P 2 / V P 3 組成の調節の新規システムが導入された。

【 0 0 7 0 】

哺乳動物起源の細胞では、A A V におけるP 4 0 により駆動される転写産物はスプライシングを受けて、V P 1 またはV P 2 / V P 3 カプシドタンパク質をそれぞれコードする2つのスプライシングされたm R N A 変異体を産生する。バキュロウイルス / S f 9 システムにおいては、p o l h プロモーターがP 4 0 / イントロン配列の代わりに用いられるため、スプライシングによる調節は利用できず、リボソームの開始コドンスキニング漏れによるV P 1 発現の代替調節が用いられる。コンセンサス配列G C C R C C A U G G C（配列番号49）（R = A またはG）は、K o z a k 配列としても知られる有効な哺乳動物翻訳開始部位（T I S）であると考えられる^{1 3}。この配列からの逸脱は、V P 1 A U G の開始コドンの読み漏らし（leaky scanning）の増加およびインフレイムの下流のV P 2 A C G またはV P 3 A U G コドンからの翻訳の開始をもたらし、それによりV P 1 / V P 2 / V P 3 の化学量論比の変化をもたらし、最近の研究では、バキュロウイルス / S f 9 システムにおけるV P 1 / V P 2 / V P 3 カプシド組成物の比を合理的に調節して、より高いV P 1 / V P 2 含量を有する粒子をもたらし、結果としてH E K 2 9 3 由来のベクターと比較しても顕著に大きな生物学的効力をもたらし方法が説明されている。

【 0 0 7 1 】

この先進的な産生プラットフォームの全体を特徴付けるために、製造されたカプシド形成されたD N A の次世代シーケンシング（N G S）分析を以下の2つの方法により行った：従来のH E K 2 9 3 のトリプルプラスミド同時トランスフェクションおよび安定して組み込まれたr e p / c a p ヘルパー遺伝子を挿入したS f 9 細胞株の単独B E V 感染。2つのプラットフォームにより製造されたr A A V カセットの直接的なサイドバイサイド（side-by-side）N G S 分析は、混入しているD N A を有意に少なくカプセル化した昆虫細胞におけるウイルスD N A パッケージの精度を高めた。

【 0 0 7 2 】

A A V 5 およびr A A V 9 カプシド遺伝子の設計。リボソームの読み漏らしを増加させるため、弱毒型K o z a k 配列が先行する基準A U G コドンを用いた。8つの残基の関連ストレッチにまたがる可能性のあるT I S 配列の複雑性は65, 536の可能性のある並べ替え（permutation）があるため、A U G の上流または下流のヌクレオチドをランダムに修飾することは現実的なアプローチではないであろう。さらに、コンセンサスK o z a k

配列は、酵母¹⁴、高等植物¹⁵、無脊椎動物¹⁶、または脊椎動物¹⁷について異なっていることが明らかである。従って、弱毒型TISのスクリーニングを合理化する1つの方法は、Nodererら¹⁸により行われた全ての可能性のある哺乳動物TIS配列の実証されたヒートマップを利用することであって、これにより、TISの全ての可能な組み合わせに、コンセンサスKozak配列と比較して“開始効率(initiation efficiency)”の値が割り当てられた。

【0073】

12 - 43%の範囲の開始効率が選択され、2 - 4%の増加により異なる10個の変異体について試験した。10個すべてのAAV5 VP1で試験したTISを表9に示し、既報⁷の通りにBS^Rプール細胞株を誘導し、それらのカプシド組成を評価するために、cap発現ヘルパープラスミド(図4A)という観点で用いた。顕著な例外を除いて(例えば、図4B、レーン6)、相対的VP1含量は徐々に減少し、それは相対的TIS効率の理論値の低下に密接に従った。この相関は、翻訳開始コドンの読み漏らしがVP1含量を調節するのに利用できるという元々の仮説を支持する。有用なVP1/VP2/VP3化学量論をさらに同定するために、10個のrAAV5ベクターのそれぞれの感染力および全体の力価をアッセイした。感染性rAAV5ベクターを産生するために、BEVをコードするCBAにより駆動されるGFP(図10A、pTR-Bac-UF26)を作製した。サイドバイサイド比較は、40%のTIS相対効率を有する構築物(図4B、レーン2)が、他の全ての構築物と比較して優れており、最も高い収量を生じることを明らかにした。従って、弱毒型TIS、UGUUUUUAUGUC(表9の配列番号9)を組み込んだ、この特定のカプシド遺伝子含有ヘルパー構築物を選択して、プロデューサー細胞株を誘導した。しかしながら、他の配列もまた使用可能である。同様の方法で、弱毒型Kozak配列を有する12個のAAV9 VP1プラスミド構築物をスクリーニングした(表9)。AAV9について、特に有用な配列は、UAGUGUAUGGC(配列番号42)であって、45%の相対的TIS効率を構成した。しかしながら、他の配列もまた使用可能である。

【0074】

rep2/cap5安定細胞株の特徴付け。個々の細胞株は、Rep結合エレメント(REBE)を欠くRep2 - およびCap5を発現するプラスミドを用いて誘導された⁸。Cap5ヘルパーは、以下の弱毒型TISを含んだ：UGUUUUUAUGUC(配列番号9)。5個の個々の細胞株を増殖させ、上記のように試験した⁷。rAAV5 - -UF26の最高収量を示す1つの細胞株、吹き替え(dubbed)B8を、特徴付けのために選択した。以下のパラメーターを調べた。

【0075】

【表 7】

表 9. AAV5 および AAV9 カプシド遺伝子の発現について試験した WT および弱毒型 TIS

	配列	効率 (%) *
AAV5 Koz VP1		
wt AAV5	GUAGUC <u>AUGUC</u> (配列番号 46)	91
1	UCUUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 8)	43
2	UGUUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 9)	40
3	UAGUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 10)	37
4	UAGUGU <u>AUGUC</u> (配列番号 11)	33
5	CAUUGU <u>AUGUC</u> (配列番号 2)	32
6	UCGUUU <u>AUGGA</u> (配列番号 3)	30
7	CAGUUU <u>AUGGU</u> (配列番号 4)	20
8	CAUUGU <u>AUGGU</u> (配列番号 5)	16
9	UAGUGU <u>AUGCU</u> (配列番号 6)	14
10	CAUUGU <u>AUGCU</u> (配列番号 7)	12
AAV9 Koz VP1		
wt AAV9	CCAGGU <u>AUGGC</u> (配列番号 47)	130
1	UCUUUU <u>AUGGC</u> (配列番号 45)	57
2	UGUUUU <u>AUGGC</u> (配列番号 44)	54
3	UAGUUU <u>AUGGC</u> (配列番号 43)	50
4	UAGUGU <u>AUGGC</u> (配列番号 42)	45
5	UCUUUU <u>AUGGG</u> (配列番号 41)	43
6	UCUUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 37)	43
7	UGUUUU <u>AUGGG</u> (配列番号 40)	42
8	UGUUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 36)	40
9	UAGUUU <u>AUGGG</u> (配列番号 39)	38
10	UAGUUU <u>AUGUC</u> (配列番号 35)	37
11	UAGUGU <u>AUGGG</u> (配列番号 38)	33
12	UAGUGU <u>AUGUC</u> (配列番号 34)	33

* 推定相対的 TIS 効率¹⁸

各血清型について選択された配列を太字で強調している。下線は VP1 開始コドンを示す。

【0076】

VP1 / VP2 / VP3 化学量論。連続二倍イオジキサノール勾配により HEK293 細胞から精製された rAAV5 - GFP のカプシド組成は、VP1 / VP2 / VP3 について 1 / 1 / 10 の理論値から逸脱しており、すなわち、より低い VP1 含量であった (図 4C)。さらに、このカプシドは、わずかに高い MW を有するさらなる VP2 カプシドタンパク質を組み込んでいた。対照的に、Sf9 B8 由来のベクターは、より高いレベルの VP1 および VP2 から構成された (図 4C)。rAAV9 について、Sf9 由来のベクターのカプシド組成は、HEK293 細胞で作製されたベクターのものとはほぼ同一であった (図 4D)。rAAV5 とは異なり、両ウイルスサンプルは、VP2 より多くの VP1 を取り込み、カプシド特異的タンパク質分解の産物であり得る VP3 よりも小さいバンドを含むことも明らかである¹⁹。

【0077】

正確な数値を定量化するために、rAAV5 についてのそれぞれのカプシドバンドの密度を、曲線下面積 (AUC) としてプロットした (図 11)。以下の値 (VP3 = 10 の

共通の分母に調整した、2つの独立した実験の平均)を導出した: $HEK293VP1/VP2/VP3 = 0.2/0.5/10$; $Sf9B8VP1/VP2/VP3 = 0.7/1.7/10$ 。計算された化学量論を検証するために、 $rAAV5$ カプシド組成物を、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間(MALDI-TOF)を用いて質量分析によって分析した。

【0078】

MALDI-TOF。ビリオン殻を構成するAAV VPは、それらのVP3 C末端を共有する(図5A、黒色で示す)。VP1(破線)およびVP2(一点短鎖線)のユニークなN末端は、共通の共有VP3ドメインと比較して比較的小さく、それらのユニークなトリプシンペプチドを分析することにより相対的化学量論を読み解くことを困難にしている。従って、差異的 $^{16}O/^{18}O$ 標識アプローチを用いて、同一のペプチドであるがVP1、VP2またはVP3に由来するペプチドを識別した。重酸素の安定同位体である水 $H_2^{18}O$ をトリプシン消化中に使用するとき、2つの ^{18}O 原子がトリプシンペプチドのC末端カルボキシル基で交換され、4Daだけ質量シフトする 20 、 21 。2個の異なるタンパク質に由来する同一のペプチド(例えば、VP1またはVP3)間のこのシフトは、タンパク質の同定および定量を可能にする。

【0079】

パイロット消化を行った後、VP3領域の3つのペプチド(図5A)を選択して、各タンパク質の相対存在量を定量した。2個の ^{18}O 原子の完全な取り込みを、VP3/VP1サンプルおよびVP2/VP3サンプルを別々に試験することによって確認した。その後、 $H_2^{18}O$ 中の全てのVP3消化トリプシン産物の完全なMALDIスペクトルを分析した(図5B)。全てのペプチドは、予測されたペプチド分子量から4Daの質量シフトを示し、2つの ^{18}O 原子が組み込まれていることを確認した。観察された質量シフトが2Daのみの場合、反応が完全でないか、または不完全なトリプシン不活性化からの逆交換が起きたかのいずれかである 20 。図5Cは、別々にスポットされ、MALDI-TOFによって分析されたVP1(元のカラー図では赤色)またはVP3(元のカラー図では青色)のいずれかからトリプシンペプチドTWVLP SYNNHQYR(配列番号48)の重複を示す。VP3サンプルについての4Daの明確な質量シフトは、逆交換は見られず、完全な ^{18}O 原子交換を証明した。図5Dは、 $H_2^{18}O$ で消化され、 $H_2^{16}O$ 中で消化されたVP1と1:1で混合されたVP3の代表的なMALDI-TOFスペクトルを示す。ピーク領域を統合し、各タンパク質の存在量を計算するために用いた。

【0080】

それぞれ3回反復したMALDI-TOF実験において、各タンパク質当たり、3つのユニークなペプチド(図5A)を分析した(表10および11)。これにより、それらの相対存在量の信頼性の高い定量化が可能になった 22 。以下の値(3つの独立した実験の平均、VP3=10の公分母に合わせた)が得られた: $HEK293VP1/VP2/VP3 = 0.4/0.5/10$; $Sf9B8VP1/VP2/VP3 = 1.1/1.7/10$ 。これらの数値は、上記のAUC密度と顕著に一致した。

【0081】

【表 8】

表 10. VP1/VP3イオン、強度および比

イ、 M/Z*	HEK、VP1/VP3				B8、VP1/VP3			
	I	II	III	平均	I	II	III	平均
1464	0.029	0.031	0.022	0.027	0.101	0.13446	0.101408	0.11228932
1677	0.057	0.059	0.018	0.045	0.1123019	0.1475244	0.123	0.12760876
2051	0.04	0.038	0.026	0.035	0.178	0.1548061	0.09411	0.14230537
全体平均値：0.036					全体平均値：0.127			

* M/Zは、質量を電荷で割った値を表す。

10

【 0 0 8 2 】

【表 9】

表 11. VP2/VP3イオン、強度および比

イ、 M/Z*	HEK、VP2/VP3				B8、VP2/VP3			
	I	II	III	平均	I	II	III	平均
1464	0.046521	0.045163	0.037953	0.043	0.177247	0.203963	0.218152	0.1997873
1677	0.045479	0.044517	0.027105	0.039	0.162602	0.178148	0.150699	0.1638163
2051	0.040742	0.031026	0.031464	0.034	0.22123	0.137658	0.165207	0.1746982
全体平均値：0.039					全体平均値：0.179			

* M/Zは、質量を電荷で割った値を表す。

20

【 0 0 8 3 】

完全粒子 / 空粒子の比。このパラメーターを調べて、2つの製造プラットフォームのいずれが、有害な免疫応答の潜在的な発生源およびベクター精製中の技術的課題である、より高い比率で空粒子を生じるかどうかを決定した。rAAV5およびrAAV9は、単一特異性抗体親和性樹脂、rAAV5についてAVBおよびrAAV9についてPOROS Capture Select（商標）を用いた一工程のクロマトグラフィーにより精製した。精製後、ベクターゲノム粒子の力価を、QC-PCRを用いてアッセイした。rAAV5およびrAAV9ベクターの全粒子力価を、金ナノ粒子で装飾されたrAAVカプシドのナノ粒子トラッキング解析（NTA）を用いてアッセイした。この方法は、金ナノ粒子などの高度に光散乱する材料とウイルスカプシドと間の静電引力を利用する。得られた金標識されたウイルス粒子は、光学システムによって視覚化され追跡されるのに十分な光を散乱させ（図6A-6F）、NTAを用いて、AAVのサイズおよび濃度を測定することができる。興味深いことに、両プラットフォームのrAAV9粒子の平均サイズは同一であった（38nmの主要ピーク、図6A、6B）が、HEK293由来およびSf9/B8由来のrAAV5の平均サイズは異なっていた（48nm 対 42nm、図6D、6E）。注目されるのは、これらのサイズは、ウイルス粒子の電荷の関数である、ウイルス / 金ナノ粒子複合体の近似値である。

30

40

【 0 0 8 4 】

全体 - 対 - 完全粒子の比を計算した後、HEK293由来のrAAV9についてこれらの値は2.8であって、Sf9由来のrAAV9については3.1であった（図6C）。同様に、rAAV5について、比は有意には相違しなかった：14.8 対 15.2（図6F）。明らかに、rAAV9について全体的なより低い比は、DNA含有rAAV9粒子の優先的結合および濃縮を示したCapture Select樹脂クロマトグラフィーの精製バイアスに起因した（データ示さず）。

【 0 0 8 5 】

50

インビトロでの形質導入効率。ルシフェラーゼおよびmAppleレポーター遺伝子を組み込んだrAAV導入遺伝子カセット(図10B、pTR-UF50-BC^{2 3})を用いて、形質導入効率を試験するためにSf9 B8細胞株に感染するそれぞれのBEVを生成した。また、同じプラスミドを用いて、HEK293細胞の三重プラスミド同時トランスフェクションによってrAAVを生成した。精製され、サイドバイサイドで滴定された、両方のrAAV5-Luc-mAppleベクターを用いて、HeLa由来のC12細胞株を感染させた^{2 4}。FACS分析(図12A)は、Sf9により産生されたrAAV5ベクターについての形質導入効率よりも顕著に高い(5倍まで)ことを明らかにした。rAAV9について、rAAV9の2つのサンプル間に有意差はなかった(図12B)。両方の実験からのデータは、タンパク質含有量と一致する。

10

【0086】

インビボでの形質導入効率(図7)。HEK293細胞およびSf9 B8細胞で産生されたrAAV5-Luc-mAppleを、マウスの脳(線条体)においてインビボでアッセイした。注入の3週間後、形質導入効率を生物発光(BLI)により決定した(図7A)。Sf9 B8由来のAAV5を注入された動物は、HEK293由来のAAV5よりも4倍高いBLIシグナル強度を示した(図7B、それぞれ $4.3 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$ 、および $1.1 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^4$)。同様に、脳切片の蛍光分析は、HEK293と比べて、Sf9 B8由来のサンプルにおいてより強いmAppleシグナルを示した(図7C)。

【0087】

20

HEK293細胞およびSf9細胞で産生されたrAAV5ベクターの次世代シーケンシング(NGS)解析。より高い効力のrAAV5ベースのベクターの産生のための改善されたOneBacシステムを確立するために、HEK293細胞における標準トリプル同時トランスフェクションプロトコルによって製造されたか、または安定なrep2cap5 Sf9細胞株B8の単一のBEV-UF26感染により製造された、カプシド化ssDNA(pTR-Bac-UF26、図10A)の比較NGS解析を行った。NGS解析の目的は、rAAVカセット特異的なDNA種、ならびに副次的にパッケージされた混入DNA種を特徴付けることであり、そのために、GMPグレードのrAAVベクター産生の要求を満たす好ましいプラットフォームを確立した。全てのNGSライブラリーを調製し、配列決定し、デュプリケートで分析した。一般的なワークフローは、フローチャートに示されている(図13)。以下のパラメーターが分析されている。

30

【0088】

混入DNA配列の副次的パッケージ。

フィルタリング後、インデックスに割り当てられたリード総数は757,433,116であった。対照配列に対してリードをアライメント後、rAAVカセットのカバレッジ(coverage)は、2,260,074リード数/nt(nt位置2,000)に高まった。副次的にパッケージされた配列に関して、カバレッジは顕著に低かった:10,781リード数/nt(nt位置1,299、ベクター骨格)、または6,424リード数/nt(nt位置200、AcMNPVゲノム)。

【0089】

40

両方の産生プロトコルについて、大部分のリードは、すべてのカプシド化されたDNA配列の96.5%(HEK293)および99.4%(Sf9)を占めるrAAV-Bac-UF26カセットであった(表12、図8A、8B)。HEK293システムの混入DNAの大部分は、低レベルのrep2/cap5ヘルパー配列(0.7%)およびヒトゲノムDNA(0.17%)を含む細菌プラスミド骨格(2.5%)であったが、一方、Sf9調製物中の混入物質は、シャトルプラスミド骨格(0.3%)およびAcMNPVゲノム(0.2%)であった。Sf9由来のrAAV5については、近年、ATCCから得られたSf9細胞株から単離された外来性の(adventitious)ラウドウイルス(Sf-ラウドウイルス)と相同であることが見いだされたリードはなかった^{2 5}。

【0090】

50

副次的にパッケージされた配列は、r A A Vカセットおよびそのそれぞれの骨格：H E K 2 9 3細胞について細菌プラスミド、およびS f 9細胞についてバキュロウイルスゲノム、の即時の連結によってより豊富に表示された。注目すべきことに、2つのシステム間のジャンクションリードのカバレッジにおいて少なくとも10倍の有意な差があり、それにより、H E K 2 9 3細胞が、より高い頻度で左右の両方のA A V末端リピートからより離れた細菌プラスミド骨格配列をカプシド化することが明らかであった（図8 C、8 D）。従って、混入DNA配列の解析は、H E K 2 9 3細胞について3.5%に対して、カプシド形成されたベクターゲノムの0.6%のみが外来DNAを取り込むことにより、O n e B a cシステムがより正確に送達し、より高品質のr A A Vベクターを提供することを示唆する。

10

【0091】

【表10】

表12. H E K 2 9 3およびS f 9細胞におけるr A A V 5－U F 2 6の特異的および副次的パッケージの分析*

HEK 293			Sf9		
対照ゲノム	NGSライブラリー		対照ゲノム	NGSライブラリー	
	PCRフリー	PCR		PCRフリー	PCR
UF26カセット	96.50	95.24	UF26カセット	99.44	99.25
	96.59	95.38		99.45	99.29
ベクター骨格	2.58	3.49	ベクター骨格	0.30	0.42
	2.52	3.39		0.30	0.42
pHelper	0.04	0.04	AcMNPV	0.22	0.29
	0.04	0.04		0.21	0.25
rep2cap5	0.71	1.00	cap5	0.009	0.002
	0.68	0.97		0.009	0.002
			rep2	0.005	0.001
				0.006	0.001
ホモ・サピエンス	0.17	0.22	ヨトウガ	0.026	0.040
	0.17	0.22		0.025	0.041

20

30

*精製されたビリオン中のDNAの相対含量は、NGS解析によって同定された全配列の割合として示される。全てのNGS解析は、2つの平行した行において各対照ゲノムについてデュプリケートで行われた。

【0092】

r A A Vゲノムカバレッジ。NGSライブラリーを作製するために8サイクルのPCR増幅工程のみを含む標準プロトコルを用いて、いくつかの配列がC B Aプロモーター内で同定され、下流イントロンがA A Vカセットの残りと比べて、少なくとも10倍低い配列決定カバレッジを示した。厳密な試験により、これらの配列が顕著にG Cリッチであることが明らかとなった（図8 A、8 B）。この比較的低いカバレッジは、DNA複製中の短縮化のために、パッケージされたビリオン中のこれらの配列のより低い表示を反映している可能性がある。あるいは、この低下は、PCR関連NGSライブラリー調製によって導入された人工的な効果である。第2の可能性を排除するために、NGSライブラリーを、PCR増幅せずに精製したカプシド化したr A A V DNAから直接調製した。このようにして、目的の配列のカバレッジはカセットの残りの部分に匹敵するレベルに回復した。従って、H E K 2 9 3細胞およびS f 9細胞は両方とも、短縮化の証拠がほとんどなく、全長r A A Vカセットのパッケージを支持する。

40

【0093】

50

r A A V - B a c - U F 2 6 カセットのゲノム同一性。A A V カセットの高い配列決定深度は、そのそれぞれの親細菌プラスミドに対するパッケージされた D N A の配列同一性および相関の詳細な分析を可能にした。誤った呼び出し (call) の可能性を減らし、一塩基多型 (S N P) 分析の信頼性を高めるために、P C R フリーサンプルの N G S データのみを利用した。両ウイルスサンプルならびに陽性対照プラスミドサンプルからの D N A の S N P 変異体は、置換の顕著に類似したプロファイルを示した (相関係数 0 . 7 5 - 0 . 7 7) (図 9 A)。興味深いことに、S N P の大部分が、G C 含有が豊富な領域として上記で同定された非コーディング配列：ニワトリ β アクチンプロモーターおよびイントロン配列と共局在していた (図 9 B)。さらに、および Lecomte ら^{2 6} と一致して、A A V T R は、比較的高い S N P 変動性を示した。

10

【 0 0 9 4 】

昆虫細胞で製造された A A V 5 および A A V 8 血清型の r A A V ベクターの相対的に低い効力は、Urabe ら^{1 0} および Kohlbrener ら⁹ により以前に報告されている。その後、多くの他の O n e B a c 由来の A A V 血清型が、2 9 3 由来の A A V と比べて低い感染力により特徴付けられることが示された^{2 7}。全ての影響を受けた血清型の統一の原因は、カプシドヘルパー遺伝子の改変型配列であって、結果としてホスホリパーゼ A 2 活性を組み込んだ V P 1 カプシドタンパク質のより低い含有量がもたらされる。予期されるように、推奨される解決策は、異なる開始コドンである C U G^{1 1} または人工イントロン⁸、^{1 2}を用いることによってこの問題を緩和することを目的とした。新しいデザインがいくつかのベクターの感染力を増加させるのに役立ったとしても、その解決策は、血清型特異的配列の調整に必要なフレキシビリティがないようであった。

20

【 0 0 9 5 】

カプシドの相対的 V P 1 / V P 2 含有量を増加させるための新しい方法が本明細書に記載されている。これは、V P 1 A U G 開始コドンに先行する標準的 K o z a k 配列を改変することにより達成される。原理の証明のため、最も好ましい翻訳開始部位が、H E K 2 9 3 由来の対応物の形質導入効率を上回る r A A V ベクターを血清型特異的に産生することを示す、A A V 5 および A A V 9 血清型についてある範囲の K o z a k 配列を試験した。しかしながら、記載された方法は、異なる血清型についても変化する相対的な T I S 効率の狭いウインドウにおける V P 1 K o z a k 配列の微調整を必要とする。この変化の理由の 1 つは、V P 1 : V P 2 : V P 3 比が、V P 1 T I S の相対的効率だけでなく、すべての血清型についても異なる V P 2 および V P 3 T I S の相対効率にも依存することである (表 1 3)。さらに、V P 1 : V P 2 : V P 3 比が理論値である 1 : 1 : 1 0 から大幅にシフトすると、ウイルスの収量が急激に減少するため、意図的に任意の閾値を上回る V P 1 含有量に増加させること (例えば、図 4 B、レーン 1 および 6) は、逆効果であるようである。特定の用途のための特異的 T I S が経験的に同定され得るという理解の下で、当業者は、' コンセンサス ' V P 1 T I S : U (C) A (C / G) U (G) U G (U) U A U G G (配列番号 5 0) を導き出すことができる。

30

【 0 0 9 6 】

【表 1 1】

表 1 3. AAV血清型におけるVP 1、VP 2およびVP 3 開始コドンの周りの翻訳開始配列

AAV 血清 型	V P 1 O R F			V P 2 O R F			V P 3 O R F		
	上流	Kozak TIS 、 %	下流	上流	Kozak TIS、 %	下流	上流	Kozak TIS 、 %	下流
1	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA G	ACG	GC	ACTAC A	ATG (115)	GC
2	TCAGG T	ATG (133)	GC	GTAA G	ACG	GC	AATAC G	ATG (114)	GC
3	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA A	ACG	GC	AATAC A	ATG(108)	GC
4	CCAGA T	ATG (99)	AC	GGTGA G	ACG	GC	AGTGA G	ATG (80)	CG
5	GTAAG C	ATG (91)	TC	GCTAA G	ACG	GC	GATAC A	ATG (114)	TC
6	TTTAAA	ATG (126)	GC	GCTAA G	ACG	GC	ACTAC A	ATG (115)	GC
7	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA G	ACG	GC	GGTAC A	GTG*	GC
8	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA G	ACG	GC	AATAC A	ATG (108)	GC
9	TCAGG T	ATG (133)	GC	GCTAA G	ACG	GC	CTTAC A	ATG (129)	GC
10	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA G	ACG	GC	GGTAC A	ATG (113)	GC
11	CCAGG T	ATG (130)	GC	GCTAA A	ACG	GC	ATTGA A	ATG (81)	CG

*は、AAV血清型カプシド遺伝子の配列アラインメントによって推定される、AAV 7における推定代替開始コドンVP 3を示す。K o z a k T I Sの相対強度は、開始コドンの次の%で表される¹⁸

【 0 0 9 7 】

分析のために選択された r A A V 5 構築物において、相対的 V P 1 含有量の数値は、H E K 2 9 3 由来のベクターにおける 0 . 2 - 0 . 4 (2 つの独立したアッセイによる) から S f 9 細胞における 0 . 7 - 1 . 1 まで増加した (すなわち、平均 3 倍増加した) 。 V P 2 について、これらの値は、0 . 5 から 1 . 7 に増加し、同様に 3 倍増加であった。 V P 2 の同時増加は、r A A V 5 V P 1 の相対的増加の予期しない影響の 1 つであった。 V P 1 および V P 2 の両方の N 末端には、A A V がそのゲノムを核内に送達し、その後細胞に形質導入するのに有用な保存的核局在配列 (N L S) モチーフを表す、いわゆる塩基性領域 3 (B R 3 、 P K R K K A R T (配列番号 5 1)) を組み込む^{2 8 - 3 0}。従って、各 V P 1 および V P 2 の 3 倍の増加が、より感染性のウイルスの収量を増加させることは驚くべきことではない。

【 0 0 9 8 】

上記のデータには、最近記載された O n e B a c 2 . 0 ⁸ および現在のシステムで製造された r A A V 5 および r A A V 9 の直接比較は含まれない。しかしながら、当業者は、それぞれのカプシド比を関連付け、これらの血清型について、新たに設計された c a p ヘルパー遺伝子が、A A V 5 および A A V 9 カプシドの両方の化学量論を顕著に改善させ、より高い効率のウイルスベクターに翻訳されることを結論付けることができる。

【 0 0 9 9 】

別の予期せぬ発見は、H E K 2 9 3 細胞およびS f 9 細胞によって提示されたパッケージ効率の類似性であって、完全 - 対 - 空の粒子比の代替パラメーターによって評価された。1 : 2 . 5 の r e p / c a p 発現カセットの以前に同定された比を用いて、安定なプロデューサー細胞株を構築し⁷、H E K 2 9 3 と同様に、パッケージ効率を達成した。

【 0 1 0 0 】

多くの臨床治験が進行中であり、異なるプロトコルによって製造された r A A V 株 (stock) の遺伝的同一性を評価することは、規制上の重大な課題となっている。多くのグループが、パッケージ宿主細胞^{2 6}、^{3 1}、^{3 2}、細菌ヘルパープラスミド骨格^{2 6}、^{3 3}、ヘルパーウイルス⁸、^{3 2}、および w t A A V r e p / c a p 配列^{2 6}、^{3 4}に由来する配列の副次的なカプシド形成を報告している。パッケージされた r A A V カセットの遺伝的同一性を評価するために、カプシド化された一本鎖ウイルスDNAのNGS分析が行われた。パイロット分析は、両プラットフォームでほぼ同一であるGC富化配列における該カセットの不均一な配列カバレッジを示した。PCRフリープロトコルを利用することにより、カバレッジの低下は、明らかに、ライブラリー調製中のPCR誘導性人工物に起因し、短縮型 r A A V ゲノムのパッケージが原因でないことが示された^{3 5}、^{3 6}。NGSライブラリー調製のためのPCRベースの方法の精度は、とりわけ逆位末端反復 (I T R) などのGCに富むパリンドロームでのA A V 関連解析には適切ではない^{3 7}、またはGC富化配列に適用される^{3 8}といくつかのグループによって調べられた。従って、r A A V ベクター調製物のNGS解析は、適当なプロトコルを用いて行われるべきである。

【 0 1 0 1 】

両プラットフォーム由来のウイルスDNAの遺伝的同一性の分析は、昆虫細胞 対 ヒト細胞においてカプシド化された r A A V DNA 間に有意差を示さなかった。しかしながら、注目すべきことは、H E K 2 9 3 細胞をトランスフェクトするために用いられる p T R - B a c - U F 2 6 プラスミドDNAプールの配列の、データベース中のこのプラスミドの配列とのずれという本明細書に記載された事実である。プラスミドDNAのそのような遺伝的浮遊の事実は、驚くべきことであるが、以下のメカニズムによって説明することができる。r A A V カセット含有プラスミドを、A A V I T R の完全性を維持するために大腸菌の組換え欠損株において増殖させる。これらの株は、非標準的な二次および三次構造の再構成および消失を触媒する経路の成分 (e n d A 、 r e c B r e c J) を欠く。その結果、プラスミドDNAは、ミスマッチ修復系によって修復され得るミスマッチ塩基および点突然変異を蓄積する。DNAにおけるミスマッチは、修復されなければ、自然突然変異頻度が高いという結果になる。従って、トランスフェクション中、変異したプラスミドDNAは、宿主H E K 2 9 3 細胞核にそのヘテロ二重鎖 “ インプリント ” 構造を有し、ここで、それは修復された^{3 9} または複製された変異の複製物である。従って、同時トランスフェクションプロトコルにおけるプラスミドDNAプールは、いくつかのGCに富む配列にとって実質的であり得るカプシド形成されたA A V カセットへの大腸菌の突然変異の導入頻度が高いものをいくつか含む。興味深いことに、G F P レポーター c D N A は、その合成 “ ヒト化 ” 複製起点を反映し得る、最小限の変異を有する (図 8 A)^{4 0}。この点に関して、その免疫原性関連作用に加えて^{4 1}、r A A V カセットから C p G モチーフを枯渇させることは、親プラスミドDNAの遺伝的安定性を高めるのに役立つかもしれない。

【 0 1 0 2 】

2 つのプラットフォームにより製造された r A A V カセットの直接的なサイドバイサイドNGS解析は、予期せず、昆虫細胞におけるウイルスDNAパッケージが高い精度であり、混入DNAがかなり少ない量でカプシド化されること (0 . 6 % 対 3 . 5 %) を明らかにする。この6倍の減少は、当業者が、FDAガイドラインの “ 細胞基質DNA残存量が1用量あたり10 n g 以下でなければならない ” との記載を考慮するとき、重要であると思われる (f d a . g o v / d o w n l o a d s / A d v i s o r y C o m m i t t e e s / C o m m i t t e e s M e e t i n g M a t e r i a l s /

10

20

30

40

50

BloodVaccinesandOtherBiologics/VaccinesandRelatedBiologicalProductsAdvisoryCommittee/UCM319573.pdf)。

【 0 1 0 3 】

現在の r A A V を用いる臨床治験を考慮すると、用量が 6×10^{13} v g / k g まで高くなると^{4 2}、^{4 3}、ベクターは、H E K 2 9 3 細胞で産生された場合、F D A ガイドラインを超える量の混入 D N A を取り込み得る。ここで、O n e B a c システムを用いて産生された r A A V 5 ベクターは、顕著により感染性であり、同時に、より少ない量の外来 D N A をカプシド形成することが示された。従って、この産生方法は、その有効用量を低下させ、安全性を向上させることにより、ベクター投与の可能性のある治療結果を改善する。

10

【 0 1 0 4 】

材料および方法

以下の非限定的な材料および方法を、本明細書に記載のいくつかの実験に関連して用いた。これらの、または他の材料および方法は、本明細書に記載の態様と関連して用いることができる。

【 0 1 0 5 】

H E K 2 9 3 細胞における r A A V 5 および r A A V 9 産生

r A A V 5 および r A A V 9 ベクターは両方とも、既報の三重同時トランスフェクト法^{4 4}により産生された。r A A V カセット (r A A V 5 - B a c - U F 2 6、または r A A V 5 - U F 5 0 - B C、ならびに r A A V 9 - B a c - U F 2 6、図 1 0 A - 1 0 B) を有するプラスミドを、p H e l p e r および p R e p 2 C a p 5 (または、p R e p 2 C a p 9) と 1 : 1 : 1 モル比で組み合わせて用いた。r A A V 5 および r A A V 9 の両方を、連続 2 回のイオジキサノール浮遊密度勾配遠心分離 (sequential double rounds iodixanol buoyant density centrifugation) を用いて精製した。具体的には、完全粒子を含有する第 1 ラウンドのイオジキサノール画分を $1 \times$ PBS - M K 緩衝液で 2 . 5 倍に希釈し、標準勾配で 1 5 % のイオジキサノール - 1 M N a C l 工程のかわりに用いた^{4 4}。

20

【 0 1 0 6 】

S f 9 細胞における r A A V 5 および r A A V 9 産生

B a c - U F 2 6、または U F 5 0 - B C r A A V カセットを、p F a s t B a c 骨格に挿入し、それぞれの B E V を B a c - t o - B a c システムガイドラインに従って誘導した。既報⁷の通りに、ブランク精製した B E V を P 3 に増殖させ、ブランクアッセイにより滴定し、そして r e p 2 c a p 5 または r e p 2 c a p 9 誘導性ヘルパー遺伝子を有する S f 9 ベースの安定な細胞株を感染させるために用いた。回収時、凍結融解溶解物をベンゾナーゼで処理し、2 0 , 0 0 0 g で 3 0 分間の高速遠心によって清澄化した。上清を、H E K 2 9 3 により製造された A A V について上記の通りに精製した。

30

【 0 1 0 7 】

r A A V 5 および r A A V 9 の一工程精製。r A A V 5 を、既報^{4 5}のとおり、A V B セファロース 高速親和性クロマトグラフィー樹脂 (G E H e a l t h c a r e) を用いて、清澄化された粗溶解物から精製した。r A A V 9 を、P O R O S C A P T U R E S E L E C T (商標) A A V 9 樹脂 (T h e r m o F i s h e r) を用いて一工程親和性クロマトグラフィーにより粗溶解物から精製した。具体的には、清澄化された粗溶解物を重力下で樹脂 0 . 5 m l を含むカラムに適用し、その後、該カラムを 1 0 倍のカラム容量の $1 \times$ P B S で洗浄し、次いで 1 m l の溶出緩衝液 : 5 0 m M クエン酸緩衝液 p H 3 . 0 - 1 M N a C l で洗浄した。溶出された r A A V 9 を、0 . 1 m l 1 M T r i s H C l p H 8 . 4 で直ちに中和した。

40

【 0 1 0 8 】

r A A V 滴定 (力価測定)

r A A V ベクターの直接比較分析には、それぞれのウイルス力価の正確な予測が必要である。4 つの独立したアッセイを用いて、H E K 2 9 3 または S f 9 細胞に由来する r A

50

AVを力価測定した：1) BioRad QX200 Digital PCRシステムを用いて対照標準を確立する、Droplet Digital PCR (ddPCR)⁴⁶；2) iTaq (商標) Universal SYBR (登録商標) Green Supermixキット (BioRad、1725121) および qPCR BioRad CFX Connect RealTime システムを用いる、定量的競合PCR (QC-PCR)；3) ピコグリーンベースのプロトコール⁴⁷、および4) rAAV粒子の力価およびサイズを定量化する、NanoSight 300 (NS-300、Malvern Instruments、Malvern、UK)を用いるナノ粒子トラッキング解析 (NTA)。各プロトコールの条件を確立し、ddPCRによる対照標準を用いた後、プロトコール2)および3)から計算した力価は、常に、2倍以内であり、平均して作用力価を得た。簡潔には、以下の手順に従った。

10

【0109】

ddPCR . 0.05%ブルロニックF-68を補充した1x乳酸リンゲル (LR) 溶液を用いて、反応当たり1~10³ ウイルスゲノムコピーの範囲内で3組の希釈物のセットを調製した。DdPCRを以下のプライマーを用いて行った：TM_CMV_F 5' - ATAGGGAC TTTTCCATTGACGTC - 3' (配列番号52)、TM_CMV_R 5' - TGATACACTTGATGTACTGCCAAG - 3' (配列番号53)、TM_CMV_プローブ FAM 5' - TGGGTGGACTATTTACGGTA AACTGCC - 3' BHQ (配列番号54)。

【0110】

QC-PCR . 標準曲線を得るために、rAAV-UF26導入遺伝子カセットを、それぞれのプラスミドpTR-Bac-UF26のSmaI消化後にゲル精製した。回収したDNAをおよそ1ng/μlの濃度に希釈し、正確な濃度をQUBIT dsDNAアッセイにより決定した。高度に精製されたSf9またはHEK 293より産生されたrAAVの直接的QC-PCR滴定を、同じプライマーセットを用いて、対照rAAVサンプル (ddPCR) およびゲル精製されたrAAVカセット (QC-PCR) の10倍連続希釈によって作成された標準曲線を用いて行った。

20

【0111】

ピコグリーンベースのアッセイを、既報⁴⁷のように、標準曲線を較正するためにLambda DNA標準を用いて、Quanti-iT PicoGreen dsDNAアッセイキット (Life Technology、P7589) により行った。光学密度を、Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor Vにより測定した。

30

【0112】

NTA . NTA解析の前に、ウイルスストックの力価をPAAGゲル電気泳動によって評価した。およその力価を知ると、LR緩衝液で希釈した50μlのAAVストック液を、標識緩衝液 (20mM クエン酸、pH 3.5、0.1%ブルロニックF68、1mM NaCl) および金ナノ粒子 (Sigma、カタログ番号 741949) を含む標識ミックスに添加した。室温 (RT) で30分間インキュベーション後、金標識したAAVを、標識緩衝液で終濃度5x10⁸ - 3x10⁹ 粒子/mLまで希釈した。AAVを含まない標識ミックスおよび金を含まない標識緩衝液中のAAVを陰性対照として用いた。測定を以下の設定を用いて、NS-300装置を用いて行った：レーザータイプ - Blue 488、カメラレベル - 15、フレーム数 - 749、記録時間 - 30秒、記録数 - 各データ点毎に3つ。NS-300によって生成された少なくとも4つのデータ点を用いてAAV力価を計算した。

40

【0113】

MALDI-TOF . VP1、VP2およびVP3バンドをSDS-PAAGから切り出し、トリプシン消化のために調製した。カプシドタンパク質を、製造者推奨プロトコルを用いてPromega (Madison WI) のシーケンシンググレードのトリプシンを用いてゲルスライス内で消化した。簡潔には、バックグラウンドポリアクリルアミド材料を最小限に抑えるために、バンドを可能な限りそれに近くトリミングした。次いで、ゲル片

50

をナノピュアH₂O中で5分間洗浄した。洗浄工程を2回繰り返した後、各サイクル10分間の1:1 v/vのメタノール:50 mM 重炭酸アンモニウムでの脱染色を2サイクル行った。ゲル片を、1:1 v/vのアセトニトリル:50 mM 重炭酸アンモニウムで脱水した。ゲルスライスを再水和し、ジチオスレイトール(DTT)溶液(100 mM 重炭酸アンモニウム中25 mM)と共に30分間インキュベートした後、100 mM 重炭酸アンモニウム溶液中55 mMのヨードアセトアミドを添加した。ヨードアセトアミドを暗闇下でゲルスライスと共に30分間インキュベートした。ゲルスliceを再度、2サイクルのH₂Oで洗浄し、1:1 v/v アセトニトリル:50 mM 重炭酸アンモニウムで脱水した。0.01% protease MAX界面活性剤中12 ng/mlのトリプシン中で、5分間、再水和することによりゲル片内にプロテアーゼを導入した。その後、該ゲル片を、40 µLの0.01%のprotease MAX界面活性剤:50 mM 重炭酸アンモニウム上に置き、振とう機で1時間穏やかに混合した。0.5% TFAの添加により消化を停止させた。MS分析を、高品質のトリプシンペプチドで最小限の非特異的切断を確実にするために直ちに行うか、またはサンプルを分析するまで-80℃で凍結させた。protease MAX界面活性剤以外は同じ方法で¹⁸O-標識した消化を行い、トリプシンをH₂¹⁸O中で調製した。逆交換を防ぐために、トリプシンを100℃で15分間インキュベートすることにより不活性化した。VP3をH₂¹⁸Oを用いて消化し、一方で、VP1を通常のH₂¹⁶O中で消化した;消化産物を1:1で混合し、MALDI-TOFにより分析した。VP2/VP3についても同様の分析を行った。

【0114】

MALDI-TOFは、Bruker Daltonics Microflex LRF質量分光計(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)にて、N2レーザーを用いて、リフレクトロン(reflectron)のポジティブイオン(正イオン検出)モードで操作して行った。レーザー出力は、シグナルを生成するのに必要な閾値レベルで用いた。この機器を、アンギオテンシンII、アンギオテンシンI、サブスタンスP、ボンベシン、ACTHクリップ1-17、ACTHクリップ18-39、ソマトスタチン28、ブラジキニンフラグメント1-7、~700 Da-3200 Daの質量範囲のブタ(porcine)のレニン基質であるテトラデカペプチドの混合物である、ペプチド校正標準II(Bruker Daltonics)で校正した。α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸をマトリックスとして用い、50% ACN/0.1% TFA(H₂O中)中の飽和溶液として調製した。1 µLのマトリックスおよび1 µLのサンプルの分液(aliquot)を完全に混合した;これの0.5 µLを標的プレート上にスポットし、乾燥させた。

【0115】

インビトロ形質導入アッセイ。rAAV5-Bac-UF26およびrAAV9-Bac-UF26を、MOIが2,000でrAAVを感染させ、MOIが5でAd5を共感染させたC12細胞²⁴を用いてアッセイした。感染の48時間後、mApple蛍光が陽性の細胞を、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって計数した。

【0116】

AAV注射

全ての動物実験手順は、フロリダ大学動物実験センター(University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee)の承認を受けている。4~5週齢のメスのBALB/c(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME USA)マウスをこの実験に用いた。

全ての外科的処置は、無菌操作およびイソフルランガス麻酔を用いて行った。脳外科手術は既報の通りに行った²³。簡潔には、麻酔した後、マウスを定位フレーム(Kopf Instruments, Tujunga, CA)に入れ、2 µlのHEK-または8B-由来のrAAV5-UF50-BCベクター(4.75 × 10¹¹ v.g/ml)のいずれかを、30-40 µmの内径を有するガラス製マイクロピペットを通して、0.5 µl/分の速度で、右線条体(座標:前方(anterior)-後方(posterior)-0.3 mm、外側(lateral)-2.0 mm、背腹側(dorsoventral)-3.0 mm)に注射した。針を脳から抜く前に、

5 分間その場に留置した。

【0117】

生物発光イメージング

マウスを既報の通りに画像化した^{2 3}。D - ルシフェリン (P B S 中 1 5 m g / m L、1 2 6 m g ルシフェリン / k g 体重) の腹腔内注射の 1 2 分後に、生物発光測定を、X e n o g e n I V I S L u m i a インビボイメージングシステム (PerkinElmer、Walt man、MA) を用いて目的の領域 (region-of-interest) の分析から得た。3 匹のマウスを、2 5 c m の視野で同時に画像化した。中間感度の (medium) ピニングで 6 0 秒の撮影時間およびエフストップ (f-stop) = 1 を、カメラ設定に用いた。各データセットに表示された画像は、適当な色強度スケールに正規化された。B L I データは、電荷結合素子検出器に到達する総カウント数として生データとして報告される。

10

【0118】

脳組織調製および蛍光イメージング

マウスをペントバルビタール (Beuthanasia-D) で深麻酔し、1 0 m l の生理食塩溶液、次いで、0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) 中 1 0 m l の氷冷 4 % パラホルムアルデヒド (P F A) で上行大動脈を灌流した。脳を取り出し、P F A 中、4 で一晩固定化した。6 0 マイクロメートル厚の冠状切片をビブラトームステージ V T 1 0 0 0 S (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany) で切断した。可変モードレーザースキャナー (Typhoon 9200、GE Amersham、Pittsburgh、PA、USA) により、または倒立顕微鏡 D M I 4 0 0 0 B (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany) を用いて m A p p l e 蛍光を分析した。

20

【0119】

N G S 解析

N G S を、H i S e q 3 0 0 0 装置 (Illumina、San Diego、CA) およびペアエンドシーケンシングを用いて、U F I C B R コアにより実施した。選択された N G S プロトコールの再現性を実証するために、全ての D N A サンプルをデュプリケートで調製した。同様に、N G S ライブラリー合成、シーケンシングおよびバイオインフォマティクスのすべてのステップを並行して、デュプリケートで行った。

【0120】

H E K 2 9 3 ベースの産生のための対照 D N A は、r A A V ストックを汚染する可能性のある全ての D N A 配列を含んだ：ヒトゲノム配列 (H E K 2 9 3、G R C h 3 8 . P 9、ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.35 または R e f S e q アセンブリ受託：GCF_000001405.35)；アデノウイルスヘルパープラスミド (pHelper、GenBank：AF369965.1)；A A V 2 R e p および A A V 5 V P タンパク質 (r e p 2 c a p 5) をコードする p A C G r 2 c 5、ならびにそれぞれのプラスミド骨格。S f 9 ベースの産生については、以下の配列を分析した：ヨウトガ (S . frugiperda) ゲノム (JQCY02.1.fsa_nt.gz、GenBank：JQCY00000000.2)；A c M N P V ゲノム (GenBank NC_001623.1)；S . frugiperda ラブドウイルス単離体 S f (GenBank KF947078.1)；FastBac シャトルプラスミド骨格、ならびに A A V 2 R e p および A A V 5 V P をコードする配列。

30

【0121】

P C R フリーおよび P C R 濃縮オプションの両方を含む A C C E L - N G S (登録商標) 2 S P C R - フリー D N A ライブラリーキット (Swift Biosciences、Ann Arbor、MI) を利用して、N G S ライブラリーを作製した。精製した r A A V 粒子の十分な D N A s e 処理および二本鎖 (d s) D N A 合成を、Lecomte ら^{2 6} の文献に記載のプロトコールに僅かな修正を加えて行った。簡潔には、 4×10^{11} のベクターゲノム (v g) を含む粒子を、ベースライン Z E R O および P l a s m i d - S a f e のエキソヌクレアーゼで、次いで、プロテイナーゼ K および R N A s e A 処理により十分に処理した。D N A を、2 : 1 のビーズ : D N A 比を用いて M a g - B i n d R x n P u r e P l u s キット (Omega Bio-Tek、Norcross、GA) を用いて精製した。D N A p o l I を用いて第 2 鎖を合成後、D N A を C o v a r i s 装置を用いて超音波処理した。D N A せん断のために以下

40

50

の設定を用いた：標的サイズ 400 bp、ピーク出力増加 - 175 W、デューティ比 (duty factor) - 10 %、パースト当たりのサイクル数 - 200 ; 時間 - 38 秒、水位 - 15、水温 - 7.6 ~ 7.8、および反応容積 - 47 μ L。せん断されたインプット dsDNA および合成された NGS ライブラリーのプロファイルを図 14 に示す。Sf9 細胞および HEK293 細胞に由来する rAAV DNA のサンプルは、NGS ライブラリー調製中の各段階において同様のプロファイルおよび品質を示した。ライブラリー調製の全段階において、DNA 品質を、テープステーション (Agilent) および Qubit (Thermo Fisher Scientific) によりモニタリングした。PCR フリーの NGS ライブラリーの合成のために、220 ng の dsDNA をせん断して、200 bp のオプションインプットの標的サイズにした。PCR 富化ライブラリーについて、ライゲーション工程 2 の後の DNA の 10 % を、製造業者の推奨に従って 8 サイクル増幅させた。最後に、全てのライブラリーを 1x Mag-Bind ビーズで精製した。

【0122】

バイオインフォマティクス分析

バイオインフォマティクスワークフローのフローチャートを図 15 に示す。Fastq ファイルを、そのデフォルト設定でスーパーコンピューティングクラスターで使われるように改変された専用のオープンソースソフトウェア Contavect v2.0²⁶ を用いて分析した。Contavect のコードは、ジョブスケジューラ (job scheduler) によって管理されるバッチ環境で最大の効率およびスループットを得るために、blastn ツールおよび bwa ツールの実行を適切にスケールするように適合された。変更の 1 つは、コンピューターを起動するノード (computing node) 上の CPU コアの総数に等しいスレッド数で常に blastn と bwa を実行する Contavect の制限に関連していた。共有コンピューティング環境においてパーソナルワークステーションで使用する時、この仮定が有効な場合もあるが、一般的に、スレッド数はバッチ処理 (batch job) に要求されたかまたは仮想マシン内で利用可能な CPU コア数と等しくなければならない。そうでなければ、問題のプログラムの効率は、分析のスループットを大幅に低下させる。Contavect のコンフィグレーションファイルにおいてスレッド番号が 0 に設定されているとき、新しい改変により、互換性のために古いモデルを使用できるようになったが、現行の Contavect は、指定されたスレッド数で blastn と bwa を実行できる。デフォルトでは 1 つのスレッドが使用される。さらに、MATPLOTLIBRC 環境変数を介して環境にエクスポートできるオプションの構成ファイルが追加されて、Contavect を、X11 環境を使用しないクラスターノードで駆動するとき、失敗なく matplotlib を用いてグラフを生成できるようにする。上記の変更により、分析は、UF Research Computing HiPerGator スーパーコンピューターで成功裏 (正常) に完了し、データに対する Contavect の実行時間は、数日から数時間に短縮された。全ての変更は、GitHub コードの Pull Request (プルリクエスト) として以下のリポジトリ: github.com/a-slide/Contavect and github.com/a-slide/pyDNA において Contavect の作成者に提出された。記載されている全ての適合が承認され、ソースコードに組み込まれている。SNP 変異体は、BAM ファイルから、高深度カバレッジの配列解析に利用される Java ベースのアプリケーション (github.com/lindenb/jvarkit/wiki/MiniCaller) である MiniCaller ソフトウェアにより検索された。HEK293 または Sf9 rAAV ライブラリーのための MiniCaller により作成された VCF ファイル、ならびに陽性対照ライブラリー (各デブリケート) を、GenBank の対照分子とアライメントした。VCF ファイルの解析は、CSV ファイルを生成する Python スクリプト (nbviewer.ipynb.org/github/a-slide/iPython-Notebook/blob/master/Notebooks/VCF_analysis.ipynb) により実行された。VCF ファイルおよび CSV ファイルは、Dryad Digital Repository から入手可能である: bio.rc.ufl.edu/secure/zolotukhin/genther/; ユーザー名: "genther"、パスワード: "KrAkkegZ8F"。

【0123】

参考文献

1. Girod, A, Wobus, CE, Zadori, Z, Ried, M, Leike, K, Tijssen, P et al. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 83: 973-978.
2. Rose, JA, Maizel, JV, Jr., Inman, JK & Shatkin, AJ. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol* 8: 766-770.
3. Johnson, FB, Ozer, HL & Hoggan, MD. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J Virol* 8: 860-863.
4. Buller, RM & Rose, JA. (1978). Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J Virol* 25: 331-338. 10
5. Snijder, J, van de Waterbeemd, M, Damoc, E, Denisov, E, Grinfeld, D, Bennett, A et al. (2014). Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by Orbitrap mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 136: 7295-7299.
6. Urabe, M, Ding, C & Kotin, RM. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13: 1935-1943.
7. Aslanidi, G, Lamb, K & Zolotukhin, S. (2009). An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5059-5064.
8. Mietzsch, M, Casteleyn, V, Weger, S, Zolotukhin, S & Heilbronn, R. (2015). OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV5 Vectors with Enhanced Infectivity and Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther* 26: 688-697. 20
9. Kohlbrenner, E, Aslanidi, G, Nash, K, Shklyayev, S, Campbell-Thompson, M, Byrne, BJ et al. (2005). Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther* 12: 1217-1225.
10. Urabe, M, Nakakura, T, Xin, KQ, Obara, Y, Mizukami, H, Kume, A et al. (2006). Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80: 1874-1885.
11. Urabe, M, Ozawa, K, Haast, S & Hermens, W in EP 2311967 A2 20110420 (EN) (Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT) B.V., 2015).
12. Chen, H. (2008). Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells. *Mol Ther* 16: 924-930. 30
13. Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
14. Cigan, AM & Donahue, TF. (1987). Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast--a review. *Gene* 59: 1-18.
15. Joshi, CP, Zhou, H, Huang, X & Chiang, VL. (1997). Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol* 35: 993-1001.
16. Pesole, G, Gissi, C, Grillo, G, Licciulli, F, Liuni, S & Saccone, C. (2000). Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs. *Gene* 261: 85-91. 40
17. Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 8125-8148.
18. Noderer, WL, Flockhart, RJ, Bhaduri, A, Diaz de Arce, AJ, Zhang, J, Khavari, PA et al. (2014). Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq. *Mol Syst Biol* 10: 748.
19. Salganik, M, Venkatakrishnan, B, Bennett, A, Lins, B, Yarbrough, J, Muzyczka, N et al. (2012). Evidence for pH-dependent protease activity in the adeno-associated virus capsid. *J Virol* 86: 11877-11885.
20. Storms, HF, van der Heijden, R, Tjaden, UR & van der Greef, J. (2006). Considerations for proteolytic labeling-optimization of 18O incorporation and prohi 50

bition of back-exchange. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 3491-3497.

21. Ye, X, Luke, B, Andresson, T & Blonder, J. (2009). 180 stable isotope labeling in MS-based proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8: 136-144.

22. Qian, WJ, Liu, T, Petyuk, VA, Gritsenko, MA, Petritis, BO, Polpitiya, AD et al. (2009). Large-scale multiplexed quantitative discovery proteomics enabled by the use of an (18)O-labeled "universal" reference sample. *J Proteome Res* 8: 290-299.

23. Marsic, D, Mendez-Gomez, HR & Zolotukhin, S. (2015). High-accuracy biodistribution analysis of adeno-associated virus variants by double barcode sequencing. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2: 15041.

10

24. Clark, KR, Voulgaropoulou, F & Johnson, PR. (1996). A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 3: 1124-1132.

25. Ma, H, Galvin, TA, Glasner, DR, Shaheduzzaman, S & Khan, AS. (2014). Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. *J Virol* 88: 6576-6585.

26. Lecomte, E, Tournaire, B, Cogne, B, Dupont, JB, Lindenbaum, P, Martin-Fontaine, M et al. (2015). Advanced Characterization of DNA Molecules in rAAV Vector Preparations by Single-stranded Virus Next-generation Sequencing. *Mol Ther Nucl Acid* 4: e260.

20

27. Mietzsch, M, Grasse, S, Zurawski, C, Weger, S, Bennett, A, Agbandje-Mckenna, M et al. (2014). OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 25: 212-222.

28. Grieger, JC, Snowdy, S & Samulski, RJ. (2006). Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* 80: 5199-5210.

29. Sonntag, F, Bleker, S, Leuchs, B, Fischer, R & Kleinschmidt, JA. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* 80: 11040-11054.

30

30. Popa-Wagner, R, Sonntag, F, Schmidt, K, King, J & Kleinschmidt, JA. (2012). Nuclear translocation of adeno-associated virus type 2 capsid proteins for virion assembly. *J Gen Virol* 93: 1887-1898.

31. Allay, JA, Sleep, S, Long, S, Tillman, DM, Clark, R, Carney, G et al. (2011). Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum Gene Ther* 22: 595-604.

32. Ye, GJ, Scotti, MM, Liu, J, Wang, L, Knop, DR & Veres, G. (2011). Clearance and characterization of residual HSV DNA in recombinant adeno-associated virus produced by an HSV complementation system. *Gene Ther* 18: 135-144.

40

33. Chadeuf, G, Ciron, C, Moullier, P & Salvetti, A. (2005). Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol Ther* 12: 744-753.

34. Nony, P, Chadeuf, G, Tessier, J, Moullier, P & Salvetti, A. (2003). Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J Virol* 77: 776-781.

35. Kapranov, P, Chen, L, Dederich, D, Dong, B, He, J, Steinmann, KE et al. (2005). High-throughput sequencing of the human genome reveals extensive transcription of noncoding regions. *Nature* 437: 433-439.

50

- 012). Native molecular state of adeno-associated viral vectors revealed by single-molecule sequencing. *Hum Gene Ther* 23: 46-55.
36. Wang, Y, Ling, C, Song, L, Wang, L, Aslanidi, GV, Tan, M et al. (2012). Limitations of encapsidation of recombinant self-complementary adeno-associated viral genomes in different serotype capsids and their quantitation. *Hum Gene Ther Methods* 23: 225-233.
37. Cogne, B, Snyder, R, Lindenbaum, P, Dupont, JB, Redon, R, Moullier, P et al. (2014). NGS library preparation may generate artifactual integration sites of AAV vectors. *Nat Med* 20: 577-578.
38. Kozarewa, I, Ning, Z, Quail, MA, Sanders, MJ, Berriman, M & Turner, DJ. (2009). Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nat Methods* 6: 291-295.
39. Folger, KR, Thomas, K & Capecchi, MR. (1985). Efficient correction of mismatched bases in plasmid heteroduplexes injected into cultured mammalian cell nuclei. *Mol Cell Biol* 5: 70-74.
40. Zolotukhin, S, Potter, M, Hauswirth, WW, Guy, J & Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol* 70: 4646-4654.
41. Faust, SM, Bell, P, Cutler, BJ, Ashley, SN, Zhu, Y, Rabinowitz, JE et al. (2013). CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest* 123: 2994-3001.
42. Herzog, RW. (2016). A Cure For Hemophilia: the Promise Becomes a Reality. *Mol Ther* 24: 1503-1504.
43. Dolgin, E. (2016). Early clinical data raise the bar for hemophilia gene therapies. *Nat Biotechnol* 34: 999-1001.
44. Zolotukhin, S, Byrne, BJ, Mason, E, Zolotukhin, I, Potter, M, Chesnut, K et al. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6: 973-985.
45. Smith, RH, Levy, JR & Kotin, RM. (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* 17: 1888-1896.
46. Lock, M, Alvira, MR, Chen, SJ & Wilson, JM. (2014). Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. *Hum Gene Ther Methods* 25: 115-125.
47. Piedra, J, Ontiveros, M, Miravet, S, Penalva, C, Monfar, M & Chillon, M. (2015). Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther Methods* 26: 35-42.

【 0 1 2 4 】

他の態様

本明細書に記載された特徴の全ては、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に記載の各特徴は、同じ、同等、または類似の目的を果たす代替の特徴と置き換えることができる。従って、他にこれと異なる記載がない限り、記載された各特徴は、同等または類似の特徴の一般的なシリーズの一例に過ぎない。

【 0 1 2 5 】

上述の明細書の記載から、当業者は本明細書の記載の本質的な特徴を容易に確認することができ、そして当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な用途および条件に適合させるために、本明細書に記載されるものを改変および修飾することができる。従って、他の態様もまた、本発明の範囲内にある。

【 0 1 2 6 】

均等物

いくつかの本発明の態様が本明細書に記載され説明されているが、当業者は、機能を実行し、そして／または結果および／もしくは本明細書に記載の利点の１つ以上を得るための種々の他の手段ならびに／あるいは構造を容易に想到することができ、かかる変形および／または修飾の各々は、本明細書に記載の本発明の態様の範囲内にあるとみなされる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載の全てのパラメーター、寸法、材料、および構成が非限定的であることを意味し、実際のパラメーター、寸法、材料および／または構成は、特定の用途または本発明の教示が用いられる用途によって変わり得ることを容易に認識し得る。当業者は、本明細書に記載の特定の発明の態様に対する多くの均等物を認識するか、または単に常套的な実験を用いて確認することができる。従って、上記の態様は単なる例示として記載されており、添付の特許請求の範囲およびそれと均等の範囲内で、本発明の態様は、具体的に記載され特許請求される以外の方法で実施され得ることが理解されるべきである。本明細書に記載の本発明の態様は、本明細書に記載される個々の特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法を対象とする。さらに、かかる特徴、システム、物品、キット、および／または方法が相互に矛盾しない場合、そのような特徴、システム、物品、キットおよび／または方法の２以上の任意の組み合わせは、本発明の範囲内に包含される。

10

【 0 1 2 7 】

本明細書で定義され用いられている全ての定義は、辞書の定義、引用により組み込まれた文献の定義、および／または定義された用語の通常の意味を包含すると理解されるべきである。

20

【 0 1 2 8 】

本明細書中に記載される全ての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用されている主題に関して参考文献として組み込まれており、ある場合には、その文献の内容全体が包含され得る。

【 0 1 2 9 】

本明細書および特許請求の範囲において用いられる不定冠詞“ a ”および“ a n ”は、他にこれと異なる記載がない限り、“ 少なくとも１つ ”を意味すると理解されるべきである。

【 0 1 3 0 】

本明細書および特許請求の範囲において用いる語句“ および／または ”は、そのように結合された要素の“ 一方または両方 ”を意味する、すなわち、複数の要素が、ある場合には結合的に存在し、他の場合には分離して存在することを意味すると理解されるべきである。“ および／または ”と共に列挙された複数の要素は、同じように、すなわち、そのように結合された要素の“ １つまたはそれ以上 ”と解釈されるべきである。場合によって、具体的に特定された要素と関連するかどうかにかかわらず、語句“ および／または ”によって具体的に特定されたそれらの要素以外の他の要素が存在してよい。従って、非限定的な例として、“ A および／または B ”への言及は、“ 含む (comprising) ”などの制限のない用語 (open-ended language) と併せて用いられるとき、一態様において、A のみを意味してよく (場合により、B 以外の要素を含む) ; 別の態様において、B のみを意味してよく (場合により、A 以外の要素を含む) ; さらに別の態様において、A および B の両方を意味してよい (場合により、他の要素を含む) ; 等。

30

40

【 0 1 3 1 】

本明細書および特許請求の範囲において用いる、“ または ”は、上で定義した“ および／または ”と同じ意味を有すると理解すべきである。例えば、リスト中で項目を分けるとき、“ または ”または“ および／または ”は、包括的であると解釈されるべきであり、すなわち、多数の要素または要素のリストの少なくとも１つを含むが、２以上も含み、場合により、さらなるリストにない項目も含む。これに対して、“ ~のうち１つのみ ”または“ ~のうち正確に１つ ”のように明示された用語または、特許請求の範囲において用いるとき、“ ~からなる ”と明示された用語のみが、多数の要素または要素のリストのうち正確に１つの要素を含むことを意味し得る。一般的に、本明細書で用いる用語“ または ”は

50

、“いずれか”、“～の１つ”、“～の１つのみ”または“～の正確に１つ”のような排他的な用語の前にあるとき、排他的な選択肢（すなわち、“一方または他方であるが、両方でない”）を示すものとしてのみ解釈されるべきである。特許請求の範囲に用いるとき、“本質的に～からなる”は、特許法の分野で用いられる通常の意味を有するものとする。

【 0 1 3 2 】

本明細書および特許請求の範囲において用いる、１つまたは複数の要素のリストを引用して、“少なくとも１つ”という語句は、要素のリストにおいていずれか１つまたは複数の要素から選択される少なくとも１つの要素を意味すると理解されるべきであるが、必ずしも要素のリスト内に具体的に列挙された各要素および全要素の少なくとも１つを含む必要はなく、要素のリストにおいて要素の任意の組合せを除外しない。この定義はまた、場合により、要素のリスト内に具体的に特定される要素以外に、要素が存在してもよいことを可能にし、ここで、語句“少なくとも１つ”が、具体的に特定される要素に関連するか、関連しないかを問わない。従って、非限定的な例として、“AおよびBの少なくとも１つ”（または、同様の“AまたはBの少なくとも一方”、または同様の“Aおよび/またはBのうち少なくとも１つ”）は、一態様において、少なくとも１つの、場合により２以上の、Aを含み、Bが存在しない（および、場合により、B以外の要素を含む）ことを意味し得る；別の態様において、少なくとも１つの、場合により２以上の、Bを含み、Aが存在しない（および、場合により、A以外の要素を含む）ことを意味し得る；さらに別の態様において、少なくとも１つの、場合により２以上の、Aを含み、および少なくとも１つの、場合により２以上のBを含む（および、場合により他の要素を含む）；等、を意味し得る。

【 0 1 3 3 】

他にこれと異なる記載がない限り、２以上のステップまたは動作を含む本明細書に記載の任意の方法において、該方法の複数のステップまたは動作の順序は、必ずしも該方法の複数のステップまたは動作が列挙される順に限定されないことも理解されるべきである。

【 0 1 3 4 】

特許請求の範囲において、ならびに上記の明細書の記載において、“含む（comprising）”、“含む（including）”、“担持する（carrying）”、“有する（having）”、“混入する（containing）”、“伴う（involving）”、“保有する（holding）”、“構成する（composed of）”などのような全ての移行句（transitional phrase）は、制限されない（open-ended）こと、すなわち、包含を意味するが、限定されないことが理解されるべきである。“～からなる”および“本質的に～からなる”という移行句のみが、米国特許商標庁のManual of Patent Examining Proceduresのセクション2111.03において記載されるように、それぞれ閉鎖式（closed）または半閉鎖式（semi-closed）の移行句であるものとする。制限のない（open-ended）移行句（例えば、“含む（comprising）”）を用いて本明細書に記載された態様もまた、別の態様において、制限のない移行句によって記載された特徴“からなる”および“本質的にそれからなる”として意図されることが理解されるべきである。例えば、本明細書の記載が“AおよびBを含む組成物”を記載するとき、該記載は、別の態様“AおよびBからなる組成物”および“本質的にAおよびBからなる組成物”も企図する。

【図 1】

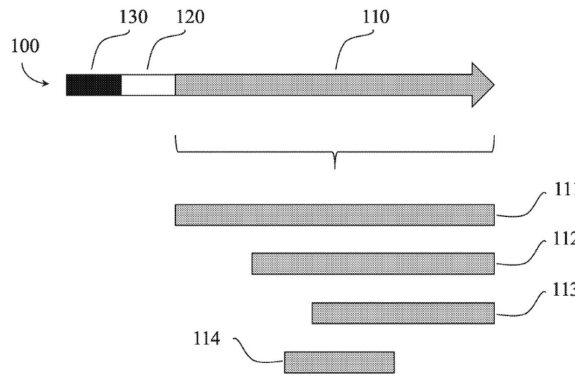


FIG. 1

【図 2 B】

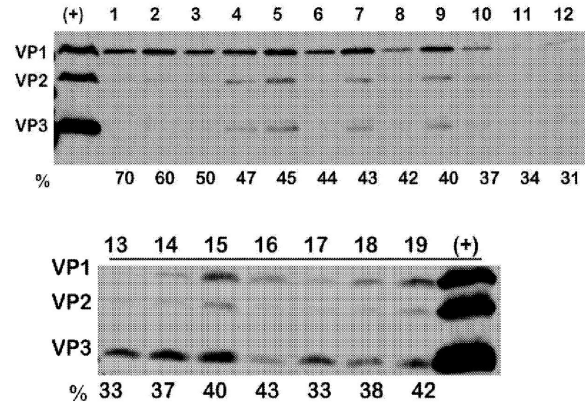


FIG. 2B

【図 2 A】

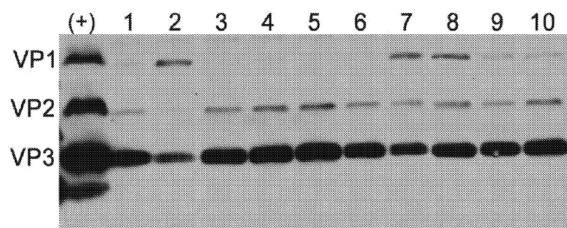


FIG. 2A

【図 2 C】

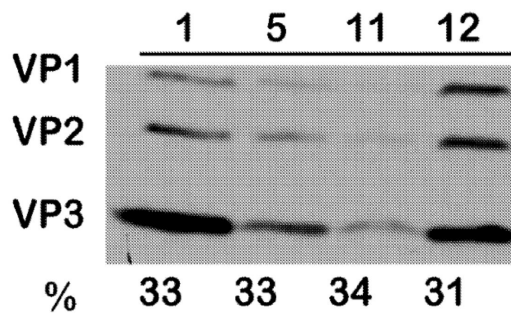


FIG. 2C

【図 4】

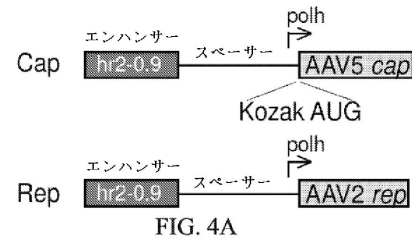


FIG. 4A

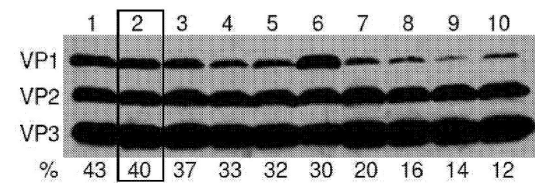


FIG. 4B

【図 3】

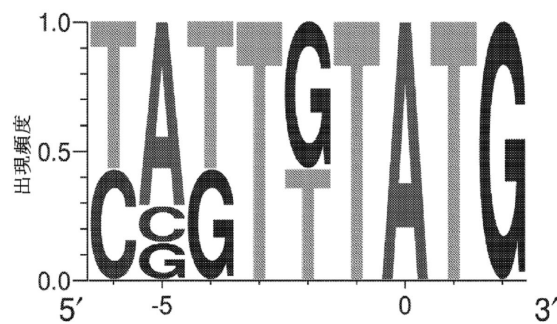


FIG. 3

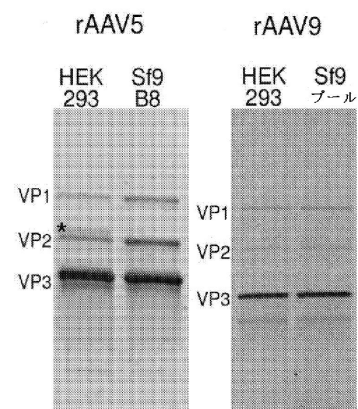


FIG. 4C

FIG. 4D

【図 5 A】

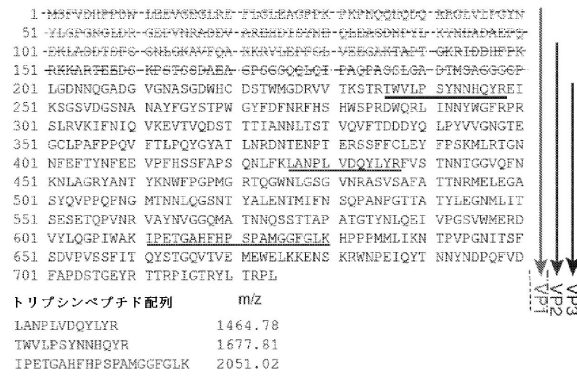


FIG. 5A

【図 5 C】

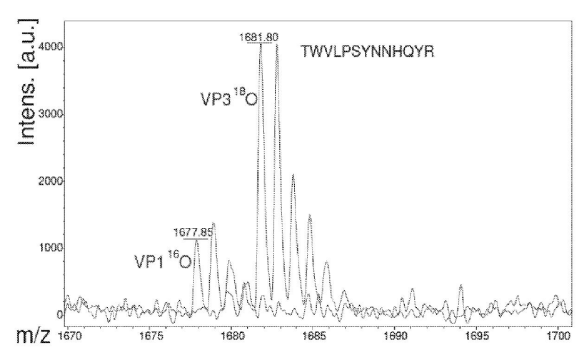


FIG. 5C

【図 5 B】

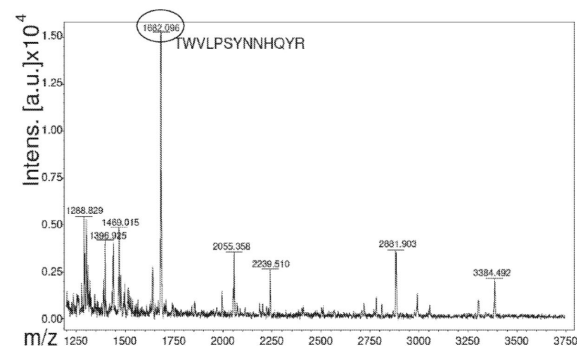


FIG. 5B

【図 5 D】

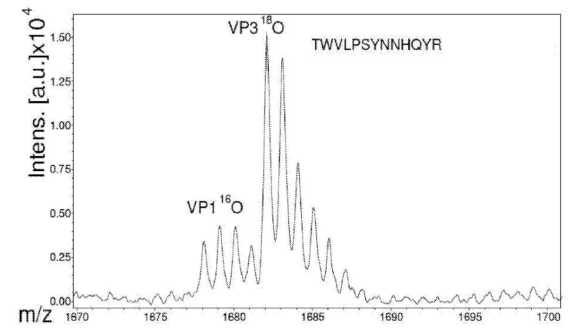


FIG. 5D

【図 6 - 1】

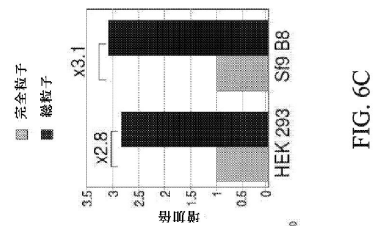


FIG. 6C

【図 6 - 2】

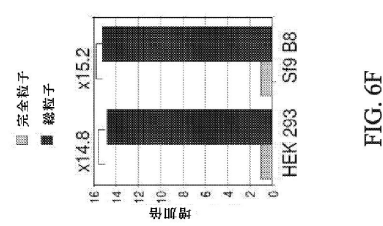


FIG. 6F

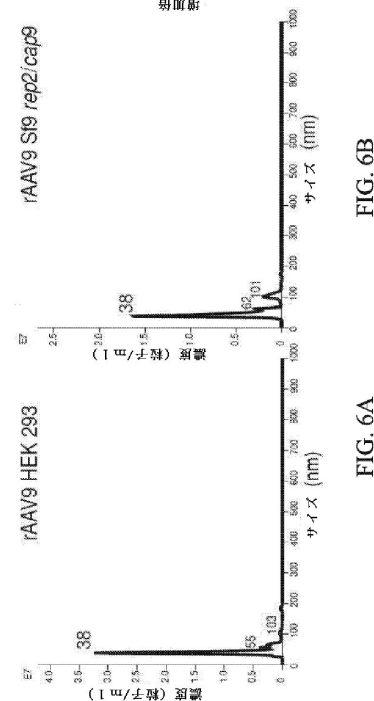


FIG. 6A

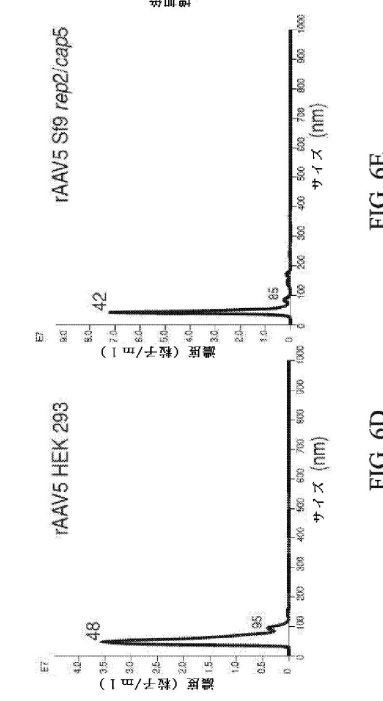


FIG. 6D

FIG. 6B

FIG. 6E

【図 7 A】

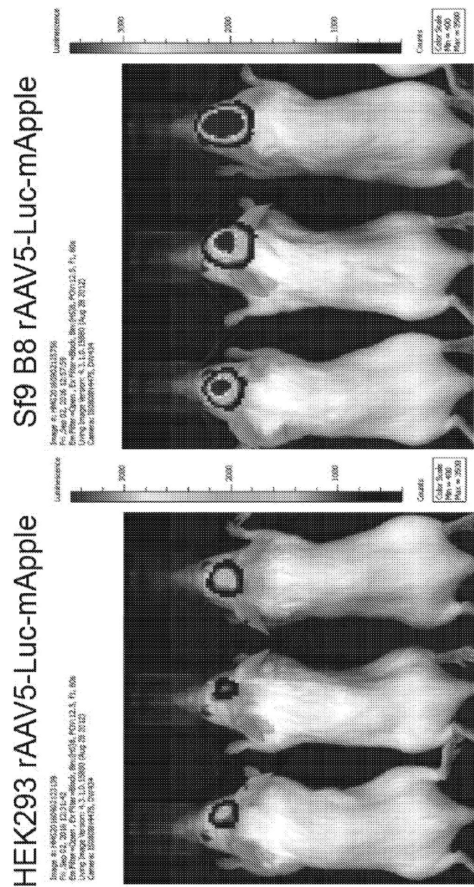


FIG. 7A

【図 7 B】

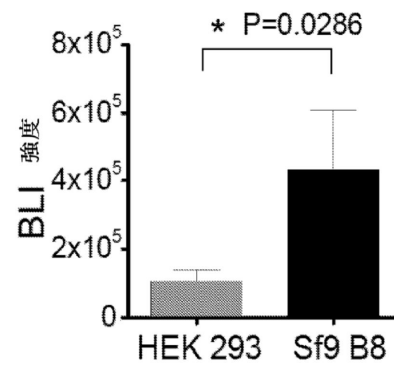


FIG. 7B

【図 7 C】

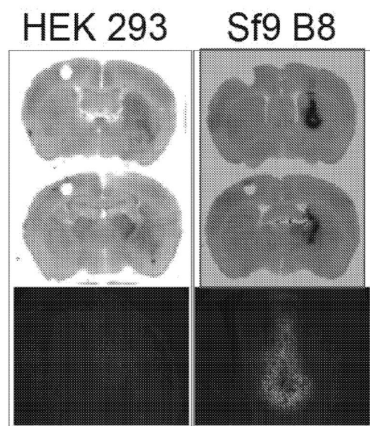
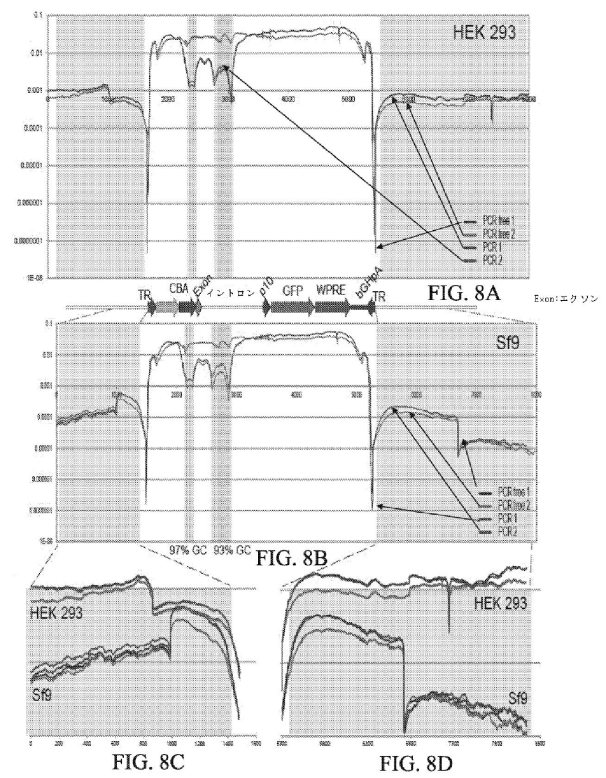
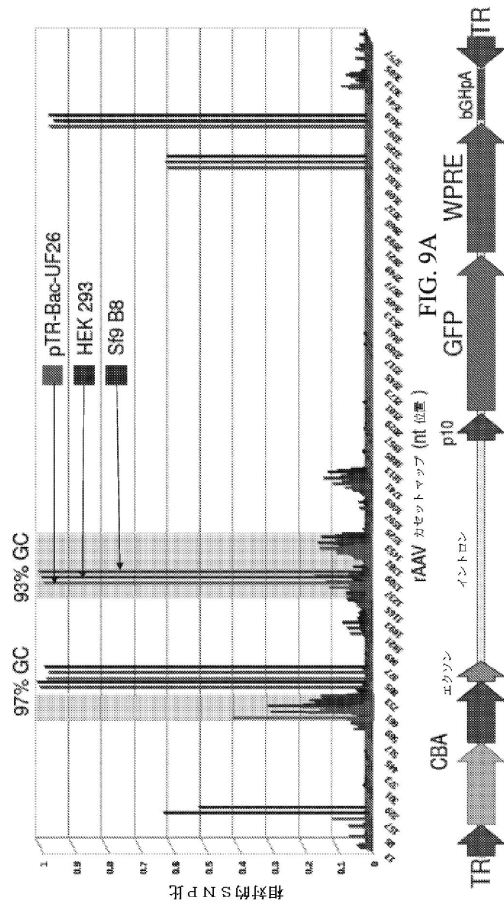


FIG. 7C

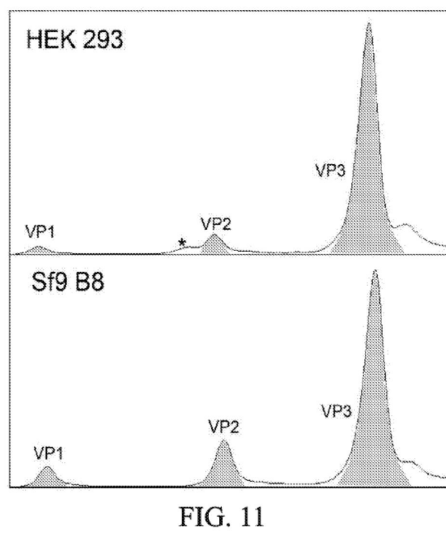
【図 8】



【図 9】



【図 11】



【図 10】

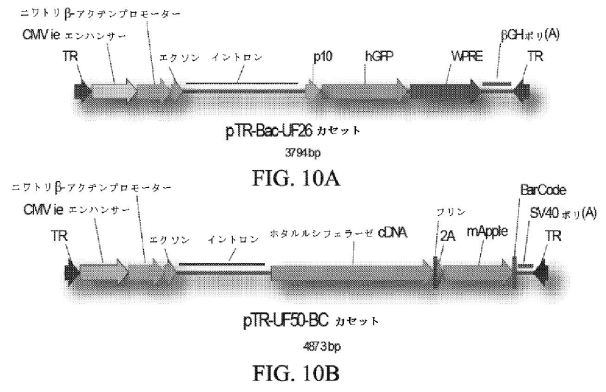
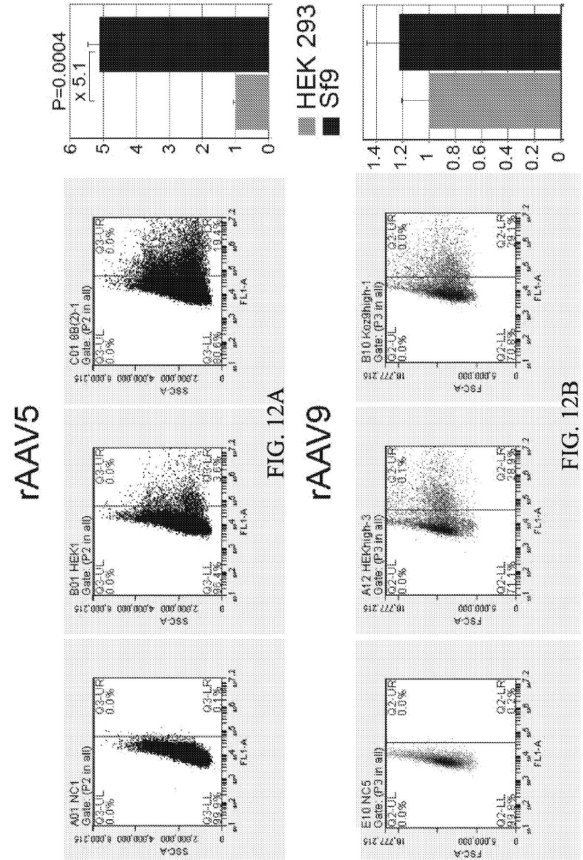


FIG. 9B

【図 12】



【図 13】

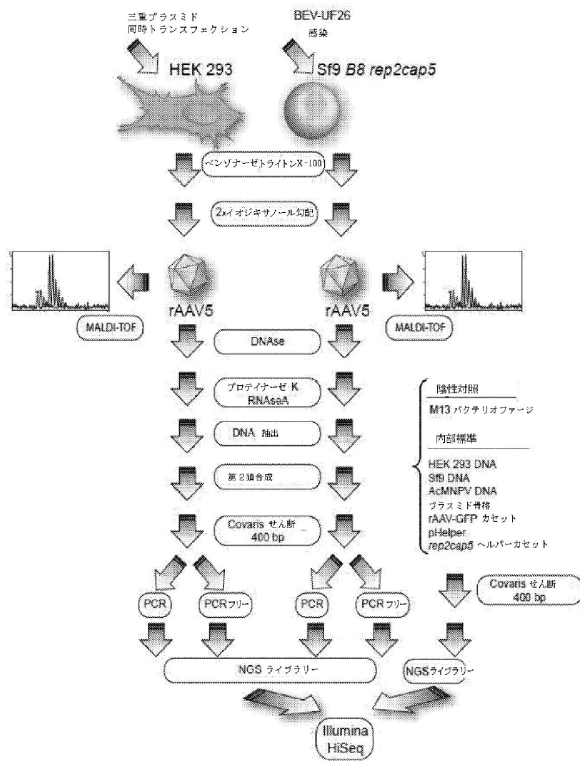


FIG. 13

【図 14】

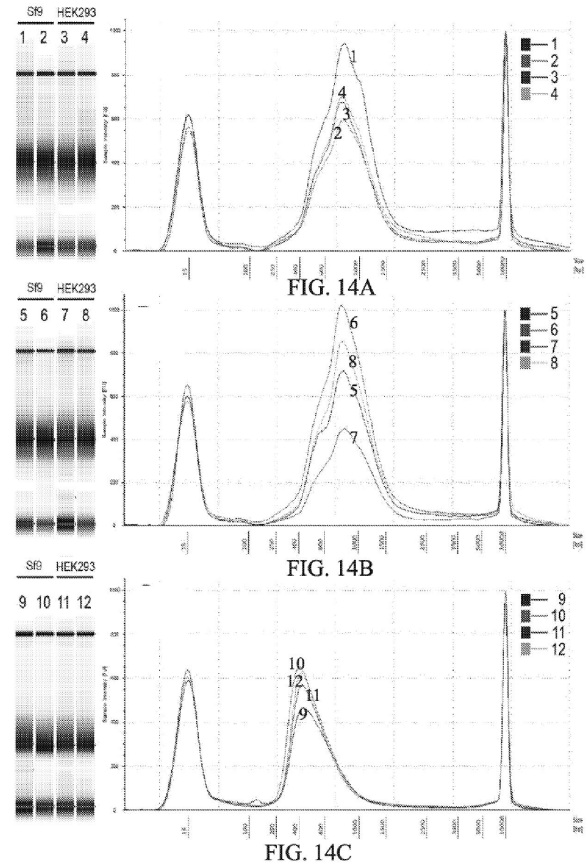


FIG. 14C

【図 15】

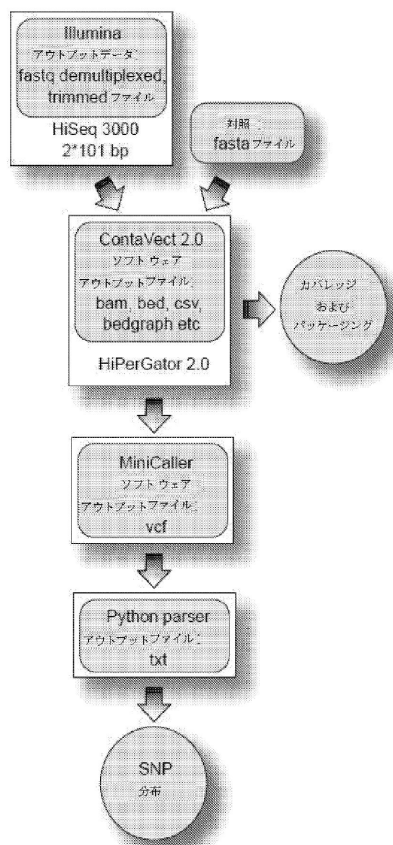


FIG. 15

【配列表】

0006975980000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00

(72)発明者 セルゲイ・ゾロトゥヒン
 アメリカ合衆国 3 2 6 0 7 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・ナインティシックス・ストリート 1 1 2 2 番

(72)発明者 オレクサンドル・コンドラトフ
 アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 - 6 5 0 3 フロリダ州ゲインズビル、サウスウエスト・サーティフォー・ストリート 3 6 1 1 番、アパートメント 1 3 2

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 3 7 8 0 2 (W O , A 1)
 特表 2 0 0 9 - 5 1 2 4 3 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N	1 5 / 4 0
C 0 7 K	1 4 / 0 8
C 1 2 N	7 / 0 0
C 1 2 N	5 / 1 0
C 1 2 N	5 / 0 7
A 6 1 K	3 5 / 7 6
A 6 1 K	4 8 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)	
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)	