

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 9 日(09.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/007120 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/067488
- (22) 国際出願日: 2013 年 6 月 26 日(26.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-152124 2012 年 7 月 6 日(06.07.2012) JP
- (71) 出願人: タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).
- (72) 発明者: 西江 敏和(NISHIE, Toshikazu); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 高島 扶有子(TAKASHIMA, Fuyuko); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 榎 竜嗣(ENOKI, Tatsuji); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一(MINENO, Junichi); 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号梅

田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: CELL CAPABLE OF PRODUCING ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR

(54) 発明の名称: アデノ随伴ウイルスベクターの産生細胞

(57) Abstract: According to the present invention, an AAV vector having a higher titer compared with those of conventional ones can be produced using a cell into which a nucleic acid capable of expressing miRNA is introduced artificially. An AAV vector produced using the cell and a composition containing the virus vector as an active ingredient are very useful as gene transfer means in the studies or clinical practice of gene therapies.

(57) 要約: 本発明によれば、人為的にmiRNAを発現する核酸を導入した細胞を用いることにより、従来に比べ高力価のAAVベクターを製造することができる。当該細胞を用いて製造されたAAVベクターや当該ウイルスベクターを有効成分とする組成物は遺伝子治療の研究又は臨床の分野における遺伝子導入方法として非常に有用である。



WO 2014/007120 A1

明 細 書

発明の名称： アデノ随伴ウイルスベクターの産生細胞

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子治療の研究又は臨床の分野において、ヒトへの遺伝子導入に特に有用なアデノ随伴ウイルスベクターを高力価で産生する細胞に関する。

背景技術

[0002] 現在、先天性遺伝子疾患の治療のほか、癌や感染症の治療を目的としてウイルスベクターを用いた遺伝子治療が多数試みられている。ウイルスベクターとしては、従来、レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターが多く用いられている。

[0003] アデノ随伴ウイルス（A A V）は線状1本鎖DNAウイルスで、ヒトを含む広範な種の細胞に感染可能であり、血球、筋、神経細胞など分化を終えた非分裂細胞にも感染する。また、ヒトに対する病原性がないため副作用の心配が低いこと、ウイルス粒子が安定であることなどから近年遺伝子導入用のベクターとして開発が進んできた。

[0004] 遺伝子導入用のA A Vベクターの製造には他のウイルスベクターと同様、野生型A A Vゲノム上にあるウイルス粒子形成に必須な要素のうち、シス供給を要するものとトランス供給可能なものを分離してウイルス産生用の細胞に導入し、発現させることで、野生型A A V産生とA A Vベクターの感染先での自立複製を防ぐ方法がとられる（特許文献1）。

従来のA A Vベクターの製造方法としては、1) 野生型A A Vゲノムの両端のI T Rを残して、r e p、c a p遺伝子を除いたA A Vベクタープラスミドの導入、2) R e p、C a pタンパク質をトランスに供給するためのr e p、c a p遺伝子発現プラスミドの導入、加えてA A Vはその感染性ウイルス粒子形成にヘルパーウイルスと呼ばれる、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、又はワクシニアウイルスなどのいずれかからの補助要素の供給を要

するため、3) アデノウイルス感染、を用いる方法が確立している（特許文献2）。

しかし上記方法によって得られるAAVベクターは、理論上アデノウイルスが混入する。このことは、混入アデノウイルスの除去・不活性化の作業を要するため、AAVベクター力価の低減の要因となる。更に、ヒトに投与した場合にアデノウイルス感染症、炎症などの副作用の発生の懸念が残る。そこで、上記3)に代わって3') アデノウイルス由来要素のうち、AAVウイルス粒子形成に必須な要素のみを発現するヘルパープラスミドの導入、を用いる製造方法（ヘルパーフリー系）が開発された（特許文献3）。この方法によれば、製造されたAAVベクターへのアデノウイルスの混入がないため、安全性に優れる。

[0005] 一方、遺伝子治療の研究又は臨床の分野に使用することを目的としたAAVベクターの製造では、高力価のウイルスベクター液の取得が必要とされており、ヒト由来HeLa細胞やA549細胞をもとにrep、cap遺伝子の恒常発現株を作製して、当該遺伝子の発現量を調節する工夫などが行われている。しかし、得られるAAVベクターの力価は充分でなく、更に高力価のAAVベクターの製造方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許第6093570号明細書

特許文献2：国際公開第97／06272号パンフレット

特許文献3：国際公開第97／17458号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、煩雑な操作なく高力価のAAVベクター液を得るための細胞、及び当該細胞を用いたAAVベクター製造方法、キットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 上述のとおり、遺伝子治療の研究又は臨床に使用することを目的とした AAVベクターの製造においては、より高力価な AAVベクターの製造が可能となる方法が求められている。本発明者らは鋭意研究の結果、人為的に導入された miRNA、例えば hsa-miR-196a1、hsa-miR-324、hsa-miR-342 を発現する細胞を AAVベクター製造に使用することにより、従来よりも高力価の AAVベクターが得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] 本発明を概説すれば、本発明は

[1] AAVベクターを産生する能力を有する細胞であって、人為的に導入された miRNA を発現している細胞、

[2] 人為的に導入された miRNA が、hsa-miR-196a1、hsa-miR-324、hsa-miR-342 からなる群より選択された少なくとも 1 種である、[1] に記載の細胞、

[3] [1] 又は [2] に記載の細胞にウイルスに封入される核酸を導入した AAVベクター産生細胞、

[4] AAVベクターの製造方法であって、[3] に記載の細胞を培養する工程を含む方法、

[5] miRNA を供給する核酸と、AAVベクターのウイルス粒子形成に必要な要素を供給する核酸を含む AAVベクター製造用のキット、

[6] [4] に記載の方法を用いて得られる AAVベクター、

[7] AAVベクター産生細胞内で発現することによって AAVベクター産生細胞の AAVベクター産生能力を向上させることが可能な miRNA の選択方法であって、miRNA を発現する AAVベクターの混合物を作製し、細胞において高産生される AAVベクターを選抜する工程を包含する選択方法、

[8] 下記工程 (a) ~ (e) を包含する [7] に記載の選択方法であって、

- (a) m i R N Aを発現するA A Vベクター混合物を得る工程、
 - (b) m i R N Aを発現するA A Vベクター混合物を細胞へ感染させる工程、
 - (c) 工程 (b) により得られた細胞を培養し、当該細胞より産生されたA A Vベクター混合物を取得する工程、
 - (d) 工程 (c) で得られたA A Vベクター混合物を使用した上記 (b) 、
 - (c) の工程を1回以上繰り返す工程、及び
 - (e) 工程 (d) により得られたA A Vベクター混合物中のm i R N Aをコードする核酸を得る工程、
- に関する。

発明の効果

- [0010] 本発明により、A A Vベクターを産生する能力を有する細胞が提供される。当該細胞を使用することにより、煩雑な操作なく従来に比べて高力価のA A Vベクターを製造することが可能となる。更に、当該細胞を用いたA A Vベクターの製造方法、キットが提供される。

発明を実施するための形態

- [0011] 本発明のA A Vベクターを産生する能力を有する細胞（以下、本発明の細胞）は、A A Vベクター産生に必要な要素、並びに人為的に導入したm i R N Aを発現する細胞である。また本発明のA A Vベクター産生細胞は、前記本発明の細胞にウイルス粒子に封入される核酸を導入した細胞である。
- [0012] 本発明の細胞の作製において、材料として使用する細胞には特に限定はない。前記細胞としては、ヒト、サル、げっ歯類などの哺乳動物細胞、好適には形質転換効率が高く、アデノウイルスE 1 遺伝子を恒常的に発現する2 9 3細胞（A T C C C R L - 1 5 7 3）や2 9 3 T細胞（A T C C C R L - 1 1 2 6 8）、2 9 3 F細胞、2 9 3 F T細胞（いずれもライフテクノロジーズ社製）、G 3 T - h i細胞（国際公開第0 6 / 0 3 5 8 2 9号パンフレット）、市販のA A Vベクター産生用細胞株、A A V 2 9 3細胞（S t r a t a g e n e社製）が例示される。またA A Vベクター産生に必要なタン

パク質のいくつかを一過的もしくは恒常的に発現するように改変した細胞が使用できる。

[0013] 前記AAVベクター産生に必要な要素として、(A) AAV由来Repタンパク質、Capタンパク質、(B) アデノウイルス由来要素、例えばE1a、E1b、E2、E4、VARNA遺伝子、などが例示される。本発明の細胞にAAVベクターのウイルス粒子形成に必須な要素を供給する核酸として、(a) Repタンパク質をコードする核酸、Capタンパク質をコードする核酸、(b) アデノウイルス由来要素をコードする核酸が例示される。これらの核酸の形態には限定はなく、使用される細胞においてそれぞれの要素を供給可能な1又は複数の核酸構築物として、プラスミドやウイルスベクターに搭載して、細胞に導入することができる。例えば市販のプラスミドであるpAAV-RC1 plasmid、pHelper plasmid (Cell Biolabs社製)の使用が例示される。Capタンパク質をコードする核酸は、Capタンパク質をコードするものとは異なる読取り枠でAAV粒子の形成に必要なAssembly-Activating Protein (AAP) をコードしている[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ジ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第107巻、第10220～10225頁(2010)]。特に断らない限り、本明細書に記載された「Capタンパク質をコードする核酸」はAAPをもコードしている核酸を指す。Capタンパク質をコードする核酸においてAAPの機能が失われるような変異が(自然発生的に、もしくは人為的に)生じている場合には、さらにAAPをコードする核酸を本発明の細胞に導入すればよい。E1a、E1bタンパク質をコードする核酸は、先述の通り293細胞などにおいてはゲノム中に挿入され、恒常発現しているため、別途導入する必要はない。E1a、E1bタンパク質をコードする核酸は、使用する細胞に応じて必要であれば導入すればよい。

[0014] 核酸構築物の導入の方法としては、一過性、又は恒常的な導入方法が例示

される。一過性に導入する方法は特に限定はなく、公知の一過性導入方法、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、ポリエチレンジイミン法、エレクトロポレーション法などが使用可能である。また市販の試薬、例えばTransIT（登録商標）-293 Reagent、TransIT（登録商標）-2020（Mirus社製）、Lipofectamine 2000 Reagent、Lipofectamine 2000CD Reagent（以上、ライフテクノロジーズ社製）、FuGene（登録商標）Transfection Reagent（プロメガ社製）などを用いてもよい。

また核酸を細胞に恒常的に導入する方法は特に限定はなく、公知の恒常的導入方法、例えばレトロウイルスベクターを用いる方法、プラスミドの一過性導入方法と同様の方法で導入し、染色体に組み込まれた細胞を選択する方法などが使用可能である。レトロウイルスベクターを用いる方法においては、市販の試薬、例えばRetrovirus Constructive System（タカラバイオ社製）を用いてもよい。

[0015] 本発明におけるmiRNAとしては、AAVベクター産生細胞内で発現することによってAAVベクター産生細胞のAAVベクター産生能力を向上させることが可能なmiRNAが好適に例示される。

[0016] 前記AAVベクター産生細胞内で発現することによってAAVベクター産生細胞のAAVベクター産生能力を向上させることが可能なmiRNAは、本明細書に開示される選択方法（以下、本発明の選択方法）によって、当業者であれば容易に選択可能である。本発明の選択方法は、細胞中で各々異なるmiRNA（例えばヒトmiRNA）を発現するAAVベクターのライブラリー（混合物）を作製し、その中から細胞において高産生されるAAVベクターを選抜する工程を含む。

前記AAVベクターライブラリーの作製方法としては、miRNAライブラリーをコードする核酸をウイルス粒子に封入される核酸に連結した核酸構築物を作製し、この核酸構築物に公知の方法を適用してmiRNAライブラ

リー搭載AAVベクターを取得する方法が例示される。前記の核酸構築物の作製は、例えば市販のAAVベクタープラスミドであるpAAV-MCS Expression Vector (Cell Biolabs社製)等を利用することができる。次に上記miRNAライブラリー搭載AAVベクターをAAVベクター産生細胞の作製に適した細胞（例えばAAV293細胞）に感染させる。ついでこの細胞にAAVベクター産生に必要な要素をコードする核酸構築物を一過性に導入して培養し、当該細胞が産生するAAVベクター混合物を取得する。ここで得られたAAVベクターを用いて上述の工程（感染、培養、ベクター取得）を1サイクル以上行う。このサイクルを繰り返すことで、AAVベクター混合物中にAAVベクター産生を向上させるmiRNAを発現する核酸を搭載するAAVベクターが濃縮されていく。こうして得られたAAVベクター混合物中のAAVベクターについて、搭載されたmiRNAの塩基配列の解読を行う。上記サイクルを繰り返すことにより得られる頻度が高くなるmiRNAを同定し、それらをAAVベクター産生を向上させるmiRNAとみなす。このようにして選択されるmiRNAは、本発明の細胞におけるmiRNAとして好適に利用でき、例えばhsa-miR-196a1、hsa-miR-324、及びhsa-miR-342が例示される。

[0017] 前記hsa-miR-196a1、hsa-miR-324、hsa-miR-342を構成するRNAの塩基配列は公知であり、それぞれをコードするDNA配列はNCBI GENE ID: 406972、442898、442909として登録されている。当該配列を搭載したmiRNA発現プラスミドベクターは市販されており、タカラバイオ社などから入手可能である。

[0018] 本発明の細胞は、前述のようなmiRNAを発現する核酸が人為的に導入されて作製されている。人為的に導入する方法には特に限定はなく、例えばプラスミド等の核酸構築物の形態で一過性又は恒常的に導入される。又、核酸構築物への搭載の形態にも限定はなく、単独で、あるいはAAVベクター

産生に必要な要素を供給する核酸、又はウイルス粒子に封入される核酸と同一の核酸構築物に搭載されていても良い。

[0019] 本発明のAAVベクターを産生する能力を有する細胞にウイルス粒子に封入される核酸が導入されることにより、本発明のAAVベクター産生細胞が作製される。こうして作製されるAAVベクター産生細胞も本発明の態様の一つである。前記のウイルス粒子に封入される核酸は、AAV由来のITR配列とAAVベクターに搭載することが望まれる核酸で構成される。前記のAAVベクターに搭載することが望まれる核酸としては、任意の外来遺伝子、例えばポリペプチド（酵素、成長因子、サイトカイン、レセプター、構造タンパク質など）、アンチセンスRNA、リボザイム、デコイ、RNA干渉を起こすRNAなどをコードする核酸が例示される。前記の外来遺伝子の発現の制御のため、適当なプロモーター、エンハンサー、ターミネーターやその他の転写調節要素が前記の核酸に挿入されていてもよい。ウイルス粒子に封入される核酸はプラスミドの形態で細胞に導入することができる。前記のプラスミドは、例えば市販のAAVベクタープラスミドであるpAAV-MCS Expression vector等（Cell Biolabs社製）を使用して構築することができる。

[0020] 本発明のAAVベクターの製造は、本発明の細胞にウイルス粒子に封入される核酸を一過性又は恒常的に導入する工程を含む方法により得られた、AAVベクター産生細胞を培養することで実施される。核酸を一過性又は恒常的に導入する方法としては、特に限定はなく、例えば、核酸構築物の導入方法として上記した公知の一過性導入方法又は恒常的導入方法を用いてもよい。

好適にはmiRNAを発現する核酸は、単独で、もしくはRepタンパク質及び／又はCapタンパク質をコードする核酸と同一の発現プラスミドに搭載して一過性に導入することにより、本発明はより高い効果を発揮する。

[0021] 本発明によるAAVベクターの製造において、AAVベクター産生細胞の培養は、公知の培養条件で行うことができる。例えば温度30～37℃、湿

度 95%、CO₂濃度 5～10%での培養が例示されるが、本発明はこのような条件に限定されるものではない。所望の細胞の増殖、AAVベクターの産生が達成できるのであれば前記の範囲以外の温度、湿度、CO₂濃度で実施してもよい。

[0022] 培養用培地は、本発明のAAVベクター産生細胞が培養されAAVベクター製造が達成される物であれば特に限定はなく、例えば公知の培地や無血清培地、例えばDMEM、IMDM、ハムF12、RPMI-1640などを使用してもよく、これらはLonza社、ライフテクノロジーズ社、シグマ・アルドリッチ社などから市販品として入手することができる。培地には、ウシ胎児血清(FBS)やヒト血清由来のアルブミン等を添加してもよい。

[0023] 培養期間は特に限定はなく、例えば12～72時間、好適には48～72時間が好ましい。また、AAVベクター液は、培養上清や回収した細胞を適当な緩衝液に再懸濁して破碎したもの(細胞破碎液)の遠心上清から取得することができる。本発明では、こうして得られた培養上清や遠心上清は、そのまま、あるいは更に、例えばフィルターろ過して、又は公知の方法により濃縮もしくは精製してAAVベクター液とし、適切な方法、例えば凍結して所望の用途に使用するまで保存される。

[0024] 本発明のAAVベクター産生細胞を用いて製造するAAVベクターには特に限定はなく、既存の血清型もしくは天然から新たに取得した野生型AAVに由来する組換えAAVベクターが例示される。本発明の細胞を作製する際に適切な材料、例えばRepタンパク質をコードする核酸やCapタンパク質をコードする核酸を選択することにより、使用したい血清型のAAVに基づく組換えAAVベクターを作成することができる。またウイルス粒子に封入される核酸からRepタンパク質をコードする核酸を欠損させることで、ウイルス粒子に封入されたDNAの標的細胞ゲノムへの挿入を防止し、任意の外来遺伝子の挿入領域を増加させたAAVベクターも例示される。

[0025] 本明細書では、AAVベクター産生の程度はAAVベクターの力価を用いて示される。前記AAVベクターの力価は、一定量の試料におけるa) 正常

に形成されたA A Vベクター粒子から得られたゲノムの個数（ゲノム力価）、又はb）実験的に測定されるA A Vベクターの細胞への感染能力（感染力価）のいずれかであり、必要に応じて明記して示される。

[0026] ゲノム力価の測定方法としては、例えば核酸分解酵素処理とそれに引き続くプロテアーゼ処理を行うことで核酸不純物が分解されたA A Vベクター含有試料中のウイルスゲノムのコピー数をP C R法で検定する方法が例示される。

感染力価の測定方法としては、例えばA A Vベクター含有試料の系列希釈液を適当な標的細胞に感染させ、導入遺伝子の発現、細胞の形状変化（細胞変性）の検出、細胞に導入されたプロウイルスのコピー数の測定、といった方法が例示される。

[0027] 本発明により、本発明のA A Vベクター産生細胞を用いて取得したA A Vベクターを有効成分として含有する医薬組成物も提供される。当該医薬組成物は、遺伝子治療用A A Vベクター製剤の製造技術に従って適宜調製することができる。例えば、本発明の製造方法により得られたA A Vベクターを公知の方法で濃縮、精製して得られたA A Vベクターを医薬組成物とすることができる。当該医薬組成物は、患者由来の細胞に体外で使用するか、もしくは患者へ直接投与することもできる。

したがって、本発明は、本発明のA A Vベクター産生細胞を用いて取得したA A Vベクターを有効成分として含有する医薬組成物を投与することを特徴とする治療方法も提供する。さらに、本発明は、医薬の製造における、本発明のA A Vベクター産生細胞を用いて取得したA A Vベクターの使用を提供する。また、本発明は、治療において使用するための、本発明のA A Vベクター産生細胞を用いて取得したA A Vベクターを提供する。

[0028] 本発明の細胞の作製に使用されるm i R N Aを発現する核酸と、A A Vベクターのウイルス粒子形成に必須な要素を供給する核酸（R e pタンパク質をコードする核酸、C a pタンパク質をコードする核酸、アデノウイルス由来タンパク質をコードする核酸）を組み合わせることにより、A A Vベクタ

一産生細胞作製用のキットとすることができる。前記の核酸はそれぞれ、もしくは適宜組み合わせて、細胞内で所望のRNAやタンパク質を供給可能な核酸構築物としてキットに含有させることができる。当該キットには、更にウイルス粒子に封入される核酸を作成するためのベクターや適切な細胞を含有させてもよい。

実施例

[0029] 以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0030] 実施例1 pAAV-AsRed2-miRNAライブラリープラスミドの構築

pAsRed2-C1 Vector (クロンテック社製) の、CMVプロモーターからpolyAシグナルにわたる約1.6kbの断片をPCR法によって得た。この際、NotIの認識部位を有する増幅用プライマーを使用し、PCR産物の両端にNotIの認識部位を付加した。この断片をNotI (タカラバイオ社製) で処理して、インサート断片とした。一方pAAV-MCS Vector (Cell Biolabs社製) をNotIで処理して約2.9kbの断片を得、これをベクター断片とした。このベクター断片とインサート断片をDNA Ligation Kit<Mighty Mix> (タカラバイオ社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミドでE. coli HST08 Premium Competent Cells (タカラバイオ社製、以下大腸菌と記載する) を形質転換した。得られた形質転換体から抽出したプラスミドDNAのうち、上流からCMVプロモーター、AsRed2コード領域、マルチクロニングサイト(MCS)、polyAシグナルの順に挿入されたものを選んでpAAV-AsRed2 Vectorとした。

pAAV-AsRed2 VectorをBglII (タカラバイオ社製) とHindIII (タカラバイオ社製) で処理した。一方、pBApo-CMV DNAにクローニングされたヒトmiRNAライブラリー (タカラ

バイオ社製)をBamHI(タカラバイオ社製)とHindIIIで処理し、得られたmiRNAコード領域の断片をDNA ligation kit(タカラバイオ社製)を用いて前記のpAAV-AsRed2 Vectorに連結した。ただし、内部にBamHI又はHindIII認識部位を持つmiRNAに関しては、In-Fusion(登録商標) Advantage PCRクローニングキット(クロンテック社製)を用いたディレクショナルクローニングによりpAAV-AsRed2 Vectorに連結した。こうして得られた組換えプラスミドをpAAV-AsRed2-miRNAライブラリープラスミドとして以下の実験に使用した。

[0031] 実施例2 AAV-miRNAライブラリーベクターの製造

(1) AAV293細胞の播種

AAV293細胞(Stratagene社製)を10%FBS(サーモサイエンティフィック社製)、2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEM(シグマ・アルドリッチ社製)に 2.5×10^5 細胞/mLとなるように懸濁した。この懸濁液4mLを細胞培養用60mmディッシュ(IWAKI社製)に添加し、5%CO₂存在下、37℃のインキュベーター(以下37℃のCO₂インキュベーター)で一夜培養した。

(2) AAV293細胞へのプラスミド導入

実施例1で得たpAAV2-AsRed2-miRNAライブラリープラスミド及びpHelper plasmidとpAAV-RC1 plasmid(いずれもCell Biolabs社製)をそれぞれ4μgずつ使用し、リン酸カルシウム法を用いて実施例2-(1)のAAV293細胞にトランスフェクションした。6時間後、培地を完全に除去し、2%FBS及び2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEM 4mLを添加し、37℃のCO₂インキュベーターで更に48時間培養した。

[0032] (3) AAV-miRNAライブラリーベクターの回収

実施例2-(2)で培養したAAV293細胞より培地を除去し、PBS(ナカライテスク社製)を1mL添加した。ピペティングでAAV293

細胞を1.5 mLチューブに回収し、4℃、700×g、5分間遠心後、上清を除去した。PBS 0.1 mLにAAV293細胞を再懸濁後、エタノール／ドライアイスで2分間、37℃のウォーターバスで2分間、ボルテックス・ミキサーでの攪拌1分間の処理を3回繰り返し、AAV-miRNAライブラリーベクターを含む細胞破碎液を回収した。この細胞破碎液を4℃、10,000×g、10分間遠心後、上清を回収しAAV-miRNAライブラリーベクター液とした。

[0033] 実施例3 AAVベクターのゲノム力価測定

(1) DNase処理

AAV-miRNAライブラリーベクター液2 μLに、10×DNase Iバッファー2 μL、注射用水（大塚製薬社製）15.2 μL、DNase I（タカラバイオ社製）0.8 μLを添加した反応液を調製した。TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（登録商標）Standard（タカラバイオ社製）を用いて37℃で一時間インキュベートし、遊離のゲノムやプラスミドを分解した。その後、DNase Iを不活化するために99℃、10分間の熱処理した後、実施例3-（2）の処理まで4℃あるいは-20℃にて保存した。

[0034] (2) Proteinase K処理

実施例3-（1）で得られた反応液20 μLに、注射用水15 μL、10×Proteinase Kバッファー（0.1M Tris-HCl（pH7.8）、0.1M EDTA、5% SDS）4 μL、Proteinase K（タカラバイオ社製）1 μLを加え、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（登録商標）Standardを用いて55℃で一時間インキュベートし、AAVベクターのゲノムを遊離させた。その後、Proteinase Kを不活化するためにこの溶液を95℃で10分間処理した。こうして調製した溶液をAAV-miRNAライブラリーベクターゲノム液として、リアルタイムPCRに供するまで4℃又は-20℃にて保存した。

[0035] (3) リアルタイムPCR

実施例3-(2)で調製したAAVベクターゲノム液を注射用水で50倍希釈したもの2 μ Lを鋳型とし、配列表の配列番号1 (Forward primer 1) 及び配列番号2 (Reverse primer 1) に記載のプライマー、SYBR (登録商標) Premix ExTaq II (Perfect Real Time) (タカラバイオ社製) を用いてリアルタイムPCRを行った。反応液調製はキットに添付の説明書に従った。標準品として、AAVベクターゲノム液に替えて、pAAV-AsRed 2をEcoRIで処理して線状化したDNA液を用いた。リアルタイムPCR反応はThermal Cycler Dice (登録商標) Real Time System Single (タカラバイオ社製) を用い、装置推奨の条件で行った。その後、装置添付の説明書に従ってAAVベクターゲノムの定量を行い、ゲノム力価をAAVベクター産生細胞1個当たりのAAVベクターゲノム数 (viral genome/cell、以下VG/cell) で表した。

[0036] 実施例4 AAV-miRNAライブラリーのスクリーニング

(1) AAV293細胞の播種

AAV293細胞を10%FBS、2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEMに 2.5×10^5 細胞/mLとなるように懸濁した。この懸濁液4mLを細胞培養用60mmディッシュに添加し、37°CのCO₂インキュベーターで一夜培養した。

[0037] (2) AAV-miRNAライブラリーベクターのAAV293細胞への感染

実施例4-(1)で培養したAAV293細胞より培地を完全に除去した後、実施例2で調製したAAV-miRNAライブラリーベクター溶液をゲノム力価換算値でmoi (multiplicity of infection) 約850になるように2%FBSを含むDMEMに希釈して2mL添加し、37°CのCO₂インキュベーターで2時間培養した。その後、2%F

BSを含むDMEMを2 mL添加し、37℃のCO₂インキュベーターで一夜培養した。

[0038] (3) pAAV-RC1 plasmid及びpHelper plasmidのAAV293細胞へのトランスフェクション

実施例4-(2)で培養したAAV293細胞に、リン酸カルシウム法を用いて、pAAV-RC1 plasmid及びpHelper plasmidを4 µgずつトランスフェクションした。6時間後、培地を完全に除去した後に2% FBS及び2 mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEM 4 mLを添加した細胞を、37℃のCO₂インキュベーターで更に48時間培養した。

[0039] (4) AAV-miRNAライブラリーベクターの再回収

実施例4-(3)で培養したAAV293細胞より培地を除去し、PBSを1 mL添加した。ピペティングでAAV293細胞を1.5 mLチューブに回収し、4℃、700×g、5分間遠心後、上清を除去した。PBS 0.1 mLに細胞を再懸濁後、エタノール/ドライアイスで2分間、37℃のウォーターバスで2分間、ボルテックス・ミキサーでの攪拌1分間の処理を3回繰り返し、AAV-miRNAライブラリーベクターを含む細胞破砕液を回収した。この細胞破砕液を4℃、10,000×g、10分間遠心後、上清を回収しAAV-miRNAライブラリーベクター液とした。

[0040] (5) AAV-miRNAライブラリーベクターの濃縮

上記実施例4-(1)～(4)を計8回繰り返し、AAV-miRNAライブラリーベクターを濃縮した。各ラウンドにおける感染時ウイルス量(moi)及び回収ウイルス量をゲノム力価換算値を用いて表1に示す。

[0041]

[表1]

	感染時ウイルス量 (VG/cell)	回収ウイルス量 (VG/cell)	r a t i o
ラウンド1	849	716	84%
ラウンド2	251	80	32%
ラウンド3	56	96	172%
ラウンド4	68	23	34%
ラウンド5	17	491	2,816%
ラウンド6	20	147	735%
ラウンド7	20	130	650%
ラウンド8	20	147	735%

[0042] 上記の表より、ラウンド5以降はAAV-miRNAウイルスが複製しやすくなっており、AAVベクター産生を向上させるmiRNAが濃縮されたと考えられた。

[0043] 実施例5 AAVベクター産生を向上させるmiRNAの選択

(1) AAV-miRNAベクターゲノムの調製

実施例4の各ラウンドで回収したAAV-miRNAライブラリーベクター液2 μ Lを用いて実施例3-(1)、(2)と同様の方法でAAV-miRNAライブラリーベクターゲノム液を得た。

[0044] (2) miRNAのクローニング

実施例5-(1)で得たAAV-miRNAライブラリーベクターゲノム液を鋳型とし、配列表の配列番号3 (Forward primer 2) 及び配列番号4 (Reverse primer 2) に記載のプライマー、PrimeSTAR (登録商標) GXL DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いてmiRNAコード領域周辺をPCR法により増幅させた。反応は、98℃10秒、55℃15秒、68℃30秒を30サイクル繰り返した後、更に同じ条件を1回繰り返した。得られた断片を、In-Fusion (登録商標) Advantage PCRクローニングキットを用いてHincII (タカラバイオ社製) 及びBAP (タカラバイオ社製) 処理済のpUC118 (タカラバイオ社製) に連結した。

[0045] (3) miRNAの塩基配列の解読

実施例5-(2)で得られた組換えプラスミドで大腸菌を形質転換後、ア

ンピシリンを含むLBプレートに播種して37℃で一夜培養し、コロニーを多数得た。コロニーをいくつか選び、それぞれをアンピシリンを含むLB液体培地で一夜培養し、Miniprep DNA Purification Kit（タカラバイオ社製）を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドについて塩基配列の解読を行い、プラスミド上にコードされているmiRNA名を同定した。その結果を表2に示す。

[0046] [表2]

名称	ラウンド 4	ラウンド 5	ラウンド 6	ラウンド 7	ラウンド 8	総出数
h s a - m i R - 3 2 4	9	7	13	19	24	72
h s a - m i R - 1 9 6 a 1	1	2	3	4	1	11
h s a - m i R - 3 4 2				5	3	8
h s a - m i R - 1 2 5 a			2	2		4
h s a - m i R - 1 4 5		1		1		2
h s a - m i R - 5 1 8 e			2			2
h s a - m i R - 6 4 5		1			1	2
m i R N A 0 0 1			2			2
h s a - m i R - 1 0 6 b		1				1
h s a - m i R - 1 2 4	1					1
h s a - m i R - 1 2 5 b		1				1
h s a - m i R - 2 0 5	1					1
h s a - m i R - 3 0 a	1					1
h s a - m i R - 3 0 e		1				1
h s a - m i R - 3 3 5		1				1
h s a - m i R - 4 8 3				1		1
h s a - m i R - 4 9 4	1					1
h s a - m i R - 4 9 9					1	1
h s a - m i R - 5 1 3 a	1					1
h s a - m i R - 5 1 5					1	1
h s a - m i R - 5 1 6 b				1		1
h s a - m i R - 5 1 7 b				1		1
h s a - m i R - 5 5 0			1			1
h s a - m i R - 6 3 3			1			1
m i R N A 1 0 1					1	1
塩基配列解読数	15	15	24	34	32	120

[0047] 上記の表に示す通り、h s a - m i R - 1 9 6 a 1、3 2 4、3 4 2等が複数回同定されたことから、ラウンドを繰返すことで、AAVベクター産生を向上させるmiRNAが取得されたと考えられた。

[0048] 実施例6 取得したmiRNAの評価

(1) miRNA発現プラスミドの調製

pBApo-CMV DNAにクローニングされたヒトmiRNAライブラリーからhsa-miR-196a1、hsa-miR-324、hsa-miR-342が挿入されたプラスミドを選択し、それぞれを用いて大腸菌を形質転後、プラスミドを大量調製した。プラスミド調製にはNucleobond Xtra Midi EF（マッハライナーゲル社製）を用いた。得られたプラスミドをそれぞれpBApo-miR196a1、pBApo-miR324、pBApo-miR342と名付けた。

[0049] (2) AAVベクターの製造

実施例6-(1)で得られたプラスミドを、pAAV-AsRed2-C1 vector、pAAV-RC1 plasmid、pHelper plasmidと同時にAAV293細胞にトランスフェクションした。コントロールとして、実施例6-(1)で得られたプラスミドに替えてpBApo-CMVをトランスフェクションした群も設定した。トランスフェクション及びAAVベクター回収までの操作は、実施例2-(1)～(3)と同様の方法で行った。

[0050] (3) AAVベクターのゲノム力価測定

得られたAAVベクターのゲノム力価を実施例3と同様の方法で測定した。その結果を表3に示す。

[0051] [表3]

p l a s m i d	取得ウイルス量 (VG/c e l l)
p B A p o - C M V D N A	4, 4 8 0
p B A p o - m i R 1 9 6 a 1	5, 4 6 4
p B A p o - m i R 3 2 4	1 3, 2 6 1
p B A p o - m i R 3 4 2	4, 6 0 6

[0052] 上記の表に示すとおり、pBApo-miR324、pBApo-miR196a1、pBApo-miR342を用いたところ、コントロールと比較して高いゲノム力価のAAVベクターが得られた。とくにpBApo-miR324では数倍高いゲノム力価のAAVベクターが得られた。

[0053] 実施例7 pRC-miR342プラスミドの評価

(1) pRC-miR342プラスミドの調製

pBApo-miR342を鋳型として、配列表の配列番号5 (Forward primer 3) 及び配列番号6 (Reverse primer 3) に記載のプライマーを用いたPCR法によりCMVプロモーターからmiR342コード領域までを含む領域を増幅した。得られた断片を、SnaBI (タカラバイオ社製) 処理したpAAV-RC1 plasmid にIn-Fusion (登録商標) Advantage PCRクローニングキットを用いて連結した。得られた組換えプラスミドの塩基配列を解読しCMV-miR342断片が挿入されていることを確認後、プラスミドを調製した。得られたプラスミドをpRC-miR342とした。

[0054] (2) pRC-miR342の評価

実施例7-(1) で得られたpRC-miR342を、pAAV-AsRed2 vector、pHelper plasmidと同時にAAV293にトランスフェクションした。コントロールとして、pRC-miR342に替えてpAAV-RC1 plasmidをトランスフェクションした群も設定した。こうして得られたAAVベクター産生細胞を293-RC-miR342細胞、293-RC細胞と名付けた。トランスフェクションの方法及びAAVベクター回収までの操作は、実施例2-(1) ~ (3) と同様の方法で行った。

[0055] (3) AAVベクターのゲノム力価測定

実施例7-(2) で得られた各AAVベクター産生細胞から得られたAAVベクターのゲノム力価を実施例3と同様の方法で測定した。その結果を表4に示す。

[0056]

[表4]

AAVベクター産生細胞名	取得ウイルス量 (VG/cell)	平均 (VG/cell)	ratio
293-RC細胞	1.31E+04 1.26E+04	1.29E+04	1.64
293-RC-miR34 2細胞	1.92E+04 2.30E+04	2.11E+04	

[0057] 上記の表に示すように、pRC-miR342を用いて作製したAAVベクター産生細胞からは、コントロールと比較して6割高いゲノム力価のAAVベクターが得られたことが示された。

[0058] 実施例8 得られたAAVベクターの評価

(1) 標的細胞の播種

AAV293細胞を10%FBS、2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEMに 4×10^4 細胞/mLとなるように懸濁した。この懸濁液1mLを細胞培養用24ウェルプレート（コーニング社製）に添加し、37℃のCO₂インキュベーターで一夜培養した。

[0059] (2) ウイルス感染

実施例8-(1)のAAV293細胞より培地を除去した後、10%FBS及び2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEMを500μL添加し、実施例7-(2)で得られたAAVベクター溶液を1μL添加した。37℃のCO₂インキュベーターで6時間培養後、培地を除去し、10%FBS及び2mM L-グルタミン酸ナトリウムを含むDMEMを500μL添加し、一夜培養した。

[0060] (3) フローサイトメーター解析と感染力価の算出

実施例8-(2)で培養したAAV293細胞より培地を除去し、PBSを500μL添加した。トリプシン処理後、培地を500μL添加しピペティングでAAV293細胞を1.5mLチューブに回収した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメーターCytomics FC500（ベックマン・コールター社製）でAsRed2陽性率を測定した。得られた値をもとに感染力価を算出し、AAVベクター液1mL当たりの感染性AAVベクタ

—数 (Infectious viral particle/mL、以下 i v p/mL) で示した。その結果を表5に示す。

[0061] [表5]

AAVベクター産生細胞名	ウイルス感染力価 (i v p/mL)
293-RC細胞	2.5.E+06
293-RC-miR342細胞	3.6.E+06

[0062] 上記の表に示すように、pRC-miR342を用いて製造したAAVベクターは、ゲノム力価だけでなく、感染力価も高く、pRC-miR342はAAVベクター産生細胞に導入されたことで、正常な感染能を持ったAAVベクターの産生能力を向上させることが明らかとなった。

[0063] 実施例9 pRC6-miR342、pRC9-miR342プラスミドの評価

(1) pRC-miRNAプラスミドの作製

pAAV-RC1をSmiIとSnaBIで処理し、9型AAVのCap遺伝子の同部位を人工合成の上、連結して、pRC9を構築した。実施例7-(1)で増幅したCMVプロモーターからmiR342コード領域まで含む断片を、SnaBI処理したpRC9に実施例7-(1)と同様の方法により連結し、pRC9-miR342を得た。即ち、pRC9-miR342は9型AAVのCap遺伝子及びCMV-miR342断片を含むヘルパープラスミドである。また、pBapo-miR342を鋳型として、配列表の配列番号7 (Forward primer 4) 及び配列番号8 (Reverse primer 4) に記載のプライマーを用いたPCR法によりCMVプロモーターからmiR342コード領域までを含む領域を別途増幅した。この断片を、SmaI (タカラバイオ社製) 処理したpRep-Cap AAV6プラスミド (Applied Viromics社製) にIn-Fusion (登録商標) Advantage PCRクローニング

キットを用いて連結し、pRC6-miR342を得た。即ち、pRC6-miR342は6型AAVのCap遺伝子及びCMV-miR342断片を含むヘルパープラスミドである。

[0064] (2) pRC-miRNAの評価

実施例9-(1)で得られたプラスミドまたはコントロールプラスミドを、pAAV-AsRed2、pHelper plasmidと同時にAAV293へトランスフェクションした。トランスフェクションの方法及びAAVベクター回収までの操作は、実施例2-(1)～(3)と同様の方法で行った。

[0065] (3) AAVベクターのゲノム力価測定

実施例3と同様の方法で、製造したAAVベクターのゲノム力価を定量した。その結果を表6に示す。

[0066] [表6]

p l a s m i d	取得ウイルス量 (VG/c e l l)
p R C 6	8. 4. E+0 2
p R C 6-m i R 3 4 2	3. 9. E+0 3
p R C 9	3. 6. E+0 4
p R C 9-m i R 3 4 2	4. 0. E+0 4

[0067] 表6に示すように、miR342を挿入したpRCを用いると、6型及び9型AAVであってもコントロールと比較して高いゲノム力価のAAVベクターが得られることが示された。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明の細胞を用いることにより、従来に比べ高力価のAAVベクターを製造することができる。本発明の細胞を用いて製造されたAAVベクターや当該AAVベクターを有効成分とする組成物は、遺伝子治療の研究又は臨床の分野における遺伝子導入方法として非常に有用である。

配列表フリーテキスト

[0069] SEQ ID NO:1: Forward primer 1

SEQ ID N0:2: Reverse primer 1

SEQ ID N0:3: Forward primer 2

SEQ ID N0:4: Reverse primer 2

SEQ ID N0:5: Forward primer 3

SEQ ID N0:6: Reverse primer 3

SEQ ID N0:7: Forward primer 4

SEQ ID N0:8: Reverse primer 4

請求の範囲

- [請求項1] A A Vベクターを産生する能力を有する細胞であって、人為的に導入されたm i R N Aを発現している細胞。
- [請求項2] 人為的に導入されたm i R N Aが、h s a - m i R - 1 9 6 a 1、h s a - m i R - 3 2 4、h s a - m i R - 3 4 2からなる群より選択された少なくとも1種である、請求項1に記載の細胞。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の細胞にウイルスに封入される核酸を導入したA A Vベクター産生細胞。
- [請求項4] A A Vベクターの製造方法であって、請求項3に記載の細胞を培養する工程を含む方法。
- [請求項5] m i R N Aを供給する核酸と、A A Vベクターのウイルス粒子形成に必要な要素を供給する核酸を含むA A Vベクター製造用のキット。
- [請求項6] 請求項4に記載の方法を用いて得られるA A Vベクター。
- [請求項7] A A Vベクター産生細胞内で発現することによってA A Vベクター産生細胞のA A Vベクター産生能力を向上させることが可能なm i R N Aの選択方法であって、m i R N Aを発現するA A Vベクターの混合物を作製し、細胞において高産生されるA A Vベクターを選抜する工程を包含する選択方法。
- [請求項8] 下記工程（a）～（e）を包含する請求項7に記載の選択方法：
 （a）m i R N Aを発現するA A Vベクター混合物を得る工程；
 （b）m i R N Aを発現するA A Vベクター混合物を細胞へ感染させる工程；
 （c）工程（b）により得られた細胞を培養し、当該細胞より産生されたA A Vベクター混合物を取得する工程；
 （d）工程（c）で得られたA A Vベクター混合物を使用した上記（b）、（c）の工程を1回以上繰り返す工程；及び
 （e）工程（d）により得られたA A Vベクター混合物中のm i R N Aをコードする核酸を得る工程。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/113, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAMBARA, H. et al., Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122, J. Virol., 2011, Vol.86, No.3, pages 1382-1393.	1-8
Y	MUNSON, D. J. and BURCH, A. D., A novel miRNA produced during lytic HSV-1 infection is important for efficient replication in tissue culture, Arch. Virol., June 2012, Vol.157, pages 1677-1688.	1-8
Y	APARICIO, O. et al., Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production, J. Virol., 2006, Vol.80, No.3, pages 1376-1384.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 July, 2013 (29.07.13)

Date of mailing of the international search report
06 August, 2013 (06.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/067488

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RANDALL, G. et al., Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2007, Vol.104, No.31, pages 12884-12889.	1-8
Y	HUSSAIN, M. et al., West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells, Nucleic Acids Res., 2011, Vol.40, No.5, pages 2210-2223.	1-8
Y	WO 01/032899 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 10 May 2001 (10.05.2001), entire text & US 6995010 B1 & EP 1225229 A1 & WO 2001/032899 A1	1-8
Y	WO 2006/035829 A1 (Takara Bio Inc.), 06 April 2006 (06.04.2006), entire text & US 2008/0293141 A1 & US 2008/0092467 A1 & EP 1795601 A1 & WO 2006/035829 A1	1-8
Y	WO 2009/148137 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 10 December 2009 (10.12.2009), entire text & US 2011/0130442 A1 & EP 2298359 A1 & WO 2009/148137 A1	1-8
A	OZAWA, K., Gene therapy using AAV (adeno-associated virus) vectors, Virus, 2003, Vol.53, No.2, pages 163-170.	1-8
A	JP 2001-517454 A (The Trustees of the University of Pennsylvania), 09 October 2001 (09.10.2001), entire text & US 6475769 B1 & US 2003/0040101 A1 & EP 1015619 A & WO 1999/015685 A1	1-8
A	JP 2001-520051 A (Targeted Genetics Corp.), 30 October 2001 (30.10.2001), entire text & US 2006/0205079 A1 & EP 1025251 A & WO 1999/020779 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/113, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、PubMed、CiNii、Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KAMBARA, H. et al., Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122, J. Virol., 2011, Vol.86, No.3, pages 1382-1393.	1-8
Y	MUNSON, D. J. and BURCH, A. D., A novel miRNA produced during lytic HSV-1 infection is important for efficient replication in tissue culture, Arch. Virol., June 2012, Vol.157, pages 1677-1688.	1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 7 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 8 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

白井 美香保

4 N

4 5 0 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	APARICIO, O. et al., Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production, J. Virol., 2006, Vol.80, No.3, pages 1376-1384.	1-8
Y	RANDALL, G. et al., Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2007, Vol.104, No.31, pages 12884-12889.	1-8
Y	HUSSAIN, M. et al., West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells, Nucleic Acids Res., 2011, Vol.40, No.5, pages 2210-2223.	1-8
Y	WO 01/032899 A1 (寶酒造株式会社) 2001.05.10, 全文 & US 6995010 B1 & EP 1225229 A1 & WO 2001/032899 A1	1-8
Y	WO 2006/035829 A1 (タカラバイオ株式会社) 2006.04.06, 全文 & US 2008/0293141 A1 & US 2008/0092467 A1 & EP 1795601 A1 & WO 2006/035829 A1	1-8
Y	WO 2009/148137 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2009.12.10, 全文 & US 2011/0130442 A1 & EP 2298359 A1 & WO 2009/148137 A1	1-8
A	OZAWA, K., Gene therapy using AAV (adeno-associated virus) vectors, ウイルス, 2003, Vol.53, No.2, pages 163-170.	1-8
A	JP 2001-517454 A (ザ・トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア) 2001.10.09, 全文 & US 6475769 B1 & US 2003/0040101 A1 & EP 1015619 A & WO 1999/015685 A1	1-8
A	JP 2001-520051 A (ターゲットッド ジェネティックス コーポレイション) 2001.10.30, 全文 & US 2006/0205079 A1 & EP 1025251 A & WO 1999/020779 A1	1-8