(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7522839号
(P7522839)

(45)発行日　令和6年7月25日(2024.7.25)

(24)登録日　令和6年7月17日(2024.7.17)

(51)国際特許分類		FI		
C12N	*15/861 (2006.01)*	C12N	15/861	ZZNA
C12N	*7/01 (2006.01)*	C12N	7/01	
C12N	*15/35 (2006.01)*	C12N	15/35	

請求項の数　19　（全49頁）

(21)出願番号　特願2022-547119(P2022-547119)
(86)(22)出願日　令和3年2月3日(2021.2.3)
(65)公表番号　特表2023-513891(P2023-513891A)
(43)公表日　令和5年4月4日(2023.4.4)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/050235
(87)国際公開番号　WO2021/156609
(87)国際公開日　令和3年8月12日(2021.8.12)
審査請求日　令和4年10月11日(2022.10.11)
(31)優先権主張番号　2001486.6
(32)優先日　令和2年2月4日(2020.2.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関　英国(GB)
(31)優先権主張番号　2009241.7
(32)優先日　令和2年6月17日(2020.6.17)
最終頁に続く

(73)特許権者　518305392
オックスフォード ジェネティクス リミテッド
ＯＸＦＯＲＤ ＧＥＮＥＴＩＣＳ ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス、オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス４ ４エイチジー、ロバート ロビンソン アヴェニュー、メダワー センター

(73)特許権者　507226592
オックスフォード ユニヴァーシティ イノヴェーション リミテッド
英国 オーエックス２ ０ジェイビー オックスフォード ウエスト ウェイ３ バクストン コート
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アデノ随伴ウイルスベクターの製造プロセス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

核酸分子を含むアデノウイルスベクターであって、

前記核酸分子のヌクレオチド配列は、少なくとも１つのＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードし、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は下記特徴を有する、アデノウイルスベクター。

（ｉ）機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連していない；

（ｉｉ）機能的ＡＡＶ ｐ１９プロモーターを含まず、および／または、機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチドをコードしない；ならびに

（ｉｉｉ）配列番号１０に示される配列、または、配列番号１０に対する配列同一性が少なくとも９０％である変異体であって、かつ、宿主細胞中でアデノウイルスベクターの複製を阻害することができる配列、を有する機能的アデノウイルス阻害配列を含まない。

【請求項２】

前記ヌクレオチド配列が機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードする、請求項１に記載のアデノウイルスベクター。

【請求項３】

前記核酸分子がｐ５プロモーターを含まない、請求項１または２に記載のアデノウイルスベクター。

【請求項４】

前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列が、

（ｉ）機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連しておらず；かつ
（ｉｉｉ）機能的ＡＡＶ ｐ４０プロモーターを含まず、かつ、前記機能的アデノウイルス阻害配列を含まない、
という特徴を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項５】
前記Ｒｅｐ７８ポリペプチドは、野生型ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子の野生型ｐ５プロモーターと作動可能に関連する野生型Ｒｅｐ７８ポリペプチドの発現レベルの１０％未満である発現レベルで発現される、請求項２に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項６】
前記Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ４０ポリペプチドは発現できない、請求項１～５のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項７】
前記アデノウイルス阻害配列は転写できない、請求項１～６のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項８】
宿主細胞における前記アデノウイルス阻害配列の転写が、前記宿主細胞中の野生型アデノウイルスの複製を阻害しないように、前記アデノウイルス阻害配列が修飾される、請求項１～７のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項９】
前記核酸分子が、アデノウイルス初期遺伝子のうちの一つに位置する、請求項１～８のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１０】
前記核酸分子が、Ｅ４、Ｅ２ＡおよびＥ２Ｂ発現カセットと同じ転写方向で、Ｅ１領域に位置する、請求項１～９のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１１】
前記核酸分子が上流のプロモーターと作動可能に関連しない、請求項９または１０に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１２】
前記アデノウイルスベクターがさらにＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１３】
前記アデノウイルスベクターが、さらに、単純ヘルペスウイルス由来のＶＰ１６転写アクチベーターまたはｐ５３タンパク質由来のトランスアクチベータードメインをコードする、請求項１～１２のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１４】
前記アデノウイルスベクターが、抑制可能な主要後期プロモーター（ＭＬＰ）を含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクター。
【請求項１５】
（Ａ）請求項１～１４のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターである第１のアデノウイルスベクターと、
（Ｂ）第２のアデノウイルスベクターであって、
（ｉ）ＡＡＶ Ｃａｐポリペプチドをコードする核酸分子、および／または
（ｉｉ）組み換えＡＡＶゲノムをコードする核酸分子、
を含む第２のアデノウイルスベクターと、
を含む、キット。
【請求項１６】
前記第１のアデノウイルスベクターが、前記第２のアデノウイルスベクターに存在するプロモーターを転写的に活性化することができるポリペプチドを、さらにコードする、請求項１５に記載のキット。
【請求項１７】

ＡＡＶ粒子を製造するためのプロセスであって、
前記プロセスが、
（ａ）哺乳類宿主細胞に、請求項１～１４のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターである第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程と、
（ｂ）前記宿主細胞に第２のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、前記第２のアデノウイルスベクターが導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶゲノムを含み、前記第１のアデノウイルスベクターおよび前記第２のアデノウイルスベクターのうちの少なくとも一つがＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む、工程と、
（ｃ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｄ）ＡＡＶ粒子を前記宿主細胞または前記細胞培地から単離または精製する工程とを含む、製造するためのプロセス。
【請求項１８】
ＡＡＶ粒子を製造するためのプロセスであって、前記プロセスが、
（ａ）哺乳類宿主細胞に、請求項１～１４のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターである第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、前記哺乳類宿主細胞は、前記宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれた組み換えＡＡＶゲノムを含み、前記組み換えＡＡＶゲノムは導入遺伝子を含み、
（ｉ）前記アデノウイルスベクターはさらにＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含むか、または
（ｉｉ）ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子が前記哺乳類宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか、または
（ｉｉｉ）前記細胞が、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む第２のアデノウイルスベクターに感染している、工程と
（ｂ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、前記導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｃ）ＡＡＶ粒子を前記細胞または前記細胞培地から単離または精製する工程と、を含む、製造するためのプロセス。
【請求項１９】
組み換えＡＡＶ粒子を製造するためのプロセスであって、前記プロセスが、
（ａ）哺乳類宿主細胞に、請求項１～１４のいずれか一項に記載のアデノウイルスベクターである第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、
（ｉ）前記第１のアデノウイルスベクターはさらにＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含むか、または
（ｉｉ）前記細胞が、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む第２のアデノウイルスベクターに感染している、工程と
（ｂ）前記哺乳類宿主細胞に導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶを感染させる工程と、
（ｃ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、前記導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｄ）ＡＡＶ粒子を前記細胞または前記細胞培地から単離および／または精製する工程と、を含む、製造するためのプロセス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、少なくとも１つのＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードする核酸分子に関し、ＡＡＶ ｐ５プロモーター、ＡＡＶ ｐ１９プロモーターおよびＡＡＶ ｐ４０プロモーターの一つ以上がＲｅｐポリペプチドの一つ以上の発現を低減もしくは除去するように修飾されるか、前記核酸分子が機能的Ｒｅｐ ５２ポリペプチドもしくは機能的Ｒｅｐ ４０ポリペプチドをコードしないか、または、前記核酸分子が機能的アデノウイルス阻害配列（inhibitor sequence）をコードしない。
【０００２】

本発明はまた、２－アデノウイルス系を使用することにより組み換えＡＡＶベクターを製造するプロセスに関し、ＡＡＶ複製とパッケージングとに必要な遺伝子のすべて（すなわち、本発明のＡＡＶＲｅｐ配列、ＡＡＶ ｃａｐ、および、導入遺伝子を含むＡＡＶトランスファーベクター）が、二つのアデノウイルス内にコードされてもよい。

【０００３】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、パルボウイルス科に属する単鎖ＤＮＡウイルスである。このウイルスは、分裂細胞および非分裂細胞の両方を含む広い範囲の宿主細胞に感染することができる。また、このウイルスは、ほとんどの患者において限定的な免疫応答のみを引き起こす、非病原性ウイルスである。

【０００４】

ここ数年間、ＡＡＶ由来のベクターが、遺伝子送達の非常に有用かつ有望な形態として浮上している。これは、これらのベクターの下記の特性による。

- ＡＡＶは、小さいノンエンベロープウイルスであり、その内在遺伝子は二つのみ（ｒｅｐおよびｃａｐ）である。したがって、様々な遺伝子療法用のベクターを開発するために容易に操作できる。これは、ＡＡＶゲノムのｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子の除去によって、また、これらの配列を患者に治療効果を提供しうる外因性配列（導入遺伝子）に置き換えることによって、達成される。
- ＡＡＶ粒子は、剪断力、酵素、または溶媒によって容易に分解されない。このことは、これらのウイルスベクターの精製および最終製剤化を容易にする。
- ＡＡＶは非病原性であり、免疫原性が低い。これらのベクターを使用することにより、好ましくない炎症反応のリスクをさらに低減する。レンチウイルス、ヘルペスウイルスおよびアデノウイルスなどの他のウイルスベクターとは違い、ＡＡＶは害がなく、なんらかのヒトの疾患を起こす原因となるとは考えられていない。
- ＡＡＶベクターを使用して、患者に約４５００ｂｐ以下の遺伝子配列を送達することができる。
- 野生型ＡＡＶベクターはヒト染色体１９へ遺伝物質を挿入する時があることが示されている一方で、この特性は、ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子をウイルスゲノムから取り除くことにより、ＡＡＶ遺伝子治療ベクターから一般的には除去されている。かかる場合に、前記ウイルスは、宿主細胞内でエピソーム形態のままである。これらエピソームは非分裂細胞中で保全されるが、分裂細胞中では細胞分裂の間に失われる。

【０００５】

天然型ＡＡＶゲノムは、それぞれが複数のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードする、ｒｅｐ遺伝子とｃａｐ遺伝子との二つの遺伝子を含み、ｒｅｐ遺伝子は、ウイルスゲノムの、ＡＡＶのライフサイクルおよび部位特異的な組み込みに必要な非構造的タンパク質をコードし、ｃａｐ遺伝子は構造カプシドタンパク質をコードする。

【０００６】

また、これらの二つの遺伝子の両側には、ヘアピン構造を構成する能力がある１４５個の塩基からなる末端逆位反復配列（ＩＴＲ）がある。これらのヘアピン配列は、第２のＤＮＡ鎖のプライマーゼ独立性合成と、ウイルスＤＮＡの宿主細胞ゲノムへの組み込みとのために必要である。

【０００７】

ウイルスの組み込み能力を除去するために、組み換えＡＡＶベクターはウイルスゲノムのＤＮＡからｒｅｐおよびｃａｐを除去する。かかるベクターを製造するために、導入遺伝子（単数または複数）の転写を駆動するためのプロモーターとともに、所望の導入遺伝子（単数または複数）が、末端逆位反復配列（ＩＴＲ）の間に挿入され、前記ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子が第２のプラスミドにトランスに提供される。アデノウイルスＥ４、Ｅ２ａおよびＶＡ遺伝子などのヘルパー遺伝子も提供される。ｒｅｐ遺伝子、ｃａｐ遺伝子、およびヘルパー遺伝子は、細胞にトランスフェクトされた追加のプラスミド上に提供されてもよい。

【０００８】

従来、ＡＡＶベクターの産生は異なる多数の経路から達成されている。

当初、ＡＡＶは野生型（ＷＴ）アデノウイルス血清型５を用い、ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子とＡＡＶゲノムとをコードするプラスミドを細胞にトランスフェクトして生成された。これにより、ＷＴアデノウイルスがウイルス複製を容易にする数多くの因子をトランスに提供できるようになった。しかしこの手法には数多くの限界があった。たとえば、ＡＡＶの各バッチは純粋な生成物を提供するためには製造後にアデノウイルス（ＡＶ）粒子から分離しなければならないが、全てのＡｄ５を確実に除去することは困難である。さらに、製造中に、細胞がＡＡＶよりむしろアデノウイルス粒子の産生に膨大なリソースを充当していることも望ましくない。

【０００９】

他の系では、ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子を発現する安定的なパッケージ細胞株が使用されてきた。かかる系では、前記ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子は細胞ゲノムに組み込まれ、したがってプラスミドベースのｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子が不要になる。しかしながら、これらの遺伝子は、通常、その固有の毒性のせいで、組み込まれる頻度が低い（たとえば、細胞あたり１～２コピー）。これらの系はアデノウイルスベクターでの感染を必要とする。

【００１０】

さらに最近では、アデノウイルスに基づく系は、ＡＡＶ産生に必要なアデノウイルスゲノムの部分をコードするプラスミドに置き換えられた。これにより、最終ウイルス製剤に存在するアデノウイルス粒子に関する懸念の一部は解決したが、数多くの問題が残っている。その問題には、製造細胞株のトランスフェクションに十分なプラスミドを予め製造することが必要であることや、トランスフェクションのプロセスそれ自体が本質的に非効率であること、などがある。これらの系の収率も、Ａｄ５に基づく手法と比べて低い。

【００１１】

ＡＡＶ遺伝子（ｒｅｐおよびｃａｐ）およびＡＡＶトランスファーベクターをアデノウイルスにコードすることが、過去に広く調査されてきた（Fisher, K.J et al., 1996; Liu, X.L. et al., 1999）。ＡＡＶゲノムおよびＡＡＶ Ｃａｐ ＤＮＡ配列はアデノウイルスのゲノム内に挿入されたときには許容される一方、ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質およびＤＮＡ配列は、アデノウイルスに対し致死的であり、その複製を阻害する。アデノウイルス複製におけるＡＡＶ Ｒｅｐの毒性にもかかわらず、ＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードするアデノウイルスの産生が成功したと報告した論文もいくつかある。しかしながら、これらのアデノウイルスは、産生での低い力価や、ウイルスの複数継代後のｒｅｐ遺伝子の消失とあいまって、一般的に不安定である（Zhang, H.G et al. 2001; Zhang, X and Li, C-Y, Mol. Ther. 2001）。

【００１２】

ＡＡＶ Ｒｅｐによるアデノウイルスの阻害は、二つの主要なメカニズムにより引き起こされる。第一に、ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質は、アデノウイルスプロモーター（ＭＬＰ、Ｅ２Ｂ、Ｅ４を含む）の、潜在的な阻害剤である（Timpe J.M. et al., 2006）。第二に、アデノウイルス阻害配列は、（ｃａｐ遺伝子の発現を駆動するためのウイルスによって普通は使用されるｐ４０プロモーターの中に位置する）ＡＡＶ ｒｅｐ ＤＮＡ中にコードされる。この「阻害的」ｐ４０ ＤＮＡ配列を組み換える（scrambling）ことにより、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子がアデノウイルス内に許容できることが、論文に示されている（Sitaraman, V. et al., 2011; Weger, S. et al., J. Virol. 2016）。

【００１３】

本発明は、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子がアデノウイルスベクターに安定的にコードされることを可能にする工程の組み合わせに基づく。ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子をアデノウイルスベクターに挿入し維持することが成功したことはこれまでに無かった。特に、一部の実施形態において、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子プロモーターｐ５、ｐ１９およびｐ４０はすべて修飾されるか除去されている。ｐ５プロモーターが除去されて、Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＲｅｐ６８ポリペプチドの発現を低減し、したがってその毒性を低減している。ｐ１９プロモー

ターが除去されて、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよびＲｅｐ４０ポリペプチドの発現を停止し、ｐ４０プロモーター内のＡＶ阻害配列が除去されるか修飾され、またはその転写が妨げられている。

【００１４】

ＡＶを使用してＡＡＶを製造する際に、遺伝学的に異なる、望ましいＡＡＶのそれぞれのために１つのＡＶを修飾するだけでよいことが好ましい。しかしながら、ｒｅｐ遺伝子、ｃａｐ遺伝子、およびトランスファーＡＡＶゲノムを組み合わせた分子のサイズは、Ｅ１／Ｅ３欠失ＡＶベクターのパッケージング能力を超えてしまう。

【００１５】

本発明者らは、二つのＡＶを使用することによって利点が得られることを発見した。遺伝学的に異なるＡＡＶがユニークなカプシドおよびトランスファーＡＡＶゲノムを含みうるので、本発明の一つの態様は、細胞を二つのＡＶベクターに接触させることに関し、二つのＡＶベクターの一つは、ＡＡＶ Ｒｅｐコーディング配列を含むものであり、もう一つは、Ｃａｐコーディング配列およびトランスファーＡＡＶゲノム配列（後者はＡＡＶ末端逆位反復配列が隣接する配列として定義される）を含むものである。

【００１６】

本発明者らは、また、Ｒｅｐコーディング配列およびＡＡＶ ＩＴＲ配列が同じＡＶに存在することが、ＡＶの増殖に有害であると判断した。かかるＡＶは回収できる一方で、その収量は典型的には、ＡＶが各配列をそれぞれ独立して含む場合の５～１０倍低い。

【００１７】

したがって、本発明の他の態様では、Ｒｅｐコーディング配列はその発現を駆動するプロモーターを含まず、かつ、その転写方向は、ＡＶゲノムのＥ２Ａ転写ユニット、Ｅ２Ｂ転写ユニット、およびＥ４転写ユニットの転写方向と合致している。これによって、Ｒｅｐポリペプチドが、細胞に対する毒性を低減するために低レベル、基準レベルまたは最小レベルで発現されること、および、Ｒｅｐポリペプチドが、アデノウイルスパッケージングシグナルエレメントに埋め込まれた強力なＥ１Ａプロモーターから転写リードスルーを介して、高レベルで転写されないことが確実になる。

【００１８】

さらに他の態様では、ｒｅｐ遺伝子を含む第１のＡＶが、場合によっては、ｃａｐ遺伝子の発現を駆動している第２のＡＶ中のプロモーターを転写的に活性化させることができるタンパク質をもコードしてもよい。これによって、両方のＡＶが同じ細胞内に存在する場合にのみｃａｐ遺伝子の転写が誘導され、ＡＶの製造中にＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を発現する負担を軽減する。

【００１９】

本発明の目的は、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子を含む核酸分子であって、アデノウイルスベクターへの前記核酸分子の組み込み、および／またはその後の発現による毒性の低減のために、前記ｒｅｐ遺伝子プロモーターが修飾されるかまたは除去されている核酸分子を提供することである。

【００２０】

本発明の他の目的は、本発明の核酸分子を含むアデノウイルスベクター、および本発明の核酸分子を含む宿主細胞を提供することである。

【００２１】

本発明の他の目的は、本発明の核酸分子を含む改変された宿主細胞（modified host cell）およびアデノウイルスベクターを製造するプロセス、ならびにＡＡＶを製造するプロセスを提供することである。

【００２２】

一実施形態において、本発明は核酸分子を提供し、前記核酸分子のヌクレオチド配列は、少なくとも１つのＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードし、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は下記特徴のうちの二つまたは三つを有する。

（ｉ）機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連していない。

（ｉｉ）機能的ＡＡＶ ｐ１９プロモーターを含まないか、または、機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチドをコードしない。
（ｉｉｉ）機能的ＡＡＶ ｐ４０プロモーターを含まないか、または、機能的アデノウイルス阻害配列を含まない。
【００２３】
好ましくは、前記ヌクレオチド配列は機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードする。好ましくは、前記核酸分子は、作動可能に関連（operably-associated）するプロモーターの非存在下で、機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ５２ポリペプチドまたは機能的ＡＡＶ Ｒｅｐ４０ポリペプチドを発現することができない。
【００２４】
本発明の核酸分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡであってもよい。それは、一本鎖または二本鎖であってもよい。
【００２５】
本明細書において、「ｒｅｐ遺伝子」という用語は、１つ以上のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードする遺伝子のことをいい、前記ＯＲＦの各々はＡＡＶ Ｒｅｐ非構造タンパク質またはその変異体もしくは誘導体をコードする。これらのＡＡＶ Ｒｅｐ非構造タンパク質（またはその変異体もしくは誘導体）は、ＡＡＶゲノムコピーおよび／またはＡＡＶゲノムパッケージングに関与している。
【００２６】
野生型ｒｅｐ遺伝子は、ｐ５、ｐ１９およびｐ４０の３つのプロモーターを含む。異なる長さの、二つの重複するメッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）は、ｐ５から、およびｐ１９から、産生することができる。これらのｍＲＮＡの各々は、１つのスプライスドナー部位と２つの異なるスプライスアクセプター部位とを使用し、スプライスアウトできるイントロンを含むか、またはスプライスアウトできないイントロンを含む。。このように、６つの異なるｍＲＮＡが形成でき、そのうち４つのみが機能的である。前記イントロンを除去していない二つのｍＲＮＡ（ｐ５から転写されたものと、ｐ１９から転写されたもの）は、共通ターミネーター配列まで読み取られ、かつＲｅｐ７８およびＲｅｐ５２をそれぞれコードする。前記イントロンの除去、および前記５'モストスプライスアクセプター部位（5'-most splice acceptor site）の使用は、なんらかの機能的なＲｅｐタンパク質の産生をもたらすわけではない－前記配列の残りのフレームがシフトするから正しいＲｅｐ６８タンパク質またはＲｅｐ４０タンパク質を産生できず、Ｒｅｐ７８またはＲｅｐ５２のターミネーターがスプライスアウトされるのでそれらの正しいＣ末端を産生することもないだろう。逆に、前記イントロンの除去、および前記３’スプライスアクセプターの使用は、Ｒｅｐ６８およびＲｅｐ４０の正しいＣ末端を産生し、Ｒｅｐ７８およびＲｅｐ５２のターミネーターをスプライスアウトすることになるだろう。したがって、前記機能的スプライシングのみとすることは、イントロンをまとめてスプライスアウトすることを回避する（Ｒｅｐ７８およびＲｅｐ５２を産生する）か、または、前記３’スプライスアクセプターを使用する（Ｒｅｐ６８およびＲｅｐ４０を産生する）かのどちらかになる。その結果、重複した配列を持つ４つの異なる機能的Ｒｅｐタンパク質が、これらのプロモーターから合成できる。
【００２７】
野生型ｒｅｐ遺伝子では、前記ｐ４０プロモーターは３'末端に位置する。Ｃａｐタンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３）の転写は、野生型ＡＡＶゲノムでは、このプロモーターから開始される。
【００２８】
前記４つの野生型Ｒｅｐタンパク質は、Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２、およびＲｅｐ４０である。したがって、前記野生型ｒｅｐ遺伝子は、前記４つのＲｅｐタンパク質Ｒｅｐ７８、Ｒｅｐ６８、Ｒｅｐ５２およびＲｅｐ４０をコードする遺伝子である。
【００２９】

本明細書において、「ｒｅｐ遺伝子」という用語は、野生型ｒｅｐ遺伝子およびその誘導体、ならびに、同等の機能を有する人工のｒｅｐ遺伝子を含む。前記野生型ｒｅｐ遺伝子は、機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチド、機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチド、機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチド、および機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチドをコードする。

【００３０】

特に好ましい実施形態において、前記ヌクレオチド配列は機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードする。

【００３１】

本明細書において、Ｒｅｐ７８ポリペプチドという用語は、配列番号２２のポリペプチドのことをいうか、またはその変異体であって、配列番号２２のポリペプチドに対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％であり、かつ機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドをコードする変異体のことをいう。本明細書において、Ｒｅｐ６８ポリペプチドという用語は、配列番号２３のポリペプチドのことをいうか、またはその変異体であって、配列番号２３のポリペプチドに対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％であり、かつ機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードする変異体のことをいう。

【００３２】

ＡＡＶの産生において、十分な機能的Ｒｅｐポリペプチドの非存在下で、低い力価（たとえばゲノムコピー）が観察される（ｑＰＣＲにより測定できる）。これは、パッケージされるＩＴＲプラスミドがほとんど無く、効果的にパッケージされないという事実のためである。また、誇張された不完全体／完全体粒子比率（exaggerated empty:full particle ratio）を観察してもよい。これはＥＬＩＳＡや光学密度測定によって測定できる。

【００３３】

前記Ｒｅｐ７８ポリペプチド／Ｒｅｐ６８ポリペプチドは、ＡＴＰと結合し、かつ、ヘリカーゼ活性を有し、かつ、一本鎖のゲノム前駆体の蓄積の支援および予め形成されたＡＡＶカプシドへの新たに形成されたＤＮＡ鎖のパッケージの支援に関与してもよい。

【００３４】

Ｒｅｐ７８ポリペプチド変異体またはＲｅｐ６８ポリペプチド変異体が発現しているかどうかをウエスタンブロットで判定し、これらのポリペプチドが正しい分子量で産生されているかを判定することが可能である。

【００３５】

これらのポリペプチドの機能は、その精製された形態で、ＡＴＰの消費を判定する生物発光ＡＴＰアッセイを使用して判定してもよい。Ｒｅｐ７８およびＲｅｐ６８はどちらもヘリカーゼ活性を有するので、適切なヘリカーゼアッセイも使用してもよい。

【００３６】

生物発光ＡＴＰアッセイにおいて、野生型Ｒｅｐ７８ポリペプチド（たとえば、配列番号２２のもの）のＡＴＰ消費のレベルの少なくとも８０％（好ましくは少なくとも９０％）のレベルのＡＴＰ消費を有する試験Ｒｅｐ７８ポリペプチドは、機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドであるとみなすことができる。

【００３７】

生物発光ＡＴＰアッセイにおいて、野生型Ｒｅｐ６８ポリペプチド（たとえば、配列番号２３のもの）のＡＴＰ消費のレベルの少なくとも８０％（好ましくは少なくとも９０％）のレベルのＡＴＰ消費を有する試験Ｒｅｐ６８ポリペプチドは、機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドであるとみなすことができる。

【００３８】

野生型Ｒｅｐ７８ポリペプチド（たとえば、配列番号２２のもの）のヘリカーゼ活性レベルの少なくとも８０％（好ましくは少なくとも９０％）のレベルのヘリカーゼ活性を有する試験Ｒｅｐ７８ポリペプチドは、機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドであるとみなすことができる。

【００３９】

野生型Ｒｅｐ６８ポリペプチド（たとえば、配列番号２３のもの）のヘリカーゼ活性レベルの少なくとも８０％（好ましくは少なくとも９０％）のレベルのヘリカーゼ活性を有する試験Ｒｅｐ６８ポリペプチドは、機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドであるとみなすことができる。

【００４０】

前記野生型ＡＡＶ（血清型２）ｒｅｐ遺伝子ヌクレオチド配列は、配列番号１に記載されている。

【００４１】

一実施形態において、前記「ｒｅｐ遺伝子」またはＲｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号1に対する配列同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％または１００％であるヌクレオチド配列であって、Ｒｅｐ７８ポリペプチド、Ｒｅｐ６８ポリペプチド、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよびＲｅｐ４０ポリペプチドの一つ以上をコードし、好ましくは、機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のことをいう。

【００４２】

前記Ｒｅｐ５２ヌクレオチド配列およびＲｅｐ４０ヌクレオチド配列は、本明細書において配列番号１６および１７に記載されている。前記Ｒｅｐ７８ヌクレオチド配列およびＲｅｐ６８ヌクレオチド配列は、本明細書において配列番号２０および２１に記載されている。

【００４３】

本明細書において、「ｃａｐ遺伝子」という用語は、１つ以上のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードする遺伝子のことをいい、前記ＯＲＦの各々はＡＡＶ Ｃａｐ構造タンパク質またはその変異体もしくは誘導体をコードする。これらＡＡＶ Ｃａｐ構造タンパク質（またはその変異体もしくは誘導体）は、ＡＡＶカプシドを形成する。

【００４４】

前記３つのＣａｐタンパク質は、好適な細胞に感染することができる感染ＡＡＶウイルス粒子の産生を可能にするよう機能しなければならない。前記３つのＣａｐタンパク質は、ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３であり、これらのサイズは、一般的にはそれぞれ８７ｋＤａ、７２ｋＤａ、および６２ｋＤａである。したがって、前記ｃａｐ遺伝子は、３つのＣａｐタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３をコードする遺伝子である。

【００４５】

野生型ＡＡＶにおいて、これらの３つのタンパク質はｐ４０プロモーターから翻訳され、１つのｍＲＮＡを形成する。このｍＲＮＡが合成されたのちに、長いイントロンまたは短いイントロンを切り取ることができ、その結果２．３ｋｂまたは２．６ｋｂのｍＲＮＡを形成する。

【００４６】

前記ＡＡＶカプシドは、６０のカプシドタンパク質サブユニット（ＶＰ１、ＶＰ２、およびＶＰ３）で構成され、前記サブユニットは、１：１：１０の比率の正二十面体対称で配置され、３．９ＭＤａの推定サイズを有する。

【００４７】

本明細書において、「ｃａｐ遺伝子」という用語は、野生型ｃａｐ遺伝子およびその誘導体、ならびに、同等の機能を有する人工のｃａｐ遺伝子を含む。前記ＡＡＶ（血清型２）ｃａｐ遺伝子ヌクレオチド配列およびＣａｐポリペプチド配列は、それぞれ、配列番号２および３に記載されている。本明細書において、「ｃａｐ遺伝子」という用語は、好ましくは、配列番号２に記載の配列を有するヌクレオチド配列、または配列番号３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のことをいうか、または配列番号２に対する配列同一性が少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％または９９％、もしくは配列番号３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対するヌクレオチド配列同一性が少なくとも８０％、９０％、９５％または９９％であり、ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のことをいう。

【００４８】
前記ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子は、好ましくはウイルス遺伝子であるか、またはウイルス遺伝子から由来する。より好ましくは、それらはＡＡＶ遺伝子であるか、またはＡＡＶ遺伝子から由来する。一部の実施形態において、前記ＡＡＶは、アデノ随伴デペンドパルボウイルスＡである。他の実施形態において、前記ＡＡＶは、アデノ随伴デペンドパルボウイルスＢである。
【００４９】
１１の異なるＡＡＶ血清型が公知である。前記公知の血清型はすべて、多様な組織タイプの細胞に感染することができる。組織特異性は、カプシド血清型によって決定される。前記ＡＡＶは、血清型１、血清型２、血清型３、血清型４、血清型５、血清型６、血清型７、血清型８、血清型９、血清型１０、または血清型１１由来であってもよい。好ましくは、前記ＡＡＶは、血清型１、血清型２、血清型５、血清型６、血清型７、血清型８、または血清型９であってもよい。最も好ましくは、前記ＡＡＶ血清型は５である（すなわち、ＡＡＶ５）。
【００５０】
前記ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子（および、その中のタンパク質コーディングＯＲＦの各々）は、１つ以上の異なるウイルス（たとえば、２つ、３つ、または４つの異なるウイルス）由来であってもよい。たとえば、前記ｒｅｐ遺伝子がＡＡＶ２由来であってもよく、一方で前記ｃａｐ遺伝子がＡＡＶ５由来であってもよい。
【００５１】
ＡＡＶのｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子が系統や分離株によって異なることは、当業者に認識されている。かかる系統や分離株のすべてから由来するこれら遺伝子の配列が本明細書において含まれ、またそれらの誘導体も含まれる。
【００５２】
本明細書において、「組み換えＡＡＶゲノム」という用語は、ＡＡＶ末端逆位反復配列（ＩＴＲ）に隣接する導入遺伝子を（ｒｅｐ遺伝子およびｃａｐ遺伝子の代わりに）含むＡＡＶゲノムのことをいう。本明細書において、「ＡＡＶゲノム」、「ＡＡＶトランスファーベクター」、および「トランスファープラスミド」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。それらはすべて、導入遺伝子に隣接する５'－および３'－ウイルス性（好ましくはＡＡＶ）末端逆位反復配列（ＩＴＲ）を含むベクターのことをいう。
【００５３】
前記導入遺伝子はコーディング配列であっても、非コーディング配列であってもよく、ゲノムＤＮＡであってもｃＤＮＡであってもよい。好ましくは、前記導入遺伝子は、ポリペプチドまたはその断片をコードする。
好ましくは、導入遺伝子は１つ以上の転写制御エレメントおよび／または翻訳制御エレメント（たとえば、エンハンサー配列、プロモーター配列、ターミネーター配列など）と作動可能に関連する。
【００５４】
一部の実施形態において、前記導入遺伝子は、治療ポリペプチドまたはその断片をコードする。好ましい治療ポリペプチドの例は、抗体、ＣＡＲ－Ｔ分子、ｓｃＦＶ、ＢｉＴＥ、ＤＡＲＰｉｎおよびＴ細胞受容体を含む。
【００５５】
一部の実施形態においては、治療ポリペプチドはＤＲＤ１などのＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）である。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは、免疫療法ターゲット、たとえばＣＤ１９、ＣＤ４０またはＣＤ３８などである。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは、ヒトの視覚または網膜機能に関与する遺伝子の機能的コピー、たとえばＲＰＥ６５またはＲＥＰなどの機能的コピーである。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは、ヒトの血液生成に関与する遺伝子の機能的コピーであるか、または第ＩＸ因子などの血液成分であるか、またはβまたはαサラセミアまたは鎌形赤血球貧血に関与するものである。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは、重症複合

免疫不全（ＳＣＩＤ）またはアデノシンデアミナーゼ欠損症（ＡＤＡ－ＳＣＩＤ）におけるものなどの免疫機能に関与する遺伝子の機能的コピーである。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは、細胞、たとえば増殖因子受容体の増殖を増加／減少させるタンパク質である。一部の実施形態においては、治療ポリペプチドはイオンチャネルポリペプチドである。

【００５６】

一部の実施形態においては、治療ポリペプチドは免疫チェックポイント分子である。好ましくは、免疫チェックポイント分子は腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体スーパーファミリーメンバー（たとえば、ＣＤ２７、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＧＩＴＲまたはＣＤ１３７など）またはＢ７－ＣＤ２８スーパーファミリーメンバー（たとえば、ＣＤ２８、ＣＴＬＡ４またはＩＣＯＳなど）である。好ましくは、免疫チェックポイント分子は、ＰＤ１、ＰＤＬ１、ＣＴＬＡ４、Ｌａｇ１、またはＧＩＴＲである。

【００５７】

一部の好ましい実施形態においては、導入遺伝子は、ＣＲＩＳＰＲ酵素（たとえば、Ｃａｓ９，ｄＣａｓ９、Ｃｐｆ１、またはその変異体もしくは誘導体）またはＣＲＩＳＰＲｓｇＲＮＡをコードする。

【００５８】

野生型ＡＡＶ ｐ５プロモーターは、Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＲｅｐ６８ポリペプチドの発現を促進する。前記ｐ５プロモーターは、前記野生型ｒｅｐ遺伝子の５'末端に位置する。

【００５９】

野生型ＡＡＶ２ ｐ５プロモーターは、配列番号４に記載のヌクレオチド配列を有する。コア配列はボールドで強調表示されている。

【００６０】

本明細書において、「機能的ｐ５プロモーター」という用語は、配列番号４のヌクレオチド配列からなるかもしくはそれを含むヌクレオチド配列、あるいは、その変異体であって配列番号４に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である変異体からなるかもしくはそれを含み、かつ一つ以上のＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードする、好ましくはＲｅｐ７８ポリペプチドおよびＲｅｐ６８ポリペプチドをコードする作動可能に関連するヌクレオチド分子の転写を促進することができるヌクレオチド配列のことをいう。

【００６１】

ｐ５プロモーターの活性レベルは、試験ｐ５プロモーター配列を好適な導入遺伝子と作動可能に関連付けし、そして前記導入遺伝子の発現レベルについて解析することにより判定されてもよい。

【００６２】

野生型ｐ５プロモーター（同じ導入遺伝子と作動可能に関連付けられた場合）の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）である発現レベルは、機能的ではないとみなされてもよい。

【００６３】

一部の実施形態において、本発明の核酸分子において、（ｉ）前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連していない。好ましくは、このヌクレオチド配列は、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列の上流（５'）に位置し、より好ましくは前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列のすぐ上流に位置する（すなわち、Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列の５'末端に連続して連結している）。このようにして、Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＲｅｐ６８ポリペプチドの発現が低減され、したがってこれらのポリペプチドのアデノウイルスに対する毒性が低減される。

【００６４】

作動可能に関連するプロモーターの非存在下で、前記Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ６８ポリペプチドは、低レベル、ベースラインレベルまたは最小限レベルで

のみ、本発明の核酸分子から発現できる。

【００６５】

たとえば、野生型ＡＡＶ ｐ５プロモーター配列（たとえば、配列番号４）は、前記コア領域（上記強調表示されている）における変異の存在により非機能的にされてもよく、または、プロモーターのＴＡＴＡエレメントにおける変異を有していてもよく、それによってＴＡＴＡエレメントはＴＡＴＡ結合タンパク質および／または転写開始に必要である他の転写因子によって結合されることができない。

【００６６】

したがって、一実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、コア領域および／またはＴＡＴＡエレメントに１つ以上の変異を有するＡＡＶ ｐ５プロモーターと作動可能に関連する。好ましくは、これらの変異は、ＡＡＶ ｐ５プロモーターのプロモーター活性を、配列番号４のプロモーターと比較して低減し、最も好ましくは、低減してそれを非機能的（上記に定義されたように）にする。

【００６７】

一部の好ましい実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号４に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である配列番号４のヌクレオチド配列の変異体からなるかまたはそれを含むヌクレオチド配列と作動可能に関連し、ここで、前記変異体が導入遺伝子と作動可能に関連している場合、当該導入遺伝子の発現レベルは、配列番号４の配列を有するプロモーターが当該導入遺伝子と作動可能に関連付けられている場合の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）である。

【００６８】

他の実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的または非機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連していない。

【００６９】

この実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号４に対する配列同一性が少なくとも９９％、９５％、９０％または８５％未満であるヌクレオチド配列と作動可能に関連していてもよく、好ましくはプロモーター活性が全く無いかまたは本質的に無い前記ヌクレオチド配列と作動可能に関連していてもよい。

【００７０】

一部の実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、ＩＲＥＳエレメントに作動可能に関連していない。一部の実施形態において、前記ｐ５プロモーターはＩＲＥＳに置換されない。

本発明のこの態様の一部の実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号５（ヒトβグロブリン遺伝子の５'非翻訳領域（ＵＴＲ）の部分を形成する配列）と作動可能に関連している。

【００７１】

野生型ＡＡＶ ｐ１９プロモーターは、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよびＲｅｐ４０ポリペプチドの発現を促進する。ｐ１９プロモーターは、前記野生型ｒｅｐ遺伝子内に位置する。

【００７２】

野生型ＡＡＶ２ ｐ１９プロモーターは、配列番号６に記載のヌクレオチド配列を有する。強調表示された部分は、ＴＡＴＡボックスおよびＴＳＳエレメントである。

【００７３】

本明細書において、「機能的ｐ１９プロモーター」という用語は、配列番号６のヌクレオチド配列からなるかもしくはそれを含むヌクレオチド配列、あるいは、その変異体であって配列番号６に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である変異体からなるかもしくはそれを含み、かつ一つ以上のＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードする、好ましくはＲｅｐ５２ポリペプチドおよびＲｅｐ４０ポリペプチドをコードする作動可能に関連するヌクレオチド分子の転写を促進することができるヌクレオチド配列のことをいう。

【００７４】
ｐ１９プロモーターの活性レベルは、試験ｐ１９プロモーター配列を好適な導入遺伝子に作動可能に関連付けし、そして前記導入遺伝子の発現レベルについて解析することにより判定されてもよい。野生型ｐ１９プロモーター（同じ導入遺伝子に作動可能に関連付けられた場合）の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）の発現レベルは、機能的ではないとみなされてもよい。
【００７５】
一部の実施形態において、本発明の核酸分子において、（ｉｉ）前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的ＡＡＶ ｐ１９プロモーターを含んでいない。作動可能に関連するプロモーターの非存在下で、前記Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ４０ポリペプチドは、本発明の核酸分子から発現できない。このようにして、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ４０ポリペプチドの発現が防止または阻害される。これらのポリペプチドは、組み換えＡＡＶ粒子の産生に必須ではないが、アデノウイルス産生を阻害することができる。その結果、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ４０ポリペプチドの発現の防止または阻害により、アデノウイルスが本発明の核酸分子を含む系においてアデノウイルスの産生を増加させる。
【００７６】
たとえば、野生型ＡＡＶ ｐ１９プロモーター配列（たとえば、配列番号６）は、前記ＴＳＳエレメントにおける変異の存在により非機能的にされていてもよいし、または、プロモーターのＴＡＴＡエレメントにおける変異を有していてもよく、それによってＴＡＴＡエレメントは、ＴＡＴＡ結合タンパク質および／または転写開始に必要である他の転写因子によって結合されることができない。
【００７７】
したがって、一実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、ＴＳＳエレメントおよび／またはＴＡＴＡエレメントに１つ以上の変異を有するＡＡＶ ｐ１９プロモーターと作動可能に関連する。好ましくは、これらの変異は、ＡＡＶ ｐ１９プロモーターのプロモーター活性を、配列番号６のプロモーターと比較して低減し、最も好ましくは、低減してそれを非機能的（上記に定義されたように）にする。
【００７８】
一部の実施形態において、前記ＡＡＶ ｐ１９プロモーターは、ＴＡＴＡボックスの一部またはすべてを含む欠失を有する。より好ましくは、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列はｐ１９プロモーターを有し、ＴＡＴＡボックスのヌクレオチドの１つ以上（たとえば１つ、２つ、３つ、または４つ）を代わりのヌクレオチドと置換することによって、たとえばＴＡＴＡ配列をＴＴＴＴに変換することにより、ＴＡＴＡボックスが切除され（ablated）ている。好ましくは、前記変更は同義変異であるか、または前記変更はコーディング配列のフレームを保存している。これら実施形態において、前記ｐ１９プロモーターは機能的であってもよく、非機能的であってもよい。
【００７９】
非機能的ｐ１９配列の一例が、配列番号７に記載されている。強調表示された配列は、前記プロモーターを非機能的にする、変異したＴＡＴＡボックスエレメントである。
【００８０】
一部の好ましい実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号６に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である配列番号６のヌクレオチド配列の変異体からなるかまたはそれを含むヌクレオチド配列と作動可能に関連し、ここで、前記変異体が導入遺伝子と作動可能に関連している場合、前記導入遺伝子の発現レベルは、配列番号６の配列を有するプロモーターが導入遺伝子と作動可能に関連付けられている場合の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）である。
【００８１】
他の実施形態において、前記Ｒｅｐコーディングポリペプチド配列は、機能的ＡＡＶ ｐ

１９プロモーターをコードするが、機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／または機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチドをコードしない。

好ましくは、前記Ｒｅｐ７８ポリペプチド／Ｒｅｐ６８ポリペプチドの活性は、有意な影響を受けることはない。

【００８２】

たとえば、Ｒｅｐ５２ポリペプチド／Ｒｅｐ４０ポリペプチドの開始コドンは、これらのポリペプチドの発現を排除するよう変異してもよい。一例において、前記開始コドン（メチオニン）をコードするヌクレオチド配列が変異してもよく、好ましくは、前記Ｒｅｐ７８ポリペプチド／Ｒｅｐ６８ポリペプチドの発現に有意な影響を及ぼすことなく変異してもよい。

【００８３】

非機能的Ｒｅｐ５２配列の例としては、配列番号１６のヌクレオチド配列の変異体または配列番号１８のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異体からなるヌクレオチド配列または該変異体を含むヌクレオチド配列であって、それに対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％であり、かつ機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチド配列をコードしないヌクレオチド配列がある。

【００８４】

非機能的Ｒｅｐ４０配列の例としては、配列番号１７のヌクレオチド配列の変異体または配列番号１９のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の変異体からなるヌクレオチド配列または該変異体を含むヌクレオチド配列であって、それに対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％であり、かつ機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチド配列をコードしないヌクレオチド配列がある。

【００８５】

前記Ｒｅｐ５２ポリペプチド／Ｒｅｐ４０ポリペプチドは、ＡＴＰと結合し、かつヘリカーゼ活性を有し、かつ一本鎖のゲノム前駆体の蓄積の支援、および予め形成されたＡＡＶカプシドへの新たに形成されたＤＮＡ鎖のパッケージの支援に関与してもよい。これらはＲｅｐ７８やＲｅｐ６８とは異なり、ＡＡＶの産生用のための使い捨て（disposable）であるとみなされることがよくある。

【００８６】

Ｒｅｐ５２ポリペプチド変異体またはＲｅｐ４０ポリペプチド変異体が発現しているかどうかをウエスタンブロットで判定し、これらのポリペプチドが正しい分子量で産生されているかを判定することが可能である。これらのポリペプチドの機能は、その精製された形態で、ＡＴＰの消費を判定する生物発光ＡＴＰアッセイを使用して判定してもよい。Ｒｅｐ５２およびＲｅｐ４０はどちらもヘリカーゼ活性を有するので、適切なヘリカーゼアッセイも使用してもよい。

【００８７】

野生型Ｒｅｐ５２ポリペプチド（たとえば、配列番号１８のもの）のヘリカーゼ活性レベルの５％未満（好ましくは１％未満）のレベルのヘリカーゼ活性を有する試験Ｒｅｐ５２ポリペプチドは、非機能的Ｒｅｐ５２ポリペプチドであると考えてよい。

【００８８】

野生型Ｒｅｐ４０ポリペプチド（たとえば、配列番号１９のもの）のヘリカーゼ活性レベルの５％未満（好ましくは１％未満）のレベルのヘリカーゼ活性を有する試験Ｒｅｐ４０ポリペプチドは、非機能的Ｒｅｐ４０ポリペプチドであると考えてよい。

【００８９】

野生型ＡＡＶ ｐ４０プロモーターは、ＡＡＶ Ｃａｐポリペプチドの発現を促進する。ｐ４０プロモーターは、前記野生型ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子の３’末端の近くに位置する。

【００９０】

野生型ＡＡＶ２ ｐ４０プロモーターは、配列番号８に記載のヌクレオチド配列を有する。強調表示されたエレメントは、ＴＡＴＡエレメントである。

【００９１】

本明細書において、「機能的ｐ４０プロモーター」という用語は、配列番号８のヌクレオチド配列からなるかもしくはそれを含むヌクレオチド配列、あるいは、その変異体であって配列番号８に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である変異体からなるかもしくはそれを含み、かつ、１つ以上のＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドをコードする、好ましくは１つ以上のＡＡＶ Ｃａｐポリペプチドをコードする作動可能に関連するヌクレオチド分子の転写を促進することができるヌクレオチド配列のことをいう。

【００９２】

ｐ４０プロモーターの活性レベルは、試験ｐ４０プロモーター配列を好適な導入遺伝子に作動可能に関連付け、前記導入遺伝子の発現レベルについて解析することにより判定されてもよい。野生型ｐ４０プロモーター（同じ導入遺伝子に作動可能に関連付けられた場合）の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）の発現レベルは、機能的ではないとみなされてもよい。

【００９３】

一部の実施形態において、本発明の核酸分子において、（ｉｉ）前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的ＡＡＶ ｐ４０プロモーターを含んでいない。このように、アデノウイルス阻害配列は転写されない。

【００９４】

たとえば、野生型ＡＡＶ ｐ４０プロモーター配列（たとえば、配列番号８）は、プロモーターのＴＡＴＡエレメントにおける変異の存在により非機能的にされていてもよく、それによってＴＡＴＡエレメントはＴＡＴＡ結合タンパク質および／または転写開始に必要である他の転写因子によって結合されることができない。

【００９５】

したがって、一実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、ＴＡＴＡエレメントに１つ以上の変異を有するＡＡＶ ｐ４０プロモーターと作動可能に関連する。好ましくは、これらの変異は、ＡＡＶ ｐ４０プロモーターのプロモーター活性を、配列番号８のプロモーターと比較して低減し、最も好ましくは、低減してそれを非機能的（上記に定義されたように）にする。

【００９６】

一部の好ましい実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号８に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％または９９％である配列番号８のヌクレオチド配列の変異体からなるかまたはそれを含むヌクレオチド配列と作動可能に関連し、ここで、前記変異体が導入遺伝子と作動可能に関連している場合、当該導入遺伝子の発現レベルは、配列番号８の配列を有するプロモーターが当該導入遺伝子と作動可能に関連付けられている場合の発現レベルの５％未満（好ましくは１％未満）である。

【００９７】

他の実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的または非機能的ＡＡＶ ｐ４０プロモーターに作動可能に関連していない。この実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、配列番号８に対する配列同一性が少なくとも９９％、９５％、９０％または８５％未満であるヌクレオチド配列であって、好ましくはプロモーター活性が全く無いか本質的に無いヌクレオチド配列と作動可能に関連していてもよい。

【００９８】

好ましい非機能的ｐ４０プロモーター配列が、配列番号９に記載されている。この配列において、ＴＡＴＡボックスエレメント、転写開始部位および転写因子結合部位が変異し、その一方で、Ｒｅｐ７８ポリペプチドコーディング配列およびＲｅｐ６８ポリペプチドコーディング配列は維持されている。

【００９９】

野生型ＡＡＶ ｐ４０プロモーター配列は、アデノウイルス阻害配列を含む。本明細書に

おいて、「機能的アデノウイルス阻害配列（inhibitor sequence）」という用語は、アデノウイルスゲノムのシスに存在する場合に、そのアデノウイルスの複製を著しく阻害するヌクレオチド配列のことをいう。野生型ＡＡＶ２アデノウイルス阻害配列は、配列番号１０の配列を有する。この配列は、前記ｐ４０プロモーターおよびアデノウイルス阻害配列を形成する。前記ＴＡＴＡエレメントおよび転写開始部位は、阻害配列のコアを形成する。

【０１００】

好ましくは、機能的アデノウイルス阻害配列は、配列番号１０に示される配列を有するもの、または、配列番号１０に対する配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％または９５％であり、かつ、宿主細胞中でアデノウイルスベクターの複製を阻害することができる変異体として、定義される。

【０１０１】

アデノウイルス阻害配列の活性レベルは、分子クローニングによってアデノウイルス阻害配列を（シスまたはトランスに）ＡＶベクターの配列に含め、その後前記ＡＶを哺乳類細胞中に回収しようとすることにより、判定してもよい。野生型アデノウイルス阻害配列をＡＶに挿入することにより、いかなるＡＶベクターの回収や増殖（outgrowth）をも完全に防止するであろう。アデノウイルス阻害配列の配列修飾により、ＡＶベクターを回収できるかもしれないが、その成功の度合いはまちまちである。これは回収されたＡＶの感染力価を測定することにより算出でき、阻害のレベルを判定する。ＡＶ力価を測定するために使用できるアッセイには、ＴＣＩＤ５０法や、プラークアッセイ法などがある。

【０１０２】

野生型アデノウイルス阻害配列の活性レベルの５％未満（好ましくは１％未満）の活性レベル（同じ条件下で）は、機能的ではないとみなされてもよい。

【０１０３】

野生型ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子は、アデノウイルス阻害配列を含むｐ４０プロモーター配列を含む。

【０１０４】

一部の実施形態において、本発明の核酸分子において、（ｉｉｉ）前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的アデノウイルス阻害剤配列を含んでいない。

【０１０５】

たとえば、アデノウイルス阻害配列がＲｅｐポリペプチドコーディング配列から除去されてもよく、またはアデノウイルス阻害配列が（たとえば、アデノウイルス阻害配列に１つ以上の変異をつくることにより）非機能的にされてもよい。

【０１０６】

宿主細胞においてアデノウイルス阻害配列の転写が宿主細胞中の野生型アデノウイルスの複製を著しく阻害しないように、前記アデノウイルス阻害配列が修飾されていてもよい。

【０１０７】

好ましくは、Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は機能的Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよび機能的Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードし、すなわち、アデノウイルス阻害配列の除去、またはアデノウイルス阻害配列を非機能的にすることは、Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＲｅｐ６８ポリペプチドのアミノ酸コーディング配列に影響しない。

【０１０８】

好ましくは、同義コドン交換により、ｐ４０プロモーター内のＡＶ阻害配列を除去し、Ｒｅｐコーディングアミノ酸を維持する。これにより、ＡＶ遺伝子の阻害が低減される。

【０１０９】

一部の実施形態において、Ｒｅｐ５２ポリペプチドおよび／またはＲｅｐ４０ポリペプチドのための正しいコーディング配列を保持する必要が無い。

【０１１０】

一実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的ｐ４０プロモーター配列を含み、すなわち、アデノウイルス阻害配列の除去、またはアデノウイルス

阻害配列を非機能的にすることは、ｐ４０プロモーターの機能に影響せず、ｐ４０プロモーターの機能を著しく低減せず、または完全に除去したりしない。

【０１１１】

他の実施形態において、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、機能的ｐ４０プロモーター配列を含まず、すなわち、アデノウイルス阻害配列の除去、またはアデノウイルス阻害配列を非機能的にすることは、ｐ４０プロモーターの機能を完全に除去する。

【０１１２】

好ましくは、機能的ｐ４０プロモーター配列を有していないヌクレオチド配列は、配列番号１１に記載の配列を有する。配列番号１１において、同義コドン交換により、ｐ４０プロモーター内のＡＶ阻害配列を除去して、Ｒｅｐコーディングアミノ酸を維持し、ＡＶ遺伝子の阻害を低減する。

【０１１３】

一部の実施形態において、本発明の核酸分子は、ＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列と作動可能に関連する異種プロモーターを含んでいない。

【０１１４】

他の実施形態において、本発明の核酸分子は、ＡＡＶ Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列と近接するプロモーターを含んでいない。

【０１１５】

本明細書において、プロモーターおよび遺伝子という文脈での「作動可能に関連する」という用語は、問題となっているプロモーターと遺伝子とが、前記プロモーターが前記遺伝子の発現を促進できるほど互いに十分に近い距離で位置しているということを意味する。一部の実施形態において、前記プロモーターと前記遺伝子とは、並んでいるか（juxtaposed）、または近接している（contiguous）。

【０１１６】

好ましくは、Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列（ｒｅｐ遺伝子）は、配列番号１２に記載の配列を有するか、または、配列番号１２に対するヌクレオチド配列同一性が少なくとも８０％、８５％、９０％または９５％である配列番号１２の変異体を有し、ここで、ｐ１９プロモーターは非機能的であり、かつｐ４０プロモーターは非機能的であり、かつアデノウイルス阻害配列は非機能的である。配列番号１２において、ｐ１９プロモーターおよびｐ４０プロモーターは切除され、Ｒｅｐ７８コーディング配列およびＲｅｐ６８コーディング配列が保持されている。

【０１１７】

他の好ましい実施形態において、Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は下記の特徴を有する。

（ｉ）機能的ＡＡＶ ｐ５プロモーターに作動可能に関連しておらず、かつ

（ｉｉｉ）機能的ＡＡＶ ｐ４０プロモーターを含まず、かつ、機能的アデノウイルス阻害配列を含まない。

【０１１８】

より好ましくは、前記Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、ｐ１９プロモーターを有し、ここで、ＴＡＴＡボックスは、たとえばＴＡＴＡボックスのヌクレオチドの１つ以上（たとえば１つ、２つ、３つ、または４つ）を代わりのヌクレオチドと置換することによって切除され（ablated）ており、たとえばＴＡＴＡ配列をＴＴＴＴに変換することによって切除され（ablated）ている。

【０１１９】

一部の実施形態において、前記ＡＡＶ ｐ１９プロモーターは、ＴＡＴＡボックスの一部またはすべてを含む欠失を含むか、またはＴＡＴＡ塩基の１つ以上がＴＡＴＡから代わりのヌクレオチドに変わっている。好ましくは、前記変更は同義変異であるか、または前記変更はコーディング配列のフレームを保存している。

【０１２０】

ｐ１９プロモーターは機能的であってもよく、すなわちＲｅｐ４０ポリペプチドおよび

Ｒｅｐ５２ポリペプチドはｐ１９プロモーターから発現できる。または、ｐ１９プロモーターは非機能的であってもよい。

【０１２１】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を含むアデノウイルスベクターを提供する。本発明の核酸分子は、アデノウイルスゲノムに安定的に組み込まれている。

【０１２２】

本発明の核酸分子を適応させるために、1つ以上のアデノウイルス遺伝子の一部またはすべて（好ましくはアデノウイルスヘルパー遺伝子ではない遺伝子）を欠失してもよい。

【０１２３】

たとえば、本発明の核酸分子は、アデノウイルス初期遺伝子のうちの一つに挿入されていしてもよく、または、初期遺伝子がアデノウイルスから欠失した部位に挿入されていしてもよい。後者の例では、欠失した初期遺伝子は、前記欠失した遺伝子を含む細胞株によって、たとえばアデノウイルスＥ１Ａ領域およびＥ１Ｂ領域を含むＨＥＫ２９３細胞によって、トランス補完されてもよい。

【０１２４】

本発明の核酸分子は、アデノウイルスゲノムのＥ１欠失を含む領域に挿入されていてもよい。他の例では、アデノウイルスに必須ではない遺伝子もまた欠失することができ、これらの部位は本発明の核酸分子を挿入するために使用できる。たとえば、アデノウイルスベクターではＥ３遺伝子の大半が欠失できるので、本発明の核酸分子はＥ３領域に挿入されていてもよい。

【０１２５】

本発明の核酸分子は、（アデノウイルス遺伝子の転写の方向に対して）センスの向きで、またはアンチセンスの向きで、アデノウイルス遺伝子に挿入されていてもよい。本発明の好ましい実施形態は、本発明の核酸分子をＥ１領域に挿入する場合、本発明の核酸分子がＥ４、Ｅ２ＡおよびＥ２Ｂ発現カセットと同じ転写方向であることである。これは、（Ｅ１欠失ＡＶ中によく保持されている）Ｅ１Ａプロモーターが、ｒｅｐ遺伝子発現を駆動するプロモーターとして動作しないようにするためである。前記Ｅ１Ａプロモーターは、ＡＶパッケージングシグナルを含んでいるので、除去できない。

【０１２６】

本発明の好ましい実施形態は、Ｒｅｐコーディング配列が上流プロモーターを含まないことである。

【０１２７】

一部の好ましい実施の形態において、本発明の核酸分子が、アデノウイルスＥ１遺伝子に挿入され、好ましくはＥ１遺伝子の一部が欠失している。好ましくは、前記Ｅ１遺伝子は、Ｅ１Ａおよび／またはＥ１Ｂである。

【０１２８】

一実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を含むアデノウイルスベクターを提供し、（本発明の核酸分子によってコードされる）前記Ｒｅｐポリペプチドは、低レベル、ベースラインレベルまたは最小限レベルで発現する。

好ましくは、Ｒｅｐポリペプチドコーディング配列は、いかなる機能的プロモーターとも作動可能に関連していない。本明細書において、「低レベル、ベースラインレベル、または最小限レベル」という用語は、（野生型ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子の）野生型ｐ５プロモーターと作動可能に関連する野生型Ｒｅｐ７８ポリペプチドの発現レベルの５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満または１０％未満である、本発明の核酸分子のＲｅｐ７８ポリペプチドの発現レベルのことをいう。このようにして、少なくともいくつかのＡＡＶの産生を可能にするために、十分なＲｅｐポリペプチドが提供されるが、Ｒｅｐポリペプチドの発現レベルはアデノウイルスの複製を完全に阻害するには不十分である。

【０１２９】

一部の実施形態において、本発明の核酸分子は、本発明の核酸分子の発現がアデノウイルスプロモーターによって駆動されるように、好ましくは低レベルまたは最小レベルで駆

動されるように、アデノウイルスゲノムに組み込まれる。

【０１３０】

他の実施形態において、本発明の核酸分子は、本発明の核酸分子の発現が作動可能に関連した異種プロモーターによって駆動されるように、好ましくは低レベルまたは最小レベルで駆動されるように、アデノウイルスゲノムに組み込まれる。

【０１３１】

作動可能に関連するプロモーターは、構成型プロモーターであってもよく、または誘導性プロモーターであってもよい。一部の実施形態において、前記プロモーターは構成型プロモーターである。他の実施形態において、前記プロモーターは、誘導性または抑制性である。

【０１３２】

構成型プロモーターの例としては、ＣＭＶ、ＳＶ４０、ＰＧＫ（ヒトまたはマウス）、ＨＳＶ ＴＫ、ＳＦＦＶ、ユビキチン、伸長因子アルファ、ＣＨＥＦ－１、ＦｅｒＨ、Ｇｒｐ７８、ＲＳＶ、アデノウイルスＥ１Ａ、ＣＡＧ、もしくはＣＭＶベータグロブリンプロモーター、またはそれらから誘導されたプロモーターなどがある。

【０１３３】

好ましくは、ｒｅｐ遺伝子プロモーターは、ＳＶ４０プロモーター、または、それから誘導されたプロモーター、または、ヒト細胞およびヒト細胞株（たとえばＨＥＫ－２９３細胞）中のＳＶ４０プロモーターと比較して同等の強度のプロモーターもしくはそれより小さい強度のプロモーターである。

【０１３４】

一部の実施形態において、前記プロモーターは、誘導性または抑制性の制御性（プロモーター）エレメントを含むことにより、誘導性または抑制性である。

【０１３５】

たとえば、前記プロモーターは、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、ＩＰＴＧまたはラクトースで誘導可能なものであってもよい。

【０１３６】

本発明の一部の実施形態において、本発明の核酸分子は、いかなる機能的プロモーターも含まず、かついかなる機能的プロモーターとも作動可能に関連していない。

【０１３７】

一部の実施形態において、本発明のアデノウイルスベクターは、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子をコードするヌクレオチド分子をさらに含む。

【０１３８】

好ましくは、前記ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子または本発明の核酸分子とは並んでいない。特に、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は、好ましくは、ｒｅｐ遺伝子ｐ４０プロモーター（野生型ＡＡＶ ｐ４０プロモーターまたは本発明のｐ４０プロモーター配列）と作動可能に関連していない。

【０１３９】

たとえば、好ましくは、前記ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子（またはｒｅｐ遺伝子プロモーター）または本発明の核酸分子の、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、または５ｋｂ以内のアデノウイルスゲノム中には存在しない。

【０１４０】

好ましくは、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は異種プロモーターと作動可能に関連している。

好ましくは、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は構成型プロモーターまたは誘導性プロモーターと作動可能に関連している。

【０１４１】

一部の実施形態において、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子はプロモーターと作動可能に関連していないか、または、最小のプロモーター、たとえば、ＣＭＶプロモーター、ＲＳＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーターの最小のプロモーター領域と作動可能に関連するか、、または、ＴＡＴＡボックスと、ＴＡＴＡボックスの下流で基礎転写を開始するために十分な制

御性結合部位とを含む複合コアプロモーター領域と作動可能に関連する。プロモーターが使用されない場合は、ＴＡＴＡボックスは存在しない。これにより、ｃａｐ遺伝子の低レベル、ベースラインレベルまたは最小限レベルでの発現が維持される。

【０１４２】

本明細書において、「低レベル、ベースラインレベル、または最小限レベル」という用語は、（たとえば野生型ＡＡＶ中の）野生型ｐ４０プロモーターと作動可能に関連する野生型ｃａｐ遺伝子の発現レベルの５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満または１０％未満である、ｃａｐ遺伝子の発現レベルのことをいう。

【０１４３】

本明細書において、「異種」という用語は、問題となっている遺伝子が、生来的（naturally）に関連しているわけではない遺伝エレメントのことをいう。

【０１４４】

本発明の好ましい実施形態において、前記ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子または本発明の核酸分子とは並んでいない。

【０１４５】

特に、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子は、アクチベータータンパク質およびｒｅｐ遺伝子の両方をコードするＡＶにコードされたタンパク質によって活性化されるプロモーターの制御下で、ＡＶに組み込まれる。

【０１４６】

本発明のさらなる実施形態において、本発明の核酸分子を含むアデノウイルスベクター（第１のアデノウイルスベクター）は、（遠隔）プロモーター、たとえば第２のアデノウイルスベクターに存在するプロモーターを転写的に活性化することができるポリペプチドを、さらにコードする。好ましくは、前記第２のアデノウイルスベクターのプロモーターは、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子と作動可能に関連する（すなわち、その発現を駆動する）プロモーターである。

【０１４７】

一部の実施形態において、アデノウイルスベクターは、当該アデノウイルスベクターに存在しないプロモーターを転写的に活性化することができるポリペプチドをコードする。

【０１４８】

かかるポリペプチドの例としては、単純ヘルペスウイルス由来のＶＰ１６転写アクチベーター、およびｐ５３タンパク質由来のトランスアクチベータードメインなどがある。これらの配列は、ＤＮＡ結合ドメイン、クメート（cumate）結合部位またはテトラサイクリン結合部位に結合するものなどに連結してもよい。

【０１４９】

これによって、第１のアデノウイルスベクターと第２のアデノウイルスベクターとの両方が同じ細胞内に存在する場合にのみｃａｐ遺伝子の転写が誘導され、アデノウイルスの製造中にＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を発現する負担を軽減する。

【０１５０】

本発明は、また、本発明の核酸分子を含む宿主細胞も提供し、前記核酸分子は宿主細胞内にエピソーマルに存在する。前記宿主細胞は単離細胞であってもよく、たとえばそれらは生存する動物または生存する哺乳動物内に存在しない。好ましくは、前記宿主細胞は哺乳類細胞である。

哺乳類細胞の例は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル、ウサギ、ロバ、ウマ、ヒツジ、ウシおよび類人猿に由来する任意の臓器または組織に由来するものを含む。

好ましくは、前記細胞はヒト細胞である。前記細胞は、初代細胞であってもよく、または不死化細胞であってもよい。

好ましい細胞には、ＨＥＫ－２９３、ＨＥＫ ２９３Ｔ、ＨＥＫ－２９３Ｅ、ＨＥＫ－２９３ ＦＴ、ＨＥＫ－２９３Ｓ、ＨＥＫ－２９３ＳＧ、ＨＥＫ－２９３ ＦＴＭ、ＨＥＫ－２９３ＳＧＧＤ、ＨＥＫ－２９３Ａ、ＭＤＣＫ、Ｃ１２７、Ａ５４９、ＨｅＬａ、ＣＨＯ、マウス骨髄腫、ＰｅｒＣ６、９１１、およびＶｅｒｏ細胞株がある。ＨＥＫ－２９３細

胞はＥ１Ａタンパク質およびＥ１Ｂタンパク質を含むよう改変されており、このため、これらのタンパク質がヘルパープラスミドに供給される必要が無い。同様に、ＰｅｒＣ６細胞および９１１細胞はより小さな改変を含み、これもまた使用することができる。

【０１５１】

最も好ましくは、ヒト細胞は、ＨＥＫ２９３、ＨＥＫ２９３Ｔ、ＨＥＫ２９３Ａ、ＰｅｒＣ６、９１１、またはＨｅＬａＲＣ３２である。他の好ましい細胞には、Ｈｅｌａ細胞、ＣＨＯ細胞およびＶＥＲＯ細胞などがある。

【０１５２】

本発明者らは、Ｒｅｐコーディング配列およびＡＡＶ ＩＴＲ配列が同じアデノウイルスに存在することが、アデノウイルスの増殖に有害であると判断した。かかるアデノウイルスは回収できる一方で、その収量は典型的には、ＡＶが各配列をそれぞれ独立して含む場合の５～１０倍低い。したがって、Ｒｅｐコーディング配列およびＡＡＶ ＩＴＲｓ配列を分離すること、すなわちそれらを二つの別々のアデノウイルスベクターに配置することにより、利点が得られる。

【０１５３】

さらに他の実施形態において、本発明は、下記を含むキットを提供する：

（Ａ）本発明の核酸分子を含む第１のアデノウイルスベクター、および

（Ｂ）下記を含む第２のアデノウイルスベクター、

（ｉ）ＡＡＶ Ｃａｐポリペプチドをコードする核酸分子、および／または

（ｉｉ）組み換えＡＡＶゲノムをコードする核酸分子。

【０１５４】

好ましくは、前記第１のアデノウイルスベクターは、前記第２のアデノウイルスベクターに存在するプロモーターを転写的に活性化することができるポリペプチドを、さらにコードする。好ましくは、前記第２のアデノウイルスベクター中のプロモーターは、ＡＡＶｃａｐ遺伝子と作動可能に関連する（すなわち、その発現を駆動する）プロモーターである。

【０１５５】

ＷＯ２０１９／０２０９９２は、後期アデノウイルス遺伝子の転写が、リプレッサーエレメントの主要後期プロモーターへの挿入により調節（阻害など）できることを開示している。アデノウイルス後期遺伝子の発現の「スイッチを切る」ことにより、細胞のタンパク質製造能力を所望の組み換えタンパク質またはＡＡＶ粒子の産生に転用することができる。好ましくは、本発明のアデノウイルスベクターは抑制可能な主要後期プロモーター（ＭＬＰ）を含み、より好ましくは、前記ＭＬＰがアデノウイルス後期遺伝子の転写を調節または制御することのできる１つ以上のリプレッサーエレメントを含み、かつ前記リプレッサーエレメントの１つ以上がＭＬＰ ＴＡＴＡボックスの下流に挿入される。

【０１５６】

ウイルス（好ましくはＡＡＶ）粒子の産生に好ましい特徴は、下記のものがある。

－ＭＬＰ ＴＡＴＡボックスと転写＋１位との間に１つ以上のリプレッサーエレメントが挿入される。

－ 前記リプレッサーエレメントが、リプレッサータンパク質と結合することのできるものである。

－ リプレッサーエレメントと結合することのできるリプレッサータンパク質をコードする遺伝子が、アデノウイルスゲノム内でコードされる。

－ 前記リプレッサータンパク質が、前記ＭＬＰの制御下で転写される。

－ 前記リプレッサータンパク質が、テトラサイクリンリプレッサー、ラクトースリプレッサーまたはエクジソンリプレッサーであり、好ましくはテトラサイクリンリプレッサー（ＴｅｔＲ）である。

－ 前記リプレッサーエレメントが、配列番号１３に示す配列を含むかまたはこれからなるテトラサイクリンリプレッサー結合部位である。

－前記ＭＬＰのヌクレオチド配列が、配列番号１４または配列番号１５に示す配列を含む

かまたはこれからなる。
－ リプレッサーエレメントの存在は、アデノウイルスＥ２Ｂタンパク質の産生に影響しない。
－ 前記アデノウイルスベクターが、アデノウイルスＬ４ １００Ｋタンパク質をコードし、かつ前記Ｌ４ １００Ｋタンパク質は前記ＭＬＰの制御下にない。
－ 導入遺伝子が、アデノウイルス初期領域の一つに挿入され、好ましくはトランスファープラスミドの代わりにアデノウイルスＥ１領域の中に挿入される。
－ 前記導入遺伝子は、その５’－ＵＴＲに三分節系リーダー（ＴＰＬ）を含む。
－ 前記導入遺伝子は、治療ポリペプチドをコードする。
－ 前記導入遺伝子は、ウイルスタンパク質をコードし、好ましくは細胞の中または外に集まってウイルス様粒子を産生することができるタンパク質をコードし、好ましくは前記導入遺伝子はノロウイルスＶＰ１または肝炎Ｂ ＨＢｓＡＧをコードする。

【０１５７】
さらなる実施形態においては、本発明はまた、改変された宿主細胞を生成するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）本発明の核酸分子を宿主細胞に導入する工程を含み、
前記核酸分子は、
（ｉ）前記宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれるか、または
（ｉｉ）前記宿主細胞内にエピソーマルに存在する。

【０１５８】
好ましくは、本発明の核酸分子は前記宿主細胞内にエピソーマルに存在する。

【０１５９】
本発明の一部の実施形態において、前記細胞中の本発明の核酸分子は、いかなる機能的プロモーターも含まず、かついかなる機能的プロモーターとも作動可能に関連していない。

【０１６０】
一部の実施形態において、前記宿主細胞は、Ｃａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムを発現する宿主細胞であるか、またはＣａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムを発現することができる宿主細胞である。

【０１６１】
たとえば、前記宿主細胞は、Ｃａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のＤＮＡ分子が安定的に組み込まれる宿主細胞であってもよい。Ｃａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムをコードする前記ヌクレオチド配列は、好ましくは、好適な調節エレメントと作動可能に関連し、たとえば誘導性プロモーターまたは構成型プロモーターと作動可能に関連する。

【０１６２】
たとえば、前記宿主細胞は、Ｃａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムをコードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のＤＮＡプラスミドまたはベクターを含む宿主細胞であってもよい。Ｃａｐポリペプチドおよび／またはＡＡＶゲノムをコードする前記ヌクレオチド配列は、好ましくは、好適な調節エレメントと作動可能に関連し、たとえば誘導性プロモーターまたは構成型プロモーターと作動可能に関連する。

【０１６３】
前記宿主細胞は、ＡＡＶパッケージング細胞またはＡＡＶ産生細胞であってもよい。

【０１６４】
本明細書において、１つ以上のプラスミドまたはベクターを細胞に「導入する」という用語は、形質転換を含み、特に、エレクトロポレーション、接合、感染、形質導入またはトランスフェクションのいずれの形態をも含む。

【０１６５】
さらなる実施形態においては、本発明は、改変されたアデノウイルスベクターを産生するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）本発明の核酸分子をアデノウイルスベクターに導入する工程を含む。

【０１６６】
好ましくは、前記核酸分子は、アデノウイルスベクターゲノムに安定的に組み込まれている。
【０１６７】
本発明の一部の実施形態において、前記アデノウイルスベクターゲノムの本発明の核酸分子は、いかなる機能的プロモーターも含まず、かついかなる機能的プロモーターとも作動可能に関連していない。
【０１６８】
さらなる実施形態においては、本発明は、ＡＡＶ粒子を産生するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）哺乳類宿主細胞に本発明の第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程と、
（ｂ）前記宿主細胞に第２のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、
前記第２のアデノウイルスベクターは、導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶゲノムを含み、前記第１のアデノウイルスベクターおよび第２のアデノウイルスベクターのうちの少なくとも一つはＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む工程と、
（ｃ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｄ）ＡＡＶ粒子を前記細胞または前記細胞培地から単離または精製する工程と、を含む。
【０１６９】
前記アデノウイルスベクターの少なくとも一つはまた、ＡＡＶゲノムをパッケージするために十分なヘルパー遺伝子（たとえば、Ｅ４、Ｅ１、Ｅ２ａ、およびＶＡ）を含む。
【０１７０】
さらなる実施形態においては、本発明は、ＡＡＶ粒子を産生するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）哺乳類宿主細胞にアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、前記ベクターは、
（ｉ）導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶゲノムと、
（ｉｉ）ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子とを含み、
前記哺乳類宿主細胞は、前記宿主細胞内にエピソーマルに存在するかまたは前記宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれた本発明の核酸分子を含む、工程と、
（ｂ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｃ）ＡＡＶ粒子を前記宿主細胞または前記細胞培地から単離または精製する工程と、を含む。
【０１７１】
前記アデノウイルスベクターはまた、ＡＡＶゲノムをパッケージするために十分なヘルパー遺伝子（たとえば、Ｅ２Ａ遺伝子を含む、Ｅ４、Ｅ２ａおよびＶＡ）を含む。
【０１７２】
さらなる実施形態においては、本発明は、ＡＡＶ粒子を産生するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）哺乳類宿主細胞に本発明の第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、
前記哺乳類宿主細胞は、前記宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれた組み換えＡＡＶゲノムを含み、前記組み換えＡＡＶゲノムは導入遺伝子を含み、ここで、
（ｉ）前記アデノウイルスベクターは、さらにＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含むか、または
（ｉｉ）ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子が、前記哺乳類宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれるか、または
（ｉｉｉ）前記細胞が、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む第２のアデノウイルスベクターに感染している、工程と
（ｂ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような

条件下で、培養する工程と、
（ｃ）ＡＡＶ粒子を前記細胞または前記細胞培地から単離または精製する工程と、を含む。
【０１７３】
前記細胞に存在する前記アデノウイルスベクターの少なくとも一つはまた、ＡＡＶゲノムをパッケージするために十分なヘルパー遺伝子（たとえば、Ｅ４、Ｅ１Ａ、Ｅ１ＢおよびＶＡ、ならびに場合によってはＥ２Ａ遺伝子）を含む。
【０１７４】
さらなる実施形態においては、本発明は、組み換えＡＡＶ粒子を産生するためのプロセスを提供し、前記プロセスは、
（ａ）哺乳類宿主細胞に本発明の第１のアデノウイルスベクターを感染させる工程であって、
（ｉ）前記第１のアデノウイルスベクターは、さらにＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含むか、または
（ｉｉ）前記細胞が、ＡＡＶ ｃａｐ遺伝子を含む第２のアデノウイルスベクターに感染している、工程と
（ｂ）前記哺乳類宿主細胞に導入遺伝子を含む組み換えＡＡＶを感染させる工程と、
（ｃ）前記哺乳類宿主細胞を、培地で、導入遺伝子を含むＡＡＶ粒子が産生されるような条件下で、培養する工程と、
（ｄ）ＡＡＶ粒子を前記細胞または前記細胞培地から単離および／または精製する工程と、を含む。
【０１７５】
前記細胞に導入された（感染させた）前記アデノウイルスベクターの少なくとも一つはまた、ＡＡＶゲノムをパッケージするために十分なヘルパー遺伝子（たとえば、Ｅ４、Ｅ１Ａ、Ｅ１ＢおよびＶＡ、ならびに場合によってはＥ２Ａ遺伝子）を含む。
【０１７６】
前記工程（ａ）および工程（ｂ）における工程は、どのような順序で行われてもよい。導入遺伝子を含む前記初期組み換えＡＡＶは、最初に、なんらかの好適な手段によって作成されればよい。
【０１７７】
上記の実施形態において、導入遺伝子および前記アデノウイルスベクターを含む前記初期組み換えＡＡＶは、前記プロセスを繰り返すために、引き続きさらなる宿主細胞に再導入され（たとえば、再感染させ）てもよい。アデノウイルスの主要後期プロモーターが調節される例では、主にＡＡＶが産生される。したがって、上記実施形態から産生されたＡＡＶ（の一部など）にくわえて、さらなるアデノウイルスベクターを前記宿主細胞に加えることにより、前記プロセスを繰り返すことができ、このように、さらなるアデノウイルスベクターを追加することを通じてＡＡＶを継代培養する。このように、前記工程（ａ）および／または工程（ｂ）を必要に応じて繰り返してもよい。
【０１７８】
二つのアミノ酸配列または核酸配列を整合するために利用できるアルゴリズムは、多数確立されている。典型的には、一つの配列が参照配列となり、参照配列に対して試験配列を比較すればよい。配列比較アルゴリズムは、試験配列の参照配列に対する百分率配列同一性を、指定されたプログラムパラメータに基づいて算出する。比較を目的としたアミノ酸配列または核酸配列の整合（alignment）は、たとえば、コンピュータ実行アルゴリズム（たとえば、ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡまたはＴＦＡＳＴＡ）、またはＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ ２．０アルゴリズムなどによって実施されてもよい。
【０１７９】
百分率アミノ酸配列同一性および百分率ヌクレオチド配列同一性は、ＢＬＡＳＴ整合法を使用して判定してもよい（Altschul et al. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）。好ましくは、標準ま

たはデフォルトの整合パラメータを用いる。

【０１８０】

タンパク質データベース内の類似した配列を見つけるために、標準タンパク質－タンパク質ＢＬＡＳＴ（ｂｌａｓｔｐ）を使用してもよい。他のＢＬＡＳＴプログラムと同様に、ｂｌａｓｔｐは類似した局所的な領域を発見することができるように設計されている。配列の類似性が全配列に及ぶ場合、ｂｌａｓｔｐは全般的整合も報告し、これはタンパク質同定の目的には好ましい結果である。好ましくは、標準またはデフォルトの整合パラメータを用いる。一部の場合では、「低複雑度フィルター」を外してもよい。

【０１８１】

ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、ＢＬＡＳＴＸプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３で実施することもある。比較を目的としたギャップ整合を得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389の記載に従ってギャップＢＬＡＳＴ（ＢＬＡＳＴ２．０に含まれる）を利用することができる。またその代わりに、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ（ＢＬＡＳＴ２．０に含まれる）を用いて、分子間の遠隔関係を検出する累次検索を実施することができる（Altschul et al. (1997)上記参照）。ＢＬＡＳＴ、ギャップＢＬＡＳＴ、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータを用いてもよい。

【０１８２】

ヌクレオチド配列の比較については、ＭＥＧＡＢＬＡＳＴ、不連続ｍｅｇａｂｌａｓｔおよびｂｌａｓｔｎを用いてこの目標を達成してもよい。好ましくは、標準またはデフォルトの整合パラメータを用いる。ＭＥＧＡＢＬＡＳＴは、非常に類似した配列間で長い整合を効率よく発見するよう特に設計されている。不連続ＭＥＧＡＢＬＡＳＴを用いて、本発明の核酸と類似しているが、同一ではないヌクレオチド配列を発見することができる。

【０１８３】

ＢＬＡＳＴヌクレオチドアルゴリズムは、クエリをワードと呼ばれる短いサブ配列に分解することによって類似した配列を発見する。プログラムは、始めにクエリワードとの完全一致を特定する（ワードヒット）。次に、ＢＬＡＳＴプログラムはこれらのワードヒットを多段階で拡張し、最終ギャップ整合を生成する。一部の実施形態においては、ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索はＢＬＡＳＴＮプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２で実施することができる。

【０１８４】

ＢＬＡＳＴ検索の精度を支配する重要なパラメータの一つはワードサイズである。ｂｌａｓｔｎがＭＥＧＡＢＬＡＳＴよりも感度が高い最も重要な理由は、より短いデフォルトワードサイズ（１１）を用いることである。このためｂｌａｓｔｎは、他の生物に由来する関連ヌクレオチド配列に対する整合発見において、ＭＥＧＡＢＬＡＳＴよりも優れている。ｂｌａｓｔｎではワードサイズを調節することが可能であり、デフォルト値より短縮して最小で７とし、検索感度を高めることができる。

【０１８５】

新たに導入された不連続ｍｅｇａｂｌａｓｔページを用いることにより、より感度の高い検索を遂行することができる（www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/FallWinter02/blastlab.html）。このページでは、Ｍａら（Bioinformatics. 2002 Mar; 18(3): 440-5）によって報告されたものと同様のアルゴリズムを用いる。不連続ｍｅｇａｂｌａｓｔは、整合拡張のシードとして完全ワードマッチを必要とするのではなく、テンプレートのより長いウインドウ内で非連続ワードを用いる。コーディングモードでは、第１および第２コドン位置での一致の発見に注目する一方で、第３位の不一致を無視することにより、第３塩基のゆれを考慮に入れる。同じワードサイズを用いた不連続ＭＥＧＡＢＬＡＳＴにおける検索は、同じワードサイズを用いた標準的ｂｌａｓｔｎよりも感度および効率が高い。不連続ｍｅｇａｂｌａｓｔに固有のパラメータは：ワードサイズ：１１または１２；テンプレート：１６、１８、または２１；テンプレートタイプ：コーディング（０）、非コーディング（１）、または両方（２）である。

【０１８６】
一部の実施形態においては、デフォルトパラメータを用いてＢＬＡＳＴＰ２．５．０＋アルゴリズム（ＮＣＢＩから入手できるものなど）を用いうる。
【０１８７】
他の実施形態においては、ギャップコスト：Ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ １１およびＥｘｔｅｎｓｉｏｎ １による二つのタンパク質配列のＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈ整合を用いたＢＬＡＳＴ Ｇｌｏｂａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔプログラムを用いうる（ＮＣＢＩから入手できるものなど）。
【０１８８】
本願に記載された各参照文献の開示はすべて、この参照により本明細書に具体的に組み込まれる。
【図面の簡単な説明】
【０１８９】
【図１】図１は、ｒｅｐ遺伝子内の様々なＡＡＶプロモーターを示した、野生型ＡＡＶゲノムの構造を示す。
【図２Ａ】図２：ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質は、アデノウイルス主要後期プロモーターからの基礎転写を抑制することができる。
【図２Ｂ】図２：ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質は、アデノウイルス主要後期プロモーターからの基礎転写を抑制することができる。
【図３Ａ】図３：ＡＡＶ Ｒｅｐ ＤＮＡは、アデノウイルスゲノムへ安定的に組み込まれ複製される。
【図３Ｂ】図３：ＡＡＶ Ｒｅｐ ＤＮＡは、アデノウイルスゲノムへ安定的に組み込まれ複製される。
【図４Ａ】図４：ＴＥＲＡベクターとの共感染は、ヘルパーフリープラスミドトランスフェクション法と比較して、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶの産生を著しく増大させる。
【図４Ｂ】図４：ＴＥＲＡベクターとの共感染は、ヘルパーフリープラスミドトランスフェクション法と比較して、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶの産生を著しく増大させる。
【図５】図５：ＡＡＶトランスファーゲノムとＡＡＶ２ ｃａｐとをコードするＴＥＲＡベクターと、ＡＡＶ Ｒｅｐ７８－６８をコードするＴＥＲＡベクターとの共感染は、ヘルパーフリープラスミドトランスフェクション法と比較して、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶの産生を著しく増大させる。
【図６】図６：ＨＥＫ２９３細胞にＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐを共感染させることによるＡＡＶの産生、または、ヘルパーフリープラスミドトランスフェクション法によるＡＡＶの産生。結果として、全ＡＡＶ感染粒子と、ＡＡＶ粒子を含む全ゲノムに対する形質導入粒子の比率とを示す。定量化は、ＡＡＶの段階希釈をＨＥＫ２９３細胞に加えてＧＦＰ陽性細胞を最も低い希釈でカウントする、改定ＴＣＩＤ５０法を介して行う。その後ＴＣＩＤ５０法にしたがいＡＡＶ力価を反転演算処理する。
【図７】図７：本発明がＷＯ２０１９／０２０９９２に開示されているような抑制可能なアデノウイルス系を妨げないことを示す。全感染アデノウイルス粒子が示され、ＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子がアデノウイルスベクターに組み込まれても、ＡＡＶ製剤のアデノウイルス混入を防止するためにこの手法が使用できることを表している。アデノウイルスヘキソン配列に対してＱＰＣＲにより定量化を行う。
【図８】図８：アデノウイルスベクターへのＡＡＶ Ｒｅｐ、ＣａｐおよびゲノムＡの組み込みが、プラスミドフリーのＡＡＶ産生を可能にし、プラスミドに基づく産生方法と比較して収率を著しく改善することを示す。定量化は、ＡＡＶベクターにおけるＥＧＦＰ発現カセットに対してＱＰＣＲを使用する。
【図９】図９：ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子をコードするアデノウイルスベクターの連続継代。アデノウイルスヘキソン配列と比較したこれらの配列のＱＰＣＲ定量化は、これらの遺伝子が安定的に挿入されており、長期にわたって伝播可能であることを示す。

【図１０】図１０：ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐからのＡＡＶ Ｒｅｐ発現を示すウエスタンブロットであり、ＡＡＶ Ｒｅｐの全主要アイソフォームの発現を示す。
【図１１】図１１：ＡＡＶ Ｒｅｐ（ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ、ＴＥＲＡ２．０またはＴＥＲＡ２．０＋Ｄｏｘ）をコードするアデノウイルスベクターを感染させた細胞、またはＡＡＶ２参照物質のウエスタンブロット
【図１２】図１２：ＡＡＶ血清型５からのＲｅｐおよびＣａｐをコードするものと、ＡＡＶゲノムをコードするものとの二つのアデノウイルスベクター（ＴＥＲＡ２．０）を細胞に感染させた場合に、ヘルパーフリー法と比較して、ＡＡＶ産生が高いことを示す。
【図１３】図１３：ＡＡＶ血清型６からのＲｅｐおよびＣａｐをコードするものと、ＡＡＶゲノムをコードするものとの二つのアデノウイルスベクター（ＴＥＲＡ２．０）を細胞に感染させた場合に、ヘルパーフリー法と比較して、ＡＡＶ産生が高いことを示す。
【図１４】図１４：ＡＡＶ血清型９からのＲｅｐおよびＣａｐをコードするものと、ＡＡＶゲノムをコードするものとの二つのアデノウイルスベクター（ＴＥＲＡ２．０）を細胞に感染させた場合に、ヘルパーフリー法と比較して、ＡＡＶ産生が高いことを示す。
【図１５】図１５Ａは、Ｒｅｐコーディング配列をアデノウイルスベクターに組み込むことにより、Ｒｅｐをコードするプラスミドまたはトリプルプラスミド/ヘルパーフリー手法と比較して、ＡＡＶの収量を著しく増加させることを示す。図１５Ｂは、Ｒｅｐプロモーターが強力なＣＭＶプロモーターから駆動される場合でも、ＡＡＶ生産性に関してアデノウイルスベクターへの組み込みが著しく優れていることを示す。
【実施例】
【０１９０】
本発明は以下の実施例によってさらに例示され、別段の言及がない限りその部および割合は重量によるものであり、温度は摂氏である。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、例示を目的としてのみ提示されることを理解すべきである。上記の考察およびこれらの実施例により、当業者は本発明の本質的特性を確認し、その主旨および範囲を逸脱することなく、本発明に多様な変更および変法を行って多様な用途および条件に適合させることができる。したがって、本願に提示および記載するものに加えて、本発明の多様な変法が、先行する記述により当業者に明らかになるであろう。そのような変法もまたは付属の請求項の範囲内となることを意図している。
【０１９１】
下記の実施例では、「ＴＥＲＡベクター」とは、ＷＯ２０１９／０２０９９２に記載のように、主要後期プロモーターからの後期アデノウイルス遺伝子の転写が調節されているアデノウイルスベクターのことをいう。ＷＯ２０１９／０２０９９２は、後期アデノウイルス遺伝子の転写が、主要後期プロモーターへのリプレッサーエレメントの挿入により調節（阻害など）できることを開示している。アデノウイルス後期遺伝子の発現の「スイッチを切る」ことにより、細胞のタンパク質製造能力を所望の組み換えタンパク質またはＡＡＶ粒子の産生に転用することができる。
【０１９２】
ＷＯ２０１９／０２０９９２は、主要後期プロモーターにリプレッサーエレメントを含むアデノウイルスベクターが、下流に、かつ主要後期プロモーターの転写制御下で、ＴｅｔＲタンパク質をコードすることもできることを開示している。ドキシサイクリンの非存在下で、前記ＴｅｔＲタンパク質は、主要後期プロモーターリプレッサーエレメントに結合し、プロモーターの活性を抑制する。ドキシサイクリンの存在下で、前記ＴｅｔＲタンパク質は、主要後期プロモーター中の主要後期プロモーターリプレッサーエレメントに結合できない。その結果、ドキシサイクリンの存在下で、アデノウイルスの主要後期プロモーターが活性化し、アデノウイルスの構造遺伝子が発現し、前記ウイルスの複製が起こりうる。
ベクター「ＴＥＲＡ－ＡＡＶ」は、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードする。
【０１９３】
ベクター「ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ」は、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐをコード

する。このコンストラクトにおいて、機能的Ｒｅｐ ｐ５プロモーターまたは機能的ｐ４０プロモーターは存在せず、Ｒｅｐアデノウイルス阻害配列は存在せず、かつＲｅｐ ｐ１９プロモーターが修飾されてＴＡＴＡボックスが欠失しているが、前記プロモーターは機能を維持している。ｒｅｐ遺伝子がアデノウイルスのＥ１領域に挿入されている。ＣａｐはＣＭＶプロモーターから発現している。ｃａｐ遺伝子がアデノウイルスのＥ１領域に挿入されている。ＣＭＶプロモーターの転写方向は、Ｒｅｐコーディング配列に向かってはいない。

【０１９４】

ＴＥＲＡ２．０の手法とは、ＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐを細胞に加えるプロセスのことをいう。

【０１９５】

ベクターＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ５、ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ６、およびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ９は、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、またはＡＡＶ９からのＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子を、それぞれコードする。ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ５において、前記Ｃａｐ遺伝子は最小のＣＭＶプロモーター領域によって駆動される。ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ６およびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ９において、前記Ｃａｐ遺伝子は全長のＣＭＶプロモーターによって駆動される。これらのコンストラクトにおいて、機能的Ｒｅｐ ｐ５プロモーターまたは機能的ｐ４０プロモーターは存在せず、Ｒｅｐアデノウイルス阻害配列は存在せず、かつＲｅｐ ｐ１９プロモーターが修飾されてＴＡＴＡボックスが切除されているが、前記プロモーターは機能を維持している。ｒｅｐ遺伝子がアデノウイルスのＥ１領域に挿入されている。Ｃａｐ遺伝子発現カセットがアデノウイルスのＥ１領域に挿入されている。前記最小のＣＭＶプロモーターまたは前記全長のＣＭＶプロモーターの転写方向は、Ｒｅｐコーディング配列に向かってはいない。

【０１９６】

トリプルプラスミドトランスフェクションまたはヘルパーフリーの手法とは、（アデノウイルスの使用とは違って）アデノウイルスヘルパープラスミド、天然に見出されるようなＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐをコードするプラスミド、およびＣＭＶ駆動ＥＧＦＰ発現カセットがＡＡＶ ＩＴＲの間に挿入されているようなＡＡＶゲノムを含むプラスミドのトランスフェクションのことをいう。

【０１９７】

前記プラスミドｐＲｅｐＣａｐ２、ｐＲｅｐＣａｐ５、ｐＲｅｐＣａｐ６、ｐＲｅｐＣａｐ９は、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、またはＡＡＶ９からのＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子を、それぞれコードする。これらのコンストラクトにおいて、前記ＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子は、天然に見出されるような構成である。

【０１９８】

前記プラスミドｐＡＡＶ－ＥＧＦＰは、ＡＡＶゲノムの左右のＩＴＲをコードする。ＥＧＦＰレポーター遺伝子の発現を駆動するＣＭＶプロモーターがＩＴＲの間に挿入され、それにポリアデニル化シグナルが続く。

【０１９９】

前記プラスミドｐＨｅｌｐｅｒは、ＡＡＶヘルパーに必要なアデノウイルス配列を含む。これは、Ｅ４領域、Ｅ２Ａ領域、およびＶＡ遺伝子を含む。本明細書に記載される研究に使用されるＨＥＫ２９３細胞に見出されるからといって、このプラスミドはアデノウイルスＥ１領域をコードするわけではない。

【０２００】

実施例１:ＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質は、アデノウイルス主要後期プロモーターからの転写を抑制する。

アデノウイルス主要後期プロモーター（ＭＬＰ）からの転写に対するＡＡＶ Ｒｅｐタンパク質の効果を判定するために、分子クローニング法によって、野生型ＭＬＰ配列またはＴｅｔＲ抑制可能ＭＬＰ配列を、ＥＧＦＰレポータータンパク質を発現するプラスミドに

挿入した。ＭＬＰプロモータープラスミドを、コントロールＣＭＶプラスミド、またはＣＭＶプロモーターの制御下でＡＡＶ Ｒｅｐ７８、ＡＡＶＲｅｐ６８、ＡＡＶＲｅｐ５２もしくはＡＡＶＲｅｐ４０を発現するプラスミドコンストラクトとともに、ＨＥＫ２９３細胞に共トランスフェクトした。ＥＧＦＰレポーターの発現を、トランスフェクションの４８時間後にフローサイトメトリーによって定量化した。

その結果を図２Ａおよび２Ｂに示す。これらの結果は、Ｒｅｐタンパク質の高発現が、アデノウイルス主要後期プロモーターまたはＴｅｔＲ結合部位を含む主要後期プロモーターの修飾型の活性を阻害することを示している。

【０２０１】

実施例２:ＡＡＶ ｒｅｐ ＤＮＡは、アデノウイルスゲノムへ安定的に組み込まれ複製される。

ＡＡＶ Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＡＡＶ Ｒｅｐ６８ポリペプチドをコードするアデノウイルスベクターを構築するために、ｐ５プロモーターおよびｐ１９プロモーター（ＡＡＶ Ｒｅｐ５２およびＡＡＶ Ｒｅｐ４０の転写に関与）、ならびにｐ４０アデノウイルス阻害配列を、（ＡＡＶ Ｒｅｐ７８ポリペプチドおよびＡＡＶ Ｒｅｐ６８ポリペプチドは維持したままで）スクランブルし（scramble）、かつ、分子クローニング法でアデノウイルスベクターのＥ１欠失領域に挿入した。

この結果、アデノウイルスベクターがＲｅｐコーディング配列とＥＧＦＰを発現するＡＡＶゲノムとをコードする図３Ｂに示すベクターの産生が起こった。

前記アデノウイルスベクターゲノムを、ＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、完全な細胞変性効果を観察した後、トランスフェクションの１５日後までにウイルスベクターを回収した。その後ＨＥＫ２９３細胞でベクターを継代し（＞５）、アデノウイルス粒子をＤＮａｓｅで処理してカプセル化ＤＮＡを分解した。ＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子配列およびアデノウイルスヘキソン遺伝子配列の存在を、ＱＰＣＲによって判定した。その結果を図３Ａに示し、前記ベクターを図３Ｂに示す。

図３Ａは、ＡＡＶ ＲｅｐコーディングＤＮＡの頻度と、アデウイルスヘキソンＤＮＡの頻度が同数で存在することを示し、アデノウイルスゲノムへのＲｅｐ ＤＮＡの挿入が安定的であることを表している。

【０２０２】

実施例３：ＴＥＲＡベクターとの共感染は、ヘルパーフリープラスミドトランスフェクション法と比較して、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶの産生を著しく増大させる。

ＨＥＫ２９３細胞を、４８ウェル組織培養プレートフォーマットに９ｅ４細胞／ウェルで２４時間播種した。ヘルパーフリーのプラスミドで細胞をトリプルトランスフェクトするか、または、ドキシサイクリン０．５ｕｇ／ｍＬまたはＤＭＳＯの存在下で、Ａ）ＭＯＩ １００で、ＥＧＦＰ発現カセットとＣＭＶプロモーターによって駆動させたＡＡＶ２ Ｃａｐ２遺伝子とともに、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡ（ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－Ｃａｐ）と、 Ｂ）ＭＯＩ ５０で、ＥＧＦＰ発現カセットとＡＡＶ Ｒｅｐ７８－６８ｓとともに、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡ（ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－Ｒｅｐ）との共感染で、細胞をトリプルトランスフェクトした。ＡＡＶベクターを、形質導入の９６時間後に回収し、カプセル化ＡＡＶ粒子と混入しているアデノウイルス粒子とをＱＰＣＲで定量化した。

その結果を図４Ａに示し、前記ベクターを図４Ｂに示す。これらの結果は、ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＣａｐおよびＴＥＲＡ－ＡＡＶ－Ｒｅｐの組み合わせを使用して、ＡＡＶが高力価で産生されうることを示している。図４Ａは、得られた力価が、ヘルパーフリーの手法のトリプルトランスフェクションで得られた力価よりもかなり高いことを示す。図４Ｂは、ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＲｅｐおよびＴＥＲＡ－ＡＡＶ－Ｃａｐについて、ＡＡＶ成分を含むアデノウイルスゲノムの模式図を示す。

【０２０３】

実施例４：ＡＡＶトランスファーゲノムおよびＡＡＶ２ ＣａｐをコードするＴＥＲＡベクターと、ＡＡＶ Ｒｅｐ７８－６８をコードするＴＥＲＡベクターとの共感染は、ヘルパ

ーフリープラスミドトランスフェクション法と比較して、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶの産生を著しく増大させる。

ＨＥＫ２９３細胞を４８ウェル組織培養プレートフォーマットに９ｅ４細胞／ウェルで２４時間播種した。ヘルパーフリーのプラスミドで細胞をトリプルトランスフェクトするか、または、ドキシサイクリン０．５ｕｇ／ｍＬまたはＤＭＳＯの存在下で、Ａ）ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－Ｃａｐと、Ｂ）ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＲｅｐまたはＣ）ＡＡＶ Ｒｅｐ７８－６８ｓをコードするＴＥＲＡ（ＴＥＲＡ－Ｒｅｐ７８－６８）との（示されたＭＯＩでの）共感染で細胞をトリプルトランスフェクトした。ＡＡＶベクターを、形質導入の９６時間後に回収し、カプセル化ＡＡＶ粒子と混入しているアデノウイルス粒子とをＱＰＣＲで定量化した。

その結果を図５に示す。これらの結果は、ＡＡＶ成分すべてを含む二つのウイルスが、ＡＡＶ力価を改善し、これら力価はヘルパーフリー／トリプルプラスミドトランスフェクション手法で得られた力価よりもかなり高いということを示している。様々なウイルスベクターの組み合わせが図５に示され、前記手法の柔軟性および多能性を示している。各産生において、少なくとも一つのウイルスベクターが本発明のＲｅｐコンストラクトを含む。

【０２０４】

実施例５：二つのＴＥＲＡベクター、すなわちＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターと、ＡＡＶ ｒｅｐおよびＡＡＶ ｃａｐをコードするＴＥＲＡベクターとからなるＴＥＲＡ２．０システムを使用した、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ２ベクターの産生

本明細書に記載の本発明の開発まで、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐの両方を単一のアデノウイルスベクター内にコードすることは不可能だった。ＡＡＶ製造の手法を単純化するために、血清型２からＡＡＶ ＲｅｐとＡＡＶカプシドとの両方をコードする新たなアデノウイルスベクターを構築した（ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ）。この実施例において、この新たなアデノウイルスベクター（ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ）をＴＥＲＡ－ＡＡＶと組み合わせて使用してのＡＡＶ産生を試験した。この手法をＴＥＲＡ－２．０と呼ぶ。この手法を、トリプルプラスミドトランスフェクション/ヘルパーフリー方法と比較した。

ＨＥＫ２９３細胞にＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐをそれぞれＭＯＩ２５で感染させて、ＴＥＲＡ２．０を実現させた。

さらに、ＨＥＫ２９３細胞をヘルパーフリープラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ；ｐＲｅｐＣａｐ２；ｐＨｅｌｐｅｒ）でトリプルトランスフェクトした。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化した。これら二つの手法で産生されたＡＡＶベクターを使用して、新鮮なＨＥＫ２９３細胞に感染させ、形質導入ユニットをＴＣＩＤ５０アッセイによって定量化した。

その結果を図６に示す。右の軸に示されるゲノムコピー（ＧＣ）と形質導入ユニット（ＴＵ）との比率は、ｑＰＣＲによって判定された無傷のＡＡＶ粒子を、ＴＣＩＤ５０アッセイから測定された形質導入ユニットによって除することにより決定した。この実施例の結果は、ＴＥＲＡ２．０を使用した細胞の感染（ＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐとの共感染）が、トリプルプラスミドトランスフェクションから産生された製剤と比較して、形質導入の能力のあるＡＡＶベクターの産生を１０００倍に増加できたことを示す。

【０２０５】

実施例６：ＴＥＲＡ２．０手法を使用したＡＡＶ２産生プロセスからの混入アデノウイルスのレベルの判定

ＴＥＲＡ２．０手法（ＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐとの共感染、それぞれＭＯＩ ２５）を使用して感染させ、そしてドキシサイクリン０．５ｕｇ／ｍｌまたはＤＭＳＯ（－ＤＯＸ）とともに４日間培養したＨＥＫ２９３細胞中でＡＡＶ産生を行い、た。ドキシサイクリン（ＤＭＳＯ処理群）の非存在下で、アデノウイルス後期遺伝子は抑制され、ウイルス複製サイクルが切断される（truncated）。さらに、増殖培地中のド

キシサイクリンの存在は、ＴＥＲＡベクターからの後期アデノウイルス遺伝子の発現と、アデノウイルスの産生を可能にする。ベクターを３回凍結融解することにより回収し、混入アデノウイルスを新鮮なＨＥＫ２９３細胞に感染させることによるＴＣＩＤ５０アッセイによって検出し、ドキシサイクリン０．５ｕｇ／ｍｌを使用して培養した。

この実施例は、二つのＴＥＲＡベクター、すなわちＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターと、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ ＣａｐをコードするＴＥＲＡベクターとを使用した、ドキシサイクリン非存在下のＡＡＶベクターの産生が、アデノウイルスの複製を著しく抑制し、混入の無いＡＡＶ製剤を生成したことを示す。ドキシサイクリン存在下でのＡＡＶ産生と比較して、混入アデノウイルスの９９．９９９９９９％を超える減少（9 log reduction）が見られた。

【０２０６】

実施例７：１Ｌ攪拌タンクバイオリアクターでのトリプルプラスミドトランスフェクション法と比較した、ＴＥＲＡ２．０システムを使用したＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ２ベクター産生

懸濁ＨＥＫ２９３細胞をＴＥＲＡ２．０手法（ＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐを共感染）を使用してそれぞれＭＯＩ ２５で感染させた。ＴＣＩＤ５０ Ｕｎｉｔｓ／ｃｅｌｌ。

さらに、ＨＥＫ２９３細胞をヘルパーフリープラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ；ｐＲｅｐＣａｐ２；ｐＨｅｌｐｅｒ）でトリプルトランスフェクトした。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化し、無傷の粒子（ウイルスゲノム（ＶＧ））の力価を判定した。

この実施例は、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターとＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ ＣａｐをコードするＴＥＲＡベクターとの共感染を利用して、懸濁適合ＨＥＫ２９３細胞中で、ＡＡＶ２ベクターが産生できることを示す。この手法から得られたＡＡＶ２ベクターの力価は、無傷の粒子において１００倍を超える増加であった。

【０２０７】

実施例８：ＡＡＶ ｒｅｐおよびＡＡＶ ｃａｐをコードするＴＥＲＡベクターのｑＰＣＲによる遺伝安定性の評価

ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐをコードするプラスミドＤＮＡを、ベクターの回収のためにＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、さらに連続継代によって増殖した。ＨＹＰＥＲＦｌａｓｋ細胞培養容器中で、ＨＥＫ２９３細胞を感染させた（ＭＯＩ １５）。３日後にベクターを回収し、塩化セシウム超遠心法によって精製し、連続継代４代を生成した。このプロセスを繰り返し、ベクター継代５、６、７代を作成した。各代で精製したＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐベクターからＤＮＡを抽出し、ＡＡＶ２ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ２ ｃａｐ遺伝子、ならびにＡｄ５ ヘキソン遺伝子をｑＰＣＲによって定量化した。図９のデータは、Ａｄ５ヘキソンに対するＡＡＶ２ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ２ ｃａｐ遺伝子のコピー数を示し、ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐをコードするＤＮＡプラスミドと比較した（ｎｓ、２要因分散分析（two-way ANOVA））。

この実施例は、ＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ遺伝子が、ＨＥＫ２９３細胞内での連続継代中に、ＴＥＲＡベクター内で安定的に伝播されることを示す。

【０２０８】

実施例９：ＡＡＶ ｒｅｐおよびＡＡＶ ｃａｐをコードするＴＥＲＡベクターからのＡＡＶ Ｒｅｐ発現の評価。ＴＥＲＡ２．０法を使用したＡＡＶ産生プロセスからのＲｅｐタンパク質のウエスタンブロット検出。

ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクター（ＴＥＲＡ－ＡＡＶ）ならびにＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ ＣａｐをコードするＴＥＲＡベクター(ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ)で、ＨＥＫ２９３細胞を共感染させた（ＭＯＩ 各２５）。感染の２４時間および４８時間後にサンプルを回収し、ウエスタンブロットによってＡＡＶ２ Ｒｅｐ抗体で、全細胞抽出物（２５ｕＬ）を探索した。データは生物学的反復実験（duplicate biological

replicates）として示す。

その結果を図１０に示す。この実施例は、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐをコードするｔｅｒａベクターから高レベルのＡＡＶ Ｒｅｐ５２およびＡＡＶ Ｒｅｐ４０が発現し、低レベルのＲｅｐ７８およびＲｅｐ６８もまた発現することを示している。

【０２０９】

実施例１０：ＡＡＶ ｒｅｐおよびＡＡＶ ｃａｐをコードするｔｅｒａベクターを使用して産生される粒子からのＡＡＶ２カプシドタンパク質の評価

ＨＥＫ２９３細胞に、（ドキシサイクリン０．５μｇ／ｍＬの存在下または非存在下で）ｔｅｒａ－ＡＡＶおよびｔｅｒｅ－ＲｅｐＣａｐを（ＭＯＩ 各２５）共感染させるか、または５０ＧＣ／細胞でのＡＡＶ２粒子（ｔｅｒａ２．０から作成）のｔｅｒａ－ＲｅｐＣａｐ（ＭＯＩ ２５）との共感染を経て共感染させた。感染の９６時間後にサンプルを回収し、抗ＡＡＶ２ ＶＰ１／２／３抗体で細胞ライセート（２５ｕＬ）を探索した。

その結果を図１１に示す。ＡＡＶ２標準（ＡＴＣＣ ＶＲ－１６１６）も示される。この結果は、ＡＡＶ２カプシドサブユニットＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３の相対的組成が、参照標準のＡＡＶ２ベクターと同じであり、また、トリプルプラスミドトランスフェクション法で産生される物質とも同じであることを示す。

【０２１０】

実施例１１：二つのｔｅｒａベクター、すなわちＡＡＶトランスファーゲノムをコードするｔｅｒａベクターと、ＡＡＶ ｒｅｐおよびＡＡＶ ｃａｐ５をコードするｔｅｒａベクターとからなるｔｅｒａ２．０システムを使用した、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ５ベクターの産生。ＡＡＶ産生を、トリプルプラスミドトランスフェクション法と比較する。

上述したｔｅｒａ２．０手法を使用してＨＥＫ２９３細胞を感染させるが、ＡＡＶ２カプシドをＡＡＶ血清型５からのカプシドと交換した（ｔｅｒａ－ＡＡＶおよびｔｅｒａ－ＲｅｐＣａｐ５、Ｒｅｐは異種プロモーターからは発現せず、Ｃａｐ５は最小のＣＭＶプロモーターから発現する）。ｔｅｒａ－ＡＡＶはＭＯＩ ２５で使用し、ｔｅｒａ－ＲｅｐＣａｐ５は細胞あたり７５個のゲノムコピー（ＧＣ）で使用した。または、ＨＥＫ２９３細胞をヘルパーフリープラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ；ｐＲｅｐＣａｐ５；ｐＨｅｌｐｅｒ）でトリプルトランスフェクトした。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化した。

その結果を図１２に示す。この実施例からの結果は、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするｔｅｒａベクターとＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ ｃａｐ５遺伝子をコードするｔｅｒａベクターとの二つのｔｅｒａベクターとの共感染が、トリプルプラスミドトランスフェクション／ヘルパーフリー法と比較して、無傷のＡＡＶ５粒子の１６倍を超える増加を可能にしたことを示す。

【０２１１】

実施例１２：二つのｔｅｒａベクター、すなわちＡＡＶトランスファーゲノムをコードするｔｅｒａベクターと、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐ６をコードするｔｅｒａベクターとからなるｔｅｒａ２．０システムを使用した、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ６ベクターの産生。ＡＡＶ産生を、トリプルプラスミドトランスフェクション法と比較する。

上述したｔｅｒａ２．０手法を使用してＨＥＫ２９３細胞を感染させるが、ＡＡＶ２カプシドをＡＡＶ血清型６からのカプシドと交換した（ｔｅｒａ－ＡＡＶおよびｔｅｒａ－ＲｅｐＣａｐ６）。ｔｅｒａ－ＡＡＶはＭＯＩ ２５で使用し、ｔｅｒａ－ＲｅｐＣａｐ６は細胞あたり７５個のゲノムコピー（ＧＣ）で使用した。さらに、ＨＥＫ２９３細胞をヘルパーフリープラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ；ｐＲｅｐＣａｐ６；ｐＨｅｌｐｅｒ）でトリプルトランスフェクトした。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化した。

その結果を図１３に示す。この実施例からの結果は、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターとＡＡＶ Ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ６遺伝子をコードするＴＥＲＡベクターとの二つのＴＥＲＡベクターとの共感染が、トリプルプラスミドトランスフェクション法と比較して、無傷のＡＡＶ６粒子の１８倍を超える増加を可能にしたことを示す。

【０２１２】

実施例１３：二つのＴＥＲＡベクター、すなわちＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターと、ＡＡＶ ＲｅｐおよびＡＡＶ Ｃａｐ９をコードするＴＥＲＡベクターとからなるＴＥＲＡ２．０システムを使用した、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ９ベクターの産生。ＡＡＶ産生を、トリプルプラスミドトランスフェクション法と比較する。

上述したＴＥＲＡ２．０手法を使用してＨＥＫ２９３細胞を感染させるが、ＡＡＶ２カプシドをＡＡＶ血清型９からのカプシドと交換した（ＴＥＲＡ－ＡＡＶおよびＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ９）。ＴＥＲＡ－ＡＡＶはＭＯＩ ２５で使用し、ＴＥＲＡ－ＲｅｐＣａｐ９は細胞あたり５０個のゲノムコピー（ＧＣ）で使用した。さらに、ＨＥＫ２９３細胞をヘルパーフリープラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ；ｐＲｅｐＣａｐ９；ｐＨｅｌｐｅｒ）でトリプルトランスフェクトした。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化した。

その結果を図１４に示す。これらの結果は、ＡＡＶトランスファーゲノムをコードするＴＥＲＡベクターとＡＡＶ ｒｅｐ遺伝子およびＡＡＶ Ｃａｐ９遺伝子をコードするＴＥＲＡベクターとの二つのＴＥＲＡベクターとの共感染が、トリプルプラスミドトランスフェクション法と比較して、無傷のＡＡＶ９粒子の８．５倍を超える増加を可能にしたことを示す。

【０２１３】

実施例１４：Ｉ）ＡＡＶ ＲｅｐをコードするＴＥＲＡベクター（ＴＥＲＡ－Ｒｅｐ）と、ＩＩ）ＡＡＶ－ＥＧＦＰとＣＭＶプロモーターで駆動されるＡＡＶ Ｃａｐ２発現カセットとをコードするＴＥＲＡベクター(ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＥＧＦＰ－Ｃａｐ２）との、二つのＴＥＲＡベクターを使用した、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＡＶ２ベクターの産生を、ヘルパーフリープラスミド法と比較し、または、ＴＥＲＡ－Ｒｅｐを、天然型ＡＡＶ ｐ５プロモーターによって駆動されるＲｅｐコーディング配列をコードするプラスミドと交換したものと比較した。

ＡＡＶ２－ＥＧＦＰベクターを産生するために、ＨＥＫ２９３細胞にＴＥＲＡ－Ｒｅｐ（ＭＯＩ ５、１０、または５０）と、ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＥＧＦＰ－Ｃａｐ２（ＭＯＩ １００）とを共感染させた。これを、プラスミドｐ５－ＲｅｐをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞と比較した。この場合、Ｒｅｐ７８ポリペプチド／Ｒｅｐ６８ポリペプチドは天然型ｐ５プロモーターから発現し、ＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＥＧＦＰ－Ｃａｐ２と感染させた（ＭＯＩ １００）。細胞をベクターの回収前に４日間培養した。サンプルをＤＮＡｓｅで２時間３７℃で処理し、ＥＧＦＰ導入遺伝子に対するプライマーおよびプローブを使用してｑＰＣＲで定量化した。無傷のＡＡＶ２－ＥＧＦＰの生産性を、ヘルパーフリートランスフェクション法（ＨＦ）と比較した。この場合、ＨＥＫ２９３細胞はＡＡＶトランスファーゲノムプラスミド（ｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ）、プラスミドｐＲｅｐＣａｐ２、およびプラスミドｐＨｅｌｐｅｒでトランスフェクトした。コントロールサンプルは、ｐＲｅｐＣａｐ２の代わりにスタッファーＤＮＡ（ｐＵＣ１９）でトランスフェクトし、ＤＮＡｓｅ処理の効率についての対照とした。

図１５Ａからの結果は、二つのＴＥＲＡベクター：ＴＥＲＡ－ＲｅｐとＴＥＲＡ－ＡＡＶ－ＥＧＦＰ－Ｃａｐ２との共感染は、Ｒｅｐ発現プラスミドをトランスフェクションにより供給する場合、すなわちＲｅｐが天然型ｐ５ ＡＡＶプロモーターから発現するか、または、ヘルパーフリープラスミドを介して発現する場合と比較して、は、無傷のＡＡＶ２ベクターの産生量を著しく増やしたことを示す。

図１５Ｂの結果は、図１５Ａの実験と同じ実験を示すが、Ｒｅｐ発現を駆動するｐ５プロモーターが強力なＣＭＶプロモーターと置き換えられており、これは、ＴＥＲＡ－Ｒｅｐの使用の場合と比較して、ＡＡＶの生産性を改善してはいない。

【０２１４】

参考文献

Fisher, K.J. et al (1996) A novel adenovirus-adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome.Hum gene ther.7:2079-2087.

Liu, X.L et al (1999) Production of recombinant adeno-associated virus vectors using a packaging cell line and a hybrid recombinant adenovirus.Gene ther.6:293-299.

Sitaraman, V. et al (2011) Computationally designed adeno-associated virus (AAV) rep 78 is efficiently maintained within an adenovirus vector.Proc.Natl.Acad.Sci.108:14294-14299.

Timpe, J.M. et al (2006) Effect of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection.J. Virol.16:7807-7815.

Weger, S. et al (2016) A regulatory element near the 3' end of adeno-associated virus rep gene inhibits adenovirus replication in cis by means of p40 promoter-associated short transcripts.J. Virol.90:3981-3993.

Zhang, H-G. et al (2001) Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titre recombinant adeno-associated virus.Gene ther.8:704-712.

Zhang, X. and Li, C-Y.(2001) Generation of recombinant adeno-associated virus vectors by a complete adenovirus-mediated approach.Mol.Ther.3:787-693.

【０２１５】

SEQUENCES

【表１】

SEQ ID NO: 1

Rep nucleotide sequence (AAV serotype 2)

atgccggggttttacgagattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgagcatctgcccggcatttctgacagctt
tgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcac
ccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctt
ttctttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccat
ggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgc
caaactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatcccc
aattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtatttaagcgcctgttt
gaatctcacggagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagaga
atcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctc
gtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctc
caactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgcccccgact
acctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaattttggaactaaacgggtacgat
ccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgg
gcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactgga
ccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggaggggaagatgaccgccaag
gtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagat
agacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttcgaac
accagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggatcatgactttgggaaggtcacc
aagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaa
gggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgc
agccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaaatgttctcgtcacgtgggc
atgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcactcacggaca
gaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgt
gctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgac
tgcatctttgaacaaTAG

SEQ ID NO: 2

Cap nucleotide sequence (AAV serotype 2)

Cagttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaaatgttctcgt
cacgtgggcatgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcac
tcacggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatc
agaaactgtgctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggat
ttggatgactgcatctttgaacaataaatgatttaaatcaggt
atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactctctctgaaggaataagacagtggtggaagctcaa
acctggcccaccaccaccaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttcctgggtacaagt

【表２】

acctcggacccttcaacggactcgacaagggagagccggtcaacgaggcagacgccgcggccctcgagcacgacaaa
gcctacgaccggcagctcgacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtttcaggagcg
ccttaaagaagatacgtcttttgggggcaacctcggacgagcagtcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctc
tgggcctggttgaggaacctgttaagacggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctcctgtggagccagac
tcctcctcgggaaccggaaaggcgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttggtcagactggagacgcaga
ctcagtacctgacccccagcctctcggacagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacgatggctacag
gcagtggcgcaccaatggcagacaataacgagggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgat
tccacatggatgggcgacagagtcatcaccaccagcacccgaacctgggccctgcccacctacaacaaccacctcta
caaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcactactttggctacagcacccctggggtattttg
acttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgactggcaaagactcatcaacaacaactggggattccgaccc
aagagactcaacttcaagctctttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggtacgacgacgattgccaa
taaccttaccagcacggttcaggtgtttactgactcggagtaccagctcccgtacgtcctcggctcggcgcatcaag
gatgcctcccgccgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacgggagtcag
gcagtaggacgctcttcattttactgcctggagtactttccttctcagatgctgcgtaccggaaacaactttacctt
cagctacacttttgaggacgttcctttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctc
tcatcgaccagtacctgtattacttgagcagaacaaacactccaagtggaaccaccacgcagtcaaggcttcagttt
tctcaggccggagcgagtgacattcgggaccagtctaggaactggcttcctggaccctgttaccgccagcagcgagt
atcaaagacatctgcggataacaacaacagtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagag
actctctggtgaatccgggcccggccatggcaagccacaaggacgatgaagaaaagttttttcctcagagcggggtt
ctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaaatgtggacattgaaaaggtcatgattacagacgaagaggaaat
caggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctaccaacctccagagaggcaacagacaagcag
ctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggacagagatgtgtaccttcaggggccc
atctgggcaaagattccacacacggacggacattttcacccctctcccctcatgggtggattcggacttaaacaccc
tcctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccttcgaccaccttcagtgcggcaaagtttgctt
ccttcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggaaaacagcaaacgc
tggaatcccgaaattcagtacacttccaactacaacaagtctgttaatgtggactttactgtggacactaatggcgt
gtattcagagcctcgccccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaA

SEQ ID NO: 3

Cap amino acid sequence (AAV serotype 2)

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDK
AYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD
STWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRP
KRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQ
AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQF
SQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGV
LIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP

【表３】

IWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
WNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL*

SEQ ID NO: 4

gtcctgtattagaggtcacgtgagtgttttgcgacattttgcgacaccatgtggtcacgctggg**tatttaagcccga**
gtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggtttgaacgcgcagccgcc

SEQ ID NO: 5

agatctttgtcgatcctaccatccactcgacacacccgccagcggccgctgccaagcttccgagctctcgaattc

SEQ ID NO: 6

gtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatccccaattacttgctccc
caaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacag**tatttaa**gcgcctgtttgaatctcacggagc
gtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagagaatcagaatcccaat
tctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtac

SEQ ID NO: 7

gtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatccccaattacttgctccc
caaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacag**tacctca**gcgcctgtttgaatctcacggagc
gtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagagaatcagaatcccaat
tctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtac

SEQ ID NO: 8

Ggtcaccaagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacg
tcaaaaagggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcaga**tataa**gtgagcccaaacgggtgcgcgagtca
gttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggt

SEQ ID NO: 9

gtgacaaaacaagaggtgaaggacttctttcgttgggccaaagaccatgtggtcgaggtcgaacacgagttctatgt
gaagaaaggaggcgcgaagaagcgcccagcgccatcggacgctgacatctccgaaccgaagcgcgtgagagagagcg
tggcacaaccatcaacctcggatgccgaggcatccatcaattatgcggacaggt

SEQ ID NO: 10

Gtcaccaagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgt
caaaaagggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcag
ttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggt

【表４】

SEQ ID NO: 11

gtgacaaaacaagaggtgaaggacttctttcgttgggccaaagaccatgtggtcgaggtcgaacacgagttctatgt
gaagaaaggaggcgcgaagaagcgcccagcgccatcggacgctgacatctccgaaccgaagcgcgtgagagagagcg
tggcacaaccatcaacctcggatgccgaggcatccatcaattatgcggacaggt

SEQ ID NO: 12

atgccggggttttacgagattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgagcatctgcccggcatttctgacagctt
tgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcac
ccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctt
ttctttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccat
ggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgc
caaactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatcccc
aattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtacctcagcgcctgttt
gaatctcacggagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagaga
atcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctc
gtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctc
caactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgcccccgact
acctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaattttggaactaaacgggtacgat
ccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgg
gcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactgga
ccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggaggggaagatgaccgccaag
gtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagat
agacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtcatcgacggaaatagcaccactttcgagc
atcaacagcctctgcaggatcggatgtttaagttcgagctgacgaggcggctcgaccatgatttcgggaaagtgaca
aaacaagaggtgaaggacttctttcgttgggccaaagaccatgtggtcgaggtcgaacacgagttctatgtgaagaa
aggaggcgcgaagaagcgcccagcgccatcggacgctgacatctccgaaccgaagcgcgtgagagagagcgtggcac
aaccatcaacctcggatgccgaggcatccatcaattatgcggacaggtaccaaaacaaatgttctcgtcacgtgggc
atgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcactcacggaca
gaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgt
gctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagatgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgac
tgcatctttgaacaataaatgatttaattcaggtatggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacactc
tctctga

SEQ ID NO: 13

TetR binding site

tccctatcag tgatagaga

【表５】

SEQ ID NO: 14

Modified MLP

cgccctcttc ggcatcaagg aaggtgattg gtttgtaggt gtaggccacg tgaccgggtg
ttcctgaagg ggggctataa aaggtcccta tcagtgatag agactca

SEQ ID NO: 15

Modified MLP

cgccctcttc ggcatcaagg aaggtgattg gtttgtaggt gtaggccacg tgactcccta
tcagtgatag agaactataa aaggtcccta tcagtgatag agactca

SEQ ID NO: 16

Rep52 nucleotide sequence

CATGGAGCTGGTCGGGTGGctcgtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcat
acatctccttcaatgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagc
ctgactaaaaccgcccccgactacctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaat
tttggaactaaacgggtacgatccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaaga
ggaacaccatctggctgtttgggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgccc
ttctacgggtgcgtaaactggaccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtggga
ggaggggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccaga
aatgcaagtcctcggcccagatagacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgac
gggaactcaacgaccttcgaacaccagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctgga
tcatgactttgggaaggtcaccaagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtgg
agcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaa
cgggtgcgcgagtcagttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaa
caaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaa
atatctgcttcactcacggacagaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtc
aaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatct
ggtcaatgtggatttggatgaCTGCATCTTTGAACAATAG

SEQ ID NO: 17

Rep40 nucleotide sequence

ATGGAGCTGGTCGGGTGGctcgtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcata
catctccttcaatgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcc
tgactaaaaccgcccccgactacctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaatt
ttggaactaaacgggtacgatccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagag
gaacaccatctggctgtttgggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgccct
tctacgggtgcgtaaactggaccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggag
gaggggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaa
atgcaagtcctcggcccagatagacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacg

【表６】

ggaactcaacgaccttcgaacaccagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggat
catgactttgggaaggtcaccaagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtgga
gcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaac
gggtgcgcgagtcagttgcgcagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacagattggctcga
ggacactctctcTAG

SEQ ID NO: 18

Rep52 amino acid sequence (AAV serotype 2)

MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTAPDYLVGQQPVEDISSNRIYKI
LELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPATTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWE
EGKMTAKVVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMFKFELTRRLD
HDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQN
KCSRHVGMNLMLFPCRQCERMNQNSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDL
VNVDLDDCIFEQ*

SEQ ID NO: 19

Rep40 amino acid sequence (AAV serotype 2)

MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTAPDYLVGQQPVEDISSNRIYKI
LELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPATTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWE
EGKMTAKVVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMFKFELTRRLD
HDFGKVTKQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRLAR
GHSL*

SEQ ID NO: 20

Rep78 nucleotide sequence (AAV serotype 2)

atgccggggttttacgagattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgggcatctgcccggcatttctgacagctt
tgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcac
ccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctt
ttctttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccat
ggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgc
caaactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatcccc
aattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtacctcagcgcctgttt
gaatctcacggagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagaga
atcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctc
gtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctc
caactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgcccccgact
acctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaattttggaactaaacgggtacgat
ccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgg
gcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactgga

【表７】

ccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggaggggaagatgaccgccaag
gtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagat
agacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttcgaac
accagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggatcatgactttgggaaggtcacc
aagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaa
gggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgc
agccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaaatgttctcgtcacgtgggc
atgaatctgatgctgtttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcactcacggaca
gaaagactgtttagagtgctttcccgtgtcagaatctcaacccgtttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgt
gctacattcatcatatcatgggaaaggtgccagacgcttgcactgcctgcgatctggtcaatgtggatttggatgac
tgcatctttgaacaaTAG

SEQ ID NO: 21

Rep68 nucleotide sequence (AAV serotype 2)

ATGCCGGGGTTTTACGAGattgtgattaaggtccccagcgaccttgacgagcatctgcccggcatttctgacagctt
tgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcac
ccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggcccttttctttgtgcaatttgagaagggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaaatccat
ggttttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgcgggatcgagccgactttgc
caaactggttcgcggtcacaaagaccagaaatggcgccggaggcgggaacaaggtggtggatgagtgctacatcccc
aattacttgctccccaaaacccagcctgagctccagtgggcgtGGACTAATATGGAACAGTACCTCAGCGCCTGTTT
GAATCTCACGGagcgtaaacggttggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaacaaagaga
atcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaacttcagccaggtacatggagctggtcgggtggctc
gtggacaaggggattacctcggagaagcagtggatccaggaggaccaggcctcatacatctccttcaatgcggcctc
caactcgcggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgcccccgact
acctggtgggccagcagcccgtggaggacatttccagcaatcggatttataaaattttggaactaaacgggtacgat
ccccaatatgcggcttccgtctttctgggatgggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctggctgtttgg
gcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgcccttctacgggtgcgtaaactgga
ccaatgagaactttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggaggaggggaagatgaccgccaag
gtcgtggagtcggccaaagccattctcggaggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagat
agacccgactcccgtgatcgtcacctccaacaccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactcaacgaccttcgaac
accagcagccgttgcaagaccggatgttcaaatttgaactcacccgccgtctggatcatgactttgggaaggtcacc
aagcaggaagtcaaagactttttccggtgggcaaaggatcacgtggttgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaa
gggtggagccaagaaaagacccgcccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtcagttgcgc
agccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacagTAG

【表８】

SEQ ID NO: 22
Rep78 amino acid sequence (AAV serotype 2)

MPGFYEIVIKVPSDLDGHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSDMDLNLIEQAPLTVAEKLQRDFLTEWRRVSKAPEAL
FFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIREKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIP
NYLLPKTQPELQWAWTNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARYMELVGWL
VDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTAPDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYD
PQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPATTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAK
VVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMFKFELTRRLDHDFGKVT
KQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVG
MNLMLFPCRQCERMNQNSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVNVDLDD
CIFEQ*

SEQ ID NO: 23
Rep68 amino acid sequence (AAV serotype 2)

MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSDMDLNLIEQAPLTVAEKLQRDFLTEWRRVSKAPEAL
FFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIREKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIP
NYLLPKTQPELQWAWTNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARYMELVGWL
VDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTAPDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYD
PQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPATTGKTNIAEAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCVDKMVIWWEEGKMTAK
VVESAKAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMFKFELTRRLDHDFGKVT
KQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDADISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYAD*

SEQUENCE LISTING FREE TEXT

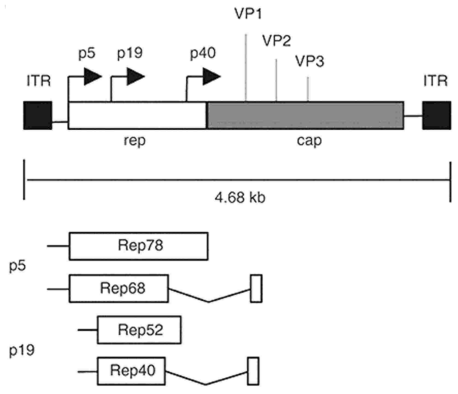
〈210〉 1
〈213〉 Rep nucleotide sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 2
〈213〉 Cap nucleotide sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 3
〈213〉 Cap amino acid sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 4
〈213〉 Wild-type adeno-associated virus 2 p5 promoter
〈210〉 5
〈213〉 Sequence that forms part of the 5'-untranslated region (UTR) of the Homo sapiens beta-globin gene
〈210〉 6
〈213〉 Wild-type adeno-associated virus 2 p19 promoter
〈210〉 7
〈223〉 Non-functional p19 sequence
〈210〉 8
〈213〉 Wild-type adeno-associated virus 2 p40 promoter
〈210〉 9
〈223〉 Non-functional p40 promoter sequence
〈210〉 10
〈213〉 Wild-type adeno-associated virus 2 adenovirus inhibitor
〈210〉 11
〈223〉 Nucleotide sequence without a functional p40 promoter sequence
〈210〉 12

〈223〉 rep gene sequence with p19 and p40 promoters ablated, retaining the Rep78 and Rep68 coding sequences
〈210〉 13
〈223〉 TetR binding site
〈210〉 14
〈223〉 Modified MLP
〈210〉 15
〈223〉 Modified MLP
〈210〉 16
〈223〉 Rep52 nucleotide sequence
〈210〉 17
〈223〉 Rep40 nucleotide sequence
〈210〉 18
〈213〉 Rep52 amino acid sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 19
〈213〉 Rep40 amino acid sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 20
〈213〉 Rep78 nucleotide sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 21
〈213〉 Rep68 nucleotide sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 22
〈213〉 Rep78 amino acid sequence (adeno-associated virus 2)
〈210〉 23
〈213〉 Rep68 amino acid sequence (adeno-associated virus 2)

【図面】

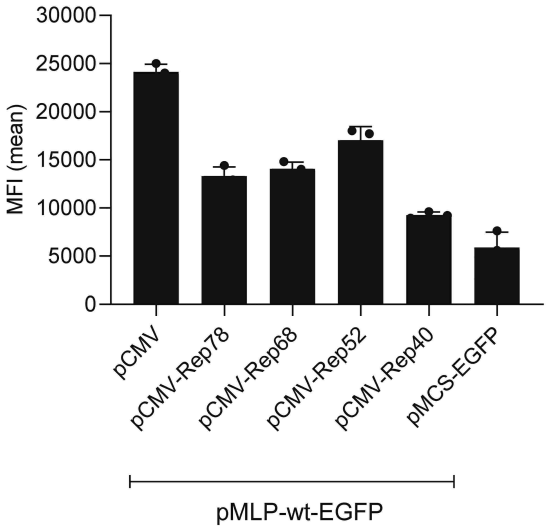
【図１】

Figure 1



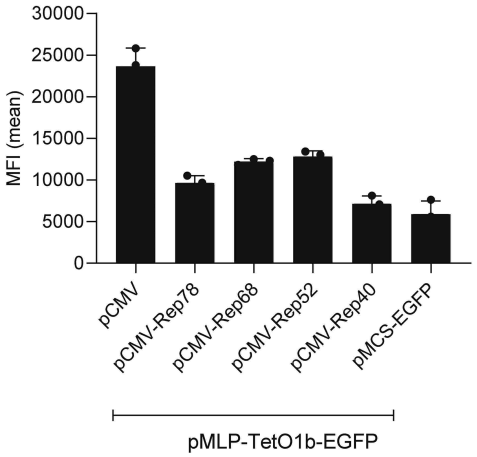
【図２Ａ】

Figure 2A



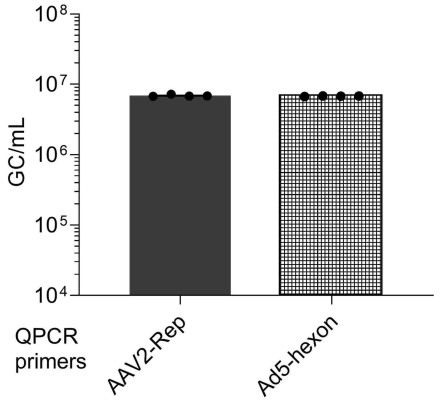
【図２Ｂ】

Figure 2B



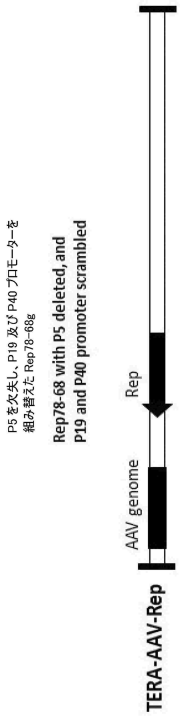
【図３Ａ】

Figure 3A



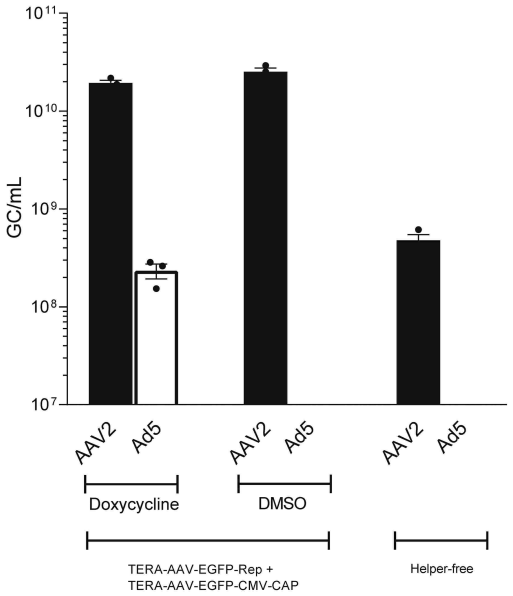
【図３Ｂ】

Figure 3B



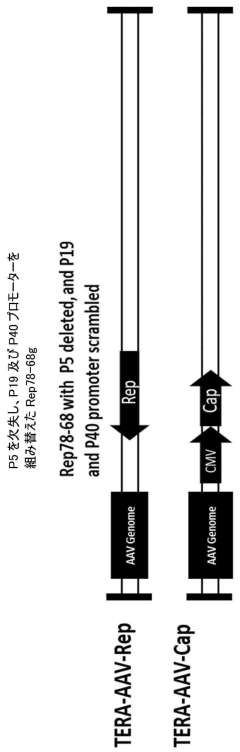
【図４Ａ】

Figure 4A



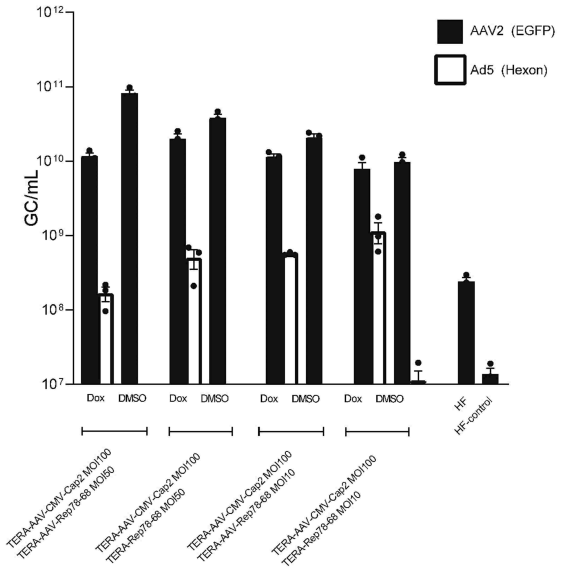
【図４Ｂ】

Figure 4B



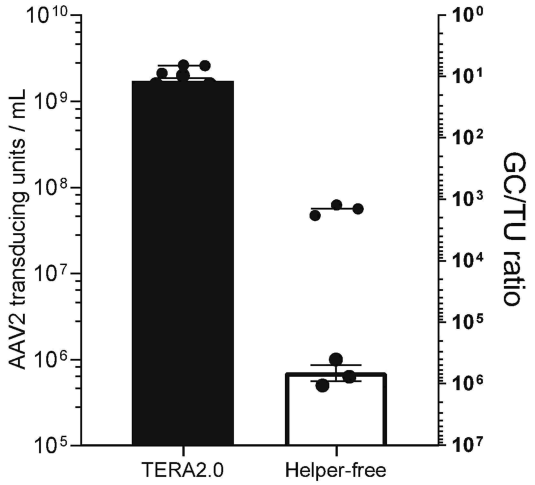
【図５】

Figure 5



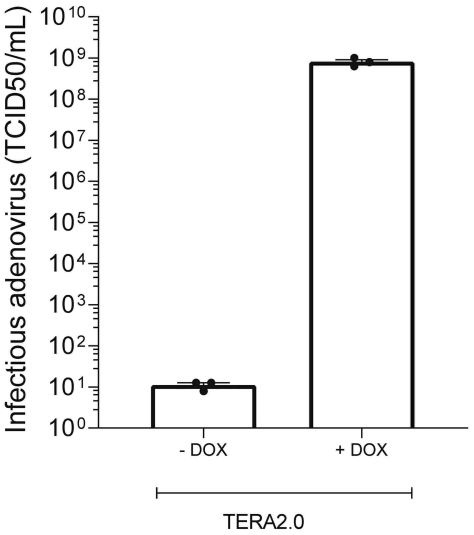
【図６】

Figure 6



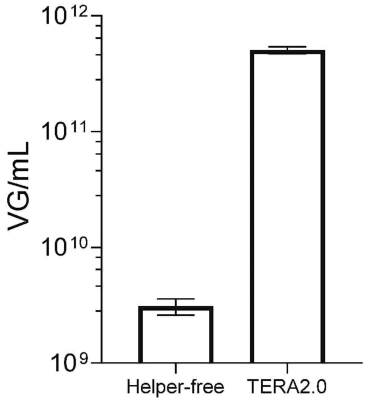
【図７】

Figure 7



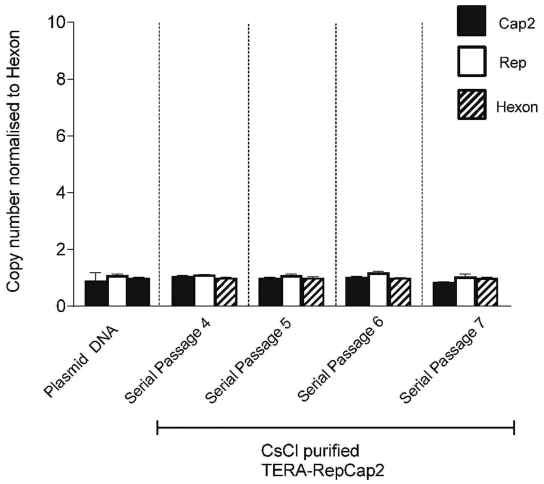
【図８】

Figure 8



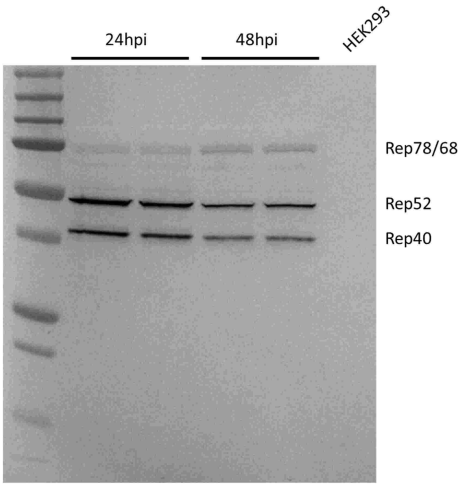
【図９】

Figure 9



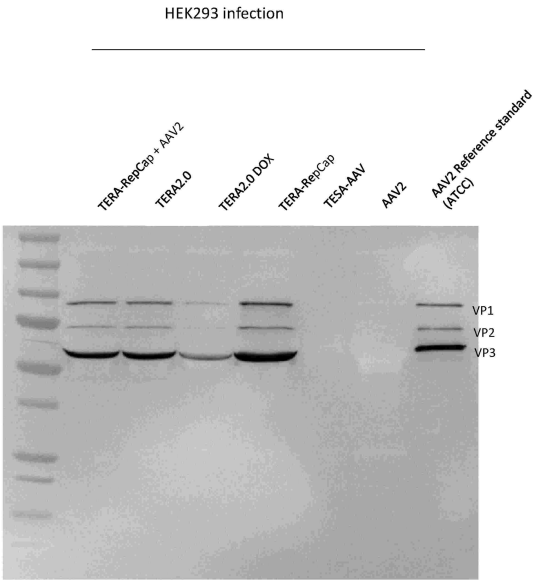
【図１０】

Figure 10



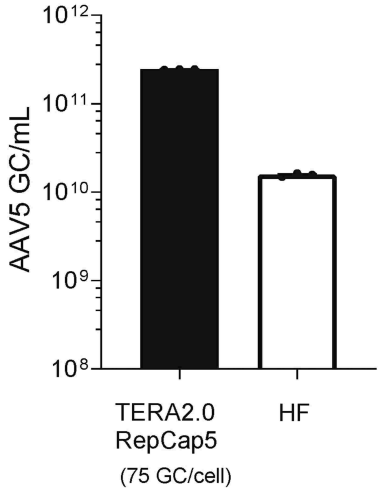
【図１１】

Figure 11



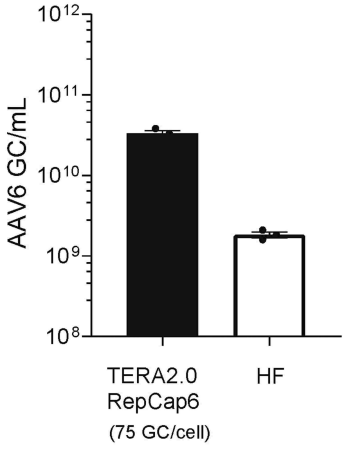
【図１２】

Figure 12



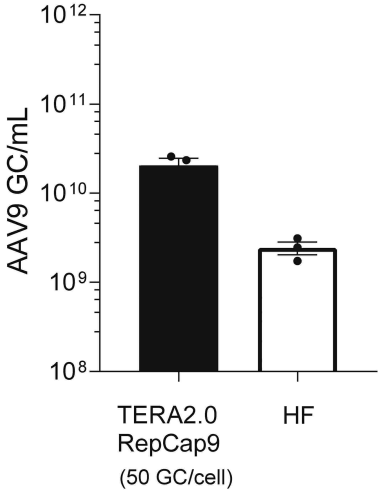
【図１３】

Figure 13



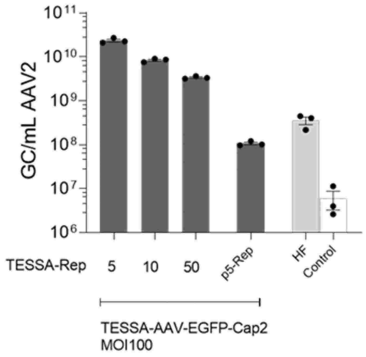
【図１４】

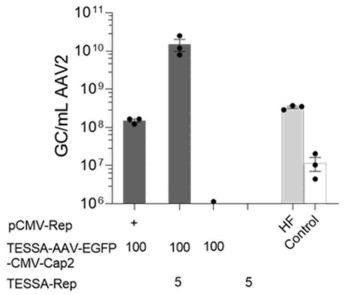
Figure 14



【図１５】

Figures 15A and 15B





【配列表】
0007522839000001.app

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2010835.3
(32)優先日　令和2年7月14日(2020.7.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(31)優先権主張番号　2011437.7
(32)優先日　令和2年7月23日(2020.7.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(74)代理人　110000040
弁理士法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　ケイウッド、ライアン
イギリス、オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス４　４エイチジー、ロバート ロビンソン アヴェニュー、 メダワー センター シー／オー オックスフォード ジェネティクス リミテッド
(72)発明者　スー、ウェイヘン
イギリス、オックスフォード オックスフォードシャー オーエックス４　４エイチジー、ロバート ロビンソン アヴェニュー、 メダワー センター シー／オー オックスフォード ジェネティクス リミテッド
審査官　鈴木 崇之
(56)参考文献　国際公開第２０１９／０２０９９２（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第２０１９／１４１９９３（ＷＯ，Ａ１）
欧州特許出願公開第０３４５６８２２（ＥＰ，Ａ１）
特表２００２－５０５０８５（ＪＰ，Ａ）
PNAS，2011年，Vol. 108, No. 34，pp. 14294-14299
J. Virol.，2014年，Vol. 88, No. 24，pp. 14126-14137
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　１／００－ ７／０８
Ｃ１２Ｐ　１／００－４１／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）