

明 細 書

発明の名称： I T R－R e p 遺伝子複合体

技術分野

[0001] 本開示は、A A Vベクターの生産性が高い、R e pとI T Rとを含むプラスミドDNAまたはDNA／カチオン性物質複合体を提供する。

背景技術

[0002] A A Vベクターが製造される際、I T RとR e pタンパク質は相互作用し、カプシドタンパク質にDNAを包有する。近年のA A Vベクターが利用される適応疾患の拡大や製造コスト高騰の問題に伴い、A A Vベクターの生産量を向上されられる技術が求められる。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0003] 本発明者らは、I T R 2／R e p 2以外の組み合わせで、A A Vベクターの生産性が高いI T RとR e pの特定の組み合わせを見出した。したがって、本開示は、A A Vベクターの生産性の高い組み合わせのR e pとI T Rを含むプラスミドDNAまたはDNA／カチオン性物質複合体を提供する。

[0004] したがって、本開示は以下を提供する。

(項目 1)

第 1 の血清型のアデノ随伴ウイルス (A A V) 由来のR e p 遺伝子と、
前記第 1 の血清型とは異なる第 2 の血清型のA A V由来であり、－65 から－95 k c a l／m o l の範囲のΔG値を有する末端逆位反復 (I T R) 配列と
を含む、核酸。

(項目 2)

前記R e p 遺伝子が血清型 2 のA A V由来であり、前記I T R 配列が－75 から－95 k c a l／m o l の範囲のΔG値を有する、上記項目に記載の核酸。

(項目 3)

前記 I T R 配列が、 -80 から -88 kcal/mol の範囲の ΔG 値を有する、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 4)

前記 I T R 配列が、血清型 1、6 または 7 の A A V 由来である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 4 A)

前記 R e p 遺伝子が R e p 1 / 6、R e p 2、R e p 3 / 4、R e p 1 2、R e p 5、R e p 8、R e p 7 / 9 および R e p 1 0 / 1 1 からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 4 B)

前記 R e p 遺伝子が R e p 3、R e p 1 または R e p 7 の少なくとも 1 つと 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするものである、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 5)

前記 R e p 遺伝子が血清型 1、2、5、7 または 10 の A A V 由来であり、前記 I T R 配列が -75 から -95 kcal/mol の範囲の ΔG 値を有する、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 6)

前記 I T R 配列が、 -80 から -90 kcal/mol の範囲の ΔG 値を有する、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 7)

前記 I T R 配列が、血清型 1 ~ 7 のいずれか 1 つの A A V 由来である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 8)

A A V 由来の C a p 遺伝子をさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 9)

血清型 1 ～ 10 のいずれか 1 つの AAV 由来の Cap 遺伝子をさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 10)

同じ核酸分子または核酸二重鎖上に、前記 Rep 遺伝子、前記 ITR 配列、および AAV 由来の Cap 遺伝子を含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 11)

アデノウイルス (AdV) 由来のヘルパー遺伝子をさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 12)

前記 Rep 遺伝子および前記 ITR 配列の組み合わせが、CMV プロモーターまたは EGFP をターゲットにした qPCR で測定した場合に、ひとつの Rep 遺伝子と前記 ITR 配列の組み合わせが、その Rep 遺伝子と ITR-5 の組合せと比較して 2 倍以上の Titer [GC/mL] のウイルスベクターを生産する能力を有する、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 13)

前記核酸がプラスミドである、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 14)

前記核酸がカチオン性物質と複合体を形成している、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 15)

前記カチオン性物質がポリマーまたはリボソームを含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸。

(項目 16)

上記項目のいずれか一項に記載の核酸を含む、ウイルスベクターを産生するための組成物。

(項目 17)

前記 Rep 遺伝子を含む核酸と、前記 ITR を含む核酸とを組み合わせる

工程を含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸を合成する方法。

(項目 18)

上記項目のいずれか一項に記載の核酸または上記項目のいずれか一項に記載の組成物をプロデューサー細胞に導入するステップと、

前記プロデューサー細胞においてウイルスベクターを形成させるステップと

を含む、ウイルスベクターを作製する方法。

(項目 19)

前記核酸の少なくとも一部が前記プロデューサー細胞の染色体に組み込まれる、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 20)

上記項目のいずれか一項に記載の方法によって作製されたプロデューサー細胞またはウイルスベクター。

[0005] 本開示において、上記の 1 つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0006] 本開示は、AAVベクターの生産性の高い組み合わせのRepとITRを含むプラスミドDNAまたはDNA／カチオン性物質複合体を提供する。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図1は、ITR 8 種類およびRep 7 種類の56パターンの構築物の模式図を示す。

[図2]図2は、図1の構築物のqPCRおよびHPLCによる測定結果を示す。

[図3]図3は、ITR 7 種類、Rep 1 種類およびCap 2 種類の14パターンの構築物の模式図を示す。

[図4]図4は、図3の構築物のqPCRおよびHPLCによる測定結果を示す。

。

[図5]図5は、5' I T Rおよび3' I T Rの ΔG のグラフを示す。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0009] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0010] 本明細書において「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。本明細書において、特段の限定が無ければ、「核酸」とは、1分子の核酸および複数分子の核酸の両方ならびに一本鎖核酸および二本鎖核酸の両方を意味する。本明細書において、特段の限定が無ければ、核酸が複数の要素を含むという記載には、複数の要素が同じ核酸分子上に存在する実施形態および複数の要素がそれぞれ異なる核酸分子上に存在する実施形態が含まれ、複数の要素が同じ二本鎖核酸複合体に存在する実施形態および複数の要素がそれぞれ異なる二本鎖核酸複合体に存在する実施形態が含まれる。核酸の例として、DNA、RNA、cDNA、mRNA、rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、lncRNAが挙げられる。この用語はまた、「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチド誘導体を含むか、またはヌクレオチド間結合が通常とは異なるポリヌクレオチドをいう。

「ヌクレオチド誘導体」とは、天然のDNAまたはRNAにおいて使用される通常のヌクレオチドとは異なる構造を有するヌクレオチドをいい、例えば、ロケット核酸 (LNA)、2' - O, 4' - C - エチレン架橋核酸 (2'-O, 4'-C-ethylene bridged nucleic acid、ENA) などのエチレン核酸、その他の架橋核酸 (bridged nucleic acid、BNA)、ヘキシトール核酸 (hexitol nucleic acid、HNA)、アミド架橋核酸 (Amido-bridged nucleic acid、AmNA)、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA (tcDNA)、ポリエーテル核酸 (例えば、米国特許第5,908,845号参照)、シクロヘキセン核酸 (CeNA) などが挙げられる。ヌクレオチド間結合が通常とは異なる例として、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合などが挙げられる。

[0011] 他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る。例えば、アデノウイルスの血清型1～52およびアデノ随伴ウイルスの血清型1～12など具体的な野生型配列に基づく改変体には、公知の改変体 (例えば、rh10、DJ、DJ/8、PHP、eB、PHP、S、AAV2-retro、AAV2-QuadYF、AAV2.7m8、AAV6.2、rh.74、AAV2.5、AAV-TT、Anc80など) 以外にも、元となる配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも99.5%の配列同一性を有する配列を含む核酸

も含まれる。

[0012] 本明細書において「遺伝子」とは、一定の生物学的機能を果たす核酸部分を指す。この生物学的機能として、ポリペプチドまたはタンパク質をコードすること、タンパク質非コード機能性RNA（rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、lncRNAなど）をコードすること、ポリペプチド、タンパク質またはタンパク質非コード機能性RNAの生産を制御すること、特定のタンパク質に特異的に結合されること、核酸の切断または複製を制御することが挙げられる。そのため、本明細書における遺伝子には、タンパク質またはタンパク質非コード機能性RNAをコードする核酸部分以外にも、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、インスレーター、サイレンサー、複製起点、内部リボソーム侵入部位などの転写翻訳調節配列、およびウイルス粒子へのパッケージングに必要となる核酸部分が含まれる。本明細書において「遺伝子産物」とは、遺伝子から転写されたmRNA、遺伝子にコードされるポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質非コード機能性RNAを指す。本明細書において「遺伝子の発現」とは、遺伝子産物が生産されることを指す。特に、ウイルスの遺伝子は、一つの核酸領域中に長さの異なる複数の種類のタンパク質をしばしばコードする。本明細書において、遺伝子から生産され得る少なくとも1種類のタンパク質が生産された場合に、遺伝子が発現されたと称される。

[0013] 本明細書において、「アデノ随伴ウイルス」（AAV）とは、パルボウイルス科ディペンドウイルス属の線状一本鎖DNAウイルスを指し、ウイルス粒子は直径20～26nmである。AAVの増殖には通常アデノウイルスエレメントが必要である。AAVゲノムの量末端にはITR（inverted terminal repeat）と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在する。このITRの部分が複製の開始点となり、プライマーの役割を果たす。また、ウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにもこのITRが必要である。ゲノムの左半分に非構造蛋白質、すなわち複製や転写を司る調節タンパク質（Rep78、Rep68、Rep

52、Rep40)をコードするrep遺伝子が存在し、ゲノムの右半分に構造蛋白質(VP1、VP2、VP3)の三つのカプシドタンパク質をコードするcap遺伝子が存在する。AAVの生活環は潜伏感染と溶解感染に分けられる。前者は単独で感染した場合であり、宿主細胞の第19番染色体長腕のAAVS1領域(19q13.3-qter)へ組み込まれるのが特徴的である。この組み込みは非相同組換えによるものでありRepが関与している。AAVS1領域とITRのRep結合領域とに共通して存在する塩基配列(GAGC繰返し配列)に、Rep78/Rep68が結合することが報告されている。したがって、野生型AAVが標的細胞に感染した際には、RepがAAVのITRおよびAAVS1に結合し、Repが介在することによりAAVゲノムの第19番染色体への部位特異的組み込みが起こるものと考えられている。アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染した場合、AAVが潜伏感染している細胞にさらにヘルパーウイルスが重複感染した場合にAAVの複製が起こり、細胞破壊により大量のウイルスが放出される(溶解感染)。

[0014] AAVは、カプシドに基づいて1～12型までの血清型が報告されている。また、rh10、DJ、DJ/8、PHP.eB、PHP.S、AAV2-retro、AAV2-QuadYF、AAV2.7m8、AAV6.2、rh.74、AAV2.5、AAV-TT、Anc80の血清型も報告されている。本開示のAAV由来構築物は、標的組織に応じて好適な血清型のAAVに基づいて作製されてもよい。例えば、(血清型)：(標的組織)の関係は以下の通りに選択されてもよい；(AAV1)：(筋肉、肝臓、気道、神経細胞)、(AAV2)：(筋肉、肝臓、神経細胞)、(AAV3)：(筋肉、肝臓、神経細胞)、(AAV4)：(筋肉、脳室上皮細胞)、(AAV5)：(筋肉、肝臓、神経細胞、グリア細胞、気道)、(AAV6)：(筋肉、肝臓、気道、神経細胞)、(AAV7)：(筋肉、肝臓)、(AAV8)：(筋肉、肝臓)、(AAV9)：(筋肉、肝臓、気道)。AAVのカプシドとして、野生型の他に、標的化変異を加えたカプシド(AAV2i

8、AAV2、5、AAV-TT、AAV9、HRなど）、ランダム変異を加えたカプシド（AAV-PHP、Bなど）、インシリコで設計したカプシド（Anc80など）が挙げられ、一つの実施形態において、本開示のAAV由来構築物はこれらの改変カプシドを含んでもよく、本開示のAAV由来構築物プラスミドはこれらの改変カプシドをコードするように構築されてもよい。本明細書において、核酸配列が特定の血清型に由来すると記載する場合、核酸配列は、野生型のカプシドをコードしてもよいし、野生型のカプシドに基づき上記のような改変が施されたカプシドをコードしてもよいことが企図される。

[0015] 本明細書において、核酸について「ウイルス由来」とは、その核酸がそのウイルスに存在する核酸と高い相同性または同一性を有することを意味し、その核酸が、そのウイルスから取得されていることもそのウイルスから取得された核酸を使用して調製されていることも必要としない。例えば、ある核酸またはその翻訳産物が、ウイルスに存在する核酸またはその翻訳産物に対して高い同一性（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など）を有する配列を有する場合、その核酸は、そのウイルス由来であり得る。

[0016] 本明細書において、「Rep」とは、アデノ随伴ウイルス（AAV）が有するRep遺伝子もしくはその部分またはその改変体を指す。野生型のAAVのRepには、複製や転写を司る調節タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52、Rep40）がコードされ、本開示のRepは、Rep78、Rep68、Rep52およびRep40のうちの少なくとも1つと同等の機能を有するタンパク質をコードし得る。AAVは、カプシドに基づいて1～12型の血清型が報告されており、他にも、rh10、DJ、DJ/8、PHP、eB、PHP、S、AAV2-retro、AAV2-Qua

d Y F、A A V 2. 7 m 8、A A V 6. 2、r h. 7 4、A A V 2. 5、A A V - T T、A n c 8 0の血清型が報告されている。本開示のR e pは、任意の血清型のA A VのR e pに由来し得る。本開示のR e pまたはその遺伝子産物（タンパク質など）は、任意の血清型のA A VのR e pまたはその遺伝子産物（タンパク質など）に対して高い同一性（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など）を有する配列（塩基配列またはアミノ酸配列）を有し得る。

[0017] 本明細書において「反復配列」または「タンデムリピート」（な核酸配列）とは、生物ゲノムの核酸配列で、同じ配列が反復して（特に数回以上）見られるものの総称である。当該分野で使用される任意の反復配列を本開示において使用することができる。典型的には、プロモーター配列が反復して出現する。

[0018] 本明細書において「末端反復配列」は、生物ゲノムの核酸配列で、同じ配列が反復して（特に数回以上）見られるもののうち、末端に存在するものの総称である。末端反復配列としては、末端逆位反復配列（I T R）または長鎖末端反復配列（L T R）などをあげることができるがこれらに限定されない。末端反復配列は、アデノウイルスの血清型1～52またはアデノ随伴ウイルスの血清型1～12、あるいはその改変体（r h 1 0、D J、D J / 8、P H P. e B、P H P. S、A A V 2 - r e t r o、A A V 2 - Q u a d Y F、A A V 2. 7 m 8、A A V 6. 2、r h. 7 4、A A V 2. 5、A A V - T T、A n c 8 0など）のいずれかに由来するものが利用され得る。末端反復配列としては、天然のものであっても、人工的に変異を導入したものであってもよい。「人工的に変異」を導入したものは、例えば公知の文献に記載されている天然のものの配列に対して適宜の変異を導入することで作製することができる。

[0019] 本明細書において、「ヘルパー遺伝子」とは、プロデューサー細胞におけるAAV生産量を増大させる任意の遺伝子を指す。例えば、HEK293細胞(ATCC:CRL-1573)にpAAV-ZsGreen(TAKARA:6231)とpRC1(TAKARA:6672)を導入し、さらに候補遺伝子を導入した細胞および導入しなかった細胞を作製し、これらの細胞をDMEM(Thermo fisher:11965)(2% FBS(Thermo fisher:10270)、1%ペニシリン-ストレptomycin混合溶液(ナカライテスク:09367-34))培地で37℃、5%CO₂のインキュベーターで培養して、3日後に、回収した2μLの上清に5μLのNuclease-Free water(Promega:P1193)、1μLの10×React Buffer(MgCl₂添加)(Thermo fisher:ED0521)、2μLのDNaseI(Thermo fisher:ED0521)を添加し、37℃で30分間ブロックインキュベーターで反応させ、その後、90μLのNuclease-Free water(0.001% Pluronic(登録商標)F-68(100X)(Thermo fisher:24040032)、5mM EDTA(TAKARA:T9191))を添加して95℃で10分間ブロックインキュベーターで反応させ、得られた溶液をNuclease-Free water(0.001% Pluronic(登録商標)F-68(100X))で100倍希釈して調製した溶液2μLに2μLのNuclease-Free water、5μLのPowerUp(登録商標)SYBR(登録商標)Green Master Mix(Thermo fisher:A25780)、0.5μLの10μM CMV-Fプライマー(CATCAATGGGCGTGGATAGC:配列番号1)、0.5μLの10μM CMV-Rプライマー(GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA:配列番号2)を添加して、QuantStudio 3リアルタイムPCRシステムFast96ウェル(Thermo fisher:QS3-96F)を使用して、95℃で10分の後、9

5℃で15秒、55℃で5秒、72℃で30秒を40サイクル繰り返す条件でqPCRを行い、AAV粒子量を測定した場合、候補遺伝子を導入した細胞において導入しなかった細胞と比べて少なくとも50%のAAV粒子量の増大があった場合、候補遺伝子はヘルパー遺伝子と判定することができる。典型的には、ヘルパー遺伝子は、アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、VA、E4もしくはその部分またはその改変体から選択される。現在までに52のヒトアデノウイルスの抗原型（血清型）が同定されている。本開示のヘルパー遺伝子、任意の抗原型のアデノウイルスのヘルパー遺伝子に由来し得る。本開示のヘルパー遺伝子またはその遺伝子産物（タンパク質など）は、任意の血清型のアデノウイルスのヘルパー遺伝子またはその遺伝子産物（タンパク質など）に対して高い同一性（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など）を有する配列（塩基配列またはアミノ酸配列）を有し得る。

[0020] 本明細書において、「Rep遺伝子の発現の制御」とは、Rep遺伝子産物（例えば、Rep遺伝子転写物）の量を増減させる任意の操作を指す。例えば、同じ細胞、同じ培養液または同じ隔離空間（ウェルやディッシュなど）において、異なる時点（例えば、6時間、12時間、24時間または72時間離れた）でRep遺伝子産物の量またはRep遺伝子に対するRep遺伝子産物の量比が少なくとも30%変動する場合、Rep遺伝子の発現は制御されている。

[0021] 本明細書において、「ヘルパー遺伝子の発現の制御」とは、ヘルパー遺伝子産物（例えば、遺伝子転写物）の量を増減させる任意の操作を指す。例えば、同じ細胞、同じ培養液または同じ隔離空間（ウェルやディッシュなど）において、異なる時点（例えば、6時間、12時間、24時間または72時間離れた）でヘルパー遺伝子産物の量またはヘルパー遺伝子に対するヘルパ

一遺伝子産物の量比が少なくとも30%変動する場合、ヘルパー遺伝子の発現は制御されている。ヘルパー遺伝子の発現を制御する工程は、例えば、ヘルパー遺伝子に作動可能に連結された刺激応答性プロモーターに対応する刺激（薬物、光など）を与えることを含み得る。

[0022] 本明細書において、ある遺伝子に対する「発現制御系」とは、特定の条件下でその遺伝子の転写および／または翻訳の開始または停止、あるいはその遺伝子を含む核酸またはその遺伝子産物の分解を引き起こすことができる物質もしくは物質の部分またはこれらの組み合わせを指す。例えば、発現制御系としては、刺激（薬物、光など）とその刺激に応答性のプロモーターとの組み合わせ（遺伝子の転写の制御）、Creタンパク質とCreタンパク質応答性核酸領域（LoxP）との組み合わせ（遺伝子の転写の制御）、CRISPR-Cas9システム（遺伝子を含む核酸の分解）、siRNAまたはshRNA（遺伝子産物の分解）、ユビキチンリガーゼ（遺伝子産物の分解）などが挙げられる。発現制御系が、プロモーターおよび特定の機能を有する核酸領域などの核酸物質を含む場合、これは発現制御系の核酸エレメントと称され得る。細胞、培養物または隔離空間が、ヘルパー遺伝子に対する発現制御系の核酸エレメントを含む場合、ヘルパー遺伝子の発現は制御されていると考えられる。典型的には、発現制御系は、標的細胞に天然に存在しない物質を標的細胞に加えることで起動および／または停止を切り替えることができる。

[0023] 本明細書において2つの遺伝子がシスであるとは、同一の核酸分子または相補鎖（二本鎖核酸の場合）の核酸分子上にそれらの遺伝子が存在することを指す。また、本明細書において2つの遺伝子がトランスであるとは、（ある生物における）ある細胞において、これらの遺伝子が、同一の核酸分子または相補鎖（二本鎖核酸の場合）の核酸分子上に存在しないことを指す。例えば、ゲノム上に存在する遺伝子と、ウイルス由来構築物で導入された核酸上の遺伝子はトランスであり得る。必要に応じて、2つの遺伝子がトランスであるかどうかは、2つの遺伝子が細胞に同時に存在するようになった（例

えば、細胞への核酸の導入）時点における状態において判断され得る。

[0024] 本明細書において遺伝子の数について言及する場合、1つの遺伝子は、ある生物のゲノム上に通常（最も高い頻度または50%以上の確率）存在する形態において連続配列を有する遺伝子を指す。例えば、あるタンパク質をコードする2つのエクソンは、2つの遺伝子であり得る。例えば、プロモーター配列とタンパク質をコードする配列とが連続配列を形成している場合、プロモーター配列およびタンパク質をコードする配列を含む核酸部分は、1つの遺伝子であり得る。例えば、切断されることで機能的になるタンパク質がゲノム上で連続配列によってコードされる場合、このタンパク質は、1つの遺伝子にコードされ得る。機能の側面から遺伝子に言及する場合、核酸配列は連続配列である必要はなく、例えば、あるタンパク質をコードする複数のエクソンは集合的にそのタンパク質の遺伝子として言及される。

[0025] 本明細書において使用する場合、遺伝子を「欠損する」とは、核酸がその遺伝子を含まないか、またはその遺伝子の正常な機能（例えば、機能的なタンパク質を生産する機能）を発揮しないように改変された遺伝子を含むことを指す。

[0026] 本明細書において使用する場合、「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

[0027] 本明細書において使用する場合、「プラスミド」とは、細胞中で染色体とは別個に存在するか、または細胞に導入した場合に染色体とは別個に存在する環状DNAを指す。

[0028] 本明細書において使用する場合、「カチオン性物質」とは、中性の水に添加した場合に陽電荷を帯びる物質を指し、典型的には、核酸（プラスミドなど）との複合体において提供される。

- [0029] 本明細書において、「ウイルス由来構築物」とは、ウイルスに由来する構造を少なくとも部分的に有する核酸構築物またはそこから生産されるタンパク質を含む構築物を指す。ウイルス由来構成物としては、ウイルスベクター、ウイルス様粒子（VLP）、腫瘍溶解ウイルス（がん細胞でのみ増殖するように改変されたものを含む）、およびウイルスレプリコン（ウイルス粒子産生能を欠失させた自己複製可能なウイルスゲノム）が挙げられる。
- [0030] 本明細書において使用する場合、「ウイルスベクター」とは、ウイルスに由来する構造を少なくとも部分的に有し、標的細胞に核酸を導入できる構築物を指す。典型的には、ウイルスベクターは、ウイルスの構造タンパク質および異種遺伝子を含む核酸を含むウイルス粒子の形態である。
- [0031] 本明細書において使用する場合、「プロデューサー細胞」とは、所望のウイルス由来構成物を産生できる細胞を意味し、ウイルス由来構成物の産生に必要な遺伝子が、染色体および導入したプラスミドから発現される細胞であり得る。プロデューサー細胞にプラスミドを導入することで、所望のウイルス由来構成物が生産され得る。例えば、AAVウイルスベクターの場合、その産生にE1AとE1Bが必要であるが、HEK293はこれらを有するため、これらをヘルパープラスミドから除くことができる。他の細胞でも、このような機能補助因子を有するように改変すれば、プロデューサー細胞として機能する。
- [0032] 本明細書において「動物細胞」とは、動物（ヒト、マウス、ラット、サル、イヌなど）から取得された細胞または動物から取得された細胞を改変した細胞を指す。
- [0033] 本明細書において使用する場合、「宿主細胞」とは、外来性の核酸またはタンパク質またはウイルスもしくはウイルス由来構築物が導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）をさす。
- [0034] 本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミ

ノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、天然または人工的に改変されたポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。

- [0035] 本明細書において使用する場合、「転写翻訳調節配列」は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、エンハンサー、IRESなどを総称し、それらが協働して、レシピエント細胞でコード配列の複製、転写及び翻訳を可能にする。選択されるコード配列の複製、転写および翻訳が適当な宿主細胞において可能である限り、これらの転写翻訳調節配列のすべてが必ずしも存在する必要があるわけではない。当業者は、公開情報から調節核酸配列を容易に同定することができる。さらに、当業者は、例えば *in vivo*、*ex vivo* または *in vitro* で、使用目的に適用できる転写翻訳調節配列を同定することができる。

- [0036] 本明細書において使用する場合、「プロモーター」は、作動可能に連結された核酸配列の転写を制御する核酸配列のセグメントを指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼによる認識、結合および転写開始のために十分である特定の配列を含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼの認識、結合または転写開始を調節する配列を含んでもよい。

- [0037] 本明細書において使用する場合、「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高める機能を有する核酸配列のセグメントを指す。

- [0038] 本明細書において使用する場合、「サイレンサー」は、エンハンサーとは逆に目的遺伝子の発現効率を低下させる機能を有する核酸配列のセグメントを指す。

- [0039] 本明細書において使用する場合、「インスレーター」は、DNAの配列上の離れた位置にある遺伝子の発現の調節を行うシス調節の機能を有する核酸配列のセグメントを指す。

- [0040] 本明細書において使用する場合、「ターミネーター」は、タンパク質をコードする領域の下流に位置し、核酸がmRNAに転写される際の転写の終結に参与する核酸配列のセグメントを指す。
- [0041] 本明細書において使用する場合、「複製起点」は、その核酸配列を認識するタンパク質（例えば、イニシエーターDNAタンパク質など）が結合することや、RNAが合成されることで部分的にDNA二重らせんが解かれ、複製が開始される核酸配列のセグメントを指す。
- [0042] 本明細書において使用する場合、内部リボソーム侵入部位（「IRES」）は、その下流の核酸配列の翻訳の際、リボソームの侵入または保持を促進する核酸セグメントを指す。
- [0043] 本明細書において核酸の「相同性」とは、2以上の核酸配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの核酸の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。「類似性」は、同一性に加え、類似の塩基についても計算に入れた数値であり、ここで類似の塩基とは、混合塩基（例えば、 $R = A + G$ 、 $M = A + C$ 、 $W = A + T$ 、 $S = C + G$ 、 $Y = C + T$ 、 $K = G + T$ 、 $H = A + T + C$ 、 $B = G + T + C$ 、 $D = G + A + T$ 、 $V = A + C + G$ 、 $N = A + C + G + T$ ）において、一部が一致する場合をいう。2種類の核酸が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、またはストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの核酸配列を直接比較する場合、その核酸配列間で、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。
- [0044] アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言

及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.10.1+ (2020. 6.18発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。類似性は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。

[0045] 本明細書において、特に断らない限り、ある生物学的物質（例えば、タンパク質、核酸、遺伝子）についての言及は、その生物学的物質の生物学的機能と同様の機能（同じ程度でなくてもよい）を発揮するその生物学的物質のバリエーション（例えば、塩基配列に修飾を有するバリエーション）についての言及でもあることが理解される。このようなバリエーションには、元の分子のフラグメント、同一サイズの元の生物学的物質のアミノ酸配列または核酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアラインメントを行ってアラインされる元の分子の配列と比較した際、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%同一である分子が含まれ得る。バリエーションには、改変されたヌクレオチド（例えば、メチル化による改変）を有する分子が含まれ得る。

[0046] 本明細書において「対応する」アミノ酸または核酸とは、あるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸またはヌクレオチドと同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸またはヌクレオチドをいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける

同様の部分であり得る。対応するアミノ酸は、例えば、システイン化、グルタチオン化、S-S結合形成、酸化（例えば、メチオニン側鎖の酸化）、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などがされる特定のアミノ酸であり得る。あるいは、対応するアミノ酸は、二量体化を担うアミノ酸であり得る。このような「対応する」アミノ酸または核酸は、一定範囲にわたる領域またはドメインであってもよい。従って、そのような場合、本明細書において「対応する」領域またはドメインと称される。

[0047] 本明細書において「対応する」遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子（例えば、ポリヌクレオチド配列または分子）をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。例えば、血清型1のAAVのcapは血清型2のAAVのcapに対応し得る。例えば、あるウイルスにおける対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となるウイルスの遺伝子配列をクエリ配列として用いてそのウイルスの配列データベースを検索することによって見出すことができる。

[0048] 本開示に従って、用語「活性」は、本明細書において、最も広い意味での分子の機能を指す。活性は、限定を意図するものではないが、概して、分子の生物学的機能、生化学的機能、物理的機能または化学的機能を含む。活性は、例えば、酵素活性、他の分子と相互作用する能力、および他の分子の機能を活性化するか、促進するか、安定化するか、阻害するか、抑制するか、または不安定化する能力、安定性、特定の細胞内位置に局在する能力を含む。適用可能な場合、この用語はまた、最も広い意味でのタンパク質複合体の機能にも関する。

[0049] 本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内において有し得る特定の機能をいい、これに

は、例えば、特異的な細胞表面構造認識能、酵素活性、特定のタンパク質との結合能等を挙げることができるがそれらに限定されない。本開示においては、例えば、あるプロモーターが特定の宿主細胞において認識される機能などを挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において、生物学的機能は、「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含され、例えば、ある分子との相互作用によって別の分子が活性化または不活化される活性も包含される。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドの対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

[0050] 本開示において使用する場合、ウイルスまたはウイルス由来構築物の「感染性」とは、ウイルスまたはウイルス由来構築物の細胞への接着または膜融合によって、ウイルスまたはウイルス由来構築物内の核酸を細胞内に導入する能力を指す。ウイルスまたはウイルス由来構築物の「複製能力」とは、感染細胞内で感染性のウイルス粒子またはウイルス由来構築物粒子を産生する能力を指す。

[0051] 本明細書において使用する場合、用語「形質転換」、「形質導入」および「トランスフェクション」は、特に言及しない限り互換可能に使用され、宿主細胞への核酸の導入（必要に応じてウイルスまたはウイルス由来構築物を介した）を意味する。形質転換方法としては、宿主細胞に核酸を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、コンピテント化細胞の使用、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法、リン酸カルシウム法などの種々の周知の技術が挙げられる。

[0052] 本明細書において「精製された」物質または生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少

なくとも一部が除去されたものをいう。従って、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。本明細書中で使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本開示で用いられる物質は、好ましくは「精製された」物質である。

[0053] 本明細書において「医薬成分」とは、医薬を構成し得る任意の成分を意味し、例えば、有効成分（それ自体が薬効を示すもの）、添加成分（それ自体は、薬効を期待されていないが、医薬として含まれる場合一定の役割（例えば、賦形剤、滑沢剤、界面活性剤等）を果たすことが期待される成分）等を例示することができる。医薬成分は、単独の物質であってもよく、複数の物質や剤の組み合わせであってもよい。有効成分と添加成分との組み合わせ、アジュバントと有効成分との組み合わせなどの任意の組み合わせも含まれ得る。

[0054] 本明細書では、「有効成分」は、意図される薬効を発揮する成分をいい、単独または複数の成分が該当し得る。

[0055] 本明細書において「添加成分」とは、薬効を期待されていないが、医薬として含まれる場合一定の役割を果たす任意の成分をいい、例えば、薬学的に受容可能なキャリア、安定化剤、（補）助剤、溶解度改善剤、可溶化剤、希釈剤、賦形剤、緩衝剤、結合剤、希釈剤、香味料、潤滑剤を挙げることができる。

[0056] 本明細書において「薬剤」、「剤」または「因子」（いずれも英語では *agent* に相当する）は、広義には、交換可能に使用され、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポ

リヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子およびこれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

[0057] 本明細書において使用される場合、「複合体」または「複合分子」とは、2以上の部分を含む任意の構成体を意味する。例えば、一方の部分がポリペプチドである場合は、他方の部分は、ポリペプチドであってもよく、それ以外の物質（例えば、基材、糖、脂質、核酸、他の炭化水素等）であってもよい。本明細書において複合体を構成する2以上の部分は、共有結合で結合されていてもよくそれ以外の結合（例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力等）で結合されていてもよい。

[0058] 本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、RI（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。標的タンパク質またはそれを捕捉する因子または手段を複数、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10nm以上であることが好ましい。機能に影響を与えない任意の標識が使用できるが、蛍光物質としては、AlexaTMFluorが挙げられる。AlexaTMFluorは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またpH感受性が低い。蛍光極大波長が10nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、AlexaTM555とAlexaTM633の組み合わせ、AlexaTM488とAlexaTM555との組み合わせ等を挙げ

ることができる。他の蛍光標識として、シアニン色素（例えば、CyDyeTMシリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N-2-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAFのヨウ素誘導体）等が挙げられる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

[0059] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、ウイルス由来構築物、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、プラスミド等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

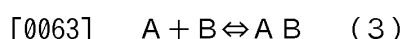
[0060] 本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示の医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与形態を指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本開示が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

[0061] 本明細書において「（ギブスの）自由エネルギー変化（ ΔG ）」は、熱力学的また統計力学的に以下の式（1）および（2）で記述される。

[0062] $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ (1)

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + R T \ln K$$
 (2)

ここで、Kは平衡定数、 ΔG° は標準状態（1 atm、25℃）のギブズの自由エネルギー変化量とする。核酸の平衡定数を考える場合、二つの鎖AとB（例えば、3' UTRおよび5' UTR）が1：1で会合する平衡反応として記述できる（式（3））。



二本鎖の状態モル分率を α 、核酸の全濃度をCとすると、完全解離したときのAおよびBの濃度[A]、[B]はC/2になるため、平衡定数は以下の式（4）で表すことができる。

[0064] $K = 2\alpha / ((1 - \alpha)^2 \times C)$ (4)

核酸が50%乖離した平衡状態であるとき、

$$\alpha = 1/2, \Delta G = 0$$
 (5)

となるため、式（2）に式（4）および（5）を代入すると、

$$\Delta G^{\circ} = -R T_m \ln (4/C)$$
 (6)

となる。

式（1）に式（6）を代入することで、以下の式（7）が得られる。

[0065] $1/T_m = (R/\Delta H^{\circ}) \ln (C/4) + \Delta S^{\circ} / \Delta H^{\circ}$ (7)

$1/T_m$ と $\ln (C/4)$ の2つの関数として測定値をプロットすると、切片と傾きから標準状態のエンタルピー変化量 ΔH° およびエントロピー変化量 ΔS° が求められる。

[0066] 用語「約」は、示された値プラスまたはマイナス10%を指す。「約」が、温度について使用される場合、示された温度プラスまたはマイナス5℃を指し、「約」が、pHについて使用される場合、示されたpHプラスまたはマイナス0.5を指す。

[0067] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は

以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0068] 一つの局面において、本開示は、第1の血清型のアデノ随伴ウイルス（AAV）由来のRep遺伝子と、前記第1の血清型とは異なる第2の血清型のAAV由来であり、 -65 から -95 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する末端逆位反復（ITR）配列とを含む、核酸を提供する。AAVのゲノム複製およびゲノムパッケージングには、ITRとRepの相互作用が関係している（Chiorini J. A., et al., JOURNAL OF VIROLOGY (1999).）。したがって、ITRとRepとが相互作用しない場合は、AAVが生産されず、また、AAVゲノムがパッケージングされない。そこで、本発明者らは、ITRの自由エネルギー変化（ ΔG ）に着目したところ、特定の範囲の自由エネルギー変化の範囲を有するITRが、AAVベクターの生産性を向上していることを見出した。したがって、本開示の核酸は、高いAAVベクター生産性を示す。これを達成するための任意の手段が本開示の範囲であると企図される。例えば、明示的な記載がなくとも、ある成分を使用する方法の記載は、同成分を含む組成物、同成分の使用および同方法に使用するための同成分など、他の手段を反映した実施形態も同時に企図するものである。

[0069] いくつかの実施形態において、Rep遺伝子は、血清型2のAAV由来であり得る（以下Rep2、Rep-2等と表現することもある。）。血清型2のAAV由来と、特定の自由エネルギー変化（ ΔG ）値を有するITRとを含む核酸は、高いAAVベクターの生産性を示す。いくつかの実施形態において、ITRの自由エネルギー変化（ ΔG ）値は、 $-65 \sim -95$ kcal/mol、好ましくは $-75 \sim -95$ kcal/mol、より好ましくは $-80 \sim -90$ kcal/mol、最も好ましくは $-80 \sim -88$ kcal/molであり得る。特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型2

のAAV由来であり得、ITRは、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来、好ましくは血清型1、6または7のAAV由来であり得る（以下ITR1、ITR-1等と表現することもある。）。

[0070] いくつかの実施形態において、自由エネルギー変化 (ΔG (kcal/mol)) は、核酸二次構造予測プログラム、例えば、mfold (GCG Software)、IPknot、CentroidFold (<https://www.ncrna.org/>)、ViennaRNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>)、RNALOSS (P Clote, RNALOSS: a web server for RNA locally optimal secondary structures, Nucleic Acids Res. 2005 Jul 1; 33: W600-4.)、またはRNA Secondary structure prediction (http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)によって計算され得る。

[0071] いくつかの実施形態において、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。好ましい実施形態において、ITR配列は、血清型1～4、6および7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0072] いくつかの実施形態において、Rep遺伝子は、血清型1～12のAAV由来であり得る。いくつかの実施形態において、Rep遺伝子は、血清型1、2、3、5、7、8または10のAAV由来であり得る。好ましい実施形態において、Rep遺伝子は、血清型1、2、5、7または10のAAV由来であり得る。Rep4はRep3と、Rep6はRep1と、Rep9はRep7と相溶性が高いため、それぞれRep3、Rep1およびRep7を用いた場合と同等のAAV産生を達成できることが予測される。したがって、一つの実施形態では、本開示は、Rep遺伝子がRep1/6、Rep2、Rep3/4、Rep12、Rep5、Rep8、Rep7/9およびRep10/11からなる群より選択されるものであってもよい。なお、Rep1/6、Rep3/4およびRep7/9と表記したのはこれらが互いに類似する（アミノ酸配列レベルで90%の同一性）があるため分類法により同じファミリーと分類されることがあるからである。また、ある実施形態では、Rep遺伝子はRep3、Rep1またはRep7の少なくとも1つ

と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするものであってもよい。

[0073] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型1型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0074] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型2型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0075] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型3型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0076] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型4型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0077] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型5型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0078] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型6型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0079] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型7型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0080] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型8型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0081] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型9型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

[0082] 特定の実施形態において、Rep遺伝子は、血清型10型のAAV由来であり、ITR配列は、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来であり得る。

。

[0083] いくつかの実施形態において、本開示の核酸は、Cap遺伝子（例えば、血清型1～10のいずれか1つのAAV由来のCap遺伝子）をさらに含む。好ましい実施形態において、Cap遺伝子は、血清型6または9のAAV由来であり得る。

[0084] 好ましいRep遺伝子とITR配列との組み合わせは、Rep1／ITR

1、Rep1/ITR2、Rep1/ITR3、Rep1/ITR4、Rep1/ITR6、Rep1/ITR7、Rep2/ITR1、Rep2/ITR2、Rep2/ITR3、Rep2/ITR4、Rep2/ITR5、Rep2/ITR6、Rep2/ITR7、Rep5/ITR5、Rep7/ITR1、Rep7/ITR2、Rep7/ITR3、Rep7/ITR4、Rep7/ITR6、Rep7/ITR7、Rep10/ITR1、Rep10/ITR2、Rep10/ITR3、Rep10/ITR4、Rep10/ITR6、またはRep10/ITR7であり得る。

[0085] さらに実施形態において、Rep遺伝子とITR配列との組み合わせは、Rep6/ITR1、Rep6/ITR2、Rep6/ITR3、Rep6/ITR4、Rep6/ITR6、Rep6/ITR7、Rep9/ITR1、Rep9/ITR2、Rep9/ITR3、Rep9/ITR4、Rep9/ITR6、Rep9/ITR7を含んでもよい。

[0086] いくつかの実施形態において、RepとITRとは、別個の核酸に含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、核酸は、3' ITRおよび5' ITRを含み、それぞれ同じ血清型のAAV由来であっても、異なる血清型のAAV由来であっても良い。

[0087] 本開示の核酸によるAAVベクターの生産性は、本開示の核酸に含まれるCMVプロモーターをターゲットにしたqPCRによって測定され得るか、またはHPLCにより定量分析をすることによってEmpty率および/またはFull率として測定され得るか、またはRefeyn One（ライフサイエンスソリューションズ）を用いたMass photometry法によってEmpty率および/またはFull率として測定され得る。HPLCにおいて、x軸にRetention time (min)、y軸にCountsを示し、相対面積比からEmpty率、Full率を算出した。Refeynにおいて、x軸にMass (kDa)、y軸にCountsを示し、3000から4000kDaの範囲をEmpty、4010から5000kDaの範囲をFullと定め、その個数の割合をそれぞれEmpty

y 率、F u l l 率とした。

- [0088] いくつかの実施形態において、本開示の核酸は、アデノウイルス（A d V）由来のヘルパー遺伝子をさらに含み得る。一つの実施形態において、ヘルパー遺伝子は、アデノウイルスの E 1 B、E 2、E 4 および V A から選択される遺伝子を含む。一つの実施形態において、ヘルパー遺伝子は、アデノウイルスの E 1 B 遺伝子を含む。一つの実施形態において、ヘルパー遺伝子は、アデノ随伴ウイルス（A A V）由来構築物の産生に関する二つ以上のヘルパー遺伝子を含み、必要に応じて、ヘルパー遺伝子は、E 1 A、E 1 B、E 2、E 4 および V A から選択され得る。一つの実施形態において、ヘルパー遺伝子は、E 1 A および E 1 B から選択されるヘルパー遺伝子と、E 2、E 4 および V A から選択されるヘルパー遺伝子とを含む。
- [0089] いくつかの実施形態において、同じ核酸分子または核酸二重鎖上に、前記 R e p 遺伝子、前記 I T R 配列、A A V 由来の C a p 遺伝子を含み得る。さらなる実施形態において、同じ核酸分子または核酸二重鎖上に、R e p 遺伝子、I T R 配列、A A V 由来の C a p 遺伝子、およびアデノウイルス（A d V）由来のヘルパー遺伝子、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。
- [0090] いくつかの実施形態において、前記 R e p 遺伝子および前記 I T R 配列の組み合わせが、C M V プロモーターまたは E G F P などの目的タンパク質をターゲットにした q P C R で測定した場合に、ひとつの R e p 遺伝子と前記 I T R 配列の組み合わせが、その R e p 遺伝子と I T R - 5 の組合せと比較して 2 倍以上の T i t e r [G C / m L] のウイルスベクターを生産する能力を有し得る。例えば、R e p 遺伝子として R e p 1 を選択した場合、好ましい R e p 1 と特定の I T R 配列の組み合わせは、R e p 1 と I T R - 5 の組み合わせと比較して 2 倍以上の T i t e r のウイルスベクターを生産する能力を有し得る。
- [0091] いくつかの実施形態において、本開示の核酸は、プラスミドであり得る。
- [0092] いくつかの実施形態において、本開示の核酸は、ポリマーおよびリポソームなどの核酸がカチオン性物質と複合体を形成し得る。カチオン性物質とし

て、PEI pro、FectoVIR-AAV、Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、FuGENE 6、FuGENE HD、FuGENE 4Kが挙げられるが、これらに限定されない。

[0093] さらに局面において、本開示は、上記核酸を含む、ウイルスベクターを産生するための組成物を提供する。

[0094] さらに局面において、本開示は、Rep遺伝子を含む核酸と、LTRを含む核酸とを組み合わせる工程を含む、核酸を合成する方法を提供する。

[0095] さらに局面において、本開示は、上記核酸または組成物をプロデューサー細胞に導入するステップと、プロデューサー細胞においてウイルスベクターを形成させるステップとを含む、ウイルスベクターを作製する方法を提供する。前記核酸の少なくとも一部が前記プロデューサー細胞の染色体に組み込まれ得る。さらに局面において、本開示は、上記方法によって作製されたプロデューサー細胞またはウイルスベクターを提供する。

[0096] 一つの実施形態において、本開示は、Rep遺伝子を含む核酸およびLTRを含む核酸を含むプロデューサー細胞を提供する。プロデューサー細胞の例として、例えば、ヒト胚性腎臓細胞（ヒト胎児の腎細胞にアデノウイルス5を切断したDNAをトランスフェクションさせることにより作製されたもの）、911細胞、PER.C6細胞、E1形質転換羊膜細胞、E1形質転換A549細胞、GH329:HeLa細胞、HEK293細胞、IT293SF細胞、HEK293T、HEK293F、Vero細胞、CHO細胞、Sf9細胞、Freestyle（商標）293-F、Expi293-F（商標）、Expi293 inducible、Expi293 NGT-Viral Production Cells 1.0、Viral Production Cells 2.0（VPC2.0細胞）、AAVpro（登録商標）293T Cell Line、Lenti-X（商標）293T Cell Line、FreeStyle（商標）CHO-S cells、ExpiCHO-S（商標）、VirusExpress

(商標) 293 AAV生産細胞、VirusExpress (商標) 293 T レンチウイルス生産細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。AAV由来構築物を生産するためのプロデューサー細胞として、特に、HEK293、HEK293T、HEK293F、HeLa、Sf9などの細胞が挙げられる。

[0097] 一つの実施形態において、細胞は、Rep遺伝子およびLTR配列を染色体に含み、必要に応じて、ヘルパー遺伝子およびヘルパー遺伝子に対する発現制御系の核酸エレメントのうちの1つまたは複数を染色体にさらに含む。一つの実施形態において、細胞は、目的の遺伝子(GOI)、Cap遺伝子を(必要に応じて染色体に)含む。一つの実施形態において、細胞は、ヘルパー遺伝子、LTR、GOI、Cap遺伝子およびRep遺伝子を(必要に応じて染色体に)含む。一つの実施形態において、細胞は、ヘルパー遺伝子、LTR、GOI、Cap遺伝子およびRep遺伝子を染色体の一遺伝子座に含む。

[0098] 本開示の核酸、発現制御系の要素、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物はキットとして提供することができる。一つの実施形態では、本開示は、Rep遺伝子の発現を制御するためのキットであって、Rep遺伝子を含む核酸と、ヘルパー遺伝子を含む核酸と、ヘルパー遺伝子に対する発現制御系(特にその核酸エレメント)とを含む、キットを提供する。一つの実施形態では、本開示は、本開示の組成物に添加され得る1以上の成分が充填された、1以上の容器を含む、薬剤パックまたはキットを提供する。場合によって、このような容器に付随して、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。

[0099] 本開示の組成物の医薬等としての製剤化手順は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、本明細書の記載があれば、過度な実験を行うこと

なく、使用すべき量等の実施形態を決定することができる。

[0100] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

[0101] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0102] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0103] 試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D Systems、USCN Life Science INC等）の同等品でも代用可能である。

[0104] （プラスミドDNAの構築）

1. SYNp34__pHelper

pUC19ベクタープラスミド（Addgene：#500005）を制限酵素（AatII、PciI）で処理した。そこに以下の3断片（VA断片、E4断片およびE2A断片）をInFusionを用いて挿入した。VA断片は、Ad5のゲノム（ATCC VR-1516を参照のこと）をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：プライマー配列5'-ttagtaagcttccctcctgacgcggtaggaggaggagggtgccctgcatg-3'（配列番号3）、5'-

c c t t t t g c t c a c a t g t c a a t t g g t a g a t g t a c c t
g g a c a t c c a g g t g a t g c c g g c g - 3' (配列番号4)。E
4断片は、Ad5のゲノムをテンプレートとして以下のプライマーを使用し
て調製した：プライマー配列5' - t g t a c a G G C G C G C C g a a t
t c g t t t t a g g g c g g a g t a a c t t g t a t g t g t t g g g
a a t t g t a g - 3' (配列番号5)、5' - a g g g a a g c t t a c
t a a a c g g t a c a c a g g a a a c a g g a g a c a c a a c t c c
a a g t g - 3' (配列番号6)。E2A断片は、Ad5のゲノムをテンプレ
ートとして以下のプライマーを使用して調製した：プライマー配列5' -
g a a a a g t g c c a c c t g a c g t c g c g g c c g c G C G A T C
G C g g t a c c c a a c t c c a t g c t c a a c a g t c c c c a g g
t a c a g c c c - 3' (配列番号7)、5' - g a a t t c G G C G C G
C C t g t a c a g c c c g g g c g a c c g c a c c c t g t g a c g a
a a g c c g c c c g c a a g - 3' (配列番号8)。

[0105] 2. pAAV-ITR1-EGFP

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素 (AatII、PciI) で処
理した。そこに以下の2断片をInFusionを用いて挿入した。プライ
マー配列5' - c g a a a a g t g c c a c c t A A A T A A T G A T T T
T A T T T T G A C T G A T A G T G A C C T G T T C G T T G C A A C A
A A T T G A T G A G C A A - 3' (配列番号9)、5' - c a g g c c C
A C C T G C t c a g a t t a C A A C T T T T G T A T A C A A A G T T
G G C A T T A T A A A A A G C A T T G C T C A T C A A T T T G - 3
' (配列番号10)、テンプレートはなし (テンプレートなしの場合は、プ
ライマー同士が結合して伸長することで断片を形成する。短い断片なのでこ
の方法で作製される)。プライマー配列5' - g a G C A G G T G g g c c
t g a t t g g c c C A A C T T T T C T A T A C A A A G T T G G C A T
T A T A A G A A A G C A T T G C T T A T C A A T T T G - 3' (配列番
号11)、5' - t g g c c t t t t g c t c g c A A A T A A T G A T

TTTATTTTGGACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAA
CAAATTGATAAGCAA-3'（配列番号12）、テンプレートはなし。得られたプラスミド（pUC19_PaqCI-SfiI）を制限酵素（PaqCI、SfiI）で処理した。そこに以下の表1の種プラスミド#2の5' ITR、EGFP、3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入した。

[0106] [表1]

種プラスミド 番号	5'ITR 組換え単位	3'ITR 組換え単位	Helper 組換え単位	Rep 組換え単位
#1	改良型 AAV-2	AAV-5	Ad-2	改良型 AAV-2
#2	AAV-1	AAV-1	Ad-12	AAV-1
#3	AAV-2	AAV-2	Ad-14	AAV-2
#4	AAV-3	AAV-3	Ad-5	AAV-3
#5	AAV-4	AAV-4	Ad-8	AAV-8
#6	AAV-5	改良型 AAV-2	Ad-4	AAV-5
#7	AAV-6	AAV-6	Ad-40	AAV-10
#8	AAV-7	AAV-7	Ad-52	AAV-7

[0107] 3. pAAV-ITR2wt-EGFP

pUC19_PaqCI-SfiIを制限酵素（PaqCI、SfiI）で処理した。そこに表1の種プラスミド#3の5' ITR、EGFP、3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入した。

[0108] 4. pAAV-ITR4-EGFP

pUC19_PaqCI-SfiIを制限酵素（PaqCI、SfiI）で処理した。そこに表1の種プラスミド#5の5' ITR、EGFP、3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入し

た。

[0109] 5. pAAV-ITR5-EGFP

pUC19_PaqCI-SfiIを制限酵素(PaqCI、SfiI)で処理した。そこに表1の種プラスミド#6の5' ITR、EGFP、種プラスミド#1の3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入した。

[0110] 6. pAAV-ITR6-EGFP

pUC19_PaqCI-SfiIを制限酵素(PaqCI、SfiI)で処理した。そこに表1の種プラスミド#7の5' ITR、EGFP、3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入した。

[0111] 7. pAAV-ITR7-EGFP

pUC19_PaqCI-SfiIを制限酵素(PaqCI、SfiI)で処理した。そこに表1の種プラスミド#8の5' ITR、EGFP、3' ITR遺伝子部分を有するプラスミドからそれぞれPaqCI、PaqCI、PaqCIとSfiIで切り出した3断片をライゲーションにより挿入した。

[0112] 8. pAAV-ITR2変異型-EGFP

pAAV-CMV (Takara 6230)を制限酵素(EagI、BamHI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5' -gccCGAATCCCGGCCGCCACCATGGTGAGCAAG-3' (配列番号11)、5' -TGCCACCCGTggatccTTACTTGTACAGCTCGTC-3' (配列番号12)、テンプレートはEGFP遺伝子配列(ベクタービルダー)を使用した。

[0113] 9. pRIC6

以下の10. pR2C6（プラスミド#10）を制限酵素（Swa I、Not I）で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5' -ATAAAGTTGg c g g c c g c t c g c g a a g c g c c t c c c a c -3'（配列番号13）、5' -AGCCAT a c c t g a t t t a a a t c a t T T A T T G C T C A G A A -3'（配列番号14）、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV1 Rep遺伝子を使用した。

[0114] 10. pR2C6

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素（Aat II、Pci I）で処理した。そこに以下の3断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5' -g a a a a g t g c c a c c t g a c g t c g c g g c c g c g g a g g g t g g a g t c g t g a c g t g a a t t a c g t c a t a g g g t t a g g g a g g t c c t g t a t t a g a g g t c a c g t g a g t g t t t t g c g a c -3'（配列番号15）、5' -g t t c a a a c c t c c c g c t t c a a a a t g g a g a c c c t g c g t g c t c a c t c g g g c t t a a a t a c c c a g c g t g a c c a c a t g g t g t c g c a a a a t g t c g c a a a a c a c t c a -3'（配列番号16）、テンプレートはなし。プライマー配列5' -g c g g g a g g t t t g a a c g c g c a g c c g c c A T G C C G G G G T T T T A C -3'（配列番号17）、5' -a c t a g t A G C G C T a t t t a a a t c a t T T A T T G T T C A A A G A T -3'（配列番号18）、テンプレートはpRC2-mi342（Takara）を使用した。プライマー配列5' -a a t A G C G C T G C G A T C G C g g c c t c c a a a a a a g c -3'（配列番号19）、5' -c c t t t t g c t c a c a t g t c a a t t g a t c c c g c c c c t a a c t -3'（配列番号20）、テンプレートはSV40ori遺伝子配列（TOYOBO）を使用した。得られたプラスミドを制限酵素（Swa I、Afe I）で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5' -A A C A A T A A

atgattttaaatcagg-3' (配列番号21)、5'-ggccGCGATCGCAGCGCTgtagccatggaaactagata-3' (配列番号22)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV6 Cap遺伝子を使用した。得られたプラスミド(pR2C6__1)を制限酵素(NotI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5'-gtgccacctgacgtcAAATAATGATTTTATTTTGA CTGATAGTGACCTGTTCTGTGCAACAAATTGATGAGCAAT-3' (配列番号23)、5'-cgactccacccctccgcggccgcCAACTTTATTATACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTCATCAATTT-3' (配列番号24)、テンプレートはなし。得られたプラスミドを制限酵素(AsiSI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5'-catggctacAGCGCTGCGATCGCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTG-3' (配列番号25)、5'-ttttttggaggccGCGCAAATAATGATTTTATTTTGA CTGATAGTGACCTGTTCTGTTGCAACAAATTGATAAGCAA-3' (配列番号26)、テンプレートはなし。

[0115] 11. pR3C6

上記の10. pR2C6 (プラスミド#10)を制限酵素(SwaI、NotI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5'-ATAAAGTTGgcggccgcagtgacgtaacgcgaagc-3' (配列番号27)、5'-AGCCATacctgattttaaatcatTTATTGCTCAGAA-3' (配列番号28)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV3 Rep遺伝子を使用した。

[0116] 12. pR5C6

上記の10. pR2C6 (プラスミド#10) を制限酵素 (Swa I、N ot I) で処理した。そこに以下の断片を InFusion を用いて挿入した。プライマー配列 5' -ATAAAGTTGg c g g c c g c g g g t t t t g t a a g c a g t g a-3' (配列番号29)、5' -AGCCAT a c c t g a t t t a a a t c a t T T A C T G T T C T T T A-3' (配列番号30)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV5 Rep 遺伝子を使用した。

[0117] 13. pR7C6

上記の10. pR2C6 (プラスミド#10) を制限酵素 (Swa I、N ot I) で処理した。そこに以下の断片を InFusion を用いて挿入した。プライマー配列 5' -ATAAAGTTGg c g g c c g c a a g c g c c t c c c a c g c t g-3' (配列番号31)、5' -AGCCAT a c c t g a t t t a a a t c a t T T A T T G C T C A G A A-3' (配列番号32)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV7 Rep 遺伝子を使用した。

[0118] 14. pR8C6

上記の10. pR2C6 (プラスミド#10) を制限酵素 (Swa I、N ot I) で処理した。そこに以下の断片を InFusion を用いて挿入した。プライマー配列 5' -ATAAAGTTGg c g g c c g c c a g a g a g g g a g t g g c c a a-3' (配列番号33)、5' -AGCCAT a c c t g a t t t a a a t c a t T T A T T G C T C A G A A-3' (配列番号34)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV8 Rep 遺伝子を使用した。

[0119] 15. pR10C6

上記の10. pR2C6 (プラスミド#10) を制限酵素 (Swa I、N ot I) で処理した。そこに以下の断片を InFusion を用いて挿入した。プライマー配列 5' -ATAAAGTTGg c g g c c g c c a g a g a g g g a g t g g c c a a-3' (配列番号35)、5' -AGCCAT

a c c t g a t t t a a a t c a t T T A T T G C T C A G A A - 3' (配列番号36)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV10 Rep遺伝子を使用した。

[0120] 16. pR2C9

pR2C6__1を制限酵素(SwaI、AfeI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。プライマー配列5' - A A C A A T A A a t g a t t t a a a t c a g g - 3' (配列番号37)、5' - g g c c G C G A T C G C A G C G C T g t a g c c a t g g a a a c t a g a t a - 3' (配列番号38)、テンプレートは人工遺伝子合成したAAV9 Cap遺伝子を使用した。

[0121] 17. pAAV-ITR3-EGFP

遺伝子合成とOGAB法により作製した。このプラスミドが有する遺伝子とその順番を以下に示す：5' ITR3 (人工遺伝子合成)、CMVプロモーター(TAKARA)、EGFP(ベクタービルダー)、hGH poly A signal(TAKARA)、3' ITR3 (人工遺伝子合成)、アンピシリン耐性遺伝子(pUC19)、大腸菌複製起点(pUC19)。ここで、OGAB法の例示的な手順を以下に示す。目的の導入核酸を、約1 kb以下の断片に分割した。各断片の末端がユニークかつ特定の断片とのみ相補的になるように設計した。このように設計した各断片それぞれについてプライマーを設計してPCRに法により各断片を調製した。各断片をベクタープラスミドにクローニングし、各ベクタープラスミドを使用して大腸菌の形質転換を行い、各断片について正しい配列を含むクローンを取得した。これら的大腸菌クローンからプラスミドを精製し、プラスミド溶液のDNA濃度を測定した。各断片のプラスミドの量が等しくなるように、それぞれのプラスミド溶液を分取して混合した。この混合液に制限酵素を添加し、それぞれがユニークかつ特定の断片とのみ相補的になる末端を有するDNA断片を生成した。その後、同じ制限酵素で切断したOGAB集積用ベクターを各断片とモル濃度を合わせるような量で溶液に添加し、ライゲーションを行い、相

補的な末端を有する断片（OGAB集積用ベクターの断片を含む）のペア同士を連結した。これを枯草菌コンピテントセルに添加し、培養した後、形質転換されたコロニーを取得した。このコロニーから目的の構造を有するプラスミドを回収した。

[0122] (rAAVの作製(293T細胞)) 構築物の模式図を図1に示す。

[0123] トランスフェクションの前日に 6×10^6 個の293T細胞を10cm-dishに播種した。22時間後、9.5mLのDMEM培地(2%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン)に交換し、37℃、5%CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の293T細胞へ(表1)の1種のpHelper、7種のpAAV、7種のpRCをそれぞれ組み合わせた49種類のプラスミド混合液をそれぞれ含むDMEM培地250μLとDNAの1倍量のPEIpro(登録商標)(PolyPlus-transfection SAS)を含むDMEM培地250μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0124]

[表2]

表2:293T細胞に用いたプラスミドDNA

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA量[μg]
1	pHelper	11120	8.91
2	pAAV-ITR1-EGFP	4136	3.31
3	pAAV-ITR2wt-EGFP	4140	3.32
17	pAAV-ITR3-EGFP	4724	3.78
4	pAAV-ITR4-EGFP	4122	3.30
5	pAAV-ITR5-EGFP	4843	3.88
6	pAAV-ITR6-EGFP	4132	3.31
7	pAAV-ITR7-EGFP	4144	3.32
8	pAAV-ITR2 変異型 -EGFP	5245	4.20
9	pR1C6	6557	5.25
10	pR2C6	6535	5.24
11	pR3C6	6540	5.24
12	pR5C6	6528	5.23
13	pR7C6	6552	5.25
14	pR8C6	6598	5.29
15	pR10C6	6589	5.28

[0125] 37℃、5%CO₂で72時間培養後、1mLの10×Lysis buffer (20mM MgCl₂、1.5M NaCl、500mM Tris、1% Triton (登録商標) X-100 (ナカライテスク) ; pH7.5) で懸濁し、さらにBenzonase (登録商標) (Novagen) を0.5μL添加して37℃で60分反応させた。その後、1.9M MgSO₄溶液を2/100容量添加し、室温で10分静置した。12,000×g、4℃、10分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic (登録商標) F-68 (Thermo Fisher Scientific) を終濃度0.001%で添加した。

[0126] 3種類の塩化セシウム溶液 (1.35g/cm³、1.27g/cm³、1.25g/cm³) とサンプル溶液8mLを重層した密度勾配遠心分離を226,000×g、18℃、1.5時間行い、1.27g/cm³付近の溶液が

ら約2 mLのrAAVを回収した。そこにPluronic（登録商標）F-68（Thermo Fisher Scientific）を終濃度0.001%で添加した。さらに、100Kのアミコンウルトラ-4を用いてBuffer（10% Sucrose, 100mM Tris, 200mM NaCl, 0.005% Pluronic F-68; pH 7.4）への交換を行い、0.5 mL程度に濃縮した。

[0127] （rAAVの作製（293細胞））

構築物の模式図を図3に示す。

[0128] トランスフェクションの前日に 3.62×10^6 個の293細胞を10 cm² dishに播種した。22時間後、9.5 mLのDMEM培地（2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の293細胞へ（表2）の1種のpHelper、7種のpAAV、2種のpRCをそれぞれ組み合わせた14種類のプラスミド混合液をそれぞれ含むDMEM培地250 μLとDNAの1倍量のPEI pro（登録商標）（PolyPlus-transfection SAS）を含むDMEM培地250 μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0129] [表3]

表3:293細胞に用いたプラスミドDNA

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA 量[μg]
1	pHelper	11120	3.75
2	pAAV-ITR1-EGFP	4136	1.39
3	pAAV-ITR2wt-EGFP	4140	1.40
17	pAAV-ITR3-EGFP	4724	1.59
4	pAAV-ITR4-EGFP	4122	1.39
5	pAAV-ITR5-EGFP	4843	1.63
6	pAAV-ITR6-EGFP	4132	1.39
7	pAAV-ITR7-EGFP	4144	1.40
8	pAAV-ITR2 変異型-EGFP	5245	1.77
10	pR2C6	6535	2.20
16	pR2C9	6336	2.14

[0130] 37℃、5% CO₂で72時間培養後、1mLの10×Lysis buffer (20mM MgCl₂、1.5M NaCl、500mM Tris、1% Triton (登録商標) X-100 (ナカライテスク) ; pH 7.5) で懸濁し、さらにBenzonase (登録商標) (Novagen) を0.5μL添加して37℃で60分反応させた。その後、1.9M MgSO₄溶液を2/100容量添加し、室温で10分静置した。12,000×g、4℃、10分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic (登録商標) F-68 (Thermo Fisher Scientific) を終濃度0.001%で添加した。

[0131] 3種類の塩化セシウム溶液 (1.35g/cm³、1.27g/cm³、1.25g/cm³) とサンプル溶液8mLを重層した密度勾配遠心分離を226,000×g、18℃、1.5時間行い、1.27g/cm³付近の溶液から約2mLのrAAVを回収した。そこにPluronic (登録商標) F-68 (Thermo Fisher Scientific) を終濃度0.001%で添加した。さらに、100Kのアミコンウルトラ-4を用いてBuffer (10% Sucrose, 100mM Tris, 200mM NaCl, 0.005% Pluronic F-68; pH 7.4) への交換を行い、0.5mL程度に濃縮した。

[0132] (rAAVの評価)

rAAVのゲノムタイターを定量するために、DNase I処理を30分行い、95℃で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った。プライマー配列はCMVプロモーターをターゲットにした5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3' (配列番号39) および5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3' (配列番号40) を用いた。PCR条件は95℃で10分の後、95℃/15秒、55℃/5秒、72℃/30秒を40サイクル繰り返した。

[0133] Full率を測定するために、HPLCによる定量分析を行った。検出器は蛍光高度計、カラムはC1Mac AAV full/empty co

Column-0.1 (内径5.2 mm, 長さ4.95 mm, チャンネル径1.3 μm, BIA separation製)を使用した。移動相はA:超純水、B:1 Mテトラメチルアンモニウムクロリド溶液、C:250 mMピストリスプロパン (pH9.0)を、流量毎分0.5 mLで混合比をAAV6は表3のように、AAV9は表4のように変えて濃度勾配制御して送液した。293T細胞で作製したサンプルは5 μLを、293細胞で作製したサンプルは25 μLを注入した。

[0134] [表4]

表4:HPLC のグラジエントプログラム(AAV6 用)

注入後からの時間 (min)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)	移動相 C (vol%)
0	72	0	28
25	47	25	28
30	0	72	28

[0135] [表5]

表5:HPLC のグラジエントプログラム(AAV9 用)

注入後からの時間 (min)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)	移動相 C (vol%)
0	72	0	28
0.5	72	0	28
3.5	69	3	28
8	47	25	28
13	0	72	28
13.1	72	0	28
17	72	0	28

[0136] (結果)

結果を図2および4に示す。示されるように、AAVベクター生産量 (TiterおよびFull率) は、RepおよびITRの組み合わせによって大きく依存していた。Rep2は、いずれのITRとの組み合わせにおいても、高いTiterおよびFull率を示し、どのITRとも相互作用していることが示唆される。Rep1、7および10は、ITR5以外との組み

合わせにおいて、高いT i t e rおよびF u l l率を示した。R e p 8は、どのI T Rとの組み合わせにおいても、T i t e rおよびF u l l率は低かった。

[0137] (実施例2：自由エネルギーの計算)

(方法)

Mfold web serverのDNA Folding Form (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) にITRの塩基配列を入力し、Fold DNAを実行する。(設定はデフォルトを使用した)

(結果)

結果を図5に示す。実施例1の結果を併せて考慮すると、I T Rの自由エネルギー変化(ΔG)は、 -65 から -95 k c a l / m o l の範囲であり、好ましくは $-75 \sim -95$ k c a l / m o l、より好ましくは $-80 \sim -90$ k c a l / m o l、最も好ましくは $-80 \sim -88$ k c a l / m o l であり得る。

[0138] (実施例3：他のR e pの例)

本実施例において、R e p配列が、血清型1 / 6ファミリー、血清型2ファミリー、血清型3 / 4ファミリー、血清型12ファミリー、血清型5ファミリー、血清型8ファミリー、血清型7 / 9ファミリー、または血清型10 / 11ファミリーのいずれのA A V由来であっても、所望の効果を奏することを実証する。

[0139] 本実施例では、実施例1と同様の実験を行い、表2において示される293 T細胞に用いたプラスミドDNAを示されるトランスフェクションしたpDNAをpR4C6、pR6C6、pR9C6に代えて実験を行う。各々の塩基長は、いずれも6541bpである。

[0140] R e p 4、R e p 6、R e p 9において、それぞれR e p 3、R e p 1、R e p 7と同様のT i t e rおよびF u l l率を示すと期待される。

[0141] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきた

が、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本出願は日本国特許庁に2023年2月17日に出願された特願2023-023545号に対して優先権主張をするものであり、その内容はその全体が本願において参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0142] 本開示は、AAVベクターの生産性が高い、RepとITRとを含むプラスミドDNAまたはDNA／カチオン性物質複合体を提供する。

配列表フリーテキスト

[0143] 配列番号1：CMV-Fプライマー（CATCAATGGGCGTGGATAGC）

配列番号2：CMV-Rプライマー（GGAGTTGTTACGACATTTTGGA A A）

配列番号3：プライマー配列5' - t t a g t a a g c t t c c c t c c t g a c g c g g t a g g a g g a g g g a g g g t g c c c t g c a t g - 3'、

配列番号4：プライマー配列5' - c c t t t t g c t c a c a t g t c a a t t g g t a g a t g t a c c t g g a c a t c c a g g t g a t g c c g g c g - 3'

配列番号5：プライマー配列5' - t g t a c a G G C G C G C C g a a t t c g t t t t a g g g c g g a g t a a c t t g t a t g t g t t g g g a a t t g t a g - 3'

配列番号6：プライマー配列5' - a g g g a a g c t t a c t a a a c g g t a c a c a g g a a a c a g g a g a c a c a a c t c c a a g t g - 3'

配列番号7：プライマー配列5' - g a a a a g t g c c a c c t g a c g

t c g c g g c c g c G C G A T C G C g g t a c c c a a c t c c a t g
c t c a a c a g t c c c c a g g t a c a g c c c - 3'

配列番号8：プライマー配列5' - g a a t t c G G C G C G C C t g t a
c a g c c c g g g c g a c c g c a c c c t g t g a c g a a a g c c g
c c c g c a a g - 3'

配列番号9：プライマー配列5' - c g a a a a g t g c c a c c t A A A
T A A T G A T T T T A T T T T G A C T G A T A G T G A C C T G T T C
G T T G C A A C A A A T T G A T G A G C A A - 3'

配列番号10：プライマー配列5' - c a g g c c C A C C T G C t c a g
a t t a C A A C T T T T G T A T A C A A A G T T G G C A T T A T A A
A A A A G C A T T G C T C A T C A A T T T G - 3'

配列番号11：プライマー配列5' - g c c C G A A T C C C G G C C G G
C C A C C A T G G T G A G C A A G - 3'

配列番号12：プライマー配列5' - T G C C A C C C G T g g a t c c T
T A C T T G T A C A G C T C G T C - 3'

配列番号13：プライマー配列5' - A T A A A G T T G g c g g c c g c
t c g c g a a g c g c c t c c c a c - 3'

配列番号14：プライマー配列5' - A G C C A T a c c t g a t t t a a
a t c a t T T A T T G C T C A G A A - 3'

配列番号15：プライマー配列5' - g a a a a g t g c c a c c t g a c
g t c g c g g c c g c g g a g g g g t g g a g t c g t g a c g t g a
a t t a c g t c a t a g g g t t a g g g a g g t c c t g t a t t a g
a g g t c a c g t g a g t g t t t t g c g a c - 3'

配列番号16：プライマー配列5' - g t t c a a a c c t c c c g c t t
c a a a a t g g a g a c c c t g c g t g c t c a c t c g g g c t t a
a a t a c c c a g c g t g a c c a c a t g g t g t c g c a a a a t g
t c g c a a a a c a c t c a - 3'

配列番号17：プライマー配列5' - g c g g g a g g t t t g a a c g c

g c a g c c g c c A T G C C G G G G T T T T A C - 3 '

配列番号18 : 5' - a c t a g t A G C G C T a t t t a a a t c a t T
T A T T G T T C A A A G A T - 3 '

配列番号19 : プライマー配列5' - a a t A G C G C T G C G A T C G C
g g c c t c c a a a a a g c - 3 '

配列番号20 : プライマー配列5' - c c t t t t g c t c a c a t g t c
a a t t g a t c c c g c c c c t a a c t - 3 '

配列番号21 : プライマー配列5' - A A C A A T A A a t g a t t t a a
a t c a g g - 3 '

配列番号22 : プライマー配列5' - g g c c G C G A T C G C A G C G C
T g t a g c c a t g g a a a c t a g a t a - 3 '

配列番号23 : プライマー配列5' - g t g c c a c c t g a c g t c A A
A T A A T G A T T T T A T T T T G A C T G A T A G T G A C C T G T T
C G T T G C A A C A A A T T G A T G A G C A A T - 3 '

配列番号24 : プライマー配列5' - c g a c t c c a c c c c t c c g c
g g c c g c C A A C T T T A T T A T A C A A A G T T G G C A T T A T
A A A A A A G C A T T G C T C A T C A A T T T - 3 '

配列番号25 : プライマー配列5' - c a t g g c t a c A G C G C T G C
G A T C G C A C C C A G C T T T C T T G T A C A A A G T T G G C A T
T A T A A G A A A G C A T T G C T T A T C A A T T T G - 3 '

配列番号26 : プライマー配列5' - t t t t t g g a g g c c G C G C A
A A T A A T G A T T T T A T T T T G A C T G A T A G T G A C C T G T
T C G T T G C A A C A A A T T G A T A A G C A A - 3 '

配列番号27 : プライマー配列5' - A T A A A G T T G g c g g c c g c
a g t g a c g t a a c g c g a a g c - 3 '

配列番号28 : プライマー配列5' - A G C C A T a c c t g a t t t a a
a t c a t T T A T T G C T C A G A A - 3 '

配列番号29 : プライマー配列5' - A T A A A G T T G g c g g c c g c

g g g t t t t g t a a g c a g t g a - 3'

配列番号30: プライマー配列5' - AGCCATacctgatttaa
atcatTTACTGTTCTTTA-3'

配列番号31: プライマー配列5' - ATAAAGTTGgcggccgc
aagcgccctcccaagctg-3'

配列番号32: プライマー配列5' - AGCCATacctgatttaa
atcatTTATTGCTCAGAA-3'

配列番号33: プライマー配列5' - ATAAAGTTGgcggccgc
cagagagggaagtggccaa-3'

配列番号34: プライマー配列5' - AGCCATacctgatttaa
atcatTTATTGCTCAGAA-3'

配列番号35: プライマー配列5' - ATAAAGTTGgcggccgc
cagagagggaagtggccaa-3'

配列番号36: プライマー配列5' - AGCCATacctgatttaa
atcatTTATTGCTCAGAA-3'

配列番号37: プライマー配列5' - AACCAATAAatgatttaa
atcagg-3'

配列番号38: プライマー配列5' - ggcGCGATCGCAGCGC
Tgtagccatggaaactagata-3'

配列番号39: プライマー配列5' - CATCAATGGGCGTGGAT
AGC-3'

配列番号40: プライマー配列5' - GGAGTTGTTACGACATT
TTGGAAA-3'

請求の範囲

- [請求項1] 第1の血清型のアデノ随伴ウイルス（AAV）由来のRep遺伝子と、
- 前記第1の血清型とは異なる第2の血清型のAAV由来であり、 -65 から -95 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する末端逆位反復（LTR）配列とを含む、核酸。
- [請求項2] 前記Rep遺伝子が血清型2のAAV由来であり、前記LTR配列が -75 から -95 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する、請求項1に記載の核酸。
- [請求項3] 前記LTR配列が、 -80 から -88 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する、請求項2に記載の核酸。
- [請求項4] 前記LTR配列が、血清型1、6または7のAAV由来である、請求項2または3に記載の核酸。
- [請求項5] 前記Rep遺伝子が血清型1、2、5、7または10のAAV由来であり、前記LTR配列が -75 から -95 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する、請求項1に記載の核酸。
- [請求項6] 前記LTR配列が、 -80 から -90 kcal/molの範囲の ΔG 値を有する、請求項5に記載の核酸。
- [請求項7] 前記LTR配列が、血清型1～7のいずれか1つのAAV由来である、請求項5または6に記載の核酸。
- [請求項8] AAV由来のCap遺伝子をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項9] 血清型1～10のいずれか1つのAAV由来のCap遺伝子をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項10] 同じ核酸分子または核酸二重鎖上に、前記Rep遺伝子、前記LTR配列、およびAAV由来のCap遺伝子を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項11] アデノウイルス（AdV）由来のヘルパー遺伝子をさらに含む、請

求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の核酸。

- [請求項12] 前記 R e p 遺伝子および前記 I T R 配列の組み合わせが、C M V プロモーターまたは E G F P をターゲットにした q P C R で測定した場合に、ひとつの R e p 遺伝子と前記 I T R 配列の組み合わせが、その R e p 遺伝子と I T R - 5 の組合せと比較して 2 倍以上の T i t e r [G C / m L] のウイルスベクターを生産する能力を有する、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項13] 前記核酸がプラスミドである、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項14] 前記核酸がカチオン性物質と複合体を形成している、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項15] 前記カチオン性物質がポリマーまたはリポソームを含む、請求項 1 4 に記載の核酸。
- [請求項16] 請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸を含む、ウイルスベクターを産生するための組成物。
- [請求項17] 前記 R e p 遺伝子を含む核酸と、前記 I T R を含む核酸とを組み合わせる工程を含む、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の核酸を合成する方法。
- [請求項18] 請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸または請求項 1 6 に記載の組成物をプロデューサー細胞に導入するステップと、
前記プロデューサー細胞においてウイルスベクターを形成させるステップと
を含む、ウイルスベクターを作製する方法。
- [請求項19] 前記核酸の少なくとも一部が前記プロデューサー細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 8 に記載の方法。
- [請求項20] 請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法によって作製されたプロデューサー細胞またはウイルスベクター。