

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2024-123940
(P2024-123940A)

(43)公開日 令和6年9月12日(2024.9.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/64 (2006.01)

C 1 2 N 15/64 Z

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 Z

審査請求		未請求	請求項の数	16	O L	(全49頁)
(21)出願番号	特願2023-31784(P2023-31784)		(71)出願人	504132272		
(22)出願日	令和5年3月2日(2023.3.2)			国立大学法人京都大学		
				京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1		
			(74)代理人	100106518		
				弁理士 松谷 道子		
			(74)代理人	100138911		
				弁理士 櫻井 陽子		
			(72)発明者	垣塚 彰		
				京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1		
				国立大学法人京都大学内		
			(72)発明者	小池 雅昭		
				京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1		
				国立大学法人京都大学内		

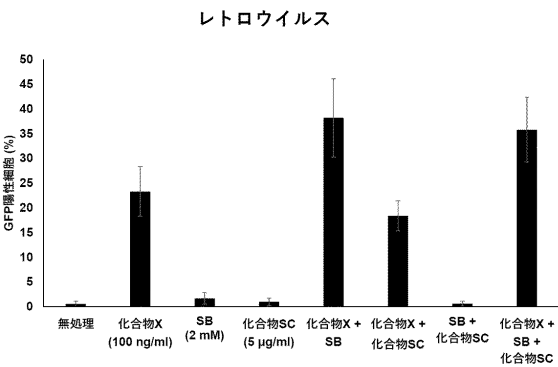
(54)【発明の名称】 ウイルスベクターの製造方法

(57)【要約】

【課題】本開示の目的は、培養細胞を用いるウイルスベクターの製造において、ウイルスベクターの生産量を高めることである。

【解決手段】ウイルスベクターの製造方法であって、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸およびウイルスベクターにより送達しようとする核酸を含む細胞を、プロテインキナーゼC（PKC）を活性化する条件下で培養することを含み、ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、方法を提供する。

【選択図】図33



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスベクターの製造方法であって、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸およびウイルスベクターにより送達しようとする核酸を含む細胞を、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する条件下で培養することを含み、

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF- κ B および YY1 から選択される少なくとも 1 つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、方法。

【請求項 2】

ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ウイルスベクターにより送達しようとする核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF- κ B および YY1 から選択される少なくとも 1 つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

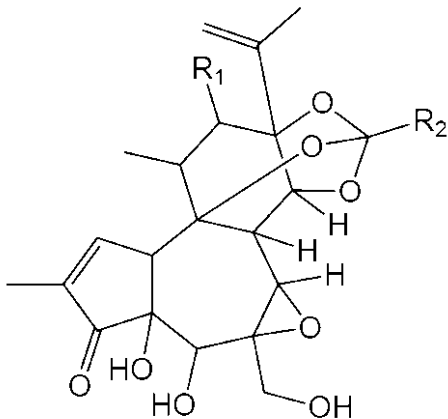
【請求項 5】

PKC 活性化剤の存在下で前記細胞を培養することにより PKC を活性化する、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

PKC 活性化剤が、式 (I) :

【化 1】



{式中、

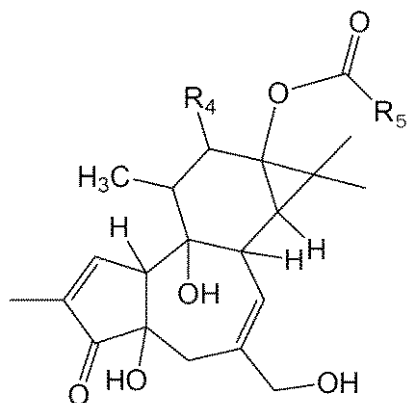
R^1 は、H、ハロゲン、-OH、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{6-14} アリールまたは $-OC(O)R^3$ であり、ここで、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{1-6} アルコキシまたはアリールは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R^2 は、 C_{6-12} アルキル、 C_{6-12} アルケニル、 C_{6-12} アルキニルまたは C_{6-12} アルコキシであり、ここで、 C_{6-12} アルキル、 C_{6-12} アルケニル、 C_{6-12} アルキニルまたは C_{6-12} アルコキシは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R^3 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、アミノまたは C_{6-14} アリールであり、ここで C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルまたは C_{6-14} アリールは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよい}、

式 (II) :

【化 2】



10

{式中、

R^4 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニル、 C_{1-18} アルコキシまたは $-OC(O)R^6$ であり、ここで、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニルまたは C_{1-18} アルコキシは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R^5 は、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルまたはアミノであり、ここで、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{2-6} アルキニルは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよく、

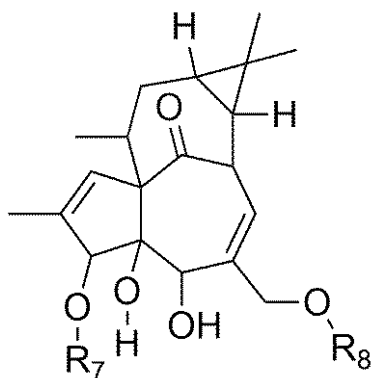
20

R^6 は、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニルまたはアミノであり、ここで C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニルまたは C_{2-18} アルキニルは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよい}、

または、

式 (III) :

【化 3】



30

{式中、

R^7 は、H、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニルまたは $-C(O)R^9$ であり、ここで、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニルまたは C_{2-18} アルキニルは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよく、

40

R^8 は、H、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニルまたは $-C(O)R^9$ であり、ここで、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニルまたは C_{2-18} アルキニルは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R^9 は、 C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニル、 C_{2-18} アルキニルまたはアミノであり、ここで C_{1-18} アルキル、 C_{2-18} アルケニルまたは C_{2-18} アルキニルは、同一または異なる、1個～3個のハロゲンにより置換されていてもよい}

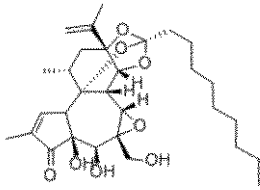
50

の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、請求項 5 に記載の方法。

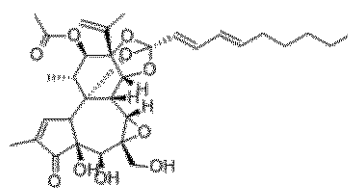
【請求項 7】

P K C 活性化剤が、

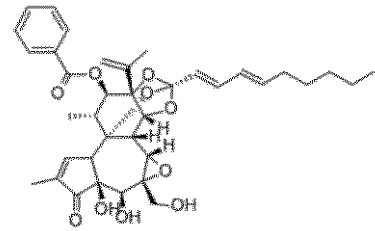
【化 4】



化合物X

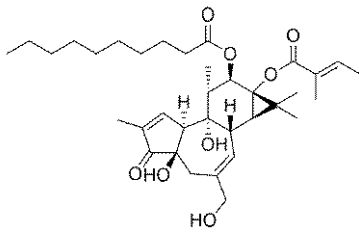


化合物#1

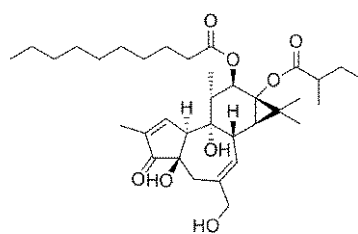


化合物#2

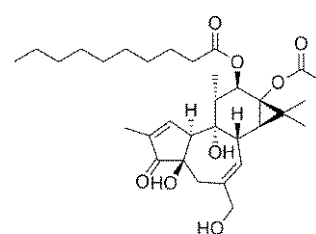
10



化合物#3

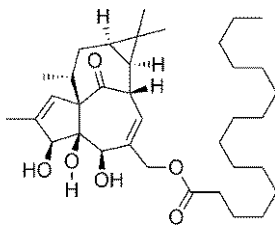


化合物#4

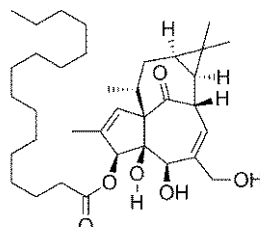


化合物#5

20



化合物#6



化合物#7

30

T P A、プロストラチン、(−)−インドラクタム V、ホルボール 1 2, 1 3−ジブチラート、インゲノール 3−アングラートおよび (2 S, 5 S)−(E, E)−8−(5−(4−(トリフルオロメチル)フェニル)−2, 4−ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクタムから選択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

P K C 活性化剤が、化合物 X および化合物 # 1 ~ # 7 から選択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、P r o 領域または R I N G 領域を含むペプチドをコードする核酸と連結されている、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 0】

活性化型 P K C を前記細胞に発現させることにより P K C を活性化する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1】

カルモジュリン阻害剤の存在下で前記細胞を培養する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の存在下で前記細胞を培養する、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 13】

細胞がパッケージング細胞である、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤または活性化型 PKC をコードする核酸と、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸とを含む、ウイルスベクターを製造するためのキットであって、

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF-κB および YY1 から選択される少なくとも 1 つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結しているものである、キット。

【請求項 15】

PKC 活性化剤を含む、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤または活性化型 PKC をコードする核酸を含む、ウイルスベクターの産生を増強するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ウイルスベクターの製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

遺伝子治療は近年成長が期待されている分野である。遺伝子治療では、目的の遺伝子を細胞に送達するために、各種のベクターが使用される。ウイルスベクターはその 1 種であり、目的に応じてレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどが選択される。

【0003】

ウイルスベクターは、抗体などの生物製剤（バイオ医薬品）と同様に、培養細胞を用いて製造される。通常、ウイルス粒子の産生に必要な核酸と、目的の遺伝子の核酸を培養細胞に発現させることにより、目的の遺伝子を含むウイルスベクターを産生させ、培養培地に放出されたウイルスベクターを回収する。従って、ウイルスベクターの生産量は、細胞のタンパク質生産能、培養容積および培養時間に依存する。細胞のタンパク質生産能を高めることができれば、製造コストを抑制しながらウイルスベクターの生産量を増加させられると期待される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本開示の目的は、ウイルスベクターの生産量を高めることである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、PKC を活性化することにより、CMV プロモーターなどのプロモーターの転写活性を高められること、および、PKC を活性化する新たな方法を見出し、それにより培養細胞におけるウイルスベクターの生産量を高められることを明らかにした。

【0006】

従って、ある態様では、本開示は、ウイルスベクターの製造方法であって、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸およびウイルスベクターにより送達しようとする核酸を含む細胞を、PKC を活性化する条件下で培養することを含み、

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF-κB および YY1 から選択される少なくとも 1 つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、方法を提供する。

【0007】

ある態様では、本開示は、PKC 活性化剤または活性化型 PKC をコードする核酸と、

10

20

30

40

50

ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸とを含む、ウイルスベクターを製造するためのキットであって、

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結しているものである、キットを提供する。

【0008】

ある態様では、本開示は、PKC活性化剤または活性化型PKCをコードする核酸を含む、ウイルスベクターの産生を増強するための組成物を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本開示により、ウイルスベクターの生産量を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物Xまたは化合物#1～#7のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図2】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物Xの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性の変化を示す。

【図3】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物XまたはPKC活性化剤#1～#4のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図4】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物XまたはPKC活性化剤#5～#6のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図5】 pRL-CAGまたはpRL-EF1をトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物Xまたは化合物#1～#5のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【0011】

【図6】 pRL-CAGをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物X、化合物#6～#7およびPKC活性化剤#1～#6のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図7】 pRL-EF1をトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物X、化合物#6～#7およびPKC活性化剤#1～#6のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図8】 HEK293A細胞における、化合物X、化合物#1～#7、PKC活性化剤#1～#6、化合物SCおよび化合物SBのいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのPKCの基質タンパク質のリン酸化状態を示す。

【図9】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物Xおよび／または化合物SCの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図10】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物X、化合物SCおよび／またはSBの存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【0012】

【図11】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物Xおよび化合物#1～#7のいずれかの存在下、化合物SBまたは化合物SB+SCの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図12】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物XおよびPKC活性化剤#1～#6のいずれかの存在下、化合物SBまたは化合物SB+SCの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

10

20

30

40

50

【図13】 pRL-CMV (Renilla Luciferase) を恒常的に発現するHEK293A細胞における、化合物Xまたは化合物X+化合物SCの存在下、各種ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図14】 CMVプロモーターの制御下にマウスIgG抗体重鎖のcDNAを連結した発現コンストラクトおよびCMVプロモーターの制御下にマウスIgG抗体軽鎖のcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、化合物X、化合物#1～#5、PKC活性化剤#1～#6のいずれかを添加した培地中、化合物SB+SCの存在下または非存在下で培養し、培地中のマウスIgG抗体の濃度を測定した結果を示す。

【図15】 CMVプロモーターの制御下にヒトプロインスリンを恒常的に発現するHEK293A細胞を、化合物X、化合物#1～#5、PKC活性化剤#1～#3、#5または#6を添加した培地中、化合物SB+SCの存在下または非存在下で培養し、培地中のヒトプロインスリンの濃度を測定した結果を示す。

【0013】

【図16】 CMVプロモーターの制御下にヒトレプチンのcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、化合物X、化合物#1～#5、PKC活性化剤#1～#6のいずれかを添加した培地中、化合物SB+SCの存在下または非存在下で培養し、培地中のヒトレプチンの濃度を測定した結果を示す。

【図17】 図14～16と同様にマウスIgG抗体重鎖および軽鎖、ヒトプロインスリンまたはヒトレプチンを一過性または恒常的に発現する細胞を、化合物X、化合物#6または化合物#7を添加した培地中、化合物SB+SCの存在下または非存在下で培養し、培地中の各タンパク質の濃度を測定した結果を示す。

【図18】 CMVプロモーターの制御下にマウスIgG抗体重鎖および軽鎖、ヒトプロインスリンまたはヒトレプチンを恒常的に発現するHEK293A細胞を、化合物Xまたは化合物X+SBの存在下または非存在下で培養し、培地中の各タンパク質の濃度を3日間または4日間にわたって測定した結果を示す。

【図19】 CMVプロモーター、タンパク質のcDNA (XXX)、IRESおよび活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトの模式図である。

【図20】 CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよび活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す。

【0014】

【図21】 CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESまたはP2A、および活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す。

【図22】 CMVプロモーター、マウスIgG抗体重鎖のcDNA、IRESおよび活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトおよびCMVプロモーター、マウスIgG抗体軽鎖のcDNA、IRESおよび活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、培地中のIgG抗体の濃度を4日間にわたって測定した結果を示す。

【図23】 CMVプロモーター、ヒトレプチンのcDNA、IRESおよび活性化型PKCのcDNAを連結した発現コンストラクトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、培地中のレプチンの濃度を4日間にわたって測定した結果を示す。

【図24】 pRL-CMVをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、ナフタレンスルホンアミド誘導体の存在下、化合物Xの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図25】 CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびPML (野生型または欠損型) のcDNAを連結した発現コンストラクトの模式図を示す。

【0015】

【図26】 CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびPML (野生型ま

10

20

30

40

50

たは欠損型)のcDNAを含む発現コンストラクトをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物Xの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図27】CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびPMLΔ9またはPML-RingのcDNAを含む発現コンストラクトをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物X、SB、化合物SCまたはこれらの組合せの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【図28】PMLのRING領域のアミノ酸配列をBLAST解析し、相同性のあるアミノ酸配列を持つ遺伝子間での系統樹を示す。

【図29】CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびRING領域のcDNAを連結した発現コンストラクトの模式図を示す。

10

【図30】CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびRING領域のcDNAを連結した発現コンストラクトをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物Xの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

【0016】

【図31】CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびPML(停止コードン導入)のcDNAを連結した発現コンストラクト、および、CMVプロモーター、RlucのcDNAおよびPML(野生型または欠損型)のcDNAを連結した発現コンストラクトの模式図を示す。

【図32】CMVプロモーター、RlucのcDNA、IRESおよびPML(停止コードン導入)のcDNAを連結した発現コンストラクト、および、CMVプロモーター、RlucのcDNAおよびPML(野生型または欠損型)のcDNAを連結した発現コンストラクトをトランスフェクションしたHEK293A細胞における、化合物Xの存在下または非存在下でのルシフェラーゼ活性を示す。

20

【図33】GFP遺伝子が挿入されたレトロウイルスベクターを、化合物X、化合物SCおよび/またはSBの存在下でPlat-E細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図34】GFP遺伝子が挿入されたレンチウイルスベクターを、化合物X、化合物SCおよび/またはSBの存在下でLenti-X293T細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図35】GFP遺伝子が挿入されたアデノウイルスベクターを、化合物X、化合物SCおよび/またはSBの存在下でLenti-X293T細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

30

【0017】

【図36】GFP遺伝子が挿入されたアデノ随伴ウイルスベクターを、化合物X、化合物SCおよび/またはSBの存在下でLenti-X293T細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図37】GFP遺伝子が挿入されたレトロウイルスベクターを、化合物X、化合物#1~#4、#6、#7およびPKC活性化剤#1~#6のいずれかの存在下、PKC阻害剤の存在下または非存在下でPlat-E細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

40

【図38】GFP遺伝子が挿入されたレトロウイルスベクターを、化合物X、化合物SC、SBおよび/またはPKC阻害剤の存在下でPlat-E細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図39】GFP遺伝子が挿入されたレンチウイルスベクターを、化合物X、化合物SC、SBおよび/またはPKC阻害剤の存在下でPlat-E細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図40】GFP遺伝子が挿入されたアデノウイルスベクターを、化合物X、化合物SC、SBおよび/またはPKC阻害剤の存在下でPlat-E細胞に産生させ、HEK293A細胞へと感染させ、GFP陽性細胞数を測定した結果を示す。

【0018】

50

【図 4 1】 G F P 遺伝子が挿入されたアデノ随伴ウイルスベクターを、化合物 X、化合物 S C、S B および／または P K C 阻害剤の存在下で P l a t - E 細胞に産生させ、H E K 2 9 3 A 細胞へと感染させ、G F P 陽性細胞数を測定した結果を示す。

【図 4 2】 実施例で使用した C M V プロモーター、C A G プロモーターおよび E F 1 プロモーターにおける転写因子の結合部位を示す。

【図 4 3】 p A d / D E S T / C M V ベクターに含まれるプロモーターにおける転写因子の結合部位を示す。

【図 4 4】 H E K 2 9 3 細胞内のアデノウイルス遺伝子のプロモーターにおける転写因子の結合部位を示す。H E K 2 9 3 細胞にはアデノウイルス 5 型の 1 - 4 3 5 5 n t (E 1 遺伝子: E 1 A、E 1 B を含む) が組み込まれている。

【図 4 5】 p A A V - 2 / 9 n ベクターに含まれるプロモーターにおける転写因子の結合部位を示す。R E P 上流領域は、p A A V - 2 / 9 n の f 1 o r i 配列から R E P 遺伝子の上流までの 2 5 8 n t の領域である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

特に具体的な定めのない限り、本開示で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されたとおりの意味を有する。以下にいくつかの本開示で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本開示において、一般的な理解に優先する。

【0020】

本開示のウイルスベクターの製造方法は、ウイルスベクターの産生に必要な核酸を培養細胞に導入し、ウイルスベクターを産生させて回収する、遺伝子工学的手法を利用するものである。かかる遺伝子工学的手法は、当分野で周知であり、文献に記載される方法などに準じて行うことができる（例えば、Molecular Cloning, T. Maniatis et al., C S H Laboratory (1983)、DNA Cloning, D M. Glover, IRL PRESS (1985)）。

【0021】

「ウイルスベクター」とは、インビトロ、エクスピボまたはインビボで細胞に送達しようとする核酸を含むように組み換えられたウイルスゲノムがウイルス粒子内にパッケージされているベクターを意味する。

【0022】

野生型ウイルスに基づいて作製された様々なウイルスベクターが知られており、いかなるウイルスベクターも使用し得る。公知のウイルスベクターには、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、マウス白血病ウイルスベクター、ハイブリッドウイルスベクターが含まれる。ある実施態様では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター、好ましくはレトロウイルスベクターである。

【0023】

一般的に、ウイルスベクターは、ウイルスベクターの産生に必要な核酸、即ち、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸およびウイルスベクターにより送達しようとする核酸を含む細胞を培養することにより製造される。ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸は、ウイルスベクターが由来するウイルスのタンパク質または R N A をコードするものであり、天然の核酸であってもよく、ウイルスベクターの目的に応じて改変されていてもよい。

【0024】

ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸は、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要なタンパク質をコードする核酸であり得る。ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要なタンパク質は、ウイルスベクターが由来するウイルスによって異なり、当分野で周知である。

10

20

30

40

50

【0025】

例えば、レトロウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要なタンパク質には、Gag、Polおよびエンベロープタンパク質（VSV-G、MLVなど）が含まれる。レンチウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要なタンパク質には、Gag、Pol、Revおよびエンベロープタンパク質（VSV-G、MLVなど）が含まれる。

【0026】

アデノウイルスベクターは多数のタンパク質からなり、例えば、アデノウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要なタンパク質は、アデノウイルスゲノムのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4またはL5領域にコードされるタンパク質である。また、アデノウイルスではウイルス関連RNA（VARN）などのRNAもウイルス粒子の産生に必要なことが知られている。アデノウイルスには多数の血清型が知られており、例えば、ヒトアデノウイルス2型またはヒトアデノウイルス5型に由来するアデノウイルスベクター、または、E1遺伝子および／またはE3遺伝子が欠失したこれらのアデノウイルスベクター、特に、E1遺伝子およびE3遺伝子が欠失したヒトアデノウイルス5型のアデノウイルスに由来するアデノウイルスベクターを使用し得る。

10

【0027】

アデノ随伴ウイルスベクターは、ウイルス複製にアデノウイルスなどのヘルパーウイルスを必要とするアデノ随伴ウイルスに基づくベクターであり、ウイルス粒子の産生に必要なタンパク質には、例えば、アデノウイルスゲノムのE1A、E1B、E2AおよびE4領域にコードされるタンパク質、並びに、アデノ随伴ウイルスゲノムのRepおよびCap領域にコードされるタンパク質が含まれる。また、ヘルパーウイルスのウイルス関連RNA（VARN）などのRNAもウイルス粒子の産生に必要なことが知られている。アデノ随伴ウイルスには多数の血清型が知られており、例えばAAV2型、AAV5型またはAAV9型のアデノ随伴ウイルスに由来するアデノ随伴ウイルスベクターを使用し得る。

20

【0028】

少なくとも1つのウイルス粒子の産生に必要な核酸は、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している。少なくとも1つのウイルス粒子の産生に必要な核酸が当該プロモーターに作動可能に連結していれば、他のウイルス粒子の産生に必要な核酸は、当該プロモーターに作動可能に連結していても、していなくてもよい。ウイルス粒子の産生に必要な2以上の、例えば全部の核酸が、当該プロモーターに作動可能に連結していてもよく、この場合、各核酸と連結するプロモーターの種類は同じであっても異なってもよい。1つのプロモーターにウイルス粒子の産生に必要な1つの核酸が作動可能に連結していてもよく、1つのプロモーターに2以上の当該核酸が作動可能に連結していてもよい。

30

【0029】

本開示において、プロモーターは、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含む。即ち、プロモーターは、これらの結合部位のうち1個を含むか、これらの結合部位のうち2個、3個もしくは4個を任意の組合せで含むか、または、これらの結合部位をすべて含む。プロモーターは、さらに他の転写因子、例えばCREBの結合部位を含んでもよい。ある実施態様では、プロモーターは、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1の結合部位を含む。ある実施態様では、プロモーターは、SP1、CEBP、AP1、NF-κB、YY1およびCREBの結合部位を含む。使用し得るプロモーターの例として、CMVプロモーター、CAGプロモーターおよびEF1プロモーター、好ましくはCMVプロモーターおよびEF1プロモーター、特に好ましくはCMVプロモーターが挙げられる。プロモーターは、ウイルス由来のプロモーターであってもよい。例えば、アデノウイルスのE1Aプロモーター、E1Bプロモーター、E2Aプロモーター、E2Bプロモーター、E4プロモ-

40

50

ター、主要後期プロモーターもしくはI Xプロモーター、アデノ随伴ウイルスのp 5プロモーター、p 19プロモーターもしくはp 40プロモーターを使用し得る。これらの転写因子、結合部位、プロモーターは当分野で周知であり、文献に記載される方法などに準じて使用できる。

【0030】

本開示において、「作動可能に連結した」とは、プロモーター、内部リボソーム進入部位(IRES)および2A自己切断ペプチド(2Aペプチド)配列などの調節配列エレメントと、ウイルスベクターの産生に必要な核酸が、遺伝子の発現を可能とする様式で連結されていることを意味し、各DNAの3'末端と、その下流のDNAの5'末端とは、直接連結していてもよく、その間に任意のDNA配列が存在してもよい。

10

【0031】

ウイルスベクターにより送達しようとする核酸は、所望のタンパク質または核酸をコードするヌクレオチド配列を含む核酸であり得る。ウイルスベクターにより送達しようとする核酸は、使用する培養細胞に対して許容し得ない毒性がない限り、限定されない。例えば、当該核酸は、遺伝子治療用の核酸であり得る。当該核酸は、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子等の、遺伝子導入された細胞の選択を可能にするマーカー遺伝子を含んでもよい。当該核酸は、核酸の配列情報に基づき、例えば、通常のDNA合成やRT-PCRによる増幅などによって、製造することができる。ウイルスベクターにより送達しようとする核酸が連結するプロモーターは限定されず、例えば、当該核酸は、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結していてもよい。

20

【0032】

ウイルスベクターの産生に必要な核酸を発現ベクターに組み込むことにより、発現コンストラクトを作製することができる。ここで用いる発現ベクターは、産生しようとするウイルスベクター、用いる培養細胞等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ウイルスベクター等が挙げられる。例えば、pQCXIN、pcDNA、pLV SIN、pSPAX2、pAd、pAAV、pAdDeltaF6、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、マウス白血病ウイルスベクター、ハイブリッドウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。発現コンストラクトは、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を含んでもよい。ウイルスベクターにより送達しようとする核酸を含む発現コンストラクトは、当該核酸のウイルス粒子内へのパッケージを可能にする因子を含んでもよい。ウイルスベクターの産生に必要な核酸をすべて含む発現コンストラクトを用いてもよく、1つまたは複数のウイルスベクターの産生に必要な核酸を含む発現コンストラクトを組み合わせて用いてもよい。例えば、アデノ随伴ウイルスベクターを製造する場合、アデノウイルス由来の遺伝子の一部(E4、E2A、VARNAなど)を組み込んだヘルパープラスミドを用いてもよい。

30

【0033】

発現コンストラクトで宿主細胞を形質転換することにより、ウイルスベクターの産生に必要な核酸を含む細胞を作製することができる。宿主細胞にウイルスベクターの産生に必要なすべての核酸を導入してもよい。ウイルスベクターの産生に必要な核酸の一部が予め導入された宿主細胞に、ウイルスベクターの産生に必要な残りの核酸を導入してもよい。ウイルス粒子の産生に必要な核酸の一部または全部が予め導入された宿主細胞(パッケージング細胞)に、ウイルスベクターにより送達しようとする核酸と、場合によりウイルス粒子の産生に必要な残りの核酸を導入してもよい。宿主細胞は典型的には動物細胞であり、例えば、HEK293A細胞、HEK293T細胞、CHO細胞、COS細胞、Ver o細胞、HeLa細胞、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、NIH3T3細胞などが挙げられる。パッケージング細胞としては、例えば、レトロウイルスの

40

50

G a g および／または P o l および／またはエンベロープタンパク質が導入された細胞、アデノウイルスの E 1 A および／または E 1 B 領域が導入された細胞が挙げられる。ウイルスベクターの産生に適する市販の細胞を使用してもよく、例えば、P l a t e 細胞（コスモバイオ、#RV-101）、L e n t i - X 2 9 3 T 細胞（Takara、#Z2180N）が挙げられる。

【0034】

宿主細胞への発現コンストラクトの導入方法としては、宿主細胞と発現ベクターに適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、D E A E - デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などが挙げられる。

【0035】

一過性にウイルスベクターを産生するように細胞を形質転換してもよく、継続的にウイルスを産生する能力を有するように形質転換し、細胞株としてもよい。後者の場合、細胞株をマスターセルバンク（M C B）やワーキングセルバンク（W C B）として使用し得る。

【0036】

形質転換した細胞を、P K C を活性化する条件下で培養することにより、ウイルスベクターを効率よく製造することができる。各細胞と各ウイルスベクターの培養に適する培地、培養時間、培養温度等の培養条件は、当業者に周知であり、適宜選択すればよい。例えば、P K C を活性化する条件下で、1 時間以上、2 時間以上、4 時間以上、6 時間以上、8 時間以上、1 2 時間以上、1 8 時間以上、2 4 時間以上、3 6 時間以上、4 8 時間以上、かつ、7 2 時間以内、6 0 時間以内、4 8 時間以内、3 6 時間以内、3 0 時間以内または 2 4 時間以内、例えば 2 4 時間～7 2 時間、3 6 時間～6 0 時間、4 2 時間～5 4 時間、4 5 時間～5 1 時間、4 6 時間～5 0 時間、4 7 時間～4 9 時間または約 4 8 時間、細胞を培養した後に、ウイルスベクターを含む培養上清を回収する。

【0037】

ウイルスベクターは、前記の上清のまま、または、上清をフィルターろ過して得られたろ液、公知の方法により希釈、濃縮もしくは精製されたウイルスベクターとして使用されてよく、適切な方法により、例えば凍結して、使用するまで保存されてもよい。精製手段としては、超遠心法、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。市販の濃縮試薬、例えば、Retro-X Concentrator（TaKaRa #631455）、Lenti-X Concentrator（TaKaRa #631231）などを使用してもよい。

【0038】

ある実施態様では、P K C を活性化する条件は、P K C 活性化剤の存在下で細胞を培養することである。P K C は、基質タンパク質のセリン残基およびスレオニン残基のヒドロキシル基をリン酸化するタンパク質キナーゼの一種であり、1 0 種類以上のアイソザイムが知られている。アイソザイムはその構造、活性化の機序、生理活性によって在来型（ α 、 β I、 β I I、 γ ）、新型（ δ 、 ϵ 、 θ 、 η ）、非典型（ ζ 、M ζ 、 ι / λ ）の 3 種類のサブファミリーに分類される。本開示において、P K C は、好ましくは在来型 P K C アイソザイムまたは新型 P K C アイソザイム、特に好ましくは P K C α または P K C δ である。

【0039】

本開示において、「P K C 活性化剤」は、P K C のキナーゼ活性を増強する物質を意味する。2 種以上の P K C 活性化剤を併用してもよい。

【0040】

ある実施態様では、P K C 活性化剤として、式（I）：

10

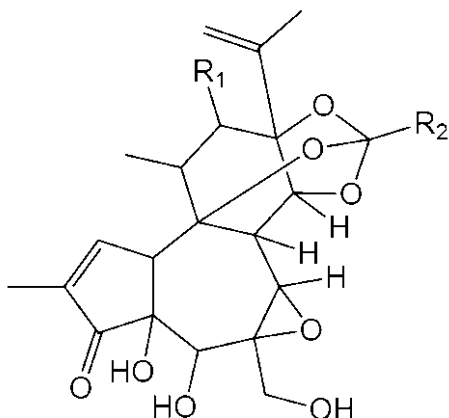
20

30

40

50

【化 1】



10

{式中、

R 1 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニル、C 1 - 6 アルコキシ、C 6 - 1 4 アリールまたは $-OC(O)R_3$ であり、ここで、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニル、C 1 - 6 アルコキシまたはアリールは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

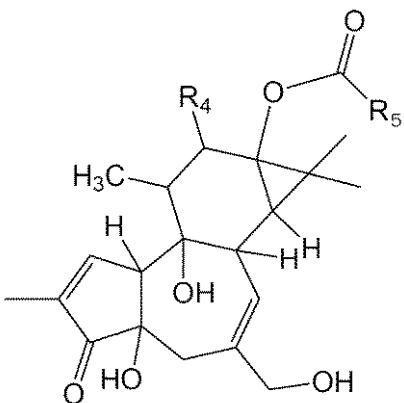
20

R 2 は、C 6 - 1 2 アルキル、C 6 - 1 2 アルケニル、C 6 - 1 2 アルキニルまたはC 6 - 1 2 アルコキシであり、ここで、C 6 - 1 2 アルキル、C 6 - 1 2 アルケニル、C 6 - 1 2 アルキニルまたはC 6 - 1 2 アルコキシは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R 3 は、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニル、アミノまたはC 6 - 1 4 アリールであり、ここでC 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニルまたはC 6 - 1 4 アリールは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよい}、

式 (I I) :

【化 2】



30

40

{式中、

R 4 は、H、ハロゲン、 $-OH$ 、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニル、C 1 - 1 8 アルコキシまたは $-OC(O)R_6$ であり、ここで、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニルまたはC 1 - 1 8 アルコキシは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R 5 は、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニルまたはアミノであり、ここで、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニルまたはC 2 - 6 アルキニルは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

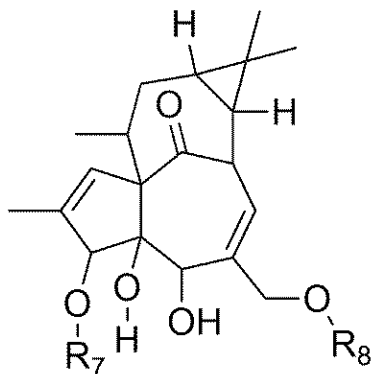
50

R 6 は、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニルまたはアミノであり、ここでC 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニルまたはC 2 - 1 8 アルキニルは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよい}、

または、

式 (I I I) :

【化 3】



10

{式中、

R 7 は、H、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニルまたは - C (O) R 9 であり、ここで、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニルまたはC 2 - 1 8 アルキニルは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

20

R 8 は、H、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニルまたは - C (O) R 9 であり、ここで、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニルまたはC 2 - 1 8 アルキニルは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよく、

R 9 は、C 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニル、C 2 - 1 8 アルキニルまたはアミノであり、ここでC 1 - 1 8 アルキル、C 2 - 1 8 アルケニルまたはC 2 - 1 8 アルキニルは、同一または異なる、1 個～3 個のハロゲンにより置換されていてもよい}

の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物を使用し得る。

30

【0 0 4 1】

本開示において、用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選ばれる原子を意味する。

本開示において、用語「アルキル」は、飽和した、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を示す。

本開示において、用語「アルケニル」は、1 つまたはそれ以上の二重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。

本開示において、用語「アルキニル」は、1 つまたはそれ以上の三重結合を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素を意味する。

本開示において、用語「アルコキシ」は、- O - アルキル（ここで、アルキルは本開示に定義されている通りである）を意味する。

40

【0 0 4 2】

本開示において、用語「アリール」は、1 個の環（例えばフェニル）または複数の縮合環（例えばナフチルまたはアントリル）を有する6 ～ 1 4 個の炭素原子の1 価芳香族性炭素環式基を意味する。アリールは典型的には、フェニルおよびナフチルを含む。

本開示において、用語「アミノ」は - N H 2 の基を意味する。

【0 0 4 3】

本開示において、「エステル」は、インビボまたはインビトロで加水分解され得るエステルを意味し、容易に分解されて親化合物またはその塩を放出するものを含む。好適なエステル基は、例えば、脂肪族カルボン酸、特にアルカン酸、アルケン酸、シクロアルカン

50

酸およびアルカン二酸に由来するもの（ここで、各アルキルまたはアルケニル基は、例えば6個以下の炭素原子を有する）を含む。具体的なエステル例には、ギ酸エステル、酢酸エステル、プロピオン酸エステル、ブチル酸エステル、アクリル酸エステルおよびエチルコハク酸エステルが含まれる。

【0044】

本開示において、「塩」は、化合物の無機または有機酸との塩であり得る。好ましい塩は、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸または硫酸との塩、または、有機カルボン酸またはスルホン酸、例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、安息香酸またはメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸またはナフタレンジスルホン酸との塩である。

10

【0045】

また、塩は、常套の塩基との塩、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウムまたはカリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウムまたはマグネシウム塩）、または、アンモニアまたは有機アミン（例えば、ジエチルアミン、トリエチルアミン、エチルジイソプロピルアミン、プロカイン、ジベンジルアミン、N-メチルモルホリン、ジヒドロアビエチルアミン、メチルピペリジン、L-アルギニン、クレアチン、コリン、L-リジン、エチレンジアミン、ベンザチン、エタノールアミン、メグルミンまたはトロメタミン）から誘導されるアンモニウム塩、特にナトリウム塩であり得る。

【0046】

本開示において、「溶媒和物」は、固体または液体状態で溶媒分子との配位により錯体を形成している化合物を意味する。好適な溶媒和物は水和物である。

20

【0047】

ある実施態様では、式(I)中、
R1は、Hまたは-OC(O)R3であり、
R2は、C6-12アルキルまたはC6-12アルケニルであり、
R3は、C1-6アルキルまたはC6-14アリアルである。

【0048】

ある実施態様では、式(I)中、
R1は、Hまたは-OC(O)R3であり、
R2は、ノニルまたは1,3-ノナジエニルであり、
R3は、メチルまたはフェニルである。

30

【0049】

ある実施態様では、式(I)の化合物は、後述する化合物X、化合物#1または化合物#2である。

【0050】

ある実施態様では、式(II)中、
R4は、Hまたは-OC(O)R6であり、
R5は、C1-6アルキルまたはC2-6アルケニルであり、
R6は、C1-18アルキルである。

40

【0051】

ある実施態様では、式(II)中、
R4は、Hまたは-OC(O)R6であり、
R5は、メチル、プロピル、sec-ブチルまたはブテニルであり、
R6は、プロピル、ノニルまたはトリデシルである。

【0052】

ある実施態様では、式(II)の化合物は、後述する化合物#3、化合物#4、化合物#5、TPA、ホルボール12,13-ジブチラートまたはプロストラチン、特に化合物#3、化合物#4または化合物#5である。

【0053】

50

ある実施態様では、式 (I I I) 中、
R 7 は、H または $-C(O)R_9$ であり、
R 8 は、H または $-C(O)R_9$ であり、
R 9 は、C 1 - 18 アルキルまたは C 2 - 18 アルケニルである。

【0054】

ある実施態様では、式 (I I I) 中、
R 7 は、H または $-C(O)R_9$ であり、
R 8 は、H または $-C(O)R_9$ であり、
R 9 は、ペンタデシルまたはブテニルである。

【0055】

ある実施態様では、式 (I I I) の化合物は、後述する化合物 # 6、化合物 # 7 または
インゲノール 3 - アンゲラート、特に化合物 # 6 または化合物 # 7 である。

【0056】

式 (I) ~ (I I I) の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物は、例えば、
0.1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 ~ 1000 ng/ml 、2 ~ 5
00 ng/ml または 5 ~ 200 ng/ml の濃度で培養培地に添加し得る。

【0057】

ある実施態様では、PKC 活性化剤は、式 (I) の化合物またはそのエステル、塩もし
くは溶媒和物である。これらは、例えば、0.1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
l、0.1 ~ 1000 ng/ml 、20 ~ 500 ng/ml または 50 ~ 200 ng/ml
l の濃度で培養培地に添加し得る。

【0058】

ある実施態様では、PKC 活性化剤は、下記の化合物 X および化合物 # 1 ~ # 7 から選
択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である。

10

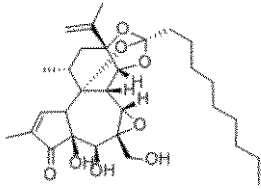
20

30

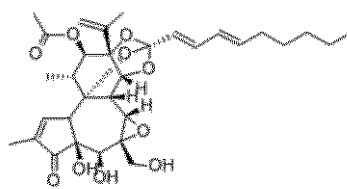
40

50

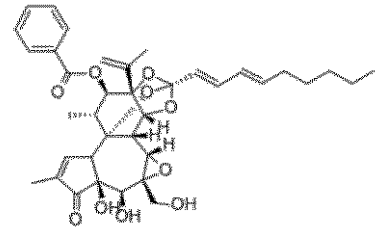
【化 4】



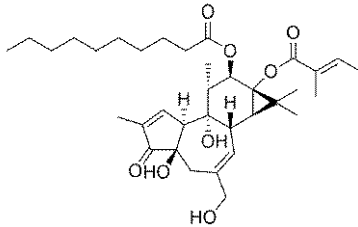
化合物X



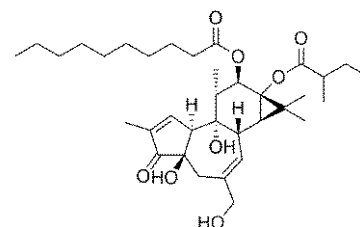
化合物#1



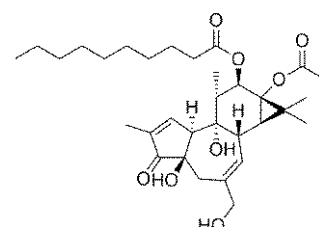
化合物#2



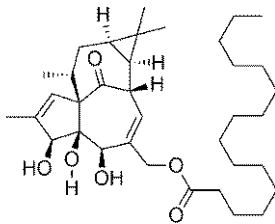
化合物#3



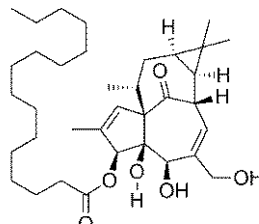
化合物#4



化合物#5



化合物#6



化合物#7

【0059】

化合物 X および化合物 # 1 ~ # 7 は、化学合成により入手してもよく、これらを含む植物から抽出してもよい。例えば、化合物 X は黄芩花 (Lowdaphne Stringbush) から、化合物 # 1 および # 2 は芫花 (Lilac Daphne) から、化合物 # 3 ~ # 5 は巴豆 (Croton) から、化合物 # 6 ~ # 7 は千金子 (Caper Euphorbia) から抽出し得る。これらの化合物を含む植物加工物、例えば、植物エキスまたは抽出物を使用してもよい。

【0060】

ある実施態様では、P K C 活性化剤は化合物 X またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である。

【0061】

公知の P K C 活性化剤を使用してもよい。公知の P K C 活性化剤として、12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセタート (TPA、ホルボール12-ミリスタート13-アセタート (PMA) と呼ばれる)、プロストラチン、ブリオスタチン1、ブリオスタチン2、FR236924、(-)-インドラクタムV、PEP005、ホルボール12、13-ジブチラート、1-オレオイル-2-アセチル-sn-グリセロール、1-O-ヘキサデシル-2-O-アラキドニル-sn-グリセロール、1,2-ジオクタノイル-sn-グリセロール、PIP2、レシニフェラトキシ、ホルボール12、13-ジヘキサノアート、メゼレイン、インゲノール3-アングラート、RHC-80267、DCP-LA、リボキシナ4、(2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクタムなどが例示されるが、これらに限定されない。ある実施態様では、P K C 活性化剤は、TPA、プロストラチン、(-)-インドラクタムV、ホルボール12、13-ジブチラート、インゲノール3-アングラート、または、(2S, 5S)-(E, E)-8-(5-(4-(

10

20

30

40

50

トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクタムである。公知のPKC活性化剤は、当分野で知られている方法、例えば製造業者の推奨する方法により、適宜使用し得る。

【0062】

ある実施態様では、PKC活性化剤は、化合物X、化合物#1~#7、TPA、プロストラチン、(-)-インドラクタムV、ホルボール12,13-ジブチラート、インゲノール3-アングラートおよび(2S,5S)-(-E,E)-8-(5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクタムから選択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である。

【0063】

ある実施態様では、細胞は、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸をさらに含む。Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸は、ウイルス粒子の産生に必要な核酸と同じ発現コンストラクトに含まれてもよく、別の発現コンストラクトに含まれてもよい。例えば、作動可能に連結されている、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸を含む発現コンストラクトを使用し得る。ある実施態様では、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸は、この順序で作動可能に連結されている。

【0064】

Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸は、ペプチドに翻訳されてもされなくてもよい。翻訳されるようにする場合、ウイルス粒子の産生に必要な核酸とPro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸の間に、IRESまたは2Aペプチド配列を挿入し得る。IRESおよび2Aペプチド配列の詳細は、後述する。例えば、作動可能に連結されている、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、IRESまたは2Aペプチド配列、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸を含む発現コンストラクトを使用し得る。ある実施態様では、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、IRESまたは2Aペプチド配列、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸は、この順序で作動可能に連結されている。

【0065】

本開示において、Pro領域またはRING領域はいかなる種のものであってもよく、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル、ヒト等、特にヒトに由来するものである。好ましくは、Pro領域またはRING領域は、使用する細胞と同じ種に由来するものである。

【0066】

Pro領域はプロリン残基に富んだアミノ酸配列を有する領域を指し、WWドメインやSH3ドメインなどの機能性ドメインとの特異的相互作用を媒介する。Pro領域としては、反復性の短いプロリン残基に富んだアミノ酸配列、タンデムに繰り返されたプロリン残基に富んだアミノ酸配列、非反復性のプロリン残基に富んだアミノ酸配列、およびヒドロキシプロリン残基に富んだアミノ酸配列を有する領域が挙げられる。Pro領域は、これだけに限定されないが、核内タンパク質、転写因子、輸送体、チャネル、および受容体などの内在性膜タンパク質、球状タンパク質、ホルモン、神経ペプチド、ムチン、免疫グロブリン、ならびに細胞外マトリックスタンパク質を含めた種々のタンパク質に見いだすことができる。

【0067】

Pro領域は、いかなるタンパク質に由来してもよい。Pro領域を含むタンパク質として、例えば、PML、ARHGGEF1、アグリカン-1、RALGDS、DGKK、SPATA21、ラブフィリン-3A、TEAD3、SPPL2BおよびFLJ43093が挙げられる。

【0068】

R I N G 領域は、R I N G フィンガー領域とも呼ばれ、一対の亜鉛原子に結合し、タンパク質間相互作用を媒介する。R I N G 領域は、一般的に下記の共通配列を有する。

C - X 2 - C - X 9 - 3 9 - C - X 1 - 3 - H - X 2 - 3 - C - X 2 - C - X 4 - 4 8 - C - X 2 - C

{式中、Cはシステイン残基であり、Hはヒスチジン残基であり、Xは任意のアミノ酸残基である。}

これらのシステイン残基およびヒスチジン残基は、亜鉛原子との結合を介した構造を形成するために必要であり、高度に保存されている。

【0069】

R I N G 領域は、いかなるタンパク質に由来してもよい。R I N G 領域を含むタンパク質として、例えば、T R I M 1 3、L O N R F 3、T R I M 4 7、R N F 1 3 5、T R I M 1 0、T R I M 7 2、T R I M 6 0、T R I M 3 9、T R I M 4、T R I M 4 3 B、T R I M 4 3、T R I M 2 5、T R I M 2 6、T R I M 3 1、H T L F、B R C A 1、T R I M 5 0、T R I M 2 1、S S A 1、T R I M 5 d、T R I M 2 2、K I A A 0 1 8 2、T R I M 6 5、R A G 1、B F A R、P e x 1 0、R N F 8、R I N G 2、C O P I、T R I M 2、T R I M 3、S H 3 R F 2、P M L および T R I M 5 6 が挙げられる。ある実施態様では、R I N G 領域は、P M L、T R I M 3、T R I M 5 6、C O P I、P e x 1 0、B R C A 1 または H T L F の R I N G 領域である。

【0070】

ある実施態様では、P r o 領域または R I N G 領域は、前骨髄球性白血病タンパク質 (P M L) に由来する。P M L は、P M L ボディと呼ばれる核内構造体の組み立てに必要とされる。P M L ボディは多様な機能を有し、幅広い細胞内プロセスへの関与が示唆されている。ヒト P M L には複数のアイソフォームが知られており、N 末端側はすべてのアイソフォームで同一のアミノ酸配列である。

【0071】

ヒト野生型 (W T) P M L アイソフォーム 5 (Gene ID: 5371, NCBI Reference Sequence: NP_150247.2) のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を配列番号 7 および 8 に示す。アミノ酸配列は、560 個のアミノ酸からなり、図 25 に示す各領域を有する。配列番号 7 のアミノ酸配列の第 1 位～第 45 位 (配列番号 9) が P r o 領域であり、第 46 位～第 105 位 (配列番号 10) が R I N G 領域である。配列番号 8 のヌクレオチド配列の第 1 位～第 135 位 (配列番号 11) が P r o 領域をコードし、第 136 位～第 315 位 (配列番号 12) が R I N G 領域をコードする。

【0072】

P r o 領域は、あるタンパク質のアミノ酸配列と配列番号 7 のアミノ酸配列を最適な状態 (アミノ酸の一致が最大となる状態) にアラインメントしたときに、配列番号 7 の第 1 位～第 45 位の領域と一致する、当該タンパク質の領域であり得る。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 9 のアミノ酸配列からなる。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 11 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列により、または、それを含むヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 11 のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施態様では、P r o 領域は、配列番号 11 のヌクレオチド配列によりコードされる。

【0073】

R I N G 領域は、あるタンパク質のアミノ酸配列と配列番号 7 のアミノ酸配列を最適な状態にアラインメントしたときに、配列番号 7 の第 46 位～第 105 位の領域と一致する、当該タンパク質の領域であり得る。ある実施態様では、R I N G 領域は、配列番号 10 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。ある実施態様では、R I N G 領域は、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む

。ある実施態様では、RING領域は、配列番号10のアミノ酸配列からなる。ある実施態様では、RING領域は、配列番号12のヌクレオチド配列と、少なくとも90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列により、または、それを含むヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施態様では、RING領域は、配列番号12のヌクレオチド配列によりコードされる。ある実施態様では、RING領域は、配列番号12のヌクレオチド配列によりコードされる。

【0074】

本開示において、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性とは、核酸またはタンパク質間の配列の類似の程度を意味し、比較対象の配列の領域にわたって最適な状態（ヌクレオチドまたはアミノ酸の一致が最大となる状態）にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。配列同一性の数値（%）は両方の配列に存在する同一のヌクレオチドまたはアミノ酸を決定して、適合部位の数を決定し、次いでこの適合部位の数を比較対象の配列領域内のヌクレオチドまたはアミノ酸の総数で割り、得られた数値に100をかけることにより算出される。最適なアラインメントおよび配列同一性を得るためのアルゴリズムとしては、当業者が通常利用可能な種々のアルゴリズム（例えば、BLASTアルゴリズム、FASTAアルゴリズムなど）が挙げられる。配列同一性は、例えばBLAST、FASTAなどの配列解析ソフトウェアを用いて決定され得る。

【0075】

ある実施態様では、PKCを活性化する条件は、活性化型PKCを細胞に発現させることである。「活性化型PKC」は、恒常的にキナーゼ活性を示すPKC変異体を意味する。活性化型PKCは、N末端の調節領域を欠くPKCであり得る（Molecular and Cellular Biology 19(2):1313-24, 1999）。活性化型PKCは、さらに、キナーゼ活性を増強する変異を有してもよい（PNAS 115(24):E5497-E5505, 2018）。活性化型PKCの例として、PKC δ -CA（配列番号1）およびPKC α CA-M489V（配列番号2）が挙げられる。

【0076】

PKC変異体のキナーゼ活性は、当分野で知られている各種の方法により測定し得る。例えば、培養細胞にPKC変異体を過剰発現させ、リン酸化型基質特異的抗体を用いて基質のリン酸化レベルをウェスタンブロットで検出する方法（例えば、THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 279, No. 27, pp. 27986-27993, 2004）、ELISA法（例えば、Cell Death and Differentiation (2015) 22, 2078-2086）、インビトロで32P-ガンマーATPを用いて基質へのリン酸基の取り込みを評価する方法（例えば、THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 262, No. 20, pp. 9569-9573, 1987）などを使用できる。PKC kinase activity kit（Enzo Life Science, #ADI-EKS-420A）などの、キナーゼ活性を測定する各種キットを使用してもよい。

【0077】

ある実施態様では、PKC変異体を発現する細胞をPKC阻害剤の存在下および非存在下で培養し、リン酸化タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる免疫学的手法によりリン酸化タンパク質の量を測定し、PKC阻害剤によりリン酸化タンパク質の量が減少する場合に、PKC変異体が活性化型PKCであると決定し得る。免疫学的手法としては、フローサイトメトリー解析、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、酵素免疫固相法（ELISA法）、ウェスタンブロットティング、免疫組織染色などを例示できる。

【0078】

例えば、活性化型PKCをコードする核酸を含む発現コンストラクトを用いてもよく、作動可能に連結されている、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、IRESまたは2Aペプチド配列、および活性化型PKCをコードする核酸を含む発現コンストラクトを使用して、ウイルス粒子の産生に必要なタンパク質と活性化型PKCを細胞に発現させてもよい。ある実施態様では、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、IRESまたは2Aペプチド配列、および活性化型PKCをコードする核酸は、この順序で

作動可能に連結されている。

【0079】

IRESを利用して1つの発現コンストラクトからウイルス粒子の産生に必要なタンパク質と活性化型PKCを発現させることにより、ウイルス粒子の産生に必要なタンパク質を効率よく製造することができる。IRESは、真核生物のリボソームをmRNAヘリクルートすることができるRNA領域であり、タンパク質合成のプロセスの一部として、キャップ非依存的な翻訳の開始を可能にする。多くのIRESが、ウイルスゲノムおよび真核ゲノムで同定されており、合成IRESも開発されている。

【0080】

例えば、IRESは、エンテロウイルス（例えばヒトパピローマウイルス1、ヒトコクサッキーウイルスB）；ライノウイルス（例えばヒトライノウイルス）；ヘパトウイルス（A型肝炎ウイルス）；カーディオウイルス（脳心筋炎ウイルスECMVおよびタイラー脳脊髓炎ウイルス）；アフトウイルス（口蹄疫ウイルス、ウマ鼻炎Aウイルス、ウマ鼻炎Bウイルス）；ペスティウイルス（例えばウシウイルス性下痢ウイルスおよびブタコレラウイルス）；ヘパシウイルス（例えばC型肝炎ウイルス）およびGBウイルスBを含む種々のウイルスに由来するものであり得る。あるいは、IRESは、レトロウイルス科のウイルス、例えば、レンチウイルスファミリーのメンバー（例えば、シミアン免疫不全ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス1）；BLV-HTLVレトロウイルス（例えば、ヒトTーリンホトロピックウイルス1型）；および哺乳動物C型レトロウイルスファミリー（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス、トリ細網内皮症ウイルス、Maus 白血病ウイルス（envRNA）、ラウス肉腫ウイルス）に由来するものであり得る。真核生物のmRNAに由来するIRESとしては、例えば、BiP、ショウジョウバエのアンテナペディア（エクソンdおよびe）、c-myc、およびアポトーシスのX連結阻害剤（XIAP）遺伝子のIRESが挙げられる。また、様々な合成IRESが開発されており、例えば、De Gregorio et al. (1999) EMBO J. 75:4865-74; Owens et al. (2001) PNAS 4:1471-6; および Venkatesan et al. (2001) Molecular and Cellular Biology 21:2826-37を参照し得る。当分野で知られているさらなるIRESについては、例えば ranguel.inserm.fr/IRESdatabase を参照し得る。ある実施態様では、脳心筋炎ウイルスECMV由来のIRESを用いる。

【0081】

2Aペプチド配列は、タンパク質の翻訳中にリボソームスキッピングを誘発する。タンパク質のアミノ酸配列中に2Aペプチド配列が存在すると、当該タンパク質は2Aペプチド配列のC末端で切断された2つのポリペプチドとして翻訳される。2Aペプチドとしては、例えば、Kim, J. H., et al., PLoS One. 6(4), e18556 (2011) に記載されるペプチドが挙げられ、例えば、P2Aペプチド（配列番号3：(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP）、T2Aペプチド（配列番号4：(GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP）、E2Aペプチド（配列番号5：(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNP GP）およびF2Aペプチド（配列番号6：(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP）などが知られている（各配列中、N末端のGSGは存在してもしなくてもよい）。

【0082】

PKCを活性化する際に、さらにカルモジュリン阻害剤を培地に添加してもよい。カルモジュリンは、カルシウムセンサーとして機能する酸性タンパク質であり、細胞内カルシウムレベルを調節する。カルモジュリン阻害剤として、式(IV)

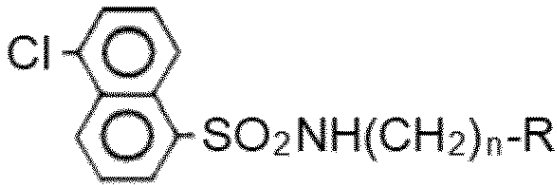
10

20

30

40

【化 5】



{ 式中、

n は 1 ～ 8 の整数であり、

R は、C 1 - 6 アルキル、C 2 - 6 アルケニル、C 2 - 6 アルキニル、C 1 - 6 アルコキシ、C 6 - 1 4 アリール、アミノ、ヒドロキシ、COOH または COOR' であり、ここで R' は C 1 - 6 アルキルである}

の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物を使用し得る。

【 0 0 8 3 】

ある実施態様では、式 (I V) 中、

n は 4 ～ 6 の整数であり、

R は、C 1 - 6 アルキル、C 6 - 1 4 アリールまたはアミノである。

【 0 0 8 4 】

ある実施態様では、式 (I V) 中、

n は 4 または 6 の整数であり、

R は、メチル、フェニルまたはアミノである。

【 0 0 8 5 】

式 (I V) の化合物には、例えば、SC-9、SC-10、W-7 が含まれる。式 (I V) の化合物は、例えば、0.5 ～ 100 μg / ml、1 ～ 50 μg / ml または 2 ～ 10 μg / ml の濃度で使用し得る。

【 0 0 8 6 】

公知のカルモジュリン阻害剤、例えば、W-7、カルミダゾリウム、ビスインドリルマレイミド I、トリフルオペラジン、ルテニウムレッド、オフィオボリン A、CaMK 阻害剤 II (290-309)、E6 ベルバミン、マストパラン、コンパウンド 48 / 80、フェノキシベンザミン、W-7 アイソマー、ポリステスマストパラン、A-7、フルフェナジン-N-2-クロロエタン、W-13、W-13 アイソマー、CGS 9343 B、W-5 アイソマー、W-12、N-(5-アミノペンチル)-5-クロロ-2-ナフタレンスルホンアミド、W-5 を、当分野で知られている方法、例えば製造業者の推奨する方法により、適宜使用してもよい。2 種以上のカルモジュリン阻害剤を併用してもよい。

【 0 0 8 7 】

PKC を活性化する際に、さらにヒストンデアセチラーゼ阻害剤を培地に添加してもよい。ヒストンデアセチラーゼは、クロマチン構造において主要な構成因子であるヒストンを脱アセチル化する酵素であり、遺伝子の転写制御において重要な役割を果たしている。公知のヒストンデアセチラーゼ阻害剤、例えば、トリコスタチン A、M344、酪酸塩、フェニル酪酸塩、アピシジン、バルプロ酸、BML-210、デプデシン、ロミデプシン (FK-228)、HCT キシン、オキサムフラチン、スクリプタイド、スプリトマイシン、スベロイルビス-ヒドロキサム酸、ポリノスタット、ダシノスタット (LAQ-824)、パノビノスタット (LBH-589)、ベリノスタット (PXD-101)、酢酸フェニル、IF2357、FK-228、エンチノスタット (MS-275)、モセチノスタット (MGCD0103) またはタセジナリン (CI994)、好ましくは、酪酸ナトリウム、バルプロ酸、トリコスタチン A、ポリノスタット、アピシジン、エンチノスタットまたはタセジナリン、特に好ましくは酪酸ナトリウムを、当分野で周知の方法、例えば、製造業者の推奨する方法に従って、適宜使用し得る。例えば、酪酸ナトリウムは、0.1 ～ 10 mM、0.5 ～ 5 mM または 1 ～ 3 mM の濃度で使用し得る。2 種以上のヒストンデアセチラーゼ阻害剤を併用してもよい。

10

20

30

40

50

【0088】

ある態様では、本開示の方法に使用し得るキットも提供される。キットに含まれる各構成要素は、各々別個に、あるいは可能であれば混合した状態で、水または適当な緩衝液中に溶解されるか、または凍結乾燥された状態で、適切な容器中に収容されて提供され得る。好適な容器には、ボトル、バイアル、試験管、チューブ、プレート等が含まれる。容器は、ガラス、プラスチック、金属などの多様な材料から形成されていてよい。容器は、ラベルを有していてもよい。キットは、さらに、使用のための説明を含む文書（例えば、書面または記憶媒体等）等の、商業的見地および使用者の見地から望ましいその他の構成要素を含んでもよい。

【0089】

ある態様では、PKC活性化剤または活性化型PKCをコードする核酸を含む、ウイルスペクターの産生を増強するための組成物も提供される。当該組成物は、PKC活性化剤または活性化型PKCをコードする核酸を適当な賦形剤と共に含み、本開示の方法に準じて使用し得る。

【0090】

例えば、下記の実施態様が提供される。

【1】ウイルスペクターの製造方法であって、ウイルスペクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸およびウイルスペクターにより送達しようとする核酸を含む細胞を、プロテインキナーゼC（PKC）を活性化する条件下で培養することを含み、

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF- κ BおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、方法。

【2】ウイルスペクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸および／またはウイルスペクターにより送達しようとする核酸を細胞に導入する工程を含む、第1項に記載の方法。

【3】ウイルスペクターを回収する工程を含む、第1項または第2項に記載の方法。

【4】ウイルスペクターが、レトロウイルスペクター、レンチウイルスペクター、アデノウイルスペクターまたはアデノ随伴ウイルスペクターである、第1項～第3項のいずれかに記載の方法。

【5】ウイルスペクターがレトロウイルスペクターである、第1項～第4項のいずれかに記載の方法。

【6】ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、Gag、Polおよびエンベロープタンパク質から選択される少なくとも1つのタンパク質をコードする、第5項に記載の方法。

【7】ウイルスペクターがレンチウイルスペクターである、第1項～第4項のいずれかに記載の方法。

【8】ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、Gag、Pol、Tat、Revおよびエンベロープタンパク質から選択される少なくとも1つのタンパク質をコードする、第7項に記載の方法。

【9】ウイルスペクターがアデノウイルスペクターである、第1項～第4項のいずれかに記載の方法。

【10】ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、アデノウイルスゲノムのE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、L1、L2、L3、L4およびL5領域にコードされるタンパク質から選択される少なくとも1つのタンパク質またはVA RNAをコードする、第9項に記載の方法。

【0091】

【11】ウイルスペクターがアデノ随伴ウイルスペクターである、第1項～第4項のいずれかに記載の方法。

【12】ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、アデノウイルスゲノムのE1A、E1B、E2AおよびE4領域、並びに、アデノ随伴ウイルスゲノムのRepおよびCap領域にコードされるタンパク質から選択される少なくとも1つのタンパク質またはVA RNAをコードする、第11項に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔13〕ウイルス粒子の産生に必要な全部の核酸が、当該プロモーターに作動可能に連結している、第1項～第12項のいずれかに記載の方法。

〔14〕ウイルスベクターにより送達しようとする核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結している、第1項～第13項のいずれかに記載の方法。

〔15〕プロモーターが、SP1、CEBP、AP1、NF-κBおよびYY1の結合部位を含む、第1項～第14項のいずれかに記載の方法。

〔16〕プロモーターが、さらにCREBの結合部位を含む、第1項～第15項のいずれかに記載の方法。

〔17〕プロモーターが、CMVプロモーター、CAGプロモーターまたはEF1プロモーターである、第1項～第16項のいずれかに記載の方法。

〔18〕プロモーターが、CMVプロモーターまたはEF1プロモーターである、第1項～第17項のいずれかに記載の方法。

〔19〕プロモーターがCMVプロモーターである、第1項～第18項のいずれかに記載の方法。

〔20〕プロモーターがウイルス由来のプロモーターである、第1項～第14項のいずれかに記載の方法。

〔0092〕

〔21〕ウイルス由来のプロモーターが、アデノウイルスのE1Aプロモーター、E1Bプロモーター、E2Aプロモーター、E2Bプロモーター、E4プロモーター、主要後期プロモーターもしくはIXプロモーター、アデノ随伴ウイルスのp5プロモーター、p19プロモーターもしくはp40プロモーターである、第20項に記載の方法。

〔22〕PKC活性化剤の存在下で前記細胞を培養することによりPKCを活性化する、第1項～第21項のいずれかに記載の方法。

〔23〕PKC活性化剤が、式(I)、式(II)または式(III)の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第22項に記載の方法。

〔24〕PKC活性化剤が、式(I)の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第22項または第23項に記載の方法。

〔25〕R1が、Hまたは-OC(O)R3であり、R2が、C6-12アルキルまたはC6-12アルケニルであり、R3が、C1-6アルキルまたはC6-14アリールである、第24項に記載の方法。

〔26〕R1が、Hまたは-OC(O)R3であり、R2が、ノニルまたは1,3-ノナジエニルであり、R3が、メチルまたはフェニルである、第24項または第25項に記載の方法。

〔27〕PKC活性化剤が、式(II)の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第22項または第23項に記載の方法。

〔28〕R4が、Hまたは-OC(O)R6であり、R5が、C1-6アルキルまたはC2-6アルケニルであり、R6が、C1-18アルキルである、第27項に記載の方法。

〔29〕R4が、Hまたは-OC(O)R6であり、R5が、メチル、プロピル、sec-ブチルまたはブテニルであり、R6が、プロピル、ノニルまたはトリデシルである、第25項または第28項に記載の方法。

〔30〕PKC活性化剤が、式(III)の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第22項または第23項に記載の方法。

〔0093〕

〔31〕R7が、Hまたは-C(O)R9であり、R8が、Hまたは-C(O)R9であり、R9が、C1-18アルキルまたはC2-18アルケニルである、第30項に記載の方法。

〔32〕R7が、Hまたは-C(O)R9であり、R8が、Hまたは-C(O)R9であり、R9が、ペンタデシルまたはブテニルである、第30項または第31項に記載の方法。

。

10

20

30

40

50

〔33〕PKC 活性化剤が、化合物 X、化合物 # 1 ~ # 7、TPA、プロストラチン、(ー)ーインドラクタム V、ホルボール 12, 13-ジブチラート、インゲノール 3-アンゲラートおよび (2S, 5S) - (E, E) - 8 - (5 - (4 - (トリフルオロメチル)フェニル) - 2, 4-ペンタジエノイルアミノ) ベンゾラクタムから選択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第 22 項に記載の方法。

〔34〕PKC 活性化剤が、化合物 X および化合物 # 1 ~ # 7 から選択される化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第 33 項に記載の方法。

〔35〕PKC 活性化剤が、化合物 X またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第 31 項または第 34 項に記載の方法。

〔36〕前記細胞が、Pro 領域または RING 領域を含むペプチドをコードする核酸をさらに含む、第 1 項 ~ 第 35 項のいずれかに記載の方法。

〔37〕ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、Pro 領域または RING 領域を含むペプチドをコードする核酸と連結されている、第 1 項 ~ 第 36 項のいずれかに記載の方法。

〔38〕前記細胞が RING 領域を含むペプチドをコードする核酸をさらに含む、第 36 項または第 37 項に記載の方法。

〔39〕RING 領域が、

C-X2-C-X9-39-C-X1-3-H-X2-3-C-X2-C-X4-48-C-X2-C

{式中、C はシステイン残基であり、H はヒスチジン残基であり、X は任意のアミノ酸残基である。}

のアミノ酸配列を含む、第 38 項に記載の方法。

〔40〕RING 領域が、TRIM13、LONRF3、TRIM47、RNF135、TRIM10、TRIM72、TRIM60、TRIM39、TRIM4、TRIM43B、TRIM43、TRIM25、TRIM26、TRIM31、HTLF、BRCA1、TRIM50、TRIM21、SSA1、TRIM5d、TRIM22、KIAA0182、TRIM65、RAG1、BFAR、Pex10、RNF8、RING2、COPI、TRIM2、TRIM3、SH3RF2、PML または TRIM56 の RING 領域である、第 38 項に記載の方法。

〔0094〕

〔41〕RING 領域が、PML、TRIM3、TRIM56、COPI、Pex10、BRCA1 または HTLF の RING 領域である、第 38 項 ~ 第 40 項のいずれかに記載の方法。

〔42〕RING 領域が PML の RING 領域である、第 38 項 ~ 第 41 項のいずれかに記載の方法。

〔43〕RING 領域が、配列番号 10 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、第 38 項 ~ 第 42 項のいずれかに記載の方法。

〔44〕RING 領域が、配列番号 12 のヌクレオチド配列と、少なくとも 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされる、第 38 項 ~ 第 43 項のいずれかに記載の方法。

〔45〕前記細胞が Pro 領域を含むペプチドをコードする核酸をさらに含む、第 36 項または第 37 項に記載の方法。

〔46〕Pro 領域が、PML、ARHGEF1、アグリカン-1、RALGDS、DGKKK、SPATA21、ラプフィリン-3A、TEAD3、SPPL2B または FLJ43093 の Pro 領域である、第 45 項に記載の方法。

〔47〕Pro 領域が PML の Pro 領域である、第 45 項または第 46 項に記載の方法。

〔48〕Pro 領域が、配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、第 45 項 ~ 第 47 項のいずれかに記載の方法。

〔49〕Pro 領域を含むペプチドをコードする核酸が、配列番号 11 のヌクレオチド配列と、少なくとも 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなる、第 45 項 ~ 第

10

20

30

40

50

48項のいずれかに記載の方法。

〔50〕前記細胞がPro領域およびRING領域を含むペプチドをコードする核酸をさらに含む、第36項または第37項に記載の方法。

〔0095〕

〔51〕前記細胞が、作動可能に連結されている、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸を含む発現コンストラクトを含む、第36項～第50項のいずれかに記載の方法。

〔52〕プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸が、この順序で作動可能に連結されている、第51項に記載の方法。

〔53〕発現コンストラクトがさらに内部リボソーム進入部位または2Aペプチド配列をコードする核酸を含む、第51項または第52項に記載の方法。

〔54〕プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、内部リボソーム進入部位または2Aペプチド配列、および、Pro領域またはRING領域を含むペプチドをコードする核酸が、この順序で作動可能に連結されている、第51項～第53項のいずれかに記載の方法。

〔55〕活性化型PKCを前記細胞に発現させることによりPKCを活性化する、第1項～第21項のいずれかに記載の方法。

〔56〕前記細胞が、活性化型PKCをコードする核酸を含む発現コンストラクトを含む、第55項に記載の方法。

〔57〕前記細胞が、作動可能に連結されている、プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、内部リボソーム進入部位または2Aペプチド配列、および、活性化型PKCをコードする核酸を含む発現コンストラクトを含む、第55項に記載の方法。

〔58〕プロモーター、ウイルス粒子の産生に必要な核酸、内部リボソーム進入部位または2Aペプチド配列、および、活性化型PKCをコードする核酸が、この順序で作動可能に連結されている、第57項に記載の方法。

〔59〕活性化型PKCが、PKC δ -CAまたはPKC α CA-M489Vである、第55項～第58項のいずれかに記載の方法。

〔60〕カルモジュリン阻害剤の存在下で前記細胞を培養する、第1項～第59項のいずれかに記載の方法。

〔0096〕

〔61〕カルモジュリン阻害剤が、式(IV)の化合物またはそのエステル、塩もしくは溶媒和物である、第60項に記載の方法。

〔62〕カルモジュリン阻害剤が、SC-9、SC-10またはW-7である、第60項または第61項に記載の方法。

〔63〕カルモジュリン阻害剤がSC-10である、第60項～第62項のいずれかに記載の方法。

〔64〕ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の存在下で前記細胞を培養する、第1項～第63項のいずれかに記載の方法。

〔65〕ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、酪酸ナトリウム、バルプロ酸、トリコスタチンA、ポリノスタット、アピシジン、エンチノスタットまたはタセジナリンである、第64項に記載の方法。

〔66〕ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が酪酸ナトリウムである、第64項または第65項に記載の方法。

〔67〕細胞がパッケージング細胞である、第1項～第66項のいずれかに記載の方法。

〔68〕細胞がPlat-E細胞またはLentix293T細胞である、第1項～第67項のいずれかに記載の方法。

〔69〕プロテインキナーゼC(PKC)活性化剤または活性化型PKCをコードする核酸と、ウイルスベクターのウイルス粒子の産生に必要な核酸とを含む、ウイルスベクターを製造するためのキットであって、

10

20

30

40

50

ウイルス粒子の産生に必要な核酸が、SP1、CEBP、AP1、NF- κ BおよびYY1から選択される少なくとも1つの転写因子の結合部位を含むプロモーターに作動可能に連結しているものである、キット。

【70】PKC活性化剤または活性化型PKCをコードする核酸を含む、ウイルスベクターの産生を増強するための組成物。

【0097】

本明細書で引用するすべての文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

以下、実施例にて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されない。また、上記の説明は、すべて非限定的なものであり、本発明は添付の特許請求の範囲において定義され、その技術的思想を逸脱しない範囲で種々の変更が可能である。

【実施例】

【0098】

コンストラクト

CMVプロモーターによるルシフェラーゼ活性測定用には、pRL-CMV (Promega, #E2261) を使用した。CAGプロモーターはpCAGGSベクター、EF1プロモーターはpEFBOSベクター由来のプロモーターを使用し、pRL-CMVのCMV領域と載せ換えたコンストラクトを作製した。マウスIgG抗体（重鎖、軽鎖）、ヒトプロインスリンおよびヒトレプチン発現コンストラクトはpcDNAベクターのCMVプロモーターの下流にこれらのcDNAを挿入したコンストラクトを作製した。これらのプロモーターにおける転写因子の結合部位を図42に示す。

【0099】

細胞

HEK293A細胞（ヒト胎児腎細胞）は10% FCS、1% ペニシリン／ストレptomycinを含むDMEM培地を用いて37℃、5% CO₂、湿度90%の条件下で培養した。マウスIgG抗体、ヒトプロインスリン、および、レプチンを恒常的に発現するHEK293A細胞株は、CMVプロモーターの下流にこれらのcDNAを挿入したコンストラクトをトランスフェクションした後、長期培養によって単一クローンを形成させた。その後、各クローンから目的タンパク質の発現をELISA法を用いて確認し、細胞株を樹立した。これらの細胞株も同様の条件で培養した。

【0100】

トランスフェクション

HEK293A細胞を24ウェルプレートに1.0×10⁵細胞／ウェルとなるように播種し、24時間培養した。特記しない限り、1ウェルあたり50ngの発現コンストラクト、1μl-Plus Reagent、1μl-Lipofectamine LTXを50μlのOpti-MEMで調整し、細胞を培養した24ウェルプレートの各ウェルに添加し、37℃で24時間培養することでトランスフェクションを行った。

【0101】

ルシフェラーゼアッセイ

トランスフェクションから24時間後にウェルから培地を除去し、各濃度の化合物を添加した培地を加え、さらに24時間培養した。その後、培地を除去し、500μl PBSで洗浄した後、50μlの1x Glo Lysis buffer (Promega #E2661) で細胞を溶解した。この内、5μlをルシフェラーゼ活性測定に、5μlをタンパク質濃度測定に用いた。ルシフェラーゼ活性はセレンテラジンh (FUJIFILM #035-22991) の発光を検出することでRLucの発現量を定量し、また、タンパク質濃度はBCA法を用いて定量し、各ルシフェラーゼ活性はRLuc／BCA値で算出した。なお、発光検出、BCA測定にはマルチラベルリーダー 2030 ARVOTM X (Perkin Elmer) を用いた。

【0102】

ウェスタンブロット

HEK293A細胞を6ウェルプレートに5.0×10⁵細胞／ウェルとなるように播種し、24時間培養した。その後、培地交換によって各化合物群を処理し、3時間後に

10

20

30

40

50

細胞を2 mL PBSで洗浄したのち、200 μ L RIPAバッファーを用いて溶解した。溶解した細胞を超音波処理を用いて破碎し、遠心(20,000 g、15分、4℃)し、上清を回収し、タンパク質濃度を定量した。それらの溶解液を等量に合わせた後、1×SDSサンプルバッファーを加え、95℃で3分間熱処理した物をSDS-PAGEのサンプルとして用いた(1レーンあたり5 μ gのタンパク質)。SDS-PAGEのゲルはスーパーセップTMエース5-20%, 17ウェル(Wako)のゲルを用い、ゲル1枚あたり

500 V、40 mA、35分間の条件下で電気泳動を行った。その後、ブロッキング装置(ATTO)を用いてゲル1枚あたり500 V、100 mA、60分間の条件でPVDFメンブレンに転写した。転写後のメンブレンをブロッキング溶液(3% BSA/TBST)を用いて室温で30分間浸透し、一次抗体の反応は、ブロッキング溶液に一次抗体(Phospho-PKC Substrate Motif [(R/K)XpSX(R/K)] MultiMabTM Rabbit mAb mix, Cell Signaling Technology #6967)を3000倍希釈の条件下、4℃で一晩で行った。その後、TBSTを用いてメンブレンを3回洗浄し、二次抗体反応を、TBST中にHRP標識二次抗体(Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey, Cytiva #NA934-1ML)を5000倍希釈の条件下、室温で3時間行った。その後、TBSTを用いてメンブレンを3回洗浄し、Chemi-Lumi One (nacalai #07880-70)とImageQuant LAS4010を用いて検出を行った。

10

【0103】

ELISA法

20

各分泌タンパク質発現細胞を24ウェルプレートに 1.0×10^4 細胞/ウェルとなるように播種し、24時間培養した。その後、1 mL/ウェルの条件で培地交換によって各化合物群を処理し、24時間ごとに培地を120 μ L回収、冷蔵保存した。その後、各ELISAキット(マウスIgG, Betyl Lab #E99-131, ヒトプロインスリン: Mercodia #10-1118-01, ヒトレプチン: Proteintech #KE00095)を用いて培地中の目的タンパク質の濃度を測定した。測定にはマルチラベルリーダー2030 ARVOTM X (Perkin Elmer)を用いた。

【0104】

化合物

下表の化合物を使用した。

30

40

50

【表 1】

PKC阻害剤 (R o - 3 1 8 4 2 5)	Calbiochem #557514
PKC活性化剤 # 1 (TPA)	Santa Cruz #sc-3576
PKC活性化剤 # 2 (インゲノール 3 - アンゲラート)	Santa Cruz #sc-364214
PKC活性化剤 # 3 (ホルボール 1 2, 1 3 - ジブチラート)	Santa Cruz #sc-202285
PKC活性化剤 # 4 (プロストラチン)	Santa Cruz #sc-203422
PKC活性化剤 # 5 ((2 S, 5 S) - (E, E) - 8 - (5 - (4 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 2 , 4 - ペンタジエノイルアミノ) ベンゾラクタム)	Calbiochem #565740
PKC活性化剤 # 6 ((-) - インドラクタム V)	Santa Cruz #sc-202182
化合物 SC (SC - 1 0)	Santa Cruz #sc-202335
酪酸ナトリウム	富士フィルム和光純薬 # 193-01522
バルプロ酸	Santa Cruz, sc-202378
TSA	和光純薬, 203-17561
SAHA	Santa Cruz, sc-220139
アピシジン	Sigma-Aldrich, A8851
MS - 2 7 5	Cayman, 13284
CI - 9 9 4	東京化成工業, A2501

10

20

【 0 1 0 5 】

試験 1 : CMV プロモーターの転写活性を増強する化合物の同定

HEK 293 T 細胞に CMV プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを 24 - ウェルプレートの 1 ウェルあたり 20 ng でトランスフェクションし、24 時間後に 30 μ g / ml の植物エキスを含んだ培地に培地交換した。その後、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを用いて、CMV プロモーター活性を測定した。本研究では約 1000 種類の植物エキスをを用いた。独自の植物 (生薬原料) エキスライブラリーから、CMV プロモーターの転写活性を劇的に増強する 5 種類の植物エキスおよびその活性を担う化合物 (下記の 8 種類) を同定した。

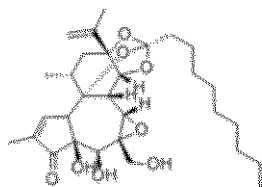
30

40

50

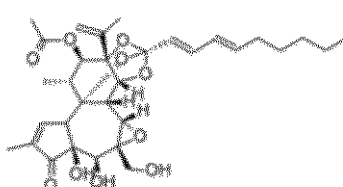
【化 6】

化合物X：黄芩花由来

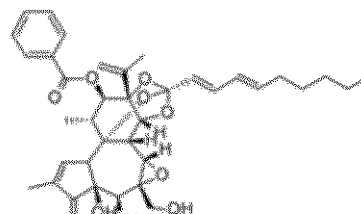
 $C_{30}H_{44}O_8$

シンプレキシ

化合物#1：芫花由来

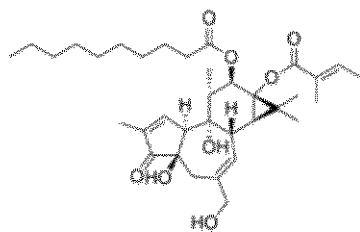
 $C_{32}H_{42}O_{10}$

化合物#2：芫花由来

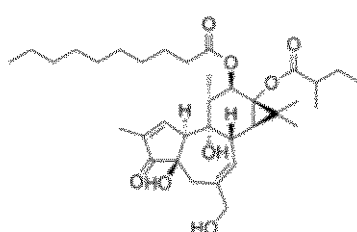
 $C_{37}H_{44}O_{10}$

10

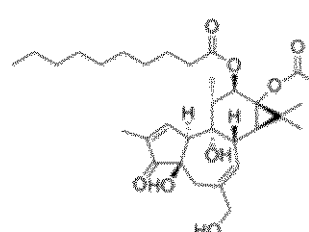
化合物#3：巴豆由来

 $C_{35}H_{52}O_8$

化合物#4：巴豆由来

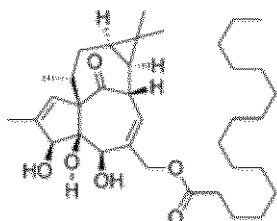
 $C_{35}H_{54}O_8$

化合物#5：巴豆由来

 $C_{32}H_{48}O_8$

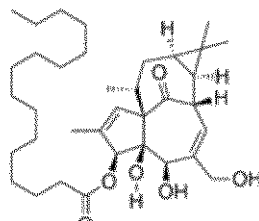
20

化合物#6：千金子由来

 $C_{36}H_{58}O_6$

インゲノール 20-パルミテート

化合物#7：千金子由来

 $C_{36}H_{58}O_6$

インゲノール 3-パルミテート

30

【0106】

試験 2：化合物の活性はプロテインキナーゼ C (PKC) の阻害剤により阻害される

pRL-CMV を恒常的に発現する HEK293A 細胞を、図 1 に示す濃度で化合物 X または化合物 #1 ~ #7 を含む培地中、PKC 阻害剤の存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 1 に示す。CMV プロモーターの転写活性は、化合物の存在下で増強され、その増強は PKC 阻害剤により阻害された。

40

【0107】

pRL-CMV を恒常的に発現する HEK293A 細胞を、化合物 X (100 ng/ml) を添加した培地中で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。結果を図 2 に示す。化合物 X による CMV プロモーターの転写活性増強は、化合物 X 添加の 1 時間後から観察された。

【0108】

試験 3：CMV プロモーターの活性は既知の PKC 活性化剤によっても増強される

pRL-CMV を恒常的に発現する HEK293A 細胞を、図 3 に示す濃度で化合物 X または PKC 活性化剤 #1 ~ #4 を含む培地中、PKC 阻害剤の存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 3 に示す。CMV プロモーター

50

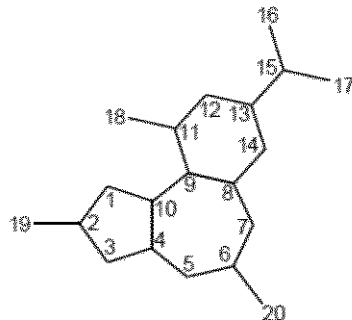
一の転写活性は、既知のPKC活性化剤によっても増強された。

【0109】

化合物X、化合物#1～#7およびPKC活性化剤#1～#4は、テルペンに属し、ジテルペンと総称される化合物である。骨格により以下の3種類に分類される。

【化7】

ダフナン骨格

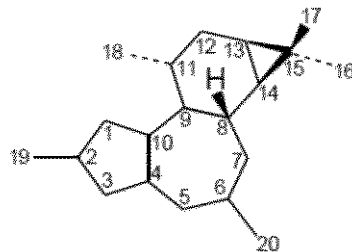


化合物X

化合物#1

化合物#2

チグリアン骨格



化合物#3

化合物#4

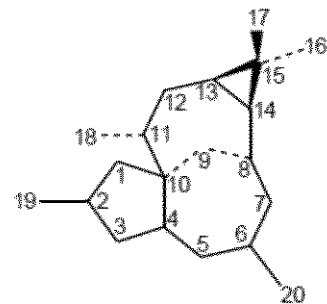
化合物#5

PKC活性化剤#1(TPA)

PKC活性化剤#3

PKC活性化剤#4

インゲナン骨格



PKC活性化剤#2

化合物#6

化合物#7

10

20

【0110】

試験4：CMVプロモーターの活性はジテルペン以外のPKC活性化剤によっても増強される

pRL-CMVを恒常的に発現するHEK293A細胞を、図4に示す濃度で化合物XまたはPKC活性化剤#5～#6を含む培地中、PKC阻害剤(Ro-318425)の存在下または非存在下で24時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図4に示す。CMVプロモーターの転写活性は、ジテルペン以外のPKC活性化剤によっても増強された。

30

【0111】

試験5：化合物はCAGプロモーターおよびEF1プロモーターの活性も増強する

HEK293A細胞に、pCAG-Rluc、もしくはpEF1-Rlucをトランスフェクションし、図5～7に示す濃度で化合物X、化合物#1～#7またはPKC活性化剤#1～#6を含む培地中で培養し、pCAGGSベクター由来のCAGプロモーターおよびpEFBOSベクター由来のEF1プロモーターの転写活性を測定した。結果を図5～7に示す。CAGプロモーターおよびEF1プロモーターの転写活性は、化合物またはPKC活性化剤の存在下で増強されたが、その増強はPKC阻害剤により阻害された。これらのプロモーターは、SP1、CEBP、AP1、NF-κB、YY1などの転写因子の結合部位を有する。従って、これらの化合物およびPKC活性化剤は、共通の転写因子を介してこれらのプロモーターを活性化することが示唆される。

40

【0112】

試験6：化合物群はPKCを活性化する

HEK293A細胞を、試験2～5と同様の濃度で化合物X、化合物#1～#7、PKC活性化剤#1～#6、化合物SCまたは酪酸ナトリウム(SB)を含む培地中、PKC阻害剤(3 μM)の存在下または非存在下で3時間培養した。細胞を溶解し、PKCによってリン酸化されたタンパク質を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロットを行

50

った。結果を図 8 に示す。化合物 X、化合物 # 1 ~ # 7 および P K C 活性化剤 # 1 ~ # 6 は、P K C を活性化した。化合物 S C および酪酸ナトリウムによる P K C 活性化は確認されなかった。

【 0 1 1 3 】

試験 7：新たな C M V プロモーター活性化剤の同定

p R L - C M V を恒常的に発現する H E K 2 9 3 A 細胞を、図 9 に示す濃度で化合物 X および / または化合物 S C を含む培地中、P K C 阻害剤の存在下または非存在下で 2 4 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 9 に示す。C M V プロモーターの転写活性は、化合物 S C によっても増強されたが、この増強は P K C 阻害剤により阻害されなかった。化合物 X と化合物 S C を併用すると転写活性はさらに増強された。

10

【 0 1 1 4 】

試験 8：P K C 活性化剤、化合物 S C およびヒストンデアセチラーゼ阻害剤の併用により C M V プロモーターの転写活性はさらに増強される

p R L - C M V を恒常的に発現する H E K 2 9 3 A 細胞を、図 1 0 に示す濃度で化合物 X、化合物 S C および / または酪酸ナトリウム (S B) を含む培地中で 2 4 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 1 0 に示す。C M V プロモーターの転写活性は、化合物 X、化合物 S C および酪酸ナトリウムを併用すると最も高かった。同様の結果が化合物 # 1 ~ # 7 および P K C 活性化剤 # 1 ~ # 6 でも得られた (図 1 1 および 1 2) 。酪酸ナトリウムの代わりにヒストンデアセチラーゼ阻害剤のバルプロ酸、トリコスタチン A (T S A) 、ポリノスタット (S A H A) 、アピシジン、エンチノスタット (M S - 2 7 5) またはタセジナリン (C I 9 9 4) を用いても、同様の結果が得られた (図 1 3) 。

20

【 0 1 1 5 】

試験 9：P K C 活性化剤によるタンパク質生産の増加

p c D N A ベクターの C M V プロモーターの下流にマウス I g G 抗体重鎖、マウス I g G 抗体軽鎖、ヒトプロインスリンまたはヒトレプチンの c D N A を挿入し、発現コンストラクトを作製した。マウス I g G 抗体およびヒトレプチンのコンストラクトをそれぞれ H E K 2 9 3 A 細胞にトランスフェクションした。ヒトプロインスリンのコンストラクトを H E K 2 9 3 A 細胞にトランスフェクションし、ヒトプロインスリンを恒常的に発現する H E K 2 9 3 A 細胞を作製した。図 1 4 ~ 1 7 に示す濃度で化合物 X、化合物 # 1 ~ # 7、P K C 活性化剤 # 1 ~ # 6 を含む培地中、化合物 S C または化合物 S C + 酪酸ナトリウム (S B) の存在下または非存在下で細胞を 2 4 時間培養し、培地中の各タンパク質の濃度を E L I S A 法により測定した。結果を図 1 4 ~ 1 7 に示す。さらに、化合物 X について、マウス I g G 抗体重鎖および軽鎖、ヒトプロインスリンまたはヒトレプチンを恒常的に発現する H E K 2 9 3 A 細胞を用い、酪酸ナトリウム (S B) の存在下または非存在下で、2 4 時間毎に 4 日間にわたりタンパク質濃度を測定した。結果を図 1 8 に示す。I g G 抗体、プロインスリンおよびレプチンの生産はこれらの化合物により増強された。I g G 抗体およびプロインスリンの生産は、これらの化合物と化合物 S C および酪酸ナトリウムを併用するとさらに増強された。レプチンの生産は、これらの化合物と化合物 S C を併用した場合に最も増強され、S B の存在下では減少したが、いずれの物質も含まない培地で培養した場合よりは多かった。

30

40

【 0 1 1 6 】

試験 1 0：遺伝子工学的 P K C 活性化による C M V プロモーターの活性化

遺伝子工学的に P K C を活性化して、C M V プロモーターの転写活性を調べた。C M V プロモーターの下流に、タンパク質の c D N A (X X X) 、I R E S および活性化型 P K C の c D N A を連結した発現コンストラクトを使用した。活性化型 P K C として、ヒト P K C δ の 3 3 4 - 6 9 5 アミノ酸領域 (P K C δ - C A) 、ヒト P K C α の 3 2 6 - 6 7 2 アミノ酸領域の 4 8 9 番目のメチオニンをバリンに変えた恒常的活性化体 (P K C α C A - M 4 8 9 V) を使用した。また X X X には R l u c、マウス I g G 抗体 (重鎖、軽鎖) 、およびヒトレプチン遺伝子を挿入した。これらのコンストラクトの模式図を図 1 9 に

50

示す。

【0117】

p c D N A ベクターの C M V プロモーターの下流に、R l u c の c D N A、I R E S、および、P K C δ -C A または P K C α C A-M 4 8 9 V の c D N A を挿入し、発現コンストラクトを作製した。P K C を欠く対照のコンストラクトも作製した。これらのコンストラクトを 6.25~200 ng/ウェルの濃度で H E K 2 9 3 A 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 20 に示す。P K C 群では、ルシフェラーゼ活性が高かった。この結果は、C M V プロモーターの転写活性がポジティブフィードバックにより増強されることを示す。I R E S の代わりに 2 A 自己切断ペプチド配列である P 2 A ペプチド配列を用いた発現コンストラクトでも、同様の結果が得られた (図 21)。

10

【0118】

p c D N A ベクターの C M V プロモーターの下流に、マウス I g G 抗体重鎖または軽鎖の c D N A、I R E S、および、P K C δ -C A または P K C α C A-M 4 8 9 V の c D N A を挿入し、発現コンストラクトを作製した。P K C を欠く対照のコンストラクトも作製した。I g G 抗体重鎖および軽鎖のコンストラクトを組み合わせ、100 ng/ウェルの濃度で H E K 2 9 3 A 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養し、培地中の I g G 抗体の濃度を E L I S A 法により 24 時間毎に 4 日間にわたって測定した。結果を図 22 に示す。P K C 群では、I g G 抗体の生産が増強された。この結果は、遺伝子工学的 P K C 活性化により、C M V プロモーターを活性化し、タンパク質生産を増強できることを示す。

20

【0119】

p c D N A ベクターの C M V プロモーターの下流に、ヒトレプチンの c D N A、I R E S、および、P K C α C A-M 4 8 9 V の c D N A を挿入し、発現コンストラクトを作製した。P K C を欠く対照のコンストラクトも作製した。これらのコンストラクトを 100 ng/ウェルの濃度で H E K 2 9 3 A 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養し、培地中のレプチンの濃度を E L I S A 法により 4 日間にわたって測定した。結果を図 23 に示す。P K C 群では、レプチンの生産が増強された。この結果は、遺伝子工学的 P K C 活性化により、C M V プロモーターを活性化し、タンパク質生産を増強できることを示す。

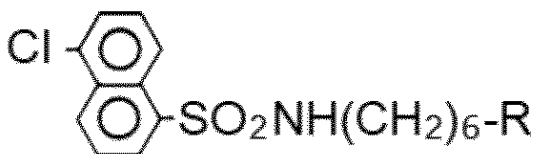
30

【0120】

試験 11：化合物 S C の標的タンパク質の探索

化合物 S C を含む下記の構造を有するナフタレンスルホンアミド誘導体について、化合物 X との相乗効果を調べた。

【表 2】



40

	R
SC-9	
SC	-CH ₃
W-7	-NH ₂

【0121】

p R L-C M V を恒常的に発現する H E K 2 9 3 A 細胞を、いずれかのナフタレンスル

50

ホンアミド誘導体を図 24 に示す濃度で含む培地中、化合物 X (100 ng/ml) の存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 24 に示す。CMV プロモーターの転写活性は、ナフタレンスルホンアミド誘導体のみでは変化しなかったが、ナフタレンスルホンアミド誘導体を化合物 X と併用すると増強された。ナフタレンスルホンアミド誘導体 W-7 はカルモジュリン阻害剤として利用されており、化合物 SC および SC-9 もカルモジュリン阻害剤として作用し、化合物 X との相乗効果を示していると考えられる。

【0122】

試験 12 : PKC 活性化剤および遺伝子工学的 PML 発現により CMV プロモーターの転写活性は増強される

p cDNA ベクターの CMV プロモーターの下流に、R luc の cDNA、IRES、および、野生型 PML または欠損変異型 PML (PML Δ1~10 または PML-Ring) の cDNA を挿入し、発現コンストラクトを作製した (図 25)。野生型 PML および PML Δ1~10 のコンストラクトを HEK293A 細胞にトランスフェクションし、化合物 X の存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 26 に示す。野生型 PML、PML Δ1 および PML Δ6~10 を導入された細胞では、対照 (-) の細胞と比較して、化合物 X 存在下のルシフェラーゼ活性が高かった。この結果は、PML が化合物 X により増強される CMV プロモーターの転写活性をさらに増強し、PML の第 1 位~第 46 位を含む Pro 領域がその活性を担うことを示唆する。また、野生型 PML、PML Δ1 および PML Δ6~10 を導入された細胞では、化合物 X の非存在下でも、ルシフェラーゼ活性が対照 (-) の細胞と比較して高かった。

【0123】

また、PML Δ9 または PML-Ring を含むコンストラクトを HEK293A 細胞にトランスフェクションし、化合物 X、SB、化合物 SC またはこれらの組合せの存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 27 に示す。PML Δ9 または PML-Ring を導入された細胞では、対照 (Mock) の細胞と比較して、いずれの条件でもルシフェラーゼ活性が高かった。この結果は、PML の第 47 位~第 106 位を含む RING 領域も、化合物 X により増強される CMV プロモーターの転写活性をさらに増強することを示唆する。また、PML Δ9 または PML-Ring を導入された細胞では、化合物 X の非存在下でも、ルシフェラーゼ活性が対照 (-) の細胞と比較して高かった。

【0124】

試験 13 : PKC 活性化剤および RING 領域を含むペプチドの遺伝子工学的発現により CMV プロモーターの転写活性は増強される

RING 領域は、各種のタンパク質間で共通の配列を有する。PML の RING 領域のアミノ酸配列を BLAST 解析し、類似の配列を有するタンパク質として図 28 に示すタンパク質を同定した。これらのタンパク質の RING 領域において、いくつかのシステイン残基およびヒスチジン残基に高い保存性が見られた。PML の RING 領域との類似性の程度が異なるタンパク質をいくつか選択し、以下の解析に用いた。

【0125】

p cDNA ベクターの CMV プロモーターの下流に、R luc の cDNA、IRES、および、PML、TRIM3、TRIM56、COPI、Pex10、BRCA1 または HTLF の RING 領域の cDNA を挿入し、発現コンストラクトを作製した (図 29)。これらの発現コンストラクトを HEK293A 細胞にトランスフェクションし、化合物 X の存在下または非存在下で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 30 に示す。RING 領域を導入された細胞では、対照 (-) の細胞と比較して、化合物 X 存在下のルシフェラーゼ活性が高かった。この結果は、各種タンパク質の RING 領域が、化合物 X により増強される CMV プロモーターの転写活性をさらに増強することを示唆する。また、RING 領域を導入された細胞では、化合物 X の非存在下でも、対照 (-) の細胞と比較してルシフェラーゼ活性が高かった。

【0126】

試験14：PMLによるCMVプロモーターの転写活性増強はmRNAの発現に依存する
p c D N AベクターのCMVプロモーターの下流に、R l u cのc D N A、I R E S、
および、野生型PMLまたは欠損変異型PML（PMLΔ9、第2位に停止コドンが導入
されたPMLΔ9、または、第7位に停止コドンが導入されたPMLΔ9）のc D N Aを
挿入し、発現コンストラクトを作製した（図31左）。また、p c D N AベクターのCM
Vプロモーターの下流に、R l u cのc D N A、および、野生型PMLまたは欠損変異型
PML（PMLΔ9、PMLΔ10またはPML-RING）のc D N Aを挿入し、発現
コンストラクトを作製した（図31右）。これらのコンストラクトを細胞に導入すると、
PMLのmRNAは転写されるが、タンパク質には翻訳されない。これらのコンストラ
クトをHEK293A細胞にトランスフェクションし、化合物Xの存在下または非存在下で
24時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図32に示す。いずれのコンス
トラクトでも、化合物Xの存在下および非存在下で、対照よりも高いルシフェラーゼ活性
が見られた。この結果は、PMLによるCMVプロモーターの転写活性増強は、PMLの
タンパク質ではなく、PMLのPro領域またはRING領域をコードするmRNAの発
現に依存することを示唆する。

10

【0127】

試験15：ウイルスベクターの製造

材料と方法

コンストラクト

20

レトロウイルスベクターには、p Q C X I Nベクター（TaKaRa #631514）のマル
チクローニングサイトにGFP遺伝子を挿入したコンストラクトを作製した。また、エン
ベロープタンパク質を発現するベクターとしてp c D N A-V S V-G（水疱性口内炎ウ
イルスのG糖タンパク質）を用いた。

レンチウイルスベクターには、p L V S I N-C M V P u rベクター（TaKaRa #61
83）のマルチクローニングサイトにGFP遺伝子を挿入したコンストラクトを作製した
。また、エンベロープタンパク質を発現するベクターとしてp c D N A-V S V-Gを、
ウイルス産生に必要な構造遺伝子（g a g, p o l）を発現するベクターとしてp s P A
X 2（Addgene #12260）を用いた。

30

アデノウイルスベクターには、p A d / D E S T / C M V / V 5 - D E S T G a t e
w a yベクター（Invitrogen #V49320）にGFPを挿入したベクターを作製し、制
限酵素P a c Iで酵素処理したものを精製した後に用いた。

アデノ随伴ウイルスベクターには、p A A V-C M V-P I-E G F P-W P R E-b
G H（Addgene #105530）とp A A V-2 / 9 n（Addgene #112865）、p A d
D e l t a F 6（Addgene #112867）を用いた。

【0128】

各コンストラクトのプロモーターを下表および図43～45に示す。

【表1】

	標的		パッケージング、エンベロープ	
	遺伝子	プロモーター	遺伝子	プロモーター
レトロウイルス	GFP	CMV	Gag, Pol	EF1
			VSVG	CMV
レンチウイルス	GFP	CMV	Gag, Pol, VSVG	CMV
アデノウイルス	GFP	CMV	Ad5(ΔE1, ΔE3)*+IT Rs	ウイルス由来
アデノ随伴ウイル ス	GFP	CMV	E4, E2A, VA, Rep, Cap	ウイルス由来

40

50

* A d 5 (Δ E 1, Δ E 3) は、アデノウイルスゲノムの E 2 A、E 2 B、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4 および L 5 領域を含む。

【0129】

細胞

P l a t - E 細胞株 (コスモバイオ #RV-101)、L e n t i - X 2 9 3 T 細胞株 (T a K a R a #Z2180N) は 1 0 % F C S、1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを含む D M E M 培地を用いて 3 7 ° C、5 % C O 2、湿度 9 0 % の条件下で培養した。

【0130】

トランスフェクション

P l a t - E 細胞、もしくは L e n t i - X 2 9 3 T 細胞を 6 ウェルプレートに 2 . 0 × 1 0 6 細胞 / ウェルとなるように播種し、2 4 時間培養した。1 ウェルあたり 2 ~ 5 μ g のコンストラクト、1 2 μ l - P E I - M a x を 1 0 0 μ l の D M E M で調整し、細胞を培養した 6 ウェルプレートの各ウェルに添加し、3 7 ° C で 2 4 時間培養することでトランスフェクションを行った。

【0131】

ウイルス液の回収および調整

トランスフェクションから 2 4 時間後にウェルから培地を除去し、各濃度の化合物を添加した培地を加え、さらに 4 8 時間培養した。その後、培地を回収し、シリンジフィルター (孔径 0 . 4 5 μ m) を通した後、レトロウイルスとアデノ随伴ウイルスの培地には R e t r o - X C o n c e n t r a t o r (T a K a R a #631455) を、レンチウイルスとアデノウイルスの培地には L e n t i - X C o n c e n t r a t o r (T a K a R a #631231) を適量加え、4 ° C で一晩静置した。その後、遠心処理 (1, 5 0 0 g、4 5 分、4 ° C) を行い、沈殿画分をウイルス培地に懸濁し濃縮したウイルス溶液とした。

【0132】

ウイルス感染細胞数の計測

H E K 2 9 3 A 細胞を 2 4 - ウェルプレートに 1 . 0 × 1 0 5 細胞 / ウェルとなるように播種し、2 4 時間培養した。その後、培地交換によって濃縮したウイルス液を処理し、4 8 時間、ウイルスの感染をおこなった。その後、培地交換時に H o e c h s t 3 3 2 5 8 (W a k o #343-07961) を処理することで核 D N A の染色を行った。C O 2 インキュベーター内で 3 0 分以上静置した後、オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-X810) を用いて G F P と H o e c h s t 3 3 2 5 8 像の写真を撮影し、その後、(G F P 陽性細胞数 / H o e c h s t 3 3 2 5 8 陽性細胞数) を用いて、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。

【0133】

結果

(1) C M V プロモーター活性化化合物によるレトロウイルスベクター産生増強

6 ウェルプレートに P l a t - E 細胞を 2 . 0 × 1 0 6 細胞 / ウェルとなるように播種し、2 4 時間培養した後、p Q C X I N ベクターのマルチクロニングサイトに G F P 遺伝子を挿入したコンストラクトを 1 ウェルあたり 1 . 5 μ g、p c D N A - V S V - G を 0 . 4 μ g、トランスフェクションを行った。その後、2 4 時間後に培地交換を行い、各化合物 (化合物 X : 1 0 0 n g / m l、ソジウムブチレート (S B) : 2 m M、化合物 S C : 5 μ g / m l) を添加し、4 8 時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、4 0 0 μ l の 1 0 % F C S、1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを含む D M E M 培地へと懸濁した。その懸濁液を原液で H E K 2 9 3 A 細胞へと感染させ、4 8 時間後に H o e c h s t 3 3 2 5 8 を処理することで核 D N A を染色し、写真撮影を行なった。(G F P 陽性細胞数 / H o e c h s t 3 3 2 5 8 陽性細胞数) を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。化合物 X 処理、または化合物 X と S B、化合物 X と S B と化合物 S C の処理により、G F P 陽性細胞数 (ウイルス感染細胞数) の劇的な増加が確認された (図 3 3)。

【0134】

(2) P K C 活性化剤によるレンチウイルスベクター産生増強

6ウェルプレートにLent i-X293T細胞を 2.0×10^6 細胞/ウェルとなるように播種し、24時間培養した後、pLV S I N-CMVPurベクターのマルチクローニングサイトにGFPを挿入したコンストラクトを1ウェルあたり $2 \mu\text{g}$ 、p c D N A-V S V-Gを $0.6 \mu\text{g}$ 、p s P A N 2を $1.6 \mu\text{g}$ 、トランスフェクションを行った。その後、24時間後に培地交換を行い、各化合物（化合物X： 100 ng/ml 、ソジウムブチレート（SB）： 2 mM 、化合物SC： $5 \mu\text{g/ml}$ ）を添加し、48時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、 $400 \mu\text{l}$ の10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地へと懸濁した。その懸濁液を100倍希釈した後にHEK293A細胞へと感染させ、48時間後にHoechst 33258を処理することで核DNAを染色し、写真撮影を行なった。（GFP陽性細胞数/Hoechst 33258陽性細胞数）を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。化合物X処理、または化合物XとSB、化合物XとSBと化合物SCの処理により、GFP陽性細胞数（ウイルス感染細胞数）の増加が確認された（図34）。

10

【0135】

（3）CMVプロモーター活性化化合物によるアデノウイルスベクター産生増強

6ウェルプレートにLent i-X293T細胞を 2.0×10^6 細胞/ウェルとなるように播種し、24時間培養した後、PacI処理したpAd/DEST/CMV/V5-DEST GatewayベクターにGFPを挿入したベクターを1ウェルあたり $2 \mu\text{g}$ 、トランスフェクションを行った。その後、24時間後に培地交換を行い、各化合物（化合物X： 100 ng/ml 、ソジウムブチレート（SB）： 2 mM 、化合物SC： $5 \mu\text{g/ml}$ ）を添加し、48時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、 $400 \mu\text{l}$ の10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地へと懸濁した。その懸濁液を3倍希釈した後にHEK293A細胞へと感染させ、48時間後にHoechst 33258を処理することで核DNAを染色し、写真撮影を行なった。（GFP陽性細胞数/Hoechst 33258陽性細胞数）を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。化合物X処理、または化合物XとSB、化合物XとSBと化合物SCの処理により、GFP陽性細胞数（ウイルス感染細胞数）の増加が確認された（図35）。

20

【0136】

（4）CMVプロモーター活性化化合物によるアデノ随伴ウイルスベクター産生増強

6ウェルプレートにLent i-X293T細胞を 2.0×10^6 細胞/ウェルとなるように播種し、24時間培養した後、pAAV-CMV-PI-E GFP-WPRE-bGHを1ウェルあたり $1.5 \mu\text{g}$ 、pAAV-2/9nを $1.5 \mu\text{g}$ 、pAdDeltaF6を $1.5 \mu\text{g}$ 、トランスフェクションを行った。その後、24時間後に培地交換を行い、各化合物（化合物X： 100 ng/ml 、ソジウムブチレート（SB）： 2 mM 、化合物SC： $5 \mu\text{g/ml}$ ）を添加し、48時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、 $400 \mu\text{l}$ の10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地へと懸濁した。その懸濁液を3倍希釈した後にHEK293A細胞へと感染させ、48時間後にHoechst 33258を処理することで核DNAを染色し、写真撮影を行なった。（GFP陽性細胞数/Hoechst 33258陽性細胞数）を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。化合物X処理、または化合物XとSB、化合物XとSBと化合物SCの処理により、GFP陽性細胞数（ウイルス感染細胞数）の増加が確認された（図36）。

30

40

【0137】

（5）CMVプロモーター活性化化合物とPKC阻害剤によるレトロウイルスベクター産生増強の変化

（1）と同様にPlat-E細胞を用いてレトロウイルスベクターをトランスフェクションし、24時間後に培地交換を行い、その際にPKC阻害剤Ro-318425、 $3 \mu\text{M}$ 有無の条件下で各活性化化合物を添加し、48時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、 $400 \mu\text{l}$ の10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地へと懸濁した。その懸濁液を原液でHEK293A細胞へと感染させ、4

50

8 時間後にHoechst 33258を処理することで核DNAを染色し、写真撮影を行なった。
（GFP陽性細胞数／Hoechst 33258陽性細胞数）を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。活性化化合物群によるGFP陽性細胞数（ウイルス感染細胞数）の劇的な増加と、PKC阻害剤による抑制が確認された（図37）。

【0138】

（6）CMVプロモーター活性化化合物とPKC阻害剤によるウイルスベクター産生増強の変化

（5）と同様にP1a-E細胞を用いてレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターをトランスフェクションし、24時間後に培地交換を行い、その際にPKC阻害剤Ro-318425、3μM有無の条件下で各活性化化合物を添加し、48時間培養した。その後、培地からウイルスを回収・濃縮し、400μlの10%FCS、1%ペニシリン／ストレプトマイシンを含むDMEM培地へと懸濁した。その懸濁液をレトロウイルスは原液で、レンチウイルスは100倍希釈した後、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターは3倍希釈した後、HEK293A細胞へと感染させ、48時間後にHoechst 33258を処理することで核DNAを染色し、写真撮影を行なった。（GFP陽性細胞数／Hoechst 33258陽性細胞数）を計測することで、ウイルス感染細胞数の割合を計測した。活性化化合物群によるGFP陽性細胞数（ウイルス感染細胞数）の劇的な増加と、PKC阻害剤による抑制が確認された（図38～図41）。

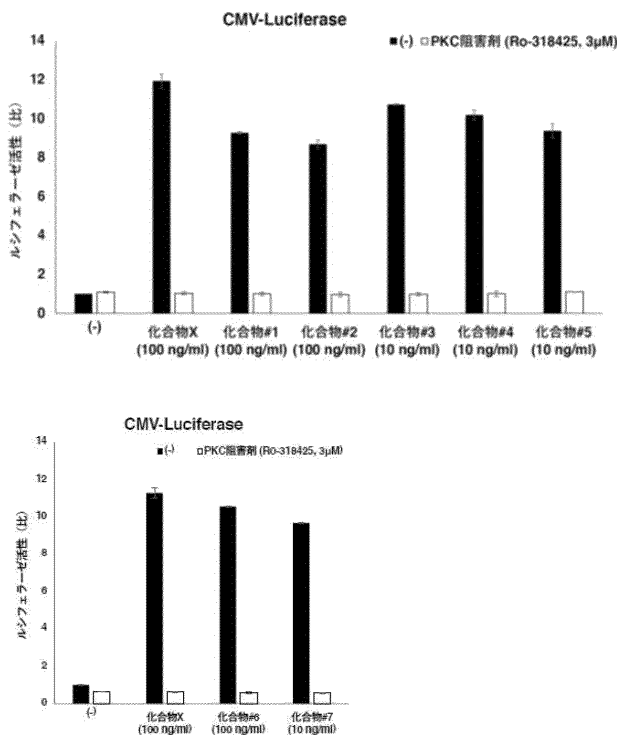
【産業上の利用可能性】

【0139】

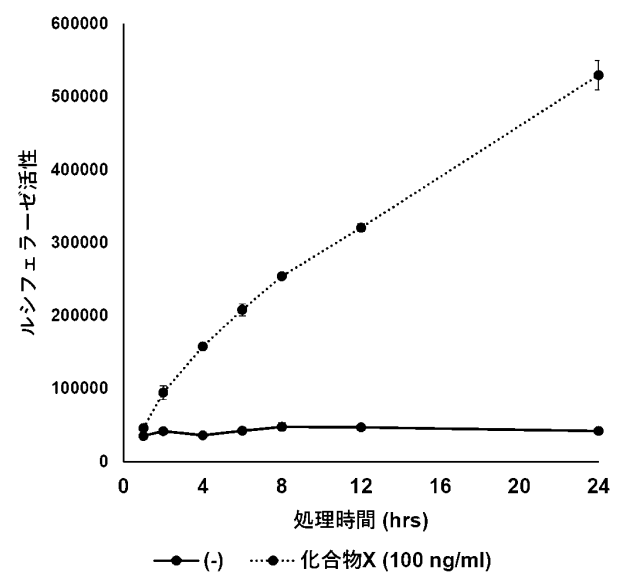
本開示は、ウイルスベクターの生産量を高めることを可能にするため、バイオ医薬品の製造に利用できる。

【図面】

【図1】



【図2】



10

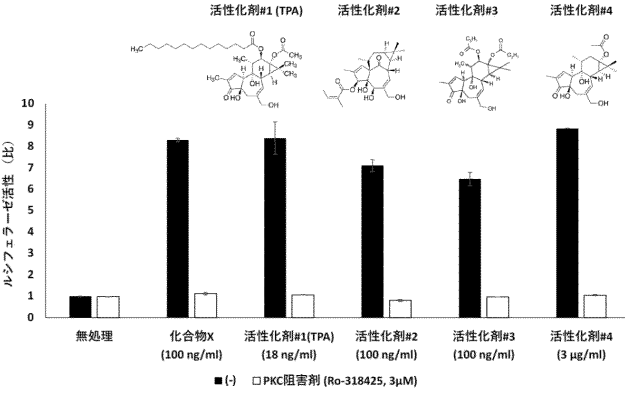
20

30

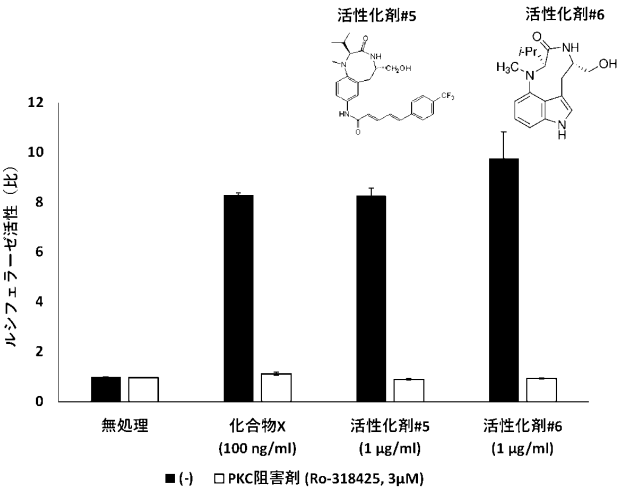
40

50

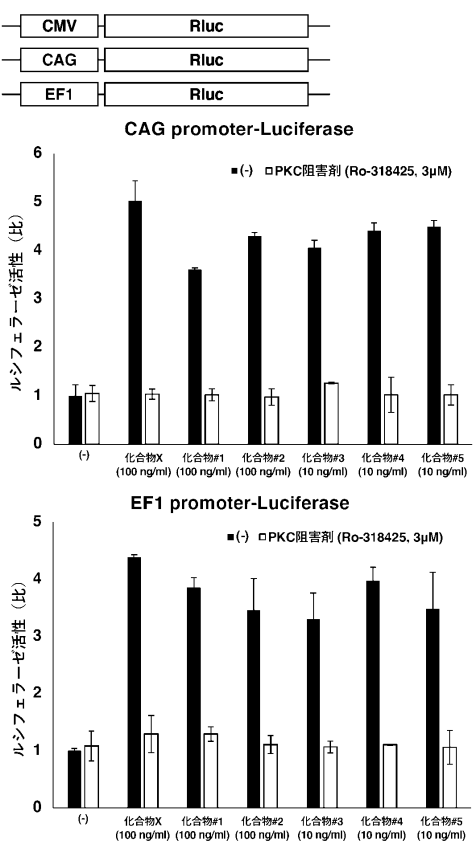
【図 3】



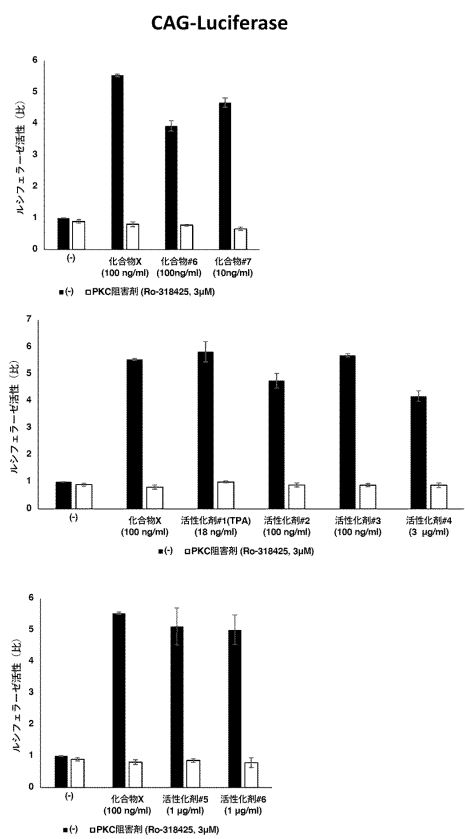
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

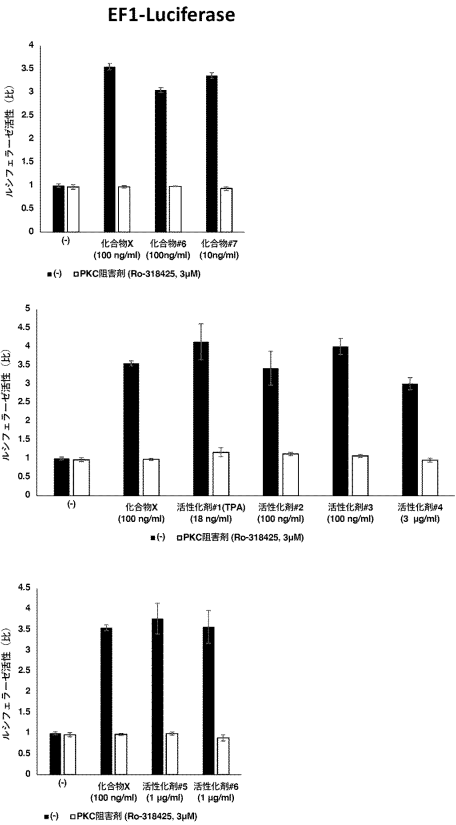
20

30

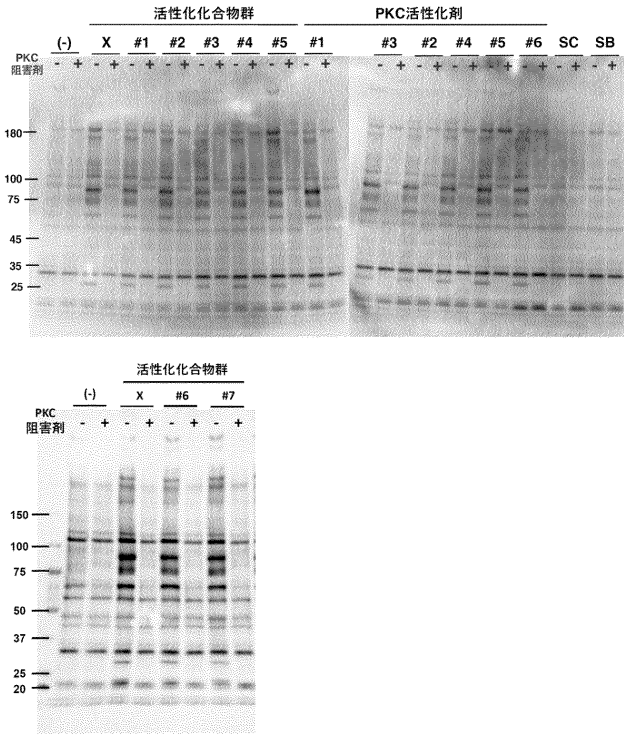
40

50

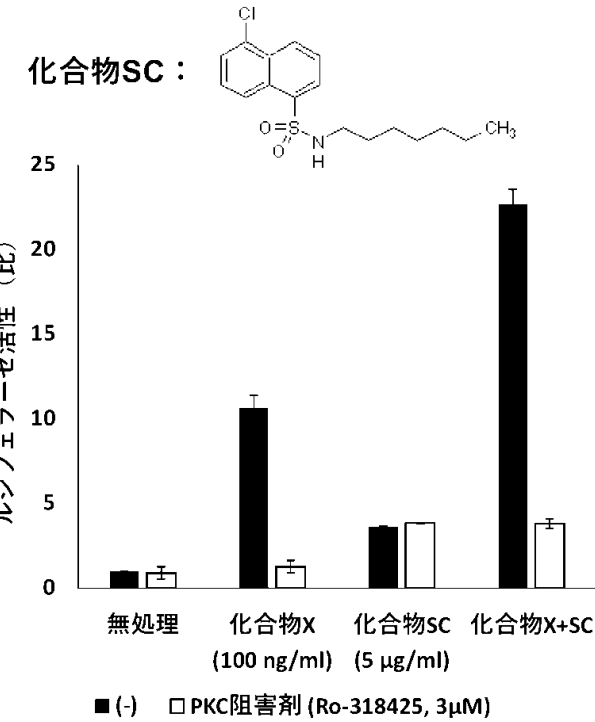
【 図 7 】



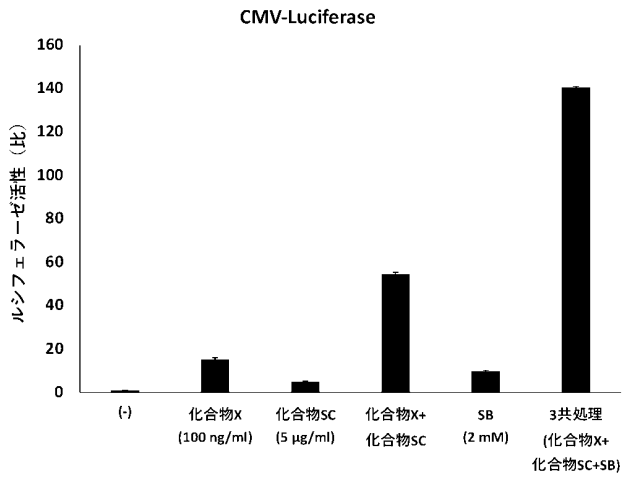
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



10

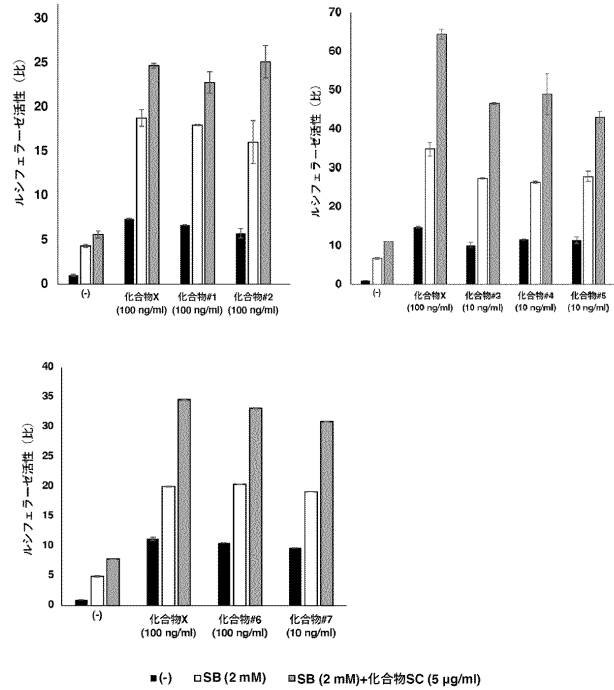
20

30

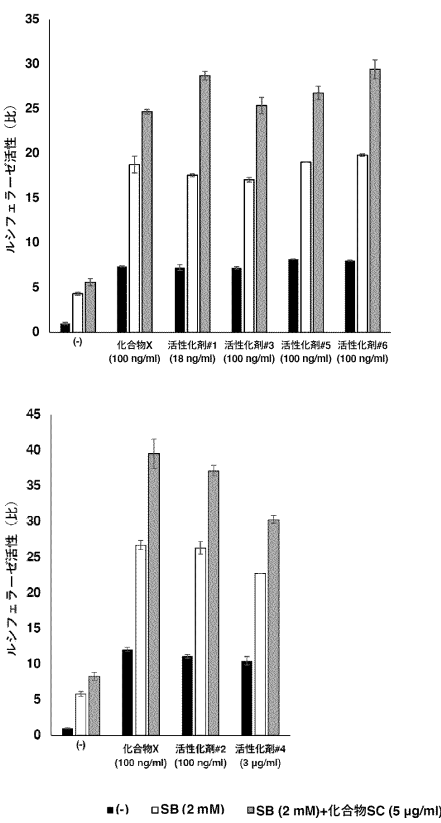
40

50

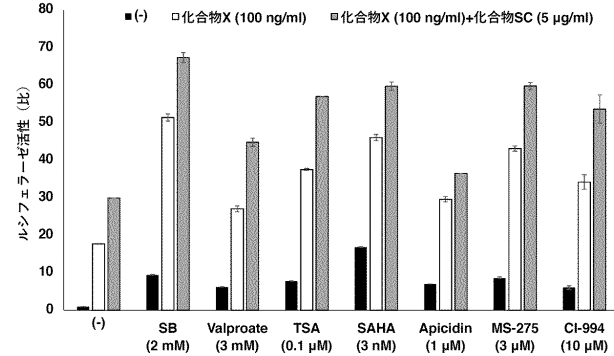
【図 1 1】



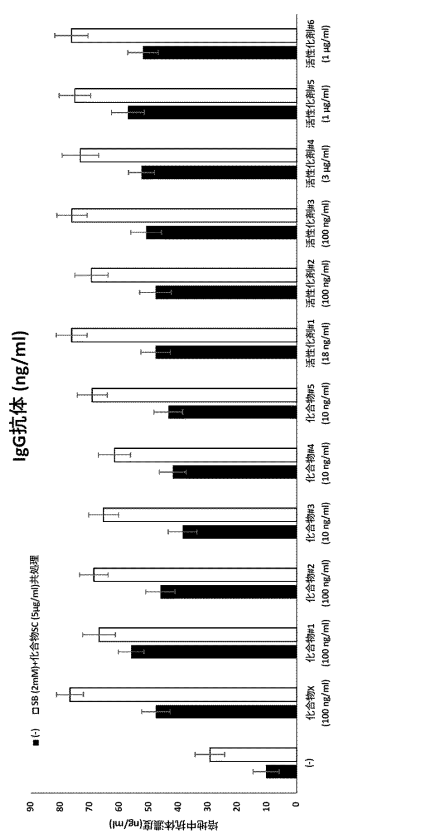
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

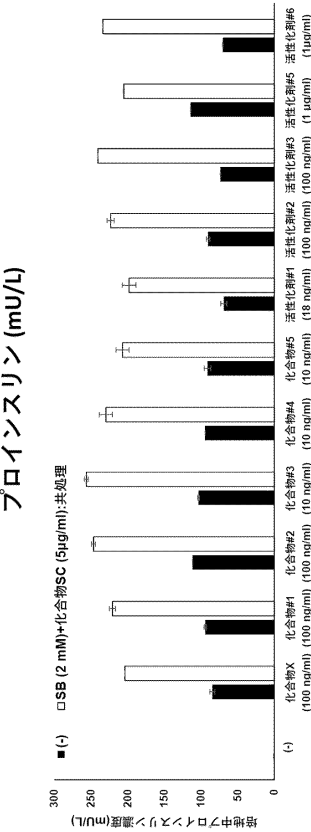
20

30

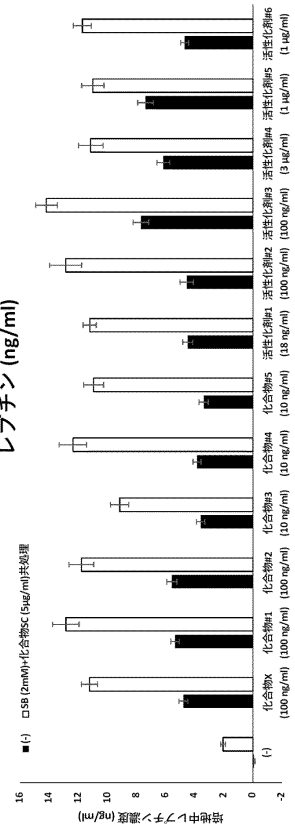
40

50

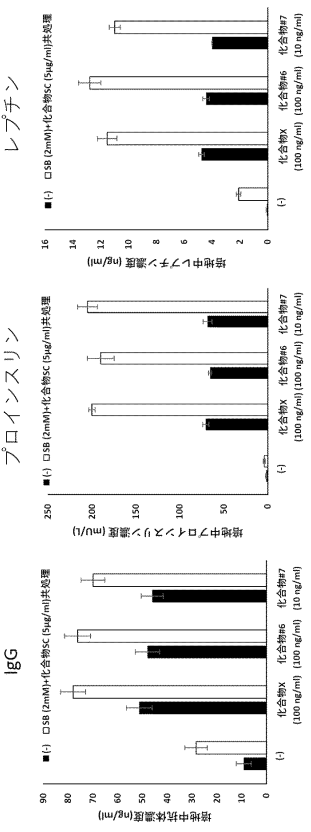
【図 15】



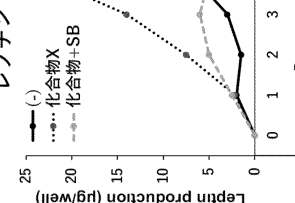
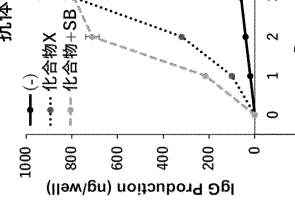
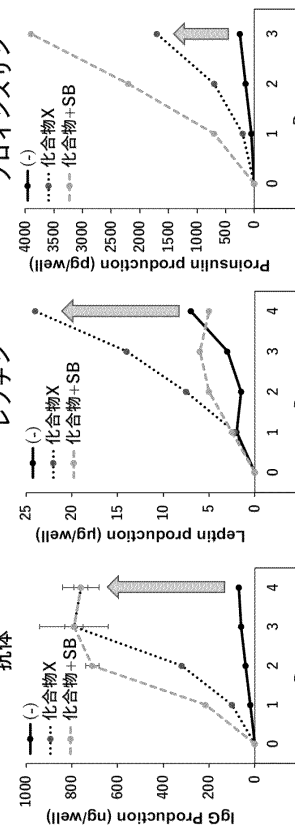
【図 16】



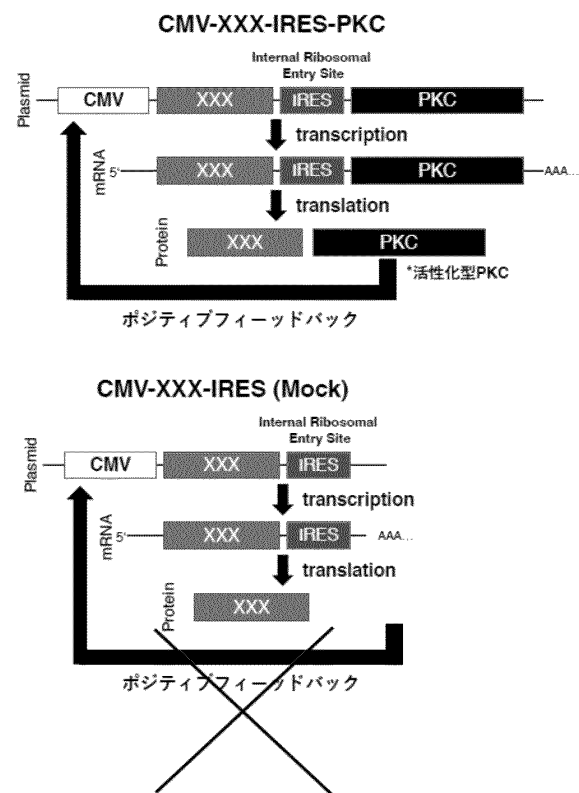
【図 17】



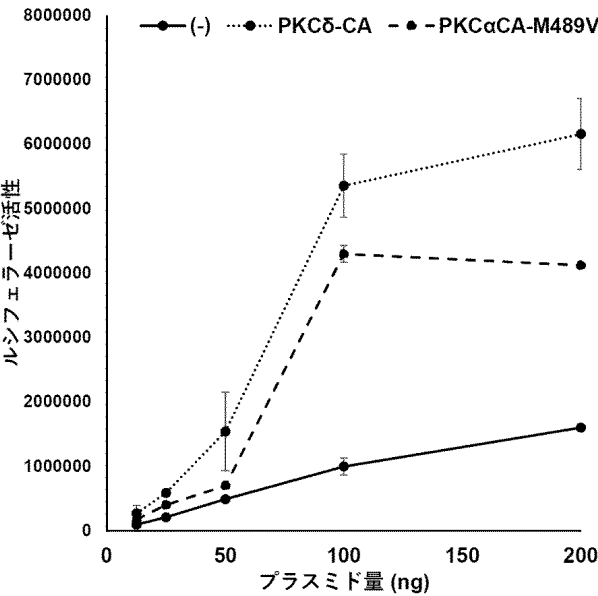
【図 18】



【図 19】



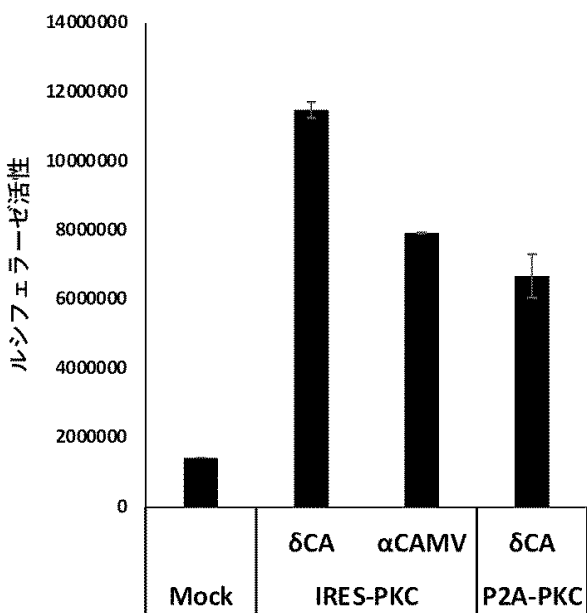
【図 20】



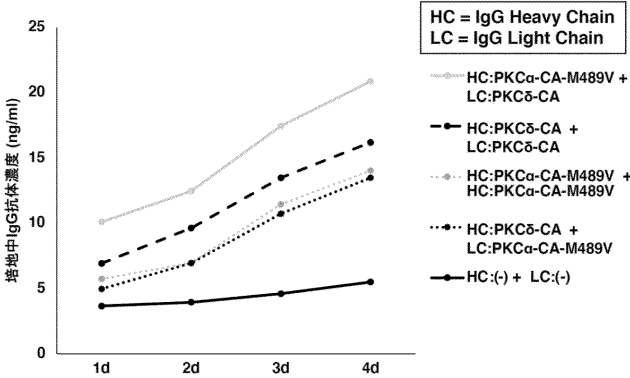
10

20

【図 21】



【図 22】

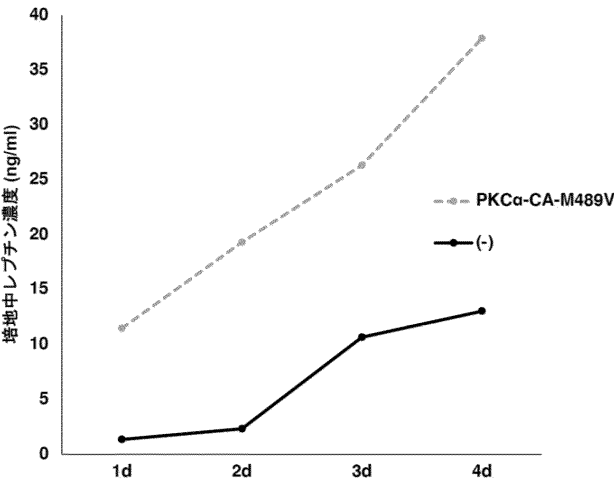


30

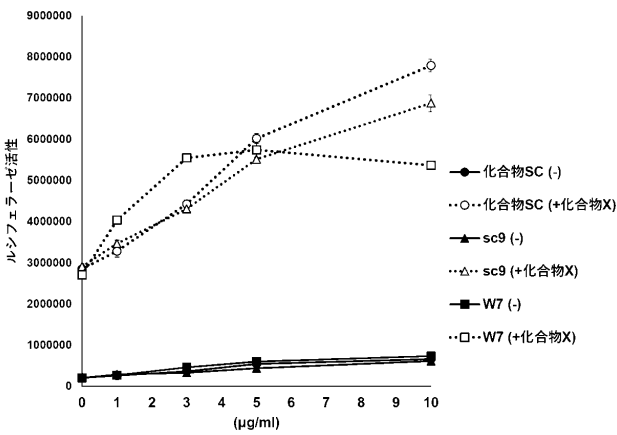
40

50

【図 2 3】

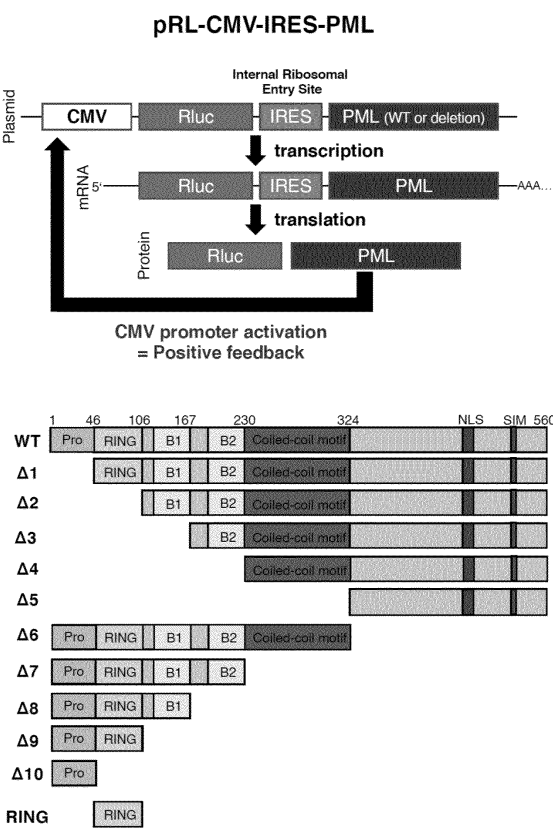


【図 2 4】

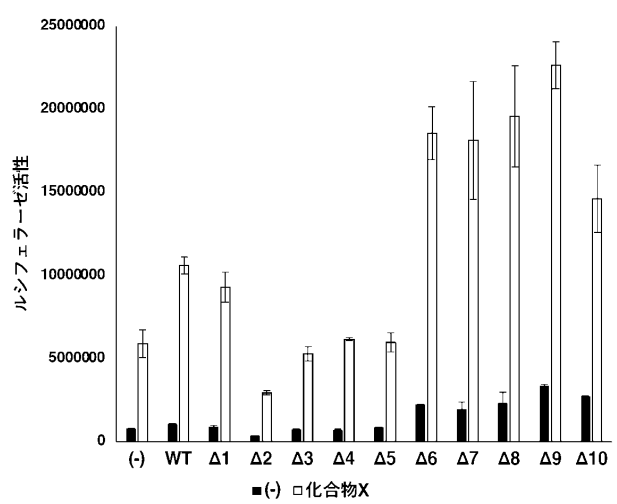


10

【図 2 5】



【図 2 6】



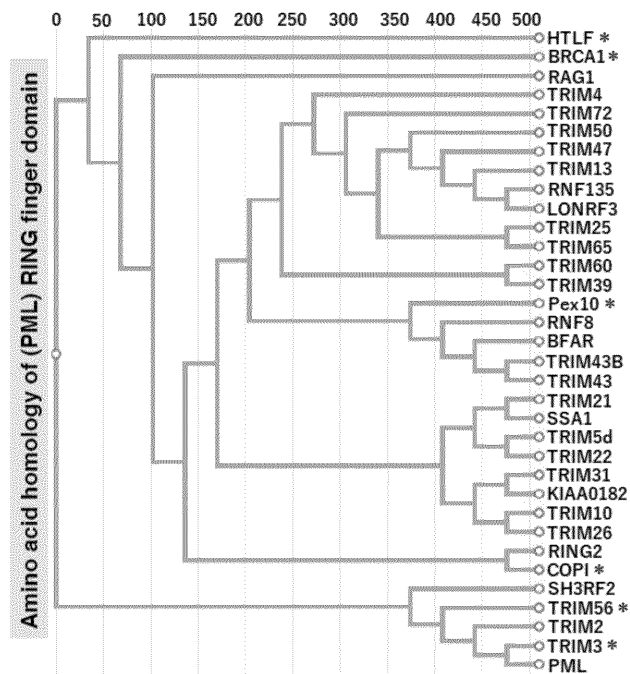
20

30

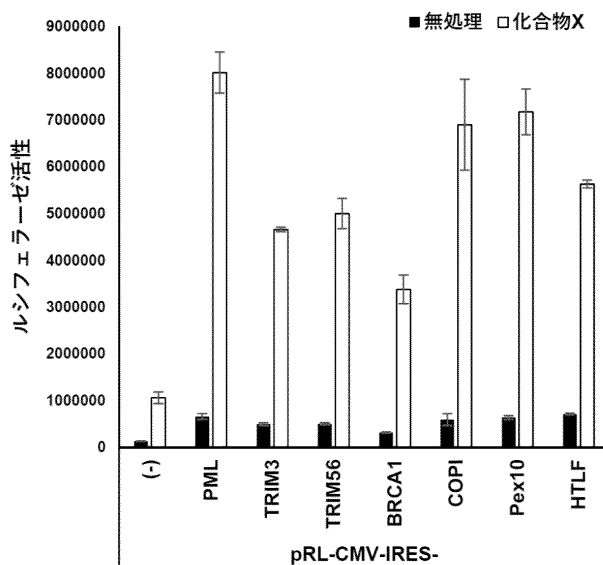
40

50

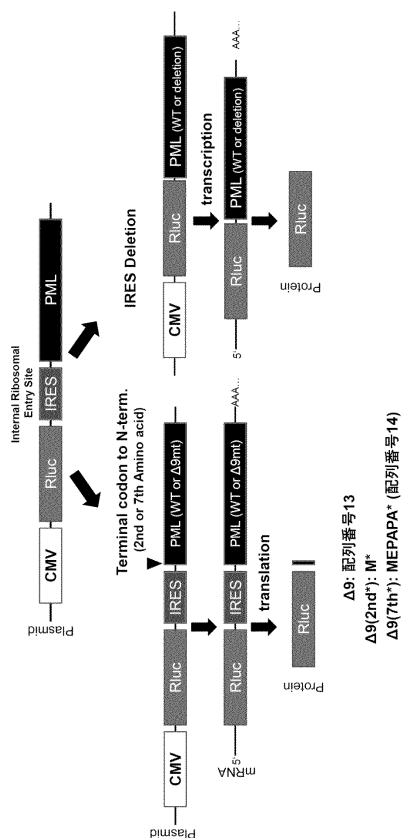
【圖 28】



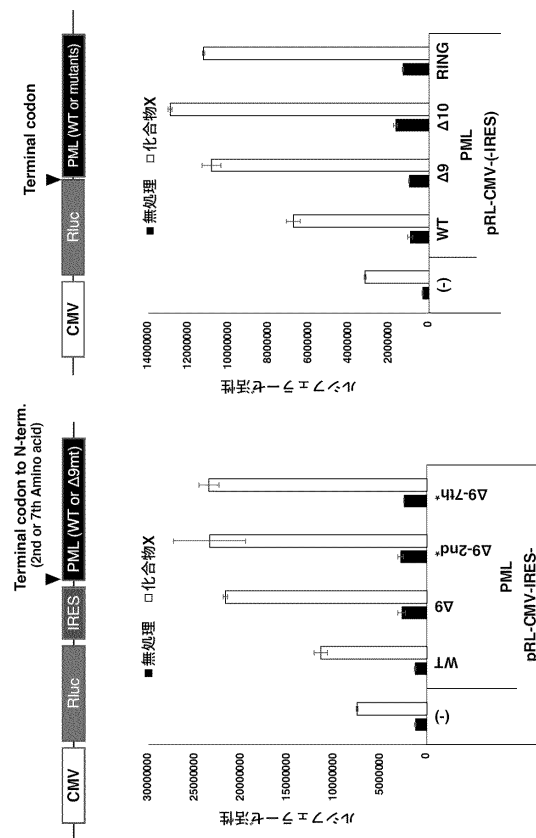
【圖 30】



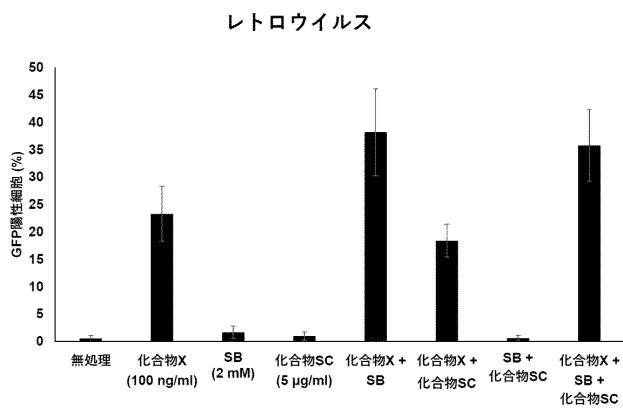
【図 3 1】



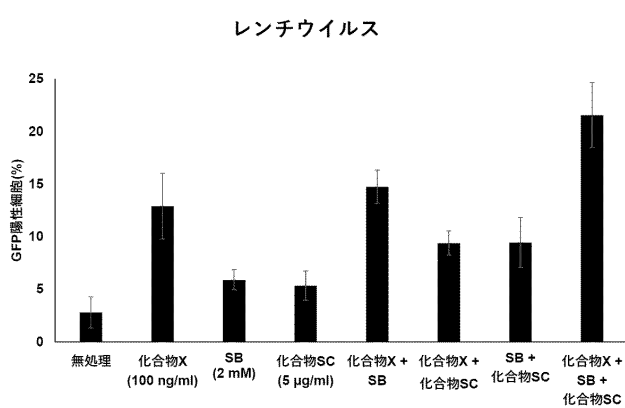
【圖 3 2】



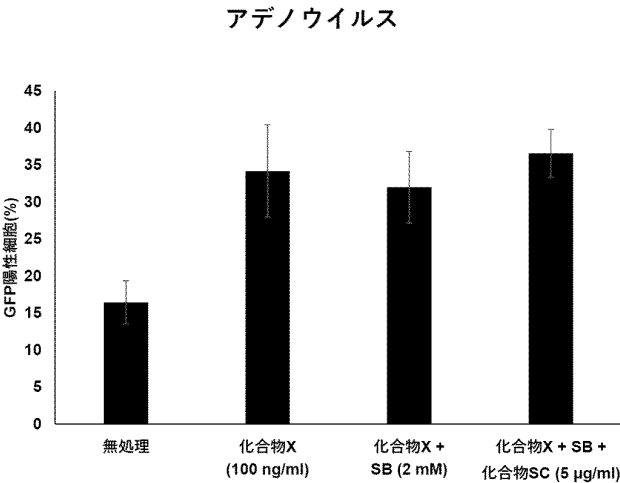
【図 3 3】



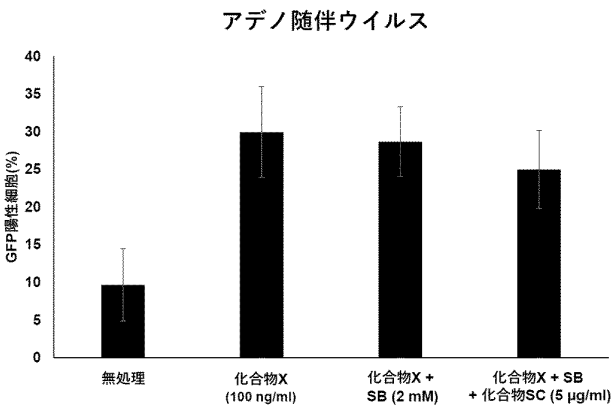
【圖 3 4】



【図 3 5】

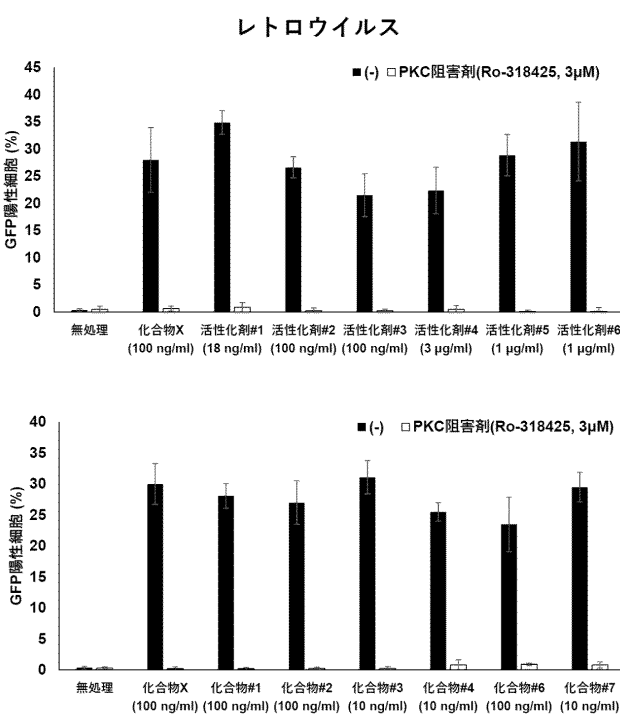


【図 3 6】

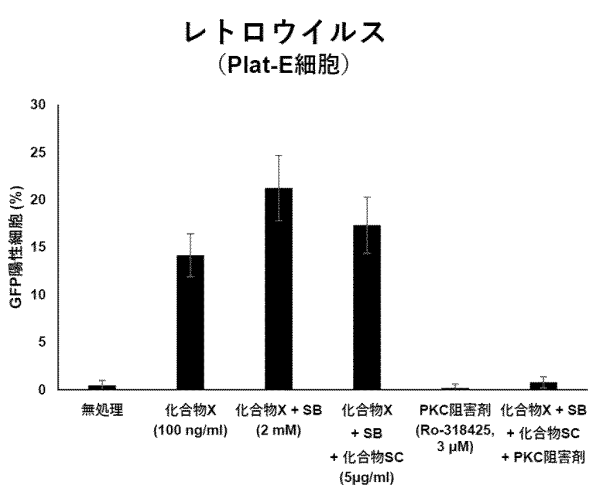


10

【図 3 7】



【図 3 8】



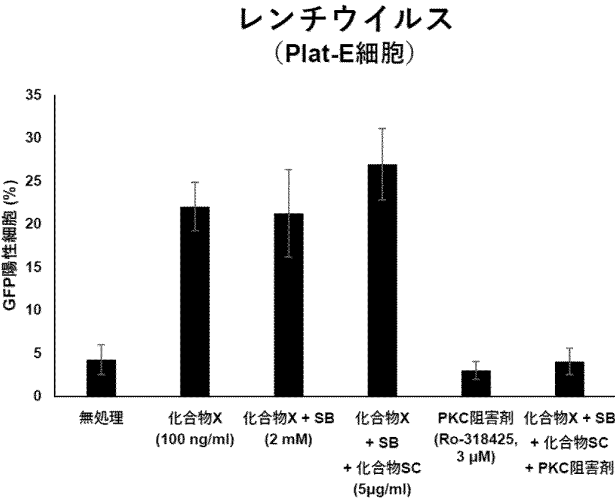
20

30

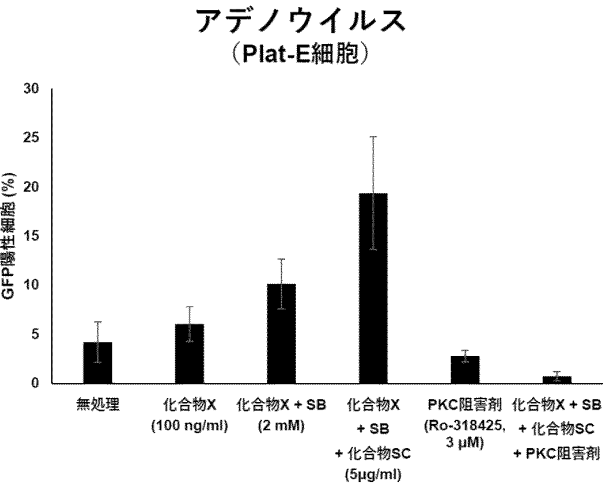
40

50

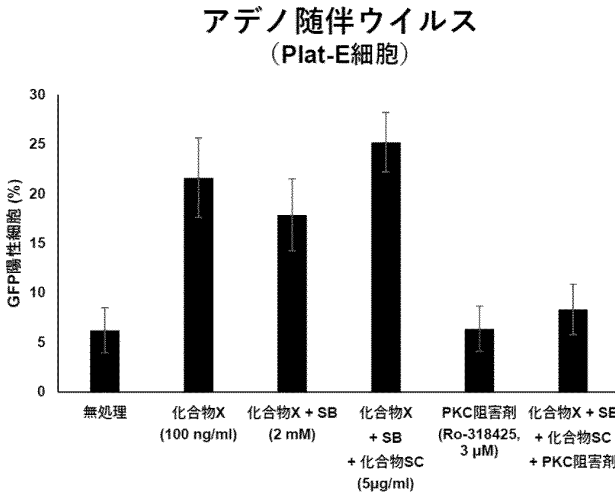
【図 3 9】



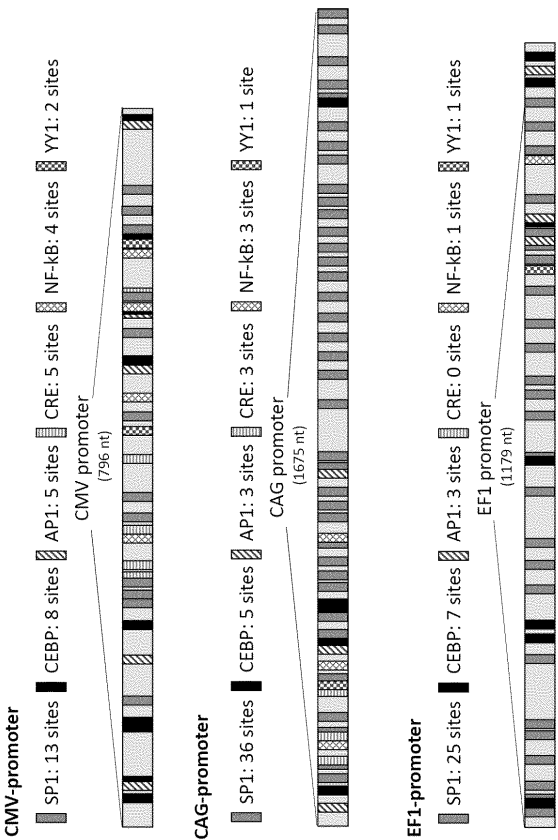
【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】



10

20

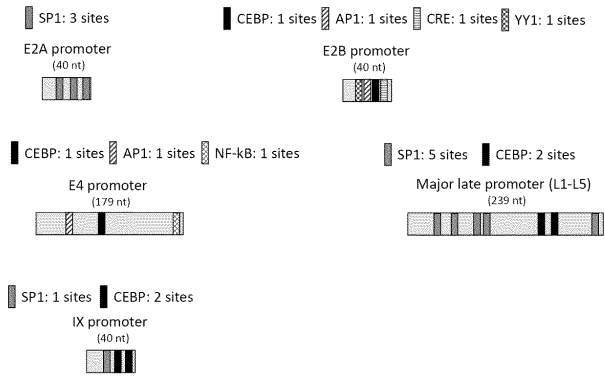
30

40

50

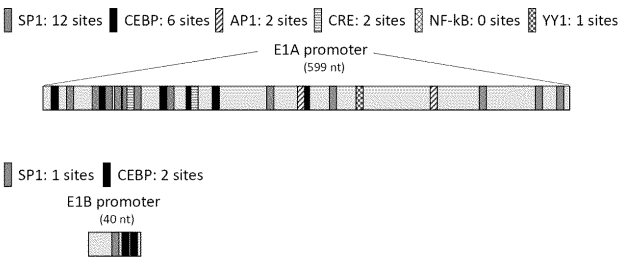
【図 4 3】

Promoters in pAd-CMV-DEST vector



【図 4 4】

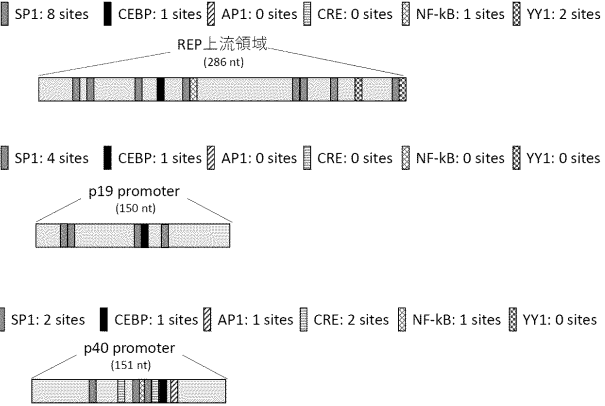
HEK293細胞内のアデノウイルス遺伝子のプロモーター



10

【図 4 5】

Promoters in AAV2/9n vector



20

【配列表】

2024123940000001.xml

30

40

50