

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7098521号

(P7098521)

(45)発行日 令和4年7月11日(2022.7.11)

(24)登録日 令和4年7月1日(2022.7.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/79 (2006.01)

C 1 2 N 15/79

Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 7/04

C 1 2 N 15/49 (2006.01)

C 1 2 N 15/49

C 1 2 N 15/47 (2006.01)

C 1 2 N 15/47

請求項の数 15 (全27頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-526799(P2018-526799)

(86)(22)出願日 平成28年11月21日(2016.11.21)

(65)公表番号 特表2018-534937(P2018-534937
A)

(43)公表日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/078336

(87)国際公開番号 WO2017/089308

(87)国際公開日 平成29年6月1日(2017.6.1)

審査請求日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(31)優先権主張番号 1520761.6

(32)優先日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1609303.1

(32)優先日 平成28年5月26日(2016.5.26)

最終頁に続く

(73)特許権者 513032275

グラクソスミスクライン、インテレクト
ユアル、プロパティ、ディベロップメ
ント、リミテッドGLAXOSMITHKLINE IN
TELLECTUAL PROPERTY
DEVELOPMENT LIMITED
イギリス国ミドルセックス、ブレントフ
ォード、グレート、ウエスト、ロード、
9 8 0

(74)代理人 100091982

弁理士 永井 浩之

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100082991

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レトロウイルス産生のための安定な細胞株

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非哺乳動物複製起点と少なくとも25キロベース(kb)のDNAを保持する能力とを含
んでなる核酸ベクターであって、

前記核酸ベクターが細菌人工染色体(BAC)であり、

gagおよびpolタンパク質、ならびに

envタンパク質

をコードするレトロウイルス核酸配列を含んでなり、

前記レトロウイルス核酸配列のそれぞれが核酸ベクター内にそれ自体のプロモーターを有
し、前記核酸ベクターを部位特異的に哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込むための
1つまたは複数の組換え部位を有する、核酸ベクター。

【請求項 2】

レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムをコードする核酸配列を付加的に含んでなる
、請求項1に記載の核酸ベクター。

【請求項 3】

補助遺伝子revまたはその類似遺伝子を付加的に含んでなる、請求項1または請求項2
に記載の核酸ベクター。

【請求項 4】

安定なレトロウイルスパッケージング細胞株の製造方法であって、

(a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に

導入すること；および

(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること
を含んでなる、方法。

【請求項 5】

前記核酸ベクターが、レトロウイルスベクター粒子の RNA ゲノムをコードする核酸配列を付加的に含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸ベクターが、補助遺伝子 *rev* またはその類似遺伝子を付加的に含んでなる、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳動物宿主細胞が HEK 293 細胞である、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記哺乳動物宿主細胞が懸濁適応 / 非接着細胞株である、請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 4 または 5 に記載の方法により得られるレトロウイルスパッケージング細胞であって、前記核酸配列がすべてレトロウイルスパッケージング細胞ゲノム内の単一の遺伝子座に位置する、レトロウイルスパッケージング細胞。

【請求項 10】

複製欠陥レトロウイルスベクター粒子の製造方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入すること；

(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること；および

(c) 前記哺乳動物宿主細胞を複製欠陥レトロウイルスベクター粒子が産生される条件下でさらに培養すること
を含んでなる、方法。

【請求項 11】

複製欠陥レトロウイルスベクター粒子を単離することを付加的に含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記レトロウイルス核酸配列が、レンチウイルス、アルファレトロウイルス、ガンマレトロウイルスまたは泡沫レトロウイルスからなる群から選択されるレトロウイルスに由来する、請求項 4 ~ 8、10 および 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記レトロウイルス核酸配列が、HIV - 1、HIV - 2、SIV、FIV、EIAV および Visna からなる群から選択されるレンチウイルスに由来する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記レトロウイルス核酸配列が HIV - 1 に由来する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 env タンパク質が水疱性口内炎ウイルスに由来する、請求項 4 ~ 8 および 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レトロウイルス産生に必要とされる遺伝子を含んでなる核酸ベクターおよびそれらの使用に関する。また、本明細書に記載の核酸ベクターを含んでなるレトロウイルス

10

20

30

40

50

パッケージング/産生細胞株を作製する方法も提供される。

【背景技術】

【0002】

遺伝子療法では、遺伝物質が処置を必要とする対象の内在細胞に送達される。この遺伝物質は、対象に新規な遺伝子を導入するか、または既存の遺伝子の付加的コピーを導入するか、または対象に存在する遺伝子の異なる対立遺伝子もしくは変異体を導入する。遺伝子療法で使用するために有効な遺伝子送達法としてウイルスベクター系が提案されている(Verma and Somia (1997) Nature 389: 239-242)。

【0003】

特に、これらのウイルスベクターはレトロウイルス科のメンバーに基づき、これは宿主のゲノムへそれらの遺伝子弾頭を組み込むそれらの能力によるものである。レトロウイルスベクターは、レトロウイルスゲノムのパッケージングおよび送達に必要とされる必須タンパク質を維持するが、それらの疾患の原因となるものを含む必須でない補助的タンパク質が除去されるよう設計される。レトロウイルスベクターの例としては、レンチウイルスベクター、例えば、非増殖細胞に組み込むことができるために広く使用されている1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)に基づくものが挙げられる。

【0004】

現在のところ、大部分のウイルスベクターは、宿主細胞株へのウイルス遺伝子の一時的同時トランスフェクション(transient co-transfection)により作製される。ウイルス遺伝子は、ウイルス遺伝子がプラスミドに留まりゲノム内に組み込まれないために限定された期間だけ宿主細胞内に存在する細菌プラスミドを用いて導入される。従って、一時的にトランスフェクトされた遺伝物質は、細胞分裂の際に次世代に受け渡されない。

【0005】

一時的トランスフェクションに関しては、バッチごとの変動、高コストのトランスフェクション試薬および品質管理の維持の難しさなどのいくつかの欠点がある(Segura et al. (2013) Expert Opin. Biol. Ther. 13(7): 987-1011参照)。トランスフェクションのプロセス自体も労働集約的であり、スケールアップが困難である。また、ベクター作製の際に持ち越されるプラスミド不純物を除去するという困難な作業もある(Pichlmair et al. (2007) J. Virol. 81(2): 539-47参照)。

【0006】

一時的トランスフェクションに付随する問題に取り組むために、レトロウイルスベクター産生を簡単にするためのレトロウイルスパッケージングおよび産生細胞株の開発が望まれてきた。

【0007】

パッケージング細胞株は、レトロウイルスベクターのパッケージング能のある細胞株をプラスミド(個々のプラスミドはレトロウイルスパッケージング遺伝子およびユニークな真核生物選択マーカーを有する)でトランスフェクトすることにより作製されてきた。パッケージング遺伝子は、パッケージング細胞株のゲノムに組み込まれ、安定にトランスフェクトされると言われる。ここ20年間、レトロウイルスベクター用の安定なパッケージングおよび産生細胞株を作製するために様々な試みがなされてきた。

【0008】

レトロウイルスベクター成分の宿主細胞ゲノムへの組込みを介して作出されるパッケージングおよび産生細胞株には報告されている多くの問題がある。第一に、レトロウイルスベクター成分の連続的導入は労力がかかり、融通が利かないものであり得る。また、宿主細胞ゲノムに組み込まれる場合、組込み部位が予測できないために、レトロウイルスベクター成分の遺伝的および/または転写的不安定性という問題もある(Ni et al. (2005) J. Gene Med. 7: 818-834)。また、産生細胞株の懸濁適応およびスケールアップの際の、ウイルスベクター生産性の著しい低下も報告されている(Farson et al. (2001) Hum. Gene Ther. 12: 981-997; Guy et al. (2013) Hum. Gene Ther. Methods. 24(2): 125-39)。

【0009】

よって、本発明の目的は、既存の方法に付随する欠点の１以上を克服する、安定なレトロウイルスパッケージングおよび産生細胞株の作製方法を提供することである。

【発明の概要】

【００１０】

本発明者らは、レトロウイルスベクター産生に必須のレトロウイルス遺伝子を含んでなり、非哺乳動物複製起点と少なくとも２５キロベース（kb）のDNA、例えば細菌人工染色体、を保持する能力を含んでなる核酸ベクターの使用を含む、パッケージングおよび産生細胞株を作製する新規な方法を開発した。これにより、一時的トランスフェクション法に付随する問題を改善するための、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子の産生に必要とされるレトロウイルス遺伝子の発現が可能となる。

10

【００１１】

非哺乳動物複製起点を含んでなり、かつ、少なくとも２５kbのDNA（すなわち、大型構築物DNA）を保持する能力を有する核酸ベクターの使用にはいくつかの利点がある。第一に、これらのベクターは、哺乳動物宿主細胞ではなく、それらの使用をはるかに容易にする非哺乳動物細胞（例えば、微生物細胞、例えば、細菌細胞）でまず操作することができる（例えば、細菌人工染色体は大腸菌（*E. coli*）でまず操作することができる）。ひと度、核酸ベクターが作製されれば、それを哺乳動物宿主細胞に導入することができ、核酸ベクターが内在性染色体に組み込まれた哺乳動物細胞を、安定な細胞株を単離するために選択することができる。

20

【００１２】

また、レトロウイルス核酸の哺乳動物宿主細胞への導入は単一工程で起こり、これは選択圧およびサイレンシング時間枠を低減する助けとなる。これにより潜在的パッケージング細胞のより速いスクリーニングが可能となり、１つのベクターが使用されるだけであるので、複数のプラスミドベクターを使用する従来の方法よりも材料のコストが削減される。特に、現行の系を使用すると、プラスミドコスト、必要とされるトランスフェクション試薬（例えば、ポリエチレンジイミン [PEI]）の節約、必要とされるベンゾナーゼ処理の量の削減（レンチウイルス収獲物中のDNAの量が少なくなるので、下流処理で余分なものを除去するために必要なベンゾナーゼが少なくなる）および検査コストの削減（レンチウイルス産物中の残留プラスミドを検査する必要がなくなる）により生産コストが削減される。

30

【００１３】

さらに、レトロウイルス産生（移入ベクターを用いるまたは用いない（with or without））に必須のレトロウイルス遺伝子は、そのベクターが哺乳動物宿主細胞に導入された際に核酸ベクターに組み込まれたレトロウイルス遺伝子の総てが内在哺乳動物宿主細胞ゲノム内の１つの遺伝子座で統合するように、核酸ベクター内に存在する。これにより、レトロウイルス遺伝子が宿主細胞ゲノム内に無作為に異なる遺伝子座で統合される場合に起こり得る遺伝子サイレンシングなどの問題が克服できる。

【００１４】

よって、本発明の核酸ベクターの使用は、レトロウイルスパッケージングおよび産生細胞株の作製に利点をもたらす。

40

【００１５】

よって、本発明の第１の面によれば、

gagおよびpolタンパク質；

envタンパク質またはその機能的置換体；ならびに

レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノム

をコードする核酸配列を含んでなるレトロウイルス産生細胞であって、

前記核酸配列が総て前記レトロウイルス産生細胞ゲノム内の単一の遺伝子座に位置するレトロウイルス産生細胞が提供される。

【００１６】

本発明のさらなる面によれば、

50

非哺乳動物複製起点と少なくとも25キロベース(kb)のDNAを保持する能力を含んでなる核酸ベクターであって、

gagおよびpolタンパク質、ならびに

envタンパク質またはその機能的置換体

をコードするレトロウイルス核酸配列を含んでなり、

前記レトロウイルス核酸配列のそれぞれが核酸ベクター内に個々の発現構築物として配置されている

ことを特徴とする核酸ベクターが提供される。

【0017】

本発明のさらなる面によれば、安定なレトロウイルスパッケージング細胞株の製造方法であって、

(a) 本明細書で定義される核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入すること；および

(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること

を含んでなる方法が提供される。

【0018】

本発明のさらなる面によれば、本明細書に定義される方法により得られたレトロウイルスパッケージング細胞が提供される。

【0019】

本発明のさらなる面によれば、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子の製造方法であって、

(a) 本明細書に定義される核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入すること；

(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること；および

(c) 前記哺乳動物宿主細胞を複製欠陥レトロウイルスベクター粒子が産生される条件下でさらに培養すること

を含んでなる方法が提供される。

【0020】

本発明のさらなる面によれば、本明細書に定義される方法により得られた複製欠陥レトロウイルスベクター粒子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1：BACpack-WTGP-277delU5およびBACpack-SYNGP-277delU5の構築の段階的ガイド。

【図2】図2：安定なポリクローナルプールの選択。HEK293T接着細胞を、リン酸カルシウムを用いてBACpackWTGagPol-トランスファーでトランスフェクトした。安定なプールが2週間のゼオシン選択後に作出された。安定なトランスフェクタントにウイルス生成能があるかどうか調べるために、安定なプールにドキシサイクリンで48時間誘導を行った。誘導48時間後にウイルス上清を採取し、0.22μmフィルターで濾過し、HEK293T細胞を形質導入することにより力価を測定した。GFP陽性形質導入細胞を用いて形質導入単位/ml(TU/ml)を計算した。

【図3】図3：安定なトランスフェクション懸濁クローンの作製。HEK2936E細胞を、293フェクチン試薬を用いて、BACpackWTGagPol-トランスファーでトランスフェクトした。安定なプールが2週間のゼオシン選択後に作出された。これらの安定なプールを96ウェルプレートでの限界希釈によりクローニングして単細胞クローンを得、これを次に拡大培養した。接着培地(DMEM+FBs)とその後の懸濁適応(FreeStyle培地)で得られた最良のクローン1、14、15および16の蛍光顕微鏡により検出されたGFP。

【図4】図4：懸濁クローンにおけるレンチウイルスの誘導。安定なHEK6Eトランスフェクタントにウイルス生成能があるかどうか調べるために、20mlの安定な懸濁クロ

10

20

30

40

50

ーンにドキシサイクリン ($2 \mu\text{g} / \text{ml}$) で 48 時間誘導を行った。誘導 48 時間後にウイルス上清を採取し、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過し、HEK293T 細胞を形質導入することにより力価を測定した。GFP 陽性形質導入細胞を用いて形質導入単位 / ml (TU / ml) を算出した。

【図 5】図 5：実施例 4 に従って作製されたクローンのベクター力価。結果は、5 代 ~ 21 代の間に中等度の増殖を示したクローン 1 および 16 のベクター力価を示す。

【発明の具体的説明】

【0022】

定義

そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される総ての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で参照される総ての特許および刊行物は、引用することによりそれらの全内容が本明細書の一部とされる。

10

【0023】

用語「を含んでなる」は、「含む」または「からなる」を包含し、例えば、X を「含んでなる」組成物は、排他的に X からなる場合、またはなにかをさらに含む場合、例えば、X + Y の場合がある。

【0024】

用語「から本質的になる」は、特徴の範囲を明示された材料または工程および特許請求される特徴の基本的な特性に実質的に影響を及ぼさないものに限定する。

20

【0025】

用語「からなる」は、いずれの付加的成分の存在も排除する。

【0026】

数値 x に関して用語「約」は、例えば、 $x \pm 10\%$ 、 5% 、 2% または 1% を意味する。

【0027】

用語「ベクター」または「核酸ベクター」は、外来の (すなわち、外因性の) 遺伝物質を別の細胞に人為的に運び、そこでそれが複製および / または発現され得るビヒクルを意味する。ベクターの例としては、非哺乳動物核酸ベクター、例えば、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC)、P1 由来人工染色体 (PAC)、コスミドまたはフォスミドが挙げられる。

30

【0028】

ベクターの他の例としては、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターが挙げられ、これらは本出願で特に注目される。レンチウイルスベクター、例えば、1 型ヒト免疫不全ウイルス 1 (HIV-1) に基づくものは、非増殖細胞に組み込むことができるので、広く使用されている。ウイルスベクターは、ウイルスゲノムを別個の部分に分割することにより、例えば、別個のプラスミドに配置することにより、複製欠陥とすることができる。例えば、Salk Institute for Biological Studies により開発された、いわゆる第一世代のレンチウイルスベクターは、パッケージング発現カセット、エンベロープ発現カセットおよびベクター発現カセットからなる 3 つのプラスミド発現系として構築された。「パッケージングプラスミド」は、全 gag-pol 配列、調節配列 (tat および rev) および補助配列 (vif、vpr、vpu、nef) を含む。「エンベローププラスミド」は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの制御下に、天然 HIV-1 エンベロープタンパク質の代わりに水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質 (Vesicular stomatitis virus glycoprotein) (VSVg) を保持する。第三のプラスミド (「移入プラスミド」) は、宿主細胞内で導入遺伝子を発現させるため、長い末端反復配列 (Long Terminal Repeats) (LTR)、カプセル封入配列 ()、Rev 応答エレメント (Rev Response Element) (RRE) 配列および CMV プロモーターを運ぶ。

40

【0029】

第二のレンチウイルスベクター世代は、毒性配列 vpr、vif、vpu および nef の

50

欠失を特徴とする。パッケージングベクターは g a g、p o l、t a t および r e v 遺伝子に減らされ、従って、系の安全性が高まった。

【 0 0 3 0 】

レンチウイルス系を改良するために、パッケージング構築物から t a t 遺伝子を除去し、ベクターカセットから L T R を不活化し、従って、挿入突然変異誘発効果に関する問題を軽減することによって、第三世代のベクターが設計された。

【 0 0 3 1 】

種々のレンチウイルス世代が以下の参考文献に記載されている：第一世代：Naldini et al. (1996) Science 272(5259): 263-7；第二世代：Zufferey et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15(9): 871-5；第三世代：Dull et al. (1998) J. Virol. 72(11): 8463-7、これらは総て、引用することによりそれらの全内容が本明細書の一部とされる。レンチウイルスベクターの開発についての総説は、Sakuma et al. (2012) Biochem. J. 443(3): 603-18 および Picanco-Castro et al. (2008) Exp. Opin. Therap. Patents 18(5):525-539 に見出すことができる。

【 0 0 3 2 】

用語「非哺乳動物複製起点」は、そこで複製が開始され、かつ、非哺乳動物起源に由来する核酸配列を意味する。これは本発明の核酸ベクターが安定に複製すること、および宿主細胞が哺乳動物宿主細胞である場合を除いてそれが宿主細胞後代に伝達されるように好適な宿主細胞（例えば、細菌または酵母細胞などの微生物細胞）内で内在性染色体とともに分離することを可能とする。哺乳動物宿主細胞において、非哺乳動物複製起点を有する核酸ベクターは、哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれるか、または哺乳動物宿主細胞複製時に失われる。例えば、細菌人工染色体(bacterial artificial chromosomes) (B A C)、P 1 由来人工染色体(P1-derived artificial chromosome) (P A C)、コスミドまたはフォスミドなどの、非哺乳動物複製起点を有する核酸ベクターは、細菌細胞（例えば、大腸菌）内で安定に複製し、内在性染色体とともに分離することがきるが、それらがもし哺乳動物宿主細胞に導入されれば、B A C、P A C、コスミドまたはフォスミドは哺乳動物宿主細胞複製時に組み込まれるか、または失われる。酵母人工染色体(Yeast artificial chromosomes) (Y A C) は、酵母細胞内で安定に複製し、内在性染色体とともに分離することがきるが、それらがもし哺乳動物宿主細胞に導入されれば、Y A C は哺乳動物宿主細胞複製時に組み込まれるか、または失われる。従って、これに関して、本発明の核酸ベクターは、レトロウイルス産生用の安定な細胞株を作製するために哺乳動物細胞に容易に移入できるDNAのリザーバーとして（すなわち、レトロウイルス産生に必須の遺伝子のために）働く。非哺乳動物複製起点の例としては、細菌複製起点、例えば、o r i C、o r i V もしくは o r i S、または自律複製配列 (A R S エlement) としても知られる酵母複製起点が挙げられる。

【 0 0 3 3 】

本発明の核酸ベクターは非哺乳動物複製起点を含んでなり、かつ、少なくとも25キロベース (k b) のDNAを保持可能である。一つの実施態様では、核酸ベクターは、少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340または350 k b のDNAを保持する能力を有する。「保持する能力」という場合にはその通常の意味を有し、核酸ベクターの挿入サイズの上限が特許請求されるサイズ以上（すなわち、25 k b 以上のDNA）であることを含意すると理解される。

【 0 0 3 4 】

本発明の目的は、単一の構築物（すなわち、核酸ベクター）にレトロウイルスパッケージングに必須の遺伝子を含めることである。よって、本発明の核酸ベクターは、大きなDNAインサートを保持することができなければならない。疑念を避けるため、「核酸ベクター」または「人工染色体」という場合には、天然細菌プラスミド（例えば、一時的トラン

10

20

30

40

50

スフェクション法で現行使用されているプラスミド)は少なくとも25 kbのDNAを保持することができないので、これらを意味しないものと理解される。プラスミドが含み得る最大サイズのインサートは約15 kbである。このような核酸ベクターはまた、一般に5 ~ 11 kbの最大インサートを保持するにすぎないバクテリオファージも意味しない。よって、一つの実施態様では、本発明の核酸ベクターは、プラスミド、バクテリオファージまたはエピソードではない。

【0035】

用語「内在性染色体」は、細菌人工染色体などの外因性核酸ベクターの作製または導入の前に宿主細胞に見られるゲノム染色体を意味する。

【0036】

用語「トランスフェクション」、「形質転換」および「形質導入」は、本明細書で使用する場合、標的細胞への非哺乳類またはウイルスベクターの挿入を表して使用され得る。ベクターの挿入は通常、細菌細胞については形質転換および真核細胞についてはトランスフェクションと呼ばれるが、ウイルスベクターの挿入はまた形質導入とも呼ばれ得る。当業者ならば、限定されるものではないが、物理的方法(例えば、エレクトロポレーション、細胞スクイーミング、ソノポレーション、光学的トランスフェクション、プロトプラスト融合、インペールフェクション(impalefection)、マグネトフェクション(magnetofection)、遺伝子銃または粒子衝撃)、化学試薬(例えば、リン酸カルシウム、高分岐有機化合物または陽イオンポリマー)または陽イオン脂質(例えば、リポフェクション)の使用を含む、慣用される非ウイルストランスフェクション法に気づくであろう。多くのトランスフェクション法は、プラスミドDNAの溶液と細胞との接触を必要とし、次にこれらを増殖させ、マーカー遺伝子発現に関して選択する。

【0037】

用語「プロモーター」は、遺伝子発現を駆動する配列を意味する。高レベルの発現を駆動するためには、非レトロウイルス高効率プロモーターなどの高効率プロモーターを使用することが有益であり得る。好適なプロモーターの例としては、ヒトサイトメガロウイルス(cytomegalovirus)(CMV)前初期プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス(spleen focus-forming virus)(SFFV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus)(RSV)プロモーター、またはヒト延長因子1(pEF)プロモーターなどのプロモーターが挙げられる。

【0038】

Tetオペロン(テトラサイクリン制御性転写活性化(Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation))は誘導性遺伝子発現の方法で使用可能であり、ここで、転写は、抗生物質テトラサイクリンまたはその誘導体の1つ(例えば、ドキシサイクリン)の存在下で可逆的にオンまたはオフされる。本来、Ptetプロモーターは、リプレッサーTetRとテトラサイクリン抗生物質を細胞外へくみ出すタンパク質TetAを発現する。本発明では、Tetオペロンは存在してもしなくてもよく、例えば、一つの実施態様では、Tetオペロンはプロモーター内に存在してよい。

【0039】

用語「選択マーカー」は、挿入された遺伝子(例えば、導入遺伝子)を活発に発現する細胞を選択する助けをする遺伝子を意味する。好適な選択マーカーの例としては、抗生物質(すなわち、抗生物質耐性遺伝子)、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、またはゼオシン耐性をコードする酵素が挙げられる。好適な選択マーカーの別の例としては、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein)(GFP)、赤色蛍光タンパク質(red fluorescent protein)(RFP)または青色蛍光タンパク質(blue fluorescent protein)(BFP)が挙げられる。

【0040】

用語「ポリAシグナル」は、例えば、導入遺伝子の3'側に配置された、宿主因子が転写の際に新生mRNAの末端にポリアデノシン(ポリA)テールを付加することを可能とする

10

20

30

40

50

ポリアデニル化シグナル配列を意味する。このポリ A テールは、mRNA を酵素分解から保護し、また翻訳を補助する、300 までのアデノシンリボヌクレオチドのストレッチである。従って、本発明の核酸ベクターは、ヒト グロビンまたはウサギ グロビンポリ A シグナル、シミアンウイルス 40 (simian virus 40) (SV40) 前期または後期ポリ A シグナル、ヒトインスリンポリ A シグナル、またはウシ成長ホルモンポリ A シグナルなどのポリ A シグナル配列を含み得る。一つの実施態様では、ポリ A シグナル配列は、ヒト グロビンポリ A シグナルである。

【0041】

用語「イントロン配列」は、RNA スプライシングにより最終遺伝子産物から除去されるヌクレオチド配列を意味する。エンハンサー/プロモーター領域の下流および cDNA インサートの上流でのイントロンの使用は、遺伝子発現のレベルを増強することが示されている。発現の増強は特定の cDNA インサートに依存する。よって、本発明の核酸ベクターは、ヒト グロビンイントロン、ウサギ グロビンイントロン I I またはキメラヒト グロビン - 免疫グロブリンイントロンなどのイントロンを含み得る。一つの実施態様では、イントロンは、ヒト グロビンイントロンおよび/またはウサギ グロビンイントロン I I である。

【0042】

用語「パッケージング細胞株」は、gag および pol タンパク質およびエンベロープ糖タンパク質遺伝子が安定に挿入された細胞株を意味する。あるいは、用語「産生細胞株」は、対象とする導入遺伝子を含む移入ベクターが安定に挿入されたパッケージング細胞株を意味する。本明細書に記載の核酸ベクターは、パッケージング細胞株（すなわち、少なくとも gag、pol および env 遺伝子が核酸ベクターに存在し、宿主細胞に組み込まれる場合）または産生細胞株（すなわち、核酸ベクターが、gag、pol および env 遺伝子とともに宿主細胞に組み込まれる移入ベクター成分を付加的に含んでなる場合）を作製するために使用可能であることが当業者には理解されるであろう。

【0043】

用語「安定にトランスフェクトされる」は、導入されたレトロウイルス遺伝子を後代（すなわち、娘細胞）に受け渡すことができる細胞株を意味し、これはトランスフェクトされた DNA が内在性染色体に組み込まれていたためか、また外因性染色体の安定な継承を介したものである。

【0044】

核酸ベクター

本発明の 1 つの面によれば、非哺乳動物複製起点と少なくとも 25 キロベース (kb) の DNA とを保持する能力を含んでなる核酸ベクターであって、
gag および pol タンパク質；ならびに
env タンパク質またはその機能的置換体
をコードするレトロウイルス核酸配列を含んでなることを特徴とする核酸ベクターが提供される。

【0045】

特に、前記レトロウイルス核酸配列のそれぞれは、核酸ベクター内に個々の発現構築物として配置され得る。

【0046】

レトロウイルスベクターを作製するための現行の方法は、宿主細胞へのレトロウイルス遺伝子の一時的トランスフェクションを含む。しかしながら、コストと労力がかかり、スケールアップが難しいことから、この方法には多くの欠点が付随してきた。1 つの解決策は、一時的トランスフェクションに付随する問題を回避するためおよび変動のあるレトロウイルスベクター生産を減らすためにレトロウイルスパッケージング遺伝子を安定に組み込むパッケージング細胞株を操作により作出することである。

【0047】

本発明者らは、本明細書に記載の核酸ベクターが、レトロウイルスベクター産生法に付随

10

20

30

40

50

するこれまでの欠点を改善するレトロウイルスパッケージング細胞株を作製するために使用可能であることを見出した。例えば、レトロウイルスパッケージング細胞株を製造する既知の方法は、各レトロウイルス遺伝子が導入された後に複数回の選択を含む。この過程には最大6か月かかり、極めて労働集約的である。核酸ベクターに総てのレトロウイルス遺伝子を含めることにより、これらのレトロウイルス遺伝子は次に単一の工程で哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に挿入することができる。従って、核酸ベクターの使用は、本明細書で提案されるように、選択圧を小さくし、サイレンシング時間枠を短縮し、かつ、潜在的パッケージング細胞のより迅速なスクリーニングを可能とする。さらに、核酸ベクターに含まれるレトロウイルス遺伝子は、総てが哺乳動物宿主細胞の内在性染色体の単一の遺伝子座に組み込まれると考えられ、これにより個々のレトロウイルス遺伝子がサイレントとなるリスクが減り、総てのレトロウイルス遺伝子が一様に発現されることが保証される。

10

【0048】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムをコードする核酸配列を付加的に含んでなる。レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムは通常、一時的トランスフェクション法に使用される「移入ベクター」に含まれることが理解されるであろう。移入ベクタープラスミドは一般に、プロモーター（例えば、CMV）、3'LTR（自己不活性化（すなわち、SIN）3'-LTRであってもなくてもよい）、5'LTR（U5領域を含んでも含まなくてもよい）、キャプシド形成配列（ ）および可能性としてはプロモーターに連結された導入遺伝子を含む。

20

【0049】

一つの実施態様では、複数コピーの、レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノム（すなわち、移入ベクター）が核酸ベクターに含まれる。複数コピーの移入ベクターは、より高いウイルスベクター力価をもたらすと予想される。例えば、核酸ベクターは、2以上、例えば、3、4、5、6、7、8、9または10以上のコピーの、レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノム（すなわち、移入ベクター）を含み得る。

【0050】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、1または複数の組換え部位を含む。これは、標的配列がリコンビナーゼ酵素の存在下で部位特異的に哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれることを可能とする。リコンビナーゼ酵素は、2つの組換え部位の間の組換え反応を触媒する。

30

【0051】

多くのタイプの部位特異的組換え系が当技術分野で公知であり、いずれの好適な組換え系を本発明で使用してもよい。例えば、一つの実施態様では、組換え部位は、ファージの int/att系、バクテリオファージP1のCre/lox系、酵母のFLP/FRT系、ファージMuのGin/gixリコンビナーゼ系、Cinリコンビナーゼ系、大腸菌のPinリコンビナーゼ系およびpSR1プラスミドのR/Rs系、またはそれらの任意の組合せから選択されるか、またはそれらに由来する。さらなる実施態様では、組換え部位は、att部位（例えば、ファージ由来）であり、このatt部位は、インテグラーゼの存在下で部位指定組込みを可能とする。「インテグラーゼ」という場合には、int/att系となお適合する突然変異インテグラーゼ、例えば、WO2002/097059に記載の修飾インテグラーゼについての言及を含むことが理解されるであろう。

40

【0052】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、P1由来人工染色体（PAC）、フォスミドまたはコスミドから選択される。さらなる実施態様では、核酸ベクターは、細菌人工染色体（BAC）である。

【0053】

細菌人工染色体

用語「細菌人工染色体」または「BAC」は、大きな外因性DNAインサートを保持することができる細菌プラスミド由来のDNA構築物を意味する。それらは通常およそ350

50

k bの最大DNAインサートを保持することができる。BACは、細菌の細胞分裂後にプラスミドの様な分布を促進する分配遺伝子を含む、十分に特徴付けられた細菌機能的稔性プラスミド(Fプラスミド)から開発された。これはBACが安定に複製し、内在細菌ゲノム(例えば、大腸菌)とともに分離することを可能とする。BACは通常、少なくとも1コピーの複製起点(例えば、oriSまたはoriV遺伝子)、repE遺伝子(プラスミド複製およびコピー数の調節のため)および細菌細胞内でのBACの安定な維持を確保する分配遺伝子(例えば、sopA、sopB、parA、parBおよび/またはparC)を含む。BACは通常、環状およびスーパーコイル型であり、これはそれらをYACなどの直鎖人工染色体よりも回収容易とする。それらはまた、エレクトロポレーションなどの簡単な方法を用い、比較的容易に細菌宿主細胞に導入することもできる。

10

【0054】

一つの実施態様では、細菌人工染色体は、oriS遺伝子を含んでなる。一つの実施態様では、細菌人工染色体は、repE遺伝子を含んでなる。一つの実施態様では、細菌人工染色体は、分配遺伝子を含んでなる。さらなる実施態様では、分配遺伝子は、sopA、sopB、parA、parBおよび/またはparCから選択される。なおさらなる実施態様では、細菌人工染色体は、sopAおよびsopB遺伝子を含んでなる。

【0055】

本発明で使用するためのBACは、例えば、LUCIGEN(商標)(全長骨格配列については、ゲノム受託番号EU101022.1を参照)からのpSMART BACなど、商業ソースから入手可能である。このBACはL-アラビノース「コピーアップ」系を含み、これはまた、TrfA複製タンパク質の存在下でのみ活性なoriVミディウムコピー複製起点も含む。TrfAの遺伝子は、細菌宿主細胞のゲノムのL-アラビノース誘導プロモーターaraC-PBADの制御下に組み込むことできる(Wild et al. (2002) Genome Res. 12(9): 1434-1444参照)。L-アラビノースの添加はTrfAの発現を誘導し、TrfAはoriVを活性化し、細胞当たり50コピーまでプラスミドを複製させる。

20

【0056】

酵母人工染色体

用語「酵母人工染色体」または「YAC」は、酵母DNAが細菌プラスミドに組み込まれている染色体を意味する。それらは自律的複製配列(autonomous replication sequence)(ARS)(すなわち、複製起点)、セントロメアおよびテロメアを含む。BACとは異なり、YACは直鎖であり、従って、宿主細胞後代に受け渡される際に、染色体の各末端に、その末端を分解から保護する酵母テロメアを含む。YACは、100~2000 kbであれば、一定範囲のDNA挿入サイズを保持できる。

30

【0057】

P1由来人工染色体

用語「P1由来人工染色体」または「PAC」は、P1バクテリオファージおよび細菌FプラスミドのDNAに由来するDNA構築物を意味する。それらは通常、およそ100~300 kb最大DNAインサートを保持でき、大腸菌においてクローニングベクターとして使用される。PACは、精製および細菌宿主細胞への導入が容易など、BACと同様の利点を持つ。

40

【0058】

コスミドおよびフォスミド

用語「コスミド」は、バクテリオファージ に由来するcos部位を付加的に含む細菌プラスミドに由来するDNA構築物を意味する。コスミドは一般に、細菌複製起点(例えば、oriV)、選択マーカー、クローニング部位および少なくとも1つのcos部位を含む。コスミドは通常、40~45 kbの最大DNAインサートを受容する。コスミドは、大腸菌細胞感染において標準的な細菌プラスミドよりも効率的であることが示されている。用語「フォスミド」は、細菌Fプラスミドに基づくこと以外はコスミドと同様の非哺乳動物核酸ベクターを意味する。特に、それらは、大きなDNA断片のクローニングを可能

50

とするFプラスミド複製起点および分配機構を使用する。フォスミドは通常、40kbの最大DNAインサートを受容する。

【0059】

レトロウイルス

レトロウイルスは、擬似二倍体一本鎖RNAゲノムを含むウイルス科である。それらは、RNAゲノムからDNAを産生する逆転写酵素をコードし、このDNAはその後、宿主細胞のDNAに挿入され得る。本明細書に記載の本発明は、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子を産生するために使用され得る。本発明のレトロウイルスベクター粒子は、任意の好適なレトロウイルスから選択されるか、またはそれに由来するものであり得る。

【0060】

一つの実施態様では、レトロウイルスベクター粒子は、レンチウイルス、アルファレトロウイルス、ガンマレトロウイルスまたは泡沫レトロウイルス、例えば、レンチウイルスまたはガンマレトロウイルス、特に、レンチウイルスに由来するか、またはから選択される。さらなる実施態様では、レトロウイルスベクター粒子は、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、EIAVおよびVisnaからなる群から選択されるレンチウイルスである。レンチウイルスは非分裂（すなわち、静止）細胞に感染することができ、これにより、レンチウイルスは遺伝子療法にとって魅力的なレトロウイルスベクターとなる。なおさらなる実施態様では、レトロウイルスベクター粒子はHIV-1であるか、またはHIV-1に由来する。いくつかのレトロウイルスのゲノム構造を当技術分野において見出すことができる。例えば、HIV-1の詳細はNCBI Genbank（ゲノム受託番号AF033819）から見出すことができる。HIV-1は、最も理解されているレトロウイルスの1つであり、従って、レトロウイルスベクターとしてしばしば使用されている。

【0061】

レトロウイルス遺伝子

総てのレトロウイルスに共通の核酸配列は、次のようにより詳しく説明することができる：長い末端反復配列（LTR）：レトロウイルスゲノムの基本構造は、レトロウイルス産生に必要とされる遺伝子の間またはそれらが位置する範囲内に5'-LTRおよび3'-LTRを含んでなる。LTRはレトロウイルスの組み込みおよび転写に必要とされる。それらはまた、レトロウイルス遺伝子の発現を制御するためのプロモーター配列として働くこともできる（すなわち、それらがシス作用遺伝子である）。LTRは、U3、R、U5と呼ばれる3つの部分領域から構成され、U3はRNAの3'末端にユニークな配列に由来し；RはRNAの量末端で反復する配列に由来し；U5はRNAの5'末端にユニークな配列に由来する。よって、一つの実施態様では、核酸ベクターは、5'-および3'-LTRを付加的に含んでなる。さらなる実施態様では、5'LTRのU5領域を欠失させ、非HIV-1ポリAテールに置換することができる（Hanawa et al. (2002) Mol. Ther. 5(3): 242-51参照）。

【0062】

複製可能ウイルスの生成に関する安全性の問題に取り組むために、3'LTRのU3領域中の、TATAボックスならびに転写因子Sp1およびNF- κ Bの合部位を含む切片を欠失させることによって自己不活性化(self-inactivating)（SIN）ベクターが開発された（Miyoshi et al. (1998) J. Virol. 72(10):8150-7参照）。この欠失は、感染細胞における逆転写および組み込みの後に5'LTRに移入され、これにより、LTRの転写の不活性化が起こる。これは自己不活性化レンチウイルスに基づくベクター系として知られ、本発明に含まれ得る。

【0063】

：レトロウイルスRNAのキャプシド形成は、レトロウイルスゲノムの5'末端に位置する（プシー）配列の力で起こる。また、プシー配列の下流にあってgagコード領域へと延伸する配列が効率的なレトロウイルスベクター産生に関与することも当技術分野でよく知られている（Cui et al. (1999) J. Virol. 73(7): 6171-6176参照）。一つの実施態様では、核酸ベクターは、（プシー）配列を付加的に含んでなる。

【 0 0 6 4 】

プライマー結合部位(Primer Binding Site) (P B S) : レトロウイルスゲノムは、5' - L T R の U 5 領域の後に存在する P B S を含む。この部位は、逆転写の開始に必要とされる t R N A プライマーと結合する。一つの実施態様では、核酸ベクターは、P B S 配列を付加的に含んでなる。

【 0 0 6 5 】

P P T : レトロウイルスゲノムは、レトロウイルスゲノムの 3' 末端付近に、ポリプリントラクト(polypurine tracts) (P P T) と呼ばれるプリンの短いストレッチを含む。これらの P P T は、逆転写中にプラス鎖 D N A 合成の R N A プライマーとして機能する。複雑なレトロウイルス (例えば、H I V - 1) は、より中央に位置する第 2 の P P T (すなわち、セントラルポリプリントラクト(central polypurine tract) (c P P T)) を含み、これは D N A 合成の開始の第 2 の部位を提供する。c P P T をコードするレトロウイルスベクターは、形質導入およびトランス遺伝子発現が増強されることが示されている (Barry et al. (2001) Hum. Gene Ther. 12(9):1103-8 参照)。一つの実施態様では、核酸ベクターは、3' - P P T 配列および / または c P P T 配列を付加的に含んでなる。

【 0 0 6 6 】

上記の非コード領域のゲノム構造は当業者の周知である。例えば、H I V - 1 の非コード領域のゲノム構造に関する詳細は、N C B I G e n b a n k からゲノム受託番号 A F 0 3 3 8 1 9 として、または H I V - 1 H X B 2 (慣用 H I V - 1 参照株) ではゲノム受託番号 K 0 3 4 5 5 として見出すことができる。一つの実施態様では、非コード領域は、ゲノム受託番号 K 0 3 4 5 5 の、例えば、塩基対 4 5 4 ~ 1 1 2 6 (R - U 5 - P B S - G a g の場合)、7 6 2 2 ~ 8 4 7 9 (R R E の場合) または 7 7 6 9 ~ 8 1 4 6 (R R E の場合)、4 7 8 1 ~ 4 8 9 8 (c P P T の場合)、9 0 1 5 ~ 9 1 2 0 および 9 5 2 1 ~ 9 7 1 9 (d N E F - P P T - s i n U 3 - R - U 5 の場合) から取得可能な配列に由来する。

【 0 0 6 7 】

G a g / p o l : g a g および p o l 遺伝子の発現は、g a g と g a g p o l の間の翻訳フレームシフトに依存する。両方とも成熟の際に切断されるポリタンパク質である。レトロウイルスベクターの主要な構造マトリックス、キャプシド、およびヌクレオキャプシドタンパク質は g a g によりコードされている。p o l 遺伝子は、レトロウイルス酵素 : i) レトロウイルス R N A ゲノムの二本鎖 D N A への逆転写に不可欠な逆転写酵素、i i) レトロウイルス D N A ゲノムの宿主細胞染色体への組込みを可能とするインテグラーゼ、および i i i) レトロウイルスの成熟した機能的タンパク質を産生するために合成されたポリタンパク質を切断するプロテアーゼをコードしている。一つの実施態様では、g a g および p o l タンパク質をコードするレトロウイルス核酸配列は H I V - 1 H X B 2 配列に由来し、この配列は、ゲノム受託番号 K 0 3 4 5 5 の、例えば、塩基対 7 9 0 ~ 5 1 0 5 から取得可能である。

【 0 0 6 8 】

E n v : e n v (「エンベロープ」) 遺伝子は、レトロウイルスエンベロープの表面および膜貫通成分 (例えば、H I V - 1 の糖タンパク質 g p 1 2 0 および g p 4 1) をコードし、レトロウイルス - 細胞膜融合に関与する。レトロウイルスベクターの組織向性を拡大するために、本明細書に記載のレトロウイルスベクターは、別のウイルス由来のエンベロープタンパク質を用いてシュードタイピング(pseudotyped)してもよい。シュードタイピング(Pseudotyping)は、レンチウイルスベクターを含むレトロウイルスベクターの宿主細胞範囲が拡大され得る、またはレトロウイルスベクター粒子上の糖タンパク質(glycoproteins) (G P) を変化させることにより変更され得る (例えば、他のエンベロープウイルスから得られるもしくは他のエンベロープウイルスに由来する G P を使用するか、または合成 / 人工 G P を使用することによる) プロセスを意味する。レトロウイルスベクターのシュードタイピングに最も慣用される糖タンパク質は、広い向性と高いベクター粒子安定性に起因して水疱性口内炎ウイルス G P (Vesicular stomatitis virus GP) (V S V) で

10

20

30

40

50

ある。しかしながら、他の糖タンパク質もシュードタイピングに使用可能であることが当業者には理解されるであろう（引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる Cronin et al. (2005) Curr. Gene Ther. 5(4):387-398参照）。シュードタイピングに使用されるウイルスの選択はまた、いくつかのシュードタイプは組織種選好性を持つことが示されていることから、標的とされる細胞および/または器官の種類によっても異なり得る。

【 0 0 6 9 】

一つの実施態様では、env タンパク質またはその機能的置換体は、ベジクロウイルス（例えば、水疱性口内炎ウイルス）、リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス、モコラウイルス）、アレナウイルス（例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(Lymphocytic choriomeningitis virus) (LCMV)）、アルファウイルス（例えば、ロスリバーウイルス(Ross River virus) (RRV)、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス(Semliki Forest virus) (SFV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス）、フィロウイルス（例えば、レストンエボラウイルス、ザイルエボラウイルス、ラッサ熱ウイルス）、アルファレトロウイルス（例えば、トリ白血病ウイルス(Avian leukosis virus) (ALV)）、ベータレトロウイルス（例えば、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス(Jaagsiekte sheep retrovirus) (JSRV)）、ガンマレトロウイルス（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス(Moloney Murine leukaemia virus) (MLV)、テナガザル白血病ウイルス(Gibbon ape leukaemia virus) (GALV)、ネコ内在性レトロウイルス(RD114)）、デルタレトロウイルス（例えば、ヒトTリンパ球向性ウイルス1(Human T-lymphotrophic virus 1) (HTLV-1)）、スプマウイルス（例えば、ヒト泡沫状ウイルス）、レンチウイルス（例えば、マエディ・ビスナウイルス(Maedi-visna virus) (MVV)）、コロナウイルス（例えば、SARS-CoV）、レスピロウイルス（例えば、センダイウイルス、呼吸器系合胞体ウイルス(Respiratory syncytia virus) (RSV)）、ヘパチウイルス（例えば、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus) (HCV)）、インフルエンザウイルス（例えば、インフルエンザウイルスA）および核多角体ウイルス（例えば、オートグラフ・カルフォルニカ多角体病ウイルス(Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus) (AcMNPV)）から選択されるウイルスから得られるか、またはそれらのウイルスに由来する。さらなる実施態様では、env タンパク質またはその機能的置換体は、水疱性口内炎ウイルスから得られるか、またはそのウイルスに由来する。この実施態様では、レトロウイルス粒子がより広い宿主細胞範囲に感染し、野生型エンベロープタンパク質を産生するために組換えの機会を少なくすることを可能とする水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSVG)タンパク質が使用可能である。さらなる実施態様では、env タンパク質またはその機能的置換体をコードするレトロウイルス核酸配列は、ゲノム受託番号J02428.1の、例えば、塩基対3071~4720から取得可能な配列に由来する。

【 0 0 7 0 】

本明細書に記載の構造遺伝子は、総てのレトロウイルスに共通する。さらなる補助遺伝子は、種々のタイプのレトロウイルスで見出すことができる。例えば、レンチウイルス、例えば、HIV-1は、rev、vif、vpu、vpr、nefおよびtatとして知られるさらに6つの補助遺伝子を含む。他のレトロウイルスは、本明細書に記載の遺伝子に類似する補助遺伝子を持ち得るが、それらは文献に常に同じ名称で示されているわけではない。Tomonaga and Mikami (1996) J. Gen. Virol. 77(Pt 8):1611-1621などの参照文献に種々のレトロウイルス補助遺伝子が記載されている。

【 0 0 7 1 】

Rev: 補助遺伝子 rev (「ビリオンのレギュレーター(regulator of virion)」は、Rev 応答エレメント(Rev Response element) (RRE) に結合し、レトロウイルス転写産物の輸出を促進する補助タンパク質をコードする。この遺伝子のタンパク質産物は、Rev 応答エレメント (RRE) を含むレトロウイルスmRNAの断片が核から細胞質へ輸出されることを可能とする。RRE配列は、複雑な折りたたみ構造を形成すると予想され

る。revのこの特定の役割は、スプライシングステップと核輸出ステップの強固な共役を反映する。一つの実施態様では、核酸ベクターは、RRE配列を含んでなる。さらなる実施態様では、RRE配列は、HIV-1 HXB2配列に由来し、この配列はゲノム受託番号K03455の、例えば、塩基対7622~8479、または7769~8146、特に、塩基対7622~8479から取得可能である。

【0072】

RevはRREと結合し、シングルスプライシング(env、vif、vprおよびvpu)または非スプライシング(gag、polおよびゲノムRNA)ウイルス転写産物の輸出を促進して、遺伝子翻訳およびパッケージングのような下流事象をもたらす(Suhani and Reddy (2009) Curr. HIV Res. 7(1): 91-100参照)。一つの実施態様では、核酸ベクターは、補助遺伝子revまたはその類似遺伝子(すなわち、他のレトロウイルスもしくは機能的に類似の系由来)を付加的に含んでなる。rev遺伝子の包含は、特にRREエレメントもまた輸送される転写産物に含まれる場合に、核から細胞質へのレトロウイルスベクターゲノムのRNA転写産物の効率の輸出を保証する。さらなる実施態様では、rev遺伝子は、ゲノム受託番号M11840の塩基対970~1320(すなわち、HIV-1クローン12cDNA、HIVPCV12遺伝子座)と少なくとも60%の配列同一性、例えば、少なくとも70%の配列同一性を含んでなる。もう一つの実施態様では、rev遺伝子は、ゲノム受託番号K03455.1(すなわち、1型ヒト免疫不全ウイルス、HXB2)の塩基対5970~6040および8379~8653と少なくとも60%の配列同一性、例えば、少なくとも70%、80%、90%または100%の配列同一性を含んでなる。

【0073】

補助遺伝子はレトロウイルス複製および病因に役割を果たすと思われ、従って、多くの現行のウイルスベクター産生系は、これらの遺伝子のいくつかを含まない。例外は通常存在するrevであり、またはrev/RRE系に類似の系は潜在的に使用される。よって、一つの実施態様では、補助遺伝子vpr、vif、vpu、tatおよびnef、または類似の補助遺伝子のうち1以上をコードする核酸配列は、前記補助遺伝子がレトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムから除かれるか、または機能的補助タンパク質をコードできないように破壊される。さらなる実施態様では、補助遺伝子vpr、vif、vpu、tatおよびnef、または類似の補助遺伝子のうち少なくとも2以上、3以上、4以上、または総てが、記補助遺伝子がレトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムから除かれるか、または機能的補助タンパク質をコードできないように破壊される。機能的補助遺伝子の除去は遺伝子全体の除去を必要とせず、その遺伝子の一部の除去またはその遺伝子の破壊で十分である。

【0074】

複製欠陥レトロウイルスベクター粒子をコードする核酸配列は、レトロウイルスベクター粒子が基づくレトロウイルスの野生型遺伝子と同じ、またはそれに由来するものであり得、すなわち、それらの配列は、野生型ウイルスに含まれる配列の遺伝的にまたはそれ以外の点で変更されたバージョンであり得ると理解される。よって、核酸ベクターまたは宿主細胞ゲノムに組み込まれるレトロウイルス遺伝子は、野生型遺伝子のコドン最適化バージョンも意味し得る。

【0075】

付加的成分

本発明の核酸ベクターは、さらなる付加的成分を含んでなり得る。これらの付加的特徴は、例えば、翻訳のために転写産物を安定化させる、遺伝子発現のレベルを増強する、および遺伝子転写のオン/オフを切り替える助けをするために使用され得る。

【0076】

本発明により産生されるレトロウイルスベクター粒子は、遺伝子療法の方法で使用され得る。よって、一つの実施態様では、核酸ベクターは、1以上の導入遺伝子を付加的に含んでなる。この導入遺伝子は、標的疾患を治療または改善するために使用され得る遺伝子産

10

20

30

40

50

物をコードする治療上有効な遺伝子であり得る。導入遺伝子は、例えば、アンチセンス RNA、リボザイム、タンパク質（例えば、腫瘍抑制タンパク質）、毒素、抗原（抗体誘導する、またはT細胞もしくは細胞傷害性T細胞を助けるために使用され得る）または抗体（例えば、一本鎖抗体）をコードし得る。一つの実施態様では、導入遺伝子は、グロビンをコードする。

【0077】

導入遺伝子を含有する複数コピーの移入ベクターはより高いレトロウイルスベクター力価を生じると予想され、よって、一つの実施態様では、核酸ベクターは、複数コピーの導入遺伝子、例えば、2以上、特に、3以上のコピーの導入遺伝子を含んでなる。場合によっては、疾患を処置するために2以上の遺伝子産物が必要とされ、よって、さらなる実施態様では、核酸ベクターは、2以上、例えば、3以上、または4以上の異なる導入遺伝子を付加的に含んでなる。

10

【0078】

本明細書で「導入遺伝子」という場合には、導入される哺乳動物宿主細胞には存在しない、または十分に発現していない異種または外来DNAを意味する。これは、例えば、標的遺伝子が哺乳動物宿主細胞で適正に発現されず、従って、標的遺伝子の矯正型が導入遺伝子として導入される場合を含み得る。よって、導入遺伝子は、潜在的治療対象の遺伝子であり得る。導入遺伝子は、他の細胞種、または別の種から得られたものであっても、または合成産生されたものであってもよい。あるいは、導入遺伝子は、天然遺伝子に存在するものとは異なる調節領域と機能的に連結された宿主細胞から得られたものであってもよい。あるいは、導入遺伝子は、宿主細胞に存在する遺伝子の異なる対立遺伝子または変異体であってもよい。

20

【0079】

遺伝子療法のための目的は、治療目的で生細胞の遺伝物質を修飾することであり、それは治療効果を達成するために細胞に機能的遺伝子を導入することを含む。本明細書に記載の核酸ベクターおよび宿主細胞を用いて作製されたレトロウイルスベクターは、標的細胞をトランスフェクトし、潜在的治療対象の遺伝子の発現を誘導するために使用できる。よって、レトロウイルスベクターは、限定されるものではないが、遺伝的障害、癌、および特定のウイルス感染を含む病態に罹患している、ヒト対象などの哺乳動物対象の処置のために使用できる。

30

【0080】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、転写調節エレメントを付加的に含んでなる。例えば、本明細書に記載のエレメントはいずれも、発現が制御可能なようにプロモーターに機能的に連結することができる。本明細書に言及されるプロモーターは、構成的に作用し得るか、または例えば、調節タンパク質の存在下で誘導可能な既知のプロモーターの全体または一部を含み得る。一つの実施態様では、核酸ベクターは、高効率プロモーター、例えば、CMVプロモーターを付加的に含んでなる。このプロモーターは、非哺乳動物核酸ベクターにコードされているエレメントの高レベルの発現を促進するという利点を有する。さらなる実施態様では、CMVプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス株AD169に由来する配列を含んでなる。この配列は、ゲノム受託番号X17403の、例えば、塩基対173731~174404から取得可能である。

40

【0081】

一つの実施態様では、プロモーター（例えば、CMVプロモーター）は、少なくとも1つのTetオペロンを付加的に含んでなる。Tetオペロン系は、核酸ベクター内に含まれるレトロウイルス配列の発現を制御するために使用され得る。簡単に述べれば、Tetリプレッサータンパク質は、プロモーターに導入されるTetオペロン部位に結合することにより発現を遮断する。よって、TetリプレッサーがTetオペロンと結合している場合には、遺伝子発現は見られない。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンを添加すると、Tetリプレッサーは隔離されてプロモーター活性を可能とし、よって、遺伝子発現がオンにされる。Tetオペロン系は、Invitrogenから入手可能なpcDNA

50

(商標) 4 / T O 哺乳動物発現ベクターで使用される T e t オペロンなど、広く入手可能である。

【 0 0 8 2 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、テトラサイクリン耐性オペロンリプレッサータンパク質(「T e t リプレッサー」または「T e t R」)を付加的に含んでなる。さらなる実施態様では、T e t リプレッサーは、コドンが最適化されている。

【 0 0 8 3 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、クロマチンインスレーターなどのインスレーターを付加的に含んでなる。用語「インスレーター」は、プロモーターとエンハンサーの間の相互作用を遮断する遺伝子配列を意味する。さらなる実施態様では、インスレーター(例えば、クロマチンインスレーター)は、レトロウイルス核酸配列のそれぞれの間に存在する。これは、隣接するレトロウイルス核酸配列間のプロモーター干渉(すなわち、ある転写単位からのプロモーターが隣接する転写単位の発現を障害する場合)を防ぐ助けをする。核酸ベクターの、レトロウイルス核酸配列のそれぞれの間にインスレーターが存在すれば、これらは核酸ベクター内に個々の発現構築物として配置されてもよいと理解される。例えば、レトロウイルス核酸配列をコードする各配列は、その固有のプロモーターおよび/またはイントロンおよび/またはポリAシグナルを有する。一つの実施態様では、クロマチンインスレーターは、ニワトリ(G a l l u s g a l l u s) H S 4 インスレーター配列(例えば、ゲノム受託番号 U 7 8 7 7 5 . 2、塩基対 1 ~ 1 2 0 5 参照)と少なくとも 9 0 % の配列同一性、例えば、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する。

【 0 0 8 4 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、選択マーカーを付加的に含んでなる。これは、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子をコードする核酸配列が組み込まれている細胞を選択することを可能とする。さらなる実施態様では、選択マーカーは、ゼオシン、カナマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子、特に、ゼオシン(Z e o R)耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子である。なおさらなる実施態様では、ゼオシン耐性遺伝子は、ストレプトアロテिकास・ヒンダスタンス(Streptoalloteichushindustans) b l e 遺伝子に由来する、例えば、ゲノム受託番号 X 5 2 8 6 9 . 1 の塩基対 3 ~ 3 7 7 参照。

【 0 0 8 5 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、ポリAシグナルを付加的に含んでなる。ポリAシグナルの使用は、m R N A を酵素分解から保護し、翻訳を補助するという利点を有する。さらなる実施態様では、ポリAシグナルは、S V 4 0、ウシ成長ホルモンおよび/またはヒト グロビンから得られるか、またはそれに由来する。一つの実施態様では、ポリAシグナルは、S V 4 0 前記ポリAシグナル(例えば、ゲノム受託番号 E F 5 7 9 8 0 4 . 1、マイナス鎖由来の塩基対 2 6 6 8 ~ 2 5 3 8 参照)に由来する。一つの実施態様では、ポリAシグナルは、ヒト グロビンポリAシグナル(例えば、ゲノム受託番号 G U 3 2 4 9 2 2 . 1、塩基対 3 3 9 4 ~ 4 1 6 2 参照)に由来する。

【 0 0 8 6 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、イントロン配列を付加的に含んでなる。エンハンサー/プロモーター領域の下流および c D N A インサート(すなわち、導入遺伝子)の上流でのイントロンの使用は、そのインサートの発現レベルを増強することが知られている。さらなる実施態様では、イントロン配列は、ヒト グロビンイントロンまたはウサギ グロビンイントロン I I 配列である。一つの実施態様では、ヒト グロビンイントロンは、ゲノム受託番号 K M 5 0 4 9 5 7 . 1 (例えば、塩基対 4 7 6 ~ 1 3 9 3 由来)で取得可能な配列に由来する。一つの実施態様では、ウサギ グロビンイントロン I I は、ゲノム受託番号 V 0 0 8 8 2 . 1 (例えば、塩基対 7 1 8 ~ 1 2 9 0 由来)で取得可能な配列に由来する。

【 0 0 8 7 】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element)(W P R

10

20

30

40

50

E)を付加的に含んでなる。WPREの存在は発現を増強することが示されており、従って、高レベルの発現を達成する上で有益である可能性がある。さらなる実施態様では、WPREは、ゲノム受託番号J04514.1(例えば、塩基対1093~1684由来)で取得可能な配列に由来する。

【0088】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、内部リボソーム進入部位(internal ribosome entry site)(IRES)を付加的に含んでなる。IRESは、5'キャップの下流の5'非翻訳領域(開始複合体のアセンブリに必要とされる)に通常見られる構造化されたRNAエレメントである。IRESは翻訳開始因子によって認識され、キャップ非依存的翻訳を可能とする。さらなる実施態様では、IRESは、脳心筋炎ウイルス(Encephalomyocarditis virus)(EMCV)ゲノム(例えば、ゲノム受託番号KF836387.1、塩基対151~724参照)に由来する。

10

【0089】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、多重クローニング部位(Multiple Cloning Site)(MCS)を付加的に含んでなる。MCSは、核酸ベクター内の、多重制限部位(例えば、10、15または20部位)を含む短いDNAセグメントである。これらの部位は通常、エンドヌクレアーゼが一箇所でのみ切断することを保証するために核酸ベクター内に一度しか見られない。これはレトロウイルス遺伝子が適当なエンドヌクレアーゼ(すなわち、制限酵素)を用いて容易に挿入されることを可能とする。

【0090】

20

これらの構築物は核酸ベクター内にいずれの順序で配置されていてもよいことが当業者には理解されるであろう。例示的实施態様では、核酸ベクターは、以下のインサートを含んでなる：gagおよびpolタンパク質をコードするレトロウイルス核酸配列、envタンパク質またはその機能的置換体(例えば、VSVG)をコードするレトロウイルス核酸配列、補助遺伝子rev(例えば、コドン最適化rev配列)もしくはその類似遺伝子または機能的に類似の系をコードするレトロウイルス核酸配列、テトラサイクリン耐性オペロンリプレッサータンパク質(TetR)、内部リボソーム進入部位、および選択マーカー(例えば、ゼオシン耐性選択マーカー)(すなわち、GagPol-Env-Rev-Tetリプレッサー-IRES-抗生物質耐性マーカー-残りのBAC配列(「BAC骨格」)；例えば、GagPol-(野生型)VSVG-(コドン最適化)Rev-Tetリプレッサー-IRES-ゼオシン耐性-pSMARTBAC)。さらなる実施態様では、インスレーター(例えば、クロマチンインスレーター)が、gagpol、envおよびrev配列のそれぞれの間に存在する。さらなる実施態様では、プロモーターがgagpol、envおよびrev配列のそれぞれの前に存在する。なおさらなる実施態様では、少なくとも1コピーの移入ベクター配列(すなわち、レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムをコードする核酸配列を含んでなる)がgagpol配列の前に存在する。

30

【0091】

一つの実施態様では、核酸ベクターは、以下のインサートを含んでなる：インスレーター(例えば、クロマチンインスレーター)、プロモーター(例えば、場合によりTetオペロン配列を含んでなるCMVプロモーター)、イントロン(例えば、ヒトグロビンイントロン)、gagおよびpolタンパク質をコードするレトロウイルス核酸配列、RREをコードするレトロウイルス核酸、ポリAシグナル(例えば、ヒトグロビンポリAシグナル)、インスレーター(例えば、クロマチンインスレーター)、プロモーター(例えば、場合によりTetオペロン配列を含んでなるCMVプロモーター)、イントロン(例えば、ヒトグロビンイントロン)、envタンパク質またはその機能的置換体(例えば、VSVG)をコードするレトロウイルス核酸配列、ポリAシグナル(例えば、ヒトグロビンポリAシグナル)、インスレーター(例えば、クロマチンインスレーター)、プロモーター(例えば、場合によりTetオペロン配列を含んでなるCMVプロモーター)、補助遺伝子revもしくはその類似遺伝子または機能的に類似の系をコードするレトロウイルス核酸配列、ポリAシグナル(例えば、ヒトグロビンポリAシグナル)、インスレー

40

50

ター（例えば、クロマチンインスレーター）、プロモーター（例えば、CMVプロモーター）、イントロン（例えば、ウサギ グロビンイントロン）、テトラサイクリン耐性オペロンリプレッサータンパク質（TetR）、内部リボソーム進入部位、選択マーカー（例えば、ゼオシン耐性選択マーカー）、ポリAシグナルおよび多重クローニング部位。

【0092】

核酸配列は核酸ベクターに順次導入してよい。これは必要とされる核酸配列の総てが核酸ベクターに首尾良く組み込まれることを保証するように、各組込み後の選択を可能とする。あるいは、少なくとも2以上の核酸配列が同時に核酸ベクターに導入される。

【0093】

本明細書に記載の付加的遺伝子は、当技術分野で公知の標準的な分子クローニング技術により、例えば、制限エンドヌクレアーゼおよびライゲーション技術を用いて、核酸ベクターに導入され得ることが理解されるであろう。さらに、核酸ベクター、特に、BAC、PAC、フォスミドおよび/またはコスミドは、エレクトロポレーションなどの標準的技術によって細菌宿主細胞（例えば、大腸菌細胞、特に、大腸菌DH10B株）に導入され得る。

【0094】

使用

本発明のさらなる面によれば、レトロウイルスパッケージングまたは産生細胞株を作製する上で使用するための本明細書に定義される核酸ベクターが提供される。

【0095】

本明細書に記載の核酸ベクターは、レトロウイルスベクター作製を大幅に簡単にするレトロウイルスパッケージング細胞株を作出するために使用可能である。導入遺伝子が核酸ベクターに含まれていれば、これが産生細胞株の作出のために使用されることが理解されるであろう。

【0096】

本明細書に記載されるように、一時的トランスフェクションに付随する欠点を克服するためには、安定なレトロウイルスパッケージング（または産生）細胞株を開発することが有用となろう。本明細書に記載の核酸ベクターは、レトロウイルスパッケージングに必要とされる必須遺伝子を含有する大きなDNAインサートを保持することができ、これは次に哺乳動物宿主細胞の内在ゲノムに一工程で組み込まれ得るので、前記パッケージング細胞株の作製に使用可能である。

【0097】

宿主細胞

本発明のさらなる面によれば、

gagおよびpolタンパク質；ならびに

envタンパク質またはその機能的置換体

をコードする核酸配列を含んでなるレトロウイルスパッケージング細胞

が提供され、

前記核酸配列は総て、レトロウイルスパッケージング細胞ゲノム内の単一の遺伝子座に位置する。

【0098】

大きな核酸ベクターにレトロウイルス遺伝子の総てを含めることの利点は、それらがまず、取り扱いおよび操作がはるかに容易な微生物細胞（例えば、細菌または酵母細胞）で調製でき、その後、一工程で哺乳動物細胞に組み込まれるということである。これは選択圧を和らげ、ひと度レトロウイルス遺伝子が哺乳動物宿主細胞に組み込まれればサイレンシング時間枠を減じる。この方法の特有な特徴は、パッケージング細胞株を作出するために必要とされるレトロウイルス遺伝子の総てが、内在ゲノム中に無作為に分散するのではなく、内在ゲノム内の単一の遺伝子座に存在するという点である。これは、レトロウイルス遺伝子が内在ゲノムに無作為に組み込まれ、一様でないレベルの発現を生じ得る従来の方法に比べて、レトロウイルス遺伝子の総てが同じ遺伝子座に位置するので同じレベルで

10

20

30

40

50

発現するレトロウイルスパッケージング細胞を作製するという利点を持つ。

【0099】

一つの実施態様では、レトロウイルスパッケージング細胞は、レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノムをコードする核酸配列を付加的に含んでなる。これもまた、gagおよびpolタンパク質およびenvタンパク質またはその機能的置換体をコードする核酸配列とともに単一の遺伝子座に位置し得る。

【0100】

よって、本発明のさらなる面によれば、

gagおよびpolタンパク質；

envタンパク質またはその機能的置換体；ならびに

レトロウイルスベクター粒子のRNAゲノム

をコードする核酸配列を含んでなるレトロウイルス産生細胞が提供され、

前記核酸配列は総て、レトロウイルス産生細胞ゲノム内の単一の遺伝子座に位置する。

【0101】

一つの実施態様では、レトロウイルスパッケージング細胞は、哺乳動物細胞である。さらなる実施態様では、哺乳動物細胞は、HEK293細胞、CHO細胞、Jurkat細胞、KS62細胞、PerC6細胞、HeLa細胞またはそれらの誘導体もしくは機能的等価物から選択される。なおさらなる実施態様では、哺乳動物宿主細胞はHEK293細胞であるか、またはHEK293細胞に由来する。このような細胞は、接着細胞株（すなわち、それらは表面に結合して単層として増殖する）または懸濁適応/非接着細胞株（すなわち、それらは培養培地中、懸濁状態で増殖する）であり得る。なおさらなる実施態様では、HEK293細胞は、HEK293T細胞である。用語「HEK293細胞」は、バイオテクノロジーに慣用されるヒト胎児腎293細胞を意味する。特に、HEK293T細胞は、種々のレトロウイルスベクターの産生に慣用される。好適な市販の細胞株の他の例としては、T-REX（商標）（Life Technologies）細胞株が挙げられる。

【0102】

核酸ベクターに関して以上に記載した実施態様は総て、本発明のレトロウイルスパッケージング/産生細胞にも適用可能であることが理解されるであろう。

【0103】

方法

本発明のさらなる面によれば、安定なレトロウイルスパッケージング細胞株の製造方法であって、

(a) 本明細書に記載の核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入すること；および

(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること

を含んでなる方法が提供される。

【0104】

一つの実施態様では、哺乳動物宿主細胞は、HEK293細胞、HEK6E細胞、CHO細胞、Jurkat細胞、KS62細胞、PerC6細胞、HeLa細胞またはそれらの誘導体もしくは機能的等価物から選択される。さらなる実施態様では、哺乳動物宿主細胞はHEK293細胞であるか、またはHEK293細胞に由来する。このような細胞は接着細胞株（すなわち、それらは表面に結合して単層として増殖する）または懸濁適応/非接着細胞株（すなわち、それらは培養培地中、懸濁状態で増殖する）であり得る。なおさらなる実施態様では、HEK293細胞は、HEK293T細胞またはHEK6E細胞である。好適な市販の細胞株の他の例としては、T-REX（商標）（Life Technologies）細胞株が挙げられる。

【0105】

当業者ならば、核酸ベクターを宿主細胞に導入することは、当技術分野で公知の好適な方法、例えば、脂質媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、細胞（例えば

10

20

30

40

50

、マイクロセル)融合、エレクトロポレーションまたは微粒子衝撃を用いて実施され得ることに気づくであろう。一つの実施態様では、核酸ベクターは、エレクトロポレーションにより宿主細胞に導入される。核酸ベクターの導入に使用するための方法の選択は、使用する哺乳動物宿主細胞の種類に応じて選択され得ることが理解されるであろう。

【0106】

ひと度、哺乳動物宿主細胞にあれば、核酸ベクターは、哺乳動物宿主細胞の内在ゲノムに無作為に組み込まれる。よって、本方法は、核酸ベクターにコードされる核酸が組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択することを付加的に含んでなる(例えば、ゼオシン耐性マーカーなどの抗生物質耐性選択マーカーを使用する)。

【0107】

当業者ならば、例えば、核酸ベクターが自然状態で環状であれば(例えば、BAC、PAC、コスミドまたはフォスミド)それを線状化するなど、核酸ベクターの組込みを助長する方法に気づくであろう。核酸ベクターは、内在ゲノム内の選択された部位に組込みをガイドするための、哺乳動物宿主細胞の内在性染色体と相同性を共有する領域を付加的に含んでなり得る。さらに、組換え部位が核酸ベクター上に存在すれば、これらは標的組換えに使用可能である。例えば、核酸ベクターは、Creリコンビナーゼと組み合わせた場合に(すなわち、P1バクテリオファージに由来するCre/Lox系を使用する)、標的組込みを可能とするLoxP部位を含み得る。あるいは(または加えて)、組換え部位は、att部位(例えば、ファージ由来)であり、このatt部位は、インテグラーゼの存在下での部位指定組込みを可能とする。これは、レトロウイルス遺伝子が高いかつ/または安定な発現を可能とする内在ゲノム内の遺伝子座に標的化されることを可能とする。

【0108】

標的化組込みの他の方法も当技術分野で周知である。例えば、選択された染色体遺伝子座での標的組換えを助長するために、ゲノムDNAの標的切断を誘導する方法を使用することができる。これらの方法は多くの場合、二重鎖切断(double strand break)(DSB)を誘導するための操作された切断系または非騒動末端結合(non-homologous end joining)(NHEJ)もしくは修復鋳型(すなわち、相同性組換え修復(homology directed repair)またはHDR)を用いる修復などの天然プロセスにより切断の修復を誘導するための内在ゲノムのニックの使用を含む。

【0109】

切断は、特異的切断をガイドするためにCRISPR/Cas9系を、操作されたcrRNA/tracrRNA(「シングルガイドRNA」とともに使用する、および/またはアルゴノート系に基づくヌクレアーゼ(例えば、T.サーモフィラス(*T. thermophilus*)由来、「Ttago」として知られる、Swartz et al. (2014) Nature 507(7491): 258-261)を使用する、操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ(zinc finger nucleases)(ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(transcription-activator like effector nucleases)(TALEN)などの特異的ヌクレアーゼの使用を介して起こり得る。これらのヌクレアーゼ系の使用を用いた標的切断は、HDRまたはNHEJのいずれかにより媒介されるプロセスを用いて、特定の標的位置に核酸を挿入するために活用することができる。よって、一つの実施態様では、本方法は、少なくとも1つのヌクレアーゼを用いて、核酸ベクターにコードされる核酸配列を哺乳動物宿主細胞のゲノム(すなわち、内在性染色体)に組み込むことを付加的に含んでなり、前記少なくとも1つのヌクレアーゼは、前記核酸配列が細胞のゲノムに組み込まれるように、哺乳動物宿主細胞のゲノムを切断する。さらなる実施態様では、少なくとも1つのヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALENヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casヌクレアーゼ系およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0110】

本発明のさらなる面によれば、本明細書に定義される方法により得られるレトロウイルスパッケージング細胞が提供される。

【0111】

本明細書に定義される方法を用いて得られる細胞株は、高力価のレトロウイルスベクターを産生するために使用され得る。

【0112】

本明細書で用語「高力価」についての言及は、患者細胞などの標的細胞を形質導入できるレトロウイルスベクターまたは粒子の有効量を意味する。一つの実施態様では、高力価は、濃縮なく 10^6 TU/ml (TU = 形質導入単位) を超えるものである。

【0113】

本発明のさらなる面によれば、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子の製造方法であって、
(a) 本明細書で定義される核酸ベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入すること；
(b) 前記培養物内で、前記ベクターにコードされている核酸配列が哺乳動物宿主細胞の
内在性染色体に組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択すること；および
(c) 前記哺乳動物宿主細胞を複製欠陥レトロウイルスベクター粒子が産生される条件下
でさらに培養すること

を含んでなる方法が提供される。

【0114】

以上に記載されるように、一つの実施態様では、哺乳動物宿主細胞は、HEK293細胞、CHO細胞、Jurkat細胞、KS62細胞、PerC6細胞、HeLa細胞またはそれらの誘導体もしくは機能的等価物から選択される。さらなる実施態様では、哺乳動物宿主細胞はHEK293細胞であるか、またはHEK293細胞に由来する。このような細胞は接着細胞株（すなわち、それらは表面に結合して単層として増殖する）または懸濁適応/非接着細胞株（すなわち、それらは培養培地中、懸濁状態で増殖する）であり得る。なおさらなる実施態様では、HEK293細胞は、HEK293T細胞である。好適な市販の細胞株の他の例としては、T-Rex (商標) (Life Technologies) 細胞株が挙げられる。

【0115】

本明細書に記載の方法において使用される条件は使用される宿主細胞によって異なることが当業者により理解されるであろう。典型的な条件は、例えば、使用される培養培地または温度は当技術分野で周知である。一つの実施態様では、培養は哺乳動物宿主細胞を加湿条件下でインキュベートすることによって実施される。さらなる実施態様では、加湿条件は、トランスフェクト細胞を37、5%CO₂でインキュベートすることを含んでなる。一つの実施態様では、培養は、10% (vol/vol) ウシ胎児血清 (FBS) を含有するダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM)、無血清UltraCULTURE (商標) 培地 (Lonza、カタログ番号12-725F)、またはFreeStyle (商標) Expression培地 (Thermo Fisher、カタログ番号12338-018) から選択される培養培地を用いて実施される。

【0116】

一つの実施態様では、本方法は、複製欠陥レトロウイルスベクター粒子を単離することを付加的に含んでなる。例えば、一つの実施態様では、単離は、フィルターを使用することにより実施される。さらなる実施態様では、フィルターは、低タンパク質結合膜（例えば、0.22 μm低タンパク質結合膜または0.45 μm低タンパク質結合膜）、例えば、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) またはポリエーテルスルホン (PES) 人工膜である。

【0117】

ひと度、哺乳動物宿主細胞にあれば、核酸ベクターに存在するレトロウイルス核酸は、内在ゲノム内の無作為な単一遺伝子座に組み込まれ得る。組込み工程は、以上に記載されるように、例えば、線状化および/または共通相同性領域を用いて助長され得る。組換え部位もまた標的化組換えのために使用され得る。

【0118】

標的遺伝子が抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーとともに内在性染色体に組み込まれる場合、本方法は、レトロウイルス核酸が首尾良く組み込まれた哺乳動物宿主細胞を選択することを付加的に含んでなり得る。

10

20

30

40

50

【0119】

ひと度単離されれば、レトロウイルスベクター粒子は *in vivo* 適用のために濃縮され得る。濃縮方法としては、例えば、超遠心分離、沈降または陰イオン交換クロマトグラフィーが含まれる。超遠心分離は、小規模でのレトロウイルスベクター濃縮のための迅速法として有用である。あるいは、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Mustang Q 陰イオン交換膜カートリッジを使用）または沈降（例えば、PEG 6000 を使用）は、大容量のレンチウイルスベクター上清を処理するために得に有用である。

【0120】

本発明のさらなる面によれば、本明細書で定義される方法により得られる複製欠陥レトロウイルスベクター粒子が提供される。

10

【0121】

以下、本発明を下記の限定されない例を参照してさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0122】

実施例 1：構築物ガイド

図 1 は、BAC pack - WTGP - 277delU5 および BAC pack - SYNGP - 277delU5 の構築のための段階的ガイドを示す。XbaI および NheI 消化の適合末端 (compatible ends) のために、レンチウイルスパッケージング遺伝子を pSmart BAC ベクターに段階的に搭載した。GagPol の付加に際して、野生型 GagPol (WTGP) またはコドン最適化 GagPol である SYNGP のいずれかを含む 2 つの構築物を作製した。これらをそれぞれ BAC pack - WTGP および BAC pack - SYNGP と呼称した。次に、移入力セットをこれらの構築物の両方に負荷し、このようにして BAC pack WTGP - 277delU5 および BAC pack SYNGP - 277delU5 を作出した。

20

【0123】

実施例 2：安定なポリクローナルプールの選択

接着細胞株 HEK293T を BAC pack SYNGP - 277delU5 または BAC pack WTGP - 277delU5 でトランスフェクトすることにより、ポリクローナルの安定なトランスフェクタントプールを作出した。その後、上手くいった組込み事象をゼオシンで選択した。

30

【0124】

これらのポリクローナルプールのレンチウイルスベクター生成能を評価するために、細胞をドキシサイクリン (I) で誘導するか、または誘導せずに残し (UI)、非トランスフェクト HEK293T 細胞と比較した。

【0125】

結果は、各トランスフェクション条件から採取したレンチウイルスベクター上清の力価を形質導入単位 (transduction units) (TU) / mL で示す。図 2 の力価測定結果から、BAC pack SYNGP - 277delU5 または BAC pack WTGP - 277delU5 のいずれかをを用いて作製した安定なポリクローナルプールは現行の一時的トランスフェクション系に匹敵する 10^7 TU / mL の領域での濃縮でレンチウイルスベクターを産生する能力があることが見て取れる。

40

【0126】

これらの結果から、レンチウイルス産生に必要な総てのパッケージング遺伝子を含む単一の BAC ベクターが好適な力価でレンチウイルスベクターを産生することができる細胞株を作出できることが確認される。

【0127】

実施例 3：安定なトランスフェクション懸濁クローンの産生

BAC 技術を用いたレンチウイルスベクター産生細胞株を作出する主要な目的は、プラットフォームに新たな進歩 (advances) を迅速に適用することである。これらの進歩は、特殊細胞株の修飾を含む可能性がある。例えば、接着細胞よりも高密度まで増殖することから

50

懸濁液細胞で生体産物を産生することにより収量を高めることが業界標準である。しかしながら、現行のレンチウイルスベクター産生系は、接着 H E K 2 9 3 T 細胞よりも懸濁液細胞で達成するほうが困難な高トランスフェクション率に依存している。トランスフェクション効率は、成功した組込み体を選択するために、安定な細胞株を作出する場合をあまり考慮していないので、B A C 構築物は、レンチウイルスベクター産生懸濁液細胞株を作出するための理想的な解決策である。

【 0 1 2 8 】

従前に実証されたように、B A C 構築物は、接着 H E K 2 9 3 T 細胞からレンチウイルスベクター産生細胞株を作出することができる。B A C 構築物の適用性を証明するために、安定なトランスフェクタント細胞株を懸濁液細胞株 H E K 2 9 3 6 E から作出した。H E K 2 9 3 6 E 細胞を B A C 構築物 B A C p a c k W T G P - 2 7 7 d e l U 5 でトランスフェクトした後にゼオシンで選択した。この後クローニングを行ってクローン細胞株を作出した。図 3 の結果は、安定な細胞株により生成された G F P シグナルを示す。これは、移入ベクターセグメントにゼオシン耐性と機能的 G F P 発現カセットの両方が存在していることを示す。

10

【 0 1 2 9 】

この結果は、B A C 構築物が複数の細胞株から安定なクローンを作出する能力を有することを示唆する。

【 0 1 3 0 】

実施例 4：懸濁クローンにおけるレンチウイルスの誘導

20

安定な懸濁クローンの、レンチウイルスベクター産生能を確認するために、クローン 1、1 4、1 5 および 1 6 に対して $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ドキシサイクリンで誘導を行い、H E K 2 9 3 T 細胞の形質導入によって上清のウイルス力価を測定した。

【 0 1 3 1 】

図 4 の結果は、各クローンから採取したレンチウイルスベクター上清の力価（形質導入単位（T U）/ m L）を示す。これらの結果は、懸濁液細胞株 H E K 2 9 3 6 E の、B A C p a c k W T G P - 2 7 7 d e l U 5 による安定なトランスフェクションによって作出された細胞株は、現行の一時的トランスフェクション系に匹敵する収量でレンチウイルスベクターを産生できることを明らかに示す。

【 0 1 3 2 】

30

実施例 5：クローンのベクター力価

図 4 に記載されるように、クローン 1 および 1 6 を継代培養し、誘導を行い、後の時点で力価を測定して、これらの高生産性クローンかのベクター産生が安定であるかどうかを判定した。図 5 A および 5 B に示されるように、これらのクローンのベクター力価は、おそらくはこの誘導方法に導入された酪酸ナトリウム濃度の増大のために、実際に 5 代目 ~ 2 1 代目の間に中等度の増加を見せた。

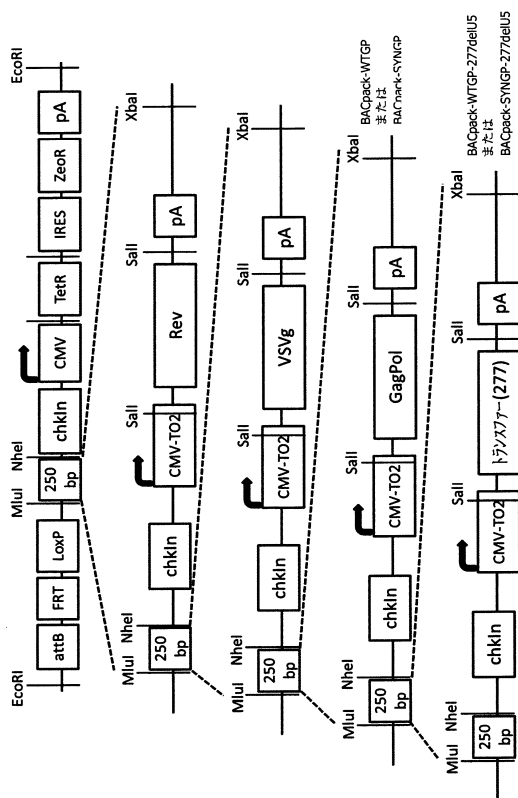
【 0 1 3 3 】

本明細書に記載の実施態様は本発明の総ての面に当てはまり得ると理解される。さらに、限定されるものではないが、特許および特許出願を含め、本明細書に引用されている総ての刊行物は、引用することにより、完全に示されているかのごとく本明細書の一部とされる。

40

【図面】

【 図 1 】



【圖 2】

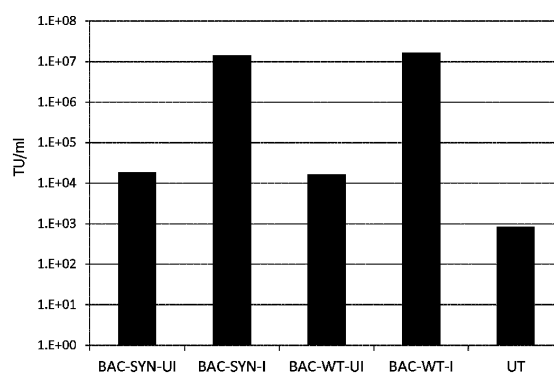


FIGURE 2

【 図 3 】

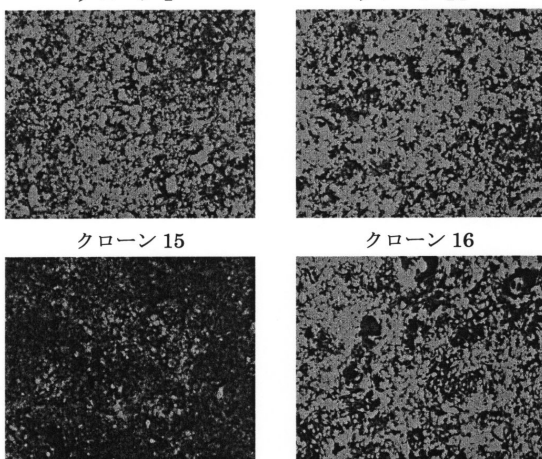
安定細胞の GFP 蛍光画像

クローン 1

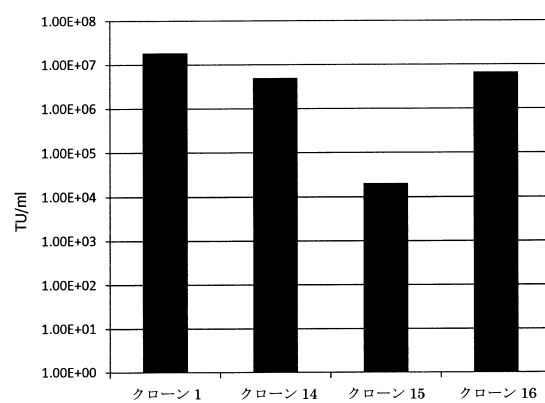
クローン 14

クローン 15

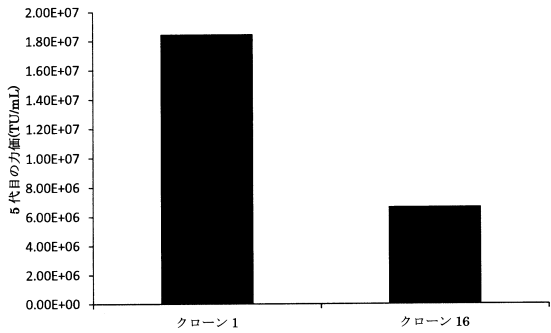
クローン 16



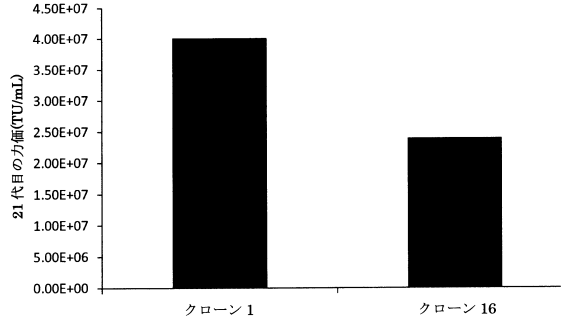
【圖 4】



【 5 A 】



【 5 B 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 0 4 Z

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

佐藤 泰和

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100143971

藤井 宏行

(74)代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72)発明者 サビン、ジョンソン

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミ
スクライン

(72)発明者 セレステ、バラント

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミ
スクライン

(72)発明者 エイリーニ、バンバ

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、ケアオブ、グ
ラクソスミスクライン

(72)発明者 コンラッド、ピンク

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミ
スクライン

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 1 7 5 5 4 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 5 7 5 5 3 (U S , A 1)

国際公開第 9 5 / 0 0 3 4 0 0 (W O , A 1)

特表 2 0 0 5 - 5 1 2 5 7 3 (J P , A)

再公表特許第 2 0 1 0 / 1 3 1 7 4 7 (J P , A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 2 9 4 6 6 (J P , A)

川口 寧, 3. BACシステム: 大腸菌遺伝学とウイルス学が融合した新しいヘルペスウイルス
の遺伝子改変法, ウイルス, 54巻2号, 2004年, P.255-264Teru Kanda, Production of high-titer Epstein-Barr virus recombinants derived from Akata
cells by using a bacterial artificial chromosome system, J Virol., 2004年, 78(13), p.700
4-7015

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

A 6 1 K

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)