

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-526348

(P2023-526348A)

(43)公表日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/64 (2006.01)	C 1 2 N 15/64	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全42頁)

(21)出願番号	特願2022-570127(P2022-570127)	(71)出願人	522446591
(86)(22)出願日	令和3年5月14日(2021.5.14)		アイヴェックスソル インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年12月12日(2022.12.12)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01605 ウースター プライデンストリート 17
(86)国際出願番号	PCT/US2021/032479	(74)代理人	100094569
(87)国際公開番号	WO2021/231884		弁理士 田中 伸一郎
(87)国際公開日	令和3年11月18日(2021.11.18)	(74)代理人	100103610
(31)優先権主張番号	63/025,812		弁理士 吉 田 和彦
(32)優先日	令和2年5月15日(2020.5.15)	(74)代理人	100109070
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 須田 洋之
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100119013
	最終頁に続く		弁理士 山崎 一夫
		(74)代理人	100123777
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞療法及び遺伝子療法のための安定したウイルスベクター産生細胞を産生するための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、ウイルスベクターの工業的規模の産生を可能にする、安定したウイルスベクター産生細胞株を産生するための組成物及び方法を提供する。また、哺乳動物細胞におけるウイルスベクターの産生のための、目的の遺伝子を担持する新規のベクター構築物及びウイルスアクセサリタンパク質を担持する新規のベクター構築物も開示される。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

安定したウイルスベクター産生細胞株を作製する方法であって、

a．目的の遺伝子（GOI）をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、を細胞集団に導入することと、

b．前記GOI及び前記1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団を産生することと、

c．前記トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、

d．前記細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、を含み、

前記1つ以上のアクセサリ構築物の前記導入が、同時に生じる、方法。

10

**【請求項 2】**

安定したウイルスベクター産生細胞株を作製する方法であって、

a．目的の遺伝子（GOI）をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、を細胞集団に導入することと、

b．前記GOI及び前記1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団を産生することと、

c．前記トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、

d．前記細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、を含み、

前記1つ以上のアクセサリ構築物の前記導入が、介在する細胞培養なしで1つ以上の逐次ステップを介して生じる、方法。

20

**【請求項 3】**

前記トランスジェニック細胞が、ポリクローナル細胞を含む、請求項1又は2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記選択することが、前記トランスジェニック細胞のポリクローナルからモノクローナルへの選択を更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

30

**【請求項 5】**

前記方法が、凍結保存によって前記選択された細胞株を保存することを更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記方法が、前記凍結保存された細胞株から細胞を増殖させて、ウイルスベクターを産生することを更に含む、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記方法が、前記選択された細胞クローン、前記生成された細胞株、又はその両方における前記ウイルスベクターゲノム及び前記1つ以上のアクセサリタンパク質のレベルを定量化することを更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

40

**【請求項 8】**

前記方法が、前記選択された細胞クローン、前記生成された細胞株、又はその両方におけるウイルスベクターゲノムRNAと1つ以上のアクセサリタンパク質の化学量論比を決定することを更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記方法が、前記選択された細胞クローン、前記生成された細胞株、又はその両方の組み込みプロファイルを決定することを更に含む、請求項1又は2に記載の方法。

**【請求項 10】**

50

前記方法が、前記選択された細胞クローン、前記生成された細胞株、又はその両方からウイルスベクターを回収することを更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記方法が、前記選択された細胞クローン、前記生成された細胞株、又はその両方のウイルス力価を決定することを更に含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ウイルスベクター産生細胞株が、レトロウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ウイルスベクター産生細胞株が、レンチウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。 10

【請求項 1 4】

前記ウイルスベクター産生細胞株が、アデノ随伴ウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ウイルスベクター産生細胞株が、1つ以上のカプシドタンパク質を含むウイルスベクターを産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ウイルスベクター産生細胞株が、1つ以上のエンベロープタンパク質を含むウイルスベクターを産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。 20

【請求項 1 7】

前記ウイルスベクターゲノム構築物が、5'長鎖末端反復、3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、及びセントラルポリプリントラクトからなる群から選択される1つ以上のエレメントを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ウイルスベクターゲノム構築物が、5'長鎖末端反復、3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、又はセントラルポリプリントラクトを含まない、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ウイルスベクターゲノム構築物が、自己不活性型長鎖末端反復を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。 30

【請求項 2 0】

前記1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質が、構造ウイルスタンパク質、調節ウイルスタンパク質、又はその両方をコードする配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記構造タンパク質及び/又は調節タンパク質が、Gag、Pol、Rev、Env、Tat、Nef、Vpr、Vif、Vpu、及びVpxからなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記導入ステップが、形質導入を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。 40

【請求項 2 3】

前記導入ステップが、トランスフェクションを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記安定したウイルスベクター産生細胞株が、接着培養又は浮遊培養に適合される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記安定したウイルスベクター産生細胞株が、血清補充培地又は無血清培地で培養される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記安定なウイルスベクター産生細胞株が、HEK 293 細胞又はその誘導体である、 50

請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 27】

前記安定したウイルスベクター産生細胞株が、キメラウイルス粒子を産生する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ウイルスベクターゲノム構築物及び前記 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物の所定の比率又は事前に選択された比率が、使用される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年5月15日に提出された米国仮特許出願第63/025,812号の優先権を主張し、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、細胞療法及び遺伝子療法のためのウイルスベクターの産生の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

臨床開発による急速な進展と相まった遺伝子療法の候補の数の増加により、遺伝子療法ベクターの世界的な不足が生じている。500を超える遺伝子療法及び100を超える細胞療法の候補が、様々な開発段階にある。2200を超える臨床試験が、世界中で進行中である。ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）の強力で実証された安全性プロファイルは、堅牢な臨床開発パイプラインを支えてきた。しかしながら、ウイルスベクター、特に、レンチウイルスベクターの臨床的な製造及び使用もまた、いくつかの制限を伴う。例えば、従来の製造方法及び関連技術は、時代遅れであり、拡張可能ではなく、下流プロセスの収率が低く（約20%）、確立するには、更に多額の先行投資及び継続的な運用コストを必要とする。更に、伝統的に、ウイルスベクターの製造は予測不可能で非常にリスクが高いとみなされており、その結果、需要が供給を大幅に上回り、次いで価格が上昇する。ウイルスベクターを製造するための新たな方法及び改善を、高容量で高力価の安定した産生株を生成することによって特定する必要がある。

【発明の概要】

【0004】

ある態様では、本開示は、安定したウイルスベクター産生細胞株（viral vector producer cell line）を作製する方法を提供し、本方法は、

- a. 目的の遺伝子（GOI）をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、を細胞集団に導入することと、
- b. GOI及び1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団（a population of transgenic cells）を産生することと、
- c. トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、
- d. 細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、を含み、

1つ以上のアクセサリ構築物の導入が、同時に生じる。

【0005】

別の態様では、本開示は、安定したウイルスベクター産生細胞株を作製する方法を提供し、本方法は、

a. 目的の遺伝子（GOI）をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、を細胞集団に導入することと、

10

20

30

40

50

b. GOI及び1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団を産生することと、

c. トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、

d. 細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、を含み、

1つ以上のアクセサリ構築物の導入が、介在する細胞培養なしで1つ以上の逐次ステップを介して生じる。

【図面の簡単な説明】

【0006】

10

【図1】HIV-1ウイルスのゲノム構成の図を提供する。HIV-1ゲノムは、9,749bpを含む。HIV-1は、全てのレトロウイルスに共通するgag、pol、及びenv遺伝子に加えて、ウイルス複製に不可欠な調節遺伝子rev、並びにインビトロウイルス増殖には不要でありながら、インビボ複製及び病態形成のための鍵である5つのアクセサリ遺伝子vif、vpr、vpu、tat、及びnefを含む。表1に、HIVコードタンパク質の各々の生物学的機能に関する更なる情報を提供する。

【図2】様々な構築要素を安定的に導入して細胞クローンを生成する例示的な作業フローを提供する。

【図3】実施例2で使用した例示的なベクター構築物を提供する。

【図4】GFPの最適条件(組み合わせ16及び4)及びグロビン-LCR-GFPの最適条件(組み合わせ12及び6)を示す実施例2の実験の結果を提供する。

20

【発明を実施するための形態】

【0007】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。当業者は、本開示の実施において、多くの方法が使用され得ることを認識するであろう。実際、本開示は、記載される方法及び材料に決して限定されない。用語が単数形で提供される場合、本発明者はまた、その用語の複数形によって記載される開示の態様も企図し、逆もまた同様である。参照によって組み込まれる参考文献で使用される用語及び定義に矛盾がある場合、本願で使用される用語は、本明細書で与えられる定義を有するものとする。使用される他の専門用語は、当該技術分野専門の様々な辞書、例えば、“The American Heritage (登録商標) Science Dictionary” (Editors of the American Heritage Dictionaries, 2011, Houghton Mifflin Harcourt, Boston and New York)、 “McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms” (6th edition, 2002, McGraw-Hill, New York)、又は“Oxford Dictionary of Biology” (6th edition, 2008, Oxford University Press, Oxford and New York)によって例示されているような、それらが使用される技術分野における通常の意味を有する。

30

40

【0008】

例えば、全ての特許及び刊行物を含む、本明細書で引用される任意の参考文献は、それらの全体が参照により援用される。

【0009】

選択肢の群化が提示される場合、その選択肢の群化を構成するメンバーの任意の組み合わせ及び全ての組み合わせが具体的に想定される。例えば、アイテムが、A、B、C、及びDからなる群から選択される場合、本発明者は、各代替物(例えば、A単独、B単独など)、並びにA、B、及びD、A及びC、B及びCなどの組み合わせ、を具体的に想定する。「及び/又は」という用語は、2つ以上のアイテムのリストで使用される場合、それ自体により列挙されたアイテムのうちのいずれか1つ、又は他の列挙されたアイテムのう

50

ちのいずれか1つ以上との組み合わせを意味する。例えば、「A及び/又はB」という表現は、A及びBのいずれか又は両方、すなわち、A単独、B単独、又はA及びBの組み合わせを意味するように意図される。「A、B、及び/又はC」という表現は、A単独、B単独、C単独、A及びBの組み合わせ、A及びCの組み合わせ、B及びCの組み合わせ、又はA、B、及びCの組み合わせを意味することを意図している。

#### 【0010】

数の範囲が本明細書で提供される場合、その範囲は、範囲の端部と、定義された範囲の端部間の任意の数とを含むことが理解される。例えば、「1~10」は、1~10の任意の数字、並びに数字1及び数字10を含む。

#### 【0011】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈から別途明確に示されない限り、複数の参照を含む。例えば、「1つの化合物」又は「少なくとも1つの化合物」という用語は、それらの混合物を含む、複数の化合物を含み得る。

#### 【0012】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、本明細書では、だいたい、大まかに、およそ、又はその領域内を意味するように使用される。「約」という用語が数値範囲と共に使用される場合、それは、示された数値の上限及び下限を拡張することによってその範囲を変更し、プラス又はマイナス10%を意味すると理解される。例えば、「約100」には、90~110が含まれる。

#### 【0013】

本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、品質を修飾するために使用される時、一般的にその品質が失われることなく、ある程度の変動を許容する。例えば、特定の態様では、かかる変動の程度は、0.1%未満、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1%、1~2%、2~3%、3~4%、4~5%、又は5%超であり得る。

#### 【0014】

疑義を避けるために、本明細書では、「約」、「少なくとも」、「少なくとも約」、「最大で」、「より少ない」、「より多い」、「内」又は「同様に」などの用語又は語句が、パーセンテージの一連の数のリストに続く場合、かかる用語又は語句は、副詞、前置詞、又は他の修飾語句が、各々及び全てのメンバーの前に再現されるかどうかにかかわらず、各々及び全てのシリーズ又はリストのパーセンテージの数を修飾するとみなされる。

#### 【0015】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター産生細胞(viral vector producer cell)」は、組換えウイルスベクター粒子(例えば、レトロウイルス送達システムを含む)の産生に必要な全てのエレメントを含む細胞を指す。典型的には、かかるウイルスベクター産生細胞は、ウイルス構造タンパク質(gag、pol、及びenvなど)を発現することができる1つ以上の発現カセットを含む。「安定したウイルスベクター産生細胞」は、組換えウイルスベクター粒子の産生に必要な全てのエレメントを、その核ゲノムに含むか、エピソーム的に維持するか、又はその組み合わせである、ウイルスベクター産生細胞を指す。「安定したウイルスベクター産生細胞株」は、適切な新鮮な培地及び空間を与えられた場合に無制限に増殖する、安定したウイルスベクター産生細胞の永続的に樹立された細胞培養物を指す。

#### 【0016】

本明細書で使用される場合、「組換えウイルスベクター」は、エンベロープビリオン粒子であり、発現可能なポリヌクレオチド配列を含み、標的宿主細胞を透過することができる、それによって、発現可能な配列を細胞に運ぶことができる。ある態様では、発現可能なポリヌクレオチド配列は、目的の遺伝子(GOI)を含むか、又はコードする。エンベロープ粒子は、好ましくは、レンチウイルス又は非レンチウイルスを含む別のウイルス種由来の操作された若しくは天然のウイルスエンベロープ又はカプシドタンパク質でシールド

10

20

30

40

50

タイプ化されており、これは、天然ウイルスの宿主範囲及び感染性を变化させる。

【0017】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクターゲノム構築物」は、形質導入組換えウイルスベクターにパッケージングされるポリヌクレオチド配列を含む構築物である。ある態様では、ウイルスベクターゲノム構築物は、5'LTR及び3'LTRを含み、機能的なインテグラーゼ酵素と共にパッケージングされる場合、宿主ゲノムに組み込まれ得る組換えウイルスベクターの産生に使用することができる。別の態様では、ウイルスベクターゲノム構築物は、5'LTR及び3'LTRを含み、機能的なインテグラーゼ酵素を欠くため宿主ゲノムに組み込まれ得ない組換えウイルスベクター（インテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター（IDLV）としても知られる）を産生する。

10

【0018】

本明細書で使用される場合、「ウイルスアクセサリ構築物」は、適合性の宿主細胞において機能的な組換えウイルスベクターを産生し、それを発現可能な異種配列にパッケージングするのに有用な1つ以上のエレメントを含むか若しくはコードする構築物、プラスミド、又は単離された核酸分子を指す。

【0019】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター構築物」は、ウイルスベクターゲノム構築物又はウイルスアクセサリ構築物のいずれかを指す。

【0020】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、あるピースが別のピースの意図された遺伝的結果をもたらすことができるように、2つ以上のDNAピースの空間関係を説明する。例えば、「作動可能に連結された」は、調節領域（典型的にはプロモーターエレメントであるが、エンハンサーエレメントを含み得る）と遺伝子のコード領域との間の関係を示すことができ、それによって、コード領域の転写が調節領域の制御下にある。

20

【0021】

本明細書で使用される場合、「コンカテマー」は、直列に連結された同じ又は実質的に同じDNA配列の複数のコピーを含む連続したDNA分子として定義される。ある態様では、コンカテマーはまた、1つ以上の選択遺伝子を含み得る。

【0022】

本明細書で使用される場合、「トランス」という用語は、異なる分子から作用するメカニズムを指す。

30

【0023】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、最小のプロモーターから上流エレメント及びエンハンサーを含むプロモーターまでの複雑性及びサイズの範囲の核酸領域を含む。

【0024】

本明細書で使用される場合、「形質導入」という用語は、ウイルスベクターを使用する、ウイルスベクターによる核酸セグメントの送達を指す。

【0025】

本明細書で使用される場合、「トランスフェクション」という用語は、真核細胞への外来DNAの導入を指す。

40

【0026】

いかなる理論にも拘束されるものではないが、ウイルスベクター産生細胞株に由来する感染性ベクター粒子の質及び量は、レンチウイルスベクターのゲノムRNAとトランス発現アクセサリタンパク質の化学量論比によって直接影響を受ける。任意の所与のレンチウイルスベクターゲノムの場合、最適な比率は事前に知られておらず、試行錯誤を通して経験的に決定されなければならない。この生物学的事実は、あまり認識されていないため、安定した細胞株の構築は、歴史的に、アクセサリ遺伝子を一度に1つずつ連続的に追加することによって達成されてきた。これにより、アクセサリタンパク質を有し、発現する子

50

孫クローンが保証されたが、次善の比率でレンチウイルスベクターゲノムのベクターを産生する最終的な細胞株の能力が制限された。この問題に対して提供される解決策は、エレメントの各々の複数の導入を促すような様式で、全てのアクセサリエレメントを一度に追加することである。これは、複数ラウンドのサブクローニングから単一ラウンドのサブクローニングへとアクセサリ遺伝子の導入をまとめること(collapsing)によって、任意の所与の産生クローンの開発時間を速めるだけでなく、各々異なる比を有する多様なセットのクローンの生成が可能になり、その結果、クローンをスクリーニングする場合、それがどんな比であるかを事前に知っていなくても、所望の質及び量のベクターを産生するクローンを見つけられる可能性が増加する。

【0027】

ある態様では、本開示は、ショットガンクローニングを使用したランダムアソートメントによって最適化された安定したベクター産生細胞株の自然選択を達成するための方法を提供する。ある態様では、本出願は、レンチウイルスベクターゲノムと、別個に導入される構築物からトランスで発現されるレンチウイルスアクセサリタンパク質との両方を導入することによって提供される、安定したレンチウイルスベクター産生細胞株を提供する。

【0028】

ある態様では、ベクター産生細胞株は、不死化ヒト細胞株に由来する親細胞株から産生される。別の態様では、ベクター産生細胞株は、ヒト/動物由来の血清を含むか又は含まない規定培地(defined media)のいずれかで増殖する。別の態様では、ベクター産生細胞株は、付着又は浮遊に適合した様式で増殖する。

組換えウイルスベクター

【0029】

本開示は、組換えウイルスベクター(組換えウイルス粒子としても知られている)の製造及び/又は産生に関する。本開示は、組換えウイルスベクター及びそれらの製造のための構築物に関し、発現可能な目的のポリヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するために利用することができる。

【0030】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクター産生細胞は、レトロウイルス産生システムを含み、ウイルスベクターが、レトロウイルスに由来する。レトロウイルスは、7~12 kbの一本鎖ポジティブセンスRNAゲノムを有するエンベロープウイルスのファミリーを含む。レトロウイルスファミリーには、5つの群の発がん性レトロウイルス、レンチウイルス、及びスプーマウイルスが含まれる。

【0031】

レトロウイルスベクター産生システムは、典型的には、ウイルスパッケージング機能からのウイルスゲノムの分離を伴う。ウイルスアクセサリタンパク質又はウイルスアクセサリタンパク質ドメインは、別個の発現カセットを介して、又はトランスで導入され得る。ある態様では、ウイルスアクセサリ構築物は、ウイルスパッケージングに関与する1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコード又は提供する。

【0032】

ある態様では、本開示は、レンチウイルスベクター及びそれらの製造のための構築物に関し、発現可能な目的のポリヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するために利用することができる。ある態様では、レンチウイルスベクターは、エンベロープビリオン粒子であり、発現可能なポリヌクレオチド配列を含み、標的宿主細胞を透過することができ、それによって、発現可能な配列を細胞に運ぶことができる。エンベロープ粒子は、好ましくは、非レンチウイルスを含む別のウイルス種由来の操作された若しくは天然のウイルスエンベロープタンパク質でシュードタイプ化されており、これは、天然ウイルスの宿主範囲及び感染性を変化させる。

【0033】

本明細書に記載のウイルスベクターは、例えば、タンパク質産生(ワクチン産生を含む)、遺伝子療法(遺伝子置換、遺伝子編集、及び合成生物学を含む)、治療用ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの送達、s i R N A、リボザイム、アンチセンス、及び他の機能性ポリヌクレオチドの送達などを含む幅広い用途に利用することができる。そのような形質導入ベクターは、単一又は二重遺伝子を担持し、抑制配列（例えば、R N A i 又はアンチセンス）を含む能力を有する。特定の態様では、形質導入ベクターは、転写活性が低下しているが存在しないわけではない修飾 3 ' L T R を含む核酸も担持する。

【 0 0 3 4 】

レンチウイルスは、長期の潜伏期間を特徴とするレトロウイルスの群である。ウシ、ウマ、ネコ、ヒツジノヤギ、及び霊長類の脊椎動物の宿主に応じて、5つの血清型に分類される。レンチウイルスのいくつかの例は、ヒト（H I V）、サル（S I V）、及びネコ（F I V）免疫不全ウイルスである。

【 0 0 3 5 】

レンチウイルスは、宿主細胞のD N Aに大量の遺伝情報を送達することができ、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に組み込むことができる。ウイルスゲノムが、分裂中に娘細胞に伝達されるため、最も効率的な遺伝子送達ベクターの1つになっている。

【 0 0 3 6 】

H I Vの構造は、他のレトロウイルスとは異なる。H I Vは、ほぼ球形であり、約120nmの直径を有する。H I Vは、2コピーのポジティブs s R N Aで構成され、これは、9つの遺伝子をコードし、2,000コピーのp24タンパク質を含む円錐形カプシドによって囲まれている。s s R N Aは、ヌクレオカプシドタンパク質p7、並びにビリオンの発生に必要な酵素：逆転写酵素（R T）、プロテアーゼ（P R）、リボヌクレアーゼ、及びインテグラーゼ（I N）に緊密に結合している。p17で構成されるマトリックスは、ビリオンの完全性を確保するためにカプシドを取り囲む。これは、次に、新しく形成されたウイルス粒子が細胞から出芽するとき、ヒト細胞の膜から取り出された2層のリン脂質で構成されるエンベロープによって囲まれる。ウイルスエンベロープには、宿主細胞由来のタンパク質と、ウイルス粒子の表面を貫いて突出する約70コピーの複合体H I Vタンパク質（E n vとして知られている）と、が埋め込まれている。E n vは、3つのg p 120分子からなるキャップと、その構造をウイルスエンベロープに固定する3つのg p 41分子からなるステムと、からなる。糖タンパク質複合体は、ウイルスが標的細胞に付着し、標的細胞と融合して、感染サイクルを開始することを可能にする。表1に、H I Vコードタンパク質の各々の生物学的機能に関する更なる情報を提供する。

【表1】

表1：H I Vコードタンパク質の生物学的機能の概要

	遺伝子		前駆体タンパク質→産物
ベクター化レンチウイルスの必須遺伝子	gag	群特異抗原	gag → MA, CA, SP1, NC, SP2, P6
	pol	ポリメラーゼ	pol → RT, RNase H, IN, PR
	env	エンベロープ	gp160 → gp120, gp41
	rev	ビリオンタンパク質の発現調節因子	主要ウイルスタンパク質の合成に重要であり、ウイルス複製に必須である
野生型H I Vで発見された追加の遺伝子	tat	H I Vトランスアクチベータ	正の転写調節因子
	vif	ウイルス感染性	いくつかの細胞型における感染性に必要
	vpr	ウイルスプロテインR	プレインテグレーション複合体の核内移行及び宿主細胞周期停止
	vpu	ウイルスプロテインU	CD44のプロテアソーム分解及び感染細胞からのビリオン放出
	nef	負の因子	アポトーシス及びウイルス感染性における役割

【 0 0 3 7 】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクター産生細胞は、レンチウイルスベクター産生システムを含み、ウイルスベクターが、レンチウイルスに由来する。レンチウイルスは、徐々に進行する疾患を引き起こすレトロウイルスの一群である。本明細書に開

10

20

30

40

50

示されるレンチウイルスベクター産生システムによって産生されるレンチウイルスベクター粒子は、ゆっくりと分裂する細胞を形質導入することができるが、標準的なレトロウイルス（レトロウイルス）は、有糸分裂活性な細胞のみに感染することができる。「ゆっくりと分裂する」細胞型は、約3～4日ごとに1回分裂し得る。

【0038】

レンチウイルスベクターの産生では、複数のプラスミドが使用され、1つのプラスミドが、エンベロープタンパク質（envプラスミド）をコードし、1つ以上のプラスミドが、ウイルスアクセサリタンパク質をコードし、1つのプラスミドが、レンチウイルス3' - LTRとレンチウイルス5' - LTRとの間に目的の遺伝子の発現カセットを含み、コードされた目的の遺伝子の宿主ゲノムへの組み込みを促進する。

10

【0039】

ある態様では、ウイルスベクターは、ハイブリッドウイルスベクターであり得る。本明細書で使用される「ハイブリッド」という用語は、レンチウイルス配列及び非レンチウイルス配列の両方を含むベクター又はベクターの核酸成分を指す。

【0040】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクター産生細胞は、ヘルペスウイルスベクター産生システムを含み、ウイルスベクターが、ヘルペスウイルスに由来する。

【0041】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクター産生細胞は、アデノウイルスベクター産生システムを含み、ウイルスベクターが、アデノウイルスに由来する。アデノウイルスは、非エンベロープウイルスであり、36キロ塩基の二本鎖DNAゲノムを有する。アデノウイルスは、高力価組換えウイルスとして増殖する能力、大きな導入遺伝子容量、及び分裂細胞及び非分裂細胞の効率的な形質導入のため、魅力的な遺伝子送達ビヒクルの候補である。幅広い組織への遺伝子送達を媒介する、50を超えるヒト及び非ヒト血清型のアデノウイルスが見出されている。

20

【0042】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクター産生細胞は、アデノ随伴ウイルスベクター産生システムを含み、ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスに由来する。アデノ随伴ウイルス（AAV）は、非エンベロープウイルスであり、4.7kbの一本鎖DNAゲノムを有する。ヒト及び非ヒト組織から、100を超える血清型のAAVが単離されている。

30

【0043】

更なる態様では、本明細書に開示される組換えウイルスベクターは、モザイクゲノム構造を含むウイルスに由来する。更なる態様では、本明細書に開示される組換えウイルスベクターは、標的特異的である。更なる態様では、標的特異的ウイルスベクターは、受容体を標的化する。更なる態様では、標的特異的ウイルスベクターは、組換え抗体分子を含む。標的特異的ウイルスベクターを産生する方法は、当該技術分野で既知である。更なる態様では、組換えベクターは、部分的又は完全に合成された核酸配列に由来する。

【0044】

本明細書に開示の組換えウイルスベクターは、1つ以上の選択可能な、追跡可能な、又はその他検出可能なマーカーエレメントを有し得る。ある態様では、選択可能なエレメントは、レポーター遺伝子である。更なる態様では、選択可能なエレメントは、エピトープタグである。更なる態様では、ウイルスベクターは、レポーター遺伝子及びエピトープタグの両方を含み得る。ある態様では、エピトープタグは、当該技術分野で既知の方法によって選択又は検出され得、クロマトグラフィー、酵素アッセイ、蛍光アッセイ、及び免疫検出アッセイを含むが、これらに限定されない。ある態様では、免疫検出アッセイには、免疫プロットティング、免疫蛍光、免疫細胞化学、及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）が含まれ得るが、これらに限定されない。

40

【0045】

更なる態様では、レポーター遺伝子は、吸光度を検出する方法によって検出され得る。

50

吸光度を検出する方法は、当該技術分野で既知である。ある態様では、レポーター遺伝子は、蛍光を検出する方法によって検出され得る。蛍光を検出する方法は、当該技術分野で既知である。更なる態様では、レポーター遺伝子は、発光を検出する方法によって検出され得る。発光を検出する方法は、当該技術分野で既知である。ある態様では、選択可能なマーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子である。更なる態様では、抗生物質遺伝子は、ネオマイシン耐性をコードする。更なる態様では、抗生物質遺伝子は、ピューロマイシン耐性をコードする。

【0046】

更なる態様では、トレース可能なマーカー遺伝子は、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含み得る。異なる発色団を有する蛍光タンパク質を選択する方法は、当該技術分野で既知である。更なる態様では、蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質（GFP）又はそのバリエーションであり得、ウルトラマリン、青色蛍光タンパク質、及びシアン蛍光タンパク質を含むが、これらに限定されない。更なる態様では、蛍光タンパク質のバリエーションは、最適化されたバリエーションであり得る。蛍光タンパク質の形質を最適化するための方法が当該技術分野で既知であり、とりわけ、発色団の成熟、フォールディング動態、及び熱安定性などの形質を改善するための方法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0047】

ある態様では、組換えウイルスベクターは、自己不活性型であり得る。「自己不活性型（self-inactivating）」という用語は、標的細胞又は宿主細胞のゲノムに組み込まれると起動するベクターの能力が改変により低下するように、改変されたベクターを指す。例えば、改変は、3'長鎖末端反復（long terminal repeat）（LTR）領域における欠失を含むことができる。遺伝子送達用途には、SINベクターは、非SINベクターよりも安全性の利点を有する。

20

【0048】

別の態様では、本明細書で産生される組換えウイルスベクターは、自己不活性型レンチウイルスベクター（SINベクター）である。SINベクターにおいて、3'LTRからのレンチウイルスエンハンサー及びプロモーター配列の欠失は、標的細胞の感染に際して、ベクター長のRNAを転写することができないベクターの産生をもたらす。この修飾のため、組み込まれたSINベクターは、更なる複製を行うことができず、したがって、複製能のあるウイルスを生成する可能性、並びに近傍の内因性プロモーターの転写活性にうっかり影響を与える危険性を低減する。

30

【0049】

別の態様では、本明細書で産生される組換えウイルスベクターは、コンディショナルSINベクターである。例えば、例示的なコンディショナルSINベクターにおいて、3'LTR U3転写調節エレメントは、誘導性プロモーター（例えば、Tet応答エレメント）で置き換えることができる。

【0050】

ウイルスベクターゲノム構築物

本明細書に開示される開示では、ウイルスベクターゲノム構築物は、目的の遺伝子をコードする。ある態様では、目的の遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。

40

【0051】

ある態様では、目的の遺伝子は、疾患の病態生理学において既知又は潜在的に重要な候補遺伝子であり得る。更なる態様では、目的の遺伝子は、既知の又は潜在的な治療用途又は診断用途を有し得る。ある態様では、目的の遺伝子は、コード領域を含み得る。更なる態様では、目的の遺伝子は、部分的なコード領域を含み得る。本明細書に開示されるウイルスベクターに挿入するための目的の遺伝子は、当該技術分野で既知の様々な技法を通して得ることができる。

【0052】

更なる態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物は、1つ以上の選択可能又は検出可能なエレメントを含む。ある態様では、選択可能又は検出可能なエレ

50

メントは、レポーターである。更なる態様では、選択可能又は検出可能な態様は、エピトープタグである。ある態様では、選択可能又は検出可能なエレメントは、当該技術分野で既知の方法によって選択又は検出され得、発光、吸光度、蛍光、抗生物質、抗原 - 抗体相互作用、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

#### 【0053】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物は、プロモーター、5'及び3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、セントラルポリプリンクトラクト (central polypurine tract)、及びポリアデニル化配列 (p(A)) からなる群から選択される1つ以上のエレメントを含む。別の態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物は、前文の全てのエレメントを含む。別の態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物は、プロモーター、5'長鎖末端反復、3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、セントラルポリプリンクトラクト、又はポリアデニル化配列を含まない。別の態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物を使用して、ウイルス様粒子を産生することができる。更なる態様では、長鎖末端反復は、自己不活性型の長鎖末端反復である。

10

#### 【0054】

本明細書に開示される本開示のウイルスベクターゲノム構築物は、コンカテマーの形態であり得る。ある態様では、コンカテマーは、1つ以上の転写因子を含み得る。更なる態様では、転写因子は、リガンド応答性の転写因子であり得る。更なる態様では、コンカテマーは、1つ以上の抗生物質選択遺伝子を含み得る。抗生物質選択遺伝子は、当該技術分野で既知である。ある態様では、コンカテマーは、Throm et al. Blood, 2009; 113(21): 5104-10に記載されているように、作製及び使用される。例えば、安定したウイルス産生細胞株は、コンカテマーアレイトランスフェクションによってゲノムに安定して組み込まれたSINレンチウイルスゲノム及びウイルスアクセサリ構築物を含むことができる。かかるアレイは、SINレンチウイルスベクターゲノムをコードするDNA断片を、薬剤耐性及び/又はアレイに含まれる他の選択/レポーターカセットとライゲーションすることによって得ることができる。

20

#### 【0055】

ウイルスアクセサリ遺伝子/タンパク質/構築物

ある態様では、ウイルスアクセサリ構築物は、1つ以上のアクセサリタンパク質をコードし、例えば、構造タンパク質 (例えば、Gag前駆体)、プロセッシングタンパク質 (例えば、Pol前駆体)、及び他のタンパク質 (例えば、プロテアーゼ、エンベロープタンパク質) が含まれる。別の態様では、ウイルスアクセサリベクターは、宿主細胞において1つ以上のアクセサリタンパク質を製造し、機能的なウイルス粒子を組み立てるのに必要な発現及び調節シグナルを提供する配列を含む。一態様では、Env、Rev、及びGag-Pol前駆体のコード配列は、同じプラスミド又はウイルスアクセサリ構築物上にある。別の態様では、Env、Rev、及びGag-Pol前駆体のコード配列は、別個のプラスミド又はウイルスアクセサリ構築物上に配置される。更なる態様では、別個のプラスミド又はウイルスアクセサリ構築物は、Gag、Pol、Rev、及びエンベロープタンパク質の各コード配列に使用される。ある態様では、ウイルスアクセサリ構築物は、群特異抗原 (Gag)、RNA依存性DNAポリメラーゼ (Pol)、ウイルスタンパク質の発現調節因子 (Rev)、エンベロープ (Env)、トランスアクチベーター (Tat)、負の調節因子 (Nef)、ウイルスタンパク質R (Vpr)、ウイルス感染因子 (Vif)、ウイルスタンパク質U (Vpu)、及びウイルスタンパク質X (Vpx) からなる群から選択される1つ以上の構造及び/又は調節ウイルスタンパク質、又はそれらの機能的断片若しくはドメインをコードし得る。別の態様では、機能的断片又はドメインは、MA (マトリックス [p17])、CA (カプシド [p24])、NC (ヌクレオカプシド [p9])、p6、プロテアーゼ (p10)、RT (p50)、RNaseH (p15)、及びインテグラーゼ (p31) からなる群から選択される1つ以上のタンパク質を含むことができる。ある態様では、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質のコード配列

30

40

50

は、作動可能に連結される。ある態様では、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質のコード配列は、別個のウイルスアクセサリ構築物上に存在する。

【0056】

ある態様では、本明細書で使用されるウイルスアクセサリ構築物は、組換えレンチウイルスベクターを産生するためのものである。ある態様では、本開示で使用されるウイルスアクセサリ構築物は、別個に又は集合的に、任意の好適な順序又は位置で、例えば、a) レンチウイルス Gag 及び Pol をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、レンチウイルス Gag - Pol 前駆体）に作動可能に連結された異種プロモーター、並びに b) env コード配列に作動可能に連結された異種プロモーターのうちの一つ以上を含むことができる。

10

【0057】

任意の好適なレンチウイルス 5' LTR は、任意のレンチウイルス種、亜種、株又はクレードから得られた LTR を含み、本開示に従って利用することができる。これには、霊長類及び非霊長類のレンチウイルスが含まれる。種の具体例としては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) - I (A、B、C、D、E、F、及び G、R5 及び R5 X 4 ウイルスなどの亜種、クレード、又は株を含む)、HIV - 2 (R5 及び R5 X 4 ウイルスなどの亜種、クレード、又は株を含む)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、サル・ヒト免疫不全ウイルス (SHIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV)、ヤギ関節炎・脳炎ウイルス、ジェンブラナ病ウイルス、ウシレンチウイルス、ピスナ・マエディウイルス、及びウマ感染性貧血ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0058】

かかるウイルスのゲノム参照配列は、例えば、HIV - I (NC\_001802)、HIV - 2 (NC\_001722)、SIV (NC\_001549)、SIV - 2 (NC\_004455)、ヤギ関節炎・脳炎ウイルス (NC\_001463)、ネコ免疫不全ウイルス (NC\_001482)、ジェンブラナ病ウイルス (NC\_001654)、ウシレンチウイルス (NC\_001511)、ピスナ・マエディウイルス (NC\_001452)、ウマ感染性貧血ウイルス (NC\_001450)、及びウシ免疫不全ウイルス (NC\_001413) など、広く利用可能である。

【0059】

ある態様では、本明細書で使用されるレンチウイルス 5' LTR は、エンハンサー、プロモーター、転写開始 (キャッピング)、転写ターミネーター、及びポリアデニル化を含む、遺伝子発現に利用されるシグナルを含む。それらは、典型的には、U3、R、及び U5 領域を有すると記載される。LTR の U3 領域は、エンハンサー、プロモーター、及び転写調節シグナルを含み、RBEI I I、NF - k B、Sp I、AP - I、及び / 又は G A B P モチーフが含まれる。T A T A ボックスは、5' LTR を得た種及び株に応じて、R 配列の開始から約 25 塩基対に位置する。完全にインタクトな 5' LTR を利用しても、改変コピーを利用してもよい。修飾は、好ましくは、T A R 配列が置換されている (以下を参照) R 領域、及び / 又は U5 領域の全部又は一部の欠失を伴う。改変された 5' LTR は、好ましくは、プロモーター及びエンハンサー活性、例えば、好ましくは天然 U3、置換された T A R を有する改変された R、及び天然 U5 を含む。

30

40

【0060】

ある態様では、異種又は非ウイルスプロモーターは、レンチウイルスの Gag 及び Pol をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結され得る。用語「作動可能に連結された」とは、プロモーターが、列挙されたコード配列の転写を駆動することができるように配置されることを意味する。ある態様では、gag 及び pol コード配列は、天然レンチウイルスにおける gag - pol 前駆体として組織化される。gag 配列は、p55 とも称され、55 k D G a g 前駆体タンパク質をコードする。p55 は、成熟プロセス中に、ウイルスがコードするプロテアーゼ 4 (pol 遺伝子の産物) によって、M A (マトリックス [ p 1 7 ] )、C A (カプシド [ p 2 4 ] )、N C (ヌクレオカプシド [ p 9 ]

50

）、及び p 6 と称される 4 つのより小さなタンパク質に切断される。P o l 前駆体タンパク質は、ウイルスがコードするプロテアーゼによって G a g から切断され、更に分解されて、プロテアーゼ ( p 1 0 )、R T ( p 5 0 )、R N a s e H ( p 1 5 )、及びインテグラーゼ ( p 3 1 ) 活性を分離する。

#### 【 0 0 6 1 】

ある態様では、1 つ以上のスプライドナー ( S D ) 部位は、ウイルスベクターゲノム構築物又はウイルスアクセサリ構築物に存在し得る。スプライドナー部位は、典型的には、5 ' L T R の 3 ' 末端とパッケージング配列との間に存在する。下流スプライスアクセプター ( S A ) もまた、例えば、p o l 配列の 3 ' 末端に存在し得る。S D 部位は、ベクターの任意の有効な位置に、複数のコピーで存在することができる。S D は、レンチウイルス配列の天然又は変異コピーを有することができる。

10

#### 【 0 0 6 2 】

天然の g a g - p o l 配列は、ウイルスアクセサリ構築物で利用することができ、又は改変を行うことができる。これらの改変には、キメラ g a g - p o l が含まれ得、g a g 及び p o l 配列が、異なるウイルス (例えば、異なる種、亜種、株、クレードなど) から得られ、かつ/又は配列が、転写及び/若しくは翻訳を改善し、かつ/又は組換えを低減するように改変されている。本開示の他の態様では、G a g 及び P o l 前駆体 (又はその部分、例えば、M A (マトリックス [ p 1 7 ] )、C A (カプシド [ p 2 4 ] )、N C (ヌクレオカプシド [ p 9 ] )、p 6、プロテアーゼ ( p 1 0 )、R T ( p 5 0 )、R N a s e H ( p 1 5 )、及びインテグラーゼ ( p 3 1 ) ) のうちの 1 つ以上)、をコードする配列を分離し、異なるベクター構築物上に配置することができ、各配列が、独自の発現シグナルを有する。

20

#### 【 0 0 6 3 】

H I V - I の R N A ゲノムは、約 1 2 0 ヌクレオチド p s i パッケージングシグナルを含み、これは、ウイルスのアセンブリ中に、G a g ポリタンパク質のヌクレオカプシド ( N C ) ドメインによって認識される。パッケージングシグナルの重要な部分は、5 ' L T R の U 5 領域に対してやや遠位の、H I V プロウイルスの主要なスプライドナー ( S D ) 部位と g a g 開始コドンとの間にある。ある態様では、パッケージングシグナルは、機能的に活性な g a g - p o l 前駆体のウイルス形質導入ベクターへのパッケージングを回避するために、アクセサリ構築物には機能的に存在しない。例えば、g a g を含むがパッケージングシグナルを欠くベクターが記載されている米国特許第 5 , 9 8 1 , 2 7 6 号 ( S o d r o s k i ら ) を参照されたい。

30

#### 【 0 0 6 4 】

g a g - p o l 前駆体の転写を増加、改善、増強するなどのために、追加のプロモーター及びエンハンサー配列を 5 ' L T R の上流に配置することができる。有用なプロモーターの例としては、哺乳類プロモーター (例えば、構成的、誘導性、組織特異的)、C M V、R S V、他のレンチウイルス種由来の L T R、並びに上記及び下記の他のプロモーターが挙げられる。加えて、構築物は、プロモーター配列によって駆動される転写を終結するのに有効なポリ A シグナルなどの転写終結シグナルを更に含むことができる。任意の好適なポリ A 配列 (例えば、グロビン (哺乳動物、ヒト、ウサギなど)、チミジンキナーゼ、成長ホルモン、S V 4 0、及び多くの他のものからの配列) を利用することができる。

40

#### 【 0 0 6 5 】

ある態様では、g a g - p o l 配列は、単一のウイルスアクセサリベクターにおいて、エンベロープ配列とは反対の転写方向に配置される。後者は、転写の方向が反対又は逆であることを意味する。これは、対応するプロモーターを反対方向に配置する (すなわち、互いに向き合う) か、又は双方向プロモーターを使用することによって達成され得る (例えば、T r i n k l e i n e t a l . , G e n o m e R e s e a r c h 1 4 : 6 2 - 6 6 , 2 0 0 4 )。この配置は、安全性の目的、例えば、組換え及び/又は機能的な組換え H I V ゲノムの産生のリスクを低減するために利用することができる。転写リードスルーが機能的な g a g - p o l 配列及び e n v 配列の両方を含む R N A をもたらす可能

50

性がないため、かかるベクターを用いると安全性が向上する。転写干渉は、転写を終結させる強力なポリアデニル化配列を利用することによって、防止することができる。強力な転写終結配列の例は、当該技術分野で既知であり、例えば、ウサギ - グロビンポリアデニル化シグナル (Lanoix and Acheson, EMBO J. 1988 Aug; 7 (8) : 2515 - 22) が含まれる (また、Plant et al., Molecular and Cellular Biology, April 2005, 25 (8) : 3276 - 3285 も参照されたい)。加えて、他のエレメント (例えば、シス作用リボザイム、又は任意の推定リードスルー配列を標的とする RNAi 配列) を、gag-pol コード配列と env コード配列との間に挿入して、転写終結を促進することができる。同様に、不安定配列、終結配列、及び休止部位を、コード配列の間に配置することができる。

10

## 【0066】

ある態様では、ウイルスクセサリ構築物は、構造ウイルスタンパク質をコードし得る。ある態様では、ウイルスクセサリ構築物は、調節ウイルスタンパク質をコードし得る。ある態様では、ウイルスクセサリ構築物は、構造ウイルスタンパク質及び調節ウイルスタンパク質の両方をコードし得る。

## 【0067】

ある態様では、ウイルスクセサリ構築物は、構造ウイルスタンパク質及び/又は調節ウイルスタンパク質をコードすることができ、これには、群特異抗原 (Gag)、DNA ポリメラーゼ (Pol)、ウイルスタンパク質の発現調節因子 (Rev)、エンベロープ (Env)、トランスアクチベーター (Tat)、負の調節因子 (Nef)、ウイルスタンパク質 R (Vpr)、ウイルス感染因子 (Vif)、ウイルスタンパク質 U (Vpu)、及びウイルスタンパク質 X (Vpx) が含まれるが、これらに限定されない。

20

## 【0068】

Gag は、マトリックスタンパク質 (MA)、カプシドタンパク質 (CA)、及びヌクレオカプシドタンパク質 (NC) などの構造タンパク質をコードする。Pol は、プロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、及びインテグラーゼ (IN) などのタンパク質をコードする。Env は、エンベロープタンパク質の表面ユニット及び膜貫通ユニットをコードする。

## 【0069】

ある態様では、コードされたウイルスクセサリタンパク質は、融合タンパク質である。ある態様では、コードされたウイルスクセサリタンパク質は、タンパク質ドメインなどの部分的なウイルスクセサリタンパク質である。ある態様では、ウイルスクセサリタンパク質ドメインとしては、カプシドタンパク質 (CA)、マトリックスタンパク質 (MA)、ヌクレオカプシドタンパク質 (NC)、p6、転写因子特異的タンパク質 1 (SP1)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN)、プロテアーゼ (PR)、及びデオキシウリジントリホスファターゼ (dUTPase 又は DU) が挙げられ得るが、これらに限定されない。更なる態様では、コードされるウイルスクセサリタンパク質は、少なくとも 1 つの完全長タンパク質又は少なくとも 1 つのタンパク質ドメインを含む。

30

## 【0070】

ある態様では、ウイルス構築物は、RRE エレメントを更に含むことができ、5'LTR 又は gag 及び pol 配列とは異なるレンチウイルス種から得られる RRE エレメントが含まれる。RRE エレメントは、13kD 配列特異的 RNA 結合タンパク質である rev ポリペプチドの結合部位である。RRE 配列を含む構築物は、効率的な発現のために Rev ポリペプチドに依存する。Rev は、pol 及び gag コード配列に対して遠位の HIV の第 2 のイントロン内に位置する Rev 応答エレメント (「RRE」) の複合体 RNA 二次構造の 240 塩基領域に結合する。Rev の RRE への結合は、スプライシングされていないウイルス RNA 及び完全にはスプライシングされていないウイルス RNA の核から細胞質への輸送を促進し、それによって、HIV タンパク質の発現を調節する。RRE エレメントは、構築物上の任意の好適な位置にあり得、好ましくは、ほぼ本来の位置に

40

50

ある Gag - Pol 前駆体に続く。同様に、Tat ポリペプチドについては、RRE に結合する能力を保持している限り、任意の好適な Rev ポリペプチドを利用することができる。

【0071】

ウイルスカプシド/エンベロープ

ウイルス粒子には、ウイルスゲノムが含まれ、カプシドと呼ばれるタンパク質コートにパッケージングされている。一部のウイルスについては、カプシドは、ウイルスタンパク質を含む脂質二重層によって囲まれており、通常、ウイルスが宿主細胞に結合することを可能にするタンパク質を含む。この脂質及びタンパク質の構造は、ウイルスエンベロープと呼ばれ、宿主細胞膜に由来する。カプシド及びエンベロープは、ウイルス感染において多くの役割を果たし、細胞へのウイルスの付着、細胞への侵入、細胞へのカプシド内容物の放出、及び新たに形成されたウイルス粒子のパッケージングが含まれる。カプシド及びエンベロープはまた、ウイルス遺伝物質を1つの細胞から別の細胞に伝達することにも関与する。これらの構造はまた、化学的又は物理的な不活性化に対する耐性などの、ウイルス粒子の安定性特性を決定する。

10

【0072】

ある態様では、安定したウイルスベクター産生細胞株は、エンベロープタンパク質を産生する。ある態様では、この細胞株システムで用いられるエンベロープタンパク質は、天然の HIV env 遺伝子（野生型又はコドン最適化）を使用するか、又は生体適合性の代替物（限定されないが、広宿主性（amphotropic）エンベロープタンパク質、水疱瘡口内炎ベクター（インディアナ若しくは他の株）、麻疹若しくは生物工学的（bioengineered）キメラ麻疹エンベロープタンパク質、テナガザル白血病ウイルス若しくはネコ白血病ウイルス又は生物工学的 FLV キメラが含まれる）を使用してシュードタイプ粒子（pseudotyped particle）を生成する。

20

【0073】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、1つ以上のカプシドタンパク質を含む。ある態様では、カプシドタンパク質は、異種であり得る。ある態様では、カプシドタンパク質は、遺伝子改変され得る。更なる態様では、カプシドタンパク質は、化学的に改変され得る。カプシドタンパク質を遺伝的及び化学的に修飾するための戦略は、当該技術分野で既知である。カプシドタンパク質は、ベクター生体分布を変化させるために修飾され得る。

30

【0074】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、1つ以上のエンベロープ（「Env」）タンパク質をコードする配列を有し得る。ウイルスベクター向性は、ウイルスエンベロープタンパク質が宿主細胞上の分子（タンパク質、脂質、又は糖）と相互作用する能力によって決定される。

【0075】

ある態様では、ウイルスアクセサリ構築物は、env コード配列に作動可能に連結された異種プロモーターを含むエンベロープモジュール又は発現カセットを含むことができる。エンベロープポリペプチドは、ウイルス表面に呈示され、ウイルス粒子による宿主細胞の認識及び感染に関与する。宿主範囲及び特異性は、エンベロープポリペプチドを修飾するか、又はそれを、例えば、異なる（異種の）ウイルス種によって発現されるエンベロープ若しくはその他の修飾されたエンベロープで置換することによって変えることができる。これをシュードタイプ化と呼ぶ。例えば、Yee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9564 - 9568, 1994 を参照されたい。水疱性口内炎ウイルス（VSV）タンパク質 G（VSVG）は、その広範な種及び組織向性、並びにベクター粒子に対する物理的安定性及び高い感染性を付与する能力のために、広く使用されてきた。例えば、Yee et al., Methods Cell Biol., (1994) 43: 99 - 112 を参照されたい。

40

【0076】

50

エンベロープポリペプチドを利用することができ、例えば、H I V g p 1 2 0 (天然及び修飾形態を含む)、モロニー Maus 白血病ウイルス (M o M u L V 又は M M L V)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (H a M u S V 又は H S V)、Maus 乳がんウイルス (M u M T V 又は M M T V)、テナガザル白血病ウイルス (G A L V)、ラウス肉腫ウイルス (R S V)、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス (V S V - G)、モコラウイルス、狂犬病、フィロウイルス (例えば、N P \_ 0 6 6 2 4 6 及び Q 0 5 3 2 0 を含む G P 1 / G P 2 エンベロープなどのエボラ及びマールブルグ)、広宿主性、アルファウイルスなどを含むが、これらに限定されない。他の例としては、例えば、トガウイルス科、ラブドウイルス科、レトロウイルス科、ポックスウイルス科、パラミキソウイルス科、及び他のエンベロープウイルス科からのエンベロープタンパク質が挙げられる。他の例示的なエンベロープは、ワールド・ワイド・ウェブにある以下のデータベース [ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses](http://ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses) に列挙されているウイルス由来のエンベロープである。

10

#### 【0077】

更に、ウイルスエンベロープタンパク質は、形質導入ベクターが、その通常の範囲外の宿主細胞を標的化してそれに感染するか、又は細胞若しくは組織型への形質導入をより具体的に制限することを可能にするポリペプチド配列を含むように改変又は操作することができる。例えば、エンベロープタンパク質は、受容体リガンド、抗体 (抗体の抗原結合部分又は単鎖抗体などの組換え抗体型分子を使用して)、及びポリペプチド部分若しくはその修飾 (例えば、グリコシル化部位が標的配列に存在する場合) などの標的化配列とインフレイムで連結され得、これは、形質導入ベクターコート上に呈示された場合、ビリオン粒子の目的の標的細胞への指向性送達を促進する。更に、エンベロープタンパク質は、細胞機能を調節する配列を更に含むことができる。形質導入ベクターを用いて細胞機能を調節することで、細胞の混合集団における特定の細胞型の形質導入効率を増加又は減少させることができる。例えば、幹細胞は、血液又は骨髄に見出される他の細胞型ではなく、幹細胞に特異的に結合するリガンド又は結合パートナーを含むエンベロープ配列を用いて、より特異的に形質導入することができる。かかるリガンドは、当該技術分野で既知である。非限定的な例は、幹細胞因子 (S C F) 及び F l t - 3 リガンドである。他の例としては、例えば、抗体 (例えば、細胞型に特異的な一本鎖抗体)、及び本質的に、肺、肝臓、膵臓、心臓、内皮、平滑、乳房、前立腺、上皮などの組織に特異的な任意の抗原 (受容体を含む) が挙げられる。

20

30

#### 【0078】

任意の異種プロモーターは、作動可能に連結された場合、ウイルスエンベロープコード配列の発現を駆動するために利用することができる。例えば、C M V プロモーター、E F 1 プロモーター、E F 1 - H T L V - 1 ハイブリッドプロモーター、フェリチンプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、及び本明細書で言及される他のプロモーターが挙げられる。

#### 【0079】

ある態様では、コードされたエンベロープタンパク質は、内因性である。更なる態様では、コードされたエンベロープタンパク質は、異種である。本明細書に開示されるウイルスベクターの異種エンベロープタンパク質は、生体適合性である任意のエンベロープタンパク質を使用して生成することができる。生体適合性は、当該技術分野で既知の方法を使用して決定することができる。

40

#### 【0080】

ある態様では、e n v は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に由来し得る。ある態様では、H I V 由来エンベロープ遺伝子をコードする配列は、野生型であり得る。更なる態様では、H I V 由来エンベロープ遺伝子をコードする配列は、コドン最適化され得る。

#### 【0081】

E n v はまた、シュードタイプ粒子として生成され得る。シュードタイプ化は、異なる標的細胞特異性を有するウイルスベクター粒子を操作して、エンベロープタンパク質が由

50

来した天然ウイルスの宿主範囲を拡大及び/又は変更することを可能にする。

【0082】

ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、広宿主性シュードタイプウイルスベクター (amphotropic pseudotyped viral vector) であり得る。ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、狭宿主性シュードタイプウイルスベクター (ecotropic pseudotyped viral vector) であり得る。ある態様では、本明細書に開示されるウイルスベクターは、汎親和性シュードタイプウイルスベクター (pantropic pseudotyped viral vector) であり得る。本明細書に開示されるウイルスベクターによってコードされるエンベロープタンパク質配列は、ベシクロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、又はモルビリウイルス属の任意の種に由来し得る。

10

【0083】

ある態様では、エンベロープタンパク質は、ベシクロウイルス属の種に由来し得、水疱性口内炎ニュージャージウイルス (VSV-NJ) 及び水疱性口内炎インディアナウイルス (VSV-IN) が含まれるが、これらに限定されない。更なる態様では、エンベロープタンパク質は、任意の水疱性口内炎ウイルス血清型に由来し得る。更なる態様では、エンベロープタンパク質は、切断型 (truncated) タンパク質であり得る。更なる態様では、エンベロープタンパク質は、生物工学的なキメラベシクロウイルスタンパク質であり得る。

【0084】

ある態様では、エンベロープタンパク質は、ガンマレトロウイルス属の種に由来し得、テナガザル白血病ウイルス (GaLV) 及びネコ白血病ウイルス (FLV) が含まれるが、これらに限定されない。更なる態様では、エンベロープタンパク質は、GaLVキメラ及びFLVキメラを含む、生物工学的なキメラガンマレトロウイルスタンパク質であり得る。本明細書で定義される「キメラ」は、異なる起源又は異なる組成の2つ以上の遺伝子断片から構成される、ウイルスなどの生物学実体を指す。

20

【0085】

ある態様では、エンベロープタンパク質は、モルビリウイルス属の種に由来し得、麻疹ウイルスを含むが、これに限定されない。更なる態様では、エンベロープタンパク質は、生物工学的なキメラ麻疹エンベロープタンパク質を含む、生物工学的なキメラモルビリウイルスタンパク質であり得る。キメラエンベロープタンパク質を生体工的に操作する方法は、当該技術分野で既知である。

30

【0086】

任意選択的な Tat

ある態様では、安定したウイルスベクター産生細胞株は、Tatタンパク質を含むか、又は産生する。別の態様では、安定なウイルスベクター産生細胞株は、Tatタンパク質を産生しない。Tatタンパク質の不在下では、レンチウイルスゲノムベクターは、5'LTRのHIVプロモーターを異種エンハンサー/プロモーターに置き換えて転写を確実にするように改変される。ある態様では、かかるプロモーターは、ウイルス性 (CMVのような) 又は細胞性 (EF1-のような) のいずれかであり得る。

40

【0087】

別の態様では、ウイルスアクセサリ構築物は、TARエレメントを更に含むことができ、これは、5'LTR、及び/又はその中に存在する gag 及び pol 配列とは異なるレンチウイルス種、群、亜種、亜群、株、又はクレードから得られる (すなわち、構築物に存在する他のレンチウイルスエレメントに対して異種である)。TARは、好ましくは、5'LTR内のその通常的位置 (例えば、LTRのU3エレメントとU5エレメントとの間) に存在し、例えば、天然のRが、異種レンチウイルス種のR'に置き換えられている。

【0088】

TARエレメントは、ウイルスDNAの5'LTR (例えば、R) 及び対応するRNAの5'末端に位置する、トランス活性化応答領域又は応答エレメントである。転写トラン

50

スアクチベーターである Tat は、レンチウイルス RNA 中に存在する場合、それに結合し、HIV LTR からの転写を何倍も活性化する。Tat は、TAR エlement によって形成される短いステムループ構造に結合する RNA 結合タンパク質である。

【0089】

異種 TAR エlement が利用される場合、5' LTR は、天然の TAR を別の種由来の TAR 配列に置き換えることによって、日常的に改変され得る。TAR 領域の例は広く知られている。例えば、De Arellano et al., AIDS Res. Human Retro., 2005, 21: 949 - 954 を参照されたい。かかる改変されたレンチウイルス 5' LTR は、LTR が完全に機能するように、インタクトな U3 及び U5 領域を含むことができる。TAR 領域又は R 全体が置換され得る。

10

【0090】

上記のように、Tat ポリペプチドは、TAR 配列に結合する。ウイルスアクセサリ構築物中に、tat のコード配列が存在してもよい。TAR に結合し、RNA の転写を活性化することができる限り、任意の Tat ポリペプチドを利用することができる。これには、同族 TAR エlement と同じ種又は異なる種から得られる天然 tat 配列、並びに操作及び改変された tat 配列が含まれる。

【0091】

プロモーター

ある態様では、本明細書に開示される構築物は、構成的、誘導性、切り替え (switch)、組換え、破壊/編集プロモーター又はプロモーター/エンハンサーの制御下で、アクセサリタンパク質又は RNA 分子を発現する 1 つ以上の発現カセットを含む。ある態様では、プロモーターは、プロモーターの時空間的発現パターンを決定するための上流シス調節を有する最小限のプロモーターである。上流調節エレメントは、シス作用エレメント (又はシス作用モチーフ) 又は転写因子結合部位を含み得る。更なる態様では、プロモーターは、異種上流調節エレメントの組み合わせを含む。

20

【0092】

ある態様では、プロモーターは、プロモーター/エンハンサーである。本明細書で使用される場合、プロモーター/エンハンサーという用語は、プロモーター機能及びエンハンサー機能の両方を提供することができる配列を含む DNA のセグメントを指す。プロモーター/エンハンサーは、内因性又は外因性若しくは異種であってもよい。内因性のプロモーター/エンハンサーとは、天然のウイルスゲノムにおいて所与の遺伝子と自然に連結しているものである。外因性又は異種のエンハンサー/プロモーターとは、その遺伝子の転写が連結されたプロモーター/エンハンサーによって指示されるように、分子生物学的技術の手段で遺伝子と並立に配置されるものである。

30

【0093】

ある態様では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。ある態様では、誘導性プロモーターは、正に誘導可能であり、正の制御によって調節される。ある態様では、誘導性プロモーターは、負に誘導可能であり、負の制御によって調節される。

【0094】

更なる態様では、誘導性プロモーターは、化学的に誘導可能なプロモーターであり得る。化学的に誘導可能なプロモーターは、当該技術分野で既知である。更なる態様では、化学的に誘導可能なプロモーターは、テトラサイクリンで制御可能なプロモーターであり得る。更なる態様では、テトラサイクリンで制御可能プロモーターは、天然プロモーターである。更なる態様では、テトラサイクリンで制御可能プロモーターは、合成プロモーターである。

40

【0095】

更なる態様では、誘導性プロモーターは、温度誘導性プロモーターであり得る。更なる態様では、誘導性プロモーターは、光誘導性プロモーターであり得る。更なる態様では、誘導性プロモーターは、生理学的に調節されたプロモーターであり得る。

【0096】

50

ある態様では、プロモーターは、構成的プロモーターであり得る。ある態様では、プロモーターは、切り替え (switched) プロモーターであり得る。ある態様では、プロモーターは、組換えプロモーターであり得る。ある態様では、プロモーターは、破壊/編集されたプロモーターであり得る。

【0097】

ある態様では、プロモーターエレメントは、自然に誘導可能であり得る。更なる態様では、プロモーターは、真核生物プロモーターに由来する配列を含むことができ、これには、CMV、EF1a、SV40、PGK1、Ubc、ヒトアクチン、CAG、TRE、CaMKIIa、Ca11、10、H1、及びU6が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0098】

更なる態様では、プロモーターは、合成エレメントを含む。合成プロモーターを調製する方法は、当該技術分野で既知である。ある態様では、合成プロモーターは、構成的合成プロモーターである。ある態様では、合成プロモーターは、誘導性合成プロモーターである。ある態様では、合成プロモーターは、組織特異的合成プロモーターである。

【0099】

ポリアデニル化配列

ある態様では、ウイルスベクターゲノム構築物又はウイルスアクセサリ構築物は、1つ以上のポリアデニル化配列 (p(A)) を含む。真核細胞における組換えDNA配列の発現は、得られる転写物の終止及びポリアデニル化を指示するシグナルの発現を必要とする。本明細書で使用される「ポリアデニル化配列」という用語は、新しく形成されたRNA転写物の終結及びポリアデニル化を指示する核酸配列を指す。ポリAテールを欠く転写物は、不安定であり、急速に分解され得る。本明細書に開示されるウイルスベクターゲノム構築物において利用されるポリAシグナルは、異種又は内因性であり得る。内因性ポリAシグナルは、所与の遺伝子のコード領域の3'末端に天然に見出されるポリA配列を指す。異種ポリAシグナルは、ある遺伝子から単離され、別の遺伝子の3'末端に配置されるポリA配列を指す。

20

【0100】

発現カセット

ある態様では、本明細書に記載のウイルスベクターゲノム構築物及び/又はウイルスアクセサリ構築物は、1つ以上の発現カセットを含む。発現カセットは、モノシストロン発現カセット又はポリシストロン発現カセットであり得る。

30

【0101】

ある態様では、ポリシストロン発現カセットは、1つ以上のウイルススキップ配列を含む。ウイルススキップ配列は、「自己切断」2Aペプチドであり、これは、真核細胞における翻訳中にポリペプチドの「切断」を媒介する18~22アミノ酸のウイルスオリゴペプチドである。「2A」という呼称は、ウイルスゲノムの特定の領域を指す。2A切断のメカニズムは、リボソームスキッピングであり、立体障害の生成に不可欠な高度に保存されたC末端配列によって媒介される。ある態様では、ウイルススキップ配列は、ブタテッショウウイルス-12A (P2A) に由来する2Aペプチドを含み得る。ある態様では、ウイルススキップ配列は、Thosea signaウイルス2A (T2A) に由来する2Aペプチドを含み得る。ある態様では、ウイルススキップ配列は、ウマ鼻炎Aウイルス (E2A) に由来する2Aペプチドを含み得る。ある態様では、ウイルススキップ配列は、口蹄疫ウイルス (F2A) に由来する2Aペプチドを含み得る。更なる態様では、ウイルススキップ配列は、保存された「2A」のC末端配列GDVEXNPGPと実質的に類似した2A配列を有する任意のウイルスに由来し得る。

40

【0102】

ある態様では、ポリシストロン発現カセットは、1つ以上の内部リボソーム進入部位エレメント (IRES) を含む。IRESエレメントは、タンパク質合成の内部開始を促進するシス作用性RNA領域である。IRES配列は、リボソームによって認識され、した

50



## 【0109】

ある態様では、ウイルスベクター構築物は、当該技術分野で既知の化学的方法を使用して、標的細胞又は宿主細胞に導入される。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、当該技術分野で既知の生物学的方法を使用して、標的細胞又は宿主細胞に導入される。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、当該技術分野で既知の物理学的方法を使用して、標的細胞又は宿主細胞に導入される。

## 【0110】

ある態様では、ウイルスベクター構築物は、光学技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、磁気技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、微粒子銃 (biolistic) 技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、ポリマーベースの技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、リポソームベースの技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。ある態様では、ウイルスベクター構築物は、ナノ粒子ベースの技術を含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。更なる態様では、ウイルスベクター構築物は、限定されないが、光学、磁気、微粒子銃、ポリマーベース、リポソームベース、及びナノ粒子ベースの技術を含む、技術の組み合わせを含む方法の組み合わせによって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。

10

## 【0111】

更なる態様では、ウイルスベクター構築物は、エレクトロポレーションを含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。更なる態様では、ウイルスベクター構築物は、ソノポレーションを含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。更なる態様では、ウイルスベクター構築物は、メカノポレーションを含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。更なる態様では、ウイルスベクター構築物は、フォトポレーションを含む方法によって、標的細胞又は宿主細胞に導入され得る。

20

## 【0112】

更なる態様では、導入方法はまた、カチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、カチオン性脂質、又はそれらの組み合わせの使用を伴う方法を含み得る。ある態様では、カチオン性ポリマーは、臭化ヘキサジメトリン (商業ブランド名ポリブレン) である。

30

## 【0113】

更なる態様では、導入方法はまた、レトロウイルス、レンチウイルス、トランスポゾン、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、CRISPR関連ヌクレアーゼ (例えば、Cas9、Cas12aなど)、又はリコンビナーゼの使用を伴う方法も含み得る。ある態様では、リコンビナーゼは、Creリコンビナーゼ、Flippaseリコンビナーゼ、又はその誘導体であり得る。

## 【0114】

核酸の産生細胞への組み込みを促進する方法は、当該技術分野で既知であり、核酸構築物を線状化することが含まれるが、これに限定されない。

40

## 【0115】

ある態様では、1つ以上のウイルスベクター構築物は、ウイルスベクター産生細胞内で安定して組み込まれるか、又はエピソーム的に維持され得る。導入されたウイルスベクターのうちのいずれかによってコードされる配列の遺伝子発現は、組み込み配列又はエピソームから生じ得る。

## 【0116】

ある態様では、成分のうちのいくつかを安定して発現するウイルスベクター産生細胞は、ベクター産生に必要なとされる残りの成分でトランスフェクトされ得る。ウイルスベクター産生に必要な残りの成分のトランスフェクションは、一過性であり得る。

## 【0117】

50

ウイルスベクター構築物は、宿主細胞又は標的細胞への導入時に、ランダムに又は部位特異的な様式で組み込まれ得る。

【0118】

ウイルスベクター産生細胞

本明細書に開示される開示は、適合する標的細胞又は宿主細胞に本開示の1つ以上のウイルスベクター構築物を導入し、細胞増殖及びベクター成分の発現をもたらす条件下で細胞を増殖させることによって、インビトロでウイルスベクター粒子を作製する方法を提供する。本明細書で使用される「標的細胞」及び「宿主細胞」という用語は、互換的である。

【0119】

ウイルスベクター産生細胞は、1つ以上のウイルスベクター構築物の導入時に、ウイルスベクター又はウイルスベクター粒子を産生することができる標的細胞又は宿主細胞である。

【0120】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞は、トランスジェニック細胞である。本明細書で使用される場合、「トランスジェニック細胞」という用語は、ある細胞型から別の細胞型に導入された遺伝物質を含む細胞を指す。ある態様では、ウイルスベクター産生細胞集団は、ポリクローナルである。ポリクローナル細胞は、複数のクローンを含む異種細胞集団を含み、細胞にわたる組み込み事象及び組み込み部位の数にばらつきがある可能性がある。更なる態様では、ウイルスベクター産生細胞集団は、モノクローナルである。

【0121】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞は、選択されたウイルスベクター産生細胞クローンから増殖させた細胞株に由来する。

【0122】

ウイルスベクター産生細胞クローンは、当該技術分野で既知の方法によって、ポリクローナル集団に由来し得る。選択方法には、限界希釈、単一細胞選別、単一細胞選択、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。限界希釈は、当該技術分野で既知の方法によって行われ得る。単一細胞選別は、当該技術分野で既知の方法によって行われ得、単一細胞プリンティング、蛍光活性化細胞選別(FACS)、及び磁気活性化細胞選別が含まれるが、これらに限定されない。単一細胞選択は、当該技術分野で既知の方法によって行われ得、エピトープ、タンパク質、レポーター遺伝子、又はそれらの組み合わせに対する選択が含まれるが、これらに限定されない。更なる態様では、単一細胞選択方法は、1つ以上の代謝特性又は抗生物質特性を介した選択を含み得る。

【0123】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、接着的な様式で増殖する。ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、浮遊培養(suspension)で増殖する。更なる態様では、接着ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、浮遊培養適応性であり得る。

【0124】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、血清補充培地又は無血清培地で培養される。当業者であれば、所与のウイルスベクター産生細胞型に適した培地を選択し、本明細書に開示される方法の様々な段階で培地組成を改変することができるであろう。培地は、分泌された細胞タンパク質、拡散性栄養素、アミノ酸、有機塩、無機塩、ビタミン、微量金属、糖、及び他の増殖促進物質(例えば、サイトカイン)の選択を有し得る。培地は、グルタミン又はその代替物を補充してもよい。

【0125】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、ベクターが由来する特定のウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。ある態様では、レトロウイルスベクターに関して、産生細胞クローン又は細胞株は、レトロウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。ある態様では、レンチウイルスベク

10

20

30

40

50

ターについて、産生細胞クローン又は細胞株は、レンチウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。ある態様では、ヘルペスウイルスベクターに関して、産生細胞クローン又は細胞株は、ヘルペスウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。ある態様では、アデノウイルスベクターに関して、産生細胞クローン又は細胞株は、アデノウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。ある態様では、アデノ随伴ウイルスベクターに関して、産生細胞クローン又は細胞株は、アデノ随伴ウイルスのライフサイクルを支持する任意の真核細胞であり得る。

【0126】

ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、不死化される。細胞株は、市販されているか、又は市販されていない実験室誘導体 (laboratory-derived) であり得る。更なる態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、真核生物起源である。ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、哺乳動物起源である。ウイルスベクターの産生のための哺乳動物細胞は、当該技術分野で既知である。ある態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株は、ヒト起源である。

10

【0127】

更なる態様では、ウイルスベクター産生細胞株は、高度にトランスフェクト可能であるヒト胎児腎臓 (HEK) 293細胞において又はそれから開発される。更なる態様では、ウイルスベクター産生細胞株は、HEK 293細胞の誘導体 (例えば、HEK 293T又はHEK 293F細胞) である。更なる態様では、ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株の細胞型には、HeLa細胞、Vero細胞、チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、A549細胞、及びNIH3T3細胞が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0128】

産生されたウイルスベクターの特徴付け

ウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株によって産生されるウイルスベクター粒子は、当業者に既知の様々な方法によって特徴付けられ得る。

【0129】

ある態様では、本明細書に開示される方法によって産生されるウイルスベクター粒子は、シュードタイプウイルス粒子である。シュードタイプウイルス粒子は、あるウイルス血清型から別のウイルス血清型へウイルス附着タンパク質を置換することによって産生され得る。本明細書で使用される場合、「ウイルス附着タンパク質 (viral attachment protein)」は、ウイルスカプシドタンパク質又はウイルスエンベロプタンパク質を指す。

30

【0130】

ある態様では、本明細書に開示される方法によって産生されるウイルスベクター粒子は、モザイクウイルス粒子である。モザイクウイルス粒子は、異なるウイルスバリエント由来の異なるウイルス附着タンパク質を混合することによって生成することができる。

【0131】

ある態様では、本明細書に開示される方法によって産生されるウイルスベクター粒子は、キメラウイルス粒子である。キメラウイルス粒子は、(合理的方法又はハイスルーブット組換え技術を介して) 血清型間でウイルス附着タンパク質のより小さなドメインを交換することを含む方法によって産生され得る。

40

【0132】

安定したウイルスベクター産生細胞クローン又は細胞株から、ウイルスベクターゲノム及びアクセサリタンパク質は、定量的又は定性的に特徴付けられ得る。ある態様では、ウイルスベクターゲノム及び1つ以上のアクセサリタンパク質の化学量論的比が決定され得る。更なる態様では、ウイルスベクターゲノム及び1つ以上のアクセサリタンパク質のレベルが決定され得る。

【0133】

50

選択された細胞クローン又は細胞株の組み込みプロファイルが決定され得る。ある態様では、組み込みプロファイル又は挿入プロファイルは、インバースPCR、線形増幅媒介PCR、又はライゲーション媒介PCRなどの当該技術分野で既知の方法によって検出され得る。そのような方法によって検出されたベクター隣接配列を、次いで、宿主細胞ゲノムにマッピングし、参照セットと比較することができる。マッピングは、QuickMapなどのベクター隣接配列をマッピング及び分析するための計算ツールを使用して実行することができる。

【0134】

ある態様では、組換えウイルスベクターは、細胞クローン又は細胞株から回収され得る。ある態様では、細胞株は、モノクローナルである。回収されたウイルスベクターは、定性的又は定量的に特徴付けられ得る。ある態様では、ウイルス力価は、1ミリリットル当たりの形質導入単位(t.u./ml)で表される。

10

【0135】

ウイルス力価は、物理的又は機能的滴定を使用して決定され得る。ある態様では、滴定方法は、限定されないが、ベクター上清の用量依存的な量を使用した指標細胞の形質導入を含む。

【0136】

更なる態様では、形質導入された指標細胞は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して評価することができる。PCRによる定量は、相対定量又は絶対定量を使用して実施され得る。PCRによる相対的又は絶対的な定量化の方法は、当該技術分野で既知である。

20

【0137】

更なる態様では、ウイルス力価決定方法は、酵素免疫アッセイである。回収されたウイルス粒子は、ウイルスカプシドタンパク質が由来したウイルスに特異的なイムノアッセイを使用して、ウイルスカプシドタンパク質の量を測定することによって定量化することができる(例えば、HIVのp24)。

【0138】

本明細書に開示される方法によって産生されるウイルスベクター粒子は、フロースルー超遠心分離及び高速遠心分離、及び接線流濾過を使用して濃縮及び/又は精製され得る。フロースルー超遠心分離は、RNA腫瘍ウイルスの精製に使用されている(Toplin et al., Applied Microbiology, 1967, 15: 582-589; Burger et al., Journal of the National Cancer Institute, 1970, 45: 499-503)。本開示は、レンチウイルスベクターの精製のためのフロースルー超遠心分離の使用を提供する。この方法は、以下のステップのうちの一つ以上を含み得る。例えば、レンチウイルスベクターは、セルファクトリー又はバイオリクターシステムを使用して、細胞から産生され得る。一過性トランスフェクションシステム(上記参照)を使用することができ、又はパッケージング若しくは産生細胞株も同様に使用することができる。必要に応じて、材料を超遠心分離機にロードする前に事前清澄化ステップを使用することができる。フロースルー超遠心分離は、連続流又はバッチ沈降を使用することができる。沈殿に使用される材料は、次のとおりである。塩化セシウム(CsCl)、酒石酸カリウム、臭化カリウムはいずれも腐食性であるが、低粘度で高密度を作り出す。CsClは、作製可能な広い密度勾配(1.0~1.9 g/cm)により、高純度を達成することができるため、プロセス開発に頻繁に使用される。臭化カリウムは、高密度で使用することができるが、高い温度(すなわち、25 )でのみ使用することができ、一部のタンパク質の安定性と互換性がない可能性がある。スクロースは、安価で無毒であるため、広く使用されており、ほとんどのタンパク質、細胞画分(sub-cellular fraction)、及び全細胞の分離に好適な勾配を形成することができる。通常、Hi最大密度は、約1.3 g/cm<sup>3</sup>である。スクロースの浸透ポテンシャルは、細胞に対して有毒であり得るが、この場合、複合勾配材料(例えば、Nycodenz)を使用することができる。勾配は、勾

30

40

50

配における1つ以上のステップを使用することができる。好ましい態様は、段階的なスクロース勾配を使用することである。材料の体積は、好ましくは、1回当たり0.5リットル～200リットル超であり得る。流速は、好ましくは、1時間当たり5～25リットルを超える。好ましい動作速度は、25,000～40,500rpmであり、最大122,000×gの力が生まれる。ローターは、所望の体積分率で静的にアンロードすることができる。好ましい態様は、遠心分離された材料を100ml画分でアンロードすることである。精製及び濃縮されたレンチウイルスベクターを含む単離画分は、次いで、ゲル濾過又はサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、所望の緩衝液に交換することができる。陰イオン交換クロマトグラフィー又は陽イオン交換クロマトグラフィーは、緩衝液交換又は更なる精製のための代替的又は追加的な方法として使用することもできる。加えて、接線流濾過は、必要に応じて、緩衝液交換及び最終製剤にも使用することができる。接線流濾過(TFF)は、2ステップのTFF手順が実施されるであろう超高速遠心分離又は高速遠心分離の代替ステップとしても使用することができる。第1のステップは、ベクター上清の体積を減少させ、一方、第2のステップは、緩衝液交換、最終製剤化、及び材料のいくつかの更なる濃縮に使用されるであろう。TFF膜は、100～500キロダルトンの膜サイズを有するべきであり、ここで、第1のTFFステップは、好ましくは、500キロダルトンの膜サイズを有するべきであり、第2のTFFは、好ましくは、300～500キロダルトンの膜サイズを有するべきである。最終緩衝液には、長期保存のためのベクターを保存することができる材料が含まれている必要がある。

10

#### 【0139】

20

本開示はまた、ベクター及びアクセサリ構築物でトランスフェクト又は形質導入してレンチウイルスベクターを産生する、接着細胞を含むセルファクトリー又は浮遊細胞を含むバイオリアクターのいずれかを使用して、レンチウイルスベクターを濃縮及び精製するための方法を提供する。非限定的な例又はバイオリアクターとしては、Waveバイオリアクターシステム及びXcellerexバイオリアクターが挙げられる。いずれもディスポーザブルシステムである。しかしながら、非ディスポーザブルシステムも使用され得る。構築物は、本明細書に記載のもの、並びに他の組換えウイルスベクターであり得る。あるいは、細胞株を操作して、形質導入又はトランスフェクションを必要とせずにレンチウイルスベクターを産生することができる。トランスフェクション後、レンチウイルスベクターを回収し、濾過して微粒子を除去し、次いで、連続流高速遠心分離又は超遠心分離を使用して遠心分離することができる。ある態様では、高速遠心分離機を備えたJCF-Aゾーナルローター及び連続流ローターのような高速連続流デバイスが使用される。また、遠心分離の速度が5,000×gRCF超、26,000×gRCF未満である任意の連続流遠心分離機も提供される。好ましくは、連続流遠心力は、約10,500×g～23,500×gRCFであり、回転時間は、20時間～4時間であり、より遅い遠心力には、より長い遠心時間が使用される。ウイルスベクターのペレットをもたらすベクターのストレート遠心分離の問題のように、レンチウイルスベクターが濾過不可能な凝集体を形成しないように、レンチウイルスベクターは、より密度の高い材料のクッション(非限定的な例はスクロースであるが、他の試薬を使用してクッションを形成することができ、これらは当該技術分野で周知である)上で遠心分離され得る。クッション上への連続流遠心分離は、ベクターが大きな凝集体を形成しないようにさせ、しかも、レンチウイルスベクターを産生する大量のトランスフェクトされた材料から、ベクターを高レベルに濃縮することが可能になる。加えて、スクロースの密度の低い第2の層を使用して、レンチウイルスベクター調製物のバンドを形成することができる。連続流量遠心分離の流量は、好ましくは、1分間当たり1～100mlであるが、より高い及びより低い流量を使用することもできる。流量は、ベクターが遠心分離機のコアに入るのに十分な時間を提供するよう調整され、高流量のせいでかなりの量のベクターが失われることはない。より高い流量が望まれる場合、連続流遠心分離機から流出する材料を再循環させ、2回目の遠心分離に通すことができる。連続流遠心分離を使用してウイルスを濃縮した後、接線流濾過(TFF)を使用してベクターを更に濃縮することができ、又はTFFシステムを単純に使用

30

40

50

して緩衝液交換することができる。T F Fシステムの非限定的な例は、G F > H e a l t h c a r eによって製造されるX a m p l e rカートリッジシステムである。好ましいカートリッジは、M Wカットオフが5 0 0 , 0 0 0 M W以下のものである。好ましくは、カートリッジは、3 0 0 , 0 0 0 M WのM Wカットオフで使用される。1 0 0 , 0 0 0 M Wカットオフのカートリッジも使用することができる。より大きな容量には、より大きなカートリッジを使用することができ、当業者は、ベクター調製物の最終充填の前に、この最終の緩衝液交換及び/又は濃縮ステップに適したT F Fシステムを容易に見出すことができるであろう。最終充填調製物は、ベクターを安定化する因子を含み得る。例えば、糖が一般に使用され、当該技術分野で既知である。

#### 【0140】

##### 細胞株の更なる改変

ある態様では、組換えウイルスベクターを製造するために利用される細胞株は、例えば、ウイルスベクターの産生を制限する遺伝子の発現を減少させる遺伝子をロックアウトするためにR N A i若しくはアンチセンスを導入することによって、又はウイルスベクターの産生を増強する配列を導入することによって、ウイルスベクター産生を増強するために、以下に記載される方法のうちいずれかで改変され得る。ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルス(ウイルス産物のレベルを増強するようにH I V L T Rに作用する)、又は細胞のトランスアクチベータータンパク質などの、細胞又はウイルスエンハンサーをコードする配列を、細胞株に操作することもできる(例えば、追加のプラスミドベクターを使用して)。細胞のトランス活性化タンパク質としては、例えば、N F - k B、紫外線応答因子、及びT細胞活性化因子が挙げられる。別の態様では、組換えウイルスベクターを製造するために利用される細胞株は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)、C R I S P R関連ヌクレアーゼ(例えば、C a s 9、C a s 1 2 aなど)からなる群から選択されるヌクレアーゼによって改変又は編集され得る。

#### 【0141】

ある態様では、細胞株は、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム、リボソームなどを使用して、構築D N Aで日常的に形質転換されて、D N Aを細胞に導入することができる。細胞は、(すなわち、アクセサリベクター及び導入ベクターの両方を使用して)共形質転換され得るか、又はそれらは、別個のステップで形質転換され得、各ステップが、異なるベクターの導入を伴う。

#### 【0142】

細胞は、ウイルスベクターを産生するのに有効な条件下で培養される。かかる条件には、例えば、タンパク質産生を達成するために必要な特定の環境が含まれる。かかる環境には、例えば、適切な緩衝液、酸化剤、還元剤、p H、補因子、温度、イオン濃度、細胞の好適な齢及び/又は段階(例えば、細胞周期の特定の部分、又は特定の遺伝子が発現されている特定の段階)、細胞が使用される場合、培養条件(細胞培地、基質、酸素、二酸化炭素、グルコース、及び他の糖基質、血清、増殖因子などを含む)が含まれる。

#### 【0143】

本開示はまた、増殖のための増強された特性を有し、培地中に存在する高価な因子への依存を低減し、タンパク質をより高い収率で産生し、ベクター粒子をより高い力価で産生する、細胞株の使用を提供する。例えば、H E K 2 9 3細胞では、細胞受容体の発現が特異的に増加することが最近報告され、細胞の培地に特異的リガンドを添加することによって、増殖能が増加することが示された(A l l i s o n e t a l . , B i o p r o c e s s I n t e r n a t i o n a l , 2 0 0 5 , 3 ( 1 ) : 3 8 - 4 5)。好ましい態様は、H E K 2 9 3細胞に関連するリガンドタンパク質の最適化された組み合わせを発現する複数のレンチウイルスベクターであり、その後、細胞をハイスループット法によって選別して、複数コピーのレンチウイルスベクターを含むH E K 2 9 3細胞のクローンを単離する。これらの細胞は、異なるが、H I Vベクターに含まれる複数コピーのリガンド遺伝子も発現するH I Vベクターの組み合わせを含む。リガンド遺伝子は、コドン最適化さ

10

20

30

40

50

れるか、又は変異を追加して、それらの発現を更に増加させることができる。好ましい組み合わせは、最終的に単離されたクローン細胞において発現され、次いで、複数の用途を有し得る、複数コピーのリガンドタンパク質を有する。タンパク質又は抗体（モノクローナル、ヒト化、一本鎖を含む）産生に使用することができる。レンチウイルスベクターなどのベクターの産生にも使用することができるが、レンチウイルスベクターに限定されない。他のベクター、例えば、アデノ及びアデノ随伴ベクター、マウスレトロウイルスベクター、SV40ベクター、並びに他のベクターなども、この今や最適化された細胞株から容易に作製することができる。HEK293細胞における発現/活性の増加を示す受容体及びそのリガンドのリストには、例えば、AXL受容体(gas)、EGF受容体(EGF)、ケモカイン受容体(フラクタリン)、PDGF受容体(PDGF)、IL-15R、IL-2R、ケモカイン受容体2(MCP1)、IL-2R、IL-1R-1、CSF-I受容体、オンコスタチン受容体、IL-4R、ビタミンD3受容体、ニューロピリン1(VEGF)、マクロファージ刺激受容体1(MSP)、NGF-R、PDGFR受容体、IL-11-R(例えば、)、IL-10-R(例えば、)、FGF-R-4(aFGF)、BMP受容体(例えば、II型(BMP-2))、TGF-R(例えば、受容体(TGF)、FGF-R-I(bFGF)、ケモカイン受容体4(SDIF)、インターフェロン受容体1及び2が含まれる。BioProcess International, January 2005を参照されたい。表1、「HEK-293によって発現される増殖因子/サイトカイン受容体」。かかる細胞は、より高いタンパク質及びベクター産生能を有し、細胞自体が因子を産生し、それらを培地中に分泌するため、培地中に存在するリガンド因子の存在に依存しなくなるであろう。

#### 【0144】

CHO細胞などの他の細胞型の場合、他の受容体-リガンドの組み合わせが重要であり得る。例えば、インスリン増殖因子受容体I、インスリン増殖因子、及びインスリンは、細胞内で抗アポトーシス活性を有すると考えられている。複数のレンチウイルスベクターは、インスリン増殖因子受容体(I又はII)、インスリン増殖因子(I又はII)、インスリン、及び産生のための標的タンパク質が、CHO細胞などの産生細胞の形質導入のためのベクターに全て含まれるように構築することができ、好ましくはハイスループット法を使用して適切なクローンを選択し、標的タンパク質の非常に高い産生を示すクローンを選択することができる。最適なクローンは、遺伝子発現の全ての操作された遺伝子又は阻害剤を高度に発現する細胞でなくてもよく、むしろ、遺伝子の各々を最適な発現レベルで発現する細胞であり、いくつかの発現レベルが低い場合がある。レンチウイルスベクターシステムの値及び複数のレンチウイルスベクターを使用してかかる細胞株を操作することは、レンチウイルスベクター混合物で形質導入された細胞集団において、各ベクターのコピー数がランダム又は確率的に分布していることであり、したがって、混合物中の各ベクターの量を変化させることによって、各個々の第2の遺伝子又は抑制配列のコピー数を最適化することができる。ベクター及び二次遺伝子又は遺伝子抑制配列の好ましい組み合わせは、各レンチウイルスベクターが、産生のために目的のタンパク質を発現し、それに加えて、任意選択的に、産生細胞の生存率又は一部の態様に影響を与えることによって、直接的又は間接的にタンパク質収率又はベクター収率を更に促進する少なくとも1つのRNAi又は遺伝子を発現することである。しかしながら、これらの二次配列の効果を高めるために、二次遺伝子又は遺伝子発現の抑制因子のみを発現する少なくとも1つのレンチウイルスベクターを有するのも有益であり得る。

#### 【0145】

##### 例示的な実施形態

実施形態1. 安定したウイルスベクター産生細胞株を作製する方法であって、

a. 目的の遺伝子(GOI)をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、を細胞集団に導入することと、

b. 当該GOI及び当該1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込

み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団を産生することと、

c. 当該トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、

d. 当該細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、  
を含み、

当該1つ以上のアクセサリ構築物の当該導入が、同時に生じる、方法。

【0146】

実施形態2. 安定したウイルスベクター産生細胞株を作製する方法であって、

a. 目的の遺伝子(GOI)をコードするウイルスベクターゲノム構築物と、1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする1つ以上のウイルスアクセサリ構築物と、  
を細胞集団に導入することと、

b. 当該GOI及び当該1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質をコードする組み込み配列又はエピソーム配列を含むトランスジェニック細胞集団を産生することと、

c. 当該トランスジェニック細胞集団から、所望のウイルス力価を産生する細胞クローンを選択することと、

d. 当該細胞クローンから、安定したウイルスベクター産生細胞株を生成することと、  
を含み、

当該1つ以上のアクセサリ構築物の当該導入が、介在する細胞培養なしで1つ以上の逐次ステップを介して生じる、方法。

【0147】

実施形態3. 当該トランスジェニック細胞が、ポリクローナル細胞を含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0148】

実施形態4. 当該選択することが、当該トランスジェニック細胞のポリクローナルからモノクローナルへの選択を更に含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0149】

実施形態5. 当該ポリクローナルからモノクローナルへの選択が、限界希釈、単一細胞選別、単一細胞選択、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態4に記載の方法。

【0150】

実施形態6. 当該安定したウイルスベクター産生細胞株の当該生成が、当該選択された細胞クローンの増殖によって生じる、実施形態1～5のいずれか1つに記載の方法。

【0151】

実施形態7. 当該方法が、凍結保存によって当該選択された細胞株を保存することを更に含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0152】

実施形態8. 当該方法が、当該凍結保存された細胞株から細胞を増殖させて、ウイルスベクターを産生することを更に含む、実施形態7に記載の方法。

【0153】

実施形態9. 当該方法が、当該選択された細胞クローン、当該生成された細胞株、又はその両方における当該ウイルスベクターゲノム及び当該1つ以上のアクセサリタンパク質のレベルを定量化することを更に含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0154】

実施形態10. 当該方法が、当該選択された細胞クローン、当該生成された細胞株、又はその両方におけるウイルスベクターゲノムRNAと1つ以上のアクセサリタンパク質の化学量論比を決定することを更に含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0155】

実施形態11. 当該方法が、当該選択された細胞クローン、当該生成された細胞株、又はその両方の組み込みプロファイルを決定することを更に含む、実施形態1又は2に記載の方法。

【0156】

10

20

30

40

50

実施形態 12 . 当該方法が、当該選択された細胞クローン、当該生成された細胞株、又はその両方からウイルスベクターを回収することを更に含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 5 7 】

実施形態 13 . 当該方法が、当該選択された細胞クローン、当該生成された細胞株、又はその両方のウイルス力価を決定することを更に含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 5 8 】

実施形態 14 . 当該ウイルス力価を決定することが、物理的滴定、機能的滴定、又はその両方を含む、実施形態 13 に記載の方法。

【 0 1 5 9 】

実施形態 15 . 当該ウイルス力価を決定することが、PCR、RT-PCR、及びプロットハイブリダイゼーションによる定量的検出からなる群から選択されるアッセイを介してウイルス核酸についてアッセイすることによって、又はイムノアッセイを介してウイルスタンパク質についてアッセイすることによって決定される、実施形態 13 に記載の方法。

【 0 1 6 0 】

実施形態 16 . 当該方法が、当該選択された細胞クローン又は当該生成された細胞株の当該ウイルス力価の感染性を決定することを更に含む、実施形態 14 に記載の方法。

【 0 1 6 1 】

実施形態 17 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、標的特異的ウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 2 】

実施形態 18 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、レトロウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 3 】

実施形態 19 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、レンチウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 4 】

実施形態 20 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、ヘルペスウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 5 】

実施形態 21 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、アデノウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 6 】

実施形態 22 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、アデノ随伴ウイルスに由来するウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 7 】

実施形態 23 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、1つ以上のカプシドタンパク質を含むウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【 0 1 6 8 】

実施形態 24 . 当該1つ以上のカプシドタンパク質が、異種である、実施形態 23 に記載の方法。

【 0 1 6 9 】

実施形態 25 . 当該1つ以上のカプシドタンパク質が、遺伝子改変されている、実施形態 23 に記載の方法。

【 0 1 7 0 】

実施形態 26 . 当該1つ以上のカプシドタンパク質が、化学的に改変されている、実施形態 23 に記載の方法。

【 0 1 7 1 】

実施形態 27 . 当該ウイルスベクター産生細胞株が、1つ以上のエンベロープタンパク

10

20

30

40

50

質を含むウイルスベクターを産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0172】

実施形態 28 . 当該 1 つ以上のエンベロープタンパク質が、異種である、実施形態 27 に記載の方法。

【0173】

実施形態 29 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、5'長鎖末端反復、3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、及びセントラルポリプリントラクトからなる群から選択される 1 つ以上のエレメントを含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0174】

実施形態 30 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、5'長鎖末端反復、3'長鎖末端反復、パッケージングシグナル、又はセントラルポリプリントラクトを含まない、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0175】

実施形態 31 . 当該 5'長鎖末端反復が、キメラである、実施形態 29 に記載の方法。

【0176】

実施形態 32 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、自己不活性型長鎖末端反復を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0177】

実施形態 33 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、1 つ以上の選択可能又はレポーターエレメントを含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0178】

実施形態 34 . 当該 1 つ以上の選択可能又はレポーターエレメントが、レポーター遺伝子、エピトープタグ、又はその両方である、実施形態 33 に記載の方法。

【0179】

実施形態 35 . 当該 1 つ以上の選択可能又はレポーターエレメントが、発光、吸光度、蛍光、抗生物質、抗原-抗体相互作用、又はそれらの組み合わせによって選択又は検出される、実施形態 33 に記載の方法。

【0180】

実施形態 36 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、プロモーター及びポリアデニル化配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0181】

実施形態 37 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物の当該プロモーターが、構成的又は誘導性である、実施形態 36 に記載の方法。

【0182】

実施形態 38 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物の当該プロモーターが、合成である、実施形態 36 に記載の方法。

【0183】

実施形態 39 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、インスレーター配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0184】

実施形態 40 . 当該ウイルスベクターゲノム構築物が、コンカテマーを含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0185】

実施形態 41 . 当該コンカテマーが、当該 GOI をコードする複数コピーの発現カセットを含む、実施形態 40 に記載の方法。

【0186】

実施形態 42 . 当該コンカテマーが、転写因子をコードする 1 つ以上の発現カセットを含む、実施形態 40 に記載の方法。

【0187】

実施形態 43 . 当該コンカテマーが、抗生物質選択遺伝子をコードする 1 つ以上の発現

20

30

40

50

カセットを含む、実施形態 40 に記載の方法。

【0188】

実施形態 44 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物が、プロモーター及びポリ阿德ニル化配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0189】

実施形態 45 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物が、エンハンサー配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0190】

実施形態 46 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物が、インスレーター配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0191】

実施形態 47 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物の当該プロモーターが、プロモーター/エンハンサーを含む、実施形態 44 に記載の方法。

【0192】

実施形態 48 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物の当該プロモーターが、合成プロモーターである、実施形態 44 に記載の方法。

【0193】

実施形態 49 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物の当該プロモーターが、誘導性、構成的、切り替え、組換え、又は破壊/編集プロモーターからなる群から選択される、実施形態 44 に記載の方法。

【0194】

実施形態 50 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリタンパク質が、融合タンパク質である、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0195】

実施形態 51 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリ構築物が、1 つ以上の発現カセットを含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0196】

実施形態 52 . 当該発現カセットが、モノシストロン発現カセット又はポリシストロン発現カセットである、実施形態 51 に記載の方法。

【0197】

実施形態 53 . 当該ポリシストロン発現カセットが、1 つ以上のウイルススキップ配列、内部リボソーム進入部位エレメント、又はその両方を更に含む、実施形態 52 に記載の方法。

【0198】

実施形態 54 . 当該ウイルススキップ配列が、P2A、T2A、E2A、及びF2A からなる群から選択される、実施形態 53 に記載の方法。

【0199】

実施形態 55 . 当該 1 つ以上のウイルスアクセサリタンパク質が、構造ウイルスタンパク質、調節ウイルスタンパク質、又はその両方をコードする配列を含む、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0200】

実施形態 56 . 当該構造タンパク質及び/又は調節タンパク質が、Gag、Pol、Rev、Env、Tat、Nef、Vpr、Vif、Vpu、及びVpx からなる群から選択される、実施形態 55 に記載の方法。

【0201】

実施形態 57 . 当該ウイルスアクセサリ構築物が、部分的なウイルスアクセサリタンパク質をコードする配列を含む、実施形態 50 に記載の方法。

【0202】

実施形態 58 . 当該部分的なウイルスアクセサリタンパク質が、1 つ以上のウイルスアクセサリタンパク質ドメインを含む、実施形態 57 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0203】

実施形態59．当該1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質ドメインが、CA、MA、NC、p6、SP1、RT、IN、PR、及びDUからなる群から選択される、実施形態57に記載の方法。

## 【0204】

実施形態60．当該1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質又はドメインをコードする配列が、野生型配列、変異配列、コドン最適化配列、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態55～59のいずれか1つに記載の方法。

## 【0205】

実施形態61．当該1つ以上のウイルスアクセサリタンパク質又はウイルスアクセサリタンパク質ドメインが、別々の発現カセットを介して導入される、実施形態55～60のいずれか1つに記載の方法。

## 【0206】

実施形態62．当該envタンパク質が、生物工学的キメラエンベロープタンパク質を含む、実施形態56に記載の方法。

## 【0207】

実施形態63．当該envタンパク質が、抗体又はリガンドに連結されている、実施形態56に記載の方法。

## 【0208】

実施形態64．当該envタンパク質が、ヒト免疫不全ウイルスに由来する、実施形態56に記載の方法。

## 【0209】

実施形態65．当該envタンパク質が、ベシクロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、及びモルビリウイルス属からなる群から選択されるウイルスに由来する、実施形態56に記載の方法。

## 【0210】

実施形態66．当該ベシクロウイルス属が、水疱性口内炎ニュージャージーウイルス(VSV-NJ)、水疱性口内炎インドアナウイルス(VSV-IN)、及びそれらに由来する株からなる群から選択される、実施形態65に記載の方法。

## 【0211】

実施形態67．当該ガンマレトロウイルス属が、テナガザル白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、及びそれらの誘導体からなる群から選択される、実施形態65に記載の方法。

## 【0212】

実施形態68．当該モルビリウイルス属が、麻疹ウイルス及びその誘導体からなる群から選択される、実施形態65に記載の方法。

## 【0213】

実施形態69．当該導入ステップが、化学的、生物学的、又は物理的ステップを含む、実施形態1又は2に記載の方法。

## 【0214】

実施形態70．当該導入ステップが、光学的方法、磁気的方法、微粒子銃方法、ポリマーベースの方法、リボソームベースの方法、ナノ粒子ベースの方法、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態1又は2に記載の方法。

## 【0215】

実施形態71．当該導入ステップが、形質導入を含む、実施形態1又は2に記載の方法。

## 【0216】

実施形態72．当該導入ステップが、トランスフェクションを含む、実施形態1又は2に記載の方法。

## 【0217】

10

20

30

40

50

実施形態 73 . 当該化学導入ステップが、カチオン性ポリマー、リン酸カルシウム、カチオン性脂質、又はそれらの組み合わせの使用を含む、実施形態 69 に記載の方法。

【0218】

実施形態 74 . 当該生物学的導入ステップが、レトロウイルス、レンチウイルス、トランスポゾン、T A L E N、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、C R I S P R 関連ヌクレアーゼ、又はリコンビナーゼを介した導入を含む、実施形態 69 に記載の方法。

【0219】

実施形態 75 . 当該リコンビナーゼが、C r e リコンビナーゼ又は F l i p p a s e リコンビナーゼを含む、実施形態 74 に記載の方法。

10

【0220】

実施形態 76 . 当該物理的導入ステップが、エレクトロポレーション、ソノポレーション、メカノポレーション、及びフォトポレーションからなる群から選択される、実施形態 69 に記載の方法。

【0221】

実施形態 77 . 当該組み込み配列が、ランダムな組み込みを示す、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0222】

実施形態 78 . 当該組み込み配列が、部位特異的組み込みを示す、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

20

【0223】

実施形態 79 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、一定量の培地を含む細胞培養物中にある、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0224】

実施形態 80 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、接着培養又は浮遊培養 ( c u l t u r i n g i n s u s p e n s i o n ) に適合される、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0225】

実施形態 81 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、血清補充培地又は無血清培地で培養される、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

30

【0226】

実施形態 82 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、不死化されている、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0227】

実施形態 83 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、真核生物である、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0228】

実施形態 84 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、哺乳動物である、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0229】

実施形態 85 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、ヒトである、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

40

【0230】

実施形態 86 . 当該安定なウイルスベクター産生細胞株が、H E K 2 9 3 細胞又はその誘導体である、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0231】

実施形態 87 . 当該 H E K 2 9 3 細胞が、H E K 2 9 3 T 細胞である、実施形態 86 に記載の方法。

【0232】

実施形態 88 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、シュードタイプウイルス

50

粒子を産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0233】

実施形態 89 . 当該シュードタイプウイルス粒子が、ベシクロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、及びモルビリウイルス属からなる群から選択されるウイルスの 1 つ以上のエンベロープタンパク質を含む、実施形態 88 に記載の方法。

【0234】

実施形態 90 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、モザイクウイルス粒子を産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0235】

実施形態 91 . 当該安定したウイルスベクター産生細胞株が、キメラウイルス粒子を産生する、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。 10

【0236】

これまで本開示を概説してきたが、例示として提供される以下の実施例を参照することによって、同様のことがより容易に理解されるであろう。ただし、それらは、特定されない限り、本開示を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0237】

実施例 1 :

本明細書に記載の概念の例示として、HIV ベースのレンチウイルスベクター産生細胞株が産生される ( 図 1 ) 。 図 2 は、様々な構築エレメントが安定して導入された細胞クローンを生成する代表的な作業フローの概要であり、細胞クローンは、その後、増殖、凍結保存、及びバンクされ得る。 20

【0238】

実施例 2 :

各ベクターが異なる比を使用して最良の力価を生成することを実証するために、一連の異なる構成比を使用して 2 つの異なるベクター構築物を試験する実験を行った。アクセサリ遺伝子は、標準的なパッキングプラスミドを使用して、gag/pol、rev、及びenv について各々 1 つずつ送達される。ベクター構築物 ( 別名 GOI、目的遺伝子について ) は、各々、緑色蛍光タンパク質レポーターカセットを送達し、これを使用して、標準的な滴定アッセイによってベクターの感染性を決定する。第 1 の GOI 構築物は、GF 30 P と呼ばれ、4.2 kb のプロウイルスにおける単純な単一の発現カセットを送達する ( 図 3 ) 。 第 2 の GOI は、約 10 kb のより複雑で臨床的に関連する構築物であり、GF P レポーターカセット、3.3 kb の構造エレメント ( 遺伝子座制御領域 ( LCR ) と呼ばれる )、及びヒト グロビンカセット ( アンチセンス方向でその天然プロモーターから発現され、最終的な mRNA からスプライシングで除かれる 2 つのイントロンの組み込みを可能にする ) を含む ( 図 3 ) 。 この構築物 ( グロビン - LCR - GF P として図 3 に示されている ) は、GF P よりも低い力価を生成することが知られている。以下に要約されるベクター産生プロトコルに従って、両方の構築物を試験する。

【0239】

HEK293 パッケージング細胞の調製 : 振盪フラスコの HEK293 細胞を、対数期 40 まで増殖させ、試料を取り出してカウントし、次いで、新鮮な培地を加えることによって  $3.5 \times 10^6$  細胞 / ml に希釈する。37 °C、8% CO<sub>2</sub> で振盪しながら一晩インキュベートする。細胞を採取し、カウントし、新鮮な培地で希釈して、 $4.7 \times 10^6$  細胞 / ml にする。各条件について、新しい 125 ml 振盪フラスコに 25.5 ml の細胞懸濁液を添加する。1.5 ml の LV-MAX サプリメントを添加し、渦巻くように混ぜる。インキュベーターに戻し、その間、DNA トランスフェクション混合物を調製する。

【0240】

DNA トランスフェクション : 各条件について、示された量の 4 つの各々のプラスミドを、ラベルした 15 ml コニカルチューブに添加し、Opti-MEM 培地で希釈して、合計 1.5 ml にする ( 表 2 に従う ) 。渦巻くように / 軽くたたいて混合する。各条件に 50

ついて、180  $\mu$ l の LV-MAX 試薬及び 1.32 ml の Opti-MEM 培地を、第2のラベルした 15 ml コニカルチューブに添加する。渦巻くように / 軽くたたいて混合する。希釈したプラスミド DNA を、希釈した LV-MAX トランスフェクション試薬に添加し、穏やかに上下にピペティングして混合する。トランスフェクション混合物を、室温で 10 分間インキュベートする。インキュベーターから標的細胞を取り出し、各条件についてトランスフェクション混合物を振盪フラスコにゆっくりと移し、穏やかに渦巻くように混合し、シェーカーインキュベーターに 48 ~ 55 時間戻す。

#### 【0241】

ベクターの回収：培養物を 50 ml のコニカルチューブに移し、室温で 5 分間、1500  $\times$  g で遠心分離する。上清を 0.45 ミクロンの PES シリンジフィルターを装着した 60 ml シリンジに移し、穏やかに圧力をかけて、新しい 50 ml コニカルチューブにゆっくりと上清を濾過する。清澄化したベクター調製物を、1 チューブ当たり 3 ~ 5 ml のラベルした 15 ml コニカルチューブにアリコートし、ドライアイス上で瞬間凍結し、次いで、使用するまで -20  $^{\circ}$ C で保存する。

10

#### 【0242】

標的細胞の調製：SupT1 細胞を、対数増殖期まで培養し、試料を取り出してカウントし、次いで、細胞を、新鮮な培地で  $1 \times 10^6$  細胞 / ml に希釈する。1000 倍の硫酸プロタミンを添加して、最終細胞懸濁液を 2 組作製する (1 ml の細胞当たり 2  $\mu$ l)。細胞混合物を 96 ウェルプレートにプレートし、示されるように、各ベクター調製物について 1 列配置する。

20

#### 【0243】

ベクターの調製：試験する全てのベクターロットが完全に解凍するまで、室温でインキュベートすることによって解凍する。4 本の 15 ml コニカルチューブに、1 : 2、1 : 10、1 : 20、1 : 100 とラベルする。1 : 2 のチューブに、2 ml の解凍したベクター及び 2 ml の新鮮な SupT1 培地を添加し、2 ~ 3 回反転させて混合する。1 : 10 のチューブに、1 ml の解凍したベクター及び 9 ml の新鮮な SupT1 培地を添加し、2 ~ 3 回反転させて混合する。1 : 20 のチューブに、1 ml の 1 : 2 希釈液及び 9 ml の新鮮な SupT1 培地を添加し、2 ~ 3 回反転させて混合する。1 : 100 のチューブに、1 ml の 1 : 10 希釈液及び 9 ml の新鮮な SupT1 培地を添加し、2 ~ 3 回反転させて混合する。細胞培養プレートに、各希釈を 3 連で、ベクター当たり 1 列ずつ、希釈したベクターを、1 ウェル当たり 100  $\mu$ l 添加する (この様式では、1 プレート当たり 8 列で、8 つのベクターを試験することができる)。タイタープレートを、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で 3 日間インキュベートする。

30

#### 【0244】

力価の決定：フローサイトメトリーを使用して、タイタープレートの各ウェルについて、GFP 陽性率 (% GFP+) 対非形質導入 SupT1 対照を決定する。1 ウェル当たりの力価を、以下の式を使用して決定する： $(1 \times 10^5 \text{ 細胞} \times \% \text{ GFP}+) / (100 \mu\text{l} \times \text{希釈倍率}) = \text{力価 (tu/ml の単位)}$ 。1 ~ 10% の % GFP+ を有する所与のベクター調製物の全ての試料について、算術平均を決定する。その平均値は、その調製物の観察された力価である。

40

#### 【0245】

グロビン-LCR-GFP 構築物は、GFP ベクターよりも低い力価を示す。GFP ベクターについて観察された最適力価は、条件 16 (9 : 1 : 1 : 9 の比) を使用して、約  $1 \times 10^7$  tu / ml であり、次の最適力価は、条件 4 (3 : 1 : 1 : 3 の比) を使用して、約  $8 \times 10^6$  tu / ml である。グロビン-LCR-GFP の最適力価は、条件 12 (9 : 1 : 1 : 6 の比率) を使用して、 $1 \times 10^6$  tu / ml であり、2 番目に最適なのは、条件 6 (6 : 1 : 1 : 3 の比率) であり、 $2 \times 10^5$  tu / ml の力価を有する (図 4)。

#### 【0246】

この実験は、異なる GOI 構築物について、最適なベクター粒子感染力価を達成するた

50

めに異なる比率の構成要素が必要であることを実証する。この実験はまた、一連の開始比を使用することによって、その後、最適比を経験的に決定することができるため、どんな最適比になるのかを事前に知る必要がないことを示している。この実験は、固定比の成分を使用して安定した産生システムを製造しても、任意の可能なGOIの最適力価を生成する可能性が低く、狭い範囲の構築物を使用してのみうまく機能する可能性が高いことを示す。この実験は、本明細書に記載される例示的な実施形態を提供し、これにより、考えられる様々なベクター比及び組み合わせが生じることを可能にし、次いで、得られた株を経験的に試験して、最適な産生細胞クローンを見つける。

【表 2】

表 2: 別個の試験構築物の最適な組み合わせについて試験するために使用される例示的なプラスミド比

条件	比				プラスミドの量(μg)			
	gag/pol	rev	env	GOI	gag/pol	rev	env	GOI
1	1	1	1	1	18.75	18.75	18.75	18.75
2	3	1	1	1	37.50	12.50	12.50	12.50
3	1	1	1	3	12.50	12.50	12.50	37.50
4	3	1	1	3	28.13	9.38	9.38	28.13
5	6	1	1	1	50.00	8.33	8.33	8.33
6	6	1	1	3	40.91	6.82	6.82	20.45
7	1	1	1	6	8.33	8.33	8.33	50.00
8	3	1	1	6	20.45	6.82	6.82	40.91
9	6	1	1	6	32.14	5.36	5.36	32.14
10	9	1	1	1	56.25	6.25	6.25	6.25
11	9	1	1	3	48.21	5.36	5.36	16.07
12	9	1	1	6	39.71	4.41	4.41	26.47
13	1	1	1	9	6.25	6.25	6.25	56.25
14	3	1	1	9	16.07	5.36	5.36	48.21
15	6	1	1	9	26.47	4.41	4.41	39.71
16	9	1	1	9	33.75	3.75	3.75	33.75

10

20

30

40

50



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/032479

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/64 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C40B C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. E. THROM ET AL: "Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection", BLOOD, vol. 113, no. 21, 21 May 2009 (2009-05-21), pages 5104-5110, XP055287486, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2008-11-191049 abstract page 5105, column 1, paragraph 3 - paragraph 5 figures 1, 2 ----- -/--	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 October 2021		Date of mailing of the international search report 22/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chavanne, Franz

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/032479

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/041647 A1 (CALIMMUNE INC [US]) 27 February 2020 (2020-02-27) paragraphs [0008], [0012], [0014], [0020], [0021], [0023], [0025], [0026], [0073], [0075], [0086], [0095] - [0097] paragraphs [0099] - [0101], [0117], [0136] example 5 figures 1, 11 -----	1-4,7-28
X	US 2020/095606 A1 (VINK CONRAD [GB]) 26 March 2020 (2020-03-26) abstract paragraphs [0066] - [0068], [0184] examples 2-4 -----	1-28
X	US 2003/113898 A1 (OLSEN JOHN C [US] ET AL) 19 June 2003 (2003-06-19) paragraphs [0001], [0024], [0026] - [0028], [0059], [0060], [0074] - [0077], [0085] - [0091], [0158] - [0160], [0514] -----	1-28
X	JP 2018 534937 A (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY) 29 November 2018 (2018-11-29) paragraphs [0001], [0009], [0015], [0028] - [0030], [0044], [0073], [0090], [0101] - [0104] figures 1-4 -----	1-4,7-28

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/032479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020041647 A1	27-02-2020	AU 2019325609 A1	18-03-2021
		CA 3109924 A1	27-02-2020
		CN 112639109 A	09-04-2021
		EP 3841212 A1	30-06-2021
		KR 20210049133 A	04-05-2021
		SG 11202101594W A	30-03-2021
		US 2021238632 A1	05-08-2021
		WO 2020041647 A1	27-02-2020
US 2020095606 A1	26-03-2020	BR 112019020941 A2	05-05-2020
		CA 3058972 A1	25-10-2018
		CN 110520535 A	29-11-2019
		EP 3612634 A1	26-02-2020
		JP 6878620 B2	26-05-2021
		JP 2020516307 A	11-06-2020
		US 2020095606 A1	26-03-2020
		WO 2018192981 A1	25-10-2018
US 2003113898 A1	19-06-2003	CA 2344208 A1	30-10-2002
		US 2003113898 A1	19-06-2003
JP 2018534937 A	29-11-2018	AU 2016360763 A1	31-05-2018
		BR 112018010635 A2	27-11-2018
		CA 3006288 A1	01-06-2017
		CN 108291208 A	17-07-2018
		DE 102016122316 A1	24-05-2017
		EP 3380604 A1	03-10-2018
		EP 3489353 A1	29-05-2019
		FR 3044016 A1	26-05-2017
		GB 2544892 A	31-05-2017
		JP 2018534937 A	29-11-2018
		KR 20180079351 A	10-07-2018
		RU 2018122636 A	25-12-2019
		US 2017145388 A1	25-05-2017
		US 2018320147 A1	08-11-2018
		US 2020123505 A1	23-04-2020
WO 2017089308 A1	01-06-2017		

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 グリーン マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01605 ウースター プライデン ストリート 17

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA23 CA44