

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-539700

(P2023-539700A)

(43)公表日 令和5年9月15日(2023.9.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	5/071 (2010.01)	C 1 2 N	5/071		
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全180頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-537888(P2023-537888)	(71)出願人	523072267		
(86)(22)出願日	令和3年9月1日(2021.9.1)		6 4 -エックス, インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年4月27日(2023.4.27)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/048741		0 7, サンフランシスコ, 3 アールデ		
(87)国際公開番号	WO2022/051418		イー ストリート 6 6 5, 스위트 2		
(87)国際公開日	令和4年3月10日(2022.3.10)		5 0		
(31)優先権主張番号	63/073,365	(74)代理人	100078282		
(32)優先日	令和2年9月1日(2020.9.1)		弁理士 山本 秀策		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413		
(31)優先権主張番号	63/111,238		弁理士 森下 夏樹		
(32)優先日	令和2年11月9日(2020.11.9)	(74)代理人	100181674		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100181641		
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔		
		(74)代理人	230113332		最終頁に続く

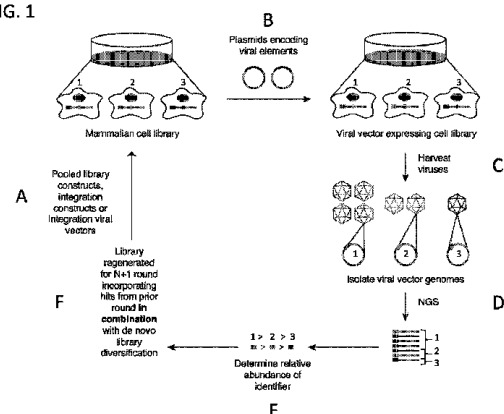
(54)【発明の名称】 哺乳動物細胞及びその改変方法

(57)【要約】

本開示は、ウイルスベクターの発現のための哺乳動物細胞株、ならびにその作製方法及び使用方法を提供する。提供する方法は、ウイルスベクターにパッケージングすることができる識別子の使用を採用して、ウイルスベクター産生についての有益な特性に関連する改変された配列を有する哺乳動物細胞株を選択し、及び／または同定する。例示的なウイルスベクターとして、AAVベクターが挙げられる。本開示は、とりわけ、哺乳動物細胞におけるウイルスベクターの産生及び／または発現のための方法、系及び組成物を提供する。本開示は、哺乳動物細胞内でウイルスベクターを発現させるための現在の技術において、最適化された哺乳動物細胞株を単離するためのウイルス産生及びスクリーニングが非効率的であることが負担となっていると認識する。

【選択図】 図 1

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a. 哺乳動物細胞のライブラリから複数のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを産生することを含み、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、各哺乳動物細胞が個別に、

(i) 2つの機能的 AAV ITR 配列の間に配置されたバーコードを含む核酸配列であって、前記核酸配列を、シス作用性組み込み配列のペアの間に配置された哺乳動物ゲノムに組み込む、前記核酸配列、

(ii) 1つ以上の摂動をもたらす1つ以上のライブラリバリエーションであって、少なくとも1つのライブラリバリエーションが、gRNAを含む、前記ライブラリバリエーション、

(iii) RNAガイドヌクレアーゼ、及び

(iv) AAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含み、

前記複数の哺乳動物細胞が、複数のAAVベクターを産生し、各AAVベクターが、それを産生した前記哺乳動物細胞のバーコードに対応する前記バーコードを含み、

b. 前記複数のAAVベクターの前記バーコードを検出することを含み、方法。

【請求項 2】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを産生するための哺乳動物細胞の選択方法であって、前記方法が、

a. 哺乳動物細胞のライブラリに、前記 AAVベクターの産生に必須の1つ以上の配列をトランスフェクトし、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、個別に、

(i) 2つの機能的 AAV ITR 配列の間に配置されたバーコードを含む核酸配列であって、前記核酸配列を、シス作用性組み込み配列のペアの間に配置された哺乳動物ゲノムに組み込む、前記核酸配列、

(ii) 1つ以上の摂動をもたらす1つ以上のライブラリバリエーションであって、少なくとも1つのライブラリバリエーションが、gRNAを含む、前記ライブラリバリエーション、及び

(iii) RNAガイドヌクレアーゼを含み、

b. 前記哺乳動物細胞のライブラリから複数のAAVベクターを産生し、前記 AAVベクターがそれぞれ、それを産生した前記個々の哺乳動物細胞のバーコードに対応する前記バーコードを含み、

c. 前記複数のAAVベクターの前記バーコードを検出することを含み、前記バーコードの存在量が、前記哺乳動物細胞によるAAVベクターの産生及び／または分泌と関連する、前記方法。

【請求項 3】

前記シス作用性組み込み配列が、レンチウイルス由来のウイルス反復配列である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記シス作用性組み込み配列が、リコンビナーゼ認識部位である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物細胞のライブラリから産生された前記複数のAAVベクターに存在するすべてのバーコードに対する特定のバーコードの相対量を測定するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 1つ以上の摂動が、前記 1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞と比較して、AAV産生及び／または AAV分泌の増加に関連する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1つ以上の摂動を含む前記哺乳動物細胞が、前記 1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞と比較して、AAV産生及び／または AAV分泌が少なくとも 10% 増加している

10

20

30

40

50

、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 RNA ガイドヌクレアーゼが、ヌクレアーゼ不活性型 RNA ガイドヌクレアーゼである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 つのライブラリバリエントを、前記シス作用性組み込み配列のペアの間に配置された前記哺乳動物ゲノムに組み込む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

1 コピーまたは 2 コピーの前記核酸配列を哺乳動物ゲノムに組み込む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 2 つの機能的 AAV ITR 配列が、ヒト AAV1 ITR、ヒト AAV2 ITR、ヒト AAV3b ITR、ヒト AAV4 ITR、ヒト AAV5 ITR、ヒト AAV6 ITR、ヒト AAV7 ITR、ヒト AAV8 ITR、ヒト AAV9 ITR、ヒト AAV10 ITR、ヒト AAV11 ITR、ヒト AAV12 ITR、またはヒト AAV13 ITR を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 2 つの機能的 AAV ITR 配列が、ウシ AAV (b-AAV) ITR、イヌ AAV (CAAV) ITR、マウス AAV1 ITR、ヤギ AAV ITR、ラット AAV ITR、またはトリ AAV (AAAV) ITR を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 AAV ベクターの産生に必須の 1 つ以上の配列が、(a) AAV Rep 遺伝子、(b) AAV Cap 遺伝子、(c) 1 つ以上の AAV ヘルパー遺伝子、または (d) それらの組み合わせを含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 AAV ベクターの産生に必須の 1 つ以上の配列が、ヒト AAV1 キャプシドタンパク質、ヒト AAV2 キャプシドタンパク質、ヒト AAV3b キャプシドタンパク質、ヒト AAV4 キャプシドタンパク質、ヒト AAV5 キャプシドタンパク質、ヒト AAV6 キャプシドタンパク質、ヒト AAV7 キャプシドタンパク質、ヒト AAV8 キャプシドタンパク質、ヒト AAV9 キャプシドタンパク質、ヒト AAV10 キャプシドタンパク質、ヒト AAV11 キャプシドタンパク質、ヒト AAV12 キャプシドタンパク質、またはヒト AAV13 キャプシドタンパク質をコードする AAV Cap 遺伝子を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の摂動が、内在性ゲノムコード配列の挿入、欠失、置換、変換、エピジェネティック修飾、及び／または再編成を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 1 つ以上のライブラリバリエントが、少なくとも 2 つのライブラリバリエントを含み、前記少なくとも 2 つのライブラリバリエントが、少なくとも 1 つのユニークな遺伝子、少なくとも 1 つのユニークな ORF、少なくとも 1 つのユニークな gRNA 配列、及び／または少なくとも 1 つのユニークな非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法が、単一細胞シーケンシングをさらに含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 2 に記載の方法により選択された哺乳動物細胞。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、

(i) 2つの機能的AAV ITR配列の間に配置されたバーコードを含む核酸配列であって、前記核酸配列を、シス作用性組み込み配列のペアの間に配置された哺乳動物ゲノムに組み込む、前記核酸配列、

(ii) 1つ以上の摂動をもたらす1つ以上のライブラリバリエーションであって、少なくとも1つのライブラリバリエーションが、gRNAを含む、前記ライブラリバリエーション、

(iii) RNAガイドヌクレアーゼ、及び

(iv) AAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含み、

前記哺乳動物細胞集団が、複数のAAVベクターを産生し、各AAVベクターが、それを産生した前記哺乳動物細胞のバーコードに対応する前記バーコードを含む、前記哺乳動物細胞集団。

10

【請求項20】

前記シス作用性組み込み配列が、レンチウイルス由来のウイルス反復配列である、請求項19に記載の哺乳動物細胞集団。

【請求項21】

前記シス作用性組み込み配列がリコンビナーゼ認識部位である、請求項19に記載の哺乳動物細胞集団。

【請求項22】

前記1つ以上の摂動が、前記1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞集団と比較して、AAV産生及び／またはAAV分泌の増加に関連する、請求項19～21のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【請求項23】

前記1つ以上の摂動を含む哺乳動物細胞が、前記1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞と比較して、AAV産生及び／またはAAV分泌が少なくとも10%増加している、請求項22に記載の哺乳動物細胞集団。

【請求項24】

前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、Exp293細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、HeLa S3細胞、PER.C6細胞、HKB11細胞、CAP細胞、ベビーハムスター腎臓線維芽細胞(BHK細胞)(例えば、BHK-21細胞)、マウスミエロマ細胞(例えば、Sp2/0細胞、NS0細胞)、緑色アフリカザル腎細胞(例えば、COS細胞及びVero細胞)、A549細胞、アカゲザル胎児肺細胞(例えば、FRhL-2細胞)、またはそれらのいずれかの誘導体を含む、請求項18～23のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【請求項25】

前記1つ以上の摂動を欠く哺乳動物細胞によって産生されるAAV集団と比較して、少なくとも1つの向上した特徴を含むAAVベクターの集団を産生する、請求項18～24のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【請求項26】

請求項18～25のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団によって産生されるAAVベクターの集団であって、前記AAVベクターの集団が、少なくとも1つの向上した特徴を含み、少なくとも1つの向上した特徴が、ウイルス核酸を移入する能力の変化、AAV治療活性の変化、及び／または非機能的な前記AAV集団の割合の減少、及び／またはそれらの意図した用途のためのすべての及び／または必須の核酸配列及び／または他のエレメントを含むウイルスベクターの医薬品製造基準の下での割合の増加を含む、前記AAVベクターの集団。

40

【請求項27】

レンチウイルスに由来する5'及び3'ウイルス反復配列を含む単離された核酸であって、前記5'及び3'ウイルス反復配列の間の前記配列が、

50

(i) 2つの機能的なアデノ随伴ウイルス (AAV) ITR 配列の間に配置されたバーコード、

(ii) 選択マーカー、及び

(iii) 1つ以上のライブラリバリエーションを含む、前記単離された核酸。

【請求項 28】

前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのORF、少なくとも1つのgRNA配列、少なくとも1つの非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、少なくとも1つの改変された配列を含む、請求項27に記載の単離された核酸。

【請求項 29】

バリエーションのライブラリを含む核酸の集団であって、前記集団の各核酸が、標的哺乳動物細胞に導入するためのシス作用性組み込み配列を含み、これらのシス作用性組み込み配列の間に、2つの機能的なアデノ随伴ウイルス (AAV) ITR 配列の間に配置された (i) 少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び (ii) バーコードが配置される、前記核酸の集団。

【請求項 30】

前記シス作用性組み込み配列が、レンチウイルス由来のウイルス反復配列である、請求項29に記載の核酸の集団。

【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9月1日出願された米国仮特許出願第63／073,365号、及び2020年11月9日出願された米国仮特許出願第63／111,238号の利益を主張し、両方の内容はその全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

例えば、遺伝子治療や細胞治療などの生物製剤の市場は拡大しているが、現在は高い製造コストと生産規模の拡大に伴う困難が重荷になっている。生物製剤の生産及びウイルスベクターの生産を含むがこれらに限定されない用途のために、改善された細胞株及びその単離方法が引き続き必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示は、とりわけ、哺乳動物細胞におけるウイルスベクターの産生及び／または発現のための方法、系及び組成物を提供する。本開示は、哺乳動物細胞内でウイルスベクターを発現させるための現在の技術において、最適化された哺乳動物細胞株を単離するためのウイルス産生及びスクリーニングが非効率的であることが負担となっていると認識する。本開示は、ウイルスベクター産生に関連する改変された特徴及び他の特徴のために、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターを改変するためのプラットフォーム技術を提供する。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターの発現及び／または産生について、向上した特性（例えば、ウイルスベクター発現の増加、発現期間の増加、安定性の増加など）を有する哺乳動物細胞株の産生及び／または選択を可能にする。いくつかの実施形態では、方法は、識別子を用いて哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターをスクリーニングすることを含む。提供される技術には、哺乳動物細胞の識別子（例えば、バーコード配列及び／またはライブラリバリエーションを含む）をウイルスベクターに取り込ませ、それを発現させることによって、ライブラリ内の細胞のウイルスベクター産生能力を効率的に評価し、特徴決定し、及び／または同定することができるという驚くべき洞察が含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞の集団をそれぞれ、ウイルスベクター内に識別子をパッケージングするのに適したアーキテクチ

10

20

30

40

50

を有する識別子を含むライブラリ構築物で形質転換する（例えば、AAVベクターの場合、識別子はAAV ITR間に配置され得る）。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞のそのような集団によって産生されたウイルスベクターのプールを、豊富な固有の識別子によってスクリーニングし、選択し、及び／または特徴決定することができる。

【0004】

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(ii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。

10

【0005】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）によって産生されたウイルスベクターは、それを産生した哺乳動物細胞の識別子と同じ識別子を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、それを産生した哺乳動物細胞の識別子に由来する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、それを産生した哺乳動物細胞の識別子に対応する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、それを産生した哺乳動物細胞の識別子と、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一である。

【0006】

20

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、(ii) 少なくとも1つの摂動、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ペイロード及び／または少なくとも1つのライブラリバリエーションをさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列をさらに含む。

【0007】

30

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、(ii) 少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ペイロード及び／または少なくとも1つの摂動をさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列をさらに含む。

【0008】

40

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、(ii) 少なくとも1つのペイロード、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び／または少なくとも1つの摂動をさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列をさらに含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列をさらに含む。

【0010】

50

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、(ii) 少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び／または摂動、(iii) 少なくとも1つのペイロード、(iv) 少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、(v) 少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列、及び(vi) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。

【0011】

いくつかの実施形態では、(i) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、(ii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び任意選択で(iii) 少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列と一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。

【0012】

いくつかの実施形態では、(i) ライブラリ構築物、及び(ii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、ライブラリ構築物は識別子を含み、識別子は、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に位置し、哺乳動物細胞は、識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）は、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含み、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。

【0013】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）によって産生されるウイルスベクターは、ライブラリ構築物と同じ識別子を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、関連するライブラリ構築物の識別子に由来する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、ライブラリ構築物の識別子に対応する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、ライブラリ構築物の識別子と、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一である。

【0014】

いくつかの実施形態では、(i) ライブラリ構築物、及び(ii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、ライブラリ構築物は識別子を含み、識別子は、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に位置し、哺乳動物細胞は、識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び／または少なくとも1つのペイロードを含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）は、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含み、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。

10

20

30

40

50

【0015】

いくつかの実施形態では、それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団（複数可）を提供し、1つ以上の改変された配列は、（i）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団（複数可）を提供し、1つ以上の改変された配列は、（i）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、（ii）少なくとも1つのライブラリバリエーション及び／または摂動、（iii）少なくとも1つのペイロード、及び（iv）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団（複数可）を提供し、1つ以上の改変された配列は、（i）ライブラリ構築物、及び（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子を含み、哺乳動物細胞集団は、識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団（複数可）を提供し、1つ以上の改変された配列は、（i）ライブラリ構築物、及び（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子を含み、哺乳動物細胞集団は、識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び／または少なくとも1つのペイロードを含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含む1つ以上の改変された配列を任意選択でさらに含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態で

50

は、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含むウイルスベクターも産生する摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含み、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含むウイルスベクターを産生し、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含み、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含むウイルスベクターも産生し、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。

10

【0020】

哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、ウイルスベクターの発現に適した当技術分野の任意の哺乳動物細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類（例えば、ヒト）、及び／またはブタの細胞を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）には、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、Exp293細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、HeLaS3細胞、PER.C6細胞、HKB11細胞、CAP細胞、ベビーハムスター腎臓線維芽細胞（BHK細胞）（例えば、BHK-21細胞）、マウスミエロマ細胞（例えば、Sp2/0細胞、NS0細胞）、緑色アフリカザル腎細胞（例えば、COS細胞、Vero細胞）、A549細胞、アカゲザル胎児肺細胞（例えば、FRhL-2細胞）、またはそれらのいずれかの誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞には、HEK293細胞、HEK293T細胞、CHO細胞、またはそれらの誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞には、HEK293細胞、HEK293T細胞、またはそれらの誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞には、HeLa細胞またはその誘導体が含まれる。

20

30

【0021】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、浮遊細胞培養に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、接着細胞培養に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、浮遊細胞及び／または接着細胞を含み得る。

【0022】

本開示の哺乳動物細胞及び／または方法は、任意のウイルスベクターを産生するために使用してよい。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるウイルスベクターは、摂動（例えば、1つ以上の摂動）を含む。いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクターの産生に関連する1つ以上の特徴（例えば、ウイルスベクターの安定性など）または他の特徴（例えば、治療活性の変化など）を変化させる。

40

【0023】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞（複数可）は、産生されるウイルスベクターの受容体（複数可）を破壊するかまたは除去するように改変されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ウイルスベクターの感染を遮断する薬剤で処理されている。

【0024】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、レトロウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベ

50

クター)、ポリオーマウイルスベクター、(例えば、シミアンウイルス40(SV40)ベクター)、パピローマウイルスベクター(例えば、ウシパピローマウイルス(BPV)ベクター)、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、麻疹ウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、狂犬病ウイルスベクター、水疱性口内炎ウイルス(VSV)ベクター、ピコルナウイルスベクター(例えば、ポリオウイルスベクター)、レオウイルスベクター、セネカウイルスベクター、エコーウイルスベクター(例えば、RIGVIR)、セムリキフォレストウイルス(SFV)ベクター、フラビウイルスベクター、アネロウイルスベクター、ニューカッスル病ウイルス(NDV)ベクター、パラミクソウイルスベクター、センダイウイルスベクター、オルソミクソウイルスベクター、インフルエンザウイルスベクター、コロナウイルスベクター、及び／またはハイブリッドウイルスベクター、及び／またはその誘導体、ハイブリッド、及び／または改変された誘導体である。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの発現に有用である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(複数可)は、(i) AAVベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(ii) AAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列は、それぞれ、AAVベクター内へパッケージングすることができるAAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列は、それぞれ哺乳動物AAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列は、それぞれヒトAAV ITR配列である。

20

【0026】

いくつかの実施形態では、複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団を提供し、複数の哺乳動物細胞のそれぞれは、(i) 2つの機能的AAV ITR配列の間に配置されたバーコードを含む核酸配列(この核酸配列は、哺乳動物ゲノムへ組み込まれ、シス作用性組み込み配列ペアの間に配置される)、(ii) 1つ以上の摂動をもたらす1つ以上のライブラリバリエーション、及び(iii) AAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含み、哺乳動物細胞集団は、複数のAAVベクターを産生し、各AAVベクターは、それを産生した哺乳動物細胞のバーコードに対応するバーコードを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのライブラリバリエーションはgRNAを含み、前記哺乳動物細胞(複数可)は、さらにRNAガイドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞によって産生されるAAVベクターは、ペイロードをさらに含む。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(複数可)のシス作用性組み込み配列は、レンチウイルス由来のウイルス反復配列である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(複数可)のシス作用性組み込み配列は、リコンビナーゼ認識部位である。

【0028】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞(複数可)の1つ以上の摂動は、1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞集団と比較して、AAV産生及び／またはAAV分泌の増加に関連する。いくつかの実施形態では、1つ以上の摂動を含む哺乳動物細胞(複数可)は、1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞と比較して、AAV産生及び／またはAAV分泌が少なくとも10%増加している。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物の2つのウイルス反復配列は、ヒトAAV1 ITR(複数可)、ヒトAAV2 ITR(複数可)、ヒトAAV3b ITR(複数可)、ヒトAAV4 ITR(複数可)、ヒトAAV5 ITR(複数可)、ヒトAAV6 ITR(複数可)、ヒトAAV7 ITR(複数可)、ヒトAAV8 ITR(複数可)、ヒトAAV9 ITR(複数可)、

50

ヒトAAV10 ITR（複数可）、ヒトAAV11 ITR（複数可）、ヒトAAV12 ITR（複数可）、ヒトAAV13 ITR（複数可）、またはそれらの任意の組み合わせであるか、またはそれらを含む、1対の逆位末端配列（ITR）を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物の2つのウイルス反復配列は、ウシAAV（b-AAV）ITR（複数可）、イヌAAV（CAAV）ITR（複数可）、マウスAAV1 ITR（複数可）、ヤギAAV ITR（複数可）、ラットAAV ITR（複数可）、またはトリAAV（AAAV）ITR（複数可）であるか、またはそれらを含む、1対の逆位末端配列（ITR）を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、AAVキャプシドタンパク質などのAAVベクターの産生に必須の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ヒトAAV1キャプシドタンパク質、ヒトAAV2キャプシドタンパク質、ヒトAAV3bキャプシドタンパク質、ヒトAAV4キャプシドタンパク質、ヒトAAV5キャプシドタンパク質、ヒトAAV6キャプシドタンパク質、ヒトAAV7キャプシドタンパク質、ヒトAAV8キャプシドタンパク質、ヒトAAV9キャプシドタンパク質、ヒトAAV10キャプシドタンパク質、ヒトAAV11キャプシドタンパク質、ヒトAAV12キャプシドタンパク質、またはヒトAAV13キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ヒト祖先AAVキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ウシAAV（b-AAV）キャプシドタンパク質、イヌAAV（CAAV）キャプシドタンパク質、マウスAAV1キャプシドタンパク質、ヤギAAVキャプシドタンパク質、ラットAAVキャプシドタンパク質、またはトリAAV（AAAV）キャプシドタンパク質を含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、AAVベクターの発現に有用であり、哺乳動物細胞（複数可）は、（i）AAVベクターにパッケージングすることができる、2つのAAV ITR配列の間に配置された少なくとも1つの識別子を含むライブラリ構築物、及び（ii）Rep遺伝子、Cap遺伝子、ヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせから選択される、AAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターの形成に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、AAV Rep遺伝子、AAV Cap遺伝子、1つ以上のAAVヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは複製可能である。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、複製条件付き、複製能欠失型、複製不能型、及び／または複製欠損型である。

【0033】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、AAVの受容体を破壊または除去するために、事前にまたは同時に遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、AAVベクターの感染を遮断する薬剤で処理されている。

【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、レンチウイルスベクターの発現に有用である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）は、（i）レンチウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、及び（ii）レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列は、それぞれレンチウイルスベクターにパッケージングすることができるレンチウイルスLTR配列である。

【0035】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物の2つのウイルス反復配列は、H I V L T R、S I V L T R、ウマ伝染性貧血ウイルスL T R、F I V L T R、ビスナウイルスL T R、またはその誘導体もしくは組み合わせを含む、一対のL T Rを含む。いくつかの特定の実施形態では、レンチウイルスベクターはH I V ベクターであり、L T RはH I V L T Rまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、レンチウイルスP s i 配列を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団を提供し、複数の哺乳動物細胞のそれぞれは、(i) 2つの機能的レンチウイルスL T R 配列の間に配置されたバーコードを含む核酸配列（この核酸配列は、哺乳動物ゲノムへ組み込まれ、シス作用性組み込み配列ペアの間に配置される）、(ii) 1つ以上の摂動をもたらす1つ以上のライブラリバリエーション、及び(iii) レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含み、哺乳動物細胞集団は、複数のレンチウイルスベクターを産生し、各レンチウイルスベクターは、それを産生した哺乳動物細胞のバーコードに対応するバーコードを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのライブラリバリエーションはg R N Aを含み、前記哺乳動物細胞（複数可）は、さらにR N Aガイドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞によって産生されるレンチウイルスベクターは、ペイロードをさらに含む。

【0037】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）のシス作用性組み込み配列は、レンチウイルス由来のウイルス反復配列である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）のシス作用性組み込み配列は、リコンビナーゼ認識部位である。

【0038】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスL T Rは、H I V L T R、S I V L T R、ウマ伝染性貧血ウイルスL T R、F I V L T R、ビスナウイルスL T R、またはそれらの誘導体もしくは組み合わせを含む。いくつかの特定の実施形態では、レンチウイルスベクターはH I V ベクターであり、L T RはH I V L T Rまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、レンチウイルスP s i 配列を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）の1つ以上の摂動は、1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞集団と比較して、レンチウイルスベクター産生及び／またはレンチウイルスベクター分泌の増加に関連する。いくつかの実施形態では、1つ以上の摂動を含む哺乳動物細胞（複数可）は、1つ以上の摂動を欠く参照哺乳動物細胞と比較して、レンチウイルスベクター産生及び／またはレンチウイルスベクター分泌が少なくとも10%増加している。

【0040】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び方法によって発現されるレンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）ベクター、サル免疫不全ウイルス（S I V）ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルス（F I V）ベクター、ビスナウイルスベクター、またはその誘導体である。

【0041】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、レンチウイルスg a g タンパク質またはその断片などのレンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、g a g タンパク質は、マトリックス（M A）、キャプシド（C A）、及びヌクレオキャプシド（N C）ドメインから選択される1つ以上のドメインを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、レンチウイルスエンベロープタンパク質またはその断片などのレンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、異なるウイルスに由来するg a

10

20

30

40

50

g タンパク質及びエンベロープタンパク質を含む偽型レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベクター、サル免疫不全ウイルス（SIV）ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルスベクター、ビスナウイルスベクターまたはそれらの誘導体由来する gag タンパク質及び／または env タンパク質を含む偽型レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、レンチウイルスベクターの発現に有用であり、哺乳動物細胞（複数可）は、（i）レンチウイルスベクターにパッケージングすることができる、2つのレンチウイルスLTR配列及びPsi配列の間に配置された少なくとも1つの識別子を含むライブラリ構築物、及び（ii）gag遺伝子、env遺伝子、pol遺伝子、またはそれらの組み合わせから選択される、レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターの形成に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、レンチウイルスgag遺伝子、レンチウイルスenv遺伝子、レンチウイルスpol遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは複製可能である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、複製条件付き、複製能欠失型、複製不能型、及び／または複製欠損型である。

【0044】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターの形成に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドは、HIV gag遺伝子、HIV env遺伝子、HIV pol遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、複製可能なHIVベクターである。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、複製条件付き、複製能欠失型、複製不能型、及び／または複製欠損型のHIVベクターである。

【0045】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、レンチウイルスの受容体を破壊または除去するために、事前にまたは同時に遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、レンチウイルスベクターの感染を遮断する薬剤で処理されている。そのような実施形態では、組み込みベクター及び／またはシス作用性組み込み配列は、レンチウイルス由来ではない。

【0046】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターの発現に有用である。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞（複数可）は、（i）HSVベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された少なくとも1つの識別子、及び（ii）HSVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、単純ヘルペスウイルス1（HSV-1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV-2）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）、ヒトヘルペスウイルス6及び／またはヒトヘルペスウイルス7、及び／またはそれらの誘導体であるか、またはそれらに由来する。

【0047】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物の2つのウイルス反復配列は、末端α配列を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、HSVキャプシドタンパク質またはその断片などのHSVベクターの産生に必須の1つ以上のタンパク質をコードする1つ以上のポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、HSVキャプシドは、VP5、VP19C、VP23、プレVP22a及び／または成熟プロテアーゼ（UL26遺伝子産物）を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、HSVベクターの発現に有用であり、哺乳動物細胞（複数可）は、（i）HSV末端α配列（前記配列は、HSVベクターにパッケージングされ得る）の間に配置された少なくとも1つの識別子を含むライブラリ構築物、及び（ii）HSVキャプシドタンパク質を含むHSVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。

10

【0050】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞、哺乳動物細胞集団及び／または方法は、HSV-AAVハイブリッドベクターの発現に有用である。いくつかの実施形態では、HSV-AAVハイブリッドベクターは複製可能である。いくつかの実施形態では、HSV-AAVハイブリッドベクターは、複製条件付き、複製能欠失型、複製不能型、及び／または複製欠損型である。

【0051】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞にエピソームとして存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞ゲノムに存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列は、異種調節エレメント（例えば、異種プロモーター及び／または異種エンハンサー）を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列は、SV40プロモーター、伸長因子（EF）-1プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）1プロモーター、ユビキチン（Ubc）プロモーター、ヒトβアクチンプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント（TRE）プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）プロモーター、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）プロモーター、スーパーコアプロモーター（SCP）、CAGプロモーター、もしくはその誘導体であるか、またはそれを含む異種プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列は、CMV初期エンハンサー、cAMP応答エレメント（CRE）エンハンサー、もしくはその誘導体であるか、またはそれを含む異種エンハンサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列は、誘導性転写制御エレメントの制御下にある。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を、誘導性転写制御エレメント（例えば、誘導性プロモーター及び／または誘導性エンハンサー）の制御下で哺乳動物細胞ゲノムに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を、誘導性転写制御エレメント（例えば、誘導性プロモーター及び／または誘導性エンハンサー）の制御下で哺乳動物細胞にエピソームとして存在させることができる。

20

30

40

【0052】

本開示の哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団の改変された配列のいずれも、エピソームとして存在させ、及び／または哺乳動物細胞ゲノムに組み込んでもよい。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列（識別子、摂動、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列を含むがこれらに限定されない）を、哺乳動物細胞にエピソームとして存在させてもよい。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列（識別子、摂動、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み

50

配列、及び／またはシス作用性組み込み配列を含むがこれらに限定されない)を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込んでもよい。

【0053】

いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、ウイルスベクターに存在する(例えば、識別子、摂動、ペイロードなど)。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、識別子及び摂動をそれぞれ含むウイルスベクターを発現する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスベクター産生に関連する1つ以上の特徴及び／または他の特徴(例えば、安定性など)を変化させる摂動を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ペイロードをさらに含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レポーター及び／または選択マーカーをさらに含む。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物を構成する1つ以上のポリヌクレオチド(識別子、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列を含むがこれらに限定されない)を、哺乳動物細胞にエピソードとして存在させてもよい。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物を構成する1つ以上のポリヌクレオチド(識別子、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列を含むがこれらに限定されない)を、哺乳動物細胞に組み込んでもよい。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を構成する1つ以上のポリヌクレオチドを、低いコ

20

【0055】

いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、異種コード配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、異種遺伝子及び／または異種遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、異種調節エレメント(例えば、異種プロモーター及び／または異種エンハンサー)を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、SV40プロモーター、伸長因子(EF)-1プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)1プロモーター、ユビキチン(Ubc)プロモーター、ヒトβアクチンプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント(TRE)プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)プロモーター、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)プロモーター、スーパーコアプロモーター(SCP)、CAGプロモーター、もしくはその誘導体であるか、またはそれを含む異種プロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、CMV初期エンハンサー、cAMP応答エレメント(CRE)エンハンサー、もしくはその誘導体であるか、またはそれを含む異種エンハンサー配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列は、誘導性転写制御エレメントを含む。

30

【0056】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、複数の改変された配列(例えば、識別子、摂動、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列)を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上の改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、最大100個の改変された配列を含む。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、例えば、識別子、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列を含み得る1つ以上の改変され

50

た配列を含むライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、少なくとも1つのライブラリ構築物を含み、少なくとも1つのライブラリ構築物は、少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上の改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、最大100個の改変された配列を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、例えば、識別子、摂動、ペイロード、及び／またはシス作用性組み込み配列を含み得る1つ以上の改変された配列を含むウイルスベクターを産生する。

10

【0059】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、少なくとも1つのバーコード、少なくとも1つの識別子、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つのシス作用性組み込み配列、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらから選択される少なくとも1つの改変された配列を含む少なくとも1つのライブラリ構築物を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、バーコードを含む少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、約5～約25ヌクレオチドである配列を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、複数のユニークなバーコードを含み、複数のユニークなバーコードは、約5～約25ヌクレオチドであるユニークな配列を含む。

20

【0061】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む識別子を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む識別子を含み、バーコードは、2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、バーコードは、2つのウイルス反復配列の間に配置され、識別子ではない。いくつかの実施形態では、バーコードは、2つのウイルス反復配列の間に配置されない。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含む。ライブラリバリエーションは、遺伝子、ORF、gRNA配列、非コード核酸、またはそれらの組み合わせを含む改変された配列を含み得るが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、最大100個のライブラリバリエーションを含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、複数のライブラリバリエーションを含み、複数のライブラリバリエーションは、少なくとも1つのユニークな遺伝子、少なくとも1つのユニークなORF、少なくとも1つのユニークなgRNA配列、及び／または少なくとも1つのユニークな非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも1つのユニークな遺伝子、少なくとも1つのユニークなORF、少なくとも1つのユニークなgRNA配列、少なくとも1つのユニークな非コード核酸配列、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、複数のユニークな遺伝子、複数のユニークなORF、複数のユニークなgRNA配列、複数のユニークな非コード核酸配列、またはそれらの組み合わせを含む。

40

50

【0064】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、gRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも1つのユニークなgRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも100個のユニークなgRNA配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ORFを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも1つのユニークなORFを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも100個のユニークなORFを含む。

10

【0066】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも1つのユニークな遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも100個のユニークな遺伝子を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、非コード核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、それぞれ少なくとも1つのユニークな非コード核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、少なくとも100個のユニークな非コード核酸配列を含む。

20

【0068】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのレポーター及び／または選択マーカーを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を含む1つ以上のポリヌクレオチドは、レポーター及び／または選択マーカーを含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、複数のライブラリ構築物は、複数の識別子を含む。いくつかの実施形態では、識別子は、少なくとも1つのバーコード及び／または少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、少なくとも1つのバーコード及び／または少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む識別子を含むライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、複数の識別子を含む複数のライブラリ構築物を含み、識別子は、複数のバーコード及び／または複数のライブラリバリエーションを含む。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数の改変された配列を含み、複数の改変された配列の第1のサブセットは、2つのウイルス反復配列の間に配置され、複数の改変された配列の第2のサブセットは、2つのウイルス反復配列の外側に配置される。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含む複数の改変された配列を含み、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子の両方が2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含む複数の改変された配列を含み、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードは、2つのウイルス反復配列の間に配置される。

50

【0072】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含む複数の改変された配列を含み、少なくとも1つの識別子は2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含む複数の改変された配列を含み、少なくとも1つの識別子及び少なくとも1つのペイロードは2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも2つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含む複数の改変された配列を含み、少なくとも1つの識別子及び少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、2つのウイルス反復配列の間に配置されるペイロードをさらに含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子の両方が、2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含み、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードは2つのウイルス反復配列の間に配置される。

20

【0075】

いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、少なくとも1つの識別子は2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含み、少なくとも1つの識別子及び少なくとも1つのペイロードは2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、少なくとも2つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、少なくとも1つの識別子及び少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、提供するライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の間に配置されるペイロードをさらに含む。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの識別子はバーコードを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、少なくとも1つのバーコードは2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列の間に配置されるバーコードは識別子である。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む少

50

なくとも1つの改変された配列を含み、少なくとも1つのバーコードは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。

【0078】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、複数のバーコードを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、複数のバーコードを含み、少なくとも1つのバーコードは2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、複数のバーコードを含み、複数のバーコードは2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列の間に配置される少なくとも1つのバーコードは識別子である。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は複数のバーコードを含み、複数のバーコードの第1のサブセットは2つのウイルス反復配列の間に配置され、複数のバーコードの第2のサブセットは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。

10

【0079】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、ライブラリ構築物の複数のc o pまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、ライブラリ構築物またはその一部の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、複数コピーのライブラリ構築物またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、1〜4コピーのライブラリ構築物またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、正確に2コピーのライブラリ構築物またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、正確に1コピーのライブラリ構築物またはその一部を含む。

20

【0080】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、単一の連続核酸配列からなる少なくとも1つのライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞集団は複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物はそれぞれ単一の連続核酸配列からなり、複数のライブラリ構築物は複数のユニークな核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数の不連続核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10個の不連続核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、最大100個の不連続核酸配列を含む。

30

【0081】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞集団は複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物はそれぞれ不連続核酸配列からなり、ライブラリ構築物は複数のユニークな核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、個々の哺乳動物細胞それぞれに由来する核酸またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法中に少なくとも1つのユニークな細胞同一性配列を含む。いくつかの実施形態では、個々の哺乳動物細胞それぞれに由来する複数の核酸配列またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む。いくつかの実施形態では、個々のライブラリ構築物それぞれに由来する核酸またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法中に少なくとも1つのユニークな細胞同一性配列を含む。いくつかの実施形態では、個々のライブラリ構築物それぞれに由来する複数の核酸配列またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む。

40

【0082】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリ構築物を含み、各哺乳動物細胞は、複数の不連続核酸配列からなる単一のライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物は、複数のユニークな核酸配列を含み、ライブラリ構築物由来の複数の核酸配列（またはその誘導体）は、単一細胞シーケンシング法の間に細胞同一性配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物由来のすべての核酸配列（またはその誘

50

導体) は、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含む少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞内にエピソームとして存在する少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの提供する哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞のゲノムに存在する少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は少なくとも2つの摂動を含み、少なくとも1つの摂動はエピソームとして存在し、少なくとも1つの摂動は哺乳動物細胞のゲノムに存在する。

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターは、摂動(例えば、1つ以上の摂動)を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルス核酸に存在する摂動を含む改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ITRに存在する摂動を含む改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ITR間に存在する摂動を含む改変された配列を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上のポリヌクレオチドは、摂動(例えば、1つ以上の摂動)を含む改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上のポリヌクレオチドは、エピソームとして存在し、摂動(例えば、1つ以上の摂動)を含む改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上のポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞のゲノムに存在し、摂動(例えば、1つ以上の摂動)を含む改変された配列を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、複数のユニークな摂動を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8または9個のユニークな摂動を含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、内在性ゲノムコード配列の挿入、欠失、置換、変換、エピジェネティック修飾、及び／または再編成を含む少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、内在性コード配列は、内在性遺伝子または遺伝子セグメントであるか、またはそれらを含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、内在性ゲノム調節エレメントの挿入、欠失、置換、変換、エピジェネティック修飾、及び／または再編成を含む少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、内在性調節エレメントは、内在性プロモーター配列及び／または内在性エンハンサー配列であるか、またはそれらを含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含む。いくつかの実施形態では、摂動アクセサリ配列は、RNAガイドヌクレアーゼまたはその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドヌクレアーゼには、Cas9、Cpf1、及び／またはCasZ、あるいは転写調節因子を含む融合タンパク質(例えば、Cas9-VPRまたはCas9-KRAB-Mecp2融合体)、ヌクレアーゼドメインとのCRISPRタンパク質融合体(例えば、FokI)、酵素的塩基編集体(例えば、BE及びABE融合体のバージョン)、逆転写酵素融合体(例えば、Prime Editor)、CRISPRリコンビナーゼ(例えば、RecCas9)、及びCRISPRトランスポザーゼ(例えば、Tn7様トランスポザーゼ系Cas12

10

20

30

40

50

k 及び T n i Q とのカスケード複合体)を含むそれらの誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、RNA ガイドヌクレアーゼは、Cas 9 またはその誘導体を含む。

【0090】

提供するライブラリ構築物は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して哺乳動物細胞に導入することができる。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、トランスフェクション及び／または形質導入によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、レンチウイルス媒介形質導入によって哺乳動物細胞に導入する。

【0091】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物の少なくとも1つの改変された配列はエピソームとして存在する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、個々の細胞のそれぞれは少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含み、少なくとも1つの改変された配列はエピソームとして存在する。

10

【0092】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物の少なくとも1つの改変された配列は少なくとも1つのライブラリバリエーションを含み、少なくとも1つのライブラリバリエーションはエピソームとして存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのライブラリバリエーションはエフェクターである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのライブラリバリエーションは、少なくとも1つの摂動になる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのライブラリバリエーションは、少なくとも1つのORF、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つの非コード核酸配列、及び／または少なくとも1つのgRNA、または複数のそれらを含む。

20

【0093】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのgRNAを含む少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、個々の細胞のそれぞれは、RNA ガイドヌクレアーゼもしくは非RNA ガイドヌクレアーゼまたはその誘導体を含む少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含み、少なくとも1つの改変された配列はエピソームとして存在する。

30

【0094】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのgRNAを含む少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、個々の細胞のそれぞれは、RNA ガイドヌクレアーゼもしくは非RNA ガイドヌクレアーゼまたはその誘導体を含む少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含み、少なくとも1つの改変された配列はエピソームとして存在する。

【0095】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、ゲノム配列変化、エピソーム配列変化、及び／またはエピジェネティック修飾を含む少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、内在性ゲノムコード配列の挿入、欠失、置換、及び／または再編成を含む少なくとも1つの摂動を含む。

40

【0096】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、少なくとも1つの摂動を個別に含むウイルスベクターを産生する。

【0097】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラ

50

リ構築物の少なくとも1つの改変された配列は、哺乳動物細胞のゲノムに存在する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞はライブラリ構築物を含み、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、個々の細胞のそれぞれは少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含み、少なくとも1つの改変された配列は哺乳動物細胞のゲノムに存在する。

【0098】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物またはその一部を、哺乳動物細胞のゲノムにランダムな挿入部位で挿入する。いくつかの実施形態では、ランダムな挿入部位は、ゲノム位置の所定のサブセット内でランダムである。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物またはその一部を、哺乳動物細胞のゲノムに所定の挿入部位で挿入する。

10

【0099】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列を含み、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、(i) 少なくとも1つの組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクター、(ii) 少なくとも1つのリコンビナーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物、(iii) 少なくとも1つのヌクレアーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物、(iv) 少なくとも1つのトランスポザゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物、及び／または(v) 少なくとも1つの改変された配列を含む。

20

【0100】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクターを含む少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の第1のセットに隣接するシス作用性組み込み配列の少なくとも1つのペアを含み、シス作用性組み込み配列は、ウイルス反復配列の第2のセットを含む。いくつかの実施形態では、組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、スプマレトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはその誘導体である。いくつかの実施形態では、組み込み構築物または組み込みウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の第1のセット（例えば、ウイルスベクター標的に配列をパッケージングするための）及びウイルス反復配列の第2のセットを含むシス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列の第2のセットを含むシス作用性組み込み配列は、LTRであるか、またはそれを含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ヌクレアーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物を含む少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列を含む。

40

【0103】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、少なくとも1つのヌクレアーゼを含み、少なくとも1つのヌクレアーゼは、RNAガイドヌクレアーゼまたはその融合体もしくは誘導体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、少なくとも1つのヌクレアーゼを含み、少なくとも1つのヌクレアーゼは、非RNAガイドヌクレアーゼまたはその融合体もしくは誘導体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのヌクレアーゼには、Cas9、CasZ、Cpf1、プログラム可能なDNA結合ドメインとの改変FokIヌクレアーゼドメイン融合体、例えば、TALEタンパク質(TALEN)またはジンクフィンガータンパク

50

質（ZFN）、及び／またはメガヌクレアーゼ、またはその誘導体が含まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのヌクレアーゼはCas9を含む。

【0104】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、少なくとも1つの改変された配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、RNAガイドヌクレアーゼまたはその融合体もしくは誘導体を含み、少なくとも1つのgRNAも含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の第1のセットに隣接するシス作用性組み込み配列の少なくとも1つのペアを含み、シス作用性組み込み配列は、相同性アーム配列を含む。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、リコンビナーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の第1のセットに隣接するシス作用性組み込み配列の少なくとも1つのペアを含み、シス作用性組み込み配列は、リコンビナーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Cre、Flp、Dre、PhiC31、及び／またはBxb1、またはその誘導体を含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Creを含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、LoxP部位を含む。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Bxb1を含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、Att部位を含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Flpを含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼ認識部位は、Frt部位を含む。

【0110】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、トランスポザーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の第1のセットに隣接するシス作用性組み込み配列の少なくとも1つのペアを含み、シス作用性組み込み配列は、トランスポザーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、トランスポザーゼには、Piggybackトランスポザーゼ、Sleepingbeautyトランスポザーゼ、及び／またはTn5トランスポザーゼ、またはそれらの誘導体が含まれる。いくつかの特定の実施形態では、トランスポザーゼには、Piggybackトランスポザーゼまたはその誘導体が含まれる。いくつかの特定の実施形態では、トランスポザーゼには、Sleepingbeautyトランスポザーゼまたはその誘導体が含まれる。いくつかの特定の実施形態では、トランスポザーゼには、Tn5トランスポザーゼまたはその誘導体が含まれる。

30

【0111】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、改変されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、細胞へ核酸を移入する方法が変更されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、治療的に改変されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、意図する用途において改変されたウイルスベクターを産生する。

40

【0112】

50

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、用途において機能性が低いウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、用途において非機能的なウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、細胞への核酸の導入において機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、治療的に機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、それらの意図する用途において機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、用途において、より機能的及び／または増強されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、細胞への核酸の導入において、より機能的及び／または増強されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、治療的により機能的及び／または増強されたウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照集団と比較して、それらの意図する用途において、より機能的及び／または増強されたウイルスベクターを産生する。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でウイルスベクター産生を変更する少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でウイルスベクター産生を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター産生が改変された哺乳動物細胞は、参照細胞と比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、またはそれ以上の摂動を含む。

30

【0115】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）下でウイルスベクター産生を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）は、優良医薬品製造基準（GMP）下でウイルスベクター産生を増加させる。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、非優良医薬品製造基準（非GMP）下でウイルスベクター産生を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照細胞集団と比較して、哺乳動物細胞集団の生存率を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照細胞集団と比較して、哺乳動物細胞集団によるウイルスベクター産生の持続時間を増加させる少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、参照細胞集団と比較して、哺乳動物細胞集団のゲノム安定性を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、医

50

薬品製造基準下で産生され、参照細胞集団と比較して、用途において機能性が低いウイルスベクターの割合を減少させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、医薬品製造基準下で産生され、参照細胞集団と比較して、用途において非機能的なウイルスベクターの割合を減少させる少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、割合が減少したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、細胞への核酸の移入において機能性が低い、及び／または非機能的である。いくつかの実施形態では、割合が減少したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、治療的に機能性が低い、及び／または非機能的である。いくつかの実施形態では、割合が減少したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途において機能性が低い、及び／または非機能的である。

10

【0118】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、医薬品製造基準下で産生され、参照細胞集団と比較して、用途においてより機能的及び／または増強されたウイルスベクターの割合を増加させる少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、割合が増加したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、細胞への核酸の移入においてより機能的及び／または増強されている。いくつかの実施形態では、割合が増加したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、治療的により機能的及び／または増強されている。いくつかの実施形態では、割合が増加したウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途においてより機能的及び／または増強されている。

20

【0119】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）は、参照細胞集団と比較して、意図する用途のためのすべて及び／または必須の核酸配列及び／または他のエレメントを含む医薬品製造基準の下で、ウイルスベクターの割合を増加させる。

【0120】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された配列（例えば、摂動）は、参照細胞集団と比較して、意図する用途のためのすべて及び／または必須の核酸配列及び／または他のエレメントを欠失及び／または変異導入されている医薬品製造基準の下で、ウイルスベクターの割合を減少させる。

30

【0121】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団及び／またはウイルスベクターは、複数の改変された配列を含み、複数の改変された配列は、複数の摂動を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、参照細胞集団は、（a）少なくとも1つの改変された配列を含まない同等の哺乳動物細胞集団、及び／または（b）ウイルスベクターを産生することができる標準細胞集団である。

【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、参照細胞集団と比較して医薬品製造基準下でウイルスベクター産生を変化させる改変された配列（例えば、摂動）を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、機能性（例えば、治療機能、核酸を細胞に移入する能力）、ゲノム安定性、哺乳動物細胞による製造収量、哺乳動物細胞による産生期間、すべての必須核酸配列を含むウイルスベクター産生割合、及び／またはウイルスベクター産生、ウイルスベクター活性及び／またはウイルスベクター用途に関連する別の特徴を変化させる摂動を含む。

40

【0124】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団を、（a）複数のライブラリ構築物を含む複数の改変された配列を複数の哺乳動物細胞に導入し（個々のライブラリ構築物は、2つ

50

のウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含む)、
(b) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを複数の哺乳動物細胞に導入することによって産生する。

【0125】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団を、複数のライブラリ構築物を含む複数の改変された配列を複数の哺乳動物細胞に導入することによって産生し、個々のライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含み、複数の哺乳動物細胞は、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞がウイルスベクターを産生するような条件下で本開示の哺乳動物細胞集団を培養することを含むウイルスベクターの産生方法を提供し、産生される各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つの識別子に由来する少なくとも1つの識別子を含む。いくつかの実施形態では、産生した各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つの識別子と同一である少なくとも1つの識別子を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、(a) 哺乳動物細胞のライブラリからウイルスベクターを産生し(哺乳動物細胞のライブラリは、複数の哺乳動物細胞を含み、複数の哺乳動物細胞の各々は、個別に、(i) 少なくとも1つの改変された配列、(ii) 識別子、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の識別子に由来する識別子を含む)、(b) ウイルスベクター中の識別子を検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の識別子と同一である識別子を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、(a) 哺乳動物細胞のライブラリからウイルスベクターを産生し(哺乳動物細胞のライブラリは、複数の哺乳動物細胞を含み、複数の哺乳動物細胞の各々は、個別に、(i) 少なくとも1つの改変された配列、(ii) 少なくとも1つの識別子、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つの識別子に由来する少なくとも1つの識別子を含む)、(b) 次世代シーケンシングによってウイルスベクター中の1つ以上の識別子を検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、各ウイルスベクターは、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つの識別子と同一である少なくとも1つの識別子を含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、(a) AAVライブラリを作製し(AAVライブラリは、哺乳動物細胞のライブラリに由来する複数のAAVベクターを含み、哺乳動物細胞のライブラリは、複数の哺乳動物細胞を含み、複数の哺乳動物細胞の各々は、個別に、(i) 少なくとも1つの改変された配列、(ii) 少なくとも1つのバーコード配列、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、各AAVウイルスベクターは、少なくとも1つの構築物を含み、少なくとも1つの構築物は、AAVウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つのバーコード配列に由来するバーコード配列を含む)、(b) AAVライブラリ内の1つ以上のバーコード配列を検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、各AAVウイルスベクターは、少なくとも1つの構築物を含み、少なくとも1つの構築物は、AAVウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む。

【0130】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、(a) AAVライブラリを作製し(AAVライブラリは、哺乳動物細胞のライブラリに由来する複数の構築物を含み、哺乳動物細胞のライブラリは、複数の哺乳動物細胞を含み、複数の哺乳動物細胞の各々は、個別に、(i)少なくとも1つの改変された配列、(ii)少なくとも1つのバーコード配列、及び(iii)ウイルススペクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、各AAVウイルススペクターは、少なくとも1つの構築物を含み、少なくとも1つの構築物は、AAVウイルススペクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つのバーコード配列に由来するバーコード配列を含む)、(b)次世代シーケンシングによってAAVライブラリ内の1つ以上のバーコード配列を検出することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、各AAVウイルススペクターは、少なくとも1つの構築物を含み、少なくとも1つの構築物は、AAVウイルススペクターを産生した哺乳動物細胞の少なくとも1つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、哺乳動物細胞のライブラリの各個々の細胞内で、少なくとも1つまたはすべての核酸配列またはその誘導体の単一細胞シーケンシングのステップをさらに含み、少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法の中に単一細胞同一性配列を含み、少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体は、少なくとも1つのライブラリ構築物を含む。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、提供する本開示の方法は、哺乳動物細胞のライブラリの各個々の細胞内で、少なくとも1つまたはすべての核酸配列またはその誘導体の単一細胞シーケンシングをさらに含み、少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体は、単一細胞シーケンシング法の中に単一細胞同一性配列を含み、少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体は、少なくとも1つの識別子を含む少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、提供する本開示の方法は、哺乳動物細胞への第2のライブラリ構築物の導入をさらに含み、哺乳動物細胞は、第1のライブラリ構築物に由来する少なくとも1つの摂動を含み、第2のライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含む少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の複数のライブラリ構築物を複数の哺乳動物細胞に導入し、複数の哺乳動物細胞は、第1の複数のライブラリ構築物に由来する少なくとも1つの摂動を含み、第2の複数のライブラリ構築物は、複数の改変された配列を含み、第2の複数のライブラリ構築物中の個々のライブラリ構築物はそれぞれ、2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、単一細胞シーケンシング及び／または次世代シーケンシングによる、1つ以上の識別子及び／または1つ以上の改変された配列の検出をさらに含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、2ラウンドを上回るライブラリ構築物の導入ならびに1つ以上の識別子及び／または1つ以上の改変された配列の検出を含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、機械学習アプローチを使用して、標的の摂動の望ましい組み合わせを特定するための機械学習モデルを開発することをさらに含む。

30

40

【0133】

いくつかの実施形態では、提供する本開示の方法は、哺乳動物細胞の少なくとも1つの識別子を除去するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞及び／またはライブラリ構築物がレポーター及び／または選択マーカーを含む場合、提供する方法は、レポーター及び／または選択マーカーを除去するステップを含み得る。

【0134】

説明を通して、系または組成物が、特定の成分を有する、含む、もしくは備えると記載される場合、または、方法が特定のステップを有する、含む、もしくは備えると記載される場合、それらに加えて、記載される成分から基本的になるか、もしくはそれらからなる本発明の系もしくは組成物が存在すること、ならびに、記載されるステップから基本的に

50

なるか、もしくはそれらからなる本発明による方法が存在することが企図される。

【0135】

ステップの順序または特定の行為を行う順序は、本発明が動作可能である限りは、重要でないことを理解されたい。さらに、2つ以上のステップまたは行為を、同時に行ってもよい。

【0136】

以下の説明は、本開示の説明及び例示のみを目的としており、本発明を記載された具体的な実施形態に限定することを意図するものではない。

【0137】

以下の図からなる、本明細書に含まれる図面は、単に例示目的であり、限定するためではない。

10

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】ライブラリ中の哺乳動物細胞のウイルスベクター産生を同定または特徴決定するための技術プラットフォームの概略図を示し、ウイルスベクターには、それらを発現する哺乳動物細胞に関連する識別子が組み入れられる。

【図2-1】識別子を含むAAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを生成するための例示的なスキームを示し、レンチウイルスを、哺乳動物細胞ゲノムへのライブラリ構築物の単一コピーまたは低コピー組み込みに使用する。

【図2-2】識別子を含むAAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを生成するための例示的なスキームを示し、レンチウイルスを、哺乳動物細胞ゲノムへのライブラリ構築物の単一コピーまたは低コピー組み込みに使用する。

20

【図3-1】ウイルスベクターのプール中の識別子の相対的濃縮を決定すること、及び哺乳動物細胞中の改変された配列を同定するために単一細胞シーケンシング法を使用することによって、ライブラリ中の哺乳動物細胞のウイルスベクター産生を同定し、及び／または特徴決定するための例示的なスキームを示す。

【図3-2】ウイルスベクターのプール中の識別子の相対的濃縮を決定すること、及び哺乳動物細胞中の改変された配列を同定するために単一細胞シーケンシング法を使用することによって、ライブラリ中の哺乳動物細胞のウイルスベクター産生を同定し、及び／または特徴決定するための例示的なスキームを示す。

30

【図4】識別子を含む構築物のAAV-in-Lentiライブラリを使用して、AAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを生成するための例示的なスキームを示す。

【図5】AAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリの生成方法で使用するための例示的なライブラリ構築物の概略図を示す。pSFX-LV-AAVは、例示的なAAV-in-Lentiライブラリ構築物であり、pSFX-PB-AAVは、例示的なAAVイントランスポザーゼライブラリ構築物であり、pSFX-AAVは、エピソーム発現用の例示的なAAV構築物である。

【図6】ウイルスベクター核酸、例えば、ウイルスベクター（例えば、AAVウイルスベクター）または細胞ゲノムDNA由来の識別子（例えば、バーコード）配列の配列決定の例示的な概略図を示す。

40

【図7】23個のgRNAライブラリバリエーションについてAAV-in-Lenti構築物を使用して生成された例示的な限定された哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞（ライブラリバリエーションを欠損する）の存在量に対する相対値である。プロット内の各ドットは、ライブラリ内の単一のgRNAライブラリバリエーションのスコアを表し、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図8】およそ12,000個のgRNAライブラリバリエーションのAAV-in-Lenti構築物を使用して生成した例示的な哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールに由来するバーコード識別子の相対的存在量の2つのプロットを示

50

す。(A)は、Cas9を構成的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示し、(B)は、Cas9を誘導的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞(ライブラリバリエーションを欠損する)の存在量に対する相対値である。各ドットは、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表し(4つの対応するsgRNAスコアから計算した)、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図9】識別子を含む構築物のAAV-イントランスポザースライブラリを使用して、AAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを生成するための例示的なスキームを示す。

【図10】23個のgRNAライブラリバリエーションのAAV-イントランスポザース構築物を使用して生成した例示的な哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールに由来するバーコード識別子の相対的存在量の2つのプロットを示す。(A)は、Cas9を構成的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示し、(B)は、Cas9を誘導的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞(ライブラリバリエーションを欠損する)の存在量に対する相対値である。プロット内の各ドットは、ライブラリ内の単一のgRNAライブラリバリエーションのスコアを表し、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図11】およそ12,000個のgRNAライブラリバリエーションのAAV-イントランスポザース構築物を使用して生成した例示的な哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールに由来するバーコード識別子の相対的存在量の2つのプロットを示す。(A)は、Cas9を構成的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示し、(B)は、Cas9を誘導的に発現する哺乳動物細胞のライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞(ライブラリバリエーションを欠損する)の存在量に対する相対値である。各ドットは、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表す(4つの対応するsgRNAスコアから計算した)、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図12】識別子を含む構築物のエピソームライブラリを使用して、AAVウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを生成するための例示的なスキームを示す。

【図13】23個のgRNAライブラリバリエーションについてエピソームAAVライブラリ構築物を使用して生成された例示的な限定された哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールにおけるバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞(ライブラリバリエーションを欠損する)の存在量に対する相対値である。プロット内の各ドットは、ライブラリ内の単一のgRNAライブラリバリエーションのスコアを表し、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図14】およそ12,000個のgRNAライブラリバリエーションのエピソームAAVライブラリ構築物を使用して生成した例示的な哺乳動物細胞ライブラリによって産生されたウイルスベクターのプールに由来するバーコード識別子の相対的存在量のプロットを示す。バーコードの存在量は、野生型細胞(ライブラリバリエーションを欠損する)の存在量に対する相対値である。各ドットは、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表し(4つの対応するsgRNAスコアから計算した)、結果は、3つの生物学的反復の平均である。

【図15】本明細書に記載の例示的な方法によって同定されたライブラリバリエーションを含むように改変された哺乳動物細胞(HEK293T)のウイルスベクター、特にAAVの産生能力のプロットを示す。Y軸はAAV力価を μ Lあたりのコピー数で示し、x軸は様々な改変された細胞を示す。x軸の左から右に向かって、最初がRep/Capを欠損する野生型哺乳動物細胞の試料(陰性対照)、続いて野生型哺乳動物細胞、次いで本明細書

10

20

30

40

50

に記載のスクリーニングから同定された単一の遺伝子、すなわち遺伝子1～14においてそれぞれ改変されている14種の異なる哺乳動物細胞である。AAVの力価は、いくつかの遺伝子について野生型細胞と比較して向上しており、遺伝子13及び遺伝子14ではおよそ10倍の増加が観察された。

【発明を実施するための形態】

【0139】

特定の定義

本発明がより容易に理解されるように、特定の用語を以下に最初に定義する。以下の用語及び他の用語の追加の定義は、本明細書全体に記載される。本発明のバックグラウンドを説明し、その実践に関するさらなる詳細を提供するために、本明細書で参照される刊行物及び他の参考資料は、参照により本明細書に援用される。

10

【0140】

本出願では、特に文脈から明らかでない限り、(i)用語「a」及び「an」は、本明細書では、刊行物の1つ～複数（すなわち、少なくとも1つ）の目的語を指すために使用され、(ii)用語「または」は「及び／または」を意味すると解されてもよく、(iii)用語「備えている」及び「含んでいる」は、項目分けした構成要素またはステップが、それら自体で提示されるか、1つ以上の追加の構成要素またはステップと共に提示されるかにかかわらず、それらを包含すると解されてもよく、(iv)範囲が指定されている場合は両端点も含まれる。

20

【0141】

本明細書を通して、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが一連の文字（例えば、ポリヌクレオチドの場合、それぞれアデノシン、シチジン、グアノシン、及びチミジンを表すA、C、G、及びT）によって表される場合は常に、そのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、左から右に向かって、5'から3'へ、またはN末端からC末端への順序で示す。

【0142】

約またはおよそ：本明細書で使用する場合、用語「約」または「およそ」は、言及された参照値と同様の値を含む、1つ以上の関心対象の値に適用され得る。一般に、文脈に精通している当業者は、その文脈において「約」または「およそ」に包含される妥当な差異の度合いを理解するであろう。いくつかの実施形態では、用語「約」または「およそ」とは、別段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、言及された参照値の±20%内（より大きいまたはより小さい）に収まる値の範囲を指す。例えば、いくつかの実施形態では、用語「約」または「およそ」とは、参照値の20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下の範囲内にある値の範囲を包含し得る。

30

【0143】

アミノ酸：本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」とは、例えば1つ以上のペプチド結合の形成によってポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び／または物質を意味する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造、例えば、 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は非天然アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はD-アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はL-アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然のペプチドに一般に見出される20種類の標準的なL-アミノ酸のうちのいずれかを指す。「非標準アミノ酸」とは、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指し、それが合成的に調製されるか天然源から得られるかを問わない。文脈から明らかになるように、いくつかの実施形態では、用語「アミノ酸」とは、遊離アミノ酸を指すように使用される場合があり、いくつかの実施形態では、この用語は、ポリペプチドのアミノ酸残基を指すように使用される場合がある。

40

【0144】

50

関連している：本明細書で使用する場合、語句「関連している (associated with)」は、一方の存在、レベル、及び／または形態が他方のそれと関係、接続、または相関している場合の2つの事象または実体を表す。例えば、第1の実体（例えば、識別子）の存在及び／またはレベルが第2の実体（例えば、改変された配列）の存在及び／またはレベル（例えば、哺乳動物細胞における、例えば、細胞分裂及び／または遺伝子操作による）と関係しているか相関している場合、第1の実体は第2の実体に関連していると考えられる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は、それらが同じ細胞、ゲノム、染色体、または遺伝子領域に存在する場合、互いに物理的に「関連している」（例えば、複数世代の哺乳動物細胞分裂を通じて一緒に受け継がれるように）。いくつかの実施形態では、特定の实体（例えば、識別子及び／または改変された配列）は、その存在、レベル及び／または形態が、例えば、特定の表現型（例えば、ウイルスベクターの細胞内産生）の変化したレベルまたは浸透度と相関している場合（例えば、実体がウイルスベクター産生の増加を示す細胞）、その表現型と関連していると考えられる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は物理的に互いに関連し、直接的または間接的に相互作用し、その結果、互いに物理的に近接し、及び／または近接状態を保持する。いくつかの実施形態では、互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、互いに共有結合性に連結している。いくつかの実施形態では、互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、互いに共有結合性に連結していないが、例えば、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁気、及びそれらの組み合わせによって、非共有結合性に関連している。

10

20

30

40

【0145】

バーコード：本明細書で使用する場合、用語「バーコード」とは、実体の大規模な異種母集団中で、実体（例えば、分子、核酸、ウイルス、細胞など）または実体の組み合わせを実質的に区別することができる任意の分子的特徴（例えば、核酸配列）を指す。いくつかの実施形態では、バーコードは、改変された配列の一種である。いくつかの実施形態では、バーコードは、改変された核酸配列の一種である。いくつかの実施形態では、バーコードは、ライブラリ構築物の一部である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数のバーコードを含み得る。ライブラリ構築物が1つ以上のバーコードを含む場合、1つ以上のバーコードは、(i) 識別子内、(ii) 識別子の外側、または(iii) 識別子の内外の両方に含まれ得る。いくつかの実施形態では、検出時（例えば、次世代シーケンシング法による）に、1つ以上のバーコードは、直接検出されない（例えば、次世代シーケンシング法によって）1つ以上のライブラリバリエーションの同一性を示す。いくつかの実施形態では、バーコードは、既知の核酸配列のプール内に由来する核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、バーコードは外来性核酸配列である。いくつかの実施形態では、バーコードは内在性核酸配列である。いくつかの実施形態では、バーコードは、外来性配列と内在性配列の両方を含み得る。一般に、バーコードは、3ヌクレオチド～50ヌクレオチドの範囲内の長さを有する配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、バーコードは、下限及び上限によって境界付けられる範囲内の長さを有する配列を含み、上限は下限よりも大きい。いくつかの実施形態では、下限は、約5ヌクレオチド、約6ヌクレオチド、約7ヌクレオチド、約8ヌクレオチド、約9ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約11ヌクレオチド、約12ヌクレオチド、約13ヌクレオチド、約14ヌクレオチド、または約15ヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、上限は、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約45ヌクレオチド、または約50ヌクレオチドであってもよい。いくつかの特定の実施形態では、バーコードは、5ヌクレオチド～25ヌクレオチドの範囲内の長さを有する配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、バーコードは、約5ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、または約25ヌクレオチドの長さを有する配列を含む。

【0146】

生物製剤：本明細書で使用する場合、用語「生物製剤」とは、その最も広い意味で、生物によって作られたか、またはそれに由来する（例えば、生物系で製造された）物品を指

50

す。本開示による生物製剤には、タンパク質、ポリペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、ウイルス、ウイルスベクター、治療用血清、毒素、抗毒素、ワクチン、アレルギー抽出物、血液成分または誘導体、遺伝子治療製品、ヒト組織または細胞製品が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、生物製剤は、重篤または生命を脅かす疾患または病状を治療、治療、軽減、予防、または診断するために使用され得るポリペプチドベースの分子であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、生物製剤は治療用生物製剤である。治療用生物製剤は、疾患または病態の予防、治療、または治療に適用し得る治療用生物製剤である（例えば、哺乳動物、例えば、ヒトにおいて）。いくつかの実施形態では、生物製剤は診断用生物製剤である。いくつかの実施形態では、生物製剤を、製造において（例えば、遺伝子治療製品または細胞治療製品の製造において）使用する。いくつかの特定の実施形態では、生物製剤はウイルスベクターである。

10

【0147】

細胞同一性配列：本明細書で使用する場合、単一細胞シーケンシング法の一部として特定の哺乳動物細胞から配列決定するすべての核酸を標識するための核酸配列を指す。本開示は、細胞同一性配列を使用する単一細胞シーケンシングが、ライブラリ構築物が複数の不連続核酸配列を含む方法に有用であるという認識を包含する。そのような方法では、所与の細胞同一性配列は、同じ細胞に存在したすべての識別子及び／またはライブラリバリエーションの関連付けを提供することができる。不連続ライブラリ構築物及び単一細胞シーケンシングを用いる方法の例示的な概略図を図3に示す。しかしながら、本開示はまた、細胞同一性配列を使用する単一細胞シーケンシングが、いくつかの実施形態ではライブラリ構築物が単一の連続核酸配列を含む方法にも有用であり得るという認識を包含する。本開示はまた、単一細胞シーケンシング法中の発現RNAの逆転写中に単一細胞同一性配列が特異的に付加されるという認識を包含する。逆転写ステップ中に適切なプライマーを使用して、すべての転写産物が細胞同一性配列でタグ付けされた単一細胞となるように、単一細胞シーケンシング用の構築物または核酸が、発現したRNAに含まれるべきであることが理解される。

20

【0148】

シス作用性組み込み配列：本明細書で使用する場合、ライブラリ構築物に関する語句「シス作用性組み込み配列」とは、1つ以上のトランス作用性組み込み配列及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物による細胞ゲノム（例えば、哺乳動物細胞）への組み込みを促進するライブラリ構築物自体に存在する核酸配列（複数可）を指す。いくつかの実施形態では、シス作用性組み込み配列はライブラリ構築物に含まれ、細胞ゲノムに組み込まれるライブラリ構築物の一部に隣接する。いくつかの実施形態では、シス作用性組み込み配列は、相同性アーム、認識部位、及び／またはウイルス反復配列を含む。

30

【0149】

同等の：本明細書で使用する場合、用語「同等の」とは、互いに同一でなくてもよいが、観察される差または類似性に基づいて結論が合理的に導かれ得ることを当業者が理解する、それらの間の比較を可能にするほど十分に類似する、2つ以上の薬剤のセット、実体、状況、条件のセット、対象、集団などを指す。いくつかの実施形態では、同等の薬剤のセット、実体、状況、条件のセット、対象、集団などは、複数の実質的に同一の特徴と、1つまたは少数の異なる特徴によって特徴付けられる。当業者は、文脈における任意の所与の状況で、2つ以上のそのような薬剤、実体、状況、条件のセット、対象、集団などが同等とみなされるために、どの程度の同一性が必要とされるかを理解するであろう。例えば、当業者は、薬剤のセット、実体、状況、条件のセット、対象、集団などは、異なる環境、刺激、薬剤、実体、状況、条件のセット、対象、集団などの下で、またはそれらを用いて得られた結果または観察された現象の差が、様々なそれらの特徴の差異により引き起こされるか、または様々なそれらの特徴の差異の存在を示すという合理的な結論を保証するための十分な数及び種類の実質的に同一の特徴を特徴とする場合に、互いに比較可能であることを理解するであろう。

40

50

【0150】

相補的：本明細書で使用する場合、用語「相補的」とは、標準的なワトソン・クリック相補規則（アデニン「A」がチミン「T」と塩基対を形成し、グアニン「G」がシトシン「C」と塩基対を形成する）に従って塩基対を形成するヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を指す。「100%相補的」または「100%の相補性」を示すヌクレオチド配列は、2つのヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つの全体にわたって互いに塩基対形成するヌクレオチド配列である。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドよりも長い鋳型ポリヌクレオチドに対して「100%相補的」であり得る（すなわち、オリゴヌクレオチドの全配列が鋳型ポリヌクレオチドの一部と塩基対形成する場合、オリゴヌクレオチドは鋳型ポリヌクレオチドに対して「100%相補的」である）。しかしながら、「相補的」な核酸配列は、100%相補的である必要はない。一般に、2つ以上の核酸配列に関する用語「相補的」とは、増幅方法、例えば、PCRまたはLCRのアニーリング段階中に使用されるストリンジェントな条件及び／または温度でハイブリダイズするように、2つの核酸配列にわたって十分な相補性があることを指す。

10

【0151】

構築物：本明細書で使用する場合、用語「構築物」とは、少なくとも1つのポリヌクレオチドを保有することができる実体を指す。いくつかの実施形態では、構築物は、プラスミド、トランスポゾン、コスミド、または人工染色体（例えば、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来の人工染色体（PAC））であり得る。いくつかの実施形態では、構築物は、細胞へのポリヌクレオチドの移入を促進する。特定の構築物は、それらが導入される宿主細胞内で自己複製することができる（例えば、複製起点を有するプラスミド）。他の構築物を宿主細胞のゲノム内に導入することができ、それによって、宿主ゲノムと共に複製させることができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの1つ以上のエレメントをコードする構築物を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞内での発現のためのウイルスベクターの1つ以上のエレメントをコードするプラスミドを提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの1つ以上のエレメントをコードする構築物を提供する。いくつかの実施形態では、構築物はウイルスベクターである。

20

【0152】

対照：本明細書で使用する場合、用語「対照」とは、結果を比較する標準であるという当技術分野で公知の「対照」の意味を指す。一般的には、対照は、そのような変数についての結論を出すために変数を分離することによって実験における完全性を増強するために使用される。いくつかの実施形態では、対照は、比較器を提供するための試験反応またはアッセイと同時に実施する反応またはアッセイである。例えば、1つの実験では、「試験」（すなわち、試験する変数）を適用する。第2の実験において、「対照」、すなわち試験する変数を適用しない。いくつかの実施形態では、対照は、既存対照（例えば、既に実施された試験もしくはアッセイ、または既に知られている量もしくは結果の）である。いくつかの実施形態では、対照は、印刷または別の方法で保存された記録であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、対照は陽性対照である。いくつかの実施形態では、対照は陰性対照である。

30

40

【0153】

対応する：ポリペプチド及び核酸に関して本明細書で使用する場合、用語「対応する」は、適切な参照ポリペプチドまたは核酸配列との比較を通じて、それぞれアミノ酸残基またはヌクレオチド残基の位置／同一性を指定する。例えば、いくつかの実施形態では、ポリマー中の単量体残基（例えば、ポリペプチド中のアミノ酸残基またはポリヌクレオチド中の核酸残基）は、適切な参照ポリマー中の残基に「対応する」として同定され得る。例えば、簡略化のために、多くの場合、ポリペプチド中の残基を参照関連ポリペプチドに基づく正規の番号付けシステムを使用して指定し、その結果、アミノ酸が190位の残基に「対応する」（例えば、実際には特定のアミノ酸鎖の190番目のアミノ酸である必要はなく、参照ポリペプチドの190位に認められる残基に対応する）ようになることを当業

50

者は理解するであろう。当業者であれば、「対応する」アミノ酸を同定する方法を容易に理解している（例えば、Benson et al., Nucl. Acids Res. (1 January 2013) 41 (D1): D36–D42; Pearson et al., PNAS Vol. 85, pp. 2444–2448, April 1988 を参照のこと）。当業者であれば、本開示と共に、例えば、ポリペプチド及び／または核酸中の「対応する」残基を同定するために利用することができるソフトウェアプログラム（例えば、BLAST、FASTAなど）を含む、様々な配列アラインメント戦略を認識するであろう。

【0154】

内在性：本明細書で使用する場合、用語「内在性」とは、その天然の状況で存在するあらゆるものを指す。核酸に関して、「内在性」とは、例えば、細胞内に由来する核酸またはその配列を指し得る。例えば、内在性核酸配列は、人の手による操作を伴わずに哺乳動物細胞のゲノムに天然に存在するであろう配列である（例えば、その天然の位置、天然の発現エレメント（複数可）の制御下で）。

【0155】

改変された：本明細書で使用する場合、用語「改変された」とは、人の手によって操作された状態を指す。核酸に関して、改変は、核酸に対して行うことができる任意の種類の修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、配列が人の手によって操作されて、例えば、欠失、挿入、置換、変換、再編成、及び／または第2の配列への融合を含む、天然環境において見出されない配列が生成された場合、ポリヌクレオチドは、「改変された」とみなされ得る。例えば、改変されたポリヌクレオチドは、2つ以上の配列を含む場合があり、それらは天然においてはその順序で一緒に連結されていないが、改変されたポリヌクレオチドにおいてはそれらが互いに直接連結されるように人の手によって操作されている。同様に、細胞または生物は、その遺伝情報を変更するように操作されている（例えば、以前には存在しなかった新規遺伝物質が、例えば、形質転換、交配、体細胞ハイブリダイゼーション、トランスフェクション、形質導入、もしくは他のメカニズムによって導入されているか、または以前に存在した遺伝物質が、例えば、置換もしくは欠失変異、または交配プロトコルによって変更または除去される）場合、「改変された」とみなされる。いくつかの実施形態では、改変された細胞（例えば、改変された哺乳動物細胞）とは、操作に供されたことによって、その遺伝的、後成的、及び／または表現型の同一性が、適切な参照細胞、例えばそのように操作されていないことを除けば同一の細胞と比べて変化している細胞を指す。いくつかの実施形態では、操作は、遺伝子操作であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された細胞とは、そのような適切な参照細胞と比べて変化した量で、及び／または変化したタイミングに従って、特定の目的の作用因子（例えば、タンパク質、核酸、及び／またはその特定の形態）を含み、及び／または発現するように操作されている細胞である。一般的な慣行であり、当業者であれば理解するように、改変されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫は、実際の操作が以前の実体に対して行われたとしても、一般的に依然として「改変された」と称される。

【0156】

改変された配列：本明細書で使用する場合、語句「改変された配列」とは、人の手によって操作されている（例えば、ヌクレオチドの）配列を指す。いくつかの実施形態では、改変された配列は、改変された核酸配列である。いくつかの実施形態では、改変された核酸配列は、5'から3'方向及び／または3'から5'方向に読み取られる配列を含み得る。改変された核酸配列は、核酸に対して行うことができる任意の種類の修飾（例えば、導入、置換、欠失、変換、再編成、後成的修飾など）を含み得る。いくつかの実施形態では、改変された配列は、哺乳動物細胞のゲノム配列の遺伝子改変であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、哺乳動物細胞のゲノムDNAのエピジェネティック修飾であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、エピソーム配列であるか、またはそれを含む（例えば、細胞内でエピソームとして存在する配列の導入または改変）。いくつかの実施形態では、改変された配列は、1つ以上

のエピジェネティックな特徴を有するエピソーム配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、識別子であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、摂動であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、ライブラリバリエーションであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、ペイロードであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、摂動アクセサリ配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、シス作用性組み込み配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、ライブラリ構築物であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、改変された配列は、バーコードであるか、またはそれを含む。

10

【0157】

エピソーム：本明細書で使用する場合、用語「エピソーム」とは、自律的に複製し得る染色体外の遺伝物質を指す。いくつかの実施形態では、エピソームとしての遺伝物質（例えば、DNA）は、プラスミド、コスミド、フォスミド、人工染色体（例えば、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC））、またはウイルスベクター上にあり得る。

20

【0158】

外来性：本明細書で使用する場合、用語「外来性」とは、生物または細胞に導入される、または導入されている任意の実体を指す。例えば、「外来性核酸」は、生物または細胞の外部に由来する核酸である。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞内の外来性核酸は、細胞膜を通して（例えば、人の手によって）導入されている。いくつかの実施形態では、外来性核酸は、非天然の状況で（例えば、異なる位置で、及び／または非天然発現エレメント（複数可）の制御下で）天然ゲノムに存在するヌクレオチド配列であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、外来性核酸は、生物または細胞（例えば、異なる生物由来の）のゲノムに以前には存在しなかったヌクレオチド配列であるか、またはそれを含み得る。外来性核酸には、外来性遺伝子が含まれる。「外来性遺伝子」は、RNA及び／またはタンパク質の発現をコードする、生物または細胞に（例えば、形質転換／トランスフェクションによって）導入されている核酸またはその配列であり、本明細書では「導入遺伝子」とも呼ばれる。

30

【0159】

染色体外：本明細書で使用する場合、用語「染色体外」とは、染色体に含まれていない遺伝物質を指す。哺乳動物細胞に関して、染色体には核染色体とミトコンドリア染色体が含まれる。染色体外遺伝物質には、エピソーム遺伝物質が含まれる。

【0160】

遺伝子：本明細書で使用する場合、用語「遺伝子」とは、遺伝子産物（例えば、RNA産物、例えば、ポリペプチド産物）をコードする染色体中のDNA配列を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子は、コード配列（すなわち、特定の産物をコードする配列）を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、非コード配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、遺伝子は、コード（例えば、エキソン）及び非コード（例えば、イントロン）配列の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、遺伝子発現の1つ以上の態様（例えば、細胞型特異的発現、誘導性発現など）を、例えば、制御するか、または影響を与え得る1つ以上の調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）及び／またはイントロン配列を含み得る。本明細書で使用する場合、用語「遺伝子」とは、一般に、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸の一部を指し、この用語は、文脈から当業者には明らかであるように、調節配列を任意選択で包含し得る。この定義は、用語「遺伝子」を非タンパク質コード発現ユニットへ適用することを排除することを意図するものではないが、ほとんどの場合、本明細書で使用する用語は、ポリペプチドをコードする核酸を

40

50

指すことを明確にすることを意図している。いくつかの実施形態では、遺伝子は、ポリペプチドをコードし得るが、そのポリペプチドは機能的でない場合があり、例えば、遺伝子バリエーションは、野生型遺伝子と比較して、同じようには、またはまったく機能しないポリペプチドをコードし得る。

【0161】

ゲノム：本明細書で使用する場合、用語「ゲノム」は、個々の生物または細胞の染色体の完全な核酸配列によって表される、その生物または細胞が保有する全遺伝情報を指す。

【0162】

ガイド配列：本明細書で使用する場合、用語「ガイド配列」とは、ヌクレアーゼ媒介編集（例えば、RNAガイドヌクレアーゼによる）のためのガイドRNAの核酸配列に対応する核酸配列を指す。用語「ガイドRNA」及び「gRNA」とは、Cas9またはCpf1などのRNAガイドヌクレアーゼと、細胞内のゲノムまたはエピソーム配列などの標的配列との特異的な会合（すなわち「標的化」）を促進する任意の核酸を指す。gRNAは、単分子（単一のRNA分子を含み、あるいはキメラと呼ばれる）、またはモジュール（多くの場合、例えば二本鎖化によって相互に会合した複数の、通常は2つの別個のRNA分子、例えば、crRNAやtracrRNAを含む）であり得る。ガイドRNAは、単分子であろうとモジュールであろうと、編集が必要な細胞のゲノム内のDNA配列など、標的内の配列に完全または部分的に相補的な「ガイド配列」を含む。ガイド配列は、文献において、限定されないが、「ターゲティングドメイン」、「相補性領域」（例えば、Cotta-RamusinoらによるWO2016/073990）、「スペーサー」（例えば、Brinerらによる、Molecular Cell 56（2），333-339，October 23，2014）、及び一般的に「crRNA」（例えば、Jiang et al. Nat Biotechnol. 2013 Mar；31（3）：233-239）を含む、様々な名称で呼ばれる。それらを与えられた名称に関係なく、ガイド配列は通常、長さが約10～30ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、長さが15～25ヌクレオチドである。特定の実施形態では、ガイド配列は、長さが16～24ヌクレオチド（例えば、長さが16、17、18、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド）である。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、gRNAの5'末端またはその近位にある（例えば、Cas9またはそれから誘導または取得されたヌクレアーゼと共に）。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、gRNAの3'末端またはその近位にある（例えば、Cpf1またはそれから誘導または取得されたヌクレアーゼと共に）。

【0163】

異種：本明細書で使用する場合、用語「異種」とは、それが存在する特定の状況（例えば、細胞または生物）では天然に存在しない任意の実体を指す。核酸に関して、異種とは、天然には一緒に（例えば、同じポリヌクレオチドまたは同じ細胞内に）存在しない配列を指す。いくつかの実施形態では、異種配列は、非内在性（例えば、異なるゲノム位置由来、または異なる生物由来）の状況への配列の再編成、変換、挿入、置換であり得る。例えば、異種プロモーター配列または異種エンハンサー配列は、異なる遺伝子または異なる生物由来の天然に関連する配列であり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞のゲノムに異種配列が存在する。いくつかの実施形態では、異種配列は、哺乳動物細胞においてエピソームとして存在する。

【0164】

相同性：本明細書で使用する場合、用語「相同性」または「相同体」とは、オリゴヌクレオチド分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）及び／またはポリペプチド分子は、それらの配列が少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である場合に互いに「相同」とあると考えられる。いくつかの実施形態では、

オリゴヌクレオチド分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）及び／またはポリペプチド分子は、それらの配列が少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%類似している（例えば、関連する化学的性質を有する残基を対応する位置を含む）場合に互いに「相同」とであると考えられる。例えば、当業者には周知であるように、特定のアミノ酸は、一般的に、互いに類似するものとして、「疎水性」もしくは「親水性」アミノ酸、及び／または「極性」もしくは「非極性」側鎖を有するものに分類される。1つのアミノ酸を同じ種類の別のアミノ酸に置換することは、多くの場合、「相同的」置換とみなされる場合がある。

【0165】

識別子：本明細書で使用する場合、(i)（例えば、次世代シーケンシングによって）検出することができ、(ii) ウイルスベクターが産生され、及び／または由来する哺乳動物細胞またはクローン細胞株を同定することができるエレメントを指す。本開示は、哺乳動物細胞とウイルスベクターとの間で共有及び／または伝達される識別子を提供する。いくつかの実施形態では、識別子は、核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、識別子は、1つ以上のバーコード、1つ以上のライブラリバリエーション、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、例えば、PCR（例えば、定量的PCR）、ハイブリダイゼーション（例えば、プローブを使用）、及び／または配列決定（例えば、次世代シーケンシング及び／またはサンガーシーケンシング）によって検出することができる配列を含む。いくつかの実施形態では、識別子は、哺乳動物細胞とウイルスベクターとの間で共有及び／または伝達される核酸配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、ライブラリ構築物に含まれる（例えば、哺乳動物細胞への導入のために）。いくつかの実施形態では、識別子は、ウイルスベクターへの識別子のパッケージングに適切な遺伝子アーキテクチャ間のライブラリ構築物に含まれる（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAV ITR配列）。いくつかの実施形態では、識別子は、ウイルスベクターのゲノム内（例えば、ウイルス反復配列間）に存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターのゲノム中（例えば、ウイルス反復配列間）の識別子の検出は、ウイルスベクターが産生され、または由来する哺乳動物細胞またはクローン細胞株に関連する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターのゲノム中（例えば、ウイルス反復配列間）の識別子の検出は、ウイルスベクターが産生され、または由来した哺乳動物細胞またはクローン細胞株に関連する1つ以上のライブラリ構築物及び／または1つ以上のライブラリバリエーションの存在に関連する。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターのプールまたは試料中の特定のウイルスベクターの相対存在量を決定するために、識別子を配列決定するステップ（例えば、次世代シーケンシング法を使用して）を含み得る。

【0166】

同一性：本明細書で使用する場合、用語「同一性」とは、ポリマー分子間、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。2つの核酸配列またはポリペプチド配列の同一性の割合の計算は、最適な比較を目的として、2つの配列をアラインすることにより実施することができる（例えば、最適なアラインメントのために、第1及び第2の配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較を目的として非同一配列を無視することができる）。いくつかの実施形態では、比較を目的としてアラインする配列の長さは、参照配列の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%であり、次いで、対応する位置のヌクレオチドを比較する。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置と同一の残基（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）で占められている場合、その2つの分子（すなわち、第1及び第2の）はその位置で同一である。2つの配列間の同一性の割合は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、比較している2つの配列に共通

10

20

30

40

50

する同一の位置の数の関数である。配列の比較及び2つの配列間の同一性の割合の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。例えば、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているMeyers and Miller（CABIOS, 1989, 4:11-17、その全体が参照により援用される）のアルゴリズムを使用して、2つのヌクレオチド配列間の同一性の割合を決定することができる。

【0167】

組み込み構築物または組み込みウイルスベクター：本明細書で使用する場合、ライブラリ構築物などの構築物のゲノム組み込みを促進する構築物を指す。いくつかの実施形態では、組み込み構築物は、エンベロープウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）を含む組み込みウイルスベクターである。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、組み込みウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）に関して哺乳動物細胞に導入して、哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれたライブラリ構築物を有する哺乳動物細胞を生成し、そのような哺乳動物細胞は、識別子を含むウイルスベクターを産生する。

10

【0168】

単離された：本明細書で使用する場合、（1）最初に産生された場合に（天然において及び／または実験環境においてかを問わず）関連していた成分の少なくとも一部から分離している、及び／または（2）人の手によって設計、産生、調製、及び／または製造されている物質及び／または実体を指す。単離された物質及び／または実体は、それらが最初に関連していた他の成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超から分離していてもよい。いくつかの実施形態では、単離された作用物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超純粋である。本明細書で使用する場合、物質が他の成分を実質的に含まない場合、その物質は「純粋」である。いくつかの実施形態では、当業者には理解されるように、物質は、例えば、1つ以上の担体または賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水など）などの、特定の他の成分と合わされている後でも、「単離されている」またはさらには「純粋」であるとみなされ得る。そのような実施形態では、物質の単離率または純度を、そのような担体または賦形剤を含めずに計算する。ほんの一例を挙げると、いくつかの実施形態では、天然に生じるポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生体高分子は、a) その起源または由来源を理由として、自然界においてその天然状態ではそれに付随する成分のうち、一部または全部に関連していない場合、b) 自然界でそれを産生する種と同じ種の他のポリペプチドまたは核酸を実質的に含まない場合、c) 自然界でそれを産生する種のものではない細胞または他の発現系の成分によって発現された場合、または別様にその成分に関連している場合に、「単離された」とみなされる。したがって、例えば、いくつかの実施形態では、化学合成された、または自然界でそれを産生するものとは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドであるとみなされる。あるいは、またはさらに、いくつかの実施形態では、1つ以上の精製技術に供されているポリペプチドは、a) それが自然界に関連している他の成分、及び／またはb) それが最初に生成された時点で関連していた他の成分から分離されている限り、「単離された」ポリペプチドであるとみなされ得る。

20

30

40

【0169】

ライブラリ構築物：本明細書で使用する場合、哺乳動物細胞ライブラリを生成するための1つ以上の核酸構築物を指す。本明細書で使用する場合、ライブラリ構築物は、（i）少なくとも1つの識別子、（ii）ウイルスベクターへの識別子のパッケージングに適した遺伝子アーキテクチャ（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAV ITR配列）、及び（iii）識別子内にまだ含まれていない場合、任意のライブラリバリエーションを含む。ライブラリ構築物はまた、任意のシス作用性組み込み配列（ライブラリ構築物のゲノム組み込みが関連する場合）及び／または任意のバーコードなどであるがこれらに限定され

50

ない、他の改変された配列も含み得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物のすべてのエレメントが、核酸（例えば、DNA）の単一（すなわち、1つ）の連続片に含まれる。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、核酸（例えば、DNA）の複数の別個の不連続片を指す。ライブラリ構築物が複数の核酸を含む場合（すなわち、不連続なライブラリ構築物）、識別子をウイルスベクターにパッケージングするための配列間に配置された識別子を含む少なくとも1つの構築物（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAV ITR配列）を含む。ライブラリ構築物が不連続であるいくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、1つ以上の構築物をさらに含み、個々の構築物はそれぞれ1つ以上のライブラリバリエーションを含む。不連続なライブラリ構築物を使用する提供する方法は、ライブラリ構築物の1つ以上のライブラリバリエーションを同定するステップ（例えば、哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシング）も含む。例えば、図3は、識別子（例えば、ITRが隣接するバーコード）を含む構築物と、ライブラリバリエーション（例えば、3つの別個のユニークなgRNA）を含む3つの追加の構築物とを含む細胞を示す、別個のDNA片を含むライブラリ構築物を用いる方法を示しており、その場合、識別子（例えば、バーコード）はウイルスベクターにパッケージ化され、ライブラリバリエーションとの関連性は単一細胞シーケンシングによって決定される。単一の連続したライブラリ構築物を使用する多くの方法では、単一細胞シーケンシングは必ずしも必要ではないが、状況によっては依然として有用であり得ると考えられる。

10

【0170】

ライブラリバリエーション：本明細書で使用する場合、細胞間で変動する摂動を生じさせるライブラリ構築物のエレメントを指す。例えば、細胞の集団では、各細胞は、ユニークなライブラリバリエーションまたはライブラリバリエーションの組み合わせを含む異なるライブラリ構築物を取得する。例えば、ライブラリバリエーションは、遺伝子、ORF、gRNA配列、非コード核酸、またはそれらの複数及び／または組み合わせを含み得る。本開示に関して、ライブラリバリエーションはバーコードとは別個であるが、1つ以上のライブラリバリエーションを1つ以上のバーコードと関連付けることができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のライブラリバリエーション及び／またはバーコードは、ライブラリ構築物内の識別子の内部または外部に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーション自体ではなく、1つ以上のバーコード自体を直接検出することができる（例えば、次世代シーケンシング法において）。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、本明細書においてエフェクターと呼ばれることがあり、それによって、ライブラリバリエーションは、細胞間で変動する摂動に影響を与えるか、またはもたらす。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーション自体が、細胞間で変動する摂動になり得る。例えば、いくつかの実施形態では、gRNAであるライブラリバリエーションはエフェクターであり、RNAガイドヌクレアーゼ（例えば、摂動アクセサリ配列）と共に、細胞のゲノムDNA内に欠失をもたらす。他の実施形態では、ORFまたは遺伝子配列であるライブラリバリエーションは、細胞へのトランスフェクション時、及びいくつかの場合ではゲノムDNAへの組み込み時（例えば、トランス作用性及びシス作用性組み込み配列によって実行される）、それ自体が細胞の遺伝物質の摂動または修飾になる。

20

30

【0171】

核酸：本明細書で使用する場合、その最も広い意味で、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込むことができる、任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込むことができる化合物及び／または物質である。文脈から明らかなように、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び／またはヌクレオシド）を指し、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであるか、またはそれを含み、いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然核酸残基であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上

40

50

の核酸類似体であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。

【0172】

ペイロード：本明細書で使用する場合、用語「ペイロード」とは、本開示の方法によって產生されるウイルスベクターによる送達に関心のある任意の実体を指す。例えば、そのようなペイロードは、細胞、器官、生物、及び／または生物系（例えば、細胞を含む）に導入されることが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、ペイロード配列は、本開示のウイルスベクターによる送達のための異種核酸配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ペイロード配列は、コード領域、遺伝子調節エレメント、及び転写ターミネーターのうちの1つ以上を含む。遺伝子調節エレメントの非限定的な例として、プロモーター、転写活性化因子、エンハンサー、及びポリアデニル化シグナルが挙げられる。いくつかの実施形態では、ペイロード配列は、コード領域、遺伝子調節エレメント、及び転写ターミネーターを含み、コード領域が遺伝子調節エレメントと転写ターミネーターとの間にあるように、これらは互いに対して配置される。いくつかの実施形態では、コード領域は、遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子産物はRNAである。いくつかの実施形態では、コード領域は、ポリペプチド（例えば、タンパク質、例えば、糖タンパク質）をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、融合ポリペプチド及び／またはキメラポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、1つの遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、複数の遺伝子産物（例えば、2、3、4、5、6、7またはそれ以上の遺伝子産物）をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、調節RNA（例えば、siRNA、マイクロRNAなど）をコードする。いくつかの特定の実施形態では、ペイロードは、遺伝子編集（例えば、gRNA媒介編集系）のための1つ以上の実体をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロードは、タンパク質産物をコードする。

10

20

【0173】

摂動：本明細書で使用する場合、本明細書に記載の方法から生じる、及び／または同定される、哺乳動物細胞、產生されるウイルスベクター、ウイルスベクターの產生に必須のポリヌクレオチド、及び／または他の構築物における遺伝子改変を指す。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞、產生されるウイルスベクター、ウイルスベクターの產生に必須のポリヌクレオチド、及び／または他の構築物は、1つ以上の摂動を含む。これらは、ウイルスベクターの発現及び／または產生のために、本開示の哺乳動物細胞ライブラリから生成、產生、同定及び／または選択される。いくつかの実施形態では、摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの結果である。いくつかの実施形態では、摂動は遺伝子改変であり、これは、ライブラリバリエーションの結果ではなく、本明細書に記載の方法から生じ、及び／または同定される遺伝子改変である。いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクターの產生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドにおける遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、摂動は、哺乳動物細胞（例えば、ウイルスベクター（例えば、独立して及び／または合成的に）の発現のため）またはウイルスベクターの1つ以上の所望の特徴に関連する。いくつかの実施形態では、摂動には、ゲノム配列変化（例えば、ゲノム挿入、欠失、置換、再編成など）、エピソーム配列変化、及び／またはエピジェネティック修飾が含まれる。

30

40

【0174】

摂動アクセサリ配列：本明細書で使用する場合、ライブラリ構築物と組み合わせて摂動を作り出すのを助ける任意の配列が含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、gRNAを含むライブラリバリエーションを含み、摂動アクセサリ配列は、RNAガイドヌクレアーゼまたはヌクレアーゼ媒介摂動のための他のエレメントをコードする配列を含む。

【0175】

ポリペプチド：本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」とは、通常、ペプチド結合によって連結される残基（例えば、アミノ酸）の任意のポリマー鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態で

50

は、ポリペプチドは、非天然のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、人の手の作用によって設計及び／または生成されるように改変されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはその両方を含むか、またはそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端、ポリペプチドのC末端、またはそれらの任意の組み合わせで、1つ以上のペンドント基または他の修飾、例えば、1つ以上のアミノ酸側鎖の修飾またはそれへの結合を含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなペンドント基または修飾は、アセチル化、アミド化、脂質化、メチル化、ペグ化など、それらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方を含むし得、かつ当業者に公知の様々なアミノ酸修飾または類似体のいずれかを含有し得る。いくつかの実施形態では、有用な修飾は、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化などであるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、及びそれらの組み合わせを含み得る。用語「ペプチド」は、一般的に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すように使用される。いくつかの実施形態では、タンパク質は、抗体、抗体断片、その生物学的に活性な部分、及び／またはその特徴的部分である。

10

【0176】

ポリヌクレオチド：本明細書で使用する場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、核酸の任意のポリマー鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAであるか、またはそれを含み、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の天然の核酸残基であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の核酸類似体であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しないという点で核酸とは異なる。あるいはまたはさらに、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合ではなく、1つ以上のホスホロチオエート及び／または5'-N-ホスホラミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、インターカレート塩基、及びそれらの組み合わせ）であるか、それらを含むか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然核酸の糖と比較して、1つ以上の修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAまたはタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然源からの単離、相補的鋳型に基づく重合による酵素合成（*in vivo*または*in vitro*）、組換え細胞または系における複製、及び化学合成のうちの1つ以上によって調製される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、

20

30

40

50

160、170、180、190、20、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000またはそれ以上の残基長である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは部分的または全体的に一本鎖であり、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは部分的または全体的に二本鎖である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードするか、またはコードする配列の相補体である少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、酵素活性を有する。

【0177】

所定の：本明細書で使用する場合、用語「所定の」とは、実験及び／または分析の開始前を指す。例えば、いくつかの実施形態では、改変された配列を導入する物理的行為の前に、予想される結果（例えば、挿入部位）のセットが既知である場合、改変された配列の位置または特徴は所定とみなされ得る（例えば、改変された配列を、いくつかの異なるゲノム位置のうちの1つに挿入することができる）。

【0178】

タンパク質：本明細書で使用する場合、用語「タンパク質」とは、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された一連の少なくとも2つのアミノ酸）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含んでもよく（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなどであってもよい）、及び／または他の方法で処理もしくは修飾されていてもよい。当業者は、「タンパク質」が、細胞によって産生される完全なポリペプチド鎖（シグナル配列有りまたは無し）であっても、またはその特徴的部分であってもよいことを理解するであろう。当業者は、タンパク質が、例えば、1つ以上のジスルフィド結合によって連結するか、または他の手段によって会合する複数のポリペプチド鎖を含み得る場合があることを理解するであろう。

【0179】

参照：本明細書で使用する場合、用語「参照」は、比較を行う対象に対する標準または対照を表す。例えば、いくつかの実施形態では、目的の作用因子、動物、個体、集団、試料、配列または値を、それぞれ、参照または対照の作用因子、動物、個体、集団、試料、配列または値と比較する。いくつかの実施形態では、参照または対照を、目的の試験または決定と実質的に同時に試験及び／または決定する。いくつかの実施形態では、参照または対照は、任意選択で有形媒体に具現化された歴史的参照または対照である。一般的には、当業者に理解されるように、参照または対照を、評価対象と同等の条件または状況下で決定または解析する。当業者は、考えられる特定の参照または対照への依存及び／または比較を正当化するのに十分な類似性が存在する場合を理解するであろう。いくつかの実施形態では、参照は陰性対照参照であり、いくつかの実施形態では、参照は陽性対照参照である。いくつかの実施形態では、比較は、同等の遺伝的特徴を有し、同等の条件下（分析する変数に関しては除く）で培養した参照細胞または参照細胞集団に対して行う。いくつかの特定の実施形態では、参照細胞は、少なくとも1つの改変された配列及び／または少なくとも1つのバーコード配列の存在に関して異なるが、それ以外は同等である。

【0180】

RNAガイドヌクレアーゼ：本明細書で使用する場合、用語「RNAガイドヌクレアーゼ」とは、ガイドRNA分子（ポリペプチドと複合体を形成し、標的配列とハイブリダイズする）によって、特定の標的ヌクレオチド配列に配列特異的に結合し、標的ヌクレオチド配列に向けられるポリペプチドを指す。RNAガイドヌクレアーゼは、結合時に標的配列を切断することができるが、RNAガイドヌクレアーゼという用語は、標的配列に結合することができるが切断はできないヌクレアーゼ不活性型RNAガイドヌクレアーゼも包含する。RNAガイドヌクレアーゼによる標的配列の切断は、一本鎖または二本鎖の切断をもたらし得る。二本鎖核酸分子の一本鎖のみを切断することができるRNAガイドヌクレアーゼは、本明細書ではニッカーゼと呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNAガイ

10

20

30

40

50

ドヌクレアーゼは、Cas9、CasZ、CpfI、及び／またはFokIであるか、それらに由来する。

【0181】

トランス作用性組み込み配列：本明細書で使用する場合、ライブラリ構築物に関する語句「トランス作用性組み込み配列」とは、哺乳類細胞ゲノムへのライブラリ構築の組み込みに必要な、ライブラリ構築物自体の一部として必ずしも含まれない核酸配列を指す。トランス作用性組み込み配列及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物（例えば、リコンビナーゼ）は、シス作用性組み込み配列（例えば、リコンビナーゼ部位）と協調して、細胞ゲノム（例えば、哺乳動物細胞）へのライブラリ構築物またはその一部の組み込みを実行する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物の組み込みには、複数のトランス作用性組み込み配列が必要である。

10

【0182】

形質転換またはトランスフェクション：本明細書で使用する場合、用語「形質転換」または「トランスフェクション」とは、宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）に外来性DNAを導入する任意のプロセスを指す。形質転換は、当技術分野で周知の様々な方法を使用して、天然または人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核または真核宿主細胞への外来核酸配列の挿入のための任意の既知の方法に依存し得る。いくつかの実施形態では、特定の形質転換方法論は、形質転換する宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染または形質導入、エレクトロポレーション、リポフェクションを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、「形質転換された」細胞は、挿入されたDNAが自律複製プラスミドとして、または宿主染色体の一部として複製可能であるという点で、安定して形質転換される。いくつかの実施形態では、形質転換細胞は、導入された核酸を限られた期間一過性に発現する。

20

【0183】

ウイルスベクター：本明細書で使用する場合、用語「ウイルスベクター」は、(i)少なくとも1つのポリヌクレオチドを保有することができ、(ii)ウイルスタンパク質（例えば、キャプシドタンパク質、例えば、ウイルスクャプシドタンパク質及び／またはそのバリエーションもしくは誘導体）を含む実体を指す。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、1つ以上の核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、細胞への核酸の移入を促進し得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、1つ以上の核酸配列及び1つ以上のウイルスクャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及び／またはレトロウイルスベクターに由来するキャプシドタンパク質及び／または核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、エンベロープを含む。

30

【0184】

特許、特許出願、記事、書籍、論文、及びウェブページを含むが、これらに限定されない本出願において引用されるすべての文献及び同様の資料の形式に関係なく、そのような文献及び同様の資料は、その全体が参照により明示的に援用される。組み込まれる文献、及び同様の資料のうちの1つ以上が、本出願（定義される用語、用語の用法、記載される技法などを含むがこれらに限定されない）と異なるか、または矛盾する場合は、本出願が優先される。本明細書中で使用する節の見出しは編成を目的としたものに過ぎず、記載する主題をいかようにも限定するものとして解釈すべきではない。

40

発明を実施するための形態

【0185】

細胞及び遺伝子治療、ワクチン、及び生物学的試薬を含む生物製剤は、急速に成長している市場である。生物製剤は、細胞内で製造されるか、またはそれ自体が細胞であってもよい（例えば、CAR-Tなどの細胞療法）。例えば、哺乳動物細胞を使用してウイルスを合成し、次いで治療薬（例えば、ワクチン、遺伝子治療）として使用するか、または哺乳動物細胞を治療薬として使用してもよい。しかしながら、生物製剤、特にウイルスベク

50

ターを使用する生物製剤を生産するためのサプライチェーンは非常に非効率的である。ウイルスベクターまたは哺乳動物宿主細胞の微妙な変化でさえ、製造収量に影響を与え得る。例えば、ウイルスベクターのペイロード及び血清型は、哺乳動物細胞の代謝、生存率、ウイルスベクター集合体、ウイルスベクターの産生及び／またはウイルスベクターの発現に影響を与え得る。哺乳動物細胞培養などにおけるウイルスベクターの生物学的産生は、コストを削減し、適正製造基準に準拠するためにも重要である。本開示は、哺乳動物細胞株が一般的には最適化されておらず、及び／または最適化された細胞株を単離するためのスクリーニングプラットフォームも非効率的であるというウイルスベクターの産生に関する問題を認識している。ウイルスベクターの現在の製造は、生物学的生産の高コスト及び長い生産時間、ならびに大量のウイルスベクターに対する市場の需要の増加の両方に起因して、不十分である。

10

【0186】

本開示は、とりわけ、哺乳動物細胞においてウイルスベクターを発現させるためのプラットフォーム技術を提供する。本開示は、ウイルスベクターを発現する能力に基づいて哺乳動物細胞または細胞株をスクリーニング、評価、及び／または特性決定するためのライブラリベースのアプローチを使用する方法を提供する。提供する技術により、ウイルスベクターに、それを発現する哺乳動物細胞の識別子（例えば、バーコード配列及び／またはライブラリバリエーションを含む）を取り込ませ、それにより、ウイルスベクターゲノム（例えば、ウイルス反復配列間の）を配列決定し、より高いウイルスベクター発現及び／またはウイルスベクター産生の他の特徴を有する哺乳動物細胞を同定するための効率的かつロバストな方法を提供することができる。提供する方法、系、及び組成物は、有益なウイルスベクター特性（例えば、ウイルスベクター発現の増加、発現期間の増加、安定性の増加など）を有する哺乳動物細胞を改変するための迅速でロバストなプラットフォームを提供する。

20

【0187】

ウイルスベクター発現用の哺乳動物細胞プラットフォーム

本開示は、ウイルスベクターの発現のために哺乳動物細胞（複数可）または細胞株（複数可）を産生、スクリーニング、選択、改変、及び／または同定するためのプラットフォーム技術を提供する。本開示は、ライブラリ内の哺乳動物細胞起源を示す識別子を用いたライブラリベースのアプローチを使用する方法を提供する。本開示は、哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターが識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーションを含む）を取り込む新規プラットフォーム技術を提供する。哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターをプールし、所望の特性について（例えば、配列決定により、例えば次世代シーケンシングにより）分析することができる。識別子をウイルスベクターに取り込ませることにより、ウイルスベクター産生の増強または向上などの所望の特徴を有する、ウイルスベクターを産生する哺乳動物細胞の迅速な同定が可能になる。本開示は、ウイルスベクターの識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーションを含む）を配列決定することによって、ウイルスベクター産生の所望の特徴（例えば、ウイルスベクター産生の向上）を有する細胞株について哺乳動物細胞ライブラリをスクリーニングすることができるという認識を包含する。例えば、哺乳動物細胞ライブラリによって発現されるウイルスベクターに由来する識別子のプール中の特定の識別子の相対的存在量は、ライブラリ中の特定の哺乳動物細胞株の相対的なウイルスベクター生産性と相関し得る（例えば、特定の識別子が大量に存在することが、ウイルスベクターの生産性が高い哺乳動物細胞株と相関し得る）。

30

40

【0188】

図1は、ウイルスベクターの発現または他のウイルスベクターの特徴について哺乳動物細胞をスクリーニングするための例示的な技術の概略図を示す。提供する技術は、識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーションを含む）を、その識別子をウイルスベクターにパッケージングするための適切な遺伝子エレメント（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）と共に含むように改変

50

された哺乳動物細胞ライブラリを使用する（図1、ステップAに示す）。いくつかの実施形態では、識別子はライブラリ構築物上に存在し、識別子は単一の連続ポリヌクレオチドまたは2つ以上の不連続ポリヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、例えば、少なくとも1つのライブラリバリエーションをさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ウイルスベクターの産生または他の特性に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、摂動、例えば、ウイルスベクター産生または他の特徴に影響を及ぼし得る1つ以上の遺伝子改変を引き起こし得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を、ウイルスパッケージング配列間、ならびに任意選択で、摂動、ライブラリバリエーション、ペイロード、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列及び／またはシス作用性組み込み配列のいずれかとの間に配置された識別子を含む1つ以上の改変された配列を含むように遺伝子改変する。

10

【0189】

哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞はまた、ウイルスベクターを発現するのに十分な遺伝物質を含む（例えば、エピソームとして既に存在し、及び／または哺乳動物細胞ゲノム内に組み込まれている）か、または遺伝物質を含むように改変され（例えば、トランスフェクトされ）得る（図1、ステップBに示す）。哺乳動物細胞ライブラリの遺伝物質（例えば、1つ以上の改変された配列）によるトランスフェクションまたは形質導入を使用して、ウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリを生成してもよい。

【0190】

遺伝物質は、例えば、複製のためのウイルス遺伝子及び必要なウイルスタンパク質、例えばキャプシドタンパク質をコードするウイルス遺伝子を含み得る。AAVベクターの場合、ウイルスベクターを発現するのに十分な遺伝物質には、(i) AAV Rep タンパク質及び AAV Cap タンパク質をコードする遺伝子、及び (ii) AAV 複製をサポートするために必要なアデノウイルス遺伝子（例えば、E2、E4 及び VARNA）。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ペイロード（例えば、ペイロードをコードする核酸）をさらに含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、プロモーター、ORF、及びポリAシグナルを有する発現カセットを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞を、ペイロード及び識別子を含むウイルスベクターを発現するのに十分な遺伝物質でトランスフェクトする。

20

【0191】

いくつかの実施形態では、提供する技術は、ウイルスベクターが識別子を取り込む（例えば、ウイルスベクターゲノムにおいて、例えば、ウイルス反復配列間で）ユニークなアプローチを含む。したがって、ライブラリの哺乳動物細胞の各クローン集団は、ユニークな識別子を有するウイルスベクターを発現する。これにより、ウイルスベクターを直接的に特徴決定し、それを産生した哺乳動物細胞を同定することができる。一般に、本開示のウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリは、識別子をウイルスベクターにパッケージングするための配列間に配置された識別子を含む少なくとも1つの改変された配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のための AAV ITR）、及び目的のウイルスベクターの発現に十分な遺伝物質を含む。ウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞はまた、1つ以上の（例えば、最大100個のユニークな）ライブラリバリエーション及び／または摂動を含み得る。哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターには、1つ以上の摂動が存在し得る。

30

40

【0192】

改変された配列（例えば、ウイルスベクター、識別子、及び／または他の改変された配列をコードする）のいずれも、エピソームとして（例えば、1つ以上のプラスミド上に）存在させ、及び／または哺乳動物細胞のゲノムに組み込むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を哺乳動物細胞に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を、哺乳動物細胞にエピソームとして存在させることができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を誘導的に発現

50

させることができる（例えば、誘導性プロモーターの制御下で）。

【0193】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリを培養し、当技術分野で公知の任意の適切な方法（複数可）を使用してウイルスベクターを回収する（図1、ステップCに示す）。いくつかの実施形態では、ライブラリの哺乳動物細胞によって産生された全ウイルスベクターを回収する。いくつかの実施形態では、ライブラリの哺乳動物細胞によって産生されたウイルスベクターを、時間間隔に応じて回収する。例えば、ウイルスベクターを毎日、2日ごと、3日ごと、またはそれ以上の間隔で回収して、一定期間にわたるウイルスベクター産生を評価することができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を洗浄し、長期間後にウイルスベクターを回収することができる（例えば、ウイルスベクターの持続的産生を評価するために）。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの遺伝物質（例えば、識別子を含む）を単離する。

10

【0194】

ウイルスベクターをプールし、遺伝物質を配列決定することができる（例えば、次世代シーケンシングを使用して）（図1、ステップDに示す）。ウイルスベクターのプールに識別子が存在することは、哺乳動物細胞ライブラリ内の哺乳動物細胞または哺乳動物クローン細胞株（これも識別子を有する）がウイルスベクターを産生することができることを示している。いくつかの実施形態では、1つ以上の識別子の相対的存在量を測定する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターのプールから測定される識別子の相対的存在量は、対応する細胞株による相対的なウイルスベクター産生と相関する。いくつかの実施形態では、識別子の相対的存在量を使用して、ライブラリ中の異なる哺乳動物細胞によって産生される特定のウイルスベクターの量（例えば、相対量）を決定することができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクタープール内の豊富な識別子を使用して、ライブラリ内の哺乳動物細胞のウイルスベクター産生能力に対する様々な改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション及び／または摂動）の影響を決定することができる。

20

【0195】

本開示は、ウイルスベクターの量または存在量に、偏り（例えば、特定の哺乳動物細胞または哺乳動物クローン細胞株の細胞分裂または細胞数の増加）が反映され、必ずしも哺乳動物細胞またはクローン細胞株に関連付けられたウイルスベクター産生レベルが反映されない場合があることを認識している。したがって、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの量または存在量を正規化してもよい。いくつかの実施形態では、検出されるウイルスベクターの量または存在量は、例えば、細胞の量及び／または細胞DNAの量に対して正規化され得る。いくつかの実施形態では、細胞ライブラリは、ライブラリ中の細胞の各試料内にほぼ同じ数の細胞を含む。

30

【0196】

所望のウイルスベクター特性（例えば、高発現）に関連する哺乳動物細胞を同定し、それらの改変された配列を決定することができる（例えば、ゲノム配列決定によって）。例えば、参照細胞と比較して、医薬品製造基準下で（例えば、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）下で）、ウイルスベクター産生が増加した哺乳動物細胞を選択することができる。ウイルスベクター産生の増加は、参照細胞と比較して、一定期間にわたるウイルスベクター数の増加、または長期間にわたる産生であり得る。いくつかの実施形態では、参照細胞と比較してより長期間ウイルスベクターを産生する哺乳動物細胞を選択することができる（例えば、生存率の増加、ゲノム安定性の増加、及び／またはウイルスベクター産生の持続時間の増加により）。参照細胞には、改変された配列を含まない同等の哺乳動物細胞、及び／または標準細胞（例えば、ウイルスベクターを産生することができる細胞）を含ませることができる。

40

【0197】

選択された哺乳動物細胞候補は、一般に、ウイルスベクター（複数可）の産生に使用することができる、及び／または同定された対応するライブラリバリエーション及び／または摂動を使用して、新規哺乳動物細胞ライブラリの構築を知らせることができる（図1、パネル

50

Fに示す)。所望の特徴を有し、及び／または所望の量でウイルスベクターを発現する改変された哺乳動物細胞が同定されるまで、ライブラリベースのプラットフォームアプローチを繰り返すことができる。所望の特性に関連付けられた改変された配列は、例えば、機械学習(ML)アプローチを使用して機械学習モデルを開発することで分析することができる。トレーニング済みの機械学習モデルは、将来の設計に情報を提供し、スクリーニングする哺乳動物細胞ライブラリの数及び／または各哺乳動物細胞ライブラリのサイズを減らし、それによって時間とコストを削減するのに役立つ。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリを設計し、及び／または方法を実行して、所望の特性(例えば、特定のレベルのウイルスベクター産生)を有するように哺乳動物細胞内で相乗的に相互作用する改変された配列(例えば、2つ以上の改変された配列の組み合わせ)を同定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプラットフォーム技術から得られる結果として生じる哺乳動物細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の改変された配列(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の摂動)を有し得る。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクター産生の所望の特性(例えば、あるレベルでの産生、所望の期間の産生など)を有する哺乳動物細胞を産生、スクリーニング、選択、改変、及び／または同定するのに有用である。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクター産生に影響を及ぼす1つ以上の摂動または摂動の組み合わせを産生、スクリーニング、選択、改変、及び／または同定するのに有用である。いくつかの実施形態では、選択される哺乳動物細胞候補は、追加の改変(例えば識別子の除去)後にウイルスベクター(複数可)の産生に使用することができる。いくつかの実施形態では、同定された対応するライブラリバリエーション及び／または摂動を使用して、類似の哺乳動物細胞株または細胞株の構築を知らせることができる(例えば、摂動を、同じ祖先細胞株、類似の祖先細胞株に導入することができ、その場合、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドを、哺乳動物細胞ゲノム、及び／または非常に異なる祖先細胞株内に組み込む)。

10

20

30

40

50

【0198】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を、誘導性転写制御エレメント(例えば、プロモーター)の制御下にあるウイルスベクターの1つ以上の成分を含むように改変する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの遺伝子エレメントを含む哺乳動物細胞を操作して、ライブラリ構築物をさらに含める。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を、誘導性転写制御エレメントの制御下でウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントを有するポリヌクレオチドを含み(例えば、エピソームとして及び／または哺乳動物ゲノムに組み込まれ)、さらにライブラリ構築物を含むように改変する。

【0199】

当業者であれば、図1の概略図が、1つ以上の改変された配列及び1つ以上の識別子を含むように哺乳動物細胞ライブラリを改変し、次いでウイルスベクターの遺伝子エレメントを導入することを示す一方で、ウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞ライブラリを改変するためのこれらのステップは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、任意の順序で実施することができることを認識するであろう。例えば、哺乳動物細胞ライブラリを発現するウイルスベクターの改変は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、任意の順序で実施することができる。例えば、いくつかの実施形態では、改変された配列(複数可)、識別子(複数可)、及びウイルスベクターのエレメントの導入は、同時にまたは実質的に同時に導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの形成に必須のユニークな改変された配列及びポリヌクレオチドを含む哺乳動物細胞ライブラリを生成し、続いて識別子を導入する。いくつかの実施形態では、識別子を含むユニークな改変された配列を含む哺乳動物細胞ライブラリを生成し、続いてウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチドを導入する。

【0200】

提供する方法は、任意の所望のウイルスベクターの産生のために所望の特徴を有する哺

乳動物細胞を生成、同定及び／または選択するために使用することができる。一般に、そのようなウイルスベクターは、その所望の目的に対して機能的である。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子治療用のウイルスベクターは、ペイロード（例えば、標的細胞への核酸など）を送達する機能を有する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、がん細胞を殺傷することができる腫瘍溶解性ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、治療的に活性である。しかしながら、いくつかの実施形態では、提供する方法は、1つ以上の機能的特徴を欠くが、関心のある他の特徴を保持する非機能的ウイルスベクターをもたらす得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、特定の特徴に対して非機能的であるか、または機能が低下している。例えば、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ペイロードを伝達する能力が低下している場合があるか、またはペイロードを伝達することができない場合がある。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、がん細胞を殺傷する能力が低下している場合がある。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、治療的に不活性であり得る。

10

【0201】

ウイルスベクター

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞株は、ウイルスベクターの産生に有用である。いくつかの実施形態では、産生されたウイルスベクターを、生物製剤及び／または治療薬自体として使用する。いくつかの実施形態では、産生されたウイルスベクターを、多くの生物製剤及び／または治療薬を生み出す研究、産生、及び／または製造プロセスで使用する。例えば、ウイルスベクターを、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解性治療）、及び／または遺伝子治療（例えば、*in vivo* 遺伝子及び／またはゲノム編集）を含むがこれらに限定されない多くの方法で 사용할 ことができる。別の例として、ウイルスベクターを、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解性治療）、遺伝子治療（例えば、*ex vivo* 遺伝子及び／またはゲノム編集）、及び／または細胞療法（例えば、*ex vivo* 遺伝子及び／またはゲノム編集）の研究、産生、及び／または製造を含むがこれらに限定されない多くの方法で 사용할 ことができる。したがって、これらの様々な用途のための広範なウイルスベクターが存在する。

20

【0202】

本開示の方法を使用して、ウイルスベクター、例えば、当技術分野で公知であるか、または本明細書に記載の任意のウイルスベクターの発現に有益な特性を有する哺乳動物細胞を選択し、及び／または同定することができ、本開示は、特定のウイルスベクターに限定されない。

30

【0203】

ウイルスベクターは、異なるサイズ、運搬能力、異なるゲノム構造（例えば、DNA 及び／またはRNA、及び一本鎖及び／または二本鎖）を有し得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを使用して、一過性発現または長期発現のために核酸を細胞に送達することができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、広範囲の宿主細胞を有する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、限られた及び／または特定のタイプの宿主細胞を有し得る。

【0204】

提供する哺乳動物細胞及び／または哺乳動物細胞集団は、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞にエピソードとして存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むポリヌクレオチドは、哺乳動物細胞ゲノムに存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列は、誘導性転写制御エレメントの制御下にある。例えば、いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を、誘導性転写制御エレメント（例えば、誘導性プロモーター及び／または誘導性エンハンサー）の制御下で哺乳動物細胞ゲノムに組み込むことができる。ウイルスベクターが由来するウイルスとして、アデノ随

40

50

伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス（例えば、シンドビスウイルス）、レトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス）、ポリオーマウイルス（例えば、シミアンウイルス40（SV40））、パピローマウイルス（例えば、ウシパピローマウイルス（BPV））、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、麻疹ウイルス、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス）、レオウイルス、セネカウイルス、エコーウイルス（例えば、RIGVIR）、セムリキフォレストウイルス（SFV）、フラビウイルス、アネロウイルス（<https://www.ringtx.com>）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、パラミクソウイルス（例えば、センダイウイルス）、センダイウイルスベクター、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、コロナウイルス、及びハイブリッド及び／または改変されたウイルス及び／またはウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0205】

いくつかの特定の実施形態では、本開示に関して、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、及び／または単純ヘルペスウイルスに由来する。

【0206】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞株は、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及び／または単純ヘルペスウイルスベクターなどのウイルスベクターの産生に有用である。

20

【0207】

いくつかの実施形態では、本開示の産生されたウイルスベクターは、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）を使用して、多くの生物製剤及び／または治療薬を生成する生産及び／または製造プロセスに適している。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、生物製剤の工業規模の製造における使用に適している。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、国内規制基準（例えば、FDA及び／またはEMAの規制基準）に準拠する製造方法での使用に適している。

【0208】

ウイルスベクターは、生であり、弱毒化されていてもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは複製条件付きであってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは複製欠損であってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは複製不能型であってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは複製欠損型である。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは複製可能型である。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは非病原性である。

30

【0209】

いくつかの実施形態では、本開示は、ウイルスベクターが、それを発現する哺乳類細胞から識別子を取り込み、それをそのウイルス核酸（例えば、ウイルスゲノムまたは構築物、例えば、ウイルス反復配列の間）に組み込むユニークなアプローチを提供する。したがって、哺乳動物細胞及び／または本開示の技術によって産生されるウイルスベクターは、それらのウイルス核酸（例えばウイルス反復配列間の、例えばウイルスゲノムまたは構築物）内に識別子を有する。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるウイルスベクターは、キャプシド及び核酸などの改変された配列を含み、核酸は、（i）ペイロード、（ii）識別子、及び（iii）ウイルスゲノムの1つ以上の配列（例えば、AAVについては、AAV ITR配列（複数可）の間にあり得る）を含む。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロードまたはその一部を、ウイルスベクターから後に除去する。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロードまたはその一部を、ウイルスベクターから後に除去し、ペイロードまたはその一部を、別のペイロードまたはその一部に置き換える。

40

【0210】

50

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター

いくつかの実施形態では、本開示の方法及び哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。AAVは、遺伝子送達に一般的に使用されるウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、免疫原性が低い（例えば、ヒトにおいて）。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、広範囲の宿主細胞と適合する。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、分裂細胞及び静止細胞の両方に形質導入することができる。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、本明細書に記載のAAVベクターを産生する。

【0211】

いくつかの実施形態では、本開示は、AAVベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントをコードする核酸配列を提供する。AAVベクターの必須エレメントには、Repタンパク質及び／またはキャプシド（Cap）タンパク質（例えば、AAVキャプシドを形成するVP1、VP2及びVP3）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、AAVベクターの必須エレメントは、1つ以上の構築物（例えば、哺乳動物細胞内にエピソードとして組み込まれるかまたは存在し得る）上でコードされ得る。いくつかの実施形態では、AAVベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントをコードする核酸を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、AAVベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントをコードする核酸を、哺乳動物細胞においてエピソードとして存在させる。

【0212】

いくつかの実施形態では、本開示は、ペイロードを含むキャプシド及び核酸を含むAAVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、直鎖状一本鎖DNA核酸を包含する二十面体タンパク質キャプシドを有する。

【0213】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるウイルスベクターは、AAVキャプシド及び核酸を含み、核酸は、（i）ペイロード、（ii）識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーションを含む）、及び（iii）2つのITR配列（例えば、AAV由来）を含む。

【0214】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ヒトAAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、またはその誘導体由来する。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、合成及び／またはハイブリッドヒトAAVベクターである。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、ウシAAV（b-AAV）、イヌAAV（CAAV）、マウスAAV1、ヤギAAV、ラットAAV、またはトリAAV（AAAV）に由来する。

【0215】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、キャプシドの株及び核酸の特定の配列（例えば、ITR）の株の記載である血清型を有すると記載され得る。例えば、いくつかの実施形態では、AAVベクターはAAV2と記載される場合があり、その場合、ベクターは、AAV2キャプシド、及び特徴的なAAV2逆位末端配列（ITR）を含む核酸を有する。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、偽型として記載される場合があり、その場合、キャプシド及びITRは異なるAAV株に由来し、例えば、AAV2／9は、AAV2 ITR及びAAV9キャプシドを利用する構築物を含むAAVベクターを指す。

【0216】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、血清型及び／または偽型を有さない。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、改変されたAAVキャプシド及び／またはITR（例えば、既知のAAV血清型のものと有意な相同性を有さない）を含む。

【0217】

いくつかの実施形態では、本開示のAAVベクターは、AAVキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAVキャプシドは、AAV2、3、4、5、6、7、8、9、1

10

20

30

40

50

0、rh8、rh10、rh39、rh43もしくはAnc80血清型のAAVキャプシドに由来するか、もしくはそれから誘導され、またはその1つ以上のハイブリッドである。いくつかの実施形態では、AAVキャプシドは、AAV祖先血清型に由来する。いくつかの実施形態では、AAVキャプシドは祖先(Anc)AAVキャプシドである。Ancキャプシドは、推定祖先配列を決定するための進化的確率及び進化モデリングを使用して構築された構築物の配列から作成される。したがって、Ancキャプシド／構築物の配列が自然界に存在しているかは不明である。いくつかの実施形態では、AAVキャプシドは、人工的に改変された配列である（例えば、既知のAAV血清型キャプシドに対して有意な相同性を有さない）。

【0218】

本明細書で提供するように、本開示のAAVベクターは、AAVキャプシドとAAV核酸との任意の組み合わせを含み得る（例えば、ペイロード及び／またはAAV ITRを含む）。例えば、AAV由来ITRが隣接する識別子及び／またはペイロードを含むAAV核酸をキャプシド化する野生型またはバリエーションAAVキャプシドである。

【0219】

一般に、AAV核酸は、一本鎖デオキシリボ核酸(ssDNA)からなる。いくつかの実施形態では、AAV核酸は、天然のAAVゲノムに由来するか、またはそれから改変された1つ以上の成分を含む。いくつかの実施形態では、AAV核酸は、AAVに由来するか、またはそれから改変されている逆位末端配列(ITR)を含む。いくつかの実施形態では、AAV核酸は、ペイロード配列及び2つのITRを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、キャプシド、ならびにペイロード配列、及び2つのウイルス反復配列、例えばITR配列をDNA鎖の各末端(5'及び3')に1つずつ含むssDNAを含む。

【0220】

いくつかの実施形態では、提供するAAV核酸は、コード配列及び1つ以上の調節配列及び／または制御配列、ならびに任意選択で5'及び3'位にAAV由来逆位末端配列(ITR)を含むペイロードを含む。いくつかの実施形態では、提供するAAV核酸は、AAVキャプシドにパッケージされて、AAVベクターを形成する。

【0221】

特定のいくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、識別子及び／またはペイロード配列、ならびに5'または「左」及び3'または「右」のAAV ITR配列に隣接する関連する調節エレメントを含む核酸を含む。5'及び左の指定は、構築物全体に対するITR配列の位置を指し、センス方向に向けて左から右に読み取られる。当業者であれば、5'／左または3'／右のITR、またはそのアンチセンスバージョンのいずれかとして使用するために、所与のITR配列を修飾する方法を理解するであろう。

【0222】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAVベクターのAAV核酸は、一般的には、シス作用性5'及び3' ITR配列を含む（例えば、B. J. Carter, in “Handbook of Parvoviruses,” ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155–168, 1990（その全体が参照により本明細書に援用される））。いくつかの実施形態では、一般的なITR配列の少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%）を、本明細書で提供する構築物に組み込む。これらのITR配列を改変する能力は、当業者の範囲内である（例えば、Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; 及びK. Fisher et al., J. Virol. 70: 520–532, 1996などの文献を参照のこと（これらの各々は、その全体が参照により援用される））。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロード配列は、5'及び3' AAV ITR配列に隣接する。いくつかの実施形態では、AAV核酸は、5'及び3' AAV ITR配列に隣接する識別

10

20

30

40

50

子及びペイロードを含む。A A V I T R配列は、現在同定されているA A V型を含む任意の既知のA A Vから取得してもよい。

【0223】

いくつかの実施形態では、A A Vベクターの核酸は、ペイロード、識別子、及び2つのA A V I T Rを含む。いくつかの実施形態では、A A Vベクターは、キャプシドと、(i) ペイロード及び／または識別子、ならびに(ii) DNA鎖の各末端(5'及び3')に1つずつ、2つのA A V I T R配列を含むdsDNAとを含む。

【0224】

一般に、I T Rは、ヘアピンを形成することができる。ヘアピンを形成する能力は、I T Rの自己プライミング能力に寄与し、第2のDNA鎖のプライマーゼ非依存的合成を可能にする。I T Rは、A A VベクターにおけるA A V構築物の効率的なカプセル化にも役立つ。A A V I T R配列は、哺乳動物のA A V型を含む任意の既知のA A Vから取得してもよい。

【0225】

いくつかの実施形態では、I T Rは、天然のI T R配列の1つ以上の修飾、例えば短縮化、欠失、置換または挿入を含む。これらのI T R配列を改変する能力は、当業者の範囲内である(例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989;及びK. Fisher et al., J. Virol. 70:520-532, 1996などの文献を参照のこと(これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用される))。例えば、A A V2由来のI T R配列は、長さが約145ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、I T Rは、145未満のヌクレオチド、例えば、127、130、134または141ヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、I T Rは、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、または145ヌクレオチドを含む。

【0226】

いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードはまた、構築物によってトランスフェクトされるか、または本開示によって産生されたウイルスベクターに感染した細胞内で、その転写、翻訳及び／または発現が可能な様式で、コード配列に作動可能に連結された従来の制御エレメントを含む。いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードは、プロモーター、エンハンサー、非翻訳領域(例えば、5' UTR、3' UTR)、コザック配列、内部リボソーム進入部位(IRES)、スプライシング部位(例えば、アクセプター部位、ドナー部位)、ポリアデニル化部位、及び／またはそれらの任意の組み合わせを任意選択で含む。

【0227】

いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードは4 kb未満である。いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードは、少なくとも500 bp、少なくとも1 kb、少なくとも1.5 kb、少なくとも2 kb、少なくとも2.5 kb、少なくとも3 kb、少なくとも3.5 kb、少なくとも4 kb、または少なくとも4.5 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードは、最大で7.5 kb、最大で7 kb、最大で6.5 kb、最大で6 kb、最大で5.5 kb、最大で5 kb、最大で4.5 kb、最大で4 kb、最大で3.5 kb、最大で3 kb、または最大で2.5 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、A A Vベクターペイロードは、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約2 kb～約3 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約5 kb、約3 kb～約4 kb、約3 kb～約5 kb、または約4 kb～約5 kbの配列を含み得る。

【0228】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、A A Vベクターは、ペイロードの長期発現を指示することができる。いくつかの実施形態では、A A Vベクターは、ペイロードの一時的発現を指示することができる。

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるA A Vベクターは、A A Vキャプシド及び核酸を含み、核酸は、(i) ペイロード、(i i) 識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーション）、及び(i i i) 2つのウイルス反復配列（例えば、A A V由来ITR）を含む。

【0229】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞を、A A Vベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むように遺伝子改変する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞は、A A Vベクターを産生するために必要な例えばrep配列、cap配列、及びヘルパー機能などの提供される1つ以上のA A Vベクター成分を有し得る。いくつかの実施形態では、A A Vベクターの1つ以上の成分（例えば、A A V Rep遺伝子、A A V Cap遺伝子、1つ以上のヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせ）は、誘導性転写制御エレメント（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサー）の制御下にある。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物細胞の集団の）は、(i) 2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子、及び(i i) A A V Rep遺伝子、A A V Cap遺伝子、1つ以上のヘルパー遺伝子、及び／またはそれらの組み合わせを含む1つ以上のポリヌクレオチドを含み、その場合、哺乳動物細胞（複数可）は、識別子を含むA A Vベクターを産生する。いくつかの実施形態では、A A Vベクターは、ペイロードを含む。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロードまたはその一部を、A A Vベクターから後に除去する。識別子及び／またはペイロードまたはその一部をA A Vベクターから除去したいいくつかの実施形態では、ペイロードまたはその一部を、異なるペイロードまたはその一部に置き換える。

【0230】

アデノウイルスベクター

いくつかの実施形態では、本開示の方法及び哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。アデノウイルスは、エンベロープを持たないウイルスであり、それらが誘発する強力な免疫原性応答のためにワクチンとして一般的に使用されている。いくつかのアデノウイルスは、がん細胞に優先的に感染して殺傷する能力があるため、がん治療に利用されている。

【0231】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、ヒトアデノウイルスに由来する。ヒトアデノウイルスは、いくつかの部分群に分類される少なくとも51の血清型のファミリーを包含する。例えば、部分群Aには、アデノウイルス血清型12、18、及び31が含まれる。部分群Bには、アデノウイルス血清型3、7、11a、11p、14、16、21、34、35及び50が含まれる。部分群Cには、アデノウイルス血清型1、2、5、及び6が含まれる。部分群Dには、アデノウイルス血清型8、9、10、13、15、17、19、19p、20、22～30、32、33、36～39、42～49、及び51が含まれる。部分群Eには、アデノウイルス血清型4が含まれる。部分群Fには、アデノウイルス血清型40及び41が含まれる。本開示のアデノウイルスベクターは、任意のアデノウイルス群、部分群、及び／または血清型のものであり得る。

【0232】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、血清型1～血清型51（例えば、1、2、4、5・・・51）などの任意の血清型に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス2型またはアデノウイルス5型である。いくつかの特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは、少なくとも部分的にアデノウイルス5型に由来する。

【0233】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは複製欠損型である（例えば、特定

10

20

30

40

50

の必須ウイルス遺伝子が欠失しており、及び／またはペイロード配列で置換されている）。本明細書に記載の方法で使用するアデノウイルスベクターのいずれも、E 1、E 2 a、E 2 b、E 3、またはE 4コード領域のいずれか1つ以上に欠失を含み得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは複製欠損型であり、E 4遺伝子座を欠いている（例えば、E 4コード領域が欠失している）。いくつかの実施形態では、複製欠損型アデノウイルスベクターは、がん治療及び／または遺伝子治療のためのワクチンとして有用である。

【0234】

一般に、アデノウイルスは、高い形質導入効率と直接的な高い導入遺伝子発現を特徴とする。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、ペイロードの一時的発現を指示することができる。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、標的細胞におけるペイロードの一過性発現を指示する。

10

【0235】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは複製可能型である。例えば、複製可能型アデノウイルスベクター（例えば、腫瘍溶解性ベクター）を、がん細胞内で優先的に複製され、天然の溶解性ウイルス複製プロセスを通じてがん細胞を破壊するように改変することができる。

【0236】

いくつかの実施形態では、本開示は、ペイロードを含むキャプシド及び核酸を含むアデノウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、直鎖状二本鎖核酸を包含する二十面体タンパク質キャプシドを有する。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、直径約90～100nmである。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、直鎖状二本鎖DNAを包含する二十面体タンパク質キャプシドを有する。

20

【0237】

一般に、アデノウイルスベクターの核酸は、二本鎖DNA（dsDNA）からなり、天然のアデノウイルスゲノムに由来するか、または改変された1つ以上の成分を有する。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターの核酸は、任意の血清型（例えば、アデノウイルス5型）のアデノウイルスに由来するか、または改変された逆位末端配列（ITR）を含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターの核酸は、ペイロード及び2つのウイルス反復配列、例えば、ITRを含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターの核酸は、識別子及び2つのウイルス反復配列、例えば、ITRを含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターの核酸は、ペイロード、識別子、及び2つのウイルス反復配列、例えば、ITRを含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、キャプシドと、（i）ペイロード及び／または識別子、ならびに（ii）DNA鎖の各末端（5'及び3'）に1つずつ、2つのITR配列を含むdsDNAとを含む。

30

【0238】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスITRは、約40bp～約200bpの長さを有する配列を有する。例えば、ヒトアデノウイルス5型のITRは103bpである。いくつかの実施形態では、アデノウイルスITRは、約30bp、約40bp、約50bp、約60bp、約70bp、約80bp、約90bp、約100bp、約110bp、約120bp、約130bp、約140bp、約150bp、約160bp、約170bp、約180bp、約190bp、約200bp、約220bp、約240bp、約260bp、約280bp、約300bp、約325bp、約350bp、約375bp、または約400bpの長さを含む。いくつかの特定の実施形態では、アデノウイルスITR配列は、約50～約250bpである。

40

【0239】

いくつかの実施形態では、提供するアデノウイルスベクターは、アデノウイルス由来キャプシドと、ペイロード及び1つ以上のアデノウイルス由来配列（例えば、ITRなど）

50

を含む核酸とを含む。いくつかの実施形態では、提供するアデノウイルスベクターは、アデノウイルス由来キャプシドと、識別子、ペイロード、及び少なくとも2つのウイルス反復配列を含む核酸とを含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、バーコード及び／またはライブラリバリエーションを含む識別子を含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターペイロードは、コード配列ならびに1つ以上の調節配列及び／または制御配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、5'及び3'アデノウイルス由来逆位末端配列（ITR）を含む。いくつかの特定の実施形態では、アデノウイルスベクターは、キャプシド及び改変されたアデノウイルスゲノムを含み、改変されたゲノムは、特定の配列の欠失（例えば、E1欠失及び／またはE3欠失）ならびにペイロード及び／または識別子の挿入を含む。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターのペイロードは、7.5 kb未満である。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターのペイロードは、少なくとも500 bp、少なくとも1 kb、少なくとも1.5 kb、少なくとも2 kb、少なくとも2.5 kb、少なくとも3 kb、少なくとも3.5 kb、少なくとも4 kb、少なくとも4.5 kb、少なくとも5 kb、少なくとも5.5 kb、少なくとも6 kb、少なくとも6.5 kb、少なくとも7 kb、少なくとも7.5 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターのペイロードは、最大で10 kb、最大で9.5 kb、最大で9 kb、最大で8.5 kb、最大で8 kb、最大で7.5 kb、最大で7 kb、最大で6.5 kb、最大で6 kb、最大で5.5 kb、最大で5 kb、最大で4.5 kb、または最大で4 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターのペイロードは、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約1 kb～約6 kb、約1 kb～約7 kb、約1 kb～約8 kb、約1 kb～約9 kb、約1 kb～約10 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約6 kb、約2 kb～約8 kb、約2 kb～約10 kb、約4 kb～約6 kb、約4 kb～約8 kb、または約5 kb～約8 kbである配列を含み得る。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるアデノウイルスベクターは、アデノウイルスキャプシド及び核酸を含み、核酸は、(i) ペイロード、(ii) 識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーション）、及び(iii) 2つのウイルス反復配列（例えば、アデノウイルス由来ITR）を含む。

30

【0242】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞を、アデノウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むように遺伝子改変する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞は、アデノウイルスベクターを産生するために必要な例えばrep配列、cap配列、及びヘルパー機能などの提供される1つ以上のアデノウイルスベクター成分を有し得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターの1つ以上の成分（例えば、アデノウイルスRep遺伝子、アデノウイルスCap遺伝子、1つ以上のヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせ）は、誘導性転写制御エレメント（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサー）の制御下にある。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物細胞の集団の）は、(i) 2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子、及び(ii) アデノウイルスRep遺伝子、アデノウイルスCap遺伝子、1つ以上のヘルパー遺伝子、及び／またはそれらの組み合わせを含む1つ以上のポリヌクレオチドを含み、その場合、哺乳動物細胞（複数可）は、識別子を含むアデノウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、ペイロードを含む。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロードまたはその一部を、アデノウイルスベクターから後に除去する。識別子及び／またはペイロードまたはその一部をアデノウイルスベクターから除去したいいくつかの実施形態では、ペイロードまたはその一部を、異なるペイロードまたはその一部に置き換える。

40

50

【0243】

レトロウイルス及びレンチウイルスベクター

いくつかの実施形態では、本開示の方法及び哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。レトロウイルスは、そのRNAをウイルスの逆転写酵素を使用してDNAに転写することにより、宿主細胞内で複製するエンベロープウイルスである。レトロウイルスのDNAは、宿主ゲノムの一部として複製し、プロウイルスと呼ばれる。レトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、エコトロピックレトロウイルス、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、及びそれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない、これらに基づき、またはこれらに由来する。

10

【0244】

いくつかの実施形態では、本開示の方法及び哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入する能力があるため、用途の広いツールである。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染することができる。一般に、レンチウイルスベクターは、長期及び／または安定した遺伝子発現を可能にし、また、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。

【0245】

レンチウイルスは、直径約80～約120nmのエンベロープ粒子である。いくつかの実施形態では、本開示は、直径約50nm～約200nmの範囲内の直径を有するレンチウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、直径約80nm～約120nmの範囲内の直径を有するレンチウイルスベクターを提供する。

20

【0246】

レンチウイルスには、マトリックス、キャプシド、ヌクレオキャプシド、エンベロープ、及び逆転写酵素タンパク質を含む、いくつかの構造タンパク質が含まれ得る。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープを含むレンチウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、及び核酸を含むレンチウイルスベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、及びペイロード及び／または識別子を含む核酸を含むレンチウイルスベクターを提供する。

30

【0247】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるレンチウイルスベクターは、レンチウイルスキャプシド（またはその誘導体）、エンベロープ、及び核酸を含み、核酸は、（i）ペイロード、（ii）識別子、及び（iii）2つの末端反復（LTR）配列（例えば、レンチウイルス由来）を含む。いくつかの実施形態では、2つのLTR配列は、核酸をレンチウイルスベクターにパッケージングすることができる。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、レンチウイルスPsi配列（またはその誘導体もしくは改変されたバリエーション）を含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターには、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）、HIV-2、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス、サル免疫不全ウイルス（SIV）、及びマエディビスナウイルス（MVV）に基づくベクターが含まれる。いくつかの実施形態では、レンチウイルス核酸（すなわち、改変されたゲノム）及びエンベロープ糖タンパク質は、異なるウイルスに基づき、その結果、結果として得られるウイルスベクターは偽型である。

40

【0249】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターはHIV-1由来である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、HIV-1由来であり、キャプシドタンパク質と、（i）ペイロード、（ii）識別子、及び（iii）2つの末端反復（LTR）配列（例えば、レンチウイルス由来）を含む核酸とを含む。いくつかの実施形態では、レ

50

レンチウイルスベクターはH I Vベクターであり、哺乳動物細胞は、H I V L T R配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターはS I Vベクターであり、哺乳動物細胞は、S I V L T R配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターはウマ伝染性貧血ウイルスベクターであり、哺乳動物細胞は、ウマ伝染性貧血ウイルスL T R配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターはF I Vベクターであり、哺乳動物細胞は、F I V L T R配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターはビスナウイルスベクターであり、哺乳動物細胞は、ビスナウイルスL T R配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。

【0250】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、g a gタンパク質またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、マトリックス(M A)、キャプシド(C A)、及びヌクレオキャプシド(N C)ドメインから選択される1つ以上のドメインを含むg a gタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、エンベロープタンパク質またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは偽型レンチウイルスベクターであり、g a gタンパク質及びエンベロープタンパク質は異なるウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)ベクター、サル免疫不全ウイルス(S I V)ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルスベクター、ビスナウイルスベクターまたはその誘導体に由来するg a gタンパク質及び／またはe n vタンパク質を含む。

【0251】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、(i)レンチウイルスg a g遺伝子、(i i)レンチウイルスe n v遺伝子、(i i i)レンチウイルスp o l遺伝子、または(i v)それらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞は、(i)レンチウイルスg a g遺伝子、(i i)レンチウイルスe n v遺伝子、及び(i i i)レンチウイルスp o l遺伝子のうちの1つ以上を含む。

【0252】

いくつかの実施形態では、例えば、自己不活化末端反復配列(L T R)及び組み込み欠損を含み得るレンチウイルスベクターに安全機能を組み込む。特定の実施形態では、組み込み欠損は、ベクターゲノムのエレメントによって付与され得るが、パッケージング系のエレメント(例えば、ベクターゲノムの一部ではないが、トランスで供給され得る非機能的インテグラーゼタンパク質)に由来し得る。

【0253】

レンチウイルスは、一本鎖RNA(s s RNA)ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、s s RNAである核酸を含み、H I V-1及び／またはS I Vなどのレンチウイルスに由来するペイロード及び配列を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードには、宿主ゲノムへのトランスファープラスミド配列の組み込みを促進する末端反復(L T R)配列が隣接する。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、s s RNAである核酸を含み、識別子及びウイルス反復配列(例えば、H I V-1及び／またはS I V L T R)を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、s s RNAである核酸を含み、ペイロード、識別子、及びウイルス反復配列(例えば、H I V-1及び／またはS I V L T R)を含む。

【0254】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターの核酸は、レンチウイルスの5'及び3' L T R由来の配列を含んでいてもよく、特に、レンチウイルスの5' L T R由来のR配列及びU5配列及びレンチウイルス由来不活性化または自己不活性化3' L T Rを含んでいてもよい。L T R配列は、任意の種に由来する任意のレンチウイルス由来のL T R配列であってもよい。例えば、それらはH I V、S I V、F I VまたはB I V由来のL T R

10

20

30

40

50

配列であってもよい。いくつかの実施形態では、LTR配列はHIV LTR配列である。
【0255】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターのパイロードは8 kb未満である。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターのパイロードは、少なくとも500 bp、少なくとも1 kb、少なくとも1.5 kb、少なくとも2 kb、少なくとも2.5 kb、少なくとも3 kb、少なくとも3.5 kb、少なくとも4 kb、少なくとも4.5 kb、少なくとも5 kb、少なくとも5.5 kb、少なくとも6 kb、少なくとも6.5 kb、少なくとも7 kb、少なくとも7.5 kb、または少なくとも8 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターのパイロードは、最大で10 kb、最大で9.5 kb、最大で9 kb、最大で8.5 kb、最大で8 kb、最大で7.5 kb、最大で7 kb、最大で6.5 kb、最大で6 kb、最大で5.5 kb、最大で5 kb、最大で4.5 kb、または最大で4 kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターのパイロードは、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約1 kb～約6 kb、約1 kb～約7 kb、約1 kb～約8 kb、約1 kb～約9 kb、約1 kb～約10 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約6 kb、約2 kb～約8 kb、約2 kb～約10 kb、約4 kb～約6 kb、約4 kb～約8 kb、または約5 kb～約8 kbである配列を含み得る。

10

【0256】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞を、レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むように遺伝子改変する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞は、提供する1つ以上のレンチウイルスベクター成分を有し得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターの1つ以上の成分は、誘導性転写制御エレメント（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサー）の制御下にある。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物細胞の集団の）は、(i) 2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子、及び(ii) レンチウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のポリヌクレオチドを含み、哺乳動物細胞（複数可）は、識別子を含むレンチウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、パイロードを含む。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはパイロードまたはその一部を、レンチウイルスベクターから後に除去する。識別子及び／またはパイロードまたはその一部をレンチウイルスベクターから除去したいいくつかの実施形態では、パイロードまたはその一部を、異なるパイロードまたはその一部に置き換える。

20

30

【0257】

HSVベクター

いくつかの実施形態では、本開示の方法及び哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターである。HSVは、トロイダルdsDNAゲノムを含む正二十面体キャプシドを有する大きなエンベロープウイルスである。HSVは、ニューロンの生涯にわたる潜伏感染によってin vivoで特徴付けられる。この特性により、HSVベクターは導入遺伝子の長期発現に有用である。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、複製可能型弱毒化ベクター、複製不能型組換えベクター、または複製欠損型ヘルパー依存性ベクターである。

40

【0258】

いくつかの実施形態では、HSVベクターは、約120 nm～約200 nmの範囲内の直径を有する。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、直径約120～約200 nmのエンベロープ粒子である。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、約100 nm～約200 nmの範囲内の直径を有する。

【0259】

いくつかの実施形態では、HSVベクターは、単純ヘルペスウイルス1（HSV-1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV-2）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、カポジ肉腫関

50

連ヘルペスウイルス（KSHV）、ヒトヘルペスウイルス6及び／またはヒトヘルペスウイルス7、及び／またはその誘導体に由来するか、またはそれらから誘導される。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、HSV-1、HSV-2、またはそれらの組み合わせに由来するか、またはそれらから誘導される（例えば、HSV-1由来のキャプシドを含み、HSV-2由来の核酸配列を含む）。

【0260】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、HSV-AAVハイブリッドベクターである。

【0261】

天然のHSV-1ゲノムは、長短のユニークなセグメント（UL及びUS）と呼ばれる2つのストレッチのゲノムコード領域からなり、これらはそれぞれ、逆位反復配列（それぞれ、TRL／IRL及びIRS／TRS）に隣接する。いくつかの実施形態では、HSVベクターを改変して、ICP0、ICP4、ICP22、ICP27及び／またはICP47を欠損または欠失させて、毒性を低減する。HSVベクターを設計するための方法及び考慮事項は、当技術分野で公知であり、例えば、Manservigi, et al., Open Virol J. 2010; 4: 123-156である。

【0262】

いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシドタンパク質及びペイロードを含む核酸を含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、VP5、VP19C、VP23、プレVP22a及び／または成熟プロテアーゼ（UL26遺伝子産物）を含むキャプシドを含む。

【0263】

いくつかの実施形態では、HSV核酸は、HSVウイルスから得られるかまたは誘導される配列（例えば、TRL／IRL及び／またはIRS／TRS配列）をさらに含む。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシドタンパク質と、HSVウイルス反復配列（例えば、TRL／IRL及び／またはIRS／TRS配列）を含む核酸とを含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、及びペイロードを含む核酸を含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、ならびにペイロード及びHSVウイルス反復配列（例えば、TRL／IRL及び／またはIRS／TRS配列）を含む核酸を含むHSVベクターを提供する。

【0264】

いくつかの実施形態では、HSVベクターのペイロードは100kb未満である。いくつかの実施形態では、HSVベクターのペイロードは、少なくとも1kb、少なくとも2kb、少なくとも3kb、少なくとも4kb、少なくとも5kb、少なくとも6kb、少なくとも7kb、少なくとも8kb、少なくとも9kb、少なくとも10kb、少なくとも15kb、少なくとも20kb、少なくとも25kb、少なくとも30kb、少なくとも40kb、または少なくとも50kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、HSVベクターのペイロードは、最大で150kb、最大で140kb、最大で130kb、最大で120kb、最大で110kb、最大で100kb、最大で90kb、最大で80kb、最大で70kb、最大で60kb、最大で50kb、最大で40kb、最大で30kb、最大で25kb、最大で20kb、最大で15kb、または最大で10kbである配列を含み得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターのペイロードは、約1kb～約150kb、約1kb～約100kb、約1kb～約50kb、約1kb～約25kb、約5kb～約100kb、約5kb～約90kb、約5kb～約80kb、約5kb～約70kb、約5kb～約60kb、約5kb～約50kb、約5kb～約40kb、約5kb～約30kb、約5kb～約25kb、約5kb～約20kb、約5kb～約15kb、約5kb～約10kb、約10kb～約100kb、約10kb～約50kb、または約10kb～約25kbである配列を含み得る。

【0265】

いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシドタンパク質、及び識別子を含む核酸を含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシドタンパク質と、識別子及びHSVウイルス反復配列（例えば、TRL/IRL及び／またはIRS/TRS配列）を含む核酸とを含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、及び識別子を含む核酸を含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、キャプシド、エンベロープ、ならびに識別子及びHSVウイルス反復配列（例えば、TRL/IRL及び／またはIRS/TRS配列）を含む核酸を含むHSVベクターを提供する。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、末端α配列を含む2つのウイルス反復配列を含む。

【0266】

10

いくつかの実施形態では、HSV核酸は、ペイロード、識別子、及びHSVウイルスから得られるか、または誘導される1つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法及び／または哺乳動物細胞によって産生されるHSVベクターは、HSVキャプシド、エンベロープ、ならびにペイロード、識別子、及びHSVウイルスから得られるか、または誘導される1つ以上の配列を含む核酸（例えば、TRL/IRL及び／またはIRS/TRS配列）を含む。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、HSVキャプシド、エンベロープ、ならびにHSVウイルス反復配列（例えば、TRL/IRL及び／またはIRS/TRS配列）に隣接し、ペイロード及び／または識別子を含む核酸を含む。

【0267】

20

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞を、HSVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むように遺伝子改変する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞は、提供する1つ以上のHSVベクター成分を有し得る。いくつかの実施形態では、HSVベクターの1つ以上の成分は、誘導性転写制御エレメント（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサー）の制御下にある。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（例えば、哺乳動物細胞の集団の）は、(i) 2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子、及び(ii) HSVベクターの産生に必須の1つ以上のポリヌクレオチドを含み、哺乳動物細胞（複数可）は、識別子を含むHSVベクターを産生する。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、ペイロードを含む。いくつかの実施形態では、識別子及び／またはペイロードまたはその一部を、HSVベクターから後に除去する。識別子及び／またはペイロードまたはその一部をHSVベクターから除去したいくつかの特定の実施形態では、ペイロードまたはその一部を、異なるペイロードまたはその一部に置き換える。

30

【0268】

ライブラリ構築物

本開示は、本開示に関して哺乳動物細胞を改変するためのライブラリ構築物を提供する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上の改変された配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、最大100個の改変された配列を含み得る。

40

【0269】

ライブラリ構築物は、ウイルスベクターへの識別子のパッケージングに適した識別子及び遺伝子アーキテクチャを少なくとも含む。本明細書で使用するライブラリ構築物には、任意のライブラリバリエーションも含まれる。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクター（例えば、ウイルス反復配列間）にパッケージングするためのペイロードをさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、(i) ウイルス反復配列間に配置された識別子及びペイロード、ならびに(ii) 少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含む。

【0270】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、シス作用性組み込み配列（例えば、相

50

同性アーム、認識部位、及び／またはウイルス反復配列)を含む1つ以上の構築物をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、(i)ウイルス反復配列間に配置された識別子及びペイロード、(ii)少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列、ならびに(iii)ライブラリ構築物またはその一部を哺乳動物細胞ゲノムに組み込むためのシス作用性組み込み配列を含む。

【0271】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードをさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、(i)ウイルス反復配列間に配置された識別子及びペイロード、(ii)少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列、ならびに(iii)少なくとも1つのバーコードを含む。別の例として、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、(i)ウイルス反復配列間に配置された識別子及びペイロード、(ii)少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列、(iii)少なくとも1つのバーコード、ならびに(iv)ライブラリ構築物またはその一部を哺乳動物ゲノムに組み込むためのシス作用性組み込み配列を含む。

10

【0272】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのレポーター及び／または選択マーカーを含む少なくとも1つの改変された配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を含む1つ以上のポリヌクレオチドは、レポーター及び／または選択マーカーを含む。本開示に関して、任意の適切なレポーター(例えば、GFP、RFP、YFP、lacZなど)または選択マーカー(例えば、人工的に選択可能な形質を付与するもの、例えば、耐性カセットなど)を使用することができる。

20

【0273】

ライブラリ構築物の連続性

ライブラリ構築物は、単一の連続構築物または複数の不連続構築物であってもよい。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、単一の(すなわち、1つの)連続構築物である。単一の連続ライブラリ構築物を有するそのような実施形態では、得られたウイルスベクターの特徴決定は、任意のライブラリバリエーションに関する情報を直接提供する(例えば、ウイルスベクターの識別子の決定は、任意のライブラリバリエーションに直接関連付けることができる)。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数の不連続な構築物を含む。ライブラリ構築物が不連続なライブラリ構築物であるそのような実施形態において、提供する方法はまた、哺乳動物細胞におけるライブラリバリエーションを同定する(例えば、単一細胞配列決定によって)ステップを含む。

30

【0274】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物はそれぞれ単一の連続核酸配列からなり、複数のライブラリ構築物は複数のユニークな核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞集団は複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物はそれぞれ不連続核酸配列からなり、複数のライブラリ構築物は複数のユニークな核酸配列を含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、複数のポリヌクレオチドを含むライブラリ構築物を含み、個々の哺乳動物細胞はそれぞれ、ライブラリ構築物を構成する複数のポリヌクレオチドの第1のサブセットの正確に1つのユニークなポリヌクレオチド、及びライブラリ構築物を構成する複数のポリヌクレオチドの第2のサブセットの2つ以上のユニークなポリヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、個々の哺乳動物細胞はそれぞれ、正確に1つのユニークな識別子及び2つ以上のユニークなライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、複数のポリヌクレオチドを含むライブラリ構築物を含み、個々の哺乳動物細胞はそれぞれ、ライブラリ構築物を構成する複数のポリヌクレオチドの第1のサブセットの正確に2つのユニークなポリヌクレオチド、及びライブラリ構築物を構成する複数のポリヌクレオチドの第2のサブ

40

50

セットの複数のユニークなポリヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、個々の哺乳動物細胞はそれぞれ、正確に2つのユニークな識別子及び複数のユニークなライブラリバリエーションを含む。

【0276】

連続ライブラリ構築物

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子をウイルスベクターにパッケージングするのに適切な遺伝子アーキテクチャ（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAV ITR 配列）と隣接する少なくとも1つの識別子、及び任意のライブラリバリエーションを含む単一の連続構築物である。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、識別子及び1つ以上のライブラリバリエーションを含み、識別子及びライブラリバリエーションの両方がウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子、及びウイルス反復配列の外側に配置された1つ以上のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子と1つ以上のライブラリバリエーション、及びウイルス反復配列の外側に配置された1つ以上の追加のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は連続ライブラリ構築物であり、レポーター及び／または選択マーカーを含む。単一の連続ライブラリ構築物のいくつかの例示的な構成を以下の表1に示す。

【0277】

【表1-1】

表1-単一の連続構築物としての例示的なライブラリ構築物

識別子	ライブラリバリエーション(複数可) (例えば、gRNA、ORF、遺伝子(哺乳動物及び/またはウイルス)、非コード核酸、またはそれらの一部、複数もしくは組み合わせ)	摂動	ペイロード
バーコード	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
バーコード	ウイルス反復配列の外側に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間

【表 1 - 2】

バーコード	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-gRNA	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-gRNA	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-ORF	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-ORF	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-遺伝子またはその一部	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-遺伝子またはその一部	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-非コード核酸	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
ライブラリバリエーション-非コード核酸	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
バーコード及びライブラリバリエーション	ウイルス反復配列間に位置するライブラリバリエーション(複数可)	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間
バーコード及びライブラリバリエーション	ウイルス反復配列の間とウイルス反復配列の外側の両方に位置するライブラリバリエーション	KO、SNP、活性化、抑制、挿入	存在する場合、ウイルス反復配列間

10

20

30

40

【0278】

細胞内の位置及びコピー番号

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、エピソームであり、及び／または哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、エピソームである単一の連続構築物である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれる単一の連続構築物である。

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みのためのシス作用性組み込み配列をさらに含む。例えば、表 1 の例示的実施形態のいずれも、シス作用性組み込み配列（例えば、相同性アーム、認識部位、及び／またはウイルス反復配

50

列) をさらに含み得る。

【0279】

いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、シス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、ライブラリ構築物の3'末端及び5'末端に位置するシス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに低コピー数（例えば、ライブラリ構築物の10以下のコピー）で組み込む。いくつかの実施形態では、4コピー以下の単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、3コピー以下の単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、2コピー以下の単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、単一コピーの単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。

10

【0280】

いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、哺乳動物細胞にエピソームとして存在する。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物は、哺乳動物細胞において、低コピー数（例えば、10コピー以下のライブラリ構築物、例えば、4コピー以下のライブラリ構築物、例えば、3コピー以下のライブラリ構築物、2コピー以下のライブラリ構築物、例えば、単一（1）コピーのライブラリ構築物）でエピソームとして存在する。

20

【0281】

不連続ライブラリ構築物

いくつかの実施形態では、提供する方法及び細胞は、例えば、複数のライブラリバリエーションの同時スクリーニングを可能にする不連続ライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数の不連続な構築物を含み、少なくとも1つの構築物は、ウイルスベクターへの識別子のパッケージングに適した識別子及び遺伝子アーキテクチャを含む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子を含む第1の構築物及び1つ以上の追加の構築物を含む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子及びペイロードを含む第1の構築物ならびに1つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物を含む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物は、例えば、表1に記載の単一の連続ライブラリ構築物のいずれかを含む第1の構築物及び1つ以上の追加の構築物（例えば、追加のライブラリバリエーションを含む）を含む。

30

【0282】

いくつかの実施形態では、追加の不連続ライブラリ構築物は、ウイルスベクターの成分、例えばウイルスCap遺伝子、及びバーコードを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリは、改変された、または異なる血清型のウイルスベクター成分（例えば、Cap遺伝子）を有するライブラリ構築物を含む。例えば、ウイルスCap遺伝子のライブラリは、異なる血清型のCap遺伝子を用いて同時にスクリーニングしてもよい（例えば、複数の異なる血清型のウイルスベクターの特徴が改善された哺乳動物細胞を選択するために）。

40

【0283】

いくつかの特定の実施形態では、1つ以上の追加の構築物は、バリエーションウイルスベクター成分である（例えば、改変された、または異なる血清型の）ライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、表1に記載のライブラリ構築物及び1つ以上の追加の構築物を含み、少なくとも1つの追加の構築物は、ウイルスCap遺伝子及びバーコードを含む。

【0284】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションの複数の別個のライブラリをスクリーニングし、その各々を別個の識別子に関連付ける。例えば、gRNAライブラリバリエーション

50

トのライブラリとCap遺伝子バリエーションのライブラリを同時にスクリーニングすることができ、これにより、様々なCap遺伝子ライブラリバリエーションを濃縮するgRNAバリエーションの選択が可能になる（例えば、様々なウイルスベクター血清型で有益な効果を有するgRNA媒介摂動を選択するために）。

【0285】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、それぞれが1つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の構築物をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物及び／または識別子を含む構築物は、1つ以上のバーコードをさらに含む。

【0286】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の不連続核酸配列を含む不連続ライブラリ構築物（例えば、個々の構築物）である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、最大20個の不連続核酸配列、最大30個の不連続核酸配列、最大40個の不連続核酸配列、最大50個の不連続核酸配列、最大60個の不連続核酸配列、最大70個の不連続核酸配列、最大80個の不連続核酸配列、最大90個の不連続核酸配列、または最大100個の不連続核酸配列を含む不連続ライブラリ構築物である。

【0287】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、ライブラリ構築物の1つ以上の個々のポリヌクレオチドは、レポーター及び／または選択マーカを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、ライブラリ構築物の複数の個々のポリヌクレオチドは、レポーター及び／または選択マーカを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、ライブラリ構築物の個々のポリヌクレオチドのそれぞれは、レポーター及び／または選択マーカを含む。

【0288】

10

20

30

40

50

【表 2】

表2－例示的な不連続ライブラリ構築物

第1の構築物	追加の構築物(複数可)
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが2つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード及びペイロード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード及びペイロード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが2つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたライブラリバリエーション(識別子として)及びペイロード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたライブラリバリエーション(識別子として)及びペイロード(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが2つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード、ペイロード、及びライブラリバリエーション(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。
ウイルス反復配列の間に配置されたバーコード、ペイロード、及びライブラリバリエーション(ウイルスベクターへのパッケージング用)	それぞれが2つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物、及び任意選択で各ライブラリバリエーションを、バーコードに関連付ける。

10

20

30

40

【0289】

細胞内の位置及びコピー番号

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、1つ以上の個々の構築物はエピソームである。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、1つ以上の個々の構築物を哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、少なくとも1つの構築物はエピソームであり、少なくとも1つの構築物を哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。

【0290】

いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の1つ以上の個々の構築物を哺乳動

50

物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の1つ以上の個々の構築物は、シス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の1つ以上の個々の構築物は、各構築物の3'末端及び5'末端に位置するシス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、シス作用性組み込み配列は、ウイルス反復配列を含む（例えば、ウイルスベクターへのパッケージングのために任意のウイルス反復配列の外側に配置される）。

【0291】

ライブラリ構築物が複数の不連続な構築物を含むいくつかの実施形態では、1つ以上の個々の構築物が哺乳動物細胞にエピソームとして存在する。いくつかの実施形態では、1つ以上の個々の構築物は、哺乳動物細胞において、低コピー数（例えば、10コピー以下のライブラリ構築物、例えば、4コピー以下のライブラリ構築物、例えば、3コピー以下のライブラリ構築物、2コピー以下のライブラリ構築物、例えば、単一（1）コピーのライブラリ構築物）でエピソームとして存在する。

10

【0292】

識別子

本開示は、ウイルスベクターが産生され、及び／または由来する哺乳動物細胞またはクローン細胞株を検出することができ、同定することができる識別子を提供する。いくつかの実施形態では、特定の識別子の相対的存在量は、プールされたウイルスベクターの試料（例えば、それぞれが識別子を含む）の間で特徴決定し、検出し、及び／または定量化することができる。いくつかの実施形態では、識別子の少なくとも一部を検出する。いくつかの実施形態では、識別子は、配列決定によって（例えば、次世代シーケンシングによって）検出する。例えば、いくつかの実施形態では、識別子の少なくとも一部は、次世代シーケンシング及び／または単一細胞シーケンシング及び／またはサンガーシーケンシングによって検出する。

20

【0293】

いくつかの実施形態では、識別子は哺乳動物細胞に存在し、哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターにも存在する。いくつかの実施形態では、本開示は、ライブラリ構築物に存在する識別子を提供する。いくつかの実施形態では、識別子は、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列間に配置される（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターは、例えばウイルスベクターの核酸中に識別子を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターは、2つのウイルス反復配列の間に配置される識別子を含む核酸を含む（例えば、AAVベクターのITR）。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの核酸内の識別子の少なくとも一部は、次世代シーケンシング及び／または単一細胞シーケンシング及び／またはサンガーシーケンシングによって検出する。

30

【0294】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞及び発現されるウイルスベクターは両方とも同じ識別子を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、それを産生した哺乳動物細胞の識別子に対応する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子は、それを産生した哺乳動物細胞の識別子に由来する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの識別子及びウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞の識別子は、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一である。

40

【0295】

いくつかの実施形態では、識別子はバーコードを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、バーコードであるか、またはそれを含み、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリ構築物に存在する。いくつかの実施形態では、識別子

50

は、ウイルスベクター核酸に存在するバーコードであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターの試料からバーコードを含む識別子を検出することを含む。

【0296】

いくつかの実施形態では、識別子は、ライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、ライブラリバリエーションを含み、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリ構築物に存在する。いくつかの実施形態では、識別子は、ウイルスベクターの核酸に存在するライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターの試料からライブラリバリエーションを含む識別子を検出することを含む。

10

【0297】

いくつかの実施形態では、識別子は、バーコード及びライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、バーコード及びライブラリバリエーションを含み、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリ構築物に存在する。いくつかの実施形態では、識別子は、ウイルスベクターの核酸に存在するバーコード及びライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターの試料からバーコード及びライブラリバリエーションを含む識別子の少なくとも一部を検出することを含む。

20

【0298】

バーコード

本開示は、バーコードが異なる成分間の関連を追跡するのに有用であり得るという認識を包含する。いくつかの実施形態では、バーコードは、改変された配列の一種である。いくつかの実施形態では、バーコードは、改変された核酸配列の一種である。いくつかの実施形態では、バーコードは、ライブラリ構築物の一部である。

【0299】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、検出時（例えば、次世代シーケンシング法による）に1つ以上のライブラリバリエーション及び／または直接検出されない他の改変された配列の同一性を示す1つ以上のバーコードを含む。いくつかの実施形態では、1つのバーコードを、1つ以上の改変された配列に関連付ける。例えば、いくつかの実施形態では、1つのバーコードを、1つ以上のライブラリバリエーションに関連付ける。いくつかの実施形態では、1つのバーコードを、1つの改変された配列に関連付ける。例えば、いくつかの実施形態では、1つのバーコードを、1つのライブラリバリエーションに関連付ける。

30

【0300】

いくつかの実施形態では、バーコードは識別子を含まない。いくつかの実施形態では、バーコードは識別子を含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、核酸配列を含む識別子を含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、改変された配列を含む識別子を含む。いくつかの実施形態では、識別子はバーコードを含まない。いくつかの実施形態では、識別子はバーコードを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、核酸配列を含むバーコードを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、改変された配列を含むバーコードを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は複数のバーコードを含み、少なくとも1つのバーコードは識別子であり、少なくとも1つのバーコードは識別子ではない。

40

【0301】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、バーコードを含む。いくつかの実施形態では、バーコードを、識別子として使用する。いくつかの実施形態では、バーコードを、識別子として使用し、2つのウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、バーコードを、識別子として使用しない。いくつかの実施形態では、バーコードを識別子として使用せず、2つのウイルス反復配列の間に配置するが、検出されない（例えば、次世代シーケンシングによって）。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2

50

つのウイルス反復配列の外側に配置されたバーコード配列を含み、したがってウイルスベクターにパッケージされない。

【0302】

いくつかの実施形態では、バーコードを識別子として使用し、その場合、バーコードは、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリ構築物に存在する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターが産生され、及び／または由来する哺乳動物細胞またはクローン細胞株の識別を可能にする識別子としてバーコードを使用する。いくつかの実施形態では、バーコードの相対的存在量は、それが由来する哺乳動物細胞の相対的生産性を示す。いくつかの実施形態では、バーコードを識別子として使用し、検出時（例えば、次世代シーケンシング法による）に、直接検出されない1つ以上のライブラリバリエーション及び／または改変された配列の同一性も示す。

10

【0303】

いくつかの実施形態では、バーコードを識別子として使用しないが、検出時（例えば、次世代シーケンシング法及び／または単一細胞シーケンシング法による）に、直接検出されない1つ以上のライブラリバリエーション及び／または改変された配列の同一性を示す。例えば、ライブラリ構築物が不連続であるいくつかの実施形態では、バーコードを、1つ以上のライブラリバリエーションを追跡するために使用してもよい。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子を含む第1の構築物、及び各々がバーコードを含む1つ以上の追加の構築物を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、それぞれが1つ以上のライブラリバリエーションを含む1、2、3、4、5つ、またはそれ以上の構築物をさらに含み、個々の構築物はそれぞれバーコードをさらに含む。いくつかの実施形態では、各ライブラリバリエーションを、それぞれユニークなバーコードに関連付ける。別の例として、ライブラリ構築物が連続であるいくつかの実施形態では、バーコードを、1つ以上のライブラリバリエーションを追跡するためにも使用してよい。いくつかの実施形態では、連続ライブラリ構築物は、ウイルス反復配列の間に配置された識別子を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、1つ以上のライブラリバリエーション及び1つ以上のバーコードをさらに含む。いくつかの実施形態では、各ライブラリバリエーションを、それぞれユニークなバーコードに関連付ける。

20

【0304】

いくつかの実施形態では、バーコードは、3ヌクレオチド～50ヌクレオチドの範囲内の長さを有する核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、下限及び上限によって境界付けられる範囲内の長さを有する核酸配列を含み、上限は下限よりも大きい。いくつかの実施形態では、下限は、約5ヌクレオチド、約6ヌクレオチド、約7ヌクレオチド、約8ヌクレオチド、約9ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約11ヌクレオチド、約12ヌクレオチド、約13ヌクレオチド、約14ヌクレオチド、または約15ヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、上限は、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約45ヌクレオチド、または約50ヌクレオチドであってもよい。いくつかの特定の実施形態では、バーコードは、5ヌクレオチド～25ヌクレオチドの範囲内の長さを有する配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、バーコードは、約5ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、または約25ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、DNA及び／またはRNAを含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、3ヌクレオチド～50ヌクレオチド、または約5ヌクレオチド～約25ヌクレオチドの範囲内の長さを有するDNA配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードは、3ヌクレオチド～50ヌクレオチド、または約5ヌクレオチド～約25ヌクレオチドの範囲内の長さを有するRNA配列を含む。

30

40

【0305】

いくつかの実施形態では、提供する方法は、バーコードを検出することを含む（例えば

50

、配列決定によって、例えば、次世代シーケンシング及び／または単一細胞シーケンシング及び／またはサンガーシーケンシングによって）。

【0306】

ライブラリバリエーション

本開示は、ライブラリの哺乳動物細胞間で変動する摂動を生じさせる1つ以上のライブラリバリエーションを含む哺乳動物細胞を提供する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ウイルスベクター産生の特定の特徵に影響を与え得る摂動を生じさせる。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、摂動を生じさせる改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは配列変化である。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションはエピジェネティックな変化である。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションはエフェクターであり、それによって、ライブラリバリエーションは、細胞間で変動する摂動に影響を与えるか、またはもたらす。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーション自体が、細胞間で変動する摂動になり得る。例えば、いくつかの実施形態では、gRNAであるライブラリバリエーションはエフェクターであり、RNAガイドヌクレアーゼ（例えば、摂動アクセサリ配列）と共に、細胞のゲノムDNA内に欠失をもたらす。他の実施形態では、ライブラリバリエーションはORFまたは遺伝子配列であり、細胞へのトランスフェクション時、及びいくつかの場合ではゲノムDNAへの組み込み時（例えば、トランス作用性及びシス作用性組み込み配列によって実行される）、それ自体が細胞の遺伝物質の摂動または修飾になる。

【0307】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ガイドRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列を含むライブラリバリエーションは、識別子（例えば、ウイルスベクターを、それを産生した哺乳動物細胞と関連付けるユニークなgRNA配列）でもあり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ウイルスベクターによって取り込まれ得るガイド配列を含むライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、長さが約10～30ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、長さが15～25ヌクレオチドである。特定の実施形態では、ガイド配列は、長さが16～24ヌクレオチド（例えば、長さが16、17、18、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド）である。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、gRNAの5'末端またはその近位にある（例えば、Cas9またはそれから誘導または取得されたヌクレアーゼと共に）。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、gRNAの3'末端またはその近位にある（例えば、Cpf1またはそれから誘導または取得されたヌクレアーゼと共に）。

【0308】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ゲノム欠失の導入に関連するガイドRNA配列をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ゲノム変異（例えば、SNP）の導入に関連するガイドRNA配列をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ゲノム再編成の導入に関連するガイドRNA配列をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、遺伝子の発現の変化（例えば、活性化及び／または抑制）に関連するガイドRNA配列をコードする。

【0309】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、1つ以上のORFを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ORFを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、RNA配列をコードするORFを含む。いくつかの実施形態では、ORFは、ポリペプチド（例えば、タンパク質、例えば、糖タンパク質）をコードする。いくつかの実施形態では、ORFは、融合ポリペプチド及び／またはキメラポリペプチドをコードする。

【0310】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、1つ以上の遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

ライブラリバリエーションは、RNA配列をコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、ポリペプチド（例えば、タンパク質、例えば、糖タンパク質）をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子は、融合ポリペプチド及び／またはキメラポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、哺乳動物遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ウイルス遺伝子（例えば、Cap遺伝子）を含む。

【0311】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、非コード核酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、調節RNA配列（例えば、siRNA、マイクロRNAなど）をコードする。

10

【0312】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションまたはその一部は識別子でもあるが、ライブラリ構築物は、識別子ではない1つ以上の追加のライブラリバリエーションを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションまたはその一部は識別子であり、ライブラリバリエーションは、ウイルスベクターにパッケージングするための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）の間に配置される。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは識別子ではない（例えば、ウイルスベクターにパッケージングされていない）。ライブラリバリエーションまたはその一部が識別子であるいくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションまたはその一部は、その特定の哺乳動物細胞または細胞株（及びそれらから発現するウイルスベクター）に対してユニークである。

20

【0313】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、ウイルスベクターの成分を含む。例えば、ウイルスベクターの改変された成分及び／または様々な血清型の成分。このようにして、様々な改変された、または血清型のウイルスベクターをスクリーニングしてもよい。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、Cap遺伝子（例えば、様々な血清型の）を含む。

【0314】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、少なくとも1つのライブラリバリエーションを個別に含み、少なくとも1つのライブラリバリエーションは、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのORF、少なくとも1つのgRNA配列、少なくとも1つのユニークな非コード核酸配列、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む少なくとも1つの改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団は、複数のライブラリバリエーションを含み、複数のライブラリバリエーションは、少なくとも1つのユニークな遺伝子、少なくとも1つのユニークなORF、少なくとも1つのユニークなgRNA配列、及び／または少なくとも1つのユニークな非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、少なくとも1つの改変された配列を含む。

30

【0315】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、1つ以上のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、少なくとも100個のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、約2～約100個のライブラリバリエーション、約2～約20個のライブラリバリエーション、約3～約30個のライブラリバリエーション、約4～約40個のライブラリバリエーション、約5～約50個のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、10個以下のライブラリバリエーション、20個以下のライブラリバリエーション、30個以下のライブラリバリエーション、40個以下のライブラリバリエーション、50個以下のライブラリバリエーション、60個以下のライブラリバリエーション、70個以下のライブラリバリエーション、80個以下のライブラリバリエーション

40

50

、90個以下のライブラリバリエーション、または100個以下のライブラリバリエーションを含む。

【0316】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子の両方が、2つのウイルス反復配列の間に配置される。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、少なくとも1つの識別子は2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも2つのライブラリバリエーション及び1つの識別子を含み、識別子と少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の間に配置され、少なくとも1つのライブラリバリエーションは2つのウイルス反復配列の外側に配置される。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の間及び／または外側に配置された1つ以上の追加の改変された配列をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の間に配置されたペイロードをさらに含む。別の例として、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つのウイルス反復配列の間及び／または外側に配置された1つ以上の追加のバーコードをさらに含む。

10

【0317】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ライブラリバリエーションである識別子、及び1つ以上の追加のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリバリエーションである識別子、及びウイルスベクターにパッケージングするための配列の外側に配置された1つ以上の追加のライブラリバリエーションを含む単一の連続ライブラリ構築物である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたライブラリバリエーションである識別子、及び1つ以上の追加のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物を含む不連続ライブラリ構築物である。いくつかの特定の実施形態では、1つ以上の追加のライブラリバリエーションは、ウイルスベクターの成分（例えば、Cap遺伝子）を含む。

20

30

【0318】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、バーコードである識別子、及び1つ以上のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたバーコードである識別子、及びウイルスベクターにパッケージングするための配列の外側に配置された1つ以上のライブラリバリエーションを含む単一の連続ライブラリ構築物である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置されたバーコードである識別子、及び1つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物を含む不連続ライブラリ構築物である。

40

【0319】

ライブラリ構築物におけるライブラリバリエーションのいくつかの例示的な構成を、以下の表3に示す。

【0320】

50

【表 3 - 1】

表3ーライブラリ構築物の例示的なライブラリバリエーション

形式	識別子	ライブラリバリエーション	摂動
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム KO
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム SNP
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム活性化
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム抑制
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた ORF	ゲノム挿入
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	エピソーム gRNA	ゲノム KO
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	エピソーム gRNA	ゲノム SNP
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	エピソーム gRNA	ゲノム活性化
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	エピソーム gRNA	ゲノム抑制
単一の連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	エピソーム ORF	エピソームの新規遺伝子またはコピー数の増加
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム KO
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム SNP
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム活性化
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	細胞ゲノムに組み込まれた gRNA	ゲノム抑制
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	細胞ゲノムに組み込まれた ORF	ゲノム挿入

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	エピソード gRNA	ゲノム KO
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	エピソード gRNA	ゲノム SNP
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	エピソード gRNA	ゲノム活性化
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のライブラリバリエーション	エピソード gRNA	ゲノム抑制
不連続ライブラリ構築物	ウイルス反復配列間のバーコード	エピソード ORF	エピソードの新規遺伝子またはコピー数の増加

10

【0321】

いくつかの実施形態では、提供する方法は、1つ以上のライブラリバリエーションを検出することを含む（例えば、配列決定によって、例えば、次世代シーケンシングによって）。

20

【0322】

ウイルス反復配列

本開示は、ウイルス反復配列などのウイルスベクターへの識別子のパッケージングに適したアーキテクチャを提供する。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、DNA及び／またはRNA配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、DNA配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、RNA配列である。いくつかの実施形態では、2つのウイルス反復配列の間に配置された任意の核酸配列を、ウイルスベクターにパッケージングする。

【0323】

いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、標的ウイルスベクターと同じタイプのウイルスに由来する。例えば、いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターはAAVベクターであり、ウイルス反復配列はAAVに由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、標的ウイルスベクターと同じウイルス株に由来する。例えば、いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターはAAV5ベクターであり、ウイルス反復配列はAAV5由来ITRである。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、標的ウイルスベクターとして異なるウイルス株に由来するが、依然として標的ウイルスベクターにパッケージングすることができる。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、改変されたウイルス反復配列である（例えば、2つ以上のウイルスに由来する配列を含む）。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、合成ウイルス反復配列である（例えば、コンセンサスウイルス反復配列に基づいて設計された）。

30

40

【0324】

いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターはAAVベクターであり、ウイルス反復配列はAAV ITRまたはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、AAVベクターとは異なるAAV株に由来するが、依然として標的ウイルスベクターによって取り込まれることができる。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、改変されたAAV ITR配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、合成AAV ITR配列である。

【0325】

いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターはアデノウイルスベクターであり、ウイルス反復配列はアデノウイルスITRまたはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施

50

形態では、ウイルス反復配列は、アデノウイルスベクターとは異なるアデノウイルス株に由来するが、依然として標的ウイルスベクターによって取り込まれることが可能である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、改変されたアデノウイルス I T R 配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、合成アデノウイルス I T R 配列である。

【0326】

いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターはレンチウイルスベクターであり、ウイルス反復配列は、レンチウイルス L T R またはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターは H I V - 1 ベクターであり、ウイルス反復配列は、H I V - 1 L T R またはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、標的レンチウイルスベクターとは異なるレンチウイルス株に由来するが、依然として標的レンチウイルスベクターによって取り込まれることが可能である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、改変されたアデノウイルス I T R 配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、合成アデノウイルス I T R 配列である。

10

【0327】

いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターは H S V ベクターであり、ウイルス反復配列は、H S V T R_L / I R_L 及び / または H S V I R_S / T R_S 及び / またはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的ウイルスベクターは H S V - 1 ベクター及び / または H S V - 2 ベクターであり、ウイルス反復配列は、H S V T R_L / I R_L 及び / または H S V I R_S / T R_S 及び / またはその誘導体の配列を含む。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、標的 H S V ベクターとは異なる H S V 株に由来するが、依然として標的 H S V ベクターによって取り込まれることが可能である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、改変された H S V T R_L / I R_L 及び / または H S V I R_S / T R_S 配列である。いくつかの実施形態では、ウイルス反復配列は、合成 H S V T R_L / I R_L 及び / または H S V I R_S / T R_S 配列である。

20

【0328】

ペイロード

とりわけ、本開示は、ペイロードを含むウイルスベクターを提供する。ペイロードは、一般に、細胞、器官、生物、及び / または生物学的系（例えば、細胞を含む）に導入することが望まれる関心対象の任意の配列である。例えば、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、細胞を編集するために使用することができるペイロード（例えば、遺伝子治療及び / または細胞治療で使用するためのゲノム編集ツールをコードする）を含み得る。いくつかの実施形態では、ペイロードは、ライブラリ構築物に含まれる。いくつかの実施形態では、ペイロードは、ライブラリ構築物に含まれ、ウイルスベクターにパッケージングするための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、A A V ベクターの発現のための A A V I T R）間に配置される。

30

【0329】

いくつかの実施形態では、ペイロード配列は、コード領域、遺伝子調節エレメント、及び転写ターミネーターのうちの 1 つ以上を含む。遺伝子調節エレメントの非限定的な例には、プロモーター、転写活性化因子、エンハンサー、及びポリアデニル化シグナルが含まれる。いくつかの実施形態では、ペイロード配列は、コード領域、遺伝子調節エレメント、及び転写ターミネーターを含み、コード領域が遺伝子調節エレメントと転写ターミネーターとの間にあるように、これらは互いに対して配置される。

40

【0330】

いくつかの実施形態では、コード領域は、遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子産物は R N A である。いくつかの実施形態では、コード領域は、ポリペプチド（例えば、タンパク質、例えば、糖タンパク質）をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、融合ポリペプチド及び / またはキメラポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、1 つの遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、複数の遺伝子産物（例えば、2、3、4、5、6、7 または

50

それ以上の遺伝子産物)をコードする。いくつかの実施形態では、コード領域は、調節RNA(例えば、siRNA、マイクロRNAなど)をコードする。

【0331】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のウイルスベクターのペイロードは、遺伝子治療ペイロードであってもよく、対象、例えば、疾患または障害を有する対象にとって有益な任意のタンパク質またはその一部をコードしていてもよい。タンパク質は、細胞外、細胞内または膜結合タンパク質であってもよい。タンパク質は、治療用タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子治療を投与する対象は、疾患または障害を有し、それにより、対象の内在性バージョンのタンパク質に欠損があるか、限られた量しか産生されないか、またはまったく産生されない。いくつかのそのような実施形態では、ペイロードは、タンパク質の非欠損型バージョンをコードする。いくつかの実施形態では、遺伝子治療を投与する対象は、標的遺伝子によって(例えば、標的遺伝子の発現レベル及び／または標的ポリペプチドの活性レベルによって)媒介される疾患または障害を有し、ペイロードは、標的遺伝子または標的ポリペプチドの阻害剤をコードする。治療用タンパク質の例として、注入可能または注射可能な治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン及びインターフェロン、成長因子、アディポカインなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0332】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、遺伝子編集成分を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、ペイロードは、切除される核酸を含んでいてもよい(例えば、ウイルスベクターがRNAガイドヌクレアーゼを標的細胞に送達する場合)。いくつかの実施形態では、遺伝子編集成分を含むペイロードは、当技術分野で公知の任意の適切なエンドヌクレアーゼをコードしていてもよい。例えば、ペイロードは、CRISPR(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート)／Cas系の1つ以上の成分をコードするか、または含み得る。

20

【0333】

ペイロード配列は、関連するウイルスベクターと互換性のある任意の長さであり得る。いくつかの実施形態では、ペイロード配列を、ウイルスから得られるか、または由来する1つ以上の配列(例えば、AAVのITR配列)に隣接させる。いくつかの実施形態では、ペイロード配列を、ウイルスベクターへのパッケージングのための配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、ペイロード配列を、ウイルス反復配列(例えば、AAVのITR配列)の間に配置する。

30

【0334】

プロモーター

いくつかの実施形態では、ペイロードは、プロモーターを含む。用語「プロモーター」とは、作動可能に連結されたコード配列(例えば、遺伝子)の転写を促進及び／または開始することができる酵素／タンパク質によって認識されるDNA配列を指す。例えば、プロモーターは一般的には、例えば、RNAポリメラーゼ及び／または任意の関連因子が結合し、そこから転写を開始することができるヌクレオチド配列を指す。したがって、いくつかの実施形態では、ペイロードは、本明細書に記載の非限定的な例のプロモーターの1つに作動可能に連結されたコード配列を含む。

40

【0335】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、哺乳動物細胞プロモーター、ウイルスプロモーター、キメラプロモーター、改変されたプロモーター、組織特異的プロモーター、または当技術分野で公知の任意の他のタイプのプロモーターである。

【0336】

様々なプロモーターが当技術分野で公知であり、本明細書で使用するすることができる。本明細書で使用するすることができるプロモーターの非限定的な例として、ヒトEF1 α 、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)(その全体が参照により本明細書に援用される米国特許

50

第5, 168, 062号)、ヒトユビキチンC (UBC)、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ1、ポリオーマアデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV40)、 β -グロビン、 β -アクチン、 α -フェトプロテイン、 γ -グロビン、 β -インターフェロン、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、マウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV)、ラウス肉腫ウイルス、ラットインスリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、メタロチオネインII (MT II)、アミラーゼ、カテプシン、MIムスカリン受容体、レトロウイルスLTR (例えば、ヒトT細胞白血病ウイルスHTLV)、AAV ITR、インターロイキン-2、コラゲナーゼ、血小板由来増殖因子、アデノウイルス5 E2、ストロメリシン、マウスMX遺伝子、グルコース調節タンパク質 (GRP78及びGRP94)、 α -2-マクログロブリン、ビメンチン、MHCクラスI遺伝子H-2Kb、HSP70、プロリフェリン、腫瘍壊死因子、甲状腺刺激ホルモンa遺伝子、免疫グロブリン軽鎖、T細胞受容体、HLA DQa及びDQ、インターロイキン-2受容体、MHCクラスII、MHCクラスII HLA-DRa、筋肉クレアチンキナーゼ、プレアルブミン (トランスサイレチン)、エラスターゼI、アルブミン遺伝子、c-fos、c-Ha-ras、神経細胞接着分子 (NCAM)、H2B (TH2B) ヒストン、ラット成長ホルモン、ヒト血清アミロイド (SAA)、トロポニンI (TN I)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ヒト免疫不全ウイルス、脾フォーカス形成ウイルス (SFFV) プロモーター、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) プロモーター、スーパーコアプロモーター (SCP)、及びテナガザル白血病ウイルス (GALV) プロモーターが挙げられる。プロモーターの追加の例は、当技術分野で公知である。例えば、Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007を参照されたい (これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に援用される)。いくつかの実施形態では、プロモーターはCMV前初期プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターまたはCAG/CBAプロモーターである。

10

20

【0337】

用語「構成的」プロモーターとは、コード配列 (例えば、タンパク質コード配列) と作動可能に連結された場合に、ほとんどまたはすべての生理学的条件下で細胞内の核酸からRNAを転写させるヌクレオチド配列を指す。

【0338】

構成的プロモーターの例として、限定されないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (例えば、Boshart et al, Cell 41: 521-530, 1985を参照のこと (その全体が参照により本明細書に援用される))、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター、及びEFL- α プロモーター (Invitrogen) が挙げられる。

30

【0339】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外来的に供給された化合物、温度などの環境要因、または例えば、急性期、細胞の特定の分化状態、もしくは複製中の細胞限定など、特定の生理学的状態の存在によって調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導系は、限定されないが、Invitrogen、Clontech、及びAriadを含む様々な商業的供給源から入手することができる。誘導性プロモーターの追加の例は、当技術分野で公知である。

40

【0340】

外来的に供給された化合物によって調節される誘導性プロモーターの例として、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン (MT) プロモーター、デキサメタゾン (Dex) 誘導性マウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、RU486誘導系、及びラパマイシン誘導系が挙げられる。

50

【0341】

用語「組織特異的」プロモーターとは、特定の細胞型及び／または組織でのみ活性である（例えば、特定の遺伝子の転写が、組織特異的プロモーターに結合する転写調節及び／または制御タンパク質を発現する細胞内でのみ起こる）プロモーターを指す。

【0342】

いくつかの実施形態では、調節配列及び／または制御配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。いくつかの場合では、組織特異的な調節配列及び／または制御配列が、組織特異的な方法で転写を誘導する組織特異的な転写因子に結合する。

【0343】

エンハンサー

いくつかの場合では、ペイロードにエンハンサー配列を含めることができる。用語「エンハンサー」とは、核酸コード配列（例えば、タンパク質）の転写レベルを上昇させることができるヌクレオチド配列を指す。エンハンサー配列（一般に50～1500bpの長さ）は、一般に、転写関連タンパク質（例えば、転写因子）に追加の結合部位を提供することにより、転写のレベルを高める。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列はイントロン配列内に存在する。プロモーター配列とは異なり、エンハンサー配列は、転写開始部位からはるかに離れた場所で作用することができる（例えば、プロモーターと比較して）。エンハンサーの非限定的な例として、RSVENハンサー、CMVENハンサー、CMV初期エンハンサー、cAMP応答エレメント（CRE）エンハンサー、及び／またはSV40エンハンサーが挙げられる。

【0344】

追加の配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のペイロードのいずれも、5'UTRまたは3'UTRなどの非翻訳領域（UTR）を含み得る。遺伝子のUTRは転写されるが、翻訳されない。5'UTRは、転写開始部位から始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンを含まない。3'UTRは、終止コドンの直後から始まり、転写終結シグナルまで続く。

【0345】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するタンパク質をコードするペイロードは、ポリアデニル化（ポリ（A））シグナル配列を含み得る。ほとんどの新生真核生物のmRNAは、その3'末端にポリ（A）テールを有し、これは、一次転写産物の切断及びポリ（A）シグナル配列によって駆動される共役ポリアデニル化反応を含む複雑なプロセス中に付加される（例えば、Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002（その全体が参照により本明細書に援用される））。ポリ（A）テールは、mRNAの安定性及び伝達性を付与する（Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994（その全体が参照により本明細書に援用される））。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列を、コード配列に対して3'に配置する。

【0346】

いくつかの実施形態では、タンパク質をコードするペイロードは、内部リボソーム進入部位（IRES）を含み得る。IRESは、複雑な二次構造を形成し、IRESが位置する場所のすぐ下流のmRNAを有する任意の位置から翻訳開始が起こることを可能にする（例えば、Pelletier and Sonenberg, Mol. Cell. Biol. 8(3):1103-1112, 1988を参照のこと）。例えば、口蹄疫ウイルス（FMDV）、脳筋炎ウイルス（EMCV）、ヒトライノウイルス（HRV）、コオロギ麻痺病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、A型肝炎ウイルス（HAV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、及びポリオウイルス（PV）由来の配列を含む、当業者に公知のいくつかのIRES配列が存在する。

【0347】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する構築物のいずれも、転写中に起こるRN

10

20

30

40

50

A プロセッシング中に機能するスプライスドナー及び／またはスプライスアクセプター配列を含み得る。いくつかの実施形態では、スプライス部位は、トランススプライシングに参与する。

【0348】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するペイロードは、レポーターポリペプチド及び／またはレポータータンパク質をコードする配列（「レポーター配列」）及び／または選択マーカをコードする配列（例えば、人工的に選択することができる形質を付与する、例えば、抵抗カセットなど）を任意選択で含み得る。レポーター配列の非限定的な例として、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質、mCherry 蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、及びルシフェラーゼをコードするDNA配列が挙げられる。レポーター配列の追加の例は、当技術分野で公知である。レポーター配列は、それらの発現を駆動する制御エレメントと結合すると、酵素、X線撮影、比色、蛍光、または他の分光学的アッセイ、蛍光標識細胞分取（FACS）アッセイ、免疫学的アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、及び免疫組織化学）を含む従来の手段によって検出可能なシグナルを提供することができる。同様に、それらの発現を駆動する制御エレメントと関連付けられる場合、選択マーカ配列は、従来の手段によって人工的に選択することもできる形質を付与することができる。

10

20

【0349】

ウイルス反復配列に関連するライブラリ構築エレメントの位置

ライブラリ構築物は、1つ以上の改変された配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、複数の改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ウイルスベクターをパッケージングするためのウイルス反復配列を含む。

【0350】

ライブラリ構築物上の1つ以上及び／または複数の改変された配列は、互いに関して、及びライブラリ構築物上のウイルス反復配列に関して、多くの位置及び／または位置の組み合わせであり得る。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団は、複数の改変された配列を含む少なくとも1つのライブラリ構築物を含み、複数の改変された配列の第1のサブセットは、ウイルス反復配列の間に配置され、複数の改変された配列の第2のサブセットは、ウイルス反復配列の外側に配置される。

30

【0351】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物上の複数の改変された配列は、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含む。いくつかの実施形態では、すべてのライブラリバリエーション及び識別子を、ウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、識別子をウイルス反復配列の間に配置し、すべてのライブラリバリエーションをウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、複数の改変された配列は、少なくとも2つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含む。いくつかの実施形態では、識別子と少なくとも1つのライブラリバリエーションをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのライブラリをウイルス反復配列の外側に配置する。

40

【0352】

いくつかの実施形態では、複数の改変された配列は、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含む。いくつかの実施形態では、すべてのライブラリバリエーション、識別子、及びペイロードを、ウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、すべての識別子及びペイロードをウイルス反復配列の間に配置し、すべてのライブラリバリエーションをウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、複数の改変された配列は、少なくとも2つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、及び少なくとも1つの識別子を含む。いくつかの実施形態では、すべての識別子、ペイロード、及び少なくとも1つのライブラリ

50

バリエーションをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのライブラリをウイルス反復配列の外側に配置する。

【0353】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのレポーター及び／または選択マーカを含む少なくとも1つの改変された配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、すべてのレポーター及び／または選択マーカをウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、すべてのレポーター及び／または選択マーカをウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのレポーター及び少なくとも1つの選択マーカの両方を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのレポーター及び少なくとも1つの選択マーカの両方を、ウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのレポーター及び少なくとも1つの選択マーカの両方を、ウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのレポーターをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つの選択マーカをウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの選択マーカをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのレポーターをウイルス反復配列の外側に配置する。

10

【0354】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのバーコードを含む少なくとも1つの改変された配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、すべてのバーコードを、ウイルス反復配列の間に配置する。いくつかの実施形態では、すべてのバーコードを、ウイルス反復配列の外側に配置する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は複数のバーコードを含み、第1のサブセットをウイルス反復配列の間に配置し、第2のサブセットをウイルス反復配列の外側に配置する。

20

【0355】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つの識別子及び少なくとも1つのバーコードを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのバーコードを識別子として使用し、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのバーコードを識別子として使用しない。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのバーコードまたはその一部を識別子として使用する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのバーコードを識別子として使用しない。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つの識別子及び少なくとも2つのバーコードを含む。いくつかの実施形態では、すべての識別子及び少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の外側に配置し、ウイルス反復配列（またはその一部）の間に配置した少なくとも1つのバーコードを、識別子として使用する。いくつかの実施形態では、すべての識別子及び少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の間に配置し、少なくとも1つのバーコードをウイルス反復配列の外側に配置し、少なくとも2つのバーコードのいずれも識別子として使用しない。

30

【0356】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも2つのバーコードを含み、少なくとも1つの追加の改変された配列をさらに含み、バーコードを識別子として使用せず、すべてのバーコードを追加の改変された配列を追跡するために使用する。例えば、いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は少なくとも2つのバーコードを含み、少なくとも1つのライブラリバリエーションをさらに含み、バーコードを識別子として使用せず、すべてのバーコードを、ライブラリバリエーションを追跡するために使用する。いくつかの実施形態では、1つのバーコードを識別子として使用し、追加のバーコードを、ライブラリバリエーションを追跡するために使用する。

40

【0357】

いくつかの実施形態では、1つのバーコードが、単一の改変された配列（例えば、単一のライブラリバリエーション）を示す。いくつかの実施形態では、1つのバーコードが、複数

50

の改変された配列（例えば、複数のライブラリバリエーション）を示す。いくつかの実施形態では、複数のバーコードが、1つの改変された配列（例えば、1つのライブラリバリエーション）を示す。いくつかの実施形態では、複数のバーコードが、複数の改変された配列（例えば、複数のライブラリバリエーション）を示す。いくつかの実施形態では、バーコードを識別子として使用せず、すべてのバーコードを、バーコードを含む他の改変された配列を追跡するために使用する。いくつかの実施形態では、1つのバーコードを識別子として使用し、追加のバーコードを、バーコードを含む他の改変された配列を追跡するために使用する。

【0358】

哺乳動物細胞における構築物の使用
構築物と改変された配列の他の機能
プロモーター

10

いくつかの実施形態では、構築物は、プロモーターを含む。用語「プロモーター」とは、作動可能に連結されたコード配列（例えば、遺伝子）の転写を促進及び／または開始することができる酵素／タンパク質によって認識されるDNA配列を指す。例えば、プロモーターは一般的には、例えば、RNAポリメラーゼ及び／または任意の関連因子が結合し、そこから転写を開始することができるヌクレオチド配列を指す。したがって、いくつかの実施形態では、改変された配列は、本明細書に記載の非限定的な例のプロモーターの1つに作動可能に連結されたコード配列を含む。

【0359】

20

いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、哺乳動物細胞プロモーター、ウイルスプロモーター、キメラプロモーター、改変されたプロモーター、組織特異的プロモーター、または当技術分野で公知の任意の他のタイプのプロモーターである。

【0360】

様々なプロモーターが当技術分野で公知であり、本明細書で 사용할 ことができる。本明細書で 사용할 ことができるプロモーターの非限定的な例として、ヒトEF1 α 、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）（その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第5,168,062号）、ヒトユビキチンC（UBC）、マウスホスホグリセリンキナーゼ1、ポリオーマアデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）、 β -グロビン、 β -アクチン、 α -フェトプロテイン、 γ -グロビン、 β -インターフェロン、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、マウス乳房腫瘍ウイルス（MMTV）、ラウス肉腫ウイルス、ラットインスリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、メタロチオネインII（MT II）、アミラーゼ、カテプシン、M1ムスカリン受容体、レトロウイルスLTR（例えば、ヒトT細胞白血病ウイルスHTLV）、AAV ITR、インターロイキン-2、コラゲナーゼ、血小板由来増殖因子、アデノウイルス5 E2、ストロメリン、マウスMX遺伝子、グルコース調節タンパク質（GRP78及びGRP94）、 α -2-マクログロブリン、ビメンチン、MHCクラスI遺伝子H-2Kb、HSP70、プロリフェリン、腫瘍壊死因子、甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子、免疫グロブリン軽鎖、T細胞受容体、HLA DQ α 及びDQ、インターロイキン-2受容体、MHCクラスII、MHCクラスII HLA-DR α 、筋肉クレアチンキナーゼ、プレアルブミン（トランスサイレチン）、エラスターゼI、アルブミン遺伝子、c-fos、c-Ha-ras、神経細胞接着分子（NCAM）、H2B（TH2B）ヒストン、ラット成長ホルモン、ヒト血清アミロイド（SAA）、トロポニンI（TN I）、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ヒト免疫不全ウイルス、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）プロモーター、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）プロモーター、スーパーコアプロモーター（SCP）、及びテナガザル白血病ウイルス（GALV）プロモーターが挙げられる。プロモーターの追加の例は、当技術分野で公知である。例えば、Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007を参照されたい（これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細

30

40

50

書に援用される)。いくつかの実施形態では、プロモーターはCMV前初期プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターまたはCAG/CBAプロモーターである。

【0361】

用語「構成的」プロモーターとは、コード配列（例えば、タンパク質コード配列）と作動可能に連結された場合に、ほとんどまたはすべての生理学的条件下で細胞内の核酸からRNAを転写させるヌクレオチド配列を指す。

【0362】

構成的プロモーターの例として、限定されないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター（例えば、Boshart et al, Cell 41:521-530, 1985を参照のこと（その全体が参照により本明細書に援用される））、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、及びEF α プロモーター(Invitrogen)が挙げられる。

【0363】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外来的に供給された化合物、温度などの環境要因、または例えば、急性期、細胞の特定の分化状態、もしくは複製中の細胞限定など、特定の生理学的状態の存在によって調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導系は、限定されないが、Invitrogen、Clontech、及びAriadを含む様々な商業的供給源から入手することができる。誘導性プロモーターの追加の例は、当技術分野で公知である。

【0364】

外来的に供給された化合物によって調節される誘導性プロモーターの例として、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオンイン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制系、テトラサイクリン誘導系、RU486誘導系、及びラパマイシン誘導系が挙げられる。

【0365】

用語「組織特異的」プロモーターとは、特定の細胞型及び／または組織でのみ活性である（例えば、特定の遺伝子の転写が、組織特異的プロモーターに結合する転写調節及び／または制御タンパク質を発現する細胞内でのみ起こる）プロモーターを指す。

【0366】

いくつかの実施形態では、調節配列及び／または制御配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。いくつかの場合では、組織特異的な調節配列及び／または制御配列が、組織特異的な方法で転写を誘導する組織特異的な転写因子に結合する。

【0367】

エンハンサー

いくつかの場合では、構築物にエンハンサー配列を含めることができる。用語「エンハンサー」とは、核酸コード配列（例えば、タンパク質）の転写レベルを上昇させることができるヌクレオチド配列を指す。エンハンサー配列（一般に50~1500bpの長さ）は、一般に、転写関連タンパク質（例えば、転写因子）に追加の結合部位を提供することにより、転写のレベルを高める。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列はイントロン配列内に存在する。プロモーター配列とは異なり、エンハンサー配列は、転写開始部位からはるかに離れた場所で作用することができる（例えば、プロモーターと比較して）。エンハンサーの非限定的な例として、RSVエンハンサー、CMVエンハンサー、CMV初期エンハンサー、cAMP応答エレメント(CRE)エンハンサー、及び／またはSV40エンハンサーが挙げられる。

【0368】

追加の配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物のいずれも、5' UTRまたは3' UTRなどの非翻訳領域(UTR)を含み得る。遺伝子のUTRは転写されるが、翻訳されない。5' UTRは、転写開始部位から始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンを含まない。3' UTRは、終止コドンの直後から始まり、転写終結シグナルまで続く。

【0369】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するタンパク質をコードする改変された配列を含む構築物は、ポリアデニル化(ポリ(A))シグナル配列を含み得る。ほとんどの新生真核生物のmRNAは、その3'末端にポリ(A)テールを有し、これは、一次転写産物の切断及びポリ(A)シグナル配列によって駆動される共役ポリアデニル化反応を含む複雑なプロセス中に付加される(例えば、Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002(その全体が参照により本明細書に援用される))。ポリ(A)テールは、mRNAの安定性及び伝達性を付与する(Molecular Biology of the Cell, Third Edition by B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994(その全体が参照により本明細書に援用される))。いくつかの実施形態では、ポリ(A)シグナル配列を、コード配列に対して3'に配置する。

10

【0370】

いくつかの実施形態では、タンパク質をコードする改変された配列を含む構築物は、内部リボソーム進入部位(IRES)を含み得る。IRESは、複雑な二次構造を形成し、IRESが位置する場所のすぐ下流のmRNAを有する任意の位置から翻訳開始が起こることを可能にする(例えば、Pelletier and Sonenberg, Mol. Cell Biol. 8(3):1103-1112, 1988を参照のこと)。例えば、口蹄疫ウイルス(FMDV)、脳心筋炎ウイルス(EMCV)、ヒトライノウイルス(HRV)、コオロギ麻痺病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、及びポリオウイルス(PV)由来の配列を含む、当業者に公知のいくつかのIRES配列が存在する。

20

【0371】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する構築物のいずれも、転写中に起こるRNAプロセッシング中に機能するスプライスドナー及び／またはスプライスアクセプター配列を含み得る。いくつかの実施形態では、スプライス部位は、トランススプライシングに関与する。

30

【0372】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する構築物のいずれも、レポーターポリペプチド及び／またはレポータータンパク質をコードする配列(「レポーター配列」)及び／または選択マーカーをコードする配列(例えば、人工的に選択することができる形質を付与する、例えば、抵抗力セットなど)を任意選択で含み得る。レポーター配列の非限定的な例として、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ(LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質、mCherry蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、及びルシフェラーゼをコードするDNA配列が挙げられる。レポーター配列の追加の例は、当技術分野で公知である。レポーター配列は、それらの発現を駆動する制御エレメントと結合すると、酵素、X線撮影、比色、蛍光、または他の分光学的アッセイ、蛍光標識細胞分取(FACS)アッセイ、免疫学的アッセイ(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、及び免疫組織化学)を含む従来の手段によって検出可能なシグナルを提供することができる。同様に、それらの発現を駆動する制御エレメントと関連付けられる場合、選択マーカー配列は、従来の手段によって人工的に選択することもできる形質を付与することができる。

40

【0373】

哺乳動物細胞改変及び細胞構築物の進入

いくつかの実施形態では、本開示は、哺乳動物細胞ライブラリを調製または取得するこ

50

とを含む方法を提供する。遺伝子改変に適した任意の方法を使用して、本開示に関して哺乳動物細胞を操作し、例えば、ライブラリ構築物を導入し、別の構築物を導入し、及び／または摂動を導入することができる。例えば、トランスフェクション、感染（例えば、ウイルス形質導入）、またはエレクトロポレーションを含む、外来性核酸（例えば、DNA）を真核細胞に導入するための多数の方法が当技術分野で公知である。

【0374】

構築物を哺乳動物細胞に送達する方法は、必要に応じて様々に異なり得る。特定の実施形態では、特定の構築物を、1つ以上のプラスミド中の核酸（例えば、DNA）構築物として送達してもよい。送達方法として、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、インパレフェクション、静水圧、持続注入、超音波処理、マグネトフェクション、化学ビヒクル（例えば、オリゴヌクレオチド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子、及び細胞透過性ペプチド）、ウイルスベクター（例えば、組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクター、例えば、複製可能型ウイルスベクター、複製不能型ウイルスベクター、複製能欠失型ウイルスベクター、複製欠損型ウイルスベクター、複製可能型ウイルスベクター、及び／または複製条件付きウイルスベクター）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0375】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリを、ライブラリ構築物及び／または他の構築物を含むように遺伝子改変する。ライブラリ構築物及び／または他の構築物を、例えば核酸操作の当業者に公知であり、遺伝子改変、組換え改変、及び合成技術を含む、任意の適切な方法によって送達してもよい（例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照のこと（その全体が参照により本明細書に援用される））。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ライブラリ構築物を含む1つ以上の核酸をライブラリの哺乳動物細胞にトランスフェクトすることを含む。

【0376】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリを、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含むように遺伝子改変する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現及び／または産生する哺乳動物細胞ライブラリは、トランスで哺乳動物細胞に提供される1つ以上のウイルスベクター成分を有していてもよい。例えば、本開示のAAVベクターを産生するために必要な組換えAAV構築物及び／または改変された配列、rep配列、cap配列、及びヘルパー機能を、任意の適切な構築物を使用してパッケージング宿主細胞に送達してもよい。

【0377】

ウイルスエレメントをコードする構築物を、例えば核酸操作の当業者に公知であり、遺伝子改変、組換え改変、及び合成技術を含む、任意の適切な方法によって送達してもよい（例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照のこと（その全体が参照により本明細書に援用される））。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルス構築物を含むか、またはウイルスベクター成分をコードする1つ以上の核酸をライブラリの哺乳動物細胞にトランスフェクトすることを含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクターをコードする核酸分子（複数可）を含むか、またはそれから本質的になる1つ以上のプラスミド（複数可）をトランスフェクトすることを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター成分は、細胞にトランスフェクトする1つ以上のプラスミドに含まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター成分は、細胞にそれぞれトランスフェクトする1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のプラスミドに含まれる。

【0378】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）であり、

ウイルスのトランスフェクションは、AAVベクターをコードする核酸分子（複数可）を含むか、またはそれから本質的になるプラスミド（複数可）を哺乳動物細胞にトランスフェクトし、AAVベクターの複製及びパッケージングに必須である、AAVベクターのrep及び／またはcapを供給することを含む。いくつかの実施形態では、AAVベクターの成分をそれぞれ含む1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のプラスミドを細胞にトランスフェクトする。いくつかの特定の実施形態では、組み合わせて、ヘルパーウイルス、パイロード（例えば、治療遺伝子）、rep及び／またはcapを含む様々なAAV成分を提供するプラスミド（例えば、1～5個のプラスミド、例えば、3個のプラスミド）を細胞にトランスフェクトする。

【0379】

いくつかの特定の実施形態では、AAV構築物のウイルストランスフェクションは、三重トランスフェクション法を使用して実施してもよい（例えば、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第6,001,650号に記載されるように）。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、rep配列及び／またはcap配列を含むがこれらに限定されないAAVベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む1つ以上の構築物及び／またはヘルパー機能を含む構築物で宿主細胞をトランスフェクトすることによって産生される。いくつかの実施形態では、rep配列及びcap配列は、生産的なAAVベクターの複製及びキャプシド形成のために、トランスで機能する。いくつかの実施形態では、rep配列及び／またはcap配列を含む構築物は、検出可能な野生型AAVベクター（すなわち、機能的なrep遺伝子及びcap遺伝子を含むAAVベクター）を生成することなく、効率的なAAV構築物の産生をサポートする。ヘルパー機能構築物は、非AAV由来ウイルス機能及び／または細胞機能のためのヌクレオチド配列をコードし、AAVベクターは複製依存的であり、それは、限定されないが、AAVベクターの遺伝子転写の活性化に関与する部分、ステージ特異的AAVベクターmRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の合成、及び／またはAAVベクターキャプシド集合体を含むAAV構築物の複製に必要なそれらの機能を含み得る。これらのウイルスベースの機能は、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外）、及びワクシニアウイルスなどの任意の既知のヘルパーウイルスから得ることができる。

【0380】

いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターが哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞に再感染するのを防ぐことが有益であり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞（複数可）は、産生されるウイルスベクターの受容体（複数可）を破壊するかまたは除去するように改変されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、感染／遮断剤で処理されている。

【0381】

例えば、いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターは、AAVベクターであるか、またはそれを含み、哺乳動物細胞ライブラリは、AAVの受容体を破壊または除去するように、事前にまたは同時に遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターは、レンチウイルスベクターであるか、またはそれを含み、哺乳動物細胞ライブラリは、レンチウイルスの受容体を破壊または除去するように、事前にまたは同時に遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、レンチウイルスベクターの感染を遮断する薬剤で処理されている。そのような実施形態では、組み込みベクター及び／またはシス作用性組み込み配列は、レンチウイルス由来ではない。

【0382】

哺乳動物細胞における構築物及び改変された配列の位置

本明細書に記載の構築物のいずれも、哺乳動物細胞の染色体外に存在させてもよく、及び／または哺乳動物細胞ゲノムに組み込んでもよい。

【0383】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、エピソームであり、及び／または哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、エピソ

10

20

30

40

50

ームである単一の連続構築物である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれる単一の連続構築物である。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、1つ以上の個々の構築物はエピソードである。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、1つ以上の個々の構築物を哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続であり、少なくとも1つの構築物はエピソードであり、少なくとも1つの構築物を哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。

【0384】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の配列を、哺乳動物細胞内の染色体外（例えば、エピソード）に存在させる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の配列を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込む。

10

【0385】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の配列を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込み、1つ以上の配列を誘導的に発現させる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須のすべての配列を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込み、1つ以上の配列を誘導的に発現させる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須のすべての配列を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込み、2つ以上の配列を誘導的に発現させる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの産生に必須のすべての配列を、哺乳動物細胞のゲノムに組み込み、すべての配列を誘導的に発現させる。

【0386】

配列を組み込むための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。いくつかの実施形態では、組み込みは、標的化組み込み（例えば、所定の部位での）である。いくつかの実施形態では、組み込みは、ランダムな組み込み（例えば、ランダムな部位での）である。いくつかの実施形態では、組み込みは、ゲノム位置の所定のサブセット内でランダムである。

20

【0387】

いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列（例えば、ライブラリ構築物及び／または他の構築物）を、当技術分野で公知の方法を使用して哺乳動物ライブラリの細胞に事前に組み込む。いくつかの実施形態では、1つ以上の組み込まれた配列を有する哺乳動物細胞に、ウイルスベクターをコードする配列をトランスフェクトする。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスベクター配列もゲノムに組み込む。

30

【0388】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを培養するための哺乳動物細胞ライブラリは、当業者に公知の方法を使用して、1つ以上のそのようなウイルス成分（例えば、組換えAAV構築物、rep配列、cap配列、及び／またはヘルパー機能）を含むように安定に改変してもよい。いくつかの実施形態では、そのような安定な哺乳動物細胞は、誘導性プロモーターの制御下にあるそのようなウイルスベクター成分（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、そのようなウイルスベクター成分（複数可）は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。いくつかの実施形態では、選択された安定な哺乳動物細胞は、構成的プロモーターの制御下にある選択された成分（複数可）及び1つ以上の誘導性プロモーターの制御下にある他の選択された成分（複数可）を含み得る。例えば、構成的プロモーターの制御下のE1ヘルパー機能、ならびに誘導性プロモーターの制御下のrep遺伝子及び／またはcap遺伝子を含む、例えば、安定な哺乳動物細胞。他の安定な哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞ライブラリを作製するための基礎として日常的な方法を使用して、当業者によって生成され得る。次いで、そのような安定発現哺乳動物細胞株を、識別子配列を含む様々な異なる改変された配列を含むように操作して、それによってウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリを生成してもよい。

40

【0389】

いくつかの実施形態では、外来性DNA（例えば、ライブラリ構築物）をゲノムDNAに組み込み、それによって外来性DNAを哺乳動物細胞のゲノムDNAに隣接させる。い

50

くつかの実施形態では、組み込みは、細胞にとって内在性の天然のDNA修復メカニズムによって媒介される。例えば、外来性DNAを細胞に導入し、部位特異的ヌクレアーゼに組み込み部位を作成させ、ドナーDNAを組み込むことにより、組み込みをシンプルに行うことができる。DNAを組み込むのに十分な時間、細胞を培養状態に保持してもよい。これは通常、(i) 部位特異的ヌクレアーゼによって作成した組み込み部位に外来性DNAを組み込んだ組換え細胞、及び任意選択で(ii) 所望の組み込み部位以外の部位に、外来性DNAを組み込んでいる細胞、及び／または任意選択で(iii) 外来性DNAが組み込まれていない細胞を含む、細胞の混合集団をもたらす。当技術分野で公知の選択方法を使用して、ライブラリ中の遺伝子組成物を有する細胞を濃縮してもよい。

10

【0390】

エピソードライブラリ構築物

いくつかの実施形態では、本開示は、1つ以上の構築物（例えば、ライブラリ構築物及び／またはウイルスベクターの産生に必須の配列をコードする構築物）を、哺乳動物細胞ゲノムに組み込まず、エピソードとして存在させる哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞にエピソード構築物を導入するための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。

【0391】

いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物細胞にエピソードとして存在させる。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の1つ以上の個々の構築物を、哺乳動物細胞においてエピソードとして存在させる（例えば、識別子及びウイルスパッケージング配列を含む構築物）。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物のすべての個々の構築物を、哺乳動物細胞においてエピソードとして存在させる。

20

【0392】

いくつかの実施形態では、外来性核酸（例えば、DNA）を、標準的なトランスフェクションまたはエレクトロポレーション法によって哺乳動物細胞に導入することができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞に導入した外来性核酸を、単一、低コピー数または高コピー数でエピソードとして細胞内に存在させることができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞に導入した外来性核酸を、可変コピー数でゲノム上及び／またはエピソードとして存在させてもよい。当技術分野で公知の選択方法及び／またはスクリーニング方法を使用して、細胞をエピソード構築物（例えば、ライブラリ構築物）で濃縮してもよい。

30

いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリによって生成されたウイルスベクターのプールを使用して哺乳動物細胞をトランスフェクトし、第2の哺乳動物細胞ライブラリを生成する。いくつかの実施形態では、第2の哺乳動物細胞ライブラリは、ライブラリバリエーションをエピソードとして発現する。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリによって生成されるウイルスベクターのプールは、AAVベクターのプールである。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリによって生成されたAAVベクターのプールを使用して、哺乳動物細胞に形質導入し、識別子をエピソードを含む第2の哺乳動物細胞ライブラリを生成する。

【0393】

組み込まれたライブラリ構築物

いくつかの実施形態では、本開示は、1つ以上の構築物（例えば、ライブラリ構築物及び／またはウイルスベクターの産生に必須の配列をコードする構築物）を哺乳動物細胞ゲノムに組み込んだ、哺乳動物細胞を提供する。配列を組み込むための当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。

【0394】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内への構築物（例えば、ライブラリ構築物）の組み込みは、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列によって媒介される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、(i) 組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクター、(ii) リコンビナーゼ、(iii)

40

50

）ヌクレアーゼ、（i v）トランスポザーゼ、及び／またはその誘導体及び／またはその融合体を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内への構築物（例えば、ライブラリ構築物）の組み込みは、少なくとも1つのシス作用性組み込み配列と協調した少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列によって媒介される。いくつかの実施形態では、シス作用性組み込み配列は、（i）ウイルス反復配列、（i i）リコンビナーゼ認識部位、（i i i）相同性アーム、及び／または（i v）トランスポザーゼ認識部位及び／またはその誘導体を含む。

【0395】

いくつかの実施形態では、哺乳動物ゲノムに組み込ませる構築物（例えば、ライブラリ構築物）は、組み込ませる配列に隣接する少なくとも1対のシス作用性組み込み配列を含む。例えば、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列の第1のセットを含むライブラリ構築物を提供し、ウイルス反復配列の第1のセットは、シス作用性組み込み配列に隣接する。

【0396】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノムへの構築物の組み込みは、標的化された組み込みである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノムへの構築物の組み込みは、ランダム組み込みである。いくつかの実施形態では、構築物を、ランダム挿入部位で哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ランダムな挿入部位は、ゲノム位置の所定のサブセット内でランダムである。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内へのライブラリ構築物の挿入は、所定の挿入部位を含む。

【0397】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物（例えば、ライブラリ構築物に関連する1つ以上の個々の核酸）を、哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、単一の連続ライブラリ構築物を、哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の1つ以上の個々の構築物を、哺乳動物ゲノムに組み込む（例えば、識別子及びウイルスパッケージング配列を含む構築物）。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物のすべての個々の構築物を哺乳動物ゲノムに組み込む。

【0398】

いくつかの実施形態では、外来性核酸（例えば、DNA）を、標準的なトランスフェクションまたはエレクトロポレーション法によって哺乳動物細胞に導入することができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞に導入した外来性核酸を、単一、低コピー数または高コピー数でゲノムに組み込み、及び／または細胞内に単一、低コピー数または高コピー数でエピソームとして存在させることができる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞に導入した外来性核酸は、可変コピー数でゲノム上及び／またはエピソーム上に存在し得る。当技術分野で公知の選択方法及び／またはスクリーニング方法を使用して、細胞を組み込み構築物（例えば、ライブラリ構築物）で濃縮してもよい。

【0399】

ウイルス形質導入を介した組み込み

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、ウイルス形質導入媒介組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、例えば、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列の第1のセットを含むライブラリ構築物を提供し、ウイルス反復配列の第1のセットは、ウイルス反復配列の第2のセットを含むシス作用性組み込み配列に隣接する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、組み込みウイルスベクター及び／または組み込み構築物を含み、組み込みウイルスベクターは、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、スプマレトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはその誘導体である。

【0400】

いくつかの実施形態では、組み込みウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、レンチウイルス組み込みベクターは、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、

ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするためのAAV ITR）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の第1のセットは、ウイルス反復配列の第2のセットを含むシス作用性組み込み配列（例えば、ライブラリ構築物またはその一部を哺乳動物ゲノムに組み込むためのレンチウイルスLTR）に隣接する。

【0401】

ライブラリ構築物のレンチウイルス形質導入媒介組み込みのいくつかの例示的なシナリオを以下の表4に示す。表4の実施形態のそれぞれは、単一の連続ライブラリ構築物または不連続ライブラリ構築物に関するものであり得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、識別子を含む個々の構築物をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、ライブラリ構築物の2つ以上の個々の構築物を、レンチウイルス形質導入を介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の個々の構築物のすべてを、レンチウイルス形質導入を介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。

【0402】

【表4】

表4－レンチウイルス形質導入を介した組み込みの例示的なシナリオ

シナリオ	ライブラリバリエーション	位置	シス作用性組み込み配列	トランス作用性組み込み配列
AAV-in-lenti を介した gRNA KO ライブラリの組み込み	レンチウイルス形質導入によって導入された gRNA	ランダム組み込み	ウイルスパッケージング配列に隣接する LTR(例えば、AAV ITR)	組み込みウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)
AAV-in-lenti を介した gRNA SNP ライブラリの組み込み	レンチウイルス形質導入によって導入された gRNA	ランダム組み込み	ウイルスパッケージング配列に隣接する LTR(例えば、AAV ITR)	組み込みウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)
AAV-in-lenti を介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み	レンチウイルス形質導入によって導入された gRNA	ランダム組み込み	ウイルスパッケージング配列に隣接する LTR(例えば、AAV ITR)	組み込みウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)
AAV-in-lenti を介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み	レンチウイルス形質導入によって導入された gRNA	ランダム組み込み	ウイルスパッケージング配列に隣接する LTR(例えば、AAV ITR)	組み込みウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)
AAV-in-lenti を介した 挿入ライブラリの組み込み	レンチウイルス形質導入によって導入された ORF	ランダム組み込み	ウイルスパッケージング配列に隣接する LTR(例えば、AAV ITR)	組み込みウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)

【0403】

ヌクレアーゼを介した組み込み

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、ヌクレアーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、例えば、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列の第1のセットを含むライブラリ構築物を提供し、ウイルス反復配列の第1のセットは、相同性アームを含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0404】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、Cas9、CasZ、Cpf1、TALENタンパク質（TALEN）またはジンクフィンガータンパク質（ZFN）などのプログラム可能なDNA結合ドメインへの改変されたFokIヌクレアーゼドメイン融合体、及び／またはメガヌクレアーゼ、及び／またはその誘導体を含む、ヌクレアーゼ及び／またはその融合体及び／またはその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、Cas9であるか、またはそれを含む。

10

【0405】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインとDNA切断ドメインを組み合わせることによって生成される人工制限酵素である。ZFNで最も一般的な切断ドメインは、IIS型制限エンドヌクレアーゼFokI由来の非特異的切断ドメインであり、ガイド配列を使用して標的とすることができる。ZFNを使用する方法は、例えば、WO2009146179A1、WO2008060510A2及びCN102174576Aに記載されており、これらはその全体が参照により援用される。

20

【0406】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を含む。TALENは、DNAの特定の配列を切断するように改変することができる制限酵素である。TALENを使用する方法は、例えば、WO2014134412A1、WO2013163628A2及びWO2014040370A1に記載されており、これらはその全体が参照により援用される。

【0407】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、非RNAガイドヌクレアーゼ及び／またはその融合体及び／または誘導体を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内へのライブラリ構築物の挿入は、少なくとも2つのトランス作用性組み込み配列によって媒介され、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、RNAガイドヌクレアーゼ及び／またはその融合体及び／または誘導体を含み、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、gRNA配列を含む。

30

【0408】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内へのライブラリ構築物の挿入は、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列によって媒介され、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、ヌクレアーゼ（例えば、RNAガイドヌクレアーゼまたは非RNAガイドヌクレアーゼ）及び／またはその融合体及び／または誘導体を含み、ライブラリ構築物は、相同性アームである少なくとも1対のシス作用性組み込み配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つのウイルスパッケージング配列（例えば、ウイルス反復配列）の間に識別子及び／またはペイロードを含み、そのすべては、相同性アーム配列を含むシス作用性組み込み配列の間に位置する。

40

【0409】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内へのライブラリ構築物の挿入は、少なくとも2つのトランス作用性組み込み配列によって媒介され、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、ヌクレアーゼ（例えば、RNAガイドヌクレアーゼ）及び／またはその融合体及び／または誘導体を含み、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、gRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、2つのウイル

50

スパッケージング配列（例えば、ウイルス反復配列）の間に識別子及び／またはペイロードを含み、そのすべては、相同性アーム配列を含むシス作用性組み込み配列の間に位置する。

【0410】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、ヌクレアーゼを介した組み込みによって（例えば、CRISPR／Cas9を使用して）哺乳動物細胞のゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物の組み込みは、細胞にとって内在性の天然のDNA修復メカニズムによって媒介される。例えば、外来性DNAを細胞に導入し、部位特異的ヌクレアーゼに組み込み部位を作成させ、ドナーDNAを組み込むことにより、組み込みをシンプルに行うことができる。

10

【0411】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ゲノム内へのライブラリ構築物の挿入は、Cas9によって媒介される。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、AAV ITR配列間に識別子及び／またはペイロードを含み、そのすべては、相同性アーム配列を含むシス作用性組み込み配列の間に位置する。

【0412】

ライブラリ構築物のヌクレアーゼを介した組み込みのいくつかの例示的なシナリオを以下の表5に示す。表5の実施形態のそれぞれは、単一の連続ライブラリ構築物または不連続ライブラリ構築物に関するものであり得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、識別子を含む個々の構築物をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、ライブラリ構築物の2つ以上の個々の構築物を、ヌクレアーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の個々の構築物のすべてを、ヌクレアーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。

20

【0413】

30

40

50

【表 5】

表5－ヌクレアーゼを介した組み込みの例示的なシナリオ

シナリオ	ライブラリバリエーション	位置	シス作用性組み込み配列	トランス作用性組み込み配列
CRISPR を介した gRNA KO ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	相同性アーム	ヌクレアーゼ(例えば、Cas)及び gRNA
CRISPR を介した gRNA SNP ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	相同性アーム	ヌクレアーゼ(例えば、Cas)及び gRNA
CRISPR を介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	相同性アーム	ヌクレアーゼ(例えば、Cas)及び gRNA
CRISPR を介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	相同性アーム	ヌクレアーゼ(例えば、Cas)及び gRNA
CRISPR を介した挿入ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された ORF	標的化	相同性アーム	ヌクレアーゼ(例えば、Cas)及び gRNA

10

20

30

【0414】

リコンビナーゼを介した組み込み

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、リコンビナーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、例えば、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列の第1のセットを含むライブラリ構築物を提供し、ウイルス反復配列の第1のセットは、リコンビナーゼ認識部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0415】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、リコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼは、Cre、Flp、Dre、PhiC31、及び／またはBxb1、及び／またはその誘導体及び／または融合体を含む。

40

【0416】

いくつかの実施形態では、トランス作用性組み込み配列は、Creを含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、Creは、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするためのAAV ITR）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の第1のセットは、LoxP部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

50

【0417】

いくつかの実施形態では、トランス作用性組み込み配列は、B x b 1を含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、B x b 1は、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするためのAAV ITR）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の第1のセットは、A t t部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0418】

いくつかの実施形態では、トランス作用性組み込み配列は、F l pを含むリコンビナーゼを含む。いくつかの実施形態では、F l pは、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするためのAAV ITR）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の第1のセットは、F r t部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0419】

ライブラリ構築物のリコンビナーゼを介した組み込みのいくつかの例示的なシナリオを以下の表6に示す。表6の実施形態のそれぞれは、単一の連続ライブラリ構築物または不連続ライブラリ構築物に関するものであり得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、識別子を含む個々の構築物をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、ライブラリ構築物の2つ以上の個々の構築物を、リコンビナーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の個々の構築物のすべてを、リコンビナーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。

【0420】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6ーリコンビナーゼを介した組み込みの例示的なシナリオ

シナリオ	ライブラリバリエーション	位置	シス作用性組み込み配列	トランス作用性組み込み配列
リコンビナーゼを介した gRNA KO ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	LoxP、Att、Frt などの認識部位	Cre、Bxb1、Flp などのリコンビナーゼ
リコンビナーゼを介した gRNA SNP ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	LoxP、Att、Frt などの認識部位	Cre、Bxb1、Flp などのリコンビナーゼ
リコンビナーゼを介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	LoxP、Att、Frt などの認識部位	Cre、Bxb1、Flp などのリコンビナーゼ
リコンビナーゼを介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	標的化	LoxP、Att、Frt などの認識部位	Cre、Bxb1、Flp などのリコンビナーゼ
リコンビナーゼを介した挿入ライブラリの組み込み	トランスフェクションにより導入された ORF	標的化	LoxP、Att、Frt などの認識部位	Cre、Bxb1、Flp などのリコンビナーゼ

10

20

30

【0421】

トランスポザーゼを介した組み込み

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を、トランスポザーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、例えば、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列の第1のセットを含むライブラリ構築物を提供し、ウイルス反復配列の第1のセットは、トランスポザーゼ認識部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0422】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列は、トランスポザーゼを含む。いくつかの実施形態では、トランスポザーゼは、Sleeping beauty トランスポザーゼ及び／または Piggyback トランスポザーゼ及び／またはその誘導体及び／または融合体を含む。

40

【0423】

いくつかの実施形態では、トランス作用性組み込み配列は、Sleeping beauty トランスポザーゼを含むトランスポザーゼを含む。いくつかの実施形態では、Sleeping beauty トランスポザーゼは、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするための AAV ITR）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の

50

第1のセットは、トランスポザーゼ認識部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0424】

いくつかの実施形態では、トランス作用性組み込み配列は、P i g g y b a cトランスポザーゼを含むトランスポザーゼを含む。いくつかの実施形態では、P i g g y b a cトランスポザーゼは、ライブラリ構築物またはその一部の哺乳動物細胞ゲノムへの組み込みを媒介する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、識別子及び／またはペイロードに隣接するウイルス反復配列（例えば、AAVベクターをパッケージングするためのAAV I T R）の第1のセットを含み、ウイルス反復配列の第1のセットは、トランスポザーゼ認識部位を含むシス作用性組み込み配列に隣接する。

【0425】

ライブラリ構築物のトランスポザーゼを介した組み込みのいくつかの例示的なシナリオを以下の表7に示す。表7の実施形態のそれぞれは、単一の連続ライブラリ構築物または不連続ライブラリ構築物に関するものであり得る。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、識別子を含む個々の構築物をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は不連続なライブラリ構築物であり、ライブラリ構築物の2つ以上の個々の構築物を、トランスポザーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物の個々の構築物のすべてを、トランスポザーゼを介した組み込みによって哺乳動物ゲノムに組み込む。

【0426】

10

20

30

40

50

【表 7】

表7—トランスポザーゼを介した組み込みの例示的なシナリオ

シナリオ	ライブラリバリエーション	位置	シス作用性組み込み配列	トランス作用性組み込み配列
トランスポザーゼを介した gRNA KO ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	ランダム	認識部位	Piggybac または Sleepingbeauty などのトランスポザーゼ
トランスポザーゼを介した gRNA SNP ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	ランダム	認識部位	Piggybac または Sleepingbeauty などのトランスポザーゼ
トランスポザーゼを介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	ランダム	認識部位	Piggybac または Sleepingbeauty などのトランスポザーゼ
トランスポザーゼを介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された gRNA	ランダム	認識部位	Piggybac または Sleepingbeauty などのトランスポザーゼ
トランスポザーゼを介した挿入ライブラリの組み込み	トランスフェクションによって導入された ORF	ランダム	認識部位	Piggybac または Sleepingbeauty などのトランスポザーゼ

【0427】

哺乳動物細胞

本開示は、本明細書に記載の方法を使用して同定及び／または産生される哺乳動物細胞を提供する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、ウイルスベクターを発現する。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のポリヌクレオチドを含む。

【0428】

本開示はまた、本明細書に記載のウイルスベクター、構築物、及び／または組成物のいずれかを含む哺乳動物細胞を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、(i) 識別子、(ii) 改変された配列、及び (iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントを含む哺乳動物細胞を提供する。

【0429】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、(i) ウイルスパッケージング配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAV ITR）の間に配置された識別子、(ii) 摂動及び／または摂動アクセサリ配列を含む改変された配列、及び (iii) ウイルスベクターの生産に必須の1つ以上のエレメントを含む。いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、(i) ライブラリ構築物、及び (ii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上のエレメントを含み、ライブラリ構築物は、ウイルスパッケージング

配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、A A V I T R）の間に配置された識別子、及び任意選択でライブラリバリエーション及び／またはシス作用性組み込み配列を含む。

【0430】

いくつかの実施形態では、提供する技術は、ウイルスベクターが識別子を取り込む（例えば、ウイルスベクターゲノムにおいて、例えば、ウイルス反復配列間で）ユニークなアプローチを含む。したがって、ライブラリの哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターは、それぞれ識別子を含む。これにより、ウイルスベクターを直接的に特徴決定し、それを産生した哺乳動物細胞を同定することができる。

【0431】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ペイロード及び識別子（例えば、ウイルスベクター核酸中の）を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター核酸の配列決定により、ウイルスベクタープール中の識別子（例えば、バーコード及び／またはライブラリバリエーション）の存在量を同定することができる。理論に拘泥することを望むものではないが、識別子の存在量は、改変された配列をウイルスベクター発現の変化などの表現型の変化と結び付けることができる。例えば、ウイルスベクタープール中の識別子が豊富に存在することにより、ウイルスベクター産生が向上している可能性がある（例えば、その識別子に対応する）ライブラリバリエーション（及び結果として生じる摂動）を含む細胞を同定することができる。

【0432】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、（i）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の間に配置された識別子、（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、哺乳動物細胞は、少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、識別子は、ユニークなライブラリバリエーション（例えば、ガイド配列、ORFなど）を含む。いくつかの実施形態では、識別子はバーコードを含み、哺乳動物細胞はさらに1つ以上のライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ライブラリ構築物及びウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む。

【0433】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞に（i）ライブラリ構築物及び（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を導入することによって産生される。

【0434】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の方法を使用して同定される摂動を含むように改変されている哺乳動物細胞を提供する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、本開示の方法を使用して同定される1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個またはそれ以上の摂動を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、1つ以上の摂動（例えば、ウイルスベクター産生に影響を与えるもの）及びウイルスベクターの産生に必須の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、（i）1つ以上の摂動を含み、（ii）ペイロードを送達するウイルスベクターを産生する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は識別子を含まない（例えば、識別子が除去されており、及び／または同定された摂動を有する哺乳動物細胞が改変されている）。

【0435】

いくつかの実施形態では、（i）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された識別子を含むライブラリ構築物、及び（ii）ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞（複数可）を提供し、その場合、ライブラリ構築物は識別子を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つの摂動及び／または少なくとも1つのライブラリ

10

20

30

40

50

バリエーションをさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのペイロードをさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列をさらに含む。

【0436】

当技術分野で公知の任意の適切な哺乳動物細胞株を、本開示に関して改変し、またはスクリーニングすることができる。ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞には、当技術分野で公知の任意の哺乳動物細胞型が含まれ得る。代表的な哺乳類細胞として、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞（例えば、HEK293細胞、HEK293T細胞、Exp1293細胞）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞（例えば、HeLa S3細胞）、PER.C6細胞、HKB11細胞、CAP細胞、ベビーハムスター腎線維芽細胞（BHK細胞）（例えば、BHK-21細胞）、マウスミエローマ細胞（例えば、Sp2/0細胞及びNS0細胞）、アフリカミドリサル腎臓細胞（例えば、COS細胞及びVero細胞）、A549細胞、アカゲザル胎児肺細胞（例えば、FRhL-2細胞）、及びそれらの任意の誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ウイルスのライフサイクルをサポートすることができる。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、高度にトランスフェクト可能である。

10

【0437】

ウイルス産生のための哺乳動物細胞は、当技術分野で公知である。そのような細胞の代表的な例として、ヒト胎児腎臓（HEK）293細胞及びその誘導体（例えば、293T株、293SF-3F6株）、HeLa細胞、A549細胞、KB細胞、CKT1細胞、NIH/3T3細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはウイルスのライフサイクルをサポートする任意の真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0438】

いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞はCHO細胞である。CHO細胞には、CHO-K1、CHO-S、CHO-DG44、及びCHO-DXB11など、様々な系統がある。いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞はHEK293細胞である。いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞はHEK293T細胞である。いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞はHeLa細胞である。

30

【0439】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、接着細胞培養に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を接着細胞培地で培養する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を無血清条件下で増殖することができる。

【0440】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、浮遊細胞培養に適している。いくつかの実施形態では、浮遊細胞培養に適した哺乳動物細胞は、CHO細胞（例えば、CHO-K1、CHO-S、CHO-DG44、及び／またはCHO-DXB11細胞）、HEK293細胞（例えば、293SF、3F6、293T）、HeLa細胞、及びその誘導体である。いくつかの特定の実施形態では、哺乳動物細胞を、無血清条件下の懸濁液中で培養することができる。いくつかの実施形態では、HEK293細胞は、無血清条件下の懸濁液中で増殖する能力を有する。

40

【0441】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を、浮遊細胞培養で培養する。いくつかの実施形態では、浮遊細胞培養用の哺乳動物細胞は、大量培養（例えば、容量1L以上、容量2L以上、容量3L以上、容量4L以上、容量5L以上、容量10L以上、容量20L以上

50

、容量 30 L 以上、容量 40 L 以上、容量 50 L 以上、容量 60 L 以上、容量 70 L 以上、容量 80 L 以上、容量 90 L 以上、容量 100 L 以上、容量 200 L 以上、容量 300 L 以上、容量 400 L 以上、または容量 500 L 以上) に適している。

【0442】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞株は、生物製剤（例えば、ウイルスベクター）の製造に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞株は、生物製剤の工業規模の製造における使用に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞株は、国内規制基準（例えば、FDA 及び／または EMA の規制基準）に準拠する製造方法での使用に適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞株は、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）を使用して生物製剤（例えば、ウイルスベクター）を製造するのに適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞株は、優良医薬品製造基準（GMP）を使用して生物製剤（例えば、ウイルスベクター）を製造するのに適している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞株は、非優良医薬品製造基準（非 GMP）を使用して生物製剤（例えば、ウイルスベクター）を製造するのに適している。

10

【0443】

摂動

本開示は、哺乳動物細胞、産生されるウイルスベクター、ウイルスベクターの産生に必須のポリヌクレオチド、及び／または 1 つ以上の摂動を含む他の構築物を提供する。これらは、ウイルスベクターの発現及び／または産生のために、本開示の哺乳動物細胞ライブラリから生成、産生、同定及び／または選択される。本明細書で使用する場合、摂動は、本明細書に記載の方法から生じる、及び／または同定される、哺乳動物細胞、産生されるウイルスベクター、ウイルスベクターの産生に必須のポリヌクレオチド、及び／または他の構築物における遺伝子改変を含む。

20

【0444】

いくつかの実施形態では、摂動は、1 つ以上のライブラリバリエーションの結果である。いくつかの実施形態では、摂動は遺伝子改変であり、これは、ライブラリバリエーションの結果ではなく、本明細書に記載の方法から生じ、及び／または同定される遺伝子改変である。いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドにおける遺伝子改変を含む。

【0445】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターの集団内で、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターはそれぞれ、複数のユニークな摂動を含む少なくとも 1 つの改変された配列を個別に含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターの集団内で、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターはそれぞれ、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つまたは 9 つのユニークな摂動を含む少なくとも 1 つの改変された配列を個別に含む。

30

【0446】

いくつかの実施形態では、摂動には、哺乳動物細胞における改変された配列、産生されるウイルスベクター、ウイルスベクターの産生に必須のポリヌクレオチド、及び／またはゲノム配列の変化（例えば、ゲノム挿入、欠失またはノックアウト、置換（例えば、SNP）、変換、再編成など）、エピソーム配列の変化（例えば、挿入、欠失またはノックアウト、SNP（置換）、交換、再編成など）、及び／またはエピジェネティックな修飾（例えば、活性化、抑制など）が含まれる。いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクター内の改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドにおける改変された配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞及び／または方法によって産生されるウイルスベクターは、摂動を含む。

40

【0447】

いくつかの実施形態では、摂動は、内在性コード配列への改変を含む。いくつかの実施形態では、内在性コード配列は、内在性遺伝子または遺伝子セグメントを含む。いくつか

50

の実施形態では、摂動は、内在性調節エレメントへの改変を含み、調節エレメントは、少なくとも1つのプロモーター配列及び／または少なくとも1つのエンハンサー配列を含む。

【0448】

摂動の種類

いくつかの実施形態では、摂動には、1つ以上のゲノム及び／またはエピソーム修飾が含まれる。いくつかの実施形態では、摂動には、1つ以上の欠失またはノックアウト、SNP（置換）、変換、挿入、再編成、及び／またはエピジェネティック修飾（例えば、活性化（例えば、1つ以上の遺伝子の活性化）及び／または抑制（例えば、1つ以上の遺伝子の抑制））が含まれる。

10

【0449】

いくつかの実施形態では、摂動には、ゲノムまたはエピソームの欠失またはノックアウトが含まれる。いくつかの実施形態では、ゲノムまたはエピソームの欠失またはノックアウトを含む摂動は、gRNA欠失またはノックアウトライブラリの一部である1つ以上のライブラリバリエーションの発現から生じる。いくつかの実施形態では、ゲノムまたはエピソームの欠失またはノックアウトを含む摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因しない。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを、任意の適切な手段によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、gRNA欠失またはKOライブラリの一部であるライブラリ構築物に含まれる。

【0450】

いくつかの実施形態では、摂動には、ゲノムまたはエピソームSNPが含まれる。いくつかの実施形態では、ゲノムSNPまたはエピソームSNPを含む摂動は、gRNA SNPライブラリの一部である1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因する。いくつかの実施形態では、ゲノムSNPまたはエピソームSNPを含む摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因しない。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを、任意の適切な手段によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、gRNA SNPライブラリの一部であるライブラリ構築物に含まれる。

20

【0451】

いくつかの実施形態では、摂動は、ゲノム活性化またはエピソーム活性化（例えば、1つ以上の遺伝子の）を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム活性化またはエピソーム活性化を含む摂動は、gRNA活性化ライブラリの一部である1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因する。いくつかの実施形態では、ゲノム活性化またはエピソーム活性化を含む摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因しない。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを、任意の適切な手段によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、gRNA活性化ライブラリの一部であるライブラリ構築物に含まれる。

30

【0452】

いくつかの実施形態では、摂動は、ゲノム抑制またはエピソーム抑制（例えば、1つ以上の遺伝子の）を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム抑制またはエピソーム抑制を含む摂動は、gRNA抑制ライブラリの一部である1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因する。いくつかの実施形態では、ゲノム抑制またはエピソーム抑制を含む摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因しない。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを、任意の適切な手段によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、gRNA抑制ライブラリの一部であるライブラリ構築物に含まれる。

40

【0453】

いくつかの実施形態では、摂動は、ゲノム挿入またはエピソーム挿入（例えば、1つ以上の遺伝子の）を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム挿入またはエピソーム挿入を含む摂動は、gRNA挿入ライブラリの一部である1つ以上のライブラリバリエーションの発現

50

に起因する。いくつかの実施形態では、ゲノム挿入またはエピソーム挿入を含む摂動は、1つ以上のライブラリバリエーションの発現に起因しない。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを、任意の適切な手段によって哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、挿入ライブラリの一部であるライブラリ構築物に含まれる。

【0454】

いくつかの実施形態では、1つ以上の改変された配列を含む1つ以上の摂動を、ゲノム編集を使用して哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞に導入することができる。摂動のいくつかの例示的なクラス、及び関連するライブラリシナリオと摂動アクセサリを以下の表8に示す。

【0455】

【表8】

表8－哺乳動物細胞における例示的な摂動

摂動	シナリオ(複数可)	摂動アクセサリ配列
ゲノム KO	AAV-in-lenti を介した gRNA KO ライブラリの組み込み CRISPR を介した gRNA KO ライブラリの組み込み リコンビナーゼを介した gRNA KO ライブラリの組み込み トランスポゾン を介した gRNA KO ライブラリの組み込み エピソーム gRNA KO ライブラリ	Cas
ゲノム SNP	AAV-in-lenti を介した gRNA SNP ライブラリの組み込み CRISPR を介した gRNA SNP ライブラリの組み込み リコンビナーゼを介した gRNA SNP ライブラリの組み込み トランスポゾン を介した gRNA SNP ライブラリの組み込み エピソーム gRNA SNP ライブラリ	Cas
ゲノム活性化	AAV-in-lenti を介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み CRISPR を介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み リコンビナーゼを介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み トランスポゾン を介した gRNA 活性化ライブラリの組み込み エピソーム gRNA 活性化ライブラリ	Cas
ゲノム抑制	AAV-in-lenti を介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み CRISPR を介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み リコンビナーゼを介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み トランスポゾン を介した gRNA 抑制ライブラリの組み込み エピソーム gRNA 抑制ライブラリ	Cas
ゲノム挿入	AAV-in-lenti を介した挿入ライブラリの組み込み CRISPR を介した挿入ライブラリの組み込み リコンビナーゼを介した挿入ライブラリの組み込み トランスポゾン を介した挿入ライブラリの組み込み	該当せず
エピソーム挿入	エピソーム挿入ライブラリ(隣接するウイルス反復配列は、閉じた環状プラスミドに含まれる)	該当せず

【0456】

摂動アクセサリ配列

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、ライブラリ構築物と組み合わせて摂動を作り出すのを支援する摂動アクセサリ配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、(i) gRNAを含む1つ以上のライブラリバリエーションを含むライブラリ構築物、(ii) RNAガイドヌクレアーゼ及び／またはその誘導体及び／または融合体をコードする配列を含む摂動アクセサリ配列、及び／または(iii) ヌクレアーゼを介した摂動のための他のエレメントを含む。いくつかの実施形態では、摂動アクセサリ配列は、Cas9、CasZ、CpfI、及び／またはFokIに由来するRNAガイドヌクレアーゼを含む。

【0457】

いくつかの実施形態では、摂動アクセサリ配列は、RNAガイドヌクレアーゼを含み、これには、Cas9、CpfI、及び／またはCasZ、あるいは転写調節因子を含む融合タンパク質（例えば、Cas9-VPRまたはCas9-KRAB-MecP2融合体）、ヌクレアーゼドメインとのCRISPRタンパク質融合体（例えば、FokI）、酵素的塩基編集体（例えば、BE及びABE融合体のバージョン）、逆転写酵素融合体（例えば、Prime Editor）、CRISPRリコンビナーゼ（例えば、RecCas9）、及びCRISPRトランスポザーゼ（例えば、Tn7様トランスポザーゼ系Cas12k及びTnIQとのカスケード複合体）を含むそれらの誘導体が含まれる。

【0458】

いくつかの実施形態では、摂動アクセサリエレメントは、CpfIエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、CpfIには、Zetsche et al. (2015) Cell 163: 759-771に開示されているCpfIポリペプチド及びU.S. 2016/0208243に開示されているCpfIポリペプチドのCpfI相同体及びオルソログが含まれる。他の改変されたCpfIバリエーションは、当業者に公知であり、本開示の範囲内に含まれる（例えば、WO/2017/184768を参照のこと）。

【0459】

いくつかの実施形態では、提供する哺乳動物細胞は、哺乳動物細胞に(i) ライブラリ構築物、(ii) 摂動アクセサリ配列、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を導入することによって産生される。いくつかの実施形態では、本開示の細胞ライブラリを発現するウイルスベクターは、各細胞（例えば、哺乳動物細胞）に、(i) ライブラリ構築物、(ii) 摂動アクセサリ配列、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を導入することによって生成される。

【0460】

いくつかの実施形態では、提供する方法は、哺乳動物細胞において摂動アクセサリ配列を発現させることを含む。いくつかの実施形態では、提供する方法は、哺乳動物細胞ライブラリによって産生されるウイルスベクターをスクリーニングすることを含み、ライブラリの各細胞は、(i) ライブラリ構築物、(ii) 摂動アクセサリ配列、及び(iii) ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む。

【0461】

例えば、哺乳動物細胞は、ゲノム編集を使用して、1つ以上の改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション）を導入してもよい。

【0462】

いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーション及び摂動アクセサリ配列は、天然のCRISPR系から適合された成分：ガイドRNA（ライブラリバリエーションとして）及びRNAガイドヌクレアーゼ（摂動アクセサリエレメントとして）に対応する。CRISPR/Cas系では、ガイドRNA（gRNA）がCas9エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼと複合体を形成する。次いで、複合体はgRNAによって、通常は標的細胞のゲノムに位置するDNA標的配列に誘導される。Cas9またはCas9エンドヌクレアーゼとは、Cas9タンパク質、またはその断片を含むRNAガイドエンドヌクレアーゼを指す（例えば、Cas9の活性もしくは不活性DNA切断ドメインまたは部分的

10

20

30

40

50

に不活性なDNA切断ドメイン（例えば、Cas9ニッカーゼ）、及び／またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質）。Cas9は、自己と非自己を区別するのに役立つCRISPR反復配列内の短いモチーフ（PAMすなわちプロトスペーサー隣接モチーフ）を認識する。Cas9エンドヌクレアーゼ及びガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA）の配列及び構造は、当業者に周知である（例えば、Ferretti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:4658-4663 (2001); Deltcheva et al., Nature 471:602-607 (2011); 及びJinek et al., Science 337:816-821 (2012)を参照のこと）。

【0463】

スクリーニングされた哺乳動物細胞とウイルスベクターの潜在的な特徴

いくつかの実施形態では、摂動は、ウイルスベクターの1つ以上の特徴（例えば、所望の特徴）及び／またはウイルスベクターの発現及び／または産生（例えば、独立して及び／または合成的に）に関連する。いくつかの実施形態では、単一（1つ）の摂動は、ウイルスベクターの1つ以上の特徴（例えば、所望の特徴）及び／またはウイルスベクターの発現及び／または産生に関連する。いくつかの実施形態では、2つ以上の摂動は共に、ウイルスベクターの1つ以上の特徴（例えば、所望の特徴）及び／またはウイルスベクターの発現及び／または産生に関連する。

【0464】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、用途及び／または意図された用途において何らかの方法で改変されたウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、核酸を細胞に移入する方法が改変されたウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、治療的に改変されたウイルスベクターの産生に関連する。

【0465】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、何らかの方法で非機能的及び／または機能の低いウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、何らかの方法でより機能的及び／または増強されたウイルスベクターの産生に関連する。

【0466】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの摂動は、細胞に感染するウイルスベクターの効力または能力の変化（例えば、増加）に関連する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの摂動は、宿主細胞に形質導入する能力の変化（例えば、増加）に関連する。

【0467】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、核酸を細胞に移入する方法において非機能的及び／または機能の低いウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、核酸を細胞に移入する方法においてより機能的及び／または増強されたウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、治療的に非機能的及び／または機能の低いウイルスベクターの産生に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、治療的により機能的及び／または増強されたウイルスベクターの産生に関連する。

【0468】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、ウイルスベクターの発現及び／または産生の改変に関連する

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、ウイルスベクターの発現及び／または産生の増加に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、ウイルスベクターの分泌の増加に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）の下でのウイルスベクターの発現及び／または産生の変化（例えば、増加）に関連している。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、ウイルスベクターの発現、産生及び／または分泌の変化（例えば、増加）に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、非優良医薬品製造基準（非GMP）の下でのウイルスベクターの発現、産生及び／または分泌の変化（例えば、増加）に関連する。

10

【0469】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団は、ウイルスベクターの産生の増加に関連する少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの摂動を含む哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動を欠損する同等の哺乳動物細胞と比較して、ウイルスベクター産生が、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも12倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、または少なくとも50倍増加している。

20

【0470】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの摂動を含む哺乳動物細胞は、少なくとも1つの摂動を欠損する同等の哺乳動物細胞と比較して、ウイルスベクター発現が、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも12倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、または少なくとも50倍増加している。

【0471】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスベクターの産生及び／または発現の増加に関連する少なくとも1つの摂動を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞（複数可）は、少なくとも1つの摂動を含むウイルスベクターを、摂動を欠損するウイルスベクターを発現する同等の哺乳動物細胞よりも高いレベルで発現する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの摂動を含むウイルスベクターは、摂動を欠損する同等のウイルスベクターの発現に比べて、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも12倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、または少なくとも50倍高いレベルで産生され、及び／または発現する。

30

【0472】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、ウイルスベクターの発現及び／または産生の持続時間の増加（例えば、増加）に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、哺乳動物細胞の生存率の変化（例えば、増加）に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、哺乳動物細胞の安定性（例えば、ゲノム安定性）の変化（例えば、増加）に関連する。

40

【0473】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、ウイルスベクターの安定性（例えば、ゲノム安定性）の変化（例えば、増加）に関連する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、少なくとも1つの摂動を含み、例えば、産生される空のウイルスベクタ

50

一の割合の変化（例えば、減少）に関連する。

【0474】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、上記の関連性、効果または表現型のいずれかを得るために、1つ以上または2つ以上の摂動を必要とする。例えば、いくつかの実施形態では、1つ以上または2つ以上の摂動を有する哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、ウイルスベクター産生のレベルが変化している（例えば、増加または減少）。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターは、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターにおいて、合成的に相互作用して、上記の関連性、効果または表現型のいずれかをもたらす2つ以上の摂動を必要とする。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターにおいて、2つ以上の摂動が合成的に相互作用して、ウイルスベクター産生のレベルを変化（例えば、増加または減少）させる。

10

【0475】

いくつかの実施形態では、上記の関連性、効果または表現型のいずれかを参照集団と比較し、その場合、参照集団は、少なくとも1つの摂動を含まない同等または標準の哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターの集団である。

【0476】

細胞改変プラットフォームの方法

本開示は、ウイルスベクターの発現及び／または産生の特徴、及び／または他の特徴について、哺乳動物細胞ライブラリを改変及び／またはスクリーニングする方法を提供する。

20

【0477】

いくつかの実施形態では、本開示は、哺乳動物細胞ライブラリ由来のウイルスベクターを産生及び／または製造する方法を提供し、ライブラリの各哺乳動物細胞は、(i) 識別子及び(ii) ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上のエレメントを発現する少なくとも1つの核酸配列を含む1つ以上の改変された配列を個別に含み、その場合、発現する各ウイルスベクターは識別子を含む。

【0478】

いくつかの実施形態では、本開示は、哺乳動物細胞ライブラリをスクリーニングする方法を提供し、ライブラリの各哺乳動物細胞は、(i) 識別子及び(ii) ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上のエレメントを発現する少なくとも1つの核酸配列を含む1つ以上の改変された配列を個別に含み、その場合、発現する各ウイルスベクターは識別子を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、ウイルスベクター中の識別子を検出するステップを含む（例えば、次世代シーケンシング及び／または単一細胞シーケンシングによって）。

30

【0479】

いくつかの実施形態では、本開示は、哺乳動物細胞ライブラリ由来のAAVベクターを産生する方法を提供し、ライブラリの各哺乳動物細胞は、(i) 識別子及び(ii) AAVベクターの形成に必須の1つ以上のエレメントを発現する少なくとも1つの核酸配列を含む1つ以上の改変された配列を個別に含み、その場合、発現する各AAVベクターは識別子を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された配列は、ライブラリバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された配列は、ライブラリバリエーション及びバーコードを含む。いくつかの実施形態では、識別子はバーコードを含む。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターにおいて、少なくとも1つの摂動（例えば、AAVベクター産生の態様を変化させる摂動）を生成する。

40

【0480】

いくつかの実施形態では、本開示は、AAVベクター産生に関連する特徴について、哺乳動物細胞ライブラリをスクリーニングする方法を提供し、ライブラリの各哺乳動物細胞は、(i) 識別子及び(ii) AAVベクターの形成に必須の1つ以上のエレメントを発

50

現する少なくとも1つの核酸配列を含む1つ以上の改変された配列を個別に含み、その場合、発現する各AAVベクターは識別子を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、AAVベクター中の識別子を検出するステップを含む（例えば、次世代シーケンシングによって）。いくつかの実施形態では、特定の識別子の相対的存在量を、AAVベクターのプール内のすべての識別子に対して決定する。

【0481】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された配列は、ペイロード、レポーター、選択マーカー、摂動アクセサリ配列、トランス作用性組み込み配列、及び／またはシス作用性組み込み配列をさらに含む。

【0482】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) ウイルスベクターを発現及び／または產生する哺乳動物細胞ライブラリ（ライブラリの各哺乳動物細胞は、(a) ウイルスパッケージング配列の間に配置された識別子を含むライブラリ構築物、及び(b) ウイルスベクターの產生に必須の1つ以上のポリヌクレオチドを含む）、(ii) ライブラリの哺乳動物細胞を培養して、識別子を含むウイルスベクターを產生し、(iii) ウイルスベクターのプール中の識別子を検出することを含む方法を提供する。

【0483】

いくつかの実施形態では、本開示は、(i) AAVベクターを発現及び／または產生する哺乳動物細胞ライブラリ（ライブラリの各哺乳動物細胞は、(a) AAV ITR配列の間に配置された識別子を含むライブラリ構築物、及び(b) AAVベクターの產生に必須の1つ以上のポリヌクレオチドを含む）、(ii) ライブラリの哺乳動物細胞を培養して、識別子を含むAAVベクターを產生し、(iii) AAVベクターのプール中の識別子を検出することを含む方法を提供する。

【0484】

図2は、識別子を有するAAVウイルスベクターの発現のための例示的な単一連続ライブラリ構築物を使用して、ウイルスベクターを発現及び／または產生する哺乳動物細胞ライブラリを改変するための例示的なプラットフォーム方法の概略図を示す。哺乳動物細胞を、(i) 単一の連続ライブラリ構築物、及び(ii) 図2のステップCに示すAAV発現に必須の配列（例えば、ヘルパー及びrep/cap）を含むAAV構築物を含むように改変する。例示的な概略図では、ライブラリの哺乳動物細胞へ単一ライブラリ構築物を組み込むために、組み込みウイルスベクター（例えば、AAV-in-lenti組み込みレンチウイルスベクター）を使用する。

【0485】

いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を含むレンチウイルスベクターを生成する。ライブラリ構築物を含むレンチウイルスベクターを生成するために、哺乳動物細胞の第1のサブセットを、レンチウイルス発現に必須の配列（例えば、エンベロープ及びgag）ならびに識別子（例えば、ユニークなライブラリバリエーション（例えば、gRNA）及び／またはバーコード）を含み、ウイルスパッケージング配列（例えば、AAV ITR）に隣接するライブラリ構築物を含み、そのすべてがシス作用性組み込み配列（例えば、レンチウイルスLTR）に隣接するように改変する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、ペイロードをさらに含み得る。

【0486】

いくつかの実施形態では、AAV-in-lenti組み込みレンチウイルスベクターライブラリを使用して、哺乳動物細胞ライブラリを生成することができ、哺乳動物細胞の第2のサブセットを使用して、ライブラリ構築物を、低コピー数（例えば、およそ単一コピー、例えば1コピー、または2コピー以下、または3コピー以下、または4コピー以下）で哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物（例えば、AAV産生哺乳動物細胞ライブラリ用）は、他の手段（例えば、ヌクレアーゼを介した組み込み、リコンビナーゼを介した組み込み、トランスポザーゼを介した組み込みなど）によって組み込むか、または哺乳動物細胞内でエピソードとして発現させることができ

10

20

30

40

50

る。様々な実施形態において、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞は、ライブラリ構築物の一貫した低コピー数（例えば、単一コピー）を含むべきである。図2のステップDは、本明細書で提供する方法に従ってスクリーニングすることができる、得られた哺乳動物細胞ライブラリ由来のAAVベクターの発現を示している。

【0487】

図3は、識別子を有するAAVウイルスベクターの発現及び／または産生のための例示的な不連続ライブラリ構築物を使用して、ウイルスベクターを発現及び／または産生する哺乳動物細胞ライブラリを改変するための例示的なプラットフォーム方法の概略図を示す。いくつかの実施形態では、不連続なライブラリ構築物を、共にライブラリ構築物を構成する一連の構築物として提供する。いくつかの実施形態では、不連続ライブラリ構築物は、図3のステップAに示すように、識別子（例えば、バーコード）を含むAAV-in-lent-i構築物、及びそれぞれが1つ以上のライブラリバリエーションを含む1つ以上の追加の構築物を含む。いくつかの実施形態では、これらの追加の構築物のそれぞれは、1つ以上のバーコードも含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物は、他の手段によるゲノム組み込みのためのシス作用性組み込み配列（例えば、ヌクレアーゼを介した組み込みのための相溶性アーム、リコンビナーゼを介した組み込みのための組換え部位、トランスポザーゼを介した組み込みのためのトランスポザーゼ部位など）を含むか、または哺乳動物細胞内でのエピソーム発現用であってもよい。

【0488】

図3のステップBに示すように、ライブラリ構築物を構成する様々なAAV-in-lent-i組み込みレンチウイルスベクターライブラリを、哺乳動物細胞の第1のサブセットに形質導入する。例えば、識別子（例えば、バーコード）を含むAAV-in-lent-i構築物を細胞に形質導入してもよく、識別子はITR配列に隣接し、これにLTR配列が隣接する。いくつかの実施形態では、細胞あたりほぼ単一コピー（1つ）のライブラリ構築物を有する哺乳動物細胞を得る条件下で、識別子（例えば、バーコード）を含むAAV-in-lent-i組み込みレンチウイルスベクターを、哺乳動物細胞の第2のサブセットに形質導入する。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションを含む個々のライブラリ構築物を、高コピー用量または単一コピー用量の複数ラウンドで（例えば、組み込みレンチウイルスベクターを使用して）哺乳動物細胞に導入し、及び／または組み込み、多コピーライブラリバリエーション（例えば、gRNA）で摂動させた哺乳動物細胞ライブラリ集団を生成する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの各細胞は、細胞ごとに単一のITR隣接バーコード、及び細胞ごとに複数のライブラリバリエーション（例えば、gRNA）を含む。

【0489】

哺乳動物細胞を、図3のステップCに示すAAV発現に必須の配列（例えば、ヘルパー及びrep/cap）を含むように改変する。不連続ライブラリ構築物を使用する方法では、ライブラリの哺乳動物細胞の少なくとも一部及び／またはAAVベクターの少なくとも一部を配列決定する。図3のステップDは、哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングを示し、図3のステップEは、AAVベクターにおける識別子の配列決定を示す。特に、これらの配列決定ステップを、任意の順序で実施してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、AAVベクターの配列決定を最初に実施して、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクター（例えば、ウイルスベクター産生のため）の所望の特徴に関連する識別子を決定してもよく、その後、単一細胞シーケンシングにより細胞を配列決定して、特定の識別子（例えば、以前に同定された識別子）を、原因となり得るライブラリバリエーションと関連付けることができる。いくつかの実施形態では、選択された識別子に関連する哺乳動物細胞のみを、単一細胞シーケンシングによって配列決定してもよい。いくつかの実施形態では、AAVベクターの配列決定及び哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングを、実質的に同時に実施する。

【0490】

当業者であれば、図2及び図3中の概略図は、ウイルスベクターの発現及び／または産

生の特徴について哺乳動物細胞ライブラリをスクリーニングすることを示しているが、ステップの順序を適宜調整してもよいことを認識するであろう。

【0491】

いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリによって生成されたウイルスベクターのプールを使用して、哺乳動物細胞を形質導入し、ライブラリバリエーションを含む第2の哺乳動物細胞ライブラリを生成する。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリは、組み込まれたライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリは、エピソームライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、第2の哺乳動物細胞ライブラリは、組み込まれたライブラリ構築物を含む。いくつかの実施形態では、第2の哺乳動物細胞ライブラリは、エピソームライブラリ構築物を含む。

10

【0492】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、第1の哺乳動物細胞ライブラリから回収及び／またはプールする。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターはAAVウイルスベクターであり、第1の哺乳動物細胞ライブラリを、AAV-in-Lentiライブラリ、AAV-introtransposaseライブラリ、またはエピソームAAVライブラリを使用して生成する。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリから回収及び／またはプールしたウイルスベクターを使用して、哺乳動物細胞をトランスフェクトし、第2の哺乳動物細胞ライブラリを生成する。いくつかの実施形態では、第2の哺乳動物細胞ライブラリは、ライブラリバリエーションをエピソームとして発現する。いくつかの実施形態では、第1の哺乳動物細胞ライブラリによって生成されたAAVベクターのプールを使用して、哺乳動物細胞に形質導入し、識別子をエピソームに含む第2の哺乳動物細胞ライブラリを生成する。

20

【0493】

ウイルスベクターの回収及びプール

哺乳動物細胞ライブラリを発現するウイルスベクターを培養し、産生されるウイルスベクターを、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して回収する。

【0494】

ウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞の培養を、バッチ培養、フェドバッチ培養、または連続培養によって行ってもよい。ウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞を、懸濁液中で培養するか、シェーカーフラスコ、発酵槽、またはバイオリアクター内で固体担体に接着させてもよい。培養後、哺乳動物細胞及び／または上清を回収し、当技術分野で公知の方法を使用して適切な画分から核酸を単離及び精製することができる。

30

【0495】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを哺乳動物細胞ライブラリから回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、哺乳動物細胞による発現に十分な時間の後に回収し、これは、哺乳動物細胞の種類及び培養条件に基づいて様々に異なり得る。

【0496】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクター発現哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞によって産生される全ウイルスベクターを回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現する細胞ライブラリの哺乳動物細胞によって産生されるウイルスベクターを、時間間隔に応じて回収する。例えば、ウイルスベクターを毎日、2日ごと、3日ごと、またはそれ以上の間隔で回収して、時間にわたってウイルスベクター産生を評価することができる。

40

【0497】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、哺乳動物細胞が特定の範囲内の細胞密度に達した時点で回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、特定の時間後に回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、ウイルストランスフェクションの12時間～2週間後に回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、ウイルストランスフェクションの24～144時間後に回収する。いくつかの実施形態

50

では、ウイルスベクターを、細胞培地から回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを回収する過程で、哺乳動物細胞を溶解させる。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞が少なくとも閾値レベルのウイルスベクター（例えば、精製前の哺乳動物細胞あたり平均少なくとも約 1×10^3 個のウイルスベクター）を産生する場合、ウイルスベクターを回収する。

【0498】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を洗浄し、長期間後にウイルスベクターを回収することができる（例えば、ウイルスベクターの持続的産生を評価するために）。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター由来のウイルスベクター核酸（例えば、識別子を含む）を単離する。

10

【0499】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を、回収前にプールする。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター核酸（例えば、DNA 及び／または RNA）を配列決定する前に、ウイルスベクターをプールする。

【0500】

ウイルスベクター配列決定

いくつかの実施形態では、提供する方法及び技術は、ウイルスベクター核酸の配列決定を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター核酸を、配列決定の前に定量化する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター核酸を、配列決定の前に定量化しない。当技術分野における任意の適切な配列決定法を使用することができる。

20

【0501】

いくつかの実施形態では、精製後のウイルスベクター力価を測定する。いくつかの実施形態では、定量的 PCR を使用して力価を測定する。特定の実施形態では、構築物に特異的な TaqMan プローブを利用して、構築物のレベルを測定する。様々な実施形態において、提供する方法及び技術は、ウイルスベクター核酸物質（またはその一部、例えば、識別子）を増幅する増幅ステップを含む。任意の用途に適した増幅反応がいくつかの実施形態に適合すると考えられるが、特定の例として、いくつかの実施形態では、増幅ステップは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、多重置換増幅（MDA）、等温増幅、及びそれらの任意の組み合わせであるか、またはそれを含み得る。

30

【0502】

いくつかの実施形態では、本方法に関して使用する配列決定は、次世代シーケンシングを含む。様々な配列決定技術を使用する様々な NGS プラットフォームが多数存在する。一般に、NGS プラットフォームは、何百万もの小さな DNA 断片の配列決定を並行して実行する。いくつかの実施形態では、NGS は、各塩基がユニークな蛍光シグナルを放出し、それらを核酸鎖に付加するため、DNA 塩基を同時に同定する Solexa 配列決定であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、NGS は、ヌクレオチドがポリメラーゼによって新規 DNA 鎖に取り込まれた後、再び蛍光を使用してピロリン酸放出を検出する 454 配列決定であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、NGS は、DNA ポリメラーゼによる個々の塩基の取り込みからの H^+ （プロトン）の直接放出を測定するイオントレント：プロトン／PGM 配列決定であるか、またはそれを含む。

40

【0503】

ウイルスベクター核酸のプールにおける識別子の存在量を分析することができる。識別子配列を使用して、所望のウイルスベクター特性（例えば、高い産生）を促進する哺乳動物細胞を選択することができる。ウイルスベクター産生の増加は、例えば、参照細胞と比較して、一定期間にわたるウイルスベクター数の増加、または長期間にわたる産生であり得る。いくつかの実施形態では、結合の異なる時点でのウイルスベクタープールの試料を分析することができる（例えば、後の時点でウイルスベクターを産生する哺乳動物細胞株を評価するために）。ウイルスベクター中の識別子を使用して、対応する哺乳動物細胞を同定し、その細胞中の改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション）を決定すること

50

ができる。例えば、これは、ライブラリバリエーションと識別子との直接的かつ所定の関連付けによって（例えば、連続ライブラリ構築物を使用する場合）、または単一細胞シーケンシングと、それに続く識別子と潜在的な原因となるライブラリバリエーションとの関連付けの追加のステップによって（例えば、不連続ライブラリ構築物を使用する場合）、行うことができる。

【0504】

単一細胞シーケンシング

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、単一細胞シーケンシングのステップを含む。哺乳動物細胞がライブラリ構築物（例えば、不連続なライブラリ構築物）を含むいくつかの実施形態では、提供する方法は、単一細胞シーケンシングのステップ（例えば、ウイルスベクターにパッケージングされていない哺乳動物細胞内の1つ以上の改変された配列を同定するための）を含む。いくつかの実施形態では、単一細胞シーケンシングのステップは、連続ライブラリ構築物を使用する場合にも有用であり得ることが理解される。

10

【0505】

ライブラリ構築物が複数の不連続な構築物を含むいくつかの実施形態では、提供する方法は、単一細胞シーケンシングのステップを含む。いくつかの実施形態では、単一細胞シーケンシングによって配列決定する核酸（例えば、構築物の）は、哺乳動物細胞内でRNAとして発現する。いくつかの実施形態では、単一細胞シーケンシングを含む、提供する方法は、1つ以上の発現配列（例えばRNA、例えばmRNA）を細胞同一性配列で標識するステップを含む。いくつかの実施形態では、すべての発現配列（例えばRNA、例えばmRNA）を、細胞同一性配列で標識する。いくつかの実施形態では、ライブラリの哺乳動物細胞は、細胞内に存在する任意の識別子及び／またはライブラリバリエーションを含むポリAテールmRNAを発現する。

20

【0506】

いくつかの実施形態では、1つ以上のライブラリバリエーションを細胞同一性配列で標識する。いくつかの実施形態では、すべてのライブラリバリエーションを細胞同一性配列で標識する。いくつかの実施形態では、すべてのライブラリバリエーション及びすべての識別子を細胞同一性配列で標識する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの各哺乳動物細胞または細胞株は、ユニークな細胞同一性配列を含む。したがって、細胞同一性配列は、連続または非連続ライブラリ構築物（配列決定された核酸を含む）に含まれる構築物由来の核酸を、それが由来する個々の哺乳動物細胞または細胞株と関連付ける。

30

【0507】

本開示はまた、単一細胞シーケンシング法中のcDNAへの変換に際して、発現RNAの逆転写中に単一細胞同一性配列が特異的に付加されるという認識を包含する。逆転写ステップ中に適切なプライマーを使用して、すべての転写産物が細胞同一性配列でタグ付けされた単一細胞となるように、単一細胞シーケンシング用の構築物または核酸が、発現したRNAに含まれるべきであることが理解される。

【0508】

いくつかの実施形態では、提供する方法は、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングのステップ及びウイルスベクター配列決定のステップ（例えば、次世代シーケンシングを使用して）の両方を含む。本開示は、ウイルスベクター及び哺乳動物細胞の両方を配列決定することにより、哺乳動物細胞中のウイルスベクター存在量と任意のライブラリバリエーション（複数可）との間の関連性を決定することができるという認識を包含する。

40

【0509】

いくつかの実施形態では、提供する方法は、ウイルスベクター配列決定のステップ（例えば、次世代シーケンシングを使用して）と、それに続く単一細胞シーケンシングのステップを含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングを、ウイルスベクター配列決定に基づいて選択された哺乳動物細胞株に対して実施する。

50

【0510】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングを、ウイルスベクター配列決定と同時に実施する（例えば、次世代シーケンシングを使用して）。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞の単一細胞シーケンシングを、ウイルスベクター配列決定の前に実施する。

【0511】

分析

いくつかの実施形態では、本開示は、ウイルスプール中の特定の識別子の存在量を使用して、改善された特性、例えば、ウイルスベクター特性またはウイルスベクター産生特性（例えば、高い発現及び／または産生）を有する哺乳動物細胞（ライブラリ中の細胞間で）を同定することができる。哺乳動物細胞における対応する改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション）を決定することができる。例えば、これは、ライブラリバリエーションと配列決定した識別子との直接的かつ所定の関連付けによって（例えば、連続ライブラリ構築物を使用する場合）、または単一細胞シーケンシングと、それに続く識別子と潜在的な原因となるライブラリバリエーションとの関連付けの追加のステップによって（例えば、不連続ライブラリ構築物を使用する場合）、行うことができる。

10

【0512】

いくつかの実施形態では、提供する方法及び技術は、ウイルスベクター配列決定の前に選択またはスクリーニングするステップを含む。例えば、哺乳動物細胞のライブラリによって産生されるウイルスベクターを、ウイルスベクターの機能的特徴、例えば、ウイルスベクターの安定性、ウイルスベクターの効力、細胞に感染するウイルスベクターの能力、ウイルスベクター結合（例えば、受容体への）、核酸を移入するウイルスベクターの能力などについて、選択またはスクリーニングしてもよい。いくつかの実施形態では、そのような選択されたウイルスベクターをプールし、配列決定する。そのような方法を使用して、複数の有益な特徴を有する哺乳動物細胞及び／または摂動を同定してもよい。例えば、安定した高レベルのウイルスベクターを産生する細胞株である。

20

【0513】

いくつかの実施形態では、提供する方法及び技術は、ウイルスベクター配列決定の後に選択またはスクリーニングステップを含む。例えば、選択またはスクリーニングされた候補ウイルスベクター、または同定した摂動（例えば、遺伝子変化）を使用して、様々な特性について分析することができるウイルスベクターライブラリの構築を知らせることができる。例えば、そのようなウイルスベクターライブラリを、哺乳動物細胞に形質導入する能力について選択またはスクリーニングすることができる。

30

【0514】

選択された哺乳動物細胞候補を、ウイルスベクターの産生に使用することができ、または同定された摂動（例えば、遺伝子変化）を使用して、新規哺乳動物細胞ライブラリの構築を知らせることができる。所望の特徴を有し、及び／または所望の量でウイルスベクターを発現する改変された哺乳動物細胞が同定されるまで、ライブラリベースのプラットフォームアプローチ（図1パネルA～Fに示す）を繰り返すことができる。所望の特性に関連付けられた改変された配列は、例えば、機械学習（ML）アプローチを使用して機械学習モデルを開発することで分析することができる。トレーニング済みの機械学習モデルは、将来の設計に情報を提供し、スクリーニングする哺乳動物細胞ライブラリ数を減らし、それによって時間とコストを削減するのに役立つ。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞ライブラリを設計し、及び／または方法を実行して、所望の特性（例えば、特定のレベルのウイルスベクター産生）を有するように哺乳動物細胞内で相乗的に相互作用する改変された配列（例えば、2つ以上の改変された配列の組み合わせ）を同定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプラットフォーム技術から得られる結果として得られる哺乳動物細胞は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション及び／または摂動）を有し、その結果、所望の特性のウイルスベクター産生（例えば、特定のレベルでの産生、所望の期間の産生など

40

50

）を有する哺乳動物細胞が生成される。

【0515】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞及び／またはウイルスベクターにおいて、改変された配列（例えば、摂動）が、1つ以上の追加の摂動と共に、相乗的及び／またはさらに向上したウイルスベクター特性を有する可能性が高いかどうかを示す予測を生成するための機械学習モデルをトレーニングする。

【0516】

様々な実施形態において、機械学習モデルは、回帰モデル（例えば、線形回帰、ロジスティック回帰、または多項式回帰）、決定木、ランダムフォレスト、サポートベクターマシン、単純ベイズモデル、k平均クラスター、またはニューラルネットワーク（例えば、フィードフォワードネットワーク、畳み込みニューラルネットワーク（CNN）、または深層ニューラルネットワーク（DNN））のいずれか1つである。機械学習モデルは、線形回帰アルゴリズム、ロジスティック回帰アルゴリズム、決定木アルゴリズム、サポートベクターマシン分類、単純ベイズ分類、K最近傍分類、ランダムフォレストアルゴリズム、深層学習アルゴリズム、勾配ブースティングアルゴリズム、及び次元縮退技術のいずれか1つなど、機械学習で実装される方法を使用してトレーニングすることができる。様々な実施形態において、機械学習モデルを、教師あり学習アルゴリズム、教師なし学習アルゴリズム、半教師あり学習アルゴリズム（例えば、部分教師）、弱い教師あり学習、転移学習、マルチタスク学習、またはそれらの任意の組み合わせを使用してトレーニングする。様々な実施形態において、機械学習モデルは、機械学習モデルのトレーニング中に調整されるパラメータを含む。例えば、パラメータを、損失関数を最小化するように調整し、それによって機械学習モデルの予測能力を向上させる。

【0517】

一般に、ウイルスベクターの発現を変化させる1つ以上の編集を区別するように、機械学習モデルをトレーニングする。例えば、機械学習モデルを、ウイルスベクターの発現の増加または減少に寄与するトレーニング例全体のパターンを認識するようにトレーニングする。具体的な例として、編集された場合に、哺乳動物細胞がウイルスベクターの産生を増加及び／または拡張する可能性が高い特定のゲノム位置を同定するように、機械学習モデルをトレーニングする。別の特定の例として、編集された場合に、ウイルスベクター産生が増加及び／または延長された哺乳動物細胞を生じる特定のゲノム位置を同定するように、機械学習モデルをトレーニングすることができる。

【0518】

様々な実施形態において、同定された編集を、機械学習モデルによって出力される予測スコアを使用して分類する。一例として、閾値を超えるスコアが割り当てられた同定された編集を、さらなる試験のための編集候補として分類する。様々な実施形態において、閾値スコアは、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.85、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99である。閾値スコア基準を満たさない同定された編集は、非候補編集として分類する。

【0519】

全体として、機械学習モデルの実装によって *in silico* 予測及び編集の分類が可能になり、これによって迅速に除外することができる。したがって、候補編集のみをさらなる試験のためにゲノム設計で使用し、その一方で非候補編集をさらなる検討から除外する。これにより、非常に時間とコストがかかる、編集のすべての組み合わせを *in vitro* で試験する必要がなくなる。

【0520】

用途

本開示は、とりわけ、ウイルスベクターを発現するための哺乳動物細胞、哺乳動物細胞を生成するための構築物、及び本明細書に記載の方法を使用して生成されるウイルスベクターを提供する。ウイルスベクター及び関連する哺乳動物細胞は、ワクチン、がん治療（

10

20

30

40

50

例えば、腫瘍溶解療法）、遺伝子治療、及び／または細胞治療（例えば、C A R－T）を含むがこれらに限定されない多くの用途において有用であり得る。ウイルスベクター及び哺乳動物細胞を、生物製剤及び／または治療法を生成する研究及び製造プロセスにおいて、または生物製剤自体として使用してもよい。

【0521】

例えば、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解性治療）、及び／または遺伝子治療（例えば、i n v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）を含むがこれらに限定されない多くの方法で使用する事ができる。別の例として、いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解性治療）、遺伝子治療（例えば、e x v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）、及び／または細胞療法（例えば、e x v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）の研究、産生、及び／または製造を含むがこれらに限定されない多くの方法で使用する事ができる。したがって、これらの様々な用途のための広範なウイルスベクターが存在する。

10

【0522】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリ構築物、ウイルスベクター、及び／または哺乳動物細胞を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を産生するための本明細書に記載の方法の使用を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクター（例えば、A A V ベクター）を生成するための、本明細書に記載の方法の使用を提供する。いくつかの実施形態では、ライブラリ構築物を作製するための本明細書に記載の方法の使用を提供する。

20

【0523】

いくつかの実施形態では、改変された哺乳動物細胞を産生するための、本明細書に記載のライブラリ構築物、ウイルスベクター、及び／または方法の使用を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現する哺乳動物細胞の製造方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載のスクリーニング方法を使用して同定された1つ以上の摂動を導入することを含む。

【0524】

本開示はまた、本明細書に記載のウイルスベクター及び／または哺乳動物細胞を使用した、組成物（例えば、医薬組成物）による対象の治療方法も提供する。

30

【0525】

哺乳動物細胞及びウイルスベクターの例示的な用途

本開示の哺乳動物細胞は、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解療法）、遺伝子治療、及び／または細胞療法（例えば、C A R－T）を含むがこれらに限定されない多くの用途において使用することができる。哺乳動物細胞を、生物製剤及び／または治療法を生成する研究及び製造プロセスにおいて、または生物製剤として使用してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を使用して、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解療法）、及び／または遺伝子治療（例えば、i n v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）を含むがこれらに限定されない生物学的製剤及び／または療法として直接使用することができるウイルスベクターを産生することができる。別の例として、いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞を使用して、ワクチン、がん治療（例えば、腫瘍溶解療法）、遺伝子治療（例えば、e x v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）、及び／または細胞療法（例えば、e x v i v o 遺伝子及び／またはゲノム編集）を含むがこれらに限定されない、生物製剤及び／または療法の研究、産生、及び／または製造に使用することができるウイルスベクターを産生することができる。

40

【0526】

いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、ウイルスベクターを所望のレベルで産生する。いくつかの実施形態では、本開示の哺乳動物細胞は、ウイルスベクター産生に影響を与える1つ以上の摂動を含む。

【0527】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞を培養することを含む、ウイルスベクターの製造方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の哺乳動物細胞を培養することを含む、標的レベルのウイルスベクターの製造方法を提供する。いくつかの実施形態では、閾値レベルを超えるレベルでウイルスベクター（例えば、AAVベクター）を産生するための哺乳動物細胞の使用を提供する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを産生するための哺乳動物細胞は、1つ以上の摂動を含み、1つ以上の摂動を欠く対応する哺乳動物細胞よりも高いレベルでウイルスベクターを産生する。

【0528】

いくつかの実施形態では、その後細胞療法を生成するために使用することができる、哺乳動物細胞内でのウイルスベクターの産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターは、CAR-T細胞を生成するためのキメラ抗原受容体をコードするペイロードを有し、その場合、生成したCAR-T細胞を対象に投与することができる。

10

【0529】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の哺乳動物細胞を培養することを含む、ワクチンの製造方法及び／または産生方法を提供し、ウイルスベクターは、ワクチン成分を含むペイロードを含む。いくつかの実施形態では、AAVベースのワクチンの製造方法及び／または産生方法を提供する。

【0530】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の哺乳動物細胞を培養することを含む、腫瘍溶解性ウイルスベクターの製造方法及び／または産生方法を提供し、ウイルスベクターは腫瘍溶解性ウイルスベクターである。

20

【0531】

いくつかの実施形態では、その後遺伝子治療として使用することができる、哺乳動物細胞内でのウイルスベクターの産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターは、in vivo 遺伝子治療を行うことができるペイロードを有し、生成されたウイルスベクターを対象に投与することができる。

【0532】

いくつかの実施形態では、その後ex vivo 遺伝子治療に使用することができる、哺乳動物細胞内でのウイルスベクターの産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、産生されるウイルスベクターは、ex vivo で遺伝子治療を行うことができるペイロードを有し、生成されるウイルスベクターを使用して治療用細胞を生成することができ、これを、その後対象に投与することができる。

30

【0533】

特定の例示的な実施形態

ウイルスベクター産生のためのガイドRNAベースのスクリーニングの例示的な方法

いくつかの実施形態では、提供する技術は、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を使用して（例えば摂動を誘導するために）遺伝子改変された哺乳動物細胞ライブラリを使用する。いくつかの実施形態では、各哺乳動物細胞は、標的配列に特異的なRNAガイドエンドヌクレアーゼ及びガイドRNA分子の発現による少なくとも1つの標的ゲノム修飾（すなわち、ライブラリバリエーションである改変された配列）を有する。いくつかの実施形態では、標的ゲノム改変は、遺伝子の不活性化、遺伝子の欠失、遺伝子の修飾、遺伝子への挿入、及び／または遺伝子の全部または一部の置換であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態では、識別子は、ガイド配列（例えば、ガイドRNA配列またはガイド配列をコードするガイドDNA配列）である。したがって、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を哺乳動物細胞でを使用して、核酸配列を同時に改変し、識別子（例えば、ガイド配列）を提供することができる。いくつかの実施形態では、ガイド配列である識別子を含む少なくとも1つの構築物を含むライブラリ構築物で哺乳動物細胞を形質転換し、識別子は、識別子をウイルスベクターにパッケージングするための配列（例えば、ウイルス反復配列、例えば、AAVベクターの発現のためのAAV ITR）間に配置される。

40

50

【0534】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集（例えば、摂動）によって編集されている少なくとも1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集によって編集されている少なくとも1つの配列、及び1つ以上の追加の改変された配列（例えば、ヌクレアーゼ媒介編集及び／または他の方法によって）を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリ中の哺乳動物細胞は、少なくとも2つ以上の改変された配列（例えば、2つ以上の摂動）を含む。

【0535】

いくつかの実施形態では、方法は、ウイルスベクター（例えば、ヘルパー、T_x遺伝子、Rep Capの遺伝子エレメントを含むものとして示されるAAVベクター）の発現のための配列を含む構築物によるライブラリの哺乳動物細胞をトランスフェクトし、それによって、ウイルスベクター産生哺乳動物細胞ライブラリを生成することを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を、構築物のトランスフェクションの前に実施する。いくつかの実施形態では、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を、構築物のトランスフェクションとほぼ同時に実施し、ガイドRNA媒介編集成分及びウイルスベクター成分を同時に哺乳動物ライブラリにトランスフェクトすることを意味する。

【0536】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を、構築物のトランスフェクションと実質的に同時に実施する。いくつかの実施形態では、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を、ウイルスベクターの発現のための遺伝子エレメントを既に有する哺乳動物細胞に対して実施する（例えば、ウイルスベクターを発現するための配列による哺乳動物細胞のトランスフェクション後に）。いくつかの実施形態では、ガイドRNA依存性ヌクレアーゼ媒介編集を、ウイルスベクター（例えば、AAVベクター）を発現するようにすでに改変されている哺乳動物細胞に対して実施する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現するための1つ以上のエレメントを、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現するための1つ以上のエレメントを、哺乳動物細胞の染色体外に存在させる。

【0537】

ステップの順序に関係なく、当業者は哺乳動物細胞ライブラリを作成することができ、各細胞または細胞株は、1つ以上の改変された配列及び少なくとも1つの識別子（例えば、ガイド配列を含むライブラリバリエーション）、及びウイルスベクターを発現させるのに十分な遺伝子エレメントを含む。したがって、ウイルスベクターを産生する哺乳動物細胞ライブラリを提供し、各細胞は、（i）少なくとも1つのライブラリバリエーション（例えば、改変された配列）、（ii）少なくとも1つの識別子（例えば、ガイド配列を含む）、及び（iii）目的のウイルスベクターを発現するのに十分なウイルスエレメントを含む。

【0538】

いくつかの実施形態では、提供する技術は、ウイルスベクターがガイド配列をウイルスベクターゲノムに取り込む（例えば、ウイルス反復配列間で）ユニークなアプローチを含む。これにより、ウイルスベクターの直接的な特徴決定と、関連する改変された配列（例えば、ライブラリバリエーション）の同定が可能になる。いくつかの実施形態では、ライブラリバリエーションは、哺乳動物細胞の識別子として機能することができる（これは、例えば配列決定によって同定することができる変異をさらに含み得る）。

【0539】

いくつかの特定の実施形態では、提供する哺乳動物細胞を、ウイルスベクターをコードする1つ以上の構築物でトランスフェクトし、例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のプラスミド（例えば、rep/cap、ヘルパー、txプラスミド）を細胞にトランスフェクトする。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスベクター配列をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスベクター配列がエピソームであ

10

20

30

40

50

る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ペイロード（例えば、ガイド配列及びヌクレアーゼ配列を含む）を含む（そのような場合、ゲノム改変（例えば、改変された配列の導入）、識別配列の導入、及び構築物のトランスフェクションステップをすべて、同時に行う）。

【0540】

いくつかの実施形態では、ライブラリ中の哺乳動物細胞を、ペイロード配列を含むtxプラスミドでトランスフェクトする。いくつかの実施形態では、ウイルス発現哺乳動物細胞は、少なくともペイロード及びガイドRNAを保有するAAVを産生する。

【0541】

いくつかの実施形態では、ライブラリ中の哺乳動物細胞を、コードする少なくとも2つのガイドRNA及びCas9を含むtxプラスミドでトランスフェクトし、第1のgRNAは患者のゲノムに結合し、第2のガイドRNAは哺乳動物細胞集団に結合する（そして識別子として機能する）。いくつかの実施形態では、ウイルス発現哺乳動物細胞は、少なくともヌクレアーゼ、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAを保有するAAVを産生する。

【0542】

ウイルスベクター発現細胞ライブラリを培養し、当技術分野で公知の適切な方法を使用してウイルスベクターを回収する。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムDNA（例えば、ガイド配列を含む）を単離し、ウイルス核酸（例えば、DNA）を配列決定する（例えば、次世代シーケンシングを使用して）。識別子（例えば、ガイド配列）の相対的存在量を決定してもよく（例えば、他のガイド配列と比較して）、これはそれらの特定のウイルスベクターの存在量と相関する。いくつかの特定の実施形態では、ライブラリ中の哺乳動物細胞を、本明細書に記載した。

【0543】

ウイルス産生のためのバーコードベースのスクリーニングの例示的な方法

いくつかの実施形態では、提供する技術は、バーコード配列及び1つ以上の改変された配列（変異、挿入、欠失、変換、置換、再編成などを含む）を含むように遺伝子改変されている哺乳動物細胞ライブラリを使用する。いくつかの実施形態では、提供する方法は、各細胞がバーコード配列及び1つ以上の改変された配列（例えば、目的の1つ以上の変異を含む）を有する、哺乳動物細胞ライブラリを生成及び／または取得することを含む。

【0544】

いくつかの実施形態では、改変された配列を導入する前に、バーコード配列を哺乳動物細胞に導入する（例えば、標的化によって、またはランダム変異誘発及び／または編集によって）。いくつかの実施形態では、バーコード配列を、改変された配列と実質的に同時に哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、バーコード配列を、改変された配列を導入した後に哺乳動物細胞に導入する。

【0545】

次いで、哺乳動物細胞ライブラリの哺乳動物細胞をトランスフェクトしてウイルスベクター（例えば、ヘルパー、Tx遺伝子、RepCapの遺伝子エレメントを含むものとして示されるAAVベクター）を発現させ、それによってウイルス感染哺乳動物細胞ライブラリ（図1の右側部分に示す）を生成する。一般に、本開示のウイルス感染哺乳動物細胞ライブラリは、目的のウイルスベクターを発現するのに十分な改変された配列、バーコード配列、及びウイルスエレメントを含む。

【0546】

いくつかの特定の実施形態では、提供する哺乳動物細胞に、ウイルスベクターをトランスフェクトし、例えば、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のプラスミド（例えば、rep/cap、ヘルパー、txプラスミド）を細胞にトランスフェクトする。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスベクター配列をゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスベクター配列がエピソームである。

【0547】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、(i) バーコード配列、(ii) 改変された配列、及び (iii) ウイルスベクターを発現するための遺伝子エレメントのうちの2つ以上を、哺乳動物細胞に実質的に同時に導入する。いくつかの実施形態では、3つすべてを実質的に同時に導入する。いくつかの実施形態では、バーコード配列及び／または改変された配列を、ウイルスベクターを発現するための配列による哺乳動物細胞のトランスフェクション後に、哺乳動物細胞に導入する。いくつかの実施形態では、バーコード配列及び／または改変された配列を、ウイルスベクター（例えば、AAVベクター）を発現するように改変されている哺乳動物細胞に対して導入する。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現するための1つ以上のエレメントを、哺乳動物細胞ゲノムに組み込む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターを発現するための1つ以上のエレメントを、哺乳動物細胞の染色体外に存在させる。

10

【0548】

いくつかの実施形態では、提供する技術は、ウイルスベクターがバーコード配列をウイルスベクターゲノムに取り込む（例えば、ウイルス反復配列間で）ユニークなアプローチを含む。これにより、ウイルスベクターを直接的に特徴決定し、ウイルスベクターを産生した哺乳動物細胞を同定することができる。

【0549】

いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞によって発現されるウイルスベクターは、ペイロード及びバーコードを含む。いくつかの特定の実施形態では、ウイルスベクターは、バーコード及びペイロードを含む（例えば、ペイロードは、gRNA及びヌクレアーゼ（例えば、Cas9）を含み得る）。いくつかの特定の実施形態では、そのような方法を使用して哺乳動物細胞ライブラリによって産生されるウイルスベクター（例えば、AAV）は、ペイロード（例えば、Cas9／gRNA）及びバーコードを含み得る。バーコード配列を使用して、ライブラリ内のどの哺乳動物細胞が高いウイルスベクター産生であるかを判断し、目的の改変された配列を同定することができる。

20

【0550】

ウイルスベクター発現細胞ライブラリを培養し、当技術分野で公知の適切な方法を使用してウイルスベクターを回収する。いくつかの実施形態では、ウイルス核酸（例えば、ガイド配列を含む、例えば、ゲノムDNA）を単離し、ウイルス核酸（例えば、ゲノムDNA）を配列決定する（例えば、次世代シーケンシングを使用して）。バーコードの相対的存在量を決定してもよく（例えば、他のウイルスベクターバーコードと比較して）、これは特定のウイルスベクターの存在量と相関する。いくつかの特定の実施形態では、ライブラリ中の哺乳動物細胞を、本明細書に記載した。

30

【0551】

特定の番号が付けられた例示的な実施形態

実施形態1. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び (b) 前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

40

【0552】

実施形態2. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び (b) 前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び (c) 少なくとも1つの摂動と一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

【0553】

実施形態3. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイル

50

ス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び(c)少なくとも1つの摂動、及び(d)少なくとも1つのライブラリバリエーションと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

【0554】

実施形態4. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び(c)少なくとも1つの摂動、及び(d)少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び(e)少なくとも1つのペイロードと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

10

【0555】

実施形態5. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び(c)少なくとも1つの摂動、及び(d)少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び(e)少なくとも1つのペイロード、及び(f)少なくとも1つの摂動アクセサリ配列と一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

20

【0556】

実施形態6. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び(c)少なくとも1つの摂動、及び(d)少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び(e)少なくとも1つのペイロード、及び(f)少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、及び(g)少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列と一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

30

【0557】

実施形態7. (a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び(c)少なくとも1つの摂動、及び(d)少なくとも1つのライブラリバリエーション、及び(e)少なくとも1つのペイロード、及び(f)少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、及び(g)少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び(h)少なくとも1つのシス作用性組み込み配列と一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

40

【0558】

実施形態8. それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記1つ以上の改変された配列が、(a) ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、前記哺乳動物細胞集団が、前記少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

50

【0559】

実施形態9．（a）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び（b）前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、任意選択で、1つ以上の改変された配列が、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含み、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

10

【0560】

実施形態10．それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記1つ以上の改変された配列が、（a）ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子、及び（b）前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、任意選択で、1つ以上の改変された配列が、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含み、前記哺乳動物細胞集団が、前記少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

20

【0561】

実施形態11．（a）少なくとも1つのライブラリ構築物、及び（b）前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの識別子を含み、前記識別子が、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、前記哺乳動物細胞が、前記少なくとも1つの識別子を含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

【0562】

実施形態12．それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記1つ以上の改変された配列が、（a）少なくとも1つのライブラリ構築物、及び（b）前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの識別子を含み、前記識別子が、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、前記哺乳動物細胞集団が、少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

30

【0563】

実施形態13．（a）少なくとも1つのライブラリ構築物であって、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの識別子を含み、前記識別子が、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置される、前記少なくとも1つのライブラリ構築物、及び（b）前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含む、1つ以上の改変された配列を含む哺乳動物細胞であって、任意選択で、1つ以上の改変された配列が、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含み、前記哺乳動物細胞集団が、前記少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

40

50

【0564】

実施形態14．それぞれが1つ以上の改変された配列を個別に含む複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記1つ以上の改変された配列が、(a)少なくとも1つのライブラリ構築物であって、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの識別子を含み、前記識別子が、ウイルスベクターにパッケージングすることができる2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置される、前記少なくとも1つのライブラリ構築物、及び(b)前記ウイルスベクターの産生に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドと一緒に含み、任意選択で、1つ以上の改変された配列が、少なくとも1つの摂動、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列、少なくとも1つのトランス作用性組み込み配列、及び／または少なくとも1つのシス作用性組み込み配列を含み、前記哺乳動物細胞集団が、前記少なくとも1つの識別子を個別に含むウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞。

10

【0565】

実施形態15．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、Exp1293細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、HeLaS3細胞、PER.C6細胞、HKB11細胞、CAP細胞、ベビーハムスター腎臓線維芽細胞(BHK細胞)(例えば、BHK-21細胞)、マウスミエローマ細胞(例えば、Sp2/0細胞、NS0細胞)、緑色アフリカザル腎細胞(例えば、COS細胞及びVero細胞)、A549細胞、アカゲザル胎児肺細胞(例えば、FRhL-2細胞)、またはそれらのいずれかの誘導体を含む、実施形態1～14のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0566】

実施形態16．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に浮遊細胞及び／または接着細胞を含む、実施形態15に記載の哺乳動物細胞もしくは哺乳動物細胞集団、またはその誘導体。

【0567】

実施形態17．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、HEK293細胞、HEK293T細胞、CHO細胞、またはそれらの誘導体を含む、実施形態1～16のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0568】

実施形態18．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、HEK293細胞、HEK293T細胞、またはそれらの誘導体を含む、実施形態1～17のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0569】

実施形態19．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別にHeLa細胞を含む、実施形態1～16のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0570】

実施形態20．前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、レトロウイルスベクター(例えば、ガンマレトロウイルスベクター)、ポリオーマウイルスベクター、(例えば、シミアンウイルス40(SV40)ベクター)、パピローマウイルスベクター(例えば、ウシパピローマウイルス(BPV)ベクター)、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、麻疹ウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、狂犬病ウイルスベクター、水疱性口内炎ウイルス(VSV)ベクター、ピコルナウイルスベクター(例えば、ポリオウイルスベクター)、レオウイルスベクター、セネカウイルスベクター、エコーウイルスベクター(例えば、RIGVIR)、セムリキフォレストウイルス(SFV)ベクター、フラビウイルスベクター、アネロウイルスベクター(<https://www.ringtx.com>)、ニューカッスル病ウイルス(NDV)ベクター、パラミクソウイルスベクター、センダイ

40

50

ウイルスベクター、オルソミクソウイルスベクター、インフルエンザウイルスベクター、コロナウイルスベクター、及び／またはハイブリッドウイルスベクター、及び／またはその誘導体、ハイブリッド、及び／または改変された誘導体である、実施形態 1～19 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0571】

実施形態 21．前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、実施形態 1～20 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0572】

実施形態 22．前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットが、それぞれ、AAV ベクターにパッケージングすることができる AAV ITR 配列である、実施形態 1～21 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0573】

実施形態 23．前記 AAV ベクターが、ヒト AAV1 キャプシドタンパク質、ヒト AAV2 キャプシドタンパク質、ヒト AAV3b キャプシドタンパク質、ヒト AAV4 キャプシドタンパク質、ヒト AAV5 キャプシドタンパク質、ヒト AAV6 キャプシドタンパク質、ヒト AAV7 キャプシドタンパク質、ヒト AAV8 キャプシドタンパク質、ヒト AAV9 キャプシドタンパク質、ヒト AAV10 キャプシドタンパク質、ヒト AAV11 キャプシドタンパク質、ヒト AAV12 キャプシドタンパク質、またはヒト AAV13 キャプシドタンパク質を含む、実施形態 1～22 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0574】

実施形態 24．前記 AAV ベクターが、ヒト祖先 AAV キャプシドタンパク質を含む、実施形態 1～23 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0575】

実施形態 25．前記ウイルスベクターが、AAV ベクターを含み、前記 AAV ベクターが、ヒト AAV1 ITR (複数可)、ヒト AAV2 ITR (複数可)、ヒト AAV3b ITR (複数可)、ヒト AAV4 ITR (複数可)、ヒト AAV5 ITR (複数可)、ヒト AAV6 ITR (複数可)、ヒト AAV7 ITR (複数可)、ヒト AAV8 ITR (複数可)、ヒト AAV9 ITR (複数可)、ヒト AAV10 ITR (複数可)、ヒト AAV11 ITR (複数可)、ヒト AAV12 ITR (複数可)、またはヒト AAV13 ITR (複数可) であるか、またはそれを含む、逆位末端配列 (ITR) のペアを含む 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットを含む、実施形態 1～24 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0576】

実施形態 26．前記 AAV ベクターが、ウシ AAV (b-AAV) キャプシドタンパク質、イヌ AAV (CAAV) キャプシドタンパク質、マウス AAV1 キャプシドタンパク質、ヤギ AAV キャプシドタンパク質、ラット AAV キャプシドタンパク質、またはトリ AAV (AAAV) キャプシドタンパク質を含む、実施形態 1～25 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0577】

40

実施形態 27．前記ウイルスベクターが、AAV ベクターを含み、前記 AAV ベクターが、ウシ AAV (b-AAV) ITR (複数可)、イヌ AAV (CAAV) ITR (複数可)、マウス AAV1 ITR (複数可)、ヤギ AAV ITR (複数可)、ラット AAV ITR (複数可)、またはトリ AAV (AAAV) ITR (複数可) であるか、またはそれを含む、ITR のペアを含む、実施形態 1～26 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0578】

実施形態 28．ウイルスベクターの形成に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、(a) AAV Rep 遺伝子、(b) AAV Cap 遺伝子、(c) 1 つ以上の AAV ヘルパー遺伝子、または (d) それらの組み合わせを含む

50

、実施形態 1～27 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0579】

実施形態 29 . 前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態 1～20 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0580】

実施形態 30 . 前記レンチウイルスベクターが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ベクター、サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルスベクター、ビスナウイルスベクター、またはその誘導体である、実施形態 29 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0581】

実施形態 31 . 前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットが、それぞれレンチウイルスベクターにパッケージングすることができるレンチウイルスLTR配列である、実施形態 29 または 30 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0582】

実施形態 32 . 前記レンチウイルスベクターが、レンチウイルスPsi配列を含む、実施形態 29～31 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0583】

実施形態 33 . 前記レンチウイルスベクターが、gagタンパク質またはその断片を含む、実施形態 29～32 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0584】

実施形態 34 . 前記 gag タンパク質が、マトリックス (MA)、キャプシド (CA)、及びヌクレオキャプシド (NC) ドメインから選択される 1 つ以上のドメインを含む、実施形態 29～33 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0585】

実施形態 35 . 前記レンチウイルスベクターが、エンベロープタンパク質またはその断片を含む、実施形態 29～34 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0586】

実施形態 36 . 前記レンチウイルスベクターが、異なるウイルスに由来する gag タンパク質及びエンベロープタンパク質を含む偽型レンチウイルスベクターである、実施形態 29～35 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0587】

実施形態 37 . 前記レンチウイルスベクターが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ベクター、サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルスベクター、ビスナウイルスベクター、またはその誘導体に由来する gag タンパク質及び／またはenvタンパク質を含む、実施形態 29～36 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0588】

実施形態 38 . 前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターを含み、前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) ベクター、サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルスベクター、ネコ免疫不全ウイルスベクター、ビスナウイルスベクター、またはそれらの誘導体に由来するレンチウイルスLTR及び／またはPsi配列を含む、実施形態 29～37 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0589】

実施形態 39 . ウイルスベクターの形成に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、(a) レンチウイルス gag 遺伝子、(b) レンチウイルスenv遺伝子、(c) レンチウイルスpol遺伝子、または(d) それらの組み合わせを含む、実施形態 29～38 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

20

30

40

50

【0590】

実施形態40．前記ウイルスベクターが単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターである、実施形態1～20のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0591】

実施形態41．HSVベクターが、単純ヘルペスウイルス1（HSV-1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV-2）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）、ヒトヘルペスウイルス6及び／またはヒトヘルペスウイルス7、及び／またはそれらの誘導体由来する、実施形態40に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0592】

実施形態42．前記ウイルスベクターがHSVベクターであり、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットが、末端a配列を含む、実施形態40または41に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0593】

実施形態43．前記キャプシドが、VP5、VP19C、VP23、プレVP22a及び／または成熟プロテアーゼ（UL26遺伝子産物）を含む、実施形態40～42のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0594】

実施形態44．前記ウイルスベクターがHSV-AAVハイブリッドベクターである、実施形態1～28または40～43のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0595】

実施形態45．前記ウイルスベクターが複製可能型ウイルスベクターである、実施形態1～44のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0596】

実施形態46．前記ウイルスベクターが、複製条件付、複製能欠失型、複製不能型、及び／または複製欠損型ウイルスベクターである、実施形態1～45のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0597】

実施形態47．少なくとも1つの改変された配列が、個々の哺乳動物細胞のそれぞれにおいてエピソームとして存在する、実施形態1～46のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0598】

実施形態48．少なくとも1つの改変された配列が、個々の哺乳動物細胞のそれぞれのゲノムに存在する、実施形態1～47のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0599】

実施形態49．少なくとも1つの改変された配列が、個々の哺乳動物細胞のそれぞれのゲノムに存在し、前記少なくとも1つの改変された配列が、誘導的に発現される、実施形態1～48のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0600】

実施形態50．少なくとも1つの改変された配列が、異種コード配列を含む、実施形態1～49のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0601】

実施形態51．前記異種コード配列が、異種遺伝子及び／または異種遺伝子セグメントを含む、実施形態50に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0602】

実施形態52．少なくとも1つの改変された配列が、異種調節エレメントを含む、実施形態1～51のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

50

【0603】

実施形態53．前記異種調節エレメントが、異種プロモーター配列及び／または異種エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態52に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0604】

実施形態54．前記異種プロモーター配列が、SV40プロモーター、伸長因子（EF）-1プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）1プロモーター、ユビキチン（Ubq）プロモーター、ヒトβアクチンプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント（TRE）プロモーター、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）プロモーター、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）プロモーター、スーパーコアプロモーター（SCP）、CAGプロモーター、もしくはその誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態53に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0605】

実施形態55．前記異種エンハンサー配列が、CMV前初期エンハンサー、cAMP応答エレメント（CRE）エンハンサー、もしくはそれらの誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態53または54に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0606】

実施形態56．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上の改変された配列を含む、実施形態1～55のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0607】

実施形態57．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、最大100個の改変された配列を含む、実施形態1～56のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0608】

実施形態58．個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、少なくとも1つのライブラリ構築物を含み、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの改変された配列を含む、実施形態1～57のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0609】

実施形態59．個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、少なくとも1つのライブラリ構築物を含み、前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのバーコード、少なくとも1つの識別子、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、少なくとも1つのシス作用性組み込み配列、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、実施形態1～58のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0610】

実施形態60．前記少なくとも1つのバーコードが、約5～約25ヌクレオチドである配列を含む、実施形態59に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0611】

実施形態61．前記哺乳動物細胞集団が、複数のユニークなバーコードを含み、前記複数のユニークなバーコードが、約5～約25ヌクレオチドであるユニークな配列を含む、実施形態59または60に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0612】

実施形態62．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のライブラリバリエーションを含む、実施形態59～61のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0613】

実施形態63．前記哺乳動物細胞が、それぞれ個別に、最大100個のライブラリバリエーションを含む、実施形態59～62のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

50

アントを含む、実施形態 59～61 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0614】

実施形態 64. 前記少なくとも 1 つのライブラリバリエーションが、少なくとも 1 つの遺伝子、少なくとも 1 つの ORF、少なくとも 1 つの gRNA 配列、少なくとも 1 つの非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、実施形態 59～61 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0615】

実施形態 65. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリバリエーションを含み、前記複数のライブラリバリエーションが、少なくとも 1 つのユニークな遺伝子、少なくとも 1 つのユニークな ORF、少なくとも 1 つのユニークな gRNA 配列、及び／または少なくとも 1 つのユニークな非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、少なくとも 1 つの改変された配列を含む、実施形態 1～64 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0616】

実施形態 66. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも 1 つのユニークな遺伝子、少なくとも 1 つのユニークな ORF、少なくとも 1 つのユニークな gRNA 配列、少なくとも 1 つのユニークな非コード核酸、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、実施形態 1～65 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0617】

実施形態 67. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、少なくとも 1 つの gRNA 配列を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0618】

実施形態 68. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも 1 つのユニークな gRNA 配列を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0619】

実施形態 69. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも 100 個のユニークな gRNA 配列を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0620】

実施形態 70. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、少なくとも 1 つの ORF を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0621】

実施形態 71. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも 1 つのユニークな ORF を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0622】

実施形態 72. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも 100 個のユニークな ORF を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0623】

実施形態 73. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、少なくとも 1 つの遺伝子を含む、実施形態 64～66 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0624】

実施形態 74. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数の

50

ライブラリ構築物が、少なくとも1つのユニークな遺伝子を含む、実施形態64～66のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0625】

実施形態75．前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも100個のユニークな遺伝子を含む、実施形態64～66のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0626】

実施形態76．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの非コード核酸配列を含む、実施形態64～66のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0627】

実施形態77．前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも1つのユニークな非コード核酸配列を含む、実施形態64～66のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0628】

実施形態78．前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、前記複数のライブラリ構築物が、少なくとも100個のユニークな非コード核酸配列を含む、実施形態64～66のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0629】

実施形態79．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのレポーター及び／または選択マーカー、またはそれらの組み合わせ及び／または複数のそれらを含む、実施形態58～78のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0630】

実施形態80．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つの識別子を含む、実施形態58～79のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0631】

実施形態81．前記哺乳動物細胞集団が、複数の識別子を含む複数のライブラリ構築物を含む、実施形態58～79のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0632】

実施形態82．個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、単一のバーコードを含む識別子を含む、実施形態80～81のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0633】

実施形態83．前記少なくとも1つの識別子が、(a)少なくとも1つのバーコード及び／または(b)少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む、実施形態80～81のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0634】

実施形態84．前記哺乳動物細胞集団が、(a)複数のバーコード及び／または(b)複数のライブラリバリエーションを含む複数の識別子を含む、実施形態80～81のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0635】

実施形態85．(i)前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、複数の改変された配列を含み、(a)前記複数の改変された配列の第1のサブセットが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、(b)前記複数の改変された配列の第2のサブセットが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態58～84のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0636】

実施形態86．前記複数の改変された配列が、(i)少なくとも1つのライブラリバリエーション及び(ii)少なくとも1つの識別子を含み、(ii)前記少なくとも1つのライブラリバリエーション及び前記少なくとも1つの識別子の両方が、前記2つのウイルス反復配

10

20

30

40

50

列の第1のセットの間に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0637】

実施形態87．前記複数の改変された配列が、(i)少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含み、(ii)前記少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び前記少なくとも1つのペイロードが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0638】

実施形態88．前記複数の改変された配列が、少なくとも1つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、(a)前記少なくとも1つの識別子が、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、(b)前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0639】

実施形態89．前記複数の改変された配列が、少なくとも1つのライブラリバリエーション、少なくとも1つの識別子、及び少なくとも1つのペイロードを含み、(a)前記少なくとも1つの識別子及び前記少なくとも1つのペイロードが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、(b)前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0640】

実施形態90．前記複数の改変された配列が、少なくとも2つのライブラリバリエーション及び少なくとも1つの識別子を含み、(a)前記少なくとも1つの識別子及び前記少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、(b)前記少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0641】

実施形態91．前記複数の改変された配列が、少なくとも2つのライブラリバリエーション、少なくとも1つのペイロード、及び少なくとも1つの識別子を含み、(a)前記少なくとも1つの識別子、少なくとも1つのペイロード、及び前記少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置され、(b)前記少なくとも2つのライブラリバリエーションのうちの少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態85に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0642】

実施形態92．前記少なくとも1つの識別子が、少なくとも1つのバーコードを含む、実施形態85～91のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0643】

実施形態93．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのバーコードを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、前記少なくとも1つのバーコードが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置される、実施形態85～91のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0644】

実施形態94．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのバーコードを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、前記少なくとも1つのバーコードが、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの外側に配置される、実施形態85～91の

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0645】

実施形態 95. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、複数のバーコードを含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、(a) 前記複数のバーコードの第 1 のサブセットが、前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットの間に配置され、(b) 前記複数のバーコードの第 2 のサブセットが、前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットの外側に配置される、実施形態 85～91 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0646】

実施形態 96. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、複数コピーの前記ライブラリ構築物またはその一部を含む、実施形態 58～95 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0647】

実施形態 97. 前記哺乳動物細胞集団が、複数コピーの前記ライブラリ構築物またはその一部を含む、実施形態 58～95 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0648】

実施形態 98. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、1～4 コピーの前記ライブラリ構築物またはその一部を含む、実施形態 58～95 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0649】

実施形態 99. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、2 コピーの前記ライブラリ構築物またはその一部を含む、実施形態 58～95 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0650】

実施形態 100. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、正確に 1 コピーの前記ライブラリ構築物を含む、実施形態 58～95 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0651】

実施形態 101. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、単一の連続核酸配列を含む、実施形態 58～100 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0652】

実施形態 102. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物のそれぞれが、単一の連続核酸配列からなり、前記複数のライブラリ構築物が、複数のユニークな核酸配列を含む、実施形態 58～101 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0653】

実施形態 103. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、複数の不連続核酸配列を含む、実施形態 58～102 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0654】

実施形態 104. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 の不連続な核酸配列を含む、実施形態 58～103 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0655】

実施形態 105. 前記少なくとも 1 つのライブラリ構築物が、最大 100 個の不連続核酸配列を含む、実施形態 58～104 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0656】

実施形態 106. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、個々のラ

50

イブラリ構築物のそれぞれが、不連続核酸配列からなり、前記ライブラリ構築物が、複数のユニークな核酸配列を含む、実施形態 58～105 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0657】

実施形態 107. 個々の哺乳動物細胞それぞれに由来する前記核酸またはその誘導体が、単一細胞シーケンシング法中に少なくとも 1 つのユニークな細胞同一性配列を含む、実施形態 58～106 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0658】

実施形態 108. 複数の核酸配列またはその誘導体が、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む、実施形態 58～107 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0659】

実施形態 109. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物のそれぞれが、不連続核酸配列からなり、前記ライブラリ構築物が、複数のユニークな核酸配列を含み、前記ライブラリ構築物由来の複数の核酸配列（またはその誘導体）が、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む、実施形態 58～108 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0660】

実施形態 110. 前記哺乳動物細胞集団が、複数のライブラリ構築物を含み、個々のライブラリ構築物のそれぞれが、不連続核酸配列からなり、前記ライブラリ構築物が、複数のユニークな核酸配列を含み、前記ライブラリ構築物由来のすべての核酸配列（またはその誘導体）が、単一細胞シーケンシング法中に細胞同一性配列を含む、実施形態 58～109 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0661】

実施形態 111. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、少なくとも 1 つの摂動を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、前記少なくとも 1 つの摂動が、前記哺乳動物細胞においてエピソームとして存在する、実施形態 1～110 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0662】

実施形態 112. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、少なくとも 1 つの摂動を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、前記少なくとも 1 つの摂動が、前記哺乳動物細胞のゲノムに存在する、実施形態 1～111 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0663】

実施形態 113. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、少なくとも 2 つの摂動を含む少なくとも 2 つの改変された配列を含み、少なくとも 1 つの摂動がエピソームとして存在し、少なくとも 1 つの摂動が前記哺乳動物細胞のゲノムに存在する、実施形態 1～112 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0664】

実施形態 114. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、複数のユニークな摂動を含む、少なくとも 1 つの改変された配列を含む、実施形態 1～113 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0665】

実施形態 115. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つまたは 9 つのユニークな摂動を含む、少なくとも 1 つの改変された配列を含む、実施形態 1～114 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0666】

実施形態 116. 前記少なくとも 1 つの摂動が、内在性ゲノムコード配列の挿入、欠失、置換、変換、エピジェネティック修飾、及び／または再編成を含む、実施形態 111～

50

115のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0667】

実施形態117. 前記内在性コード配列が、内在性遺伝子または遺伝子セグメントであるか、またはそれを含む、実施形態116に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0668】

実施形態118. 前記少なくとも1つの摂動が、内在性ゲノム調節エレメントの挿入、欠失、置換、変換、エピジェネティック修飾、及び／または再編成を含む、実施形態111～115のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0669】

実施形態119. 前記内在性調節エレメントが、内在性プロモーター配列及び／または内在性エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態118に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0670】

実施形態120. 前記哺乳動物細胞がそれぞれ個別に、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含む少なくとも1つの改変された配列を含み、前記少なくとも1つの摂動アクセサリ配列が、少なくとも1つのRNAガイドヌクレアーゼまたはその誘導体を含む、実施形態111～115のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0671】

実施形態121. 前記少なくとも1つのRNAガイドヌクレアーゼが、Cas9、Cpf1、及び／またはCas2、あるいは転写調節因子を含む融合タンパク質（例えば、Cas9-VPRまたはCas9-KRAB-MecP2融合体）、ヌクレアーゼドメインとのCRISPRタンパク質融合体（例えば、FokI）、酵素的塩基編集体（例えば、BE及びABE融合体のバージョン）、逆転写酵素融合体（例えば、Prime Editor）、CRISPRリコンビナーゼ（例えば、RecCas9）、及びCRISPRトランスポザーゼ（例えば、Tn7様トランスポザーゼ系Cas12k及びTnIQとのカスケード複合体）を含むそれらの誘導体を含む、実施形態120に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0672】

実施形態122. 前記少なくとも1つのRNAガイドヌクレアーゼが、Cas9またはその誘導体を含む、実施形態120に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0673】

実施形態123. 前記ライブラリ構築物を、トランスフェクションを介して個々の細胞のそれぞれに導入する、実施形態1～122のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0674】

実施形態124. 前記改変された配列が、ウイルス形質導入を介して個々の細胞のそれぞれに導入する少なくとも1つのライブラリ構築物を含む、実施形態123に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0675】

実施形態125. 前記ライブラリ構築物を、レンチウイルスを介した形質導入によって個々の細胞のそれぞれに導入する、実施形態124に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0676】

実施形態126. 前記少なくとも1つのライブラリ構築物またはその一部が、前記哺乳動物細胞においてエピソームとして存在する、実施形態123～125のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0677】

実施形態127. 前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含み、個々の細胞のそれぞれが

10

20

30

40

50

、少なくとも1つの摂動アクセサリ配列を含む、実施形態126に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0678】

実施形態128．前記少なくとも1つのライブラリ構築物が、少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む少なくとも1つの改変された配列を含む、実施形態126に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0679】

実施形態129．前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、少なくとも1つのエフェクターを含む、実施形態127～128のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0680】

実施形態130．前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、前記少なくとも1つの摂動になる、実施形態127～128のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0681】

実施形態131．前記少なくとも1つのライブラリバリエーションが、少なくとも1つのORF、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つの非コード核酸配列、及び／または少なくとも1つのgRNA、または複数のそれらを含む、実施形態129～130のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0682】

実施形態132．前記少なくとも1つのライブラリバリエーションがgRNAであり、前記少なくとも1つの摂動アクセサリ配列が、RNAガイドヌクレオチドまたはその誘導体である、実施形態131に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0683】

実施形態133．前記少なくとも1つの摂動アクセサリ配列が、非RNA依存性ヌクレオチドまたはその誘導体である、実施形態131に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0684】

実施形態134．少なくとも1つの摂動を含む、実施形態126～133のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0685】

実施形態135．ゲノム配列変化、エピソーム配列変化、及び／またはエピジェネティック修飾を含む少なくとも1つの摂動を含む、実施形態126～134のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0686】

実施形態136．前記摂動が、内在性ゲノムコード配列の挿入、欠失、置換、及び／または再編成を含む、実施形態126～135のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0687】

実施形態137．前記少なくとも1つのライブラリ構築物またはその一部が、前記哺乳動物細胞のゲノムに存在する、実施形態123～125のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0688】

実施形態138．前記哺乳動物細胞ゲノム内の少なくとも1つのライブラリ構築物の挿入が、ランダムな挿入部位である、実施形態137に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0689】

実施形態139．前記ランダムな挿入部位が、ゲノム位置の所定のサブセット内でランダムである、実施形態138に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0690】

10

20

30

40

50

実施形態 140. 前記哺乳動物細胞ゲノム内の少なくとも 1 つのライブラリ構築物の挿入が、所定の挿入部位である、実施形態 137 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0691】

実施形態 141. 少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列を含み、前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、(a) 少なくとも 1 つの組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクター、(b) 少なくとも 1 つのリコンビナーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物、(c) 少なくとも 1 つのヌクレアーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、またはポリヌクレオチド産物、(d) 少なくとも 1 つのトランスポザーゼ、及び／またはそのポリペ

10

【0692】

実施形態 142. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、少なくとも 1 つの組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクターを含む、実施形態 141 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0693】

実施形態 143. (a) 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、前記ウイルス反復配列の第 1 のセットに隣接する少なくとも 1 対のシス作用性組み込み配列を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、(b) 前記シス作用性組み込み配列が、ウイルス反復配列の第 2 のセットを含む、実施形態 141 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0694】

実施形態 144. 前記組み込み構築物及び／または組み込みウイルスベクターが、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター、スプマレトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはその誘導体である、実施形態 143 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0695】

実施形態 145. 前記組み込み構築物または組み込みウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、実施形態 144 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0696】

実施形態 146. 前記ウイルス反復配列の第 1 のセットが、ITR であるかまたはそれを含み、前記ウイルス反復配列の第 2 のセットが、LTR であるかまたはそれを含む、実施形態 145 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0697】

実施形態 147. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、ヌクレアーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、もしくはポリヌクレオチド産物を含む、実施形態 141 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0698】

実施形態 148. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、少なくとも 1 つのヌクレアーゼを含み、前記少なくとも 1 つのヌクレアーゼが、RNA ガイドヌクレアーゼまたはその融合体もしくは誘導体を含む、実施形態 147 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0699】

実施形態 149. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、少なくとも 1 つのヌクレアーゼを含み、前記少なくとも 1 つのヌクレアーゼが、非 RNA ガイドヌクレアーゼまたはその融合体もしくは誘導体を含む、実施形態 147 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0700】

実施形態 150. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、少なくとも 1

50

つの改変された配列をさらに含む、実施形態 1 4 8 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0701】

実施形態 1 5 1 . 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、少なくとも 1 つの gRNA をさらに含む、実施形態 1 4 8 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0702】

実施形態 1 5 2 . (a) 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、前記ウイルス反復配列の第 1 のセットに隣接する前記少なくとも 1 対のシス作用性組み込み配列を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、(b) 前記シス作用性組み込み配列が、相同性アーム配列を含む、実施形態 1 4 7 ~ 1 5 1 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0703】

実施形態 1 5 3 . 前記少なくとも 1 つのヌクレアーゼが、Cas9、CasZ、Cpf1、プログラム可能な DNA 結合ドメインとの改変 FokI ヌクレアーゼドメイン融合体、例えば、TALE タンパク質 (TALEN) またはジンクフィンガータンパク質 (ZFN)、及び／またはメガヌクレアーゼ、またはその誘導体を含む、実施形態 1 5 2 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0704】

実施形態 1 5 5 . 前記少なくとも 1 つのヌクレアーゼが、Cas9 を含む、実施形態 1 5 3 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0705】

実施形態 1 5 6 . 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、リコンビナーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、もしくはポリヌクレオチド産物を含む、実施形態 1 4 1 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0706】

実施形態 1 5 7 . (a) 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、前記ウイルス反復配列の第 1 のセットに隣接する前記少なくとも 1 対のシス作用性組み込み配列を含む少なくとも改変された配列を含み、(b) 前記シス作用性組み込み配列が、リコンビナーゼ認識部位を含む、実施形態 1 5 6 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0707】

実施形態 1 5 8 . 前記少なくとも 1 つのリコンビナーゼが、Cre、Flp、Dre、PhiC31、及び／または Bxb1、またはその誘導体を含む、実施形態 1 5 7 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0708】

実施形態 1 5 9 . 前記少なくとも 1 つのリコンビナーゼが、Cre を含む、実施形態 1 5 8 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0709】

実施形態 1 6 0 . 前記リコンビナーゼ認識部位が、LoxP 部位を含む、実施形態 1 5 9 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0710】

実施形態 1 6 1 . 前記少なくとも 1 つのリコンビナーゼが、Bxb1 を含む、実施形態 1 5 8 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0711】

実施形態 1 6 2 . 前記リコンビナーゼ認識部位が、Att 部位を含む、実施形態 1 6 1 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0712】

実施形態 1 6 3 . 前記少なくとも 1 つのリコンビナーゼが、Flp を含む、実施形態 1 5 8 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0713】

50

実施形態 164. 前記リコンビナーゼ認識部位が、F r t 部位を含む、実施形態 163 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0714】

実施形態 165. 前記少なくとも 1 つのトランス作用性組み込み配列が、トランスポザーゼ、及び／またはそのポリペプチド、タンパク質、核酸、もしくはポリヌクレオチド産物を含む、実施形態 141 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0715】

実施形態 166. (a) 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、前記ウイルス反復配列の第 1 のセットに隣接する前記少なくとも 1 対のシス作用性組み込み配列を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含み、(b) 前記シス作用性組み込み配列が、トランスポザーゼ認識部位を含む、実施形態 165 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0716】

実施形態 167. 前記少なくとも 1 つのトランスポザーゼが、P i g g y b a c トランスポザーゼ、S l e e p i n g b e a u t y トランスポザーゼ、及び／または T n 5 トランスポザーゼ、またはそれらの誘導体を含む、実施形態 166 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0717】

実施形態 168. 前記少なくとも 1 つのトランスポザーゼが、P i g g y b a c トランスポザーゼを含む、実施形態 167 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0718】

実施形態 169. 前記少なくとも 1 つのトランスポザーゼが、S l e e p i n g b e a u t y トランスポザーゼを含む、実施形態 167 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0719】

実施形態 170. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、改変されたウイルスベクターを産生する、実施形態 1～169 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0720】

実施形態 171. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、核酸を細胞に移入する方法が改変されたウイルスベクターを産生する、実施形態 170 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0721】

実施形態 172. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、治療的に改変されたウイルスベクターを産生する、実施形態 170 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0722】

実施形態 173. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、それらの意図する用途において改変されたウイルスベクターを産生する、実施形態 1～172 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0723】

実施形態 174. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、用途において機能性が低いウイルスベクターを産生する、実施形態 1～173 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0724】

実施形態 175. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、用途において非機能的なウイルスベクターを産生する、実施形態 1～174 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0725】

実施形態 176. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、細胞への核酸の導入において機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する、実施形態 174 または 175 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

50

【0726】

実施形態177. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、治療的に機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する、実施形態174～175のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0727】

実施形態178. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、それらの意図する用途において、機能性が低い、及び／または非機能的なウイルスベクターを産生する、実施形態174～175のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0728】

実施形態179. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、用途において、より機能的であり、及び／または増強されたウイルスベクターを産生する、実施形態1～178のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0729】

実施形態180. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、細胞への核酸の導入において、より機能的であり、及び／または増強されたウイルスベクターを産生する、実施形態179に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0730】

実施形態181. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、治療的により機能的であり、及び／または増強されたウイルスベクターを産生する、実施形態179に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

20

【0731】

実施形態182. 前記細胞集団が、参照集団と比較して、それらの意図する用途において、より機能的であり、及び／または増強されたウイルスベクターを産生する、実施形態179に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0732】

実施形態183. 前記少なくとも1つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でウイルスベクター産生を変化させる、実施形態1～182のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0733】

実施形態184. 前記少なくとも1つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でのウイルスベクター産生を増加させる、実施形態1～183のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

30

【0734】

実施形態185. ウイルスベクター産生を変化させる前記少なくとも1つの改変された配列が、少なくとも1つの摂動を含む、実施形態183または184に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0735】

実施形態186. 前記少なくとも1つの摂動が、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）の下でウイルスベクター産生を増加させる、実施形態185に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

40

【0736】

実施形態187. 前記少なくとも1つの摂動が、優良医薬品製造基準（GMP）の下でウイルスベクター産生を増加させる、実施形態185に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0737】

実施形態188. 前記少なくとも1つの摂動が、非優良医薬品製造基準（非GMP）の下でウイルスベクター産生を増加させる、実施形態185に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0738】

実施形態189. 前記少なくとも1つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、

50

前記哺乳動物細胞集団の生存率を増加させる、実施形態 1 ～ 188 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0739】

実施形態 190. 前記少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団によるウイルスベクター産生の持続時間を増加させる、実施形態 1 ～ 189 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0740】

実施形態 191. 前記少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団のゲノム安定性を増加させる、実施形態 1 ～ 190 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0741】

実施形態 192. 前記少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、用途において機能性が低い医薬品製造基準下で産生されたウイルスベクターの割合を減少させる、実施形態 1 ～ 185 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0742】

実施形態 193. 前記少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、用途において非機能的である医薬品製造基準下で産生されたウイルスベクターの割合を減少させる、実施形態 1 ～ 185 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0743】

実施形態 194. 前記割合が減少したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、核酸を細胞に移入する際に機能性が低い、及び／または非機能的である、実施形態 192 または 193 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0744】

実施形態 195. 前記割合が減少したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、治療的に機能性が低い、及び／または非機能的である、実施形態 192 または 193 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0745】

実施形態 196. 前記割合が減少したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途において機能性が低い、及び／または非機能的である、実施形態 192 または 193 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0746】

実施形態 197. 前記少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、用途においてより機能的であり、及び／または増強された、医薬品製造基準下で産生されたウイルスベクターの割合を増加させる、実施形態 1 ～ 191 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0747】

実施形態 198. 前記割合が増加したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、核酸を細胞に移入する際に、より機能的であり、及び／または増強された、実施形態 197 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0748】

実施形態 199. 前記割合が増加したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、治療的により機能的であり、及び／または増強された、実施形態 197 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0749】

実施形態 200. 前記割合が増加したウイルスベクターが、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途において、より機能的であり、及び／または増強された、実施形態 197 に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0750】

10

20

30

40

50

実施形態 201. 少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途のためのすべての及び／または必須の核酸配列及び／または他のエレメントを含むウイルスベクターの割合を医薬品製造基準下で増加させる、実施形態 1 ～ 191 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0751】

実施形態 202. 少なくとも 1 つの改変された配列が、参照細胞集団と比較して、それらの意図する用途のためのすべての及び／または必須の核酸配列及び／または他のエレメントを欠失しており、及び／または変異しているウイルスベクターの割合を医薬品製造基準下で減少させる、実施形態 1 ～ 191 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

10

【0752】

実施形態 203. 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、少なくとも 1 つの摂動を含む少なくとも 1 つの改変された配列を含む、実施形態 1 ～ 202 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0753】

実施形態 204. 前記哺乳動物細胞集団が、複数の改変された配列を含み、前記複数の改変された配列が、複数の摂動を含む、実施形態 1 ～ 203 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0754】

実施形態 205. 個々の哺乳動物細胞がそれぞれ、複数の摂動を含む複数の改変された配列を含む、実施形態 1 ～ 204 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0755】

実施形態 206. 前記参照細胞集団が、(a) 前記少なくとも 1 つの改変された配列を含まない同等の哺乳動物細胞集団、及び／または (b) ウイルスベクターを産生することができる標準細胞集団である、実施形態 1 ～ 205 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞または哺乳動物細胞集団。

【0756】

実施形態 207. (a) 複数のライブラリ構築物であって、前記個々のライブラリ構築物が、前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットの間に配置された少なくとも 1 つの識別子を含む、前記複数のライブラリ構築物を含む複数の改変された配列を、前記複数の哺乳動物細胞に導入し、(b) 前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む前記少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを、前記複数の哺乳動物細胞に導入するステップによって産生される、実施形態 1 ～ 206 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0757】

実施形態 208. 複数のライブラリ構築物であって、前記個々のライブラリ構築物が、前記 2 つのウイルス反復配列の第 1 のセットの間に配置された少なくとも 1 つの識別子を含み、前記複数の哺乳動物細胞が、前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む、前記複数のライブラリ構築物を含む複数の改変された配列を、前記複数の哺乳動物細胞に導入するステップによって産生される、実施形態 1 ～ 206 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0758】

実施形態 209. 哺乳動物細胞がウイルスベクターを産生するような条件下で、実施形態 1 ～ 206 のいずれか 1 項に記載のように前記哺乳動物細胞の集団を培養することを含むウイルスベクターの産生方法であって、産生される各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子に由来する少なくとも 1 つの識別子を含む、前記産生方法。

【0759】

実施形態 210. 産生した各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子と同一である少なくとも 1 つの識別子を含

50

む、実施形態 209 に記載の方法。

【0760】

実施形態 211. (a) 哺乳動物細胞のライブラリであって、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、前記複数の哺乳動物細胞の各々が、個別に、(i) 少なくとも 1 つの改変された配列、(ii) 少なくとも 1 つの識別子、及び (iii) 前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子に由来する少なくとも 1 つの識別子を含む、前記哺乳動物細胞のライブラリからウイルスベクターを産生し、(b) 前記ウイルスベクター中の前記 1 つ以上の識別子を検出することを含む方法。

10

【0761】

実施形態 212. 各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子と同一である少なくとも 1 つの識別子を含む、実施形態 211 に記載の方法。

【0762】

実施形態 213. (a) 哺乳動物細胞のライブラリであって、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、前記複数の哺乳動物細胞の各々が、個別に、(i) 少なくとも 1 つの改変された配列、(ii) 少なくとも 1 つの識別子、及び (iii) 前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子に由来する少なくとも 1 つの識別子を含む、前記哺乳動物細胞のライブラリからウイルスベクターを産生し、(b) 前記ウイルスベクター中の前記 1 つ以上の識別子を次世代シーケンシングによって検出することを含む方法。

20

【0763】

実施形態 214. 各ウイルスベクターが、前記ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つの識別子と同一である少なくとも 1 つの識別子を含む、実施形態 213 に記載の方法。

【0764】

実施形態 215. (a) AAV ライブラリであって、前記 AAV ライブラリが、哺乳動物細胞のライブラリに由来する複数の AAV ベクターを含み、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、前記複数の哺乳動物細胞の各々が、個別に、(i) 少なくとも 1 つの改変された配列、(ii) 少なくとも 1 つのバーコード配列、及び (iii) 前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、各 AAV ウイルスベクターが、少なくとも 1 つの構築物を含み、前記少なくとも 1 つの構築物が、前記 AAV ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つのバーコード配列に由来するバーコード配列を含む、前記 AAV ライブラリを作製し、(b) 前記 AAV ライブラリ内の前記 1 つ以上のバーコード配列を検出するステップを含む方法。

30

【0765】

実施形態 216. 各 AAV ウイルスベクターが、少なくとも 1 つの構築物を含み、前記少なくとも 1 つの構築物が、前記 AAV ウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む、実施形態 215 に記載の方法。

40

【0766】

実施形態 217. (a) AAV ライブラリであって、前記 AAV ライブラリが、哺乳動物細胞のライブラリに由来する複数の構築物を含み、前記哺乳動物細胞のライブラリが、複数の哺乳動物細胞を含み、前記複数の哺乳動物細胞の各々が、個別に、(i) 少なくとも 1 つの改変された配列、(ii) 少なくとも 1 つのバーコード配列、及び (iii) 前記ウイルスベクターの産生に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、各 AAV ウイルスベクターが、少なくとも 1 つの構築物を含み、前記少

50

なくとも1つの構築物が、前記AAVウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも1つのバーコード配列に由来するバーコード配列を含む、前記AAVライブラリを作製し、(b)前記AAVライブラリ内の前記1つ以上のバーコード配列を次世代シーケンシングによって検出するステップを含む方法。

【0767】

実施形態218. 各AAVウイルスベクターが、少なくとも1つの構築物を含み、前記少なくとも1つの構築物が、前記AAVウイルスベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも1つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む、実施形態217に記載の方法。

【0768】

実施形態219. 哺乳動物細胞のライブラリの各個々の細胞内で、少なくとも1つまたはすべての核酸配列またはその誘導体の単一細胞シーケンシングをさらに含み、前記少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体が、単一細胞シーケンシング法の間に単一細胞同一性配列を含み、前記少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体が、少なくとも1つのライブラリ構築物を含む、実施形態209～218のいずれか1項に記載の方法。

【0769】

実施形態220. 哺乳動物細胞のライブラリの各個々の細胞内で、少なくとも1つまたはすべての核酸配列またはその誘導体の単一細胞シーケンシングをさらに含み、前記少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体が、単一細胞シーケンシング法に関して単一細胞同一性配列を含み、前記少なくとも1つまたはすべての核酸配列、またはその誘導体が、少なくとも1つの識別子を含む少なくとも1つのライブラリバリエーションを含む、実施形態209～218のいずれか1項に記載の方法。

【0770】

実施形態221. 第2のライブラリ構築物を哺乳動物細胞に導入し、前記哺乳動物細胞が、第1のライブラリ構築物に由来する少なくとも1つの摂動を含み、前記第2のライブラリ構築物が、前記2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含む少なくとも1つの改変された配列を含む、実施形態209～220のいずれか1項に記載の方法。

【0771】

実施形態222. 前記第2の複数のライブラリ構築物を複数の哺乳動物細胞に導入し、前記複数の哺乳動物細胞が、第1の複数のライブラリ構築物に由来する少なくとも1つの摂動を含み、前記第2の複数のライブラリ構築物が、複数の改変された配列を含み、第2の複数のライブラリ構築物中の個々のライブラリ構築物はそれぞれ、2つのウイルス反復配列の第1のセットの間に配置された少なくとも1つの識別子を含む、実施形態209～221のいずれか1項に記載の方法。

【0772】

実施形態223. 単一細胞シーケンシング及び／または次世代シーケンシングによる、1つ以上の識別子及び／または1つ以上の改変された配列の検出をさらに含む、実施形態221～222のいずれか1項に記載の方法。

【0773】

実施形態224. 2ラウンドを上回るライブラリ構築物の導入ならびに1つ以上の識別子及び／または1つ以上の改変された配列の検出を含む、実施形態221～223のいずれか1項に記載の方法。

【0774】

実施形態225. 機械学習アプローチを使用して機械学習モデルを開発し、標的の摂動の望ましい組み合わせを特定することをさらに含む、実施形態221～224のいずれか1項に記載の方法。

【0775】

実施形態226. 前記少なくとも1つの識別子を前記細胞から除去する、実施形態20

10

20

30

40

50

7～225のいずれか1項に記載の方法。

【0776】

実施形態227．產生された各ウイルスベクターが、レポーター及び／または選択マーカーを含む、実施形態209～226のいずれか1項に記載の方法。

【0777】

実施形態228．前記方法が、前記レポーター及び／または選択マーカーを除去するステップをさらに含む、実施形態227に記載の方法。

【0778】

実施形態229．（a）少なくとも1つの改変された核酸配列、（b）少なくとも1つのバーコード配列、及び（c）ウイルスベクターの產生に必須である1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドをそれぞれ個別に含む、複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記複数の哺乳動物細胞が、複数の前記ウイルスベクターを產生する、前記哺乳動物細胞集団。

10

【0779】

実施形態230．前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でのウイルスベクター產生を増加させる、実施形態229に記載の哺乳動物細胞集団。

【0780】

実施形態231．前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、現行の優良医薬品製造基準（cGMP）の下で、前記產生されたウイルスベクターを増加させる、実施形態229または230に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0781】

実施形態232．前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団の生存率を増加させる、実施形態229～231のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0782】

実施形態233．前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団によるウイルスベクター產生の持続時間を増加させる、実施形態229～232のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0783】

実施形態234．前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団のゲノム安定性を増加させる、実施形態229～233のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0784】

実施形態235．前記参照細胞集団が、（i）前記少なくとも1つの改変された核酸配列を含まない同等の哺乳動物細胞集団、または（ii）前記ウイルスベクターを產生することができる標準細胞集団である、実施形態230～234のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0785】

実施形態236．（a）～（c）の少なくとも1つが、前記哺乳動物細胞においてエピソームとして存在する、実施形態229～235のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0786】

実施形態237．（a）～（c）の少なくとも1つが、前記哺乳動物細胞のゲノムに存在する、実施形態229～236のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0787】

実施形態238．前記少なくとも1つのバーコード配列が、単一のバーコード配列からなり、前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、単一の改変された核酸配列からなる、実施形態229～237のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0788】

50

実施形態 239. 前記少なくとも 1 つのバーコード配列が、前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列と関連している、実施形態 238 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0789】

実施形態 240. 前記少なくとも 1 つのバーコード配列が、第 1 のバーコード配列及び第 2 のバーコード配列からなり、前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、第 1 の改変された核酸配列及び第 2 の改変された核酸配列からなる、実施形態 229 ~ 237 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0790】

実施形態 241. 前記第 1 のバーコード配列が、前記第 1 の改変された核酸配列と関連し、前記第 2 のバーコード配列が、前記第 2 の改変された核酸配列と関連している、実施形態 240 に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0791】

実施形態 242. 前記第 2 の改変された核酸配列を、前記第 1 の改変された核酸配列の後に選択し、及び／または前記哺乳動物細胞集団に導入する、実施形態 240 または 241 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0792】

実施形態 243. 第 3 のバーコード配列に関連する第 3 の改変された配列をさらに含む、実施形態 240 ~ 242 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0793】

実施形態 244. 前記少なくとも 1 つのバーコード配列が、単一のバーコード配列からなり、前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、少なくとも 2 つの改変された核酸配列からなる、実施形態 229 ~ 237 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0794】

実施形態 245. 前記少なくとも 1 つのバーコード配列が、単一のバーコード配列からなり、前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの改変された核酸配列からなる、実施形態 229 ~ 237 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0795】

実施形態 246. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、異種コード配列を含む、実施形態 229 ~ 245 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0796】

実施形態 247. 前記異種コード配列が、異種遺伝子及び／または異種遺伝子セグメントであるか、それを含む、実施形態 246 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0797】

実施形態 248. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、異種調節エレメントを含む、実施形態 229 ~ 247 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0798】

実施形態 249. 前記異種調節エレメントが、異種プロモーター配列及び／または異種エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態 248 に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0799】

実施形態 250. 前記異種プロモーター配列が、SV40 プロモーター、伸長因子 (EF) -1 プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 1 プロモーター、ユビキチン (Ubc) プロモーター、ヒト β アクチンプロモーター、テトラサイクリン応答エレメント (TRE) プロモーターもしくはその誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態 248 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0800】

実施形態 251. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノム内の内在性コード配列の挿入、欠失、置換、変換、または再編成であるか、またはそれを含む、実施形態 229 ~ 250 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

50

【0801】

実施形態252. 前記内在性コード配列が、内在性遺伝子または遺伝子セグメントであるか、またはそれを含む、実施形態251に記載の哺乳動物細胞集団。

【0802】

実施形態253. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノム内の内在性調節エレメントの挿入、欠失、置換、変換、または再編成を含む、実施形態229～252のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0803】

実施形態254. 前記内在性調節エレメントが、内在性プロモーター配列及び／または内在性エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態253に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0804】

実施形態255. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノム内の挿入を含む、実施形態229～254のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0805】

実施形態256. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノムへのウイルスまたは非ウイルス核酸配列の挿入を含む、実施形態229～255のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0806】

実施形態257. 前記哺乳動物細胞ゲノム内の前記挿入が、ランダム挿入部位を含む、実施形態255または256に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0807】

実施形態258. 前記ランダムな挿入部位が、ゲノム位置の所定のサブセット内でランダムである、実施形態257に記載の哺乳動物細胞集団。

【0808】

実施形態259. 前記哺乳動物細胞ゲノム内の前記挿入が、所定の挿入部位を含む、実施形態255または256に記載の哺乳動物細胞集団。

【0809】

実施形態260. 前記第2の改変された核酸配列が、所定の挿入部位での挿入であるか、またはそれを含む、実施形態240～242のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0810】

実施形態261. 前記所定の挿入部位を、合理的に選択する、実施形態260に記載の哺乳動物細胞集団。

【0811】

実施形態262. 前記所定の挿入部位を、機械学習を使用して合理的に選択する、実施形態261に記載の哺乳動物細胞集団。

【0812】

実施形態263. 前記所定の挿入部位を、前記哺乳動物細胞ゲノムにおける前記第1の改変された配列の前記配列または前記第1の改変された配列の前記位置を使用して合理的に選択する、実施形態262に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0813】

実施形態263. 前記第1の改変された核酸配列及び第1のバーコード配列を前記複数の哺乳動物細胞に導入し、前記第2の改変された核酸配列及び第2のバーコード配列を前記複数の哺乳動物細胞に導入するステップによって産生され、前記第2の改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノムの所定の部位に挿入される、実施形態240～242のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0814】

実施形態264. 前記少なくとも1つのバーコード配列が、約5～約25ヌクレオチドである核酸配列を含む、実施形態229～263のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集

50

団。

【0815】

実施形態265. 前記複数の哺乳動物細胞が、ヒト胎児腎臓（HEK）細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、PER.C6細胞、HKB11細胞、CAP細胞、ベビーハムスター腎線維芽細胞（BHK細胞）、Sp2/0細胞、NS0細胞、COS細胞、Vero細胞、もしくはそれらのいずれかの誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態229～264のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0816】

実施形態266. 前記複数の哺乳動物細胞が、HEK293細胞、CHO細胞、またはそれらの誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態229～264のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0817】

実施形態267. 前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、実施形態229～266のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0818】

実施形態268. 前記AAVベクターが、ヒトAAV1キャプシドタンパク質、ヒトAAV2キャプシドタンパク質、ヒトAAV3bキャプシドタンパク質、ヒトAAV4キャプシドタンパク質、ヒトAAV5キャプシドタンパク質、ヒトAAV6キャプシドタンパク質、ヒトAAV7キャプシドタンパク質、ヒトAAV8キャプシドタンパク質、ヒトAAV9キャプシドタンパク質、ヒトAAV10キャプシドタンパク質、ヒトAAV11キャプシドタンパク質、ヒトAAV12キャプシドタンパク質、またはヒトAAV13キャプシドタンパク質を含む、実施形態267に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0819】

実施形態269. 前記AAVベクターが、ヒト祖先AAVキャプシドタンパク質を含む、実施形態267に記載の哺乳動物細胞集団。

【0820】

実施形態270. 前記AAVベクターが、AAVベクターを含み、前記AAVベクターが、ヒトAAV1 ITR（複数可）、ヒトAAV2 ITR（複数可）、ヒトAAV3b ITR（複数可）、ヒトAAV4 ITR（複数可）、ヒトAAV5 ITR（複数可）、ヒトAAV6 ITR（複数可）、ヒトAAV7 ITR（複数可）、ヒトAAV8 ITR（複数可）、ヒトAAV9 ITR（複数可）、ヒトAAV10 ITR（複数可）、ヒトAAV11 ITR（複数可）、ヒトAAV12 ITR（複数可）、またはヒトAAV13 ITR（複数可）であるか、またはそれを含む、逆位末端配列（ITR）のペアを含む、実施形態240～242のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0821】

実施形態271. 前記AAVベクターが、ウシAAV（b-AAV）キャプシドタンパク質、イヌAAV（CAAV）キャプシドタンパク質、マウスAAV1キャプシドタンパク質、ヤギAAVキャプシドタンパク質、ラットAAVキャプシドタンパク質、またはトリAAV（AAAV）キャプシドタンパク質を含む、実施形態267に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0822】

実施形態272. 前記AAVベクターが、AAVベクターを含み、前記AAVベクターが、ウシAAV（b-AAV）ITR（複数可）、イヌAAV（CAAV）ITR（複数可）、マウスAAV1 ITR（複数可）、ヤギAAV ITR（複数可）、ラットAAV ITR（複数可）、またはトリAAV（AAAV）ITR（複数可）であるか、またはそれを含む、ITRのペアを含む、実施形態267～271のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0823】

実施形態273. ウイルスベクターの形成に必須の1つ以上の核酸配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドが、AAV Rep遺伝子、AAV Cap遺伝子、1つ以上

50

のアデノウイルスヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 267～272 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0824】

実施形態 274．前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、レポーター遺伝子、治療遺伝子、免疫原性遺伝子、診断遺伝子、もしくはそれらの組み合わせであるか、またはそれを含む導入遺伝子をさらに含む、実施形態 229～273 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0825】

実施形態 275．前記複数の哺乳動物細胞が、前記導入遺伝子を含む複数の前記ウイルスベクターを産生する、実施形態 274 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0826】

実施形態 276．複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、個別に、(a) 少なくとも 1 つの改変された核酸配列、(b) 少なくとも 1 つのバーコード配列、及び (c) AAV Rep 遺伝子、AAV Cap 遺伝子、1 つ以上のアデノウイルスヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせから選択される AAV ベクターの形成に必須の 1 つ以上のエレメントを含む少なくとも 1 つの核酸配列を含み、前記複数の哺乳動物細胞が、複数の前記 AAV ベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

【0827】

実施形態 277．アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの産生に適した複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、個別に、(a) 少なくとも 1 つの改変された核酸配列、(b) 少なくとも 1 つのバーコード配列、及び (c) AAV ベクターの形成に必須の 1 つ以上のエレメントを含む少なくとも 1 つの核酸配列を含み、前記複数の哺乳動物細胞が、前記 AAV ベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

【0828】

実施形態 278．(a) 複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞のライブラリから、複数の AAV ベクターを含む AAV ライブラリを作製するステップを含み、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが個別に、少なくとも 1 つの改変された核酸配列、少なくとも 1 つのバーコード配列、及び AAV ベクターの形成に必須の 1 つ以上のエレメントを発現する少なくとも 1 つの核酸配列を含み、各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む AAV ベクターを含み、(b) 前記 AAV ライブラリ内の前記 1 つ以上のバーコード配列を検出するステップを含む方法。

【0829】

実施形態 279．前記バーコードを検出するステップが、前記バーコードを配列決定するステップを含む、実施形態 278 に記載の方法。

【0830】

実施形態 280．前記配列決定するステップが、次世代シーケンシング (NGS) ステップを含む、実施形態 279 に記載の方法。

【0831】

実施形態 281．前記 AAV ライブラリ中のバーコードの存在に基づいて、AAV ベクターを産生する哺乳動物細胞を同定することをさらに含む、実施形態 278～280 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0832】

実施形態 282．実施形態 281 において同定された哺乳動物細胞を培養し、それによって AAV ベクターを産生することを含む、哺乳動物細胞における AAV ベクターの産生方法。

【0833】

実施形態 283．前記哺乳動物細胞が AAV ベクターを産生するような条件下で、実施

10

20

30

40

50

形態 229～279 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団を培養することを含み、産生される各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを産生した哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つのバーコード配列と同一である少なくとも 1 つのバーコード配列を含む AAV ベクターを含む、AAV ベクターの産生方法。

【0834】

実施形態 284．前記 AAV ベクターを単離することをさらに含む、実施形態 282～283 に記載の方法。

【0835】

実施形態 285．前記 AAV ベクターを産生した前記哺乳動物細胞が、HEK 細胞または CHO 細胞である、実施形態 280～284 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0836】

実施形態 286．前記方法が、哺乳動物細胞あたり少なくとも約 1×10^3 個の AAV ベクターを提供する、実施形態 280～285 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0837】

実施形態 287．前記方法が、培養 1 リットルあたり少なくとも約 1×10^3 個の AAV ベクターを提供する、実施形態 280～286 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0838】

実施形態 288．実施形態 282～287 のいずれか 1 項に記載の方法によって産生される AAV ベクター。

【0839】

実施形態 289．実施形態 281 において同定された哺乳動物細胞を条件付きで培養し、それによって AAV ベクターを産生することを含む、哺乳動物細胞における AAV ベクターの産生方法。

【0840】

実施形態 290．前記哺乳動物細胞が AAV ベクターを産生するような条件下で哺乳動物細胞を培養することを含み、前記哺乳動物細胞がそれぞれ、個別に、少なくとも 1 つの改変された核酸配列、少なくとも 1 つのバーコード配列、及び AAV ベクターの形成に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを産生した前記哺乳動物細胞の前記少なくとも 1 つのバーコード配列と同一である少なくとも 1 つのバーコード配列を含む、AAV ベクターの産生方法。

【0841】

実施形態 291．前記 AAV ベクターを単離することをさらに含む、実施形態 290 に記載の方法。

【0842】

実施形態 292．前記同定された哺乳動物細胞が、HEK 細胞または CHO 細胞である、実施形態 290 または 291 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0843】

実施形態 293．実施形態 289～290 のいずれか 1 項に記載の方法によって産生される AAV ベクター。

【0844】

実施形態 294．少なくとも 1×10^3 個の AAV ベクターを含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターのライブラリであって、各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを同定するのに適したバーコード配列を含む、前記ライブラリ。

【0845】

実施形態 295．少なくとも 1×10^3 個の AAV ベクターを含む、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターのライブラリであって、各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを産生した哺乳動物細胞または哺乳動物クローン細胞株を同定するのに適したバーコード配列を含む、前記ライブラリ。

【0846】

10

20

30

40

50

実施形態 296. 前記 AAV ベクターがそれぞれ、導入遺伝子をコードする核酸配列を含む AAV ベクターを含む、実施形態 294 または 295 に記載のライブラリ。

【0847】

実施形態 297. 前記 AAV ベクターが、哺乳動物細胞または哺乳動物クローン細胞株によって産生される、実施形態 294 ~ 296 のいずれか 1 項に記載のライブラリ。

【0848】

実施形態 298. 複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、各哺乳動物細胞が、(a) 少なくとも 1 つの改変された核酸配列、(b) 少なくとも 1 つのバーコード配列、及び (c) ウイルスベクターの形成に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含み、前記複数の哺乳動物細胞が、複数の前記ウイルスベクターを産生し、前記複数の哺乳動物細胞が、哺乳動物細胞の 2 つ以上のサブセットを含み、哺乳動物細胞の各サブセットが、少なくとも 1 つの改変された核酸配列及び前記サブセットにユニークな少なくとも 1 つのバーコード配列を含む、前記哺乳動物細胞集団。

【0849】

実施形態 299. (a) 複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞のライブラリから、複数の AAV ベクターを含む AAV ライブラリを作製するステップを含み、前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが個別に、少なくとも 1 つの改変された核酸配列、少なくとも 1 つのバーコード配列、及び AAV ベクターの形成に必須の 1 つ以上のエレメントを発現する少なくとも 1 つの核酸配列を含み、前記複数の哺乳動物細胞が、哺乳動物細胞の 2 つ以上のサブセットを含み、哺乳動物細胞の各サブセットが、前記サブセットにユニークな少なくとも 1 つの改変された核酸配列及び少なくとも 1 つのバーコード配列を含み、前記複数の各 AAV ベクターが、前記 AAV ベクターを産生した前記哺乳動物細胞の少なくとも 1 つのバーコード配列と同一であるバーコード配列を含む AAV ベクターを含み、(b) 前記 AAV ライブラリ内の前記 1 つ以上のバーコード配列を検出するステップを含む方法。

【0850】

実施形態 300. 前記 AAV ライブラリ中の前記 1 つ以上のバーコード配列のそれぞれの量を測定することをさらに含む、実施形態 299 に記載の方法。

【0851】

実施形態 301. 前記 AAV ライブラリ中の前記 1 つ以上のバーコード配列の量を、参照値と比較することをさらに含む、実施形態 300 に記載の方法。

【0852】

実施形態 302. 前記 AAV ライブラリ中の前記 1 つ以上のバーコード配列のうちの少なくとも 2 つの量を測定することをさらに含む、実施形態 299 または 300 に記載の方法。

【0853】

実施形態 303. 前記 AAV ライブラリ中の前記 1 つ以上のバーコード配列のうちの前記少なくとも 2 つの量を互いに比較することをさらに含む、実施形態 302 に記載の方法。

【0854】

実施形態 304. 前記 AAV ライブラリ中のバーコードの存在に基づいて、AAV ベクターを産生する哺乳動物細胞または哺乳動物クローン細胞株を同定することをさらに含む、実施形態 299 ~ 303 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0855】

実施形態 305. (a) 少なくとも 1 つの改変された核酸配列、(b) ガイド配列であって、前記ガイド配列が、改変された核酸配列に少なくとも部分的に相補的である、前記ガイド配列、(c) 少なくとも 1 つの切除核酸、及び (d) ウイルスベクターの産生に必須である 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドをそれぞれ個別に含む、複数の哺乳動物細胞を含む哺乳動物細胞集団であって、前記複数の哺乳動物細胞が、複数の前記ウイルスベクターを産生する、前記哺乳動物細胞集団。

【0856】

実施形態 306. 前記少なくとも 1 つの切除核酸が、核局在化シグナル (NLS) に融合された RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードし、前記ガイド配列が、前記エンドヌクレアーゼを、哺乳動物細胞に存在する少なくとも 1 つの標的化された遺伝子座に向かわせるガイド RNA を含む、実施形態 305 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0857】

実施形態 307. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、医薬品製造基準下でのウイルスベクター産生を増加させる、実施形態 305 または 306 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0858】

実施形態 308. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、現行の優良医薬品製造基準 (cGMP) の下で、前記産生されたウイルスベクターを増加させる、実施形態 305 ~ 307 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0859】

実施形態 309. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団の生存率を増加させる、実施形態 305 ~ 308 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0860】

実施形態 310. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団によるウイルスベクター産生の持続時間を増加させる、実施形態 305 ~ 309 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0861】

実施形態 311. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、参照細胞集団と比較して、前記哺乳動物細胞集団のゲノム安定性を増加させる、実施形態 305 ~ 310 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0862】

実施形態 312. 前記参照細胞集団が、(i) 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列を含まない同等の哺乳動物細胞集団、または (ii) 前記ウイルスベクターを産生することができる標準細胞集団である、実施形態 306 ~ 311 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0863】

実施形態 313. 前記複数の哺乳動物細胞が、ヒト胎児腎臓 (HEK) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、PER.C6 細胞、HK211 細胞、CAP 細胞、ベビーハムスター腎線維芽細胞 (BHK 細胞)、Sp2/O 細胞、NS0 細胞、COS 細胞、Vero 細胞、もしくはそれらのいずれかの誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態 305 ~ 312 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0864】

実施形態 314. 前記複数の哺乳動物細胞が、HEK293 細胞、CHO 細胞、またはそれらの誘導体であるか、またはそれを含む、実施形態 305 ~ 313 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0865】

実施形態 315. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノム内の内在性コード配列の挿入、欠失、置換、変換、または再編成であるか、またはそれを含む、実施形態 305 ~ 314 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0866】

実施形態 316. 前記内在性コード配列が、内在性遺伝子または遺伝子セグメントであるか、またはそれを含む、実施形態 315 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0867】

実施形態 317. 前記少なくとも 1 つの改変された核酸配列が、前記哺乳動物細胞ゲノム内の内在性調節エレメントの挿入、欠失、置換、変換、または再編成を含む、実施形態 305 ~ 316 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0868】

実施形態318. 前記内在性調節エレメントが、内在性プロモーター配列及び／または内在性エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態317に記載の哺乳動物細胞集団。

【0869】

実施形態319. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、単一の改変された核酸配列からなる、実施形態305～318のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0870】

実施形態320. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、異種コード配列を含む、実施形態305～319のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0871】

実施形態321. 前記異種コード配列が、異種遺伝子及び／または異種遺伝子セグメントであるか、それを含む、実施形態320に記載の哺乳動物細胞集団。

【0872】

実施形態322. 前記少なくとも1つの改変された核酸配列が、異種調節エレメントを含む、実施形態305～319のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0873】

実施形態323. 前記異種調節エレメントが、異種プロモーター配列及び／または異種エンハンサー配列であるか、またはそれを含む、実施形態322に記載の哺乳動物細胞集団。

20

【0874】

実施形態324. 前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、実施形態305～323のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0875】

実施形態325. 前記AAVベクターが、ヒトAAV1キャプシドタンパク質、ヒトAAV2キャプシドタンパク質、ヒトAAV3bキャプシドタンパク質、ヒトAAV4キャプシドタンパク質、ヒトAAV5キャプシドタンパク質、ヒトAAV6キャプシドタンパク質、ヒトAAV7キャプシドタンパク質、ヒトAAV8キャプシドタンパク質、ヒトAAV9キャプシドタンパク質、ヒトAAV10キャプシドタンパク質、ヒトAAV11キャプシドタンパク質、ヒトAAV12キャプシドタンパク質、またはヒトAAV13キャプシドタンパク質を含む、実施形態324に記載の哺乳動物細胞集団。

30

【0876】

実施形態326. 前記AAVベクターが、ヒト祖先AAVキャプシドタンパク質を含む、実施形態324に記載の哺乳動物細胞集団。

【0877】

実施形態327. 前記AAVベクターが、AAVベクターを含み、前記AAVベクターが、ヒトAAV1 ITR(複数可)、ヒトAAV2 ITR(複数可)、ヒトAAV3b ITR(複数可)、ヒトAAV4 ITR(複数可)、ヒトAAV5 ITR(複数可)、ヒトAAV6 ITR(複数可)、ヒトAAV7 ITR(複数可)、ヒトAAV8 ITR(複数可)、ヒトAAV9 ITR(複数可)、ヒトAAV10 ITR(複数可)、ヒトAAV11 ITR(複数可)、ヒトAAV12 ITR(複数可)、またはヒトAAV13 ITR(複数可)であるか、またはそれを含む、逆位末端配列(ITR)のペアを含む、実施形態324～326のいずれか1項に記載の哺乳動物細胞集団。

40

【0878】

実施形態328. 前記AAVベクターが、ウシAAV(b-AAV)キャプシドタンパク質、イヌAAV(CAAV)キャプシドタンパク質、マウスAAV1キャプシドタンパク質、ヤギAAVキャプシドタンパク質、ラットAAVキャプシドタンパク質、またはトリAAV(AAAV)キャプシドタンパク質を含む、実施形態324に記載の哺乳動物細胞集団。

【0879】

50

実施形態 329. 前記 AAV ベクターが、AAV ベクターを含み、前記 AAV ベクターが、ウシ AAV (b-AAV) ITR (複数可)、イヌ AAV (CAAV) ITR (複数可)、マウス AAV1 ITR (複数可)、ヤギ AAV ITR (複数可)、ラット AAV ITR (複数可)、またはトリ AAV (AAAV) ITR (複数可) であるか、またはそれを含む、ITR のペアを含む、実施形態 325 または 328 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0880】

実施形態 330. ウイルスベクターの形成に必須の 1 つ以上の核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、AAV Rep 遺伝子、AAV Cap 遺伝子、1 つ以上のアデノウイルスヘルパー遺伝子、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 324 ~ 329 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

10

【0881】

実施形態 331. 前記複数の哺乳動物細胞のそれぞれが、レポーター遺伝子、治療遺伝子、免疫原性遺伝子、診断遺伝子、もしくはそれらの組み合わせであるか、またはそれを含む導入遺伝子をさらに含む、実施形態 305 ~ 330 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物細胞集団。

【0882】

実施形態 332. 前記複数の哺乳動物細胞が、前記導入遺伝子を含む複数の前記ウイルスベクターを産生する、実施形態 331 に記載の哺乳動物細胞集団。

【0883】

以下の実施例は、本明細書に記載の方法及び組成物をどのように作製及び使用するかを当業者に説明するために提供され、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

20

【実施例】

【0884】

実施例 1: レンチウイルスベクターを使用してゲノムに組み込まれた、AAV 産生をスクリーニングする CRISPR gRNA ベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞摂動による (例えば、特定のライブラリバリエーションを含む細胞における) 例示的なウイルスベクター (例えば、本実施例では AAV ベクター) の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、この実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用する gRNA は、識別子である。

30

【0885】

実施例 1. 1: 哺乳動物細胞ライブラリのトランスフェクション及び構築

本実施例は、AAV ベクター産生哺乳動物細胞ライブラリの生成方法を記載する。例示的な AAV ベクター宿主産生細胞株、例えば 293T を、CRISPRヌクレアーゼ発現構築物の安定または一過性発現によって改変することができる。例えば、CRISPRヌクレアーゼ発現構築物を、SpCas9ヌクレアーゼ (293T-Cas9) のレンチウイルス組み込みによって安定的に発現させることができる。ゲノム配列を標的とする gRNA 配列 (ライブラリバリエーション) のライブラリを合成し、2 つの AAV ITR 配列間のベクター (例えば、プラスミド) にクローニングする。ITR で区切られた配列自体は、レンチウイルス 5'LTR の下流、及び Psi を含む関連するレンチウイルスパッケージング配列、及びレンチウイルス 3'LTR の上流の核酸上に位置し、LTR で区切られた転写された RNA の第 3 世代レンチウイルスパッケージングに適しており、転写された RNA の形態で AAV ITR 配列と gRNA 発現カセットを含む。レンチウイルス LTR と Psi 配列との間に配置された AAV ITR を有するそのような構築物は、本明細書では AAV-in-Lenti と呼ばれる。例示的な AAV-in-Lenti 構築物の概略図を図 2 に示す。AAV-in-Lenti プラスミドにはまた、抗生物質耐性 (

40

50

例えば、ピューロマイシン耐性) または蛍光タンパク質 (例えば、GFP) などの選択マーカー遺伝子を含めてもよく、これにより、最終的に組み込まれたライブラリ構築物を含む哺乳動物細胞を将来的に選択し、または同定することができる。AAV-in-LentiプラスミドにクローニングしたgRNAライブラリを、293T-Cas9細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製してもよい。このプラスミドライブラリを、ウイルス糖タンパク質、例えば、VSV-Gタンパク質をコードするプラスミドと、第2または第3世代のレンチウイルスパッケージングプラスミド (複数可) と一緒に、293T細胞にトランスフェクトして、最小限のレンチウイルスGag Pol、Rev遺伝子の機能を提供することができる。AAV-in-Lentiライブラリウイルスベクターを、培養上清から回収し、濾過し、濃縮するか、または293T-Cas9細胞株に直接適用する。AAV-in-Lentiライブラリで形質導入した細胞を、それらの選択マーカーを介して単離する。形質導入後、細胞ごとのgRNAライブラリの発現は、安定的に発現するSpCas9遺伝子の作用により、gRNAを標的とした切断とインデル形成をもたらしたと想定される。次いで、精製したAAV-in-Lentiライブラリの細胞集団に、組換えAAVウイルスベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物 (例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド)、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトすることができる。これらのプラスミドに存在する機能は、レンチウイルスに組み込まれたITR-in-Lenti配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示することができ、これらのITRウイルスベクター構築物はパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。このAAV-in-Lenti法を使用し、レンチウイルスパッケージングされた構築物を293T-Cas9細胞上で力価測定することにより、各細胞がおおよそ1つのITR隣接gRNAライブラリメンバー配列を受け取るようにMOIを制御することができる。

10

20

30

40

50

【0886】

実施例1.2: ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。例えば、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に記載されているように、当技術分野で公知の方法を用いて、ウイルスベクターを作製する。例えば、トランスフェクション後、24時間後に培地 (Glutamax、ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM) を交換し、72時間後に50%の培地量 (500mL) を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置する。上清を分離し、0.22µmフィルター (Corning 431098) で濾過する。dH₂O中の40% PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解する。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器 (Millipore UFC910024) を使用して濃縮し、-80℃で凍結する。

【0887】

実施例1.3: ウイルスベクターのNGS

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはgRNAをコードする配列を識別子として配列決定する方法を記載する。精製されたAAVベクターのプール (例えば、AAVベクターの全プール、選択された細胞のサブセットからのAAVベクターのプール、または選択されたAAVベクター) からDNAを単離する。アルカリ溶解などの当技術分野で公知の方法を使用してDNAを精製することができる。隣接するプライマー配列から、PCRを使用してDNAを増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン: アダプターのモル比50:1で相同なオーバーハングを有するシーケンシングアダ

プター（例えば、Illuminaアダプター）と混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晚（16℃で5分間、その後37℃で5分間）に供する（Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487) と概念的に類似する）。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定する。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるgRNA配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各gRNAの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのgRNAのプール内での相対的存在量を決定する。AAVベクター関連DNAから増幅されたgRNA配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるgRNA配列の存在量と比較する。このようにして、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすgRNAライブラリバリエーションは、それらが、参照宿主細胞集団と比較してAAVベクターDNA集団中で濃縮または脱濃縮されることから、同定することができる。

10

【0888】

本明細書に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、AAVベクター集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価のAAVベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたgRNA配列を、AAV-in-Lenti gRNAライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

20

【0889】

実施例2：レンチウイルスベクターを使用してゲノムに組み込まれた、AAV産生をスクリーニングするバーコード付きCRISPR gRNAベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞摂動による（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む細胞における）例示的なウイルスベクター（例えば、AAVベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、本実施例は、バーコードを識別子として使用して、哺乳動物細胞ライブラリから産生される個々のウイルスベクターをそれらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載する。この方法の概略図を図4として示す。

【0890】

30

実施例2.1：哺乳動物細胞ライブラリのトランスフェクション及び構築

本実施例は、例示的なAAVベクター産生哺乳動物細胞ライブラリの生成方法を記載する。例示的なAAVベクター宿主産生細胞株、例えばHEK293Tを、CRISPRヌクレアーゼ発現構築物、例えばCas9を発現するように改変した。安定的なレンチウイルス組みこみにより、Cas9をHEK293T細胞で安定的に発現させた。構成的プロモーターの制御下でCas9を安定的に発現するHEK293T細胞、及び誘導性プロモーター（例えば、テトラサイクリン誘導性プロモーター（TetON））の制御下でCas9を発現する細胞も作製した。Cas9を構成的及び誘導的に発現する両方の哺乳動物細胞において、モデルgRNAを使用して遺伝子編集の成功が示された（データは示さず）。さらに、TetONプロモーター下でCas9を発現する哺乳動物細胞では、遺伝子編集はドキシサイクリン濃度の増加に伴う用量依存的な編集であり、ドキシサイクリンの非存在下では編集は観察されなかった（データは示さず）。

40

【0891】

様々なゲノム配列を標的とするgRNA配列（ライブラリバリエーション）の例示的なライブラリを合成し、プラスミドにクローニングした。23個のgRNAのパイロットライブラリを構築し、より大きな12,000種のgRNAのスクリーニングライブラリを構築した。

【0892】

各ライブラリ構築物には、2つのAAV ITR配列の外側に配置されたgRNAライブラリバリエーションと、2つのAAV ITR配列の間に配置された対応するバーコード識

50

別子配列が含まれていた。バーコード配列のペアリングと関連付けられるライブラリバリエーション（gRNA）のペアリングは、構築物の設計と合成の時点で事前に決定されている場合もあり、使用する特定のクローニング方法に応じてランダムに関連付けられる場合もあり、gRNA：バーコードのペアリングは、クローニングされたライブラリプラスミドDNAのNGSによって決定される。LTRで区切られた配列自体は、シス作用性組み込み配列、例えば、レンチウイルス5'LTRの下流、及びPsiを含む関連するレンチウイルスパッケージング配列、及びレンチウイルス3'LTRの上流のプラスミド上に位置し、LTRで区切られた転写されたRNAの第3世代レンチウイルスパッケージングに適しており、転写されたRNAの形態でAAV LTR配列とgRNA発現カセットを含む。レンチウイルスLTRとPsi配列の間に配置されたAAV LTRを有するそのようなライブラリ構築物は、本明細書ではAAV-in-Lentiと呼ばれ、pSFV-LV-AAVと表記される、そのようなAAV-in-Lenti構築物の例示的な概略図を図5に示す。例示的な選択マーカー遺伝子、抗生物質耐性遺伝子（例えば、ピューロマイシン耐性）、及び蛍光タンパク質遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）の例示的なAAVペイロードも含むAAV-in-Lentiプラスミドを生成し、これにより、組み込まれたライブラリ構築物を含み、AAVベクターを産生する哺乳動物細胞を、将来的に選択または同定することができる。

10

【0893】

AAV-in-Lenti形式にクローニングされた例示的なgRNAライブラリを、293T-Cas9細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製した。23個のgRNA（パイロットアッセイ）及び12,000個のgRNA（スクリーニングアッセイ）のAAV-in-Lentiプラスミドライブラリを、ウイルス糖タンパク質、例えば、VSV-Gタンパク質、及び第2または第3世代レンチウイルスパッケージングプラスミド（複数可）をコードするプラスミドと共に、293T細胞にトランスフェクトして、最小限のレンチウイルスGag Pol、Rev遺伝子の機能を提供することができる。AAV-in-Lentiライブラリウイルスベクターを、培養上清から回収し、濾過し、濃縮するか、または293T-Cas9細胞株に直接適用する。レンチウイルスにパッケージングされたAAV-in-Lentiライブラリで形質導入した細胞を、それらの選択マーカーを介して単離する。形質導入後、細胞ごとのgRNAライブラリの発現は、安定的に発現するSpCas9遺伝子の作用により、gRNAを標的とした切断とインデル形成をもたらしたと想定される。次いで、精製したライブラリ集団に、組換えAAVウイルスベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、レンチウイルスに組み込まれたLTR-in-Lenti配列からLTRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのLTRウイルスベクター構築物はパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。このAAV-in-Lenti法を使用し、レンチウイルスパッケージングされた構築物を293T-Cas9細胞上で力価測定することにより、各細胞がおよそ1つのLTR隣接gRNAライブラリメンバー配列を受け取るようにMOIを制御することができる。

20

30

40

【0894】

実施例2.2：ウイルスベクターの産生及び回収

例えば、上記の実施例1.2に、及びZolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)に記載されているように、当技術分野で公知の方法を用いて、ウイルスベクターを作製した。

【0895】

レンチウイルスにより組み込まれ、LTRに隣接する鋳型DNAから精製したAAVの機能性を評価した。精製したAAVをHEK293Tに形質導入し、緑色細胞を蛍光顕微鏡で可視化した。AAV-in-Lentiライブラリから産生したAAVは、HEK293T細胞にうまく形質導入されることが判明した（データは示さず）。

50

【0896】

実施例 2.3：ウイルスベクターのNGS

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはバーコード配列及びライブラリバリエーション（例えば、gRNA）の増幅方法及び配列決定方法を記載する。本開示は、バーコード配列が、AAVベクターを産生した哺乳動物細胞、及び哺乳動物細胞の対応するライブラリバリエーションを識別することができるという認識を包含する。この精製、増幅及び配列決定の概略図を図6として示す。実施例1.3に記載の当技術分野で公知の方法を使用してDNAを単離した。上記の実施例1.3のように、増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するシーケンシングアダプター（例えば、Illuminaアダプター）と混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晚（16℃で5分間、その後37℃で5分間）に供した。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定した。宿主細胞産生株ライブラリ内に含まれるgRNA配列も、実質的に同様の方法を使用して増幅及び配列決定した。各gRNAの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのgRNAのプール内での相対的存在量を決定した。AAVベクター関連DNAから増幅されたgRNA配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるgRNA配列の存在量と比較した。このようにして、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすgRNAライブラリバリエーションは、それらが、宿主細胞集団と比較してAAVベクターDNA集団中で濃縮または脱濃縮されることから、同定した。

10

20

【0897】

23個のgRNAのパイロットライブラリのスクリーニングの結果を図7に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、野生型（「WT」）細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェアを使用して、NGSデータを、23個のプールのバーコードのセットにアラインメントした。Langmead B, Salzberg S. "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." *Nature Methods*. 2012, 9:357-359。示差的発現分析のために、相対的なバーコード存在量をDESeq2パッケージで評価した。Love MI, Huber W, Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biology*, 15, 550。図7の結果は、スクリーニングプロトコル、NGS試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが効果的であることを示している。さらに、パイロットスクリーニングの結果は、いくつかの遺伝子が、高い統計的信頼性で、AAV産生の増加または減少に関連している可能性があることを示唆している（調整されたp値約0.1）。

30

【0898】

12,000個のgRNAのライブラリのスクリーニング結果を図8に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、WT細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェア（Langmead and Salzberg、上記）を使用して、NGSデータを、12個のプールのバーコードのセットにアラインメントした。MAGeCKパッケージを用いて相対的なバーコード存在量を評価し、遺伝子レベルの濃縮と有意性（FDR）スコアを計算した。Li, et al. "MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens." (2014) *Genome Biology* 15:554。図8の各点は、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表す（4つの対応するsgRNAスコアから計算した）。図8の結果は、スクリーニングプロトコル、NGS試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが、大規模スクリー

40

50

ニングについて効果的であることを示している。さらに、データは、多数の細胞株（及び関連する gRNA）が AAV 産生の増加または減少に関連していたため、AAV 産生の変化に関連するライブラリバリエーションを識別するための読み出しとしてバーコードを使用することができることを示している。

【0899】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、AAV ベクター集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価の AAV ベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認された gRNA 配列を、AAV-in-Lenti gRNA ライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

10

【0900】

実施例 3：DNA 転位を使用してゲノムに組み込まれたレンチウイルス産生をスクリーニングするための ORF ベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞バリエーションによる（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む）例示的なウイルスベクター（例えば、本実施例ではレンチウイルスベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、この実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用するトランスジェニック ORF は、識別子である。

20

【0901】

実施例 3.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば 293T 内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する組換えレンチウイルスベクターの生成方法を記載する。宿主細胞株において期待される生物学的機能を有するタンパク質遺伝子産物をコードする ORF 配列のライブラリ（下流の配列決定準備ステップでの BsmBI 制限酵素などの酵素による切断を排除するように設計された配列を含む）を合成し、レンチウイルス転移プラスミド内に、レンチウイルス 5'LTR 及び Psi を含む関連するレンチウイルスパッケージング配列の下流、かつレンチウイルス 3'LTR の上流でクローニングし、これは、LTR によって区切られた転写された RNA の第 3 世代のレンチウイルスパッケージングに適している。この LTR で画定されたセグメントは、それ自体が DNA 配列の間に配置され、これにより、例えば、piggyBac DNA トランスポゾン系から取得した隣接する同族逆位末端配列（ITR）を介して piggyBac トランスポザーゼを使用することにより、宿主細胞ゲノムへの DNA の酵素的組み込みが可能になる。トランスポゾン ITR 間に配置されたレンチウイルス LTR を有するそのような構築物は、本明細書では Lenti-in トランスポゾンと呼ばれる。Lenti-in トランスポゾンプラスミドには、ピューロマイシン耐性または緑色蛍光タンパク質などの選択マーカー遺伝子も含まれており、最終的に組み込まれたライブラリ構築物を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができる。Lenti-in トランスポゾンプラスミドにクローニングされた ORF ライブラリを、293T 細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製する。このプラスミドライブラリを、トランスポザーゼ酵素発現プラスミド（トランス作用性組み込み配列を発現する）と一緒に 293T 細胞にトランスフェクトして、宿主ゲノム内のランダムな位置への酵素的組み込みを駆動する。このトランスフェクション後に産生したゲノム改変ライブラリ細胞を、ピューロマイシンなどの選択可能な薬剤への継続的な曝露によって、または GFP などの蛍光マーカー遺伝子での蛍光標識細胞分取によって単離する。次いで、この方法で単離した安定クローンのライブラリ集団に、組換えレンチウイルスベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、VSV-G タンパク質などのウイルス糖タンパク質をコードするプラスミド、及びレンチウイルス Gag Pol、Rev

30

40

50

遺伝子の機能を最小限提供するための第2世代または第3世代のいずれかのレンチウイルスパッケージングプラスミド（複数可）でトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、トランスポゾンに組み込まれたLentivirus-1トランスポゾン配列から、LTRで画定されたレンチウイルスベクターゲノムの産生を指示し、これらのレンチウイルスベクターRNAはパッケージングされ、レンチウイルスベクター内に放出される。このLentivirus-1トランスポゾン法を使用することにより、細胞あたりのライブラリメンバーの低コピー数での組み込みが可能になり、それにより、大過剰の組み込まれていないトランスフェクトされたプラスミドDNAを、安定的なライブラリ集団の選択の過程で枯渇させる。

【0902】

実施例3.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。例えば、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)に記載されているように、当技術分野で公知の方法を用いて、ウイルスを作製する。例えば、トランスフェクション後、24時間後に培地（Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM）を交換し、48時間後に50%の培地量（500mL）を添加する。3日後、培養上清を回収し、0.45µMフィルター（Corning 431098）で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。この材料を1500gで45分間遠心分離し、ペレットを回収して溶解させる。

【0903】

実施例3.3：ウイルスベクターのNGS

本実施例は、精製レンチウイルスベクターRNA、具体的にはORFコード配列を配列決定する方法を記載する。精製レンチウイルスベクターのプール全体から、RNAをまとめて単離する。アルカリ溶解を使用してRNAを精製する。ORFの下流に結合部位を有するユニバーサルプライマー逆配列を使用して、RNAをcDNAに逆転写する。次いで、このcDNAを、ORF配列に隣接するユニバーサルフォワードプライマー及びユニバーサルリバースプライマーを使用してPCRに供する。PCRの増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するIlluminaアダプターと混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晩（16℃で5分間、その後37℃で5分間）に供する（Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487)と概念的に類似する）。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定する。組み込みDNAとして、宿主細胞産生株ライブラリに含まれるORF配列も同様にPCRにより増幅し、配列決定のために調製する。Illuminaの各読み取りから得られる部分的な末端ORF配列を既知の全長配列と参照することにより、読み取りごとにORFを同定する。したがって、それぞれの出現頻度を測定し、すべてのORFのプール内の相対的存在量を決定する。レンチウイルスベクター関連RNAから増幅したORFの相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるORF配列の存在量と比較する。このようにして、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なレンチウイルスベクター産生をもたらすORFライブラリバリエーションは、それらが、宿主細胞集団と比較してレンチウイルス集団中で濃縮または脱濃縮されることから、同定することができる。

【0904】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、レンチウイルス集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価のレンチウイルスベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたORF配列を、Lentivirus-1トランスポゾンORFライブラリから別々に宿主細胞に導入するこ

とができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

【0905】

実施例4：DNA転位を使用してゲノムに組み込まれた、AAV産生をスクリーニングするためのバーコード付きCRISPR gRNAベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定のライブラリバリエーションによる例示的なウイルスベクター（例えば、AAVベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、本実施例では、DNA転位によって哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれたCRISPR gRNAベースのライブラリと共にバーコード識別子を使用する、哺乳動物細胞の例示的なライブラリの構築を記載する。本実施例はまた、前記哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来した特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を提供する。この方法の概略図を図9として示す。

【0906】

実施例4.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば293T内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する組換えAAVベクターの生成方法を記載する。AAVベクター宿主産生細胞株、例えば293Tを、実施例2.1で上述したように、例えばCas9などのCRISPRヌクレアーゼ発現構築物の安定的なレンチウイルス組み込みによって改変した。ゲノム配列を標的とするgRNA配列（ライブラリバリエーション）のライブラリを合成し、2つのAAV ITR配列の外側の位置でプラスミドにクローニングし、対応するバーコード識別子配列を2つのAAV ITR配列の間に配置した。このITRで画定されたセグメントは、DNA配列の間に配置され、これにより、例えば、piggyBac DNAトランスポゾン系から取得した隣接する同族逆位末端配列（トランスポゾンITR）を介してpiggyBacトランスポザナーゼを使用することにより、宿主細胞ゲノムへのDNAの酵素的組み込みが可能になる。トランスポゾンITR間に配置されたAAV ITRを有するそのような構築物は、本明細書ではAAV-in-トランスポゾンと呼ばれ、pSF-X-PB-AAVと表記される、そのようなAAV-in-トランスポゾン構築物の例示的な概略図を図5に示す。AAV-in-トランスポゾンプラスミドにはまた、例示的な選択マーカー遺伝子、抗生物質耐性遺伝子（例えば、ピューロマイシン耐性）、及び蛍光タンパク質遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）の例示的なAAVペイロードも含まれていたが、これにより、組み込まれたライブラリ構築物を含み、AAVベクターを産生する哺乳動物細胞を、将来的に選択または同定することができる。AAV-in-トランスポゾンプラスミドにクローニングされた例示的なバーコード付きgRNAライブラリを、293T細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製した。23個のgRNA（パイロットアッセイ）及び12,000個のgRNA（スクリーニングアッセイ）のAAV-in-トランスポゾンプラスミドライブラリを生成した。これらのプラスミドライブラリを、トランスポザナーゼ酵素発現プラスミド（トランス作用性組み込み配列を発現する）と一緒に293T細胞にトランスフェクトして、宿主ゲノム内のランダムな位置への酵素的組み込みを駆動した。

【0907】

このトランスフェクション後に産生したゲノム改変ライブラリ細胞を、ピューロマイシンなどの選択可能な薬剤への継続的な曝露によって、またはGFPなどの蛍光マーカー遺伝子での蛍光標識細胞分取によって単離した。Cas9を構成的に発現するHEK293T細胞と、誘導性TetON-Cas9を発現するHEK293T細胞の両方に、AAV-in-トランスポゾンプラスミドを形質導入した。蛍光細胞を蛍光顕微鏡で可視化し、すべてのトランスポザナーゼ：トランスポゾン比で蛍光細胞が観察され、組み込みの成功が示された。

【0908】

次いで、精製した細胞ライブラリ集団に、組換えAAVウイルスベクターの産生及びパ

パッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトした。これらのプラスミドに存在する機能は、ゲノムに組み込まれたAAV-in-トランスポゾン配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのITRウイルスベクター構築物はパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。

【0909】

トランスポゾンのコピー数を、プラスミド標準と比較してqPCRによって測定し、ゲノムコピー数は、トランスポゾンとトランスポザーゼの比率に応じて、最初は3～8の範囲であった（データは示さず）。ソートされた集団から得られたAAV力価は、ソートされた集団のGFP発現レベルに正比例していた。

10

【0910】

ほとんどの細胞がおよそ1つの遺伝的摂動（ライブラリから、1対のgRNAライブラリバリエーション／バーコード）のみを受け取るために、トランスポゾン組み込み細胞のコピー数が、以前に観察されたコピー数よりも低くなるように、トランスフェクトするトランスポザーゼ：トランスポゾンプラスミドの比率を最適化した。シス作用性トランスポゾンを含むプラスミドを、piggyBacトランスポザーゼをコードするトランス作用性配列を含むプラスミドと共に、様々なトランスポザーゼ：トランスポゾン比で同時トランスフェクトして、低いコピー数を得た。トランスポゾンプラスミドの相対量が増加するにつれてコピー数が増加し、最適化されたトランスポザーゼ：トランスポゾン比の同定に成功し、細胞あたりおよそ1コピーを達成した（データは示さず）。

20

【0911】

本実施例は、トランスフェクトするトランスポザーゼ：トランスポゾンプラスミドの比率の最適化が成功したことを示し、その結果、ほとんどの細胞が1つの遺伝的摂動（ライブラリから、1対のsgRNA：バーコード）のみを受け取る。したがって、本実施例は、例示的なAAV-in-トランスポゾン法により、細胞あたりのライブラリバリエーションの低コピー数での組み込みが可能になり、それにより、大過剰の組み込まれていないトランスフェクトされたプラスミドDNAを、安定的なライブラリ集団の選択の過程で枯渇させる。

30

【0912】

実施例4.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。例えば、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)に記載されているように、当技術分野で公知の方法を用いて、ウイルスベクターを作製した。例えば、トランスフェクション後、24時間後に培地（Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM）を交換し、72時間後に50%の培地量（500mL）を添加した。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解した。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置した。上清を分離し、0.22µmフィルター（Corning 431098）で濾過した。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートした。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解した。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器（Millipore UFC910024）を使用して濃縮し、-80℃で凍結した。

40

【0913】

トランスポザーゼにより組み込まれ、ITRに隣接する鋳型DNAから精製したAAVの機能性を評価した。精製したAAVをHEK293Tに形質導入し、緑色細胞を蛍光顕微鏡で可視化した。AAV-in-トランスポゾンライブラリから産生したAAVは、H

50

E K 2 9 3 T細胞にうまく形質導入されることが判明した（データは示さず）。

【0914】

実施例 4. 3：ウイルスベクターのNGS

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはライブラリgRNAに対応するバーコード配列を配列決定する方法を記載する。この精製、増幅及び配列決定の概略図を図6として示す。実施例1. 3. に記載の当技術分野で公知の方法を使用してDNAを単離した。隣接するプライマー配列から、PCRを使用してDNAを増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するIlluminaアダプターと混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晚（16Cで5分間、その後37Cで5分間）に供した（Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487)と概念的に類似する）。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定した。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるgRNA配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各gRNAの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのgRNAのプール内での相対的存在量を決定した。AAVベクター関連DNAから増幅されたgRNA配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるgRNA配列の存在量と比較した。このようにして、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすgRNAライブラリバリエーションは、それらが、宿主細胞集団と比較してAAVベクターDNA集団中で濃縮または脱濃縮されることから、同定することができる。

10

20

【0915】

23個のgRNAのパイロットライブラリのスクリーニングの結果を図10に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、野生型（「WT」）細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。別個に、テトラサイクリン誘導性プロモーター（「TetON」）の制御下でCas9を発現する細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、野生型（「WT」）細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェアを使用してNGSデータを23個のプールのバーコードのセットにアラインメントした。Langmead B, Salzberg S. "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." Nature Methods. 2012, 9:357-359. 示差的発現分析のために、相対的なバーコード存在量をDESeq2パッケージで評価した。Love MI, Huber W, Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biology, 15, 550. 図10の結果は、スクリーニングプロトコル、NGS試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが効果的であることを示している。さらに、パイロットスクリーニングの結果は、いくつかの遺伝子が、高い統計的信頼性で、AAV産生の増加または減少に関連している可能性があることを示唆している（調整されたp値約0.1）。

30

40

【0916】

12,000個のgRNAのライブラリのスクリーニング結果を図11に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、WT細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェア（Langmead and Salzberg, 上記）を使用して、NGSデータを、12,000個のプールのバーコードのセットにアラインメントした。MAGeCKパッケージを用いて相対的なバーコード存在量を評価し、遺伝子レベルの濃縮と有意性（FDR）スコアを計算した。Li, et al. "MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens." (2014) Ge

50

nome Biology 15:554。図11の各点は、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表す（4つの対応するsgRNAスコアから計算した）。図11の結果は、スクリーニングプロトコル、NGS試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが、大規模スクリーニングについて効果的であることを示している。さらに、データは、多数の細胞株（及び関連するgRNA）がAAV産生の増加または減少に関連していたため、AAV産生の変化に関連するライブラリバリエーションを識別するための読み出しとしてバーコードを使用することができることを示している。

【0917】

したがって、本実施例により、様々な組み込み方法（例えば、レンチウイルスの組み込みとトランスポゾンを用いた組み込み）を使用したライブラリの構築が両方とも効果的であることが確認される。

10

【0918】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、AAVベクター集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価のAAVベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたgRNA配列を、AAV-in-Lenti gRNAライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

【0919】

実施例5：標的化ヌクレアーゼ切断によりゲノムに組み込まれた、AAV産生をスクリーニングするためのバーコードORFベースのライブラリ技術

20

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞バリエーションによる（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む）例示的なウイルスベクター（例えば、本実施例ではAAVベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用する各トランスジェニックORFライブラリバリエーションを、識別子であるDNAバーコードとペアリングする。

【0920】

実施例5.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

30

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば293T内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する組換えAAVベクターの生成方法を記載する。宿主細胞株において期待される生物学的機能を有するタンパク質遺伝子産物をコードするORF配列（ライブラリバリエーション）のライブラリを合成し、DNAバーコード配列と一緒にプラスミドにクローニングする。このORF：DNAバーコード配列のペアリングは、構築物の設計と合成の時点で事前に決定されている場合もあれば、使用する特定のクローニング方法に応じてランダムに関連付けられる場合もあり、ORF：バーコードのペアリングは、クローニングされたライブラリプラスミドDNAのNGSによって決定される。このライブラリは、バーコード配列が2つのAAV ITR配列の間に位置し、対応するORF及びプロモーター及びポリAシグナルなどのORF発現調節配列がITRにより画定される領域の外側に位置するように構築される。ITRで区切られた領域とORF発現ユニットの連続配列全体は、宿主へのヌクレアーゼ刺激による相同組換えに基づくAAVS1遺伝子座などの宿主細胞ゲノム遺伝子座への標的組み込みのための相同性アーム（シス作用組み込み配列）として機能するのに十分な配列に、上流と下流で隣接する。AAVS1相同性アーム間に配置されたAAV ITRを有するそのような構築物は、本明細書ではAAV-in-Locusと呼ばれる。AAV-in-Locusプラスミドには、ピューロマイシン耐性または緑色蛍光タンパク質などの選択マーカー遺伝子も含まれており、最終的に組み込まれたライブラリ構築物を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができる。AAV-in-Locusプラスミドにクローニングされたバーコード付きORFライブラリを、293T細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製する。このプラスミド

40

50

ライブラリを、SpCas9ヌクレアーゼをコードするプラスミドとAAVS1遺伝子座を標的とするgRNAと共に293T細胞にトランスフェクトする。このトランスフェクション後に産生したゲノム改変ライブラリ細胞を、ピューロマイシンなどの選択可能な薬剤への継続的な曝露によって、またはGFPなどの蛍光マーカー遺伝子での蛍光標識細胞分取によって単離する。次いで、この方法で単離した安定クローンのライブラリ集団に、組換えAAVベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAVRep-Capをトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、AAVS1に組み込まれたITR-in-Locus配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのITRベクターDNAはパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。このAAV-in-Locus法を使用することにより、可能なオンターゲット組み込み事象を、宿主細胞の姉妹染色分体内に存在するAAVS1遺伝子座のコピーのみに制限することにより、細胞ごとのライブラリメンバーのコピー数を制御することができる。

10

【0921】

実施例5.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24時間後に培地 (Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM) を交換し、72時間後に50%の培地量 (500mL) を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置する。上清を分離し、0.22µmフィルター (Corning 431098) で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解する。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器 (Millipore UFC910024) を使用して濃縮し、-80℃で凍結する。

20

30

【0922】

実施例5.3：ウイルスベクターのNGS

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはバーコード配列を配列決定する方法を記載する。精製AAVウイルスベクターのプール全体から、DNAをまとめて単離する。アルカリ溶解を使用してDNAを精製する。隣接するプライマー配列から、PCRを使用してDNAを増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するIlluminaアダプターと混合し、GGA反応物 (BsmBI及びT4リガーゼ、NEB) に入れ、100×サイクル、一晩 (16℃で5分間、その後37℃で5分間) に供する (Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487) と概念的に類似する)。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定する。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるバーコード配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各バーコードの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのバーコードのプール内での相対的存在量を決定する。AAVベクター関連DNAから増幅されたバーコード配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるバーコード配列の存在量と比較する。各バーコードには特定のORFライブラリメンバーとの関連性が知られているため、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすORFライブラリバリエーションは、それらの関連するバーコードが、宿主細胞集団

40

50

と比較して A A V ベクター D N A 集団中で濃縮または脱濃縮されることから、同定することができる。

【0923】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、A A V 集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価の A A V ベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたバーコード付きの O R F 配列を、A A V - i n - L o c u s バーコード付き O R F ライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

【0924】

実施例 6：エピソームプラスミド D N A での A A V 産生をスクリーニングするためのバーコード付き O R F ベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞バリエーションによる（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む）例示的なウイルスベクター（例えば、本実施例では A A V ベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用する各トランスジェニック O R F ライブラリバリエーションを、識別子である D N A バーコードとペアリングする。

【0925】

実施例 6.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば 293T 内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する組換え A A V ベクターの生成方法を記載する。宿主細胞株において期待される生物学的機能を有するタンパク質遺伝子産物をコードする O R F 配列（ライブラリバリエーション）のライブラリを合成し、D N A バーコード配列と一緒にプラスミドにクローニングする。この O R F : D N A バーコード配列のペアリングは、構築物の設計と合成の時点で事前に決定されている場合もあれば、使用する特定のクローニング方法に応じてランダムに関連付けられる場合もあり、O R F : バーコードのペアリングは、クローニングされたライブラリプラスミド D N A の N G S によって決定される。このライブラリは、バーコード配列が 2 つの A A V I T R 配列の間に位置し、ポリ A テール付き m R N A 転写産物に転写されるように構築され、この転写産物は、I T R 隣接転写ユニットまたは介在する I T R にまたがる転写ユニットである。対応する O R F ならびに、例えば、プロモーター及びポリ A シグナルなどの O R F 発現調節配列は、I T R により画定される領域の外側に位置する。I T R で区切られた領域と O R F 発現ユニットの連続配列全体が、環状プラスミド D N A 骨格内に含まれる。A A V - o n - プラスミドを含むそのような構築物には、ピューロマイシン耐性または緑色蛍光タンパク質などの選択マーカー遺伝子も含まれており、これにより、プラスミド構築物及び S V 40 複製起点を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができ、培養のその後の継代にわたって、トランスフェクトされた細胞内でプラスミドを維持することを容易にする。A A V - o n - プラスミドにクローニングされたバーコード付き O R F ライブラリを、293T 細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製する。次いで、この方法でトランスフェクトされた細胞のライブラリ集団に、組換え A A V ベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、p H e l p e r 及び p A A V R e p - C a p をトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、I T R - o n - プラスミド配列から I T R で画定された A A V ベクターゲノムの複製を指示し、これらの I T R ベクター D N A はパッケージングされ、A A V ベクター内に放出される。低効率で細胞をトランスフェクションすると、細胞あたりのユニークなプラスミドの数が制限され、293T 細胞内での S V 40 起点に依存した複製により、プラスミド由来の選択マーカーを介したライブラリ細胞精製ステップの過程で低コピーのトランスフェクションを維持することができる。さらに、第 1 に、検出可能なライブラ

10

20

30

40

50

リメンバーを、宿主細胞核内で実際に機能し、細胞内の他の場所（エンドソームまたは細胞質など）に保持されていないプラスミドに限定することを介して、第2に、確立された単一細胞バーコーディング及びRNA配列決定法（10×Genomicsなど）を使用してバーコード配列を捕捉することを介して細胞ごとの多重プラスミドライブラリメンバーの同定を容易にすることにより、発現mRNA転写産物内にバーコードを含めることにより、細胞ごとの多コピープラスミドライブラリメンバーの同一性のデコンボリューションが容易になる。このAAV-on-プラスミド法を使用することにより、宿主細胞ごとの多重ライブラリメンバーの数の問題が制限され、その一方で、細胞ごとの多コピーの同一性のデコンボリューションが容易になる。次いで、これらの細胞ごとのコンビナトリアルライブラリの同一性を、AAVベクター濃縮バーコードと関連付けて、多重化されたライブラリ集団内からヒットを確信的に同定することができる。

10

【0926】

実施例6.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24時間後に培地（Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM）を交換し、72時間後に50%の培地量（500mL）を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置する。上清を分離し、0.22µmフィルター（Corning 431098）で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解する。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器（Millipore UFC910024）を使用して濃縮し、-80℃で凍結する。

20

実施例6.3：ウイルスベクターのNGS及び細胞ごとのライブラリメンバー表現

【0927】

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはバーコード配列を配列決定する方法を記載する。精製AAVウイルスベクターのプール全体から、DNAをまとめて単離する。アルカリ溶解を使用してDNAを精製する。隣接するプライマー配列から、PCRを使用してDNAを増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するIlluminaアダプターと混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晩（16℃で5分間、その後37℃で5分間）に供する（Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487) と概念的に類似する）。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配列決定する。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるバーコード配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各バーコードの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのバーコードのプール内での相対的存在量を決定する。AAVベクター関連DNAから増幅されたバーコード配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるバーコード配列の存在量と比較する。各バーコードには特定のORFライブラリバリエーションとの関連性が知られているため、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすORFライブラリバリエーションは、それらの関連するバーコードが、宿主細胞集団と比較してAAVベクターDNA集団中で濃縮または脱濃縮されるため、同定することができる。細胞ライブラリのカバー率が十分に高く、シーケンシング深度が高いため、真に濃縮されたヒットが、本質的に多重化されたトランスフェクトされたプラスミドライ

30

40

50

ライブラリ内で識別される。さらに、多重トランスフェクトライブラリ内からのヒット識別の問題を単純化するために、プロデューサー集団を単一細胞シーケンシングに供することができる。プロデューサー細胞は、細胞mRNAの逆転写中に個別に標識され(10×Genomics)、細胞識別配列を細胞mRNAに付加し、それによって細胞ライブラリ集団内に含まれるすべてのバーコードをタグ付けする。次いで、細胞識別配列タグ付きバーコードcDNAをPCRによって特異的に増幅し、これらのアンプリコンを上記のようにIlluminaによってNGS用に調製することができる。これらのアンプリコンの配列決定により、細胞ライブラリ集団内に存在する細胞ごとのライブラリメンバーの組み合わせが明らかになり、単一または組み合わせのヒットと、誤って濃縮された「ヒッチハイカー」を識別することができる。

10

【0928】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、AAVベクター集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価のAAVベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたバーコード付きのORF配列を、AAV-on-プラスミドバーコード付きORFライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

【0929】

実施例7：エピソームプラスミドDNAでのAAV産生をスクリーニングするためのバーコード付きCRISPR gRNAベースのライブラリ技術

20

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞バリエーションによる(例えば、特定のライブラリバリエーションを含む)例示的なウイルスベクター(例えば、本実施例ではAAVベクター)の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用する各トランスジェニックgRNAライブラリバリエーションを、識別子であるDNAバーコードとペアリングした。この方法の概略図を図12として示す。

【0930】

実施例7.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

30

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば293T内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する組換えAAVベクターの生成方法を記載する。宿主細胞株において期待される生物学的機能を有するタンパク質遺伝子産物をコードするバーコード付きCRISPR gRNA配列(ライブラリバリエーション)のライブラリを合成し、DNAバーコード配列と一緒にプラスミドにクローニングした。このgRNA：DNAバーコード配列のペアリングは、構築物の設計と合成の時点で事前に決定されている場合もあれば、使用する特定のクローニング方法に応じてランダムに関連付けられる場合もあり、gRNA：バーコードのペアリングは、クローニングされたライブラリプラスミドDNAのNGSによって決定される。このライブラリは、バーコード配列が2つのAAV ITR配列の間に位置するように構築された。対応するgRNAならびにプロモーターなどのgRNA発現調節配列は、ITRにより画定される領域の外側に位置する。ITRで区切られた領域とgRNA発現ユニットの連続配列全体が、環状プラスミドDNA骨格内に含まれ、pSFV-AAVと表記されるそのようなエピソーム構築物の例示的な概略図を図5に示す。そのようなAAV-on-プラスミド構築物にはまた、例示的な選択マーカー遺伝子、抗生物質耐性遺伝子(例えば、ピューロマイシン耐性)、及び蛍光タンパク質遺伝子(例えば、緑色蛍光タンパク質)の例示的なAAVペイロードも含まれており、これにより、AAVベクターを産生する組み込まれたライブラリ構築物ならびにSV40複製起点を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができ、培養のその後の継代にわたって、トランスフェクトされた細胞内でプラスミドを維持することを容易にする。AAV-on-プラスミドにクローニングされたバーコード付きgRNAライブラリを、293T細胞へのトランスフェク

40

50

ション用の精製プラスミドプールとして調製した。次いで、この方法でトランスフェクトされた細胞のライブラリ集団に、組換えAAVベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトした。これらのプラスミドに存在する機能は、ITR-on-プラスミド配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのITRベクターDNAはパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。低効率で細胞をトランスフェクションすると、細胞あたりのユニークなプラスミドの数を制限することができ、293T細胞内でのSV40起点に依存した複製により、プラスミド由来の選択マーカーを介したライブラリ細胞精製ステップの過程で低コピーのトランスフェクションを維持することができる。さらに、第1に、検出可能なライブラリメンバーを、宿主細胞核内で実際に機能し、細胞内の他の場所（エンドソームまたは細胞質など）に保持されていないプラスミドに限定することを介して、第2に、確立された単一細胞バーコーディング及びRNA配列決定法（10×Genomicsなど）を使用してバーコード配列を捕捉することを介して細胞ごとの多重プラスミドライブラリメンバーの同定を容易にすることにより、発現mRNA転写産物内にバーコードを含めることにより、細胞ごとの多コピープラスミドライブラリメンバーの同一性のデコンボリューションが容易になる。このAAV-on-プラスミド法を使用することにより、宿主細胞ごとの多重ライブラリメンバーの数が制限され、その一方でまた、細胞ごとの多コピーの同一性のデコンボリューションが容易になる。次いで、これらの細胞ごとのコンビナトリアルライブラリの同一性を、AAVベクター濃縮バーコードと関連付けて、多重化されたライブラリ集団内からヒットを確信的に同定する。

10

20

【0931】

実施例7.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24時間後に培地（Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM）を交換し、72時間後に50%の培地量（500mL）を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解した。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置した。上清を分離し、0.22µmフィルター（Corning 431098）で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートした。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解した。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器（Millipore UFC910024）を使用して濃縮し、-80℃で凍結した。

30

【0932】

実施例7.3：ウイルスベクターのNGS及び細胞ごとのライブラリメンバー表現

本実施例は、精製されたAAVベクター内に含まれるDNA、具体的にはバーコード配列を配列決定する方法を記載する。精製AAVウイルスベクターのプール全体から、DNAをまとめて単離した。アルカリ溶解を使用してDNAを精製した。隣接するプライマー配列から、PCRを使用してDNAを増幅した。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比50：1で相同なオーバーハングを有するIlluminaアダプターと混合し、GGA反応物（BsmBI及びT4リガーゼ、NEB）に入れ、100×サイクル、一晩（16℃で5分間、その後37℃で5分間）に供した（Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487) と概念的に類似する）。次いで、この材料を増幅してIlluminaアダプター及びインデックスを加え、NextSeqプラットフォームを使用して配

40

50

列決定した。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるバーコード配列も同様に増幅し、配列決定のために調製した。各バーコードの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのバーコードのプール内での相対的存在量を決定した。AAVベクター関連DNAから増幅されたバーコード配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるバーコード配列の存在量、及びCas9を発現せず、したがってゲノム修飾されていないトランスフェクト細胞と比較した。各バーコードには特定のgRNAライブラリバリエーションとの関連性が知られているため、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的なAAVベクター産生をもたらすgRNAライブラリバリエーションは、それらの関連するバーコードが、宿主細胞集団及び／またはCas9を発現しない細胞（WT細胞）から単離されたAAVと比較してAAVベクターDNA集団中で濃縮または脱濃縮されるため、同定することができる。細胞ライブラリのカバー率が十分に高く、シーケンシング深度が高いため、真に濃縮されたヒットを、本質的に多重化されたトランスフェクトされたプラスミドライブラリ内で識別することができる。さらに、多重トランスフェクトライブラリ内からのヒット識別の問題を単純化するために、プロデューサー集団を単一細胞シーケンシングに供することができる。プロデューサー細胞は、細胞mRNAの逆転写中に個別に標識され（10×Genomics）、細胞識別配列を細胞mRNAに付加し、それによって細胞ライブラリ集団内に含まれるすべてのバーコードをタグ付けする。次いで、細胞識別配列タグ付きバーコードcDNAをPCRによって特異的に増幅し、これらのアンプリコンを上記のようにIlluminaによってNGS用に調製することができる。これらのアンプリコンの配列決定により、細胞ライブラリ集団内に存在する細胞ごとのライブラリメンバーの組み合わせが明らかになり、単一または組み合わせのヒットと、誤って濃縮された「ヒッチハイカー」を識別することができる。

10

20

【0933】

23個のgRNAのパイロットライブラリのスクリーニングの結果を図13に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、野生型（「WT」）細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェアを使用して、NGSデータを、23個のプールのバーコードのセットにアラインメントした。Langmead B, Salzberg S. "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." *Nature Methods*. 2012, 9:357-359. 示差的発現分析のために、相対的なバーコード存在量をDESeq2パッケージで評価した。Love MI, Huber W, Anders S (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biology*, 15, 550. 図13の結果は、スクリーニングプロトコル、NGS試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが効果的であることを示している。さらに、パイロットスクリーニングの結果は、いくつかの遺伝子が、高い統計的信頼性で、AAV産生の増加または減少に関連している可能性があることを示唆している（調整されたp値約0.1）。

30

【0934】

12,000個のgRNAのライブラリのスクリーニング結果を図14に示す。Cas9発現細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復を、WT細胞で産生されたAAVの3つの生物学的反復と比較した。bowtie2ソフトウェア（Langmead and Salzberg、上記）を使用して、NGSデータを、12,000個のバーコードプールにおけるバーコードのセットにアラインメントした。MAGeCKパッケージを用いて相対的なバーコード存在量を評価し、遺伝子レベルの濃縮と有意性（FDR）スコアを計算した。Li, et al. "MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens." (2014) *Genome Biology* 15:554. 図14の各点は、ライブラリ内の単一の遺伝子のスコアを表す（4つの対応するsgRNAスコアから計算した）。

40

50

図 1 4 の結果は、スクリーニングプロトコル、N G S 試料調製、配列決定、及びデータ分析パイプラインが、大規模スクリーニングについて効果的であることを示している。さらに、データは、多数の細胞株（及び関連する g R N A）が A A V 産生の増加または減少に関連していたため、A A V 産生の変化に関連するライブラリバリエーションを識別するための読み出しとしてバーコードを使用することができることを示している。

【0935】

プールされた V e c t o r S e l e c t スクリーニングにより、A A V 産生の増強に関連する数百の遺伝子が同定され、14 個を選択して個別に検証した。したがって、本実施例により、様々な組み込み方法（例えば、レンチウイルスの組み込みとトランスポゾンを紹介した組み込み）を使用したライブラリの構築が両方とも効果的であることが確認される。スクリーニングデータに基づいて、C R I S P R M a x 試薬を使用したリバーストランスフェクションを介して、14 個の遺伝子のそれぞれに最適な s g R N A を C a s 9 とのリボ核タンパク質（R N P）複合体として H E K 2 9 3 T 細胞に送達した。各 s g R N A を個別に送達し、個別の改変された細胞の群と参照試料（W T）として改変されていない群を生成した。遺伝子編集された細胞を R N P 送達後 8 日間回復させ、各細胞群から同数の細胞を播種し、A A V 転移プラスミド（p T r a n s f e r）、ヘルパープラスミド（p H e l p e r）、ならびに A A V 2 r e p 及び c a p 遺伝子を有するプラスミド（p R e p C a p）を三重トランスフェクトして A A V を産生した。p T r a n s f e r のみを未修飾細胞にトランスフェクトして作成した陰性対照群（W T - R e p C a p）も含めた。

【0936】

編集された細胞のすべての群について、A A V 産生を生物学的 3 つ組で実施した。市販の A A V 2 P r o 精製キット（例えば、T a k a r a 製）を使用して A A V を回収し、次いで D N a s e I で処理してカプセル化されていない D N A を除去した。精製産物中の A A V ベクターゲノムの数を、A A V I T R 領域を標的とするプライマーを使用する E v a G r e e n ベースのプロトコルにより、d d P C R を使用して測定した。

【0937】

各細胞群についての d d P C R によるベクターゲノムの定量化を図 1 5 に示す。A A V を生成しないはずであり、アッセイにおけるバックグラウンドシグナルの尺度を提供する R e p C a p 群（陰性対照）と比較して、シグナルの大きな差によって測定されるように、この結果は、すべての群で A A V が正常に生成されたことを示している。このデータから得られる重要なポイントは、14 個の遺伝子ノックアウト群すべてで、未改変の H E K 2 9 3 T 細胞群と比較して A A V 産生が増加しており、いくつかの場合では 10 倍近く増加していたことである（遺伝子 13 及び 14）。これにより、V e c t o r S e l e c t ハイスループットプールスクリーニングの結果が確認され、従来のロースループットの並行スクリーニングアッセイで個別に試験した場合に検証される可能性が高い候補細胞摂動を迅速に同定するプラットフォームの能力が検証される。

【0938】

本実施例に記載のアプローチはまた、ライブラリスクリーニングの反復ラウンドを可能にし、その場合、A A V ベクター集団中で有意な濃縮が認められ、より高い力価の A A V ベクターの産生に向けて細胞に摂動が導入されることが確認されたバーコード付きの g R N A 配列を、A A V - o n - プラスミドバーコード付き g R N A ライブラリから別々に宿主細胞に導入することができ、スクリーニング及びヒット確認の連続ラウンドにわたって、変異の組み合わせを「スタック」することができる。

【0939】

実施例 8：レンチウイルスベクターを介してゲノムに組み込まれた A A V 産生をスクリーニングするための多重 g R N A ライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の特定の細胞バリエーションによる（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む）例示的なウイルスベクター（例えば、本実施例では A A V ベクター）の産生レベルを測定する方法を

記載する。具体的には、本実施例は、多重 gRNA ゲノム編集された哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載し、DNA 及び RNA でコードされたバーコードは識別子である。

【0940】

実施例 8.1：哺乳動物細胞ライブラリの生成

本実施例は、AAV 産生哺乳動物細胞ライブラリの生成方法を記載する。AAV 宿主産生細胞株、例えば 293T を、CRISPRヌクレアーゼ発現構築物、例えば SpCas9ヌクレアーゼ (293T-Cas9) の安定的なレンチウイルス組み込みによって改変する。ゲノム配列を標的とする gRNA 配列 (ライブラリバリエーション) のライブラリを合成し、レンチウイルスベクタープラスミドにクローニングし、それにより、gRNA をコードする配列はまた、レンチウイルスベクター由来のポリ A テール付き mRNA 転写産物内に含まれる。これとは別に、識別子として機能するバーコード配列を 2 つの AAV-ITR 配列間でクローニングし、ベクター内に配置し、それにより、識別子はポリ A テール付き mRNA 転写産物内に含まれる。この ITR に隣接する識別子自体は、レンチウイルス 5'LTR の下流、及び Psi を含む関連するレンチウイルスパッケージング配列、及びレンチウイルス 3'LTR の上流のプラスミド上に位置するそれ自体に隣接し、LTR で区切られた転写された RNA の第 3 世代レンチウイルスパッケージングに適しており、転写された RNA の形態で AAV-ITR 配列を含む。レンチウイルス LTR と Psi 配列との間に配置された AAV-ITR を有するそのような構築物は、本明細書では AAV-in-Lenti と呼ばれる。AAV-in-Lenti プラスミドには、ピューロマイシン耐性または緑色蛍光タンパク質などの選択マーカー遺伝子も含まれており、最終的に組み込まれたライブラリ構築物を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができる。レンチウイルス gRNA ライブラリとバーコード付き AAV-in-Lenti プラスミドライブラリを、別々に、ウイルス糖タンパク質、例えば、VSV-G タンパク質をコードするプラスミドと、第 2 または第 3 世代のレンチウイルスパッケージングプラスミド (複数可) と一緒に、293T 細胞にトランスフェクトして、最小限のレンチウイルス Gag-Pol、Rev 遺伝子の機能 (例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド) を提供することができる。このトランスフェクション後に産生されるレンチウイルスベクターを、培養上清から回収し、濾過し、濃縮するか、または 293T-Cas9 細胞株に直接適用する。細胞を最初に高効率で形質導入し、個別の gRNA ライブラリバリエーションの多コピー組み込みを促進する。細胞ライブラリ内の細胞あたりのライブラリバリエーション数の所望の平均値の達成は、細胞ライブラリ gDNA の qPCR によって決定される。その後、この多コピー gRNA ライブラリ集団を、識別子を含む AAV-in-Lenti バーコードライブラリと共に単一コピー効率で形質導入し、選択して、細胞ごとのバーコード付き多重 gRNA 細胞ライブラリを確立する。

【0941】

細胞ごとの gRNA の発現は、安定的に発現する SpCas9 遺伝子の作用により、gRNA を標的とした切断とインデル形成をもたらしたと想定される。次いで、精製されたライブラリ集団に、組換え AAV ベクター、例えば pHelper 及び pAAV-Rep-Cap の産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物をトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、レンチウイルスに組み込まれた ITR-in-Lenti 配列から ITR で画定された AAV ベクターゲノムの複製を指示し、これらの ITR ベクター DNA はパッケージングされ、AAV ベクター内に放出される。

【0942】

実施例 8.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24 時間後に培地 (Glutamate

a x、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5 % F B Sを含有するD M E M)を交換し、7 2時間後に5 0 %の培地量(5 0 0 m L)を添加する。5日後、N a C lを1 5 0 m Mまで添加し、3 7 °Cで2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4 °Cで一晩放置する。上清を分離し、0 . 2 2 μ Mフィルター(C o r n i n g 4 3 1 0 9 8)で濾過する。d H ₂ O中の4 0 % P E G - 8 0 0 0をウイルスベクター材料に最終濃度8 %まで添加し、4 °Cで一晩インキュベートする。この材料を4 8 0 0 gで2 0分間遠心分離し、ペレットを回収して7 m LのP B Sに溶解する。次いで、Z o l o t u k h i n, e t a l., 1 9 9 9 (G e n e T h e r a p y 6, p p. 9 7 3 - 9 8 5)で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器(M i l l i p o r e U F C 9 1 0 0 2 4)を使用して濃縮し、- 8 0 °Cで凍結する。

10

【0 9 4 3】

実施例 8 . 3 : ウイルスベクターの N G S 及び細胞ごとのライブラリメンバー表現

本実施例は、精製された A A V ベクター内に含まれる D N A、具体的にはバーコード配列を配列決定する方法を記載する。精製 A A V ウイルスベクターのプール全体から、D N Aをまとめて単離する。アルカリ溶解を使用して D N Aを精製する。隣接するプライマー配列から、P C Rを使用して D N Aを増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比 5 0 : 1 で相同なオーバーハングを有する I l l u m i n a アダプターと混合し、G G A 反応物(B s m B I 及び T 4 リガーゼ、N E B)に入れ、1 0 0 × サイクル、一晩(1 6 °Cで5 分間、その後 3 7 °Cで5 分間)に供する(V e l c u l e s c u, e t a l., 1 9 9 5 (S c i e n c e V o l. 2 7 0, I s s u e 5 2 3 5, p p. 4 8 4 - 4 8 7)と概念的に類似する)。次いで、この材料を増幅して I l l u m i n a アダプター及びインデックスを加え、N e x t S e q プラットフォームを使用して配列決定する。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるバーコード配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各バーコードの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのバーコードのプール内での相対的存在量を決定する。A A V ベクター関連 D N A から増幅されたバーコード配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるバーコード配列の存在量と比較する。ベクター識別子をプロデューサー細胞遺伝子型に関連付けるために(すなわち、組み合わせの g R N A 同一性)、プロデューサー集団を、細胞 m R N A の逆転写中に単一細胞 R N A 標識(1 0 × g e n o m i c s)に供し、m R N A に細胞同一性配列を追加し、それによって、細胞ライブラリ集団全体で細胞ごとに含まれるすべての I T R 隣接バーコード及び g R N A をタグ付けする(それぞれがポリ A テール m R N A 転写産物内にセンスまたはアンチセンス方向に含まれるように設計されているため)。次いで、細胞識別配列タグ付きバーコード c D N A を P C R によって特異的に増幅し、これらのアンプリコンを上記のように N G S (I l l u m i n a) 用に調製することができる。これらのアンプリコンの配列決定により、細胞ライブラリ集団内に存在する細胞ごとのライブラリメンバーの組み合わせが明らかになり、単一または組み合わせの g R N A 誘導インデルによる真のヒットと、誤って濃縮された「ヒッチハイカー」を識別することができる。

20

30

【0 9 4 4】

この実施例で説明するアプローチは、ライブラリメンバーと I T R に隣接する識別子が不連続であるため、コンビナトリアルライブラリの生成とライブラリスクリーニングの反復ラウンドを容易にし、ライブラリ組成と細胞ごとのコピー数を、複合多重 g R N A コード D N A 構築物を再クロニングする必要なく、連続するラウンドで調整することができる。単一細胞 R N A シーケンシング法を使用することにより、クローン遺伝子型がウイルスベクター産生表現型に結び付けられ、D N A ライブラリ構築に最大限の柔軟性が与えられる。

40

【0 9 4 5】

実施例 9 : ウイルス感染及び再増幅を用いたエピソームプラスミド D N A での A A V 産生のスクリーニングのための C R I S P R g R N A ベースのライブラリ技術

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリを産生し、スクリーニングして、ライブラリ内の

50

特定の細胞摂動による（例えば、特定のライブラリバリエーションを含む細胞における）例示的なウイルスベクター（例えば、本実施例ではAAVベクター）の産生レベルを測定する方法を記載する。具体的には、この実施例は、哺乳動物細胞ライブラリから産生された個々のウイルスベクターを、それらが由来する特定の細胞バリエーションに関連付ける方法を記載しており、哺乳動物細胞ライブラリを作成するために使用するgRNAは、識別子である。本実施例では、2つの連続した哺乳動物細胞ライブラリにおいて、ウイルスベクターを生成する。これにより、哺乳動物細胞ライブラリ2における追加の低コピー数選択ステップを介して、哺乳動物細胞ライブラリ1において高コピー数で送達される改変された配列の効果を正確に特定する方法を提供する。

実施例9.1：哺乳動物細胞ライブラリ1の生成

【0946】

本実施例は、宿主産生細胞株、例えば293T内の哺乳動物細胞ライブラリを産生する第1の組換えAAVベクターの生成方法を記載する。宿主細胞株において期待される生物学的機能を有するタンパク質遺伝子産物をコードするバーコード付きCRISPR gRNA配列（ライブラリバリエーション）のライブラリを合成し、DNAバーコード配列と一緒にプラスミドにクローニングする。このgRNA：DNAバーコード配列のペアリングは、構築物の設計と合成の時点で事前に決定されている場合もあれば、使用する特定のクローニング方法に応じてランダムに関連付けられる場合もあり、gRNA：バーコードのペアリングは、クローニングされたライブラリプラスミドDNAのNGSによって決定される。このライブラリは、バーコード配列が2つのAAV ITR配列の間に位置するように構築される。対応するgRNAならびにgRNA発現調節配列（例えば、プロモーターなど）は、ITRにより画定される領域の外側に位置する。ITRで区切られた領域とgRNA発現ユニットの連続配列全体が、環状プラスミドDNA骨格内に含まれ、pSFV-AAVと表記されるそのようなエピソーム構築物の例示的な概略図を図5に示す。AAV-on-プラスミドを含むそのような構築物にはまた、例示的な選択マーカー遺伝子、抗生物質耐性遺伝子（例えば、ピューロマイシン耐性）、及び蛍光タンパク質遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）の例示的なAAVペイロードも含まれており、これにより、AAVベクターを産生する組み込まれたライブラリ構築物ならびにSV40複製起点を含む哺乳動物細胞を将来的に選択または同定することができ、培養のその後の継代にわたって、トランスフェクトされた細胞内でプラスミドを維持することを容易にする。AAV-on-プラスミドにクローニングされたバーコード付きgRNAライブラリを、293T細胞へのトランスフェクション用の精製プラスミドプールとして調製する。次いで、この方法でトランスフェクトされた細胞のライブラリ集団に、組換えAAVベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、ITR-on-プラスミド配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのITRベクターDNAはパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。

【0947】

実施例9.2：ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリ1から産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24時間後に培地（GlutaMax、ペニシリン／ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM）を交換し、72時間後に50%の培地量（500mL）を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置する。上清を分離し、0.22µmフィルター（Corning 431098）で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。

この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解する。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器 (Millipore UFC910024) を使用して濃縮し、-80℃で凍結する。

【0948】

実施例9.3: ウイルス感染による哺乳類細胞ライブラリ2の生成、ならびにウイルスベクターの再増幅及び回収

哺乳動物細胞ライブラリ1から精製したウイルスベクターを使用して、HEK293Tなどの宿主産生株、またはCas9ヌクレアーゼもしくは誘導体を発現するこの細胞株のバリエーションに感染させる。これらの細胞は、改変された配列で以前に改変されていない。この細胞集団へのgRNAライブラリバリエーションを含むウイルスベクターペイロードの形質導入により、第2の哺乳動物細胞ライブラリである哺乳動物細胞ライブラリ2が生成する。Cas9を発現する哺乳動物細胞ライブラリ2の細胞は、高レベルのウイルスを産生した哺乳動物細胞ライブラリ1の細胞に由来する形質導入されたgRNAライブラリバリエーションのセットによって改変され、したがって、哺乳動物細胞ライブラリ1のgRNAが増幅され、その効果はウイルス力価の向上と真に関連している。

【0949】

次いで、この方法で生成された細胞のライブラリ集団に、組換えAAVベクターの産生及びパッケージングに必要なプラスミド構築物（例えば、ウイルスベクターの形成に必須のポリヌクレオチド）、例えば、pHelper及びpAAV Rep-Capをトランスフェクトする。これらのプラスミドに存在する機能は、ITR-on-プラスミド配列からITRで画定されたAAVベクターゲノムの複製を指示し、これらのITRベクターDNAはパッケージングされ、AAVベクター内に放出される。

【0950】

この連続的に哺乳動物細胞ライブラリを使用する方法は、エピソーム送達に起因する改変された配列の多コピー送達の影響をデコンボリューションする方法を提供する。哺乳動物細胞ライブラリ1によって産生されたウイルスを第2の細胞集団に感染させることを、ほとんどの細胞メンバーが細胞ごとに1コピーのgRNAライブラリのみを受け取るように制御された条件下で実施することができる。哺乳動物細胞ライブラリ1がエピソームトランスフェクションによって構築され、複数の改変された配列を受け取った多くの細胞が含まれている可能性が高いため、この第2の哺乳動物細胞ライブラリのコピー数の制御により、哺乳動物細胞ライブラリ1と比較してAAV産生に影響を与えるgRNAがよりロバストに同定される。

【0951】

次いで、細胞ごとのライブラリの同一性を、AAVベクター濃縮バーコードと関連付けて、多重化されたライブラリ集団内からヒットを確信的に同定する。

【0952】

実施例9.4: ウイルスベクターの産生及び回収

本実施例は、哺乳動物細胞ライブラリ2から産生されるウイルスベクターの産生方法及び精製方法を記載する。Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985)に以前に記載されたようにウイルスベクターを産生する。簡潔に述べると、トランスフェクション後、24時間後に培地 (Gluta max、ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質、5% FBSを含有するDMEM) を交換し、72時間後に50%の培地量 (500mL) を添加する。5日後、NaClを150mMまで添加し、37℃で2時間インキュベートすることにより、細胞を溶解する。培地と細胞の混合物を回収し、4℃で一晩放置する。上清を分離し、0.22µmフィルター (Corning 431098) で濾過する。dH₂O中の40%PEG-8000をウイルスベクター材料に最終濃度8%まで添加し、4℃で一晩インキュベートする。この材料を4800gで20分間遠心分離し、ペレットを回収して7mLのPBSに溶解

10

20

30

40

50

する。次いで、Zolotukhin, et al., 1999 (Gene Therapy 6, pp. 973-985) で以前に記載されているように、材料をイオジキサノール勾配精製にかけ、スピン濃縮器 (Millipore UFC910024) を使用して濃縮し、 -80°C で凍結する。

【0953】

実施例 9.5 : ウイルスベクターの NGS 及び細胞ごとのライブラリメンバー表現

本実施例は、精製された AAV ベクター内に含まれる DNA、具体的にはバーコード配列を配列決定する方法を記載する。精製 AAV ウイルスベクターのプール全体から、DNA をまとめて単離する。アルカリ溶解を使用して DNA を精製する。隣接するプライマー配列から、PCR を使用して DNA を増幅する。増幅産物を精製し、アンプリコン：アダプターのモル比 50 : 1 で相同なオーバーハングを有する Illumina アダプターと混合し、GGA 反応物 (BsmBI 及び T4 リガーゼ、NEB) に入れ、100×サイクル、一晚 (16°C で 5 分間、その後 37°C で 5 分間) に供する (Velculescu, et al., 1995 (Science Vol. 270, Issue 5235, pp. 484-487) と概念的に類似する)。次いで、この材料を増幅して Illumina アダプター及びインデックスを加え、NextSeq プラットフォームを使用して配列決定する。宿主細胞産生株ライブラリに含まれるバーコード配列も同様に増幅し、配列決定のために調製する。各バーコードの配列読み取りの頻度を測定し、すべてのバーコードのプール内での相対的存在量を決定する。AAV ベクター関連 DNA から増幅されたバーコード配列の相対的存在量を、元の宿主細胞集団におけるバーコード配列の存在量、及び Cas9 を発現せず、したがってゲノム修飾されていないトランスフェクト細胞と比較する。各バーコードには特定の gRNA ライブラリバリエーションとの関連性が知られているため、宿主細胞の生物学を直接変化させる摂動を生じさせ、示差的な AAV ベクター産生をもたらす gRNA ライブラリバリエーションは、それらの関連するバーコードが、宿主細胞集団及び／または Cas9 を発現しない細胞 (WT 細胞) から単離された AAV と比較して AAV ベクター DNA 集団中で濃縮または脱濃縮されるため、同定することができる。細胞ライブラリのカバー率が十分に高く、シーケンシング深度が高いため、真に濃縮されたヒットが、本質的に多重化されたトランスフェクトされたプラスミドライブラリ内で識別される。さらに、多重トランスフェクトライブラリ内からのヒット識別の問題を単純化するために、プロデューサー集団を単一細胞シーケンシングに供することができる。プロデューサー細胞は、細胞 mRNA の逆転写中に個別に標識され (10× Genomics)、細胞識別配列を細胞 mRNA に付加し、それによって細胞ライブラリ集団内に含まれるすべてのバーコードをタグ付けする。次いで、細胞識別配列タグ付きバーコード cDNA を PCR によって特異的に増幅し、これらのアンプリコンを上記のように Illumina によって NGS 用に調製することができる。これらのアンプリコンの配列決定により、細胞ライブラリ集団内に存在する細胞ごとのライブラリメンバーの組み合わせが明らかになり、単一または組み合わせのヒットと、誤って濃縮された「ヒッチハイカー」を識別することができる。

【0954】

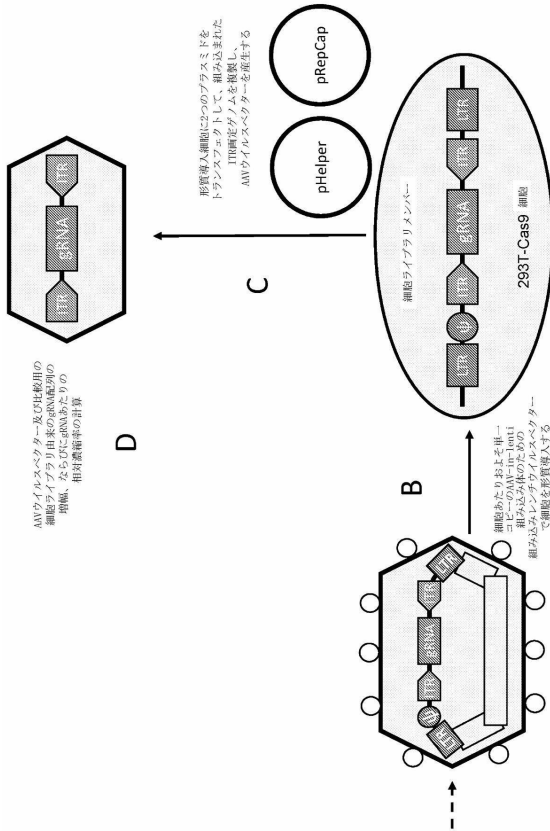
均等物

当業者は、本開示に対する様々な変更、修正、及び改良が当業者には容易に想起されることが理解されるべきである。そのような変更、修正、及び改良は、本開示の一部であることを意図しており、本発明の精神及び範囲内であることを意図している。したがって、前述の説明及び図面は単なる例であり、本開示に記載されているいずれの発明も以下の特許請求の範囲によってさらに詳細に説明されている。

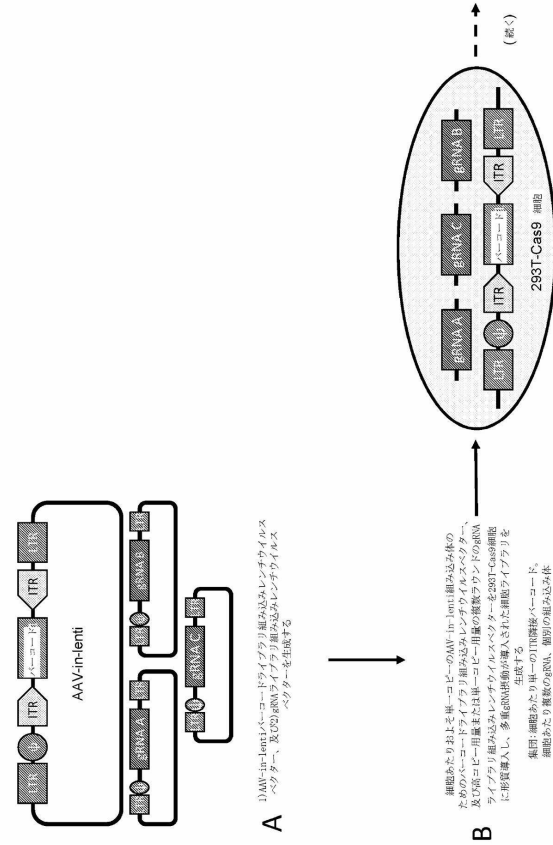
【0955】

当業者は、本明細書に記載のアッセイまたは他のプロセスで得られた値に起因する偏差または誤差の典型的な基準を理解するであろう。本発明の背景を説明し、その実践に関するさらなる詳細を提供するために、本明細書で参照される刊行物、ウェブサイト、及び他の参考資料は、その全体が参照により本明細書に援用される。

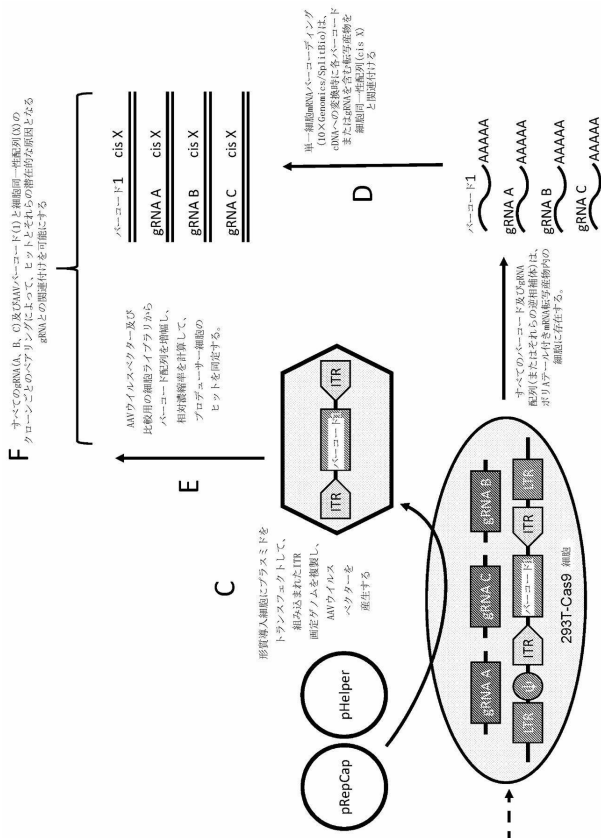
【圖 2-2】



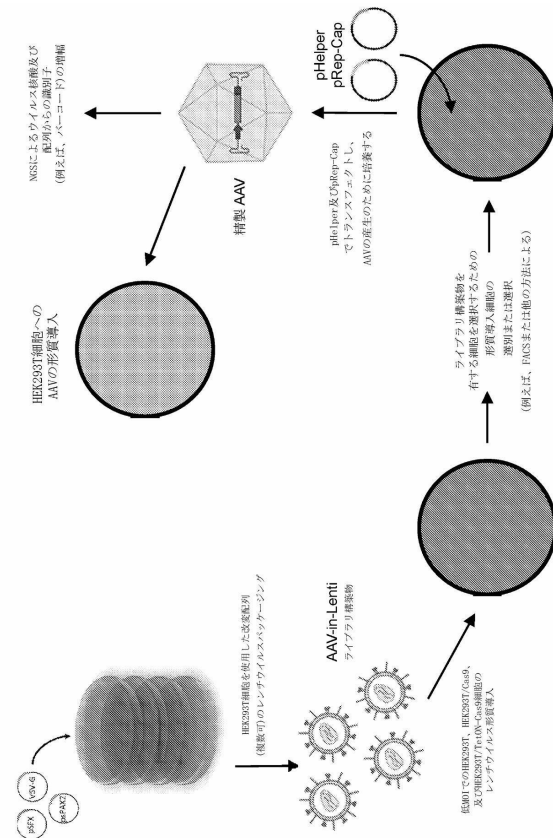
【圖 3 - 1】



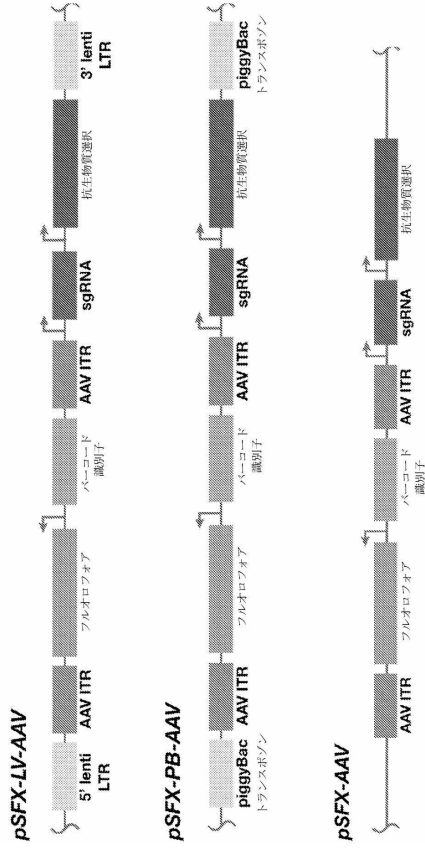
【図 3 - 2】



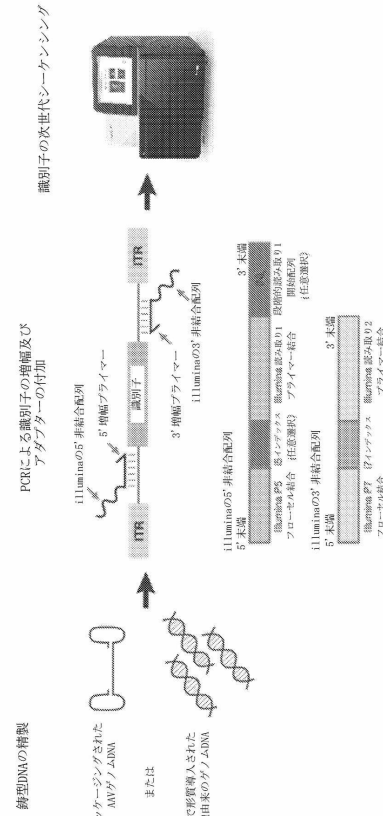
【図 4】



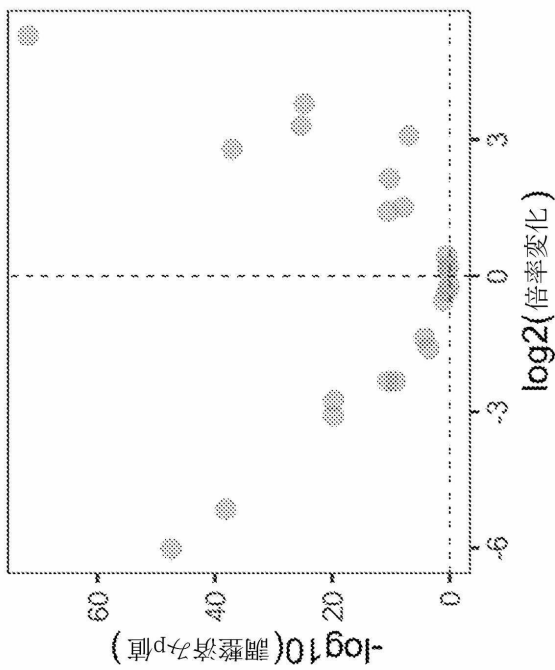
【図 5】



【図 6】

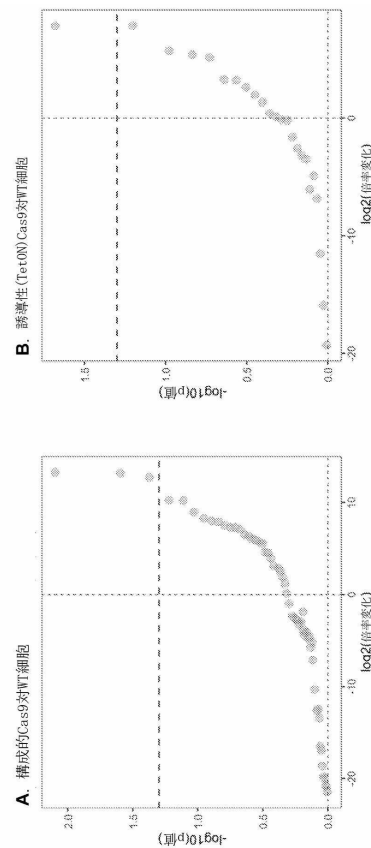


【図 7】



パイロットスクリーニング

【図 8】



10

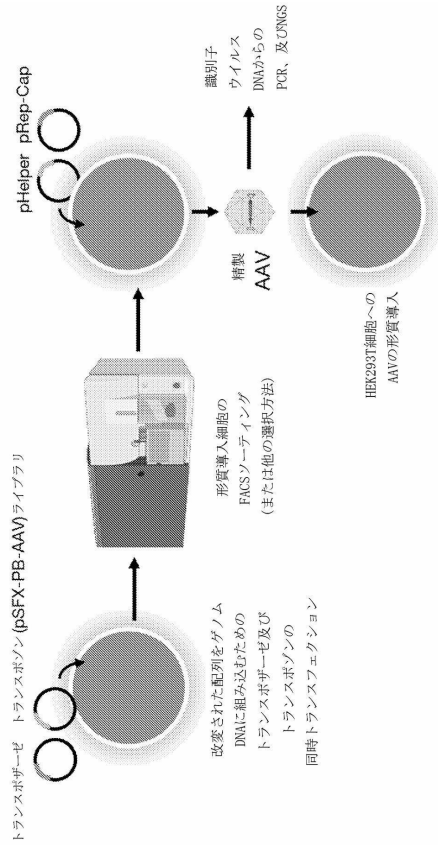
20

30

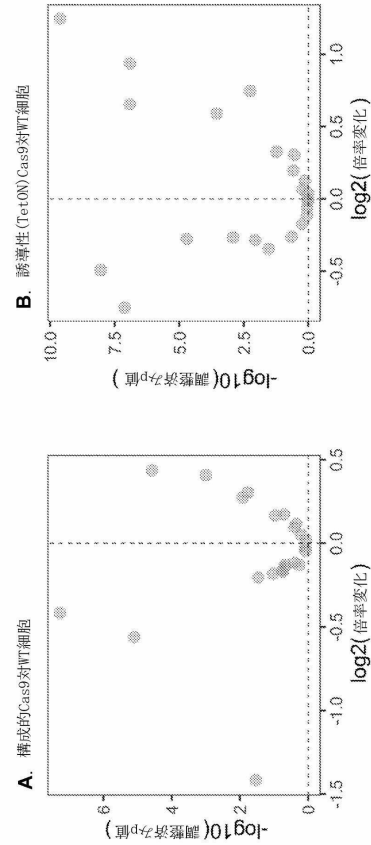
40

50

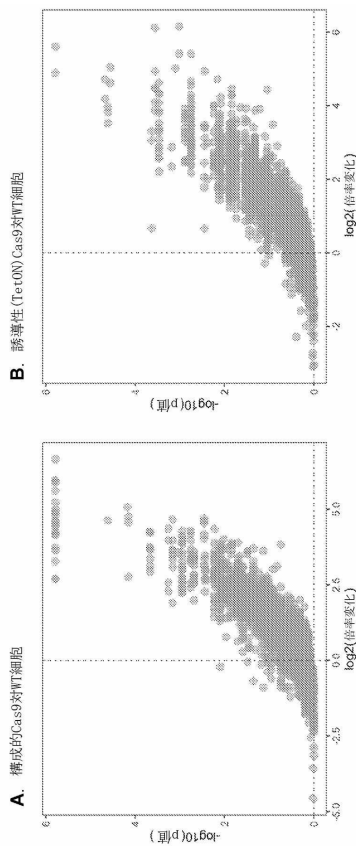
【図 9】



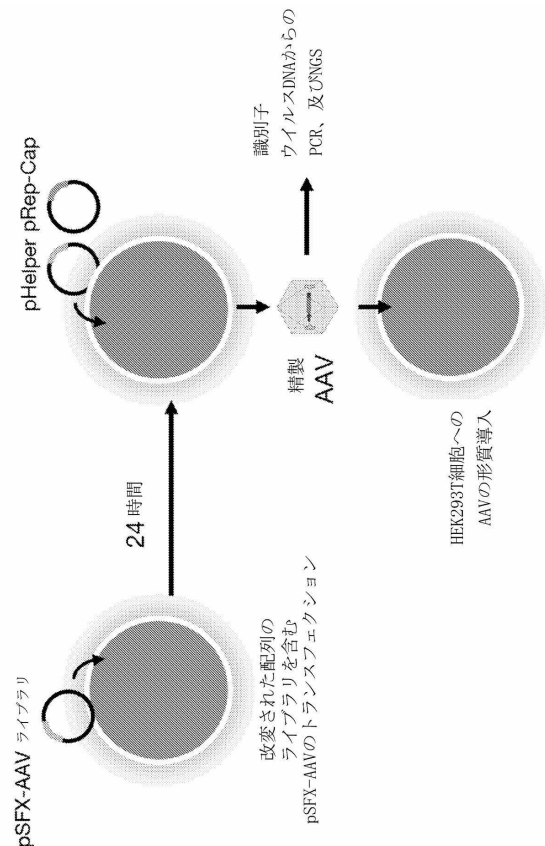
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

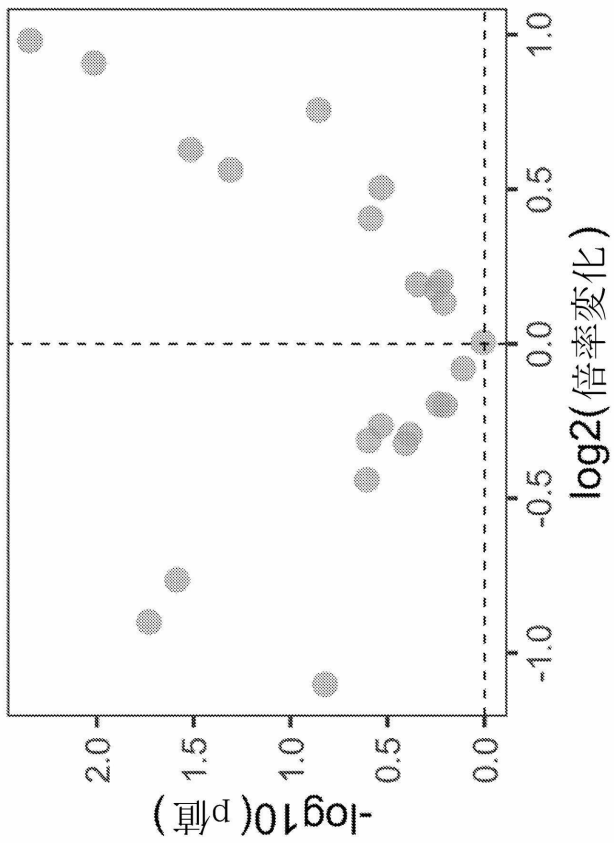
20

30

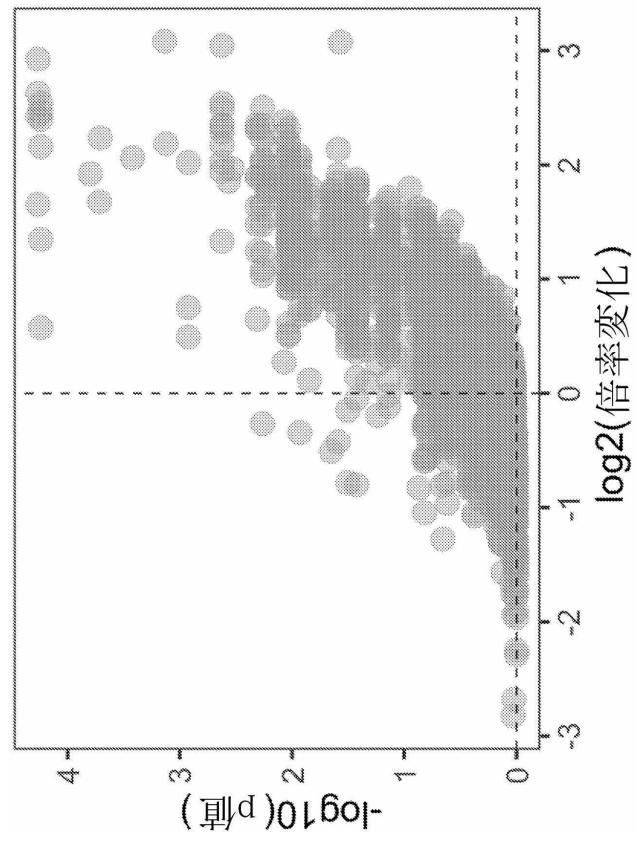
40

50

【図 1 3】



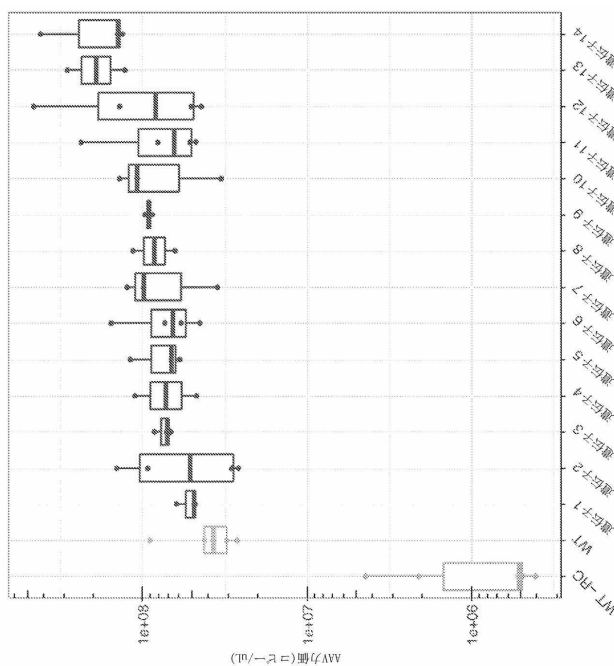
【図 1 4】



10

20

【図 1 5】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/048741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/10 C12N15/861 C12N15/90 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED 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, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/055878 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; UNIV BRANDEIS [US]) 21 March 2019 (2019-03-21) page 2 - page 21; figures 1-17 -----	1-30
X	CA 3 123 875 A1 (UNIV PITTSBURGH COMMONWEALTH SYS HIGHER EDUCATION [US]) 2 July 2020 (2020-07-02) pages 2-7; figures 1-11 ----- -/--	1-30
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 15 December 2021		Date of mailing of the international search report 10/01/2022
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 Seranski, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/048741

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Katja Pekrun ET AL: "Using a barcoded AAV capsid library to select for novel clinically relevant gene therapy vectors", bioRxiv, 27 June 2019 (2019-06-27), XP055604667, DOI: 10.1101/683672 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/06/27/683672.full-text.pdf [retrieved on 2019-07-11] page 1 - page 50 -----	1-30
X	Kei Adachi ET AL: "Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing", Nature communications, 1 January 2014 (2014-01-01), page 3075, XP055221564, England DOI: 10.1038/ncomms4075 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/ncomms/2014/140117/ncomms4075/pdf/ncomms4075.pdf page 1 - page 14 -----	1-30
A	KEI ADACHI ET AL: "Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 5, no. 1, 17 January 2014 (2014-01-17), XP055548821, DOI: 10.1038/ncomms4075 page 1 - page 14 -----	1-30

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/048741

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019055878 A2	21-03-2019	AU 2018334273 A1	30-04-2020
		CA 3075532 A1	21-03-2019
		CN 111344403 A	26-06-2020
		EP 3682004 A2	22-07-2020
		US 2020270632 A1	27-08-2020
		WO 2019055878 A2	21-03-2019

CA 3123875 A1	02-07-2020	AU 2019414426 A1	10-06-2021
		CA 3123875 A1	02-07-2020
		CN 113227387 A	06-08-2021
		EP 3902919 A1	03-11-2021
		KR 20210110341 A	07-09-2021
		WO 2020139892 A1	02-07-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 4 0 B 40/02 (2006.01)

C 4 0 B 40/02

C 1 2 N 15/35 (2006.01)

C 1 2 N 15/35

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z

,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,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,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,KE,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,NG,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,Z
W

弁護士 山本 健策

(72)発明者

ロブナー, アレクシス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

チャクラバルティ, ガウラブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

トンプソン, デイビッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

シーツキエヴィチ, グレゴリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ヒックス, マッケナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ベルッチ, ジョセフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, 3アールディー ストリート
6 6 5, スイート 2 5 0, 6 4-エックス, インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考)

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52

4B065 AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA60