

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7568513号
(P7568513)

(45)発行日 令和6年10月16日(2024.10.16)

(24)登録日 令和6年10月7日(2024.10.7)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
		請求項の数 33 (全228頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2020-564225(P2020-564225)	(73)特許権者	519397987
(86)(22)出願日	令和1年5月15日(2019.5.15)		フラッグシップ パイオニアリング イノ
(65)公表番号	特表2021-523724(P2021-523724		ベーションズ ブイ, インコーポレイテ
	A)		ッド
(43)公表日	令和3年9月9日(2021.9.9)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2019/032488		1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ
(87)国際公開番号	WO2019/222403		パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ
(87)国際公開日	令和1年11月21日(2019.11.21)		フロア
審査請求日	令和4年5月13日(2022.5.13)	(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	62/671,838		弁理士 山本 秀策
(32)優先日	平成30年5月15日(2018.5.15)	(74)代理人	100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 森下 夏樹
	米国(US)	(74)代理人	100181674
(31)優先権主張番号	62/695,529		弁理士 飯田 貴敏
(32)優先日	平成30年7月9日(2018.7.9)	(74)代理人	100181641
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 フソソーム組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

フソソームであって、
a) 再標的化パラミクソウイルスフソゲンを含む脂質二重層であって、前記再標的化パラミクソウイルスフソゲンが標的化部分に連結され、前記再標的化パラミクソウイルスフソゲンが、非標的細胞と比べて標的細胞への外因性薬剤の優先的送達をもたらし、前記フソソームが前記外因性薬剤をコードする核酸を含む、脂質二重層と、
b) 核酸であって、
(i) 前記外因性薬剤をコードする前記核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメントであって、前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが、前記標的細胞における前記外因性薬剤の発現を、前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて増加させ、前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが組織特異的プロモーターである、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および
(i i) 前記外因性薬剤をコードする前記核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメントであって、前記非標的細胞における前記外因性薬剤の発現を、前記非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて減少させる、非標的細胞特異的調節エレメント
を含むまたはコードする、核酸と、
を含む、フソソーム。

【請求項 2】

i) 前記フソソームが非標的細胞とよりも標的細胞と高い割合で融合し、任意に、前記高い割合は、少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、または 100 倍である、

ii) 前記フソソームが、別のフソソームとよりも標的細胞と高い割合で融合し、前記別のフソソームは、前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントおよび／または前記非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は前記フソソームと同様であり、任意に、前記高い割合は少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、または 100 倍である、

10

iii) 前記フソソームは、前記フソソームにおける前記外因性薬剤が 24、48、または 72 時間後に標的細胞の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % に送達されるような割合で標的細胞と融合する、

iv) 前記フソソームが、前記核酸を標的細胞に非標的細胞よりも高い割合で送達し、任意に、前記高い割合は少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、または 100 倍である、

v) 前記フソソームが、前記核酸を標的細胞に別のフソソームよりも高い割合で送達し、前記別のフソソームは、前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントおよび／または前記非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は前記フソソームと同様であり、任意に、前記高い割合は、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、または 100 倍である、あるいは

20

vi) 前記フソソームが前記核酸を標的細胞に、前記フソソームにおける前記外因性薬剤が 24、48、または 72 時間後に標的細胞の少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、または 90 % に送達されるような割合で送達する、のうちの 1 つ以上である、請求項 1 に記載のフソソーム。

【請求項 3】

前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的プロモーター、組織特異的エンハンサー、組織特異的スプライス部位、RNA もしくはタンパク質の半減期を延長する組織特異的部位、組織特異的 mRNA 核外輸送促進部位、組織特異的翻訳増強部位、または組織特異的翻訳後改変部位を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のフソソーム。

30

【請求項 4】

前記組織特異的プロモーターが、肝細胞特異的プロモーターである、請求項 1～3 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 5】

前記肝細胞特異的プロモーターが、hAAT、ApoE、HCR-hAAT、増強トランスサイレチン、TTR、ALB、ApoA2、CYP3A4、LP1B、MIR122、ヘモペキシンおよびHLPを含む群から選択される、請求項 4 に記載のフソソーム。

40

【請求項 6】

前記非標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的 miRNA 認識配列、組織特異的プロテアーゼ認識部位、組織特異的ユビキチンリガーゼ部位、組織特異的転写抑制部位、または組織特異的エピジェネティック抑制部位を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 7】

前記非標的細胞特異的調節エレメントが組織特異的 miRNA 認識配列を含む、請求項 1～6 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 8】

前記非標的細胞特異的調節エレメントが、前記外因性薬剤をコードする転写化領域内に

50

配置またはコードされ、任意に、前記転写化領域によって生成されたRNAが、UTRまたはコード領域内の前記組織特異的miRNA認識配列を含む、請求項7に記載のフソソーム。

【請求項9】

前記標的細胞が癌細胞であり、前記非標的細胞が非癌性細胞である、請求項1～8のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項10】

前記フソソームがさらに、

i) 前記脂質二重層に第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および前記脂質二重層に第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) 前記脂質二重層に第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に前記低下したレベルが、非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%である第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%である第1の免疫刺激タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%である第2の免疫刺激タンパク質を含む、請求項1～9のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項11】

前記フソソームが対象に投与される場合、

i) 前記フソソームが検出可能な抗体応答を生じず、または前記フソソームに対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

ii) 前記フソソームが検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する細胞性免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

iii) 前記フソソームが検出可能な自然免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する前記自然免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

iv) フソソームの10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が血清によって不活性化される、

v) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な抗体応答を生じず、または前記標的細胞に対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、あるいは

vi) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記標的細胞に対する細胞応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、のうちの1つ以上である、請求項10に記載のフソソーム。

【請求項12】

前記免疫抑制タンパク質が補体調節タンパク質またはCD47である、請求項10または請求項11に記載のフソソーム。

【請求項13】

前記免疫刺激タンパク質がMHCであり、任意に、前記MHCがタンパク質であるHLAである、請求項11または請求項12に記載のフソソーム。

【請求項14】

前記核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含む、請求項1～13のいずれかに

10

20

30

40

50

【請求項 15】

【請求項 16】

10

20

【請求項 19】

【請求項 20】

30

【請求項 2 1】

【請求項 22】

【請求項 23】

40

【請求項 24】

50

V1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、スフィンゴシン
 -1-リン酸受容体(S1P1R)、NMDAチャネル、膜貫通タンパク質、マルチスパ
 ン膜貫通タンパク質、T細胞受容体モチーフ、T細胞アルファ鎖、T細胞β鎖、T細胞γ
 鎖、T細胞δ鎖、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、C
 D11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、
 CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、C
 D62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、30 CD133
 、CD137(4-1BB)、CD163、F4/80、IL-4Ra、Sca-1、C
 TLA-4、GITR、GARP、LAP、グランザイムB、LFA-1、トランスフェ
 リン受容体、NKp46、パーフォリン、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th4
 0、Th22、Th9、Tfh、古典的Treg、FoxP3+、Tr1、Th3、Tr
 eg17、TREG、CDCP1、NT5E、EpCAM、CEA、gpA33、ムチン
 、TAG-72、炭酸アンヒドラーゼIX、PSMA、葉酸結合タンパク質、ガングリオ
 シド、CD2、CD3、GM2、ルイス-γ2、VEGF、VEGFR1/2/3、αV
 β3、α5β1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErbB3、MET、I
 GF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、テ
 ネイシン、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RE
 T、IL-1β、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R
 、JAK3、BRAF、PTCH、Smoothed、PIGF、ANPEP、TI
 MP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR、またはANTXR1、葉酸受容体アルファ
 (FRa)、ERBB2(HER2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、上皮成
 長因子受容体(EGFR)、メソテリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、
 CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、10 EGFRvIII、G
 D2、GD3、BCMA、MUC16(CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、
 IL13Rα1、L1-CAM、TnAg、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ROR
 1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B
 7H3、KIT、インターロイキン-11受容体α(IL-11Ra)、PSCA、PR
 SS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ(PD
 GFRベータ)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、プロスターゼ、PAP
 、ELF2M、エフリンB2、IGF-1受容体、CAIX、LMP2、gpLOO、b
 cr-abl、チロシナーゼ、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMA
 A、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、C
 LDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシア
 ル酸、PLACL、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB
 3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ES
 O-1、LAGE-la、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、ETV6
 -AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-C
 T-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロスタイン、サバイビン、テロメ
 ラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hT
 ERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融
 合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、R
 hoC、TRP-2、CYP11B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES
 1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、R
 U1、RU2、腸内カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、
 CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、25 CD300LF、
 CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、
 新生抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD2
 9、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A、B、C)CD49
 f、CD151、CD340、CD200、tkrA、tkrB、もしくはtkrC、ま
 たはそれらの抗原性フラグメントまたは抗原性部分を含む群から選択される、請求項23

10

20

30

40

50

に記載のフソソーム。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが、CD19 を標的化する、請求項 24 に記載のフソソーム。

【請求項 26】

前記標的化部分が scFv を含む、請求項 1～25 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 27】

前記フソソームがレトロウイルスベクターである、請求項 1～26 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 28】

前記核酸を標的細胞に送達する、請求項 1～27 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 29】

前記標的細胞が、T 細胞、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD34+造血幹細胞、CD105+造血幹細胞、CD117+造血幹細胞、CD105+内皮細胞、B 細胞、CD20+B 細胞、CD19+B 細胞、癌細胞、CD133+癌細胞、EpCAM+癌細胞、CD19+癌細胞、Her2/Neu+癌細胞、GluA2+ニューロン、GluA4+ニューロン、NKG2D+ナチュラルキラー細胞、SLC1A3+星状細胞、SLC7A10+脂肪細胞、および CD30+肺上皮細胞からなる群から選択される、請求項 1～28 のいずれかに記載のフソソーム。

【請求項 30】

対象における疾患または障害の治療のための薬品の製造における、請求項 1～29 のいずれかに記載のフソソームの使用であって、前記フソソームが、前記外因性薬剤を送達するために前記対象に投与されるものであり、任意に、前記対象がヒト対象である、使用。

【請求項 31】

対象、標的組織、または標的細胞において機能を調節するための薬品の製造における、請求項 1～29 のいずれかに記載のフソソームの使用であって、前記フソソームを前記標的組織または前記標的細胞と接触させることを含み、任意に、前記対象がヒト対象である、使用。

【請求項 32】

対象における疾患または障害の治療のための薬品の製造における、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のフソソームの使用であって、前記フソソームが、前記対象に投与されるものであり、任意に、前記対象がヒト対象である、使用。

【請求項 33】

a) 前記核酸および前記再標的化パラミクソウイルスフソゲンを含む細胞を用意することと、

b) 前記細胞を前記フソソームの生成を可能にする条件下で培養することと、

c) 前記細胞から前記フソソームを分離、豊富化、または精製することと、を含み、それによってフソソームを作製する、請求項 1～29 のいずれかに記載のフソソームを作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018 年 5 月 15 日に出願された米国特許第 62/671,838 号および 2018 年 7 月 9 日に出願された米国特許第 62/695,529 号の優先権を主張し、これらの各々は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列リストの参照による組み込み

本出願は、電子形式の配列リストと共に提出されている。配列リストは、2019 年 5 月 14 日に作成された V2050-7023WO Sequence Listing. T

10

20

30

40

50

X Tというタイトルのファイルとして提供され、サイズは651キロバイトである。配列リストの電子形式の情報は、その全体が参照によって組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

複合的な生物製剤は、様々な疾患における有望な治療候補である。しかしながら、原形質膜は細胞と細胞外空間との間の障壁として作用するため、大きい生物学的薬剤を細胞に送達することは困難である。当技術分野において、対象における細胞に複合的な生物製剤を送達する新しい方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、少なくとも部分的に、インビボ送達のためのフソソーム法および組成物を提供する。いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞に対する特異性を促進するエレメントの組み合わせ、例えば、再標的化フソゲン、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および非標的細胞特異的調節エレメントのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、フソソームは、フソソームに対する免疫応答を低下させる1つ以上の改変を含む。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】 ポジティブ T C S R E または N T C S R E を含む核酸構築体をコードするレンチウイルス (L V) によって形質導入された、標的ヒト肝癌細胞株 (H e p G 2) および非標的 (非肝) 細胞株を含む細胞株に関する結果を示す一連のグラフである。図1Aは、P G K プロモーターの制御下で、m i R T 配列を加えて (h P G K - e G F P + m i R T) または m i R T 配列を加えず (h P G K - e G F P) に生成された L V によって形質導入された、ヒト肝癌細胞株 (H e p G 2)、ヒト胎児腎臓細胞株 (2 9 3 L X)、造血由来のヒト T 細胞株 (M o l t 4 . 8)、およびマウス脳に由来する内皮細胞株 (b E N D . 3) における G F P 発現を示す。図1Bは、P G K プロモーターの制御下で生成された L V (h P G K - e G F P)、または肝細胞特異的プロモーター A p o E の制御下で m i r T 配列および G F P を含む L V (h A p o E - e G F P + m i R T) によって形質導入された H e p G 2 および 2 9 3 L X 細胞における G F P 発現を示す。図1Cは、導入遺伝子フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (P A L) を S F F V プロモーターの制御下で含む L V (S F F V - P A L)、または m i r T 配列を h A p o E プロモーターの制御下で含む L V (h A p o E - P A L + m i R T) によって形質導入された H e p G 2 および 2 9 3 L X 細胞の上清中のフェニルアラニン (P h e) の定量化を示す。

【図1B】 同上。

【図1C】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0006】

実施形態の列举

本明細書で提供されるのは、レンチウイルスベクターまたは粒子などのレトロウイルスベクターまたは粒子を含むフソソームであり、一般的に、例えば対象において、細胞へのフソソームの導入後に、非標的細胞と比較して、標的細胞における所望の外因性薬剤 (例えば、治療用導入遺伝子) の発現の増加をもたらす。例えば、いくつかの例では、発現における増加が、提供されたフソソーム (例えば、レトロウイルスベクターまたは粒子) の対象、例えばヒト対象へのインビボでの投与の後に続いている。特に、遺伝子治療を成功させるための主要な課題の1つは、インビボで遺伝子改変細胞からの治療用導入遺伝子 (例えば、外因性薬剤) の安定した長期発現を維持する能力である。抗原提示細胞 (A P C) などの非標的細胞における導入遺伝子の発現は、いくつかの態様において、適応免疫応答の活性化を生じ、B細胞による導入遺伝子産物に対する中和抗体の生成および／または T細胞による導入遺伝子産物細胞の排除をもたらす。したがって、導入遺伝子の発現を標

10

20

30

40

50

的細胞に限定することは、いくつかの実施形態では、免疫クリアランスを回避することによって、導入遺伝子発現の耐久性に実質的に影響を及ぼし得る。さらに、細胞型特異的導入遺伝子の発現は、例えば、アポトーシス促進遺伝子の発現を腫瘍細胞または他の標的細胞（例えば、肝細胞）に限定するなど、疾患生物学に非常に関連し得る。

【0007】

特に、本明細書で提供されるのは、いくつかの例では、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（TC SRE、例えば、組織特異的プロモーター）および／またはネガティブ標的細胞特異的調節エレメント（ネガティブTC SRE）、例えば、非標的細胞特異的調節エレメント（NTC SRE）の制御下にある、またはそれらによって調節される核酸配列の発現を含むフソソーム（例えば、レトロウイルスベクターpr粒子）である。いくつかの実施形態において、NC SREなどのネガティブTC SREは、細胞におけるmiRNA配列に相補的である核酸配列によるなど、miRNA媒介性遺伝子サイレンシングによるものである。いくつかの実施形態において、提供されるフソソーム（例えば、レトロウイルスベクターまたは粒子）は、非標的細胞における発現を制限または限定しながら、標的細胞株（例えば、腫瘍もしくは肝細胞または他の標的細胞）における導入遺伝子（外因性薬剤）発現を特異的に促進することができる。

【0008】

提供される実施形態は、なかでも以下である。

1. フソソームであって、

a) 再標的化フソゲンを含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する異なるフソソームと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、または

(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて減少させる非標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

【0009】

2. フソソームであって、

a) 再標的化されたフソゲンを含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する異なるレトロウイルスベクターと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、または

(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたネガティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、ネガティブ組織特異的調節エレメントが非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ネガティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なレトロウイルスと比べて減少させる、ネガティブ標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

【0010】

3. フソソームであって、

a) フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）を含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および

(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて減少させる非標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

10

【0011】

4. フソソームであって、

a) フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）を含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する異なるレトロウイルスベクターと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および

20

(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたネガティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、ネガティブ組織特異的調節エレメントが非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ネガティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なレトロウイルスと比べて減少させるネガティブ標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

【0012】

5. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、

i) フソソームが、非標的細胞よりも標的細胞と、例えば、少なくとも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で融合し、

30

ii) フソソームが、別のフソソームよりも標的細胞と、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で融合し、

iii) フソソームが標的細胞と、フソソームにおける薬剤が24、48、または72時間後に標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で融合し、

iv) フソソームが核酸を、非標的細胞よりも標的細胞に、例えば、少なくとも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で送達し、

40

v) フソソームが核酸を標的細胞に、別のフソソームよりも、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い割合で送達し、あるいは

vi) 核酸を標的細胞に、フソソームにおける薬剤が24、48、または72時間後に標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で送達する、のうちの1つであるフソソーム。

【0013】

50

6. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、脂質二重層がエンベロープ、例えば、ウイルスエンベロープによって構成され、そして核酸がレトロウイルス核酸である、のうちの1つ以上（例えば、2つまたは3つすべて）が適用される、フソソーム。

【0014】

7. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、核酸が、5'LTR（例えば、U5を含み、機能的U3ドメインを欠如する）、Psiパッケージングエレメント（Psi）、ペイロード遺伝子、例えば外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結された中央ポリプリントラクト（cPPT）プロモーター、ペイロード遺伝子、例えば外因性薬剤をコードする核酸（任意に、オープンリーディングフレームの前にイントロンを含む）、ポリAテール配列、WPRE、および3'LTR（例えば、U5を含み、機能的U3を欠如している）、のうちの1つ以上（例えば、すべて）を含む、フソソーム。

10

【0015】

8. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、ポリメラーゼ（例えば、逆転写酵素、例えば、polまたはその一部分）、インテグラーゼ（例えば、polまたはその一部分、例えば、機能的または非機能的変異体）、マトリックスタンパク質（例えば、gagまたはその一部分）、カプシドタンパク質（例えば、gagまたはその一部分）、ヌクレオカプシドタンパク質（例えば、gagまたはその一部分）、およびプロテアーゼ（例えば、pro）、のうちの1つ以上（例えば、すべて）を含む、フソソーム。

【0016】

20

9. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームが対象に投与される場合、

i) 対象において検出可能で存在する外因性薬剤の10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が非標的細胞にあり、

ii) 外因性薬剤を検出可能で含む対象の細胞の少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%が標的細胞（例えば、単一細胞型の細胞、例えば、T細胞）であり、

iii) 外因性薬剤を検出可能で含む対象の細胞の1,000,000、500,000、200,000、100,000、50,000、20,000、または10,000個未満の細胞が非標的細胞であり、

30

iv) 対象の全標的細胞における外因性薬剤の平均レベルが、対象の全非標的細胞における外因性薬剤の平均レベルよりも少なくとも100倍、200倍、500倍、または1,000倍高く、あるいは

v) 外因性薬剤が対象においていずれの非標的細胞でも検出可能ではない、のうちの1つ以上である、フソソーム。

【0017】

10. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、再標的化フソゲンが、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質もしくはFおよびHタンパク質もしくはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、フソソーム。

40

【0018】

11. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600

50

個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号 1～132のいずれかに示される配列を有する、フソソーム。

【0019】

12. 実施形態11のフソソームであって、パラミクソウイルスがニパウイルス、例えばヘニパウイルスである、フソソーム。

【0020】

13. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的プロモーター、組織特異的エンハンサー、組織特異的スプライス部位、RNAもしくはタンパク質の半減期を延長する組織特異的部位、組織特異的mRNA核外輸送促進部位、組織特異的翻訳増強部位、または組織特異的翻訳後改変部位を含む、フソソーム。

10

【0021】

14. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞特異的調節エレメントまたはネガティブTCSEが、組織特異的miRNA認識配列、組織特異的プロテアーゼ認識部位、組織特異的ユビキチンリガーゼ部位、組織特異的転写抑制部位、または組織特異的エピジェネティック抑制部位を含む、フソソーム。

【0022】

15. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞特異的調節エレメントまたはネガティブTCSEが、組織特異的miRNA認識配列を含む、フソソーム。

【0023】

20

16. 実施形態15のフソソームであって、非標的細胞特異的調節エレメントまたはネガティブTCSEが、転写化領域（例えば、外因性薬剤をコードする転写化領域）内に配置またはコードされ、例えば、転写化領域によって生成されるRNAがUTRまたはコード領域内にmiRNA認識配列を含む、フソソーム。

【0024】

17. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、標的細胞が癌細胞であり、非標的細胞が非癌性細胞である、フソソーム。

【0025】

18. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、核酸、例えばレトロウイルス核酸が、ポジティブTCSEおよび／またはNTCSEもしくはネガティブTCSEをコードする、フソソーム。

30

【0026】

19. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レトロウイルス核酸が、ポジティブTCSEおよび／またはNTCSEもしくはネガティブTCSEの相補体を含む、フソソーム。

【0027】

20. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞、例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11c+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞に、核酸を送達しない、フソソーム、

40

【0028】

21. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞型（例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11c+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞）の10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%、または0.000001%未満が、定量的PCRを使用して、例えば、実施例1のアッセイを使用して、核酸、例えば、レトロウイルス核酸を含む、フソソーム。

50

【0029】

22. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、標的細胞が、ホスト細胞ゲノムあたり核酸、例えば、レトロウイルス核酸またはその一部の0.00001~10、0.0001~10、0.001~10、0.01~10、0.1~10、0.5~5、1~4、1~3、または1~2コピーを含み、例えば、核酸のコピー数がインビボでの投与後に評価される、フソソーム。

【0030】

23. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、

非標的細胞（例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11c+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞）の10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%、0.01%未満が外因性薬剤を含み、または

外因性薬剤（例えば、タンパク質）が、非標的細胞に、例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11c+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、もしくは非癌性細胞に、検出可能で存在しない、フソソーム。

【0031】

24. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、核酸、例えば、レトロウイルス核酸を、標的細胞、例えば、T細胞、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD34+造血幹細胞、CD105+造血幹細胞、CD117+造血幹細胞、CD105+内皮細胞、B細胞、CD20+B細胞、CD19+B細胞、癌細胞、CD133+癌細胞、EpCAM+癌細胞、CD19+キャンセル細胞、Her2/Neu+癌細胞、GluA2+ニューロン、GluA4+ニューロン、NKG2D+ナチュラルキラー細胞、SLC1A3+星状細胞、SLC7A10+脂肪細胞、またはCD30+肺上皮細胞に送達する、フソソーム。

【0032】

25. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、標的細胞（例えば、T細胞、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD34+造血幹細胞、CD105+造血幹細胞、CD117+造血幹細胞、CD105+内皮細胞、B細胞、CD20+B細胞、CD19+B細胞、癌細胞、CD133+癌細胞、EpCAM+癌細胞、CD19+キャンセル細胞、Her2/Neu+癌細胞、GluA2+ニューロン、GluA4+ニューロン、NKG2D+ナチュラルキラー細胞、SLC1A3+星状細胞、SLC7A10+脂肪細胞、またはCD30+肺上皮細胞のうちの1つ以上）の少なくとも0.00001%、0.0001%、0.001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が、例えば、定量的PCRを使用して、例えば、実施例3のアッセイを使用して、核酸を含む、フソソーム。

【0033】

26. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、標的細胞（例えば、T細胞、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD34+造血幹細胞、CD105+造血幹細胞、CD117+造血幹細胞、CD105+内皮細胞、B細胞、CD20+B細胞、CD19+B細胞、癌細胞、CD133+癌細胞、EpCAM+癌細胞、CD19+キャンセル細胞、Her2/Neu+癌細胞、GluA2+ニューロン、GluA4+ニューロン、NKG2D+ナチュラルキラー細胞、SLC1A3+星状細胞、SLC7A10+脂肪細胞、またはCD30+肺上皮細胞）の少なくとも0.00001%、0.0001%、0.001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が外因性薬剤を含む、フソソーム。

【0034】

27. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、投与時に、上記核酸を含む非標的細胞に対する上記核酸を含む標的細胞の比が、例えば、定量的PCRアッセイによって、例えば、実施例1および実施例3のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

【0035】

28. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞における上記核酸またはその一部の平均コピー数に対する標的細胞における上記核酸またはその一部の平均コピー数の比が、例えば、定量的PCRアッセイによって、例えば、実施例1および実施例3のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

10

【0036】

29. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞における上記核酸またはその一部のコピー数の中央値に対する標的細胞における上記核酸またはその一部分のコピー数の中央値の比が、例えば、定量的PCRアッセイによって、例えば、実施例1および実施例3のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

【0037】

30. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性RNA剤を含む非標的細胞に対する外因性RNA剤を含む標的細胞の比が、例えば、逆転写定量的PCRアッセイによって、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

20

【0038】

31. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞の外因性RNA剤の平均レベルに対する標的細胞の外因性RNA剤の平均レベルの比が、例えば、逆転写定量的PCRアッセイによって、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

【0039】

32. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞の外因性RNA剤レベルの中央値に対する標的細胞の外因性RNA剤レベルの中央値の比が、例えば、逆転写定量的PCRアッセイによって、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

30

【0040】

33. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性タンパク質剤を含む非標的細胞に対する外因性タンパク質剤を含む標的細胞の比が、例えば、FACSアッセイによって、例えば、実施例2および／または実施例4のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

【0041】

34. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞の外因性タンパク質剤の平均レベルに対する標的細胞の外因性タンパク質剤の平均レベルの比が、例えば、FACSアッセイによって、例えば、実施例2および／または実施例4のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000である、フソソーム。

40

【0042】

35. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、非標的細胞の外因性タンパク質剤レベルの中央値に対する標的細胞の外因性タンパク質剤レベルの中央値の比が、例えば、FACSアッセイによって、例えば、実施例2および／または実施例4のアッセイを使用して、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、10

50

00、5000、10,000である、フソソーム。

【0043】

36. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、

i) 脂質二重層、例えば、エンベロープに、外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および

ii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する免疫刺激タンパク質、のうちの一方または両方を含むフソソーム。

【0044】

37. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、

i) 脂質二重層、例えば、エンベロープに、第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および脂質二重層、例えば、エンベロープに、第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) 脂質二重層、例えばエンベロープに、第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第1の免疫刺激タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第2の免疫刺激タンパク質、のうちの1つ以上を含むフソソーム。

【0045】

38. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含む、フソソーム。

【0046】

39. フソソームであって、

a) フソゲン（例えば、再標的化されたフソゲン）を含む脂質二重層と、

b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）または外因性薬剤をコードする核酸（例えば、レトロウイルス核酸）と、

c)

i) 脂質二重層、例えば、エンベロープに、第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および脂質二重層、例えば、エンベロープに、第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) 脂質二重層、例えばエンベロープに、第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第1の免疫刺激タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する第2の免疫刺激タンパク質、のうちの1つ以上と、を含み、

10

20

30

40

50

対象（例えば、ヒト対象またはマウス）に投与される場合、

i) フソソームが、例えば、FACS抗体検出アッセイ、例えば、実施例13または実施例14のアッセイによって、検出可能な抗体反応（例えば、単回投与または複数回投与後）を生じず、またはフソソームに対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在し、

ii) フソソームが、例えば、PBMC溶解アッセイ（例えば、実施例5のアッセイ）によって、NK細胞溶解アッセイ（例えば、実施例6のアッセイ）によって、CD8キラーT細胞溶解アッセイ（例えば、実施例7のアッセイ）によって、マクロファージ食作用アッセイ（例えば、実施例8のアッセイ）によって、検出可能な細胞性免疫応答（例えば、T細胞応答、NK細胞応答、またはマクロファージ応答）を生じず、またはフソソームに対する細胞性免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在し、

iii) フソソームが、例えば、補体活性アッセイ（例えば、実施例9のアッセイ）によって、検出可能な自然免疫応答、例えば、補体活性化（例えば、単回投与または複数回投与後）を生じず、またはフソソームに対する自然免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満高いレベルで存在し、

iv) フソソームの90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.02%、0.01%、0.005%、0.002%、または0.001%未満が、例えば、血清不活性化アッセイ、例えば、実施例11または実施例12のアッセイによって、血清によって不活性化され、

v) フソソームから外因性薬剤を受容した標的細胞が、例えば、FACS抗体検出アッセイ、例えば、実施例15のアッセイによって、検出可能な抗体応答を生じず（例えば、単回投与または複数回投与後）、または標的細胞に対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在し、あるいは

vi) フソソームから外因性薬剤を受容した標的細胞が、例えば、マクロファージ食作用アッセイ（例えば、実施例16のアッセイ）によって、PBMC溶解アッセイ（例えば、実施例17のアッセイ）によって、NK細胞溶解アッセイ（例えば、実施例18のアッセイ）によって、またはCD8キラーT細胞溶解アッセイ（例えば、実施例19のアッセイ）によって、検出可能な細胞性免疫応答（例えば、T細胞応答、NK細胞応答、またはマクロファージ応答）を生じず、または標的細胞に対する細胞応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%高いレベルで存在する、のうちの1つ以上である、フソソーム。

【0047】

40. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、脂質二重層がエンベロープ、例えば、ウイルスエンベロープによって構成され、そして核酸がレトロウイルス核酸である、のうちの1つ以上（例えば、2つまたは3つすべて）が適用される、フソソーム。

【0048】

41. 実施形態39または40のフソソームであって、バックグラウンドレベルが、粒子またはベクターの投与前の同一対象におけるその対応するレベルである、フソソーム。

【0049】

42. 実施形態39～41のいずれかのフソソームであって、免疫抑制タンパク質が補体調節タンパク質またはCD47である、フソソーム。

【0050】

43. 実施形態39～42のいずれかのフソソームであって、免疫刺激タンパク質がMHC（例えば、HLA）タンパク質である、フソソーム。

【0051】

44. 実施形態39～43のいずれかのフソソームであって、第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質のうち的一方または両方がCD47以外であり、第2の免疫

10

20

30

40

50

刺激タンパク質がMHC以外である、フソソーム。

【0052】

45. フソソームであって、

- a) フソゲンを含む脂質二重層と、
- b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と、
- c) 脂質二重層に外因性または過剰発現したMHC、例えば、HLA（例えば、HLA-GまたはHLA-E）、またはそれらの組み合わせと、を含む、フソソーム。

【0053】

46. フソソームであって、

- a) フソゲンを含む脂質二重層であって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1～132のうちのいずれか1つに示される、脂質二重層と、

- b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と、

- c) エンベロープに外因性または過剰発現したCD47または補体調節タンパク質、あるいはそれらの組み合わせと、を含む、フソソーム。

【0054】

47. フソソームであって、

- a) フソゲンを含む脂質二重層であって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1～132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、脂質二重層と、

- b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と、

- c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するMHC I（例、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C）またはMHC II（例、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、またはHLA-DR）と、を含む、フソソーム。

【0055】

48. フソソームであって、

- a) フソゲンを含む脂質二重層であって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1～132のうちのいずれか1つに示される配列を有する、脂質二重層と、

- b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と、

- c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在する外因性もしくは過剰発現した免疫抑制タンパク質または免疫刺激タンパク質のうち的一方または両方と、を含む、フソソ

10

20

30

40

50

ーム。

【0056】

49. 実施形態45～48のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、脂質二重層がエンベロープ、例えば、ウイルスエンベロープによって構成され、そして核酸がレトロウイルス核酸である、のうちの1つ以上（例えば、2つまたは3つすべて）が適用される、フソソーム。

【0057】

50. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームが対象への投与後、少なくとも0.5、1、2、3、4、6、12、18、24、36、または48時間循環している、フソソーム。

【0058】

51. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に30分循環している、フソソーム。

【0059】

52. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に1時間循環している、フソソーム。

【0060】

53. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に2時間循環している、フソソーム。

【0061】

54. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に4時間循環している、フソソーム。

【0062】

55. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に8時間循環している、フソソーム。

【0063】

56. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に12時間循環している、フソソーム。

【0064】

57. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に18時間循環している、フソソーム。

【0065】

58. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に24時間循環している、フソソーム。

10

20

30

40

50

【0066】

59. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.01%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に36時間循環している、フソソーム。

【0067】

60. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.01%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に48時間循環している、フソソーム。

10

【0068】

61. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、適切な動物モデル、例えば、本明細書で記載される動物モデルへのフソソームの1回以上の投与後に、対照レトロウイルス、例えば、非改変である以外は当該フソソームと同様なフソソームと比べて、体液性応答における低下によって測定されたとき、免疫原性に低下を有する、フソソーム。

【0069】

62. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、体液性応答における低下が、抗細胞抗体力価、例えば、抗レトロウイルス抗体力価によって、例えば、ELISAによって、血清試料において測定される、フソソーム。

【0070】

63. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レトロウイルス組成物が投与された動物からの血清試料が、非改変細胞を投与された対象からの血清試料と比べて、抗フソソーム抗体力価の1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有する、フソソーム。

20

【0071】

64. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームが投与された対象からの血清試料が、ベースライン、例えば、フソソーム投与前の同一対象からの血清試料を参考にするベースラインから、増加した抗細胞抗体力価、例えば、1%、2%、5%、10%、20%、30%、または40%の増加を有する、フソソーム。

【0072】

65. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、
フソソームを投与されるべき対象が、フソソームと反応性である既存の抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、または試験され、
フソソームを投与されるべき対象が、フソソームと反応性である既存の抗体の検出可能なレベルを有さず、

30

フソソームを受けた対象が、フソソームと反応性である抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、または試験され、

フソソームを受ける対象（例えば、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回以上）が、フソソームと反応性である抗体の検出可能なレベルの抗体を有さず、あるいは

抗体のレベルが、2つの時点である、フソソームの最初の投与前である第1の時点と、フソソームの1回以上の投与後である第2の時点との間で、1%、2%、5%、10%、20%、または50%を超えて上昇しない、フソソーム。

40

【0073】

66. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームが、例えば、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞から、実施例5、6、または7の方法によって生成されるレトロウイルスベクターである、フソソーム。

【0074】

67. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがNMC-HLA-G細胞から生成されたレトロウイルスベクターであり、溶解、例えば、PBMC媒介溶解、NK細胞媒介溶解、および／またはCD8+T細胞媒介溶解の割合が、NMCまたはN

50

M C 空ベクターから生成されたレトロウイルスベクターと比べて、特定の時点で減少している、フソソーム。

【0075】

68. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、改変されたフソソームがマクロファージによる食作用を回避する、フソソーム。

【0076】

69. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームが、実施例8の方法によって、例えば、CD47 cDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、フソソーム。

【0077】

70. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、マクロファージがNMC-CD47に由来するレトロウイルスベクターとインキュベートされるとき、食作用指数がNMCまたはNMC空ベクターに由来するものと比べて低下される、フソソーム。

【0078】

71. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、対照フソソーム、例えば、非改変である以外は当該フソソームと同様であるフソソームと比べて、マクロファージ食作用における低下、例えば、マクロファージ食作用における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、マクロファージ食作用における低下がインビトロでの食作用指数、例えば、実施例8で説明されるようにアッセイすることによって決定される、フソソーム。

【0079】

72. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、複数のフソソームを含む組成物が、マクロファージ食作用のインビトロアッセイでマクロファージとインキュベートされたとき、例えば、実施例8のアッセイによって測定されたとき、0、1、10、100以上の食作用指数を有する、フソソーム。

【0080】

73. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、改変されており、改変されていないレトロウイルスベクターと比較して低下した補体活性を有するフソソーム。

【0081】

74. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、実施例9の方法によって、例えば、補体調節タンパク質、例えば、DAFをコードするcDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、フソソーム。

【0082】

75. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、レトロウイルスベクターの用量は、200 pg/mlのC3aが存在して、対照レトロウイルスベクター（例えば、HEK293レトロウイルスベクター）が対応するマウス血清（例えば、HEK293マウス血清）とインキュベートされたよりも、改変レトロウイルスベクター（例えば、HEK293-DAF）が対応するマウス血清（例えば、HEK-293DAFマウス血清）とインキュベートされたもので大きい、フソソーム。

【0083】

76. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、レトロウイルスベクターの用量は、200 pg/mlのC3aが存在して、未処置マウス血清とインキュベートされた対照レトロウイルスベクター（例えば、HEK293レトロウイルスベクター）よりも、ナイーブマウス血清とインキュベートされた改変されたレトロウイルスベクター（例えば、HEK293-DAF）で大きい、フソソーム。

【0084】

77. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、実施例9のアッセイによって、

10

20

30

40

50

投与後30分の患者血清における補体媒介不活性化に耐性であるフソソーム。

【0085】

78. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が補体媒介性不活性化に耐性である、フソソーム。

【0086】

79. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、補体調節タンパク質が、崩壊促進因子(DAF、CD55)と結合するタンパク質、例えばH因子(FH)様タンパク質-1(FHL-1)、例えばC4b-結合タンパク質(C4BP)、例えば補体受容体1(CD35)、例えば膜補因子タンパク質(MCP、CD46)、例えばプロテクチン(CD59)、例えば古典的および代替補体経路CD/C5変換酵素を阻害するタンパク質、例えばMACアセンブリを調節するタンパク質、のうちの1つ以上を含む、フソソーム。

【0087】

80. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、実施例10の方法によって、例えば、MHCクラスIを標的にするshRNAをコードするDNAでトランスフェクトされた細胞から生成され、例えば、NMC-shMHCクラスIに由来するレトロウイルスベクターがNMCおよびNMCベクターコントロールと比べてMHCクラスIの低い発現を有する、フソソーム。

【0088】

81. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソーム(例えば、レトロウイルスベクター)における免疫原性の尺度が、血清不活性化、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例11で説明されるように測定される血清不活性化である、フソソーム。

【0089】

82. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、フソソームナীবマウスからの血清および熱不活性化血清とインキュベートされているフソソーム試料の間で異なる、フソソーム。

【0090】

83. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、フソソームナীবマウスからの血清と共にインキュベートされているフソソーム試料と無血清コントロールインキュベーションとの間で異なる、フソソーム。

【0091】

84. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、フソソームナীবマウスからの血清と共にインキュベートされているフソソーム試料よりも、陽性コントロール血清と共にインキュベートされているフソソーム試料において低い、フソソーム。

【0092】

85. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、例えば、本明細書で説明される方法によって改変された、改変レトロウイルスベクターが、本改変レトロウイルスベクターの複数回(例えば1回超、例えば2回以上)の投与後に、低下した(非改変レトロウイルスベクターの投与と比較して低下した)血清不活性化を有する、フソソーム。

【0093】

86. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、本明細書で説明されるフソソームが、複数回の投与後に血清によって不活性化されない、フソソーム。

【0094】

87. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームにおける免疫原性の尺度が、血清不活性化、例えば、複数回投与後に、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例12で説明されるように測定された、例えば複数回投与後の血清不活性化である、フソソーム。

10

20

30

40

50

【0095】

88. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）フソソームで処理されたマウスからの血清および熱不活性化血清と共にインキュベートされているフソソーム試料の間で異ならない、フソソーム。

【0096】

89. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）レトロウイルスベクターで1、2、3、5、または10回処理されたマウスからの血清と共にインキュベートされているフソソーム試料間で異ならない、フソソーム。

10

【0097】

90. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、ビヒクルで処理されたマウスおよび改変された（例えば、HEK293-HLA-G）フソソームで処理されたマウスからの血清とインキュベートされているフソソーム試料間で異ならない、フソソーム。

【0098】

91. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）フソソームよりも対照細胞（例えば、HEK293）に由来するフソソームにおいて少ない、フソソーム。

【0099】

92. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームにおける免疫原性の尺度が抗体応答である、フソソーム。

20

【0100】

93. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、本明細書で説明されるフソソームを受ける対象が、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例13で説明されるように測定されて、フソソームと結合して認識する既存の抗体を有する、フソソーム。

【0101】

94. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームナイーブマウスからの血清が、陰性コントロール、例えば、免疫原性が生じていることを示すIgMおよびIgGが、例えば、枯渇したマウスからの血清である陰性コントロールよりも多いシグナル（例えば、蛍光）を示す、フソソーム。

30

【0102】

95. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソームナイーブマウスからの血清が、例えば、免疫原性が検出可能で生じなかったことを示す陰性コントロールと比べて同様なシグナル（例えば、蛍光）を示す、フソソーム。

【0103】

96. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、改変された、例えば、本明細書で説明される方法によって改変されたレトロウイルスベクターを含み、改変レトロウイルスの複数回（例えば、1回超、例えば2回以上）の投与後に、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例14で説明されるように測定されて、体液性応答の低下（例えば、非改変レトロウイルスの投与と比較して低下した）を有する、フソソーム。

40

【0104】

97. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソソーム、例えばレトロウイルスベクターが、実施例5、6、7、または14の方法によって、例えば、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、フソソーム。

【0105】

98. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、体液性応答が、抗フソソーム抗体（例えば、IgM、IgG1、および／またはIgG2抗体）のレベルの値を決定することによって評価される、フソソーム。

【0106】

50

99. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、改変された（例えば、NMC-HLA-G）フソソーム、例えば、レトロウイルスベクターが、コントロール、例えば、NMCレトロウイルスベクターまたはNMC空レトロウイルスベクターと比べて、注入後に抗ウイルスIgMまたはIgG1/2抗体力価（例えば、FACSの蛍光強度によって測定されたとき）を減少させた、フソソーム。

【0107】

100. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞が抗体応答によって標的化されない、または抗体応答が、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例15で説明されるように測定されて、対照レベル未満である、フソソーム。

【0108】

101. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、シグナル（例えば、平均蛍光強度）が、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である、フソソーム。

【0109】

102. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がマクロファージ応答である、フソソーム。

【0110】

103. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞がマクロファージによって標的化されない、または対照レベルより低く標的化される、フソソーム。

【0111】

104. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例16で説明されるように測定される食作用指数が、フソソームで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である、フソソーム。

【0112】

105. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がPBMC応答である、フソソーム。

【0113】

106. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞がPBMC応答を誘発しない、フソソーム。

【0114】

107. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、CD3+/CMG+細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例17で説明されるように測定されたとき、フソソームで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、フソソーム。

【0115】

108. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がナチュラルキラー細胞応答である、フソソーム。

【0116】

109. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞がナチュラルキラー細胞応答を誘発せず、または、より低いナチュラルキラー細胞応答を、例えば、対照値より低く誘発する、フソソーム。

【0117】

110. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、CD3+/CMG+細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例18で説明されるように測定されたとき、フソソームで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、フソソーム。

【0118】

111. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がCD8+T細胞応答である、フソソーム。

10

20

30

40

50

【0119】

112. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、レシピエント細胞がCD8+T細胞応答を誘発せず、または、より低いCD8+T細胞応答を、例えば、対照値より低く誘発する、フソソーム。

【0120】

113. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、CD3+／CMG+細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例19で説明されるように測定されたとき、フソソームで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、フソソーム。

【0121】

114. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、フソゲンが再標的化されたフソゲンである、フソソーム。

【0122】

115. 上記実施形態のいずれかのフソソームであって、(i) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、または(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメントまたはネガティブTCSE、のうちの一方または両方をコードするレトロウイルス核酸を含む、フソソーム。

【0123】

116. フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層であって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲンと、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスが配列番号1～132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、脂質二重層と、

b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸であって、レトロウイルス核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含む核酸と、を含むフソソーム。

【0124】

117. 実施形態116のフソソームであって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、脂質二重層がエンベロープ、例えば、ウイルスエンベロープ、例えば、偽型エンベロープによって構成され、そして核酸がレトロウイルス核酸である、のうちの1つ以上（例えば、2つまたは3つすべて）が適用される、フソソーム。

【0125】

118. 実施形態116または117のフソソームであって、核酸が2つのインスレーターエレメント、例えば、外因性薬剤をコードする領域の上流である第1のインスレーターエレメント、および外因性薬剤をコードする領域の下流である第2のインスレーターエレメントを含み、例えば、第1のインスレーターエレメントおよび第2のインスレーターエレメントが、同一または異なる配列を含む、フソソーム。

【0126】

119. 実施形態116～118のいずれかのフソソームであって、対象に第1の時点でフソソームを投与した後に単離された細胞の試料における外因性薬剤レベルの中央値における変動が、対象に後の第2の時点でフソソームを投与した後に単離された細胞の試料における外因性薬剤レベルの中央値の少なくとも、約10,000%、5,000%、2,000%、1,000%、500%、200%、100%、50%、20%、10%、または5%、あるいはそれら未満である、フソソーム。

【0127】

120. 実施形態119のフソソームであって、細胞あたりの発現レベルの中央値が、少なくとも1.0のレトロウイルスゲノムコピー数を有する細胞においてのみ評価される

10

20

30

40

50

、フソソーム。

【0128】

121. 実施形態116～120のいずれかのフソソームであって、対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が外因性薬剤を検出可能で含む、フソソーム。

【0129】

122. 実施形態119～121のいずれかのフソソームであって、ペイロード遺伝子発現レベルの中央値が、対象へのフソソームの投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日で対象から単離された細胞にわたって評価される、フソソーム。

【0130】

123. 実施形態116～122のいずれかのフソソームであって、第1の時点で外因性薬剤を検出可能で含んだ対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が、後の第2の時点で依然として外因性薬剤を検出可能で含み、第1の時点が、対象へのフソソームの投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日である、フソソーム。

【0131】

124. 実施形態123のフソソームであって、第2の時点が、第1の時点後の7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日である、フソソーム。

【0132】

125. 実施形態116～124のいずれかのフソソームであって、遺伝毒性ではなく、またはフソソームで処理されていない標的細胞と比較して標的細胞における腫瘍形成の割合を増加させない、フソソーム。

【0133】

126. 実施形態116～125のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤レベルの中央値が、フソソームを受けた対象からの細胞の集団において評価される、フソソーム。

【0134】

127. 実施形態116～126のいずれかのフソソームであって、投与後の異なる日に対象から収集された（例えば、単離された）細胞の集団において評価された外因性薬剤レベルの中央値が、7日、14日、28日、または56日で評価された細胞の集団における外因性薬剤レベルの中央値と、約10,000%、1000%、100%、または10%未満、例えば、10,000%～1000%、1000%～100%、または100%～10%異なり、集団内の細胞が少なくとも1.0のベクターコピー数を有する、フソソーム。

【0135】

128. 実施形態116～127のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤レベルが、フソソームを受けた対象からの細胞にわたって評価される、フソソーム。

【0136】

129. 実施形態116～128のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤を含む細胞のパーセントが、フソソームの投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日で対象から収集された（例えば、単離された）複数の細胞において評価される、フソソーム。

【0137】

130. 実施形態116～129のいずれかのフソソームであって、投与後2つの異なる日で単離された細胞で評価された外因性薬剤を含む細胞のパーセントにおける差が、1%、5%、10%、20%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、1500%、または2000%未満である、フソソーム。

【0138】

131. 実施形態116～130のいずれかのフソソームであって、外因性薬剤について陽性である標的細胞のパーセントが、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞にわたって同様である、フソソーム。
【0139】

132. 実施形態116～131のいずれかのフソソームであって、
7日と少なくとも同じ数の標的細胞が、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
14日と少なくとも同じ数の標的細胞が、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
28日と少なくとも同じ数の標的細胞が、56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
56日と少なくとも同じ数の標的細胞が、112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
112日と少なくとも同じ数の標的細胞が、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
365日と少なくとも同じ数の標的細胞が、730日または1095日で外因性薬剤について陽性であり、
730日と少なくとも同じ数の標的細胞が、1095日で外因性薬剤について陽性である、フソソーム。

10

【0140】

20

133. 実施形態116～132のいずれかのフソソームであって、
外因性薬剤を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞において同様であり、
外因性薬剤を14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が、7日と少なくとも同じ高さであり、
外因性薬剤を28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が、14日と少なくとも同じ高さであり、
外因性薬剤を56日、112日、365日、730日、または1095日で含む標的細胞の外因性薬剤レベルの中央値が、28日と少なくとも同じ高さであり、
外因性薬剤を112日、365日、730日、または1095日で含む標的細胞の外因性薬剤レベルの中央値が、56日と少なくとも同じ高さであり、
外因性薬剤を365日、730日、または1095日で含む標的細胞の外因性薬剤レベルの中央値が、112日と少なくとも同じ高さであり、
外因性薬剤を730日または1095日で含む標的細胞の外因性薬剤レベルの中央値が、365日と少なくとも同じ高さであり、あるいは
外因性薬剤を1095日で含む標的細胞の外因性薬剤レベルの中央値が、730日と少なくとも同じ高さである、フソソーム。

30

【0141】

40

134. 対象（例えば、ヒト対象）に外因性薬剤を送達する方法であって、対象に上記実施形態のいずれかのフソソームを投与すること、それによって外因性薬剤を対象に送達することを含む、方法。

【0142】

135. 対象（例えば、ヒト対象）、標的組織、または標的細胞における機能を調節する方法であって、対象、標的組織、または標的細胞に上記実施形態のいずれかのフソソームに接触させる、例えば、投与することを含む、方法。

【0143】

136. 実施形態135の方法であって、標的組織または標的細胞が対象に存在する、方法。

50

【0144】

137. 対象（例えば、ヒト対象）における障害、例えば、癌を治療または予防する方法であって、対象に上記実施形態のいずれかのフソソームを投与することを含む、方法。

【0145】

138. 上記実施形態のいずれかのフソソームを作製する方法であって、

a) 核酸およびフソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含む供給源細胞を用意することと、

b) フソソームの生成を可能にする条件下で供給源細胞を培養することと、

c) 供給源細胞からフソソームを分離すること、豊富化すること、または精製することと、を含み、それによってフソソームを作製する、方法。

10

【0146】

139. フソソームを生成するための供給源細胞であって、

a) 核酸と、

b) 核酸をパッケージングすることができる構造タンパク質であって、少なくとも1つの構造タンパク質がフソゲン受容体と結合するフソゲンを含む、構造タンパク質と、

c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞と比べて、低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲンと、を含む、供給源細胞。

【0147】

140. 実施形態138の方法または実施形態139の供給源細胞であって、フソソームがレトロウイルスベクターであり、核酸がレトロウイルス核酸であり、そして構造的タンパク質がウイルス構造タンパク質である、のうちの1つ以上（例えば、2つまたは3つすべて）が適用される、方法または供給源細胞。

20

【0148】

141. 実施形態139または140の供給源細胞であって、フソゲンがフソゲン受容体と結合すると、フソソームと標的細胞との融合を生じる、供給源細胞。

【0149】

142. 実施形態139～141のいずれかの供給源細胞であって、第2の同様な供給源細胞と結合する、例えば、供給源細胞のフソゲンが第2の供給源細胞でフソゲン受容体と結合する、供給源細胞。

30

【0150】

143. 実施形態139～142のいずれかの供給源細胞の、集団。

【0151】

144. 実施形態143の供給源細胞の集団であって、集団における細胞の10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が多核化されている、供給源細胞の集団。

【0152】

145. 実施形態139～144のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、本明細書で説明されるフソソームの製造の際に、他の供給源細胞との融合が低減している（例えば、融合しない）ように改変されている、供給源細胞または供給源細胞の集団。

40

【0153】

146. 実施形態139～145のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）が、供給源細胞によって含まれるタンパク質に、例えば、供給源細胞の表面上のタンパク質に、結合しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0154】

147. 実施形態139～146のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）が、供給源細胞によって含まれるタンパク質と結合するが、細胞と融合しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0155】

50

148. 実施形態139～147のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲンが供給源細胞との融合を誘発しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0156】

149. 実施形態139～148のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、供給源細胞が、フソゲンと結合するタンパク質（例えば、抗原）を発現しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0157】

150. 実施形態139～149のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、複数の供給源細胞が、フソゲンを発現するときに合胞体を形成せず、または集団における細胞の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が多核化される（例えば、2つ以上の核を含む）、供給源細胞または供給源細胞の集団。

10

【0158】

151. 実施形態139～150のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、複数の供給源細胞が、フソソームを生成するときに合胞体を形成せず、または集団における細胞の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が多核化される、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0159】

152. 実施形態139～151のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、集団における核の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が合胞体にある、供給源細胞または供給源細胞の集団。

20

【0160】

153. 実施形態139～152のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、集団における核の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%が単核細胞内にある、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0161】

154. 実施形態139～153のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、多核化されている細胞のパーセンテージが、非改変である以外は同様である供給源細胞の集団と比べて低い、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

30

【0162】

155. 実施形態139～154のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、合胞体に存在する核のパーセントが、非改変である以外は同様である供給源細胞と比べて低い、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0163】

156. 実施形態139～155のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、多核化細胞（例えば、2つ以上の核を有する細胞）が、顕微鏡アッセイ、例えば、DNA染色を使用した、例えば、実施例20のアッセイによって検出される、供給源細胞または供給源細胞の集団。

40

【0164】

157. 実施形態139～156のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、改変された供給源細胞から得られる機能的フソソーム（例えば、ウイルス粒子）が、例えば、実施例20のアッセイを使用して、非改変である以外は同様である供給源細胞から得られるフソソームの数よりも、少なくとも10%、20%、40%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、5倍、または10倍多い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

50

【0165】

158. フソソームであって、フソゲン受容体を欠如する、または非改変である以外は同様な供給源細胞に由来する非改変フソソームと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲン受容体を含む、フソソーム。

【0166】

159. フソソームを作製する方法であって、

a) フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含む供給源細胞であって、供給源細胞がフソゲン受容体を欠如する、または非改変である以外は同様な供給源細胞と比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲン受容体を含む、供給源細胞を用意することと、

b) フソソームの生成を可能にする条件下で供給源細胞を培養することと、

c) 供給源細胞からフソソームを分離すること、豊富化すること、または精製することと、を含み、それによりフソソームを作製する、方法。

【0167】

160. 実施形態159の方法であって、供給源細胞を用意することが、供給源細胞またはその前駆体におけるフソゲン受容体をノックダウンまたはノックアウトすることを含む、方法。

【0168】

161. 実施形態158のフソソーム、または実施形態159もしくは160の方法であって、フソソームがレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子である、フソソームまたは方法。

【0169】

162. レトロウイルスベクター（例えば、ヒト対象におけるインビボでの使用に好適な）であって、

a) 再標的化フソゲンを含むエンベロープと、

b)

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する異なるレトロウイルスベクターと比べて増加させるポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、あるいは

(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたネガティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、ネガティブ組織特異的調節エレメントが非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ネガティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なレトロウイルスと比べて減少させるネガティブ標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードするレトロウイルス核酸と、を含む、レトロウイルスベクター。

【0170】

163. レトロウイルスベクター（例えば、ヒト対象におけるインビボでの使用に好適な）であって、

a) フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含むエンベロープと、

b)

(i) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的プロモーター）であって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する異なるレトロウイルスベクターと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント

、および

(i i) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたネガティブ標的細胞特異的調節エレメント（例えば、組織特異的miRNA認識配列）であって、ネガティブ組織特異的調節エレメントが非標的細胞または組織における外因性薬剤の発現を、ネガティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なレトロウイルスと比べて減少させる、ネガティブ標的細胞特異的調節エレメント、を含むまたはコードするレトロウイルス核酸と、を含む、レトロウイルスベクター。

【0171】

164. 上記実施形態のどちらかのレトロウイルスベクターであって、対象に投与される場合、

i) 対象において検出可能で存在する外因性薬剤の10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が非標的細胞にあり、

ii) 外因性薬剤を検出可能で含む対象の細胞の少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%が標的細胞（例えば、単一細胞型の細胞、例えば、T細胞）であり、

iii) 外因性薬剤を検出可能で含む対象の細胞の1,000,000,500,000,200,000,100,000,50,000,20,000、または10,000個未満の細胞が非標的細胞であり、

iv) 対象の全標的細胞における外因性薬剤の平均レベルが、対象の全非標的細胞における外因性薬剤の平均レベルよりも少なくとも100倍、200倍、500倍、または1,000倍高く、あるいは

v) 外因性薬剤が対象におけるいずれの非標的細胞でも検出可能ではない、のうちの1つ以上である、レトロウイルスベクター。

【0172】

165. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、再標的化フソゲンが、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質もしくはFおよびHタンパク質もしくはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはそれらの誘導体、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、レトロウイルスベクター。

【0173】

166. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1~132のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を有する、レトロウイルスベクター。

【0174】

167. 実施形態166のレトロウイルスベクターであって、パラミクソウイルスがニパウイルス、例えばヘニパウイルスである、レトロウイルスベクター。

【0175】

168. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的プロモーター、組織特異的エンハンサー、組織特異的スプライス部位、RNAもしくはタンパク質の半減期を延長する組織特異的部位、組織特異的mRNA核外輸送促進部位、組織特異的翻訳増強部位、または組織特異的翻訳後改変部位を含む、レトロウイルスベクター。

10

20

30

40

50

【0176】

169. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、ネガティブ標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的miRNA認識配列、組織特異的プロテアーゼ認識部位、組織特異的ユビキチンリガーゼ部位、組織特異的転写抑制部位、または組織特異的エピジェネティック抑制部位を含む、レトロウイルスベクター。

【0177】

170. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、ネガティブ標的細胞特異的調節エレメントが組織特異的miRNA認識配列を含む、レトロウイルスベクター。

【0178】

171. 実施形態170のレトロウイルスベクターであって、ネガティブ標的細胞特異的調節エレメントが、転写化領域（例えば、外因性薬剤をコードする転写化領域）内に配置またはコードされ、例えば、それにより、転写化領域によって生成されるRNAが、UTRまたはコード領域内にmiRNA認識配列を含む、レトロウイルスベクター。

【0179】

172. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、標的細胞が癌細胞であり、非標的細胞が非癌性細胞である、レトロウイルスベクター。

【0180】

173. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス核酸がポジティブTCSEおよび／またはネガティブTCSEをコードする、レトロウイルスベクター。

【0181】

174. 実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス核酸がポジティブTCSEおよび／またはネガティブTCSEの相補体を含む、レトロウイルスベクター。

【0182】

175. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞、例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11e+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞に、核酸を送達しない、レトロウイルスベクター。

【0183】

176. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞型（例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD11e+細胞、CD11b+細胞、脾細胞、B細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞）の10%、5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%、または0.000001%未満が、定量的PCRを使用して、例えば、実施例1のアッセイを使用して、レトロウイルス核酸を含む、レトロウイルスベクター。

【0184】

177. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、標的細胞が、ホスト細胞ゲノムあたりレトロウイルス核酸またはその一部の0.00001~10、0.0001~10、0.001~10、0.01~10、0.1~10、0.5~5、1~4、1~3、または1~2コピーを含み、例えば、レトロウイルス核酸のコピー数がインビボで投与後に評価される、レトロウイルスベクター。

【0185】

178. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞（例えば、抗原提示細胞、MHCクラスII+細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD1

10

20

30

40

50

1 c + 細胞、CD 1 1 b + 細胞、脾細胞、B 細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞) の 1 0 %、5 %、2 . 5 %、1 %、0 . 5 %、0 . 1 %、0 . 0 1 % 未満が外因性薬剤を含み、あるいは外因性薬剤 (例えば、タンパク質) が非標的細胞、例えば、抗原提示細胞、M H C クラス I I + 細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞、異型抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、CD 1 1 c + 細胞、CD 1 1 b + 細胞、脾細胞、B 細胞、肝細胞、内皮細胞、または非癌性細胞に検出可能で存在しない、レトロウイルスベクター。

【0186】

179. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターがレトロウイルス核酸を標的細胞、例えば、T 細胞、CD 3 + T 細胞、CD 4 + T 細胞、CD 5 + T 細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD 3 4 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 造血幹細胞、CD 1 1 7 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 内皮細胞、B 細胞、CD 2 0 + B 細胞、CD 1 9 + B 細胞、癌細胞、CD 1 3 3 + 癌細胞、E p C A M + 癌細胞、CD 1 9 + キャンセル細胞、H e r 2 / N e u + 癌細胞、G l u A 2 + ニューロン、G l u A 4 + ニューロン、N K G 2 D + ナチュラルキラー細胞、S L C I A 3 + 星状細胞、S L C 7 A I O + 脂肪細胞、または CD 3 0 + 肺上皮細胞に送達する、レトロウイルスベクター。

【0187】

180. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスであって、標的細胞 (例えば、T 細胞、CD 3 + T 細胞、CD 4 + T 細胞、CD 5 + T 細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD 3 4 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 造血幹細胞、CD 1 1 7 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 内皮細胞、B 細胞、CD 2 0 + B 細胞、CD 1 9 + B 細胞、癌細胞、CD 1 3 3 + 癌細胞、E p C A M + 癌細胞、CD 1 9 + キャンセル細胞、H e r 2 / N e u + 癌細胞、G l u A 2 + ニューロン、G l u A 4 + ニューロン、N K G 2 D + ナチュラルキラー細胞、S L C I A 3 + 星状細胞、S L C 7 A I O + 脂肪細胞、または CD 3 0 + 肺上皮細胞のうち 1 つ以上) の少なくとも 0 . 0 0 0 0 1 %、2 0 0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 %、2 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % が、例えば、定量的 P C R を使用して、例えば、実施例 3 のアッセイを使用して、レトロウイルス核酸を含む、レトロウイルスベクター。

【0188】

181. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスであって、標的細胞 (例えば、T 細胞、CD 3 + T 細胞、CD 4 + T 細胞、CD 5 + T 細胞、肝細胞、造血幹細胞、CD 3 4 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 造血幹細胞、CD 1 1 7 + 造血幹細胞、CD I 0 5 + 内皮細胞、B 細胞、CD 2 0 + B 細胞、CD 1 9 + B 細胞、癌細胞、CD 1 3 3 + 癌細胞、E p C A M + 癌細胞、CD 1 9 + キャンセル細胞、H e r 2 / N e u + 癌細胞、G l u A 2 + ニューロン、G l u A 4 + ニューロン、N K G 2 D + ナチュラルキラー細胞、S L C I A 3 + 星状細胞、S L C 7 A I O + 脂肪細胞、または CD 3 0 + 肺上皮細胞) の少なくとも 0 . 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 %、2 %、5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % が外因性薬剤を含む、レトロウイルスベクター。

【0189】

182. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスであって、投与時に、レトロウイルス核酸を含む非標的細胞に対するレトロウイルス核酸を含む標的細胞の比が、例えば、定量的 P C R アッセイによって、例えば、実施例 1 および実施例 3 のアッセイを使用して、少なくとも 1 . 5、2、3、4、5、1 0、2 5、5 0、1 0 0、5 0 0、1 0 0 0、5 0 0 0、1 0、0 0 0 である、レトロウイルスベクター。

【0190】

183. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞におけるレトロウイルス核酸またはその一部の平均コピー数に対する標的細胞におけるレトロウイルス核酸またはその一部の平均コピー数の比が、例えば、定量的 P C R アッセイによ

10

20

30

40

50

って、例えば、実施例 1 および実施例 3 のアッセイを使用して、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

【0191】

184. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞におけるレトロウイルス核酸またはその一部のコピー数の中央値に対する標的細胞におけるレトロウイルス核酸またはその一部のコピー数の中央値の比が、例えば、定量的 PCR アッセイによって、例えば、実施例 1 および実施例 3 のアッセイを使用して、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

10

【0192】

185. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、外因性 RNA 剤を含む非標的細胞に対する外因性 RNA 剤を含む標的細胞の比が、例えば、逆転写定量的 PCR アッセイによって、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

【0193】

186. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞の外因性 RNA 剤の平均レベルに対する標的細胞の外因性 RNA 剤の平均レベルの比が、例えば、逆転写定量的 PCR アッセイによって、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

20

【0194】

187. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞の外因性 RNA 剤レベルの中央値に対する標的細胞の外因性 RNA 剤レベルの中央値の比が、逆転写定量的 PCR アッセイによって、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

【0195】

188. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、外因性タンパク質剤を含む非標的細胞に対する外因性タンパク質剤を含む標的細胞の比が、例えば、FACS アッセイによって、例えば、実施例 2 および／または実施例 4 のアッセイを使用して、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

30

【0196】

189. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞の外因性タンパク質剤の平均レベルに対する標的細胞の外因性タンパク質剤の平均レベルの比が、例えば、FACS アッセイによって、例えば、実施例 2 および／または実施例 4 のアッセイを使用して、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

【0197】

40

190. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、非標的細胞の外因性タンパク質剤レベルの中央値に対する標的細胞の外因性タンパク質剤レベルの中央値の比が、例えば、FACS アッセイによって、例えば、実施例 2 および／または実施例 4 のアッセイを使用して、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、25、50、100、500、1000、5000、10,000 である、レトロウイルスベクター。

【0198】

191. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、
i) エンベロープに外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および
ii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも 10%、20%、30%、40

50

%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する免疫刺激タンパク質、のうち的一方または両方、を含むレトロウイルスベクター。

【0199】

192. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、

i) エンベロープに第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、およびエンベロープに第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) エンベロープに第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第1の免疫刺激タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第2の免疫刺激タンパク質、のうち1つ以上を含む、レトロウイルスベクター。

【0200】

193. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含む、レトロウイルスベクター。

【0201】

194. レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター(例えば、ヒト対象におけるインビボ使用に好適な粒子またはベクター)であって、

a) フソゲン(例えば、再標的化フソゲン)を含むエンベロープと、

b) 外因性薬剤(例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA)または外因性薬剤をコードする核酸(例えば、レトロウイルス核酸)と、

c)

i) エンベロープに第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、およびエンベロープに第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) エンベロープに第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第1の免疫刺激タンパク質、および不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在する第2の免疫刺激タンパク質、のうち1つ以上と、を含み、対象(例えば、ヒト対象またはマウス)に投与される場合、

i) 粒子もしくはベクターが、例えば、FACS抗体検出アッセイ、例えば、実施例13もしくは実施例14のアッセイによって、検出可能な抗体反応を生じず(例えば、単回投与または複数回投与後)、または粒子もしくはベクターに対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在し、

10

20

30

40

50

i i) 粒子またはベクターが、例えば、P B M C 溶解アッセイ（例えば、実施例 5 のアッセイ）によって、N K 細胞溶解アッセイ（例えば、実施例 6 のアッセイ）によって、C D S キラー T 細胞溶解アッセイ（例えば、実施例 7 のアッセイ）によって、マクロファージ食作用アッセイ（例えば、実施例 8 のアッセイ）によって、検出可能な細胞性免疫応答（例えば、T 細胞応答、N K 細胞応答、またはマクロファージ応答）を生じず、または粒子もしくはベクターに対する細胞性免疫応答がバックグラウンドレベルより 1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、もしくは 1 % 未満高いレベルで存在し、

i i i) 粒子もしくはベクターが、例えば、補体活性アッセイ（例えば、実施例 9 のアッセイ）によって、検出可能な自然免疫応答、例えば、補体活性化（例えば、単回投与または複数回投与後）を生じない、または粒子もしくはベクターに対する自然免疫応答がバックグラウンドレベルより 1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、もしくは 1 % 未満高いレベルで存在し、

10

i v) ウイルスの 9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0 . 5 %、0 . 2 %、0 . 1 %、0 . 0 5 %、0 . 0 2 %、0 . 0 1 %、0 . 0 0 5 %、0 . 0 0 2 %、もしくは 0 . 0 0 1 % 未満が、例えば、血清不活性化アッセイによって、例えば、実施例 1 1 または実施例 1 2 のアッセイによって、血清で不活性化され、

v) 粒子もしくはベクターから外因性薬剤を受容した標的細胞が、例えば、F A C S 抗体検出アッセイ、例えば、実施例 1 5 のアッセイによって、検出可能な抗体応答を生じない（例えば、単回投与または複数回投与後）、または標的細胞に対する抗体がバックグラウンドレベルより 1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、もしくは 1 % 未満高いレベルで存在し、あるいは

20

v i) 粒子もしくはベクターから外因性薬剤を受容した標的細胞が、例えば、マクロファージ食作用アッセイ（例えば、実施例 1 6 のアッセイ）によって、P B M C 溶解アッセイ（例えば、実施例 1 7 のアッセイ）によって、N K 細胞溶解アッセイ（例えば、実施例 1 8 のアッセイ）によって、または C D S キラー T 細胞溶解アッセイ（例えば、実施例 1 9 のアッセイ）によって、検出可能な細胞性免疫応答（例えば、T 細胞応答、N K 細胞応答、もしくはマクロファージ応答）を生じない、または標的細胞に対する細胞応答がバックグラウンドレベルより 1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、もしくは 1 % 未満高いレベルで存在する、のうちの 1 つである、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0202】

195. 実施形態 194 のレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、バックグラウンドレベルが、粒子またはベクターの投与前の同一対象におけるその対応するレベルである、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0203】

196. 実施形態 194 または 195 のレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、免疫抑制タンパク質が補体調節タンパク質または C D 4 7 である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0204】

40

197. 実施形態 194 ~ 196 のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、免疫刺激タンパク質が M H C（例えば、H L A）タンパク質である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0205】

198. 実施形態 194 ~ 197 のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、第 1 の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質のうち的一方または両方が C D 4 7 以外であり、第 2 の免疫刺激タンパク質が M H C 以外である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0206】

199. レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター（例えば、ヒト対象にお

50

けるインビボ使用に好適な粒子またはベクター)であって、

a) フソゲンを含むエンベロープと、

b) 外因性薬剤(例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA)をコードするレトロウイルス核酸と、

c) エンベロープに外因性または過剰発現したMHC、例えば、HLA(例えば、HLA-A-GまたはHLA-E)、またはそれらの組み合わせと、を含む、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0207】

200. 偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター(例えば、ヒト対象におけるインビボ使用に好適な粒子またはベクター)であって、

a) フソゲンを含む偽型エンベロープであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1~132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、偽型エンベロープと、

b) 外因性薬剤(例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA)をコードするレトロウイルス核酸と、

c) エンベロープに外因性もしくは過剰発現したCD47または補体調節タンパク質、あるいはそれらの組み合わせと、を含む、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0208】

201. 偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター(例えば、ヒト対象におけるインビボ使用に好適な粒子またはベクター)であって、

a) フソゲンを含む偽型エンベロープであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1~132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、偽型エンベロープと、

b) 外因性薬剤(例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA)をコードするレトロウイルス核酸と、

c) 不在、または非改変である以外は同一な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスと比べて低下したレベル(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下)で存在するMHC I(例えば、HLA-A、HLA-B、またはHLA-C)またはMHC II(例えば、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、またはHLA-DR)と、を含む、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルス。

【0209】

202. 偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター(例えば、ヒト対象におけるインビボ使用に好適な粒子またはベクター)であって、

a) フソゲンを含む偽型エンベロープであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1~132のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、偽型エンベロープと、

b) 外因性薬剤(例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA)をコードするレトロウイルス核酸と、

c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたレトロウイルス様

10

20

30

40

50

粒子またはレトロウイルスベクターと比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）である外因性もしくは過剰発現した免疫抑制タンパク質または免疫刺激タンパク質のうちの一方または両方と、を含む、偽レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0210】

203. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターが、患者への投与後、少なくとも0.5、1、2、3、4、6、12、18、24、36、または48時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0211】

204. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に30分循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0212】

205. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に1時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0213】

206. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に2時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0214】

207. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に4時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0215】

208. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に8時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0216】

209. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に12時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0217】

210. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に18時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルス

10

20

30

40

50

ベクター。

【0218】

211. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に24時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0219】

212. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に36時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0220】

213. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、投与後に48時間循環している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0221】

214. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、対照レトロウイルス、例えば、非改変である以外は当該レトロウイルスと同様なレトロウイルスと比べて、適切な動物モデル、例えば、本明細書で記載される動物モデルへのレトロウイルスの1回以上の投与後の体液性応答における低下によって測定されたとき、免疫原性の低下を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0222】

215. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、体液性応答における低下が、血清試料において、抗細胞抗体力価、例えば、抗レトロウイルス抗体力価、例えば、ELISAによって測定される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0223】

216. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス組成物が投与された動物からの血清試料が、非改変細胞を投与された対象からの血清試料と比べて、抗レトロウイルス抗体力価の1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0224】

217. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス組成物が投与された対象からの血清試料が、ベースライン、例えば、レトロウイルス組成物投与前の同一対象からの血清試料を参考にするベースラインから、増加した抗細胞抗体力価、例えば、1%、2%、5%、10%、20%、30%、または40%の増加を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0225】

218. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスまたは医薬組成物を投与されるべき対象が、レトロウイルスと反応性である既存の抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、または試験され、レトロウイルス組成物を投与されるべき対象が、レトロウイルスと反応性である既存の抗体の検出可能なレベルを有さず、レトロウイルスまたは医薬組成物を受けた対象が、レトロウイルスと反応性である抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、または試験され、レトロウイルスまたは医薬

50

組成物（例えば、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回以上）を受けている対象が、レトロウイルスと反応性である抗体の検出可能なレベルを有さない、あるいは抗体のレベルが2つの時点である、レトロウイルスの最初の投与前である第1の時点、およびレトロウイルスの1回以上の投与後である第2の時点の間で、1%、2%、5%、10%、20%、または50%を超えて上昇しない、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0226】

219. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターが実施例5、6、または7の方法によって、例えば、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、

10

【0227】

220. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、NMC-HLA-G細胞から生成されたレトロウイルスベクターが、NMCまたはNMC空ベクターから生成されたレトロウイルスベクターと比較して、特定の時点で溶解、例えば、PBMc媒介溶解、NK細胞媒介溶解、および／またはCDS+T細胞媒介溶解のパーセントが減少している、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0228】

221. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、改変されたレトロウイルスベクターがマクロファージによる食作用を回避する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0229】

222. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターが、例えば、CD47 cDNAでトランスフェクトされた細胞から、実施例8の方法によって生成される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0230】

223. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、マクロファージがNMC-CD47に由来するレトロウイルスベクターとインキュベートされるとき、NMCまたはNMC空ベクターに由来するものに比べて、食作用指数が低下される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0231】

224. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、対照レトロウイルス、例えば、非改変である以外は当該レトロウイルスと同様であるレトロウイルスと比べて、マクロファージ食作用における低下、例えば、マクロファージ食作用における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、マクロファージ食作用における低下が、例えば、実施例8で説明されるように、食作用指数をインビトロでアッセイすることによって決定される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0232】

225. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス組成物が、マクロファージ食作用のインビトロアッセイでマクロファージとインキュベートされたとき、例えば、実施例8のアッセイによって測定されたとき、0、1、10、100以上の食作用指数を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0233】

226. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、改変されており、非改変レトロウイルスベクターと比べて低下した補体活性を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

50

【0234】

227. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、実施例9の方法によって、例えば、補体調節タンパク質、例えば、DAFをコードするcDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0235】

228. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターの用量が、200 pg/mlのC3aが存在して、対照レトロウイルスベクター（例えば、HEK293レトロウイルスベクター）が対応するマウス血清（例えば、HEK293マウス血清）とインキュベートされたよりも、改変レトロウイルスベクター（例えば、HEK293-DAF）が対応するマウス血清（例えば、HEK-293DAFマウス血清）とインキュベートされたもので大きい、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0236】

229. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターの用量が、200 pg/mlのC3aが存在して、対照レトロウイルスベクター（例えば、HEK293レトロウイルスベクター）がナイーブマウス血清とインキュベートされたよりも、改変レトロウイルスベクター（例えば、HEK293-DAF）がナイーブマウス血清とインキュベートされたもので大きい、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0237】

230. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス組成物が、実施例9のアッセイによって、投与後30分の患者血清における補体媒介不活性化に耐性である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0238】

231. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスの少なくとも0.001%、0.01%、0.1%、1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%が、補体媒介不活性化に耐性である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0239】

232. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、補体調節タンパク質が、崩壊促進因子（DAF、CD55）と結合するタンパク質、例えばH因子（FH）様タンパク質-I（FHL-1）、例えばC4b-結合タンパク質（C4BP）、例えば補体受容体I（CD35）、例えば膜補因子タンパク質（MCP、CD46）、例えばプロテクチン（CD59）、例えば古典的および代替補体経路CD/C5変換酵素を阻害するタンパク質、例えばMACアセンブリを調節するタンパク質、のうちの1つ以上を含む、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0240】

40

233. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、実施例10の方法によって、例えば、MHCクラスIを標的にするshRNAをコードするDNAでトランスフェクトされた細胞から生成され、例えば、NMC-shMHCクラスIに由来するレトロウイルスベクターがNMCおよびNMCベクターコントロールと比べてMHCクラスIの低い発現を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0241】

234. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターにおける免疫原性の尺度が、血清不活性化、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例11で説明されるように測定される血清

50

不活性化である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0242】

235. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清および熱不活性化血清とインキュベートされているレトロウイルス試料の間で異なる、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0243】

236. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料と無血清コントロールインキュベーションとの間で異なる、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0244】

237. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料よりも、陽性コントロール血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料において少ない、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0245】

238. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、例えば、本明細書で説明される方法によって改変された改変レトロウイルスベクターが、改変レトロウイルスベクターの複数回（例えば1回超、例えば2回以上）の投与後に、低下した（非改変レトロウイルスベクターの投与と比較して低下した）血清不活性化を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0246】

239. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターが、複数回の投与後に血清によって不活性化されない、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0247】

240. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターにおける免疫原性の尺度が、血清の不活性化、例えば、複数回投与後の、本明細書で説明されるように、例えば、実施例12で説明されるように測定された、例えば複数回投与後の血清不活性化である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0248】

241. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）レトロウイルスベクターで処理されたマウスからの血清および熱不活性化血清とインキュベートされているレトロウイルスベクター試料の間で異なる、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0249】

242. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）レトロウイルスベクターで1、2、3、5、または10回処理されたマウスからインキュベートされているレトロウイルスベクター試料間で異なる、フソソーム。

【0250】

243. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、ビヒクルで処理されたマウスおよび改変された（例えば、HEK293-HLA-G）レトロウイルスベクターで処理さ

50

れたマウスからの血清とインキュベートされているレトロウイルスベクター試料間で異なる、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0251】

244. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントが、改変された（例えば、HEK293-HLA-G）レトロウイルスベクターにおけるよりも対照細胞（例えば、HEK293）に由来するレトロウイルスベクターにおいて少ない、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0252】

245. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターにおける免疫原性の尺度が抗体応答である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0253】

246. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターを受ける対象が、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例13で説明されるように測定されて、レトロウイルスベクターと結合して認識する既存の抗体を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0254】

247. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクター—ナイーブマウスからの血清が、陰性コントロール、例えば、免疫原性が生じていることを示すIgMおよびIgGが、例えば、枯渇したマウスからの血清である陰性コントロールよりも多いシグナル（例えば、蛍光）を示す、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0255】

248. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクター—ナイーブマウスからの血清が、例えば、免疫原性が検出可能で生じなかったことを示す陰性コントロールと比べて、同様なシグナル（例えば、蛍光）を示す、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0256】

30

249. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、改変された、例えば、本明細書で説明される方法によって改変されたレトロウイルスベクターであり、改変レトロウイルスベクターの複数回（例えば、1回超、例えば2回以上）の投与後に、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例14で説明されるように測定されて、体液性応答の低下（例えば、非改変レトロウイルスの投与と比較して低下した）を有する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0257】

250. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルスベクターが実施例5、6、7、または14の方法によって、例えば、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞から生成される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0258】

251. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、体液性応答が、抗レトロウイルスベクター抗体（例えば、IgM、IgG1、および／またはIgG2抗体）のレベルについて値を決定することによって評価される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0259】

252. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、改変された（例えば、NMC-HLA-G）レトロウイルスベクターが、コントロール、例えば、NMCレトロウイルスベクターまたはNMC空レトロウイルスベク

50

ターと比べて、注入後に抗ウイルスIgMまたはIgG1／2抗体力価（例えば、FACSの蛍光強度によって測定されたとき）を減少させた、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0260】

253．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞が抗体応答によって標的化されず、または抗体応答が、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例15で説明されるように測定されて、対照レベル未満である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0261】

254．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、シグナル（例えば、平均蛍光強度）が、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0262】

255．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がマクロファージ応答である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0263】

256．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞がマクロファージによって標的化されない、または対照レベルより低く標的化される、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0264】

257．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、食作用指数が、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例16で説明されるように測定されるとき、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0265】

258．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がPBMC応答である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0266】

259．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞がPBMC応答を誘発しない、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0267】

260．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、CD3＋／CMG＋細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例17で説明されるように測定されたとき、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0268】

261．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がナチュラルキラー細胞応答である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0269】

262．上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞がナチュラルキラー細胞応答を誘発せず、または低いナチュラルキラー細胞応答を、例えば、対照値より低く、誘発する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

50

【0270】

263. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、CD3+ / CMG+細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例18で説明されるように測定されたとき、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0271】

264. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞の免疫原性の尺度がCDS+T細胞応答である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0272】

265. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レシピエント細胞がCDS+T細胞応答を誘発せず、または低いCDS+T細胞応答を、例えば、対照値より低く誘発する、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0273】

266. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、CD3+ / CMG+細胞のパーセントが、例えば、本明細書で説明されるように、例えば、実施例19で説明されるように測定されたとき、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0274】

267. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、フソゲンが再標的化されたフソゲンである、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0275】

268. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、(i) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、または(ii) 外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたネガティブ標的細胞特異的調節エレメント、のうちの一方または両方をコードするレトロウイルス核酸を含む、レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0276】

269. 偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター（例えば、ヒト対象におけるインビボ使用に好適な粒子またはベクター）であって、

a) フソゲンを含む偽型エンベロップであって、フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲン、例えば、表4または表5の配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも40、50、60、80、100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号1~132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する、偽型エンベロップと、

40

b) 外因性薬剤（例えば、外因性ポリペプチドまたは外因性RNA）をコードするレトロウイルス核酸であって、レトロウイルス核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含むレトロウイルス核酸と、を含む、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0277】

270. 実施形態269の偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、レトロウイルス核酸が2つのインスレーターエレメント、例えば、外因性薬剤をコードする領域の上流である第1のインスレーターエレメント、および外因性薬剤をコードする領域の下流である第2のインスレーターエレメントを含み、例えば、第1のインスレーターエレメントおよび第2のインスレーターエレメントが、同一または異なる配列を

50

含む、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0278】

271. 実施形態269または270の偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、対象に第1の時点での粒子またはベクターの投与後に単離された細胞の試料における外因性薬剤レベルの中央値における変動が、対象に後の第2の時点での粒子またはベクターの投与後に単離された細胞の試料における外因性薬剤レベルの中央値の少なくとも、約10,000%、5,000%、2,000%、1,000%、500%、200%、100%、50%、20%、10%、または5%、あるいはそれら未満である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0279】

272. 実施形態271の偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、細胞あたりの発現レベルの中央値が、少なくとも1.0のレトロウイルスゲノムコピー数を有する細胞においてのみ評価される、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0280】

273. 実施形態269～272のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が外因性薬剤を検出可能で含む、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0281】

274. 実施形態271～273のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、ペイロード遺伝子発現レベルの中央値が、対象へのレトロウイルス組成物の投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日で対象から単離された細胞にわたって評価される、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0282】

275. 実施形態269～274のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、第1の時点で外因性薬剤を検出可能で含んだ対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が、後の第2の時点で依然として外因性薬剤を検出可能で含み、第1の時点が、対象へのレトロウイルス組成物の投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0283】

276. 実施形態275の偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、第2の時点が、第1の時点後の7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0284】

277. 実施形態269～276のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、遺伝毒性ではなく、またはレトロウイルス様粒子もしくはレトロウイルスベクターで処理されていない標的細胞と比較して標的細胞における腫瘍形成の割合を増加させない、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0285】

278. 実施形態269～277のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤レベルの中央値が、レトロウイルスベクターまたは医薬組成物を受けた対象からの細胞の集団において評価される、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0286】

279. 実施形態269～278のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロ

10

20

30

40

50

ウイルスベクターであって、投与後の異なる日に対象から収集された（例えば、単離された）細胞の集団において評価された外因性薬剤レベルの中央値が、7日、14日、28日、または56日で評価された細胞の集団における外因性薬剤レベルの中央値と、約10,000%、1000%、100%、または10%未満、例えば、10,000%~1000%、1000%~100%、または100%~10%異なり、集団内の細胞は少なくとも1.0のベクターコピー数を有する、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0287】

280. 実施形態269~279のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤レベルが、レトロウイルスベクターまたは医薬組成物を受けた対象からの細胞にわたって評価される、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0288】

281. 実施形態269~280のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を含む細胞のパーセントが、レトロウイルスベクターまたは医薬組成物の投与後、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、1095日で対象から収集された（例えば、単離された）複数の細胞において評価される、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

【0289】

282. 実施形態269~281のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、投与後2つの異なる日で単離された細胞で評価された外因性薬剤を含む細胞のパーセントにおける差が、1%、5%、10%、20%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、750%、1000%、1500%、または2000%未満である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

20

【0290】

283. 実施形態269~282のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤について陽性である標的細胞のパーセントが、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞にわたって同様である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

30

【0291】

284. 実施形態269~283のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、7日と少なくとも同じ数の標的細胞が、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、14日と少なくとも同じ数の標的細胞が28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性物質について陽性であり、28日と少なくとも同じ数の標的細胞が56日、112日、365日、730日、または1095日で外因性物質について陽性であり、56日と少なくとも同じ数の標的細胞が112日、365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、112日と少なくとも同じ数の標的細胞が365日、730日、または1095日で外因性薬剤について陽性であり、365日と少なくとも同じ数の標的細胞が730日または1095日で外因性薬剤について陽性であり、あるいは730日と少なくとも同じ数の標的細胞が1095日で外因性薬剤について陽性である、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

40

【0292】

285. 実施形態269~284のいずれかの偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクターであって、外因性薬剤を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞において同様であり、外因性薬剤を14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で含む標的細胞における外因性薬剤レベルの

50

中央値が7日と少なくとも同じくらい高く、外因性薬剤を28日、56日、112日、365日、730日、または1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が14日と少なくとも同じくらい高く、外因性薬剤を56日、112日、365日、730日、または1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が28日と少なくとも同じくらい高く、外因性薬剤を112日、365日、730日、または1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が56日と少なくとも同じくらい高く、外因性薬剤を365日、730日、または1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が112日と少なくとも同じくらい高く、外因性薬剤を730日または1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が365日と少なくとも同じくらい高く、あるいは、外因性薬剤を1095日を含む標的細胞における外因性薬剤レベルの中央値が730日と少なくとも同じくらい高い、偽型レトロウイルス様粒子またはレトロウイルスベクター。

10

【0293】

286. 外因性薬剤を対象（例えば、ヒト対象）に送達する方法であって、対象に上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子（例えば、偽型レトロウイルス様粒子）またはレトロウイルスベクター（例えば、偽型レトロウイルスベクター）を投与することを含み、それによって外因性薬剤を対象に送達する、方法。

【0294】

287. 対象（例えば、ヒト対象）、標的組織、または標的細胞において機能を調節する方法であって、対象、標的組織、または標的細胞に上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子（例えば、偽型レトロウイルス様粒子）またはレトロウイルスベクター（例えば、偽型レトロウイルスベクター）を接触させる、例えば、投与することを含む、方法。

20

【0295】

288. 実施形態287の方法であって、標的組織または標的細胞が対象に存在する、方法。

【0296】

289. 対象（例えば、ヒト対象）における障害、例えば、癌を治療または予防する方法であって、対象に上記実施形態のいずれかのレトロウイルス様粒子（例えば、偽型レトロウイルス様粒子）またはレトロウイルスベクター（例えば、偽型レトロウイルスベクター）を投与することを含む、方法。

30

【0297】

290. 上記実施形態のいずれかのレトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子を作製する方法であって、

a) レトロウイルス核酸およびフソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含む供給源細胞を用意することと、

b) レトロウイルスベクターの生成を可能にする条件下で供給源細胞を培養することと、

c) レトロウイルスベクターを供給源細胞から分離すること、豊富化すること、または精製することと、を含み、それによってレトロウイルスベクターを作製する、方法。

【0298】

291. レトロウイルスベクターを生成するための供給源細胞であって、

40

a) レトロウイルス核酸と、

b) レトロウイルス核酸をパッケージングすることができるウイルス構造タンパク質であって、少なくとも1つの構造タンパク質がフソゲン受容体と結合するフソゲンを含む、ウイルス構造タンパク質と、

c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞と比べて、低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲン受容体と、を含む、供給源細胞。

【0299】

292. 実施形態291の供給源細胞であって、フソゲンがフソゲン受容体と結合すると、レトロウイルスベクターと標的細胞との融合を生じる、供給源細胞。

50

【0300】

293. 実施形態291または292の供給源細胞であって、第2の類似した供給源細胞と結合する、例えば、供給源細胞のフソゲンが第2の供給源細胞上のフソゲンと結合する、供給源細胞。

【0301】

294. 実施形態291～293のいずれかの供給源細胞の、集団。

【0302】

295. 実施形態294の供給源細胞の集団であって、集団における細胞の10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が多核化されている、供給源細胞の集団。

【0303】

296. 実施形態291～295のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、供給源細胞が、本明細書で説明されるレトロウイルスの製造中に、他の供給源との融合が低減されている（例えば、融合しない）ように改変されている、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0304】

297. 実施形態291～296のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）が、供給源細胞によって含まれるタンパク質、例えば、供給源細胞の表面上のタンパク質と、結合しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0305】

298. 実施形態291～297のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）が、供給源細胞によって含まれるタンパク質と結合するが、細胞と融合しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0306】

299. 実施形態291～298のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、フソゲンが供給源細胞との融合を誘発しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0307】

300. 実施形態291～299のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、供給源細胞が、フソゲンと結合するタンパク質、例えば、抗原を発現しない、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0308】

301. 実施形態291～300のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、複数の供給源細胞が、フソゲンを発現するときに合胞体を形成せず、または集団における細胞の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が多核化される（例えば、2つ以上の核を含む）、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0309】

302. 実施形態291～301のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、複数の供給源細胞が、レンチウイルスを生成するときに融合細胞を形成せず、または集団における細胞の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が多核化される、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0310】

303. 実施形態291～302のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、集団における核の50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が合胞体にある、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0311】

304. 実施形態291～303のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、集団における核の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%が単核細胞にある、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0312】

10

20

30

40

50

305. 実施形態291～304のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、多核化されている細胞のパーセンテージが、非改変である以外は同様である供給源細胞の集団と比べて低い、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0313】

306. 実施形態291～305のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、合胞体に存在する核のパーセントが、非改変である以外は同様である供給源細胞の集団と比べて低い、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

10

【0314】

307. 実施形態291～306のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、多核化細胞（例えば、2つ以上の核を有する細胞）が、顕微鏡アッセイ、例えば、DNA染色を使用して、例えば、実施例20のアッセイによって検出される、供給源細胞または供給源細胞の集団。

【0315】

308. 実施形態291～307のいずれかの供給源細胞または供給源細胞の集団であって、改変された供給源細胞から得られる機能的ウイルス粒子が、例えば、実施例20のアッセイを使用して、非改変である以外は同様である供給源細胞から得られる機能的ウイルス粒子の数よりも、少なくとも10%、20%、40%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、5倍、または10倍多い、供給源細胞または供給源細胞の集団。

20

【0316】

309. レトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子であって、フソゲン受容体を欠如する、または非改変である以外は同様な供給源細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子と比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲン受容体を含む、レトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子。

30

【0317】

310. レトロウイルスベクターまたはレトロウイルス様粒子を作製する方法であって、

a) フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含む供給源細胞であって、供給源細胞がフソゲン受容体を欠如し、または非改変である以外は同様な供給源細胞と比べて低下したレベル（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の低下）で存在するフソゲン受容体を含む、供給源細胞を用意することと、

b) レトロウイルスベクターの生成を可能にする条件下で供給源細胞を培養することと、

c) レトロウイルスベクターを供給源細胞から分離すること、豊富化すること、または精製することと、を含み、それによってレトロウイルスベクターを作製する、方法。

40

【0318】

311. 実施形態310の方法であって、供給源細胞を用意することが、供給源細胞またはその前駆体におけるフソゲン受容体をノックダウンまたはノックアウトすることを含む、方法。

【0319】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0320】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で

50

言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、本明細書で言及される、例えば、本明細書の任意の表において、すべてのGenBank、Unigene、およびEntrez配列は参照によって組み込まれる。特に明記されていない限り、本明細書におけるいずれの表も含め、本明細書で指定された配列寄託番号は、2018年5月15日現在のデータベースエントリを参照している。1つの遺伝子またはタンパク質が複数の配列寄託番号を参照する場合、すべての配列変異体が包含される。加えて、材料、方法、および実施例は、単なる例示であり、限定することは意図されていない。

〔発明を実施するための形態〕

【0321】

本開示は、少なくとも部分的に、インビボ送達のためのフソソーム法および組成物を提供する。いくつかの実施形態において、フソソームは、標的細胞に対する特異性を促進するエレメントの組み合わせ、例えば、再標的化フソゲン、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および非標的細胞特異的調節エレメントのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、フソソームは、フソソームに対する免疫応答を減少させる1つ以上の改変を含む。

【0322】

定義

特許請求の範囲および明細書で使用される用語は、特に明記しない限り、以下に記載されるように定義される。

【0323】

本明細書で使用される場合、「検出可能で存在する」は、外因性薬剤が検出可能で存在するという文脈で使用される場合、外因性薬剤それ自体が検出可能で存在することを意味する。例えば、外因性薬剤がタンパク質である場合、それをコードする核酸が検出可能で存在するかに関係なく、外因性タンパク質薬剤は検出可能で存在することができる。

【0324】

本明細書で使用される場合、「フソソーム」は、管腔または空洞を取り囲む両親媒性脂質の二重層、および両親媒性脂質二重層と相互作用するフソゲンを指す。実施形態では、フソソームは核酸を含む。いくつかの実施形態において、フソソームは、膜で囲まれた調製物である。いくつかの実施形態において、フソソームは、供給源細胞に由来する。

【0325】

本明細書で使用される場合、「フソソーム組成物」は、1つ以上のフソソームを含む組成物を指す。

【0326】

本明細書で使用される場合、「フソゲン」は、管腔を囲む2つの膜の間に相互作用を生じる薬剤または分子を指す。実施形態において、フソゲンは膜の融合を促進する。他の実施形態では、フソゲンは、2つの管腔（例えば、レトロウイルスベクターの管腔と標的細胞の細胞質）の間に接続、例えば、孔を生じる。いくつかの実施形態において、フソゲンは、2つ以上のタンパク質の複合体を含み、例えば、どちらのタンパク質も単独では融合活性を有さない。いくつかの実施形態において、フソゲンは標的化ドメインを含む。

【0327】

本明細書で使用される場合、「フソゲン受容体」は、標的細胞によって含まれる実体（例えば、タンパク質）を指し、フソソーム（例えば、レトロウイルス）上のフソゲンと、標的細胞上のフソゲン受容体との結合は、標的細胞への核酸（例えば、レトロウイルス核酸）（および任意にまた、そこにコードされるコードされる外因性薬剤）の送達を促進する。

【0328】

本明細書で使用される場合、「インスレーターエレメント」は、エンハンサーを遮断する、またはヘテロクロマチン拡散を防ぐヌクレオチド配列を指す。インスレーターエレメントは、野生型または変異体である得る。

10

20

30

40

50

【0329】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、治療される症状および／または状態を有意かつポジティブに変更するのに十分である（例えば、ポジティブ臨床反応を提供する）医薬組成物の量を意味する。医薬組成物に使用するための有効成分の有効量は、治療される特定の状態、状態の重症度、治療の期間、併用療法の性質、使用される特定の有効成分（複数可）、使用される特定の薬学的に許容される賦形剤（複数可）および／または担体（複数可）、ならびに主治医の知識および専門技術を伴うような要因によって変化する。

【0330】

ウイルス、VLP、またはフソソームに関連して本明細書で使用される「外因性薬剤」は、対応する野生型ウイルスまたは対応する野生型供給源細胞から作製されたフソゲンによって含まれず、コードされない薬剤を指す。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、天然由来タンパク質と比較して（例えば、挿入、欠失、または置換によって）変異される配列を有するタンパク質または核酸など、天然に存在しない。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、供給源細胞に天然に存在しない。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、供給源細胞に天然に存在するが、ウイルスにとって外因性である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、レシピエント細胞に天然に存在しない。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、レシピエント細胞に天然に存在するが、所望のレベルまたは所望の期間で存在しない。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、RNAまたはタンパク質を含む。

【0331】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに好適であり、合理的な利益／リスク比に見合う、賦形剤、組成物、および／または剤形を指す。

【0332】

本明細書で使用される場合、「ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント」（またはポジティブTCSE）は、非標的細胞と比較して標的細胞における外因性薬剤のレベルを増加させる核酸配列を指し、外因性薬剤をコードする核酸は、ポジティブTCSEと操作可能に連結される。いくつかの実施形態において、ポジティブTCSEは機能的核酸配列であり、例えば、ポジティブTCSEはプロモーターまたはエンハンサーを含むことができる。いくつかの実施形態において、ポジティブTCSEは機能的RNA配列をコードし、例えば、ポジティブTCSEは、標的細胞におけるRNAの正しいスプライシングを促進するスプライス部位をコードすることができる。いくつかの実施形態において、ポジティブTCSEは、機能的なタンパク質配列をコードし、またはポジティブTCSEは、タンパク質の正しい翻訳後改変を促進するタンパク質配列をコードすることができる。いくつかの実施形態では、ポジティブTCSEは、外因性薬剤のダウンレギュレーターまたは阻害剤のレベルまたは活性を減少させる。

【0333】

本明細書で使用される場合、「ネガティブ標的細胞特異的調節エレメント」（またはネガティブTCSE）は、標的細胞と比較して非標的細胞における外因性薬剤のレベルを減少させる核酸配列を指し、外因性薬剤をコードする核酸は、ネガティブTCSEに操作可能に連結される。いくつかの実施形態において、ネガティブTCSEは機能的核酸配列、例えば、非標的細胞においてレトロウイルス核酸の分解または阻害を生じるmiRNA認識部位である。いくつかの実施形態において、核酸配列は機能的RNA配列をコードし、例えば、核酸は、外因性タンパク質剤をコードするmRNAに存在するmiRNA配列をコードし、それによってmRNAが非標的細胞において分解または阻害される。いくつかの実施形態において、ネガティブTCSEは、外因性薬剤のダウンレギュレーターまたは阻害剤のレベルまたは活性を増加させる。

【0334】

本明細書で使用される場合、「非標的細胞特異的調節エレメント」（またはNTCSR

E) は、標的細胞と比較して非標的細胞における外因性薬剤のレベルを低下させる核酸配列を指し、外因性薬剤をコードする核酸はNTCSREに操作可能に連結される。いくつかの実施形態において、NTCSREは、機能的核酸配列、例えば、非標的細胞においてレトロウイルス核酸の分解または阻害を生じるmiRNA認識部位である。いくつかの実施形態において、核酸配列は機能的RNA配列をコードし、例えば、核酸は、外因性タンパク質剤をコードするmRNAに存在するmiRNA配列をコードし、それによってmRNAが非標的細胞において分解または阻害される。いくつかの実施形態において、NTCSREは、外因性薬剤のダウンレギュレーターまたは阻害剤のレベルまたは活性を増加させる。「ネガティブTCSRE」および「NTCSRE」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

10

【0335】

本明細書で使用される場合、「再標的化フソゲン」は、フソゲンの天然起源型の一部ではない配列を有する標的化部分を含むフソゲンを指す。実施形態において、フソゲンは、フソゲンの天然起源型における標的化部分と比べて、異なる標的化部分を含む。実施形態において、フソゲンの天然起源型は標的化ドメインを欠如し、再標的化フソゲンは、フソゲンの天然起源型に存在しない標的化部分を含む。実施形態において、フソゲンは、標的化部分を含むように改変される。実施形態において、フソゲンは、例えば、膜貫通ドメイン、融合形成的に活性なドメイン、または細胞質ドメインにおいて、フソゲンの天然起源型と比較して、標的化部分の外側に1つ以上の配列変化を含む。

【0336】

20

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス核酸」は、単独で、またはヘルパー細胞、ヘルパーウイルス、もしくはヘルパープラスミドと組み合わせて、レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターにパッケージングするための少なくとも最小配列要求を含む核酸を指す。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸はさらに、外因性薬剤、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、非標的細胞特異的調節エレメント、またはネガティブTCSREを含み、またはコードする。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、5'LTR（例えば、統合を促進するため）、U3（例えば、ウイルスゲノムRNA転写を活性化するため）、R（例えば、Tat結合領域）、U5、3'LTR（例えば、統合を促進するため）、パッケージング部位（例えば、psi(Ψ)）、RRE（例えば、Revに結合して核外輸送を促進するため）、のうちの1つ以上（例えば、すべて）を含む。レトロウイルス核酸は、RNA（例えば、ピリオンの一部である場合）またはDNA（例えば、供給源細胞に導入されるとき、またはレシピエント細胞における逆転写後）を含むことができる。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、gag、pol、およびenvのうちの1つ以上（例えば、すべて）を含むヘルパー細胞、ヘルパーウイルス、またはヘルパープラスミドを使用してパッケージングされる。

30

【0337】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」は、フソソーム（例えば、レンチウイルスベクター）が外因性薬剤を送達することが望まれるタイプの細胞を指す。実施形態では、標的細胞は、特定の組織タイプまたはクラスの細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞である。いくつかの実施形態において、標的細胞は、罹患細胞、例えば、癌細胞である。いくつかの実施形態において、フソゲン、例えば、再標的化フソゲン（単独で、またはポジティブTCSRE、NTCSRE、ネガティブTCSRE、もしくはそれらの任意の組み合わせと組み合わせて）は、非標的細胞と比べて、標的細胞への外因性薬剤の優先的送達をもたらす。

40

【0338】

本明細書で使用される場合、「非標的細胞」は、フソソーム（例えば、レンチウイルスベクター）が外因性薬剤を送達することが望まれないタイプの細胞を指す。いくつかの実施形態では、非標的細胞は、特定の組織タイプまたはクラスの細胞である。いくつかの実施形態において、非標的細胞は、非罹患細胞、例えば、非癌性細胞である。いくつかの実施形態において、フソゲン、例えば、再標的化フソゲン（単独で、またはポジティブTC

50

SRE、NTCSRE、ネガティブTCSRE、もしくはそれらの任意の組み合わせと組み合わせる）は、標的細胞に比べて、非標的細胞への外因性薬剤の低下した送達をもたらす。

【0339】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療している」、または「治療」という用語は、疾患または障害を改善すること、例えば、疾患または障害、例えば、障害の根本原因またはその臨床症状のうちの少なくとも1つの発症を、遅延すること、または阻止すること、または低減することを指す。

【0340】

フソソーム、例えば、細胞由来フソソーム

フソソームは様々な形態をとることができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソソームは、供給源細胞に由来する。フソソームは、例えば、細胞外小胞、微小胞、ナノ小胞、エキソソーム、アポトーシス小体（アポトーシス細胞由来）、微粒子（例えば、血小板から派生され得る）、エクソソーム（例えば、血清中の好中球および単球から派生可能である）、プロスタトソーム（前立腺癌細胞から得られる）、カルディオソーム（心臓細胞から得られる）、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、フソソームは供給源細胞から自然に放出され、いくつかの実施形態では、供給源細胞は、フソソームの形成を増強するように処理される。いくつかの実施形態では、フソソームは、直径が約10~100nm、例えば、直径が約30~100nmである。いくつかの実施形態では、フソソームは、1つ以上の合成脂質を含む。

【0341】

いくつかの実施形態において、フソソームは、ウイルス、例えば、レトロウイルス、例えば、レンチウイルスであり、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、脂質二重層を含むフソソームは、エンベロープを含むレトロウイルスベクターを含む。例えば、いくつかの実施形態において、両親媒性脂質のフソソームの二重層は、ウイルスエンベロープであり、またはそれらを含む。ウイルスエンベロープは、フソゲン、例えば、ウイルスに内因性であるフソゲンまたは偽型フソゲンを含み得る。いくつかの実施形態において、フソソームの内腔または空洞は、ウイルス核酸、例えば、レトロウイルス核酸、例えば、レンチウイルス核酸を含む。ウイルス核酸はウイルスゲノムであり得る。いくつかの実施形態において、フソソームはさらに、例えば、その空洞または内腔内に、1つ以上のウイルス非構造タンパク質を含む。

【0342】

フソソームは、例えば、所望の導入遺伝子または外因性薬剤などのペイロードの標的細胞への送達を容易にする様々な特性を有し得る。例えば、いくつかの実施形態では、フソソームおよび供給源細胞は共に、標的細胞と融合することができる粒子を作製するのに十分な核酸（複数可）を含む。実施形態において、これらの核酸（複数可）は、gagポリタンパク質活性、ポリメラーゼ活性、インテグラーゼ活性、プロテアーゼ活性、およびフソゲン活性である活性のうちの1つ以上（例えば、すべて）を有するタンパク質をコードする。

【0343】

フソソームはまた、標的細胞へのペイロードの送達を容易にする様々な構造を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、フソソーム（例えば、ウイルス、例えば、レトロウイルス、例えば、レンチウイルス）は、gagポリタンパク質、ポリメラーゼ（例えば、pol）、インテグラーゼ（例えば、機能的または非機能的変異体）、プロテアーゼ、およびフソゲンであるタンパク質のうちの1つ以上（例えば、すべて）を含む。いくつかの実施形態では、フソソームはさらにrevを含む。いくつかの実施形態では、上記タンパク質のうちの1つ以上はレトロウイルスゲノムにコードされ、いくつかの実施形態では、上記タンパク質のうちの1つ以上は、例えば、ヘルパー細胞、ヘルパーウイルス、またはヘルパープラスミドによる導入で提供される。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸（例えば、レトロウイルス核酸）は、5'LTR（例えば、U5を含み、機能的U

10

20

30

40

50

3ドメインを欠如している)、P s i パッケージングエレメント (P s i)、ペイロード遺伝子と操作可能に連結される中央ポリプリントラクト (c P P T) プロモーター、ペイロード遺伝子 (任意にオープンリーディングフレームの前にイントロンを含む)、ポリAテール配列、W P R E、および3' L T R (例えば、U 5を含み、機能的U 3を欠如している) である核酸配列のうちの1つ以上 (例えば、すべて) を含む。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸 (例えば、レトロウイルス核酸) はさらに、1つ以上のインスレーターエレメントを含む。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸 (例えば、レトロウイルス核酸) はさらに、1つ以上のm i R N A 認識部位を含む。いくつかの実施形態では、m i R N A 認識部位のうちの1つ以上は、ポリAテール配列の下流、例えば、ポリAテール配列とW P R Eとの間に位置する。

10

【0344】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるフソソームは、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに投与される。そのような実施形態では、対象は、特定の疾患または状態 (例えば、本明細書に記載の疾患または状態) のリスクがあり得、症状を有し得、あるいは有すると診断または特定され得る。一実施形態では、対象は癌を有する。一実施形態では、対象は感染症を有する。いくつかの実施形態において、フソソームは、疾患または状態を治療するための外因性薬剤をコードする核酸配列を含む。

【0345】

レンチウイルス成分およびヘルパー細胞

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、5' プロモーター (例えば、パッケージされたRNA全体の発現を制御するため)、5' L T R (例えば、R (ポリアデニル化テールシグナル) および/またはプライマー活性化シグナルを含むU 5)、プライマー結合部位、p s i パッケージングシグナル、核外輸送のためのR R Eエレメント、導入遺伝子の発現を制御するために導入遺伝子のすぐ上流であるプロモーター、導入遺伝子 (または他の外因性薬剤エレメント)、ポリプリントラクト、および3' L T R (例えば、変異したU 3、R、およびU 5を含む) のうちの1つ以上 (例えば、すべて) を含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸はさらに、c P P T、W P R E、および/またはインスレーターエレメントのうちの1つ以上を含む。

20

【0346】

レトロウイルスは通常、そのゲノムRNAを逆転写によって線状の二本鎖DNAコピーに複製し、続いてそのゲノムDNAを宿主ゲノムに共有結合によって統合する。特定の実施形態での使用に好適な例示的なレトロウイルスには、限定されないが、モロニーネズミ白血病ウイルス (M - M u L V)、モロニーネズミ肉腫ウイルス (M o M S V)、ハーベイネズミ肉腫ウイルス (H a M u S V)、ネズミ乳房腫瘍ウイルス (M u M T V)、テナガザル白血病ウイルス (G a L V)、ネコ白血病ウイルス (F L V)、スプマウイルス、フレンドネズミ白血病ウイルス、ネズミ幹細胞ウイルス (M S C V)、およびラウス肉腫ウイルス (R S V))、ならびにレンチウイルスが含まれる。

30

【0347】

いくつかの実施形態では、レトロウイルスはガムレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスはイプシロンレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスはアルファレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスはベータレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスはデルタレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスはレンチウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスは、スプマレトロウイルスである。いくつかの実施形態では、レトロウイルスは内在性レトロウイルスである。

40

【0348】

例示的なレンチウイルスには、限定されないが、H I V (ヒト免疫不全ウイルス、H I V 1型およびH I V 2型を含む)、ビスナ・マウディウイルス (V M V) ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (C A E V)、ウマ感染性貧血ウイルス (E I A V)、ネコ免疫不全ウイルス (F I V)、ウシ免疫不全ウイルス (B I V)、およびサル免疫不全ウイルス (

50

S I V) が含まれる。いくつかの実施形態では、H I V をベースとした骨格（すなわち、H I V シス作用性配列エレメント）が使用される。

【0349】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるベクターは、別の核酸分子を移行または輸送することができる核酸分子である。移行された核酸は、一般に、ベクター核酸分子に連結、例えば、それらに挿入される。ベクターは、細胞内で自律複製を指示する配列を含み得、または宿主細胞 DNA への統合を可能にするのに十分な配列を含み得る。有用なベクターには、例えば、プラスミド（例えば、DNA プラスミドまたは RNA プラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌人工染色体、およびウイルスベクターが含まれる。有用なウイルスベクターには、例えば、複製欠損性レトロウイルスおよびレンチウイルスが含まれる。

10

【0350】

ウイルスベクターは、例えば、核酸分子の転移または細胞のゲノムもしくは核酸転移を媒介するウイルス粒子への統合を一般的に促進するウイルス由来の核酸エレメントを含む核酸分子（例えば、転移プラスミド）を含み得る。ウイルス粒子は、通常、核酸（複数可）に加えて、様々なウイルス成分、およびまたしばしば宿主細胞成分を含む。ウイルスベクターは、例えば、核酸を細胞に、または転移された核酸（例えば、裸の DNA として）に移行することができるウイルスまたはウイルス粒子を含むことができる。ウイルスベクターおよびトランスファープラスミドは、主にウイルスに由来する構造的および／または機能的遺伝子エレメントを含むことができる。レトロウイルスベクターは、構造的および機能的遺伝子エレメント、またはそれらの部分を含むウイルスベクターまたはプラスミドを含むことができ、主にレトロウイルスに由来する。レンチウイルスベクターは、構造的および機能的遺伝的要素、またはそれらの部分を含むウイルスベクターまたはプラスミドを含むことができ、主にレンチウイルスに由来する L T R を含む。

20

【0351】

実施形態において、レンチウイルスベクター（例えば、レンチウイルス発現ベクター）は、レンチウイルス転移プラスミド（例えば、裸の DNA として）または感染性レンチウイルス粒子を含み得る。クローニング部位、プロモーター、調節エレメント、異種核酸などのエレメントに関して、これらのエレメントの配列は、レンチウイルス粒子中に RNA 形態で存在することができ、DNA プラスミド中に DNA 形態で存在することができる

30

【0352】

本明細書で説明されるいくつかのベクターでは、複製に寄与し、または複製に必須である 1 つ以上のタンパク質コード領域の少なくとも一部が、対応する野生型ウイルスと比較して不在であり得る。これがウイルスベクター複製欠損をもたらす。いくつかの実施形態において、ベクターは、標的の非分裂宿主細胞を形質導入すること、および／またはそのゲノムを宿主ゲノムに統合することが可能である。

【0353】

野生型レトロウイルスゲノムの構造は、しばしば、5' 長末端反復 (L T R) および 3' L T R を含み、その間または内部に、ゲノムのパッケージングを可能にするパッケージングシグナル、プライマー結合部位、宿主ゲノムへの統合を可能にする統合部位、ならびにウイルス粒子の集合を促進するパッケージング成分をコードする g a g、p o l、および e n v 遺伝子を含む。より複雑なレトロウイルスは、H I V における r e v および R R E 配列などの追加の特性を有し、統合されたプロウイルスの RNA 転写物の、核から感染標的細胞の細胞質への効率的な輸送を可能にする。プロウイルスでは、ウイルス遺伝子は長末端反復 (L T R) と呼ばれる領域によって両端でフランキングされる。L T R は、プロウイルスの統合および転写に含まれる。L T R はまた、エンハンサープロモーター配列としても機能し、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルス RNA のカプシド形成は、ウイルスゲノムの 5' 末端に位置する p s i 配列によって生じる。

40

【0354】

50

LTR自体は通常、類似した（例えば、同一の）配列であり、U3、R、およびU5と呼ばれる3つのエレメントに分けることができる。U3は、RNAの3'末端に固有である配列に由来する。RはRNAの両端で反復される配列に由来し、U5はRNAの5'末端に固有である配列に由来する。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルス間でかなり変化し得る。

【0355】

ウイルスゲノムの場合、転写開始部位は通常、1つのLTRにおけるU3とRの間の境界にあり、ポリ(A)付加(末端)部位は他方のLTRにおけるRとU5の間の境界にある。U3は、プロウイルスの転写制御エレメントのほとんどを含み、細胞の、いくつかの例では、ウイルスの、転写アクチベータータンパク質に応答するプロモーターおよび多数のエンハンサー配列が含まれる。いくつかのレトロウイルスは、遺伝子発現の調節に含まれるタンパク質をコードする遺伝子である、*tot*、*rev*、*tax*、および*rex*のうちのいずれか1つ以上を含む。

【0356】

構造遺伝子*gag*、*pol*、および*env*それら自体に関し、*gag*はウイルスの内部構造タンパク質をコードする。*Gag*タンパク質は、タンパク質分解によって、成熟タンパク質MA(マトリックス)、CA(カプシド)、およびNC(ヌクレオカプシド)にまで処理される。*pol*遺伝子は、DNAポリメラーゼ、関連するRNaseH、およびインテグラーゼ(IN)を含む逆転写酵素(RT)をコードし、ゲノムの複製を媒介する。*env*遺伝子は、細胞受容体タンパク質と特異的に相互作用する複合体を形成する、ビリオンの表面(SU)糖タンパク質および膜貫通(TM)タンパク質をコードする。この相互作用は、例えばウイルス膜と細胞膜との融合によって、感染を促進する。

【0357】

複製欠損レトロウイルスベクターゲノムでは、*gag*、*pol*、および*env*は不在であり得、または機能的でないことがあり得る。RNAの両端でのR領域は、通常、反復配列である。U5およびU3は、それぞれRNAゲノムの5'末端および3'末端にある固有の配列を表す。

【0358】

レトロウイルスはまた、*gag*、*pol*、および*env*以外のタンパク質をコードする追加の遺伝子を含み得る。追加の遺伝子の例には、(HIVにおいて)、*vif*、*vpr*、*vpx*、*vpu*、*tat*、*rev*、および*nef*のうちの1つ以上が含まれる。EIAVは(とりわけ)追加の遺伝子S2を有する。追加の遺伝子によってコードされるタンパク質は様々な機能を果たし、そのいくつかは細胞タンパク質によってもたらされる機能と重複し得る。EIAVでは、例えば、*tat*はウイルスLTRの転写アクチベーターとして機能する(DerseおよびNewbold 1993 *Virology* 194:530-6、Mauryら、1994 *Virology* 200:632-42)。それはTARと呼ばれる安定したステムループRNA二次構造と結合する。*Rev*は、*rev*応答エレメント(RRE)を介してウイルス遺伝子の発現を調節および調整する(Martaranoら、1994 *J. Virol.* 68:3102-11)。これら2つのタンパク質の作用機序は、霊長類ウイルスにおける類似の機序とおおむね同様であると考えられる。さらに、EIAVタンパク質であるTtmは、膜貫通タンパク質の開始時に*env*コード配列にスプライシングされた*tat*の最初のエクソンによってコードされることが特定されている。

【0359】

プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼに加えて、非霊長類レンチウイルスは、dUTPアーゼをコードする4番目の*pol*遺伝子産物を含む。これは、特定の非分裂細胞またはゆっくり分裂する細胞型に感染するこれらのレンチウイルスの能力において役割を果たし得る。

【0360】

実施形態において、組換えレンチウイルスベクター(RLV)は、パッケージング成分

10

20

30

40

50

の存在下で、標的細胞に感染することができるウイルス粒子へのRNAゲノムのパッケージングを可能にするのに十分なレトロウイルス遺伝情報を有するベクターである。標的細胞の感染は、逆転写および標的細胞ゲノムへの統合を含むことができる。RLVは通常、ベクターによって標的細胞に送達される非ウイルスコード配列を有する。実施形態では、RLVは、標的細胞内で感染性レトロウイルス粒子を生成するための独立した複製能力がない。通常、RLVは機能的なgag-polおよび/またはenv遺伝子および/または複製に関与する他の遺伝子を欠如している。ベクターは、スプリットイントロンベクターとして、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT特許出願第WO 99/15683号に記載されているように、構成され得る。

【0361】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、最小のウイルスゲノムを含み、例えば、ウイルスベクターは、感染、形質導入、および標的宿主細胞に目的のヌクレオチド配列を送達するために必要とされる機能性を得るために、非必須エレメントを取り除いて必須エレメントを保持するように操作されており、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、WO 98/17815に記載されている。

【0362】

最小のレンチウイルスゲノムは、例えば、(5') R-U5-1つ以上の第1のヌクレオチド配列-U3-R (3')を含み得る。しかし、供給源細胞内でレンチウイルスゲノムを生成するために使用されるプラスミドベクターはまた、供給源細胞内のゲノムの転写を指示するためにレンチウイルスゲノムに操作可能に連結される転写調節制御配列を含むことができる。これらの調節配列は、転写化レトロウイルス配列、例えば5' U3領域に関連する天然配列を含み得、またはそれらは、別のウイルスプロモーター、例えばCMVプロモーターなどの異種プロモーターを含み得る。いくつかのレンチウイルスゲノムは、効率的なウイルス生成を促進する追加の配列を含む。例えば、HIVの場合、revおよびRRE配列が含まれ得る。これに代えて、または組み合わせで、コドン最適化が使用され得、例えば、外因性薬剤をコードする遺伝子は、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWO 01/79518に記載されるように、コドン最適化され得る。rev/RRE系と同様または同じ機能を実施する代替配列も使用され得る。例えば、rev/RRE系の機能的類似体は、マソン・ファイザーサルウイルスに認められる。これはCTEとして知られており、感染した細胞における因子と相互作用すると考えられるゲノム内のRREタイプの配列を含む。細胞因子は、rev類似体として考えることができる。したがって、CTEはrev/RRE系の代替として使用され得る。さらに、HTLV-IのRexタンパク質は、HIV-IのRevタンパク質を機能的に置き換えることができる。RevおよびRexはIRE-BPと同様な効果を有する。

【0363】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸（例えば、レンチウイルス核酸、例えば、霊長類または非霊長類レンチウイルス核酸）は、(1) gagにおける欠失が、gagコード配列の約350~354ヌクレオチドの下流である1つ以上のヌクレオチドを取り除いた、欠失したgag遺伝子を含み、(2) レトロウイルス核酸に存在しない1つ以上のアクセサリ遺伝子を有し、(3) tat遺伝子を欠如しているが、5' LTRの端とgagのATGの間にリーダー配列を含み、ならびに(4) (1)、(2)、および(3)の組み合わせである。一実施形態では、レンチウイルスベクターは、特性(1)と(2)と(3)のすべてを含む。この戦略は、WO 99/32646でさらに詳細に記載され、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0364】

いくつかの実施形態において、霊長類レンチウイルス最小系は、ベクター生成または分裂細胞および非分裂細胞のトランスダクションのいずれかのために、HIV/SIV追加遺伝子vif、vpr、vpx、vpu、tat、rev、およびnefのいずれも必要としない。いくつかの実施形態において、EIAV最小ベクター系は、ベクター生成または分裂細胞および非分裂細胞の形質導入のいずれもS2を必要としない。

10

20

30

40

50

【0365】

追加の遺伝子の削除は、レンチウイルス（例えば、HIV）感染症における疾患と関連する遺伝子を伴わずにベクターを生成することを可能にし得る。特に、tatは疾患と関連している。第二に、追加の遺伝子の削除は、ベクターがより異種のDNAをパッケージ化することを可能にする。第三に、S2などの機能が不明な遺伝子を省略して、それによって望ましくない影響を生じるリスクを低減し得る。最小レンチウイルスベクターの例は、WO99/32646およびWO98/17815に開示されている。

【0366】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、少なくともtatおよびS2（EIAVベクター系である場合）、そしておそらくvif、vpr、vpx、vpu、およびnefも欠いている。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸はまた、rev、RRE、またはその両方を欠いている。

10

【0367】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸はvpxを含む。Vpxポリペプチドは、細胞質内の遊離dNTPを分解するSAMHD1制限因子と結合してその分解を誘導する。したがって、VpxがSAMHD1を分解して細胞質内の遊離dNTPの濃度が増加し、逆転写活性が増加され、そのためレトロウイルスゲノムの逆転写および標的細胞ゲノムへの統合を促進する。

【0368】

異なる細胞では、特定のコドンのそれらの使用法が異なる。このコドンバイアスは、細胞型における特定のtRNAの相対的な量におけるバイアスに対応する。配列におけるコドンを変更することによって、それらに対応するtRNAの相対的な量と一致するように調整され、それによって発現を増加させることが可能である。同様に、対応するtRNAが特定の細胞型にまれであることが知られているコドンを意図的に選択することによって、発現を減少させることが可能である。したがって、追加レベルの翻訳制御が利用可能である。コドン最適化の追加の説明は、例えば、WO99/41397に認められ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0369】

HIVおよび他のレンチウイルスを含む多くのウイルスは、多数のまれなコドンを使用し、これらを一般的に使用される哺乳動物のコドンに対応するように変更することによって、哺乳動物のプロデューサー細胞におけるパッケージング成分の増加した発現を達成することができる。

30

【0370】

コドン最適化は多くの他の利点を有する。それらの配列の変化によって、パッケージング成分をコードするヌクレオチド配列は、それらから減少または排除されるRNA不安定性配列（INS）を有し得る。同時に、パッケージング成分のアミノ酸配列コード配列が保持され、それによって、配列によってコードされるウイルス成分は、パッケージング成分の機能が損なわれないものと同じまたは少なくとも十分同様に保持される。いくつかの実施形態では、コドン最適化はまた、輸送のためのRev/RRE要件を克服し、最適化された配列をRevに依存しないようにする。いくつかの実施形態において、コドン最適化はまた、ベクター系内の異なる構築体間の相同組換えを低減する（例えば、gag-polおよびenvオープンリーディングフレームにおける重複領域間）。いくつかの実施形態において、コドン最適化は、ウイルス力価の増加および／または改善された安全性をもたらす。

40

【0371】

いくつかの実施形態では、INSに関連するコドンのみがコドン最適化される。他の実施形態では、配列は、gag-polのフレームシフト部位を包含する配列を除いて、それらの全体でコドン最適化される。

【0372】

gag-pol遺伝子は、gag-polタンパク質をコードする2つの重複するリー

50

ディングフレームを含む。両タンパク質の発現は、翻訳中にフレームシフトに依存する。このフレームシフトは、翻訳中にリボソームの「滑り」の結果として発生する。この滑りは、少なくとも部分的にはリボソームを失速させるRNAの二次構造によって引き起こされると考えられる。このような二次構造は、gag-pol遺伝子におけるフレームシフト部位の下流に存在する。HIVの場合、重複領域は、gagの始まりの下流のヌクレオチド1222位（ヌクレオチド1はgagATGのA）からgagの終わり（nt1503）まで伸長する。結果として、フレームシフト部位および2つのリーディングフレームの重複領域にまたがる281bpフラグメントは、好ましくは、コドン最適化されない。いくつかの実施形態において、このフラグメントを保持することは、gag-polタンパク質のより効率的な発現を可能にする。EIAVの場合、重複の始まりはnt1262である（ヌクレオチド1位はgagATGのAである）。重複の終わりはnt1461である。フレームシフト部位およびgag-polの重複が維持されることを確実にするために、野生型配列がnt1156～1465まで保持され得る。

【0373】

例えば、都合の良い制限部位に適応するために、最適なコドン使用から誘導させ得、保存的アミノ酸変化をgag-polタンパク質に導入し得る。

【0374】

いくつかの実施形態では、コドン最適化は、哺乳動物系における低いコドン使用を有するコドンに基づいている。3番目ならびに時々2番目および3番目の塩基が変化され得る。

【0375】

遺伝暗号の縮退性のため、多くのgag-pol配列が当業者によって達成することができることが理解されよう。また、コドン最適化されたgag-pol配列を生成するための開始点として使用することができる多くの報告されたレトロウイルス変異体がある。レンチウイルスのゲノムはかなり可変的であり得る。例えば、依然として機能的であるHIV-Iの多くの準種がある。これはまたEIAVにも当てはまる。これらの変異体は、形質導入プロセスの特定の部分を増強するために使用され得る。HIV-I変異体の例は、ロスアラモス国立研究所によって維持されるHIVデータベースに認められ得る。EIAVクローンの詳細は、国立衛生研究所によって維持されるNCBIデータベースで認められ得る。

【0376】

コドン最適化gag-pol配列のための戦略は、いずれかのレトロウイルス、例えば、EIAV、FIV、BIV、CAEV、VMR、SIV、HIV-I、およびHIV-2と関連して使用することができる。さらに、この方法は、HTLV-I、HTLV-2、HFV、HSRV、およびヒト内在性レトロウイルス（HERV）、MLV、ならびに他のレトロウイルスからの遺伝子の発現を増加させるために使用することができる。

【0377】

上記のように、レトロウイルスベクターのためのパッケージング成分は、gag、pol、およびenv遺伝子の発現生成物を含むことができる。さらに、パッケージングは、4つのステムループの短配列、それに続くパッケージングシグナルとしてgagおよびenvからの部分的配列を使用することができる。したがって、レトロウイルスベクターゲノムにおける削除されたgag配列の包含（パッケージング構築体における完全なgag配列に加えて）を使用することができる。実施形態において、レトロウイルスベクターは、依然としてenv配列を保持するベクター中のgagの255から360ヌクレオチド、またはスプライスドナー突然変異である、gagおよびenv欠失の特定の組み合わせにおけるgagの約40ヌクレオチドを含むパッケージングシグナルを含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、1つ以上の欠失を含むgag配列を含み、例えば、gag配列は、N末端に由来する約360ヌクレオチドを含む。

【0378】

レトロウイルスベクター、ヘルパー細胞、ヘルパーウイルス、またはヘルパープラスミドは、レトロウイルスの構造およびアクセサリタンパク質、例えば、gag、pol、

10

20

30

40

50

env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx、もしくはnefタンパク質、または他のレトロウイルスタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、レトロウイルスタンパク質は、同じレトロウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスタンパク質は、2つ以上のレトロウイルス、例えば、2、3、4つ以上のレトロウイルスに由来する。

【0379】

gagおよびpolコード配列は、一般に、ネイティブレンチウイルスにおけるGag-Pol前駆体として編成される。gag配列は、p55とも呼ばれる55kDのGag前駆体タンパク質をコードする。p55は、MA（マトリックス[p17]）、CA（カプシド[p24]）、NC（ヌクレオカプシド[p9]）、およびp6と呼ばれる4つの小さいタンパク質に成熟するプロセス中に、ウイルスにコードされたプロテアーゼ4（pol遺伝子の生成物）によって切断される。pol前駆体タンパク質は、ウイルスにコードされたプロテアーゼによってGagから切断して離され、さらに消化されて、プロテアーゼ（p10）、RT（p50）、RNアーゼH（p15）、およびインテグラーゼ（p31）の活性を分離する。

【0380】

ネイティブGag-Pol配列は、ヘルパーベクター（例えば、ヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルス）で利用することができ、改変が加えられ得る。これらの改変には、GagおよびPol配列が異なるウイルス（例えば、異なる種、亜種、株、クレードなど）から得られるキメラGag-Pol、および／または配列は転写および／または翻訳を改善するため、および／または組換えと低下するために改変されている配列を含む。

【0381】

様々な例において、レトロウイルス核酸は、(i) 野生型INS1と比較してRNAの核外輸送の制限を低減する変異INS1阻害配列を含み、(ii) フレームシフトおよび早期終結をもたらす2つのヌクレオチド挿入を含み、および／または(iii) gagのINS2、INS3、およびINS4阻害配列を含まない、gagタンパク質の150～250（例えば、168）ヌクレオチド部分をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0382】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるベクターは、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）配列および非レンチウイルス配列の両方を含むハイブリッドベクターである。いくつかの実施形態において、ハイブリッドベクターは、逆転写、複製、統合、および／またはパッケージングのためのレトロウイルス、例えばレンチウイルスの配列を含む。

【0383】

特定の具体的な実施形態によれば、ウイルスベクター骨格配列のほとんどまたはすべては、レンチウイルス、例えば、HIV-1に由来する。しかし、レトロウイルスおよび／またはレンチウイルス配列の多くの異なる供給源を使用、または組み合わせることができ、特定のレンチウイルス配列における多数の置換および変更が、本明細書で説明される機能を実施する移行ベクターの能力を損なうことなく適応され得ることが理解される。様々なレンチウイルスベクターがNaldiniら（1996a、1996b、および1998）、Zuffereyら（1997）、Dullら、1998、米国特許第6,013,516号、および同第5,994,136号に記載されており、それらの多くはレトロウイルス核酸を生成するために適応され得る。

【0384】

プロウイルスの両端には、通常、長末端反復（LTR）が認められる。LTRは通常、レトロウイルス核酸の末端に位置するドメインを含み、これらの天然配列の関連で、直接反復であり、U3、R、およびU5領域を含む。LTRは一般に、レトロウイルス遺伝子の発現（例えば、遺伝子転写物の促進、開始、およびポリアデニル化）およびウイルス複製を促進する。LTRは多数の調節シグナルを含むことができ、転写制御エレメント、ポリアデニル化シグナル、およびウイルスゲノムの複製と統合のための配列が含まれる。ウ

イルスのLTRは通常、U3、R、U5と呼ばれる3つの領域に分けられる。U3領域に通常、エンハンサーおよびプロモーターエレメントを含む。U5領域は通常、プライマー結合部位とR領域の間の配列であり、ポリアデニル化配列を含むことができる。R（リピート）領域は、U3およびU5領域によってフランキングされ得る。LTRは通常、U3、R、およびU5領域から構成され、ウイルスゲノムの5'および3'末端の両方に出現することができる。いくつかの実施形態では、5'LTRに隣接して、ゲノムの逆転写（tRNAプライマー結合部位）および粒子へのウイルスRNAの効率的なパッケージング（Psi部位）のための配列がある。

【0385】

パッケージングシグナルは、ウイルスカプシドまたは粒子へのウイルスRNAの挿入を媒介するレトロウイルスゲノム内に位置する配列を含むことができ、例えば、Cleverら、1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109を参照。いくつかのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのカプシド形成のために最小限のパッケージングシグナル（psi[Ψ]配列）を使用する。

10

【0386】

様々な実施形態において、レトロウイルス核酸は、改変された5'LTRおよび／または3'LTRを含む。LTRのいずれかまたは両方は、1つ以上の改変を含み得、限定されないが、1つ以上の欠失、挿入、または置換が含まれる。3'LTRの改変は、ウイルスを複製欠損、例えば、感染性ビリオンが生成されないように完全で有効な複製ができないウイルス（例えば、複製欠損レンチウイルスの子孫）にすることによって、レンチウイルスまたはレトロウイルス系の安全性を改善することがしばしば行われる。

20

【0387】

いくつかの実施形態において、ベクターは、自己不活性化（SIN）ベクター、例えば、複製欠損ベクター、例えば、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターであり、U3領域として知られる右（3'）LTRエンハンサー-プロモーター領域が、ウイルス複製の初回を超えてウイルス転写を防ぐように改変（例えば、欠失または置換によって）されている。これは、ウイルス複製の際に右（3'）LTR U3領域が左（5'）LTR U3領域のテンプレートとして使用され得、したがってU3エンハンサー-プロモーターの不在によってウイルス複製が阻害されるためである。実施形態において、3'LTRは、U5領域が除去、変更、または、例えば、外因性ポリ（A）配列によって置換されるように改変され、3'LTR、5'LTR、または3'および5'の両LTRは、改変されたLTRである得る。

30

【0388】

いくつかの実施形態において、5'LTRのU3領域は、ウイルス粒子の生成の際にウイルスゲノムの転写を推進するために異種プロモーターによって置換される。使用することができる異種プロモーターの例には、例えば、ウイルス性シミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、サイトメガロウイルス（CMV）（例えば、即時初期）、モロニーネズミ白血病ウイルス（MoMLV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、および単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーターが含まれる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、Tat非依存的様式で高レベルの転写を推進することができる。特定の実施形態において、異種プロモーターは、ウイルスゲノムが転写される様式を制御する追加の利点を有する。例えば、異種プロモーターは誘導性であり得、これによってウイルスゲノムの全部または一部の転写が、誘導要因が存在する場合にのみ生じる。誘導要因には、限定されないが、1つ以上の化合物、および宿主細胞が培養される温度またはpHなどの生理学的条件が含まれる。

40

【0389】

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、例えば、レンチウイルス（例えば、HIV）LTRのR領域に位置する、TAR（トランス活性化応答）エレメントを含む。このエレメントは、レンチウイルストランスアクチベーター（tat）遺伝子エレメントと相互作用して、ウイルス複製を高める。しかし、このエレメントは、例えば、5'LTR

50

RのU3領域が異種プロモーターによって置換される実施形態では必要とされない。

【0390】

R領域、例えば、キャッピング基の開始（すなわち、転写の開始）で始まり、ポリAトラクトの開始の直前に終了するレトロウイルスLTR内の領域は、U3およびU5領域によってフランキンクされ得る。R領域は、ゲノムの方の端から他方の端への新生DNAの移送における逆転写の際に役割を演じる。

【0391】

レトロウイルス核酸はまた、FLAPエレメント、例えば、配列がレトロウイルス、例えば、HIV-1またはHIV-2の中央ポリプリントラクトおよび中央終結配列（cPPTおよびCTS）を含む核酸、を含むことができる。好適なFLAPエレメントは、米国特許第6,682,907号およびZennouら、2000、Cell, 101:173に記載されており、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。HIV-1逆転写の際、中央ポリプリントラクト（cPPT）でのプラス鎖DNAの中央開始と、中央終結配列（CTS）での中央終結は、3本鎖DNA構造：HIV-1中央DNAフラップの形成をもたらすことができる。いくつかの実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクター骨格は、外因性薬剤をコードする遺伝子の上流または下流に1つ以上のFLAPエレメントを含む。例えば、いくつかの実施形態において、トランスファープラスミドは、FLAPエレメント、例えば、HIV-1から派生または単離されたFLAPエレメントを含む。

【0392】

実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルス核酸は、1つ以上の輸送エレメント、例えば、核から細胞の細胞質へのRNA転写物の輸送を調節するシス作用性転写後調節エレメントを含む。RNA輸送エレメントの例には、限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）rev応答エレメント（RRE）（例えば、Cullenら、1991、J. Virol. 65:1053、およびCullenら、1991、Cell 58:423を参照）、およびB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（HPRE）が含まれ、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。一般に、RNA輸送エレメントは遺伝子の3' UTR内に配置され、1つまたは多数のコピーとして挿入され得る。

【0393】

いくつかの実施形態において、ウイルスベクターにおける異種配列の発現は、転写後調節エレメント、ポリアデニル化部位、および転写終結シグナルのうちの1つ以上、例えば、それらのすべてをベクターに組み込むことによって増加する。様々な転写後調節エレメントは、タンパク質での異種核酸、例えば、ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント（WPRE；Zuffereyら、1999、J. Virol., 73:2886）、B型肝炎ウイルスに存在する転写後調節エレメント（HPRE）（Huangら、Mol. Cell. Biol., 5:3864）、（Liuら、1995、Genes Dev., 9:1766）などの発現を増加させることができ、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、WPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントを含む。

【0394】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、WPREまたはHPREなどの転写後調節エレメントを欠如し、または含まない。

【0395】

異種核酸転写物の終結およびポリアデニル化を指示するエレメントは、例えば、外因性薬剤の発現を増加させるために含まれ得る。転写終結シグナルは、ポリアデニル化シグナルの下流に認められ得る。いくつかの実施形態において、ベクターは外因性薬剤をコードするポリヌクレオチドのポリアデニル化配列3'を含む。ポリA部位は、RNAポリメラーゼIIによる新生RNA転写物の終結およびポリアデニル化の両方を指示するDNA配列を含み得る。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端へのポリAテールの付加によっ

てmRNAの安定性を促進して、翻訳効率の増加に寄与することができる。レトロウイルス核酸で 사용할 ことができるポリAシグナルの実例には、AATAAA、ATTA AA、AGTAAA、ウシ成長ホルモンpolyA配列(BGHpA)、ウサギβ-グロビンポリA配列(rβgpA)、または別の好適な異種または内因性ポリA配列が含まれる。

【0396】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、1つ以上のインスレーターエレメント、例えば、本明細書で説明されるインスレーターエレメントをさらに含む。

【0397】

様々な実施形態において、ベクターは、外因性薬剤をコードするポリヌクレオチドに操作可能に連結されたプロモーターを含む。ベクターは、1つ以上のLTRを有し得、いずれかのLTRは、ヌクレオチド置換、付加、または欠失などの1つ以上の改変を含む。ベクターはさらに、形質導入効率を増加させる1つ以上のアクセサリーエレメント(例えば、cPPT/FLAP)、ウイルスパッケージング(例えば、Psi(Ψ)パッケージングシグナル、RRE)、および/または外因性遺伝子発現を増加させる他のエレメント(例えば、ポリ(A)配列)を含み得、任意にWPREまたはHPREを含み得る。

【0398】

いくつかの実施形態において、レンチウイルス核酸は、1つ以上、例えば、5'から3'まで、プロモーター(例えば、CMV)、R配列(例えば、TARを含む)、U5配列(例えば、統合のため)、PBS配列(例えば、逆転写のため)、DIS配列(例えば、ゲノム二量体化のため)、psiパッケージングシグナル、部分的gag配列、RRE配列(例えば、核外輸送のため)、cPPT配列(例えば、核外輸送のため)、外因性薬剤の発現を促進するプロモーター、外因性薬剤をコードする遺伝子、WPRE配列(例えば、効率的な導入遺伝子発現のため)、PPT配列(例えば、逆転写のため)、R配列(例えば、ポリアデニル化および終結のため)、およびU5シグナル(例えば、統合のため)のうちの1つ以上、例えば、すべてを含む。

【0399】

スプライス部位を除去するように操作されたベクター

いくつかのレンチウイルスベクターは、内部活性遺伝子を統合し、異常な切断され得る転写物の形成をもたらす強いスプライシングおよびポリアデニル化シグナルを有する。

【0400】

癌原遺伝子活性化のメカニズムは、挿入変異原のゲノムに含まれるプロモーターエレメントまたはスプライス部位と、統合によって標的にされる細胞転写ユニットとの相互作用から生じるキメラ転写物の生成を含み得る(Gabrielaら、2009.Nat Med 15:1431-1436、Bokhovenら、J Virol 83:283-29)。ベクター配列および細胞mRNAを含むキメラ融合転写物は、ベクター配列から始まり、隣接する細胞遺伝子に進むリードスルー転写、またはその逆によるいずれかによって生成され得る。

【0401】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレンチウイルス核酸は、少なくとも2つのスプライス部位が、例えば、レンチウイルスベクターの安全性プロファイルを改善するために除去されているレンチウイルス骨格を含む。そのようなスプライス部位の種および特定の方法は、WO2012/156839A2に記載されており、これらはすべて参照によって含まれる。

【0402】

レトロウイルス生成法

大規模なウイルス粒子生成は、所望のウイルス力価を達成するためにしばしば有用である。ウイルス粒子は、ウイルスの構造および/またはアクセサリー遺伝子、例えば、gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx、もしくはnef遺伝子または他のレトロウイルス遺伝子を含むパッケージング細胞株にトランスファー

10

20

30

40

50

ベクターをトランスフェクトすることによって生成することができる。

【0403】

実施形態において、パッケージングベクターは、パッケージングシグナルを欠き、1、2、3、4つ以上のウイルス構造および／またはアクセサリ遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたはウイルスベクターである。通常、パッケージングベクターはパッケージング細胞に含まれ、トランスフェクション、形質導入、または感染を介して細胞に導入される。レトロウイルス、例えば、レンチウイルスのトランスファーベクターを、トランスフェクション、形質導入、または感染を介してパッケージング細胞株に導入して、供給源細胞または細胞株を生成することができる。パッケージングベクターは、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む標準的な方法によって、ヒト細胞または細胞株に導入することができる。いくつかの実施形態において、パッケージングベクターは、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストジシン、ゼオシン、チミジンキナーゼ、DHFR、Glnシンテターゼ、またはADAなどの主要な選択可能マーカーと共に細胞に導入され、その後、適切な薬剤の存在下での選択およびクローンの単離が続けられる。選択可能なマーカー遺伝子は、パッケージングベクター、例えば、IRESまたは自己切断ウイルスペプチドによってコードされる遺伝子に物理的に連結することができる。

【0404】

パッケージング細胞株には、パッケージングシグナルを含まないが、ウイルス粒子をパッケージングすることができるウイルス構造タンパク質および複製酵素（例えば、gag、pol、およびenv）を安定的または一時的に発現する細胞株が含まれる。任意の好適な細胞株、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を使用することができる。使用することができる好適な細胞株には、例えば、CHO細胞、BHK細胞、MDCK細胞、C3H10T1／2細胞、FLY細胞、Psi-2細胞、BOSC23細胞、PA317細胞、WEHI細胞、COS細胞、BSC1細胞、BSC40細胞、BMT10細胞、VERO細胞、W138細胞、MRC5細胞、A549細胞、HT1080細胞、293細胞、293T細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、HuH7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、および211A細胞が挙げられる。実施形態では、パッケージング細胞は、293細胞、293T細胞、またはA549細胞である。

【0405】

供給源細胞株は、組換えレトロウイルス粒子を生成することができる細胞株を含み、パッケージング細胞株およびパッケージングシグナルを含むトランスファーベクター構築体を含む。ウイルスストック溶液を調製する方法は、例えば、Y. Soneokaら（1995）Nuc l. Acids Res. 23: 628-633、およびN. R. Landauら（1992）J. Virol. 66: 5110-5113によって説明され、これらは参照によって本明細書に組み込まれる。感染性ウイルス粒子は、例えば、細胞溶解、または細胞培養物の上清の収集によって、パッケージング細胞から収集され得る。任意に、収集されたウイルス粒子は、豊富化または精製され得る。

【0406】

パッケージングプラスミドおよび細胞株

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、ウイルス粒子をパッケージングすることができるウイルス構造タンパク質および複製酵素（例えば、gag、polおよびenv）をコードする1つ以上のプラスミドを含む。いくつかの実施形態では、gag、pol、およびenv前駆体のうちの少なくとも2つをコードする配列は、同一プラスミドにある。いくつかの実施形態において、gag、pol、およびenv前駆体をコードする配列は、異なるプラスミドにある。いくつかの実施形態において、gag、pol、およびenv前駆体をコードする配列は、同一発現シグナル、例えば、プロモーターを有する。いくつかの実施形態では、gag、pol、およびenv前駆体をコードする配列は、異なる発現シグナル、例えば、異なるプロモーターを有する。いくつかの実施形態では、g

a g、p o l、およびe n v前駆体の発現は誘導性である。いくつかの実施形態において、ウイルス構造タンパク質および複製酵素をコードするプラスミドは、同時にまたは異なる時にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態において、ウイルス構造タンパク質および複製酵素をコードするプラスミドは、パッケージングベクターと同時にまたは異なる時にトランスフェクトされる。

【0407】

いくつかの実施形態において、供給源細胞株は、1つ以上の安定して統合されたウイルス構造遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、安定して統合されたウイルス構造遺伝子の発現は誘導可能である。

【0408】

いくつかの実施形態において、ウイルス構造遺伝子の発現は、転写レベルで調節される。いくつかの実施形態において、ウイルス構造遺伝子の発現は、翻訳レベルで調節される。いくつかの実施形態において、ウイルス構造遺伝子の発現は、翻訳後レベルで調節される。

【0409】

いくつかの実施形態において、ウイルス構造遺伝子の発現は、テトラサイクリン (T e t) 依存性システムによって調節され、T e t調節転写リプレッサー (T e t-R) は、プロモーターに含まれるDNA配列と結合し、立体障害によって転写を抑制する (Y a o ら、1998; J o n e s ら、2005)。ドキシサイクリン (d o x) の添加で、T e t-Rが放出され、転写が可能になる。多数の他の好適な転写調節プロモーター、転写因子、および小分子インデューサーは、ウイルス構造遺伝子の転写を調節するのに好適である。

【0410】

いくつかの実施形態では、T e t調節プロモーターの制御下にあり、抗生物質耐性カセットと結合された、第3世代レンチウイルス成分、ヒト免疫不全ウイルス1型 (H I V) R e v、G a g / P o l、およびエンベロープが、供給源細胞ゲノムに別々に統合される。いくつかの実施形態では、供給源細胞は、ゲノムに統合された、R e v、G a g / P o l、およびエンベロープタンパク質の各々の1つのコピーを有するのみである。

【0411】

いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードする核酸 (例えば、外因性薬剤をコードするレトロウイルス核酸) もまた、供給源細胞ゲノムに統合される。いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードする核酸は、エピソームによって維持される。いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードする核酸は、ゲノム内に安定して統合された R e v、G a g / P o l、およびエンベロープタンパク質を有する供給源細胞にトランスフェクトされる。例えば、M i l a n i ら、E M B O M o l e c u l a r M e d i c i n e, 2017を参照し、その全体が明細書に参照によって組み込まれる。

【0412】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、逆転写を受けることができない。そのような核酸は、実施形態では、外因性薬剤を一時的に発現することができる。レトロウイルスまたはV L Pは、無効化された逆転写酵素タンパク質を含み得、または逆転写酵素タンパク質を含み得ない。実施形態において、レトロウイルス核酸は、無効化されたプライマー結合部位 (P B S) および／またはa t t部位を含む。実施形態において、r e v、t a t、v i f、n e f、v p r、v p u、v p x、およびS 2またはそれらの機能的同等物を含む1つ以上のウイルスアクセサリ遺伝子は、無効化されるか、またはレトロウイルス核酸に存在しない。実施形態において、S 2、r e v、およびt a tから選択される1つ以上のアクセサリ遺伝子は、無効化されるか、またはレトロウイルス核酸に存在しない。

【0413】

レトロウイルス核酸をパッケージングするための戦略

通常、最新のレトロウイルスベクターシステムは、ウイルスRNAのウイルス粒子への

10

20

30

40

50

転写、逆転写、統合、翻訳、およびパッケージングのためのシス作用性ベクター配列を有するウイルスゲノム、および（２）ウイルス粒子の生成のために必要とされるトランス作用性レトロウイルス遺伝子配列（例えば、g a g、p o l、およびe n v）を発現するプロデューサー細胞株からなる。シスおよびトランス作用性ベクター配列を完全に分離することによって、ウイルスは感染の１サイクルを超えて複製を維持することができない。生きたウイルスの生成は、多くの戦略によって回避することができ、例えば、組換えを回避するためにシスおよびトランス作用性配列間の重複を最小することによる。

【０４１４】

ウイルスRNAを欠くかまたは欠如する配列を含むウイルスベクター粒子は、配列からウイルスRNAを除去または排除した結果であり得る。一実施形態では、これは、g a gにおける内因性パッケージングシグナル結合部位を使用することによって達成され得る。あるいは、内因性パッケージングシグナル結合部位はp o l上にある。この実施形態では、送達されるべきRNAは、同族のパッケージングシグナルを含む。別の実施形態では、送達されるべきRNAに位置する異種結合ドメイン（g a gに対して異種である）、およびg a gまたはp o lに位置する同族結合部位を使用して、送達されるべきRNAのパッケージングを確実にすることができる。異種配列は非ウイルス性であり得、またはそれはウイルス性であり得、その場合、それは異なるウイルスに由来し得る。ベクター粒子を使用して治療用RNAを送達することができ、その場合、機能的インテグラーゼおよび／または逆転写酵素は必要とされない。これらのベクター粒子はまた、目的の治療用遺伝子を送達するために使用することができ、その場合、通常、p o lが含まれる。

【０４１５】

一実施形態では、g a g-p o lが変異され、パッケージングシグナルが対応するパッケージングシグナルに置換される。この実施形態では、粒子は、新しいパッケージングシグナルによってRNAをパッケージングすることができる。この手法の利点は、ウイルス配列を欠くRNA配列、例えばRNA iをパッケージ化することが可能であることである。

【０４１６】

別の手法は、パッケージ化されるべきRNAの過剰発現に依存することである。一実施形態では、パッケージングされるべきRNAは、パッケージングシグナルを含むいずれかのRNAの不在下で過剰発現される。これは、かなりのレベルの治療用RNAがパッケージ化されることをもたらし得、この量は細胞に形質導入して生物学的効果を有するのに十分である。

【０４１７】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ウイルスg a gタンパク質またはレトロウイルスg a gおよびp o lタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、g a gタンパク質またはp o lタンパク質は、RNA配列中の対応する配列を認識してウイルスベクター粒子へのRNA配列のパッケージングを容易にすることができる異種RNA結合ドメインを含む。

【０４１８】

いくつかの実施形態において、異種RNA結合ドメインは、バクテリオファージコートタンパク質、R e vタンパク質、U 1小核リボヌクレオタンパク質粒子のタンパク質、N o v aタンパク質、T F 1 1 1 Aタンパク質、T I S 1 1タンパク質、t r p RNA-結合減衰タンパク質（T R A P）またはシュードウリジンシンターゼに由来するRNA結合ドメインを含む。

【０４１９】

いくつかの実施形態では、本明細書の方法は、複製能力のあるレトロウイルスの不在を検出または確認することを含む。この方法は、遺伝子産物がガンマレトロウイルスまたはレンチウイルスなどの複製能力のあるレトロウイルスに感染した特定の細胞において発現されるが、異種核酸で細胞に形質導入するために使用されるウイルスベクターに存在せず、複製能力のあるレトロウイルスを含まない細胞で存在および／または発現がされない、または予想されない、ウイルス遺伝子、例えば、構造遺伝子またはパッケージング遺伝子

などの1つ以上の標的遺伝子のRNAレベルを評価することを含み得る。複製能力のあるレトロウイルスは、1つ以上の標的遺伝子のRNAレベルが対照値より高い場合に存在することが決定され得、例えば標的遺伝子を含む陽性コントロール試料から直接的または間接的に測定することができる。詳細な開示については、WO 2018/023094 A1を参照。

【0420】

供給源細胞における外因性薬剤をコードする遺伝子の抑制

供給源細胞で（過剰）発現されたタンパク質は、ベクタービリオンアセンブリおよび／または感染性に間接的または直接的に影響を有し得る。ベクタービリオンへの外因性薬剤の取り込みも、ベクター粒子の下流プロセッシングに影響し得る。

10

【0421】

いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターを使用して、供給源細胞における外因性薬剤の発現を制限する。いくつかの実施形態において、異種翻訳制御システムが、真核細胞培養で使用され、供給源細胞における外因性薬剤の翻訳を抑制する。より具体的には、レトロウイルス核酸は、外因性薬剤をコードする遺伝子と操作可能に連結された結合部位を含み得、結合部位は、外因性薬剤の翻訳が供給源細胞において抑制または防止されるように、RNA結合タンパク質と相互作用することができる。

【0422】

いくつかの実施形態において、RNA結合タンパク質は、トリプトファンRNA結合減衰タンパク質（TRAP）、例えば、細菌性トリプトファンRNA結合減衰タンパク質である。RNA結合タンパク質（例えば、細菌性trpオペロンレギュレータータンパク質、トリプトファンRNA結合減衰タンパク質、TRAP）、およびそれが結合するRNA標的の使用は、供給源細胞内の導入遺伝子翻訳を抑制または防止する。このシステムは、ベクター生成細胞における導入遺伝子抑制システムまたはTRIPシステムと呼ばれる。

20

【0423】

実施形態では、NOI翻訳開始コドンの上流にRNA結合タンパク質（例えば、TRAP結合配列、tbs）の結合部位を配置することによって、内部発現カセットに由来するmRNAの翻訳の特異的抑制が可能になり、ベクターRNAの生成または安定性に有害な効果を有さない。外因性薬剤をコードする遺伝子のtbsと翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドの数は、0から12ヌクレオチドまで変化し得る。tbsは、内部リボソーム侵入部位（IRES）の下流に配置されて、マルチシストロンmRNAで外因性薬剤をコードする遺伝子の翻訳を抑制し得る。

30

【0424】

キルスイッチシステムおよび増幅

いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードする遺伝子を有するポリヌクレオチドまたは細胞は、自殺遺伝子、例えば、誘導性自殺遺伝子を利用して、直接的毒性および／または制御されない増殖のリスクを低減させる。特定の態様において、自殺遺伝子は、外因性薬剤を有する宿主細胞に免疫原性ではない。自殺遺伝子の例には、カスパーゼ-9、カスパーゼ-8、またはシトシンデアミナーゼが含まれる。カスパーゼ-9は、二量体化の特異的化学誘導物質（CID）を使用して活性化することができる。

40

【0425】

特定の実施形態において、ベクターは、標的細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞を、インビボで陰性選択に対して敏感である遺伝子セグメントを含む。例えば、形質導入された細胞は、個体のインビボ状態における変化の結果として排除され得る。陰性選択可能な表現型は、投与された薬剤、例えば、化合物に対して感受性を付与する遺伝子の挿入から生じ得る。陰性選択可能な遺伝子は当技術分野で知られており、とりわけ、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ（HSV-ITK）遺伝子（Wiglerら、Cell 111: 223, 1977）、細胞のヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T）遺伝子、細胞のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（APRT）遺伝子、および細菌のシトシンデアミナーゼ

50

(Mullenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))が含まれる。

【0426】

いくつかの実施形態において、形質導入された細胞、例えば、T細胞などの免疫エフェクター細胞は、インビトロで陽性選択可能な表現型の細胞の選択を可能にする陽性マーカーをさらに含むポリヌクレオチドを含む。陽性選択マーカーは、標的細胞に導入されると、遺伝子を有する細胞の陽性選択を可能にする優性表現型を発現する遺伝子であり得る。このタイプの遺伝子には、とりわけ、ハイグロマイシンBに対する耐性を付与するハイグロマイシン-Bホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hph)、抗生物質G418に対する耐性をコードするTn5からのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子(neoまたはaph)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子(ADA)、および多剤耐性(MDR)遺伝子が含まれる。

【0427】

いくつかの実施形態では、陽性選択可能マーカーおよび陰性選択可能エレメントは、陰性選択可能エレメントの喪失が必然的に陽性選択可能マーカーの喪失も伴うように連結される。例えば、陽性および陰性の選択可能なマーカーを融合して、一方の損失は、必然的に他方の損失をもたらすことができる。上記の所望の陽性および陰性選択機能の両方を付与するポリペプチドを発現産物として生成する融合ポリヌクレオチドの例は、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼチミジンキナーゼ融合遺伝子(HyTK)である。この遺伝子の発現は、インビトロでの陽性選択についてハイグロマイシンB耐性を、インビボでの陰性選択についてガンシクロビル感受性を付与するポリペプチドを生成する。Lupton S. D.ら、Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991を参照。さらに、実施形態において、キメラ受容体をコードするポリヌクレオチドは、融合遺伝子、特にインビトロでの陽性選択についてハイグロマイシンB耐性、およびインビボでの陰性選択についてガンシクロビル感受性を付与するものを含むレトロウイルスベクター、例えば、Lupton, S. D.ら(1991)、前出に記載されたHyTKレトロウイルスベクターである。有力な陽性選択可能マーカーと陰性選択可能マーカーとの融合に由来する二重機能性選択可能融合遺伝子の使用を説明している、PCT U591/08442およびPCT/U594/05601の公開も。

【0428】

好適な陽性選択マーカーは、hph、nco、およびgptからなる群から選択される遺伝子に由来し、好適な陰性選択マーカーは、シトシンデアミナーゼ、HSV-ITK、VZVTk、HPRt、ARRt、およびgptからなる群から選択される遺伝子に由来し得る。他の好適なマーカーは二重機能性選択可能融合遺伝子であり、陽性選択可能マーカーはhphまたはneoに由来し、陰性選択可能マーカーはシトシンデアミナーゼもしくはTK遺伝子または選択可能マーカーに由来する。

【0429】

レンチウイルス統合を調節するための戦略

レトロウイルスまたはレンチウイルスゲノムの標的細胞ゲノムへの統合を防ぐために、重要なタンパク質／配列が欠如しているかまたは無効にされているレトロウイルスおよびレンチウイルス核酸が開示される。例えば、レトロウイルスインテグラーゼの高度に保存されたDDEモチーフを構成する各アミノ酸の各々を欠くウイルス核酸(EngelmanおよびCraigie (1992) J. Virol. 66:6361-6369、Johnsonら(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7648-7652、Khanら(1991) Nucleic Acids Res. 19:851-860)は、統合欠損レトロウイルス核酸の生成を可能にする。

【0430】

例えば、いくつかの実施形態では、本明細書のレトロウイルス核酸は、インテグラーゼをウイルスゲノムの細胞ゲノムへの統合に触媒作用を及ぼすことを不可能にさせる変異を含むレンチウイルスインテグラーゼを含む。いくつかの実施形態において、変異は、統合

に直接的に影響を与えるⅠ型変異、またはビリオン形態形成および／または逆転写に影響を与える多面発現欠損を誘発するⅡ型変異である。Ⅰ型変異の例示的な非限定的な例は、インテグラーゼの触媒コアダメインに関与する3つの残基である、 $DX_{39\sim58}DX_{35}E$ （ $HIV-1$ のインテグラーゼの $D64$ 、 $D116$ 、および $E152$ 残基）のいずれかに影響を与えるこれらの変異である。特定の実施形態において、インテグラーゼをウイルスゲノムの細胞ゲノムへの統合に触媒作用を及ぼすことを不可能にさせる変異は、インテグラーゼの触媒コアダメインの DDE モチーフの1つ以上のアミノ酸残基の置換、好ましくは DDE モチーフの最初のアスパラギン酸残基のアスパラギン残基による置換である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、インテグラーゼタンパク質を含まない。

10

【0431】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスは、活性な転写ユニットを統合する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスは、転写開始部位である遺伝子の5'末端、または $DNAse1$ 切断部位の付近に統合しない。いくつかの実施形態では、レトロウイルス統合は、活性な癌原遺伝子または不活性な腫瘍抑制遺伝子を行わない。いくつかの実施形態において、レトロウイルスは遺伝毒性ではない。いくつかの実施形態では、レンチウイルスはイントロンを統合する。

【0432】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、特定のコピー数で標的細胞のゲノムを統合する。平均コピー数は、単一の細胞、細胞の集団、または個々の細胞コロニーから決定され得る。コピー数を決定するための例示的な方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびフローサイトメトリーが含まれる。

20

【0433】

いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードするDNAは、ゲノムに統合される。いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードするDNAは、エピソームによって維持される。いくつかの実施形態において、外因性薬剤をコードするエピソームDNAに対する統合された比は、少なくとも0.01、0.1、0.5、1.0、2、5、10、100である。

【0434】

いくつかの実施形態では、外因性薬剤をコードするDNAは線状である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤をコードするDNAは環状である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤をコードする環状DNAコピーに対する線状コピーの比は、少なくとも0.01、0.1、0.5、1.0、2、5、10、100である。

30

【0435】

実施形態では、外因性薬剤をコードするDNAは、1つのLTRを有する環状である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤をコードするDNAは、2つのLTRを有する環状である。いくつかの実施形態では、外因性薬剤をコードするDNAを含む環状の2つのLTRに対する外因性薬剤をコードするDNAを含む環状の1つのLTRの比は、少なくとも0.1、0.5、1.0、2、5、10、20、50、100である。

【0436】

エピソームウイルスの維持

統合が不足しているレトロウイルスでは、逆転写（retrotranscription）の環状cDNA副産物（例えば、1-LTRおよび2-LTR）は、宿主ゲノムに統合されることなく細胞核に蓄積し得る（Yanez-Munoz RJら、Nat. Med. 2006, 12:348-353を参照）。他の外因性DNAのように、これらの中間体は、次いで、同じ頻度（例えば、 $10^3 \sim 10^5$ /細胞）で細胞DNAに統合されることができる。

40

【0437】

いくつかの実施形態において、エピソームレトロウイルス核酸は複製しない。エピソームウイルスDNAは、真核生物の複製起点および核マトリックスとの結合のためのスキャ

50

ホルド／マトリックス結合領域（S／MAR）の含有によって、複製細胞で維持されるように改変することができる。

【0438】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、真核生物の複製起点またはその変異体を含む。対象となる真核生物の複製起点の例は、Aladjemら（Science, 1995, 270: 815-819）によって報告されているβ-グロビン遺伝子の複製起点、Priceら、Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(22): 19649-59によって報告されているサルCV-1細胞およびヒト皮膚線維芽細胞から既に単離されているアルファ-サテライト配列と結合された自律複製配列に由来するコンセンサス配列、McWinneyおよびLeffak（McWinney C. および Leffak M., Nucleic Acid Research 1990, 18(5): 1233-42）によって報告されているヒトc-mycプロモーター領域の複製起点である。実施形態において、変異体は、真核生物において複製を開始する能力を実質的に維持する。複製を開始する特定の配列の能力は、任意の好適な方法、例えば、プロモデオキシウリジン取り込みおよび密度シフトに基づく自律複製アッセイによって決定することができる（Araujo F. D. ら、前出；Frappier L. ら、前出）。

【0439】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、スキャホルド／マトリックス結合領域（S／MAR）またはその変異体、例えば、長さが数百塩基対の非コンセンサス様ATリッチDNAエレメントを含み、タンパク質スキャホルドまたは細胞核のマトリックスへの断続的な結合によって、真核生物ゲノムの核DNAをクロマチンドメインに編成する。それらは通常、フランキング領域、クロマチン境界領域、およびイントロンなどの非コード化領域に認められる。S／MAR領域の例は、Bodeら（Bode J. ら、Science, 1992, 255: 195-7）によって報告されているヒトIFN-γ遺伝子（hIFN-γ^{large}）の1.8 kbpのS／MAR、Ramezani（Ramezani A. ら、Blood 2003, 101: 4717-24）によって報告されているヒトIFN-γ遺伝子（hIFN-γ^{short}）のS／MARの0.7 kbp最小領域、Mesner L. D. ら、Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 3281-86）によって報告されているヒトデヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（hDHFR）のS／MARの0.2 Kbp最小領域である。実施形態では、S／MARの機能的に同等な変異体は、S／MAR機能に寄与することが共同または単独で示唆されている6つの規則のセットに基づいて選択される配列である（Kramerら（1996）Genomics 33, 305、Singhら（1997）Nucl. Acids Res 25, 1419）。これらの規則は、genomecluster.secs.oakland.edu/MAR-Wizで無料で入手可能なMAR-Wizコンピュータプログラムに併合されている。実施形態において、変異体は、それが由来するS／MARの同じ機能、特に、核、マトリックスと特異的に結合する能力を実質的に維持する。当業者は、特定の変異体が核マトリックスに特異的に結合することができるか、例えば、Mesnerら（Mesner L. D. ら、前出）によって報告されたインビトロまたはインビボMARアッセイによって決定することができる。いくつかの実施形態では、特定の変異体がDNA鎖分離の傾向を示す場合、特定の配列はS／MARの変異体である。この特性は、平衡統計力学の方法に基づく特定のプログラムを使用して決定することができる。ストレス誘発性二本鎖不安定化（SIDD）分析手法は、「[...]」高次ラセンストレスの負荷されたレベルが各DNA配列に沿った各位置で二重鎖を開くために必要とされる自由エネルギーを減少させる程度を計算する。結果はSIDDプロファイルとして表され、強い不安定化の部位が深い最小値として示される「[...]」として、Bodeら（2005）J. Mol. Biol. 358, 597で定義されている。SIDDアルゴリズムと数学的基礎（BiおよびBenham（2004）Bioinformatics 20, 1477）、およびSIDDプロファイルの分析は、WebSIDD（w

10

20

30

40

50

ww.genomecenter.ucdavis.edu/benham) で無料で入手可能なインターネットリソースを使用して実施することができる。したがって、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、それがS/MARと同様なSIDDプロファイルを示す場合、S/MAR配列の変異体と考えられる。

【0440】

フソゲンおよび偽型化

フソゲンは、ウイルスエンベロープタンパク質(env)を含み、一般に、フソソームによって感染されて形質転換され得る宿主細胞の範囲を決定する。HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、およびEIVなどのレンチウイルスの場合、ネイティブenvタンパク質はgp41およびgp120を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で説明される供給源細胞によって発現されるウイルスenvタンパク質は、既に報告されているように、ウイルスのgagおよびpol遺伝子とは別のベクターでコードされる。

【0441】

使用することができるレトロウイルス由来のenv遺伝子の実例には、限定されないが、MLVエンベロープ、10A1エンベロープ、BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、エボラ、センダイ、FPV（トリペストウイルス）、およびインフルエンザウイルスエンベロープが含まれる。同様に、RNAウイルス（例えば、ピコornaウイルス科、カルシビル科、アストロウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、レトロウイルス科のRNAウイルス科）、ならびにDNAウイルス（ヘパドナウイルス科、サーコウイルス科、パルボウイルス科、パポウイルス科、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポキシーウイルス科、イリドウイルス科の科）からのエンベロープをコードする遺伝子が利用され得る。代表的な例には、FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10、およびEIAVが挙げられる。

【0442】

いくつかの実施形態において、フソソームでの提示のためのエンベロープタンパク質は、限定されないが、以下の供給源のいずれかを含み、H1N1、H1N2、H3N2およびH5N1（鳥インフルエンザ）などのインフルエンザA、インフルエンザB、インフルエンザCウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ノーウォークウイルス群の任意のウイルス、腸内アデノウイルス、パルボウイルス、デングフィーバーウイルス、モンキーポックス、モノネガウイルス、狂犬病ウイルスなどのリサウイルス、ラゴスバットウイルス、モコラウイルス、デュベンヘイジウイルス、ヨーロッパのコウモリウイルス1および2、オーストラリアコウモリウイルス、エフェメロウイルス、ベシキュロウイルス、小胞性口内炎ウイルス(VSV)、単純ヘルペスウイルス1型および2型などのヘルペスウイルス、バリセラ帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ヒトヘルペスウイルス(HHV)、ヒトヘルペスウイルス6型および8型、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、乳頭腫ウイルス、ネズミガンマヘルペスウイルス、アルゼンチン出血熱ウイルスなどのアリーナウイルス、ボリビア出血熱ウイルス、サビア関連出血熱ウイルス、ベネズエラ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、マチュポウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスなどのブニヤウイルス科、ハンタウイルス、腎症候群を引き起こす出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、エボラ出血熱およびマールブルグ出血熱を含むフィロウイルス科(フィロウイルス)、カイサヌール森林病ウイルスを含むフラビウイルス科、オムスク出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎を引き起こすウイルスおよびヘンドラウイルスとニパウイルスなどのパラミクソウイルス科、バリオラメジャーおよびバリオラマイナー(スモールポックス)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルスなどのアルファウイルス科、西部ウマ脳炎ウイルス、

10

20

30

40

50

SARS 関連コロナウイルス (SARS-CoV)、西ナイルウイルス、脳炎を引き起こすいずれかのウイルスが挙げられる。

【0443】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明される供給源細胞は、フソソーム、例えば、組換えレトロウイルス、例えば、VSV-G糖タンパク質で偽型化されたレンチウイルスを生成する。

【0444】

フソソームまたは偽型ウイルスは、一般に、そのエンベロープタンパク質のうちの1つ以上に改変を有し、例えば、エンベロープタンパク質は、別のウイルスに由来するエンベロープタンパク質で置換される。例えば、HIVは水疱性口内炎ウイルスGタンパク質 (VSV-G) エンベロープタンパク質で偽型化され得、HIVをより広範囲の細胞に感染させることが可能になり、これはHIVエンベロープタンパク質 (env遺伝子によってコードされる) は通常、本ウイルスをCD4+提示細胞に標的化させるためである。いくつかの実施形態において、レンチウイルスエンベロープタンパク質は、VSV-Gで偽型化される。一実施形態では、供給源細胞は、VSV-Gエンベロープ糖タンパク質で偽型化された組換えレトロウイルス、例えばレンチウイルスを生成する。

【0445】

さらに、フソゲンまたはウイルスエンベロープタンパク質は、形質導入ベクターがその通常範囲外の宿主細胞を標的にして感染することを可能にし、またはより具体的には細胞または組織タイプへの形質導入を制限することを可能にするポリペプチド配列を含むように改変または操作することができる。例えば、フソゲンまたはエンベロープタンパク質は、受容体リガンド、抗体 (抗体の抗原結合部分または単鎖抗体などの組換え抗体型分子を使用する) などの標的配列とインフレイムで結合することができ、ポリペプチド部分またはその修飾 (例えば、グリコシル化部位が標的配列に存在する場合) は、形質導入ベクターコート上に提示されるとき、目的の標的細胞へのビリオン粒子の直接送達を容易にする。さらに、エンベロープタンパク質は、細胞機能を調節する配列をさらに含むことができる。細胞機能を形質導入ベクターで調節することによって、細胞の混合集団中における特定の細胞タイプについて形質導入効率を増加または減少させ得る。例えば、幹細胞は、血液または骨髄で認められる他の細胞型よりもむしろ、幹細胞に特異的に結合するリガンドまたは結合パートナーを含むエンベロープ配列によって、より特異的に形質導入することができる。非限定的な例は、幹細胞因子 (SCF) およびFLT-3リガンドである。他の例には、例えば、抗体 (例えば、細胞型に特異的な単鎖抗体)、および肺、肝臓、脾臓、心臓、内皮、平滑、乳房、前立腺、上皮、血管の癌などの組織と結合する基本的に任意の抗原 (受容体を含む) が含まれる。

【0446】

例示的なフソゲン

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、例えば、レトロウイルスベクターまたはVLPと膜、例えば、細胞膜との融合を促進するために、1つ以上のフソゲンを含む。

【0447】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、特定の細胞または組織タイプを標的とするために、そのエンベロープに1つ以上のフソゲンを含む。フソゲンには、限定されないが、タンパク質ベース、脂質ベース、および化学物質ベースのフソゲンが含まれる。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、タンパク質フソゲンである第1のフソゲンおよび、脂質フソゲンまたは化学物質フソゲンである第2のフソゲンを含む。フソゲンは、標的細胞の表面上のフソゲン結合パートナーと結合し得る。いくつかの実施形態において、フソゲンを含むレトロウイルスベクターまたはVLPは、膜を標的細胞の脂質二重層に統合する。

【0448】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソゲンのうちの1つ以上は、レ

10

20

30

40

50

トロウイルスベクターまたはVLPに含まれ得る。

【0449】

タンパク質フソゲン

いくつかの実施形態において、フソゲンは、タンパク質フソゲン、例えば、哺乳動物タンパク質または哺乳動物タンパク質のホモログ（例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える同一性を有する）、ウイルスタンパク質またはウイルスタンパク質のホモログ（例えば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを超える同一性を有する）などの非哺乳動物タンパク質、天然タンパク質または天然タンパク質の誘導体、合成タンパク質、それらのフラグメント、それらの変異体、フソゲンまたはフラグメントのうちの1つ以上を含むタンパク質、およびそれらの任意の組み合わせである。

【0450】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、レトロウイルスベクターまたはVLP中の脂質と標的細胞中の脂質との間の混合をもたらす。いくつかの実施形態において、フソゲンは、レトロウイルスベクターまたはVLPの内部と標的細胞のサイトゾルとの間に1つ以上の孔の形成をもたらす。

【0451】

哺乳動物タンパク質

いくつかの実施形態において、フソゲンは、哺乳動物タンパク質を含み得、表1を参照する。哺乳動物のフソゲンの例には、限定されないが、vSNAREおよびtSNAREなどのSNAREファミリータンパク質、シンシチン-1（DOI:10.1128/JVI.76.13.6442-6452.2002）およびシンシチン-2などのシンシチンタンパク質、ミオマーカ（myomaker）（[biorxiv.org/content/early/2017/04/02/123158](https://doi.org/10.1101/123158)、doi.org/10.1101/123158、[doi:10.1096/fj.201600945R](https://doi.org/10.1096/fj.201600945R)、[doi:10.1038/nature12343](https://doi.org/10.1038/nature12343)）、ミオミキサー（myomixer）（www.nature.com/nature/journal/v499/n7458/full/nature12343.html、[doi:10.1038/nature12343](https://doi.org/10.1038/nature12343)）、ミオマーガ（myomerg）（science.sciencemag.org/content/early/2017/04/05/science.aam9361、DOI:10.1126/science.aam9361）、FGFR1（線維芽細胞成長因子受容体様1）、ミニオン（doi.org/10.1101/122697）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のアイソフォーム（例えば、米国特許第6,099,857A号に開示されている）、コネキシン43、コネキシン40、コネキシン45、コネキシン32、またはコネキシン37などのgag連結タンパク質（例えば、米国特許第2007/0224176号に開示されている）、Hap2、異種細胞間でシンシチン形成を誘導することができる任意のタンパク質（表2を参照）、フソゲン特性を有する任意のタンパク質（表3を参照）、それらのホモログ、それらのフラグメント、それらの変異体、およびそれらの1つ以上のタンパク質またはフラグメントを含むタンパク質融合物が含まれ得る。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ヒトゲノムで認められるヒト内在性レトロウイルスエレメント（HERV）によってコードされる。追加の例示的なフソゲンは、米国特許第6,099,857A号および米国特許第2007/0224176号に開示されており、その全容は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1：ヒトおよび非ヒトフソゲンの非限定的な例。

ヒトおよび非ヒトのフソゲンクラス		
フソゲンクラス	Uniprot タンパク質ファミリーID	配列番号
EFF-AFF	PF14884	191
SNARE	PF05739	5977
DC-STAMP	PF07782	633
ENV	PF00429	312

【表 2 - 1】

表 2：フソゲン特性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

遺伝子オントロジー注釈を有するヒト遺伝子: 原形質膜融合タンパク質によるシンシチウム形成	
ID	シンボル
A0A024R0I0	DYRK1B
A0A024R1N1	MYH9
A0A024R2D8	CAV3
A0A096LNV2	FER1L5
A0A096LPA8	FER1L5
A0A096LPB1	FER1L5
A0AVI2	FER1L5
A6NI61	TMEM8C (ミオマーカー)
B3KSL7	-
B7ZLI3	FER1L5
H0YD14	MYOF
O43184	ADAM12
O60242	ADGRB3
O60500	NPHS1
O95180	CACNA1H
O95259	KCNH1
P04628	WNT1
P15172	MYOD1
P17655	CAPN2
P29475	NOS1
P35579	MYH9
P56539	CAV3
Q2NNQ7	FER1L5

10

20

30

40

50

【表 2－2】

Q4KMG0	CCON
Q53GL0	PLEKHO1
Q5TCZ1	SH3PXD2A
Q6YHK3	CD109
Q86V25	VASH2
Q99697	PITX2
Q9C0D5	TANC1
Q9H295	DCSTAMP
Q9NZM1	MYOF
Q9Y463	DYRK1B

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : ヒトフソゲン候補

フソゲンクラス	遺伝子 ID
SNARE	O15400
	Q16623
	K7EQB1
	Q86Y82
	E9PN33
	Q96NA8
	H3BT82
	Q9UNK0
	P32856
	Q13190
	O14662
	P61266
	O43752
	O60499
	Q13277
	B7ZBM8
DC-STAMP	A0AVG3
	Q12846
	Q9H295
	Q5T1A1
	Q5T197
	E9PJX3
ENV	Q9BR26
	Q9UQF0
	Q9N2K0
	P60507
	P60608
	B6SEH9
	P60508
	B6SEH8
	P61550
	P60509
筋融合 (ミオマーカー)	Q9N2J8
	H0Y5B2
	H7C1S0
	Q9HCN3
	A6NDV4
筋融合 (ミオミキサー)	K4DI83
	NP_001302423.1
	ACT64390.1
	XP_018884517.1
	XP_017826615.1

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	XP_020012665.1
	XP_017402927.1
	XP_019498363.1
	ELW65617.1
	ERE90100.1
	XP_017813001.1
	XP_017733785.1
	XP_017531750.1
	XP_020142594.1
	XP_019649987.1
	XP_019805280.1
	NP_001170939.1
	NP_001170941.1
	XP_019590171.1
	XP_019062106.1
	EPQ04443.1
	EPY76709.1
	XP_017652630.1
	XP_017459263.1
	OBS58441.1
	XP_017459262.1
	XP_017894180.1
	XP_020746447.1
	ELK00259.1
	XP_019312826.1
	XP_017200354.1
	BAH40091.1
HA	P03452
	Q9Q0U6
	P03460
GAP 連結	P36382
	P17302
	P36383
	P08034
	P35212
他	FGFRL1
	GAPDH

【0452】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、湾曲生成タンパク質、例えば、エプシン1、ダイナミン、またはBARDメインを含むタンパク質を含む。例えば、Kozlovら、Curr Opin Struc Bio 2015, Zimmerbergら、Nat Rev 2006、Richardら、Biochem J 2011を参照。

【0453】

非哺乳動物タンパク質
ウイルスタンパク質

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、フソゲンは、非哺乳動物タンパク質、例えば、ウイルスタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスフソゲンは、クラスEウイルス膜融合タンパク質、クラスE Eウイルス膜タンパク質、クラスE E Eウイルス膜融合タンパク質、ウイルス膜糖タンパク質、または他のウイルス融合タンパク質、あるいはそれらのホモログ、それらのフラグメント、それらの変異体、またはそれらの1つ以上のタンパク質またはフラグメントを含むタンパク質融合物である。

【0454】

いくつかの実施形態において、クラスEウイルス膜融合タンパク質には、限定されないが、バキュロウイルスFタンパク質、例えば、核多角体病ウイルス(NPV)属のFタンパク質、例えば、シロイチモジヨトウMNPV(SeMNPV)Fタンパク質およびマイマイガMNPV(LdMNPV)、ならびにパラミクソウイルスFタンパク質が含まれる。

10

【0455】

いくつかの実施形態では、クラスE Eウイルス膜タンパク質には、限定されないが、ダニ骨脳炎E(TBEVE)、セムリキ森林ウイルスE1/E2が含まれる。

【0456】

いくつかの実施形態において、クラスE E Eウイルス膜融合タンパク質には、限定されないが、ラプトウイルスG(例えば、小胞性胃炎ウイルス(VSV-G)の融合性タンパク質G)、ヘルペスウイルス糖タンパク質B(例えば、単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)gB)、エプスタインバーウイルス糖タンパク質B(EBVgB)、トゴトウイルスG、バキュロウイルスgp64(例、オートグラフィアカリフォルニアマルチプルNPV(AcMNPV)gp64)、およびボルナ病ウイルス(BDV)糖タンパク質(BDVG)が含まれる。

20

【0457】

他のウイルスフソゲン、例えば、膜糖タンパク質およびウイルス融合タンパク質の例には、限定されないが、インフルエンザ血球凝集素(HA)または変異体などのウイルス合胞体タンパク質、またはそれらの融合タンパク質、ヒト免疫不全ウイルス1型エンベロープタンパク質(HIV-1ENV)、リンパ球合胞体を形成するHIV結合LFA-1由来のgp120、HIVgp41、HIVgp160、またはHIV転写トランスアクチベーター(TAT)、ウイルス糖タンパク質VSV-G、ラプトウイルス科の水疱性口内炎ウイルス由来のウイルス糖タンパク質、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の糖タンパク質gBおよびgH-gL、ネズミ白血病ウイルス(MLV)-10A1、テナガザル白血病ウイルス糖タンパク質(GaLV)、狂犬病、モコラ、水疱性口内炎ウイルスおよびトガウイルスのG型糖タンパク質、ネズミ肝炎ウイルスJHM表面突起タンパク質、ブタ呼吸器コロナウイルススパイクおよび膜糖タンパク質、鳥類伝染性気管支炎スパイク糖タンパク質とその前駆体、ウシ腸コロナウイルススパイクタンパク質、麻疹ウイルスのFおよびH、HNまたはG遺伝子、イヌジステンパーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス3、シミアンウイルス41、センダイウイルスおよびヒト呼吸器合胞体ウイルス、シャペロンタンパク質gLを有するヒトヘルペスウイルス1型および水痘帯状疱疹ウイルスのgH、ヒト、ウシ、およびオナガザルヘルペスウイルスgB、フレンドネズミ白血病ウイルスおよびメイソンファイザーモンキーウイルスのエンベロープ糖タンパク質、おたふく風邪ウイルス血球凝集素ノイラミニダーゼ、およびグリオプロテインF1およびF2、ベネズエラウマ脳脊髄炎の膜糖タンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、SIVgp160タンパク質、エボラウイルスGタンパク質、またはセンダイウイルス融合タンパク質、あるいはそれらのホモログ、それらのフラグメント片、それらの変異体、ならびにそれらの1つ以上のタンパク質またはそのフラグメントを含むタンパク質融合が含まれる。

30

40

【0458】

非哺乳動物フソゲンには、ウイルスフソゲン、それらのホモログ、それらのフラグメント、およびそれらの1つ以上のタンパク質またはそのフラグメントを含む融合タンパク質が含まれる。ウイルス性フソゲンには、クラスEフソゲン、クラスE Eフソゲン、クラス

50

III フソゲン、およびクラスIV フソゲンが含まれる。実施形態において、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) gp41 などのクラスI フソゲンは、中央のコイルドコイル構造を伴う α ヘリックスヘアピンのシグネチャー三量体を有する特徴的な融合後構造を有する。クラスI ウイルス融合タンパク質には、中央の融合後6ヘリックスバンドルを有するタンパク質が含まれる。クラスI ウイルス融合タンパク質には、インフルエンザHA、パラインフルエンザF、HIV Env、Ebola GP、オルトミクソウイルス由来の血球凝集素、パラミクソウイルス由来のFタンパク質 (例えば、麻疹、(Katohら、BMC Biotechnology 2010, 10:37))、レトロウイルスに由来するENVタンパク質、およびフィロウイルスとコロナウイルスのフソゲンが含まれる。実施形態では、デング熱E糖タンパク質などのクラスII ウイルスフソゲンは、ヘアピンの三量体をもたらすようにリフォールディングする細長い外部ドメインを形成する β シートの構造的シグナチャーを有する。実施形態では、クラスII ウイルスフソゲンは、中央のコイルドコイルを欠いている。クラスII ウイルスフソゲンは、アルファウイルス (例えば、E1タンパク質) およびフラビウイルス (例えば、E糖タンパク質) に認められることができる。クラスII ウイルスフソゲンには、セムリキ森林ウイルス、シンビス、風疹ウイルス、およびデング熱ウイルスに由来するフソゲンが含まれる。実施形態において、水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質などのクラスIII ウイルスフソゲンは、クラスI およびII に認められる構造的シグナチャーを組み合わせる。実施形態において、クラスIII ウイルスフソゲンは、 α ヘリックス (例えば、クラスI ウイルスフソゲンと同様にタンパク質を折り返すために6ヘリックスバンドルを形成する)、およびその末端に両親媒性融合ペプチドを有する β シートを含み、クラスII ウイルスを暗示させる。クラスIII ウイルスフソゲンは、ラブドウイルスおよびヘルペスウイルスに認められ得る。実施形態では、クラスIV ウイルスフソゲンは、融合関連小膜貫通 (FAST) タンパク質であり (doi:10.1038/sj.emboj.7600767、Nesbitt, Rael., "Targeted Intracellular Therapeutic Delivery Using Liposomes Formulated with Multifunctional FAST proteins" (2012) Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 388)、非エンベロープレオウイルスによってコードされる。実施形態では、クラスIV ウイルスフソゲンは、ヘアピンを形成しないほど小さい (doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122422、doi:10.1016/j.devcel.2007.12.008)。

【0459】

いくつかの実施形態において、フソゲンはパラミクソウイルスフソゲンである。いくつかの実施形態において、フソゲンは、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイルスFタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFタンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルスFタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、またはアブラウイルスFタンパク質である。

【0460】

いくつかの実施形態において、フソゲンはポックスウイルス科のフソゲンである。

【0461】

追加の例示的なフソゲンは、US9,695,446、US2004/0028687、US6,416,997、US7,329,807、US2017/0112773、US2009/0202622、WO2006/027202、およびUS2004/0009604に開示されており、これらすべての全容は本明細書に参照により組み込まれる。

【0462】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソゲンは、表4のアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%

10

20

30

40

50

、もしくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは、配列の一部、例えば、長さが１００、２００、３００、４００、５００、もしくは６００個のアミノ酸の部分と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソゲンは、表４の任意のアミノ酸配列と少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される核酸配列は、表４のアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが４０、５０、６０、８０、１００、２００、３００、４００、５００、または６００個のアミノ酸の部分と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

10

【０４６３】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソゲンは、配列番号１～５６のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが１００、２００、３００、４００、５００、または６００個のアミノ酸の部分と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソゲンは、配列番号１～５６のうちのいずれか１つで示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される核酸配列は、配列番号１～５６のうちのいずれか１つに示されるアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが４０、５０、６０、８０、１００、２００、３００、４００、５００、または６００個のアミノ酸の部分と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

20

30

40

50

【表 4－1】

表 4. パラミクソウイルス F 配列クラスター。列 1、Genbank ID には、クラスターの重心配列であるウイルスの全ゲノム配列の Genbank ID が含まれる。列 2、CDS のヌクレオチドは、全ゲノムの遺伝子の CDS に対応するヌクレオチドを示す。列 3、全遺伝子名は、Genbank ID、ウイルス種、株、およびタンパク質名を含む遺伝子のすべての名称を示す。列 4、配列は、遺伝子のアミノ酸配列を示す。列 5、配列数/クラスターは、この重心配列でクラスター化する配列の数を示す。

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
KP317927	5630-7399	gb: KP317927: 5630-7399 生物: ヒト呼吸器合胞体ウイルス 株名: Kilifi_9465_7_RSVB_2011 タンパク質名: 融合糖タンパク質 遺伝子記号: F	MIPQARTELNLGQITMELLIHRSSAIFL TLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAV SRGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKET KCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMN YTINTTGSLSNVSISKRRKRRFLGFLG VGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNKIKN ALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDDL KNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEF QQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTY MLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSS NVQIVRQQSYSIMSHKEEVLAYVVQL PIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGS NICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAD TCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLC NTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSN GCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNL EGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSPDEFD ASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNV NTGKSTTNIMITAHIVIVVLLSLIAIGL LLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIAFS K	993	1
AB524405	4556-6217	gb: AB524405: 4556-6217 生物: ニューカッスル病ウイルス 株名: ガチョウ /Alaska/415/91 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MDPKPSTSYLHAFPLIFVAISLVFMAG RASALDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIY TSSQTGTIIKLLPNMPKDKEQCAKSP LDAYNRTLTTLLAPLGDSIRRIQESVT TSGGERQERLVGAIIGGVALGVATAA QITAASALIQANQNAANILKLKESIAA TNEAVHEVTSGLSQLAVAVGKMQQF VNDQFNKTAQEIDCIKITQQVGVELN LYLTELTTFVGPQITSPALTQLTIQAL YNLAGGNMDYMLTKLGVGNQLSS LISSGLISGNPILYDSQTQLLGIQVTLP SVGNLNNMRATYLETLVSTNKGFA SALVPKVVTQVGSVIEELDTSYCIETD LDLYCTRIVTFPMSPGIFSLGGNTSA CMYSKTEGALTTPYMTLKGSVIANC KMTTCRCADPPGIISQNYGEAVSLIDK KVCNILTLDGITLRLSGEFDATYQKNI SIQDSQVVITGNLDISTELGNVNNSIS NALDKLEESNSKLDKVNVRILTSTAL ITYIVLTITIALICGIVSLVACIYIMYKQ KAQQKTLLWLGNNTLDMQMRATTKM	418	2

10

20

30

40

【表 4 - 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AF266286	4875-7247	gb: AF266286: 4875-7247 生物: 麻疹ウイルス株 AIK-C 株名: 麻疹ウイルス株 Edmonston (AIK-C ワクチン) タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MSIMGLKVNVS AIFMAVLLTLQTPTG QIHWGNLSKIGVVIGSASYKVMTRS SHQSLVIKLPNITLLNNCTRVEIAEY RRLRTVLEPIRDALNMTQNIQPVQ SVASSRRHKRFAGVVLAGAALGVAT AAQITAGIALHQSMNLNSQAIDNLRAS LETTNQAIEAIRQAGQEMILAVQGVQ DYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGLKL LRYYTEILSLFGPSLRDPISAEISIQALS YALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILE SRGIKARITHVDTESYFIVLSIAYPTLS EIKGVIVHRLEGVSYNIGSQEWYTTV PKYVATQGYLISNFDSESSCTFMPEGT VCSQNALYPMSPLLQECLRGYTKSCA RTLVSQSFGNRFILSQGNLIANCASIL CKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADNCP VVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHRID LGPPILLERLDVGTNLGNAIAKLEDA KELLESDQILRSMKGLSSTCIVYILIA VCLGGLIGIPALICCCRGRCKKGEQ VGMSRPGLKPDLTGTSKSYVRSL	128	3
AB503857	3068-4687	gb: AB503857: 3068-4687 生物: ヒトメタニューモウイルス 株名: Jpn03-1 タンパク質名: 融合糖タンパク質前駆体 遺伝子記号: F	MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEES CSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEV DVENLTCSDBGPSLIKTELDLTKSALRE LKTVSADQLAREEQIEKPRQSRFVLG AIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLES EVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVL ATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDI DDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSD NAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMP TSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIG VYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKA APSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQN AGSTVYYYPNEKDCETRGDHFVCDTA AGINVAEQSKECNINISTTNPCKVST GRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCS IGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTV TIDNTVYQLSKVEGEQHVIGRPVSS SFDPIKFPEDQFNVALDQVFENIENSQ ALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIIVILIA VLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELS GVTNNGFIPHS	125	4

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
EU277658	5078-6700	gb: EU277658: 5078-6700 生物: ウシパラインフルエンザウイルス 3 株名: Q5592 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MIIIVITMILSLTPSSLCQIDITKLQSVG VLVNSPKGIKISQNFETRYLILSLIPKIE DSHSCGNQQIDQYKKLLDRLIPLYD GLKLQKDVIVVNHESHNNNTNLRTR FFGEIIGTIAIGIATSAQITA AVALVEA KQARSDIDKLKEAIKDTNKAVQSIQS SVGNLIVAVKSVQDYVNNEIVPSITRL GCEAAGLQLGIALTQHYSELTNIFGD NIGTLGEKGVKLQGIASLYRTNITEVF TTSTVDQYDIYDLLFTESIKMRVIDVD LSDYSITLQVRLPLLTKVSNTQIYKVD SISYNIQGKEWYIPLPHHIMTKGAFLG GADIKECIESFSNYICPSDPGFILNHEM ENCLSGNITQCPKTIVTSDIVPRYAFV DGGVIANCIPTTCTCNGIDNRINQSPD QGIKIITYKECQIVGINGMLFKTNQEG TLAKYTFDNIKLNNVALNPIDISLEL NKA KSDLEESKRWIEKSNQKLD SIGS WHQSSVTIIIIIVMIVVLLIINAIHIMIMI RYLRDRNRHLNNKDSEPYVLTNRQ	93	5
AB040874	4546-6162	gb: AB040874: 4546-6162 生物: おたふく風邪ウイルス 株名: Miyahara タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MKVFLVTCLGFAVSSSVCVNINILQ QIGYIKQQRQLSYYSQSSSSYIVVKL LPNIQPTDNSCEFKSVTQYNKTLNLL LPIAENINNIASPSGSRHRKRFAGIAI GIAALGVATAAQVTA AVSLVQAQTN ARAIAAMKNSIQATNRAVFEVKEGT QRLAIAVQAIQDHINTIMNTQLNNMS CQILDNQLATSLGLYLTELTTVFQPQL INPALSPISIQALRSLLGSMTPAVVQA TLSTSISAAEILSAGLMEGQIVSVLLD EMQMIVKINIPTIVTQSNALVIDFYSIS SFINNQESIIQLPDRILEIGNEQWSYPA KNCKLTRHHIFCQYNEAERLSLESKL CLAGNISACVFSPAGSYMRRFVALD GTIVANCRSLTCLCKSPSYPIYQPDHH AVTTIDLTACQTLSDGLDFSI VLSNI TYAENLTISLSQTINTQPIDISTELSKV NASLQNAVKYIKESNHQLQSVNVNS KIGAIIVAALVLSILSIISLLFCCWAYV ATKEIRRINFKTNHINTISSSVDDLIRY	89	6

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AB475097	4908-6923	gb: AB475097: 4908-6923 生物: イヌジステンパーウイルス 株名: M25CR タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MNPHEQTIPMHEKIPKRSKTQTHTQQ DLPQQHSTKSAESKTSRARHSITSAQR STHYDPRTADWPDYYIMKRTRSCCKQ ASYRSDNIPAHGDHDGIIHHTPESVSQ GAKSRLKMGQSNVAVKSGSQCTWLVL WCIGVASLFLCSKAQIHWNNLSTIGII GTDSVHYKIMTRPSHQYLVIKLMPNV SLIDNCTKAELDEYEKLLSSILEPINQA LTLMTKNVKPLQSVGSGRRQRRFAG VVLAGAALGVATAAQITAGIALHQS NLNAQAIQSLRTSLEQSNKAIEEIREA TQETVIAVQGVQDYVNNELVPAMQH MSELVGQRLGLKLLRYYTELLSIFG PSLRDPISAEISIQALSALGGEIHKILE KLGYSGNDMIAILESRIKTKITHVDL PGKFIILSVSYPTLSEVKGVIVHRLEA VSYNIGSQEWYTTVPRYVATNGYLIS NFEDESSCVFVSESAICSQNSLYPMSP LQQCIRGDTSSCARTLVSGTMGNKFI LSKGNIVANCASILCKCYSTSTIINQSP DKLLTFIASDTCPLVEIDGVTIQVGS QYPDMVYESKVALGPAISLERLDVGT NLGNALKKLDDAKVLIDSSNQILETV RRSSFNFGSLLVPILSCTALALLLLIC CCKRRYQQTHKQNTKVDPTFKPDLT GTSRSYVRSL	46	7
AJ849636	5526-7166	gb: AJ849636: 5526-7166 生物: 小反芻獣疫ウイルス 株名: Turkey2000 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MTRVAILTFLFLFPNAVACQIHWG SKIGIVGTGSASYKVMTRPSHQTLVIK LMPNITAIDNCTKSEIAEYKRLITVL KPVEDALSVITKNVRPIQTLTPGRRTR RFAGAVLAGVALGVATAAQITAGVA LHQSMLNSQAIESLKSLEKSNQAIEE IRLANKETILAVQGVQDYINNELVPS VHRMSCELVGHKLGLKLLRYYTEILS IFGPSLRDPIAAEISIQALSALGGDIN RILDKLGYSGGDFLAILES KGIKARVT YVDTRDYFIILSIAYPTLSEIKGVIVHK IEAITYNIGAQEWYTTIPKYVATQGYL ISNFDETSCVFTPDGTVCSQNALYPM SPLLQECFQGSKSCARTLVSGTISNR FILSKGNLIANCASVLCKCYTTETVIS QDPDKLLTVVASDKCPVVEVDGVTI QVGSREYPDSVYLHKIDLGAISLEKL DVGTNLGNAVTRLENAKELLDASDQ ILKTVKGVPFGGNMYIALAACIGVSL GLVTLICCKGRCKNKEVPISKINPGL KPDLTGTSKSYVRSL	34	8

10

20

30

40

【表 4 - 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AF017149	6618-8258	gb: AF017149 生物: ヘンド ライウイルス 株 名: UNKNOWN- AF017149 タン パク質名: 融合 遺伝子記 号: F	MATQEVRLKCLLCGIIVLVLSLEGLGI LHYEKLKSLGLVKGITRKYKIKSNPLT KDIVIKMIPNVSNVSKCTGTVMENYK SRLTGILSPIKGAIELYNNTDHLVGD VKLAGVVMAGIAIGIATAAQITAGVA LYEAMKNADNINKLKSSIESTNEAVV KLQETAECTVYVLTALQDYINTNLVP TIDQISCKQTEALDLALSKYLSDLLF VFGPNLQDPVSNMTIQAISQAFGGN YETLLRTLGYATEDFDDLLESDSIAG QIVYVDLSSYYIIVRVYFPILTEIQQAY VQELLPVSFNNDNSEWISIVPNFVLIR NTLISNIEVKYCLITKKSVCINQDYAT PMTASVRECLTGSTDKCPRELVVSSH VPRFALSGGVLFANCISVTCQCQTG RAISQSGEQTLLMIDNTTCTTVVLGNI IISLGKYLGSINYNSESIAVGPPVYTDK VDISSQISSMNQSLQSKDYIKEAQKI LDTVNPSLISMLSMIILYVLSIAALCIG LITFISFVIVEKKRGNYSRLDDRQVRP VSNGLYYIGT	29	9
AB005795	4866-6563	gb: AB005795: 4866-6563 生 物: センダイ ウイルス 株 名: Ohita タン パク質名: 融 合タンパク質 遺伝子記号: F	MATYIQRVQCISALLSVVLTTLVSCQI PRDRLSNIGVIVDEGKSLKIAGSHESR YIVLSLVPGLDLENGCGTAQVIQYKSL LNRLLIPLRDALDLQEALITVTNDTM TGADVPQSRFFGAVIGTIALGVATSA QITAGIALAEAREAKRDIALIKESMTK THKSIELLQNAVGEQILALKTLQDFV NDEIKPAISELGCETAALRLGIKLTQH YSELLTAFGSNFGTIGESLTLQALSS LYSANITEIMTTIRTGQSNIDYDVIYTEQ IKGTVIDVDLERYMVTLSVKIPILSEV PGVLIHKASSISYNIDGEEWYVTVPSH ILSRASFLGGANIADCVESRLTYICPR DPAQLIPDSQQKCILGDTTRCPVTKV VDNIIPKFAFVNGGVVANCIASTCTC GTGRRPISQDRSKGVVFLTHDNCGLI GVNGIELYANRKGHDATWGVQNL VGPAIAIRPVDISLNLAAATDFLQDSR AELEKARKILSEVGRWYNSGATLITII VVMIVVLVVIIVIVIVLYRLRRSMLMS NPAGRISRDTYTLEPKIRHMYTNGGF DAMTEKR	23	10

【表 4 - 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AF457102	5088-6755	gb: AF457102 生物: ヒトパ ラインフルエ ンザウイルス 1 株ワシント ン/1964 株名: Washington196 4 タンパク質 名: F 糖タンパ ク質 遺伝子記 号: F	MQKSEILFLVYSSLLSSSLCQIPVEKL SNVGVIINEGKLLKIAGSYESRYIVLS LVPSIDLQDGC GTTQIIQYKNLLNRLL IPLKDALDLQESLITITNDTTVTNDNP QTRFFGAVIGTIALGVATAAQITAGIA LAEAREARKDIALIKDSIVKTHNSVEL IQRGIGEQUIALKTLQDFVNDEIRPAIG ELRCETTALKLGIKLTQHYSELATAFS SNLGTIGEKSLTLQALSSLYSANITEIL STTKKDKSDIYDIIYTEQVKGTVIDVD LEKYMVTLLVKIPILSEIPGVLIYRASS ISYNIEGEEWHVAIPNYIINKASSLGG ADVTNCIESKLAYICPRDPTQLIPDNQ QKCILGDVSKCPVTKVINNLVPKFAFI NGGVVANCIASTCTCGTNRIPVNQDR SRGVTFITYTNCGLIGINGIELYANKR GRDTTWGNQIIKVGPAVSIRPVDISLN LASATNFLEESKTELMKARAIISAVG GWHNTESTQIIMIIIVCIIIIICGILYYL YRVRRLVMINSTHNSPVNAYTLESR MRNPYMGNNNSN	21	11
AB910309	4951-6582	gb: AB910309: 4951-6582 生 物: ネコモル ビリウイルス 株名: SS1 タン パク質名: 融 合タンパク質 遺伝子記号: F	MGKIRVIISSLLLSNITTAQVGWDNL TSIGVISTKQYDYKITTLNTNQLMVIK MVPNISSIINCTKPELMKYRELVLGVI RPINESLELMNSYINMRAGSERFIGAV IAGVALGVATAAQITSGIALHNSIMN KRQIQELRKALSTTNKAIDEIRIAGER TLIAVQGVQDYINNIIIPMQDKLQCDI LSSQLAIALRYYTNILTVFGPSIRDPV TSIISIQALSQAFNGNLQALLDGLGYT GRDLRDLLESRSITGQIIHADMTDLFL VLRINYPITEMQGVTIYELNSITYHIG PEEWYTIMPNFIAVQGF LTSNFDERK CSITKSSILCQQNSIYPMSTEMQRCIK GEIRFCPRSKAVGTLVNRFILTKGNL MANCLGVICRCYSSGQIITQDPSKLITI ISQEECKEVGVDGIRIMVGPRKLPDVI FNARLEVGVPISLSKLDVGTDLAIASA KLNNSKALLEQSDKILDSMSKLD SINS RITGLILAIMAIFIITVTIIWIIYKRCRNK DNKFSTSIEPLYIPPSYNPHSVV KSI	12	12

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
KT071755	4310-6070	gb: KT071755: 4310-6070 生物: トリパラミクソウイルス 2 株名: APMV-2/クリムネマシコ/China/Suiling/53/2013 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MIAALFISLFATCGALDNSVLAPVGIA SAQEWQLAAYTNTLSGTIAVRFPVL PGNLSTCAQATLAEYNKTVTNILGPL KENLETLLSEPTKTAARFVGAIIGTVA LGVATSAQITA AVALNQAQENARNI WRLKESIRKTNEAVLELKDGLASTAI ALDKVQKFINEDIIPQIKEIDCQVVAN KLGVYLSLYLTELTTIFGAQITNPALT PLSYQALYNLCGGDMGKLTIGLIGVK AKDINSLEYANLITGQVIGYDSESQIIL IQVSYPSPVSEVTGVRATELVTVSVTTP KGEGRAIAPKYVAQSRVVTEELDTST CRFSKTTLYCRSIITRPLPLIANCLNG LYQDCQYTTEIGALSSRFITVNGGIIA NCRATICKCVNPPKIIQSDASSLTVI DSAICKDVVLNDNVQLRLEGKLSAQYF TNITIDLSQITTSGLDISSEIGSINNTV NKVEELIAESNAWLQAVNPHLVNNT SIIVLCVLA AIFVWLVALTGCLAYYI KKSSATRMVGIGSSPAGNPYVAQSAT KM	12	13
AY029299	4598-6265	gb: AY029299 生物: トリパラミクソウイルス 6 株名: APMV-6/アヒル/Taiwan/Y1/98 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MGARLGPLAMAPGRYVIFNLILLHR VVS LDNSRLLQQGIMSATEREIKVYT NSITGSIAVRLIPNLPQEV LKCSAGQIK SYNDTLNRIFTPIKANLERLLATPSML EDNQNPAPPEPRLIGAIIGTAALGLATA AQVTAALALNQAQDNAKAILNLKESI TKTNEAVLELKDATGQIAIALDKTQR FINDNILPAINNLTCEVAGAKVGVELS LYLTELSTVFGSQITNPALSTLSIQAL MSLCGNDFNYLLNLMGAKHSDLGAL YEANLINGRIIQYDQASQIMVIQVSP SISSISGLRLTELFTLSIETPVGEGKAV VPQFVVESGQLLEEIDTQACTLTDTT AYCTIVRTKPLPELVAQCLRGDESRC QYTTGIGMLESRFGVFDGLVIANCKA TICRCLAPEMIITQNKGLPLTVISQETC KRILIDGVTLQIEAQVSGSYSRNITVG NSQIAPSGPLDISSELGKVNQSLSNVE DLIDQSNQLLNRVNPVNTAIIVTI VLLVLLVLWCLALTISILYVSKHAVR MIKTVPNPYVMQAKSPGSATQF	11	14

【表 4 - 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AY141760	5028-6665	gb: AY141760 生物: フェル ドランスパラ ミクソウイルス 株名: ATCCVR-895 タンパク質名: 融合タンパク 質 F 遺伝子記 号: F	MTRITILQIILTLTLPVMCQVSFDNLE QVGVMFDKPKFLKITGPASTATMIK LIPTLGTMESECGTSAVNEYKKTLDLIL VPLRDTINKLSTDITVVEGTSNISKR EKRFVGIAIAGVALATSAQITAGIA LSNTIKNAEAIKSSIQASNQAIQKV IDAQGRVTVINGIQDHINSVINPALN QLGCDVAKNTLAISLTQYFSKLSLLF GPNLRNPVEQPLSVQAIAGLMDGDIN AVVSQLGYTQSDLLDLLSTESIVGT TAIDMVNYMIQIEMSFQYITIPDTKV LEGHKITFNDKGSEWQTQVPSTIAVR DILIAGVDPDGCSTSTSYICKNDPTY AMSEVLTCNFRGNTQECPRARITSTF ATRFIAIRSTVIANCVAAVCLCGDPGI PVVQKAEVTLTAMTLDQCSLITVDGL QIKPSKSIANVTANFGNITLGPVVS DLDLSAELTKVQSDLKEAQDKLDES NAILQGINNKILTAPTSIALIVSVVVI LLIIGMISWLVWLTAKAVRRSNTSR VTPSAYNNLGF	8	15
EU877976	4330-6410	gb: EU877976: 4330-6410 生物: トリパラ ミクソウイルス 4株名: APMV- 4/KR/YJ/06 タンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MRLSRTILTLILGTLTGYLMGAHSTN VNEGPKSEGIRGDLIPGAGIFVTQVRQ LQIYQQSGYHDLVIRLLPLLPAELNDC QREVVTENNTVSQLLQPIKTNLDTL LADGGTRDADIQPRFIGAIIATGALAV ATVAEVTAAQALSQSKTNAQNILKLR DSIQATNQAVFEISQGLEATATVLSKL QTELNENIIPSLNNLSAAMGNRLGV SLSLYLTLMTTLFGDQITNPVLTPI SYS TLSAMAGGHIGPVMKILAGSVTSQ L GAEQLIASGLIQSQVVGYSQYQLLV IRVNLVRIQEVQNTRVSLRTLAVNR DGGLYRAQVPPEVVERSGIAERFYAD DCVLTTTDYICSSIRSSRLNPELVKCL SGALDSCTFERESALLSTPFFVYNKA VVANCKAATCRCNKPPSIIAQYSASA LVTITTDTCADLEIEGYRFNIQTESNS WVAPNFTVSTSQIVSVDPIDISSDI AKI NSSIEAAREQLELSNQILSRINPRIVND ESLIAHVTIVVLSLLVIGLIVVLGVMY KNLKKVQRAQAAMMMQMQSSSQPV TTKLGT	8	16

【表 4 - 9】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/ クラスター	配列番号
AB176531	4793-6448	gb: AB176531: 4793-6448 生物: ヒトパラインフルエンザウイルス 2 株名: Nishio タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MHHLHPMIVCIFVMYTGIVGSDAIAG DQLLNIGVQSKIRSLMYYTDGGASFI VVKLLPNLPPSNGTCNITSLDAYNVT LFKLLTPLIENLSKISTVTDTKTRQKR FAGVVVGLAALGVATAAQITAATAVAI VKANANAAAINNLAASSIQSTNKAVSD VIDASRTIATAVQAIQDRINGAIVNGI TSASCRAHDALIGSILNLYLTELTTIFH NQITNPALTPLSIQALRILLGSTLPVIE SKLNTNFNTAELLSSGLLTGQIISIPM YMQMLIQINVPTFIMQPGAKVIDLIAI SANHKLQEVVVQVPNRILEYANELQ NYPANDCVVTPNSVFCRYNEGSPICE SQYQCLRGNLNSCTFTPIHGNFLKRFA FANGVLYANCKSLLCRCADPPHVVS QDDTQGISIIDIKRCSEMMLDTFSFRIT STFNATYVTDFSMINANIVHLSPLDLS NQINSINKSLKSAEDWIADSNFFANQ ARTAKTLYSLSAIALILSVITLVVVGL LIAYIIKLVSQIHQFRSLAATTMFHRE NPAFFSKNNHGNIIYGIS	7	17
BK005918	4677-6302	gb: BK005918 生物: プタルブラウウイルス 株名: UNKNOWN-BK005918 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MPQQQVAHTCVMLWGHISTVSGINTE ALSQYGVVVTNVRQLTYTQAGSTY LAVRLLPSLASPDQSCALHSIINYAT LQAILSPIAENLNLISTALREQHRKKR FAGVAIGLTALGVATAAQATAAVAL VRANKNAEKVEQLSQALGETNAAIS DLIDATKNLGFVQAIQNQINTAILPQ IHNLSQCVIDAQLGNILSLYLTELTTV FQPQLTNPALSPLTIQALRAVLGTTLP ALLSEKLKSNIPGLDLMSSGLLKGQL VGLNLQNMLMIIELYIPTLSTHSTAKV LDLVTISSHVNGREVEIQVPNRVLELG SEVLGYGGSECALTMSHILCPFNDAR VLSTDMKYCLQGNITHCIFSPVVGSL RRFALVNGVVIANCADMSCVCDFPQ EIIYQNFQEPTTVIDIKKCGKVQLDTL TFTISTFANRTYGPPAYVPPDNIIQSEP LDISGNLIAVNNSLSSALNHLATSEIL RNEQIWTSSLGISTIVALVIIGILIICLV VTWAALWALLKEVRGLNSAVNSQLS SYVMGDKFIRY	7	18

【表 4 - 1 0】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
KC237063	4530-6185	gb: KC237063: 4530-6185 生物: パラインフルエンザウイルス 5 株名: 08-1990 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F セグメント: 4	MGTRIQFLMVSCLLAGTGS LDPAAL MQIGVIPTNV RQLMYYTEASSAFIVV KLMPTIDSPISGCNITSISSYNATMTKL LQPIGENLETIRYQLIPTRRRRRFVGV VIGLAALGVATAAQVTA AVALVKAN KNAAAILNLKNAIQKTNA A VADV VQ ATQSLGTAVQAVQDHINSV VSPAITA ANCKAQDAIIGSILNLYLTELTTIFHN QITNPALSPITIQALRILLGSTLPTVVR KSFNTQISAAELLSSGLLTGQIVGLDL TYMQMVIKIELPTLTVQPATQIIDLVT ISAFINNREVM AQLPTRIIVTGS LIQAY PASQCTITPNTVYCRYNDAQVLSDDT MACLQGNLTRCTFSPVVG SFLTRFVL FDGIVYANCRSMLCKCMQPA AVILQP SSSPVTVIDMHKCVSLQLDNL RFTITQ LANITYNSTIKLETSQILPIDPLDISQNL AAVNKSLSDALQH LAQSDTYLSAITS ATTSVLSHIACLGSLGLILILISVVV WKLLTIVAANRRNRMENFVYHNSAFH HSRSDLSEKNQPATLGTR	7	19
AY729016	5862-7523	gb: AY729016: 5862-7523 生物: ネズミ肺炎ウイルス 株名: 15 ; ATCC VR-25 タンパク質名: 融合糖タンパク質前駆体 遺伝子記号: F	MIPGRIFLVLLVIFNTKPIHPNTLTEKF YESTCSVETAGYKSALRTGWHMTVM SIKLSQINIESCKSSNSLLAHELAIYSS AVDELRTLSSNALKSKRKKRFLGLIL GLGAAVTAGVALAKTVQLESEIALIR DAVRNTNEAVVSLTNGMSVLAKVV DDLKNFISKELLPKINRVSCDVHDITA VIRFQQLNKRLLEV SREFSSNAGLTHT VSSFMLTDRELTSIVGGMAVSAGQKE IMLSSKAIMRRNGLAILSSVNADTLV YVIQLPLFGVMDTDCWVIRSSIDCHNI ADKYACLARADNGWYCHNAGSLSY FPSPTDCEIHNGYAFCDTLKSLTVPVT SRECNSNMYTTNYDCKISTSKTYVST AVLTTMGCLVSCYGHNSCTVINNDK GIIRTLPDGCHYISNKGVD RVQVGNT VYYLSKEVGKSIVVRGEPLVLKYDPL SFPDDKFDVAIRDVEHSINQTRTFLKA SDQLLDLSENRENKNLNKSYILTTLLF VVMLIIMAVIGFILYKVLKMIRDNKL KSKSTPGLTVLS	6	20

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
AB543336	5174-6805	gb: AB543336: 5174-6805 生物: ヒトパラインフルエンザウイルス 4a 株名: M-25 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MGVKGLSLIMIGLLISPITNLDITHLM NLGTVPTAIRSLVYYTYTKPSYLTVD LIPNLKNLDQNCNYSSLNYYNKTALS LIQPIADNINRLTKPITSSEIQSRFFGAV IGTIALGVATAAQVTAAIGLAKAQEN AKLILTLKKAATETNEAVRDLANSNK IVVKMISAIQNQINTIIQPAIDQINCQIK DLQVANILNLYLTEITTVFHNQLTNP ALESISIQALKSLLGPTLPEVLSKLDLN NISAASVMASGLIKGQIIAVDIPTMTL VLMVQIPSISPLRQAKIIDLTSITIHTNS QEVQAVVPARFLEIGSEILGFDGSVCQ ITKDTIFCPYNDAYELPIQQKRCLQGQ TRDCVFTPVAGTFPRRFLTTYGTIVA NCRDLVCSCLRPPQIIYQPDENPVTIID KDLCTTLTLDSTIEIQKSINSTFRREV VLESTQVRSLTPLDLSTDNLQYNQLL KSAEDHIQRSTDYLSINPSIVNNNAII ILILCILLILVTICHWLKYLTKEVKN VARNQRLNRDADLFYKIPSQIPVPR	5	21
AF298895	4834-6450	gb: AF298895 生物: チオマンウイルス 株名: UNKNOWN-AF298895 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MRIALTAVIVSIHFDLAFPMNKNSLLS VGLVHKSVKNLYFYSSQGSYSYIVVKL VPTLGNVPGNCTLNSLVRYKSTVSSL LSPLAENLEYLQKTLTVSRGGRRRRF AGVAIGLAALGVAAAAQATAAVALV EARQNAAQISLSEAIQNTNLAVNEL KTAIGASATAIQAIQTQINEVINPAINR LSCEILDAQLASMLNLYLIHLTTVFQN QLTNPALTPLSIQSLQSLQGTSSVLT NITSSSKLALNDALVTGLITGQVVGL NMTSLQIVIAAYVPSVAKLSNAVVHN FIRITTSVNGTEVHIIQSPTIIMEQNEVM YDLKTGHCTESDLNIYCPYVDAQLLS PGMTNCINGRLNDCTFSKVVGSPFTR FAAVEGAILANCKYLQCNCLTPPYIIT PLNGEMISMIDLSKCQRLDLGTIVFDI NNPVNVTFNGNYRADVGQMIVTNPL DISAELNQINTSLSNAQGFLSKSDAW LHVSQWVTNSGTIFILHGLIVGIVYMI INTYVVVQIIKEINRMRTSDRAHLLKG SISSIST	5	22

【表 4 - 1 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
FJ215863	4499-6130	gb: FJ215863: 4499-6130 生物: トリパラクソウイルス 8 株名: グース /Delaware/1053 /76 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MGQISVYLINSVLLLLVYPVNSIDNTL IAPIGVASANEWQLAAYTTSLSGTIAV RFLPVLPDNMTTCLRETITTYNNTVN NILGPLKSNLDALLSSETYPQTRLIGA VIGSIALGVATSAQITA AVALKQAQD NARNILALKEALSKTNEAVKELSSGL QQTALALGKIQSFVNEEILPSINQLSCE VTANKLGVYLSLYL TELTTIFGAQLT NPALTSLSYQALYNLCGGNMAMLTQ KIGIKQQDVNSLYEAGLITGQVIGYDS QYQLLVIQVNYP SISEVTGVRATELV TVSVTTDKGEGKAIVPQFVAESRV TIE ELDVASCKFSSTTL YCRQVNTRALPP LVASCLRGNYDDCQYTT EIGALSSRY ITLDGGVLVNCKSIVCRCLNPSKIISQ NTNAAVTYVDATICKTIQLDDIQLQL EGSLSSVYARNISIEISQVTTSGSLDISS EIGNINNTVNRVEDLIHQSEEWLAKV NPHIVNNTTLIVLCVLSALAVIWLAV LTAIIH YLRTKLKTISALAVTNTIQSNP YVNQTKRESKF	5	23
JN689227	4689-6521	gb: JN689227: 4689-6521 生物: タイラムウイルス 株名: TL8K タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MKLSVVYTTLVSTFYSDLARSQLAL SELTIGVIPGRSYDLKISTQASYQYM VVKLIPNLTGLNNTNGTIEAYKKML NRLLSPIDAALRKMKDAVNDKPPESV GNVKFWGAVIGGVALGVATSAQITA GVALHNSIQNANAILALKDSIRQSNK AIQELQTAMSTTVVVLNALQDQINNQ LVPAINSLGCQVVANTLGLKLNQYFS EISLVFGPNLRDPTSETLSIQALSRAFN GDFDSMLSCLKYDDSDFLDLLESDSI RGRIIDVSLSDYLITIQIEYPALLSIKDA VIQTFNLISYNTRGTEWISIFPKQLLVR GTYISNIDISQCVIAATSIICKSDTSTPIS SATWSCATGNITNCARTRVVNAHVP RFALYGGVVFANCAPVVKCQDPLY SINQEPKVTNVMVDVDACKEMYLDG LYITLGKTQISRAMYAEDVSLGGPISV DPIDLGNEINSINSAINRSEEHLNHAN ELLDKVNPRIVNVKTFGVMIGLLVLV VLWCVITLVWLICLTKQLARTAYAGS MGSRASTVNSLSGFVG	5	24

【表 4 - 1 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
JX857409	4831-6615	gb: JX857409: 4831-6615[生物: プタパラインフルエンザウイルス 1]株名: S206N タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MQVTTLRPAIILSIALLVGTGQVPRDKL ANLGIIHKDSKALKIAGSYENRYIVLSL VPTIDNVNGCGSIQIAKYKEMLERLLI PIKDALDLQESLIVIDNETVNNNYSPO YRFVGAIIIGTIALGVATAAQVTVAGVA LMEAREAKRDISMLKEAIEKTQNSIE KLQNSAGEQILALKMLQDYVNGEIKP AIEELGCETAALKLGIALTQHYTELTN AFGSNLGSIGESLTLQALSSLYKTNI TNILTATNLGKTDIYDIIYAEQVKGRV IDVDLKRYMVTISVKIPILSEIPGVLIY EVSSISYNIDGAEWYAAVPDHILSKSA YIGGADISDCIESRLTYICPDPAQIIA DNQQQCFFGHLDKCPITKVIDNLVPK FAFINGGVVANCIASTCTCGEERIQVS QDRNKGVTFLTHNNCGLIGINGIEFH ANKKGS DATWNVSPIGVGPVSLRP VDISLQIVAATNFLNSSRKDLMKAKEI LNQVGNLKD LTTITIINIVIIILLICVIG LGILYHQLRSALGMRDKMSVLNNS YSLEPRTAQVQVIKPTSFMG	5	25
AY640317	2932-4571	gb: AY640317: 2932-4571[生物: トリメタニューモウイルス]株名: LAH A タンパク質名: F 遺伝子記号: F	MDVRI LLLFLISNPSSCIQETYNEESC STVTRGYKSVLRTGWYTNVFNLEIGN VENITCNDGPSLIDTELVLTKNALREL KTVSADQVAKESRLSSPRRRRFVLGA IALGVATAAAV TAGVALAKTIRLEGE VKA IKNALRNTNEAVSTLGNGVRVL ATAVNDLKEFISKKLTPAINQNKCNIA DIKMAISFGQNNRRFLNVVRQFSDSA GITS AVSLDLMTDDELVRRAINRMPTS SGQISLMLNNRAMVRRKGFGILIGVY DGTVVYMVQLPIFGVIETPCWRVVA APLCRKRGRGYACILREDQGWYCTN AGSTAYYPNKDDCEVRDDYVFCDTA AGINVALEVDQCNYNISTSKYPCKVS TGRHPVSMVALTPLGGLVSCYESVSC SIGSNKVGHIKQLGKGCTHIPNNEADT ITIDNTVYQLSKVVGEQRTIKGAPVV NNFNPILFPVDQFNVALDQVFESIDRS QDLIDKSNDDL GADAKSKAGIAIAIV VLVILGIFLLAVIYYCSRVRKTKPKH DYPATTGHSSMAYVS	4	26

【表 4 - 1 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
KU646513	4641-6498	gb: KU646513: 4641-6498 生物: トリパラミクソウイルス 13 ガチョウ/カザフスタン/5751/2013 株名: APMV-13/white fronted goose/Northern Kazakhstan/5751/2013 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MARFSWEIFRLSTILLIAQTCQGSIDG RLTLAAGIVPVGDRPISITSSQTGIIV VKLIPNLPDNKKDCAKQSLQSYNETL SRILTPLATAMSAIRGNSTTQVRENRL VGAIGSVALGVATAAQITAATALIQA NQNAANIARLANSLAKTNEAVTDLTE GLGTLAIGVGKLQDYVNEQFNNTAV AIDCLTLESRLGIQLSLYLTELMGVFG NQLTSPALTPITIQUALYNLAGGNLNL LSRLGASETQLGSLNSGLIKGMPIMY DDANKLLAVQVELPSIGKLNGARSTL LETLAVDTTRGPSSPIIPSAVIEIGGAM EELDLSPCITTDLDMFCTKIISYPLSQS TLSCNLNGNLSDCVFSRSEGVLPSTPYM TIKGKIVANCKQVICRCMDPPQILSQN YGEALLIDENTCRSLELSGVILKLAG TYESEYTRNLTVDPSPQVIITGPLDISAE LSKVNQSIDSAKENIAESNKFLSQVN VKLLSSSAMITYIVATVVCLIIAITGCV IGIYTLTKLKSQKTLWLGNNAEMH GSRSKTSF	4	27
AF326114	4818-6482	gb: AF326114 生物: メナングルウイルス 株名: UNKNOWN-AF326114 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MMPRVLGMIVLYLTHSQILCINRNTL YQIGLIHRSVKKNFYSGSPSYIVVK LVPTLAAIPPNCISIKSLQRYKETVTS VQPISDNLGYLQDKLVTGQSRRRRRF AGVAIGLAALGVAAAAQATAAVALV ETRENAGKIQALSESQNTNQAVHSL KTALGFSATAIQAIQNQVNEVINPAIN KLSCEVLDSQLASMLNLYLIHLTTVF QTQLTNPALTPLSIQALTSVLQGTSGV LMNSTNSTLTQPIDLLATGLITGQIISV NMTSLQLIIATFMPSIAELPNAVLHSF FRITTSVNLTEVMIQSPEFIMEQNGVF YDFNTAHCQLGDNNVYCPYIDAARL SSMMTNCINGNLGECVFSRVIGSFPSR FVSLNGAILANCKFMRCNCLSPEKIIT PLDGEMISLIDLRVCQKLTGLTITFEIS QPVNVSFQGGFVANAGQIIVTNPFDIS AELGQINNSLNDAAQGLDQSNWLK VSGWINNSGSLFIAGIVVIGLIVLCIVII IYINVQIIREVNRLRSFIYRDYVLDHD KAPYSPSSPHRKSCLKTVS	3	28

【表 4 - 1 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
GU206351	5441-7468	gb: GU206351: 5441-7468 生物: トリパラクソウイルス 5 株名: セキセイインコ /Kunitachi/74 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MLQLPLTILLSILSAHQSLCLDNSKLIH AGIMSTTEREVNVYAQSITGSIVVRLI PNIPSNHKSCATSQIKLYNDTLTRLIT PIKANLEGLISAVSQDQSQNSGKRKK RFVGAVIGAAALGLATAAQVTATVA LNQAQENARNILRLKNSIQKTNEAVM ELKDAVGQTAVAIDKTQAFINNQLP AISNLSCEVLGNKIGVQLSLYLTELTT VFGNQLTNPALTTLSQLALYNLCGDD FNYLINLLNAKNRNLASLYEANLIQG RITQYDSMNQLLIQVQIPSISTVSGMR VTEFTLSVDTPIGEGKALVPKYVLSS GRIMEEVDLSSCAITSTSVFCSSIIIRPL PLETINCLNGNVTQCQFTANTGTLES RYAVIGGLVIANCKAIVCRCLNPPGVI AQNGLPITIISNTCQRINLEQITLSLG NSILSTYSANLSQVEMNLAPSNPLDIS VELNRVNTSLSKVESLIKESNSILDSV NPQILNVKTVIILAVIIGLIVVWCFILT CLIVRGFMLLVKQKFKGLSVQNNP YVSNNSH	3	29
JQ001776	6129-8166	gb: JQ001776: 6129-8166 生物: シダーウィルス 株名: CG1a タンパク質名: 融合糖タンパク質 遺伝子記号: F	MSNKRRTTVLIISYTLFYLNNAIVGF DFDKLNKIGVVQGRVLNYKIKGDPM TKDLVLKFIPNIVNITECVREPLSRYN ETVRRLLLPIHNMLGLYLNNTNAKM TGLMIAGVIMGGIAIGIATAAQITAGF ALYEAKKNTENIQKLTDSIMKTQDSI DKLTDSVGTSILILNKLQTYINNQLVP NELLSQRQNKIEFDLMLTKYLVOLDM TVIGPNINNPVNKDMTIQSLSLFLDGN YDIMMSELGYTPQDFLDLIESKSITGQ IIYVDMENLYVVIRTYLPTLIEVPDAQ IYEFNKITMSSNGGEYLSSTIPNFILIRG NYMSNIDVATCYMTKASVICNQDYS LPMSQNLRSYQGETEYCPVEAVIAS HSPRFALTNGVIFANCINTICRCQDNG KTITQINQFVSMIDNSTCNDVMVDK FTIKVGKYMGRKDINNINIQIGPQIIID KVDLSNEINKMNQSLKDSIFYLREAK RILDSVNISLISPSVQLFLIISVLSFIILL IIIVYLYCKSKHSYKYNKFIDDPDYNN DYKRERINGKASKSNNIYYVGD	3	30

【表 4 - 1 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
LC168749	4869-7235	gb: LC168749: 4869-7235 生物: 牛痘麻疹ウイルス 株名: Lv タンパク質名: F タンパク質 遺伝子記号: F	MGILFAALLAMTNPHLATGQIHWGN LSKIGVVGTSASYKVMQTSSHQSLV IKLMPNVTAIDNCTKTEIMEYKRLLG TVLKPIREALNAITKNIKPIQSSTTSRR HKRFAGVVLAGAALGVATAAQITAG IALHQSMMSQAIESLKASLETTNQAI EEIRQAGQEMVLAVQGVQDYINNEL VPAMGQLSCEIVGQKLGLKLLRYYTE ILSLFGPSLRDPVSAELSIQALSYALG GDINKILEKLGYSGLDILAILESKGIK AKITYVDIESYFIVLSIAYPSLSEIKGVI VHRLESVSYNIGSQEWYTTVPRYVAT QGYLISNFDDTPCAFTPEGTICSQNAL YPMSPLLQECFRGSTRSCARTLVSGSI GNRFILSKGNLIANCASILCKCYTTGSI ISQDPDKILTYIAADQCPVVEVGGVTI QVGSREYSDAVYLHEIDLGPPISEKL DVGTNLWNAVTKLEKAKDLLDSSDL ILENIKGVSVTNTGYILVGVGIAVVG ILIITCCCKRRSDNKVSTMVLNPGLR PDLTGTSKSYVRSL	2	31
LC187310	6250-7860	gb: LC187310: 6250-7860 生物: トリパラミクソウイルス 10 株名: rAPMV-10-FI324/YmHA タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MTRTRLFLLLTCYIPGAVSLDNSILAP AGIISASERQIAIYTQTLQGTIALRFIPV LPQNLSSCAKDTLESYNSTVSNLLLPI AENLNALLKDADKPSQRIIGAIIGSVA LGVATTAQVTAALAMTQAQQNARNI WKLKESIKNTNQAVLELKDGLQQSAI ALDKVQSFINSEILPQINQLGCEVAAN KLGIFLSLYLTEITTVEKNQITNPALST LSYQALYNLCGGNMAALTKQIGIKD TEINSLYEALITGQVIGYDSADQILLI QVSYPVSVSRVQGVRAVELLTVSVATP KGEGKAIAPSFIAQSNIIAEELDTQPCK FSKTTLYCRQVNTRTLPVRVANCLKG KYNDQCQYTTTEIGALASRYVTITNGVV ANCRSHICRCLDPEGIVAQNSDAAITVI DRSTCKLIQLGDITLRLEGKLSSSYSK NITIDISQVTTSGSLDISSELGSINNTIT KVEDLISKSNWLSKVNPTLISNDTII ALCVIAGIVVIWLVIITILSYIILIKLKN VALLSTMPKKDLNPPYVNNTKF	2	32

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_005283	5277-6935	gb: NC_005283: 5277-6935 生 物: イルカモ ルビリウイル ス 株名: UNKNOWN- NC_005283 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MAASNGGVMYQSFLTIIILVIMTEGQI HWGNLSKIGIVGTGSASYKVMTRPN HQYLVIKLMPNVTMIDNCTRTEVTEY RKLLKTVLEPVKNALTVITKNIKPIQS LTTSRRSKRFAGVVLAVAGVALGVATA AQITAGVALHQSIMNSQSIDNLRSL KSNQAIEEIRQASQETVLAVQGVQDFI NNELIPSMHQLSCEMLGQKLGLKLLR YYTEILSIFGPSLRDPVSAEISIQALSY ALGGDINKILEKLGYSAGDLLAILESR GIKAKVTHVDLEGYFIVLSIAYPTLSE VKGIVVHKLEAVSYNLGSQEWYTTL PKYVATNGYLISNFDDESSAFMSEVTI CSQNALYPMSPLLQCLRGSTASCAR SLVSGTIGNRFILSKGNLIANCASVLC KCYSTGTIISQDPDKLLTFVAADKCPL VEVDGITIQVGSREYPDSVYVSRIDL PAISLEKLDVGTNLGSALTCLDNADK LLDSSNQILENVRSSFFGGAMYIGILV CAGALVILCVLVYCCRRHCRKRVQT PPKATPGLKPDLTGTTKSYVRSL	2	33
NC_005339	5374-7602	gb: NC_005339: 5374-7602 生 物: モスマン ウイルス 株 名: UNKNOWN- NC_005339 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MSNYFPARVIIIIVSLITAVSCQISFQNL STIGVFKFKEYDYRVSGDYNEQFLAI KMVPNVTGVENCTASLIDEYRHVIYN LLQPINTTLTASTSNVDPYAGNKKFF GAVIAGVALGVATAAQVTAGVALYE ARQNAAAIAEIKESLHYTHKAIESLQI SQKQTVVAIQGIQDQINTNIIPQINALT CEIANQRLRLMLLQYYTEMLSSFGPII QDPLSGHITVQALSQAAGGNITGLMR ELGYSSKDLRYILSVNGISANIIDADPE IGSIILRIRYPSMIKIPDVAVMELSYLA YHAAGGDWLTVGPRFILKRGYSLSN LDITSCTIGEDFLLCSKDVSSPMSLAT QSCLRGDTQMCSRTAVQDREAPRFL LLQGNLIVNCMSVNCKCEDPEETITQ DPAYPLMVLGSDTCKIHIDGIRIKLG KVQLPPITVLNLTSLGPVVLNPIDVS NQLSLVETTVKESEDHLKNAIGALRS QSRVGGVGIVAIVGLIATVSLVVLVI SGCCLVKYFSRTATLESSLTTHIEHGPT LAPKSGPIIPTYINPVYRHD	2	34

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_007454	4635-6384	gb: NC_007454: 4635-6384 生 物: J ウイルス 株名: UNKNOWN- NC_007454 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MKPVALIYLTILAF TVKVRSQ LALSD LTKIGIIPAKSYELKISTQAAQQLMVI KLIPNVNGLTNCTIPVMDSYKKMLDR ILKPIDDALNHVKNAIQDKQGDGVP VRFWGAIIIGGVALGVATSAQITAGVA LHNSIQNANAILQLKESIRNSNKAIEE LQAGLQSTVLVINALQDQINSQ LVP NTLGCSVIAN TLGLRLNQYFSEISLVF GPNLRDPTSQTL SIQAIKAFNGDFDS MMKKMHYTDSDFLDLES DSIRGRII SVSLEDYLIHQIDYPGLTTIPNSV VQTF NLITYNYKGT EWESIFPRELLIRGSYIS NIDISQCVGT SKSMICKSDTSTTISPAT WACATGNLTSCARTRVVNSHSTRFA LSGGVLFANCAPIACRCQDPQYSINQ EPKTTNVMVTSEDCKELYIDGFYLT GKKMLDRAMYAEDVALGGSVSVDPI DIGNELNSINESINKSHEYLDKANELL EQVNPNI NVSSFSFILVISILLIWFIV TLVWLIYLT KHMNFIVGKVAMGSR STVNSLSGFVG	2	35
NC_009489	4620-6500	gb: NC_009489: 4620-6500 生 物: マプエラ ウイルス 株 名: BeAnn370284 タンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MRSSLFLVLTLLVPFAHSIDSIT LEQY GTVITSVRSLAYFLETNPTYISVRLMP AIQTDSSHCSYHSIENYNLT LTKLLP LQENLHQITDSLSSRRRKRFAGVAV GLAALGVATAAQVTA AIAVVKAKEN SAKIAQLTSAISETNRAVQDLIEGSKQ LAVAVQAIQDQINNVIQPQLTNLSCQ VADAQVG TILNMYLTELTVFHPQIT NSALTPITI QALRSLLGSTLPQVVTSTI KTDVPLQDLLTSGLLKGQIVYLDLQS MIMVVS VSVPTIALHSMKVYTLKAI SAHVNNAEVQM QVPSRVMELGSEIM GYDIDQCEETSRYLFCPYNGGSILSAT MKMCLNGNISQCVFTPIYGSFLQRFV LVDGVIVANCRDMTCACKSPSKIITQ PDSLPTIHDSTSCSNLVLD TLELPIISI NNATYRPVQYVGP NQHIFSQPLDLLSQ LGKINSSLSDAIEHLAKSDEILEQIQW DSPQGYTLIALTSVLA FVVVAIVGLLI STRYLIFEIRRI NTTLTQQLSSYVLSNK IIQY	2	36

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 9】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_017937	4534-6330	gb: NC_017937: 4534-6330 生物: ナリバウウイルス 株名: UNKNOWN-NC_017937 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MAEQEKTPLRYKILLIIIVINHYNITNV FGQIHLANLSSIGVFVTKTLDYRTTSD PTEQLLVINMLPNISNIQDCAQGVVN EYKHLISSLLTPINDTLDLITSNINPYS GRNKLFGEIIAGAALTVATSAQITAG VALYEARQNAKDIAAIKESLGYAYK AIDKLTTATREITVVINELQDQINNRLI PRINDLACEVWATRLQAMLLQYYAE IFSVIGPNLQDPLSGKISIQALARAAG GNIKLMVDELNYSQDLSRLVKVGA KGQIIDADPSLGVVVIKMRYPNIIKIPN VAISELSYVSYSDDGQDWITGPNYIV TRGYSIANIQTSSCSVGDDFVLCDRD MTYPMSQVTQDCLRGNIALCSRMVV RDREAPRYLILQGNMVANCMISITCRC EPESEIYQSPDQPLTLLTRDTCPTHV VDGIRIRLGVKRLPTISVINNITLGPIT TDPIDVSNQLNAVSTIDQSAELLHQ AQRVLSERARGARDHILATAAIVICV VLAVLILVLLIGLVYLYRTQNEILVKT TMLEQVPTFAPKSFPMESQIYSGKTN KGYDPAE	2	37
NC_025256	6865-8853	gb: NC_025256: 6865-8853 生物: コウモリパラミクソウイルス Eid_hel/GH-M74a/GHA/2009 株名: コウモリ PV/Eid_hel/GH-M74a/GHA/2009 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MKKKTDNPTISKRGHNHSRGIKSRL LRETDNYSNGLIVENLVRNCHHPSKN NLNYTKTQKRDSTIPYRVEERKGYHYP KIKHLIDKSYKHIKRGKRRNGHNGNII TIILLILILKTQMSEGAIHYETLSKIGL IKGITREYKVKGTSSKDIVIKLIPNVT GLNKCTNISMENYKEQLDKILIPINNII ELYANSTKSAPGNARFAGVIIAGVAL GVAAAAQITAGIALHEARQNAERINL LKDSISATNNAVAELQEATGGIVNVIT GMQDYINTNLVPQIDKLQCSQIKTAL DISLSQYYSEILTVFGPNLQNPVTTSM SIQAISQSFSGNIDLLLNLGYTANDL LDLLESKSITGQITYINLEHYFMVIRV YYPIMTTISNAYVQELIKISFNVDGSE WVSLVPSYILIRNSYLSNIDISECLITK NSVICRHDFAMPMSYTLKECLTGDE KCPREAVVTSYVPRFAISGGVIYANC LSTTCQCYQTGKVIAQDGSQTLMMID NQTCIVRIEELISTGKYLGSQEYNT MHVSVGNPVFTDKLDITSQISNINQSI EQSKFYLDKSKAILDKINLNLIGSVPI ILFIILSLILSIITFVIVMIIVRRYNYT PLINSDPSSRRSTIQDVYIIPNPGEHSIR SAARSIDRDRD	2	38

10

20

30

40

【表 4 - 2 0】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025347	4471-6386	gb: NC_025347: 4471-6386 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 7 株名: APMV- 7/dove/Tenness ee/4/75 タンパ ク質名: 融合 タンパク質 遺 伝子記号: F	MRVRPLIILVLLVLLWLNILPVIGLDN SKIAQAGIISAQYAVNVYSQSNEAYI ALRTVPYIPPHNLSCFQDLINTYNTTI QNIFSPIQDQITSITSASTLPSSRFAGLV VGAIALGVATSAQITA AVALTKAQQ NAQEIIRLRDSIQNTINAVNDITVGLSS IGVALSKVQNYLNDVINPALQNLSCQ VSALNLGIQLNLYLTEITTIFGPQITNP SLTPLSIQALYTLAGDNLMQFLTRYG YGETSVSSILESGLISAQIVSFDKQTGI AILYVTLPSIATLSGSRVTKLMSVSVQ TGVGEGSAIVPSYVIQQTVEEFIPDS CIFTRSDVYCTQLYSKLLPDSILQCLQ GSMADCQFTRSLGSFANRFMTVAGG VIANCQTVLCRCYNPVMIIIPQNNGIA VTLIDGSLCKELELEGIRLTMAPVPVFA SYSRDLIINGNQFAPSDALDISSELGQ LNNSSSATDNLQKAQESLNKSIIPAA TSSWLIILLFVLVSISLVIGCISYFIYK HSTTNRSRNLSSDIISNPYIQKAN	2	39
NC_025348	4790-6570	gb: NC_025348: 4790-6570 生 物: ツホコ (Tuhoko)ウイ ルス 2 株名: UNKNOWN- NC_025348 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MAPCVLFLSSLLLISTISPSHGINQPAL RRIGAIVSSVKQLKFYSKTKPNYIIVK LLPTINLSKSNCLTSINRYKESVIEIHK PLADNIDNLNQKLLPKNRRKRMAGV AIGLAALGVAAAAQATAAVALVEAR KNTQMIQSLADSIQDTNAAVQAVNIG LQNSAVAIQAIQNQINNVINPALDRLN CEVLDAQIASILNLYLIKSVTIFQNQLT NPALQQLSIQMLSIVMQDTAKILGNF TIGDKFDQHDLLGSGSLITGQVVGVNL TNLQLIAAFIPSIAPLPQAYIIDLISITIS VNDTEAVIQIPERIMEHGSSYQFGGK QCVYGGFSAYCPFSDAVLMTQDLQL CMKGNIEHCIFSSVLGSFPNRFASVDG VFYANCKYMSCACSDPLQVIHQDDSD VNLVIDSSVCRSLTLGHVTFPIIAFS NVSYQMKTNISIEQMIVTSPDLSTEL KQINNSVNIAFTLDSSNRALKTSIFG TSSQIILIVLLIFTCLLILYVIFLTYIHKIL IKEVKRLRDGNSRTGSKLSFINPDV	2	40

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 1】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025350	4663-6428	gb: NC_025350: 4663-6428 生 物: ツホコ (Tuhoko)ウイ ルス 3 株名: UNKNOWN- NC_025350 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MLWLTILIALVGNHESTCMNINFLQS LGQINSQKRFLNFYTQQPPSYMVIRL VPTLQLSANNCTLGSIYRYRNAIKELI QPMDENLRWLSSNLIPQRRGKRFAG VAVGLAALGVAVAAQATAAVALVE ARANAEEKIASMSQSIQETNKAVTSLS QAVSASGIAIQAIQNEINNVHPILNQV QCDVLDARVGNILNLYLIKVTTFQNL QLTNPALQRLSTQALSMLMQSTSSYL RNLSSSESAINADLSMTNLIEAQIVGI NMTNLQLVLAVFIPSIARLNGALLYD FISITISSNQTEVMLQIPHRVLEIGNSL YTFEGTQCEMTKLNAYCLYSDAIPVT ESLRDCMNGLFSQCGFVRIIGSFANRF ASVNGVIYANCKHLTCSCLPDEIITQ DTNVPLTIIDTKRCTKISLGHLTFTIRE YANVTYSLRTEIANSQITVVSPLDLSS QLTTINNSLADATNHIMNSDRILDRL NSGLYSKWVVIIFLICASIVSLIGLVFLG FLIRGLILELRSKHRSNLNKASTYSIDS SIGLT	2	41
NC_025352	5950-8712	gb: NC_025352: 5950-8712 生 物: モジャン グ (Mojiang) ウイルス 株 名: Tongguan1 タンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MALNKNMFSSLFLGYLLVYATTVQS SIHYDSLKVGVIKGLTYNYKIKGSPS TKLMVVKLIPNIDSVKNCTQKQYDEY KNLVRKALEPVKMAIDTMLNNVKS GNNKYRFAGAIMAGVALGVATAATVT AGIALHRSNENAQAIAANMKSIAQNTN EAVKQLQLANKQTLAVIDTIRGEINN NIIPVINQLSCDTIGLSVGIRLTQYYSEI ITAFGPALQNPVNTRITQAISSVFNGN FDELLKIMGYTSGDLYEILHSELIRGN IIDVDVDAGYIALEIEFPNLTLVPNAV VQELMPISYNIDGDEWVTLVPRFVLT RTTLLSNIDTSRCTITDSSVICDNDYA LPMSHELIGCLQGDTSKCAREKVVS YVPKFALSDGLVYANCLNTICRCMD TDTPIQSGLGATVSLLDNKRCSVYQV GDVLISVGSYLGDEYNADNVELGPP IVIDKIDIGNQLAGINQTLQEAEDYIEK SEEFLKGVNPSIITLGSMVVLYIFMILI AIVSVIALVLSIKLTVKGNVVRQQFTY TQHVPSPMENINYVSH	2	42

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025363	4622-6262	gb: NC_025363: 4622-6262 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 12 株名: Wigeon/Italy/3 920_1/2005 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MAIPVPSSTALMIFNILVSLAPASALD GRLLLGAGIVPTGDRQVNVYTSSQTG IIALKLLPNLPKDKENCAEVSIRSNE TLTRILTPLAQSMIAIRGNSTVSTRGR EPRLVGAIIGGVALGVATAAQITAAT ALIQANQNAENIARLAKGLAATNEA VTDLTGKVGSLAIGVGKLQDYVNEQ FNRTGEAIECLTIESRVGVQLSLYTE VIGVFGDQITSPALSDISIQALYNLAG GNLNVLLQKMGIEGTQLGSLINSGLI KGRPIMYDDGNKILGIQVTLPSVGRIN GARATLLEAIAVATPKGNASPLIPRA VISVGS LVEELDMTPCVLTPTDIFCTRI LSYPLSDSLTTCLKGNLSSCVFSRTEG ALSTPYVSVHGKIVANCKSVVCRCVE PQQIISQNYGEALSLIDESLCRILELNG VILKMDGQFTSEYTKNITIDPVQVIISG PIDISSELSQVNSQLDSALENIKESNSY LSKVNVKLISSAMITYIVITVICLILTF VALVLGIYSYTKIRSQQKTLIWMGN IARSKEGNRF	2	43
NC_025373	4617-6582	gb: NC_025373: 4617-6582 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 3 株名: シ チメンチョウ /Wisconsin/68 タンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MASPMVPLLITVVPALISSQSANIDK LIQAGIIMGSGKELHIYQESGLDLYL RLLPVIPSNLSHCQSEVITQYNSTVTR LLSPIAKNLNHLQPRPSGRLFGAVIG SIALGVATSAQISAAIALVRAQQNAN DILALKAAIQSSNEAIKQLTYGQEKQL LAISKIQKAVNEQVIPALTALDCAVL GNKLAAQLNLYLIEMTTIFGDQINNP VLTPIPLSYLLRLTGSELNDVLLQQTR SSLSLIHLVSKGLLSGQIIGYDPSVQGI IIRIGLIRTQRIDRSLVFXPYVLPITISSN IATPIIPDCVVKKGVIIIEGMLKSNCIEL ERDIICKTINTYQITKETRACLQGNIT MCKYQQSRTQLSTPFITYNGVVIANC DLVSCRCIRPPMIITQVKGYPLTIINRN LCTELSDNLILNIETNHNFSNLNPTIID SQSRLIATSPLEIDALIQDAQHHAAAA LLKVEESNAHLLRVTGLGSSSWHILI LTLLVCTIAWLIGLSIYVCRIKNDDST DKEPTTQSSNRGIGVGSIQYMT	2	44

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025386	5548-7206	gb: NC_025386: 5548-7206 生 物: セーラム ウイルス 株 名: UNKNOWN- NC_025386 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MNPLNQTLIAKVLGFLLLSSSFTVGQI GFENLTRIGVHQVKQYGYKLAHYN HQLLLIRMIPTVNGTHNCTHQVITRY REMVREIITPIKGALDIMKKA VSPDLV GARIFGAIVAGAALGIATSAQITAGVA LHRTKLNGQEISKLEAVSLTNEAVE QLQYSQGKSILAIQGIQDFINFNVVPL LEEHTCGIAKLHLEMALMEYFQKLIL VFGPNLRDPIGSTIGIQALATLFQNNM FEVSLRLGYAGDDLEDVLQSNIRAN IIEAEPDSGFIVLAIRYPTLTLVEDQVI TELAHITFNDGPQEWVATIPQFVTYR GLVLANIDVSTCTFTERNVICARDQT YPMIIDLQLCMRGNIAKCGRTRVTGS TASRFLKDGNNMYANCIATMCRCMS SSSIINQEPShLTTLIVKETCSEVMIDTI RITLGERKHPPIDYQTTITLGQPIALAP LDVGTELANAVSYLNKSKVLEHSN EVLSSVSTAHTSLTATIVLGIVVGGLA ILIVVMFLFLEAQVIKVRAMMLCPIT NHGYLPNEDLLTRGHSIPTIG	2	45
NC_025390	4805-6460	gb: NC_025390: 4805-6460 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 9 株名: ア ヒル/New York/22/1978 タンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MGYFHLILLITAIASIAHLCTTTLDG RKLLGAGIVITEEKQVRVYTAAQSGT IVLRSFRVVS LDRYSCMESTIESYNKT VYNILAPLGDAIRRIQASGVSVIRIRE GRIFGAILGGVALGVATAAQITAAIAL IQANENAKNILRIKDSITKTNEAVRDV TNGVSQLTIAVGKLQDFVNKEFNKTT EAINCVQAAQQLGVLSLYLTEITTVF GPQITSPALSKLTIQALYNLAGVSLDV LLGRLGADNSQLSSLVSSGLITGQPIL YDSESQLALQVSLPSISDLRGVRATY LDTLAVNTAAGLASAMIPKVVIQSN IVEELDTTACIAAEADLYCTRITTFPIA SAVSACILGDVVSQCLYSKTNGVLTTP YVAVKGKIVANCKHVTCTRCVDPTSII SQNYGEAATLIDDQLCKVINLDGVSI QLSGTFESTYVRNVVISANKVIVSSSID ISNELENVNSSLSSALEKLDESDAALS KVNVLHTSTSAMATYIVLTVIALILGF VGLGLGCFAMIKVKSQAKTLLWLGA HADRSYILQSKPAQSST	2	46

【表 4 - 2 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025403	4826-6649	gb: NC_025403: 4826-6649 生 物: アキモタ ウイルス 1 株 名: UNKNOWN- NC_025403 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MWIMIILSLFQIIPGVTPINSKVLTLQLG VITKHTRQLKFYSHSTPSYLVVKLVLP TINTESTVCNFTSLSRKDSVRELITPL AKNIDNLNSILTIPKRRKRMAGVVIGL AALGVAAAAQATAAVALIEAKKNT QIQALSESIQNTNKAIVSSIEKGLSSAAI AVQAIQNQINNVPAL TALDCGVTD AQLGNILNLYLIKTLTVFQKQITNPAL QPLSIQALNIIMQETSSVLRNFTKTDEI EHTDLLTSLGITGQVVGVNLTNLQLII AAFIPSIAPLNQAYILDFIRITVNINNSE SMIQIPERIMEHGISLYQFGGDQCTFS DWSAYCPYSDATLMAPGLQNCFRGQ AADCVFSTVMGSFPNRFVSVQGVFY VNCKFIRCACTQPQRLITQDDSLSLTQ IDAKTCRMLTLGFVQFSINEYANVTY SFKNNVTAGQLIMTNPIDLSTEIKQM NDSVDEAARYIEKSNAALNKLMYGG RSDIVTTVLLVGFILLVYVIFVITYILK ILMKEVARLRNSNHPDLIKPYNYPM	2	47
NC_025404	4772-6647	gb: NC_025404: 4772-6647 生 物: アキモタ ウイルス 2 株 名: UNKNOWN- NC_025404 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MLNSFYQIICLAVCLTTYTVISIDQHN LLKAGVIVKSIKGLNFYSRGQANYIIV KLIPNVNVTDTDCDIGSIKRYNETVYS LIKPLADNIDYLRTQFAPTKRKKRFA GVAIGLTALGVATAAQVTAVALVK AQENARKLDALADSIQATNEAVQDL STGLQAGAIAIQAIQSEINHVINPALER LSCEIIDTRVASILNLYLIRLTTVFHRQ LVNPALTPLSIQALNHLLQGETEGLV KNESKMTDSKIDLLMSGLITGQVVG NIKHMQLMIAVFPPTTAQLPNAYVIN LLTITANINNSEVLVQLPNQILERSGII YQFRGKDCVSPNHMYCPYSDASILS PELQLCLQGRLEMCLFTQVVGSPFTR FASDKGIVYANCRHLQCACSEPEGIIY QDDTSAITQIDASKCSTLKLDMITFK LSTYANKTFDASFVSGKDQMLVTNL LDLSAELKTMNASVAHANKLIDKSN LLIQSNALIGHSENTIFIVVIVILAVMVL YLIIVTYIIKVMVEVSRLKRMNIYSID K	2	48

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025410	4958-6751	gb: NC_025410: 4958-6751 生 物: ツホコ (Tuhoko)ウイ ルス 1 株名: UNKNOWN- NC_025410 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MVTIIKPLILLVTVILQISGHIDTTALTS IGAVIASSKEIMYYAQSTPNYIVIKLIP NLPNIPSQCNFSSIAYYNKTLDDLFTPI SDNINMLHQRLSNTGRNRRFAGVAIG LAALGVATAAQVTAALVEAKSNT AKIAQIGQAIQNTNAAINSLNAGIGGA VTAIQAIQTQINGIITDQINAATCTALD AQIGTLLNMYLLQLTTTTFQPQIQNPA LQPLSIQALHRIMQGTIVLSNLTDS KYGLNDALSAGLITGQIVSVDLRLMQ ITIAANVPTLSRLENAIAHDIMRITTNV NNTIVVQLPETIMEHAGRLYQFNKD HCLSSTQRFPCPYSDAKLLTSKISSCL SGIRGDCIFSPVVGNFATRFISVKGVII ANCKFIRCTCLQPEGIISQLDDHTLTVI DLKLCNKLDLGLIQFDLQVLSNISYE MTLNTSQNLILTDPLDLSELQTMN QSINNAANFIEKSNSLLNSSTYEFNRS VALLVALILLSLTILYVIVLTCVVKLL VHEVSKNRRHIQDLESHHK	2	49
NC_028249	4850-7055	gb: NC_028249: 4850-7055 生 物: アザラシ ジステンパー ウイルス 株 名: PDV/Wadden_ Sea. NLD/1988 タ ンパク質名: 融合タンパク 質 遺伝子記 号: F	MTRVKKLVPPTNPPMHSLDSPFLNP EHATGKISITDDTSSQLTNFLYHKYH KTTINHLRTISGTDPPSAKLNKFGSPI LSTYQIRSAWVIAWVILVHCVMGQI HWTNLSTIGIIGTDSSHYKIMTRSSHQ YLVKLMPNVSIIDNCTKAELDEYEK LLNSVLEPINQALTLMTKNVKSLSLQSL GSGRRQRRFAGVVIAGAALGVATAA QITAGVALYQSNLNAQAIQSLRASLE QSNKAIDEVRQASQNIHIAVQGVQDY VNNEIVPALQHMSCELIGQRLGLKLL RYYTELLSVFGPSLRDPVSAEISIQALS YALGGEIHKILEKLGYSNDMVAILE TKGIRAKITHVDLSGKFIVLSISYPTLS EVKGVVVHRLEAVSYNIGSQEWYTT VPRYVATNGYLISNFDDESSCVFVSESA ICSQNSLYPMSPILQQCLRGETASCAR TLVSGTLGNKFILSKGNIIANCASILCK CHSTSKIINQSPDKLLTFIASDTCSLVE IDGVTIQVGSRQYPDVVYASKVILGP AISLERLDVGTNLGSALKKLNDKVL IESSDQILDTVKNSYLSLGTIALPVSI GLGLILLLLICCCCKRYQHLFSQSTKV APVFKPDLTGTSKSYVRSL	2	50

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_028362	5217-6842	gb: NC_028362: 5217-6842 生物: ヤギパラインフルエンザウイルス 3 株名: JS2013 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MIKKIICIFSMPIILLSFCQVDIIKLQRVG ILVSKPKSIKISQNFETRYLVNLIPNIE NAQSCGDQQIKQYKKLLDRLIPLYD GLRLQQDIIVVDNNLKNNTNHRAKRF FGEIIGTIALGVATSAQITAAVALVEA KQARSDIERVKNAVRDTNKAVQSIQ GSVGNLIVAVKSVQDYVNNEIVPSIK RLGCEAAGLQLGIALTQHYSELTNIF GDNIGTLKEKGIKLQGIASLYHTNITEI FTTSTVDQYDIYDLLFTESIKMRVIDV DLNDYSITLQVRLPLLTKISDAQIYNV DSVSYNIGGTEWYIPLPRNIMTKGAF LGGANLQDCIESFSYICPSDPGFILN RDIENCLSGNITQCPKTLVISDIVPRYA FVDGGVIANCLSTTCTCNGIDNRINQ APDQGIKIITYKDCQTIGINGMLFKTN QEGTLAAYTPVDITLNNSVNLDPIDLS IELNRARSDLAESKEWIKRSEAKLDS VGSWYQSSTTEIIQIVMIIVLFIINIIVLI VLIKYSRSQNQSMNNHMEPYILTNK VQ	2	51
AF079780	5919-7580	gb: AF079780 生物: ツパイバラムイクソウイルス 株名: UNKNOWN-AF079780 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MASLLKTICYIYLITYAKLETPKSQL DLDSLASIGVVDAGKYNYKLMTTGS EKLMMVIKLVPNITYATNCNLTAHTAY TKMIERLLTPINQSLYEMRSVITERDG GTIFWGAIAGAALGVATAAAITAGV ALHRAEQNARNIAALKDALRNSNEAI QHLKDAQGHTVLAIQGLQEINNNIIP KLKESHCLGVNNQLGLLLNQYYSEIL TVFGPNLQNPVSASLTIAIAKAFNG DFNSLMTNLNYDPTDLLDILESNSING RIIDVNLNEKYIALSIEIPNFITLDAKI QTFNRITYGYGSNEWLTLIPDNILEYG NLISNVDLTSCVKTSSYICNQDTSYP ISSELTRCLRGDTSSCPRTPVVNSRAP TFALSGGHIYANCAKAACRCEKPPM AIVQPATSTLTFLTEKECQEVVIDQINI QLAPNRLNKTIIITDGIDLGPEVINPID VSAELGNIELEMDKTQKALDRSNKIL DSMITEVTPDKLLIAMIVVFGILLWL FGVSYAFKIWSKLHFLDSYVYSLRN PSHRSNGHQNHSTDISG	1	52

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
EU403085	4664-6585	gb: EU403085: 4664-6585 生物: トリパラムクソウイルス 3 株名: APMV3/PKT/ Netherland/449 /75 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MQPGSALHLPHELYIIIALVSDGTLGQT AKIDRLIQAGIVLGSGKELHISQDSGT LDFVRLLPVLPNSNLHCQLEAITQYN KTVTRLLAPIGKNLEQVLQARPRGR FGPIIGSIALGVATSAQITAAIALVRAQ QNANDILALKNALQSSNEAIRQLTYG QDKQLLAISKIQKAVNEQILPALDQL DCAVLGTKLAVQLNLYLIEMTTIFGE QINNPVLATIPLSYILRLTGAELNNVL MKQARSSLSLVQLVSKGLLSGQVIGY DPSVQGLHVRVNL MRTQKIDRALVYQ PYVLPITLNSNIVTPIAPECVIQKGTIIE GMSRKDCTELEQDIICRTVTTYTLAR DTRLCLQGNISSCRYQQSGTQLHTPFI TYNGAVIANCDLVSCRCLRPPMIITQ VKGYP LTIITRSVCQELSVDNLVLNIE THHNFSLNPTIIDPLTRVIATTPLEIDSL IQEAQDHANAALAKVEESDKYLRAV TGGNYSNWIYIVLVIVLLFGNLGWSLL LTVLLCRSRKQRRYQQDDSVGSER GVGVGTIQYMS	1	53
KX258200	4443-6068	gb: KX258200: 4443-6068 生物: トリパラムクソウイルス 14 株名: APMV14/duck/ Japan/11OG03 52/2011 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MEKGTVLFLAALTLYNVKALDNTKL LGAGIASGKEHELKIYQSSVNGYIAV KLIPFLPSTKRECYNEQLKNYNATINR LMGPINDNIKLVLSGVKTRTREGKLI GAIIGTAALGLATAAQVTAAIALEQA QDNARAILTLKESIRNTNNAVSELKT GLSEVSIALSKTQDYINTQIMPALSNL SCEIVGLKIGIQLSQYLTEVTAVFGNQ ITNPALQPLSMQALYQLCGGDFSLLL DKIGADRNELESLEYANLVTGRIVQY DTADQLVIIQVSIPSVSTLSGYRVTEL QSISVDMDHGEGKAVIPRYIVTSGRVI EEMDISPCVL TATAVVCNRLTTSLEPE SVLKCLDGDHSSCTYTSNSGVLETRY IAFDGMLIANCRSIVCKCLDPYIIPQN KGKPLTIISKEVCKKVTLTGITLLIDA EFTGEYGLNITIGPDQFAPSGALDISTE LGKLNNSINKAEDYIDKSNELLNRVN VDIVNDTAVIVLCVMSALVVVWCIG LTVGLIYVSKNTLRAVAIKGTSIENPY VSSGKHAKNSS	1	54

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	完全な遺伝子名	配列	配列数/クラスター	配列番号
KY511044	4592-6247	gb: KY511044: 4592-6247 生物: トリパラミクソウイルス UPO216 株名: APMV-15/WB/Kr/UP O216/2014 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MIFTMYHVTVLLLLSLLTLPLGIQLAR ASIDGRQLAAAGIVVTGEKAINLYTSS QTGTIVVKLLPNVPQGREACMRDPLT SYNKTLTSLLSPLGEAIRRIHESTTETA GLVQARLVGAIIGSVALGVATSAQIT AAAALIQANKNAENILKLKQSIATN EAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQDFIN TQFNNTAQEIDCIRISQQLGVNELNLYL TELTTFVFGPQITSPALSPLSIQALYNLA GGNLDVLLSKIGVGNNQLSALISSGLI SGSPILYDSQTQLLGIQVTLPSVSSLN NMRAIFLETLSVSTDKGFAAALIPKV VTTVGTVTEELDTSYCIETDIDLFCTRI VTFPMSPGIYACLNGNTSECMYSKTQ GALTTPYMSVKGSIVANCKMTTCRC ADPASIISQNYGEAVSLIDSSVCRVITL DGVTLRLSGSFDSTYQKNITIRDSQVII TGSLDISTELGNVNNNSINNALDKIEES NQILESNNVSLTSTNALIVYIICHTALAL ICGITGLILSCYIMYKMRSQKQKTLMW LGNNTLDQMRAQTKM	1	55
NC_025360	6104-8123	gb: NC_025360: 6104-8123 生物: 大西洋サケパラミクソウイルス 株名: ASPV/Yrkje37 1/95 タンパク質名: 融合タンパク質 遺伝子記号: F	MDGPKFRFVLLILLTAPARGQVDYDK LLKVGIFEKGTANLKISVSSQORYMVI KMMPNLGPMNQCGIKEVNLYKESIL RLITPISTTLNLIKSEIQVEREVALQPN GTIVRFFGLIVAAGALTLATSAQITAG IALHNSLENAKAIKGLTDAIKESNLAI QKIQDATAAGTVIALNALQDQVNTNIIP AINTLGCTAAGNTLGIALTRYSELIM IFGPSLGNPVEAPLTIQALAGAFNGDL HGMIREYGYTPSDIEDILRTNSVTGRV IDVDLVGMNIVLEINLPTLYTLRDTKI VNLGKITYNVDGSEWQTLVPEWLAI RNTLMGGVDLSRCVVSRLICKQDP VFSLDTSIISCLNGNTESCPRNRVNS VAPRYAVIRGNILANCISTTCLCGDPG VPIIQKGDNTLTAMSINDCKLVGVDG YVFRPGPKAVNVTFNPLHLNLGPEVN VNPVDISGALGKVEQDLASSRDHLAK SEKILSGINPNINTEMVLVAVILSLVC AMVVIGIVCWLSILTKWVRSCRADCR RPNKGPD LGPIMSSQDNLSF	1	56

【0 4 6 4】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソゲンは、表 5 のアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは、配列の一部、例えば、長さが 100、200、300、400、500、もしくは 600 個のアミノ酸と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソゲンは、表 5 の任意のアミノ酸配列と少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される核酸配列は、表 5 のアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが 40、50、60、80、100、200、300、400、50

0、もしくは600個のアミノ酸の部分と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【0465】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソゲンは、配列番号57～132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが100、200、300、400、500、または600個のアミノ酸の部分と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソゲンは、配列番号57～132のうちのいずれか1つで示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される核酸配列は、配列番号57～132のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、あるいは配列の一部、例えば、長さが40、50、60、80、100、200、300、400、500、もしくは600個のアミノ酸の部分と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする。

【表5-1】

表5、パラミクソウイルスプロテインG、H、およびHN配列クラスター。列1、Genbank IDには、クラスターの重心配列であるウイルスの全ゲノム配列のGenbank IDが含まれる。列2、CDSのヌクレオチドは、全ゲノムの遺伝子のCDSに対応するヌクレオチドを示す。列3、全遺伝子名は、Genbank ID、ウイルス種、株、およびタンパク質名を含む遺伝子のすべての名称を示す。列4、配列は、遺伝子のアミノ酸配列を示す。列5、配列数/クラスターは、この重心配列でクラスター化する配列の数を示す。

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
KU950686	4643-5638	gb: KU950686: 4643-5638 生物: ヒト呼吸器合胞体ウイルス 株名: RSVA/ホモサピエンス/USA/TH_105 06/2014 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSKTKDQRTAKTLERTWDTLNHLLFI SSCLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLII AAIIFIASANKVTLTTAIIQDATNQIK NTTPTYLTQNPQLGISFSNLSGTTLQS TTILASTTPSAESTPQSTTVKIINTTTT QILPSKPTTKQRQNKPNKPNNDFFH EVFNFPVPCISNNPTCWAICKRIPNK KPGKKTTKPTKKPTLKTTKKDPKPQ TTKPKEALTTPKPTGKPTINTTKTNIRT TLLTSNTKGNPEHTSQEETLHSTTSEG YLSPSQVYTTSGQEETLHSTTSEGYLS PSQVYTTSEYLSQSLSSSNTTK	706	57

【表 5 - 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列 番号
AB524405	6424-8274	gb: AB524405: 6424-8274 生物: ニューカッスル病ウイルス 株名: グース /Alaska/415/91 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミナーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MERGVSQVALENDEREAKNTWRLVF RVTVLFLTIVTLAISAAALAFSMNAST PQDLEGIPVAISKVEDKITSALGASQD VMDRIYKQVALESPLALLNTESTIMN ALTSLSYQINGAANASGCGAPVPDPD YIGGIGKELIVDDTSDVTSFYPSAFQE HLNFIPAPTTGSGCTRIPSFDMMSATHY CYTHNVILSGCRDHSQYLAALGV RTSATGRVFFSTLRSINLDDTQNRKSC SVSATPLGCDMLCSKVTETEEEDYQS TDPTLMVHGRLGFDGQYHERDLDVH TLFGDWVANYPGVGGGSFINNRVWF PVYGGGLKPGSPTDKRQEGQYAIYKR YNDTCPDDQEYQVRMAKSAYKPNRF GGKRVQQAILSIGVSTTLADDPVLT TSNTITLMGAEGRVMTVGTSHYLYQ RGSSYYSPAILYPLTIANKTATLQDPY KFNAFTRPGSVPCQASARCPNSCVTG VYTDYPYPIVFHKNHTLRGVFGTMLD DEQARLNPVSAVFDSIARSRVTRVSSS STKAAAYTTSTCFKVVKTKGVYCL EISNTLFGFRIVPLLVEILRDEGRSEA RSALTQGHPGWNDEVVDPIFCAVT NQTDHRQKLEEYAQSWP	418	58
JQ582844	4686-5636	gb: JQ582844: 4686-5636 生物: ヒト呼吸器合胞体ウイルス 株名: NH1067 タンパク質名: 受容体結合糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSKNKNQRTARTLEKTWDTLNLH SSCLYKLNLSIAQIALSVLAMIISTSL IIAAIIFIISANHKVTLTTVTQTIKNHT EKNITTYLTQVSPERVSPSKQPTTTPPI HTNSATISPNTKSETHHTTAQTKGRT TTPTQNNKPSTKPRPKNPCKPKDDY HFEVFNFPVPCSGNQLCKSICKTIP NNKPKKKPTTKPTNKPTTKTNKRDP KTPAKTLKKETTINPTTKKPTPKTTER DTSTPQSTVLDTTTSKHTERDTSTPQS TVLDTTTSKHTIQQSLHSITPENTPN STQPTASEPSTSNSTQKL	278	59

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
AB254456	7271-9136	gb: AB254456: 7271-9136 生物: 麻疹ウイルス 株名: SSPE-Kobe-1 タンパク質名: 血球凝集素 遺伝子記号: H	MSPHRDRINAFYRDNPHPKGSRIVINR EHLMDIRPYVLLAVLFVMFLSLIGLL AIAGIRLHRAAIYTAIEHKSLSTNLDV TNSIEHQVKDVLTPLFKIIIGDEVGLRT PQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFR DLTWCINPPERIKLDYDQYCADVAEE ELMNALVNSTLLEARATNQFLAVSK GNCSGPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLSR GYNVSSIVTMTSQGMYGGTYLVGKP NLSSKGSELSQLSMHRVFEVGVIRNP GLGAPVFHMTNYFEQPVSNDFSNCM VALGELRFAALCHREDSVTVPYQGS GKGVSFQLVKLGWKSPTDMQSWV PLSTDDPVIDRLYLSSHARGVIADNQA KWAVPTTRTDDKLRMETCFQQACKG KNQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLS VNLSLTVELKIKIASGFGPLITHGSGM DLYKTNHDNVYWLTIIPMKNLALGV INTLEWIPRFKVSPLFTVPIKEAGED CHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPG QDLQYVLATYDTSRVEHAVVYYVYS PSRSFSYFYPFRLPIKGVPIELQVECFT WDQKLWCRHFCVLADSESGGHITHS GMVGMGVSVCTVTREDGTNRRQGCQ	128	60
AB040874	6614-8362	gb: AB040874: 6614-8362 生物: おたふく風邪ウイルス 株名: Myahara タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MEPSKLFMTSDNATFAPGPVINAADK KTFRTCFRILVLSVQAVTLILVIVTLG ELVRMINDQGLSNQLSSIADKIRESAT MIASAVGVMNQVIHGVTVSLPLQIEG NQNQLLSTLATICTGKKQVSNCSTNIP LVNDLRFINGINKFIIEDYATHDFSIGH PLNMPSFIPTATSPNGCTRIPSFSLGKT HWCYTHNVINANCKDHTSSNQYISM GILVQTASGYPMFKTLKIQYLSDGLN RKSCSIATVPDGCAMYCYVSTQLETD DYAGSSPPTQKLTLIFYNDTVERTIS PTGLEGNWATLVPVGSGIYFENKLI FPAYGGVLPNSSLGVKSAREFFRPVN PYNPCSGPQQDLQDQALRSYFSPYFS NRRVQSAFLVCAWNQILVTNCELVV PSNNQTLMGAEGRVLLINNRLYYQ RSTSWWPYELLYEISFTFTNSGQSSVN MSWIPIYSFTRPGSGNCSGENVCPTAC VSGVYLDPWPLTPYSHQSGINRNIFYF TGALLNSSTTRVNPTLYVSALNNLKV LAPYGNQGLFASYTTTTTCFQDTGDAS VYCVYIMELASNIVGEFQILPVLTRLT IT	87	61

10

20

30

40

【表 5 - 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
AB736166	6709-8427	gb: AB736166: 6709-8427 生物: ヒトレスピロウイルス 3 株名: ZMLS/2011 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MEYWKHTNHGKDAGNELETATATH GNRLTNKITYILWTITLVLLSIVFIIVLI NSIKSEKAHESLLQDINNEFMVTEKI QVASDNTNDLIQSGVNTRLLTIQSHV QNYIPISLTQQISDLRKFISEITIRNDNQ EVPPQRITHDVGKPLNPDDFWRCTS GLPSLMRTPKIRLMPGPGLLAMPPTTV DGCVRTPSLVINDLIYAYTSNLTIRGC QDIGKSYQVLQIGIITVNSDLVDPDLP RISHTFNINDNRKSCSLALLNTDVYQL CSTPKVDERSDYASSGIEDIVLDIVNY DGSISTTRFKNNNISFDQPYAALYPSV GPGIYYKGGKIIIFLGYGGLEHPINENAI CNTTGCPCGKTQRDCNQASHSPWFSD RRMVNSIIVVDKGLNSVPKLKVTIS MRQNYWGSEGRLLLLGNKIYIYTRST SWHSLQLGIIDITDYSIRIKWTWHN VLSRPGNNECPWGHSCPDGCITGVYT DAYPLNPTGSIVSSVILDSQKSRVNPV ITYSTATERVNELAIRNKTLASAGYTTT SCITHYKGYCFHIVEINHKSNTFQP MLFKTEIPKSCS	78	62
KJ627396	6166-6885	gb: KJ627396: 6166-6885 生物: ヒトメタニューモウイルス 株名: HMPV/Homo sapiens/PER/FLI1305/2010/A タンパク質名: 付着糖タンパク質 G 遺伝子記号: G	MEVKVENIRAIDMLKARVKNRVAR KCFKNASLILIGITLSIALNIYLIINYTI QKTTSESEHHTSSPPTESNKETSTIPID NPDITPNSQHPTQQSTESLTLYPASSM SPSETEPASTPGITNRLSLADRSTTQPS ESRTKTNSTVHKKNKKNISSTISRTQS PPRTTAKAVSRRTALRMSSTGERPTT TSVQSDSSTTAQNHEETGPANPQASV STM	71	63

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
AB475097	7079-8902	gb: AB475097: 7079-8902 生物: イヌジステンパーウイルス 株名: M25CR タンパク質名: 血球凝集素 遺伝子記号: H	MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSL VTEEQGRRPPYLLFVLLILLVGILAL LAAGVRFQVSTSNVEFGRLLKDDL EKSEAVHHQVMDVLTPLFKIIGDEIGL RLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPREFD FRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDAIG VRKSIASAAANPILLSALSGGRGDIFPP YRCSGATTSVGRVFPLSVLSMSLISK TSEIISMLTAISDGVYGKTYLLVPDYI EREFDTQKIRVFEIGFIKRWLNDMPLL QTTNYMVLPEMSKAKVCTIAVGELTL ASLCVDESTVLLYHDSNGSQDSILVV TLGIFGATPMNQVEEVIPVAHPSVERI HITNHRGFIKDSVATWMVPALVSEQQ EGQKNCLESACQKRSYPMCNOQTSWE PFGGVQLPSYGRLTLPLDASIDLQLNI SFTYGPVILNGDGMDDYENPLDLSG WLTIPPKNGTILGLINKASRGDQFTVT PHVLTAFRESSGNCYLPIQTSQIMDK DVLTESNLVVLPTQNFRYVVATYDIS RENHAIVYYVYDPIRTISYTFRLTT KGRPDFLRIECFVWDDDLWCHQFYR FESDITNSTTSVEDLVRIRFSCNRSKP	45	64
AJ849636	7326-9155	gb: AJ849636: 7326-9155 生物: 小反芻獣疫ウイルス 株名: Turkey2000 タンパク質名: ヘマグルチニン 遺伝子記号: H	MSAQRERINAFYKDNPHNKNHRVIL DRERLVIERPYILLGVLLVMFLSLIGL LAAGIRLHRATVGTSEIQSRLNTNIEL TESIDHQTCDVLTPLFKIIGDEVGIRIP QKFSDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRD LRWCMNPPERVKINFDQFCEYKAAV KSIEHIFESPLNKSCKKLQSLTLGPGTG CLGRTVTRAHFSELTLTMDLDLEM KHNVSSTVTVVEEGLFGRTYTVWRS DARDPSTDGLIGHFLRVFEIGLVRDLG LGPPVFHMTNYLTVMNSDDYRRCLL AVGELKLTALCSSSETVTLGERGVPK REPLVVVILNLAGPTLGGELYSVLPTS DLMVEKLYLSSHRGHIKDDEANWVV PSTDVRDLQNKGECLVEACKTRPPSF CNGTGSGPWSEGRIPAYGVIRVSLDL ASDPGVVITSVFGPLPHLSGMDLYN NPFSAVWLAVPPYEQSFLGMINTIG FPNRAEVMPHILTTEIRGPRGRCHVPI ELSRRVDDDIKIGSNMVLPTIDLRIT ATYDVSRSEHAIVYYIYDTGRSSSYF YPVRLNFKGNPLSLRIECFPWRHKVW CYHDCLIYNTITDEEVHTRGLTGIEVT CNPV	34	65

10

20

30

40

【表 5 - 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
AB005795	6693-8420	gb: AB005795: 6693-8420 生物: センダイウイルス 株名: Ohita タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MDGDRSKRDSYWSTSPGGSTTKLVS DSERSGKVDTWLLLAFTQWALSIA T VIICIVIAARQGYSMERYSMTEALNT SNKEVKESLTSLIRQEVITRAANIQSS VQTGIPVLLNKNSRDVIRLIEKSCNRQ ELTQLCDSTIAVHHAEGIAPLEPHSFW RCPAGEPYLSSDPEVSLLPGPSLLSGS TTISGCVRLPSLSIGEAIYAYSSNLITQ GCADIGKSYQVLQLGYISLNSDMFPD LNPVVSHTYDINDNRKSCSVVATGTR GYQLCSMPIVDERTDYSSDGIEDLVL DILDLDKGRTKSHRYSNSEIDLDPFSA LYPSVGSGIATEGSLIFLGYGGLTTPL QGDTKCRIQGCQVVSQDTCNEALKIT WLGKQVSVLQVNDYLSERPRIRV TTIPITQNYLGAEGRLKLGQVYIYT RSSGWHSQLQIGVLDVSHPLTISWTP HEALSRPGNEDCNWYNTCPKECISGV YTDAYPLSPDAANVATVTLYANTSR VNPTIMYSNTTNIINMLRIKDVQLEAA YTTTSCITHFGKGYCFHIIINQKSLNT LQPMLFKTSIPKLCCKAES	23	66
AF457102	6903-8630	gb: AF457102 生物: ヒトパラインフルエンザウイルス 1 株ワシントン/1964 株名: Washington1964 タンパク質名: HN 糖タンパク質 遺伝子記号: HN	MAEKGKTNSYWSSTRNDNSTVNTH INTPAGRTHIWLLIATTMHTVLSFIIMI LCIDLIIKQDTCMKTNIMTVSSMNESA KIIKETITELIRQEVISRTINIQSSVQSGI PILLNKQSRDLTQLIEKSCNRQELAQI CENTIAIHHADGISPLDPHDFWRCVPV EPLLSNNPNISLLPGPSLLSGSTTISGC VRLPSLSIGDAIYAYSSNLITQGCADI GKSYQVLQLGYISLNSDMYPDLNPVI SHTYDINDNRKSCSVIAAGTRGYQLC SLPTVNETTDYSSEGIEDLVFDILDLDK GKTKSHRYKNEDITFDHPFSAMYPSV GSGIKIENTLIFLGYGGLTTPLQGD TK CVINRCTNVNQSVCNDAKITWLKK RQVVNVLRINNYLSDRPKIVVETIPIT QNYLGAEGRLKLGKKIYIYTRSSGW HSNLQIGSLDINNPMTIKWAPHEVLS RPGNQDCNWNRCPRECISGVYTDA YPLSPDAVNVATTTLYANTSRVNPTI MYSNTSEIINMLRLKNVQLEAAAYTTT SCITHFGKGYCFHIVEINQASLNTLQP MLFKTSIPKICKITS	21	67

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列 番号
KJ627397	6146-6888	gb: KJ627397: 6146-6888 生 物: ヒトメタ ニューモウイ ルス 株名: HMPV/Homo sapiens/PER/F PP00098/2010/ B タンパク質 名: 付着糖タ ンパク質 G 遺 伝子記号: G	MEVRVENIRAIDMFKAKMKNRIRSSK CYRNATLILIGLTALSMALNIFLIIDYA TLKNMTKVEHCVNMPPVEPSKKSPM TSAADLNTKLNPPQATQLTTEDSTSL AATSENHLHTETTPTSDATISQQATDE HTLLRPINRQTTQTTEKKPTGATTK KDKEKETTTTRTTSTAATQTLNNTNQT SNGREATTTTSARSRNGATTQNSDQTI QAADPSSKPYHTQTNTTTAHNTDTSS LSS	21	68
AF017149	8913-10727	gb: AF017149 生物: ヘンド ラウイルス 株 名: UNKNOWN- AF017149 タ ンパク質名: 糖タンパク質 遺伝子記号: G	MMADSKLVSLNNNLGKIKDQGKVI KNYYGTMDIKKINDGLLDSKILGAFN TVIALLGSIHVMNIMIIQNYTRTTDNQ ALIKESLQSVQQQIKALTDKIGTEIGP KVSLIDTSSITIPANIGLLGSKISQSTS SINENVNDKCKFTLPPLKIHECNISCP NPLPFREYRPISQGVSDLVGLPNQICL QKTTSTILKPRLISYTLPI NTREGVCIT DPLLAVDNGFFAYSHLEKIGSCTR GIA KQRIIGVGEVLDRGDKVPSMFMTNV WTPPNPSTIIHCSSTYHEDFYTLCA VSHVGDPI LNSTSWTESLSLRLAVRP KSDSGDYNQKYIAITKVERGKYDKV MPYGPSGIKQGD TLYFPAVGFLPRTE FQYND SNCP IIHCKY SKAENCRLSMG VNSKSHYILRSGLLKYNLSLGGDIILQ FIEIADNRLTIGSPSKIYNSLGQPVFYQ ASYSWDTMIKLGVDVDTVDPLRVQWR NNSVISRPGQSQCPRFNVCPVCWEG TYNDAFLIDRLNWVSAGVYLN SNQT AENPVFAVFKDNEILYQVPLAEDDTN AQKTITDCFLLE NVIWCISLVEIYDTG DSVIRPKLFAVKIPAQCSES	14	69

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
AF212302	8943-10751	gb: AF212302 生物: ニパウ イルス 株名: UNKNOWN- AF212302 タ ンパク質名: 付着糖タンパ ク質 遺伝子記 号: G	MPAENKKVRFENTTSDKGKIPSKVIK SYYGTMDIKKINEGLLDKILSAFNTV IALGSIIVMNIMIIQNYTRSTDNQA VIKDALQGIQQIKGLADKIGTEIGPK VSLDTSSTITIPANIGLLGSKISQSTASI NENVNEKCKFTLPPLKIHECNISCPNP LPFREYRPQTEGVSNLVGLPNNICLQ KTSNQILKPKLISYTLPPVVGQSGTCIT DPLLAMDEGYFAYSHLERIGSCSRGV SKQRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNV WTPPNPNTVYHCSAVYNNEFYVLC AVSTVGDPILNSTYWSGSLMMTRLA VKPKSNGGGYNQHLALRSIEKGRY DKVMPYGPSGIKQGDLYFPAVGFLV RTEFKYNDSPITKCQYKPCNCRL SMGIRPNSHYILRSGLLKYNLSDGENP KVVFIISDQRLSIGSPSKIYDSLQGPV FYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVV NWRNNTVISRPGQSQCPRFNTCPEIC WEGVYNDAFLIDRINWISAGVFLDSN QTAENPVFTVFKDNEILYRAQLASED TNAQKTITNCFLKNIWCISLVEIYD TGDNVIRPKLFAVKIPEQCT	14	70
EU439428	6751-8638	gb: EU439428: 6751-8638 生 物: ブタパラ インフルエン ザウイルス 3 株名: 92- 7783_ISU-92 タンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ HN 遺 伝子記号: HN	MEYWKHTNSTKDTNNELGTTDRDHS SKATNIIMYIFWTTTSTILSVIFIMILIN LIQENHNHKLMLQEIKKEFAVIDTKIQ KTSDDISTSQSGINTRLLTIQSHVQNY IPLSLTQQMSDLRKFINDLTTKREHQE VPIQRMTHDSGIEPLNPKFWRCTSG NPSLTSSPKIRLIPGPGLLATSTTVNGC IRIPSLAINNLIYAYTSNLITQGCQDIG KSYQVLQIGIITNSDLVPDLNPRVTH TFNIDDNRKSCSLALLNTDVYQLCST PKVDERSDYASTGIEDIVLDIVTSNGL IITTRFTNNNITFDKPYAALYPSVGPGI YYKDKVIFLGYGGLEHEENGDVICNT TGC PGKTQRDCNQASYSWFNSRRM VNSIIVVDKSIDTTFSLRVWTIPMRQN YWGSEGRLLLLGDRIYIYTRSTSWHS KLQLGVIDISDYNINIRINWTWHNVLS RPGNDECPWGHSCPDGCITGVYTDA YPLNPSGSVVSSVILDSQKSRENPIITY STATNRVNELAIYNRTLPAAYTTTNCI THYDKGYCFHIVEINHRSLNTFQPML FKTEVPKNCS	14	71

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
KF530164	6157-6906	gb: KF530164: 6157-6906 生物: ヒトメタニューモウイルス 株名: HMPV/AUS/172832788/2004/B タンパク質名: 付着糖タンパク質 G 遺伝子記号: G	MEVRVENIRAIDMFKAKIKNRIRSSRCYRNATLILIGLTALSMALNIFLIIDHATLRNMIKTENCANMPSPAEPSSKKTPTS TAGPSTKPNPQQATQWTENSTSPAATLEGHPYTGTTPDTPAPQQTDDKH TALPKSTNEQITQTTEKKTRATTQKREKRKENTNQTTSTAATQTTNTTNQT RNASETITTSDDGPRIDTTTQSSEQTAR ATEPGSSPYHARRGAGPR	14	72
AB910309	6960-8747	gb: AB910309: 6960-8747 生物: ネコモルビリウイルス 株名: SS1 タンパク質名: 血球凝集素タンパク質 遺伝子記号: H	MKNINIKYYKDSNRYLGKILDEHKIVNSQLYSLSIKVITIIIVSLIATIMTIIN ATSGRTTLNSNTDILLNQRDEIHSIHE MIFDRVYPLITAMSTELGLHIPTLLDE LTKAIDQKIKIMNPPVDVTSDLSWCI KPPNGIIIDPKGYCESMELSKTYKLLL DQLDVSRRKSLTINRKNINQCQLVDD SEIIFATVNIQSTPRFLNFGHTVSNQRI TFGQGTYSSTYILTIQEDGITDVQYRV FEIGYISDQFGVFPSLIVSRVLPIRMVL GMESCTLTSDRQGGYFLCMNTLTRSI YDYVNIRDLSLYITLPHYGKVNITY FNFGKIRSPHEIDKLWLTSRGRQIISG YFAAFVTITIRNYYNYPYKCLNNPCF DNSENYCRGWYKNITGTDDVPILAYL LVEMYDEEGPLITLVAIPPYNYTAPSH NSLYYDDKINKLIMTTSHIGYIQINEV HEVIVGDNLKAILLNRLSDEHPNLTA CRLNQGIKEQYKSDGMIISNSALIDIQ ERMYITVKAIPPVGNYNFTVELHSRS NTSYILLPKQFNAKYDKLHLECFNWD KSWWCALIPQFSLSWNESLSVDTAIF NLINCK	12	73

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 0】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
AB759118	7116-8957	gb: AB759118: 7116-8957 生物: トリパラミクソウイルス 6 株名: トウネン/日本/8KS0813/2008 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MASPSELNRSQATLYEGDPNSKRTW RTVYRASTLILDLAILCVSIVAIVRMS TLTPSDVTDSSISSITSLSDTYQSVWSD THQKVNSIFKEVGISIPVTLDKMQVE MGTAVNIIIDAVRQLQGVNGSAGFSI TNSPEYSGGIDALIYPQKSLNGKSLAI SDLLEHPSFIPAPTTSHGCTRIPTFHLG YRHWCYSHNTIESGCHDAGESIMYLS MGAVGVGHQGKPVFTTSAAVILDDG KNRKSCSVVANPNNGCDVLCSLVKQT EDQDYADPTPTPMIHGRLHFNGTYTE SMLDQSLFTGHWVAQYPAVSGSGSVS HGRLFFPLYGGISKSSSLFPKLRAHAY FTHNEELECKNLTSKQREDLFNAYMP GKIAGSLWAQGIVICNLTTLADCKIA VANTSTMMAAEGRLQLVQDKVVL YQRSSSWWPVLIYYDILVSELVNARH LDIVNWVPYPQSKFPRPTWTGKLCCK PSICPAVCVTGVYQDVWVSVGDFS NETVVIGGYLEAASERKDPWIAAANQ YNWLTRRQLFTAQTEAAYSSTTCFRN THQDKVFCLTIMEVTDNLLGDWRIAP LLYEVTVVDRQQSSRKAVAMSEHR TRFKYYSPENKFTPQH	11	74
AY141760	6791-8485	gb: AY141760 生物: フェルドランスパラミクソウイルス 株名: ATCCVR-895 タンパク質名: ヘマグルチニン-ニューラミニダーゼ タンパク質 HN 遺伝子記号: HN	MDPKSYCNEDLRSDGGEKSPGGDL YKGHILVSTVISLIIAISLAFIIDNKINIQ SLDPLRGLED SYLVPIKDKSEISQDIQ EGIFPRLNLITAATTTTIPRSIAIQTDL SDLIMNRCYPSVVNNDTSCDVLGAI HSNLFSQLDPSTYWTCSSGTPTMNQT VKLLPDNSQIPGSTYSTGCVRIPTFSL GSMIYSYSHNVIYEGCNDHSSQYW QLGYISTSKTGEPLQQVSRTLTLNNG LNRKSCSTVAQGRGAYLLCTNVVED ERTDYSTEGIQDLTLDYIDIFGAERSY RYTNNEVDLDRPYAALYPSVSGSTV YNDRILFLGYGGLMTPYGDQAMCQA PECTSATQEGCNSNQLIGYFSGRQIVN CHIEITVGTEKPIIRVRTIPNSQVWLGA EGRIQTLGGVLYLYIRSSGWHALAQT GIILTLDPIRISWIVNTGYSRPGNGPCS ASSRCPAQCITGVYTDIFPLSQNYGYL ATVTLLSGVDRVNPVISYGTSTGRVA DSQLTSSSQVAAYTTTTCTFTFNQKGY CYHIIELSPATLGIFQPVLVVTEIPKICS	8	75

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
EU877976	6248-8161	gb: EU877976: 6248-8161 生物: トリパラミクソウイルス 4 株名: APMV-4/KR/YJ/06 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MQGNMEGSRDNLTVDELKTTWRL AYRVVSLLLMVSALIISIVILTRDNSQS IITAINQSSDADSKWQTGIEGKITSIMT DTLDTRNAALLHIPLQLNTLEANLLS ALGGNTGIGPGDLEHCRYPVHDTAY LHGVNRLINQTAADYTAEGPLDHVNF IPAPVTTTGCTRIPSFVSSSIWCYTHN VIETGCNDHSGSNQYISMGVIKRAGN GLPYFSTVVSKYLTGDLNRKSCSVAA GSGHCYLLCSLVSEPEPDDYVSPDPTP MRLGVLTDGSGYTEQAVPERIFKNI WSANYPGVGSGAIVGNKVLFPFYGG VRNGSTPEVMNRGRYYYIQDPNDYC PDPLQDQILRAEQSYYPTRFGRMMVM QGVLACPVSNNSTIASQCQSYFNNNS LGFIGAESRIYYLNGNIYLYQRSSSW WPHPQIYLLDSRIASPGTQNIIDSGVNL KMLNVTVITRPSGFCNSQSRCPNDC LFGVYSDIWPLSLTSDSIFATMYLQG KTTRIDPAWALFSNHAIGHEARLFNK EVSAAYSTTTCFSDTIQNQVYCLSILE VRSELLGAFKIVPFLYRVL	8	76
AB176531	6821-8536	gb: AB176531: 6821-8536 生物: ヒトパラインフルエンザウイルス 2 株名: Nishio タンパク質名: ヘマグルチニン-ニューラミニダーゼ タンパク質 遺伝子記号: HN	MEDYSNLSLKSIPKRTCRIIFRTATILG ICTLIVLCSSILHEIHLVSSGLMDS DSQQGHIQPIHESLKSIALANQILYNV AIIIPLKIDSIETVIFSALKDMHTGSM NTNCTPGNLLLHDAAYINGINKFLVL KSYNGTPKYGPLLNIPSFIPSATSPNG CTRIPSFSLIKTHWCYTHNVMLGDCL DFTTSNQYLAMGIIQQSAAAFPIFRM KTIYLSGGINRKSCSVTAIPGGCVLYC YVATRSEKEDYATTDLAELRLAFYY YNDTFIERVISLPNTTGQWATINPAVG SGIYHLGFILFPVYGGISGTPSYNKQ SSRYFIPKHPNITCAGNSSEQAAAARS SYVIRYHSNRLIQSAVLICPLSDMHTA RCNLVMFNNSQVMMGAEGRLYVID NNLYYYQRSSSWWSASLFYRINTDFS KGIPPIIEAQWVPSYQVPRPGVMPCN ATSFCPANCITGVYADVWPLNDPEPT SQNALNPNYRFAGAFLRNESNRTNPT FYTASASALLNTTGFNNTNHKAAYTS STCFKNTGTQKIYCLIIEMGSSLLGEF QIIPFLRELIP	7	77

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
AF052755	6584-8281	gb: AF052755 生物: パライ ンフルエンザ ウイルス 5 株 名: W3A タン パク質名: ヘ マグルチニン- ニューラミニ ダーゼタンパ ク質 遺伝子記 号: HN	MVAEDAPVRATCRVLFRTTTLIFLCT LLALSISILYESLITQKQIMSQAGSTGS NSGLGSITDLLNNILSVANQIHYNSAV ALPLQLDTLESTLLTAIKSLQTSQKLE QNCSWSAALINDNRYINGINQFYFSIA EGRNLTGLPLLNMPSTFIPTATTPEGCT RIPSFSLTKTHWCYTHNVILNGCQDH VSSNQFVSMGIIPTSAGFPFFRTLKTL YLSGTVNRKSCSISTVPGGCMYCF VSTQPERDDYFSAAPPEQRIIIMYYND TIVERIINPPGVLDVWATLNPGTGSGV YYLGWVLFPIYGGVIKGTSLWNNQA NKYFIPQMVAALCSQNQATQVQNAK SSYYSSWFGNRMISGILACPLRQDL TNECLVLPFSNDQVLMGAEGRLMY GDSVYYYQRSNSWWPMTMLYKVTI TFTNGQPSAISAQNVPTQQVPRPGTG DCSATNRCPGFCLTG VYADAWLLTN PSSTSTFGSEATFTG SYLNTATQRINP TMYIANNTQIISQ QFGSSGQEAAYG HTTCFRDTGSVMVYCIYIELSSSLG QFQIVPFIRQVTL	7	78
BK005918	6560-8290	gb: BK005918 生物: ブタル ブラウウイルス 株名: UNKNOWN- BK005918 タ ンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: HN	MSQLGTDQIMHLAQPAIARRTWRLC FRIFALFILIAIVITQIFMLTFDHTLLTT TQFLT SIGNLQSTITSWTPDVQAMLSI SNQLIYTTSITLPLKISTTEMSILTAIRD HCHCPDCSSACPTRQMLLNDPRYMS GVNQFIGAPTESINITFGPLFGIPSTFIPT STTTQGCTRIPSFALGPSHWCYTHNFI TAGCADGGHSNQYLAMGTIQSASDG SPLLITARSYYLSGTVNRKSCSIAVVP GGCAMYCYVATRSETDYYAGNSPPQ QLLTLVFSNDTIIERTIHTPTGLANGWV MLVPGVGSGLTYNEYLLFPAYGGMQ QILANQSGEINQFFTPYNATVRCAMA QPQFSQRAAASYYPYFSNRWIRSAI VACPYRAIYQTQCTLIPLPNRMVMM GSEGRIFTLGDRLFYYQRSSSWWPYP LLYQVGLNFLTPPSVSSMTQVPLEH LARGKGGCPGNHCPATCVTG VYA DVWPLTDPRSGVGGTSLVAAGGLDS TSEMAPVNYLAIGESLLSKTYLLSK TQPAAYTTTTCFRDTDTGKIYCITIAE LGKVLLGEFQIVPFLREIKIQSRY	7	79

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
EU338414	6015-7913	gb: EU338414: 6015-7913 生物: トリパラムイクソウイルス 2 株名: APMV-2/Chicken/California/Yuicaipa/56 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MDFPSRENLAAGDISGRKTRWLLFRI LTLSIGVVCLAINIATIAKLDHLDNMA SNTWTTTEADRVISSITPLKVPVNQI NDMFRIVALDLPLQMTSLQKEITSQV GFLAESINNVLSKNGSAGLVLVNDPE YAGGIAVSLYQGDASAGLNFQPISLIE HPSFVPGPTTAKGCIRIPTFHMGP SHW CYSHNIIASGCQDASHSSMYISLGVLK ASQTGSPIFLTTASHLVDDNINRKSCSI VASKYGCDILCSIVIENTENEDYRSDPA TSMIIGRLFFNGSYTESKINTGSIFSLFS ANYPAVGSIGVVGDEAAFPYGGGVKQ NTWLFNQLKDFGYFTHNDVYKCNRT DIQQTILDAYRPPKISGRLWVQGILLC PVSLRPDPGCRLKVFNTSNVMMGAE ARLIQVGSTVYLYQRSSSWVVGLT YKLDVSEITSQTGNLTNHDVPIAHTK FPRPSFRRDACARPNICPAVCVSGVY QDIWPISTATNNSNIVWVGQYLEAFY SRKDPRIGIATQYEWKVTNQLFNSNT EGGYSTTTCFRNTKRDKAYCVVISEY ADGVFGSYRIVPQLIEIRTTTGKSE	7	80
KC403973	6234-6964	gb: KC403973: 6234-6964 生物: ヒトメタニューモウイルス 株名: HMPV/USA/TN-82-518/1982/A タンパク質名: 付着糖タンパク質 G 遺伝子記号: G セグメント: 8	MEVKVENIRTIDMLKARVKNRVAR KCFKNASLILIGITLSIALNIYLIINYT MQENTSESEHHTSSSPMESSRETPTVP IDNSDTNPSSQYPTQQSTEGSTLYFAA SASSPETEPTSTPDTTSRPPFVDTHTP PSASRTKTSPAVHTKNNPRISSRTHSP PWAMTRTVRRTTTLRTSSIRKRSSTA SVQPDSSATTHKHEEASPVSPQTSAST TRPQRKSMEASTSTTYNQT	6	81
KF015281	4511-5844	gb: KF015281: 4511-5844 生物: イヌニューモウイルス 株名: イヌ/Bari/100-12/ITA/2012 タンパク質名: 付着タンパク質 遺伝子記号: G	MRPAEQLIQENYKLTSLSMGRNFEVS GSTTNLNFERTQYPDTFRAVVVKVNQ MCKLIAGVLTSAAVAVCVGVIMYSV FTSNHKANSQM NATIRNSTSAPPQPT AGPPTTEQGTTTPKFTKPPTKTTTHHEI TEPAKMVTPSEDPYQCSSNGYLDRPD LPEDFKLVLDVICKPPGPEHHSTNCYE KREINLGSVCPLVTMKANMGLNNG GGEEAAPYIEVITLSTYSNKRAMCVH NGCDQGFCFFLSGLSTDQKRAVLELG GQQAIMELHYDSYWKHYWSNSNCV VPRTNCLTDQTVILFSPFNKNQSQ CTTCADSAGLDNKFYLTCDGLSRNLP LVGLPSLSPQAHKAALKQSTGTTTAP TPETRNPTPAPRRSKPLSRKKRALCG VDSREPKPTMPYWCPLQLFPRRSN S	6	82

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
KF973339	4624-5310	gb: KF973339: 4624-5310 生物: 呼吸器合胞体ウイルス タイプ A 株名: RSV-A/US/BID-V7358/2002 タンパク質名: 切断型付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSKTKDQRAAKTLEKTWDTLNHLLF ISSCLYKSNLKSIAQITLSILAMTIPTSL IIVATTFIASANNKVTPTTAHQDATSQI KNTTPTHLTQNPQPGISFFNLSGTISQT TAILAPTTSPVEPILOSTTVKTKNTTTT QIQPSKLTTKQRQNKPPNKPNDDFHF EVFNFVPCSICSNNPTCWAICKRIPSK KPGKKTTPKTKKQTIKTTKKDLKPQ TTKPKEAPTT	6	83
FJ215864	6383-8116	gb: FJ215864: 6383-8116 生物: トリパライクスウイルス 8 株名: オナガカモ/Wakuya/20/78 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミナーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MSNIASSLENIVEQDSRKTWRAIFR WSVLLITTGCLALSIVSIVQIGNLKIPS VGDLADEVVTPKTTLSDTLRNPINQI NDIFRIVALDIPLQVTSIQKDLASQFS MLIDSLNAIKLGNGTNLIPTSDKEYA GGIGNPVFTVDAGGSIGFKQFSLIEHP SFIAGPTTTRGCTRIPTFHMSESHWCY SHNIIAAGCQDASASSMYISMGLVHV SSSGTPIFLTASELIDGVRNRSKCSIV ATQFGCDILCSIVIEKEGDDYWSDTPT PMRHGRFSFNGSFVETELPVSSMFSSF SANYPAVGSGEIVKDRILFPIYGGIKQ TSPEFTELVKYGLFVSTPTTVQCSSWT YDQVKAAYRPDYISGRFWAQVILSC ALDAVDLSSCIVKIMNSSTVMMAAE GRIIKIGIDYFYYQRSSSWWPLAFVTK LDPQELADTNSIWLNSIPIQSKFPRP SYSENYCTKPAVCPATCVTGVYSIDIW PLTSSSSLPSIHWIGQYLDAPVGRITYPR FGIANQSHWYLQEDILPTSTASAYSTT TCFKNTARNRVFCVTIAEFADGLFGE YRITPQLYELVRNN	5	84

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
JX857409	6619-8542	gb: JX857409: 6619-8542 生物: ブタパラインフルエンザウイルス 1 株名: S206N タンパク質名: ヘマグルチニンタンパク質 遺伝子記号: H	MEETKVKTSEYWARSPQIHATNHPN VQNREKIKEILTILISFISSLVLVIAV LIMQSLHNGTILRCKDVGLESINKSTY SISNAILDVIKQELITRIINTQSSVQVAL PILINKKIQDLSLIEKSSKVHQNSPTCS GVAALTHVEGIKPLDPDDYWRCPGSG EPYLEDELTLSLIPGPSMLAGTSTIDG CVRLPSLAIGKSLYAYSSNLITKGCQD IGKSYQVLQLGIITLNSDLHPDLNPIIS HTYDINDNRKSCSVAVSETKGYQLCS MPRVNEKTDYTSKGIEDIVFDVLDLK GSSRSFKFSNNDINFDHPFSALYPSVG SGIIWKNELYFLGYGALTALQGNTK CNLMGCPGATQDNCNKFISSSWLYS KQMVNVLIQVKGYLSSKPSIIVRTIPIT ENYVGAEGKLVGTREIRIYTYTRSTGW HTNLQIGVLNINHPITITWTDHRVLSR PGRSPCAWNNKCPRNCTTGVYTDAY PISPDANYVATVTLLSNSTRNPTIMY SSSDRVYNMLRLRNTELEAAAYTTTSC IVHFDRGYCFHIIIEINQKELNTLQPML FKTAIPKACRISNL	5	85
KF908238	7510-9249	gb: KF908238: 7510-9249 生物: ヒトパラインフルエンザウイルス 4b 株名: QLD-01 タンパク質名: ヘマグルチニン-ニューラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MQDSRGNTQIFSQANSMVKRTWRL FRIVTLILLISIFVLSLIIVLQSTPGNLQS DVDIIRKELDELMENFETTSKSLLSVA NQITYDVSVLTPIRQEATETNIIAKIKD HCKDRVVKGESTCTLGHKPLHDVSF LNGFNKFYFTYRDNVQIRLNPLLDYP NFIPTATTPHGCIRIPSFSLSQTHWCYT HNTILRGCEDTASSKQYVSLGTLQTL ENGDPYFKVEYSHYLNDRKNRKS VVAVLDGCLLYCVIMTKNETENFKD PQLATQLLTYISYNGTIKERIINPPGSS RDWVHISPGVSGILYSNYIIFPLYGG LMENSMIYNNQSGKYFFPNSTKLPCS NKTSEKITGAKDSYTITYFSKRLIQSA FLICDLRQFLSEDCEILIPSNDHMLVG AEGRLYNIENNIFYYQRGSSWWPYP LYRIKLNSNKKYPRIIEIKFTKIEIAPRP GNKDCPGNKACPKECITGVYQDIWPL SYPNTAFPHKKRAYYTGFYLNNSLAR RNPTFYTADNLDYHQQERLGKFNL AGYSTTTCFKQTTTARLYCLYILEVG DSVIGDFQIFPFLRSIDQAIT	5	86

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
KT071757	6066-7962	gb: KT071757: 6066-7962 生物: トリパラミクソウイルス 2 株名: APMV-2/Emberiza spodocephala/China/Daxing'anling/974/2013 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ タンパク質 遺伝子記号: HN	MDALSRENLTEISQGGRRRTWRMLFRI LTLVLTIVCLAINIATIAKLDSIDTSKV QTWTTTESDRVIGSLDTLTKIPINQVN DMFRIVALDLPLQMTTLQKEIASQVG FLAESINNFLSKNGSAGSVLVNDPEY AGGIGTSLFHGDSASGLDFEAPSLIEH PSFIPGPTTAKGCIRIPTFHMSASHWC YSHNIIASGCQDAGHSSMYISMVGLK ATQAGSPSFLTTASQLVDDKLNKSC SIISTTYGCDILCSLVVENEDADYRSD PPTDMILGRLFFNGTYESKLNNTSAIF QLFSANYPAVSGSIVLGDEIAFPVYG GVKQNTWLFNQLKDYGYFAHNNVY KCNNNIHQTVLNAYRPPKISGRLWS QVVLICPMRLFINTDCRIKVNTSTVM MGAEARLIQVGSIDIYLYQRSSSWV VGLTYKLDQFELSSKTGNLNNVSPIA HAKFPRPSYSRDACARNIPAVCVS GVYQDIWPSTAHNLSQVWVWGQYL EAFYARKDPWIGIATQYDWKKNVRL FNANTEGGYSTTTTCFRNTKRDKAFCV IIEYADGVFGSYRIVPQLIEIRTTSSK GLPS	5	87
LC041132	6605-8437	gb: LC041132: 6605-8437 生物: トリパラミクソウイルス goose/Shimane /67/2000 株名: ガチョウ/Shimane/67/2000 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MQPGISEVSFVNDERSESGTWRLLFRI LTIVLCLTSIGIGIPALIYSKEAATSGDI DKSLEAVKTGMSTLSSKIDESINTEQK IYRQVILEAPVSQLNMESNILSAITSL YQIDGTSNSSGCGSPMHDQDFVGGIN KEIWTTDNVNLGEITLTPFLEHLNFIP APTTGNGCTRIPSFDLGLTHWCYTHN VILSGCQDYSSSFQYIALGVLKISATG HVFLSTMRSINLDDERNRKSCSISATS IGCDIICSLVTEREVDDYNSPAATPMI HGRDLDFSGKYNEVDLNVGQLFGDWS ANYPGVGGGSFLNGRVWFPIYGGVK EGTPTFKENDGRYAIYTRYNDTCPDS ESEQVSRAKSSYRPSYFGGKLQQAV LSIKIDDTLGLDPVLTISNNSITLMGAE SRVLQIEEKLYFYQRGTSWFPSLIMYP LTVDDKMVRFEPTTFDQFTRPGNHP CSADSRCPNACVTGVYTDGYPIVFHN NHSIAAVYGMQLNDVTNRLNPRSAV WYGVSMNSNVIRVSSSTTKAAYTTSTC FKVKKTQRVYCLSIGEIGNTLFGEFRI VPLLLLEVYSEKGKSLKSSFDGWEDISI NNPLRPLDNHRVDPILISNYTSSWP	4	88
AF092942	4705-5478	gb: AF092942 生物: ウシ呼吸器合胞体ウイルス 株名: ATue51908 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSNHTHHLKFKTLKRAWKASKYFIV GLSCLYKFNLSLVQTALTTLAMITL TSLVITAIYISVGNAAKPTSKPTIQQ TQQPQNHTSPFFTEHNYKSTHTSIQST TSLQLPNTDTTRETTSYSHSINETQNRK IKSQSTLPATRKPPINPSGSNPPENHQ DHNNSQTLVPYCSTCEGNLACLSLC QIGPERAPSRAPTITLKKTPKPKTTKK PTKTTIHHRTSPEAKLQPKNNTAAPQ QGILSSPEHTNQSTTQI	3	89

10

20

30

40

【表 5 - 17】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列 番号
AF326114	6691-847	gb: AF326114 生物: メナ ングルウイルス 株名: UNKNOWN- AF326114 タ ンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: HN	MWNSIPQLVSDHEEAKGKFTDIPLQD DTDSQHPSGSKSTCRTLFRTVSIILSLV ILVLGVTSTMFSKYSGGCATNSQLL GVSNLINQIQKSIDSLISEVNQVSITTA VTLPIKIMDFGKSVTDQVTQMIRQCN TVCKGPGQKPGSQNV RIMPSNNLSTF QNINMSARGIAYQDVPLTFVRPIKNP QSCSRFPSYSVSFGVHCFANAVTDQT CELNQNTFYRVVLSVSKGNISDPSSLE TKAETRTPKGPVRTCSIISSVYGCYL LCSKATVPESEEMKTIGFSQMFIYLS MDSKRIIYDNIVSSTSIAWSGLYPGEG AGIWHMGQLFFPLWGGIPFLTPLGQK ILNSTLDIPEVGSCKCKSDLTSPAKTK DMLFSPYYGENVMVFGFLT CYLLSN VPTNCHADYLNSTVLGFGSKAQFYD YRGIVYMYIQSAGWYPFTQIFRITLQL KQNRQLAKSIKRIEVTSTTRPGNRECS VLRNCPYICATGLFQVPWIVNSDAITS KEVDNMVVFVQAWAADFTEFRKGILS LCSQVSCPINDLLSKDNSYMRDTTY CFPQTVPNILSCTSFVEWGGDSGNPIN ILEIHYEIVFVAS	3	90
GU206351	7500-9714	gb: GU206351: 7500-9714 生 物: トリバラ ミクソウイル ス 5 株名: セ キセイインコ /Kunitachi/74 タンパク質名: ヘマグルチニ ンノイラミニ ダーゼタンパ ク質 遺伝子記 号: HN	MDKSYYTEPEDQRGNSRTWRLLFRLI VLTLCLIACTSVSQLFYPWLPQVLST LISLNSSIITSSNGLKKEILNQNIKEDLI YREVAINIPLTLDRVTVEVGTAVNQIT DALRQLQSVNGSAAFALSNSPDYSGG IEHLVFQRNTLINRSVSVSDLIEHPSFI PTPTTQHGCTRIPTFHLGTRHWCYSH NIIGQGCADSGASMMYISMALGVSS LGTPTFTTSATSILSDSLNRKSCSIVAT TEGCDVLCISVTQTEDQDYADHTPTP MIHGRLWFNGTYTERSLSQSLFLGTW AAQYPAVGSIMTPGRVIFPFYGGVIP NSPLFLDLERFALFTHNGDLECRNLT QYQKEAIYSAYKPPKIRGSLWAQGF VCSVGDMGNC SLKVINTSTVMMGAE GRLQLVGDSVMYYQRSSSWWPVGIL YRLSLVDIIARDIQVVINSEPLPLSKFP RPTWTPGVCQKPNVCPAVCVTG VYQ DLWAISAGETLSEMFFGGYLEASTQ RKDPWIGVANQYSWFMRRRLFKTST EAAYSSSTCFRNTRLDRNFCLLIFELT DNLLGDWRIVPLLFELTIV	3	91

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
JQ001776	8170-10275	gb: JQ001776: 8170-10275 生物: シダーウイルス 株名: CG1a タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MLSQLQKNYLDNSNQQGDKMNNPD KKLSVNFNPLELDKGQKDLNKSYYV KNKNYNVSNLLNESLHDIKFCIYCIFS LLIIITIINIITISIVITRLKVHEENGMES PNLQSIQDSLSSLTNMINTETPRIGILV TATSVTLSSSINYVGTKTNQLVNELK DYITKSCGFKVPELKLHECNISCADPK ISKSAMYSTNAYAELAGPPKIFCKSVS KDPDFRLKQIDYVIPVQQDRSICMNN PLDISDGGFFTYIHYEGINSCKKSDSFK VLLSHGEIVDRGDYRPSLYLLSSHYH PYSMQVINCVPVTCNQSSFVFCNISN NTKTLDNSDYSSDEYYITYFNGIDRP KTKKIPINMTADNRYIHFTFSGGGG VCLGEEFIIPVTTVINTDVFTHDYCESF NCSVQTGKSLKEICESLSRPTNSSRY NLNGIMIISQNNMTDFKIQLNGITYNK LSFGSPGRLSKTLGQVLYYQSSMSWD TYLKAGFVEKWKPTPNWMNNTVIS RPNQGNCPRYHKCPEICYGGTYNDIA PLDLGKDMYVSVILDSQLAENPEIT VFNSTTILYKERVSKDELNTRSTTTSC FLFLDEPWCISVLETNRFNGKSIRPEIY SYKIPKYC	3	92
KP271123	6644-8431	gb: KP271123: 6644-8431 生物: デビオットウイルス 株名: Geelong タンパク質名: 付着タンパク質 遺伝子記号: HN	MWSTQASKHPAMVNSATNLVDIPLD HPSSAQFPINRKRTGRLIYRLFSILCNL ILISILISLVVIWSRSSRDCAKSDGLSS VDNQLSSLRSINSLITEVNQISVTTAI NLPIKLSEFGKSVVDQVTQMIRQCNA ACKGPGEKPGIQNVRINIPNNFSTYSE LNRTANSLNFQSRALFARPNNYPKT CSRFPYSVYFGIHCFSHAVTDSSCEL SDSTYYRLVIGVADKNLSDPADVKYI GETTTPVRVQTRGCSVVSSIYGCYLL CSKSNQDYQDDFREQGFHQMFIPLS RELKTTFFDDMVSTTVTWNGLYPG EGSGIWHMGHLVFPLWGGIRFGTHA SEGILNSTLELPPVGPSCKRSLADNGL INKDVLFSPPYFGDSVMVFAYLSCYML SNVPTHCQVETMNSSVLGFGSRAQFY DLKGIVYLYIQSAGWFSYTQLFRLSL QSKGYKLSVKQIKRIPISSTSRPGTEPC DIIHNCPTYCATGLFQAPWIVNGDSIR DRDVRNMAFVQAWSGAINTFQRPFM SICSQYSCPLSELLDSESSIMRSTTTYC FPSLTESILQCVSFIEWGGPVGNPISIN EVYSSISFRPD	3	93

10

20

30

40

【表 5 - 1 9】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
AY286409	7644-9542	gb: AY286409 生物: モスマンウイルス 株名: UNKNOWN-AY286409 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MVDPPAVSYYTGTGRNDRVKVVTQ STNPYWAHNPQNQLRLIDMVVNVI MVTGVIFALINIILGVIISQSAGSRQDT SKSLDIIQHVDSSVAITKQIVMENLEP KIRSILDSVSFQIPKLLSSLGPGKTDP PIALPTKASTPVIPTTEYPSLNTTCLRI EESVTQNAALFNISFDLKTVMYELV TRTGGCVTLPSYSELYTRVRTFSTAIR NPKTCQRAGQETDLNLIPAFIGTDTGI LINSQVRQPVIATGDGIYALTYLTMR GTCQDHRHAVRHFEIGLVRRDAWW DPVLTPIHHFTEPGTPVFDGCSLTVQN QTALALCTLTTDGPETDIHNGASLGL ALVHFNIRGEFSKHKVDPRNIDTQNNQ GLHLVTTAGKSAVKKGILYSFGYMV TRSPEPGDSKCVTEECNQNNQEKCN YSKTTLDPPDKPRSMIIFQIDVGAEYFT VDKVVVVPRQTQYYQLTSGDLFYTG ENDLLYQLHNKGWYNKPIRGRVTFD GQVTLHEHSRTYDSLNRACNPRLG CPSTCELTSMASYFPLDKDFKAAVGV IALRNGMTPIITYSTDDWRNHWKYIK NADLEFSESSLSCYSPNPLDDYVLCT AVITAKVMSNTNPQLLATSWYQYDK CHT	2	94
AY900001	7809-9938	gb: AY900001 生物: J-ウイルス 株名: UNKNOWN-AY900001 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MNPVAMS NFYGINQADHLREKGDQP EKGPSVLTYVSLITGLLSLFTIHALNVT NIIYLTGSGGTMAIKDNQQSMMSGM RDISGMLVEDLKPKTDLINSMVSYTIP SQISAMSAMIKNEVLRQCTPSFMFNN TICPIAEHPVHTSYFEEVGIEAISMCTG TNRKLVVNQGINFVEYPSFIPGSTKPG GCVRLPSFSLGLEVFAYAHAITQDDC TSSSTPDYFYSVGRIADHGTDPVFET LAEWFLDDKMNRRCSTVAAGKGG WLGCSILVGSFTDELTSPEVNRISLSY MDTFGKKKDWLYTGSEVRADQSW ALFFSVGSGVVIGDTVYFLVWGGLN HPINVDAMCRAPGCQSPTQSLCNYAI KPQEWGGNQIVNGILHFKHDTNEKPT LHVRTLSPDNNWMGAEGRLFHFHNS GKTFIYTRSTWHTLPQVGILTLGWP LSVQWVDITSISRPGQSPCEYDNRC QCVTGVTDLFPLGVSYEYSVTAYL DQVQSRMNPKIALVGAQEKIYEKTT TNTQHADYTTSCFAYKLRVWCVSI VEMSPGVITTRQVPVFLYHLNLGCQD TSTGSLTPLDAHGGTYLNTDPVGNKV DCYFVLHEGQIYFGMSVGPINITYSI VGRSREIGANMNVSLNQLCHSVYTEF LKEKEHPGTRNNIDVEGWLLKRIETL NGTKIFGLDDLEGSGPGHQSGPEDPSI APIGHN	2	95

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 0】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
EF199772	6150-6944	gb: EF199772: 6150-6944 生物: トリメタニューモウイルス 株名: PL-2 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MEVKVENVGKSQELKVKVKNFIKRS DCKKKLFAILGLVSFELTMNIMLSV MYVESNEALSLCRIQGTAPRDNKTN TENATKETTLHTTTTTTRDPEVRETKT TKPQANEGATNPSRNLTTKGDKHQ TRATTEAELEKQSKQTTEPGTSTQKH TPARPSSKSPTTTQATAQPTTPTAPKA STAPKNRQATTKKKTETDTTASRARN TNNPTETATTPKATTETGKGKEGPT QHTTKEQPETTARETTTPQPRRTAGASPRAS	2	96
JF424833	5981-7156	gb: JF424833: 5981-7156 生物: トリメタニューモウイルス 株名: IT/Ty/A/259-01/03 タンパク質名: 付着タンパク質 遺伝子記号: G	MGSKLYMVQGTSAVQTAVGFWLDI GRRYILAIVLSAFGLTCTVTIALTVSVI VEQSVLEECRNNGGDRDWWSTTQE QPTTAPSATPAGNYGGLQTARTRKSE SCLHVQISYGDMYSRSDTVLGGFDC MGLLVLCCKSGPICQRDNQVDPTALC HCRVDLSSVDCCKVNKISTNSSTTSEP QKTNPAWPSQDNTSDPNPQGITTST ATLLSTSLGLMLTSKTGTHKSGPPQA LPGSNTNGKTTTRELSTNQPNSTT NGQHNKHTQRMTPPSYDNTRTILQ HTTPWEKTFSTYKPTHSPTNESDQSLP TTQNSINCEHFDPPQGEKICIRVGSY NSNITKQCRIDVPLCSTYNTVCMKTY YTEPFNCWRRIRCLCDDGVGLVEWCCTS	2	97

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 1】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
JN689227	7918-12444	gb: JN689227: 7918-12444 生物: タイラムウイルス 株名: TL8K タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSQLAAHNLAMSNFYGIHQGGQSTS QKEEEQPVQGVIRYASMI VGLLSLFTI IALNVTNIHYMTESGGTMQSIKNAQGS IDGSMKDLSGTIMEDIKPKTDLINSMV SYNIP AQLSMIHQIIKNDVLKQCTPSF MFNNTICPLAENPTHSRYFEEVNLDISI SECSGNEMSLELGTEPEFIEYPSFAPG STKPGSCVRLPSFSLSTVFAYTHTIM GHGCSELDVGDHYLAIGRIADAGHEI PQFETISSWFINDKINRRSCTVAAGVM ETWMGCVIMTETFYDDLDSLDTGKIT ISYLDVFGRRKKEWIYTRSEILYDYTYT SVYFSIGSGVVVGDTVYFLLWGSLS PIEETAYCYAPGCSNYNQRMCNEAQ RPAKFGHRQMANAILRFTNSMGKP SISVRTLSPTVIPFGTEGRLIYSDFTKII YLYLRSTSWYVLPLTGLLILGPPVSIS WVTQEAVSRPGEYPCGASNRCPKDCI TGVYTDLFPLGARYEYAVTVYLNAE TYRVNPTLALIDRSKIIARKKITTESQK AGYTTTTTCFVFKLRIWCMSVVELAPA TMTAFEPVPFLYQLDLTCKRNNGTTA MQFSGQDGMYSKGRYKSPRNECFE KVS NKYYFVVSTPEGIQPYEVRDLTP ERVSHVIMYISDVCAPALSAFKKLIPA MRPITTLTIGNWQFRPVDISGLRVNI YRNLTTRYGDLMSAPEDPGTDTFPGT HAPSKGHEEVGHYTL PNEKLSEVTTA AVKTKESLNLIPDTKDTRGEEENGSG LNEITGHTTPGHIKTHPAETKVTKHT VIIPQIEEDGSGATTSTELQDETYHT EDYNTTNTNGSLTAPNERNNYTS HTVSGEDITHITVSDRTKTQTLPD NTFNQPTPKIQEGSPKSESTPKDYTAI ESED SHFTDPTLIRSTPEGTIVQVIGDQ FHS AVTQLGESNAIGNSEPIDQGNLI PTTDRGTMDNTSSQSHSSTTSTQGS SAGHGSQSNMNLALADTDSVTDQS TSTQEIDHEHENVSSILNPLSRHTRVM RDTVQEALTGA WGFIRGMIP	2	98
KC562242	6178-6926	gb: KC562242: 6178-6926 生物: ヒトメタニューモウイルス 株名: HMPV/USA/C1-334/2004/B タンパク質名: 付着糖タンパク質 G 遺伝子記号: G	MEVRVENIRAIDMFKAKIKNRIRNSR CYRNATLILIGLTALSMALNIFLIIDHA TLRNMIKTENCANMP SAEPSKKT PMT SIAGPSTKPNPQATQWTTENSTSPA ATLEGHPTGTGTTPDTPAQQTDDK HTALPKSTNEQITQTTEKKTTTRATTQ KRKKEKKTQTKPQVQLQPKQPTPPTK SEMQRQSQHPTDPELTPLPKAVNRQ PGQQNQAPHHIMHGEVQDPGERNTQ VSH PSS	2	99

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
KC915036	6154-7911	gb: KC915036: 6154-7911 生物: トリメタニューモウィルス C 型 株名: GDY タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MEVKIENVGKSQELRVKVKNFIRSD CKKKLFALILGLISFDITMNIMLSVMY VESNEALSSCRVQGTPAPRDNRTNTE NTAKETTLHTMTTTRNTEAGGKT KPQADERATSPSKNPTIGADKHKTT ATTEAEQEKQSKQTTEPGTSTPKHIPA RPSSKSPATTKTTTQPTTPTVAKGGT APKNRQTTTKKTEADPTTTSRAKQTN KPTGTETTPPRATTETDKDKEGPTQH TTKEQPETTAGGTTTPQPRRTTSRPAP TTNTKEGAETTGTTRTTKSTQTSASPPR PTRSTPSKTATGTNKRATTTKGPN TASTDRRQQTRTTPKQDQQTQTKAKTT TNKAHAKAATTPEHNTDTTDSMKEN SKEDKTTRDPSSKATTKQENTSKGTT ATNLGNNTAEAGARTPPTTTPTRHTE PATSTAGGHTKARTTRWKSTAARQP TRNNTADTKTAQSKQTPAQLGNN TTPENTTPPDNKSNSQTNVAPTEEIEI GSSLWRRRYVYGPCRENALEHPMNP CLKDNTTWIYLDNGRNLPAGYYSK TDKIICYGIYRGNSYCYGRIECTCKNG TGLLSYCCNSYNWS	2	100
LC168749	7239-9196	gb: LC168749: 7239-9196 生物: 牛痘麻疹ウイルス 株名: Lv タンパク質名: H タンパク質 遺伝子記号: H	MSSPRDRVNAFYKDNLQFKNTRVVL NKEQLLIERPYMLLAVLFVMSLVG LLAIAGIRLHRAAVNTAEINSLTTSI DITKSIEYQVKDVLTPFKIIGDEVGL RTPQRFTDLTKFISDKIKFLNPDKEYD FRDINWCISPPERIKINYDQYCAHTAA EELITMLVNSSLAGTAVLRTSLVNLG RSCTGSTTTKGQFSNMSLALSGIYSG RGYNISSMITITEKMGYGSTYLVGKH NQGARRPSTAWQRDYRVFEVGIHREL GVGTPVFHMTNYLELPRQPELEICML ALGEFKLAALCLADNSVALHYGGLR DDHKIRFVKLGWVWSPADSDTLATLS AVDPTLDGLYITTHRGIIAAGKAVWA VPVTRTDDQRKMGQCRREACREKPP PFCNSTDWEPLAAGRIPAYGILTIRLG LADKPEIDIIEFGPLITHDSGMDLYTP LDGNEYWLTIPPLQNSALGTVNTLV EPSLKISPNIITLPIRSGGGDCYTPTYL SDLADDDVKLSSNLVILPSRNLQYVS ATYDTSRVEHAIVYYIYSTGRLLSSYY YPVKLPIKGDVPSLQIGCFPWGLKLW CHHFCSVIDSGTGKQVTHTGAVGIEIT CNSR	2	101

10

20

30

40

【表 5 - 2 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
LC187310	8144-9871	gb: LC187310: 8144-9871 生物: トリパラミクソウイルス 10 株名: rAPMV-10-FI324/YmHA タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ 遺伝子記号: HN	MDSSQMNILDAMDRESSKRTWRGVF RVTTIIMVVTCTVVLSAITLSKVAHPQG FDTNELGNGIVDRVSDKITEALTVPN NQIGEIFKIVALDLHVLVSSSQQAIAAG QIGMLAESINSILSQNGSASTILSSSPE YAGGIGVPLFSNKLNGTVIKPITLIEH PSFIPGPTTIGGCTRIPTFHMASSHC YSHNIEKGCKDSGISSMYISLGLVQV LKKGTPVFLVTASAVLSDDRNRKSCS IISRFGCEILCSLVTEAESDDYKSDTP TGMVHGRLYFNGTYREGLVDTETIFR DFSANYPGVGSGEIVEGHIHFPIYGGV KQNTGLYNSLTPYWLDANKYDYC KLPTYNTQIQNSYKPPFIHGRFWAQGI LSCDLDFNLGNCNLKIIRSDKVMG AESRLMLVGSKLLMYQRASSWWPLG ITQEIDIAELHSSNTTILREVKPISSKF PRPSYQPNYCTKPSVCPAVCVTG VYT DMWPISITGNISDYAWISHYLDAPTSR QQPRIGIANQYFWIHQTITFPTNTQSS YSTTTTCFRNQVRSRMFCLSLAEFADG VFGEFRIVPLLYELRV	2	102
NC_004074	6590-8563	gb: NC_004074: 6590-8563 生物: チオマンウイルス 株名: UNKNOWN-NC_004074 タンパク質名: 付着タンパク質 遺伝子記号: HN	MWATSESKAPIPANSTLNLVDVPLDE PQTITKHKRQKRTGRLVFRLLSLVLSL MTVILVLVILASWSQKINACATKEGF NSLDLQISGLVKSLNITEVQNISITT AINLPIKLSDFGKSIVDQVTQMIRQCN AVCKGPGEKPGIQNIRINIPNNFSTYL ELNNTVKSELQRRPALLARPNIPIKS CSRFPYSVNFGIHCFHAITDQSCCEL SDKTYRLAIGISDKNLSDPSDVKYIG EAFTPMGLQARGCSVISSYGCYLLCS KSNQGYEADFQTQGFHQMYILFLSRD LKTTLFNDMISSTTVVWNGLYPGEGA GIWHMGYLIFPLWGGIKIGTPASTSIL NSTLDLPLVGPSCKSTLENNLINKDV LFSPYFGESVMVFGFLSCYMLSNVPT HCQVEVLNSSLVGFGRSRLMDLKG VYLYIQSAGWYSYTLFRLSLQSRGY KLTVKQIRRIPISSSTRPGTAPCDVVH NCPYTCATGLFQAPWIVNGDSILDRD VRNLVVFQAWSGNFNTFQKGLISICN QYTCPLTTLNDNSIMRSTTTYCYP SLSEYNLQCQSFIEWGGPVGPNPIGILE VHYIHKFK	2	103

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列 番号
NC_005283	7091-8905	gb: NC_005283: 7091-8905 生 物: イルカモ ルビリウイル ス 株名: UNKNOWN- NC_005283 タ ンパク質名: ヘマグルチニ ンタンパク質 遺伝子記号: H	MSSPRDKVDAFYKDIPRPRNNRVLLD NERVIIERPLILVGVLA VMFLSLVGLL AIAGVRLQKATTNSIEVNRKLSTNLET TVSIEHHVKDVL TPLFKIIGDEVGLRM PQKLTEIMQFISNKIKFLNPDREYDFN DLHWCVNPPDQVKIDY AQYCNHIAA EELIVTKFKELMNHSLDMSKGRIFPPK NCSG SVITRGQT IKPGLTLVNIYTTRN FEVSFMTVISGGMYGKTYFLKPPPEP DDPFEFQAFRIFEVGLVRDVGSREPV LQMTNFMVIDEDEGLNFCLLSVGELRL AAVCVRGRPVVTKDIGGYKDEPFKV VTLGIIIGGGLSNQKTEIYPTIDSSIEKL YITSHRGIIRNSKARWSVPAIRSDDKD KMEKCTQALCKSRPPSPCNSSDWEPL TSNRIPAYAYIALEIKEDSGLELDITSN YGPLIIHGAGMDIYEGPSSNQDWLAIP PLSQSVLG VINKVDFTAGFDIKPHTLT TAVDYESGKCYVPVELSGAKDQDLK LESNLVVLPTKDFGYVTATYDTSRSE HAIVYVYD TARSSSYFFPFRIKARGE PIYLRIECFWRSRQLWCHHYCMINST VSNEIVVDNLVSINMSCSR	2	104
NC_007803	7978-12504	gb: NC_007803: 7978-12504 生 物: ベイロシ ウイルス 株 名: Li タンパ ク質名: 付着 糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSQLAAHN LAMSNFYGTHQGDLSGS QKGEEQVQGVIRYVSMIVSLLSLFTI IALNVTNIIYMTESGGTMQSIKTAQGS IDGSMREISGVIMEDVKPKTDLINSM VSYNIPAQLSMIHQIIKNDVPKQCTPS FMFNNTICPLAENPHTSRFYEEVNLD SISECSGPDMLHGLGVNPEFIEFPSPAP GSTKPGSCVRLPSFSLSTTVFAYHTI MGHGCELDVGDHYFSVGRIADAGH EIPQFETISSWFINDKINRRSCTVAAG AMEAWMGCVIMTETTFYDDRNSLDT GKLTISYLDVFGRRKEWIYTRSEILYD YTYTSVYFSVSGSVVVGDTVYFLIW GSLSSPIEETAYCFAPDCSNYNQRM CNEAQRPSKFGHRQMVNGILKFKTTST GKPLLSVGTLSPSVVPFGSEGRLMYS EITKIIYLYLRSTSWHALPLTGLFVLG PPTSISWIVQRAVSRPGEFPCGASNRC PKDCVTGVYTDLFPLGSRYEYAATV YLNSETYRVNPTLALINQTNIIASKKV TTESQRAGYTTTTCFVFKLRVWCISV VELAPSTMTAYEPIPFYQLDLTCKG KNGSLAMRFAGKEGTYKSGRYKSPR NECFFEKVS NKYYFIVSTPEGIQPYEIR DLTPDRMPHIIMYISDV CAPALSAFKK LLPAMRPITTLTIGNWQFRPVEVSGG LRVNIGRNLTKEGDLTMSAPEDPGSN TFPGNHIPGNGLDAGYYTVEYPKE	2	105

10

20

30

40

【表 5 - 2 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_009489	6559-8512	gb: NC_009489: 6559-8512 生 物: マプエラ ウイルス 株 名: BeAnn370284 タンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: HN	MASLQSEPGSQKPHYQSDQLVKRT WRSFFRFSVLVVTITSLALSIITLIGVN RISTAKQISNAFAAIQANILSSIPDIRPI NSLLNQLVYTSSVTLPLRISSLESNVL AAIQEACTYRDSQSSCSATMSVMND QRYIEGIQVYSGSFLDLQKHTLSPPIA FPSFIPTSTTTVGCTRIPSFSLTkTHWC YTHNYIKTGCRDATQSNQYIALGTIY TDPDGTGPGFSTSRSQYLNDGVNRKSC SISAVPMGCALYCFISVKEEVDYYKG TVPPAQTLILFFFNQTVHEHRIVPSSM NSEWVMLSPGVGSGVFYNNYIIFPLY GGMTKDKAEKRGELTRFFTPKNSRSL CKMNDSVFSNAAQSAYPPYFSSRWI RSGLLACNWNQIITNCEILTFSNQV MMMGAEGRLILINDDLFYQRTSW WPRPLVYKLDIELNYPDSHIQRVDQV EVTFTPRPGWGGCVGNFPCMICVSG VYQDVWPVTNPVNTTDSRTLWVG TLLSNTTRENPAVVTSGGSSISQTVSW FNQTVPGAYSTTTCFNDQVQGRIFCLI IFEVGGGLLGEYQIVPFLKELKYQGA VHA	2	106
NC_017937	6334-8544	gb: NC_017937: 6334-8544 生 物: ナリバウ イルス 株名: UNKNOWN- NC_017937 タ ンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: H	MAPINYPASYTNNNAERPVVITTKST ESKGQRPLPLGNARFWEYFGHVCCT LTFCMSLIGIIVGIIALANYSSDKDWK GRIGGDIQVTRMATEKTVKLILEDTP KLRNILDVLFQLPKMLASIASKINTQ TPPPPTTSGHSTALATQCSSNCENRPE IGYDYLRQVEQSLQRITNISIQLLEASE IHSMAGAYPNALYKIRTQDSWSVTA KECPLQAFQPNLNLIPAMIGTATGALI RNCVRQPVIIVDDGVYMLTYLAMR GSCQDHQKSVRHFEMGVITSDPFQDP VPTPLRHWTKRALPAYDGCALAVKG HAGFALCTETSVGPLRDRTAKRKPN VLFKASLVGELSERRVPPQSWLSGFSF FSVYTVAGKGYAYHSKFHAFGNVVR VGQSEYQAKCRGTGCPTANQDDCNT AQRVSQEDNTYLHQAILSVDIDSVIDP EDVVYVIERDQYYQASAGDLYRVPE TGEILYNLHNGGWSNEVQVGRIQPSD RFYMREIQLTSTRVPAPNGCNRVKGC PGGCVAVISPAFTPMHPEFNVGVGIFP MNQPHNPSIMHVQQQTELFWKPIVG GNITLHESSIACYSTVPPNPSYDLCIGV MTLLHQQQLPQFQALSWYQPTMCN GNAPQNRRLIPVIVEDSKAMSVSSD APRTP	2	107

10

20

30

40

【表 5 - 2 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025256	9117-11015	gb: NC_025256: 9117-11015 生 物: コウモリ パラミクソウ イルス Eid_hel/GH- M74a/GHA/20 09 株名: BatPV/Eid_hel/ GH- M74a/GHA/20 09 タンパク質 名: 糖タンパ ク質 遺伝子記 号: G	MPQKTVEFINMNSPLERGVSTLSDKK TLNQSKITKQGYFGLGSHSERNWKK QKNQNDHYMTVSTMILEILVVLGIMF NLIVLTMVYYQNDNINORMAELTSNI TVLNLNLNQLTNKIQREIIPRITLIDTA TTITIPSAITYILATLTTRISELLPSINQK CEFKTPTLVLNDCRINCTPPLNPSDGV KMSSLATNLVAHGSPCRNFSSVPTIY YYRIPGLYNRTALDERCILNPRLTISST KFAYVHSEYDKNCTRGFKYYELMTF GEILEGPEKEPRMFSRFSYSPTNNAVNY HSCTPIVTVNEG YFLCLECTSSDPLYK ANLSNSTFHLVILRHNDKDEKIVSMPSF NLSTDQEYVQIIPAEGGGTAESGNLY FPCIGRLLHKRVTHPLCKKSNCSTRD DESCLSYYNQSGPQHQQVNVCLIRIR NAQRDNPTWDVITVDLTNTYPGSRSR IFGSFSKPMLYQSSVSWHTLLQVAEIT DLDKYQLDWLDTPIYISRPGGSECPFG NYCPTVCWEGTYNDVYSLTPNNDLF VTVYLKSEQVAENPYFAIFSRDQILKE FPLDAWISSARTTTISCFMFNNEIWC AALEITRLNDDIIRPIYYSFWLPTDCRT PYPHGTGKMTRVPLRSTYNY	2	108
NC_025347	6398-8418	gb: NC_025347: 6398-8418 生 物: トリバラ ミクソウイルス 7 株名: APMV- 7/dove/Tenness ee/4/75 タンパ ク質名: ヘマ グルチニン-ノ イラミニダー ゼ 遺伝子記 号: HN	MESIGKGTWRTVYRVLTILLDVVIII SVIALISLGLKPGERIINEVNGSIHNQL VPLSGITSDIAKVSSIYRSNLLSIPLQ LDQINQAISSARQIADTINSFLALNGS GTFIYTNSPEFANGFNRAFPNLNQL NMLTPGNLIEFTNFIPPTTKSGCIRIPS FSMSSSHWCYTHNIIASGCQDHSTSSE YISMGVVEVTDQAYPNFRTTLSITLA DNLNRKSCSIAATGFGCDILCSVVTET ENDDYQSPEPTQMIYGRLLFFNGTYSE MSLNVNQMFADWVANYPVAVGSGVE LADFVIFPLYGGVKITSTLGASLSQYY YIPKVPTVNCSETDAQQIEKAKASYSP PKVAPNIWAQAVVRCNKSVNLANS EILTFNTSTMMMGAEGRLLMIGKNV YFYQRSSSYWPVGIIYKLDLQELTTF SNQLLSTIPIPEKFP RPASTAGVCSKP NVCPAVCQTGVYQDLWVLYDLGKL ENTTAVGLYLNSAVGRMNPFIGANT LSWYNTTRLFAQGTPASYSTTTCTFKN TKIDTAYCLSILELSDSLLGSWRITPLL YNITLSIMS	2	109

10

20

30

40

【表 5 - 2 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
NC_025348	6590-8548	gb: NC_025348: 6590-8548 生 物: ツホコウ イルス 2 株名: UNKNOWN- NC_025348 タ ンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ 遺伝子 記号: HN	MPPVPTVSQSIDEGSFTDIPLSPDDIKH PLSKKTCRKLFRIVTLIGVGLISILTIIS LAQQTGILRKVDSSDFQSYVQESFKQ VLNLMKQFSSNLNSLIEITSVTLFPRID QFGTDIKTQVAQLVRQCNAVCRGPIK GPTTQNIVYPALYETSLNKTLETKNV RIQEVQRQEVDPVPGPGLSNGCTRNP FSVYHGVWCYTHATSIGNCNGSLGTS QLFRIGNVLEGDGGAPYHKSLATHLL TTRNVSRQCSATASYGICYFICSEPV LTERDDYETPGIEPITIFRLDPDGNWV VFPNINRFTEYSLKALYPGIGSGVLFQ GKLIFPMYGGIDKERLSALGLGNIGLI ERRMADTCNHTEKELGRSFPAGFSSP YYHDAVMLNFFLICEMIENLPGDCDL QILNPTNMSMGSESQSLVDNELFLY QRSASWWPYTLIYRLNMRYTGKYLK PKSIIPMVIKSNTRPGYEGCNHERVCP KVCVTGVFQAPWILSIGRDHKERVSN VTYMWAWMDKSDRTYPAVSVCGS DTCKLTVPLGDSKVHSAYSVTRCYLS RDHMSAYCLVIFELDARPAEMRIQS FLYKLILT	2	110
NC_025350	6451-8341	gb: NC_025350: 6451-8341 生 物: ツホコウ イルス 3 株名: UNKNOWN- NC_025350 タ ンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ 遺伝子 記号: HN	MHNRTQSVSSIDTSSDVYLPRRKKAV TKFTFKKIFRVLILTLLLSIIIIIVIFPKI DHIRETCDNSQILETITNQNSEIKNLIN SAITNLNVLLTSTTVDLPIKLNNFGKSI VDQVTMMVRQCNAVCRGPGDRPTQ NIELFKGLYHTSPPSNTSTKLSMITEA SNPDDIVPRPGKLLGCTRFPSFSVHYG LWCYGHMASTGNCSSGSSPSVQIIRIGS IGTNKDGTPKYVIIASASLPETTRLYH CSVTMTSIGCYILCTTPSVSETDDYST MGIEKMSISFLSLDGYLTLQLGQPTGL DNQONLYALYPGPGSGVIFRDFLIFPM MGGIRLMDAQKMLNRNITYRGFPPSE TCTESELKLLQEVANMLTSPYYGEVL VLNFLYVCSLLDNIPGDCSVQLIPPDN MTLGAESRLYVLNGLIMYKRGSSW WPYTELYQINYRVNNRAFRVRESVRI NTTSTSRPGVQGCNLEKVCVKVCSG IYQSPGIISAPVNPTRQEEGLLYFLVW TSSMSSRTGPLSSLCDHSTCRITYPIGD DTIFIGYTDSSCFMSSIKEGIYCIAFLEL DNQPYSMMAIRSLSYIIN	2	111

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
NC_025352	8716-11257	gb: NC_025352: 8716-11257 生 物: モジヤン グ (Mojiang) ウイルス 株 名: Tongguan1 タンパク質名: 付着糖タンパ ク質 遺伝子記 号: G	MATNRDNTITSAEVSQEDKVKYYG VETAEKVADSIIGNKVFILMNTLLILT GAIIITITLNTLTAASKQQNMLKIIQD DVNAKLEMFVNLDQLVKGEIKPKVS LINTAVSVSIPGQISNLQTKFLQKYVY LEESITKQCTCNPLSGIFPTSGPTYPT DKPDDDDTTDDDKVDTTIKPIEYKPKD GCNRTGDHFTMEPGANFYTVPNLGP ASSNSDECYTNPSFSIGSSIMFSQEIR KTDCTAGEILSIQIVLGRIVDKGQQGP QASPLLWVAVPNPKIINSCAVAAGDE MGWVLCSTLTAASGEPIPHMFDGF WLYKLEPDTEVVSYRITGYAYLLDK QYDSVFIGKGGGIQKGNLDFQMYG LSRNRQSFKALCEHGSCLGTGGGGY QVLCRAVMSFGSEESLITNAYLKVN DLASGKPVIIGQTFPPSDSYKGSNGR MYTIGDKYGLYLAPSSWNRYLRFGIT PDISVRSTTWLKSQDPIMKILSTCTNT DRDMCPEICNTRGYQDIFPLSEDSEY YTYIGITPNNGGTKNFVAVRDSGDHI ASIDILQNYYSITSATISCFMYKDEIW CIAITEGKKQKDNPPQRIYAHYSKIRQ MCYNMKSATVTVGNAKNITIRRY	2	112
NC_025363	6503-8347	gb: NC_025363: 6503-8347 生 物: トリバラ ミクソウイル ス 12 株名: Wigeon/Italy/3 920_1/2005 タ ンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ 遺伝子 記号: HN	MESATSQVSFENDKTSRRTWRAVF RVLMIILALSSLCVTVAALIYSAKAAI PGNIDASEQRILSSVEAVQVPVSRLED TSQKIYRQVILEAPVTQLNMETNILNA ITSLSYQIDASANS SGCGAPVHDSDF GGVGRELLQEAENVLTIIIRPSKFLEHL NFIPAPTTGNGCTRIPSFDLGQTHWCY THNVVLNGCRDRGHSFYVALGILR TSATGSVFLSTLRSVNLDDDRNRKSC SVSATPIGCEMLCSLVTETEEGDYDSI DPTPMVHGRLGFDGKYREVDLSEKEI FADWRANYPVVGGAFFGNRVWFP VYGGLKEGTQSERDAEKGYAIYKRF NNTCPDDNTTQIANAKASYRPSRFGG RFIQGILSFKVEGNLGS DPILSLTDNS ITLMGAEARVMNIENKLYLYQRGTS WFPSALVYPLDVANTAVKVRAPYIFD KFTRPGGHPCSASSRCPNVCVTGVYT DAYPLVFSRSHDIVAVYGMQLAAGT ARLDPPQAAIWYGNEMSTPTKVSSSTT KAAAYTTSTCFKVTCTKRIYCISIAEIG NTLFGFRIVPLLIEVQKTPLTRRSELR QQMPQPPIDLVIDNPFCAPSGNLSRKN AIDEYANSWP	2	113

10

20

30

40

【表 5 - 2 9】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025373	6619-8605	gb: NC_025373: 6619-8605 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 3 株名: シ チメンチョウ/ ウィスコンシ ン/68 タンパ ク質名: 血球 凝集素 遺伝子 記号: HN	MEPTGSKVDIVPSQGTKRTRCTFYRL LILILNLIHILTIISIYVSISTDQHKLCNN EADSLLSHIVPITVPLGTDSDVEDEL REIRRDGTGINIQIDNTENIILTTLASIN SNIARLHNATDESPTCLSPVNDPRFIA GINKITKGSMIYRNFSNLIEHVNFI PSP TTLSGCTRIPSFSLSKTHWCYSHNVIS TGCQDHAASSQYISIGIVDTGLNNEPY LRTMSSRLNDGLNRKSCSVTAGAG VCWLLCSVVTESESADYRSRAPTAMI LGRFNFYGDYTESPVPASLFSGRFTA NYPGVGSGTQLNGTLYFPIYGGV VN DSDIELSNRGKSFRPRNPTNPCDPEV TQSQRAQASYYPTRFGRLLIQQAILA CRISDTTCTDYLLYFDNNQVMMGA EARIYYLNNQMYLYQRSSSWWPHPL FYRFSPLPHCEPMSVCMITDTHLITYA TSRPGTSICTGASRCPNNCVDGVYTD VWPLTEGTTQDPDSYYTVFLNSPNRR ISPTISIYSYNQKISSRLAVGSEIGAAY TTSTCFSRDTGTALYCITIEAVNTIFG QYRIVPILVQLISD	2	114
NC_025386	7541-9403	gb: NC_025386: 7541-9403 生 物: セーラム ウイルス 株 名: UNKNOWN- NC_025386 タ ンパク質名: 付着糖タンパ ク質 遺伝子 記号: G	MKAMHYKNDNFADPGTNDNSSDLT TNPFIISNQIKSNLSPPVLAEGHLS PPIP KFRKILLTISFVSTIVVLTIVILLVLT IRI LTHIEASAGDEKDIHTLSSLLNTFMNE YIPVFKNLVSIISLQIPQMLIDLKTSST QMMQSLKTFPRDLETSTVTQSVAVL LEKAKSTIPDINKFYKNVGKVTFNDP NIKVLTLEVPAWLPIVRQCLKQDFRQ VISNSTGFALIGALPSQLFNEFEGYPSL AIVSEVYAITYLKGVMFENQENFLYQ YFEIGTISPDGYNKPYFLRHTSVMLST FKLSGKCTAAVDYRGGIFLCTPSPKIP KILQNPPDLPTLTVVSIIPFDGRYTIRNI SLMLTDEADIIYDLDTLQGRGVLQAM RFYALVRVISSSPRHFPFCKNSWCPT ADDKICDQSRRLGADGNYPVMYGLI SIPAHSSYQGNVSLKLIDPKYYAYTR DASLFYNSMTDTYHYSFGTRGWVSR PIIGELLGDDIVLTRYTVRSVSRATA GDCTTVSMCPQACSGGMNSIFYPLNF DKPQVTGVAIRQYERQQEGIIIVTMN DHYYYSVPPIKNGTLLISSVTDCFWL MGDLWCMSLMEKNNLPLGVRSLAH LTWNIHWSCS	2	115

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 0】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
NC_025390	6647-8386	gb: NC_025390: 6647-8386 生 物: トリパラ ミクソウイル ス 9 株名: ア ヒル/New York/22/1978 タンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ 遺伝子 記号: HN	MESGISQASLVNDNIELRNTWRTAFR VVSLLLGFSLVLTACALHFALNAAT PADLSSIPVAVDQSHHEILQTLMSD IGNKIYKQVALDSPVALLNTESTLMS AITSLSYQINNAANNSSGCGAPVHDKD FINGVAKELFVGSQYNASNYRPSRFL EHLNFIPAPTTGKGCTRIPSFDLAATH WCYTHNVILNGCNDHAQSYQYISLGI LKVSATGNVFLSTLRSINLDDDENRK SCSISATPLGCDLLCAKVTEREEADY NSDAATRLVHGRLGFDGVYHEQALP VESLFSWDVANYPSVGGGSYFDNRV WFGVYGGIRPGSQTDLLQSEKYAIYR RYNNTCPDNNPTQIERAKSSYRQRF GQRLVQQAILSIRVEPSLGNDPKLSVL DNTVVLMGAEARIMTFGHVALMYQ RGSSYFPSALLYPLSLTNGSAAASKPF IFEQYTRPGSPPCQATARCPNSCVTG YTDAYPLFWSEDHKVNGVYGMMLD DITSRLNPVAAIFDRYGRSRVTRVSS STKAAAYTTNTCFKVVKTKRVYCL EIENTLFGFEFRITPLLSEIFDPNLEPSD TSRN	2	116
NC_025403	6692-8645	gb: NC_025403: 6692-8645 生 物: アキモタ ウイルス 1 株 名: UNKNOWN- NC_025403 タ ンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: HN	MATNLSTITNGKFSQNSDEGSLTELPF FEHNRKVATTKRTCRFVFRSVITLCN LTILIVTVVVLFFQQAGFIKRTESNQVC ETLQNDMHGVVTMSKGVITTLNNLIE ITSVNLPFQMKQFGQGIVTQVTQMVR QCNAVCKGPTIGPDIQNIVYPASYES MIKHPVNNSNILLSEIRQPLNFPNTG KLNGCTRTPSFSVYNGFWCYTHAES DWNCNGSSPYMQVFRVGVVTSDDYD YNVIHKTLLHTKTSRLANVTYQCSTIST GYECYFLCSTPNVDEITDYKTPGIESL QIYKIDNRGTFAKFPITDQLNKELLTA LYPGPGNGVLYQGRLLFPMHGGMQS SELNKVNLNNTVLSQFNDNKGCNAT EIKLESEFPGTFTSPYYSNQVMLNYILI CEMIENLPGNCDLQIVAPKNMSMGSE SQLYSINNKLILYQRSSRWPYPLIYE VGTRLTNRQFRLRAINRFLIKSTTRPG SEGCNIYRVCPKVCVTGVYQAPWILH VSKAGSQSIKVLVAVAWSKDHMSR KGPLFSICDNDTCFLTKSLASEHVHSG YSITRCYLENSERHIICVVIMELDASP WAEMRIQSVIYNITLPS	2	117

10

20

30

40

【表 5 - 3 1】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
NC_025404	6655-8586	gb: NC_025404: 6655-8586 生 物: アキモタ ウイルス 2 株 名: UNKNOWN- NC_025404 タ ンパク質名: 付着タンパク 質 遺伝子記 号: HN	MDNSMSISTISLDAQPRIWSRHESRRT WRNIFRITSLVLLGVTVIIWLCCEV ARESELELLASPLGALIMAINTIKSSV VKMTTELNQVTFTTSIILPNKVDQFG QNVVSQVAQLVKQCNVCRGHQDT PELEQFINQKNPTWILQPNYTTKLNL HEIDSIIPLVDYPGFSKSTRFPSFSEGS KFWCFTYAVVKEPCSDISSIQVVKY GAIKANHSDGNPYLVLGTKVLDDGK FRRGCSITSSLYGCYLLCSTANVSEVN DYAHTPAYPLTLELISKDGITTDLSPT YTVQLDKWSALYPGIGSGVIFKGYL MFPVYGGGLPFKSPLISASWVGPGNK WPVDFSCSEDQYSTFNFSNPYSALYS PHFSNNIVVSALFVCPLENLPYSCEV QVLPQGNLTIGAEGRLYVIDQDLYYY QRSTSWWPYLQLYKLNIRITNRVFRV RSLSLPIKSTTRPGYGNCTYFKLCPH ICVTGVYQSPWLISIRDKRPHEEKNIL YFIGWSPDEQIRQNPLVSLCHETACFI NRSLATNKTHAGYSESHCVQSFERNK LTCTVFYELTAKPWAEMRVQSLLFQ VDFL	2	118
NC_025410	6799-8869	gb: NC_025410: 6799-8869 生 物: ツホコウ ウイルス 1 株名: UNKNOWN- NC_025410 タ ンパク質名: ヘマグルチニ ン-ニューラミ ニダーゼ 遺伝 子記号: HN	MDSRSDSFTDIPLDNRIERTVTSKKT WRSIFRVTAIILLICVVVSSISLNQHN DAPLNGAGNQATSGFMDAIIKSLK MSQTINELNQVVMTTSVQLPNRITKF GQDILDQVTQMVRQCNVCRGPGVG PSIQNYVIQGHAPTVSFDPISAEYQKF VFGITEKTLITAYHNPWECLRFPSQHL FDTTWCVSYQILTQNCSDHGPRITVIQ LGEIMIANNLSTVFRDPVIKYIRHHIW LRSCSVVAYYSQCTIFCTSTNKSEPSD YADTGYEQLFLATLQSDGTFTEHSM HGVNIVHQWNAIYGGVGNVIGRN MLIPLYGGINYYDHNTTIVQTVDLRP YPIPDSCSQTDNYQTNYLPSMFTNSY YGTNLVVSGLSCRLMAGTPTSCSIR VIPIENMTMGSEGQFYLINNQLYYYK RSSNWIRDTQVYLLSYSDKGNIEITS AERYIFKSVTSPDEGDCVTNHGCPSN CIGGLFQAPWILNDFKLCGSNITCPKI VTVWADQPDKRSNPMLSIAETDKLL LHKSININYHTAVGYSTVLCFDSPKLN LKTCVVLQELMSDDKLLIRISYSIVSI MVE	2	119

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 2】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
NC_028249	7059-9010	gb: NC_028249: 7059-9010 生 物: アザラシ ジステンパー ウイルス 株 名: PDV/Wadden_ Sea. NLD/1988 タ ンパク質名: 血球凝集素タ ンパク質 遺伝 子記号: H	MFSHQDKVGAFYKNNARANSSKLSL VTDEVEERRSPWFLSILLILLVGILILL AITGIRFHQVVKSNLEFNKLLIEDMEK TKAVHHQVKDVLTPLFKIIGDEVGLR LPQKLNEIKQFIVQKTNFFNPNREFDF RELHWCINPPSKVKVNFTQYCEITEF KEATRSVANSILLLTLYRGRDDIFPPY KCRGATTSMGNVFPLAVSLMSLSISK PSEVINMLTAISEGIYGKTYLLVTDDT EENFETPEIRVFEIGFINRWLGDMPLF QTTNYRIISNNSNTKICTIAVGELALA SLCTKESTILLNLGDEESQNSVLVVIL GLFGATHMDQLEEVIPVAHPSIEKIHI TNHRGFIKDSVATWMVPALALSEQG EQINCLRSACKRRTYPMCQTSWEPF GDKRLPSYGRLTSLDVSSTDLSINVS AQPPIIFNGDGMDDYEGTLLNSGWL TIPKNGTILGLINQASKGDQFIVTPHIL TFAPRESSTDCHLPIQTYQIQDDDVLL ESNLVVLPTQSFYVATYDVSRSDH AIVYYVYDPARTVSYTYPFRLRTKGR PDILRIECFVWDGHLWCHQFYRFQLD ATNSTSVVENLIRIRFSCDRDLP	2	120
NC_028362	6951-8675	gb: NC_028362: 6951-8675 生 物: ヤギバラ インフルエン ザウイルス 3 株名: JS2013 タンパク質名: ヘマグルチニ ン-ノイラミニ ダーゼ 遺伝子 記号: HN	MEYWGHTNPNPKINRKVGVDQVRD RSKTLKIITFIISMMSIMSTVALILILI MFIQNNNNNRILQELRDETDAIEARI QKASNDIGVSIQSGINTRLLTIQNHVQ NYIPLALTQQVSSLRESINDVITKREE TQSKMPIQRMTHDDGIEPLIPDNFWK CPSGIPTISASPKIRLIPGPGLLATSTTI NGCIRLPSLVINNLIIAYTSNLITQGC QDIGKSYQVLQIGIITINSDLVPDLNPR ITHTFDIDDNRKSCSLALRNADVYQL CSTPKVDERSDYSSIGIEDIVLDIVTSE GTVSTTRFTNNNITFDKPYAALYPSV GPGIYYDNKIIFLGYGGLEHEENGDI CNITGCPGKTQHDCNQASYSPWFSNR RMVNAIILVNKGLNKVPSLQVWTIPM RQNYWGSEGRLLLLGNKIYIYTRSTS WHSKLQLGTLDISNYNDIRIRWTHHD VLSRPGSEECPWGNTCPRGCITGVYN DAYPLNPSGSVVSSVILDSRTSRENPII TYSTDTSRVNELAIRNNTLSAAAYTTT NCVTHYGGYCFHIIIEINHKSNTLQP MLFKTEIPKSCN	2	121

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 3】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
AB548428	5999-7261	gb: AB548428: 5999-7261 生物: トリメタニューモウイルス 株名: VCO3/60616 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MGSELYIIEGVSSSEIVLKQVLRRSKKI LLGLVLSALGLTLTSTIVISICISVEQV KLRQCVDTYWAENGLHPGQSTENT STRGKTTTKDPRRLQATGAGKFESCG YVQVVDGDMHDRSYAVLGGVDCLG LLALCESGPICQGDWSEDGNFCRCT FSSHGVSCCKPKSKATTAQRNSKPA NSKSTPPVHSDRASKEHNPSQGEQPR RGPTSSKTTIASTPSTEDTAKPTISKPK LTIRPSQRGPSGSTKAASSTPSHKTNT RGTSKTTDQRPRTGPTPERPRQTHST ATPPPTPIHKGRAPTPKPTTDLKVP REGSTSPTAIQKNPTTQSNLVDCTLSD PDEPQRICYQVGTYNPSQSGTCNIEVP KCSTYGHACMATLYDTPFNCWRRTR RCICDSGGELIEWCCTSQ	1	122
AF079780	8118-10115	gb: AF079780 生物: ツパイパラミクソウイルス 株名: UNKNOWN-AF079780 タンパク質名: ヘマグルチニン 遺伝子記号: H	MDYHSHTTQTGSNETLYQDPLQSQS GSRDTLDGPPSTLQHYSNPPPYSEED QGIDGPQRSQPLSTPHQYDRYYGVNI QHTRVYNHLGTIYKGLKLAFLQILGW VSVIITMIITVTTLKKMSDGNSQDSAM LKSLDENFDAIQEVANLLDNEVRPKL GVTMTQTTFQLPKELSEIKRYLLRLE RNCPCVCGTEATPQGSKGNASGDTAF CPPCLTRQCSDESTHDQGPVGEVTSR NHKGKINFPHILQSDDCGRSDNLIVYS INLVPGLSFIQLPSGTHKCIIDVSYTFS DTLAGYLIVGGVDGCQLHNKAIHLS LGYYKTKMIYPPDYIAIATYTYDLVP NLRDCSIAVNQTSIAICTSKKTKEN QDFSTSGVHPFYIFTLNTDGIFTVTVIE QSQLKLDYQYAALYPATGPGIFIGDH LVFLMWGGLMTKAEGDAYCQASGC NDAHRTSCNIAQMPSAYGHRQLVNG LLMLPIKELGSHLIQPSLETISPKNWA GGHGRLYYNWEINTTYIYIEGKTWRS RPNLGIISWSKPLSIRWIDHSVARRPG ARPCDSANDCPEDCLVGGYYDMFPM SSDYKTAITIIPTHHQWPSSPALKLFN TNREVRVVMILRPPNNVKKTTISCIRI MQTNWCLGFIIFKEGNNAWGQIYSYI YQVESTCPNTK	1	123

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 4】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
AY590688	6138-7935	gb: AY590688: 6138-7935 生物: トリメタニューモウイルス 株名: Colorado タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MEVKVENVGKSQELKVVKNFIKRS DCKKKLFLILGLVSFELTMNIMLSV MYVESNEALSLCRIQGTAPRDNKTN TENATKETTLHTTTTTRDPEVRETKT TKPQANEGATNPSRNLTTKGDKHQT TRATTEAELEKQSKQTTEPGTSTQKH TPTRPSSKSPTTTQAIAQLTTPTPKAS TAPKNRQATTKKTTETDTTASRARNT NNPTETATTTPKATTETGKSKEGPTQ HTTKEQPETTAGETTTPQPRRTASRP APTTKIEEEAETTKRRTTKSTQTSTGP PRPTGGAPSGAATEGSGRAAAAGGPS AASAGGRRRTEAAAERDRRTRAGAG PTAGGARARTAAASERGADTAGSAG GGPGGDGATGGLSGGAPAEREDASG GTAAAGPGDGTEADGRAPPAAALAG RTTESAAGAAGDSGRAGTAGWGSAA DGRSTGGNAAAEAGAAQSGRAAPRQ PSGGTAPESTAPPNSGGSGRADAAPT EEVGVGSGLWRGRYVCGPCGESVPE HPMNPFCGDGTAWICSDDGGSLPAG CYDGGTDGVVCCGVCNGNSCCCGR VECTCGGGAGLLSCCCGSYSWS	1	124
EU403085	6620-8593	gb: EU403085: 6620-8593 生物: トリパラミクソウイルス 3 株名: APMV3/PKT/ Netherland/449 /75 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MESPPSGKDAPAFREPKRTCRLCYRA TTLNLNTIVVLSIISIYVSTQTGANNS CVNPTIVTPDYLTGSTTGSVEDLADL ESQLREIRRDGTINLPVQIDNTENLILT TLASINSNLRFLQNATTESQTCLSPVN DPRFVAGINRIPAGSMAYNDFSNLIEH VNFIPSPTTSLGCTRIPSFSLSKTHWCY THNVISNGCLDHAASSQYISIGIVDTG LNNEPYFRTMSSKSLNDGLNRKSCSV TAAANACWLLCSVVTEYEAADYRSR TPTAMVLGRFDNFNGEYETIAVPSSLF DGRFASNYPGVGSGTQVNGTLYFPL YGGVLNGSDIETANKGKSFRPQNPKN RCPDSEAIQSFRQAQDSYYPTRFGKVL QQAIIACRISNKSCTDFYLLYFDNNRV MMGAEARLYLNNQLYLYQRSSSW WPHPLFYSSISLPSCQALAVCQITEAHL TLTYATSRPGMSICTGASRCPNNCVD GVYTDVWPLTKNDAQDPNLFYTVYL NNSTRISPTISLYTYDRRIKSKLAVG SDIGAAYTTSTCFGRSDTGAVYCLTI METVNTIFGQYRIVPILLRVTSR	1	125

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 5】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
FJ977568	6139-7936	gb: FJ977568: 6139-7936 生物: トリメタニューモウイルス 株名: aMPV/MN/turkey/2a/97 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MEVKVENVGKSQELKVKVKNFIKRS DCKKKLFALILGLVSFELTMNIMLSV MYVESNEALSLCRIQGTAPRDNKTN TENATKETTLLHTTTTTTRDPEVRETKT TKPQANEGATNPSRNLTTKGDKHQT TRATTEAELEKQSKQTTEPGTSTQKH TPARPSSKSPTTTQATAQPTTPTAPKA STAPKNRQATTKKTETDTTASRARN TNNPTETATTTPKATTETGKGKEGPT QHTTKEQPETTARETTTPQPRRTASRP APTTKIEEEAETTKTRTTKNTQTSTGP PRPTRSTPSKTATENNKRTTTTKRPNT ASTDSRQQTRTTAEQDQQTQTRAKPT TNGAHPQTTTTPEHNTDTTNSTKGSP KEDKTTRDPSSKTPTEQEDASKGTAA ANPGGSAEADRRAPPATTPTGRTTES AAGTTGDDSGAETRRRSAADRRPT GGSTAAEAGTAQSGRATPKQPSGGT AAGNTAPPNNESSGRADAAPAEAG VGPSIRRGHACGPRRESAPEHPTNPC PGDGTAWTRSDGGGNLPAGRHDGSA DGAARRGARGGNPRRRGRAERTRGG GAGPPSCRCGSHNRS	1	126
HG934339	5997-7166	gb: HG934339: 5997-7166 生物: トリメタニューモウイルス D 型 株名: シチメンチョウ /1985/Fr85. 1 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MGAKLYAISGASDAQLMKKTCAKLL EKVVPIILAVLGITGTTTIALSISISIER AVLSDCTTQLRNGTTSGLSNPTRSTT STAVTTRDIRGLQTTRTRELKSCSNV QIAYGYLHDSSNPVLDSIGCLGLLAL CESGPFCQRNYNPRDRPKCRCTLRGK DISCCKEPPTAVTTSKTPWGTEVHPT YPTQVTPQSQPATMAHQTATANQRS STTEPVGSQGNNTSSNPEQQTEPPSP QHPPTTTSQDQSTETADGQEHTPTRK TPTATSNRRSPTPKRQETGRATPRNT ATTQSGSSPPHSSPPGVDANMEGQCK ELQAPKPNSVCKGLDIYREALPRGCD KVLPLCKTSTIMCVDAYYSKPPICFG YNQRCFCMETFGPIEFCCCKS	1	127
JN032116	4659-5252	gb: JN032116: 4659-5252 生物: 呼吸器合胞体ウイルス 株名: B/WI/629-12/06-07 タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSKNKNQRTARTLEKTWDTLNHLIVI SSCLYKLNLSIAQIALSVLAMIISTSL IIAAIIFIISANHKVTLTTTVTVTIKNHT EKNITTYLTQVSPERVSPSKQPTTTPPI HTNSATISPNTKSEIHHTTAQTKGRTS TPTQNNKPNTKPRPKNPPKKDDYHFE VFNFVPCSICGNNQLCKSICKTIPSNK PRKNQP	1	128

10

20

30

40

【表 5 - 3 6】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラス ター	配列 番号
KX258200	6254-7996	gb: KX258200: 6254-7996 生物: トリパラミクソウイルス 14 株名: APMV14/duck /Japan/11OG03 52/2011 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MEGSRTVIYQGDPNKNTWRLVFRT LTLILNLAILSVTIASHIITSKITLSEVTT LKTEGVVEEVITPLMATLSDSVQQEKM IYKEVAISIPLVLDKIQTDTVGTSAQIT DALRQIQGVNGTQAFALSNAPEYSGG IEVPLFQIDSFVNKSMISGLLEHASFI PSPTTLHGCTRIPSFHLGPRHWCYTH NIIGSRCRDEGFSSMYISIGAITVNRDG NPLFITASTILADDNNRKSCSIHASSY GCDLLCSIVTESENDDYANPNPTKMV HGRFLYNGSYVEQALPNSLFQDKWV AQYPGVGSGITTHGKVLFPYGGIKK NTQLFYELSKYGFFAHNKELECKNM TEEQIRDIKAAAYLPSKTSGNLFAQGII YCNISKLGDCNVAVLNTSTTMMGAE GRLQMMGEYVYYYQRSSSWWPVGI VYKKSLAELMNGINMEVLSFEPIPLS KFPRPTWTAGLCQKPSICPDVCVTGV YTDLFSVTIGSTTDKDTYFGVYLD SA TERKDPWVAAADQYEWNRNRVRLFES TTEAAYTTSTCFKNTVNNRVFCVSIV ELRENLLGDWKIVPLLFIQIGVSQGP PPK	1	129

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 7】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/クラスター	配列番号
KX940961	7978-12504	gb: KX940961: 7978-12504 生物: ペイロウイルス 株名: ERN081008_1 S タンパク質名: 付着糖タンパク質 遺伝子記号: G	MSQLAAHNLAMSNFYGTHQGDLSGS QKGEEQQVQGVIRYVSMIVGLLSLFT IIALNVTNIIYMTESGGTMQSIKTAQG SIDGSMREISGVIMEDVKPKTDLINSM VSYNIPAQLSMIHQIKNDVLKQCTPS FMFNNTICPLAENPTHSRYFEEVNLDS ISECSGPDMLGLGVNPEFIEFPSFAP GSTKPGSCVRLPSFSLSTTVFAYTHTI MGHGCELDVGDHYFSVGRIADAGH EIPQFETISSWFINDKINRRSCTVAAG AMEAWMGCVIMTETFYDDLNSLDTG KLTISYLDVFGKKKEWIYTRSEILYDY TYTSVYFSVSGGVVVGDTVYFLIWGS LSSPIEETAYCFAPDCSNYNQRCMCNE AQRPSKFGHRQMVNGILKFKTTSTGK PLLSVGTLSPSVVPFGSEGRLMYSEIT KIIYLYLRSTSWHALPLTGLFVLGPPT SISWIVQRAVSRPGEFPCGASNRCPKD CVTGVTDLFPLGSRYEYAATVYLNLS ETYRVNPTLALINQTNIIASKKVTTES QRAGYTTTTCFVKLRVWCISVVELA PSTMTAYEPIPLYQLDLTCKGKNGS LAMRFTGKEGTYKSGRYKSPRNECFE EKVSNKYFIVSTPEGIQPYEIRDLTP DRMPHIIMYISDVCAPALSAFKLLPA MRPITTLTIGNWQFRPVEVSGGLRVSI GRNLTKEGDLTMSAPEDPGSNTFPGG HIPGNGLFDAGYYTVEYPKEWKQTT PKPSEGNIIDKNKTPVIPSRDNPTS SIPHRESIEPVRPTREVLKSSDYVTIVS TDSGSGSGDFATGVPWTGVSPKAPQ NGINLPGTELPHPTVLDRINTPAPSDP KVSADSDHTRDTIDPTALSKPLNHDT TGDTDTRINTGTATYGFTPGREATSS GKLANDLTNSTVPSEAHPSASTSEAS KPEKNTDNRVTQDPTSGTAERPTTNA PVDGKHSTQLTDARPNTADPERTSQH SSSTTRDEVKPSLPSTTEASTHQRT EATPPELVNNTLNPPSTQVRSVRSLMQ DAIAQAWNFRGVTP	1	130

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 8】

Genbank ID	CDS のヌクレオチド	全配列 ID	配列	配列数/ クラスター	配列番号
KY511044	6454-8310	gb: KY511044: 6454-8310 生物: トリパラミクソウイルス UPO216 株名: APMV-15/WB/Kr/UP O216/2014 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MERGISEVALANDRTEEKNTWRLIFR ITVLVSVITLGLTAASLVYSMNAAQ PADFDGIIPAVQQVGTSLTNSIGGMQ DVLDRTYKQVALESPLTLLNMESTIM NAITSLSYKINNGGNSSGCGAPIHDPE YIGGIGKELLIDDNVDVTSFYPSAFKE HLNFIPAPTTGAGCTRIPSFDLSATHY CYTHNVILSGCQDHSQYIALGLV KLSDTGNVFFSTLRSINLDDTANRKS CSISATPLGCDILCSKVTELEEDYKS EPTPMVHGRLSFDGTYSEKDLVDN NLFSDWTANYPSVGGGSYIGNRVWY AVYGGLKPGSNTDQSQRDYVYIKR YNNTCPDPEDYQINKAKSSYTPSYFG SKRVQQAILSIASPTLGSDPVLTPLS NDVVLMGAEGRMHIGGYTYLYQR GTSYYSALLYPLNIQDKSATASSPYK FDAFTRPGSVPCQADARCPQSCVTGV YTDYPLIFAKDHSIRGVYGMMLND VTARLNPIAAVFSNISRSQITRVSSST KAAYTTSTCFKVIKTNRICYMSIAEIS NTLFGFEFRIVPLLVEILSNGGNTARSA GGTPVKESPKGWSDAIAEPLFCTPTN VTRYNADIRRYAYSWP	1	131
NC_025360	8127-10158	gb: NC_025360: 8127-10158 生物: 大西洋サケパラミクソウイルス 株名: ASPV/Yrkje37 1/95 タンパク質名: ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質 遺伝子記号: HN	MPPAPSPVHDPSSFYGSFLNEDTASR KGTSEEIHLGIRWNTVLIVLGLILAI GIGIGASSFSASGITGNTTKEIRLIVEE MSYGLVRISDSVRQEISPKVTLQNA VLSSIPALVTTETNTIINAVKNHCNSPP TPPPTEAPLKKHETGMAPLDPTTYW TCTSGTFRFYSSPNATFIPGPSPLPHTA TPGGCVRIPSMHIGSEIYAYTSNLIAS GCQDIGKSYQNVQIGVLDRTPEGNPE MSPMLSHTFPINDNRKSCSIVTLKRA AYIYCSQPKVTEFVDYQTPGIEPMSL DHINANGTTKTWYSPTEVVTDPVYA SMYPSVGSVVIDGKLVLVYGGLL NGIQVPAMCLSPECPGIDQAACNASQ YNQYLSGRQVVNGIATVDLMNGQKP HISVETISPSKNWFGAEGRLVYMGR LYIYIRSTGWHSPIQIGVIYTMNPLAIT WVTNTVLSRPGSAGCDWNNRCPKAC LSGVYTDAYPISPDYNHLATMILHSTS TRSNPVMVYSSPTNMVNYAQLTTTA QIAGYTTTSCFTDNEVGYCATALELT PGTLSSVQPILVMTKIPKECV	1	132

【 0 4 6 6 】

他のタンパク質

いくつかの実施形態において、フソゲンは、pH 依存性タンパク質、そのホモログ、そのフラグメント、およびその1つ以上のタンパク質またはそのフラグメントを含むタンパク質融合物を含み得る。フソゲンは、細胞表面またはエンドソームあるいは別の細胞膜結合空間において膜融合を媒介し得る。

【 0 4 6 7 】

いくつかの実施形態において、フソゲンは、EFF-1、AFF-1、gap 結合タンパク質、例えば、コネキシン（Cn43、GAP43、CX43など）（DOI: 10.

10

20

30

40

50

1021/jacs.6b05191)、他の腫瘍結合タンパク質、それらのホモログ、それらのフラグメント、それらの変異体、およびそれらの1つ以上のタンパク質またはそのフラグメントを含むタンパク質融合物を含む。

【0468】

脂質フソゲン

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、飽和脂肪酸などの1つ以上の融合性脂質を含むことができる。いくつかの実施形態において、飽和脂肪酸は、10~14個の炭素を有する。いくつかの実施形態において、飽和脂肪酸は、より長い鎖のカルボン酸を有する。いくつかの実施形態では、飽和脂肪酸はモノエステルである。

10

【0469】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、1つ以上の不飽和脂肪酸を含み得る。いくつかの実施形態において、不飽和脂肪酸は、C16~C18不飽和脂肪酸を有する。いくつかの実施形態では、不飽和脂肪酸には、オレイン酸、モノオレイン酸グリセロール、グリセリド、ジアシルグリセロール、変性不飽和脂肪酸、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0470】

理論に拘束されることを望まないが、いくつかの実施形態では、負の湾曲脂質は膜融合を促進する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、膜内に、1つ以上の負の湾曲脂質、例えば、外因性の負の湾曲脂質を含む。実施形態において、負の湾曲脂質またはその前駆体は、供給源細胞、レトロウイルスベクター、またはVLPを含むメディアに添加される。実施形態において、供給源細胞は、1つ以上の脂質合成遺伝子を発現または過剰発現するように操作される。負の湾曲脂質は、例えば、ジアシルグリセロール(DAG)、コレステロール、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、または脂肪酸(FA)であり得る。

20

【0471】

理論に拘束されることを望まないが、いくつかの実施形態では、正の湾曲脂質は膜融合を阻害する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、膜において、1つ以上の正の湾曲脂質、例えば、外因性の正の湾曲脂質の低下したレベルを含む。実施形態では、レベルは、供給源細胞において脂質の合成を阻害することによって、例えば、脂質合成遺伝子のノックアウトまたはノックダウンによって、減少される。正の湾曲脂質は、例えば、リゾホスファチジルコリン(LPC)、ホスファチジルイノシトール(PtdIns)、リゾホスファチジン酸(LPA)、リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)、またはモノアシルグリセロール(MAG)であり得る。

30

【0472】

化学物質フソゲン

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、融合性化学物質によって処理され得る。いくつかの実施形態では、融合性化学物質は、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体である。

【0473】

いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、2つの膜の間に局所的な脱水を誘発し、二重層の好ましくない分子パッキングをもたらす。いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、脂質二重層付近の領域の脱水を誘発し、2つの膜間の水性分子の排除を引き起こし、2つの互いの膜間の相互作用を可能にする。

40

【0474】

いくつかの実施形態では、化学物質フソゲンは正のカチオンである。正のカチオンのいくつかの非限定的な例には、Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、La³⁺、Sr³⁺、およびH⁺が挙げられる。

【0475】

いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、表面極性を変更することによって

50

標的膜に結合し、水和依存性の膜間反発を変化させる。

【0476】

いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、溶解可能である可溶性脂質である。いくつかの非限定的な例には、オレオイルグリセロール、ジオレオイルグリセロール、トリオレオイルグリセロール、ならびにそれらの変種および誘導体が挙げられる。

【0477】

いくつかの実施形態では、化学物質フソゲンは水溶性化学物質である。いくつかの非限定的な例には、ポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ならびにそれらの変種および誘導体が挙げられる。

【0478】

いくつかの実施形態では、化学物質フソゲンは小さい有機分子である。非限定的な例には、*n*-ヘキシルブロミドが挙げられる。

【0479】

いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、フソゲンまたは標的膜の構成、細胞生存率、またはイオン輸送特性を変化させない。

【0480】

いくつかの実施形態において、化学物質フソゲンは、ホルモンまたはビタミンである。いくつかの非限定的な例には、アブシジン酸、レチノール（ビタミンA1）、トコフェロール（ビタミンE）、ならびにそれらの変種および誘導体が挙げられる。

【0481】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、アクチンおよび重合化アクチンを安定化する薬剤を含む。理論に拘束されることは望まないが、レトロウイルスベクターまたはVLPにおける安定化されたアクチンは、標的細胞との融合を促進することができる。実施形態において、重合化アクチンを安定化させる薬剤は、アクチン、ミオシン、ピオチン-ストレプトアビジン、ATP、神経性ウィスコット-アルドリッチ症候群タンパク質（N-WASP）、またはフォルミンから選択される。例えば、Langmuir, 2011 Aug 16; 27(16):10061-71、およびWeira, Nat Commun, 2016 Aug 31; 7を参照。実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、外因性アクチン、例えば、野生型アクチンまたは重合を促進する変異を含むアクチンを含む。実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、ATPまたはホスホクレアチン、例えば、外因性ATPまたはホスホクレアチンを含む。

【0482】

小分子フソゲン

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、融合性小分子で処理され得る。いくつかの非限定的な例には、ハロタン、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）であるメロキシカム、ピロキシカム、テノキシカム、およびクロルプロマジンなどが挙げられる。

【0483】

いくつかの実施形態において、小分子フソゲンは、ミセル様凝集体で、または凝集体なしで存在し得る。

【0484】

タンパク質フソゲンにおける変異

タンパク質フソゲンまたはウイルスエンベロープタンパク質は、融合タンパク質または標的タンパク質（例えば、血球凝集素タンパク質）のアミノ酸残基を変異させることによって再標的化され得る。いくつかの実施形態では、フソゲンはランダムに変異される。いくつかの実施形態では、フソゲンは合理的に変異される。いくつかの実施形態では、フソゲンは定向進化が加えられる。いくつかの実施形態では、フソゲンは切断され、ペプチドのサブセットのみがレトロウイルスベクターまたはVLPで使用される。例えば、麻疹血球凝集素タンパク質のアミノ酸残基を変異させて、タンパク質の結合特性を変化させ、融

10

20

30

40

50

合を向け直し得る (doi:10.1038/nbt942、Molecular Therapy vol. 16 no. 8、1427-1436 Aug. 2008、doi:10.1038/nbt1060、DOI:10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002、DOI:10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001、doi:10.1073pnas.0604993103)。
【0485】

タンパク質フソゲンは、標的化部分を融合タンパク質または標的化タンパク質（例えば、血球凝集素タンパク質）と共有結合させることによって再標的化され得る。いくつかの実施形態において、融合体および標的化部分は、標的化部分に連結されたフソゲンを含むキメラタンパク質の発現によって共有結合される。標的には、標的細胞に提示される任意のペプチド（例えば、受容体）が含まれる。いくつかの例では、標的は、非標的細胞よりも標的細胞において高いレベルで発現される。例えば、単鎖可変フラグメント (scFv) をフソゲンに結合させて、フソゲン活性を scFv 結合標的を提示する細胞に向け直すことができる (doi:10.1038/nbt1060、DOI 10.1182/blood-2012-11-468579、doi:10.1038/nmeth.1514、doi:10.1006/mthe.2002.0550、HUMAN GENETHERAPY 11:817-826、doi:10.1038/nbt942、doi:10.1371/journal.pone.0026381、DOI 10.1186/s12896-015-0142-z)。例えば、設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) をフソゲンに結合させて、DARPin 結合標的 (doi:10.1038/mt.2013.16、doi:10.1038/mt.2010.298、doi:10.4049/jimmunol.1500956)、ならびに異なる DARPin の組み合わせ (doi:10.1038/mt.2016.3) を提示する細胞に融合活性を向け直すことができる。例えば、受容体リガンドおよび抗原をフソゲンと結合させて、標的受容体を提示する細胞にフソゲン活性を向け直すことができる (DOI:10.1089/hgtb.2012.054、DOI:10.1128/JVI.76.7.3558-3563.2002)。標的タンパク質はまた、例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv フラグメント、scFv 抗体フラグメント、ジスルフィド結合 Fv (sdFv)、VH および CH1 ドメインからなる Fd フラグメント、線形抗体、sdAb (VL または VH) などの単ドメイン抗体、ナノボディ、またはラクダ VHHD メイン)、フィブロネクチンポリペプチドミニボディなどの抗原結合フィブロネクチン III 型 (Fn3) スキャホルド、リガンド、サイトカイン、ケモカイン、または T 細胞受容体 (TCR) を含むことができる。タンパク質フソゲンは、標的化部分を融合タンパク質または標的化タンパク質（例えば、血球凝集素タンパク質）に非共有結合的に結合させることによって再標的化され得る。例えば、融合タンパク質は、標的細胞上の抗原を標的とする抗体の Fc 領域と結合するように操作され、抗体の標的を提示する細胞に向けて融合活性を向け直すことができる (DOI:10.1128/JVI.75.17.8016-8020.2001、doi:10.1038/nm1192)。改変フソゲンおよび非改変フソゲンは、同じレトロウイルスベクターまたは VLP で提示され得る (doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.051)。
【0486】

標的化部分は、例えば、ヒト化抗体分子、インタクト無傷の IgA、IgG、IgE または IgM 抗体、二重特異性または多重特異性抗体（例えば、Zybodyes（登録商標）など）、Fab フラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fd' フラグメント、Fd フラグメント、および単離された CDR またはそれらのセットなどの抗体フラグメント、単鎖 Fvs、ポリペプチド-Fc 融合、単ドメイン抗体（例えば、IgNAR またはそのフラグメントなどのシャーク単ドメイン抗体）、ラクダ様抗体、マスクされた抗体（例えば、Probodyes（登録商標））、Small Modular Immunopharmaceuticals（「SMIPs™」）、単

10

20

30

40

50

鎖またはタンデム二重抗体 (TandAb (登録商標))、VHH、Anticalins (登録商標)、Nanobodies (登録商標)、ミニボディ、BiTE (登録商標)、アンキリン反復タンパク質またはDARPin (登録商標)、Avimers (登録商標)、DART、TCR様抗体、Adnectins (登録商標)、Affilins (登録商標)、Trans-bodies (登録商標)、Affibodies (登録商標)、TrimerX (登録商標)、MocroProteins、Fynomers (登録商標)、Centyrins (登録商標)、およびKALBITOR (登録商標) を含み得る。

【0487】

実施形態において、再標的化されたフソゲンは、標的細胞上の細胞表面マーカー、例えば、タンパク質、糖タンパク質、受容体、細胞表面リガンド、アゴニスト、脂質、糖、クラスI膜貫通タンパク質、クラスII膜貫通タンパク質、またはクラスIII膜貫通タンパク質と結合する。

【0488】

レトロウイルスベクターまたはVLPはタンパク質フソゲンに結合されていない標的部分を提示して、融合活性を標的部分によって結合される細胞に向け直し、またはホーミングに影響を及ぼし得る。

【0489】

レトロウイルスベクターまたはVLPに付加された標的化部分は、異なる結合強度を有するように調節され得る。例えば、様々な結合強度を有するscFvおよび抗体を使用して、大量または少量の標的抗原を提示する細胞に対するレトロウイルスベクターまたはVLPの融合活性を変化させ得る (doi:10.1128/JVI.01415-07、doi:10.1038/cgt.2014.25、DOI:10.1002/jgm.1151)。例えば、異なる親和性を有するDARPinを使用して、大量または少量の標的抗原を提示する細胞に対するレトロウイルスベクターまたはVLPの融合活性を変化させ得る (doi:10.1038/mt.2010.298)。標的化部分はまた、標的リガンド上の異なる領域を標的にするように調節され得、標的を提示する細胞との融合割合に影響を与える (doi:10.1093/protein/gzv005)。

【0490】

いくつかの実施形態において、タンパク質フソゲンは、例えば、本明細書で説明されるように、免疫反応性を低減するように変化させることができる。例えば、タンパク質フソゲンは、PEGなどの免疫相互作用を低減する分子で装飾され得る (DOI:10.1128/JVI.78.2.912-921.2004)。したがって、いくつかの実施形態では、フソゲンは、PEGを含み、例えば、PEG化ポリペプチドである。免疫系によって標的にされるフソゲン中のアミノ酸残基は、免疫系によって認識されないように変更され得る (doi:10.1016/j.virol.2014.01.027、doi:10.1371/journal.pone.0046667)。いくつかの実施形態において、フソゲンのタンパク質配列は、ヒト (ヒト化) で認められるアミノ酸配列に類似するように変更される。いくつかの実施形態において、フソゲンのタンパク質配列は、MHC複合体とわずかな強さで結合するタンパク質配列に変更される。いくつかの実施形態において、タンパク質フソゲンは、ヒトに感染しない (そしてヒトがワクチン接種されていない) ウイルスまたは生物に由来し、患者の免疫系がタンパク質フソゲンに対してナイーブである可能性を高める (例えば、フソゲンに対する無視できるほどの体液性または細胞媒介性の適応免疫応答がある) (doi:10.1006/mthe.2002.0550、doi:10.1371/journal.ppat.1005641、doi:10.1038/gt.2011.209、DOI10.1182/blood-2014-02-558163)。いくつかの実施形態では、フソゲンのグリコシル化を変更して、免疫相互作用を変化、または免疫反応性を低下させ得る。理論に束縛されることを望まないが、いくつかの実施形態において、ヒトに感染しないウイルスまたは生物に由来するタンパク質フソゲンは、患者において天然の融合標的を有さず、したがって高い特異

10

20

30

40

50

性を有する。

【0491】

ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントを含み、組織特異的プロモーター、組織特異的エンハンサー、組織特異的スプライス部位、RNAもしくはタンパク質の半減期を延長する組織特異的部位、組織特異的mRNA核外輸送促進部位、組織特異的翻訳増強部位、または組織特異的翻訳後改変部位などが挙げられる。

【0492】

本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、ホスト細胞と相互作用して転写および翻訳を実行する領域、例えば、複製の起点、選択カセット、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（シャインダルガルノ配列またはコザック配列）、イントロン、5'および3'非翻訳領域などの非翻訳領域を含み、操作可能に連結されるポリヌクレオチドの転写または発現を指示、増加、調節、または制御することができる。このようなエレメントは、その強度および特異性が異なり得る。利用されるベクターシステムおよび宿主に応じて、遍在性プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む、任意の数の好適な転写および翻訳エレメントを使用し得る。

【0493】

特定の実施形態では、制御エレメントは、細胞特異的な様式で、操作可能に連結されたポリヌクレオチドの転写または発現を指示、増加、調節、または制御することができる。特定の実施形態では、レトロウイルス核酸は、特定の細胞、細胞型、または細胞系統、例えば標的細胞に特異的である1つ以上の発現制御配列を含み、すなわち、特定の細胞、細胞型、または細胞系統に特異的である発現制御配列に操作可能に連結されたポリヌクレオチドの発現は、標的細胞で発現され、非標的細胞では発現されない（またはより低いレベル）。

【0494】

特定の実施形態において、レトロウイルス核酸は、プロモーターおよび／またはエンハンサーなどの外因性、内因性、または異種の制御配列を含むことができる。

【0495】

実施形態では、プロモーターは、RNAポリメラーゼが結合する認識部位を含む。RNAポリメラーゼは、プロモーターに操作可能に連結されたポリヌクレオチドを開始および転写する。特定の実施形態では、哺乳動物細胞で機能するプロモーターは、転写が開始される部位から約25～30塩基上流に位置するATリッチ領域、および／または転写開始から70～80塩基上流に認められる別の配列である、Nが任意のヌクレオチドであり得るCNCAAT領域を含む。

【0496】

実施形態では、エンハンサーは、増強された転写を提供することができ、いくつかの例では、別の制御配列に対する適応とは無関係に機能することができる配列を含むDNAのセグメントを含む。エンハンサーは、プロモーターおよび／または他のエンハンサーエレメントと協調的または相加的に機能することができる。いくつかの実施形態において、DNAのプロモーター／エンハンサーセグメントは、プロモーターおよびエンハンサー機能の両方をもたらすことができる配列を含む。

【0497】

例示的な遍在性発現制御配列には、限定されないが、サイトメガロウイルス（CMV）即時初期プロモーター、ウイルスシミアンウイルス40（SV40）（例えば、初期または後期）、モロニーネズミ白血病ウイルス（MoMLV）LTRプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、単純ヘルペスウイルス（HSV）（チミジンキナーゼ）プロモーター、ワクシニアウイルス由来のH5、P7.5、およびP11プロモーター、伸長因子1-アルファ（EF1a）プロモーター、初期増殖応答1（EGR1）、フェリチンH（FerH）、フェリチンL（FerL）、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロ

10

20

30

40

50

ゲナーゼ (GAPDH)、真核生物翻訳開始因子4A1 (EIF4A1)、熱ショック70 kDaタンパク質5 (HSPA5)、熱ショックタンパク質90 kDaベータ、メンバー1 (HSP90B1)、熱ショックタンパク質70 kDa (HSP70)、 β -キネシン (β -KIN)、ヒトROSA26遺伝子座Orionsら, Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007))、ユビキチンCプロモーター (UBC)、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ β -アクチン (CAG) プロモーター、 β -アクチンプロモーターおよび骨髄増殖肉腫ウイルスエンハンサー、削除されたネガティブコントロール領域、d1587 revプライマー結合部位置換 (MND) プロモーター (Challitら, J Virol. 69 (2) : 748-55 (1995)) が挙げられる。

10

【0498】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓細胞、例えば、肝細胞、肝臓類洞内皮細胞、胆管細胞、星状細胞、肝常在抗原提示細胞 (例えば、クッパー細胞)、肝常在免疫リンパ球 (例えば、T細胞、B細胞、またはNK細胞)、または門脈線維芽細胞における発現を促進するプロモーターである。様々な好適な肝臓特異的プロモーター (例えば、肝細胞特異的プロモーターおよび肝類洞内皮細胞プロモーター) を以下の表6に記載する。表6にはまた、肝細胞に特異的ではないいくつかの遍在性プロモーターも列挙される。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソソーム (例えば、ウイルスベクター) は、その核酸において、表6の配列を有するプロモーター、またはそれらの転写活性フラグメント、あるいはそれらと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有する変異体を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソソーム (例えば、ウイルスベクター) は、その核酸において、表6に列挙される遺伝子のための転写開始部位の3 kb内の領域からの転写因子結合部位を有するプロモーターを含む。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソソーム (例えば、ウイルスベクター) は、その核酸において、表6に列挙される遺伝子の転写開始部位のすぐ上流の2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、もしくは0.5 kb内の領域、あるいはそれらの転写活性フラグメント、またはそれらと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有する変異体を含む。

20

30

【0499】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるフソソーム (例えば、ウイルスベクター) は、その核酸において、配列番号133~142もしくは161~168のうちのいずれか1つに示される配列を有するプロモーター、またはそれらの転写活性フラグメント、あるいはそれらと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有する変異体を含む。

40

50

【表 6 - 1】

表 6. 例示的なプロモーター、例えば、肝細胞特異的プロモーター

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	hAAT (SerpinA1)	α 1 アンチトリプシン遺伝子 (SerpinA1 遺伝子)	AGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATT CTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTAC TCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTC CACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCA GGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAG CTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCG TAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTT AGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACC TTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCC CCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACA GGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTG ACCTGGGACAGTGAATGTCCCCCTGATCTGCGGCC GTGACTCTCTTAAGGTAGCCTTGCAAGTTGGTC GTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACA AGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCT TGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAG GCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTT CTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAG CT	161

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	ApoE.HC R-hAAT	アポリポタンパク質 E/CI 遺伝子、 α 1 アンチトリプシン遺伝子	gtagggctcagaggcacacaggagtttctgggctcaccctgccccctccaacccc tcagttcccatcctccagcagctgtttgtgtgctgctctgaagtcacactgaacaa acttcagcctactcatgtccctaaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa acacacagccctccctgcctgctgacctggagctggggcagaggtcagagacct ctctgggcccattgccacctccaacatccactcgaccccttggatttcgggtggaga ggagcagaggtgtcctggcgtggttaggtagtgtgagaggggtacccggggat ctgtaccagtggaacagccactaagattctgcagtgagagcagagggccagc taagtgtactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccaccttggacac aggacgctgtggttctgagccaggtacaatgactccttccgtaagtgcagtgga gctgtacctgcccaggcaaacggtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatc ccagccagtggacttagccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttggtaa tattaccagcagcctcccccgttgcctcctggatccactgcttaataacggacga ggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagtga tgatccccctgatctcggcctcgacggtatcgataagcttgatcgaattctagt gtcgaccactttcacaatctgtagcaacctgaggaggtatcgtagaaattcgct gtctcgaggggccagctgttggggtagtactccctcctcaaaaggggcatgactt ctgcgctaagattgtcagtttcaaaaacgaggaggatttgatattcacctggccc cggtgatgcctttaggggtggccgctccatctggtcagaaaagacaattttgtt gtcaagcttgagggtgtggcaggttgagatcgatcgaccatacacttgagtga tgacatccacttgccttctctccacaggtgtccactcccagggtccaac	133
肝細胞	増強トランスサイレチン	トランスサイレチン遺伝子	CTCGAGGTCAATTCACGCGAGTTAATAATTACCAG CGCGGGCCAAATAAATAATCCGCGAGGGGCAGGT GACGTTTGGCCAGCGCGCGCTGGTAATTATTAACC TCGCGAATATTGATTTCGAGGCCGCGATTGCCGCAA TCGCGAGGGGCAGGTGACCTTTGCCAGCGCGCG TTCGCCCCGCCCGGACGGTATCGATAAGCTTAGG AGCTTGGGCTGCAGGTTCGAGGGCACTGGGAGGAT GTTGAGTAAGATGGAAAACTACTGATGACCCTTGC AGAGACAGAGTATTAGGACATGTTTGAACAGGGG CCGGGCGATCAGCAGGTAGCTCTAGAGGATCCCC GTCTGTCTGCACATTTCTGATAGAGCGAGTGTTCCGA TACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTG TAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAAT AATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCA GGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTAT AAAAGCCCCCTTACCAGGAGAAGCCGTCACACAG ATCCACAAGCTCCTGCCACCATGG	162

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	TTR	トランスサイレチン	CCCACCTCCCGGAGTCCTCTCCTGCACATTCTCAT GTTCCTGAAAGGCTTTTCTGTCCCTTCCACTACTCC CTGTAAGCTCCTGTGCTTCACAATTTCTTGTTGAAT TTTTCTAATCTGACTCTATCAGTTATGGGAATGTT CCCTCAATTCTTAGTGCTCCAAACCGGACTTGCTC TTGGCTTGTATTTGTCCAAAATATTTGTCTTCTCTA TGTTTCTACATGTTTGTCTTATAAGGACAAAAAC CTGCCTTAGTTTATCCATGAACAAAGCCACGCATG CTAGTGGACACACACACACATGCGCGTGCGCGCG CACACACACACACACACACATACACACAGAGACT TTGTATGTGAGTAATGAATCATCAAATCATCATAA TTTCTGGACTTGTATTAATAAGTCGGCCAGGAGGA AAAGAATCTGCTGTCAATCATGGCTTCTGGTTCTC ACAGTCATCTCTACTTTCTTCCAGCAAGTTTGTTCT TGTCAAAAACCGAGCTGTCAGCCTTGTTCTGTCATG CCCAATGCAGAAGAGTCAGTAAAGAAGATTTGGT TCTCTGTATTTACAGGGGCATCAATGCCAGGTTGAA ATATGCCATTCTGGCCCAGCTCAGTGGCTCACACG TGTAATCCCAGCACTTTTGAAGGCCAAAGCGGGT GGATTGCTTGAGCTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTG GGCAAGAGGCTGAGGTGGGAGGATGACCTGAGCC CGGGAGGTCAAGGCTGCAGCGAGCTGTGATCGTG CCACTGCACTCGAGCCAGGGCGTTGGAGTGAGAC CCTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAGGAAAA AAGGAAGGAAGGAAGGGAGGGAGGGAAGATGCC ATTCTTAGATTGAAGTGGACTTTATCTGGGCAGAA CACACACACACATACACACATGCACACACACATT GTGGAGAAATTGCTGACTAAGCAAAGCTTCCAAA TGACTTAGTTTGGCTAAAATGTAGGCTTTTAAAAA TGTGAGCACTGCCAAGGGTTTTTCCTTGTTGACCC ATGGATCCATCAAGTGCAAACATTTTCTAATGCAC TATATTTAAGCCTGTGCAGCTAGATGTCATTCAAC ATGAAATACATTATTACAACCTTGCATCTGTCTAAA ATCTTGCACTCTAAAATGAGAGACAAAAAATCTAT AAAAATGGAAAACATGCATAGAAATATGTGAGGG AGGAAAAAATTACCCCAAGAATGTTAGTGCACG CAGTCACACAGGGAGAAGACTATTTTGTGTTTGT TTGATTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTGTGTTTTG TGACCTAACTGGTCAAATGACCTATTAAGAATATT TCATAGAACGAATGTTCCGATGCTCTAATCTCTCT AGACAAGGTTTATATTTGTATGGGTTACTTATTCT CTCTTTGTTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCA GGTTTGCAGTCAGATTGGCAGGGATAAGCAGCCT AGCTCAGG	163

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	Alb	アルブミン遺伝子	ccaccgcggtggcggcgcgtctagcttccttagcatgacgttcactttttctaagg tgagacttactcttggatttgatctttgtgaaacttttgaaattaccatcttctaag cttctgcttctcagtttctgcttctcattccacttttccagctgacctgccccctac caacattgctccacaagcacaattcatccagagaaaataaattctaagtttatagtt gtttggatcgcataggttagctaaagaggtggcaaccacacatccttaggcatgag cttgattttttgattagaaccttcccctctctgttcttagactacactacacattctgc aagcatagcacagagcaatgttctactttaattactttcattttctgtatcctcacagcc tagaaaataacctgcgttacagcatccactcagatcccttgagcatgaggtgacac tacttaacataggagagatggtactttgtgtcctgctctgtcagcaggccactg tactgctgataccagggaatgtttgttctaataccatcattccggacgttttgcctt ggccagttttccatgtacatgcagaaagaagttggactgatcaatacagtcctctgc ctttaagcaataggaaaaggccaactgtctacgttttagtatgtgctgtagaagg gtatagatataaaaaataaactaatgaaatggcagctttacacattttggcagcttat ttaagtcttggtttaagtacgctggagctgtcacagctaccaatcaggcatgtctg ggaatgagtacacggggaccataagttactgacattcgtttccattccattgaata cacactttgtcatggtattgcttgcgtgaaattgtttgcaaaaaaacccctcaaatc atatataattttaataaatgaattttaattatctcaatgttataaaaaagtcattttaat aattaggtacttatataaccaataatctcaacaatcattttaaacattgtttatgagct tattatggatgaatctatctctatatactctataactctaaaaagaagaaagaccata gacaatcatctattgatgtgttaaagtttacatgtgagtagacatcagatgctccatt tctactgtaataccatttatagttacttgcataaactaactggaattctaggactaaat attttaagtttagctgggtgactggttgaaaatttaggtaagtactgaaaccaaga gattataaaacaataaattctaaagtttagaagtgatcataatcaatattaccctcta atgaaaatattcacaagttgagctacagaaattcaacataagataattttagctgtaa caatgaattgttctctattttctttgagatacagttttctgtctagctttggctgctc ggacctgctctgtagaccaggttggtctgaactcagagatctgctgcctctgcctt gcaagtctagtgattaaaaagcatgtgccaccactgcctggctacaatctatgtttat aagagattataaagctctggctttgtgacattaatcttcagataataagcttttgatt gtgtctggagaacatacagactgtgagcagatgttcagaggatattgtctagggg tgattcaatctgcagcaataattatgagcagaattactgacattccattttatacatt ctactgtctgatcatgaacatagataagcatgcaggcattcatcatagttttcttatac tgaaaaacattaaatatgaagaagcactttataatacagtttagatgtgttttgcca tcttttaatttctaagaataactaagctgatgcagagtgaagagtgtgtgaaaagca gtggtgcagcttggcttgaactggtctccagcttgggacgacctgcaggcatgctt ccatccaaggccacactgaaatgctcaaatgggagacaaaagagattaagctctt atgtaaaatttgcgttttacataactttaatgaatggacaaagtcttgcacatgggggt gggggtgggggttagaggggaacagctccagatggcaaacatacgaagggtatt agtcaacaacttttggcaagatggtatgattttgtaatggggtagggaaccaatga aatgagggtaagtatggttaatgatctacagtattgtttaaagaagtataattagagc gagctttctgcacacagatcaaccttctatcaacccgggacccccgggctgca ggaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgacctcgagggggggcccggtac	134

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	Apoa2	アポリポタンパク質 A-II 遺伝子	CCGGGCGTGGTGGCGCATGTCTGTAATCCCAGCTA CTTGGGATGCTGAGGCAGGAGAATCCTTGAACCC GGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCATGC CATTACGCTCCAGCCTGAGCAACAAGAGCAAAAC TCCGTCTCAGGAAAACAAACAAAAAACCTGCAC ATATACTTCTGAATTTAAAACAAAAGTTAAAAAAC AAAGATTTCTTGGTCTCTGGTCACTACCTCCCTCAT CAGCTTTGCGCCTCCACTGTCACCCTCAGGAATGT TCCACATACTCAGCGAGTATGCTTGGGGGGCAAA AGGGTGAAAGATACAAAAGCTTCTGATATCTATTT AACTGATTTACCCAAATGCTTTGAACCTGGGAAT GTACCTCTCCCCCTCCCCACCCCCAACAGGAGTG AGACAAGGGCCAGGGCTATTGCCCCTGCTGACTC AATATTGGCTAATCACTGCCTAGAACTGATAAGGT GATCAAATGACCAGGTGCCTTCAACCTTTACCCTG GTAGAAGCCTCTTATTACCTCTTTTCTGCCAGA GCCCTCCATTGGGAGGGGACGGGCGGAAGCTGTT TTCTGAATTTGTTTTACTGGGGGTAGGGTATGTT AGTGATCAGCATCCAGGTCATTCTGGGCTCTCCTG TTTTCTCCCCGTCTCATTACACATTAACCAAAAA CGGACAAGATCATTTACACTTGCCCTCTTACCCGA CCCTCATTCCCCTAACCCCCATAGCCCTCAACCT GTCCCTGATTTCAATTCCTTTCTCCTTTCTTCTGCT CCCCAATATCTCTCTGCCAAGTTGCAGTAAAGTGG GATAAGGTTGAGAGATGAGATCTACCCATAATGG AATAAAGACACCATGAGCTTTCATGGTATGATGG GTTGATGGTATTCCATGGGTTGATATGTCAGAGCT TTCCAGAGAAATAACTTGGAATCCTGCTTCCTGTT GCACTCAAGTCCAAGGACCTCAGATCTCAAAGA ATGAACCTCAAATATACCTGAAGTGACCCCTTA GCCTCCACTAAGAGCTGTACCCCTGCCTCTCACC CCATCACCATGAGTCTTCCATGTGCTTGTCTCTCC TCCCCATTCTCCAACCTGTTTATCCTCACATAAT CCCTGCCCCACTGGGCCCCATCCATAGTCCCTGTCA CCTGACAGGGGGTGGGTAAACAGACAGGTATATA GCCCCCTTCTCTCCAGCCAGGGCAGGCACAGACAC CAAGGACAGAGACGCTGGCTAGGTAAGATAAGGA GGCAAGATGTGTGAGCAGCATCCAAAGAGGCCTG GGCTTCAGTTGTGGAGAGGGAGAGAGCCAGGTTG GAATGGGCAGCAGGTAGGGAGATCCCTGGGGAGG AGCTGAAGCCCATTGGCTTCAGTGTCCCCAAAC CCCCACCACCT	164

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	Cyp3a4	Cyp3a4 遺伝子	AGCTCCTGGGGCCTGCCCTCCTCCCATTAGAAAAT CCTCCACTTGTCAAAAAGGAAGCCATTGCTTTGA ACTCCAATTCCACCCCCAAGAGGCTGGGACCATCT TATTGGAGTCCTTGATGCTGTGTGACCTGCAGTGA CCACTGCCCCATCATTGCTGGCTGAGGTGGTTGGG GTCCATCTGGCTATCTGGGCAGCTGTTCTCTTCTCT CCTTTCTCTCCTGTTTCCAGACATGCAGTATTTCCA GAGAGAAGGGGCCACTCTTTGGCAAAGAACCTGT CTAACTTGCTATCTATGGCAGGACCTTTGAAGGGT TCACAGGAAGCAGCACAAATTGATACTATTCCACC AAGCCATCAGCTCCATCTCATCCATGCCCTGTCTC TCCTTTAGGGGTCCCCTTGCCAACAGAATCACAGA GGACCAGCCTGAAAGTGCAGAGACAGCAGCTGAG GCACAGCCAAGAGCTCTGGCTGTATTAATGACCTA AGAAGTCACCAGAAAGTCAGAAGGGATGACATGC AGAGGCCCAGCAATCTCAGCTAAGTCAACTCCAC CAGCCTTTCTAGTTGCCCACTGTGTGTACAGCACC CTGGTAGGGACCAGAGCCATGACAGGGAATAAGA CTAGACTATGCCCTTGAGGAGCTCACCTCTGTTCA GGGAAACAGGCGTGGAACACAATGGTGTTAAAG AGGAAAGAGGACAATAGGATTGCATGAAGGGGAT GGAAAGTGCCAGGGGAGGAAATGGTTACATCTG TGTGAGGAGTTTGGTGAGGAAAGACTCTAAGAGA AGGCTCTGTCTGTCTGGGTTTGGAAGGATGTGTAG GAGTCTTCTAGGGGGCACAGGCACACTCCAGGCA TAGGTAAAGATCTGTAGGTGTGGCTTGTGTTGGGATG AATTTCAAGTATTTTGGAATGAGGACAGCCATAGA GACAAGGGCAGGAGAGAGGCGATTTAATAGATTT TATGCCAATGGCTCCACTTGAGTTTCTGATAAGAA CCCAGAACCCCTTGGAAGTCCCCAGTAACATTGATTG AGTTGTTTATGATACCTCATAGAATATGAAGTCAA AGGAGGTCAGTGAGTGGTGTGTGTGATTCTTTG CCAAGTCCCAAGGTGGAGAAGCCTCTTCCAAGTGC AGGCAGAGCACAGGTGGCCCTGCTACTGGCTGCA GCTCCAGCCCTGCCTCCTTCTCTAGCATATAAACA ATCCAACAGCCTCACTGAATCACTGCTGTGCAGGG CAGGAAAGCTCCATGCA	165
肝細胞	LP1B	アポリポタンパク質 E/C1 遺伝子、 α 1 アンチトリプシン遺伝子	cggcctctagactcgagccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaa acacacagccctccctgctgaccttgagctggggcagaggtcagagacct ctctgggcccattgcaactccaacatccactcgaccttgggaattcgggtggaga ggagcagaggtgtctggcgtggttaggtagtgtgagaggtggacacaggac gctgtggtttctgagccagggggcgactcagatcccagccagtggaacttagccct gtttgctctccgataactgggtgaccttggttaattaccagcagcctccccg ttgccctctggatccactgcttaatacggacgaggacagggccctgtctctcag cttcaggcaccaccactgacctgggacagtgaatccggactctaaggtaataataa aattttaagtgtataatgtgtaactactgattctaattgtttctcttttagattccaac ctttggaactgaaccggt	135

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	MIR122	マイクロRNA-122	GAATGCATGGTTAACTACGTCAGAAATGACCAGTT CAAGAGGAGAATGAGATTGGCTTCCAAATGTTGG TCAAGAGCTCTACGTAGCATGAGCCAAGGATCTAT TGAACCTAGTAGGCTCCTGTGACCGGTGACTCTTC TGTCTCTAGAAATCTGGGGAGGTGACCAGGTCATA CATGGCAGTCTTCCCGTGAGGAACGTTAAACTGGT TGGAAGTTGGGGTTCTGAGGGGAAGATGTATTCA CTAGGTGACCTGTCTTCTCTGCCTCGGTGGCCTCC ATGGCTGCCTGCTGGCCGCACACCCCCACTCAGCA GAGGAATGGACTTTCCAATCTTGCTGAGTGTGTTT GACCAAAGGTGGTGTGCTGACTTAGTGGCCTAAGGT CGTGCCCTCCCTCCCCACTGAATCGATAAATAAT GCGACTTATCAGAAAGAGAAAGAATTGTTTACTTT TAAACCCTGGATCCCATAAAGGGAGAGGGGAGAG GCCTAAAGCCACAGAAGCTGTGGAAGGCGCCATC CTGCCTGCCACAGGAAGGGCCTTGACTGAGAGG ACCGGAGCTGACTGGGGGTAAGTGCGGCTCTCCC CCGGCGCCTGCCGACCCCCTGAGTGATCAGGCCG TTCTTTGGGGTGGCCGCTGACCGAGAAATGACGG GAGG Li ら, 2011, J. Hepatol., 55: 602-611 を参照	166

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝細胞	ヘモペキシ	ヘモペキシ遺伝子	GCAGCTTTGGGAGTGGGCCCAGGAAGTACTGAGG ATAGCAGGTGAGATCCCAGGAAGAGATGGATGTG GGGCCGAGACACTGGAGAGAGAAACAGGACTGTC AGATAAAGGGCGTCTGTGACTCCTAGATCTCATT TGCCTACTACCATAACCTACCCCCAATTCCTAATA TTCTCCTACCCTAGAGGGGGGAAATTGTCAGAA ATTTGGCTGCAACACTAGCAACACTACTCAGTACT TGAAATGCATTTTTGCATTTTTTTCATTCAACAAAT ATTTCTGGAACAACTCTTATATGCCAGGCACTATT TTAGGAGTCAGGGATATATAATGGTAAACAAGAC AGGCAAAACAAGCAAGCAACAACAACCATCAC CAGATAAGTAGACAGATGAAAGAATTTCAAGTTT TAGTAAGTAAAATAAAAACAAGCAAGGGTCTGAAA TGGCTAGATAAGGTGGTCAAGAAAGGCTTCATTG AGAAGGTAGCATTTAAGCAGGAGTCAGCTAGAAA TATGTGAAATTCAGTTACAGTTCATTGTTCTG GGTGGTTAAATAAAGCTTTTTCCCCCAAGGTGGA AACTACCAAGAAAGACTAATTACTAGTAGTGGTG GTGCTCTCTGGAAGAGAGACACCTCCTGTTTCTGC CTCATTACTGTCAACCCTTCACTCCAGGCACTTTT TGCAAAGCCCTTTGCCAGTCAGGGAAGGCGAGAG GCTGGGCATGGGGCTTGGACATTTGACAACAGTG AGACATTATTGTCCCAGACTCACTAGCCCAAGGG TAAAGCTGAAGAGGCTTGGGCATGCCCCAGAAAG GCCCCTGATGAAGCTTGGAAAAAGCTGTTCTCTGA GTATTTCTAAGTAAGTTTATCTGTGTGTGTGGTTAC TAAAAGTAGTAAGTATTGCTGTCTCTAGCTGCCTT AGAGCAGGGCTTGACACAGTACACAGCAATATTA GTTCCCTCCTTTTCTCACCTCCCCCATTGTGGAGAT AACTCAATCACAAAAGGTGATCCTCAGTCTACTC ACTTCCCTGACTTATGGATGCCTGGACCCATTGCC AGTGTGAGAGTCACAGCTGGACGTCAGCAGTGTA GCCCAGTTACTGCTTGAAAATTGCTGAAGGGGGTT GGGGGGCAGCTGCCGGGAAAAAGGAGTCTTGGAT TCAGATTTCTGTCCAGACCCTGACCTTATTTGCAG TGATGTAATCAGCCAATATTGGCTTAGTCCTGGGA GACAGCACATTCCCAGTAGAGTTGGAGGTGGGGG TGGTGCTGCTGCCAACT	167
肝細胞	HLP	アポリポタンパク質、SERINA1	tgtttgctgctgcaatgtttgccattttagggtggacacaggacgctgtggttctg agccagggggcgactcagatcccagccagtgacttagccctgtttgctctcgcg ataactggggtagccttggttaattaccagcagcctccccgttgccctctgg atccactgcttaatacaggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcacc accactgacctgggacagtgaatc	136

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
肝類洞内皮細胞	VEC	血管内皮カドヘリン遺伝子	CCCCTGCCCTCCTCCTCTGCCCTCTCCTGGCATTCC TCCTTCATCATGGGACCCTCTTCTAATGGATCCCC AAATGTCAGAGGGTCCAAGTCCTCCCTCCCTCCAA GCTCATCCATGCCCATGGCCTCAGATGCCAGCCAT AAGCTGTTGGGTTCCAAACCTCGACTCCAGGCTGG ACTCACCCCTGTCTCCCCCACCAGCCTGACACCTC CACCTGGGTATCTAACGAGCATCTCAAACTCAACC TGCCTGAGACAGAGGAATCACTATCCCCCTCCTCT CCAAAAATATCCTTCCATCACACTCCCCATCTTGT GCTCTGATTTACTAAACGGCCCTGGGCCCTCTCTT TCTCAGGGTCTCTGCTTGCCCAGCTATATAATAAA ACAAGTTTGGGACTTCCCAACCATTACCCATGGA AAAACAGAAGCAACTCTTCAAAGGACAGATTCCC AGGATCTGCCCTGGGAGATTCCAAATCAGTTGATC TGGGGTGAGCCCAGTCCTCTGTAGTTTTTAGAAGC TCCTCCTATGTCTCTCCTGGTCAGCAGAATCTTGG CCCCTCCCTTCCCCCAGCCTCTTGGTTCTTCTGGG CTCTGATCCAGCCTCAGCGTCACTGTCTTCCACGC CCCTCTTTGATTCTCGTTTATGTCAAAAAGCCTTGTG AGGATGAGGCTGTGATTATCCCCATTTTACAGATG AGGAACTGTGGCTCCAGGATGACACAACCTGGCC AGAGGTCACATCAGAAGCAGAGCTGGGTCATTG ACTCCACCCAATATCCCTAAATGCAAACATCCCT ACAGACCGAGGCTGGCACCTTAGAGCTGGAGTCC ATGCCCGCTCTGACCAGGAGAAGCCAACCTGGTC CTCCAGAGCCAAGAGCTTCTGTCCCTTTCCCATCT CCTGAAGCCTCCCTGTACCTTTAAAGTCCATTCC CACAAAGACATCATGGGATCACACAGAAAATCA AGCTCTGGGGCTAGGCTGACCCAGCTAGATTTTT GGCTCTTTTATACCCAGCTGGGTGGACAAGCACC TTAACCCGCTGAGCCTCAGCTTCCCGGGCTATAA AATGGGGGTGATGACACCTGCCTGTAGCATTCCAA GGAGGGTTAAATGTGATGCTGCAGCCAAGGGTCC CCACAGCCAGGCTCTTTGCAGGTGCTGGGTTCAGA GTCCCAGAGCTGAGGCCGGGAGTAGGGTTCAAG TGGGGTGCCCCAGGCAGGGTCCAGTGCCAGCCCT CTGTGGAGACAGCCATCCGGGGCCGAGGCAGCCG CCCACCGCAGGGCCTGCTATCTGCAGCCAGCCCA GCCCTCACAAAGGAACAATAACAGGAAACCATCC CAGGGGGAAGTGGGCCAGGGCCAGCTGGAAAACC TGAAGGGGAGGCAGCCAGGCCTCCCTCGCCAGCG GGGTGTGGCTCCCTCCAAAGACGGTCGGCTGAC AGGCTCCACAGAGCTCCACTCACGCTCAGCCCTGG ACGGACAGGCAGTCCAACGGAACAGAAACATCCC TCAGCCCACAGGCACGGTGAGTGGGGGCTCCAC ACTCCCCCTCCACCCCAAAACCCGCCACCCTGCG	168
偏在性	EF1a コアプロモーター	EF1α 遺伝子	gggcagagcgacatcgccacagtcgccgagaagtgggggagggtcgg caattgaacgggtgctagagaaggtggcggggtaactgggaaagtatgt cgtgtactggctcgcccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagt agtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttgcgcgcagacaacag	137

10

20

30

40

【表 6 - 10】

特異性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
偏在性	EF1a	EF1a 遺伝子	ggctccgggtgcccggtcagtgaggcagagcgacatcgccacagtgcccgagaa gttggggggagggtcgccaattgaaccgggtgcttagaagaagggtggcgggg taaactgggaaagtgtatgctgtactgctccgctttttcccgagggtgggga gaaccgtatataagtcagtagtgcggtgaacgtttttgcaacgggtttgccg ccagaacacaggtaaagtgcgtgtgtgttcccggggctggccttttacgggt tatggccttgctgcttgaattacttcaactggctccagtagtgattcttcatcc ctagctggagccaggggcgggccttgctttaggagcccttcgctcgtgctt gagttgagccctggcctggcgctggggccgcccgtgcgaatctggtggcacc ttcgcccgtgtcgtgctttcgataagtcctagccatttaaaatfittgatgacctgc tgcgacgcttttttctgcaagatagcttgaatgcgggcccaggtctgcacact ggtattcgggttttggcccgggcgacggggccggtgctccagcgca catgttcggcgaggcggggctgcgagcgggccaccgagaatcgagcgggg gtatgtcaagctggccgctgctgtgctgctgcccgtgctgctgctgctgctg ccccgcctggcgcgcaaggctggccggtcggcaccagttgctgagcgga agatggccgcttccggcctgctccaggggctcaaatggaggacggcgcg tgggagagcgggcggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttccgtcc tcagccgtcgttcatgtactccacggagtagccggcgccgtccagcgacctcg attagtctgagcgttttgagtagctgctttaggttgggggaggggtttatgctg atggagtttcccacactgagtggtgagtagtgaagttagccagcttggcactt gatgtaattctccttgaattggcctttttagtttgatcttggttcatctcaagcctc agacagtgggtcaagtttttttccatttcaggtgctgga	138
偏在性	hPGK	PGK 遺伝子	ggggttgggggtgccccttttcaaggcagccctgggttgcgaggagcgggc tgcctctggcggtggttccgggaaacgcagcgccgaccctgggtctgcacat tcttcacgtccgttcgagcgtcaccggatcttgcgctacccttggggccccc cgcgacgcttctcctcgcgccctaaagtcgggaagggttcttgcggttcggtg tgcggagcgtgacaaacggaagccgacgtctactagtagccctcgagacgga cagcgccaggaggcaatggcagcgccgaccgcatgggtggtgccaatag cggtgctcagcgggcgccgagagcagcgccgggaaggggcggtgctg ggaggcggggtgtggggcggtagtgtggccctgttctcggcgcggtgttcc gcattctgcaagcctccggagcgacgtcggcagtcgggtccctcgttgaccgaat caccgacctctctcccca	139
偏在性	mCMV	サイトメガロウイルス	ggtagcggtgtacgggtgggagcgctatataagcagagct	140
偏在性	Ubc	ユビキチン C 遺伝子	gtctaacaaaaaaagccaaaacggccagaatttagcggacaatttactagttaac actgaaattacatattgacccaaatgattacatttcaaaagggtgcttaaaaaacttca caaaacacactcgccaacccgagcgcatagttcaaaacggagcttcaagctactt aagaagataggtacataaaaacgacaaaagaaactgacgctcacttaccctccc ctaccagaggtccggcgtgctgattcaggagagcctaccctaggcccgaaacc ctgctctctgcagcgagaaaaagcctaccgcacactaccggcaggtggcccca ccttgcatataagccaacagaacgggtgacgtcacgacacgagggcgcg gctcccaaaggtacgggtgactgccaacggcaccgccataactggccccc gcaacagacgacaaaccgagttcctcagtcagtgacaaactcacgtcagggtcc ccagatgggtgccccagccatctacccgaataagagctttcccgcatlagcgaag gcctcaagaccttgggttcttggcccccacatgcccccaactgtttcaacgacc tcacagcccgcctcacaagcgttcttcaattcaagactcgggaacagccgcatttt ctgctctcccccaacccagttcagggcaacctgtctcgggaccagactac agcccttggcggtctctccacacgttccgtccaccgagcgcccgcgccac gaaagccccggccagcccagcagccgctactaccaagtacgatcacagcg atccacaaacagaacccgacccaaatccggctgacgaggaactagctgtc cacaccggcgctccttataatcagcggttcaccgccccacggagatccct ccgcagaatcccgagaaaggactacttttctcgcctgttccgctctctggaaaga aaaccagtccctagagtcaccaagtcctcctctctctctctgatact ggggttctaaggccgagctttagcagcgggcgctgtctgagcgtccggcg ggaaggatcaggacgtcgtcgccttctgctgacgtgacgagcgtcgcctg aggagggggcgcccggggagcgccaaaacccggcgaggggc	141

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

特異性 偏在性	プロモーター名	シス調節エレメントの供給源	例示的な配列	配列番号
	SFFV	脾フォーカス形成ウイルス	gtaacgccattttgcaaggcatggaaaaataccaaccaagaatagagaagttcag atcaaggcgccgtacatgaaaatagctaacgttggccaacagatatctgcgg tgagcagtttcggccccggccggggccaagaacagatggtcaccgcagtttcg gccccggccgaggccaagaacagatgggtcccagatatggccaaccctcagc agtttcttaagaccatcagatgtttccaggctccccaaggacctgaaatgacct gcgcctatttgaattaaccaatcagcctgcttctcgttctgtgcgcgcttctgctt cccgagctctataaaagagctcacaccctcactcggcgcgccagtcctccgac agactgagtcgccccggg	142

10

【0500】

肝臓特異的シス調節モジュール（例えば、プロモーター）内の様々なコンセンサス配列が記載されている。いくつかの実施形態において、肝臓特異的シス調節モジュールは、HNF1 α 、C/EBP、LEF1、FOX、IRF、LEF1/TCF、Tal1 β /E47、およびMyoDのうちの1つ以上について結合部位を含む。いくつかの実施形態において、肝臓特異的シス調節モジュールは、Chuahら、“Liver-Specific Transcriptional Modules Identified by Genome-Wide In Silico Analysis Enable Efficient Gene Therapy in Mice and Non-Human Primates” Mol Ther. 2014 Sep; 22 (9) : 1605-1613の図1または表1に示された配列を含み、その全体が、その図1および表1の配列を含めて、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、肝臓特異的シス調節モジュールは、Dhuahらの前出に記載されている、HS-CRM1、HS-CRM2、HS-CRM3、HS-CRM4、HS-CRM5、HS-CRM6、HS-CRM7、HS-CRM8、HS-CRM9、HS-CRM10、HS-CRM11、HS-CRM12、HS-CRM13、またはHS-CRM14のヒト配列を含む。

20

【0501】

内部リボソーム侵入部位（IRES）は通常、シストロン（タンパク質コード領域）のATGなどの開始コドンへの直接的な内部リボソーム侵入を促進し、それによって遺伝子のcap非依存性翻訳をもたらす。例えば、Jacksonら（1990）Trends Biochem Sci 15 (12) : 477-83、ならびにJacksonおよびKaminski. (1995) RNA 1 (10) : 985-1000を参照。特定の実施形態では、ベクターは、1つ以上の外因性薬剤をコードする1つ以上の外因性遺伝子を含む。特定の実施形態において、複数の外因性タンパク質剤の各々の効率的な翻訳を達成するために、ポリヌクレオチド配列は、1つ以上のIRES配列または自己切断ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列によって分離することができる。

30

【0502】

本明細書におけるレトロウイルス核酸はまた、1つ以上のコザック配列、例えば、リボソームの小サブユニットとのmRNAの初期結合を促進し、翻訳を増加させる短いヌクレオチド配列を含み得る。コンセンサスコザック配列は(GCC)RCCATGGであり、Rはプリン(AまたはG)である(Kozak, (1986) Cell. 44 (2) : 283-92、およびKozak, (1987) Nucleic Acids Res. 15 (20) : 8125-48)。

40

【0503】

異種転写因子およびインデューサーに応答するプロモーター

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、外因性薬剤の条件付き発現、例えば、限定されないが、誘導性発現、抑制性発現、細胞型特異的発現、または組織特異的発現を含む任意のタイプの条件付き発現を可能にする。いくつかの実施形態では、外因性薬剤の条件付き発現を達成するために、発現は、細胞、組織、または生物に、外因性薬剤

50

を発現させる、または外因性の発現の増加または減少を生じる処理または条件を加えることによって制御される。

【0504】

誘導性プロモーター／システムの例示的な例には、限定されないが、グルココルチコイドまたはエストロゲン受容体をコードする遺伝子のためのプロモーター（対応するホルモンによる処理によって誘導可能）などのステロイド誘導性プロモーター、メタロチオニンプロモーター（様々な重金属による処理によって誘導可能）、MX-1プロモーター（インターフェロンによって誘導可能）、「遺伝子スイッチ」ミフェプリストン調節可能システム（Sirinら、2003、Gene、323：67）、クメート（cumat e）誘導性遺伝子スイッチ（WO2002／088346）、テトラサイクリン依存性調節システムなどが含まれる。

10

【0505】

導入遺伝子発現は、インデューサー分子の存在または不在によって活性化または抑制され得る。いくつかの例では、インデューサー分子は段階的様式で遺伝子発現を活性化または抑制し、いくつかの例では、インデューサー分子はオールオアナッシング様式で遺伝子発現を活性化または抑制する。

【0506】

一般的に使用される誘導性プロモーター／システムは、テトラサイクリン（Tet）調節システムである。Tetシステムは、それぞれの標的細胞における2つのエレメントの共発現に基づいており、（i）最小プロモーターに融合され、目的の遺伝子（例：外因性薬剤をコードする遺伝子）に接続されたTetオペレーター配列（TetO）の反復を含むテトラサイクリン応答エレメントおよび（ii）転写トランスアクチベーター（tTA）、Tetリプレッサー（TetR）の融合タンパク質、および単純ヘルペスウイルス由来のVP16タンパク質のトランス活性化ドメインである。最初に説明された方式では、導入遺伝子発現はテトラサイクリンまたはその強力な類似体であるドキシサイクリン（Dox）の不在下で活性であり、Tet-Offシステムと呼ばれるが、トランスアクチベータータンパク質内の4つのアミノ酸の改変は逆tTA（rtTA）をもたらし、Doxの存在下でのみTetOと結合する（Tet-Onシステム）。いくつかの実施形態では、トランスアクチベーターにおいて、VP16ドメインが最小の活性化ドメインによって置き換えられており、潜在的なスプライスドナーおよびスプライスアクセプター部位が除去されており、タンパク質はコドン最適化されており、Doxに対するより高い感受性および低いベースライン活性を有する改善されたトランスアクチベーター変異体rtTA2S-M2をもたらす。さらに、様々なTet応答性プロモーターエレメントが生成されており、調節を増強するために隣接するオペレーターから36ヌクレオチド離れたTetOにおける改変が含まれる。追加の改変は、基礎活性をさらに低下させ、発現ダイナミックレンジを増加させるのに有用であり得る。例として、pTet-T11（単にTII）変異体は、高いダイナミックレンジと低いバックグラウンド活性を示す。

20

30

【0507】

条件付き発現はまた、部位特異的DNAリコンビナーゼを使用することによって達成することができる。特定の実施形態によれば、レトロウイルス核酸は、部位特異的リコンビナーゼによって媒介される組換えのための少なくとも1つ（典型的には2つ）の部位（複数可）を含み、例えば、切除性または統合性タンパク質、酵素、補因子、または1つ以上の組換え部位（例えば、2、3、4、5、7、10、12、15、20、30、50など）を含む組換え反応に含まれる関連タンパク質が挙げられ、野生型タンパク質（Landy, Current Opinion in Biotechnology 3：699-707（1993））、または変異体、誘導体（例えば、組換えタンパク質配列もしくはそのフラグメントを含む融合タンパク質）、フラグメント、およびそれらの変異体であり得る。リコンビナーゼの例示的な例には、限定されないが、Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、ΦC31、Cin、Tn3レゾルバーゼ、Tn dX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1、およびParA

40

50

が含まれる。

【0508】

外因性薬剤の発現を調節するリボスイッチ

本明細書で提供される組成物および方法のいくつかは、1つ以上のリボスイッチまたは1つ以上のリボスイッチを含むポリヌクレオチドを含む。リボスイッチは、遺伝子発現を調節する細菌における一般的な機能であり、生物学的機能のRNA制御を達成する手段である。リボスイッチは、mRNAの5'非翻訳領域に存在することができ、リボスイッチ活性を誘発または抑制する小分子リガンドの結合を通じて遺伝子発現の調節制御を可能にすることができる。いくつかの実施形態では、リボスイッチは、小分子リガンドの生成に含まれる遺伝子産物を制御する。リボスイッチは通常、シス方式で作用するが、リボスイッチはトランス方式で作用することが特定されている。天然のリボスイッチは、2つのドメインからなり、三次元で折り畳まれたRNA構造を介してリガンドと結合するアプタマードメイン、およびリガンドの不在または存在に基づいてリボスイッチにおける活性を誘発または抑制する機能スイッチングドメインである。したがって、リボスイッチによって達成される2つのリガンド感受性構造があり、オン状態およびオフ状態を示す。(Gars et al., 2011)。機能スイッチングドメインは、内部リボソーム侵入部位、レトロウイルス遺伝子構築体におけるpre-mRNAスプライスドナーの接近性、翻訳、転写の終了、転写物分解、miRNA発現、またはshRNA発現を調節することによってポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼすことができる(DambachおよびWinkler 2009)。アプタマーおよび機能スイッチングドメインはモジュラー成分として使用することができ、合成RNAデバイスが遺伝子発現を、ネイティブアプタマー、変異/進化したネイティブアプタマー、またはランダムRNAライブラリーのスクリーニングから特定される全合成アプタマーのいずれかとして制御できるようにする(McKeagueら2016)。

【0509】

プリンリボスイッチファミリーは、認められた500配列を超える最大のファミリーの1つを表す(Mandalら2003、US2008/0269258、およびWO2006/055351)。プリンリボスイッチは、介在するループ/接合エレメント(J1-2、L2、J2-3、L3、J3-1)を有する3つの保存されたラセン構造/ステム構造(P1、P2、P3)からなる同様の構造を共有する。リボスイッチのプリンファミリーのアプタマードメインは、配列の変化に起因する、アデニン、グアニン、アデノシン、グアノシン、デオキシアデノシン、デオキシグアノシンなどの様々なプリン化合物によって、それらの親和性/調節において自然に変化する(Kimら2007)。

【0510】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルス核酸は、プロモーターおよびリボスイッチに操作可能に連結された外因性薬剤をコードするポリヌクレオチドを含む。リボスイッチは、a.) アプタマードメイン、例えば、ヌクレオシド類似体抗ウイルス剤に結合することができ、ヌクレオシド類似体抗ウイルス剤と比較してグアニンまたは2'-デオキシグアノシンへの結合が減少しているアプタマードメイン、b.) 機能スイッチングドメイン、例えば、外因性薬剤の発現を調節することができ、アプタマードメインによるヌクレオシド類似体の結合が、機能スイッチングドメインの発現調節活性を誘導または抑制し、それによって外因性薬剤の発現を調節する、機能スイッチングドメイン、のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、ポリペプチド、miRNA、またはshRNAであり得る。例えば、一実施形態では、リボスイッチは、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸に操作可能に連結されている。本明細書で提供される非限定的な例示的な例では、外因性遺伝子は、1つ以上の操作されたシグナル伝達ポリペプチドをコードする。例えば、リボスイッチおよび1つ以上の操作されたシグナル伝達ポリペプチドをコードする標的ポリヌクレオチドは、供給源細胞のゲノムに、複製能力のない組換えレトロウイルス粒子に、T細胞および/またはNK細胞に認めることができる。

【0511】

アプタマードメインは、例えば、モジュラー構成要素として使用することができ、RNA転写物に影響を及ぼすために機能スイッチングドメインのいずれかと組み合わせることができる。本明細書に開示される実施形態のいずれにおいても、リボスイッチは、内部リボソーム侵入部位(IRES)、プレmRNAスプライスドナーの接近性、翻訳、転写の終結、転写物分解、miRNA発現、またはshRNA発現の活性のいずれかを調節することによってRNA転写物に影響を及ぼすことができる。いくつかの実施形態では、機能スイッチングドメインは、抗IRESのIRESとの結合を制御することができる(例えば、Ogawa, RNA (2011), 17:478~488を参照、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。本明細書に開示される実施形態のいずれかにおいて、小分子リガンドの存在または不在は、リボスイッチにRNA転写物への影響を及ぼさせることができる。いくつかの実施形態において、リボスイッチは、リボザイムを含むことができる。リボザイムを有するリボスイッチは、小分子リガンドの存在下で標的ポリヌクレオチドの転写物分解を阻害または増強することができる。いくつかの実施形態において、リボザイムは、リボザイムのピストルクラス、リボザイムのハンマーヘッドクラス、リボザイムのツイストクラス、リボザイムのハチエットクラス、またはHDV(デルタ肝炎ウイルス)であり得る。

10

【0512】

非標的細胞特異的調節エレメント

いくつかの実施形態において、非標的細胞特異的調節エレメントまたはネガティブTC-SREは、組織特異的miRNA認識配列、組織特異的プロテアーゼ認識部位、組織特異的ユビキチンリガーゼ部位、組織特異的転写抑制部位、または組織特異的エピジェネティック抑制部位を含む。

20

【0513】

いくつかの実施形態において、非標的細胞は、内因性miRNAを含む。レトロウイルス核酸(例えば、外因性薬剤をコードする遺伝子)は、そのmiRNAの認識配列を含み得る。したがって、レトロウイルスの核酸が非標的細胞に入ると、miRNAは外因性物質の発現を下方調節することができる。これは、標的細胞と非標的細胞に対する特異性を達成するのに役立つ。

【0514】

いくつかの実施形態において、miRNAは、20~22ヌクレオチドの小さい非コードRNAであり、典型的には、プレmiRNAとして知られる約70ヌクレオチドのフォールドバックRNA前駆体構造から切り取られる。一般に、miRNAは、miRNAと標的の間の相補性の程度に応じて、2つの方式のうちの1つでそれらの標的をネガティブ調節する。最初に、タンパク質コード化mRNA配列と完全またはほぼ完全な相補性で結合するmiRNAは、通常、RNA媒介干渉(RNAi)経路を誘導する。miRNAは、それらのmRNA標的の3'非翻訳領域(UTR)内の不完全な相補的部位と結合することによってそれらの調節効果を発揮し、通常、RNAi経路に使用されるものと類似、または同一の可能性のあるRISC複合体を介して、標的遺伝子発現を転写後に、明らかに翻訳のレベルで抑制する。翻訳制御と一致して、このメカニズムを使用するmiRNAは、それらの標的遺伝子のタンパク質レベルを低下させるが、これらの遺伝子のmRNAレベルは最小限の影響のみ受ける。miRNA(例えば、天然に存在するmiRNAまたは人工的に設計されたmiRNA)は、任意のmRNA配列を特異的に標的にすることができる。例えば、一実施形態では、当業者は、ヒトmiRNA(例えば、miR-30またはmiR-21)一次転写物として発現される短ヘアピンRNA構築体を設計することができる。この設計は、ヘアピン構築体にDroshaプロセッシング部位を追加して、ノックダウン効率を大幅に増加させることが示されている(Puschら、2004)。ヘアピンシステムは、22ntのdsRNA(例えば、アンチセンスは所望の標的と完全な相補性を有する)およびヒトmiRからの15~19ntのループからなる。ヘアピンの片側または両側にmiRループおよびmiR30フランキング配列を追加することによって、

30

40

50

マイクロRNAを有さない従来のshRNA設計と比較して、発現したヘアピンのDroshaおよびDicerプロセッシングは10倍を超える増加をもたらす。DroshaおよびDicerプロセッシングの増加は、siRNA/miRNA生成および発現したヘアピンに対する効力を増加させる。

【0515】

何百もの異なるmiRNA遺伝子が、発生の際そして組織タイプにわたって差次的に発現される。いくつかの研究は、発生の時機、細胞分化、増殖、アポトーシス、発癌、インスリン分泌、およびコレステロール生合成を含む、幅広い生物学的プロセスにおけるmiRNAに関する重量な調節的役割を示唆した。(Bartel 2004 Cell 116:281-97、Ambros 2004 Nature 431:350-55、Duffら. 2005 Development 132:4645-52、Chen 2005 N. Engl. J. Med. 353:1768-71、Krutzfeldtら. 2005 Nature 438:685-89を参照。)分子分析は、miRNAが異なる組織で異なる発現プロファイルを有することを示した。コンピュータ法を使用して、約7,000の予測されるヒトmiRNA標的の発現を分析している。データは、miRNA発現が多く、ヒト組織におけるmRNA発現の組織特異性に広く寄与することを示唆する。(Soodら. 2006 PNAS USA 103(8):2746-51を参照。)

【0516】

したがって、miRNAをベースとした方法は、内因性マイクロRNA種を使用して非標的細胞タイプでの外因性薬剤の発現をサイレンシングすることによって、外因性薬剤の発現を標的細胞集団に限定するために使用され得る。マイクロRNAは、メッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳を阻害することによって、またはmRNAの分解を引き起こすことによって、多くの生物で配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングを誘導する。例えば、Brownら. 2006 Nature Med. 12(5):585-91およびWO2007/000668を参照、これらの各々は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、組織特異的miRNA認識配列のうちの1つ以上(例えば、複数の)を含む。いくつかの実施形態において、組織特異的miRNA認識配列は、長さが約20~25、21~24、または23ヌクレオチドである。実施形態において、組織特異的miRNA認識配列は、非標的細胞に存在するmiRNAと完全な相補性を有する。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、GFPを含まず、例えば、蛍光タンパク質を含まず、例えば、レポータータンパク質を含まない。いくつかの実施形態では、標的外細胞は造血細胞ではなく、および/またはmiRNAは造血細胞に存在しない。

【0517】

いくつかの実施形態では、本明細書における方法は、標的細胞における外因性薬剤の組織特異的発現を含み、外因性薬剤をコードするヌクレオチドおよび少なくとも1つの組織特異的マイクロRNA(miRNA)標的配列を含む複数のレトロウイルスベクターを、標的細胞および非標的細胞を含む複数の細胞と接触させることを含み、外因性薬剤が標的細胞で優先的に、例えば、限定されて、発現される。

【0518】

例えば、レトロウイルス核酸は、非標的細胞、例えば、造血前駆細胞(HSPC)、造血幹細胞(HSC)において対応するmiRNAを有するヌクレオチド配列に操作可能に連結された少なくとも1つのmiRNA認識配列を含むことができ、非標的細胞におけるヌクレオチド配列の発現を防止または低減するが、標的細胞、例えば、分化細胞において防止または低減しない。いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸は、非標的細胞において有効量で存在する(例えば、内因性miRNAの濃度が導入遺伝子の発現を低減または防止するのに十分である)miRNAに対する少なくとも1つのmiRNA配列標的を含み、かつ導入遺伝子を含む。実施形態では、このシステムで使用されるmiRNAは、HSPCおよびHSCなどの非標的細胞で強く発現されるが、例えば骨髄およびリンパ球系の分化した子孫では発現されず、感受性幹細胞集団における導入遺伝子の発現を

防止または低減し、一方、標的細胞における発現と治療効能を維持する。

【0519】

いくつかの実施形態において、ネガティブ T S C R E または N T S C R E は、m i R N A 認識部位、例えば、造血細胞に対して内因性である m i R N A によって結合される m i R N A 認識部位を含む。例えば、ネガティブ T S C R E または N T S C R E は、造血細胞に内因性である m i R N A に相補的な配列である。例示的な m i R N A を以下の表 7 に示す。いくつかの実施形態において、核酸（例えば、フソソーム核酸またはレトロウイルス核酸）は、表 7 の m i R N A に相補的であるか、またはそれらと少なくとも 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% 相補性を有する。いくつかの実施形態において、核酸（例えば、フソソーム核酸またはレトロウイルス核酸）は、内因性 m i R N A、例えば、表 7 の m i R N A におけるシード配列と完全に相補的である配列を含む。実施形態では、シード配列は、長さが少なくとも 6、7、8、9、または 10 ヌクレオチドである。

【0520】

いくつかの実施形態において、核酸（例えば、フソソーム核酸またはレトロウイルス核酸）は、配列番号 143～160 のいずれか 1 つに示される m i R N A に相補的な配列、または少なくとも 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の相補性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸（例えば、フソソーム核酸またはレトロウイルス核酸）は、配列番号 143～160 のいずれか 1 つに示される内因性 m i R N A 内のシード配列と完全に相補的である配列を含む T S C R E または N T S C R E を含む。実施形態では、シード配列は、長さが少なくとも 6、7、8、9、または 10 ヌクレオチドである。

【表 7】

表 7. 例示的な m i R N A 配列。

サイレンシングされる細胞タイプ	miRNA 名	成熟 miRNA	miRNA 配列	配列番号
造血細胞	miR-142	hsa-miR-142-3p	uguaguguuuuccuacuuuauugga	143
造血細胞	miR-142	hsa-miR-142-5p	cauaaaguagaaagcacuacu	144
造血細胞	mir-181a-2	hsa-miR-181a-5p	aacauucaacgcugucggugagu	145
造血細胞	mir-181a-2	hsa-miR-181a-2-3p	accacugaccguugacuguaacc	146
造血細胞	mir-181b-1	hsa-miR-181b-5p	aacauucauugcugucggugggu	147
造血細胞	mir-181b-1	hsa-miR-181b-3p	cucacugaacaauaauugcaa	148
造血細胞	mir-181c	hsa-miR-181c-5p	aacauucaaccugucggugagu	149
造血細胞	mir-181c	hsa-miR-181c-3p	aaccaucgaccguugaguggac	150
造血細胞	mir-181a-1	hsa-miR-181a	aacauucaacgcugucggugagu	151
造血細胞	mir-181a-1	hsa-miR-181a-3p	accaucgaccguugauuuguaacc	152
造血細胞	mir-181b-2	hsa-miR-181b-5p	aacauucauugcugucggugggu	153
造血細胞	mir-181b-2	hsa-miR-181b-2-3p	cucacugaauaauaauugca	154
造血細胞	mir-181d	hsa-miR-181d-5p	aacauucauugcugucggugggu	155
造血細胞	mir-181d	hsa-miR-181d-3p	ccaccgggggaugaauugucac	156
造血細胞	miR-223	hsa-miR-223-5p	cguguauuugacaagcugaguu	157
造血細胞	miR-223	hsa-miR-223-3p	ugucaguuuugcaauuacccca	158
p D C	miR-126	hsa-miR-126-5p	cauuauuacuuuugguacgcg	159
p D C	miR-126	hsa-miR-126-3p	ucguaccgugaguuauaauugcg	160

【0521】

いくつかの実施形態では、ネガティブ T S C R E または N T S C R E は、本明細書で説明される m i R N A に対する m i R N A 認識部位を含む。例示的な m i R N A は、G r i f f i t h s - J o n ら、N u c l e i c A c i d s R e s . 2 0 0 6 J a n 1 ; 3 4、C h e n および L o d i s h、S e m i n I m m u n o l . 2 0 0 5 A p r ; 1 7 (2) : 1 5 5 - 6 5、C h e n ら、S c i e n c e . 2 0 0 4 J a n 2 ; 3 0 3 (5 6 5 4) : 8 3 - 6、B a r a d ら、G e n o m e R e s . 2 0 0 4 D e c ; 1 4 (1 2

) : 2486-2494、Krichevskyら、RNA. 2003 Oct; 9 (10)
) : 1274-81、Kasashimaら、Biochem Biophys Res Commun. 2004 Sep 17; 322 (2) : 403-10、Houbaviyら、Dev Cell. 2003 Aug; 5 (2) : 351-8、Lagos-Quintanaら、Curr Biol. 2002 Apr 30; 12 (9) : 735-9、Calinら、Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Mar 2; 101 (9) : 2999-3004、Sempereら、Genome Biol. 2004; 5 (3) : R13、Metzlerら、Genes Chromosomes Cancer. 2004 Feb; 39 (2) : 167-9、Calinら、Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Nov 26; 99 (24) : 15524-9、Mansfieldら、Nat Genet. 2004 Oct; 36 (10) : 1079-83、Michaelら、Mol Cancer Res. 2003 Oct; 1 (12) : 882-91、およびwww.mirna.orgで認められるものに含まれる。

【0522】

いくつかの実施形態では、ネガティブTSCREまたはNTSCREは、miR-1b、miR-189b、miR-93、miR-125b、miR-130、miR-32、miR-128、miR-22、miR-124a、miR-296、miR-143、miR-15、miR-141、miR-143、miR-16、miR-127、miR-99a、miR-183、miR-19b、miR-92、miR-9、miR-130b、miR-21、miR-30b、miR-16、miR-142-s、miR-99a、miR-212、miR-30c、miR-213、miR-20、miR-155、miR-152、miR-139、miR-30b、miR-7、miR-30c、miR-18、miR-137、miR-219、miR-1d、miR-178、miR-24、miR-122a、miR-215、miR-142-a、miR-223、miR-142、miR-124a、miR-190、miR-149、miR-193、miR-181、let-7a、miR-132、miR-27a、miR-9*、miR-200b、miR-266、miR-153、miR-135、miR-206、miR-24、miR-19a、miR-199、miR-26a、miR-194、miR-125a、miR-15a、miR-145、miR-133、miR-96、miR-131、miR-124b、miR-151、miR-7b、miR-103、およびmiR-208から選択されるmiRNAに対するmiRNA認識部位を含む。

【0523】

いくつかの実施形態において、核酸（例えば、フソソーム核酸またはレトロウイルス核酸）は、2つ以上のmiRNA認識部位を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上のmiRNA認識部位の各々は、本明細書で説明されるような、例えば、表7に列挙されるいずれかのmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、2つ以上のmiRNA認識部位の各々は、配列番号143~160のうちのいずれか1つに示されるmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、2つ以上のmiRNA認識部位は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のmiRNA認識部位を含むことができる。2つ以上のmiRNA認識部位を核酸内にタンデムに配置して、miRNAに対する多数のタンデム結合部位をもたらすことができる。

【0524】

いくつかの実施形態では、2つ以上のmiRNA認識部位は、1、2、3、4、5、6つ以上の第1のmiRNA認識部位など、少なくとも1つの第1のmiRNA認識部位、および1、2、3、4、5、6つ以上の第2のmiRNA認識部位など、少なくとも1つの第2のmiRNA認識部位を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸は、2つ以上の第1のmiRNA認識部位を含み、当該第1のmiRNA認識部位の各々は、核酸中にタンデムに存在し、第1のmiRNAに対する複数のタンデム結合部位を提供し、および／または核酸は、さらに2つの第2のmiRNA認識部位を含み、当該第2のmiRNA認識部位の各々は、核酸中にタンデムに存在し、第2のmiRNAに対する複

数のタンデム結合部位を提供する。いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位は、同じmiRNAによって認識され、いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位は、異なるmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位は、同一の非標的細胞に存在するmiRNAによって認識され、いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位は、異なる非標的細胞に存在するmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位のうち的一方または両方は、本明細書で説明されるような、表7に示されるいずれかなどのmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態では、第1のmiRNA認識部位および第2のmiRNA認識部位のうち的一方または両方は、配列番号143～160のうちのいずれか1つに示されるmiRNAによって認識される。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸（例えば、エグレットロウイルス核酸）上のmiRNA認識部位のうちの1つ以上は、外因性薬剤によってシスで転写される。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸（例えば、レトロウイルス核酸）上のmiRNA認識部位のうちの1つ以上は、ポリAテール配列の下流、例えば、ポリAテール配列とWPREとの間、に位置する。いくつかの実施形態において、フソソーム核酸（例えば、レトロウイルス核酸）上のmiRNA認識部位のうちの1つ以上は、WPREの下流に位置する。

【0525】

免疫調節

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターまたはVLPは、上昇したCD47を含む。例えば、US9,050,269を参照、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターまたはVLPは、上昇した補体調節タンパク質を含む。例えば、ES2627445T3およびUS6790641を参照、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターまたはVLPは、MHCタンパク質、例えば、MHC-1クラス1またはクラスIIの欠如または低下したレベルを含む。例えば、US2017/0165348を参照、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0526】

レトロウイルスベクターまたはVLPは、ときには対象の免疫系によって認識される。エンベロープ化ウイルスベクター粒子（例えば、レトロウイルスベクター粒子）の場合、ウイルスエンベロープの表面に提示される膜結合タンパク質が認識され得、ウイルス粒子それ自体が中和され得る。さらに、標的細胞に感染すると、ウイルスエンベロープは細胞膜と統合され、結果として、ウイルスエンベロープタンパク質が細胞の表面に提示されるか、または細胞の表面と密接に結合したままであり得る。したがって、免疫系は、ウイルスベクター粒子が感染した細胞も標的にし得る。両方の効果は、ウイルスベクターによる外因性薬剤送達の有効性の低下をもたらし得る。

【0527】

ウイルス粒子エンベロープは通常、供給源細胞の膜に由来する。したがって、ウイルス粒子が突き出る細胞膜上に発現される膜タンパク質は、ウイルスエンベロープに組み込まれ得る。

【0528】

免疫調節タンパク質CD47

細胞外物質の細胞への内在化は、一般にエンドサイトーシスと呼ばれるプロセスによって実施される（Rabinovitch, 1995, Trends Cell Biol. 5(3):85-7、Silverstein, 1995, Trends Cell Biol. 5(3):141-2、Swansonら, 1995, Trends Cell Biol. 5(3):89-93、Allenら, 1996, J. Exp. Med. 184(2):627-37）。エンドサイトーシスは2つの一般的なカテゴリに分類され、粒

10

20

30

40

50

子の取り込みを含む食作用、ならびに、流体および溶質の取り込みを含む飲作用である。

【0529】

膜受容体CD47を欠くノックアウトマウスを用いる研究に基づいて、プロフェッショナル食細胞が非自己と自己と区別することが示されている（Oldenborgら、2000, Science 288 (5473) : 2051-4）。CD47は、マクロファージに認められた免疫阻害受容体SIRPα（シグナル調節タンパク質）と相互作用するIgスーパーファミリーの遍在性メンバーである（Fujiookaら、1996, Mol. Cell. Biol. 16 (12) : 6887-99、Veilletteら、1998, J. Biol. Chem. 273 (35) : 22719-28、Jiangら、1999, J. Biol. Chem. 274 (2) : 559-62）。CD47-SIRPα相互作用はマウスにおいて自己マクロファージを不活性化するように思われるが、CD47の著しい減少（おそらく90%）がいくつかのRh遺伝子型に由来するヒト血液細胞で認められ、貧血の証拠をほとんどまたはまったく示さず（Mouro-Chanteloupら、2003, Blood 101 (1) : 338-344）、そして食細胞単球との高められた細胞相互作用の証拠もほとんどまたはまったく示さない（Arndtら、2004, Br. J. Haematol. 125 (3) : 412-4）。

10

【0530】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLP（例えば、約1 μm未満、約400 nm未満、または約150 nm未満の半径を有するウイルス粒子）は、CD47の少なくとも生物学的に活性な部分を、例えば、レトロウイルスベクターまたはVLPの曝露される表面に含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター（例えば、レンチウイルス）またはVLPは、脂質コーティングを含む。実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPにおける生物学的に活性なCD47の量は、約20~250、20~50、50~100、100~150、150~200、または200~250分子/μm²である。いくつかの実施形態では、CD47はヒトCD47である。

20

【0531】

本明細書で説明される方法は、食細胞による粒子の食作用を回避することを含むことができる。この方法は、レトロウイルスベクターまたはVLPにおいてCD47の少なくとも生物学的に活性な部分を含む少なくとも1つのペプチドを発現させることを含み得、それによって、CD47を含むレトロウイルスベクターまたはVLPが食作用細胞に曝露されるとき、ウイルス粒子は食作用細胞による食作用を回避し、または非改変である以外は同様なレトロウイルスベクターまたはVLPと比べて食作用の減少を示す。いくつかの実施形態において、対象におけるレトロウイルスベクターまたはVLPの半減期は、非改変である以外は同様なレトロウイルスベクターまたはVLPと比べて延長される。

30

【0532】

MHCの削除

主要組織適合複合体クラスI（MHC-I）は、ウイルスエンベロープに組み込むことができる宿主細胞膜タンパク質であり、本来的に多型性が高いため、体の免疫応答の主要な標的である（McDevitt H. O. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18 : 1-17）。供給源細胞の原形質膜に曝露されるMHC-I分子は、ベクターの出芽のプロセス中にウイルス粒子エンベロープに組み込まれ得る。供給源細胞に由来し、ウイルス粒子に組み込まれたこれらのMHC-I分子は、次に、標的細胞の原形質膜に移ることができる。あるいは、MHC-I分子は、ウイルス粒子が標的細胞膜を吸収して結合したままになる傾向の結果として、標的細胞膜と密接に結合したままであり得る。

40

【0533】

形質導入された細胞の原形質膜上またはその付近における外因性MHC-I分子の存在は、対象におけるアロ反応性免疫応答を誘発し得る。これは、体外遺伝子導入とそれに続く対象への形質導入細胞の投与で、またはウイルス粒子の直接的なインビボ投与のいずれかで、形質導入した細胞の免疫媒介性の死滅または食作用をもたらし得る。さらに、ウイ

50

ルス粒子を有するMHC-Iの血流へのインビボ投与の場合には、ウイルス粒子は、それらの標的細胞に到達する前に、既存のMHC-I特異的抗体によって中和され得る。

【0534】

したがって、いくつかの実施形態では、供給源細胞は、細胞の表面でのMHC-Iの発現を減少させるように改変される（例えば、遺伝子操作される）。実施形態では、供給源は、 $\beta 2$ -ミクログロブリン（ $\beta 2 M$ ）をコードする遺伝子の遺伝子操作された破壊を含む。実施形態では、供給源細胞は、MHC-I α 鎖をコードする1つ以上の遺伝子の遺伝子操作された破壊を含む。細胞は、 $\beta 2$ -ミクログロブリンをコードする遺伝子のすべてのコピーにおいて遺伝子操作された破壊を含み得る細胞は、MHC-I α 鎖をコードする遺伝子のすべてのコピーにおいて遺伝子操作された破壊を含み得る。細胞は、 $\beta 2$ -ミクログロブリンをコードする遺伝子の遺伝子操作された破壊、およびMHC-I α 鎖をコードする遺伝子の遺伝子操作された破壊の両方を含み得る。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、表面に露出されたMHC-I分子数の減少を含む。表面に露出したMHC-I分子の数は、MHC-Iに対する免疫応答が治療的に適切な程度まで減少するように、減少され得る。いくつかの実施形態において、エンベロープ化ウイルスベクター粒子は、表面に露出されたMHC-I分子を実質的に欠いている。

10

【0535】

HLA-G/E過剰発現

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、そのエンベロープに、免疫寛容原性タンパク質、例えば、ILT-2もしくはILT-4アゴニスト、例えば、HLA-EもしくはHLA-G、または任意の他のILT-2もしくはILT-4アゴニストを提示する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルス、例えば、非改変である以外は同様であるレトロウイルスと比べて、HLA-E、HLA-G、ILT-2またはILT-4の増加した発現を有する。

20

【0536】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス組成物は、非改変レトロウイルスと比べて低下したMHCクラスI、および非改変レトロウイルスと比較して増加したHLA-Gを有する。

【0537】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルス、例えば、非改変である以外は同様なレトロウイルスと比べて、HLA-GまたはHLA-Eの発現における増加、例えば、HLA-GまたはHLA-Eの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の発現における増加を有し、HLA-GまたはHLA-Eの発現は、フローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してインビトロでアッセイされる。

30

【0538】

いくつかの実施形態において、増加したHLA-G発現を有するレトロウイルスは、奇形腫形成アッセイにおいて、例えば、免疫細胞浸潤の減少によって測定されたとき、低下した免疫原性を示す。

40

【0539】

補体調節タンパク質

補体活性は通常、多くの補体調節タンパク質（CRP）によって制御される。これらのタンパク質は、偽炎症および宿主組織の損傷を防止する。CD55/崩壊促進因子（DAF）およびCD46/膜補因子タンパク質（MCP）を含むタンパク質の一群は、古典的な代替経路のC3/C5転換酵素を阻害する。CD59を含む別の一連のタンパク質はMACアセンブリを調節する。CRPは、異種移植した組織の拒絶反応を防ぐために使用されており、ウイルスやウイルスベクターを補体不活性化から保護することも示されている。

【0540】

膜侵襲補体制御因子には、例えば、崩壊促進因子（DAF）またはCD55、H因子（

50

FH)様タンパク質-1 (FHL-1)、C4b結合タンパク質 (C4BP)、補体受容体1 (CD35)、膜穂因子タンパク質 (MCP) またはCD46、およびCD59 (プロテクチン) (例えば、膜侵襲複合体 (MAC) の形成を防ぎ、細胞を溶解から保護するため) が含まれる。

【0541】

アルブミン結合タンパク質

いくつかの実施形態において、レンチウイルスは、アルブミンと結合する。いくつかの実施形態において、レンチウイルスは、その表面に、アルブミンと結合するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルスは、その表面にアルブミン結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、アルブミン結合タンパク質は、連鎖球菌のアルブミン結合タンパク質である。いくつかの実施形態において、アルブミン結合タンパク質は、連鎖球菌のアルブミン結合ドメインである。

10

【0542】

レンチウイルスエンベロープにおける非フソゲンタンパク質の発現

いくつかの実施形態において、レンチウイルスは、その表面に1つ以上のタンパク質を含むように操作される。いくつかの実施形態では、タンパク質は、対象との免疫相互作用に影響を及ぼす。いくつかの実施形態において、タンパク質は、対象においてレンチウイルスの薬理学に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、タンパク質は受容体である。いくつかの実施形態では、タンパク質はアゴニストである。いくつかの実施形態では、タンパク質はシグナル伝達分子である。いくつかの実施形態において、レンチウイルス表面上のタンパク質は、抗CD3抗体 (例えば、OKT3) またはIL7を含む。

20

【0543】

いくつかの実施形態において、マイトジェン膜貫通タンパク質および／またはサイトカインベースの膜貫通タンパク質が、供給源細胞に存在し、それが供給源細胞膜から出芽するときにレトロウイルスに組み込まれ得る。マイトジェン膜貫通タンパク質および／またはサイトカインベースの膜貫通タンパク質は、ウイルスエンベロープ糖タンパク質の一部であるというよりも、供給源細胞に別の細胞表面分子として発現され得る。

【0544】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、実質的に非免疫原性である。免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように定量化することができる。

30

【0545】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、標的細胞と融合して、レシピエント細胞を生成する。いくつかの実施形態において、1つ以上のレトロウイルスベクターまたはVLPと融合したレシピエント細胞は、免疫原性について評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、細胞表面上の抗体の存在について、例えば、抗IgM抗体で染色することによって、分析される。他の実施形態では、免疫原性は、PBMC細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、末梢血単核細胞 (PBMC) と共にインキュベートされ、次いで、PBMCによる細胞の溶解について評価される。他の実施形態において、免疫原性は、ナチュラルキラー (NK) 細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、NK細胞と共にインキュベートされ、次いで、NK細胞による細胞の溶解について評価される。他の実施形態において、免疫原性は、CD8+T細胞溶解アッセイによって評価される。実施形態において、レシピエント細胞は、CD8+T細胞と共にインキュベートされ、次いで、CD8+T細胞による細胞の溶解について評価される。

40

【0546】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は同様の供給源細胞またはHEK293細胞から生成されるものと比べて、上昇したレベルの免疫抑制物質 (例えば、免疫抑制タンパク質) を含む。いくつかの実施形態において、上昇したレベルは、少なくとも

50

も5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照細胞から存在しない免疫抑制物質を含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は同様の供給源細胞またはHEK293細胞から生成されるものと比べて、減少したレベルの免疫刺激物質（例えば、免疫刺激タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、減少したレベルは、対照レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、または99%である。いくつかの実施形態において、免疫刺激剤は、レトロウイルスベクターまたはVLPに実質的に存在しない。

10

【0547】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPが由来するレトロウイルスベクターまたはVLPあるいは供給源細胞は、以下の特性、

a. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な供給源細胞、またはHeLa細胞、もしくはHEK293細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満、またはそれ未満の発現、

20

b. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な供給源細胞、またはHEK細胞、もしくは本明細書に記載の対照細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLP、と比べて、限定されないが、LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3、またはB7-H4を含む1つ以上の共刺激タンパク質の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満、またはそれ未満の発現、

c. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはジャーカット細胞もしくはHEK293細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、マクロファージ貪食を抑制する表面タンパク質、例えば、CD47の発現が、例えば、本明細書に記載される方法によって検出可能な発現が、例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上を超えるマクロファージ貪食を抑制する表面タンパク質、例えば、CD47の発現、

30

d. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはHEK293細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、可溶性免疫抑制サイトカイン、例えば、IL-10の発現が、例えば、本明細書に記載の方法による検出可能な発現が、例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上を超える、可溶性免疫抑制サイトカイン、例えば、IL-10の発現、

e. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはHEK293細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、可溶性免疫抑制タンパク質、例えば、PD-L1の発現が、例えば、本明細書に記載の方法による検出可能な発現が、例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上を超える、可溶性免疫抑制タンパク質、例えば、PD-L1の発現、

40

f. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはHEK293細胞もしくはU-266細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、IFN- γ またはTNF- α の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満、またはそれ未満の発現、

g. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変で

50

ある以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、A 5 4 9細胞、もしくはS K - B R - 3細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、内因性免疫刺激抗原、例えば、Z g 1 6またはH o r m a d 1の5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、もしくは5 %未満、またはそれ未満の発現、

h. 対照レトロウイルスベクターもしくはV L P、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、H L A - EまたはH L A - Gの発現、例えば、本明細書に記載の方法によって検出可能な発現、

i. 例えば、N K細胞の活性化を抑制するように作用する、例えば、シアル酸を含む、表面グリコシル化プロファイル、

j. 対照レトロウイルスベクターもしくはV L P、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、もしくはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、T C R α / β の発現の5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、もしくは5 %未満、またはそれ未満の発現、

k. 対照レトロウイルスベクターもしくはV L P、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、もしくはH e L a細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、A B O式血液型の5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、もしくは5 %未満、またはそれ未満の発現、

l. 対照レトロウイルスベクターもしくはV L P、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、もしくはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、マイナー組織適合性抗原(M H A)の5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、もしくは5 %未満、またはそれ未満の発現、もしくは

m. 対照レトロウイルスベクターもしくはV L P、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、またはH E K 2 9 3細胞、もしくはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはV L Pと比べて、1 0 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、もしくはそれ未満のミトコンドリアM H Aを有し、または検出可能なミトコンドリアM H Aを有さない、のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2以上を有する。

【0 5 4 8】

実施形態では、共刺激タンパク質は4 - 1 B B、B 7、S L A M、L A G 3、H V E M、またはL I G H Tであり、対照細胞はH D L M - 2である。いくつかの実施形態では、共刺激タンパク質はB Y - H 3であり、対照細胞はH e L aである。いくつかの実施形態において、共刺激タンパク質は、I C O S LまたはB 7 - H 4であり、対照細胞は、S K - B R - 3である。いくつかの実施形態では、共刺激タンパク質はI C O SまたはO X 4 0であり、対照細胞はM O L T - 4である。いくつかの実施形態では、共刺激タンパク質はC D 2 8であり、対照細胞はU - 2 6 6である。いくつかの実施形態では、共刺激タンパク質はC D 3 0 LまたはC D 2 7であり、対照細胞はダウディである。

【0 5 4 9】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、V L P、または医薬組成物は、免疫系、例えば、自然免疫系による免疫原性応答を実質的に誘発しない。実施形態において、免疫原性応答は、例えば、本明細書に記載されるように、定量化することができる。いくつかの実施形態において、自然免疫系による免疫原性応答は、自然免疫細胞による応答を含み、限定されないが、N K細胞、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、樹状細胞、マスト細胞、またはガンマ/デルタT細胞が含まれる。いくつかの実施形態において、自然免疫系による免疫原性応答は、可溶性血液成分および膜結合成分を含む補体系による応答を含む。

【0 5 5 0】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、V L P、または医薬組成物は、免疫系、例えば、適応免疫系による免疫原性応答を実質的に誘発しない。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、適応免疫系による免疫原性応答は、限定されないが、Tリンパ球（例えば、CD4 T細胞、CD8 T細胞、および／またはガンマ-デルタT細胞）またはBリンパ球の数もしくは活性における変化、例えば、増加を含む適応免疫細胞による免疫原性応答を含む。いくつかの実施形態において、適応免疫系による免疫原性応答は、限定されないが、サイトカインまたは抗体（例えば、IgG、IgM、IgE、IgA、またはIgD）の数もしくは活性における変化、例えば、増加を含む、可溶性血液成分のレベルの増加を含む。

【0551】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、低下した免疫原性を有するように改変される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変以外は当該供給源細胞、HEK293細胞またはジャーカット細胞と同一である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPよりも、5%、10%、20%、30%、40%、または50%未満の低い免疫原性を有する。

【0552】

本明細書で説明される態様のいずれかのいくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、例えば、免疫原性を低下、例えば、低減させるように、例えば、本明細書で説明される方法を使用して改変された、改変されたゲノムを有する、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来する。免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように定量化することができる。

【0553】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、

- a. MHCクラスI、MHCクラスII、またはMHA、
- b. 1つ以上の共刺激タンパク質、限定されないが、LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3、またはB7-H4、
- c. 可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、IFN-ガンマまたはTNF- α
- d. 内因性免疫刺激抗原、例えば、Zg16またはHormad1、
- e. T細胞受容体（TCR）、
- f. ABO式血液型をコードする遺伝子、例えばABO遺伝子、
- g. 免疫活性化を促進する転写因子、例えば、NFkB、
- h. MHC発現を制御する転写因子、例えば、クラスIIトランスアクチベーター（CIITA）、Xbox5の調節因子（RFX5）、RFX関連タンパク質（RFXAP）、またはRFXアンキリン反復（RFXANK、RFXBとしても知られている）、あるいは
- i. TAPタンパク質、例えば、MHCクラスIの発現を低下させるTAP2、TAP1、TAPBP、のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ以上を枯渇した、例えば、ノックアウトを有する、哺乳動物細胞に由来する。

【0554】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、免疫抑制物質、例えば、以下のうちの1つ、2つ、3つ以上の発現の増加をもたらす遺伝子改変を伴う供給源細胞に由来する（例えば、遺伝子改変の前に、細胞は因子を発現しなかった）。

a. マクロファージ貪食を抑制する表面タンパク質、例えばCD47、例えば、対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な供給源細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、CD47の増加した発現、

b. 可溶性免疫抑制性サイトカイン、例えば、IL-10、例えば、対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターも

10

20

30

40

50

しくはVLPと比べて、IL-10の増加した発現、

c. 可溶性免疫抑制タンパク質、例えば、PD-1、PD-L1、CTLA4、またはBTLA、例えば、対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、免疫抑制タンパク質の増加した発現、

d. 免疫寛容原性タンパク質、例えば、ILT-2もしくはILT-4アゴニスト、例えば、HLA-EもしくはHLA-G、または任意の他の内因性ILT-2もしくはILT-4アゴニスト、例えば、対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、HLA-E、HLA-G、ILT-2、またはILT-4の増加した発現、あるいは

e. 補体活性を抑制する表面タンパク質、例えば、補体調節タンパク質、例えば、崩壊促進因子(DAF、CD55)に結合するタンパク質、例えば、H因子(FH)様タンパク質-1(FHL-1)、例えば、C4b結合タンパク質(C4BP)、例えば、補体受容体1(CD35)、例えば、膜補因子タンパク質(MCP、CD46)、例えば、プロフェクチン(CD59)、例えば、古典的な代替補体経路CD/C5コンバーターゼ酵素を阻害するタンパク質、例えば、MACアセンブリを調節するタンパク質、例えば、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、補体調節タンパク質の増加した発現。

【0555】

いくつかの実施形態において、増加した発現レベルは、対照レトロウイルスベクターまたはVLPと比較して、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍高い。

【0556】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、免疫刺激物質、例えば、以下のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ以上の減少した発現を有するように改変された供給源細胞に由来する。

a. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはHeLa細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

b. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、または本明細書に記載される参照細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、1つ以上の共刺激タンパク質、限定されないが、LAG3、ICOS-L、ICOS、OX40L、OX40、CD28、B7、CD30、CD30L4-1BB、4-1BBL、SLAM、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、B7-H3、またはB7-H4の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

c. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはU-266細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、可溶性免疫刺激サイトカイン、例えば、IFN-γまたはTNF-αの50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

d. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、A549細胞、またはSK-BR-3細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、内因性免疫刺激抗原、

例えば、Zg16またはHormad1の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

e. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、T細胞受容体(TCR)の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

f. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはHeLa細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、ABO血液型群の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

g. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、免疫活性化を促進する転写因子、例えばNFkBの50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、

h. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはジャーカット細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、MHC発現を制御する転写因子、例えば、クラスIIトランスアクチベーター(CIITA)、Xbox5(RFX5)の調節因子、RFX関連タンパク質(RFXAP)、またはRFXアンキリン反復(RFXANK; RFXBとしても知られる)の50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現、あるいは

i. 対照レトロウイルスベクターもしくはVLP、例えば、当該供給源細胞と非改変である以外は同様な細胞、HEK293細胞、またはHeLa細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターもしくはVLPと比べて、MHCクラスI発現を低下させるTAPタンパク質、例えば、TAP2、TAP1、もしくはTAPBPの50%、40%、30%、20%、15%、10%、もしくは5%未満またはそれ未満の発現。

【0557】

いくつかの実施形態において、MHCクラスI発現を減少させるためにshRNA発現レンチウイルスを使用して改変された哺乳動物細胞、例えば、HEK293に由来する、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、非改変レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、改変されていない細胞(例えば、間葉系幹細胞)に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比較して、MHCクラスIの低下した発現を有する。いくつかの実施形態において、HLA-Gの発現を増加させるためにHLA-Gを発現するレンチウイルスを使用して改変された哺乳動物細胞、例えば、HEK293に由来するレトロウイルスベクターまたはVLPは、例えば、改変されていない細胞(例えば、HEK293)に由来する、非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、HLA-Gの増加した発現を有する。

【0558】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、供給源細胞、例えば、実質的に免疫原性ではない哺乳動物細胞に由来し、供給源細胞は、T細胞IFN-γ分泌を、IFN-γELISPOTアッセイによって、例えば、インビトロでアッセイされた場合、例えば、0pg/mLから>0pg/mLのレベルで、刺激、例えば、誘発する。

【0559】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は、免疫抑制剤、例えば、グルココルチコイド(例えば、デキサメタゾン)、細胞増殖抑制剤(例えば、メトトレキサート)、抗体(例えば、ムロモナブ(OKT3)-CD3)、またはイムノフィリンモジュレーター(例えば、シクロスポリンまたはラパマイシンによって処理された細胞培養

10

20

30

40

50

からのものである。

【0560】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は、外因性薬剤、例えば、治療剤を含む。

【0561】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来し、哺乳動物細胞は組換え細胞である。

【0562】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクター、VLP、または薬剤は、ウイルス免疫エバシン、例えば、hCMV US2、またはUS11を発現するように遺伝子改変された哺乳動物細胞に由来する。

10

【0563】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターもしくはVLPの表面、または供給源細胞の表面は、ポリマー、例えば、免疫原性および免疫媒介性クリアランスを低減させる生体適合性ポリマー、例えば、PEGと共有結合または非共有結合によって修飾される。

【0564】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターもしくはVLPの表面、または供給源細胞の表面は、シアル酸、例えば、NK抑制グリカンエピトープを含む糖ポリマーを含むシアル酸と共有結合または非共有結合によって修飾される。

20

【0565】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPの表面、または供給源細胞の表面は、ABO血液型を除去するために、例えば、グリコシダーゼ酵素、例えば、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼで酵素的に処理される。

【0566】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターもしくはVLPの表面、または供給源細胞の表面は、酵素的に処理されて、レシピエントの血液型に一致するABO血液型上昇させる、例えば、発現を誘発する。

【0567】

免疫原性を評価するためのパラメーター

30

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、実質的に免疫原性ではなく、または免疫原性の低下を有するように改変された、例えば、本明細書で説明される方法を使用して改変された、供給源細胞、例えば、哺乳動物細胞に由来する。供給源細胞およびレトロウイルスベクターまたはVLPの免疫原性は、本明細書に記載のアッセイのいずれかによって決定することができる。

【0568】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、インビボでの移植片生着の増加、例えば、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の増加を有する。

40

【0569】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、適切な動物モデル、例えば、本明細書に記載の動物モデルへの対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPの1つ以上の移植後の体液性応答と比べて、適切な動物モデル、例えば、本明細書に記載の動物モデルへの当該レトロウイルスベクターまたはVLPの1つ以上の移植後の体液性応答における低下によって測定されたとき、免疫原性の低下を有する。いくつかの実施形態において、体液性応答における低下は、血清試料にお

50

いて、抗細胞抗体力価、例えば、抗レトロウイルスまたは抗VLP抗体力価によって、例えば、ELISAによって測定される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPが投与された動物からの血清試料は、非改変レトロウイルスベクターまたはVLPが投与された動物からの試料と比べて、抗レトロウイルスまたは抗VLP抗体力価の1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPが投与された動物からの血清試料は、増加した抗レトロウイルスまたは抗VLP抗体力価、例えば、ベースラインから1%、2%、5%、10%、20%、30%、または40%の増加を有し、ベースラインは、レトロウイルスベクターまたはVLPの投与前の同一動物からの血清試料を参考にする。

10

【0570】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、マクロファージ食作用における低下、例えば、マクロファージ食作用における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、マクロファージ食作用における低下は、インビトロでの食作用指数を、例えば、実施例8に記載されるようにアッセイすることによって決定される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、例えば、マクロファージ食作用のインビトロアッセイにおいてマクロファージと共にインキュベートされた場合、例えば、実施例8のアッセイによって測定されたとき、0、1、10、100以上の食作用指数を有する。

20

【0571】

いくつかの実施形態では、供給源細胞もしくはレシピエント細胞は、対照細胞、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様な細胞、または非改変レトロウイルスもしくはVLPを受容したレシピエント細胞、もしくは間葉幹細胞と比べて、例えば、実施例17のアッセイを使用して、PBMCによる細胞毒性媒介細胞溶解における低下、例えば、細胞溶解における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有する。実施形態において、ソース細胞は外因性HLA-Gを発現する。

【0572】

いくつかの実施形態において、供給源細胞またはレシピエント細胞は、対照細胞、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様な細胞、または非改変レトロウイルスもしくはVLPを受容したレシピエント細胞と比べて、NK媒介性細胞溶解における低下、例えば、NK媒介細胞溶解における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、NK媒介細胞溶解は、インビトロで、例えば、クロム放出アッセイまたはユーロピウム放出アッセイによって、例えば、実施例18のアッセイを使用して、アッセイされる。

30

【0573】

いくつかの実施形態において、供給源細胞またはレシピエント細胞は、対照細胞、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様な細胞、または非改変レトロウイルスもしくはVLPを受容したレシピエント細胞と比べて、CD8+T細胞媒介性細胞溶解における低下、例えば、CD8+T細胞媒介細胞溶解における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、CD8+T細胞媒介細胞溶解は、インビトロで、実施例19のアッセイによって、アッセイされる。

40

【0574】

いくつかの実施形態において、供給源細胞またはレシピエント細胞は、対照細胞、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様な細胞、または非改変レトロウイルスもしくはVLPを受容したレシピエント細胞と比べて、CD4+T細胞媒介性細胞溶解における低下、例えば、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を有し、CD4+T細胞媒介細胞溶解は、インビトロでア

50

ッセイされる（例えば、改変または非改変哺乳動物供給源細胞およびCD4+T細胞のCD3/CD28Dyabeadsを添加した共培養アッセイ）。

【0575】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、T細胞IFN-γ分泌における低下、例えば、T細胞IFN-γ分泌における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を生じ、T細胞IFN-γ分泌は、インビトロで、例えばIFN-γELISPOTによってアッセイされる。

10

【0576】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、免疫原性サイトカインの分泌における低下、例えば、免疫原性サイトカインの分泌における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の低下を生じ、免疫原性サイトカイン分泌は、インビトロで、ELISAまたはELISPOTを使用してアッセイされる。

【0577】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、免疫抑制サイトカインの増加した分泌、例えば、免疫抑制サイトカインの分泌における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の増加をもたらす、免疫抑制サイトカインの分泌は、インビトロで、ELISAまたはELISPOTを使用してアッセイされる。

20

【0578】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、HLA-GまたはHLA-Eの発現における増加、例えば、HLA-GまたはHLA-Eの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の発現における増加を有し、HLA-GまたはHLA-Eの発現は、インビトロでフローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してアッセイされる。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、例えば、改変されていない細胞と比較して、HLA-GまたはHLA-Eの増加した発現、例えば、HLA-GまたはHLA-Eの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の増加した発現を有するように改変される供給源細胞に由来し、HLA-GまたはHLA-Eの発現は、インビトロでフローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してインビトロでアッセイされる。いくつかの実施形態において、増加したHLA-G発現を有する改変細胞に由来するレトロウイルスベクターまたはVLPは、低下した免疫原性を示す。

30

【0579】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、T細胞インヒビターリガンド（例えば、CTLA4、PD1、PD-L1）の発現における増加、例えば、T細胞インヒビターリガンドの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の発現における増加を有し、または生じ、T細胞インヒビターリガンドの発現は、インビトロでフローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してアッセイされる。

40

50

【0580】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、共刺激リガンドの発現における減少、例えば、共刺激リガンドの発現における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を有し、共刺激リガンドの発現は、インビトロでフローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してアッセイされる。

【0581】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、対照レトロウイルスベクターまたはVLP、例えば、非改変である以外は当該供給源細胞またはHeLa細胞と同様である細胞に由来する非改変レトロウイルスベクターまたはVLPと比べて、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現における減少、例えば、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの発現における1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を有し、MHCクラスIまたはIIの発現は、インビトロでフローサイトメトリー、例えば、FACSを使用してアッセイされる。

【0582】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPは、実質的に非免疫原性である細胞源、例えば、哺乳動物細胞源に由来する。いくつかの実施形態において、免疫原性は、例えば、本明細書に記載されるように、定量化され得る。いくつかの実施形態において、哺乳動物細胞源は、以下の特徴のいずれか1つ、すべて、または組み合わせを含む。

- a. 供給源細胞が自家細胞源、例えば、レトロウイルスベクターまたはVLPを受ける、例えば、投与されるレシピエントから得られる細胞から得られ、
- b. 供給源細胞が、レトロウイルスベクターまたはVLPを受ける、例えば、投与されるレシピエント、例えば、本明細書に記載のレシピエントと一致する、例えば、同一の性別のものである同種異系細胞源から得られ、
- c. 供給源細胞が、レシピエントのHLAと、例えば、1つ以上の対立遺伝子で、一致するHLAである同種異系細胞源から得られ、
- d. 供給源細胞が、HLAホモ接合体である同種異系細胞源から得られ、
- e. 供給源細胞が、MHCクラスIおよびIIを欠如している（または対照細胞と比較して低下したレベルを有する）同種異系細胞源から得られ、あるいは
- f. 供給源細胞が、限定されないが、幹細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、セルトリ細胞、または網膜色素上皮細胞を含む、実質的に非免疫原性であることが知られている細胞源から得られる。

【0583】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPを投与される対象は、レトロウイルスベクターまたはVLPと反応する既存抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、またはそれらについて試験される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPを投与される対象は、レトロウイルスベクターまたはVLPと反応する既存抗体の検出可能なレベルの有さない。抗体に関する試験は、例えば、実施例13に記載される。

【0584】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPを受けた対象は、レトロウイルスベクターまたはVLPと反応する抗体（例えば、IgGまたはIgM）を有し、もしくは有することが知られ、またはそれらについて試験される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターまたはVLPを受けた対象（例えば、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回以上）は、レトロウイルスベクターまたはVLPと反応する抗体の検出可能なレベルを有さない。実施形態において、抗体のレベルは、2つの時点

である、レトロウイルスベクターまたはVLPの最初の投与の前である第1の時点と、レトロウイルスベクターまたはVLPの1回以上の投与の後である第2の時点との間で、1%、2%、5%、10%、20%、または50%を超えて上昇しない。抗体に関する試験は、例えば、実施例14に記載される。

【0585】

外因性薬剤

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物は、外因性薬剤をコードする。

【0586】

外因性タンパク質

いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、細胞質ゾルタンパク質、例えば、レシピエント細胞で生成され、レシピエント細胞の細胞質に局在するタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、分泌されたタンパク質、例えば、レシピエント細胞によって生成されて分泌されるタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、外因性薬剤は、核タンパク質、例えば、レシピエント細胞で生成され、レシピエント細胞の核に移入されるタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、オルガネラタンパク質（例えば、ミトコンドリアタンパク質）、例えば、レシピエント細胞で生成され、レシピエント細胞のオルガネラ（例えば、ミトコンドリア）に移入されるタンパク質を含む。

【0587】

いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、核酸、例えば、RNA、イントロン（複数可）、エクソン（複数可）、mRNA（メッセンジャーRNA）、tRNA（トランスファーRNA）、改変RNA、マイクロRNA、siRNA（小干渉RNA）、tmRNA（トランスフェルメッセンジャーRNA）、rRNA（リボソームRNA）、mtRNA（ミトコンドリアRNA）、snRNA（小核RNA）、小体核RNA（snRNA）、SmY RNA（mRNAトランススプライシングRNA）、gRNA（ガイドRNA）、TERC（テロメラーゼRNA成分）、aRNA（アンチセンスRNA）、cis-NAT（シス天然アンチセンス転写物）、CRISPR RNA（crRNA）、lncRNA（長非コードRNA）、piRNA（piwi相互作用RNA）、shRNA（短ヘアピンRNA）、tasRNA（トランス作用性siRNA）、eRNA（エンハンサーRNA）、サテライトRNA、pcRNA（タンパク質コードRNA）、dsRNA（二本鎖RNA）、RNAi（干渉RNA）、circRNA（環状RNA）、リプログラミングRNA、アプタマー、およびそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、野生型核酸または変異体核酸である。いくつかの実施形態では、核酸は、多数の核酸配列の融合またはキメラである。

【0588】

いくつかの実施形態において、外因性薬剤は、ポリペプチド、例えば、酵素、構造ポリペプチド、シグナル伝達ポリペプチド、調節ポリペプチド、輸送ポリペプチド、感覚ポリペプチド、モーターポリペプチド、防御ポリペプチド、貯蔵ポリペプチド、転写因子、抗体、サイトカイン、ホルモン、異化ポリペプチド、同化ポリペプチド、タンパク質分解ポリペプチド、代謝ポリペプチド、キナーゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、酵素モジュレーターポリペプチド、タンパク質結合ポリペプチド、脂質結合ポリペプチド、膜融合ポリペプチド、細胞分化ポリペプチド、エピジェネティックポリペプチド、細胞死ポリペプチド、核輸送ポリペプチド、核酸結合ポリペプチド、再プログラミングポリペプチド、DNA編集ポリペプチド、DNA修復ポリペプチド、DNA組換えポリペプチド、トランスポターゼポリペプチド、DNA統合ポリペプチド、標的化エンドヌクレアーゼ（例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（TALEN）、cas9およびそのホモログ）、リコンビナーゼ、およびそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、分解のために細胞内のタンパク質を標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質は、タンパク質をプロテアソームに局在化させることによる分解のために細胞内のタンパク質を

10

20

30

40

50

標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質は、野生型タンパク質または変異体タンパク質である。いくつかの実施形態において、タンパク質は、融合またはキメラタンパク質である。

【0589】

膜タンパク質

いくつかの実施形態において、外因性薬剤は膜タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、膜タンパク質は、キメラ抗原受容体（CAR）、T細胞受容体、インテグリン、イオンチャネル、孔形成タンパク質、トール様受容体、インターロイキン受容体、細胞接着タンパク質、または輸送タンパク質を含む。

【0590】

いくつかの実施形態では、膜タンパク質は、米国特許公開第2016/0289674号の配列番号8144～16131の配列を含み、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、膜タンパク質は、米国特許公開第2016/0289674号の配列番号8144～16131の配列のフラグメント、変異体、またはホモログを含む。いくつかの実施形態では、膜タンパク質は、米国特許公開第2016/0289674号の配列番号8144～16131の配列を含むタンパク質をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、膜タンパク質は、米国特許公開第2016/0289674号の配列番号8144～16131の配列のフラグメント、変異体、またはホモログを含むタンパク質をコードする核酸を含む。

【0591】

いくつかの実施形態において、膜タンパク質は、抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を含む。いくつかの実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメイン（例えば、1つ、2つ、または3つのシグナル伝達ドメイン）を含む第一世代CARであり、または含む。いくつかの実施形態では、CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および少なくとも3つのシグナル伝達ドメインを含む第三世代CARを含む。いくつかの実施形態において、第四世代CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、3つまたは4つのシグナル伝達ドメイン、およびCARのシグナル伝達が成功するとサイトカイン遺伝子の発現を誘導するドメインを含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、scFvまたはFabであり、またはそれを含む。

【0592】

いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、新生細胞に特徴的な抗原を標的とする。いくつかの実施形態において、新生細胞に特徴的な抗原は、細胞表面受容体、イオンチャネル結合受容体、酵素結合受容体、Gタンパク質結合受容体、受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ関連受容体、受容体様チロシンホスファターゼ、受容体セリン／スレオニンキナーゼ、受容体グアニリルシクラーゼ、ヒスチジンキナーゼ関連受容体、表皮成長因子受容体（EGFR）（ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3、およびErbB4/HER4を含む）、線維芽細胞成長因子受容体など（FGFR）（FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF18、およびFGF21を含む）血管内皮成長因子受容体（VEGFR）（VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、およびPIGFを含む）、RET受容体およびEph受容体ファミリー（EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphA9、EphA10、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、およびEphB6を含む）、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CFTR、CIC-1、CIC-2、CIC-4、CIC-5、CIC-7、CIC-Ka、CIC-Kb、ベストロフィン、TMEM16A、GABA受容体、グリシン受容体、ABCトランスポーター、NAV1.1、NAV1.2、NAV1.3、NAV1.4、NAV1.5、NAV1.6、NAV1.7、NAV1.8、NAV1.9、スフィンゴシン-1-リン酸受容体（S1P1

10

20

30

40

50

R)、NMDAチャネル、膜貫通タンパク質、マルチスパン膜貫通タンパク質、T細胞受容体モチーフ、T細胞アルファ鎖、T細胞β鎖、T細胞γ鎖、T細胞δ鎖、CCR7、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD11b、CD11c、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD34、CD35、CD40、CD45RA、CD45RO、CD52、CD56、CD62L、CD68、CD80、CD95、CD117、CD127、CD133、CD137(4-1BB)、CD163、F4/80、IL-4Ra、Sca-1、CTLA-4、GITR、GARP、LAP、グランザイムB、LFA-1、トランスフェリン受容体、Nkp46、パーフォリン、CD4+、Th1、Th2、Th17、Th40、Th22、Th9、Tfh、古典的Treg、FoxP3+、Tr1、Th3、Treg17、TREG、CDCP1、NT5E、EPCAM、CEA、gpA33、ムチン、TAG-72、炭酸アンヒドラーゼIX、PSMA、葉酸結合タンパク質、ガングリオシド(例えば、CD2、CD3、GM2など)、ルイス-γ2、VEGF、VEGFR1/2/3、αVβ3、α5β1、ErbB1/EGFR、ErbB1/HER2、ErbB3、c-MET、IGF1R、EphA3、TRAIL-R1、TRAIL-R2、RANKL、FAP、テネニン、PDL-1、BAFF、HDAC、ABL、FLT3、KIT、MET、RET、IL-1β、ALK、RANKL、mTOR、CTLA-4、IL-6、IL-6R、JAK3、BRAF、PTCH、Smoothed、PIGF、ANPEP、TIMP1、PLAUR、PTPRJ、LTBR、またはANTXR1、葉酸受容体アルファ(FRa)、ERBB2(HER2/neu)、EphA2、IL-13Ra2、上皮成長因子受容体(EGFR)、メソテリン、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、MUC16(CA125)、L1CAM、LeY、MSLN、IL13Rα1、L1CAM、TnAg、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、インターロイキン-11受容体α(IL-11Ra)、PSCA、PRSS21、VEGFR2、ルイスY、CD24、血小板由来成長因子受容体ベータ(PDGFRベータ)、SSEA-4、CD20、MUC1、NCAM、プロスターゼ、PAP、ELF2M、エフリンB2、IGF-1受容体、CAIX、LMP2、gpLOO、bcr-abl、チロシナーゼ、フコシルGM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-アセチル-GD2、葉酸受容体ベータ、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、ポリシアル酸、PLACL、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-la、MAGE-A1、レグマイン、HPV E6、E7、ETV6-AML、精子タンパク質17、XAGE1、Tie2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos関連抗原1、p53、p53変異体、プロスタイン、サバイビン、テロメラーゼ、PCTA-1/ガレクチン8、MelanA/MART1、Ras変異体、hTERT、肉腫転座ブレークポイント、ML-IAP、ERG(TMPRSS2-ETS融合遺伝子)、NA17、PAX3、アンドロゲン受容体、サイクリンB1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP11B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2、腸内カルボキシエステラーゼ、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、新生抗原、CD133、CD15、CD184、CD24、CD56、CD26、CD29、CD44、HLA-A、HLA-B、HLA-C、(HLA-A、B、C)CD49f、CD151、CD340、CD200、tkrA、trkB、trkC、あるいはそれらの抗原性フラグメントまたは抗原性部分から選択される。

【0593】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、CAR膜貫通ドメインは、少なくともT細胞受容体のアルファ、ベータ、もしくはゼータ鎖の膜貫通領域、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、またはそれらの機能的変異体を含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、少なくともCD8 α 、CD8 β 、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、Fc ϵ RI γ 、CD16、OX40/CD134、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR ζ 、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS、およびFGFR2B、またはそれらの機能的変異体の膜貫通領域（複数可）を含む。

10

【0594】

いくつかの実施形態では、CARは、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC、PDCD6)、4-1BB/TNFSF9/CD137、4-1BBリガンド/TNFSF9、BAFF/BlyS/TNFSF13B、BAFFR/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27リガンド/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30リガンド/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40リガンド/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITRリガンド/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、リンボトキシン-アルファ/TNF-ベータ、OX40/TNFRSF4、OX40リガンド/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF- α 、TNFR1I/TNFRSF1B)、2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6、SLAM/CD150)、CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLAクラスI、HLA-DR、イカロス、インテグリンアルファ4/CD49d、インテグリンアルファ4ベータ1、インテグリンアルファ4ベータ7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、CAP12、デクチン-1/CLEC7A、DPP4/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLPR、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、NKG2C、CD3ゼータドメイン、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)、CD27、CD28、4-1BB、CD134/OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの機能的フラグメント、のうちの1つ以上から選択される少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。

20

30

40

【0595】

miRNAおよびsiRNA

実施形態において、レトロウイルスゲノムは、1つ以上のRNA標的に対して向けられた1つ以上（例えば、2つ以上）の阻害性RNA分子をコードする。阻害性RNA分子は、例えば、miRNAまたはshRNAであり得る。いくつかの実施形態において、阻害性分子は、例えば、Pri-miRNAもしくはPre-miRNAなどのmiRNAの前駆体、またはshRNAの前駆体であり得る。いくつかの実施形態において、阻害性分子は、人工的に派生されたmiRNAまたはshRNAであり得る。他の実施形態では、阻害性RNA分子は、siRNAまたはsiRNA自体にプロセシングされるdsRNA（転写または人工的に導入される）であり得る。いくつかの実施形態において、阻害性R

50

NA分子は、自然界に見出されない配列を有し、または自然界に見出されない少なくとも1つの機能的セグメントを有し、または自然界に見出されない機能的セグメントの組み合わせを有するmiRNAまたはshRNAであり得る。例示的な実施形態では、阻害性RNA分子のうちの少なくとも1つまたはすべては、miR-155である。

【0596】

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターは、1つ以上のRNA標的に対して向けられた2つ以上の阻害性RNA分子をコードする。いくつかの実施形態では、2つ以上の阻害性RNA分子は、異なる標的に対して向けることができる。他の実施形態では、2つ以上の抑制性RNA分子は、同じ標的に対して向けられる。

【0597】

いくつかの実施形態において、外因性薬剤はshRNAを含む。shRNA（ショートヘアピンRNA）は、単一の自己相補的RNA鎖によって形成される二本鎖構造を含むことができる。shRNA構築体は、標的遺伝子のコード配列または非コード配列のいずれかの部分と同一のヌクレオチド配列を含むことができる。標的配列に対して挿入、欠失、および単一点突然変異を伴うRNA配列も使用することができる。阻害性RNAと標的遺伝子の部分との間における90%を超える配列同一性、または同じ100%の配列同一性を使用することができる。特定の実施形態において、shRNAの二本鎖形成部分の長さは、例えば、ダイサー依存性切断によって生成されるRNA生成物にサイズが対応する、長さが少なくとも20、21、または22ヌクレオチドである。特定の実施形態において、shRNA構築体は、長さが少なくとも25、50、100、200、300、または400塩基である。特定の実施形態において、shRNA構築体は、長さが400〜800塩基である。shRNA構築体は、ループ配列およびループサイズにおける変動に対して高度に耐性である。

【0598】

実施形態において、siRNA、miRNA、shRNA、またはリボザイムをコードするレトロウイルスベクターは、1つ以上の調節配列、例えば、強力な構成的pol II、例えば、ヒトU6snRNAプロモーター、マウスU6snRNAプロモーター、ヒトおよびマウスH1 RNAプロモーター、ならびにヒトtRNA-valプロモーター、または強力な構成的pol IIプロモーターを含む。

【0599】

フソゲン受容体および供給源細胞融合を防止する方法

いくつかの実施形態において、供給源細胞は、供給源細胞によって発現されるフソゲンと結合するフソゲン受容体の低下した発現を有する（例えば、発現なし）ように改変される（例えば、siRNA、miRNA、shRNA、ゲノム編集、または他の方法を使用して）。いくつかの実施形態において、フソゲンは、再標的化されたフソゲンであり、例えば、フソゲンは標的結合ドメイン、例えば、抗体、例えば、scFvを含み得る。いくつかの実施形態において、フソゲン受容体は抗体によって結合される。

【0600】

インスレーターエレメント

いくつかの実施形態において、レトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターまたはVLPはさらに、1つ以上のインスレーターエレメント、例えば、本明細書で説明されるインスレーターエレメントを含む。インスレーターエレメントは、レンチウイルス発現配列、例えば治療用ポリペプチドを、ゲノムDNAに存在するシス作用エレメントによって媒介され、転移された配列の調節解除された発現（例えば、位置効果、例えば、Burgess-Beusseら、2002、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433、およびZhanら、2001、Hum. Genet., 109:471を参照）、または転移された配列と隣接する内因性配列の調節解除された発現をもたらし得る、統合部位効果から保護することに寄与し得る。いくつかの実施形態において、転移ベクターは、1つ以上のインスレーターエレメント3'LTRを含み、プロウイルスが宿主ゲノムに統合されると、プロウイルスは、3'LTRを複製することによって5'LT

10

20

30

40

50

Rおよび／または3'LTRにおいて、1つ以上のインスレーターを含む。好適なインスレーターには、限定されないが、ニワトリHS4などのニワトリβ-グロビンインスレーター（本明細書に参照により組み込まれるChungら、1993. Cell 74: 505、Chungら、1997. N4S94: 575、およびBellら、1999. Cell 98: 387を参照）、またはヒトβ-グロビン遺伝子座に由来するインスレーターが含まれる。いくつかの実施形態では、インスレーターは、CCCTC結合因子（CTCF）と結合する。いくつかの実施形態では、インスレーターはバリアインスレーターである。いくつかの実施形態では、インスレーターは、エンハンサー遮断インスレーターである。例えば、その両方は参照によってそれらの全体が含まれる、Emeryら、Human Gene Therapy, 2011、ならびにBrowningおよびTrobbridge, Biomedicines, 2016を参照。

10

【0601】

いくつかの実施形態において、レトロウイルス核酸におけるインスレーターは、レシピエント細胞における遺伝毒性を低減する。遺伝毒性は、例えば、Cesanaら「Uncovering and dissecting the genotoxicity of self-inactivating lentiviral vectors in vivo」Mol Ther. 2014 Apr; 22(4): 774-85. doi: 10.1038/mt.2014.3. Epub 2014 Jan 20で報告されるように測定することができる。

【0602】

20

医薬組成物およびそれらを作製する方法

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの1つ以上の形質導入ユニットが対象に投与される。いくつかの実施形態では、1kgあたり少なくとも1、10、100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または 10^{14} の形質導入単位が対象に投与される。いくつかの実施形態では、血液1mlあたり1標的細胞につき少なくとも1、10、100、1000、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、または 10^{14} の形質導入単位が対象に投与される。

【0603】

レンチウイルスの濃縮および精製

30

いくつかの実施形態において、本明細書で説明されるレトロウイルスベクター製剤は、例えば、時系列で

- (i) レトロウイルスベクターを生成する細胞を培養するステップと、
- (ii) レトロウイルスベクター含有上清を収集するステップと、
- (iii) 任意に、上清を浄化するステップと、
- (iv) レトロウイルスベクターを精製してレトロウイルスベクター調製物を得るステップと、
- (v) 任意に、レトロウイルスベクター調製物をフィルター滅菌するステップと、
- (vi) レトロウイルスベクター調製物を濃縮して最終的なバルク生成物を生成するステップと、のうちの1つ以上、例えば、すべてを含むプロセスによって生成することができる。

40

【0604】

いくつかの実施形態では、プロセスは、浄化ステップ(iii)を含まない。他の実施形態では、プロセスは、浄化ステップ(iii)を含む。いくつかの実施形態では、ステップ(vi)は、限外ろ過、または接線ろ過、より好ましくはホローファイバー限外ろ過を使用して実施される。いくつかの実施形態では、ステップ(iv)における精製方法は、イオン交換クロマトグラフィー、より好ましくは陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、ステップ(v)におけるフィルター滅菌は、0.22 μmまたは0.2 μmの滅菌フィルターを使用して実施される。いくつかの実施形態では、ステップ(iii)は、フィルター浄化によって実施される。いくつかの実施形態では、

50

ステップ (i v) は、クロマトグラフィー、限外ろ過／透析ろ過、または遠心分離から選択される方法または方法の組み合わせを使用して実施される。いくつかの実施形態において、クロマトグラフィー法または方法の組み合わせは、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーから選択される。いくつかの実施形態では、遠心分離法は、ゾーン遠心分離、等密度遠心分離、およびペレット化遠心分離から選択される。いくつかの実施形態では、限外ろ過／透析ろ過法は、接線流透析ろ過、攪拌セル透析ろ過、および透析から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのステップが、核酸を分解して精製を改善するプロセスに含まれる。いくつかの実施形態において、当該ステップは、ヌクレアーゼ処理である。

10

【0605】

いくつかの実施形態において、ベクターの濃縮は、ろ過前に行われる。いくつかの実施形態において、ベクターの濃縮は、ろ過後に行われる。いくつかの実施形態では、濃縮およびろ過のステップが繰り返される。

【0606】

いくつかの実施形態では、最終濃縮ステップは、フィルター滅菌ステップ後に実施される。いくつかの実施形態では、本プロセスは、治療薬としてヒトに投与するのに好適な臨床グレード製剤を生成するための大規模プロセスである。いくつかの実施形態では、フィルター滅菌ステップは、濃縮ステップの前に行われる。いくつかの実施形態では、濃縮ステップは本プロセスの最後のステップであり、フィルター滅菌ステップは本プロセスの最後から2番目のステップである。いくつかの実施形態では、濃縮ステップは、限外ろ過、好ましくは接線流ろ過、より好ましくはホローファイバー限外ろ過を使用して実行される。いくつかの実施形態では、フィルター滅菌ステップは、約 $0.22\ \mu\text{m}$ の最大孔径を有する滅菌フィルターを使用して実施される。別の好ましい実施形態では、最大孔サイズは $0.2\ \mu\text{m}$ である。

20

【0607】

いくつかの実施形態において、ベクター濃度は、フィルター滅菌前の調製物 $1\ \text{mL}$ あたり約 4.6×10^{11} RNAゲノムコピー以下である。適切な濃度レベルは、必要に応じて、例えば希釈ステップを使用して、ベクター濃度を制御することによって達成することができる。したがって、いくつかの実施形態では、レトロウイルスベクター調製物は、フィルター滅菌前に希釈される。

30

【0608】

浄化は、ろ過ステップによって行い、細胞デブリおよび他の不純物を除去し得る。好適なフィルターは、セルロースフィルター、再生セルロースファイバー、無機ろ過助剤（例えば、珪藻土、パールライト、ヒュームドシリカ）と組み合わせたセルロースファイバー、無機ろ過助剤および有機レジンを組み合わせたセルロースフィルター、またはそれらの任意の組み合わせ、ならびにポリマーフィルター（例として、限定されないが、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエーテルスルホンが含まれる）を利用して、有効な除去および許容可能な回収を達成し得る。多段階プロセスが使用され得る。例示的な2段階または3段階のプロセスは、大きな沈殿物および細胞デブリを除去する粗いフィルター（複数可）と、続いて $0.2\ \mu\text{m}$ より大きく $1\ \mu\text{m}$ 未満の公称孔サイズを有する洗練化第2段階フィルター（複数可）からなる。最適な組み合わせは、沈殿物のサイズ分布ならびに他の変数の関数であり得る。さらに、比較的小さな孔サイズフィルターまたは遠心分離を使用する単一段階操作もまた、浄化のために使用され得る。より一般的には、限定されないが、全量ろ過、精密ろ過、遠心分離、または全量ろ過または深層ろ過と組み合わせたるろ過助剤（例えば、珪藻土）のボディフィードを含む任意の浄化方法は、その後のステップでメンブランおよび／またはレジンを詰まらせない好適な浄化度のろ液をもたらす、本発明の浄化ステップで使用することが許容される。

40

【0609】

50

いくつかの実施形態では、深層ろ過およびメンブランろ過が使用される。これに関して有用である市販の製品は、例えば、W O 0 3 / 0 9 7 7 9 7、p. 2 0 ~ 2 1 に記載されている。使用することができるメンブランは、異なる材料で構成され得、孔サイズが異なり得、組み合わせて使用され得る。それらは、いくつかの供給業者から商業的に入手できる。いくつかの実施形態では、浄化に使用されるフィルターは、1 . 2 ~ 0 . 2 2 μ m の範囲にある。いくつかの実施形態では、浄化に使用されるフィルターは、1 . 2 / 0 . 4 5 μ m フィルターまたは 0 . 2 2 μ m の最小公称孔サイズを有する非対称フィルターのいずれかである。

【0610】

いくつかの実施形態では、この方法は、ヌクレアーゼを使用して、混入している DNA / RNA、すなわち主に宿主細胞の核酸を分解する。本発明における使用に好適な例示的なヌクレアーゼには、あらゆる形態の DNA および RNA（一本鎖、二本鎖の線状または環状）を攻撃して分解する *Benzonase*（登録商標）ヌクレアーゼ（EP 0 2 2 9 8 6 6）、または調製物から不要または混入した DNA および / または RNA を排除する目的のために当技術分野で一般的に使用される任意の他の DN アーゼおよび / または RN アーゼが含まれる。好ましい実施形態において、ヌクレアーゼは *Benzonase*（登録商標）ヌクレアーゼであり、特定のヌクレオチド間の内部ホスホジエステル結合を加水分解することによって核酸を迅速に加水分解し、それによってベクター含有上清におけるポリヌクレオチドのサイズを減少させる。*Benzonase*（登録商標）ヌクレアーゼは、Merck KGaA（コード W 2 1 4 9 5 0）から市販されており、入手することができる。ヌクレアーゼが使用される濃度は、好ましくは 1 ~ 1 0 0 単位 / ml の範囲内である。

【0611】

いくつかの実施形態において、ベクター懸濁液は、本プロセス中に少なくとも 1 回の限外ろ過（緩衝液交換に使用される場合、透析ろ過と呼ばれることもある）が、例えば、ベクターを濃縮および / または緩衝液交換のために加えられる。ベクターを濃縮するために使用されるプロセスは、希釈液がベクター調製物から取り除かれ、一方、ベクターはフィルターを通過できずにベクター調製物に濃縮された形態で残るような様式で、希釈液を強制的にフィルターに通すことによってベクター濃度が増加される、任意のろ過プロセス（例えば、限外ろ過（UF））を含むことができる。UF は、例えば、*Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, L. Zeman and A. Zydney（Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1996）、および *Ultrafiltration Handbook*, Munir Cheryan（Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 8 7 7 6 2 - 4 5 6 - 9）に詳細が記載されている。好適なるろ過プロセスは、例えば、「*Pharmaceutical Process Filtration Catalogue*」pp. 177-202（Bedford, Mass., 1995 / 96）と題された MILLIPORE カタログに記載されている接線ろ過（「TFF」）である。TFF は、ウイルスを含む生成物の細胞収集、浄化、精製、濃縮のためにバイオプロセッシング業界で広く使用されている。このシステムは、3 つの異なるプロセス流である供給溶液、透過液、および保持液から構成されている。用途に応じて、異なる孔サイズを有するフィルターを使用し得る。いくつかの実施形態において、保持液は、生成物（レンチウイルスベクター）を含む。選択された特定の限外ろ過メンブランは、ベクターを保持するためには十分小さいが、不純物を効果的に除去するためには十分大きい孔サイズを有し得る。製造業者およびメンブランタイプに応じて、レトロウイルスベクターでは、1 0 0 ~ 1 0 0 0 kDa の公称分子量カットオフ（NMWC）が適切であり得、例えば、3 0 0 kDa または 5 0 0 kDa の NMWC を有するメンブランである。メンブラン組成物は、限定されないが、再生セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、またはそれらの誘導体であり得る。メンブランは、フラットシート（フラットスクリーンとも呼ばれる）またはホローファイバーであることがで

10

20

30

40

50

きる。好適なUFは、ホローファイバーUF、例えば、 $0.1\mu\text{m}$ 未満の孔サイズを有するフィルターを使用するろ過である。生成物は一般に保持されるが、透過によって体積を低減することができる（または、透析ろ過の際に、緩衝液および不純物を含有する透過液が透過液側で除去される速度と同じ速度で緩衝液を添加することによって、一定に維持される）。

【0612】

バイオ製薬業界においてTFFで最も広く使用されている2つの形状は、プレート&フレーム（フラットスクリーン）およびホローファイバーモジュールである。限外ろ過および精密ろ過用のホローファイバーユニットは、1970年代の初めにAmiconとRamiconによって開発されたが（Cheryan, M. Ultrafiltration Handbook）、現在はSpectrumおよびGE Healthcareを含む多数の供給業者がある。ホローファイバーモジュールは、高密度のスキン層を備えた一連の自立型ファイバーで構成される。ファイバーの直径は 0.5mm ～ 3mm の範囲である。特定の実施形態では、ホローファイバーがTFFに使用される。特定の実施形態では、 500kDa （ $0.05\mu\text{m}$ ）の孔サイズのホローファイバーが使用される。限外ろ過は、透析ろ過（DF）を含み得る。微量溶質は、限外ろ過される溶液に、UF速度に等しい速度で溶媒を加えることによって除去することができる。これにより、溶液から微小種が一定容量で洗い流され、保持されたベクターが精製される。

【0613】

UF／DFは、精製プロセスの様々な段階で、ベクター懸濁液を濃縮および／または緩衝液交換するために使用することができる。この方法は、DFステップを利用してクロマトグラフィーまたは他の精製ステップの後に上清の緩衝液を交換することができるが、クロマトグラフィーの前にも使用され得る。

【0614】

いくつかの実施形態において、クロマトグラフィーステップからの溶出液は、濃縮され、さらに限外ろ過－透析ろ過によって精製される。このプロセス中に、ベクターは製剤緩衝液に交換される。最終的な所望の濃度への濃縮は、フィルター滅菌ステップ後に行うことができる。滅菌ろ過後、フィルター滅菌された物質は無菌UFによって濃縮されて、バルクベクター生成物を生成する。

【0615】

実施形態では、限外ろ過／透析ろ過は、接線流透析ろ過、攪拌セル透析ろ過、および透析であり得る。

【0616】

精製技術は、細胞環境からのベクター粒子の分離、および必要に応じて、ベクター粒子のさらなる精製を含める傾向がある。様々なクロマトグラフィー法のうちの1つ以上がこの精製のために使用され得る。イオン交換、より具体的には陰イオン交換、クロマトグラフィーが好適な方法であり、他の方法を使用され得る。いくつかのクロマトグラフィー技術の説明を以下に示す。

【0617】

イオン交換クロマトグラフィーは、生体分子およびウイルスベクターなどの荷電種が、反対の荷電を有する基を、その表面に固定されて有する固定相（メンブラン、またはカラム内に充填など）と可逆的に結合できるという事実を利用する。イオン交換体には2つのタイプがある。陰イオン交換体は、正電荷を有する基を有する固定相であり、したがって、負電荷を有する種と結合することができる。陽イオン交換体は負電荷を有する基を有し、したがって、正電荷を有する種と結合することができる。メディウムのpHは、種の電荷を変えることができ、これに対して影響を有する。したがって、タンパク質などの種では、pHがpIを超える場合、正味電荷は負になり、pIを下回ると正味電荷は正になる。

【0618】

結合種の置換（溶出）は、好適な緩衝液の使用によって達成され得る。したがって、一般に、緩衝液のイオン濃度は、種が固定相におけるイオン部位に対する緩衝液イオンの競

10

20

30

40

50

合によって置換されるまで、増加させる。これに代わる溶出方法では、種の正味電荷が固定にとどまることを支持しなくなるまで、緩衝液のpHを変更する必要がある。例としては、種が正味の正電荷であると考えられ、陰イオン交換体とにもはや結合しなくなるまで、pHを下げる。

【0619】

不純物が帯電していない場合、またはそれらが目的の化学種とは反対の符号の電荷を有しているが、イオン交換体の電荷と同じ符号を有している場合、ある程度の精製を達成することができる。これは、非荷電種およびイオン交換体と同じ符号の電荷を有するものは、通常結合しないためである。異なる結合種の場合、結合の強度は、電荷密度および様々な種における電荷の分布などの要因によって異なる。したがって、イオン勾配またはpH勾配（連続勾配として、または一連のステップとして）を適用することによって、所望の種を不純物とは別々に溶出し得る。

【0620】

サイズ排除クロマトグラフィーは、種をそれらのサイズに応じて分離する手法である。通常、それは、十分定められたサイズの孔を有する粒子が充填されたカラムを使用によって実施される。クロマトグラフィー分離では、粒子は分離されるべき混合物中の種のサイズに関して適切である孔サイズを有するものが選択される。混合物が溶液（または懸濁液、ウイルスの場合）としてカラムにアプライされ、次いで緩衝液によって溶出され、最大の粒子は、それらが孔への制限された（またはアクセスしない）アクセスを有するため、最初に溶出される。小さい粒子は孔に入ることができるため、後で溶出し、したがって、カラムを通過する経路が長くなる。そのため、ウイルスベクターの精製においてサイズ排除クロマトグラフィーの使用を検討する場合、ベクターはタンパク質などのより小さな不純物の前に溶出されることが予想される。

【0621】

タンパク質などの種は、それらの表面に、固定相における弱い疎水性部位と可逆的に結合することができる疎水性領域を有する。比較的高い塩濃度を有するメディウムでは、この結合が促進される。通常、HICでは、精製される試料は、高い塩濃度環境で固定相に結合される。次に、溶出が、減少させた塩濃度の勾配（連続的または一連のステップとして）の適用によって達成される。一般的に使用される塩は硫酸アンモニウムである。異なる疎水性レベルを有する種は、異なる塩濃度で溶出される傾向があり、そのため標的種を不純物から精製することができる。pH、温度、ならびに界面活性剤、カオトロピック塩、および有機物などの溶出媒体への添加剤などの他の要因も、HIC固定相への種の結合の強度に影響を与えることができる。これらの要因のうちの1つ以上を調整または利用して、生成物の溶出および精製を最適化することができる。

【0622】

ウイルスベクターは、それらの表面にタンパク質などの疎水性部分を有し、そのため、HICを精製の手段として潜在的に使用され得る。

【0623】

HICと同様に、RPCは種をそれらの疎水性の差に従って分離する。HICで使用されているものよりも疎水性の高い固定相が使用される。固定相は、しばしば、アルキル基またはフェニル基などの疎水性部分が結合した材料、典型的にはシリカからなる。あるいは、固定相は、結合した基のない有機ポリマーであり得る。分離されるべき種の混合物を含む試料は、結合を促進する比較的高い極性の水性メディウムにおける固定相に加えられる。次に、溶出は、イソプロパノールまたはアセトニトリルなどの有機溶媒の添加によって水性メディウムの極性を低下させることによって達成される。通常、有機溶媒濃度を増加させる勾配（連続的または一連のステップとして）が使用され、種はそれらそれぞれの疎水性の順に溶出される。

【0624】

溶出メディウムのpHなどの他の要因および添加剤の使用も、RPC固定相への種の結合の強度に影響を及ぼすことができる。これらの要因のうちの1つ以上を調整または利用

10

20

30

40

50

して、生成物の溶出および精製を最適化することができる。一般的な添加剤はトリフルオロ酢酸（TFA）である。これは、試料中のカルボキシル部分などの酸性基のイオン化を抑制する。また、それは溶出メディウムにおけるpHを低下させ、このことがシリカマトリックスを有する固定相の表面に存在し得る遊離シラノール基のイオン化を抑制する。TFAは、イオン対形成剤として知られる添加剤のクラスの1つである。これらは、反対の電荷を有する試料中の種に存在して、イオン基と相互作用する。相互作用は電荷をマスキングする傾向があり、種の疎水性を増加させる。TFAおよびペンタフルオロプロピオン酸などの陰イオン対形成剤は、種における正電荷基と相互作用する。トリエチルアミンなどの陽イオン対形成剤は、負電荷基と相互作用する。

【0625】

ウイルスベクターはそれらの表面にタンパク質などの疎水性部分を有し、そのためRPCが精製の手段として潜在的に使用され得る。

【0626】

アフィニティークロマトグラフィーは、タンパク質またはヌクレオチドなどの生体分子と特異的に結合する特定のリガンドを、固定相に固定化できるという事実を利用している。次に、修飾された固定相を使用して、混合物から関連する生体分子を分離することができる。高度に特異的なリガンドの例は、標的抗原を精製するための抗体および酵素を精製するための酵素阻害剤である。広範囲の抗体を単離するためのプロテインAリガンドの使用など、より一般的な相互作用も利用できる。

【0627】

通常、アフィニティークロマトグラフィーは、目的の種を含む混合物を、結合された関連するリガンドを有する固定相に適用することによって実施される。適切な条件下では、これが種の固定相との結合をもたらす。次に、未結合の成分は、溶出メディウムが加えられる前に洗い流される。溶出メディウムは、リガンドの標的種との結合を破壊するように選択される。これは通常、適切なイオン強度、pHの選択によって、またはリガンド部位で標的種と競合する物質の使用によって達成される。いくつかの結合種では、尿素などのカオトロピック剤を使用して、リガンドからの置換を達成する。しかし、これは、種の不可逆的な変性をもたらす得る。

【0628】

ウイルスベクターは、それらの表面に、適切なリガンドと特異的に結合することができ得るタンパク質などの部分を有する。これは、潜在的に、アフィニティークロマトグラフィーがそれらの分離に使用することができることを意味する。

【0629】

タンパク質などの生体分子は、金属イオンと配位結合を形成できる電子供与部分をそれらの表面に有することができる。これは、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、または Fe^{3+} などの固定化金属イオンを有する固定相へのそれらの結合を促進することができる。IMACで使用される固定相には、それらの表面と共有結合されているキレート剤、通常はニトリロ酢酸またはイミノ二酢酸を有し、金属イオンを保持するのはキレート剤である。キレート化された金属イオンは、生体分子との配位結合を形成するために利用可能なままである、少なくとも1つの配位部位を有することが必要である。潜在的に、生体分子の表面には、固定化された金属イオンと結合することができ得るいくつかの部分がある。これらには、ヒスチジン、トリプトファン、およびシステイン残基、ならびにリン酸基が含まれる。しかし、タンパク質では、主なドナーはヒスチジン残基のイミダゾール基であるように思われる。ネイティブタンパク質は、それらが好適なドナー部分をそれらの表面に示す場合、IMACを使用して分離することができる。それ以外の場合、IMACは、いくつかの連結されたヒスチジン残基の鎖を有する組換えタンパク質の分離のために使用することができる。

【0630】

通常、IMACは、目的の種を含む混合物を固定相に適用することによって実施される。適切な条件下では、このことが種の固定相との配位結合をもたらす。次に、未結合の成

10

20

30

40

50

分は、溶出メディウムが加えられる前に洗い流される。溶出には、塩濃度を上げるまたは pH を下げる勾配（連続的または一連のステップとして）が使用され得る。また、一般的に使用される手順は、イミダゾール濃度を増加させる勾配の適用である。異なる供与体特性を有する、例えば、異なる環境にヒスチジン残基を有する生体分子は、勾配溶出の使用によって分離することができる。

【0631】

ウイルスベクターは、それらの表面に、IMAC 固定相と結合することができ得るタンパク質などの部分を有する。これは、潜在的に、IMAC をそれらの分離に使用することができることを意味する。

【0632】

好適な遠心分離技術には、ゾーン遠心分離、等密度超遠心分離、およびペレット化遠心分離が含まれる。

【0633】

フィルター滅菌は、医薬品グレードの材料におけるプロセスに好適である。フィルター滅菌は、得られた製剤に混入物を実質的に含まなくする。フィルター滅菌後の混入物質のレベルは、製剤が臨床使用に好適であるようなものである。フィルター滅菌ステップに続くさらなる濃縮（例えば、限外ろ過による）は、無菌状態で実施され得る。いくつかの実施形態では、滅菌フィルターは、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ の最大孔サイズを有する。

【0634】

本明細書におけるレトロウイルスベクターはまた、フロースルー超遠心分離および高速遠心分離、ならびに接線ろ過を使用してレンチウイルスベクターを濃縮および精製する方法を行うことができる。フロースルー超遠心分離は、RNA 腫瘍ウイルスの精製に使用することができる（Toplin ら、Applied Microbiology 15: 582-589, 1967、Burger ら、Journal of the National Cancer Institute 45: 499-503, 1970）。フロースルー超遠心分離は、レンチウイルスベクターの精製のために使用することができる。この方法は、以下のステップのうちの1つ以上を含むことができる。例えば、レンチウイルスベクターは、セルファクトリーまたはバイオリアクターシステムを使用して細胞から生成することができる。一過性トランスフェクションシステムを使用することができ、あるいはパッケージングまたはプロデューサー細胞株を同様に使用することもできる。材料を超遠心分離機に加える前の前浄化ステップが、必要に応じて、使用され得る。フロースルー超遠心分離は、連続フローまたはバッチ沈降を使用して実施することができる。沈降に使用される材料は、例えば、塩化セシウム、酒石酸カリウム、および臭化カリウムであり、それらはすべて腐食性であるが、高密度を低粘度で生じる。CsCl は、得られる広い密度勾配（ $1.0\sim 1.9\text{ g/cm}^3$ ）によって高度な純度が達成することができるため、プロセス開発のためにしばしば使用される。臭化カリウムは、例えば、 25°C などの高められた温度で、高密度で使用され得、いくつかのタンパク質の安定性と両立し得ない。ショ糖は安価で非毒性であるために広く使用されており、ほとんどのタンパク質、細胞内画分、および細胞全体の分離に好適な勾配を形成することができる。典型的には最大密度は約 1.3 g/cm^3 である。ショ糖の浸透ポテンシャルは細胞に有毒であり得、その場合、複合的な勾配材料、例えばナイコデントを使用することができる。勾配は、勾配における1つ以上のステップによって使用することができる。一実施形態は、段階的なショ糖勾配を使用することである。材料の容量は、1回の実施あたり 0.5 リットル から 200 リットル 超であることができる。流速は1時間あたり $5\sim 25\text{ リット}$ 超であることができる。好適な動作速度は $25,000\sim 40,500\text{ rpm}$ であり、最大 $122,000\times g$ の力を生じる。ローターは、所望の容量画分で静的に取り外すことができる。一実施形態は、遠心分離された材料を 100 ml の画分で取り出すことである。次に、精製および濃縮されたレンチウイルスベクターを含む単離された画分を、ゲルろ過またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、所望の緩衝液中に交換することができる。陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィーは、緩衝液交換またはさらなる精製のための代替

10

20

30

40

50

または追加の方法としても使用することができる。さらに、接線流ろ過は、必要に応じて、緩衝液交換および最終製剤にも使用することができる。接線流ろ過（TFF）は、超高速または高速遠心分離の代替ステップとしても使用することができ、2ステップTFF手順が実行される。第1のステップはベクター上清の容量を減少させ、第2のステップは緩衝液交換、最終製剤、および材料のさらなる濃縮のために使用される。TFFメンブランは、100～500キロダルトンのメンブランサイズを有することができ、第1のTFFステップは500キロダルトンのメンブランサイズを有することができ、第2のTFFは300～500キロダルトンのメンブランを有することができる。最終緩衝液は、ベクターを長期間保存することを可能にする材料を含むべきである。

【0635】

実施形態では、本方法は、接着細胞を含むセルファクトリー、またはベクターおよびヘルパー構築体でトランスフェクトまたは形質導入されてレンチウイルスベクターを生成する浮遊細胞を含むバイオリアクターのいずれかを使用する。非限定的な例またはバイオリアクターには、WaveバイオリアクターシステムおよびXcellerexバイオリアクターが含まれる。どちらも使い捨てシステムである。しかし、使い捨てではないシステムも使用することができる。構築体は、本明細書で説明されるもの、ならびに他のレンチウイルス形質導入ベクターであることができる。あるいは、細胞株は、形質導入またはトランスフェクションを必要とせずにレンチウイルスベクターを生成するように操作することができる。トランスフェクション後、レンチウイルスベクターを収集してろ過して粒子を除去し、次いで連続フローの高速または超遠心分離を使用して遠心分離する。好ましい実施形態は、高速遠心分離機を備えたJCF-Aゾーンおよび連続フローローターのような高速連続フロー装置を使用することである。また、中規模のレンチウイルスベクター生成のためにCentrifuge Stratus遠心分離機の使用も好ましい。また、遠心分離の速度が5,000×g RCF超および、26,000×g RCF未満である任意の連続フロー遠心分離機も好適である。好ましくは、連続フロー遠心力は、20時間～4時間の回転時間による約10,500×g～23,500×g RCFであり、より緩い遠心力ではより長い遠心時間を使用する。レンチウイルスベクターは、より密度の高い物質のクッション上で遠心分離することができ（非限定的な例はショ糖であるが、他の試薬を使用してクッションを形成することができ、これらは当技術分野で周知である）、それによってレンチウイルスベクターは、ウイルスベクターペレットをもたらすベクターの直接遠心分離によって時々生じるような、ろ過できない凝集体を形成しない。クッション上での連続フロー遠心分離は、ベクターが大きな凝集体の形成を回避することを可能にし、また、レンチウイルスベクターを生成する大容量のトランスフェクトされた材料からベクターを高レベルに濃縮することを可能にする。さらに、ショ糖の第2の密度の低い層を使用して、レンチウイルスベクター調製物を帯状にすることができる。連続フロー遠心分離機の流量は、1分あたり1～100mlであることができるが、さらに高いそして低い流量も使用することができる。流量は、高流量のために大量のベクターが失われることなく、ベクターが遠心分離機のコアに入るのに十分な時間を得るように調整される。より高い流量が望まれる場合は、連続フロー遠心分離機から流出する物質を再循環させて、遠心分離機を再度通過させることができる。ウイルスを連続フロー遠心分離を使用して濃縮した後、ベクターは接線流ろ過（TFF）を使用してさらに濃縮することができ、またはTFFシステムを緩衝液交換のために使用することができる。TFFシステムの非限定的な例は、GB-Healthcareによって製造されるXamplerカートリッジシステムである。好ましいカートリッジは、500,000MW以下のMWカットオフを有するものである。好ましくは、カートリッジは、300,000MWのMWカットオフで使用される。100,000MWカットオフのカートリッジも使用することができる。より大きな容量の場合、より大きなカートリッジを使用することができ、ベクター調製物の最終充填の前に、この最終緩衝液交換および／または濃縮ステップに適切なTFFシステムを見い出すこと当業者にとって容易であろう。最終的な充填調製物は、ベクターを安定化する因子を含み得、糖が一般的に使用され、当技術分野で知られている。

10

20

30

40

50

【0636】

タンパク質含有物

いくつかの実施形態において、レトロウイルス粒子は、様々な供給源細胞ゲノム由来タンパク質、外因性タンパク質、およびウイルスゲノム由来タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルス粒子は、ウイルスゲノム由来タンパク質に対する供給源細胞ゲノム由来タンパク質、外因性タンパク質に対する供給源細胞ゲノム由来タンパク質、およびウイルスゲノム由来タンパク質に対する外因性タンパク質の様々な比を含む。

【0637】

いくつかの実施形態において、ウイルスゲノム由来タンパク質は、GAGポリタンパク質前駆体、HIV-1インテグラーゼ、POLポリタンパク質前駆体、カプシド、ヌクレオカプシド、p17マトリックス、p6、p2、VPR、Vifである。

10

【0638】

いくつかの実施形態において、供給源細胞由来タンパク質は、シクロフィリンA、ヒートショック70kD、ヒト伸長因子-1アルファ(EF-1R)、ヒストンH1、H2A、H3、H4、ベータグロビン、トリプシン前駆体、パルブリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、Lck、ユビキチン、SUMO-1、CD48、シンテニン-1、ヌクレオホスミン、異種核リボヌクレオプロテインC1/C2、ヌクレオリン、ATP依存性ヘリカーゼDDX48、マトリン-3、転移性ERATPアーゼ、GTP結合核タンパク質Ran、異種核リボヌクレオプロテインU、インターロイキンエンハンサー結合因子2、オクタマー結合タンパク質を含む非POUDメイン、RuvB様2、HSP90-b、HSP90-a、伸長因子2、C-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、α-エノラーゼ、C-1-テトラヒドロ葉酸シンターゼ、細胞質性、ビルビン酸キナーゼ、アイソザイムM1/M2、ユビキチン活性化酵素E1、26Sプロテアーゼ調節サブユニットS10B、60S酸性リボソームタンパク質P2、60S酸性リボソームタンパク質P0、40Sリボソームタンパク質SA、40Sリボソームタンパク質S2、40Sリボソームタンパク質S3、60Sリボソームタンパク質L4、60Sリボソームタンパク質L3、40Sリボソームタンパク質S3a、40Sリボソームタンパク質S7、60Sリボソームタンパク質L7a、60S酸性リボソームタンパク質L31、60Sリボソームタンパク質L10a、60Sリボソームタンパク質L6、26Sプロテアソーム非ATPアーゼ調節サブユニット1、チューブリンb-2鎖、アクチン、細胞質1、アクチン、大動脈平滑筋、チューブリンa-遍在鎖、クラスリン重鎖1、ヒストンH2B、b、ヒストンH4、ヒストンH3.1、ヒストンH3.3、ヒストンH2Aタイプ8、26Sプロテアーゼ調節サブユニット6A、ユビキチン-4、RuvB様1、26Sプロテアーゼ調節サブユニット7、ロイシル-tRNAシンテターゼ、細胞質性、60Sリボソームタンパク質L19、26Sプロテアソーム非ATPアーゼ調節サブユニット13、ヒストンH2B.F、U5小核リボヌクレオプロテイン200kDaヘリカーゼ、ポリ[ADP-リボース]ポリメラーゼ-1、ATP依存性DNAヘリカーゼII、DNA複製ライセンス因子MCM5、核酸感受性エレメント結合タンパク質1、ATP依存性RNAヘリカーゼA、インターロイキンエンハンサー結合因子3、転写伸長因子Bポリペプチド1、Pre-mRNAプロセッシングプライミングファクター8、タンパク質を含むブドウ球菌ヌクレアーゼドメイン1、プログラム化細胞死6-相互作用タンパク質、RNAポリメラーゼII転写サブユニット8ホモログのメディエーター、核RNAヘリカーゼII、エンドプラスミン、DnaJホモログサブファミリーAメンバー1、熱ショック70kDaタンパク質1L、T-複合タンパク質1eサブユニット、GCN1様タンパク質1、セロトランスフェリン、フルクトースニリン酸アルドラーゼA、イノシン-5'-リン酸デヒドロゲナーゼ2、26Sプロテアーゼ調節サブユニット6B、脂肪酸シンターゼ、DNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット、40Sリボソームタンパク質S17、60Sリボソームタンパク質L7、60Sリボソームタンパク質L12、60Sリボソームタンパク質L9、40Sリボソームタンパク質S8、40Sリボソームタンパク質S4Xアイソフォーム、60Sリボソームタンパク質L11、26Sプロテアソーム非ATPアーゼ

20

30

40

50

調節サブユニット2、コアトマーサブユニット、ヒストンH2A、 α 、ヒストンH1、2、Dynein重鎖サイトゾルである。Saphireら、Journal of Proteome Research, 2005、およびWheelerら、Proteomics Clinical Applications, 2007を参照する。

【0639】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターはペグ化されている。

【0640】

粒子サイズ

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの直径の中央値は、10~1000nm、25~500nm、40~300nm、50~250nm、60~225nm、70~200nm、80~175nm、または90~150nmである。

10

【0641】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの90%は、レトロウイルスの直径の中央値の50%以内である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの90%は、レトロウイルスの直径の中央値の25%以内である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの90%は、レトロウイルスの直径の中央値の20%以内である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの90%は、レトロウイルスの直径の中央値の15%以内である。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの90%は、レトロウイルスの直径の中央値の10%以内である。

20

【0642】

適応症および使用

いくつかの実施形態では、本明細書で説明されるフソソーム、例えば、レトロウイルスベクターもしくは粒子、またはそれらの医薬組成物は、対象、例えば哺乳動物、例えばヒトに投与することができる。いくつかの態様において、本明細書に提供されるのは、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに投与することができる、本明細書で説明されるいずれかなどの、レトロウイルスベクター、VLP、または医薬組成物である。そのような実施形態では、対象は、特定の疾患または状態（例えば、本明細書に記載の疾患または状態）のリスクがあり得、症状を有し得、あるいは有すると診断または特定され得る。一実施形態では、対象は癌を有する。一実施形態では、対象は感染症を有する。いくつかの実施形態では、フソソーム、例えばレトロウイルスベクターまたは粒子は、対象における疾患または状態を治療するための外因性薬剤をコードする核酸配列を含む。例えば、外因性薬剤は、新生細胞のタンパク質を標的とし、または特異的であり、フソソームは対象に、対象における腫瘍または癌を治療するために投与される。別の例では、外因性薬剤は、サイトカインなどの炎症性メディエーターまたは免疫分子であり、フソソームは、癌または感染症などの免疫応答を調節（例えば増加）することが望まれる任意の状態を治療するために対象に投与される。

30

【0643】

したがって、いくつかの態様において、提供されるフソソーム、例えば、レンチウイルスベクターおよび粒子などのレトロウイルスベクターおよび粒子、および／またはそれらを含む組成物の投与方法および使用、例えば、治療的および予防的使用も提供される。そのような方法および使用は、例えば、疾患、状態、または障害を有する対象に、当該疾患、状態、または障害の治療のための外因性薬剤の送達のため、フソソーム、例えば、レンチウイルスベクターもしくは粒子などのレトロウイルスベクターもしくは粒子、またはそれらを含む組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態において、フソソーム（例えば、レンチウイルスベクターもしくは粒子などのレトロウイルスベクターもしくは粒子）は、疾患、状態、または障害の治療を達成するのに有効な量または用量で投与される。本明細書に提供されるのは、そのような方法および治療における、ならびにそのような治療方法を実行するための薬品の調製における、提供されるフソソーム（例えば、レンチウイルスベクターまたは粒子などのレトロウイルスベクターまたは粒子）のいずれかの使用である。いくつかの実施形態では、本方法は、フソソーム（例えば、レンチウイルスベク

40

50

ターまたは粒子などのレトロウイルスベクターまたは粒子)、またはそれらを含む組成物を、疾患または状態または障害を有するか、有しているか、または有することが疑われる対象に投与することによって実行される。いくつかの実施形態では、本法は、それによって、対象における疾患または状態または障害を治療する。また本明細書に提供されるのは、外因性薬剤によって標的化または提供される特定の遺伝子またはタンパク質に関連する疾患、状態、または障害の治療のための、本明細書に提供される医薬組成物などの組成物のいずれかの使用である。

【0644】

癌には、例えば、白血病、リンパ腫（ホジキンおよび非ホジキン）、骨髄腫および骨髄増殖性疾患肉腫、黒色腫、腺腫、固形組織の癌腫、口、喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、肝臓癌、前立腺、子宮頸部、膀胱、子宮などの泌尿生殖器癌、および内分泌癌と腎細胞癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、皮膚または眼内黒色腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、頭頸部癌、乳癌、胃腸癌、および神経系癌、良性病変乳頭腫などの良性病変、などが含まれる。

【0645】

哺乳動物（例えば、ヒト）組織に由来する標的細胞には、上皮、結合、筋肉、または神経組織もしくは細胞、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。標的となる哺乳類（例、ヒト）の細胞および臓器系には、心臓血管系（心臓、血管系）、消化器系（食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、結腸、直腸、肛門）、内分泌系（視床下部、下垂体、松果体または松果腺、甲状腺、副甲状腺、副腎）、排泄系（腎臓、尿管、膀胱）、リンパ系（リンパ、リンパ節、リンパ管、扁桃腺、アデノイド、胸腺、脾臓）、外皮系（皮膚、髪、爪）、筋肉系（例えば、骨格筋）、神経系（脳、脊髄、神経）、生殖器系（卵巣、子宮、乳腺、精巣、精管、精嚢、前立腺）、呼吸器系（咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、横隔膜）、骨格系（骨、軟骨）、およびそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、非標的細胞または器官系は、心臓血管系（心臓、血管系）、消化器系（食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、結腸、直腸、肛門）、内分泌系（視床下部、下垂体、松果体または松果腺、甲状腺、副甲状腺、副腎）、排泄系（腎臓、尿管、膀胱）、リンパ系（リンパ、リンパ節、リンパ管、扁桃腺、アデノイド、胸腺、脾臓）、外皮系（皮膚、髪、爪）、筋肉系（例えば、骨格筋）、神経系（脳、脊髄、神経）、生殖器系（卵巣、子宮、乳腺、精巣、精管、精嚢、前立腺）、呼吸器系（咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、横隔膜）、骨格系（骨、軟骨）、およびそれらの組み合わせから選択される。

【0646】

本明細書で説明される医薬組成物の投与は、例えば、経口、吸入、経皮、または非経口（静脈内、腫瘍内、腹腔内、筋肉内、腔内、および皮下を含む）投与の方法によるものであり得る。フソソームは、いくつかの実施形態において、単独で投与され得、または医薬組成物として製剤化され得る。

【0647】

実施形態では、フソソーム組成物は、標的細胞に対する効果を媒介し、効果は、少なくとも1、2、3、4、5、6、もしくは7日、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、6、もしくは12か月の間持続する。いくつかの実施形態（例えば、フソソーム組成物が外因性タンパク質を含む）では、効果は、1、2、3、4、5、6、もしくは7日、2、3、もしくは4週間、または1、2、3、6、もしくは12か月未満の間持続する。

【0648】

実施形態では、本明細書で説明されるフソソーム組成物は、細胞または組織、例えば、ヒトの細胞または組織に体外で送達される。

【0649】

本明細書で説明されるフソソーム組成物は、いくつかの実施形態では、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに投与することができる。特定の実施形態において、対象は、特定の疾患または状態（例えば、本明細書に記載の疾患または状態）のリスクがあり得、症状を有し得、または有すると診断もしくは特定され得る。

【0650】

いくつかの実施形態において、フソソームの供給源は、フソソーム組成物が投与される同一対象に由来する。他の実施形態では、それらは異なる。例えば、フソソームおよびレシピエント組織の供給源は、自家（同一対象から）または異種（異なる対象から）であり得る。いずれの場合も、本明細書で説明されるフソソーム組成物のドナー組織は、レシピエント組織とは異なる組織タイプであり得る。例えば、ドナー組織は筋肉組織であり得、レシピエント組織は結合組織（例えば、脂肪組織）であり得る。他の実施形態では、ドナー組織およびレシピエント組織は、同一または異なるタイプであり得るが、異なる器官系からであり得る。

【0651】

いくつかの実施形態において、フソソームは、膜融合を阻害するタンパク質の阻害剤と同時投与される。例えば、サプレシンは細胞間融合を阻害するヒトタンパク質である（Sugimotoら“A novel human endogenous retroviral protein inhibits cell-cell fusion”Scientific Reports 3:1462 DOI:10.1038/srep01462）。したがって、いくつかの実施形態において、フソソームは、シプレシンの阻害剤、例えば、siRNAまたは阻害性抗体と同時投与される。

【0652】

本明細書で説明される組成物は、いくつかの実施形態において、様々な他の生物の細胞または組織の機能または生理学を同様に調節するために使用され得、限定されないが、家畜または使役動物（ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリなど）、愛玩用または動物園の動物（ネコ、イヌ、トカゲ、鳥類、ライオン、トラ、クマなど）、水産養殖動物（魚類、カニ、エビ、カキなど）、植物種（木、作物、観賞用花など）、発酵種（サッカロミセスなど）が含まれる。本明細書で説明されるフソソーム組成物は、いくつかの実施形態では、そのような非ヒト供給源から作製され、非ヒト標的細胞もしくは組織または対象に投与することができる。

【0653】

フソソーム組成物は、標的に対して自家、同種異系、または異種であることができる。

【0654】

追加の治療剤

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、追加の薬剤、例えば、治療剤、と共に、対象、例えば、レシピエント、例えば、本明細書に記載のレシピエントに同時投与される。いくつかの実施形態において、同時投与される治療剤は、免疫抑制剤、例えば、グルココルチコイド（例えば、デキサメタゾン）、細胞増殖抑制剤（例えば、メトトレキサート）、抗体（例えば、ムロモナブーCD3）、またはイムノフィリンモジュレーター（例えば、シクロスポリンまたはラパマイシン）である。実施形態において、免疫抑制剤は、フソソームの免疫媒介性クリアランスを減少させる。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫刺激剤、例えば、アジュバント、インターロイキン、サイトカイン、またはケモカインと同時投与される。

【0655】

いくつかの実施形態において、フソソーム組成物および免疫抑制剤は、同時に投与され、例えば、同じ時間に投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫抑制剤の投与前に投与される。いくつかの実施形態において、フソソーム組成物は、免疫抑制剤の投与後に投与される。

【0656】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤は、イブプロフェン、アセトアミノフェン、シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸、シクロホスファミド、グルココルチコイド、シロリムス、アザスリオピン、またはメトトレキサートなどの小分子である。

【0657】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤は抗体分子であり、限定されないが、ムロノマブ（抗CD3）、ダクリズマブ（抗IL12）、バシリキシマブ、インフリキシマブ（抗TNF α ）、またはリツキシマブ（抗CD20）が含まれる。

【0658】

いくつかの実施形態において、免疫抑制剤とのフソソーム組成物の同時投与は、フソソーム組成物単独の投与と比較して、対象におけるフソソーム組成物の増強された持続性をもたらす。いくつかの実施形態において、同時投与におけるフソソーム組成物の増強された持続性は、単独で投与された場合のフソソーム組成物の持続性と比べて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上長い。いくつかの実施形態において、同時投与におけるフソソーム組成物の増強された持続性は、単独で投与されたときのフソソーム組成物の残存と比べて、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、もしくは30日、またはそれ以上長い。

10

【実施例】

【0659】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために記載されているが、その範囲を制限することを意図されておらず、またそのように解釈されるべきではない。

【0660】

実施例1. 標的外細胞をアッセイしてレトロウイルス核酸送達の特異性を検出する

この実施例は、単一細胞におけるベクターコピー数を測定することによる、標的外レシピエント細胞における核酸の定量化を説明する。

20

【0661】

一実施形態では、処理されたマウスは、標的外細胞において、未処理のマウス、例えば、ベクターなし、からのものと同様なベクターコピー数、または陰性コントロールレベルと同様なベクターコピー数を有する。一実施形態では、処理されたマウスは、未処理のマウス、例えば、細胞なし、からのものと同様な、ベクターを含む標的外細胞のパーセント、または陰性コントロールレベルと同様な細胞数を有する。

【0662】

この実施例では、標的外レシピエント細胞はCD11c+細胞である。しかし、このプロトコルは、好適な表面マーカーが存在し、対象から単離することができる任意の細胞タイプに適応され得る。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

30

【0663】

マウスは、本明細書で説明されるように生成されたレトロウイルスベクターまたはPBS（陰性コントロール）によって処理される。処理の28日後、レトロウイルスベクターを受けたマウスおよびPBS処理を受けたマウスから末梢血を収集する。血液は5 μ MのEDTAを含有する1mlのPBSに収集され、直ちに混合して凝固を防止する。チューブを氷上に維持し、赤血球は緩衝化塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して取り除く。細胞は、細胞染色緩衝液（Biolegend カタログ番号：420201）中で10分間Fcブロッキング（Biolegend カタログ番号：101319）した後、ネズミCD11c：APC-Cy7抗体（Biolegend カタログ番号：117323）またはアイソタイプコントロールAPC-Cy7抗体（Biolegend カタログ番号：400230）によって暗所で4 $^{\circ}$ C、30分間染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞をFACS Aria（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）で、FACS Diva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）を実行して、640nmレーザー励起および780-/+60nmで収集された発光によって分析し、アイソタイプコントロールAPC-Cy7抗体標識細胞を使用して陰性ゲートを設定する。APC-Cy7陽性細胞は、ベクターコピー数分析のためにプレートの単一ウェルに分類される。

40

【0664】

50

ベクターコピー数を、シングルセルネステッドPCRを使用して評価する。PCRは、ベクターおよび内因性コントロール遺伝子に特異的なプライマーおよびプローブを使用したqPCRで実施する。ベクターコピー数は、ベクターのqPCRシグナルの量を内因性のコントロール遺伝子のqPCRシグナルの量で除することによって決定される。ベクターを受けた細胞は、少なくとも1.0のベクターコピー数を有する。ベクターコピー数は、複数の細胞のベクターコピー数を平均することによって、集団にわたって評価される。

【0665】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターで処置されたマウスは、ビヒクルで処置されたマウスからのものと同様な標的外細胞における平均ベクターコピー数を有する。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターで処理されたマウスは、ビヒクルで処理され処理されたマウスからのものと同様な、ベクターを受けた標的外細胞のパーセントを有する。

10

【0666】

実施例2. 標的外細胞をアッセイして外因性タンパク質剤の送達の特異性を検出する

この実施例は、単一細胞における外因性薬剤の発現による、標的外レシピエント細胞における外因性薬剤の発現の定量化を説明する。

【0667】

一実施形態では、処理されたマウスは、未処理のマウスからのものと同様な、標的外細胞における外因性薬剤発現を有する。一実施形態では、処理されたマウスは、未処理のマウスからのものと同様な、外因性薬剤を発現する標的外細胞のパーセントを有する。

20

【0668】

この実施例では、標的外レシピエント細胞はCD11c+細胞である。しかし、このプロトコルは、好適な表面マーカーが存在し、対象から単離することができる任意の細胞タイプに適応され得る。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。この実施例では、外因性薬剤は蛍光タンパク質であり、発現はフローサイトメトリーによって測定される。他の実施形態では、外因性タンパク質剤の発現は、タンパク質について免疫染色を用いて測定され得る。他の実施形態では、外因性タンパク質剤の発現は、顕微鏡検査またはウエスタンブロットを介して測定され得る。

【0669】

30

マウスは、本出願で説明される方法のいずれかを介して生成されたtdtomato蛍光タンパク質剤を有するレトロウイルスベクターによって、またはPBS（陰性コントロール）によって処理される。処理の28日後、レトロウイルスベクターを受けたマウスおよびPBS処理を受けたマウスから末梢血を収集する。血液は5μMのEDTAを含有する1mlのPBSに収集され、直ちに混合して凝固を防止する。チューブを氷上に維持し、赤血球は緩衝化塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して取り除く。細胞は、細胞染色緩衝液（Biolegend カタログ番号：420201）中で10分間Fcブロッキング（Biolegend カタログ番号：101319）した後、ネズミCD11c：APC-Cy7抗体（Biolegend カタログ番号：117323）またはアイソタイプコントロールAPC-Cy7抗体（Biolegend カタログ番号：400230）によって暗所で4℃、30分間染色する。PBSで2回洗浄した後、FACS Diva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）を実行して、FACS Aria（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）で細胞を分析する。CD11cの陰性ゲートは、アイソタイプコントロールAPC-Cy7抗体標識細胞を使用し、640nmのレーザー励起および780-/+60で収集された発光で設定する。tdtomato発現での陰性ゲートは、ビヒクルで処理されたマウスから分離された細胞によって、552nmのレーザー励起および585-/+42nmで収集された発光で設定する。

40

【0670】

tdtomato陽性であるCD11c+細胞のパーセントを測定する。いくつかの実

50

施形態において、*tdtomato*陽性であるCD11c+細胞のパーセントは、処置マウスおよび未処理マウスからの細胞において同様である。*tdtomato*蛍光レベルの中央値はCD11c+細胞で測定される。いくつかの実施形態において、CD11c+細胞における*tdtomato*蛍光レベルの中央値は、処置マウスおよび未処置マウスからの細胞において同様である。

【0671】

実施例3．標的細胞をアッセイしてレトロウイルス核酸送達の特異性を検出する

この実施例は、単一細胞におけるベクターコピー数を測定することによる、標的レシピエント細胞における核酸の定量化を説明する。

【0672】

一実施形態では、処置されたマウスは、未処置マウスからのものよりも、標的細胞における高いベクターコピー数を有する。一実施形態では、処理されたマウスは、ベクターを含む標的細胞のパーセントが、未処理マウスよりも高い。

【0673】

この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞である。しかし、このプロトコルは、好適な表面マーカーが存在し、対象から単離することができる任意の細胞タイプに適応され得る。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

【0674】

マウスをレトロウイルスベクターで処理し、血液試料を実施例1で前述されたように収集する。細胞は、マウスCD3:APC-Cy7抗体(Biolegend カタログ番号:100330)または実施例1で前述されたプロトコルを使用したアイソタイプコントロールによって染色する。ベクターのコピー数は、実施例1で説明されたようにシングルセルネステッドPCRを使用して評価する。

【0675】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターで処理されたマウスは、ビヒクルで処理されたマウスからのものよりも、標的細胞における高い平均ベクターコピー数を有する。いくつかの実施形態では、レトロウイルスベクターで処理され処理されたマウスは、ビヒクルで処理されたマウスからのものよりも、ベクターを受容した標的細胞の高いパーセントを有する。

【0676】

実施例4．標的細胞をアッセイして外因性タンパク質剤の送達の特異性を検出する

この実施例は、単一細胞における外因性タンパク質剤の発現による、標的レシピエント細胞における外因性タンパク質剤の発現の定量化を説明する。

【0677】

一実施形態では、処置されたマウスは、処置されていないマウスからのものよりも、標的細胞においてより高い外因性タンパク質剤の発現を有する。一実施形態では、処理されたマウスは、未処理マウスからのものよりも、外因性タンパク質剤を発現する標的細胞の高いパーセントを有する。

【0678】

この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞である。しかし、このプロトコルは、好適な表面マーカーが存在し、対象から単離することができる任意の細胞タイプに適応され得る。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。この例では、外因性タンパク質剤は蛍光タンパク質であり、発現はフローサイトメトリーによって測定される。他の実施形態では、外因性タンパク質剤の発現は、タンパク質について免疫染色を用いて測定され得る。他の実施形態では、外因性タンパク質剤の発現は、顕微鏡検査またはウエスタンブロットを介して測定され得る。

【0679】

マウスをレトロウイルスベクターで処理し、血液試料を実施例2で前述されたように収

10

20

30

40

50

集する。細胞をマウスCD3:APC-Cy7抗体(Biolegend カタログ番号:100330)またはアイソタイプコントロールを用いて染色し、実施例2で説明されるプロトコルを使用してフローサイトメトリーによって分析する。

【0680】

tdtomato陽性であるCD3+細胞のパーセントが測定される。いくつかの実施形態において、tdtomato陽性であるCD3+細胞のパーセントは、未処理マウスよりも処理されたマウスからの細胞で高い。tdtomato蛍光レベルの中央値はCD3+細胞で測定される。いくつかの実施形態において、CD3+細胞におけるtdtomato蛍光レベルの中央値は、未処理マウスよりも処理されたマウスからの細胞で高い。

【0681】

実施例5. PBMC細胞溶解によって媒介される減少した細胞毒性のためのHLA-GまたはHLA-Eによるレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、末梢血単核細胞(PBMC)による細胞溶解に起因する細胞毒性の低下を有するように改変された細胞に由来するレトロウイルスベクターを説明する。

【0682】

一実施形態では、PBMCによるレトロウイルスベクターの細胞毒性媒介細胞溶解は、溶解がレトロウイルスベクターの活性を低減、例えば、阻害または停止するとき、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度である。

【0683】

レトロウイルスベクターは、未改変細胞(以後、NMC、陽性コントロール)、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞(以後、NMC-HLA-G)、および空ベクターコントロールでトランスフェクトされた細胞(以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール)から作成される。

【0684】

レトロウイルスベクターのPBMC媒介性溶解は、Boumaら、Hum. Immunol. 35(2):85-92;1992、およびvanBesouwら、Transplantation 70(1):136-143;2000で報告されているユーロピウム放出アッセイによって決定する。PBMC(以後、エフェクター細胞)を適切なドナーから単離し、丸底96ウェルプレート中で同種異系のガンマ線照射したPBMCおよび200IU/mLのIL-2(プロロイキン、Chiron BV、アムステルダム、オランダ)によって37°Cで7日間刺激する。レトロウイルスベクターは、ユーロピウム-ジエチレントリアミンペンタアセテート(DTPA)(sigma、セントルイス、MO、米国)で標識化する。

【0685】

7日目に、細胞毒性媒介溶解アッセイを、 ^63Eu 標識レトロウイルスベクターをエフェクター細胞と96ウェルプレートで、1000:1~1:1および1:1.25~1:1000の範囲のエフェクター/標的比でプレートに加えてから、1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、または48時間インキュベートすることによって実施する。インキュベーション後、プレートを遠心分離し、上清の試料を、バックグラウンド蛍光の低い96ウェルプレート(フルオロイムノプレート、Nunc、ロスキレ、デンマーク)に移す。

【0686】

続いて、増強溶液(PerkinElmer、フローニンゲン、オランダ)を各ウェルに加える。放出されるユーロピウムを、時間分解蛍光光度計(Victor1420マルチラベルカウンター、LKB-Wallac、フィンランド)で測定する。蛍光は1秒あたりのカウント数(CPS)で表される。標的レトロウイルスベクターによるユーロピウムの最大放出パーセントは、レトロウイルスベクターの適切な数($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)を1%トリトン(シグマアルドリッチ)と適切な時間インキュベートすることによって決定される。標的レトロウイルスベクターによるユーロピウムの自発的放出は、エフェクター細胞が添加されない標識化された標的レトロウイルスベクターのインキュベーション

10

20

30

40

50

によって測定される。次に、漏出のパーセントは、 $(\text{自発的放出} / \text{最大放出}) \times 100\%$ として計算される。細胞毒性媒介溶解のパーセンテージは、 $\text{溶解}\% = [(\text{測定された溶解} - \text{自発的溶解} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})] \times 100\%$ として計算される。データは、異なるエフェクター標的比の関数として溶解のパーセントを調べることによって分析される。

【0687】

一実施形態では、NMC-HLA-G細胞から生成されたレトロウイルスベクターは、NMCまたはNMC空ベクターから生成されたレトロウイルスベクターと比較して、特定の時点で標的細胞による溶解の減少したパーセントを有する。

【0688】

実施例6．減少したNK溶解活性のためのHLA-GまたはHLA-Eによるレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、NK細胞による細胞毒性媒介細胞溶解を減少させるように改変されている細胞源に由来するレトロウイルスベクター組成物の生成を説明する。一実施形態では、NK細胞によるレトロウイルスベクターの細胞毒性媒介細胞溶解は、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度である。

【0689】

レトロウイルスベクターは、未改変細胞（以後、NMC、陽性コントロール）、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-HLA-G）、および空ベクターコントロールでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール）から作成される。

【0690】

レトロウイルスベクターのNK細胞媒介性溶解は、Boumaら、Hum. Immunol. 35 (2) : 85-92 ; 1992、およびvan Besouwら、Transplantation 70 (1) : 136-143 ; 2000で報告されているユーロピウム放出アッセイによって決定する。NK細胞（以後、エフェクター細胞）を、Cropら、Cell transplantation (20) : 1547-1559 ; 2011における方法に従って適切なドナーから単離し、丸底96ウェルプレート中で同種異系のガンマ線照射したPMBcおよび200 IU/mLのIL-2（プロロイキン、Chiron BV、アムステルダム、オランダ）によって37°Cで7日間刺激する。レトロウイルスベクターは、ユーロピウム-ジエチレントリアミンペンタアセテート（DTPA）（sigma、セントルイス、MO、米国）で標識化する。細胞毒性媒介溶解アッセイおよびデータ分析は、実施例5で前述されたように実施する。

【0691】

一実施形態では、NMC-HLA-G細胞から生成されたレトロウイルスベクターは、NMCまたはNMC空ベクターから生成されたレトロウイルスベクターと比較して、特定の時点で標的細胞による溶解の減少したパーセントを有する。

【0692】

実施例7．減少したCD8キラーT細胞溶解のためのHLA-GまたはHLA-Eによるレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、CD8+細胞による細胞毒性媒介細胞溶解を減少させるように改変されている細胞源に由来するレトロウイルスベクター組成物の生成を説明する。一実施形態では、CD8+細胞によるレトロウイルスベクターの細胞毒性媒介細胞溶解は、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度である。

【0693】

レトロウイルスベクターは、未改変細胞（以後、NMC、陽性コントロール）、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-HLA-G）、および空ベクターコントロールでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール）から作成される。

【0694】

10

20

30

40

50

レトロウイルスベクターのCD8+細胞媒介性溶解は、Boumaら、Hum. Immunol. 35 (2) : 85-92 ; 1992、およびvan Besouwら、Transplantation 70 (1) : 136-143 ; 2000で報告されているユーロピウム放出アッセイによって決定する。CD8+細胞（以後、エフェクター細胞）を、Cropら、Cell transplantation (20) : 1547-1559 ; 2011における方法に従って適切なドナーから単離し、丸底96ウェルプレート中で同種異系のガンマ線照射したPMBCおよび200 IU/mLのIL-2（プロロイキン、Chiron BV、アムステルダム、オランダ）によって37℃で7日間刺激する。レトロウイルスベクターは、ユーロピウム-ジエチレントリアミンペンタアセテート（DTPA）（sigma、セントルイス、MO、米国）で標識化する。細胞毒性媒介溶解アッセイおよびデータ分析は、実施例5で前述されたように実施する。

10

【0695】

一実施形態では、NMC-HLA-G細胞から生成されたレトロウイルスベクターは、NMCまたはNMC空ベクターから生成されたレトロウイルスベクターと比較して、特定の時点で標的細胞による溶解の減少したパーセントを有する。

【0696】

実施例8：マクロファージ食作用を回避するためのCD47によるレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、改変レトロウイルスベクターによる食作用の回避の定量化を説明する。一実施形態では、改変されたレトロウイルスベクターは、マクロファージによる食作用を回避する。

20

【0697】

細胞は食作用に関与し、粒子を貪食し、細菌や死んだ細胞などの外来侵入物の隔離および破壊を可能にする。いくつかの実施形態において、マクロファージによるレンチウイルスベクターの食作用は、それらの活性を低下させるであろう。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターの食作用は、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度である。

【0698】

レトロウイルスベクターは、CD47を欠く細胞（以後、NMC、陽性コントロール）、CD47 cDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-CD47）、および空ベクターコントロールでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール）から生成される。レトロウイルスベクター生成前に、細胞はCSFEで標識化される。

30

【0699】

マクロファージを媒介した免疫クリアランスの低下は、以下のプロトコルに従った食作用アッセイによって決定される。マクロファージを、収集後直ちに共焦点ガラス底皿に播種する。マクロファージをDMEM+10% FBS+1% P/Sで1時間インキュベートして付着させる。NMC、NMC-CD47、NMC-空ベクターから生成された適切な数のレトロウイルスベクターを、プロトコルに示されるようにマクロファージに加え、2時間インキュベートする、tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdf。

40

【0700】

2時間後、皿を穏やかに洗浄し、細胞内蛍光を検査する。貪食されたレトロウイルス粒子によって放出された細胞内蛍光は、488励起で共焦点顕微鏡によって画像化する。食作用陽性マクロファージの数は、画像化ソフトウェアを使用して定量化する。データは、食作用指数 = (貪食された細胞の総数 / カウントされたマクロファージの総数) × (貪食された細胞を含むマクロファージの数 / カウントされたマクロファージの総数) × 100として表される。

【0701】

一実施形態では、食作用指数は、マクロファージがNMC-CD47に由来するレトロ

50

ウイルスベクターとインキュベートされるとき、N M CまたはN M C空ベクターに由来するものと比べて低下する。

【0702】

実施例9：補体を回避するための補体調節タンパク質によるレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、インビトロアッセイを使用したレトロウイルスベクターに対する補体活性の定量化を説明する。いくつかの実施形態において、本明細書で説明される改変レトロウイルスベクターは、非改変レトロウイルスベクターと比較して、低下した補体活性を有する。

【0703】

この実施例では、マウスからの血清を、レトロウイルスベクターに対する補体活性について評価する。この実施例では、すべての補体経路における中心節点である補体C3aのレベルを測定する。本明細書で説明される方法は、プロトコルに最適化されたヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

【0704】

この実施例では、レトロウイルスベクターは、補体調節タンパク質DAFをコードするcDNAでトランスフェクトされたHEK293細胞(HEK293-DAFレトロウイルスベクター)または相補的調節タンパク質を発現しないHEK293細胞(HEK293レトロウイルスベクター)から生成される。他の実施形態では、他の補体調節タンパク質が使用され、崩壊促進因子(DAF、CD55)、例えばH因子(FH)様タンパク質-1(FHL-1)、例えばC4b結合タンパク質(C4BP)、例えば補体受容体1(CD35)、例えば膜補因子タンパク質(MCP、CD46)、例えばプロフェクチン(CD59)、例えば古典的および代替補体経路CD/C5コンバーターゼ酵素を阻害するタンパク質、例えばMACアセンブリを調節するタンパク質などが挙げられる。

【0705】

血清は、ナイーブマウス、HEK293-DAFレトロウイルスベクターを投与されたマウス、またはHEK293レトロウイルスベクターを投与されたマウスから回収される。血清はマウスから、新鮮な全血を採取し、数時間完全に凝固させることによって収集する。遠心分離によって血餅をペレット化し、血清上清を取り出す。陰性コントロールは、熱不活性化マウス血清である。陰性コントロール試料は、摂氏56度で1時間加熱する。血清は小分けして冷凍し得る。

【0706】

異なるレトロウイルスベクターを、標的細胞集団における細胞の50%がレトロウイルスベクター中の外因性薬剤を受容する用量について試験する。レトロウイルスベクターは、本明細書で説明される外因性薬剤のいずれかを含み得る。外因性薬剤のレシピエント細胞へのレトロウイルス送達をアッセイするための多くの方法もまた、本明細書で説明される。この特定の例では、外因性薬剤はCreタンパク質(レトロウイルス核酸によってコードされる)であり、標的細胞は、CMVプロモーターの下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP」カセットを安定して発現するRPMI8226細胞であり、Creによる組換えで、送達のマーカーとして、GFPからRFP発現に切り替える。レシピエント細胞の50%がRFP陽性であると特定された用量は、さらなる実験に使用される。いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の50%が外因性薬剤を受容することが特定された用量は、レトロウイルスベクターにわたって同様であるであろう。

【0707】

レトロウイルスベクターのリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.4)による2倍希釈液を、標的細胞の50%が外因性薬剤を受容するレトロウイルスベクターの用量から開始し、同一レトロウイルスベクターで処理されたマウスまたはナイーブマウスからの血清の1:10希釈液と混合し(アッセイ容量、20μl)、37℃で1時間インキュベートする。試料はさらに1:500に希釈し、C3aに特異的な酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)に使用する。ELISAは、LifeSpan BioSciences Incによって販売されてるマウス補体C3a ELISAキット製品LS-F4210であ

10

20

30

40

50

り、試料中のC3a濃度を測定する。200pg/mlのC3aが存在するレトロウイルスベクターの用量を、マウスから単離された血清にわたって比較する。

【0708】

いくつかの実施形態では、200pg/mlのC3aが存在するレトロウイルスベクターの用量は、HEK293マウス血清とインキュベートされたHEK293レトロウイルスベクターよりも、HEK-293DAFマウス血清とインキュベートされたHEK293-DAFレトロウイルスベクターの方が高く、レトロウイルスベクターを標的とする補体活性は、HEK293-DAFレトロウイルスベクターよりもHEK293レトロウイルスベクターで処理されたマウスの方が高いことを示す。いくつかの実施形態では、200pg/mlのC3aが存在するレトロウイルスベクターの用量は、ナイーブマウス血清とインキュベートされたHEK293レトロウイルスベクターよりもナイーブマウス血清とインキュベートされたHEK293-DAFレトロウイルスベクターの方が高く、レトロウイルスを標的とする補体活性は、HEK293-DAFレトロウイルスベクターよりもHEK293レトロウイルスベクターで処理されたマウスの方が高いことを示す。

【0709】

実施例10：免疫原性タンパク質をノックダウンして免疫原性を低下させるためのレトロウイルスベクターの改変

この実施例は、免疫原性である分子の発現を減少させるように改変された細胞源に由来するレトロウイルスベクター組成物の生成、および減少した発現の定量化を説明する。一実施形態では、レトロウイルスベクターは、免疫原性である分子の発現を低下させるように改変されている細胞源に由来することができる。

【0710】

免疫応答を刺激する治療法は、治療効能を低下させ、または、レシピエントに毒性を生じる可能性がある。したがって、免疫原性は、安全で有効な治療用レトロウイルスベクターにとって重要な特性である。特定の免疫活性化剤の発現は、免疫応答を引き起こすことができる。MHCクラスIは、免疫活性化剤の一例である。

【0711】

レトロウイルスベクターを、通常MHC-1を発現する非改変細胞（以後、NMC、陽性コントロール）、MHCクラスIを標的とするshRNAをコードするDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-shMHCクラスI）、および非標的スクランブルshRNAベクターコントロールをコードするDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-ベクターコントロール、陰性コントロール）から生成する。レトロウイルス生成前に、細胞はCSFEで標識化される。

【0712】

レトロウイルスベクターを、フローサイトメトリーを使用してMHCクラスIの発現についてアッセイする。適切な数のレトロウイルスベクターを洗浄し、PBSに再懸濁化させ、MHCクラスI（Harlan Sera-Lab、ベルトン、英国）に対する蛍光結合モノクローナル抗体の1:10~1:4000希釈液と共に氷上で30分間維持する。レトロウイルスベクターをPBSで3回洗浄し、PBSに再懸濁化させる。非特異的蛍光は、同等の希釈率で適切な蛍光結合アイソタイプコントロール抗体とインキュベートしたレトロウイルスベクター調製物の等量を使用して決定する。レトロウイルスベクターをフローサイトメーター（FACS sort、Becton-Dickinson）でアッセイし、データをフロー分析ソフトウェア（Becton-Dickinson）で分析する。

【0713】

NMC、NMC-shMHCクラスI、およびNMC-ベクターコントロールに由来するレトロウイルスベクターの平均蛍光データを比較する。一実施形態では、NMC-shMHCクラスIに由来するレトロウイルスベクターは、NMCおよびNMC-ベクターコントロールと比較して、MHCクラスIの低い発現を有する。

【0714】

実施例 11：レトロウイルスベクターの既存血清不活性化を測定する

この実施例は、インビトロ送達アッセイを使用してレトロウイルスベクターの既存血清不活性化の定量化を説明する。

【0715】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度は、血清不活性化である。レトロウイルスベクターの血清不活性化は、抗体を媒介した中和または補体を媒介した分解に起因し得る。一実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターのいくつかのレシピエントは、レトロウイルスベクターと結合して不活性化するこれらの血清中の因子を有する。

【0716】

この実施例では、レトロウイルスベクターナীবマウスを、血清中のレトロウイルスベクターを不活性化する因子の存在について評価する。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

【0717】

陰性コントロールは熱不活性化マウス血清であり、陽性コントロールは異種供給源細胞から生成されたレトロウイルスベクターの複数回の注射を受けたマウスに由来する血清である。血清はマウスから、新鮮な全血を採取し、数時間完全に凝固させることによって収集する。遠心分離によって血餅をペレット化し、血清上清を取り出す。陰性コントロール試料は、摂氏 56 度で 1 時間加熱する。血清は小分けして冷凍し得る。

【0718】

レトロウイルスベクターは、実施例 9 で前述されたように、標的細胞集団中の細胞の 50 % がレトロウイルスベクター中の外因性薬剤を受容する用量について試験する。

【0719】

レトロウイルスベクターの血清不活性化を評価するために、レトロウイルスベクターを正常または熱不活性化血清（または無血清コントロールとして 10 % 熱不活性化 FBS を含むメディウム）に 1 : 5 に希釈し、混合物を 37 °C で 1 分間インキュベートする。インキュベーション後、メディウムを反応液に加えてさらに 1 : 5 に希釈し、1 : 10 の比率で連続して 2 回希釈する。このステップに続いて、レトロウイルスベクターは、レシピエント細胞の 50 % が外因性薬剤を受容する（例えば RFP 陽性）既に特定された用量で存在するはずである。

【0720】

次に、血清に曝露されているレトロウイルスベクターを標的細胞と共にインキュベートする。外因性薬剤を受容する細胞、したがって RFP 陽性である細胞のパーセントを計算する。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、レトロウイルスベクターナীবマウスからの血清および熱不活性化血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料との間で異ならず、レトロウイルスベクターの血清不活性化がないことを示す。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、レトロウイルスベクターナীবマウスからの血清と共にインキュベートされたレトロウイルスベクター試料と無血清コントロールインキュベーションとの間で異ならず、レトロウイルスベクターの血清不活性化がないことを示す。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、レトロウイルスベクターナীবマウスからの血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料よりも、陽性コントロール血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料において低く、レトロウイルスベクターの血清不活性化がないことを示す。

【0721】**実施例 12：複数回投与後のレトロウイルスベクターの血清不活性化を測定する**

この実施例は、レトロウイルスベクターの複数回投与後のインビトロ送達アッセイを使用して、レトロウイルスベクターの血清不活性化の定量化を説明する。一実施形態において、例えば、本明細書で説明される方法によって改変された、改変レトロウイルスベクターは、改変レトロウイルスベクターの複数回（例えば 1 回超、例えば 2 回以上）の投与後

10

20

30

40

50

に、低下した（非改変レトロウイルスベクターの投与と比較して低下した）血清不活性化を有するであろう。一実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターは、複数回の投与後に血清によって不活性化されないであろう。

【0722】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターにおける免疫原性の尺度は、血清不活性化である。一実施形態では、レトロウイルスベクターの反復注入は、抗レトロウイルスベクター抗体、例えば、レトロウイルスベクターを認識する抗体の発生をもたらし得る。一実施形態では、レトロウイルスベクターを認識する抗体は、レトロウイルスベクターの活性または寿命を制限し、補体分解を媒介することができる様式で結合することができる。

10

【0723】

この実施例では、レトロウイルスベクターの1回以上の投与後に血清不活性化を検査する。レトロウイルスベクターは、先の実施例のいずれかによって生成される。この例では、レトロウイルスは、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-HLA-G）、および空ベクターコントロール（以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール）でトランスフェクトされた細胞から作成される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、他の免疫調節タンパク質を発現している細胞に由来する。

【0724】

血清は、ビヒクル（レトロウイルスベクターナイズ群）、HEK293-HLA-Gレトロウイルスベクター、またはHEK293レトロウイルスベクターの1、2、3、5、または10回注入によって全身および／または局所注入されたマウスである、異なるコホートから採取される。血清はマウスから、新鮮な全血を採取し、数時間完全に凝固させることによって収集する。遠心分離によって血餅をペレット化し、血清上清を取り出す。陰性コントロールは、熱不活性化マウス血清である。陰性コントロール試料は、摂氏56度で1時間加熱する。血清は小分けして冷凍し得る。

20

【0725】

レトロウイルスベクターは、実施例9で前述されたように、標的細胞集団中の細胞の50%がレトロウイルスベクター中の外因性薬剤を受容する用量について試験する。

【0726】

レトロウイルスベクターの血清不活性化を評価するために、レトロウイルスベクターを血清に曝露し、上記の実施例11で説明されるように標的細胞と共にインキュベートする。

30

【0727】

外因性薬剤を受容する細胞、したがってRFP陽性である細胞のパーセントを計算する。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、HEK293-HLA-Gレトロウイルスベクターで処理されたマウスからの血清および熱不活性化血清と共にインキュベートされているレトロウイルスベクター試料の間で異ならず、レトロウイルスベクターの不活性化または適応免疫応答がないことを示す。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、HEK293-HLA-Gレトロウイルスベクターで1、2、3、5、または10回処理されたマウスからインキュベートされたレトロウイルスベクター試料間で異ならず、レトロウイルスベクターの血清不活性化または適応免疫応答がないことを示す。いくつかの実施形態において、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、ビヒクルで処理されたマウスおよびHEK293-HLA-Gレトロウイルスベクターで処理されたマウスからの血清と共にインキュベートされたレトロウイルスベクター試料間で異ならず、レトロウイルスベクターの血清不活性化または適応免疫応答がないことを示す。いくつかの実施形態では、外因性薬剤を受容する細胞のパーセントは、HEK293-HLA-GレトロウイルスベクターよりもHEK293由来のレトロウイルスベクターの方が低く、HEK293-HLA-Gレトロウイルスベクターの血清不活性化または適応免疫応答がないことを示す。

40

【0728】

50

実施例 13：レトロウイルスベクターに対して反応性である既存の I g G および I g M 抗体を測定する

この実施例は、フローサイトメトリーを使用して測定された既存の抗レトロウイルスベクター抗体価の定量化について説明する。

【0729】

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度は、抗体応答である。レトロウイルスベクターを認識する抗体は、レトロウイルスベクターの活性または寿命を制限することができる様式で結合することができる。一実施形態では、本明細書で説明されるレトロウイルスベクターのいくつかのレシピエントは、レトロウイルスベクターと結合して認識する既存の抗体を有する。

10

【0730】

この実施例では、抗レトロウイルスベクター抗体力価は、異種供給源細胞を使用して生成されたレトロウイルスベクターを使用して試験される。この実施例では、レトロウイルスベクターナイーブマウスを抗レトロウイルスベクター抗体の存在について評価する。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。

【0731】

陰性コントロールは、I g M および I g G が枯渇しているマウス血清であり、陽性コントロールは、異種供給源細胞から生成されたレトロウイルスベクターの複数回注入を受けたマウスに由来する血清である。

20

【0732】

レトロウイルスベクターと結合する既存の抗体の存在を評価するために、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清を最初に 56℃ で 30 分間加熱してすることによって最初に補体除去し、続いて 3% F C S および 0.1% N a N 3 を含有する P B S で 33% に希釈する。等量の血清およびレトロウイルスベクター ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ レトロウイルスベクター / mL) 懸濁液を 4℃ で 30 分間インキュベートし、仔ウシ血清クッションを介して P B S で洗浄する。

【0733】

I g M 異種反応性抗体は、レトロウイルスベクターをマウス I g M の F c 部分に特異的な P E 結合ヤギ抗体 (B D B i o s c i e n c e) と 4℃ で 45 分間インキュベートすることによって染色する。特に、抗マウス I g G 1 または I g G 2 二次抗体も使用し得る。全群からのレトロウイルスベクターを 2% F C S を含む P B S で 2 回洗浄し、F A C S システム (B D B i o s c i e n c e s) で分析する。蛍光データは、対数増幅の使用によって収集し、平均蛍光強度として表す。

30

【0734】

一実施形態では、陰性コントロール血清は、無血清または二次単独コントロールに匹敵する無視できる蛍光を示す。一実施形態では、陽性対照は、陰性対照よりも強い蛍光、および無血清または二次単独コントロールよりも強く示す。一実施形態では、免疫原性が生じる場合、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清は、陰性コントロールよりも強い蛍光を示す。一実施形態では、免疫原性が生じない場合、レトロウイルスベクターナイーブマウスからの血清は、陰性コントロールと比較して同様の蛍光を示す。

40

【0735】

実施例 14：レトロウイルスベクターの複数回投与後の I g G および I g M 抗体応答を測定する

この実施例は、改変レトロウイルスベクターの複数回投与後の改変レトロウイルスベクターの体液性応答の定量化を説明する。一実施形態において、改変レトロウイルスベクター、例えば、本明細書で説明される方法によって改変された改変レトロウイルスベクターの複数回 (例えば 1 回超、例えば 2 回以上) の投与後に、低下した (非改変レトロウイルスベクターの投与と比較して低下した) 体液性応答を有する。

【0736】

50

いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターの免疫原性の尺度は、抗体応答である。一実施形態では、レトロウイルスベクターの反復注入は、抗レトロウイルスベクター抗体、例えば、レトロウイルスベクターを認識する抗体の発生をもたらし得る。一実施形態では、レトロウイルスベクターを認識する抗体は、レトロウイルスベクターの活性または寿命を制限することができる様式で結合し得る。

【0737】

この実施例では、抗レトロウイルスベクター抗体力価は、レトロウイルスベクターの1回以上の投与後に検査される。レトロウイルスベクターは、先の実施例のいずれかによって生成される。この実施例では、レトロウイルスは、免疫調節タンパク質でトランスフェクトされていない細胞（NMC）、HLA-GまたはHLA-E cDNAでトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-HLA-G）、および空ベクターコントロール細胞でトランスフェクトされた細胞（以後、NMC-空ベクター、陰性コントロール）から作成される。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、他の免疫調節タンパク質を発現している細胞に由来する。

【0738】

血清は、ビヒクル（レトロウイルスベクターナリーブ群）、NMCレトロウイルスベクター、NMC-HLA-Gレトロウイルスベクター、またはNMC空ベクターレトロウイルスベクターの1、2、3、5、または10回注入によって全身および／または局所注入されたマウスである、異なるコホートから採取される。

【0739】

抗レトロウイルスベクター抗体の存在および量を評価するために、マウスからの血清を最初に56℃で30分間加熱して補体除去し、続いて3% FCSと0.1% NaN₃を含むPBSで33%に希釈する。等量の血清およびレトロウイルスベクター（ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ レトロウイルスベクター/mL）を4℃で30分間インキュベートし、仔ウシ血清クッションを介してPBSで洗浄する。

【0740】

レトロウイルスベクター反応性IgM抗体は、レトロウイルスベクターをマウスIgMのFc部分に特異的なPE結合ヤギ抗体（BD Bioscience）と4℃で45分間インキュベートすることによって染色する。特に、抗マウスIgG1またはIgG2二次抗体も使用し得る。全群からのレトロウイルスベクターを2% FCSを含むPBSで2回洗浄し、FACSシステム（BD Biosciences）で分析する。蛍光データは、対数増幅の使用によって収集し、平均蛍光強度として表す。

【0741】

一実施形態では、NMC-HLA-Gレトロウイルスベクターは、NMCレトロウイルスベクターまたはNMCが空のレトロウイルスベクターと比較して、注入後の抗ウイルスIgM（またはIgG1/2）抗体力価（FACSの蛍光強度によって測定されたとき）が減少する。

【0742】

実施例15：レトロウイルスベクターレシピエント細胞に対するIgGおよびIgM力価抗体応答を測定する

この実施例は、フローサイトメトリーを使用したレシピエント細胞（レトロウイルスベクターと融合した細胞）に対する抗体価の定量化を説明する。いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の免疫原性の尺度は、抗体応答である。レシピエント細胞を認識する抗体は、細胞の活性または寿命を制限することができる様式で結合し得る。一実施形態では、レシピエント細胞は、抗体応答の標的とならず、または抗体応答が対照レベルを下回る。

【0743】

この実施例では、対象（例えば、ヒト、ラット、またはサル）における抗レシピエント細胞抗体力価が試験される。さらに、プロトコルは、好適な表面マーカーが存在する任意の細胞タイプに適応され得る。この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞で

10

20

30

40

50

ある。

【0744】

マウスは、本出願で説明される方法のいずれかを介して生成されたレトロウイルスベクターまたはPBS（陰性コントロール）で5日間毎日処理する。最終処置の28日後、末梢血をレトロウイルスベクターを受けたマウスおよびPBS処理を受けたマウスから収集する。血液は5 μ MのEDTAを含有する1mLのPBSに収集され、直ちに混合して凝固を防止する。チューブを氷上に維持し、赤血球は緩衝化塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して取り除く。細胞を、ウシ血清アルブミンで10分間ブロッキングした後、ネズミCD3-FITC抗体（Thermo Fisher カタログ番号：11-0032-82）によって、暗所で4℃、30分間染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞をLSRII（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）で、FACS Diva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）を実行して、488nmのレーザー励起および530+/-30nmで収集した発光によって分析する。CD3+細胞を分類する。

10

【0745】

次に、反応混合物をマウスIgM（BD Bioscience）のFc部分に特異的なPE結合ヤギ抗体と4℃で45分間インキュベートすることによって、分類したCD3+細胞をIgM抗体で染色する。特に、抗マウスIgG1またはIgG2二次抗体も使用し得る。すべての群からの細胞を2%FCS含有PBSで2回洗浄し、次いでFACSシステム（BD Biosciences）で分析する。蛍光データは、対数増幅の使用によって収集し、平均蛍光強度として表す。平均蛍光強度を、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスからの分類されたCD3細胞について計算する。

20

【0746】

低い平均蛍光強度は、レシピエント細胞に対する低い体液性応答を示す。PBSで処理されたマウスは、低い平均蛍光強度を有することが予測される。一実施形態では、平均蛍光強度は、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスからのレシピエント細胞において同様である。

【0747】

実施例16：レトロウイルスベクターレシピエント細胞に対する食作用応答を測定する

30

この実施例は、食作用アッセイを用いたレシピエント細胞に対するマクロファージ応答の定量化を説明する。

【0748】

いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の免疫原性の尺度は、マクロファージ応答である。マクロファージは食作用に関与し、細胞を貪食し、細菌や死細胞などの外来侵入物の隔離および破壊を可能する。いくつかの実施形態において、マクロファージによるレシピエント細胞の食作用は、それらの活性を低下させる。

【0749】

一実施形態では、レシピエント細胞はマクロファージによって標的化されない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するマクロファージ応答が試験される。さらに、プロトコルは、好適な表面マーカーが存在する任意の細胞タイプに適応され得る。この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞である。

40

【0750】

マウスは、本出願で説明される方法のいずれかを介して生成されたレトロウイルスベクターまたはPBS（陰性コントロール）で5日間毎日処理する。最終処置の28日後、末梢血をレトロウイルスベクターを受けたマウスおよびPBS処理を受けたマウスから収集する。血液は5 μ MのEDTAを含有する1mLのPBSに収集され、直ちに混合して凝固を防止する。チューブを氷上に維持し、赤血球は緩衝化塩化アンモニウム（ACK）溶液を使用して取り除く。

【0751】

50

細胞をウシ血清アルブミンで10分間ブロッキングした後、マウスCD3-FITC抗体（Thermo Fisherカタログ番号：11-0032-82）によって、暗所で4℃、30分間染色する。PBSで2回洗浄した後、細胞をLSRII（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）で、FACSDiva（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ）を実行して、488nmのレーザー励起および530+/-30nmで収集した発光によって分析する。次に、CD3+細胞を分類する。

【0752】

食作用アッセイは、以下のプロトコルに従ってマクロファージ媒介性免疫クリアランスを評価するために実行する。マクロファージを、収集後直ちに共焦点ガラス底皿に播種する。マクロファージをDMEM+10%FBS+1%P/Sで1時間インキュベートして付着させる。レトロウイルスベクターおよびPBSを受けたマウスに由来する適切な数の分類されてFITC染色されたCD3+細胞を、プロトコルに示されるようにマクロファージに添加し、例えば、Vybrant（商標）Phagocytosis Assay Kitの製品情報インサート（Molecular Probes、2001年3月18日改訂、tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06694.pdfでみられる）に記載されるように、2時間インキュベートする。

【0753】

2時間後、皿を穏やかに洗浄し、細胞内蛍光を検査する。マクロファージを同定するために、細胞を最初にFc受容体ブロッキング抗体（eBioscienceカタログ番号14-0161-86、クローン93）と氷上で15分間インキュベートし、マクロファージで多量に発現されるFc受容体への標識化mAbの結合を遮断する。このステップに続いて、抗F4/80-PE（Thermo Fisherカタログ番号12-4801-82、クローンBM8）および抗CD11b-PerCP-Cy5.5（BD Biosciencesカタログ番号550993、クローンM1/70）結合抗体を添加してマクロファージ表面抗原を染色する。細胞を暗所で4℃で30分間インキュベートした後、遠心分離してPBSで洗浄する。次に、細胞をPBSに再懸濁させる。次に、試料のフローサイトメトリーを実施し、マクロファージは、それぞれ533nmおよび647nmのレーザー励起を使用したF4/80-PEおよびCD11b-PerCP-Cy5.5の陽性蛍光シグナルによって同定される。マクロファージをゲーティングした後、貪食されたレシピエント細胞によって放出される細胞内蛍光を、488nmレーザー励起によって評価する。食作用陽性マクロファージの数は、画像化ソフトウェアを使用して定量化する。データは、食作用指数=（貪食された細胞の総数/カウントされたマクロファージの総数）×（貪食された細胞を含むマクロファージの数/カウントされたマクロファージの総数）×100として表される。

【0754】

低い食作用指数は、低い食作用およびマクロファージによる標的化を示す。PBSで処理されたマウスは、低い食作用指数を有することが予想される。一実施形態では、食作用指数は、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞において同様である。

【0755】

実施例17：レトロウイルスベクターレシピエント細胞に対するPBMC応答を測定する
この実施例は、細胞溶解アッセイを用いるレシピエント細胞に対するPBMC応答の定量化を説明する。

【0756】

いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の免疫原性の尺度は、PBMC応答である。一実施形態では、PBMCによるレシピエント細胞の細胞毒性媒介細胞溶解は、溶解がレトロウイルスベクターの活性を低下、例えば、阻害または停止させるため、免疫原性の尺度である。

10

20

30

40

50

【0757】

一実施形態では、レシピエント細胞は、P B M C 応答を誘発しない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するP B M C 応答が試験される。

【0758】

さらに、プロトコルは、好適な表面マーカーが存在する任意の細胞タイプに適応され得る。この実施例では、標的レシピエント細胞はC D 3 +細胞である。

【0759】

マウスは、本出願で説明される方法のいずれかを介して生成されたレトロウイルスベクターまたはP B S（陰性コントロール）によって5日間毎日処理される。最終処理の28日後、末梢血をレトロウイルスベクターを受けたマウスおよびP B S 処理を受けたマウスから収集する。血液は5 μ MのE D T Aを含有する1 m lのP B Sに収集され、直ちに混合して凝固を防止する。チューブを氷上に維持し、赤血球は緩衝化塩化アンモニウム（A C K）溶液を使用して取り除く。細胞は、細胞染色緩衝液（B i o l g e n d カタログ番号：4 2 0 2 0 1）で10分間F cブロック（B i o l g e n d カタログ番号：1 0 1 3 1 9）した後、ネズミC D 3：A P C - C y 7抗体（B i o l g e n d カタログ番号：1 0 0 3 3 0）またはアイソタイプコントロールA P C - C y 7（I C：A P C - C y 7）抗体（B i o l g e n d カタログ番号：4 0 0 2 3 0）によって暗所で4℃、30分間染色する。P B Sで2回洗浄した後、細胞をF A C S A r i a（B D B i o s c i e n c e s、カリフォルニア州サンノゼ）で、F A C S D i v a（商標）ソフトウェア（B D B i o s c i e n c e s、カリフォルニア州サンノゼ）を実行して、640 nmレーザー励起および780 - / + 60 nmで収集された発光によって分析し、アイソタイプコントロールA P C - C y 7抗体標識細胞を使用して陰性ゲートを設定し、次いでA P C - C y 7陽性細胞を分類して収集する。次いで、分類したC D 3 +細胞は、C e l l M a s k（商標）G r e e n P l a s m a膜染色（C M G、T h e r m o F i s h e r カタログ番号：C 3 7 6 0 8）または陰性コントロールとしてD M S Oのいずれかで標識化する。

【0760】

レトロウイルスベクターまたはP B Sで処理されたマウスからC D 3 +細胞を単離する7日前に、C r o p r a、C e l l t r a n s p l a n t a t i o n（20）：1547 - 1559；2011の方法に従ってレトロウイルスベクターまたはP B Sで処理したマウスからP B M Cを単離し、丸底96ウェルプレート中で、I L - 2組換えマウスタンパク質（R & D S y s t e m s カタログ番号：402 - M L - 020）およびC D 3 / C D 28ビーズ（T h e r m o F i s h e r カタログ番号：11456D）の存在下、37℃で7日間シミュレーションした。7日目に、刺激したP B M CをC D 3 + / C M G + またはC D 3 + / D M S Oコントロール細胞と共に、P B M C：C D 3 + / C M G + またはP B M C：C D 3 + / D M S Oコントロール細胞細胞のプレートに加えた比を1000：1 ~ 1：1および1：1.25 ~ 1：1000の範囲で、1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、24、48時間共培養する。陰性コントロールとして、一連のウェルはC D 3 + / C M G + およびC D 3 + / D M S Oコントロール細胞のみ加え、P B M Cは加えない。インキュベーション後、プレートを遠心分離して処理し、上記のネズミC D 3：A P C - C y 7抗体またはI C：A P C - C y 7抗体のいずれかをを用いて標識化する。P B Sで2回洗浄した後、細胞をP B Sに再懸濁させ、F A C S A r i a（A P C - C y 7：640 nmレーザー励起 / 780 - / + 60 nmで発光収集、およびC M G：561 nmレーザー励起 / 585 - / + 16 nmで発光収集）で、F A C S D i v a（商標）ソフトウェア（B D B i o s c i e n c e s、サンノゼ、カリフォルニア州）を実行して分析する。次に、F S C / S S Cイベントデータを最初に使用して、「細胞」と標識化されたイベントのゲートを設定する。次に、この「細胞」ゲートを使用してイベントを表示し、I C：A P C - C y 7 / D M S Oのみで標識化された試料を分析する640 nmおよび561 nmのレーザー用にP M T電圧を設定する。この試料は、A P C - C y 7およびC M Gの両方における陰性細胞についてゲートを設定するためにも使用される。次に、

10

20

30

40

50

いずれのPBM Cも受容しなかったCD3+/CMG+細胞を使用して、CD3+およびCMG+細胞における陽性ゲートを設定する。

【0761】

データを、全細胞の集団におけるCD3+/CMG+細胞のパーセントを調べることによって分析する。処理群を比較すると、PBM C:CD3+/CMG+細胞の任意の所定のアッセイ比でのCD3+/CMG+細胞のパーセントが比較的低く、レシピエント細胞溶解を示す。一実施形態では、CD3+/CMG+のパーセントは、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である。

【0762】

実施例18:レトロウイルスベクターレシピエント細胞に対するNK細胞応答を測定する
この実施例は、細胞溶解アッセイによるレシピエント細胞に対するナチュラルキラー細胞応答の定量化を説明する。

【0763】

いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の免疫原性の尺度は、ナチュラルキラー細胞応答である。一実施形態では、ナチュラルキラー細胞によるレシピエント細胞の細胞毒性媒介細胞溶解は、溶解がレトロウイルスベクターの活性を低下、例えば阻害または停止させるため、免疫原性の尺度である。

【0764】

一実施形態では、レシピエント細胞はナチュラルキラー細胞応答を誘発しない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するナチュラルキラー応答が試験される。さらに、プロトコルは、好適な表面マーカーが存在する任意の細胞タイプに適応され得る。この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞である。

【0765】

マウスをレトロウイルスベクターで処理し、血液試料を採取し、CD3+細胞を上記の実施例17に記載したように選別する。NK細胞は、実施例17で使用されるPBM C細胞の代わりにNK細胞が使用されることを除いて、実施例17で前述されたプロトコルに従って単離され、CD3+細胞と共に培養され、FACSによって分析される。

【0766】

データを、全細胞の集団におけるCD3+/CMG+細胞のパーセントを調べることによって分析する。処理群を比較すると、NK細胞:CD3+/CMG+細胞の任意の所定のアッセイ比でのCD3+/CMG+細胞の割合が比較的低いことは、レシピエント細胞溶解を示す。一実施形態では、CD3+/CMG+のパーセントは、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様である。

【0767】

実施例19:レトロウイルスベクターレシピエント細胞に対するCD8T細胞応答を測定する

この実施例は、細胞溶解アッセイによって、レシピエント細胞（レトロウイルスベクターと融合している細胞）に対するCD8+T細胞応答の定量化を説明する。

【0768】

いくつかの実施形態において、レシピエント細胞の免疫原性の尺度は、CD8+T細胞応答である。一実施形態では、CD8+T細胞によるレシピエント細胞の細胞傷害性媒介細胞溶解は、溶解がレトロウイルスベクターの活性を低下、例えば阻害または停止させるため、免疫原性の尺度である。

【0769】

一実施形態では、レシピエント細胞は、CD8+T細胞応答を誘発しない。この実施例では、対象におけるレシピエント細胞に対するCD8+T細胞の応答が試験される。さらに、プロトコルは、好適な表面マーカーが存在する任意の細胞タイプに適応され得る。この実施例では、標的レシピエント細胞はCD3+細胞である。

10

20

30

40

50

【0770】

マウスをレトロウイルスベクターで処理し、血液試料を採取し、CD3+細胞を上記の実施例17に記載したように選別する。CD8+細胞は、実施例17で使用されるPBM C細胞の代わりにCD8+細胞が使用されることを除いて、実施例17で前述されたプロトコルに従って単離され、CD3+細胞と共に培養され、FACSによって分析される。

【0771】

データを、全細胞の集団におけるCD3+／CMG+細胞のパーセントを調べることによって分析する。処理群を比較すると、CD8+細胞：CD3+／CMG+細胞の任意の所定のアッセイ比でのCD3+／CMG+細胞の割合が比較的低いことは、レシピエント細胞溶解を示す。一実施形態では、CD3+／CMG+のパーセントは、レトロウイルスベクターで処理されたマウスおよびPBSで処理されたマウスに由来するレシピエント細胞について同様ある。

10

【0772】

実施例20．フソゲン耐性供給源細胞を作成する

この実施例は、レトロウイルスベクターが標的とする受容体が存在せず、または低下したレベルであるように供給源細胞が改変されているため、レトロウイルスベクターによって標的化することができない（または低レベルで標的化される）供給源細胞を説明する。

【0773】

この実施例では、フソゲンはシンシチン-1（HERV-W）であり、受容体はASCT2であり、受容体発現は、Cas9によるゲノム編集およびASCT2遺伝子座を標的とするガイドRNAを使用して、供給源細胞において低下される。他の様々な受容体は、様々な方法、例えば、RNA干渉を使用することによって下方調節することができることが理解される。

20

【0774】

HEK293T供給源株を、Cas9をコードするmRNAおよびASCT2を標的とするガイドRNA（HEK293T-ASCT2）、またはCas9を発現しないコントロールmRNA（HEK293T-コントロール）でトランスフェクトする。細胞を3週間培養した後、免疫染色およびフローサイトメトリーを使用してASCT2発現について染色する。いくつかの実施形態において、HEK293T-ASCT2集団における細胞の少なくとも90%は、ASCT2について陰性に染色され、HEK293Tコントロール集団における細胞の少なくとも90%は、ASCT2について陽性に染色される。これらの細胞は、その後の実験に使用される。

30

【0775】

次に、細胞を、レンチウイルスパッケージングベクター（Gag、Pol、およびRev）、シンシチン-1エンベロープベクター、およびGFPをコードするペイロードベクターによってトランスフェクトする。24時間後、顕微鏡を使用して細胞を画像化し、合胞体形成をアッセイし、次いでウイルス粒子を上清から収集する。

【0776】

供給源細胞集団における合胞体の量は、DAPIによる染色後に合胞体あたりの核の数を顕微鏡で定量化することによってアッセイすることができる。いくつかの実施形態において、合胞体あたりの核のパーセントは、HEK293T-ASCT2供給源細胞において、HEK293Tコントロール供給源細胞よりも低い。

40

【0777】

HEK293T-ASCT2供給源細胞およびHEK293Tコントロール供給源細胞からの機能的なウイルス粒子の量は、HEK293T細胞を上清から収集されたウイルス粒子と共に培養することによって定量化される。細胞をウイルス粒子と共に培養した後に5日間培養し、GFP陽性細胞のパーセントをフローサイトメトリーでアッセイする。いくつかの実施形態において、GFP陽性細胞のパーセントは、HEK293Tコントロール供給源細胞由来ウイルス粒子よりも、HEK293T-ASCT2供給源細胞由来ウイルス粒子で処理されたHEK293T細胞で高い。

50

【0778】

実施例21：標的細胞における発現レベルの中央値を時間にわたって評価する

この実施例は、単一細胞における外因性薬剤レベルを測定することによる、標的細胞における外因性薬剤の発現の定量化を説明する。

【0779】

一実施形態では、外因性薬剤レベルは、ハウスキーピング遺伝子よりも高い。一実施形態では、ペイロード発現は、標的細胞にわたって同様である。

【0780】

この実施例では、標的細胞はCD3+細胞である。しかし、このプロトコルは、好適な表面マーカーが存在し、対象から単離することができる任意の細胞タイプに適応され得る。特に、本明細書で説明される方法は、プロトコルへの最適化を伴うヒト、ラット、サルに等しく適用可能であり得る。この実施例では、ペイロードは蛍光タンパク質であり、発現はフローサイトメトリーを介して測定される。他の実施形態では、タンパク質ペイロードの発現は、タンパク質の免疫染色によって測定され得る。他の実施形態では、タンパク質ペイロードの発現は、顕微鏡検査またはウェスタンブロットを介して測定され得る。

【0781】

マウスは、本出願で説明される方法のいずれかを介して生成されたtdtomato蛍光タンパク質を有するレトロウイルスベクターによって、またはPBS（陰性コントロール）によって処理される。処理後7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、および1095日に、レトロウイルスベクターを受けたマウスおよびPBS処理を受けたマウスから末梢血を収集する。血液を実施例2に前述されたように収集する。細胞をマウスCD3：APC-Cy7抗体（Biolegend カタログ番号：100330）またはアイソタイプコントロールを用いて染色し、実施例2で説明されるプロトコルを使用してフローサイトメトリーによって分析する。

【0782】

tdtomato陽性であるCD3+細胞のパーセントを測定する。いくつかの実施形態において、tdtomato陽性であるCD3+細胞のパーセントは、未処理マウスよりも処理されたマウスからの細胞で高い。いくつかの実施形態では、tdtomato陽性であるCD3+細胞のパーセントは、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞にわたって同様である。tdtomato蛍光レベルの中央値はCD3+Tdtomato+細胞で測定される。いくつかの実施形態では、CD3+Tdtomato+細胞におけるtdtomato蛍光レベルの中央値は、7日、14日、28日、56日、112日、365日、730日、または1095日で収集された細胞において同様である。

【0783】

実施例22：組織特異的プロモーターおよびmiRNA媒介遺伝子サイレンシングを使用した導入遺伝子発現の特異性の評価。

この実施例は、標的ヒト肝癌細胞株（HepG2）における外因性薬剤の定量化および、非標的（非肝）細胞株と比較して説明する。細胞株は、ポジティブTCsRE（例えば、組織特異的プロモーター）またはポジティブTCsREとNTCsREの組み合わせ（例えば、組織特異的miRNA認識配列によるmiRNA媒介性遺伝子サイレンシング）を含むレンチウイルス（LV）によって形質導入した。標的および非標的細胞株を、ポジティブおよびネガティブ調節エレメントを含む生成されたレンチウイルス粒子で形質導入し、細胞株における導入遺伝子発現の効果を評価した。

【0784】

A. 導入遺伝子発現の特異性におけるmiRNA媒介性遺伝子調節の効果。

肝細胞に加えて、肝臓を系統にする主要な細胞集団には、内皮細胞およびクッパー細胞（造血系統に由来する常在性マクロファージ）が含まれ、それぞれmir-126-3pおよびmir-142-3pを発現する。これらのmiRNAは肝細胞では実質的に発現されない。レンチウイルスベクターは、増強緑色蛍光タンパク質（eGFP）発現カセ

10

20

30

40

50

ットを、構成的に活性なプロモーターホスホグリセリン酸キナーゼ（hPGK、ポジティブTCBRE、例えば、配列番号139を参照、の制御下で、NTBREとして、mir-142-3p（例えば、表7、配列番号143）およびmir-126-3p（例えば、表7、配列番号160）に相補的である配列の各々の4つのタンデムコピーの添加または無添加で含むように構築した。NTBREを有するレンチウイルスベクター（LV）構築体はhPGK-eGFP+miRTと呼ばれ、NTBREを有さない構築体はhPGK-eGFPと呼ばれる。

【0785】

これらのhPGK-eGFP+miRTおよびhPGK-eGFPベクターから生成されたレンチウイルス（LV）をそれぞれ使用して、標的ヒト肝細胞株（HepG2）、ヒト胎児腎臓細胞株（293LX）、ヒト造血系起源のヒトT細胞株（Molt4.8）、またはマウス脳に由来する内皮細胞株（bEND.3）に形質導入した。形質導入の7日後、GFP発現をフローサイトメトリーによって測定した。

【0786】

図1Aに示されるように、hPGK-eGFP+LVで形質導入したすべての細胞タイプの18〜30%がGFPを発現した。非標的細胞におけるmirT配列（hPGK-eGFP+miRT）を含むLVの形質導入後、0.6%のGFP発現のみがMolt4.8細胞（mir-142-3pを発現）で認められ、bEND.3細胞では発現が認められなかった（mir-126-3pを発現）。GFP発現の軽度の低下が293LX細胞で認められ、これらmiRNAのうち的一方または両方の非常に低いレベルの発現を有し得る。mirT配列（hPGK-eGFP+miRT）を含むLVで形質導入されていたHepG2標的細胞では、GFP発現における効果は認められなかった。これらの結果は、レンチウイルスベクターにおけるmiRT配列の組み込みが、造血系および内皮系の細胞において導入遺伝子発現の少なくとも50倍の低下をもたらし、一方、肝細胞において頑強な発現を維持したことを示した。

【0787】

B. 導入遺伝子発現におけるmiRNA媒介性遺伝子調節および組織特異的プロモーターの組み合わせ効果。

追加のレンチウイルスベクター（LV）は、前述のように実質的に生成したが、eGFPまたは以下に示されるN末端フラグタグヌクレオチド配列を有する酵素フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）をコードする導入遺伝子のいずれかを伴い、ポジティブTCBREとしての組織特異的調節プロモーターとして肝細胞特異的ヒト（APOE-HCR-hAAT（hAPOE）プロモーター（例えば、表6、配列番号133に示される）または構成的に活性な脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）プロモーター（例えば、表6、配列番号142に示される）の制御下にある。得られる核酸構築体を使用した肝細胞におけるPALの発現は、標的細胞における所望の外因性薬剤の発現を表す。例えば、ヒト肝細胞における内因性PAH欠乏は、血中のPheの毒性蓄積を引き起こし、重度の神経障害および発育阻害を特徴とする臨床症状であるフェニルケトン尿症（PKU）をもたらす可能性がある。いくつかの態様において、PKU患者へのPALの早期投与は、血中Pheレベルを首尾よく減少させ、症状を軽減することが示される。

【0788】

PAL遺伝子のヌクレオチド配列を示す（配列番号169）：

10

20

30

40

50

【化 1】

ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGCCAAGACACTGTCTCAGGCCCAG
 AGCAAGACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTCACCGGCAACAGCAGCGCCAACGTGAT
 CATCGGCAACCAGAAGCTGACCATCAACGACGTGGCCAGAGTGGCCCCGGAATGGCA
 CACTGGTGTCCCTGACCAACAACACCGATATCCTGCAGGGCATCCAGGCCAGCTGC
 GACTACATCAACAACGCCGTGGAAGCGGCGAGCCCATCTACGGCGTGACATCTGG
 CTTTGGCGGCATGGCTAATGTGGCCATCAGCAGAGAGCAGGCCAGCGAGCTGCAGA
 CCAATCTCGTGTGGTTCTGAAAACCGGCGCTGGCAACAACTGCCCTGGCTGATG
 TTCGGGCTGCCATGCTGCTGAGAGCCAACTCTCACATGAGAGGGCGCCAGCGGCATC
 CGGCTGGAAGTATCAAGCGGATGGAATCTTCTGAAACGCTGGCGTGACCCCTTAC
 GTGTACGAGTTTGGCTCTATCGGCGCCTCCGGCGATCTGGTGCCTCTGTCTTACATCA
 CCGGCAGCCTGATCGGCCTGGATCCTAGCTTCAAGGTGGACTTCAACGGCAAAGAG
 ATGGACGCCCCCTACCGCTCTGAGACAGCTGAATCTGAGCCCTCTGACACTGCTGCCC
 AAAGAAGGCCTGGCCATGATGAATGGCACCAGCGTGATGACAGGGATCGCCGCCAA
 TTGCGTGTACGACACCCAGATCCTGACCGCCATTGCCATGGGAGTGCACGCCCTGGA
 TATTCAGGCCCTGAACGGCACCAACCAGAGCTTTACCCCTTCATCCACAACAGCAA
 GCCCCATCCTGGACAGCTGTGGGCGCTGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAACAG
 CCAGCTCGTGCGGGATGAGCTGGATGGCAAGCACGACTACAGAGATCACGAGCTGA
 TCCAGGACCGGTACAGCCTGAGATGCCTGCCTCAGTATCTGGGCCCTATCGTGGATG
 GCATCTCTCAGATCGCCAAGCAGATCGAGATTGAGATCAACAGCGTGACCGACAAT
 CCCCTGATCGACGTGGACAACCAGGCCTCTTATCACGGCGGCAACTTTCTGGGCCAG
 TACGTCGGCATGGGCATGGACCACCTGAGGTACTATATCGGCCTCCTGGCCAAGCAC
 CTGGACGTGCAAATTGCCCTGCTGGCAAGCCCCGAGTTCAGCAATGGACTGCCTCCT
 AGCCTGCTCGGCAACCGCGAGAGAAAAGTGAACATGGGCCTGAAGGGCCTGCAGAT
 CTGTGGCAACTCCATCATGCCCCCTGCTGACCTTCTACGGCAACTCTATCGCCGACAG
 ATTCCCCACACACGCCGAGCAGTTCAACCAGAACATCAACTCCCAGGGCTACACCA
 GCGCCACACTGGCTAGAAGAAGCGTGGACATCTTCCAGAACTACGTGGCAATCGCC
 CTGATGTTTGGAGTGCAGGCCGTGGACCTGCGGACCTACAAGAAAACAGGCCACTA
 CGACGCCAGAGCCAGCCTGTCTCCTGCCACCGAGAGACTGTATTCTGCCGTGCGGCA
 TGTCGTGGGCCAGAAGCCTACAAGCGACAGACCCTACATCTGGAACGACAACGAGC
 AGGGCCTCGACGAGCACATTGCCAGAATCTCTGCCGATATCGCTGCCGGCGGAGTG
 ATTGTGCAGGCTGTGCAAGACATCCTGCCAAGCCTGCACTGA

10

20

30

40

【0789】

図1Bに示すように、肝細胞特異的プロモーター（hApoE-eGFP+miRT）
 の制御下でのhPGK-eGFPを含むLVまたはmiRT配列およびGFPを含むLV
 による形質導入は、フローサイトメトリーで測定されたとき、293LXでのGFP発現
 の250倍を超える抑制をもたらし、HepG2細胞ではほとんど影響を伴わない。

【0790】

HepG2および293LX細胞を、SFFVプロモーターの制御下でPAL導入遺伝
 子を含むLV（SFFV-PAL）、またはhApoEプロモーターの制御下でmiRT
 配列と共にPAL導入遺伝子を含むLV（hApoE-PAL+miRT）によって形質

50

導入した。PALは、フェニルアラニン（Phe）のアンモニアと桂皮酸への変換に触媒作用を及ぼし、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（PAH）の先天性欠損症を有する患者における酵素補充療法で使用されている。PAL導入遺伝子発現の特異性は、新鮮な培地と比較した培養上清（SN）におけるPheレベルの低下によって測定した。

【0791】

図1Cに示されるように、構成的プロモーター（SFFV）からの発現は、両方の細胞タイプから収集されたSNにおけるPheレベルに大きな低下をもたらした。しかし、hApoE-PAL+miRT構築体は、HepG2細胞でのみ大きなPheの低下をもたらし、hApoE-PAL+miRT LVで形質導入された293LX細胞から収集されたSNにおけるPheレベルは、形質導入されていないコントロールと区別できなかった。この結果は、ポジティブTSCREおよびNTSCREを含むLV構築体で形質導入されたとき、非標的293LX細胞にはない、HepG2標的細胞における例示的な導入遺伝子PALの高い発現と一致する。

【0792】

C. 結論

総合すると、これらのデータは、miRNA標的部位と連結された組織特異的プロモーターの使用が導入遺伝子発現に実質的な特異性を付与することができるという発見を支持する。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

（i）外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメントであって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが、標的細胞または組織における前記外因性薬剤の発現を、前記ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、または

（ii）前記外因性薬剤をコードする前記核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメントであって、非標的細胞または組織における前記外因性薬剤の発現を、前記非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて減少させる、非標的細胞特異的調節エレメントを含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

（項目2）

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層と、

b) 核酸であって、

（i）外因性薬剤をコードする核酸と操作可能に連結されたポジティブ標的細胞特異的調節エレメントであって、ポジティブ組織特異的調節エレメントが、標的細胞または組織における前記外因性薬剤の発現を、前記ポジティブ組織特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて増加させる、ポジティブ標的細胞特異的調節エレメント、および

（ii）前記外因性薬剤をコードする前記核酸と操作可能に連結された非標的細胞特異的調節エレメントであって、非標的細胞または組織における前記外因性薬剤の発現を、前記非標的細胞特異的調節エレメントを欠如する以外は同様なフソソームと比べて減少させる、非標的細胞特異的調節エレメントを含むまたはコードする核酸と、を含む、フソソーム。

（項目3）

前記フソソームが、前記外因性薬剤または前記外因性薬剤をコードする核酸を含む、項目1または項目2に記載のフソソーム。

10

20

30

40

50

(項目4)

i) 前記フソソームが非標的細胞とよりも標的細胞と高い割合で融合し、任意に、前記高い割合は、少なくとも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である、

ii) 前記フソソームが、別のフソソームとよりも標的細胞と高い割合で融合し、任意に、前記高い割合は少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である、

iii) 前記フソソームは、前記フソソームにおける前記外因性薬剤が24、48、または72時間後に標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で標的細胞と融合し、

iv) 前記フソソームが、前記核酸を標的細胞に非標的細胞よりも高い割合で送達し、任意に、前記高い割合は少なくとも少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である、

v) 前記フソソームが、前記核酸を標的細胞に別のフソソームよりも高い割合で送達し、任意に、前記高い割合は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍である、あるいは

vi) 前記フソソームが前記核酸を標的細胞に、前記フソソームにおける前記外因性薬剤が24、48、または72時間に標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%に送達されるような割合で送達する、のうちの1つ以上である、項目1～3のいずれかに記載のフソソーム。

(項目5)

前記フソソームが対象に投与される場合、

i) 前記対象において検出可能で存在する前記外因性薬剤の10%、5%、4%、3%、2%、または1%未満が非標的細胞にある、

ii) 前記外因性薬剤を検出可能で含む前記対象の前記細胞のうちの少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%が標的細胞であり、任意に、前記標的細胞が単一細胞型のものであり、任意に前記標的細胞がT細胞である、

iii) 前記外因性薬剤を検出可能で含む前記対象の前記細胞のうちの1,000,000、500,000、200,000、100,000、50,000、20,000、または10,000個未満の細胞が非標的細胞である、

iv) 前記対象の全標的細胞における前記外因性薬剤の平均レベルが、前記対象の全非標的細胞における前記外因性薬剤の平均レベルよりも少なくとも100倍、200倍、500倍、または1,000倍高いものである、あるいは

v) 前記外因性薬剤が前記対象におけるいずれの非標的細胞でも検出可能ではない、のうちの1つ以上である、項目1～4のいずれかに記載のフソソーム。

(項目6)

前記フソゲンが再標的化フソゲンである、項目1～5のいずれかに記載のフソソーム。

(項目7)

前記再標的化フソゲンが、ニパウイルスFおよびGタンパク質、麻疹ウイルスFおよびHタンパク質、ツパイアパラミクソウイルスFおよびHタンパク質、パラミクソウイルスFおよびGタンパク質もしくはFおよびHタンパク質もしくはFおよびHNタンパク質、ヘンドラウイルスFおよびGタンパク質、ヘニパウイルスFおよびGタンパク質、モルビリウイルスFおよびHタンパク質、レスピロウイルスFおよびHNタンパク質、センダイウイルスFおよびHNタンパク質、ルブラウイルスFおよびHNタンパク質、またはアブラウイルスFおよびHNタンパク質、あるいはそれらの誘導體、あるいはそれらの任意の組み合わせから選択される配列を含む、項目6に記載のフソソーム。

10

20

30

40

50

(項目 8)

前記フソゲンが、野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有する長さが少なくとも 100 個のアミノ酸のドメインを含み、任意に、前記野生型パラミクソウイルスフソゲンが配列番号 1 ~ 132 のうちのいずれか 1 つで示される、項目 1 ~ 7 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 9)

前記野生型パラミクソウイルスがニパウイルスであり、任意に、前記ニパウイルスがヘニパウイルスである、項目 8 に記載のフソソーム。

(項目 10)

前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的プロモーター、組織特異的エンハンサー、組織特異的スプライス部位、RNA もしくはタンパク質の半減期を延長する組織特異的部位、組織特異的 mRNA 核外輸送促進部位、組織特異的翻訳増強部位、または組織特異的翻訳後改変部位を含む、項目 1 ~ 9 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 11)

前記ポジティブ標的細胞特異的調節エレメントが組織特異的プロモーターを含む、項目 1 ~ 10 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 12)

前記非標的細胞特異的調節エレメントが、組織特異的 miRNA 認識配列、組織特異的プロテアーゼ認識部位、組織特異的ユビキチンリガーゼ部位、組織特異的転写抑制部位、または組織特異的エピジェネティック抑制部位を含む、項目 1 ~ 11 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 13)

前記非標的細胞特異的調節エレメントが組織特異的 miRNA 認識配列を含む、項目 1 ~ 12 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 14)

前記非標的細胞特異的調節エレメントが、前記外因性薬剤をコードする転写化領域内に配置またはコードされ、任意に、前記転写化領域によって生成された RNA が、UTR またはコード領域内の前記組織特異的 miRNA 認識配列を含む、項目 13 に記載のフソソーム。

(項目 15)

前記標的細胞が癌細胞であり、前記非標的細胞が非癌性細胞である、項目 1 ~ 14 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 16)

前記外因性薬剤が外因性ポリペプチドまたは外因性 RNA であり、任意に、前記外因性薬剤が治療剤である、項目 1 ~ 15 のいずれかに記載のフソソーム。

(項目 17)

前記フソソームがさらに、

i) 前記脂質二重層に第 1 の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および前記脂質二重層に第 2 の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) 前記脂質二重層に第 1 の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に前記低下したレベルが、非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、もしくは 90 % である第 2 の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、もしくは 90 % である第 1 の免疫刺激タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくと

10

20

30

40

50

も10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%である第2の免疫刺激タンパク質を含む、項目1～16のいずれかに記載のフソソーム。

(項目18)

対象に投与される場合、

i) 前記フソソームが検出可能な抗体応答を生じず、または前記フソソームに対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

ii) 前記フソソームが検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する細胞性免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

iii) 前記フソソームが検出可能な自然免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する前記自然免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

iv) フソソームの10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が血清によって不活性化される、

v) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な抗体応答を生じず、または前記標的細胞に対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、あるいは

vi) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記標的細胞に対する細胞応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、のうちの1つ以上である、項目17に記載の方法。

(項目19)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層と、

b) 外因性薬剤または外因性薬剤をコードする核酸と、

c)

i) 前記脂質二重層に第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および前記脂質二重層に第2の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、

ii) 前記脂質二重層に第1の外因性または過剰発現した免疫抑制タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に前記低下したレベルが、非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%である第2の免疫刺激タンパク質、あるいは

iii) 不在、または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%低下した第1の免疫刺激タンパク質、および不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%低下した第2の免疫刺激タンパク質、のうちの1つ以上と、を含み、

対象に投与される場合、任意に、前記対象がヒト対象またはマウスであり、

i) 前記フソソームが検出可能な抗体応答を生じず、または前記フソソームに対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

ii) 前記フソソームが検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する細胞性免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

iii) 前記フソソームが検出可能な自然免疫応答を生じず、または前記フソソームに対する前記自然免疫応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%

10

20

30

40

50

、もしくは1%未満高いレベルで存在する、

i v) フソソームの10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満が血清によって不活性化される、

v) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な抗体応答を生じず、または前記標的細胞に対する抗体がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、あるいは

v i) 前記フソソームから前記外因性薬剤を受容した標的細胞が検出可能な細胞性免疫応答を生じず、または前記標的細胞に対する細胞応答がバックグラウンドレベルより10%、5%、4%、3%、2%、もしくは1%未満高いレベルで存在する、のうちの1つ以上である、フソソーム。

(項目20)

前記バックグラウンドレベルが、前記フソソームの投与前の前記同一対象におけるその対応するレベルである、項目18または項目19に記載のフソソーム。

(項目21)

前記免疫抑制タンパク質が補体調節タンパク質またはCD47である、項目17~20のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目22)

前記免疫刺激タンパク質がMHCであり、任意に、前記MHCがタンパク質であるHLAである、項目18~21のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目23)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層と、

b) 外因性薬剤をコードする核酸と、

c) 前記脂質二重層に外因性または過剰発現されたMHCであって、任意に、前記MHCはHLAであり、任意に、前記HLAはHLA-GもしくはHLA-E、またはそれらの組み合わせである、HMCと、を含む、フソソーム。

(項目24)

前記フソゲンが、配列番号1~132のいずれか1つに示される野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも100個のアミノ酸のドメインを含む、項目19~23のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目25)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層であって、前記フソゲンが配列番号1~132のいずれか1つに示される野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも100個のアミノ酸のドメインを含む、脂質二重層と、

b) 外因性薬剤をコードする核酸と、

c) 前記脂質二重層に外因性もしくは過剰発現したCD47または補体調節タンパク質、あるいはそれらの組み合わせと、を含む、フソソーム。

(項目26)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層であって、前記フソゲンが、配列番号1~132のいずれか1つに示される野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも100個のアミノ酸のドメインを含む、脂質二重層と、

b) 外因性薬剤をコードする核酸と、

c) MHC Iであって、任意に前記MHC IがHLA-A、HLA-B、もしくはHLA-C、またはMHC IIであり、任意に、MHC IIがHLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、またはHLA-DRであり、不在また

10

20

30

40

50

は低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80、もしくは90%低下した、HMC Iと、を含む、フソソーム。

(項目27)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層であって、前記フソゲンが、配列番号1～132のいずれか1つで示される野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも100個のアミノ酸のドメインを含む、脂質二重層と、

b) 外因性薬剤をコードする核酸と、

c) 不在または低下したレベルで存在し、任意に、前記低下したレベルが非改変である以外は同様な供給源細胞から生成されたフソソームと比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%低下した、外因性もしくは過剰発現した免疫抑制タンパク質または免疫刺激タンパク質のうち的一方または両方と、を含む、フソソーム。

(項目28)

前記核酸が1つ以上のインスレーターエレメントを含む、項目1～27のいずれかに記載のフソソーム。

(項目29)

フソソームであって、

a) フソゲンを含む脂質二重層であって、前記フソゲンが、配列番号1～132のいずれか1つで示される野生型パラミクソウイルスフソゲンと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する長さが少なくとも100個のアミノ酸のドメインを含む、脂質二重層と、

b) 外因性薬剤をコードする核酸であって、1つ以上のインスレーターエレメントを含む核酸と、を含む、フソソーム。

(項目30)

前記核酸が2つのインスレーターエレメントを含み、任意に、前記2つのインスレーターエレメントが、前記外因性薬剤をコードする領域の上流である第1のインスレーターエレメントおよび前記外因性薬剤をコードする領域の下流である第2のインスレーターエレメントを含み、任意に、前記第1のインスレーターエレメントおよび前記第2のインスレーターエレメントが同一または異なる配列を含む、項目28または項目29に記載のフソソーム。

(項目31)

前記対象に第1の時点で前記フソソームを投与した後に単離された細胞の試料における前記外因性薬剤の中央レベルの変動が、前記対象に後の第2の時点で前記フソソームを投与した後に単離された細胞の試料における前記外因性薬剤の中央レベルの少なくとも、約10,000%、5,000%、2,000%、1,000%、500%、200%、100%、50%、20%、10%、または5%、あるいはそれら未満である、項目28～30のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目32)

前記対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が前記外因性薬剤を検出可能で含む、項目28～31のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目33)

第1の時点で前記外因性薬剤を検出可能で含んだ前記対象における標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%が、後の第2の時点で前記外因性薬剤を依然として検出可能で含む、項目28～32のいずれか一項に記載のフソソーム。

10

20

30

40

50

(項目 3 4)

遺伝毒性でなく、または標的細胞における腫瘍形成の割合を増加しない、項目 2 8 ～ 3 3 のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目 3 5)

前記外因性薬剤が外因性ポリペプチドまたは外因性 RNA であり、任意に、前記外因性薬剤が治療剤である、項目 1 9 ～ 3 4 に記載のいずれか一項に記載のフソソーム。

(項目 3 6)

外因性薬剤を対象に送達する方法であって、前記対象に項目 1 ～ 3 5 のいずれかに記載のフソソームを投与することを含み、それによって前記外因性薬剤を前記対象に送達し、任意に、前記対象がヒト対象である、方法。

(項目 3 7)

対象、標的組織、または標的細胞において機能を調節する方法であって、前記標的組織または前記標的細胞を項目 1 ～ 3 6 のいずれかに記載のフソソームと接触させることを含み、任意に、前記対象がヒト対象である、方法。

(項目 3 8)

前記標的組織または前記標的細胞が対象に存在する、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記接触することが、前記フソソームを前記対象に投与することによって実行される、項目 3 7 または項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

対象において、障害を治療または予防する方法であって、前記対象に項目 1 ～ 3 9 のいずれか一項に記載のフソソームを投与することを含み、任意に、前記対象がヒト対象である、方法。

(項目 4 1)

a) 前記核酸および前記フソゲン（例えば、再標的化フソゲン）を含む細胞を用意することと、

b) 前記細胞を前記フソソームの生成を可能にする条件下で培養することと、

c) 前記細胞から前記フソソームを分離、豊富化、または精製することと、を含み、それによってフソソームを作製する、項目 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載のフソソームを作製する方法。

(項目 4 2)

フソソームを生成するための供給源細胞であって、

a) 核酸と、

b) 前記核酸をパッケージングすることができる構造タンパク質であって、少なくとも 1 つの構造タンパク質が、フソゲン受容体と結合するフソゲンを含む構造タンパク質と、

c) 不在、または非改変である以外は同様な供給源細胞と比べて低下したレベル（例えば、少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または 9 0 % 低下）で存在するフソゲン受容体と、を含む、供給源細胞。

(項目 4 3)

前記フソゲンが、前記フソゲン受容体と結合するときに、前記フソソームと前記標的細胞との融合を生じる、項目 4 2 に記載の供給源細胞。

(項目 4 4)

第 2 の同様な供給源細胞と結合し、例えば、前記供給源細胞の前記フソゲンが前記第 2 の供給源細胞上の前記フソゲン受容体と結合する、項目 4 2 または 4 3 に記載の供給源細胞。

(項目 4 5)

項目 4 2 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の供給源細胞の、集団。

(項目 4 6)

前記集団における細胞の 1 0 %、5 %、4 %、3 %、2 %、または 1 % 未満が多核化されている、項目 4 5 に記載の供給源細胞の集団。

10

20

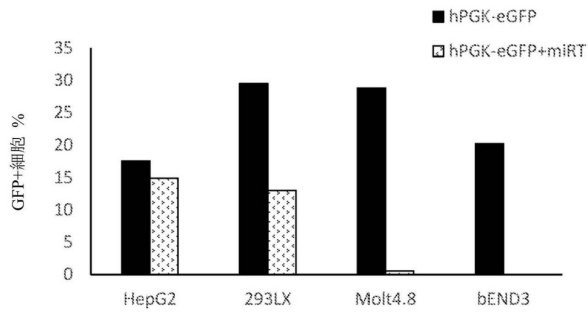
30

40

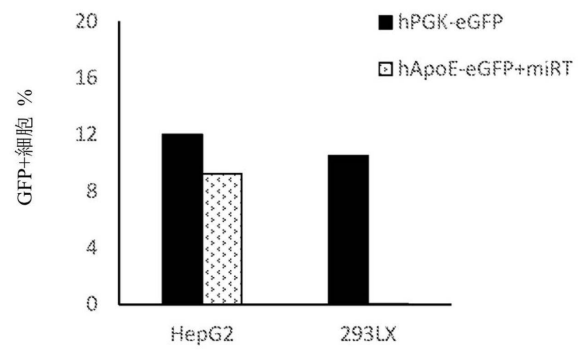
50

【図面】

【図 1 A】

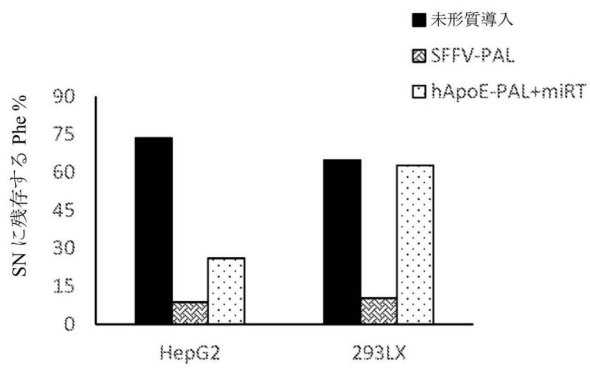


【図 1 B】



10

【図 1 C】



20

【配列表】

0007568513000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ヴォン マルツァーン, ジェフリー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ルーベンス, ジェイコブ ローゼンブラム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ミー, マイケル トラヴィス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ミルウィド, ジョン マイルズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ゴードン, ニール フランシス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 シャー, ジャゲシュ ヴィジャイクマール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 トルドー, カイル マーヴィン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ハートレー, ブリガム ジェイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ジョーンズ, ピーター アンソニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8ティーエイチ フロア, フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ,
インコーポレイテッド 気付

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2008/071959 (WO, A1)
特表2002-526085 (JP, A)
特表2004-502426 (JP, A)
国際公開第2016/196350 (WO, A1)
特表2004-520019 (JP, A)
国際公開第2017/182585 (WO, A1)
Molecular Therapy, 2014年, Vol.22, No.8, PP.1472-1483
PLOS ONE, 2012年, Vol.7, No.12, e51952, PP.1-10

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
C12N 5/10
A61K 9/127
A61K 31/7088
A61K 48/00
A61K 45/00
A61K 47/46
A61P 35/00
A61K 47/42
C07K 14/705
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq