

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6629210号  
(P6629210)

(45) 発行日 令和2年1月15日 (2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019.12.13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/49 (2006.01)

C 1 2 N 15/49

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 35/76

請求項の数 13 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2016-542356 (P2016-542356)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月12日 (2014.9.12)  
 (65) 公表番号 特表2016-530890 (P2016-530890A)  
 (43) 公表日 平成28年10月6日 (2016.10.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2014/052279  
 (87) 国際公開番号 WO2015/036713  
 (87) 国際公開日 平成27年3月19日 (2015.3.19)  
 審査請求日 平成29年9月6日 (2017.9.6)  
 (31) 優先権主張番号 1358909  
 (32) 優先日 平成25年9月16日 (2013.9.16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 フランス (FR)

(73) 特許権者 503197304  
 ジェネトン  
 フランス・F-91000・エヴリ・リュ  
 ・ドゥ・ランテルナシオナル・1・ビス  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (72) 発明者 フェナール, ダヴィド  
 フランス国、エフ-91540 メネシー  
 、アンパッス・デ4ヴァン 2  
 審査官 高山 敏充

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンペローブウイルスの産生方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レンチウイルスを産生する宿主細胞が、弱酸性培地中で培養されることを特徴とする、  
 レンチウイルスを産生するためのプロセス、ここで培地の pH が、5.8 から 6.2 の間  
 に含まれる、プロセス。

【請求項 2】

培地の pH が、6 である、請求項 1 記載のプロセス。

【請求項 3】

レンチウイルスが、シュードタイプ化されている、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項記載の  
 プロセス。

【請求項 4】

レンチウイルスが、ラウドウイルス科、アレナウイルス科、トガウイルス科、フィロウ  
 イルス科、レトロウイルス科、コロナウイルス科、パラミクソウイルス科、フラビウイル  
 ス科、オルトミクソウイルス科又はバキュロウイルス科に属するウイルスに由来するエン  
 ペローブタンパク質でシュードタイプ化されている、請求項 3 記載のプロセス。

【請求項 5】

レンチウイルスが、ベシクロウイルス属 (VSV - G)、狂犬病ウイルス、モコラウ  
 イルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ロスリバーウイルス (RRV)、シ  
 ンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス (SFV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西  
 部ウマ脳炎ウイルス、エボラウイルス、ラッサウイルス、トリ白血病ウイルス (ALV)

、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、ヤークジークテヒツジレトロウイルス、様々なマウス白血病ウイルス（MLV）、改変型ヒト内在性ウイルス（BAEVTR）、改変型テナガザル白血病ウイルス（GALVTR）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV-1）ヒトスプーマウイルス、マエディービスナウイルス（MMV）、SARS-コロナウイルス、センダイウイルス、ヒトパラインフルエンザ3型ウイルス、ニパーウイルス、麻疹ウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、インフルエンザウイルス又はオートグラファカリフォルニカ核多核体病ウイルスのエンベロープタンパク質から選択されるエンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化されている、請求項3又は4記載のプロセス。

【請求項6】

レンチウイルスが、VSV-Gエンベロープタンパク質又はGALVTRエンベロープタンパク質より選択されるエンベロープタンパク質でシュードタイプ化されている、請求項5記載のプロセス。

【請求項7】

宿主細胞が、HEK293、HEK293T、HEK293FT、Te671、CEM、NIH-3T3、Mp f又はD17細胞より選択される、請求項1～6のいずれか一項記載のプロセス。

【請求項8】

宿主細胞が、レンチウイルスを産生するために必要なエレメントをコードする1つ以上のプラスミドが安定に又は一過性トランスフェクトされている、請求項1～7のいずれか一項記載のプロセス。

【請求項9】

レンチウイルスが、さらにそのゲノム中に導入された関心対象の導入遺伝子を含む、請求項1～8のいずれか一項記載のプロセス。

【請求項10】

- 前記レンチウイルスを産生するために必要なエレメントをコードする1つ以上のプラスミドによりHEK293T細胞を一過性トランスフェクトする段階；  
- pHが6の適切な培地中で前記細胞を培養する段階；  
- 培養上清中のレンチウイルスを採集する段階  
を含む、請求項1～9のいずれか一項記載のプロセス。

【請求項11】

1つのプラスミドが、レンチウイルスgagpol遺伝子を含む発現カセットを有し、1つのプラスミドが、レンチウイルスrev遺伝子を含む発現カセットを有し、1つの伝達プラスミドが、レンチウイルスのLTR-5'とLTR-3'との間に含まれる関心対象の導入遺伝子の発現カセットを含み、1つのプラスミドが、エンベロープ糖タンパク質の発現カセットを有する、4つのプラスミドにより細胞がトランスフェクトされる、請求項10記載のプロセス。

【請求項12】

弱酸性培地、又は培地のpHを弱酸性値にするために有用な1つ以上の溶液を伴う前記培地を含むキットであって、さらに：

(a) レンチウイルスを産生するために適切な1つ以上のプラスミド；及び/又は  
(b) 前記レンチウイルスを産生するために適切な細胞  
を含み、

ここで、弱酸性値は、pH5.8から6.2の間に含まれる、請求項1～11のいずれか一項記載のプロセスを適用するためのキット。

【請求項13】

請求項1～11のいずれか一項記載のレンチウイルスを産生するためのプロセスを適用するための説明書をさらに含む、請求項12記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、弱酸性培地中で細胞培養により産生されたエンベロープウイルスを産生するためのプロセスに関する。本発明のプロセスは、特に、大規模に、かつ適正製造規範（GMP）を遵守する条件下で実施された場合に産生収量を高める目的で生物医学又は生物工学研究での適用のためにこれらの粒子を産生するために有用である。

#### 【0002】

##### 技術的背景

エンベロープウイルスベクター、特にヒト免疫不全ウイルス - 1（HIV - 1）由来のベクターなどのレンチウイルスベクターは、遺伝子療法アプローチの範囲内で有望なツールである。しかし、臨床用等級のそのようなベクターの大量産生は、現時点で難題のままである。それらの産生を改善するためにいくつかのアプローチ：宿主細胞においてベクターを産生するために必要なプラスミドのトランスフェクションの最適化（例えば、トランスフェクション剤、細胞密度、プラスミドの比率などの最適化）又は特定の細胞代謝経路に焦点を当てた細胞培養条件（例えば、脂質、コレステロール、クロロキン、酪酸ナトリウムなどの添加）が提唱されている（Ansorge et al. 2010; Schweizer and Merten 2010）。

10

#### 【0003】

本発明者らは、この分野を拡張し、物理化学的パラメーターを最適化するという考えをもち、より詳細にはpH条件に関心があった。培地のpHが中性であることは、哺乳動物細胞を培養するための重大なパラメーターとして見なされる。そのうえ、研究によって、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質（VSV - G）を有するシュードタイプレンチウイルスが、pH6のリン酸緩衝液中で不安定であることが報告された（Higashikawa and Chang 2001）。これらの要素を考慮すると、当業者は、培地中のpH低下がエンベロープウイルスの産生にマイナスの影響を及ぼすと考えたであろう。

20

#### 【0004】

##### 発明の概要

本発明は、エンベロープウイルスを産生している細胞が弱酸性培地中で培養されたとき、前記ウイルスの産生に改善が観察されることに起因する。全く驚くべき方法で、前記弱酸性条件は、従来使用された中性培地で得られた感染力価の2～3倍の感染力価を有するウイルスを産生する可能性を与えた。

#### 【0005】

したがって、本発明の目的は、エンベロープウイルスを産生するための弱酸性条件の使用である。より詳細には、本発明は、エンベロープレレンチウイルスベクターを産生するためのプロセスであって、前記ベクターを産生する宿主細胞を培養するために使用される培地が弱酸性培地であることを特徴とするプロセスに関する。

30

#### 【0006】

##### 発明の詳細な説明

したがって、本発明は、エンベロープベクターを産生するためのプロセスであって、前記ベクターが、弱酸性条件下で産生されることを特徴とするプロセスに関する。

#### 【0007】

表現「弱酸性条件」は、5から6.6の間、特に5.5から6.6の間、又は5から6.2の間、より詳細には5.8から6.2の間に含まれる水溶液のpHを表す。pHは、特に5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.6.1又は6.2に等しい。特定の一実施態様によると、pHは約6である。選択されたpHは、また、使用される培地の緩衝力に依存し、当業者は、それを自分の一般知識を考慮して容易に決定することができる。

40

#### 【0008】

当業者は、溶液のpH、特に細胞培地のpHを改変することができる。当業者は、特に酸、特に塩酸などの強酸の溶液を前記溶液に導入してもよい。pHを再調整して所望の値にするために、必要ならば、塩基、特に水酸化ナトリウムなどの強塩基の溶液を使用してもよい。

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明の目的である弱酸性条件を除き、エンベロープウイルスを産生するために使用されるプロセスは、当技術分野において周知のプロセス及び材料を適用する。当業者は、特に (Ansorge et al. 2010; Schweizer and Merten 2010; Rodrigues et al. 2011) によって例証される、エンベロープウイルスの産生における自分の一般知識を参照してもよい。

## 【 0 0 1 0 】

本発明の範囲内で、「ウイルス」という用語は、自然界で見られるような天然ウイルスと、由来する親ウイルスのゲノムに比べてゲノムが改変を含む改変ウイルスとの両方を意味する。これは、由来する天然ウイルスに比べて病原力の全て又は一部を欠如した弱毒ウイルスであり得る。そのゲノムは、細胞培養物又は生きた生物における連続継代の間にインピボで改変される。用語「ウイルス」は、ゲノムが遺伝子工学技法によってインピトロで改変された組換えウイルスも表し得る。改変は、例えばウイルス複製のための少なくとも1種の必須遺伝子の不活性化(ウイルスを複製欠損にする)及び/又はタンパク質若しくは(普通は天然ウイルスによってコードされない)異種RNAをコードするDNAフラグメントの挿入を可能にし得る。後者の場合、これは、「ウイルスベクター」と呼ばれる。挿入は、標的細胞において異種DNAを発現させるようにウイルスゲノムの適切な領域内に行われる。用語「ウイルス」は、シュードウイルス粒子、すなわち表面のエンベロープ糖タンパク質又はゲノムのいずれかを有さず、かつウイルスの構造タンパク質及び/又は酵素タンパク質の自然集合によって得られるウイルス粒子も表す。

## 【 0 0 1 1 】

特定の一実施態様によると、エンベロープウイルスはウイルスベクターである。ウイルスベクターは、特にレトロウイルス、例えばレンチウイルスから得られる。本発明により産生されるレトロウイルスベクターは、特に、アルファレトロウイルス(トリ白血病ウイルスにあたるALVなど)から、ベータレトロウイルス(マウス乳癌ウイルスにあたるMMTVなど)から、ガンマレトロウイルス(マウス白血病ウイルスにあたる様々な種類のMLVなど)から、デルタレトロウイルス(ヒトTリンパ球向性ウイルスにあたる様々な種類のHTLVなど)から、イプシロンレトロウイルス(ウォールアイ皮膚肉腫ウイルスにあたるWDSVなど)から、スプーマウイルス(ヒトフォーミーウイルスにあたるHFV及びサルフォーミーウイルスにあたるSFVなど)から、様々な種類のヒト免疫不全ウイルス(ヒト免疫不全ウイルスにあたるHIV)、様々な種類のサル免疫不全ウイルス(サル免疫不全ウイルスにあたるSIV)などの霊長類レンチウイルスから、又はウマ伝染性貧血ウイルス(ウマ伝染性貧血ウイルスにあたるEIAV)、ネコ免疫不全ウイルス(ネコ免疫不全ウイルスにあたるFIV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(ヤギ関節炎脳炎ウイルスにあたるCAEV)、若しくはヒツジピスナ-マエディウイルス(ピスナ-マエディウイルスにあたるVMV)などの非霊長類性哺乳類レンチウイルスから得られる。

## 【 0 0 1 2 】

特定の一実施態様によると、レトロウイルスベクター、特にレンチウイルスベクターは、シュードタイプ化されており、すなわち、それは、レトロウイルス粒子が得られるウイルスとは異なるウイルスから得られるエンベロープ糖タンパク質、改変エンベロープ糖タンパク質又はキメラエンベロープ糖タンパク質を含む。特定の一実施態様によると、レトロウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス由来エンベロープ糖タンパク質(VSV-G)又はテナガザル白血病ウイルス(テナガザル白血病ウイルスにあたるGALV)由来エンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化されるものの、当業者は、他のウイルス性エンベロープ糖タンパク質の使用を考えてもよい(Frecha et al. 2008)。特定の一実施態様によると、レトロウイルスベクター、より詳細にはレンチウイルスベクターは、GALVTR(ピリオン内C末端が両種指向性ヒト白血病誘発ウイルスA-MLVのエンベロープ糖タンパク質のC末端と置換されていることで、レンチウイルス粒子内へのエンベロープ糖タンパク質の高効率組み込みが可能になるGALVのエンベロープ糖タンパク質)などの改変エンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化されている(Christodouloupoul

os and Cannon 2001)。特定の一実施態様によると、レトロウイルスベクター、より詳細にはレンチウイルスベクターは、標的細胞表面での所与の受容体の特異的ターゲティングを可能にするために、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の様々な領域をコードする融合タンパク質（単鎖可変フラグメントにあたる *scFv*）又はリピートアンキリンドメインを有するタンパク質（設計アンキリンリピートタンパク質にあたる *DARPin*）が挿入されている麻疹ウイルスのエンベロープ糖タンパク質などのキメラエンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化される（Anliker et al. 2010; Munch et al. 2011）。

#### 【0013】

特定の一実施態様によると、レトロウイルスベクター、より詳細にはレンチウイルスベクターをシュードタイプ化するために使用されるウイルスエンベロープ糖タンパク質は、  
10 ラブドウイルス科、特にベシクロウイルス属（例えば *VSV-G*）又はリッサウイルス属（例えば、狂犬病ウイルス、モコラウイルス）；アレナウイルス科（例えばリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（*LCMV*））；トガウイルス科、より詳細にはアルファウイルス属（例えばロスリバーウイルス（*RRV*）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス（*SFV*）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）；フィロウイルス科、最も詳細にはフィロウイルス属（例えば、エボラウイルス、ラッサウイルス）；レトロウイルス科、より詳細にはアルファレトロウイルス属（例えば、トリ白血病ウイルス（*ALV*）、ラウス肉腫ウイルス（*RSV*）、ベータレトロウイルス属（例えばヤークジークテヒツジレトロウイルス）、ガンマレトロウイルス属（例えば、様々なマウス白血病ウイルス（*MLV*）、野生型ヒビ内在性ウイルス（*BAEV*）又は改変型（*BAEVTR*）、野生型  
20 テナガザル白血病ウイルス（*GALV*）又は改変型（*GALVTR*）、デルタレトロウイルス属（例えばヒトTリンパ球向性ウイルス（*HTLV-1*）、スプーマウイルス属（例えばヒトスプーマウイルス（*spumous virus*））、レンチウイルス属（例えばマエディ-ビスナウイルス（*MMV*））；コロナウイルス科、より詳細にはコロナウイルス属（例えば *SARS-CoV*）；パラミクソウイルス科、より詳細にはレスピロウイルス属（例えば、センダイウイルス、ヒトパラインフルエンザ3型ウイルス）、ヘニパウイルス属（例えばニパーウイルス）、モルビリウイルス属（例えば麻疹ウイルス）；フラビウイルス科（*flaviridae*）、より詳細にはヘパシウイルス属（例えばC型肝炎ウイルス（*HCV*））；オルトミクソウイルス科、より詳細にはA型インフルエンザウイルス属（例えばインフルエンザウイルス）；バキュロウイルス科、より詳細には核多角体ウイルス属（例  
30 えばオートグラファカリフォルニカ（*Autographa californica*）核多角体病ウイルス）に属するウイルスのエンベロープ糖タンパク質から得られる。シュードタイプ化のために使用されるエンベロープ糖タンパク質は、より詳細には改変型エンベロープ糖タンパク質、例えば麻疹-*scFv*、ツパイ-*scFv*、シンドビス-*scFv*エンベロープ糖タンパク質などの単一可変鎖 *scFv* を有する抗体フラグメントと融合されたエンベロープタンパク質；麻疹/*DARPin*エンベロープタンパク質などのアンキリンリピートドメインと融合されたエンベロープタンパク質；又はさらに欠陥結合タンパク質を用いた *VSV-G* + ナノボディーディスプレイである。

#### 【0014】

特定の一実施態様によると、本発明により産生されたレトロウイルス、より詳細にはレンチウイルスは、*VSV-G*、麻疹、*GALV* 若しくは *BAEV*（ウイルスがレトロウイルスの場合）、*GALVTR* 若しくは *BAEVTR*（ウイルスがレンチウイルスの場合）又はバキュロウイルス *gp64* 糖タンパク質でシュードタイプ化されている。

#### 【0015】

そのうえ、エンベロープウイルスは、そのゲノムに導入された関心対象の導入遺伝子を含み得る。もちろん、関心対象の導入遺伝子は、エンベロープウイルスベクターを充てることになっている特定の使用に依存する。例証として、治療用RNAをコードする関心対象の導入遺伝子（例えば、標的RNA若しくはDNA配列の相補的アンチセンスRNAをコードする関心対象の導入遺伝子）、病態に冒された被験体における欠損若しくは不在タンパク質をコードする遺伝子療法用導入遺伝子、又はDNAのワクチン接種のために使用  
50

される導入遺伝子、すなわちタンパク質をコードする導入遺伝子であって、その発現が、受入れ側生物に前記タンパク質に対するワクチン接種を引き起こす導入遺伝子が挙げられよう。したがって、本発明によるプロセスは、遺伝子療法に使用され得るエンベローブウイルスベクターの産生を可能にする。本発明によるプロセスは、有利には、医薬品安全性試験実施基準に適合し、エンベローブウイルスベクター、特にレンチウイルスベクター、特にシュードタイプ化レンチウイルスベクター（特にVSV-G又はGALVTRエンベローブタンパク質を用いた）の大規模産生を考慮する可能性を与える。

#### 【0016】

レンチウイルスベクターを産生するための好ましい一実施態様によると、以下の4つのエレメント：レンチウイルスgagpol遺伝子を含む発現カセット、レンチウイルスrev遺伝子を含む発現カセット、レンチウイルスLTR-5'とLTR-3'との間に含まれる関心対象の導入遺伝子の発現カセット、及びエンベローブ糖タンパク質の発現カセットが宿主細胞に導入される。

#### 【0017】

特定の一実施態様では、エンベローブウイルス、特にレトロウイルスベクター、より詳細にはレンチウイルスベクターは、エンベローブウイルスを産生するために必要な1つ以上のエレメントを発現している安定系統（Miller 2001; Rodrigues et al. 2011）、例えば、VSV-Gエンベローブ糖タンパク質でシュードタイプ化されたHIV-1から得られたレンチウイルスベクターを構成的に産生するヒト産生系統GPRG-EF1-hcOPT（Greene et al. 2012）、又は例えばGALVエンベローブ糖タンパク質でシュードタイプ化されたガンマレトロウイルスベクターMLVを構成的に産生するマウス産生系統PG13-MFG-GFP（Merten 2004）などから産生される。特定の一実施態様では、エンベローブウイルスは、ウイルスを産生するために必要なエレメントをコードする1つ以上のプラスミドが一過性トランスフェクトされた哺乳類宿主細胞から産生される。レンチウイルスベクターを産生させる一代替によると、前記エレメントは、4つのプラスミド：レンチウイルスgagpol遺伝子を含む発現カセットを有するプラスミド、レンチウイルスrev遺伝子を含む発現カセットを有するプラスミド、レンチウイルスLTR-5'とLTR-3'との間に含まれる関心対象の導入遺伝子の発現カセットを含む伝達プラスミド、及びエンベローブ糖タンパク質の発現カセットを有するプラスミドによって細胞内に導入される。

#### 【0018】

当業者は、本開示から、ウイルスの産生が開始されるとすぐに、本発明に従って弱酸性培地中の培養が実施されることを理解している。すなわち、産生細胞と接触する前にpHが弱酸性である培地中で、産生細胞が培養される。特定の一実施態様によると、細胞は、トランスフェクションの5～24時間後に、より詳細にはトランスフェクションの10～20時間後に、なおより詳細にはトランスフェクションの16～20時間後に、弱酸性培地中で培養される。

#### 【0019】

宿主細胞は、エンベローブウイルスの産生を可能にする任意の細胞より選択してもよい。特定の一実施態様によると、前記細胞は、ヒト細胞（HEK293、HEK293T、HEK293FT、Te671、HT1080、CEM）、ネズミ科細胞（NIH-3T3）、イタチ科細胞（Mpff）、イヌ科細胞（D17）（Miller 2001; Miller and Chen 1996; Merten 2004; Rodrigues et al. 2011; Stacey and Merten, 2011）より選択される。

#### 【0020】

細胞は、哺乳動物細胞の培養及びエンベローブウイルスの産生に適切な培地中で培養される。そのうえ、培地は、適切な濃度で添加される抗生物質、血清（特にウシ胎児血清等）などの、当技術分野において周知の添加剤が補充され得る。使用される培地は、特に、血清を含む又は無血清であってもよい。哺乳動物細胞を培養するための培地は、当技術分野において周知である。DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）培地、RPMI164

10

20

30

40

50

0又は様々な培地の混合物、例えばDMEM/F12など、又はoptiMEM（登録商標）、optiPRO（登録商標）、optiPRO-SFM（登録商標）、CD293（登録商標）、Freestyle F17（登録商標）（Life Technologies）若しくはEx-Cell（登録商標）293（Sigma-Aldrich）などの無血清培地が挙げられ得る。

【0021】

一過性トランスフェクトされた細胞を使用するプロセスにおいて、プラスミドのトランスフェクションを可能にする任意の薬剤を使用してもよい。特に、リン酸カルシウム又はポリエチレンジイミンを特に使用してもよいものの、他の薬剤が当業者によって考慮され得る（Ansorge et al. 2010）。条件（特にプラスミドの量、プラスミド間の比、プラスミドとトランスフェクション剤との比、培地の種類等）及びトランスフェクション時間は、

10

産生されるウイルス及び/又は伝達プラスミドに導入される導入遺伝子の特徴に応じて当業者によって適応され得る。

【0022】

次に、エンベロープウイルスは、当技術分野において周知の方法により培養上清から採集される。

【0023】

特定の一実施態様によると、本発明によるプロセスは、以下の：

- 前記エンベロープベクターを産生するために必要なエレメントをコードする1つ以上のプラスミドによりHEK293T細胞を一過性トランスフェクトする段階；
  - pHが約6の適切な培地中で前記細胞を培養する段階；
  - 培養上清中のエンベロープウイルスを採集する段階
- を含む。

20

【0024】

この実施態様の一代替によると、産生されたエンベロープウイルスは、4つのプラスミド：レンチウイルスgagpol遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミド、レンチウイルスrev遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミド、レンチウイルスのLTR-5'とLTR-3'との間に含まれる関心対象の導入遺伝子の発現カセットを含む1つの伝達プラスミド、及びエンベロープ糖タンパク質の発現カセットを有する1つのプラスミドによる細胞のトランスフェクション後に産生されたレンチウイルスである。一代替によると、エンベロープタンパク質は、VSVウイルス（特にVSV-Gエンベロープ）又はGALVウイルス（特にレンチウイルスベクターについてのGALVTR

30

改変糖タンパク質）から得られる。

【0025】

次に、産生されたウイルス又はウイルスベクターを、当業者に周知のプロセスに従って精製してもよい（Segura et al. 2011）。

【0026】

そのうえ、本発明は、哺乳動物細胞を培養するための培地であって、弱酸性である培地に関する。特に、培地は、5.5から6.6の間、より詳細には5.8から6.2の間に含まれるpHである。より詳細には、本発明による培地のpHは、約6である。別の特定の

40

実施態様によると、培地は、弱酸性DMEM、特に本明細書において前記と同義のpHを有する培地である。特に、本発明による培地は、pHが5.8から6.2の間に含まれるDMEM培地、特にpH6のDMEM培地である。本発明による培地は、細胞を培養する前の弱酸性pHによって特徴付けられることが理解される。

【0027】

そのうえ、本発明は、弱酸性培地、又は培地のpHを弱酸性値にするために有用な1つ以上の溶液を伴う前記培地を含む、上記と同義のエンベロープウイルスを産生するためのプロセスを適用するためのキットであって、さらに：

- (a) エンベロープウイルスを産生するために適切な1つ以上のプラスミド；及び/又は
- (b) 前記ウイルスを産生するために適切な細胞

50

を含むキットに関する。

【0028】

本発明のキットは、本発明によるエンベロープウイルスを産生するためのものである。したがって、キットは、さらに、本発明によるエンベロープウイルスの産生を可能にするキットの様々な成分を使用するための説明書を含み得る。特に、これらの説明書は、産生のための細胞が、どのように適切なプラスミドでトランスフェクションされ、培地中で培養されなければならないかを示し得る。特に、説明書は、エンベロープウイルスを産生する細胞が、上に詳述したように弱酸性 pH を有する培地中で培養されなければならないことを示す。

【0029】

本発明は、また、上記と同義のエンベロープウイルスを産生するためのプロセスを適用するためのキットであって、(i) 前記プロセスを適用するための手段及び(ii) 該プロセスを適用するために従うべき説明書、を含むキットに関する。特定の一実施態様によると、キット中に含まれる手段は、以下の手段：

- (a) エンベロープウイルスを産生するために適切な1つ以上のプラスミド；
- (b) 前記ウイルスを産生するために適切な細胞；及び
- (c) 弱酸性培地、又は培地の pH を弱酸性値にするために有用な1つ以上の溶液を伴う前記培地の1つ以上より選択される。

【0030】

したがって、本発明によるキットは、特に手段(a)及び(b)、(a)及び(c)、(b)及び(c)又は(a)及び(b)及び(c)を含み得る。

【0031】

本発明は、また、上に詳述したエンベロープウイルスを産生するためのプロセスを適用するためのキットであって、培地の pH を弱酸性値にするために有用な1つ以上の溶液を伴う前記培地を含むキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】 G A L V T R エンベロープでシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター (L V) (G A L V T R - L V) の多様な pH 条件下での産生を示す図である。(a) 塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて、培地 (D M E M / F C S) を表示 pH に緩衝化した。培地中に含有される pH 指示薬 (フェノールレッド) は、黄色 (p H 6) から紫色 (p H 8) にわたる色を有する。(b) G A L V T R - L V 粒子を、表示の pH 値の D M E M / S V F 培地中で培養された H E K 2 9 3 T 細胞から産生した。感染力価 (TU/ml) を、H C T 1 1 6 細胞のトランスダクション及びフローサイトメトリーによる G F P 導入遺伝子の発現レベルの定量後に決定した。物理的粒子 G A L V T R - L V の上清の含量を、市販の E L I S A キットにより H I V - 1 のカプシド p 2 4 の定量測定によって定量した。感染力価と物理的粒子の量との比に対応する比活性 (p 2 4 の TU/ng) をヒストグラムの下に図示する。結果は、2つの独立した実験の平均 ± 標準偏差を表す。p H 7 . 2 又は p H 6 の培地中で G A L V T R - L V ベクターの7つのバッチを産生し、それらの感染性粒子 (c) 又は物理的粒子 (d) の含量について力価検定した。(e) 各 G A L V T R - L V 上清の比活性を図示する。バーは、分布の平均値を示す。

【図2】 中性又は弱酸性 pH 条件下での V S V - G - L V レンチウイルスベクターの産生を示す図である。(a) 表示の pH の D M E M / S V F 培地中で培養された H E K 2 9 3 T 細胞から V S V - G - L V ベクターの6つのバッチを産生した。図1bのように感染力価を決定した。(b) 物理的粒子の量を、市販の E L I S A キットにより H I V - 1 のカプシド p 2 4 の定量測定によって決定した。(c) 各 V S V - G - L V 上清の比活性を図示する。バーは、分布の平均値を示す。

【図3】 中性又は弱酸性 pH 条件下での G A L V - M L V ガンマレトロウイルスベクターの産生を示す図である。表示の pH の D M E M / S V F 培地中で培養された H E K 2 9 3

10

20

30

40

50



T細胞からVSV-G-LVベクターの6つのバッチを産生した。図1bのように感染力価を決定した。バーは、分布の平均値を示す。

【図4】数回の凍結/解凍サイクル後のGALVTR-LVレンチウイルス粒子の安定性の研究を示す図である。(a)ベクターについての凍結/解凍手順の図示。(b)pH7.2(黒色)又はpH6(灰色)で産生されたGALVTR-LVベクターの数バッチを1又は2回の凍結/解凍サイクルに曝露した。図1bのように感染力価を決定した。データは、得られた様々な感染力価(左図)を表し、又は1回の凍結/解凍サイクルに対応する条件を100%として規準化した(右図)。室温(R.T.)、凍結(Freeze.)、解凍(Thaw.)。

【図5】温度37℃に曝露後のGALVTR-LVレンチウイルス粒子の安定性の研究を示す図である。pH7.2又はpH6で産生されたGALVTR-LV粒子1mlが入った凍結チューブを37℃で0~4日間インキュベートした。次に、図1bのように感染力価を決定した。(a)データを、3回の独立した実験から得られた感染力価、又は(b)感染力価の平均±標準偏差のいずれかとして表し、対照条件(37℃に暴露されていないGALVTR-LVベクターに対応する条件)を100%として規準化した。

【図6】中性又は弱酸性pHの培地中で培養されたHEK293T細胞の産生における細胞内p55 gagの発現レベルの研究を示す図である。(a)pH7.2又はpH6でGALVTR-LVベクターを産生しているHEK293T細胞の溶解液(lyzate)中のp55 gag発現のウエスタンブロット。p55 gagの発現レベルをアクチンの発現レベルに対して規準化する。(b)ヒストグラムは、4回の独立した実験におけるアクチンの発現レベルに対して規準化されたp55 gagの平均発現レベル±標準偏差を表す。

#### 【0033】

##### 実施例

##### 装置及び方法

##### 細胞培養

ヒト結腸直腸癌由来HCT116細胞(CCL-247; ATCC, Manassas, VA)、ヒト胎児腎臓HEK293T細胞(Merten et al. 2011)、及びガンマレトロウイルスGALV-MLV産生細胞(PG13-MFG-GFP系統)(Fenard et al. 2013)を、2~10%熱不活性化ウシ胎児血清(FCS)(Life Technologies, St-Aubin, France)を補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM+Glutamax)中にて37℃で5%CO<sub>2</sub>を加えて培養した。塩酸又は水酸化ナトリウムを使用することによってDMEM/FCS培地を表示のpH値に緩衝化し、次にフィルター滅菌した(0.22µm)。

#### 【0034】

##### ウイルスベクターの産生及び力価検定

リン酸カルシウムを用いてHEK293T細胞内に4種のプラスミド、すなわちgag-polの発現プラスミド(pKLGag-pol)、revの発現プラスミド(pBArrev)、緑色蛍光タンパク質GFPをコードする伝達プラスミド(pCCL-eGFP)及びGALVTRエンベローブ糖タンパク質又はVSV-Gをコードするプラスミド(pBAGALV/Ampho-Kana又はpMDG)を一過性トランスフェクトすることによって、HIV-1由来レンチウイルスベクターを作製した(Fenard et al. 2013)。トランスフェクションの16~20時間後に、HEK293T細胞を洗浄し、6から8の間に含まれる表示のpH値に緩衝化したDMEM/SVF培地中でインキュベートした。24時間産生後に、ウイルス上清を収集し、濾過し(0.45µm)、-80℃で凍結した。物理的粒子の力価を、市販のELISAキット(Perkin Elmer, Courtaboeuf, France)によりHIV-1のp24カプシドの定量測定によって決定した。感染力価を、HCT116細胞を用いてフローサイトメトリー(FACSCalibur, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France)によりGFPを検出することによって決定し、力価は1ミリリットルあたりのトランスダクションユニット(TU/ml)で表現した(Fenard et al. 2013)。

#### 【0035】

ウイルスベクターの温度37℃及び複数の凍結/解凍サイクルへの曝露

pH 7.2 又は 6 で産生された GALVTR - LV 上清 (エンベロープ糖タンパク質 GALVTR でシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター) が入った 1ml 凍結チューブを 37 °C で表示時間インキュベートした (チューブのスクリュキャップは閉じたまま)。次に、チューブを再度 -80 °C で凍結させ、試験間変動を防ぐために HCT 116 細胞を用いた力価検定を全条件について同時に行った。

#### 【0036】

凍結 / 解凍に対する安定性実験のために、最初及び 2 回目の凍結 / 解凍サイクルを、同じ GALVTR - LV 産生からの 2 つの異なる試料を用いて並行して実施した。この手順により、あらゆる試験間変動を回避するために GALVTR - LV の全ての感染力価を同時に評価できるようになる。

#### 【0037】

##### ウエスタンブロット及び分析

産生細胞を洗浄し、50mM Tris - HCl (pH 7.5)、200mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、10% グリセロール、1mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤のカクテル (complete protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics, Meylan, France) を補充した 1mM PMSF を含有する緩衝液中で溶解させた。タンパク質濃度を、Bio-Rad DC Protein Assay kit I (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) により決定した。タンパク質 (30 µg/トラック) を 10% SDS - ポリアクリルアミド電気泳動ゲル (PAGE) で分離し、ニトロセルロース膜 Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) 上に転写し、ヤギ抗 p24 抗体 (Abd Serotec, Oxford, UK) 及びマウス抗アクチン抗体 (AC - 15 クローン) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) を組み合わせることによってイムノブロットを作った。IRDye 800 結合型のロバ抗ヤギ抗体及び IRDye 680 結合型のロバ抗マウス抗体を二次抗体として使用した (Eurobio, Courtaboeuf, France)。赤外 Odyssey スキャナーを用いて免疫反応性のバンドを検出し、分析ソフトウェア Odyssey 3.0 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) を用いて定量した。

#### 【0038】

##### 統計解析

P 値を、GraphPad Prism 5 ソフトウェアによるノンパラメトリック Wilcoxon 検定で決定した。

#### 【0039】

##### 結果

##### 弱酸性培地中での GALVTR - LV レンチウイルスベクターの産生

GALVTR エンベロープ糖タンパク質によりシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター (LV) (GALVTR - LV) は、造血幹細胞を非常に効果的にトランスダクションする (Sandrin et al. 2002; Jacome et al. 2009)。しかし、この種のベクターの大規模産生は、大きな難問のままである。pH 6 ~ 8 の様々な培地中での GALVTR - LV ベクターの産生効率を評価した (図 1 a)。図 1 b は、pH 8 で得られた感染力価が、典型的な pH 7.2 での感染力価よりも大きく減少していることを示す。逆に、全く驚くことに、pH 6 の培地中で産生された GALVTR - LV の感染力価は、pH 7.2 で得られた力価よりも有意に大きい (2.3 倍) (図 1 b 及び 1 c)。本発明者らが、pH 6 で産生された GALVTR - LV 上清中の p24 抗原の量にも同時に増加を観察していることに留意することが肝要である (図 1 b 及び 1 d)。この正の相関関係は、中性又は弱酸性 pH で産生されたベクターの間で比活性が安定であることにつながり (図 1 b 及び 1 e)、一方でこの比活性は pH 8 で大きく減少する (図 1 b)。したがって、弱酸性条件の利用は、大量の GALVTR - LV ベクターを産生するために最適な条件に相当する。

#### 【0040】

VSV - G タンパク質でシュードタイプ化されたレンチウイルスベクターの産生及び G A

10

20

30

40

50

L Vタンパク質でシュードタイプ化されたM L Vガンマレトロウイルスベクターに及ぼす弱酸性p H条件の効果

G A L V T R - L Vベクターで得られた、励みになる結果は、当技術分野において非常に広く使用されているエンベロープ糖タンパク質であるV S V - Gタンパク質でシュードタイプ化されたレンチウイルスベクター（V S V - G - L Vベクター）を産生するためにこれらの同じ条件を試験するよう本発明者らを駆り立てた。図3は、p H 6の培地が、感染性V S V - G - L V粒子（図2 a）及び物理的V S V - G - L V粒子（図2 b）の産生を、平均で1.5倍有意に増加させ、比活性は安定である（図2 c）ことを示す。Higashikawaのチーム（前掲）によって報告された6に等しいp Hの有害作用は、おそらく、中性p Hでレトロウイルス粒子を産生し、それらを濃縮し、次にp H 6に緩衝化された非イオン溶液中にそれらを希釈した、これらの著者によって利用された手順の結果であり、ウイルス上清の感染性を90%喪失させた。予想外に、F C Sを補充したp H 6の培地中で直接産生されたV S V - G - L V粒子は、安定なだけでなく、この種の産生に最適であると従来認識されているp H 7.2の培地から産生された場合よりも予想外に高いレベルで産生される。

#### 【0041】

観察された改善が、使用されるH E K 2 9 3 T細胞又はただ1つのレンチウイルスベクターを産生することに依存しないことを確認するために、G A L V - M L V（エンベロープ糖タンパク質G A L Vでシュードタイプ化されたM L Vガンマレトロウイルス）を産生しているP G 1 3 - M F G - G F P細胞系で弱酸性p Hの効果の評価した（Merten 2004）。本来のP G 1 3細胞系は、M L Vウイルスのパッケージングシステム（p L G P S）及びG A L Vエンベロープ糖タンパク質をコードする構築物（p M O V - G A L V）を安定的にトランスフェクトされたマウス線維芽細胞系（N I H - 3 T 3）である（Miller et al. 1991）。レトロウイルスG A L V - M L Vシュードタイプを構成的産生するために、M L VのL T Rプロモーターの制御下に置かれたG F Pタンパク質をコードする伝達プラスミド（p M F G - G F P）をP G 1 3系に安定的に導入した。並行して産生された細胞培養物において、p H 7.2又はp H 6に緩衝化されたD M E M中でP G 1 3 - M F G - G F P細胞をインキュベートし、24～48時間後に、採集された上清中の感染性粒子の含量を評価した。図3は、G A L V - M L V粒子の産生が弱酸性p Hで有意に増加することを示す。この結果は、提唱された産生プロセスがH E K 2 9 3 T系などのヒト細胞系に限らないこと、及び本プロセスがレンチウイルスベクターの産生に特に適応している上に、本発明の手順により他のエンベロープウイルスがより効率的に産生され得るので、レンチウイルス属のベクターの産生に限定されないことを示していることから、特に興味深い。

#### 【0042】

複数の凍結／解凍サイクルに曝露されたG A L V T R - L V粒子の安定性

採集されたレンチウイルスベクターの上清は、一般的に精製前に-80℃で保存される。凍結又は解凍手順中に弱酸性p H条件がビリオンの不活性化を増加させるという有害作用を有すると想定される可能性もあろう。したがって、G A L V T R - L V粒子の上清を1又は2回の凍結／解凍サイクルに供し、感染力価を各解凍段階で決定した（図4 a）。図4 bは、弱酸性条件が粒子の感染性に影響しないことを示す。1回のサイクルに比べた2回の凍結／解凍サイクル後の感染力価の平均減少は、7.2及びp H 6の両方でわずかに5%である。したがって、レンチウイルスベクターを弱酸性条件下で凍結した場合に感染性は変化しない。

#### 【0043】

G A L V T R - L V粒子を温度37℃に長期曝露する影響

レンチウイルスのトランスダクション中に、標的細胞（本発明者らの場合は哺乳動物細胞）を温度37℃で培養する。したがって、本発明者らは、レンチウイルスベクターを弱酸性p Hで産生することが、温度37℃への多少の長期曝露後にその安定性に有害作用を有したかどうかを判定しようと試みた。このために、p H 7.2又はp H 6で産生された

G A L V T R - L V ベクターの上清が入った凍結チューブを 37 で 0 ~ 4 日間インキュベートし、感染性の減少動態を追跡した。図 5 a に示すように、p H 7 . 2 で産生された G A L V T R - L V ベクター及び p H 6 で産生されたベクターの両方について、37 への長期曝露後に感染力価は大きく減少するが、この減少の傾きは、p H 6 で産生された G A L V T R - L V ベクターの方が顕著ではない。結果として得られた、p H 6 で産生された G A L V T R - L V ベクターの半減期は、p H 7 で産生された G A L V T R - L V ベクターで観察された半減期の 2 倍である ( 1 日に対して約 2 日、図 5 b 参照 )。興味深いことに、この実験から、G A L V T R - L V ベクターの粗上清が閉鎖環境 ( チューブのスクリュウキャップを閉じてある ) 中で温度 37 でかなり抵抗性である ( 半減期 1 ~ 2 日 ) ことが示された。わずか 6 時間の半減期を示す、細胞培養物での安定性とこれを対照され

10

#### 【 0 0 4 4 】

弱酸性 p H で培養された H E K 2 9 3 T 産生細胞における p 5 5 g a g の細胞内発現レベルの調節

上清 G A L V T R - L V 中から採集された H I V - 1 の p 2 4 タンパク質の量は、弱酸性条件下で改善する ( 図 1 b 及び 1 d )。したがって、本発明者らは、この増加が産生細胞中の H I V - 1 の p 5 5 g a g 前駆タンパク質の細胞内発現レベルにおける増加の結果であり得るかどうかを判定しようと試みた。図 6 a において、イムノブロット実験から、p H 7 . 2 に比べて p H 6 で p 5 5 g a g の細胞内発現が増加し、平均 1 6 0 % の過剰発現であることが示されている ( 図 6 b )。p 5 5 g a g の細胞内過剰発現とレンチウイルス上清中の p 2 4 タンパク質の量の増加とのこの正の相関関係は、弱酸性条件が、ウイルス成分の最適な発現にとって、より好都合な環境を生成することを示唆している。

20

#### 【 0 0 4 5 】

#### 参考文献

- Anliker, B., T. Abel, S. Kneissl, J. Hlavaty, A. Caputi, J. Brynza, et al. (2010). "Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors." *Nat. Methods* 7(11): 929-935.
- Ansorge, S., O. Henry and A. Kamen (2010). "Recent progress in lentiviral vector mass production." *Biochem. Eng. J.* 48(3): 362-377.
- Christodouloulopoulos, I. and P. M. Cannon (2001). "Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors." *J. Virol.* 75(9): 4129-4138.
- Fenard, D., D. Ingraio, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, et al. (2013). "Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells." *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e90.
- Frecha, C., J. Szecsi, F. L. Cosset and E. Verhoeyen (2008). "Strategies for targeting lentiviral vectors." *Curr. Gene Ther.* 8(6): 449-460.
- Greene, M. R., T. Lockey, P. K. Mehta, Y. S. Kim, P. W. Eldridge, J. T. Gray, et al. (2012). "Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line." *Hum Gene Ther Methods* 23(5): 297-308.
- Higashikawa, F. and L. Chang (2001). "Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors." *Virology* 280(1): 124-131.
- Jacome, A., S. Navarro, P. Rio, R. M. Yanez, A. Gonzalez-Murillo, M. L. Lozano, et al. (2009). "Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients." *Mol. Ther.* 17(6): 1083-1092.
- Merten, O. W. (2004). "State-of-the-art of the production of retroviral vectors.

30

40

50

" J. Gene Med. 6 Suppl 1: S105-124.

Merten, O. W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny, et al . (2011). "Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application." Hum. Gene Ther. 22(3): 343-356.

Miller, A. D. (2001). "Production of retroviral vectors." Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 12: Unit 12 15.

Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson and M. V. Eiden (1991). "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus." J Virol 65(5): 2220-2224.

Miller AD, Chen F. (1996) Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. J . Virol. 70: 5564-5571.

Munch, R. C., M. D. Muhlebach, T. Schaser, S. Kneissl, C. Jost, A. Pluckthun, et al. (2011). "DARPin: an efficient targeting domain for lentiviral vectors." Mol. Ther. 19(4): 686-693.

Rodrigues, A. F., P. M. Alves and A. S. Coroadinha (2011). Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. Viral Gene Therapy. K. Xu, InTech. Chapter 2: 15-40.

Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, et al. (2002). "Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates." Blood 100(3): 823-832.

Schweizer, M. and O. W. Merten (2010). "Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors." Curr. Gene Ther. 10(6): 474-486.

Segura, M. M., A. A. Kamen and A. Garnier (2011). "Overview of current scalable methods for purification of viral vectors." Methods Mol Biol 737: 89-116.

Stacey GN, Merten O-W (2011) Chapter 3: Hosts cells and cell banking. In: Merten O-W, Al-Rubeai M (eds.): Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, in the series of: Methods in Molecular Biology 737, Humana Press, New York, NY, pp 45-88.

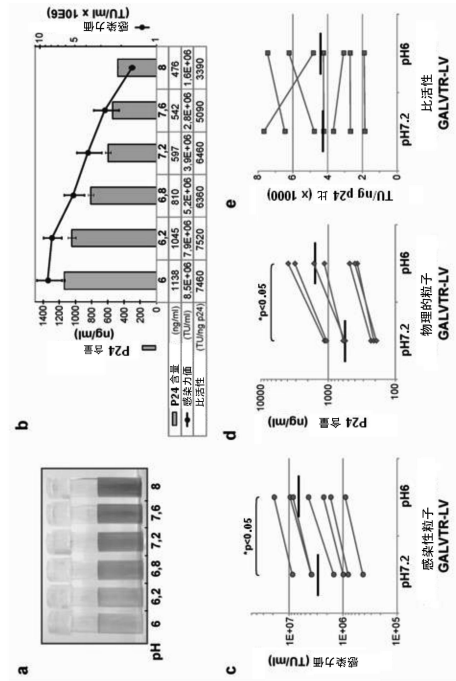
Strang, B. L., Y. Ikeda, F. L. Cosset, M. K. Collins and Y. Takeuchi (2004). "Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells." Gene Ther. 11(7): 591-598.

10

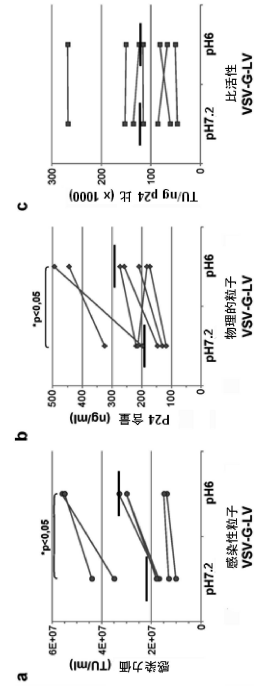
20

30

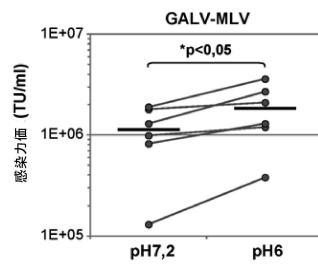
【図 1】



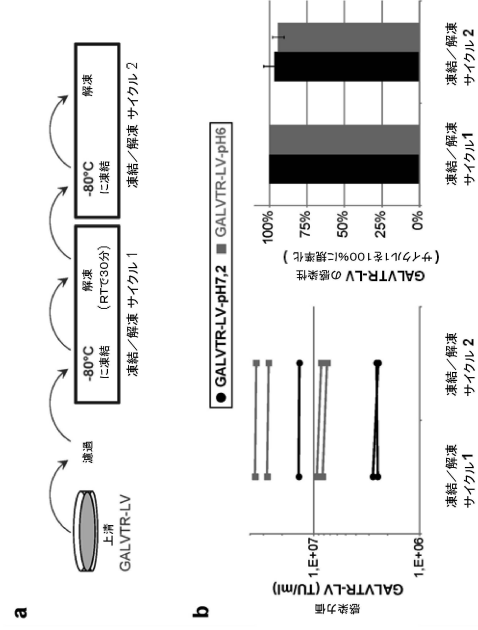
【図 2】



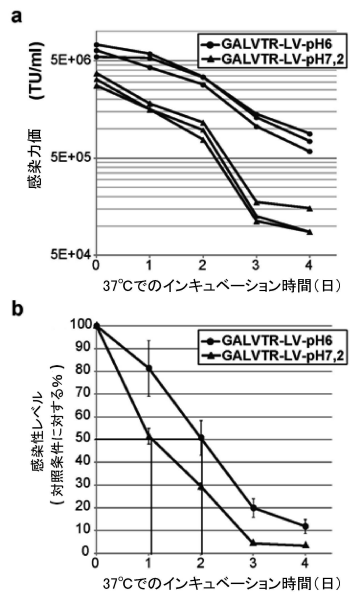
【図 3】



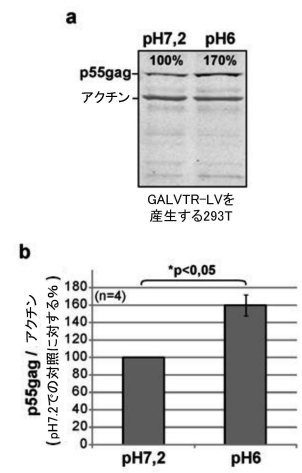
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2013/076309(WO, A1)

BIOTECHNOLOGY PROGRESS, 2000年, VOL.16, NO.5, pp.859-865, URL, <http://dx.doi.org/10.1021/bp000078j>

ウイルス, 2009年, 第59巻 第2号, pp.205-214

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

C12P

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)