

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年9月14日(14.09.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/171698 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/35 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/008736

(22) 国際出願日: 2023年3月8日(08.03.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-035100 2022年3月8日(08.03.2022) JP
特願 2023-024167 2023年2月20日(20.02.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 村口 太一 (MURAGUCHI Taichi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 森 勇介 (MORI Yusuke); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 梅谷 彩也子 (UMETANI Sayako); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: PRODUCER CELL, METHOD FOR PRODUCING PRODUCER CELL, AND METHOD FOR PRODUCING ADENO-ASSOCIATED VIRUS

(54) 発明の名称: プロデューサー細胞、プロデューサー細胞の製造方法、およびアデノ随伴ウイルスの製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a producer cell for the production of an adeno-associated virus (AAV) wherein cell damage is avoided or suppressed at the establishment of a cell line, a method for producing the producer cell, and a method for producing an AAV using the producer cell. The present invention provides a producer cell that has a Cap gene under the control of a foreign promoter and a Rep gene under the control of a foreign promoter in the chromosome, that is free from a VA-RNA gene and/or an E4 gene, and that is a mammalian cell.

(57) 要約: 本発明の課題は、細胞株の樹立時における細胞障害が回避または抑制されたAAV産生のためのプロデューサー細胞を提供すること、および上記プロデューサー細胞の製造方法、および上記プロデューサー細胞を用いたアデノ随伴ウイルスの製造方法を提供することである。本発明によれば、外来プロモーターの制御下にあるCap遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるRep遺伝子とを染色体中に有し、VA-RNA遺伝子およびE4遺伝子のうちの少なくとも一つを含まず、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞が提供される。



WO 2023/171698 A1

明 細 書

発明の名称：

プロデューサー細胞、プロデューサー細胞の製造方法、およびアデノ随伴ウイルスの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、アデノ随伴ウイルスを製造するためのプロデューサー細胞に関する。本発明はさらに、上記プロデューサー細胞の製造方法、および上記プロデューサー細胞を用いたアデノ随伴ウイルスの製造方法に関する。

背景技術

[0002] アデノ随伴ウイルス (aden-associated virus: AAVともいう) は、パルボウイルス科に属する直鎖一本鎖DNAウイルスである。野生型AAVゲノムは、複製の調節遺伝子 (Rep遺伝子) とカプシドの構造遺伝子 (Cap遺伝子) を含み、ウイルスの複製とパッケージングのために逆方向末端反復配列 (ITR) が隣接している。AAVベクターは増殖または非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の発現が可能である。また、AAVは、非病原性であると考えられており、免疫原性が低い。上記のことから、AAVベクターは、遺伝子治療用ベクターとして臨床応用が進んでいる。

[0003] AAVは、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下で増殖する非エンベロープウイルスである。遺伝子治療または核酸導入に用いるAAVを作製する際には、古典的にはアデノウイルスを宿主細胞に共感染させて、AAV複製が行なわれていた。また、アデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子が明らかにされ、この遺伝子を搭載したプラスミドも使用されている。例えば、Rep遺伝子およびCap遺伝子を含むプラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミド、ならびに目的遺伝子 (導入遺伝子) を含むプラスミドを同時にHEK293細胞にトランスフェクションすることで組換え型AAV (rAAV) へとパッケージングすることができる

。

[0004] 特許文献1には、第1の抑制解除可能なプロモーターの制御下にあるウイルスヘルパー遺伝子をコードする核酸分子と、第2の抑制解除可能なプロモーターの制御下にあるAAV遺伝子をコードする核酸分子と、第1および第2の抑制解除可能なプロモーターのリプレッサー要素をコードする核酸分子とを含む哺乳動物細胞を用いて、AAVを産生することが記載されている。

[0005] 特許文献2には、アデノ随伴ウイルスREPタンパク質REP78およびREP68をコードする核酸を含む宿主細胞であって、内部AAVプロモーターp19が、REP78タンパク質およびREP68タンパク質の機能性を維持する1つ以上の突然変異により不活性化されている、宿主細胞が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開WO2020/132059号公報

特許文献2：国際公開WO2019/57691号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1の方法においては、AAV産生に必要なヘルパー遺伝子、および、AAV遺伝子それぞれに制御配列を付加するため、3～5個の制御配列の間での相互干渉によって、対象遺伝子毎に発現量を十分に制御することが困難になる可能性があるという問題があった。

[0008] また、AAVを産生するための方法の一例としては、プロデューサー細胞を用いる方法がある。AAVを産生するプロデューサー細胞を樹立する際には、細胞障害が生じるという問題がある。特許文献2においては、REPタンパク質による細胞毒性を回避するための方法として、内部AAVプロモーターp19を不活性化する方法が記載されているが、プロデューサー細胞の製造については記載されていない。

[0009] 本発明は、細胞株の樹立時における細胞障害が回避または抑制された A A V 産生のためのプロデューサー細胞を提供することを課題とする。本発明はさらに、上記プロデューサー細胞の製造方法、および上記プロデューサー細胞を用いたアデノ随伴ウイルスの製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子を使用し、かつ V A - R N A 遺伝子および E 4 遺伝子のうちの少なくとも一つを使用せずに、プロデューサー細胞を樹立することによって、プロデューサー細胞の樹立時における細胞障害を回避または低減できることを見出した。本発明は、上記知見に基づいて完成したものである。

[0011] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

< 1 > 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子とを染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子および E 4 遺伝子のうちの少なくとも一つを含まず、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。

< 2 > R e p 遺伝子の外来プロモーターと C a p 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターである、< 1 >に記載のプロデューサー細胞。

< 3 > C a p 遺伝子の転写方向の下流に R e p 遺伝子が存在している、< 1 >に記載のプロデューサー細胞。

< 4 > 外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子を染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子を含まない、< 1 >に記載のプロデューサー細胞。

< 5 > E 4 遺伝子が I R E S の下流にある、< 4 >に記載のプロデューサー細胞。

< 6 > E 4 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、< 4 >に記載のプロデューサー細胞。

< 7 > E 4 遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、< 6 >に記載のプロデューサー細胞。

<8> E4 遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、<7>に記載のプロデューサー細胞。

<9> VA-RNA 遺伝子および E4 遺伝子の両方を含まない、<1>に記載のプロデューサー細胞。

<10> さらに E2A 遺伝子を含む、<1>から<9>の何れかーに記載のプロデューサー細胞。

<11> E2A 遺伝子が IRES の下流にある、<10>に記載のプロデューサー細胞。

<12> E2A 遺伝子が、外来プロモーターの制御下にある、<10>に記載のプロデューサー細胞。

<13> E2A 遺伝子が、サイトメガロウイルス由来プロモーターの制御下にある、<12>に記載のプロデューサー細胞。

<14> E2A 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、<10>に記載のプロデューサー細胞。

<15> E2A 遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、<14>に記載のプロデューサー細胞。

<16> E2A 遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、<15>に記載のプロデューサー細胞。

<17> 外来プロモーターの制御下にある Cap 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある Rep 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E4 遺伝子とを染色体中に有し、

VA-RNA 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。

<18> さらに目的遺伝子を含む、<1>から<17>の何れかーに記載のプロデューサー細胞。

<19> Cap 遺伝子の外来プロモーターおよび Rep 遺伝子の外来プロモーターのうちの1つ以上が、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロ

ロモーターである、＜1＞から＜18＞の何れかーに記載のプロデューサー細胞。

＜20＞ Cap遺伝子の外来プロモーターおよびRep遺伝子の外来プロモーターのうちの一つ以上が、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、＜19＞に記載のプロデューサー細胞。

＜21＞ Cap遺伝子の外来プロモーターおよびRep遺伝子の外来プロモーターのうちの一つ以上が、テトラサイクリン応答因子の下流にあることを含む、＜20＞に記載のプロデューサー細胞。

＜22＞ さらに外来プロモーターの制御下にあるSmallRep遺伝子を含む、＜1＞から＜21＞の何れかーに記載のプロデューサー細胞。

＜23＞ SmallRep遺伝子の転写方向の下流にRep遺伝子が存在している、＜22＞に記載のプロデューサー細胞。

＜24＞ SmallRep遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、＜22＞に記載のプロデューサー細胞。

＜25＞ SmallRep遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、＜24＞に記載のプロデューサー細胞。

＜26＞ SmallRep遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、＜25＞に記載のプロデューサー細胞。

＜27＞ 更にリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を発現する遺伝子を含む、＜1＞から＜26＞の何れかーに記載のプロデューサー細胞。

＜28＞ リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を発現する遺伝子がRep遺伝子の下流にあることを含む、＜27＞に記載のプロデューサー細胞。

＜29＞ 外来プロモーターの制御下にあるE4遺伝子、外来プロモーターの制御下にあるE2A遺伝子、および外来プロモーターの制御下にあるSmallRep遺伝子を含み、

C a p 遺伝子の外来プロモーターと E 2 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターであり、R e p 遺伝子の外来プロモーターと S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターである、< 1 > に記載のプロデューサー細胞。

< 3 0 > 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 2 A 遺伝子を染色体中に有し、

V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞で、C a p 遺伝子と R e p 遺伝子と E 2 遺伝子が近傍に存在し、E 4 遺伝子は近傍に存在しないプロデューサー細胞。

< 3 1 > 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 2 A 遺伝子とが搭載された第一のベクターと、外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子が搭載された第二のベクターを染色体中に有し、

V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。

< 3 2 > 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、その他の遺伝子挿入数より少ない、< 3 1 > または < 3 2 > に記載のプロデューサー細胞。

< 3 3 > 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、C a p 遺伝子または E 2 遺伝子の染色体上の挿入数より少ない、< 3 1 > または < 3 2 > に記載のプロデューサー細胞。

< 3 4 > 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、C a p 遺伝子の染色体上の挿入数の 0.4 倍以下である、< 3 1 > または < 3 2 > に記載のプロデューサー細胞。

< 3 5 > 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、E 2 遺伝子の染色体上の挿入数の 0.4 倍以下である、< 3 1 > または < 3 2 > に記載のプロデューサー細胞。

胞。

<36> 外来プロモーターの制御下にあるC a p遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p遺伝子とを哺乳動物細胞に導入することを含む、<1>から<35>の何れかーに記載のプロデューサー細胞の製造方法。

<37> 更にリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を導入することを含む、<36>に記載のプロデューサー細胞の製造方法。

<38> <1>から<35>の何れかーに記載のプロデューサー細胞を培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生することを含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。

<39> <1>から<35>の何れかーに記載のプロデューサー細胞を、C a p遺伝子およびR e p遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養して、上記プロデューサー細胞を増殖させる工程、および増殖したプロデューサー細胞を、C a p遺伝子およびR e p遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。

<40> <4>~<8>の何れかーに記載のプロデューサー細胞を、C a p遺伝子、R e p遺伝子およびE 4遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養して、上記プロデューサー細胞を増殖させる工程、および増殖したプロデューサー細胞を、C a p遺伝子、R e p遺伝子およびE 4遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。

[0012] <A> <38>~<40>の何れかーに記載のアデノ随伴ウイルスの製造方法により製造されるアデノ随伴ウイルス。

 外来プロモーターの制御下にあるC a p遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p遺伝子と外来プロモーターの制御下にあるE 2 A遺伝子が搭載された第一のベクターと、外来プロモーターの制御下にあるE 4

遺伝子が搭載された第二のベクターとを含む、プロデューサー細胞の製造のためのベクターのキット。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、プロデューサー細胞の樹立時における細胞障害を回避または低減することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を細胞に遺伝子導入し、R E P およびC A P の発現を評価した結果を示す。

[図2]図2は、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を細胞に遺伝子導入し、A A V 産生能を評価した結果を示す。

[図3]図3は、R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を細胞に遺伝子導入し、その後、ドキシサイクリンを添加して発現を誘導した後に、R E P およびC A P の発現を評価した結果を示す。

[図4]図4は、E 2 遺伝子およびG F P (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を導入した細胞について、a n t i - E 2 抗体を用いたウエスタンブロットおよびG F P 観察の結果を示す。

[図5]図5は、E 2 遺伝子およびG F P 遺伝子を有する細胞にR e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を導入し、得られた細胞のA A V 産生能を評価した結果を示す。

[図6]図6は、実験6の概要を示す。

[図7]図7は、選抜マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を使用して選抜したプロデューサー細胞株についてのA A V の定量結果を示す。

[図8]図8は、選抜マーカーとしてR F P (赤色蛍光タンパク質) を使用して選抜したプロデューサー細胞株についてのA A V の定量結果を示す。

[図9]図9は、プロデューサー細胞株の顕微鏡図を示す。

[図10]図10は、実験7の遺伝子設計の模式図を示す。G O I は、G F P 遺伝子を示す。

[図11]図11は、実験7および実験8の概要を示す。

[図12]図12は、設計1～6の配列をそれぞれ染色体に含むHEK293のうち、各設計の最高力価株についてのAAVの定量結果を示す。

[図13]図13は、実験7の設計4のベクターセットを用いて樹立したHEK293の複数クローンについて、染色体上のRep、Cap、E2、E4の各遺伝子数の定量結果を示す。

[図14]図14は、実験7の設計5のベクターを用いて樹立したHEK293の複数クローンについて、染色体上のRep、Cap、E2、E4の各遺伝子数の定量結果を示す。

[図15]図15は、浮遊培養に順化した、設計4の配列を染色体に含むHEK293細胞株と、設計5の配列を染色体に含むHEK293細胞株についてのAAVの定量結果を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本開示の実施形態の一例について説明する。但し、本開示は、以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本開示の目的の範囲内において、適宜、変更を加えて実施することができる。本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を意味する。

[0016] <用語の説明>

プロモーターとは、遺伝子発現を駆動する配列を示し、RNAポリメラーゼを結合させることができ、下流のコード配列または非コード配列の転写開始に関与するDNA制御領域／配列を意味する。

外来プロモーターとは、野生型AAV遺伝子が含まないプロモーターのことを意味する。具体的には、天然下でAAV遺伝子を発現させることが知られていないプロモーターである。

選抜マーカーは、核酸配列を活発に発現する細胞を選択するための遺伝子を指す。好適な選抜マーカーとしては、抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブラストサイジン、またはゼオシン耐性をコードする遺伝子が挙げられる。好適な選抜マーカーの

別の例は、蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）または青色蛍光タンパク質（BFP）である。

[0017] ベクターとは、外来遺伝子を別の細胞に人為的に運ぶために利用されるDNAまたはRNA分子である。遺伝子を発現するためのベクターを発現ベクターという。導入したい外来遺伝子を含むベクターが細胞内に導入されると、細胞内において外来遺伝子の複製および／または発現が行われる。ベクターとしては、エピソーム性（例えばプラスミド）ベクター、および非エピソーム性ベクターが挙げられる。ベクターは、トランスフェクション、トランスダクション、細胞融合およびリポフェクション、エレクトロポレーション法などの方法により、宿主細胞に導入することができる。

[0018] 搭載とは、染色体や核酸配列に他の核酸配列が組み込まれることを意味する。

[0019] 遺伝子は、塩基配列であれば限定されるものではないが、生体内で機能を有するものが好ましい。例えば、ポリペプチドをコードするヌクレオチドでもよくcDNAやゲノムDNAといった核酸分子が挙げられる。

[0020] プロデューサー細胞とは、ヘルパー遺伝子の導入やウイルス感染などの追加のヘルパー機能を必要とせずrAAVを産生することができる細胞である。本明細書中では、Rep遺伝子、Cap遺伝子が染色体に組み込まれた細胞である。更に付加的には、目的遺伝子（例えば、所望の治療または予防用遺伝子）、および必要なアデノウイルスヘルパー遺伝子を染色体に組み込んでいてもよい。目的遺伝子は、ITRを含んでいてもよい。また、2つのAAV逆方向末端反復（ITR：Inverted terminal repeat）に隣接して、目的遺伝子を含む遺伝子が組み込まれた細胞であってもよい。染色体に組み込んでいない遺伝子は、ベクターに搭載してプロデューサー細胞に導入することでrAAVを産生させてもよい。

また、プロデューサー細胞は、プロモーターの活性に作用する因子を発現させる遺伝子を染色体に組み込んだ細胞であってもよく、プロモーターの活性に作用する因子の遺伝子の全てを染色体に組み込んだ細胞であってもよい。

。プロモーターの活性に作用する因子としては、プロモーターを活性化する因子であることが好ましく、リバーステトラサイクリン調節性因子であることがより好ましい。

[0021] <プロデューサー細胞>

本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるC a p遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p遺伝子とを染色体中に有し、V A - R N A遺伝子およびE 4遺伝子のうちの少なくとも一つを含まず、哺乳動物細胞である。

[0022] 本発明の実施例の実験1においては、E 4遺伝子またはV A - R N A遺伝子を使用しない条件下においてはR E PとC A Pの発現量は大幅に減少することが確認された。

実験2においては、R e p遺伝子とC a p遺伝子に直接強制的（恒常的）CMVプロモーターを結合して発現させた。その結果、E 4遺伝子およびV A - R N A遺伝子を使用しない条件下においても、A A Vの産生は可能になった。しかし、R E Pは細胞毒性があることから、R e p遺伝子そのまま組み込んでしまうと安定株とすることはできない。

実験3においては、R e p遺伝子とC a p遺伝子に薬剤誘導型（T R E - C M V - m i n i m a lプロモーター）を連結させた。その結果、E 4遺伝子およびV A - R N A遺伝子を使用しない条件下においても、R E PおよびC A Pを発現することができた。

[0023] 実験4においては、E 2遺伝子およびG F P遺伝子（目的遺伝子）を安定に有する細胞株を樹立した。

実験5においては、実験4において樹立した細胞株にR e p遺伝子およびC a p遺伝子を導入した。得られた細胞株はA A Vを産生できることが確認された。

実験6においては、スイッチ化したR e p遺伝子およびC a p遺伝子を細胞に組み込んだ。薬剤または蛍光を指標にして細胞を選抜することにより、R e p遺伝子およびC a p遺伝子を安定に有する細胞株を樹立した。得られ

た細胞株はAAVを産生できることを確認した。

[0024] 実験7においては、Rep遺伝子、Cap遺伝子、E2遺伝子、および場合によりE4遺伝子を細胞に組み込んだ。薬剤または蛍光を指標にして細胞を選抜することにより、Rep遺伝子およびCap遺伝子を安定に有する細胞株を樹立した。得られた細胞株はAAVを産生できることを確認した。

実験8においては、実験7で樹立したプロデューサー細胞を浮遊化させて培養した。浮遊化した細胞は、AAVを産生できることを確認した。

[0025] 本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるCap遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるRep遺伝子とを染色体中に有する。

[0026] Rep遺伝子とCap遺伝子としては、アデノ随伴ウイルス遺伝子のRep遺伝子とCap遺伝子を使用することができる。

[0027] アデノ随伴ウイルス(AAV)は、パルボウイルス科およびディペンドパルボウイルス属のファミリーの、一本鎖DNAを含む、小型の、複製能の不完全な、非エンベロープ型ウイルスを指す。AAVには100を超える血清型が存在しており、血清型の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なることが知られている。血清型2(AAV2)は古くから広く研究されてきた血清型の一つであり、宿主域が非常に広いことが知られている。血清型1(AAV1)、血清型5(AAV5)、血清型6(AAV6)は、より高い組織指向性を持った血清型である。AAV1は筋肉、肝臓、気道、中枢神経系等、AAV5は中枢神経系、肝臓、網膜等、AAV6は心臓、筋肉、肝臓等への遺伝子導入効率が高いと言われている。本発明は血清型2または血清型5で用いることが好ましい。特に好ましくは血清型5である。

[0028] アデノ随伴ウイルス遺伝子とは、一つまたは複数のアデノ随伴ウイルスの血清型に由来する一つまたは複数の核酸配列から構成される遺伝子を指す。アデノ随伴ウイルス遺伝子は、好ましくは、AAVの複製およびパッケージングに関する遺伝子、およびAAV構成タンパク質をコードする遺伝子である。

- [0029] R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子は、ビリオンの複製とパッケージングに
関与するタンパク質をコードしている。C a p 領域は、V P 1、V P 2、お
よびV P 3を発現させる。
- [0030] R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子は、野生型の遺伝子でもよいが、本来有
する機能を発揮するものである限り、野生型の遺伝子に、塩基の置換、欠失
、挿入または付加等の改変がなされた遺伝子を使用してもよい。
- [0031] 野生型のR e p 遺伝子およびC a p 遺伝子に、塩基の置換、欠失、挿入ま
たは付加等の改変を行う場合、改変される塩基の個数は、好ましくは1～2
0個、より好ましくは1～10個、更に好ましくは1～3個である。改変を
加えたR e p 遺伝子およびC a p 遺伝子の塩基配列は、野生型のR e p 遺伝
子およびC a p 遺伝子の塩基配列と、好ましくは85%以上の配列同一性を
示し、より好ましくは90%以上の配列同一性を示し、更に好ましくは95
%以上の配列同一性を示し、更により好ましくは98%以上の配列同一性を
示す。
- [0032] R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を細胞に導入する場合、R e p 遺伝子お
よびC a p 遺伝子を含むベクターを細胞に導入することができる。ベクター
におけるR e p 遺伝子およびC a p 遺伝子の配置は特に限定されず、C a p
遺伝子とR e p 遺伝子は同じ方向に配置されていてもよいし、異なる向きに
配置してもよい。好ましくは、C a p 遺伝子とR e p 遺伝子は異なる向きで
ベクターに配置される。ある遺伝子の向きとは5'側から3'側に向かう方
向を意味し、異なる向きに配置するとは、ある遺伝子と他の遺伝子の5'側
から3'側の方向がベクター上で逆向きに配置されていることを意味する。
また、R e p 遺伝子とC a p 遺伝子は別のベクターに配置されていてもよい
。
- [0033] R e p 遺伝子は、当業者に公知の、ウイルスゲノムの複製に集合的に必要
とされるウイルスの複製タンパク質、または、例えばヒトヘルペスウイルス
6 (H H V - 6) R e p 遺伝子など (A A V - 2 D N A 複製を媒介するこ
とが公知) の、その機能的ホモログをコードするA A V ゲノムの領域を意味

する。したがって、Rep遺伝子のコード領域は少なくとも、AAVのREP78およびREP68（長い形態のREPタンパク質）並びにREP52およびREP40（短い形態のREPタンパク質；「SmallRep」とも称する）をコードする遺伝子またはその機能的ホモログを含む。SmallRep遺伝子とは、例えば、少なくともREP52またはREP40を含み、両者を含むことが好ましい。Rep遺伝子およびSmallRep遺伝子については、

Maurer AC, Weitzman MD. Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. Hum Gene Ther. 2020 May;31(9-10):499-511. doi: 10.1089/hum.2020.069. PMID: 32303138; PMCID : PMC7232694 ; および

小澤 敬也. AAV を利用した遺伝子治療. ウイルス 第57 巻 第1号, pp.47-56, 2007 :

が参照され、本明細書に組み込まれる。AAVの生産には、REP68またはREP78が必要とされ、REP68とREP78は同一の遺伝子から選択的スプライシングにより転写される2種類のmRNAの翻訳産物である。本発明において、REPは少なくともREP68またはREP78タンパク質を含むもので有り、好ましくはREP52および／またはREP40を更に含んでも良い。本発明で用いられるRep遺伝子のコード領域は、いかなるAAV血清型に由来するものでもよいが、AAV2に由来するものが好ましい。AAV2に由来するものとしては、REP78およびREP68並びにREP52およびREP40、ITRが挙げられる。

[0034] Cap遺伝子は、当業者に公知のウイルスのカプシドタンパク質をコードするAAVゲノム中の領域を意味する。これらのカプシドタンパク質の例は、AAVカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3である。本発明において使用するCap遺伝子は、いかなるAAV血清型に由来するものでもよいが、AAV2またはAAV5に由来するものが好ましい。特に好ましくはAAV5である。

[0035] 好ましくは、C a p 遺伝子の外来プロモーターは、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである。

好ましくは、R e p 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、

[0036] オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターとしては、刺激の有無により発現のオンとオフを調節できるプロモーターを使用することができる。刺激としては、化学的刺激(内在性ホルモン・ストレス応答、ラクトース、テトラサイクリンまたはその誘導體(例えば、ドキシサイクリン)、クミン酸、タンパク質(ラパマイシン、FKC s A、アブシシン酸(A B A)など)、タモキシフェン/C r e - l o x P (タモキシフェンにより活性化を誘導できるように改変したC r e プロモーターを使用する系)、リボスイッチ)、物理的刺激(青色光、熱)などを挙げることができるが、特に限定されない。

[0037] オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターは、好ましくは、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである。薬剤としては、好ましくはテトラサイクリンまたはその誘導體(例えば、ドキシサイクリン)である。

[0038] オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターとしては、テトラサイクリン応答性プロモーター、R U 4 8 6 誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、ラパマイシン誘導性プロモーター、およびメタロチオネインプロモーターなどが挙げられる。具体的なテトラサイクリン応答性プロモーターには、テトラサイクリン応答因子とC M V プロモーターの一部からなるT R E - C M V - m i n i m a l プロモーターが挙げられる。この配列はテトラサイクリン応答因子とC M V プロモーターの一部が連結したプロモーターである。このプロモーターは、T e t オン/オフシステム(T E T s y s t e m s 社製)に使われている。

[0039] インスレーターとは、周囲の配列の影響を受けず遺伝子の転写を安定に制御するための配列である。インスレーターはR E P とC A P の間にあった方

がよい。またインスレーターは特に限定されるわけではないが、50bp以上10000bp以下であることが好ましく、100bp以上5000bp以下であることがより好ましく、300bp以上4000bp以下であることが特に好ましい。bp（ベースペア）は塩基配列または塩基配列数を意味する。

[0040] IRES (internal ribosome entry site) は遺伝子の転写産物の翻訳を開始させる配列であり、ある遺伝子と他の遺伝子をIRESで連結することで、同一の転写産物からそれぞれの遺伝子を翻訳させることができる。Cap遺伝子とE2遺伝子の間にIRESをコードすることができる。

[0041] オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターは、テトラサイクリンにより発現調節可能なプロモーターであるTetオン／オフシステムでもよく、Tetオンシステムでもよい。

[0042] Tetオンシステムにおいては、プロモーターは、少なくとも一つのテトラサイクリン応答因子（Tetオペロン）を付加的に含む。テトラサイクリン応答因子（Tetオペロン：テトラサイクリン制御転写活性化）を使用することにより、抗生物質であるテトラサイクリンまたはその誘導体のうちの一つ（例えば、ドキシサイクリン）の存在下において転写のオンまたはオフを可逆的に切り替えることができる。細胞内に存在するTetリプレッサータンパク質は、プロモーターへと導入されるTet operator配列に結合することによって発現を遮断する。したがって、TetリプレッサーがTet operator配列と結合している場合には、遺伝子発現は見られない。テトラサイクリンまたはドキシサイクリンを添加すると、Tetリプレッサーは隔離されてプロモーター活性を可能とし、遺伝子発現がオンにされる。Tetオペロン系は、Invitrogen社から入手可能なpcDNA（商標）4/T0哺乳動物発現ベクターにおいて使用されるTetオペロンなど、広く入手可能である。

[0043] プロモーターは、テトラサイクリン応答因子の下流にあることが好ましい

。

[0044] 好ましくは、本発明のプロデューサー細胞は、プロモーターの活性に作用する因子を含んでいてもよく、好ましくはプロモーターを活性化する因子であり、より好ましくはリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子 (rtTA) を発現する遺伝子を含んでいる。好ましくは、リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を発現する遺伝子は、R e p 遺伝子の下流に存在する。

[0045] R e p 遺伝子とC a p 遺伝子とは、一個の同じ外来プロモーターにより駆動していてもよいし、R e p 遺伝子とC a p 遺伝子とが、それぞれの遺伝子を駆動する二個の外来プロモーターにより駆動していてもよい。

R e p 遺伝子とC a p 遺伝子とが、それぞれの遺伝子を駆動する二個の外来プロモーターにより駆動される場合、R e p 遺伝子の外来プロモーターとC a p 遺伝子の外来プロモーターとは、同一の配列のプロモーターでもよいし、異なる配列のプロモーターでもよいが、好ましくは同一の配列のプロモーターである。

[0046] C a p 遺伝子とR e p 遺伝子とが、同一のベクターに含まれている場合、C a p 遺伝子の転写方向の下流にR e p 遺伝子が存在してもよいし、C a p 遺伝子の転写方向の上流にR e p 遺伝子が存在してもよいが、好ましくは、C a p 遺伝子の転写方向の下流にR e p 遺伝子が存在している。

[0047] 本発明のプロデューサー細胞は、好ましくは、さらに外来プロモーターの制御下にあるS m a l l R e p 遺伝子を含んでいてもよい。S m a l l R e p 遺伝子としては、R E P 5 2 およびR E P 4 0 が挙げられる。

本発明のプロデューサー細胞が、外来プロモーターの制御下にあるS m a l l R e p 遺伝子を含む場合、好ましくは、S m a l l R e p 遺伝子がR e p 遺伝子の上流にある。

[0048] S m a l l R e p 遺伝子は、好ましくは、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである。オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターの詳細は本明細書中において上記した通りである。

S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターは、好ましくは薬剤により発現を誘導できるプロモーターである。薬剤により発現を誘導できるプロモーターの詳細は本明細書中において上記した通りである。

S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターは、好ましくはテトラサイクリン応答因子の下流にある。

[0049] R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を含むベクターとしては、核酸であれば、特に限定されるものではなく、環状でも線状でもよい。例えば、人工的に設計した核酸などを使用することができ、好ましくは、プラスミドである。

[0050] アデノ随伴ウイルスの製造においては、一般的には、ウイルスヘルパー遺伝子を使用する。ウイルスヘルパー遺伝子とは、アデノ随伴ウイルスの複製およびパッケージングを可能にするための非アデノ随伴ウイルス遺伝子である。ウイルスヘルパー遺伝子としては、アデノ随伴ウイルス以外の他種ウイルスに由来する遺伝子が使用される。ウイルスヘルパー遺伝子の具体例としては、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスに由来するウイルスヘルパー遺伝子を挙げることができ、好ましくは、ウイルスヘルパー遺伝子は、アデノウイルス由来である。

[0051] アデノウイルスとは、アデノウイルス科のファミリーの、二本鎖DNAを含む二十面体ヌクレオカプシドを有する非エンベロープ型ウイルスを指す。50超のアデノウイルスのサブタイプがヒトから単離され、多くの異なるサブタイプが他の哺乳動物および鳥類から単離されている。これらのサブタイプは、アデノウイルス科のファミリーに属し、2つの属（すなわちマストアデノウイルス属およびアピアデノウイルス属）に分類されている。これらのアデノウイルスは、形態学的および構造的に類似している。しかしながら、ヒトにおいて、アデノウイルスは、異なる免疫学的特性を示し、すなわち血清型に分類される。アデノウイルスの2つのヒト血清型（すなわちA d 2およびA d 5）が重点的に研究されている。

[0052] アデノウイルス由来のウイルスヘルパー遺伝子としては、E 1 A、E 1 B、E 2（好ましくはE 2 A）、E 4、およびV A - R N Aなどが挙げられる

。E 1 領域の全部またはその一部を有する宿主細胞において、A A V のゲノムが複製されてカプシドにパッケージングされて、ウイルスピリオンを形成するために必要なアデノウイルスゲノムの領域は、E 2 A 領域、E 4 領域、およびV A 1 RNA 領域とされている。E 2 遺伝子には、E 2 A 領域とE 2 B 領域が含まれるが、本発明におけるE 2 遺伝子としては、E 2 A 領域のみを使用することができる。また、E 4 遺伝子には、複数のO R F が含まれる。E 4 領域による機能について、E 4 領域のオープンリーディングフレーム6 (E 4 O R F 6) によりコードされるE 4 34 k D a 蛋白質がA A V の複製に必要とされる。よって、本発明におけるE 4 遺伝子としては、O R F 6 のみを使用することができる。

[0053] 本発明のプロデューサー細胞は、V A - R N A 遺伝子およびE 4 遺伝子のうちの少なくとも一つを含まない。即ち、本発明のプロデューサー細胞としては、V A - R N A 遺伝子を含まずE 4 遺伝子を含む場合、V A - R N A 遺伝子を含みE 4 遺伝子を含まない場合、並びにV A - R N A 遺伝子およびE 4 遺伝子の両方を含まない場合が挙げられる。

[0054] 好ましくは、本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるE 4 遺伝子を染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子を含まない。この場合のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子と外来プロモーターの制御下にあるE 4 遺伝子とを染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞である。

[0055] 本発明のプロデューサー細胞がE 4 遺伝子を含む場合、E 4 遺伝子はI R E S の下流にあることが好ましい。

[0056] E 4 遺伝子の外来プロモーターは、好ましくは、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである。オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターの詳細は本明細書中において上記した通りである。

E 4 遺伝子の外来プロモーターは、好ましくは薬剤により発現を誘導できるプロモーターである。薬剤により発現を誘導できるプロモーターの詳細は

本明細書中において上記した通りである。

E 4 遺伝子の外来プロモーターは、好ましくはテトラサイクリン応答因子の下流にある。

[0057] 別の態様においては、本発明のプロデューサー細胞は、V A - R N A 遺伝子およびE 4 遺伝子の両方を含まない。「ある遺伝子を含まない」とは染色体に含まれないことだけでなく、細胞中に含まれないことを意味する。

[0058] 本発明のプロデューサー細胞は、好ましくは、さらにE 2 遺伝子（好ましくはE 2 A 遺伝子）を含んでいてもよい。

[0059] E 2 A 遺伝子は、野生型の遺伝子でもよいが、本来有する機能を発揮するものである限り、野生型の遺伝子に、塩基の置換、欠失、挿入または付加等の改変がなされた遺伝子を使用してもよい。

[0060] 本発明のプロデューサー細胞が、E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子を含む場合、好ましくは、E 2 遺伝子はI R E Sの下流にある。あるいは、E 2 遺伝子は、R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を含むベクターとは異なる第二のベクターとして導入してもよい。

[0061] 野生型のE 2 A 遺伝子に、塩基の置換、欠失、挿入または付加等の改変を行う場合、改変される塩基の個数は、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、更に好ましくは1～3個である。改変を加えたE 2 A 遺伝子の塩基配列は、野生型のE 2 A 遺伝子の塩基配列と、好ましくは85%以上の配列同一性を示し、より好ましくは90%以上の配列同一性を示し、更に好ましくは、95%以上の配列同一性を示し、更により好ましくは98%以上の配列同一性を示す。

[0062] E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子は、プロモーターの制御下、好ましくは外来プロモーターの制御下にあってもよい。

E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子の外来プロモーターは、好ましくは、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである。オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターの詳細は本明細書中において上記した通りである。

E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子の外来プロモーターは、好ましくは薬剤により発現を誘導できるプロモーターである。薬剤により発現を誘導できるプロモーターの詳細は本明細書中において上記した通りである。

[0063] E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子は、テトラサイクリン応答性プロモーター（TET）の制御の下で遺伝子のオンオフを制御してもよい。E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子のプロモーターとしては、特に限定されないが、サイトメガロウイルス由来プロモーター（CMVプロモーター）（所望によりエンハンサーを含む）、SV40初期プロモーター、ヒト伸長因子-1 α （EF-1 α ）プロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、およびテトラサイクリン応答性プロモーターなどを挙げることができる。上記の中でも、好ましくは、テトラサイクリン応答性プロモーター、サイトメガロウイルス由来プロモーターである。テトラサイクリン応答性プロモーターとしては、TRE-CMV-minimalプロモーターが挙げられる。好ましくは、E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子の外来プロモーターは、テトラサイクリン応答因子の下流にある。

[0064] 本発明の好ましい態様においては、プロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるE 4 遺伝子、外来プロモーターの制御下にあるE 2（好ましくはE 2 A）遺伝子、および外来プロモーターの制御下にあるSmall Rep 遺伝子を含み、Cap 遺伝子の外来プロモーターとE 2 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターであり、Rep 遺伝子の外来プロモーターとSmall Rep 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターである。

[0065] E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子を細胞に導入する場合、E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子を含むベクターを細胞に導入することができる。

[0066] E 2（好ましくはE 2 A）遺伝子を含むベクターとしては、核酸であれば、特に限定されるものではなく、環状でも線状でもよい。例えば、プラスミ

ド、人工的に設計した染色体などを使用することができ、好ましくは、プラスミドである。

[0067] 本発明のプロデューサー細胞は、好ましくは、さらに目的遺伝子を含んでいてもよい。

目的遺伝子としては、例えば、治療または予防用遺伝子を使用することができる。

治療または予防用遺伝子としては、標的細胞のゲノムにおいては不完全であるかまたは失われている遺伝子、または、所望の生物学的または治療的效果（例えば抗ウイルス機能）を有する非天然タンパク質をコードする遺伝子などを使用することができるが、特に限定されない。治療または予防用遺伝子の具体例としては、炎症性疾患、自己免疫、慢性および伝染性疾患（AIDS、癌、神経系疾患、心血管疾患、過剰コレステラ血症などの障害を含む）、貧血および血友病などの各種の血液疾患、遺伝子欠損（例えば嚢胞性線維形成、ゴーシェ疾患、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損、気腫など）の治療または予防のために使用される遺伝子が挙げられる。本実施例では、目的遺伝子の代わりにGFPまたはRFPを用いた。

[0068] 治療または予防用遺伝子としては、がんに対する、およびウイルス疾患に対するアンチセンス療法において有用であるいくつかのアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えばmRNAの翻訳開始部位（AUGコドン）周辺の配列に対する相補的短鎖オリゴヌクレオチド）でもよい。

[0069] 治療または予防用遺伝子は、治療または予防用遺伝子を発現させるためのプロモーターに連結されていてもよい。治療または予防用遺伝子を発現させるためのプロモーターは特に限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター（所望によりエンハンサーを含む）、SV40初期プロモーター、ヒト伸長因子-1 α （EF-1 α ）プロモーター、ヒトユビキチンCプロモーター、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、およびホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーターなどを挙げるることができる。

。治療または予防用遺伝子および遺伝子を発現させるためのプロモーターは I T R 配列に挟まれていることが好ましい。

逆方向末端配列 (I T R) は、標的細胞にアデノ随伴ウイルスの遺伝子が組み込まれるための塩基配列である。逆方向末端配列は通常、目的遺伝子を挟む位置に 2 つ存在する。逆方向末端配列は、これに限定されることはないが、好ましくは血清型 2 の A A V 由来配列であることが好ましい。

[0070] 本発明のプロデューサー細胞は、好ましくは真核細胞であり、例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞である。細胞は、より好ましくは哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞としては、例えば、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、サル細胞、ハムスター細胞などを挙げることができるが、特に限定されない。好ましくはヒト細胞を使用することができる。細胞の例としては、HEK 293 (ヒト胎児由来腎臓) 細胞、マウス骨髄腫 (NSO) 細胞系、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系、HT 1080、H9、Hep G 2、MCF 7、MDBK Jurkat、NIH3T3、PC12、BHK (乳児ハムスター腎臓細胞)、VERO、SP2/0、YB2/0、Y0、C127、L細胞、COS (例えばCOS1およびCOS7)、QC1-3、VERO、PER. C6、HeLa、EB1、EB2、EB3、ハイブリドーマ細胞系が挙げられる。好ましくは、細胞は、HEK 293細胞である。

[0071] 本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるCap遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるRep遺伝子とを染色体中に有している。好ましくは、本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるCap遺伝子を含むベクターと、外来プロモーターの制御下にあるRep遺伝子を含むベクターとを染色体中に有している。染色体中に有するとは、ベクターの全長もしくは一部が染色体に組み込まれていることを意味する。ベクターが染色体に組み込まれていることにより、上記遺伝子が細胞内に恒常的に維持されることになり、アデノ随伴ウイルスを任意のタイミングで産生することが可能となる。

[0072] 本発明のプロデューサー細胞の好ましい態様としては、

外来プロモーターの制御下にあるC a p遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p遺伝子と外来プロモーターの制御下にあるE 4遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるE 2 A遺伝子を染色体中に有し、V A-R N A遺伝子を含まない、哺乳動物細胞で、C a p遺伝子とR e p遺伝子とE 2遺伝子が近傍に（例えば同一遺伝子座に）存在し、E 4遺伝子は近傍に（例えば同一遺伝子座に）存在しないプロデューサー細胞；並びに

外来プロモーターの制御下にあるC a p遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p遺伝子と外来プロモーターの制御下にあるE 2 A遺伝子が搭載された第一のベクターと、外来プロモーターの制御下にあるE 4遺伝子が搭載された第二のベクターを染色体中に有し、V A-R N A遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞：
を挙げることができる。

[0073] 本発明のプロデューサー細胞においては、染色体上のE 4遺伝子挿入数が、その他の遺伝子挿入数より少ないことが好ましい。E 4の毒性は細胞生存を低下させる原因になり、E 4遺伝子挿入数が少ない方が、細胞が生存しやすいからである。

本発明のプロデューサー細胞においては、染色体上のE 4遺伝子挿入数が、C a p遺伝子またはE 2遺伝子の染色体上の挿入数より少ないことが好ましい。より好ましくは、染色体上のE 4遺伝子挿入数は、C a p遺伝子またはE 2遺伝子の染色体上の挿入数の0.8倍以下であることがより好ましく、0.6倍以下であることがさらに好ましく、0.4倍以下であることがさらに好ましく、0.3倍以下であることがさらに好ましく、0.2倍以下であることが特に好ましい。

染色体上のE 4遺伝子挿入数の下限は、C a p遺伝子またはE 2遺伝子の染色体上の挿入数の0.01倍以上であることが好ましく、0.02倍以上であることがより好ましく、0.03倍以上がさらに好ましい。

[0074] <プロデューサー細胞の製造方法>

本発明のプロデューサー細胞は、外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子とを哺乳動物細胞に導入することによって製造することができる。即ち、本発明によるプロデューサー細胞の製造方法は、外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子とを哺乳動物細胞に導入することを含む方法である。

[0075] 本発明のプロデューサー細胞の製造において使用するベクターの組み合わせの好ましい態様としては、以下の態様を挙げることができる。

(1) R e p 遺伝子およびC a p 遺伝子を含むベクター、E 2 (好ましくはE 2 A) 遺伝子を含むベクター、並びに所望の治療または予防用遺伝子を含むベクター

(2) R e p 遺伝子、C a p 遺伝子、E 2 (好ましくはE 2 A) 遺伝子を含むベクター、並びに所望の治療または予防用遺伝子を含むベクター；および

(3) R e p 遺伝子、C a p 遺伝子、E 2 (好ましくはE 2 A) 遺伝子、および所望の治療または予防用遺伝子を含むベクター；

[0076] 外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子を含むベクターと、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子を含むベクターとは、発現されるように導入されていればよいが、本発明においてはベクターが細胞の染色体の中に組み込まれることによって、好ましくは永続的な発現となる。永続的な発現とは、細胞が分裂した場合に、外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子および外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子を含むベクターも複製され、分裂後の細胞もベクターを有することになることをいう。

[0077] 外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子を含むベクターと、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子を含むベクターは、トランスフェクション、トランスダクションにより、染色体に組み入れることができる。更にトランスポゾン法と併用することにより、高効率に染色体に組み入れることができる。

[0078] トランスフェクションとは、化学的手段（例えば、リン酸カルシウム仲介

沈殿やリポフェクション)、機械的手段(例えば、エレクトロポレーション)または物理的手段(例えば、生体弾(bio ballistic)による送達)によって真核細胞の膜を横断して核酸を細胞に導入することをいう。リポフェクションとは、電気的な相互作用によりベクターと陽性荷電脂質などとの複合体を形成させ、エンドサイトーシスや膜融合により、核酸を細胞に導入することをいう。

[0079] トランスダクションとは、ウイルス由来のベクターを介して、真核細胞の膜を横断して、核酸を細胞に導入することをいう。

[0080] 本発明のプロデューサー細胞の製造方法は、遺伝子発現調節因子を導入することを含んでもよく、更にリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を導入することを含んでもよい。

リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子の導入は、リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子をコードする遺伝子を含むベクターを、トランスフェクション、トランスダクション、リポフェクションなどの方法により、細胞に導入することにより行うことができる。

[0081] <アデノ随伴ウイルスの製造方法>

本発明においては、本発明のプロデューサー細胞を培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生することができる。即ち、本発明のアデノ随伴ウイルスの製造方法は、本発明のプロデューサー細胞を培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生することを含む方法である。

[0082] 好ましくは、本発明のプロデューサー細胞を、Cap遺伝子およびRep遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養して、プロデューサー細胞を増殖させる工程を行い、その後、増殖したプロデューサー細胞を、Cap遺伝子およびRep遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を行うことができる。

[0083] さらに好ましくは、外来プロモーターの制御下にあるE4遺伝子を染色体中に有し、VA-RNA遺伝子を含まない本発明のプロデューサー細胞を、Cap遺伝子、Rep遺伝子およびE4遺伝子の発現を誘導させない条件下

において培養して、プロデューサー細胞を増殖させる工程を行い、その後、増殖したプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子、R e p 遺伝子およびE 4 遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を行うことができる。

[0084] 本発明のプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導させない条件下とは、誘導型プロモーターがC a p 遺伝子およびR e p 遺伝子を制御しており、その発現がオフにあることを意味し、好ましくはその発現は薬剤により制御されており、誘導型プロモーターをオンにする薬剤にプロデューサー細胞が接触しないことを意味し、更に好ましくはテトラサイクリン系薬剤がプロデューサー細胞に接触しないことを意味する。

[0085] C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導する条件下とは、誘導型プロモーターがC a p 遺伝子およびR e p 遺伝子を制御しており、その発現がオンにあることを意味し、好ましくはその発現は薬剤により制御されており、誘導型プロモーターをオンにする薬剤にプロデューサー細胞が接触することを意味し、更に好ましくは、テトラサイクリン系薬剤がプロデューサー細胞に接触することを意味し、特に好ましくは、ドキシサイクリンがプロデューサー細胞に接触することを意味する。

[0086] 本発明におけるプロデューサー細胞は、C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養し、3日以上増殖させる工程を行った後に、増殖したプロデューサー細胞をC a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導させる条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を行うことができる。

C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導させない条件下において、3日以上培養することが好ましく、5日以上培養することがより好ましく、7日以上培養することがより好ましい。

[0087] また、誘導型プロモーターをオフにするドキシサイクリンにプロデューサー細胞を接触させてC a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導する条件下で培養した後に、ドキシサイクリンを除去した場合において、プロデュー

サー細胞が、テトラサイクリン調節性トランス活性化因子 (tTA) を発現する遺伝子を含んでいる場合には、AAVを産生することができる。上記操作により、産生されたAAVに抗菌薬であるドキシサイクリンが混入しにくくなるという利点がある。

[0088] 本発明のアデノ随伴ウイルスの製造方法における細胞の培養は、細胞の培養のための通常の条件において行うことができる。使用する培地、および培養条件は、当業者であれば適宜選択することができる。培地としては、Expi293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, A1435101)、10% (vol/vol) ウシ胎仔血清 (FBS) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、無血清UltraCULTURE (商標) 培地 (Lonza) などを使用することができるが、特に限定されない。

[0089] 培養温度は、一般的には25℃~45℃であり、好ましくは30℃~42℃であり、より好ましくは35℃~40℃であり、一例としては37℃である。

CO₂濃度は、一般的には3~10%CO₂であり、好ましくは5~10%CO₂であり、一例としては8%CO₂である。

[0090] 細胞は、任意の体積の培地において培養することができ、例えば、1mLから2000Lの培地において細胞を培養することができ、好ましくは1L~2000Lであり、50L~2000Lがより好ましく、500L~2000Lが特に好ましい。

培養は振盪攪拌しながら行ってもよい。振盪攪拌する場合の攪拌速度は、一般的には50rpm~200rpmであり、好ましくは80~150rpmである。

攪拌培養は、リアクター内のプロペラ等による回転攪拌培養であってもよい。回転攪拌する場合の攪拌速度は、一般的には50rpm~200rpmであり、好ましくは80~150rpmである。また、波型振盪攪拌や、攪拌翼の上下動によって攪拌してもよいが、特に限定されない。

AAV産生工程における培養時間は、特に限定されないが、一般的には6時間～14日間であり、好ましくは12時間～7日間であり、より好ましくは24時間～144時間であり、さらに好ましくは24時間～96時間である。

[0091] 製造されたアデノ随伴ウイルスの力価は、当業者に公知の通常の方法により測定することができる。例えば、培養後の細胞培養液を回収し、凍結融解にて細胞を破碎した後、遠心分離によって上清を回収する。回収した上清にMgCl₂およびBenzonaseを添加して反応を行うことにより、gDNA（ゲノムDNA）や残存プラスミドを消化することができる。上記により得られたアデノ随伴ウイルスを含むサンプルを、ddPCR（Droplet Digital PCR）サンプルとして使用し、ddPCRを行うことによりAAVの力価を測定することが可能である。

[0092] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0093] [材料および方法]

<細胞培養>

浮遊化HEK293細胞（Thermo Fisher Scientific, R79007）を12mLのExpi293 Expression Medium（Thermo Fisher Scientific, A1435101）で 1×10^7 cells/mLとなるように懸濁し、125mL振とうフラスコで24時間培養した。培養液は120rpmで一定に攪拌しながら、37℃、8%CO₂ 条件下でインキュベートを行った。

[0094] <プラスミド構築>

AAVpro（登録商標）Helper Free System（AAV5）（タカラバイオ, 6650）を使用した（配列番号1、配列番号2、配列番号3）。

使用したプラスミドの全体配列を、配列表の配列番号4～14に示す。配列は全合成法にて製造した。

[0095] [表1]

配列番号	配列名称：説明
配列番号 1	pHelper : E2, E4, VA-RNA 遺伝子がコードされたプラスミド。
配列番号 2	pRC5 : Rep, Cap 遺伝子がコードされたプラスミド。
配列番号 3	pAAV-LacZ : 2つの ITR 配列間に LacZ 遺伝子がコードされたプラスミド。
配列番号 4	pAAV-GFP : 2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子がコードされたプラスミド。
配列番号 5	pHelper Vector Δ E4 : 配列 1 から E4 遺伝子を除去したプラスミド。
配列番号 6	pHelper Vector Δ VA : 配列 1 から VA-RNA 遺伝子を除去したプラスミド。
配列番号 7	pCMV-CIR : CMV プロモーター下に Cap 遺伝子、インスレーター配列、CMV プロモーター下に Rep 遺伝子をコードしたプラスミド。
配列番号 8	pCMV-E2 : CMV プロモーター下に E2 遺伝子をコードしたプラスミド。
配列番号 9	pTET-CIE-REP : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Rep 遺伝子をコードしたプラスミド。
配列番号 10	prtTA : CMV プロモーター下に r tTA 遺伝子をコードしたプラスミド。
配列番号 11	pLenti_AAV-GFP-Puro : 2つの ITR 配列間に GFP および puromycin 耐性遺伝子がコードされたレンチウイルスパッケージング用プラスミド。
配列番号 12	pLenti_CMV-E2-Hyg : CMV プロモーター下に E2 遺伝子および hygromycin 耐性遺伝子がコードされたレンチウイルスパッケージング用プラスミド。
配列番号 13	pTET-CIE-REP-rtTA-RFP : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子、インスレーター配列と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子と、CMV プロモーター下に RFP 遺伝子をコードしたプラスミド。
配列番号 14	pTET-CIE-REP-rtTA-NEO : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子、インスレーター配列と、TRE-CMV-MINIMAL プロモーター下に Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子と、PGK プロモーター下に Neomycin 耐性遺伝子をコードしたプラスミド。

配列番号 1 5	ddPCR-PrimerF : AAV ゲノム検出用プライマー。
配列番号 1 6	ddPCR-PrimerR : AAV ゲノム検出用プライマー。
配列番号 1 7	Probe : AAV ゲノム検出用プローブ。
配列番号 1 8	(図 1 0 遺伝子設計 1 のプラスミド) pTET-SR1E2-CIR-rtTA-Puro-GOI : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Small Rep 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。
配列番号 1 9	(図 1 0 遺伝子設計 2 のプラスミド) pTET-C1E2-SR1R-rtTA-Puro-GOI : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Small Rep 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。
配列番号 2 0	(図 1 0 遺伝子設計 3 のプラスミド) 第一ベクター pTET-C-SR1R-rtTA-Puro-GOI ; TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Small Rep 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。
配列番号 2 1	(図 1 0 遺伝子設計 3 のプラスミド) 第二ベクター pTET-E2 : TRE-CMV-minimal プロモーター下に E2 遺伝子と、EF-1 α プロモーター下に rtTA 遺伝子と、PGK プロモーター下に Neomycin 耐性遺伝子とをコードしたプラスミド。

配列番号 2 2	<p>(図 1 0 遺伝子設計 4 のプラスミド) 第一ベクター pTET-CIE2-SRIR-rtTA-Puro-GOI : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Small Rep 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 3	<p>(図 1 0 遺伝子設計 4 のプラスミド) 第二ベクター pTET-RFP-IE4 : TRE-CMV-minimal プロモーター下に RFP 遺伝子、IRES 配列、E4 遺伝子と、PGK プロモーター下に Neomycin 耐性遺伝子をコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 4	<p>(図 1 0 遺伝子設計 5 のプラスミド) pTET-CIE2IE4-SRIR-rtTA-Puro-GOI : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子、IRES 配列、E2 遺伝子、IRES 配列、E4 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に Small Rep 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 5	<p>(図 1 0 遺伝子設計 6 のプラスミド) 第一ベクター pTET-C-SRIR-rtTA-Puro-GOI : TRE-CMV-minimal プロモーター下に Cap 遺伝子と、TRE-CMV-minimal プロモーター下に SmallRep 遺伝子、IRES 配列、Rep 遺伝子と、CMV プロモーター下に rtTA 遺伝子、IRES 配列、Puromycin 耐性遺伝子と、2つの ITR 配列間に GFP 遺伝子と、これらが piggyBac トランスポゼース認識配列間にコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 6	<p>(図 1 0 遺伝子設計 6 のプラスミド) 第二ベクター pTET-E2-IE4 : TRE-CMV-minimal プロモーター下に E2 遺伝子、IRES 配列、E4 遺伝子と、EF-1α プロモーター下に rtTA 遺伝子と、PGK プロモーター下に Neomycin 耐性遺伝子をコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 7	<p>CMV プロモーター下に piggyBac トランスポゼース遺伝子をコードしたプラスミド。</p>
配列番号 2 8	<p>ddPCR-RPP30_F : RPP30 遺伝子検出用プライマー 1。</p>

配列番号 29	ddPCR-RPP30_R : RPP30 遺伝子検出用プライマー 2。
配列番号 30	ddPCR-RPP30_P : RPP30 遺伝子検出用プローブ。
配列番号 31	ddPCR-Rep_F : Rep 遺伝子検出用プライマー 1。
配列番号 32	ddPCR-Rep_R : Rep 遺伝子検出用プライマー 2。
配列番号 33	ddPCR-Rep_P : Rep 遺伝子検出用プローブ。
配列番号 34	ddPCR-Cap_F : Cap 遺伝子検出用プライマー 1。
配列番号 35	ddPCR-Cap_R : Cap 遺伝子検出用プライマー 2。
配列番号 36	ddPCR-Cap_P : Cap 遺伝子検出用プローブ。
配列番号 37	ddPCR-E2_F : E2 遺伝子検出用プライマー 1。
配列番号 38	ddPCR-E2_R : E2 遺伝子検出用プライマー 2。
配列番号 39	ddPCR-E2_P : E2 遺伝子検出用プローブ。
配列番号 40	ddPCR-E4_F : E4 遺伝子検出用プライマー 1。
配列番号 41	ddPCR-E4_R : E4 遺伝子検出用プライマー 2。
配列番号 42	ddPCR-E4_P : E4 遺伝子検出用プローブ。

[0096] <遺伝子導入方法>

1. 8 mL の Expi293 Expression Medium に Polyethylenimine (PEI) (PolyPlus-transfection SAS, 115-0015) 36 μ L と、後記する組み合わせのプラスミドを等量混合し総量 18 μ g を懸濁し、15 分間静置した。その後、前日に細胞濃度 1×10^7 cells/mL で播種した培養細胞（培養液量は 12 mL）に、上記試薬を添加し、37°C、8% CO₂ 条件下でインキュベートを行った。

[0097] <ウエスタンブロット>

細胞を遠心分離により回収し、RIPA Buffer で溶解した。細胞溶液に Sample Buffer (ナカライ, 09499-14) を添加し、100°C で 5 分間加熱してサンプルを調製した。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ゲル電気泳動装置 (アトー, 2321670) を用いてサンプル中のタンパク質をサイズ分離後、セミドライブロットティング装置 (アトー, 2322490) を用いてメンブレンに転写を行った。転写後のメンブレ

ンはBlocking One (ナカライテスク, 03953-95) を用いて30分間ブロッキング後、ブロッキング溶液で70倍に希釈した抗REP抗体 (OriGene Technologies)、カプシドの構造タンパク質に反応する抗VP抗体 (PROGEN Biotechnik GmbH)、抗 β -Actin抗体 (Abcam) で常温、3時間反応させた。次に、二次抗体としてブロッキング溶液で10,000倍に希釈したanti-mouse IgG-HRP (Cytiva) を常温、2時間反応後、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, 34095) によりREPタンパク質およびカプシドの構造タンパク質 (VP1、VP2、VP3) を検出した。撮影にはWSE-6100 LuminoGraph I (アトー, 2006100) を用いた。取得画像の解析にはImageJを用いて定量評価を実施した。

[0098] <AAV力価測定>

遺伝子導入後72時間、37℃、8%CO₂条件下で培養を行ったHEK細胞培養液を回収し、-80℃での凍結融解にて細胞を破碎した。その後、13,800×gの遠心分離によって上清を回収し、終濃度2mmol/L MgCl₂、25U/mL Benzonaseを添加し、37℃で2時間反応を行い、gDNA (ゲノムDNA) や残存プラスミドを消化した。反応後のサンプルは、95℃で15分、70℃で3分、40℃で3分、20℃で3分の順にインキュベーションし、Benzonaseを失活させ、これをddPCR (Droplet Digital PCR) サンプルとした。ddPCRサンプルはTE buffer (pH8.0, 0.05%Pluronic F-68 および10μg/mLウシ胸腺DNA含有) で50倍に希釈した。氷上でチューブにddPCRTm Supermix for Probes (no dUTP) (BIORAD社) 10μL、希釈済みのddPCRサンプル2μL、プライマー (配列番号15、配列番号16、最終濃度900nmol/L) およびプローブ (配列番号17、最終濃度25

0 nmol/L)、ヌクレアーゼフリーwater (Thermo Fisher Scientific, 10977015) を混合して、総液量 22 μ L に調整し、ddPCRを行った。

[0099] ddPCRにおいては、ドロップレット形成機器にて調製液からドロップレット形成し、95°Cで10分(プレヒート)、94°Cで30秒(変性)した後55°Cで60秒(アニーリングと伸長)の変性、アニーリング、伸長を40サイクル、98°Cで10分の順でインキュベーションした。ドロップレットリーダーにより測定を行い、AAVゲノム力価(vg/mL)を算出した。

[0100] <細胞株樹立>

1. 8 mLのExpi293 Expression MediumにPolyethylenimine (PEI) (PolyPlus-transfection SAS, 115-0015) 36 μ Lと、後記する組み合わせのプラスミドを等量混合し総量18 μ gを懸濁し、15分間静置した。その後、前日に細胞濃度 1×10^7 cells/mLで播種した培養細胞(培養液量は12 mL)に、上記試薬を添加し、37°C、8%CO₂条件下でインキュベートを行った。遺伝子導入した細胞を3週間維持培養し、耐性遺伝子による薬剤選抜もしくはフローサイトメトリーを用いてRFPもしくはGFP蛍光陽性細胞をシングルセルで単離した。単離した細胞は、10%ウシ胎児血清を含有したDMEMに懸濁し、6ウェルプレート上で37°C、8%CO₂ 条件下で1ヵ月培養し、細胞株を樹立した。

[0101] DOX (+) のサンプルには遺伝子導入後に、終濃度0.5 μ g/mLのドキシサイクリン(DOX)を添加した。ドキシサイクリン添加後、72時間培養したHEK293細胞から抽出したAAVゲノム力価を評価した。

[0102] 実験1:

<方法>

以下に記載の配列を有するプラスミドをそれぞれ細胞に遺伝子導入し、細胞を回収後、ウエスタンブロッティングで、発現を評価した。

C t r l : 配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 3

△ヘルパー : 配列番号 2 および配列番号 3

△E 4 : 配列番号 2、配列番号 3、および配列番号 5

△V A - R N A : 配列番号 2、配列番号 3、および配列番号 6

[0103] <結果>

結果を図 1 に示す。

ヘルパー遺伝子 (3 種) がない場合 (△ヘルパー) には、R E P と C A P は発現しなかった。また、E 4 または V A - R N A を単独で除いた場合においても、R E P と C A P の発現量は大幅に減少した。

[0104] 市販のキット (T a k a r a 等) においては 3 種のプラスミドを使用することが一般的であるが、これらのプラスミドに含まれる各種遺伝子は相互作用している。従って、E 4 遺伝子と V A - R N A 遺伝子を使用しない場合には R E P と C A P を発現させることができず、A A V を産生することができない。

[0105] 実験 2 :

<方法>

以下に記載の配列を有するプラスミドをそれぞれ細胞に遺伝子導入し、細胞を 7 2 時間後に回収した後、d d P C R で A A V 産生能を評価した。

C t r l : 配列番号 1、配列番号 4、および配列番号 7

△E 4 △V A - R N A : 配列番号 4、配列番号 7、および配列番号 8

[0106] <結果>

結果を図 2 に示す。

外来プロモーターを R e p 遺伝子と C a p 遺伝子に結合すると、E 4 と V A がなくても約 8 0 % の A A V が産生可能であった。

[0107] 実験 3 :

<方法>

配列番号 9 を作製して、配列番号 1 0 と同時に遺伝子導入し、遺伝子導入後 2 4 時間でドキシサイクリン (D O X) を添加し、さらに 7 2 時間後に、

REPタンパク質およびCAPタンパク質の発現をウエスタンブロットで評価した。

rtTA (-)、DOX (-) : TET調整因子と誘導剤がない状態 (スイッチOFFでの遺伝子発現リークを評価)

rtTA (+)、DOX (-) : TET調整因子有り / 誘導剤がない状態 (スイッチOFFでの遺伝子発現リークを評価)

rtTA (+)、DOX (+) : TET調整因子と誘導剤がある状態 (スイッチONでの遺伝子発現を評価)

rtTAはTRE-CMV-minimalプロモーターの制御下にある遺伝子を発現させるタンパク質であり、プラスミドとして導入した。rtTAのプロモーターとしてはCMV-minimalプロモーターを使用した。

[0108] <結果>

結果を図3に示す。

配列番号9は、配列番号10の存在下、ドキシサイクリン添加時に、REPタンパク質およびCAPタンパク質の発現を制御することができた。

[0109] 実験4 : E2遺伝子、GFP挿入細胞の製造

<方法>

HEK293T細胞 (Takara) に、Lentiviral High Titer Packaging Mix (Takara) と配列番号11もしくは配列番号12を共に導入してレンチウイルスを産生した。その培養上清を、1/100分量のHEK293細胞にポリブレン2~12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分と共に添加して感染細胞を樹立した。そこで薬剤を添加し、1ヶ月以上継代したものからゲノムを抽出し、PCRにてE2遺伝子およびGFP遺伝子の染色体への挿入を確認した。タンパク質が発現しているかは、E2をWestern Blot (E2抗体) で検出した。また、GFPは蛍光顕微鏡で緑色の蛍光が存在することを確認した。

[0110] <結果>

結果を図4に示す。図4は、安定発現株（増殖させた細胞）について、a n t i - E 2抗体を用いたウエスタンブロット（（図4の下段の左図）とG F P観察（蛍光顕微鏡）（図4の下段の右図）の結果を示す。

目的遺伝子としてI T Rで挟まれたG F Pが挿入された安定株が樹立され、C M Vプロモーター下で駆動するE 2が挿入された安定株が樹立された。

[0111] 実験5：A A V機能評価

<方法>

上記した、C M V - E 2およびI T Rで挟まれたG F Pが導入された細胞株に、R e p遺伝子およびC a p遺伝子（配列番号7）をプラスミドで導入した。導入から72時間後に、培養上清を回収して、A A Vをd d P C Rで検出した。

[0112] <結果>

結果を図5に示す。

配列番号7を添加していない場合はA A Vをほぼ検出できなかったが、配列番号7を導入した細胞株（別日樹立株2種類）ではA A Vを産生することができた。

[0113] 実験6：プロデューサー細胞の製造

<方法>

配列番号11を用いてレンチウイルスを作成し、「実験4：E 2遺伝子、G F P挿入細胞の製造」の<方法>に記載した方法で感染導入したH E K 2 9 3に配列番号13（選抜マーカー：R F P 赤色蛍光タンパク質）を遺伝子導入した細胞と配列番号14（選抜マーカー：N E O、ネオマイシン耐性遺伝子）を遺伝子導入し多細胞を作製し、それぞれ染色体に導入されたシングル株を選抜した。配列番号13の導入細胞は赤色蛍光を指標に選抜した。また、配列番号14の導入細胞は、G 4 1 8を200 μ g / m lの濃度で添加し、選抜した（図6）。遺伝子導入から1ヶ月以上培養した細胞からゲノムを取り出し、P C R法にてゲノムへの導入を確認し安定株を樹立した。

[0114] 選抜した細胞株（配列番号14導入株は30株、配列番号13導入株は6

0株)を30万/Wellになるように播種し、ドキシサイクリンを添加し遺伝子発現を誘導した。72時間後にAAVをddPCRで定量した。

[0115] <結果>

配列番号14 (選抜マーカー: NEO ネオマイシン耐性遺伝子)を導入した株についての、AAVの定量結果を図7に示す。縦軸は、AAV Titer vg/cellを示し、横軸はClone番号を示す。

配列番号13 (選抜マーカー: RFP 赤色蛍光タンパク質)を導入した株についての、AAVの定量結果を図8に示す。縦軸は、AAV Titer vg/cellを示し、横軸はClone番号を示す。

安定株の代表的な顕微鏡図を、図9に示す。

[0116] 実験7: プロデューサー細胞の製造 (2)

<方法>

HEK293に配列番号18 (選抜マーカー: GFP)を遺伝子導入した細胞 (設計1導入細胞)と、HEK293に配列番号19 (選抜マーカー: GFP)を遺伝子導入した細胞 (設計2導入細胞)と、HEK293に配列番号20および配列番号21 (選抜マーカーおよび薬剤: GFPおよびネオマイシン耐性遺伝子 (NEO))を遺伝子導入した細胞 (設計3導入細胞)と、HEK293に配列番号22および配列番号23 (選抜マーカーおよび薬剤: GFPおよびNEO)を遺伝子導入した細胞 (設計4導入細胞)と、HEK293に配列番号24 (選抜マーカー: GFP)を遺伝子導入した細胞 (設計5導入細胞)と、HEK293に配列番号25および配列番号26 (選抜マーカーおよび薬剤: GFPおよびNEO)を遺伝子導入した細胞 (設計6導入細胞)とを作製し、それぞれ染色体に導入されたシングル株を選抜した。

[0117] 設計1から設計6導入細胞の作製時は、配列番号18・19・20・22・24・25の染色体への組換え効率を向上させるために、配列番号27のプラスミドベクターをさらに共遺伝子導入しトランスポゼース組換え酵素を一過性に発現させた。

[0118] 設計1導入細胞と設計2導入細胞と設計5導入細胞は緑色蛍光を指標に選抜した。また、設計3導入細胞と設計4導入細胞と設計6導入細胞は、G418を200 μ g/mlの濃度で添加し選抜し、さらに緑色蛍光を指標に選抜した(図11)。

遺伝子導入から1ヶ月以上培養した細胞からゲノムを取り出し、PCR法にてゲノムへの導入を確認し安定株を樹立した。

選抜した細胞株を3.0 $\times 10^5$ cells/Wellになるように24WELLプレートに播種し、ドキシサイクリンを添加し遺伝子発現を誘導した。72時間後にAAVをddPCRで定量した。

[0119] 選抜した細胞株について1.0 $\times 10^6$ cellsの細胞を回収し、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)でゲノムDNAを抽出した。これをddPCRサンプルとした。ddPCRサンプルはヌクレアーゼフリーwater (Thermo Fisher Scientific, 10977015)で15ng/ μ Lに希釈した。氷上でチューブにddPCRTm Supermix for Probes (no dUTP) (BIORAD社) 10 μ L、希釈済みのddPCRサンプル2 μ L、表2に示す組み合わせのプライマー(最終濃度900nmol/L)およびプローブ(最終濃度250nmol/L)、ヌクレアーゼフリーwater (Thermo Fisher Scientific, 10977015)を混合して、総液量22 μ Lに調整し、ddPCRを行った。ゲノムDNAサンプルのddPCR測定値から、下記式1の方法で細胞あたりのゲノム上の遺伝子挿入数を算出した。

<式1>

細胞あたりのゲノム上の遺伝子挿入数(copies/cell) = (FAMの定量数/HEXの定量数) \times 3

[0120]

[表2]

Rep 遺伝子数検出セット	配列番号28、配列番号29、配列番号30 配列番号31、配列番号32、配列番号33
Cap 遺伝子数検出セット	配列番号28、配列番号29、配列番号30 配列番号34、配列番号35、配列番号36
E2 遺伝子数検出セット	配列番号28、配列番号29、配列番号30 配列番号37、配列番号38、配列番号39
E4 遺伝子数検出セット	配列番号28、配列番号29、配列番号30 配列番号40、配列番号41、配列番号42

[0121] 配列番号30はHEK蛍光色素標識したDNAプローブを、配列番号33、配列番号36、配列番号39、配列番号42はFAM蛍光色素標識したDNAプローブを使用した。

[0122] <結果>

設計1～設計6導入細胞の最高力価株についての、AAVの定量結果を図12に示す。縦軸は、AAV Titer vg/cellを示し、横軸は細胞株名を示す。

設計4導入細胞株（10株）および設計5導入細胞株（10株）についてPCR法にて計測したゲノム上の遺伝子挿入数を図13および図14に示す。第一縦軸は1細胞あたりの遺伝子挿入数、第二縦軸はAAV Titer vg/cell、横軸はクローン名を示す。

[0123] 実験8：プロデューサー細胞の浮遊化

<方法>

実験7で樹立した設計4導入細胞の最高力価株と、設計5の最高力価株を12mLのExpi293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, A1435101)で $0.1 \sim 2 \times 10^6$ cells/mLとなるように懸濁し、125mL振とうフラスコで培養し浮遊化させた。培養液は120rpmで一定に攪拌しながら、37℃、8%CO₂条件下でインキュベートを行った。浮遊化から1か月間継

続的に培養した。

[0124] 浮遊化培養した細胞株を Expi293 Expression Medium に 4.0×10^5 cells/mL になるように播種し、ドキシサイクリンを添加し遺伝子発現を誘導した。培養液は 120 rpm で一定に攪拌しながら、37℃、8%CO₂ 条件下でインキュベートを行った。72 時間後に AAV を ddPCR で定量した。

[0125] <結果>

浮遊化した設計4 導入細胞の最高力価株と設計5 の最高力価株についての、AAV の定量結果を図15 に示す。縦軸は、AAV Titer vg/cell を示し、横軸は細胞株名を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 外来プロモーターの制御下にあるC a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にあるR e p 遺伝子とを染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子およびE 4 遺伝子のうちの少なくとも一つを含まず、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。
- [請求項2] R e p 遺伝子の外来プロモーターとC a p 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターである、請求項1に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項3] C a p 遺伝子の転写方向の下流にR e p 遺伝子が存在している、請求項1に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項4] 外来プロモーターの制御下にあるE 4 遺伝子を染色体中に有し、V A - R N A 遺伝子を含まない、請求項1に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項5] E 4 遺伝子がI R E Sの下流にある、請求項4に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項6] E 4 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、請求項4に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項7] E 4 遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、請求項6に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項8] E 4 遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、請求項7に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項9] V A - R N A 遺伝子およびE 4 遺伝子の両方を含まない、請求項1に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項10] さらにE 2 A 遺伝子を含む、請求項1から9の何れか一項に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項11] E 2 A 遺伝子がI R E Sの下流にある、請求項10に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項12] E 2 A 遺伝子が、外来プロモーターの制御下にある、請求項10に記載

載のプロデューサー細胞。

- [請求項13] E 2 A 遺伝子が、サイトメガロウイルス由来プロモーターの制御下にある、請求項 1 2 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項14] E 2 A 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、請求項 1 0 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項15] E 2 A 遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、請求項 1 4 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項16] E 2 A 遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、請求項 1 5 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項17] 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子とを染色体中に有し、
V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。
- [請求項18] さらに目的遺伝子を含む、請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項19] C a p 遺伝子の外来プロモーターおよび R e p 遺伝子の外来プロモーターのうちの 1 つ以上が、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、請求項 1 から 1 8 の何れか一項に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項20] C a p 遺伝子の外来プロモーターおよび R e p 遺伝子の外来プロモーターのうちの 1 つ以上が、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、請求項 1 9 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項21] C a p 遺伝子の外来プロモーターおよび R e p 遺伝子の外来プロモーターのうちの 1 つ以上が、テトラサイクリン応答因子の下流にあることを含む、請求項 2 0 に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項22] さらに外来プロモーターの制御下にある S m a l l R e p 遺伝子を含

む、請求項1から21の何れか一項に記載のプロデューサー細胞。

- [請求項23] S m a l l R e p 遺伝子の転写方向の下流に R e p 遺伝子が存在している、請求項22に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項24] S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターが、オンおよびオフの切り替えができる誘導型プロモーターである、請求項22に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項25] S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターが、薬剤により発現を誘導できるプロモーターである、請求項24に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項26] S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターが、テトラサイクリン応答因子の下流にある、請求項25に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項27] 更にリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を発現する遺伝子を含む、請求項1から26の何れか一項に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項28] リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を発現する遺伝子が R e p 遺伝子の下流にあることを含む、請求項27に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項29] 外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子、外来プロモーターの制御下にある E 2 A 遺伝子、および外来プロモーターの制御下にある S m a l l R e p 遺伝子を含み、
C a p 遺伝子の外来プロモーターと E 2 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターであり、 R e p 遺伝子の外来プロモーターと S m a l l R e p 遺伝子の外来プロモーターが同一のプロモーターである、
請求項1に記載のプロデューサー細胞。
- [請求項30] 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 2 A 遺伝子を染色体

中に有し、

V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞で、

C a p 遺伝子と R e p 遺伝子と E 2 遺伝子が近傍に存在し、E 4 遺伝子は近傍に存在しないプロデューサー細胞。

[請求項31] 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある E 2 A 遺伝子とが搭載された第一のベクターと、
外来プロモーターの制御下にある E 4 遺伝子が搭載された第二のベクターを染色体中に有し、
V A - R N A 遺伝子を含まない、哺乳動物細胞である、プロデューサー細胞。

[請求項32] 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、その他の遺伝子挿入数より少ない、請求項 3 1 または 3 2 に記載のプロデューサー細胞。

[請求項33] 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、C a p 遺伝子または E 2 遺伝子の染色体上の挿入数より少ない、請求項 3 1 または 3 2 に記載のプロデューサー細胞。

[請求項34] 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、C a p 遺伝子の染色体上の挿入数の 0.4 倍以下である、請求項 3 1 または 3 2 に記載のプロデューサー細胞。

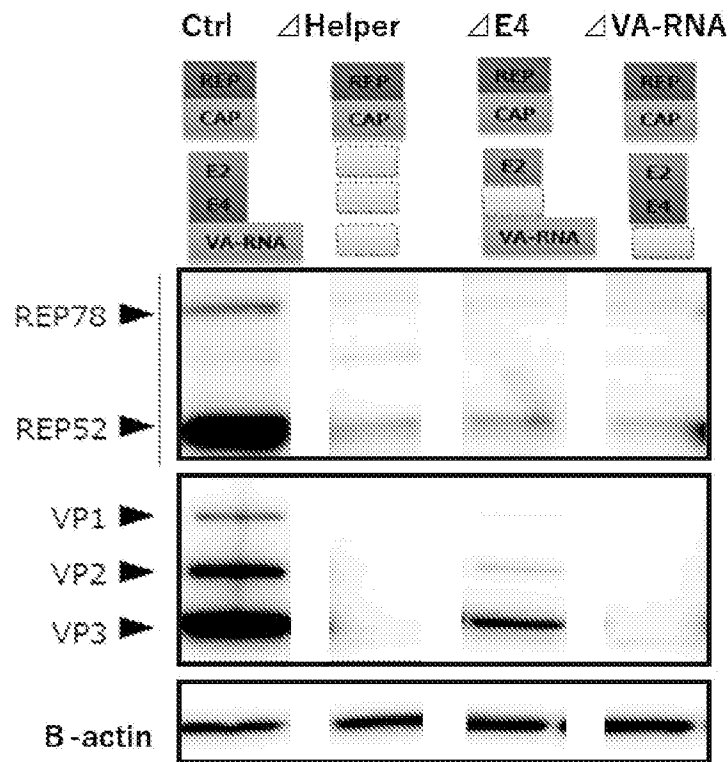
[請求項35] 染色体上の E 4 遺伝子挿入数が、E 2 遺伝子の染色体上の挿入数の 0.4 倍以下である、請求項 3 1 または 3 2 に記載のプロデューサー細胞。

[請求項36] 外来プロモーターの制御下にある C a p 遺伝子と、外来プロモーターの制御下にある R e p 遺伝子とを哺乳動物細胞に導入することを含む、請求項 1 から 3 5 の何れか一項に記載のプロデューサー細胞の製造方法。

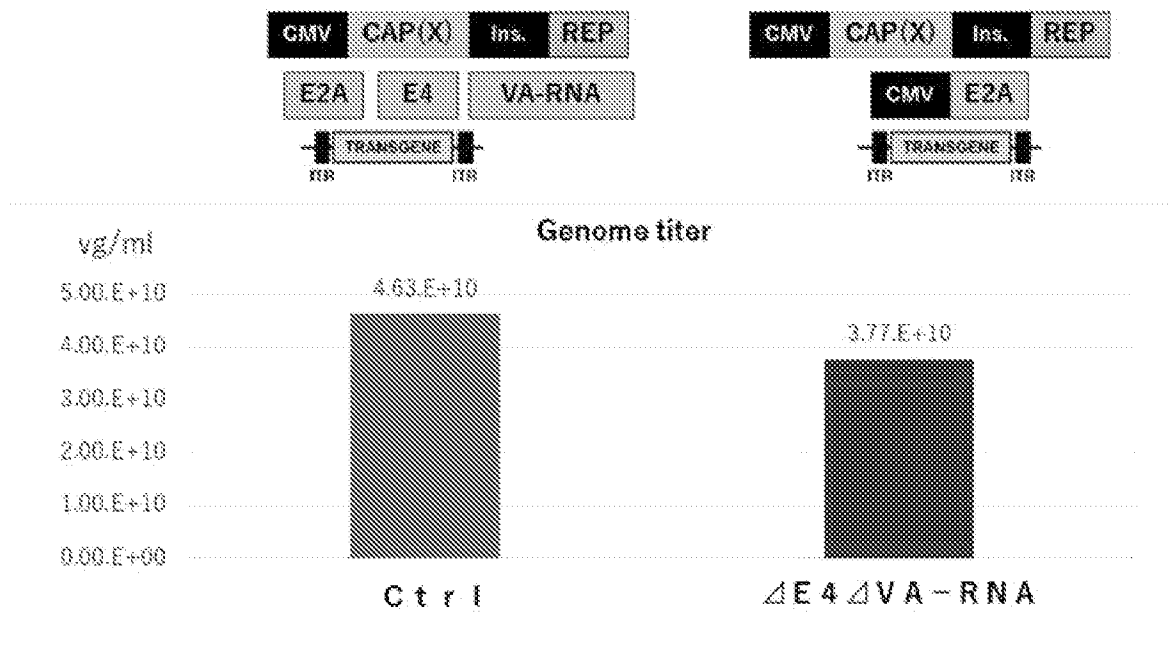
[請求項37] 更にリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子を導入することを含む、請求項 3 6 に記載のプロデューサー細胞の製造方法。

- [請求項38] 請求項1から35の何れか一項に記載のプロデューサー細胞を培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生することを含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。
- [請求項39] 請求項1から35の何れか一項に記載のプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養して、前記プロデューサー細胞を増殖させる工程、および増殖したプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子およびR e p 遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。
- [請求項40] 請求項4～8の何れか一項に記載のプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子、R e p 遺伝子およびE 4 遺伝子の発現を誘導させない条件下において培養して、前記プロデューサー細胞を増殖させる工程、および増殖したプロデューサー細胞を、C a p 遺伝子、R e p 遺伝子およびE 4 遺伝子の発現を誘導する条件下において培養することによって、アデノ随伴ウイルスを産生する工程を含む、アデノ随伴ウイルスの製造方法。

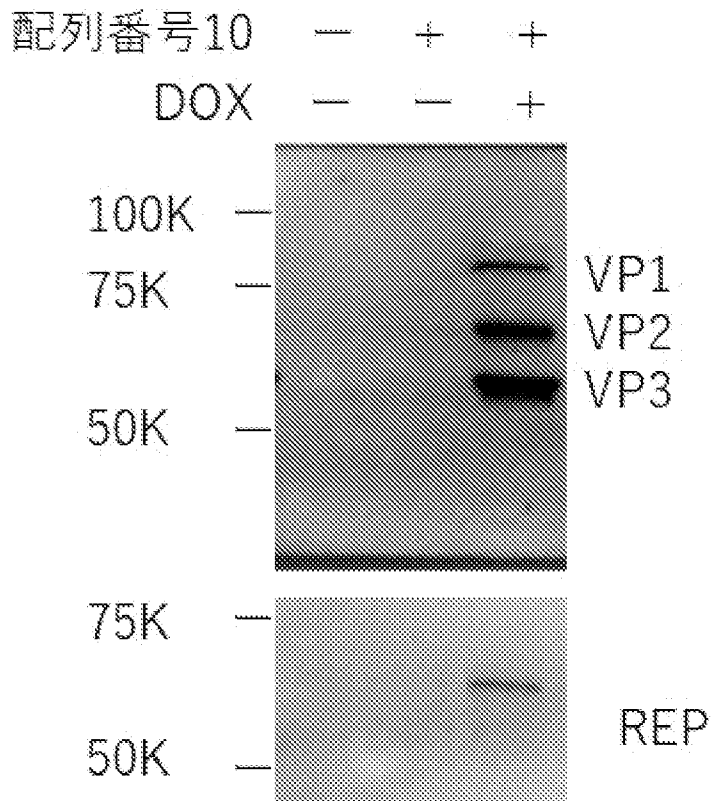
[図1]



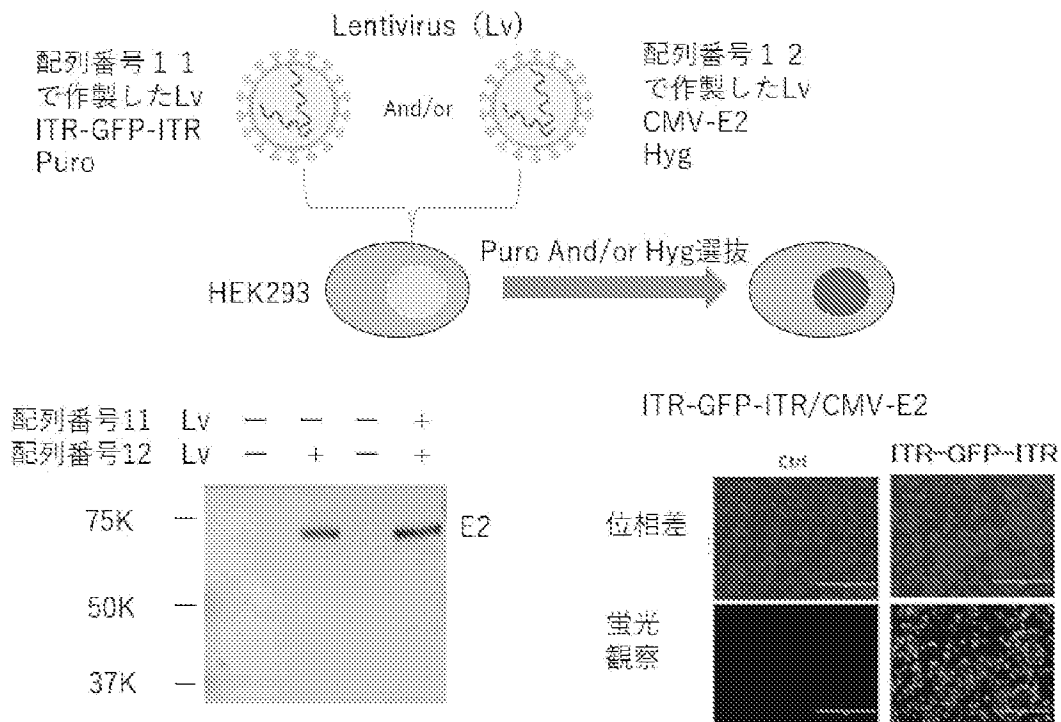
[図2]



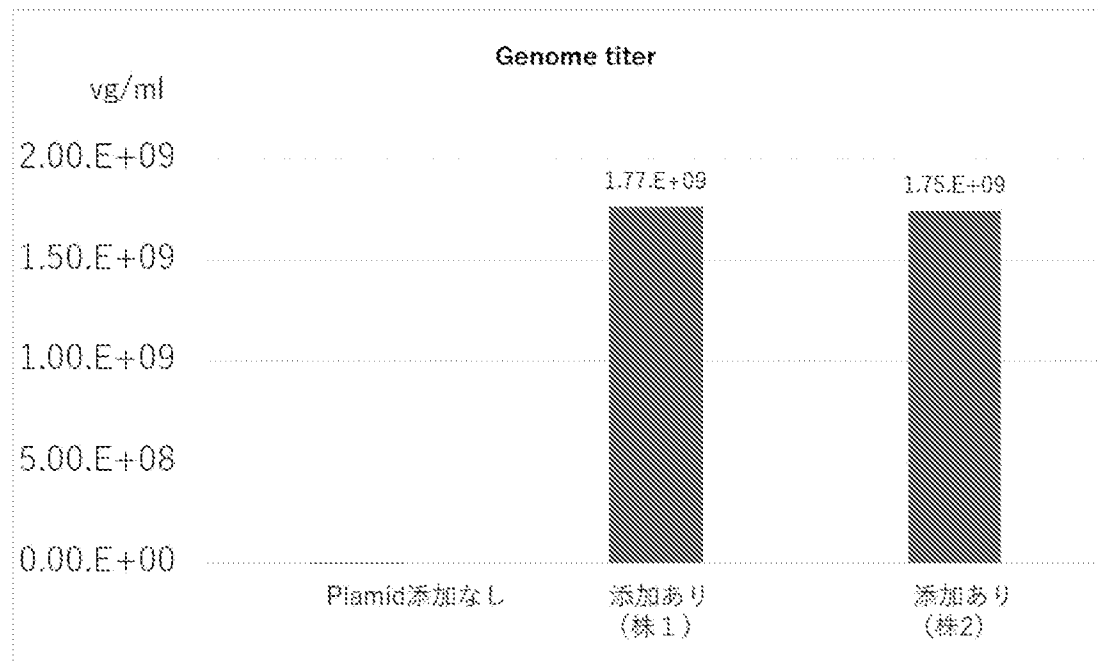
[図3]



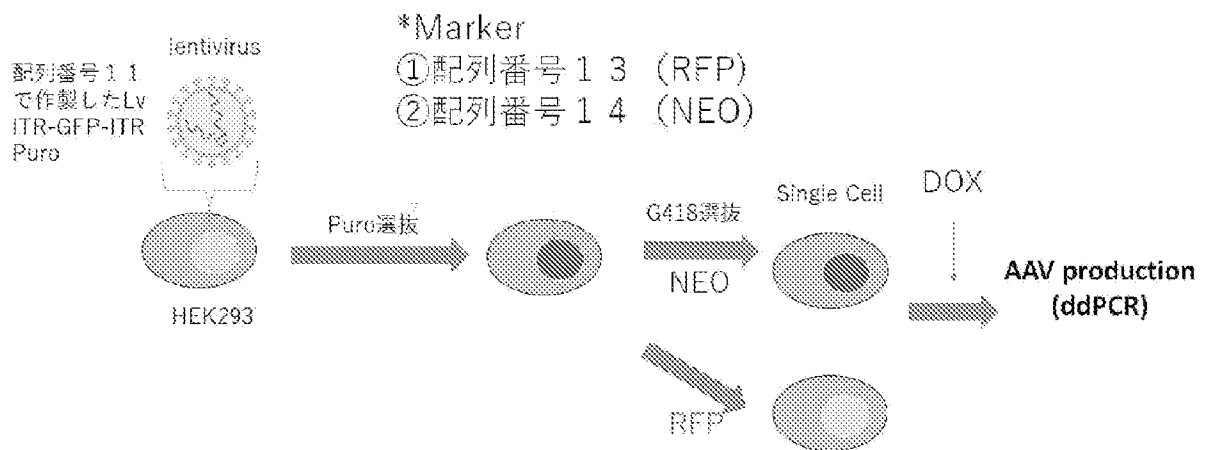
[図4]



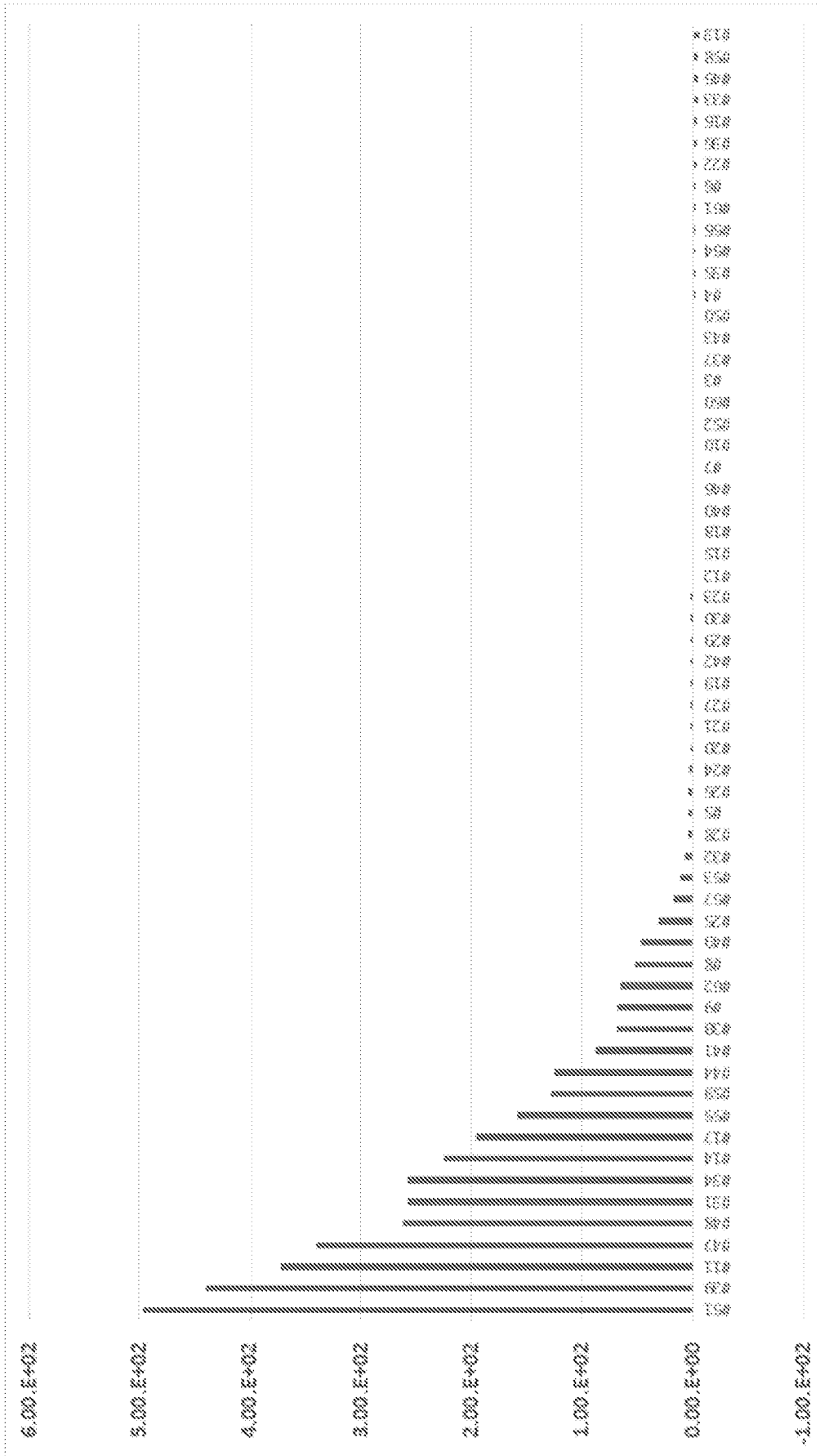
[図5]



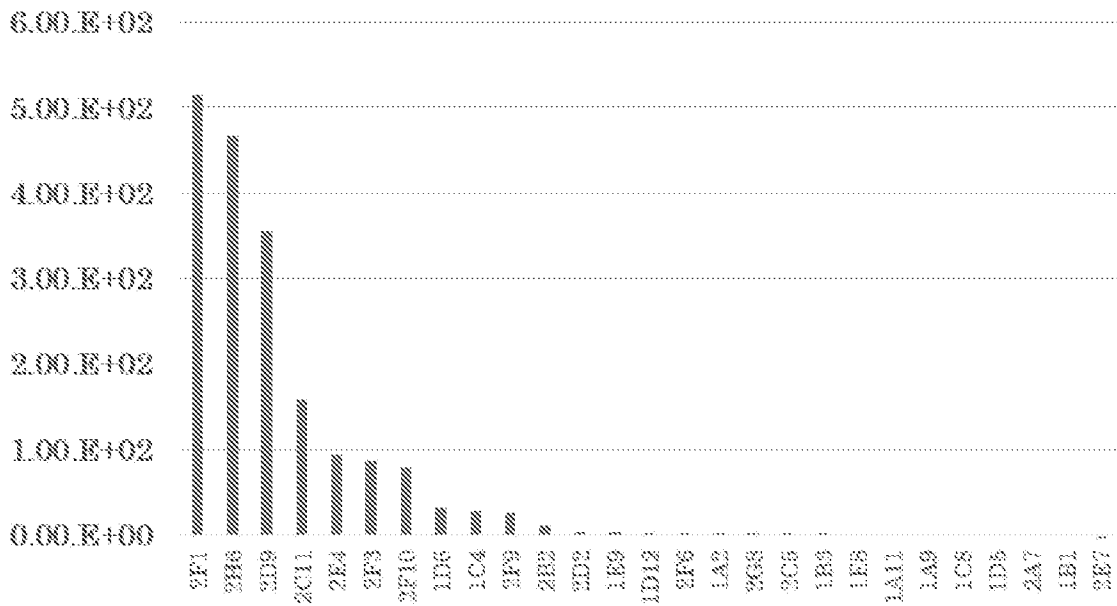
[図6]



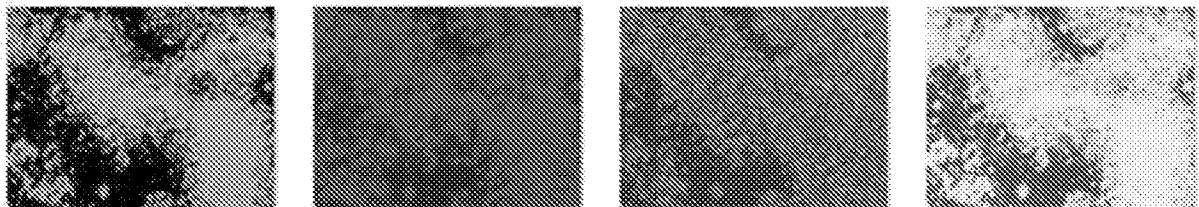
[図7]



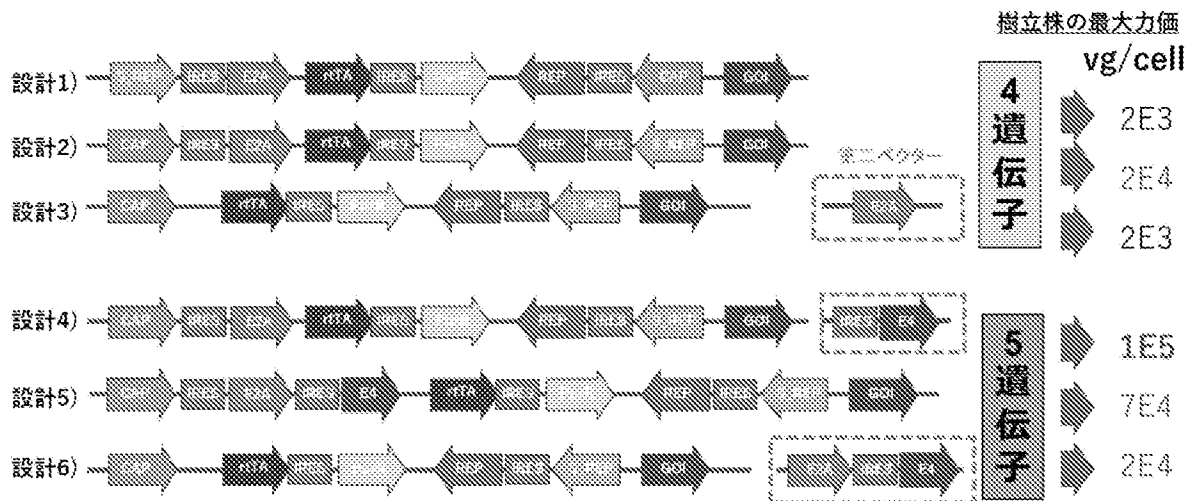
[図8]



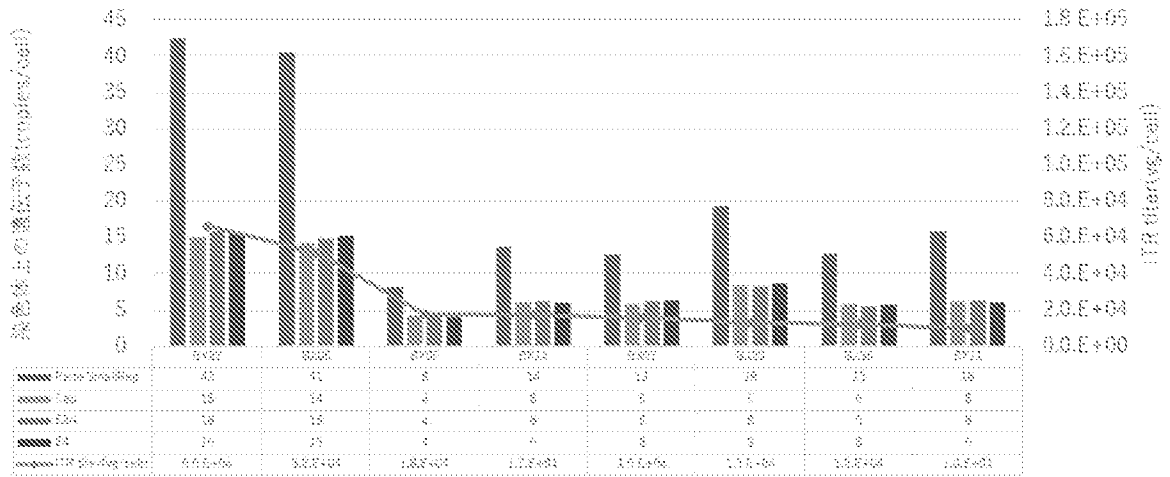
[図9]



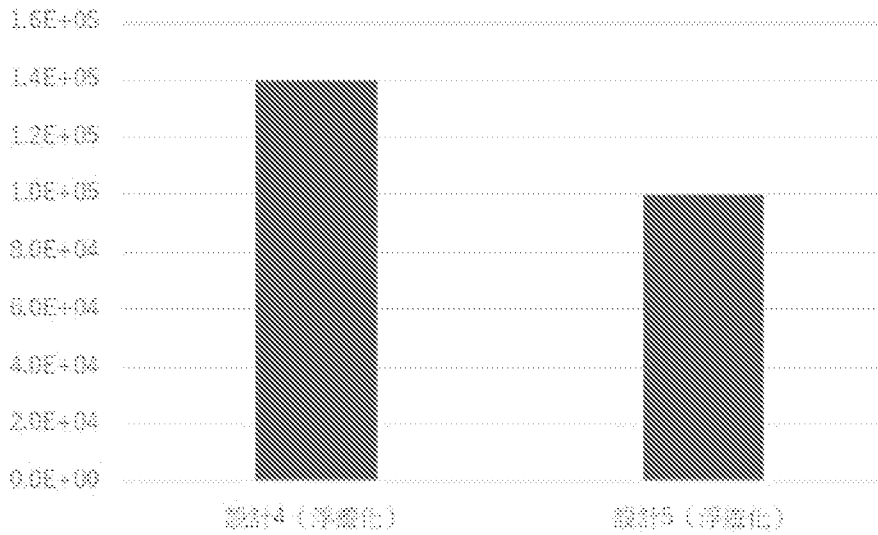
[図10]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/008736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 7/01</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/35</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/864</i> (2006.01)i FI: C12N15/864 100Z; C12N7/01; C12N5/10 ZNA; C12N15/35 ZNA		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/10; C12N7/01; C12N15/35; C12N15/864		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2020-536505 A (CEVEC PHARMACEUTICALS GMBH) 17 December 2020 (2020-12-17) claims, examples	1-40
A	JP 2022-505095 A (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LTD.) 14 January 2022 (2022-01-14) paragraphs [0075], [0077], [0078]	1-40
A	JP 2022-516004 A (LONZA WALKERSVILLE INC.) 24 February 2022 (2022-02-24) claims, examples	1-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 May 2023		Date of mailing of the international search report 23 May 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/008736

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-536505	A	17 December 2020	US 2020/0277628 A1 claims, examples WO 2019/057691 A1 EP 3456822 A1 CN 111108197 A KR 10-2020-0052283 A	
<hr/>					
JP	2022-505095	A	14 January 2022	US 2022/0177854 A1 paragraphs [0100], [0102], [0103] WO 2020/078953 A1 EP 3867388 A1 CN 112912506 A	
<hr/>					
JP	2022-516004	A	24 February 2022	US 2020/0199627 A1 claims, examples WO 2020/132059 A1 EP 3891290 A1 KR 10-2021-0108423 A	
<hr/>					

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/10(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; C12N 15/35(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i FI: C12N15/864 100Z; C12N7/01; C12N5/10 ZNA; C12N15/35 ZNA</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/10; C12N7/01; C12N15/35; C12N15/864</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	JP 2020-536505 A (ツェヴェック ファーマシューティカルズ ゲーエムベーハー) 17.12.2020 (2020 - 12 - 17) 特許請求の範囲、実施例	1-40								
A	JP 2022-505095 A (グラクソスミスクライン、インテレクチュアル、プロパティ、 ディベロップメント、リミテッド) 14.01.2022 (2022 - 01 - 14) 段落0075、0077、0078	1-40								
A	JP 2022-516004 A (ロンザ ウォーカーズヴィル、インコーポレーテッド) 24.02.2022 (2022 - 02 - 24) 特許請求の範囲、実施例	1-40								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	10.05.2023	国際調査報告の発送日 23.05.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 井関 めぐみ 4B 5574 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2023/008736

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2020-536505 A	17.12.2020	US 2020/0277628 A1 Claims, EXAMPLES WO 2019/057691 A1 EP 3456822 A1 CN 111108197 A KR 10-2020-0052283 A	
JP 2022-505095 A	14.01.2022	US 2022/0177854 A1 Paragraphs [0100], [0102], [0103] WO 2020/078953 A1 EP 3867388 A1 CN 112912506 A	
JP 2022-516004 A	24.02.2022	US 2020/0199627 A1 Claims, EXAMPLES WO 2020/132059 A1 EP 3891290 A1 KR 10-2021-0108423 A	