

明 細 書

発明の名称：細胞添加用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、細胞における所望の成分、特に抗体等のタンパク質及びウイルスベクターの製造方法；細胞に所望の成分、特に抗体等のタンパク質やウイルスベクターをコードする核酸を導入する方法；所望の成分、特に抗体等のタンパク質やウイルスベクターをコードする核酸が導入された細胞における該核酸の発現を増強する方法；及びそれらの為の組成物等に関する。

背景技術

[0002] バイオ医薬品とは、遺伝子組換え技術や細胞培養技術等を応用して、微生物や細胞が持つタンパク質（ホルモン、酵素、抗体等）等を作る力を利用して製造される医薬品であり、近年の医薬の主流となりつつある。抗体等の目的とするタンパク質の遺伝子を細胞（好ましくは哺乳動物細胞）に導入し、その細胞が目的とするタンパク質を産生する。

遺伝子導入の方法としては、レトロウイルスやレンチウイルス、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた方法と、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法など物理化学的方法の2つに大別される。

一方、遺伝子治療等の医療分野において、ヒトを含む哺乳動物細胞に遺伝子を導入する方法としては、ウイルス由来の遺伝子導入用のベクター（以下、ウイルスベクター）を用いる方法が一般的である。ウイルスベクターとは、遺伝子組み換え技術を用いて天然由来のウイルスを改変し、所望の遺伝子等を標的に移入することができるようにしたベクターのことで、近年技術開発が進んでいる。

ウイルスベクターの由来となるウイルスとしては、レトロウイルスやレンチウイルス、センダイウイルス、ならびにヘルペスウイルス等のエンベロープを持つウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（以下、A A V）

等のエンベロープを持たないウイルス（以下、非エンベロープウイルス）がよく知られている。

特にAAVはヒトを含む広範な種の細胞に感染可能で、分化を終えた非分裂細胞にも感染すること、ヒトに対する病原性がないため副作用の心配が低いこと、ウイルス粒子が物理化学的に安定であること等から、遺伝子治療法に用いる遺伝子導入用のベクターとして有望視されている。

一般的にAAVは、ヒト胎児腎細胞293（HEK293細胞）等の哺乳類細胞にAAV産生に必要なプラスミドDNAを導入する事で生産されるが、生産性の低さに加え、AAVのキャプシド内へのAAVゲノムのパッケージング率、キャプシド内にパッケージングされたAAVゲノムの断片化など、品質面での課題があることが知られている。

[0003] アデノウイルスやAAV等の非エンベロープウイルスベクターは、広い組織親和性および細胞親和性、大型の発現カセットの収容能力および高い形質導入効率を示し、遺伝子送達のための望ましい特徴を有している。

[0004] バイオ医薬品やウイルスベクター医薬の開発および商業上の製造のためには、高効率で細胞をトランスフェクションすることや細胞内で目的物の生産量を増加させることが重要である。トランスフェクション効率や遺伝子の転写活性を高めるために増強剤（エンハンサー）を添加することが知られている（特許文献1、非特許文献1及び2）。

しかしながら、ウイルスゲノム産生量やウイルスゲノム完全性が向上したウイルスベクターを製造する方法、及びその為の組成物については知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2020-524498号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Huang, Xinping et al., J Virol Methods. 2013 Nov;193(2):270-7.

非特許文献2：Cervera, Laura et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Dec;99(23):9935-49.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、抗体等のタンパク質の製造において、その生産量の向上を可能にする方法；ウイルスベクター製造において、ウイルスベクターのゲノム生産性及び／又はウイルスゲノムの完全性の向上を可能にする方法；及びそれらの為の組成物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

- [0008] 抗体等のタンパク質を生産するにあたり、タンパク質産生細胞の調製が必要になる。タンパク質産生細胞の調製には、通常、タンパク質をコードするDNAをはじめとした、タンパク質の産生に関わるプラスミドDNAの細胞への導入や導入したプラスミドDNAの細胞内での発現増強が必要である。

また、ウイルスベクターを生産するにあたり、その由来となるウイルスは、例えばAAVの場合、HEK293細胞等の哺乳動物細胞にAAV産生に必要なプラスミドDNAを導入することで調製することができ、タンパク質の生産と同様に、AAV産生に必要なプラスミドDNAの細胞への導入や導入したプラスミドDNAの細胞内での発現増強が必要である。

本発明者らは、上記課題に鑑み、プラスミドを細胞にトランスフェクションする際の条件や細胞内のプラスミドの発現を増強する条件を鋭意検討した。結果、アルコール類やジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶媒の存在下でトランスフェクションすることにより、非存在下に比べて、ウイルスベクターのウイルスゲノム生産量及びゲノム完全性が向上していることがわかった。タンパク質産生細胞の場合には、よりタンパク質の生産量が向上していることがわかった。

また、トランスフェクションする際のみでなく、細胞とアルコール類やジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶媒を接触させることによって、タンパク質産生細胞の場合には、よりタンパク質の生産量が向上し、ウイ

ルスベクターの場合には、ウイルスベクターのウイルスゲノム産生量及びゲノム完全性が向上することがわかった。

さらにその好適な反応条件を決定することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0009] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 有機溶媒を含む細胞添加用の組成物であって、該有機溶媒が細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する、組成物。

[2] 添加後の細胞において、添加前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、上記[1]記載の組成物。

[3] シグナルの調節がシグナルの増強である、上記[2]記載の組成物。

[4] シグナルが、プロテインキナーゼAシグナルである、上記[3]記載の組成物。

[5] シグナルの増強が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記[3]又は[4]記載の組成物。

[6] 因子の発現の調節が増強である、上記[5]記載の組成物。

[7] 因子の発現の調節が抑制である、上記[5]記載の組成物。

[8] シグナルの調節がシグナルの抑制である、上記[2]記載の組成物。

[9] シグナルが、ネクロプトーシスシグナル及びインターフェロンシグナルからなる群より選択される少なくとも1種である、上記[8]記載の組成物。

[10] シグナルの抑制が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記[8]又は[9]記載の組成物。

[0010] [11] 因子の発現の調節が増強である、上記[10]記載の組成物。

[12] 因子の発現の調節が抑制である、上記[10]記載の組成物。

[13] 細胞の生存及び／又は細胞の活性を高める、上記[1]～[12]のいずれかに記載の組成物。

[14] 所望の成分が抗体及び／又はウイルスベクターである、上記[1]～[13]のいずれかに記載の組成物。

〔15〕核酸のトランスフェクション用である、上記〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の組成物。

〔16〕核酸の発現増強用である、上記〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の組成物。

〔17〕核酸がタンパク質をコードするDNAである、上記〔15〕又は〔16〕記載の組成物。

〔18〕前記DNAが、抗体及びウイルスベクターからなる群から選ばれる少なくとも1種の産生に関わるDNAである、上記〔17〕記載の組成物。

〔19〕前記ウイルスベクターが、パルボウイルス科又はレトロウイルス科に属するウイルス由来である、上記〔18〕記載の組成物。

〔20〕前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、上記〔18〕又は〔19〕記載の組成物。

[0011] 〔21〕前記DNAが、ウイルスパッケージングタンパク質とヘルパータンパク質とをコードする1つまたは複数のDNAである、上記〔17〕～〔20〕のいずれかに記載の組成物。

〔22〕ウイルスパッケージタンパク質が、REPおよびCAPからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔21〕記載の組成物。

〔23〕ヘルパータンパク質が、アデノウイルス由来E1A、E1B、E2A、E4、及びVAからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔21〕記載の組成物。

〔24〕有機溶媒が、アルコール類及び／又はジメチルスルホキシドを含む、上記〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の組成物。

〔25〕細胞と有機溶媒を含む組成物を接触させ、細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する方法。

〔26〕細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートし、細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する方法。

〔27〕前記細胞が、少なくとも1つの所望の成分の生産に関わるDNAが導入された細胞である、上記〔25〕又は〔26〕に記載の方法。

[28] 有機溶媒を含む組成物との接触後、又はインキュベート後の細胞において、接触前、又はインキュベート前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、上記[25]又は[26]に記載の方法。

[29] シグナルの調節がシグナルの増強である、上記[28]に記載の方法。

[30] シグナルが、プロテインキナーゼAシグナルである、上記[29]に記載の方法。

[0012] [31] シグナルの増強が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記[29]又は[30]に記載の方法。

[32] 因子の発現の調節が増強である、上記[31]に記載の方法。

[33] 因子の発現の調節が抑制である、上記[31]に記載の方法。

[34] シグナルの調節がシグナルの抑制である、上記[28]に記載の方法。

[35] シグナルが、ネクロプトーシスシグナル及びインターフェロンシグナルからなる群より選択される少なくとも1種である、上記[34]に記載の方法。

[36] シグナルの抑制が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記[34]又は[35]に記載の方法。

[37] 因子の発現の調節が増強である、上記[36]に記載の方法。

[38] 因子の発現の調節が抑制である、上記[36]に記載の方法。

[39] 細胞の生存及び／又は細胞の活性を高める、上記[25]～[38]のいずれかに記載の方法。

[40] 所望の成分が抗体及び／又はウイルスベクターである、上記[25]～[39]のいずれかに記載の方法。

[0013] [41] 少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸、細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートし、細胞に所望の成分をコードする核酸をトランスフェクションする方法。

〔４２〕トランスフェクションした核酸の発現を増強する、上記〔４１〕記載の方法。

〔４３〕トランスフェクション後の細胞において、トランスフェクション前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、上記〔４１〕又は〔４２〕記載の方法。

〔４４〕シグナルの調節がシグナルの増強である、上記〔４３〕記載の方法。

〔４５〕シグナルが、プロテインキナーゼＡシグナルである、上記〔４４〕記載の方法。

〔４６〕シグナルの増強が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記〔４４〕又は〔４５〕記載の方法。

〔４７〕因子の発現の調節が増強である、上記〔４６〕記載の方法。

〔４８〕因子の発現の調節が抑制である、上記〔４６〕記載の方法。

〔４９〕シグナルの調節がシグナルの抑制である、上記〔４３〕記載の方法。

〔５０〕シグナルが、ネクロプトーシスシグナル及びインターフェロンシグナルからなる群より選択される少なくとも１種である、上記〔４９〕記載の方法。

[0014] 〔５１〕シグナルの抑制が、シグナルに関わる因子の発現の調節によるものである、上記〔４９〕又は〔５０〕記載の方法。

〔５２〕因子の発現の調節が増強である、上記〔５１〕記載の方法。

〔５３〕因子の発現の調節が抑制である、上記〔５１〕記載の方法。

〔５４〕核酸がタンパク質をコードするＤＮＡである、上記〔４１〕～〔５３〕のいずれかに記載の方法。

〔５５〕前記ＤＮＡが、抗体及びウイルスベクターからなる群から選ばれる少なくとも１種の産生に関わるＤＮＡである、上記〔５４〕に記載の方法。

〔５６〕前記ウイルスベクターが、パルボウイルス科又はレトロウイルス科に属するウイルス由来である、上記〔５５〕に記載の方法。

〔57〕前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、上記〔55〕又は〔56〕に記載の方法。

〔58〕前記DNAが、ウイルスパッケージングタンパク質とヘルパータンパク質とをコードする1つまたは複数のDNAである、上記〔54〕～〔57〕のいずれかに記載の方法。

〔59〕ウイルスパッケージングタンパク質が、REPおよびCAPからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔58〕に記載の方法。

〔60〕ヘルパータンパク質が、アデノウイルス由来E1A、E1B、E2A、E4、及びVAからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔58〕に記載の方法。

[0015] 〔61〕有機溶媒が、アルコール類及び／又はジメチルスルホキシドを含む、上記〔41〕～〔60〕のいずれかに記載の方法。

〔62〕有機溶媒の含有量が、反応混合物全量に対して2V/V%以下であることを特徴とする、上記〔61〕に記載の方法。

〔63〕反応混合物に、さらに、トランスフェクション試薬を含む、上記〔41〕～〔62〕のいずれかに記載の方法。

〔64〕アルコール類が、メタノール、エタノール、イソプロパノールおよびグリセリンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記〔24〕に記載の組成物、又は上記〔61〕～〔63〕のいずれかに記載の方法。

〔65〕細胞と少なくとも1つの所望の成分をコードするDNAとを含む細胞懸濁液をインキュベートする第1工程、

インキュベートした細胞懸濁液に有機溶媒を添加して反応混合物を調製する第2工程、及び

反応混合物をインキュベートする第3工程、を含む、

細胞を所望の成分をコードするDNAでトランスフェクションする方法であり、

有機溶媒が、アルコール類であり、

アルコール類の含有量が、前記反応混合物全量に対して、 $2\text{ V} / \text{V} \%$ 以下であることを特徴とする方法。

[66] 上記[41]～[64]のいずれかに記載の方法で細胞をトランスフェクトすることを特徴とするトランスフェクトされた細胞の製造方法。

[67] 上記[66]に記載の製造方法で得られた細胞からウイルスベクターを得ることを特徴とするウイルスベクターの製造方法。

発明の効果

[0016] 本発明の方法によれば、より生産量に優れた細胞によるタンパク質製造、よりウイルスゲノム産生量及び／又はゲノム完全性に優れた細胞によるウイルスベクターの製造が可能になる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1A]図1Aは、エタノール添加によるAAV2生産時の細胞内AAV2産生量への効果を調べた結果を示すグラフである。

[図1B]図1Bは、エタノール添加によるAAV2生産時の細胞培養上清中AAV2産生量への効果を調べた結果を示すグラフである。

[図1C]図1Cは、エタノール添加によるAAV2生産時の細胞生存率向上の効果を調べた結果を示すグラフである。

[図2A]図2Aは、エタノール添加によるAAV2生産時の細胞内AAV2内ゲノムの完全性への効果を調べた結果を示すグラフである。

[図2B]図2Bは、エタノール添加によるAAV2生産時の細胞培養上清中AAV2内ゲノムの完全性への効果を調べた結果を示すグラフである。

[図3]図3は、エタノールの添加時に活性化または抑制されたパスウェイのヒートマップ図である。時間は、AAV2生産用プラスミドDNAトランスフェクション後の時間である。

[図4]図4は、エタノール添加によるチャイニーズハムスター由来細胞での抗体の生産量への効果を調べた結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及

しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

[0019] 本発明は、有機溶媒を含む細胞添加用の組成物であって、該有機溶媒が細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する組成物、特に、細胞の生存を高めるための組成物、細胞内での核酸（例えば抗体等のタンパク質の生産に関わる核酸（DNA））の発現を増強するための組成物（以下、核酸の発現増強用途の場合、特に「本発明の核酸発現増強用組成物」とも称する）、または、抗体等のタンパク質やウイルスベクターの産生に関わる核酸（DNA）を細胞にトランスフェクションする際に使用する組成物（以下、トランスフェクション用途の場合、特に「本発明のトランスフェクション用組成物」とも称する）を提供する（以下、これらを「本発明の組成物」とも総称する）。本発明の組成物は好ましくは有機溶媒としてアルコール類及び／又はジメチルスルホキシド（DMSO）を含む。

本発明において核酸発現増強用組成物は、細胞内での核酸の発現を増強することを特徴とする。例えば抗体等のタンパク質の生産に関わる核酸（DNA）を恒常的に発現するように操作された細胞に、本発明の核酸発現増強用組成物を添加することにより、該核酸の発現が増強され、所望の成分（例、抗体等のタンパク質）の生産を増強することができる。

本発明においてトランスフェクション用組成物は、核酸を細胞にトランスフェクションする際に用いられることを特徴とするが、核酸を細胞に導入する為に必要なもの（いわゆるトランスフェクション試薬）ではなく、用いることによって、細胞内で産生される抗体等のタンパク質やウイルスベクターの産生量や産生されたウイルスゲノムの完全性の向上に寄与する。

[0020] 本発明において、「所望の成分の生産を増強する」とは、本発明の組成物で処理する前の細胞に比較して有意に所望の成分の細胞内で生産量を増加させることを意味する。所望の成分は取得を目的とする成分であり、例えば抗体等のタンパク質やウイルスベクター等のタンパク質及び核酸の構成物が挙げられる。所望の成分がウイルスベクターの場合は、細胞内にパッケージングされるゲノムの完全性が向上することも包含する意図である。

[0021] 本発明において、「細胞の生存を高める」とは、本発明の組成物で処理する前の細胞に比較して、例えばストレス（負荷）を与えた場合にも生存能力を有意に向上させることを意味する。ストレスとしては、例えば、細胞の剥離と再播種（いわゆる継代）や核酸の細胞内への導入（いわゆるトランスフェクション）、導入した核酸に由来するタンパク質やウイルスの細胞内での産生等が挙げられる。

[0022] 本発明の組成物で処理された細胞は、本発明の組成物で処理される前（添加する前）の状態に比べて細胞の生存に関わるシグナルが調節されていてもよく、又、されていることが好ましい。かかる細胞を以下、「本発明の細胞」とも称する。

[0023] 本発明は、細胞と有機溶媒を含む組成物を接触させ、細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する方法を提供する。

[0024] 当該方法の一実施態様は、細胞に生産の増強が求められる、少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸を有機溶媒存在下でトランスフェクションする方法（以下、「本発明のトランスフェクション法」とも称する）である。

当該方法の別の一実施形態は、生産の増強が求められる、少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸が導入された細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートする方法である。

[0025] 当該方法の一実施態様は、少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸、細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートする工程を含み、該有機溶媒は、好ましくはアルコール類及び／又はジメチルスルホキシドである。

当該方法の別の一実施態様は、少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸が導入された細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートする工程を含み、該有機溶媒は、好ましくはアルコール類及び／又はジメチルスルホキシドである。

[0026] 当該方法の一実施態様は、

細胞と少なくとも1つの所望の成分をコードするDNAとを含む細胞懸濁液をインキュベートする第1工程、

インキュベートした細胞懸濁液に有機溶媒を添加して反応混合物を調製する第2工程、及び

反応混合物をインキュベートする第3工程、

を含み、該有機溶媒がアルコール類であり、該アルコール類の含有量が、前記反応混合物全量に対して、 $2V/V\%$ 以下であることを特徴とする。

[0027] 本発明の反応混合物中の有機溶媒の使用量は上記効果が達成される限り特に限定されない。細胞と有機溶媒を含む組成物を接触させるには、細胞及び有機溶媒が必須となる為、これら必須成分を含む反応混合物全量に対して、例えば有機溶媒がアルコール類（例、エタノール）の場合、有機溶媒は通常 $2V/V\%$ 以下である。上記上限値以下であれば、細胞が死滅することなく、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、細胞内で生産されるウイルスゲノムの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性を向上させることができる。また、細胞が死滅することなく、細胞内でのタンパク質（例、抗体）の生産量を向上させることができる。好ましくは、該アルコール類の含有量は、前記反応混合物全量に対して、 $1.9V/V\%$ 以下、 $1.8V/V\%$ 以下、 $1.7V/V\%$ 以下、 $1.6V/V\%$ 以下、 $1.5V/V\%$ 以下、 $1.4V/V\%$ 以下、 $1.3V/V\%$ 以下、 $1.2V/V\%$ 以下、 $1.1V/V\%$ 以下、 $1V/V\%$ 以下、 $0.9V/V\%$ 以下、 $0.8V/V\%$ 以下、 $0.7V/V\%$ 以下、 $0.6V/V\%$ 以下で用いられる。有機溶媒の反応混合物全量における使用量の下限は上記効果が達成される限り特に限定されないが、 $0V/V\%$ を超える濃度である。好ましくは、該アルコール類の含有量は、前記反応混合物全量に対して、 $0.05V/V\%$ 以上、 $0.06V/V\%$ 以上、 $0.07V/V\%$ 以上、 $0.08V/V\%$ 以上、 $0.09V/V\%$ 以上、 $0.1V/V\%$ 以上、 $0.11V/V\%$ 以上、 $0.12V/V\%$ 以上、 $0.13V/V\%$ 以上、 $0.14V/V\%$ 以上、 $0.15V/V\%$ 以上、 $0.16V/V\%$ 以上、 $0.17V/V\%$ 以上、 $0.$

18V/V%以上、0.19V/V%以上、0.2V/V%以上である。上記下限値以上であれば、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができる。例えば、使用量は有機溶媒の種類に応じて、適宜増減することができる。

[0028] 本発明の反応混合物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産される少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、タンパク質（例、抗体）の生産量及び／又はウイルスゲノムの産生量を向上（増強）させる点で、0.05～2V/V%が好ましく、0.1～1.5V/V%がより好ましく、0.2～1V/V%がさらに好ましく、0.2～0.8V/V%が特に好ましく、0.2～0.56V/V%が最も好ましい。

[0029] トランスフェクションの際の本発明の反応混合物中の有機溶媒の使用量は上記効果が達成される限り特に限定されない。核酸の細胞へのトランスフェクションには、核酸、細胞及び有機溶媒が必須となる為、これら必須成分を含むトランスフェクション時の反応混合物全量に対して、例えば有機溶媒がアルコール類（例、エタノール）の場合、有機溶媒は通常2V/V%以下である。上記上限値以下であれば、核酸を細胞へトランスフェクションする際に使用することにより、細胞が死滅することなく、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、細胞内で生産されるウイルスゲノムの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性を向上させることができる。また、細胞が死滅することなく、細胞内でのタンパク質（例、抗体）の生産量を向上させることができる。好ましくは、該アルコール類の含有量は、前記反応混合物全量に対して、1.9V/V%以下、1.8V/V%以下、1.7V/V%以下、1.6V/V%以下、1.5V/V%以下、1.4V/V%以下、1.3V/V%以下、1.2V/V%以下、1.1V/V%以下、1V/V%以下、0.9V/V%以下、0.8V/V%以下、0.7V/V%以下、0.6V/V%以下で用いられる。有機溶媒の反応混合物全量における使用量の下限は上記効果が達成される限り特に限定されないが、0V/V%を超える濃度である。好ましくは、該アルコール類の含有量は、

前記反応混合物全量に対して、0.05 V/V%以上、0.06 V/V%以上、0.07 V/V%以上、0.08 V/V%以上、0.09 V/V%以上、0.1 V/V%以上、0.11 V/V%以上、0.12 V/V%以上、0.13 V/V%以上、0.14 V/V%以上、0.15 V/V%以上、0.16 V/V%以上、0.17 V/V%以上、0.18 V/V%以上、0.19 V/V%以上、0.2 V/V%以上である。上記下限値以上であれば、核酸を細胞にトランスフェクションする際に使用することにより、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができる。例えば、使用量は有機溶媒の種類に応じて、適宜増減することができる。

[0030] トランスフェクションの際の反応混合物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産される少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、タンパク質（例、抗体）の生産量及び／又はウイルスゲノムの生産量を向上（増強）させる点で、0.05～2 V/V%が好ましく、0.1～1.5 V/V%がより好ましく、0.2～1 V/V%がさらに好ましく、0.2～0.8 V/V%が特に好ましく、0.2～0.56 V/V%が最も好ましい。

所望の成分がウイルスベクターの場合は、トランスフェクションの際の反応混合物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産されるウイルスゲノムの完全性を向上（増強）させる点で、トランスフェクション時の反応混合物全量に対して、0.05～2 V/V%、0.1～1.8 V/V%、0.2～1.5 V/V%、0.28～1.11 V/V%もまた好ましい態様である。

[0031] 本発明は、本発明のトランスフェクション法で所望の成分を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクトすることを特徴とする、トランスフェクトされた細胞の製造方法を提供する。さらに本発明は、トランスフェクトされた細胞からウイルスベクターを得ることを特徴とするウイルスベクターの製造方法を提供する。

[0032] 1. ウイルスベクター（ウイルス）

本発明において産生する対象となるウイルスベクターの由来となるウイル

スとしては、レトロウイルスやレンチウイルス、センダイウイルス、ならびにヘルペスウイルス等のエンベロープを持つウイルス、アデノウイルス、A A V等のエンベロープを持たないウイルス（以下、非エンベロープウイルス）等が挙げられるがこれらに限定されない。エンベロープは、ウイルスが核、小胞体、ゴルジ装置、原形質膜、細胞膜等の膜を貫通して出芽する際に形成され、通常宿主由来のタンパク質又は宿主の細胞膜上に発現したウイルスのタンパク質を伴っており、標的細胞への感染に重要な役割を担っている。

[0033] 具体的には、アデノウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ヒトパピローマウイルス等のDNAウイルス、ロタウイルス、コクサッキーウイルス、エンテロウイルス、サポウイルス、ノロウイルス、ポリオウイルス、エコーウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ライノウイルス、アストロウイルス等のRNAウイルスが挙げられる。より好ましくは、レトロウイルス科のウイルス、アデノウイルス科のウイルス、及びパルボウイルス科のウイルスであり、特にパルボウイルス科のアデノ随伴ウイルス（A A V）が好ましい。A A Vはエンベロープを持たない正20面体の外殻（キャプシド）とその内部に1本の線状一本鎖DNAを有する。キャプシドは3つのキャプシドタンパク質（V P 1、V P 2、及びV P 3）を有する。本明細書において、A A Vは野生型ウイルス及びその派生物を含み、特に記載する場合を除き全ての血清型及びクレードを含む。A A Vの血清型については種々の報告があるが、ヒトに感染するA A Vの血清型としては、少なくともA A V 1、A A V 2、A A V 3 a、A A V 3 b、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V r h. 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2及びA A V 1 3の15種類が知られている。

[0034] 本発明において、「ウイルス」には、天然のウイルスに加え、天然のウイルス等を基に病原性を取り除き、外来遺伝子を導入するための領域を備えるように改変された組換えウイルス粒子が包含される。かかる組換えウイルス粒子をウイルスベクターとも称する。本発明では、天然のウイルス、組換えウイルス粒子（ウイルスベクター）をウイルスと総称する場合がある。

ウイルスベクターは、核酸の細胞への導入／移入、及び細胞内に挿入された核酸の転写又は翻訳のための、遺伝子操作（すなわち、「クローニングベクター」）に使用できる。「発現ベクター」は、宿主細胞内の発現に必要な調節領域を持つ遺伝子又は核酸配列を含む、特殊ベクターである。ベクター核酸配列は、一般に、少なくとも細胞内での増殖のための複製起点と、任意選択で異種ポリヌクレオチド配列、発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー）、イントロン、ＩＴＲ（複数可）、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）、ポリアデニル化シグナルのような追加要素を含む。

ウイルスベクターは、ウイルスゲノムを含む１つ又は複数の核酸要素に由来するか、又は基づく。

[0035] 本発明において、「ウイルスベクター」とは、キャプシドタンパク質の殻から構成された粒子を意味する。さらに本発明では、「ウイルスベクター」は、ウイルスゲノム（核酸形状）を含むものだけでなく、ウイルスゲノムを含んでいないキャプシドタンパク質のみから構成されたウイルス様の粒子である中空粒子も意味する。「ウイルスベクター」は、キャプシドタンパク質の殻の内部にウイルスゲノム（核酸形状）を含むものを得ることが好ましい。

[0036] ２．トランスフェクション

ウイルスベクターを製造する方法は、ウイルスを利用する方法とウイルスを利用しない方法とに大別されるが、本発明では、所望の成分をコードする核酸、好ましくは１以上の所望の成分をコードする核酸を細胞にトランスフェクションすることを含む。

具体的には、ウイルスパッケージングタンパク質とヘルパータンパク質とをコードする１つ又は複数のＤＮＡを、トランスフェクション試薬を用いて細胞に導入する。ウイルスパッケージングタンパク質をコードするＤＮＡとヘルパータンパク質をコードするＤＮＡとは別々のプラスミドで提供されてもよいが一つのプラスミドとすることもできる。ウイルスベクター産生に係るＤＮＡ以外の核酸を導入する場合には、両端のＩＴＲ（Inverted terminal

repeat) に目的遺伝子を含む核酸を挟み込んで導入したベクタープラスミドを、好ましくはウイルスパッケージングタンパク質とヘルパータンパク質とをコードする1つ又は複数のDNAと同時にトランスフェクションする。目的遺伝子としては、後述の「3. 核酸」の項に挙げる、機能性核酸、mRNA若しくはその断片、又はその組合せ等が挙げられる。

[0037] 「トランスフェクション試薬」は、1以上の標的細胞内への1以上の核酸の取り込みを増加させる任意の化合物及び／又は組成物であり、特に限定されない。様々なトランスフェクション試薬が、当業者に既知である。好適なトランスフェクション試薬としては、ポリエチレンジイミン (PEI) などのカチオン性ポリマー、ポリリジン及びポリアルギニンなどの正に荷電したアミノ酸のポリマー、正に荷電したデンドリマー及び分裂したデンドリマー、カチオン性 β -シクロデキストリン含有ポリマー (CDポリマー)、DEAE-デキストランなどを含む、1つ以上の化合物及び／または組成物を挙げることができる。

「ウイルスパッケージングタンパク質」という用語は、例えばAAVの場合、AAVがその複製に依存する非AAV由来のウイルス及び／又は細胞機能を指す。本願発明で使用されるウイルスパッケージングタンパク質、例えばAAVの場合、「AAVパッケージングタンパク質」であり、生産的なAAV複製のためにトランスで機能するAAV由来配列を有する。AAVパッケージングタンパク質は、主要なAAVオープンリーディングフレーム (ORF)、REP及びCAPによってコードされる。REPタンパク質は、とりわけ、DNA複製のAAVオリジンの認識、結合、及びニッキング；DNAヘリカーゼ活性；並びにAAV（又は他の異種）プロモーターからの転写の調節を含む、多くの機能を持っていることが示されている。CAP（キャプシド）タンパク質は、必要なパッケージング機能を提供する。

「ヘルパータンパク質をコードする核酸」という用語は、一般に、ヘルパー機能（複数可）を提供するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子（複数可）を指す。ヘルパータンパク質（複数可）をコードする

核酸（複数可）を含むベクターを適切な宿主細胞にトランスフェクトすることができ、ここではベクターは宿主細胞におけるウイルス（例、AAV）粒子産生に使用することができる。

ヘルパータンパク質としては、アデノウイルス由来要素、例えばE1A、E1B、E2、E4、VA等が挙げられる。

一例として、AAVベクターの作製は、LTRの間を目的遺伝子と置換したベクタープラスミド、REP、CAPを発現するパッケージングプラスミド、E2A、E4、VAを発現するヘルパープラスミドとともに293細胞（後述、E1A、E1Bを発現している）にトランスフェクションして作製する。

[0038] ベクター「ゲノム」は、ウイルス（例えば、AAV）粒子を形成するように、最終的にパッケージング又は封入される、組換え核酸配列を指す。組換えプラスミドを使用して組換えベクターを構築又は製造する場合、ベクターゲノムは、組換えプラスミドのベクターゲノム配列に対応しない、「プラスミド」の部分を含まない。組換えプラスミドの、この非ベクターゲノム部分を、「プラスミド骨格」と称するが、これは、繁殖及び組換えウイルスの作製に必要とされる工程である、プラスミドのクローニング及び増幅に重要であるが、それ自体は、ウイルス（例えば、AAV）粒子へと、パッケージングも封入もされない。したがって、ベクター「ゲノム」とは、ウイルス（例えば、AAV）によりパッケージング又は封入される核酸を指す。

[0039] 3. 核酸

「核酸」という用語は、ポリヌクレオチドとも言い得、本明細書ではデオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）を含む全ての形態の核酸及びポリヌクレオチドを指すために互換的に使用される。核酸及びポリヌクレオチドには、ゲノムDNA、cDNA及びアンチセンスDNA、並びにスプライス又は非スプライスマRNA、rRNA、tRNA及び阻害性DNA又はRNA（RNAi、例えば、スモール又は短ヘアピン（sh）RNA、マイクロRNA（miRNA）、スモール又は短干渉（si）RNA、ラン

ススプライシングRNA、又はアンチセンスRNA)が含まれる。核酸及びポリヌクレオチドには、天然に存在する、合成の、及び意図的に修飾又は改変された配列が含まれる。

[0040] 核酸は好ましくはタンパク質をコードするDNAである。本発明のトランスフェクション用組成物を、ウイルスベクター産生の為に用いる場合には、該DNAはウイルスベクターの産生に関わるDNAを少なくとも含む。該DNAがコードするタンパク質としては、例えばウイルスパッケージングタンパク質とヘルパータンパク質が挙げられる。細胞にトランスフェクションされる核酸にはウイルスベクターの産生に関わるDNA以外に、機能性核酸、mRNA若しくはその断片、又はその組合せを含んでいてもよい。「機能性核酸」とは、生体内又は細胞内において、好ましくは細胞内において、特定の生物学的機能、例えば、酵素機能、触媒機能又は生物学的阻害若しくは亢進機能（例えば、転写、翻訳の阻害又は亢進）を有する核酸をいう。具体的には、例えば、RNA干渉剤、核酸アプタマー（RNAアプタマー及びDNAアプタマーを含む）、アンチセンスDNA、リボザイム（デオキシリボザイムを含む）、U1アダプター、モレキュラー・ビーコン、リボスイッチ、又は転写因子結合領域等が挙げられる。2種以上の機能性核酸を内包してもよい。mRNAは任意のタンパク質をコードするmRNAであって、mRNA前駆体又は成熟mRNAのいずれであってもよい。

[0041] 治療用タンパク質（例、抗体ベースの薬物、Fc融合タンパク質、抗凝固剤、血液因子、骨形成タンパク質、操作されたタンパク質足場、酵素、成長因子、ホルモン、インターフェロン、インターロイキン、サイトカイン、血栓溶解剤、及びそれらの任意の組み合わせ）をコードする遺伝子、薬剤耐性遺伝子（例、カナマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子）、標識タンパク質（例、蛍光タンパク質、発光タンパク質）をコードする遺伝子等が含まれていてもよい。

[0042] 4. 組成物

本発明の組成物は、有機溶媒を含む細胞添加用の組成物であって、該有機溶媒が細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する、組成物である。「所望の成分」としては、上記、項1に記載の「ウイルスベクター」や項3に記載の「核酸」及びそれにコードされるタンパク質等が挙げられる。好ましくはタンパク質及び／又はウイルスベクターである。本発明の組成物で処理することにより、細胞の生存を高めることができる。本発明の組成物は細胞と接触させることで使用でき、細胞内での所望の成分の発現を増強することができる。また、本発明の組成物は核酸を細胞にトランスフェクションする際に使用することができる。本発明の組成物を核酸の細胞へのトランスフェクションの際に使用することにより、例えば核酸がタンパク質の産生に関わるDNAの場合、細胞内で生産されるタンパク質（例、抗体）の生産量を増加させることができる。核酸がウイルスベクターの産生に関わるDNAの場合、細胞内で生産されるウイルスゲノムの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性を向上させる。好ましい組成物は、タンパク質の産生量を向上（増加）させ、ウイルスゲノムの産生量及びウイルスゲノムの完全性を向上（増強）させるものである。

また、本発明において用いる組成物は、核酸を細胞にトランスフェクションする際に使用することにより、キャプシドタンパク質の殻の内部にウイルスゲノムを含むウイルスベクターの産生量及び／又はウイルスベクター内に含まれるウイルスゲノムの完全性を向上（増強）させるものである。好ましい組成物としては、キャプシドタンパク質の殻の内部にウイルスゲノムを含むウイルスベクターの産生量及びウイルスベクター内に含まれるウイルスゲノムの完全性を向上（増強）させるものである。

さらに、本発明において用いる組成物は、核酸を細胞にトランスフェクションする際に使用することにより、ウイルスゲノムの完全体を含むウイルスベクターの産生量を向上させるものである。

[0043] 有機溶媒としては、アルコール類、ジメチルスルホキシド（DMSO）が

挙げられる、好ましくはアルコール類である。

アルコールとは、炭化水素の水素原子をヒドロキシ基に置き換えた物質で本願明細書ではそれらを総称してアルコール類とする。アルコール類としては好ましくは炭素数1～6の低級アルコールであり、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノールおよびグリセリンからなる群から選ばれる少なくとも1種である。

[0044] 本発明の組成物中の有機溶媒の使用量は上記効果が達成される限り特に限定されない。細胞と有機溶媒を含む組成物を接触させるには、細胞及び有機溶媒が必須となる為、これら必須成分を含む反応混合物全量に対して、例えば有機溶媒がアルコール類（例、エタノール）の場合、有機溶媒は通常2V/V%以下となるよう用いられる。上記上限値以下であれば、細胞が死滅することなく、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、細胞内で生産されるウイルスゲノムの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性を向上させることができる。また、細胞が死滅することなく、細胞内でのタンパク質（例、抗体）の生産量を向上させることができる。好ましくは、該アルコール類の含有量は、反応混合物全量に対して、1.9V/V%以下、1.8V/V%以下、1.7V/V%以下、1.6V/V%以下、1.5V/V%以下、1.4V/V%以下、1.3V/V%以下、1.2V/V%以下、1.1V/V%以下、1V/V%以下、0.9V/V%以下、0.8V/V%以下、0.7V/V%以下、0.6V/V%以下となるよう使用される。有機溶媒の反応混合物全量における使用量の下限は上記効果が達成される限り特に限定されないが、0V/V%を超える濃度である。好ましくは、該アルコール類の含有量は、前記反応混合物全量に対して、0.05V/V%以上、0.06V/V%以上、0.07V/V%以上、0.08V/V%以上、0.09V/V%以上、0.1V/V%以上、0.11V/V%以上、0.12V/V%以上、0.13V/V%以上、0.14V/V%以上、0.15V/V%以上、0.16V/V%以上、0.17V/V%以上、0.18V/V%以上、0.19V/V%以上、0.2V/V%

以上となるよう使用される。上記下限値以上であれば、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができる。例えば、使用量は有機溶媒の種類に応じて、適宜増減することができる。

[0045] 本発明の組成物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産される少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、タンパク質（例、抗体）の生産量及び／又はウイルスゲノムの産生量を向上（増強）させる点で、反応混合物全量に対して、好ましくは、0.05～2 V/V%、より好ましくは0.1～1.5 V/V%、さらに好ましくは0.2～1 V/V%、特に好ましくは0.2～0.8 V/V%、最も好ましくは0.2～0.56 V/V%となるよう使用される。

[0046] トランスフェクションの際の本発明の組成物中の有機溶媒の使用量は上記効果が達成される限り特に限定されない。核酸の細胞へのトランスフェクションには、核酸、細胞及び有機溶媒が必須となる為、これら必須成分を含むトランスフェクション時の反応混合物全量に対して、例えば有機溶媒がアルコール類（例、エタノール）の場合、有機溶媒は通常2 V/V%以下となるよう用いられる。上記上限値以下であれば、核酸を細胞へトランスフェクションする際に使用することにより、細胞が死滅することなく、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、細胞内で生産されるウイルスゲノムの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性を向上させることができる。また、細胞が死滅することなく、細胞内でのタンパク質（例、抗体）の生産量を向上させることができる。好ましくは、該アルコール類の含有量は、トランスフェクション時の反応混合物全量に対して、1.9 V/V%以下、1.8 V/V%以下、1.7 V/V%以下、1.6 V/V%以下、1.5 V/V%以下、1.4 V/V%以下、1.3 V/V%以下、1.2 V/V%以下、1.1 V/V%以下、1 V/V%以下、0.9 V/V%以下、0.8 V/V%以下、0.7 V/V%以下、0.6 V/V%以下となるよう使用される。有機溶媒の反応混合物全量における使用量の下限は上記効果が達成される限り特に限定されないが、0 V/V%を超える濃度である。

好ましくは、該アルコール類の含有量は、前記反応混合物全量に対して、0.05 V/V%以上、0.06 V/V%以上、0.07 V/V%以上、0.08 V/V%以上、0.09 V/V%以上、0.1 V/V%以上、0.11 V/V%以上、0.12 V/V%以上、0.13 V/V%以上、0.14 V/V%以上、0.15 V/V%以上、0.16 V/V%以上、0.17 V/V%以上、0.18 V/V%以上、0.19 V/V%以上、0.2 V/V%以上となるよう使用される。上記下限値以上であれば、核酸を細胞にトランスフェクションする際に使用することにより、少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができる。例えば、使用量は有機溶媒の種類に応じて、適宜増減することができる。

[0047] トランスフェクションの際の組成物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産される少なくとも1つの所望の成分の生産を増強させることができ、例えば、タンパク質（例、抗体）の生産量及び／又はウイルスゲノムの産生量を向上（増強）させる点で、トランスフェクション時の反応混合物全量に対して、好ましくは、0.05～2 V/V%、より好ましくは0.1～1.5 V/V%、さらに好ましくは0.2～1 V/V%、特に好ましくは0.2～0.8 V/V%、最も好ましくは0.2～0.56 V/V%となるよう使用される。

所望の成分がウイルスベクターの場合は、トランスフェクションの際の組成物中の有機溶媒の使用量は、細胞内で生産されるウイルスゲノムの完全性を向上（増強）させる点で、トランスフェクション時の反応混合物全量に対して、0.05～2 V/V%、0.1～1.8 V/V%、0.2～1.5 V/V%、0.28～1.11 V/V%もまた好ましい態様である。

[0048] 5. トランスフェクション用反応混合物

本発明におけるトランスフェクション用反応混合物は、細胞内で産生される抗体等のタンパク質やウイルスベクターの産生量及び／又はウイルスゲノムの完全性の向上に寄与すれば特に限定されないが、細胞と、核酸と、有機溶媒とを含む組成物である。より好ましいトランスフェクション用反応混合

物としては、細胞と、核酸と、有機溶媒と、トランスフェクション試薬とを含む組成物である。

本発明のトランスフェクション用反応混合物の調製方法としては、細胞、核酸及び有機溶媒を同時に添加してもよく、細胞と核酸とを含む細胞懸濁液を調製した後に有機溶媒を添加してもよい。さらに、本発明のトランスフェクション用反応混合物がトランスフェクション試薬を含む場合、細胞、核酸、有機溶媒及びトランスフェクション試薬を同時に添加してもよく、細胞と、核酸と、トランスフェクション試薬とを含む細胞懸濁液を調製した後に有機溶媒を添加してもよい。

本発明のトランスフェクション用反応混合物をトランスフェクションの際に用いることで、細胞の生存率が向上する。

また、本発明のトランスフェクション用反応混合物は、前述した成分以外にトランスフェクションに有意に働く既知の成分（その他の成分）を含んでもよい。その他の成分としては、バルプロ酸やそのナトリウム塩、酪酸ナトリウム、カフェイン等が挙げられる。その他の成分を含む場合、細胞、核酸、有機溶媒及びその他の成分、並びに所望によりトランスフェクション試薬を同時に添加してもよく、細胞と、核酸と、所望によりトランスフェクション試薬とを含む細胞懸濁液を調製した後に有機溶媒と、その他の成分とを添加してもよい。

[0049] 6. 細胞及びトランスフェクトされた細胞の製造

本発明において、少なくとも1つの所望の成分（例、タンパク質、ウイルスベクター）を生産する為に使用する細胞としては、所望の成分がその内部で生産され増殖可能であれば特に制限はない。所望の成分がウイルスベクターの場合、好ましくはウイルスの産生に必要な遺伝子の一部が導入された細胞であり、そのみではウイルスの産生が起こらないパッケージング細胞である。真核細胞由来であり、好ましくはトランスフェクション効率が高いHEK293細胞やHEK293T細胞、HEK293F細胞、HEK293FT細胞、G3T-hi細胞、Sf9細胞、市販のウイルス産生用細胞株、

A A V 2 9 3細胞等が挙げられる。より好ましくはヒト由来であり、特に好ましくはH E K 2 9 3細胞である。また、例えば、前記H E K 2 9 3細胞等はアデノウイルスE 1タンパク質を恒常的に発現するが、このような、組換えアデノウイルスに必要なタンパク質の1つ又はいくつかを一過的もしくは恒常的に発現するように改変した細胞であってもよい。

[0050] 組換えアデノウイルス産生に必要な要素として、(A) R E Pタンパク質、C A Pタンパク質、(B) アデノウイルス由来要素、例えばE 1 A、E 1 B、E 2、E 4、V A遺伝子、等が例示される。これらの核酸の形態には限定はなく、使用される細胞においてそれぞれの要素を供給可能な1又は複数の核酸構築物として、プラスミドやウイルスベクターに搭載して、細胞に導入することができる。これらの要素が細胞に発現していない場合には、上述のように、所望の成分をコードする核酸として、(A) 及び／(B) の1以上を、細胞にトランスフェクトする。

[0051] 所望の成分が抗体等のタンパク質の場合、本発明の細胞は、もともと該タンパク質を産生する細胞であってもよいし、該タンパク質の産生に必要な遺伝子が導入された改変された細胞であってもよい。タンパク質の産生に必要な遺伝子を導入する方法は、所望されるタンパク質の種類によって異なり、適宜選択されるが、タンパク質が抗体の場合、通常、イムノグロブリン分子の重鎖及び軽鎖の遺伝子をクローニングし、これを発現効率の良いベクターを用いてホストとなる細胞（好ましくは哺乳動物の細胞）に導入する方法が挙げられる。重鎖及び軽鎖の遺伝子の可変領域（F a b領域あるいはS c F V領域）をクローニングし、インビトロで再構成してもよい。タンパク質を産生する細胞としては、株化した培養細胞が好ましく、例えば、抗体を産生する場合には、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ、株化B細胞等を例示することができる。タンパク質の産生に必要な遺伝子が導入されて改変され得る細胞としては、C H O細胞、C O S細胞、H e L a細胞、V e r o細胞等の哺乳類細胞が挙げられる。

[0052] 本発明の細胞は、本発明の組成物で処理される前（添加する前）の状態に

比べて細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることが好ましい。例えば細胞にストレス（負荷）を与えた場合に、細胞の生存度を上方制御又は下方制御するシグナルである。細胞の生存度を上方制御するシグナルの場合はその細胞内でのシグナルが増強されることによって、細胞の生存度を下方制御するシグナルの場合はその細胞内でのシグナルが抑制されることによって、細胞の生存を高めることができる。

また、本発明の細胞は、本発明の組成物で処理される前（添加する前）の状態に比べて細胞の生存度を上方制御するシグナルに関わる因子が調節されていることが好ましい。ここで「調節」とは、例えば細胞にストレス（負荷）を与えた場合に、細胞の生存度を上方制御するシグナルに関わる因子が細胞内で増強又は抑制されていることをいう。

さらに、本発明の細胞は、本発明の組成物で処理される前（添加する前）の状態に比べて細胞の生存度を下方制御するシグナルに関わる因子が調節されていることが好ましい。ここで「調節」とは、例えば細胞にストレス（負荷）を与えた場合に、細胞の生存度を下方制御するシグナルに関わる因子が細胞内で増強又は抑制されていることをいう。

各シグナル及び因子は、細胞の種類や細胞に与えられるストレスによっても異なるが、例えば表 1 及び表 2 に記載の各シグナル及び因子が挙げられる。

[0053]

[表1-1]

Pathway 名称(調節様式)	効果	因子	調節様式
NAD Signaling Pathway (増強)	細胞生存	PRKAG2	増強
	成長制御	PIK3CB	増強
	成長制御	PIK3C3	増強
		NMNAT1	増強
		DXO	増強
		INS	増強
	クロマチン構造 化、転写制御	H1-6	増強
		NADSYN1	増強
		POLR2I	抑制
		TP53	抑制
	クロマチン構造 化、転写制御	H1-6	抑制
	クロマチン構造 化、転写制御	H1-4	抑制
		POLR2K	抑制
		PARP9	抑制
		PIK3CB	抑制
		SLC29A1	抑制
Protein Kinase A Signaling (増強)	細胞発生、成長制 御	SMAD3	増強
	細胞生存	PRKAG2	増強
	細胞発生、成長制 御	NGFR	増強
		GNG2	増強
	細胞内輸送	KDELRI	増強
	細胞発生、成長制 御	PTPN3	増強
	細胞発生、成長制 御	PTPN18	増強
		PRKD3	増強

[0054]

[表1-2]

	PRKACG	増強
	CAMK4	増強
クロマチン構造 化、転写制御	H1-6	増強
	REL	増強
	PLCD3	増強
	PPP1R11	増強
クロマチン構造 化、転写制御	H1-0	増強
細胞発生、成長制 御	SMAD4	増強
細胞生存	PDE	増強
細胞生存	LIPE	増強
細胞生存	PHK	増強
細胞生存	Glycogen phosphorylase	増強
細胞生存	Glucose-1-P	増強
細胞生存	TH	増強
細胞生存	L-DOPA	増強
細胞生存	TnI	増強
転写活性、 Virus 複製	CREB1	増強
転写活性、 Virus 複製	EBI3	増強
転写活性、 Virus 複製	CTNNA1	増強
転写活性、 Virus 複製	Histone H3	増強
転写活性、 Virus 複製	CREBBP	増強
転写活性、 Virus 複製	CREM	増強
転写活性、 Virus 複製	CREB	増強

[0055]

[表1-3]

転写活性、 Virus 複製	ATF1	増強
クロマチン構造 化、転写制御	H1-2	抑制
	PTPRG	抑制
	RAF1	抑制
	PPP1R14B	抑制
	PRKAR1A	抑制
	PPP1R14C	抑制
クロマチン構造 化、転写制御	H1-6	抑制
	DUSP9	抑制
	PXN	抑制
クロマチン構造 化、転写制御	H1-4	抑制
カルシウム制御、 細胞内伝達	ITPR3	抑制
	GNAI3	抑制
	ANAPC10	抑制
	ADCY9	抑制
	AKAP10	抑制
	TCF3	抑制
細胞発生、 成長制御	PTPRK	抑制
細胞内伝達制御	NTN1	抑制
細胞生存	cAMP	抑制
細胞生存	BAD	抑制
細胞生存	PLN	抑制
細胞生存	GSK3	抑制
細胞生存	Glycogen synthase	抑制
転写活性、 Virus 複製	NFAT	抑制
転写活性、 Virus 複製	ELK1	抑制

[0056]

[表1-4]

Estrogen Receptor Signaling (増強)	細胞生存	PRKAG2	増強
	ミトコンドリア電子伝達系	MT-ND4	増強
	外部シグナル細胞応答	GNG2	増強
		MED20	増強
		MMP15	増強
	ミトコンドリア電子伝達系	MT-CYB	増強
		REL	増強
		PRKACG	増強
		RRAS	抑制
		PRKAR1A	抑制
		NDUFB7	抑制
		SP1	抑制
		NDUFA3	抑制
		MED24	抑制
		ADCY9	抑制
		RAF1	抑制
	ミトコンドリア電子伝達系	MT-ND4	抑制
	転写制御	MED6	抑制
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis (増強)	コレステロール合成	SC5D	増強
		TM7SF2	増強
		FDFT1	増強
		GGPS1	増強
		DHCR24	増強
	脂質代謝	HADHB	増強
	脂質代謝	HADHA	増強
		EBP	増強
		LBR	増強
		ACAT1	抑制
		MVD	抑制

[0057]

[表1-5]

		NSDHL	抑制
		ACAA2	抑制
		HMGCS1	抑制
		MVK	抑制
	コレステロール生 合成触媒	TM7SF2	抑制
	コレステロール生 合成触媒	DHCR24	抑制
	コレステロール生 合成	MSMO1	抑制
CLEAR Signaling Parhway (増強)			
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptor (増 強)	細胞死誘導	FADD	増強
		NFKBIE	増強
		TBK1	増強
		MAVS	増強
		IKBKG	増強
		REL	増強
	アポトーシス、 ネクロプトーシス	RIPK1	増強
		IRF3	増強
		PIN1	抑制
		JUN	抑制
		DDX58	抑制
	抗ウイルス免疫活 性	ISG15	抑制
	抗ウイルス免疫活 性、アポトーシス 誘導	IFIT2	抑制
	免疫応答、 細胞死制御	CHUK	抑制
	細胞外シグナル伝 達	MAPK12	抑制

[0058]

[表2-1]

Pathway 名称(調節様式)	効果	因子	調節様式
Necroptosis Signaling Pathway (抑制)	細胞活性制御、 グルコース取り込み	NGFR	増強
	細胞内シグナル伝達	CAPN5	増強
	細胞生存、分化	MERTK	増強
	細胞死誘導	FADD	増強
	免疫制御、 細胞内タンパク輸送	FKBP1A	増強
	ミトコンドリア内取り 込み	TOMM6	増強
	アポトーシス誘導制御	TRADD	増強
		TSPQ	増強
		GLUD1	増強
		RBCK1	増強
	ミトコンドリア内輸送	TIMM10	増強
		TNFRSF1 0B	増強
	アポトーシス、ネクロ プトーシス	RIPK1	増強
	細胞死誘導	MIR512- 3p	増強
	細胞死誘導	MIR874	増強
	細胞死誘導	MLKL	増強
	細胞死誘導	MIR128-1	増強
	細胞死誘導	MIR155	増強
	ミトコンドリア内輸送	TIMM44	抑制
		EIF2AK2	抑制
	ミトコンドリア内輸送	TIMM13	抑制
	免疫伝達系	JAK1	抑制
		TP53	抑制
	ミトコンドリア内取り 込み	TOMM20	抑制

[0059]

[表2-2]

	ミトコンドリア内輸送	TIMM8B	抑制
	細胞死誘導	GLUL	抑制
	ミトコンドリア内輸送	TIMM10	抑制
	自己免疫	TNIP1	抑制
	アポトーシス誘導制御	TRADD	抑制
	免疫応答、細胞死制御	CHUK	抑制
	ミトコンドリア内取り込み	TOMM22	抑制
		RB1	抑制
	ミトコンドリア内取り込み	TOMM7	抑制
	細胞死誘導	BIRC2/3	抑制
	細胞死誘導	CYLD	抑制
	細胞死誘導	FADD	抑制
	細胞死誘導	CFLIPS	抑制
	細胞死誘導	CASP8	抑制
	細胞死誘導	MIR873	抑制
Interferon Signaling (抑制)	免疫、炎症細胞増殖抑制	IFI35	増強
	ウイルス増殖抑制	IFITM3	増強
	転写活性化	MED14	増強
	アポトーシス活性化	BAX	増強
	抗ウイルス免疫活性	BCL2	増強
	抗ウイルス免疫活性	RELA	抑制
	免疫伝達系	JAK1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFIT1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFIT3	抑制
	抗ウイルス活性化	ISG15	抑制
	抗ウイルス免疫活性	STAT1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	STAT2	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IPF1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IPF9	抑制
	抗ウイルス免疫活性	PSMB8	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFI6	抑制

[0060]

[表2-3]

	抗ウイルス免疫活性	MX1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFITM1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFITM2	抑制
	抗ウイルス免疫活性	TAP1	抑制
	抗ウイルス免疫活性	BAK1	抑制
Role of Hypercytokinemia/hyperchem okininemia in the Pathogenesis of influenza(抑制)	抗ウイルス免疫	IRF3	増強
	免疫応答調節	NFKB1	増強
	ウイルス RNA 分解、 ウイルス複製阻害	OAS3	抑制
	ウイルス RNA 分解、 ウイルス複製阻害	OAS2	抑制
	炎症性ケモカイン、ウ イルス制御	CCL5	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFIT3	抑制
	抗ウイルス活性化	ISG15	抑制
	抗ウイルス免疫活性	IFIT2	抑制

[0061] 本発明の組成物で処理される前（添加する前）の状態に比べて調節されるシグナルとしては、

細胞内のシグナル伝達に関わる N A D シグナリング (NAD Signaling Pathway)、

プロテインキナーゼ A シグナリング (Protein Kinase A Signaling)、

遺伝子発現制御に関わるエストロゲン受容体シグナリング (Estrogen Receptor Signaling)、

細胞形態や細胞内メンテナンスに関わるコレステロール生合成シグナリング (Superpathway of Cholesterol Biosynthesis)、

C L E A R シグナリング (CLEAR Signaling Pathway)、

サイトゾルパターン認識受容体による I R F 活性化シグナリング (Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptor)、

細胞死やウイルス感染に対する免疫に関するネクロプトーシスシグナリング (Necroptosis Signaling Pathway)、

インターフェロンシグナリング (Interferon Signaling)、及び高サイトカイン血症／高ケモキネミアに関わるシグナリング (Role of Hyper cytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of influenza) が挙げられ、それぞれNADシグナリング、プロテインキナーゼAシグナリング、エストロゲン受容体シグナリング、コレステロール生合成シグナリング、CLEARシグナリング、サイトゾルパターン認識受容体によるIRF活性化シグナリングが増強され、ネクロプトーシスシグナリング、インターフェロンシグナリング、高サイトカイン血症／高ケモキネミアに関わるシグナリングが抑制される。

好ましくは、増強されるシグナルとして、プロテインキナーゼAシグナリングが挙げられ、抑制されるシグナルとして、ネクロプトーシスシグナリング及びインターフェロンシグナリングが挙げられる。

[0062] プロテインキナーゼAシグナリングに関わる因子で増強されることによってプロテインキナーゼAシグナリングを増強する因子としては、SMAD3、PRKAG2、NGFR、GNG2、KDELR1、PTPN3、PTPN18、PRKD3、PRKACG、CAMK4、H1-6、REL、PLCD3、PPP1R11、H1-0、SMAD4、PDE、LIPE、PHK、Glycogen phosphorylase、Glucose-1-P、TH、L-DOPA、TnI、CREB1、EBI3、CTNNB1、Histone H3、CREBBP、CREM、CREB、及びATF1が挙げられる。プロテインキナーゼAシグナリングに関わる因子で抑制されることによってプロテインキナーゼAシグナリングを増強する因子としては、H1-2、PTPRG、RAF1、PPP1R14B、PRKAR1A、PPP1R14C、H1-6、DUSP9、PXN、H1-4、ITPR3、GNA13、ANAPC10、ADCY9、AKAP10、TCF3、PTPRK、NTN1、cAMP、BAD、PLN、GSK3、Glycogen synthase、NFAT、及びELK1が挙げられる。

[0063] ネクロプトーシスシグナリングに関わる因子で増強されることによってネクロプトーシスシグナリングを抑制する因子としては、NGFR、CAPN5、MERTK、FADD、FKBP1A、TOMM6、TRADD、TSPO、GLUD1、RBCK1、TIMM10、TNFRSF10B、RIPK1、MIR512-3p、MIR874、MLKL、MIR128-1、及びMIR155が挙げられる。ネクロプトーシスシグナリングに関わる因子で抑制されることによってネクロ

プトースシグナリングを抑制する因子としては、TIMM44、EIF2AK2、TIMM13、JAK1、TP53、TOMM20、TIMM8B、GLUL、TIMM10、TNIP1、TRADD、CHUK、TOMM22、RB1、TOMM7、BIRC2/3、CYLD、FADD、CFLIPS、CASP8、及びMIR873が挙げられる。

[0064] インターフェロンシグナリングに関わる因子で増強されることによってインターフェロンシグナリングを抑制する因子としては、IFI35、IFITM3、MED14、BAX、及びBCL2が挙げられる。インターフェロンシグナリングに関わる因子で抑制されることによってインターフェロンシグナリングを抑制する因子としては、RELA、JAK1、IFIT1、IFIT3、ISG15、STAT1、STAT2、IPF1、IPF9、PSMB8、IFI6、MX1、IFITM1、IFITM2、TAP1、及びBAK1が挙げられる。

細胞内でこのような細胞の生存に関わるシグナル及びシグナルに関わる因子の発現が調節され、細胞の生存を高めることができれば、本発明の組成物を用いることなく、本発明の組成物を用いた場合と同様の効果を得ることもできる。

[0065] 本発明における細胞の培養は、核酸を細胞へトランスフェクションする工程と、トランスフェクションされた細胞内で抗体、タンパク質やウイルスベクターを産生する工程を含み、公知の培養条件で行うことができる。細胞の培養形態は、浮遊培養でも接着培養でもよい。例えば温度30～37℃、湿度95%RH、CO₂濃度5～10%(v/v)での培養が例示されるが、これらに限定されるものではない。所望の成分を産生する細胞の増殖や抗体やウイルス粒子(ウイルスベクター)の産生が達成できるのであれば前記の範囲以外の温度、湿度、CO₂濃度で実施してもよい。核酸を細胞へトランスフェクションするには、本発明の組成物は、細胞と少なくとも1つの所望の成分をコードするDNAと同時に添加してもよく、細胞と少なくとも1つの所望の成分をコードするDNAとを含む細胞懸濁液をインキュベート(培養)した後に添加してもよい。本発明の組成物を後から添加する場合は、細胞懸濁液を1秒～48時間培養することが好ましく、1～24時間がより好ましく、2～6時間がさらに好ましい。また、トランスフェクションされた細

胞の培養期間は特に限定はなく、本発明の組成物添加後から例えば12～150時間、好適には48～120時間である。培養に使用される培地としては、細胞の培養に必要な成分を含んでいればよく、例えば、DMEM、IMDM、DMEM:F-12等の基本合成培地、また必要に応じてこれらの基本合成培地にウシ胎児血清、成長因子類、ペプチド類を添加したり、アミノ酸類を増量したりしたものが挙げられる。

[0066] 7. 抗体の製造

本発明において抗体は本技術分野で一般的に実施されている方法又はそれに準じた方法によって製造することができる。具体的には、以下の手順で行うことができる。

所望する抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列情報に基づき得られた該抗体をコードする核酸を構築し、適当な発現ベクターに挿入する。発現ベクターは、抗体をコードする核酸に加えて、任意に、翻訳効率を上げるためのコザック配列、宿主に導入された際に抗体が培地中に分泌することを促進するシグナル配列、およびプロモーター配列などを含むことができる。本発明で使用するすることができるベクターは、本技術分野で一般的に使用されているものから選択することができるが、プラスミドベクターであるpcDNA3.4が好ましい。異種遺伝子の転写を促進するようなプロモーター配列（例、CMV）を用いたプラスミドベクターもまた好ましく使用できる。発現ベクターの宿主細胞への導入も特に限定されず、細胞内に遺伝子を導入する方法としては本技術分野で従来から使用されている方法、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、DEAE-セキストラン法の当業者に公知の方法を用いることができる。リポフェクション法を用いた導入方法は特に好適である。なおこの目的に使用される宿主細胞も、本技術分野で従来から使用されているものを使用することができる。

[0067] 抗体をコードする核酸を発現ベクターに挿入し、その核酸を含む発現ベクターにより宿主細胞にその核酸を導入し、核酸が導入された宿主細胞を培養し、その培養上清から、クロマトグラフィーなどの精製手段により、抗体を

得ることができる。本方法においては宿主細胞を培養することによって培養上清に所望する抗体を分泌させる。培養上清から、クロマトグラフィーなどの精製手段を用いて、抗体またはその抗原結合断片を得ることができる。クロマトグラフィーの手段として、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど本技術分野で知られた種々の手段を用いることができる。プロテインAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーは、特に好ましい。

[0068] 8. ウイルスベクターの製造

上記トランスフェクトされた細胞内で産生されたウイルスベクターを、該細胞から回収する方法は当分野で通常実施される方法で行うことができる。例えば、ウイルスベクター生産細胞からの抽出が挙げられる。抽出方法としては、凍結融解法、超音波破碎法、溶液抽出法、及び溶液のpHや塩濃度を適宜調節する化学的な方法が例示される。溶液抽出法としては、生産細胞を界面活性剤と接触させる方法が例示される。生産細胞を界面活性剤と接触させる方法は、遠心分離やろ過によって回収された生産細胞の界面活性剤への懸濁、又は生産細胞を含む培養液への界面活性剤の添加により実施される。抽出時の界面活性剤の添加量は、使用する界面活性剤の種類によって変動し得るが、通常、生産細胞を含む抽出溶液に対し0.01～2.5%、好ましくは0.05～2%、より好ましくは0.1～1.5%の終濃度で添加する。界面活性剤の添加量が少なすぎると十分な量のウイルスベクターが得られず、多すぎるとウイルスベクターが失活する。2種以上の界面活性剤を併用する場合には、その合計量が上記範囲内になるように適宜調整する。

[0069] 通常、抽出で用いられる界面活性剤は、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤および両イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種であり、好ましくは該群から選ばれる1種である。より好ましくは、非イオン性界面活性剤又は両イオン性界面活性剤である。

[0070] 非イオン性界面活性剤は、水中でイオンにならないものを指す。非イオン

性界面活性剤としては、公知の非イオン性界面活性剤を使用することができる。エステル型、エーテル型、エステルエーテル型、アルカノールアミド型、糖型及びメチルグルカミン型に分類される。前記エステル型としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（T w e e n（登録商標）20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（T w e e n（登録商標）40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（T w e e n（登録商標）60）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（T w e e n（登録商標）80）等が例示される。また、エーテル型としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（B r i j（登録商標）L23、B r i j（登録商標）L58）、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル（T r i t o n-X 100（登録商標））が例示される。エステルエーテル型としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヘキサン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステルポリエチレングリコール、又はポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンブロック共重合体（P l u r o n i c（登録商標））が例示される。さらにアルカノールアミド型としては、N，N-ビス〔3-（D-グルコンアミド）プロピル〕デオキシコールアミドが例示される。糖型としては、アルキルマルトシド、アルキルグルコピラノシドが例示される。メチルグルカミン型としては、アルキル-N-メチルグルカミンが例示される。

[0071] アニオン性界面活性剤は水中で電離して有機陰イオンとなるものを指す。アニオン性界面活性剤としては、公知のアニオン性界面活性剤を使用することができる。カルボン酸型、スルホン酸型、硫酸エステル型及びリン酸エステル型に分類される。当該カルボン酸型に分類されるものとしては、デオキシコール酸塩、コール酸塩又はラウロイルサルコシン塩が例示される。また、スルホン酸型としてはドデシル硫酸塩が例示される。前記塩は、ナトリウム塩、リチウム塩が好適である。

[0072] カチオン性界面活性剤は水中で電離して有機陽イオンとなるものを指す。カチオン性界面活性剤としては、公知のカチオン性界面活性剤を使用するこ

とができる。アルキルアミン塩型及び第四級アンモニウム塩型に分類され、当該アルキルアミン塩型としては、モノメチルアミン塩酸塩、ジメチルアミン塩酸塩又はトリメチルアミン塩酸塩が例示される。また、第四級アンモニウム塩型としては、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド又はミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド等が例示される。

[0073] 両イオン性界面活性剤は、分子内にアニオン基とカチオン基の両方を併せ持つ界面活性剤を指す。両イオン性界面活性剤としては、公知の両イオン性界面活性剤を使用することができる。アルキルアミノ脂肪酸塩、スルホベタイン、アルキルベタイン、アルキルアミノオキシド等が例示される。好ましくはアルキルベタインが挙げられる。アルキルベタインとしては、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸(CHAPS)が例示される。

[0074] ここで、界面活性剤以外のウイルスベクター抽出に必要な成分を添加することで十分な量のウイルスベクターを抽出できる。該成分にはエンドヌクレアーゼ及びその活性化に必要な少量の $MgCl_2$ が含まれる。エンドヌクレアーゼは混入しているDNA/RNA、すなわち大部分はウイルスベクターを含む細胞由来の核酸を分解するのに用いられる。

[0075] ウイルスベクターを含む細胞からウイルスベクターを抽出する場合、通常、25～40℃、好ましくは30～37℃で、0.5～5時間、好ましくは1～3時間、より好ましくは2時間程度インキュベートする。

[0076] 生産細胞から抽出されたウイルスベクターは限外ろ過等の粗精製を行い、さらなる精製を行うことができる。

さらなる精製としては、カラムクロマトグラフィーによる精製が挙げられる。カラムクロマトグラフィーによる精製技術は当業者に周知である（例えば、特開2014-237661号公報参照）。様々なクロマトグラフィー法の1つ又は複数をこの精製のために用いることができる。クロマトグラフィー法としては、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー

一、逆相クロマトグラフィー、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー等が挙げられ、好ましくはアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーが挙げられる。

[0077] 以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は何ら限定されるものではない。使用する試薬及び材料は特に限定されない限り商業的に入手可能であるか、既知文献等によって調製可能である。また、同様の効果、作用を有するものであれば代替可能であることを当業者は理解している。

実施例

[0078] 実施例 1

1. ヒト由来細胞によるウイルスベクターの生産

ヒト由来細胞によるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの生産性、及び品質の向上のため、AAV 2 ベクター生産時の本発明の組成物の添加を検討した。具体的な手順を下記に示す。

浮遊化された HEK 293 細胞を、浮遊細胞用の完全合成培地 (GMP 社、HE400AZ) を入れた三角フラスコにて、3~4 日間振とう培養 (37℃、8%CO₂) し、2.5~4.0×10⁶ Viable Cells / mL の細胞濃度になるまで増殖させた。

得られた細胞培養液を無菌的に回収した後、遠心分離により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットを AAV 2 生産に適した細胞濃度となるように、フレッシュな完全合成培地で再懸濁し、三角フラスコに移した後、振とう培養した (37℃、8%CO₂)。

3~4 時間後、GFP (Green Fluorescent Protein) を発現する AAV 2 生産用の下記 (i)~(iii) のプラスミドを、トランスフェクション試薬 (Polypius 社、FectoVIR-AAV) と共に培養液に添加し、細胞をトランスフェクションした。

(i) AAV 2 の Rep タンパク質及び Cap タンパク質をコードするプラスミド (タカラバイオ社、pRC2-mi342 Vector)

(i i) アデノウイルスのE 2 A配列、V A配列、E 4配列を含むプラスミド (タカラバイオ社、p H e l p e r V e c t o r)

(i i i) A A V 2の2つのI T Rの間に蛍光タンパク質G F Pの発現カセットを含むプラスミド (C E L L B I O L A B S社、p A A V - G F P)

トランスフェクションから約4時間後、培養液量に対して0.09~2.2 V/V%のろ過済みエタノールを添加し、3日間A A V 2を生産させた。

[0079] 2. ウイルスペクター抽出

トランスフェクションから3日後、A A V 2を生産したH E K 2 9 3細胞培養液を採取し、遠心分離により培養上清と細胞ペレットを分離後、培養上清を-80℃にて凍結した。細胞ペレットは、市販のA A V抽出キット (T a k a r a社、A A V p r o E x t r a c t i o n S o l u t i o n) を用い、キットの手順に従ってA A V 2を抽出後、抽出液を-80℃にて凍結した。

[0080] 3. ウイルスペクター定量

培養上清中、及び生産細胞から抽出したA A V 2を、以下に示す手順により、Droplet Digital PCR (d d P C R) 法で定量した。

培養上清、及び生産細胞からのA A V 2抽出液にD N a s eを添加して、測定サンプル中のA A V 2粒子外に存在する核酸を消化した後、D N a s eの活性を停止した。続けてP r o t e i n a s e Kにて、A A V 2のキャプシドタンパク質を分解し、A A V 2粒子内に包埋されているA A Vゲノムを抽出した後、P r o t e i n a s e Kの働きを停止させて、A A V 2ゲノム抽出液を得た。

得られたA A V 2ゲノム抽出液に対して、A A V 2ゲノムのI T R (I n v e r t e d T e r m i n a l R e p e a t) 領域、及びG F P領域の塩基配列を増幅する2種類のプライマーを用いたd d P C Rを行い、サンプル中のA A V 2の産生量を絶対定量した。

また、I T R領域、及びG F P領域の両方を検出したd d P C Rのドロップレットの割合から、各条件で産生したA A V 2のゲノムを含むA A V 2粒

子に含まれるAAV2ゲノムの完全体を含むAAV2の割合を算出した。

AAV2生産時にエタノールを添加しなかった時に対して、各種濃度でエタノールを添加した際の、細胞抽出液中、及び培養上清中のAAV2の濃度の相対値を図1A、及び図1Bに、各エタノール添加濃度の際の細胞抽出液中、及び培養上清中に含まれるAAV2のうち、完全体のゲノムを含む割合を図2A、及び図2Bに示す。

図1A、及び図1Bの結果から、AAV2生産時にエタノールを添加することで（特に1.1v/v%を超えない程度で）、細胞内、培養上清の何れにおいてもAAV2のゲノムタイターが向上していた。エタノールを添加した事で、AAV2生産細胞のAAV2生産に関わる活性向上や、AAV2の生産を抑制する代謝系の抑制が生じたことが原因と考えられる。なお、細胞中のAAV2ゲノムタイターがコントロールよりも多く産生されるエタノール添加量の範囲においては、AAV2生産中でもコントロール条件と同等以上に細胞が増殖し、トランスフェクション後3日目の生産細胞の生存度（Viability）がコントロール条件よりも高く維持されていた（図1C）。

図2A、及び図2Bの結果から、AAV2生産時にエタノールを添加することで、AAV2内のゲノムの完全体の割合は向上しており、特に、生産細胞内のAAV2は、2v/v%程度までの範囲で、エタノールを添加した方が明らかにゲノムの完全体の割合が高くなった。

[0081] 4. ウイルスベクター由来粒子数の定量

培養上清中、及び生産細胞から抽出したAAV2の粒子（AAV2ゲノムを含む粒子と、含まない粒子全体）は、市販のAAV2 ELISAキット（PROGENE社、AAV2 Titration ELISA）を用いて、キットの手順に従って測定した。

ELISA法により定量したAAV2の全粒子数と、ddPCRから得られた、AAV2ゲノムの完全体を含む粒子の定量値から、AAV2ゲノムの完全体を含むAAV2粒子の割合（Full率）を算出した。

AAV2生産時にエタノールを添加した際と、添加していない際のFull

1 率を表 3 に示す。

[0082] [表3]

サンプル	エタノール濃度 (v/v%)	ゲノムタイター (vg/ μ L)	AAV2 粒子数(個 /mL)	Full 率 (%)
試験①コントロール	0	2.26E+07	9.86E+11	2.30
試験①エタノール添加	0.56	5.05E+07	1.41E+12	3.58
試験②コントロール	0	3.23E+07	1.04E+12	3.12
試験②エタノール添加	0.56	3.81E+07	1.13E+12	3.38

* : いずれも細胞内に産生された AAV2

[0083] 表 3 に示した、AAV2 産生試験における、細胞内に生産された AAV2 の ELISA (全 AAV2 粒子数) 定量値と同サンプルのゲノムタイターの結果から、エタノールを添加して製造した AAV2 の方が、産生された AAV2 キャプシド内に、AAV2 由来ゲノムを取り込んでいる率が高いことが分かる。

[0084] 5. ウイルスベクターの細胞感染性の確認

培養上清中、及び生産細胞から AAV2 を抽出し AAV2 溶液を調製した。AAV2 溶液を、培養 HeLa 細胞に添加し 3 日後、添加した AAV2 に由来する GFP タンパク質を発現している細胞の数を測定し、1 mL あたりの AAV2 溶液が感染した細胞数を算出した。トランスフェクションの際にエタノールを添加していない (コントロール) とエタノールを添加した場合のゲノムタイター、ゲノム完全性、及び感染力価の結果を表 4 に示す。

[0085] [表4]

サンプル	ゲノムタイター (vg/ μ L)	ゲノム完全性(%)	感染力価(ifu/mL)
コントロール条件 細胞内 AAV2 抽出液	4.40E+07	45.6	1.36E+08
エタノール添加(0.56 v/v%)条件 細胞内 AAV2 抽出液	6.59E+07	54.7	1.63E+08

* : ゲノムタイターは、ITR 領域を増幅するプライマーでの ddPCR 定量値。この定量値を元に、同量のゲノムタイター量の細胞内 AAV2 抽出液を細胞に感染させて感染力価を測定した。

[0086] 表 4 に示した結果から、エタノールを添加した条件で産生され、ウイルスゲノムの完全性が向上した AAV2 ベクターの方が、細胞からの抽出液量あたりで、細胞に感染し GFP を発現した値が高くなり、高い感染力価を示し

た。

[0087] 6. ウイルスベクター生産時のプロテオーム解析、及びパスウェイ解析

エタノールを添加した際に、A A V 2 生産細胞で生じた代謝の変化、及び重要な因子を特定するため、A A V 2 生産時にエタノールを添加した際と添加していない際の細胞から、細胞内のタンパク質を抽出し、抽出したタンパク質を液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) で分析し、エタノール添加の有無で、A A V 2 生産時に発現が増加または減少したタンパク質を解析した。得られたプロテオーム解析結果を元に、Pathway解析ソフトウェアIngenuity Pathway Analysis (IPA、Qiagen社) を用いて、エタノールの添加の有無により、A A V 2 生産時に活性化、または抑制されたパスウェイと、パスウェイの制御に影響したタンパク質を特定した。

エタノール添加の有無により、A A V 2 生産時に変化したパスウェイのヒートマップを図3に、変化したパスウェイが影響する細胞の機能、及びそれぞれのパスウェイ制御に関係するタンパク質のうち、パスウェイが大きく変化した時に、特に増加または減少していたタンパク質を表5及び表6示す。

[0088]

[表5]

エタノールの添加でAAV2生産時に活性化または抑制されたパスウェイとその機能			
Related Pathways	Categories	Top Function	Regulated timing
Upregulated pathway when ethanol was added			
MAPK signaling	Inter cellular and Second Messenger Signaling	Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cellular function and Maintenance	72 hr
Protein kinase A signaling	Inter cellular and Second Messenger Signaling	Tissue Morphology, Cell Death and Survival, Connective Tissue Development and Function	48 hr, 72 hr
Erccogen Receptor Signaling	Nuclear Receptor Signaling	Gene Expression, Embryonic Development, Organism Development	72 hr
Super pathway of cholesterol biosynthesis	Steroid Biosynthesis	Cell Morphology, Embryonic Development	72 hr
CELEB signaling pathway	Cellular Stress and Injury, Transcriptional Regulation	Cell Morphology, Cellular function and Maintenance	48 hr, 72 hr
Downregulated pathway when ethanol was added			
Neurotrophin Signaling Pathway	Apoptosis, Cellular Stress and Injury, Pathogen-Pathogen-Induced Signaling	Cell Death and Survival, Organismal Injury and Abnormalities, Bone Marrow/Cell Death	48 hr, 72 hr
Interferon Signaling	Cellular Immune Response, Cytokine Signaling	Antimicrobial response, Inflammatory Response	48 hr, 72 hr
Role of Hypertrophic/Hypertrophic myotonia in the pathogenesis of influenza	Disease-Specific Pathways, Pathogen-Induced Signaling	Cellular Movement, Immune Cell Trafficking	72 hr
Pathways where change was identified when ethanol was added			
Activation of IRF by Cytoplasmic Pathway recognition	Cellular Immune Response	Inflammatory Response, Antimicrobial response, Cell Death and Survival	72 hr

に対してエタノール添加時に多く発現している場合は100、コントロールでは多く発現しているのに対し、エタノール添加時に検出されない場合は-100として表示されている。

[0091] 図3及び表5に示した結果から、エタノールの添加により、AAV2生産用プラスミドDNAトランスフェクション48時間後、及び72時間後で、細胞内のシグナル伝達に関わるNAD SignalingやProtein Kinase A Signaling、遺伝子発現制御に関わるEstrogen Receptor Signaling、細胞形態や細胞内メンテナンスに関わるSuperpathway of Cholesterol Biosynthesisや、CLEAR Signaling Pathwayが活性化されており、一方で、細胞死やウイルス感染に対する免疫に関するNecroptosis Signaling Pathway、Interferon Signaling、Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of influenza等のパスウェイが抑制されていた。これらのパスウェイの変化は、エタノールの添加によって、AAVの生産性向上や、AAVの生産時であっても細胞の増殖や、生存率が向上する効果があることを裏付けている。

更に、表6に示したタンパク質は、夫々のパスウェイの制御に関わるタンパク質のうち、エタノールを添加したことで、発現量が大きく増減したもので、PRKAG2、NGFR、GNG2等のタンパク質の発現増加は、細胞の活性化に大きく関与している。特に、SMAD3は、Protein Kinase A Signalingの中で、パスウェイの初期に関与するタンパク質であり、増加によりパスウェイの活性化に大きく寄与している。

また、GLUL、TIMM10、TNIP1、TOMM7、IFIT1、IFIT3、ISG15、IFI35等のタンパク質の発現減少は、Necroptosis Signalingや、Interferon Signalingなど、細胞死やAAV等のウイルスに対する抵抗に関連するパスウェイの抑制に大きく寄与している。

[0092] 実施例2

実施例1の「1. ヒト由来細胞によるウイルスベクター生産」における、添加する本発明の組成物をエタノールからグリセロール、メタノール、イソプロパノールに変更した以外は、実施例1と同様の手順でウイルスベクター

の産生、及び分析を行った際の、トランスフェクション3日後の生産細胞中のAAV2の産生量の、及び産生したAAV2粒子中のゲノムの完全性に関する測定結果を表7に示す。

[0093] [表7]

サンプル	添加剤濃度 (v/v%)	ゲノムタイター (vg/ μ L)	ゲノム完全性 (%)
試験③コントロール	0.00	2.26E+07	51.9
試験③Glycerol 添加	0.73	4.50E+07	58.9
試験④コントロール	0.00	2.40E+07	53.4
試験④Glycerol 添加	0.38	2.78E+07	55.2
試験④Glycerol 添加	1.15	3.66E+07	58.5
試験④Methanol 添加	0.33	2.94E+07	58.4
試験④Isopropanol 添加	0.61	2.26E+07	58.5

*:いずれも細胞内に産生されたAAV2

[0094] 表7に示した結果から、エタノール以外のアルコール類であっても、産生されたAAV2内のゲノム完全性の向上、及びゲノムタイター（生産性）の向上に効果があること、また、その効果に関しては、エタノール添加時と同様に、適正な濃度範囲があることが分かる。

[0095] 実施例3

実施例1の「1. ヒト由来細胞によるウイルスベクター生産」における、添加する本発明の組成物をエタノールからジメチルスルホキシド（DMSO）に変更した以外は、実施例1と同様の手順でウイルスベクターの産生、及び分析を行った際の、トランスフェクション3日後の培養上清、及び細胞中のAAV2の生産性に関する結果を表8に示す。

[0096] [表8]

サンプル	添加剤濃度 (v/v%)	ゲノムタイター (vg/ μ L)	ゲノム 完全性 (%)	TFday3 VCD(cells/mL)	TF day3 Viability (%)
試験⑤ コントロール	0.00	2.40E+07	53.4	4.17E+06	78.5
試験⑤ DMSO添加	0.57	3.35E+07	59.3	4.58E+06	81.5

*:細胞内に産生されたAAV2に関する値

[0097] 表8に示した結果から、アルコール類ではないDMSOであっても、産生

されたAAV2内のゲノム完全性の向上、及びゲノムタイター（生産性）の向上に効果があることが分かる。また、一般的に細胞の凍結保存時の保護機能があると言われる一方で、細胞に毒性があると言われるDMSOであるが、低濃度であれば、細胞の生育や物質生産を向上する効果があることが分かる。

[0098] 実施例4

実施例1の「1. ヒト由来細胞によるウイルスベクター生産」においてトランスフェクションした3種類のプラスミドDNAのうち、(i)AAV2のRepタンパク質及びCapタンパク質をコードするプラスミドを、(iv)AAV1のRepタンパク質及びCapタンパク質をコードするプラスミドまたは、(v)AAV6のRepタンパク質及びCapタンパク質をコードするプラスミドに変更した以外は、実施例1と同様の手順でウイルスベクターの産生、及び分析を行った際のトランスフェクション3日後の培養上清、及び細胞中のAAV1及びAAV6の生産性に関する結果を表9に示す。

[0099] [表9]

サンプル	エタノール 添加濃度 (v/v%)	培養上清		細胞抽出液	
		ゲノムタイ ター (vg/ μ L)	ゲノム完全 性(%)	ゲノムタイ ター (vg/ μ L)	ゲノム完全 性(%)
AAV1 コントロール	0.00	3.34E+06	49.3	2.67E+06	43.3
AAV1 エタノール 添加	0.28	5.09E+06	58.6	4.67E+06	54.2
AAV6 コントロール	0.00	1.20E+05	23.7	1.60E+07	51.8
AAV6 エタノール 添加	0.28	1.08E+05	28.6	2.05E+07	55.1

[0100] 表9に示した結果から、AAV1の生産においても、エタノールを添加した時に培養上清、細胞内の何れに作られるAAV1の量（ゲノムタイター）及びゲノムの完全性が向上した。また、AAV6の生産においても、エタノールを添加した時に細胞内に作られるAAV6の量（ゲノムタイター）が向上し、ゲノムの完全性は、培養上清、細胞内の何れに作られるAAV6でも向上した。このことから、エタノールの添加は、様々なセロタイプのAAV

に対して、生産性とパッケージされたゲノムの完全性向上に効果があることが分かる。

[0101] 実施例 5

1. チャイニーズハムスター由来細胞による抗体の生産

チャイニーズハムスター由来細胞（CHO細胞）による抗体の生産性向上のため、抗体生産時の本発明の組成物の添加を検討した。具体的な手順を下記に示す。

浮遊化されたCHO細胞（DG44）に抗体産生用の発現プラスミドを導入し、市販の浮遊細胞用の培地を入れた三角フラスコにて、2～3日間振とう培養（37℃、5%CO₂）し、1.0～4.0×10⁶ Viable Cells/mLの細胞濃度になるまで増殖させた。

得られた細胞培養液を無菌的に回収した後、遠心分離により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットを抗体生産に適した細胞濃度5.0×10⁵ Viable Cells/mLとなるように、フレッシュな培地で再懸濁し、三角フラスコに移液した（37℃、5%CO₂）。

その後、培養液量に対して0.25V/V%、0.5V/V%、及び0.75V/V%のろ過済みエタノールをそれぞれ添加し、7日間抗体（Bevacizumab）を生産させた。コントロールにはエタノールを添加しなかった（0V/V%）。

[0102] 2. 培養上清の回収

エタノール添加から7日後、培養液1mLをチューブに採取し、9730×g、1分間、4℃で遠心後の上清0.5mLを新たに分取し、-80℃にて保管した。

[0103] 3. 抗体の定量

-80℃にて保管していたサンプルを融解し、培養上清に含まれる抗体濃度をCedex Bio HTにてIgG Bio HTキット（ロシュ・ダイアグノスティック社製）の使用手順書に従い、定量した。結果を図4に示す。

産業上の利用可能性

- [0104] 本発明の方法によれば、より抗体の生産量に優れた抗体の製造、よりウイルスゲノム生産量及び／又は完全性に優れたウイルスベクターの製造が可能になる。
- [0105] 本出願は、日本で出願された特願２０２１－１７８３０３（出願日：２０２１年１０月２９日）及び日本で出願された特願２０２２－０７２６７７（出願日：２０２２年４月２６日）を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 有機溶媒を含む細胞添加用の組成物であって、該有機溶媒が細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する、組成物。
- [請求項2] 添加後の細胞において、添加前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、請求項1記載の組成物。
- [請求項3] 細胞の生存及び／又は細胞の活性を高める、請求項1記載の組成物。
- [請求項4] 核酸のトランスフェクション用である、請求項1記載の組成物。
- [請求項5] 核酸の発現増強用である、請求項1記載の組成物。
- [請求項6] 核酸がタンパク質をコードするDNAである、請求項4又は5記載の組成物。
- [請求項7] 前記DNAが、抗体及びウイルスベクターからなる群から選ばれる少なくとも1種の産生に関わるDNAである、請求項6記載の組成物。
- [請求項8] 有機溶媒が、アルコール類及び／又はジメチルスルホキシドを含む、請求項1記載の組成物。
- [請求項9] 細胞と有機溶媒を含む組成物を接触させ、細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する方法。
- [請求項10] 細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートし、細胞中で少なくとも1つの所望の成分の生産を増強する方法。
- [請求項11] 前記細胞が、少なくとも1つの所望の成分の生産に関わるDNAが導入された細胞である、請求項9又は10に記載の方法。
- [請求項12] 有機溶媒を含む組成物との接触後、又はインキュベート後の細胞において、接触前、又はインキュベート前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、請求項9又は10に記載の方法。
- [請求項13] 細胞の生存及び／又は細胞の活性を高める、請求項9又は10に記

載の方法。

- [請求項14] 少なくとも1つの所望の成分をコードする核酸、細胞及び有機溶媒を含む反応混合物をインキュベートし、細胞に所望の成分をコードする核酸をトランスフェクションする方法。
- [請求項15] トランスフェクションした核酸の発現を増強する、請求項14記載の方法。
- [請求項16] トランスフェクション後の細胞において、トランスフェクション前の細胞に対して細胞の生存に関わるシグナルが調節されていることを特徴とする、請求項14記載の方法。
- [請求項17] 核酸がタンパク質をコードするDNAである、請求項14記載の方法。
- [請求項18] 前記DNAが、抗体及びウイルスベクターからなる群から選ばれる少なくとも1種の産生に関わるDNAである、請求項17記載の方法。
- [請求項19] 有機溶媒が、アルコール類及び／又はジメチルスルホキシドを含む、請求項14記載の方法。
- [請求項20] 反応混合物に、さらに、トランスフェクション試薬を含む、請求項14記載の方法。
- [請求項21] 細胞と少なくとも1つの所望の成分をコードするDNAとを含む細胞懸濁液をインキュベートする第1工程、
 インキュベートした細胞懸濁液に有機溶媒を添加して反応混合物を調製する第2工程、及び
 反応混合物をインキュベートする第3工程、
 を含む、
 細胞を所望の成分をコードするDNAでトランスフェクションする方法であり、
 有機溶媒が、アルコール類である、
 方法。

- [請求項22] 請求項14に記載の方法で細胞をトランスフェクトすることを特徴とするトランスフェクトされた細胞の製造方法。
- [請求項23] 請求項22に記載の製造方法で得られた細胞からウイルスベクターを得ることを特徴とするウイルスベクターの製造方法。