

明 細 書

発明の名称：ヘルパー遺伝子

技術分野

[0001] 本開示は、ウイルスベクターの作製に有用なウイルス由来遺伝子を提供する。本開示はまた、このウイルス由来遺伝子を使用する方法、およびその生成物も提供する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療薬の開発に伴い、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターなど種々のウイルスベクターが使用される（特許文献1）。AAVベクターは、しばしば、動物細胞にアデノウイルス（AdV）をヘルパーウイルスとして添加して製造される。AAVベクターの生産量の向上などAAVベクター製造の改善のための手段が求められる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2001/090392号

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは、特定のウイルス由来遺伝子が、AAVベクターの生産量の向上などAAVベクター製造における有利な効果を示すことを見出した。この知見に基づき、本開示は、特定のウイルス由来遺伝子（単独または組み合わせ）を提供する。同様に、本開示は、特定のウイルス由来遺伝子を含む核酸（単数または複数）およびその使用を提供する。また、本開示は、これらから生産されたプロデューサー細胞やウイルス由来構築物も提供する。

[0005] したがって、本開示は以下を提供する。

（項目1）

アデノウイルス由来遺伝子およびヘルペスウイルス由来遺伝子を含む核酸。

(項目 2)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、遺伝子の複製に関連する遺伝子である、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 3)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、ヘリカーゼ、プライマーゼ、ssDNA 結合タンパク質 (DBP)、DNA ポリメラーゼおよび DNA 複製タンパク質から選択されるタンパク質をコードする、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 4)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL9、ORF6、ORF16、ORF28、ORF29、ORF55、BMRF1、BSLF1、BBLF4、BBLF2/BBLF3、BALF5、BALF2、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44、UL112、U27、U38、U41、U79、U43、U73、U74、U77、U79、ORF9 および ORF59 から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 5)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA 鎖合成遺伝子およびヘリカーゼプライマーゼ遺伝子から選択される、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 6)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44 および UL112 から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 7)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA 鎖合成遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 8)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL 29 (ICP 8)、UL 30、UL 42、UL 57、UL 54 および UL 44 から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 9)

前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA 鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の一方のみを含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 10)

前記アデノウイルス由来遺伝子が、ヘルパー遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 11)

前記アデノウイルス由来遺伝子が、E 1 A、E 1 B、E 2、E 4 および V A から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 12)

前記アデノウイルスが、血清型 1 ～ 5 2 から選択される、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 13)

前記ヘルペスウイルスが、HHV-1 ～ 8 から選択される、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 14)

上記項目のいずれかの核酸を含む、ウイルスベクターを産生するための組成物。

(項目 15)

ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子を含む核酸を含む、ウイルス由来構築物を産生するための組成物。

(項目 16)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス由来である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 17)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、ヘルペスウイルス由来である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 18)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL9、ORF6、ORF16、ORF28、ORF29、ORF55、BMRF1、BSLF1、BBLF4、BBLF2/BBLF3、BALF5、BALF2、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44、UL112、U27、U38、U41、U79、U43、U73、U74、U77、U79、ORF9およびORF59から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 19)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子およびヘリカアーゼプライマーゼ遺伝子から選択される、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 20)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 21)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 22)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL57、UL54およびUL44から選択される遺伝子を含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 23)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子またはヘリカゼープライマーゼ遺伝子の一方のみを含む、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 24)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、HHV-1～8から選択されるヘルペスウイルス由来である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 25)

前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、血清型1～52から選択されるアデノウイルス由来である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 26)

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを産生するための組成物である、上記項目のいずれかの組成物。

(項目 27)

前記核酸がプラスミドである、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 28)

前記核酸がカチオン性物質と複合体を形成している、上記項目のいずれかの核酸。

(項目 29)

上記項目のいずれかの核酸をプロデューサー細胞に導入するステップを含む、ウイルス由来構築物を生産するプロデューサー細胞を作製する方法。

(項目 30)

前記核酸の少なくとも一部が前記プロデューサー細胞の染色体に組み込まれる、上記項目のいずれかの方法。

(項目 31)

上記項目のいずれかの方法によって作製されたプロデューサー細胞。

(項目 32)

上記項目のいずれかの核酸を含むプロデューサー細胞。

(項目 33)

上記項目のいずれかの核酸をプロデューサー細胞に導入するステップと、
前記プロデューサー細胞においてウイルス由来構築物を形成させるステップと

を含む、ウイルス由来構築物を作製する方法。

(項目 3 4)

上記項目のいずれかの方法によって作製されたウイルス由来構築物。

(項目 3 5)

上記項目のいずれかの核酸を含むウイルス由来構築物。

[0006] 本開示において、上記の 1 つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、新規のウイルス由来遺伝子によるウイルス由来構築物の製造が可能であり、またウイルス由来構築物の高収量の製造が可能であり得る。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]各条件における A A V ベクター生産量を示す。A A V ベクター生産量を、細胞培養上清 1 m L あたりのゲノムコピー数で示す。

[図2]各条件における A A V ベクター生産量を示す。A A V ベクター生産量を、細胞培養上清 1 m L あたりのゲノムコピー数で示す。

[図3]各条件における A A V ベクター生産量を示す。A A V ベクター生産量を、細胞培養上清 1 m L あたりのゲノムコピー数で示す。

[図4A]各条件における A A V ベクター生産量を示す。A A V ベクター生産量を、細胞培養上清 1 m L あたりのゲノムコピー数で示す。

[図4B]各条件における A A V ベクター生産量を示す。A A V ベクター生産量を、細胞培養上清 1 m L あたりのゲノムコピー数で示す。

[図5]図 5 は、実施例5の結果を示す。A A V 3 の力価を各種ULごとに示す。

H H V の複製に関連する遺伝子を単独で A d ヘルパー遺伝子に加えた場合、加えていない場合と比較してどの遺伝子でも r A A V 3 の産生量が向上したことが示される。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、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で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0010] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0011] 本明細書において「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。本明細書において、特段の限定が無ければ、「核酸」とは、1分子の核酸および複数分子の核酸の両方ならびに一本鎖核酸および二本鎖核酸の両方を意味する。本明細書において、特段の限定が無ければ、核酸が複数の要素を含むという記載には、複数の要素が同じ核酸分子上に存在する実施形態および複数の要素がそれぞれ異なる核酸分子上に存在する実施形態が含まれ、複数の要素が同じ二本鎖核酸複合体に存在する実施形態および複数の要素がそれぞれ異なる二本鎖核酸複合体に存在する実施形態が含まれる。核酸の例として、DNA、RNA、cDNA、mRNA、rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、lncRNAが挙げられる。この用語はまた、「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチド誘導体を含む

か、またはヌクレオチド間結合が通常とは異なるポリヌクレオチドをいう。

「ヌクレオチド誘導体」とは、天然のDNAまたはRNAにおいて使用される通常のヌクレオチドとは異なる構造を有するヌクレオチドをいい、例えば、ロックト核酸 (LNA)、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸(2'-O, 4'-C-ethylene bridged nucleic acid、ENA)などのエチレン核酸、その他の架橋核酸 (bridged nucleic acid、BNA)、ヘキシトール核酸 (hexitol nucleic acid、HNA)、アミド架橋核酸 (Amido-bridged nucleic acid、AmNA)、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA (tcDNA)、ポリエーテル核酸 (例えば、米国特許第5,908,845号参照)、シクロヘキセン核酸 (CeNA) などが挙げられる。ヌクレオチド間結合が通常とは異なる例として、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合などが挙げられる。

[0012] 他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る。例えば、アデノウイルスの血清型1～52およびアデノ随伴ウイルスの血清型1～12など具体的な野生型配列に基づく改変体には、公知の改変体 (例えば、rh10、DJ、DJ／8、PHP、eB、PHP、S、AAV2-retro、AAV2-QuadyF、AAV2.7m8、AAV6.2、rh.74、AAV2.5、AAV-TT、Anc80など) 以外にも、元となる配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくと

も99%または少なくとも99.5%の配列同一性を有する配列を含む核酸も含まれる。

[0013] 本明細書において「遺伝子」とは、一定の生物学的機能を果たす核酸部分を指す。この生物学的機能として、ポリペプチドまたはタンパク質をコードすること、タンパク質非コード機能性RNA（rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、lncRNAなど）をコードすること、ポリペプチド、タンパク質またはタンパク質非コード機能性RNAの生産を制御すること、特定のタンパク質に特異的に結合されること、核酸の切断または複製を制御することが挙げられる。そのため、本明細書における遺伝子には、タンパク質またはタンパク質非コード機能性RNAをコードする核酸部分以外にも、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、インスレーター、サイレンサー、複製起点、内部リボソーム侵入部位などの転写翻訳調節配列、およびウイルス粒子へのパッケージングに必要となる核酸部分が含まれる。本明細書において「遺伝子産物」とは、遺伝子から転写されたmRNA、遺伝子にコードされるポリペプチド、タンパク質、またはタンパク質非コード機能性RNAを指す。本明細書において「遺伝子の発現」とは、遺伝子産物が生産されることを指す。特に、ウイルスの遺伝子は、一つの核酸領域中に長さの異なる複数の種類のタンパク質をしばしばコードする。本明細書において、遺伝子から生産され得る少なくとも1種類のタンパク質が生産された場合に、遺伝子が発現されたと称される。

[0014] 本明細書において、「アデノウイルス」（Ad）とは、アデノウイルス科マストアデノウイルス属のウイルスを指し、ウイルス粒子は、ヌクレオキャプシドおよび二本鎖線状DNAゲノムから構成され、90~100nmの正20面体の構造を有する。アデノウイルスの感染は細胞表面のcoxsackievirus-adenovirus receptor（CAR）にウイルスカプシドが吸着することにより開始され、次いで細胞表面のインテグリンを介してウイルスは細胞内に侵入し得る。その後、ライソゾームから脱出したウイルスゲノムは核内に到達しウイルスゲノムの複製をもたらす。ウイルス

複製は、まずE 1 A蛋白質が発現し、他の初期蛋白質であるE 1 B、E 2、E 3、E 4の発現を活性化することで開始される。ウイルスゲノムは、E 2から発現した末端タンパク質(TP)とデオキシシチジンとが共有結合し、これにさらにポリメラーゼが結合した複合体が形成されて複製が開始される。ゲノムはまた、ペントン(L 2)、ヘキソン(L 3)、骨格タンパク質(L 4)、および繊維タンパク質(L 5)を含む構造タンパク質をコードし、単一プロモーターの制御下にある、5つの後期転写単位(L 1、L 2、L 3、L 4、およびL 5)も含む。ゲノムの両端は、ウイルスの複製に必要な逆向き末端配列(inverted terminal repeat: ITR)を含む。ウイルスの構造タンパク質は細胞質で翻訳された後、核内に移行してウイルス粒子を構成し、ウイルスゲノムのパッケージングシグナル(ϕ)を認識してゲノムをパッケージングする。また、アデノウイルスは、タンパク質非コードVA RNAを生産し、これは、VA遺伝子にコードされている。アデノウイルス粒子は、L 2およびL 3のカプシドを有し得る。現在までに52のヒトアデノウイルスの抗原型が同定され、それは血球凝集反応の性質と配列相同性に基いて6つのサブグループ: サブグループA (例えば、血清型12、18および31)、サブグループB (例えば、血清型3、7、11、14、16、21、34、35および50)、サブグループC (例えば、血清型1、2、5および6)、サブグループD (例えば、血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22~30、32、33、36~39および42~48)、サブグループE (例えば、血清型4)、サブグループF (例えば、血清型40および41)、および未分類の血清型群(例えば、血清型49および51)に分類されている。

[0015] 本明細書において、「ヘルペスウイルス」とは、ヘルペスウイルス科に属するウイルスのうち特にヒトに感染するヒトヘルペスウイルスを指し、線状の2本鎖DNAをゲノムとして持つDNAウイルスであり、そのビリオンは正20面体のカプシドがエンベロープに包まれた直径120~200nmの球状粒子である。特に、本明細書に記載のヘルペスウイルスとして、単純ウ

イルス属のHuman herpesvirus 1 (HHV-1) (単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) とも称される) およびHuman herpesvirus 2 (HHV-2) (単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) とも称される)、バリセロウイルス属のHuman herpesvirus 3 (HHV-3) (水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) とも称される)、リンフォクリプトウイルス属のHuman herpesvirus 4 (HHV-4) (エプスタイン・バー・ウイルス (EBV) とも称される)、サイトメガロウイルス属のHuman herpesvirus 5 (HHV-5) (サイトメガロウイルス (CMV) とも称される)、ロゼオロウイルス属のHuman herpesvirus 6 (HHV-6) およびHuman herpesvirus 7 (HHV-7)、ならびにラディノウイルス属のHuman herpesvirus 8 (HHV-8) (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) とも称される) が挙げられる。HHV-6には、Human betaherpesvirus 6A (HHV-6A) およびHuman betaherpesvirus 6B (HHV-6B) が含まれる。例えば、2023年1月時点におけるヘルペスウイルス (およびその遺伝子) に関する特徴は、以下の表に示す公知情報を参照することができる。

[0016] [表A]

HHV-1	Human alphaherpesvirus 1 isolate KOS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT899744.1
HHV-2	Human alphaherpesvirus 2 strain MS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK855052.1
HHV-3	Human herpesvirus 3 strain Ellen	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ972913.1
HHV-4	Human gammaherpesvirus 4	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_007605.1
HHV-5	Human herpesvirus 5 strain Towne	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ616285.1
HHV-6A	Human betaherpesvirus 6A isolate U1102	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001664.4
HHV-6B	Human herpesvirus 6B	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000898.1
HHV-7	Human herpesvirus 7	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001716.2
HHV-8	Human herpesvirus 8 strain GK18	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009333.1

[0017] 本明細書において、「アデノ随伴ウイルス」(AAV) とは、パルボウイルス科ディペンドウイルス属の線状一本鎖DNAウイルスを指し、ウイルス粒子は直径20～26nmである。AAVの増殖には通常アデノウイルスエ

メントが必要である。AAVゲノムの量末端にはITR (i n v e r t e d t e r m i n a l r e p e a t) と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在する。このITRの部分が複製の開始点となり、プライマーの役割を果たす。また、ウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組込みにもこのITRが必要である。ゲノムの左半分に非構造蛋白質、すなわち複製や転写を司る調節タンパク質 (R e p 7 8、R e p 7 6、R e p 5 2、R e p 4 0) をコードするr e p遺伝子が存在し、ゲノムの右半分に構造蛋白質 (V P 1、V P 2、V P 3) の三つのカプシドタンパク質をコードするc a p遺伝子が存在する。AAVの生活環は潜伏感染と溶解感染に分けられる。前者は単独で感染した場合であり、宿主細胞の第19番染色体長腕のAAVS1領域 (1 9 q 1 3. 3 - q t e r) へ組み込まれるのが特徴的である。この組込みは非相同組換えによるものでありR e pが関与している。AAVS1領域とITRのR e p結合領域とに共通して存在する塩基配列 (G A G C繰返し配列) に、R e p 7 8 / R e p 7 6 が結合することが報告されている。したがって、野生型AAVが標的細胞に感染した際には、R e p がAAVのITRおよびAAVS1に結合し、R e p が介在することによりAAVゲノムの第19番染色体への部位特異的組込みが起こるものと考えられている。アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染した場合、AAVが潜伏感染している細胞にさらにヘルパーウイルスが重複感染した場合にAAVの複製が起こり、細胞破壊により大量のウイルスが放出される (溶解感染)。

[0018] AAVは、カプシドに基づいて1～12型までの血清型が報告されている。また、r h 1 0、D J、D J / 8、P H P、e B、P H P、S、A A V 2 - r e t r o、A A V 2 - Q u a d Y F、A A V 2. 7 m 8、A A V 6. 2、r h. 7 4、A A V 2. 5、A A V - T T、A n c 8 0の血清型も報告されている。本開示のAAV由来構築物は、標的組織に応じて好適な血清型のAAVに基づいて作製されてもよい。例えば、(血清型) : (標的組織) の関係は以下の通りに選択されてもよい ; (A A V 1) : (筋肉、肝臓、気道

、神経細胞)、(AAV2) : (筋肉、肝臓、神経細胞)、(AAV3) : (筋肉、肝臓、神経細胞)、(AAV4) : (筋肉、脳室上衣細胞)、(AAV5) : (筋肉、肝臓、神経細胞、グリア細胞、気道)、(AAV6) : (筋肉、肝臓、気道、神経細胞)、(AAV7) : (筋肉、肝臓)、(AAV8) : (筋肉、肝臓)、(AAV9) : (筋肉、肝臓、気道)。AAVのカプシドとして、野生型の他に、標的化変異を加えたカプシド(AAV2 i 8、AAV2. 5、AAV-TT、AAV9. HRなど)、ランダム変異を加えたカプシド(AAV-PHP. Bなど)、インシリコで設計したカプシド(Anc80など)が挙げられ、一つの実施形態において、本開示のAAV由来構築物はこれらの改変カプシドを含んでもよく、本開示のAAV由来構築物プラスミドはこれらの改変カプシドをコードするように構築されてもよい。本明細書において、核酸配列が特定の血清型に由来すると記載する場合、核酸配列は、野生型のカプシドをコードしてもよいし、野生型のカプシドに基づき上記のような改変が施されたカプシドをコードしてもよいことが企図される。

[0019] 本明細書において、核酸について「ウイルス由来」とは、その核酸がそのウイルスに存在する核酸と高い相同性または同一性を有することを意味し、その核酸が、そのウイルスから取得されていることもそのウイルスから取得された核酸を使用して調製されていることも必要としない。例えば、ある核酸またはその翻訳産物が、ウイルスに存在する核酸またはその翻訳産物に対して高い同一性(例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など)を有する配列を有する場合、その核酸は、そのウイルス由来であり得る。

[0020] 本明細書において、「ヘルパー遺伝子」とは、プロデューサー細胞におけるAAV生産量を増大させる任意の遺伝子を指す。例えば、HEK293細胞

胞 (ATCC : CRL-1573) に pAAV-ZsGreen (TAKARA : 6231) と pRC1 (TAKARA : 6672) を導入し、さらに候補遺伝子を導入した細胞および導入しなかった細胞を作製し、これらの細胞を DMEM (Thermo fisher : 11965) (2% FBS (Thermo fisher : 10270)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク : 09367-34)) 培地で 37℃、5% CO₂ のインキュベーターで培養して、3 日後に、回収した 2 μ L の上清に 5 μ L の Nuclease-Free water (Promega : P1193)、1 μ L の 10 $\times$ React Buffer (MgCl₂ 添加) (Thermo fisher : ED0521)、2 μ L の DNaseI (Thermo fisher : ED0521) を添加し、37℃ で 30 分間ブロックインキュベーターで反応させ、その後、90 μ L の Nuclease-Free water (0.001% Pluronic (登録商標) F-68 (100X) (Thermo fisher : 24040032)、5 mM EDTA (TAKARA : T9191)) を添加して 95℃ で 10 分間ブロックインキュベーターで反応させ、得られた溶液を Nuclease-Free water (0.001% Pluronic (登録商標) F-68 (100X)) で 100 倍希釈して調製した溶液 2 μ L に 2 μ L の Nuclease-Free water、5 μ L の PowerUp (登録商標) SYBR (登録商標) Green Master Mix (Thermo fisher : A25780)、0.5 μ L の 10 μ M CMV-F プライマー (CATCAATGGGCGTGGATAGC : 配列番号 1)、0.5 μ L の 10 μ M CMV-R プライマー (GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA : 配列番号 2) を添加して、QuantStudio 3 リアルタイム PCR システム Fast96 ウェル (Thermo fisher : QS3-96F) を使用して、95℃ で 10 分の後、95℃ で 15 秒、55℃ で 5 秒、72℃ で 30 秒を 40 サイクル繰り返す条件で qPCR を行い、AAV 粒子量を測定した場合、候補遺伝子を導入した細胞

胞において導入しなかった細胞と比べて少なくとも50%のAAV粒子量の増大があった場合、候補遺伝子はヘルパー遺伝子と判定することができる。典型的には、ヘルパー遺伝子は、アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、VA、E4もしくはその部分またはその改変体から選択される。現在までに52のヒトアデノウイルスの抗原型（血清型）が同定されている。本開示のヘルパー遺伝子は、任意の抗原型のアデノウイルス由来であり得る。本開示のヘルパー遺伝子またはその遺伝子産物（タンパク質など）は、任意の血清型のアデノウイルスのヘルパー遺伝子またはその遺伝子産物（タンパク質など）に対して高い同一性（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など）を有する配列（塩基配列またはアミノ酸配列）を有し得る。野生型とは異なるがそれと高い同一性を有する遺伝子または遺伝子産物は、本明細書において、改変体とも称され得る。

[0021] 本明細書において、「遺伝子の複製に関連する遺伝子」とは、AAVゲノムの複製を促進する任意の遺伝子を指す。例えば、HEK293細胞（ATCC: CRL-1573）にpAAV-ZsGreen（TAKARA: 6231）、pHelper（TAKARA: 6230）およびAAV2由来のRep78を発現するプラスミドを導入し、さらに候補遺伝子を導入した細胞および導入しなかった細胞を作製し、これらの細胞をDMEM（Thermo fisher: 11965）（2% FBS（Thermo fisher: 10270）、1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液（ナカライテスク: 09367-34））培地で37℃、5%CO₂のインキュベーターで培養し、2日後に細胞をセルスクレーパーで剥離し、遠心分離によって細胞を回収し、この細胞ペレットにLysis buffer（2mM MgCl₂（ナカライテスク: 09884-12）、150mM NaCl（ナカライテスク: 09649-15）、50mM Tris（ナカライテ

スク：02435-15)、0.1% Triton X-100 (ナカライテスク：12969-25) ; pH8.5) を添加して懸濁し、37℃で30分間ブロックインキュベータで反応させる。遠心分離して回収した上清2 μ L を1000倍希釈して調製した溶液2 μ L に2 μ L のNuclease-Free water、5 μ L のPowerUp (登録商標) SYBR (登録商標) Green Master Mix (Thermo fisher : A25780)、0.5 μ L の10 μ M CMV-Fプライマー (CATCAATGGGCGTGGATAGC : 配列番号1)、0.5 μ L の10 μ M CMV-Rプライマー (GGAGTTGTTACGACATTTTGGA A : 配列番号2) を添加して、QuantStudio 3リアルタイムPCRシステム Fast96ウェル (Thermo fisher : QS3-96F) を使用して、95℃で2分の後、95℃で15秒、55℃で5秒、72℃で30秒を40サイクル繰り返す条件でqPCRを行い、AAVゲノム量を測定した場合、候補遺伝子を導入した細胞において導入しなかった細胞と比べて少なくとも50%のAAVゲノムの増大があった場合、候補遺伝子は遺伝子の複製に関連する遺伝子と判定することができる。遺伝子の複製に関連する遺伝子として、典型的には、HHV-1のUL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30およびUL42、HHV-2のUL5、UL8、UL9、UL29、UL30、UL42およびUL52、HHV-3のORF6、ORF16、ORF28、ORF29およびORF55、HHV-4のBMRF1、BSLF1、BBLF4、BBLF2/BBLF3、BALF5およびBALF2、HHV-5のUL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112、HHV-6AのU27、U38およびU41、HHV-6BのU38、U41およびU79、HHV-7のU27、U38、U41、U43、U73、U74、U77およびU79、ならびにHHV-8のORF6、ORF9およびORF59が挙げられる。本開示の遺伝子の複製に関連する遺伝子またはその遺伝子産物 (タンパク質など) は、任意の野生型のヘルペスウ

イルスの遺伝子の複製に関連する遺伝子またはその遺伝子産物に対して高い同一性（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性など）を有する配列（塩基配列またはアミノ酸配列）を有し得る。

[0022] 本明細書において、ある配列が、複数の遺伝子またはその遺伝子産物の規定された同一性範囲（例えば、少なくとも90%）内である場合、この配列は最も高い同一性を示す遺伝子またはその遺伝子産物と対応付けられ得る。例えば、ある配列が、遺伝子Aの塩基配列と98%同一であり、かつ遺伝子Bの塩基配列と95%同一である場合、この配列は遺伝子Aの改変体と称され得る。

[0023] 本明細書において2つの遺伝子がシスであるとは、同一の核酸分子または相補鎖（二本鎖核酸の場合）の核酸分子上にそれらの遺伝子が存在することを指す。また、本明細書において2つの遺伝子がトランスであるとは、（ある生物における）ある細胞において、これらの遺伝子が、同一の核酸分子または相補鎖（二本鎖核酸の場合）の核酸分子上に存在しないことを指す。例えば、ゲノム上に存在する遺伝子と、ウイルス由来構築物で導入された核酸上の遺伝子はトランスであり得る。必要に応じて、2つの遺伝子がトランスであるかどうかは、2つの遺伝子が細胞に同時に存在するようになった（例えば、細胞への核酸の導入）時点における状態において判断され得る。

[0024] 本明細書において遺伝子の数について言及する場合、1つの遺伝子は、ある生物のゲノム上に通常（最も高い頻度または50%以上の確率）存在する形態において連続配列を有する遺伝子を指す。例えば、あるタンパク質をコードする2つのエクソンは、2つの遺伝子であり得る。例えば、プロモーター配列とタンパク質をコードする配列とが連続配列を形成している場合、プロモーター配列およびタンパク質をコードする配列を含む核酸部分は、1つの遺伝子であり得る。例えば、切断されることで機能的になるタンパク質が

ゲノム上で連続配列によってコードされる場合、このタンパク質は、1つの遺伝子にコードされ得る。機能の側面から遺伝子に言及する場合、核酸配列は連続配列である必要はなく、例えば、あるタンパク質をコードする複数のエクソンは集合的にそのタンパク質の遺伝子として言及される。

[0025] 本明細書において使用する場合、遺伝子を「欠損する」とは、核酸がその遺伝子を含まないか、またはその遺伝子の正常な機能（例えば、機能的なタンパク質を生産する機能）を発揮しないように改変された遺伝子を含むことを指す。

[0026] 本明細書において使用する場合、「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

[0027] 本明細書において使用する場合、「プラスミド」とは、細胞中で染色体とは別個に存在するか、または細胞に導入した場合に染色体とは別個に存在する環状DNAを指す。

[0028] 本明細書において使用する場合、「カチオン性物質」とは、中性の水に添加した場合に陽電荷を帯びる物質を指し、典型的には、核酸（プラスミドなど）との複合体において提供される。

[0029] 本明細書において、「ウイルス由来構築物」とは、ウイルスに由来する構造を少なくとも部分的に有する核酸構築物またはそこから生産されるタンパク質を含む構築物を指す。ウイルス由来構成物としては、ウイルスベクター、ウイルス様粒子（VLP）、腫瘍溶解ウイルス（がん細胞でのみ増殖するように改変されたものを含む）、およびウイルスレプリコン（ウイルス粒子産生能を欠失させた自己複製可能なウイルスゲノム）が挙げられる。

[0030] 本明細書において使用する場合、「ウイルスベクター」とは、ウイルスに由来する構造を少なくとも部分的に有し、標的細胞に核酸を導入できる構築

物を指す。典型的には、ウイルスベクターは、ウイルスの構造タンパク質および異種遺伝子を含む核酸を含むウイルス粒子の形態である。

[0031] 本明細書において使用する場合、「プロデューサー細胞」とは、所望のウイルス由来構成物を産生できる細胞を意味し、ウイルス由来構成物の産生に必要な遺伝子が、染色体および導入したプラスミドから発現される細胞であり得る。プロデューサー細胞にプラスミドを導入することで、所望のウイルス由来構成物が生産され得る。例えば、AAVウイルスベクターの場合、その産生にE1AとE1Bが必要であるが、HEK293はこれらを有するため、これらをヘルパープラスミドから除くことができる。他の細胞でも、このような機能補助因子を有するように改変すれば、プロデューサー細胞として機能する。

[0032] 本明細書において「動物細胞」とは、動物（ヒト、マウス、ラット、サル、イヌなど）から取得された細胞または動物から取得された細胞を改変した細胞を指す。

[0033] 本明細書において使用する場合、「宿主細胞」とは、外来性の核酸またはタンパク質またはウイルスもしくはウイルス由来構築物が導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）をさす。

[0034] 本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、天然または人工的に改変されたポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。

[0035] 本明細書において使用する場合、「転写翻訳調節配列」は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、エンハンサー、IRESなどを総称し、それらが協働して、レシピエント細

胞でコード配列の複製、転写及び翻訳を可能にする。選択されるコード配列の複製、転写および翻訳が適当な宿主細胞において可能である限り、これらの転写翻訳調節配列のすべてが必ずしも存在する必要があるわけではない。当業者は、公開情報から調節核酸配列を容易に同定することができる。さらに、当業者は、例えば *in vivo*、*ex vivo* または *in vitro* で、使用目的に適用できる転写翻訳調節配列を同定することができる。

- [0036] 本明細書において使用する場合、「プロモーター」は、作動可能に連結された核酸配列の転写を制御する核酸配列のセグメントを指す。プロモーターは、RNAポリメラーゼによる認識、結合および転写開始のために十分である特定の配列を含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼの認識、結合または転写開始を調節する配列を含んでもよい。
- [0037] 本明細書において使用する場合、「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高める機能を有する核酸配列のセグメントを指す。
- [0038] 本明細書において使用する場合、「サイレンサー」は、エンハンサーとは逆に目的遺伝子の発現効率を低下させる機能を有する核酸配列のセグメントを指す。
- [0039] 本明細書において使用する場合、「インスレーター」は、DNAの配列上の離れた位置にある遺伝子の発現の調節を行うシス調節の機能を有する核酸配列のセグメントを指す。
- [0040] 本明細書において使用する場合、「ターミネーター」は、タンパク質をコードする領域の下流に位置し、核酸がmRNAに転写される際の転写の終結に関与する核酸配列のセグメントを指す。
- [0041] 本明細書において使用する場合、「複製起点」は、その核酸配列を認識するタンパク質（例えば、イニシエーターDnaAタンパク質など）が結合することや、RNAが合成されることで部分的にDNA二重らせんが解かれ、複製が開始される核酸配列のセグメントを指す。
- [0042] 本明細書において使用する場合、内部リボソーム侵入部位（「IRES」）は、その下流の核酸配列の翻訳の際、リボソームの侵入または保持を促進する核

酸セグメントを指す。

- [0043] 本明細書において核酸の「相同性」とは、2以上の核酸配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの核酸の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。「類似性」は、同一性に加え、類似の塩基についても計算に入れた数値であり、ここで類似の塩基とは、混合塩基（例えば、 $R = A + G$ 、 $M = A + C$ 、 $W = A + T$ 、 $S = C + G$ 、 $Y = C + T$ 、 $K = G + T$ 、 $H = A + T + C$ 、 $B = G + T + C$ 、 $D = G + A + T$ 、 $V = A + C + G$ 、 $N = A + C + G + T$ ）において、一部が一致する場合をいう。2種類の核酸が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、またはストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの核酸配列を直接比較する場合、その核酸配列間で、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。
- [0044] アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.10.1+ (2020. 6.18発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。類似性は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。
- [0045] 本明細書において、特に断らない限り、ある生物学的物質（例えば、タン

パク質、核酸、遺伝子)についての言及は、その生物学的物質の生物学的機能と同様の機能(同じ程度でなくてもよい)を発揮するその生物学的物質のバリエーション(例えば、塩基配列に修飾を有するバリエーション)についての言及でもあることが理解される。このようなバリエーションには、元の分子のフラグメント、同一サイズの元の生物学的物質のアミノ酸配列または核酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアラインメントを行ってアラインされる元の分子の配列と比較した際、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%同一である分子が含まれ得る。バリエーションには、改変されたヌクレオチド(例えば、メチル化による改変)を有する分子が含まれ得る。

[0046] 本明細書において「対応する」アミノ酸または核酸とは、あるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸またはヌクレオチドと同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸またはヌクレオチドをいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。対応するアミノ酸は、例えば、システイン化、グルタチオン化、S-S結合形成、酸化(例えば、メチオニン側鎖の酸化)、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などがされる特定のアミノ酸であり得る。あるいは、対応するアミノ酸は、二量体化を担うアミノ酸であり得る。このような「対応する」アミノ酸または核酸は、一定範囲にわたる領域またはドメインであってもよい。従って、そのような場合、本明細書において「対応する」領域またはドメインと称される。

[0047] 本明細書において「対応する」遺伝子(例えば、ポリヌクレオチド配列または分子)とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子(例えば

、ポリヌクレオチド配列または分子)をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。例えば、血清型1のAAVのcapは血清型2のAAVのcapに対応し得る。例えば、あるウイルスにおける対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となるウイルスの遺伝子配列をクエリ配列として用いてそのウイルスの配列データベースを検索することによって見出すことができる。

[0048] 本開示に従って、用語「活性」は、本明細書において、最も広い意味での分子の機能を指す。活性は、限定を意図するものではないが、概して、分子の生物学的機能、生化学的機能、物理的機能または化学的機能を含む。活性は、例えば、酵素活性、他の分子と相互作用する能力、および他の分子の機能を活性化するか、促進するか、安定化するか、阻害するか、抑制するか、または不安定化する能力、安定性、特定の細胞内位置に局在する能力を含む。適用可能な場合、この用語はまた、最も広い意味でのタンパク質複合体の機能にも関する。

[0049] 本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内において有し得る特定の機能をいい、これには、例えば、特異的な細胞表面構造認識能、酵素活性、特定のタンパク質との結合能等を挙げることができるがそれらに限定されない。本開示においては、例えば、あるプロモーターが特定の宿主細胞において認識される機能などを挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において「生物学的機能は、「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含され、例えば、ある分子との相互作用によって別の分子が活性化または不活化される活性も包含される。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する

。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドの対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

[0050] 本開示において使用する場合、ウイルスまたはウイルス由来構築物の「感染性」とは、ウイルスまたはウイルス由来構築物の細胞への接着または膜融合によって、ウイルスまたはウイルス由来構築物内の核酸を細胞内に導入する能力を指す。ウイルスまたはウイルス由来構築物の「複製能力」とは、感染細胞内で感染性のウイルス粒子またはウイルス由来構築物粒子を産生する能力を指す。

[0051] 本明細書において使用する場合、用語「形質転換」、「形質導入」および「トランスフェクション」は、特に言及しない限り互換可能に使用され、宿主細胞への核酸の導入（必要に応じてウイルスまたはウイルス由来構築物を介した）を意味する。形質転換方法としては、宿主細胞に核酸を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、コンピテント化細胞の使用、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法、リン酸カルシウム法などの種々の周知の技術が挙げられる。

[0052] 本明細書において「精製された」物質または生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。従って、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。本明細書中で使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本開示で用いられる物質は、好ましくは「精製された」物質である。

[0053] 本明細書において「医薬成分」とは、医薬を構成し得る任意の成分を意味し、例えば、有効成分（それ自体が薬効を示すもの）、添加成分（それ自体

は、薬効を期待されていないが、医薬として含まれる場合一定の役割（例えば、賦形剤、滑沢剤、界面活性剤等）を果たすことが期待される成分）等を例示することができる。医薬成分は、単独の物質であってもよく、複数の物質や剤の組み合わせであってもよい。有効成分と添加成分との組み合わせ、アジュバントと有効成分との組み合わせなどの任意の組み合わせも含まれる。

- [0054] 本明細書では、「有効成分」は、意図される薬効を発揮する成分をいい、単独または複数の成分が該当し得る。
- [0055] 本明細書において「添加成分」とは、薬効を期待されていないが、医薬として含まれる場合一定の役割を果たす任意の成分をいい、例えば、薬学的に受容可能なキャリア、安定化剤、（補）助剤、溶解度改善剤、可溶化剤、希釈剤、賦形剤、緩衝剤、結合剤、希釈剤、香味料、潤滑剤を挙げることができる。
- [0056] 本明細書において「薬剤」、「剤」または「因子」（いずれも英語では *agent* に相当する）は、広義には、交換可能に使用され、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）であってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、*cDNA*、ゲノムDNAのようなDNA、*mRNA*のようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子およびこれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。
- [0057] 本明細書において使用される場合、「複合体」または「複合分子」とは、2以上の部分を含む任意の構成体を意味する。例えば、一方の部分がポリペプチドである場合は、他方の部分は、ポリペプチドであってもよく、それ以

外の物質（例えば、基材、糖、脂質、核酸、他の炭化水素等）であってもよい。本明細書において複合体を構成する2以上の部分は、共有結合で結合されていてもよくそれ以外の結合（例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力等）で結合されていてもよい。

[0058] 本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、R I（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。標的タンパク質またはそれを捕捉する因子または手段を複数、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10 nm以上であることが好ましい。機能に影響を与えない任意の標識が使用できるが、蛍光物質としては、A l e x aTM F l u o rが挙げられる。A l e x aTM F l u o rは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またpH感受性が低い。蛍光極大波長が10 nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、A l e x aTM 5 5 5とA l e x aTM 6 3 3の組み合わせ、A l e x aTM 4 8 8とA l e x aTM 5 5 5との組み合わせ等を挙げることができる。他の蛍光標識として、シアニン色素（例えば、C y D y eTM シリーズのC y 3、C y 5等）、ローダミン6 G試薬、N-アセトキシ-N-2-アセチルアミノフルオレン（A A F）、A A I F（A A Fのヨウ素誘導体）等が挙げられる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

[0059] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、ウイルス由来構築物、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直

前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、プラスミド等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

[0060] 本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示の医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与形態を指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本開示が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

[0061] 用語「約」は、示された値プラスまたはマイナス10%を指す。「約」が、温度について使用される場合、示された温度プラスまたはマイナス5℃を指し、「約」が、pHについて使用される場合、示されたpHプラスまたはマイナス0.5を指す。

[0062] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0063] （ウイルス由来遺伝子）

一つの局面において、本開示は、新規のウイルス由来構築物の生産に使用できるウイルス由来遺伝子を提供する。一つの局面において、本開示のウイルス由来遺伝子は、アデノウイルス由来遺伝子およびヘルペスウイルス由来遺伝子の組み合わせを含む。典型的には、これらの遺伝子は核酸分子に含まれる形態で提供される。アデノウイルス由来遺伝子を含む核酸およびヘルペスウイルス由来遺伝子を含む核酸（本明細書において、アデノウイルス由来遺伝子およびヘルペスウイルス由来遺伝子を含む核酸と同義である）は、同じ核酸分子であっても異なる核酸分子であってもよく、核酸が二本鎖を形成する場合、同じ二本鎖核酸複合体に含まれてもよいし、異なる二本鎖核酸複合体に含まれてもよい。また、本明細書において、単数または複数の要素（ヘルペスウイルス由来遺伝子など）を含む任意の核酸は、同じ核酸分子に全ての要素が含まれる実施形態および異なる核酸分子の組み合わせに全ての要素が含まれる実施形態を包含し、核酸が二本鎖を形成する場合、同じ二本鎖核酸複合体に全ての要素が含まれる実施形態および異なる二本鎖核酸複合体の組み合わせに全ての要素が含まれる実施形態を包含する。さらに、本明細書において、任意の核酸または遺伝子は、単離された核酸として提供されてもよいし、核酸分子の一部として提供されてもよいし、細胞などに含まれた状態（例えば、細胞の染色体に組み込まれた状態）で提供されてもよい。

[0064] 一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、遺伝子の複製に関連する遺伝子である。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、ヘリカーゼ、プライマーゼ、ssDNA結合タンパク質（DBP）、DNAポリメラーゼおよびDNA複製タンパク質から選択されるタンパク質をコードする。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、DNA鎖合成遺伝子およびヘリカーゼープライマーゼ遺伝子から選択される。DNA鎖合成遺伝子としては、HHV-1のUL29（ICP8）、UL30およびUL42、HHV-2のUL29、UL30、UL42およびUL52、HHV-3のORF16、ORF28およびORF29、HHV-4のBMRF1、BALF5およびBALF2、HHV-5のUL57

、UL54およびUL44、HHV-6AのU27、U38およびU41、HHV-6BのU38、U41およびU79、HHV-7のU27、U38およびU41、ならびにHHV-8のORF6、ORF9およびORF59が挙げられる。ヘリカーゼプライマーゼ遺伝子としては、HHV-1のUL8、UL5およびUL52、HHV-2のUL5、UL8、UL9およびUL52、HHV-3のORF6およびORF55、HHV-4のBSLF1、BBLF4およびBBLF2/BBLF3、HHV-5のUL102、UL105およびUL70、ならびにHHV-7のU43、U73、U74およびU77が挙げられる。

[0065] 一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112から選択される遺伝子を含む。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、DNA鎖合成遺伝子を含み、一つの実施形態において、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL57、UL54およびUL44から選択される。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、DNA鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の一方のみを含み、ここで、DNA鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の各々は1つまたは複数の遺伝子を含んでもよい。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、HHV-1～8から選択されるヘルペスウイルス由来の遺伝子を含む。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子は、HHV-1のUL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30およびUL42、HHV-2のUL5、UL8、UL9、UL29、UL30、UL42およびUL52、HHV-3のORF6、ORF16、ORF28、ORF29およびORF55、HHV-4のBMRF1、BSLF1、BBLF4、BBLF2/BBLF3、BALF5およびBALF2、HHV-5のUL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112、HHV-6AのU27、U38およ

びU41、HHV-6BのU38、U41およびU79、HHV-7のU27、U38、U41、U43、U73、U74、U77およびU79、ならびにHHV-8のORF6、ORF9およびORF59から選択される。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来遺伝子が複数の遺伝子を含む場合、それらの遺伝子は、HHV-1～8から選択されるヘルペスウイルスのうち互いに異なるヘルペスウイルスまたは同じヘルペスウイルス由来であり得る。

[0066] 一つの実施形態において、アデノウイルス由来遺伝子は、ヘルパー遺伝子を含む。一つの実施形態において、アデノウイルス由来遺伝子は、E1A、E1B、E2、E4およびVAから選択される遺伝子を含む。一つの実施形態において、アデノウイルス由来遺伝子は、血清型1～52から選択される血清型のアデノウイルス由来である。

[0067] 一つの実施形態において、アデノウイルス由来遺伝子およびヘルペスウイルス由来遺伝子は、約100:1～1:5、例えば、約100:1～1:2、約100:1～1:1、約100:1～2:1、約100:1～5:1、約100:1～10:1、約100:1～20:1、約50:1～1:5、約50:1～1:2、約50:1～1:1、約50:1～2:1、約50:1～5:1、約50:1～10:1、約20:1～1:5、約20:1～1:2、約20:1～1:1、約20:1～2:1、約20:1～5:1、約10:1～1:5、約10:1～1:2、約10:1～1:1、約10:1～2:1、約5:1～1:5、約5:1～1:2、約5:1～1:1、または約5:1～2:1のアデノウイルス由来遺伝子:ヘルペスウイルス由来遺伝子のモル比で提供され得る。

[0068] 一つの局面において、本開示のウイルス由来遺伝子は、ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子を含む。一つの実施形態において、ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は核酸の形態で提供される。一つの実施形態において、ウイルス由来ポリメラーゼ遺伝子は、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス由来である。一つの実施形態において、ウイルス由来ポリ

メラゼ遺伝子は、ヘルペスウイルス由来である。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来ポリメラゼ遺伝子は、アデノウイルス由来ヘルパー遺伝子（例えば、E 1 A、E 1 B、E 2、E 4 および V A から選択される 1 つまたは複数または全て）と組み合わせられないか、またはアデノウイルス由来ポリメラゼ遺伝子と組み合わせられずに細胞（プロデューサー細胞など）に導入される。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、DNA 鎖合成遺伝子およびヘリカーゼプライマーゼ遺伝子から選択される。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、UL 8、UL 5、UL 5 2、UL 2 9（ICP 8）、UL 3 0、UL 4 2、UL 1 0 2、UL 1 0 5、UL 7 0、UL 5 7、UL 5 4、UL 4 4 および UL 1 1 2 から選択される遺伝子を含む。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、DNA 鎖合成遺伝子を含み、一つの実施形態において、UL 2 9（ICP 8）、UL 3 0、UL 4 2、UL 5 7、UL 5 4 および UL 4 4 から選択される。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、DNA 鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の一方のみを含み、ここで、DNA 鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の各々は 1 つまたは複数の遺伝子を含んでもよい。一つの実施形態において、ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、HHV-1～8 から選択されるヘルペスウイルス由来である。一つの実施形態において、ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、血清型 1～5 2 から選択されるアデノウイルス由来である。一つの実施形態において、ヘルペスウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子は、HHV-1 の UL 8、UL 5、UL 5 2、UL 2 9（ICP 8）、UL 3 0 および UL 4 2、HHV-2 の UL 5、UL 8、UL 9、UL 2 9、UL 3 0、UL 4 2 および UL 5 2、HHV-3 の ORF 6、ORF 1 6、ORF 2 8、ORF 2 9 および ORF 5 5、HHV-4 の BMRF 1、BSLF 1、BSLF 4、BSLF 2／BSLF 3、BALF 5 および BALF 2、HHV

－5のUL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112、HHV－6AのU27、U38およびU41、HHV－6BのU38、U41およびU79、HHV－7のU27、U38、U41、U43、U73、U74、U77およびU79、ならびにHHV－8のORF6、ORF9およびORF59から選択される。

[0069] 任意の上記ウイルス由来遺伝子には、野生型の遺伝子またはその翻訳物に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有する配列（塩基配列またはアミノ酸配列）を有する核酸または翻訳物をコードする核酸が含まれ得る。

[0070] 本開示のウイルス由来遺伝子は、アデノ随伴ウイルス由来構築物を生産するための任意の追加の要素（Capをコードする核酸、Repをコードする核酸、LTRなど）と組み合わせて提供されてもよい。追加の核酸エレメントは、本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸および／またはヘルパー遺伝子を含む核酸と同じ核酸分子または同じ二本鎖核酸複合体において提供されてもよいし、別々に提供されてもよい。

[0071] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、5'LTRおよび3'LTRの間に目的の遺伝子を含む核酸と組み合わせて提供され得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、5'LTRおよび3'LTRの間に目的の遺伝子、プロモーターおよびターミネーターを含む核酸と組み合わせて提供され得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、AAVの5'LTR、rep、cap、AAP（アセンブリ活性化タンパク質）、MAAP（膜会合アクセサリタンパク質）および3'LTR、ならびにアデノウイルスのE1A、E1B、E2A、VAおよびE4を含む。任意の遺伝子は、細胞（プロデューサー細胞など）中に存在する形態で提供されてよく、細胞の染色体に組み込まれた形態で提供

されてよい。

- [0072] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸は、カチオン性物質との複合体の形態で提供されてもよい。カチオン性物質として、PEI pro、FectoVIR-AAV、Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、FuGENE 6、FuGENE HD、FuGENE 4Kが挙げられる。
- [0073] 一つの実施形態において、本開示の任意の核酸は、必要に応じて遺伝子の上流にプロモーターを含み得る。一つの実施形態において、本開示の任意の核酸は、薬剤選択マーカース核酸配列を含み得る。
- [0074] 本開示のウイルス由来遺伝子を使用して生産されるウイルス（例えばAAV）由来構築物は構造タンパク質（カプシドなど）を有し、構造タンパク質は組織または細胞との結合に関与し得る。そのため、構造タンパク質を改変して組織または細胞（またはその表面構造）との結合性を改変することでウイルス由来構築物の組織または細胞への標的化を調整することができる。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、構造タンパク質をコードする遺伝子を含む核酸と組み合わせて提供されてもよく、この構造タンパク質は改変されていてもよい。例えば、組織または細胞標的化を調整する構造タンパク質の改変として、他のタンパク質（他のウイルスカプシド（例えば、他の血清型のウイルスのカプシド、VSV-G）、抗体の抗原結合領域、被験体生物のリガンドタンパク質（がん抗原に対するリガンド）など）との置換または融合が挙げられる。また、エンベロープを有するウイルス由来構築物は、プロデューサー細胞の細胞膜成分をエンベロープに含み得る。そのため、プロデューサー細胞の細胞膜成分を改変することで、エンベロープを有するウイルス由来構築物の組織または細胞への標的化を調整することができる。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物は、神経細胞（末梢神経系または中枢神経系の細胞、ニューロンおよびオリゴデンドロサイトなどの脳細胞など）、肺細胞、眼の細胞（網膜細胞、網膜色素上皮、角膜細胞など）、上皮細胞（例えば、腸または呼吸器の上皮細胞）、筋細胞（例

えば、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、横隔膜筋細胞）、樹状細胞、脾臓細胞（島細胞など）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾臓細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、前立腺細胞、生殖細胞、がん細胞などを標的とするように設計されてもよい。それぞれの細胞に特異的な表面構造（受容体など）は、公知であり、当業者は、その表面構造に強力にまたは特異的に結合するタンパク質を適宜選択できる。

[0075] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、生産するウイルス由来構築物の起源ウイルスのタンパク質を弱毒化したタンパク質をコードする遺伝子を含む核酸と組み合わせて提供されてもよい。任意の公知の弱毒化ウイルスタンパク質をコードする遺伝子が含まれ得る。

[0076] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来遺伝子は、目的の遺伝子を含む核酸と組み合わせて提供されてもよい。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、2つの末端反復配列の間に配置され得る。目的の遺伝子は、最終的にウイルス由来構築物に組み込まれ得る。このような目的の遺伝子は、治療用タンパク質がコードされていてもよいし、遺伝子治療用遺伝子がコードされていてもよいし、CAR T療法など遺伝子細胞治療用遺伝子がコードされていてもよいし、タンパク質非コード機能性RNA（rRNA、tRNA、マイクロRNA（miRNA）、lncRNAなど）をコードしていてもよいし、これらと組み合わせてまたは独立にプロモーター、ターミネーター、インスレーター、エンハンサー、サイレンサー、複製起点などの転写翻訳調節配列を含んでもよい。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、サイトメガロウイルスプロモーター、CAGプロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーターなどのウイルスプロモーターを含む（必要に応じて、タンパク質コード遺伝子の upstream に）。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、IRESを含む（必要に応じて、タンパク質コード遺伝子の upstream に）。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、ウイルス由来構築物を投与する被験体の染色体に組み込まれ得る。この実施形態において、目的の

遺伝子は、被験体が元来有する遺伝子の発現を制御する機能を有してもよいし、長期にわたるタンパク質発現をもたらしてもよい。例えば、アデノ随伴ウイルスに基づくウイルス由来構築物は、被験体の染色体に組み込まれ得る。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、治療用細胞（例えば、染色体）に組み込まれ得る（例えば、体外でのウイルス由来構築物による細胞の処理を介して）。

[0077] 一つの実施形態において、目的の遺伝子は、複数の遺伝子を含み得る。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、2～100、例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、7以上、10以上、12以上、15以上、20以上、25以上、30以上、40以上または50以上、かつ100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、35以下、30以上、25以下、20以下、17以下、15以下、12以下または10以下の遺伝子を含み得る。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、約0.1～1000 kbp、例えば、約0.1 kbp以上、約0.3 kbp以上、約1 kbp以上、約2 kbp以上、約5 kbp以上、約7 kbp以上、約10 kbp以上、約20 kbp以上、約50 kbp以上または約100 kbp以上、かつ約1000 kbp以下、約700 kbp以下、約500 kbp以下、約200 kbp以下、約100 kbp以下、約70 kbp以下、約50 kbp以下、約20 kbp以下または約10 kbp以下の塩基長を含み得る。一つの実施形態において、目的の遺伝子が複数の遺伝子を含むことで、被験体の組織（例えば、がん組織）特異的または時期特異的なプロモーターとこれに作動可能に連結された治療用遺伝子（治療用タンパク質コード配列、遺伝子治療用遺伝子、遺伝子細胞治療用遺伝子など）との組合せ、代謝カスケードを制御する一連の酵素の協調発現を可能と一連の酵素をコードする配列など、高度な機能性を有する核酸を被験体に送達可能であり得る。

[0078] 一つの実施形態において、目的の遺伝子にコードされるタンパク質としては、治療用ポリペプチド（例えば、補充療法）、免疫原性ポリペプチド（例えば、病原体ポリペプチド、がん抗原ポリペプチド）などが挙げられる。治

療用ポリペプチドとしては、嚢胞性線維症膜貫通制御タンパク質（CFTR）、ジストロフィン（ミニジストロフィンおよびマイクロジストロフィン、ミオスタチンプロペプチド、フォリスタチン、アクチビンⅠⅠ型可溶性受容体、IGF-1、抗炎症性ポリペプチド、サルコspan、ユートロフィン、ミニユートロフィン、凝固因子（例えば、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子など）、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、レプチン、LDL受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、 β -グロビン、 α -グロビン、スペクトリン、 α 1-アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ、ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 β -グルコセレブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、リソソームヘキソサミニダーゼA、分岐鎖ケト酸脱水素酵素、RP65タンパク質、サイトカイン（例えば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、インターフェロン- γ 、インターロイキン-2、インターロイキン-4、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシンなど）、ペプチド増殖因子、神経栄養因子およびホルモン（例えば、ソマトトロピン、インスリン、インスリン様増殖因子1および2、血小板由来増殖因子、上皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、神経増殖因子、神経栄養因子-3および-4、脳由来神経栄養因子、骨形態形成タンパク質、グリア由来増殖因子、形質転換増殖因子- α および- β など）、リソソーム酸 α -グルコシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼA、腫瘍壊死増殖因子 α 可溶性受容体、S100A1、パルプアルブミン、アデニリルシクラーゼ6型、抗炎症性因子、抗ミオスタチンタンパク質、アスパルトアミラーゼ、自殺遺伝子産物（例えば、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、腫瘍壊死因子）、腫瘍抑制遺伝子産物（例えば、p53、Rb、Wt-1）、TRAIL、FAS-リガンドなどが挙げられる。

[0079] 病原体ポリペプチドとしては、細菌、真菌、寄生虫などの病原生物の細胞表面タンパク質、およびウイルスの表面に発現するタンパク質（例えば、ス

パイクタンパク質、エンベロープタンパク質、カプシドタンパク質など）が挙げられる。病原体ポリペプチドの具体例としては、オルソミクソウイルス免疫原（例えば、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）、核タンパク質）、レンチウイルス免疫原（例えば、HIVもしくはSIVのエンベロープGP160タンパク質、マトリックス／カプシドタンパク質、gag、pol、env遺伝子産物）、アレナウイルス免疫原（例えば、ラッサ熱ウイルス核カプシドタンパク質、エンベロープ糖タンパク質）、ポックスウイルス免疫原（例えば、ワクシニアL1またはL8遺伝子産物）、フラビウイルス免疫原（例えば、黄熱病ウイルスまたは日本脳炎ウイルス免疫原）、フィロウイルス免疫原（例えば、NPおよびGP遺伝子産物などのエボラウイルスまたはマールブルグウイルス免疫原）、ブニヤウイルス免疫原（例えば、RVFV、CCHF、SFSウイルス免疫原）、コロナウイルス免疫原（例えば、ヒトコロナウイルスエンベロープ糖タンパク質などのヒトコロナウイルス免疫原）、ポリオ免疫原、ヘルペスウイルス免疫原（例えば、CMV、EBV、HSV免疫原）、ムンプスウイルス免疫原、麻疹ウイルス免疫原、風疹ウイルス免疫原、ジフテリア毒素もしくは他のジフテリア免疫原、百日咳抗原、および肝炎（例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎など）免疫原などが挙げられる。

[0080] がん抗原ポリペプチドとして、BRCA1遺伝子産物、BRCA2遺伝子産物、gp100、チロシナーゼ、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、LAGE、NY-ESO-1、CDK-4、 β -カテニン、MUM-1、カスパーゼ-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、メラノーマ腫瘍抗原、MART-1、gp100 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、チロシナーゼ、HER-2/neu遺伝子産物、CA125、LK26、FB5（エンドシアリン）、TAG72、AFP、CA19-9、NSE、DU-PAN-2、CA50、SPan-1、CA72-4、HCG、STN（シアリルTn抗原）、c-erbB-2タンパク質、PSA、L-C

a n A g、エストロゲン受容体、乳脂肪グロブリン、p 5 3 腫瘍抑制因子タンパク質、ムチン抗原、テロメラーゼ、核マトリックスタンパク質、前立腺酸性ホスファターゼ、パピローマウイルス抗原などが挙げられる。

[0081] 一つの実施形態において、目的の遺伝子は、特定の疾患を治療するための遺伝子（例えば、遺伝子治療遺伝子）であり得る。特定の疾患に対して選択すべき遺伝子は当業者が適宜選択し得る。このような疾患として、例えば、各種病原体による感染症、嚢胞性線維症、血友病A、血友病B、サラセミア、貧血、アルツハイマー病、多発性硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、癲癇、がん（メラノーマ、腺がん腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、肝臓がん、結腸がん、白血病、子宮がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、膵臓がん、脳がんなど）、糖尿病、筋ジストロフィー、ゴーシェ病、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠乏症、糖原貯蔵疾患、先天性肺気腫、レッシュ・ナイハン症候群、ニーマン・ピック病、テイ・サックス病、アンジェルマン症候群、メープルシロップ尿症、加齢黄斑変性、黒内障、糖尿病性網膜症、網膜変性疾患、星状細胞腫、膠芽腫、心不全、末梢動脈疾患、関節炎、関節障害、内膜過形成、A I D S、筋消耗、腎臓欠損症、肝炎、L D L 受容体欠乏症、高アンモニア血症、クラッベ病、バッテン病、脊髄性大脳性運動失調症、フェニルケトン尿症、自己免疫疾患、アミノ酸代謝異常症、有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症、ミトコンドリア病、糖質代謝異常症、ライソゾーム病、ペルオキシソーム病、金属代謝異常症、プリンピリミジン代謝異常症、ビタミン代謝異常症、神経伝達物質異常症、脂質代謝異常症、結合組織異常症、先天性ポルフィリン症、 α 1-アンチトリプシン欠損症、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症障害、ファブリー病、カナバン病、リー病、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、重症筋無力症、ピンスワンガー病、脳梗塞、気分障害、うつ病、双極性感情障害、持続性感情障害、二次的気分障害、統合失調症、薬物依存性、不安症、強迫障害、身体表現性障害、解離性障害、悲嘆

、産後うつ病、幻覚、妄想、認知症、パノイア、自閉症スペクトラム障害、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食障害、体重障害、肥満症、悪液質、神経性食欲不振症、過食症などが挙げられる。一つの実施形態において、目的の遺伝子は、CART療法などで使用する治療用細胞（例えば、染色体）に組み込まれ得る（例えば、体外でのウイルス由来構築物による細胞の処理を介して）。

[0082] （方法）

一つの局面において、本開示は、本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸をプロデューサー細胞に導入するステップと、プロデューサー細胞においてウイルス由来構築物を形成させるステップとを含む、ウイルス由来構築物を作製する方法を提供する。一つの実施形態において、導入した核酸の少なくとも一部は、プロデューサー細胞の染色体に組み込まれる。

[0083] （細胞）

一つの局面において、本開示は、本開示のウイルス由来遺伝子を含む細胞を提供する。典型的には、細胞は、プロデューサー細胞（例えば、AAV由来構築物を生産する）である。一つの実施形態において、本開示は、本開示のウイルス由来遺伝子の少なくとも1つの要素を細胞に導入する工程を含む、細胞を作製する方法を提供する。

[0084] プロデューサー細胞の例として、例えば、ヒト胚性腎臓細胞（ヒト胎児の腎細胞にアデノウイルス5を切断したDNAをトランスフェクションさせることにより作製されたもの）、911細胞、PER、C6細胞、E1形質転換羊膜細胞、E1形質転換A549細胞、GH329:HeLa細胞、HEK293細胞、IT293SF細胞、HEK293T、HEK293F、Vero細胞、CHO細胞、Sf9細胞、Freestyle（商標）293-F、Expi293-F（商標）、Expi293 inducible、Expi293 NGT-Viral Production Cells 1.0、Viral Production Cells 2.0（VPC2.0細胞）、AAVpro（登録商標）293T Cell Lin

e、Lenti-X（商標）293T Cell Line、FreeStyle（商標）CHO-S cells、ExpiCHO-S（商標）、VirusExpress（商標）293 AAV生産細胞、VirusExpress（商標）293T レンチウイルス生産細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。AAV由来構築物を生産するためのプロデューサー細胞として、特に、HEK293、HEK293T、HEK293F、Hela、Sf9などの細胞が挙げられる。

[0085] 一つの実施形態において、細胞は、本開示のウイルス由来遺伝子のうちの1つまたは複数を染色体に含む。一つの実施形態において、細胞は、末端逆位反復配列（ITR）、目的の遺伝子（GOI）、Rep遺伝子、Cap遺伝子を（必要に応じて染色体に）含む。一つの実施形態において、細胞は、ヘルパー遺伝子、ITR、GOI、Cap遺伝子およびRep遺伝子を（必要に応じて染色体に）含む。一つの実施形態において、細胞は、ヘルパー遺伝子、ITR、GOI、Cap遺伝子およびRep遺伝子を染色体の一遺伝子座に含む。

[0086] （ウイルス由来構築物）

一つの局面において、本開示は、本開示のウイルス由来遺伝子を使用して作製されたウイルス由来構築物も提供する。典型的には、ウイルス由来構築物は、AAV由来構築物である。ウイルス由来構築物は、ウイルスベクター、ウイルス様粒子（VLP）、腫瘍溶解ウイルス（がん細胞でのみ増殖するように改変されたものを含む）、またはウイルスレプリコン（ウイルス粒子産生能を欠失させた自己複製可能なウイルスゲノム）であり得る。

[0087] 本開示のAAV由来構築物は、標的組織に応じて好適な血清型のAAVに基づいて作製され得る。例えば、（血清型）：（標的組織）の関係は以下の通りを選択されてもよい；（AAV1）：（筋肉、肝臓、気道、神経細胞）、（AAV2）：（筋肉、肝臓、神経細胞）、（AAV3）：（筋肉、肝臓、神経細胞）、（AAV4）：（筋肉、脳室上皮細胞）、（AAV5）：（筋肉、肝臓、神経細胞、グリア細胞、気道）、（AAV6）：（筋肉、肝臓

、気道、神経細胞）、（AAV7）：（筋肉、肝臓）、（AAV8）：（筋肉、肝臓）、（AAV9）：（筋肉、肝臓、気道）。AAVのカプシドとして、野生型の他に、標的化変異を加えたカプシド（AAV2 i 8、AAV2 . 5、AAV-TT、AAV9. HRなど）、ランダム変異を加えたカプシド（AAV-PHP. Bなど）、インシリコで設計したカプシド（Anc 80など）が挙げられ、一つの実施形態において、本開示のAAV由来構築物はこれらの改変カプシドを含んでもよい。

[0088] 一つの実施形態において、本開示は、本開示のウイルス由来構築物の集団を含むウイルス由来構築物含有組成物を提供する。本開示の方法により作製された本開示のウイルス由来構築物および本開示のウイルス由来構築物含有組成物は、ウイルス由来構築物の立体構造や表面修飾などにおいて完全には分析できないまたは分析することが非常に困難な構造特徴を有し得る。そのため、本開示の方法により作製されたという特徴は、本開示のウイルス由来構築物および本開示のウイルス由来構築物含有組成物を適切に表現する特徴の一つである。

[0089] 一つの実施形態において、本開示は、本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸を含むウイルス由来構築物を提供する。本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸は、ウイルス由来構築物の形成の過程で通常除去されるが、完全な除去は困難であり得、得られたウイルス由来構築物に残留し得る。ウイルス由来構築物調製物をDNase処理してウイルス粒子外の核酸を分解した後、DNaseを不活化し、その後ウイルス粒子から抽出した核酸を確認した場合に、1用量あたりに、約10 ng未満の本開示のウイルス由来遺伝子を含む核酸（またはその断片、例えば、200 bp以下の断片）が見出され得る。

[0090] （組成物）

一つの実施形態において、本開示は、本明細書に記載のウイルス由来遺伝子、核酸、発現制御系の要素、細胞、およびウイルス由来構築物のうちの少なくとも1つを含む組成物を提供する。組成物は、ウイルス（例えばAAV

）由来構築物の生産のための組成物であり得る。

[0091] （剤型等）

本明細書に記載されるウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、およびウイルス由来構築物は、種々の形態で（例えば組成物）提供され得る。組成物の形態としては、例えば、注射剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、吸入剤等であってもよい。注射用の水溶液は、例えば、バイアル、またはステンレス容器で保存してもよい。また注射用の水溶液は、例えば生理食塩水、糖（例えばトレハロース）、 NaCl 、または NaOH 等を配合してもよい。

[0092] 一つの実施形態では、本開示の組成物は、薬学的に許容しうるキャリアもしくは賦形剤を含む。このようなキャリアは、無菌液体、例えば水および油であることも可能であり、石油、動物、植物または合成起源のものが含まれ、限定されるわけではないが、ピーナツ油、ダイズ油、ミネラルオイル、ゴマ油等が含まれる。医薬を経口投与する場合は、水が好ましいキャリアである。医薬組成物を静脈内投与する場合は、生理食塩水および水性デキストロースが好ましいキャリアである。好ましくは、生理食塩水溶液、並びに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が、注射可能溶液の液体キャリアとして使用される。適切な賦形剤には、軽質無水ケイ酸、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、ポロキサマー、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が含まれる。組成物は、望ましい場合、少量の湿潤剤または乳化剤、あるいは pH 緩衝剤もまた含有することも可能である。これらの組成物は、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、ピル

、カプセル、粉末、持続放出配合物等の形を取ることも可能である。伝統的な結合剤およびキャリア、例えばトリグリセリドを用いて、組成物を座薬として配合することも可能である。経口配合物は、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的キャリアを含むことも可能である。適切なキャリアの例は、E.W.Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences(Mark Publishing Company, Easton, U.S.A)に記載される。これらのほか、例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含んでもよい。一つの実施形態では、本開示の任意の液体組成物のpHは、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、約10、約10.5、約11またはこれらの任意の2つの値の間の範囲であり得る。

[0093] 本開示の組成物の任意の成分は、薬学的に許容しうる塩として提供することができ、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する遊離型のカルボキシル基とともに形成される塩、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどの遊離型のアミン基とともに形成される塩、並びにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、および水酸化第二鉄とともに形成される塩であり得る。

[0094] 好ましい実施形態において、公知の方法に従って、ヒトへの投与に適応させた医薬組成物として、組成物を配合することができる。このような組成物は注射により投与することができる。代表的には、注射投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝剤中の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射部位での疼痛を和らげるリドカインなどの局所麻酔剤も含むことも可能である。一般的に、成分を別個に供給するか、または単位投薬型中で一緒に混合して供給し、例えば活性剤の量を示すアンプルまたはサシェ

などの密封容器中、凍結乾燥粉末または水不溶濃縮物として供給することができる。組成物を注入によって投与しようとする場合、無菌薬剤等級の水または生理食塩水を含有する注入ビンを用いて、分配することも可能である。組成物を注射によって投与しようとする場合、投与前に、成分を混合可能であるように、注射用の無菌水または生理食塩水のアンプルを提供することも可能である。

[0095] (使用・用途)

本明細書に記載のウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物は遺伝子治療、機能的ゲノム学、癌ワクチン接種および／または抗ウイルスワクチン接種など、種々の用途で使用する事ができる。

[0096] 本開示のウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物を被験体に適用する場合、被験体は特に限定されず、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、ブタ、サル、ヒトなど）、鳥類、爬虫類、両生類、節足動物、魚類などであり得る。

[0097] 本開示のウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物の量は、処置または予防する障害または状態の性質によって変動するが、当業者は本明細書の記載に基づき標準的臨床技術によって決定可能である。場合によって、*in vitro*アッセイを使用して、最適投薬量範囲を同定するのを補助することも可能である。配合物に使用しようとする正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重大性によっても変動しうるため、担当医の判断および各患者の状況に従って、決定すべきである。本開示のウイルス由来構築物またはウイルス由来構築物含有組成物の投与量は特に限定されないが、例えば、1回あたり 1×10^5 個、 1×10^6 個、 1×10^7 個、 1×10^8 個、 1×10^9 個、 1×10^{10} 個、 1×10^{11} 個、 1×10^{12} 個、 1×10^{13} 個、 1×10^{14} 個もしくは 1×10^{15} 個の個数のウイルス由来構築物であってもよく、それらいずれか

2つの値の範囲内であってもよい。投与間隔は特に限定されないが、例えば、1、7、14、21、または28日あたりに1または2回投与してもよく、それらいずれか2つの値の範囲あたりに1または2回投与してもよい。投与量、投与間隔、投与方法は、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択してもよい。

[0098] 本明細書に記載のウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物の投与経路は、例えば、静脈内、皮下、皮下、筋肉内、腹腔内、髄腔内、脳室内、脳実質内、経肺、鼻内、硬膜外、または経口投与等であってもよい。一つの実施形態では、本開示の組成物、種々の送達（デリバリー）系をともに使用することができる。このような系には、例えばリポソーム、微小粒子、および微小カプセル中の被包：受容体が仲介するエンドサイトーシスの使用などがある。好適な経路によって、例えば注入によって、ボラス（bolus）注射によって、上皮または皮膚粘膜裏打ち（例えば口腔、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収によって、医薬を投与することも可能であるし、必要に応じてエアロゾル化剤を用いて吸入器または噴霧器を使用し、そして他の薬剤と一緒に投与することも可能である。投与は全身性または局所であることも可能である。

[0099] 本開示のウイルス由来遺伝子、核酸、細胞、もしくはウイルス由来構築物、またはこれらを含む組成物はキットとして提供することができる。一つの実施形態では、本開示は、ウイルス由来構築物を生成するためのキットであって、ウイルス由来遺伝子を含む核酸を含む、キットを提供する。一つの実施形態では、本開示は、本開示の組成物に添加され得る1以上の成分が充填された、1以上の容器を含む、薬剤パックまたはキットを提供する。場合によって、このような容器に付随して、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。

[0100] 本開示の組成物の医薬等としての製剤化手順は、当該分野において公知で

あり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、本明細書の記載があれば、過度な実験を行うことなく、使用すべき量等の実施形態を決定することができる。

[0101] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

[0102] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0103] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0104] 試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D Systems、USCN Life Science INC等）の同等品でも代用可能である。

[0105] （プラスミドDNAの構築）

本実施例で使用した各プラスミドは、以下の通り入手または作製した。

[0106] ・ #1 SYNp148__UL5.8.52

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素（AatII、PciI）で処理した。そこに以下の4断片（CMVプロモーター断片、SV40 polyA断片、bGH polyA断片およびCAGプロモーター断片）をIn Fusionを用いて挿入した。CMVプロモーター断片は、CMVプロモーター遺伝子配列（ベクタービルダー）をテンプレートとして以下のプライ

マーを使用して調製した：5' - c g a a a a g t g c c a c c t g c g g c c g c a a g c t t t c t a g g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a - 3' (配列番号3)、5' - G A A T T C C C T G C A G G G C T C T T C a g c t c t g c t t a t a t a g a c c t c - 3' (配列番号4)。SV40 polyA断片は、SV40 polyA signal 遺伝子配列 (ベクタービルダー) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' - C C C T G C A G G G A A T T C t a a g a t a c a t t g a t g a g - 3' (配列番号5)、5' - g g a g g a t c c a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a - 3' (配列番号6)。bGH polyA断片は、bGH polyA signal 遺伝子配列 (ベクタービルダー) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' - c a a g t t g g a t c c t c c c c a g c a t g c c t g c t a t t c - 3' (配列番号7)、5' - t t g G C T A G C t g t a c a c t g t g c c t t c t a g t t g c c - 3' (配列番号8)。CAGプロモーター断片は、CAGプロモーター遺伝子配列 (ベクタービルダー) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' - c a a g t t g g a t c c t c c c c a g c a t g c c t g c t a t t c - 3' (配列番号9)、5' - g c t g g c c t t t t g c t c g c g g c c g c a g a t c t a c g c g t C C T A G g c t c g a c a t t g a t t a t t g a c - 3' (配列番号10)。得られたプラスミドを制限酵素 (A v r I I) で処理した。この断片と以下の2断片 (E F A 1 プロモーター断片およびhGH polyA断片) をInFusionを用いて結合した。E F A 1 プロモーター断片は、E F A 1 遺伝子配列 (ベクタービルダー) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' - c a a t g t c g a g c C T A G G g g c t c c g g t g c c c g t c a g t g - 3' (配列番号11)、5' - G A A G A G C g g t a c c G G C G C G C C t c a c g a c a c c t g a a a t g g a a - 3' (配列番号12)。hGH polyA断片は、hGH polyA signal 遺伝子配列 (ベクタービルダー) を

テンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' -CCgg
taccGCTCTTCgggtggcatccctgtgaccc-3'
(配列番号13)、5' -tctacgcgtgtcgacaaggaca
gggaaggagcag-3' (配列番号14)。得られたプラスミド
(pUC19_CMVp-CAGp-EF1Ap)を制限酵素(SbfI、
EcoRI)で処理した。この断片と以下のUL5断片をInFusion
を用いて結合し、pUC19_CMVp-UL5を構築した(#1.1)。
UL5断片は、UL5遺伝子配列(ATCC VR-1493D)をテンプ
レートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' -agagctG
AAGAGCCCTGCAGGATGGCGGCGGCCGGCGGGGA
GCGCCAGCTAG-3' (配列番号15)、5' -atgtatct
taGAATTCTTAATAGACAATGACCACGTTTCGGAT
CGCG-3' (配列番号16)。pUC19_CMVp-CAGp-EF
1Apを制限酵素(BsrGI、NheI)で処理した。この断片と以下の
UL8断片をInFusionを用いて結合し、pUC19_CAGp-UL
8を構築した(#1.2)。UL8断片は、UL8遺伝子配列(ATCC
VR-1493D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調
製した：5' -gaaggcacagtgtacaTCAGGCAAACA
GAAACGACATCTTGTCTCGTC-3' (配列番号17)、5' -
caaagaaattgGCTAGCATGGACACCGCAGATATC
GTGTGGGTGGAG-3' (配列番号18)。pUC19_CMVp
-CAGp-EF1Apを制限酵素(AscI、KpnI)で処理した。こ
の断片と以下のUL52断片をInFusionを用いて結合し、pUC1
9_EF1Ap-UL52を構築した(#1.3)。UL52断片は、UL
52遺伝子配列(ATCC VR-1493D)をテンプレートとして以下
のプライマーを使用して調製した：5' -gtgtcgtgaGGCGCG
CCATGGGGCAGGAAGACGGGAACCGCGGGGAG-3'
(配列番号19)、5' -gccaccccGAAGAGCgggtaccT

CAAGACGACGGTTGAGAGGTGCTGCAGGGAACGGACGGC-3' (配列番号20)。pUC19__CMVp-UL5とpUC19__EF1Ap-UL52を制限酵素(AscI、NsiI)で処理してライゲーションした。得られたプラスミドとpUC19__CAGp-UL8を制限酵素(BsrGI、XbaI)で処理してライゲーションした。

[0107] ・ #2 SYNp149__UL29.30.42

pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(SbfI、EcoRI)で処理した。この断片と以下のUL42断片をInFusionを用いて結合し、pUC19__CMVp-UL42を構築した(#2.1)。UL42断片は、UL42遺伝子配列(ATCC VR-1493D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-agagctGAAGAGCCCTGCAGGATGACGGATTCCCCTGGCGGTGTGGCCCCC-3' (配列番号21)、5'-atgtatcttaGAATTCTCAGGGGAATCCAAAACCATACGGGGTTTTG-3' (配列番号22)。pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(BsrGI、NheI)で処理した。この断片と以下のUL29断片をInFusionを用いて結合し、pUC19__CAGp-UL29を構築した(#2.2)。UL29断片は、UL29遺伝子配列(ATCC VR-1493D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-gaaggcacagtgtacaTCACAGCATATCCAACGTCAGGTCTCCCTTTTTTG-3' (配列番号23)、5'-caaagaattgGCTAGCATGGAGACAAAGCCCAAGACGGCAACCACC-3' (配列番号24)。pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(AscI、KpnI)で処理した。この断片と以下のUL30断片をInFusionを用いて結合し、pUC19__EF1Ap-UL30を構築した(#2.3)。UL30断片は、UL30遺伝子配列(ATCC VR-1493D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-gtgtc

g t g a G G C G C G C C A T G T T T T C C G G T G G C G G C G G C C
C G C T G T C C C C C G G A G G - 3' (配列番号25)、5' - g c c
a c c c G A A G A G C g g t a c c T C A T G C T A G A G T A T C A A
A G G C T C T A T G C A A C - 3' (配列番号26)。pUC19__CMV
Vp-UL42とpUC19__CAGp-UL29を制限酵素(HindIII、EcoRI)で処理してライゲーションした。得られたプラスミドと
pUC19__EF1Ap-UL30を制限酵素(AvrII、NsiI)で
処理してライゲーションした。

[0108] ・ #3 SYNp150__UL70. 102. 105

pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(SbfI、E
coRI)で処理した。この断片と以下のUL105断片をInFusion
を用いて結合し、pUC19__CMVp-UL105を構築した(#3.
1)。UL105断片は、UL105遺伝子配列(ATCC VR-977
D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' - a
g a g c t G A A G A G C C C T G C A G G A T G T C G A T G A C G G C
C T C G T C A T C C A C A C C G C G G C C - 3' (配列番号27)、5
' - a t g t a t c t t a G A A T T C T C A A A A A A T A A G C G T G
G T G C G T T T G T C T T T G - 3' (配列番号28)。pUC19__C
MVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(BsrGI、NheI)で処理
した。この断片と以下のUL102断片をInFusionを用いて結合し
、pUC19__CAGp-UL102を構築した(#3. 2)。UL102
断片は、UL102遺伝子配列(ATCC VR-977D)をテンプレ
ートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' - g a a g g c a c a
g t g t a c a T T A A G C G T T G A G C C G G A A A A A C C G C A G
G C C - 3' (配列番号29)、5' - c a a a g a a t t g G C T A G C
A T G A C C G C T C A G C C G C C G C T G C A C C A C C G C - 3' (配
列番号30)。pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素
(AscI、KpnI)で処理した。この断片と以下のUL70断片をIn

Fusionを用いて結合し、pUC19_EF1Ap-UL70を構築した(#3.3)。UL70断片は、UL70遺伝子配列(ATCC VR-977D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-gtgtcgtgaGGCGCGCCATGACGCTCGTTCTGTTCGCAACAGAGTATG-3' (配列番号31)、5'-gccaccGAGAGCggtaCCTCAGACGGCGGTGCGCCGGCGGCATGGGCGC-3' (配列番号32)。pUC19_CMVp-UL105とpUC19_CAGp-UL102を制限酵素(SbfI、EcoRI)で処理してライゲーションした。得られたプラスミドとpUC19_EF1Ap-UL70を制限酵素(AvrII、HindIII)で処理してライゲーションした。

[0109] ・ #4 SYNp151_UL44.54.57

pUC19_CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(SbfI、EcoRI)で処理した。この断片と以下のUL44断片をInFusionを用いて結合し、pUC19_CMVp-UL44を構築した(#4.1)。UL44断片は、UL44遺伝子配列(ATCC VR-977D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-agagctGAAGAGCCCTGCAGGATGGATCGCAAGACGCGCCTCTCGGAGCCAC-3' (配列番号33)、5'-atgtatcttaGAATTCTAGCCGCACTTTTGCTTCTTGGTGTTAGG-3' (配列番号34)。pUC19_CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素(BsrGI、NheI)で処理した。この断片と以下のUL57断片をInFusionを用いて結合し、pUC19_CAGp-UL57を構築した(#4.2)。UL57断片は、UL57遺伝子配列(ATCC VR-977D)をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5'-gaaggcacagtgtacaTTACAACCGGCTGCGTTTGGCCGGCAATAAC-3' (配列番号35)、5'-caaagaattgGCTAGCATGAGCCACGAG

GAAC TAACCGCGCTAGCG-3' (配列番号36)。pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apを制限酵素 (A s c I、K p n I) で処理した。この断片と以下のUL54断片をInFusionを用いて結合し、pUC19__EF1Ap-UL54を構築した (#4.3)。UL54断片は、UL54遺伝子配列 (ATCC VR-977D) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' -g t g t c g t g a G G C G C G C C A T G T T T T T C A A C C C G T A T C T G A G C G G C G G C G T G A C C G G-3' (配列番号37)、5' -g c c a c c c G A A G A G C g g t a c c T C A A C A G C A T T C G T G C G C C T T G A C A C T G T A C-3' (配列番号38)。pUC19__CMVp-UL44とpUC19__CAGp-UL57を制限酵素 (S b f I、B a m H I) で処理してライゲーションした。得られたプラスミドとpUC19__EF1Ap-UL54を制限酵素 (A v r I I、H i n d I I I) で処理してライゲーションした。

[0110] ・ #5 SYNp152__UL112

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素 (A a t I I、P c i I) で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。この断片は、pUC19__CMVp-CAGp-EF1Apをテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' -c g a a a a g t g c c a c c t g c g g c c g c a a g c t t t c t a g a a c t a g t c c t a g g g g c t c c g g t g c c c g t c a g t g-3' (配列番号39)、5' -g c t g g c c t t t t g c t c g c g g c c g c a g a t c t a c g c g t g t c g a-3' (配列番号40)。得られたプラスミドを制限酵素 (K p n I) で処理した。この断片と以下のUL112断片をInFusionを用いて結合した。UL112断片は、UL112遺伝子配列 (ATCC VR-977D) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' -a t c c g a a t t c g c t a g c A T G G A T C T G C C T A C T A C C G T C G T G C G A A A A T A C-3' (配列番号41)、5'

—g c c a c c c G A A G A G C g g t a c c T T A A T C G T C G A A A
A A C G C C G C G A T C G A G G C G G C G G C G A T C—3'（配列番号42）。

[0111] ・ # 6 p H e l p e r

pUC19ベクタープラスミド（Addgene：#500005）を制限酵素（AatII、PciI）で処理した。そこに以下の3断片（VA断片、E4断片およびE2A断片）をInFusionを用いて挿入した。VA断片は、Ad5のゲノム（ATCC VR-1516を参照のこと）をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5'—t t a g t a a g c t t c c c t c c t g a c g c g g t a g g a g g a g g g g a g g g t g c c c t g c a t g—3'（配列番号43）、5'—c c t t t t g c t c a c a t g t c a a t t g g t a g a t g t a c c t g g a c a t c c a g g t g a t g c c g g c g—3'（配列番号44）。E4断片は、Ad5のゲノムをテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5'—t g t a c a G G C G C G C C g a a t t c g t t t t a g g g c g g a g t a a c t t g t a t g t g t t g g g a a t t g t a g—3'（配列番号45）、5'—a g g g a a g c t t a c t a a a c g g t a c a c a g g a a a c a g g a g a c a c a a c t c c a a g t g—3'（配列番号46）。E2A断片は、Ad5のゲノムをテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5'—g a a a a g t g c c a c c t g a c g t c g c g g c c g c G C G A T C G C g g t a c c c a a c t c c a t g c t c a a c a g t c c c c a g g t a c a g c c c—3'（配列番号47）、5'—g a a t t c G G C G C G C C t g t a c a g c c c g g g c g a c c g c a c c c t g t g a c g a a a g c c g c c c g c a a g—3'（配列番号48）。

[0112] ・ # 7 p R 2 C 1

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素（AatII、PciI）で処理した。そこに以下の3断片（p5遺伝子断片、AAV2 Rep断片およ

びSV40 ori断片)をInFusionを用いて挿入した。p5遺伝子断片は、以下のプライマーを使用して調製した：5' -g a a a a g t g c c a c c t g a c g t c g c g g c c g c g g a g g g g t g g a g t c g t g a c g t g a a t t a c g t c a t a g g g t t a g g g a g g t c c t g t a t t a g a g g t c a c g t g a g t g t t t t g c g a c - 3' (配列番号49)、5' -g t t c a a a c c t c c c g c t t c a a a a t g g a g a c c c t g c g t g c t c a c t c g g g c t t a a a t a c c c a g c g t g a c c a c a t g g t g t c g c a a a a t g t c g c a a a a c a c t c a - 3' (配列番号50)。AAV2 Rep断片は、pRC2-mi342 (Takara) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' -g c g g g a g g t t t g a a c g c g c a g c c g c c A T G C C G G G G T T T T A C - 3' (配列番号51)、5' -G A T C G C A G C G C T a t t t a a a t c a t T T A T T G T T C A A A G A T - 3' (配列番号52)。SV40 ori断片は、SV40 ori遺伝子配列 (TOYOBO) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' -a a t A G C G C T G C G A T C G C g g c c t c c a a a a a a g c - 3' (配列番号53)、5' -c c t t t t g c t c a c a t g t c a a t t g a t c c c g c c c c t a a c t - 3' (配列番号54)。得られたプラスミドを制限酵素 (Swa I、Afe I) で処理した。そこにAAV1 Cap断片をInFusionを用いて挿入した。AAV1 Cap断片は、pRC1 (Takara) をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5' -A A C A A T A A a t g a t t t a a a t c a g g - 3' (配列番号55)、5' -g g c c G C G A T C G C A G C G C T g t a g c c a t g g a a a c t a g a t a - 3' (配列番号56)。

[0113] ・ #8 pAAV-EGFP

ベクタービルダーから購入した (pAAV [Exp] -CMV>EGFP : WP RE)。

[0114] ・ # 9 S Y N p 1 8 0 - 1

S Y N p 1 7 7 _ A I O _ H e l p e r - A d 5 _ R 2 C 1 _ E G F P _ w t E 1 _ k m を遺伝子合成と O G A B 法により作製した。このプラスミドが有する遺伝子とその順番を以下に示す： 5' I T R 2 (ベクタービルダー)、CMV プロモーター (ベクタービルダー)、E G F P (ベクタービルダー)、W P R E (ベクタービルダー)、h G H p o l y A s i g n a l (TAKARA)、3' I T R 2 (ベクタービルダー)、E 2 A (A d 5)、E 4 (A d 5)、V A (A d 5)、C a p (A A V 1)、R e p (A A V 2)、p 5 (A A V 2)、E 1 A (A d 5)、E 1 B (A d 5)、p U C o r i (p U C 1 9)、カナマイシン耐性遺伝子 (ベクタービルダー)、H S V T K P o l y A s i g n a l (TAKARA)、ピューロマイシン耐性遺伝子 (ベクタービルダー)、m P G K プロモーター (ベクタービルダー)。ここで、O G A B 法の例示的な手順を以下に示す。目的の導入核酸を、約 1 k b 以下の断片に分割する。各断片の末端がユニークかつ特定の断片とのみ相補的になるように設計する。このように設計した各断片それぞれについてプライマーを設計して P C R に法により各断片を調製する。各断片をベクタープラスミドにクローニングし、各ベクタープラスミドを使用して大腸菌の形質転換を行い、各断片について正しい配列を含むクローンを取得する。これらの大腸菌クローンからプラスミドを精製し、プラスミド溶液の D N A 濃度を測定する。各断片のプラスミドの量が等しくなるように、それぞれのプラスミド溶液を分取して混合する。この混合液に制限酵素を添加し、それぞれがユニークかつ特定の断片とのみ相補的になる末端を有する D N A 断片を生成する。その後、同じ制限酵素で切断した O G A B 集積用ベクターを各断片とモル濃度を合わせるような量で溶液に添加し、ライゲーションを行い、相補的な末端を有する断片 (O G A B 集積用ベクターの断片を含む) のペア同士を連結する。これを枯草菌コンピテントセルに添加し、培養した後、形質転換されたコロニーを取得する。このコロニーから目的の構造を有するプラスミドを回収する。S Y N p 1 7 7 _ A I O _ H e l p e r - A

d5__R2C1__EGFP__wtE1__kmを制限酵素 (FseI、SalI) で処理した。E1/p5/AAV2 Rep断片を取り除いた箇所にp5/AAV2 Rep断片をInFusionを用いて挿入してSYNp180-1を作製した。p5/AAV2 Rep断片は、プラスミド#6のSYNp21__pR2C1をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した: 5' -TCACCATCTTGTCGACACAGTCGTTGAAGGG-3' (配列番号57)、5' -agcgcgagcgagtcGGCCGGCCg c g g c c g c g g a g g g g t g g a g t c g-3' (配列番号58)。

[0115] ・ #10 SYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFP

遺伝子合成とOGAB法により作製した。このプラスミドが有する遺伝子とその順番を以下に示す: 5' ITR2 (TAKARA)、CMVプロモーター (TAKARA)、EGFP (ベクタービルダー)、WPRE (ベクタービルダー)、hGH polyA signal (TAKARA)、3' ITR2 (TAKARA)、E2A (Ad2)、E4 (Ad2)、VA (Ad2)、Rep (AAV2)、Cap (AAV2)、CMVプロモーター (TAKARA)、mi342 (TAKARA)、HSV TK PolyA signal (TAKARA)、p5 (TAKARA) tetL (pGETS151)、枯草菌複製開始点 (pGETS151)、大腸菌複製開始点 (pGETS151)、アンピシリン耐性遺伝子 (pGETS151)。OGAB法の例示的な手順は上記を参照のこと。

[0116] ・ #11 SYNp163__pGETS151__AIO-R2C3-EGFP

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素 (SgrDI) で処理した。Rep2-Cap3遺伝子配列をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した: 5' -ACATCTACGGA

T T A C G T C G A g g a g g g g t g g a g t c g t g a c g - 3' (配列番号59)、5' - A C C G C A T T A A A G C T C G T C G A A G C G C T g t a g c c a t g g a a a c - 3' (配列番号60)。

[0117] ・ # 1 2 S Y N p 1 6 4 _ _ p G E T S 1 5 1 _ _ A I O - R 2 C 4 - E G F P

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap4遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0118] ・ # 1 3 S Y N p 1 6 5 _ _ p G E T S 1 5 1 _ _ A I O - R 2 C 5 - E G F P

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap5遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0119] ・ # 1 4 S Y N p 1 6 6 _ _ p G E T S 1 5 1 _ _ A I O - R 2 C 6 - E G F P

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap6遺伝子配列をテンプレートとして配列番号57および58のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0120] ・ # 1 5 S Y N p 1 6 7 _ _ p G E T S 1 5 1 _ _ A I O - R 2 C 7 - E G F P

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap7遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0121] ・ # 1 6 S Y N p 1 6 8 _ _ p G E T S 1 5 1 _ _ A I O - R 2 C 8 - E G F

P

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap8遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0122] ・ #17 SYNp169__pGETS151__AIO-R2C9-EGFP プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap9遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0123] ・ #18 SYNp170__pGETS151__AIO-R2C10-EGFP

プラスミド#10のSYNp162__pGETS151__AIO-R2C2-EGFPを制限酵素(SgrDI)で処理した。Rep2-Cap10遺伝子配列をテンプレートとして配列番号59および60のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した。

[0124] ・ #19 SYNp180-3

プラスミド#9のSYNp180-1を制限酵素(SalI、AseI)で処理した。Rep2-Cap3遺伝子配列をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した断片をInFusionを用いてそこに挿入した: 5'-gtgagcaaaaggGCGATCGCTCTAGAAC TAGTgtagccatggaaactagata-3' (配列番号61)、5'-CAACGACTGTGTGTCGACAAGATG-3' (配列番号62)。

[0125] ・ #20 pUC19__CMV-Ad5Pol

pUC19ベクタープラスミドを制限酵素(AatII、PciI)で処理した。そこに以下の2断片(CMVプロモーター断片およびhGH polyA断片)をInFusionを用いて挿入した。CMVプロモーター断

片は、CMVプロモーター遺伝子配列（ベクタービルダー）をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5′－g a a a a g t g c c a c c t g c g g c c g c a a g c t t t c t a g g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a－3′（配列番号63）、5′－g g t a c c G G C G C G C C g g a t c c G C T C T T C a g c t c t g c t t a t a t a g a c c t c－3′（配列番号64）。hGH polyA断片は、hGH polyA signal遺伝子配列（タカラ）をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5′－g g t a c c G G C G C G C C g g a t c c G C T C T T C a g c t c t g c t t a t a t a g a c c t c－3′（配列番号65）、5′－g c t g g c c t t t t g c t c g c g g c c g c a g a t c t a c g c g t g t c g a c a a g g a c a g g g a a g g g a g c a g－3′（配列番号66）。このプラスミドを制限酵素（BamHI、AscI）で処理した。そこにAd5由来ポリメラーゼ遺伝子断片をInFusionを用いて挿入した。Ad5ポリメラーゼ遺伝子断片は、Ad5ゲノム抽出物をテンプレートとして以下のプライマーを使用して調製した：5′－g c t G A A G A G C g g a t c c g c c a c c a t g g a c a g c t c c c a t c t g c g c g a t g t t g t c a t c a a g c t c c－3′（配列番号67）、5′－A G C g g t a c c G G C G C G C C t a c g g c a t c t c g a t c c a g c a t a t c t c c t c g t t t c g c g g g t t g－3′（配列番号68）。

[0126] 特に、本実施例において検討したヒトヘルペスウイルス（HHV）由来の遺伝子をコードするプラスミドの構造の概要を以下にまとめる。

[0127]

[表1]

HHV プラスミド (全長)	遺伝子	遺伝子 の長さ (bp)	機能	起源 ウイルス	プロモ- ーター	PolyA シグナル
#1 SYNp148 (14223 bp)	UL8	2253	ヘリカーゼ-プライマーゼサブ ユニット	HHV-1	CAG	bGH
	UL5	2649	ヘリカーゼ-プライマーゼの ヘリカーゼサブユニット	HHV-1	CMV	SV40
	UL52	3177	ヘリカーゼ-プライマーゼのプ ライマーゼサブユニット	HHV-1	EF1A	hGH
#2 SYNp149 (14910 bp)	UL29 (ICP8)	3591	一本鎖 DNA 結合タンパク質	HHV-1	CAG	bGH
	UL30	3708	DNA ポリメラーゼ触媒サブユ ニット	HHV-1	EF1A	hGH
	UL42	1467	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット	HHV-1	CMV	SV40
#3 SYNp150 (14478 bp)	UL102	2622	ヘリカーゼ-プライマーゼサブ ユニット	HHV-5	CAG	bGH
	UL105	2871	ヘリカーゼ-プライマーゼの ヘリカーゼサブユニット	HHV-5	CMV	SV40
	UL70	2841	ヘリカーゼ-プライマーゼのプ ライマーゼサブユニット	HHV-5	EF1A	hGH
#4 SYNp151 (14883 bp)	UL57	3708	一本鎖 DNA 結合タンパク質	HHV-5	CAG	bGH
	UL54	3729	DNA ポリメラーゼ触媒サブユ ニット	HHV-5	EF1A	hGH
	UL44	1302	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット	HHV-5	CMV	SV40
#5 SYNp152 (5753 bp)	UL112	2203	遺伝子制御、DNA 複製	HHV-5	EF1A	hGH

[0128] (実施例 1 : ヒトヘルペスウイルス (HHV) 由来遺伝子による AAV 生産)

血清型 5 のアデノウイルス (Ad5) のヘルパー遺伝子の代替として HH

Vの遺伝子の複製に関連する遺伝子を用いたときの複数の細胞株におけるAAV1ベクターの生産を検討した。

[0129] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 5×10^6 個のHEK293細胞、HeLa細胞、またはCHO-K1細胞を6wellプレートに播種した。22時間後、1.9mLの培地（2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示すプラスミドを含むDMEM培地50μLと、DNAの1倍量のPEI pro（登録商標）（PolyPlus-transfection SAS）を含むDMEM培地50μLとを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0130] [表2]

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA 量 [μg/well]
1	SYNp148_UL5.8.52	14223	0.66
2	SYNp149_UL29.30.42	14910	0.69
3	SYNp150_UL70.102.105	14478	0.67
4	SYNp151_UL44.54.57	14883	0.69
6	pHelper	11120	0.52
7	pR2C1	6336	0.30
8	pAAV-EGFP	5118	0.24

[0131] ・ rAAVの評価

37℃、5% CO₂で72時間培養後、上清に含まれるrAAVのゲノムタイター（コピー数）を定量するために、上清に対してDNase I処理を30分行い、95℃で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った。CMVプロモーターを標的として、5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'（配列番号1）および5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'（配列番号2）のプライマー配列を用いた。PCR条件は95℃で10分の後、95℃／15秒、55℃

／5秒、72℃／30秒を40サイクル繰り返した。

[0132] 結果を図1に示す。アデノウイルスのヘルパー遺伝子の代わりにヘルペスウイルスの遺伝子の複製に関連する遺伝子を用いてもAAVベクターが生産されることが確認された。なお、HEK293細胞は、アデノウイルスのヘルパー遺伝子E1AおよびE1Bを含むが、HeLa細胞およびCHO-K1細胞はこれらのヘルパー遺伝子を含まない。それでも、E1AおよびE1Bを添加していないHeLa細胞およびCHO-K1細胞においてAAVベクターの生産が観察されたことから、ヘルペスウイルスの遺伝子の複製に関連する遺伝子がAAVベクターの生産において有用であり得る。

[0133] (実施例2：アデノウイルスヘルパー遺伝子の補助としてのヘルペスウイルス遺伝子のAAVベクター生産量への影響)

Ad5のヘルパー遺伝子に加えてHHVの遺伝子の複製に関連する遺伝子を使用した場合のHEK293細胞におけるAAV1ベクター生産量を検討した。

[0134] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 5×10^6 個のHEK293細胞を6wellプレートに播種した。22時間後、1.9mLのDMEM培地(2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン)に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示されるプラスミドを含むDMEM培地50μLと、DNAの1倍量のPEI pro (登録商標) (PolyPlus-transfection SAS)を含むDMEM培地50μLとを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0135]

[表3]

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA 量 [μg/well]
1	SYNp148_UL5.8.52	14223	0.66
2	SYNp149_UL29.30.42	14910	0.69
3	SYNp150_UL70.102.105	14478	0.67
4	SYNp151_UL44.54.57	14883	0.69
6	pHelper	11120	0.52
7	pR2C1	6336	0.30
8	pAAV-EGFP	5118	0.24
9	SYNp180-f	19464	0.91

[0136] ・ r A A V の評価

37℃、5% CO₂で72時間培養後、上清に含まれる r A A V のゲノムタイターを定量するために、上清に対してDNase I 処理を30分を行い、95℃で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った。CMVプロモーターを標的として、5' -CATCAATGGGCGTG GATAGC-3' (配列番号1) および5' -GGAGTTGT TACG ACATTTTGGAAA-3' (配列番号2) のプライマー配列を用いた。PCR条件は95℃で10分の後、95℃/15秒、55℃/5秒、72℃/30秒を40サイクル繰り返した。

[0137] 結果を図2に示す。ヘルペスウイルスの遺伝子の複製に関連する遺伝子単独よりもアデノウイルスのヘルパー遺伝子を加えた方がA A Vベクターの生産量が向上した。

[0138] (実施例3：ヘルペスウイルス遺伝子の選択によるA A Vベクター生産量への影響)

導入するHHVの遺伝子の複製に関連する遺伝子の種類および量を変えて、Ad5のヘルパー遺伝子に加えてHHV遺伝子を使用した場合のHEK293細胞におけるA A V1ベクター生産量を検討した。

[0139] ・ r A A V の作製

トランスフェクションの前日に 5×10^6 個の HEK293 細胞を 6well
プレートに播種した。22 時間後、1.9 mL の DMEM 培地（2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換し、37℃、5% CO_2 で 2 時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示されるプラスミドを含む DMEM 培地 50 μ L と、DNA の 1 倍量の PEI pro（登録商標）（PolyPlus-transfection SAS）を含む DMEM 培地 50 μ L とを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0140] [表4]

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA 量(モル比=1.0)[μ g/well]	トランスフェクションした pDNA 量(モル比=0.5) [μ g/well]
1	SYNp148_UL5.8.52	14223	0.66	0.33
2	SYNp149_UL29.30.42	14910	0.69	0.35
3	SYNp150_UL70.102.105	14478	0.67	0.34
4	SYNp151_UL44.54.57	14883	0.69	0.35
5	SYNp152_UL112	5753	0.27	0.13
9	SYNp180-1	19464	0.91	-

[0141] ・ rAAV の評価

37℃、5% CO_2 で 72 時間培養後、上清に含まれる rAAV のゲノム
タイターを定量するために、上清に対して DNase I 処理を 30 分行い、
95℃で 10 分反応させたサンプルを 1000 倍希釈して qPCR を行った。
CMV プロモーターを標的として、5' -CATCAATGGGCGTG
GATAGC-3'（配列番号 1）および 5' -GGAGTTGTTACG
ACATTTTGGAAA-3'（配列番号 2）のプライマー配列を用いた。
PCR 条件は 95℃で 10 分の後、95℃／15 秒、55℃／5 秒、72℃／30 秒を 40 サイクル繰り返した。

[0142] 結果を図 3 に示す。ここでは、DNA の 2 本鎖を解くヘリカーゼおよびプ

ライマー付加の機能を有するプライマーゼを、連続する機能を有する遺伝子（ヘリカーゼープライマーゼ遺伝子）として一緒に導入した。また、DNA結合タンパク質およびポリメラーゼを、連続する機能を有する遺伝子（DNA鎖合成遺伝子）として一緒に導入した。特に、DNA鎖合成遺伝子を導入した場合のAAVベクター生産量が高かった。ヘリカーゼープライマーゼ遺伝子およびDNA鎖合成遺伝子を組み合わせて導入するよりも、それぞれ単独で導入した方が高いAAVベクター生産量が得られ、さらにHHV遺伝子を導入しなかった場合よりも高いAAVベクター生産量が得られ得ることが見出された。また、別の遺伝子の複製に関連する遺伝子であるUL112も単独導入により同様の結果が得られた。プロデューサー細胞に導入したヘルパー遺伝子に対するヘルペス遺伝子のモル比は、1である場合よりも0.5である場合の方が全体的にAAVベクター生産量は高かった。別の実験によりさらにモル比の検討を行った結果、0.05のモル比でもヘルペス遺伝子追加の影響が確認された。なお、トランスフェクションするプラスミドの種類を減らして実験を簡素化するために複数のHHV遺伝子を含むプラスミド（SYNp148、SYNp149など）を使用して実験を行ったが、遺伝子を別々のプラスミドに分割しても同様の結果が得られ得る。

[0143] （実施例4：AAVカプシドの血清型ごとのヘルペスウイルス遺伝子導入によるAAVベクター生産量への影響）

導入するAAVカプシドの血清型を変えて、Ad5のヘルパー遺伝子に加えてHHVの遺伝子の複製に関連する遺伝子を使用した場合のHEK293細胞におけるAAVベクター生産量を検討した。

[0144] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 5×10^6 個のHEK293細胞を6wellプレートに播種した。22時間後、1.9mLのDMEM培地（2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示されるプラスミドを含むDMEM培地50μLとDNAの1倍量のPEI pro（登

録商標) (PolyPlus-transfection SAS) を含む DMEM 培地 50 μ L を混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0145] [表5]

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェクションした pDNA 量 [μ g/well]
2	SYNp149_UL29.30.42	14910	0.69
4	SYNp151_UL44.54.57	14883	0.69
5	SYNp152_UL112	5753	0.27
9	SYNp180-1	19464	0.91
10	SYNp162_pGETS151_AIO-R2C2-EGFP	23762	1.11
11	SYNp163_pGETS151_AIO-R2C3-EGFP	22724	1.06
12	SYNp164_pGETS151_AIO-R2C4-EGFP	22718	1.06
13	SYNp165_pGETS151_AIO-R2C5-EGFP	22688	1.06
14	SYNp166_pGETS151_AIO-R2C6-EGFP	22724	1.06
15	SYNp167_pGETS151_AIO-R2C7-EGFP	22727	1.06
16	SYNp168_pGETS151_AIO-R2C8-EGFP	22730	1.06
17	SYNp169_pGETS151_AIO-R2C9-EGFP	22724	1.06
18	SYNp170_pGETS151_AIO-R2C10-EGFP	22730	1.06

[0146] ・ rAAV の評価

37℃、5% CO₂ で 72 時間培養後、上清に含まれる rAAV のゲノムタイターを定量するために、上清に対して DNase I 処理を 30 分行い、95℃ で 10 分反応させたサンプルを 1000 倍希釈して qPCR を行った。CMV プロモーターを標的として、5' -CATCAATGGGCGTG GATAGC-3' (配列番号 1) および 5' -GGAGTTGTTACG ACATTTTGGAAA-3' (配列番号 2) のプライマー配列を用いた。PCR 条件は 95℃ で 10 分の後、95℃ / 15 秒、55℃ / 5 秒、72℃ / 30 秒を 40 サイクル繰り返した。

[0147] 結果を図 4 A および 4 B に示す。実施例 3 と同様に HHV の遺伝子の複製に関連する遺伝子を使用したことで AAV ベクター生産量が向上した例が多数確認された。特にサンプル # 6、# 7 (AAV 2 と SYNp149 または SYNp151 との組み合わせ) の結果が注目され、AAV 2 は上清に分泌

されにくく、通常は細胞抽出液から回収されるが、上清におけるAAVベクター量の向上を示す本結果から、生産性の面において有効であると考えられる。

[0148]（実施例5：単独のHHV遺伝子を使用したAAVベクター生産）

表6に示すHHVの複製に関連する遺伝子を単独でAd5ヘルパー遺伝子に加えた場合のHEK293細胞におけるAAV3ベクター生産量を確認した。

[0149] [表6]

起源ウイルス	遺伝子	機能
HHV-1	UL8	ヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット
	UL5	ヘリカーゼ-プライマーゼのヘリカーゼサブユニット
	UL52	ヘリカーゼ-プライマーゼのプライマーゼサブユニット
	UL29 (ICP8)	一本鎖DNA結合タンパク質
	UL30	DNAポリメラーゼ触媒サブユニット
	UL42	DNAポリメラーゼ processivity サブユニット
HHV-5	UL102	ヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット
	UL105	ヘリカーゼ-プライマーゼのヘリカーゼサブユニット
	UL70	ヘリカーゼ-プライマーゼのプライマーゼサブユニット
	UL57	一本鎖DNA結合タンパク質
	UL54	DNAポリメラーゼ触媒サブユニット
	UL44	DNAポリメラーゼ processivity サブユニット

[0150] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に、 0.225×10^6 個のHEK293細胞を24wellプレートに播種した。22時間後、0.38mLのDMEM培地（2% FBS、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示されるpDNA#19にそれぞれのpDNAを加えたDMEM培地10μLとDNAの1倍量のPEI pro（登録商標）（PolyPlus-transfection SAS）を含むDMEM培地10μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0151]

[表6A]

pDNA#	トランスフェクションした pDNA	Length [bp]	トランスフェク ションした pDNA 量[$\mu\text{g}/\text{well}$]
1.1	pUC19_CMVp-UL5	8793	0.086
1.2	pUC19_CAGp-UL8	8397	0.082
1.3	pUC19_EF1Ap-UL52	9321	0.091
2.1	pUC19_CMVp-UL42	7611	0.074
2.2	pUC19_CAGp-UL29	9735	0.095
2.3	pUC19_EF1Ap-UL30	9852	0.096
3.1	pUC19_CMVp-UL105	9015	0.088
3.2	pUC19_CAGp-UL102	8766	0.086
3.3	pUC19_EF1Ap-UL70	8985	0.088
4.1	pUC19_CMVp-UL44	7446	0.073
4.2	pUC19_CAGp-UL57	9852	0.096
4.3	pUC19_EF1Ap-UL54	9873	0.096
19	SYNp180-3	19464	0.380

[0152] ・ r A A V の評価

37℃、5% CO₂で72時間培養後、上清に含まれる r A A V のゲノムタイターを定量するために、上清に対してDNase I 処理を30分行い、95℃で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った。CMVプロモーターを標的として、5'-CATCAATGGGCGTG GATAGC-3'（配列番号1）および5'-GGAGTTGTTACG ACATTTTGGAAA-3'（配列番号2）のプライマー配列を用いた。PCR条件は95℃で10分の後、95℃/15秒、55℃/5秒、72℃/30秒を40サイクル繰り返した。

[0153] 結果を図5に示す。HHVの複製に関連する遺伝子を単独でAdヘルパー遺伝子に加えた場合、加えていない場合と比較してどの遺伝子でも r A A V 3の産生量が向上した。特に、HHV-1のUL30とHHV-5のUL54で示されるDNAポリメラーゼ触媒サブユニットの追加は共通して高い生産量が確認された。この結果から、他のHHVの血清型においても同様に、複製に関連する遺伝子の添加は r A A V ベクター産生量を向上させ得る。

[0154] （実施例6：種々のHHVの遺伝子を使用したAAVベクター生産）

以下の表に示す各種ヘルペスウイルスの遺伝子の複製に関与する遺伝子を

単独でまたは組み合わせて、A A V 産生遺伝子と共にトランスフェクションした場合の A A V ベクター産生量を確認する。

[0155]

[表7]

起源ウイルス	遺伝子	機能
HHV-2	UL5	ヘリカーゼ-プライマーゼのヘリカーゼサブユニット
	UL8	ヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット
	UL9	DNA 複製開始点結合ヘリカーゼ
	UL29	一本鎖 DNA 結合タンパク質
	UL30	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	UL42	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット
	UL52	ヘリカーゼ-プライマーゼのプライマーゼサブユニット
HHV-3	ORF6	DNA ヘリカーゼ-プライマーゼ複合体の構成要素
	ORF16	DNA ポリメラーゼのサブユニット
	ORF28	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	ORF29	一本鎖 DNA 結合タンパク質
	ORF55	DNA ヘリカーゼ-プライマーゼ複合体の構成要素
HHV-4	BMRF1	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット
	BSLF1	ヘリカーゼ-プライマーゼのプライマーゼサブユニット
	BBLF4	ヘリカーゼ-プライマーゼのヘリカーゼサブユニット
	BBLF2/BBLF3	ヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット
	BALF5	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	BALF2	一本鎖 DNA 結合タンパク質
HHV-6A	U27	複製、二本鎖 DNA 結合タンパク質、ポリメラーゼ processivity サブユニットトランス活性化
	U38	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	U41	主要 DNA 結合タンパク質
HHV-6B	U38	DNA ポリメラーゼ
	U41	主要 DNA 結合タンパク質
	U79	DNA ポリメラーゼ
HHV-7	U27	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット
	U38	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	U41	一本鎖 DNA 結合タンパク質
	U43	ヘリカーゼ-プライマーゼのプライマーゼサブユニット
	U73	DNA 複製開始点結合ヘリカーゼ
	U74	ヘリカーゼ-プライマーゼサブユニット
	U77	ヘリカーゼ-プライマーゼのヘリカーゼサブユニット
	U79	遺伝子制御
HHV-8	ORF6	一本鎖 DNA 結合タンパク質
	ORF9	DNA ポリメラーゼ触媒サブユニット
	ORF59	DNA ポリメラーゼ processivity サブユニット

[0156] ヘルペスウイルスの遺伝子の複製に関与する遺伝子は、単独で導入した場合も、組み合わせて導入した場合と同様に、AAVベクターを産生できることが確認され得る。

[0157] (実施例7：HHVポリメラーゼ単独をヘルパー遺伝子として使用したAAVベクター生産)

HEK293、HeLa、CHO-K1細胞を用いて、以下の表に示すプラスミド（実施例1を参照のこと）をヘルパー遺伝子と組み合わせず、pR2C1およびpAAV-EGFPと共にトランスフェクションした場合のAAVベクター産生量を確認する。

[0158] [表8]

細胞株	HHV プラスミド	ヘルパー遺伝子 (Ad)	pR2C1	pAAV-EGFP
HEK293	-	+	+	+
HEK293	SYNp148	-	+	+
HEK293	SYNp149	-	+	+
HEK293	SYNp150	-	+	+
HEK293	SYNp151	-	+	+
HeLa	SYNp148	-	+	+
HeLa	SYNp149	-	+	+
HeLa	SYNp150	-	+	+
HeLa	SYNp151	-	+	+
CHO-K1	SYNp148	-	+	+
CHO-K1	SYNp149	-	+	+
CHO-K1	SYNp150	-	+	+
CHO-K1	SYNp151	-	+	+

[0159] AAVベクターが産生されることが確認され、ヘルパー遺伝子を導入した場合よりも高いAAVベクター産生量が得られ得る。

[0160] (実施例8：種々のAdのDNAポリメラーゼ遺伝子を使用したAAVベクター生産)

アデノウイルスの7つの種A、B、C、D、E、FおよびGから、血清型

Ad12、Ad14、Ad5、Ad8、Ad4、Ad40およびAd52をそれぞれ選択し、そのDNAポリメラーゼ遺伝子をAAV産生遺伝子と共にトランスフェクションした場合のAAVベクター生産量を確認する。

[0161] アデノウイルスのDNAポリメラーゼを導入した場合の方が導入しない場合よりも高いAAVベクター生産量が得られ得る。

[0162] (実施例9：AdのDNAポリメラーゼ遺伝子を使用したAAVベクター生産)

ヘルペスウイルス由来遺伝子だけでなく、アデノウイルス5由来DNAポリメラーゼ遺伝子を追加した場合のHEK293細胞におけるAAV3ベクター生産量を確認した。

[0163] ・rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 0.225×10^6 個のHEK293細胞を24wellプレートに播種した。22時間後、0.38mLのDMEM培地(2% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン)に交換し、37℃、5% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の細胞へ以下の表に示すプラスミドを含むDMEM培地10μLとDNAの1倍量のPEI pro(登録商標)(PolyPlus-transfection SAS)を含むDMEM培地10μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0164] [表9]

pDNA#	トランスフェクションしたpDNA	Length [bp]	トランスフェクションしたpDNA量[μg/well]
20	pUC19_CMV-Ad5Pol	6046	0.059
19	SYNp180-3	19464	0.380

[0165] ・rAAVの評価

37℃、5% CO₂で72時間培養後、上清に含まれるrAAVのゲノムタイターを定量するために、上清に対してDNase I処理を30分行い、95℃で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った

。CMVプロモーターを標的として、5' -CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'（配列番号1）および5' -GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'（配列番号2）のプライマー配列を用いた。PCR条件は95℃で10分の後、95℃/15秒、55℃/5秒、72℃/30秒を40サイクル繰り返した。

[0166] アデノウイルスのDNAポリメラーゼを導入した場合の方が導入しない場合よりも高いAAVベクター生産量が確認された。この結果から、アデノウイルスの7つの種A、B、C、D、E、FおよびGの血清型におけるDNAポリメラーゼ遺伝子においても同様に、rAAVベクター産生量を向上させ得る。

[0167] （注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本出願は、2023年1月31日に日本国特許庁に出願した特願2023-013329に対して優先権主張をともなうものであり、その内容は本出願において必要に応じてすべてが本明細書を構成するものとして引用される。

産業上の利用可能性

[0168] 本開示は、新規のウイルス由来構築物の生産に使用できるウイルス由来遺伝子を提供し、それにより、ウイルス由来構築物の改善された提供が可能である。

配列表フリーテキスト

[0169] ・配列番号1：CATCAATGGGCGTGGATAGC、CMVプロモーター用プライマー1
・配列番号2：GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA、CMVプロモーター用プライマー2

- ・配列番号3 : TTAGTAAGCTTCCCTCCTGACGCGGTAGGAGGAGGGGAGGGGTGCCCTGCATG、CMVプロモーター断片用プライマー1
- ・配列番号4 : TTAGTAAGCTTCCCTCCTGACGCGGTAGGAGGAGGGGAGGGGTGCCCTGCATG、CMVプロモーター断片用プライマー2
- ・配列番号5 : CCCTGCAGGGAATTCTAAGATACATTGATGAG、SV40 polyA断片用プライマー1
- ・配列番号6 : GGAGGATCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATA、SV40 polyA断片用プライマー2
- ・配列番号7 : CAAGTTGGATCCTCCCCAGCATGCCTGCTATTC、bGH polyA断片用プライマー1
- ・配列番号8 : TTGGCTAGCTGTACACTGTGCCTTCTAGTTGCC、bGH polyA断片用プライマー2
- ・配列番号9 : CAAGTTGGATCCTCCCCAGCATGCCTGCTATTC、CAGプロモーター断片用プライマー1
- ・配列番号10 : GCTGGCCTTTTGTCTCGCGGCCGCAGATCTACGCGTCCTAGGCTCGACATTGATTATTGAC、CAGプロモーター断片用プライマー2
- ・配列番号11 : CAATGTCGAGCCTAGGGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG、EFA1プロモーター断片用プライマー1
- ・配列番号12 : GAAGAGCGGTACCGGCGCGCCTCACGACACCTGAAATGGAA、EFA1プロモーター断片用プライマー2
- ・配列番号13 : CCGGTACCGCTCTTCGGGTGGCATCCCTGTGACCC、hGH polyA断片用プライマー1
- ・配列番号14 : TCTACGCGTGTGACAAAGGACAGGGAAGGGAGCAG、hGH polyA断片用プライマー2

- ・ 配列番号 15 : AGAGCTGAAGAGCCCTGCAGGATGGC
GGCGGCCGGCGGGGAGCGCCAGCTAG、UL 5 断片用プライマー 1
- ・ 配列番号 16 : ATGTATCTTAGAATTCTTAATAGACA
ATGACCACGTTTCGGATCGCG、UL 5 断片用プライマー 2
- ・ 配列番号 17 : GAAGGCACAGTGTACATCAGGCAAAC
AGAAACGACATCTTGTGTCGTC、UL 8 断片用プライマー 1
- ・ 配列番号 18 : CAAAGAATTGGCTAGCATGGACACCG
CAGATATCGTGTGGGTGGAG、UL 8 断片用プライマー 2
- ・ 配列番号 19 : GTGTCGTGAGGCGCGCCATGGGGCAG
GAAGACGGGAACCGCGGGGAG、UL 5 2 断片用プライマー 1
- ・ 配列番号 20 : GCCACCCGAAGAGCGGTACCTCAAGA
CGACGGTTGAGAGGTGCTGCAGGGAACGGACGGC
、UL 5 2 断片用プライマー 2
- ・ 配列番号 21 : AGAGCTGAAGAGCCCTGCAGGATGAC
GGATTCCCCTGGCGGTGTGGCCCCC、UL 4 2 断片用プライマー 1
- ・ 配列番号 22 : ATGTATCTTAGAATTCTCAGGGGAAT
CCAAAACCATACGGGGTTTTG、UL 4 2 断片用プライマー 2
- ・ 配列番号 23 : GAAGGCACAGTGTACATCACAGCATA
TCCAACGTCAGGTCTCCCTTTTTTG、UL 29 断片用プライマー 1
- ・ 配列番号 24 : CAAAGAATTGGCTAGCATGGAGACAA
AGCCCAAGACGGCAACCACC、UL 29 断片用プライマー 2
- ・ 配列番号 25 : GAAGGCACAGTGTACATCACAGCATA
TCCAACGTCAGGTCTCCCTTTTTTG、UL 30 断片用プライマー 1

- ・ 配列番号 26 : CAAAGAATTGGCTAGCATGGAGACAAAGCCCAAGACGGCAACCACC、UL30断片用プライマー2
- ・ 配列番号 27 : AGAGCTGAAGAGCCCTGCAGGATGTCGATGACGGCCTCGTCATCCACACCGCGGCC、UL105断片用プライマー1
- ・ 配列番号 28 : ATGTATCTTAGAATTCTCAAAAATAAGCGTGGTGCGTTTTGTCTTTG、UL105断片用プライマー2
- ・ 配列番号 29 : GAAGGCACAGTGTACATTAAGCGTTGAGCCGGA AAAACCGCAGGCC、UL102断片用プライマー1
- ・ 配列番号 30 : CAAAGAATTGGCTAGCATGACCGCTCAGCCGCCGCTGCACCACCGC、UL102断片用プライマー2
- ・ 配列番号 31 : GTGTCGTGAGGCGCGCCATGACGCTCGTTCTGTTGCAACAGAGTATG、UL70断片用プライマー1
- ・ 配列番号 32 : GCCACCCGAAGAGCGGTACCTCAGACGGCGGTGCGCCGGCGGCATGGGCGC、UL70断片用プライマー2
- ・ 配列番号 33 : AGAGCTGAAGAGCCCTGCAGGATGGATCGCAAGACGCGCCTCTCGGAGCCAC、UL44断片用プライマー1
- ・ 配列番号 34 : ATGTATCTTAGAATTCTTAGCCGCACTTTTGCTTCTTGGTGTTAGG、UL44断片用プライマー2
- ・ 配列番号 35 : GAAGGCACAGTGTACATTACAACCGGCTGCGTTTTGGCCGGCAATAAC、UL57断片用プライマー1

- ・配列番号36 : CAAAGAATTGGCTAGCATGAGCCACG
AGGAACTAACC GCGCTAGCG、UL57断片用プライマー2
- ・配列番号37 : GTGTCGTGAGGCGCGCCATGTTTTTC
AACCCGTATCTGAGCGGCGGCGTGACCGG、UL54
断片用プライマー1
- ・配列番号38 : GCCACCCGAAGAGCGGTACCTCAACA
GCATTCGTGCGCCTTGACACTGTAC、UL54断片用プ
ライマー2
- ・配列番号39 : CGAAAAGTGCCACCTGCGGCCGCAAG
CTTTCTAGAACTAGTCCTAGGGGCTCCGGTGCCC
GTCAGTG、プライマー1
- ・配列番号40 : GCTGGCCTTTTTGCTCGCGGCCGCGAGA
TCTACGCGTGTCGA、プライマー2
- ・配列番号41 : ATCCGAATTCGCTAGCATGGATCTGC
CTACTACCGTCGTGCGAAAATAC、UL112断片用プラ
イマー1
- ・配列番号42 : GCCACCCGAAGAGCGGTACCTTAATC
GTCGAAAAACGCCGCGATCGAGGCGGCGGCGATC
、UL112断片用プライマー2
- ・配列番号43 : TTAGTAAGCTTCCCTCCTGACGCGGT
AGGAGGAGGGGAGGGTGCCCTGCATG、VA断片用プラ
イマー1
- ・配列番号44 : CCTTTTGCTCACATGTCAATTGGTAG
ATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCG、VA断
片用プライマー2
- ・配列番号45 : TGTACAGGCGCGCCGAATTCGTTTTA
GGGCGGAGTAAC TTGTATGTGTTGGGAATTGTAG
、E4断片用プライマー1
- ・配列番号46 : AGGGAAGCTTACTA

AACGGTACACAGGAAACAGGAGACACAACCTCCAA
GTG、E4断片用プライマー2

・配列番号47: GAAAAGTGCCACCTGACGTCGCGGCC
GCGCGATCGCGGTACCCAACTCCATGCTCAACAG
TCCCCAGGTACAGCCC、E2A断片用プライマー1

・配列番号48: GAATTCGGCGCGCCTGTACAGCCCGG
GCGACCGCACCCCTGTGACGAAAGCCGCCCGCAAG
、E2A断片用プライマー2

・配列番号49: GAAAAGTGCCACCTGACGTCGCGGCC
GCGGAGGGGTGGAGTCGTGACGTGAATTACGTCA
TAGGGTTAGGGAGGTCCTGTATTAGAGGTCACGT
GAGTGTTTTTGCGAC、p5遺伝子断片用プライマー1

・配列番号50: GTTCAAACCTCCCGCTTCAAATGGA
GACCCTGCGTGCTCACTCGGGCTTAAATACCCAG
CGTGACCACATGGTGTCGCAAAATGTCGCAAAAC
ACTCA、p5遺伝子断片用プライマー2

・配列番号51: GCGGGAGGTTTTGAACGCGCAGCCGCC
ATGCCGGGGTTTTTAC、AAV2 Rep断片用プライマー1

・配列番号52: GATCGCAGCGCTATTTAAATCATTTA
TTGTTCAAAGAT、AAV2 Rep断片用プライマー2

・配列番号53: AATAGCGCTGCGATCGCGGCCTCCAA
AAAAGC、SV40 ori断片用プライマー1

・配列番号54: CCTTTTGCTCACATGTCAATTGATCC
CGCCCCCTAACT、SV40 ori断片用プライマー2

・配列番号55: AACAATAAATGATTTAAATCAGG、AA
V1 Cap断片用プライマー1

・配列番号56: GGCCGCGATCGCAGCGCTGTAGCCAT
GGAAACTAGATA、AAV1 Cap断片用プライマー2

- ・配列番号57 : TCACCATCTTGTCGACACAGTCGTTG
AAGGG、p5/AAV2 Rep断片用プライマー1
- ・配列番号58 : AGCGCAGCGAGTCGGCCGGCCGCGGC
CGCGGAGGGGTGGAGTCG、p5/AAV2 Rep断片用
プライマー2
- ・配列番号59 : ACATCTACGGATTACGTCGAaggagg
gtggagtcgtgacg、p5/Cap断片用プライマー1
- ・配列番号60 : ACCGCATTAAAGCTCGTCGAAGCGCT
gtagccatggaaac、p5/Cap断片用プライマー2
- ・配列番号61 : gtgagcaaaaggGCGATCGCTCTAGA
ACTAGTgtagccatggaaactagata、Rep2/Ca
p断片用プライマー1
- ・配列番号62 : CAACGACTGTGTCGACAAGATG、Rep
2/Cap断片用プライマー2
- ・配列番号63 : gaaaagtgccacctgcggccgcagc
tttctaggcgttacataacttacggtaa、CMV/h
GH polyA断片用プライマー1
- ・配列番号64 : ggtaccGGCGCGCCggatccGCTCTT
Cagctctgcttatatagacctc、CMV/hGH pol
yA断片用プライマー2
- ・配列番号65 : ggtaccGGCGCGCCggatccGCTCTT
Cagctctgcttatatagacctc、CMV/hGH pol
yA断片用プライマー3
- ・配列番号66 : gctggccttttgctcgcggccgcaga
tctacgcgtgtcgacaaggacagggaaggaggca
g、CMV/hGH polyA断片用プライマー4
- ・配列番号67 : gctGAAGAGCggatccgccaccatgg
acagctcccatctgcgcgatgttgtcatcaagct

c c、A d 5 ポリメラーゼ断片用プライマー 1

・ 配列番号 68 : A G C g g t a c c G G C G C G C C t a c g g c a t c
t c g a t c c a g c a t a t c t c c t c g t t t c g c g g g t t g、
A d 5 ポリメラーゼ断片用プライマー 2

請求の範囲

- [請求項1] アデノウイルス由来遺伝子およびヘルペスウイルス由来遺伝子を含む核酸。
- [請求項2] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、遺伝子の複製に関連する遺伝子である、請求項1に記載の核酸。
- [請求項3] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、ヘリカーゼ、プライマーゼ、ssDNA結合タンパク質（DBP）、DNAポリメラーゼおよびDNA複製タンパク質から選択されるタンパク質をコードする、請求項1または2のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項4] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29（ICP8）、UL30、UL42、UL9、ORF6、ORF16、ORF28、ORF29、ORF55、BMRF1、BSLF1、BSLF4、BSLF2／BSLF3、BALF5、BALF2、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44、UL112、U27、U38、U41、U79、U43、U73、U74、U77、U79、ORF9およびORF59から選択される遺伝子を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項5] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子およびヘリカーゼプライマーゼ遺伝子から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項6] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29（ICP8）、UL30、UL42、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44およびUL112から選択される遺伝子を含む、請求項5に記載の核酸。
- [請求項7] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項8] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、UL29（ICP8）、UL30、UL42、UL57、UL54およびUL44から選択される

遺伝子を含む、請求項 7 に記載の核酸。

- [請求項9] 前記ヘルペスウイルス由来遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の一方のみを含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項10] 前記アデノウイルス由来遺伝子が、ヘルパー遺伝子を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項11] 前記アデノウイルス由来遺伝子が、E 1 A、E 1 B、E 2、E 4 およびV Aから選択される遺伝子を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項12] 前記アデノウイルスが、血清型 1～52 から選択される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項13] 前記ヘルペスウイルスが、HHV-1～8から選択される、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の核酸。
- [請求項14] 請求項 1～13 のいずれか一項に記載の核酸を含む、ウイルスベクターを産生するための組成物。
- [請求項15] ウイルス由来の遺伝子の複製に関連する遺伝子を含む核酸を含む、ウイルス由来構築物を産生するための組成物。
- [請求項16] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス由来である、請求項 15 に記載の組成物。
- [請求項17] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、ヘルペスウイルス由来である、請求項 15 または 16 のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項18] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL 8、UL 5、UL 52、UL 29 (ICP 8)、UL 30、UL 42、UL 9、ORF 6、ORF 16、ORF 28、ORF 29、ORF 55、BMRF 1、BSLF 1、BSLF 4、BSLF 2/BSLF 3、BALF 5、BALF 2、UL 102、UL 105、UL 70、UL 57、UL 54、UL 44、UL 112、U 27、U 38、U 41、U 79、U 43、U 73、U 74、U 77、U 79、ORF 9およびORF 59から選

択される遺伝子を含む、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項19] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子およびヘリカーゼプライマーゼ遺伝子から選択される、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項20] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL8、UL5、UL52、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL102、UL105、UL70、UL57、UL54、UL44 および UL112 から選択される遺伝子を含む、請求項 19 に記載の組成物。

[請求項21] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子を含む、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項22] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、UL29 (ICP8)、UL30、UL42、UL57、UL54 および UL44 から選択される遺伝子を含む、請求項 21 に記載の組成物。

[請求項23] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、DNA鎖合成遺伝子またはヘリカーゼプライマーゼ遺伝子の一方のみを含む、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項24] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、HHV-1～8 から選択されるヘルペスウイルス由来である、請求項 15～23 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項25] 前記遺伝子の複製に関連する遺伝子が、血清型 1～52 から選択されるアデノウイルス由来である、請求項 15～24 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項26] アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを産生するための組成物である、請求項 15～25 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項27] 前記核酸がプラスミドである、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の核酸。

[請求項28] 前記核酸がカチオン性物質と複合体を形成している、請求項 1～1

3 または 27 のいずれか一項に記載の核酸。

[請求項29] 請求項 1 ～ 23、27 または 28 のいずれか一項に記載の核酸をプロデューサー細胞に導入するステップを含む、ウイルス由来構築物を生産するプロデューサー細胞を作製する方法。

[請求項30] 前記核酸の少なくとも一部が前記プロデューサー細胞の染色体に組み込まれる、請求項 29 に記載の方法。

[請求項31] 請求項 29 に記載の方法によって作製されたプロデューサー細胞。

[請求項32] 請求項 1 ～ 13、27 または 28 のいずれか一項に記載の核酸を含むプロデューサー細胞。

[請求項33] 請求項 1 ～ 13、27 または 28 のいずれか一項に記載の核酸をプロデューサー細胞に導入するステップと、
前記プロデューサー細胞においてウイルス由来構築物を形成させるステップと
を含む、ウイルス由来構築物を作製する方法。

[請求項34] 請求項 33 に記載の方法によって作製されたウイルス由来構築物。

[請求項35] 請求項 1 ～ 13、27 または 28 のいずれか一項に記載の核酸を含むウイルス由来構築物。