

明 細 書

発明の名称： ウイルス由来構築物プラスミド

技術分野

- [0001] 本開示は、ウイルス由来構築物を生産するためのプラスミドを提供する。
本開示は、またプラスミドから生産されたウイルス由来構築物およびこれを含む組成物を提供する。

背景技術

- [0002] 遺伝子治療およびワクチン療法などのためにアデノウイルスベクター（特許文献1）など種々のウイルス由来構築物が開発されている。
- [0003] ウイルス由来構築物の調製のためには、通常、プロデューサー細胞にウイルス由来構築物プラスミドを導入する必要がある。そのため、ウイルス由来構築物プラスミドの合成・構築が必要である。設計されたウイルス由来構築物プラスミドは、大腸菌などにおいて合成・構築されることが多く、他の生物の細胞において合成・構築されたことはなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 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

- [0005] 本発明者らは、第1の微生物および第2の微生物の組み合わせにおいてウイルス由来構築物プラスミドを生産できることを見出した。この知見に基づき、本開示は、第1の微生物および第2の微生物において複製できるウイルス由来構築物プラスミドを提供する。さらに本発明者らは、ウイルス由来構築物を生産する新たな構造のプラスミドを見出し、本開示はこれを提供する。また、本開示は、ウイルス由来構築物プラスミドを含む微生物、およびウイルス由来構築物プラスミドから生産されたウイルス由来構築物も提供する。
- [0006] したがって、本開示は以下を提供する。

(項目 1)

ウイルス由来構成物プラスミドを作製する方法であって、

i) 第 1 の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、

ii) 第 2 の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第 2 の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、
を含む方法。

(項目 2)

ウイルス由来構成物を作製する方法であって、

i) 第 1 の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、

ii) 第 2 の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第 2 の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、

iii) 前記ウイルス由来構成物プラスミドに基づく導入プラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップと、
を含む方法。

(項目 3)

ステップ ii) とステップ iii) との間に、前記ウイルス由来構成物プラスミドにおけるウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む核酸をクローニングして前記導入プラスミドを作成するステップを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 4)

前記プロデューサー細胞が動物細胞である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 5)

前記プロデューサー細胞がヒト胚性腎臓細胞であり、プロデューサー細胞 1 つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかの方法。

(項目 6)

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、

(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、

(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、

(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、

(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と

を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 7)

前記導入プラスミドが、前記核酸配列 (A) ~ (D) を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 8)

前記第 1 の微生物宿主細胞が枯草菌である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 9)

前記第 2 の微生物宿主細胞が、大腸菌である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 10)

i) のステップが、核酸断片から前記ウイルス由来構成物プラスミドを形成することを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 11)

前記核酸断片が、タンデムリピートな核酸配列を有する非環状核酸断片である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 12)

i) のステップは、コンピテントな前記第 1 の微生物宿主細胞を、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む核酸と接触させることを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 1 3)

ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも一部を作動可能に連結されて含む、プラスミドであって、

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、

(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、

(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、

(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、

(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と

を含み、(A)～(D)の核酸配列のうちの少なくとも2つを含む、プラスミド。

(項目 1 4)

(A)～(D)の核酸配列を作動可能に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 1 5)

(A)の末端反復配列を含む核酸配列が、所望の遺伝子を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 1 6)

前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルスを起源とするウイルス由来構成物である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 1 7)

前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスを起源とするウイルスベクターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 1 8)

(A)の末端反復配列を含む核酸配列が2つの末端逆位反復配列 (ITR) を含み、

(B)のパッケージング因子をコードする核酸配列がrepを含み、

(C)の構造タンパク質をコードする核酸配列がcapを含み、

(D)の機能補助因子をコードする核酸配列が、E1A、E1B、E2A、

E 2 B、E 3、E 4 および V A のうちの少なくとも 1 つを含む、
上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 1 9)

前記 2 つの I T R のうちの少なくとも 1 つが、アデノ随伴ウイルスの血清型 1 ～ 1 2 およびその改変体のいずれかに由来する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 0)

(B) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型 1 ～ 1 2 およびその改変体のいずれかに由来する r e p を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 1)

(B) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の r e p 7 8、r e p 7 6、r e p 5 2 および r e p 4 0 のうち少なくとも一つを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 2)

前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 3)

(A) の前記末端反復配列および (B) の核酸配列が、異なるアデノ随伴ウイルスの血清型に由来する核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 4)

(C) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型 1 ～ 1 2 およびその改変体のいずれかに由来する c a p を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 5)

(C) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の V P 1、V P 2 および V P 3 のうち少なくとも一つ

を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 6)

(D) の核酸配列が、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ボカウイルスおよびその改変体のいずれかに由来する機能補助因子をコードする核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 7)

(D) の核酸配列が、アデノウイルスの血清型 1 ～ 5 2 およびその改変体のいずれかに由来する核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 8)

(D) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3 および E 4 のうち少なくとも一つを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 2 9)

前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 0)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' I T R、プロモーター、所望の遺伝子、ターミネーターおよび 3' I T R を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 1)

前記ウイルス由来構成物が、レトロウイルスを起源とするウイルスベクターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 2)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が 2 つの長鎖末端反復配列 (L T R) を含み、

(B) のパッケージング因子をコードする核酸配列が ψ を含み、

(C) の構造タンパク質をコードする核酸配列が、g a g、p o l、V S V - G および e n v のうちの少なくとも 1 つを含み、

(D) の機能補助因子をコードする核酸配列が R e v を含む、
上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 3)

(C) ～ (D) の核酸配列のうちの少なくとも 1 つの上流に、薬剤応答性
プロモーターを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 4)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' L T R、プロモーター、
所望の遺伝子、ターミネーターおよび 3' L T R を含む、上記項目の
いずれかのプラスミド。

(項目 3 5)

(B) の核酸配列が (A) の核酸配列内に存在し、(C) および (D) の
核酸配列が、(A) の核酸配列の外に存在する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 6)

(A) ～ (D) の核酸配列にコードされる 8 個以上の遺伝子を、作動可能
に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 7)

薬剤選択マーカー核酸配列を、(A) ～ (D) の核酸配列にコードされる
いずれか 2 つの遺伝子の間に含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 8)

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、約 1 0 k b 以上である、
上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 3 9)

所望の遺伝子が、2 ～ 1 0 0 個の遺伝子である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 0)

第 1 の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と、
第 2 の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と

を作動可能に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 1)

前記第 1 の微生物宿主細胞が枯草菌である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 2)

前記第 2 の微生物宿主細胞が大腸菌である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 3)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞 1 つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 4)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞 1 つあたり 1×10^4 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 5)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP/VG) が 15 以下であるウイルスベクターを提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 6)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP/VG) が 10 以下であるウイルスベクターを提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 7)

前記プラスミドおよびプロデューサー細胞が、一緒になって前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプ

ラスミド。

(項目 4 8)

CCC (covalently closed circular) 純度が、80%以上である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 4 9)

上記項目のいずれかのプラスミドを含む微生物宿主細胞。

(項目 5 0)

上記項目のいずれかのプラスミドを含む、ウイルス由来構成物を調製するための組成物。

(項目 5 1)

上記項目のいずれかのプラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップを含む、ウイルスベクターを作製する方法。

(項目 5 2)

前記プラスミドに含まれる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 5 3)

上記項目のいずれかの方法によって生産されるウイルス由来構成物。

(項目 5 4)

上記項目のいずれかの方法によって生産されるウイルス由来構成物含有組成物。

(項目 5 5)

ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP/VG) が 15 以下である、上記項目のいずれかのウイルス由来構成物含有組成物。

(項目 5 6)

上記項目のいずれかのプラスミドが導入されたプロデューサー細胞であって、前記プラスミドに含まれる核酸の少なくとも一部が、前記プロデューサ

一細胞の染色体に組み込まれている、プロデューサー細胞。

(項目 A 1)

ウイルス由来構成物プラスミドを作製する方法であって、

i) 第 1 の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、

ii) 第 2 の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第 2 の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、

を含む方法。

(項目 A 2)

ウイルス由来構成物を作製する方法であって、

i) 第 1 の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、

ii) 第 2 の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第 2 の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、

iii) 前記ウイルス由来構成物プラスミドに基づく導入プラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップと、を含む方法。

(項目 A 3)

ステップ ii) とステップ iii) との間に、前記ウイルス由来構成物プラスミドにおけるウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む核酸をクローニングして前記導入プラスミドを作成するステップを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 4)

前記プロデューサー細胞が動物細胞である、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 5)

前記プロデューサー細胞がヒト胚性腎臓細胞であり、プロデューサー細胞 1 つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 6)

ステップ i) が、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列以外のベクター部分核酸配列を含む少なくとも 2 つの核酸断片を含む複数の核酸断片から前記ウイルス由来構成物プラスミドを取得することを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 7)

前記ベクター部分核酸配列が、核酸複製、薬剤耐性、コピー数調整、安定性改善のうち少なくとも 1 つの機能を有する核酸配列またはマルチクロニングサイトを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 8)

ステップ i) の前に前記複数の核酸断片のうち少なくとも 2 つを化学合成または酵素反応により作製するステップを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 9)

ステップ i) の前に前記複数の核酸断片の全てを化学合成または酵素反応により作製するステップを含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 10)

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、
(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、
(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、
(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、
(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と
を含む、上記項目のいずれかの方法。

(項目 A 11)

前記導入プラスミドが、前記核酸配列（A）～（D）を含む、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 2）

前記第 1 の微生物宿主細胞が枯草菌である、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 3）

前記第 2 の微生物宿主細胞が、大腸菌である、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 4）

i) のステップが、核酸断片から前記ウイルス由来構成物プラスミドを形成することを含む、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 5）

前記核酸断片が、タンDEMリピーTな核酸配列を有する非環状核酸断片である、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 6）

i) のステップは、コンピテンTな前記第 1 の微生物宿主細胞を、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む核酸と接触させることを含む、上記項目のいずれかの方法。

（項目 A 1 7）

上記項目のいずれかの方法によって調製されたウイルス由来構成物プラスミド。

（項目 A 1 8）

上記項目のいずれかの方法によって調製されたウイルス由来構成物。

（項目 A 1 9）

上記項目のいずれかの方法によって調製されたウイルス由来構成物含有組成物。

（項目 A 2 0）

ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも一部を作動可能に連結されて含む、プラスミドであって、

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、
(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、
(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、
(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、
(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と
を含み、(A)～(D)の核酸配列のうちの少なくとも2つを含む、プラスミド。

(項目 A 2 1)

(A)～(D)の核酸配列を作動可能に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 2 2)

(A)の末端反復配列を含む核酸配列が、所望の遺伝子を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 2 3)

前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルスを起源とするウイルス由来構成物である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 2 4)

前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスを起源とするウイルスベクターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 2 5)

(A)の末端反復配列を含む核酸配列が2つの末端逆位反復配列 (ITR) を含み、

(B)のパッケージング因子をコードする核酸配列が *rep* を含み、

(C)の構造タンパク質をコードする核酸配列が *cap* を含み、

(D)の機能補助因子をコードする核酸配列が、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4およびVAのうちの少なくとも1つを含む、
上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 2 6)

前記2つのLTRのうちの少なくとも1つが、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A27)

(B)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来するrepを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A28)

(B)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流のrep78、rep76、rep52およびrep40のうち少なくとも一つを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A29)

前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A30)

(A)の前記末端反復配列および(B)の核酸配列が、異なるアデノ随伴ウイルスの血清型に由来する核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A31)

(C)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来するcapを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A32)

(C)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流のVP1、VP2およびVP3のうち少なくとも一つを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目A33)

(D)の核酸配列が、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ボカウイルス

およびその改変体のいずれかに由来する機能補助因子をコードする核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 4)

(D) の核酸配列が、アデノウイルスの血清型 1 ～ 5 2 およびその改変体のいずれかに由来する核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 5)

(D) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3 および E 4 のうち少なくとも一つを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 6)

前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 7)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' I T R、プロモーター、所望の遺伝子、ターミネーターおよび 3' I T R を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 8)

前記ウイルス由来構成物が、レトロウイルスを起源とするウイルスベクターである、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 3 9)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が 2 つの長鎖末端反復配列 (L T R) を含み、

(B) のパッケージング因子をコードする核酸配列が ϕ を含み、

(C) の構造タンパク質をコードする核酸配列が、g a g、p o l、V S V - G および e n v のうちの少なくとも 1 つを含み、

(D) の機能補助因子をコードする核酸配列が R e v を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 0)

(C) ~ (D) の核酸配列のうちの少なくとも 1 つの上流に、薬剤応答性プロモーターを含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 1)

(A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' L T R、プロモーター、所望の遺伝子、ターミネーターおよび 3' L T R を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 2)

(B) の核酸配列が (A) の核酸配列内に存在し、(C) および (D) の核酸配列が、(A) の核酸配列の外に存在する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 3)

(A) ~ (D) の核酸配列にコードされる 8 個以上の遺伝子を、作動可能に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 4)

薬剤選択マーカー核酸配列を、(A) ~ (D) の核酸配列にコードされるいずれか 2 つの遺伝子の間に含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 5)

前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、約 1 0 k b 以上である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 6)

所望の遺伝子が、2 ~ 1 0 0 個の遺伝子である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 7)

第 1 の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と、
第 2 の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と
を作動可能に連結されて含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 4 8)

前記第 1 の微生物宿主細胞が枯草菌である、上記項目のいずれかのプラス

ミド。

(項目 A 4 9)

前記第 2 の微生物宿主細胞が大腸菌である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 0)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞 1 つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 1)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞 1 つあたり 1×10^4 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 2)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP/VG) が 15 以下であるウイルスベクターを提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 3)

プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP/VG) が 10 以下であるウイルスベクターを提供する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 4)

前記プラスミドおよびプロデューサー細胞が、一緒になって前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 5)

CCC (covalently closed circular) 純度

が、80%以上である、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 6)

化学合成または酵素反応により作製した核酸断片にベクター部分核酸配列を含む少なくとも2つの核酸断片を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 7)

化学合成または酵素反応により作製した複数の核酸断片のみを環状化した、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 8)

前記核酸断片が3つ以上の核酸断片を含む、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 5 9)

前記核酸断片の各々が、2 kb以下の長さを有する、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 6 0)

前記ベクター部分核酸配列が、前記ウイルス由来構成物プラスミドの全配列の40%以下を占める、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 6 1)

前記ベクター部分核酸配列が、核酸複製、薬剤耐性、コピー数調整、および安定性改善のうち少なくとも1つの機能を有する核酸配列を含み、前記ウイルス由来構成物プラスミドが、前記ベクター部分核酸配列の上流および下流に制限酵素認識配列を含み、前記制限酵素認識配列と同じ配列は、前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列には含まれない、上記項目のいずれかのプラスミド。

(項目 A 6 2)

上記項目のいずれかのプラスミドを含む微生物宿主細胞。

(項目 A 6 3)

上記項目のいずれかのプラスミドを含む、ウイルス由来構成物を調製する

ための組成物。

(項目 A 6 4)

上記項目のいずれかのプラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップを含む、ウイルスベクターを作製する方法。

(項目 A 6 5)

前記プラスミドに含まれる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 A 6 6)

上記項目のいずれかの方法によって生産されるウイルス由来構成物。

(項目 A 6 7)

上記項目のいずれかの方法によって生産されるウイルス由来構成物含有組成物。

(項目 A 6 8)

ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数 (VP / VG) が 15 以下である、上記項目のいずれかのウイルス由来構成物含有組成物。

(項目 A 6 9)

上記項目のいずれかのプラスミドが導入されたプロデューサー細胞であって、前記プラスミドに含まれる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ている、プロデューサー細胞。

[0007] 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

[0008] 本開示によれば、ウイルス由来構築物プラスミドに基づいて、従来にない改善された様式でウイルス由来構築物生産が可能である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] pGETS103-AAV-Helper-RC2プラスミドの構造を示す（オールインワン構造）。

[図2] pGETS103-AAV-Helper-RC2プラスミドを22の断片からOGAB法によって構築する概略を示す。点線の囲みは、AarI切断によって取り除かれる部分を示す（大文字はリンカー由来配列を示し、小文字はベクター由来配列を示す）。第1、第3および第16の断片は化学合成およびMAP法によって取得した。その他の断片は、PCRによって取得した。

[図3] OGAB法によって構築したpGETS103-AAV-Helper-RC2プラスミドの電気泳動の結果を示す。

[図4] プラスミドpGETS118-AarIの構造および核酸導入箇所を示す。点線囲み部分は、AarI切断によって取り除かれる部分を示す。

[図5] pGETS118-AarIに導入したAAVベクターを生産するための追加の7種のオールインワン構造を示す。各オールインワン構造の下に示す白抜き四角は、構築に使用した単位DNAの数およびおおよその対応領域を示す。

[図6] pAAV-CMVプラスミドの構造を示す。

[図7] pRC2-mi342プラスミドの構造を示す。

[図8] pHelperプラスミドの構造を示す。

[図9] pGETS103-AAVプラスミドの構造を示す。

[図10] pGETS103-Helperプラスミドの構造を示す。

[図11] pGETS103-RC2プラスミドの構造を示す。

[図12] プラスミドrAAV #1～5からのウイルスベクター生産の結果を示す。縦軸は、各プラスミドからのウイルスゲノム（VG：左）またはウイルス粒子（VP：右）の生産量を示す。

[図13] プラスミドrAAV #6および#7からのウイルスベクター生産の結果を示す。縦軸は、各プラスミドからのウイルスゲノム（VG：左）また

はウイルス粒子（VP：右）の生産量を示す。

[図14] pGETS151-AAV-Helper-RC2プラスミドの構造を示す（オールインワン構造）。

[図15] プラスミド rAAV #8および#9からのウイルスベクター生産の結果を示す。縦軸は、各プラスミドからのウイルスゲノム（VG）の生産量を示す。

[図16] プラスミド rAAV #10および#11からのウイルスベクター生産の結果を示す。縦軸は、各プラスミドからのウイルスゲノム（VG）の生産量を示す。

[図17] アデノウイルスベクターを生産するためのオールインワン構造を示す。下に示す白抜き四角は、構築に使用した単位DNAの数およびおおよその対応領域を示す。GOIは所望の遺伝子を示す。

[図18] プラスミド pBET131-AarIの構造および核酸導入箇所を示す。点線囲み部分は、AarI切断によって取り除かれる部分を示す。

[図19] pGETS103-ΔAarIに基づくAAV1のRepおよびAAV6のCapを使用したAAVオールインワンベクタープラスミドの構造を示す。オールインワン構造の下に示す白抜き四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおおよその対応領域を示す。

[図20] pGETS103-ΔAarIに基づくCAGプロモーター、AAV5のRepおよびAAV1のCapを使用したAAVオールインワンベクタープラスミドの構造を示す。オールインワン構造の下に示す白抜き四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおおよその対応領域を示す。

[図21] pGETS103-ΔAarIに基づくEF1αプロモーター、AAV8のRepおよびAAV9のCapを使用したAAVオールインワンベクタープラスミドの構造を示す。オールインワン構造の下に示す白抜き四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおおよその対応領域を示す。

[図22] pGETS103-ΔAarIに基づくRep、CapおよびHelperを異なる順序で配置したAAVオールインワンベクタープラスミドの

構造を示す。SV40プロモーターを使用した例でもある。オールインワン構造の下に示す白抜きの四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおよその対応領域を示す。

[図23] pBETS131-AarIに基づくRep、CapおよびHelperを異なる順序で配置したAAVオールインワンベクタープラスミドの構造を示す。オールインワン構造の下に示す白抜きの四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおよその対応領域を示す。

[図24] pBETS103-ΔAarIに基づくHelper遺伝子の要素を変更したAAVオールインワンベクタープラスミドの構造を示す。オールインワン構造の下に示す白抜きの四角は、構築に使用する単位DNAの数およびおよその対応領域を示す。

[図25] pGETS103ΔAarIをベースに構築した例示的なレンチウイルスベクタープラスミドの構造を示す。

[図26] pGETS103ΔAarIをベースに構築した例示的なレトロウイルスベクタープラスミドの構造を示す。

[図27] pGETS103ΔAarIをベースに構築した例示的なアデノウイルスベクタープラスミドの構造を示す。

[図28] OGAB法により完全化学合成又は酵素合成した核酸断片から全体構造の構築を試みたウイルスベクタープラスミドの構造を示す。

[図29] pGETS151-AAV-EGFP-WRPE-Helper-RC2プラスミドの構造を示す。

[図30] pAAV-EGFP-WRPEプラスミドの構造を示す。

[図31] pGETS151-AAV-EGFP-WRPE-Helper-RC2プラスミド (Single-transfection法) および同じウイルスベクター構成用遺伝子を含むTriple-transfection法からのウイルスベクター生産の結果を示す。縦軸は、各プラスミドからのウイルスゲノム (VG) の生産量を示す。

発明を実施するための形態

- [0010] 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。
- [0011] 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。
- [0012] 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。
- [0013] 本明細書において「プラスミド複製を促進する核酸配列」とは、「プラスミド増幅を促進する核酸配列」と同じ意味で用いられ、宿主細胞（例えば、枯草菌）に導入されたときに、宿主細胞内に存在するプラスミドの複製（この文脈においては、増幅と同じである。）を促進する任意の核酸配列をいう。好ましくは、このプラスミド複製を促進する核酸配列は、対象となるプラスミドをコードする核酸配列と作動可能に連結されているがこれに限定されない。プラスミド複製を促進する核酸配列、対象となるプラスミド、それらの関係などの詳細は、本明細書の別の箇所に記載される。プラスミド複製を促進する核酸配列としては、対象となる宿主細胞（例えば、枯草菌）において作動する複製起点を含む核酸配列などをあげることができる。例えば、枯草菌においてプラスミド複製を促進する核酸配列は、枯草菌におけるプラスミド複製の促進を可能にする能力を有するが、枯草菌以外の微生物（例えば、大腸菌）においてプラスミド複製の促進を可能にする能力をさらに有して

もよい。枯草菌および他の生物（例えば、大腸菌）においてプラスミド複製を促進する核酸配列は、枯草菌および他の生物（例えば、大腸菌）の両方において同じ領域がプラスミド複製の促進のために利用される核酸配列でもよいし、本開示のウイルス由来構成物プラスミド上の連続配列であってもよいし、離れた箇所に位置付けられる配列であってもよい。例えば、プラスミド p S T K 1（Issay Narumtら、BIOTECHNOLOGY LETTERS、Volume 17 No.5（May 1995）pp.475-480）、およびプラスミド p B S 1 9 5（Molekular naia Genetikaら、01 May 1991, (5):26-29、PMID:1896058）は、枯草菌および大腸菌の両方において同じ複製開始領域で複製可能であることが示されており、このような核酸配列は、枯草菌および大腸菌の両方においてプラスミド複製を促進する核酸配列として使用され得る。また、B R 3 2 2（大腸菌プラスミド）および p C 1 9 4（枯草菌プラスミド）を連結して作製されたシャトルプラスミド（P Trieu-Cuotら、EMBO J. 1985 Dec 16;4(13 A):3583-3587.）、およびタカラバイオ（滋賀県）から提供される p U B o r i および C o l E 1 o r i を含む B. subtilis Secretory Protein Expression System のプラスミドは、大腸菌および枯草菌の両方において複製可能であり、このような離れて位置付けられる核酸配列も、枯草菌および大腸菌の両方においてプラスミド複製を促進する核酸配列として使用され得る。枯草菌における核酸（プラスミド）の複製機構としては、ローリングサークル型、シータ型、o r i C、ファージによるものなどが挙げられ、枯草菌内で複製される配列としていずれの機構を利用するものでも使用することができる。ローリングサークル型の複製機構は、二本鎖DNAの片側の一本鎖の複製を行ったのち、もう一方の鎖の複製を行う機構であり、核酸が一本鎖DNAとして存在する時間が長い場合プラスミドが不安定化になる傾向がある。シータ型の複製機構は、細菌染色体の複製の場合と同じように複製起点から2方向に同時に二本鎖DNA（プラスミド）の複製が開始される機構であり、本開示のように長いDNA（例えば、10 kb以上）の複製の際には好ましく使用され得る（Janni

ere, L., A. Gruss, and S. D. Ehrlich. 1993. Plasmids, p. 625-644. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.). *oriC* の複製機構は、宿主細菌（例えば、枯草菌）染色体の複製の場合と同じように作動する。枯草菌内でプラスミド複製を促進する核酸配列としては、ローリングサークル型、シータ型、*oriC*、ファージなどによる複製機構を作動させることが公知である、プラスミドもしくはその部分または複製起点あるいはそれらの改変体などが挙げられる。ローリングサークル型プラスミドとして、pUB110、pC194、pE194、pT181などが公知であり、シータ型プラスミドとして、pAM β 1、pTB19、pLS32、pLS20などが公知である。枯草菌内でプラスミド複製を促進する核酸配列は、公知の複製開始点と同一または類似の配列（例えば、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上の配列同一性）を有し得る。例えば、候補DNA断片と、薬剤耐性遺伝子などの枯草菌で有効な選択マーカー遺伝子とを連結したDNA断片を枯草菌に導入した後、（薬剤などを添加して）培養した後に、これが染色体外で複製される場合、この候補DNA断片は枯草菌内でプラスミド複製を促進する核酸配列を有すると判定できる。プラスミド増幅を促進する核酸配列は、複製開始点を有するDNA断片であり、染色体DNAとは独立して複製可能なDNA断片を指す。これらのDNA断片が複製可能かどうかは、これらのDNA断片に薬剤耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子を連結し、薬剤などの選択条件で培養した後、プラスミドDNAを精製し、電気泳動によりそのDNAのバンドを観察するなどの手法により確認することが出来る。プラスミドは、複製開始点の他に、複製開始点に宿主のDNA複製酵素を誘導するrepタンパク質の遺伝子や、プラスミドの娘細胞への分配を確実にを行うための分配機構遺伝子、選択マーカー遺伝子などを含んでもよい。repタンパク質の遺伝子内に複製開始点が融合してい

てもよい。

[0014] 本明細書において使用する場合、「パッケージング細胞」とは、ウイルス由来構成物プラスミドを生産するための細胞を指す。

[0015] 本明細書において使用する場合、「ウイルス由来構成物プラスミド」とは、ウイルス由来構成物に搭載する遺伝子を含む、プロデューサー細胞においてウイルス由来構成物を生産するためのプラスミドを指す。ウイルス由来構成物プラスミドは、2つの末端反復配列の間にウイルス由来構成物の標的細胞内で発現させる遺伝子（所望の遺伝子）の配列を含み、その他にプロモーターを含み、さらに他の要素（例えば、エンハンサー、ターミネーター等）を含んでもよい。

[0016] 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本開示のウイルス由来構成物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。

[0017] 本明細書において、「形質転換生物」は、OGAB法において使用でき、非環状の長鎖核酸を取り込み、プラスミドを生成できる生物を指す。形質転換生物としては、自発的に核酸を取り込む微生物が使用できる。代表的な形質転換生物は、枯草菌である。

[0018] 本明細書において「枯草菌」とは、土壌や植物に普遍的に存在し、反芻動物やヒトの胃腸管に存在する、好気性のグラム陽性のカタラーゼ陽性の細菌であり、 $0.7 \sim 0.8 \times 2 \sim 3 \mu\text{m}$ の大きさであり、中温性で、最適生育温度は $25 \sim 40^\circ\text{C}$ であり、芽胞を形成するとされ、学名*Bacillus subtilis*またはこれと近縁な*Bacillus*属細菌である*Bacillus amyloliquefaciens*、*B*

acillus licheniformis、Bacillus pumilusなどを含む、病原性を有せず、自然形質転換能を有する任意の細菌をさす。好ましい実施形態では、枯草菌は、Bacillus subtilisの中で高い自然形質転換能を有する株であるMarburg 168株またはその派生株のRM125株である。168株は、遺伝的に最も研究されたグラム陽性菌であり、RM125株とともにATCC (American Type Culture Collection) などから入手可能であり、それ自体は人畜無害であること、O G A B法が適応可能であることが判っていることなどからも、本開示において好適に使用され得る。

- [0019] 本明細書において、「微生物」とは、真正細菌および古細菌の他にも、小型の（例えば、1 mm以下の、または0.1 mm以下の、あるいは肉眼で見えない）藻類、原生生物、菌類（カビ、真菌など）、酵母、動物（原生動物、後生動物など）も含まれる生物を意味する。
- [0020] 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。
- [0021] 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。ウイルス由来構築物としては、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。
- [0022] 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。
- [0023] 本明細書において、「ウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列」とは、これを含むプロデューサー細胞がウイルス由来構築物を生産できる核酸配列（例えば、核酸配列の組合せ）を指す。一つの実施形態において、

ウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、ウイルスの構造タンパク質をコードする核酸配列と、パッケージング因子をコードする核酸配列と、ウイルスの2つの末端反復配列と、機能補助因子をコードする核酸配列とを含む。「機能補助因子をコードする核酸配列」とは、例えば、ウイルスの構造タンパク質をコードする核酸配列、パッケージング因子をコードする核酸配列、およびウイルスの2つの末端反復配列以外の任意のウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列を含みうるかあるいは本質的になる。これらのそれぞれの核酸配列は、ウイルス由来構築物ごとに異なり得る。これらの詳細は、本明細書の別の箇所に記載される。好ましい実施形態では、ウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、AAVおよびアデノウイルスに共通する有利な配列が利用され、より好ましくはAAVに有利な配列が利用され得る。このようなAAVおよびアデノウイルスに共通する有利な配列は、末端逆位反復配列（ITR）の間に所望の遺伝子を含み、機能補助因子、rep、capまたはL1、L2、L3、L4、L5を含んでもよいという特徴を有し、AAVに有利な配列は、ITRの間に所望の遺伝子を含み、機能補助因子、rep、capを含んでもよい。機能補助因子、rep、capの配置は2つのITRの外側でもよいという特徴を有する。例えば、このような例としては、特定の機能補助因子E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4の配列が挙げられるがこれに限定されない。

[0024] 本明細書において「パッケージング因子」とは、ウイルスのゲノムを構造タンパク質に内包させるタンパク質を含み、repおよびφなどを挙げることができる。限定を意図しないが、パッケージング因子はアデノウイルスの血清型1～52またはアデノ随伴ウイルスの血清型1～12、あるいはその改変体（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）のいずれかに由来するものが利用され得る。このタンパク質は、天然のものであっても、人工的に変異を導入したものであってもよい。「人工的に変異」を導入し

たものは、例えば公知の文献に記載されている天然のものの配列に対して適宜の変異を導入することで作製することができる。

[0025] 本明細書において使用する場合、「構造タンパク質」は、その少なくとも一部がウイルスまたはウイルス由来構築物の表面に存在する（例えば、エンベロープを横断している）ウイルスが有する遺伝子から生産されるタンパク質を指す。構造タンパク質は細胞への感染性を担い得る。

[0026] 本明細書において使用する場合、「カプシド」は、ウイルスまたはウイルス由来構築物の表面に存在する（必要に応じてエンベロープに封入されている）ウイルスが有する遺伝子から生産されるタンパク質を指し、「カプシドタンパク質」ともいう。

[0027] 本明細書において「反復配列」または「タンデムリピート」（な核酸配列）とは、生物ゲノムの核酸配列で、同じ配列が反復して（特に数回以上）見られるものの総称である。当該分野で使用される任意の反復配列を本開示において使用することができる。典型的には、プロモーター配列が反復して出現する。

[0028] 本明細書において「末端反復配列」は、生物ゲノムの核酸配列で、同じ配列が反復して（特に数回以上）見られるもののうち、末端に存在するものの総称である。末端反復配列としては、末端逆位反復配列（ITR）または長鎖末端反復配列（LTR）などをあげることができるがこれらに限定されない。末端反復配列は、アデノウイルスの血清型1～52またはアデノ随伴ウイルスの血清型1～12、あるいはその改変体（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）のいずれかに由来するものが利用され得る。末端反復配列としては、天然のものであっても、人工的に変異を導入したものであってもよい。「人工的に変異」を導入したものは、例えば公知の文献に記載されている天然のものの配列に対して適宜の変異を導入することで作製することができる。

- [0029] 本明細書において「機能補助因子」とは、単独では増殖できないウイルスの増幅を支援する遺伝子をいう。本開示において、機能補助因子には、例えば、そのウイルスの構造タンパク質をコードする核酸配列、そのウイルスのパッケージング因子をコードする核酸配列、ならびにそのウイルスの2つの末端反復配列以外の任意のウイルス由来構築物を構成、増殖、活性向上、毒性低減するのに必要な核酸配列が挙げられ得るがこれらに限定されない。使用され得る機能補助因子としては、例えば、E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 4、R P E、W R P E、P P T、o P R E、エンハンサー、インスレーター、サイレンサー配列等を挙げることができるがこれらに限定されない。
- [0030] 本明細書において使用する場合、「搭載 (l o a d e d) 核酸」とは、ウイルス由来構築物 (ウイルスベクターなど) に担持されている核酸を意味する。搭載核酸であるかどうかは、ウイルス由来構築物調製物を D N a s e 処理してウイルス粒子外の核酸を分解した後、D N a s e 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することによって確認することができる。搭載核酸であるかどうかは、得られた核酸生成物の配列 (好ましくは全長または全長に近い長さのもの) を調べることによって確認することもできる。
- [0031] 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。
- [0032] 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。

[0033] 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。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。

[0034] 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。

[0035] 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を指し得る。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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、使用目的に適応できる転写翻訳調節配列を同定することができる。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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、アミノ酸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、改変されたアミノ酸（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化またはリン酸化による改変）また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。

- [0051] 本明細書において「ストリンジентな条件」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。ストリンジентな条件は、例えば、以下の条件を採用することができる。(1)洗浄のために低イオン強度および高温を用いる（例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム）、(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる（例えば、42℃で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、および750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム）、または(3)20%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、および20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中で、37℃で一晩インキュベーションし、次に約37-50℃で1×SSCでフィルターを洗浄する。なお、ホルムアミド濃度は50%またはそれ以上であってもよい。洗浄時間は、5、15、30、60、もしくは120分、またはそれら以上であってもよい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーに影響する要素としては温度、塩濃度など複数の要素が考えられ、詳細はAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照することができる。「高度にストリンジентな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム

、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。ハイブリダイゼーション、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。中程度のストリンジेंटな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することができ、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3番、Vol. 1、7.42～7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)の前洗浄溶液、約40～50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC～6×SSC（または約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。従って、本開示において使用されるポリペプチドには、本開示で特に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子に対して、高度または中程度でストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドも包含される。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。従って、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、宿主細胞における上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度が挙げられる。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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、香料、潤滑剤を挙げることができる。

- [0062] 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）でもあってもよい。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。
- [0063] 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。
- [0064] 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、*RI*（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、10nm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、*AlexaTMFluor*が挙げられる。*AlexaTMFluor*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10nm以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、AlexaTM555とAlexaTM633の組み合わせ、AlexaTM488とAlexaTM555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、CyDyeTMシリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N-2-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAF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。

[0065] 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、ウイルス由来構築物等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

[0066] 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（p a

ckage 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。

[0067] 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。

[0068] (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。

[0069] (ウイルス由来構築物プラスミド)

一つの局面において、本開示は、ウイルス由来構築物の少なくとも一部の要素をコードするプラスミドを提供する。一つの実施形態では、本開示は、第 1 の微生物および第 2 の微生物の組み合わせにおいて複製できるウイルス由来構築物プラスミドを提供する。これを達成するための任意の手段が本開示の範囲であると企図される。例えば、明示的な記載がなくとも、ある成分を使用する方法の記載は、同成分を含む組成物、同成分の使用および同方法に使用するための同成分など、他の手段を反映した実施形態も同時に企図するものである。

[0070] 一つの局面において、本開示は、ウイルス由来構築物の少なくとも一部の要素をコードするプラスミドを提供する。一つの実施形態において、本開示は、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも一部を作動可能に連結されて含むプラスミドを提供する。一つの実施形態において、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列は、(A) 末端

反復配列を含む核酸配列（例えば、血清型 1 ～ 12 またはその改変体のいずれかに由来する）と、（B）パッケージング因子をコードする核酸配列（例えば、*rep*、アデノ随伴ウイルスの血清型 1 ～ 12 またはその改変体のいずれかに由来し得る）と、（C）構造タンパク質をコードする核酸配列（例えば、*cap*、アデノ随伴ウイルスの血清型 1 ～ 12 またはその改変体のいずれかに由来し得る）と、（D）機能補助因子をコードする核酸配列（例えば、E1A、E1B、E2A、E4、およびVAのうちの少なくとも1つ、アデノウイルスの血清型 1 ～ 52 またはその改変体のいずれかに由来し得る）とを含む。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、（A）～（D）の核酸配列のうちの2つ、3つ、または4つを含む。

[0071] 一つの実施形態において、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列は、ウイルス由来構築物プラスミド上のまとまった領域に配置される。ウイルスを構成するのに必要な核酸配列を含む核酸断片を元となるプラスミドに組み込むことでこのような構造のウイルス由来構築物プラスミドが形成され得る。一つの実施形態において、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列は、ウイルス由来構築物プラスミドの全塩基長の約90%以下、約80%以下、約70%以下、約60%以下、約50%以下、約40%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約10%以下、または約5%以下、かつ約80%以上、約70%以上、約60%以上、約50%以上、約40%以上、約30%以上、約25%以上、約20%以上、約15%以上、約10%以上、約5%以上または約1%以上（矛盾しない上限と下限の組み合わせ）の塩基長の連続領域内に存在する。一つの実施形態において、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列の末端反復配列以外の要素（例えば、ウイルスの構造タンパク質をコードする核酸配列、パッケージング因子質をコードする核酸配列および機能補助因子のうちの1つまたは複数）は、各々、2つの末端反復配列の間に配置されてもよいし、外側に配置されてもよい。本開示のウイルス由来構築物プラスミドにおいて、ウイルスを構成するのに必

要な核酸配列の各要素は、任意の順序および位置で配置してもよく、図面などにおいて具体的に示した配置以外の種々の配置のものが使用できると理解される。機能補助因子など特定の機能で記載される核酸配列が複数の要素を含む場合、特段記載しない限り、ウイルス由来構築物プラスミドにおける各要素の順序および位置は任意であり得るが、任意の要素（例えば、V A、E 2 A、E 4）同士を連続して（間に他の遺伝子を挟まずに）配置してもよい。

[0072] 一つの実施形態において、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列は、ウイルスの2つの末端反復配列を含み、2つの末端反復配列に挟まれる領域の塩基長（末端反復配列自体は除く）は、約1 k b以上、約5 k b以上、約10 k b以上、約20 k b以上、約30 k b以上、約40 k b以上、約50 k b以上、約70 k b以上、または約100 k b以上であり得る。一つの実施形態において、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列は、ウイルスの2つの末端反復配列およびその他の部分を含み、その他の部分は、前記2つの末端反復配列に挟まれる領域の外に位置付けられる。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、5' ITRおよび3' ITRの間に上流からプロモーター、所望の遺伝子およびターミネーターを含む。特に、ウイルスの構造タンパク質をコードする核酸配列は、野生型配列（例えば、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12）の改変体であってもよいことが企図される。

[0073] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、必要に応じて要素の上流にプロモーターを含む。例えば、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列の（B）、（C）および（D）の核酸配列またはそこに含まれる遺伝子のうちの1つまたは複数の上流にプロモーターを含んでよい。例えば、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、1つまたは複数の所望の遺伝子の1つまたは複数の上流にプロモーターを含んでよい。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、薬剤選択マーカー核酸配列を、（

A) ~ (D) の核酸配列のいずれか 2 つの間に含む。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、薬剤選択マーカー核酸配列を、(A) ~ (D) の核酸配列にコードされるいずれか 2 つの遺伝子の間に含む。

[0074] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、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) を生産するために使用される。

[0075] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、i) 第 1 の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、ii) 第 2 の微生物宿主細胞にウイルス由来構成物プラスミドを導入し、第 2 の微生物宿主細胞をウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、を含む方法によって作製され得る。一つの実施形態において、第 1 の微生物宿主細胞は枯草菌である。一つの実施形態において、第 2 の微生物宿主細胞は、大腸菌である。枯草菌で合成し、枯草菌で複製した、枯草菌のみから得られたウイルス由来構築物プラスミドと比較して、枯草菌で合成し、大腸菌で複製したウイルス由来構築物プラスミドは、同じモル数でプロデューサー細胞に導入した場合に、予想外にプラスミドあたりより多くのウイルス由来構築物を提供した。そのため、異なる微生物宿主細胞を経由して生産されたウイルス由来構築物プラスミドは優れた性能を有し得る。また、例えば意図せぬ変異が導入されてしまうなどの原因から、特定の遺伝子 (GC リッチな遺伝子など) は、大腸菌では増幅できず、枯草菌では増幅できる場合がある。このようにウイルス由来構成物プラスミドの増幅において、複数種類の微生物を使用することは有利であり得る。一つの実施形態において、i) のステップは、核酸断片からウイルス由来構成物プラスミドを形成することを含む。一つの実施形態において、本開示の

ウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法によってウイルス由来構築物プラスミドを構築した後に、このウイルス由来構築物プラスミドの部分（例えば、（A）～（D）の核酸配列を含む領域）を別のプラスミドに導入して、新たなウイルス由来構築物プラスミドを作製してもよい。

[0076] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、第1の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と、第2の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列とを作動可能に連結されて含む。一つの実施形態において、第1の微生物宿主細胞は形質転換生物（枯草菌など）である。一つの実施形態において、第2の微生物宿主細胞は大腸菌である。一つの実施形態において、枯草菌においてプラスミド複製を促進する核酸配列は、枯草菌において作動する複製起点、例えば、*oriC*、およびpTB19 (Imanaka, T., et al. J. Gen. Microbiol. 130, 1399-1408. (1984)) やpLS32 (Tanaka, T and Ogra, M. FEBS Lett. 422, 243-246. (1998))、pAM β 1 (Swinfield, T. J., et al. Gene 87, 79-90. (1990)) 等のプラスミドに含まれる複製起点を含み得る。枯草菌においてプラスミド複製を促進する核酸配列としては、ローリングサークル型、シータ型、*oriC*、ファージなどによる複製機構を作動させることが公知である、プラスミドもしくはその部分または複製起点あるいはそれらの改変体などが挙げられる。一つの実施形態において、枯草菌においてプラスミド複製を促進する核酸配列は、公知の複製開始点と同一または類似の配列（例えば、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上の配列同一性）を有し得る。一つの実施形態において、微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列は、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列が存在する連続領域内に配置されてもよいし、この連続領域外に配置されてもよい。

[0077] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、枯

草菌において作動するプロモーターおよび／またはエンハンサーを有し得る。例えば、枯草菌のプロモーターとして、IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) で発現制御可能な Pspac (Yansura, D. and Henner, D. J. Pro. Natl. Acad. Sci, USA 81, 439-443. (1984.))、あるいはPrプロモーター (Itaya, M. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 602-604. (1999.)) 等が挙げられる。枯草菌において作動する核酸エレメントは枯草菌に由来する必要はなく、高効率に作動するものなどが選択され得る。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミド中の枯草菌において作動する複製起点、プロモーターおよび／またはエンハンサーは、ウイルス由来構築物の起源ウイルスのゲノム（改変を含んでもよい）またはその一部をコードする領域の外側に位置付けられる。

[0078] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、枯草菌以外の生物の細胞において作製または使用され得るので、それら生物において作動する複製起点、プロモーター、転写終結配列などの転写翻訳調節配列を含み得る。生物ごとの転写翻訳調節配列は、公知であり、当業者が適宜選択できる。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、大腸菌、酵母などにおいて作製または複製され得るので、これらの微生物において作動する転写翻訳調節配列を含み得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、プロデューサー細胞に導入され得るので、プロデューサー細胞において作動する転写翻訳調節配列を含み得る。特に、プロデューサー細胞は動物細胞であり得るので、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、動物細胞において作動する転写翻訳調節配列を含み得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルスの全ゲノムのうち少なくとも一部の遺伝子の配列を含まない。

[0079] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、所

望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、所望の遺伝子は、2つの末端反復配列の間に配置され得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドにおける所望の遺伝子は、最終的にウイルス由来構築物の搭載核酸に含まれ得る。このような所望の遺伝子は、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、所望の遺伝子は、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上流に）。一つの実施形態において、所望の遺伝子は、IRESを含む（必要に応じて、タンパク質コード遺伝子の上流に）。一つの実施形態において、所望の遺伝子は、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、所望の遺伝子は、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、レトロウイルスなど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、所望の遺伝子は、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）。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物の起源ウイルスが増殖するために必要な遺伝子を全て含むことはなく、そうすることで生産されるウイルス由来構築物が増殖能を備えないように構成されてもよい。

[0080] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、プロデューサー細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞1つあたり、1×

10^2 以上、 4×10^2 以上、 1×10^3 以上、 4×10^3 以上、 1×10^4 以上、 4×10^4 以上、または 1×10^5 以上のウイルス由来構築物ゲノムコピー数を提供し得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物ゲノムコピー数に対するウイルス由来構築物粒子数 (VP/VG) が、35、30、25、20、15、10、5または1以下であるウイルス由来構築物を提供し得る。

[0081] 一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドの上記の性能は、以下の条件で評価した場合に決定される：トランスフェクションの前日に1. 5×10^7 個の293T細胞を15cm-dishに播種し、22時間後、19mL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、コンフルエント状態の293T細胞 (細胞数： 3×10^7 個) へウイルス由来構築物プラスミドを2.1pmol含むDMEM培地500 μ LとDNAの1倍量のPEI proを含むDMEM培地500 μ Lを混合したトランスフェクション溶液を添加し、37℃、5% CO_2 で72時間培養後、0.5M EDTA (pH 8.0) を1/80容量添加し、室温で10分静置する。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドの上記の性能は、以下の条件で評価した場合に決定される：トランスフェクションの当日に 9.0×10^7 個のVPC2.0細胞を125mL三角フラスコに播種した。1時間後、3mLのAAV-MAX Enhancerを添加し、37℃、8% CO_2 で2時間培養した。VPC2.0細胞へウイルス由来構築物プラスミドを3.0pmolを含むViral-Plex™ Complexation Buffer 3mLとAAV-MAX Transfection Booster 90 μ LとAAV-MAX Transfection Reagent 180 μ Lを混合したトランスフェクション溶液を添加し、37℃、8% CO_2 で72時間培養後、細胞懸濁液を回収し、 $180 \times g$ で5分遠心分離して上清を完全に除去する。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドの上記の性能は、ゲノムタイター (VG) をリアルタイムPCR (

S Y B R Green法)で定量し、粒子タイター(VP)をELISAで定量して評価した場合に決定される。

[0082] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドにおける所望の遺伝子は、複数の遺伝子を含み得る。一つの実施形態において、所望の遺伝子は、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、本開示のウイルス由来構築物プラスミドにおける所望の遺伝子は、約0.1～1000kbp、例えば、約0.1kbp以上、約0.3kbp以上、約1kbp以上、約2kbp以上、約5kbp以上、約7kbp以上、約10kbp以上、約20kbp以上、約50kbp以上または約100kbp以上、かつ約1000kbp以下、約700kbp以下、約500kbp以下、約200kbp以下、約100kbp以下、約70kbp以下、約50kbp以下、約20kbp以下または約10kbp以下の塩基長を含み得る。本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、OGAB法によって複数の遺伝子を含む複雑な構造に構築され得るので、所望の遺伝子も複雑な構造に構築され得る。ウイルス由来構築物の種類によって搭載核酸のサイズは制限され得るので、所望の遺伝子のサイズに応じてウイルス由来構築物の種類が選択されてもよい。一つの実施形態において、所望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。

[0083] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、化

学合成または酵素反応（例えば、制限酵素を使用した反応）により作製した核酸断片にベクター部分核酸配列を含む少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、またはそれより多くの核酸断片を含む。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、化学合成または酵素反応により作製した複数の核酸断片のみを環状化して作製される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、3つ以上、4つ以上、5つ以上、7つ以上、10つ以上、15つ以上、20つ以上またはそれより多くの核酸断片から作製される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドの作製に使用される核酸断片は、独立して、20 kb以下、15 kb以下、10 kb以下、7 kb以下、5 kb以下、4 kb以下、3 kb以下、2 kb以下、1.5 kb以下、1 kb以下、0.7 kb以下、または0.5 kb以下の長さを有し得る。

[0084] 一つの実施形態において、ベクター部分核酸配列は、本開示のウイルス由来構築物プラスミドの全配列の約60%以下、約50%以下、約40%以下、約30%以下、約20%以下、または約10%以下を占める。特定のウイルス由来構築物プラスミドに対して設計されたベクター部分核酸配列は、不要なエレメントを省くことで短縮することができ、プラスミド全体に占める割合を低く設計できる。一つの実施形態において、ベクター部分核酸配列は、核酸複製、薬剤耐性、コピー数調整、および安定性改善のうち少なくとも1つの機能を有する核酸配列を含む。これらのエレメントまたはベクター部分核酸配列全体の上流および／または下流に特定の制限酵素（例えば、本願明細書に記載される）による認識配列を含み得る。このような制限酵素認識配列は、ウイルス由来構築物プラスミドの他の部分（例えば、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列）には見出されない配列を有してもよく、そうすることで、ベクター部分を独立して操作可能であり得る。

[0085] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドにおける所望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、
、囊胞性線維症膜貫通制御タンパク質 (C F T R)、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、I G F - 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、L D L 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、ヒポキサンチングアニ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、リソソームヘキササ
ミニダーゼA、分岐鎖ケト酸脱水素酵素、R P 6 5 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、S 1 0 0 A 1、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
スパルトアシラーゼ、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、p 5 3、R b、W t - 1)、T R A I L、F A S - リガンドなどが
挙げられる。

[0086] 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）、ボ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。

[0087] 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、S

TN（シアリルTn抗原）、c-erbB-2タンパク質、PSA、L-CaAg、エストロゲン受容体、乳脂肪グロブリン、p53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。

[0088] 一つの実施形態において、所望の遺伝子は、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、AIDS、筋消耗、腎臓欠損症、肝炎、LDL受容体欠乏症、高アンモニア血症、クラッペ病、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、リソゾーム蓄積症、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、所望の遺伝子は、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）。

[0089] （ウイルス由来構築物）

本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物を生産するために使用される。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構築物プラスミドを使用して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、本開示は、このように作製されたウイルス由来構築物含有組成物またはウイルス由来構築物を提供する。ウイルス由来構築物としては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはアデノウイルスに基づくウイルス由来構築物が挙げられる。一つの実施形態において、本開示は、ウイルス由来構築物を作製する方法であって、i) 第1の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、ii) 第2の微生物宿主細胞にウイルス由来構成物プラスミドを導入し、第2の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、iii) ウイルス由来構成物プラスミドに基づく導入プラスミドをプロデューサー細胞（例えば、動物細胞）に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップと、を含み得る。

[0090] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、プロデューサー細胞に導入されてウイルス由来構築物を生産する。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 Line、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。生産するウイルス由来構築物の種類に応じて、任意の公知の好適なプロデューサー細胞が選択され得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物の起源ウイルスの遺伝子のうちの少数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ）を欠損し、他の全ての遺伝子を含んでもよい。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物を生産するために必要な遺伝子セットのうちの一部を欠損しており、遺伝子セットのうちのウイルス由来構築物プラスミドが欠損している遺伝子は、ウイルス由来構築物プラスミドとはトランスにプロデューサー細胞において供給される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、その他のプラスミドと組み合わせることなく単独でプロデューサー細胞に導入することでウイルス由来構築物の生産を可能にし得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物を生産するために必要な遺伝子セットのうちウイルス由来構築物プラスミドが欠損した遺伝子全てを発現するプロデューサー細胞に導入され得る。例えば、AAVのcapおよびrep、ならびにアデノウイルスのE2A、E4およびVAを含む本開示のウイルス由来構築物プラスミドは単独で、アデノウイルスのE

1 A および E 1 B を発現する H E K 2 9 3 細胞に導入することでウイルス由来構築物を生産し得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物を生産するために必要な遺伝子セットのうちウイルス由来構築物プラスミドが欠損した遺伝子を含む別の核酸またはその遺伝子の産物（例えば、ウイルス粒子）とともにプロデューサー細胞に導入され得る。

[0091] 一つの実施形態において、ウイルス由来構築物は、ウイルス由来構築物プラスミドを、ウイルス由来構築物の起源ウイルスを感染させたプロデューサー細胞の中に導入し、その細胞の中で相同組み換えを生じさせることにより作製することができる。この実施形態において使用するウイルス由来構築物プラスミドは、所望の遺伝子および起源ウイルスのゲノムのいずれかの領域（例えば、遺伝子間の領域）に相同性を有する核酸配列を含む。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドは、生産するウイルス由来構築物の起源ウイルスのゲノムのいずれかの遺伝子の間に所望の遺伝子を含む構造を有し得る。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドに含まれる核酸の少なくとも一部がプロデューサー細胞の染色体に組み込まれる。

[0092] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、生産するウイルス由来構築物の起源ウイルスの搭載核酸切り出しのためのセグメント（レトロウイルスにおける L T R、A A V における I T R など）を含み、一つの実施形態において、このセグメントの間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、このセグメントの間に所望の遺伝子ならびにこれに作動可能に連結したプロモーターおよび／またはターミネーター（例えば、ウイルス由来構築物が標的とする対象において作動可能であるもの）を含む。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、このセグメントの間にウイルス由来構築物の起源ウイルスの複製のために必要な遺伝子を含まない。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、生産するウ

イルス由来構築物の起源ウイルスのパッケージングシグナルを含む。

[0093] 生産されるウイルス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構築物プラスミドは、構造タンパク質をコードする遺伝子を有してもよく、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、構造タンパク質を有さないウイルス由来構築物の場合、脂質粒子等の非ウイルス由来物質を用いて細胞への標的化が調整され得る。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、膵臓細胞（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。

- [0094] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、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んでもよい。本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、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を含むことができる。
- [0095] 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プラスミドの集団を含むプラスミド含有組成物を提供する。一つの実施形態において、プラスミド含有組成物は、プラスミドのCCC (covalently closed circular) 純度が、約60%以上、約70%以上、約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上または約95%以上であり得る。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プラスミドおよび本開示のウイルス由来構築物プラスミド含有組成物は、プラスミドの立体構造や塩基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プラスミドおよび本開示のウイルス由来構築物プラスミド含有組成物を適切に表現する特徴の一つである。
- [0096] ・アデノウイルス由来構築物
- アデノウイルスは、アデノウイルス科マストアデノウイルス属のウイルスであり、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coxackie-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E1A蛋白質が発現し、他の初期蛋白質であるE1B、E2、E3、E4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、E2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。

[0097] 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づいて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。

[0098] 一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つおよび所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、5' ITRおよび3' ITRの間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、5' ITRおよび3' ITRの間に所望の遺伝子、プロモーターおよびターミネーターを含む。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、5' ITRおよび3' ITRの間にアデノウイルス由来構築物

を構成するのに必要な核酸配列のうちの1つまたは複数（例えば全て）を含まない。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物プラスミドおよびプロデューサー細胞がアデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列を含むようなプロデューサー細胞において機能するように構成される。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちウイルス由来構築物プラスミドに含まれない遺伝子のうち1つまたは複数（例えば、全て）は、プロデューサー細胞の染色体にコードされていてもよい。

[0099] 一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、L 1、L 2、L 3、L 4、L 5、I X、I V a 2をコードする遺伝子を含み得る。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、E 3以外のアデノウイルスの全ての遺伝子であり得る。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、構造タンパク質をコードする核酸配列（L 2、L 3）と、パッケージング因子をコードする核酸配列（E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 4）と、2つの末端反復配列（5' I T R、3' I T R）と、機能補助因子をコードする核酸配列とを含み得る。一つの実施形態において、機能補助因子をコードする核酸配列は、L 2、L 3、E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 3、E 2 B、E 4、5' I T R、3' I T R以外の全てのアデノウイルス遺伝子であり得る。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、V A、E 1 A、E 1 B、E 2 A、E 2 B、E 4のうちの1つまたは複数を含まなくてもよく、一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列はこれらを含む。特定の実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、E 1 AおよびE 1 Bを含まない。一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物プラスミドは、E 1 Aを欠損しており、この欠損箇所に所望の遺伝子が挿入されていてもよい。V A R N Aは、ヒトにおいてエキスポーチン、R I S K、D i c e rなどと相互作用

用することが知られており、アデノウイルス由来構築物プラスミドからVAを欠損させることでアデノウイルス由来構築物感染細胞への副作用が低減され得る。E1A、E1B、E2A、E2B、E4は、アデノウイルスの複製に必要な遺伝子であり得るので、これらを欠損させたアデノウイルス由来構築物プラスミドは、感染細胞における複製能力が低減され得る。

[0100] 一つの実施形態において、本開示のアデノウイルス由来構築物はヒトのサブグループC、例えば、血清型2または血清型5由来であり得る。一つの実施形態において、本開示のアデノウイルス由来構築物は血清型12（サブグループA）、血清型7または血清型35（サブグループB）、血清型30または血清型36（サブグループD）、血清型4（サブグループE）、あるいは血清型41（サブグループF）由来であり得る。アデノウイルス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、HEK293、HEK293T、HEK293F、HeLa、Sf9などの細胞が挙げられる。

[0101] ・アデノ随伴ウイルス由来構築物

アデノ随伴ウイルス（AAV）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ウイルスであり、ウイルス粒子は直径20～26nmである。AAVの増殖にはアデノウイルスエレメントが必要である。AAVゲノムの量末端にはLTR（inverted terminal repeat）と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在する。このLTR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LTR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（Rep78、Rep76、Rep52、Rep40）をコードするrep遺伝子が存在し、ゲノムの右半分に構造蛋白質（VP1、VP2、VP3）の三つのカプシドタンパク質をコードするcap遺伝子が存在する。

[0102] 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（19q1

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。*A A V S 1*領域と*I T R*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*A A V*が標的細胞に感染した際には、*R e p*が*A A V*の*I T R*および*A A V S 1*に結合し、*R e p*が介在することにより*A A V*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、*A A V*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*A A V*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)。

[0103] 一つの実施形態において、*A A V*由来構築物プラスミドは、*A A V*由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つおよび所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、*A A V*由来構築物プラスミドは、5' *I T R*および3' *I T R*の間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、*A A V*由来構築物プラスミドは、5' *I T R*および3' *I T R*の間に所望の遺伝子、プロモーターおよびターミネーターを含む。一つの実施形態において、*A A V*由来構築物プラスミドは、5' *I T R*および3' *I T R*の間に*A A V*由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの1つまたは複数(例えば全て)を含まない。一つの実施形態において、*A A V*由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物プラスミドおよびプロデューサー細胞が*A A V*由来構築物を構成するのに必要な核酸配列を含むようなプロデューサー細胞において機能するように構成される。一つの実施形態において、*A A V*由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちウイルス由来構築物プラスミドに含まれない遺伝子のうち1つまたは複数(例えば、全て)は、プロデューサー細胞の染色体にコードされていてもよい。

[0104] 一つの実施形態において、*A A V*由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、*A A V*の5' *I T R*、*r e p*、*c a p*、*A A P*(アセンブリ活性化タンパク質)、*M A A P*(膜会合アクセサリタンパク質)および3' *I T R*

、ならびにアデノウイルスのE1A、E1B、E2A、VAおよびE4であり得る。一つの実施形態において、AAV由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、AAV構造タンパク質をコードする核酸配列(cap)と、AAVのパッケージング因子をコードする核酸配列(rep)と、AAVの2つの末端反復配列(5' ITR、3' ITR)と、機能補助因子をコードする核酸配列(アデノウイルスのE1A、E1B、E2A、VA、E4)とを含み得る。一つの実施形態において、AAV由来構築物プラスミドは、rep、cap、VA、E1A、E1B、E2A、E4のうちの1つまたは複数を含まなくてもよく、一つの実施形態において、アデノウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列はこれらを含む。

[0105] 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、rh10、DJ、DJ/8、PHP.eB、PHP.S、AAV2-retro、AAV2-QuadYF、AAV2.7m8、AAV6.2、rh.74、AAV2.5、AAV-TT、Anc80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；(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、HEK293、HEK293T、HEK293F、HeLa、Sf9などの細胞が挙げられる。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(AAV2i8、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。

[0106] ・レトロウイルス由来構築物

本明細書において、「レトロウイルス」は、一般にレトロウイルス科のウイルスを指す。レトロウイルスは、主にゲノムをRNAからDNAに逆転写する能力を特徴とする二本鎖RNAエンベロープウイルスである。ビリオンの長さは直径約100～120nmであり、ヌクレオキャプシドタンパク質と複合体を形成した同一のプラスRNA鎖の二量体ゲノムを含有する。ゲノムは、ウイルス感染に必要な酵素タンパク質、すなわち逆転写酵素、インテグラーゼおよびプロテアーゼを含有するキャプシドに封入されている。マトリックスタンパク質が、ウイルス核粒子の周りを囲む、宿主細胞膜に由来する脂質二重層であるエンベロープと相互作用するキャプシドコアの外側の層を形成する。この二重層には、宿主細胞上の特異的受容体を認識し、感染プロセスを開始させるウイルスエンベロープ糖タンパク質が固定されている。エンベロープタンパク質は、タンパク質を脂質膜内に固定させる膜貫通（TM）と細胞受容体に結合する表面（SU）の2つのサブユニットによって形成される。

[0107] レトロウイルスとして、マウス白血病ウイルス（MLV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ウマ感染性貧血ウイルス（EIAV）、マウス乳房腫瘍ウイルス（MMTV）、Rous肉腫ウイルス（RSV）、Fujinami肉腫ウイルス（FuSV）、Moloneyマウス白血病ウイルス（Mo-MLV）、FBRマウス骨肉腫ウイルス（FBR-MSV）、Moloneyマウス肉腫ウイルス（Mo-MSV）、Abelsonマウス白血病ウイルス（A-MLV）、トリ骨髓細胞腫症ウイルス29（MC29）、お

よびトリ赤芽球症ウイルス（A E V）、およびレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。レンチウイルスは、「霊長類」および「非霊長類」に分けることができる。霊長類レンチウイルスの例としては、ヒト後天性免疫不全症候群（A I D S）の原因物質であるヒト免疫不全ウイルス（H I V）、およびサル免疫不全ウイルス（S I V）が挙げられる。非霊長類レンチウイルス群には、プロトタイプ「遅発性ウイルス」のビスナ／マエディウイルス（V M V）、ならびに関連するヤギ関節炎脳炎ウイルス（C A E V）、ウマ感染性貧血ウイルス（E I A V）、およびより最近になって記述されたネコ免疫不全ウイルス（F I V）、およびウシ免疫不全ウイルス（B I V）が含まれる。

[0108] 感染プロセスの間、レトロウイルスは最初に特定の細胞表面受容体に付着する。感受性の宿主細胞に侵入すると、レトロウイルスRNAゲノムは、逆転写酵素によってDNAにコピーされる。このDNAは宿主細胞核に輸送され、次いで宿主ゲノムに組み入れられ、この状態はプロウイルスと呼ばれる。プロウイルスは、細胞分裂中の宿主染色体において安定であり、他の細胞タンパク質のように転写される。プロウイルスは、より多くのウイルスを複製するために必要とされるタンパク質およびパッケージング機構をコードし、出芽して細胞から離れることができる。レトロウイルスが宿主細胞から出芽すると、それらは宿主細胞脂質膜を含む。このようにして、宿主細胞由来膜タンパク質がレトロウイルス粒子の一部となる。

[0109] レトロウイルスのゲノムは、g a g（群特異的抗原）、p r o（プロテアーゼ）、p o l（ポリメラーゼ）およびe n v（エンベロープ）の4つの遺伝子を含む。g a g配列は、マトリックスタンパク質、ヌクレオキャプシドタンパク質、およびキャプシドタンパク質の3つの主要な構造タンパク質をコードする。p r o配列は、粒子の集合、出芽および成熟の間にG a gおよびG a g－P o lを切断する役割を担うプロテアーゼをコードする。p o l配列は、逆転写酵素およびインテグラーゼの酵素をコードし、前者は、感染プロセスの間にウイルスゲノムのRNAからDNAへの逆転写を触媒し、後

者はLTRをプロセシングし、プロウイルスDNAを宿主細胞ゲノムへ組み入れる役割を担う。env配列は、エンベロープ糖タンパク質のSUおよびTMサブユニットの両方をコードする。レトロウイルスが特異的な細胞表面受容体を使用してその標的宿主細胞に結合する能力はEnvタンパク質の表面成分(SU)によって与えられるが、レトロウイルスが膜融合を介して細胞に進入する能力は、膜アンカー型膜貫通成分(TM)によって付与され得る。レトロウイルスゲノムは、遺伝子発現、逆転写および宿主細胞染色体への組み入れを促進するために必要な要素を含有し、この要素として、2つのLTR(長い末端反復)、新たに形成するビリオンへのウイルスRNAの特異的パッケージングに必要なパッケージングシグナル(ψ)配列、および逆転写の間にプラス鎖DNA合成を開始する部位として機能するポリプリントラクト(polypurine tract; PPT)のような非コーディングシス作用性配列が挙げられる。長鎖末端反復(LTR)は約600ntの長さであり、そのうちU3領域が450、R配列が100、U5領域がおよそ70ntの長さである。

[0110] レンチウイルスなどの複合レトロウイルスのゲノムは、gag、pro、polおよびenvに加えて、ウイルス遺伝子発現、感染性粒子の集合を調節し、感染細胞におけるウイルス複製をモジュレートするアクセサリ遺伝子を含み得る。代表的なレンチウイルスはHIV-1である。レンチウイルスは、2つの制御遺伝子、tatおよびrevを含み得る。例えば、HIV-1はvif、vpr、vpuおよびnefをさらに含む。他にもvpxなどのアクセサリ遺伝子が存在する。これらのアクセサリ遺伝子は、ウイルスRNAの合成およびプロセシングならびに他の複製機能の制御に関与している。特に、HIVはその他にも構造的ランドマーク(TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、INS)などを含む。レンチウイルス粒子は、p24のカプシドタンパク質を含み得る。

[0111] 一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、レトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1

つおよび所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび所望の遺伝子の間にprimer binding site (PBS) および／またはポリプリントラクト (PPT) を含んでもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、所望の遺伝子および3'LTRの間にウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) を含んでもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、ウイルス由来構築物プラスミドおよびプロデューサー細胞がレトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列を含むようなプロデューサー細胞において機能するように構成される。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちウイルス由来構築物プラスミドに含まれない遺伝子のうち1つまたは複数（例えば、全て）は、プロデューサー細胞の染色体にコードされていてもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物の構築の際に、envをVSV-G（水疱性口内炎ウイルス (VSV) の糖タンパク質G）をコードする遺伝子と取り換えてもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物（レンチウイルスを含む）プラスミドは、VSV-G遺伝子を追加で含んでもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物（レンチウイルスを含む）の構築の際に、envに加えてまたはこれと置き換えて、狂犬病ウイルスの糖タンパク質遺伝子 (RV-G) またはRV-Gの細胞内ドメインを水泡性口内炎ウイルス糖タンパク質 (VSV-G) のもので置換した融合糖タンパク質 (FuG-B) を使用してもよく、レトロウイルス由来構築物（レンチウイルスを含む）プラスミドは、これらの遺伝子を含んでもよい。

[0112] 一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、構造タンパク質をコードする核酸配列 (gag) と、パッケージング因子 (ψ) と、2つの末端反復配列 (5'LTR、3'LTR) と

、機能補助因子をコードする核酸配列とを含み得る。一つの実施形態において、機能補助因子をコードする核酸配列は、*pro*、*pol*および*env*であり得る。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、*gag*、*pro*、*pol*、*env*のうちの1つまたは複数を含まなくてもよく、一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列はこれらを含む。*pol*は、レトロウイルスの複製に必要な遺伝子であり得るので、これを欠損させたレトロウイルス由来構築物プラスミドは、感染細胞における複製能力が低減され得る。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間にレトロウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの1つまたは複数（例えば全て）を含まない。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間に所望の遺伝子、プロモーター、およびターミネーターを含む。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、LTRのU3領域が欠損するように改変されていてもよい。レトロウイルス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、HEK293Tなどの細胞が挙げられる。

[0113] 一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列は、構造タンパク質をコードする核酸配列（*gag*、*pol*、*VSV-G*、*env*）と、パッケージング因子（パッケージングシグナル（ ϕ ）配列）と、2つの末端反復配列（5'LTR、3'LTR）と、機能補助因子をコードする核酸配列とを含み得る。一つの実施形態において、機能補助因子をコードする核酸配列は、*rev*であり得る。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、*rev*、*gag*、*pro*、*pol*、*env*のうちの1つまたは複数を含まなくてもよく、一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列はこれらを含む。*pol*および*rev*は、レンチウイルスの複製に必要な遺伝子で

あり得るので、これらを欠損させたレンチウイルス由来構築物プラスミドは、感染細胞における複製能力が低減され得る。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、tat、vif、vpr、vpu、nef、vpx、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、INS、APP、MAAP、RPE、PPT、PRE、WRPE、oPREのうちの1つまたは複数を含んでもよい。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間にレンチウイルス由来構築物を構成するのに必要な核酸配列のうちの1つまたは複数（例えば全て）を含まない。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間に所望の遺伝子を含む。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、5'LTRおよび3'LTRの間に所望の遺伝子、プロモーター、ターミネーター、およびWRPEを含む。一つの実施形態において、レンチウイルス由来構築物プラスミドは、LTRのU3領域、TATが欠損するように改変されていてもよい。一つの実施形態において、レトロウイルス由来構築物プラスミドは、LTRのU3領域が欠損するように改変されていてもよい。レンチウイルス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、HEK293T、HEK293、HeLaなどの細胞が挙げられる。

[0114] 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。一つの実施形態において、ウイルス由来構築物含有組成物は、ウイルス由来構築物ゲノムコピー数に対するウイルス由来構築物粒子数（VP/VG）が、35、30、25、20、15、10または5以下であり得る。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。

[0115] (ウイルス由来構築物プラスミドの作製)

一つの実施形態において、本開示は、複数の核酸配列を作動可能に連結するステップを含む、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法を提供する。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法は、第1の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含むウイルス由来構築物プラスミドを取得するステップと、(i) 第2の微生物宿主細胞にウイルス由来構築物プラスミドを導入し、第2の微生物宿主細胞をウイルス由来構築物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップを含む。一つの実施形態において、第1の微生物宿主細胞は形質転換生物（枯草菌など）であり得る。一つの実施形態において、第2の微生物宿主細胞は大腸菌であり得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法は、枯草菌内で複製される配列を有する、ウイルス由来構築物を生産するための核酸配列を含む核酸を宿主細胞に導入して、前記宿主細胞においてプラスミドを形成させるステップを含む。本明細書において、一つの実施形態において、枯草菌は外部から取り込んだ核酸からプラスミドを形成する能力を有し得るので、この方法において、導入する核酸はプラスミドでなくともよい。例えば、枯草菌は、核酸（例えば、タンデムリピートな核酸配列を有する非環状核酸）と接触すると、この核酸を取り込み、枯草菌内でプラスミドを形成し得る（例えば、本明細書に記載のOGAB法を参照のこと）。

[0116] 一つの実施形態において、ウイルス由来構築物プラスミドの作製の際に、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列以外の核酸配列（本明細書において、ベクター部分核酸配列と記載する）が複数の断片に断片化され得る。OGAB法においては、核酸断片を使用してプラスミドを構築するが、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列と組み合わせるおよび／またはこれとは独立してベクター部分核酸配列も断片化してOGAB法に

供することで、ベクター部分も柔軟に設計され得る。共通して種々のウイルスベクタープラスミドの構築に使用できるベクター部分は、個別のウイルスベクタープラスミドの構築には不要な部分も含み得るので、ベクター部分の設計の柔軟性はベクタープラスミドの小型化を可能にし得る。一つの実施形態において、第1の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップは、ベクター部分核酸配列を含む少なくとも2つ（例えば、2～20個、2～10個、2～5個、3～20個、3～10個、3～5個、4～20個、4～10個、5～20個、5～10個など）の核酸断片を含む複数の核酸断片からウイルス由来構成物プラスミドを取得することを含む。

[0117] ベクター部分は、通常、ウイルス由来構成物の生産に関連するエレメント（例えば、カプシドをコードする配列、それを制御する配列など）とは異なる機能を有する核酸配列を含み、ウイルスベクタープラスミドの取り扱いを容易にするためのエレメントなどが含まれ得る。一つの実施形態において、ベクター部分核酸配列は、核酸複製、薬剤耐性、コピー数の調整、安定性の改善、または遺伝子工学による操作性改善（マルチクローニングサイトの設計）の機能を有する核酸配列を含む。例えば、ベクター部分核酸配列は、複製開始点、薬剤耐性遺伝子、プロモーター、セントロメア配列、伝達遺伝子、複製調節遺伝子、伝達調節遺伝子、毒素遺伝子、抗毒素遺伝子、相同組換え部位、またはマルチクローニングサイトの核酸配列を含み得る。ベクター部分核酸配列は、機能単位ごとにモジュール化（ブロック化）することができ、ここで、1つのモジュールは1つの核酸断片に含まれてもよいし、複数の核酸断片に含まれてもよい。薬剤耐性など類似の機能を有するモジュールとして複数種類の核酸断片を準備しておくことで、効率的に新規ウイルス由来構成物プラスミドが作製され得る。

[0118] 一つの実施形態において、本開示は、枯草菌においてアデノ随伴ウイルス由来構築物プラスミドを作製する、本開示のウイルス由来構築物プラスミド

を作製する方法、そのような方法により作製されるウイルス由来構築物プラスミド、およびウイルス由来構築物を提供する。ウイルス由来の遺伝子は、変異の発生や宿主細胞への増殖阻害等により、宿主細胞によって複製が困難になる事態がしばしば発生する。特に、AAVが含むLTRは、大腸菌においても変異が生じやすく、複製が困難とされる。また、現在の技術であっても、ウイルス由来構築物プラスミドの複製は任意の宿主細胞において容易に達成できるものではない。大腸菌によるウイルス由来構築物プラスミド複製においても種々の工夫がなされる中、宿主を枯草菌に変えて、ウイルス由来構築物プラスミドを構築・複製することは容易になし得たことではない。枯草菌におけるウイルス由来構築物プラスミドの形成・生産は、本開示の実験を通して初めて可能となったものである。

[0119] 一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法は、本開示のウイルス由来構築物プラスミド（例えば、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを作製する方法により得られたもの）の一部を取り出し、他のプラスミド（本開示のウイルス由来構築物プラスミドであってもよい）に組み込む（クローニングする）ステップを含んでもよい。組み込みの際に他のプラスミドの一部を除去してもよい。例えば、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列の（A）～（D）の核酸配列の1つまたは複数において、より高いウイルス由来構成物の生産量を与える核酸配列が見出された場合、既存のウイルス由来構築物プラスミドの対応する（A）～（D）の核酸配列と置き換えることでウイルス由来構成物の生産量の向上が得られ得る。例えば、特定の所望の遺伝子上流に配置した場合に所望の遺伝子の良好な発現をもたらすプロモーターを含むウイルス由来構成物プラスミドが得られた場合、そのプロモーターおよび所望の遺伝子の領域の核酸配列を既存のウイルス由来構築物プラスミドに組み込むことで所望の遺伝子を高発現するウイルス由来構成物が得られ得る。

[0120] 一つの実施形態において、枯草菌に核酸を導入する方法は、任意の方法であり得るが、例えば、コンピテントな枯草菌の使用、エレクトロポレーション

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が挙げられる。「コンピテント」とは、細胞が外来性の物質（例えば、核酸）に対してより透過性になった状態を指す。枯草菌をコンピテントにするためには、任意の公知の方法を使用することができるが、例えば、Anagnostopoulou, C. and Spizizen, J. J. *Bacteriol.*, 81, 741-746 (1961)に記載の方法を使用することができる。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、枯草菌において作製され、そのまま同じ枯草菌において増幅されてもよい。

[0121] 枯草菌に核酸を導入して、この核酸とは異なる構造のウイルス由来構築物プラスミドを作製する場合、導入する核酸は、上記で詳細に説明するウイルス由来構築物プラスミドの各要素を含み得る。

[0122] (OGAB法)

一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、OGAB法によって作製され得る。OGAB (Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*) 法は、集積核酸を形質転換生物に取り込ませることでこの生物において環状のプラスミドを生成する方法である。OGAB法では、大きなサイズの核酸を含むプラスミドが簡便に調製され得る。形質転換生物に取り込ませる核酸を本明細書では「集積核酸」と呼び、典型的には、集積核酸は、同じ方向にプラスミドの1単位と、1セットの単位核酸とが繰り返し現れるようなタンデムリピート状の構造を有し、このような構造の集積核酸を使用することで、形質転換生物におけるプラスミドの生成が促進され得る。本明細書において「単位核酸」とは、集積核酸の配列を構成する一部の配列を有する核酸分子または核酸分子の部分を指し、以下で詳細に説明されるように、複数種類の単位核酸が単位ベクターとして調製され、その後集積核酸が構築される。

[0123] 以下で、形質転換生物に取り込ませるための集積核酸の作製手順を説明する。

[0124] ・単位核酸の調製

集積核酸に組み込むための単位核酸を調製する。単位核酸は任意の公知の方法によって作製でき、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）や化学合成により作製することができる。単位核酸は、所望のタンパク質（治療用タンパク質、ウイルス由来構築物を構成するタンパク質など）をコードする配列またはその部分、遺伝子を制御する配列（プロモーター、エンハンサーなど）、核酸を操作するための配列（制限酵素認識配列など）など任意の所望の配列を有し得る。集積核酸に組み込んだときに、複数種類の単位核酸が特定の順番および/または特性の方向に並ぶように、それぞれの単位核酸の末端は、特定の突出配列を生じるように構成され得る。

[0125] 最終的にプラスミド上に多数の単位核酸が集積され得るので、1つまたは複数の単位核酸は塩基長の長い1つまたは複数の遺伝子をコードするように設計されてもよい。塩基長の長い遺伝子としては、例えば、一連の代謝経路を構成する遺伝子群などが挙げられる。

[0126] ・単位ベクターの調製

単位核酸と、それとは異なる付加核酸とを連結することで単位ベクターを調製することができる。単位ベクターを使用することで、単位核酸をより容易に取り扱うことが可能になり得る。

[0127] 付加核酸は、直鎖状核酸であってもよいし、環状のプラスミドであってもよい。環状のプラスミドを付加核酸として使用する場合、単位ベクターも環状構造を有し得るため、例えば、大腸菌等の形質転換に使用できる。一つの実施形態において、導入された宿主中で単位ベクターが複製されるように、付加核酸は複製開始点を含み得る。一つの実施形態において、ある集積核酸を構築するための全ての単位核酸は、同一種類の付加核酸に連結してもよく、そうすることで単位ベクター間のサイズ差を小さくし、複数種類の単位ベクターの取り扱いが容易になり得る。一つの実施形態において、ある集積核酸を構築するための単位核酸は、異なる種類の付加核酸に連結してもよい。一つの実施形態において、ある集積核酸を構築するための1つまたは複数の

単位核酸について、（単位核酸の塩基長）／（単位ベクターの塩基長）の割合またはその平均は、50％以下、40％以下、30％以下、20％以下、15％以下、10％以下、7％以下、5％以下、2％以下、1.5％以下、1％以下または0.5％以下であり得る。付加核酸のサイズが単位核酸より大きいほど、異なる種類の単位ベクターのより均一な取り扱いが可能になり得る。単位核酸と付加核酸との連結は、例えば、DNAリガーゼを用いたライゲーション、TAクローニング法など任意の方法で実施できる。一つの実施形態において、ある集積核酸を構築するための1つまたは複数の単位核酸について、（単位核酸の塩基長）／（単位ベクターの塩基長）の割合またはその平均は、1％以上、0.3％以上、0.1％以上、0.03％以上、0.01％以上、0.003％以上または0.001％以上であり得、単位ベクターの操作が容易になり得る。

[0128] 一つの実施形態において、単位核酸の長さは、10bp以上、20bp以上、50bp以上、70bp以上、100bp以上、200bp以上、500bp以上、700bp以上、1000bp以上または1500bp以上、かつ5000bp以下、5000bp以下、2000bp以下、1500bp以下、1200bp以下、1000bp以下、700bp以下または500bp以下であり得る。

[0129] 一つの実施形態において、集積核酸は、2種以上、4種以上、6種以上、8種以上、10種以上、15種以上、20種以上、30種以上、40種以上、50種以上、60種以上、70種以上、80種以上、90種以上または100種以上、かつ1000種以下、700種以下、500種以下、200種以下、120種以下、100種以下、80種以下、70種以下、60種以下70種以下または50種以下の単位核酸から構築され得る。各々の単位核酸（または単位ベクター）のモル数がほぼ同一になるように調整することで、タンデムリピート状の構造を有する所望の集積核酸が効率的に作製され得る。

[0130] 一つの実施形態において、単位核酸は、集積核酸における1セットの反復

配列を単位核酸の数でほぼ等分した塩基長を有してもよい。そうすることで、各々の単位核酸（または単位ベクター）のモル数を揃える操作が容易になり得る。一つの実施形態において、単位核酸は、集積核酸における1セットの反復配列を単位核酸の数でほぼ等分した塩基長から30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、7%以下または5%以下の増大または減少した塩基長を有し得る。

[0131] 一つの実施形態において、単位核酸は、単位核酸の端部に非回文配列（パリンδροーム配列でない配列）を有するように設計され得る。このように設計された単位核酸は、その非回文配列を突出配列にした場合、集積核酸において単位核酸が互いに順序を保ったまま連結した構造を容易に与え得る。

[0132] ・集積核酸の作製

集積核酸は、単位核酸を互いに連結することによって構築され得る。一つの実施形態において、単位核酸は、単位ベクターから制限酵素などによって切り出されることで調製され得る。集積核酸は、反復配列のセットを1つ以上、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上または10つ以上含み得る。集積核酸における反復配列は、単位核酸の配列および必要に応じて集積ベクター核酸の配列を含み得る。集積核酸は、形質転換生物において核酸の複製を可能とする配列を有し得る。一つの実施形態において、形質転換生物において核酸の複製を可能とする配列は、形質転換生物（例えば、*Bacillus* 属細菌（枯草菌））中で有効な複製開始点を含み得る。枯草菌中で有効な複製開始点の配列は、特に限定されないが、例えば、 θ 型の複製機構を有するものとしては、pTB19 (Imanaka, T., et al. J. Gen. Microbiol. 130, 1399-1408. (1984)) や pLS32 (Tanaka, T and Ogra, M. FEBS Lett. 422, 243-246. (1998))、pAM β 1 (Swinfield, T.J., et al. Gene 87, 79-90. (1990)) 等のプラスミドに含まれる複製開始点等の配列が挙げられる。

[0133] 集積核酸は、単位核酸の他にも、必要に応じて追加の塩基配列を含んでもよい。一つの実施形態において、集積核酸は、プロモーター、オペレーター

、アクチベーター、ターミネーター等の転写翻訳を制御する塩基配列を含んでもよい。枯草菌を宿主とした場合のプロモーターとしては、具体的には、IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) で発現制御可能な P_{lac} (Yansura, D. and Henner, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 439-443. (1984.))、あるいは P_{trp} プロモーター (Itaya, M. *Biochem. Biotechnol.* 63, 602-604. (1999)) 等が挙げられる。

[0134] 単位核酸は、集積核酸において一定の順序および向きを保った繰り返し構造を形成し得る。一つの実施形態において、単位ベクターから切り出された単位核酸の突出末端の塩基配列が互いに相補的になるように単位核酸を構築することで、集積核酸における一定の順序および向きを保った繰り返し構造の形成が可能になり得る。一つの実施形態において、異なる単位核酸毎に突出末端の構造をユニークにすることで、効率的に一定の順序および向きを保った繰り返し構造を形成し得る。一つの実施形態において、突出末端は、非回分配列を有してもよく、5' 末端突出または 3' 末端突出のいずれであってもよい。

[0135] 一つの実施形態において、制限酵素を用いて単位ベクターから突出末端を有する単位核酸が切り出され得る。この実施形態において、単位ベクターは、1つまたは複数の制限酵素認識配列を有し得る。単位ベクターが複数の制限酵素認識配列を有する場合、それぞれの制限酵素認識配列は同じ制限酵素によって認識されてもよいし、異なる制限酵素によって認識されてもよい。一つの実施形態において、単位ベクターは、同じ制限酵素によって認識される 1 対の領域を、完全な単位核酸領域がこれらの領域の間に含まれるように含み得る。使用される制限酵素は、特に限定されないが、タイプ I 制限酵素、例えば、AarI、BbsI、BbvI、BcoDI、BfuAI、BsaI、BsaXI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspMI、BspQI、BtgZI、FokI、SfaNI などのタイプ II 制限酵素を使用でき、これらの制限酵素は、認識配列の外側の認識配列から一定距離離れた部位に突出末端を創出可能であり得る。(例えば単独の) タイプ I

I S制限酵素を用いると、切り出した単位核酸の突出末端の配列が単位核酸毎に異なり得るので、複数の単位核酸を一定の順序および向きで集積させるのに有利であり得る。タイプII S制限酵素を使用する一つの実施形態において、単位ベクターは単位核酸領域にそのタイプII S制限酵素が認識する領域を含まない。認識領域を切断する制限酵素を使用する実施形態において、単位ベクターは単位核酸領域の末端にその制限酵素が認識する領域を含み得る。

[0136] 一つの実施形態において、複数の単位ベクターから単位核酸を切り出すために同じ種類の制限酵素を使用する場合、この複数の単位ベクターを含む溶液中で制限酵素処理を行うことができ、作業の効率が向上し得る。ある集積核酸を作製するために使用する制限酵素の種類は、例えば、5種以下、4種以下、3種以下、2種以下または1種であり得、少ない種類の制限酵素を使用することで、単位核酸間のモル数のばらつきが低減され得る。一つの実施形態において、単位ベクターから切り出された単位核酸は、アガロースゲル電気泳動など任意の公知の分画法により容易に精製され得る。

[0137] 単位核酸および必要に応じて集積ベクター核酸は、DNAリガーゼ等を用いて互いに連結（ライゲーション）することができる。これにより、集積核酸を作製できる。例えば、単位核酸および必要に応じて集積ベクター核酸の連結は、ポリエチレングリコール（例えば、PEG2000、PEG4000、PEG6000、PEG8000など）および塩（例えば、1価のアルカリ金属、塩化ナトリウムなど）などの成分の存在下で実施することができる。ライゲーション反応液中の各単位核酸の濃度は、特に限定されず、1 fmol/μl以上などであり得る。ライゲーションの反応温度および時間は、特に限定されず、37℃で30分以上などである。一つの実施形態において、単位核酸および必要に応じて集積ベクター核酸を連結させる前に、単位核酸および必要に応じて集積ベクター核酸を含む組成物を制限酵素を失活させる任意の条件に供してもよい（例えば、フェノール・クロロホルム処理）。

[0138] 単位核酸は、WO 2015/111248に記載される方法などを使用して、ほぼ同じモル数に調整することができる。単位核酸をほぼ同じモル数に調整することで、タンデムリピート状の構造を有する所望の集積核酸が効率的に作製され得る。単位ベクターまたは単位核酸の濃度を測定することで、単位核酸のモル数を調整することができる。

[0139] ・集積核酸からのプラスミドの作製

集積核酸を形質転換生物と接触させることで、形質転換生物においてプラスミドが形成され得る。一つの実施形態において、形質転換生物として、*Bacillus* 属細菌、*Streptococcus* 属細菌、*Haemophilus* 属細菌、*Neisseria* 属などが挙げられる。*Bacillus* 属細菌としては、*B. subtilis* (枯草菌)、*B. megaterium* (巨大菌)、*B. stearothermophilus* (中度高熱菌) などが挙げられる。好ましい実施形態において、形質転換生物は枯草菌である。一つの実施形態において、集積核酸を取り込ませる形質転換生物は、コンピテント状態であり、能動的に核酸を取り込むことができる。例えば、コンピテント状態の枯草菌は、基質となる2本鎖核酸を細胞上で切断し、2本鎖の内のいずれかの1本鎖をこの切断点から分解し、他方の1本鎖を菌体内に取り込む。取り込まれた1本鎖は、菌体内で環状の2本鎖核酸に修復され得る。形質転換生物をコンピテント状態にするために、任意の公知の方法を使用できるが、例えば、枯草菌は、Anagnostopoulou, C. and Spizizen, J. J. *Bacteriol.*, 81, 741-746(1961)に記載の方法を用いてコンピテント状態にすることができる。形質転換の方法は、それぞれの形質転換生物に適した公知の方法を用いることができる。

[0140] 一つの実施形態において、パッケージング細胞から生産されたウイルス由来構築物プラスミドは任意の公知の方法を用いて精製でき、本開示は、このように精製されたウイルス由来構築物プラスミドも提供する。一つの実施形態において、精製したウイルス由来構築物プラスミドが所望の核酸配列を有することは、制限酵素切断により発生する断片のサイズパターンを調べるこ

と、PCR法、塩基配列決定法などにより確認することができる。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミド作製方法によって調製されたウイルス由来構築物プラスミド含有組成物は、含有エンドトキシンが少量であり得る。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドを含む枯草菌を提供する。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、化学合成または酵素反応により作製した核酸断片にベクター部分核酸配列を含む少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、またはそれより多くの核酸断片から作製される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、化学合成または酵素反応により作製した複数の核酸断片のみを環状化して作製される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドは、3つ以上、4つ以上、5つ以上、7つ以上、10つ以上、15つ以上、20つ以上またはそれより多くの核酸断片から作製される。一つの実施形態において、本開示のウイルス由来構築物プラスミドの作製に使用される核酸断片は、独立して、20 kb以下、15 kb以下、10 kb以下、7 kb以下、5 kb以下、4 kb以下、3 kb以下、2 kb以下、1.5 kb以下、1 kb以下、0.7 kb以下、または0.5 kb以下の長さを有し得る。

[0141] (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構築物プラスミドまたはウイルス由来構築物を含む組成物を提供する。

[0142] (剤型等)

本明細書に記載される組成物は、種々の形態で提供され得る。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。

[0143] 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、医薬等級のマンニトール、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、矯味剤等を含んでいてもよい。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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] (使用・用途)

本明細書に記載のウイルス由来構築物プラスミドまた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、種々の用途で使うことができる。

[0147] 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。

[0148] 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しうるが、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。

[0149] 本明細書に記載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経路は、例えば、静脈内、皮内、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）系と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、ボーラス（b o l u s）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うるし、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。

[0150] 本開示の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プラスミドを作製するためのキットであって、枯草菌においてプラスミド複製を促進する核酸配列と、ウイルスを構成するのに必要な核酸配列と、を含む少なくとも1つの核酸を含む、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。

[0151] 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。

[0152] 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。

[0153] 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。

[0154] 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、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0155] 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。

[0156] （実施例1：OGAB法によるpGETS103-AAV-Helper-RC2の構築）

・OGAB集積用ベクターDNAの構築

プラスミドpGETS103ΔAarIを制限酵素HindIIIで切断し、TE飽和フェノール処理、ブタノール抽出、エタノール沈殿で精製し、これに配列番号3および4で示される一本鎖DNAをアニールして作製したリンカーDNAを挿入して、OGAB集積用ベクターであるpGETS103-ΔAarI-Linkerを作製した。このプラスミドを制限酵素AarIで切断し、低融点アガロースゲル電気泳動によりサイズ分離し、大きい15kbの断片をゲルから切り出し、精製して、OGAB集積用のベクター断片を取得した。

[0157] ・OGAB用集積断片の準備

pGETS103-AAV-Helper-RC2（図1）の塩基配列のうち、ベクター部分のpGETS103の塩基配列を除くAAV-Helper-RC2の領域（図2）について、OGAB法による構築が可能かどうかを検討した。まず、上記DNA領域を図1に示す22個の断片に分割するように設計した。第3断片はAAV断片とHelper断片の境界の領域を含み、第16断片はHelper断片とRC2断片の境界の領域を含むため

、第1、第3および第16断片は、以下に示すように材料のDNAを化学合成後、MAP法（特願2018-93024）により準備した。具体的には、第1断片については配列番号5～10の、第3断片については配列番号11～16の、第16断片については配列番号17～22の、一本鎖DNAを用いて、MAP法によりアセンブリして得られた二本鎖DNAを用いた。残りの領域については、配列番号23～66に示す各断片の番号の付くFとRのプライマーの組み合わせを用いて、第2断片についてはpAAV-CMV Vectorを、第4～第15断片はpHelper Vectorを、第17～第22断片についてはpRC2-mi342 Vectorをテンプレートとして以下の条件によりPCRにより増幅した。一反応あたり、10 μ Lの2×Prime Star mix（タカラバイオ）、1 μ LのテンプレートDNA、両方のプライマーを3.2 pmolずつ含む1 μ Lの溶液、8 μ Lの滅菌水を加えて、96℃2分ののち、98℃10秒、55℃15秒、72℃5秒のサイクルを30サイクル行った。

[0158] ・OGAB用集積断片のベクターへのクローニング

DNA断片をMAP法、もしくはPCR法により得たのち、これらのDNAをMinElute PCR Purification Kit（キアゲン）を用いて精製し、最終的に15 μ LのTE緩衝液（ナカライテスク）によりカラムから溶出した。得られたDNA溶液の1.4 μ Lに0.2 μ Lの10×Ex-Taq buffer（タカラバイオ）、0.2 μ Lの2mM dNTP（タカラバイオ）、0.2 μ Lの10×A-attachment mix（TOYOBO）を加えて、60℃で1時間反応させた。その後、1 μ LのpMD19 simple（タカラバイオ）をTE緩衝液で20倍に希釈して、3 μ LのDNA Ligation Kit <Mighty Mix>を加えて、16℃で3時間ライゲーション反応を行い、大腸菌JM109コンピテントセル（タカラバイオ）を用いて形質転換を行った。終夜培養後、カルベニシリン入りLBプレートに出現したコロニーについて塩基配列を確認することで、それぞれの断片について正しい配列のクロー

ンを取得した。

[0159] ・OGAB用断片の等モル混合物の調整

これらのクローンを持つ大腸菌を2mlのLB培地で増殖後、その900 μ Lを用いてQIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン) により、自動化システムQIAcubeによりプラスミドを精製し、最終的に30 μ LのTE緩衝液に溶出した。そのうちの2.5 μ g相当のプラスミドDNAを含む溶液を50 μ LになるようにTE緩衝液を添加した。さらにそこに、6 μ Lの10X Plasmid safe buffer (epicentre)、2.4 μ Lの25mM ATP、2 μ LのPlasmid-Safe ATP-Dependent DNase (epicentre) を加えて、37°C 1時間反応後、70°C 30分失活させることで、環状構造以外のDNAを分解した。その後、反応液をMinElute PCR Purification Kit (キアゲン社) を用いて精製し、最終的に15 μ LのTE緩衝液 (ナカライテスク) によりカラムから溶出した。得られたDNA溶液を微量分光光度計 (Nano drop One、ThermoFisher) を用いて測定し、100 ng/ μ LとなるようにTE緩衝液を加えて希釈した。その後、再度濃度を測定し、正確に500 ngのDNAを分取する際に必要なDNA体積を小数点以下2桁 μ Lまで計算して、マイクロピペットにより分取することで各プラスミドの等モル分取を行った。分取したDNA溶液は、その後に使用する制限酵素の種類により2つの1.5 mlの遠心チューブに分けてプールした。第1、3、5、7、9、11、13、14、17、19、21断片をクローン化するプラスミドは、制限酵素AarIで切断するチューブへ、第2、4、6、8、10、12、15、16、18、20、22断片をクローン化するプラスミドは、制限酵素BsaIで切断するグループにそれぞれプールした。その後、AarIで切断するチューブには、各プラスミドの容積の合計を1体積とした場合に、1.94体積の滅菌水、0.33体積の10X Buffer AarI (ThermoFisher)、0.06体積の50Xオリゴヌクレオ

チド (0.025 mM)、0.17 体積の Aar I (ThermoFisher) を加えて 37℃ で 2 時間反応させた。また、Bsa I で切断するチューブには、各プラスミドの容積の合計を 1 体積とした場合に、2 体積の滅菌水、0.33 体積の 10X CutSmart buffer (NEB)、0.17 体積の Bsa I-HF v2 を加えて 37℃ で 2 時間反応させた。それぞれのチューブに制限酵素反応液と等量の TE 飽和フェノールを添加して、よく混合することで制限酵素を失活させた後、乳化した状態のフェノールと DNA 溶液の混合物を一つの 2 ml 遠心チューブに統合して、20,000 × g で 10 分間遠心し、フェノール相と水相とに分離した。上層を新しいチューブに移して、そこに等量の 1-ブタノールを加え、よく攪拌し、20,000 × g で 1 分間遠心した。その後、上層をピペットで吸って取り除き、下層の体積が 450 μL 以下になるまで、再度等量の 1-ブタノールを加えて、遠心、上層を捨てる、の操作を繰り返した。その後、50 μL の P3 バッファーを加えて、900 μL のエタノールを加え、20,000 × g で 10 分間遠心した。沈殿を失わないように上清を捨てたのち、900 μL の 70% エタノールでリンス後、上清をピペットで吸って捨てた。その後、再度遠心し、残っている上清を底部に集めて、ピペットで完全に液体を取り除いた。直ちに、TE 50 μL を加えて沈殿を 5 分間タッピングすることで完全に溶解した。その後、低融点アガロースゲルによる電気泳動により pMD19 から切り出された約 750 bp の 22 種類の断片の等モル混合物をサイズ分画し、電気泳動ゲルからの DNA 断片の切り出しと精製の方法に従って、22 種類の断片の混合物を精製した。

[0160] ・OGAB 法による pGETS103-AAV-Helper-RC2 の構成

その後、得られた DNA 溶液の 1 fmol と、Aar I で切断し精製した pGETS103ΔAar I-Linker の 1 fmol とに合計 4 μL となるように TE 緩衝液を追加し、そこに 5 μL の 2×ライゲーションバッファー (15% ポリエチレングリコール 6000、500 mM NaCl、1

32 mM Tris・HCl (pH 7.6)、13.2 mM MgCl₂、20 mM DTT、0.2 mM ATP) を添加してよく混合後、1 μ L の T4 DNA Ligase (タカラバイオ) を加え、37°C で5時間インキュベーションした。ここに枯草菌コンピテントセル100 μ L を添加し、37°C で、30分ダックローターにより回転培養した。その後、300 μ L のLB培地を添加して、37°C で1時間ダックローターで回転培養し、その後、培養液を10 μ g/mL のテトラサイクリン (シグマアルドリッチ) 入りLBプレートに広げ、37°Cで一晩培養した。コロニーは94個得られた。

[0161] ・形質転換体のプラスミド構造確認

ランダムに12株のコロニーを選択して、2 mL の10 μ g/mL のテトラサイクリン入りLB培地で一晩培養し、内部のプラスミドのコピー数を増幅するためにIPTGを終濃度1 mMとなるように添加して更に37°Cで3時間培養した。得られた菌体から以下の様に少量のプラスミド抽出を行った。900 μ L の菌液を1.5 mL遠心チューブにとり、6800 $\times$ gで3分遠心し、上清をマイクロピペットで取り除いた。得られた菌体ペレットをよく懸濁後、10 mg/mL の卵白リゾチーム (wak o) を含むP1バッファを100 μ L 添加後、37°Cで5分間インキュベーションした。そこに、200 μ L のP2バッファを加えて4回転倒混和した。その後、P3を150 μ L 添加し、4回転倒混和した。これを20,000 $\times$ gで、10分間遠心することにより、白い沈殿と上清に分離した。上清を新しい1.5 mL遠心チューブに移して、そこに、450 μ L のTE飽和フェノール (ナカライテスク) を添加し、良く混和した後、20,000 $\times$ gで、10分間遠心することにより、フェノール相と水相とに分離し、水相320 μ L を新しいチューブに移して、そこに900 μ L のエタノールを加え、20,000 $\times$ gで、10分間遠心した。上清をマイクロピペットで取り除き、900 μ L の70%エタノールを加え、チューブ全体をリンスした。その後、70%エタノールをマイクロピペットで取り除き、得られた沈殿を27 μ L のTE

緩衝液で溶解した。得られたプラスミド溶液を8 μ Lとり、そこに1 μ Lの10 $\times$ 3.1 NEB buffer (NEB)と、1 μ LのSma Iを添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、アガロースゲル電気泳動により切断パターンを確認した。図3に示すように、12個中1個(クローン番号3)が期待した切断パターンを示した。このクローンについて、全塩基配列を決定したところ、pGETS103-AAV-Helper-RC2を構築していることを確認した。

[0162] (実施例2：様々なAAVオールインワンベクタープラスミドの構築)

実施例1と同様に、AAVベクターを生産するためのオールインワン構造の7種類のベクタープラスミドを、他の血清型のAAVゲノムおよびアデノウイルスゲノムから取得した構成要素を使用して構築した。pGETS118-AarI (Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., and Itaya, M. Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments. Sci Rep 5, 10655 (2015).)に基づき各プラスミドを構築した(図4に模式図を示す)。ベクタープラスミドの各々において使用したITR、Rep、CapおよびHelper (VA、E2AおよびE4)の由来となるウイルスゲノムの血清型を以下の表に示す(図5も参照のこと)。

[表1]

表1:それぞれのプラスミドの構成

ベクタープラスミド番号	5' ITR	3' ITR	Helper	Rep	Cap
1*	改良型 AAV-2	改良型 AAV-2	Ad-2C	改良型 AAV-2	AAV-2
2	改良型 AAV-2	改良型 AAV-2	Ad-2C	改良型 AAV-2	AAV-2
3	AAV-1	AAV-1	Ad-12A	AAV-1	AAV-2
4	AAV-2	AAV-2	Ad-14B	AAV-2	AAV-2
5	AAV-3	AAV-3	Ad-5C	AAV-3	AAV-2
6	AAV-4	AAV-4	Ad-8D	AAV-8	AAV-2
7	AAV-6	AAV-6	Ad-40F	AAV-10	AAV-2
8	AAV-7	AAV-7	Ad-52G	AAV-7	AAV-2

*1のベクタープラスミドは、実施例1のものである（pGETS103-AAV-Helper-RC2。AAV：アデノ随伴ウイルス血清型、Ad：アデノウイルス血清型および群

[0163] 上記のそれぞれのオールインワン核酸（全長15～16kb）を設計し、その長さに応じて18～19個の単位DNA断片（700～900bp）を含むDNA断片を化学合成した。これらのDNA断片を、AarI、BbsI、BsaI、BsmBIのいずれかの制限酵素により切り出して単位DNA断片を調製した。これらの単位DNA断片をAarIで切断したpGETS118とタンデムリピートに連結し、その後、実施例1と同様にOGAB法により枯草菌において環状のプラスミドを形成させた。その結果、上記の追加の7種類のAAVベクターのオールインワン構造のベクタープラスミドの構築が確認された。

[0164] （実施例3：接着培養でのウイルスベクター産生評価（フラスコ培養））

・ プラスミドDNAの大量培養

構築したpGETS103-AAV-Helper-RC2を、大腸菌JM109コンピテントセル（タカラバイオより購入）、枯草菌BUSY9797株（神戸大学より譲渡、Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., Itaya, M. (2015) Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments, Scientific Reports, 5, 10655.) に形質転換し、枯草菌および大腸菌でそれぞれ大量培養した。LB培地（Bactotryptone 10g、Yeast extract 5g、塩化ナトリウム5gを1Lの水に溶解）に抗生物質（テトラサイクリン）を加えたものを200mL用意し、500mLの三角フラスコに100mLずつ入れて、大腸菌もしくは枯草菌プラスミド保持株を接種し、37℃で終夜培養した（さらに大量に培養する場合は、本フラスコ培養を繰り返し実施）。遠心分離を行い培養液から集菌し、溶菌後、塩化セシウム密度勾配超遠心法（塩化セシウム密度：約0.84g/mL）により精製し、ス

ーパーコイル状のプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAの濃度は紫外可視分光光度計を用いて測定した。尚、pAAV-CMV (図6)、pHelper (図7)、pRC2-mi342 (図8) はタカラバイオより購入し、同様に大腸菌で大量培養した。また、pGETS103-AAV (図9)、pGETS103-Helper (図10)、pGETS103-RC2 (図11) は、pAAV-CMV、pHelper、pRC2-mi342 pGETS103 を制限酵素処理し、ウイルスベクター産生に必要な各遺伝子をそれぞれpGETS-103にクローニングしたプラスミドDNAであり、同様に大腸菌と枯草菌で大量培養した。

[表2]

表2: 利用したプラスミドDNAのサマリー

rAAV #	トランスフェクションしたpDNA	トランスフェクションしたpDNAの数	Length [bp]	大量培養に利用した宿主
1	pGETS103-AAV-Helper-RC2	1	31884	枯草菌
2	・pGETS103-AAV ・pGETS103-Helper ・pGETS103-RC2	3	17722 24812 20982	枯草菌
3	pGETS103-AAV-Helper-RC2	1	31884	大腸菌
4	・pGETS103-AAV ・pGETS103-Helper ・pGETS103-RC2	3	17722 24812 20982	大腸菌
5	・pAAV-CMV ・pHelper ・pRC2-mi342	3	5031 11635 8189	大腸菌

[0165] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 1.5×10^7 個の293T細胞を15 cm-dishに播種した。22時間後、19 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% CO₂で2時間培養した。コンフルエント状態の293T細胞(細胞数: 3×10^7 個)へプラスミドを2.7 pmol含むDMEM培地500 μLとDNAの1倍量のPEI pro (登録商標)を含むDMEM培地500 μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

[0166] 37℃、5% CO₂で72時間培養後、0.5M EDTA (pH8.0) を1/80容量添加し、室温で10分静置した。剥離した細胞懸濁液を回収し、180×gで5分遠心分離して上清を完全に除去した。細胞ペレットを1.2mLのLysis buffer (2mM MgCl₂、150mM NaCl、50mM Tris、0.1% Triton (登録商標) X-100; pH8.5) で懸濁し、さらにBenzonase (登録商標) (50ユニット/mL) を添加して37℃で30分反応させた。その後、1.9M MgSO₄溶液を2/100容量添加し、室温で10分静置した。12,000×g、4℃、10分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic (登録商標) F-68を終濃度0.001%で添加した。

3種類の塩化セシウム溶液 (1.50g/cm³、1.30g/cm³、1.25g/cm³) を重層した密度勾配遠心分離を226,000×g、18℃、1.5時間行い、1.30g/cm³付近の溶液から約3.5mLのrAAVを回収した。

[0167] ・rAAVの評価 (図12)

rAAVのゲノムタイターを定量するために、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。プライマー配列は5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (配列番号1) および5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (配列番号2) 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。

[0168] ELISA法にて粒子タイターの定量を行った。定量キットには、AAV2 Titration ELISA 2.0Rを利用し、プロトコールに基づき試験を実施した。キットに含まれる抗AAV2抗体が固定化されて96ウェルプレートに、rAAVおよび標準品 (キットに含まれる空カプシド試薬) を100μLずつ添加した。37℃で1時間静置後、液を廃棄し、200μLのアッセイバッファーで3回洗浄した。100μLのビオチン結合抗AAV2抗体を添加し、37℃で1時間静置後、液を廃棄し、200μL

のアッセイバッファーで3回洗浄した。さらに、 $100\mu\text{L}$ のHRP標識済みのストレプトアビジンを添加し、 37°C で1時間静置後、液を廃棄し、 $200\mu\text{L}$ のアッセイバッファーで3回洗浄した。最後に、 $100\mu\text{L}$ のTMBを添加し、室温で15分間静置後、反応停止試薬を加えて、マイクロプレートリーダーで吸光度(450nm 、 650nm)を測定した。VP/VG比は、粒子タイターをゲノムタイターで除することで算出した。VG/細胞比は、ゲノムタイターをコンフルエント状態の細胞数で除することで算出した。

[表3]

表3:ウイルスベクター生産の結果

rAAV #	ゲノムタイター [VG/mL]	総ゲノム量 [VG]	粒子タイター [VP/mL]	VP/VG 比	VG/細胞比
1	6.78E+09	2.37E+10	1.38E+11	20	7.90E+02
2	2.82E+10	9.87E+10	4.48E+11	16	3.29E+03
3	1.67E+11	5.85E+11	2.25E+12	13	1.95E+04
4	4.26E+10	1.49E+11	9.67E+11	23	4.97E+03
5	4.93E+10	1.72E+11	1.50E+12	30	5.75E+03

[0169] (実施例4: 接着培養でのウイルスベクター産生評価 (ジャー培養))

・プラスミドDNAの大量培養

pGETS103-AAV-Helper-RC2を大腸菌JM109コンピテントセルと枯草菌BUSY9797株に形質転換し、それぞれジャーファメンター (バイオット、BMS-P) で大量培養した。前培養として50mLのLB培地を500mLフラスコに添加し、植菌後、バッチ培養を実施した。終夜培養した液から一部を採取し、10L容ジャーファメンター内の4Lの初発培地に植菌し本培養 (バッチ培養) を開始した。溶存酸素 (大腸菌: $3.6\sim 7.3\text{ppm}$ 、枯草菌: $5.4\sim 6.9\text{ppm}$) とpH ($6.95\sim 7.05$) を一定に保ちつつ培養を継続し、濁度 (OD600値) が一定値 (大腸菌: 21、枯草菌: 38) 以上であることを確認後、培養を終了した。遠心分離を行い培養液から集菌し、溶菌後、塩化セシウム密度勾配超遠心法 (塩化セシウム密度: 約 0.84g/mL) により精製し、スー

パーコイル状のプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAの濃度は紫外可視分光光度計を用いて測定した。

[表4]

表4: 利用したプラスミドDNAの構成

rAAV #	トランスフェクションしたpDNA	トランスフェクションしたpDNAの数	Length [bp]	大量培養に利用した宿主
6	pGETS103-AAV-Helper-RC2	1	31884	大腸菌
7	pGETS103-AAV-Helper-RC2	1	31884	枯草菌

[0170] ・ rAAVの作製

トランスフェクションの前日に 3×10^6 個の293T細胞を10cm-dishに播種した。22時間後、9.5mL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293T細胞（細胞数： 6×10^6 個）へプラスミドを11.53μg含むDMEM培地250μLとDNAの1倍量のPEIpro（登録商標）（PolyPlus-transfection SAS）を含むDMEM培地250μLを混合したトランスフェクション溶液を添加した。

37℃、5% CO₂で72時間培養後、0.5M EDTA（pH8.0）を1/80容量添加し、室温で10分静置した。剥離した細胞懸濁液を回収し、180×gで5分遠心分離して上清を完全に除去した。細胞ペレットを400μLのLysis buffer（2mM MgCl₂、150mM NaCl、50mM Tris、0.1% Triton（登録商標）X-100（ナカライテスク）；pH8.5）で懸濁し、さらにBenzonase（登録商標）（50ユニット/mL、Novagen）を添加して37℃で30分反応させた。その後、1.9M MgSO₄溶液を2/100容量添加し、室温で10分静置した。12,000×g、4℃、10分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic（登録商標）F-68（Thermo Fisher Scientific）を終濃度0.001%で

添加した。

[0171] 3種類の塩化セシウム溶液 (1.50 g/cm^3 、 1.30 g/cm^3 、 1.25 g/cm^3) を重層した密度勾配遠心分離を $226,000\times\text{g}$ 、 18°C 、1.5時間行い、 1.30 g/cm^3 付近の溶液から約3.5mLのrAAVを回収した。

[0172] ・rAAVの評価 (図13)

rAAVのゲノムタイターを定量するために、DNase I処理を30分行い、 95°C で10分反応させたサンプルを1000倍希釈してqPCRを行った。プライマー配列は5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (配列番号1) および5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (配列番号2) を用いた。PCR条件は 95°C で10分の後、 $95^\circ\text{C}/15\text{秒}$ 、 $55^\circ\text{C}/5\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/30\text{秒}$ を40サイクル繰り返し続けた。

ELISA法にて粒子タイターの定量を行った。定量キットには、AAV2 Titration ELISA 2.0R (PROGEN) を利用し、プロトコールに基づき試験を実施した。キットに含まれる抗AAV2抗体が固定化されて96ウェルプレートに、rAAVおよび標準品 (キットに含まれる空カプシド試薬) を $100\mu\text{L}$ ずつ添加した。 37°C で1時間静置後、液を廃棄し、 $200\mu\text{L}$ のアッセイバッファーで3回洗浄した。 $100\mu\text{L}$ のビオチン結合抗AAV2抗体を添加し、 37°C で1時間静置後、液を廃棄し、 $200\mu\text{L}$ のアッセイバッファーで3回洗浄した。さらに、 $100\mu\text{L}$ のHRP標識済みのストレプトアビジンを添加し、 37°C で1時間静置後、液を廃棄し、 $200\mu\text{L}$ のアッセイバッファーで3回洗浄した。最後に、 $100\mu\text{L}$ のTMBを添加し、室温で15分間静置後、反応停止試薬を加えて、マイクロプレートリーダーで吸光度 (450 nm 、 650 nm) を測定した。

[0173] VP/VG比は、粒子タイターをゲノムタイターで除することで算出した。
VG/細胞比は、ゲノムタイターをコンフルエント状態の細胞数で除することで算出した。

[表5]

表5: ウイルスベクター生産の結果

rAAV #	ゲノムタイター [VG/mL]	総ゲノム量 [VG]	粒子タイター [VP/mL]	VP/VG 比	VG/細胞比
6	6.12E+10	1.84E+11	5.19E+11	8	3.06E+04
7	1.62E+08	4.85E+08	5.34E+09	33	8.08E+01

[0174] (実施例5: 異なるプラスミドベクタープラスミドを使用したウイルスベクター生産)

・プラスミドDNAの大量培養

pGETS103-AAV-Helper-RC2の塩基配列のうち、ベクター部分のpGETS103の塩基配列を除くAAV-Helper-RC2の領域(図2)について、pGETS151にクローニングしpGETS151-AAV-Helper-RC2(図14)を構築した。pGETS151-AAV-Helper-RC2を大腸菌JM109コンピテントセルと枯草菌M112株に形質転換し、それぞれジャーファメンター(バイオット、BMS-P)で大量培養した。前培養として50mLのLB培地(枯草菌はTryptone, YE濃度を2倍にした培地を使用)を500mLフラスコに添加し、植菌後、バッチ培養を実施した。終夜培養した液から一部を採取し、10L容ジャーファメンター内の4Lの初発培地に植菌し本培養(フェドバッチ培養)を開始した。溶存酸素(4.3~7.3ppm)とpH(6.95~7.1)を一定に保ちつつ培養を継続し、濁度(OD600値)が50以上であることを確認後、培養を終了した。遠心分離を行い培養液から集菌し、溶菌後、塩化セシウム密度勾配超遠心法(塩化セシウム密度: 約0.84g/mL)により精製し、スーパーコイル状のプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAの濃度は紫外可視分光光度計を用いて測定した。

[表6]

表6: 実施例5に利用したプラスミド DNA

rAAV #	トランスフェクションしたpDNA	トランスフェクションした pDNA の数	Length [bp]	大量培養に利用した宿主
8	pGETS151-AAV-Helper-RC2	1	22749	大腸菌
9	pGETS151-AAV-Helper-RC2	1	22749	枯草菌

[0175] ・ r A A V の作製

トランスフェクションの前日に 1.5×10^7 個の 293T 細胞を 15 cm dish に播種した。22 時間後、19 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% CO₂ で 2 時間培養した。コンフルエント状態の 293T 細胞 (細胞数: 3×10^7 個) へプラスミドを 2.1 pmol 含む DMEM 培地 500 μL と DNA の 1 倍量の PEI pro (登録商標) を含む DMEM 培地 500 μL を混合したトランスフェクション溶液を添加した。

37℃、5% CO₂ で 72 時間培養後、0.5 M EDTA (pH 8.0) を 1/80 容量添加し、室温で 10 分静置した。剥離した細胞懸濁液を回収し、180×g で 5 分遠心分離して上清を完全に除去した。細胞ペレットを 1.2 mL の Lysis buffer (2 mM MgCl₂、150 mM NaCl、50 mM Tris、0.1% Triton (登録商標) X-100; pH 8.5) で懸濁し、さらに Benzonase (登録商標) (50 ユニット/mL) を添加して 37℃ で 30 分反応させた。その後、1.9 M MgSO₄ 溶液を 2/100 容量添加し、室温で 10 分静置した。12,000×g、4℃、10 分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic (登録商標) F-68 を終濃度 0.001% で添加した。

3 種類の塩化セシウム溶液 (1.45 g/cm³、1.27 g/cm³、1.25 g/cm³) を重層した密度勾配遠心分離を 226,000×g、18℃、1.5 時間行い、1.27 g/cm³ 付近の溶液から約 2 mL の rAAV を回収した。

[0176] ・ r A A V の評価 (図 1 5)

r A A V のゲノムタイターを定量するために、D N a s e I 処理を 3 0 分
行い、9 5 ° C で 1 0 分反応させたサンプルを 1 0 0 0 倍希釈して q P C R を
行った。プライマー配列は 5' -GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (配列番号 1) およ
び 5' -CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (配列番号 2) を用いた。P C R 条件は 9 5 ° C で
1 0 分の後、9 5 ° C / 1 5 秒、5 5 ° C / 5 秒、7 2 ° C / 3 0 秒を 4 0 サイク
ル繰り返した。V G / 細胞比は、ゲノムタイターをコンフルエント状態の細
胞数で除することで算出した。

[表 7]

表 7 : ウイルスベクター生産の結果

rAAV #	ゲノムタイター [VG/mL]	総ゲノム量 [VG]	VG/細胞比
8	7.46E+10	1.49E+11	4.97E+03
9	2.10E+09	4.20E+09	1.40E+02

[0177] (実施例 6 : 浮遊培養でのウイルスベクター産生評価)

・ プラスミド D N A の大量培養

p G E T S 1 5 1 - A A V - H e l p e r - R C 2 を大腸菌 J M 1 0 9 コ
ンピテントセルと枯草菌 M I 1 1 2 株に形質転換し、それぞれジャーファメ
ンター (バイオット、B M S - P) で大量培養した。前培養として 5 0 m L
の L B 培地 (枯草菌は T r y p t o n e , Y E 濃度を 2 倍にした培地を使用
) を 5 0 0 m L フラスコに添加し、植菌後、バッチ培養を実施した。終夜培
養した液から一部を採取し、1 0 L 容ジャーファメンター内の 4 L の初発培
地に植菌し本培養 (フェドバッチ培養) を開始した。溶存酸素 (4 . 3 ~ 7
. 3 p p m) と p H (6 . 9 5 ~ 7 . 1) を一定に保ちつつ培養を継続し、
濁度 (O D 6 0 0 値) が 5 0 以上であることを確認後、培養を終了した。遠
心分離を行い培養液から集菌し、溶菌後、塩化セシウム密度勾配超遠心法 (
塩化セシウム密度 : 約 0 . 8 4 g / m L) により精製し、スーパーコイル状
のプラスミド D N A を回収した。回収したプラスミド D N A の濃度は紫外可
視分光光度計を用いて測定した。

[表8]

表8: 利用したプラスミド DNA の構成

rAAV #	トランスフェクションしたpDNA	トランスフェクションした pDNA の数	Length [bp]	大量培養に利用した宿主
10	pGETS151-AAV-Helper-RC2	1	22,749	大腸菌
11	pGETS151-AAV-Helper-RC2	1	22,749	枯草菌

[0178] ・ r A A V の作製

トランスフェクションの当日に 9.0×10^7 個の細胞の VPC2.0 (登録商標) 細胞 (HEK293 由来浮遊細胞) を 125 mL 三角フラスコに播種した。1 時間後、3 mL の AAV-MAX Enhancer を添加し、 37°C 、 $8\% \text{CO}_2$ で 2 時間培養した。VPC2.0 (登録商標) 細胞 (細胞数: 9.0×10^7 個) ヘプラスミドを $3.0 \mu\text{mol}$ を含む Viral-Plex™ Complexation Buffer 3 mL と AAV-MAX Transfection Booster $90 \mu\text{L}$ と AAV-MAX Transfection Reagent $180 \mu\text{L}$ を混合したトランスフェクション溶液を添加した。

37°C 、 $8\% \text{CO}_2$ で 72 時間培養後、細胞懸濁液を回収し、 $180 \times g$ で 5 分遠心分離して上清を完全に除去した。細胞ペレットを 3.6 mL の Lysis buffer (2mM MgCl_2 、 150mM NaCl 、 50mM Tris 、 $0.1\% \text{Triton}$ (登録商標) X-100; pH8.5) で懸濁し、さらに Benzonase (登録商標) (167ユニット/mL) を添加して 37°C で 30 分反応させた。その後、 1.9M MgSO_4 溶液を $2/100$ 容量添加し、室温で 10 分静置した。 $12,000 \times g$ 、 4°C 、10 分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic (登録商標) F-68 を終濃度 0.001% で添加した。

3 種類の塩化セシウム溶液 (1.35g/cm^3 、 1.27g/cm^3 、 1.25g/cm^3) を重層した密度勾配遠心分離を $226,000 \times g$ 、 18°C 、1.5 時間行い、 1.27g/cm^3 付近の溶液から約 2.0 mL の rA

AVを回収した。

・ rAAVの評価 (図16)

rAAVのゲノムタイターを定量するために、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。プライマー配列は5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (配列番号1) およ
び5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (配列番号2) 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。VG/細胞比は、ゲノムタイターをコンフルエント状態の細
胞数で除することで算出した。

[表9]

表9: ウイルスベクター生産の結果

rAAV #	ゲノムタイター [VG/mL]	総ゲノム量 [VG]	VG/細胞比
10	6.84E+11	1.37E+12	9.87E+3
11	8.61E+10	1.72E+11	1.05E+3

[0179] (実施例7: アデノウイルスオールインワンベクタープラスミドの構築)

アデノウイルスベクターAd5について、タカラバイオ社のpAxCaw
tit2にGLO遺伝子を導入した全長約36kbのアデノウイルスベク
ターを生産するためのオールインワン構造を設計した(図17)。これを40
個の約800bpに分割し、PCRまたは化学合成により単位DNA断片を
含むDNA断片を調製した。これらのDNA断片を、AarI、BbsI、
BsaI、BsmBIのいずれかの制限酵素により切り出して単位DNA断
片を調製した。その後、AarIで切断したpGETS118-AarI、
またはpBET131 (Tanaka, T., and M. Ogura. 1998. A novel B
acillus natto plasmid pLS32 capable of replication in Bacillu
s subtilis. FEBS Lett. 422:243-246) のBamHIサイトにリンカーD
NAを導入して新たなAarIサイトを2か所導入したpBET131-A
arI (図18) をAarIで切断して得られる2つの大きい断片とタンデム
リピートに連結し、その後、上の実施例と同様にOGAB法により枯草菌に

において環状のプラスミドを形成させた。その結果、アデノウイルスベクターを生産するためのオールインワン構造を有するクローンの構築が確認された。

[0180] (実施例8：さらなるAAVオールインワンベクタープラスミドの構造例)

図19～24に示すAAVオールインワンベクタープラスミドも企図される。

・図19は、pGETS103-ΔAarIに基づくAAV1のRepおよびAAV6のCapを使用した構築例である。

・図20は、pGETS103-ΔAarIに基づくCAGプロモーター、AAV5のRepおよびAAV1のCapを使用した構築例である。

・図21は、pGETS103-ΔAarIに基づくEF1αプロモーター、AAV8のRepおよびAAV9のCapを使用した構築例である。

・図22は、pGETS103-ΔAarIに基づくSV40プロモーターを使用し、Rep、CapおよびHelperを異なる順序で配置した構築例である。

・図23は、pGETS131-AarIに基づくRep、CapおよびHelperを異なる順序で配置した構築例である。

・図24は、pBETS103-ΔAarIに基づくHelper遺伝子の要素を変更した（他の要素と分離してアデノウイルスE1AおよびE1Bを追加した）構築例である。

[0181] (実施例9：種々のウイルスに基づくウイルスベクタープラスミドの構築)

AAVベクタープラスミドは、HEK293以外のプロデューサー細胞（NIH3T3、HT1080、A549、HeLa、HEK293Tなど）を使用する場合には、上記の実施例の構造に加えて、さらにE1AおよびE1B遺伝子を含むように構築することができる。

[0182] 例えば、レトロウイルスベクタープラスミド、レンチウイルスベクタープラスミド、アデノウイルスウイルスベクタープラスミドの具体的な構成として、上記実施例のpGETS103ΔAarIをベースとして図25～27

が想定される。

[0183] レンチウイルスベクタープラスミド (図25)

pGETS103ΔAarlをベースに以下の核酸配列を追加してベクタープラスミドを構築する。

・CMVプロモーター、VSV-G (水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質G)、ポリA・CMVプロモーター、rev、ポリA

・5'LTR、Ψ (パッケージングシグナル配列)、RPE、PPT、CMVプロモーター、WPPE、3'LTR

・CMVプロモーター、gag、pol、RPE、ポリA

(所望の遺伝子はLTR間でプロモーターの下流に位置付けられ得る。)

[0184] レトロウイルスベクタープラスミド (図26)

pGETS103ΔAarlをベースに以下の核酸配列を追加してベクタープラスミドを構築する。

・CMVプロモーター、env、ポリA

・5'LTR、Ψ (パッケージングシグナル配列)、RPE、PPT、CMVプロモーター、WPPE、3'LTR

・CMVプロモーター、gag、pol、RPE、ポリA

(所望の遺伝子はLTR間でプロモーターの下流に位置付けられ得る。)

[0185] アデノウイルスベクタープラスミド (図27)

pGETS103ΔAarlをベースに以下の核酸配列を追加してベクタープラスミドを構築する。

・5'LTR、アデノウイルス血清型5のゲノム (E1遺伝子の部位をプロモーターおよびE1A遺伝子で置換する)、3'LTR

(E1A遺伝子に加えて、所望の遺伝子も上記または他のプロモーターの下流に位置付けられ得る。)

[0186] (実施例10: OGAB法による全ウイルスベクタープラスミドの構築)

AAVベクターの生産に関するエレメントに加え、薬剤耐性遺伝子などその他のベクタープラスミドのエレメント (ベクター部分と本明細書において

記載する) をコードするDNA断片も使用して、ウイルスベクタープラスミド全体をOGAB法により調製した。ベクター部分もOGAB法により調製することにより、ウイルスベクターの生産に直接的には関連しないベクタープラスミドの部分をより柔軟に設計できるようになる。ベクター部分を種々のベクタープラスミドに適合させると、ベクター部分に多数のエLEMENTを含める必要が生じ得るが、ベクタープラスミドごとにベクター部分を設計すれば、そのベクタープラスミドにとって不要な部分を省略できるため、ベクタープラスミドの小型化が可能になり得る。

[0187] ・OGAB用集積断片の準備

図28に示すように、ベクター領域を含む全体配列を30個に分割するように各断片を設計した(配列番号67~96)。第2~第4、第22、第23、第28、及び第30の各断片については、それぞれ配列番号97~138の配列を有する材料DNAを化学合成後、MAP法(特開2019-198236号)により準備した。具体的には、各断片を構成する一本鎖DNAを用いて、MAP法によるアセンブルにより二本鎖DNAを準備した。残りの断片については、配列番号139~184に示す各断片の番号を付したFおよびRプライマーの組み合わせを用いて、pGETS151-AAV-Helper-RC2をテンプレートとして、以下の条件によりPCR法で増幅した。1反応あたり、2 μ Lの10 $\times$ ExTaqBuffer(タカラバイオ社)、1.6 μ Lの2.5mM dNTP(タカラバイオ社)、1 μ LのテンプレートDNA(1ng)、FとRの両方のプライマーを3.2pmolずつ含む1 μ Lの溶液、及び13.3 μ Lの滅菌水を加えて、94 $^{\circ}$ Cで2分間の温度保持の後、98 $^{\circ}$ Cで20秒間、58 $^{\circ}$ Cで30秒間、及び72 $^{\circ}$ Cで1分間であるサイクルを、30サイクル行った。

[0188] ・OGAB用集積断片のベクターへのクローニング

二本鎖DNA断片を、MinElute PCR Purification Kit(キアゲン社)を用いて精製し、最終的に15 μ LのTE緩衝液(ナカライテスク社)によりカラムから溶出させた。得られたDNA溶液

の1.4 μL に0.2 μL の10 $\times$ Ex-Taq Buffer (タカラバイオ)、0.2 μL の2mM dNTP (タカラバイオ)、0.2 μL の10 $\times$ A-attachment mix (TOYOBO社)を加えて、60 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。その後、0.5 μL のpBR322- Δ Type I IS (4 ng/ μL)と2.5 μL のDNA Ligation Kit<Mighty Mix>を加えて、16 $^{\circ}\text{C}$ で1晩ライゲーション反応を行い、大腸菌JM109コンピテントセル (タカラバイオ社)を用いて形質転換を行った。37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養したカルベニシリン入りLBプレート上に出現したコロニーについて塩基配列を確認することで、それぞれの断片について正しい配列のクローンを取得した。

[0189] ・OGAB用断片の等モル混合物の調製

これらのクローンを持つ大腸菌を、2 mLのLB培地で増殖させた後、そのうちの900 μL を用いてQIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社)により、自動化システムQIAcubeを用いてプラスミドを精製し、最終的に30 μL のTE緩衝液に溶出させた。そのうちの4 μg 相当のプラスミドDNAを含む溶液に、液量が50 μL になるまで、TE緩衝液を添加した。さらにそこに、6 μL の10 $\times$ Plasmid Safe Buffer (epicentre社)、2.4 μL の25mM ATP、2 μL のPlasmid-Safe ATP-Dependent DNase (epicentre)を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた後、75 $^{\circ}\text{C}$ で30分間失活処理に付すことで、環状構造以外のDNAを分解した。その後、反応液をMinElute PCR Purification Kit (キアゲン社)を用いて精製し、最終的に15 μL のTE緩衝液 (ナカライテスク社)によりカラムから溶出した。得られたDNA溶液を、微量分光光度計Nanodrop One (ThermoFisher社)を用いて測定し、100 ng/ μL となるようにTE緩衝液を加えて希釈した。その後、微量分光光度計Lunatic (Unchained Labs社)を用いて濃度を再度測定し、正確に500 ngのDNAを分取する

際に必要なDNA体積 (μL) を小数点以下2桁まで計算し、当該体積をマイクロピペットにより分取することで、各プラスミドの等モル分取を行った。分取したDNA溶液は、その後に使用する制限酵素の種類により、各2つの1.5 mLの遠心チューブに分けてプールした。第1、第3、第4、第6、第7、第9、第10、第13、第17、第19、第20、第23、第25、第27、及び第29の各断片をクローン化するプラスミドは、制限酵素AarIで切断するためのチューブ内に、また、第2、5、8、11、12、14、15、16、18、21、22、24、26、28、及び30の各断片をクローン化するプラスミドは、制限酵素BbsIで切断するためのチューブ内に、それぞれプールした。その後、AarIで切断するチューブには、各プラスミドの分取溶液の容積の合計を1体積とした場合に、2体積の滅菌水、0.33体積の10×Buffer AarI (ThermoFisher社)、0.06体積の50×オリゴヌクレオチド (0.025 mM)、0.17体積のAarI (ThermoFisher社) を加えて、37℃で2時間反応させた。また、BbsIで切断するためのチューブ内には、各プラスミドの分取溶液の容積の合計を1体積とした場合に、2体積の滅菌水、0.33体積の10×Cut Smart Buffer (NEB)、及び0.17体積のBbsI-HFを加えて、37℃で2時間反応させた。それぞれのチューブに制限酵素反応液と等量のTE飽和フェノールを添加し、よく混合することで制限酵素を失活させた。その後、乳化した状態のフェノールとDNA溶液の混合物を1つの2 mL遠心チューブ内に統合して、15,000×gで5分間遠心し、フェノール相と水相とに分離した。上層を新しいチューブに移して、そこに50 μL のP3バッファーを加えて、900 μL のエタノールを加え、15,000×gで10分間遠心した。沈殿が失われないように上清を捨て、900 μL の70%エタノールで沈殿をリンスした後、液体部分をピペットで取り除いた。その後、再度遠心し、いまだ残っている液体を底部に集めて、当該液体をピペットで完全に取り除き、沈殿を取得した。その後、当該沈殿を30 μL のTE緩衝液に溶解した。

[0190] 低融点アガロースゲル電気泳動による電気泳動により、pBR322から切り出された約850bpの25種類の断片の等モル混合物をサイズ分画し、当該電気泳動後のゲルからDNA断片領域の切り出し及びDNA断片の精製を行って、25種類のDNA断片の混合物の精製物として、DNA溶液を得た。

[0191] ・OGAB法によるpGETS151-AAV-EGFP-WPRE-Helper-RC2の構成

得られたDNA溶液6.4 μ L(300ng)に対して5.6 μ Lの滅菌水、15 μ Lの2 $\times$ ライゲーションバッファー(15%ポリエチレングリコール6000、500mM NaCl、132mM Tris $\cdot$ HCl(pH7.6)、13.2mM MgCl₂、20mM DTT、0.2mM ATP)を添加してよく混合後、その内18 μ Lに対して2 μ LのT4 DNA Ligase(タカラバイオ)を加え、37 $^{\circ}$ Cで5時間半インキュベートした。この溶液を各10 μ Lの2本に分け、これらに枯草菌コンピテントセル100 μ Lずつを添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間ダックローターによる回転培養を行った。これにより得られた培養液を10 μ g/mLのテトラサイクリン(ナカライテスク)入りLBプレートに広げ、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

[0192] ・形質転換体のプラスミド構造確認

6株のコロニーを無作為に選択して、2mLの10 μ g/mLのテトラサイクリン入り培地で、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた菌体から、以下のよう少量のプラスミド抽出を行った。

[0193] まず、900 μ Lの菌液を1.5mLチューブにとり、6800 $\times$ gで3分間遠心し、上清をマイクロピペットで取り除いた。得られた菌体ペレットをよく懸濁化した後、10mg/mLの卵白リゾチーム(wako社)を含むP1バッファーを100 μ L添加し、ボルテックスミキサーで懸濁後に37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベーションした。そこに、200 μ LのP2バッファーを加えて転倒混和した。その後、P3バッファーを150 μ L添加し、チューブの縦軸方向に3回激しく振ることで混和した。これを15,000r

pmで5分間遠心することにより、白い沈殿と上清に分離した。上清を新しい1.5 mL遠心チューブに移し、そこに450 μ LのTE飽和フェノール（ナカライテスク社）を添加してよく混和した後、10,000 rpmで10分間遠心することにより、フェノール相と水相とに分離した。当該水相の300 μ Lを新しいチューブに移して、そこに900 μ Lのエタノールを加え、10,000 rpmで10分間遠心した。上清をマイクロピペットで取り除き、900 μ Lの70%エタノールを加え、チューブ全体をリンスした。その後、70%エタノールをマイクロピペットで取り除き、再度10,000 rpmで1分間遠心した。マイクロピペットで上清を完全に除去し、27 μ Lの30 μ g/mLのRNase A入りTE緩衝液で沈殿を溶解した。得られたプラスミド溶液8 μ Lを取り、そこに1 μ Lの10X CutSmart Buffer（NEB社）と、0.5 μ LのSacI-HF又はSfiIを添加し、37℃で15分間インキュベートし、65℃で5分間の加熱処理で前記酵素を失活させた。当該制限酵素処理物のアガロースゲル電気泳動により、制限酵素切断パターンを確認した。正しい切断パターンを示したクローンについて、全塩基配列を決定した所、pGETS151-AAV-EGFP-WPRE-Helper-RC2（図29）を構築していることを確認した。

[0194] ・オールインワンプラスミド（pGETS151-AAV-EGFP-WPRE-Helper-RC2）を使用したrAAVの作製

Triple-transfectionに使用する3つのプラスミドと同じ遺伝子を有するオールインワンプラスミドを用いてウイルス粒子生産への影響を評価した。

[0195] トランスフェクションの前日に 1×10^6 個のHEK293細胞を6well plate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% CO₂で2時間培養した。そこへTriple-transfectionではpAAV-EGFP-WPREプラスミド（図30）0.48 μ g、

pRC-mi342プラスミド（図7）0.52 μ g、pHelperプラスミド（図8）0.95 μ g、1倍量のPEI proおよびDMEM培地を混合したトランスフェクション溶液100 μ Lを添加した。Single-transfectionではpGETS151-AAV-EGFP-WPRE-Helper-RC2プラスミド（図29）1.95 μ g、1倍量のPEI proおよびDMEM培地を混合したトランスフェクション溶液100 μ Lを添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で72時間培養後、0.5M EDTA（pH8.0）を1/80容量添加し、室温で10分静置した。剥離した細胞懸濁液を回収し、180 $\times$ gで5分遠心分離して上清を完全に除去した。細胞ペレットを200 μ LのLysis buffer（2mM MgCl₂、150mM NaCl、50mM Tris、0.1% Triton（登録商標）X-100；pH8.5）で懸濁し、さらにBenzonase（25units）を添加して37 $^{\circ}$ Cで30分反応させた。その後、1.9M MgSO₄溶液を2/100容量添加し、室温で10分静置した。12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分の遠心分離によって上清を回収し、Pluronic（登録商標）F-68を終濃度0.001%で添加した。

[0196] ・rAAVの評価

上清に対してDNase I処理を30分行い、95 $^{\circ}$ C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185）および5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGAAA-3'（配列番号186）のプライマー配列を用いた。反応条件は95 $^{\circ}$ Cで10分の後、95 $^{\circ}$ C/15秒、55 $^{\circ}$ C/5秒、72 $^{\circ}$ C/30秒を40サイクル繰り返した。

[0197] 上記の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。

・6230__pAAV-CMV

TAKARAから購入した（6230__pAAV-CMV）。

・ 6230__pRC2-mi342

TAKARAから購入した(6230__pRC2-mi342)。

・ 6230__pHelper

TAKARAから購入した(6230__pHelper)。

・ SYNp204__pAAV-EGFP-WPRE

pAAV-CMVプラスミド(TAKARA:6230)を制限酵素(AflII、BamHI)で処理した。そこに以下の断片をInFusionを用いて挿入した。EGFP-WPRE断片はpGETS151-AAV-EGFP-WPRE-Helper-RC2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:プライマー配列5'-GAGCTGGTTTAGTGGATATC-3'(配列番号187)、5'-CAGGGATGCACCCGTTTAATTA-3'(配列番号188)。

[0198] Triple-transfectionおよびSingle-transfectionのそれぞれの条件で生産されたウイルスベクター量を図31に示す。ウイルスベクタープラスミド全体を設計してOGAB法により調製でき、このように作製されたウイルスベクタープラスミドからウイルスベクターが高生産されることが確認された。

[0199] (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、特許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。

[0200] 本出願は、2022年5月2日に日本国特許庁に出願された特願2022-76060号に対する優先権の利益を主張し、その内容全体が本明細書に参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0201] 本開示は、新たな構造のウイルス由来構築物プラスミドを提供し、ウイルス由来構築物プラスミドに基づくウイルス由来構築物の供給を可能とし得る。

配列表フリーテキスト

[0202] 配列番号 1 : プライマー

GGAACCCCTAGTGATGGAGTT

配列番号 2 : プライマー

CGGCCTCAGTGAGCGA

配列番号 3 : リンカーF

AGCTTGCGCAGGTGCACCTGCATGCGG

配列番号 4 : リンカーR

AGCTCCGCATGCAGGTGCACCTGCGCA

配列番号 5 : 第1-1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCAAGCTTGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGC
TCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC
GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG

配列番号 6 : 第1-2

GGTCGTTGGCGGTGAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGC
TATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAAAGCTTGATATCGATAGGAACCCCTAGTGATGGAG
TTGGCCACTCCCTCTCT

配列番号 7 : 第1-3

ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
TAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAGTGGCCACTTGGCAG
TACATCAAGTGTATCAT

配列番号 8 : 第1-4

GTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAGGTCATGTACTGGGCA
TAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGA
TGTAAGTGGGCA

配列番号 9 : 第1-5

GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
ATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCA
CCAAAATCAACGGGACT

配列番号 10 : 第1-6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATCACCTGCGATCCTGGGCCCTTAAGGATATCCACTAAACCAGCTC
TGCTTATATAGACCTCCACCGTACACGCCTACGCCCATTGCGTCAATGGGCGGAGTTGTTACGAC
ATTTTGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAAAC

配列番号 11 : 第3-1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATC
TTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGG
ATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTT

配列番号 12 : 第3-2

AGGGAGCAGTGGTTCACGCCTGTAATCCAGCAATTTGGGAGGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATT
AGGAGTTGGAGACCAGCCTGGCCAATATGGTGAAACCCCGTCTCTACCAAAAAACAAAAATTAGCTGA
GCCTGGTCATGC

配列番号 13 : 第3-3

GGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCTGTCTTATCGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGG
AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCC
CGGGCTTTGCCCGG

配列番号 14 : 第3-4

GGAAGCTGTAGAGCTGTTCTGGTTGCGACGCAGGGTGGGCTGTACCTGGGACTGTTAAGCATGGAGT
TGGGTACCGGATCTGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCG
GGCGTCGGGCGACC

配列番号 15 : 第3-5

CGCAACCAGGAACAGCTCTACAGCTTCCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCGCAGCCACAGTGCGCAG
ATTAGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCACTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGGAGACACTTTCAA
TAAAGGCAAATGT

配列番号 16 : 第3-6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATCACCTGCGATCTGTCCCTGCCAGTGGCGCATAGCGATGCGCGGC
AGAACCCCTTTGATTTTTAAACGGCGCAGACGGCAAGGGTGGGGGTAAATAATCACCCGAGAGTGATC
AAATAAAAACATTTGCCTTTATTGAAAGTGTCTCCT

配列番号 17 : 第16-1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGGTCTCGCAGGTACATCTACGGATTACGTCGACGTTTAAAC
CATATGAGCGGCCCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGAAGATCAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTA
TTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCTGATCTGCGCAGCCGCC

配列番号 18 : 第16-2

CAGAATCTGGCGGCAACTCCCATTCCTTCTCGGCCACCCAGTTCACAAAGCTGTCAGAAATGCCGGGCA
GATGCTCGTCAAGGTCGCTGGGGACCTTAATCACAATCTCGTAAAACCCCGGCATGGCGGCTGCGCAGA
TCAGAAGTTCCTATAC

配列番号 19 : 第16-3

AGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCG
TGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTT
TCTTTGTGCAAT

配列番号 20 : 第16-4

CCGCGGTAAATTCTCTGAATCAGTTTTTCGCGAATCTGACTCAGGAAACGTCCCAAAACCATGGATTT
ACCCCGGTGGTTTCCACGAGCACGTGCATGTGGAAGTAGCTCTCTCCCTTCTCAAATTGCACAAAGAAA
AGGGCCTCCGGGGCCT

配列番号 21 : 第16-5

CGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTCACAAA
GACCAGAAATGGCGCCGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCC
CAAAACCCAGCCTGAG

配列番号 22 : 第16-6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATGGTCTCCCTGCTCCTGCGTCTGCGACACGTGCGTCAGATGCTGC
GCCACCAACCGTTTACGCTCCGTGAGATTCAAACAGGCGCTTAAATACTGTTCCATATTAGTCCACGCC
CACTGGAGCTCAGGCTGGGTTTTGGGAGCAAGTAAT

配列番号 2 3 : 第1-F

TAGCACCTGCATGCAAGCTTGCCTGCAGGCA

配列番号 2 4 : 第1-R

TAGCACCTGCGCATCTGGGCCCTTAAGGATATC

配列番号 2 5 : 第2-F

TAGGGTCTCGCCAGCCGGCC

配列番号 2 6 : 第2-R

TAGGGTCTCCTTCCCAATAGACCCCGCA

配列番号 2 7 : 第3-F

TAGCACCTGCATGCGGAACCAAGCTGGAGTG

配列番号 2 8 : 第3-R

TAGCACCTGCGCATTGTCCCTGCCAGTGG

配列番号 2 9 : 第4-F

TAGGGTCTCGGACACGTTGCCGATACTGGT

配列番号 3 0 : 第4-R

TAGGGTCTCCCACGAGCCCACGG

配列番号 3 1 : 第5-F

TAGCACCTGCATGCCGTGGTGCTTGTAGGTTAC

配列番号 3 2 : 第5-R

TAGCACCTGCGCATGAGCGCGGACGC

配列番号 3 3 : 第6-F

TAGGGTCTCGGCTCGGGGTGGT

配列番号 3 4 : 第6-R

TAGGGTCTCCTTGCCGCGGTTTCTC

配列番号 3 5 : 第7-F

TAGCACCTGCATGCGCAAACGCTCTGCAACAAGA

配列番号 3 6 : 第7-R

TAGCACCTGCGCATGTCCGCCAGGTGC

配列番号 3 7 : 第8-F

TAGGGTCTCGGGACATTATCTTCCCGAAC

配列番号 3 8 : 第8-R

TAGGGTCTCCGTGGCGGCGGC

配列番号 3 9 : 第9-F

TAGCACCTGCATGCCACCCACGGACGA

配列番号 4 0 : 第9-R

TAGCACCTGCGCATGAGGGAGCGCAGAGA

配列番号 4 1 : 第10-F

TAGGGTCTCGCCTCACCCGCAGCTG

配列番号 4 2 : 第10-R

TAGGGTCTCCGACTAAAAATGACGTAACGGTTAAAGTC

配列番号 4 3 : 第11-F

TAGCACCTGCATGCAGTCCTATATATACTCGCTCTGTACT

配列番号 4 4 : 第11-R

TAGCACCTGCGCATGGAGCTATGCTAACCAGC

配列番号 4 5 : 第12-F

TAGGGTCTCGCTCCGAGTATGCGTGTCA

配列番号 4 6 : 第12-R

TAGGGTCTCCGTAGTTGTAGTATATCCACTCTCTCA

配列番号 4 7 : 第13-F

TAGCACCTGCATGCCTACTACACAGAGCGAGCT

配列番号 4 8 : 第13-R

TAGCACCTGCGCATGCACAGCACCACAATATTGTTCA

配列番号 4 9 : 第14-F

TAGCACCTGCATGCGTGCTGCAGTTACTGTGCT

配列番号 5 0 : 第14-R

TAGCACCTGCGCATTAGCGAGGTAAGCACTTACTCT

配列番号 5 1 : 第15-F

TAGGGTCTCGGCTAGTTTCTGTGGATTCACTAGA

配列番号 5 2 : 第15-R

TAGGGTCTCCCCTGGACATCCAGGTGA

配列番号 5 3 : 第16-F

TAGGGTCTCGCAGGTACATCTACGGATTACGT

配列番号 5 4 : 第16-R

TAGGGTCTCCCTGCTCCTGCGTCTG

配列番号 5 5 : 第17-F

TAGCACCTGCATGCGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCC

配列番号 5 6 : 第17-R

TAGCACCTGCGCATGGTGAGTTCAAATTTGAACATCCG

配列番号 5 7 : 第18-F

TAGGGTCTCGCACCCGCCGTCTG

配列番号 5 8 : 第18-R

TAGGGTCTCCCGAGGGCCGCG

配列番号 5 9 : 第19-F

TAGCACCTGCATGCCTCGAGCACGACAAAGC

配列番号 6 0 : 第19-R

TAGCACCTGCGCATTGACTTGAATGTTAAAGAGCTTGAAGTTGA

配列番号 6 1 : 第20-F

TAGGGTCTCGGTCAAAGAGGTCACGCAGA

配列番号 6 2 : 第20-R

TAGGGTCTCCTTGTTGTCCTGATTTCTCTTC

配列番号 6 3 : 第21-F

TAGCACCTGCATGCCCAATCCCGTGGCTAC

配列番号 6 4 : 第21-R

TAGCACCTGCGCATGCATATGATACACTTGATGTACTGC

配列番号 6 5 : 第22-F

TAGGGTCTCGATGCCAAGTACGCCCCCT

配列番号 6 6 : 第22-R

TAGGGTCTCCCTCCCGGGCTGTAGT

配列番号 6 7 : 断片1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT
TATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTTCAAGAATTCTCATG
TTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC
GGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTATCGATATCAAGCTTTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG
CCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC
CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTT
TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCA
TTGACGGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 6 8 : 断片2

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA
GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGGATATCGTATACGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
GTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCT
GCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGA
CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT
CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG
CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTA
CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCG

CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCG
CCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA
GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCACTA

配列番号 69 : 断片3

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCAAGTAAGTATACCGATAATCAACCTCTGG
ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG
CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGATAAAT
CCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT
TTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTT
TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGC
TGTGGGCACTGACAATTCGTGGTGTGTGCGGGAAGCTGACGTCCTTTCATGGCTGCTCGCCTGTG
TTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTC
CTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA
TCTCCCTTTGGGCGCCTCCCGCATCGGTTAATTAACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTG
CCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGCCTAATAAAATTAAGTTGCATC
ATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAA
GTTGGGAAGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCACTA

配列番号 70 : 断片4

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCT
ATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTCAAG
CGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTT
TGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGA
TCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTA
TCGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
GGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
CAGCTGCCTGCAGGCAGATCCCTCGAGGGGTACCAACTCCATGCTTAACAGTCCCAGGTACAGCCC
ACCTGCGTCGCAACCAGGAACAGCTCTACAGCTTCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCCGACGCCAC

AGTGCGCAGATTAGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCACTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGGAGA
CACTTTCAATAAAGGCAAATGTTTTATTGTACACTCTCGGGTGATTATTTACCCCCACCCTTGCCG
TCTGCGCGGTTTAAAAATCAAAGGGGTTCTGCCGCGCATCGCTATGCCGCACTGGCAGGGACACGTTGC
GATACTGGTGGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 1 : 断片5

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGGTGTTTAGTGCTCCACTTAAACTCAGGCACAA
CCATCCGCGGCAGCTCGGTGAAGTTTTCACTCCACAGGCTGCGCACCATCACCACGCGTTTAGCAGGT
CGGGCGCCGATATCTTGAAGTCGCAGTTGGGGCCTCCGCCCTGCGCGCGCAGTTGCGATACACAGGGT
TGCAGCACTGGAACACTATCAGCGCCGGGTGGTGCACGCTGGCCAGCACGCTCTTGTCGGAGATCAGAT
CCGCGTCCAGGTCCTCCGCGTTGCTCAGGGCGAACGGAGTCAACTTTGGTAGCTGCCTTCCAAAAAGG
GTGCATGCCAGGCTTTGAGTTGCACTCGCACCGTAGTGGCATCAGAAGGTGACCGTGCCCGGTCTGGG
CGTTAGGATACAGCGCTGCATGAAAGCCTTGATCTGCTTAAAGCCACCTGAGCCTTTGCGCCTTCAG
AGAAGAACATGCCGCAAGACTTGCCGAAAACTGATTGGCCGGACAGGCCGCGTCATGCACGCAGCACC
TTGCGTCGGTGTGGAGATCTGCACCACATTTGGCCCCACCGGTTCTTCACGATCTTGGCCTTGCTAG
ACTGCTCCTTCAGCGCGCGCTGCCGTTTTGCTCGTCACATCCATTTCAATCACGTGCTCCTTATTTA
TCATAATGCTCCCGTGTAGACACTTAAGCTCGCCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACGCGC
AGCCCGTGGGCTCGTGGTGCTTGTAGGTTACCTCTGCAAACGACTGCAGGTACGCCTGCAGGAATCGCC
CCATCGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 2 : 断片6

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCATCATCGTCACAAAGGTCTTGTTGCTGGT
GAAGGTCAGCTGCAACCCGCGGTGCTCCTCGTTTAGCCAGGTCTTGCATACGGCCGCCAGAGCTTCCAC
TTGGTCAGGCAGTAGCTTGAAGTTTGCTTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCATCAACGCGCG
CGCAGCCTCCATGCCCTTCTCCACGCAGACAGATCGGCAGGCTCAGCGGTTTTATACCGTGCTTTC
ACTTTCCGCTTCACTGGACTCTTCCTTTTCTCTTGCGTCCGCATACCCGCGCCACTGGGTGCTCTTC
ATTCAGCCGCCGCACCGTGCGCTTACCTCCCTTGCCGTGCTTGATTAGCACCGGTGGGTTGCTGAAACC
CACCATTTGTAGCGCCACATCTTCTTTCTTCTCGCTGTCCACGATCACCTCTGGGGATGGCGGGCG
CTCGGGCTTGGGAGAGGGGCGCTTCTTTTTCTTTTGGACGCAATGGCCAAATCCGCCGTCGAGGTGCA
TGGCCGCGGGCTGGGTGTGCGCGGCACCAGCGCATCTTGTCAGAGTCTTCTCGTCTCGGACTCGAG

ACGCCGCTCAGCCGCTTTTTTGGGGCGCGCGGGAGGCGGCGGCGACGGCGACGGGGACGACACGTC
CTCCATGGTTGGTGGACGTGCGCGCGACCGCGTCCGCGCTCGGGGTGGTTTCGCGCTGCTCCTCTTC
CCGACTGGCCATTTCTTCTCTATAGGCAGAAAAAGATCATGGAGTCAGTCGAGAAGGAGGACAGCCT
AGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAAGTA

配列番号 7 3 : 断片7

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCCTAACCGCCCCCTTTGAGTTCGCCACCAC
CGCTCCACCGATGCCGCCAACGCGCTACCACCTTCCCCGTCGAGGCACCCCCGCTTGAGGAGGAGGA
AGTGATTATCGAGCAGGACCCAGGTTTTGTAAGCGAAGACGACGAGGATCGCTCAGTACCAACAGAGGA
TAAAAAGCAAGACCAGGACGACGACAGAGGCAAACGAGGAACAAGTCGGGCGGGGGACCAAAGGCATGG
CGACTACCTAGATGTGGGAGACGACGTGCTGTTGAAGCATCTGCAGCGCCAGTGCGCCATTATCTGCGA
CGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGTCCCCCTGCCATAGCGGATGTCAGCCTTGCTACGAACGCCACCT
GTTCTCACCGCGGTACCCCCAAACGCCAAGAAAACGGCACATGCGAGCCCAACCCGCGCTCAACTT
CTACCCCGTATTTGCCGTGCCAGAGGTGCTTGCCACCTATCACATCTTTTTCCAAAAGTGAAGATACC
CCTATCCTGCCGTGCCAACCGCAGCCGAGCGGACAAGCAGCTGGCCTTGCGGCAGGGCGCTGTCATACC
TGATATGCCTCGCTCGACGAAGTGCCAAAAATCTTTGAGGGTCTTGACGCGACGAGAAACGCGCGGC
AAACGCTCTGCAACAAGAAAACAGCGAAAATGAAAGTCACTGTGGAGTGCTGGTGGAAGTTGAGGGTGA
CAACGCGCGCCTAGCCGTGCTGAAACGCGAGCATCGAGGTACCCACTTTGCCTACCCGGCACTTAACCT
ACCCCCAAGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAAGTA

配列番号 7 4 : 断片8

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACCAAGGTTATGAGCACAGTCATGAGCGAGCTGA
TCGTGCGCCGTGCACGACCCCTGGAGAGGGATGAAACTTGCAAGAACAACCGAGGAGGGCCTACCCG
CAGTTGGCGATGAGCAGCTGGCGCGCTGGCTTGAGACGCGCGAGCCTGCCGACTTGAGGAGCGACGCA
AGCTAATGATGGCCGAGTGCTTGTTACCGTGAGCTTGAGTGCATGCAGCGGTTCTTTGCTGACCCGG
AGATGCAGCGCAAGCTAGAGGAAACGTTGCACTACACCTTTGCCAGGGCTACGTGCGCCAGGCCTGCA
AAATTTCAACGTGGAGCTCTGCAACCTGGTCTCCTACCTTGGAATTTGCACGAAAACCGCCTCGGGC
AAAACGTGCTTCATTCCACGCTCAAGGGCGAGGCGCGCCGCGACTACGTCCGCGACTGCGTTTACTTAT
TTCTGTGCTACACCTGGCAAACGGCCATGGGCGTGTGGCAGCAATGCCTGGAGGAGCGCAACCTAAAGG
AGCTGCAGAAGCTGCTAAAGCAAACTTGAAGGACCTATGGACGGCCTTCAACGAGCGCTCCGTGGCCG

CGCACCTGGCGGACATTATCTTCCCCGAACGCCTGCTTAAACCCTGCAACAGGGTCTGCCAGACTTCA
CCAGTCAAAGCATGTTGCAAACTTTAGGAACTTTATCCTAGAGCGTTCAGGAATTCTGCCCCGACCT
GCTGTGCGCTTCTAGCGACTTTGTGCCCATTAAGTACCGTGAATGCCCTCCGCCGCTTTGGGGTCACT
GCTACCTTCGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 5 : 断片9

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCTTCTGCAGCTAGCCAACTACCTTGCCTAC
CACTCCGACATCATGGAAGACGTGAGCGGTGACGGCCTACTGGAGTGCTACTGTCGCTGCAACCTATGC
ACCCCGCACCGCTCCCTGGTCTGCAATTCGCAACTGCTTAGCGAAAGTCAAATTATCGGTACCTTTGAG
CTGCAGGGTCCCTCGCCTGACGAAAAGTCCGCGGCTCCGGGGTTGAACTCACTCCGGGGCTGTGGACG
TCGGCTTACCTTCGCAAATTTGTACCTGAGGACTACCACGCCCACGAGATTAGTTCTACGAAGACCAA
TCCCGCCCGCCAAATGCGGAGCTTACCGCTGCGTCATTACCCAGGGCCACATCCTTGCCAATTGCAA
GCCATCAACAAAGCCCGCCAAGAGTTTCTGCTACGAAAGGGACGGGGGTTTACCTGGACCCCCAGTCC
GGCGAGGAGCTCAACCAATCCCCCGCCGCCGAGCCCTATCAGCAGCCGCGGGCCCTTGCTTCCCAG
GATGGCACCCAAAAAGAAGCTGCAGCTGCCGCCGCCGCCACCCACGGACGAGGAGGAATACTGGGACAG
TCAGGCAGAGGAGGTTTTGGACGAGGAGGAGGAGATGATGGAAGACTGGGACAGCCTAGACGAAGCTTC
CGAGGCCGAAGAGGTGTGACGAAACACCGTCACCCTCGGTGCGATTCCCCTCGCCGGCGCCCCAGAA
ATTGGCAACCGTTCCAGCATCGCTACAACCTCCGCTCCTCAGGCGCCGCCGGCACTGCCTGTTCCGG
ACCGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 6 : 断片10

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGACCAACCGTAGATGGGACACCACTGGAA
CCAGGGCCGGTAAGTCTAAGCAGCCGCCGCCGTTAGCCCAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCT
CGTGGCGCGGGCACAAGAACGCCATAGTTGCTTGCTTGCAAGACTGTGGGGGAACATCTCCTTCGCCC
GCCGCTTTCTTCTCTACCATCACGGCGTGGCCTTCCCCGTAACATCCTGCATTACTACCGTCATCTCT
ACAGCCCCTACTGCACCGGGCGGAGCGGCAGCGGCAGCAACAGCAGCGGTACACAGAAGCAAAGGCGA
CCGGATAGCAAGACTCTGACAAAGCCCAAGAAATCCACAGCGGGCGGAGCAGCAGGAGGAGGAGCGCTG
CGTCTGGCGCCCAACGAACCGTATCGACCGCGAGCTTAGAAATAGGATTTTTCCCACTCTGTATGCT
ATATTTCAACAAAGCAGGGGCCAAGAACAAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGCTCCCTCACC
CGCAGCTGCCTGTATCAGAAAAGCGAAGATCAGCTTCGGCGCACGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTCTTC

AGCAAATACTGCGCGCTGACTCTTAAGGACTAGTTTCGCGCCCTTTCTCAAATTTAAGCGCGAAACTA
CGTCATCTCCAGCGGCCACACCCGGCGCCAGCACCTGTCGTCAGCGCCATTATGAGCAAGGAAATTCCTC
ACGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATGGGACTTGGCGCTGGAGCTGCCCAAGACTACTCAACC
CGAATAAACTACGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 7 : 断片11

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACTACATGAGCGCGGACCCACATGATATCCCG
GGTCAACGGAATCCGCGCCACCGAAACCGAATTCTCCTCGAACAGGCGCTATTACCACCACACCTCG
TAATAACCTTAATCCCGTAGTTGGCCCGCTGCCCTGGTGTACCAGGAAAGTCCCGCTCCACCACTGT
GGTACTTCCCAGAGACGCCAGGCCGAAGTTCAGATGACTAACTCAGGGGCGCAGCTTGCGGGCGGCTT
TCGTCACAGGGTGCAGTCCCGGGGCTTTTAGGGCGGAGTAAGTTCATGATGATTGGGAATTGTAGTTT
TTTTAAATGGGAAGTGACGTATCGTGGGAAAACGGAAGTGAAGATTTGAGGAAGTTGTGGGTTTTTTG
GCTTTCGTTTCTGGGCGTAGGTTGCGGTGCGGTTTTCTGGGTGTTTTTTGTGGACTTTAACCGTTACGT
CATTTTTTAGTCCTATATACTCGCTCTGTACTTGGCCCTTTTTTACACTGTGACTGATTGAGCTGGTG
CCGTGTCGAGTGGTGTTTTTAATAGTTTTTTTACTGGTAAGGCTGACTGTTATGGCTGCCGCTGTGG
AAGCGCTGTATGTTGTTCTGGAGCGGGAGGGTGCTATTTTGCCTAGGCAGGAGGGTTTTTCAGGTGTTT
ATGTGTTTTTCTCTCCTATTAATTTTGTATACCTCCTATGGGGGCTGTAATGTTGTCTCTACGCTGC
GGGTATGATTCCCCGGGCTATTTCCGTGCTTTTTAGCACTGACCGATGTTAACCAACCTGGAGTCT
TCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 7 8 : 断片12

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACCTGATGTGTTTACCGAGTCTTACATTATGACT
CCGGACATGACCGAGGAACTGTCGGTGGTGCTTTTTAATCACGGTGACCAAGTTTTTTACGGTCACGCC
GGCATGGCCGTAGTCCGTCTTATGCTTATAAGGGTTGTTTTCTGTGTGAAGACAGGCTTCTAATGTT
TAAATGTTTTTTTTTTGTTATTTTATTTTGTGTTAATGCAGGAACCCGCAGACATGTTTGAGAGAAA
AATGGTGTCTTTTTCTGTGGTGGTTCCGGAACCTTACCTGCCTTTATCTGCATGAGCATGACTACGATGT
GCTTGCTTTTTTGCAGGAGGCTTTCCTGATTTTTTGAAGCAGCACCTTGCATTTTATCGCCGCCCAT
GCAACAAGCTTACATAGGGGCTACGCTGGTTAGCATAGCTCCGAGTATGCGTGTGATAATCAGTGTGGG
TTCTTTTGTGATGGTTCCTGGCGGGGAAGTGGCCGCGCTGGTCCGTGCAGACCTGCACGATTATGTTCA
GCTGGCCCTGCGAAGGGACCTACGGGATCGCGGTATTTTTGTTAATGTTCCGCTTTTGAATCTTATACA

GGTCTGTGAGGAACCTGAATTTTTGCAATCATGATTCGCTGCTTGAGGCTGAAGGTGGAGGGCGCTCTG
GAGCAGATTTTTACAATGGCCGGACTTAATATTCGGGATTTGCTTAGAGACATATTGATAAGGTGGCGA
GATGAAAATTATTTGGGCATGGTTGAAGGTGCTGGAATGTTTATAGAGGAGATTCACCCTGAAGGGTTT
AGCCTTTACGTCCGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 79 : 断片13

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGTCCACTTGACGTGAGGGCAGTTTGCCTT
TTGGAAGCCATTGTGCAACATCTTACAAATGCCATTATCTGTTCTTTGGCTGTAGAGTTTGACCACGCC
ACCGGAGGGGAGCGCGTTCACCTTAATAGATCTTCATTTGAGGTTTTGGATAATCTTTGGAATAAAAA
AAAAAAACATGGTTCTTCCAGCTCTTCCCGCTCCTCCCGTGTGTGACTCGCAGAACGAATGTGTAGGT
TGGCTGGGTGTGGCTTATTCTGCGGTGGTGGATGTTATCAGGGCAGCGCGCATGAAGGAGTTTACATA
GAACCCGAAGCCAGGGGGCGCTGGATGCTTTGAGAGAGTGGATATACTACAACACTACTACACAGAGCGA
GCTAAGCGACGAGACCGGAGACGCAGATCTGTTTGTACGCGCCGCACCTGGTTTTGCTTCAGGAAATAT
GACTACGTCCGGCGTTCCATTTGGCATGACACTACGACCAACACGATCTCGTTGTCTCGGCGCACTCC
GTACAGTAGGGATCGCCTACCTCCTTTTGAGACAGAGACCCGCGCTACCATACTGGAGGATCATCCGCT
GCTGCCCAATGTAACACTTTGACAATGCACAACGTGAGTTACGTGCGAGGTCTTCCCTGCAGTGTGGG
ATTTACGCTGATTCAGGAATGGGTTGTTCCCTGGGATATGGTTCTGACGCGGGAGGAGCTTGTAATCCT
GAGGAAGTGTATGCACGTGTGCCTGTGTTGTGCCAACATTGATATCATGACGAGCATGATGATCCATGG
TTACGGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 80 : 断片14

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGATACGAGTCCTGGGCTCTCCACTGTCATTGTTCC
AGTCCCGGTTCCCTGCAGTGCATAGCCGGCGGGCAGGTTTTGGCCAGCTGGTTTAGGATGGTGGTGGAT
GGCGCCATGTTTAATCAGAGGTTTATATGGTACCGGGAGGTGGTGAATTACAACATGCCAAAAGAGGTA
ATGTTTATGTCCAGCGTGTATGAGGGGTGCCACTTAATCTACCTGCGCTTGTGGTATGATGGCCAC
GTGGGTTCTGTGGTCCCCGCCATGAGCTTTGGATACAGCGCCTTGCACTGTGGGATTTTGAACAATATT
GTGGTGCTGTGCTGCAGTTACTGTGCTGATTTAAGTGAGATCAGGGTGCGCTGCTGTGCCCGGAGGACA
AGGCGTCTCATGCTGCGGGCGGTGCGAATCATCGCTGAGGAGACCACTGCCATGTTGTATTCTGCAGG
ACGGAGCGGCGGGCAGCAGTTTATTCGCGCGCTGCTGCAGCACCACCGCCCTATCCTGATGCACGAT
TATGACTCTACCCCATGTAGGCGTGACTTCCCTTCGCCGCCCGTTGAGCAACCGCAAGTTGGACAG

CAGCCTGTGGCTCAGCAGCTGGACAGCGACATGAACTTAAGCGAGCTGCCCGGGAGTTTATTAATATC
ACTGATGAGCGTTTGGCTCGACAGGAAACCGTGTGGAATATAACACCTAAGAATATGTCTGTTACCCAT
GATATGATGCTTTTTAAGGCCAGCCGGGGAGAAAGGACTGTGTACTCTGTGTGTTGGGAGGGAGGTGGC
AGGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 1 : 断片15

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGCAGGTTGAATACTAGGTTCTGTGAGTTTGAT
TAAGGTACGGTGATCAATATAAGCTATGTGGTGGTGGGCTATACTACTGAATGAAAAATGACTTGAAA
TTTTCTGCAATTGAAAAATAAACACGTTGAAACATAACATGCAACAGGTTACGATTCTTTATTCCTGG
GCAATGTAGGAGAAGGTGTAAGAGTTGGTAGCAAAAGTTTCAGTGGTGTATTTTCCACTTTCCAGGAC
CATGTAAAAGACATAGAGTAAGTGCTTACCTCGCTAGTTTCTGTGGATTCACTAGAATCGATGTAGGAT
GTTGCCCTCCTGACGCGGTAGGAGAAGGGGAGGTTGCCCTGCATGTCTGCCGCTGCTCTTGCTCTTG
CGCTGCTGAGGAGGGGGGCGCATCTGCCGAGCACC GGATGCATCTGGGAAAAGCAAAAAGGGGCTCG
TCCCTGTTTCCGGAGGAATTTGCAAGCGGGTCTTG CATGACGGGGAGGCAAACCCCGTTCCGGCAG
TCCGGCCGGCCCGAGACTCGAACCGGGGGTCTGCGACTCAACCCTTGAAAAATAACCCTCCGGCTACA
GGGAGCGAGCCACTTAATGCTTTGCTTTCCAGCCTAACCGCTTACGCCGCGCGGCCAGTGGCCAAA
AAAGCTAGCGCAGCAGCCGCCGCGCTGGAAGGAAGCCAAAAGGAGCGCTCCCCGTTGTCTGACGTG
CACACCTGGGTTGACACGCGGGCGGTAACCGCATGGATCACGGCGGACGGCCGGATCCGGGGTTGAA
CGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 2 : 断片16

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGAACCCCGGTCGTCCGCCATGATACCCTTGCGA
ATTTATCCACCAGACCACGGAAGAGTGCCCGCTTACAGGCTCTCCTTTTGACGGTCTAGAGCGTCAAC
GACTGCGCACGCCTCACC GGCCAGAGCGTCCCGACCATGGAGCACTTTTGGCGCTGCGCAACATCTGG
AACCGCGTCCGCGACTTTCCGCGCGCCTCCACCACCGCCGCGGCATCACCTGGATGTCCAGGTACATC
TACGGATTACGTGACGTTTAAACCATATGAGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGAAGATCA
GAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTGATCTGCGCAGCCGCCATGC
CGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACA
GCTTTGTGAAGTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGA
TTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGA

GTAAGGCCCCGAGGCCCTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGC
TCGTGGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTCGCGAAAACTGA
TTCAGAGAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATG
GCGCCGGAGGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 3 : 断片 17

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGGAGGCGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGC
TACATCCCAATTACTTGCTCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAG
TATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCG
CAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAA
CTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATC
CAGGAGGACCAGGCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAATCAAGGTGCC
TTGGACAATGCGGGAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCC
GTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCAATATGCG
GCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGCCT
GCAACTACCGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAAC
TGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGAAG
ATGACCGCCAAGGTGCTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAA
TGCAAGTCCTCGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 4 : 断片 18

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCG
TCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTGAACACCAGCAGCCGT
TGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGC
AGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCA
AAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCG
AGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACA
AATGTTCTCGTCAGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGA
ATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAAC
CCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAG

ACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTT
AAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGA
CAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCACCACCACCAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCGAG
TCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 5 : 断片19

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTGGGTACAA
GTACCTCGGACCTTCAACGGAAGTCTGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGCCCTCGA
GCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGA
CGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCA
GGCGAAAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAA
GAGGCCGGTAGAGCACTCTCTGTGGAGCCAGACTCCTCTCGGGAACCGGAAAGCGGGCCAGCAGCC
TGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCGAGCCTCTCGG
ACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCATGGC
AGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAATTGGCATTGCGATTCCACATGGAT
GGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACCTCTACAA
ACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTA
TTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACTG
GGGATTCCGACGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 6 : 断片20

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCGACCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTT
AACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACG
GTTCAAGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTC
CCGCCGTTCCAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAG
GCAGTAGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAAC
TTTACCTTCAGCTACACTTTTGAAGACGTTTCTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGAC
CGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAAACACTCCAAGTGAACC
ACCACGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCGAGTGACATTGGGACCAGTCTAGGAACTGG
CTTCTTGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATAC

TCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCCATG
GCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTCTCAGAGCGGGTTCTCATCTTTGGAAGCAAGGC
TCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAAT
CCCGTGGGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 7 : 断片21

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACC
AACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATG
GTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACAT
TTTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTGCGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAAC
ACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGGGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTAC
TCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCC
GAAATTCAGTACACTTCCAACCTACAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCGTG
TATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAA
ACCGTTTAATTGTTTTAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGTATTTCTTCTTATCTAGTTTCCATGGCTAC
TAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA
TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT
GGGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 8 8 : 断片22

TAGAGGCAAGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA
CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGG
GAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCA
AATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGATCCTGCC
ATTGCATCCTTCTCTGCAGACTAAGATGGAGTTCCTGAACCAAGACCGCTTGCTGGCCAACCTGTGAAA
CTGGGCTCAAGGTGAGGGTGCTATCTGTGATTGAGGGACATGGTTAATGGAATTGTCTCACACAGAAA
TCGCACCCGTACCTTGGCCTACTTATCACCACCCCAAACAGAGGAACACGCCTTCTCCAGCCACAGCC
TATGGAAGGGCCTTCAGCTGCTGTGGCCCCGAGGTAAGCTTGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGA

GACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAACGCACGGTGTGGGTC
GTTGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAGCCCGGGGTTTAAACAGCGGGCGGAGGGG
TGGAGTCGTGACGTGAATTACGTCATAGGGTTAGGGAGGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTGTTG
CGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 89 : 断片23

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCTTGCGACATTTTGGACACCATGTGGTCTC
GCTGGGGGGGGGGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGAGCGCTG
GCGCGCTCCGTCGACGAGCTTAAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCG
TGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGC
TTGGTTATGCCGGTACTGCCGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTAT
GGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGAC
CGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCG
ACCACACCCGTCCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGCCGGGCATCACCGGCCACAGGTGCG
GTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGC
GCTTGTTTCGGCGTGCGGTATGGTGGCAGGCCCGTGCGCGGGGACTGTTGGCGGCCATCTCCTTGAT
GCACCATTCCTTGCGCGGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAG
TCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCG
CGGGGCATGACGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 90 : 断片24

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGATGACTAGATCCACCTGCACGTAAAAGGCCTTCT
TGGCCGCCCTTCCCGGTCGATATGAACAGCTTATTTACATAATTCACGTTATTGGTAGTTATAAATGAA
ATTCCTAATATCGGTTATGAAGTGAAATTGAATTTCTACTTGATCTTTCTCTATTTTTGTAAATAA
AATTAAGAATATTTAAATATTCAATGATTCAATTTTGCAGAAATCGGAGGAAGAAGATATATGAAAAC
ATTTAACATTTCTCAACAAGATCCCCCATATTGTTGTATAAGTGATGAAATACTGAATTTAAACTTA
GTTTATATGTGGTAAATGTTTTAATCAAGTTTAGGAGGAATTAATTATGAAGTGAATGAATAATGAA
TGTAACAGGGTCAATTAAGAGGGAAGCGTATCATTAAACCTATAAACTACGTCTGCCCTCATTATT
GGAGGGTGAAATGTGAATACATCCTATTCACAATCGAATTTACGACACAACCAATTTTAATTTGGCTT
TGCATTTTATCTTTTTTAGCGTATTAATGAAATGGTTTTGAACGTCTCATTACCTGATATTGCAAAT

GATTTTAATAAACACCAGCGAGTACAACTGGGTGAACACAGCCTTTATGTTAACCTTTCCATTGGA
ACAGCTGTATATGGAAAGCTATCTGATCAATTAGGCATCAAAGGTTACTCCTATTTGGAATTATAATA
AATTGTTTCGGGTCGGTAATTGGGTTTGTGGCCATTCTTTCTTTTCCTTACTTATTATGGCTCGAGTC
TTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCGTA

配列番号 9 1 : 断片25

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGCTCGTTTTATTCAAGGGGCTGGTGCAGCT
GCATTTCCAGCACTCGTAATGGTTGTAGTTGCGCGCTATATCCAAAGGAAAATAGGGGTAAAGCATTT
GGTCTTATTGGATCGATAGTAGCCATGGGAGAAGGAGTCGGTCCAGCGATTGGTGGAATGATAGCCCAT
TATATTCATTGGTCCTATCTTCTACTCATTCTATGATAACAATTATCACTGTTCCGTTTCTTATGAAA
TTATTAAGAAAGAAGTAAGGATAAAAGGTCATTTTGATATCAAAGGAATTATACTAATGTCTGTAGGC
ATTGATTTTTTTATGTTGTTTACAACATCATATAGCATTTCTTTTCTTATCGTTAGCGTGCTGTCATTC
CTGATATTTGTAAACATATCAGGAAAGTAACAGATCCTTTTGTTGATCCCGGATTAGGGAAAAATATA
CCTTTTATGATTGGAGTTCTTTGTGGGGGAATTATATTTGGAACAGTAGCAGGGTTTGTCTCTATGGTT
CCTTATATGATGAAAGATGTTCAACAGCTAAGTACTGCCGAAATCGGAAGTGTAATTATTTCCCTGGA
ACAAAGAGTGTCATTATTTTCGGCTACATTGGTGGGATACTTGTTGATAGAAGAGGTCCTTTATACGTG
TTAAACATCGGAGTTACATTTCTTTCTGTTAGCTTTTTAACTGCTTCCTTTCTTTAGAAACAACATCA
TGGTTCATGACAATTATAATCGTATTTGTTTTAGGTGGGCTTTCGTTACCAAAACAGTTATATCAACA
ATTGTTTCAAGTAGCTTGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCGTA

配列番号 9 2 : 断片26

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGCTTGAAACAGCAGGAAGCTGGTGCTGGAATGA
GTTTGCTTAACCTTACCAGCTTTTTATCAGAGGGAACAGGTATTGCAATTGTAGGTGGTTTATTATCCA
TACCCTTACTTGATCAAAGGTTGTTACCTATGGAAGTTGATCAGTCAACTTATCTGTATAGTAATTTGT
TATTACTTTTTTCAGGAATCATTGTCATTAGTTGGCTGGTTACCTTGAATGTATATAAACATTCTCAAA
GGGATTTCTAAATCGTTAAGGGATCAACTTTGGGAGAGAGTTCAAATTGATCCTTTTTTTATAACAGG
AATTGGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTC
GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGG
AGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGA
TGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTTCTGTGTCATATCTACAATTCTACACAGCCAGTCCAGAC

TATTGAATTGTATCACGTTTTTGATATCCTACCAATAACAAATTGATTGGAGGAATGCAAAGTGAATAA
TGAACCAGTAAACGTGGTAAGAAGAACAGATGGGAATTAACCTACCTATAATGACTTATGTAGTAGC
TGATGATTGGATTGATAAACTAGGACACGAAACGTTTACTTTATGGTTGAGGTTCCATACTTGGGTAGA
GTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 9 3 : 断片27

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGGTAGATAGAGAAGATGAACTCCGAGATTA
TGATCGCATACCTAGAAGTTTTGAGAACATATATAAAAGACACTAGGAATCTCAAAAAGTAAGTTTTA
TAGATTGATAAAACCTTTATGGGAATATGGATTAATAGACATCATAGAATACGAAGAATCTAACCCTAA
TTCTACTAAACCTAAAAATATAATTGTTTATGAGTATCCTTTACACGAAATAGAAAGAAAGTATAAACC
ACTAGAAAAATTAAGAGATTGGGATAAAGACTATAATTCCGTTTCTAAAGAATTAGGTAAAACAGGTGG
TAGACCAAGGAAAAAGATAGTGAAGAAGAACCCGAAAGAAACCCGAAAGTAAGTAAAGAAAGACG
TAAATATAAGTTAAAAAGAGTTATCCACAACGGTTTCAAAAATGAAACGGTGGAGGGTTTCAAAAATGA
AACGGTGGAGGGTTTCAAAAATGAAACGGTGACCGTTTCAAAAATAAAACCAATAATTATTCAAATAT
CTTAATAACTTATCAAATATTTCTACTAATGTTTCAAATAATTTATTAATTGATGATGATGAGGAAAT
CGAAAAATGAACCAACTGGTCGTACAATAAATAGGTCATTACTTTTTTACAAGAAGATATTAACAGGC
CTATCAATTTATTAATAGATTTTCAGTTATACAGTTACGTGAAAACCTTTAGCTTTGATAAACACTTTGA
AGAACGGTTGGTATGTTATTTATGAAAGCAGGGATTTCTACTTTTTACACGCACGAAATCAGTAAAT
GATAAAAAAATAGCGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 9 4 : 断片28

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGATAGCAGACTATGAAAAATCTAAAAAGGTAGAT
TAAACCAATACGTGACCGAGCCTTATATATGGTAAATGGTCTTGTAATGAATAGAGCTTCTTCCCAA
GTGAACATGCTACTTATAAACTAAACCAATATAAAAAACAGAAGGAACAGGAAAAACAACAACAGGAGC
AACAAAGATCAAGAGTACCGTTCTATAATTGGTTGGAGGAAAGAGAAGAACAAACCGAAGGTCAACTAC
CCACCACTTAAGCGGCCGCAAGCTTGAAGAGCTCTTCTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTT
TTATGAGACGTCTCGGCCTGTTTGGCCATTATACTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACT
GAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA

GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTT
TCTCGAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 9 5 : 断片29

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
TAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC
CCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGA
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
GCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC
TACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG
GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC
TGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGGATCGCAGGTGATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 9 6 : 断片30

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAA
CGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGG
TTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC
TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG
AACTTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGT

TTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTG
AATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGGCGATGCCACATTTCCCCGAAAA
GAGTCTTCATAGAGGTCTTTCTTCCAACCAGTA

配列番号 97 : 断片2-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGAGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA
GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGGATATCGTATACGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
GTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGA

配列番号 98 : 断片2-構築プライマー2

TGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCAGGGCAGCTTGCCGGTGGTGAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGC
CGTAGGTGGCATGCCCTCGCCCTCGCCGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAGCT
CGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGA

配列番号 99 : 断片2-構築プライマー3

CCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC

配列番号 100 : 断片2-構築プライマー4

TTGTCGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCG
TCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACACAGGGTGTGCCCTCGAACTTCACCTCG
GCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTG

配列番号 101 : 断片2-構築プライマー5

GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACA
ACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCG
TGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCA

配列番号 102 : 断片2-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATGAAGACTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGC
GGCGGTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTG
GGTGCTCAGGTAGTGTTGTGCGGCAGCAG

配列番号 103 : 断片3-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCCAAGTAAGTATACCGATAATCAACCTCTGG
ATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG
CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT

配列番号 104 : 断片3-構築プライマー2

TGGCAATGCCCCAACCAAGTGGGGTTGCGTCAGCAAACACAGTGCACACCACGCCACGTTGCCTGACAA
CGGGCCACAACCTCCTCATAAAGAGACAGCAACCAGGATTTATACAAGGAGGAGAAAATGAAAGCCATAC
GGGAAGCAATAGCATGATACAAAGGCATTAAAG

配列番号 105 : 断片3-構築プライマー3

ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTGCTTTCCCCC
TCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGG
GCACTGACAATTCCGTGGTGTTCGGGG

配列番号 106 : 断片3-構築プライマー4

CGGAAGAGGCCGAGAGCCGGCAGCAGGCCGCGGAAGGAAGGTCCGCTGGATTGAGGGCCGAAGGGAC
GTAGCAGAAGGACGTCCCGCGCAGAATCCAGGTGGCAACACAGGCGAGCAGCCATGGAAAGGACGTCAG
CTTCCCCGACAACACCACGGAATTGTCAGTGCC

配列番号 107 : 断片3-構築プライマー5

GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTT
TGGGCCGCTCCCGCATCGGTTAATTAACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCT
GGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAG

配列番号 108 : 断片3-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATCACCTGCGATCTTCCCAACTTGCCCTTGCTCCATACCACCCCC
CTCCACCCATAATATTATAGAAGGACACCTAGTCAGACAAAATGATGCAACTTAATTTTATTAGGACA
AGGCTGGTGGGCACTGGAGTGGCAACTTCCAGG

配列番号 109 : 断片4-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCT
ATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAG
CGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGG

配列番号 1 1 0 : 断片4-構築プライマー2

GTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATTAGGAGTTGGAGACCAGCCTGG
CCAATATGGTGAAACCCCGTCTCTACCAAAAAACAAAAATTAGCTGAGCCTGGTCATGCATGCCTGGA
ATCCCAACAACCTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAA

配列番号 1 1 1 : 断片4-構築プライマー3

CACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTATCGATA
GATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG
GCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT

配列番号 1 1 2 : 断片4-構築プライマー4

CCAGGAAGCTGTAGAGCTGTTCTGGTTGCGACGCAGGGTGGGCTGTACCTGGGGACTGTTAAGCATGG
AGTTGGGTACCCCTCGAGGGGATCTGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCG
GGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG

配列番号 1 1 3 : 断片4-構築プライマー5

GCAACCAGGAACAGCTCTACAGCTTCCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCGCGAGCCACAGTGGCAGA
TTAGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCACTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGGAGACACTTTCAAT
AAAGGCAAATGTTTTTATTTGTACACTCTCGGG

配列番号 1 1 4 : 断片4-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATCACCTGCGATCCACCAGTATCGCAACGTGTCCCTGCCAGTGGCG
CATAGCGATGCGCGGCAGAACCCCTTTGATTTTTAAACGGCGCAGACGGCAAGGGTGGGGGTAAATAA
TCACCCGAGAGTGACAAATAAAAAACATTTGCC

配列番号 1 1 5 : 断片22-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA
CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA

配列番号 1 1 6 : 断片22-構築プライマー2

AGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAA
AGTCCCGTTGATTTTTGGTGCCAAAACAACTCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGAAATCCCG
GTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTTGAT

配列番号 1 1 7 : 断片22-構築プライマー3

TGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGATCCTGCCAT
TGCATCCTTCTCTGCAGACTAAGATGGAGTTCCTGAACCAAGACCGCTTGCTGGCCAACCTGTGAAACT
GGGCTCAAGGTGAGGGGTGCTATCTGTGA

配列番号 1 1 8 : 断片22-構築プライマー4

TCGGGGCCACAGCAGCTGAAGGCCCTTCCATAGGCTGTGGCTGGAGAAGGCGTGTTCTCTGTTTGGGG
TGGTGATAAGTAGGCCAAGGTGACGGGTGCGATTTCTGTGTGAGACAATTCCATTAACCATGTCCCTCA
ATCACAGATAGCACCCCTCACCTTGAGCCCA

配列番号 1 1 9 : 断片22-構築プライマー5

TGGAAGGGCCTTCAGCTGCTGTGGCCCCGAGGTAAGCTTGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGA
CAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTTGGGTCGT
TGTAAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATT

配列番号 1 2 0 : 断片22-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATGAAGACTCGCAAAACACTCACGTGACCTCTAATACAGGACCTCC
CTAACCCCTATGACGTAATTCACGTACGACTCCACCCCTCCGCCCGCTGTTTAAACCCCGGGCTGTAGT
TAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTAC

配列番号 1 2 1 : 断片23-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTACACCTGCGATCTTGCGACATTTTGCGACACCATGTGGTCTC
GCTGGGGGGGGGGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGAGCGCTG
GCGCGCTCCGTGACGAGCTTTAATGCGGTAGT

配列番号 1 2 2 : 断片23-構築プライマー2

ATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCC
GAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGA
TAAACTACCGCATTAAAGCTCGTCGACGGAGCG

配列番号 1 2 3 : 断片23-構築プライマー3

ATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTG
CTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTT
GGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACT

配列番号 1 2 4 : 断片23-構築プライマー4

TCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCC
ACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCT
CCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGG

配列番号 1 2 5 : 断片23-構築プライマー5

CTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGG
CGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCT
TGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACT

配列番号 1 2 6 : 断片23-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATCACCTGCGATCGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACT
GGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCC
AGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCC

配列番号 1 2 7 : 断片28-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGATAGCAGACTATGAAAAATCTAAAAAGGTAGAT
TAAACCAATACGTGACCGAGCCTTATATATGGTAAATGGTCTTGTAATGAATAGAGCTTCTTCCCAAA
GTGAACATGCTACTTATAAACTAAACCAATAT

配列番号 1 2 8 : 断片28-構築プライマー2

GAGCTCTTCAAGCTTGCGGCCGCTTAAGTGGTGGTAGTTGACCTTCGGTTTGTTCTTCTTTCTCTCC
AACCAATTATAGAACGGTACTCTTGATCTTTGTTGCTCCTGTTGTTGTTTTCTGTTCTTCTGTTTT
TTATATTGTTTAGTTTATAAGTAGCATGTTT

配列番号 1 2 9 : 断片28-構築プライマー3

CACTTAAGCGCCGCAAGCTTGAAGAGCTCTTCTTTCAGAACGCTCGGTTGCCCGGGCGTTTTTTAT
GAGACGTCTCGGCTGTTTGCCATTATACTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGA
GTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCG

配列番号 1 3 0 : 断片28-構築プライマー4

CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACC
GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTG
TGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCT

配列番号 1 3 1 : 断片28-構築プライマー5

GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC

配列番号 1 3 2 : 断片28-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATGAAGACTCGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGT
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT

配列番号 1 3 3 : 断片30-構築プライマー1

TAGAGGCAAGGGTTGTTTTATTGACTAGAAGACGACGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAA
CGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGT

配列番号 1 3 4 : 断片30-構築プライマー2

CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGG
ATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACA
CCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGT

配列番号 1 3 5 : 断片30-構築プライマー3

CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT
CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCT

配列番号 1 3 6 : 断片30-構築プライマー4

GCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA
CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGG
CAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTAT

配列番号 1 3 7 : 断片30-構築プライマー5

GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAA
TACTCATACTTTCCTTTTTCAATATTAT

配列番号 1 3 8 : 断片30-構築プライマー6

TACTGGTTGGAAGAAAGACCTCTATGAAGACTCTTTTCGGGGAAATGTGGCGATCGCCGCGGAACCCCT
ATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT
CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGT

配列番号 1 3 9 : 断片1-F

TAGCACCTGCGATCAAAAGTGCCACCTGACGTCTAA

配列番号 1 4 0 : 断片5-F

TAGGAAGACGAGGTGTTTAGTGCTCCACTTAAACT

配列番号 1 4 1 : 断片6-F

TAGCACCTGCGATCCATCATCGTCACAAAGGTCTTGTT

配列番号 1 4 2 : 断片7-F

TAGCACCTGCGATCCCTAACCGCCCCCTTT

配列番号 1 4 3 : 断片8-F

TAGGAAGACGACCAAGGTTATGAGCACAGTCAT

配列番号 1 4 4 : 断片9-F

TAGCACCTGCGATCCTTCTGCAGCTAGCCAACTA

配列番号 1 4 5 : 断片10-F

TAGCACCTGCGATCGACCCAACCGTAGATGG

配列番号 1 4 6 : 断片11-F

TAGGAAGACGACTACATGAGCGCGGGA

配列番号 1 4 7 : 断片12-F

TAGGAAGACGACCTGATGTGTTTACCGAGTCTTA

配列番号 1 4 8 : 断片13-F

TAGCACCTGCGATCGTCCACTTGACGTGAG

配列番号 1 4 9 : 断片14-F

TAGGAAGACGATACGAGTCCTGGGCTCT

配列番号 1 5 0 : 断片15-F

TAGGAAGACGAGCAGGTTGAATACTAGGGTTCT

配列番号 1 5 1 : 断片16-F

TAGGAAGACGAGAACCCCGGTCGTC

配列番号 1 5 2 : 断片17-F

TAGCACCTGCGATCGGAGGCGGAACAAG

配列番号 1 5 3 : 断片18-F

TAGGAAGACGACCTCGGCCAGATAGA

配列番号 1 5 4 : 断片19-F

TAGCACCTGCGATCCAGCAGGGGTCTTGTG

配列番号 1 5 5 : 断片20-F

TAGCACCTGCGATCCGACCCAAGAGACTCAACTT

配列番号 1 5 6 : 断片21-F

TAGGAAGACGAGTGGCTACGGAGCAGTAT

配列番号 1 5 7 : 断片24-F

TAGGAAGACGATGACTAGATCCACCTGCAC

配列番号 1 5 8 : 断片25-F

TAGCACCTGCGATCGCTCGTTTTATTCAAGGGGCT

配列番号 1 5 9 : 断片26-F

TAGGAAGACGAGCTTGAAACAGCAGGAAGCT

配列番号 1 6 0 : 断片27-F

TAGCACCTGCGATCGGTAGATAGAGAAGATGAACTCC

配列番号 1 6 1 : 断片29-F

TAGCACCTGCGATCTCTCCCTTCGGAAGC

配列番号 1 6 2 : 断片1-R

TAGCACCTGCGATCCGTCAATGGGGCGGA

配列番号 1 6 3 : 断片5-R

TAGGAAGACTCGATGGGGCGATTCTG

配列番号 1 6 4 : 断片6-R

TAGCACCTGCGATCTAGGCTGTCCTCCTTCTC

配列番号 1 6 5 : 断片7-R

TAGCACCTGCGATCTTGGGGGTAGGTTAAGTG

配列番号 1 6 6 : 断片8-R

TAGGAAGACTCGAAGGTAGCAGTGACCC

配列番号 1 6 7 : 断片9-R

TAGCACCTGCGATCGGTCGGCGAACAGG

配列番号 1 6 8 : 断片10-R

TAGCACCTGCGATCGTAGTTTATTCGGGTTGAGTAGTCTT

配列番号 1 6 9 : 断片11-R

TAGGAAGACTCCAGGTTGGTTAACATCGGTCA

配列番号 1 7 0 : 断片12-R

TAGGAAGACTCGGACGTAAAGGCTAAACCCTT

配列番号 1 7 1 : 断片13-R

TAGCACCTGCGATCCGTAACCATGGATCATCATGCT

配列番号 1 7 2 : 断片14-R

TAGGAAGACTCCTGCCACCTCCCTC

配列番号 1 7 3 : 断片15-R

TAGGAAGACTCGTTCGAACCCCGGATC

配列番号 1 7 4 : 断片16-R

TAGGAAGACTCCTCCGGCGCCATTTCT

配列番号 1 7 5 : 断片17-R

TAGCACCTGCGATCGAGGACTTGCATTTCTGGTC

配列番号 1 7 6 : 断片18-R

TAGGAAGACTCGCTGTCGTCCTTATGCC

配列番号 1 7 7 : 断片19-R

TAGCACCTGCGATCGTCGGAATCCCAGTTGTT

配列番号 1 7 8 : 断片20-R

TAGCACCTGCGATCCACGGGATTGGTTGTC

配列番号 179 : 断片21-R

TAGGAAGACTCCCAGGCGGGCCATT

配列番号 180 : 断片24-R

TAGGAAGACTCGAGCCATAATAAGTAAGGAAAAGAAAGAATG

配列番号 181 : 断片25-R

TAGCACCTGCGATCAAGCTACTTGAAACAATTGTTGATATAACTGTTTTG

配列番号 182 : 断片26-R

TAGGAAGACTCTACCCAAGTATGGAACCTCAAC

配列番号 183 : 断片27-R

TAGCACCTGCGATCGCTATTTTTTTTATCATTTTACTGATTTTCGTGCGT

配列番号 184 : 断片29-R

TAGCACCTGCGATCCTCGGCCCTTCCG

配列番号 185 : CMVプロモーター用プライマー 1

CATCAATGGGCGTGGATAGC

配列番号 186 : CMVプロモーター用プライマー 2

GGAGTTGTTACGACATTTTGAAA

配列番号 187 : EGFP-WPRE断片用プライマー 1

GAGCTGGTTTAGTGGATATC

配列番号 188 : EGFP-WPRE断片用プライマー 2

CAGGGATGCCACCGTTTAATTA

請求の範囲

- [請求項1] ウイルス由来構成物プラスミドを作製する方法であって、
- i) 第1の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、
 - ii) 第2の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第2の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、
- を含む方法。
- [請求項2] ウイルス由来構成物を作製する方法であって、
- i) 第1の微生物宿主細胞からウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含むウイルス由来構成物プラスミドを取得するステップと、
 - ii) 第2の微生物宿主細胞に前記ウイルス由来構成物プラスミドを導入し、前記第2の微生物宿主細胞を前記ウイルス由来構成物プラスミドが増幅する条件下に配置するステップと、
 - iii) 前記ウイルス由来構成物プラスミドに基づく導入プラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップと、
- を含む方法。
- [請求項3] ステップii)とステップiii)との間に、前記ウイルス由来構成物プラスミドにおけるウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも1つを含む核酸をクローニングして前記導入プラスミドを作成するステップを含む、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記プロデューサー細胞が動物細胞である、請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 前記プロデューサー細胞がヒト胚性腎臓細胞であり、プロデューサー細胞1つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数

を提供する、請求項 2 に記載の方法。

- [請求項6] ステップ i) が、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列以外のベクター部分核酸配列を含む少なくとも 2 つの核酸断片を含む複数の核酸断片から前記ウイルス由来構成物プラスミドを取得することを含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項7] 前記ベクター部分核酸配列が、核酸複製、薬剤耐性、コピー数調整、安定性改善のうち少なくとも 1 つの機能を有する核酸配列またはマルチクローニングサイトを含む、請求項 6 に記載の方法。
- [請求項8] ステップ i) の前に前記複数の核酸断片のうち少なくとも 2 つを化学合成または酵素反応により作製するステップを含む、請求項 6 に記載の方法。
- [請求項9] ステップ i) の前に前記複数の核酸断片の全てを化学合成または酵素反応により作製するステップを含む、請求項 6 に記載の方法。
- [請求項10] 前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、
(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、
(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、
(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、
(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と
を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項11] 前記導入プラスミドが、前記核酸配列 (A) ~ (D) を含む、請求項 10 に記載の方法。
- [請求項12] 前記第 1 の微生物宿主細胞が枯草菌である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項13] 前記第 2 の微生物宿主細胞が、大腸菌である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] i) のステップが、核酸断片から前記ウイルス由来構成物プラスミドを形成することを含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項15] 前記核酸断片が、タンデムリピートな核酸配列を有する非環状核酸

断片である、請求項 14 に記載の方法。

- [請求項16] i) のステップは、コンピテントな前記第 1 の微生物宿主細胞を、ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む核酸と接触させることを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 請求項 1 に記載の方法によって調製されたウイルス由来構成物プラスミド。
- [請求項18] 請求項 2 に記載の方法によって調製されたウイルス由来構成物。
- [請求項19] 請求項 2 に記載の方法によって調製されたウイルス由来構成物含有組成物。
- [請求項20] ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列のうちの少なくとも一部を作動可能に連結されて含む、プラスミドであって、
前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、
(A) 末端反復配列を含む核酸配列と、
(B) パッケージング因子をコードする核酸配列と、
(C) 構造タンパク質をコードする核酸配列と、
(D) 機能補助因子をコードする核酸配列と
を含み、(A) ～ (D) の核酸配列のうちの少なくとも 2 つを含む、
プラスミド。
- [請求項21] (A) ～ (D) の核酸配列を作動可能に連結されて含む、請求項 20 に記載のプラスミド。
- [請求項22] (A) の末端反復配列を含む核酸配列が、所望の遺伝子を含む、請求項 20 に記載のプラスミド。
- [請求項23] 前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルスを起源とするウイルス由来構成物である、請求項 20 に記載のプラスミド。
- [請求項24] 前記ウイルス由来構成物が、アデノ随伴ウイルスを起源とするウイルスベクターである、請求項 20 に記載のプラスミド。

- [請求項25] (A)の末端反復配列を含む核酸配列が2つの末端逆位反復配列 (LTR) を含み、
(B)のパッケージング因子をコードする核酸配列が *rep* を含み、
(C)の構造タンパク質をコードする核酸配列が *cap* を含み、
(D)の機能補助因子をコードする核酸配列が、E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4およびVAのうちの少なくとも1つを含む、
請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項26] 前記2つのLTRのうちの少なくとも1つが、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来する、請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項27] (B)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来する *rep* を含む、請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項28] (B)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の *rep78*、*rep76*、*rep52* および *rep40* のうち少なくとも一つを含む、請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項29] 前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、請求項28に記載のプラスミド。
- [請求項30] (A)の前記末端反復配列および(B)の核酸配列が、異なるアデノ随伴ウイルスの血清型に由来する核酸配列を含む、請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項31] (C)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスの血清型1～12およびその改変体のいずれかに由来する *cap* を含む、請求項24に記載のプラスミド。
- [請求項32] (C)の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流のVP1、VP2およびVP3のうち少

なくとも一つを含む、請求項 24 に記載のプラスミド。

[請求項33] (D) の核酸配列が、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ボカウイルスおよびその改変体のいずれかに由来する機能補助因子をコードする核酸配列を含む、請求項 24 に記載のプラスミド。

[請求項34] (D) の核酸配列が、アデノウイルスの血清型 1 ～ 52 およびその改変体のいずれかに由来する核酸配列を含む、請求項 24 に記載のプラスミド。

[請求項35] (D) の核酸配列が、アデノ随伴ウイルスのプロモーターと異なるプロモーターおよびその下流の E1A、E1B、E2A、E2B、E3 および E4 のうち少なくとも一つを含む、請求項 24 に記載のプラスミド。

[請求項36] 前記プロモーターが薬剤応答性のプロモーターである、請求項 35 に記載のプラスミド。

[請求項37] (A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' LTR、プロモーター、所望の遺伝子、ターミネーターおよび 3' LTR を含む、請求項 24 に記載のプラスミド。

[請求項38] 前記ウイルス由来構成物が、レトロウイルスを起源とするウイルスベクターである、請求項 20 に記載のプラスミド。

[請求項39] (A) の末端反復配列を含む核酸配列が 2 つの長鎖末端反復配列 (LTR) を含み、

(B) のパッケージング因子をコードする核酸配列が ϕ を含み、

(C) の構造タンパク質をコードする核酸配列が、gag、pol、VSV-G および env のうちの少なくとも 1 つを含み、

(D) の機能補助因子をコードする核酸配列が Rev を含む、請求項 38 に記載のプラスミド。

[請求項40] (C) ～ (D) の核酸配列のうちの少なくとも 1 つの上流に、薬剤応答性プロモーターを含む、請求項 38 に記載のプラスミド。

[請求項41] (A) の末端反復配列を含む核酸配列が、上流から 5' LTR、プ

ロモーター、所望の遺伝子、ターミネーターおよび3'LTRを含む、請求項38に記載のプラスミド。

[請求項42] (B)の核酸配列が(A)の核酸配列内に存在し、(C)および(D)の核酸配列が、(A)の核酸配列の外に存在する、請求項31に記載のプラスミド。

[請求項43] (A)～(D)の核酸配列にコードされる8個以上の遺伝子を、作動可能に連結されて含む、請求項20に記載のプラスミド。

[請求項44] 薬剤選択マーカース核酸配列を、(A)～(D)の核酸配列にコードされるいずれか2つの遺伝子の間に含む、請求項20に記載のプラスミド。

[請求項45] 前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列が、約10 kb以上である、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。

[請求項46] 所望の遺伝子が、2～100個の遺伝子である、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。

[請求項47] 第1の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と、
第2の微生物宿主細胞においてプラスミド複製を促進する核酸配列と
を作動可能に連結されて含む、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。

[請求項48] 前記第1の微生物宿主細胞が枯草菌である、請求項47に記載のプラスミド。

[請求項49] 前記第2の微生物宿主細胞が大腸菌である、請求項47に記載のプラスミド。

[請求項50] プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞1つあたり 4×10^3 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、請求項20～44のいずれか一項に記載のプ

ラスミド。

- [請求項51] プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、プロデューサー細胞1つあたり 1×10^4 以上のウイルスベクターゲノムコピー数を提供する、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項52] プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数(VP/VG)が15以下であるウイルスベクターを提供する、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項53] プロデューサー細胞であるヒト胚性腎臓細胞に導入した場合に、ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数(VP/VG)が10以下であるウイルスベクターを提供する、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項54] 前記プラスミドおよびプロデューサー細胞が、一緒になって前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列を含む、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項55] CCC (covalently closed circular) 純度が、80%以上である、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項56] 化学合成または酵素反応により作製した核酸断片にベクター部分核酸配列を含む少なくとも2つの核酸断片を含む、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項57] 化学合成または酵素反応により作製した複数の核酸断片のみを環状化した、請求項20～44のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項58] 前記核酸断片が3つ以上の核酸断片を含む、請求項56または57に記載のプラスミド。
- [請求項59] 前記核酸断片の各々が、2 kb以下の長さを有する、請求項56～58のいずれか一項に記載のプラスミド。

- [請求項60] 前記ベクター部分核酸配列が、前記ウイルス由来構成物プラスミドの全配列の40%以下を占める、請求項56～59のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項61] 前記ベクター部分核酸配列が、核酸複製、薬剤耐性、コピー数調整、および安定性改善のうち少なくとも1つの機能を有する核酸配列を含み、前記ウイルス由来構成物プラスミドが、前記ベクター部分核酸配列の上流および下流に制限酵素認識配列を含み、前記制限酵素認識配列と同じ配列は、前記ウイルス由来構成物を構成するのに必要な核酸配列には含まれない、請求項56～60のいずれか一項に記載のプラスミド。
- [請求項62] 請求項20～61のいずれか一項に記載のプラスミドを含む微生物宿主細胞。
- [請求項63] 請求項20～61のいずれか一項に記載のプラスミドを含む、ウイルス由来構成物を調製するための組成物。
- [請求項64] 請求項20～61のいずれか一項に記載のプラスミドをプロデューサー細胞に導入してウイルス由来構成物を形成させるステップを含む、ウイルスベクターを作製する方法。
- [請求項65] 前記プラスミドに含まれる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64に記載の方法。
- [請求項66] 請求項64に記載の方法によって生産されるウイルス由来構成物。
- [請求項67] 請求項64に記載の方法によって生産されるウイルス由来構成物含有組成物。
- [請求項68] ウイルスベクターゲノムコピー数に対するウイルスベクター粒子数(VP/VG)が15以下である、請求項67に記載のウイルス由来構成物含有組成物。
- [請求項69] 請求項20～61のいずれか一項に記載のプラスミドが導入されたプロデューサー細胞であって、前記プラスミドに含まれる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ている

、プロデューサー細胞。