

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4108746号
(P4108746)

(45) 発行日 平成20年6月25日(2008.6.25)

(24) 登録日 平成20年4月11日(2008.4.11)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 N 7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00	

請求項の数 14 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平9-501730	(73) 特許権者	ユニバーシティ オブ ノース カロライ ナ アット チャペル ヒル
(86) (22) 出願日	平成8年6月6日(1996.6.6)		アメリカ合衆国27599-4105 ノ ースカロライナ州チャペル・ヒル、キャン パス・ボックス4105、バイナム・ホー ル308番
(65) 公表番号	特表平11-510371	(74) 代理人	弁理士 青山 稜
(43) 公表日	平成11年9月14日(1999.9.14)	(74) 代理人	弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/009405	(74) 代理人	弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W01996/040240		
(87) 国際公開日	平成8年12月19日(1996.12.19)		
審査請求日	平成15年6月2日(2003.6.2)		
(31) 優先権主張番号	08/483,757		
(32) 優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘルパーウイルスを含まないAAV産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組換えアデノ随伴ウイルスの、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストックを産生する方法であって、以下の工程：

(a) アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を以下のもの：

- i) 感染性AAVビリオン中にパッケージングされ得る組換えアデノ随伴ウイルスベクター、
- ii) 該組換えアデノ随伴ウイルスベクターの複製、および感染性AAVビリオンへのパッケージングに必須のAAVウイルス機能を提供するヘルパーAAVベクター、および
- iii) 増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含有するゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するが、ヘルパーウイルスの複製および/または感染性ヘルパーウイルスビリオン中へのパッケージングに必要なシス作用シグナルを欠くヘルパーウイルスベクター、

でコトランスフェクトする工程；ならびに

(b) 産生されたビリオンを回収する工程、を包含する、方法。

【請求項2】

前記ヘルパーウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ヘルパーウイルスベクターが、アデノウイルスの大きなxbaIフラグメントを含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記細胞が、ヒト293細胞である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記ヘルパー-AAVベクターが、感染性AAVビリオン中にパッケージングされ得ない、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

アデノ随伴ウイルスの、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストックを産生する方法であって、以下の工程：

(a) 増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含有するゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するが、ヘルパーウイルスの複製および/または感染性ヘルパーウイルスビリオン中へのパッケージングに必要なシス作用シグナルを欠くヘルパーウイルスベクターでアデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞をトランスフェクトする工程；

(b) 該細胞をアデノ随伴ウイルスで感染する工程；および

(c) 変生されたビリオンを回収する工程、

を包含する、方法。

【請求項7】

アデノ随伴ウイルスの、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストックを産生する方法であって、以下の工程：

(a) 増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含有するゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するが、ヘルパーウイルスの複製および/または感染性ヘルパーウイルスビリオン中へのパッケージングに必要なシス作用シグナルを欠くヘルパーウイルスベクターでアデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を、トランスフェクトする工程；

(b) 該細胞を感染性アデノ随伴ウイルスDNAでトランスフェクトする工程；および

(c) 変生されたビリオンを回収する工程、

を包含する、方法。

【請求項8】

請求項1に記載の方法によって変生された、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストック。

【請求項9】

請求項6に記載の方法によって産生された、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストック。

【請求項10】

請求項7に記載の方法によって産生された、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストック。

【請求項11】

組換えアデノ随伴ウイルスの、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストックを産生する方法であって、以下の工程：

(a) アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を、以下のもの：

i) 感染性AAVビリオン中にパッケージングされ得る組換えアデノ随伴ウイルスベクター、および

10

20

30

40

50

ii) 該組換えアデノ随伴ウイルスベクターの複製および感染性AAVビリオンへのパッケージングに必須のAAVウイルス機能を提供するヘルパーAAVベクター、
 でコトランスフェクトする工程であって、ここで該細胞が、増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含むゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するヘルパーウイルスベクターを有する染色体外エレメントを含む工程；ならびに
 (b) 変生されたビリオンを回収する工程、
 を包含する、方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法によって產生された、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して検出可能な細胞変性効果を生じないストックである実質的にヘルパーウイルスを含まないストック。

10

【請求項13】

以下の工程を包含する方法によって產生される細胞株：

(a) アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を、増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含むゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するが、ヘルパーウイルスの複製および/または感染性ヘルパーウイルスビリオン中へのパッケージングに必要なシス作用シグナルを欠くヘルパーウイルスベクターでトランスフェクトする工程；および

(b) 該ヘルパーウイルスベクターが、染色体外エレメント上に存在する細胞株を選択する工程。

20

【請求項14】

以下の工程を包含する方法によって產生される細胞株：

(a) アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を、増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子を含むゲノムヘルパーウイルスDNAの部分を提供するが、ヘルパーウイルスの複製および/または感染性ヘルパーウイルスビリオン中へのパッケージングに必要なシス作用シグナルを欠くヘルパーウイルスベクターでトランスフェクトする工程；および

(b) 該ヘルパーウイルスベクターが、染色体DNA中に安定に組み込まれた細胞株を選択する工程。

30

【発明の詳細な説明】

序論

技術分野

本発明は、実質的にヘルパーウイルスを含まない、アデノ随伴ウイルスストックを產生するための方法、細胞、およびベクターに関する。

背景

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、パルボウイルス科の欠損メンバーである。AAVゲノムは、プラスまたはマイナス極性の一本鎖DNA分子としてキャプシドに包まれる(BernsおよびRose, 1970, J. Virol. 5:693-699; Blacklowら, 1967, J. Exp. Med. 115:755-763)。両極性の鎖がパッケージングされるが、別々のウイルス粒子にパッケージングされ(BernsおよびAdler, 1972, Virology 9:394-396)、そして両方の鎖は感染性である(Samulskiら, 1987, J. Virol. 61:3096-3101)。

40

ヒトアデノ随伴ウイルス2型(AAV2)の一本鎖DNAゲノムは、4681塩基対の長さであり、各145塩基対の末端反復配列によって隣接されている(Lusbyら, 1982, J. Virol. 41:518-526)。最初の125ヌクレオチドは、「T」型ヘアピン構造を形成するように自身で折り畳み得、そして2配向(フリップまたはフロップ)のいずれでも存在し得るパルンドローム配列を形成し、このことは、AAVが、AAVの末端ヘアピンがDNA複製開始用のプライマーとして使用される直鎖状染色体DNAについてCavalier-Smithによって最初に提案されたモデル(1974, Nature 250:467-470)に従って複製し得る示唆(BernsおよびHauswirth, 1979, Adv. Virus Res. 25:407-449)に導く。ウイルスDNAのパッケージング、組み込み/レスキュー、および複製のためにシスに必要とされるAAV配列は、末端反復配列を含む284塩

50

基対 (bp) 配列内に配置されるようである (McLaughlinら、1988, J. Virol. 62:1963-1973)。

変異される場合に、表現型的に異なるウイルスを生じさせる少なくとも3つの領域が、AAVゲノム中に同定されている (Hermonatら、1984, J. Virol. 51:329-339)。rep領域は、DNA複製および組換えプラスミドからのレスキューに必要とされる、少なくとも4つのタンパク質 (Mendelsonら、1986, J. Virol. 60:823-832) をコードする。cap領域は、AAVキャプシドタンパク質をコードし; この領域内に損傷を含む変異体は、DNA複製が可能である (Hermonatら、1984, J. Virol. 51:329-339)。AAVは、3つの転写プロモーターを含む (Carterら、1983, 「The Parvoviruses」、K. Berns編、Plenum Publishing Corp., NY 153-207頁; GreenおよびRoeder、180, Cell 22:231-242, Laughlinら、1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5567-5571; LusbyおよびBerns、1982, J. Virol. 41:518-526; Marcusら、1981, Eur. J. Biochem. 121:147-154)。ウイルスDNA配列は、2つの主要な読み取り枠である、従来のAAVマップの左半分の1つおよび右半分のもう1つを示す (Srivastavaら、1985, J. Virol. 45:555-564)。

AAVは、溶菌ウイルスとして増殖され得るか、またはプロウイルスとして維持され、宿主細胞DNAに組み込まれ得る (Cukorら、1984, 「The Parvoviruses」、Berns編、Plenum Publishing Corp., NY 33-66頁)。特定の条件下で、AAVは、ヘルパーウイルスの非存在下で複製し得るが (Yakobsonら、1987, J. Virol. 61:972-981)、効率的な複製には、ヘルパーウイルス (アデノウイルス (Atchinsonら、1965, Science 194:754-756; Hoggan, 19865, Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 24:248; Parksら、1967, J. Virol. 1:171-180) ; ヘルペス単純ウイルス (Bullerら、1981, J. Virol. 40:241-247)、またはサイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、あるいはワクシニアウイルスを含む) との同時感染が必要とされる。従って、AAVは「欠損」ウイルスとして分類される。

ヘルパーウイルスが入手不可能なときは、AAVは、組み込まれたプロウイルスとして、宿主細胞ゲノムDNAに持続し得る (Bernsら、1975, Virology 68:556-560; Cheungら、1980, J. Virol. 33:739-748)。ウイルス組み込みは、細胞増殖または形態には明白な影響を有さないようである (Handaら、1977, Virology 82:84-92; Hogganら、1972, 「Proceedings of the Fourth Lapetit Colloquium, North Holland Publishing Co., Amsterdam 243-249頁)。組み込まれたAAVゲノムの物理学的構造の研究 (Cheungら、1980、前出; Bernsら、1982「Viurs Persistence」、Mahyら編、Cambridge University Press, NY 249-265頁) は、ウイルス挿入は、宿主染色体のランダムな位置に生じるが、AAV DNAに関しては独特の位置である、末端反復配列内に生じることを示唆する。より最近の研究は、宿主染色体へのAAV組み込みは、ランダムであり得ず、第19染色体上の部位にほとんど優先的に標的化される (Samulski 1993 Curr. Opinion in Genet. and Devel. 3:74-80) ことを明らかにした。組み込まれたAAVゲノムは、本質的に安定であることが見いだされ、100継代を超えて組織培養で維持される (Cheungら、1980、前出)。

AAVは、ヒトウイルスであると考えられるが、溶菌増殖に対するその宿主範囲は通常広範である。実質的に評価された全ての哺乳動物細胞株 (種々のヒト、サル、およびげっ歯類細胞株を含む) は、適切なヘルパーウイルスが使用されれば、AAVで生産的に感染され得る (Cukorら、1984, 「The Parvoviruses」、Berns編、Plenum Publishing Corp. NY, 33-66頁)。

ヒトでも動物集団でも、広範囲な曝露および明白な感染にもかかわらず、AAVに関連する疾患はない (Ostroveら、1987, Virology 113:521-533)。抗AAV抗体は、ヒトおよびサルにおいてしばしば見いだされている。最初の10年以内に、約70~80パーセントの子供が、AAV 1型、2型、および3型に対する抗体を獲得すると評価され; 50%を超える成人が検出可能な抗AAV抗体を保持することが見いだされた。AAVは、急性アデノウイルス感染間の糞便、眼球、および呼吸標本から単離されているが、その他の疾患の間は単離されなかった (Davis, Dulbecco, EisenおよびGinsbergの「Microbiology」、第三版、Harper and Row Publishers, Hagerstown, 1059頁から再版された、DulbeccoおよびGinsberg, 1980, 「Virology」)。

10

20

30

40

50

組換えアデノ随伴ウイルス

Samulskiら (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:2077-2081) は、細菌プラスミド pBR322にインタクトな二重鎖AAV DNAをクローン化し、そしてそのAAVゲノムが、ヘルパーとしてアデノウイルス5と共に、ヒト細胞へのプラスミドDNAのトランスフェクションによって、組換えプラスミドからレスキューされ得ることを見出した。プラスミドからのレスキュー効率は、当量の精製AAVビリオンDNAでのトランスフェクション後に観察されたものに匹敵するAAV DNA収率を生じるのに十分に高かった。

組換えプラスミド中でのAAV配列は修飾され得、次に、トランスフェクションによって真核生物細胞へ「往復される (shuttled)」。ヘルパーアデノウイルスの存在下で、いずれのプラスミドDNA配列も含まないAAVゲノムがレスキューされ、そして複製されて感染性AAV粒子を産生することが認められた (Samulskiら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2077-2081; Laughlinら、1983, Gene 23:65-73; Samulskiら、1983, Cell 33:134-143; Senapathyら、1982, J. Mol. Biol. 179:1-20)。

AAVベクター系は、種々の遺伝子を真核生物細胞で発現するために使用された。Hermonat および Muzyczka (1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6466-6470) は、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) が AAVキャプシド遺伝子の代わりに置換された、組換え AAV (rAAV) ウイルスストックを産生し、マウスおよびヒト細胞株へのネオマイシン耐性の rAAV 形質導入を観察した。Tratschenら (1984, Mol. Cell, Biol. 4:2072-2081) は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子をヒト細胞で発現することが見いだされた rAAV を作製した。Lafareら (1988, Virology 162:483-486) は、AAVベクターを使用して、造血前駆細胞への遺伝子導入を観察した。Ohiら (1988, J. Cell. Biol. 107:304A) は、ヒト α -グロビン cDNA を含む組換え AAVゲノムを構築した。Wondisfordら (1988, Mol. Endocrinol. 2:32-39) は、2つの異なる組換え AAVベクター (各ベクターは、ヒトチロトロピンのサブユニットをコードする) で細胞をコトランスフェクトし、生物学的に活性化チロトロピンの発現を観察した。

いくつかの rAAVベクター系が設計されている。Samulskiら (1987, J. Virol. 61:3096-3101) は、ウイルスコードメインに隣接する2つの XbaI 切断部位を含む、感染性アデノ随伴ウイルスゲノムを構築した; これらの制限酵素切断部位は、非ウイルス配列が、AAVのシス作用末端反復間に挿入され得るように作製された。米国特許第4,797,368号は、プラスミドに含有され、AAV粒子にパッケージングされ得、AAV転写プロモーターの制御下の場合、真核生物細胞において遺伝子またはDNA配列の安定な維持または発現のためのベクターとして機能する、AAVベクターに関する。その他のAAVベクターおよびそれらの使用は、米国特許第5,139,941号およびWO 9413788に記載される。

組換え AAV (rAAV) ウイルスストックの現在の産生方法は、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスでの宿主細胞の感染、ならびに rAAVでのトランスフェクションおよび rAAVから欠失した必須の AAV機能をトランスで供給するヘルパー AAV DNAでのトランスフェクションを必要とする。最近の研究は、AAVヘルパーを本質的に含まない、rAAVストックの産生を達成した (Samulskiら、1989, J. Virol. 63:3822-3828)。しかし、これらの rAAVストックはまだ、毒性のアデノウイルスまたはその他のヘルパーウイルスを rAAVビリオンとともに含有する。本発明の方法は、アデノウイルスまたはその他のヘルパーウイルスによる同時感染を伴わないで、組換え AAVまたは野生型 AAVのインビボでの産生を可能にする。従って、感染性ヘルパーウイルス混入物の産生は、減少あるいは排除される。

発明の要旨

本発明の目的は、実質的にヘルパーウイルスを含まないアデノ随伴ウイルス (AAV) ストックを産生する方法を提供することである。この方法は、野生型 AAVストックまたは組換え AAV (rAAV) ストックのいずれかの産生に使用され得る。この方法は、従来のヘルパーウイルスによる感染の必要性を排除する。特に、本発明の方法では、AAVによる増殖性感染に必須のヘルパーウイルス機能は、ヘルパーウイルスベクターでの宿主細胞のトランスフェクションによって提供される。あるいは、ヘルパーウイルスベクターは、宿主細胞中の染色体外エレメントから提供され得るか、または宿主細胞染色体へ安定に組み込まれ得

10

20

30

40

50

、AAVによる増殖性感染に必須のヘルパーウイルス機能を発現する細胞株を提供する。

特定の実施態様の説明

AAVストックおよびrAAVストックを産生するために現在用いられる方法は、AAVまたはrAAVによる増殖性感染を達成するための、アデノウイルスのようなヘルパーウイルスとの同時感染を必要とする。これは、AAVまたはrAAVストックのヘルパーウイルス混入の有意なレベルをもたらし得る。本発明は、ヘルパーウイルスによる感染の必要性を排除することによって、この問題を解決する。本発明の方法によって、増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス機能は、必要なウイルス機能を提供するが、ヘルパーウイルスビリオンにパッケージングされ得ない、ヘルパーウイルスベクターでのトランスフェクションによって、トランスに供給される。

10

一般に、本発明の方法は、先行技術の方法において使用されているようなヘルパーウイルスでの感染よりむしろ、ヘルパーウイルスベクターでのトランスフェクションを用いることにより、ヘルパーウイルスを実質的に含まないrAAVストックを産生するために使用され得る。別の実施態様では、本発明の方法は、ヘルパーウイルスを実質的に含まない野生型AAVストックを産生するために使用され得る。wt AAVストックは、例えば、ヘルパーウイルスベクターによるトランスフェクションと組み合わせたwt AAVビリオンでの感染、または感染性クローン化AAVプラスミドでのトランスフェクションによって作製され得る。さらなる実施態様では、ヘルパーウイルスベクターは、染色体外エレメントとして、宿主細胞株へ安定に組み込まれ得る。この実施態様では、必須のヘルパーウイルス機能が、染色体外エレメントから提供され、ヘルパーウイルスベクターでのさらなるトランスフェクションは必要とされない。

20

特に、1つの実施態様において本発明の方法は：

(a)アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を以下のもの：

- i)感染性AAVビリオン中にパッケージングされ得る組換えアデノ随伴ウイルスベクター、
- ii)この組換えアデノ随伴ウイルスベクターの複製、および感染性AAVビリオン中へのパッケージングに必須のAAVウイルス機能を提供するヘルパー-AAVベクター、および
- iii)増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス機能を提供するが、それ自身は感染性ヘルパーウイルスビリオン中にパッケージングされ得ないヘルパーウイルスベクター、

でコトランスフェクトする工程；ならびに

30

(b)産生されたビリオンを回収する工程、
を包含する。

別の実施態様において本発明の方法は：

(a)増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス機能を提供するが、それ自身は感染性ヘルパーウイルスビリオン中にパッケージングされ得ないヘルパーウイルスベクターで、アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞をトランスフェクションする工程；

(b)この細胞をアデノ随伴ウイルスで感染する工程；および

(c)産生されたビリオンを回収する工程、
を包含する。

40

第3の実施態様において本発明は：

(a)アデノウイルス随伴ウイルス複製を許容する細胞を、以下のもの：

i)感染性AAVビリオン中にパッケージングされ得る組換えアデノ随伴ウイルスベクター、
および

ii)この組換えアデノ随伴ウイルスベクターの複製、および感染性AAVビリオン中へのパッケージングに必須のAAVウイルス機能を提供するヘルパー-AAVベクター、

でコトランスフェクトする工程であって、ここでこの細胞が、増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のヘルパーウイルス機能を提供するヘルパーウイルスベクターを含有する染色体外エレメントを含有する工程；ならびに

(b)産生されたビリオンを回収する工程、

50

を包含する。

本発明者らは、驚くべきことに、AAVまたはrAAVの増殖性感染は、増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス機能が供給されれば、ヘルパーウイルスによる感染が無くとも、宿主細胞で生じ得ることを見出した。増殖性AAV感染は、AAVまたはrAAV DNAが、宿主細胞において複製され、そして感染性ビリオン中にパッケージングされることを意味する。

本発明のヘルパーウイルスベクターは、当該分野で周知の多数のヘルパーウイルスのいずれか由来のDNAを包含する（例えば、BernsおよびLabow, 1987, J. Gen. Virol. 68:601-614; Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:97-129; Berns, 1990, Microbiol. Rev. 54:316-329を参照のこと）。ヘルパーウイルスは、増殖性AAV感染を支持するウイルスである。これらのウイルスとしては、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、およびワクシニアウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のヘルパーウイルスベクターは、ヘルパーウイルス由来のDNAを含み、このDNAは増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス機能を提供するが、ベクター自身は感染性ヘルパーウイルスビリオン中にパッケージングされ得ない。好ましくは、本発明の方法の実施には、ヘルパーウイルスベクターは、ヘルパーウイルスの複製および/またはパッケージングに機能するシス作用シグナル以外は、ヘルパーウイルスの全ゲノムDNAを含有し得る。多くのヘルパーウイルスについて、これらのシス作用シグナルが同定されている（例えば、Sussenbach「The Adenoviruses」、Ginsberg, H. 編、Plenum Press 1984、およびその中の参考文献；Fraenkel-Conrat,「Virology」1982 Prentice-Hall、およびその中の参考文献を参照のこと）。シス作用シグナルはまた、本明細書に記載の方法；例えば、種々の変異を含むヘルパーウイルスゲノムDNAまたはヘルパーウイルスDNAフラグメントでの宿主細胞のトランスフェクション、およびヘルパーウイルスビリオン産生についてのアッセイによって同定され得る。本発明の実施のためにより好ましくは、ヘルパーウイルスベクターは、増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス遺伝子または他の配列を含有する、ゲノムヘルパーウイルスDNAの部分のみを含有する。例えば、アデノウイルスE1、E2、E4、およびVA遺伝子産物が、増殖性アデノ随伴ウイルス感染に必須のアデノウイルス機能であることは公知である（BernsおよびLabow, 1987, J. Gen. Virol. 68:601-614）。

一般的に、ヘルパーウイルスベクターは、全ての必須のヘルパーウイルス機能をコードするヘルパーウイルスDNAを含有する。しかし、増殖性AAV感染に必須の1つ以上のヘルパーウイルス機能を発現し得る特定の宿主細胞と組み合わせて使用されると、従って、ヘルパーウイルスベクターは、ヘルパーウイルスゲノム配列をほとんど含有しなくてもよい。例えば、1つの好ましいヘルパーウイルスベクターは、アデノウイルス(Ad) dl309の大きなXbaIフラグメントである。このフラグメントは、アデノウイルスゲノムから左の大部分の約900塩基を欠失している。アデノウイルスdl309の左末端は、アデノウイルスの複製およびパッケージングに必須のシス作用シグナルを含むだけでなく、Ad E1遺伝子に対するプロモーター領域も含有する。Ad E1遺伝子産物は、AAVの増殖性感染に必須である。しかし、ヒト細胞株293は、トランスフェクション用の宿主として293およびヘルパーウイルスベクターとして大きなXbaIフラグメントの使用が、必須のヘルパーウイルス機能の全相補を提供するように、Ad E1遺伝子を発現する。本明細書に記載の方法または当該分野で周知の他の匹敵する方法を使用することにより、当業者は、増殖性AAV感染に必須のいずれか特定のヘルパーウイルスの特定のゲノム配列を容易に決定し得る。

ヘルパーウイルスベクターに含有されるべき特定のヘルパーウイルスDNA配列は、ヘルパーウイルスの従来の変異分析によって決定され得る。例えば、ヘルパーウイルスゲノムを通しての種々の欠失または点変異を含むヘルパーウイルスベクターでのトランスフェクションの使用によって、AAVの増殖性感染のための必須の機能を提供する、ヘルパーウイルスゲノムの領域が決定され得る。変異分析の代替として、ヘルパーウイルスゲノムDNAの種々の制限フラグメントまたはその他のフラグメントが、トランスフェクションのためにフラグメントを直接使用すること、またはフラグメントをクローン化して、トランスフェクションのためにそのクローンを使用することのいずれかによって、必須の機能の存在に

10

20

30

40

50

ついてアッセイされ得る。これらの技術のいずれについても、ヘルパーウイルスDNAが、AAVによってトランスフェクトされるか、または感染される宿主細胞中へトランスフェクトされ、そして増殖性AAV感染の存在または非存在が、従来方法（例えば、感染センターアッセイ、McLaughlinら、1988）によって決定される。あるいは、AAVの増殖性感染は、AAV repおよびcap遺伝子の発現に依存するので、AAV repおよびcap遺伝子（ヘルパーAAVベクターに由来する）の発現を誘導するトランスフェクトされたヘルパーウイルスDNAの能力が決定され得る。上記のように、増殖性AAV感染に必須の機能をコードするヘルパーウイルス領域の多くは、すでに公知である。少なくともこれらの既知の必須の領域は、ヘルパーウイルスベクターに含有される。

ヘルパーウイルスベクターは、任意の都合の良い形態であるDNA分子（例えば、全ウイルスゲノム、ウイルスゲノムの制限フラグメント、ヘルパーウイルス配列を含有するプラスミドまたはバクテリオファージ、または、化学的または酵素的に合成されたDNA）であり得る。ヘルパーウイルスベクターDNAは、任意の適切な方法によって調製され得る。

特に、Ad dl309由来の大きなXbaIフラグメント（JonesおよびShenk, Cell, 1979 17:683-689）は、ヘルパーウイルスベクターとして使用され得る。Ad dl309は、1つのXbaI部位を含み、そしてXbaIでの切断は、左末端からの約900 bpフラグメントおよび右末端からの約35,000 bpフラグメントを提供する。より大きなフラグメントが、Ad E1以外の増殖性AAV感染に必須の全ヘルパーウイルス機能を提供する。XbaIの大きなフラグメントを用いてヒト293細胞をトランスフェクトすると、Ad E1は293細胞によって供給される。

ヘルパーAAVベクターおよび組換えAAVベクターは、当該分野で周知である（例えば、Muzycka, 1992, 前出；米国特許番号第5139941号；WO9413788を参照のこと）。一般的に、組換えAAVベクターは、外来（すなわち、非AAV）遺伝子または目的のDNA配列に連結された、AAV逆方向末端反復（または、ベクターが、複製および/または組み込み、ならびにパッケージングするのを可能にするその他の配列、例えば、WO9413788に記載されている2重（double）Dベクター）を含有する。本発明による使用に適した組換えAAVベクターとして、psub201（Samulski 1987 J. Virol. 61:3096）、およびdl3-94（McLaughlinら、1988 J. Virol. 62:1963）が挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヘルパーAAVベクターは、例えば、AAV repおよびキャプシド遺伝子を含む、rAAVを複製およびパッケージングするのに必要なAAV機能を発現する。本発明による使用に適したヘルパーAAVベクターは、pAAV/Ad（Samulski, 1989）を含むが、これに限定されない。本発明の方法は、いずれの特定のrAAVベクターまたはヘルパーAAVベクターにも依存せず、従来方法により（すなわち、ヘルパーウイルスとの同時感染により）感染性rAAVを産生し得る任意のこのような系が、本発明の方法での使用に適している。

トランスフェクションは、DEAE-デキストラン法（McCutchenおよびPagano, 1968, J. Natl. Cancer Inst. 41:351-357）、リン酸カルシウム手順（Grahamら1973, J. Virol. 33:739-748）、または当該分野で公知の任意の他の方法（例えば、マイクロインジェクション、リポフェクション、およびエレクトロポレーションを含むが、これらに限定されない）によって実施され得る。トランスフェクションに使用されるベクターDNA量は、 10^6 細胞あたり約0.2~10 μ gの適切な各DNAであるが、異なるDNA構築物および異なる細胞型の間で変化し得る。トランスフェクションの数時間から数日後の最後に、トランスフェクトされた細胞は、例えば、凍結-解凍技術、超音波処理または加圧型（ダウンス型）ホモナジナイゼーションによって破壊され、そして産生されたビリオンが得られた溶解物から回収され得る。溶解物は、ビリオン濃度のアッセイにまたはレシピエント細胞の感染に直接使用され得る。あるいは、溶解物中のビリオンはまず、遠心分離により（例えば、CsCl勾配中の密度勾配遠心分離により）、または高速度でウイルスをペレット化することによって濃縮され得る。

典型的に、本発明の方法には、約 10^6 宿主細胞は、0.2 μ gと10 μ gとの間のヘルパーウイルスベクター、ヘルパーAAVベクター、およびrAAVベクターの各々でトランスフェクトされる。DNA量は、使用される特定のベクターおよび細胞に依存するが、一般的に、DNAモル比は約1 : 2 : 9 rAAVベクター : ヘルパーウイルスベクター : ヘルパーAAVベクターである

10

20

30

40

50

。しかし、ベクターのいずれか特定の組み合わせに対するこの比の変化は、異なる量のいずれか特定のベクターでトランスフェクションし、そして最大ピリオン収率を得るための最適量を決定することによって、当業者により容易に決定され得る。一般的に、ヘルパーウイルスベクター量は、感染に使用される感染性ウイルス量（プラーク形成単位）の 10^3 倍と 10^5 倍（ゲノム当量）との間である。例えば、Ad dl309の大きなXbaIフラグメントがヘルパーウイルスベクターである場合、 5×10^6 細胞のトランスフェクションに使用されるDNA量は、 2.6×10^{11} ゲノム当量である。同量の細胞が、アデノウイルスdl309で感染される場合には、感染に対してのウイルス最適量（MOI=5）は、 2×10^7 プラーク形成単位である。細胞を、数時間～数日間、好ましくは24時間～72時間インキュベートして、次に、その細胞を回収し、溶解して、ピリオンを回収して力価を決定する。

本発明の方法に有用な宿主細胞としては、AAVの複製を許容する任意の細胞、特に哺乳動物細胞（HeLa細胞またはヒト293細胞を含むが、これらに限定されない）が挙げられる。宿主細胞の選択が、使用される特定のヘルパーウイルスベクターに部分的に依存し得ることは、前記の考察から理解される。潜伏感染を有する細胞もまた使用され得る。

本発明の方法によって得られたAAVまたはrAAVピリオンの力価は、従来方法で調製されたウイルスストックに対するAAVウイルス力価の決定に一般的に使用される方法（例えば、McLaughlinら、1988 J. Virol. 62:1963; Dhawanら、1991を参照のこと）と同じ方法によって決定され得る。選択される特定の方法は、ピリオンが有する特定の遺伝子または他のDNAに依存する。例えば、ピリオンDNAが γ -ガラクトシダーゼ遺伝子（LacZ）を有する場合、力価は、レシピエント細胞を形質導入し、形質導入体中の γ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現頻度を測定することによって、評価され得る（例えば、Dhawanら、Science 254:1509 1991を参照のこと）。典型的には、本発明の方法は、従来方法によって（すなわち、ヘルパーウイルス感染を用いて）提供される力価に匹敵するか、またはそれより大きい、rAAVに対するウイルス力価を提供する。驚くことに、ヘルパーウイルスによる感染よりむしろヘルパーウイルスDNAによるトランスフェクションの使用は、ウイルス収率において有意な減少をもたらさない。おそらく、両方の系が、rAAVプラスミドおよびヘルパーAAVプラスミドのトランスフェクション効率によって制限されるからである。典型的に、本発明の方法によって産生されるwt AAVの収率は、より従来方法によって一般的に得られるものより少ないが、産生されるwt AAVは実質的にヘルパーウイルスを含まない。

本発明の方法は、実質的にヘルパーウイルスを含まないrAAVまたはAAVストックを提供する。実質的にヘルパーウイルスを含まないことは、本発明の方法によって産生されたウイルスストックが、ヘルパーウイルス感染に感受性のある細胞に対して、検出可能な細胞変性効果（CPE）を生じないことを意味する。細胞変性効果は、 4×10^5 の適切な宿主細胞を、本発明の方法によって産生された、1 mlあたり $10^6 \sim 10^8$ AAVを含有する、AAVウイルスストックの1～1000希釈物の10 μ lで感染させることによって、好都合に測定され得る。AAVまたはrAAVストックの産生に関する限り、CPE決定には同じ種類の細胞が好都合に使用されるが、特定のヘルパーウイルスベクターが由来するヘルパーウイルスによる感染に感受性のあるいずれの細胞もCPE決定に適している。感染は1時間進行され、培地は適切に交換され、そして細胞はどのクリアランスについても観察される。CPEが、48時間後に観察されないときには、AAVウイルスストックは、実質的にヘルパーウイルスを含まない。CPE決定の他の方法は、本発明の方法に有用であり、そして当該分野で周知である（例えば、Aggarwalら、1988 J. Med. Virol. 26:85-92を参照のこと）。

本発明の方法の別の実施態様では、細胞は、ヘルパーウイルスベクターでトランスフェクトされ、そして野生型（wt）AAVで感染され、混入するヘルパーウイルスを含まないwt AAVピリオンを産生する。トランスフェクションおよび感染は、当該分野で周知の手順および上記の手順によって実施される。あるいは、細胞は、ヘルパーウイルスベクターおよび感染性AAVプラスミド、例えば、pSM620（Samulski, 1982）でコトランスフェクトされる。これらの方法のいずれかは、rAAVストックについて上記のように、実質的にヘルパーウイルスを含まないwt AAVストックを提供する。

本発明のさらなる実施態様では、ヘルパーウイルスベクターは、宿主細胞中で染色体外工

10

20

30

40

50

レメント（例えば、ミニクロモソームまたはエピソーム）に存在し得る。このような染色体外エレメントは、宿主細胞で安定に維持され、そして毎回ヘルパーウイルスベクターでのトランスフェクションの必要性がなく、増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス機能を提供する。哺乳動物染色体外エレメント（例えば、エプスタインバーウイルス（EBV）に基づく核エピソーム（Margolski, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:67-95））は公知であり、そして周知の方法（例えば、Giraudら（Proc. Natl Acad. Sci., 1994, 91:10039-10043））によって容易にヘルパーウイルスベクターから調製され得る。好ましくは、ヘルパーウイルスベクターを含む染色体外エレメントは、細胞あたり1~100コピー存在する。あるいは、ヘルパーウイルスベクターは、宿主細胞の染色体に安定に組み込まれて、増殖性AAV感染に必須のヘルパーウイルス機能を発現する細胞株を産生し得る。ヘルパーウイルスベクターが染色体外エレメントに存在するか、または染色体DNAに安定に組み込まれる細胞株が、ヘルパーウイルスベクターで適切な宿主細胞をトランスフェクトし、そしてAAVの増殖性感染を支持し得るクローン化された細胞株を選択することによって、同定および単離され得る。このような細胞株は、特に、ヘルパーAAVベクターでトランスフェクトし、AAV repおよびcap遺伝子の誘導についてアッセイするか、rAAVでトランスフェクトし、rAAVゲノムの複製についてアッセイするか、または感染性AAVプラスミドでトランスフェクトし、感染性AAVビリオンの産生をアッセイすることを含む当該分野で周知の技術、およびこれらの技術の任意の組み合わせによって決定され得る。必須のヘルパーウイルス機能の発現を調節するための染色体外エレメントまたは組み込まれたヘルパーウイルスベクター中の誘導性プロモーターの使用は、宿主細胞に対して有害な影響を有し得るヘルパーウイルス遺伝子の未成熟発現を防ぐのに望ましい。適切な誘導性プロモーターとしては、マウスメタロチオネインプロモーター、熱ショックプロモーター（Wurmら、PNAS 1986 83:5414-5418）、グルココルチコイド誘導性プロモーター（Heynesら、PNAS 1981 78:2038; Leeら、Nature 1991 294:228）、およびDeuschleら（Mol. Cell. Biol. 1995 15:1907-1914）に記載の転写アクチベータードメインが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

上記記載された工程の特定の例が、以下の実施例に掲載されている。しかし、多くの改変が可能であり、その実施例は例示目的のみに提供され、明記しない限り本発明を限定しないことは、当業者には明白である。

実施例

30

実施例 1 アデノウイルスゲノムDNAの調製

宿主細胞を、感染多重度（MOI）5においてアデノウイルスで感染し、明確なCPEで回収する。細胞を、1000 rpmで5分間遠心分離してペレット化する。使用する細胞の10 cmプレート5個ずつについて、細胞ペレットを、5 ml Tris-生理食塩水（0.025 M Tris pH 7.4、0.14 M NaCl、30 mM KCl、7 mM Na₂HPO₄、6 mMデキストロース）に再懸濁する。再懸濁ペレットを、凍結-解凍に3回供する。細胞片を遠心分離で除去し、そして上清をCsCl段階（step）勾配（1.4 g/ml下層、1.2 g/ml上層）に重層する。勾配を、SW41ローターで1時間、30,000 rpmで行う。下層のウイルスバンドを取り出し、1.34 g/mlに調整し、40,000 rpmで24時間、SW41ローターで遠心分離する。下層のウイルスバンドを取り出し、そして10 mM Tris（pH 7.5）、1 mM EDTA、200 mM NaClで透析し、その後200 ug/mlプロテイナーゼK、0.5% SDSで、37 °Cで1時間処理する。透析物を、2容量のフェノールで2回、2容量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）で1回抽出する。DNAを、1/10容量の3 M酢酸ナトリウムおよび2.5容量のエタノールで沈澱させる。

40

実施例 2 アデノウイルスdl309 DNAの大きなXbaIフラグメントの調製

アデノウイルスdl309ゲノムDNAを、実施例1に記載されているように単離する。次に、精製Ad DNA（50 ug）を、製造者の示唆に従って、50単位の制限酵素XbaIとともに、消化が完了するまでインキュベートする。XbaI消化DNAを、0.8%アガロースゲルでの電気泳動によって分離し（Maniatisら、1982, Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories）、そしてより大きなフラグメント（35,000 bp）を、ゲルから切り出す。アガロースを、ゲラーゼ（gelase）（5Prime-3Prime）を使用して可溶化し、

50

そしてDNAをエタノールで沈澱させ、水に再懸濁する。

実施例 3 アデノウイルスdl309の大きなXbaIフラグメントでのトランスフェクションによる感染性rAAV/ β -galの調製

293細胞 (Grahamら、1977 J. Gen. Virol. 36:59-72) を、密度 9.09×10^4 細胞/cm²で、10 cm組織培養プレート中で継代した。翌日、細胞を、CaPO₄沈澱法 (Gibco-BRL) を用いて、12時間トランスフェクトした。各10 cmディッシュについて、以下の量のDNAを使用した: pAAV/ β -gal (1 μ g) (pAAV/ β -galは、Goodmanら、1994 Blood 84:1492-1500に記載されているpAB11と同じである)、pAAV/Ad (9 μ g)、アデノウイルスdl309 DNAの大きなXbaIフラグメント (10 μ g)。12時間の最後に、培地を、DMEM + 10% FCSと交換し、細胞をさらに48時間インキュベートした。インキュベーションの最後に、細胞を回収し、超音波処理より溶解し、感染性ピリオンを含有する得られた溶解物を、293細胞またはHeLa細胞のいずれかの次の感染の際に β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした (青色の染色核は、パッケージングされた感染性rAAVを示す)。細胞を、種々の量の溶解物で感染させ、固定し、24時間後に染色した。うまくパッケージングされたrAAVの存在は、青色の染色核の数により明らかであった。さらに、細胞変性効果 (CPE) の形跡はなく、これらはいずれの混入Adも存在しないことを示す。

10

実施例 4 ウイルス力価決定のためのドットプロットアッセイ

293細胞の10個の10 cmディッシュを、実施例 3のようにトランスフェクトする。トランスフェクションの48時間後に、その細胞を回収し、超音波処理または凍結-解凍のいずれかによって溶解し、その後、RNaseAおよびDNaseIによって処理し、そして細胞片を遠心分離により除去する。ウイルスを、等容量の飽和硫酸アンモニウムの添加により沈澱させる。沈澱をCsCl溶液 (密度 = 1.4 g/ml) に再懸濁し、SW41ローターで、48時間40,000 rpmにて遠心分離する。勾配を滴下し、そして0.4 ml画分を回収する。画分を、以下の手順によってDNAについてアッセイする。

20

5 μ lのCsCl勾配画分を、2 μ l RNase (1 mg/ml)、2 μ l DNase (1 mg/ml)、1 μ l 1 M CaCl₂、1 μ l 1 M MgCl₂、および189 μ l 50 mM Tris (pH 8) と混合する。その混合物を37°Cで30分間インキュベートし、次に、2 μ l 0.5 M EDTA (pH 8)、4 μ l 0.25 M EGTA (pH 8)、および10 μ l 10%サルコシンを加える。混合物を70°Cまで10分間加熱し、次に、37°Cまで冷却する。20 μ l プロテイナーゼK (10 mg/ml) を加えて、そして37°Cにて2時間インキュベートする。40 μ l 5 M NaOH、20 μ l 0.5 M EDTA (pH 8)、および224 μ lの水を加え、そして試料をドットプロット装置の別々のウェルにアプライする。ドットプロットを、従来手順によって、適切なAAV (またはヘルパーウイルス) プロンプにハイブリダイズされ、そしてDNA量を標準と比較して決定する。

30

本明細書に記載されている全ての刊行物および特許出願は、それぞれ個々の刊行物または特許出願が、詳細におよび個々に示されて参考として援用される場合と同程度に、参考として本明細書に援用されている。

本発明は、ここに十分に記載され、多くの変化および改変が、添付の請求の範囲の精神または範囲を逸脱することなく実施され得ることは、当業者には明白である。

フロントページの続き

- (72)発明者 フェラーリ, フォレスト ケイ.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27514, チャペル ヒル, アムステッド ドライブ 3
04
- (72)発明者 ギアオ, ギアオ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27514, チャペル ヒル, リバー パーチ レーン 2
10
- (72)発明者 サムルスキー, リチャード ジェイ.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27514, チャペル ヒル, ダーリン サークル 102

審査官 森井 隆信

- (56)参考文献 J. Virol., 米国, 1989年, Vol.63, No.9, 3822-3828
Proc. Natl. Acad. Sci., 米国, 1994年, Vol.91, 8802-8806
J. Virol., 米国, 1998年 3月, Vol.72, No.3, 2224-2232

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
C12N 5/00
C12N 7/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed