

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成22年7月1日(2010.7.1)

【公表番号】特表2005-537815(P2005-537815A)  
 【公表日】平成17年12月15日(2005.12.15)  
 【年通号数】公開・登録公報2005-049  
 【出願番号】特願2004-571924(P2004-571924)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 7/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/76 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/29 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)  
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/70 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/569 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/576 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 7/00	Z N A
A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/14	
C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/576	Z
C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/00	B

【誤訳訂正書】  
 【提出日】平成22年5月10日(2010.5.10)  
 【誤訳訂正1】  
 【訂正対象書類名】特許請求の範囲  
 【訂正対象項目名】全文  
 【訂正方法】変更  
 【訂正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項1】

ex vivoにおけるヘパシウイルス様感染性粒子の生産方法であって、以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；

- 前記レトロウィルス由来のコアタンパク質をコードするcDNAを含む第二の核酸配列を提供し；

- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びにヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列を提供し；ここで、E1及びE2タンパク質のC末端膜貫通ドメインが、天然E1及びE2タンパク質に対して改変されておらず；

- 前記核酸配列により宿主細胞をトランスフェクトし、そしてヘパシウイルス及びレトロウィルス由来の構造タンパク質を生産するため、培養中でcDNAの発現を可能にする十分な時間トランスフェクトした細胞を保持し；そして当該構造タンパク質にウィルス様粒子を形成させる、  
を含んで成る生産方法。

【請求項2】

前記第三の核酸配列が、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、並びにヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含んで成る請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノム及びコアタンパク質が、MLV,ALV,RSV,MPMV,HIV-1,HIV-2,SIV,EIAV,CAEV,又はHFVから成る群から選定される、請求項1又は請求項2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

前記ポリタンパク質が、ヘパシウイルスコアタンパク質及びヘパシウイルスE1タンパク質を含んで成る、請求項2又は請求項3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記ポリタンパク質が、ヘパシウイルスコアタンパク質及びヘパシウイルスE2タンパク質を含んで成る、請求項2から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記第三の核酸配列が、更にヘパシウイルスp7タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含んで成る、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記ポリタンパク質が、天然ヘパシウイルスE1及び/又はE2タンパク質を含んで成る、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記ポリタンパク質が、天然肝ウイルスp7タンパク質を含んでなる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記ポリタンパク質が、天然肝コアタンパク質、天然ヘパシウイルスE1タンパク質及び天然ヘパシウイルスE2タンパク質を含んで成る、請求項2から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記ポリタンパク質が、天然p7タンパク質を含んでなる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

コアタンパク質、E1タンパク質及びE2タンパク質、並びにp7タンパク質が、同一のヘパシウイルス由来である、請求項2から10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記ヘパシウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記 H C V コアタンパク質が、H C V コアのカルボキシ末端の最後の 2 1 アミノ酸を含んで成る請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 E 2 タンパク質が、C 末端のアミノ酸残基をそこから欠失させた E 2 タンパク質、及び超可変領域 1 ( H V R 1 ) を欠失させた天然 E 2 タンパク質から成る群から選定された突然変異した E 2 タンパク質である、請求項 1 1 又は請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記核酸配列が、更に導入遺伝子を含むパッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含んで成る、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

レトロウイルス由来コアタンパク質、並びに E 1 ヘパシウイルス糖タンパク質 及び / 又は E 2 ヘパシウイルス糖タンパク質 を含んで成る、請求項 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法により得ることのできる ヘパシウイルス様感染性粒子であって、当該 E 1 及び E 2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインが、天然 E 1 及び E 2 タンパク質に対して改変されていない、前記肝ウイルス様感染性粒子。

【請求項 1 7】

E 1 及び E 2 ヘパシウイルス糖タンパク質 を含んで成る請求項 1 6 に記載の感染性粒子

。

【請求項 1 8】

E 1 ヘパシウイルス糖タンパク質 を含んで成る請求項 1 6 に記載の感染性粒子。

【請求項 1 9】

E 2 ヘパシウイルス糖タンパク質 を含んで成る請求項 1 6 に記載の感染性粒子。

【請求項 2 0】

更に ヘパシウイルス p 7 タンパク質 を含む、請求項 1 6 から 1 9 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 2 1】

天然 E 1 及び / 又は E 2 ヘパシウイルス性糖タンパク質 を含んで成る請求項 1 6 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 2 2】

天然 p 7 タンパク質を含む、請求項 2 1 に記載の感染性粒子。

【請求項 2 3】

コア E 1 及び E 2 タンパク質、並びに p 7 タンパク質 が、同一の ヘパシウイルス から由来する、請求項 1 6 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 2 4】

前記 ヘパシウイルス が H C V である、請求項 2 3 に記載の感染性粒子。

【請求項 2 5】

前記 E 2 タンパク質が、C 末端アミノ酸残基をそこから欠失させた天然 E 2 タンパク質、及び超可変領域 1 ( H V R 1 ) を欠失させた天然 E 2 タンパク質から成る群から選定された突然変異した E 2 タンパク質である、請求項 2 4 に記載の感染性粒子。

【請求項 2 6】

前記レトロウイルスが、MLV,ALV,RSV,MPMV,HIV-1,HIV-2,SIV,EIAV,CAEV,又はHFVから成る群から選定される、請求項 1 6 から 2 5 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 2 7】

前記核酸配列が、更に導入遺伝子を含むパッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含んで成る、請求項 1 6 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 2 8】

肝炎に対するワクチンとして有用である医薬の調製のための 3 つの核酸配列の使用であって、当該核酸配列が：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードする c D N A を含む第二の核酸配

列；

- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びにヘパシウイルス E 1 タンパク質及び / 又は ヘパシウイルス E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含む第三の核酸配列；ここで当該 E 1 及び E 2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインは、天然 E 1 及び E 2 タンパク質に対して改変されておらず；

であり、そして対象の細胞中へ転移した時、当該核酸配列はヘパシウイルス及びレトロウイルスから構造タンパク質を生産することができ、前記ウイルス様粒子由来の構造タンパク質は免疫原性である使用。

【請求項 2 9】

前記第三の核酸配列が、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、及びヘパシウイルス E 1 タンパク質及び / 又は ヘパシウイルス E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含んで成る、請求項 2 8 に記載の使用。

【請求項 3 0】

前記第三の核酸配列が、更にヘパシウイルス p 7 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含んで成る、請求項 2 8 又は請求項 2 9 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 3 1】

前記ヘパシウイルスが H C V である、請求項 2 8 から 3 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 3 2】

請求項 1 6 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子の細胞受容体への結合の検出を含む、ヘパシウイルス E 1 及び / 又は E 2 糖タンパク質のための受容体の ex vivo における同定方法。

【請求項 3 3】

ヘパシウイルスのための細胞受容体を ex vivo で同定する方法であって、以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染を許容しない細胞に、ヘパシウイルスの受容体になるようなタンパク質をコードする核酸配列をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と請求項 1 6 から 2 6 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子を接触させ；

- 前記形質転換した細胞がヘパシウイルス感染を許容するに至ったか否かを決定し；そして、

- 形質転換され感染を許容するに至った細胞により発現する前記タンパク質をヘパシウイルスの細胞受容体として同定する、  
を含んで成る方法。

【請求項 3 4】

ヘパシウイルスのための細胞受容体を ex vivo で同定するための方法であって、以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染を許容する細胞から得られた発現 c D N A ライブラリーを提供し；

- 前記発現 c D N A ライブラリーによりヘパシウイルス感染を許容しない細胞をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と請求項 1 6 から 2 6 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子を接触させ；

- ヘパシウイルス感染を許容するに至ったそれらの形質転換した細胞を同定及び単離し；

- 許容性に至った細胞中でトランスフェクトした発現ベクターを単離し；そして

- 前記単離した発現ベクターの c D N A 配列によりコードされるタンパク質をヘパシウイルスの受容体として同定する、  
を含んで成る方法。

## 【請求項 35】

候補分子の存在下又は不存在下における請求項 1\_6 から 2\_6 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子による細胞感染のレベルの比較を含めて、細胞中に侵入するヘパシウイルスを干渉することができる分子の ex vivo でのスクリーニング又は同定の方法。

## 【請求項 36】

患者におけるヘパシウイルスの検出方法であり、患者の生物学的サンプル中に存在するような抗ヘパシウイルス抗体と請求項 1\_6 から 2\_6 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子との相互作用により形成される免疫複合体を検出することを含んで成る方法。

## 【請求項 37】

患者におけるヘパシウイルスの検出方法であり、請求項 1\_6 から 2\_6 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子による許容性細胞への感染に対する、患者の生物学的サンプル中に存在していると思われる抗 - ヘパシウイルス抗体の阻害的效果を検出することを含んで成る方法。

## 【請求項 38】

請求項 1\_6 から 2\_6 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子及び前記免疫複合体の適切な検出手段を含んで成る、請求項 3\_7 記載の方法のための有用な診断キット。

## 【請求項 39】

請求項 1\_6 から 2\_7 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子及び医薬的に許容され得る担体を含んで成るワクチン組成物。

## 【請求項 40】

注目の導入遺伝子を運搬する請求項 1\_6 から 2\_7 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子で細胞を感染させること含む肝細胞に注目の導入遺伝子を in vitro において転移する方法。

## 【請求項 41】

患者の疾患予防又は治療のための医薬の調製のための注目の導入遺伝子を運搬する請求項 1\_6 から 2\_7 のいずれか 1 項に記載のヘパシウイルス様粒子の使用であって、ここで患者の細胞中へ当該注目の導入遺伝子の転移を可能にし、そして疾患に対する予防又は治療効果を有す産物をコードする前記ヘパシウイルス様粒子の使用。

## 【請求項 42】

以下：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードした cDNA を含む第二の核酸配列；及び
- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びにヘパシウイルス E1 タンパク質及び / 又はヘパシウイルス E2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする cDNA を含む第三の核酸配列；ここで当該 E1 及び E2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインが、天然 E1 及び E2 タンパク質に対して改変されていない；

含んで成る形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 43】

前記第三の核酸配列が、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、並びにヘパシウイルス E1 タンパク質及び / 又はヘパシウイルス E2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードした cDNA を含んで成る、請求項 4\_2 に記載の形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 44】

前記第三の核酸配列が、更に HCV p7 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする cDNA を含んで成る、請求項 4\_2 又は請求項 4\_3 のいずれか 1 項に記載の形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 45】

前記ヘパシウイルスが HCV である、請求項 4\_2 から 4\_4 のいずれか 1 項に記載の形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 46】

候補分子の存在下又は不存在下における請求項42から45のいずれか1項に記載の形質転換した宿主細胞の標的宿主細胞への融合のレベルの比較を含む、細胞中に侵入するヘパシウイルスに干渉することができる分子のex vivoでのスクリーニング方法。

【請求項47】

以下から成るステップ：

- 合胞体フォーメーションを許容する条件下、即ち、細胞-細胞融合、及び任意の候補分子の不存在下において標的宿主細胞中へヘパシウイルス様粒子が侵入する条件下で、候補分子の不存在下又は存在下において、標的宿主細胞と前記形質転換した宿主細胞を共培養し；

- 前記候補分子の不存在下又は存在下において合胞体フォーメーションを評価し；

- 前記候補分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションと、任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体のフォーメーションを比較し；

- 任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体フォーメーションと比較して前記分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションが減少している前記候補分子を、ヘパシウイルス侵入を妨げることができる分子として同定する、を含んで成る請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記ヘパシウイルスがHCVである、請求項32から37、40及び45から47のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

ex vivoにおけるHCV様感染性粒子の生産方法であって、以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；

- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードするcDNAを含む第二の核酸配列を提供し；

- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びにHCV E1タンパク質及び/又はHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列を提供し；ここで、E1及びE2タンパク質のC末端膜貫通ドメインが、天然E1及びE2タンパク質に対して改変されておらず；

- 前記核酸配列により宿主細胞をトランスフェクトし、そしてHCV及びレトロウイルス由来の構造タンパク質を生産するため、培養中でcDNAの発現を可能にする十分な時間トランスフェクトした細胞を保持し；そして当該構造タンパク質にウイルス様粒子を形成させる、を含んで成る生産方法。

【請求項50】

前記第三の核酸配列が、連続するHCVコアタンパク質、並びにHCV E1タンパク質及び/又はHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含んで成る請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記第三の核酸配列が、更にHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含んで成る、請求項49又は50に記載の方法。

【請求項52】

前記ポリタンパク質が、天然HCV E1及び/又はE2タンパク質を含んで成る、請求項49から51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

前記ポリタンパク質が、天然肝コアタンパク質、天然HCV E1タンパク質及び天然HCV E2タンパク質を含んで成る、請求項50から52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

前記ポリタンパク質が、天然p7タンパク質を含んでなる、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記 H C V コアタンパク質が、H C V コアのカルボキシ末端の最後の 2 1 アミノ酸を含んで成る請求項 5 0 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 E 2 タンパク質が、C 末端のアミノ酸残基をそこから欠失させた E 2 タンパク質、及び超可変領域 1 ( H V R 1 ) を欠失させた天然 E 2 タンパク質から成る群から選定された突然変異した E 2 タンパク質である、請求項 5 0 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

レトロウィルス由来コアタンパク質、並びに E 1 H C V 糖タンパク質及び / 又は E 2 H C V 糖タンパク質を含んで成る、請求項 4 9 から 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法により得ることのできる H C V 様感染性粒子であって、当該 E 1 及び E 2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインが、天然 E 1 及び E 2 タンパク質に対して改変されていない、前記肝ウィルス様感染性粒子。

【請求項 5 8】

更に H C V p 7 タンパク質を含む、請求項 5 7 に記載の感染性粒子。

【請求項 5 9】

天然 E 1 及び / 又は E 2 H C V 性糖タンパク質を含んで成る請求項 5 7 又は 5 8 に記載の感染性粒子。

【請求項 6 0】

天然 p 7 タンパク質を含む、請求項 5 9 に記載の感染性粒子。

【請求項 6 1】

前記 E 2 タンパク質が、C 末端アミノ酸残基をそこから欠失させた天然 E 2 タンパク質、及び超可変領域 1 ( H V R 1 ) を欠失させた天然 E 2 タンパク質から成る群から選定された突然変異した E 2 タンパク質である、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の感染性粒子。

【請求項 6 2】

前記レトロウィルスが、MLV, ALV, RSV, MPMV, HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, CAEV, 又は HFV から成る群から選定される、請求項 5 7 から 6 1 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子。

【請求項 6 3】

肝炎に対するワクチンとして有用である医薬の調製のための 3 つの核酸配列の使用であって、当該核酸配列が：

- パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；

- 前記レトロウィルス由来のコアタンパク質をコードする c D N A を含む第二の核酸配列；

- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びに H C V E 1 タンパク質及び / 又は H C V E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含む第三の核酸配列；ここで当該 E 1 及び E 2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインは、天然 E 1 及び E 2 タンパク質に対して改変されておらず；

であり、そして対象の細胞中へ転移した時、当該核酸配列は H C V 及びレトロウィルスから構造タンパク質を生産することができ、前記ウィルス様粒子由来の構造タンパク質は免疫原性である使用。

【請求項 6 4】

前記第三の核酸配列が、連続する H C V コアタンパク質、及び H C V E 1 タンパク質及び / 又は H C V E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含んで成る、請求項 6 3 に記載の使用。

【請求項 6 5】

前記第三の核酸配列が、更に H C V p 7 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含んで成る、請求項 6 3 又は 6 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6 6】

請求項 5 7 から 6 1 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子の細胞受容体への結合の検出を含む、H C V E 1 及び / 又は E 2 糖タンパク質のための受容体の ex vivo における同定方

法。

【請求項 67】

H C V のための細胞受容体を ex vivo で同定する方法であって、以下から成るステップ

：

- H C V 感染を許容しない細胞に、H C V の受容体になるようなタンパク質をコードする核酸配列をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子を接触させ；

- 前記形質転換した細胞が H C V 感染を許容するに至ったか否かを決定し；そして、

- 形質転換され感染を許容するに至った細胞により発現する前記タンパク質を H C V の細胞受容体として同定する、

を含んで成る方法。

【請求項 68】

H C V のための細胞受容体を ex vivo で同定するための方法であって、以下から成るステップ：

- H C V 感染を許容する細胞から得られた発現 c D N A ライブラリーを提供し；

- 前記発現 c D N A ライブラリーにより H C V 感染を許容しない細胞をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子を接触させ；

- H C V 感染を許容するに至ったそれらの形質転換した細胞を同定及び単離し；

- 許容性に至った細胞中でトランスフェクトした発現ベクターを単離し；そして

- 前記単離した発現ベクターの c D N A 配列によりコードされるタンパク質を H C V の受容体として同定する、

を含んで成る方法。

【請求項 69】

候補分子の存在下又は不存在下における請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の感染性粒子による細胞感染のレベルの比較を含めて、細胞中に侵入する H C V を干渉することができる分子の ex vivo でのスクリーニング又は同定の方法。

【請求項 70】

患者における H C V の検出方法であり、患者の生物学的サンプル中に存在するような抗 H C V 抗体と請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子との相互作用により形成される免疫複合体を検出することを含んで成る方法。

【請求項 71】

患者におけるヘパシウイルスの検出方法であり、請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子による許容性細胞への感染に対する、患者の生物学的サンプル中に存在していると思われる抗 - H C V 抗体の阻害的效果を検出することを含んで成る方法。

【請求項 72】

請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子及び前記免疫複合体の適切な検出手段を含んで成る、請求項 71 記載の方法のための有用な診断キット。

【請求項 73】

請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子及び医薬的に許容され得る担体を含んで成るワクチン組成物。

【請求項 74】

注目の導入遺伝子を運搬する請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子で細胞を感染させること含む肝細胞に注目の導入遺伝子を in vitro において転移する方法

。

【請求項 75】

患者の疾患予防又は治療のための医薬の調製のための注目の導入遺伝子を運搬する請求項 57 から 61 のいずれか 1 項に記載の H C V 様粒子の使用であって、ここで患者の細胞

中へ当該注目の導入遺伝子の転移を可能にし、そして疾患に対する予防又は治療効果を有す産物をコードする前記 H C V 様粒子の使用。

【請求項 76】

以下：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；  
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードした c D N A を含む第二の核酸配列；及び  
- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、並びに H C V E 1 タンパク質及び / 又は H C V E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含む第三の核酸配列；ここで当該 E 1 及び E 2 タンパク質の C 末端膜貫通ドメインが、天然 E 1 及び E 2 タンパク質に対して改変されていない；  
含んで成る形質転換した宿主細胞。

【請求項 77】

前記第三の核酸配列が、連続する H C V コアタンパク質、並びに H C V E 1 タンパク質及び / 又は H C V E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードした c D N A を含んで成る、請求項 76 に記載の形質転換した宿主細胞。

【請求項 78】

前記第三の核酸配列が、更に H C V p 7 タンパク質を含むポリタンパク質をコードする c D N A を含んで成る、請求項 76 又は請求項 77 に記載の形質転換した宿主細胞。

【請求項 79】

候補分子の存在下又は不存在下における請求項 76 から 78 のいずれか 1 項に記載の形質転換した宿主細胞の標的宿主細胞への融合のレベルの比較を含む、細胞中に侵入する H C V に干渉することができる分子の ex vivo でのスクリーニング方法。

【請求項 80】

以下から成るステップ：

- 合胞体フォーメーションを許容する条件下、即ち、細胞 - 細胞融合、及び任意の候補分子の不存在下において標的宿主細胞中へ H C V 様粒子が侵入する条件下で、候補分子の不存在下又は存在下において、標的宿主細胞と前記形質転換した宿主細胞を共培養し；  
- 前記候補分子の不存在下又は存在下において合胞体フォーメーションを評価し；  
- 前記候補分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションと、任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体のフォーメーションを比較し；  
- 任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体フォーメーションと比較して前記分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションが減少している前記候補分子を、H C V 侵入を妨げることができる分子として同定する、  
を含んで成る請求項 79 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】機能的 E 1 , E 2 エンベロープタンパク質を含む感染性ヘパシウイルスシュード粒子

【技術分野】

【0001】

本発明は、レトロウイルスコア粒子上で集成した機能的 E 1 , E 2 エンベロープ糖タンパク質を含むヘパシウイルスシュード粒子 (hepacivirus pseudo-particles) の作製及び使用に関する。これらの粒子は高い感染性があり、そして有効なヘパシウイルスビリオンのモデルを構成する。

【背景技術】

## 【 0 0 0 2 】

全世界で数億人がC型肝炎ウイルス（HCV）に感染している（Lavanchy等.,1999）。慢性疾患への進行はHCVに感染した人々の大部分に起こる。感染は肝疾患のリスク及び肝細胞性癌の増加と関連し、並びに肝臓移植の主な指標となった。HCV感染は、HIVに感染した人々の合併症の数も増加させる（Dieterich,2002）。現在のところ新しい感染を予防するための役立つワクチンはなく、そして慢性C型肝炎のための治療にのみインターフェロン 単独療法、又はグアノシンアナログであるリバビリンとの併用療法のいずれかがある。しかしながら40%に満たない患者にのみ治療の応答があるだけである。明確には、HCVに感染した人の健康の犠牲は、今後数10年以内に激高することが予測されるため、新規治療戦略が早急に求められる。

## 【 0 0 0 3 】

そのゲノム構造及び複製機構に基づき、HCVはウイルスの新規分類のプロトタイプとみなされ、そしてHepacivirus属Flaviviridaeウイルスファミリー中に仮に分類された（Robertson等.,1998）。

## 【 0 0 0 4 】

構造的及び非構造的なタンパク質であるヘパシウイルスタンパク質は一つのポリタンパク質前駆体から発現し、そして細胞性及びウイルス性プロテアーゼによってそれぞれ開裂し、個々に細胞区画へ放出される（Lindenbach及びRice,2001）。Flaviviridaeの他のメンバー、ヘパシウイルス、及び特にHCVゲノム構成によって、2つのエンベローブ糖タンパク質E1及びE2を含む脂質エンベローブで覆われたウイルスゲノム及びコアタンパク質（C）を含む、ヌクレオカプシドから成るウイルスが示唆される。

## 【 0 0 0 5 】

今までのこところ、C型肝炎ウイルス（HCV）の研究は、ウイルス増幅のための有効且つ信頼できる培養システムの不足によって、及びin vivoにおけるHCV複製を研究するための適した動物モデル（Lindenbach及びRice,2001）の不足によって阻止されてきた。最近、細胞培養中にミニゲノムを施した自己複製に基づくHCV複製のためのモデルが確立された（Blight等.,2000；Lohmann等.,1999）。HCVゲノム複製を研究することは非常に有用であるが、このシステムはHCV粒子の生産を支援しないシステムである（Pietzschmann等.,2002）。

## 【 0 0 0 6 】

昆虫細胞中のHCVウイルス様粒子（VLP）の生産は既に報告されている（W098/21338,Wellnitz等.,2002；Baumert等.;1998,Owsianka等.,2001）。しかしながら、これらの粒子は分泌されず、そして細胞内画分由来のそれらの抽出物は、感染性でないVLP製剤を産出した。

## 【 0 0 0 7 】

シュード型の水泡性口内炎ウイルス（SVS）ウイルス性粒子は、キメラのE1及び/又はE2糖タンパク質に設計され、それらの膜貫通ドメインは細胞表面へそれらを輸送することができるように修飾された（Buonocore等.,2002；Matsuura等.,2001）。しかしながら、かかる修飾は、E1E2複合体の立体配座及び機能を妨げるようであり（Matsuura等.,2001）、そしてかかるシュード粒子は候補HCVワクチンであるにもかかわらず（Rose等.,2001）、HCV集成及び細胞進入を調査するための道具としてのそれらの使用は、それらの以前の結果が人工的であるという目下のコンセンサスがあるため、論争の余地を残す（Buonocore等.,2002）。

## 【 0 0 0 8 】

同様に、国際特許出願W002/074941は、修飾されたE1及びE2 HCV糖タンパク質（それらの膜貫通ドメインの変化を有す）を提示するレンチウイルスに基づくシュード粒子が、293ヒト腎細胞及びHepG2肝癌細胞中へ感染することができることを開示する。この特許出願は更に293及びHepG2細胞へ感染することもできる修飾されていないE1E2糖タンパク質を提示するヒト泡沫ウイルス由来のシュード粒子を示す。しかしながら、これらの発見は、上記の通り、HCVシュード粒子上に施されたE1E2の膜貫通の

修飾 (Hsu等.,2003) はそれらの機能的特性を撤廃するから、そして野生型の H C V は293 及び H e p G 2 細胞へ感染性でないから (Bartosch等.,2003 a 及び b )、人工的なものである。

【 0 0 0 9 】

キメラの H C V - B V D V (ウシウイルス性下痢ウイルス) 粒子は、ヒト肝細胞株 H u h -7 (WO 00/75352) に感染性であることを示した。しかしながら、感染は H C V に対する抗血清により中和することができず、これらの粒子は H C V ビリオンの有効なモデルを構成しなかったことを示した。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

従って、新たなアプローチでは、H C V 細胞進入阻害剤をデザインするために H C V 集成及び細胞への進入を研究すること、並びに H C V に対する体液性免疫応答を研究することが非常に必要とされる。増幅し得る H C V 粒子の感染性の利用性は、診断への応用及び治療薬の開発のための有用な材料も提供するであろう。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明者等は、レトロウイルス及びレンチウイルスのコア粒子上に機能的な、特に改変されていない、H C V 糖タンパク質を提示することにより、集成できる感染性シュード粒子を首尾よく作製した。これらの H C V シュード粒子中へパッケージされた緑色蛍光タンパク質マーカー遺伝子の存在は、H C V 糖タンパク質によって仲介される感染の信頼性及び迅速な測定を可能にする。主要な肝細胞及び肝癌細胞は、in vitroでの感染の主要なターゲットであることを見出した。たとえ低い残存感染性が E 1 又は E 2 糖タンパク質のいずれかを担持するシュード粒子で観察されても、シュード粒子の高い感染性は E 1 及び E 2 H C V 糖タンパク質の両方を要求した。感染性は更に H C V 感染患者からの血清、及びいくつかの抗 E 2 モノクローナル抗体によって中和されることを見出した。これらの結果をまとめると、本明細書において発表するシュード粒子が、野生型の H C V (Bartosch 等.,2003a;Castet,2003) の早期感染ステップを真似る今まで初めて報告されたシュード粒子であることを示す。

【 0 0 1 2 】

本発明はこのようにヘパシウイルスビリオンの妥当なモデルを構成する感染性ヘパシウイルス シュード粒子、並びに特に E 1 及び E 2 糖タンパク質を担持する H C V シュード粒子を発案する。

【 0 0 1 3 】

定義

用語“ベクター”、“クローニングベクター”及び“発現ベクター”とは、宿主を形質転換し、導入する配列の発現を促進するように(例えば転写及び翻訳)宿主細胞に導入することができる D N A 又は R N A 配列(例えば外来遺伝子)による媒体を意味する。ベクターとは、典型的に挿入される外来 D N A 中の伝達可能物質の D N A を含む。D N A の他のセグメント中へ D N A の 1 のセグメントを挿入する共通の方法は、制限サイトと呼ばれる特異的なサイト(ヌクレオチドの特異的な官能基)で D N A を切断する制限酵素と呼ばれる酵素の使用に關与する。一般的に外来 D N A は 1 以上のベクター D N A の制限サイトに挿入され、その後、伝達可能ベクター D N A と一緒に宿主細胞の中へベクターによって運搬される。D N A のセグメント又は配列は、発現ベクターのような挿入された又は附加された D N A を有し、“D N A 構造体”と呼ぶこともできる。ベクターの共通のタイプは、“プラスミド”であり、通常バクテリア起源の一般的に 2 本鎖 D N A 分子を自己に含み、追加の(外来の) D N A を容易に受け入れることができ、そして適した宿主細胞中へ容易に導入することができる。プラスミドベクターとは、しばしばコードされた D N A 及びプロモーター D N A を含有し、そして外来 D N A を挿入するために適した 1 以上の制限サイトを有す。コードされた D N A とは、特定のタンパク質又は酵素のための特定のアミノ

酸配列をコードするDNA配列である。プロモーターDNAとは、開始、調節、又は他のメディエーターもしくはコードされたDNAの発現を調節するDNA配列である。プロモーターDNA及びコードされたDNAは同一の遺伝子由来又は異なる遺伝子由来でもよく、並びに同一又は異なる有機体由来でもよい。ベクターの多くは、プラスミド及び真菌類のベクターを含み、多様な真核生物及び原核生物宿主中で複製及び/又は発現すると発表された。

【0014】

“コードされた配列”又はRNA、ポリペプチド、タンパク質、もしくは酵素といった発現産物を“コード”する配列とは、ヌクレオチド配列、即ち、ポリペプチド、タンパク質、もしくは酵素のためのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、であり、それが発現した時、そのRNA、ポリペプチド、タンパク質、又は酵素の生産をもたらす。

【0015】

用語“トランスフェクション”とは、細胞中への外来核酸(DNA、cDNA又はRNA)の導入を意味し、ゆえに宿主細胞は所望される物質、典型的には導入された遺伝子もしくは配列によりコードされたタンパク質、を生産するために導入された遺伝子又は配列を発現させるであろう。導入される遺伝子は開始、終結、プロモーター、シグナル、分泌、又は細胞の遺伝の仕組みにより使用される他の配列のような制御又は調節配列を含んでよい。導入されたDNA又はRNAを受容及び発現する宿主細胞は、“形質転換”された。

【0016】

用語“宿主細胞”とは、細胞による物質の生産、例えば細胞による遺伝子、DNA配列、タンパク質、ビリオンの発現のため、任意の方法で選定され、修飾され、形質転換され、増殖させ、或いは使用又は処理された任意の組織の任意の細胞を意味する。本明細書中では、宿主細胞とは哺乳動物の細胞である。適した宿主細胞は、HuH-7ヒト肝細胞性癌(Nakabayashi等.,1982)、HeP3Bヒト肝細胞性癌(ATCC HB-8064)、HeP G2ヒト肝細胞性癌(HB-8065)、HT-1080ヒト繊維肉腫(CCL-121)、293Tヒト胚腎性細胞(ATCC CRL-1573)、TE671ヒト横紋筋肉腫(ATCC CRL-8805)、JurkatヒトT細胞白血病(TIB-152)、CEMヒトリンパ芽球性白血病(CCL-119)、COS-7アフリカ緑サル繊維芽細胞腎(CRL-1651)、VEROアフリカ緑サル腎(CCL-81)、PG-4ネコアストロサイト(CRL-2032)、BHK-21ゴールデンハムスター腎(CCL-10)、CHOチャイニーズハムスター卵巣(ATCC CCL-61)、及びNIH3T3マウス繊維芽細胞を含む。特定の態様における前記宿主細胞は、293Tである。

【0017】

本明細書において、用語“許容細胞”とは、ヘパシウイルス感染を許容する細胞を意味する。

【0018】

“ヘパシウイルス”とは、C型肝炎ウイルス、GB型ウイルス、即ちGBウイルスA、GBウイルスB、GBウイルスC、及びGBV-A様作用物質、並びにG型肝炎ウイルスを意味する。好適には前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルス(HCV)である。本発明の明細書において、前記ヘパシウイルスは、そこにおいて適した任意の種、遺伝子型、及びサブタイプ、並びにそれらの変異体でもよい。

【0019】

“C型肝炎ウイルス”又は“HCV”は、Flaviviridaeファミリーの一員である。他のヘパシウイルスゲノムと同様にHCVゲノムは、一つのポリタンパク質NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOHをコードし、それは構造的(“コア”(C)と呼ばれるN末端ヌクレオカプシドタンパク質、並びに糖タンパク質E1及びE2)、及び非構造的(NS)タンパク質の両方へ同時及び後翻訳的にプロセッシングされる。ポリタンパク質のアミノ末端部分は、宿主細胞のプロテアーゼ及びその産物により切断され、コア及びエンベロープ(E1及びE2)タンパク質がHCV粒子(ビリオン)の主要な構成物質になると信じられている。

## 【0020】

翻訳が完了するまでの間又は翻訳後速やかに、ポリタンパク質前駆体中の最大の切断が起こるにもかかわらず、E2のカルボキシ末端で見出された疎水性ドメインのE2及びp7の間のプロセッシングは不完全であり、十分にプロセッシングされたE2及び切断されないE2-p7の生産をもたらす。HCVのp7ポリペプチドは小さな疎水性タンパク質であり、未だ十分に特徴化されていない。確かに、この長さ63アミノ酸のポリペプチドの構造は決定されておらず、そしてその推定されている機能は未知のままである。

## 【0021】

本発明の明細書中におけるHCVは、任意の遺伝子型、例えば1, 2, 3, 4, 5, 6及びサブタイプ、例えばa, b, c, d, e, f, g, h, k及びそれらの変異体である。

## 【0022】

HCV株Hのポリタンパク質配列(遺伝子バンクアクセス番号AF009606)はSEQ ID N° 16において示される。HCV E1、E2、p7及びコアタンパク質のアミノ酸の位置は、この配列SEQ ID N° 16を参照することにより後に示す。

## 【0023】

用語“変異体”とは、相同のポリヌクレオチド配列をいい、対応するアミノ酸配列が、HVCの超可変性のために、異なるHCV株中に見出された。

## 【0024】

好適には、HCVは1a又は1bのいずれかの遺伝子型を有し(Dubuisson等., 1994)、特にここに挙げたHCV遺伝子型は、最も優勢であり、そして最もインターフェロン治療(Zein, 2000)に抵抗性を示す。同様に、好適にはHCVは遺伝子型2a、2b、3a、3b、4a又は4bのいずれかを有す。

## 【0025】

本明細書において用いられる用語“ヘパシウイルス様粒子”、“ヘパシウイルス様 シュード粒子”、或いは“ヘパシウイルス シュード粒子”又は“ヘパシウイルス シュードタイプ粒子”とは、自然に発生するウイルス粒子ではなく、ヘパシウイルスのエンベロープタンパク質を含むものを言う。好適には、本発明に従ったヘパシウイルス様粒子は野生型のヘパシウイルスビリオンと同じように細胞向性を示す。

## 【0026】

本明細書において用いられる用語“HCV様粒子”又は“HCVシュード粒子”又は“HCVシュードタイプ粒子”とは、自然に発生するウイルス粒子ではなく、HCVのエンベロープタンパク質を含むものを言う。

## 【0027】

本発明の粒子は、より詳細にはレトロウイルスコアタンパク質を含む。かかる粒子は当業界における当業者により容易に生産することができる。当業者は例えば免疫応答を調節するための抗原を発現する合成レトロウイルス粒子の生産について発表したEP 1 201 750を参照することができる。

## 【0028】

本発明のヘパシウイルス、特にHCV、シュード粒子は、標的細胞へ感染性である。好適には、HCVシュード粒子は野生型のHCVビリオンと同じような向性、即ち、肝細胞の優先的な向性を示す(“野生型のHCVビリオンの向性”とも呼ばれる)。好適には肝標的細胞は、主要なヒト肝細胞、及び肝癌細胞株HuH7, PLC/PRF/5、又はHe p 3 B由来の細胞、及びCD 8 1 (“He p G 2 - CD 8 1”)を発現させるために遺伝子操作されたHe p G 2細胞から成る群から選定され得る。上記の通り、野生型のHCVはHe p G 2細胞株に感染性ではなく、及び本明細書において記載の通りHe p G 2細胞株は、本発明のHCVシュード粒子による非常に弱いレベルの感染を見せる。しかしながら、発明者等は、CD 8 1の発現がHe p G 2細胞中(Bartosch等., 2003 b)へのHCVシュード粒子の侵入を回復させるために十分であることを証明した。He p G 2 - CD 8 1はこのようにHCVビリオン及びHCVシュード粒子のための肝の標的細胞の更な

る例を示す。

【0029】

本発明の明細書において、用語“感染性”は細胞へ入ることを導くウィルスサイクルの最初のステップを完全に本発明の粒子の能力を記載するために用いる。しかしながら、宿主細胞との相互作用により、ヘパシウイルス様粒子は子孫ウィルスを生産するかもしれないし、しないかもしれない。

【0030】

用語“ヘパシウイルスのエンベロープタンパク質”はヘパシウイルスの天然E1又はE2糖タンパク質又はそれらの突然変異体を意味する。

【0031】

“E1糖タンパク質”又は“E1タンパク質”とは、ヘパシウイルス株の任意の種、遺伝子型、サブタイプ及び変異体由来のエンベロープ1タンパク質(E1)を意味する。

【0032】

“E2糖タンパク質”又は“E2タンパク質”とは、ヘパシウイルス株の任意の種、遺伝子型、サブタイプ及び変異体由来のエンベロープ2タンパク質(E2)を意味する。

【0033】

好適には、E1及びE2糖タンパク質は同一のヘパシウイルス株由来物である。好適には、E1及び/又はE2糖タンパク質は天然である。

【0034】

“p7タンパク質”はヘパシウイルス株の任意の種、遺伝子型、サブタイプ、及び変異体由来の天然p7タンパク質、又はそれらの突然変異体を意味する。好適には、p7タンパク質並びにE1及び/又はE2糖タンパク質は同一のヘパシウイルス株由来である。好適には、p7タンパク質並びにE1及び/又はE2糖タンパク質は天然である。

【0035】

用語“HCVのエンベロープタンパク質”とは、HCVのE1もしくはE2糖タンパク質、又はそれらの突然変異体を意味する。

【0036】

“HCV E1糖タンパク質”又は“HCV E1タンパク質”とは、HCV株の任意の遺伝子型、サブタイプ及び変異体由来エンベロープ1タンパク質(E1)を意味する。全長E1タンパク質は、SEQ ID N° 16の192から383アミノ酸により定義づけられる。

【0037】

“HCV E2糖タンパク質”又は“HCV E2タンパク質”とは、HCV株の任意の遺伝子型、サブタイプ及び変異体由来エンベロープ2タンパク質(E2)を意味する。全長E2タンパク質は、SEQ ID N° 16の384から746アミノ酸により定義づけられる。

【0038】

好適には、HCV E1及びE2糖タンパク質は同一のHCV株から由来する。好適には、HCV E1及び/又はE2糖タンパク質は天然である。

【0039】

“HCV p7タンパク質”とは、HCV株の任意の遺伝子型、サブタイプ、及びそれらの変異体由来の天然p7タンパク質(SEQ ID N° 16中で見られるような747から809アミノ酸)、又はそれらの突然変異体を意味する。好適には、HCV p7タンパク質並びにE1及び/又はE2糖タンパク質は同一のHCV株に由来する。好適には、HCV p7タンパク質並びにE1及び/又はE2糖タンパク質は天然である。

【0040】

用語“突然変異体”又は“突然変異”とは、DNA配列の変化を意味し、天然のE1、E2、又はp7タンパク質のアミノ酸配列の修飾をもたらす。かかる修飾は例えば1以上のアミノ酸の置換及び/又は欠失を可能とする。突然変異体には天然E1、E2、及びp7タンパク質のフラグメントを特に含む。変異体は、天然的に生じる突然変異体の特殊な

例である。突然変異体は、ワクチン接種の目的のための細胞感染性の維持、或いはE 1及び/又はE 2の抗原性の増加のために必要であるE 1及び/又はE 2タンパク質、並びに任意にp 7タンパク質の構造的要素を同定するために有用であるとしてより詳細に考慮される。

【0041】

好適には、i) 突然変異体E 1、E 2、又はp 7タンパク質はレトロウイルスに基づくシュード粒子上へ集成する能力を保持し、そして宿主細胞によって放出されるようにシュード粒子を作製することを可能にし；及び/又はiii) 突然変異体E 1、E 2、又はp 7タンパク質を担持する当該シュード粒子は肝細胞のHCVビリオンの優先的な向性を保持する。

【0042】

これに関して、糖タンパク質の膜への固定し、そしてウイルス粒子上への集合を可能にするE 1又はE 2糖タンパク質のC末端膜貫通ドメインの実質的な変更は、好ましくは避けるべきである。なぜなら、これらの変更は、細胞向性の変化をもたらすか、及び/又はシュード粒子の組み立て及び放出を妨げる可能性があるからである。より詳細には、膜貫通ドメイン及び/又は細胞質尾部が異種タンパク質、例えばVSV-Gタンパク質の膜貫通ドメイン及び/又は細胞質尾部により、少なくとも部分的に、好ましくは実質的に全体的に置換された突然変異E 1又はE 2タンパク質は、特にそのようにして生産されたシュード粒子がもはや野生型HCVビリオンの向性を示さないような場合、本発明の範囲から除外されるべきである。

【0043】

好都合には、突然変異したE 1、E 2、又はp 7タンパク質を有すヘパシウイルスシュード粒子は、対応する天然E 1、E 2、又はp 7タンパク質を担持するシュード粒子と比較したところ、それらの感染性の減少は見られないものを言う。この観点から、好適なヘパシウイルスシュード粒子は、細胞レセプターへ付着するヘパシウイルス中に含まれるE 1又はE 2のドメインに影響する突然変異体を含まない。特に、前記シュード粒子はHCV細胞受容体であると推定されている(Pileri等.,1998;Scarselli等.,2002)CD 81への結合ドメインの又はスカベンジャー受容体クラスBタイプ1(SR-B1)の一つを突然変異させたHCV E 2糖タンパク質を含まないであろう。CD 81へのE 2結合ドメインは、E 2(SEQ ID N° 16の474-494、522-551及び612-620アミノ酸)の両末端で3つに分離したセグメントとして定義され、E 2糖タンパク質ホモ二量体の頭部から尾部までのモデルにおいて互いに結合することができ(Yagnik等.,2000)、一方SR-B1へ結合するE 2は、超可変領域1により仲介される(HVR1、SEQ ID N° 16の384から410アミノ酸)(Bartosch等.,2003b;Scarselli等.,2002)。

【0044】

E 1、E 2又はp 7の好適な突然変異体は、それらを担持するヘパシウイルスシュード粒子の感染性の増加をもたらす。特に前記E 2突然変異体は、最後のC末端残基を欠失させたE 2糖タンパク質であってよい(SEQ ID N° 16中に示されるAla746)。10から50倍の感染性の増強は、E 2タンパク質のC末端の切断(SEQ ID N° 16の384から745アミノ酸)したものを担持するHCVシュード粒子と天然の全長E 2糖タンパク質を担持するHCVシュード粒子との比較で観察された。

【0045】

しかしながら、本発明に伴うヘパシウイルスシュード粒子は、突然変異したE 1、E 2、又はp 7タンパク質を含んでよく、そして天然E 1、E 2、又はp 7タンパク質を担持する対応するシュード粒子との比較において感染性を減少させることを示した。それにもかかわらず、かかるシュード粒子はワクチン接種の目的のため有益であり、そしてウイルスの細胞侵入メカニズムの理解のための興味深いツールであることを示す。従って、当該突然変異体は超可変領域1(HVR1)を欠失させたE 2糖タンパク質を包含してよく、一方その粒子は、感染力が減少したにもかかわらず、感染性を残したまま生産された。

## 【0046】

用語“ヘパシウイルスコア”とは、ヘパシウイルス株、それらのフラグメント、又はそれらの変異体の天然、全長、コアタンパク質を意味する。一つの態様によると、コアタンパク質はコアシグナルペプチドを含むヘパシウイルスコア（C）のN末端的に切断されたフォームである。その機能が達成された後、コアタンパク質は細胞性プロテアーゼによりプロセッシングされ、それによってポリタンパク質E1E2から切断される。従って、ヘパシウイルスコアタンパク質は本発明に係るシュード粒子中に見出されない。当業者はヘパシウイルスのコアタンパク質が任意の異種のタイプI膜タンパク質（即ち、そのC末端により膜に固定されたタンパク質）のシグナル配列を含むペプチド配列により置き換えることができることを容易に理解するであろう。

## 【0047】

“シグナルペプチド”とは、タンパク質上に存在するペプチドを意味し、分泌されるか、又は膜成分とされるか、のいずれかの目的とされる。シグナルペプチドは普通N末端に位置し、通常成熟タンパク質には存在しない。それは通常シグナル認識粒子と相互作用する配列（約20個の長さのアミノ酸）を言い、そして共翻訳的な挿入が起こる小胞体ヘリポソームを導く。シグナル配列は、通常は小胞体の槽表面上に位置する特異的なプロテアーゼであるシグナルペプチターゼによって成長したペプチド鎖から除去される。

## 【0048】

本発明の明細書中における“異種の”とは、ヘパシウイルスビリオン中、及び特にHCVビリオン中において非天然に生じたタンパク質を意味する。

## 【0049】

タイプI膜タンパク質からのシグナル配列の例は、当業界における当業者に周知である。例えば参考文献では、免疫グロブリンのシグナル配列、又はウイルス性タイプI糖タンパク質のシグナル配列、特にレトロウィルスの表面の糖タンパク質を作製し得る。タイプI糖タンパク質の例は、Paetzel等（2002）及びvon Heijne（1990）において更に発表された。

## 【0050】

本明細書において用いられる用語“HCVコア”とは、様々なHCV株の天然コアタンパク質、それらのフラグメント、又はそれらの変異体を意味する。HCVコアは、そこへ結合したE1又は任意にE2のためのシグナルペプチドを提供し、それは小胞体へのタンパク質トランスロケーションを可能にする。HCVコアシグナルペプチドはHCVコアのカルボキシ末端の最後の21残基に相当する（GCSFSIFLLALLSCLTVPAS A, SEQ ID N° 1; SEQ ID N° 16の171から191アミノ酸に対応する）。一つの態様によると、コアタンパク質はこのようなHCVコア（C）のフォームをN末端的に切断する。好適にはCはHCVコアのカルボキシ末端の最後の21残基を含む。特にHCVコアはHCVコアのカルボキシ末端の最後の60残基から構成されてよい（SEQ ID N° 16の132から191アミノ酸）。

## 【0051】

本発明の明細書中において、用語“天然”又は“非修飾”とは、野生型の、全長タンパク質を記載するために中立的に用いられる。

## 【0052】

本明細書において使用される用語“ポリタンパク質”とは、本来の適切な生物学的活性を保持する配列において互いに結合した個々のタンパク質から構成されるタンパク質構造体を記載するために使用した。

## 【0053】

用語“ヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質へ結合したヘパシウイルスコアタンパク質を含むポリタンパク質”、又は“連続するヘパシウイルスコアタンパク質、及びヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質”とは、CE1E2, CE2E1, CE1, CE2, CE1E2, CE2E1, CE1, 及び CE2ポリタンパク質を含む。任意に、前

記ポリタンパク質は更に p7 タンパク質を含む。ヘパシウイルス E1 タンパク質及び/又はヘパシウイルス E2 タンパク質と結合したヘパシウイルスコアタンパク質を含むポリタンパク質はこのようにして付加的に CE1E2p7, CE2p7E1, CE1p7, CE2p7, CE1E2p7, CE2p7E1, CE1p7, 及び CE2p7 ポリタンパク質を含む。

【0054】

“CE1E2”とは、連続的にヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E1 タンパク質及びヘパシウイルス E2 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2E1”とは、連続的にヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E2 タンパク質及びヘパシウイルス E1 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1”とは、ヘパシウイルス E1 タンパク質と結合したヘパシウイルスコアタンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2”とは、ヘパシウイルス E2 タンパク質と結合したヘパシウイルスコアタンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1E2”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにヘパシウイルス E1及びヘパシウイルス E2 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2E1”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにヘパシウイルス E2及びヘパシウイルス E1 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1”とは、ヘパシウイルス E1 タンパク質と結合したヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端を含むポリタンパク質をいう。“CE2”とは、ヘパシウイルス E2 タンパク質と結合したヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端を含むポリタンパク質をいう。CE1E2、及び CE2 は、E2 末端での終止コドン挿入することによって構築し、一方 CE2E1 及び CE1 は E1 末端での終止コドン挿入することにより構築した。“CE1E2p7”とは、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E1 タンパク質、ヘパシウイルス E2 タンパク質、及びヘパシウイルス p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2p7E1”とは、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E2 タンパク質、ヘパシウイルス p7 タンパク質、及びヘパシウイルス E2 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1p7”とは、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E1 タンパク質、及びヘパシウイルス p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2p7”とは、連続するヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E2 タンパク質、及びヘパシウイルス p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1E2p7”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、ヘパシウイルス E1 タンパク質、ヘパシウイルス E2 タンパク質、及びヘパシウイルス p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2p7E1”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、ヘパシウイルス E2 タンパク質、ヘパシウイルス p7 タンパク質、及びヘパシウイルス E1 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE1p7”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、ヘパシウイルス E1 タンパク質、及び p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。“CE2p7”とはヘパシウイルスコアタンパク質のカルボキシ末端、ヘパシウイルス E2 タンパク質、及び p7 タンパク質を含むポリタンパク質をいう。CE1E2p7、CE1p7 及び CE2p7 は、p7 の末端に終止コドン挿入することにより構築され、一方 CE2p7E1 は E1 の末端で終止コドン挿入することにより構築された。

【0055】

用語“HCV E1 タンパク質及び/又は HCV E2 タンパク質へ結合した HCV コアタンパク質を含むポリタンパク質”、又は“連続する HCV コアタンパク質、並びに HCV E1 タンパク質及び/又は HCV E2 タンパク質を含むポリタンパク質”とは、HCV CE1E2, CE2E1, CE1, CE2, CE1E2, CE2E1, CE1, 及び CE2 ポリタンパク質を含む。任意に、前記ポリタンパク質は更に p7 タンパク質を含む。HCV E1 タンパク質及び/又は HCV E2 タンパク質と結合した HCV コアタンパク質を含むポリタンパク質は、このようにして付加的に HCV CE1E2p7, CE2p7E1, CE1p7, CE2p7, CE1E2p7, CE2p7E1,

CE1p7, 及び CE2p7ポリタンパク質を含む。"HCV CE1E2"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質及びHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2E1"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質及びHCV E1タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE1"とはHCV E1タンパク質と結合したHCVコアタンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2"とはHCV E2タンパク質と結合したHCVコアタンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HVC CE1E2"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにHCV E1及びHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HVC CE2E1"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにHCV E2及びHCV E1タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HVC CE1"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにHCV E1タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HVC CE2"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、並びにHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をいう。HCV CE1E2、及びHCV CE2は、E2の末端に終止コドン挿入することにより構築し、一方、CE2E1、及びCE1はE1の末端に終止コドン挿入することにより構築した。"HCV CE1E2p7"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2p7E1"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質、HCV p7タンパク質、及びHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE1p7"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質、及びHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2p7"とは、連続するHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE1E2p7"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、HCV E1タンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2p7E1"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、HCV E2タンパク質、HCV p7タンパク質、及びHCV E1タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE1p7"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、HCV E1タンパク質、及びp7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。"HCV CE2p7"とは、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端、HCV E2タンパク質、及びp7タンパク質を含むポリタンパク質をいう。HCV CE1E2p7、HCV CE1p7、及びHCV CE2p7は、p7の末端で終止コドン挿入することにより構築し、一方、CE2p7E1はE1の末端で終止コドン挿入することにより構築した。

【0056】

"レトロウイルス"とは、RNA分子から成るゲノムを持つウイルスを意味し、逆転写酵素、即ちレトロウイルス科ファミリーのメンバー、を含む。レトロウイルスはオンコウイルス、レンチウイルス及びスプマウイルスの中で分類される。好適には前記レトロウイルスはオンコウイルス(例えばMLV, ALV, RSV, 又はMPMV)、レンチウイルス(例えばHIV-1、HIV-2、SIV、EIAV, 又はCAEV)、或いはHFVのようなスプマウイルスである。これらのレトロウイルスのゲノムは、データバンクで容易に入手できる。

【0057】

本発明の明細書中における"パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む核酸配列"とは、"シス-作用"配列として公知のレトロウイルスの核酸配列を含む配列を意味する。これらは、転写及び組込みの制御のための末端反復配列(LTRs)、カプシド化のために必要なpsi配列、及びプライマー結合サイト(PBS)及びレトロウイルスゲノムの逆転写のために必要なポリプリントラック(PPT)配列を含む。好都合には、パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む前記核酸配列は、更に導入遺伝子を含む。

【0058】

前記レトロウイルスゲノムは、任意のトランス - 相補機能不存在下において、複製欠陥的又は複製能的であってよい。複製能的ゲノムは、更にgag, pol, 及びenvレトロウイルス遺伝子を含む。複製欠陥的ゲノム中においては、ウイルス遺伝子gag, pol, 及びenvは欠失している。しかしながら、ウイルス性シュード粒子の集成は、gag, pol 及びenvを含むが、“シス”配列に対して欠陥である他のベクターをトランス位置に提供することによって達成してよい。それらの発現は、ウイルス遺伝子の増殖のため、及び完全なウイルス粒子の形成のため必要である遺伝子を排除した外来遺伝子のカプシド化を可能にする。

【0059】

本明細書において使用される用語“導入遺伝子”とは、本発明の粒子により感染した標的細胞中で発現する遺伝子をいう。

【0060】

導入遺伝子の例は、治療に関連した分子をコードする遺伝子、マーカー遺伝子、免疫調節因子をコードする遺伝子、抗原、又は自殺遺伝子を含む。

【0061】

“マーカー遺伝子”とは発現を検出することができる遺伝子をいう。例えばマーカー遺伝子の発現は、蛍光放出、色素原反応、又は発現が起こるところの細胞を優先的に成長される（抗生物質耐性遺伝子）といった検出可能シグナルを産出することができる。

【0062】

“免疫調節因子”とは、in vivoにおいて対象の免疫システム活性を調節する遺伝子産物をいう。免疫調節因子の発現は、サイトカイン（例えば、インターロイキン、インターフェロン、又は造血コロニー刺激因子）、ケモカイン及び類似物を含む。形質転換した細胞による免疫調節因子の発現は、細胞環境を変え、及び免疫細胞の識別性を変えてよく、そしてこのようにして与えられる抗原に対する免疫応答のタイプ及び強度の調節を引き起こす。

【0063】

“抗原”とは、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のような分子をいい、免疫応答に対して求められる。当該抗原は、例えば腫瘍性、バクテリア性、病原性、タンパク質性、又はウイルス性抗原であってよい。

【0064】

“自殺遺伝子”とは、条件付きの単純ヘルペスウイルスタイプIチミジンキナーゼ遺伝子のようなプログラムされた細胞死（アポトーシス）を含む細胞中での遺伝子の発現を意味する。

【0065】

“レトロウイルス由来のコアタンパク質”とは、gag及びpol遺伝子によりコードされたタンパク質をいう。当該gag遺伝子は、更にコアを含む構造タンパク質中で、レトロウイルス性プロテアーゼにより処理されるポリタンパク質をコードする。当該pol遺伝子はレトロウイルス性プロテアーゼ、逆転写酵素、及びインテグラーゼをコードする。

【0066】

“医薬的に許容され得る担体”とは、本発明に係るワクチン組成物を製剤化することができる任意の媒体をいう。それはリン酸塩緩衝液のような塩溶液を含む。一般的に、希釈剤又は担体は投与形態及び経路、並びに標準的な医薬の慣行に基づき選定される。

【0067】

本出願の明細書中における“ワクチン接種”とは予防的又は治療的なワクチン接種を意図する。“治療的なワクチン接種”とはHCV感染患者へのワクチン接種を意味する。

【0068】

本発明による用語“対象”又は“患者”とは、ヘパシウイルス、特にHCVに感染したらしい、任意の哺乳動物を意味する。ヒト、チンパンジー、タマリン、及びマウス、特にヒト肝 - 異種移植されたマウスがヘパシウイルス、及び特にHCVの宿主の例である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

### ヘパシウイルス シュード粒子の生産

本発明者等は、機能的な、そしてより詳細には改変されていないヘパシウイルス糖タンパク質、特にレトロウィルスコア粒子上に集成するHCV糖タンパク質、を含む感染性シュード粒子を生産した。ヘパシウイルス (HCV) E1E2、及び任意にp7は、コア(C)タンパク質又はそれらのフラグメント(特にE1又はE2のシグナルペプチドとして働くCタンパク質のカルボキシ末端)並びにE1及び/又はE2糖タンパク質を含むポリタンパク質から発現される。より一般的にはヘパシウイルス E1E2は異種のタイプI膜タンパク質からのシグナルペプチドを含むポリタンパク質から発現されてよい。

#### 【0070】

本発明は、このように以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；
- 前記レトロウィルス由来のコアタンパク質をコードするcDNAを含む第二の核酸配列を提供し；
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルスコアタンパク質、及びヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列を提供し；
- 前記核酸配列により宿主細胞をトランスフェクトし、そしてヘパシウイルス及びレトロウィルス由来の構造タンパク質を生産するため、培養中でcDNAの発現を可能にする十分な時間トランスフェクトした細胞を保持し；そして当該構造タンパク質にウィルス様粒子を形成させる、を含んで成るex vivoでのヘパシウイルス様粒子を生産するための方法を提供する。

#### 【0071】

本発明は、in vivoにおいてヘパシウイルス様粒子を産出するための方法を更に提供し、当該方法は以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；
- 前記レトロウィルス由来のコアタンパク質をコードしたcDNAを含む第二の核酸配列を提供し；
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含んで成る第三の核酸配列を提供し；
- ヘパシウイルス及びレトロウィルスから構造的なタンパク質を生産するためにcDNAの発現をもたらすべく、前記核酸配列により対象の細胞をin vivoにおいてトランスフェクトし；及びウィルス様粒子を形成するための構造タンパク質を可能にする、を含んで成る。

#### 【0072】

本発明の他の観点では、ヘパシウイルス感染、即ち肝炎、に対するワクチンとして有用である医薬の調製のための3つの核酸配列の使用であり、ここで核酸配列は：

- パッケージング能力を有するレトロウィルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウィルス由来のコアタンパク質をコードするcDNAを含む第二の核酸配列；
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルスコアタンパク質、並びにヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列；であり、対象の細胞中へ転移した時、当該核酸配列はヘパシウイルス及びレトロウィルスから構造タンパク質を生産することができ、ここでウィルス様粒子由来の当該構造タンパク質は、免疫原性である。

#### 【0073】

好適には、前記第三の核酸配列は、ポリタンパク質をコードするcDNAを含み、更に

ヘパシウイルス p 7 タンパク質を含む。このようにして、好適には前記ポリタンパク質は連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 1 タンパク質及び / 又は ヘパシウイルス E 2 タンパク質、並びに任意に ヘパシウイルス p 7 タンパク質を含む。

【 0 0 7 4 】

特定な態様に従った前記パッケージング能力を有するレトロウイルスゲノム及びコアタンパク質は、MLV, ALV, RSV, MPMV, HIV-1, HIV-2, SIV, EIAV, CAEV, 及び HFV から成る群から選定されるレトロウイルスから由来する。

【 0 0 7 5 】

好都合には、パッケージング能力を有するレトロウイルスゲノムは更にマーカー遺伝子又は免疫調節因子を含む。

【 0 0 7 6 】

本発明の方法において、前記ポリタンパク質は ヘパシウイルス E 1 タンパク質に結合した ヘパシウイルス コアタンパク質、又は ヘパシウイルス E 2 タンパク質に結合した ヘパシウイルス コアタンパク質、或いは連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 1 タンパク質及び ヘパシウイルス E 2 タンパク質、又は連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 2 タンパク質及び ヘパシウイルス E 1 タンパク質を含んでよい。前記ポリタンパク質は更に連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 1 タンパク質及び p 7 タンパク質、又は連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 2 タンパク質及び ヘパシウイルス p 7 タンパク質、或いは連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 1 タンパク質、ヘパシウイルス E 2 タンパク質及び ヘパシウイルス p 7 タンパク質、又は連続する ヘパシウイルス コアタンパク質、ヘパシウイルス E 2 タンパク質、ヘパシウイルス p 7 タンパク質、及び ヘパシウイルス E 1 タンパク質を含む。

【 0 0 7 7 】

一つの態様によると、E 1 及び / 又は E 2、並びに任意に p 7 タンパク質は、天然タンパク質である。他の態様によると、E 1 及び / 又は E 2 糖タンパク質、並びに任意に p 7 タンパク質は、おそらく ヘパシウイルス 感染性のための糖タンパク質決定要素を特徴づけるために有用であろう粒子を得るために突然変異する。

【 0 0 7 8 】

前記 E 1 及び E 2 糖タンパク質が共に同一の ヘパシウイルス 株から由来することが好ましい。前記 E 1 又は E 2 糖タンパク質及び p 7 タンパク質が共に同一の ヘパシウイルス 株から由来することが好ましい。更に、前記 E 1 及び E 2 糖タンパク質、並びに p 7 タンパク質が共に同一の ヘパシウイルス 株から由来することが好ましい。

【 0 0 7 9 】

他の態様によれば、前記 ヘパシウイルス コアタンパク質は、コアタンパク質シグナルペプチドを含む ヘパシウイルス コアタンパク質のカルボキシ末端フォーム ( C ) である。

【 0 0 8 0 】

好適には、前記 ヘパシウイルス は C 型肝炎ウイルス ( H C V ) である。

【 0 0 8 1 】

本発明はこのようにして C 型肝炎ウイルス ( H C V ) 様粒子の ex vivo で生産するための方法を提供し、当該方法は以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードした c D N A を含む第二の核酸配列を提供し；
- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適には H C V コアタンパク質、及び H C V E 1 タンパク質、及び / 又は H C V E 2 タンパク質を含むポリタンパク質をコードした c D N A を含む第三の核酸配列を提供し；
- C 型肝炎ウイルス及びレトロウイルス由来の構造タンパク質を生産するため、前記核

酸配列により宿主細胞をトランスフェクトし、及び培養中でcDNAの発現を可能にする十分な時間トランスフェクトした細胞を保持し；及びウイルス様粒子を形成するための構造タンパク質を可能にする、を含んで成る。

【0082】

本発明はin vivoにおいてC型肝炎ウイルス(HCV) - 様粒子を生産するための方法を更に提供し、当該方法は以下のステップ：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列を提供し；
- 前記レトロウイルスからのコアタンパク質をコードするcDNAを含む第二の核酸配列を提供し；
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはHCVコアタンパク質、及びHCV E1タンパク質及び/又はHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列を提供し；
- C型肝炎ウイルス及びレトロウイルス由来の構造タンパク質を生産するため、前記核酸配列により対象の細胞をin vivoにおいてトランスフェクトし；及びウイルス様粒子を形成するための構造タンパク質を可能にする、含んで成る。

【0083】

本発明の他の観点では、C型肝炎に対するワクチンとして有用である医薬の調製のための3つの核酸配列の使用であり、ここで核酸配列は：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードしたcDNAを含む第二の核酸配列；
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはHCVコアタンパク質、及びHCV E1タンパク質、及び/又はHCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列；であり、及び、対象の細胞中へ転移した時、当該核酸配列はC型肝炎ウイルス及びレトロウイルスから構造タンパク質を生産することができ、ここでウイルス様粒子由来の当該構造タンパク質は、免疫原性である。

【0084】

特定の態様によれば、前記パッケージング能力を有するレトロウイルスゲノム、及びコアタンパク質は、MLV,ALV,RSV,MPMV,HIV-1,HIV-2,SIV,EIAV,CAEV,及びHFVから成る群から選定されたレトロウイルスに由来する。

【0085】

好都合には、当該パッケージング能力を有するレトロウイルスゲノムは、更にマーカー遺伝子、又は免疫調節因子を含む。

【0086】

好適には、前記第三の核酸配列は、更にHCV p7タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む。このように、好適には前記ポリタンパク質は連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質、及び/又はHCV E2タンパク質、並びに任意にHCV p7タンパク質を含む。

【0087】

HCV E1 E2及びレトロウイルスの発現構造体の例は、図6A及び6Bに示す。

【0088】

本発明の方法において、前記ポリタンパク質はHCV E1タンパク質と結合したHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質と結合したHCVコアタンパク質、或いは連続するHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質、及びHCV E2タンパク質、又は連続するHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV E1タンパク質を含んでよい。前記ポリタンパク質は連続するHCVコアタンパク質、HCV E1タンパク質、及びp7タンパク質、又は連続するHCVコアタンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV p7タンパク質、或いは連続するHCVコアタンパク質、HCV E1

タンパク質、HCV E2タンパク質、及びHCV p7タンパク質、又は連続するHCV コアタンパク質、HCV E2タンパク質、HCV p7タンパク質、及びHCV E1タンパク質を更に含む。

【0089】

一つの態様によれば、HCV E1及び/又はE2、並びに任意にHCV p7タンパク質は、天然タンパク質である。他の態様によれば、HCV E1及び/又はE2糖タンパク質、並びに、任意にHCV p7タンパク質は、HCV感染性のための糖タンパク質決定要素を特徴づけるために有用であるだろう粒子を得るために突然変異する。好適なE2タンパク質の突然変異体は、E2タンパク質のフォームをC末端で切断し、ここでC末端Ala残基(SEQ ID N°16の746アミノ酸)を欠失させた。他の好適なE2タンパク質の突然変異体は、超可変領域I(N末端領域中に位置する、即ちシグナルペプチド後のE2タンパク質の最初の27アミノ酸、即ちSEQ ID N°16の384から410アミノ酸)を欠失させた。

【0090】

好適には、前記E1及びE2糖タンパク質は、共に同一のHCV株から由来する。好適には、前記E1又はE2糖タンパク質、及びp7タンパク質は共に同一のHCV株から由来する。更に好適には、前記E1及びE2糖タンパク質、並びにp7タンパク質は同一のHCV株から由来する。

【0091】

他の態様によると前記HCVコアタンパク質は、HCVコアタンパク質のカルボキシ末端のフォーム(C)である。特に、前記HCVコアタンパク質はHCVコアのカルボキシ末端の最後の21アミノ酸を含んでよい。

【0092】

トランスフェクションの目的のため、前記、第一、第二、及び第三の核酸配列は、同一のベクター、或いは2又は3の別個のベクターで運搬してよい。

【0093】

特に、プラスモウイルス(plasmoviruses)、アデノレトロウイルス及び複製したシュードウイルスは、上記配列を運搬するために適したベクターの例である。プラスモウイルスワクチンがかかるプラスミドDNA製剤の中に存在し、前記ヘパシウイルスに対する免疫応答を引き出すために患者へ投与した後、ヘパシウイルス シュード粒子の発現を許容する。かかるプラスモウイルスワクチンの投与は、ヘパシウイルス感染患者へのヘパシウイルス誘導疾患のリスクにある人々への予防的ワクチン接種のため、又は治療的ワクチン接種のために成された。アデノレトロウイルスは、ヘパシウイルス シュード粒子をコードする上記核酸配列を提供するための他の方法を存する。この場合、3つの独立したアデノレトロウイルス、即ち、上記3つの核酸配列をコードする組換えアデノウイルス(レトロウイルス性コア及びゲノム、並びにヘパシウイルス糖タンパク質)をデザインすることが可能であり、或いは“guttless”組換えアデノウイルスに由来する1つのアデノウイルスをデザインすることも可能であり、それは異なる核酸配列を含む。かかるアデノウイルスは、抗-ヘパシウイルス免疫応答を引き起こすためにプラスモウイルスに関する限りでは患者へ投与することができる。複製シュードレトロウイルスは、ヘパシウイルス シュード粒子をコードする上記全ての核酸配列を発現する他の可能性である。かかる構造体は事実ヘパシウイルス シュード粒子があつて、感染した後、接種された患者の細胞の中での増殖が可能となり、かくして更なる複製ヘパシウイルス シュード粒子の生産が誘導されるようにそのゲノムが操作された粒子である。この場合、レトロウイルスのゲノムはレトロウイルスのEnv遺伝子(レトロウイルス糖タンパク質をコードする)の代わりにヘパシウイルス E1 E2糖タンパク質を発現するように改変される。レトロウイルスのコアタンパク質をコードした遺伝子は変化しないままである。更に例えば、マーカー遺伝子又は免疫調節因子をコードした追加の遺伝子が、このゲノムから発現され得る。

【0094】

本発明に従うことにより、当業者間で、慣例的な分子生物学、微生物学、及び組換えD

N A 技術に用いることができる。かかる技術は十分に文献中において説明されている。例えば、Sambrook等.,1989; D N A クローニング : A Practical Approach, Volumes I 及び II (D.N.Glover ed.1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait ed.1984); Nucleic Acid Hybridization [ B.D.Hames&S.J.Higgins eds.(1985) ] ; Transcription and Translation [ B.D.Hames&S.J.Higgins, eds.(1984) ] ; Animal Cell culture [ R.I.Freshney, ed.(1986) ] ; Immobilized Cell and Enzymes [ IRL Press,(1986) ] ; B.Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning(1984); F.M.Ausubel 等.,1994参照。

【 0 0 9 5 】

特に本発明のベクターは、ex vivo、又はin vivoにおけるいずれかの培養中において、細胞の核へ核酸を運搬するための任意の公知技術によって標的細胞中へ導入され得る。

【 0 0 9 6 】

核酸配列の導入は、当業界における当業者に周知の任意の標準方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈殿、又は遺伝子ガンの使用（例えば、Wu等.,1992; Wu等,1998参照）によって実施され得る。

【 0 0 9 7 】

ドナー核酸ターゲティングシステムは、リポフェクションによっても導入され得る。一定の態様において、リポソーム及び/又はナノ粒子の使用は、宿主細胞へのドナー核酸ターゲティングシステムの導入のため期待される。ナノカプセルは一般的に安定状態、及び再生産し得る方法において、化合物をトラップ化することができる。超微粒子（サイズ約0.1µm）は、本発明において使用が期待される、生物分解性のあるポリアルキルシリアノアクリレートポリマーの使用をデザインすることができ、そしてかかる粒子は容易に作製することができる。

【 0 0 9 8 】

リポソームは水性培地中で分散させたリン脂質から形成され、そして自発的に多層板の同心の2層の小胞を形成する（マルチラメラ小胞（MLVs）とも呼ばれる）。MLVsは一般的に直径25nmから4µmを有する。MLVsの音波破砕は、コア中に水性溶液を含む直径200から500の範囲にある小さい同一層板小胞（SUVs）のフォーメーションをもたらす。陽性脂質の使用は、陰的に添加された核酸のカプセル化を促進し、そして陰的に添加された細胞膜による融合も促進することができる（Felgner等.,1989）。

【 0 0 9 9 】

In vivoにおける標的にされた遺伝子の運搬は、国際公開WO 95/28 494において発表されている。或いは、ベクターは、in vivoにおいて上記の通りリポソーム又はナノ粒子を用いたリポフェクションにより導入することができる。In vitroにおいて使用される技術と類似した技術を用いて、in vivoにおいてベクターを導入することも可能である（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション）。

【 0 1 0 0 】

形質転換細胞

本発明は、更に以下を：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードしたcDNAを含む第二の核酸配列；及び
- 連続するタイプI膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルスコアタンパク質、並びにヘパシウイルスE1タンパク質及び/又はヘパシウイルスE2タンパク質を含むポリタンパク質をコードするcDNAを含む第三の核酸配列；含んで成る形質転換した宿主細胞に関する。

【 0 1 0 1 】

好適には、前記第三の核酸配列は、更にヘパシウイルスp7タンパク質を含むポリタンパク質をコードしたcDNAを含む。このように、好適には前記ポリタンパク質は、連続

するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適にはヘパシウイルスコアタンパク質、ヘパシウイルス E1タンパク質、及び / 又はヘパシウイルス E2タンパク質、並びに任意にヘパシウイルス p7タンパク質を含む。

【0102】

かかる形質転換した宿主細胞は、上記方法で発表された通り得ることができる。

【0103】

他の観点においては、本発明は細胞に侵入するヘパシウイルスを妨げることを可能にする分子の同定のために上記で定義したような形質転換した宿主細胞の使用に関する。本発明は、特に候補分子の存在下又は不存在下における、標的宿主細胞へ融合する形質転換した宿主細胞のレベルの比較を含み、*ex vivo*でのスクリーニング又は細胞に侵入するヘパシウイルスによる感染を可能にする分子の同定方法を提供する。前記方法は、好適には以下から成るステップ：

- 合胞体フォーメーションを許容する条件下、即ち、細胞 - 細胞融合、及び任意の候補分子の不存在下において標的宿主細胞中へヘパシウイルス様粒子が侵入する条件下で、候補分子の不存在下又は存在下において、標的宿主細胞と形質転換した宿主細胞を共培養し；
- 前記候補分子の不存在下及び存在下において合胞体フォーメーションを評価し；
- 前記候補分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションと、任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体のフォーメーションを比較し；
- 任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体フォーメーションと比較して前記分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションが減少している候補分子を、ヘパシウイルス侵入を妨げることができる分子として同定する、を含んで成る。

【0104】

好適には、前記ヘパシウイルスは C 型肝炎ウイルスである。本発明は、このようにして以下：

- パッケージング能力を有するレトロウイルス由来ゲノムを含む第一の核酸配列；
- 前記レトロウイルス由来のコアタンパク質をコードした cDNA を含む第二の核酸配列；及び
- 連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適には HCV コアタンパク質、並びに HCV E1タンパク質、及び / 又は HCV E2タンパク質を含むポリタンパク質をコードする cDNA を含む第三の核酸配列；を含んで成る形質転換した宿主細胞にも関する。

【0105】

他の態様によれば、前記第三の核酸配列は、HCV p7タンパク質を更に含むポリタンパク質をコードする cDNA を含んで成る。好適には、前記ポリタンパク質は、連続するタイプ I 膜タンパク質由来シグナルペプチド、好適には HCV コアタンパク質、HCV E1タンパク質、及び / 又は HCV E2タンパク質、並びに任意に HCV p7タンパク質を含んで成る。

【0106】

かかる形質転換した宿主細胞は上記方法中で記載されたように得ることができる。

【0107】

他の観点では、本発明は上記定義の通り、細胞中への HCV 侵入を妨げることができる分子の同定のための形質転換した宿主細胞の使用に関する。本発明は特に候補分子の存在下、又は不存在下において、標的宿主細胞へ融合した形質転換した宿主細胞のレベルの比較を含む HCV による細胞進入を妨げることができる分子の *ex vivo* スクリーニング方法、又は同定方法を提供する。前記方法は、好適には以下から成るステップ：

- 候補分子の不存在下又は存在下において、合胞体のフォーメーションを許容する条件下で、標的宿主細胞と形質転換した宿主細胞を共培養し（即ち、細胞 - 細胞融合）、そして HCV - 様粒子が任意の候補分子の不存在下において、標的宿主細胞中へ侵入し；
- 前記候補分子の不存在下及び存在下において合胞体フォーメーションを評価し；

- 前記候補分子の存在下において測定した合胞体フォーメーションと、任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体のフォーメーションを比較し；

- 任意の候補分子の不存在下において測定した合胞体フォーメーションと比較して減少した前記分子の存在下において測定したような候補分子のための合胞体フォーメーションをHCV侵入を妨げることができる分子として同定する、を含んで成る。

【0108】

標的宿主細胞と形質転換した宿主細胞を接触させ、そして候補分子は、前記形質転換した宿主細胞、標的細胞及び候補分子を同時に接触させることにより実行させることができる。別の方法では、それらの3つの要素の2つは、欠損した3つ目の要素の付加の前にそれらの相互作用を許容するための十分な条件下において接触させることができる。

【0109】

好適には前記標的宿主細胞は形質転換されておらず、即ち、前記宿主細胞は、上記の通り定義した第一、第二、及び第三の核酸配列の少なくとも1つを含まない。

【0110】

合胞体フォーメーションは、当業界における当業者によって容易に評価され得る。簡潔には、共培養はpH - 5で5分間の培養で酸性pH滴定され、そして追加の12時間通常の培地中で培養させる。培養はその後、製造業者が勧める通り、May-Grunwald及びGiemsa溶液(MERCK)を付加することにより染色される。2以上の核を含む細胞は、合胞体として定義され得る。融合インデックスはその後(N - S) / Tのパーセンテージとして定義され、ここでNは合胞体中の核の数であり、Sは合胞体の数であり、Tは数えられる核の総数である。

【0111】

ヘパシウイルス - 様粒子

上記方法において、E1E2糖タンパク質の構造的修飾は、レトロウイルスコア上でそれらの適当な集成のために要求されない。本発明の方法は、このように機能的E1E2糖タンパク質を有する高い力価の感染性ヘパシウイルス シュード粒子、及び特にHCVシュード粒子を生産することを可能にする。本明細書に記載の通り、これらの粒子はウイルス感染サイクルの早期のステップに関しては、ヘパシウイルス ビリオン、及び特にHCVビリオンの有効なモデルを構成する。しかしながら、本発明のシュード粒子の意図した使用に依存する突然変異体E1、E2又はp7タンパク質は、定義の欄で説明した制限をもって、ヘパシウイルス 様粒子上に集成され得る。

【0112】

本発明は、更にレトロウイルス由来コアタンパク質、E1及び/又はE2 ヘパシウイルス 糖タンパク質、並びに任意にヘパシウイルス p7タンパク質を含むヘパシウイルス 様感染性粒子に関する。かかる粒子は上記の通りの方法によって得ることができる。

【0113】

一つの態様によると、本発明の感染性粒子は、天然ヘパシウイルス E1タンパク質、又は天然ヘパシウイルス E2タンパク質、或いは天然ヘパシウイルス E1タンパク質及び天然ヘパシウイルス E2タンパク質を含んでよい。好適には、前記E1及びE2糖タンパク質はともに同一のヘパシウイルス 株から由来する。他の態様によると、E1及び/又はE2糖タンパク質は突然変異される。

【0114】

他の態様によると、本発明の感染性粒子は、天然ヘパシウイルス E1及び天然ヘパシウイルス p7タンパク質、又は天然ヘパシウイルス E2及び天然ヘパシウイルス p7タンパク質、或いは天然ヘパシウイルス E1タンパク質、天然ヘパシウイルス E2タンパク質及び天然ヘパシウイルス p7タンパク質を含み、好適には、前記E1又はE2糖タンパク質及びp7タンパク質は、共に同一のヘパシウイルス 株から由来する。更に好適には、前記E1及びE2糖タンパク質、並びにp7タンパク質は、同一のヘパシウイルス 株から由来する。他の態様によると、E1及び/又はE2糖タンパク質並びに/或いは、p7タンパク質は突然変異される。

## 【0115】

好適には、前記ヘパシウイルスは、C型肝炎ウイルスである。本発明はこのように、レトロウイルス由来のコアタンパク質、E1及び/又はE2 HCV糖タンパク質、並びに任意にp7タンパク質を含むHCV様感染性粒子にも関する。かかる粒子は上記のような方法によって得ることができる。

## 【0116】

一つの態様によると、本発明の感染性粒子は、天然HCV E1タンパク質、又は天然HCV E2タンパク質、或いは天然HCV E1タンパク質及び天然HCV E2タンパク質を含んでよい。好適には前記E1及びE2糖タンパク質は共に同一のHCV株から由来する。他の態様によると、E1及び/又はE2糖タンパク質は突然変異される。

## 【0117】

他の態様によると、本発明の感染性粒子は、天然HCV E1及び天然HCV p7タンパク質、又は天然HCV E2及び天然HCV p7タンパク質、或いは天然HCV E1タンパク質、天然HCV E2タンパク質及び天然HCV p7タンパク質を含んでよい。好適には、前記E1又はE2糖タンパク質及びp7タンパク質は共に同一のHCV株由来である。更に好適には、前記E1及びE2糖タンパク質、並びにp7タンパク質は同一のHCV株から由来する。他の態様によると、E1及び/又はE2糖タンパク質並びに/或いはp7タンパク質は突然変異される。

## 【0118】

上記態様において、突然変異したE2タンパク質は、好適にはE2タンパク質からC末端側を切断し、ここでC末端のA1a残基(SEQ ID N°16の746アミノ酸)を欠失させた。

## 【0119】

他の好適な態様は、超可変領域I(N末端領域、即ち、シグナルペプチド後のE2タンパク質の最初の27アミノ酸に位置する、即ち、SEQ ID N°16の384-410アミノ酸)を欠失させる。E2タンパク質をこの領域から欠失させることにより生産されるHCV-様粒子(HVR1と呼ばれる)は、特に中和抗体の導入又は結合を増強させるための診断ツールとして又はワクチン接種において好都合である。当該HVR1 HCV-様粒子は、抗体の中和又は他の治療薬によって標的にされ/阻害されることができ、HCV糖タンパク質の中において、エピトープ/メカニズムを同定することにも関与する。

## 【0120】

前記レトロウイルスはMLV、ALV、RSV、MPMV、HIV-1、HIV-2、SIV、EIAV、CAEV、及びHFVから成る群から選定され得る。

## 【0121】

前記感染性粒子が、更に導入遺伝子を運搬することが好都合である。例えば前記導入遺伝子は、本発明の感染性粒子による細胞感染の追跡を可能にするマーカー遺伝子に成ることができ、そして例えば、ヘパシウイルスの侵入、及び特にHCVの侵入に關与する細胞受容体の同定のための応用を見出すことができる。前記導入遺伝子は、治療に關する分子をコードする遺伝子、及び/又は自殺遺伝子であってもよい。従って、特に主要な又は癌性の肝細胞を標的とする本発明の粒子は、遺伝子転移、及び/又は遺伝子治療のための有用なベクターを含む。

## 【0122】

本発明のヘパシウイルス様感染性粒子の使用

## 【0123】

ヘパシウイルス細胞受容体同定

これらの粒子の高い感染性は、細胞侵入におけるヘパシウイルス(HCV)E1及びE2糖タンパク質、並びにそれらの潜在的受容体の役割、ヘパシウイルス宿主範囲、そしてヘパシウイルス患者血清由来抗体による中和の調査を可能にする。これらの粒子は、E1 E2突然変異体及び機能、ウイルス集成、発芽並びに放出におけるp7タンパク質の役割

の調査を可能にする。

【0124】

本発明は、それゆえに上記の通り、ヘパシウイルスE1及び/又はE2糖タンパク質のための細胞受容体のex vivo同定のため、ヘパシウイルス様感染性粒子の使用に関する。

【0125】

一つの態様によると、本発明は細胞受容体への前記粒子の結合の検出を含むヘパシウイルスE1及び/又はE2糖タンパク質のための受容体のex vivoでの同定のための方法を提供する。より詳細には、本方法は以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染性細胞の表面で発現する受容体へヘパシウイルス様感染性粒子の特異的結合を許容する十分な条件下において、本発明の前記ヘパシウイルス様感染性粒子と前記ヘパシウイルス感染性細胞を接触させ；
- 受容体への前記粒子の結合を検出し；そして
- 前記受容体を同定する、を含んでよい。

【0126】

好適には、前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルスである。本発明はそれゆえに上記の通りex vivoでのHCV E1及び/又はE2糖タンパク質のための細胞受容体の同定のためHCV様感染性粒子の使用に関する。

【0127】

一つの態様によると、本発明は細胞受容体への前記粒子の結合の検出を含むex vivoでのHCV E1及び/又はE2糖タンパク質のための受容体の同定方法を提供する。より詳細には、当該方法は以下から成るステップ：

- HCV感染性細胞の表面で発現する受容体へHCV様感染性粒子の特異的結合を許容する十分な条件下において、本発明の前記HCV様感染性粒子と前記HCV感染性細胞を接触させ；
- 受容体への前記粒子の結合を検出し；そして
- 前記受容体を同定する、を含んでよい。

【0128】

ヘパシウイルス感染性、そして特にHCV感染性細胞は、好適にはHuh-7ヒト肝細胞性癌腫(Nakabayashi等., 1982)、PLC/PRF/5ヒト肝癌(CRL-8024)、Hep3Bヒト肝細胞性癌腫(ATCC HB-8064)、又はHepG2ヒト肝細胞性癌腫(HB-8065)、及び主なヒト肝細胞のような肝細胞株から成る群から選定されてよい。主なヒト肝細胞は、当業界における当業者により周知な手段によって、ヒト成人検体サンプルから単離され得る。当業者は、例えばGuguen-Guillouzo及びGuillouzo(1986)を参照することができる。別の方法では、かかる細胞は商業的に入手でき、例えばBiopredic International(Rennes, 仏)から購入できる。

【0129】

受容体に結合した粒子の検出は、当業界における当業者にとって周知な古典的手段によって達成され得る。例えば、これは本発明の粒子の放射活性、酵素又は蛍光ラベル、及び適切な方法による後の検出を含むことができる。蛍光材料の多くは公知であり、そしてラベルとして用いることができる。これらは、例えばフルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッドを含む。酵素ラベルは関連分子、例えばポリペプチド、への酵素の結合にあり、そして任意の比色定量、分光光度、又は蛍光分光光度技術により検出される。フローサイトメトリー分析(FACS)と本発明のシュード粒子に担持されるE1又はE2タンパク質に対しラベルされた抗体も適切である。

【0130】

他の態様によると、本発明はヘパシウイルスのための細胞受容体をex vivoで同定する方法を提供し、当該発明は以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染を許容しない細胞に、ヘパシウイルスの受容体になるようなタンパク質をコードする核酸配列をトランスフェクトし；
- 前記形質転換した細胞と本発明のヘパシウイルス様粒子を接触させ；

- 前記形質転換した細胞がヘパシウイルス感染を許容するに至ったか否かを決定し；そして、

- 形質転換され感染を許容するに至った細胞により発現する前記タンパク質をヘパシウイルスの細胞受容体として同定する、を含んで成る。

【0131】

好適には、本発明はHCVのための細胞受容体をex vivoで同定する方法を提供し、当該方法は以下から成るステップ：

- HCV感染を許容しない細胞に、HCVの受容体になるようなタンパク質をコードする核酸配列をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と本発明のHCV様粒子を接触させ；

- 前記形質転換した細胞がHCV感染を許容するに至ったか否かを決定し；そして、

- 形質転換され感染を許容するに至った細胞により発現する前記タンパク質をHCVの細胞受容体として同定する、を含んで成る。

【0132】

形質転換した細胞がヘパシウイルス感染、及び特にHCV感染を許容するに至ったか否かを決定することは、本発明のヘパシウイルス様（HCV様）粒子を用いて容易に達成され得る。特に、ここで前記粒子は、GFPのようなマーカー遺伝子を運搬し、許容性（即ちヘパシウイルスにより又はヘパシウイルス様粒子により、特にHCV粒子又はHCV様粒子により感染する細胞の受容能）は、形質転換した細胞のFACS分析により評価され得る。マーカー遺伝子である抗体耐性遺伝子があるところにおける、ヘパシウイルス様（HCV様）粒子により感染した細胞の同定は、前記抗体の暴露を通して容易に達成される。

【0133】

所定のタンパク質が細胞中へのヘパシウイルス侵入のための受容体でないと思われる場合、上記方法はHCVのようなヘパシウイルスのための細胞受容体のスクリーニング及び同定のために都合よく適用できる。特に発現cDNAライブラリー（例えば、ヘパシウイルス感染、特にHCV感染に許容的である細胞からの細胞性mRNAの逆転写により得られたcDNAライブラリー由来）を調製することができる。かかるcDNAライブラリーの発現は、その核酸配列が適したベクター中のcDNAライブラリーへ融合された本質的なプロモーターにより制御されるだろう。かかるライブラリーは、ヘパシウイルス、例えばHCVの細胞受容体をコードするベクターを含むであろう。非許容性細胞は、その後本発現ライブラリーによりトランスフェクトすることができ、更にヘパシウイルスの細胞受容体の同定のためにスクリーニングすることができる。

【0134】

従って、本発明はヘパシウイルスのための細胞受容体をex vivoで同定するための方法を提案し、当該方法は以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染を許容する細胞から得られた発現cDNAライブラリーを提供し；

- 前記発現cDNAライブラリーによりヘパシウイルス感染を許容しない細胞をトランスフェクトし；

- 前記形質転換した細胞と本発明のヘパシウイルス様粒子を接触させ；

- ヘパシウイルス感染を許容するに至ったそれらの形質転換した細胞を同定及び単離し；

- 許容性に至った細胞中でトランスフェクトした発現ベクターを単離し；そして

- 前記単離した発現ベクターのcDNA配列によりコードされるヘパシウイルスタンパク質をヘパシウイルスの受容体として同定する、を含んで成る。

【0135】

好適には、前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルスである。本発明はこのようにしてHCVのための細胞受容体をex vivoで同定する方法を提案し、当該方法は以下から成るステップ：

- H C V 感染を許容する細胞から得られた発現 c D N A ライブラリーを提供し；
- 前記発現 c D N A ライブラリーにより H C V 感染を許容しない細胞をトランスフェクトし；
- 前記形質転換した細胞と本発明の H C V 様粒子を接触させ；
- H C V 感染を許容するに至ったそれらの形質転換した細胞を同定及び単離し；
- 許容性に至った細胞中でトランスフェクトされた発現ベクターを単離し；そして
- 前記単離した発現ベクターの c D N A 配列によりコードされたタンパク質を H C V の受容体として同定する、を含んで成る。

## 【 0 1 3 6 】

形質転換した細胞が ヘパシウイルス ( H C V ) 感染を許容するに至ったかどうかの決定は、本発明の ヘパシウイルス 様 ( H C V 様 ) 粒子を用いて容易に達成され得る。ここで前記粒子は、G F P のようなマーカー遺伝子を運搬し、許容性 ( 即ち ヘパシウイルス により及び特に ヘパシウイルス 様粒子により、例えば H C V により又は H C V 様粒子により感染する細胞の受容能 ) は、形質転換した細胞の F A C S 分析により評価され得る。マーカー遺伝子である抗体耐性遺伝子があるところにおける、ヘパシウイルス 様粒子、特に H C V 様粒子により感染した細胞の同定は、前記抗体の暴露を通して容易に達成させる。

## 【 0 1 3 7 】

好都合には、発現 c D N A ライブラリーは、ヘパシウイルス ( H C V ) 非感染性細胞の感染を許容する糖タンパク質を含むレトロウイルスベクターから発現される。かかる糖タンパク質は、その受容体が *ex vivo* において大部分の細胞中で発現するタイプである水泡性口内炎ウイルス ( V S V ) 由来 V S V - G 糖タンパク質であってよい。かかるウイルス粒子は、発現 c D N A ライブラリー、及び任意にマーカー遺伝子を含むパッケージング能力を有する相補性レトロウイルス由来ゲノムを用いて集成することができる。本態様によれば、本発明の ヘパシウイルス 様 ( H C V 様 ) 粒子による感染を許容するに至った細胞中に発現した発現ベクターを単離するための方法は、大いに容易となる。確かにこの後者の態様は、細胞トランスフェクションと比較すると、より有効性を持つレトロウイルスベクターによる細胞感染の過程において、特に好都合である。更に、細胞感染は、注目の c D N A の回収及び単離を大いに促進する細胞性ゲノム中のウイルスゲノムの安定した融合を導く。従って、本発明のシュード粒子により運搬される導入遺伝子、即ち c D N A 及びマーカー遺伝子は、感染細胞によって安定的に発現されることを見出した。トランスフェクションに用いられる古典的なベクターと対比すると、細胞性ゲノム中で融合されず、及びその発現は一過性のものとなるであろう。

## 【 0 1 3 8 】

ヘパシウイルス 感染に干渉する作用物質の同定

他の観点では、本発明は、細胞中に侵入する ヘパシウイルス、及び特に H C V に干渉することができる分子の同定のための、上記定義のような感染性粒子の使用に関する。

## 【 0 1 3 9 】

特に本明細書において、候補分子の存在下又は不存在下における本発明の粒子による細胞感染のレベルの比較を含め、細胞中に侵入する ヘパシウイルス に干渉することができる分子の *ex vivo* でのスクリーニング又は同定の方法を提供する。前記方法は、好適には以下から成るステップ：

- 任意の候補分子の不存在下において ヘパシウイルス 様粒子による細胞感染を許容する条件下で、候補分子の存在下又は不存在下において、ヘパシウイルス 感染性細胞と ヘパシウイルス 様感染性粒子を接触させ；
- 前記候補分子の不存在下において、及び存在下において細胞感染性を評価し；
- 前記候補分子の存在下において測定した細胞感染性と任意の候補分子の不存在下において測定した細胞感染性を比較し；
- 任意の候補分子の不存在下において測定された細胞感染性と比較して、前記分子の存在下で測定された細胞感染性を減少させた候補分子を ヘパシウイルス 侵入に干渉することを可能にする分子として同定する、を含んで成る。

## 【0140】

ヘパシウイルス感染性細胞と、ヘパシウイルス様感染性粒子、及び候補分子を接触させることは、前記細胞、ヘパシウイルス様粒子及び候補分子を同時に接触させることにより実行することができる。別のやり方では、それらの3つの要素の内の2つが、3つ目の欠損した要素を付加する前に、それらの相互作用を許容するに十分な条件下で接触させることができる。

## 【0141】

細胞感染性は当業界における当業者により容易に評価されることができる。当業者は、ヘパシウイルス様感染性粒子が、細胞感染を検出するため検出可能なマーカー遺伝子を運搬するという態様を利用することができる。好適な態様では、マーカー遺伝子はGFPのような蛍光マーカー遺伝子であり、そして感染は蛍光測定、例えば前記感染性粒子と接触させた細胞のフローサイトメトリー分析によって検出される。

## 【0142】

ヘパシウイルス細胞侵入に干渉する分子の同定方法において使用される、適した細胞は、上記の通り肝細胞株、及び主要なヒト肝細胞から成る群から選定され得る。

## 【0143】

好適には前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルスである。本発明はこのようにして候補分子の存在下又は不存在下における本発明の粒子による細胞感染のレベルの比較を含めて、HCV細胞侵入に干渉することができる分子のex vivoでのスクリーニング又は同定の方法を更に提供する。前記方法は、好適には以下から成るステップ：

- 任意の候補分子の不存在下においてHCV様粒子による細胞感染を許容する条件下で候補分子の存在下又は不存在下において、HCV感染性細胞とHCV様感染性粒子を接触させ；

- 前記候補分子の不存在下において、及び存在下において細胞感染性を評価し；

- 前記候補分子の存在下において測定した細胞感染性と任意の候補分子の不存在下において測定した細胞感染性を比較し；

- 任意の候補分子の不存在下において測定された細胞感染性と比較して、前記分子の存在下で測定された細胞感染性を減少させた候補分子をHCV侵入に干渉することを可能にする分子として同定する、を含んで成る。

## 【0144】

HCV感染性細胞と、HCV様感染性粒子、及び候補分子を接触させることは、前記細胞、HCV様粒子及び候補分子を同時に接触させることにより実行することができる。別のやり方では、それらの3つの要素の内の2つが、3つ目の欠損した要素を付加する前に、それらの相互作用を許容するに十分な条件下で接触させることができる。

## 【0145】

細胞感染性は当業界における当業者により容易に評価されることができる。当業者は、HCV様感染性粒子が、細胞感染を検出するため検出可能なマーカー遺伝子を運搬するという態様を利用することができる。好適な態様では、マーカー遺伝子はGFPのような蛍光マーカー遺伝子であり、そして感染は蛍光測定、例えば前記感染性粒子と接触させた細胞のフローサイトメトリー分析によって検出される。

## 【0146】

HCV細胞侵入に干渉する分子の同定方法において使用される、適した細胞は、上記の通り肝細胞株、及び主要なヒト肝細胞から成る群から選定され得る。

## 【0147】

ヘパシウイルスによる、及び特にHCVによる、細胞侵入に干渉することができるかか分子は、新規の抗ウイルス剤を構成するであろう。

## 【0148】

ヘパシウイルス感染診断

本発明の感染性粒子は、更にヘパシウイルス感染の診断、及びヘパシウイルス感染の追跡、例えば患者の治療効果を評価するために有用である。

## 【0149】

本発明はこのようにヘパシウイルスにより感染しやすい対象由来の生物学的サンプル中におけるヘパシウイルスに対するin vitroでの抗体検出のためのヘパシウイルス様感染性粒子の使用に関する。前記生物学的サンプルは、血液、又は血清のような生物学的流動体、或いは組織生検であってよい。特定の態様では、前記抗体はE 1及び/又はE 2 ヘパシウイルス糖タンパク質に対するものである。

## 【0150】

従って本発明は、患者におけるヘパシウイルス感染のin vitroでの診断方法を提供し、当該方法は患者の生物学的サンプル中に存在するような抗ヘパシウイルス抗体と本発明のヘパシウイルス様粒子との相互作用により形成される免疫複合体を検出することを含んで成る。前記方法は特に以下から成るステップ：

- 生物学的サンプル中に存在するヘパシウイルスに対する抗体に前記感染性粒子が結合することにより、複合体のフォーメーションを許容するに十分な条件下において、生物学的サンプルと本発明のヘパシウイルス様感染性粒子を接触させ；

- ヘパシウイルス感染を示す存在である前記複合体を検出する、を含んで成る。

## 【0151】

ヘパシウイルス様粒子と反応的である抗体の存在は、イムノアッセイ、例えば競合、直接的反応、又はサンドウィッチタイプアッセイを含む標準的な電気泳動及び免疫診断の技術を用いて検出することができる。かかるアッセイは、制限されずに、ウェスタンブロット；凝集反応検査；ELISAsのような酵素ラベルされた及び酵素媒介されたイムノアッセイ；ビオチン/アビジンタイプアッセイ；ラジオイムノアッセイ；免疫電気泳動法；免疫沈降法、等を含む。反応は一般的に蛍光、化学発光、放射活性、酵素的ラベルもしくは染色分子のような提示ラベル、又は他のヘパシウイルス様粒子及び抗体の複合体のフォーメーション、もしくはそれらと反応する抗体を検出するための他の方法を含む。

## 【0152】

他の態様では、患者におけるヘパシウイルス感染の前記in vitroにおける診断の方法は、本発明のヘパシウイルス様粒子による許容性細胞への感染に対する、患者の生物学的サンプル中に存在していると思われる抗-ヘパシウイルス抗体の阻害的効果を検出することを含む。前記方法は特に以下から成るステップ：

- ヘパシウイルス感染を許容する細胞とヘパシウイルス様粒子及び生物学的サンプルを接触させ；

- 前記生物学的サンプルの存在下で測定した細胞感染性と、前記生物学的サンプルの不存在下で測定した細胞感染性を比較し；

- 前記生物学的サンプルの不存在下で測定した細胞感染性と比較して、前記生物学的サンプルの存在下で測定した細胞感染性の減少として、感染許容細胞へのヘパシウイルス様粒子感染の阻害を検出し、前記阻害はヘパシウイルス感染の指標となる、を含んで成る。

## 【0153】

本態様は、細胞感染を中和する特異的な抗体（即ち、これらの患者の抗体はウイルス血症に対して効果的である）の検出に頼る方法において都合がよい。

## 【0154】

本発明の更なる態様では、ヘパシウイルス粒子及びヘパシウイルスにより感染されやすい対象由来の生物学的サンプル中のヘパシウイルスに対する抗体によって形成される免疫複合体の存在下又は不存在下において検出することによる、或いは抗ヘパシウイルス（患者の生物学的サンプル中に存在すると思われる中和抗体）によって許容細胞のヘパシウイルス様粒子感染の阻害を検出することによる、商業的な診断キットは、上記診断方法を実行するために有用である。かかるキットは少なくとも本発明のヘパシウイルス様粒子を含んでよい。免疫複合体の検出に関与する方法であるところの、当該キットは、更に前記免疫複合体の適切な検出手段を含む。好適には、本発明の当該キットは、更に選択された方法、例えば“競合的”、“サンドウィッチ”、及びそれらと類似した方法、に依存した指示、及びプロトコールを含む。当該キットは緩衝剤、安定化剤等、のような核とはならな

い試薬を含んでもよい。

【0155】

好適には前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルスである。本発明の感染性粒子は、更にHCV感染の診断、及びHCV感染の追跡、例えば患者の治療の有効性評価のために有用である。

【0156】

本発明は、このようにしてHCVにより感染しやすい対象由来の生物学的サンプルにおけるHCVに対する抗体のin vitro検出のためのHCV様感染性粒子の使用に関する。前記生物学的サンプルは、血液又は血清、或いは組織生検のような生物学的流体物であってよい。特定の態様では前記抗体はE1及び/又はE2 HCV糖タンパク質に対する抗体である。

【0157】

従って、本発明は患者のHCV感染のin vitroにおける診断方法を提供し、当該方法は患者の生物学的サンプル中に存在すると思われる抗-HCV抗体と本発明のHCV様粒子との相互作用により形成される免疫複合体を検出することを含んで成る。前記方法は特に以下から成るステップ：

- 生物学的サンプル中で存在するHCVに対する抗体への前記感染性粒子の結合により、免疫複合体の形成を許容するに十分な条件下において、生物学的サンプルと本発明のHCV様感染性粒子を接触させ；
- HCV感染を提示する存在である前記複合体を検出する、を含んでよい。

【0158】

HCV様粒子と反応する抗体の存在は、上記の通り、競合、直接反応、又はサンドウィッチタイプアッセイのようなイムノアッセイを含む標準の電気泳動及び免疫診断技術を用いて検出することができる。

【0159】

反応は一般的に蛍光、化学発光、放射活性、酵素ラベルもしくは染色分子のような提示ラベル、又は他のHCV様粒子及び抗体の複合体のフォーメーション、或いはそれらと反応する抗体を検出するための他の方法を含む。

【0160】

他の態様では、患者のHCV感染の前記in vitro診断方法は、本発明のHCV様粒子により感染を許容する細胞上で、患者の生物学的サンプル中に存在していると思われる抗-HCV抗体の阻害的効果を検出することを含む。前記方法は特に以下から成るステップ：

- HCV感染を許容する細胞とHCV様粒子及び生物学的サンプルを接触させ；
- 前記生物学的サンプルの存在下で測定した細胞感染性と、前記生物学的サンプルの不存在下で測定した細胞感染性を比較し；
- 前記生物学的サンプルの不存在下で測定した細胞感染性と比較して、前記生物学的サンプルの存在下で測定した細胞感染性の減少として、感染許容細胞へのHCV様粒子感染の阻害を検出し、前記阻害はヘパシウイルス感染の指標となる、を含んで成る。

【0161】

本態様は、細胞感染を中和する特異的な抗体（即ち、これらの患者の抗体はウイルス血症に対して効果的である）の検出に頼る方法の中で都合がよい。

【0162】

本発明の更なる態様では、HCV粒子及びHCVにより感染されやすい対象由来の生物学的サンプル中のHCVに対する抗体によって形成される免疫複合体の存在下又は不存在下において検出することによる、或いは抗HCV（患者の生物学的サンプル中に存在していると思われる中和抗体）によって許容細胞のHCV様粒子感染の阻害を検出することによる、商業的な診断キットは、上記診断方法を実行するために有用である。かかるキットは少なくとも本発明のHCV様粒子を含んでよい。免疫複合体の検出に關与する方法であるところの、当該キットは、おそらく更に前記免疫複合体の適切な検出手段を含む。好適には、本発明の当該キットは、更に選択された方法、例えば“競合的”、“サンドウィッチ”

、及びそれらと類似した方法、に依存した指示、及びプロトコールを含む。当該キットは緩衝剤、安定化剤等、のような核とはならない試薬を含んでもよい。

【0163】

ヘパシウイルス感染に対するワクチン接種

本発明の他の観点では、ヘパシウイルス様感染性粒子はワクチン接種の目的のために用いることができる。

【0164】

一つの態様によると、本発明はこのようにしてワクチン接種の方法を提案し、特にヘパシウイルス感染に対して、それらを必要とする対象へのヘパシウイルス様粒子の投与を含む。本発明はヘパシウイルス様粒子及び医薬的に許容され得る担体を含むワクチン組成物にも関する。本発明は、更に本明細書において開示した医薬的に許容され得る担体、ヘパシウイルス様粒子の中に含まれる免疫原性組成物を提供する。

【0165】

本発明のワクチン及び免疫原性組成物は、ヘパシウイルスに対する免疫性を与え、又は免疫応答の誘引を引き出すことができる。

【0166】

しかしながら、本発明のヘパシウイルス様粒子は、更にヘパシウイルス抗原とは異なる他の抗原をコードする追加の遺伝子を運搬し、本発明は前記抗原に対する免疫応答を高めるために有用である組換えウィルス性ワクチンを提供する。実際に本明細書において記載されたシュード粒子の使用は、いくつかの抗原の提示とプロセッシング経路との組み合わせを通して、免疫応答の誘引を改善させることができる。例えば、本発明のワクチン組成物は、投与された時、ヘパシウイルス様粒子が感染した宿主細胞をもたらす。抗原をコードした導入遺伝子は、その後細胞性ゲノム中で融合し、続けて細胞で発現するので、ワクチン組成物により誘引される細胞性及び体液性の両免疫応答が存在する。

【0167】

好都合には、ヘパシウイルス様粒子は、更に上昇した免疫反応の増強を可能にする免疫分子をコードする導入遺伝子を運搬することができる。

【0168】

好適には、前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウィルスである。本発明はこのようにしてワクチン接種の方法を提案し、特にHCV感染に対して、それらを必要とする対象へのHCV様粒子の投与を含む。本発明はHCV様粒子及び医薬的に許容され得る担体を含むワクチン組成物にも関する。本発明は、更に医薬的に許容され得る担体、本明細書中において開示されたHCV様粒子の中に含まれる免疫原性組成物を提供する。

【0169】

本発明のワクチン及び免疫原性組成物は、HCVに対する免疫性を与え、又は免疫応答の誘引を引き出すことができる。

【0170】

しかしながら、本発明のHCV様粒子は、更にHCV抗原とは異なる他の抗原をコードする追加の遺伝子を運搬し、本発明は前記抗原に対する免疫応答を高めるために有用である組換えウィルス性ワクチンを提供する。実際に本明細書において記載されたシュード粒子の使用は、いくつかの抗原の提示とプロセッシング経路との組み合わせを通して、免疫応答の誘引を改善させることができる。例えば、本発明のワクチン組成物は、投与された時、HCV様粒子が感染した宿主細胞をもたらす。抗原をコードした導入遺伝子は、その後細胞性ゲノム中で融和し、続けて細胞で発現するので、ワクチン組成物により誘引される細胞性及び体液性の両免疫応答が存在する。

【0171】

好都合には、HCV様粒子は、更に上昇した免疫反応の増強を可能にする免疫分子をコードする導入遺伝子を運搬することができる。

【0172】

本発明のワクチン接種又は免疫原性組成物は、更にアジュバントを含んでもよい。多くの

数のアジュバントが当業界における当業者に公知である。安定したアジュバントの例は、例えば水酸化アルミニウム；サポニン；Tween80のような界面活性剤；動物性、鉱物性、又はベジタブルオイル，Corynebacterium又はPropionibacterium由来のアジュバント；Mycobacterium bovis(Bacillus calmette 及びGuerinn,又はBCG)；サイトカイン；カルボマーのようなアクリル酸ポリマー；EMA；又はそれらの組み合わせを含む。

【0173】

投与経路はワクチン分野において用いられる任意の慣用的な経路である。一般的な手引きとして、本発明のワクチン組成物は、例えば眼、鼻、肺、口、腸、直腸、膣、及び尿路表面のような粘膜表面；又は例えば静脈内、皮下、腹膜内、皮膚内、表皮内、又は筋肉内経路のような非経口経路を経由して投与される。投与経路の選択は選定される製剤に依存する。

【0174】

遺伝子転移及び/又は治療のためのベクター

更に本発明の粒子の他の態様では、遺伝子転移及び/又は治療のためのベクターとして使用し得る。遺伝子治療はいずれかのその表現型又は遺伝子型の変化のため、細胞中への遺伝材料の導入として定義されている。主要な、又は癌性のいずれかの肝細胞へのそれらの向性のため、ヘパシウイルス様粒子、特に本明細書において開示されるHCV様粒子は特異的な肝細胞への効率的な遺伝子デリバリーシステムを含む。更にかかるデリバリーシステムは感染の大きな力価を再生産的に生み出すため、複製欠陥的なヘパシウイルス様粒子、特にHCV様粒子のスケールアップを可能にする。

【0175】

従って、本発明は細胞中に注目の導入遺伝子を転移するin vivo又はin vitroでの方法に関し、当該方法は本発明のヘパシウイルス様粒子により感染した細胞を含み、ここで当該粒子は注目の導入遺伝子を運搬する。

【0176】

本発明は更に本発明のヘパシウイルス様粒子の使用に関し、当該粒子は患者の疾患の予防又は治療のための医薬の調製のため、注目の導入遺伝子を運搬し、ここでヘパシウイルス様粒子は患者の細胞中へ注目の導入遺伝子を転移することを可能にし、そして疾患に対する予防又は治療効果を有す産物をコードする。

【0177】

好ましくは、前記ヘパシウイルスはC型肝炎ウイルスである。本発明はこのように細胞中へ注目の導入遺伝子を転移するin vivo又はin vitroのための方法を提案し、当該方法は本発明のHCV様粒子により細胞を感染させることを含み、ここで当該粒子は注目の導入遺伝子を運搬する。

【0178】

本発明は更に本発明のHCV様粒子の使用に関し、それは患者の疾患の予防又は治療のための医薬の調製のため、注目の導入遺伝子を運搬し、ここでHCV様粒子は患者の細胞中へ注目の導入遺伝子を転移することを可能にし、そして疾患に対する予防又は治療効果を有す産物をコードする。

【0179】

好適には、標的にされる細胞は肝細胞である。

【0180】

本発明は以下の実施例及び添付の図面を考慮して更に理解されるであろう。

【実施例1】

【0181】

HCVシュード粒子(HCVpp)の生産

HCVシュード粒子(HCVpp)を、ネズミ白血病ウイルス(MLV)由来のレトロウイルスコアタンパク質上へ、全長、非修飾E1糖タンパク質及びC末端的に切断したE2タンパク質(C末端A1a746残基の欠失、SEQ ID N°16)のフォームを集成することにより生産した。機能的HCVppがトランス中で発現したE1及びE2に

より、又は2つの糖タンパク質の1つのみにより生産することができるかどうかの更なる調査では、E 1又はE 2糖タンパク質のいずれかを個々にコードした発現ベクターをデザインした。

【0182】

ウィルス構成要素をコードした発現ベクターの構造、即ち、E 1、E 2又はE 1 E 2糖タンパク質及びウィルスコアタンパク質。

野生型E 1 E 2ポリタンパク質を発現するプラスミドを、標準的な方法により構築した(Sambrook 等.,1989)。

【0183】

簡潔には、1 aタイプH C V由来E 1及びE 2糖タンパク質をコードするp h C M V - 7 a発現ベクターは、BamH1消化、及びKlenow平滑末端化ベクターp h C M V - G (Negre 等.,2000)の中に、H C Vコア(C)の最後の60残基、並びにp T M 1 p 5 E 1 E 2 (745)ベクター(Op De Beeck等.,2000)由来のE 1及びE 2タンパク質全体をコードする平滑末端化Cla I及びStu I制限フラグメントを挿入することによって作製した。

【0184】

H C V E 1糖タンパク質のみ発現するp H C M V - E 1発現ベクターは、プライマー5'-actggacgacgcaaagctgc(SEQ ID N°2)及び5'-cgcgatcctacgcgctcgacgccggc aaa(SEQ ID N°3)を有するE 1のC末端へ停止コドンが付加することによりp h C M V - 7 aから得られた。得られたPCRフラグメントは、BamH1により消化させ、そして消化したBamH1をp h C M V - 7 aへと結合させた。

【0185】

H C V E 2糖タンパク質のみ発現するp H C M V - E 2は、2つのPCRフラグメント(5'-tgcccgttcagccgaaacccacgtcaccggggga(SEQ ID N°4)+5'-gccagaagt cagatgctcaagg(SEQ ID N°5)及び5'-tactctgagtcctcaaacccg(SEQ ID N°6)+5'-gtgacgtgggtttcggctgaagcgggacacagtcag(SEQ ID N°7)の2つのプライマー対により生産される)を用いて、E 2のN末端をH C VコアのC末端へ融合することにより得た。当該2つのPCRフラグメントはその後PCRの第二ラウンドで融合した。得られたDNAフラグメントはBamH1により消化され、そしてBamH1が切断したp h C M V - 7 aへと結合した。

【0186】

p h C M V - C E 1ベクターの配列は、SEQ ID No 8中に見られ、一方、E 1タンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID No 9中に見られる。p h C M V - C E 1 E 2ベクターの配列はSEQ ID No 10中に見られ、一方、E 1 E 2ポリタンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID No 11中に見られる。p h C M V - C E 2ベクターの配列はSEQ ID No 12中に見られるが、一方E 2タンパク質のアミノ酸配列はSEQ ID No 13中に見られる。

【0187】

1 b遺伝子型のE 1 E 2糖タンパク質のための発現ベクターを、類似の戦略により構築した。

【0188】

従って、H C V E 1 E 2は、E 1、E 2又はE 1及びE 2糖タンパク質のためのシグナルペプチドとして働くコア(C)タンパク質のカルボキシ末端を含むポリタンパク質から発現した。

【0189】

H C Vシュード粒子の生産

レトロウィルスはH C V p pの集成のためのプラットフォームとして選定される。なぜならそれらのコアは多種多様な細胞及びウィルスの糖タンパク質を組み込むことができるからであり、並びにそれらは容易に宿主細胞DNA中にパッケージすることができ、及び一般的なマーカー遺伝子を融合させることができるからである。

【0190】

HCVppを、CE1E2、CE1又はCE2ポリタンパク質、MLVコアタンパク質、及びGFP（緑色蛍光タンパク質）マーカー遺伝子を担持するパッケージ競合MLV由来ゲノムをコードする3つの発現ベクターにより、293Tヒト胚腎細胞（ATCC CRL-1573）をトランスフェクトすることにより生産した。この構造体はその発現がCMV（サイトメガロウイルス）の迅速で早期のプロモーターにより制御されるGFPマーカー遺伝子を含む。MLV由来のレトロウイルス性ベクター（ここにおけるgag,pol,及びenvウイルス遺伝子は除去され、ここにおけるレトロウイルス性シス作用要素はベクターゲノムパッケージング、逆転写及び融合を制御する）、中に挿入されたCMV及びGFPの両核酸配列を保持した。

#### 【0191】

コントロールシュード粒子を、VSV-G糖タンパク質（Negre等.,2000）、RD114ウイルスエンベロープ糖タンパク質（Sandrin等.,2002）、及び/又は集成欠陥MLVコアタンパク質（MLV-G2A）（Swanstrom等.,1997）により生産した。

#### 【0192】

簡潔には、 $2.5 \times 10^6$ 個の293T細胞中にトランスフェクトした発現構成物を、製造業者の勧めに従ったリン酸カルシウムトランスフェクションプロトコール（Clontech、仏）を用いて、10cmプレート中に前日に播種した。培地（8mL/プレート）をトランスフェクション後16時間で置き換えた。シュード粒子を含む上清液を24時間後に採取し、 $0.45 \mu\text{m}$ -孔-サイズの膜に通してろ過し、そして以前発表された通り処理した（Negre等.,2000）。

#### 【0193】

シュード粒子の構成成分のイムノプロット分析

トランスフェクトされた細胞及び20%スクロース-クッションを通してペレット化したシュード粒子の溶解産物をイムノプロットした。HCV-1a遺伝子型由来のE1及びE2糖タンパク質、及びMLVコアタンパク質の発現は、以前に発表されたように（Sandrin等.,2002）、E1（A4）（Dubuisson等.,1994）及びE2（H52）（Flint等.,1999）に対するモノクローナル抗体、或いは抗-キャプシド（MLVCA）抗血清（ViroMed Biosafety Laboratories,米）による還元及び変性条件中で現れた。コントロールシュード粒子中で発現したVSV-Gを、モノクローナル抗体P5D4（シグマ-アルドリッチ、仏）により検出した。

#### 【0194】

トランスフェクトされた細胞のイムノプロット分析では、シュード粒子の構成成分を予想される分子量；即ち、E1を30kDa、E2を60kDa、VSV-Gを60kDa、及びRD114糖タンパク質を70kDa、で容易に検出した。MLVコアタンパク質は、成熟コア成分中への、MLVプロテアーゼにより部分的に処理された65kDaのGagタンパク質前駆体として検出した。

#### 【0195】

E1及びE2糖タンパク質を、ウイルス集成欠陥MLV-G2A突然変異体によるものでない野生型MLVコア粒子により産出した精製ビリオンのペレット中で容易に検出した。E2は、ゴルジ酵素による結合グリカンの修飾のために、細胞結合フォームよりややゆっくり移動したウイルスペレットの中で存在する。

#### 【0196】

MLV-G2A集成欠陥コアタンパク質により生産されウイルスペレット中のVSV-Gの存在は、VSV-Gそれ自体により形成される空の小胞のためである（Negre等.,2000）。

#### 【0197】

前駆細胞溶解産物とウイルスペレットにおけるVSV-G又はHCV糖タンパク質の相関性レベルの比較は、ウイルス性粒子中へのE1及びE2の効果的な組み込みを示唆する。同様に、E1及びE2糖タンパク質は、HIV-1から由来するレトロウイルス性コアタンパク質上へ効果的に集成でき、HCV及びHIVを有する患者の共感染として知られ

ている、2つの親ウイルス間の *in vivo*での病原相互作用の可能性を高めることができた (Dieterich,2002)。

【0198】

それにもかかわらず、これらの結果は、レトロウイルスコアにより生産されるシュード粒子中へHCV糖タンパク質の特異的及び効果的な導入を導く293T細胞中のE1及びE2の一時的な過剰発現を示す。HCVエンベロープ糖タンパク質はER (Op De Beeck等,2001)中で保持されることが示されたから、ER腔中へ発芽することにより形成するHCVppを保持し、或いは、ER保持の飽和/漏洩がMLV発芽を正常に起こす (Swanstrom及びWillis,1997)細胞表面に達するため、E1E2のフラクシオンを許容する。

【0199】

異なる発現ユニット由来のトランスにおけるE1及びE2の個々の発現又は共発現は、一つのE1E2ポリタンパク質由来の、シスにおける両糖タンパク質の発現と比較し、通常レベルの合成へと導く。更に、たとえE1とシス又はトランスとの関係で単独で、又は共発現したとしても、HCVppに類似のレベルのE2糖タンパク質が導入されたことを見出した。最後に、E2とトランスとの関係で単独で又は共発現するE1の導入は、わずかなレベルでしか起きず、E2のシャペロン活性と一致する (Op De Beeck等.,2001)。E1又はE2のみを運搬するHCVppの形成はHCVの細胞侵入及び感染性におけるこれらの個々の役割の調査を許容するであろう。

【実施例2】

【0200】

HCVpp細胞株感染性

HCVppの感染性は、: Hu h - 7ヒト肝細胞性癌 (Nakabayashi等.,1982)、P L C / P R F / 5ヒト肝癌 (C R L - 8 0 2 4)、H e p 3 Bヒト肝細胞性癌 (A T C C H B - 8 0 6 4)、H e p G 2ヒト肝細胞性癌 (H B - 8 0 6 5)、A 4 3 1ヒトエピデルモイド癌 (C R L - 1 5 5 5)、C a c o - 2ヒト結腸腺癌 (H T B - 3 7)、H C T 1 1 6ヒト結腸直腸腺癌 (C C L - 2 4 7)、H O Sヒト骨肉種 (C R L - 1 5 4 3)、H T - 1 0 8 0ヒト繊維肉腫 (C C L - 1 2 1)、H T - 2 9ヒト結腸直腸腺癌 (H T B - 3 8)、L o V oヒト結腸直腸腺癌 (C C L - 2 2 9)、M C F - 7ヒト乳腺癌 (H T B - 2 2)、2 9 3 T、T E 6 7 1ヒト横紋筋肉腫 (A T C C C R L - 8 8 0 5)、U 1 1 8ヒトグリア芽細胞種 (H T B - 1 5)、J u r k a tヒトT細胞白血病 (T I B - 1 5 2)、C E Mヒトリンパ芽球白血病 (C C L - 1 1 9)、M o l t - 4ヒトリンパ芽球白血病 (C R L - 1 5 8 2)、R a j i B u r k i t t ' sヒトリンパ腫 (C C L - 8 6)、C M M Tアカゲザル哺乳動物性癌 (C R L - 6 2 9 9)、C O S - 7アフリカ緑サル繊維芽細胞腎 (C R L - 1 6 5 1)、V E R Oアフリカ緑サル腎 (C C L - 8 1)、P G - 4ネコのアストロサイト (C R L - 2 0 3 2)、B H K - 2 1ゴールデンハムスター腎 (C C L - 1 0)、C H Oチャイニーズハムスター卵巣 (A T C C C C L - 6 1)、B R L 3 Aラット肝細胞 (C R L - 1 4 4 2)、N I H 3 T 3マウス繊維芽細胞 (C R L - 1 6 5 8)及びQ T 6ウズラ繊維肉腫 (C R L - 1 7 0 8)の標的細胞株のパネル上で評価された。標的細胞はA T C C (American Type Culture Collection, Rockville, MD, 米)が推奨するように育成した。

【0201】

標的細胞 (前日に  $8 \times 10^4$ 細胞 / 12ウェルプレートに播種した)を、HCVppを含む生産細胞由来の上清液の希釈物と共に3時間培養し、その後洗浄し、そして72時間後FACS分析で集成したビリオンが担持するGFPMARCA遺伝子発現まで培養した (Sandrin等.,2002)。HVPppは複製欠陥性ウイルス成分により作製されるので、本手順は感染過程の1ラウンド後のシュード粒子の特異的な感染性の評価を可能にする。

【0202】

HCVppの  $1.1 \times 10^5$  T U / m Lまでの感染力性価をHu h - 7ヒト肝癌細胞上で検出した (図1)。超遠心分離による生産細胞の上清液濃度 (Sandrin等.,2002)において、平均  $2 \times 10^6$ の感染性力価を容易に得ることができた。感染アッセイにおいて用

いられた他の標的細胞タイプでは、HCVppによる感染レベルがより弱く（PLC/P RF/5、Hep3B、HepG2、Caco-2、HT1080、HT-29、LoVo、MCF-7、U118,293T、Vero）又は検出さない（A431、HCT116、HOS、TE671、Jurkat、Molt-4、CEM、Raji、CMMT、Cos-7、BHK-21、CHO、PG-4、BRL3A、NIH3T3、QT6）ことが示された。コントロールシュード粒子による感染性は、標的細胞（全てのこれらの細胞がコントロールシュード粒子により容易に感染したことを示す）のタイプに依存して $7 \times 10^6$ から $2 \times 10^7$  TU/mLの範囲で、VSV-Gにより発生した。これは以前の細胞タイプのみの中で明確に発現したHCV侵入のために必要な全ての分子を示唆した。

#### 【0203】

感染性HCVppは、HCV遺伝子型1a及び1bから由来するE1E2糖タンパク質（レーンh及びi；図2）、並びに/或いはHIV-1又はMLVのいずれから由来するレトロウイルスコアタンパク質（レーンd及びh；図2）と同等の効率で引き起こすことができる。

#### 【0204】

AZTと共にHCVpp及び標的細胞を培養したところ、融合能プロウイルス性DNAのような、HCVppのレトロウイルス性RNAゲノムの転換を妨げる逆転写酵素阻害剤は、形質導入を阻害した（レーンj；図2）。

#### 【0205】

更に、GFPの長期発現は、1月以上の感染細胞の連続的な経過を経て、証明することができた。

#### 【0206】

これらの結果は宿主細胞DNA中での融合を導く標的細胞の感染、及びHCVppにより導入されたGFPマーカー遺伝子の安定した発現を示した。更に、E1及びE2両糖タンパク質、又はコアタンパク質を欠いたウイルス粒子により、或いはMLV-G2A集成-欠損コアタンパク質を用いた場合得ることができた感染はなかった（レーンa-c；図2）。

#### 【0207】

本発明者等は、肝細胞感染が遺伝子型2a、2b、3a、3b、4a及び4bのE1並びにE2糖タンパク質を担持するHCVppにより達成され得ることを更に証明した。

#### 【0208】

完全にこれらの結果は、任意の遺伝子型のE1及びE2糖タンパク質及びレトロウイルスコアタンパク質を担持するHCVppが感染性であり、それらのベクターゲノムをレトロウイルス媒介融合へ導くことを支援する。

#### 【0209】

最終的に、E1導入のレベルを減少させるにもかかわらず、別個のベクターからトランスにおいて発現するE1及びE2糖タンパク質を有す生産されたHCVppは、E1E2ポリタンパク質構成物を有す生産されたHCVppとほぼ同じ感染性であった（レーンg及びh；図2）。しかしながら、E1又はE2糖タンパク質のいずれにより集成したHCVppは500倍低い感染性しかなく（レーンe-f；図2）、両糖タンパク質が効率のよいウイルス侵入及び感染を許容するためにHCVpp上に共導入されることが必要であることを証明する。

#### 【実施例3】

#### 【0210】

##### HCVpp主要肝細胞感染性

肝細胞はin vivoにおける主要なHCV複製サイトを表し、更にex vivoにおける研究では、HCVがリンパ球細胞にも感染し得ることが示唆された（Lindenbach及びRice,2001）。いずれかの細胞タイプに感染することができるかどうかを確認するため、ヒト成人肝細胞（図3）及び抹消血単核球（PBMCs）に形質導入した。シュード粒子は、増殖し

ていない標的細胞の形質導入を許さないMLV由来よりもむしろHIV-1由来のコアタンパク質により生産した(Nerge等.,2000)。

【0211】

HCV、HCV及びHIVが存在しないことが確認されたヒト成人生検サンプルから単離した冷凍保存された主要肝細胞は、Biopredic International(Rennes,仏)から購入し、業者が薦める方法によってコラーゲンIで覆われたプレート上で培養した。肝細胞の形質導入はUVマイクロスコープの下でGFP-陽性細胞を数えることによって測定した。感染の特殊性は、糖タンパク質を欠いたシュード粒子(ppコア)により標的細胞が感染した際の形質導入の不存在により、又は標的細胞を感染前にJS-81抗-CD81抗体(30µg/mL)により前培養した際の形質導入のレベル減少により証明された。健常ドナーから単離したヒトPBMCsの感染は、以前に発表された通りに処理された(Sandrin等.,2002)。

【0212】

Huh-7細胞の感染に関連して、HCVppは異なるドナー由来の主要な肝細胞を容易に感染させることができ(図3)、更に形質導入の効果は、個々の生検の生存に適した質及び細胞培養により変動した。対照的に、HVPppによるPBMCsの感染は殆どないか又は検出不可能であることを見出したが、VSV-Gにより生産されたコントロールシュード粒子はそれらの主要な細胞に容易に感染することができた。

【0213】

これらのデータは、HCVppの緊密に類似した向性、及び野生型のHCVによりより早期に感染が起こり、並びに肝細胞及び肝性癌細胞へ優先的に感染することを完全に示す。

【実施例4】

【0214】

HCVppはHCV感染の早期ステップの有効なモデルである。

HCVppの感染性はE1及びE2糖タンパク質により仲介される。

HCVppの感染性がE1及びE2により特異的に仲介されるかどうか、そして細胞表面受容体とのそれらの相互作用の有無を更に測定した。HCV-1a糖タンパク質に対し特異的に反応することが以前に示されたモノクローナル抗体のパネル(Dubuisson等.,1994;Flint等.,1999;Patel等.,2000)を使用した。

【0215】

HCV-1aE1E2により、及びMLVコアタンパク質により生産されるHCVppを、遺伝子型1aのE1(A4)又はE2(H31、H33、H35、H44、H48、H53、H54、H60及びH61)糖タンパク質に対するモノクローナル抗体の飽和濃度(20µg/mL)により、或いは貯蔵された抗体(Hmix)により、Huh-7細胞の感染前に前培養した。コントロール実験では、抗体を使用せず、又はVSV-G(VSV-Gpp)により生産したシュード粒子を使用して実施した。

【0216】

それらのH35及びH48のようなモノクローナル抗体のいくつかは、例えば、遺伝子型1aのHCVppを中和し、そして70%までそれらの感染性を減少させることができた(図4)。不完全な中和は、細胞内のE1E2複合体へ結合するために開発され、選定されたそれらのモノクローナル抗体がE2の翻訳後修飾を受けやすいことを示した(Flint M.等.,2000)事実によるのであろう。確かに、その細胞内の対応部分との比較では、糖修飾が起こったことが見出されたHCVppに関連するE2は、細胞分泌経路を通して外へ運ばれるという結果に最もなりそうである。

【0217】

対照的に、それらの遺伝子型1a-特異的抗体は、遺伝子型1bのHCVpp、又はVSV-Gにより生産したコントロールシュード粒子を中和できるものはない(図4)。これらのコントロールシュード粒子の感染性の中和は、VSV-G中和41A.モノクローナル抗体を用いることにより達成した。

## 【0218】

従ってこれらのデータは、シュード粒子の感染性が特にE1及びE2糖タンパク質導入によるものであること、これらのHCVppがHCV感染の早期ステップ、即ち、受容体結合、膜融合及びエンベロープ非被覆、を調査するための有効なモデルを表すことを示すこと、を証明した。

## 【0219】

HCV感染はHCV感染患者由来の血清により中和される。

HCVppの感染性を中和するための慢性HCV感染患者由来の血清の能力を更に評価した。

## 【0220】

遺伝子型1a又は1bのHCVppを、HuH-7標的細胞への感染前に1/50に希釈した慢性HCV感染患者由来血清と一緒に30分間室温で前培養した。コントロール実験は、ヒト補体への感度を示すVSV-G (Sandrin等.,2002)よりもむしろ、RD114糖タンパク質(RD114pp)により生産したシュード粒子を用いて実施した。能率のよいコントロールシュード粒子の中和は、RD114SU糖タンパク質に対し上昇した高い免疫性のヤギ血清を用いて証明した(ViroMed Biosafety Laboratories,米)。

## 【0221】

コントロールシュード粒子の全くない中和、もしくは弱い中和は、HCV感染患者の血清を用いることにより検出することができた。対照的に、健常ドナー由来血清と比較してそれらの血清の全てがHCVppの感染性を中和できるのではないとしても、大抵はHCVppの感染性を中和できる。様々なレベルでの中和はドナーに依存し、並びに1a及び1bの両遺伝子型のHCVppの阻害を20%から90%までの範囲で検出した。1b遺伝子型のHCVによる感染患者由来の血清は、類似の効率で遺伝子型1a又は1bのE1E2により生産したHCVppを中和することができた(図5)。

## 【実施例5】

## 【0222】

HCVシュード粒子による細胞侵入受容体の使用。

共にテトラスパニン受容体ファミリーのメンバーであるLDL受容体(LDLr)及びCD81は、HCV受容体と推定されることが発表された(Pileri等.,1998; Agnello等.,1999)。しかしながら、最近の研究ではHCV粒子及び/又は糖タンパク質とのそれらの明白な結合能があるにもかかわらず、細胞侵入受容体としてのそれらの分子の役割を問いかけた(2023)。このようにして、HCV細胞侵入の早期段階におけるいずれの細胞表面分子の貢献は、受容体-競合アッセイを実施することにより調査された。

## 【0223】

更に最近では、セロトニン性組織中で発現したSR-B1ヒトスカベンジャー受容体クラスBタイプIが、その他の推定されるHCV受容体であるとして意見が出された(Scarselli, Ansuini等.,2002)。このようにして、HCV細胞侵入の早期段階におけるSR-B1の貢献を、このHCV受容体候補物質を発現するために設計された非-許容性標的細胞における感染アッセイを実施することにより調査した。

## 【0224】

LDLr

LDLrはLDL中のアポリポタンパク質B並びにVLDL複合体中のアポリポタンパク質B及びE(ApoB及びApoE)と結合し;両複合体は感染患者の血漿中のHCV粒子と関連することが見出された(Andre等.,2002)。

## 【0225】

LDL受容体競合アッセイは、シュード粒子感染前に前培養された精製したLDLs(10µg/ml、100µg/ml;シグマ-アルドリッチ、仏)、或いはモノクローナル抗体5E11(10µg/ml、50µg/ml)、4G3(抗-ApoB;10µg/ml、50µg/ml)又は1B7(抗-ApoE;1µg/ml、10µg/ml、50µg/ml、100µg/ml)(Ottawa Heart Institute Research corporation,

Ottawa, Ontario, カナダ) もしくは混合された 5 E 1 1、4 G 3 及び 1 B 7 抗体 (それぞれの濃度は 1 0  $\mu$  g / m l、5 0  $\mu$  g / m l) を用いて実施した。

【 0 2 2 6 】

精製した L D L s では、1 0 0  $\mu$  g / m l より高い濃度で使用した場合でさえ、H u h - 7 L D L r - 陽性細胞上の H C V p p の外部競合感染が見出されなかった。モノクローナル抗体が、H C V p p により前培養された A p o B 及び A p o E の受容体結合サイトを標的にした場合、抗 - A p o E 抗体のみが H C V p p の感染性をたとえ弱くとも、阻害することができた。これは、H C V p p が、H e p G 2、J u r k a t、C E M、M o l t - 4、R a j i 及び T E 6 7 1 のような L D L r - 陽性細胞株に感染できないか、もしくは殆ど感染できないかである、という我々の観察と一致する (図 1)。従って、これらの結果は H C V 侵入における L D L r の役割を排除しないが、ひょっとしたら H C V 粒子による L D L s との関連によって (Andre 等., 2002)、それらは L D L r が H C V p p 侵入の主要な受容体でないことを示唆する。

【 0 2 2 7 】

C D 8 1

H C V E 2 への結合を見せたヒト C D 8 1 の大きな細胞外ループ (L E L) を取り囲む組換え G S T - 融合ポリペプチドは (Flint 等., 1999, Pileri 等., 1998)、その後 H C V p p 細胞侵入における h C D 8 1 の役割を調査するために用いた。

【 0 2 2 8 】

h C D 8 1 - L E L G S T - 融合ポリペプチド (4  $\mu$  g / m l、8  $\mu$  g / m l、1 6  $\mu$  g / m l) を感染前にシュード粒子と共に前培養し、又は J S - 8 1 抗 - C D 8 1 抗体 (4  $\mu$  g / m l、1 0  $\mu$  g / m l、3 0  $\mu$  g / m l; Pharmingen, 仏) を感染前に標的細胞と共に前培養した。阻害剤の不存在下において得られた力価と相関する H u h - 7 細胞上で得られた感染性力価の阻害パーセンテージを計算した。コントロール実験は V S V - G により生産されたシュード粒子 (V S V - G p p) を用いて実施した。H C V p p 及び V S V - G により生産したコントロールシュード粒子を感染させた N I H 3 T 3, N I H 3 T 3 - h C D 8 1 及び H u h - 7 細胞で、比較実験を更に実施した。

【 0 2 2 9 】

H C V p p により前培養された G S T 融合 h C D 8 1 - L E L ポリペプチドは、E 1 E 2 複合体を特異的に引き起こし、E 2 糖タンパク質へのそれらの結合能を確認し (Flint 等., 1999; Pileri 等., 1998)、及び H u h - 7 細胞上の H C V p p の感染性を中和し、更に比較的効率が良くないことを見出した。阻害は、3 8 % から 5 4 % の感染性阻害の範囲にあり、用量依存性であるようだ。

【 0 2 3 0 】

H u h - 7 細胞と h C D 8 1 への E 2 組換え体 (Flint 等., 1999) の結合を遮断する J S - 8 1 モノクローナル抗体の前培養は、一貫して、H u h - 7 標的細胞及びヒト主要肝細胞の両方において H C V p p の感染性を阻害することを見出した。高濃度抗体では (3 0  $\mu$  g / m l)、9 0 % を超えた感染の阻害は、遺伝子型 1 a と遺伝子型 1 b に基づく H C V p p に得ることができた。しかしながら、H C V p p による感染を許容しない、T E 6 7 1、Jurkat、C E M、M o l t - 4 及び R a j i 細胞のような、いくつかの標的細胞では (図 1)、h C D 8 1 (C D 8 1 発現及び感染性の間の相関不足を示す) の高密度の発現を見出した。

【 0 2 3 1 】

更に、非許容性 N I H 3 T 3 マウス繊維化細胞の発現は、H C V p p による感染を許容しない (図 4 C)。

【 0 2 3 2 】

これらの結果は、h C D 8 1 が H C V E 2 に結合し、及び H C V の細胞表面結合を助けることができるが、それ自体では H C V p p による感染を許容するに十分ではないことを完全に証明した。

【 0 2 3 3 】

## S R - B 1

C L A - 1としても公知である(C D 3 6及びL I M P I Iアナログ1)(Calvo及びVega 1993;Webb等.,1998) S R - B 1をコードしたc D N Aを、M L Vレトロウイルス性ベクター中に導入し、そしてベクター粒子をV S V - G糖タンパク質により生産し、そしてシュードタイプ化した。それらはC H O及び3 T 3細胞を形質導入するために使用し、図1に示されるようにH C V p p感染に非許容性である。これらの形質導入細胞におけるS R - B 1の発現を、S R - B 1表皮ドメインに対する抗体を用いたF A C S分析により確認した。

## 【0234】

S R - B 1形質導入細胞は及び親細胞は、H C V p pを用いた感染アッセイのための標的細胞として使用した。H u h細胞はコントロール許容性標的細胞として使用した。

## 【0235】

対照的にH u h - 7細胞は、S R - B 1形質導入細胞又は親C H Oもしくは3 T 3細胞のいずれもH C V p pにより感染することができない。これらのデータはE 2を結合するS R - B 1(Scarselli等.,2002)であってH C V p pの細胞中への侵入を許容するに十分ではないことを示す。

## 【0236】

従って、h L D L R及びh C D 8 1のためとして、S R - B 1単独発現の発現は、感染のための細胞許容性に変えるに十分でない。

## 【0237】

H C V p p感染を許容する全ての分子を共発現することが必要とされるH C V標的細胞、C H O及び2 9 3標的細胞が、それぞれにS R - B 1発現を有さないか、又は低いS R - B 1発現を有するか、そしてH C V p pによる感染の許容性は共にないか(Bartosch等.,2003a及びb)、の可能性を確認するためにそれぞれにヒトC D 8 1及びS R - B 1を運搬する2つのV S V - G - シュードタイプのレトロウイルスベクターにより共感染させた。いずれの細胞タイプ上の両細胞表面分子の共発現を形質導入した2日後F A C S分析により証明した。

## 【0238】

C D 8 1及びS R - B 1共発現C H O又は2 9 3細胞は、その後H C V p pを用いた感染アッセイのための標的細胞として使用した。同類の親C H O細胞及びC D 8 1又はS R - B 1発現レトロウイルス性ベクターのいずれかによって個々に形質導入された同一の細胞は、感染性の不存在という結果となった。親2 9 3細胞及びC H O - C D 8 1 / S R - B 1細胞との対比では、S R - B 1 - 形質導入された2 9 3細胞は感染の許容性が見出され、C D 8 1及びS R - B 1の共発現がヒト細胞中における感染のために要求されることが示された。

## 【0239】

H e p G 2ヒト肝性癌細胞がH C V p pによる感染に非許容性であるため、本発明者等は更にそれらの非許容性がC D 8 1及びS R - B 1の両方の共発現の不足のせいであると考えた。実際にH e p G 2細胞は、C D 8 1発現を不足させず、S R - B 1を発現した。

## 【0240】

従って、H e p G 2細胞をV S V - Gによりシュードタイプ化したC D 8 1を運搬するM L Vレトロウイルスベクターにより形質導入した。C D 8 1発現は、形質導入2日後、F A C S分析により証明され、及びC D 8 1を形質導入したH e p G 2細胞はその後H C V p pを用いた感染アッセイのための標的細胞として使用した。

## 【0241】

親H e p G 2細胞と比較して、H C V p pによるより弱い感染があり、これらの細胞内におけるC D 8 1の外部発現はH C V p pの高い感染性をもたらし、同様にH u h - 7細胞中で観察された。

## 【実施例6】

## 【0242】

### 超可変領域 I の欠失

HCV 感染は 80% を超える患者により明確にされず、慢性化は肝疾患の様々なフォームに関連する。慢性感染は、宿主免疫応答を免れるためのウィルスを助ける HCV の高い突然変異率により引き起こされると想定される。HCV ゲノム中における注目されるいくつかの突然変異の一つは、E2 糖タンパク質の N 末端に集中した。これはいわゆる超可変領域 I と呼ばれ、*in vivo* における主要 B 細胞のエピトープ及び中和抗体の標的である。実際に HCV pp は、マウスモノクローナル抗体により、又は HVR1 に対し上昇するウサギ高免疫性血清 (Bartosch 等., 2003b) により、非常に効率よく中和させることができる。しかしながら、かかる抗体は相同配列に高特異的であり、そしてウィルスの軽度に分散した HVR1 変異体、及び HVR1 HCV pp を中和しない (Bartosch 等., 2003b)。従って、その変わりやすさから、HVR1 は宿主の免疫応答を免れる HCV を許容する重要な役割を果たすと想定される。HVR1 のアレルギーのバリエーションは、異種の HCV 株 / 遺伝子型による再感染に対する保護的免疫応答の発達を阻害することもできる。最終的に抗原的優性及び HVR1 の過度の変わりやすさは、HCV に対するワクチン開発を遅らせることになる。有効な治療 (そのターゲットは HCV 糖タンパク質の部分をより保つ) を開発するための長期の目的により、本発明者等は HVR1 が感染に必要なでないか否かを調査した。

#### 【0243】

野生型 E1E2 又は突然変異体バージョンのポリタンパク質をコードする発現構成体を目的とするため、HVR1 = E2 の最初の 27 残基を生産したポリタンパク質から欠失させた。HCV シュード粒子 (HCV pp) を野生型又は HVR1 CE1E2 のポリタンパク質のいずれかにより生産した。野生型及び突然変異体 E2 タンパク質の両方を示したトランスフェクトされた細胞のイムノプロット分析では、同一のレベルで発現した。ウィルス性粒子をトランスフェクトされた細胞の上清液から採取し、高密度スクロースクッションを通して超遠心分離により精製した。HVR1 及び野生型 E2 を同一レベルの粒子中へ組み入れた (図 7)。野生型及び突然変異体 HCV pp の感染性は Hu h-7 標的細胞上より前に検査した。2.6 × 10<sup>5</sup> TU/ml までの感染性力価を野生型 HCV pp のために検出した (図 8)。HVR1 HCV pp は約 5 から 10 倍低い感染性であり、更に 5.1 × 10<sup>4</sup> TU/ml の最大力価は、SR-B1 受容体への相互作用を経由して、感染過程を補助する HVR1 を示唆することを観察した (Scarselli 等., 2002; Bartosch 等., 2003b)。

#### 【0244】

HVR1 HCV pp は、中和をより保持するエピトープに対する抗体を誘導するだけでなく、中和を検出するためのツールとしてのエピトープは、HCV 感染により誘導される体液性応答のターゲットでもある。体液性応答は、少数の HCV 感染患者由来、及び実験的に予防接種されたチンパンジー由来の血清中で特徴付けられた (Bartosch 等., 2003c)。慢性感染由来抗体の中和は、相同及び異種の遺伝子型 1a pp に対し比較的高く滴定し、そして通常、常にではなく、異なる亜型遺伝子のシュードタイプ化ウィルスを交差中和した。本願において検査された起源血清が、HCV エンベロープタンパク質の HVR1 領域の外部エピトープにより反応するかどうかの決定は、血清のパネルを HVR1 HCV pp に対して 1:50 の希釈物で検査した。親の HCV pp を中和した血清の全ては、HVR1 HCV pp も中和した。従って、患者及びチンパンジー由来の中和抗体は、HCV エンベロープ糖タンパク質中のどこか他のところにある 1 以上の追加のエピトープと反応した HCV により持続的に感染した。かかる慢性的に感染した患者から調製された免疫グロブリンの観察と一致する、抗-HCV 抗体を中和させる慢性的に感染したチンパンジー及びヒト、並びに幅広く交差感染性である本抗体の観察では、HCV 感染に対し保護することができる。抗体に基づき HCV に対する受動的免疫予防及び能動的免疫予防の開発戦略の実行可能性を再考するため、並びに慢性 HCV 感染のコントロールにおける体液性及び細胞性免疫に関連する重要性を再評価するために重要な含意を有する。

#### 【実施例 7】

## 【 0 2 4 5 】

H C V p p 及び細胞 - 細胞融合アッセイ。

細胞 - 細胞融合アッセイは、E 1 E 2 - トランスフェクトされた 2 9 3 T (ドナー) 細胞と標的 (エフェクター) 細胞の共培養によりデザインした。当該エフェクター細胞は肝性癌細胞、又はコントロールとして、2 9 3 T 細胞であった。

## 【 0 2 4 6 】

エンベロープ糖タンパク質を発現している構造体によりトランスフェクトされた形質転換細胞を、同一の濃度で、6つのウェルプレート中で ( $3 \times 10^5$  細胞/ウェル) 分離し、数え、そして再接種した。新鮮な標的宿主細胞 (ウェル当たり、 $1 \times 10^6$  細胞) をその後トランスフェクトされた細胞上に付加し、そして24時間共培養した。

## 【 0 2 4 7 】

共培養は、p H 5 に緩衝された D M E M により置き換えた培養培地により、5分間、酸性 p H 滴下し、そしてその後正常 (中性の p H 培地) により置き換えた酸性培地を5分間培養し、そして培養を、合胞体をスコアリングすることによって評価される細胞 - 細胞融合になるまで、12時間成長させた。

## 【 0 2 4 8 】

培養はその後、製造業者が勧める通り、May-Grunwald及びGiemsa水溶液 (M E R C K) を付加することにより染色した。2以上の核を含む細胞は合胞体として定義され得る。融合インデックスは、その後 (N - S) / T のパーセンテージとして定義され、ここで N は合胞体中の核の数、S は合胞体の数、そして T は数えられた核の総数である。

## 【 0 2 4 9 】

合胞体のスコアリングの結果は表 1 に示す。

## 【表 1】

〔表 1〕 Huh-7細胞による合胞体アッセイの結果

トランスフェクトされた糖タンパク質	中性pHでの合胞体pH <sup>1</sup>	pH-5ショック後の合胞体 <sup>1</sup>
None	-	-
MLV-A	-	-
MLV-A-Rless	++	++
FPV-HA	-	++
VSV-G	+	+++
HCV E1	-	-
HCV E2	-	-
HCV E1E2	-	++ <sup>2</sup>

<sup>1</sup> (-), 1%未満の融合インデックス, (+), 1%から5%の間の融合インデックス; (++) , 5%から20%の間の融合インデックス; (+++) , 20%以上の融合インデックス.

<sup>2</sup> E1E2をトランスフェクトした細胞を、pH-5ショックの後に293細胞と共培養した時に検出された合胞体の数.

## 【 0 2 5 0 】

コントロール両方向性ネズミ白血病性ウイルス (M L V - A) p H 非依存性糖タンパク質の発現は、これらの実験条件において合胞体をもたらさなかった。しかしながら、広い合胞体のフォーメーションは細胞質への尾を短くすることによる M L V - A 糖タンパク質の突然変異体フォーム (M L V - A - R l e s s) を用いた時、検出された。

## 【 0 2 5 1 】

pH依存性トリ伝染病ウイルス血球凝集素 (FPV-HA) の発現は、共培養が5分間、pH5で培養された時にのみ、合胞体フォーメーションをもたらした。

【0252】

VSVのpH依存性G糖タンパク質の発現は、中性pHでの小さな合胞体フォーメーション、及び酸性pHでの広い合胞体フォーメーションをもたらした。

【0253】

HCV E1又はHCV E2単独の発現が、いずれかの実験条件下において合胞体をもたらさなかったが、Huh-7細胞と共に共培養させた293T細胞中におけるE1及びE2の両方の共発現は、合胞体のフォーメーションを誘導するに十分であった。これは、かかる実験的条件下において、HCV E1E2が適切なHCV受容体を発現する細胞を融合することができることを示す。

【0254】

更に、これらの結果は、多くのレトロウイルス性糖タンパク質 (例えば、MLV-A) と似ていないが、HCV E1E2のfusogenicityが、酸性pHにより引き起こされるインフルエンザウイルス血球凝集素 (例えば、FPV-HA) 又はVSV-Gと似ていることを示す。これらの発見は、エンドソームの酸性化の阻害剤へのHCVシュード粒子の感受性により確認される (表2)。

【表2】

【表2】HCVプソイド粒子によるpH感染の感受性

糖タンパク質 <sup>1</sup>	パフィロマイシン-A濃度 (nM) <sup>2</sup>			
	0	50	100	200
MLV-A	100	91.2	70	45
FPV-HA	100	12.8	2.3	2.7
VSV-G	100	27	7.3	0.5
HCV-E1E2	100	12.8	4.3	3

【0255】

<sup>1</sup>GFP-運搬シュード粒子は、パフィロマイシンAが記載された濃度で存在する中において、Huh-7細胞を感染させるために用いた記載された糖タンパク質により生産した。阻害剤を3時間後に除去し、感染性を3日後にFACS分析により測定した。

【0256】

<sup>2</sup>パフィロマイシンAの記載された濃度での感染の結果は、阻害剤の不存在下において測定された感染性のパーセンテージとして表す。

【0257】

このように、本新規細胞-細胞HCV融合アッセイは、HCV結合を阻害することができる分子のスクリーニングのため、そして膜融合による細胞侵入のために高い価値がある。

【実施例8】

【0258】

HCV p7の存在下におけるHCVシュード粒子の集成及び感染性の増加。

【0259】

HCVエンベロープタンパク質のコンホメーションの変化に影響を与えるであろうp7タンパク質は、細胞結合及びHCVビリオンの侵入におそらく重要であるだろう。従って、p7タンパク質の更なる情報を得るため、E1E2 p7ポリタンパク質を発現する発現構造体を作製した。

【0260】

H C V 1 a タンパク質デルタコア、E 1、E 2 及び p 7 を発現する、p h C M V - C E 1 E 2 p 7 ( p h C M V 7 a p 7 - 1 ) 発現ベクターは、H C V 遺伝子型 1 a の E 1、E 2 及び p 7 を含むプラスミド p T M 1 p 5 E 1 E 2 p 7 由来のデザインされたフラグメント Stu 1, Bcl 1 を用いて構成した (Fournillier-Jacob 等, 1996 ; Cocquerel 等, 2000) 。本フラグメントを、Bcl 1 による Bsu36 1 消化、平滑末端化及びサブ配列消化の後に、以前に発表されたプラスミド p h C M V - 7 a 中に結合させた。p h C M V - C E 1 E 2 ベクターの配列は、S E Q I D N o 1 4 に見られ、一方 C E 1 E 2 ポリタンパク質のアミノ酸配列は、S E Q I D N o 1 5 に見られる。

【 0 2 6 1 】

p 7 ( H C V - p 7 p p ) により生産された H C V シュード粒子の感染性を H C V p p と比較した。H C V シュード粒子の集成の間中の p 7 の発現は、1 0 倍までに増加した力価をもたらした。同様に p 7 発現により仲介された感染性力価の増加は、H C V 遺伝子型 1 a 及び 1 b 由来の E 1 E 2 糖タンパク質により集成した H C V p p を得た。

【 実施例 9 】

【 0 2 6 2 】

成熟 E 2 糖タンパク質の C 末端アミノ酸残基の欠失。

【 0 2 6 3 】

C E 1 E 2 ポリタンパク質を発現するために用いられる H C V ポリタンパク質のフラグメントは、通常、総 H C V ポリタンパク質に相関して数えられる。1 a 株 H C V 遺伝子型のため ( 遺伝子バンクのアクセスナンバー : A F 0 0 9 6 0 6 ) 、C はアミノ酸 1 3 2 - 1 9 1 ( シグナルペプチド : アミノ酸 1 7 1 - 1 9 1 ) 、アミノ酸 1 9 2 - 3 8 3 による E 1、及びアミノ酸 3 8 4 - 7 4 6 による E 2 ( H V R 1 : アミノ酸 : 3 8 4 - 4 1 0 ) により取り囲まれる。

【 0 2 6 4 】

本発明者等は、感染性 H C V シュード粒子を集成させるために要求される他の成分と共に、アミノ酸 1 3 2 から 7 4 6 の本全長ポリペプチド ( C のアミノ末端を融合させた短い配列 M N S を有し、及びそれは C E 1 E 2 ポリペプチド遺伝子の翻訳開始サイトの近くにコードされる ) を共発現させた。H C V シュード粒子は C E 1 E 2 ポリタンパク質の短いバージョンにより、アミノ酸 1 3 2 - 7 4 5 ( 及び M N S アミノ末端ペプチド ) を集成させ、取り囲むこともできる。

【 0 2 6 5 】

H C V シュード粒子の両タイプ、即ち、全長 E 1 E 2 糖タンパク質 ( H C V p p ( 7 4 6 ) ) を運搬するもの、及び 7 4 6 に位置する最後のアミノ酸を欠失させた E 1 E 2 糖タンパク質を運搬するもの、アラニン、( H C V p p ( 7 4 5 ) ) は、糖タンパク質の正常レベルを含む。しかしながら、当該 H C V p p ( 7 4 5 ) シュード粒子は、H C V p p ( 7 4 6 ) シュード粒子の 1 0 - 5 0 倍の感染性と一致する。従って、この感染性の改変は、感染アッセイ並びに中和化合物及び抗体のスクリーニングにおいて重要である。

【 実施例 1 0 】

【 0 2 6 6 】

中和抗体を引き出す H C V p p によるマウス免疫化。

【 0 2 6 7 】

Balb/c マウス、生後 4 - 5 週間、4 動物の群において、実施例 6 に記載の通り遺伝子型 1 a、1 b、2 a の E 1 E 2 糖タンパク質、又は H C V p p H V R 1 C E 1 E 2 を担持する精製した H C V p p、或いはコントロールとして、ウィルスの表面糖タンパク質を欠いている、又は R D 1 1 4 ネコ内因性ウィルス ( Bartosch 等., 2003a ) 由来の関連のない糖タンパク質を運搬するシュード粒子と一緒に腹腔内注射した。1 e 9 体内粒子とだいたい一致する精製された 1 e 6 H C V p p をマウスごとに使用した。いずれのマウスも、同一の接種により 2 倍に増加した。採取した動物の血清及びそれらの中和活性を、H C V p p を用いた感染アッセイにおいて、以前に免疫処理した同一の動物から採取したコントロール血清と比較した。

## 【 0 2 6 8 】

これらのコントロール血清でもコントロールシュード粒子により免疫処理された動物由来血清でも、HCVシュード粒子の異なるタイプの感染性を中和することができなかった。対照的に、HCVシュード粒子により免疫処理されたマウスの血清は、免疫化のために使用される適合したHCVシュード粒子タイプ、及びHCVシュード粒子の他のタイプの両方の感染性を効果的に中和することができた。これは、HCVppとの培養の前に、HCVppにより免疫処理されたマウスの血清が1/80に希釈された時、90%以上の感染性の阻害をもたらした。

## 【 0 2 6 9 】

これらのデータは、HCVシュード粒子が中和抗体、及び交差中和抗体のフォーメーションを引き出すために有用である。中和抗-HCV抗体を誘導する能力は、C型肝炎に対する受動的及び能動的な免疫予防を仲介する良好な抗体の可能性の評価を可能にするであろう。

## 【 0 2 7 0 】

結果として、本発明はE1E2糖タンパク質(成熟過程)のウィルス集成及びHCVの細胞侵入のそれらの役割の正確な調査を可能にするツールを提供する。E1E2糖タンパク質の構造的改変が、レトロウィルス及びレンチウィルスのコア上のそれらの正確な集成のため、及び機能的E1E2糖タンパク質による高い力価の感染性HCVppを生産するために要求されることはなかった。HCV E2タンパク質のC末端残基の欠失は、更に生産されたHCVシュード粒子の感染性を大きく増加させることを見出した。HCVppへのマーカー遺伝子の挿入は、フローサイトメトリーによるこれらのシュード粒子の感染性の正確且つ迅速な測定を可能にした。

## 【 0 2 7 1 】

それらの機能的な感染性HCVシュード粒子の開発は、新規HCV受容体又は共受容体の同一性の確認のような、HCV感染の早期事象を調査すること、セロコンバートされた患者における中和抗体の検出のための診断アッセイを行うこと、及びHCV感染への効果的な阻害剤を開発すること、を今般可能にする。

## 【表 3】

## 文献

- Agnello V. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12766-71. (1999).
- Andre P. et al., *J Virol* **76**, 6919-28. (2002).
- Ausubel F.M. et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).
- Bartosch, B., Dubuisson J. & Cosset, F.-L. 2003a. *J. Exp. Med.* **197**, 633-642.
- Bartosch et al., *J. Biol. Chem.* 2003b Aug 11 [Epub ahead of print].
- Bartosch et al., 2003c. Submitted.
- Baumert T. F., Ito S., Wong D. T., Liang T. J., *J Virol* **72**, 3827-36. (1998).
- Blight K. J., Kolykhalov A. A., Rice C. M., *Science* **290**, 1972-4. (2000).
- Buonocore L., Blight K. J., Rice C. M., Rose J. K., *J Virol* **76**, 6865-72. (2002).
- Calvo and Vega (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:18929-18935
- Castet V, Moradpour D. *Hepatology*. 2003 Sep;38(3):771-4.
- Cocquerel et al., *J Virol*, **74**/8, 3623-3633 (2000)
- Dieterich (2002) *J Infect Dis* **185**, S128-37.
- Dubuisson J. et al., *J Virol* **68**, 6147-60. (1994).
- Felgner et al. *Science* **337**, 387-388. (1989).
- Flint M. et al., *J Virol* **73**, 6235-44. (1999).
- Flint et al., *J Virol* **74**, 702-709 (2000).
- Fournillier-Jacob et al., *J Gen Virol*, **77**, 1055-1064 (1996)
- Guguen-Guillouzo and Guillouzo. Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. p 1-12. In A. Guillouzo and C. Guguen-Guillouzo (ed.), *Isolated and cultured hepatocytes*. Les Editions INSERM Paris. John Libbey and Co, Ltd., London, United Kingdom (1986).
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7271-7276.
- Lavanchy D. et al., *J. Viral Hepat* **6**, 35-47 (1999).
- Lindenbach B. D., Rice C. M., *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Knipe D. M., Howley P. M., Eds., *Fields Virology*, 4th ed. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001).
- Lohmann V. et al., *Science* **285**, 110-3. (1999).
- Matsuura Y. et al., *Virology* **286**, 263-75. (2001).

## 【表 4】

- Nakabayashi H. et al., *Cancer Res* **42**, 3858-63. (1982).
- Nègre D. et al., *Gene Ther* **7**, 1613-1623 (2000).
- Op De Beeck A. et al., *J Biol Chem* **275**, 31428-37. (2000).
- Op De Beeck A., L. Cocquerel, J. Dubuisson, *J Gen Virol* **82**, 2589-95. (2001).
- Owsianka A. et al., *J Gen Virol* **82**, 1877-83. (2001).
- Paetzel et al. (2002). *Chem Rev.* Dec;102(12):4549-80
- Patel A. H. et al., *J Gen Virol* **81**, 2873-83. (2000).
- Pietschmann T. et al., *J Virol* **76**, 4008-21. (2002).
- Pileri P. et al., *Science* **282**, 938-41. (1998).
- Robertson et al. (1998) *Archives of Virology* **143**, 2493-2503
- Rose N. F. et al., *Cell* **106**, 539-49. (2001).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Sandrin V. et al., *Blood* **100**, 823-832 (2002).
- Scarselli, E. et al., *EMBO J.* **21**: 5017-25 (2002).
- Swanstrom R., Wills J. W., in *Retroviruses* J. M. Coffin, S. H. Hughes, H. E. Varmus, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1997) pp. 263-334.
- von Heijne G. (1990) *J Membr Biol.* **115**(3):195-201
- Wellnitz S. et al., *J Virol* **76**, 1181-93. (2002).
- Webb et al., *J. Biol. Chem.*, **273**:15241-15248. (1998)
- Wu et al., *J. Biol. Chem.* **263**:14621-14624. (1988)
- Wu et al., *J. Biol. Chem.* **267**:963-967. (1992)
- Yagnik et al. (2000) *Proteins* **40**, 355-366

## 【図面の簡単な説明】

【0272】

【図1】 1 a 遺伝子型の HCV シュード粒子及び異なる標的細胞タイプにより実施した感染性実験の結果を描写する。結果は HCV pp のための上清液（6 までの実験の平均 ± 標準偏差）の mL あたりの形質導入ユニット（TU）として示す。超遠心分離により 100 倍に濃縮された HCV pp の Hu h - 7 細胞上の感染性を示す（100x）。

【0273】

【図2】 E1 E2 が不存在（レーン a）、レトロウイルスコアタンパク質が不存在（レーン b）、MLV-G2A 集成欠陥コアタンパク質が存在（レーン c）、HIV-1 コアタンパク質が存在（レーン d）、E1 又は E2 が単独で存在（それぞれレーン e 又は f）、トランスの 2 つの独立したベクターから発現した E1 + E2 が存在（レーン g）、シスの同一ベクターから発現した HCV-1 a E1 E2 が存在（レーン h）、又は HCV-1 b E1 E2 が存在（レーン i）で生産された HCV シュード粒子による Hu h - 7 標的細胞上で測定された感染性力価を表す。HCV pp は、標的細胞への感染の前及び感染の間、25 μM AZT（3'-アジド-3'-デオキシチミジン；シグマ-アルドリッチ，仏

)で処理した(レーンj)。HCVシュード粒子の感染性は、1a HCV遺伝子型からのE1及び1b HCV又は遺伝子型からのE2(レーンK)或いは1b HCV遺伝子型からのE1及び1a HCV又は遺伝子型からのE2(レーンI)により発生した。結果は、TU/mLとして表し、4までの実験の平均±標準偏差として示す。

【0274】

【図3】遺伝子型1aのHCV ppを有す2人のドナー由来ヒト主要肝細胞上での感染の結果を示す。感染性はHuh-7細胞上で測定される感染性のパーセンテージとして表す。

【0275】

【図4】遺伝子型1aの糖タンパク質E1(A4)又はE2(H31、H33、H35、H44、H48、H53、H54、H60及びH61)に対するモノクローナル抗体、抗体が貯蔵された場合(Hmix)、抗体が存在しない場合のHCVシュード粒子の中和を或いはVSV-G(コントロール)により生産したシュード粒子を用いた中和を示す。コントロールの中和はVSV-Gを中和する41A.1モノクローナル抗体により達成された。結果は抗体の不存在下における培養に関連した平均感染性力価±標準偏差の障害のパーセンテージとして表す。

【0276】

【図5】HCV患者血清によるHCV ppの中和を表す。それらの患者で診断されるHCVの遺伝子型は黒塗りで示す。結果は個々の健常者からのコントロール血清と一緒の培養に関連した平均感染性力価±標準偏差の障害のパーセンテージとして表す。

【0277】

【図6】HCV E1 E2及びレトロウィルス発現構造体を示す。(A)：HCVポリタンパク質遺伝子から由来するcDNAはE1 E2糖タンパク質及びE1(SP E1)のためのシグナルペプチドを提供するCタンパク質のカルボキシ末端を発現するために使用した。タンパク質の翻訳を終わらせるための発現構造体を挿入した終止コドン(star)の位置を示す。E1の膜貫通ドメイン(TMD)はE2糖タンパク質のためのシグナルペプチド(SP E2)を提供する。(B)：感染性シュード粒子を集成することを要求する異なる化合物をコードする発現構造体を示す。ウィルス性遺伝子及びマーカー遺伝子(GFP)を表すファイルされたボックスは、感染細胞へ転移される。オープンボックスはシス-作用配列を見せる。LTRは末端反復配列；CMVはヒトサイトメガロウィルスの迅速で早期のプロモーター；PBSはプライマー結合サイト；はパッケージング配列；PPTはポリプリントラック；ポリAはポリアデニル化サイト；SDはスプライスドナーサイト；SAはスプライスアクセプターサイトである。ベクター粒子はパッケージング機能、転移ベクター、及び293T細胞中へのウィルス性糖タンパク質を担持するプラスミドの共トランスフェクションにより生産した。当該ウィルス性糖タンパク質は、個々に、或いはCE1 E2として発現するHCV E1及びE2糖タンパク質、VSV-G又はRD114糖タンパク質である。トランスフェクトした細胞の上清液を一過性の発現の間に集め、超遠心分離により濃縮し、そして標的細胞の形質導入のために用いた。

【0278】

【図7】HVR1 HCVシュード粒子の導入を示す。トランスフェクトされた293T細胞の溶解産物及び20%スクロースクッションを通してペレット化されたシュード粒子のイムノプロットを示す。分子量マーカーの位置を示す(kDa)。

【0279】

【図8】HVR1 HCVシュード粒子の感染性を表す。感染後3日間の形質導入効率をFACS分析によって評価する前に、生産細胞からの上清液を希釈し、そしてHuh-7標的細胞を感染させるために用いた。