

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4318399号
(P4318399)

(45) 発行日 平成21年8月19日 (2009. 8. 19)

(24) 登録日 平成21年6月5日 (2009. 6. 5)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 7/04 (2006. 01) C 1 2 N 7/04

請求項の数 6 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2000-511447 (P2000-511447)
 (86) (22) 出願日 平成10年9月18日 (1998. 9. 18)
 (65) 公表番号 特表2003-525564 (P2003-525564A)
 (43) 公表日 平成15年9月2日 (2003. 9. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/019556
 (87) 国際公開番号 WO1999/013818
 (87) 国際公開日 平成11年3月25日 (1999. 3. 25)
 審査請求日 平成17年9月16日 (2005. 9. 16)
 (31) 優先権主張番号 60/059, 668
 (32) 優先日 平成9年9月18日 (1997. 9. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 591026333
 リサーチ ディベロップメント ファンデーション
 RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
 アメリカ合衆国, 89703 ネバダ, カ
 ーソン シティ, ノース ディヴィジョン
 ストリート 402番地
 (74) 代理人 100080115
 弁理士 五十嵐 和壽
 (72) 発明者 ブラウン, デニス ティー.
 アメリカ合衆国 27695 ノース カ
 ロライナ, ローリ, イートン ロード 3
 126番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜ウイルス宿主域変異体及びそれらのワクチン基質としての使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルスにおいて、上記シンドビスウイルスがトランスメンブレンドメインでウイルス糖タンパク質 E 2 のアミノ酸配列の位置 391 でリシンを欠失しているトランスメンブレンタンパク質をコードし、上記リシンの欠失がトランスメンブレンタンパク質を供給し、このトランスメンブレンタンパク質は、上記シンドビスウイルスが昆虫細胞内部で複製すると上記膜エンベロープを貫く (span) ことができるが、上記シンドビスウイルスが哺乳動物細胞内部で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができない、遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルス。

【請求項 2】

昆虫細胞が、蚊の細胞である請求項 1 記載の遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルス。

【請求項 3】

蚊細胞が、アエデス・アルボピクタス (Aedes albopictus) 細胞である請求項 2 記載の遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルス。

【請求項 4】

膜エンベロープを有するシンドビスウイルスのトランスメンブレンタンパク質のトランスメンブレンドメイン内でウイルス糖タンパク質 E 2 のアミノ酸配列の位置 391 でリシンの欠失を工学的に起こさせて、工学処理されたシンドビスウイルスをつくりだし、上記

トランスメンブレンタンパク質が、上記工学処理されたシンドビスウイルスが昆虫細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫く(span)ことができるが、上記工学処理されたシンドビスウイルスが哺乳動物細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができず、そして上記工学処理されたシンドビスウイルスが昆虫細胞内で複製を続けることができるようにするステップと、

上記工学処理されたシンドビスウイルスを昆虫細胞内に導入するステップと、そして上記工学処理されたシンドビスウイルスを上記昆虫細胞内で複製させるステップを含む遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルスから遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するシンドビスウイルスを製造する方法。

【請求項 5】

昆虫細胞が、蚊の細胞である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

蚊細胞が、アエデス・アルボピクタス (Aedes albopictus) 細胞である請求項 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は一般的にはウイルス学及び疾病抑制に関する。具体的には本発明は突然変異した節足動物媒介ウイルスとそれらのワクチンとしての利用に関する。

【0002】

節足動物媒介ウイルス (アルボウイルス) は自然界で吸血昆虫によって伝達されるウイルス性媒介物である。これらのウイルスの多くはウイルス粒子の保護膜を構成する会合した膜内在性タンパク質を有する膜二重層を有している (トガウイルス) (Schlesinger, S. 及び M. J. Schlesinger, 1990)。

【0003】

節足動物媒介ウイルスは統計的に見ると、世界中でヒト及び動物における昆虫媒介疾病及び死亡要因としてはマラリアについて第 2 位である (Berge A. O. 1975)。これらのウイルス性媒介物にはイースタン、ウエスタン及びベネズエラウマ脳炎ウイルス、デング熱、日本脳炎、サン・アンジェロ熱、及び黄熱病などがある。さらに、これらの媒介物によって引き起こされる疾病は蚊媒介体アエデス・アルボピクタス (Aedes albopictus) が入ってきた結果として (Sprenger 及び Wuithiranyagool, 1985)、北米では再び広まる勢いにある (N I A I D Report of the Task Force on Microbiology and Infectious Diseases 1992、N I H Publication No.92-3320)。

【0004】

自身の性質から、アルボウイルスは無脊椎昆虫及び哺乳動物ホストの両方の組織内で複製できなければならない (Brown, D. T., 及び L. Condreay, 1986、Bowersら、1995)。これら 2 つのホスト細胞システムの遺伝子的及び生化学的環境における違いは一方の宿主では複製できるが他方では複製できない (宿主域変異) ウイルスを生産するための根拠を提供してくれる。

【0005】

現在、デング熱及び西部ウマ脳炎、そしてその他の昆虫が運ぶウイルスは米国では再び広がる勢いを見せている。米国陸軍及びその他の政府機関は 1960 年代以降これらのウイルスに対するワクチン開発を行ってきているが、ほとんど成功は収めていない。従って、先行技術はほとんどの節足動物媒介ウイルス及びその他の膜被覆ウイルスに対するワクチンにおいて不足している。本発明はこの技術分野におけるこうした長年のニーズと要望を果たすものである。

【0006】

本発明のひとつの目的は、遺伝子工学処理された、膜エンベロープを有するウイルスにおいて、その 1 つまたは複数のアミノ酸欠失を有していて上記工学処理されたウイルスが昆虫細胞内で複製する場合はウイルスの膜を貫くことができ、哺乳動物細胞内で自己増殖する場合はそのウイルスの膜を貫くことができないようなトランスメンブレンタンパク質を

10

20

30

40

50

コードする遺伝子工学的に処理された、膜エンベロープを有するウイルスを提供することである。本発明の1つの実施の形態は上記の遺伝子工学処理された、膜エンベロープを有するウイルスとして節足動物媒介ウイルスを提供する。さらに好ましい実施の形態では、上記節足動物媒介ウイルスはトガウイルス、フラビウイルス、及びブニヤウイルス並びに哺乳動物細胞と昆虫細胞の両方で自然に複製できるすべての他のエンベロープを有するウイルス、さらにはウイルスか細胞の遺伝子工学処理によって哺乳動物及び昆虫細胞内で複製できるようにすることができるエンベロープを有するウイルスで構成される群から選択することができる。

【0007】

本発明の他の実施の形態においては、工学処理されたウイルスをつくりだすためにウイルストランスメンブレンタンパク質内でアミノ酸欠失を発生させ、トランスメンブレンタンパク質が上記工学処理されたウイルスが昆虫細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができるが、そのウイルスが哺乳動物細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができず、そして上記ウイルスが昆虫細胞内で複製し続けることができるようにするステップと、上記突然変異ウイルスを昆虫細胞内に導入するステップと、そして上記突然変異ウイルスを上記昆虫細胞内で複製させてウイルスワクチンをつくりだすステップで構成された哺乳動物ワクチン接種用に遺伝子工学処理された、膜結合ウイルスからのウイルスワクチンをつくりだす方法が提供される。

10

【0008】

本発明の別の実施の形態においては、本発明によるウイルスワクチンを哺乳動物細胞に導入して免疫監視のための細胞及び組織の非増殖的感染を引き起こすステップで構成された個体のワクチン接種のための方法が提供される。

20

【0009】

最後に、本発明は工学処理されたウイルスをつくりだすためにウイルストランスメンブレンタンパク質内でアミノ酸を遺伝子工学処理して、そのトランスメンブレンタンパク質が上記工学処理されたウイルスが昆虫細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができるが、そのウイルスが哺乳動物細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができず、そして上記ウイルスが昆虫細胞内で複製し続けることができるステップと、上記突然変異ウイルスを野生蚊群に導入するステップと、そして、突然変異ウイルスに上記野生蚊群内で複製させて、その蚊が噛んだ時に上記ウイルスを哺乳動物に伝達するように、上記ウイルスのワクチン株を有しているが、野生種（病原性の）ウイルスを排除する蚊の群をつくりだすようにさせるステップで構成される蚊の群によってひろがる疾病に対するウイルスワクチンをつくりだすための方法を提供するという課題も有している。

30

【0010】

本発明のその他の、そしてさらなる特徴は以下の現段階での本発明の好ましい実施の形態に関する説明から明らかになるであろう。これらの実施の形態は開示の目的で提供されるものである。

【0011】

本発明の範囲と精神を逸脱せずにここに開示されている本発明に対して種々の置き換えや修正が可能であることは当業者であれば容易に分かるであろう。

40

【0012】

ここで用いられている『膜結合ウイルス』とはその保護的な外層膜の一部として脂質膜二重層を含んでいるウイルスのことである。

【0013】

ここで用いられている『ウイルスエンベロープ』とは膜を有するウイルスの脂質膜成分及びそこに会合するタンパク質を意味している。

【0014】

ここで用いられている『節足動物媒介ウイルス』あるいは『アルボウイルス』とは節足動物（昆虫）あるいは哺乳動物細胞内で複製及び子孫ウイルスを生産するウイルス性作用物を意味している。これにはトガウイルス、フラビウイルス、及びブニヤウイルスなどが含

50

まれる。

【0015】

ここで用いられている『トガウイルス』とはアルファウイルスを含む膜含有ウイルスの一般的分類を意味している。

【0016】

ここで用いられている『膜二重層』という用語は向き合った両親媒性リン酸脂質で構成される構造である。この二重はその断面が極性頭部基から非極性炭素鎖、非極性炭素鎖、極性頭部基に変化する構造となっている。

【0017】

ここで用いられている『糖タンパク質トランスメンブレンドメイン』という用語は上記膜二重層を貫く膜会合タンパク質の領域のアミノ酸配列を意味している。

10

【0018】

ここで用いられている『ウイルスワクチン』という用語はウイルスの抗原性は有しているが病気を発生させることはできないウイルス、あるいは突然変異ウイルスを意味している。

【0019】

ここで用いられている『免疫監視』という用語は、血液リンパ球が哺乳動物の細胞及び組織を監視して外来（ウイルス）タンパク質の存在を判定し、その外来タンパク質をつくりだす細胞に向かわせて破壊することができるリンパ球の生産を促進するプロセスを意味している。このプロセスは外来タンパク質に対する循環抗体の産出にもつながる。

20

【0020】

ここで用いられている『感染性ウイルス粒子』はそれらが子孫ウイルスをつくり出すことができるかどうかには関係なく、細胞に入り込んでウイルスタンパク質をつくりだすことができるウイルスを意味している。

【0021】

ここで用いられている『非感染性ウイルス粒子』とは細胞に感染したりその内部に入り込むことができないウイルスを意味している。

【0022】

ここで用いられている『脊椎動物細胞』とはいずれかの哺乳動物細胞を意味している。

【0023】

ここで用いられている『無脊椎動物細胞』とはいずれかの昆虫細胞を意味している。

30

【0024】

本発明は遺伝子工学処理された膜エンベロープを有するウイルスに関するものであり、上記ウイルスはトランスメンブレンタンパク質をコードし、そのトランスメンブレンタンパク質はその内部に1つか複数のアミノ酸の欠失を有しており、その遺伝子工学処理されたウイルスが昆虫細胞内部で複製するとウイルスの膜を貫くことができるが、哺乳動物細胞内で複製するとそのウイルス膜を貫くことができないようになっている。本発明のこの目的のひとつの実施の形態はトガウイルス、フラビウイルス、及びブニヤウイルス、及び哺乳動物細胞と昆虫細胞の両方で自然に複製することができる他のすべてのエンベロープを持つウイルス、そして、ウイルス又は細胞のいずれかを遺伝子工学処理することで哺乳動物及び昆虫細胞で複製できるようにするエンベロープを有する被覆ウイルスで構成される群から選択される節足動物媒介ウイルスを提供する。

40

【0025】

本発明は又、工学処理されたウイルスをつくりだすためにウイルストランスメンブレンタンパク質内でアミノ酸欠失を発生させ、そのトランスメンブレンタンパク質が上記工学的処理されたウイルスが昆虫細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができるが、そのウイルスが哺乳動物細胞内で複製すると上記膜エンベロープを貫くことができず、そして上記ウイルスが昆虫細胞内で複製し続けることができようにするステップと、上記突然変異したウイルスを昆虫細胞内に導入してワクチンとして機能することができる突然変異ウイルスの生産をもたらす哺乳動物ワクチン接種用に遺伝子工学処理された、膜結合

50

ウイルスからウイルスワクチンをつくりだす方法にも関連している。

【0026】

さらに、本発明は本発明による上記ウイルスワクチンを個体の細胞に導入するステップと、そしてそのウイルスにその個体内部で免疫監視用のウイルスタンパク質をつくりださせるステップで構成された個体のワクチン接種のための方法を提供する。

【0027】

さらに、本発明は工学処理されたウイルスをつくりだすためにウイルストランスマンブレンタンパク質内でアミノ酸を遺伝子工学的処理して、そのトランスマンブレンタンパク質が上記工学処理されたウイルスが昆虫細胞内で複製すると上記膜エンベロップを貫くことができるが、そのウイルスが哺乳動物細胞内で複製すると上記膜エンベロップを貫くことができず、そして上記ウイルスが昆虫細胞内で複製し続けることができるステップと、上記突然変異ウイルスを野生蚊群に導入するステップと、そして、突然変異ウイルスに上記野生蚊群内で複製させて、その蚊が噛んだ時にワクチンを哺乳動物に伝達するように、上記ウイルスのワクチン株を有しているが、野生種（病原性の）ウイルスを排除する蚊の群をつくりだすようにさせるステップで構成される蚊の群によってひろがる疾病に対するウイルスワクチンをつくりだすための方法を提供する。

【0028】

本発明によれば、先行技術の範囲内での従来のタイプの分子生物学、微生物学、そして遺伝子組み替え技術を用いることができる。こうした技術については例えばManiatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)", "DNA Cloning: A Practical Approach, " Volumes I 及び II (D. N. Glover編1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait編1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames及びS. J. Higgins編 (1985)); "Transcription and Translation" (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984)); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney編 (1986)); "Immobilized Cells And Enzymes" (IRL Press, (1986)); B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)などに詳細に紹介されている。

【0029】

従って、ここにおいて記載された場合、以下の用語の定義は以下の通りである。

【0030】

『ベクター』とはプラスミド、ファージ、あるいはコスミドなど、取り付けられた部分の複製を引き起こすように別のDNA部分を取り付けることができるレプリコンである。被投与動物がその投与に耐えられる場合は、そのベクターは『薬学的に受容可能』とされる。投与された量が生物学的に有意である場合、そうした薬剤は『治療上有効な量』と言われる。その存在が被投与哺乳動物の生理に変化をもたらす場合、その薬剤は生理学的に有意であるとされる。例えば、ウイルス感染の処置において、その感染の程度、あるいはその感染による生理学的被害を減少させる化合物は治療上有効であるとされる。

【0031】

『DNA分子』とは単鎖あるいは二重鎖らせん形状の、ポリマー形状のデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシン）を指している。この用語はこの分子の一次及び二次構造だけを指し、いずれの具体的な三次形態にも限定されない。従って、この用語は特に線形DNA分子（例えば、制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド及び染色体で見出される二重鎖DNAを含む。以下の説明では、構造はDNAの非転写ストランドに沿った5' - 3'方向の配列だけを示す従来の方法に従って示す。

【0032】

DNA『コードディング配列』とは、適切な規制配列の制御下に置かれるとインビボでポリペプチド内に転写及び翻訳される二重鎖DNA配列である。このコード表現配列の境界は5'（アミノ酸）末端の開始コドンと3'（カルボキシル）末端の停止コドンによって決められる。コードディング配列は真核性mRNA、真核性（例えば哺乳動物の）DNAからのゲノム性DNA配列、あるいは合成DNA配列には限定されない。ポリアデニル化信号及び転写停止配列は通常コード表現配列に対して3'に配置される。

【0033】

転写及び翻訳制御配列は宿主細胞でのコードディング配列の発現をもたらすプロモーター、エンハンサー、ポリアデニール化信号などのDNA規制配列である。

【0034】

『プロモーター配列』とは細胞内でのRNAポリメラーゼを結合させたり、下流（3'方向）の転写を開始することができるDNA調節領域である。本発明について明確に定義する目的で、プロモーター配列はその3'末端で転写開始サイトによって結合され、上流（5'方向）に延びて背景と比較して検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最低数の塩基及び元素を取り込む。プロモーター配列内に転写開始サイト（通常はヌクレアーゼS Iによるマッピングによって示される）と、RNAポリメラーゼの結合に参与するタンパク質結合領域（コンセンサス配列）が見出されるであろう。真核性プロモーターは、常にはないが、しばしば“TATA”ボックスと“CAT”ボックスを含んでいる。ベクターを動かすためには種々のプロモーターを用いることができる。

10

【0035】

ここで用いられている『オリゴヌクレオチド』あるいは『プローブ』という用語はリボ核酸又はデオキシリボ核酸によって構成される分子を意味している。オリゴヌクレオチドあるいはプローブの正確なサイズは、最終的な機能とそのオリゴヌクレオチドの使用目的に依存するところの多くの要因に依存している。プローブの長さは重要ではないが、通常は約12の塩基、より多くの場合は少なくとも16の塩基で構成されており、そのプローブは基本的にはその微生物ゲノムの一部と基本的に相補性をなしているが、そのプローブがそのゲノムと完全な相補性を持っていなければならないとは限らない。プローブは適切な合成技術で合成することができ、ほとんどの場合転出可能なラベルを含んでいる。通常、合成配列は一般的な公的に利用できるクローニングベクター、そして適切な宿主内でそのプローブを大量に入手するために拡張される。拡張されるベクターはそれ自体をプローブとして用いるためにラベルしても差し支えないし、あるいは相補的なストランドを含むより短いフラグメントを切り出してラベルしてもよい。診断用テストのためのヌクレオチドプローブの調製と利用については上に述べた参考文献や、Falkowらに対する米国特許No.4,358,535に述べられている。

20

【0036】

ここで用いられる『プライマー』という用語は精製制限消化におけるように自然に発生したり、あるいは合成的につくりだされるかには関係なく、核酸ストランドに相補的なプライマー拡張生成物が誘発される条件、例えば、ヌクレオチドとDNAポリメラーゼなどの誘発剤の存在と適切な温度及びpHの下に置かれた場合に合成の開始点として機能することができるオリゴヌクレオチドを指している。このプライマーは単鎖でも二重鎖でもよく、誘発剤の存在下で望ましい拡張生成物の合成が開始されるのに十分な長さでなければならない。このプライマーの正確な長さは温度やそのプライマーの供給源及びその使用方法などを含む種々の要因に依存している。例えば、診断的な応用目的のためには、標的配列の複雑さに応じて、オリゴヌクレオチドは通常15～25あるいはそれ以上の数のヌクレオチドを含んでいるが、それより少ないヌクレオチドの数でも差し支えない。

30

【0037】

プライマーはここでは特定の標的DNA配列の異なったストランドに対して『物質的に』相補的であるように選択される。このことは、そのプライマーがそれらと対応するストランドとハイブリダイズするのに十分な程度に相補的でなければならないことを意味している。従って、プライマー配列はテンプレートの正確な配列を反映している必要はない。例えば、非相補的なヌクレオチドフラグメントをプライマーの5'末端に取り付けて、そのプライマー配列の残りの部分はそのストランドに相補的であるようにしてもよい。また、プライマーが配列との十分な相補性を有しているか、あるいはそれとハイブリダイズして、それによって拡張生成物の合成のためのテンプレートを形成するものであれば、非相補的な塩基あるいはより長い配列をプライマーに切断してもよい。

40

【0038】

50

ここで用いられている『制限エンドヌクレアーゼ』という用語はそのそれぞれが特定のヌクレオチド配列、あるいはその近くで二重鎖DNAを切断するバクテリア酵素を意味している。

【0039】

そうしたDNAが細胞内部に導入された場合に、細胞が外来性あるいは異種DNAによって『トランスフェクト』されたとされる。トランスフェクトされたDNAはその細胞のゲノムに一体化（共有結合）される場合もあれば、されない場合もある。『クローン』はひとつの細胞あるいは共通の祖先から有糸分裂によって誘導される細胞の群である。『細胞株』とは多くの世代にわたって安定して成長できる一次細胞のクローンである。

【0040】

DNA構成物の『異種』領域とは、自然の中のより大きな分子と結合した状態では見出されないより大きなDNA分子内部のDNAの確認可能なセグメントである。従って、異種領域が哺乳動物の遺伝子をコードすると、遺伝子は通常は供給源生物のゲノム内で哺乳動物のゲノム性DNAをフランクしていないDNAによってフランクされる。別の例では、コーディング配列とはそのコーディング配列自体が自然では見出されない構成物（例えば、ゲノムコード表現配列がイントロンを含んでいるcDNA、あるいは天然の遺伝子とは異なったコドンを含む合成配列）である構成物である。

【0041】

本発明による新規の突然変異ウイルスを用いて医薬品組成物をつくることが意図される。そうしたひとつの例で、医薬品組成物は本発明による新規のウイルスと薬学的に受け入れ可能な基質とから構成される。この分野の当業者であれば、過重な実験を行わなくても、このウイルスワクチン化合物の投与量及び投与経路を判定することはできるであろう。インビボで治療に用いる場合、本発明によるワクチンは患者、あるいは動物に対して治療上有効な量、つまり、措置を受ける個人をその特定のウイルスと関連した疾病から免疫化してくれる量で投与される。通常は経口的に投与されるが、好ましくは静脈注射によって投与され、しかし他の投与経路も適切に用いることができる。投与されたワクチンの量は通常は患者の体重あたり約 10^3 ～約 10^6 pfu/kgの範囲である。こうした処方措置の否定的な効果とのバランスを図りながら、有効性を最大化するまで継続される。Remington's Pharmaceutical Science、17版（1990）、Mark Publishing Co., Easton, Penn.; 及びGoodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics 8版（1990）、Pergamon Press参照。これらは引例として本明細書に組み入れられている。経口投与の場合、ワクチンは最も一般的には単位用量注射可能形状（溶液、懸濁液、乳剤）で薬学的に受け入れ可能な経口媒体と組み合わせて製剤される。こうした媒体とは好ましくは非毒性で、治療的には効果のないものである。こうした媒体の例としては水、食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、そして5%ヒト血清アルブミンである。

【0042】

本発明のワクチンは膜エンベロープを有するウイルスのタンパク質のトランスメンブレンドメインの欠失突然変異に基づいている。これら突然変異を発生させる方針は以下の情報に基づいている。哺乳動物の細胞膜の場合とは違って、昆虫細胞の膜はコレステロールを含んでいない（Clayton 1964, Mitsuhashiら、1983）。膜内部にコレステロールが存在していると、通常はその膜がより厚めになり、膜の厚さの増大はコレステロール増大につながる（Bretscher, 1993）。多くの膜エンベロープを有するウイルスはそれらの表面に膜糖タンパク質を有しており、これらは標的細胞の特定と感染に関与している（Schlesinger, S及びM. J. Schlesinger, 1990）。これらの膜糖タンパク質はタンパク質を膜二重層に固定させる疎水性の膜スパンニングドメインを有している（Riceら、1982）。

【0043】

これらのトランスメンブレンタンパク質の膜スパンニングドメインはそのタンパク質を膜に保持、あるいは固定させるためにその二重層の一方の端から他方の端に届くのに十分な長さを持っていなければならない。実験では、これらの領域がその領域内のアミノ酸の欠失で短くなった場合、タンパク質は膜と適切に結合せず、落ちてしまうことが示されてい

10

20

30

40

50

る (Adams及びRose, 1985)。

【0044】

昆虫はその細胞膜内にコレステロールを持っていないので、昆虫で発生したウイルス膜はその断面が哺乳動物由来のウイルス膜より薄くなる。昆虫の膜の方が薄いので、昆虫の細胞膜に一体化されたタンパク質の膜状に広がった領域は哺乳動物の細胞膜に一体化したもののほど長くなくてもよい。従って、工学的処理された遺伝子でウイルス糖タンパク質の膜スパンニング領域からアミノ酸を取り除いた欠失をつくり出すことは可能である。このことは昆虫細胞内で複製されたウイルスの膜には正常に組み込まれることができるが、哺乳動物の細胞内で複製するウイルスには組み込まれない糖タンパク質をもたらす。このようにして、突然変異されたウイルスは親の野生種のウイルスと同様、昆虫細胞内部でもつくりだされ、複製する。一方、哺乳動物においてはこの突然変異体ウイルスはウイルス性タンパク質をつくりだすホストに感染することはできるが、突然変異ウイルスの糖タンパク質が広がらず、哺乳動物の細胞膜に固定されないで、子孫ウイルスは哺乳動物の細胞ではつくり出すことができない。本発明の方式のさらなる利点は、その突然変異体が欠失突然変異体として発生されるので、従って、野生型表現型に戻るというウイルスワクチンによくある問題は決して起きない。

10

【0045】

本発明によって構想されるワクチンは脊椎動物及び無脊椎動物細胞内で成長するすべての膜エンベロープを有するウイルスに対して作用する。実際、本発明は昆虫細胞内で成長するように工学的処理することもできる膜エンベロープを有するウイルスに適用することもできるし、遺伝子的に修飾した昆虫細胞内で成長する膜エンベロープを有するウイルスにも適用することができる。

20

【0046】

以下の実施例は本発明の種々の実施の形態を説明するためのものであって、いかなる意味でも本発明の範囲を限定することは意図していない。

【0047】

実施例1：Toto 1101の特定のサイトに向けた突然変異生成

先に記載された (Liuら、1996、Riceら、1987) アルファウイルスシンドビスの完全な長さのクローンを用いて、ウイルス糖タンパク質E2のアミノ酸配列の位置391でリシンをコードする3つの塩基をなくした欠失を構築した。このリシンはこのタンパク質の推定膜スパンニングドメイン (Riceら、1982) の一部である。

30

【0048】

インビトロでそのクローンから感染性RNAを転写するのに用いることができる (Riceら、1987、Liu及びBrown, 1993a) 全長シンドビスcDNA及びSP6プロモータを含むプラスミドであるToto 1101内で欠失突然変異体 (Lys391) を発生させるために、特定のサイトに向けた突然変異生成を用いた。先に記載されたPCR突然変異生成のメガプリンタ法 (Sarkar及びSommer, 1990) を用いて (Liu及びBrown, 1993a)、Toto 1101のcDNAクローンからヌクレオチド (nts) 9801、9802、9803の3つのヌクレオチドを取り除き、結果的にコドンAAA (K391) が除去された。

【0049】

この配列の30塩基オリゴヌクレオチド、5'CTCACGGCGCGCACAGGCACATACACCTGC3' (配列番号：1) を突然変異生成プライマーとして用いた。このプライマーは『フォワードプライマー』5'CCATCAAGCAGTGCGTCG3' (配列番号：2；18mer) と共に518塩基『メガプリンター』 (ヌクレオチド 9295～9813) を発生させた。第2のPCR反応は0.5µgのメガプリンター、100µgのToto 1101テンプレート、及び『リバースプライマー』5'GGCAGTGTCACCTTTATCGCCTTGC3' (配列番号：3) によって構成されていた。すべてのPCR反応では95度で1分、64度で1分、72度で1分、そして72度で8分の最終培養で構成されるサイクルを30回行った。得られたPCR生成物 (1149nts) をBCL I及びSPLで切断してから、Toto 1101の対応するサイトに挿入したところ、欠失突然変異体K391がつくりだ

40

50

された。シーケナーゼ™ (U. S. Biochemical, Cleveland, OH) を用いてサブクローンされた領域全体でジデキシヌクレオチドシーケシングによって欠失を確かめた後、S P 6 ポリメラーゼを用いて感染性RNAをインビトロで転写し、BHK-21細胞内に導入（トランスフェクト）した。

【0050】

実施例2：インビトロでの転写とRNAトランスフェクション

シンドビス・ウイルスK391あるいは野生種RNAの全長cDNAコピーを含むプラスミドDNAをXho Iで線形化して、前に述べたように(Riceら、1987) S P 6 RNAポリメラーゼを用いてインビトロで転写された。1 µgのXho Iで線形化されたK391 cDNAあるいは野生種シンドビス・ウイルスcDNAを20 µl中に80mM Hepes pH7.5, 12mM MgCl₂, 10mM DTT及び2mMスペルミジンで構成される緩衝液と3mM each ATP, UTP, CTP, 1.5mM GTP及び4.5mM m⁷GpppG、20単位のS P 6 RNAポリメラーゼ及び20単位のRNaseインヒビターを含む100 µgm BSA内で転写した。37℃で2時間培養を行った後、RNA生成を1%アガロースゲル上に2 µlのRNAを泳動させて評価を行った。

【0051】

ベイビーハムスターの腎臓(BHK21)細胞及びアエデス・アルボピクタス(蚊)細胞を突然変異体あるいは野生種クローンから誘導したRNAでトランスフェクトさせた。蚊の細胞のトランスフェクションは20mM Hepes pH7.05, 137mM NaCl, 0.7mM Na₂HPO₄及び6mMでキストランで構成される電気穿孔緩衝液内で再懸濁させた5×10⁶個の細胞を用いて行った。これらの細胞の最適電気穿孔パラメータは2Kv 25µF, 1抵抗であることが分かった。トランスフェクトされた細胞を細胞変性効果が認められるまで(約24時間)、37℃の温度で培養した。

【0052】

24時間培養した後、感染された細胞株とRNAに感染されていない比較対象の群の両方から培地を回収した。各細胞株からの培地について蚊及びBHK-21細胞単層上でブランクアッセイ(Renz及びBrown, 1976)で感染性ウイルスが存在しているかどうかについてテストした(表1)。

【0053】

【表1】

BHK21 又は Aedes albopictus 細胞を
シンドビスウイルスの野性型又はK391 変異体で
トランスフェクションさせたことにより生産された感染性ウイルス

細胞系 トランス フェクト	BHK Mock ^a トランス フェクト	BHK 野性型 RNA使用	BHK K391 RNA使用	AA Mock トランス フェクト	AA 野性型 RNA使用	AA K391 RNA使用
BHK に対する 培地の滴定	ウイルス 未 検 出	5×10 ⁷ 感染性 ウイルス/ml	ウイルス 未 検 出	ウイルス 未 検 出	2×10 ⁷ 感染性 ウイルス/ml	ウイルス 未 検 出
AA に対する 培地の滴定	ウイルス 未 検 出	8×10 ⁷ 感染性 ウイルス/ml	ウイルス 未 検 出	ウイルス 未 検 出	4×10 ⁷ 感染性 ウイルス/ml	1×10 ⁷ 感染性 ウイルス/ml

a: MockはトランスフェクションプロトコルがRAN無しで行われたことを示す。

【0054】

表1に示すように、突然変異体K391は昆虫の細胞内で自己増殖する場合だけ感染性ウイルス粒子をつくりだす。このウイルスは、次に蚊の細胞の中だけでブランクをつくりだした。K391でトランスフェクトされたBHK細胞は、BHKとアエデス・アルボピクタスのいずれで調べても検出可能なウイルスはつくりださなかった。BHKの培養体をトラン

スフェクトされた蚊の細胞からつくりだしたウイルスで感染させた場合、検出可能なウイルスはつくりだされなかった。RNAコード表現野生種ウイルスは感染性のウイルスをつくりだし、このウイルスは次に両方の細胞株でプラークをつくりだした（表1）。

【0055】

実施例3：ウイルスタンパク質の代謝的放射性標識

25cm²フラスコ内のBHK21細胞の半融合状態の単層を上述べた方法で野生種あるいはK391突然変異体RNAによってトランスフェクトさせた。単層を1%FCS、2mMグルタミン、及び5%TPBを含むメチオニンとシステインを含まない(MEM-E)培養液(枯渇培養液)内で30分間枯渇させた。トランスフェクトしてから16時間後に、50μCi/ml [³⁵S] Met/Cysタンパク質ラベリング混合物を含む枯渇培養液で20分間パルスラベルした。ラベリング終了後この単層を75μg/mlシクロヘキサミドで洗浄した。この単層を通常の10倍のメチオニン及びシステインと75μg/mlシクロヘキサミドを含む培養液内で45分間培養した。

10

【0056】

実施例4：免疫沈降及びポリアクリルアミドゲル電気泳動

放射性物質でラベルしたウイルスタンパク質を公知の方法(Knipfer及びBrown, 1989)に従って抗血清で免疫沈降させた。 [³⁵S] Met/Cysでラベルした細胞を冷たいPBC内で二度洗浄して、細胞溶解緩衝液：0.5% NP-40, 0.02M トリスHCl pH7.4, 0.05M NaCl, 0.2mM PMSF, 0.2mM TPCK、及び0.02mM TLCK内で細胞溶解させた。遠心分離で核をペレット化してから、廃棄した。上澄液を細胞溶解緩衝液内に懸濁させた100μlのタンパク質A/セファロースビーズ(Sigma社)で予め吸収させた。予備吸収された上澄液を200μlのウサギ抗SVHR血清又はE2テール単一特殊性ポリクローナル血清に結合させたタンパク質A/セファロースビーズで処理して、4℃の温度で一昼夜攪拌した。この免疫沈降させたビーズ抗体タンパク質複合体を細胞溶解緩衝液で三度洗浄して、12%グリセロール、4% SDS, 50mM トリス pH6.8, 5%メルカプトエタノール、及び0.02%ブルムフェノールブルーで構成されるSDS-PAGEサンプル緩衝液内に溶かした。このサンプルを95℃で3分間加熱して、遠心分離によってサンプルからビーズを取り除いた。10.8% SDS-PAGEあるいは16%トリシングル上で前に述べた方法に従って(Liu及びBrown, 1993a, b)ゲル電気泳動を行った。公開されている方法(Bonner及びLaskey, 1974)に従ってフルオログラフィーを行い、乾燥させたゲルをKodak XAR-5フィルムに露出させた(図1参照)。

20

30

【0057】

実施例5：透過型電子顕微鏡

トランスフェクトされた蚊の細胞からつくりだされたK391で感染された、あるいはK391 RNAでトランスフェクトされたBHK-21細胞単層を望ましい時点でトリプシン処理によってフラスコから取り出して、低速遠心分離によって細胞をペレット化させた。細胞ペレットをPBS内で二度洗浄して、4%グルタルアルデヒド内で4℃の温度で一昼夜かけて固定させた。その後これらの細胞を0.2Mカコジレイト緩衝液(pH7.2)で三度洗浄してから、2%オスミウムテトロキサイドを用いて室温で1時間さらに固定してから、カコジレイト緩衝液内で三度洗浄した。これらの細胞を0.5%酢酸ウランを用いて室温で1時間en bloc染色した。三度洗浄した後、細胞ペレットを1%アガロース内に入れて、段階的エタノール/酢酸シリーズを通じて脱水させた。最終的な埋め込みはMollenhauer(1964)のエポニーアラルダイト・エポキシ混合物#1内で70℃の温度下で2日間行われた。Sorvall MT5000マイクローム上で非常に薄い部分を切断して、150メッシュ銅グリッド上で回収した。断面を1%酢酸ウラン及び/又はクエン酸鉛で染色してから、Jeol 100CX透過型電子顕微鏡で撮影した(図2参照)。

40

【0058】

K391ウイルスで感染させた、あるいはK391 RNAでトランスフェクトさせたBHK細胞はプラークアッセイで検出できるレベルのウイルスはつくりださなかったが、PAGEによってそれらがすべてウイルス構造のタンパク質をつくりだすことが示された(図1)

50

。さらに、電子顕微鏡で、それらが細胞内の（非感染性）ウイルスコアを集めることが示された（図2）。

【0059】

実施例6：シンドビス欠失突然変異体K391及び他のトガウイルス内で作られる同様の突然変異のための使用

K391は蚊の細胞内で複製するとシンドビスウイルス粒子をつくりだす。これらのタンパク質の露出された領域（ecto領域）はその配列が野生種である。これら野生種のタンパク質はウイルスが哺乳動物の細胞に入って、ウイルス性タンパク質をつくりさせるようにするが（図1）、新しいウイルスは図2の電子顕微鏡によって示されるように集められない。

10

【0060】

K391はワクチン株である。それは培養された昆虫細胞内で非常に高い濃度で作られ、しかしながら、これらのウイルスを哺乳動物ホストに注入すると、ウイルスが広がって哺乳動物ホストの細胞に感染し、これら感染された細胞は免疫監視のためのウイルスタンパク質をつくりだすが、膜領域の先端が切断されているので、感染は接種物によって最初に感染された細胞に限定される。ワクチン株は欠失突然変異の結果であるので、野生種病原性表現型への復帰は不可能である。

【0061】

さらに、工学処理された欠失突然変異体を野生の蚊の群に導入してもよい。これらのウイルスは卵巣を介した伝達で雌の親から子孫に広がることが示されている（Leakey, 1984）。これらの蚊が脊椎動物を噛むと、それらはワクチン株（例えば、K391）の免疫量（ 10^6 個の感染性粒子）を供給する。Karpf及びBrown（1997）は1つのアルファウイルスを昆虫細胞に感染させると、それらの細胞が、他のより関係の薄いアルファウイルスによって感染されるのを不確定な期間（蚊の寿命は28日であるが、細胞培養内では2年間）防ぐことを示した。従って、ワクチン株の存在（例えば、シンドビス K391）はこれらの昆虫による他の関連病原性ウイルスの蔓延を防いでくれる。

20

【0062】

実施例7：追加的な欠失突然変異

シンドビスウイルス糖タンパク質E2の膜スパンニングドメインでの追加的な欠失突然変異を作成した。これらの欠失突然変異をつくりだす手順について以下に説明する。手順はウイルスシンドビスを含むモデルの膜について述べられているが、この手順は他のいずれのウイルス膜糖タンパク質にも適用できる。

30

【0063】

シンドビスウイルスのエンベロープ糖タンパク質を6つの膜スパンニングドメインを有する多数貫通タンパク質としてエンドプラズマ細網の膜に一体化させた。従って、トランスメンブレンドメインの正しい一体化を防ぐ欠失突然変異をつくりだす可能性を有する標的個所が6つ存在する（図3参照）。これらの標的個所の一部はこの手順の場合他の個所と比較して不満足な結果を示す。TMD#1（図2）は信号認知粒子によって認識され、ERの膜へのタンパク質合成を指令する信号配列である。この領域を切断すると、哺乳動物及び昆虫の両方の細胞での目標に向かう行動が乱される。TMD#3はカプシドタンパク質を識別し、それと結合するタンパク質配列E2を含んでいる。この相互作用は自然では非常に特殊なもので、その配列がトランスメンブレンドメインに存在していることを必要としていることが示されている（Liuら、1996；Lopezら、1994）。TMD#3は従ってTMD#1と同様、機能性成分と構造的成分の両方を有している。この領域における有意な欠失が起きると、両方の細胞システムでの結合が起きなくなる。これによって膜統合に影響を及ぼす欠失をつくりだすための標的となる4つの膜横断領域が残される（図3、TMD2, 4, 5, 6）。

40

【0064】

6kタンパク質は成熟したウイルスの成分であり、ウイルス集合体でのその機能は明らかではない。ポリタンパク質内においては、E1の正しい組み込みのためには、適切な統合

50

と E R 膜内での 6 k の方向性が基本的な条件である。6 k のトランスメンブレンドメイン (TMD 4 及び 5) は欠失突然変異のためには優れた標的であり、それは、これらの領域のひとつに組み込みすることができないと、ポリタンパク質が間違った構成で膜内に組み込まれるか、あるいは E 1 との組み込みの失敗を引き起こすからである。TMD 2 と 6 は E 2 及び E 1 の膜スパンニングドメインであり、両方とも欠失突然変異には明白な標的である。このポリタンパク質内の複数の膜スパンニングドメインは、単一のトランスメンブレンドメインでの欠失突然変異が哺乳動物の細胞でのウイルス生産をまったく阻止しなければ、別の膜スパンニングドメインでの欠失はさらに突然変異を無視し得るレベルまで低下させてしまう可能性がある。

【0065】

実施例 8：E 2 疎水性膜アンカー (TMD # 2) に対する変異原性プライマーの設計
E 2 (図 3、TMD 2) のトランスメンブレンドメインに課せられる必要条件をテストするための手順を示す。この手順は他のいずれのシンドビス膜スパンニングドメインあるいは他のいずれのウイルス糖タンパク質に対しての膜スパンニングドメインに対して容易に複製することができる。疎水性シンドビス P E 2 膜アンカーは 26 個のアミノ酸によって構成されている。他の膜上にひろがった領域においても共通に認められる傾向であるが、これらアルファウイルス間においてはアミノ酸相同性はほとんど保持されていないが、この疎水性領域の長さは高度に保たれている (Strauss 及び Strauss, 1994)。この領域の配列保存の欠如はそれがこの領域の疎水性によるものであり、組み込みに必要な配列ではないことを示唆している。

【0066】

E 2 のトランスメンブレンドメインは E 2 配列のアミノ酸 365 から始まる。この疎水性領域は V Y T I L A V A S A T V A M M I G V T V A V L C A C (配列番号：4) によって構成されている。Adams と Rose (1985) は哺乳動物の細胞では適切な固着状態を達成するためには V S V G 糖タンパク質のトランスメンブレンドメインにおいて最低でも 14 個のアミノ酸が必要であることを示した。従って、E 2 膜横断領域の 1 組のネストされた欠失をつくりだす変異原性プライマーが設計されている。16 個のアミノ酸の欠失から始まって (この場合疎水性領域には 10 個のアミノ酸が残っている)、膜アンカーから最低 1 個、最大 16 個のアミノ酸欠失がつくりだされた (図 4)。

【0067】

欠失は独特な Bcl I 及び Spl I サイトを含む欠失フラグメントを発生させるために、P C R メガプリンター突然変異を用いて構築した。こうして得られたすべての構築物を突然変異体プラスミドを発生させるために野生型シンドビス c D N A 構成物内部に取り付けた。Xho I による線形化と S P 6 ポリメラーゼを用いての転写を行った後、転写物を (上に述べたような) 電気穿孔によって B H K あるいはアエデス・アルボピクタス内部にトランスフェクトさせた。これらのトランスフェクションからの感染性ウイルスの生産を B H K 及び C 710 蚊細胞の両方で力価決定を行ってこれらの構成物の宿主範囲を判定した。表 2 は欠失した配列とその構成に用いられたプライマー配列を示している。

【0068】

各構成物に対して同じプライマーを用いて Bcl I - Spl I 領域全体を発生させた。フォーワードプライマー E 1 B c 12 l はヌクレオチド 9306 ~ 9327 からの配列で構成されており、5' - 3' G C G T C G C C T A T A A G A G C G A C C (配列番号：5) である。リバープライマー Spl ext は 5' - 3' C A G T G T G C A C C T T A A T C G C C T G C (配列番号：6) の相補性配列であるヌクレオチド 10420 ~ 10444 からの配列で構成されている。

【0069】

昆虫細胞のトランスフェクションによってつくられたウイルスの突然変異体 E 2 Δ K 391 に関して B H K と C 7 ~ 10 蚊細胞内でプラークをつくりだす能力を持っているかどうか調べた。B H K 細胞内ではプラークをつくりださないこれらの突然変異体については感染された単層の免疫蛍光アッセイで野生種ウイルスに対して B H K 細胞を感染させる能力を

10

20

30

40

50

もってるいるかどうかテストした。各突然変異体群の相対的な感染性を判定するために、後者のアッセイを突然変異体及び野生種ウイルスの精製した製剤と比較した。目標はできるだけトランスメンブレンドメインの先端を切断しながら、BHK細胞に感染することはできるが成熟したウイルスはつくりだすことができないC7～10蚊細胞内で合理的な量のウイルスを確保することである。単一のトランスメンブレンドメインの先端切断がBHK細胞内でのウイルスの成長を減らしはするが完全に無くしはしないという状況が発生した場合、第2の領域を切断するなど、最大4つの領域に対して同じ手順を行う。

【0070】

【表2】

シンドビスE2における欠失及び使用したプライマーのリスト

プライマーの名称	欠失したNT	突然変異誘発性のプライマーの配列
E2TM10	9734-9782	ACATAACACTGCGATGGTGACAC (配列番号：7)
E2TM12	9740-9782	ACATAACACTGCGGCTAAGATGG (配列番号：8)
E2TM14	9746-9782	ACATAACACTGCTGCGACGGCT (配列番号：9)
E2TM16	9743-9773	GCAACAGTTACGACGGCTAAG (配列番号：10)
E2TM17	9743-9770	ACAGTTACGCGACGGCTAAG (配列番号：11)
E2TM18	9743-9767	GTTACGCCAATGACGGCTAAG (配列番号：12)
E2TM19	9743-9764	CGCCAATCATGACGGCTAAGA (配列番号：13)
E2TM20	9755-9773	GCAACAGTTACGGTAGCTGA (配列番号：14)
E2TM21	9755-9770	AGTTACGCCGGTAGCTGA (配列番号：15)
E2TM22	9761-9773	TGCAACAGTTACGCCACGGT (配列番号：16)
E2TM23	9761-9770	ACAGTTACGCCGCCACGGT (配列番号：17)
E2TM24	9761-9767	GTTACGCCAATGCCACGGT (配列番号：18)
E2TM25	9761-9764	ACGCCAATCATGCCACGGT (配列番号：19)

【0071】

本発明で述べた手順はその構造の一部として一体化膜タンパク質を有する、昆虫及び哺乳動物内で複製するウイルス、つまり、トガウイルス、フラビウイルス、及びブニヤウイルス及び哺乳動物と昆虫の両方の細胞で自然に複製できる他のすべてのエンベロープを有するウイルス、及びウイルス蚊細胞の遺伝子工学処理によって哺乳動物細胞及び昆虫細胞の両方で複製するようにさせることができるエンベロープを有するウイルスに有効である。

【0072】

10

20

30

40

50

ウイルスエンベロープに存在するタンパク質の膜スパンニングドメインからアミノ酸を除去することによって、いずれの膜含有ウイルスに対してでもワクチンをつくることができる。これは、上に述べたようなウイルスの cDNA クローンから塩基を取り除くことで行われる。変成クローンから転写された RNA を昆虫細胞内にトランスフェクトする。つくりだされたウイルスを大量の突然変異体ウイルスが得られるまで昆虫細胞内で繰り返し成長させて増幅する。このウイルスが哺乳動物に感染して後代をつくりだす能力を持っているかどうか調べる。哺乳動物細胞内で子孫をつくりださないウイルスは実験動物内で免疫性をつくりだすことができるかどうか調べる。免疫性をつくりだすものは先行技術において知られているようなヒト及び動物用ワクチン生産の候補となる。これらの手順はアルボウイルスあるいはその他のエンベロープを有するウイルスと共に用いられる。

10

【0073】

(文献リスト)

Adams G. A. and Rose J. K. (1985) Structural requirements of a membrane-spanning domain for protein anchoring and cell surface transport. *Cell*. 41(3) : 1007-15
 Berge, T. O. (ed.) (1975) : International Catalogue of Arboviruses ; 2nd ed., D H E W Publ. No. (C D C) 75-8301 (U. S. Government Office, Washington, D. C.)

Bonner, W. M. and R. A. Laskey. 1974. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46 : 83-88.

20

Bowers, D. F., B. A. Abell and D. T. Brown (1995) Replication and Tissue Tropism of the Alphavirus Sindbis in the Mosquito *Aedes Albopictus*. *Virology* 212 : 1-12

Bretscher MS. (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. 261 (5126) : 1280-1

Brown, D. T., and L. Condreay (1986) . Replication of alphaviruses in mosquito cells. In *The Togaviridae and Flaviviridae*. S. Schlesinger (ed.) , pp. 473-501.

Clayton, R. B. 1964 The utilization of sterols by insects. *J. lipid res.* 5 : 3-19

30

Karpt, et al. (1997) *J. Virol.* 71 : 7119-7123.

Knipfer, M. E., and D. T. Brown. 1989. Intracellular transport and processing of Sindbis virus glycoproteins. *Virology* 170 : 117-122.

Leake, C. J. (1984) . Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes. In *Vectors in Virus Biology* (Mayo and Harrap, eds.) , pp. 63-92. Academic Press.

Liu, N., and D. T. Brown (1993 a) . Transient translocation of the cytoplasmic (endo) domain of a type- I membrane glycoprotein into cellular membranes. *J. Cell Biol.* 120 : 877-883.

Liu, N., and D. T. Brown (1993 b) . Phosphorylation dephosphorylation events play critical roles in Sindbis virus maturation. *J. Virol.*, 196 : 703-711.

40

Liu N., H. Lee, R. Hernandez and D. T. Brown (1996) Mutations in the Endo Domain of Sindbis Glycoprotein E 2 Block Phosphorylation, Reorientation of the Endo Domain and Nucleocapsid Binding. *Virology* 222 : 236-246.

Mitsunashi et al 1983. Sterol free eucaryotic cells from continuous cell lines of insects. *Cell Biol. Int. Rep.* 7 : 1057-1062.

Mollenhauer, H. H. 1964. Plastic embedding mixture for use in electron microscopy . *Stain Techn.* 39 : 111-114.

N I A I D Report of the Task Force on Microbiology and Infectious

50

Diseases (1992) . N I H Publication No. 92-3320.

Renz, D., and D. T. Brown. 1976. Characteristics of Sindbis virus temperature-sensitive mutants in cultured BHK-21 and *Aedes albopictus* (mosquito) cells. J. Virol. 19:775-781.

Rice C. M., et al 1982. Isolation and characterization of the hydrophobic COOH-terminal domains of Sindbis Virus glycoproteins. J. Mol. Biol. 154:355-378

Rice., C. M., R. Levis, J. H. Strauss, and H. V. Huang. 1987.

Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. J. Virol. 61:3809-3819.

10

Sarkar, G., and S. S. Sommer. 1990. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. BioTechniques. 8:404-407.

Schlesinger, S. and M. J. Schlesinger (1990) . "Replication of Togaviridae and Flaviviridae." (D. M. Knipe and B. N. Fields, eds.) , In Virology Vol. I , pp. 697-711. Raven Press, Ltd., New York.

Sprenger, D. and T. Wuithiranyagool (1985) . The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. J. Am.

Mosquito control Assoc. 2:217-219

20

【0074】

本明細書で取り上げられているすべての特許及び刊行物は本発明が関係する分野の当業者が容易に理解できるレベルである。さらに、これらの特許と刊行物は、個々の刊行物について具体的、具体的に触れられることによって本明細書に組み入れられるのと同様に全体としても本明細書に組み入れられる。

【0075】

当業者であれば、本発明は上に述べた目的を実行し、課題と利点を達成、及びそれらに本質的に付随した目的、課題、利点を達成するのによく適合していることは容易に理解できるであろう。本実施例は、方法、手順、措置、分子、及び分子と共に現段階での好ましい実施の形態を示すために述べられ、例示であって、本発明の範囲の限定は意図していない。権利請求の範囲に定義されているような本発明の精神の範囲内で、変更や他の使用法が可能であることは当業者には自明であろう。

30

【0076】

以下の図面は上に述べた本発明の特徴や利点、そして目的を明らかにし、より詳細に理解できるようにするためのものである。これらの図面は明細書の一部を構成している。しかしながら、添付図面は本発明の好ましい実施の形態を示すものであって、本発明の範囲を限定するものとみなしてはならない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 トランスフェクトされた組織培養細胞から回収された放射性物質でラベルされたシンドビスウイルスの結果について示している。擬似トランスフェクトされたBHK-21細胞(1)、変異原Δ391 RNAでトランスフェクトされたBHK-21(2)、そしてΔ391 RNAでトランスフェクトされたアエデス・アルボピクタス(3)を実施例3で述べるように放射性アミノ酸でラベルした。トランスフェクトしてから24時間後に、実施例4で述べるようにウイルス固有抗血清によって沈殿させた。この図は、欠失変異原のRNAでトランスフェクトされたBHK-21細胞とアエデス・アルボピクタス細胞の両方とも擬似的にトランスフェクトされた細胞では検出されない3つの構造タンパク質E1、E2、及びCをつくりだすことを示している。

40

【図2A】 シンドビスウイルス欠失突然変異体Δ391のRNAでトランスフェクトされたBHK-21細胞の電子顕微鏡写真である。細胞は実施例2で述べられたようにトランスフェクトされた。これらの細胞が成熟したウイルスはつくりださなくても細胞質内で、ウ

50

イルスコア構造のクラスター(A)が見られる。

【図2B】 シンドビスウイルス欠失突然変異体Δ391のRNAでトランスフェクトされた及びアエデスアルボピクタス細胞の電子顕微鏡写真である。細胞は実施例2で述べられたようにトランスフェクトされた。細胞はウイルスコアのクラスターをつくりだすが、これらのコアはBHK-21細胞内のものと同様の細胞質を含んでおらず、また、細胞膜と結合していることが認められる。このケースはBHK-21細胞では見出されないので、糖タンパク質E1及びE2は存在しているけれども、それらを結合させる機能は有していないことを示唆している。

【図3】 ERに組み込まれた後のシンドビスウイルス糖タンパク質の構成を示している。このタンパク質は6つの膜スパンニングドメイン(1-6の数字を付してある)を持つマルチパスタンパク質である。

10

【図4】 E₂トランスメンブレンドメインにおける欠失アミノ酸を示している。欠失した配列は1欠失-16の範囲で該当するアミノ酸の下側に示されている。nt. 9787から始まるヒスチジン及びプロリン配列はそのタンパク質のルーメン側にあるが、これらは変異原性プライマーを設計するためには用いられない。

【符号の説明】

- 1 初期統合に関する信号配列
- 2 第1のE2膜横断領域(TMD)
- 3 第2のE2 TMD
- 4 第1の6k TMD
- 5 第2の6k TMD
- 6 E1 TMD
- S 信号ペプチダーゼによる切断点

【配列表】

20

SEQUENCE LISTING

<110> Brown, Dennis T.
 Hernandez, Raquel
 <120> Production of Vaccines Using Arthropod
 Vectored Viruses
 <130> D6123
 <140>
 <141> 1998-09-18
 <150> US 60/059,668
 <151> 1997-09-18 10
 <160> 34

 <210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Used as the mutagenesis primer with the "forward
 primer" to generate a 518 base "Megaprimer"
 corresponding to nucleotides 9295-9813. 20
 <400> 1
 ctcacggcgc gcacaggcac ataacactgc 30

 <210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Used as the "forward primer" with the mutagenesis
 primer to generate a 518 base megaprimer 30
 corresponding to nucleotides 9295-9813.
 <400> 2
 ccatcaagca gtgcgtcg 18

 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>

<223> Used as the "reverse primer" with the megaprimer
and the Toto 1101 plasmid template to create 1149
nucleotide product used to create the deletion
mutant K391 in Toto 1101.

<400> 3

ggcagtgtgc accttaatcg cctgc 25

<210> 4

10

<211> 26

<212> PRT

<213> Sindbis virus

<220>

<222> 365..390

<400> 4

Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met

5

10

15

Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys

20

20

25

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<222> 9306-9327

<223> Forward primer E1Bcl21 from megaprimer used with
reverse primer to generate deletion constructs
containing unique BclI and SplI sites.

30

<400> 5

gcgtcgcccta taagagcgac c 21

<210> 6

<211> 21

<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<222>	10420-10444		
<223>	Reverse primer Splxt from megaprimer used with forward primer to generate deletion constructs containing unique BclI and SplI sites.		
<400>	6		
<210>	7		10
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Mutagenic primer (negative strand) used to create a deletion in the E2 transmembranal domain in the Sindbis viral glycoprotein.		
<400>	7		
acataacact	gcgatggtgt acac	24	20
<210>	8		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Mutagenic primer (negative strand) used to create a deletion in the E2 transmembranal domain in the Sindbis viral glycoprotein.		
<400>	8		30
acataacact	gcggctaaga tgg	23	
<210>	9		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	artificial sequence		

<220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 9
 acataacact gctgcgacgg ct 22

<210> 10
 <211> 21 10
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 10
 gcaacagtta cgacggctaa g 21

20
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 11 30
 acagttacgc cgacggctaa g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create

a deletion in the E2 transmembranal domain in
the Sindbis viral glycoprotein.

<400> 12

gttacgccaa tgacggctaa g 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

10

<220>

<223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
a deletion in the E2 transmembranal domain in
the Sindbis viral glycoprotein.

<400> 13

cgccaatcat gacggctaag a 21

<210> 14

<211> 20

20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
a deletion in the E2 transmembranal domain in
the Sindbis viral glycoprotein.

<400> 14

gcaacagtta cggtagctga 20

30

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
a deletion in the E2 transmembranal domain in
the Sindbis viral glycoprotein.

<400> 15
 agttacgccg gtagctga 18

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create 10
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 16
 tgcaacagtt accgccacgg t 21

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence 20
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 17
 acagttacgc ccgccacggt 20

<210> 18
 <211> 20 30
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 18

gttacgccaa tcgccacggt 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> Mutagenic primer (negative strand) used to create 10
 a deletion in the E2 transmembranal domain in
 the Sindbis viral glycoprotein.
 <400> 19

acgccaatca tcgccacggt 20

<210> 20
 <211> 849870
 <212> DNA
 <213> Sindbis virus 20
 <220>
 <223>
 <400> 20

catcctgtgt acaccatctt agccgtcgca tcagctaccg tggcgatgat gattggcgta 60

actgttgcag tggtatgtgc ctgt 84

<210> 21
 <211> 28
 <212> PRT 30
 <213> Sindbis virus
 <220>
 <222> 363..390
 <400> 21

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala

5

10

15

Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys

20

25

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acid 378.

10

<400> 22

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala

5

10

15

Met Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys

20

25

20

<210> 23

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 378 and 379.

<400> 23

30

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala

5

10

15

Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys

20

25

<210> 24

<211>	25		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain of the Sindbis viral glycoprotein after deleting amino acids 378 through 380.		
<400>	24		
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala			
	5	10	15
Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys			
	20	25	
<210>	25		
<211>	24		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			20
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain of the Sindbis viral glycoprotein after deleting amino acids 378 through 381.		
<400>	25		
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala			
	5	10	15
Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys			
	20		30
<210>	26		
<211>	23		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain		

of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 376 through 380.

<400> 26
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Gly Val
5 10 15
Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys
20

10

<210> 27
<211> 22
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 376 through 381.

<400> 27
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Thr
5 10 15
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys
20

20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 372 through 378.
<400> 28

30

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Met Ile Gly Val Thr Val

5

10

15

Ala Val Leu Cys Ala Cys

20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 372 through 379.

<400> 29

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ile Gly Val Thr Val Ala

5

10

15

Val Leu Cys Ala Cys

20

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 372 through 380.

<400> 30

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Gly Val Thr Val Ala Val

5

10

15

Leu Cys Ala Cys

10

20

30

<210>	31		
<211>	18		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain of the Sindbis viral glycoprotein after deleting amino acids 372 through 381.		
<400>	31		10
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Val Thr Val Ala Val Leu			
	5	10	15
Cys Ala Cys			
<210>	32		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			20
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain of the Sindbis viral glycoprotein after deleting amino acids 373 through 384.		
<400>	32		
His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ala Val Leu Cys Ala			
	5	10	15
Cys			
<210>	33		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	artificial sequence		
<220>			
<223>	Sequence of the E2 transmembranal domain of the Sindbis viral glycoprotein after deleting amino acids 371 through 384.		

<400> 33

His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Ala Val Leu Cys Ala Cys

5

10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Sequence of the E2 transmembranal domain
of the Sindbis viral glycoprotein after deleting
amino acids 369 through 384.

<400> 34

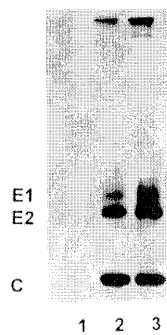
His Pro Val Tyr Thr Ile Ala Val Leu Cys Ala Cys

5

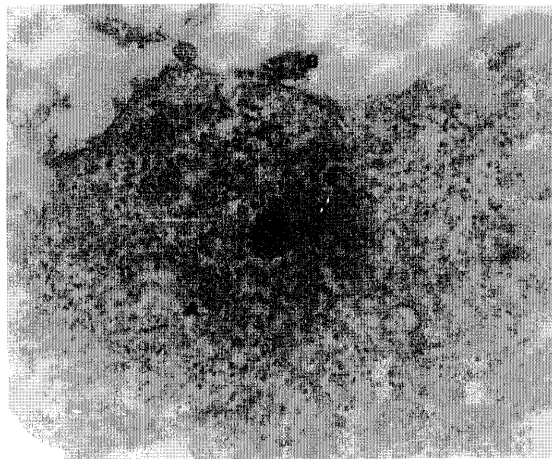
10

10

【図 1】



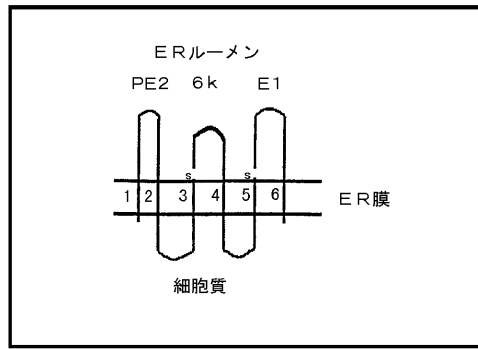
【図 2 B】



【図 2 A】



【図 3】



【図 4】

20	CATCCCTGTGTACACCATCTT	AGCCGTCGSCATCCGTCGCGATGAT	GTGGCGTAAGTGTTCGTCGT	GTGTA	GCCTGT
21	H P V Y T I L A V A S A T V A M M I G V T V A V L C A C				
22			M		
23			M	M	
24			M	M	I
25			M	M	I
26			M	M	I
27			M	M	I
28			M	M	I
29			M	M	I
30			M	M	I
31			M	M	I
32			M	M	I
33			M	M	I
34			M	M	I

フロントページの続き

(72)発明者 ヘルナンデ, ラッケル

アメリカ合衆国 27695 ノース カロライナ, ローリ, イートン ロード 3126番地

審査官 中村 花野子

(56)参考文献 Current Opinion in Biotechnology, 1996年, Vol. 7, p. 531-535

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00-7/08

C12N 15/00-15/90

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAPLUS(STN)

JSTPLUS(JDREAMII)

JMEDPLUS(JDREAMII)

JST7580(JDREAMII)