

FIG. 11

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ウイルス様粒子 (VLP) であって、

- a. 組み換え型ポリヌクレオチドを有するアルファウイルスレプリコンと、
- b. レトロウイルスの gag タンパク質と、
- c. 融合エンベロープタンパク質と

を有し、前記 VLP はアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まないウイルス様粒子 (VLP) 。

**【請求項 2】**

請求項 1 記載の VLP において、前記アルファウイルスレプリコンはシンドビスウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルスに由来するものである VLP。

10

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 記載の VLP において、前記アルファウイルスレプリコンは、

- a. シンドビスウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルス非構造タンパク質 NSP 1、NSP 2、NSP 3、および NSP 4 と、
  - b. レトロウイルスパッケージングシグナルと
- をコードする遺伝子を有するものである VLP。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記レトロウイルスの gag タンパク質はラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来するものである VLP。

20

**【請求項 5】**

上記請求項のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記レトロウイルスの gag タンパク質はラウス肉腫ウイルスに由来するものである VLP。

**【請求項 6】**

上記請求項のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記融合エンベロープタンパク質はヘマグルチニン、ラウス肉腫ウイルス融合タンパク質、ダニ媒介性脳炎ウイルスおよびデング熱ウイルスの E タンパク質、セムリキ森林ウイルスの E 1 タンパク質、バキュロウイルス gp 64、および VSV - G タンパク質から成る群から選択されるものである VLP。

30

**【請求項 7】**

上記請求項のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記融合エンベロープタンパク質は糖タンパク質、またはその断片もしくは派生物である VLP。

**【請求項 8】**

上記請求項のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記融合エンベロープタンパク質は RNA ウイルスまたはレトロウイルス、またはその断片もしくは派生物由来である VLP。

**【請求項 9】**

上記請求項のいずれか 1 つに記載の VLP において、前記融合エンベロープタンパク質は VSV - G または VSV - EnvA である VLP。

40

**【請求項 10】**

請求項 9 記載の VLP において、前記 VSV - G は変化を有するものである VLP。

**【請求項 11】**

上記請求項のうちのいずれか 1 つに記載の VLP において、前記 VLP は真核細胞と結合することが可能である VLP。

**【請求項 12】**

請求項 11 記載の VLP において、前記真核細胞はヒト細胞である VLP。

**【請求項 13】**

請求項 11 記載の VLP において、前記結合が標的細胞に特異的である VLP。

**【請求項 14】**

50

請求項 1 1 記載の V L P において、前記レプリコンは前記細胞において複製されるものである V L P。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 記載の V L P において、前記 V L P は前記細胞に細胞変性をもたらさないものである V L P。

【請求項 1 6】

上記請求項のいずれか 1 つに記載の V L P において、前記アルファウイルスレプリコンは、前記組み換え型ポリヌクレオチドに操作可能に結合したウイルス R N A 依存性 R N A ポリメラーゼのプロモーターを有するものである V L P。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 記載の V L P において、前記アルファウイルスレプリコンは少なくとも 1 つの組み換え型ポリヌクレオチドの挿入のためのクローニングサイトを有するものである V L P。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 記載の V L P において、前記組み換え型ポリヌクレオチドはアンチセンス R N A をコードするものである V L P。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載の V L P において、前記組み換え型ポリヌクレオチドは s h R N A または m i R N A をコードするものである V L P。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の V L P において、前記 s h R N A または m i R N A は前記細胞において遺伝子の発現をノックダウンするものである V L P。

【請求項 2 1】

請求項 1 6 記載の V L P において、前記組み換え型ポリヌクレオチドはタンパク質に翻訳されることが可能な R N A を有するものである V L P。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の V L P を産生する方法であって、

a . 真核細胞を同時形質転換する工程であって、

i . 前記アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有する第 1 のベクターであって、前記アルファウイルスレプリコンが目的のポリヌクレオチドを含むものである第 1 のベクターと、

i i . 前記レトロウイルスの g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 2 のベクターと、

i i i . 前記融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 3 のベクターと

により真核細胞を同時形質転換する、前記同時形質転換する工程と、

b . 各々のベクターがそのコードする産物を産生させるのに適した条件下で前記同時形質転換した細胞を培養し、それにより前記 V L P を産生する工程と、

c . 前記細胞から前記 V L P を単離する工程と

を有し、前記ベクターおよび前記細胞はいかなるアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まない方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載の第 1 のベクター、第 2 のベクター、および第 3 のベクターを有するキット。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載のキットにおいて、少なくとも 2 つの前記ベクターが連続的であるキット。

【請求項 2 5】

真核細胞において少なくとも 1 つの組み換え型ポリヌクレオチドを発現する方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の V L P を細胞に接触させる工程を有する方法

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 26】

組み換え型ポリヌクレオチドを対象に送達する方法であって、前記対象に請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の V L P を投与する工程を有する方法。

## 【請求項 27】

対象における疾患または障害を治療または予防する方法であって、前記対象に請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の V L P を投与する工程を有する方法

。

## 【請求項 28】

請求項 25 記載の方法において、前記組み換え型ポリヌクレオチドの発現は前記対象による内在性遺伝子の不十分な発現を補うものである方法。

10

## 【請求項 29】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 つに記載の V L P を有する医薬組成物。

## 【請求項 30】

真核細胞であって、

a . アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有するプラスミドであって、前記アルファウイルスレプリコンが目的のポリヌクレオチドを含むものであるプラスミドと、

b . g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するプラスミドと、

c . 異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するプラスミドと

20

を有し、前記プラスミドおよび前記細胞はアルファウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子を含まない真核細胞。

## 【請求項 31】

請求項 30 記載の真核細胞において、前記アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列はシンドビスウイルスまたはベネズエラウマ脳炎ウイルスに由来するものである真核細胞。

## 【請求項 32】

請求項 30 または 31 記載の真核細胞において、前記アルファウイルスレプリコンは、

a . シンドビスウイルス非構造タンパク質 N S P 1、N S P 2、N S P 3、および N S P 4 と、

30

b . レトロウイルスのパッケージングシグナルと

をコードする遺伝子を有するものである真核細胞。

## 【請求項 33】

請求項 32 記載の真核細胞において、前記レトロウイルスのパッケージングシグナルはラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来するものである真核細胞。

## 【請求項 34】

請求項 30 記載の真核細胞において、前記 g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列はラウス肉腫ウイルスに由来するものである真核細胞。

## 【請求項 35】

請求項 30 記載の真核細胞において、前記異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は V S V - G をコードするものである真核細胞。

40

## 【請求項 36】

請求項 25 記載の方法において、2 つの組み換え型ポリヌクレオチドが前記細胞において発現するものである方法。

## 【請求項 37】

請求項 36 記載の方法において、前記 2 つの組み換え型ポリヌクレオチドの発現が別々のサブゲノムプロモーターにより誘導されるものである方法。

## 【請求項 38】

請求項 22 記載の方法において、前記アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌ

50

クレオチド配列を有するベクターは、p D e s t 4 7 2 - V E E または p D e s t 4 7 2 - V E E - M C S である方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2012年3月26日付で出願された米国仮特許出願第61/615,687号の利益を請求し、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書において説明される発明は、複製欠損ウイルス様粒子を用い哺乳動物細胞への組み換え型ポリヌクレオチドの送達および転写に関するものである。

10

【背景技術】

【0003】

アルファウイルスは、ウイルスの第4群トガウイルス科に属する。アルファウイルスは、一本鎖プラス鎖RNAのゲノムを有する小型球形エンベロープウイルスである。全ゲノム長は11,000~12,000ヌクレオチドに及び、5'末端キャップおよび3'末端ポリA鎖を有する。3つの構造タンパク質はゲノムの3分の1の3末端と同一線状のサブゲノムmRNAから翻訳されるが、4つの非構造タンパク質遺伝子(NSP遺伝子)がゲノムの3分の2の5末端にコードされる。

【0004】

アルファウイルスゲノムの中に2つのオープンリーディングフレーム(ORFs)が存在し、非構造的および構造的である。最初のもはNSP遺伝子を含み、ウイルスRNAの書換えと複製のために必要なタンパク質(nsP1~nsP4)をコードする。2つ目のものは3つの構造タンパク質をコードする。コアヌクレオカプシドタンパク質C、およびエンベロープタンパク質P62およびE1は、ヘテロ二量体として結合する。ウイルス膜アンカー型表面糖タンパク質は、膜融合を通し受容体認識および標的細胞への侵入に参与する。

20

【0005】

シンドビス(およびVEEV)ウイルスは、そのゲノムが11703ヌクレオチドのプラスmRNA鎖を有するアルファウイルスである。このウイルスは、様々な脊椎動物宿主に感染する。シンドビスウイルスのゲノムは、宿主細胞の細胞質で直接翻訳される非構造(NS、レプリコン)および構造タンパク質(カプシドおよびpH依存性融合エンベロープ)をコードする。アルファウイルスはまた、アウラウイルス、ババンキウイルス、バーマフォレストウイルス、ベバルウイルス、Cabassouウイルス、チクングニアウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エバーグレーズウイルス、Fort Morganウイルス、ゲタウイルス、ハイランドJウイルス、Kyzylagachウイルス、マヤロウイルス、Me Triウイルス、ミッデルブルフウイルス、Mosso das Pedrasウイルス、ムカンボウイルス、ヌドゥムウイルス、オニョンニョンウイルス、Pixunaウイルス、リオネグロウイルス、ロスリバーウイルス、Salmon pancreas diseaseウイルス、セムリキ森林ウイルス、南部ゾウアザラシウイルス、Tonateウイルス、Trocaraウイルス、ウナウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、およびワタロアウイルスを含む。

30

40

【0006】

アルファウイルスの宿主細胞への感染が、アポトーシスに終わる細胞毒性の結果となる。これは大部分が、宿主細胞において抗ウイルス状態を引き起こす大量のアルファウイルスのゲノムRNAの発現および宿主細胞に対する細胞変性効果(CPE)の原因となっている細胞mRNA合成または翻訳停止を持つアルファウイルス非構造タンパク質(SINのNSP2またはVEEVのNC)の直接的相互作用の両方に起因する。感染した細胞から回復したウイルス力価は大幅に減少したが、非構造タンパク質の1つ、NSP2(位置726)において点突然変異を含む天然のシンドビスウイルス変種は感染した細胞において持続した非細胞変性増殖を示した(Frollov, I. et al., J. Virol

50

. 3 8 4 5 - 6 5 ( M a y , 1 9 9 9 ) ) 。

【 0 0 0 7 】

アルファウイルスは、遺伝子治療研究者にとり興味深いものである。ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス ( S F V ) およびベネズエラウマ脳炎ウイルス ( V E E V ) のすべては、遺伝子の送達のためのベクターを開発するために用いられた。偽型ウイルスは、アルファウイルスエンベローブ糖タンパク質およびレトロウイルスのカプシドを結合させることにより形成される可能性がある。アルファウイルスエンベローブ糖タンパク質偽型レトロウイルスまたはレンチウイルスはそれらが潜在的な宿主細胞に運搬する遺伝子をインテグレートすることが可能である。偽型アルファウイルスは、アルファウイルスエンベローブタンパク質 E 2 および E 1 により認識され感染する。ウイルス遺伝子の安定したインテグレーションは、これらのベクターのレトロウイルス内部を介して行われる。

10

【 0 0 0 8 】

ターゲティングの特異性が欠如しているため、遺伝子治療の分野においてアルファウイルスの使用には限界がある。しかしながら、E 2 の構造の非保存ループの可変抗体領域の導入を通し、特定の細胞集団が標的とされる。さらにまた、いくつかの内在性アルファウイルスタンパク質が感染においてアポトーシスの誘導に関与しているので、また、アルファウイルスカプシドが宿主細胞への m R N A の一過性導入のみを介して行われるので、遺伝子治療の場合、全てのアルファウイルスの使用は限られた有効性しか持たない。これらの限界のどちらも、レトロウイルスまたはレンチウイルスのアルファウイルスエンベローブの偽型には及ばない。

20

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本明細書の 1 態様は、アルファウイルスレプリコンを有するウイルス様粒子 ( V L P ) であり、そこでアルファウイルスレプリコンは、組み換え型ポリヌクレオチド、レトロウイルスの g a g タンパク質、融合エンベローブタンパク質を有し、V L P はアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まない。アルファウイルスレプリコンはシンドビスウイルスまたは V E E V 非構造タンパク質 N S P 1、N S P 2、N S P 3、および N S P 4、およびレトロウイルスのパッケージングシグナルに由来する可能性がある。レトロウイルスの g a g タンパク質は、ラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。融合エンベローブタンパク質は、ヘマグルチニン、ラウス肉腫ウイルス ( R S V ) 融合タンパク質、ダニ媒介性脳炎ウイルスおよびデング熱ウイルスの E タンパク質、S F V の E 1 タンパク質、バキュロウイルス g p 6 4、および水疱性口内炎 ( インディアナ ) ウイルス - G ( V S V - G ) タンパク質、望ましくは糖タンパク質、または断片またはその派生物、より望ましくは R N A ウイルスまたはレトロウイルス、または断片またはその派生物、最も望ましくは V S V - G または E n v A、または変換 V S V - G から成る群から選択される。本明細書において説明される V L P は、真核細胞、望ましくはヒト細胞と結合することが可能である可能性がある。V L P の結合は、標的細胞に特異的である可能性がある。望ましくは本明細書において説明される V L P は、標的細胞において複製する。いくつかの実施形態において、本明細書において説明される V L P は、細胞に対し細胞変性効果を持たない。V L P の組み換え型ポリヌクレオチドは、m i R N A、s h R N A、またはアンチセンス R N A、望ましくは細胞の遺伝子の発現をノックダウンする s h R N A またはアンチセンス R N A を有する可能性がある。V L P の組み換え型ポリヌクレオチドは、細胞により発現することが可能なタンパク質をコードする R N A を有する可能性がある。

30

40

【 0 0 1 0 】

本明細書の別の実施形態は本明細書において説明される V L P の産生方法であり、アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有する第 1 のベクター、そこでアルファウイルスレプリコンは目的のポリヌクレオチドを含み、レトロウイルスの g

50

a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 2 のベクター、および融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 3 のベクターで真核細胞を同時形質転換する工程、各々のベクターが、それがコードする産物の産生を生じさせる適当な条件下で同時形質転換した細胞を培養する工程、それにより V L P を産生する工程、および V L P を細胞から単離する工程を有し、ベクターも細胞も任意のアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まない。

【 0 0 1 1 】

本明細書の別の実施形態は、アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有する第 1 のベクターを有するキットであり、アルファウイルスレプリコンは目的のポリヌクレオチドを含み、レトロウイルスの g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 2 のベクター、および V S V - G のような融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する第 3 のベクターを有するキットである。いくつかの実施例において、キットにより提供されるベクターは、アルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まない。あるいは、いくつかの実施形態において、アルファウイルスレプリコン、レトロウイルスの g a g タンパク質、および融合エンベロープタンパク質の 1 若しくはそれ以上は、同じベクターによりコードされる可能性がある。

10

【 0 0 1 2 】

本明細書の別の実施形態は、細胞を本明細書において説明される V L P で処理することを有する、真核細胞において組み換え型ポリヌクレオチドを発現する方法である。

【 0 0 1 3 】

20

本明細書の別の実施形態は対象に本明細書において説明される組み換え型ポリヌクレオチドを送達する方法であり、本明細書において説明される V L P を前述の対象に投与する工程を有する。

【 0 0 1 4 】

本明細書の別の実施形態は対象における病気または障害を治療または予防する方法であり、本明細書において説明される V L P を対象に投与する工程を有する。好ましくは、目的の遺伝子の発現は、前述の対象により内在性遺伝子の不足した発現を補う。

【 0 0 1 5 】

本明細書の別の実施形態は、本明細書において説明される V L P を有する医薬品組成物である。

30

【 0 0 1 6 】

本明細書の別の実施形態は、細胞を本明細書において説明される V L P で処理することにより産生される真核細胞である。

【 0 0 1 7 】

このような V L P S を産生するために、いくつかのコンポーネントは、インビトロでの産生のために細胞株にこれらのコンポーネントをコードする 1 若しくはそれ以上のベクターをトランスフェクションまたはヌクレオフェクションすることにより産生される可能性がある。いくつかの実施形態において、これらのコンポーネントは、結果として生じる V L P が複製能を有する可能性を下げるために、別々のベクターによりコードされる。例えば、1 つのベクターが V L P によりパッケージングされるようにアルファウイルスベースの R N A ポリヌクレオチドのような遺伝物質をコードし、別のベクターが g a g タンパク質のような V L P の構造タンパク質をコードし、さらに別のベクターが標的細胞の膜に V L P の融合を促進するために V S V - G のような融合タンパク質をコードするマルチベクターシステムが用いられる可能性がある。アルファウイルスベースの R N A ポリヌクレオチドは、任意のアルファウイルス由来であることが可能である。いくつかの実施形態において、R N A ポリヌクレオチドはシンドビスウイルスに由来し、シンドビスウイルス非構造タンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、R N A ポリヌクレオチドはベネズエラウマ脳炎ウイルス ( V E E V ) に由来し、V E E V 非構造タンパク質をコードする。しかしながら、他のアルファウイルス非構造タンパク質は、本明細書において説明される R N A コンストラクトにとって十分である可能性がある。適当なアルファウイルスは

40

50

、アウラウイルス、ババンキウイルス、バーマフォレストウイルス、ベバルウイルス、C a b a s s o u ウイルス、チクングニアウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エバーグレーズウイルス、F o r t M o r g a n ウイルス、ゲタウイルス、ハイランドJウイルス、K y z y l a g a c h ウイルス、マヤロウイルス、M e T r i ウイルス、ミッデルブルフウイルス、M o s s o d a s P e d r a s ウイルス、ムカンボウイルス、ヌドゥムウイルス、オニョンニョンウイルス、P i x u n a ウイルス、リオネグロウイルス、ロスリバーウイルス、S a l m o n p a n c r e a s d i s e a s e ウイルス、セムリキ森林ウイルス、南部ゾウアザラシウイルス、T o n a t e ウイルス、T r o c a r a ウイルス、ウナウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、およびワタロウイルスを含む。

10

#### 【0018】

また、V L P s を産生するために説明されるベクターを有する細胞は、本明細書において説明される。これらの細胞は、ベクターのポリヌクレオチドを転写または発現することにより本明細書において説明されるV L P s を産生するのに用いられる可能性がある。例えば、目的の遺伝子またはポリヌクレオチドおよびパッケージングシグナルを有するアルファウイルスRNAコンストラクトをコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、レトロウイルスのg a g タンパク質をコードするベクター、およびウイルス融合タンパク質をコードするベクターをトランスフェクトした哺乳動物細胞は、V L P の中に包まれた1または2コピーのコードされたアルファウイルスRNAコンストラクトで、その表面上に発現したウイルス融合タンパク質を有するV L P を産生することが可能であった。さらにまた、これらのベクターのいずれもアルファウイルス構造タンパク質をコードしないので、伝染性ウイルスを作り出す可能性はアルファウイルス構造タンパク質を含むシステムと比較して大幅に減少する。

20

#### 【0019】

ベクターおよび細胞を用い産生させたV L P s はまた、本明細書において説明される。本明細書において説明されるV L P s は、4つの一般的な特徴を有し、それらはアルファウイルスレプリコンをコードする1つまたは2つのRNA分子、および任意に目的のタンパク質を有し、それらはレトロウイルスのg a g タンパク質、または、いくつかの実施形態において、g a g 融合タンパク質を有するウイルスコアを有し、それらは細胞で融合を促進するために表面タンパク質を有し、それらはアルファウイルス構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含まない。

30

#### 【0020】

本明細書において説明されるV L P s は様々な方法で産生される可能性があり、そのことは提供される開示に基づき当業者にとって明らかである。これらの様々な方法の共通性は、必要なタンパク質（g a g および融合タンパク質）を発現し、アルファウイルスベースのRNAレプリコンを産生することが可能な細胞における説明されるベクターの発現である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0021】

【図1】図1は、本明細書において例示される3つのベクターの配列を図示する。図1Aは、プラスミドp C M V - S i n R e p - 目的のタンパク質 - 2 ( P O I - 2 ) を示し、それはシンドビスウイルスベースのレプリコンである。図1Bは、プラスミドp G A G - 目的のタンパク質 - 1 ( P O I - 1 ) を示し、それはレトロウイルスのg a g タンパク質をコードする。図1Cは、プラスミドp E n v e l o p e を示し、それはV S V - G のようなウイルス融合タンパク質をコードする。

40

【図2】図2は、図1Aにおいて示されるプラスミドに相当する、本明細書に準じるベクターの例を図式的に示す。ベクターのDNAシーケンスは配列表において提供され、本明細書に付加される。

【図3】図3は、本明細書において説明される形質導入するV L P s を産生する方法を図式的に示す。

50

【図 4】図 4 は、3 つの別々の V L P 形質導入実験の結果を示す。図 4 A は、3 つ全てのプラスミドでトランスフェクションしたベビーハムスター腎臓 ( B H K ) - 2 1 細胞から回収した上清より得られる V L P s にパッケージングされる G F P を発現しているシンドビスウイルスレプリコンで形質導入した細胞を示し、図 4 B は、エンベロープタンパク質を欠き p C M V - S i n R e p - P O I - 2 および p G A G - P O I - 1 プラスミドのみでヌクレオフェクトした B H K - 2 1 細胞から回収した細胞上清でインキュベートした細胞における G F P 発現の欠損を示す。図 4 C は、構築した V L P s がヒト細胞を形質導入することが可能であることを証明するヒト胚腎臓 ( H E K 2 9 3 T ) 細胞の形質導入を示す。

【図 5】図 5 は、本明細書において説明される V L P s を 1 時間 ( A )、2 日 ( B )、4 日 ( C )、および 8 日 ( D ) の間 4 で保存後、細胞をうまく形質導入することが可能であることを示す。

【図 6】図 6 は、ガウシアルシフェラーゼ遺伝子を発現することが可能な V E E V レプリコンを有する V L P s で形質導入される細胞でのガウシアルシフェラーゼの発現レベルを示す ( 図 6 A、条件 4 )。図 6 A の条件 1、2、および 3 は、外来性遺伝子を持たない V E E V レプリコン ( 条件 1 )、または G F P をコードする遺伝子 ( 条件 2 および 3 ) で形質導入した細胞でのガウシアルシフェラーゼの発現を示す。図 6 B は、形質導入後、最初の 4 時間の間にルシフェラーゼタンパク質の発現動態の実例を提供する。

【図 7】図 7 は、c r e リコンビナーゼ遺伝子で V E E V レプリコンを有する V L P での形質導入を通して c r e リコンビナーゼを細胞に送達することにより細胞で遺伝子発現を変えるのに用いられることが可能である c r e / l o x システムによる遺伝的プロセスを図示する ( 図 7 A )。c r e リコンビナーゼの存在下において G F P を発現し、c r e リコンビナーゼ存在下において R F P を発現するよう設計された細胞株の、c r e リコンビナーゼを発現することが可能なレプリコンを運搬する V L P での形質導入の前および ( 5、6、および 7 日 ) 後の遺伝子発現プロファイルを示す。図 7 B は、機能的な c r e リコンビナーゼ ( 赤色細胞 ) の c r e リコンビナーゼ非存在下において G F P を発現するよう設計した細胞への送達の結果を示す。

【図 8】図 8 は、G F P を発現することが可能なシンドビスウイルスまたは V E E V ベースのレプリコンを有する V L P s で B H K - 2 1 細胞、2 9 3 T の細胞、または N I H 3 T 3 細胞の形質導入した後の G F P の発現を示す。すべてのサンプルの 2 4 および 4 8 時間の時点を示す。

【図 9】図 9 は、V L P s へのノンコーディング R N A の機能的なパッケージングを図示する。細胞は、V E E - r e p - G F P ( G F P をコードする ) ( 図 9 A )、V E E - R e p m i G F P ( G F P のマイクロ R N A をコードする ) ( 図 9 B )、V E E R e p - G F P および V E E R e p m i G F P ( 同時形質導入 ) ( 図 9 C )、V E E R e p - G F P および V E E R e p m i G F P ( G F P 形質導入の 4 時間前に生じた m i R N A 形質導入 ) ( 図 9 D )、V E E - r e p - C r e ( m i R N A の特異性を示すためのスクランブル m i R N A の代わりに使用した ) ( 図 9 E )、V E E - R e p - G F P および V E E - R e p - C r e ( 同時形質導入 ) ( 図 9 F )、または V E E R e p - C r e ( V E E - r e p - G F P を含む V L P s での形質導入の 4 時間前の細胞のインキュベーション ) ( 図 9 G ) を含む V L P s で形質導入した。

【図 10】図 10 は、発現が同じ細胞において生じることが可能である ( H L A - D R 1 または C D 8 0 をコードする ) 2 つの異なる遺伝子を有するアルファウイルスレプリコンの略図を示す ( 図 10 A )。図 10 A に示すレプリコンを有する V L P で形質導入後、両方のタンパク質を発現する細胞のイメージは、図 10 B において提供され、H L A - D R 1 発現は F I T C ( 緑色 ) で免疫特異的な標識を用い可視化され、C D 8 0 はフィコエリトリン ( 赤色 ) で免疫特異的な標識を用い視覚化され、結合したイメージはまた、同じ細胞における共発現を図示するため示される。

【図 11】図 11 は、p D e s t 4 7 2 - V E E - M C S の略図を提供する。

【図 12】図 12 は、p D e s t 4 7 2 - V E E の略図を提供する。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0022】

標的細胞における導入遺伝子発現のための様々なアルファウイルスベースの発現ベクターが報告された(Xiong C., et al., 1989, Science 1188-91およびBredenbeek P. et al., 1993, J. Virol. 6439-46)。安全性考察のため、これらの発現システムは、通常2つのプラスミドを有する。第2のプラスミドはウイルス構造遺伝子をコードするが、1つのプラスミドはウイルスレプリコン(すなわち、非構造タンパク質)のコーディング配列および内在性プロモーターおよび導入遺伝子のコーディング領域を含む。これらのプラスミドはインビトロでmRNAを生成するのに用いられ、その後球状感染性ウイルス粒子を生成するため宿主細胞にレトロポレートした。その後、これらのウイルス粒子を導入遺伝子発現のため標的細胞に感染させるために用いる。非構造および構造ウイルスエレメントをコードするこれらのシーケンズエレメントとの間の組み換えは、生体内で有意な細胞変性効果をもたらす能力を有する複製可能なアルファウイルス粒子を産生することが可能であるので、しかしながら、これらの粒子は安全性の懸念を生じさせる。

10

## 【0023】

可能性のあるこの問題の解決策は、それが自己複製し、何ら核が関与しなくても目的の遺伝子を発現することが可能である哺乳動物細胞の細胞質にアルファウイルスレプリコンを送達するために関連のないVLPsを用いることである。これらのVLPsは、3つのベクターを用い産生されることが可能である。第1のベクターは、哺乳類プロモーター(例えばCMV)の制御下のアルファウイルスレプリコンのコーディング配列、レトロウイルス特異的RNAパッケージシグナル、および目的の遺伝子またはポリヌクレオチドを有する。遺伝子は、治療または研究用途を持つタンパク質、またはshRNAまたは他の制御核酸を発現する可能性がある。第2のベクターは、レトロウイルスgagを有する。第3のベクターは、標的細胞の感染のための適当なエンベローブ糖タンパク質を提供する。

20

## 【0024】

適切なパッケージング細胞株への同時トランスフェクションでは、第1のベクターに存在する細胞プロモーターから転写されるRNA分子は、第2のベクターから産生されるVLPsにパッケージングされる。これらのVLPsは、アルファウイルスベースのレプリコンをVLPsに存在するエンベローブ糖タンパク質に基づき標的細胞に送達することが可能である。細胞内に入ると、宿主翻訳機構は導入されたアルファウイルスRNAを翻訳し、アルファウイルス複製タンパク質を産生し、それは順にRNAを増幅し、目的の遺伝子またはポリヌクレオチドを発現する。上述したような変異体レプリコンは、宿主細胞への影響を最小限に抑えて、発現の持続時間を大幅に延長することが可能である。さらに、アルファウイルス構造要素の遺伝子をコードするDNAは標的細胞において存在しないため提案されたシステムの安全性は大幅に強化される。

30

## 【0025】

VLPsに関する組成物および説明されるVLPsを製作し使用方法は、本明細書において説明される。説明される組成物はVLPsを含み、ベクターおよび細胞を説明されるVLPsを産生するため使用した。本明細書において説明される関連した方法は、VLPsを産生する方法、VLPsを用い細胞を形質導入する方法、および本明細書において説明されるVLPsを用い標的細胞における目的のタンパク質またはポリヌクレオチドを産生する方法に関するものである。ウイルス感染の危険性のない標的細胞において目的のタンパク質またはポリヌクレオチドの発現を可能にさせるアルファウイルスベースのレプリコンはまた説明される。

40

## 【0026】

## 定義

用語「1つ」、「a」、または「an」がこの開示において用いられる場合、特に明記しない限り、それらは「少なくとも1」または「1若しくはそれ以上」を意味する。

## 【0027】

50

本明細において用いられる「融合タンパク質」という用語は、受容細胞の膜にVLPのエンベロープ由来の細胞膜の融合を誘導することが可能なタンパク質を指すように意図されている。

【0028】

「発現する」および「産生する」という用語は、同義的に本明細書において用いられ、遺伝子産物の生合成を指す。これらの用語は、RNAへの遺伝子の発現を包含する。これらの用語はまた、1若しくはそれ以上のポリペプチドへのRNAの翻訳を包含し、さらにすべての天然に産生する転写後および翻訳後の修飾を含む。抗体またはその抗原結合性フラグメントの発現または産生は、細胞の細胞質内または細胞培養の増殖培地のような細胞外環境中で起こる可能性がある。

10

【0029】

同意語として「核酸分子」、「ヌクレオチド」、または「核酸」を指す「ポリヌクレオチド」は任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、それは非修飾RNAまたはDNAまたは修飾RNAまたはDNAである可能性がある。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖または、より一般的には、二本鎖または一本鎖および二本鎖領域の混合物である可能性があるDNAおよびRNAを有する混成分子を含むが、これに限定されるものではない。これに加え、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を有する三本鎖領域を指す。ポリヌクレオチドという用語はまた、1若しくはそれ以上の修飾塩基を有するDNAまたはRNAおよび安定性または他の理由のため修飾した骨格を持つDNAまたはRNAを含む。「修飾」塩基は、例えば、イノシンのようなトリチル化塩基および異常塩基を含む。様々な修飾は、DNAおよびRNAになされる可能性があり、このように「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特有のDNAおよびRNAの化学形態だけでなく、典型的に天然に認められるような、化学的に、酵素的に、または代謝的に修飾されたポリヌクレオチドの形態を含む。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる比較的短い核酸鎖を含む。

20

【0030】

本明細において用いられる「レプリコン」は、そのシーケンスの複製を促進するのに必要な遺伝因子を有するリヌクレオチドを指し、また、翻訳を成し遂げることが可能である。

30

【0031】

本明細において用いられる「ウイルス様粒子」(VLP)は、ウイルス粒子に類似している構造を指す。好ましい実施形態において、VLPは、粒子の表面に提示される少なくとも1つの融合タンパク質を有する。本発明に基づくウイルス様粒子は、ウイルスゲノムの複製コンポーネントの全てまたは一部が欠損している。一般的に、本発明に基づくウイルス様粒子は、ウイルス様粒子のタンパク質をコードする遺伝情報を運搬しない。

【0032】

ベクター

アルファウイルス構造タンパク質をコードしないアルファウイルスベースのレプリコンを運搬するVLPsを産生するのに用いられるベクターは、本明細書において説明される。このようなVLPsを産生するために、いくつかのコンポーネントは、インビトロでの産生のために細胞株にこれらのコンポーネントをコードする1若しくはそれ以上のベクターをトランスフェクションまたはヌクレオフェクションすることにより産生される可能性がある。いくつかの実施形態において、これらのコンポーネントは、結果として生じるVLPが複製能を有する可能性を下げるために、別々のベクターによりコードされる。例えば、1つのベクターがVLPによりパッケージングされるようにシンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質をコードするRNAポリヌクレオチドのような遺伝物質をコードし、別のベクターがgagタンパク質のようなVLPの構造タンパク質をコードし、さらに別のベクターが標的細胞の膜にVLPの融合を促進するためにVSV-Gのような

40

50

融合タンパク質をコードするマルチベクターシステムが用いられる可能性がある。

【 0 0 3 3 】

選択可能または誘導可能なプラスミドのような宿主細胞によりパッケージされる遺伝物質をコードするベクターは様々な形をとることが可能であるが、いくつかの共通の特徴を有する。例えば、本明細書において説明されるRNAアルファウイルスベースのレプリコンをコードするベクターは、プロモーター配列、レトロウイルスのパッケージングシグナル配列、翻訳開始配列、非構造アルファウイルスタンパク質、目的の遺伝子またはポリヌクレオチドを挿入するためのクロニングサイト、挿入された目的の遺伝子またはポリヌクレオチド、3'末端の非翻訳領域、およびポリアデノシン鎖セグメントを含む可能性がある。

10

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、ベクターのセグメントが宿主細胞により転写されるのを可能にさせるプロモーター要素を含む。いくつかの実施形態において、ベクター配列は、VLPにパッケージングされるRNAに転写される可能性がある。説明されるベクターの大部分の実施形態において、プロモーター配列は、ベクター中に含まれる翻訳可能な要素の全ての上流に位置する（例えば、サイトメガロウイルスプロモーター「pCMV」の位置を図示している図1(a)を参照）。本明細書において説明されるいくつかの実施形態において、プロモーター配列はサイトメガロウイルス(CMV)またはシミアンウイルス40(SV40)のようなウイルスに由来する。多数の他のプロモーター配列は当業者には周知であり、本明細書において説明されるベクターでのそれらの使用は提供される説明に基づき明らかである。

20

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態において、宿主細胞によりパッケージングされる遺伝物質をコードする説明されるベクターは、ベクターから転写された1または2コピーのRNA配列が、宿主細胞で形成されるVLP粒子にパッケージされるのを可能にさせるためにレトロウイルスのパッケージングシグナル配列（別名プサイ( )因子）をコードするポリヌクレオチド配列を含むことが可能である。全てではないが、ほとんどのレトロウイルスはこの天然のパッケージングシークエンスを有し、従って、これらのシークエンスが説明されるベクターへ組み込まれることは当業者にとってすぐに明らかである。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、ラウス肉腫ウイルス、モロニー Maus 白血病ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)、HIV、ヒトTリンパ球向性ウイルス、などに由来するレトロウイルスのパッケージング配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、レトロウイルスのパッケージング配列は、ラウス肉腫ウイルスに由来する。あるいは、レトロウイルスのパッケージング配列は、マウス白血病ウイルスに由来する。

30

【 0 0 3 6 】

本明細書において説明される宿主細胞によりパッケージングされる遺伝物質をコードするベクターの別の態様は、翻訳開始配列であり、宿主細胞において翻訳されるベクターによりRNA配列がコードされるのを可能にする。いくつかの実施形態において、説明される翻訳開始配列は、アルファウイルスベースの非構造タンパク質の発現を可能にさせることが可能である可能性があり、それが宿主細胞に送達されると、それは説明されるVLPsにより運搬されるRNA配列を複製することが可能である。いくつかの実施形態において、説明される翻訳開始配列は、目的の遺伝子の発現を可能にさせることが可能である可能性がある。いくつかの実施形態において、翻訳開始配列は、目的の遺伝子が宿主細胞翻訳複合体により翻訳されることを可能にさせる可能性がある。いくつかの実施形態において、本明細書において説明される翻訳開始配列は、シンドビスウイルスまたはVEEVのようなアルファウイルスに由来する可能性がある。他の実施形態において、翻訳開始配列は、哺乳類の翻訳複合体によりRNA配列の翻訳を開始することが可能である翻訳開始配列を有することが知られているウイルス遺伝子のような他の遺伝子に由来する可能性がある。あるいは、翻訳開始配列は、説明されるアルファウイルスレプリコンに挿入される目

40

50

的の遺伝子の天然の翻訳開始配列のような他の遺伝子に由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、本明細書において説明される翻訳開始配列は、パッケージングされたRNA分子の中に複数個所存在する可能性があり、このように説明されるベクターにより1若しくはそれ以上の回数、コードされる可能性がある。例えば、パッケージRNA分子によりコードされる目的の遺伝子とは別に説明されるシンドビスまたはVEEV非構造タンパク質を翻訳することが望ましい可能性がある。このような例においては、非構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは両方、ベクターおよびパッケージングされたRNAにおいて、それらの配置の5'末端に位置する別々の翻訳開始配列を有する。この説明に基づいて、当業者は、哺乳動物細胞でRNAの翻訳を促進させることが可能な様々な翻訳開始配列が本明細書において説明される記載したVLPパッケージングRNAに包含される可能性があることを理解するであろう。

10

#### 【0037】

宿主細胞によりパッケージングされるための遺伝物質をコードするベクターはまた、シンドビスウイルスまたはVEEV由来の非構造タンパク質のような非構造アルファウイルスタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。例えば、いくつかの実施形態において、説明されるベクターは1若しくはそれ以上のシンドビスウイルス非構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、1若しくはそれ以上のVEEV非構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP1をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP2をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP3をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP4をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP1、NSP2、NSP3、およびNSP4をコードするポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、アルファ

20

30

#### 【0038】

宿主細胞によりパッケージングされるための遺伝物質を取り込むために本明細書において説明されるベクターはまた、ベクターによりコードされる遺伝物質を運搬するVLPにより形質導入される宿主細胞において発現される可能性のある目的のポリヌクレオチドを含む可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるベクターはVLPにパッケージングされるRNAポリヌクレオチド配列をコードする可能性があり、その後、それは細胞のVLP介在性の形質導入により宿主細胞に送達されることが可能である。RNAポリヌクレオチド配列が標的細胞に送達されると、RNAによりコードされる目的のポリヌクレオチドは目的のタンパク質の発現を提供する可能性がある。したがって、本明細書において説明されるベクターは、標的細胞内に入ると目的の遺伝子を発現することが可能なVLPへのパッケージングのためのRNAをコードするよう設計される。したがって、いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、目的のポリヌクレオチド配列を含む。説明されるベクターのいくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、目的のタンパク質をコードする可能性がある。例えば、目的のポリヌクレオチド配列は、

40

50

いくつかの実施形態において G F P をコードする可能性があり、標的細胞のウイルス形質導入の検出可能なマーカーの役目を果たす可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞の内在性タンパク質の機能的なバージョンをコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象の内在性タンパク質の機能的なバージョンをコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞にとって異質であるタンパク質をコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象にとって異質であるタンパク質をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞に治療効果を有することが可能なタンパク質をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象に治療効果を有することが可能なタンパク質をコードする可能性がある。他の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、RNA 干渉分子として働き、宿主細胞で内在性遺伝子発現を制御する働きをする可能性がある。例えば、いくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、RNA 干渉を開始するための RNA ヘアピンループの形成を提供する配列を有する可能性がある。これに加えて、目的のポリヌクレオチドは、パッケージングされた RNA 分子によりコードされるアルファウイルス非構造タンパク質により形成される RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体により転写されることが可能である RNA のプラスまたはマイナス鎖である可能性がある。この RNA 依存性 RNA ポリメラーゼはプラス鎖およびマイナス鎖方向において RNA を転写することが可能であるため、miRNA または shRNA のような RNA 干渉する配列はパッケージングされた RNA レプリコンに挿入される可能性があり、干渉するポリヌクレオチドをどちらの方向にでもコードするよう設計されることが可能である。それが対象において選択したタンパク質の発現を可能にさせることが可能であるため、当業者は、説明される形質導入システムのこの態様の治療的な特徴を正当に評価するであろう。説明されるベクターのこの態様に基づいて、目的のポリヌクレオチド配列の挿入を容易にするために、1 若しくはそれ以上の制限酵素サイトを有するクローニングサイトはまた、ベクターに含まれる可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0039】

本明細書において説明される VLP の産生に有用な別のベクターは、ウイルス構造タンパク質をコードするベクターである。そのような種類のタンパク質の 1 つは、レトロウイルスの群特異抗原 (gag) タンパク質である。gag タンパク質はレトロウイルスのコア構造タンパク質であり、いくつかの例で、真核細胞で発現する場合、エンベロープを有するウイルスコアを形成することが可能である。それらは粒子の基本的な構造面を形成することが可能であり、レトロウイルスのパッケージングシグナル配列と関連した RNA をパッケージングを可能にさせることが可能であるので、この特性は gag タンパク質を特に VLP の産生に有用なものにする。したがって、レトロウイルスの gag タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、本明細書において説明される。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、レトロウイルス gag タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび gag 遺伝子配列が宿主細胞 RNA ポリメラーゼにより mRNA に転写を可能にさせるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む。1 実施形態において、プロモーターポリヌクレオチド配列は、SV40 または CMV のようなウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、ベクターはさらに、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。従来の当業者は、任意のレトロウイルス由来の gag タンパク質のポリヌクレオチド配列がベクターおよび本明細書において説明される VLP を産生するのに用いられる可能性があることを理解するであろう。いくつかの実施形態において、gag タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、ラウス肉腫ウイルスに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、gag タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、マウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、gag タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、SIV に由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、gag タンパク質をコードするポリヌ

レオチド配列は、ヒトTリンパ球向性ウイルスに由来する可能性がある。

【0040】

本明細書において説明されるVLPsの産生に有用な別のベクターは、VLPエンベロープと宿主細胞との間で融合を仲介するタンパク質をコードするベクターである。この目的の場合の適当なタンパク質の種類はウイルス融合タンパク質であり、それはエンベロープウイルスをその膜と宿主細胞のそれとを融合させることにより細胞のウイルス感染を促進する。ウイルス融合タンパク質の多くはまた、選択した細胞型のターゲティングを可能にさせる可能性のある細胞受容体タンパク質であることが知られており、またはそれが疑われており、または、インフルエンザウイルスのためのシアル酸のような、より遍在する受容体の場合には、より全般的なターゲティングが要求される可能性がある。いくつかの例において、ウイルス融合タンパク質は、ウイルス付着タンパク質、細胞受容体のリガンド、細胞リガンドの受容体、または付属タンパク質とともに連動して働き、従って、このようなタンパク質はまた、説明されるベクターによりコードされる可能性があり、加えて、また、ウイルス融合タンパク質をコードするベクターによりコードされる可能性がある。あるいは、いくつかの実施形態において、望ましい細胞型にVLPのターゲティングを促進、または命令する、別のウイルスのウイルス付着タンパク質、細胞受容体のリガンド、細胞リガンドの受容体、または付属タンパク質と共に1つのウイルス由来のウイルス融合タンパク質は、説明されるベクターによりコードされる可能性がある。いくつかの実施形態において、ウイルス融合タンパク質、ウイルス付着タンパク質、細胞受容体のリガンド、細胞リガンドの受容体、または付属タンパク質は1型膜タンパク質であり、細胞表面に存在する場合、それはタンパク質の細胞外領域を細胞外に配向させる。これはまた、融合タンパク質が、パッケージング細胞からのVLPの出芽後、正しい位置に配向させることを可能にさせる。細胞におけるそのようなタンパク質の発現は一般的にタンパク質で被覆されている細胞表面をもたらし、そのため、細胞膜の任意の部分からのVLPの出芽はその表面でVLPにある程度のタンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、ウイルス融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび融合タンパク質遺伝子配列が宿主細胞RNAポリメラーゼによりmRNAに翻訳されるのを可能にさせるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む。1実施形態において、プロモーターポリヌクレオチド配列は、SV40またはCMVのようなウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、説明されるベクターは、ウイルス付着タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび付着タンパク質遺伝子配列が宿主細胞RNAポリメラーゼによりmRNAに翻訳されるのを可能にさせるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む。1実施形態において、プロモーターポリヌクレオチド配列は、SV40またはCMVのようなウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、インフルエンザノイラミニダーゼタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるベクターは、ロタウイルスVP7タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。その他のそのような融合タンパク質は、望ましい親和性または関連するウイルスの細胞標的に基づく当業者にとって明らかである。

【0041】

説明されるベクターを発現している細胞

説明されるベクターを有するVLPsを産生するための細胞は、本明細書において提供される。これらの細胞は、ベクターのポリヌクレオチドを転写または発現することにより本明細書において説明されるVLPsを産生するのに用いられる可能性がある。例えば、目的の遺伝子またはポリヌクレオチドおよびパッケージングシグナルを有するアルファウ

10

20

30

40

50

イルスRNAコンストラクトをコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、レトロウイルスのgagタンパク質をコードするベクター、およびウイルス融合タンパク質をコードするベクターをトランスフェクトした哺乳動物細胞は、VLPの中に包まれた1または2コピーのコードされたアルファウイルスRNAコンストラクトで、その表面上に発現したウイルス融合タンパク質を有するVLPを産生することが可能であった。さらにまた、これらのベクターの何れもアルファウイルス構造タンパク質をコードしないので、伝染性ウイルスを作り出す可能性はアルファウイルス構造タンパク質を含むシステムと比較して大幅に減少する。

#### 【0042】

説明される細胞は、翻訳することが可能である任意の真核細胞である可能性があり、(gagおよび融合タンパク質の場合のような)必要に応じ、説明されるベクターのポリヌクレオチドを転写する。多くの実施形態において、細胞はおそらく哺乳動物細胞である。例えば、マウス、ハムスター(CHOまたはBHK-21)、またはラット細胞のような齧歯動物の細胞は、説明されるベクターを発現させるのに用いられることが可能であり、メイディンダービー腎臓細胞のようなイヌ細胞は、説明されるベクターを発現するのに用いることが可能であり、ペロ細胞のような霊長類細胞は、説明されるベクターを発現するのに用いることが可能であり、HEK293T細胞(ヒト腎臓)、Hep-2細胞(ヒト気道)、Caco-2(腸)、Hela(上皮)、および当技術分野で既知であるその他のそのような細胞株のようなヒト細胞は、説明されるベクターを発現するのに用いることが可能であった。いくつかの実施形態において、説明される細胞は、当技術分野で既知である標準的なトランスフェクションおよび選択方法を用いてトランスフェクトし、選択することが可能であり、説明されるベクターの1若しくはそれ以上を安定して有する。

#### 【0043】

いくつかの実施形態において、本明細書において説明される細胞株は、アルファウイルスレプリコンが目的のタンパク質をコードするアルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、gagタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、および異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するベクターを含み、ベクターも細胞もアルファウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルスまたはVEEVに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、アルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、およびレトロウイルスのパッケージングシグナルをコードするポリヌクレオチド配列を有する可能性がある。いくつかの実施形態において、レトロウイルスのパッケージングシグナルは、ラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、gagタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、ラウス肉腫ウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、VSV-Gをコードする。

#### 【0044】

##### ウイルス様粒子

ベクターおよび細胞を用い産生させたVLPsはまた、本明細書において説明される。本明細書において説明されるVLPsは、4つの一般的な特徴を有し、それらはアルファウイルスレプリコンをコードする1つまたは2つのRNA分子、および任意に目的のタンパク質を有し、それらはレトロウイルスのgagタンパク質、または、いくつかの実施形態において、gag融合タンパク質を有するウイルスコアを有し、それらは細胞で融合を促進するために表面タンパク質を有し、それらはアルファウイルス構造タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含まない。

#### 【0045】

本明細書において説明されるVLPsは、その中の目的のタンパク質を発現するために細胞を形質導入するのに有用である。したがって、説明されるVLPsは、目的のタンバ

10

20

30

40

50

ク質をコードすることが可能な1つまたは2つのアルファウイルススペースのRNAポリヌクレオチドを包含する可能性がある。RNA配列の翻訳を促進するために、本明細書において解説されるように、説明されるパッケージングされたRNAのいくつかの実施形態は翻訳開始配列を含む可能性がある。いくつかの実施形態において、VLPに取り込まれるRNA配列は、形成されるVLPにRNAの包含を促進するレトロウイルスのパッケージング配列を含む。いくつかの実施形態において、レトロウイルスのパッケージング配列は、ラウス肉腫ウイルス、モロニー Maus 白血病ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)、HIV、ヒトTリンパ球向性ウイルスなどに由来する。特定の実施形態において、レトロウイルスのパッケージング配列は、ラウス肉腫ウイルスに由来する。あるいは、レトロウイルスのパッケージング配列は、マウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。これに加えて、VLPに含まれるRNA配列は、非構造アルファウイルスタンパク質をコードすることが可能である可能性がある。例えば、いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、1若しくはそれ以上のシンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP1をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP2をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP3をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP4をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、パッケージングされたRNAは、シンドビスウイルスまたはVEEV非構造タンパク質NSP1、NSP2、NSP3、およびNSP4をコードする可能性がある。パッケージングされたRNAはまた、目的のタンパク質のポリヌクレオチド配列を含む可能性がある。例えば、目的のポリヌクレオチド配列は、いくつかの実施形態においてGFPをコードする可能性があり、標的細胞のウイルス形質導入の検出可能なマーカーの役割を果たす可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞の内在性タンパク質の機能的なバージョンをコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象の内在性タンパク質の機能的なバージョンをコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞にとって異質であるタンパク質をコードする可能性がある。別の実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象にとって異質であるタンパク質をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的細胞に治療効果を有することが可能なタンパク質をコードする可能性がある。いくつかの実施形態において、目的のポリヌクレオチド配列は、標的対象に治療効果を有することが可能であるタンパク質をコードする可能性がある。それらが細胞または対象において選択したタンパク質の発現を可能にさせることが可能であるため、当業者は、説明されるVLPsのこの態様の治療的な特徴を正当に評価するであろう。

#### 【0046】

説明されるVLPsはまた、ウイルスコア構造を粒子に提供するために、ウイルスgagタンパク質を有する可能性がある。真核細胞で発現される場合、gagタンパク質はレトロウイルスのコア構造タンパク質であり、いくつかの実施形態において、エンベロープを有するウイルスコアを形成することが可能である。それらが粒子の基本的な構造面を形成することが可能であり、レトロウイルスのパッケージングシグナル配列と関連したRNAをパッケージングすることを可能にさせることが可能であるので、この特性はgagタンパク質を特にVLPsの産生に有用なものにする。従来の当業者は、任意のレトロウイルス由来のgagタンパク質は、本明細書において説明されるベクターおよびVLPsを産生するのに用いられる可能性があるものと理解するであろう。いくつかの実施形態において、gagタンパク質は、ラウス肉腫ウイルスに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、gagタンパク質は、マウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。

他の実施形態において、g a g タンパク質は、S I V、H I V、ヒトTリンパ球向性ウイルス、または類似したレトロウイルスに由来する可能性がある。

【0047】

本明細書において説明されるV L P sの別のコンポーネントは、V L Pエンベロープと宿主細胞との間で融合を仲介するタンパク質である。この目的の場合の適当なタンパク質の種類はウイルス融合タンパク質であり、それはエンベロープウイルスをその膜と宿主細胞のそれとを融合させることにより細胞のウイルス感染を促進する。ウイルス融合タンパク質の多くはまた、選択した細胞型のターゲティングを可能にさせる可能性のある細胞受容体タンパク質であることが分かっていたか、疑わしかった、または、インフルエンザウイルスのためのシアル酸のような、より遍在する受容体の場合には、より全般的なターゲティングが達成される可能性がある。いくつかの例において、ウイルス融合タンパク質は、ウイルス付着タンパク質、細胞受容体のリガンド、細胞リガンドの受容体、または付属タンパク質とともに連動して働く可能性があり、従って、このようなタンパク質はまた、ウイルス融合タンパク質に加えてV L P表面に存在する可能性がある。あるいは、いくつかの実施形態において、説明されるV L P sは、望ましい細胞型にV L Pのターゲティングを促進、または命令する、1つのウイルス由来のウイルス融合タンパク質および別のウイルスのウイルス付着タンパク質、細胞受容体のリガンド、細胞リガンドの受容体、または付属タンパク質を有する可能性がある。同様に、これは選択した様々な細胞型に融合を促進する可能性があるため、説明されるV L P sはV L Pエンベロープにおいて1以上の融合タンパク質を有するよう産生される可能性がある。いくつかの実施形態において、V L P表面タンパク質は1型膜タンパク質であり、細胞表面に存在する場合、それはタンパク質の細胞外領域を細胞外に配向させることを可能にさせる。これはまた、融合タンパク質が、パッケージング細胞からのV L Pの出芽後、正しい位置に配向させることを可能にさせる。細胞におけるそのようなタンパク質の発現は一般的にタンパク質で被覆されている細胞表面をもたらす、そのため、細胞膜の任意の部分からのV L Pの出芽はその表面でV L Pにある程度の融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるV L P sは、細胞融合を仲介する水疱性口内炎ウイルスGタンパク質(V S V - G)を含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるV L P sは、細胞融合を仲介するインフルエンザヘマグルチニンタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるV L P sは、細胞融合を促進するために、インフルエンザノイラミニダーゼタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるV L P sは、呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるV L P sは、ロタウイルスV P 7タンパク質を含む。他のそのような融合タンパク質は、望ましい親和性または関連するウイルスの細胞標的に基づく当業者にとって明らかである。

【0048】

本明細書において説明されるV L P sは、アルファウイルスレプリコンを有する可能性があり、そこでアルファウイルスレプリコンは目的のポリヌクレオチドを含む、または目的のタンパク質、レトロウイルスのg a g タンパク質、および異種融合エンベロープタンパク質をコードし、そこでV L Pはアルファウイルス構造タンパク質遺伝子を含まない。いくつかの実施形態において、V L Pのアルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルスまたはV E E Vに由来する。例えば、本明細書において説明されるV L P sは、シンドビスウイルスまたはV E E V非構造タンパク質N S P 1、N S P 2、N S P 3、およびN S P 4をコードするアルファウイルスレプリコンを有する可能性がある。いくつかの実施形態において、説明されるV L P sのパッケージングされたR N Aと関連したレトロウイルスのパッケージングシグナルは、ラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来する。この説明に基づき、当業者は、説明されるV L P sがV L P安定性、R N Aパッケージング、または細胞侵入を促進する可能性のあるウイルスの面を取り込むために修飾される可能性があることは容易に理解するであろう。そのような修飾は、本明細書において提供されている開示の範囲内であると理解すべきである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 9 】

## 説明される V L P s を産生する方法

本明細書において説明される V L P s は様々な方法で産生される可能性があり、そのことは提供された開示に基づく当業者にとって明らかである。これらの様々な方法の共通性は、必要なタンパク質（g a g および融合タンパク質）を発現し、アルファウイルスベースの R N A レプリコンを産生することが可能な細胞における、説明されるベクターの発現である。したがって、本明細書において説明される V L P を産生する方法は、アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、そこでアルファウイルスレプリコンは目的のポリヌクレオチドを含む、または目的のタンパク質をコードし、レトロウイルスの g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するベクター、および異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するベクターで真核細胞を同時形質転換する工程、トランスフェクトする工程、またはヌクレオフェクトする工程、および各々のベクターがそのコードする産物の産生を生じさせる適当な条件下で同時形質転換した細胞を培養する工程、それによりウイルス様粒子を産生する工程を含む可能性がある。いくつかの実施形態において、アルファウイルスレプリコンをコードするポリヌクレオチド配列は、シンドビスウイルスまたは V E E V に由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、アルファウイルスレプリコンは、シンドビスウイルスまたは V E E V 非構造タンパク質 N S P 1、N S P 2、N S P 3、N S P 4、およびレトロウイルスのパッケージングシグナルをコードするポリヌクレオチド配列を有する可能性がある。いくつかの実施形態において、レトロウイルスのパッケージングシグナルは、ラウス肉腫ウイルスまたはマウス白血病ウイルスに由来する可能性がある。いくつかの実施形態において、g a g タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、ラウス肉腫ウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、異種融合エンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、V S V - G をコードする。

10

20

## 【 0 0 5 0 】

## 組成物および投与の方法

少なくとも 1 つの説明される V L P および薬理学的に許容可能なキャリアーを有する組成物は、本明細書において説明される。そのような組成物は、例えば、外来性タンパク質の発現、または対象と同じ種のそれらにおいて通常認められるタンパク質の発現の増加が必要な対象への投与に有用である。組成物は、当技術分野で周知であり適当である、本明細書において説明され例示されるそれらを含む、任意の様々な調製物として製剤される可能性がある。いくつかの実施形態において、組成物は水性製剤である。水溶液は、水または適当な生理バッファに V L P s を混合すること、要望通り任意に適当な着色剤、香味料、防腐剤、安定化剤、および増粘剤などを加えることにより準備される可能性がある。水性懸濁液はまた、天然または合成ゴム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および他の既知の懸濁化剤のような粘着性物質を加えた水または生理バッファにおいて V L P s を分散させることにより作成される可能性がある。

30

## 【 0 0 5 1 】

組成物は、対象への注射のために製剤される可能性がある。注射の場合、説明される組成物は、水のような水溶液で、または、ハンクス溶液、リンガー溶液、または生理的食塩水バッファのような生理的に相溶性のあるバッファで製剤される可能性がある。溶液は、懸濁化剤、安定化剤、分散剤のような 1 若しくはそれ以上の調合剤を含む可能性がある。例えば、使用前に、滅菌水、食塩液、またはアルコールのような適当な媒体のある状態により、注射製剤はまた、使用直前に注射に適切な液状調製物に変換させる目的で固形調製物として調合される可能性がある。

40

## 【 0 0 5 2 】

組成物は、対象への噴霧による送達のために製剤される可能性がある。噴霧による送達の場合、説明される組成物は、水のような水溶液で、またはハンクス溶液、リンガー溶液、または生理的食塩水バッファのような生理的に相溶性のあるバッファで製剤される可能性がある。溶液は、懸濁化剤、安定化剤、分散剤のような 1 若しくはそれ以上の調合剤を

50

含む可能性がある。

【0053】

組成物は、持続放出性または持効性製剤で製剤される可能性がある。そのような長時間作用性の製剤は、（例えば皮下または筋肉内に）移植により投与される可能性がある。つまり、例えば、組成物は適当な高分子または疎水性材料（例えば、許容可能な油中におけるエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂、または難溶性誘導体として、例として、難溶性塩として製剤される可能性がある。リボソームおよびエマルジョン類は、疎水性薬物のためのキャリアーとして使用に適している送達担体の既知の例である。

【0054】

以下の実施例は例示を目的として提供され、先行する開示を強化し、制限しないことが意図されている。

【実施例1】

【0055】

アルファウイルスベースの遺伝子発現システムの産生

アルファウイルス遺伝子発現システムは、標的細胞に細胞変性ウイルス感染を引き起こす危険性の低い外来性の目的の遺伝子（GOI）または目的のタンパク質（POI）のVLP介在性送達を可能にするよう設計される。発現システムは3つのベクターを用いて設計され、それは形質導入するVLPを産生するためにパッケージング細胞株において発現することが可能である。1つのベクターはアルファウイルスベースの発現コンストラクトをコードし、別のベクターはVLP形成を促進するレトロウイルスのgagタンパク質をコードし、および第3のベクターは宿主細胞にVLP融合を仲介する融合タンパク質をコードする。これに加え、本システムは、存在するアルファウイルス構造タンパク質を必要とせずに働くよう構築される。

【0056】

これを達成するため、アルファウイルスベースのDNAプラスミドは、サイトメガロウイルスプロモーター（CMV）、後にそれぞれのレトロウイルスのパッケージングタンパク質GAGのレトロウイルスのパッケージングシグナルが続き、後に非構造タンパク質NSP1、NSP2、NSP3、およびNSP4をコードするシンデビスまたはVEEウイルス遺伝子が続き、そして最後に目的の遺伝子（GOI）の発現を誘導する、1若しくはそれ以上のサブゲノムプロモーター（SGP；ウイルスにコードされたRNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーターで、結果的にmRNAの形成をもたらす。）を有するよう産生し、組み換え型ポリヌクレオチドから成り、複数のクローニングサイト、3'非翻訳領域（URT）、およびポリA鎖に挿入される。図2は、そのようなアルファウイルスベースのDNAプラスミドの例を示す。この発現ベクターの別のバージョンにおいて、レトロウイルスのパッケージングシグナル（GAG）は省略される。

【0057】

別のプラスミドは、レトロウイルスのgagタンパク質および第2の、任意の目的のタンパク質（POI）をコードするよう構築した。第3のプラスミドは、VSV-Gウイルス融合タンパク質の発現を提供するために構築した。これらのプラスミドの実施形態の概略図は、それぞれ図1A～1Cにおいて提供する。図1AはpCMV-SinRep-POI-2を示し、図1BはpGAG-POI-1を示し、および図1CはVSV-GのpEnvを示す。

【0058】

構築されたプラスミドは、目的の遺伝子を有するシンデビスウイルスレプリコンを運搬するVLPsを産生する能力をテストした。これらの実験のために、緑色蛍光タンパク質（GFP）が、遺伝子の送達および細胞内発現の検出を容易にするために、目的の遺伝子として用いられた。VLPsを産生するために、上述の3つのプラスミドの各々は、メーカーの使用説明書（Lonza）に従い、Amaxaシステムで標準的なヌクレオフェクション手順を用いてベビーハムスター腎臓（BHK-21）細胞にトランスフェクトした（図3）。

10

20

30

40

50

## 【0059】

簡潔に説明すると、 $3 \times 10^6$ のBHK-21細胞を、 $100 \mu\text{l}$ ヌクレオフェクション溶液L (Amaxa)中に再懸濁し、(総量 $10 \mu\text{l}$ において)GAGをコードするプラスミド $4.5 \mu\text{g}$ 、VSV-G糖タンパク質をコードするプラスミド $3 \mu\text{g}$ 、およびシンドビスアルファウイルスレプリコンをコードする $100$ ナノグラムのプラスミドまたはVEEレプリコンの $2.5$ マイクログラムを含むチューブに移した。細胞およびプラスミドの混合物をヌクレオフェクションキュベットに移し、BHK-21のセッティングを用いAmaxa nucleofector II装置を用いてヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクトした細胞を完全培養液 $500 \mu\text{l}$ に再懸濁し、培養液を含んだ組織培養プレートに移し、 $37^\circ\text{C}$ で $72 \sim 96$ 時間、または $32^\circ\text{C}$ で $72$ 時間インキュベートした。それ以降、VLPsおよびカプシドで包まれたアルファウイルスレプリコンから成る上清を、 $4^\circ\text{C}$ で $3000 \text{ RPM} / 10$ 分での遠心分離により澄まし、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過し、室温で $30$ 分間、 $10 \text{ Unit}$ のDNase I (turboTM-DNase (Ambion))に曝した。処理したVLPsは $4^\circ\text{C}$ に保存またはドライアイス上で凍結させ $-80^\circ\text{C}$ に移動した。(融合に欠陥があるVLPs)ネガティブコントロールとして、BHK-21細胞はまた、pCMV-Sin Rep-POI-2のみ、またはVEEV-Rep-POIおよびpGAG-POI-1プラスミドでヌクレオフェクトしたが、VSV-GをコードするpEnvelopeプラスミドはしなかった。トランスフェクションの後、VLPsのプラスミド由来の産生を可能にさせるため、細胞を組織培養液において通常の増殖条件下で $48 \sim 72$ 時間インキュベートした。トランスフェクトした細胞のインキュベートを終了させ、産生した任意のVLPsを含む組織培養上清を回収した。その後、回収した細胞上清は、細胞がGFPでうまく形質導入されることが可能であったかどうか同定するため、培養BHK-21細胞に加えた。図4で示すように、全3つのプラスミドでトランスフェクトしたBHK-21細胞から回収した細胞上清をトランスフェクトしなかったBHK-21細胞に曝した場合、強いGFP発現を示す結果となった(図4A)。反対に、pCMV-Sin Rep-POI-2およびpGAG-POI-1プラスミドのみでトランスフェクトしたBHK-21細胞から回収した細胞上清とともにインキュベートしたトランスフェクトしなかったBHK-21細胞についてはGFP発現は観察されなかった(図4B)。類似した実験はまた、構築したVLPsがヒト細胞を形質導入することが可能であることを実証するためにヒト胚腎臓(HEK293T)細胞を用いて行われた(図4C)。さらにまた、構築したVLPsはまた、細胞を形質導入する能力を失うことなく、少なくとも $30$ 日間 $4^\circ\text{C}$ に保存することが可能である(図5A~5D)。

## 【0060】

実験はまた、細胞においてタンパク質を発現するVEEVベースのアルファウイルスレプリコンの能力を評価するため行った。これらの研究のために、BHK-21細胞をVEEVレプリコンに挿入したガウシアルシフェラーゼ遺伝子を有するVLPsで形質導入した。形質導入の後、細胞上清のルシフェラーゼタンパク質の発現をモニターした。図6で示すように、外来性遺伝子のない(条件1)またはGFPをコードする遺伝子を持つ(条件2および3)コントロールVEEVレプリコンと比較して、ガウシアルシフェラーゼ遺伝子を有するVEEVレプリコンで形質導入した細胞(図6A、条件4)の上清において高いルシフェラーゼ量を検出した。その上、ルシフェラーゼタンパク質の発現は、形質導入の後、急速に増加した(図6B)。類似した結果はまた、機能的なcreリコンビナーゼ(赤色細胞)をcreリコンビナーゼ非存在下において、GFPを発現するよう設計した細胞に送達する状況において観察された(図7B)。

## 【0061】

細胞は、GFPをコードするシンドビスベースのVLPsまたはGFPをコードするVEEVベースのVLPsと同時に形質導入した。図8で示すように、VEEVベースのVLPsで形質導入した細胞がより高い発現レベルを有することが観察されるが、両方のアルファウイルスベースのVLPsは強いGFP発現を引き起こした(図8)。

## 【実施例 2】

## 【0062】

V E E アルファウイルスレプリコンにより発現させた m i R N A はタンパク質産生を抑制する

実験は、m i R N A 配列をコードするアルファウイルスレプリコンがタンパク質産生を抑制することが可能であったかどうか評価するために行った。これを評価するために、B H K - 2 1 細胞を G F P、G F P に特異的な m i R N A、または c r e リコンビナーゼをコードする V L P レプリコンで形質導入した（図 9）。（下の図 1 1 および 1 2、および表 1 における配列 I D 番号 1 において示されるベクターを参照。）G F P をコードするレプリコンのみで形質導入した細胞と比較して、G F P 発現は、細胞を最初に G F P のための m i R N A をコードするレプリコンで形質導入し、その後、続いて（最初の形質導入の 4 時間後）G F P をコードするレプリコンで形質導入した場合、顕著に減少した（図 9 A を図 9 D と比較）。反対に、細胞を最初に c r e リコンビナーゼをコードするレプリコンで形質導入し、その後、（最初の形質導入の 4 時間後）G F P をコードするレプリコンで形質導入した場合、G F P 発現の有意な減少は認められなかった（図 9 G）。

10

## 【実施例 3】

## 【0063】

V E E V L P s で形質導入した標的細胞における複数のタンパク質の発現

アルファウイルスレプリコンが同じ細胞で 2 つの別々のタンパク質を発現することが可能かどうか判断するために、1 つのサブゲノムプロモーターの制御下に H L A - D R 1 および別のサブゲノムプロモーター下に C D 8 0 を有する V E E レプリコンを用い実験を行った（図 1 0 A）。説明される V E E レプリコンを有する V L P s の産生の後、細胞を形質導入し、両方のタンパク質の発現を解析した。図 1 0 B で示すように、形質導入した細胞は両方のタンパク質を発現することが可能であった（免疫標識された H L A - D R 1 は緑色（F I T C）で示され、C D 8 0 は赤色（フィコエリトリン）で示される）。

20

## 【0064】

【表 1】

表 1 : 配列 I D 番号 1

1	gacggatcgg	gagatctccc	gatccccctat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	
61	ccgcatagtt	aagccagtat	ctgctccctg	cttgtgtgtt	ggaggctcgt	gagtagtgcg	
121	cgagcaaaat	ttaagctaca	acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	
181	ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	
241	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	
301	tggagttccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggccccgc	tggctgaccg	cccaacgacc	10
361	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	
421	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	aaactgccc	cttggcagta	catcaagtgt	
481	atcatatgcc	aagtagcccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	
541	atgccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	
601	tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	
661	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	
721	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	
781	gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctcg	tatggacata	ttgtcgttag	
841	aacgcggcta	caattaatac	ataaccttat	gtatcataca	catacgattt	aggggacact	20
901	atagattgac	ggcgtagtac	acactattga	atcaaacagc	cgaccaattg	cactaccatc	
961	acaatggaga	agccagtagt	aaacgtagac	gtagaccccc	agagtccggt	tgtcgtgcaa	
1021	ctgcaaaaaa	gcttcccgca	atttgaggta	gtagcacagc	aggtcactcc	aaatgaccat	
1081	gctaattgcca	gagcattttc	gcctctggcc	agtaaaactaa	tcgagctgga	ggttcctacc	
1141	acagcgacga	tcttggacat	aggcagcgca	ccggctcgta	gaatgttttc	cgagcaccag	
1201	tatcattgtg	tctgccccat	gcgtagtcca	gaagaccggg	accgcatgat	gaaatacgcc	
1261	agtaaaactgg	cggaaaaagc	gtgcaagatt	acaaacaaga	acttgcata	gaagattaag	
1321	gatctccgga	ccgtacttga	tacgccggat	gctgaaacac	catcgctctg	ctttcacaac	
1381	gatgttacct	gcaacatgcg	tgccgaatat	tccgtcatgc	aggacgtgta	tatcaacgct	30
1441	cccggaaacta	tctatcatca	ggctatgaaa	ggcgtgcgga	ccctgtactg	gattggcttc	
1501	gacaccaccc	agttcatgtt	ctcggtatg	gcaggttcgt	acctgcgta	caacaccaac	
1561	tgggccgacg	agaaagtcct	tgaagcgcgt	aacatcggac	tttgacgac	aaagctgagt	
1621	gaaggtagga	caggaaaatt	gtcgataatg	aggaagaagg	agttgaagcc	cgggtcgcgg	
1681	gtttattttct	ccgtaggatc	gacactttat	ccagaacaca	gagccagctt	gcagagctgg	
1741	catcttccat	cgggtgtcca	cttgaatgga	aagcagtcgt	acacttgccg	ctgtgataca	
1801	gtggtgagtt	gcgaaggcta	cgtagtgaag	aaaatcacca	tcagtcgccg	gatcacggga	
1861	gaaaccgtgg	gatacgcggt	tacacacaat	agcgagggt	tcttgctatg	caaagttact	
1921	gacacagtaa	aaggagaacg	ggtatcgttc	cctgtgtgca	ctgacatccc	ggccaccata	40
1981	tgcatcaga	tgactgggtat	aatggccacg	gatatacac	ctgacgatgc	acaaaaactt	
2041	ctggttgggc	tcaaccagcg	aattgtcatt	aacggtagga	ctaacaggaa	caccaacacc	
2101	atgcaaaaatt	accttctgcc	gatcatagca	caagggttca	gcaaatgggc	taaggagcgc	
2161	aaggatgatc	ttgataacga	gaaaatgctg	ggtactagag	aacgcaagct	tacgtatggc	
2221	tgcttgtggg	cgtttcgcac	taagaaagta	cattcgtttt	atcgcccacc	tggaaacgcag	
2281	acctgcgtaa	aagtcccagc	ctcttttagc	gcttttccca	tgtcgtccgt	atggacgacc	

2341 tctttgceca tgtegtgag gcagaaattg aaactggcat tgcaaccaa gaaggaggaa  
 2401 aaactgctgc aggtctcgga ggaattagtc atggaggcca aggctgcttt tgaggatgct  
 2461 caggaggaag ccagagcgga gaagctccga gaagcacttc caccattagt ggcagacaaa  
 2521 ggcatcgagg cagccgcaga agttgtctgc gaagtggagg ggctccaggc ggacatcgga  
 2581 gcagcattag ttgaaacccc gcgcggtcac gtaaggataa tacctcaagc aaatgaccgt  
 2641 atgatcgga agtatatcgt tgtctcgcca aactctgtgc tgaagaatgc caaactcgca  
 2701 ccagcgcacc cgctagcaga tcaggttaag atcataacac actccggaag atcaggaagg  
 2761 tacgcggtcg aaccatacga cgctaaagta ctgatgccag caggaggtgc cgtaccatgg  
 2821 ccagaattcc tagcactgag tgagagcgcc acgttagtgt acaacgaaag agagtttgtg  
 2881 aaccgcaaac tataccacat tgccatgcat ggccccgcca agaatacaga agaggagcag  
 2941 tacaaggtta caaaggcaga gcttgacaga acagagtacg tgtttgacgt ggacaagaag  
 3001 cgttgcgta agaaggaaga agcctcaggt ctggctctct cgggagaact gaccaaccct  
 3061 ccctatcatg agctagctct ggagggactg aagacccgac ctgcggtccc gtacaaggtc  
 3121 gaaacaatag gagtgatagg cacaccgggg tcgggcaagt cagctattat caagtcaact  
 3181 gtcacggcac gagatcttgt taccagcgga aagaaagaaa attgtcgcga aattgaggcc  
 3241 gacgtgctaa gactgagggg tatgcagatt acgtcgaaga cagtagattc ggttatgctc  
 3301 aacggatgcc acaaagcgt agaagtgtg tacgttgacg aagcgttcgc gtgccacgca  
 3361 ggagcactac ttgccttgat tgctatcgtc agggcccgca agaaggtagt actatcgga  
 3421 gaccccatgc aatgcggatt ctcaacatg atgcaactaa aggtacattt caatcacct  
 3481 gaaaaagaca tatgcacca gacattctac aagtatatct cccggcgttg cacacagcca  
 3541 gttacagcta ttgtatcgac actgcattac gatggaaaga tgaaccac gaaccgtgc  
 3601 aagaagaaca ttgaaatcga tattacaggg gccacaaagc cgaagccagg ggatatcatc  
 3661 ctgacatgtt tccgcgggtg ggttaagcaa ttgcaaactg actatcccg acatgaagta  
 3721 atgacagccg cggcctcaca agggctaacc agaaaaggag tgtatgccgt ccggcaaaaa  
 3781 gtcaatgaaa acccaactgta cgcgatcaca tcagagcatg tgaacgtgtt gtcacccgc  
 3841 actgaggaca ggctagtgtg gaaaacctg cagggcgacc catggattaa gcagcccact  
 3901 aacataccta aaggaaactt tcaggctact atagaggact gggaagctga acacaaggga  
 3961 ataattgctg caataaacag cccactccc cgtgccaatc cgttcagctg caagaccaac  
 4021 gtttgctggg cgaaagcatt ggaaccgata ctageccag cgggtatcgt acttaccggt  
 4081 tgccagtgga gcgaactgtt cccacagttt gcggatgaca aaccacattc ggccatttac  
 4141 gccttagacg taatttgc ataatgtttt ggcatggact tgacaagcgg actgttttct  
 4201 aaacagagca tcccactaac gtaccatccc gccgattcag cgaggccgg agctcattgg  
 4261 gacaacagcc caggaacccg caagtatggg tacgatcacg ccattgccgc cgaactctcc  
 4321 cgtagatttc cgggtgtcca gctagctggg aagggcacac aacttgattt gcagacgggg  
 4381 agaaccagag ttatctctgc acagcataac ctggccccgg tgaaccgaa tcttctcac  
 4441 gccttagtcc ccgagtacaa ggagaagcaa cccggccccg tcaaaaaatt cttgaaccag  
 4501 ttcaaacc accactagct tgtggtatca gaggaaaaaa ttgaagctcc ccgtaagaga  
 4561 atcgaatgga tcgccccgat tggcatagcc ggtgcagata agaactacaa cctggctttc  
 4621 gggtttccgc cgcaggcacg gtacgacctg gtgttcatca acattggaac taaatacaga  
 4681 aaccaccact ttcagcagtg cgaagaccat gcggcgacct taaaaaccct ttcgcgttcg

10

20

30

40

4741 gccctgaatt gccttaaccc aggaggcacc ctctgtgtga agtcctatgg ctacgccgac  
 4801 cgcaacagtg aggacgtagt caccgctctt gccagaaagt ttgtcagggt gtctgcagcg  
 4861 agaccagatt gtgtctcaag caatacagaa atgtacctga ttttccgaca actagacaac  
 4921 agccgtacac ggcaattcac cccgcaccat ctgaattgcg tgatttcgtc cgtgtatgag  
 4981 ggtacaagag atggagttag agccgcgcgc tcataccgca ccaaaaggga gaatattgct  
 5041 gactgtcaag aggaagcagt tgtcaacgca gccaatccgc tgggtagacc aggcgaagga  
 5101 gtctgccgtg ccatctataa acgttggccg accagtttta ccgattcagc cacggagaca  
 5161 ggcaccgcaa gaatgactgt gtgcctagga aagaaagtga tccacgcggt cggccctgat  
 5221 tttccggaagc acccagaagc agaagccttg aaattgctac aaaacgccta ccatgcagtg  
 5281 gcagacttag taaatgaaca taacatcaag tctgtcgcca ttccactgct atctacagge  
 5341 atttacgcag ccggaaaaga ccgccttgaa gtatcactta actgcttgac aaccgcgcta  
 5401 gacagaactg acgcggacgt aaccatctat tgccctggata agaagtggaa ggaaagaatc  
 5461 gacgcggcac tccaacttaa ggagtctgta acagagctga aggatgaaga tatggagatc  
 5521 gacgatgagt tagtatggat tcatccagac agttgcttga agggaagaaa gggattcagt  
 5581 actacaaaag gaaaattgta ttctgacttc gaaggcacca aattccatca agcagcaaaa  
 5641 gacatggcgg agataaaggt cctgttccct aatgaccagg aaagtaatga acaactgtgt  
 5701 gcctacatat tgggtgagac catggaagca atccgcgaaa agtgcgccgt cgaccataac  
 5761 ccgtcgtcta gcccgcceaa aacgttgccg tgcctttgca tgtatgccat gacgccagaa  
 5821 aggttccaca gacttagaag caataacgtc aaagaagtta cagtatgctc ctccaccccc  
 5881 cttcctaagc acaaaattaa gaatgttcag aaggttcagt gcacgaaagt agtcctgttt  
 5941 aatccgcaca ctcccgcat tcttcccgcc cgtaagtaca tagaagtgcc agaacagcct  
 6001 accgtcctc ctgcacagge cgaggaggcc cccgaagttg tagcgacacc gtcaccatct  
 6061 acagctgata acacctcgt tcatgtcaca gacatctcac tggatatgga tgacagtagc  
 6121 gaaggctcac ttttttcgag ctttagcgga tcggacaact ctattactag tatggacagt  
 6181 tggctcgtcag gacctagtct actagagata gtagaccgaa ggcaggtggt ggtggctgac  
 6241 gttcatgccg tccaagagcc tgcccttatt ccaccgceaa ggctaaagaa gatggccgcg  
 6301 ctggcagcgg caagaaaaga gccactcca ccggcaagca atagctctga gtccctccac  
 6361 ctctcttttg gtgggggtatc catgtccctc ggatcaattt tcgacggaga gacggccgcg  
 6421 caggcagcgg tacaacctt ggcaacagge ccacggatg tgcctatgtc tttcggatcg  
 6481 ttttccgacg gagagattga tgagctgagc cgcagagtaa ctgagtcgga acccgctctg  
 6541 tttggatcat ttgaaccggg cgaagtgaac tcaattatat cgtcccgatc agccgtatct  
 6601 tttccactac gcaagcagag acgtagacgc aggagcagga ggactgaata ctgactaacc  
 6661 ggggtaggtg ggtacatatt ttccacggac acaggccctg ggcaattgca aaagaagtcc  
 6721 gttctgcaga accagcttac agaaccgacc ttggagcgca atgtcctgga aagaattcat  
 6781 gcccgggtgc tcgacacgtc gaaagaggaa caactcaaac tcaggtacca gatgatgccc  
 6841 accgaagcca acaaaagtag gtaccagtct cgtaaagtag aaaatcagaa agccataacc  
 6901 actgagcgac tactgtcagg actacgactg tataactctg ccacagatca gccagaatgc  
 6961 tataagatca cctatccgaa accattgtac tccagtagcg taccggcgaa ctactccgat  
 7021 ccacagttcg ctgtagctgt ctgtaacaac tatctgcatg agaactatcc gacagtagca  
 7081 tcttatcaga ttactgacga gtacgatgct tacttggata tggtagacgg gacagtcgcc

10

20

30

40

7141 tgcctggata ctgcaacctt ctgccccgct aagcttagaa gttacccgaa aaaacatgag  
 7201 tatagagccc cgaatatccg cagtgcgggt ccatcagcga tgcagaacac gctacaaaat  
 7261 gtgctcattg ccgcaactaa aagaaattgc aacgtcacgc agatgcgtga actgccaaca  
 7321 ctggactcag cgacattcaa tgtcgaatgc ttctgaaaat atgcatgtaa tgacgagtat  
 7381 tgggaggagt tcgctcgga gccaattagg attaccactg agtttgtcac cgcataatgta  
 7441 gctagactga aaggccctaa ggccgccgca ctatttgcaa agacgtataa tttgggtccca  
 7501 ttgcaagaag tgcctatgga tagattcgct atggacatga aaagagacgt gaaagttaca  
 7561 ccaggcacga aacacacaga agaaagaccg aaagtacaag tgatacaagc cgcagaaccc  
 7621 ctggcgactg cttacttatg cgggattcac cgggaattag tgcgtaggt tacggccgtc  
 7681 ttgcttccaa acattcacac gctttttgac atgtcggcgg aggattttga tgcaatcata  
 7741 gcagaacact tcaagcaagg cgaccgggta ctggagacgg atatcgcac attcgacaaa  
 7801 agccaagacg acgctatggc gttaaccggc ctgatgatct tggaggacct ggggtgtggat  
 7861 caaccactac tcgacttgat cgagtgcgcc tttggagaaa tatcatccac ccatctacct  
 7921 acgggtactc gttttaaat cggggcgatg atgaaatccg gaatgttcct cacacttttt  
 7981 gtcaacacag ttttgaatgt cgttatcgcc agcagagtac tagaagagcg gcttaaaacg  
 8041 tccagatgtg cagcgttcat tggcgacgac aacatcatac atggagtagt atctgacaaa  
 8101 gaaatggctg agaggtgcgc cacttggtc aacatggagg ttaagatcat cgacgcagtc  
 8161 atcggtgaga gaccacctta cttctgcggc ggatttatct tgcaagattc ggttacttcc  
 8221 acagcgtgcc gcgtggcgga tccctgaaa agcctgttta agttgggtaa accgctccca  
 8281 gccgacgacg agcaagacga agacagaaga cgcgctctgc tagatgaaac aaaggcgtgg  
 8341 tttagagtag gtataacagg cacttttagc gtggccgtga cgaccgggta tgaggtagac  
 8401 aatattacac ctgtcctact ggcattgaga acttttgccc agagcaaaaag agcattccaa  
 8461 gccatcagag gggaaataaa gcattctctac ggtgggtccta aatagtcagc atagtacatt  
 8521 tcatctgact aatactacaa caccaccacc tctagagctt gccgccacca tggtagagca  
 8581 gggcgaggag ctgttcaccg ggggtgggtgcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtgaa  
 8641 cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg cgaggcgat gccacctacg gcaagctgac  
 8701 cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct gcccggtccc tggcccaccc tcgtgaccac  
 8761 cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt  
 8821 cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga  
 8881 cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gtctgagggc gacaccctgg tgaaccgcat  
 8941 cgagctgaag ggcctcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta  
 9001 caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt  
 9061 gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca  
 9121 gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac  
 9181 ccagtcgcgc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt  
 9241 cgtgaccgcc gccgggatca ctacggcat ggacgagctg tacaagtaaa gcgggccgtga  
 9301 gcatgcagge cttgggceca atgatecgac cagcaaaact cgatgtactt ccgaggaact  
 9361 gatgtgcata atgcatcagg ctggtacatt agatccccgc ttaccgcggg caatatagca  
 9421 acactaaaaa ctgatgtac ttccgaggaa gcgcagtgca taatgctgcg cagtgttgcc  
 9481 acataaccac tatattaacc atttatctag cggacgcca aaactcaatg tatttctgag

10

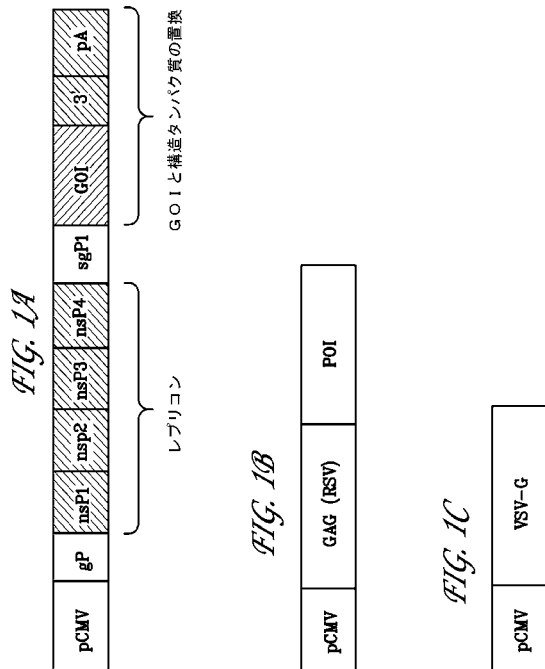
20

30

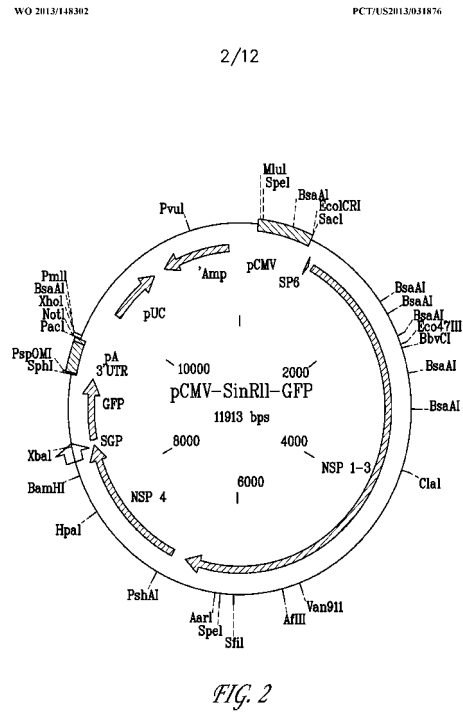
40

9541	gaagcgtggt	gcataatgcc	acgcagcgtc	tgcataactt	ttattatttc	ttttattaat	
9601	caacaaaatt	ttgtttttta	catttcaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	
9661	aaaggaatt	cctcgattaa	ttaagcggcc	gctcgagatg	gcacacgtgt	tacggtttta	
9721	ccgtcgacct	ctagctagag	cttggegtaa	tcatggteat	agctgtttcc	tgtgtgaaat	
9781	tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	cgagccggaa	gcataaagtg	taaagcctgg	
9841	ggtgcctaata	gagttagcta	actcacatta	attgcgttgc	gctcactgcc	cgttttccag	
9901	tcgggaaacc	tgctcgtgcca	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcggt	
9961	ttgcgtattg	ggcgctcttc	cgtttcctcg	ctcactgact	cgtcgcgtc	ggctgttcgg	10
10021	ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	
10081	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	
10141	gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggtc	cgtccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	
10201	cgtcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	
10261	ggaagctccc	tcgtgcgtc	tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	
10321	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	
10381	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccgttca	gcccagccgc	
10441	tgcgccttat	ccggtacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	
10501	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	20
10561	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagaa	cagtatttgg	tatctgcgt	
10621	ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggttagct	cttgatccgg	caaacaaacc	
10681	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	
10741	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaaactca	
10801	cgttaaggga	ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	cctttttaa	
10861	taaaaatgaa	gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	
10921	caatgcttaa	tcagttaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	
10981	gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggtcccggt	
11041	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgtc	ccggctccag	atttatcagc	aataaaccag	30
11101	ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtgg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtt	
11161	attaattgtt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacgtt	
11221	gttgccattg	ctacaggcat	cgtggtgtca	cgtcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	
11281	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccc	tggtgtgcaa	aaaagcggtt	
11341	agctccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	ccgcagtggt	atcactcatg	
11401	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	
11461	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgt	tgccgcgacc	gagttgctct	
11521	tgccccggcg	caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaaa	agtgtctatc	
11581	attggaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctgtt	gagatccagt	40
11641	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcageat	cttttacttt	caccagcgtt	
11701	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaat	gccgcaaaaa	agggaataag	ggcgacacgg	
11761	aatgtttgaa	tactcatact	cttctttttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	
11821	tgtctcatga	gcggatacat	atttgaatgt	atttagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	
11881	cgcacatttc	cccgaagaat	gccacctgac	gtc			

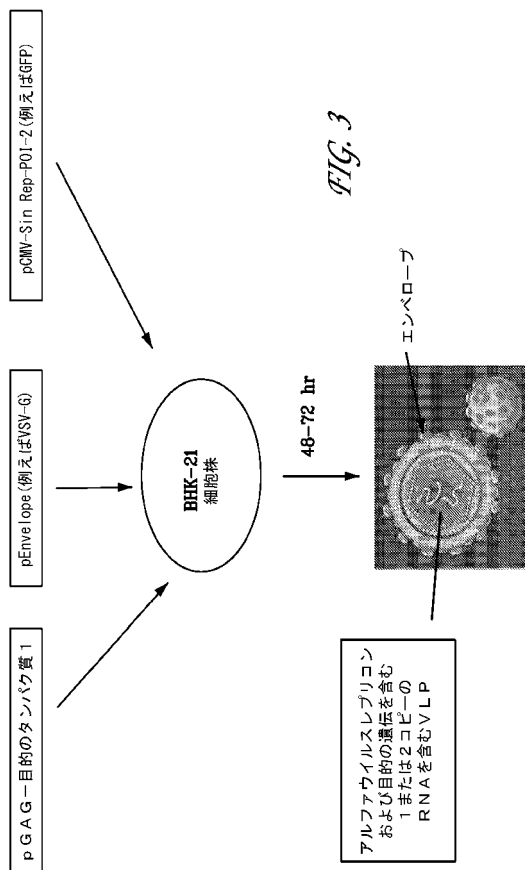
【図 1】



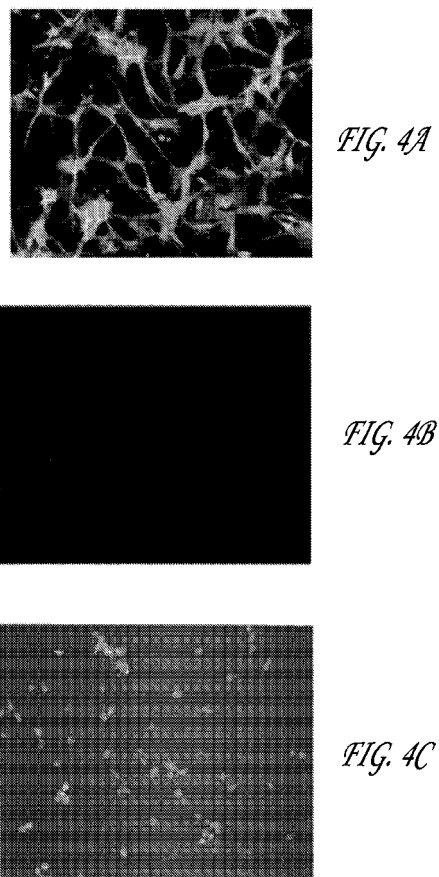
【図 2】



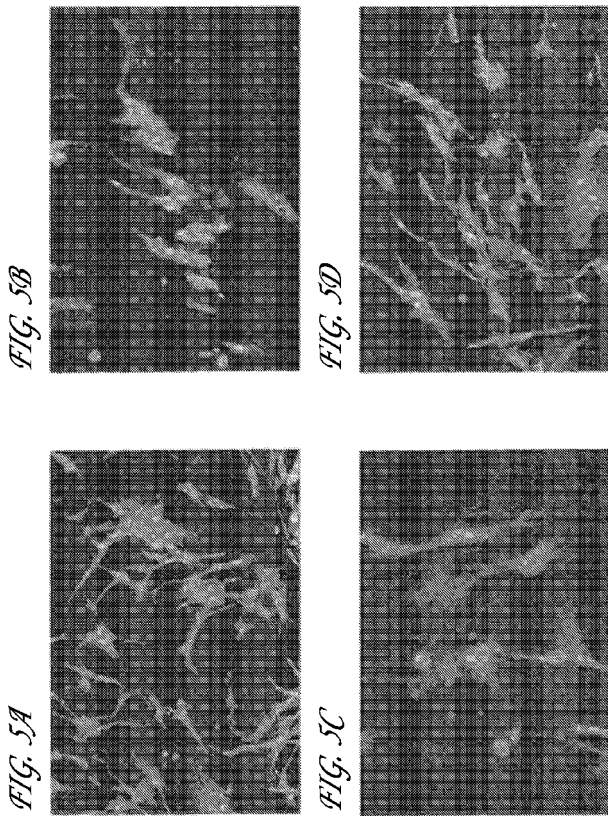
【図 3】



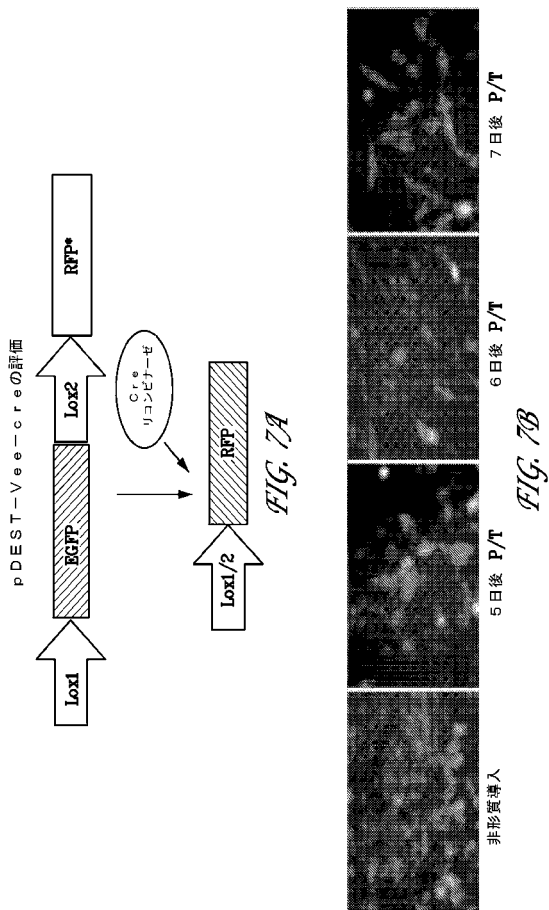
【図 4】



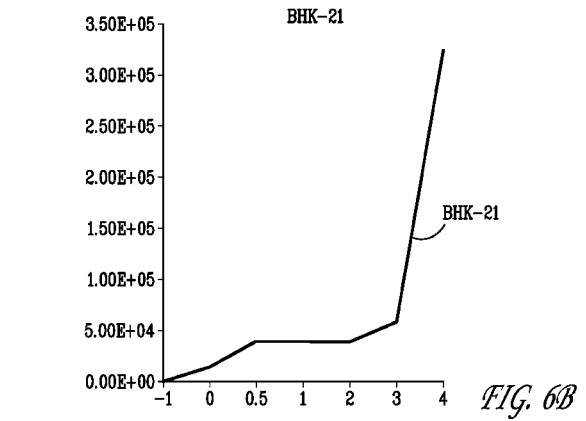
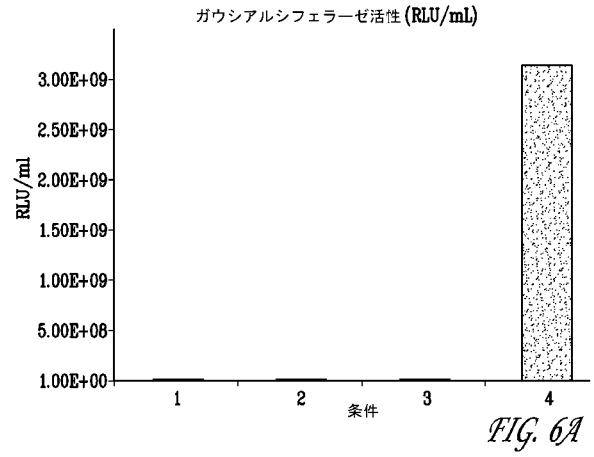
【図5】



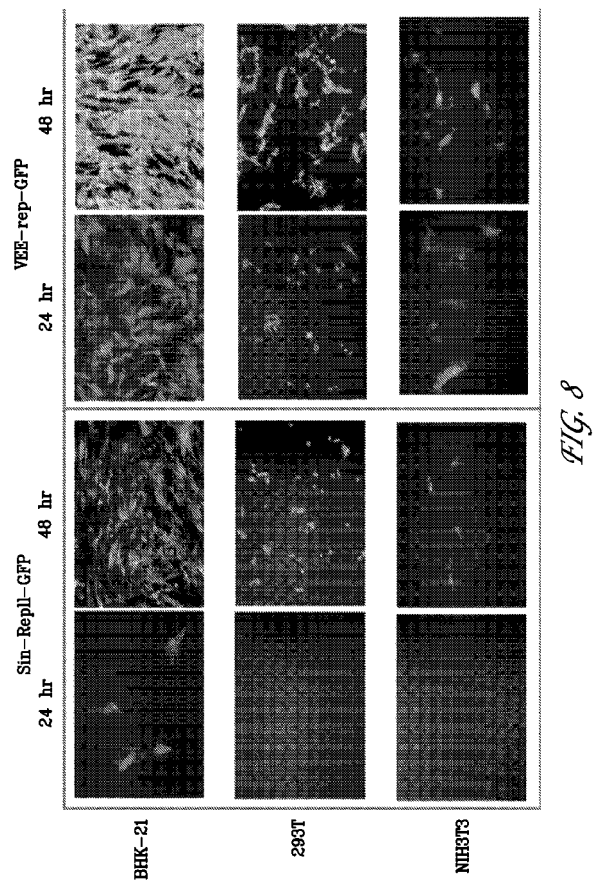
【図7】



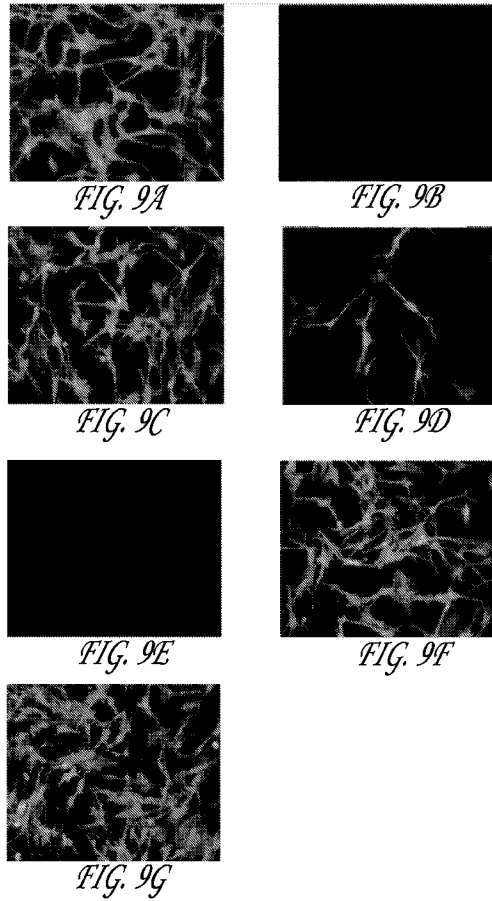
【図6】



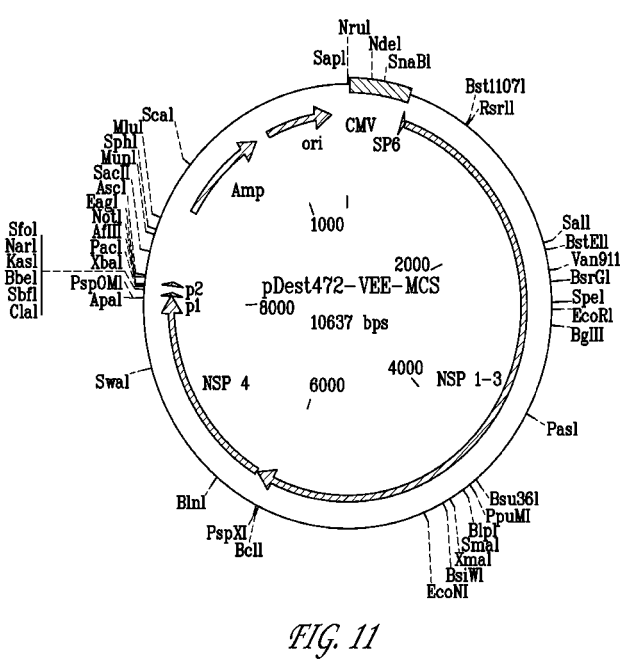
【図8】



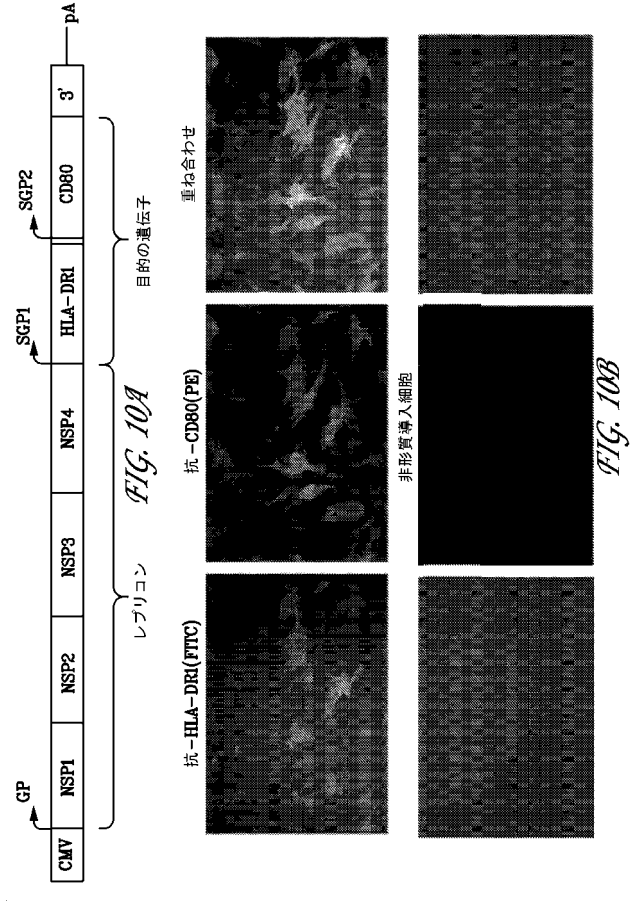
【図 9】



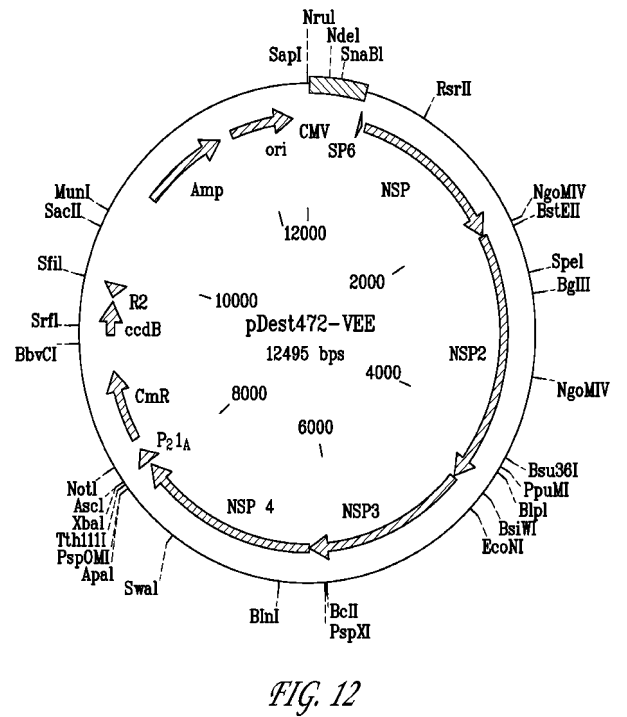
【図 11】



【図 10】



【図 12】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/031876

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N7/00 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/118956 A1 (PAGES JEAN-CHRISTOPHE [FR]) 22 May 2008 (2008-05-22)  paragraphs [0002], [0036], [0037] example 2 figure 1  ----- -/--	1-9, 11-17, 21-36, 38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 July 2013		07/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Brouns, Gaby

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/031876

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. PIVER ET AL: "Mobilization of Full-Length Semliki Forest Virus Replicon by Retrovirus Particles", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 19, 13 September 2006 (2006-09-13), pages 9889-9895, XP055072806, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00664-06 page 9893, left-hand column, paragraph 2 page 9894, left-hand column, paragraph 3 page 9894, last paragraph figures 1, 3A, 4A -----	1,4,7,8, 11-15, 17, 21-30,36
X	WO 2008/115199 A2 (UNIV NORTH CAROLINA [US]; JOHNSTON ROBERT E [US]; JURGENS CHRISTY [US]) 25 September 2008 (2008-09-25) examples 5-7 page 14, lines 35, 36 page 28, lines 11, 12, 27, 35 page 34, lines 29-34 page 36, lines 30-33 page 46 figure 10AB claims 60, 79 -----	1-3, 5-14, 16-32, 35-38
X	C. K. JURGENS ET AL: "A Novel Self-Replicating Chimeric Lentivirus-Like Particle", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 86, no. 1, 19 October 2011 (2011-10-19), pages 246-261, XP055072855, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.05191-11 figures 1, 5-7, 9 table 1 -----	1,2,7,8, 11-14, 16,17, 21-25, 30,31, 36,37
X	J. B. SCHELL ET AL: "Significant Protection against High-Dose Simian Immunodeficiency Virus Challenge Conferred by a New Prime-Boost Vaccine Regimen", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 85, no. 12, 13 April 2011 (2011-04-13), pages 5764-5772, XP055072812, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00342-11 figure 1A ----- -/--	23,24, 30,35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2013/031876

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LI K-J ET AL: "PRODUCTION OF INFECTIOUS RECOMBINANT MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS PARTICLES IN BHK CELLS USING SEMLIKI FOREST VIRUS-DERIVED RNA EXPRESSION VECTORS", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 93, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 11658-11663, XP002050539, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.93.21.11658 figure 1</p> <p>-----</p>	1-38
A	<p>A. DIATTA: "Semliki Forest virus-derived virus-like particles: characterization of their production and transduction pathways", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 86, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 3129-3136, XP055072807, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.81103-0</p> <p>-----</p>	1-38

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/031876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008118956 A1	22-05-2008	AU 2004297379 A1	23-06-2005
		BR PI0417126 A	11-12-2007
		CA 2547922 A1	23-06-2005
		CN 101006180 A	25-07-2007
		EP 1697529 A1	06-09-2006
		FR 2862982 A1	03-06-2005
		JP 2007512827 A	24-05-2007
		KR 20070085044 A	27-08-2007
		US 2008118956 A1	22-05-2008
		WO 2005056805 A1	23-06-2005
-----			
WO 2008115199 A2	25-09-2008	EP 2062246 A2	27-05-2009
		US 2012121650 A1	17-05-2012
		WO 2008115199 A2	25-09-2008
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 14/005 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/005	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/76	
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	
<b>A 6 1 K 47/42 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/42	
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	
<b>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/713	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 カズマールチェック、スタニスワフ、ジェイ .

アメリカ合衆国、 2 1 7 0 2 メリーランド州、フレデリック、 1 8 3 9 カントリー ラン ウ  
エイ

(72)発明者 チャタジー、デブ、ケイ .

アメリカ合衆国、 2 0 8 5 4 メリーランド州、ポトマック、 2 4 ビーマン ウッズ コート

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 EA04 GA11  
4B065 AA90X AA95X AB01 BA01 CA44  
4C076 AA17 AA19 AA95 BB11 BB32 EE41 FF34 FF70  
4C084 AA13 MA16 MA22 MA24 MA66 MA67 NA13 ZC80  
4C086 AA10 EA16 MA03 MA05 MA16 MA22 MA24 MA66 MA67 NA13  
ZC80  
4C087 AA01 AA03 BC83 CA12 MA17 MA22 MA24 MA66 MA67 NA13  
ZC80  
4H045 AA20 AA30 CA01 EA20