

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-534007

(P2020-534007A)

(43) 公表日 令和2年11月26日 (2020.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/47 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/47 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C 0 7 K 14/145 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/145	4 C 0 7 6
<b>C 1 2 N 7/01 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/01	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 38/16 (2006.01)</b>	A 6 1 K 38/16	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-516534 (P2020-516534)	(71) 出願人	506316557
(86) (22) 出願日	平成30年9月24日 (2018.9.24)		サントル ナショナル ドウ ラ ルシェ
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月18日 (2020.5.18)		ルシュ シアンティフィック
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/075824		フランス国 7 5 0 1 6 パリ リュ ミ
(87) 国際公開番号	W02019/057974		ケランジュ 3
(87) 国際公開日	平成31年3月28日 (2019.3.28)	(71) 出願人	514019062
(31) 優先権主張番号	17306255.5		ユニヴェルシテ パリ シュッド
(32) 優先日	平成29年9月22日 (2017.9.22)		フランス 9 1 4 0 5 オルセー リュー
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		ジョルジュ クレマンソー 1 5
		(74) 代理人	100094569
			弁理士 田中 伸一郎
		(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100109070
			弁理士 須田 洋之
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型ウイルスタンパク質

## (57) 【要約】

本発明は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む単離された非天然タンパク質であって、8、47、209 および / または 354 位のアミノ酸が、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によって置換されている、単離された非天然タンパク質に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

V S V I n d i a n a 株の細胞外ドメインのアミノ酸配列である、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む単離された非天然タンパク質であって、

配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、8、47、209 および 354 位の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換されており、

8 位での置換が、Y を除く、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものであり、且つ

209 位での置換が、H を除く、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものである、前記単離された非天然タンパク質であるか、

或いは

少なくとも 1 個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される任意の相同タンパク質であって、但し、誘導されるタンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列との少なくとも 70 % の同一性を保持し、且つ前記誘導されるタンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、且つ LDL 膜受容体と相互作用する能力を保持し、

配列番号 1 の前記配列の 8、47、209 および 354 位と等価な位置に位置する前記相同タンパク質の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換されており、

8 位と等価な位置に位置するアミノ酸の置換が、Y を除く、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものであり、且つ

209 位と等価な位置に位置するアミノ酸の置換が、H を除く、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものである、前記相同タンパク質であって、

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、且つ LDL 膜受容体と相互作用することができない、

前記単離された非天然タンパク質または相同タンパク質。

## 【請求項 2】

以下のアミノ酸配列：

- 配列番号 15 ~ 20 ；
- 配列番号 21 ~ 26 ；
- 配列番号 27 ~ 32 ；
- 配列番号 33 ~ 38 ；
- 配列番号 39 ~ 44 ；
- 配列番号 45 ~ 50 ；および
- 配列番号 51 ~ 56

のうちの 1 つを含む、請求項 1 に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 3】

47 位または 354 位、または 47 位と 354 位の両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸、特に、A、G、F または Q、好ましくは、A または Q によって置換されている、請求項 1 または 2 に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 4】

8 位および / または 209 位のアミノ酸の、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸、または前記相同タンパク質中の等価な位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸による置換をさらに含む、請求項 3 に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 5】

8 位のアミノ酸が、H または Q または Y を除く任意のアミノ酸によって置換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 6】

209 位のアミノ酸が、Y または H を除く任意のアミノ酸によって置換されている、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 7】

配列番号 57 ～ 154 のアミノ酸配列の 1 つを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 8】

192 ～ 202 位、または  
240 ～ 257 位、または  
347 ～ 353 位、または  
364 ～ 366 位、または  
376 ～ 379 位

10

のアミノ酸の間にペプチドの挿入をさらに含み、

前記ペプチドが、配列番号 1 に記載のタンパク質とは異なるペプチドに由来する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 9】

1 位または 351 位と 352 位のアミノ酸の間にペプチドの挿入をさらに含み、前記ペプチドが、配列番号 1 に記載のタンパク質とは異なるタンパク質に由来する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質。

20

## 【請求項 10】

前記ペプチドが、細胞受容体のリガンドの少なくとも一部、好ましくは、ナノボディ、例えば、抗 HER2 ナノボディ、抗 MUC18 ナノボディまたは抗 PD-1 ナノボディである、請求項 8 または 9 に記載の単離された非天然タンパク質。

## 【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質をコードする核酸分子。

## 【請求項 12】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の単離された非天然タンパク質を発現する組換えウイルス。

30

## 【請求項 13】

請求項 11 に記載の核酸分子を含む組換えウイルス。

## 【請求項 14】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の非天然タンパク質を含有する、もしくは発現する、または請求項 11 に記載の核酸分子を含有する、または請求項 12 もしくは 13 に記載のウイルスによって感染した真核細胞。

## 【請求項 15】

薬物としての使用のための、以下：

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質；または

請求項 11 に記載の核酸分子；

請求項 12 もしくは 13 に記載のウイルス；または

請求項 14 に記載の真核細胞

40

のうちの少なくとも 1 つを含む組成物。

## 【請求項 16】

がんを処置するために使用するための、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

脂質膜を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に標的化するための、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の *in vitro* での使用であって、前記タンパク質は前記脂質膜に固定される、前記使用。

## 【請求項 18】

脂質膜を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に

50

標的化するための請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質であって、前記脂質膜に固定される、前記タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、変異型ウイルスタンパク質、特に、腫瘍溶解性ウイルスを起源とする変異型タンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

水疱性口内炎ウイルス (VSV) は、ラブドウイルス科のベシクロウイルス属に属する一本鎖エンベロープ RNA ウイルスである。それは、昆虫、ウシ、ウマおよびブタに感染し得るアルボウイルスである。哺乳動物では、正常細胞を残しながら腫瘍細胞に感染し、これらを殺傷するその能力は、それを、がんの処置のための有望な腫瘍溶解性ウイルスにする (Barber, 2005 ; Fernandez et al., 2002 ; Hastie et al., 2013)。

VSV ゲノムは、5 つの構造タンパク質をコードし、中でも 1 回膜貫通型糖タンパク質 (G) をコードする。この糖タンパク質は、アミノ末端のシグナルペプチド、約 450 アミノ酸の細胞外ドメイン、単一のアルファヘリックス膜貫通セグメントおよび小さいウイルス内カルボキシ末端ドメインを有する古典的な I 型膜糖タンパク質である。シグナルペプチドは、小胞体の内腔で切断され、天然の糖タンパク質は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよびウイルス内ドメインで構成される。

【0003】

G は、ウイルス感染の初期ステップの間に重要な役割を果たす (Albertini et al., 2012b)。第 1 に、それは、特定の受容体へのウイルスの結合を担う。結合後、ビリオンは、クラスリン媒介性エンドサイトーシス経路によって細胞に進入する。エンドサイトーシス小胞の酸性環境では、G は、ウイルスとエンドソーム膜との融合を誘発し、感染のその後のステップのために細胞質ゾル中にゲノムを放出する。融合は、両方とも三量体である融合前コンフォメーションから融合後コンフォメーションへの低 pH 誘導性の大きな構造変化によって触媒される (Roche et al., 2006 ; Roche et al., 2007)。

G 細胞外ドメインのポリペプチド鎖は、融合ドメイン (FD)、プレクストリン相同ドメイン (PHD)、および三量体化ドメイン (TrD) である 3 つの異なるドメインに折り畳まれる。構造変化の間も、FD、PHD および TrD は、その三次構造を保持する。それにも拘わらず、それらは、低 pH 誘導性のコンフォメーション変化の間に再び折り畳まれるヒンジセグメント (S1 ~ S5) の二次変化のため、その相対的配向の大きな再配列を受ける (Roche et al., 2006 ; Roche et al., 2007)。

最近、低密度リポタンパク質受容体 (LDL-R) およびこの受容体ファミリーの他のメンバーが、VSV 受容体として働くことが示された (Finkelshtein et al., 2013)。

【0004】

LDL-R は、哺乳動物細胞中でコレステロール恒常性を調節する I 型膜貫通タンパク質である (Brown and Goldstein, 1986)。LDL-R は、血漿循環から、コレステロールを担持するリポタンパク質を除去する。中性 pH で LDL-R によって細胞外で結合したリガンドは、内在化した後、エンドソームの酸性環境に放出され、その後のリソソーム分解をもたらす。次いで、受容体は細胞表面に再循環して戻る。LDL-R 細胞外ドメインは、リガンド結合ドメイン、表皮増殖因子 (EGF) 前駆体相同ドメインおよび O 結合オリゴ糖に富む C 末端ドメインから構成される。リガンド結合ドメインは、7 個のシステインリッチリピート (CR1 ~ CR7、図 1) から作られる。各リピートは、約 40 個のアミノ酸から作られ、3 個のジスルフィド架橋に関与する 6 個のシステイン残基、および  $Ca^{2+}$  イオンを配位する酸性残基クラスターを含有する。カーゴの細胞内放出は、開いたコンフォメーションから閉じたコンフォメーションへの、LDL-R の低 pH 誘導性コンフォメーション変化によって駆動される。

LDL-R 遺伝子ファミリーは、細胞表面上に存在する膜貫通受容体からなり、リポタ

ンパク質のエンドサイトーシスによる取込みに関与し、リガンド結合のために  $Ca^{2+}$  を必要とする。これらの受容体は全て、一般的に、いくつかの CR リピート（最大数十個）、EGF 前駆体様リピート、膜貫通領域および少なくとも 1 個の内在化シグナル配列を含有する細胞内ドメインを有する。それらは、昆虫を含むあらゆる動物に遍在的に見出される。

VSV - G は、他のウイルスを偽型化するために広く使用されてきたが、VSV - G 偽型化レンチウイルス (VSV - G - LV) は、VSV と同じ広い向性を示す。

他方、VSV - G - LV は、LDL - R の発現レベルが非常に低いため、非刺激 T 細胞、B 細胞、および造血幹細胞への効率的な遺伝子導入を可能にしない (Amirache et al., 2014)。

LDL - R 受容体ファミリーメンバーの遍在的分布のため、VSV および VSV - G - LV の広い向性は、その治療的使用を制限する。これは、腫瘍細胞を特異的に標的化したい場合の腫瘍治療に特に当てはまる。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

本発明の 1 つの目的は、この欠点を除去することである。

本発明の 1 つの目的は、特性の 1 つが欠損した新しい変異型 VSV - G タンパク質を提供して、このタンパク質を特異的に標的化することである。

本発明の別の目的は、そのようなタンパク質を発現する新しい VSV および腫瘍治療におけるその使用を提供することである。

##### 【0006】

本発明は、VSV Indiana 株の細胞外ドメインのアミノ酸配列に一致する（である）、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離された非天然タンパク質であって、

配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、8、47、209 および 354 位の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換されている、単離された非天然タンパク質、

または少なくとも 1 個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される任意の相同タンパク質であって、但し、誘導されるタンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列との少なくとも 70 % の同一性を保持し、前記誘導されるタンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL 膜受容体と相互作用する能力を保持し、

配列番号 1 の前記配列の 8、47、209 および 354 位と等価な位置に位置する前記相同タンパク質の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換されている、相同タンパク質であり、

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL 膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または相同タンパク質に関する。

##### 【0007】

好ましい実施形態では、本発明の単離された非天然タンパク質の配列番号 1 中の 8 位（配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる）、または本発明の配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される相同タンパク質中の等価な位置のアミノ酸は、Y 残基であってはならない。

好ましい実施形態では、本発明の単離された非天然タンパク質の配列番号 1 中の 209 位（配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる）、または本発明の配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される相同タンパク質中の等価な位置のアミノ酸は、H 残基であってはならない。

##### 【0008】

かくして、換言すれば、本発明は、VSV Indiana 株の細胞外ドメインのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列に一致する（である）、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む単離された非天然タンパク質であって、

配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、8、47、209 および 354 位の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換され、

8 位での置換が、Y を除く、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものであり、

209 位での置換が、H を除く、配列番号 1 の前記配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものである、単離された非天然タンパク質であるか、

または少なくとも 1 個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される任意の相同タンパク質であって、但し、誘導されるタンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列との少なくとも 70 % の同一性を保持し、前記誘導されるタンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL 膜受容体と相互作用する能力を保持し、

配列番号 1 の前記配列の 8、47、209 および 354 位と等価な位置に位置する前記相同タンパク質の少なくとも 1 個のアミノ酸が、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なるアミノ酸によって置換され、

8 位と等価な位置に位置するアミノ酸の置換が、Y を除く、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものであり、

209 位と等価な位置に位置するアミノ酸の置換が、H を除く、配列番号 1 の配列中のその位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によるものである、相同タンパク質であり、

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL 膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または相同タンパク質に関する。

#### 【0009】

有利には、本発明は、VSV Indiana 株の細胞外ドメインのアミノ酸配列に一致する（である）、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離された非天然タンパク質であって、

配列番号 1 の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、8 位、または 47 位、または 209 位、または 354 位、または 8 位と 47 位の両方、または 8 位と 209 位の両方、または 8 位と 354 位の両方、または 47 位と 209 位の両方、または 47 位と 354 位の両方、または 209 位と 354 位の両方、または 8 位および 47 位および 209 位、または 8 位および 47 位および 354 位、または 8 位および 209 位および 354 位、または 47 位および 209 位および 354 位、または 8 位および 47 位および 209 位および 354 位のアミノ酸が、配列番号 1 に見出されるアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によって置換されている、単離された非天然タンパク質、

または少なくとも 1 個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導される任意の相同タンパク質であって、但し、誘導されるタンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列との少なくとも 70 % の同一性を保持し、前記誘導されるタンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL 膜受容体と相互作用する能力を保持し、

8 位、もしくは 47 位、もしくは 209 位、もしくは 354 位、または 8 位と 47 位の両方、または 8 位と 209 位の両方、または 8 位と 354 位の両方、または 47 位と 209 位の両方、または 47 位と 354 位の両方、または 209 位と 354 位の両方、または 8 位および 47 位および 209 位、または 8 位および 47 位および 354 位、または 8 位および 209 位および 354 位、または 47 位および 209 位および 354 位、または 8 位および 47 位および 209 位および 354 位と等価な位置に位置する前記相同タンパク質のアミノ酸が、配列番号 1 に見出されるアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によって置換され、

10

20

30

40

50

特に、8位のアミノ酸が、Hを除く、好ましくは、Yを除く任意のアミノ酸によって置換され、

47位のアミノ酸が、Kを除く任意のアミノ酸によって置換され、

209位のアミノ酸が、Yを除く、好ましくは、Hを除く任意のアミノ酸によって置換され、

354位のアミノ酸が、Rを除く任意のアミノ酸によって置換され、

ナンバリングが、配列番号1の配列中の最初のアミノ酸の位置から行われる、相同タンパク質であり、

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または相同タンパク質に関する。

10

【0010】

有利には、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離された非天然タンパク質、

```

KFTI[F]PHNQKGN[K]NVP[SNYHYCPSS]DLNWHNDLIGTAIQVKM[K]SHKAIQADGW
MCHASKWVITTCDFRWYGP[KYITQ]SIRSFT[PSVEQCKES]EQTKQGTWLN[PGFPPQSC]
GYATVITDAEAVIVQVTPHHVLVDEYTG[EWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTI]WHS DY
KVKGL[CD]SNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGT[GFERSNYEAYETGGKAC]KMOYCKHWGV
RLPSGV[WFEMADKDLFAAARFPE]CEPGSSI[SA]PSQTSVDVS[LIQDVERI]LDYSLCQET
WSKIRAGLPIS[PVDLSYLAPKNPGT]GPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAA[PILSRMV
GMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLR[TS]SGYK[F]LYMIGHGMLDSDLHLSSK
AQVFEH[F]PHIQDAASQLPDD[ESLFFGDTGLSKNP]IELVEGWFSW[K]SISASFFFIIGLI
IGLFLVL[R]VGIHLCLIKLKHKKRQIYT[DIEMNRLGK]

```

20

30

または少なくとも1個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号1に記載の前記タンパク質から誘導される任意のタンパク質であって、但し、配列番号1に記載の前記タンパク質から誘導される前記タンパク質誘導タンパク質が、上記に示された囲みのアミノ酸を保持し、

8位、もしくは47位、もしくは209位、もしくは354位、または8位と47位の両方、または8位と209位の両方、または8位と354位の両方、または47位と209位の両方、または47位と354位の両方、または209位と354位の両方、または8位および47位および209位、または8位および47位および354位、または8位および209位および354位、または47位および209位および354位、または8位および47位および209位および354位、または配列番号1に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、配列番号1に見出されるアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸によって置換され、

40

特に、8位のアミノ酸が、Hを除く、好ましくは、Yを除く任意のアミノ酸によって置換され、

47位のアミノ酸が、Kを除く任意のアミノ酸によって置換され、

209位のアミノ酸が、Yを除く、好ましくは、Hを除く任意のアミノ酸によって置換され、

354位のアミノ酸が、Rを除く任意のアミノ酸によって置換され、

ナンバリングが、配列番号1の配列中の最初のアミノ酸の位置から行われる、任意のタンパク質であり、

50

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または任意のタンパク質に関する。

#### 【0011】

有利には、本発明は、VSV Indiana株の細胞外ドメインのアミノ酸配列に一致する(である)、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離された非天然タンパク質であって、

配列番号1の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、47位、もしくは354位、または47位と354位の両方のアミノ酸が、任意のアミノ酸によって、特に、KまたはRを除く任意のアミノ酸によって置換されている、単離された非天然タンパク質、

10

または少なくとも1個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号1に記載の前記タンパク質から誘導される任意の相同タンパク質であって、但し、誘導されるタンパク質が、配列番号1に記載のアミノ酸配列との少なくとも70%の同一性を保持し、前記誘導されるタンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL膜受容体と相互作用する能力を保持し、

47位もしくは354位、または47位と354位の両方と等価な位置に位置する、前記相同タンパク質のアミノ酸が、任意のアミノ酸、特に、KまたはRを除く任意のアミノ酸によって置換され、

ナンバリングが、配列番号1の配列中の最初のアミノ酸の位置から行われる、相同タンパク質であり、

20

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、LDL膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または相同タンパク質に関する。

#### 【0012】

一実施形態では、前記単離された非天然タンパク質は、配列番号1の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、8位、または209位、または8位と209位の両方のアミノ酸の、任意のアミノ酸による置換をさらに含み、

好ましくは、8位のアミノ酸は、HまたはYを除く任意のアミノ酸によって置換され、

好ましくは、209位のアミノ酸は、HまたはYを除く任意のアミノ酸によって置換されている。

30

#### 【0013】

有利には、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離された非天然タンパク質、

```

KFTIVFFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWINDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGW
MCHASKWVTTCDFFRWYGPKYITQSIRSFPSVEQCKESIETKQGTWLNPGFPPQSC
GYATVTDAEAVIVQVTPHMLVDEYTGFWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDY
KVKGLCDSNLISMDITFFSEDELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMOYCKHWGV
RLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQET
WSKIRAGLPISFVDLSYLAPKNPGTIGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMV
GMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRITSSGYKFPPLYMIGHGMLDSDLHLSSK
AQVFEHPHIQDAASQLPDDESLEFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWKSISIASFFFIIGLI
IGLEFLVLRVGIHLCKIKLKHKKRQIYTDEMNRLGK

```

40



または少なくとも１個のアミノ酸の置換、付加または欠失によって配列番号１に記載の前記タンパク質から誘導される任意のタンパク質であって、但し、配列番号１に記載の前記タンパク質から誘導される前記タンパク質誘導タンパク質が、上記に示された囲みのアミノ酸を保持し、

４７位、もしくは３５４位、または４７位と３５４位の両方、または配列番号１に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、任意のアミノ酸によって、特に、ＫまたはＲを除く任意のアミノ酸によって置換され、

ナンバリングが、配列番号１の配列中の最初のアミノ酸の位置から行われる、任意のタンパク質であり、

前記単離された非天然タンパク質が、膜融合を誘導する能力を保持し、ＬＤＬ膜受容体と相互作用することができない、単離された非天然タンパク質または任意のタンパク質に関する。

#### 【００１４】

一実施形態では、前記単離された非天然タンパク質は、配列番号１の配列中の最初のアミノ酸の位置からナンバリングされる、８位、または２０９位、または８位と２０９位の両方のアミノ酸の、配列番号１の配列中のその位置または前記相同タンパク質中の等価な位置に示されたアミノ酸とは異なる任意のアミノ酸による置換をさらに含み、

好ましくは、８位のアミノ酸は、ＨまたはＹを除く任意のアミノ酸によって置換され、

好ましくは、２０９位のアミノ酸は、ＨまたはＹを除く任意のアミノ酸によって置換されている。

本発明は、８、４７、２０９もしくは３５４位の少なくとも１個のアミノ酸残基、または２個もしくは３個もしくは４個のアミノ酸の組合せの置換が、ＶＳＶ Ｇタンパク質がその受容体（ＬＤＬ膜受容体）と相互作用するが、特に、低いｐＨで、膜融合を誘導するその特性を保持する能力に影響するという本発明者らによって為された予想外の観察に基づくものである。

#### 【００１５】

本発明は、ＶＳＶのIndiana株の天然形態に対応し、シグナルペプチドを欠く、配列番号１のアミノ酸配列を含有するタンパク質を包含する。本発明はまた、ＶＳＶ株に由来する任意のＧタンパク質も包含するが、但し、前記タンパク質は、配列番号１中の囲みで表されるアミノ酸を保持する。

ＶＳＶ株に由来するＧタンパク質は、配列番号１において矢印で表されるアミノ酸ではない少なくとも１個のアミノ酸の付加、置換または挿入によって異なってもよい。

#### 【００１６】

アミノ酸のナンバリングに関して、このナンバリングは、本発明では、配列番号１に記載のＶＳＶ Ｇ IndianaのＧタンパク質の天然形態のアミノ酸のナンバリングに従来に基づくものである。当業者は、配列アラインメントアルゴリズムおよびプログラム（例えば、ClustalW）を知っており、様々なＧタンパク質の配列を容易に比較し、配列番号１中で得られるナンバリングと比較した所定のＧタンパク質の正確な位置を再計算することができる。明確にするために、８、４７、２０９および３５４位のアミノ酸は、上記の配列番号１中において太字で示される。

本発明は、配列番号１のアミノ酸配列を含有するタンパク質を包含する。本発明はまた、ＶＳＶ株に由来する任意の相同Ｇタンパク質も包含するが、但し、前記タンパク質は、配列番号１のアミノ酸配列との少なくとも７０％の同一性を保持する。

#### 【００１７】

「少なくとも７０％の同一性」とは、本発明では、配列番号１の配列との７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％および１００％の同一性を意味する。

同一性のパーセンテージに関して、それは、相同タンパク質の配列中の同じアミノ酸と

10

20

30

40

50

整列する、配列番号 1 のアミノ酸残基のパーセンテージによって定義される。配列アラインメントは、専用のアルゴリズムおよびプログラム（例えば、C l u s t a l W など）を使用して実行される。

【0018】

したがって、本発明によるタンパク質は、以下のアミノ酸配列から誘導されてもよい：

- 63 位、または 370 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、I n d i a n a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 2、

- 47 位、または 354 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、M a r r a b a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 3、

- 63 位、または 370 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、M a r r a b a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 4、

- 47 位、または 358 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、N e w J e r s e y 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 5、

- 63 位、または 374 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、N e w J e r s e y 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 6、

- 47 位、または 358 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、C a r a j a s 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 7、

- 63 位、または 374 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、C a r a j a s 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 8、

- 47 位、または 354 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、A l a g o a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 9、

- 64 位、または 371 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、A l a g o a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 10、

- 47 位、または 354 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、C o c a l 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 11、

- 64 位、または 371 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、C o c a l 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 12、

- 47 位、または 354 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、M o r r e t o n 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインである、配列番号 13、および

- 64 位、または 371 位、またはその両方のアミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換された、M o r r e t o n 株に由来する完全長 V S V G タンパク質である、配列番号 14。

【0019】

G タンパク質の結晶学的特性評価によって、本発明者らは、K 47 および R 354 残基が、L D L に由来する受容体との相互作用にとって非常に重要であることを示した。一方または両方の残基が、異なる物理的および化学的特性を有する別のアミノ酸残基によって置換された場合、得られる G タンパク質は、細胞受容体と相互作用するその能力を失う。対照的に、同じ得られるタンパク質は、適切な pH 条件では、その融合特性を保持する。

## 【 0 0 2 0 】

本発明では、タンパク質は、単離されており、これは、そのタンパク質がその天然の状況から単離されていることを意味する。タンパク質は、非天然であり、これは、このタンパク質を取得する唯一の方法が、人工の、当業界で周知の技術的方法を使用することによって、研究室において、置換を実行することであることを意味する。

## 【 0 0 2 1 】

より有利には、本発明は、以前に開示された単離された非天然タンパク質であって、以下のアミノ酸配列の1つを含む、またはそれから本質的になる、またはそれからなる前記タンパク質に関する：

- 配列番号 1 5 ~ 2 0 ；
- 配列番号 2 1 ~ 2 6 ；
- 配列番号 2 7 ~ 3 2 ；
- 配列番号 3 3 ~ 3 8 ；
- 配列番号 3 9 ~ 4 4 ；
- 配列番号 4 5 ~ 5 0 ；および
- 配列番号 5 1 ~ 5 6

(ここで、47位、または354位、または47位と354位の両方、または配列番号1に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸は、KまたはRを除く任意のアミノ酸である)。換言すれば、本発明では、アミノ酸 X a a は、RまたはKを除く任意のアミノ酸に相当する。

配列番号 1 5 は、47位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 1 6 は、354位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 1 7 は、47位および354位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 1 8 は、63位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 1 9 は、370位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 2 0 は、63位および370位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、I n d i a n a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 2 1 は、47位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 2 2 は、354位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 2 3 は、47位および354位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

## 【 0 0 2 2 】

配列番号 2 4 は、63位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 2 5 は、370位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 2 6 は、63位および370位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、M a r r a b a 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 2 7 は、47位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、N e w J e r s e y 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 2 8 は、358位にKまたはRを除く任意のアミノ酸による置換を有する、N

10

20

30

40

50

ew Jersey 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 29 は、47 位および 358 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、New Jersey 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 30 は、63 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、New Jersey 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 31 は、374 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、New Jersey 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 32 は、63 位および 374 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、New Jersey 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 33 は、47 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 34 は、358 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 35 は、47 位および 358 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 36 は、68 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 37 は、379 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 38 は、68 位および 379 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Carajas 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 39 は、47 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 40 は、354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 41 は、47 位および 354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 42 は、64 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 43 は、371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 44 は、64 位および 371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Alagoa 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 45 は、47 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 46 は、354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 47 は、47 位および 354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 48 は、64 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 49 は、371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 50 は、64 位および 371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Cocal 株に由来する完全長 V S V G タンパク質に対応する。

配列番号 51 は、47 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する V S V G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

10

20

30

40

50

配列番号 52 は、354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する VSV G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 53 は、47 位および 354 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する VSV G タンパク質の細胞外ドメインに対応する。

配列番号 54 は、64 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する完全長 VSV G タンパク質に対応する。

配列番号 55 は、371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する完全長 VSV G タンパク質に対応する。

配列番号 56 は、64 位および 371 位に K または R を除く任意のアミノ酸による置換を有する、Morretton 株に由来する完全長 VSV G タンパク質に対応する。

10

換言すれば、本発明は、有利には、以下の配列番号 15 ~ 56 の配列（ここで、Xaa は、R または K を除く任意のアミノ酸に相当する）の 1 つを含む、またはそれからなる単離された非天然タンパク質に関する。

有利には、本発明は、47 位、または 354 位、または 47 位と 354 位の両方のアミノ酸が、A、G、F または Q、好ましくは、A または Q によって置換された、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。

換言すれば、本発明は、有利には、以下の配列：配列番号 15 ~ 56（ここで、Xaa は、R または K を除く任意のアミノ酸に相当する）の 1 つを含む、またはそれからなる単離された非天然タンパク質に関する。

20

#### 【0023】

有利には、本発明は、以下の配列番号 155 ~ 322 の配列の 1 つを含む、それから本質的になる、またはそれからなる単離されたタンパク質に関する。換言すれば、本発明は、有利には、以下の配列番号 155、配列番号 156、配列番号 157、配列番号 158、配列番号 159、配列番号 160、配列番号 161、配列番号 162、配列番号 163、配列番号 164、配列番号 165、配列番号 166、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169、配列番号 170、配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174、配列番号 175、配列番号 176、配列番号 177、配列番号 178、配列番号 179、配列番号 180、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 183、配列番号 184、配列番号 185、配列番号 186、配列番号 187、配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、配列番号 191、配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、配列番号 195、配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 179、配列番号 180、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 183、配列番号 184、配列番号 185、配列番号 186、配列番号 187、配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、配列番号 191、配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、配列番号 195、配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 203、配列番号 204、配列番号 205、配列番号 206、配列番号 207、配列番号 208、配列番号 209、配列番号 210、配列番号 211、配列番号 212、配列番号 213、配列番号 214、配列番号 215、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 218、配列番号 219、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 223、配列番号 224、配列番号 225、配列番号 226、配列番号 227、配列番号 228、配列番号 229、配列番号 230、配列番号 231、配列番号 232、配列番号 233、配列番号 234、配列番号 235、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 238、配列番号 239、配列番号 240、配列番号 241、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 248、配列番号 249、配列番号 250、配列番号 251、配列番号 252、配列番号 253、配列番号 254、配列番号 255、配列番号 256、配列番号 257、配列番号 258、配列番号 259、配列番号 260、配列番号 261、配列番号 262、配列番号 263、配列番号 264

30

40

50

、配列番号 2 6 5、配列番号 2 6 6、配列番号 2 6 7、配列番号 2 6 8、配列番号 2 6 9  
 、配列番号 2 7 0、配列番号 2 7 1、配列番号 2 7 2、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 4  
 、配列番号 2 7 5、配列番号 2 7 6、配列番号 2 7 7、配列番号 2 7 8、配列番号 2 7 9  
 、配列番号 2 8 0、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 2、配列番号 2 8 3、配列番号 2 8 4  
 、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 6、配列番号 2 8 7、配列番号 2 8 8、配列番号 2 8 9  
 、配列番号 2 9 0、配列番号 2 9 1、配列番号 2 9 2、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 4  
 、配列番号 2 9 5、配列番号 2 9 6、配列番号 2 9 7、配列番号 2 9 8、配列番号 2 9 9  
 、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 2、配列番号 3 0 3、配列番号 3 0 4  
 、配列番号 3 0 5、配列番号 3 0 6、配列番号 3 0 7、配列番号 3 0 8、配列番号 3 0 9  
 、配列番号 3 1 0、配列番号 3 1 1、配列番号 3 1 2、配列番号 3 1 3、配列番号 3 1 4  
 、配列番号 3 1 5、配列番号 3 1 6、配列番号 3 1 7、配列番号 3 1 8、配列番号 3 1 9  
 、配列番号 3 2 0、配列番号 3 2 1 および配列番号 3 2 2 の配列 1 つを含む、それから本  
 質的になる、またはそれからなる上記で定義された単離されたタンパク質に関する。

10

#### 【0024】

より有利には、本発明は、配列番号 1 の 8 位または配列番号 1 に記載された前記タン  
 パク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、H または Q または Y を除  
 く任意のアミノ酸によって置換された、上記で定義された単離された非天然タンパク質に  
 関する。

#### 【0025】

より有利には、本発明は、配列番号 1 の 2 0 9 位または配列番号 1 に記載された前記タ  
 ンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、Y または H を除く任  
 意のアミノ酸によって置換された、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関す  
 る。

20

より有利には、本発明は、前記タンパク質が、以下のアミノ酸配列：配列番号 5 7 ~ 1  
 5 4 の 1 つを含む、またはそれから本質的になる、またはそれからなる、上記で定義され  
 た単離された非天然タンパク質に関する。

#### 【0026】

配列番号 5 7 ~ 1 5 4 は、4 7 位、または 3 5 4 位、または 4 7 位と 3 5 4 位の両方、  
 または配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置の  
 アミノ酸が、K または R を除く任意のアミノ酸によって置換されているタンパク質であっ  
 て、

30

- 配列番号 1 の 8 位または配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパ  
 ク質中の対応する位置のアミノ酸が、H または Q を除く、または好ましくは、Y を除く任  
 意のアミノ酸によって置換されている、

- 配列番号 1 の 2 0 9 位または配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導されるタ  
 ンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、Y または H を除く任意のアミノ酸によって置換  
 されている、または

- 配列番号 1 の 8 位または配列番号 1 に記載の前記タンパク質から誘導されるタンパ  
 ク質中の対応する位置のアミノ酸が、H または Q を除く、または好ましくは、Y を除く任  
 意のアミノ酸によって置換され、配列番号 1 の 2 0 9 位または配列番号 1 に記載の前記タ  
 ンパク質から誘導されるタンパク質中の対応する位置のアミノ酸が、Y または H を除く任  
 意のアミノ酸によって置換されている、タンパク質である。

40

#### 【0027】

より有利には、本発明は、  
 1 9 2 ~ 2 0 2 位、または  
 2 4 0 ~ 2 5 7 位、または  
 3 4 7 ~ 3 5 3 位、または  
 3 6 4 ~ 3 6 6 位、または  
 3 7 6 ~ 3 7 9 位

のアミノ酸の間にペプチドの挿入をさらに含み、前記ペプチドが、配列番号 1 に記載のタ

50

ンパク質とは異なるタンパク質を起源とする、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。本発明者らは、上記領域内での、V S VのGタンパク質とは異なるタンパク質を起源とするペプチドの挿入が、本発明によるタンパク質の融合特性を変化させないことを同定した。

#### 【0028】

本発明では、「アミノ酸192位～202位、240位～257位、347位～353位、364位～366位、または376～379位の間の挿入は、ペプチドが、

- 2つの連続するアミノ酸の間、例えば、アミノ酸192位～193位の間の、193および194、194および195、195および196、196および197、197および198、198および199、199および200、200および201、201および202、240および241、241および242、242および243、243および244、244および245、245および246、246および247、247および248、248および249、249および250、250および251、251および252、252および253、253および254、254および255、255および256、256および257、347および348、348および349、349および350、350および351、351および352、352および353、364および365、365および366、376および377、377および378、および378および379

- または1または複数のアミノ酸の欠失のため、2つの連続しない番号のアミノ酸の間に挿入されることを意味する；例えば、193位のアミノ酸が挿入されたペプチド（など）によって欠失または置換されたため、ペプチドを192位と194位のアミノ酸の間に挿入することができる。

上記説明があれば、当業者は、本発明によって包含される挿入の位置を決定することができる。

#### 【0029】

より有利には、本発明は、351位と352位のアミノ酸の間にペプチドの挿入をさらに含み、前記ペプチドが、配列番号1に記載のタンパク質とは異なるタンパク質を起源とする、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。有利には、本発明は、1位（換言すれば、N末端、すなわち、1位のアミノ酸の上流）にペプチドの挿入をさらに含み、前記ペプチドが、配列番号1に記載のタンパク質とは異なるタンパク質を起源とする、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。本発明では、1位でのペプチドの挿入は、上記で定義された非天然タンパク質のN末端での前記ペプチドの挿入を意味する。かくして、この実施形態では、上記で定義された前記非天然タンパク質の配列の最初のアミノ酸残基は、保存（維持）される。換言すれば、上記で定義された前記非天然タンパク質の配列の1位の前記最初のアミノ酸残基は、欠失していない。代替的な実施形態では、本発明は、1位のアミノ酸残基の代わりにペプチドの挿入をさらに含み、前記ペプチドが、配列番号1に記載のタンパク質とは異なるタンパク質を起源とする、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。かくして、この代替的な実施形態では、上記で定義された前記非天然タンパク質の配列の最初のアミノ酸残基は、欠失しており、前記ペプチドの配列と置き換えられている（すなわち、置換されている）。

#### 【0030】

有利には、本発明者らは、配列番号1の1位（換言すれば、N末端）での、またはアミノ酸351位と352位の間の、または配列番号2～14中の対応する位置での挿入、および47位、または354位またはその両方、または配列番号2～14中の対応する位置での変異が、変異型タンパク質の融合特性を改変しないことを同定した。

したがって、本発明者らは、その受容体と相互作用するV S V Gタンパク質中、これらの2個のアミノ酸の間に、膜タンパク質を特異的に認識するタグペプチド、発光物質、ナノボディまたは任意のペプチドを挿入することを提唱する。

換言すれば、特に有利には、本発明者らは、したがって、2個の上記アミノ酸の間に、目的の細胞の特異的標的化を可能にする任意のペプチドが挿入された、変異型V S V G

タンパク質を提供することを提唱する。

より有利には、本発明は、前記ペプチドが細胞受容体のリガンドの少なくとも一部である、上記で定義された単離された非天然タンパク質に関する。

ペプチドまたはナノボディが挿入された、本発明による変異型タンパク質を用いて、目的の細胞、特に、腫瘍細胞を特異的に標的化し、したがって、ウイルスの腫瘍溶解特性を使用することによって、この決定された細胞を特異的に殺傷するVSVを産生することができるようになる。

#### 【0031】

実際、この場合、本発明によるGタンパク質は、その天然の受容体(LDL-R)と相互作用しないが、配列番号1の351位および352位、または配列番号2~14中の対応する位置のアミノ酸の間に挿入されたペプチドにとっての標的である受容体を認識するであろう。本発明によるタンパク質はその融合特性を保持するため、タンパク質はウイルス進入を可能にし、したがって、ウイルスは標的細胞を殺傷することができる。

例えば、挿入されるペプチドは、抗HER2ナノボディ、抗MUC18ナノボディまたは抗PD-1ナノボディであってもよい。

本発明はまた、上記で定義された単離された非天然タンパク質をコードする核酸分子に関する。

換言すれば、本発明は、上記で定義された、配列番号15~322に記載の任意のタンパク質をコードする核酸分子に関する。

別の態様では、本発明は、上記で定義された単離された非天然タンパク質を発現する組換えウイルスに関する。有利なウイルスは、本発明による変異型タンパク質に対応するGタンパク質を除く、野生型形態の全てのウイルスタンパク質を発現するVSVである。

有利には、本発明は、上記で定義された核酸分子を含む組換えウイルスに関する。

本発明はまた、上記で定義された単離された非天然タンパク質を含有もしくは発現する、または上記で定義された核酸分子を含有する真核細胞に関する。有利には、本発明は、上記で定義されたウイルスが感染した真核細胞に関する。

#### 【0032】

本発明はまた、以下：

上記で定義されたタンパク質；または

上記で定義された核酸分子；

上記で定義されたウイルス；または

上記で定義された真核細胞

の少なくとも1つを含む組成物に関する。

特に、本発明は、以下の配列：配列番号15~322の1つを含む、またはそれからなるGタンパク質をコードするウイルスを含む組成物に関する。

#### 【0033】

本発明はまた、薬物としての使用のための、以下：

上記で定義されたタンパク質；または

上記で定義された核酸分子；

上記で定義されたウイルス；または

上記で定義された真核細胞

の少なくとも1つを含む組成物に関する。

特に、本発明は、薬物としての使用のための、以下の配列番号15~322の配列の1つを含む、またはそれからなるGタンパク質をコードするウイルスを含む組成物に関する。

有利には、本発明は、がんを処置するために使用するための、上記で定義された組成物に関する。

上記の通り、本発明による変異型タンパク質を発現するウイルスを使用して、決定された細胞を特異的に標的化し、したがって、それらを特異的に殺傷することができる。

本発明は、表面、有利には、脂質膜を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞な

10

20

30

40

50



どの殺傷しようとする細胞に標的化するための、前記表面、有利には、脂質膜中に固定された、上記で定義されたタンパク質の *in vitro* での使用に関する。

#### 【0034】

本発明では、膜を標的目的地に特異的に向かわせるためにそのような膜に固定される本発明によるタンパク質を *in vitro* で使用することが提唱される。例えば、本発明による変異型タンパク質を、リボソーム、小胞、エキソソームの膜中に、カプセル、ナノ粒子上などに固定して、本発明によるタンパク質が、このリボソーム、小胞、カプセルまたはナノ粒子を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に特異的に標的化することができるようにすることができる。

この使用は、本発明によるタンパク質が薬物の特異的標的化を可能にする、薬物送達標的化目的で特に有利である。

10

薬物は、治療分子、タンパク質、および核酸であってもよい。

本発明は、表面、有利には、脂質膜を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に標的化するための使用のための、前記表面、有利には、脂質膜中に固定された、上記で定義されたタンパク質に関する。

#### 【0035】

本発明では、膜を標的目的地に特異的に向かわせるための使用のためのそのような膜に固定される本発明によるタンパク質が提唱される。例えば、本発明による変異タンパク質を、リボソーム、小胞、エキソソームの膜中に、カプセル、ナノ粒子上などに固定して、本発明によるタンパク質が、このリボソーム、小胞、カプセルまたはナノ粒子を、特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に特異的に標的化することができるようにすることができる。

20

この使用は、本発明によるタンパク質が薬物を特定の標的、例えば、細胞、特に、がん細胞などの殺傷しようとする細胞に特異的に標的化させる、薬物送達標的化目的で特に有利である。

かくして、本発明は、薬物送達系としての使用のための本発明による変異型タンパク質であって、リボソーム、もしくは小胞、もしくはエキソソームの膜中に、またはカプセル上、もしくはナノ粒子上に固定される、変異型タンパク質に関する。

薬物は、治療分子、タンパク質、および核酸であってもよい。

本発明は、以下の図面および実施例からより良好に理解されるであろう。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

【図1】図1は、7個のCRモジュール(1~7)、3個のEGFリピート(a、bおよびc)、表皮増殖因子前駆体様ドメインの7枚羽根プロペラドメイン( ) (B.)、およびO結合オリゴ糖を含有するC末端ドメイン(C.)を示す、LDL-Rのモジュール構造の略図である。SP=シグナルペプチド；X=膜貫通ドメイン。A.: CRドメインおよびD.: 細胞外ドメイン。

【図2】図2は、pH8での、GSH磁気ビーズに結合した7個のGST-CRドメイン(1~7)と、Gthとの相互作用実験のSDS-PAGE分析の結果を表す。C.は対照を表す。タンパク質の移動位置を、矢印：A.: Gth、B.: CRx-GSTおよびD.: GSTで示す。

40

【図3】図3は、図6および図7に提示される実験を例示する。感染の4時間後、BSR細胞を、VSV核タンパク質に対する抗体(抗VSV N抗体)で標識して、感染(緑色蛍光)および表面展示された糖タンパク質によるCRドメイン認識を探索するためのGST-CRATTO550(赤色蛍光)を可視化した。

【図4】図4A~4Iは、蛍光GST-CR1ATTO550、GST-CR2ATTO550およびGST-CR3ATTO550を使用した、VSVに感染したBSR細胞の表面でのGの標識化の写真である。感染の4時間後、細胞を、4で30分間、適切なGST-CRATTO550と共にインキュベートした後、固定および透過処理し、次いで、抗VSV N抗体を使用して免疫標識化して、感染を可視化した。DAPIを使用して

50

、核を染色した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ である。図4 Aは、抗VSV N抗体を使用した細胞の標識化を表す。図4 Bは、蛍光GST-CR1 A T T O 5 5 0を使用した細胞の標識化を表す。図4 Cは、図6 Aおよび図6 Bにおける蛍光の重ね合わせを表す。図4 Dは、抗VSV N抗体を使用した細胞の標識化を表す。図4 Eは、蛍光GST-CR2 A T T O 5 5 0を使用した細胞の標識化を表す。図4 Fは、図6 Dおよび図6 Eにおける蛍光の重ね合わせを表す。図4 Gは、抗VSV N抗体を使用した細胞の標識化を表す。図4 Hは、蛍光GST-CR3 A T T O 5 5 0を使用した細胞の標識化を表す。図4 Iは、図6 Gおよび図6 Hにおける蛍光の重ね合わせを表す。

【図5】図5は、20 でのGthとCR1、GthとCR2、GthとCR3の間のそれぞれの等温滴定熱量測定(ITC)分析の代表的なプロットを表す。結合パラメーターを、一部位結合モデルを用いた曲線適合分析によって決定した。パネル中に示された値は、提示される曲線に対応するものである。本文中に記載されるKd値は、3回の独立実験の平均 $\pm$ 標準誤差である。B-C 可溶性形態のCRドメインによるVSV感染の阻害。上のx軸：時間(分)；上のY軸： $\mu\text{cal}/\text{秒}$ ；下のx軸：モル比および下のy軸：注入物質の $\text{kcal}/\text{モル}$ 。左パネル：CR1、中央パネル：CR2および右パネル：CR3。

【図6】図6 A~6 Fは、示された濃度のGST-CR1、GST-CR2、GST-CR3(A~C)、CR1、CR2、またはCR3一価ドメイン(D~F)と共に予めインキュベートしたVSV-eGFPに感染したBSR細胞の写真を表す。細胞を、感染の4時間後に固定した。感染細胞のみが、eGFPを発現している。CR1もGST-CR1構築物も、感染から細胞を保護しない。DAPIを使用して、核を染色した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ である。

【図7】図7は、リボン表示でのGthCR2結晶構造の三次元表示である。

【図8】図8は、リボン表示でのGthCR3結晶構造の三次元表示である。両複合体において、CRドメインは、Gの同じ空洞に営業している。それぞれのCRのNおよびC末端を示す。Gthの三量体化ドメイン(TrD)、プレクストリン相同ドメイン(PHD)および融合ドメイン(FD)を表示する。

【図9】図9は、LDL-R CR2とCR3の配列アラインメントである。保存された残基は灰色の囲みで、類似する残基は囲みで示される。 $\text{Ca}^{2+}$ イオンの結合に関与する酸性残基は、I、II、III、およびIVで示される。Gとの極性接触に関与するCR残基は、それぞれのCR配列上で灰色の記号で標識される(CR2については明灰色およびCR3については黒色；接触が側鎖を介して確立される場合はドットおよび接触が主鎖を介して確立される場合は三角)。CRモジュールから突出し、Gとの疎水性相互作用を確立する芳香族残基は、矢印で示される。

【図10】図10 Aは、CR2の酸性パッチ上へのG塩基性残基のドッキングを示す、Gth-CR接触面上の拡大図に対応する。G残基H8、K47、Y209およびR354が、相互作用に関与する。それぞれのCRドメイン上の残基標識は、接触が主鎖を介して確立される場合は斜体で示される；推定結合は、明灰色の破線として示される。図10 Bは、CR3の酸性パッチ上へのG塩基性残基のドッキングを示す、Gth-CR接触面上の拡大図に対応する。G残基H8、K47、Y209およびR354が、相互作用に関与する。それぞれのCRドメイン上の残基標識は、接触が主鎖を介して確立される場合は斜体で示される；推定結合は、明灰色の破線として示される。

【図11】図11 A~Nは、HEK293T細胞の表面でのWTおよび変異型糖タンパク質の発現ならびに蛍光GST-CR2(A~DおよびI~K)およびGST-CR3(E~HおよびL~M)の結合のフローサイトメトリー分析を表す。トランスフェクションの24時間後、WTおよび変異型Gの細胞表面発現を、4 で1時間、生細胞に直接対する抗Gモノクローナル抗体8G5F11を使用して評価した。次いで、細胞を、抗マウスAlexa fluor 488および示されたGST-CR A T T O 5 5 0染料と同時にインキュベートした。GST-CRドメインに依然として結合することができるG構築物をトランスフェクトされた細胞は、A T T O 5 5 0染料に起因する赤色蛍光を示した。そ

10

20

30

40

50

れぞれのプロット中に、A T T O 5 5 0 陽性細胞のパーセンテージが示される。図 1 1 A は、蛍光 G S T - C R 2 の W T 糖タンパク質との結合の実験を表す。図 1 1 B は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 H 8 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 C は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 Y 2 0 9 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 D は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 K 4 7 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 E は、蛍光 G S T - C R 3 の W T 糖タンパク質との結合の実験を表す。図 1 1 F は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 H 8 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 G は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 Y 2 0 9 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 H は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 K 4 7 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 I は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 K 4 7 Q 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 J は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 R 3 5 4 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 K は、蛍光 G S T - C R 2 の糖タンパク質 R 3 5 4 Q 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 L は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 K 4 7 Q 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 M は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 R 3 5 4 A 変異体との結合の実験を表す。図 1 1 N は、蛍光 G S T - C R 3 の糖タンパク質 R 3 5 4 Q 変異体との結合の実験を表す。

10

【図 1 2】図 1 2 は、細胞 - 細胞融合アッセイの略図である。B S R 細胞に、V S V G ( W T または変異型 G ) および P - G F P ( 細胞質マーカー ) を発現するプラスミドを同時トランスフェクトする。トランスフェクションの 2 4 時間後、細胞を 1 0 分間にわたって、示された pH に調整された培地に曝露した後、p H 7 . 4 の D M E M によって置き換える。次いで、固定前に、細胞を 3 7 ° で 1 時間保持する。融合時に、P - G F P は合胞体中に拡散する。

20

【図 1 3】図 1 3 A ~ 1 3 X は、図 2 0 に記載される実験の結果に対応する写真である。図 1 3 A は、p H 5 . 0 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 B は、p H 5 . 5 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 C は、p H 6 . 0 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 D は、p H 6 . 5 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 E は、p H 7 . 0 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 F は、p H 7 . 5 で空のベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 G は、p H 5 . 0 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 H は、p H 5 . 5 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 I は、p H 6 . 0 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 J は、p H 6 . 5 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 K は、p H 7 . 0 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 L は、p H 7 . 5 で K 4 7 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 M は、p H 5 . 0 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 N は、p H 5 . 5 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 O は、p H 6 . 0 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 P は、p H 6 . 5 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 Q は、p H 7 . 0 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 R は、p H 7 . 5 で R 3 5 4 A 変異体を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 M は、p H 5 . 0 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 N は、p H 5 . 5 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 O は、p H 6 . 0 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 P は、p H 6 . 5 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 Q は、p H 7 . 0 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。図 1 3 R は、p H 7 . 5 で W T G タンパク質を発現するベクターを用いた実験の結果を表す。

30

40

【図 1 4】図 1 4 は、野生型 H A P - 1 細胞 ( A )、L D L - R K O H A P - 1 細胞 ( B ) および H E K 2 9 3 T ( C ) 中での L D L - R 発現の分析を表す。粗細胞抽出物上でイムノブロットを実施し、抗 L D L - R 抗体 ( E P 1 5 5 3 Y - 1 . ) を用いて示した。チューブリン ( t u b ) も、ローディング対照としてイムノブロットした ( 2 . )。

50

【図15】図15は、VSV-eGFP感染に対するLDL-R欠損HAP-1細胞の感受性に対するRAPタンパク質の効果を示すヒストグラムである。VSV-eGFPを使用して、RAPの存在下（灰色の柱）または非存在下（黒色の柱）でのHAP-1（A）およびHAP-1 LDL-R KO（B）細胞を感染させた。フローサイトメーターを使用して、eGFPを発現する細胞の数を計数することによって、感染性を決定した。データは、3組実施した実験に関する平均および標準誤差を記載する。対応のないStudentのt検定を使用して、p値を決定した（\* $p < 0.01$ ；\*\*\*非有意）。

【図16】図16は、VSV G変異体を用いて偽型化したVSV G-GFPウイルスの生成の略図である。変異型Gをその表面上に発現するトランスフェクトしたHEK-293T細胞に、VSV G野生型を用いて偽型化したVSV G-GFPを感染させた。感染の16時間後、変異型VSV Gを用いて偽型化したVSV G-GFPビリオンを、上清から収獲した。

【図17】図17は、VSV G-GFPウイルス粒子中への野生型および変異型Gの組み込みを表す。野生型VSV Gを用いて偽型化したVSV G-GFPを使用して、示された変異体をトランスフェクトしたHEK-293T細胞に感染させた（MOI 1）。感染の16時間後、ウイルス上清を収集し、濃縮し、ウェスタンブロットによって分析した（抗VSV G抗体および抗VSV M抗体を使用する）。

【図18】図18は、WTおよび変異型糖タンパク質を用いて偽型化したVSV G-GFPの感染性を示すヒストグラムを表す。WT VSV Gを用いて偽型化したVSV G-GFPを使用して、示された変異型糖タンパク質を予めトランスフェクトしたHEK-293T細胞に感染させた（MOI 1）。WTまたは変異型糖タンパク質によって偽型化したVSV G-GFPウイルスを使用して、6時間、HEK-293T、BSR、CHOおよびS2細胞に感染させた；感染細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによってGFPを発現する細胞を計数することによって決定した。データは、3つの独立実験に関する平均および標準誤差を記載する。それぞれのバーの上に、力価の減少係数（1に対して正規化されたWT Gによって偽型化したVSV G-GFPと比較した）を示す。

【図19】図19は、N末端（成熟タンパク質の1位）へのmCherryタンパク質の挿入によって、およびアミノ酸351位と352位の間へのmCherryタンパク質の挿入によって改変されたVSV糖タンパク質をコードするpCAGGSプラスミドをトランスフェクトされたHEK293T細胞の写真である。赤色蛍光は、両方の事例において細胞表面に存在し、タンパク質が正確に折り畳まれ、ゴルジ装置を通して輸送されたことを示している。これは、G上のこれらの2つの位置が任意のペプチドを挿入するのに潜在的に興味深いということを示唆する。

#### 【実施例】

#### 【0037】

（実施例1）

< VSV糖タンパク質による低密度リボタンパク質受容体認識の構造的基礎 >

本発明者らは、VSV GがLDL-Rの2つの異なるCR（システインリッチ）ドメイン（CR2およびCR3）に独立に結合することができることを同定したが、これらのドメインと複合体を形成するVSV Gの結晶構造を報告する。その構造は、G上のCR2およびCR3の結合部位が同一であることを示す。本発明者らは、LDL-R遺伝子がノックアウトされたHAP-1細胞が、VSV感染に依然として罹りやすいことを示し、VSV Gが進入のためにLDL-R以外の受容体を使用することができることを確認する。しかしながら、LDL-R CRドメインとの相互作用にとって重要である塩基性残基の変異は、哺乳動物ならびに昆虫細胞中でのVSVの感染性を無効化する。これは、哺乳動物および昆虫細胞中のVSVの受容体だけが、LDL-Rファミリーのメンバーであること、ならびにVSV GがそのCRドメインと相互作用するように特異的に進化したということを示している。

#### 【0038】

< LDL - R CR2 および CR3 ドメインは、VSV G に結合し、ウイルス感染性を中和する >

本発明者らは、大腸菌中でグルタチオン S - トランスフェラーゼ ( GST ) との融合物中のそれぞれの LDL - R CR ドメインを個別に発現させた。それぞれの融合タンパク質を、グルタチオンでコーティングした磁気ビーズと共に pH 8 でインキュベートした後、G の細胞外ドメインの可溶性形態を添加した ( ウイルス粒子のサーモリシン制限タンパク質溶解によって生成された、VSV G t h、アミノ酸 ( AA ) 残基 1 ~ 422 ( 図 2 ) )。4 で 20 分のインキュベーション後、ビーズを洗浄し、結合したタンパク質を SDS / PAGE、次いで、クマシーブルー染色によって分析した。これにより、CR2 および CR3 ドメインだけが、pH 8 で VSV G に直接結合することができることが示された ( 図 2 )。さらに、ATTO550 で蛍光標識された GST - CR2 および GST - CR3 ( GST - CR1 ではない ) ( 図 3 および 図 4 ) は、感染細胞の表面に発現された VSV G を特異的に認識した。本発明者らはまた、等温滴定熱量測定 ( ITC ) を使用して、溶液中での G t h に対する CR1、CR2 および CR3 の結合パラメーターを調査した ( 図 5 )。ここで再度、G と CR1 との相互作用は検出されなかった。他方、CR2 と CR3 の両方について、発熱性であると考えられる結合反応は、1 : 1 の化学量論を示し、類似する Kd を示す ( CR3 については  $4.3 \pm 1 \mu\text{M}$  および CR2 については  $7.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$  )。

10

さらに、組換え可溶性 CR2 および CR3 ドメインは、単独で、または GST との融合物中で、感染前のウイルス接種物と共にインキュベートした場合、ウイルス感染性を中和することもできる。

20

< LDL - R CR ドメインと複合体を形成した VSV G 細胞外ドメインの結晶構造 >

本発明者らは、CR2 または CR3 のいずれかと複合体を形成した G t h を結晶化させた。G 上の CR ドメインの結合部位は、両方の結晶形態において同じである ( 図 7 および 図 8 )。

#### 【 0039 】

G の 2 個の塩基性残基 ( Tr D に由来する H8 および PH D に由来する K47 ) は、CR ドメインの八面体型カルシウムケージに属する 2 個の酸性残基 ( CR2 上の D69 および D73 ; CR3 標識された I および II 上の D108 および D112 - 図 9 ) に向いている。Y209 および R354 と一緒に、それらは相互作用によって重要であると考えられる ( 図 10 A および B )。

30

#### 【 0040 】

< K47 および R354 は、LDL - R CR ドメイン結合にとって必要とされる G の重要残基である >

LDL - R CR ドメイン結合へのそれらの寄与を調査するために、本発明者らは、G の残基 H8、K47、Y209 および R354 をアラニンまたはグルタミンに変異させた。HEK293T 細胞に、野生型または変異型 VSV G 糖タンパク質 ( WT、H8A、K47A、K47Q、Y209A、R354A および R354Q ) をコードするプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後、細胞を G 細胞外ドメインに対する MA b と共にインキュベートした。次いで、緑色蛍光抗 Ig G 二次抗体および ATTO550 で蛍光標識された GST - CR 融合タンパク質を、同時に添加した。免疫蛍光標識により、WT および全ての G 変異体が細胞表面に効率的に輸送されることが示された ( 図 11 )。H8A および Y209A 変異体は、WT G として GST - CR ドメインに結合するが、他の変異体はその結合能力に影響される ( 図 11 )。K47Q、R354A および R354Q 変異体は、GST - CR2 にも、GST - CR3 にも結合しない。最後に、K47A 変異体と CR3 との間に相互作用は検出されないが、この変異体と CR2 との間には残留結合活性が観察される ( 図 11 )。

40

#### 【 0041 】

本発明者らはまた、K47A および R354A 変異体の融合特性をチェックした。このために、BSR 細胞に、野生型または変異型 VSV G 糖タンパク質 ( WT、K47A お

50

よび R 3 5 4 A ) をコードする p C A G G S プラスミドをトランスフェクトした。変異型 G タンパク質を発現する細胞は、W T G のものと類似する融合表現型を有する ( 図 1 3 )。これは、変異型糖タンパク質が正確に折り畳まれることを確認し、G 融合活性と受容体認識を切り離すことができることを証明する。

< 他の L D L - R ファミリーメンバーは V S V の代替的な受容体である >

L D L - R 遺伝子がノックアウトされた H A P - 1 細胞 ( H A P - 1 L D L - R K O ) ( 図 1 4 ) は、W T H A P - 1 細胞と同程度に V S V 感染に罹りやすい ( 図 1 5 )。これは、L D L - R 以外の V S V 受容体が H A P - 1 細胞の表面に存在することを証明する。

#### 【 0 0 4 2 】

V S V 受容体としての他の L D L - R ファミリーメンバーの役割を評価するために、本発明者らは、L D L - R 自体を除く全ての L D L - R ファミリーメンバーへのリガンド結合を遮断する全ての L D L - R ファミリーメンバーの共通リガンドである、受容体関連タンパク質 ( R A P ) の特性を利用した ( Finkelshtein et al., 2013 )。R A P は、W T H A P - 1 細胞ではなく、H A P - 1 L D L - R K O において V S V 感染を有意に阻害する ( 図 1 5 )。これらの結果は、V S V が代替的な受容体として他の L D L - R ファミリーメンバーを使用することができることを示唆する以前のデータ ( Finkelshtein et al., 2013 ) と一致している。

#### 【 0 0 4 3 】

< C R ドメイン結合部位に影響された G 変異体は G 遺伝子を欠く組換え V S V をレスキューすることができない >

次いで、本発明者らは、上記の変異型糖タンパク質がウイルス感染を持続させることができるかどうかを検査した。本発明者らは、G エンベロープ遺伝子が緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) 遺伝子によって置き換えられ、V S V G 糖タンパク質を用いて偽型化された組換え V S V ( V S V G - G F P ) を使用した。この偽型化された組換え体を使用して、W T または変異型糖タンパク質をコードするプラスミドによってトランスフェクトされた、またはトランスフェクトされていない H E K 細胞を感染させた ( Ferlin et al., 2014 )。8 時間後、感染細胞上清を収集した ( 図 1 6 )。上清中に存在する粒子のエンベロープへの変異型糖タンパク質組込みを、ウェスタンブロットによって検証し ( 図 1 7 )、偽型化された粒子の感染性を、感染後 ( p . i . ) 4 時間でフローサイトメトリーにより G F P を発現する細胞を計数することによって、異なる細胞株 ( 哺乳動物 H E K、B S R、C H O およびショウジョウバエ S 2 細胞 ) 中で分析した ( 図 1 8 )。K 4 7 A、K 4 7 Q、R 3 5 4 A および R 3 5 4 Q 変異体は、V S V G - G F P の感染性をレスキューしなかった。W T G と比較して、感染性は 1 / 1 0 ~ 1 / 1 2 0 に低下した ( 図 1 8 )。この低下は、2 種のハムスター細胞株よりも H E K および S 2 細胞株において、より重要であった。哺乳動物細胞株では、H 8 A および Y 2 0 9 A 変異体は、V S V G - G F P の感染性をレスキューすることができるが、W T のものよりも低レベルである。S 2 細胞株では、それらの感染性は、有意に低下する ( H 8 A 変異体については 1 / 1 5 および Y 2 0 9 A 変異体については約 1 / 6 に ) ( 図 1 8 )。

#### 【 0 0 4 4 】

変異体の融合活性は影響されないため、変異型糖タンパク質を担持する偽型の感染性の喪失は、細胞受容体を認識することができないことに安全に起因し得る。これらの結果は、L D L - R C R ドメインに結合することができない K 4 7 A、K 4 7 Q、R 3 5 4 A および R 3 5 4 Q 変異体が、他の V S V 受容体に結合するその能力も著しく損傷していることを示す。

#### 【 0 0 4 5 】

< 考察 >

L D L - R は、V S V および V S V - G によって偽型化されたレンチウイルスの主要な進入口であることが証明されている ( Finkelshtein et al., 2013 )。ここで、本発明者らは、V S V - G が類似する親和性で L D L - R の 2 個の C R ドメインに結合することが

10

20

30

40

50

できることを証明する。この相互作用の生物学的関連性は、V S V 感染を阻害する C R 2 と C R 3 の両方の能力によって証明された。C R 2 および C R 3 と複合体を形成した V S V G の結晶構造は、それらが両方とも、その融合前コンフォメーションにおいて糖タンパク質の表面で同じ部位を占有すること、および同じ G 残基が C R ドメインの正確な固定を確保することを示す。この結合部位は、G がその融合後コンフォメーションにある場合、離れて分割され、G が低い pH で C R ドメインに結合することができない理由を説明する。これは、エンドソーム内腔での G と L D L - R との相互作用を破壊し、適切な融合部位へのビリオンの輸送を支持し得る。

#### 【 0 0 4 6 】

V S V G による C R ドメイン認識は、カルシウムを配位する酸性残基に向かう塩基性残基 K 4 7 および R 3 5 4 を含む。この結合様式は、L D L - R ファミリーメンバーの C R ドメインによる内因性リガンド認識について観察されるものと非常に類似しており、実際、K 4 7 または R 3 5 4 のいずれかがアラニンまたはグルタミンで置き換えられた変異型糖タンパク質は、C R ドメインに結合することができない。これらの重要残基がベシクロウイルス間で保存されていないことは注目に値する。したがって、ウイルス受容体としての L D L - R の使用を、その属の他のメンバーに一般化することはできない。実際、本発明者らは、V S V 残基 4 7 および 3 5 4 に対応する位置に塩基性残基を有しない C H A V G は、C R ドメインに結合しないことを示した。

#### 【 0 0 4 7 】

本発明者らの機能分析は、H A P - 1 L D L - R K O は H A P - 1 細胞と同程度に効率的に感染させることができるため、L D L - R が V S V の唯一の受容体ではないことを確認する。しかしながら、C R ドメインに結合することができない変異型糖タンパク質は、哺乳動物細胞においても、昆虫細胞においても、V S V G - G F P 感染性を回復させることができない。この結果の最も倏約的な解釈は、H E K 細胞中での V S V の唯一の受容体が L D L - R ファミリーのメンバーであるということである。相互作用の分子的基础は、これらの全ての受容体について同じであり、その C R ドメインに結合する G の能力を含む。これは、L D L - R ファミリーの他のメンバーのアンタゴニストである R A P タンパク質の存在下で観察される感染性の低下と一致する。全体として、本研究は、V S V G が、L D L - R ファミリーのメンバーの C R ドメインと相互作用するように特異的に進化したことを証明する。この受容体ファミリーの遍在性（無脊椎動物間にも広がっている）は、V S V の広向性を説明する。

#### 【 0 0 4 8 】

G による C R ドメイン認識の分子的基础の特性評価と一緒に、V S V の受容体が L D L - R ファミリーの全メンバーであるという証明は、向性が改変された組換え V S V を開発する道を開く。実際、( i ) 天然受容体の向性を除去する点変異および ( i i ) 腫瘍細胞を特異的に標的化するタンパク質ドメインまたはペプチドの挿入を有する糖タンパク質 ( Ammayappan et al., 2013 ) は、完全に再標的化された腫瘍溶解性 V S V の設計を可能にするはずである。そのようなウイルスは、正常な細胞を残しながら、がん性細胞を除去することができるはずである。

#### 【 0 0 4 9 】

##### < 細胞およびウイルス >

B H K - 2 1 ( ベビーハムスター腎臓細胞 ; A T C C C C L - 1 0 ) のクローンである B S R および H E K - 2 9 3 T ( サルウイルス 4 0 T 抗原を発現するヒト胚性腎臓細胞 ; A T C C - C R L - 3 2 1 6 ) 細胞を、1 0 % ウシ胎仔血清 ( F C S ) を添加した D u l b e c c o 改変 E a g l e 培地 ( D M E M ) 中で増殖させた。H o r i z o n D i s c o v e r y から購入した、H A P - 1 w t および H A P - 1 L D L - R 欠損細胞 ( H A P - 1 L D L - R K O ) を、1 0 % F C S を添加した I s c o v e 改変 D u l b e c c o 培地 ( I M D M ) 中で増殖させた。C H O ( チャイニーズハムスター卵巣から誘導された細胞株 ) 細胞を、2 m M グルタミンおよび 1 0 % F C S を添加した H a m F 1 2 培地中で増殖させた。全ての哺乳動物細胞株を、5 % C O 2 を含む加湿インキュベータ

中、37℃で維持した。ショウジョウバエS2細胞を、28℃で、10% FCSを添加したSchneider培地中で増殖させた。

野生型VSV (Mudd - Summer株、Indiana血清型)、VSV G - GCHAV (Rose et al., 2000) およびVSV - eGFPを、BSR細胞中で増殖させた。

VSV G - GFPは、Gタンパク質のコード領域が改変型のGFP遺伝子で置き換えられ、VSV Gタンパク質を用いて偽型化されたVSVゲノム (Indiana血清型) の完全長cDNAクローンから誘導された組換えVSVである (Ferlin et al., 2014)。VSV G - GFPを、pCAGGS - VSVGを予めトランスフェクトしたHEK - 293T細胞上で増殖させた。

#### 【0050】

##### < プラスミドおよびクローニング >

pCAGGSプラスミド中で、クローニングされたVSV G遺伝子 (Indiana Mudd - Summer株) から出発して点変異を創出した。簡単に述べると、所望の変異を含有するフォワードおよびリバースプライマーを、G遺伝子にフランキングするプライマーの1つと別々に組み合わせて、2つのPCR産物を生成した。これらの2つのG遺伝子断片は、変異を含有する領域において重複し、これをGibsonアセンブリ反応キット (New England Biolabs) を使用してpCAGGS線状化ベクター中で集合させた。

##### < タンパク質の発現、精製および標識化 >

VSV G<sup>th</sup>を、ウイルス粒子の限定的タンパク質溶解によって取得し、以前に記載されたように (Albertini et al., 2012a) 精製した。

#### 【0051】

ヒトLDL - R (NM\_000527、GenBank) の7個のCRドメインをコードするDNA配列を合成し (MWG biotech)、pGEX - 6P1細菌発現ベクター (Invitrogen) 中にサブクローニングした。それぞれのタンパク質構築物は、そのN末端にGSTタグおよびpreScissionプロテアーゼ切断部位を含有する。それぞれのCRドメインを、(Harper and Speicher, 2011) から誘導された以下のプロトコルを使用して精製した。CR構築物で形質転換されたC41細菌を、ODが0.6 AUに達するまでLB - アンピシリン培地中、37℃で培養した。次いで、37℃で5時間、1 mM IPTGを用いてタンパク質発現を誘導した。細胞を、溶解緩衝液 (500 mM NaCl、20 mM Tris - HCl pH 8、2 mM CaCl<sub>2</sub>、2 % w/vサルコシルおよび1 mM DTT) 中で超音波処理した。明澄化された上清を、0.2 % Triton X100の存在下で2時間、グルタチオンアガロースビーズ (Thermo Fisher Scientific) と共にインキュベートした。次いで、インキュベーション後、ビーズを、平衡化緩衝液 (200 mM NaCl、50 mM Tris - HCl pH 8、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM PMSF) を用いて十分に洗浄した。次いで、GST - CR構築物を、20 mM GSHを添加した同じ緩衝液を用いて溶出させた。それぞれのGST - CRの精製を、Superdex 200カラム (Ge Healthcare) を使用するゲル濾過ステップを用いて達成した。CRドメインを単離するために、精製されたGST - CRを、preScissionプロテアーゼと共にインキュベートし、ゲル濾過カラムSuperdex 75 (Ge Healthcare) 上に注入した。次いで、純粋なCRドメインを含有する画分をプールし、1 mMに濃縮し、使用まで - 80℃で保存した。

1ミリグラムの精製されたGST - CR2 (またはGST - CR3) を、製造業者の指示書を使用して蛍光染料ATTO550 NHSエステル (Sigma Aldrich) で標識した。次いで、標識されたタンパク質を、50 μMの濃度に希釈し、使用まで - 80℃で保存した。標識比は、1分子あたり約2個の染料であると見積もられた。

#### 【0052】

##### < GとCRドメインとの結合の特性評価 >



精製されたGST-CRドメインを、4 で20分間、攪拌下でGSH (Eurogentec) でコーティングされた磁気ビーズと共にインキュベートした。次いで、スラリーを、適切なpHの平衡化緩衝液(200mM NaCl、2mM CaCl<sub>2</sub>、50mM Tris-HCl pH8または50mM MES-NaOH pH6)で洗浄した。精製されたGthまたはウイルス粒子を、この同じ緩衝液中で20分間予備インキュベートし、GST-CR構築物に結合した磁気ビーズまたはGSTのみに添加した。穏やかな攪拌下、20分間インキュベートした後、スラリーを、適切なpH(8または6のいずれか)の平衡化緩衝液で2回洗浄した。ビーズを、ゲル充填緩衝液中に再懸濁し、SDS PAGE上で直接分析した。

#### 【0053】

<G(WTまたは変異体)を発現する細胞へのCRドメインの結合>

顕微鏡観察のために、BSR細胞を4時間感染させた後、4 で30分間、GST-CR2ATTO550またはGST-CR3ATTO550と共にインキュベートした。細胞を、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.5%Triton X-100を用いて透過処理した。核タンパク質を、マウス抗VSV Nモノクローナル抗体を使用することによって検出した。ヤギ抗マウスAlexa fluor 488 (Invitrogen)を、二次抗体として使用した。Leica SP8共焦点顕微鏡(63倍油浸対物レンズ)を使用して、画像を捕捉した。

#### 【0054】

フローサイトメトリー実験のために、HEK-293T細胞に、ポリエチレンイミン(PEI, Sigma-Aldrich)を使用して、WTまたは変異型GをコードするpCAGGSプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を収集し、G細胞外ドメインを認識するマウス抗Gモノクローナル抗体(8G5F11, KeraFast)と共にインキュベートした。次いで、ヤギ抗マウスAlexa fluor 488抗体およびGST-CR2ATTO550(またはGST-CR3ATTO550)を、細胞に同時に添加した。細胞の蛍光を、BD Accuri C6フローサイトメーターを使用して決定した。

#### 【0055】

<偽型>

80%集密度のHEK-293T細胞を、PEIを使用して、WTまたは変異型VSV GをコードするpCAGGSによってトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞に、1のMOIでVSV G-GFPを感染させた。感染の2時間後、細胞を洗浄して、接種物から残留ウイルスを除去した。偽型化されたウイルス粒子を含有する細胞上清を、感染の16時間後に収集した。偽型化されたウイルスの感染力価を、感染の4時間後にBD Accuri C6フローサイトメーターを使用してGFPを発現する細胞を計数することによって、非トランスフェクト細胞上で決定した。偽型化された粒子中へのWTおよび変異型Gの組込みを、上清濃縮後に抗VSV G抗体および抗VSV M抗体を使用するSDS PAGEおよびウェスタンブロット分析によって評価した。

#### 【0056】

<HAP-1細胞の感染>

HAP-1細胞を、70%集密度で播種し、15分間、50nMのRAPと共にインキュベートしたか、またはインキュベートしなかった。次いで、細胞を、1のMOIでVSV-eGFPに感染させた。RAPを、全ての感染時間に維持した。感染細胞(GFP陽性)のパーセンテージを、感染の4時間後にBD Accuri C6フローサイトメーターを使用して決定した。

#### 【0057】

<ITC>

ITC実験を、150mM NaCl、20mM Tris-HCl pH8.0および2mM CaCl<sub>2</sub>から構成される緩衝液中、MicroCal iTC200装置(

10

20

30

40

50

GE Healthcare)を使用して293Kで実施した。50  $\mu$ Mの濃度のGthを、600  $\mu$ Mの濃度でのCRドメインの連続注入によって滴定した。滴定シーケンスは、最初に1  $\mu$ Lの注入、次いで、注入間に180または240秒の間隔を空けて、それぞれ2  $\mu$ Lの注入を19回含んでいた。OriginLabソフトウェア(GE Healthcare)を使用して、生データを分析した。結合パラメーターを、一部位結合モデルを用いた曲線適合分析から抽出した。

#### 【0058】

##### <細胞-細胞融合アッセイ>

細胞-細胞融合アッセイを、以前に記載されたように実施した(Ferlin et al., 2014)。簡単に述べると、70%集密度でガラスカバースリップ上に塗布されたBSR細胞に、WT Gまたは変異型GをコードするpCAGGSプラスミド、およびGFPに融合された狂犬病ウイルスのホスホタンパク質をコードするP-GFPプラスミドを同時トランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を、37 で10分間、様々なpH(5.0~7.5)の融合緩衝液(DMEM-10mM MES)と共にインキュベートした。次いで、細胞を1回洗浄し、37 で1時間、pH7.4のDMEM-10mM HEPES-NaOH、1%BSAと共にインキュベートした。細胞を、1xPBS中の4%パラホルムアルデヒドで15分間固定した。細胞核をDAPIで染色し、合胞体形成を、10倍レンズを備えたZeiss Axiovert 200蛍光顕微鏡を用いて分析した。

##### <文献>

- Albertini, A.A.V., Baquero, E., Ferlin, A., and Gaudin, Y. (2012b). Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry. *Viruses* 4, 117-139.
- Amirache, F., Levy, C., Costa, C., Mangeot, P.E., Torbett, B.E., Wang, C.X., Negré, D., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123, 1422-1424.
- Ammayappan, A., Peng, K.W., and Russell, S.J. (2013). Characteristics of oncolytic vesicular stomatitis virus displaying tumor-targeting ligands. *J Virol* 87, 13543-13555.
- Barber, G.N. (2005). VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 24, 7710-7719.
- Ferlin, A., Raux, H., Baquero, E., Lepault, J., and Gaudin, Y. (2014). Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state. *J Virol* 88, 13396-13409.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7306-7311.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., and Gaudin, Y. (2006). Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313, 187-191.
- Roche, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., and Bressanelli, S. (2007). Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein g. *Science* 315, 843-848.

#### 【0059】

##### (実施例2)

##### <改変型Gをコードするプラスミドの調製>

様々な位置にmCherryが挿入された所望のコードG配列を含有するpCAGGSプラスミドの構築物を、Gibsonアセンブリ反応を使用して生成した。空のベクター

pCAGGSを、EcoRI制限酵素を使用して線状化した。次いで、重複部分を有する3つのPCR産物を生成した。生成物Iは、挿入部位の前のGの断片である；それは、1位にmCherryを挿入するためのプライマーIaおよびIb<sub>1</sub>ならびに351位にmCherryを挿入するためのプライマーIaおよびIb<sub>351</sub>を使用して、VSV-G遺伝子上でPCRを実行して生成される。生成物IIは、mCherry遺伝子である（1位にmCherryを挿入するためのプライマーIIa<sub>1</sub>およびIIb<sub>1</sub>ならびに351位にmCherryを挿入するためのプライマーIIa<sub>351</sub>およびIIb<sub>351</sub>を使用する）。生成物IIIは、挿入部位の後のGの断片である；それは、1位にmCherryを挿入するためのプライマーIIIa<sub>1</sub>およびIIIbならびに351位にmCherryを挿入するためのプライマーIIIa<sub>351</sub>およびIIIbを使用して生成される。

10

#### 【0060】

プライマー配列を、Eurofins Genomicsによって合成した：

Ia：TCTCATCATTTTGGCAAGATGAAGTGCCTTTTGTACTTAG（配列番号332）

Ib<sub>1</sub>：TTGCTCACCATGCAATTTCACCCCAATGAATAAAG（配列番号333）

Ib<sub>351</sub>：GCTCACCATAGTTTCCACTGATCATTTCCGACC（配列番号334）

IIa<sub>1</sub>：CATTTGGGGTGAATTGCGATGGTGAGCAAGGGC（配列番号335）

20

IIa<sub>351</sub>：AATGATCAGTGGAACTATGGTGAGCAAGGGC（配列番号336）

IIb<sub>1</sub>：AAAIIB1CTATGGTGAACCTTCTTGTACAGCTCGTCC（配列番号337）

IIb<sub>351</sub>：GTTCCCTTTCTGTGGTCTTGTACAGCTCGTCC（配列番号338）

IIIa<sub>1</sub>：GAGCTGTACAAGAAGTTTCACCATAGTTTTTCCACACA（配列番号339）

IIIa<sub>351</sub>：CTGTACAAGACCACAGAAAGGGGAAGTGT（配列番号340）

30

IIIb：CCGCCCGGGAGCTCGTTACTTTCCAAAGTCGGTTTC（配列番号341）

アガロースゲル上でそれぞれの断片を精製した後、3つの断片+精製消化されたpCAGGSベクターを等モル濃度で合わせ、Gibsonアセンブリ反応によって集合させる。次いで、DNAを細菌中に形質転換し、制限消化および/または配列決定によって同定した後、正確なプラスミド産物を増幅した。

#### 【0061】

（実施例3）

< 改変型VSV糖タンパク質の一過的発現 >

トランスフェクションプロトコールは、形質導入しようとする細胞の種類に依存することになる。HEK細胞については、本発明者らは、ポリエチレンイミン（PEI）トランスフェクションプロトコールを使用する。BHKについては、本発明者らは、リン酸カルシウムトランスフェクションプロトコールまたはPEIを使用する。

40

#### 【0062】

カバースリップ上で増殖させた細胞に、VSV改変型糖タンパク質をコードするpCAGGSプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの20時間後、細胞を、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定した。洗浄（PBSで3回）後、カバースライドに、immu-mount DAPI（thermo fisher）をマウントし、Zeiss顕微鏡を用いて検査した。赤色蛍光は、両方の事例において細胞表面に存在し、タンパク質がゴルジ装置を通して正確に折り畳まれたことを示している（図19）。

50

本発明は、上記の実施形態に限定されない。

【図 1】

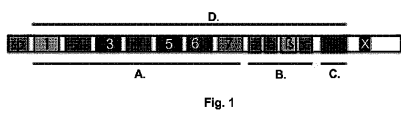


Fig. 1

【図 2】

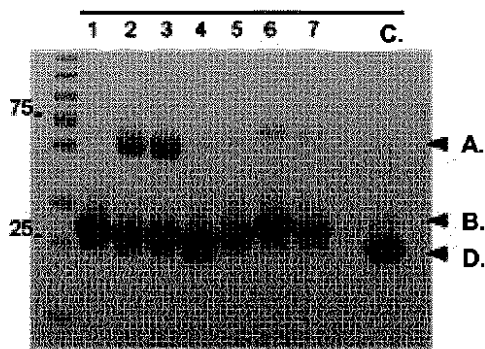


Fig. 2

【図 3】

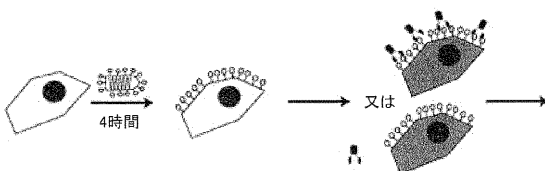
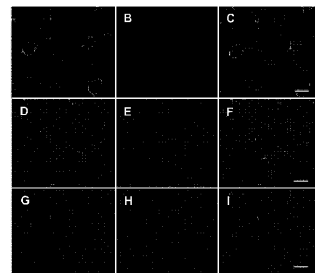


Fig. 3

【図 4】



Figs. 4

【図 5】

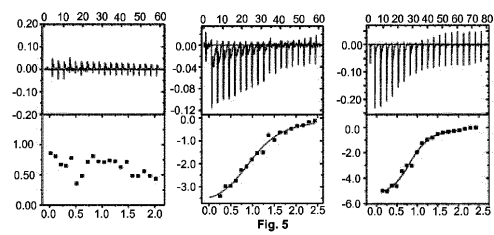
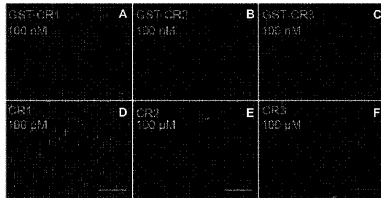


Fig. 5

【 図 6 】



Figs. 6

【 図 7 】

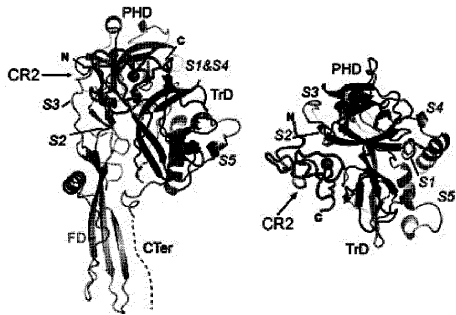


Fig. 7

【 図 8 】

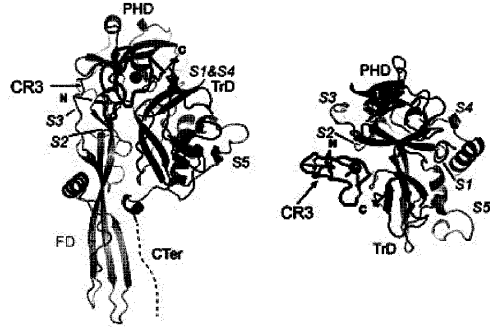


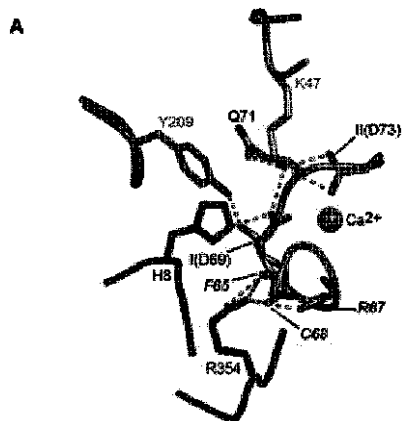
Fig. 8

【 図 9 】

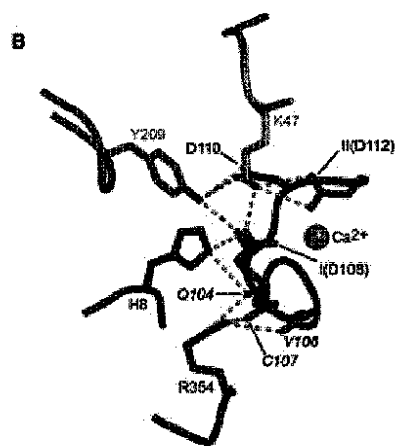


Fig. 9

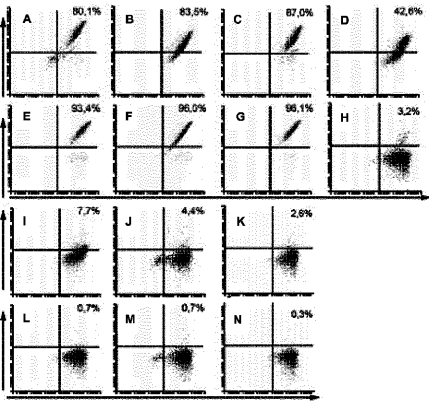
【 図 10 A 】



【 図 10 B 】



【 図 1 1 】



Figs. 11

【 図 1 2 】

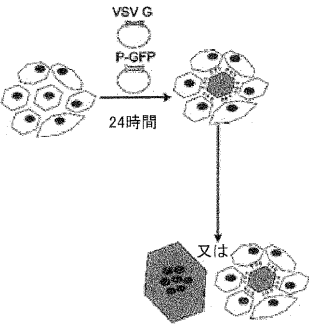


Fig. 12

【 図 1 4 】

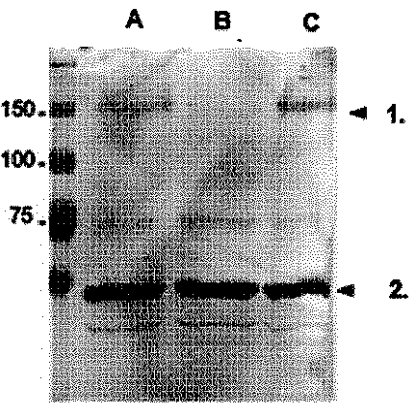
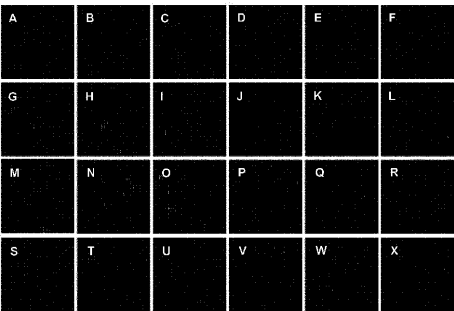


Fig. 14

【 図 1 3 】



Figs. 13

【 図 1 5 】

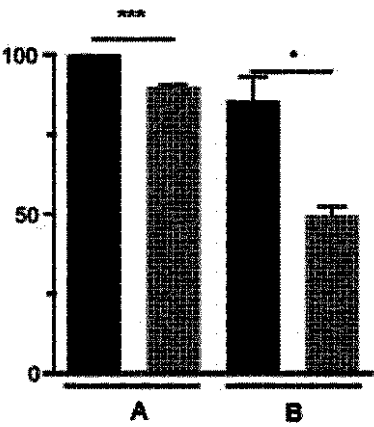


Fig. 15

【 図 1 6 】



Fig. 16

【 図 1 7 】

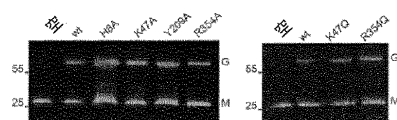
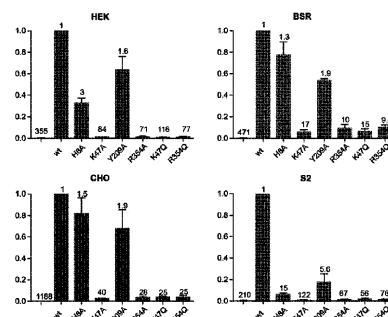


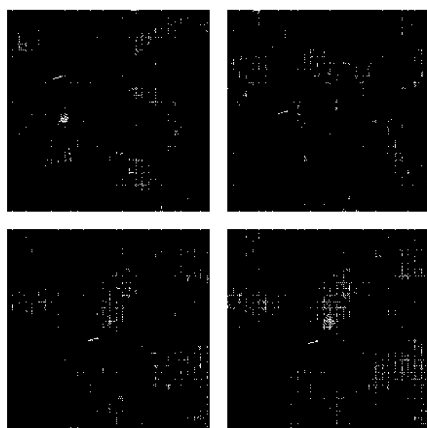
Fig. 17

【 図 1 8 】



**Fig. 18**

【 図 1 9 】



**Figs. 19**

【配列表】

2020534007000001.app



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/075824

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/005 C12N7/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	NIKOLIC J ET AL: "Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 12 March 2018 (2018-03-12), pages 1-12, XP055518690, DOI: 10.1038/s41467-018-03432-4 abstract; results; discussion; -----	1-18
Y	WO 01/19380 A2 (PRO VIRUS INC [US]) 22 March 2001 (2001-03-22) page 1; claims; figure 21; examples -----	1-18
Y	US 2008/124357 A1 (YAO JIANSHENG [CA] ET AL) 29 May 2008 (2008-05-29) claims; examples; sequence 17 -----	1-18
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2018

Date of mailing of the international search report

28/11/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommer, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/075824

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>AMMAYAPPAN A ET AL: "Characteristics of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Displaying Tumor-Targeting Ligands", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 87, no. 24, 2 October 2013 (2013-10-02), pages 13543-13555, XP055122167, US  ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02240-13  abstract; results; discussion;;  figures  -----</p>	1-15
A	<p>FINKELSHEIN D ET AL: "LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 110, no. 18, 15 April 2013 (2013-04-15), pages 7306-7311, XP055436675, US  ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1214441110  abstract; results; discussion;  -----</p>	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/075824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0119380	A2	22-03-2001	AT 319460 T 15-03-2006
			AT 418341 T 15-01-2009
			AU 782402 B2 28-07-2005
			CA 2386920 A1 22-03-2001
			CN 1496268 A 12-05-2004
			DE 60026554 T2 28-09-2006
			EP 1218019 A2 03-07-2002
			EP 1716858 A2 02-11-2006
			ES 2260057 T3 01-11-2006
			ES 2320239 T3 20-05-2009
			HK 1044708 A1 27-10-2006
			HK 1092713 A1 26-06-2009
			IL 148621 A 17-02-2010
			JP 5060694 B2 31-10-2012
			JP 2004525855 A 26-08-2004
			MX PA02002772 A 02-04-2004
			NZ 517573 A 27-02-2004
			NZ 523805 A 24-09-2004
			NZ 534306 A 23-12-2005
			NZ 534307 A 29-07-2005
			WO 0119380 A2 22-03-2001
-----			
US 2008124357	A1	29-05-2008	US 2008124357 A1 29-05-2008
			WO 2008097267 A2 14-08-2008
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>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 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 K 47/69 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/69	
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

- (74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796  
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100168631  
弁理士 佐々木 康匡
- (72)発明者 アルベルティーニ オーレリー  
フランス 9 1 9 4 0 ゴメッツ ル シャテル アヴニユ ピエール キュリー 3
- (72)発明者 ゴーダン イヴ  
フランス 7 5 0 1 5 パリ リュー レオン ドラグランジュ 4
- (72)発明者 ロー エレーヌ  
フランス 9 2 1 6 0 アントニー アレ デ アンプレシオニスト 1
- (72)発明者 プロ ローラ  
フランス 7 8 3 1 0 モルバ リュー デ フジェール 1 1
- (72)発明者 ニコリック ジョヴァン  
フランス 7 5 0 1 5 パリ リュー ルクルブ 3 2 6

F ターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA44  
4C076 AA19 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59  
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 DC50 NA13  
NA14 ZB261 ZB262  
4C085 AA14 BB44 CC23 EE01  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA09 NA13 NA14 ZB26  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 EA20 FA74