

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4544497号  
(P4544497)

(45) 発行日 平成22年9月15日 (2010. 9. 15)

(24) 登録日 平成22年7月9日 (2010. 7. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 31/00 (2006. 01)

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 33/00 (2006. 01)

A 6 1 P 33/00

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 22 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-525566 (P2000-525566)  
 (86) (22) 出願日 平成10年12月22日 (1998. 12. 22)  
 (65) 公表番号 特表2001-526901 (P2001-526901A)  
 (43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/026084  
 (87) 国際公開番号 WO1999/032648  
 (87) 国際公開日 平成11年7月1日 (1999. 7. 1)  
 審査請求日 平成17年4月4日 (2005. 4. 4)  
 (31) 優先権主張番号 60/068, 472  
 (32) 優先日 平成9年12月22日 (1997. 12. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 504326686  
 ユニバーシティ オブ テネシー リサー  
 チ ファウンデーション  
 アメリカ合衆国テネシー州 3 7 9 9 6, ノ  
 ックスヴィル, ヘンリー ストリート 6  
 〇〇, スウィート 2 1 1, ユーティーコ  
 ンフェレンスセンター  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種融合タンパク質を有する組換えラブドウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V S V (水疱性口内炎ウイルス) の標的細胞膜に対する融合を促進するのに効果的な異種 F タンパク質; V S V の G タンパク質の膜隣接外部ドメインのカルボキシル末端の第 2 3 ~ 7 0 アミノ酸残基からなる領域、V S V の G タンパク質の G ステムポリペプチドのアミノ酸配列中の第 4 8 3 ~ 5 1 1 番目のアミノ酸残基からなる細胞質内尾部ドメイン、膜貫通ドメインからなる V S V の G ステムポリペプチド; V S V の N、P、及び L タンパク質を含み、V S V の G タンパク質をコードする核酸配列が欠失した、遺伝的に操作された V S V。

【請求項 2】

さらに V S V の M タンパク質を含む、請求項 1 記載の遺伝的に操作された V S V。

【請求項 3】

さらに抗受容体タンパク質を含む、請求項 1 又は 2 記載の遺伝的に操作された V S V。

【請求項 4】

G ステムポリペプチド及び抗受容体タンパク質が共通の c D N A 配列から発現される、請求項 3 記載の組換え V S V。

【請求項 5】

F タンパク質がパラミキソウイルス株 S V 5 の融合タンパク質である、請求項 1 又は 2 記載の組換え V S V。

【請求項 6】

10

20

V S VのGステムポリペプチドが、V S VのGステムポリペプチドの<sup>404</sup>G l y及び<sup>40</sup>p h eの間の任意の残基から<sup>511</sup>A r gまでのV S V - I n d i a n a株 ( V S V<sub>IND</sub> ) ポリペプチド断片を含む、請求項5記載の組換えV S V。

【請求項7】

V S Vの細胞膜への融合を促進するのに有効な異種Fタンパク質を発現する組換えV S Vを生産する方法であって、以下の：

( A ) V S VのN、P、L及びGタンパク質をコードするc D N Aを適切な細胞に挿入する段階；

( B ) 少なくとも、V S Vの複製のためのc i s作用シグナルを含む3'及び5' V S Vのリーダー及びトレーラー領域；V S VのN、P、M及びLタンパク質をコードする遺伝子群；及び、V S VのGタンパク質の膜隣接外部ドメインのカルボキシル末端の第23～70アミノ酸残基からなる領域、V S VのGタンパク質のGステムポリペプチドのアミノ酸配列中の第483～511番目のアミノ酸残基からなる細胞質内尾部ドメイン、膜貫通ドメインからなるGステムタンパク質、および異種Fタンパク質をコードする遺伝子を含む、V S Vゲノムのポリシストロニックc D N Aコピーを適切な細胞に挿入する段階；

( C ) 組換えV S Vの生産を可能にする条件下で細胞を培養する段階；及び

( D ) 前記組換えV S Vを単離する段階；  
を含む、前記方法。

【請求項8】

ポリシストロニックc D N Aがさらに、組換えV S Vが細胞を標的とするのに効果的な、抗受容体タンパク質をコードする遺伝子を含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

抗受容体タンパク質がC D 4、C D 4誘導体、及び細胞膜上に発現された腫瘍関連抗原( T A A )を認識する抗体又は抗体断片からなる群から選択される請求項8記載の方法。

【請求項10】

ポリシストロニックc D N AがさらにGステムポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項7記載の方法。

【請求項11】

Fタンパク質がパラミキソウイルス株S V 5 Fタンパク質である請求項7記載の方法。

【請求項12】

V S Vの細胞膜への融合を促進するのに効果的な異種Fタンパク質を発現する組換えV S Vを生産する方法であって、以下の：

( A ) 少なくともV S Vの複製のためのc i s作用シグナルを含む3'及び5' V S Vリーダー、及びトレーラー領域、V S VのN、P、及びLタンパク質をコードする遺伝子及び、V S VのGタンパク質の膜隣接外部ドメインのカルボキシル末端の第23～70アミノ酸残基からなる領域、V S VのGタンパク質のGステムポリペプチドのアミノ酸配列中の第483～511番目のアミノ酸残基からなる細胞質内尾部ドメイン、膜貫通ドメインからなるGステムタンパク質、および異種Fタンパク質をコードする遺伝子を含むポリシストロニックc D N Aを適切な細胞に挿入する段階；

( B ) V S Vの複製のためのc i s作用シグナル及び少なくともV S VのG及びMタンパク質をコードする遺伝子を含むミニウイルスにより細胞を感染させる段階；

( C ) c D N Aの発現を可能にし、組換えウイルスを生産させる条件下で細胞を培養する段階；及び

( D ) 前記組換えV S Vを単離する段階；  
を含む、前記方法。

【請求項13】

Fタンパク質がパラミキソウイルス株S V 5 Fタンパク質である、請求項12記載の方法。

【請求項14】

ポリシストロニックc D N A又はミニウイルスがさらに抗受容体タンパク質をコードす

10

20

30

40

50

る cDNA を含む、請求項 7 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

ポリシストロニック cDNA 又はミニウイルスがさらにレポータータンパク質をコードする cDNA を含む、請求項 7 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

遺伝的に操作された VSV のウイルス外殻が標的細胞の細胞膜に融合する条件下で、請求項 3 の遺伝的に操作された VSV を標的細胞に接触させる段階を含む、標的細胞を遺伝的に操作された VSV に融合する方法。

【請求項 17】

標的細胞が HIV - 1 感染細胞であり、抗受容体タンパク質が CD4 又は CD4 誘導体である、請求項 16 記載の方法。

10

【請求項 18】

抗受容体がウイルス、寄生虫、又は細菌により感染した細胞の表面に発現したウイルス、寄生虫、又は細菌タンパク質に結合するのに効果的な量の請求項 3 記載の遺伝的に操作された VSV を含む、ウイルス、寄生虫又は細菌感染した患者を治療するための医薬組成物。

【請求項 19】

抗受容体が疾患に関連する、又は疾患の細胞の表面に発現するタンパク質に結合するのに効果的な量の請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項の組換え VSV を含む、疾患に罹患した患者を治療するための医薬組成物。

20

【請求項 20】

疾患の細胞又は組織が、腫瘍細胞、前腫瘍細胞、良性腫瘍、ポリープ、カフェオレ斑、白斑、及び皮膚母斑からなる群から選択される、請求項 19 記載の医薬組成物。

【請求項 21】

異種 F タンパク質を同定する方法であって、以下の：

(A) 少なくとも VSV の複製のための cis 作用シグナルを含む 3' 及び 5' VSV リーダー及びトレーラー領域、N、P、及び L タンパク質を含む VSV 遺伝子群、VSV の G タンパク質の膜隣接外部ドメインのカルボキシル末端の第 23 ~ 70 アミノ酸残基からなる領域、VSV の G タンパク質の G ステムポリペプチドのアミノ酸配列中の第 483 ~ 511 番目のアミノ酸残基からなる細胞質内尾部ドメイン、膜貫通ドメインからなる G ステムタンパク質、F タンパク質候補及び非 VSV タンパク質の遺伝子を含む、第一のポリシストロニック cDNA を適切な細胞に挿入する段階；

30

(B) VSV の複製のための cis 作用シグナル及びレポータータンパク質をコードする第二の cDNA を含むミニウイルスを細胞に感染させる段階；

(C) 第一の cDNA 及びミニウイルスの複製による組換え VSV の生産を可能にする条件下で細胞を培養する段階；

(D) 前記組換え VSV を単離する段階；

(E) 前記組換え VSV による感染を可能にする条件下で、単離された VSV を感染していない細胞に接触させる段階；及び、

(F) レポータータンパク質が発現しているかどうかを決定する段階；  
を含む、前記方法。

40

【請求項 22】

F タンパク質を発現し、疾患又は異常細胞に感染することができる、請求項 1 記載の組換え VSV を含む、疾患の進行又は退行を診断、検出、又は決定するための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は組換えラウドウイルスの標的細胞への侵入および融合を促進する融合タンパク質を少なくとも発現する組換えラウドウイルスに関するものである。本発明はそのウイルス粒子の表面に融合タンパク質を発現する水疱性口内炎ウイルス (VSV) を含む。融合タ

50

ンパク質を発現するこれらの組換えラブドウイルスは、設計されたラブドウイルスには本来発見されないタンパク質の機能および特異性を研究するために、および診断および治療の目的において異常および病気の細胞（例えば、ウイルスに感染した細胞または癌細胞）を標的とする方法として使用することが可能である。本発明はまた組換えラブドウイルスの産生方法も開示する。

#### 連邦政府による援助

本発明は部分的に以下の連邦政府助成金から、および政府が 37 C. F. R. § 401 の下に権利を授与された結果として生じたものである：NIH GM53726。

#### 【0002】

#### 【従来の技術】

#### A. ウイルスの標的細胞への利用

ウイルスは主に遺伝子治療の目的において、この10年で標的細胞に適するように設計されてきた。遺伝子治療は、遺伝子およびしばしば病気の細胞の運搬を含み、通常は宿主細胞のゲノムへの遺伝子の挿入をも含む。アデノウイルス科、パルヴォウイルス科およびレトロウイルス科に属するウイルスが、細胞ゲノムへの遺伝子の挿入のためのみならず、特異的細胞または組織への遺伝子の運搬のためにも成功的に設計されてきた。

#### 【0003】

ウイルスを特異的細胞に運搬するためには、ウイルスはその型の細胞に感染することが可能でなければならない。ウイルスは一般的には全ての細胞または全ての生物にさえ感染可能というわけではない。ウイルスの細胞への感染能力は、そのウイルスがその宿主生物およびその生物のその細胞に対して有している「向性(tropism)」に基づいている。ウイルスが細胞に感染可能であるためには、その細胞は、ウイルスが認識して細胞の受容体に結合し、その上でエンドサイトーシス、ファゴサイトーシスまたはマクロピノサイトーシスのいずれかによって細胞に侵入することを可能とするような、ウイルスタンパク質に対する受容体を有しなければならない。細胞への侵入の直後に、ウイルスは複製を開始する。ウイルスが組織向性を有しない細胞に感染するためには、ウイルスが興味の対象である細胞または組織の表面に存在する受容体を認識および結合するようにウイルスを加工しなければならない。その場合でさえ、ウイルスが依然として複製不可能である可能性があり、その細胞で産生されていない細胞性の因子を付加的に必要とする可能性がある。

#### 【0004】

遺伝子治療用ウイルスベクターは一般的に、それらが標的とする細胞を殺したり、または溶解したりはしない。遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは、薬剤のように治療上効果的なDNAを運搬するために加工されている（例えば、D. T. Curieら、米国特許第5,547,932号を参照せよ）。これらのベクターの中には、標的とした細胞内でのみ感染直後に複製することが可能であるものがある（F. McCormick, 米国特許第5,677,178号）。その他の遺伝子治療用ベクターはそれらが複製できないように加工されている。非複製遺伝子治療ベクターは通常は補助プラスミドを用いて（例えば、G. Natsoulis, 米国特許第5,622,856号；M. Marnon, 米国特許第5,646,034号を参照せよ）、またはウイルスゲノム内には存在しない遺伝因子を与えるパッケージング細胞を用いて産生される。

#### 【0005】

遺伝子治療用ベクターは、利用しているウイルスベクターが本来有している野生型の向性を克服するための問題に直面している。これを克服するために、組織または細胞標的に感染することが可能であるような異なるウイルス科または属に由来する、他のウイルスに由来する外被タンパク質をコードするDNAを有するようにウイルスゲノムを加工することによって偽型ウイルスが産生された。近年、アデノウイルスベクター（M. Cottenら、米国特許第5,693,509号）；アデノ関連ウイルスベクター（J. S. Lebkowskyら、米国特許第5,589,377号）；レトロウイルスベクター（B. O. Palssonら、米国特許第5,616,487号）；キメラ融合糖タンパク質を有するベクター（S. Kaymanら、米国特許第5,643,756号）；ウイルスコー

10

20

30

40

50

トタンパク質に対する抗体を有するベクター (C o t t e n ら) ; 通常は H I V - 1 に感染し得ない種であるサルにおける 1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1 ) の研究を可能にするために、ハイブリッドウイルスを産生することによって加工されたウイルス ( J . S o d r o s k i ら、米国特許第 5 , 6 5 4 , 1 9 5 号 ) ; および水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) の G タンパク質を有する偽型レトロウイルスベクター ( J . C . B u r n s ら、米国特許第 5 , 5 1 2 , 4 2 1 号および第 5 , 6 7 0 , 3 5 4 号 ) について記述した多くの遺伝子治療特許が刊行されている。これらの遺伝子治療用ベクターの中には、遺伝子治療における使用のためのベクターの効力を維持すると同時に、直面した向性に関連する問題に対して幾つかの局面における克服を試みる方法を用いるものも存在する。

#### 【 0 0 0 6 】

一時的な遺伝子治療のために、細胞に運搬された遺伝子の発現が一時的であり永遠ではないウイルス運搬体もまた作製されている ( I . H . M a x w e l l ら、米国特許第 5 , 5 8 5 , 2 5 4 号 ) 。ジフテリア毒素の遺伝子 ( 米国特許 5 , 5 8 5 , 2 5 4 号 ) などの、ある特定の毒素をコードする遺伝子を選択的に発現するベクターが作製されている。ウイルスベクターは、それらが感染する宿主細胞の免疫原性をより高めるように加工することもまた可能である ( 米国特許第 5 , 5 8 0 , 5 6 4 号 ) 。

#### B . ラブドウイルスの細胞標的への使用

水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) および狂犬病ウイルス ( R V ) はいずれもラブドウイルス科に属する構成因子である。 V S V はベシクロウイルス属に属し、 R V はリッサウイルス属に属する。ラブドウイルス科の全ての構成因子は、ラブドウイルス粒子の表面を形成する脂質膜エンベロープを有している。

#### ( 1 ) 狂犬病ウイルス

T . M e b a t s i o n らによる最近の論文には、 G タンパク質の全体が欠失した、または G タンパク質の僅かな部分のみが発現しているような狂犬病ウイルス ( R V ) の加工について記載されている。この組換え R V はさらに、 C D 4 または C D 4 および C X C R 4 補助受容体が組換え R V 粒子のエンベロープに発現するように加工された ( T . M e b a t s i o n ら、 ( 1 9 9 7 ) C e l l 9 0 : 9 4 1 - 9 5 1 ) 。これらの加工された R V 偽型ウイルスの性質決定およびこれらを用いた実験により、 G タンパク質の尾部を有する C D 4 / C X C R 4 構築物は H I V - 1 エンベロープタンパク質である g p 1 2 0 を発現する細胞に感染することが可能であることが示された。このウイルス系の欠点は、非 R V タンパク質 ( 例えば、 C D 4 および C X C R 4 ) の効果的な取り込みが、 G タンパク質の少なくとも尾部 ( 4 4 アミノ酸からなる細胞質ドメイン ) が C D 4 ( R V - C D 4 ) または C X C R 4 ( R V - C X C R 4 ) のいずれかに融合したキメラの形状でウイルス粒子上に発現したときにのみ起こる点である。 R V - C D 4 および欠失型 G タンパク質キメラ c D N A のみを発現する組換え R V はウイルス粒子上に検出可能な量の C D 4 を有していない。しかし、 R V - C D 4 および R V - C X C R 4 の両方を発現する組換え R V は、ウイルスエンベロープに C D 4 および C X C R 4 の両方のタンパク質を有するウイルス粒子を産生した ( T . M e b a t s i o n ら、 1 9 9 7 ) 。著者らの結論は C D 4 由来のタンパク質は異種性の「キャリアー」タンパク質とともに複合体を形成した状態でのみ取り込まれるというものであった。 R V 構築物におけるそのキャリアータンパク質は C X C R 4 補助受容体である。

#### ( 2 ) 水疱性口内炎ウイルス

C D 4 も V S V 粒子内で 5 種類全ての V S V 遺伝子産物 : N , P , M , G および L 、とともに発現されている ( S c h n e l l ら、 ( 1 9 9 6 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 1 1 3 5 9 - 1 1 3 6 5 ) 。 S c h n e l l らによる、さらに最近の出版では、 G タンパク質をコードする遺伝子の全体が欠失していても ( G ) 、 C D 4 および C X C R 4 などの補助受容体はウイルス粒子内での発現が可能であることを示した ( S c h n e l l ら、 ( 1 9 9 7 ) C e l l 9 0 : 8 4 9 - 8 5 7 ) 。この C D 4 / C X C R 4 組換え体は G タンパク質をコードする DNA を含む相補的なプラスミドを利用することによって産生された。 G 組換え V S V において、 C X C R 4 をコードする遺伝

10

20

30

40

50

子はCD4をコードする遺伝子の下流に配置した。G-CD4ウイルスの量はGタンパク質を有するCD4構築物について報告されている量の25%であった(Schneilら、1997)。しかし、CD4はGタンパク質の非存在下にも関わらず、その他のVSVタンパク質と同様の効率で組換えウイルス粒子に取り込まれた。G-CD4構築物がHIV-1感染させたジャーカット細胞に感染する能力と、CD4およびCXCR4の両方を含むVSV-G構築物(G-CD4/CXCR4)の能力とを比較すると、G-CD4/CXCR4-VSV組換え体の10%の割合でG-CD4構築物が感染した。さらに、G-CD4/CXCR4はHIV-1陽性細胞の数を減少させることが可能であった。これらの構築物はHIV-1に感染した細胞またはHIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞に侵入および増殖する能力を有することが示された(Schneilら、1997)。

10

#### 【0007】

VSVおよびRVは同一のウイルス科、すなわちラブドウイルス科の構成因子であるが、VSVはあらゆるGタンパク質の非存在下においても感染性のウイルス粒子を生成することが可能である。これに対して、RV組換え体は、非RVタンパク質が、非VSVタンパク質に融合したGタンパク質尾部を有するキメラとして提示された場合のみ機能することが可能である(Mebatsionら、1997)。VSVウイルス粒子の脂質エンベロープに、それ自身およびキメラとしてではなく非VSVタンパク質を発現する能力があるがゆえに、CD4などの非VSVタンパク質が細胞表面におけるものと同じの3次元立体構造を形成するであろうという大きな見込みがなされる。

20

#### (3) 非VSV補助受容体タンパク質を有する組換えVSV

Mebatsionら(1997)およびSchneilら(1997)により記載されている組換えラブドウイルスの使用における一つの欠点は、いずれの場合においてもHIV-1感染細胞に効果的に感染するためにはCXCR4(ヒトTリンパ球に由来する)などの補助受容体を必要とする点である。Mebatsionら(1997)の組換えRVウイルスは付加的にGタンパク質の尾部を必要とする。

#### (4) ウイルスエンベロープ融合タンパク質

外被を有するウイルスの細胞への侵入は、ウイルス外被が、細胞膜またはエンドサイトーシスに続くエンドソームまたはリソソームなどの細胞内区画へ融合した結果として起こる。パラミキソウイルスのサルウイルス5(SV5)の融合(F)タンパク質はウイルスエンベロープと細胞膜との融合を媒介する。これは組換え細胞内においてクローン化および発現されている。VSVのGタンパク質を含むその他のウイルスエンベロープタンパク質は、インビトロでの融合活性のために酸性のpHを必要とし、およびこれとは対照的に、パラミキソウイルスSV5-Fタンパク質は中性のpHにおいて細胞融合を起こすことが可能である。野生型のウイルスはFタンパク質およびそれに結合するパラミキソウイルスのHNタンパク質の連係した挙動を通してその標的細胞と融合する。Fタンパク質およびHNタンパク質の両者を発現するように形質転換された細胞は隣接する細胞と融合し、シンシウムを形成する。しかし、インビトロで作製されてFタンパク質を含む小胞は、ウイルスHNタンパク質が共に存在するかまたはレクチン(すなわちコムギ胚芽アグルチニン)などのある抗レセプター分子が存在しない限り、標的細胞と融合を起こさない。R. G. Patersonら、(1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 7520-7524。

30

40

#### 【0008】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、組換えウイルスの脂質エンベロープの標的細胞の細胞膜への融合を促進するために異種性の「Fタンパク質」(本明細書において定義されている)を発現する組換えまたは遺伝学的に加工されたラブドウイルスに関するものである。このような構築物は、特異的補助受容体を必要とするかまたは特異的な細胞向性を示すような当業者に既知であるシステムの限界を克服する。

#### 【0009】

50

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、組変えウイルスの標的細胞表面への融合を促進するために効果的である異種性のFタンパク質またはそのポリペプチド断片を少なくとも含む組変えラブドウイルスに関連する。本発明の好ましい態様はパラミキソウイルス株SV5の融合タンパク質またはそのポリペプチド断片を本明細書で定義するFタンパク質として使用する。好ましい組変えラブドウイルスは水疱性口内炎ウイルス(VSV)または狂犬病ウイルス(RV)であり得る。狂犬病ウイルスの例では、融合タンパク質をコードするDNAは好ましくはRVのGタンパク質の一部、特にその「尾」の部分にコードするcDNAに融合させる。

## 【0010】

本発明によって企図された組変えラブドウイルスはさらに第二の異種性の(すなわち、もう一つの非ラブドウイルス、非RVまたは非VSV)タンパク質を発現することが可能である。この異種タンパク質は組変えウイルスが標的細胞の細胞膜上に存在する特定の受容体を標的とするための接着タンパク質または抗受容体として使用することが可能である。このような異種接着タンパク質は、好ましくは病気の過程の一部として罹患したまたは異常を呈した細胞上に発現している糖タンパク質またはタンパク質を特異的に認識または結合する。好ましい接着タンパク質は、組変えラブドウイルスが細胞膜上にGP120タンパク質を発現するHIV感染細胞を標的とするために機能するCD4タンパク質またはその誘導体である。対応する接着タンパク質が本発明に従って加工されたラブドウイルスによって発現され得る、罹患または異常細胞上に発現するその他の受容体タンパク質は、寄生感染、ウイルス感染、細菌感染、腫瘍症、前腫瘍症、白斑症、ポリープ、皮膚科学上の病気(カフェオレ斑)および良性腫瘍に関連する病気から生じ得る。

## 【0011】

本発明はさらにラブドウイルスの細胞膜への融合を促進するために効果的であるFタンパク質またはそのポリペプチド断片を発現する組変えラブドウイルスの産生方法に関連する。本方法は、以下の工程を含む：(A)ラブドウイルスN、P、LおよびGタンパク質をコードするcDNAを適切な細胞に導入する；(B)ラブドウイルスの複製にシス作用するシグナルを含む少なくとも3'および5'末端のラブドウイルスのリーダーおよびトレーラー領域を含むポリシストロニックなcDNAコピー、N、P、M、およびLラブドウイルスタンパク質をコードする遺伝子、およびFタンパク質またはそのポリペプチド断片をコードする遺伝子の適切な細胞への導入；(C)組変えラブドウイルスの産生を許可する条件下での細胞の培養；および(D)上述の組変えラブドウイルスの単離。

## 【0012】

上述の方法はさらにもう一種類の非ラブドウイルスタンパク質またはそのペプチド断片の発現のための手段を含む。この付加的な異種タンパク質は通常は接着タンパク質として機能し、それゆえに加工されたラブドウイルスが標的とすべき細胞の表面に発現している受容体を認識および結合する能力を有するべきである。本発明の一つの好ましい態様は、加工されたウイルスの融合タンパク質としてパラミキソウイルスSV5株のFタンパク質を発現することである。

## 【0013】

本発明のもう一つの局面はラブドウイルスの細胞膜への融合を促進するために効果的なFタンパク質またはそのポリペプチド断片を発現する組変えラブドウイルスを産生する方法に関連する。本方法は以下の工程を含む：(A)ラブドウイルスの複製にシス作用するシグナルを含む少なくとも3'および5'末端のラブドウイルスのリーダーおよびトレーラー領域を含むポリシストロニックなcDNAコピー、N、P、およびLラブドウイルスタンパク質をコードする遺伝子、およびFタンパク質またはそのポリペプチド断片をコードする遺伝子の適切な細胞への導入；(B)ラブドウイルスの複製にシス作用するシグナルおよび少なくともラブドウイルスGおよびMタンパク質をコードする遺伝子を含むミニウイルスによる細胞の感染；(C)組変えラブドウイルスを産生するためにcDNAの発現を許可する条件下での細胞の培養；および(D)上述の組変えラブドウイルスの単離。

## 【0014】

好ましい組換えラブドウイルスはV S VおよびR Vである。

【0015】

融合タンパク質を発現する組換えラブドウイルスを用いたインビボまたはインビトロでの罹患細胞の標的化は、組換えウイルスによる感染を許可する条件下での、標的である罹患または異常細胞と組換えラブドウイルスの接着の工程を含む。本態様は、接着タンパク質または抗受容体として機能するためのもう一種類の非ラブドウイルスタンパク質のウイルス表面における付加的な発現を必要とし得る。組換えラブドウイルスによって標的とする上述の細胞は、標的細胞に感染直後のレポータータンパク質または蛍光タンパク質の発現をさらに含み得る。標的細胞は付加的に罹患または感染され得る。企図された一つの組換えラブドウイルスは融合工程の媒介としてパラミキソウイルスS V 5のFタンパク質を発現するものである。

10

【0016】

上記の組換えラブドウイルスはさらに、融合タンパク質を発現する治療上効果的な量の組換えラブドウイルスの患者への投与を含めた、ウイルス、寄生生物または細菌感染に罹患した患者の治療のために企図される。本組換えラブドウイルスは理想的にはウイルス、細菌または寄生生物に感染した細胞を未感染のものから認識および識別することが可能である。本組換えラブドウイルスは、感染の結果生じた細胞上に発現しているタンパク質に結合する。感染細胞に結合する機能を担う非ラブドウイルス（接着）タンパク質は組換えラブドウイルス遺伝子の制御配列に操作的に連結される。融合タンパク質を発現している組換えラブドウイルスによって発現される非ラブドウイルスタンパク質は罹患または異常細胞の表面に発現しているタンパク質を認識および結合することが可能であるような上述の方法は同様に病気を罹患した患者を治療するために企図される。治療用に企図された罹患したまたは異常の細胞または組織は腫瘍性細胞、前腫瘍性細胞、良性腫瘍、ポリープ、カフェオレ斑、白斑症、その他の皮膚のあざまたは損傷、または皮膚科学上の病気を含む。

20

【0017】

本発明はまた本明細書にて定義される融合タンパク質の同定法に関連する。本方法は以下の工程を含む：（A）ラブドウイルス複製にシス作用性に働くシグナルを含む3'および5'末端のラブドウイルスのリーダーおよびトレーラー領域を少なくとも含むポリシストロニックな第一のcDNA、N, P, およびLタンパク質をコードするラブドウイルス遺伝子、Fタンパク質候補および非ラブドウイルスタンパク質をコードする遺伝子の適切な細胞に導入；（B）ラブドウイルス複製にシス作用性に働くシグナルおよびレポータータンパク質をコードする第二のcDNAを含むミニウイルスの細胞への感染；（C）組換えラブドウイルスを産生するために第一のおよびミニウイルスの複製を許可する条件下での細胞の培養；（D）上述の組換えラブドウイルスの単離；（E）上述の組換えラブドウイルスによる感染を許可する条件下での、単離した組換えラブドウイルスの未感染細胞への接触；および（F）レポータータンパク質が発現しているか否かの決定。

30

発明の詳細な説明

A 組み換えラブドウイルスの作製

（1） 融合タンパク質

本明細書中で使用されている「融合タンパク質」または「Fタンパク質」という用語は（1）特性として脂質エンベロープを有するウイルスに由来し、（2）遺伝的に操作されたウイルスの中で異型のタンパク質として発現された場合にウイルスのエンベロープの細胞膜への融合を促進する（そのような融合はウイルスのエンベロープ上の附加タンパク質（または「抗受容体」）が細胞膜上の受容体に結合することによって媒介される）、タンパク質（およびその融合促進性ポリペプチド断片）を意味する。故に本発明のFタンパク質が天然のウイルス性附加タンパク質以外のウイルスエンベロープ上の附加タンパク質の結合を促進する際に非特異的に機能することが可能であると予想される。本明細書中で意図されているFタンパク質の一例は、より総称的な「Fタンパク質」または「融合タンパク質」ではなく本明細書中で特に「Fタンパク質」と呼称されるパラミキソウイルスのS V 5株の「Fタンパク質」として文献で知られている、ウイルスエンベロープ融合タンパク

40

50



質である。

#### 【0018】

「附加タンパク質」とも呼称される「抗受容体」はウィルス粒子を細胞膜上の対応する「受容体」に附加する段階に必要である、ウィルスエンベロープ上のタンパク質を意味する。例えば、パラミキソウィルスのSV5Fタンパク質の天然の抗受容体はウィルス性HNタンパク質である。

#### 【0019】

「ウィルスの附加」は、感染の過程でウィルス粒子の脂質エンベロープ上の抗受容体が細胞表面の「受容体」を認識して結合する段階を意味する。当業者はウィルスの附加はウィルスエンベロープ膜の標的細胞の原形質膜との融合の前に先行する段階であると認識する  
10  
と考えられる。融合はウィルス粒子が細胞に侵入するのに先行する段階である。

#### (2) 使用するラブドウィルス

本発明中で使用を企図される「ラブドウィルス」はVesiculovirus属およびLyssavirus属由来のウィルスを含む。Vesiculovirus属は水疱性口内炎ウィルス(VSV)ニュージャージー血清型(VSV<sub>NS</sub>)、VSV-インディアナ血清型(VSV<sub>IND</sub>)、VSV-アラゴアス株、コカルウィルス、ジュロナウィルス、カラジャスウィルス、マラバウィルス、ピリウィルス、カルカクイウィルス、ユボダノヴァックウィルス、イスファハンウィルス、シャンディブラウィルス、ペリネットウィルスおよびボルトン-Sウィルス(R. R. Wagner et al., IN B. N. FIELD'S 'VIROROLOGY' 第3版 第1巻(1996))を含む。Lyssavirus  
20  
属は狂犬病ウィルス(RV)、ラゴスバトウィルス、モコラウィルス、ドゥーベンヘージウィルス、オボディアンウィルスおよびコトンカンウィルス(ID.)を含む。好ましい組み換えラブドウィルスはVSV(血清型および株は問わない)およびRV(ID.)である。

#### 【0020】

すべてのラブドウィルスはヌクレオカプシド(N)タンパク質、リン酸化タンパク質(P、しかし当初はNSと表記されていた)、基質(M)タンパク質、糖タンパク質(G)および巨大(L)タンパク質をコードする5遺伝子を含む。これらの遺伝子はアンチセンスのゲノムRNA上に並んで存在し、3'-N-P-M-G-(X)-L-5'のように配列している。遺伝子の順序は合成されるタンパク質の比率を意味しているため重要である  
30  
。ラブドウィルスのゲノムのいかなる操作でも、感染および複製に十分な可能性を保持するためには少なくとも5つの転写ドメインは保持されなければならない。ラブドウィルスはプラス鎖メッセンジャーRNA(mRNA)を転写するRNAポリメラーゼを内在する。X遺伝子は全ラブドウィルスには存在しない。X遺伝子は魚類感染性造血壊死ウィルス、ウシー過熱ウィルスの非構造糖タンパク質および狂犬病ウィルスの偽遺伝子に見られる非構造タンパク質をコードする。エキストラ(X)遺伝子はラブドウィルスゲノムの異なった位置で発見されている。感染細胞におけるMタンパク質の合成は細胞には細胞変性的であり、最終的には細胞死を引き起こす。

#### 【0021】

「組み換えラブドウィルス」は本来ラブドウィルス由来ではないタンパク質を発現するウィルス  
40  
を意味する。これは「偽型」または「キメラ」ウィルスを造る。「ミニウィルス」は、N-P-M-L、N-P-L、N-P-G-L、M-G、Gのみ、Mのみまたは4つ以下のVSV遺伝子のいかなる組み合わせをもコードするポリシストロン核酸分子を含む不完全なウィルス粒子を意味する。この不完全なウィルス粒子は複製能を持たない。

#### 【0022】

「組み換えラブドウィルス」または「組み換えVSV」または「組み換えRV」は、少なくとも融合タンパク質またはそのポリペプチド断片を含む単数または複数のcDNAのトランスフェクションにより産生されるVSVとRVを含む全ての組み換えラブドウィルスを意味する。単数または複数のcDNAのトランスフェクションにより産生される組み換えラブドウィルスはトランスで感染性ウィルス粒子を作製するミニウィルスまたは他のc  
50

DNAによりトランスに相補可能である。また、タンパク質は機能的なウィルス粒子產生に必要なタンパク質を安定して発現するヘルパー細胞の使用により供給可能である。

#### 【0023】

「ポリペプチド断片」はウィルス粒子の融合を促進および／または増進する、細胞の標的化を促進および／または増進する、ウィルスの力価および／または感染力などを促進および／または増進するような生物活性を有するタンパク質、抗体、抗受容体、受容体、ラブドウィルスタンパク質、VSVタンパク質などの断片を意味する。

#### 【0024】

さらに「非ラブドウィルスタンパク質」または「非VSVタンパク質」または「非RVタンパク質」は融合タンパク質を発現するよう操作されている野生型のラブドウィルス（またはVSVまたはRV）では本来発現されないタンパク質やそのタンパク質のポリペプチド断片を意味する。

#### 【0025】

「感染性組み換え体」は、記載されているいずれかの方法により產生される、細胞感染後に他の標的細胞に感染可能な新ウィルス粒子を複製することが可能である組み換えラブドウィルスを意味する。「非感染性組み換え体」は、記載されているいずれかの方法により產生される、細胞感染後に新たなウィルス粒子を放出または產生不可能な組み換えラブドウィルスを意味する。例えば、ある「非感染性組み換え」ラブドウィルスはN、PおよびLタンパク質をコードする遺伝子を含むがGおよびMタンパク質をコードする遺伝子を欠いている。

#### 【0026】

記載されている組み換えラブドウィルスおよびVSV構築物はさらにウィルス粒子のエンベロープ上で発現されている「エンハンサータンパク質」または「Gステムポリペプチド」を含む。（「Gステム」、「Gステムポリペプチド」または「エンハンサータンパク質」は、ラブドウィルスGタンパク質の細胞質内尾部ドメイン、膜貫通ドメインおよび膜隣接外部ドメインのカルボキシ末端のおよそ23アミノ酸から70アミノ酸を含むポリペプチドを意味する。）企図されているその他のGステムポリペプチドは他のラブドウィルスGタンパク質由来の類似Gステムポリペプチドだけでなく、全VSV血清型およびその血清型の全株の全Gタンパク質由来の類似領域を含む。これらのGステムポリペプチドは組み換えウィルスの力価および感染力の増進に利用される。Gステムの機能性はエンベロープ感染力を査定することにより評価可能である。エンベロープ感染力はFタンパク質と抗受容体を発現するラブドウィルスの構築物とFタンパク質とGステムを発現するラブドウィルスの構築物間で比較される。Gステムの付加はラブドウィルスの構築物の感染力を100から10<sup>8</sup>倍増進可能である。

#### 【0027】

これらのGステムポリペプチドは次の組み合わせでFタンパク質および抗受容体タンパク質と共に発現せらる。（1）各々単独に発現したGステムポリペプチド、Fタンパク質および抗受容体タンパク質またはそのポリペプチド断片、（2）単独に発現したGステムポリペプチドおよび抗受容体タンパク質の読み取り枠の共通コードDNAから発現したFタンパク質、または（3）単独に発現したFタンパク質および抗受容体タンパク質の読み取り枠の共通コードDNAから発現したGステムポリペプチド。

#### 【0028】

VSV Gステムポリペプチドの一例はVSV - Indiana株のVSV Gステムである（GenBank 寄託番号61384）。VSV<sub>IND</sub><sup>336</sup>Nから始まるGステムポリペプチドは本明細書中に企図されている。より好ましいGステムポリペプチドはVSV<sub>IND</sub><sup>392</sup>T残基の後に始まる。最も好ましいGステムポリペプチドは<sup>404</sup>Glyから<sup>511</sup>Arg（<sup>404</sup>ghgml ds glhlsskaqv fehphiqdaa sqlddeilf fgdtgl sknp idfvegw fss wkssias fff iigliig lfl vlrvgiylyi klkhtkkrqi ytdiemnrlg r<sup>511</sup>）を含み

10

20

30

40

50

うる。別の好ましいVSV<sub>IND</sub> Gシステムは<sup>434</sup>Proから<sup>511</sup>Arg(<sup>434</sup>p d d e i l f  
f g d t g l s k n p i d f v e g w f s s w k s s i a s f f f i i g l i i  
g l f l v l r v g i y l y i k l k h t k k r q i y t d i e m n r l g r<sup>51</sup>  
')を含むポリペプチドを含む。他に企図されているVSV<sub>IND</sub> GシステムはGタンパク質  
の<sup>404</sup>Glyの後に始まるGシステムを含む。<sup>440</sup>Pheから下流で始まるVSV<sub>IND</sub> Gシ  
ステムは高凝集表現型(high assembly phenotype)を有するが、<sup>440</sup>Pheより上流から始  
まるGシステム構築物より感染の特異性が低いためあまり好ましくない。故に企図されてい  
るVSV<sub>IND</sub> Gシステムは下に記載するように、全細胞質尾部ドメイン(VSV-Ind  
iana Gタンパク質の二重下線部)および全膜貫通ドメイン(大文字の肉太活字で表  
記)だけでなく、膜隣接外部ドメインのカルボキシ末端部(例えば、外部ドメインのカル  
ボキシ末端の少なくとも23から127アミノ酸)も含む。

【0029】

【化1】

```

1 mkcflylfl figvnckfti vfphnqkgnw knvpsnyhyc psssdlnwhn dligtglqv
61 mpkshkaiqa dgwmchaskw vtctdfrwyg pkyithsirs ftpsvegcke sieqtkqgtw
121 lnpgefppqsc gyatvtadae vivqvtpphv lvdeytwewv dsqfingkcs ndicptvhns
181 ttwhsdykvk glcdsnlist ditffsedre lsslgkegtg frsnyfayet gdkackmqyc
241 khwgvrllpsg vwfemadkdl faaarfpecp egssisapsq tsdvdsliqd verildyslc
301 qetwskirag lpispvdlsy lapknpgtgp aftiingtlk yfetryirvd iaapilsrmv
361 gmisgttter elwddwapye dveigpngvl rtssgykfpl ymighgmlds glhlsskaqv
421 fehphiqdaa sqlpddeilf fgdtglsknp idfvegwffs wkSSIASFFF IIGLIIGLFL
481 VLrvvgiylvi klkhtkkrqi ytdiemnrlg_r

```

(SEQ ID NO: 1)

【0030】

上記記載ドメインを含む他のラブドウィルスだけでなく他の血清型またはVSV株由来の他の類似Gシステムポリペプチドは当業者に容易に明白だと考えられる。

(3) cDNAを用いた組み換えラブドウィルスの作製

(i) 組み換えラブドウィルス作製に必要なDNA

感染性ラブドウィルスまたは非感染性ラブドウィルスを産生するために「必要なcDNA」という語句は融合タンパク質を発現する感染性または非感染性のいずれかの組み換えラブドウィルス粒子の産生に必要な核酸分子を意味する。これらの組換えウィルスは(1)完全にcDNAを使用すること、または(2)ヘルパー細胞にトランスフェクションしたcDNAとの組み合わせ、または(3)細胞にトランスフェクションしたcDNAにより産生することが可能であり、さらに感染性または非感染性いずれかの組み換えラブドウィルス粒子の産生に必要な残存している構成要素または活性をトランスで供給するミニウィルスに感染される。これらの方法を使用する際に(例えば、ミニウィルス、ヘルパー細胞系またはcDNAトランスフェクションのみ)、必要な最小構成要素は(1)ラブドウィルスNタンパク質によるゲノム(またはアンチゲノム)RNAのカプシド中での包含、および(2)相当するゲノムまたはアンチゲノム(複製の中間生成物)RNAの複製のためのシス作用シグナルを含むRNA分子である。

【0031】

複製要素またはレプリコンとは、5'端および3'端にラブドウィルスのリーダー配列およびトレーラー配列を最小に含んでいるRNAストランドを意味する。ゲノム配列では、リーダーは3'端におよびトレーラーは5'端にある。これら二つの複製シグナル間にあるRNAは同様に複製される。リーダーおよびトレーラー領域にはさらにNタンパク質によるカプシドでの包含の目的および転写および複製を開始するために必要なポリメラーゼの結合のための最小シス作用因子を含まなければならない。

## 【 0 0 3 2 】

ミニウィルスを使用して加工されたラブドウィルスまたはV S V sの調製のためには、G遺伝子を含むミニウィルスはまたGタンパク質mRNAを産生するための適切な開始および終始シグナルを伴ったリーダー領域、トレーラー領域およびG遺伝子も含むと考えられる。もしミニウィルスがさらにM遺伝子を含むならば、Mタンパク質mRNAを産生するための適切な開始および終始シグナルもまた存在しなければならない。

## 【 0 0 3 3 】

加工されたラブドウィルスゲノム内に含まれる全遺伝子にとって、遺伝子はそれらの遺伝子を発現およびタンパク産物の産生を許す適切な開始および終始シグナルを側に置く。

## 【 0 0 3 4 】

「非感染性」加工ラブドウィルスを産生するために、加工されたラブドウィルスは最小レプリコン要素およびN、PおよびLタンパク質を持たなければならない、およびM遺伝子を含まなければならない（一例は下記の例に記載されている G構築物である）。これは細胞から発芽するが、非感染性粒子であるウィルス粒子を産生する。「感染性」粒子を産生するためには、ウィルス粒子は附加タンパク質または抗受容体の使用を通じて、ウィルス粒子の結合および融合を媒介可能であるタンパク質を付加的に含まなければならない。ラブドウィルス本来の抗受容体はGタンパク質である。

## 【 0 0 3 5 】

「適当な細胞」は下記に明白にされる三方法のいずれかで組換えラブドウィルスの集合を許すいかなる細胞を意味する。

## 【 0 0 3 6 】

感染性ウィルス粒子を調製するために、適切な細胞系（例えばBHK細胞）は最初に、T7RNAポリメラーゼまたはT3またはSP6ポリメラーゼ（U s d i n e t a l . , ( 1 9 9 3 ) B i o T e c h n i q u e s 1 4 : 2 2 2 - 2 2 4 またはR o d r i g u e z e t a l . ( 1 9 9 0 ) J . V i r o l . 6 4 : 4 8 5 1 - 4 8 5 7 参照）のような他の適当なバクテリオファージポリメラーゼをコードする、種痘ウィルスvTF7-3（T . R . F u e r s t e t a l . , ( 1 9 8 6 ) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A

3 : 8 1 2 2 - 2 6 ）または、その相当物によって感染される。次に細胞はG、N、P、LおよびMラブドウィルスタンパク質をコードする遺伝子を含む個々のcDNAに感染される。これらのcDNAは組み換えラブドウィルス粒子を構築するタンパク質を供給すると考えられる。細胞は当該技術分野において知られたいずれの方法でもトランスフェクションされうる（例えば、リボソームおよび電気穿孔法など）。細胞系はまたパラミキソウィルスSV5株のFタンパク質のような融合タンパク質をコードするcDNAでトランスフェクションされる。融合タンパク質をコードする遺伝子はそれ自身で細胞にトランスフェクションまたはGタンパク質尾部の一部をコードするDNAに融合されうる。M e b a t s i o n e t a l . , ( 1 9 9 7 ) より記載されているFタンパク質のGタンパク質尾部への融合は感染性または非感染性組み換えRVビリオンを調製する際に必要と考えられる。

## 【 0 0 3 7 】

さらにまた、ラブドウィルスゲノムRNAに等価なものを含む「ポリシストロンcDNA」も細胞系にトランスフェクションされる。もし感染性の組み換えラブドウィルス粒子が感染細胞の中で細胞を溶解するべきであるならば、融合タンパク質またはそのポリペプチド断片をコードする遺伝子だけでなくN、P、MおよびLタンパク質をコードする遺伝子が存在しなければならない。もし感染性、組み換えラブドウィルス粒子が細胞溶解性であることを予定しないならば、Mタンパク質をコードする遺伝子はポリシストロンDNAには含まれない。「ポリシストロンcDNA」は、少なくともN、PおよびLタンパク質をコードする遺伝子を含む転写単位を含むcDNAを意味する。組み換えラブドウィルスのポリシストロンDNAはまた融合タンパク質またはそのポリペプチド断片をコードする遺伝子を含んでもよい。あるいは、融合タンパク質またはその断片はトランスで供給されて

10

20

30

40

50

もよい。他の企図される態様はレポータータンパク質または蛍光タンパク質（例えば、緑蛍光タンパク質およびその派生物、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチル基転移酵素など）をコードする遺伝子、N - P - LまたはN - P - L - M遺伝子、および融合タンパク質を含むポリシストロンcDNAである。他の企図されるポリシストロンDNAは、附加タンパク質をコードする遺伝子、並びに融合タンパク質をコードする遺伝子、レポーターをコードする遺伝子、およびN - P - L遺伝子とN - P - L - M遺伝子のいずれか一つを含んでもよい。組み換えRVを加工する際、融合タンパク質および附加タンパク質をコードする遺伝子は、Me bat s i o n e t a l . , ( 1 9 9 7 ) より記載されているようにG尾部に融合させねばならないと考えられる。組み換えラブドウィルスが発生させる最初の工程はcDNA由来のゲノムまたはアンチゲノムに相当するRNAの発現である。それからNタンパク質によりRNAは包含されそしてP/Lタンパク質により複製される。こうして生成されたウィルスを回収できる。もしGタンパク質が組み換えRNAゲノムを欠いているならば、トランスで供給されなければならない。もしGおよびMタンパク質両方を欠いているならば、両方はトランスで供給されなければならない。

#### 【0038】

「非感染性ラブドウィルス」粒子の調製には、細胞にトランスフェクションされるポリシストロンcDNAがラブドウィルスのみのN、PおよびL遺伝子を含むことを除いて、方法は上記と同様でよい。非感染性ラブドウィルス粒子のポリシストロンcDNAは付加的にレポーター遺伝子をコードする遺伝子を付加的に含んでもよい。Gタンパク質をコードする遺伝子を欠損した組み換えVSVを産生する方法に関する付加的な記載は、A . T a k a d a e t a l . , ( 1 9 9 7 出版 ) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 参照。

#### ( i i ) ウィルスを産生する細胞の培養

トランスフェクションされる細胞は通常は望ましい温度、通常はおよそ37℃で少なくとも24時間培養される。非感染性ウィルス粒子のためには、上清は集められおよびウィルス粒子は分離される。感染性ウィルス粒子のためには、ウィルスを含む上清は採集されおよび新鮮な細胞に移される。その新鮮な細胞はおよそ48時間培養され、および上清は集められる。

#### ( i i i ) 組み換えラブドウィルスの精製

「分離」またはラブドウィルスを「分離すること」という用語は、細胞破片が殆ど残らないようにウィルス粒子を培養および精製する過程を意味する。一例は上清を含むピリオンをとりそして種痘ウィルスおよび細胞破片を除去するために0.1 - 0.2  $\mu$ 孔サイズのフィルター（たとえば、ミレックス - GS、ミリポア）にそれらを通過させることが考えられる（実施例1参照）。あるいは、ピリオンはショ糖勾配のような勾配を用いて精製可能である。組み換えラブドウィルス粒子はベレットに形成され、そしていずれかの望ましい賦形剤または担体に再懸濁されうる。力価は例えば、抗M(23H12)または抗N(10G4)タンパク質特異的な抗体（L . L e f r a n c o i s e t a l . , ( 1 9 8 2 ) V i o l o g y 1 2 1 : 1 5 7 - 6 7 ）を用いた間接的な免疫蛍光法により決定可能である。

#### ( 4 ) cDNAおよびミニウィルスまたはヘルパー細胞系を用いた組み換えラブドウィルスの作製法

「ミニウィルス」および「ヘルパー細胞」（「ヘルパー細胞系」とも知られている）の両方は同様のものを供給する。すなわち、ラブドウィルスピリオンの集合のためのラブドウィルスタンパク質源を供給する。ラブドウィルスミニウィルスの一例は、E . A . S t i l l m a n e t a l . , ( 1 9 9 5 ) J . V i r o l . 6 9 : 2 9 4 6 - 5 3 により報告されているようにGおよびMタンパク質のみを発現するVSVミニウィルスである。ヘルパーウィルスおよびミニウィルスはラブドウィルスタンパク質の遺伝子をコードするトランスフェクションされたDNAから産生されないラブドウィルスタンパク質を供給する方法として用いられている。

## 【0039】

ミニウィルスを使用する際には、細胞はT7RNAポリメラーゼを供給する目的の為に上記記載のように種痘ウィルスにより感染される。好ましいポリシストロンRNA、およびN、PおよびL遺伝子を含むプラスミドが細胞にトランスフェクションされる。トランスフェクション混合物はおよそ3時間後に除去され、そして細胞は、約1 m.o.i.でミニウィルスに感染される。ミニウィルスは欠損しているGおよび/またはMタンパク質を供給する(Stillman et al., (1995) J. Virol. 69:2946-53 参照)。細胞にトランスフェクションされるポリシストロンRNAは感染性または非感染性組み換えラブドウィルスのどちらが望まれるかに依存すると考えられる。

10

## 【0040】

あるいは、ミニウィルスはN、PおよびL遺伝子を供給するために使用されうる。ミニウィルスはまたN、PおよびLに加えてMタンパク質の産生にも使用可能である。ミニウィルスはまたGタンパク質を産生可能である。

## 【0041】

ヘルパー細胞系を使用する際に、欠損しているラブドウィルスタンパク質をコードする遺伝子はヘルパー細胞系により産生される。ヘルパー細胞系は野生型Gタンパク質をコードしない組み換えラブドウィルス粒子を産生するためにN、P、LおよびGタンパク質を有する。タンパク質は組み換えウィルスゲノムの一部ではない遺伝子またはDNAから発現される。これらのプラスミドまたは他のベクターシステムは細胞系のゲノムに安定して組み込まれる。タンパク質はそれで細胞質のレプリコンではなく細胞のゲノムから産生される。ヘルパー細胞系はヘルパーウィルスにより発現されない他のラブドウィルス遺伝子を含むポリシストロンDNAおよびプラスミドcDNAにより感染可能である。使用されるポリシストロンRNAは感染性または非感染性組み換えラブドウィルスのどちらが望まれるかに依存すると考えられる。さもなければ、欠損している遺伝子産物(例えば、Gおよび/またはM)の供給は上記記載のように遂行されると考えられる。B. 組み換えラブドウィルスの使用法

20

上記記載のように産生された組み換えラブドウィルスは(1)感染病原体(例えば、バクテリア、寄生虫またはウィルス)に感染された細胞を標的、(2)疾病したまたは異常な細胞を標的、(3)研究目的のため他のウィルスのエンベロープタンパク質の研究、(4)疾病または感染の治療および異常細胞の除去、(5)診断目的のため特異的な細胞また組織の想像および(6)診断および/または疾病追跡のためのキットとして使用に使用されることが可能である。

30

## (1) 感染病原体に感染された細胞の標的化

融合タンパク質を発現する組み換えラブドウィルスはさらに何らかの感染病原体(例えば、バクテリア、寄生虫またはウィルス)による感染に起因する細胞表面に位置するタンパク質を認識する附加タンパク質もまた発現するよう加工されうる。そのような組み換えラブドウィルスは(1)もし組み換えウィルスによる感染が生じるならばレポータータンパク質の産生により感染病原体の存在を診断することまたは(2)感染を治療することに利用されうると考えられる。

40

## 【0042】

企図される一例は融合タンパク質と共にCD4タンパク質を発現するラブドウィルスである。RVを使用する際は、CD4および融合タンパク質の双方はプラスミドにより創造されうると考えられるが、そこにはこれらのタンパク質をコードする遺伝子はMe bat s i o n et al., 1997に記載されているようにGタンパク質尾部をコードする遺伝子に融合されている。RV構築物におけるGタンパク質尾部の欠損は組み換えRV構築物の表面にCD4および融合タンパク質の発現を妨げると考えられる。VSVを使用する際は、CD4および融合タンパク質はGタンパク質の一部に融合されずに単独で発現されてもよい。CD4および融合タンパク質をコードする遺伝子はNおよびP遺伝子の下流に、しかしL遺伝子の前に配置されうると考えられる。L遺伝子はこれらの構築物における最終

50

遺伝子である。適切な凝集が生じるためにはラブドウィルスタンパク質の比が全構築物において十分同等に残存することが重要である。

#### 【0043】

パラミキソウィルスSV5株のFタンパク質およびCD4を発現するVSVはHIV-1が感染したマクロファージおよびT細胞双方に感染可能と考えられる。そのような組み換えVSVはさらにHIV-1が感染した細胞に侵入するレポータータンパク質を発現するように加工される。この構築物はSchneil et al., 1997およびMe batsion et al., 1997により記載されている構築物、これは補受容体CXCR4が存在するためT細胞のみに感染可能であるが、に対比している。CD4/CXCR4構築物はHIV-1が感染したマクロファージではなくHIV-1が感染したT細胞のみに付加する。インビトロで細胞を標的する(組織培養細胞またはバイオプシーのような組織試料由来の細胞)目的には、分離した組み換えラブドウィルスは当該技術分野において知られている技術を用いて細胞と培養される。組み換えラブドウィルスによる感染の検出は緑蛍光タンパク質のようなレポーター遺伝子の存在を決定することにより行われる。

10

#### 【0044】

インビボで細胞を標的する目的には、分離した組み換えラブドウィルスは血管内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、皮下(s.c.)、経口または組み換えウィルスが組織に射出されるいずれかの方法で(例えば、針またはカテーテル)投与されることが可能である。あるいは、組み換えラブドウィルスは上皮細胞への挿入により特異的に投与されることも可能である。投与の他の方法は吸引が考えられる。組み換えウィルスは循環、付加、感染およびレポーター遺伝子を産生する十分な時間を与えられると考えられる。レポータータンパク質は24時間以内および36時間以内では必ず検出可能と考えられる。

20

#### 【0045】

企図される標的にされる細胞に感染したウィルス病原体は次のウィルス科の一部を含む。Arenaviridae、Bunyaviridae、Coronaviridae、Filoviridae、Flaviviridae、Herpesviridae、Hepadnaviridae、Orthomyxoviridae、Paramyxoviridae、Poxviridae、RetroviridaeおよびRhabdoviridae。付加的な組み換えラブドウィルスにより標的にされるウィルス病原体は、アフリカ豚コレラウィルス、ボルナ病ウィルス、X肝炎、HIV-1、1型ヒトTリンパ細胞ウィルス(HTLV-1)、HTLV-2、レンチウィルス、エプスタインバールウィルス、乳頭腫ウィルス、単純疱疹ウィルス、B肝炎およびC肝炎を含む。

30

#### 【0046】

感染宿主に細胞内に存することが可能なバクテリア病原体のタンパク質はまた組み換えラブドウィルスにより感染を企図される潜在的な標的である。企図される細胞内バクテリアは、他の中で、Shingella flexneri、Salmonella typhi、Legionella種、ミコバクテリウムおよびクラミジアを含む(G.L.Mandell, "Introduction to Bacterial Disease" IN CECIL TEXTBOOK OF MEDICINE, (W.B.Saunders Co., 1996) 1556-7参照)。これらのバクテリアは組み換えラブドウィルスが付加すると考えられる感染細胞の表面にバクテリア関連タンパク質を発現することを予期されると考えられる。

40

#### 【0047】

細胞内に存する寄生虫病原体のタンパク質はまた組み換えラブドウィルスによる感染を企図される標的である。企図される細胞内寄生虫は例えば原虫類を含む。細胞に感染する原虫類はPlasmodium(例えば、Plasmodium falciparum、P. Vivax、P. ovaleおよびP. malariae)、Trypanosoma cruziおよびCryptosporidium属の寄生虫を含む。

疾病の及び/または異常な細胞は、先に記載された通りの同一の投与方法により先に記載

50

された組換えラブドウイルスを使用することにより標的となる。疾病のまたは異常な細胞は、ネオプラスティック細胞、プレネオプラスティック細胞、良性腫瘍、またはポリープ、カフェオレスポット、白斑症、及びその他の皮膚のあざを完全に含む。

#### 【0048】

組換えラブドウイルスは、疾病のまたは異常な細胞に発現する受容体を認識及び結合する、抗受容体を使用することにより標的となる。組換えラブドウイルスビリオンの融合体は、先に記載された通りの融合タンパク質により媒介される。組換えラブドウイルスにおいて可能性のある抗受容体は、あらゆる特定の細胞受容体に対する自然の抗受容体を含む。

#### 【0049】

選択的には、組換えラブドウイルスは抗体またはそのポリペプチド断片、つまり二重機能抗体、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fv、または一本鎖Fv(scFv)を、それらの付着タンパク質を発現するように設計することが可能である。そのような抗体断片は、特定の受容体を同一と認識及び結合するように構築される。これらの抗体は人間、またはキメラ抗体（以下を参照。S. L.

Morrison 「抗体分子、遺伝子工学の」、分子生物学及び生物工学；A COMPREHENSIVE DESK REFERENCE 1995；

S. D. Gilliesら(1990) Hum. Antibod. Hybridomas 1(1): 47-54； E. JARLOW 及びD. LANE、抗体；

研究室マニュアル(1988) Cold Spring Harbor Press、NY、の考察及び追加参照)を人間化することが可能である。機能のある一本鎖抗体をウイルスの表面の発現させることは、バッカニアウイルスを用い、報告された(M. C. Galmicheら(1997)

J. Gen. Virol. 78:3019-3027)。同様の方法が、融合タンパク質及び抗体または抗体断片を発現する組換えラブドウイルスを作成することにより利用された。例えば、細胞表面に発現される腫瘍関連抗原(TAA)(例えば、PMAまたはPSA)を標的とするモノクローナル抗体の遺伝子は、単離され、当該技術修得者に知られるとおりの、望まれる組換えラブドウイルス生産するために使用することが可能である。

#### 【0050】

例えば、TAAを認識する抗体の遺伝子は、Fタンパク質、完全なGタンパク質またはGステムのいずれかを融合または、Fタンパク質及びGタンパク質またはGステムの組み合わせにおける発現を可能にする。抗体の例は、悪性前立腺上皮細胞と反応するが良性前立腺組織(例えばATCC No. HB-9119； ATCC HB-9120； 及びATCC No. HB-11430)とは反応しない、または悪性乳癌細胞とは反応するが通常乳細胞(例えばATCC No. HB-8691； ATCC No. HB-10807； 及びHB-108011)とは反応しない抗体を含む。その他の疾病組織と反応するが通常組織とは反応しない抗体またはその断片は、当業者には明白である。

#### (3) その他のウイルスの外被タンパク質の研究

脂質膜外被を発現するウイルスの外被タンパク質は、組換えラブドウイルスを使用することにより研究可能である。そのような組換えウイルスは、(1)特定のウイルス外被タンパク質の向性；及び(2)ウイルス外被タンパク質により標的とされる細胞受容体(抗受容体)の研究を許諾する。ある危険なウイルスのため、実験法は高度封じ込め領域に対する通常の必要性以外で進めることが可能である。この研究における興味のウイルス外被タンパク質は、以下のウイルスファミリーのものである、例えば：Arenaviridae、Bunyaviridae、Coronaviridae、Filoviridae、

Flaviviridae、Herpesviridae、Hepadnaviridae、Orthomyxoviridae、Paramyxoviridae、Poxviridae、Retroviridae、及びRhabdoviridae。

タンパク質を発現する脂質外被を有する追加のウイルスは以下を含む、アフリカ豚熱ウイ



ルス、ボルナ病ウイルス、及び肝炎X。組換えラブドウイルスを利用した研究の完了した危険なウイルスは、その他の全てを含む：エボラウイルス（ザイル、レストン、スーダンのサブタイプ）、マールブルグウイルス、ラッサ熱、デング熱、ハンタウイルス、韓国易性出血熱、キャサヌール森ウイルス、プームラウイルス、ソウルウイルス、サル易性出血熱ウイルス、HIV、HIV、及び南アメリカ易性出血熱ウイルス（B. N. FIELDS' VIROLOGY 一巻及び二巻、ニューヨーク、NY 1996）。

#### 【0051】

他のウイルスの外被タンパク質を発現するラブドウイルスの生産は、上記記載と同一の技法により成し遂げられた。標的細胞に対する組換えラブドウイルスの投与はまた、先に記載されたとおりの技法により行われた。実施例6は、エボラウイルスレストン株の外被タンパク質を発現する組換えVSVを記載する。

10

#### （4）組換えラブドウイルスを利用した疾病または感染の治療法

「疾病細胞」により、ウイルス、バクテリア、寄生虫に感染した細胞、または、組織学的または遺伝学的に組織型に対し異常な細胞を意味する。上記記載の組換えラブドウイルス顆粒は、疾病または感染の結果の状況を治療または回復するために、使用することが可能である。もし、疾病または異常な細胞が標的となり組換えラブドウイルスに感染しMタンパク質が発現すると、感染した細胞はMタンパク質の細胞毒性の結果として結局は死ぬであろう。融合タンパク質を発現しない組換えVSV構築物は、この理由によりHIV-1に感染した細胞を殺し、数を減少させる（Schneilら、1997参照）。

#### 【0052】

20

例えば特定の腫瘍関連抗原（TAA）を認識する抗体または抗体断片を発現する組換えラブドウイルスは、少なくとも一つのTAAを発現するある癌細胞を標的とする（V. T. DEVITAら、CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY（1996））。修飾されたラブドウイルスの標的として働く潜在的TAAは、以下を含む：脳腫瘍において発現する - ヒト絨毛性ゴナドトロピンホルモン（ - HCG）及び - フェトタンパク質（AFP）；乳癌において発現するBRCA1、BRCA2の産物及び癌胎児性抗原（CEA）；メラノーマに関連するチロシナーゼ及びMART-1抗原；c-erbBファミリー；乳癌組織において発現するMUC1/REP；TuAg-1；及び肺ガンにおいて発現する上皮細胞成長因子受容体（EGFR）（V. T. DEVITAら、CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY（1996））。この様なラブドウイルス偽型は、癌細胞を標的として感染の後には癌細胞を溶解し殺す組換えラブドウイルスを、治療に効果的な量を個人に感染させることにより癌を治療するための使用が完了している。組換えラブドウイルスの発現のための他のTAAは当業者に知られている。

30

#### 【0053】

本発明の組換えラブドウイルスは、侵入後標的細胞において複製し、他の標的細胞に再感染することが可能となるよう設計されている。これらの組換えラブドウイルスは健康な細胞に感染することは不可能である。

#### （5）細胞のイメージング法

診断のため、疾病の進行または退化の決定、または特定の組換えラブドウイルスが細胞に感染可能か否か研究するために、組換えラブドウイルスはレポータータンパク質または蛍光タンパク質を発現するよう構築することが可能である。これらのレポータータンパク質は、組換えラブドウイルスが成功裏に細胞に感染したときだけ、転写、翻訳される。レポータータンパク質の存在あるいは不在が、組換えラブドウイルスが細胞に感染可能か否かを決定する。あるいは、レポータータンパク質を発現する組換えラブドウイルスは、ウイルス外被タンパク質の向性または他のタンパク質 - タンパク質（例えば、受容体 - リガンド）の相互作用を研究するとき用いられる。レポータータンパク質の検出は疾病の存在を指示する。実施例5及び7は、細胞のイメージに使用される代表的組換えラブドウイルスを記載する。

40

#### （6）疾病細胞検出のための診断キット

50

上記記載の通り、疾病または異常な細胞に感染可能であり、感染に成功するとレポータータンパク質を生産する組換えラブドウイルスを含むキットが準備可能である。組換えラブドウイルスは、疾病に関連した細胞受容体を認識するよう準備される。例えば、組換えラブドウイルスにより発現される付着タンパク質は、腫瘍関連抗原（TAA）を認識し、癌あるいは特定の型の癌を検知することが可能である。これらのキットは、より早く検出する、及びいかなる疾病が存在するかより正確に検出するために、存在する組織学的染色技術と結びつけて使用することが可能である。キットは追加的には、疾病の段階を確認するために使用可能である（例えば、癌の1段階に対し癌の4段階）。これは、いかなる診断法または診断法らが、特定の目的の疾病を治療するのに適切であるかを診断及び決定する目的に対し有用である。

10

#### 【0054】

所望のキットは、例えば生研由来の組織標本に結合するよう準備された組換えラブドウイルスを有する。この組織標本または吸引された細胞は、当業者の知るとおり、組換えラブドウイルスと共に培養される。キットラブドウイルスと共に保温した後、細胞及び/または組織は受容体タンパク質の存在または不在を試験される。

#### 【0055】

キットは上記の通りインビボ使用のためにも準備される。準備前の組換えラブドウイルスは、以前に考察された投与法の一つにより、目標に投与されうる。受容体遺伝子の発現は皮膚細胞において、または外科的診断の最中に検出される。手術のために、疾病または異常な細胞に対し、健康な（または通常の）細胞を検出することは、外科医にどの程度の量の疾病組織が切除を必要としているかを、ラブドウイルスにより感染された細胞におけるレポータータンパク質の発現を試験することにより外縁を決定することにより、決定させることを許容する。

20

#### 【0056】

従って以下の実施例は、特に所望される本発明の態様を注意し、いかなる方法においても発表の残部を限定するよう解釈すべきではない。他の一般的な配置は当業者には明らかである。

#### 【0057】

#### 【実施例】

#### 実施例1 修飾されたラブドウイルスの作成

30

組換えVSV cDNAの構築。本実施例においてパラミキソウイルスSV5のFタンパク質を発現する組換えVSVを構築するために使用した方法の図は、図5において示す。切断型細胞質領域を有するGタンパク質をコードする全長VSV cDNAは、pVSVFL(+)<sub>INJG</sub>における野生型Gタンパク質をコードする遺伝子を置き換えることにより作成された(N. Lawsonら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1995) 92:4477-4481)。CT-1の他のバージョンもまた構築された、これは3つの継続した停止コドンを含み、細胞質尾部コード領域のNheI認識部除去の残りの部分を有した。この変異体はCT-1TS(CT-1 Triple

Stop)と呼称され、ヌクレオチド975-997(VSV-インディアナの完全なゲノム配列は、GenBank #J02428を参照)に相補的なセンス鎖プライマー(MW-36)を用いた標準的PCR仲介型変異導入法により作成された、このヌクレオチドはGタンパク質cDNAにおけるKpnI認識部の5'であり、アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-TATATGCTAGCTTATTATTATCGGAGAACCAAGAATAGTCCAATG-3')(SEQ ID NO:2)である。導入された3つの停止コドンは、太字で示し、クローニングに用いたNheI認識部は下線で示した。

40

#### 【0058】

Gタンパク質欠損変異体をコードするプラスミド(pVSV-G)は、pVSVFL(+)-2よりMluIからNheI断片を除去し(Lawsonら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1995) 92:4477-81)、クレノ

50

一断片により埋め、その後プラスミドを再結合することにより作成された。そのため、pVSV-Gは、Gタンパク質遺伝子の転写制御配列及び3'非転写領域部分を保った、しかし、Gタンパク質のコード領域の読み取り枠(ORF)を欠いていた。オリゴヌクレオチド由来のポリリンカー領域(5'-MluI-KpnI-XhoI-SmaI-EagI-NheI-3')も、異種遺伝子のGタンパク質遺伝子転写単位に対する挿入を容易にするため、MluI及びNheI認識部の間に導入された。このプラスミド(pVSV-G-PL)は、ヒトCD4(pVSV-G-CD4)または、CD4の膜貫通及び細胞質領域がVSV-Gタンパク質の対応する領域と置き換えられたキメラCD4タンパク質(G-CD4G)のいずれかをコードする組換えVSV cDNAを生産するために使用された。

10

#### 【0059】

HAGS構築物(HAタグ付きGステム)はVSV-Gタンパク質の欠損型をコードし、pVSVFL(+)-2のGタンパク質遺伝子の5'非翻訳領域におけるMluI認識部に重なるプライマー及び、アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-AGGATGTTCTGAAGCGTAAATCTGGTACATCATACGGATACcttgcaatttcaccccttag-3')(SEQ ID NO:3)を用いたPCR仲介型変異導入により作成された、これはVSV-Gタンパク質における1280部のNspV認識部(下線)に重なり、Gタンパク質のシグナルペプチド(小文字)とHA抗原決定基(太字)に相補的な配列を融合し、Gタンパク質外部領域の膜近位「ステム」領域が続いた。同様の構築物(Gステム)もまた、HA抗原決定基を含んでいないが、適切な変異導入プライマー

20

#### 【0060】

組換えVSVの回収と生産。変異体Gタンパク質をコードする感染能のあるウイルスは、約 $3 \times 10^6$ のBSK-21細胞にバッカニアウイルスvTF7-3を感染させることによりプラスミドから回収した(T.R.Fuerstら、(1986)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:8122-8126)、このバッカニアウイルスはT7ポリメラーゼをコードする。一時間の後、種菌は除去され、細胞は、5µgの適切なpVSV-G変異体プラスミド及び、各々5µg、3µg、5µg及び1µgのVSVのインディアナセロ型(VSV<sub>IND</sub>)由来の野生型G、N、P及びL遺伝子からなるDNAリポソーム懸濁液により、形質転換された。細胞形質転換は、重量比が各1:2.5のジメチルジオクタデシル臭化アンモニウム(DDAB)及びL-α-ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)からなる(Roseら、(1991)BioTechniques 10:520-525)リポソーム懸濁液を用い、リポソーム形質転換試薬はエタノール導入(Campbell, (1995)BioTechniques 18:1027-1032)により準備されたのを除けば、先に記載のとおり(Whittら(1991)Focus 13:8-12)行われた。形質転換した培養液は24時間保温し、上清を $5 \times 10^6$ の新鮮なBHK細胞に置いた。48時間の保温の後、上清を1250×gで10分間遠心し、0.2µmサイズのフィルター(Millex-GS, Millipore)で濾過し、バッカニアウイルスを除去した。

30

#### 【0061】

VSV-G、G-CD4/G及びG-CD4の回収は、一次形質転換体由来の上清を $2 \times 10^6$ のBHK細胞を含む皿に直接移したことを除けば、CT変異体のために記載したとおりに行われた、このBHK細胞はvTF7-3により前感染され、10µgのGタンパク質発現プラスミドpBS-G-Tにより形質転換されていた。24時間の保温の後、上清を集め、細胞は3%パラホルムアルデヒドにより固定し、抗Mタンパク質特異的(23H12)またはNタンパク質特異的(10G4)モノクローナル抗体(L. Lefrançoisら、(1982)121:157-167)を用いた間接蛍光抗体により試験した。成功した回収物由来の上清は、1-β-Dアラビノフラノシルシトシン(AraC、25µg/µl)存在下で一過的にGタンパク質を発現するBHK細胞に感染させるために使用された。G相補ウイルスの機能する原液は残存するバッカニアウイルス

40

50

を除去するために0.2  $\mu$  フィルターで濾過し、感染後10から16時間の後、上記記載の抗体またはNIH AIDS 研究及び参照試薬プログラムより得た抗CD4モノクローナル抗体Sim. 2 (D. E. McCallusら、Viral Immuno. (1992) 5:163-172)を用い、間接蛍光抗体顕微鏡により力価を決定した。

#### 【0062】

VSVミニウイルスを用いたVSV-HAGS回収。組換えVSV-HAGSは、VSVのG及びMタンパク質のみを発現する(E. A. Stillmanら、J. Biology (1995) 69:2946-2953) VSVミニウイルス(GMMG)が、相補するGタンパク質の元を提供するために使用された選択的戦略により回収された。約 $10^6$ のVTF7-3感染細胞が、10  $\mu$ gのpVSV-HAGS及び、各々3  $\mu$ g、5  $\mu$ g、及び1  $\mu$ gの野生型VSV<sub>IND</sub>のN、P及びLタンパク質をコードするプラスミドにより形質転換された。形質転換体混合物は3時間の後除去し、細胞は一つの、感染多重度のGMMG粒子により超感染された。GMMGミニウイルスを1時間吸収した後、新鮮な培地を細胞に直接加えた。上清は18時間後まで収穫し、その後バッカニアウイルスを除去するために濾過した。

実施例2 融合タンパク質を含む組換えVSVの細胞へのインビトロ投与

濾過物を10 cm皿において細胞に投与した。18から24時間の後、細胞を細胞変性効果(CPE)試験した。CPEを示す培養液由来の上清は力価を測定し、個々のブランクを精製した。精製単離したブランクはBHK細胞を一つの感染多重度で、尾部変異体ウイルスの原液を生産するよう感染させるために使用された。各変異体より単離されたウイルスRNAを直接配列を読むことが、回収されたウイルスが適切な変異を含んでいるか確認するために行われた。

#### 【0063】

VSV-HAGSミニウイルス技術由来の濾過された各上清の二分の一は、新鮮な細胞に感染させるために使用した。成功した回収物は、培養液が感染後18から24時間で通常のVSV感染すると現れる特徴的な細胞変性効果を示したときに指摘された。これら培養液由来の上清は、力価を測定し、共相補ウイルスの原液は新鮮な細胞に0.01の感染多重度で感染させることにより生産された。VSV-HAGS及びGMMGの両方を含む上清は、24時間収穫され、VSV-HAGS及びGMMG粒子は遠心により集められた、その後、20% - 45%スクロース濃度勾配を用いたバンド形成により分離した。通常GMMGの約300倍のVSV-HAGSを含む下部分画は横に穴を開けることにより回収し、GMMGに対するVSV-HAGSの量を、Nタンパク質特異的(VSV-HAGS用)またはGタンパク質特異的モノクローナル抗体を利用した免疫蛍光に基づく力価解析により決定した。GMMGの存在しないVSV-HAGSの原液を得るため、部分的に精製したVSV-HAGSはVSVのニュージャージーセロ型由来のGタンパク質(G<sub>NJ</sub>)を発現することにより完了した。その後、VSVのインディアナセロ型(VSV<sub>IND</sub>)に特異的な中和抗体を培養培地に加えた。使用されたインディアナ特異的血清の量は、VSV-HAGS/GMMG共感染細胞により生産された全てのウイルスを中和した。G<sub>NJ</sub>を発現する細胞及び抗VSV<sub>IND</sub>中和抗体の存在下において3つの継続的経路の後、VSV-HAGSの力価は約 $10^8$  IU/mlに達した、一方0.5 mlの上清は検知可能なGMMGを含んでいなかった。VSV-G<sub>IND</sub>タンパク質で補われた純粋なVSV-HAGSの高力価の原液は、上記記載の通りVSV-Gのために作成された。

実施例3 修飾されたVSVのインビボでの細胞への投与

上記記載のいずれかの方法により用意された組換えVSV粒子は、HIV-1に感染した対象に接種される。対象に投与されるウイルスの濃度は様々で良いが、投与に望ましいウイルスの力価は、およそ $10^6$  から $10^{12}$  IU/mlのオーダーに存在すべきである。使用されるウイルスの量は、もし患者が比較的多数の感染細胞を有している場合多くても良い。実施例1において記載された収穫されたウイルスは導入目的に適切な担体または賦形剤に再懸濁する。

10

20

30

40

50

実施例4 パラミキソウイルスSV5 Fタンパク質及びエボラウイルスの外被タンパク質を発現する組換えVSVの感染力の解析

プラスミド。エボラレストンウイルスグリコタンパク質(ResGP)(A. Sanchezら、(1996)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93: 3602-3607)、VSV Gタンパク質(J. K. Roseら、(1982)Cell 30: 753-762)及びインフルエンザA/トルコ/アイルランド/1378/83(H. Niwaら、(1991)Gene 108: 193-200)の全長をコードするcDNAは、各々pCResGP、pCVSVG及び、pCTHに当てる。

#### 【0064】

細胞。ベロ、BHK、MDCK及びMDBK細胞は、10%ウシ胎児血漿(FCS)、L-グルタミン(Gibco)、ビタミン及びアミノ酸溶液(Gibco)、及びペニシリン-ストレプトマイシン溶液(Sigma)を補ったEagleの最小必須培地(MEM)において成長させた。L-細胞のためには、ウマ血清をFCSの代わりに使用した。293T、COS-1、NIH-3T3及びTbLLu細胞は、10%FCS、L-グルタミン、及び抗体を含む、高グルコースDulbeccoの修飾Eagle培地において培養した。E. Rusley博士(ヴァンダービルト大学)により提供されたCHOクローン22細胞は、5%FCS、L-グルタミン、及び抗体を含むHamのF-12培地において培養した。S. Makino博士(テキサス大学)より提供されたネズミ星状腫細胞系列であるDBT細胞は、10%ウシ新生児血漿、リン酸トリブトスブロス(Gibco)及び抗体を補ったMEMにおいて成長させた。蚊幼虫細胞系列であるクローンC6/36細胞は、EarlのBSS、必須でないアミノ酸、L-グルタミン及び10%FCSを補ったMEMにおいて成長させた。

#### 【0065】

組換えVSVの生産。VSVゲノム(インディアナセロ型、VSV<sub>IND</sub>)(N. D. Lawsonら、1995)の全長cDNAクローンにおけるGタンパク質遺伝子のコード領域は、セリン65をトレオニンに置換した修飾型の緑色蛍光タンパク質(GFP)(M. Chalfieら、(1994)、Science 263: 802-5)のコード領域に置き換えた。このプラスミドは、pVSV-G<sup>+</sup>を当てた。60mm皿におけるBHK細胞は、感染効率10のバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードする組換えバッカニアウイルスvTF7-3(T. R. Fuerstら、1986)に、37℃で1時間感染させた。感染した細胞は、pVSV-G<sup>+</sup>、VSVヌクレオキャプシドタンパク質(N)、ホスホタンパク質(P)、ポリメラーゼタンパク質(L)及びグリコタンパク質(G)を発現するプラスミドをそれぞれ先に示されたとおり(E. A. Stillmanら、(1995)J. Virology 69: 2946-2953)、10、3、5、1、及び3µgの重量比で共形質転換させた。使用した形質転換効率は、通常VSVが複製するときを観察される転写及び翻訳効率に匹敵した。

#### 【0066】

上清液は形質転換後48時間収穫し、上清の半分は、vTF7-3に感染し5µgのGタンパク質だけをコードするプラスミドで形質転換された細胞の、第二のプレートに感染させるために使用した。細胞は感染後24時間で、蛍光顕微鏡によりGFP発現を試験した。蛍光細胞の存在は、VSVゲノムが成功裏に回収されたことを示した。25µg/mlのシトシン-D-アラビノフラノシド存在下でプラスミドDNAよりGタンパク質を発現する細胞に対する、Gタンパク質を補ったVSV-G<sup>+</sup>(VSV-G<sup>+</sup>-G)を含む上清の追加経路は、高力価のVSV-G<sup>+</sup>-G原液を得るために行われた。ウイルス原液は、バッカニアウイルスを除去するために、0.2µm孔の膜を経由する濾過を行った。上清液におけるウイルス力価は、再びBHK細胞に感染させ、蛍光顕微鏡によりGFPを発現する細胞の数を定量化することにより決定した。

#### 【0067】

VSV-GまたはResGPを補った、または補わなかったVSV-G<sup>+</sup>の準備。293

10

20

30

40

50

T細胞は、リポフェクタミン (Gibco) を使用し、pCVSVG、pResGPまたはpCAGGSにより形質転換した。形質転換後36時間で、細胞は上記記載のVSV-G-G<sup>\*</sup>を、約1から4の感染多重度(m.o.i.)において37℃で1時間感染させた。これらはその後、PBSで3回洗浄し、培地を加えた。CO<sub>2</sub> 保温庫において37℃で24時間保温した後、培養液を集め、細胞を除去するために遠心した。各ウイルス原液は使用まで-80℃で保存した。

#### 【0068】

異なる細胞系列における受容体結合タンパク質を補った組換えVSVの滴定。単層細胞は、カバーガラスの上で成長させ、PBSで洗浄し、ウイルス希釈系列を用い感染させた。37℃での1時間吸引の後、種菌を吸引し成長培地を加えた。細胞はCO<sub>2</sub> 保温庫において37℃で12から14時間保温し、PBSで洗浄し、10%ホルマリンPBSで固定した。異なる細胞系列における組換えVSVの感染単位は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する細胞の数を数えることにより決定した。

#### 実施例5 VSV-エボラレストン偽型の向性の決定法及び感染細胞の解析

本実施例は、A. Takadaら、「エボラレストンウイルスグリコタンパク質の機能解析の新たなシステム」(印刷中1997) Proc. Natl

Acad. Sci. USAに由来する。上記記載の通り準備した組換えVSVウイルス粒子を使用した細胞向性の決定は、以下の通りである。単層細胞は、カバーガラスの上で成長させ、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、ウイルス希釈系列を用い感染させた。37℃での1時間吸引の後、種菌を吸引し成長培地を加えた。細胞はCO<sub>2</sub> 保温庫において37℃で12から14時間保温し、PBSで洗浄し、10%ホルマリンPBSで固定した。異なる細胞系列において発現する組換えウイルスの感染単位は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する細胞の数を数えることにより決定した。組換えVSV構築物：VSV-G<sup>\*</sup>-G、VSV-G<sup>\*</sup>-ResGP、及びVSV-G<sup>\*</sup>により成功裏に感染した細胞の実施例を図4に示す。これら組換えVSV構築物の感染力は表1において示す。

#### 【0069】

#### 【表1】

10

20

[表1] 異なる細胞系に対する組換え体VSVsの感染力<sup>a</sup>

Cell Line 細胞型 (種)	Infec 感染単位 (log <sub>10</sub> /0.1 ml)		
	VSVΔG*-G	VSVΔG*-ResGP	VSVΔG*
Vero (サル)	6.7	5.2	2.1
COS-1 (サル)	6.3	5.1	2.1
293T (ヒト)	6.5	5.1	2.0
BHK (ハムスター)	6.7	3.4	2.4
CHO (ハムスター)	5.7	3.7	2.1
L (マウス)	6.1	3.6	1.8
NIH3T3 (マウス)	5.0	3.3	1.0
DBT (マウス)	6.6	3.7	2.5
MDCK (イヌ)	6.2	3.9	1.8
MDBK (ウシ)	5.2	2.6	0.8
CEF (ニワトリ)	6.4	3.5	2.2
Tb1Lu (コウモリ)	5.1	2.9	0.3
C6/36 (カ)	3.3	0.6	0.3

10

20

30

<sup>a</sup> 所定の系に由来する細胞は例4の記述のように同群から調製されたウイルスで感染された。データは、3つの異なるウイルス群で繰り返された実験の代表的な結果である。感染後12から14時間で異なる細胞で発現された組換え体ウイルスの感染単位は、GFP発現細胞の数の計測によって決定された。

## 【0070】

結果。VSV・G\*-Gと比べ、VSV・G\*-ResGPウイルスストックの感染力は細胞株の種類に深く依存した。霊長類由来細胞（例えばVero、293TおよびCOS-1）に由来するVSV・G\*-ResGPの感染力価は、ハムスター、イヌ、畜牛、マウス、チキンまたはコウモリに由来する細胞の100倍高かった。VSV・G\*-ResGPはC6/36昆虫細胞には感染しなかった。これらの結果は、エボラウイルスの細胞への侵入の鍵となる決定基（例えば抗受容体の特異的な親和特性）が動物種間で異なることを示唆する。

40

## 【0071】

ResGPの組換えVSV粒子への組み込み。ウイルスタンパク質はまた、10%SDS-PAGEにより還元条件下で解析された。図3はVSVG遺伝子（レーン1）、ResGP遺伝子（レーン2）、またはベクタープラスミドのみ（レーン3）を含む発現ベクタープラスミドに感染した293T細胞の溶解物を示す。293T細胞は組換え体ウイルス

50

の感染30時間後、[35S]-メチオニンで5時間標識した。細胞溶解物中のタンパク質は、VSV Gタンパク質(図3、レーン1)またはResGP(レーン2、レーン3)に特異的なモノクローナル抗体を用い沈殿された。VSV Gタンパク質(レーン4; VSV・G<sup>+</sup>-G), ResGP(レーン5; VSV・G<sup>+</sup>-ResGP)により相補された、また相補されなかった(レーン6) VSV・G<sup>+</sup>を含む組換えVSVは、[35S]-メチオニンで標識され、および25-45%スクロース勾配を通した微分遠心および沈降分離によって精製された。

実施例6 組換え体VSVに感染した細胞における緑蛍光プロテイン(GFP)発現の経時解析。

#### 【0072】

プラスミドからの感染ウイルスの回収。感染粒子の回収は、106のBHK-21細胞をvTF7-3ワクシニアで60分感染させ、およびその後10μgの様々な全長VSV構築物をコードするプラスミド、および3μg、5μg、および1μgのVSV<sub>IND</sub>ヌcleoキャプシドタンパク質(N)、りん酸化タンパク質(P)およびポリメラーゼ(L)各々で形質転換することにより完了する。細胞は二日間、ウイルス粒子の複製および組み立てが可能となるよう、培養された。細胞の上清はその後新鮮なBHK細胞上で直接培養され、細胞はウイルスが増幅可能となるよう24時間培養された。これらの培養液からの上清は、その後上記のように濾過膜を通された。濾過膜は新鮮なBHK-21細胞上に移された。数時間の吸収に従い、上清はFCSを含むDMEEMで置換された。VSV感染のCPEを呈する培養物の培地は、その後除去されおよびウイルスはブランク精製された。ウイルスストックは、例えば単離ブランクのおよそ105ブランク形成単位で107細胞の感染による結果として調製された。これらの培養物からの上清は、その後の全ての感染に用いられた。回収された全てのウイルスから単離されたウイルスRNAの直接の塩基配列決定は、ウイルスがプラスミド由来であったことを保証するため実施される。

#### 【0073】

・G-GFP感染細胞におけるGFPの経時発現。BHK-21細胞は、VSV Gタンパク質のトランス型で偽型とされた・G-GFP粒子で感染された。細胞は示された時間に蛍光顕微鏡を用いてGFPの発現を検出された。同平面の位相差画像もまた収集され、図6の右手のパネルに示す。

実施例7 ウイルス、バクテリアまたは寄生生物により感染された個体の治療法。

#### 【0074】

対象は、感染因に由来するタンパク質の細胞表面への結合をもたらすウイルス、寄生生物またはバクテリアのいずれかによって感染された標的細胞に対し、上述のように工作された組換え体ラブドウイルスを用いて治療される。このタンパク質は、組換え体ラブドウイルス剤の組換え体抗受容体によって標的とされ得る受容体となる。

一実施例はHIV-1によって感染された対象の治療であり得る。CD4タンパク質は、組換え体ラブドウイルスの表面に異種由来の融合タンパク質と同様に発現され得る。組換え体ラブドウイルスは、成熟HIV-1エンベロープタンパク質であるgp120を発現する細胞を、認識、結合および感染する能力がある。組換え体ラブドウイルスは、Mタンパク質をコードする遺伝子を含む多シストロン性の核酸を含み得る。このラブドウイルスは、感染した細胞を溶解可能であり得る。結果的に、マクロファージおよびT細胞のようなHIV-1感染細胞の数は、減少し得、およびウイルスはそれにより抑制され得る。投薬された組換え体ラブドウイルスの量は、ほとんどの遺伝子治療ベクターを用いる際投薬される量とおよそ同様であり得る。

実施例8 発癌対象の治療法

組換え体VSVは、CEA、前立腺特異抗原(PSA)またはPMAのような、組換え体がある型の癌に伴うタンパク質を識別し得る接着タンパク質(抗受容体)を発現することを除き、上述のように調製される。

実施例9 融合タンパク質のポリペプチド断片を含む組換え体ラブドウイルスの作製。

#### 【0075】



VSVのような組換え体ラブドウィルスは、SV5 Fタンパク質、またはGタンパク質の推定多量体化ドメイン、膜貫通ドメインおよびGタンパク質の細胞内尾部を包囲するVSV Gタンパク質のステム領域に連結する融合タンパク質断片のような融合タンパク質を発現するよう構築される。これらの構築物は、感染細胞に用いられ、および結果となるウィルスの感染力が様々な細胞系で比較され得る。

実施例10 cDNAのみを用いる融合タンパク質の識別法

VSVのような組換え体ラブドウィルスは、接着タンパク質および融合タンパク質の候補を発現するよう構築される。接着タンパク質はCD4であり得、および標的細胞はHIV-1のエンベロープタンパク質gp120/gp160を発現する細胞であり得る。候補となる融合タンパク質を発現する構築物は、パラミキソウィルスSV5およびCD4（陽性対照）融合タンパク質を発現する構築物、およびCD4およびVSV Gタンパク質のみを発現するVSV構築物と比較されてよい。これらの構築物による感染度は、上記および例5および6に記載された緑蛍光タンパク質のようなレポータータンパク質を用いて比較され得る。

【0076】

構築物は明細書中で述べられたいかなる方法を用いて調製され得る。

実施例11 SV5 Fタンパク質で偽型化された組換え体CD4-VSVのHIV gp160発現細胞に対する感染力

パラミキソウィルスSV5 Fタンパク質を用いたCD4-VSVの偽型化。SV5 Fタンパク質を（ワクシニアT7発現系を用い）発現するBHK-21細胞は、野生型VSV Gタンパク質で先に偽型化されたCD4-VSVで感染された。上清は感染後18時間で収穫され、ワクシニアウィルスを除去するよう濾過された。結果となる上清は、CD4およびSV5の両方をウィルスエンベロープ内に有するが、VSV Gタンパク質を欠く組換え体VSVを含む。接種原（例えばGタンパク質偽型化CD4ウィルス）からの残留感染力は、VSV Gタンパク質特異的な中和抗原の添加によって算出された。

【0077】

HIV gp160発現細胞上のSV5 Fタンパク質による偽型組換え体CD4-VSVの感染力。BHK-21細胞は、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換え体ワクシニアウィルスで感染され、およびHIV gp160タンパク質をコードする様々な量の発現プラスミドで形質転換された。細胞表面へのgp120-gp41の吸収が可能となる10時間後、細胞はCD4/F-VSVで感染された。すべてのプレートは、等量のCD4/Fウィルス接種源で感染された。細胞は、さらに6時間、VSV特異的タンパク質が発現可能となるまで培養され、免疫蛍光顕微鏡によってVSV Nタンパク質の発現を調べられた。一プレート当たりの感染細胞数は、VSV Nタンパク質に対する免疫耐性のある細胞を計測することにより決定された。図7は、gp160をコードする増加量のプラスミドに感染した細胞中に、G VSV偽型CD4-SV5 Fに感染され多細胞数の結果的な増加がある。

【0078】

実施例12 前立腺ガンを標的とするPSA特異的ScFvをコードする組換え体VSVの産生

ScFv-GSの構築。まず、前立腺特異的抗原（PSA）または他の腫瘍特異的抗原を産生するハイブリドーマ細胞系由来のV-HおよびV-Lドメインは、ScFv-GSを構築する標準的な方法によりクローン化される。簡潔には、様々なドメインの配列は、好ましいハイブリドーマ細胞から単離された、ポリAを含むmRNAのRT-PCR増幅により得られる。ポリA RNAは逆転写（RT）反応の鋳型として用いられ、および使用されるプライマーは先に述べられたものに類似したものである（R. Orlandiら。（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3833-3837）。

増幅されたVドメインは、pBluescript中へクローン化され、および増幅領域の配列は標準的な方法により決定される。配列は読み枠を解析されおよび既知のVH（可

10

20

30

40

50

変重鎖)およびV<sub>L</sub>(可変軽鎖)配列と比較され得る。ひとたび配列が確定されると、これらのクローンはS c F v遺伝子構築に用いられる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする配列はオリゴヌクレオチドリンカーを用い連結される。リンカーは、最初のV領域のC末端および2番目のV(可変)領域のN末端とをV<sub>L</sub> - (G l y - S e r) - V<sub>H</sub>ポリペプチドへとつなぐ、短いG l y - S e rペプチドをコードする。全長S c F v遺伝子は、真核細胞中での後の発現においてタンパク質が粗面小胞体を標的とし、および分泌されるように、V S V

Gタンパク質のシグナル配列をコードする配列に連結される。発現解析が、S c F vが機能的で、および好ましい抗原(例えばP S A)に結合可能であることを保証するために用いられる。

#### 【0079】

次にS c F vをコードする領域は、V S V Gタンパク質の膜固定ステム領域をコードする配列に連結される。Gステム配列へ導入された唯一の制限酵素認識部位は、読み枠が損なわれなないように、二つのコード領域を連結するのに用いられる。結果となる分子は、V S V Gステム(S c F v-G S)のE 4 2 2アミノ酸に融合したS c F vドメインからなる。発現解析は、分子が発現されおよび感染細胞の細胞膜に局在することを保証するのに用いられる。

#### 【0080】

最後に、S c F v-G S遺伝子は、遺伝子がV S Vの転写制御下に置かれるようにp V S V-G-Fの多クローニング部位へとクローン化される。結果となる構築物はp V S V-S c F v-Fと呼ばれる。組換え体S c F v-Fウイルスは標準的な手順によりp V S V-S c F v-Fプラスミドから回収される。未処理V S V-S c F v-Fは、野生型V S V Gタンパク質を発現しない細胞に運搬され産生される。

#### 【0081】

P S Aを発現する腫瘍細胞の攻撃。L N C a P細胞株は前立腺癌のモデル細胞株である。これらの細胞はP S Aを発現しおよび組換え体S c F v-Fウイルスの標的として振舞い得ることが知られる。L N C a P細胞は、標準的な培養条件で生育されおよび組換え体S c F v-Fウイルスを含む上清が加えられる。細胞は軽度に着着されおよび単細胞層は容易に破壊されるため、接種源は除去されない。感染は、典型的な免疫蛍光に基づく感染中枢測定を用い、接種15時間後に見積もられる。対照群は、野生型組換え体V S V、膜固定Gステムのみを含む非感染変異体V S V-H A G S、および融合(F)タンパク質を除くS c F v-G Sポリペプチドのみをコードする組換え体での感染を含む。特異性は、P S Aを発現しない正常細胞に対してS c F v-Fウイルスの感染力を査定することによって決定される。

#### 【0082】

同様に、これらの構築物は前立腺ガンの研究に用いられる動物モデルにおいて解析され得る。ヒト前立腺癌のマウスモデル系が、開発されており、および記載された研究の規範であり得る。純粋組換え体V S V-S c F v-Fは、ヒト前立腺特異的腫瘍を有する動物に投与される。動物は、組換え体ウイルスの投与の結果として、有害な効果が見られるか否か決定するため、数週間観察される。動物は殺され、および腫瘍塊は大きさ、質量の変化、血管新生および転移を調べらる。対照は、陰性対照となるV S V-H A G Sでの感染を含む。付加的対照は、融合(F)タンパク質を含まない組換え体V S V-S c F v-G Sの投与である。V S V-H A G S同様、このウイルスは非感染性であり得る。V S V-H A G S構築物は、ウイルスエンベロープにS c F v-G Sポリペプチドを持つウイルスの投与に伴う効果の評価を可能にする。

実施例13 V S V-C D 4組換え体の感染力

V S V-C D 4組換え体の感染力を研究するため、B H K-21細胞は、C D 4-G、C D-4 G Sの一方、またはC D 4-GおよびH A G Sの両方をコードする野生型Gタンパク質偽型組換え体・G-V S Vで感染された。偽型ウイルスは60分間吸収され、接種源は除去され、および細胞単層は残留接種源を除去するため完全に洗浄された。続く感染で

10

20

30

40

50

細胞は、5 % F C S を含む培地で16時間培養された。培養後、純粋組変え体V S V / C D 4 - G、C D 4 G S またはC D 4 - G およびH A G S ウイルスの混合物を含む培地は、回収され、遊離細胞は2,500 r p m で10分遠心分離され除去された。上清のアリコートは、H I V - 1 エンベロープタンパク質の亜類型H X B を発現する細胞を感染するのに用いられた。上清は60分間無血清培地中で吸収された。すなわち接種源は除去されおよび無血清培地へ移行された。感染力は、免疫蛍光顕微鏡により、V S V ヌクレオキャプシドタンパク質を発現する細胞数の解析により測定された。

#### 【0083】

10  $\mu$  l のみのC D 4 - G S またはC D 4 G + H A G S の上清が用いられた一方、100  $\mu$  l のV S V / C D 4 - G の上清が感染力測定に用いられた。総数60のV S V / C D 4 - G 感染細胞が培養皿全体で見つめられた。この結果は、およそ1 m l あたり600感染単位( I U / m l ) の力価に相当する。対照的に、C D 4 - G S またはC D 4 G + H A G S の力価は、 $> 10^8$  I U / m l であった。

#### 【0084】

結果。図8で示されたデータは、ウイルスエンベロープ中にC D 4 - G を含みヒトケモカイン共役受容体を欠くウイルスが、T 親和性H I V - 1 エンベロープタンパク質( H X B ) を発現する細胞への感染力が極度に低いことを示す。対照的に、C D 4 - G S ( 例えば" G ステム " といったV S V - G タンパク質外ドメインのE 4 2 2 アミノ酸に連結したC D 4 外ドメイン ) は、非常に高い特異的な感染力を示した。C D 4 - G S の特異的な感染力は、野生型V S V の野生型標的宿主細胞に対してみられる特異的な感染力にほぼ匹敵する。さらに、V S V / C D 4 - G S によるH I V - 1 エンベロープ発現細胞への感染は、ケモカイン共役受容体を必要としない。精製されたV S V / C D 4 - G S ビリオンの解析は、C D 4 - G S の一部( ~ 50 % ) がC D 4 / G ステム連結部、またはその近傍で切断されることを明らかにした。感染細胞中でのタンパク質の細胞膜への輸送中に起きるこの切断は、膜固定切断産物( G ステム ) だけでなく全長C D 4 - G S 分子の両方を持つウイルス粒子の放出をもたらす( 図9 )。切断はC D 4 - G では起きず、および結果としてV S V エンベロープはC D 4 - G のみで構成される。

#### 【0085】

G ステム( この場合H A G S と呼ばれるH A 抗原認識部位標識型 ) がビリオンの感染力を増大し得るかを決定するために、C D 4 - G を含む細胞はC D 4 - G またはH A G S のいずれかをコードするウイルスで別々に共感染させた。これらの細胞から産生されたウイルスは、エンベロープ中にC D 4 - G およびH A G S の両方を含んだ。C D 4 - G / H A G S ウイルスの感染力は、C D 4 - G S の感染力と実質的に同等であった。これらの結果は、V S V - G ステムが、この場合C D 4 - G である異種結合タンパク質とともにウイルスエンベロープへ編入されたときウイルス粒子の感染力を増幅し得ることを示す。他の異種結合タンパク質候補はすでに技術を有するものに知られている。

#### 実施例14 G ステムを含むV S V 組変え体：感染力およびモデル

ウイルス産生およびG ステム編入。ウイルスは、図8で実施された実験で示されたように産生された。この上清は、感染後16時間で回収された。ビリオンは超遠心分離により濃縮され、ウイルス量およびビリオンのタンパク質含有量は、S D S - P A G E により決定された。ビリオンタンパク質は、クマシーブルー染色またはV S V - G タンパク質の細胞内ドメインに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット解析によって可視化された( 図9 参照 )。

結果。V S V / C D 4 - G 感染細胞は、G - V S V とおよそ同量のウイルスを産生する。これは野生型V S V の10分の1に相当する。対照的に、V S V / C D 4 G S は野生型とほぼ同量( 野生型の~ 70 - 75 % ) のウイルスを産生する。V S V - G の細胞質ドメインの最後の15アミノ酸を認識しおよび結合する抗体を用いた、C D 4 - G およびC D 4 - G S ウイルスの同等量の免疫ブロット解析( 図9 ) は、C D 4 - G S が切断され、相当するG ステム断片は、全長C D 4 - G S 分子とともに組変え体V S V ビリオンへ編入されることを示す。

様々な細胞種から生産されたVSV/CD4-GSの細胞に対する感染能力。本質的には図8の実験において記載されたような、示された細胞種においてウィルスが生産された。様々な細胞主のVSVによる溶解に対する感受性に依存する感染後の様々な時点において上清が回収された。上清の一部は感染能力試験に用いられ、残りは超遠心分離され、ピリオンが沈殿された。各々の細胞種により生産されたウィルスの量はSDS-PAGE によってタンパク質が分離された後、クマシーブルーにより染色されたゲルの濃度測定によって決定された。図10に示された相対的な感染力は、上清から沈澱化されたウィルスタンパク質に対して標準化の後の感染能力の量を表す。相対的な感染能力はIU/mlには対応しない。

【0086】

10

【表2】

【表2】 X4およびR5特異的外殻に対するVSV/CD4-Q427の感染能力

HIV外殻種の単離表記	ウィルスの反応性	牛痘ベクター	感染能力
なし	—	vTF7-3	—
JR-FL	M-反応性 (R5)	vCB-28	++
SF162	M-反応性 (R5)	vCB-32	+++
ADA	M-反応性 (R5)	vCB-39	++++
LAI IIIB (BH8; 非解裂)	T-反応性 (X4)	vCB-16	—
SF2	T-反応性 (X4)	vCB-34	++
RF	T-反応性 (X4)	vCB-36	—
LAI IIIB (BH10)	T-反応性 (X4)	vCB-40	++
LAV	T-反応性 (X4)	vCB-41	+

20

\*"++++" =  $10^6 - 10^5$  IU/ml; "+++" =  $10^5 - 10^4$  IU/ml; "++" =  $10^4 - 10^3$  IU/ml; "+" =  $10^3 - 10^2$  IU/ml; "—" =  $< 10^2$  IU/ml (培養皿あたり感染した細胞が10個以下)

【0087】

30

X4 (T細胞反応性外殻) およびR5 特異的外殻 (マクロファージ反応性外殻) に対するVSV/CD4-Q427構築物の感染能力を評価するために、BHK-24細胞が、511アミノ酸Gタンパク質のQ427において融合されたCD4-GSをコードする、野生型Gタンパク質の偽型組換えG-VSVによって感染された。この偽型ウィルスは60分間吸収され、接種物が除去され、接種物の残留がないように単層細胞はよく洗浄された。感染された培養物は5% FCSを含む培養液中で16時間放置された。放置の後に、純粋な組換えVSV/CD4-GS (Q427) ウィルスを含む、感染された培養物由来の培養液が採集され、剥離した細胞は2500rpmで10分間の遠心分離により除去された。100μlの上清の一部が示されたHIV-1外殻タンパク質を発現するHeLa細胞に、以下のように感染させるために用いられた。HIV-1外殻タンパク質は、NIH

40

AIDS Research and Reference Reagent Program によって供給された牛痘ウィルスベクターを用いて発現された。発現のためには、無血清培地中で60分間吸収されることにより、示された牛痘ウィルスベクターにより、HeLa細胞が感染された。接種物は除去され、5% FCSおよび100μg/mlのAraC培養液によって置換された。細胞は30分間放置され、100μlのVSV/CD4-GS (Q427) 上清が培養液に直接加えられ、培養物は4時間放置されてHIV-1外殻の発現およびCD4-GS (Q427) ウィルスの吸収が行われた。4時間後、接種物を含む培養液が除かれ、AraCおよび血清を含む培養液により置換された。培養物はさらに10時間放置され、細胞は3% パラホルムアルデヒドによって固定された。VSVヌクレオキャプシド (N) タンパク質を発現している細胞の数を、N-特異的モノクローナ

50

ル抗体を用い、免疫蛍光顕微鏡により検出することで調べることで、感染能力が試験された。

#### 【0088】

表2のデータはVSV/CD4-GSが、T-およびM-反応性HIV-1外殻タンパク質の両方を発現している細胞に感染できることを示す。この感染能力はケモカイン受容体に依存しない様式で起こる、なぜなら、組換えウイルスは、ヒトケモカイン受容体を発現していないハムスター細胞株(BHK-21)中で生産されたからである。感染能力は明らかにHIV-1外殻タンパク質の発現に依存する。T7RNAポリメラーゼをコードする組換え牛痘ウイルス(vTF7-3)に感染した細胞または正常なHeLa細胞(牛痘ウイルスに感染していないがAraCの存在下で生育させられた)はVSV/CD4-GS感染に感受性がない。加えて、解裂していない(例えばgp160)融合欠損型突然変異の(vCB-16により発現された)LAIIIIIBを発現する細胞は、このタンパク質が細胞表面に発現されていても(データは示されない)、感染に対して感受性を持たないから、感染能力は機能的なHIV-1外殻タンパク質(例えばgp120-gp41)を必要とする。牛痘ベクターはC.C. Broder et al., (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 92:9004-9008に記載されたものと同様である。

#### 【0089】

短縮型のVSV Gタンパク質はGタンパク質の細胞外ドメインの膜に近接した42アミノ酸、膜貫通ドメインの20アミノ酸および細胞質側尾部の29アミノ酸からなる。翻訳と共に小胞体に挿入された後にシグナルペプチダーゼにより解裂されるVSV-Gタンパク質シグナル配列を含む前駆体から、このタンパク質は作られる。我々が解析したうち最長のステムは膜に近接する細胞外ドメインの59アミノ酸をもち、(融合活性の増強を示す)最短のものは細胞外ドメインの29アミノ酸を持つ。

#### 【0090】

膜に結合されたGステムは、様々なウイルスヘテロ融合タンパク質の融合活性を増強するように見える。これはT-およびM-反応性ウイルスの両方由来のHIV-1 gp120-gp41、パラミキソウイルスSV5のFタンパク質、およびVSVのNew Jersey セロタイプ糖タンパク質の融合活性を含む。我々は、これらの融合タンパク質により形成された融合孔をステムが何らかの方法で安定化させることで増強すると仮定する。融合孔の存在は普通、これらのタンパク質の全体の融合活性を明確に示す他の補因子の存在を必要とする。HIV-1外殻タンパク質の場合は、補因子はケモカイン共受容体であり、パラミキソウイルスのFタンパク質についてはその同族のHNタンパク質であり、VSV Gタンパク質については酸性pHによる活性化である。

#### 【0091】

後の議論および実施例は、単に望ましい態様の詳細な記載を提示するものであると理解されるべきである。当該技術分野において通常の技能を有する者にとって、本発明の精神および展望から離れることなく、多様な修飾および等価物が作製され得ることは明らかである。上記に論じられたまたは引用された全ての特許、雑誌記事およびその他の事項は、その全体が参考文献として本明細書に含まれる。この申請書はその全体が本明細書に参考文献として含まれる、1997年12月22日に提出されたU.S. Provisional Application Serial 番号60/068、472からの優先権を主張する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1AおよびB】 粒子産生の定量化およびウエスタンブロット解析による糖タンパク質の取り込み。

【図2AおよびB】 wt-VSV, CT-1およびGウイルスの出芽の図式化。

【図3】 ResGPのVSV粒子への取り込み。

【図4】 組換えVSVによる感染直後の緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現。VSV G<sup>+</sup>-G、VSV G<sup>+</sup>-ResGPまたはVSV G<sup>+</sup>をベロ細胞に感染させ

10

20

30

40

50

、感染から12時間後に蛍光顕微鏡下で観察した。

【図5】 感染性組換えVSVのプラスミドからの回収法を示した図。感染性粒子の回収は、106個のBHK-21細胞をvTF7-3により60分間感染させ、次に細胞を様々な全長のVSV構築物をコードする10μgのプラスミド、VSVindヌクレオキャプシドタンパク質(N)、リンタンパク質(P)、およびポリメラーゼ(L)をコードする、各々3μg、5μg、および1μgのプラスミドによりトランスフェクションさせる。ウイルス粒子の複製および構築のために細胞を二日間保温する。細胞の上清を新鮮なBHK細胞の上に直接乗せ、ウイルス複製を起こすために細胞を24時間保温する。ワクシニアウイルスを除去するために、これらの培養から回収した上清を0.2μm濾紙(Milllex-GS, Millipore社)に通過させ、1mlの濾過上清を新鮮なBHKの上に乗せる。1時間の吸収の後、上清をDMEM-FCSで置換する。細胞壊死効果(CPE)を示す培養培地を取り出し、ウイルスをブランク精製する。ウイルスの保存液は、引き続き107個の細胞をおよそ105ブランク形成単位(p.f.u.)のブランク単離物に感染させることによって調製する。これらの培養から得た上清を以降の全ての感染に使用する。回収したウイルスがプラスミドに由来することを確認するために、各々の回収されたウイルスから単離したウイルスRNAの直接配列決定を実行する(実施例1を参照せよ)。

10

【図6】 G-GFP感染細胞におけるGFP発現の経時変化およびSV5-Fタンパク質により偽型化した組換えCD4-VSVの、HIV-gp160発現細胞への感染性。

20

【図7】 SV5-Fタンパク質により偽型化した組換えCD4-VSVの、HIV-gp160発現細胞への感染性。

【図8】 VSV-CD4組換え体の感染性。右側の列は位相差顕微鏡下の細胞を示す。左側の列は、免疫蛍光顕微鏡下で抗VSV-Nタンパク質抗体を用いて検出されたVSV-CD4組換え体感染細胞を示す。上段の図はVSVCD4-Gに曝された細胞である。中段の図はVSV/CD4-Q427組換え体に曝されている細胞である。下段の図はVSV/HAGS/CD4-Gに曝されている細胞である。

【図9】 ウイルス産生およびG-ステムの取り込み。左側の図は、SDS-PAGEおよびクマシーブルーにより染色した様々な組換えVSV構築物のタンパク質を示す。右側の図は、VSV-Gタンパク質の細胞質ドメインを認識する抗体を用いてGタンパク質を検出したウエスタンブロット解析である。それゆえに、G-ステム、異種タンパク質CD4-GおよびCD4-GSが本抗体によりすべて検出される。

30

【図10】 HXB2細胞の感染のための様々な株化細胞から作製したVSV/CD4-GSウイルス粒子の感染性。CD4-Q427およびCD4-G組換え体の感染性はBHK、HeLa(HeLa)、D-17、QT-6、LおよびSf9細胞において試験した。相対感染性は、VSV-Gタンパク質全体を発現するCD4-G構築物における値よりもG-ステム構築物(例えば、CD4-Q427)に対する値の方がより高かった。

【図 1】

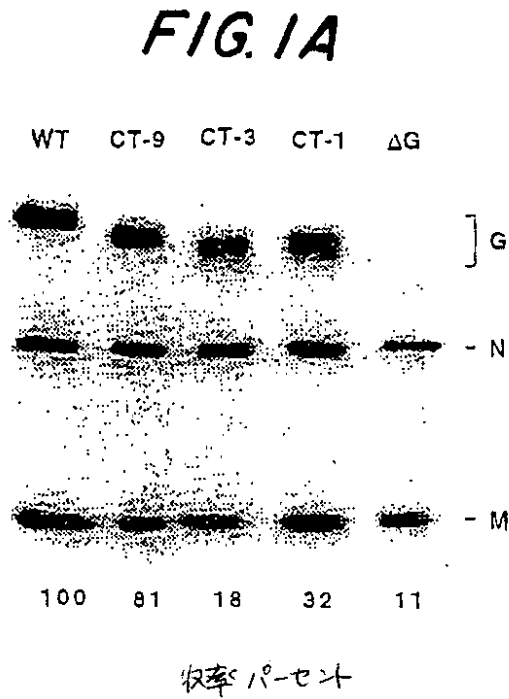
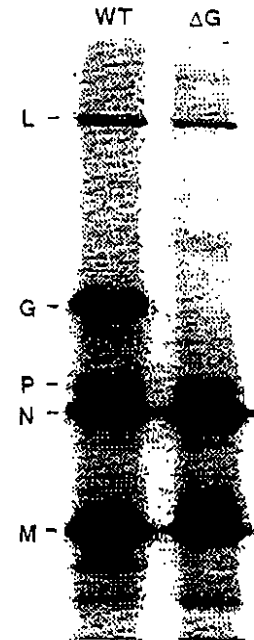


FIG. 1B



【図 2】

FIG. 2A

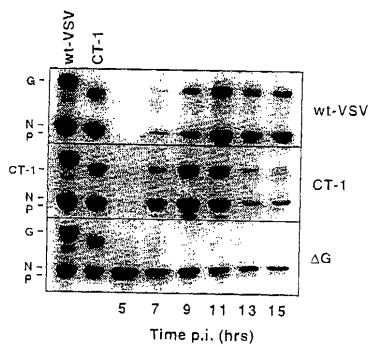
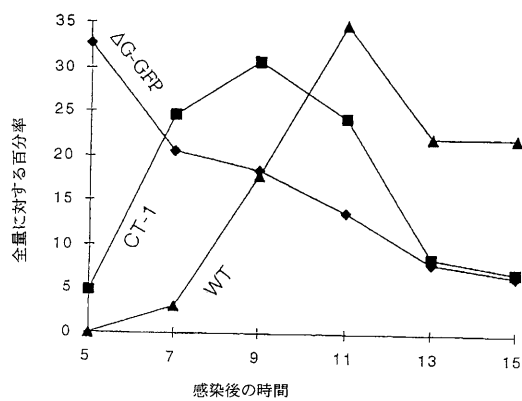
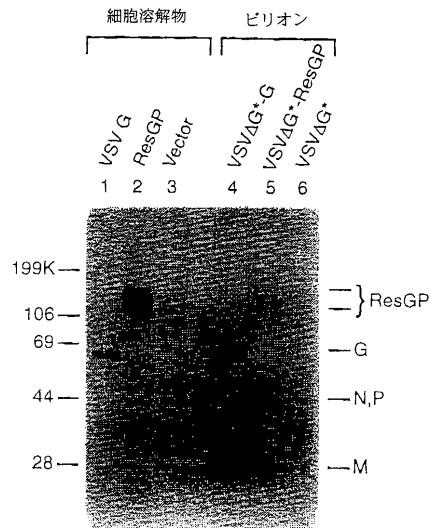


FIG. 2B



【図 3】

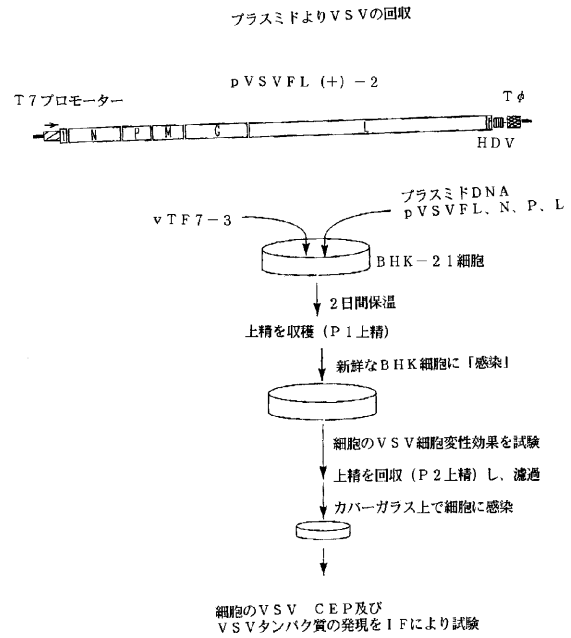


【図 4】

FIG. 4



【図 5】

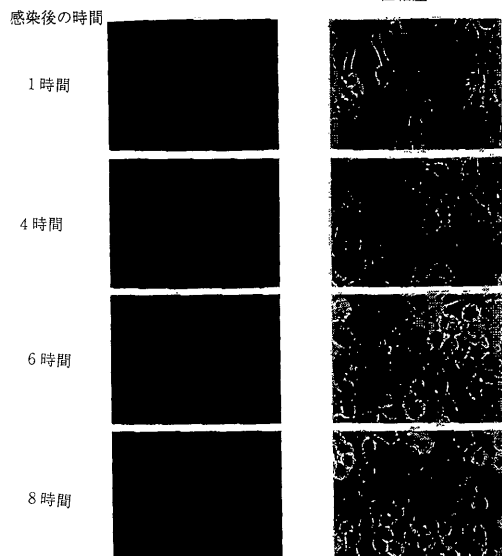


【図 6】

Δ-G/GFPからのGFPの発現

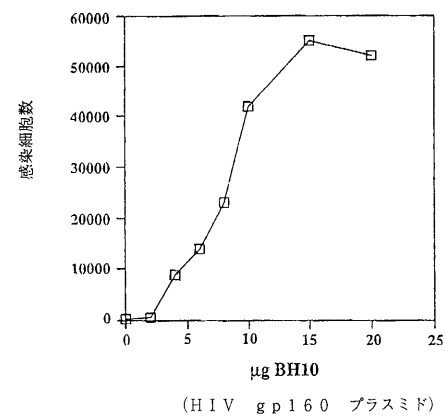
FITC-フィルター

位相差



【図 7】

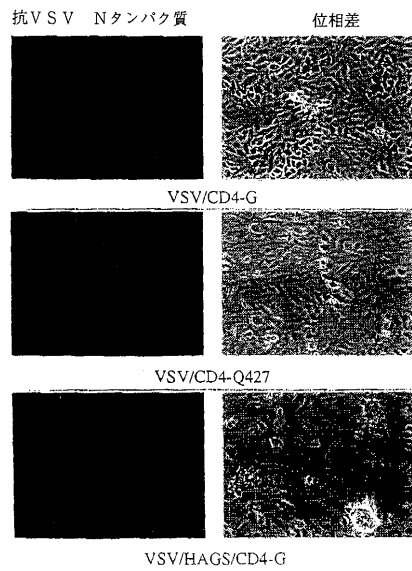
CD4/F ΔG-VSVのHIV gp160発現細胞に対する感染力





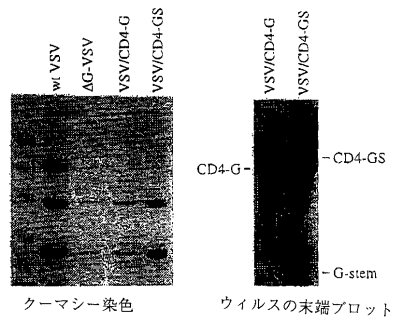
## 【図 8】

VSV-CD4 組換え体の感染力  
(G ステム断片による効力)



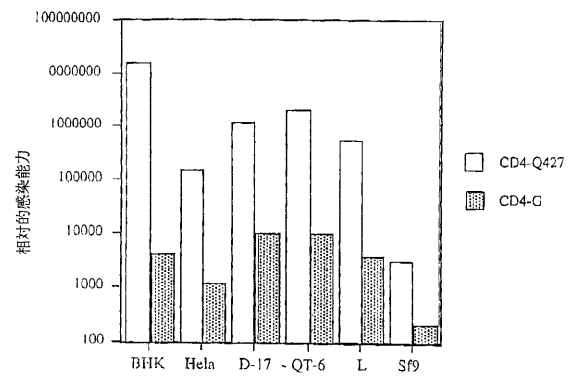
## 【図 9】

ウイルス生産およびG-ステム取り込み



## 【図 10】

異なる細胞種において生育させられたVSV-CD4-GSの  
HXB2細胞に対する感染能力



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<b>C 0 7 K 14/115 (2006.01)</b>		C 0 7 K 14/115
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>		C 1 2 N 7/00
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>		A 6 1 K 35/76

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100124305

弁理士 押鴨 涼子

(72)発明者 ホウィット, マイケル・エイ

アメリカ合衆国テネシー州 3 8 0 1 8 , コルドヴァ, プランターズ・グローブ・コウヴ 8 1 5 3

(72)発明者 ロビソン, クリントン・エス

アメリカ合衆国テネシー州 3 8 1 0 7 , メンフィス, ノース・アアイドルワイルド 7 0 8

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 Cell, 1 9 9 7 年 9 月, Vol. 90, p. 841-847

Journal of Virology, 1 9 9 7 年 7 月, Vol. 71, p. 5060-5068

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 6 年, Vol. 93, p. 11359-11365

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 8 4 年, Vol. 81, p. 6706-6710

Cell, 1 9 9 7 年 9 月, Vol. 90, p. 849-857

The EMBO Journal, 1 9 8 4 年, Vol. 3, p. 1477-1483

J. gen. Virol., 1 9 8 6 年, Vol. 67, p. 441-451

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

IPC

C12N 7/00-7/08

C12N 15/00-15/90

DB名

BIOSIS/MEDLINE(STN)

WPI

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

PubMed