(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7412002号
(P7412002)

(45)発行日　令和6年1月12日(2024.1.12)

(24)登録日　令和5年12月28日(2023.12.28)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/86	ZZNA
C12N 7/01 (2006.01)		C12N	7/01	
C07K 14/18 (2006.01)		C07K	14/18	
C12N 15/40 (2006.01)		C12N	15/40	
C12P 21/00 (2006.01)		C12P	21/00	C

請求項の数　6　（全35頁）

(21)出願番号　特願2020-534641(P2020-534641)
(86)(22)出願日　平成30年12月19日(2018.12.19)
(65)公表番号　特表2021-507713(P2021-507713A)
(43)公表日　令和3年2月25日(2021.2.25)
(86)国際出願番号　PCT/JP2018/046794
(87)国際公開番号　WO2019/124441
(87)国際公開日　令和1年6月27日(2019.6.27)
審査請求日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　62/608,213
(32)優先日　平成29年12月20日(2017.12.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

(73)特許権者　514207706
ブイエルピー・セラピューティクス・インコーポレイテッド
ＶＬＰ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国１９８０１デラウェア州ウィルミントン、オレンジ・ストリート１２０９番
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井 陽子
(72)発明者　赤畑 渉
アメリカ合衆国２０８９５メリーランド州ケンジントン、ホワイト・フリント・

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アルファウイルスレプリコン粒子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

（ｉ）カプシドおよびエンベロープを含むベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）構造タンパク質、ならびに

（ｉｉ）ＶＥＥＶ非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むアルファウイルスレプリコン

を含む、アルファウイルスレプリコン粒子（ＡＲＰ）、

ここで、前記カプシドの核局在化シグナル（ＮＬＳ）におけるリシンまたはアルギニンのうちの１つまたは複数がアスパラギンまたはアラニンにより置換されている、アルファウイルスレプリコン粒子。

【請求項２】

前記ＶＥＥＶが、ＶＥＥＶ株ＴＣ－８３である、請求項１に記載のアルファウイルスレプリコン粒子。

【請求項３】

前記目的の遺伝子が、抗原をコードする、請求項１または２に記載のアルファウイルスレプリコン粒子。

【請求項４】

アルファウイルスレプリコン粒子（ＡＲＰ）を調製する方法であって、

ｉ）ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、

ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むベクター、
ｉｉ）ＶＥＥＶのカプシドをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および
ｉｉｉ）ＶＥＥＶのＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むベクター
を細胞に共トランスフェクトする工程、ここで前記カプシドの核局在化シグナル（ＮＬＳ）におけるリシンまたはアルギニンのうちの１つまたは複数がアスパラギンまたはアラニンにより置換されている；
トランスフェクトした細胞を培養する工程；および
細胞培養物からＡＲＰを精製する工程
を含む、方法。
【請求項５】
前記ＶＥＥＶが、ＶＥＥＶ株ＴＣ－８３である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記目的の遺伝子が、抗原をコードする、請求項４または５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、遺伝子デリバリー系として使用することができるアルファウイルスレプリコン粒子に関する。
【背景技術】
【０００２】
遺伝子治療は、異常遺伝子を補正するためまたは有益なタンパク質を作製するために遺伝物質を細胞に導入するように設計されている。突然変異遺伝子により、必要なタンパク質が欠陥を生じるかまたは欠損を生じると、遺伝子治療によって、タンパク質の機能を回復させるために遺伝子の正常なコピーを導入することができる場合がある。
【０００３】
遺伝子治療は、がん、ウイルス感染、心筋梗塞、および遺伝性障害などのような慢性疾患を処置する際のその可能性のために医学および薬学における新興分野である。
【０００４】
細胞内に直接挿入される遺伝子は、通常、機能しない。代わりに、ベクターと呼ばれる担体が遺伝子をデリバリーするために遺伝子操作される。ある種のウイルスは、細胞に感染することによって新たな遺伝子をデリバリーすることができるので、しばしばベクターとして使用される。ウイルスは、人々に使用する場合、疾患を引き起こすことができないように修飾される。レトロウイルスなどの一部の種類のウイルスは、それらの遺伝物質（新たな遺伝子を含む）をヒト細胞における染色体に組み込む。アデノウイルスなどの他のウイルスは、それらの遺伝子を細胞核に導入するが、遺伝子は染色体に組み込まれない。
【０００５】
ベクターは、個々の細胞によって取り込まれる特定の組織に直接注射され得るかまたは体内に静脈内投与（ＩＶによって）され得る。あるいは、患者の細胞の試料を取り出し、実験室環境においてベクターに曝露することができる。次いでベクターを含有する細胞が患者に戻される。処置が成功すると、ベクターによってデリバリーされた新たな遺伝子は機能タンパク質を作製する。（https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/procedures, Int J Pharm Investig. 2013 Jan-Mar; 3(1): 1-7.）
【０００６】
アルファウイルスは、遺伝的、構造的、および血清学的に関連する、トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ ｆａｍｉｌｙ）の蚊媒介性ウイルスのセットを含む。アルファウイルスには、東部ウマ脳炎ウイルス（Ｅａｓｔｅｒｎ Ｅｑｕｉｎｅ Ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ Ｖｉｒｕｓ）（ＥＥＥＶ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（Ｖｅｎｅｚｕｅｌａｎ Ｅｑｕｉｎｅ Ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ Ｖｉｒｕｓ）（ＶＥＥＶ）、エバーグレ

ーズウイルス（Ｅｖｅｒｇｌａｄｅｓ　Ｖｉｒｕｓ）、ムカンボウイルス（Ｍｕｃａｍｂｏ　Ｖｉｒｕｓ）、ピクスナウイルス（Ｐｉｘｕｎａ　Ｖｉｒｕｓ）、西部ウマ脳炎ウイルス（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｅｑｕｉｎｅ　Ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ　Ｖｉｒｕｓ）（ＷＥＥＶ）、シンドビスウイルス（Ｓｉｎｄｂｉｓ　Ｖｉｒｕｓ）、セムリキ森林ウイルス（Ｓｅｍｌｉｋｉ　Ｆｏｒｅｓｔ　Ｖｉｒｕｓ）、ミドルバーグウイルス（Ｍｉｄｄｌｅｂｕｒｇ　Ｖｉｒｕｓ）、チクングニアウイルス（Ｃｈｉｋｕｎｇｕｎｙａ　Ｖｉｒｕｓ）（ＣＨＩＫＶ）、オニョンニョンウイルス（Ｏ’ｎｙｏｎｇ－ｎｙｏｎｇ　Ｖｉｒｕｓ）、ロスリバーウイルス（Ｒｏｓｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｖｉｒｕｓ）、バーマ森林ウイルス（Ｂａｒｍａｈ　Ｆｏｒｅｓｔ　Ｖｉｒｕｓ）、ゲタウイルス（Ｇｅｔａｈ　Ｖｉｒｕｓ）、サギヤマウイルス（Ｓａｇｉｙａｍａ　Ｖｉｒｕｓ）、ベバルウイルス（Ｂｅｂａｒｕ　Ｖｉｒｕｓ）、マヤロウイルス（Ｍａｙａｒｏ　Ｖｉｒｕｓ）、ウナウイルス（Ｕｎａ　Ｖｉｒｕｓ）、アウラウイルス（Ａｕｒａ　Ｖｉｒｕｓ）、ワタロアウイルス（Ｗｈａｔａｒｏａ　Ｖｉｒｕｓ）、ババンキウイルス（Ｂａｂａｎｋｉ　Ｖｉｒｕｓ）、キジラガチウイルス（Ｋｙｚｙｌａｇａｃｈ　Ｖｉｒｕｓ）、ハイランドＪウイルス（Ｈｉｇｈｌａｎｄｓ　Ｊ　ｖｉｒｕｓ）、フォートモーガンウイルス（Ｆｏｒｔ　Ｍｏｒｇａｎ　Ｖｉｒｕｓ）、ヌドゥムウイルス（Ｎｄｕｍｕ　Ｖｉｒｕｓ）、およびバギークリークウイルス（Ｂｕｇｇｙ　Ｃｒｅｅｋ　Ｖｉｒｕｓ）が含まれる。単一のウイルスタンパク質である、カプシドを含有する構造サブユニットは、正二十面体ヌクレオカプシドにおいてＲＮＡゲノムと会合する。ビリオンでは、カプシドは、膜貫通タンパク質スパイクの規則的なアレイにより覆われた脂質エンベロープに囲まれており、その膜貫通タンパク質スパイクの各々は、２つの糖タンパク質である、Ｅ１およびＥ２のヘテロ二量体複合体からなる。

【０００７】

アルファウイルスレプリコン粒子（ＡＲＰ）は細胞または培養物中で産生され、アルファウイルス構造タンパク質および膜脂質を含むビリオンシェル内で非アルファウイルス遺伝子を発現することができる「レプリコン」を組み込んでいる。

【０００８】

アルファウイルスレプリコン粒子は、米国特許第７，０４５，３３５号、国際公開第２００４／０８５６６０号およびVirology 239, 389-401, 1997に記載されている。それらの製造プロセスは米国特許第７，０７８，２１８号に記載されており、この段落に引用されている文献の内容は参照により組み込まれる。

【０００９】

遺伝子治療の臨床応用は、細胞への遺伝子の適切な導入のための適した方法の不足のためにまだ限られており、したがってこれは多くの研究者にとって興味深い領域である。首尾良い遺伝子治療を達成するために、適切な遺伝子デリバリー系の開発が最も重要な要因の１つであり得る（Int. J Pharm Investig. 2013 Jan-Mar; 3(1): 1-7）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【文献】米国特許第７，０４５，３３５号

【文献】国際公開第２００４／０８５６６０号

【文献】米国特許第７，０７８，２１８号

【非特許文献】

【００１１】

【文献】Int J Pharm Investig. 2013 Jan-Mar; 3(1): 1-7

【文献】Virology 239, 389-401, 1997

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

本発明は、改良されたアルファウイルスレプリコン粒子を含む遺伝子デリバリー系に関する。

【課題を解決するための手段】
【００１３】
一態様では、アルファウイルスレプリコン粒子（ＡＲＰ）は、
（ｉ）カプシドおよび／またはエンベロープを含むアルファウイルス構造タンパク質、ならびに
（ｉｉ）アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むアルファウイルスレプリコン
を含み、
カプシド、エンベロープにおけるＥ３およびＥ２のうちの少なくとも１つが、１つまたは複数のアミノ酸改変を含むが、エンベロープにおけるＥ１が、アミノ酸改変を含まない。
【００１４】
一態様では、本発明は、ウイルス構造タンパク質が、アルファウイルスカプシドタンパク質核局在化シグナル（ＮＬＳ）における１つまたは複数の改変を有する、ＡＲＰを提供する。
【００１５】
一態様では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、ＥＥＥＶ、ＷＥＥＶ、ＶＥＥＶ、ＣＨＩＫＶ、ロスリバーウイルス、またはバーマ森林ウイルスカプシドタンパク質である。本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、１つまたは複数の改変は、ＥＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６７～７０；ＷＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６７～７０；ＶＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６４～６８；ＣＨＩＫＶカプシドタンパク質のアミノ酸６２～６９；ロスリバーウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸７１～７４；またはバーマ森林ウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸６４～６８でのＮＬＳにおけるものである。
【００１６】
本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、改変は、ＮＬＳの荷電アミノ酸またはＮＬＳの塩基性荷電アミノ酸における置換である。一部の実施形態では、荷電アミノ酸または塩基性荷電アミノ酸はリシンまたはアルギニンである。ある特定の実施形態では、リシンまたはアルギニンは、非リシンまたは非アルギニンアミノ酸により置換されている。具体的な実施形態では、リシンまたはアルギニンは、アスパラギンまたはアラニンにより置換されている。
【００１７】
本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、ＥＥＥＶウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳはアミノ酸６７において改変されている。特定の実施形態では、ＥＥＥＶウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは置換Ｋ６７Ｎを有する。
【００１８】
本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、ＷＥＥＶウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、アミノ酸６７、６８、および６９のうちの１つまたは複数において改変されている。特定の実施形態では、ＷＥＥＶカプシドタンパク質ＮＬＳは、Ｋ６７Ｎ、Ｋ６８Ｎ、および／またはＫ６９Ｎを含む。
【００１９】
本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、ＶＥＥＶカプシドタンパク質ＮＬＳは、アミノ酸６４、６５、および６７のうちの１つまたは複数において改変されている。特定の実施形態では、ＶＥＥＶウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、Ｋ６４Ｎ、Ｋ６５ＡもしくはＫ６５Ｎ、および／またはＫ６７ＡもしくはＫ６７Ｎを含む。
【００２０】
本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、ロスリバーウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、アミノ酸７１、７２、７３、およ

び７４のうちの１つまたは複数において改変されている。特定の実施形態では、ロスリバーウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、Ｒ７１Ｎ、Ｒ７２Ｎ、Ｒ７３Ｎ、および／またはＲ７４Ｎを含む。

【００２１】

本明細書に記載されている本発明の上記態様または任意の他の態様の種々の実施形態では、バーマ森林ウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、アミノ酸６４、６５、６７、および６８のうちの１つまたは複数において改変されている。特定の実施形態では、バーマ森林ウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳは、Ｋ６４Ａ、Ｋ６５ＡもしくはＫ６５Ｎ、Ｋ６７Ａ、Ｋ６７Ｎ、Ｋ６８Ａおよび／またはＫ６８Ｎを含む。

【００２２】

カプシドＮＬＳにおける改変は、米国特許公開第２０１４－１７０１８６号または２０１７－０７３３７７号に詳細に記載されている。これらの公報の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００２３】

一態様では、アルファウイルスＥ２タンパク質は、ＣＨＩＫＶ　Ｅ２タンパク質におけるアミノ酸２３４に対応するアミノ酸位置において非リシン残基（例えば、アスパラギン）および／またはウイルス出芽の間にＥ２タンパク質を不安定化するＣＨＩＫＶ　Ｅ２タンパク質におけるアミノ酸２５１に対応するアミノ酸位置において修飾を有してもよい。

【００２４】

一態様では、アルファウイルスＥ３タンパク質は、フーリン部位（Ａｒｇ－Ｘ－Ｘ－Ａｒｇ）にてアミノ酸配列において改変／突然変異を含んでもよい。

【００２５】

「Ａｒｇ－Ｘ－Ｘ－Ａｒｇ」という用語はフーリンの最小の切断部位を示し、「Ｘ－Ｘ」は２つのアミノ酸の任意の組合せを含む。フーリン部位でのアミノ酸配列に対する改変の例には、Ｉｌｅ－Ｇｌｕ／Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ、Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－ＬｙｓまたはＳｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒへの改変が含まれる。フーリン部位改変に関する詳細は、米国特許公開第２０１６－００４０１３４号および同第２０１６－０２００７７５号（それらの引用文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００２６】

例えば、ＶＥＥＶ　ＣＴ８３株は、そのＥ３領域の末端においてＲＫＲＲのフーリン部位を有し、ＲＫＲＲはＳＧＧＧＳと置き換えることができる。

【００２７】

本発明によれば、アルファウイルスレプリコンは、アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするヌクレオチド、ならびに少なくとも１つの目的の遺伝子を含む。アルファウイルス非構造タンパク質は、構造タンパク質が由来するアルファウイルスと同じアルファウイルスに由来するものであってもよい。アルファウイルス非構造タンパク質は、構造タンパク質が由来するアルファウイルスとは異なるアルファウイルスに由来するもの（キメラアルファウイルスレプリコン粒子）であってもよい。

【００２８】

例えば、ＣＨＩＫＶに由来するアルファウイルス構造タンパク質を含むＡＲＰならびにＶＥＥＶ　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするヌクレオチドならびに目的の遺伝子を含むアルファウイルスレプリコンが、本発明に従って提供され得る。

【００２９】

一態様では、本発明は、

（ｉ）カプシドおよび／またはエンベロープを含むＣＨＩＫＶ構造タンパク質、ならびに

（ｉｉ）ＶＥＥＶ非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むＶＥＥＶレプリコンを含む、アルファウイルスレプリコン粒子（ＡＲＰ）を提供する。

【００３０】
目的の遺伝子は、任意の所望の供給源、例えば、ウイルス、原核生物、真核生物、古細菌に由来する多種多様の配列から選択され得る。目的の遺伝子のカテゴリーの例には、例えば、抗原タンパク質、サイトカイン、毒素、治療用タンパク質、酵素、アンチセンス配列、および免疫応答モジュレーターを含む、免疫原が含まれる。
【００３１】
別の態様では、本発明は、アルファウイルスレプリコン粒子を調製する方法であって、
ｉ）アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むベクター、
ｉｉ）アルファウイルスカプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、ならびに
ｉｉｉ）アルファウイルスＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むベクター
を細胞に共トランスフェクトする工程であって、
カプシド、Ｅ３およびＥ２のうちの少なくとも１つが、１つまたは複数のアミノ酸改変を含むが、Ｅ１が、アミノ酸改変を含まない、工程、
トランスフェクトした細胞を培養する工程、および
細胞培養物からＡＲＰを精製する工程
を含む、方法を提供する。
【００３２】
一般に、アルファウイルス構造タンパク質をコードするヌクレオチドは、Ｅ１、Ｅ２、６ｋおよびＥ３をコードするヌクレオチドを含む。野生型ウイルス構造タンパク質の発現の際に、６ＫおよびＥ３は、集合のプロセスの間に天然に切断され、ＡＲＰから除去される。成熟野生型ＡＲＰは、カプシド、Ｅ１およびＥ２タンパク質を含み得る。アミノ酸配列の１つまたは複数の改変が、例えば、Ｅ３タンパク質のフーリン部位に導入される場合、Ｅ３は切断されず、ＡＲＰに含まれる可能性がある。本明細書および特許請求の範囲において、「ウイルス構造タンパク質」とは、６ｋおよび／またはＥ３を有するものだけでなく、６Ｋおよび／またはＥ３を有さないものも指す。
【００３３】
アルファウイルスがＣＨＩＫＶまたはＶＥＥＶである代表的なＡＲＰは図１に例示されている。
【００３４】
一態様では、本発明は、
（ｉ）カプシドおよび／またはエンベロープを含むＣＨＩＫＶ構造タンパク質、ならびに
（ｉｉ）ＶＥＥＶ非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むＶＥＥＶレプリコンを含む、キメラアルファウイルスレプリコン粒子を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１】図１は、ＡＲＰを産生するための概略プロトコールを示す。
【図２】図２は、ＶＥＥＶレプリコン粒子のコンストラクションを示す。
【図３】図３は、ＶＥＥＶ＿ｐＢＲ３２２＿ＮＬｕｃベクターを示す。
【図４】図４は、ＴＣ８３＿ＣＭＶ＿ＣＡｗｔ＿ヘルパー１ｐベクターを示す。
【図５】図５は、ＴＣ８３＿ＣＭＶ＿ＣＡｍｕｔ＿ヘルパー１Ｐベクターを示す。
【図６】図６は、ＴＣ８３＿ＣＭＶ＿ＷＴｇｐ＿ヘルパー２Ｐベクターを示す。
【図７】図７は、ＴＣ８３＿ＣＭＶ＿Ｅ３ｇｐ＿ヘルパー２Ｐベクターを示す。
【図８】図８は、ＶＥＥ　ＶＲＰへのＶＥＥＶレプリコンのパッケージング能力を決定するための概略プロトコールを示す。
【図９】図９は、図８に示した試験の結果を示す。
【図１０】図１０は、ＶＥＥＶレプリコン粒子のコンストラクションにおける多重クロー

ニング部位の組み込みを示す。
【図１１】図１１は、ＶＥＥＶ＿ｐＢＲ３２２＿ＭＣＳ＿ＮＬｕｃ＿推定ベクターを示す。
【図１２】図１２は、精製したＶＥＥウイルスレプリコン粒子のウェスタンブロッティングの結果を示す。
【図１３】図１３は、ＩＫＫをコードするヌクレオチドを含むＶＲＰにより感染した細胞のウェスタンブロッティングを示す。レーン１：ＶＲＰにより感染した細胞、レーン２、ＩＫＫプラスミドベクターによりトランスフェクトされた細胞（陽性対照）。
【図１４】図１４は、ＪＮＫ２をコードするヌクレオチドを含むＶＲＰにより感染した細胞のウェスタンブロッティングを示す。
【図１５】図１５は、ルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むＶＲＰに感染した細胞のルシフェラーゼアッセイの結果を示す。
【図１６】図１６は、ＧＦＰをコードする遺伝子を含むＶＲＰに感染した細胞におけるＧＦＰの発現を示す。
【図１７】図１７は、ＧＦＰをコードする遺伝子を含むＶＲＰに感染したＭ２極性化マクロファージ細胞におけるＧＦＰ発現を示す。
【図１８】図１８は、実施例９の概略プロトコールを示す。
【図１９】図１９は、実施例９の結果を示す。
【図２０】図２０は、ＣＨＩＫＶ構造タンパク質およびＶＥＥＶレプリコンから得られた精製したキメラＡＲＰのウェスタンブロッティングを示す。
【図２１】図２１は、図２０のＡＲＰにより感染した細胞のＦＡＣＳ分析を示す。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
定義
本明細書に使用されている場合、「アルファウイルス」は、ウイルスのトガウイルス科に属するＲＮＡ含有ウイルスを指すことを意味する。例示的なトガウイルスには、限定されないが、東部ウマ脳炎ウイルス（ＥＥＥＶ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）、エバーグレーズウイルス、ムカンボウイルス、ピクスナウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス（ＷＥＥＶ）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ミドルバーグウイルス、チクングニアウイルス（ＣＨＩＫＶ）、オニョンニョンウイルス、ロスリバーウイルス、バーマ森林ウイルス、ゲタウイルス、サギヤマウイルス、ベバルウイルス、マヤロウイルス、ウナウイルス、アウラウイルス、ワタロアウイルス、ババンキウイルス、キジラガチウイルス、ハイランドＪウイルス、フォートモーガンウイルス、ヌドゥムウイルス、バギークリークウイルスおよびオケルボウイルス（Ｏｃｋｅｌｂｏ　ｖｉｒｕｓ）が含まれる。
【００３７】
「アルファウイルス構造タンパク質」とは、天然に存在するウイルスカプシドまたはエンベロープタンパク質と少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。一実施形態では、アルファウイルス構造タンパク質は、東部ウマ脳炎ウイルス（ＥＥＥＶ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（ＶＥＥＶ）、エバーグレーズウイルス、ムカンボウイルス、ピクスナウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス（ＷＥＥＶ）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ミドルバーグウイルス、チクングニアウイルス（ＣＨＩＫＶ）、オニョンニョンウイルス、ロスリバーウイルス、バーマ森林ウイルス、ゲタウイルス、サギヤマウイルス、ベバルウイルス、マヤロウイルス、ウナウイルス、アウラウイルス、ワタロアウイルス、ババンキウイルス、キジラガチウイルス、ハイランドＪウイルス、フォートモーガンウイルス、ヌドゥムウイルス、およびバギークリークウイルスと少なくとも約８５％、９０％、９５％またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有する。アルファウイルス構造タンパク質の野生型アミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋから得ることができる。
【００３８】
具体的な実施形態では、アルファウイルスは、ＣＨＩＫＶ、例えばＣＨＩＫＶ株３７９

９７またはＬＲ２００６　ＯＰＹ－１である。他の実施形態では、アルファウイルスは、ＶＥＥＶ、例えばＶＥＥＶ株ＴＣ－８３である。

【００３９】

「アルファウイルスレプリコン」とは、標的細胞においてインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）でそれ自体の増幅を誘導することができるＲＮＡ分子を意味する。レプリコンは、ＲＮＡ増幅を触媒するポリメラーゼ（ｎｓｐｌ、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３、ｎｓｐ４）をコードし、コードされたポリメラーゼによって認識され、利用される複製に必要とされるシスＲＮＡ配列を含有する。アルファウイルスレプリコンは典型的に以下の順序のエレメント：５’ＵＴＲ、アルファウイルス非構造タンパク質（ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３、ｎｓｐ４）をコードする配列、３’ＵＴＲ、およびポリＡシグナルを含有する。アルファウイルスレプリコンはまた、目的の遺伝子の発現を誘導する１つまたは複数のウイルスサブゲノムプロモーターも含有する。これらの配列は、先行技術において教示されている１つまたは複数の突然変異を有してもよい。

【００４０】

「アルファウイルスレプリコン粒子」（ＡＲＰ）とは、アルファウイルス構造タンパク質とパッケージングしたアルファウイルスレプリコンを意味する。ＡＲＰは、アルファウイルス構造タンパク質のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含有しない。

【００４１】

「薬剤」とは、任意の小分子化学化合物、抗体、核酸分子、もしくはポリペプチド、またはそれらの断片を意味する。

【００４２】

本明細書に使用されている場合、「アジュバント」という用語は、製剤中の特定の免疫原と組み合わせて使用される場合、得られる免疫応答を増大させるか、改変させるかまたは修飾する化合物を指すことを意味する。ある特定の実施形態では、アジュバントはＡＲＰと組み合わせて使用される。免疫応答の修飾には、抗体および細胞性免疫応答のいずれかまたは両方の特異性の強化または拡大が含まれる。免疫応答の修飾はまた、ある種の抗原特異的免疫応答の減少または抑制を意味することもある。一実施形態では、アジュバントはＲｉｂｉアジュバントである。

【００４３】

「改善する」とは、疾患またはその症状の発生または進行を減少させ、抑制させ、減衰させ、軽減させ、停止させるかまたは安定化することを意味する。

【００４４】

「改変」とは、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列に関して特定の位置でのアミノ酸またはヌクレオチドの変化を意味する。本明細書に使用されている場合、改変には、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの特定の位置でのアミノ酸またはヌクレオチドの置換、欠失、または挿入が含まれる。一部の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質核局在化シグナルの改変には、非荷電アミノ酸（例えば、アラニンもしくはアスパラギン、またはリシンもしくはアルギニンなどの塩基性荷電アミノ酸を除く任意のアミノ酸）による荷電アミノ酸（例えば、リシンまたはアルギニン）の置換が含まれる。

【００４５】

「改変」とは、本明細書に記載されているものなどの、標準的な技術の公知の方法によって検出される、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性に対する変化（増加または減少）を意味する。本明細書に使用されている場合、改変には、発現レベルにおける１０％、２５％、５０％、７５％、１００％またはそれ以上の変化が含まれる。改変には、発現レベルの１０、２０、５０、７０、８０、９０、１００、２００、５００、１０００倍またはそれ以上の変化が含まれる。

【００４６】

「類似体」とは、同一ではないが、類似の機能的または構造的特徴を有する分子を意味する。例えば、ポリペプチド類似体は、対応する天然に存在するポリペプチドの生物活性を保持するが、天然に存在するポリペプチドと比較して類似体の機能を増強するある特定

の生化学的修飾を有する。このような生化学的修飾は、例えば、リガンド結合を改変することなく、類似体のプロテアーゼ耐性、膜透過性、または半減期を増加させることができる。類似体は非天然アミノ酸を含んでもよい。

【００４７】

本開示において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含んでいる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有している」および「有する」などは、米国特許法に帰属するそれらの意味を有することができ、かつ、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含んでいる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味することができ、「から本質的になる」または「本質的になる」も同様に米国特許法に帰属する意味を有し、それらの用語はオープンエンドであり、列挙されているものの基本的または新規の特徴が、列挙されているものより多くの存在によって変化しない限り、列挙されているものより多くの存在を許容するが、先行技術の実施形態を排除する。

【００４８】

「検出する」とは、検出されるべき検体の存在、不在または量を同定することを指す。

【００４９】

「疾患」とは、細胞、組織、または器官の正常な機能を損傷するかまたは妨げるあらゆる状態または障害を意味する。

【００５０】

「有効量」とは、未処置の患者と比較して疾患の症状を改善するのに必要とされる薬剤の量を意味する。疾患の予防または処置のための本発明を実施するために使用される活性化合物の有効量は、投与様式、対象の年齢、体重、および全体的な健康に応じて変化する。最終的に、主治医または獣医が適切な量および投薬レジメンを決定する。そのような量を「有効」量と称する。

【００５１】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を意味する。この部分は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％を含有する。断片は、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、または１０００個のヌクレオチドまたはアミノ酸を含有してもよい。

【００５２】

「マーカー」とは、疾患または障害に関連する発現レベルまたは活性の改変を有する任意のタンパク質またはポリヌクレオチドを意味する。

【００５３】

本明細書に使用されている場合、「核局在化シグナル」または「ＮＬＳ」は、ポリペプチドの表面に存在する場合、ポリペプチドを細胞核に標的化するアミノ酸配列である。ＮＬＳ配列は当該技術分野において公知である。例えば、Goldfarb, D., and N. Michaud (1991) Trends Cell Biol. 1, 20-24; Gorlich, D., and I. W. Mattaj (1996) Science 271, 1513-1518を参照のこと。一実施形態では、ＮＬＳは、リシンまたはアルギニンなどの、正に荷電したアミノ酸の１つまたは複数の短い配列を含む。ＮＬＳについてのコンセンサス配列は、Ｋ－Ｋ／Ｒ－Ｘ－Ｋ／Ｒ（Schneider, J. et al. (1988) Cell 54,117-125）および約１０アミノ酸のスペーサーによって離れた塩基性アミノ酸の２つのクラスター、例えば、ＫＲ［ＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡ］ＫＫＫＫ（Dingwall et al., / Cell Biol. 107 (3): 841-9）を含む。本発明のアルファウイルスアミノ酸配列に関して、ＮＬＳは、ＥＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６７～７０（ＫＲＫＫ）；ＷＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６７～７０（ＫＫＫＫ）；ＶＥＥＶカプシドタンパク質のアミノ酸６４～６８（ＫＫＰＫＫ）；ＣＨＩＫＶカプシドタンパク質のアミノ酸６２～６９（ＲＲＮＲＫＮＫＫ）；ロスリバーウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸７１～７４（ＲＫＫＫ）；およびバーマ森林ウイルスカプシドタンパク質のアミノ酸６４～６８（ＫＫＰＫＫ）に存在する。例えば、ＶＥＥＶ　ＴＣ８３カプシドタンパク質のＫ６４Ｎが利用されても

よい。
【００５４】
本明細書に使用されている場合、「薬剤を得ること」のような「得ること」は、薬剤を合成すること、購入すること、またはそうでなければ獲得することを含む。
【００５５】
「低減する」とは、少なくとも１０％、２５％、５０％、７５％、または１００％のマイナスの改変を意味する。
【００５６】
「参照」とは、標準または対照条件を意味する。
【００５７】
「参照配列」は、配列比較のための基準として使用される規定された配列である。参照配列は、特定の配列のサブセットまたは全体；例えば、全長ｃＤＮＡもしくは遺伝子配列のセグメント、または完全ｃＤＮＡもしくは遺伝子配列であってもよい。ポリペプチドに関して、参照ポリペプチド配列の長さは概して、少なくとも約１６アミノ酸、好ましくは少なくとも約２０アミノ酸、より好ましくは少なくとも約２５アミノ酸、さらにより好ましくは約３５アミノ酸、約５０アミノ酸、または約１００アミノ酸である。核酸に関して、参照核酸配列の長さは概して、少なくとも約５０ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約６０ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約７５ヌクレオチド、さらにより好ましくは約１００ヌクレオチドもしくは約３００ヌクレオチドまたはそれら付近もしくはそれらの間の任意の整数である。
【００５８】
配列同一性は典型的に、配列分析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ、１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．５３７０５、ＢＬＡＳＴ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＧＡＰ、またはＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹＢＯＸプログラム）を使用して測定される。このようなソフトウェアは、相同性の程度を種々の置換、欠失、および／または他の修飾に割り当てることによって同一または類似の配列を一致させる。保存的置換は典型的に以下の群内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチにおいて、ＢＬＡＳＴプログラムが使用されてもよく、ｅ＜”３＞とｅ＜”１００＞との間の確率スコアは密接に関連する配列を示す。
【００５９】
「構造ポリタンパク質」とは、ウイルスカプシドまたはエンベロープに寄与する少なくとも２つの分離可能なポリペプチドを含む複合アミノ酸分子を意味する。一実施形態では、ポリペプチドは、ウイルス酵素［例えば、カプシドオートプロテイナーゼ（ａｕｔｏｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ）およびシグナラーゼ（ｓｉｇｎａｌａｓｅ）］により切断を起こしやすい。
【００６０】
「対象」とは、限定されないが、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、またはネコなどの、ヒトまたは非ヒト哺乳動物を含む、哺乳動物を意味する。
【００６１】
本明細書に提供されている範囲は、その範囲内の値の全てについての省略であると理解される。例えば、１～５０の範囲は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０を構成する群からの任意の数、数の組合せ、または部分範囲を含むと理解される。

【００６２】
本明細書に使用されている場合、「処置する」、「処置している」、「処置」などの用語は、障害および／またはそれに関連する症状を低減させるかまたは改善することを指す。除外されないが、障害または状態を処置することは、障害、状態またはそれらに関連する症状が完全に排除されることを必要としないことが理解される。
【００６３】
本明細書に使用されている場合、具体的に明記されていない限り、または文脈から明らかでない限り、「または」という用語は包括的であると理解される。
【００６４】
本明細書に使用されている場合、具体的に明記されていない限り、または文脈から明らかでない限り、「一つの（ａ）」、「一つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」という用語は、単数または複数であると理解される。
【００６５】
本明細書に使用されている場合、具体的に明記されていない限り、または文脈から明らかでない限り、「約」という用語は、当該技術分野における通常の許容範囲内、例えば、平均値の２標準偏差内と理解される。約は、記載された値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、または０．０１％以内と理解することができる。文脈から特に明らかにされていない限り、本明細書に提供されている全ての数値は、約という用語によって修飾される。
【００６６】
本明細書に提供されている任意の組成物または方法は、本明細書に提供されている他の組成物および方法のいずれかのうちの１つまたは複数と組み合わせることができる。
【００６７】
アルファウイルスレプリコン
アルファウイルスレプリコンは、真核細胞にデリバリーされると、それ自体からの転写によって（それ自体から生成するアンチセンスコピーを介して）複数の娘ＲＮＡの産生を導くことができる。アルファウイルスレプリコンは、細胞へのデリバリー後に直接翻訳され得、この翻訳はＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼを提供し、そのＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼは次いで、デリバリーされたＲＮＡからアンチセンスおよびセンス転写産物の両方を産生する。したがって、デリバリーされたＲＮＡは、複数の娘ＲＮＡの産生を導く。これらの娘ＲＮＡは、共線状（ｃｏｌｌｉｎｅａｒ）サブゲノム転写産物と同様に、コードされたタンパク質のインサイチュ（ｉｎ　ｓｉｔｕ）発現を提供するためにそれら自体で翻訳され得るか、またはタンパク質のインサイチュ発現を提供するために翻訳されるデリバリーされたＲＮＡと同じセンスを有するさらなる転写産物を提供するために転写され得る。転写のこの配列の全体的な結果は、導入されたレプリコンＲＮＡの数の大量の増幅であるので、コードされたタンパク質は細胞の主要なポリペプチド産物になる。
【００６８】
本発明によれば、アルファウイルスレプリコンは、非構造タンパク質ｎ１、ｎ２、ｎ３およびｎ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含む。アルファウイルスレプリコンは、アルファウイルス構造タンパク質のいずれもコードしていない。
【００６９】
アルファウイルス非構造タンパク質は、上記に説明したアルファウイルスの１つに由来する野生型タンパク質であってもよいかまたは野生型アミノ酸配列において１つまたは複数の改変を有していてもよい。アルファウイルス非構造タンパク質の改変は、種々の先行技術の参考文献に開示されており、当該技術分野は、これらの公知の情報に基づいて適切なアルファウイルス非構造タンパク質を選択することができる。
【００７０】
アルファウイルスレプリコンは当該技術分野において周知であり、これらの以前に開示されたレプリコンのいずれかを利用することができる（例えば、Virology. 1997 Dec 2

2;239(2):389-401.、国際公開第２００９／１３１６０４号、国際公開第２０１１／００５７９９号、国際公開第２０１２／０３１０４３号、国際公開第２０１４／１２７０４９３号および国際公開第２０１５／０９５１６７号、引用文献の内容は参照により本明細書に組み込まれる）。

【００７１】

アルファウイルス構造タンパク質

ＡＲＰは、カプシドおよびエンベロープタンパク質のアルファウイルス構造タンパク質を有する。好ましくは、アルファウイルス構造タンパク質は、カプシドタンパク質ならびにエンベロープのＥ２およびＥ１タンパク質を含み、また、エンベロープのＥ３タンパク質も有していてもよい。本発明によれば、カプシドおよびエンベロープの少なくとも１つは、哺乳動物細胞においてＡＲＰ発現を増強する少なくとも１つの改変を有する。

【００７２】

一実施形態では、アルファウイルス構造タンパク質は、アルファウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳにおけるリシン残基に対応するアミノ酸位置にて非リシン残基（例えば、アラニンまたはアスパラギン）を有するアルファウイルスカプシドタンパク質、および／またはアルファウイルスカプシドタンパク質ＮＬＳにおけるアルギニン残基に対応するアミノ酸位置にて非アルギニン残基（例えば、アラニンまたはアスパラギン）を少なくとも含む。具体的な実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｋ６７Ｎ、Ｋ６８Ｎ、およびＫ６９Ｎのうちの１つまたは複数を有するＷＥＥＶ　ＣＢＡ８７株カプシドタンパク質である。ある特定の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｋ６４Ｎ、Ｋ６５Ａ、Ｋ６５Ｎ、Ｋ６７Ａ、およびＫ６７Ｎのうちの１つまたは複数を有するＶＥＥＶ　ＴＣ８３株カプシドタンパク質である。一部の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｋ６７Ｎを有するＥＥＥＶ　ＰＥ－６株カプシドタンパク質である。特定の実施形態では、アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｒ６２Ａ、Ｒ６３Ａ、Ｒ６５Ａ、Ｋ６６Ａ、Ｋ６８Ａ、およびＫ６９Ａのうちの１つまたは複数を有するＣＨＩＫＶ株３７９９７カプシドタンパク質であり；アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｒ７１Ｎ、Ｋ７２Ｎ、Ｋ７３Ｎ、およびＫ７４Ｎのうちの１つまたは複数を有するロスリバーウイルスカプシドタンパク質であり；アルファウイルスカプシドタンパク質は、改変Ｋ６４Ａ、Ｋ６４Ｎ、Ｋ６５Ａ、Ｋ６５Ｎ、Ｋ６７Ａ、Ｋ６７Ｎ、Ｋ６８ＡおよびＫ６８Ｎのうちの１つまたは複数を有するバーマ森林ウイルスカプシドタンパク質である。上記に説明したアルファウイルスの野生型カプシドタンパク質アミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋにて入手可能である。

【００７３】

一実施形態では、アルファウイルスＥ２タンパク質は、ＣＨＩＫＶ　Ｅ２タンパク質におけるアミノ酸２３４に対応するアミノ酸位置にて非リシン残基（例えば、アスパラギン）および／またはウイルス出芽の間にＥ２タンパク質を不安定化するＣＨＩＫＶ　Ｅ２タンパク質におけるアミノ酸２５１に対応するアミノ酸位置にて修飾を有する。

【００７４】

一実施形態では、アルファウイルスＥ３をコードするポリヌクレオチドは、フーリン部位におけるアミノ酸配列に対する改変／突然変異（Ａｒｇ－Ｘ－Ｘ－Ａｒｇ）を含むように修飾され得る。

【００７５】

「Ａｒｇ－Ｘ－Ｘ－Ａｒｇ」という用語は、フーリンの最小の切断部位を示し、「Ｘ－Ｘ」は２つのアミノ酸の任意の組合せを含む。フーリン部位におけるアミノ酸配列に対する改変の例には、Ｉｌｅ－Ｇｌｕ／Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ、Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－ＬｙｓまたはＳｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒへの改変が含まれる。詳細な説明は、米国特許公開第２０１６－００４０１３４号および同第２０１６－０２００７７５号（引用文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００７６】

例えば、ＶＥＥＶ　ＣＴ８３株は、そのＥ３領域の末端においてＲＫＲＲを含むフーリ

ン部位を有し、ＲＫＲＲをコードするポリヌクレオチド配列は、ＳＧＧＧＳをコードするポリヌクレオチド配列と置き換えることができる。

【００７７】

本発明の一部の実施形態では、タンパク質は、サイレント置換、付加、または欠失を生じるが、コードされるタンパク質の特性もしくは活性、またはタンパク質が作製される方法を変化させない改変を含有する突然変異を含んでもよい。

【００７８】

ＡＲＰを調製する方法

ＡＲＰは、当該技術分野で公知である手順によって調製され得る。ＡＲＰを産生するための例示的な手順は、Virology 239, 389-401, 1997に開示されており、引用文献の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００７９】

一般に、ＡＲＰは、アルファウイルスレプリコンをコードするベクター、すなわち、ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、目的の遺伝子とを含むベクター；ならびにアルファウイルス構造タンパク質をコードする少なくとも１つのヘルパーベクターによる適切な宿主細胞の共トランスフェクションによって産生され得る。好ましくは、細胞は、アルファウイルスレプリコンをコードするベクター、カプシドタンパク質をコードするベクターおよびエンベロープタンパク質をコードするベクターにより共トランスフェクトされる。

【００８０】

特に、本発明は、アルファウイルスレプリコン粒子を調製する方法であって、

ｉ）アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むベクター、

ｉｉ）アルファウイルスカプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および

ｉｉｉ）アルファウイルスＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むベクター

を細胞に共トランスフェクトする工程であって、

カプシド、Ｅ３およびＥ２のうちの少なくとも１つは、１つまたは複数のアミノ酸改変を含むが、Ｅ１はアミノ酸改変を含まない、工程、

トランスフェクトした細胞を培養する工程、および

細胞培養物からＡＲＰを精製する工程

を含む、方法を提供する。

【００８１】

分子生物学の分野における当業者は、多種多様な発現系のいずれかを、ＡＲＰを産生するために使用することができることを理解する。共トランスフェクトされる正確な細胞（宿主細胞）は本発明にとって重要ではない。ＡＲＰは、原核生物宿主［例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）］において、または真核生物宿主［例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ２１細胞、または哺乳動物細胞、例えば、ＮＩＨ ３Ｔ３、ＨｅＬａ、ＣＯＳ細胞］において産生され得る。このような細胞は広範囲の供給源から入手可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｒｏｃｋｌａｎｄ、Ｍｄ．；また、例えば、Ausubel et al.、前出も参照のこと）。昆虫細胞の非限定的な例は、スポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）（Ｓｆ）細胞、例えば、Ｓｆ９、Ｓｆ２１、イラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ）細胞、例えば、ハイファイブ（Ｈｉｇｈ Ｆｉｖｅ）細胞、およびショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）Ｓ２細胞である。真菌（酵母を含む）宿主細胞の例は、サッカロマイセス・セレビシエ、クルイベロマイセス・ラクティス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）［Ｋラクティス（Ｋ ｌａｃｔｉｓ）］、Ｃ．アルビカンス（Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ）およびＣ．グラブラータ（Ｃ．ｇｌａｂｒａｔａ）を含むカンジダ（Ｃａ

ｎｄｉｄａ）の種、アスペルギルス・ニデュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、シゾサッカロマイセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）［Ｓ．ポンベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）］、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、およびヤロウイア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）である。哺乳動物細胞の例は、ＣＯＳ細胞、ベビーハムスター腎細胞、マウスＬ細胞、ＬＮＣａＰ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）細胞、アフリカミドリザル細胞、ＣＶ１細胞、ＨｅＬａ細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＶｅｒｏおよびＨｅｐ－２細胞である。アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ）卵母細胞、または両生類起源の他の細胞も使用することができる。原核生物宿主細胞には、細菌細胞、例えば、大腸菌、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、およびマイコバクテリア（ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ）が含まれる。

【００８２】

前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドを得る方法は当該技術分野において公知である。例えば、特定のアルファウイルスタンパク質、例えば、ＣＨＩＫＶ、ＷＥＥＶ、ＥＥＥＶ、ＶＥＥＶ、ロスリバーウイルス、またはバーマ森林ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子は、前記ウイルスに感染している細胞から抽出したポリアデニル化ｍＲＮＡからＲＴ－ＰＣＲによって単離され得る。得られた遺伝子産物は、ベクターへのポリヌクレオチド挿入物としてクローニングされ得る。

【００８３】

「ベクター」という用語は、核酸配列が生物、細胞、または細胞成分の間で伝播および／または移入され得る手段を指す。ベクターには、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、プロウイルス、ファージミド、トランスポゾン、人工染色体などが含まれ、それらは自律的に複製するかまたは宿主細胞の染色体に組み込まれ得る。ベクターはまた、裸のＲＮＡポリヌクレオチド、裸のＤＮＡポリヌクレオチド、同じ鎖内のＤＮＡおよびＲＮＡの両方から構成されるポリヌクレオチド、ポリ－リシンコンジュゲートＤＮＡまたはＲＮＡ、ペプチドコンジュゲートＤＮＡまたはＲＮＡ、リポソームコンジュゲートＤＮＡなどであってもよく、それらは自律的に複製しない。全てではないが、多くの一般的な実施形態では、本発明のベクターはプラスミドまたはバクミドである。

【００８４】

典型的に、発現される核酸分子は、プロモーターおよび／またはエンハンサーに「作動可能に連結され（ｏｐｅｒａｂｌｙ ｌｉｎｋｅｄ）」、プロモーターおよび／またはエンハンサーによって転写調節制御に供される。

【００８５】

トランスフェクションの方法および発現媒体の選択は、選択される宿主系に依存する。トランスフェクション方法は、例えば、Ausubel et al.（前出）に記載されており；発現媒体は、例えば、Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987)に提供されているものから選択され得る。この段落に引用されている参考文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【００８６】

本発明のＡＲＰの産生のための種々の発現系が存在する。このようなＡＲＰを産生するのに有用な発現ベクターには、限定されないが、染色体、エピソーム、およびウイルス由来ベクター、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、バキュロウイルスなどのウイルス、ＳＶ４０などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスに由来するベクター、ならびにこれらの組合せに由来するベクターが含まれる。

【００８７】

本明細書に使用されているコンストラクトおよび／またはベクターは、本明細書に記載されているエンベロープタンパク質またはカプシドタンパク質を含む、構造タンパク質をコードするアルファウイルスポリヌクレオチドを含む。また、本明細書に使用されている

コンストラクトおよび／またはベクターは、非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするアルファウイルスポリヌクレオチドと、目的の遺伝子とを含む。

【００８８】

ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスベクターであってもよい。ヌクレオチドを含むコンストラクトおよび／またはベクターは、非限定的な例である、ＣＭＶプロモーター、ファージラムダＰＬプロモーター、大腸菌ｌａｃ、ｐｈｏＡおよびｔａｃプロモーター、ＳＶ４０初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスＬＴＲのプロモーターなどの適切なプロモーターに機能的に連結されるものとする。他の適切なプロモーターは、宿主細胞および／または所望の発現速度に依存して当業者に公知である。発現コンストラクトは、転写開始、終結のための部位、および転写領域では、翻訳のためのリボソーム結合部位をさらに含有する。コンストラクトによって発現される転写産物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるべきポリペプチドの始めに翻訳開始コドン、および末端に適切に位置する終止コドンを含む。

【００８９】

ベクターは、好ましくは少なくとも１つの選択マーカーを含む。このようなマーカーには、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、Ｇ４１８またはネオマイシン耐性、ならびに大腸菌および他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子が含まれる。ベクターの中で好ましいのは、バキュロウイルス、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アビポックスウイルス、カナリア痘ウイルス、鶏痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、豚痘ウイルスなど）、アデノウイルス（例えば、イヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルスベクターである。本発明で使用され得る他のベクターは、ｐＱＥ７０、ｐＱＥ６０およびｐＱＥ－９、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔベクター、Ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔベクター、ｐＮＨ８Ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８Ａ、ｐＮＨ４６Ａ、ｐｔｒｃ９９ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ５を含む、細菌において使用するためのベクターを含む。好ましい真核生物ベクターには、ｐＦａｓｔＢａｃｌ　ｐＷＩＮＥＯ、ｐＳＶ２ＣＡＴ、ｐＯＧ４４、ｐＸＴｌおよびｐＳＧ、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬがある。他の適切なベクターは当業者に自明である。

【００９０】

組換えコンストラクトは、トランスフェクトするために調製され、使用され得、真核細胞および／または原核細胞内で、本明細書に記載されているものを含む、ウイルスタンパク質を発現することができる。したがって、本発明は、カプシド、Ｅ３、Ｅ２、６Ｋ、およびＥｌまたはそれらの部分を含む、アルファウイルス構造タンパク質をコードする核酸を含有する１つのベクター（または複数のベクター）、ならびにアルファウイルスｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードする核酸、ならびにＡＲＰの形成を可能にする条件下で目的の遺伝子の少なくとも１つを含む１つのベクターを含む宿主細胞を提供する。

【００９１】

一実施形態では、前記ベクターは組換えバキュロウイルスである。別の実施形態では、前記組換えバキュロウイルスは昆虫細胞にトランスフェクトされる。好ましい実施形態では、前記細胞は昆虫細胞である。別の実施形態では、前記昆虫細胞はＳｆ９細胞である。

【００９２】

ポリペプチド産生のための１つの特定の細菌発現系は大腸菌ｐＥＴ発現系（Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｉｎｃ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ）である。この発現系によれば、ポリペプチドをコードするＤＮＡは、発現を可能にするように設計された方向においてｐＥＴベクターに挿入される。このようなポリペプチドをコードする遺伝子はＴ７調節シグナルの制御下にあるので、ポリペプチドの発現は宿主細胞におけるＴ７　ＲＮＡポリメラーゼの発現を誘導することによって達成される。これは典型的に、ＩＰＴＧ誘導に応答してＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを発現する宿主株を使用して達成される。一旦産生されると、組換えポリ

ペプチドは次いで、当該技術分野において公知の標準的な方法、例えば、本明細書に記載されている方法に従って単離される。

【００９３】

ポリペプチド産生のための別の細菌発現系は、ｐＧＥＸ発現系（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）である。この系は、機能的遺伝子産物の迅速な精製および回収と共に融合タンパク質として遺伝子または遺伝子断片の高レベル発現のために設計されたＧＳＴ遺伝子融合系を利用する。目的のタンパク質は、日本住血吸虫（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）由来のグルタチオンＳ－トランスフェラーゼタンパク質のカルボキシル末端に融合され、グルタチオンセファロース４Ｂを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって細菌溶解物から容易に精製される。融合タンパク質は、グルタチオンで溶出することによって温和な条件下で回収され得る。融合タンパク質からのグルタチオンＳ－トランスフェラーゼドメインの切断は、このドメインの上流の部位特異的プロテアーゼに対する認識部位の存在によって促進される。例えば、ｐＧＥＸ－２Ｔプラスミドにおいて発現されたタンパク質はトロンビンにより切断され得、ｐＧＥＸ－３Ｘにおいて発現されたタンパク質は第Ｘａ因子により切断され得る。

【００９４】

選択されたベクターおよび宿主細胞に依存して、ＡＲＰは、組換えタンパク質が発現され、アルファウイルスレプリコンが生成され、アルファウイルス構造タンパク質の粒子とパッケージングされているアルファウイルスレプリコンを含有するＡＲＰが形成される条件下で、ベクターによってトランスフェクトされた宿主細胞を成長させることによって産生される。一実施形態では、本発明は、アルファウイルス非構造タンパク質ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも１つの目的の遺伝子とを含むベクター、少なくとも１つのアルファウイルスタンパク質を各々コードする少なくとも１つのベクターを、適切な宿主細胞内に共トランスフェクトし、ＡＲＰ形成を可能にする条件下で前記アルファウイルスタンパク質を発現させることを含む、ＡＲＰを産生する方法を含む。別の実施形態では、真核細胞は、酵母、昆虫、両生類、鳥類または哺乳動物細胞からなる群から選択される。適切な成長条件の選択は当該技術または当業者の範囲内である。

【００９５】

本発明のＡＲＰを産生する細胞を成長させる方法には、限定されないが、バッチ、バッチ供給、連続および潅流細胞培養技術が含まれる。一実施形態では、アルファウイルスレプリコンをコードするベクターおよびカプシドをコードするポリペプチドを含むベクター、ならびにＣＨＩＫＶまたはＶＥＥＶに由来するものなどのエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを共トランスフェクトした細胞は、細胞が増殖し、精製および単離のためのタンパク質（例えば、組換えタンパク質）を発現するバイオリアクターまたは発酵チャンバ内で成長する。典型的に、細胞培養は、無菌の制御された温度および大気条件下で実施される。バイオリアクターは、温度、大気、撹拌および／またはｐＨなどの環境条件をモニターすることができる、細胞を培養するために使用されるチャンバである。一実施形態では、バイオリアクターはステンレス鋼チャンバである。別の実施形態では、前記バイオリアクターは、予め滅菌されたプラスチックバッグ（例えば、Ｃｅｌｌｂａｇ．ＲＴＭ．、Ｗａｖｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ、Ｎ．Ｊ．）である。他の実施形態では、前記予め滅菌されたプラスチックバッグは約５０Ｌ～１０００Ｌのバッグである。

【００９６】

ＡＲＰは、勾配遠心分離、例えば、塩化セシウム、スクロースおよびイオジキサノール、ならびに例えば、イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを含む標準的な精製技術などによって、その完全性を保存する方法を使用して単離される。

【００９７】

以下は、本発明のＡＲＰがどのようにして作製され、単離され、精製され得るかの例である。当業者は、ＡＲＰを作製し、精製するために使用され得るさらなる方法が存在する

ことを理解する。したがって、本発明は本明細書に記載されている方法に限定されない。

【００９８】

一般に、本発明のＡＲＰの産生は、哺乳動物細胞［例えば、ヒト胚腎臓（２９３Ｔ）細胞］またはＳｆ９細胞（非感染）をシェーカーフラスコに播種し、細胞を拡大させ、細胞が成長し、増殖するとスケールアップすること（例えば、１２５ｍｌフラスコから５０Ｌ Ｗａｖｅバッグ）によって達成される。細胞を成長させるために使用される培地は、適切な細胞系（好ましくは無血清培地、例えば、昆虫培地ＥｘＣｅｌｌ－４２０、ＪＲＨ）のために策定される。次に細胞に適切なベクター（例えば、哺乳動物発現ベクターまたはＳＦについて（最も効果的な感染多重度（例えば、細胞あたり約１～約３プラーク形成単位）にて細胞組換えバキュロウイルスをトランスフェクトするかまたは感染させる。ポリヌクレオチドまたはその部分は、それらがＡＲＰに自己集合する細胞において発現され、感染後約２４～７２時間（ｈｐｉ）で細胞から分泌される。通常、トランスフェクションまたは感染は、細胞が対数成長期中期（ｍｉｄ－ｌｏｇ ｐｈａｓｅ ｏｆ ｇｒｏｗｔｈ）（４－８．×１０＜６＞細胞／ｍｌ）にあり、少なくとも約９０％が生存している場合、最も効果的である。さらに、トランスフェクトされた細胞は、ＡＲＰ産生を増加させるために細胞培養物中で高いｐＨ条件（ｐＨ＞７．２、例えば、ｐＨ７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、またはそれ以上）に曝露され得る。

【００９９】

本発明のＡＲＰは、細胞培養培地中のＡＲＰのレベルが最大に近いが、広範な細胞溶解の前である場合、感染後約４８～１２０時間で回収される。回収時の細胞密度および生存率は、色素排除アッセイによって示されるように、少なくとも２０％の生存率で約０．５×10^6細胞／ｍｌ～約１．５×10^6細胞／ｍｌであり得る。次に培地を除去し、清澄化する。ＡＲＰ凝集を回避するために、ＮａＣｌを約０．４～約１．０Ｍ、好ましくは約０．５Ｍの濃度まで培地に添加することができる。本発明のＡＲＰを含有する細胞培養培地からの細胞および細胞残屑の除去は、使い捨ての予め滅菌された中空繊維０．５または１．００μπιフィルターカートリッジまたは同様のデバイスによるタンジェンシャルフローフィルトレーション（ＴＦＦ）によって達成され得る。

【０１００】

さらに、ＡＲＰは、ＡＲＰ産生を増加させるために、精製の間、高いｐＨ条件（ｐＨ＞７．２、例えば、ｐＨ７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、またはそれ以上）に曝露され得る。

【０１０１】

次に、清澄化した培養培地中のＡＲＰを、使い捨ての予め滅菌した５００，０００分子量カットオフ中空繊維カートリッジを使用して限外濾過によって濃縮する。残留培地成分を除去するために、濃縮したＡＲＰを、０．５Ｍ ＮａＣｌを含有する１０容量のｐＨ７．０～８．０のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に対して透析濾過することができる。

【０１０２】

濃縮し、透析濾過したＡＲＰを、６，５００×ｇにて１８時間、約４Ｃ～約１０Ｃでの遠心分離によって０．５Ｍ ＮａＣｌを有するｐＨ７．２のＰＢＳ緩衝液中の２０％～６０％の不連続ショ糖勾配においてさらに精製することができる。通常、ＡＲＰは、勾配から回収され、保存され得る約３０％～約４０％の間のショ糖または界面（２０％および６０％のステップ勾配）において特徴的な可視バンドを形成する。この産生物は、精製プロセスにおける次の工程のための調製において２００ｍＭのＮａＣｌを含むように希釈することができる。この産生物はＡＲＰを含有し、インタクトなバキュロウイルス粒子を含有することができる。

【０１０３】

ＡＲＰのさらなる精製は、陰イオン交換クロマトグラフィー、または４４％等密度ショ糖クッション遠心法によって達成され得る。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、ショ

糖勾配（上記参照）からの試料を、陰イオンを有する培地（例えば、Ｍａｔｒｉｘ　Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ　ＥＭＤ　ＴＭＡＥ）を含有するカラムにロードし、他の夾雑物（例えば、バキュロウイルスおよびＤＮＡ／ＲＮＡ）からＡＲＰを分離することができる塩勾配（約０．２Ｍ～約１．０ＭのＮａＣｌ）を介して溶出する。ショ糖クッション法では、ＡＲＰを含む試料を４４％ショ糖クッションに添加し、３０，０００ｇにて約１８時間遠心分離する。ＡＲＰは４４％ショ糖の上部においてバンドを形成し、一方、バキュロウイルスは底部において沈殿し、他の夾雑タンパク質は上部において０％ショ糖層に留まる。ＡＲＰピークまたはバンドを収集する。

【０１０４】

所望の場合、インタクトなバキュロウイルスを不活性化することができる。不活性化は、化学的方法、例えば、ホルマリンまたはベータ－プロピオラクトン（ＢＰＬ）によって達成され得る。インタクトなバキュロウイルスの除去および／または不活性化はまた、上記に例示したように、当該技術分野において公知の選択的沈殿およびクロマトグラフィー法を使用することによっても大部分が達成され得る。不活性化方法は、ＡＲＰを含有する試料を０．２％のＢＰＬ中で３時間、約２５℃～約２７℃にてインキュベートすることを含む。バキュロウイルスはまた、ＡＲＰを含有する試料を４℃にて３日間、次いで３７℃にて１時間、０．０５％のＢＰＬにてインキュベートすることによって不活性化され得る。

【０１０５】

不活性化／除去工程の後、ＡＲＰを含む産生物を別の透析濾過工程に通して、不活性化工程からの試薬全ておよび／または残留ショ糖全てを除去することができ、ＡＲＰを所望の緩衝液（例えば、ＰＢＳ）に入れることができる。ＡＲＰを含む溶液は、当該技術分野において公知の方法（例えば、滅菌濾過）によって滅菌することができ、冷蔵庫または冷凍庫に保存することができる。

【０１０６】

上記の技術は、様々なスケールにわたって実施することができる。例えば、Ｔフラスコ、振とうフラスコ、スピナーボトル、工業的サイズのバイオリアクターまで。バイオリアクターは、ステンレス鋼タンクまたは予め滅菌されたプラスチックバッグ（例えば、Ｗａｖｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｂｒｉｄｇｅｗａｔｅｒ、ＮＪによって販売されているシステム）のいずれかを含んでもよい。当業者は、それらの目的のために最も望ましいものを知っている。

【０１０７】

本明細書に記載されているように、所望の宿主への投与の際に、本発明のＡＲＰは、構造タンパク質が由来するアルファウイルスによって通常感染した細胞によって取り込まれる。レプリコンに含まれる目的の遺伝子は、ＡＲＰ侵入時に細胞内に内在化される。この特性は、ＡＲＰが目的の遺伝子の所望の細胞へのデリバリーを可能にするので、遺伝子のデリバリー媒体として本明細書に記載されているＡＲＰの使用を容易にする。

【０１０８】

天然のアルファウイルスゲノムは非構造レプリカーゼポリタンパク質に加えてウイルス構造タンパク質をコードするのに対し、アルファウイルスレプリコンはアルファウイルス構造タンパク質をコードしない。したがって、アルファウイルスレプリコンは、細胞内で自身のゲノムＲＮＡコピーの産生を導くことができるが、ＲＮＡを含有するビリオンの産生を導くことができない。これらのビリオンを産生できないことは、野生型アルファウイルスとは異なり、レプリコンは感染型では自身を永続させることができないことを意味する。野生型ウイルスにおける永続に必要なアルファウイルス構造タンパク質は、レプリコンには存在せず、それらの位置は少なくとも１つの目的の遺伝子によって決められ、その結果、サブゲノム転写物は構造アルファウイルス構造タンパク質ではなく目的のタンパク質をコードする。

【０１０９】

したがって、ある特定の実施形態では、ＡＲＰは、対象にデリバリーされる必要がある治療剤または診断剤、例えば、造影剤、核酸配列（ｓｉＲＮＡおよびマイクロＲＮＡを含

む）、放射性核種、ホルモン、ペプチド、抗ウイルス剤、抗腫瘍／化学療法剤、細胞成長調節剤、細胞成長阻害剤、サイトカイン、抗原、アジュバントおよび毒素などであり得るか、またはそれらをコードし得る目的の遺伝子を含む。ウイルス構造タンパク質の粒子にパッケージングされたレプリコンは、ＡＲＰの安定性に悪影響を及ぼすべきではない。これは、所定の目的の遺伝子を含有するＡＲＰを産生し、もしあれば、ＡＲＰ安定性に対するその効果を評価することによって決定され得る。

【０１１０】

したがって、本発明は、目的の遺伝子を細胞に導入するための方法を提供する。本発明によれば、目的の遺伝子はアルファウイルスレプリコンに含まれ、アルファウイルスレプリコンはアルファウイルス構造タンパク質の粒子とパッケージングされる。関連する実施形態では、ＡＲＰは細胞と接触する。関連する実施形態では、ＡＲＰは細胞に侵入することが可能となり、それによって目的の遺伝子の細胞へのデリバリーをもたらす。

【０１１１】

本明細書に使用されている場合、「処置する」、「処置している」、「処置」などの用語は、障害および／またはそれと関連する症状を低減させるかまたは改善することを指す。除外されないが、障害または状態を処置することは、障害、状態またはそれらに関連する症状を完全に排除することを必要としないことは理解される。

【０１１２】

本明細書に使用されている場合、「予防する」、「予防している」、「予防」、「予防的処置」などの用語は、障害または状態を有さないが、障害または状態を発症するリスクがあるかまたは発症しやすい対象における障害または状態を発症する可能性を低減させることを指す。

【０１１３】

目的の遺伝子は、抗原をコードする遺伝子であってもよい。本発明のＡＲＰは、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能な形態で調製され得る。注射に適した固体形態もまた、エマルションとして、またはリポソーム中に封入されたＡＲＰと共に調製され得る。ワクチン抗原は通常、担体を受容する対象に有害な抗体の産生を誘導しない任意の担体を含む、薬学的に許容される担体と組み合わされる。適切な担体は典型的に、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体、および不活性ウイルス粒子などの、ゆっくりと代謝される大きな巨大分子を含む。このような担体は当業者に周知である。これらの担体はまた、アジュバントとして機能することもできる。

【０１１４】

本明細書に記載されているＡＲＰは、アジュバント（例えば、Ｒｉｂｉ）と組み合わせて投与され得る。アジュバントはワクチンの有効性を増強する免疫刺激剤である。所望の場合、１つまたは複数のアルファウイルスポリペプチドまたはその断片もしくは変異体を含むＡＲＰは、目的の抗原に対して生じる免疫応答の有効性を増強するアジュバントと組み合わせて投与される。有効なアジュバントには、限定されないが、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩、ムラミルペプチド、細菌細胞壁成分、サポニンアジュバント、および組成物の有効性を増強するための免疫刺激剤として作用する他の物質が含まれる。

【０１１５】

免疫原性組成物、すなわち、本明細書に記載されているＡＲＰ、薬学的に許容される担体およびアジュバントはまた、典型的に、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどの希釈剤を含有する。湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質などの補助物質も存在してもよい。タンパク質は、中性形態または塩形態としてワクチンに製剤化され得る。免疫原性組成物は典型的に、注射によって非経口で投与され、このような注射は皮下または筋肉内のいずれかであってもよい。さらなる製剤は、座剤または経口などによる他の投与形態に適している。経口組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、または徐放性製剤として投与され得る。

【０１１６】
免疫原性組成物は、用量処方と適合する様式で投与される。免疫原性組成物は、免疫学的に有効な量の本明細書に記載されているＡＲＰおよび他の前述の成分を含む。免疫学的に有効な量とは、感染の処置または予防に有効である、単回用量、または複数回用量スケジュールで投与される組成物を意味する。投与される用量は、処置される対象、対象の健康および身体状態、抗体を産生する対象の免疫系の能力、所望の防御の程度、および他の関連因子に依存して変化する。必要とされる活性成分の正確な量は、医師の判断に依存するが、典型的に、用量当たり５μｇから２５０μｇの間の抗原の範囲である。
【０１１７】
医薬組成物および投与
本発明は、本明細書に記載されているＡＲＰを含む医薬組成物を特徴とする。本明細書において有用な医薬組成物は、組成物を受容する脊椎動物に有害な免疫応答の産生をそれ自体が誘導しない任意の医薬品を含み、過度の毒性なしに投与され得る、任意の適切な希釈剤または賦形剤を含む、薬学的に許容される担体、および本発明のＡＲＰを含有する。本明細書に使用されている場合、「薬学的に許容される」という用語は、哺乳動物、より特にはヒトにおける使用のために、連邦もしくは州政府の規制当局によって承認されているかまたは米国薬局方、欧州薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に記載されていることを意味する。これらの組成物は、脊椎動物において防御免疫応答を誘導するためのワクチンおよび／または抗原性組成物として有用であり得る。
【０１１８】
薬学的に許容される担体には、限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、滅菌等張水性緩衝液、およびこれらの組合せが含まれる。薬学的に許容される担体、希釈剤、および他の賦形剤の詳細な説明は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. current edition)に提示されている。製剤は投与様式に適合されるものとする。好ましい実施形態では、製剤はヒトへの投与に適しており、好ましくは、無菌の非粒子状および／または非発熱性である。
【０１１９】
所望の場合、組成物はまた、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはｐＨ緩衝剤を含有してもよい。組成物は、再構成に適した凍結乾燥粉末などの固体形態、液体溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤、または粉末であってもよい。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含んでもよい。
【０１２０】
ある特定の実施形態では、ＡＲＰ組成物は、液体形態、例えば、ＡＲＰ組成物の量および濃度を示す封止容器中で供給される。
【０１２１】
好ましくは、ＡＲＰ組成物の液体形態は、少なくとも約５０μｇ／ｍｌ、より好ましくは少なくとも約１００μｇ／ｍｌ、少なくとも約２００μｇ／ｍｌ、少なくとも５００μｇ／ｍｌ、または少なくとも１ｍｇ／ｍｌにて密閉容器中で供給される。
【０１２２】
あるいは、ワクチン製剤は、点滴、大粒子エアロゾル（約１０ミクロン超）もしくは上気道への噴霧または小粒子エアロゾル（１０ミクロン未満）もしくは下気道への噴霧のいずれかによって、鼻腔内に投与される。上記のいずれかのデリバリー経路は免疫応答をもたらすが、鼻腔内投与は、アルファウイルス、例えば、ＣＨＩＫＶまたはＶＥＥＶを含む、多くのウイルスの侵入部位において粘膜免疫を誘発する付加的な利益を与える。
【０１２３】
したがって、本発明はまた、哺乳動物に対する感染またはその少なくとも１つの症状に対する免疫を誘導するワクチンまたは抗原性組成物を製剤化する方法であって、前記製剤に有効量のＡＲＰ、例えば、アルファウイルス（例えば、ＣＨＩＫＶまたはＶＥＥＶ）を

添加する工程を含む、方法を含む。

【０１２４】

ある特定の場合において、単回用量での免疫の刺激が好ましいが、所望の効果を達成するために、追加の投薬量も同じまたは異なる経路によって投与されてもよい。例えば、新生児および幼児では、十分なレベルの免疫を誘発するために複数回の投与が必要とされることがある。投与は、十分なレベルまたは防御を維持するために必要に応じて、小児期を通じて間隔をおいて継続してもよい。

【０１２５】

同様に、例えば、医療従事者、デイケア従事者、低年齢小児がいる家族、高齢者、および心肺機能または免疫系が損なわれた個体などの、反復性または重篤な感染症に特にかかりやすい成人は、防御免疫応答を確立し、および／または維持するために複数の免疫化を必要とし得る。誘導された免疫のレベルは、例えば、中和分泌抗体および血清抗体の量を測定することによってモニターされ得、所望のレベルの防御を誘発し、維持するために必要に応じて、投薬量が調節されるかまたはワクチン接種が反復される。

【０１２６】

医薬製剤の投薬量は、当業者によって、例えば、最初に、予防的または治療的免疫応答を誘発するのに有効な用量を同定することによって、例えば、ウイルス特異的免疫グロブリンの血清力価を測定することによって、または血清試料、または尿試料、または粘膜分泌物中の抗体の阻害比率を測定することによって容易に決定され得る。前記投薬量は動物実験から決定され得る。ワクチンの有効性を研究するために使用される動物の非限定的なリストには、モルモット、ハムスター、フェレット、チンチラ、マウスおよびコットンラット、ならびに非ヒト霊長類が含まれる。ほとんどの動物は感染因子に対する自然宿主ではないが、それでも疾患の種々の態様の研究に役立ち得る。例えば、上記動物のいずれかに、ワクチン候補、例えば、本発明のＡＲＰを投与して、誘導された免疫応答を部分的に特徴付け、および／または任意の中和抗体が産生されているかどうかを決定することができる。例えば、マウスは小型であり、それらの低コストにより研究者は規模を拡大して研究を行うことができるので、多くの研究がマウスモデルにおいて行われてきた。

【０１２７】

さらに、ヒト臨床研究が、当業者によってヒトのための好ましい有効用量を決定するために実施され得る。そのような臨床研究は慣用であり、当該技術分野において周知である。利用される正確な用量はまた、投与経路に依存する。有効用量は、インビトロ（ｉｎｖｉｔｒｏ）または動物試験システムから導き出される用量－応答曲線から推定され得る。

【０１２８】

また、当該技術分野において周知のように、特定の組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られている、免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって増強され得る。アジュバントは、未知の抗原に対する免疫の全般的な増加を促進するために実験的に使用されている。免疫化プロトコールは、長年にわたって応答を刺激するためにアジュバントを使用しており、したがってアジュバントは当業者に周知である。いくつかのアジュバントは、抗原が提示される様式に影響を及ぼす。例えば、免疫応答は、タンパク質抗原がミョウバンによって沈殿すると増加する。抗原の乳化もまた、抗原提示の期間を延長する。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Vogel et al.,「A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)」に記載されているいずれかのアジュバントの包含は、本発明の範囲内に想定される。

【０１２９】

例示的なアジュバントには、完全フロイントアジュバント［死滅結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）を含有する免疫応答の非特異的刺激因子］、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。他のアジュバントは、ＧＭＣＳＰ、ＢＣＧ、水酸化アルミニウム、ｔｈｕｒ－ＭＤＰおよびｎｏｒ－ＭＤＰなどのＭＤＰ化合物、ＣＧＰ（ＭＴＰ－ＰＥ）、リピドＡ、およびモノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）を含む。２％スクアレン／Ｔｗｅｅｎ－８０エマルション中

の、細菌から抽出された３つの成分、ＭＰＬ、トレハロースジミコール酸（ＴＤＭ）および細胞壁骨格（ＣＷＳ）を含有するＲＩＢＩもまた、企図される。ＭＦ－５９、Ｎｏｖａｓｏｍｅｓ．ＲＴＭ．、ＭＨＣ抗原もまた、使用され得る。

【０１３０】

本発明のＡＲＰはまた、「免疫刺激因子」と製剤化され得る。それらは、免疫系の応答を増加させるための身体特有の化学的メッセンジャー（サイトカイン）である。免疫刺激因子には、限定されないが、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３）などの、免疫刺激活性、免疫増強活性、および炎症活性を伴う種々のサイトカイン、リンホカインおよびケモカイン；成長因子［例えば、顆粒球マクロファージ（ＧＭ）コロニー刺激因子（ＣＳＦ）］；およびマクロファージ炎症性因子、Ｆｌｔ３リガンド、Ｂ７．１；Ｂ７．２などの他の免疫刺激分子が含まれる。免疫刺激分子は、ＡＲＰと同じ製剤中で投与され得るか、または別々に投与され得る。タンパク質またはタンパク質をコードする発現ベクターのいずれかは、免疫刺激作用を生じさせるために投与され得る。したがって、一実施形態では、本発明は、アジュバントおよび／または免疫刺激因子を含む抗原製剤およびワクチン製剤を含む。

【０１３１】

本発明によれば、前記ＡＲＰを含むデリバリー系は、目的の遺伝子を真核細胞の細胞質にデリバリーすることができ、それによってがん、ウイルス感染、神経障害、自己免疫疾患、移植片拒絶および単遺伝子性または多遺伝子性の遺伝性疾患を処置することができる。

【０１３２】

本発明は以下の実施例を参照して詳細に記載されるが、それらは本出願の範囲を限定することを意図していない。

【実施例１】

【０１３３】

ＶＥＥＶレプリコン粒子（ＶＲＰ）のコンストラクション

概略手順を図２に示す。

ルシフェラーゼを発現するＶＥＥＶレプリコンプラスミドの確立

１）完全長ＶＥＥＶ　ＴＣ８３非構造タンパク質（ｎｓｐ）１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４断片を合成した（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）。

同様に、レプリコンコンストラクトの種々の断片に対応するｇｂｌｏｃｋｓを以下のように合成した（ＩＤＴ）。

【０１３４】

２）ＶＥＥＶ　ｇｂｌｏｃｋ１－ＶＥＥＶ　ＣＡ遺伝子のＡＴＧまでＣｌａＩ－ＲＳＶｐ－５’ＵＴＲ－ｎｓｐ１（ｂｐ１－４７０）－ＲｓｒＩＩ－ＡｐａＩ－２６Ｓｐ－ｓｇＲＮＡ。この断片は５’末端においてｐＢＲ３２２骨格プラスミドと３６ｂｐの重複を有した。これは断片＃１である。

【０１３５】

３）ＶＥＥＶ　ｇｂｌｏｃｋ２－この断片は、ＡＴＧ開始コドンまでＡｐａＩ部位にて開始してＶＥＥＶ　ｇｂｌｏｃｋ１と６４ｂｐの重複を有した。これに、Ｎａｎｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　ＯＲＦ（Ｐｒｏｍｅｇａ）およびＶＥＥＶ　３’ＵＴＲの最初の７２塩基が続いた。

【０１３６】

４）断片＃２のクローニング－ＶＥＥＶ　ｇｂｌｏｃｋ２、完全長ＶＥＥＶ　３’ＵＴＲおよびＶＥＥＶポリＡシグナル（Ａ（ｎ＝５５））を、以下の表に示したオリゴマーを使用したオーバーラップエクステンションＰＣＲによって最初に集合させた：

【０１３７】

【表１】

Primer Name	Sequence 5′ → 3′
VEEV_gblock2_fwd	tcattcagctacctgagaggg (SEQ ID NO: 7)
VEEV_gblock2_rev	aaataaaaatttaaggcggcatgc (SEQ ID NO: 8)
VEEV_Oligo1_fwd	ttaaaatttttatttttatttttctttttctttttccgaat cggattttgtttttaatatttc (SEQ ID NO: 9)
VEEV_Oligo2_rev	CATCAATGTATCTTATCATGTCTGtcgcgaTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTgaaatattaaaaaca (SEQ ID NO: 10)

【０１３８】
ＶＥＥＶ＿Ｏｌｉｇｏ２はｐＢＲ３２２骨格プラスミドと１５ｂｐの重複を有する。
【０１３９】
５）次に、ＶＥＥＶ　ｇｂｌｏｃｋ１（断片＃１）、断片＃２およびｐＢＲ３２２骨格（ＣｌａＩおよびＮｒｕＩ－ＨＦにより消化した）を、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙを使用して集合させて、ｐＢＲ３２２－ＲＳＶｐ－ＲｓｒＩＩ－ＡｐａＩ－２６Ｓｐ－ｓｇＲＮＡ－ＮａｎｏＬｕｃ－Ａ（ｎ＝５５）－ＳＶ４０　ｐＡ骨格コンストラクト（ＢＢ）を得た。この骨格コンストラクトは完全長ＴＣ８３　ｎｓｐ１－４断片を欠いていた。
【０１４０】
６）ｎｓｐ１－４断片（ｂｐ４７０－７４６１）を、ＲｓｒＩＩおよびＡｐａＩ制限部位－ｉ）５’－ｃｃｇｇｃｃＣＧＧＡＣＣＧａｃａａｇｔｃｔｃｔａｔｃａｃｃ－３’（配列番号１１、ｆｗｄプライマー）およびｉｉ）５’－ｇｇｃｃｇｇＧＧＧＣＣＣｃｔｃｔｃａｇｇｔａｇｃｔｇａａｔｇ－３’（配列番号１２、ｒｅｖプライマー）を含有するプライマーを使用して１）において得られた合成したＴｈｅｒｍｏプラスミドから増幅させた。このＰＣＲにより増幅させたｎｓｐ断片を、ＲｓｒＩＩおよびＡｐａＩ部位を使用してＢＢ骨格プラスミドにクローニングして、完全長ＶＥＥＶ　ＴＣ８３レプリコンコンストラクトを得た。（図３）
【０１４１】
ヘルパープラスミド
ＶＥＥＶ　ＴＣ８３カプシドをコードするヘルパープラスミドコンストラクトを図４および５に示す。このコンストラクトは、野生型ＶＥＥＶカプシドタンパク質（配列番号１）およびＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶカプシド（Ｋ６４Ｎ、配列番号２）をそれぞれ発現する。
【０１４２】
本明細書において使用されるＶＥＥＶ　ＴＣ８３糖タンパク質Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１を発現するヘルパープラスミドコンストラクトを図６および７に示す。このコンストラクトは、野生型ＶＥＥＶ　ＴＣ８３糖タンパク質Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１（配列番号３）およびＥ３修飾Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１（Ｅ３　ＲＫＲＲの末端におけるフーリン部位をＳＧＧＧＳと置き換えた、配列番号４）をそれぞれ発現する。
【０１４３】
細胞培養物および共トランスフェクション
２９３Ｔ細胞を、１０％ＦＢＳ、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有する完全ＤＭＥＭ入りの６ウェルプレートに播種した。ＰＥＩ（各プラスミド１．７μｇ）を使用して、カプシドをコードするヘルパープラスミドおよび糖タンパク質Ｅ１－６Ｋ－Ｅ２－Ｅ３をコードするヘルパープラスミドと共に、ｎｓｐ１－４を含有する（ＶＲ）（配列番号５）かまたはｎｓｐ１－４断片を欠く（ＢＢ）等量のＶＥＥＶ　ＲＳＶｐ－ＮＬｕｃコ

ンストラクトを細胞に共トランスフェクトした。ヘルパープラスミドの組合せは、（配列番号１および３）、（配列番号１および４）、（配列番号２および３）または（配列番号２および４）であった。細胞をトランスフェクション混合物と３７℃にて約３時間インキュベートし、その後、トランスフェクション混合物を除去し、細胞を１×ＰＢＳにより洗浄し、新鮮なＤＭＥＭを添加した。パッケージングしたウイルスレプリコン粒子（ＶＲＰ）を４８ｈｐｔ（トランスフェクション後の時間）または７２ｈｐｔのいずれかに回収した。ＶＲＰを回収するために、トランスフェクトした細胞の培養上清を、細胞培養物を１２００ｒｐｍにて５分間、４℃にて遠心分離して、全ての細胞残屑をペレット化することによって得た。０．４５ｕｍフィルターを通して上清を濾過した。回収したＶＲＰを４℃または－８０℃のいずれかで保存した。

【実施例２】

【０１４４】

ＶＥＥウイルスレプリコン粒子（ＶＲＰ）へのＶＥＥＶレプリコンのパッケージング能力の決定

感染およびルシフェラーゼアッセイ

概略プロトコールを図８に示す。

２９３Ｔ細胞を、１ウェルあたり約１０，０００細胞の密度にて９６ウェルプレート中の完全ＤＭＥＭに播種した。未希釈または２倍連続希釈の回収したＶＲＰを３７℃にて細胞に感染させた。感染後１４時間（ｈｐｉ）にて、ＶＲＰを除去し、細胞をＰＢＳにより洗浄し、新鮮なＤＭＥＭをウェルに添加した。細胞をさらにインキュベートし、２４、４８および７２ｈｐｉにてルシフェラーゼアッセイのために回収した。等量の感染細胞およびＮａｎｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を白色底部不透明９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ）に添加することによってルシフェラーゼアッセイを実施した。Ｂｉｏ－Ｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＨＴＸマイクロプレートリーダーを使用してルシフェラーゼ活性を直ちに測定した。

【０１４５】

結果

結果を図９に示す。早くも２４ｈｐｉにてＶＲＰ（ＶＲ）に感染した細胞においてルシフェラーゼ発現を確認した。ｎｓｐ１－４（ＢＢ）を欠く骨格コンストラクトに感染した細胞はルシフェラーゼをほとんど発現しなかった。

【実施例３】

【０１４６】

新たなＶＥＥＶレプリコンコンストラクト

種々の「目的の遺伝子」の導入を可能にするために多重クローニング部位（ＭＣＳ）を導入することによって新たなＶＥＥＶ　ＴＣ８３レプリコンプラスミドコンストラクトを調製した。概略プロトコールを図１０に示す。コンストラクトを図１１および配列番号６に示す。図１１のコンストラクトにおいて、ルシフェラーゼをコードするヌクレオチドを目的の遺伝子として導入する。感染させる細胞を考慮してプラスミドにおけるプロモーターを選択することができる。

【実施例４】

【０１４７】

カプシドおよび／またはＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１における突然変異を有する／有さず、かつ目的の遺伝子を有するＶＲＰの調製

この実施例では、実施例１と同様に、目的の遺伝子を含有するＶＥＥＶレプリコンプラスミドを、ＶＥＥＶカプシドヘルパープラスミドおよびＶＥＥＶ　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１糖タンパク質ヘルパープラスミドと共に２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。目的の遺伝子として、ルシフェラーゼ、ＧＦＰ、ＩＫＫまたはＪＮＫ２をコードする遺伝子を利用した。

【０１４８】

以下のプラスミドを使用した：

ｉ－１）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３野生型カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、または
ｉ－２）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。
ｉｉ－１）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、または
ｉｉ－２）Ｅ３のフーリン部位において突然変異を有する、ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド
ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、ルシフェラーゼ、ＧＦＰ、ＩＫＫまたはＪＮＫ２をコードする目的の遺伝子とを含むプラスミド。

【０１４９】

共トランスフェクション
目的の遺伝子を含むＶＥＥＶ　ＴＣ８３レプリコンプラスミド、ＶＥＥＶカプシド（ＷＴまたは突然変異）をコードするヘルパープラスミドおよびＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１（ＷＴまたは突然変異）をコードするヘルパープラスミドを２９３Ｔ細胞に共トランスフェクトした。３つのプラスミド（１μｇのカプシド、１μｇのＥ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１および１０μｇの目的の遺伝子を含有するＶＥＥＶレプリコン）を２９３Ｔ細胞にトランスフェクトし（ＰＥＩ法によって）、細胞を４～７日インキュベートした。次いで、ＶＲＰを上清から回収し、オプティプレップ（ｏｐｔｉｐｒｅｐ）密度沈降によって精製した。

【０１５０】

精製したＶＲＰは、一次抗体（１：２０００）として抗ＶＥＥＶ抗体（ＡＴＣＣ）および二次抗体として抗マウスＩｇＧ（１：４０００）を使用したウェスタンブロッティングによって確認した。以下のプラスミドを使用することによって得られたＶＲＰの結果を図１２に示す：
ｉ）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。
ｉｉ）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、またＧＦＰ、ＩＫＫまたはＪＮＫ２をコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。

【実施例５】

【０１５１】

以下のベクターを使用して実施例４において得られたＶＲＰを使用した：
ｉ）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。
ｉｉ）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、またＩＫＫまたはＪＮＫ２をコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。

【０１５２】

ＩＫＫまたはＪＮＫ２遺伝子を含有するＶＲＰを２９３Ｔ細胞に感染させた。２９３Ｔ細胞へのＶＲＰの感染は実施例２と同様に行った。

【０１５３】

ＶＲＰ感染２９３Ｔ細胞におけるＩＫＫの発現を、ウェスタンブロッティングによって確認した。陽性対照として、ＩＫＫ発現ベクタープラスミドをトランスフェクトした２９３Ｔ細胞を使用した。細胞溶解物を、一次抗体（１：５００）としてＲｂ抗ＩＫＫ抗体（

Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ）および二次抗体（１：４０００）としてＨＲＰ標識化抗ＲｂＩｇＧを用いたウェスタンブロッティングに供した。

【０１５４】

結果を図１３に示す。図１３において、レーン１はＶＲＰに感染した２９３Ｔ細胞を示す。レーン２は、陽性対照、すなわち、ＩＫＫ発現ベクタープラスミドをトランスフェクトした細胞を示す。この図に示したように、ＶＲＰに感染した２９３Ｔ細胞はＩＫＫタンパク質を発現した。

【０１５５】

感染した２９３Ｔ細胞におけるレプリコン挿入ＪＮＫ２遺伝子からのＪＮＫ２の発現を、ウェスタンブロッティングによって確認した。対照として、感染していない２９３Ｔ細胞を使用した。マウス抗ＪＮＫ２抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）を一次抗体（１：５００）として使用し、ＨＲＰ標識化抗マウスＩｇＧを二次抗体（１：４０００）として使用した。結果を図１４に示す。目的の遺伝子としてＪＮＫ２を有するＶＲＰに感染した２９３Ｔ細胞は、ＪＮＫ２を発現することが確認された。

【実施例６】

【０１５６】

カプシドＮＬＳにおける突然変異の影響

以下のプラスミドを使用して実施例４において得られた２種類のＶＲＰを使用した：

ｉ－１）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３野生型カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、または

ｉ－２）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。

ｉｉ）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに

ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、またルシフェラーゼをコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。

【０１５７】

実施例２と同様にＶＲＰを２９３Ｔ細胞に感染させた。実施例２と同様にルシフェラーゼアッセイを行った。結果を図１５に示す。

【０１５８】

この図において、対照はルシフェラーゼ活性のバックグラウンドに対応する。ＮＬＳにおいて突然変異を有するカプシドを有するＶＲＰは、ＷＴカプシドを有するＶＲＰ（１１８０６３）と比較してはるかに高いルシフェラーゼ活性（９００５５６）を示した。

【０１５９】

このデータは、カプシドの修飾が、カプシドにおいて修飾を有さないアルファウイルスレプリコン粒子と比較して、より高い収率および発現を導くことを示した。

【実施例７】

【０１６０】

以下のベクターによる２９３Ｔ細胞の共トランスフェクションによって実施例４において得られたＶＥＥウイルスレプリコン粒子（ＶＲＰ）を使用した：

ｉ）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。

ｉｉ）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド。

ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、ＧＦＰをコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。

実施例２と同様にして得られたＶＲＰを２９３Ｔ細胞に感染させた。対照は感染なしの正常細胞を示す。細胞におけるＧＦＰの発現を確認した。結果を図１６に示す。

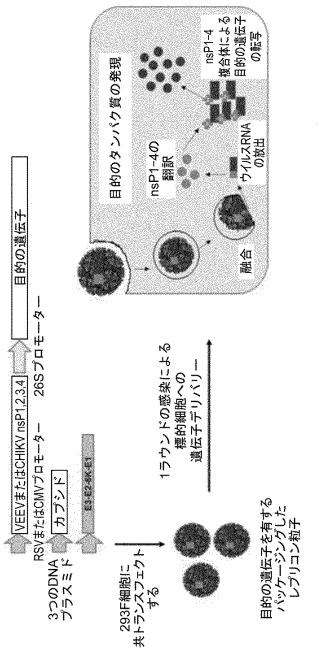
【実施例８】

【０１６１】
実施例７において使用したものと同じＶＥＥＶレプリコン粒子を使用した。マクロファージＪ７７４．Ａ１細胞および骨髄由来マクロファージ（ＢＭＤＭ）細胞にＶＲＰを感染させた。ＧＦＰをコードする目的の遺伝子は、トランスフェクトされたマクロファージ細胞において発現された。
両方の細胞をＩＬ－４により４８時間処理して極性化させ、ＧＦＰ発現について分析した。結果を図１７に示す。
【実施例９】
【０１６２】
ＣＴ２６モデルに関するインビボ有効性研究
この実施例の概略プロトコールを図１８に示す。この実施例において使用したＶＲＰは、以下のプラスミドを使用して実施例４において調製したものである：
ｉ）ＮＬＳにおいて突然変異を有するＶＥＥＶ　ＣＴ８３カプシドタンパク質（Ｋ６４Ｎ）をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、
ｉｉ）野生型ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、ヒトＩκＢキナーゼ（ＩＫＫ）をコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。
【０１６３】
この研究は合計で３２匹の動物について、４処置群、ｎ＝８からなる。動物は与えられた。動物を、腫瘍容量が６０～１００mm^3に達した０日目に無作為化し、１０ｍｇ／ｋｇ（ＢＩＷ×３およびＩＰ）にてＧ１：媒体、Ｇ２：抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、Ｇ３：ＶＲＰおよびＧ４：ＶＲＰと抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組合せによる投与を０日目に開始する。処置開始後３０日まで腫瘍成長をモニターした。
【０１６４】
１、３、４群に関して、０、２、４、６、８および１０日目に５０μｌの媒体または媒体に分散させたＶＲＰをマウスに腫瘍内注射した。ＶＲＰまたは媒体を、０．３ｍｌインスリン型注射器を使用して右側腹部において腫瘍内に投与した。目的は１つの入口点を使用することであったが、針を出し入れすることによって腫瘍を通して物質を分配することであった。
【０１６５】
腫瘍サイズの測定を１週間に２回実施した。この研究についての人道的エンドポイントは、３０００mm^3の腫瘍負荷および／または２０％もしくはそれ以上の体重減少である。各群における８匹全ての動物の結果を図１９に示す。
【０１６６】
データにより、ＩＫＫをコードする遺伝子を含むＶＲＰおよびＶＲＰと抗ＰＤ－１抗体の組合せが、対照および抗ＰＤ－１単独免疫療法より優れた抗腫瘍効果を実証することが示された。
【実施例１０】
【０１６７】
キメラアルファウイルスレプリコン粒子を、以下のベクターのセットを使用して実施例４と同様に調製した。
キメラＡＲＰ１
ｉ）野生型ＣＨＩＫＶ　３７９９７株カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、
ｉｉ）野生型ＣＨＩＫＶ　３７９９７株Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、ＧＦＰをコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。

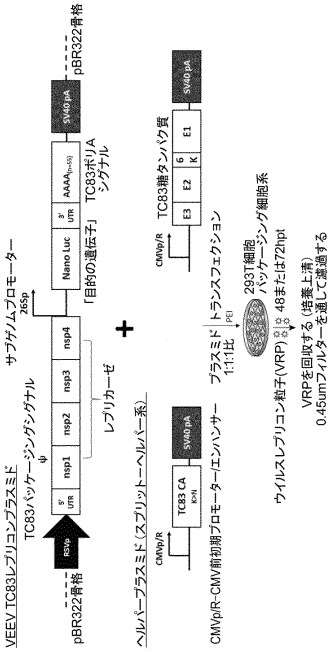
【０１６８】
キメラＡＲＰ２
ｉ）野生型ＣＨＩＫＶ　ＯＰＹ－１株カプシドタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、
ｉｉ）野生型ＣＨＩＫＶ　ＯＰＹ－１株Ｅ３－Ｅ２－６Ｋ－Ｅ１をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド、ならびに
ｉｉｉ）ＶＥＥＶ　ＣＴ８３　ｎｓｐ１、ｎｓｐ２、ｎｓｐ３およびｎｓｐ４をコードするポリヌクレオチドと、ＧＦＰをコードするポリヌクレオチドとを含むプラスミド。
【０１６９】
得られたＡＲＰを実施例１と同様に精製した。一次抗体として抗ＣＨＩＫＶウサギ血清（１：２０００）および二次抗体としてヤギ抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（１：４０００）を使用してウェスタンブロッティングによって精製したキメラＡＲＰを確認した。結果を図２０に示す。両方のキメラＡＲＰの生成を確認した。
【０１７０】
ＧＦＰをコードするキメラＡＲＰに２９３Ｔ細胞を感染させた。感染後、細胞を４８時間インキュベートし、ＧＦＰの発現をＦＡＣＳ分析によって確認した。対照として、感染していない細胞を使用した。結果を図２１に示す。ＡＲＰＳに感染した細胞の５．２１％および４．０７％がＧＦＰを発現し、キメラＡＲＰが細胞内でＧＦＰタンパク質（目的の遺伝子はＧＦＰをコードするヌクレオチドである）を首尾良く発現したことが示唆される。

【図面】

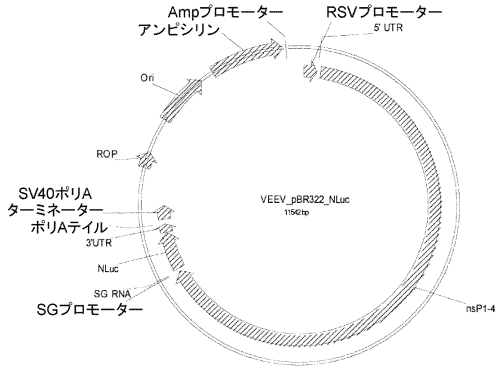
【図１】


目的の遺伝子
26Sプロモーター
VEEVまたはCHIKV nsP1,2,3,4
RSVまたはCMVプロモーター
カプシド
E3-E2-6K-E1
3つのDNA
プラスミド
293F細胞に
共トランスフェクト
する
1ラウンドの感染による
標的細胞への
遺伝子デリバリー
目的の遺伝子を有する
パッケージングした
レプリコン粒子
目的のタンパク質の発現
nsP1-4
複合体による
目的の遺伝子
の転写
nsP1-4
翻訳
ウイルスRNA
の放出
融合

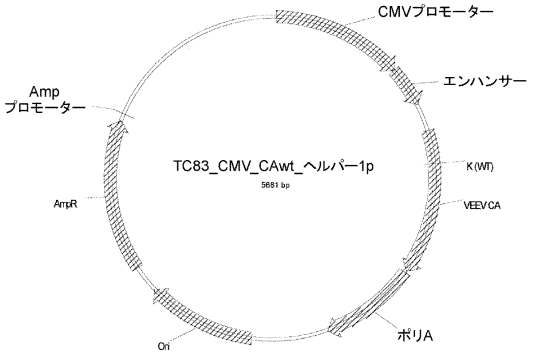
【図２】


VEEV TC83レプリコンプラスミド
TC83パッケージングシグナル
pBR322骨格
RSVp
5' UTR
nsp1
nsp2
nsp3
nsp4
レプリカーゼ
サブゲノムプロモーター
26Sp
「目的の遺伝子」
Nano Luc
3' UTR
AAAA(n-15)
TC83ポリA
シグナル
SV40 pA
pBR322骨格
ヘルパープラスミド（スプリットヘルパー系）
CMVp/R
TC83 CA
ICN1
SV40 pA
CMVp/R-CMV前初期プロモーターエンハンサー
プラスミド
1:1:1比
トランスフェクション
CMVp/R
TC83糖タンパク質
E3
E2
6
K
E1
SV40 pA
293T細胞
パッケージング細胞系
48または72hpt
ウイルスレプリコン粒子(VRP)
VRPを回収する（培養上清）
0.45umフィルターを通して濾過する

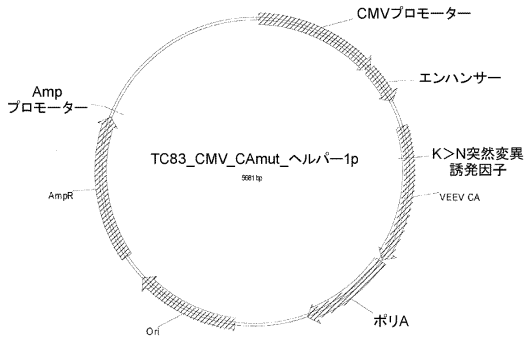
【図３】


Ampプロモーター
アンピシリン
RSVプロモーター
5' UTR
Ori
ROP
SV40ポリA
ターミネーター
ポリAテイル
3'UTR
NLuc
SG RNA
SGプロモーター
VEEV_pBR322_NLuc
11562bp
nsP1-4

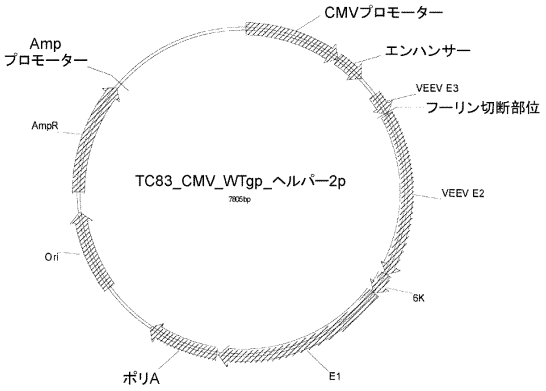
【図４】


CMVプロモーター
エンハンサー
Amp
プロモーター
TC83_CMV_CAwt_ヘルパー1p
5681 bp
K(WT)
AmpR
VEEVCA
ポリA
Ori

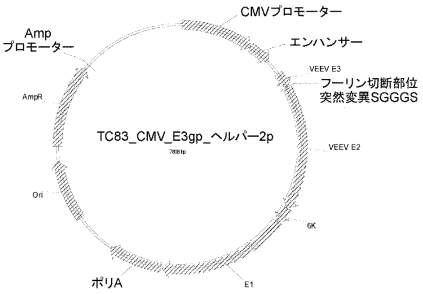
【図５】


CMVプロモーター
エンハンサー
Amp
プロモーター
TC83_CMV_CAmut_ヘルパー1p
9981bp
K>N突然変異
誘発因子
AmpR
VEEV CA
Ori
ポリA

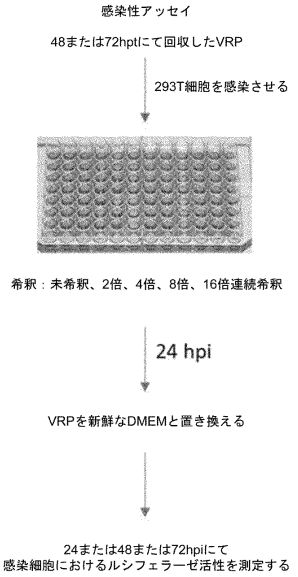
【図６】


CMVプロモーター
Amp
プロモーター
エンハンサー
VEEV E3
フーリン切断部位
AmpR
TC83_CMV_WTgp_ヘルパー2p
7805bp
VEEV E2
Ori
6K
ポリA
E1

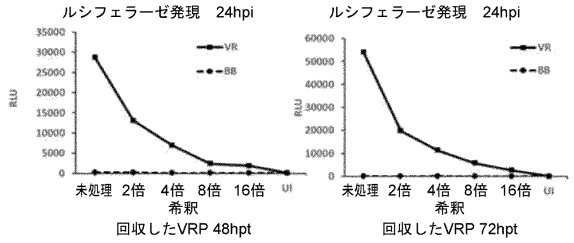
【図７】


CMVプロモーター
Amp
プロモーター
エンハンサー
VEEV E3
フーリン切断部位
突然変異SGGGS
AmpR
TC83_CMV_E3gp_ヘルパー2p
7888bp
VEEV E2
Ori
6K
ポリA
E1

【図８】

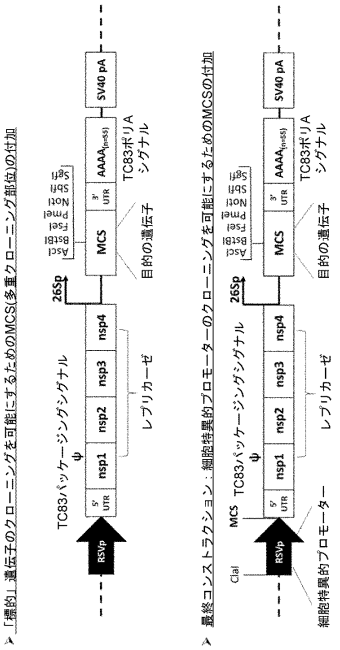

感染性アッセイ
48または72hptにて回収したVRP
293T細胞を感染させる
希釈：未希釈、2倍、4倍、8倍、16倍連続希釈
24 hpi
VRPを新鮮なDMEMと置き換える
24または48または72hpiにて
感染細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定する

【図９】

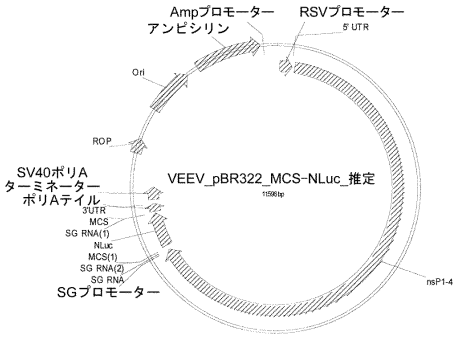


BB-nsp1-4を有さないが、RSVp、265プロモーター、Nluc ORF
およびSV40 pAを有する骨格（陰性対照）

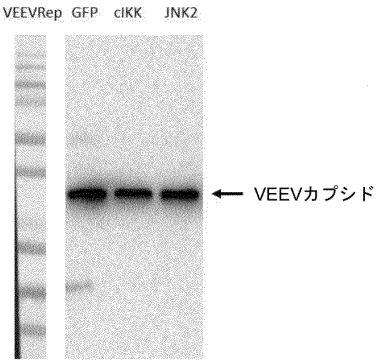
【図１０】



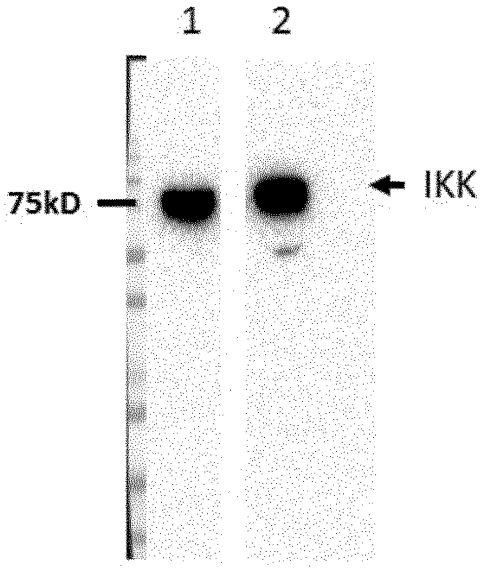
【図１１】



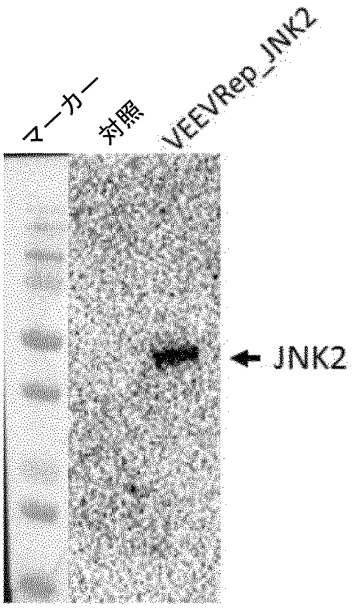
【図１２】



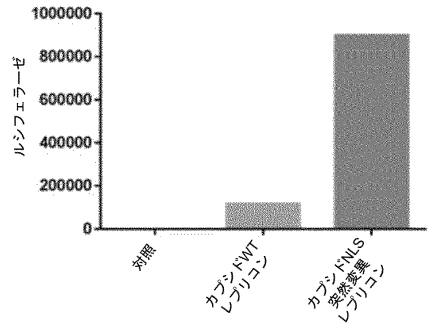
【図１３】



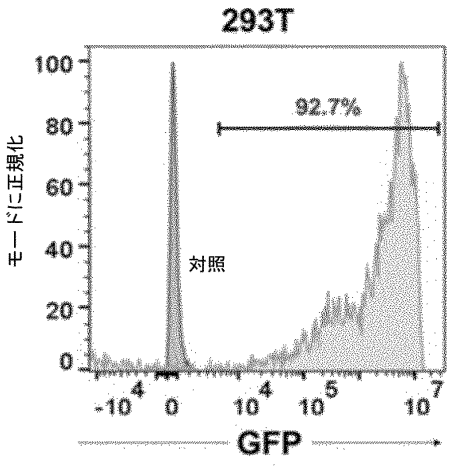
【図１４】



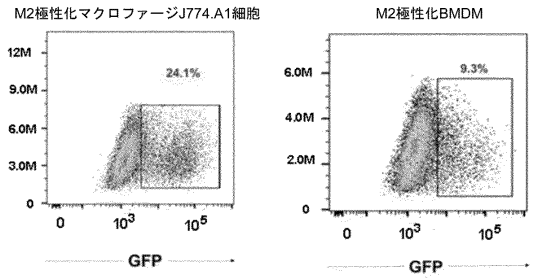
【図１５】



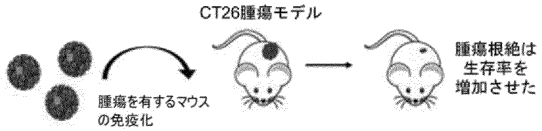
【図１６】



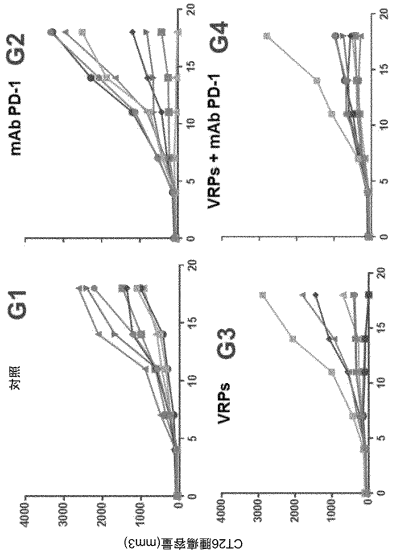
【図１７】



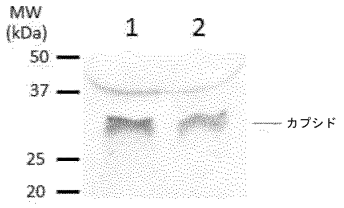
【図１８】



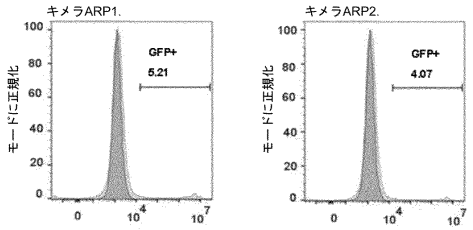
【図１９】



【図２０】



【図２１】



【配列表】

0007412002000001.app

フロントページの続き

ドライブ５２１１番
(72)発明者　上野 隆司
アメリカ合衆国２１６０１メリーランド州イーストン、マラード・ドライブ２８３０７番

審査官　西 賢二

(56)参考文献
特表平１１－５０５７１９（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１４／０１７０１８６（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１７－５２３７９６（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５１９１６５（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１１／０１７１２４９（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１３／００５２２２５（ＵＳ，Ａ１）
Wang, E. et al.，"Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya"，Vaccine，2008年，Vol. 26，pp. 5030-5039

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　７／００－７／０８
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ