

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-526393

(P2006-526393A)

(43) 公表日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/20 (2006.01)	A 6 1 K 39/20	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-508083 (P2006-508083)	(71) 出願人	504200881
(86) (22) 出願日	平成16年6月7日(2004.6.7)		ザ・ユニヴァーシティ・オヴ・クイーンズ
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月3日(2006.2.3)		ランド
(86) 国際出願番号	PCT/AU2004/000752		オーストラリア国クイーンズランド州4 O
(87) 国際公開番号	W02004/108936		7 2, プリスベン, セント・ルシア
(87) 国際公開日	平成16年12月16日(2004.12.16)	(74) 代理人	100099623
(31) 優先権主張番号	2003902842		弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日	平成15年6月6日(2003.6.6)	(74) 代理人	100096769
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(72) 発明者	クロミック, アレクサンダー・エイ
			オーストラリア国クイーンズランド州4 O
			6 1, ザ・ギャップ, デヴォンヒル・スト
			リート 1 2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラビウイルスレプリコンパッケージング系

(57) 【要約】

動物細胞内でのフラビウイルスRNAレプリコンパッケージングおよびウイルス様粒子の産生のために必要なフラビウイルス構造タンパク質の発現を促進するテトラサイクリン調節可能なフラビウイルスパッケージング系が提供される。この調節可能なパッケージング系は、クンジン、デング熱および西ナイル熱ウイルスならびにその他のフラビウイルスレプリコンに基づく発現系と適合性であり、予想外に高力価のウイルス様粒子を産生する。本パッケージング系の特定の適用は、フラビウイルスレプリコンを含み、動物細胞内での発現のために異種タンパク質またはペプチドをコードするRNAをパッケージングするウイルス様粒子の産生である。いっそうより特別には、本パッケージング系は防御的CD8 T細胞媒介性防御免疫応答を誘導する免疫原を送達することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物細胞内でフラビウイルス構造タンパク質を調節可能に発現するためのパッケージング構築物であって、前記ベクターが、Cタンパク質、p r Mタンパク質およびEタンパク質を含むフラビウイルス構造タンパク質翻訳産物をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節可能なプロモーターを含むパッケージング構築物。

【請求項 2】

前記調節可能なプロモーターがテトラサイクリン抑制性である、請求項 1 に記載のパッケージング構築物。

【請求項 3】

前記調節可能なプロモーターがテトラサイクリン抑制性 C M V プロモーターである、請求項 2 に記載のパッケージング構築物。

【請求項 4】

前記ヌクレオチド配列が、Cタンパク質、p r Mタンパク質またはEタンパク質に対して各々少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する 1 つ以上の変異体または突然変異フラビウイルス構造タンパク質をコードする、請求項 1 に記載のパッケージング構築物。

【請求項 5】

I R E S N e o 選択マーカーヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 に記載のパッケージング構築物。

【請求項 6】

前記 Cタンパク質、p r Mタンパク質およびEタンパク質が、クンジンウイルスの構造タンパク質である、請求項 1 に記載のパッケージング構築物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のパッケージング構築物を含むパッケージング細胞。

【請求項 8】

請求項 2 に記載のパッケージング構築物およびテトラサイクリン転写活性化因子構築物を含むパッケージング細胞。

【請求項 9】

B H K 2 1 細胞である、請求項 7 または 8 に記載のパッケージング細胞。

【請求項 10】

(i) 請求項 1 に記載のパッケージング構築物と；

(i i) フラビウイルス発現構築物であって、

(a) フラビウイルスレプリコン；

(b) 異種核酸；および

(c) 前記レプリコンに作動可能に連結したプロモーター、

を含むフラビウイルス発現構築物と、

を含むフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 11】

前記フラビウイルスレプリコンが、クンジンウイルスレプリコン、デング熱ウイルスレプリコンまたは西ナイル熱ウイルスレプリコンである、請求項 10 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 12】

前記異種核酸が、動物細胞内で発現可能である 1 つ以上のタンパク質をコードする、請求項 10 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 13】

前記 1 つ以上のタンパク質が免疫原性である、請求項 12 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 14】

前記レプリコンが、1 つ以上の突然変異構造タンパク質をコードする、請求項 10 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記突然変異構造タンパク質が、

- (i) 非構造タンパク質 NS 1 内のプロリンによって置換されたロイシン残基 250 と ;
- (ii) 非構造タンパク質 NS 2 A 内のプロリンによって置換されたアラニン 30 と ;
- (iii) 前記非構造タンパク質 NS 2 A 内のアスパラギン酸塩によって置換されたアスパラギン 101 と ;
- (iv) 非構造タンパク質 NS 5 内のセリンによって置換されたプロリン 270 と、
からなる群から選択された突然変異を含む、請求項 14 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

10

【請求項 16】

前記調節可能なプロモーターがテトラサイクリン抑制性である、請求項 10 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 17】

前記調節可能なプロモーターがテトラサイクリン抑制性 CMV プロモーターである、請求項 16 に記載のフラビウイルスパッケージング系。

【請求項 18】

請求項 10 に記載のフラビウイルスパッケージング系を含むパッケージング細胞。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 に記載のフラビウイルスパッケージング系およびテトラサイクリン転写活性化因子構築物を含むパッケージング細胞。

20

【請求項 20】

BHK 21 細胞である、請求項 10 に記載のパッケージング細胞。

【請求項 21】

フラビウイルス VLP を産生する方法であって、

- (i) 請求項 1 に記載のパッケージング構築物を宿主細胞内へ導入し、パッケージング細胞を産生するステップと ;
- (ii) 前記パッケージング細胞内へ、
 - (a) フラビウイルスレプリコンと ;
 - (b) 異種核酸と ;
 - (c) 前記レプリコンに作動可能に連結したプロモーターと、
を含むフラビウイルス発現構築物を導入するステップと ;
- (iii) 前記パッケージング細胞によって 1 つ以上の VLP の産生を誘導するステップと
を含む方法。

30

【請求項 22】

請求項 21 の方法によって産生されるフラビウイルス VLP。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の VLP および医薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む免疫療法用組成物。

40

【請求項 24】

ワクチンである、請求項 23 に記載の免疫療法用組成物。

【請求項 25】

組み換えタンパク質を産生する方法であって、請求項 21 に記載の VLP に宿主細胞を感染させ、前記タンパク質をコードする前記異種核酸を前記宿主細胞内で発現させるステップを含む方法。

【請求項 26】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

動物を免疫する方法であって、請求項 23 に記載の免疫療法用組成物を前記動物へ投与

50

し、前記動物において免疫応答を誘導するステップを含む方法。

【請求項 28】

前記動物が哺乳動物である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記動物がヒトである、請求項 28 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フラビウイルス起源のウイルス様粒子の産生に関する。より詳細には、本発明は、動物細胞内でのフラビウイルス RNA パッケージングのために必要なフラビウイルス構造タンパク質の誘導性発現を促進する誘導性フラビウイルスパッケージング系に関する。特定の形状では、本発明はクンジン(Kunjin)と適合性であるテトラサイクリン誘導性パッケージング系および予想外に高力価のウイルス様粒子を産生する他のフラビウイルス発現系を提供する。本パッケージング系の特定の適用は、フラビウイルスレプリコンを含み、動物細胞内での発現のために異種タンパク質またはペプチドをコードする RNA をパッケージングするウイルス様粒子の産生である。

10

【背景技術】

【0002】

抗ウイルスワクチンおよび抗癌ワクチンのために、プラス鎖 RNA ウイルスのレプリコンに基づくベクターが開発されてきた(Khromykh, 2000. Curr Opin Mol Ther. 2:555-569において概観されている)。幾つかの特徴のために、これらのベクターは高度に有効かつ安全なワクチンを開発するための望ましい選択対象となっている。これらの特徴には、(i)レプリコン RNA の自己増幅能力に起因するコードされた異種遺伝子(HG)の高レベルの発現、(ii)核スプライシングおよび/または染色体統合と関連するあらゆる可能性のある合併症を排除する専ら細胞質での複製、(iii)レプリコン RNA がトランスフェクト(または感染)された細胞から漏れ出ることとはあり得ないこと、したがって免疫された被験者におけるワクチンベクターの拡散を制限してこれらのベクターを生物学的に安全にすること、および(iv)それらの cDNA の容易な操作および組換え体の産生を可能にする比較的小さなゲノムサイズ(7~9 kb)、が含まれる。

20

【0003】

アルファウイルス、ピコルナウイルス、およびフラビウイルスを含む大多数のプラス鎖 RNA ウイルスファミリーの代表的ウイルスに対して、レプリコンに基づく発現ベクターが開発されてきた(上記の Khromykh, 2000 において概観されている)。

30

【0004】

一般に、VLP 送達は、哺乳動物における防御免疫応答を誘導するという点において最も有効であることが証明されている。

【0005】

詳細にはクンジン(KUN)フラビウイルス VLP を利用する発現系は、国際特許出願第 PCT/AU02/01598 号に記載されたように、ウイルスタンパク質に対する防御免疫応答を誘導することが証明されている。

40

【0006】

しかし VLP 内への KUN レプリコン RNA のパッケージングは比較的労力を要して時間を消費し、最初は KUN レプリコン RNA を用いる、そして 24~36 時間遅延後には KUN 構造遺伝子を発現する RNA である SFV レプリコンを用いる 2 回の連続的トランスフェクションを必要とする(Khromykh, et al., 1998. J Virol. 72:5967-5977)。さらに、この系を用いて産生する VLP の最高力価は、感染性 VLP が 1 mL 当たり約 $2 \sim 5 \times 10^6$ 個に過ぎず(Khromykh et al., 1998、上記参照; Varnavski & Khromykh, 1999, Virology. 255:366-375)、これは大規模 VLP 製造を困難および非効率にさせる。

【0007】

フラビウイルス構造タンパク質は、ウイルスによる細胞変性(viral cytopathicity)お

50

よびウイルス誘導性アポトーシスの主因の一つであると思われる(Nunes Duarte dos Santos et al.,2000.Virology 274,292-308)。全長RNA(1、2、4、9~11、13、14)と比較したフラビウイルスレプリコンの低い細胞変性は、さらにまた構造タンパク質がウイルスによる細胞変性に対して大きく寄与することも示している。DEN2およびJEウイルス由来のprMおよびEカセットを発現する安定な細胞系は生成されているが、天然prM-E遺伝子を使用した場合の発現レベルは低かった(Hunt et al.,2001,J.Virology Methods.97 133-149)。比較的多量のprM-E粒子を発現する安定な細胞系を樹立するためには、低い膜融合活性を有する未熟prM-E粒子を産生するためにprMタンパク質内のフリン切断部位の不活化(Konishi et al.,J.Virology.75 2204-2212)、または抗アポトーシス性bcl-2遺伝子の共発現(Konishi & Fujii,2002,Vaccine.20 1058-1067)が必要とされた。これらの安定な細胞系はいずれも、全3種のフラビウイルス構造タンパク質を同時には発現しなかった。

10

【0008】

本発明者らが個別プロモーター(CおよびprM-Eを個別に発現する)の制御下で全3種のKUN構造遺伝子を継続的に発現する安定な細胞系を産生するために実施した以前の試みは、極めて不安定な発現を生じさせ、少数の細胞継代後に陽性に発現する細胞を10~20%しか産生しなかった。KUNレプリコンVLPを産生するためにこれらの細胞系を使用する試みは、極めて低いVLP力価しか生じさせなかった。

【発明の開示】

【0009】

20

このため、本発明の目的は、従来のパッケージング系より有効および/または高収率のVLP産生を達成するフラビウイルスパッケージング系を提供することである。

【0010】

このため本発明は、調節可能なフラビウイルスパッケージング系、パッケージング構築物および/またはそれを含むパッケージング細胞に広く向けられる。

【0011】

国際特許公開第W099/28487号はフラビウイルス構造タンパク質を安定に、および誘導性で発現する細胞系の樹立がVLPを産生するための有用なアプローチであろうと手短に述べているが、本発明者らは、驚くべきことに高収率および高効率のVLPパッケージングを可能にするためにはCおよびprM-Eの誘導性発現だけでは不十分であることを見いだした。

30

【0012】

調節可能なフラビウイルスパッケージング系の樹立および実際の実施に着手するにあたって、本発明者らは予想外にも、先行技術から予想される量よりはるかに多量のVLPを産生するためには、構造タンパク質C、prMおよびEが、個別のCおよびprM-Eタンパク質としてよりむしろ単独の前駆体翻訳産物として発現させられなければならないことを証明した。

【0013】

本発明の特別な長所は、VLP力価が、先行技術パッケージング系を使用して典型的に入手される力価の少なくとも500倍を超えることである。

40

【0014】

本発明のまた別の特別な長所は、調節可能なフラビウイルスパッケージング系が様々なフラビウイルスサブグループのいずれかに由来するパッケージングレプリコンに有用な可能性にあることである。

【0015】

第1態様では、本発明は、動物細胞内でのフラビウイルス構造タンパク質の調節可能な発現のためのパッケージング構築物であって、前記ベクターはCタンパク質、prMタンパク質およびEタンパク質を含むフラビウイルス構造タンパク質翻訳産物をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節可能なプロモーターを含んでいるパッケージング構築物を提供する。

50

【 0 0 1 6 】

第 2 態様では、本発明は、第 1 態様のパッケージング構築物を含むパッケージング細胞を提供する。

【 0 0 1 7 】

第 3 態様では、本発明は、

(i) 動物細胞内でフラビウイルス構造タンパク質を調節可能に発現するためのパッケージング構築物であって、前記ベクターがフラビウイルス構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節可能なプロモーターを含むパッケージング構築物と；

(i i) フラビウイルス発現構築物であって、

(a) フラビウイルスレプリコンと；

(b) 異種核酸と；

(c) 前記レプリコンに作動可能に連結したプロモーターと

を含むフラビウイルス発現構築物と

を含むフラビウイルス発現系を提供する。

10

【 0 0 1 8 】

好ましくは、上記の態様によると、調節可能なプロモーターはテトラサイクリン誘導性である。

【 0 0 1 9 】

第 4 態様では、本発明は、本発明のフラビウイルス発現系を含むパッケージング細胞を提供する。

20

【 0 0 2 0 】

第 5 態様では、本発明は、フラビウイルス V L P を産生する方法であって、

(i) 第 1 態様のパッケージング構築物を宿主細胞内へ導入し、パッケージング細胞を産生するステップと；

(i i) 前記パッケージング細胞内へ

(a) フラビウイルスレプリコンと；

(b) 異種核酸と；

(c) 前記レプリコンに作動可能に連結したプロモーターと

を含むフラビウイルス発現構築物を導入するステップと；

30

(i i i) 前記パッケージング細胞によって 1 つ以上の V L P の産生を誘導するステップと

を含む方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

第 6 態様では、本発明は、第 5 態様の方法によって産生したフラビウイルス V L P を提供する。

【 0 0 2 2 】

第 7 態様では、本発明は第 6 態様の V L P および医薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 3 】

第 8 態様では、本発明は、第 6 態様の V L P に宿主細胞を感染させ、前記タンパク質をコードする前記異種核酸を前記宿主細胞内で発現させるステップを含む組み換えタンパク質を産生する方法を提供する。

40

【 0 0 2 4 】

適切には、発現したタンパク質は引き続いて精製される。

【 0 0 2 5 】

第 9 態様では、本発明は、動物を免疫する方法であって、第 7 態様の医薬組成物を前記動物へ投与し、前記動物において免疫応答を誘導するステップを含む方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、前記動物は哺乳動物である。

50

【0027】

より好ましくは、前記哺乳動物はヒトである。

【0028】

好ましくは、上記の態様によると、C、p r M、およびE構造タンパク質はクンジンウイルス(KUN)起源である。

【0029】

好ましくは、上記の態様によると、フラビウイルスレプリコンは、クンジンウイルス、西ナイル熱ウイルスまたはデング熱ウイルス起源である。

【0030】

特定の実施形態では、フラビウイルスレプリコンは1つ以上の突然変異非構造タンパク質をコードする。 10

【0031】

本明細書を通して、他に特別に明記しない限り、「含む(comprise、comprises)」、および「含んでいる(comprising)」は排他的ではなく包括的に使用しているので、明記した整数または整数群は、1つ以上の他の規定していない整数または整数群を含むことがある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明者らは、安定なパッケージング構築物ならびにKUNレプリコンVLPの単純化された(すなわち、1回のRNAトランスフェクション)誘導性製造を可能にするパッケージング細胞系t e t K U N - C p r M Eを開発した。本発明の安定なパッケージング細胞系中においては、KUN構造遺伝子C、p r MおよびEはテトラサイクリン誘導性CMVプロモーターから発現する(図1)。このパッケージング細胞系の増殖および維持中、毒性KUN構造遺伝子産物の産生は培地へのテトラサイクリン(またはドキシサイクリン)の添加によって阻害される。t e t K U N - C M E細胞内へのKUNレプリコンRNAのトランスフェクション後の培地からのドキシサイクリンの除去は、KUN構造遺伝子発現の誘導を生じさせ、その産物は次に複製中のKUNレプリコンRNAを分泌VLP内へパッケージングする(図1)。 20

【0033】

驚くべきことに、本発明のパッケージング構築物から産生したKUN構造タンパク質は、1mL当たり約 10^9 VLPまでの力価でトランスフェクトされて自己増幅したクンジンレプリコンRNAを分離VLP内へパッケージングすることができた。これは、クンジン構造遺伝子の一過性発現のために細胞変性セムリキ森林熱ウイルスレプリコンRNAを使用した以前のパッケージングプロトコルに比べて約1500倍の改良を表す。分泌KUNレプリコンVLPは、 3×10^6 個のトランスフェクト細胞から総計約 5.4×10^{10} VLPまでを産生するRNAトランスフェクションの8日後までに3~4回、連続して採取することができよう(表3)。V e r o細胞上のVLPの継代および2~4日齢の哺乳期マウスへのVLPの脳内注射は、VLP調製物中の感染性クンジンウイルスの存在についての証拠を全く示さなかった。ヒトRS(呼吸器合胞体)ウイルスM2遺伝子をコードするKUNレプリコンVLPを用いたマウスの免疫は、格別に強力なCD8+T細胞反応を誘導した。パッケージング細胞はさらにまた、遠縁のフラビウイルスである2型デング熱ウイルスならびに西ナイル熱ウイルスレプリコンからレプリコンRNAをパッケージングすることもできたが、これはこれらの細胞があらゆるフラビウイルスレプリコンRNAをパッケージングできる能力を示唆していた。 30 40

【0034】

C - p r M - E前駆体翻訳産物由来のフラビウイルス構造タンパク質からウイルス粒子(またはレプリコンVLP)を産生するために必要とされる個々のC、p r M(M)およびEタンパク質へのプロセッシングは複雑な工程であり、細胞シグナラーゼ、細胞フリンプロテアーゼおよびウイルスにコードされたプロテアーゼNS2B-NS3による5回の切断事象を必要とする(図2)。したがって本発明によって使用された連続C - p r M - E 50

前駆体翻訳産物は、レプリコンRNAから発現したウイルスプロテアーゼを供給しなければ正確にプロセッシングすることができない。これは、レプリコンRNAを用いて細胞をトランスフェクトしなければC - p r M - E発現の誘導後にt e t K U N C p r M E細胞から分泌Eタンパク質(分泌V L Pのインジケーター)が産生されないことを示している図1から明らかである。天然フラビウイルスC - p r M接合部の切断はウイルスプロテアーゼおよび細胞プロテアーゼの両方による切断を必要とし、そしてウイルスプロテアーゼによる切断が発生しなければ、細胞シグナラーゼ切断が進行することはできない(Stocks & Lobigs,1998,J Virol.72 2141-2149)。これは、細胞にとって有害なE Rストレス反応を引き起こすことがあるE R内での未切断C - p r M産物の蓄積をもたらす。さらに、p r MがCから切断されない場合は、p r Mは分泌ウイルス粒子の産生にとって不可欠であるp r M - Eヘテロダイマーの形成に参加することはできない。ウイルスプロテアーゼを用いずに細胞シグナラーゼによるCからのp r Mの効率的切断を可能にするCおよびp r M間の疎水性配列における突然変異は設計できるが、それらはウイルス粒子の産生を無効にすると考えられ(Lee et al.,2000,J Virol.74 24-32)、これは分泌ウイルス粒子の産生のために細胞プロテアーゼおよびウイルスプロテアーゼによるC - p r M接合部の協調したプロセッシングが重要な役割を果たすことを示唆している。そこで本発明において使用したウイルスプロテアーゼをコードするレプリコンRNAのトランスフェクションと結び付けたC - p r M - E前記翻訳産物をコードするヌクレオチド配列の発現はK U N構造タンパク質の適正なプロセッシングおよび高力価の分泌レプリコンV L Pの産生にとって好都合な条件を提供したと思われる。

10

20

【0035】

より詳細には、本発明の誘導性発現系は、細胞培養培地へのテトラサイクリンの添加によって潜在的に毒性のC - p r M - E前駆体翻訳産物の発現の「スイッチを切る」能力を提供する。これはC - p r M - E発現を低下させずにt e t K U N C p r M E安定性パッケージング細胞系の選択および維持を可能にし、したがって高力価のレプリコンV L Pの高レベルかつ誘導性の産生を可能にする。

【0036】

このため本発明はフラビウイルスレプリコンパッケージングへの以下の広範な適用を有する可能性があることは理解されるであろう：

- (i) あらゆるフラビウイルスレプリコンをパッケージングする能力；および/または
- (i i) フラビウイルスレプリコンパッケージングのために必要かつ十分であるいずれかのフラビウイルス構造タンパク質を発現する能力。

30

【0037】

本明細書で使用する「フラビウイルス(flavivirus)」および「フラビウイルスの(flaviviral)」は、65種以上の関連ウイルス種を含有するフラビウイルス科内のフラビウイルス属のメンバーに関連する。典型的には、フラビウイルスは、単一糖タンパク質Eを含むペプロマーを備える小さなエンベロープRNAウイルス(直径：約45nm)である。他の構造タンパク質はC(コア)およびM(膜様)と呼ばれている。一本鎖RNAは感染性であり、典型的には約 4×10^6 の分子量を有しており、5'末端ではm7G'cap'を備えるが3'末端ではポリ(A)区域を有していない；したがって単独メッセンジャーとして機能する。フラビウイルスは広範囲の脊椎動物に感染し、そして多数はダニや蚊などの節足動物によって伝播するが、別のフラビウイルス群はN K V (no-known-vector(公知の媒介動物を持たない))と呼ばれている。

40

【0038】

フラビウイルスの特定の非限定的例は、西ナイル熱ウイルス、クンジンウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、マリーバレー(Murray Valley)脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、モンタナコウモリ(Montana Myotis)白質脳炎ウイルス、ウスツ(Usutu)ウイルス、およびアルクフルマ(Alkhurma)ウイルスである。

【0039】

50

本明細書で使用する用語「核酸」は、一本鎖または二本鎖の mRNA、RNA、cRNA、RNA-DNA ハイブリッドならびに cDNA および ゲノム DNA を含む DNA を表している。

【0040】

好ましい形態では、本発明のパッケージング構築物は二本鎖プラスミド DNA パッケージング構築物である。

【0041】

「タンパク質」はアミノ酸ポリマーを意味する。アミノ酸は、当分野において周知のように、天然（すなわち、遺伝的にコードされた）、非天然、D-および L-アミノ酸を含んでいてよい。

【0042】

「ペプチド」は、50 個未満のアミノ酸を有するタンパク質である。

【0043】

「ポリペプチド」は、50 個以上のアミノ酸を有するタンパク質である。

【0044】

本発明によると、「パッケージング構築物」は 1 つ以上のフラビウイルス構造タンパク質をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節可能なプロモーターを含んでいる。

【0045】

適切には、パッケージング構築物は構造タンパク質 C、p r M および E をコードするヌクレオチド配列を含んでいる。

【0046】

本発明者らは、「前駆体」または「プレタンパク質」としての C、p r M および E 構造タンパク質をコードする連続アミノ酸配列の誘導性発現が VLP を産生するために群を抜いて有効な系であることを見いだした。これは、C および p r M - E タンパク質が個別ヌクレオチド配列によって各々コードされる典型的な従来のアプローチとは対照的である。

【0047】

これに関連して、本発明によると、構造タンパク質 C、p r M および E は、VLP 産生のために必要とされる個々の C、p r M および E 構造タンパク質を産生するために引き続いてタンパク質分解プロセッシングを受けることのできる単一の前駆体翻訳産物として動物細胞内で発現することができる。

【0048】

前駆体翻訳産物のプロセッシングについて記載している提案されたモデルは図 2 に要約した。

【0049】

プロセッシングは通常は細胞プロテアーゼおよびレプリコンにコードされたプロテアーゼの両方の存在に依存するが、構造タンパク質 C、p r M および E の 1 つ以上の中にまた別のプロテアーゼ切断部位を組み込み、動物宿主動物細胞において適切なプロテアーゼと共に発現することで、通常起こるプロセッシング系とは別のプロセッシング系を提供することも企図されている。

【0050】

そのような系は、C、p r M および E 翻訳産物のプロセッシングにおいて、フラビウイルスレプリコンにコードされたプロテアーゼの必要を撤回することができよう。

【0051】

好ましい実施形態では、構造タンパク質は KUN 構造タンパク質 C、p r M および E である。

【0052】

しかし、いずれか他のフラビウイルス由来の構造タンパク質を使用することもできる。1 種のフラビウイルス中の構造タンパク質と、他のフラビウイルスの構造タンパク質との置換がキメラフラビウイルスの回収を許容することは、明確に確証されており (Monath et

10

20

30

40

50

al., 2000, J. Virol. 74 1742; Guirakhoo et al., 2000, J. Virol. 74 5477; Pletnev et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 10532)、1種のフラビウイルス由来の構造タンパク質が他のフラビウイルス由来のRNAをパッケージングすることができることを示している。近年、(i)黄熱病レプリコンは黄熱病prMEおよび西ナイル熱またはデング熱ウイルスコアタンパク質を供することによってパッケージングできること、(ii)西ナイル熱レプリコンはウイルスを供することによってパッケージングできることが証明されている。

【0053】

構造タンパク質C、prMおよびEは、C、prMおよびE翻訳産物のプロセッシングおよび/またはウイルスパッケージングを妨害しない、または感知できるほど減少させないこれらのタンパク質の1つ以上においていずれかの突然変異または他の配列変化を含み、包含していることもまた理解されるであろう。 10

【0054】

これに関連して、また別のプロテアーゼ切断部位を構造タンパク質C、prMおよびEの1つ以上の中に組み込むことができるという上記の可能性を参照されたい。さらに、ウイルスプロテアーゼおよび細胞プロテアーゼによって認識される切断部位のすぐ上流または下流の配列は切断効率を増強するために修飾することができ(Stocks & Lobigs et al., 1998, J. Virol. 72 2141-2149)、これによりVLPの改良された切断および/または分泌をもたらすことができる。

【0055】

典型的には、突然変異および/または変異体構造タンパク質は、C、prMまたはEタンパク質アミノ酸配列各々と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、または有益には少なくとも95%、96%、97%、98%または99%のアミノ酸配列同一性を有してよいことが企図されている。 20

【0056】

したがって、突然変異および/または変異体構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、C、prMまたはEタンパク質をコードするヌクレオチド配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、いっそうより好ましくは少なくとも90%、または有益には少なくとも95%、96%、97%、98%または99%のヌクレオチド配列同一性を有してよいことは理解されるであろう。 30

【0057】

本明細書で使用する「配列同一性率」は、参照配列とのアミノ酸またはヌクレオチドとの正確なマッチ数をオーバーラップ領域内の残基数で割ることによって決定したパーセンテージである。オーバーラップの最小領域は、典型的には少なくとも6、12または20連続残基である。アミノ酸配列同一性は、non-gapped BLASTおよびGapped Blast 2.0を含めてwww.ncbi.nlm.nih.govから入手できるNCBI BLAST検索方法を含む標準方法によって決定できる。しかし、米国特許第5,691,179号およびAltschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25 3389-3402に記載された配列解析方法もまた企図されている。

【0058】

本発明のパッケージング構築物の1つの特徴は、フラビウイルス構造タンパク質翻訳産物をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節可能なプロモーターの存在である。 40

【0059】

「調節可能なプロモーター」は動物細胞内で操作可能なあらゆるプロモーターであって、プロモーター活性は1つ以上の調節因子に反応して制御することができるものを意味する。調節因子は、物理的(例、温度)であっても、あるいは化学的(例、ステロイドホルモン、重金属、抗生物質)であってもよい。

【0060】

そのようなプロモーターの例には、熱ショック誘導性プロモーター、エクジソン誘導性プロモーター、テトラサイクリン誘導性/抑制性プロモーター、メタロチオニン誘導性プ 50

ロモーターおよび細菌 *lac* オペロンを通して誘導性である哺乳動物機能的オペレーター（例、*lac* - 調節型 *CMV* または *RSV* プロモーター）が含まれる。

【0061】

好ましい調節可能なプロモーターは、ドキシサイクリンの存在下では抑制され、ドキシサイクリンの除去によって誘導される「tet off」プロモーターである。

【0062】

この実施形態の特に好ましい形態によると、調節可能なプロモーターは、別個の構築物によってコードされる、テトラサイクリン転写活性化因子（*tTA*）に対する応答性を促進するテトラサイクリン応答エレメント（*TRE*）に連結された *CMV* プロモーターを含んでいる。

10

【0063】

本発明のパッケージング構築物は、内部リボソーム進入部位（*IRES*）、3' ポリアデニル化および転写ターミネーター配列（例、*-* グロビンまたは *SV40* 由来）などの他の調節配列ならびに安定な形質転換体の選択を促進するための選択可能なマーカー遺伝子（例、ネオマイシン、ヒグロマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子）を含んでいる。

【0064】

特に好ましい形態では、本発明のパッケージング構築物は安定な形質転換体の選択を促進するために *IRES* - ネオマイシンヌクレオチド配列を含んでいる。

【0065】

この実施形態の好ましい形態では、パッケージング構築物は *-* グロビンポリアデニル化シグナルをさらに含んでいる。

20

【0066】

本発明によると、安定なパッケージング細胞系は典型的には、

（*i*）テトラサイクリン（ドキシサイクリン）転写活性化因子を発現する安定な細胞系を樹立するステップと；

（*ii*）ステップ（*i*）において産生した安定な細胞系を使用し、ドキシサイクリンの除去後に *KUN* 構造遺伝子を誘導性発現することのできるパッケージング細胞を産生するステップと

の2段階で作製する。

30

【0067】

特定の実施形態では、ステップ（*i*）での安定な細胞系は、ヒト鎖延長因子 プロモーターに作動可能に連結したテトラサイクリン転写活性化因子ヌクレオチド配列を含んでいるテトラサイクリン転写活性化因子構築物を前記細胞内へトランスフェクトするステップによって産生される。

【0068】

しかしこれに関連して、*RSV*、*SV40*、アルファクリスタリン、アデノウイルスおよび *CMV* プロモーターなどを含むがそれに限定されない他のプロモーターが有用であることは理解されるであろう。

【0069】

「作動可能に連結した」または「作動可能に結合した」は、前記調節可能なプロモーターが、前記フラビウイルス構造タンパク質をコードする *RNA* の細胞内転写を開始および調節可能に制御するように配置されていることを意味している。

40

【0070】

好ましくは、テトラサイクリン転写活性化因子構築物は、安定な形質転換体の選択を促進する *IRES* -ピューロマイシン選択マーカー配列をさらに含んでいる。

【0071】

ステップ（*ii*）では、上述した本発明のパッケージング構築物は、その後テトラサイクリン転写活性化因子を発現する安定な細胞系内にトランスフェクトされる。

【0072】

50

VLPパッケージングのための適切な宿主細胞は、タンパク質発現のために必要とされる転写、翻訳およびいずれかの転写後および/または翻訳後のプロセッシングまたは修飾を実行するためにコンピテントであるいずれかの真核、動物または哺乳動物細胞系であってよい。核酸トランスフェクションおよびタンパク質発現のために典型的に使用される哺乳動物の例には、COS、Vero、CV-1、BHK21、293、HEK、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NIH3T3、Jurkat、WEHI231、HeLaMRC-5、およびB16黒色腫細胞が含まれるが、それらに限定されない。

【0073】

好ましくは、宿主細胞はBHK21である。

【0074】

本発明によって産生されたパッケージング細胞は、1つ以上のタンパク質をコードするフラビウイルスレプリコンRNAのその後のパッケージングのために使用できることは理解されるであろう。

【0075】

本発明によって企図されるフラビウイルスレプリコンには、例えば国際特許公開第W099/28487号および国際特許公開第W002/01598号に記載されたようなフラビウイルスRNA由来のいずれか1つ以上の自己複製成分が含まれる。限定されるものではないが、これらには、DNAに基づくレプリコン構築体(レプリコンcDNAがCMVなどの哺乳動物発現プロモーターの制御下に置かれ、プラスミドDNAの形態で送達される)、およびRNAに基づくレプリコン構築体(レプリコンcDNAがSP6、T7、T3などのバクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター(対応するDNA依存性RNAポリメラーゼを使用してレプリコンRNAのインビトロ産生を可能にする)の制御下に置かれ、裸のRNAまたはVLP内へパッケージングされたRNAとして前記レプリコンRNAが送達される)が含まれる。

【0076】

本発明の好ましいフラビウイルスレプリコンはクンジンウイルスに由来するが、当業者であれば本発明のパッケージング系があらゆるフラビウイルスレプリコンをパッケージングするために使用できることを理解するであろう。

【0077】

比較的明確に特徴付けられたフラビウイルスレプリコンの例には、系統1(Shi et al., Virology, 2002, 296 219-233)および系統II(Yamshchikov et al., 2001, Virology, 281 294-304)の西ナイル熱ウイルス株、2型デング熱ウイルス(Pang et al., 2001, BMC Microbiology, 1 18)、および黄熱病ウイルス(Molenkamp et al., 2003, J. Virol., 77 1644-1648)由来のレプリコンが含まれる。

【0078】

1つの特定の実施形態では、前記フラビウイルスレプリコンはNS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4Bおよび/またはNS5を含む1つ以上の突然変異構造タンパク質をコードすることができる。

【0079】

1つの特定の実施形態では、NS1タンパク質内のロイシン残基250がプロリンによって置換されている。

【0080】

また別の特定の実施形態では、アラニン30が非構造タンパク質NS2A内のプロリンによって置換されている。

【0081】

さらにまた別の特定の実施形態では、アスパラギン101が非構造タンパク質NS2A内のアスパラギン酸塩によって置換されている。

【0082】

さらにまた別の特定の実施形態では、プロリン270が非構造タンパク質NS5内のセリンによって置換されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

それによって細胞適応的突然変異をレプリコン内に導入するために上述したものとは別のアミノ酸を使用できることは理解されるであろう。

【 0 0 8 4 】

本発明によると、「フラビウイルス発現ベクター」は、1つ以上の他の調節ヌクレオチド配列とともにフラビウイルスレプリコンを含んでいる。そのような調節配列には、プロモーター、内部リボソーム進入部位 (IRES)、1つ以上の異種核酸を挿入するための1つ以上の制限酵素部位、ポリアデニル化配列ならびに転写の停止および3'末端の正確な切断を保証する肝炎デルタウイルスリボザイム (HDVr) のアンチゲノム配列などの他の配列が含まれるが、それらに限定されない。

10

【 0 0 8 5 】

特に好ましい形態では、フラビウイルス発現ベクターは、パッケージング細胞内でC、p r MおよびEをコードする作動可能に連結したヌクレオチド配列の発現を促進するCMVプロモーターを含んでいる。しかしこれに関連して、RSV、SV40、アルファクリスタリン、アデノウイルスおよびヒト鎖延長因子プロモーターなどを含むがそれらに限定されない他のプロモーターが有用であることは理解されるであろう。

【 0 0 8 6 】

したがって、「フラビウイルス発現構築物」は、RNAの形態で、および/またはコードされたタンパク質として発現可能であるようにその中に異種核酸が挿入されている発現ベクターである。

20

【 0 0 8 7 】

前記異種核酸は、1つ以上のペプチドまたはポリペプチドをコードすることができる、または標的配列と実質的に同一または実質的に相補的であるヌクレオチド配列をコードすることができる。

【 0 0 8 8 】

異種核酸は、動物細胞内で発現できるあらゆるタンパク質をコードすることができる。

【 0 0 8 9 】

これを念頭に置くと、フラビウイルスレプリコンは、例えば国際特許公開第W099/28487号に記載されているように、典型的には1つ以上のクローニング部位を導入することによって、前記異種核酸を含むことができるように修飾、適合またはさもなければ組み換えることができる。

30

【 0 0 9 0 】

テトラサイクリン転写活性化因子構築物、パッケージング構築物またはフラビウイルス発現構築物の動物宿主細胞内への導入は、動物細胞へ適用できるいずれかの方法によって行なわれてよい。そのような方法には、リン酸カルシウム沈降法、エレクトロポレーション、リポフェクタミン、リポフェクチンおよび他の親油性物質による送達、リン酸カルシウム沈降法、DEAE-デキストラントランスフェクション、微粒子衝突(microparticle bombardment)法、マイクロインジェクション法およびプロトプラスト融合法が含まれる。

【 0 0 9 1 】

上記から、本発明のパッケージング系が動物細胞中、好ましくは哺乳動物細胞中のタンパク質の発現のために使用できることは理解されるであろう。

40

【 0 0 9 2 】

これは、動物細胞によって提供される翻訳後プロセッシングおよび/または修飾を必要とするあらゆる真核細胞タンパク質の発現を促進することができる。そのようなタンパク質の非限定的例には、ホルモン、成長因子、転写因子、酵素、組み換え免疫グロブリンまたはそのフラグメント、抗原、免疫原などが含まれる。

【 0 0 9 3 】

特定の実施形態では、本発明によって産生したVLPは適切な動物細胞に感染させ、それによって細胞中におけるコードされたタンパク質の発現を促進するために使用できる。

50

その後適切なタンパク質精製技術を使用すると発現したタンパク質を単離および精製することができる。

【0094】

そのような系は、CHO細胞などの、レプリコンでコードされた異種タンパク質を高レベルで発現することができる動物細胞を利用することができるが、それらに限定されない。

【0095】

特定の実施形態では、異種核酸は、ウイルス、真菌、細菌、原生動物などの病原微生物、寄生虫などの無脊椎動物および節足動物に由来する、もしくはそれらから入手できる免疫原性タンパク質もしくはペプチドをコードできる、または、動物およびヒトを含む動物に由来する、もしくはそれらから入手できる腫瘍抗原などの突然変異した発癌性もしくは腫瘍タンパク質をコードすることができる。異種核酸は、例えば免疫を誘導するために構築された免疫原性エピトープなどの合成または人工タンパク質もコードすることができる。

10

【0096】

本発明の免疫治療用組成物は、ヒトなどの動物を予防的または治療的に免疫するために使用できる。

【0097】

本発明のVLPによってコードされた免疫原性タンパク質またはペプチドエピトープを適切に発現させることによって、ウイルス、腫瘍、細菌、原生動物および他の無脊椎動物寄生虫に対して免疫応答を誘発または誘導することができる。

20

【0098】

好ましくは、免疫応答はCTLの誘導を含んでいる。

【0099】

本発明によると、本発明によって産生したVLPは、許容される担体、希釈剤または賦形剤および/またはアジュバントをさらに含む免疫治療用組成物またはワクチン組成物の調製において使用できる。

【0100】

「医薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤」は、全身性投与において安全に使用できる固形または液状の充填剤、希釈剤もしくはカプセル化剤を意味する。特定の投与経路に依存して、当分野において周知の様々な担体を使用できる。これらの担体は、糖、デンプン、セルロースおよびその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸緩衝液、乳化剤、等張食塩液、ならびに塩酸塩、臭化物および硫酸塩を含む鉱物酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩およびマロン酸塩などの有機酸および発熱物質無含有水を含む群から選択できる。

30

【0101】

医薬上許容される担体、希釈剤および賦形剤について記載している有用な参考文献は、参照して本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co., 米国ニュージャージー州、1991)である。

【0102】

本発明の組成物を患者に提供するためにはあらゆる安全な投与経路を使用できる。例えば、経口、直腸、非経口、舌下、経口腔、静脈内、関節内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脳室内、経皮などを使用できる。

40

【0103】

当分野において理解されるように、「アジュバント」はワクチン組成物の免疫原性および/または有効性を増強する1つ以上の物質を意味する。適切なアジュバントの非限定的例には、スクアランおよびスクアレノ(または他の動物起源の油);ブロックコポリマー; Tween(登録商標)80などの界面活性剤; Quil(登録商標)A、DrakeolもしくはMarcolなどの鉱油、ピーナッツ油などの植物油; コリネバクテリウム・パルヴム(Corynebacterium parvum)などのコリネバクテリウム由来アジュバント; プロピオンバクテリウム・アクネ(P

50

ropionibacterium acne)などのプロピオンバクテリウム由来アジュバント；マイコバクテリウム・ボビス(Mycobacterium bovis)(Bacille Calmette and GuerinまたはBCG)；インターロイキン2およびインターロイキン12などのインターロイキン類；インターロイキン1などのモノカイン類；腫瘍壊死因子；インターフェロンなどのインターフェロン類；サポニン-水酸化アルミニウムまたはQuil-A-水酸化アルミニウムなどの組み合わせ；リボソーム；ISCOM(登録商標)およびISCOMATRIX(登録商標)アジュバント；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ムラミルジペプチドなどの合成グリコペプチドもしくは他の誘導体；Avridine；リピド(Lipid)A誘導体；硫酸デキストラン；DEAE-デキストランもしくはリン酸アルミニウム含有；Carbopol'EMAなどのカルボキシポリメチレン；Neocryl A640などのアクリルコポリマーエマルジョン(例、米国特許第5,047,238号)；ワクシニアもしくは動物ボックスウイルスタンパク質；コレラ毒素などのサブウイルス粒子アジュバント、またはそれらの混合物が含まれる。

10

【0104】

本発明による免疫治療用組成物を含む医薬組成物および免疫方法は、動物およびヒトを含むがそれらに限定されないあらゆる動物に投与できる。

【0105】

したがって、獣医学的および医学的治療が企図されており、それらの治療は治療される疾患または病気に依存して治療的および/または予防的に投与できる。

【0106】

本発明を容易に理解して実際的に実行できるように、以下の非限定的例を参照として挙げる。

20

【実施例】

【0107】

[材料および方法]

[プラスミド]

pEFIRESPの誘導体(Hobbs et al.,1998 Biochem Biophys Res Commun 252,368-72)であり、テトラサイクリン転写活性化因子をコードする配列(図1A)を含有するプラスミドpEF-tTA-IRESpuroは、Queensland大学のRick Sturm氏から贈呈された。テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下でKUN CprME遺伝子カセットをコードするプラスミドpTRE2CprME-IRESNeo(図1A)を下記のとおり構築した。EMCV内部リボソーム進入部位(IRE)についての配列およびネオマイシン遺伝子は、MluIおよびXbaIを用いてpCIN1の誘導体であるpBS-CIN4IN(Rees et al.,1996,BioTechniques 20 102-110)から切り取った。次にIRESNeoカセットをpTRE2ベクター(Clontech社)の対応するMluI/XbaI部位内へ挿入して中間体pTRE2IRESNeoプラスミドを産生した。クンジン(KUN)CprME遺伝子カセットをコードする配列は、5'および3'末端でBglII制限酵素部位を備えるフラグメントを産生するために、プライマーCprMEFor 5'ATTAGGTGACACTATAGAGTAGTTCGCCTGTGTGA3'およびCprMERev 5'GAGGAGATCTAAGCATGCACGTTACGGAGAGA3'を用いて、FLSDXプラスミドDNAテンプレート(Khromykh et al.,1998,J.Virol.72 5967)から高忠実度Pfu DNAポリメラーゼ(Promega社)によってPCR増幅させた。このフラグメントの5'末端でのBglII部位がフォーワードプライマーの100ヌクレオチド下流および天然KUN翻訳開始コドンのすぐ上流に位置することに留意されたい。KUN CprME配列を含有するBglII-BglIIフラグメントをIRESNeo配列の上流に位置するpTRE2IRESNeoベクターのBamHI部位内に挿入して、pTRE2CprME-IRESNeoプラスミドを産生した(図1A)。

30

40

【0108】

様々なレプリコンRNAのインビトロ転写のために使用された様々な異種遺伝子をコードするRNAに基づくKUNレプリコンベクターおよび他のKUNレプリコン構築物については以前に報告されている(Khromykh & Westaway,1997,J.Virol.71 1497;Anraku et al

50

.,2002,J.Virol.76 3791;Liu,2002 #1264;Varnavski & Khromykh,1999,Virology 255 366;Varnavski et al.,2000,J.Virol.74 4394)。RSウイルス(RSV)のM2遺伝子をコードするKUNレプリコンは、適切なプライマーを使用してRSV感染細胞由来のRNAの逆転写(RT)およびPCR増幅によって調製したRSV M2 cDNA配列を含有するDNAフラグメントをRNA1レベクター(Anraku et al.,2002、上記参照)内へクローニングすることによって構築した。

【0109】

2型デング熱ウイルス(DEN2)レプリコン構築物pDEN CprMEおよびpDEN prMEは、構造遺伝子内で大きなインフレーム欠失を作製することによってDEN-2のニューギニア(New Guinea)C系統のゲノムに対応する全長cDNAクローンを含有するプラスミドpDVWS601に由来する。pDEN CprMEはC遺伝子の最初の81ヌクレオチドおよびE遺伝子の最後の72ヌクレオチドを保持していたが、他方pDEN prMEはprM遺伝子の最初の21ヌクレオチドおよびE遺伝子の最後の72ヌクレオチドを保持していた。

10

【0110】

〔細胞系、ウイルスおよび抗体〕

BHK21およびVer o細胞系は、5%のCO₂を含む37℃の大気中で10%ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを補給したダルベッコ改質イーグル培地(Life Technologies社)中で培養した。野生型(wt)KUNウイルス、MRM61C系統は、以前に記載されたように(Westaway et al.,1997,J.Virol.71 6650)Ver o細胞内で増殖させた。ウサギにおいて立てた抗KUN NS3ポリクローナル抗体は以前に記載されたとおりであった(Westaway et al.,1997、上記参照)。抗KUNエンベロープ3.91Dモノクローナル抗体(MAb)はマウスにおいて立てた(Adams et al.,1995,Virology 206 49)。

20

【0111】

〔DNAトランスフェクション〕

BHK21細胞は、製造業者によって記載されたように、リポフェクタミンプラス試薬(Life Technologies社)を用いて2μgのプラスミドDNAとのトランスフェクションの前に60mm径培養皿内で24時間培養した。

【0112】

〔ウイルス様粒子(VLP)の産生およびそれらの力価の決定〕

KUNレプリコンRNAは、本質的には以前に記載されたようにSP6 RNAポリメラーゼを用いてインビトロ転写させ、tetKUNCprME細胞内へエレクトロポレーションした(Khromykh & Westaway,1997、上記参照)。慣例的に、約30μgのRNAを3×10⁶cells内へエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションした細胞を次に100mm径の培養皿の中に播種し、37℃で8日間まで様々な量の培地中でインキュベートした。培養液(CF)は、通常はこの期間中の3~5回の時点に採取し、VLPの複数回の採取を可能にするために、同一量の新鮮培地と交換した。感染性VLPの力価は、採取したCFの10倍連続希釈液を用いてVer o細胞を感染させ、そして感染30~40時間後に実施した抗NS3抗体を用いたIF(間接免疫蛍光)分析においてNS3発現に対して陽性の細胞数を計数することによって決定した。

30

40

【0113】

〔免疫蛍光〕

培養細胞のカバーガラスはレプリコンRNAを用いたトランスフェクションまたはVLPを用いた感染の24~48時間後に4%パラホルムアルデヒド中で固定し、各々抗NS3または抗E抗体を用いる間接免疫蛍光(IF)法によってKUN NS3またはEタンパク質の発現についてアッセイした。

【0114】

〔ノーザンブロット分析〕

全RNAは、ドキシサイクリンを含めて、および含めずに培養したtetKUNCpr

50

M E 細胞から、そして T r i z o l 試薬 (Life Technologies社) を用いて正常 B H K 2 1 細胞から抽出した。20 μ g の R N A は 1 % ホルムアミド - T A E アガロースゲル上で分離し、次に 20 \times S S C を用いるキャピラリープロッティングによって H y b o n d - N (Amersham-Pharmacia Biotech社) へ移した。標識プローブを調製するためのテンプレートとして、p T R E 2 I N e o C p r M E から単離した A f l I I - P s t I フラグメントを使用した。この 32 P 標識プローブは、製造業者によって記載されたとおりに Rediprime II キット (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて調製した。R N A は、本質的には製造業者によって記載されたとおりに、68 で E x p r e s s H y b 溶液 (Clontech社) を使用して 32 P 標識 D N A プローブを用いてハイブリダイズさせた。バンドは X 線フィルムへの曝露、または燐光イメージングによって可視化し、ImageQuantソフトウェア (Molecular Dynamics社) を用いて定量した。

10

【0115】

〔ウエスタンブロット分析〕

t e t K U N C p r M E 細胞は、製造業者によって記載されたとおりに、ドキシサイクリンを含めて、または含めずに 60 mm 径培養皿内で 2 日間にわたり培養し、そして T r i z o l 試薬を用いて細胞タンパク質を抽出した。B H K 2 1 細胞タンパク質も陰性コントロールとして使用するために回収した。各サンプルについてのタンパク質濃度は、製造業者によって記載されたとおりに B i o R a d タンパク質アッセイ (BioRad社) を用いて決定した。5 μ g の全タンパク質を 12.5 % ゲル上で S D S - P A G E によって分離し、次に H y b o n d P 膜 (Amersham-Pharmacia Biotech社、英国) 上に移した。この膜を 4 のブロッキングバッファー (リン酸緩衝生理食塩液 (P B S) 中の 5 % 脱脂粉乳 / 0.1 % T w e e n 20) 中で一晩インキュベートした。K U N 抗 E M A b をブロッキングバッファー中で 1 : 10 に希釈し、室温で 2 時間にわたり膜と一緒にインキュベートした。5 分間にわたり 0.1 % T w e e n 20 / P B S を用いてこの膜を 3 回洗浄し、次に二次抗体を添加した。ヤギ抗マウスホースラディッシュペルオキシダーゼである二次抗体はブロッキングバッファー中で 1 : 2000 に希釈し、室温で 2 時間にわたり膜と一緒にインキュベートした。この膜を再び 0.1 % T w e e n 20 / P B S を用いて洗浄し、E C L + P l u s キット (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて展開させた。この膜を次に様々な時間間隔にわたり X 線フィルムに曝露させた。

20

【0116】

〔R T - P C R およびシーケンシング〕

全 R N A は T r i z o l を用いて t e t K U N C p r M E 細胞の 60 mm 径培養皿から抽出した。O n e - S t e p R T - P C R キット (Invitrogen社) を用いて、0.1 μ g の R N A を逆転写させ、そして増幅させた。K U N c p r M E 領域に対して使用したオリゴヌクレオチドプライマーは、フォワードプライマー、C o r e X b a I 5'GGCTCTAGACCATGTCTAAGAAACCAGGA3' およびリバースプライマー、c p r M E R e v 5'GAGGAGATCTAAGCATGCCGTTACGGAGAGA3' であった。次に c D N A 産物は、この領域の全配列をカバーするために 6 種のプライマーを使用して、B i g D y e ターミネーターミックス (Applied Biosystem社) を用いてシーケンシングするためのテンプレートとして使用した。

30

【0117】

〔K U N V L P および I L - 2 併用腫瘍療法〕

4 群の雌性 C 5 7 B L / 6 J マウス (6 - 8 週齢、1 群当たり n = 3) の背部上でマウス 1 匹当たり 4 つの腫瘍 (1 群当たり n = 12 の腫瘍) を接種するために、5 \times 10⁴ L L O v a 腫瘍細胞を皮下注射した (Nelson et al., J Immunol. 2001, 166 5557-66)。腫瘍が触知可能 (> 1 \times 1 mm²) になったら、2 群のマウスに 10⁸ p f u (200 μ L で) K U N V L P M p t を注射し、別の 2 つのコントロール群には P B S を注射したが、どちらも腹腔内経路によって 10 日間をあけて 2 回実施した。V L P M p t からの 1 群およびコントロール群は、最初の V L P M p t または P B S 注射の 4 日後に、2 日間をあけて腹腔内経路によって 2000 I U のマウス I L - 2 の 2 回の投与を受けた。残りの 2 群は I L - 2 の投与を受けなかった。腫瘍のサイズは毎日記録し、腫瘍のサイズが 15 \times 15 m

40

50

m²に達したときにマウスを安楽死させた(Anraku et al., 2002、上記参照)。

【0118】

〔KUNtetKUNCprMEレプリコンパッケージング細胞系(A8細胞系)におけるKUNレプリコンウイルス様粒子(VLP)の増幅および拡散能力についての評価〕
(細胞)

参照して本明細書に組み込まれる正常BHK21細胞およびKUNtetKUNCprME KUNレプリコンパッケージング細胞(A8細胞系)(Harvey et al., J Virol. 200478 531-8)は、37℃のCO₂インキュベーター内で10%ウシ胎児血清(FBS)を補給したダルベッコ最小必須培地(DMEM; Invitrogen社、カリフォルニア州サンディエゴ)内で増殖させた。

10

【0119】

(KUNレプリコンVLP)

KUNrepPAC/-galレプリコンVLPの調製法は、(Harvey et al., J Virol. 2004、上記参照)に記載されている。手短には、遺伝子発現を容易に比較するための-galactosidase遺伝子および選択のためのピューロマイシン遺伝子をコードするインビトロ転写KUNrepPAC/-gal RNAを用いて、A8細胞をエレクトロポレーションした。RNAトランスフェクション後の様々な時点で細胞培養液を採取し、採取液中にエンカプシレーションされたレプリコンKUNrepPAC/-gal RNAを含むVLPの力価は、Vero細胞を感染させ、それらを感染48時間後にX-Galを用いて染色することによる-gal陽性細胞数によって計算した。

20

【0120】

(KUNrepPAC/-galレプリコンVLP感染、X-Gal染色および-gal assay)

90%コンフルエントな状態にある24ウェルプレート内のBHK21およびKUNKUNレプリコンパッケージングA8細胞は、感染多重度(MOI)1でrepPAC/-gal VLPを用いて感染させ、ドキサイクリンを含まない培地中でインキュベートした。感染の48、96および144時間後に、4%ホルムアルデヒド-リン酸緩衝生理食塩液を用いて細胞を固定し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-4-ガラクトプロピラノシド(X-Gal)を用いてインサイチュー染色し、または細胞をトリプシン化し、計数し、製造業者(Promega社、ウィスコンシン州マディソン)の取扱説明書にしたがって市販の-gal検出キットを使用することによって-gal assayのために溶解させた。

30

【0121】

〔結果〕

〔KUNレプリコンRNAをVLP内へパッケージングすることのできるテトラサイクリン誘導性BHK細胞系であるtetKUNCprMEの樹立〕

我々の知る限り、全3種のフラビウイルス構造タンパク質を同時に発現する安定な細胞系はこれまでに報告されていなかった。我々は、以前にKUNCタンパク質を安定に発現するVero細胞系を生成したが、その発現レベルは低かった(Westaway et al., 1997. Virology. 234 31-41)。我々が個別プロモーター(CおよびprM-Eを個別に発現する)の制御下で全3種のKUN構造遺伝子を継続的に発現する安定な細胞系を生成するために実施した、標準(非誘導性)DNA発現ベクターを用いる以前の試みは、極めて不安定な発現を生じさせ、2、3回の細胞継代後に陽性に発現する細胞を10~20%しか産生しなかった(データは示していない)。KUNレプリコンVLPを産生するためにこれらの細胞系を使用する試みは、極めて低いVLP力価を生じさせた(データは示していない)。

40

【0122】

最初に、テトラサイクリン転写活性化因子を安定に発現するBHK細胞系であるBHK-Tet-Offを樹立するために、テトラサイクリン転写活性化因子をコードする配列(図1A)を含有するpEFIRE-S-Pの誘導体(Hobbs et al., 1998 Biochem Biophys

50

Res Commun 252368-372)である p E F - t T A - I R E S p u r o プラスミド DNA を用いて B H K 2 1 細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後、細胞クローンを選択するために濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗生物質ピューロマイシンを添加した。このトランスフェクションから、5 つの細胞クローンを単離して培養するのに成功した。これらのクローンを次に、ドキシサイクリン (テトラサイクリンと同一領域の抗生物質であるがより高い比活性およびより長い半減期を有する) の存在下 ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) および非存在下でのプラスミド p T R E 2 l u c i f e r a s e (Clontech 社) を用いたトランスフェクションによる発現の誘導について分析した。すべての B H K - T e t - O f f 細胞クローンは、程度の相違する誘導およびバックグラウンドレベルを示した (結果は示していない)。未誘導細胞に比較して最高誘導倍率のルシフェラーゼ発現を示している 2 つの B H K - T e t - O f f 細胞クローンを使用して K U N 構造タンパク質であるコア (C)、膜 (p r M) およびエンベロープ (E) を発現する安定な B H K 細胞系を樹立した。K U N C p r M E 遺伝子カセットおよび脳心筋炎ウイルス内部リボソーム進入部位 - ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子カセット (I R E S N e o) を p T R E 2 ベクター (Clontech 社、オーストラリア国ノースライド) 内にサブクロニングすることによって構築した p T R E 2 C p r M E - I R E S N e o プラスミド DNA (図 1 A) を用いて細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞に、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンおよび $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリンも含有していた培地中で $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ のジェネティシン (G 4 1 8) を用いる選択を受けさせて安定なパッケージング細胞系を樹立した。最高効率のパッケージング細胞系を選択するために、G 4 1 8 およびピューロマイシンへの耐性を付与する多数の細胞クローンは K U N レプリコン RNA (RNA l e u) を用いてエレクトロポレーションし、そしてそれらが感染性 K U N レプリコン V L P を産生できるかどうかを判定するためにドキシサイクリンを含めずに培養した。採取した培養液 (C F) 中に存在する感染性 V L P の力価 (1mL 当たりの感染単位 (I U) で) は、以前に記載されたように V e r o 細胞の感染後に抗 N S 3 抗体を用いた免疫蛍光分析を実施することによって決定した (Khromykh et al., 1998, J Virol. 72 7270-7279; Westaway et al., 1997, J Virol. 71 6650-6661)。

10

20

30

40

50

【0123】

4 つの細胞クローン、すなわち # A 3、# A 8、# E 1 および # E 5 は、RNA エレクトロポレーション 5 3 時間後に 1mL 当たり 5×10^4 から 2×10^8 I U で相違する効率で V L P を産生することができた (表 1)。 2×10^8 I U / mL の V L P を産生する最高効率細胞クローン # A 8 を t e t K U N C p r M E と指名し、その後の全試験において使用した。t e t K U N C p r M E 細胞内で産生された mRNA 内でコードされた K U N C p r M E 配列の野生型 K U N C p r M E 配列に対する同一性は、t e t K U N C p r M E 細胞から単離された全 RNA の逆転写 (R T) - P C R 増幅後の全 C p r M E 領域をシーケンシングすることによって確認した。プラスミド DNA p T R E 2 C p r M E - I R E S N e o 内に存在する配列からのヌクレオチド変化は見いだされなかった。

【0124】

[t e t K U N C p r M E 細胞内の C p r M E 発現および分泌 K U N レプリコン V L P の産生の最適化]

t e t K U N C p r M E 細胞の培養液中での分泌 K U N タンパク質および K U N V L P のレベルを試験するために、我々は以前に記載されたように抗原捕捉 E L I S A を使用した (Hunt et al., 2002、上記参照)。分析前 4 8 時間にわたり培養した誘導および未誘導 t e t K U N C p r M E 細胞から採取した C F は、両方の C F サンプル中で検出可能なレベルの K U N E タンパク質を示さなかった (図 1 B)。しかし、RNA l e u レプリコン RNA を用いて細胞をエレクトロポレーションした場合は、誘導された細胞からの C F サンプル中での RNA エレクトロポレーション 4 5 時間までに E L I S A 示度における劇的な増加が認められたが、他方未誘導細胞からの C F サンプル中では E L I S A 示度におけるほんのわずかな増加しか検出されなかった (図 1 B)。これらの C F サンプル中の V L P を V e r o 細胞上で滴定すると、V L P の力価は E L I S A 結果と明確に相関してい

た。未誘導細胞から採取したCFサンプル中で検出された1mL当たり500IUのVLPは約0.11のOD₄₅₀のELISA示度を生じさせたが、誘導細胞からのCFサンプル中の1mL当たり 2.1×10^8 IUのVLPは約0.63のELISA示度を生じさせた(図1B)。

【0125】

tetKUNCprME細胞系におけるCprME mRNA転写およびCprME遺伝子の細胞内発現を試験するために、培地中にドキシサイクリンを含めて、および含めずに細胞を48時間培養した。陰性コントロールとして正常BHK21細胞を含めた。CprME mRNA転写は³²P-標識CprME特異的cDNAプローブを用いる全細胞RNAのノーザンブロットハイブリダイゼーションによって分析し(図3A)、そしてKUNタンパク質の発現はKUN抗E抗体を用いるウェスタンブロット分析によって分析した(図3B)。これらの結果は、ドキシサイクリンの存在下で産生するCprME mRNAおよびKUN Eタンパク質が極めて少ないことを証明した(未誘導細胞)。これとは対照的に、ドキシサイクリンの除去は、対応する標識バンドにおける相対ホスホイメーサー計数によって判定されるように、CprME mRNAのレベルにおける約30倍の増加を生じさせた(図3A)。KUN Eタンパク質産生のレベルにおけるほぼ類似の増加もまた検出された(図3B)。

10

【0126】

VLP産生を最大化するために、培養液の採取および相違する時点での培地からのドキシサイクリンの除去を含む試験を実施した。KUNレプリコンRNA(RNAleu)のエレクトロポレーション後、ドキシサイクリン(0.5 μg/mL)を含有する培地をさらに16時間または30時間にわたり細胞へ添加し、次にドキシサイクリンを含まない新鮮培地と交換した。比較するためにドキシサイクリンを含めずに、エレクトロポレーションした細胞の60mm²培養皿を連続的にセットした。培養液をエレクトロポレーション53時間後および68時間後に各培養皿から採取し、Verocell上で感染性アッセイによって試験した。結果は、VLP産生のためのCprME発現を誘導するためにドキシサイクリンの除去にとって最適な時点はRNAエレクトロポレーションの直後であることを証明した(表2)。培地からのドキシサイクリンの除去における遅延は、産生されたVLPの量における実質的な減少を生じさせた。

20

【0127】

最適なVLP採取プロトコルおよびtetKUNCprME細胞が様々な異種遺伝子をコードする高レベルのVLPを産生する能力を決定するために、KUNレプリコンRNA RNAleuならびに例えばマウスポリトープ(RNAleuMpt)、HIV-1 gag(KUNGag)、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ(repPAC)、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼおよび -ガラクトシダーゼ(repPAC - gal)、および緑色蛍光タンパク質(repGFP)などの様々な異種遺伝子をコードするレプリコンRNA(Anraku et al., 2002、上記参照;Liu et al., 2002, J Virol. 76 10766-10775; Varnavski & Khromykh, 1999, Virology 255 366-375; Varnavski et al., 2000, J Virol. 74 4394-4403)をtetKUNCprME細胞内へエレクトロポレーションした。VLPはRNAエレクトロポレーション後の様々な時点に採取し、VLPの多数回採取を可能にするためにVLPを採取する度に培地を新鮮培地と交換した(表3)。エレクトロポレーション後第3日からのほぼ全部のVLP力価は1mL当たり $10^7 \sim 10^9$ IUの範囲内にあり、トランスフェクション後10日間までの第3回または第4回連続採取においてさえ、レプリコンRNAおよびVLP採取プロトコルの性質に依存して、高いままであった(表3)。最適なVLP採取プロトコルを用いて最初にトランスフェクトした 3×10^6 cellsのtetKUNCprME細胞からのVLPの全産生量は 5.4×10^{10} 個の感染性粒子(表3中の実験2のrepPAC - gal RNA)に達したが、他の採取プロトコルおよび相違するKUNレプリコンRNAを使用した場合はエレクトロポレーションした細胞 3×10^6 cells当たりの感染性粒子数は $1.6 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^{10}$ 個の範囲内であった(表3)。

30

40

50

【0128】

KUNレプリコンVLPがtetKUNCprME細胞内では拡散するが正常BHK細胞内では拡散しないことによって増幅できるかどうかを試験するために、細胞を低MOI (0.1)でRNALeuMpt VLPを用いて感染させ、ドキシサイクリンを含まない培地中でインキュベートした。KUN抗NS3抗体を用いて感染させた細胞のIF分析は、tetKUNCprME細胞内でのVLPの増幅および拡散を証明している、感染後第2～3日に陽性細胞巢のサイズにおける有意な増加を示した(図4、パネル1および2)。これとは対照的に、VLP感染後の第2日および第3日のどちらにおいても感染した正常BHK21細胞内では個別陽性細胞しか検出されなかった(図4、パネル3および4)。個別実験では、0.1 MOIのRNALeuMpt VLPを用いたtetKUN

10

【0129】

これらの結果は、tetKUNCprME細胞系は、KUN構造遺伝子の発現のために細胞変性SFVレプリコンを用いる我々が以前公表したプロトコルと比較して実質的に(約1500倍)多量のKUNレプリコンVLPを産生できることを納得できるように証明している(Varnavski & Khromykh, 1999、上記参照)。

【0130】

これはダニ媒介脳炎(TBE)prME遺伝子を安定的に発現するCHO細胞系の生成および欠失したprME遺伝子を有するTBEレプリコンRNAのパッケージングのための使用に関する報告書と比較されたい(Gehrke et al., 2003, J. Virol. 77 8924-8933)。prME-発現性CHO細胞内で入手された分泌TBEレプリコンVLPの最高力価は 5×10^7 IU/mLであった。それはtetKUNCprME細胞内で入手されたKUNレプリコンVLPの最高力価の32分の1である(1.6×10^9 IU/mL、表3)。さらに、トランスフェクト細胞 10^6 cells当たり産生したTBEレプリコンVLPの全最高量は約 10^8 IUとなったが、これはKUNレプリコンVLPについて入手された量の約540分の1である(5.4×10^{10} IU、表3を参照)。しかし、使用した細胞系(TBEのためのCHOおよびKUNのためのBHK)、レプリコンRNA(TBEのためにはコア遺伝子を含めて、そしてKUNのためにはコア遺伝子を含めずに)、エレクトロポレーション条件(すなわち、トランスフェクト細胞の数、TBE RNAについて報告されていないRNA量およびエレクトロポレーターの設定)、およびVLPを採取するためのプロトコルにおける相違に関してこれら2つの系間のパッケージング効率をさらに詳細に比較することは困難である。

20

30

【0131】

しかし本発明のtetKUNCprME細胞が誘導性発現の柔軟性、明らかにより高い力価、連続的採取、および産生するレプリコンVLPのより多い総量を提供する。さらに、tetKUNCprME細胞は様々なフラビウイルス由来のレプリコンRNAをパッケージングすることができた(下記を参照)。

【0132】

[tetKUNCprME細胞内でのKUN構造タンパク質の安定な発現]

KUNCprME遺伝子の発現の安定性を決定するために、ピューロマイシンおよびG418を含めずにtetKUNCprME細胞を12継代にわたり培養し、次にVLP産生効率を決定するためにKUNレプリコンRNA(RNALeu)を用いてエレクトロポレーションした。CprME発現の抑制を保証するために、継代中には培地中にドキシサイクリンを存在させた。全3種の抗生物質、すなわちピューロマイシン、G418およびドキシサイクリンの存在下で12継代にわたって培養したtetKUNCprME細胞は、VLP産生効率を比較するために平行してエレクトロポレーションした。CprMEの発現を誘導してVLP産生を可能にするために、レプリコンRNAのエレクトロポレーションの直後にドキシサイクリンを培地から除去した。継代中にはピューロマイシンおよ

40

50

び G 4 1 8 選択下で維持された細胞からのレプリコン RNA トランスフェクション 4 8 時間後に収集した V L P の力価は、ピューロマイシンおよび G 4 1 8 選択の非存在下で維持した細胞から同時に収集した V L P の力価と類似であった（各々、 2.2×10^6 I U / mL および 1.7×10^6 I U / mL）。この特定の実験における V L P 力価は他のパッケージング実験の大多数におけるより低かったが、これらの結果は、抗生物質選択の非存在下での少なくとも 1 2 継代後の t e t K U N C p r M E 細胞中の K U N 構造タンパク質の発現の安定性を明白に証明しており、したがって K U N 構造遺伝子カセットの細胞ゲノム内への安定な組み込みを指示している。

【 0 1 3 3 】

〔レプリコン V L P 調製物中の感染性 K U N ウイルスの非存在〕

t e t K U N C p r M E 細胞内で産生された K U N レプリコン RNA および C p r M E m R N A の C 遺伝子の C 末端領域および E 遺伝子の N 末端領域におけるオーバーラッピング配列の存在は、V L P 調製物中の感染性 K U N ウイルスの産生をもたらす可能性がある同種組み換えを潜在的に促進することができる。以前に開発したパッケージング系において、我々は S F V レプリコンベクターから産生した 2 種の m R N A から C 遺伝子および p r M - E 遺伝子の発現を分離することによって潜在的組み換えのあらゆる可能性を排除した。しかし、欠陥のある RNA とヘルパー RNA との間に長い相補性領域が存在していた、我々が実施した K U N RNA を用いた極めて多数の相補性実験（概観については、上記の Khromykh, 2000 を参照）ならびに Y F RNA を用いた相補性実験 (Lindenbach & Rice, 1997, J Virol. 71 9608-17; Lindenbach & Rice, 1999, J Virol. 73 4611-21) は、同種組み換えによって産生された可能性のある組み換え感染性ウイルスを全く検出することができなかった。いずれかの組み換え複製コンピテント K U N ウイルスが t e t K U N C p r M E 細胞内での K U N レプリコン V L P の産生中に産生したかどうかを試験するために、RNA l e u RNA を用いたトランスフェクション 2 日後に採取した C F を使用してカバーガラス上で増殖した V e r o 細胞を感染させた。感染した細胞を 5 日間にわたりインキュベートし、免疫蛍光によって E タンパク質の発現について試験した。感染したカバーガラスからの組織培養液をさらに 5 日間にわたり V e r o 細胞の新鮮培養上で再び継代させ、抗 E 抗体を含む I F によって試験した。どちらの継代においても E 陽性細胞は検出されなかった（結果は示していない）。抗 N S 3 抗体を用いた平行標識は第 1 継代における極めて多数の陽性細胞を示したが、第 2 継代では陽性細胞は検出されず（結果は示していない）、これは V L P が第 1 巡の感染でしかレプリコン RNA を送達しないことを証明している。同様に、p r M - E 遺伝子を安定に発現する C H O 細胞内での T B E レプリコン RNA のパッケージングは、p r M - E およびレプリコン RNA 間でのウイルスゲノム配列におけるオーバーラップにもかかわらず、パッケージング細胞系における数回の継代後にさえ感染性 T B E ウイルスの産生を生じさせなかった。

【 0 1 3 4 】

V L P 調製物中には感染性 K U N ウイルスが非存在であるとの追加の証拠をウイルス検出のために最も感受性の方法である哺乳期マウスへの脳内注射によって追求した。10 匹の 2 ~ 3 日齢 B a l b / C 哺乳期マウスを含む群に、 4×10^6 I U の K U N - M P t V L P または陽性コントロールとしての 1 p f u の w t K U N ウイルス (M R M 6 1 C 系統) を脳内に接種した。1 p f u の w t K U N ウイルスを注射した全 10 匹のマウスは、接種 4 日後に後肢の麻痺を発生し、これらを安楽死させた。これとは対照的に、V L P を注射した全マウスは健常のままで、実験期間 (21 日間) にわたり正常な発達を示した。これらの K U N レプリコン V L P を用いたインビトロおよびインビボ試験結果ならびに T B E レプリコン V L P を用いたインビトロ試験結果 (Gehrke et al., 2003、上記参照) は、連続的構造遺伝子カセットを発現するパッケージング細胞内でのフラビウイルスレプリコン V L P の産生が組み換え感染性ウイルスの生成をもたらさないことを明白に証明している。比較すると、連続的シンドビスウイルス構造遺伝子カセットを発現する B H K パッケージング細胞系内で産生した 10^8 I U のシンドビスウイルスレプリコン V L P は、組み換えによって生成した約 10^5 p f u の感染性ウイルスを含有していた (Polo et al.,

10

20

30

40

50

1999, Proc Natl Acad Sci USA. 96 4598-4603)。構造遺伝子をパッケージング細胞系内の2つの個別発現カセットへ分割するステップは、検出不能なレベルまで感染性ウイルスによる汚染を除去すると思われたが、しかし同時にレプリコンVLPの力価を1mL当たり $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ VLPへ減少させた(Polo et al., 1999、上記参照)。

【0135】

[tetKUNCprME細胞内の分泌感染性VLP内への西ナイル熱ウイルスおよびデング熱ウイルスレプリコンのパッケージング]

他のフラビウイルス由来のレプリコンRNAをパッケージングするためにtetKUNCprME細胞を使用できるかどうかを試験するために、我々は近縁西ナイル熱(WN)ウイルスおよび遠縁2型デング熱ウイルス(DEN2)由来のレプリコンRNAを使用した。構造領域における大きな欠失を伴い、C遺伝子の最初の20コドンおよびE遺伝子の最後のコドンしか維持していないWNレプリコン構築物「レプリコン」については以前に記載されている(Shi et al., 2002, Virology. 296 219-233; Lo et al., 2003, J Virol. 77 1004-10014)。

【0136】

2型デング熱ウイルス(DEN2)レプリコン構築物であるpDEN CprMEおよびpDEN prMEは、構造遺伝子内で大きなインフレーム欠失を作製することによってDEN-2のニューギニア(New Guinea)C系統のゲノムに対応する全長cDNAクローンを含有するプラスミドpDVWS601(Pryor et al., 2001, Am J Trop Med Hyg. 65 427-434)に由来する。pDEN CprMEはC遺伝子の最初の27コドンおよびE遺伝子の最後の24コドンを保持していたが、他方pDEN prMEはC遺伝子全体、prME遺伝子の最初の7コドンおよびE遺伝子の最後の24コドンを保持していた。

【0137】

パッケージング実験のために、DEN CMEまたはDEN MEレプリコンRNAはtetKUNCprME細胞内へエレクトロポレーションし、ドキシサイクリンを含まない培地中でインキュベートした。VLP産生を比較するために、KUNレプリコンRNA(RNA1eu)を含めた。トランスフェクション後第2日に交差反応するKUN抗NS3抗体を用いたIF分析は、各々DEN MEおよびDEN CME RNAを用いたトランスフェクション後に約80%および95%の陽性細胞を示した。KUNレプリコンRNAであるRNA1euのトランスフェクションは約95%のNS3-陽性細胞を生じさせた。培養液をエレクトロポレーション後第2日に収集し、Vero細胞上での感染性アッセイによって滴定した。DEN MEおよびDEN CprMEレプリコンRNAから産生した感染性VLPの力価は、各々 8×10^4 IU/mLおよび 1.8×10^5 IU/mLであった。同一実験におけるKUNレプリコンRNAは 2.2×10^7 IU/mLの力価を備えるVLPを産生した。

【0138】

個別実験では、WNレプリコンRNAのtetKUNCprME細胞内へのエレクトロポレーションは、エレクトロポレーション後第4日までに約70~80%のNS3-陽性細胞の検出および 7×10^7 IU/mLの分泌VLPの産生を生じさせた。同一実験で実施されたKUNレプリコンRNAであるRNA1euのエレクトロポレーションは、エレクトロポレーション後第4日までに約80~90%のNS3-陽性細胞の検出および 10^8 IU/mLのVLPの産生を生じさせた。

【0139】

1種のウイルス由来の構造遺伝子を他のフラビウイルス由来の構造遺伝子と置換することによるキメラフラビウイルスの産生の成功は、1種のフラビウイルス由来の構造タンパク質が、それらが同一RNA分子からcis形で発現した場合に他のフラビウイルス由来のRNAをパッケージングできることを証明している。我々の試験結果は、trans形で提供されたKUN構造タンパク質による様々なフラビウイルスレプリコンRNAのパッケージングについての最初の証明を表している。WNウイルスのKUNおよびNY99系統間の極めて高度の相同性(Lanciotti et al., 1999, Science. 286 2333-2337; Liu et al.,

10

20

30

40

50

2003、上記参照)およびそれらの比較的類似の複製効率を前提とすると、観察されたKUNおよびWNレプリコンRNAの類似のパッケージング効率は驚くことではない。KUNレプリコンRNAと比較してDEN2レプリコンRNAのパッケージング効率が100分の1以下である原因は、これら2種のウイルス間の重大な配列相違、および一般にデング熱ウイルスにおける低い複製効率を含む多数の因子に帰することができよう。全長感染性DEN2 cDNAを用いた以前の実験は、BHK細胞内へのRNAトランスフェクション直後の分泌DEN2ウイルスの比較的非効率的な産生を証明した(Gualano et al., 1998, J Gen Virol. 79 437-446)。我々はtetKUNCprME細胞内でのDEN2およびKUNレプリコンRNAの複製効率を比較しなかったが、DEN2レプリコンRNAの複製は、パッケージングのためにRNAを利用可能にすることがより少ないKUNレプリコンRNAより非効率であると思われる。最適なパッケージングには、同一ウイルスのRNAとコアタンパク質間の特異的相互作用をさらに必要とする可能性があるが、しかしパッケージングの特異性を決定するフラビウイルスRNAまたはコアタンパク質におけるシグナル/モチーフはまだ明確にされていない。このパッケージング系はパッケージングシグナルについてのより詳細な研究に寄与し、フラビウイルスビリオンがどのように組立てられ、分泌されるかについての理解を高めるとと思われる。

10

【0140】

[tetKUNCprME細胞内で調製されたKUNレプリコンVLPを高用量で用いた免疫は、コードされた免疫原に対するCD8+T細胞応答を改善する。]

パッケージング細胞系は約100倍高い力価を備えるKUNレプリコンVLPの産生を可能にしたので、したがって免疫実験においてVLPの用量を増量する試験が可能になった。マウスポリトープをコードするKUNレプリコンVLP(KUN-Mpt VLP)の用量の 10^6 から 10^7 IUのVLPへの10倍の増量は、エックスピボIFN ELISPOTアッセイによって測定すると3~4倍高いSIINFELエピトープ特異的CD8+T細胞を誘導した(図5A)。 10^7 から 10^8 IUのVLPへのさらに10倍の増量は、誘導されたSIINFEL特異的CD8+T細胞数のほんのわずかな増加しか生じさせなかった(図5A)。個別実験では、RSウイルス(RSV)M2遺伝子をコードする 2.5×10^7 IUのKUN VLPを用いてBALB/cマウスを1回免疫した。RSV M2遺伝子をコードするKUNレプリコンは、RSV A2単離体を用いて感染させた細胞から単離したRNAの逆転写(RT)およびPCR増幅によって調製したRSV M2 cDNA配列を含有するDNAフラグメントをRNA1eubekター内にクローニングすることによって構築した。RSV M2エピトープであるSYIGSINNIにとって特異的な高度に強力なCD8+T細胞応答は、 10^6 cellsの脾細胞当たり平均1400スポットを示しているELISPOT分析(図5B、KUN-M2 VLP)、および複数のエフェクターを2:1のエフェクター:標的比へ希釈した後に45%を超える比溶解率を示す標準的クロム放出(図5C、KUN-M2 VLP)を用いて産生した。これらの応答はRSV M2をコードする複製コンピテント組み換えワクシニアウイルスを用いたワクチン接種後に報告された応答を超えていた(Aung et al., 1999, J Virol. 73 8944-8949; Kulkarni et al., 1993, J Virol. 67 4086-4092; Simmons et al., 2001, J Immunol. 166 1106-1113)。

20

30

40

【0141】

コントロールKUN VLPは有意な特異的応答を誘導することができず(図5Bおよび5C、KUN VLPコントロール)、そしてSYIGSINNI-ペプチドを用いて調製したペプチド-ワクチンは数分の1の応答を誘導した(図5BおよびC、SYIGSINNI/TT/M720)。

【0142】

[癌における治療的ワクチン療法のための高力価KUN VLP]

CD8+T細胞に基づく治療により樹立された腫瘍の治癒は極めて多数の抗癌CD8+T細胞を必要とする(Overwijk et al., 2003, J Exp Med. 198 569-80)。我々は、ここでVLPの用量を増量することによってより多数のCD8+T細胞が誘導されることを証明し

50

た。そこで我々は、有意な抗癌活性を媒介するために高用量VLPワクチン接種を治療的に使用できるかどうかを判定しようと考えた。このモデルでは、モデル腫瘍抗原オバルブミンを発現するLewis肺癌細胞に対する治療薬として、オバルブミンCD8 T細胞エピトープであるSIINFELKを含むマウスポリトープ(Mpt)をコードするVLPを使用した(LL0va;Nelson et al.,2001、上記参照)。

【0143】

樹立されたLL0va腫瘍を有するマウスの群に指示した時点でIL-2を含めて、および含めずに 10^8 KUN VLP Mpt (図6、VLP Mpt)またはPBS (図6、コントロール)を腹腔内投与により2回ワクチン接種した。(図6、矢印)。VLP Mpt ワクチン接種は、腫瘍の増殖を有意に緩徐化した。IL-2単独またはVLP ワクチン接種との併用は、腫瘍増殖に有意な影響を及ぼさなかった。

10

【0144】

このため、高レベルのSIINFELK特異的CD8 T細胞を誘導することのできる高力価VLP Mpt ワクチンの治療的投与は先在するLL0va腫瘍の増殖を有意に緩徐化できると結論付けられる。IL-2は、単独でも、またはVLP療法と併用しても、有意な影響を及ぼさなかった。

【0145】

〔NS2AおよびNS5における適応的突然変異を備えるKUNレプリコンRNAのウイルス様粒子内へのパッケージング〕

以前の報告書は、nsP2内での一部の適応的(非細胞変性)突然変異を備えるシンドビスウイルスおよびSFVレプリコンRNAはVLP内に効率的にパッケージングすることはできないが、nsP2内での他の適応的突然変異を備えるRNAはパッケージングできることを証明した(Perri et al.,2000,J Virol.74 9802-9807)。

20

【0146】

我々は、それらを我々が近年報告したテトラサイクリン誘導性パッケージングBHK細胞系tetKUNCprME内へトランスフェクトすることによって適応的突然変異を備えるKUNレプリコンRNAのパッケージング能力について試験した。材料および方法の項に記載したとおり、分泌VLPを6~8日間にわたり2日毎に採取し、VLP力価を決定した。NS2A/A30P突然変異を備えるレプリコンRNAはwt RNAに類似する効率でパッケージングされた;他の変異型RNAは第2日にパッケージング効率の50~500分の1への減少を示したが、NS2Aにおける結合突然変異を備えるものを除く全部が第6日までに野生型に近いパッケージング効率を回復した。(表4)。NS2A内での結合突然変異を備えるRNAは、第8日までに野生型RNAの40分の1未満の効率でまだパッケージングされた。これらを要約すると、NS2A/A30P突然変異だけはレプリコンRNAのパッケージング効率に影響を及ぼさなかったが、他の適応的突然変異はパッケージング効率を低下させた。

30

【0147】

〔安定に発現する細胞系を生成するためのtetKUNCprME細胞内で入手したVLPの使用〕

我々は次にハムスター細胞系BHK21における持続性複製を樹立する際に長所を提供することが証明されたNS2Aにおける適応的突然変異も、他の細胞系、特にヒト細胞系において類似の長所を提供するかどうかについて試験した。各々1および10のMOI (Ver o細胞上で滴定した)でパッケージングされた野生型および変異型レプリコンRNAを含むVLPを用いて2種のヒト細胞系HEK293およびHEp-2の単層を感染させ、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンを含む培地中で7日間にわたり増殖させた。ピューロマイシン耐性コロニーのX-gal染色は、HEK293およびHEp-2細胞の両方においてコロニー数の野生型レプリコンと比較してNS2A/A30P変異体に対しては約50倍の増加およびNS2A/N101D変異体に対しては約20倍の増加を示した(図7)。0.01 MOIのレプリコンVLPを用いた感染後にも、野生型およびNS2A突然変異型レプリコンRNA間のピューロマイシン耐性コロニー数における類似の

40

50

相違が観察された(図7)。興味深いことに、HEK293およびHEp-2細胞の感染は、BHK21細胞内で産生されたものに類似する数のピューロマイシン耐性コロニーを産生するために、各々10倍および100倍以上のVLPを必要とした(図5)。野生型KUNウイルスの複製効率においてもこれらの細胞系間の類似の相違が観察された(結果は示していない)。個別実験では、Vero細胞内ではBHK細胞中と比較して野生型KUNウイルスの約20倍を超える効率的な複製が観察された(結果は示していない)。これらの結果は、様々な細胞系における持続性複製を樹立するそれらの能力においてNS2Aにおける適応的突然変異を備える親レプリコンRNAに比した長所を確認した。ピューロマイシンを備える選択的培地中でのレプリコンVLP感染BHK、Vero、HEK293およびHEp-2細胞の増殖は、シーケンシングによって確認された突然変異の保持を備える野生型およびNS2A突然変異型レプリコンRNAを安定に発現する細胞集団の樹立を生じさせた(結果は示していない)。BHK、Vero、HEK293、およびHEp-2細胞を用いた全実験において、NS2A/A30P突然変異は安定に発現する細胞系のより効率的およびより迅速な樹立を許容した(結果は示していない)。BHK細胞を用いた試験結果と一致して、様々なレプリコンRNAを安定に発現するHEp-2および293細胞内で樹立されたピューロマイシン耐性細胞系におけるRNA複製および-gal発現の効率もまた類似であった(結果は示していない)。

【0148】

[クンジンレプリコンベクター由来の異種遺伝子の発現を増強させるためのtetKUN CprMEパッケージング細胞の使用]

KUNレプリコンVLPをKUNパッケージングA8細胞内では拡散するが正常BHK細胞内では拡散しないことによって増幅できるかどうかを試験するために、細胞を感染多重度(MOI)1でrepPAC/-gal VLPを用いて感染させ、ドキシサイクリンを含まない培地中でインキュベートした。感染したA8パッケージング細胞のX-gal染色分析は感染後第2日(48時間後)から第6日(144時間後)において-gal陽性細胞数の有意な増加を示したが(図8A)、これはA8細胞内での-gal VLPの増幅および拡散を証明した。これとは対照的に感染した正常BHK21細胞内では個別の陽性細胞しか検出されず、KUN-レプリコンVLP感染後第2日と第6日の細胞間で-gal陽性細胞数はほとんど変化しなかった(図8A)。さらに、KUN repPAC/-gal VLP感染A8 KUNパッケージング細胞中の-gal陽性細胞数は感染後第2日からの正常BHK21細胞中よりはるかに多く(図8A)、これは第2日の早期時点におけるレプリコンVLPの増幅および拡散を示していた。

【0149】

溶解KUNレプリコンVLP感染細胞の-gal分析は、正常BHK21細胞の感染後のインキュベーション第2日から第6日への-gal発現のたった1.3倍の増加とは対照的に、A8細胞の感染後のインキュベーション第2日から第6日への-gal発現のほぼ3倍の増加を示した(図8B)。第2日から第6日へのrepPAC/-galレプリコンVLP感染A8パッケージング細胞：正常BHK21細胞の-gal発現の比率は2.3倍から5.2倍へ増加したので、したがってKUNレプリコンパッケージング細胞内での拡散によるVLPの増幅が確認された。感染第2日から第6日に観察された-gal発現のこの比較的控えめな増加(3倍から5倍)の原因は、必ずしもVLPの非効率的な拡散を表していない、新しく感染した老化(2から6日齢の過剰コンフルエント)A8パッケージング細胞が効率的なKUN RNA複製を支持する能力の損傷に帰すことができよう。研究者らは以前に、多数の実験において能動的に分割するBHK細胞中の複製と比較して低い老化BHK細胞内でのKUN RNA複製効率を観察している。結論として、これらのデータはKUN RNAレプリコンVLPがレプリコンパッケージング細胞(A8細胞系)中で増幅および拡散させられることを証明している。

【0150】

[考察]

我々は、ここでKUNウイルス構造遺伝子を発現するテトラサイクリン誘導性の安定な

10

20

30

40

50

パッケージング細胞系である *tetKUNCP rME* を用いてフラビウイルスレプリコン RNA をウイルス様粒子内へエンカプシレーションするための新規パッケージング系について説明した。1 mL 当たり約 4×10^8 個の VLP までに達する高力価 VLP および 10 日間までの複数回の VLP 採取は、 3×10^6 個の単回初期エレクトロポレーションから約 6.5×10^9 VLP までの総収率を可能にした。これは KUN 構造遺伝子の一過性発現のための細胞変性 SFV レプリコン RNA を使用した以前に開発された KUN レプリコンパッケージング系に比した実質的 (約 300 倍) 改良を表しており (Khromykh et al., 1998, J Virol. 72 5967-5977; Varnavski & Khromykh. 1999、上記参照)、将来のワクチンおよび遺伝子療法の適用にとって KUN レプリコン VLP の大規模工業生産を実現可能にする。ワクチン用途のためのパッケージング細胞内で産生した高力価 KUN レプリコン VLP の有用性は、免疫されたマウスにおける RS ウイルス由来のコードされた免疫原に対する強力な CD8 + T 細胞の生成によって証明された。さらに、*tetKUNCP rME* 細胞は Dengue 熱ウイルスレプリコンを分泌感染性 VLP 内にパッケージングすることができたが、これは遠縁フラビウイルス由来のレプリコンをエンカプシレーションする VLP の産生のための *tetKUNCP rME* 細胞の可能性のある適用を示した。

10

20

30

40

50

【0151】

本発明の誘導性パッケージング構築物は、構造タンパク質の明白な細胞毒性の問題を克服する。さらに、ワクチンおよび / またはタンパク質産生の用途を含む KUN レプリコン VLP の意図された使用を考慮に入れて、本発明の誘導性パッケージング系は VLP 調製物中の抗生物質の存在を回避する。

【0152】

ドキシサイクリンの除去後に樹立された *tetKUNCP rME* 細胞系内では KUN CP rME mRNA 転写および CP rME 発現のおよそ 30 倍の誘導が観察され、発現の誘導後に *tetKUNCP rME* 細胞内で産生した KUN 構造タンパク質の量は、KUN レプリコン RNA のトランスフェクション後に高力価の分泌感染性 VLP を入手するために十分であった。BHK 細胞内での野生型 KUN ウイルス感染のピーク時に入手されたウイルス力価と同等またはそれより高い収率である、1 mL 当たり約 4×10^8 VLP までの力価が入手された (Khromykh & Westaway, 1994, J Virol. 68 4580-4588)。

【0153】

重要にも、哺乳期マウスへの脳内注射による KUN ウイルスを検出するために最も感受性の方法は明白に、*tetKUNCP rME* 細胞由来の VLP 調製物中に存在する感染性 KUN ウイルスがないことを証明した。比較すると、シンドビスウイルス構造タンパク質カセットを発現する BHK パッケージング細胞系は、1 mL 当たり $1 \sim 5 \times 10^8$ 個のシンドビスまたは SFV レプリコン VLP を産生した (Polo et al., 1999、上記参照)。しかし、これらのアルファウイルスレプリコン VLP 調製物は、組み換えによって生成された 1 mL 当たり約 10^5 p.f.u. の感染性ウイルスを含有していた。構造タンパク質をパッケージング細胞系内の 2 つの発現カセットへ分割するステップは、感染性ウイルスによるこれらのアルファウイルスレプリコン VLP 調製物の汚染を検出不能なレベルまで除去すると思われたが、しかし同時にレプリコン VLP の力価を 1 mL 当たり $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ VLP へ低下させた (Polo et al., 1999、上記参照)。

【0154】

分泌 VLP 内への DEN2 レプリコン RNA のパッケージングは、*tetKUNCP rME* 細胞内でも達成された。

【0155】

ワクチン接種にとっての高力価 KUN レプリコン VLP の有用性を例示するために、相違するマウス系統において 2 種の VLP を試験した。以前の試験は、マウス 1 匹につき 10^6 IU までの用量で注射した KUN レプリコン VLP が実験的ウイルスおよび腫瘍惹起から動物を防御できる免疫応答の誘導において有効であったことを示した (Anraku et al., 2002、上記参照)。新規パッケージング細胞系中で産生した VLP を用いて、KUN-Mp t VLP についての用量反応は、SIIINFEL 特異的 CD8 T 細胞について C

57BL/6マウスにおいて証明され、VLPの用量の増加は誘導されたCD8⁺T細胞数の増加を生じさせた。さらに、RSV M2遺伝子をコードする 2.5×10^7 IUのtetKUNCprME由来KUNレプリコンVLPの単回接種によるBALB/cマウスの免疫は、エクスピボIFN γ ELISPOTによって測定したときに脾臓細胞 10^6 個につき1400 SYIGSINN I 特異的CD8⁺T細胞の誘導およびクロム放出アッセイにおいて2:1のエフェクター対標的細胞の比率で45%を超える溶解率を生じさせた。

【0156】

これらを要約すると、本発明は、感染性ウイルスを含まない大量の高力価分泌KUNレプリコンウイルス様粒子の産生を可能にするパッケージング系を提供し、これらの粒子を用いた免疫がコードされた免疫原に対する強力な免疫応答を誘導することを証明した。したがってこのパッケージング細胞系は、KUNレプリコンに基づくワクチンを製造するために有用であることを証明するはずである。さらに、このパッケージング細胞系は他のフラビウイルスレプリコンをパッケージングすることができ、フラビウイルスRNAパッケージングおよびウイルス組立体に関する基本的試験および様々なフラビウイルスレプリコンに基づく遺伝子発現系の開発において有用であることが証明されるはずである。

【0157】

本明細書を通して、いずれか1つの実施形態または特定の特徴の集団に本発明を限定せずに本発明の好ましい実施形態を説明することが目標であった。このため、当業者には、本開示に照らせば、本発明の範囲から逸脱せずに本明細書に例示した特定の実施形態において様々な修飾および変更を加えることができることが理解されるであろう。

【0158】

本明細書で言及した各特許および科学的文書、コンピュータプログラムおよびアルゴリズムについての開示は、その全体を参照して本明細書に組み込まれる。

【0159】

【表1】

表1. 様々なtetKUNCprME 細胞クローンのパッケージング効率

細胞クローン	VLP 力価*(IU/mL)
A3	5.7×10^5
A8	2.1×10^8
E1	2×10^7
E5	5.3×10^4

* 約15 μ gのKUNレプリコンRNAであるRNA_{Leu}を用いて 2×10^6 cellsの細胞をエレクトロポレーションし、Vero細胞上の滴定によってエレクトロポレーション53時間後に採取した分泌VLPの力価を決定した。

【0160】

【表 2】

表2. CprME 発現誘導時間が VLP 産生に及ぼす作用

誘導時間 ^a	エレクトロポレーション後の経過時間での VLP 産生量(IU/mL)	
	53 時間	68 時間
0 時間	2.1×10^8	3×10^7
16 時間	<100	2.9×10^6
30 時間	<100	5×10^5

^aRNAIeu RNAを用いたエレクトロポレーション後の指示した時点でのCprME発現の誘導はドキシサイクリンの除去によって開始された。

10

【 0 1 6 1 】

【 表 3 】

表3. tetKUNCprME パッケージング細胞系内での様々な異種遺伝子をコードする分泌 KUN レプリコン VLP の産生

VLP の型	VLP の力価(U/mL)							細胞 3 × 10 ⁶ 個当たりの VLP 総産生量
	2d	3d	4d	5d	6d	8d	10d	
RNAleuMPT ^a	3.1×10 ⁷	5.5×10 ⁷	3.8×10 ⁸	—	2.9×10 ⁸	1.3×10 ⁸	—	6.5×10 ⁹
KUNgag ^a	1×10 ⁷	3.9×10 ⁷	1.2×10 ⁸	1.6×10 ⁷	—	—	—	9.5×10 ⁸
RNAleu ^a	1.8×10 ⁸	1.9×10 ⁸	—	2.5×10 ⁶	—	—	—	1.6×10 ⁹
repGFP ^b	1.6×10 ⁸	2.6×10 ⁸	3.7×10 ⁸	2×10 ⁸	—	—	—	5.2×10 ⁹
repPAC ^a	—	—	1.6×10 ⁸	—	2.2×10 ⁸	—	1.9×10 ⁸	6.5×10 ⁹
repPAC β-gal ^d 実験 1	4×10 ⁵	—	1.1×10 ⁸	—	2.3×10 ⁸	—	—	3.4×10 ⁹
repPAC β-gal ^d 実験 2	1.2×10 ⁶	—	1.6×10 ⁹	—	1.1×10 ⁹	—	—	5.4×10 ¹⁰
repPAC β-gal ^d 実験 3	5×10 ⁶	—	1.3×10 ⁸	—	1.8×10 ⁸	3.3×10 ⁸	—	1.3×10 ¹⁰

^{a-d} 1つの10cm径培養皿上に播種した約20 μg RNAを用いて3 × 10⁶ cellsの細胞をエレクトロポレーションし、そして様々な容量の培地およびVLP採取前の様々な時間にわたリインキュベートした。初回VLP採取するため、およびその後のVLP産生および採取を可能にするために、各培養皿中で6mL^a、5mL^b、10mL^cの培地を使用した。^e第4日および第6日に10mLの培地を採取し、第10日に15mLの培地を採取した。^eエレクトロポレーションした3 × 10⁶ cellsの細胞を2つの10cm径培養皿上に播種し、各培養皿中の細胞は指示した各採取日に10mLの新鮮培地と交換した10mLの培地中でインキュベートした。VLP総産生量は、各採取時に入手したVLPの量を結合することによって計算した。「—」は、この時点には VLP が採取されなかったこと、そして次の採取時まで培地が変化させられなかったことを示している。

【表 4】

表4. tetKUNCprME パッケージング細胞内での様々な細胞適応的突然変異を備える KUN レプリコン RNA の VLP 内へのパッケージング効率(pfu/mL)

	第 2 日	第 4 日	第 6 日	第 8 日
野生型	5×10^6	1.3×10^8	1.8×10^8	3.3×10^8
NS2A/A30P	4×10^6	1×10^8	3.4×10^8	6×10^8
NS2A/N101D	4.4×10^4	1.3×10^7	4×10^7	n.d.
MS5/P270S	1.0×10^5	6×10^7	1.3×10^8	n.d.
MS2A/A30P/N101D	1×10^4	1.1×10^5	1.2×10^6	9×10^6

10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 6 3 】

【図 1】安定なパッケージング細胞系 t e t K U N C p r M E の産生および特性付け。(A) 安定なパッケージング細胞系 t e t K U N C p r M E を産生するために使用されたプラスミド構築物の略図である。p E F - t T A - I R E S p u r o プラスミドを使用して、ヒト鎖延長因子 1 プロモーター (p E F - l) からテトラサイクリン誘導性転写活性化因子 (t T A) を継続的に発現する第 1 の安定な B H K 細胞系である B H K - T e t - O f f を生成した。テトラサイクリン誘導性 C M V プロモーター (P _{minCMV}) 由来の K U N 構造遺伝子 C、p r M、および E (K U N C p r M E) を発現する t e t K U N C p r M E は、B H K - T e t - O f f 細胞内への p T R E 2 C p r M E - I R E S N e o プラスミド DNA のトランスフェクションならびに G 4 1 8 およびピューロマイシンの存在下での選択または細胞増殖によって樹立した (本文参照)。未誘導 t e t K U N C p r M E 細胞内では、ドキシサイクリン (D O X ; 高比活性を備えるテトラサイクリンの 1 つの形状) は t T A に結合し、テトラサイクリン応答エレメント (T R E) への結合および引き続いての C M V プロモーターからの C p r M E m R N A 転写の活性化を防止する。K U N C p r M E 遺伝子の発現を誘導するために、D O X を培地から除去すると、t T A の放出、t T A の T R E への結合、および C M V プロモーターからの C p r M E m R N A 転写の活性化を生じさせた。t e t R - T e t 抑制タンパク質 ; V P 1 6 - 単純ヘルペスウイルス V P 1 6 活性化ドメイン ; I R E S - E M C V 内部リボソーム進入部位 ; p u r o - ピューロマイシン N - アセチルトランスフェラーゼ ; T R E - テトラサイクリン応答エレメント ; N e o - ネオマイシン耐性遺伝子 ; S V 4 0 ポリ A - S V 4 0 転写ターミネーター / ポリ (A) シグナル ; - グロビンポリ A - - グロビン転写ターミネーター / ポリ (A) シグナル。(B) K U N レプリコン RNA の存在下および非存在下において誘導性および非誘導性 t e t K U N C p r M E 細胞内での分泌 E タンパク質および V L P の産生。「- RNA」グラフ (左側の部分) はレプリコン RNA トランスフェクションを行わない実験の結果を示しており、「+ RNA」グラフ (右側の部分) は K U N レプリコン RNA - R N A l e u のエレクトロポレーションを用いたまた別の実験の結果を示している。t e t K U N C p r M E 細胞は K U N レプリコン RNA を用いてエレクトロポレーションし (「+ RNA」)、またはエレクトロポレーションせず (「- RNA」)、そして 0 . 5 μ g / m L のドキシサイクリンを含めて (非誘導) または含めずに (誘導) 培地中で 4 8 時間維持した。抗原捕捉 E L I S A による分泌 K U N E タンパク質 (白色バー) の検出および V e r o 細胞上での感染性アッセイによる V L P 力価 (黒色バー) (1 m L 当たりの感染単位 (I U)) の決定は (材料および方法) の項に記載したように実施した。両方の実験における陰性コントロール (C o n t) は、正常 B H K 細胞からの培養液であった。各実験に使用した K U N ウイルス陽性コントロール (K U N) は、B H K 細胞上でのブランクアッセイによって決定した。

20

30

40

【図 2】クンジンウイルス構造タンパク質 C、p r M および E のプロセッシングについての概略図。切断部位は次のように表示した : N S 2 B - N S 3 (ウイルス) プロテアーゼ

50

； 宿主細胞シグナラーゼ； 宿主細胞フリプロテアーゼ。

【図3】ドキシサイクリンの除去後の *tetKUNCprME* 細胞内での *KUN* 構造遺伝子発現の誘導。(A) 誘導 (-DOX) および非誘導 (+DOX) *tetKUNCprME* および *BHK* 細胞から抽出した *RNA* のノーザンブロットハイブリダイゼーション分析。20 μ g の各 *RNA* を 1% ホルムアミドアガロースゲル上で分離し、次にキャピラリーブロッティングによって *Hybond N* 膜上に移した。(B) 誘導性 (-DOX) および非誘導性 (+DOX) *tetKUNCprME* および *BHK* 細胞から抽出したタンパク質のウェスタンブロット分析。5 μ g の全タンパク質を 12.5% ポリアクリルアミドゲル上で分離し、次に *Hybond P* 膜上に移した。この膜は *KUN* 抗 *E* モノクローナル抗体を用いてインキュベートし、結合 *KUN E* タンパク質を化学発光によって検出した 10

【図4】*tetKUNCprME* 細胞内での *KUN* レプリコン *VLP* の増幅および拡散。*tetKUNCprME* および *BHK 21* 細胞のカバーガラスに 0.1 MOI (感染多重度) の *RNAleuMpt VLP* を用いて感染させ、感染後第2日および第3日に *KUN* 抗 *NS3* 抗体を用いる *IF* によって分析した。

【図5】高力価 *KUN VLP* レプリコンを用いて免疫したマウスにおける *CD8 T* 細胞反応。(A) *C57BL/6* マウス (1群につき $n=4$) を *PBS* (実験未使用)、組み換え抗原をコードしない 10^8 IU の *KUN VLP* (*KUN VLP* コントロール)、またはマウスポリトープ *KUN-Mpt VLP* をコードする指示用量の *KUN VLP* を用いて腹腔内免疫した (Anraku et al., 2002, *J Virol*. 76, 3791-3799)。2週間後、脾細胞を除去し、*IFN ELISPOT* によって (*H-2Kb* 制限) *SIINFEL* 特異的反応について分析した。(B、C) *BALB/c* マウス (1群につき $n=3$) は、*RS* ウイルスマトリックス2タンパク質をコードする 2.5×10^7 IU の *KLTN VLP* (*KUN-M2 VLP*)、組み換え抗原をコードしない 2.5×10^7 IU の *KUN VLP* (*KUN VLP* コントロール) を用いて腹腔内免疫、または以前に記載されたように (Elliott et al., 1999, *Vaccine*. 17 2009-2019) モンタニド (Montanide) *ISA 720* 中の破傷風トキシイドを用いて調製した *H-2Kd* 制限 *RSV M2* エピトープである *SYIGSINN* (*SYIGSINN/TT/M720*) を用いて皮下免疫した。2週間後に脾細胞を除去し、以前に記載されたように (Anraku et al., 2002、上記参照)、(B) *IFN ELISPOT* および (C) 標準クロム放出アッセイ (黒い四角 - *SYIGSINN* ペプチドを用いて感作した *P815* 標的細胞、白い四角 - ペプチドを含まない *P815* 標的細胞) によって *SYIGSINN* 特異的反応について分析した。 30

【図6】*KUN VLP* および *IL-2* を用いた抗腫瘍療法。4群のマウスの背部に皮下経路により 5×10^4 *LLOVA* を注射した。*LLOVA* 腫瘍を触知できたら ($> 1 \text{ mm}^2$)、グラフ上に指示した時点で *IL-2* を含めて、そして含めずに、*KUN VLP Mpt* または *PBS* (コントロール) を用いて2回ワクチン接種した。(A) 腫瘍のサイズを監視し、*ANOVA* によって群間比較を実施した；*VLP* 群対 *VLP + IL-2* 群、 $p=0.34$ ；コントロール群対コントロール+*IL-2* 群、 $p=0.96$ ；コントロール群対 *VLP* 群、 $p<0.001$ ；コントロール群対 *VLP + IL-2* 群、 $p<0.001$ 。(B) 生存率は、同一実験に対するカプランマイヤープロットで表示した (動物は、腫瘍1個のサイズが $15 \times 15 \text{ mm}^2$ に達したときに安楽死させた)。対数順位検定によって群間比較を実施した；*VLP* 群対 *VLP + IL-2* 群、 $p=0.11$ ；コントロール群対コントロール+*IL-2* 群、 $p=0.41$ ；コントロール群対 *VLP* 群、 $p<0.0015$ ；コントロール群対 *VLP + IL-2* 群、 $p<0.001$ 。 40

【図7】適応的突然変異は、レプリコン *VLP* を用いた感染後の *BHK 21*、*HEp-2* および *293* 細胞内での *KUN* レプリコン *RNA* の持続性複製を樹立する際に利点を付与する。*BHK 21*、*HEK 293* および *HEp-2* 細胞は野生型 / *PAC-gal* レプリコン *VLP* または各々 0.01、1 および 10 の MOI での各 *NS2A* 突然変異体を用いて感染させた。感染48時間後に、1 g/mL (*HEK 293* および *HEp-2* 細胞) ならびに 5 g/mL (*BHK 21* 細胞) のピューロマイシンを培地に添加し、さらに7 50

日間にわたり細胞を増殖させた。ピューロマイシン耐性細胞コロニーを4%ホルムアルデヒド中で固定し、クリスタルバイオレット(BHK21細胞)またはX-gal(HEK293およびHEp-2細胞)のいずれかを用いて染色した。

【図8】クジンレプリコンベクター由来の異種遺伝子の発現を増強させるためのtetKUNCprME細胞の使用。24ウェルプレート中で95%コンフルエントに増殖したKUNパッケージングA8細胞系およびBHK21細胞をMOI=1でKUNrepPAC/-galVLPを用いて感染させ、感染2、4および6日後にX-gal染色(A)および-galアッセイ(B)によって分析した。白色バーはBHK21細胞を、黒色バーはA8細胞のKUNパッケージングを表す。各バーは、2つずつのサンプルからの平均値を表す。エラーバーは標準偏差を表す。

10

【図1】

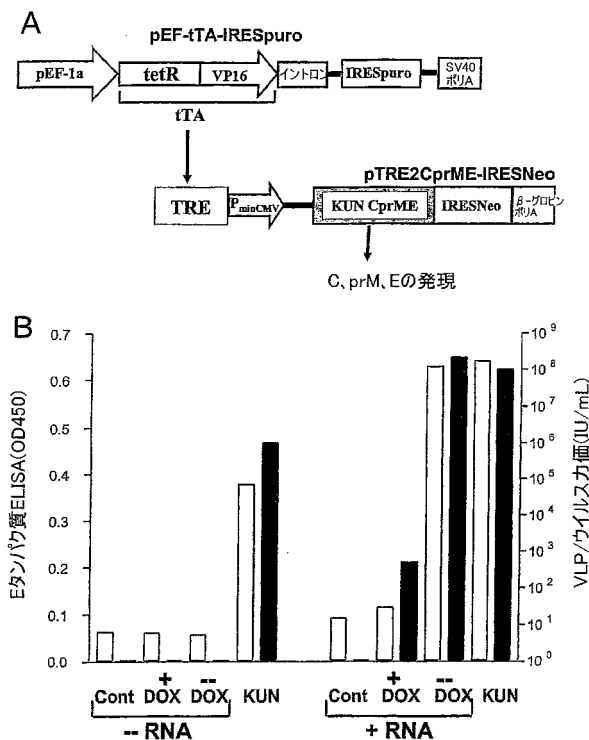


FIG. 1

【図2】

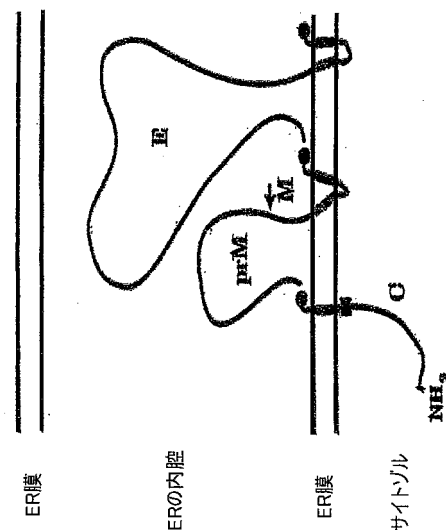


FIG. 2

【 図 3 】

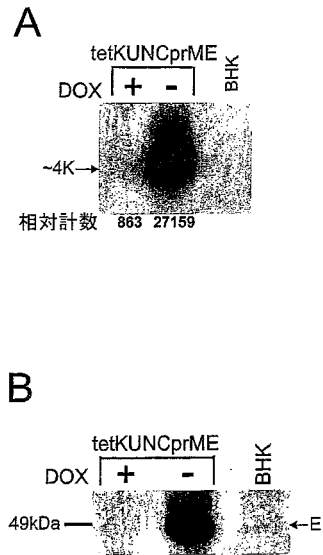


FIG. 3

【 図 4 】

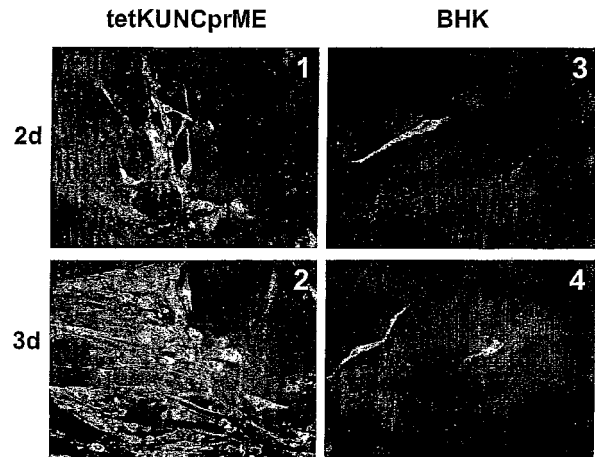


FIG. 4

【 図 5 】

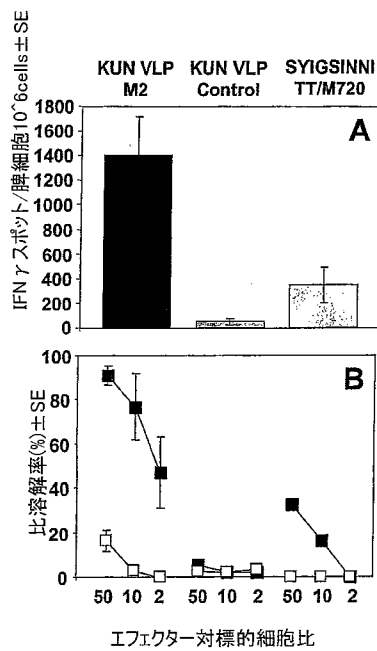


FIG. 5

【 図 6 】

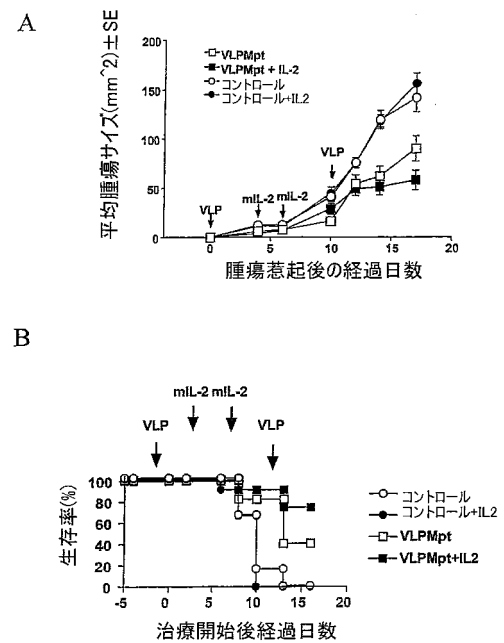


FIG. 6

【 図 7 】

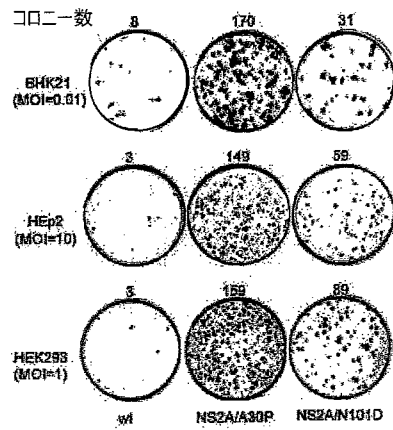


FIG. 7

【 図 8 】

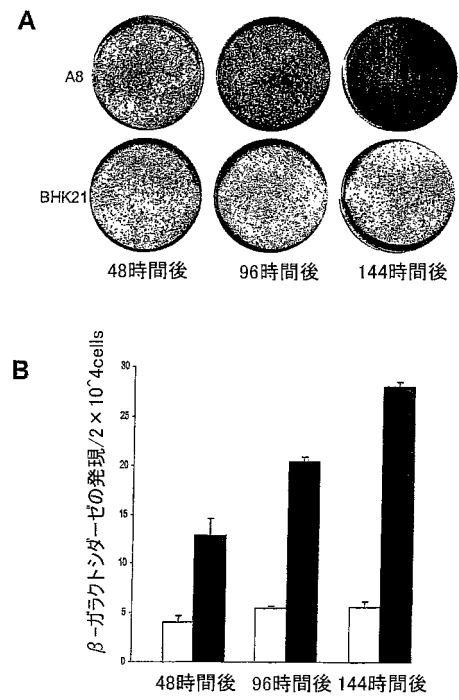


FIG. 8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2004/000752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, MEDLINE, CAPLUS: packaging, system, construct, cell, flavivirus, west nile, dengue, kunjin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KHROMYKH, A.A. et al., "Encapsidation of the Flavivirus Kunjin Repicon RNA by Using a Complementation System Providing Kunjin Virus Structural Protein in <i>trans</i> ", Journal of Virology, July 1998, Vol. 72, No. 7, pages 5967-77 See especially page 5969, left hand column, last paragraph to right hand column, first paragraph.	1-29
A	GEHRKE, R. et al., "Incorporation of Tick-Borne Encephalitis Virus Replicons into Virus-Like Particles by a Packaging Cell Line", Journal of Virology, Vol. 77, No. 16, pages 8924-33 Entire document	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2004		Date of mailing of the international search report - 6 AUG 2004
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer JAMIE TURNER Telephone No : (02) 6283 2071

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA31 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 FA02

GA14 HA01

4B065 AA91X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45

4C085 AA03 BA61 BB23 CC08 DD62 EE01 EE05