

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3946768号

(P3946768)

(45) 発行日 平成19年7月18日(2007.7.18)

(24) 登録日 平成19年4月20日(2007.4.20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 29 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-535840	(73) 特許権者	ザ・ユニヴァーシティ・オヴ・ノース・キ ャロライナ・アト・チャペル・ヒル
(86) (22) 出願日	平成8年5月21日(1996.5.21)		アメリカ合衆国、27599 ノース・キ ャロライナ、チャペル・ヒル、バイナム・ ホール 300
(65) 公表番号	特表平11-505719	(74) 代理人	弁理士 奥山 尚男
(43) 公表日	平成11年5月25日(1999.5.25)	(74) 代理人	弁理士 秋山 暢利
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/007454	(74) 代理人	弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開番号	W01996/037616	(74) 代理人	弁理士 有原 幸一
(87) 国際公開日	平成8年11月28日(1996.11.28)		
審査請求日	平成15年5月2日(2003.5.2)		
(31) 優先権主張番号	08/448,630		
(32) 優先日	平成7年5月23日(1995.5.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルファウイルスRNAレプリコン系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子を製造する方法であって、アルファウイルスは、ベネズエラ馬脳脊髄炎(Venezuelan Equine Encephalitis virus; VEE)ウイルス、シンドビスウイルス(Sindbis virus)、セムリキ森林ウイルス(Semliki Forest virus)、又は南アフリカアルボウイルスNo. 86(S.A.A.R 86)であり、

(a) アルファウイルス許容細胞を複製能欠損レプリコンRNAによりトランスフェクトするステップと、ここで、前記レプリコンRNAはアルファウイルスのパッケージングセグメントと挿入された異種RNAとを含有し、前記レプリコンRNAはアルファウイルスの構造タンパク質をコードする配列を欠失しており、前記アルファウイルス許容細胞は、

(1) 前記レプリコンRNAとは別個の第一のヘルパーRNAと、ここで、前記第一のヘルパーRNAは(i) 少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードするが、(ii) 少なくとも一の他のアルファウイルス構造タンパク質はコードしていない、
(2) 前記レプリコンRNAとは別個であり、第一のヘルパーRNAとも別個である第二のヘルパーRNAと、ここで、第二のヘルパーRNAは(i) 前記第一のヘルパーRNAによりコードされる前記少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしていないが、(ii) 前記第一のヘルパーRNAによりコードされない前記少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードする

を含み、

ここで、前記アルファウイルスのパッケージングセグメントは、前記第一及び第二のヘル

10

20

パーRNAから欠失されており、

前記第一及び第二のヘルパーRNAによりコードされる前記アルファウイルス構造タンパク質の全ては、一緒になって会合して、前記レプリコンRNAを含むアルファウイルス粒子となる、

(b) トランスフェクトされた細胞中に前記アルファウイルス粒子を作成するステップと、

(c) 前記トランスフェクトされた細胞から前記アルファウイルス粒子を回収するステップと

を含む方法。

【請求項2】

少なくとも一の前記レプリコンRNA、前記第一のヘルパーRNA、及び前記第二のヘルパーRNAが、一以上の弱毒化突然変異を含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記レプリコンRNAを前記アルファウイルス許容細胞にトランスフェクトする前記ステップが、エレクトロポレーションである請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記ヘルパーRNAが、前記アルファウイルス許容細胞にトランスフェクトされる請求項1～3の方法。

【請求項5】

前記ヘルパーRNAが、エレクトロポレーションにより前記アルファウイルス許容細胞にトランスフェクトされる請求項4に記載の方法。

【請求項6】

感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子の調製物であって、アルファウイルスは、ベネズエラ馬脳脊髄炎 (Venezuelan Equine Encephalitis virus; VEE) ウイルス、シンドビスウイルス (Sindbis virus)、セムリキ森林ウイルス (Semliki Forest virus)、又は南アフリカアルボウイルス No. 86 (S. A. AR 86) であり、

(a) アルファウイルス許容細胞を複製能欠損レプリコンRNAによりトランスフェクトするステップと、ここで、前記レプリコンRNAはアルファウイルスのパッケージングセグメントと挿入された異種RNAとを含有し、前記レプリコンRNAはアルファウイルスの構造タンパク質をコードする配列を欠失しており、前記アルファウイルス許容細胞は、

(1) 前記レプリコンRNAとは別個の第一のヘルパーRNAと、ここで、前記第一のヘルパーRNAは(i) 少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードするが、

(ii) 少なくとも一の他のアルファウイルス構造タンパク質はコードしていない、

(2) 前記レプリコンRNAとは別個であり、第一のヘルパーRNAとも別個である第二のヘルパーRNAと、ここで、第二のヘルパーRNAは(i) 前記第一のヘルパーRNAによりコードされる前記少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしていないが、(ii) 前記第一のヘルパーRNAによりコードされない前記少なくとも一の前記アルファウイルス構造タンパク質をコードする

を含み、

ここで、前記アルファウイルスのパッケージングセグメントは、前記第一及び第二のヘルパーRNAから欠失されており、

前記第一及び第二のヘルパーRNAによりコードされる前記アルファウイルス構造タンパク質の全ては、一緒になって会合して、前記レプリコンRNAを含むアルファウイルス粒子となる、

(b) トランスフェクトされた細胞中に前記アルファウイルス粒子を作成するステップとを含む方法により製造される前記トランスフェクトされた細胞から得られる細胞培養物に由来する調製物。

【請求項7】

アルファウイルスがVEEである請求項6に記載の調製物。

【請求項8】

10

20

30

40

50

アルファウイルスの構造タンパク質の少なくとも一が、E2アミノ酸の76位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸120位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸209位の弱毒化突然変異、E1アミノ酸272位の弱毒化突然変異、E1アミノ酸81位の弱毒化突然変異、E1アミノ酸253位の弱毒化突然変異、及びE1アミノ酸253位の弱毒化突然変異とE3アミノ酸56～59位の欠失の組み合わせを含む弱毒化突然変異からなる群から選択される弱毒化突然変異を含むVEEの構造タンパク質である請求項6又は7に記載の調製物。

【請求項9】

弱毒化突然変異が、

(a) E1アミノ酸81位の弱毒化突然変異

(b) E1アミノ酸253位の弱毒化突然変異、及び

(c) E1アミノ酸の81位の弱毒化突然変異とE1アミノ酸253位の弱毒化突然変異からなる群から選択される請求項8の調製物。

【請求項10】

アルファウイルスがS.A.A.R86である請求項6に記載の調製物。

【請求項11】

レプリコンRNA又はアルファウイルス構造タンパク質の少なくとも一が、S.A.A.R86に由来し、nsP1アミノ酸538位の弱毒化突然変異、nsP2アミノ酸96位の弱毒化突然変異、nsP2アミノ酸372位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸304位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸314位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸372位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸376位の弱毒化突然変異、E2アミノ酸378位の弱毒化突然変異からなる群から選択される弱毒化突然変異を含む、請求項6又は10に記載の調製物。

【請求項12】

異種RNA配列が、免疫原性タンパク質若しくはペプチド又は治療に有効なタンパク質若しくはペプチドをコードする請求項6～11のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項13】

レプリコンRNAが、2つの異なる異種RNA配列を含む請求項6～12のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項14】

レプリコンRNAが、第一の異種RNA配列の発現を指示するプロモーター配列と、第二の異種RNA配列の上流に位置するIRES配列とを含む請求項6～13のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項15】

レプリコンRNAが、2つの別個のプロモーター配列を含み、それぞれのプロモーター配列が異なる異種RNA配列の発現を指示する請求項6～13のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項16】

2つの別個のプロモーター配列がアルファウイルス26Sプロモーター配列である請求項15に記載の調製物。

【請求項17】

異種RNA配列が、ラッサ熱ウイルス免疫原、ヒト免疫不全ウイルス免疫原、サル免疫不全ウイルス免疫原、ワクシニアウイルス免疫原、エボラウイルス免疫原、マールブルグウイルス免疫原、インフルエンザウイルス免疫原、リフトバレー熱ウイルス免疫原、クリミアコンゴ出血熱ウイルス免疫原、シシリアサンドフライ(Sandfly)ウイルス免疫原性タンパク質、ヒトコロナウイルス免疫原、ウマ感染性貧血ウイルス免疫原、プラスモディウムCS1免疫原、及びポツリヌス菌毒素C断片免疫原からなる群から選択される免疫原性タンパク質又はペプチドをコードする請求項6～16のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項18】

請求項6～17のいずれか1項に記載の調製物を含む組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

請求項 6 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の調製物又は製薬的に許容可能な担体中の請求項 18 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 20】

異種 RNA 配列が効果免疫量存在する免疫原性タンパク質又はペプチドをコードする請求項 19 の医薬製剤。

【請求項 21】

請求項 6 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 18 に記載の組成物、又は医薬として使用するための請求項 19 又は 20 に記載の医薬製剤。

【請求項 22】

請求項 6 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の調製物の製造のためのヘルパー細胞であって、アルファウイルス許容細胞中に、

(a) アルファウイルスレプリコン RNA と、ここで、レプリコン RNA はアルファウイルスのパッケージングセグメントと挿入された異種 RNA を含有し、レプリコン RNA はアルファウイルスの構造タンパク質をコードし、前記ヘルパー細胞はレプリコン RNA によりトランスフェクトされている、

(b) 前記レプリコン RNA とは別個の第一のヘルパー RNA と、ここで、前記第一のヘルパー RNA が (i) 少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードするが、(ii) 少なくとも一の他のアルファウイルス構造タンパク質をコードしない、

(c) 前記レプリコン RNA と別個であり、前記第一のヘルパー RNA とも別個である第二のヘルパー RNA と、ここで、前記第二のヘルパー RNA は (i) 前記第一のヘルパー RNA によりコードされる前記少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしていないが、(ii) 前記第一のヘルパー RNA によりコードされない少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードする、

を含み、

前記アルファウイルスのパッケージングセグメントは前記第一及び第二のヘルパー RNA から欠失されており、

前記第一及び第二のヘルパー RNA によりコードされる前記アルファウイルス構造タンパク質の全ては、一緒になって会合して、前記レプリコン RNA を含有するアルファウイルス粒子となる、ヘルパー細胞。

【請求項 23】

少なくとも一の前記レプリコン RNA、前記第一のヘルパー RNA、前記第二のヘルパー RNA が、一以上の弱毒化突然変異を含む請求項 22 のヘルパー細胞。

【請求項 24】

前記レプリコン RNA が、エレクトロポレーションにより前記ヘルパー細胞にトランスフェクトされる請求項 22 又は 23 に記載のヘルパー細胞。

【請求項 25】

前記第一及び第二のヘルパー RNA が、トランスフェクションにより前記ヘルパー細胞に導入される請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のヘルパー細胞。

【請求項 26】

前記ヘルパー RNA が、エレクトロポレーションにより前記ヘルパー細胞にトランスフェクトされる請求項 25 に記載のヘルパー細胞。

【請求項 27】

ヘルパー細胞が、

(a) ヘルパー RNA の少なくとも一が、アルファウイルスのキャプシドタンパク質とアルファウイルスの E1 糖タンパク質とをコードするが、アルファウイルスの E2 糖タンパク質をコードしないヘルパー細胞、

(b) ヘルパー RNA の少なくとも一が、アルファウイルスのキャプシドタンパク質とアルファウイルスの E2 糖タンパク質とをコードするが、アルファウイルスの E1 糖タンパク質をコードしないヘルパー細胞、及び

10

20

30

40

50

(c) ヘルパーRNAの少なくとも一が、アルファウイルスのE1糖タンパク質とアルファウイルスのE2糖タンパク質とをコードするが、アルファウイルスのキャプシドタンパク質をコードしないヘルパー細胞

からなる群から選択される請求項22～26に記載のヘルパー細胞。

【請求項28】

ヘルパー細胞が、

(a) 第一のヘルパーRNAがアルファウイルスのキャプシドタンパク質をコードするが、アルファウイルスのE1糖タンパク質とアルファウイルスのE2糖タンパク質とをコードせず、第二のヘルパーRNAがアルファウイルスのE1糖タンパク質とアルファウイルスのE2糖タンパク質とをコードするヘルパー細胞、

10

(b) 第一のヘルパーRNAがアルファウイルスのキャプシドタンパク質とアルファウイルスのE1糖タンパク質をコードするが、アルファウイルスのE2糖タンパク質をコードせず、第二のヘルパーRNAがアルファウイルスのE2糖タンパク質をコードするヘルパー細胞、及び

(c) 第一のヘルパーウイルスが、アルファウイルスのキャプシドタンパク質とアルファウイルスのE2糖タンパク質をコードするが、アルファウイルスのE1糖タンパク質をコードせず、第二のヘルパーウイルスがアルファウイルスのE1糖タンパク質をコードするヘルパー細胞

からなる群から選択される請求項22～26のいずれか1項に記載のヘルパー細胞。

【請求項29】

20

Verob細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、及びニワトリ胚線維芽細胞からなる群から選択される請求項22～28のいずれか1項に記載のヘルパー細胞。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、組換えDNA技術、特に真核細胞への外来遺伝子の導入および発現に関する。

発明の背景

アルファウイルス属には、様々なウイルスが含まれ、そのすべてがトガウイルス(Togaviridae)科の一員である。アルファウイルスには、東部ウマ脳脊髄炎ウイルスEastern Equine Encephalitis virus (EEE)、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスVenezuelan Equine Encephalitis virus (VEE)、エヴァグレースウイルスEverglades virus、ムカンボウイルスMucambo virus、ピクシュナウイルスPixuna virus、西部ウマ脳脊髄炎ウイルスWestern Equine Encephalitis virus (WEE)、シンドビスウイルスSindbis virus、セムリキ森林ウイルスSemliki Forest virus、ミデルブルグウイルスMiddelburg virus、チクングヤ熱ウイルスChikungunya virus、オニョンニョン熱ウイルスO'nyung-nyong virus、ロス川ウイルス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、キジラガウイルスKyzylgach virus、ハイランドJウイルスHighlands J virus、森林モーガンウイルスFort Morgan virus、Ndumu virus、およびバギークリークウイルスBuggy Creek virusなど、

30

40

様々な種のアルファウイルスが含まれる。ウイルスのゲノムは、5'末端がメチル化されたキャップで修飾され、3'末端が可変長ポリ(A)トラクトで修飾された1本鎖メッセンジャーセンスRNAである。単一のウイルスタンパク質であるCを含む構造サブユニットは、正十二面体ヌクレオキャプシド内のRNAゲノムと会合している。ピリオンの場合、キャプシドは、膜貫通タンパク質スパイクの規則正しい配列で覆われた液体エンベロープで囲まれており、その各々は、2種の糖タンパク質、E1およびE2のヘテロダイマー複合体で構成されている。Pedersen et al. J. Virol. 14:40 (1974)を参照されたい。シンドビスウイルスおよびセムリキ森林ウイルスは、原型のアルファウイルスと考えられ、広範に研究がおこなわれてきた。Schlesinger, The Togaviridae and Flaviviridae, Plenum Publishing Corp., New York (1986)を参照されたい。本発明者は、VEEウイルス

50

を研究してきた。Davis et al.に付与された米国特許第5,185,440号を参照されたい。

上述のウイルスに関する研究により、アルファウイルス病や、外来DNAを導入するためにアルファウイルスベクターを使用することによって、他の疾患に備えてワクチン接種を行う有益な技術が開発された。Davis et alに付与された米国特許第5,185,440号、およびPCT公開WO92/10578号を参照されたい。真核細胞への外来DNA導入は、次第に高まる関心の的となった。弱毒化ウイルス生ワクチンは、ウイルス性疾患を管理する上で、最も効を奏する手段の1つであることは周知である。しかし、一部のウイルス病原体では、生きたウイルス株で免疫することは実用的でなかったり、危険であったりする可能性がある。1つの代替方法は、このような病原体の免疫感作抗原をコードしている配列を別のウイルスのワクチン株に挿入する方法である。このような、生きたVEEベクターを使用する1つの系は、1994年5月27日に提出された、筆者らの同時係属特許出願番号第08/250,445号に記載されている。また別のこのような系は、Hahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2679 (1992)に記載されており、その中には、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質の切断短縮型(truncated form)を発現するシンドビスウイルス構造物が記載されている。運悪く、現在利用できるこのような系は比較的少数である。

したがって、外来抗原のワクチンとして使用することが可能な、ウイルスのワクチン株に安全に組込むべき外来抗原をコードしている核酸配列が、依然として技術上必要性である。

発明の概要

第1の態様として、本発明は、感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子をアルファウイルス許容細胞で発現するためのヘルパー細胞を提供する。ヘルパー細胞は、細胞内アルファウイルス構造タンパク質が集まってアルファウイルス粒子を構成するように、(a)(i)少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードし、且つ(ii)少なくとも一の他のアルファウイルス構造タンパク質をコードしていない第1ヘルパーRNAと、(b)第1ヘルパーRNAとは別個の第2ヘルパーRNAであって、(i)第1ヘルパーRNAにコードされる少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードせず、且つ(ii)第1ヘルパーRNAにコードされない少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしている第2ヘルパーRNAとを含む。好ましくは、アルファウイルスパッケージングセグメントは、少なくとも第1ヘルパーRNAから欠失しており、さらに好ましくは、第1ヘルパーRNAからも第2ヘルパーRNAからも欠失している。

好ましい実施態様では、アルファウイルスパッケージングセグメントおよび挿入された異種RNAをコードするレプリコンRNAにより、ヘルパー細胞が共トランスフェクトされる。ヘルパー細胞がレプリコンRNAも含む実施態様では、アルファウイルスパッケージングセグメントは、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAの両者から欠失していてもよく、また欠失していることが好ましい。たとえば、ヘルパー細胞がアルファウイルスパッケージングセグメントおよび挿入された異種RNAをコードしているレプリコンRNAを含む実施態様では、第1ヘルパーRNAはアルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質をコードし、第2ヘルパーRNAはアルファウイルスキャプシドタンパク質をコードする。レプリコンRNA、第1ヘルパーRNA、および第2ヘルパーRNAは、すべて別個の分子上にあり、宿主細胞に共トランスフェクトされる。他の実施態様では、ヘルパー細胞はアルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質をコードしている第1ヘルパーRNAを含み、且つアルファウイルスパッケージングセグメント、挿入された異種RNA、および第1ヘルパーRNAにコードされない残りのアルファウイルス構造タンパク質をコードしているレプリコンRNAで共トランスフェクトされる。それゆえ、レプリコンRNAおよび第1ヘルパーRNAは別個の分子上にあり、レプリコンRNAと第1ヘルパーRNAにコードされない構造タンパク質をコードしているRNAは1つの分子上にある。異種RNAは、ヘルパー細胞で発現が望まれるタンパク質またはペプチドをコードする外来RNAを含む。

構造タンパク質をコードしているRNA、すなわち、第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNAは、1つ以上の転写弱毒化突然変異を含むことが好適である。好ましい実施態様では、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAのうち少なくとも1つは、弱毒化突然変異を少なくとも1つ含む。細胞内のRNA組換えの場合、弱毒化突然変異により、構造遺伝子と非構造遺伝子が結合すると毒性の低減したウイルスがつくられるという利点を得られる。

第2の態様として、本発明は感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子を製造する方法を提供する。この方法には、上述のヘルパー細胞をレプリコンRNAを共トランスフェクトするステップと、トランスフェクトされた細胞中でアルファウイルス粒子を生成するステップと、細胞からアルファウイルス粒子を収集するステップとが含まれる。レプリコンRNAは、アルファウイルスパッケージングセグメント、非構造タンパク質および異種RNAをコードする。レプリコンRNAによりコードされる非構造タンパク質は、複製および転写に必要なタンパク質であってもよい。トランスフェクトされた細胞は、上述の第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNAをさらに含む。

第3の態様として、本発明は、感染性の複製能欠損アルファウイルスを発現するための一組のRNAを提供する。この一組のRNAは、(a)少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているRNAがレプリコンRNAから欠失していることを特徴とする、プロモーター配列および挿入された異種RNAをコードしているレプリコンRNAと、(b)第1ヘルパーRNAは、レプリコンRNAから欠失している構造タンパク質、およびプロモーター配列をトランス型でコードすることを特徴とする、レプリコンRNAとは別個の第1ヘルパーRNAとの組み合わせを含む。この実施態様では、少なくとも一の構造タンパク質をコードしているRNAセグメントは、第1ヘルパーRNA以外のRNA上に位置することが好ましい。それゆえ、たとえば、この一組のRNAは、アルファウイルスパッケージング配列をコードするRNA、挿入された異種RNAおよびアルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質は欠失しているレプリコンRNAを含んでもよく、第1ヘルパーRNAはアルファウイルスE1糖タンパク質とアルファウイルスE2糖タンパク質の両者をコードしているRNAを含むことが好ましい。

別の実施態様では、この一組のRNAは、レプリコンRNAおよび第1ヘルパーRNAとは別個の第2ヘルパーRNAも含む。この実施態様では、第2ヘルパーRNAは、レプリコンRNAおよび第1ヘルパーRNAによりコードされる構造タンパク質とは異なる、少なくとも一の構造タンパク質をトランス型でコードする。それゆえ、たとえば、この一組のRNAは、アルファウイルスパッケージング配列および挿入された異種RNAをコードするRNAを含むレプリコンRNA、プロモーター配列をコードするRNAおよびアルファウイルスE1糖タンパク質とアルファE2糖タンパク質の両者をコードしているRNAを含む第1ヘルパーRNA、およびプロモーター配列およびアルファウイルスキャプシドタンパク質をコードするRNAを含む第2ヘルパーRNAを含むことが可能であり、レプリコンRNA、第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNAは、別個の分子上で、互いにトランス型である。

第4の態様として、本発明は、プロモーター配列、および挿入された異種RNAをコードしており、且つ、感染性ウイルス粒子が複製能欠損であるように、少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているRNAがそのRNAから欠失していることを特徴とするRNAを含む感染性VEEレプリコン分子を提供する。

第5の態様として、本発明は、薬理学上許容できる担体中の、有効な免疫原性量の上述の感染性アルファウイルス粒子を含む医薬製剤を提供する。

前述の態様および本発明の他の態様を、下記の詳細な説明で、詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

第1図は、pV4031クローンの図示と、pVR2クローンの製造である。

第2図は、本発明による二重ヘルパーRNA系プラスミドの構造物を示す図である。P21-1およびP24-3と表示される図面で、破線は、プラスミドで欠失している構造タ

10

20

30

40

50

ンパク質またはその一部を示す。第2図は、単一ヘルパーRNA系プラスミド、および異種遺伝子を含む組換えVEEクローンの構造物も示す。

第3図は、異なる2種の投与単位における、単一ヘルパーRNA系でつくられたVEEレプリコン/ラッサ(Lassa)N感染性粒子接種マウスで得られた結果を示すグラフ図である。上のグラフは、感染性粒子の低用量接種で得られた結果を示す。下のグラフは、感染性粒子の高用量接種で得られた結果を示す。

発明の詳細な説明

用語「アルファウイルス」は、技術上定型的な意味を有し、東部ウマ脳脊髄炎ウイルスEastern Equine Encephalitis virus (EEE)、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスVenezuelan Equine Encephalitis virus (VEE)、エヴァグレースウイルスEverglades virus、ムカンボウイルスMucambo virus、ピクシュナウイルスPixuna virus、西部ウマ脳脊髄炎ウイルスWestern Equine Encephalitis virus (WEE)、シンドビスウイルスSindbis virus、セムリキ森林ウイルスSemliki Forest virus、ミデルブルグウイルスMiddelburg virus、チクングンヤ熱ウイルスChikungunya virus、オニョンニョン熱ウイルスO'nyong-nyong virus、ロス川ウイルスRoss River virus、バーマー森林ウイルス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Auravirus、ワタロアウイルスWhataroa virus、ババンキウイルスBabanki virus、キジラガウイルスKyzylgach virus、ハイランドJウイルスHighlands J virus、森林モーガンウイルスFort Morgan virus、Ndumu virus、およびバギークリークウイルスBuggy Creek virus、およびウイルスの分類に関する国際委員会(International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV)によってアルファウイルスと同定される他のウイルスなど、様々な種のアルファウイルスが含まれる。本発明に使用するのに好ましいアルファウイルスRNA転写産物としては、VEE、シンドビスウイルス、およびセムリキ森林ウイルスなどがある。

本発明の方法に使用されるアルファウイルス許容細胞は、ウイルスRNA転写産物でトランスフェクトする際に、ウイルス粒子をすることができる細胞である。アルファウイルスは、広い宿主範囲を有する。適当な宿主細胞の例としてはベロ細胞、幼若ハムスター腎細胞(BHK)、およびニワトリ胚線維芽細胞などがあるが、これらに限定されない。

本願明細書で使用される語「構造タンパク質」または「アルファウイルス構造タンパク質」は、RNAレプリコンの包膜(たとえば、パッケージング)に必要なコードされたタンパク質を指し、キャプシドタンパク質、E1糖タンパク質およびE2糖タンパク質を含む。上述の通り、アルファウイルスの構造タンパク質は、一以上のヘルパーRNA(すなわち、第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNA)に分布している。さらに、結果として生じたアルファウイルス粒子が複製能欠損であるように、少なくとも一以上の構造タンパク質がレプリコンRNAタンパク質から欠失しているという条件で、一以上の構造タンパク質がレプリコンRNAと同じRNA分子上にあってもよい。本願明細書で使用される用語「欠失した」または「欠失」は、特定のセグメントの完全欠失、または標準用法により、特定のセグメントを無効または無機能にさせることができるほど、そのセグメントの十分な部分の欠失のいずれかを意味する。たとえば、Temin et al.に付与された米国特許第4,650,764号を参照されたい。本願明細書で使用される用語「複製能欠損」は、ヘルパーRNAが存在しない条件下で、宿主細胞でレプリコンRNAを包膜できないことを意味する。このレプリコンRNAは、包膜に必要なアルファウイルス構造タンパク質のすべてを含まず、パッケージされたレプリコンRNAはウイルスゲノム全体を複製することができないように、必要な構造タンパク質のうち少なくとも一がレプリコンRNAから欠失しているため、結果として生じるアルファウイルス粒子は複製能欠損である。

感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子を発現させるためのヘルパー細胞は、上述の通り、一組のRNAを含む。この一組のRNAは、主として第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAを含む。第1ヘルパーRNAは、少なくとも一以上のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているが、すべてのアルファウイルス構造タンパク質をコードしてはいな

10

20

30

40

50

いRNAを含む。換言すれば、第1ヘルパーRNAは、少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードせず、それゆえ、少なくとも一のコードされていないアルファウイルス構造タンパク質が第1ヘルパーRNAから欠失している。1つの実施態様では、第1ヘルパーRNAは、アルファウイルスE1糖タンパク質をコードしているRNAを含み、アルファウイルスキャプシドタンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質は第1ヘルパーRNAから欠失している。別の実施態様では、第1ヘルパーRNAはアルファウイルスE2糖タンパク質をコードしているRNAを含み、アルファウイルスキャプシドタンパク質およびアルファウイルスE1糖タンパク質は第1ヘルパーRNAから欠失している。第3の実施態様では、第1ヘルパーRNAはアルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質をコードしているRNAを含み、アルファウイルスキャプシドタンパク質は第1ヘルパーRNAから欠失している。

10

第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAによりコードされる少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質と異なる少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているRNAを含む。したがって、第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAによりコードされない少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードする。第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAによりコードされる少なくとも一の構造タンパク質をコードせず、それゆえ、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAは、構造タンパク質を二重にはコードしない。第1ヘルパーRNAがアルファウイルスE1糖タンパク質のみをコードしているRNAを含む実施態様では、第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAから欠失しているアルファウイルスキャプシドタンパク質とアルファウイルスE2糖タンパク質のうちまたは両者をコードしているRNAを含んでもよい。第1ヘルパーRNAがアルファウイルスE2糖タンパク質のみをコードしているRNAを含む実施態様では、第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAから欠失しているアルファウイルスキャプシドタンパク質とアルファウイルスE1糖タンパク質のうちまたは両者をコードしているRNAを含んでもよい。第1ヘルパーRNAがアルファウイルスE1糖タンパク質とアルファウイルスE2糖タンパク質の両者をコードしているRNAを含む実施態様では、第2ヘルパーRNAは、第1ヘルパーRNAから欠失しているアルファウイルスキャプシドタンパク質をコードしているRNAを含むことが可能である。

20

1つの実施態様では、パッケージングセグメント（包膜またはパッケージングシグナルを含むRNA）が少なくとも第1ヘルパーRNAから欠失している。好ましい実施態様では、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAの両者からパッケージングセグメントが欠失している。

30

第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAの両者からパッケージングセグメントが欠失している好ましい実施態様では、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAに加えて、レプリコンRNAでヘルパー細胞が共トランスフェクトされる。レプリコンRNAは、パッケージングセグメントおよび挿入された異種RNAをコードする。挿入された異種RNAは、タンパク質またはペプチドをコードしているRNAであってもよい。一般に、挿入された異種RNAは、宿主アルファウイルス許容細胞により発現されるのが望ましいタンパク質またはペプチドをコードし、且つ同細胞でタンパク質またはペプチドを発現するのに必要なプロモーターおよび調節セグメントを含む。挿入された異種RNAは、宿主細胞により生成が望まれる任意のタンパク質またはペプチドをコードしてもよい。適当な異種RNAは、原核起源（たとえば、ボツリヌス毒素C（*Botulinus toxin C*）をコードしているRNA）であってもよく、または真核起源（たとえば、グリーン蛍光タンパク質（*green fluorescent protein*; GFP）をコードしている*Aqueoria victoria*クラゲのRNA、マラリア*Plasmodium*タンパク質*csi*をコードしているRNA）であってもよい。

40

さらに、本発明の実行に適した挿入された異種RNAとしては、アレナウイルス（*Arenavirus*）（たとえば、ラッサ熱ウイルス）、レンチウイルス（*Lentivirus*）（たとえば、HIV、SIV、ウマ感染性貧血ウイルス）、ポックスウイルス（*Poxvirus*）（たとえば、ワクシニア）、フィロウイルス（*Filovirus*）（たとえば、エボラウイルス、マールブルクウイルス）、オルソミクソウイルス（*Orthomyxovirus*）（たとえば、インフルエンザウ

50

イルス)、ブンヤウイルス(Bunyavirus)(たとえば、RVFVウイルス、CCHFウイルス、およびSFSウイルス)、およびコロナウイルス(Coronavirus)を含め、広く様々なウイルスのウイルスRNAを含む。挿入された異種RNAを提供するのに使用することができる適当なウイルスRNA遺伝子の例としては、ラッサ熱ウイルスヌcleoキャプシドタンパク質遺伝子、ラッサ熱エンペロブ糖タンパク質遺伝子、インフルエンザ赤血球凝集素遺伝子、インフルエンザ核タンパク質遺伝子、ヒトコロナウイルスエンペロブ糖タンパク質遺伝子、HIVエンペロブGP160遺伝子、およびHIVマトリックス/キャプシド遺伝子などがあるが、これらに限定されない。レプリコンRNAは、複製および転写に必要なシス作用配列を含む、アルファウイルス非構造タンパク質もコードする。

10

好ましい実施態様では、第1分子、すなわち、レプリコンRNAは、パッケージングセグメントおよび挿入された異種RNAをコードしているRNAを含み、第2分子、すなわち、第1ヘルパーRNAは、必要な少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているが、すべてをコードしてはいないRNAを含み、第3分子、すなわち第2ヘルパーRNAは、必要な少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているが、すべてをコードしてはいないRNAを含むというように、レプリコンRNA、第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNAは、別々の分子上で提供される。たとえば、本発明の1つの好ましい実施態様では、ヘルパー細胞は、アルファウイルスE1糖タンパク質、アルファウイルスE2糖タンパク質およびキャプシドタンパク質が、宿主細胞内で集まってアルファウイルス粒子を構成するように、(a)アルファウイルスパッケージング配列および挿入された異種RNAをコードしているRNAを含むレプリコンRNAと、(b)アルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質をコードしているRNAを含む第1ヘルパーRNAと、(c)アルファウイルスキャプシドタンパク質をコードしているRNAを含む第2ヘルパーRNAを含む一組のRNAを含む。

20

別の実施態様では、第1分子、すなわち、第1ヘルパーRNAは、必要な少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているが、すべてをコードしているのではないRNAを含み、第2分子、すなわち、レプリコンRNAはパッケージングセグメント、挿入された異種RNA、および第1ヘルパーRNAにコードされない残りの構造タンパク質をコードしているRNAを含むように、レプリコンRNAと第1ヘルパーRNAは別個の分子上にあり、レプリコンRNAと、第1ヘルパーRNAにコードされない構造遺伝子をコードしているRNAが、また別の1つの分子上に一緒に存在する。たとえば、本発明の1つの好ましい実施態様では、アルファウイルスE1糖タンパク質、アルファウイルスE2糖タンパク質、およびキャプシドタンパク質は、宿主細胞内で集まってアルファウイルス粒子を構成し、レプリコンRNAはその中に納められるように、ヘルパー細胞は、(a)アルファウイルスパッケージング配列、挿入された異種RNA、およびアルファウイルスキャプシドタンパク質をコードしているRNAを含むレプリコンRNAと、(b)アルファウイルスE1糖タンパク質およびアルファウイルスE2糖タンパク質をコードしているRNAを含む第1ヘルパーRNAとを含む一組のRNAを含んでなる。

30

本発明の1つの好ましい実施態様で、アルファウイルス構造タンパク質、すなわち、キャプシド、E1糖タンパク質およびE2糖タンパク質をコードしているRNAは、少なくとも1つの弱毒化突然変異を含む。本願明細書で使用される語もである「弱毒化突然変異」および「弱毒化アミノ酸」は、従来技術の標準用語に従って、突然変異を含むヌcleoチド配列、または突然変異を含むヌcleoチド配列にコードされるアミノ酸を意味し、その突然変異はその宿主で疾患を引き起こす確率の低減(すなわち、毒性の喪失)を招く。突然変異が置換突然変異であれフレーム内欠失突然変異であれ、たとえば、B. Davis, et al., *Microbiology* 132(第3版、1980)を参照されたい。ウイルスに対して致命的な突然変異または突然変異の組み合わせは、「弱毒化突然変異」なる語から除外される。それゆえ、この実施態様によれば、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAのうち少なくとも1つは、弱毒化突然変異を少なくとも1つ含む。さらに好ましい実施態様では、第1ヘルパーRNAと第2ヘルパーRNAのうち少なくとも1つは、少なくとも2個、すなわち複数の弱毒化突

40

50

然変異を含む。複数の弱毒化突然変異は、第1ヘルパーRNAまたは第2ヘルパーRNAのいずれにあってもよく、あるいはランダムに分布して、1つ以上の弱毒化突然変異が第1ヘルパーRNAにあり、1つ以上の弱毒化突然変異が第2ヘルパーRNAにあってもよい。あるいは、レプリコンRNAおよび第1ヘルパーRNAにコードされない構造タンパク質をコードしているRNAが同一の分子上にあるとき、弱毒化突然変異は、第1ヘルパーRNAによりコードされない構造タンパク質をコードするRNAに位置してもよい。弱毒化突然変異は、非構造タンパク質（たとえば、レプリコンRNA）をコードしているRNA内にあってもよい。

適切な弱毒化突然変異は使用するアルファウイルスによって異なる。たとえば、アルファウイルスがVEEの場合、適当な弱毒化突然変異は、弱毒化アミノ酸、好ましくはリジン、アルギニン、あるいはヒスチジンをE2アミノ酸76位として特定するE2アミノ酸76位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはリジンをE2アミノ酸120位として特定するE2アミノ酸120位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはリジン、アルギニン、あるいはヒスチジンをE2アミノ酸209位として特定するE2アミノ酸209位のコドン、弱毒化突然変異、好ましくはトレオニンまたはセリンをE1アミノ酸272位として特定するE1アミノ酸272位のコドン、弱毒化突然変異、好ましくはイソロイシンまたはロイシンをE1アミノ酸81位として特定するE1アミノ酸81位のコドン、弱毒化突然変異、好ましくはセリンまたはトレオニンをE1アミノ酸253位として特定するE1アミノ酸253位のコドン、およびE3コドン56～59位の欠失と上述のような弱毒化突然変異を特定するE1アミノ酸253位のコドンの組み合わせ突然変異から成る群から選択することが可能である。VEEゲノム内の他の適当な弱毒化突然変異は、当業者に周知である。

アルファウイルスが南アフリカアルボウイルスSouth Africa Arbovirus No.86 (S. A. AR 86)である、他の実施態様で、適当な弱毒化突然変異は、非構造タンパク質と構造タンパク質の両者をコードしているRNA分子上にあり、弱毒化アミノ酸、好ましくはイソロイシンをnsP1アミノ酸538位として特定するnsP1アミノ酸538位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはトレオニンをE2アミノ酸304位として特定するE2アミノ酸304位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはリジンをE2アミノ酸314位として特定するE2アミノ酸314位のコドン、E2アミノ酸残基372位の弱毒化アミノ酸、好ましくはバリンを特定するE2アミノ酸372位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはアラニンをE2アミノ酸376位として特定するE2アミノ酸376位のコドン、E2アミノ酸残基304位、314位、372位および376位の弱毒化アミノ酸を特定するE2アミノ酸残基304位、314位、372位および376位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはロイシンをE2アミノ酸378位として特定するE2アミノ酸378位のコドン、弱毒化アミノ酸、好ましくはグリシンをnsP2アミノ酸96位として特定するnsP2アミノ酸96位のコドン、および弱毒化アミノ酸、好ましくはバリンをnsP2アミノ酸372位として特定するnsP2アミノ酸372位のコドン、組み合わせで、nsP2アミノ酸残基96位および372位の置換突然変異を弱毒化化するnsP2アミノ酸残基96位および372位のコドン、nsP2アミノ酸残基529位の弱毒化アミノ酸、好ましくはロイシンを特定するnsP2アミノ酸残基529位のコドン、nsP2アミノ酸残基571位の弱毒化アミノ酸、好ましくはアスパラギンを特定するnsP2アミノ酸残基571位のコドン、nsP2アミノ酸残基682位の弱毒化アミノ酸、好ましくはアルギニンを特定するnsP2アミノ酸残基682位のコドン、nsP2アミノ酸残基804位の弱毒化アミノ酸、好ましくはアルギニンを特定するnsP2アミノ酸残基804位のコドン、nsP3アミノ酸残基22位の弱毒化アミノ酸、好ましくはアルギニンを特定するnsP3アミノ酸残基22位のコドン、および組み合わせで、nsP2アミノ酸残基529位、571位、682位、および804位、およびnsP3アミノ酸残基22位の弱毒化アミノ酸を特定するnsP2アミノ酸残基529、571、682、および804、およびnsP3アミノ酸残基22位のコドンから成る群から選択することが可能である。他のアルファウイルスを使用する実施態様に有用な適当な弱毒化突然変異は、当

業者に周知である。既知の手順に従って、RNAをコードするcDNAに部位指向性突然変異誘発を実施することにより、弱毒化突然変異をRNAに導入することが可能である。たとえば、Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)を参照されたい。この文献の開示内容は、引用することにより本願明細書に完全に組込まれる。あるいは、既知の手順に従って、RNAをコードするcDNAの同種制限フラグメントを置換することにより、RNAに突然変異を導入することも可能である。

好ましくは、第1ヘルパーRNAおよび第2ヘルパーRNAはプロモーターも含む。レプリコンRNAがプロモーターも含むことも好ましい。第1ヘルパーRNA、第2ヘルパーRNAおよびレプリコンRNAに包含するのに適したプロモーターは、技術上周知である。1つの好ましいプロモーターは、アルファウイルスがVEEのときに使用するVEEの26Sプロモーターである。VEE26Sよりすぐれたさらなるプロモーターとしては、シンドビス26Sプロモーター、セムリキ森林26Sプロモーター、およびアルファウイルスポリメラーゼにより認識される他のプロモーター配列などがある。(野生型の活性レベルと比較して)プロモーターの活性レベルを変える突然変異を含むアルファウイルスプロモーター配列も、本発明の実行に相当である。Raju and Huang, J. Virol.65, 2501-2510 (1991)にはこのような突然変異体配プロモーター配列が記載されている。この文献の開示内容は引用することにより本願明細書に組込まれる。第1ヘルパーRNA、第2ヘルパーRNA、およびレプリコンRNAがすべて別個の分子上にある系で、3種のRNAすべてに同じプロモーターが使用される場合、プロモーターは、3つの分子間に同種配列を提供する。選択されたプロモーターが、レプリコンRNA分子によりコードされる非構造タンパク質と機能的に作用することが好ましい。

2種の免疫原をワクチン接種すると、単一の免疫原をワクチン接種するときと比較して病気に対して改善された防御が得られる場合、二重プロモーターレプリコンにより、同じ細胞で両免疫原が確実に生産されるようになる。このようなレプリコンは、2種の異なる異種タンパク質の挿入および発現を可能にするために、26SのRNAプロモーターを2コピー含み、各々の後に異なるマルチクロニング部位が続くことを除外すれば、上述のものと同じと考えられる。別の有用な戦術は、ピコルナウイルスであるEMCウイルスのIRES配列を、上述のレプリコンの単一26Sプロモーターから下流の2種の異種遺伝子の間に挿入し、このようにして、単一レプリコン転写産物由来の2種の免疫原を同じ細胞で発現させる方法である。

感染性複製能欠損アルファウイルス粒子は、本願明細書に開示されている方法に従って、当業者に周知の技術を組み合わせて作成することができる。この方法には、アルファウイルスパッケージングセグメントおよび挿入された異種RNAを含むレプリコンRNAと、少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているRNAを含む第1ヘルパーRNAと、および第1ヘルパーRNAによりコードされるものとは異なる少なくとも一のアルファウイルス構造タンパク質をコードしているRNAを含む第2ヘルパーRNAとをアルファウイルス許容細胞にトランスフェクトするステップと、トランスフェクトされた細胞内にアルファウイルス粒子を生成するステップと、細胞からアルファウイルス粒子を収集するステップとを含む。アルファウイルス許容細胞にトランスフェクトするステップは、当業者に周知の適当な任意の手段に従って実施することができる。たとえば、RNAの細胞内への取り込みは、たとえば、細胞をDEAE-デキストランで処理するか、細胞に加える前にRNAを「LIPOFECTINTM」で処理するか、あるいはエレクトロポレーションによるなど、任意の適当な手段で行うことができるが、エレクトロポレーションは、現在、アルファウイルス許容細胞へのRNA取り込みの実行に好まれる方法である。上述の技術は従来技術で周知である。たとえば、Davis et al.に付与された米国特許第5,185,440号、およびBioption ABに対するPCT公開第WO92/10578号を参照されたい。これらの文献は、引用することにより、その開示内容が本願明細書に完全に組込まれる。

細胞内で感染性ウイルス粒子の産生を促進するステップも、従来の技術を使用して実行することができる。たとえば、Davis et al.に付与された米国特許第5,185,440号

10

20

30

40

50

、Bioption ABに対するPCT公開第WO92/10578号、およびTemin et al.に付与された米国特許第4,650,764号を参照されたい(Teminらは、アルファウイルスよりもむしろレトロウイルスに関連している文献であるが)。感染性ウイルス粒子は、標準細胞培養増殖技術で産生することも可能である。

感染性アルファウイルス粒子を収集する工程も、従来技術を使用して実施することが可能である。たとえば、技術上周知の細胞溶解や、細胞培養の上清の収集によって、感染性粒子を収集することが可能である。たとえば、Davis et al.に付与された米国特許第5,185,440号、Bioption ABに対するPCT公開第WO92/10578号、およびTemin et al.に付与された米国特許第4,650,764号を参照されたい。他の適当な技術は当業者に周知であろう。場合によっては、収集された感染性アルファウイルス粒子は、要望に応じて精製してもよい。適当な精製技術は、当業者に周知である。

ワクチンなど、本発明の医薬製剤は、本願明細書に開示されている感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子の免疫原量を、薬理学上許容できる担体と組み合わせて含む。「免疫原量」は、医薬製剤が投与される被験対象に免疫応答を引き起こすことができるほど十分な感染性アルファウイルス粒子の量である。治療を受ける被験対象の年齢および種、および免疫応答が望まれる免疫原によって、1回量当たり約 10^3 ~約 10^7 の量のレプリコン含有粒子、好ましくは約 10^4 ~ 10^6 のレプリコン含有粒子が適当と考えられる。薬理学上許容できる担体の例としては、無発熱物質滅菌水および無発熱物質生理食塩水であるが、これらに限定されない。本発明の感染性の複製能欠損アルファウイルス粒子の免疫原量が投与される被験者には、ヒトや動物(たとえば、ブタ、ウシ、イヌ、ウマ、ロバ、マウス、ハムスター、サル)が含まれるが、これらに限定されない。

本発明の医薬製剤は、非経口(たとえば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、および関節内)投与に適するものを含む。代わりに、本発明の医薬製剤は、被験者の粘膜に投与するのに適していてもよい(たとえば、鼻腔内投与)。製剤は、便宜上、単位剤形で産生することも可能であり、技術上周知の方法のいずれで産生してもよい。

本発明のヘルパー細胞、RNAおよび方法は、レプリコンRNA上にある挿入島された異種RNAが、*in vitro*で望ましく合成されるタンパク質またはペプチドをコードする*in vitro*発現系に有用である。さらに、本発明のヘルパー細胞、RNA、方法および医薬製剤は、治療方法またはそれ以外の方法として、所望のタンパク質またはペプチドを必要とする被験者にタンパク質またはペプチドを投与する方法に有用である。本発明のこの実施態様で、本発明のレプリコンRNA上にある異種RNAは所望のタンパク質またはペプチドをコードし、ヘルパー細胞または本発明のヘルパー細胞を含有する医薬製剤は、所望のタンパク質またはペプチドを必要とする被験者に投与される。この方式で、タンパク質またはペプチドは、*in vivo*で被験者内で産生することが可能である。被験者にはタンパク質またはペプチドの欠乏が認められるか、被験者におけるタンパク質またはペプチドの生産は、治療またはそれ以外の方法として、若干の治療効果を与えるため、被験者はタンパク質またはペプチドを必要としていると思われる。

次の実施例は、本発明を例示することを目的としたものであり、限定することを目的としたものではない。これらの実施例で、nmはナノメートルを意味し、mLはミリリットルを意味し、IUは感染の単位を示し、pfu/mLはプラーク形成単位/ミリリットルを意味し、VEEはベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスを意味し、EMCは、脳心筋炎ウイルスを意味し、BHKは仔ハムスター腎細胞(BHK)を意味し、HAは赤血球凝集素遺伝子を意味し、GFPはグリーン蛍光タンパク質遺伝子を意味し、Nはヌクレオキャプシドを意味し、FACSは蛍光活性化細胞ソーターを意味し、IRESは内部リボソーム侵入部位を意味する。「E2アミノ酸(たとえば、lys、thr)数」という表現は、E2タンパク質の指定残基の指定アミノ酸を示す。この慣習は、E1タンパク質およびE3タンパク質の特定の残基のアミノ酸を指すのにも使用される。

例1

pVR2クローンの構築

2種の弱毒化突然変異(E2 lys 209、E1 thr 272)、および1994年5月2

10

20

30

40

50

7日に提出された同時係属特許出願番号第08/250,445号に記載のマルチクローニング部位が後続するE1糖タンパク質遺伝子の3'末端からすぐ下流の26SサブゲノムRNAプロモーター配列の重複を含むcDNAクローン(pV4031)から、VEE構造タンパク質遺伝子(C-PE2-6K-E1)を取り出した。VEEゲノム配列をヌクレオチド7505位(遺伝子配列の5'末端から番号をつけた)で切断するApaI制限酵素で、pV4031プラスミドDNAを完全に消化した。この酵素の第2認識部は、重複26Sサブゲノムプロモーターに認められる。したがって、pV4031をApaIで消化すると、DNAフラグメント2個が生じ、そのうち一つはVEE非構造遺伝子および複数のクローニング部位が後続する26SサブゲノムRNAプロモーターを1コピー含み、もう一つの小さい方のフラグメントは、VEE構造遺伝子が後続する26SサブゲノムRNAプロモーターを含有する。大きいほうのフラグメントを単離し、再連結して、クローンpVR2を産生した。第1図は、pV4031クローンおよびpVR2クローンを図示するものである。

10

例2

単一RNAヘルパープラスミドの構築

ヘルパープラスミドの出発材料は4種の全長cDNAクローン、すなわち、VEEの毒性トリニダードロバ(Trinidad donkey)株であるpV3000、およびトリニダードロバ株VEEの遺伝的バックグラウンドで、弱毒化突然変異pV3014(E2 lys 209, E1 thr 272)、pV3519(E2 lys 76, E2 lys 209, E1 thr 272)およびpV3526(E3 56~59の欠失、E1 ser 253)を含む3種のクローンである。全長cDNAクローンの独特の制限部位および希少制限部位を使用して非構造タンパク質領域の一部を欠失させることにより、幾つかの異なるヘルパープラスミドが産生されている。全長クローンを1種または2種の制限酵素で消化し、より大きいDNAフラグメントを分離し、再連結して機能的プラスミドを形成する。組織培養細胞のトランスフェクションに際して、このようなプラスミド由来のin vitro RNA転写産物は、機能的RNA複製複合体をコードせず、包膜シグナルも含まないと考えられる。ヘルパー構築物は、非構造遺伝子欠失のサイズが異なる。ヘルパー構築物は、その構築に使用される弱毒化突然変異クローン、および欠失した非構造領域のパーセンテージによって表示される。

20

V3014	520-7505(93%)	V3519	520-7507(93%)	V3526	520-7507(93%)
V3014	520-6965(87%)	V3519	1687-7507(78%)	V3526	520-7505(93%)
V3014	2311-7505(70%)	V3519	3958-7507(47%)		
V3014	3958-7505(47%)	V3519	1955-3359(19%)	V3000	1955-3359(19%)
V3014	520-3954(19%)				
V3014	1955-3359(19%)				
V3014	1951-3359(19%)				
V3014	2311-3055(10%)				
V3014	2307-3055(10%)				

30

例3

二重RNAヘルパープラスミドの構築

第2図に示す、二重ヘルパー系をコードしているプラスミドも構築した。V3014 520-7505(93%)単一ヘルパークローンを使用して、HpaI制限酵素で消化し、続いて連結することによりE2糖タンパク質遺伝子およびE1糖タンパク質遺伝子の追加欠失を構築すると、結果としてヌクレオチド8494位(E3遺伝子)からヌクレオチド11,230(E1遺伝子の3'末端付近)までの間の配列が欠失した。BHK細胞にレプリコンRNAをエレクトロポレーションするとき、このプラスミドのin vitro RNA転写産物(第2図のP21-1に示す)は、複製および転写が行われて、VEEのCタンパク質のみをコードしているmRNAが生じる。

40

二部に分かれたヘルパーの第2メンバーをコードしているプラスミド(第2図P24-3に示す)は、Tth111I制限酵素(ヌクレオチド7544位で)およびSpeI制限酵素で(ヌクレオチド8389位で)切断し、Tth111I末端およびSpeI末端を含む合成二重オリゴヌクレオチ

50

ドを挿入することにより同一起源のクローンから構築する。挿入された配列は、26Sプロモーターの下流部分、およびE3の第1アミノ酸残基であるSerコドンが後続するATG開始コドンを復帰させる。このプラスミドのin vitro RNA転写産物は、レプリコンRNAと共に細胞にトランスフェクトすると、VEE糖タンパク質が生じる。これらのヘルパーRNAをレプリコンRNAと共に細胞にトランスフェクトすると、レプリコンRNAのみを含む、感染性ではあるが複製能が欠損した粒子が生じる。このヘルパーRNAの5'末端、3'末端および26Sプロモーター(40ヌクレオチド)を除外すれば、キャプシドヘルパーRNAと糖タンパク質ヘルパーRNAとの間で共通の唯一の配列は、8389位から8494位までの配列(105ヌクレオチド)である。

例4

異種遺伝子を含有する組換えVEEレプリコン

インフルエンザHA遺伝子、ラッサ熱ウイルスNタンパク質遺伝子およびラッサ熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質遺伝子をpVR2クローンに個別に挿入すると、培養BHK細胞で首尾よく発現した。このような構築物を、第2図の3番目の部分に示す。下表1に示す通り、細菌、原生動物および無脊椎動物を含め、広範囲の生物に起源のある他の幾つかの遺伝子(たとえば、ポツリヌス毒素Cフラグメント遺伝子、マラリアプラスモジウムCS1遺伝子、Chalfieら, science 263:802(1994)によりAquoria victoriaクラゲDNAからクローニングしたGFP遺伝子)も、VEEクローンに首尾よく挿入され、発現されている。表1で、空白は、個々の遺伝子について個々の機能が試験されていないことを示すものであって、その遺伝子でのその機能の試験が不成功であったことを示すものではない。

10

20

表1. 組換えVEEレプリコン

(空白は試験の未実施を示す)

科/ウイルス/遺伝子	クローニング状態		発現	機能		
	シャトル	レプリコン		パッケージ	免疫原性	
オルソミクソウイルス						
インフルエンザHA	+	+	+	+	+	10
アレナウイルス						
ラッサN	+	+	+	+	+	
ラッサGPc	+	+	+	+		
ブンヤウイルス						
RVFV NSM-G2-G1	+	+	+	+		
CCHF M Seg	+	+				
CCHF M 5' 半分	+	+	+	+		
CCHF M 3' half	+	+	+			
SFS NSM-G1-G2	+	+				
SFS G2	+	+	+			20
SFS NSm-G1	+	+	+	+		
SFS N	+	+	+			
フィロウイルス						
エボラNP	+	+	+	+		
エボラGP	+	+	+	+		
マールブルクNP	+					
マールブルクGP	+					
マールブルクGPt	+					
ポックスウイルス						
ワクシナL1	+	+	+			30
ワクシナD8	+	+	+			
レンチウイルス						
HIV ma/ca	+	+	+	+		
HIV gp160	+	+	+			
SIV ma/ca	+	+	+	+		
SIV gp 160	+	+	+	+		
その他						
GFP	+	+	+			
マラリアCS1	+	+				
ボツニヌス-C	+					
Bot-C フラグメント	+					40

例5

異種タンパク質発現の検出および感染性レプリコン粒子のパッケージング

組換えVEEレプリコン系におけるタンパク質発現の検出は、340~490nmの範囲の光に曝露したとき、自己蛍光を発光するGFPの場合を除き、特異的蛍光抗体結合によって行われる。GFP-レプリコンRNAのみをBHK細胞にエレクトロポレーションし、発現を蛍光で分析するとき、95%を超える細胞が活性GFPを含有する。BHK細胞におけるラッサ熱Nタンパク質の発現レベルは、トランスフェクトされた細胞溶解物のポリアミドゲル電気泳動法およびNIH Image Version 1.52でクマシー染色ゲルを用いた画像分析により測定する。レベルは、総細胞タンパク質の15~19%の範囲である。

GFPレプリコンRNAとV3014 520-7505 (93%)ヘルパーRNAの共エレクトロポレーションにより、GFPを感染能欠損粒子にパッケージし、BHK細胞の感染、400nm光での定量的検鏡、ならびにFACS分析で力価を決定する。レプリコン粒子の収量は、上述の条件で $2 \sim 6 \times 10^7$ /mLである。ラッサ熱レプリコンRNAをパッケージするために、様々な単一ヘルパー構築物を使用した収量は、 1×10^4 IU/mLから 8×10^7 IU/mLの範囲であった。

例 6

単一RNAヘルパー系でパッケージされたレプリコンに対する免疫応答

ラッサ熱N遺伝子を含むパッケージされたレプリコンをマウスに接種し、Nに特異的な血清抗体の誘導に使用した。結果を第3図に報告する。低用量接種を使用すると、VEEに特異的な血清抗体は全く検出されなかった。しかし、高用量接種マウスの血清中にVEE特異的な抗体が認められ、これは製剤中の複製成分組換え型のためと考えられる(ブランクアッセイで、レプリコン粒子の力価より 10^4 少ないと推定される)。両タイプのマウスが同用量の第2回Nレプリコンを受けると、両者とも抗N力価の有意な上昇を示した。第3図を参照されたい。

10

例 7

単一RNAヘルパー系における組換えVEEレプリコンのワクチン接種

インフルエンザウイルスHAまたはラッサウイルスNを発現する組換えVEEレプリコンを構築した(それぞれ、HA-Rep、N-Rep)。これらのレプリコンをVEE単一RNAヘルパー系でパッケージすると、HA構築物およびN構築物では、それぞれ 3×10^7 感染性粒子/mL(HA-RepV)および 4×10^7 感染性粒子/mL(N-RepV)という収量が得られた。上述のパッケージされたレプリコンを様々な用量でマウスに接種し、得られた免疫応答を免疫プロット(immunoblot; IB)および酵素連結イムノアッセイ(enzyme-linked immunoassay; EIA)でモニタリングした。このマウスにインフルエンザウイルスを投与し、病気および死亡をモニタリングした。この実験結果を以下に示す。

20

1回免疫感作後、 3×10^7 のHA-RepVまたは 4×10^7 のN-RepVを受けたすべてのマウスでセロコンバージョンが認められた。さらに、ブースター免疫感作後、幾何平均EIA力価が有意に上昇した。 3×10^5 のHA-RepVおよび 4×10^5 のN-RepVを受けたすべてのマウスは、2種の免疫感作後、セロコンバージョンを示した。 3×10^3 のHA-RepVを2回受けたマウスはセロコンバージョンを示さなかった。 3×10^7 のHA-RepVまたは 3×10^5 のHA-RepVを2回受けたすべてのマウスが、重度のインフルエンザウイルス投与から保護された。低用量を受けたマウスまたは生理食塩水を受けたコントロールマウスは保護されなかった。

30

上述のレプリコンは単一RNAヘルパーでパッケージされているため、HA-RepV製剤中にもN-RepV製剤中にも、VEE約1000プラーク形成単位(PFU)/mLが生じた。その結果、ワクチン接種を受けたマウスのほとんどに、VEEに対するセロコンバージョンが認められた。しかし、ヘルパーRNAは弱毒化突然変異を含んでいたため(3014遺伝的バックグラウンド)、再生したVEEウイルスは弱毒化しており、上記動物に病気を惹起しなかった。

先の1つのRepV免疫感作が後続の異種RepV免疫感作を妨害するかどうかを決定するために、単RNA系を使用して、マウスに先ずN-RepVで免疫感作し、続いてHA-RepVで免疫感作した。 3×10^6 のN-RepVか 3×10^4 のN-RepVを2回接種後、 2×10^5 のHA-RepVを2回接種すると、すべての動物がHAに対するセロコンバージョンを示した。先行のN-RepV免疫感作による有意な妨害は明白ではなかった。続いて上記動物に毒性インフルエンザウイルスを投与すると、すべての動物が防護免疫を示した。

40

N-RepVを単一RNAヘルパーでパッケージすると、レプリコンRNAとヘルパーRNAとの間で組換えが可能になり、VEEウイルスが再生した。しかし、N-RepV製剤中のVEEウイルスが複製能を有する結果としてVEEタンパク質に対する抗体反応が動物に発生したにもかかわらず、HAに対する免疫応答が誘導された。

例 8

50

二重RNAヘルパー系でパッケージされた組換えVEEレプリコンのワクチン接種
 上述の通り、構造タンパク質を提供するために単一ヘルパーRNAを使用して組換えレプリコンをパッケージすると、共トランスフェクション中のRNA組換えにより、弱毒化されているが完全に感染性の複製有能VEEウイルスが再生する可能性がある。これを防止するために、1つのヘルパーRNA上にヌcleoキャプシド遺伝子が提供され、糖タンパク質遺伝子が第2ヘルパーRNAに提供される二重ヘルパーRNA系を構築する。(上述の例3を参照されたい)。二重ヘルパー系および上述のN-RepおよびHA-Repを用いて、共トランスフェクションを実行した。パッケージされたレプリコン、N-RepVおよびHA-RepVの収量を、免疫蛍光法でモニタリングした。同様に、免疫蛍光法およびプラークアッセイ(PFU)で複製有能VEEウイルスの有無をモニタリングした。共トランスフェクションの培地も他のBHK細胞培養に入れて、存在する感染性VEEウイルスを増幅した後、フラスコの培地をプラークアッセイで分析した。結果を表2に示す。

表2. VEEレプリコンと二重ヘルパー構築物(DH)による共トランスフェクション

	日付	免疫蛍光法		プラークアッセイ	
		共トランスフェクトされた細胞の培地		BHK細胞中で増幅した後の感染性ウイルス	
		RepU/ml ^a	VEE FFU/ml ^b	PFU/ml ^c	
N-Rep+DH	95年4月29日	3×10^6	<5 ^d	<50 ^d	なし ^e
	95年5月14日	5×10^5	<5	<50	なし
	95年7月2日	4×10^7	<5	<50	なし
	95年7月7日	1×10^8	<5	<50	なし
HA-Rep+DH	95年5月14日	3×10^5	<5	<50	なし
	95年7月2日	4×10^7	<5	<50	なし
	95年7月9日	6×10^7	<5	<50	なし

a レプリコン単位/ml、異種遺伝子を発現する、IFAによる

b フォーカス形成単位、VEE抗原を発現する、IFAによる

c プラーク形成単位/ml、プラークアッセイによる

d アッセイの最低測定限界

e 新鮮なBHK培養の感染に共トランスフェクト細胞の培地1mlを使用した(7.5cm²フラスコ)、24時間および65時間インキュベートし、感染性ウイルスをプラークアッセイでモニタリングした。

表2のデータは、二重ヘルパーRNA系およびN-Repを用いて4種のトランスフェクションが行われ、このヘルパー系およびHA-Repを用いて3種のトランスフェクションが行われたことを示す。パッケージされたレプリコンの力価は $3 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ の範囲であった。上述の収量は、単一ヘルパー系で得られたものと同様以上であった。

免疫蛍光法または直接プラークアッセイで複製有能VEEウイルス粒子が検出された例は皆無であった。これは、単一系で得られた結果と著しく異なる。複製有能VEEウイルスは、1つの感染単位を理論的に検出することができる手順である新鮮培養でのBHK細胞のブライント継代(増幅)後でも検出されなかった。

通常、新生マウスの大脳内 (ic) 接種は、細胞培養の接種よりも敏感な感染性ウイルスのアッセイ法である。したがって、単一RNA系または二重RNA系のいずれかを用いてパッケージしたHA-RepVを、哺乳マウスに高用量で接種した(表3)。単一ヘルパー系と二重ヘルパー系の両者の構築に使用されたVEE糖タンパク質遺伝子は、3014VEE構築物から得られた。これを皮下接種すると成体マウスで弱毒化されるが、脳内接種した哺乳マウスでは弱毒化されない。哺乳マウスにおける3014のLD₅₀は1.6 PFUである。

表3. レプリコン安全性試験—哺乳マウスのIC接種

単一ヘルパーおよび二重ヘルパーを使用してパッケージした
インフルエンザレプリコンの比較

レプリコン	接種した感染性単位 ^a	存在するPFU ^b	生存パーセント
偽接種物	0	0	100
HA-二重ヘルパー	5×10 ⁵	0	100
HA-二重ヘルパー	5×10 ⁷	0	100
HA-単一ヘルパー	5×10 ⁵	500	10
HA-単一ヘルパー	5×10 ⁷	50000	0

a 免疫蛍光アッセイにより、フォーカス形成単位として測定した

b プラークアッセイでベロ細胞を用いて決定した

上述のデータから、二重ヘルパーRNA系でパッケージされたHA-RepVでのプラークアッセイで、レプリコン有能VEEウイルスは全く検出されなかったが、単一ヘルパー系でパッケージされたHA-RepVでは比較的高い力価が確認されたことがわかる。二重ヘルパー系でパッケージされた用量5×10⁵および5×10⁷のHA-RepVでは哺乳マウスすべてが生存したが、単一ヘルパー系でパッケージされた高用量HA-RepVでは全く生存せず、低用量では1/10が生存したにすぎない。

二重ヘルパー系でパッケージされた用量5×10⁷のHA-RepVは、皮下接種した成体マウスでの免疫応答を実現するのに必要な量よりも約100倍多いことが以下からわかる。したがって、より高用量のパッケージされたHA-RepV/二重RNAヘルパーでも、既知の最も敏感な系(哺乳マウス)で無害であるということから、二重RNAヘルパー系の高い安全域がわかる。

例9

二重ヘルパー系でパッケージされたHAレプリコンによるマウスの免疫感作

二重RNAヘルパー系で生成されたN-RepVおよびHA-RepVを成体Ba1b/cマウスに接種し、ラッサN、インフルエンザHA、およびVEEに対する免疫応答を酵素連結イムノアッセイ(EIA)で測定した。その後、マウスに毒性インフルエンザウイルスを投与した。

表4. 二重ヘルパー系でパッケージされたインフルエンザHAレプリコン

免疫感作スケジュール				インフルエンザ抗原投与 ^d	
RepV	用量 ^a	接種後日数 ^b	VEE PFU ^c	生存/総数	病気/総数 ^e
N-RepV DH	3×10 ⁶	0	0		
	3×10 ⁶	32	0		
HA-RepV DH	2×10 ⁵	84	0		
	2×10 ⁵	112	0	6/6	6/6

10

20

血清E I A価			
接種後日数	インフルエンザ-HA	ラッサN	VEE
14	<100	205	<100
84	試験せず	5815	<100
98	4842	試験せず	<100
128	20,722	試験せず	<100

30

a 免疫蛍光アッセイで測定したときの感染単位数

b 接種後日数

c プラークアッセイにより、ベロ細胞で測定したときの接種物中に存在するプラーク形成単位

d 第136日に抗原投与したマウス

e 視覚的観察および有意な体重減少の確認により決定した

40

表4の結果からわかるように、N-RepV製剤またはHA-RepV製剤のいずれでも、プラークアッセイで複製有能VEEウイルスは全く検出されなかった。第0日のN-RepV接種後、有意な力価がマウスに現われ、これは第32日のブースター免疫感作後、劇的に増大した。VEE特異的抗体は全く検出されなかった。

第84日に、同じマウスに後続のHA-RepVを接種し、第98日に測定したとき、有意な抗HA力価を示して応答した。上記の幾何平均力価は、後続のHA-RepV接種後、20,722に上昇した。抗HA力価から、先の異種レプリコン免疫感作による妨害はないことがわかる。

二重ヘルパー系から産生したレプリコン4種を接種後、マウスには、VEEに対する検出

50

可能なE I A力価がなかった。第134日に試験したとき、マウスは毒性インフルエンザウイルスの投与から完全に防護されていた。このインフルエンザウイルスは、以前に、未ワクチン接種マウスで50%死亡率および100%罹病率を引き起こした。

例10

キャプシド遺伝子の突然変異誘発

通常、V E Eゲノムのアルファウイルスヌクレオキャプシド遺伝子および糖タンパク質遺伝子は、単一オープンリーディングフレーム(ORF)にコードされる。このORFの翻訳中に、オートプロテアーゼ活性によってヌクレオキャプシドは成長しつつあるポリプロテインを切断する。このプロテアーゼ活性は、キモトリプシンと類似した活性セリンモチーフに基づくものであり、3種の異なるアミノ酸残基(セリン、アスパラギン酸、およびヒスチジン)との相互作用を必要とする。V E Eヌクレオキャプシド遺伝子の場合、セリン残基、アスパラギン酸残基およびヒスチジン残基は、それぞれアミノ酸226、174および152に位置する。これらの残基の突然変異誘発は、ヌクレオキャプシドのプロテアーゼ活性を傷つけ、他のアルファウイルスについて示してきたように、生育不能ウイルスが生じる。しかし、ヌクレオキャプシド遺伝子が別々のmRNA上に提供される二重ヘルパー系では、オートプロテアーゼ活性の要件は皆無である。

上記残基の突然変異誘発が二重ヘルパーRNA系のパッケージングに悪影響を及ぼすかどうかを決定するために実験を行った。下表5および6に示すように、部位指向的突然変異誘発手順を使用して、上述の座の3つのアミノ酸を変えた。この突然変異は、ヌクレオキャプシド遺伝子および補足(E3)配列をコードする単一のRNAに発生した。修飾された各構築物が、レプリコンと共に、共トランスフェクトされ、ヌクレオキャプシドタンパク質のサイズをポリアミドゲルで検定し、タンパク質自己切断の程度を求めた。

続いて、突然変異の個々の組み合わせを試験して、レプリコンパッケージングの程度を求めた(感染性レプリコン単位の放出によってモニタリングした)。これらの研究で、翻訳終始シグナル(停止コドン)をキャプシド遺伝子の末端に挿入した。

10

20

表5. VEEキャプシド突然変異体のオートプロテアーゼ活性

A

キャプシド位置	残基	オートプロテアーゼ活性
152	H(wt)	+
	I	-
	D	-
	S	-
	O	-
	G	-
	V	-
	T	-
	A	-
	Y	-
	R	-

B

キャプシド位置	残基	オートプロテアーゼ活性
174	D(wt)	+
	N	+
	A	+
	F	-
	L	+
	K	-
	E	+
	G	+
	T	+
	C	+
	I	-
	S	+
	H	+
	P	-
	V	-

10

20

C

キャプシド位置	残基	オートプロテアーゼ活性
226	S(wt)	+
	M	-
	Y	-
	V	-
	R	-
	N	-
	C	-
	Q	-
	G	-
	H	-
A	-	

30

40

表6. 突然変異体VEEキャプシドヘルパーによる

VEEレプリコンのパッケージング

80%であれば、G152、D172、およびS226を含有する野生型VEEキャプシドヘルパーによるパッケージングが100%であると想定する。

A

キャプシド位置	残基	パッケージング
152	G	<0
	F	<10
	R	<10

B

キャプシド位置	残基	パッケージング
174**	N	30
	C	10
	H	50
	K	30
	F	30
	W	40

10

20

**これらの突然変異体は、152位にG突然変異も有する

C

キャプシド位置	残基	パッケージング
226	L	<10
	R	<10
	G	30
	N	試験せず

30

表5のデータは、ヌクレオキャプシドタンパク質自己切断を防止する3つの座の各々の特異的突然変異が同定されたことを示す。152座または226座で試験したすべてのアミノ酸置換は切断を阻害した。しかし、174座での幾つかの異なる変化は、切断を継続することが可能であった。

表6のデータから、パッケージングは、若干の突然変異では検出することができなかったことがわかる。しかし、他の場合、野生型VEEヌクレオキャプシドヘルパーと比較して、効率のよいパッケージングが確認された。それゆえ、レプリコンと二重RNA系RNAの各々で生じる複数の組換えが起こりそうもない場合には、このような修飾されたヌクレオキャプシド構築物を使用すると、組換え体が機能的ヌクレオキャプシドを有することを妨げることができた。本願明細書に記載の修飾されたヌクレオキャプシド遺伝子は、二重ヘルパー系でのみ機能的である。

40

上述のように変化したヌクレオキャプシドタンパク質により、複製有能ウイルスが生じる組換えが起こらないというさらなる保証が得られる。粒子集合 (particle assembly) で機能するが自己タンパク質分解 (autoproteolysis) の過程では機能しない変化したキャプシドタンパク質遺伝子は、レプリコン粒子を産生するためのヘルパー機能を提供するも

50

の、生育可能な組換え体を生じる公算は非常に低い。
 前述した事柄は、本発明の例示であって、本発明を限定すると考えてはならない。本発明は以下の請求項および請求項に含まれるべき請求項の同等物により、明確に規定される。

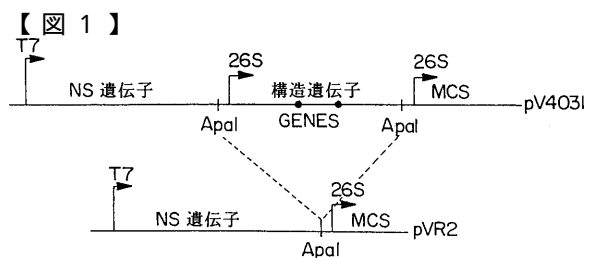


FIG. 1.

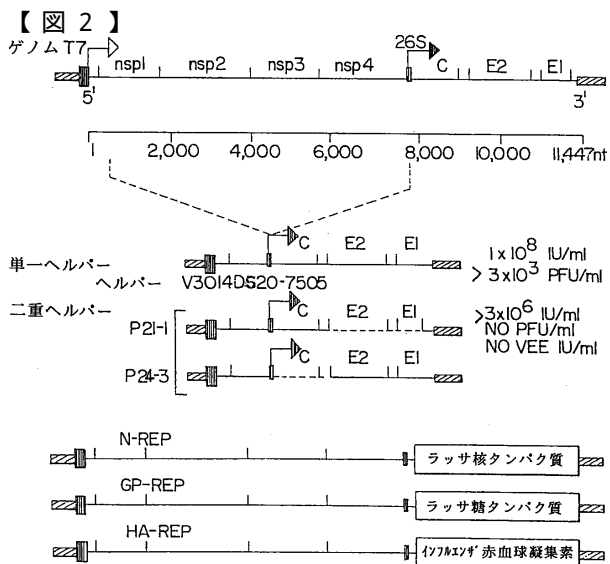


FIG. 2.

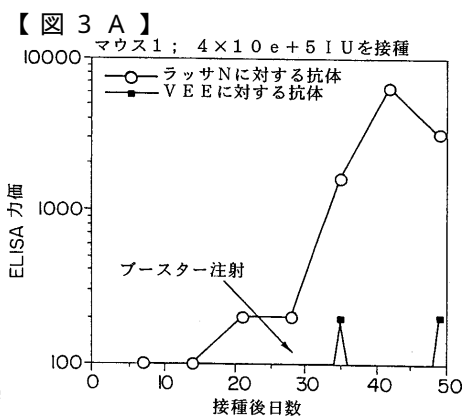


FIG. 3A.

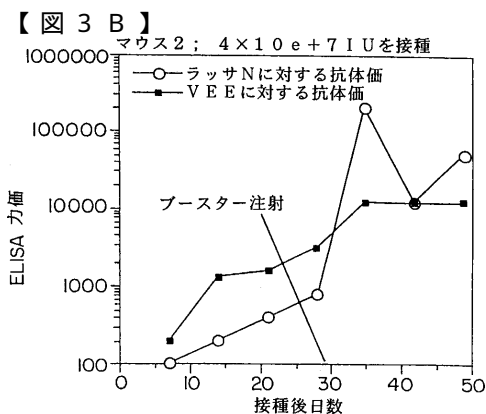


FIG. 3B.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00

(74)代理人

弁理士 松島 鉄男

- (72)発明者 ジョンストン, ロバート・イー
 アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノース・キャロライナ、チャペル・ヒル、マリン・プレイス 1 0
 1
- (72)発明者 デイヴィス, ナンシー・エル
 アメリカ合衆国、2 7 5 1 4 ノース・キャロライナ、チャペル・ヒル、シャロン・ロード 4 1
 5
- (72)発明者 スミス, ジョナサン・エフ
 アメリカ合衆国、2 1 7 8 0 メリーランド、サビラスヴィル、エイラー・ヴァリー・フロント・
 ロード 6 9 3 6
- (72)発明者 ブシュコ, ピーター
 アメリカ合衆国、2 7 0 2 メリーランド、フレデリック、ティニー・アヴェニュー 1 3 3 8、
 アpartment 2 0 2
- (72)発明者 パーカー, マイケル
 アメリカ合衆国、2 1 7 0 1 メリーランド、フレデリック、キャロル・パークウェイ 1 0 0 1
 、アpartment ティー - 1 3
- (72)発明者 ルドウィグ, ジョージ
 アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド、フレデリック、ヴァリー・サイド・ドライブ 1 7
 8 6

審査官 坦ヶ 隆幸

- (56)参考文献 特表平06 - 504198 (JP, A)
 国際公開第95 / 007994 (WO, A1)
 米国特許第05185440 (US, A)
 Journal of Virology, 1993, vol.67, p.6439-6446
 BIO/TECHNOLOGY, 1991, vol.9, p.1356-1361
 Virology, 1989, vol.171, p.189-204
 Arch. Virol., 1994, supp1.9, p.99-109
 Virology, 1995 Feb., vol.206, p.994-1006
 Virology, 1991, vol.183, p.20-31
 Science, 1984, vol.225, p.424-427
 Virology, 1988, vol.162, p.437-443

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 PubMed
 Science Direct
 JSTPlus(JDream2)
 医学・薬学予稿集全データベース