

(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2011-507515

(P2011-507515A)

(43) 公表日 平成23年3月10日 (2011.3.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 7/04 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/04 Z N A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 39/205 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/205	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2010-539483 (P2010-539483)	(71) 出願人	309040701
(86) (22) 出願日	平成20年12月18日 (2008.12.18)		ワイス・エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成22年8月11日 (2010.8.11)		アメリカ合衆国 07940 ニュージャ
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/013834		ージー州 マジソン、ファイブ ジラルダ
(87) 国際公開番号	W02009/085178		ファームズ (番地なし)
(87) 国際公開日	平成21年7月9日 (2009.7.9)	(74) 代理人	100096666
(31) 優先権主張番号	61/015, 375		弁理士 室伏 良信
(32) 優先日	平成19年12月20日 (2007.12.20)	(74) 代理人	100131934
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 ▲高▼橋 宏次
		(74) 代理人	100137040
			弁理士 宮澤 純子
		(74) 代理人	100133927
			弁理士 四本 能尚

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 繁殖欠損水疱性口内炎ウイルスベクターをパッケージングする方法

## (57) 【要約】

細胞培養物中で繁殖欠損水疱性口内炎ウイルス (VSV) を産生する方法を提供する。この方法は、最適化した VSV G 遺伝子をコードしているプラスミドベクターを細胞内に導入することと、最適化した VSV G 遺伝子から VSV G タンパク質を発現させることと、繁殖欠損 VSV を、最適化した VSV G 遺伝子によってコードされている VSV G タンパク質を発現する細胞内に導入することを含む。この方法は、細胞を培養で成長させることと、繁殖欠損 VSV を培養物から回収することとをさらに含む。

【図 1】

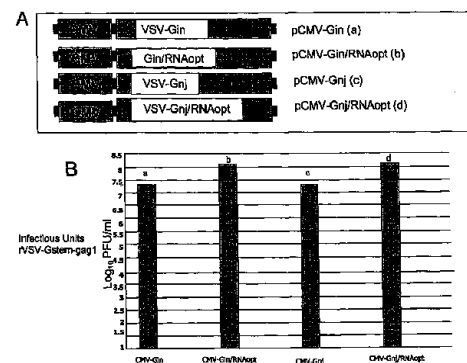


FIG. 9

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス（VSV）を産生する方法であって、最適化したVSV G遺伝子を含むプラスミドベクターを細胞内に導入することと、前記最適化したVSV G遺伝子からVSV Gタンパク質を発現させることと、VSV Gタンパク質を発現する細胞を弱毒化したVSVに感染させることと、感染した細胞を培養で成長させることと、弱毒化したVSVを培養物から回収することとを含む方法。

## 【請求項 2】

弱毒化したVSVが繁殖欠損VSVである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

感染ステップが、VSV Gタンパク質を発現する細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入した細胞と同時培養することを含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4】

細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持プラスミドでさらに形質移入する、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

電気穿孔によって細胞を形質移入する、請求項 3 または 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

ウイルスゲノムの長さのRNAが、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドから転写される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

DNA依存性RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼであり、ウイルスcDNA発現ベクターおよび支持プラスミドがT7プロモーターの制御下にある、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

支持プラスミドによってコードされているVSV Gタンパク質が、最適化されていないVSV G遺伝子によってコードされている、請求項 3 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

支持プラスミドによってコードされているVSV Gタンパク質が、最適化したVSV G遺伝子によってコードされている、請求項 3 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現が、サイトメガロウイルスに由来するRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現が、機能的なmRNAを産生するRNAポリメラーゼIIによって認識される転写単位の制御下にある、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

最適化したVSV G遺伝子が、インディアナ血清型またはニュージャージー血清型に由来する、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

前記最適化した V S V G 遺伝子が、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

ポリヌクレオチドが転写終結配列に作動可能に連結している、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 15】

ポリヌクレオチドがリボザイム配列に作動可能に連結している、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 16】

弱毒化した V S V が異種抗原をコードしている、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 17】

異種抗原が病原体由来である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

病原体が、麻疹ウイルス、サブグループ A およびサブグループ B の呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、1 型または 2 型のヒトパピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エプスタインバーウイルス、フィロウイルス、ブニヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルスおよびトラコーマ病原体 (C . t r a c h o m a t i s ) から選択される、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

弱毒化した V S V が、サイトカイン、T - ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生物のタンパク質から選択される、非ウイルス分子をさらにコードしている、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 20】

細胞が適格な産生細胞である、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 21】

細胞が V e r o 細胞である、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

弱毒化した V S V が V S V G タンパク質を欠く ( V S V - G )、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 23】

弱毒化した V S V の収量が、約  $1 \times 10^6$  I U / 培養物 1 m l を超える、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

弱毒化した V S V が、切断された細胞外ドメインを有する G タンパク質を発現する ( V S V - G s t e m )、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 25】

弱毒化した V S V の収量が、約  $1 \times 10^6$  I U / 培養物 1 m l を超える、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

弱毒化した V S V が、切断された細胞質尾部 ( C T ) 領域を有する G タンパク質を発現する、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 27】

弱毒化した V S V が、1 個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有する G タンパク質 ( G - C T 1 ) を発現する、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

10

20

30

40

50

弱毒化したVSVが、9個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有するGタンパク質(GCT9)を発現する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

弱毒化したVSVが、ウイルスゲノム中のその野生型の位置から下流に転座しているN遺伝子を含み、それによってNタンパク質発現が低下している、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

弱毒化したVSVが、非細胞変性M遺伝子突然変異(Mncp)を含有し、前記突然変異は、内部AUGでタンパク質合成を開始すること、IFN誘導に影響を与えること、核輸送に影響を与えること、またはその組合せによって、Mタンパク質のmRNAから発現される2つの重複するインフレームのポリペプチドの発現を低下させる、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項31】

細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス(VSV)を産生する方法であって、細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入することと、

形質移入した細胞を培養で成長させることと、

弱毒化したVSVを培養物から救済することと、

20

最適化したVSV G遺伝子によってコードされているVSV Gタンパク質を発現する細胞を、救済された弱毒化したVSVに感染させることと、

感染した細胞を培養で成長させることと、

弱毒化したVSVを感染した細胞の培養物から回収することとを含む方法。

【請求項32】

細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持プラスミドでさらに形質移入する、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

弱毒化したVSVが繁殖欠損VSVである、請求項31に記載の方法。

30

【請求項34】

DNA依存性RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼであり、ウイルスcDNA発現ベクターおよび支持プラスミドがT7プロモーターの制御下にある、請求項31から33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

ゲノムの長さのRNAが、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドから転写される、請求項31から34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

支持プラスミドによってコードされているGタンパク質が、最適化されていないVSV G遺伝子によってコードされている、請求項31から35のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項37】

前記最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現が、サイトメガロウイルスに由来するRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある、請求項31から36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現が、機能的なmRNAを産生するRNAポリメラーゼIIによって認識される転写単位の制御下にある、請求項31から37のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 39】

最適化した VSV G 遺伝子が、インディアナ血清型またはニュージャージー血清型に由来する、請求項 31 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 40】

電気穿孔によって細胞を形質移入する、請求項 31 から 39 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 41】

弱毒化した VSV が異種抗原をコードしている、請求項 31 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記最適化した VSV G 遺伝子が、配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 からなる群から選択される、請求項 31 から 41 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 43】

弱毒化した VSV が VSV G タンパク質を欠く (VSV - G)、請求項 31 から 42 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 44】

弱毒化した VSV の収量が、約  $1 \times 10^6$  IU / 培養物 1 ml を超える、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

弱毒化した VSV が、切断された細胞外ドメインを有する G タンパク質を発現する (VSV - G stem)、請求項 31 から 42 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 46】

弱毒化した VSV の収量が、約  $1 \times 10^6$  IU / 培養物 1 ml を超える、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 47】

繁殖欠損水疱性口内炎ウイルス (VSV) のパッケージングを改善する方法であって、  
 a) 最適化した VSV G 遺伝子をコードしているプラスミドベクターを細胞内に導入することと、  
 b) 最適化した VSV G 遺伝子から VSV G タンパク質を一過的に発現させることと、  
 c) 繁殖欠損 VSV を、VSV G タンパク質を一過的に発現する細胞内に導入することと、  
 d) 細胞を培養で成長させることと、  
 e) パッケージングされた VSV を培養物から回収することと  
 を含む方法。

30

## 【請求項 48】

薬学的に許容できる担体中に、請求項 1 から 47 のいずれか一項に記載の方法に従って産生した、免疫原性的に有効な量の弱毒化した VSV を含む免疫原性組成物。

## 【請求項 49】

弱毒化した VSV が異種抗原をコードしている、請求項 48 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 50】

弱毒化した水疱性口内炎ウイルス (VSV) を細胞培養物中で産生するための組成物であって、

40

a) 最適化した VSV G 遺伝子を含むベクターと、  
 b) 弱毒化した VSV のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドと、  
 c) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼをコードしているベクターと  
 を含む組成物。

## 【請求項 51】

構成要素 c) によってコードされている DNA 依存性 RNA ポリメラーゼが T7 RNA ポリメラーゼである、請求項 50 に記載の組成物。

50

## 【請求項 5 2】

- i - N タンパク質、
- i i - P タンパク質、
- i i i - L タンパク質、
- i v - M タンパク質、および
- v - G タンパク質

から選択される V S V タンパク質をコードしている 1 つまたは複数の支持ベクターをさらに含む、請求項 5 0 または 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5 3】

b) の弱毒化した V S V が繁殖欠損 V S V である、請求項 5 0 から 5 2 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5 4】

最適化した V S V G 遺伝子を含むベクターを含む、弱毒化した水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) を細胞培養物中で産生するためのキット。

## 【請求項 5 5】

弱毒化した V S V のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターと、

D N A 依存性 R N A ポリメラーゼをコードしているベクターと  
をさらに含む、請求項 5 4 に記載のキット。

## 【請求項 5 6】

D N A 依存性 R N A ポリメラーゼが T 7 R N A ポリメラーゼである、請求項 5 5 に記載のキット。

## 【請求項 5 7】

- i - N タンパク質、
- i i - P タンパク質、
- i i i - L タンパク質、
- i v - M タンパク質、および
- v - G タンパク質

から選択される V S V タンパク質をコードしている 1 つまたは複数の支持ベクターをさらに含む、請求項 5 4 から 5 6 のいずれか一項に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般に、マイナス鎖 R N A ウイルスに関する。より詳細には、本発明は、細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) を産生するための方法および組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) は、ラブドウイルス ( R h a b d o v i r i d a e ) 科のメンバーであり、したがって、セグメント化されていないマイナス鎖 R N A ゲノムを含有する外被に包まれたウイルスである。これは、連続して 3 ' - N - P - M - G - L - 5 ' に配置されている 5 個の遺伝子の領域からなる、比較的単純なゲノムである ( 図 1 ) ( R o s e および W h i t t , R h a b d o v i r i d a e : T h e V i r u s e s a n d T h e i r R e p l i c a t i o n , 「 F i e l d s V i r o l o g y 」 , 第 4 版、第 1 巻、L i p p i n c o t t a n d W i l l i a m s a n d W i l k i n s , 1 2 2 1 ~ 1 2 4 4 , 2 0 0 1 ) 。

## 【0003】

N 遺伝子は、ゲノムのカプシド形成を司っているヌクレオカプシドタンパク質をコード

10

20

30

40

50

している一方で、P（リンタンパク質）およびL（大）コード配列は、RNA依存性RNAポリメラーゼのサブユニットを特定する。マトリックスタンパク質（M）は、ビリオン成熟を促進し、ウイルス粒子の内部表面を裏打ちしている。VSVは、細胞付着タンパク質として役割を果たし、膜融合を媒介し、中和抗体の標的である、単一の外被糖タンパク質（G）をコードしている。

#### 【0004】

VSVは、数々の特性により、これがヒトで使用するための免疫原性組成物におけるベクターとして魅力的な候補となるため、ますますの集中的な研究および開発の努力の主題となっている（Bukreyevら、J. Virol. 80: 10293~306、2006、Clarkeら、Springer Semin Immunopathol. 28: 239~253、2006）。これらの特性には、1）VSVはヒトの病原体でないこと、2）ヒトにおけるその使用を妨害し得る既存の免疫がわずかしかな存在しないこと、3）VSVは多くの細胞種に容易に感染すること、4）免疫原性組成物の製造に適した細胞系中で効率的に繁殖すること、5）遺伝的に安定している、6）組換えウイルスを産生することができる方法が存在すること、7）VSVは、1つまたは外来遺伝子挿入物を許容し、感染の際に高い発現レベルを誘導できること、ならびに8）VSV感染は、細胞性および液性免疫の両方の効率的な誘導因子であることが含まれる。逆遺伝学方法（Lawsonら、Proc Natl Acad Sci USA、92: 4477~81、1995、Schneillら、EMBO J、13: 4195~203、1994）が開発された後、これにより組換えVSV（rVSV）を設計することが可能となり、最初のベクターは、必須の遺伝子間転写制御エレメントと共に、外来コード配列がGおよびL遺伝子の間に挿入されて設計された（図1）。これらのプロトタイプベクターは、外来抗原に対して強力な免疫応答を誘発し、それらを試験した動物モデルにおいて良好に許容されたことが見出された（Grigeraら、Virus Res、69: 3~15、2000、Kahnら、J. Virol、75: 11079~87、2001、Robertsonら、J. Virol、73: 3723~32、1999、Robertsonら、J. Virol、72: 4704~11、1998、Roseら、Cell、106: 539~49、2001、Roseら、J. Virol、74: 10903~10、2000、Schlenderethら、J. Virol、74: 4652~7、2000）。注目すべきことに、Roseらは、一方がHIV-1 envをコードしており、他方がSIV gagをコードしている2つのベクターの同時投与により、免疫化したマカクにおいて、病原性SHIVを用いた誘発に対して保護した免疫応答が生じたことを見出している（Roseら、Cell、106: 539~49、2001）。

#### 【0005】

プロトタイプウイルスによる有望な前臨床性能により、ヒトで使用するためのrVSVベクターの開発がもたらされた（Clarkeら、Springer Semin Immunopathol、28: 239~253、2006）。高度に弱毒化したベクターの調査は、増強した安全性プロフィールを提供し得るため、相当な注目を受けている。このことは、検討中の多くの免疫原性組成物は、易感染性の免疫系を有する患者（すなわち、HIVに感染した対象）において使用する可能性があるため、特に関連性がある。

#### 【0006】

高度に弱毒化したベクターを開発する要望は、繁殖欠損rVSVベクターに一部の注目を集中させている。理想的には、繁殖欠損ベクターは、感染後のウイルスの繁殖および伝播を遮断する遺伝的欠陥を有するが、遺伝子発現装置を最小限にしか妨害せず、保護的免疫応答を誘導するために十分な抗原合成を可能にして、設計する。この目的を念頭に置いて、繁殖欠損rVSVベクターは、ウイルス付着タンパク質であるVSV G（G、図2）の操作を通して生成されている。G遺伝子が完全に欠失している（VSV-G）、または切断されて細胞外ドメインのほとんどを欠くGタンパク質をコードしている（VSV-G stem）、様々な抗原および分子アジュバントをコードしているベクターが開発されている（Clarkeら、Springer Semin Immunopathol

、28:239~253、2006)、Kahnら、J Virol、75:11079~87、2001、Klasら、Vaccine、24:1451~61、2006、Klasら、Cell Immunol、218:59~73、2002、Majidら、J Virol、80:6993~7008、2006、Publicoverら、J Virol、79:13231~8、2005)(Wyethの未公開データ)。VSV-G systemおよびVSV-Gなどの繁殖欠損ベクターは、機能的な付着タンパク質をコードしておらず、Gタンパク質を発現する細胞内にパッケージングする必要がある。

#### 【0007】

GおよびG systemベクターは有望であるが、ヒトに投与するための免疫原性組成物の製造を管理している規制に準拠した拡張可能な繁殖方法の開発が、依然として、臨床評価を正当化できる前に対処しなければならないハードルである。実行可能な産生方法は、感染性ウイルス粒子の形態形成または「パッケージング」を刺激するために、十分な量の機能的なGタンパク質をトランスで提供する必要がある。満足できるレベルのGタンパク質発現の達成は、Gが、膜融合を媒介することが部分的な原因で、細胞系に毒性があるという事実によって複雑となっている(RoseおよびWhitt、Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication、Fields Virology、第4版、第1巻、Lippincott Williams and Wilkins、1221~1244、2001)。この毒性により、ウイルス糖タンパク質を構成的に発現する補完細胞系が開発が妨げられる。同様に、誘導性プロモーターからGタンパク質を発現する安定な細胞系が開発は、漏出發現頻度が毒性をもたらし、また、特に免疫原性組成物の製造に必要なスケールでは、誘導後に達成されるレベルは、多くの場合効率的なパッケージングを促進するためには不十分であるため、問題がある。1つの誘導性細胞系が記載されているが(Schnellら、Cell、90:849~57、1997)、これは、しばしば、数継代後にGタンパク質を発現するその能力を失い、また、ヒトに投与するための免疫原性組成物の産生に現在適格な細胞種ではないBHK細胞に由来する。形質移入したBHK(Majidら、J Virol、80:6993~7008、2006)もしくは293T(Takadara、Proc Natl Acad Sci USA、94:14764~9、1997)細胞または電気穿孔したVero細胞(Witkoら、J Virol Methods、135:91~101、2006)におけるGタンパク質の一過性の産生も、繁殖欠損VSVの繁殖に使用されている。

#### 【0008】

本発明以前には、一過性Gタンパク質発現は、前臨床研究に必要な、比較的小スケールの量のrVSV-GおよびrVSV-G systemベクターを産生するために十分であることが証明された。しかし、公開された手順は、ヒトで使用するための産生に適格でない細胞系(すなわちBHK)を日常的に利用するか、または、プロトコルが大スケールでの製造に適応および最適化されていないため、これらの以前の方法は、現在臨床開発に不十分である。さらに、これらの以前の方法を用いたウイルス粒子の観察された収量は、一般に $1 \times 10^7$  IU/ml未満であり(データ示さず)、単一のヒト用量は少なくとも $1 \times 10^7$  IU/mlであることが予測されることを考慮すると、VSVベクターの製造は、培地1mlあたり $10^7$  IUより多くが産生される場合にのみ実用的である。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

したがって、回収される弱毒化したVSV粒子の収量が、免疫原性組成物の製造において有用であるために十分である、弱毒化したVSV粒子を産生する方法が当分野で必要である。また、そのような方法は、ヒトに投与するための産生に適格な細胞を用いる。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス(VSV)を産生する方法

10

20

30

40

50



を提供する。この方法は、最適化したVSV G遺伝子を含むプラスミドベクターを細胞内に導入することと、前記最適化したVSV G遺伝子からVSV Gタンパク質を発現させることと、VSV Gタンパク質を発現する細胞を弱毒化したVSVに感染させることと、感染した細胞を培養で成長させることと、弱毒化したVSVを培養物から回収することとを含む。本方法の一部の実施形態では、弱毒化したVSVは繁殖欠損VSVである。

#### 【0011】

上述の方法の一実施形態では、感染ステップは、最適化したVSV G遺伝子からVSV Gタンパク質を発現する細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入した細胞と同時培養することを含む。本方法の特定の実施形態では、細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持プラスミドでさらに形質移入する。一部の好ましい実施形態では、電気穿孔によって細胞を形質移入する。

10

#### 【0012】

本発明は、細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス(VSV)を産生するさらなる方法を提供する。この方法は、細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入することと(たとえば電気穿孔によって)、形質移入した細胞を培養で成長させることと、弱毒化したVSVを培養物から救済することと、最適化したVSV G遺伝子によってコードされているVSV Gタンパク質を発現する細胞を、救済された弱毒化したVSVに感染させることと、感染した細胞を培養で成長させることと、弱毒化したVSVを感染した細胞の培養物から回収することとを含む。特定の実施形態では、ウイルス救済細胞を、VSV Mタンパク質をコードしている支持プラスミドでさらに形質移入する。本方法の一部の実施形態では、弱毒化したVSVは繁殖欠損VSVである。

20

#### 【0013】

また、本発明は、繁殖欠損水疱性口内炎ウイルス(VSV)のパッケージングを改善する方法も提供する。この方法は、最適化したVSV G遺伝子をコードしているプラスミドベクターを細胞内に導入することと(たとえば形質移入によって)、最適化したVSV G遺伝子からVSV Gタンパク質を一過的に発現させることと、繁殖欠損VSVを、VSV Gタンパク質を一過的に発現する細胞内に導入することと、細胞を培養で成長させることと、パッケージングされたVSVを培養物から回収することとを含む。繁殖欠損VSVは、たとえば、そのような細胞を繁殖欠損VSVに感染させることによって、VSV Gタンパク質を一過的に発現する細胞内に導入し得る。一部の実施形態では、この感染は、VSV Gタンパク質を発現する細胞を、繁殖欠損VSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入した(たとえば電気穿孔によって)細胞と同時培養することによって達成する。特定の実施形態では、細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持プラスミドでさらに形質移入する。

30

40

#### 【0014】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、適格な産生細胞である細胞を用いる。一部の実施形態では、適格な産生細胞はVer o細胞である。

#### 【0015】

本発明の方法の一部の実施形態では、ウイルスゲノムの長さのRNAは、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドから転写される。一

50

部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、転写終結配列に作動可能に連結している。一部のさらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、リボザイム配列に作動可能に連結している。

【0016】

本発明の方法の一部の好ましい実施形態では、DNA依存性RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼであり、ウイルスcDNA発現ベクターおよび支持プラスミドはT7プロモーターの制御下にある。

【0017】

本発明の方法の特定の実施形態では、支持プラスミドによってコードされているVSV Gタンパク質は、最適化されていないVSV G遺伝子によってコードされている。他の実施形態では、支持プラスミドによってコードされているVSV Gタンパク質は、最適化したVSV G遺伝子によってコードされている。

10

【0018】

本発明の方法の一部の実施形態では、最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現は、サイトメガロウイルスに由来するRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある。本発明の方法の一部のさらなる実施形態では、最適化したVSV G遺伝子からのVSV Gタンパク質の発現は、機能的なmRNAを産生するRNAポリメラーゼIIによって認識される転写単位の制御下にある。

【0019】

特定の実施形態では、本発明の方法で用いる最適化したVSV G遺伝子は、インディアナ型 (Indiana) VSV血清型またはニュージャージー型 (New Jersey) VSV血清型に由来する。一部の実施形態では、本発明の方法で用いる最適化したVSV G遺伝子は、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される。

20

【0020】

一部の実施形態では、本発明の方法によって産生される弱毒化したVSVは、異種抗原をコードしている。異種抗原は、たとえば病原体由来であり得る。一部の実施形態では、病原体は、それだけには限定されないが、麻疹ウイルス、サブグループAおよびサブグループBの呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、1型または2型のヒトパピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エプスタインバーウイルス、フィロウイルス、ブンヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルスおよびトラコーマ病原体 (Chlamydia trachomatis) から選択され得る。

30

【0021】

本発明の方法の一部の実施形態では、弱毒化したVSVは、サイトカイン、T-ヘルパーエпитープ、制限部位マーカー、または哺乳動物宿主において免疫応答を誘発することができる微生物病原体もしくは寄生生物のタンパク質から選択される、非ウイルス分子をさらにコードしている。

【0022】

本発明の方法の一実施形態では、弱毒化したVSVはVSV Gタンパク質を欠く (VSV-G)。特定の実施形態では、本発明の方法を用いたVSV-Gの収量は、約  $1 \times 10^6$  IU / 培養物 1 ml を超える。

40

【0023】

本発明の方法の一部の他の実施形態では、弱毒化したVSVは、切断された細胞外ドメインを有するGタンパク質を発現する (VSV-G stem)。特定の実施形態では、本発明の方法を用いたVSV-G stemの収量は、約  $1 \times 10^6$  IU / 培養物 1 ml を超える。

【0024】

本発明の方法の一部のさらなる実施形態では、弱毒化したVSVは、切断された細胞質尾部 (CT) 領域を有するGタンパク質を発現する。特定の実施形態では、弱毒化したV

50

S V は、1 個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有する G タンパク質 ( G - C T 1 ) を発現する。他の特定の実施形態では、弱毒化した V S V は、9 個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有する G タンパク質 ( G - C T 9 ) を発現する。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法のさらなる実施形態では、弱毒化した V S V は、ウイルスゲノム中のその野生型の位置から下流に転座している V S V N 遺伝子を含み、それによって V S V N タンパク質発現が低下している。本発明の方法のさらなる実施形態では、弱毒化した V S V は非細胞変性 M 遺伝子突然変異 ( M n c p ) を含有し、前記突然変異は、内部 A U G でタンパク質合成を開始すること、I F N 誘導に影響を与えること、核輸送に影響を与えること、またはその組合せによって、M タンパク質の m R N A から発現される 2 つの重複するインフレームのポリペプチドの発現を低下させる。

10

【 0 0 2 6 】

さらに、本発明は、薬学的に許容できる担体中に、本発明の方法のいずれかに記載のように産生した、免疫原性的に有効な量の弱毒化した V S V を含む免疫原性組成物も提供する。免疫原性組成物の一部の実施形態では、弱毒化した V S V は異種抗原をコードしている。

【 0 0 2 7 】

また、本発明は、弱毒化した水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) を細胞培養物中で産生するための組成物も提供する。組成物は、最適化した V S V G 遺伝子を含むベクターと、弱毒化した V S V のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドと、D N A 依存性 R N A ポリメラーゼをコードしているベクターとを含む。別の実施形態では、組成物は、N タンパク質、P タンパク質、L タンパク質、M タンパク質、および G タンパク質から選択される V S V タンパク質をコードしている 1 つまたは複数の支持ベクターをさらに含む。

20

【 0 0 2 8 】

組成物の一部の実施形態では、弱毒化した V S V のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドによってコードされている D N A 依存性 R N A ポリメラーゼは、T 7 R N A ポリメラーゼである。一部のさらなる実施形態では、前記ポリヌクレオチドは、繁殖欠損 V S V のゲノムまたはアンチゲノムをコードしている。

【 0 0 2 9 】

また、本発明は、弱毒化した水疱性口内炎ウイルス ( V S V ) を細胞培養物中で産生するためのキットも提供する。キットは、最適化した V S V G 遺伝子を含むベクターを少なくとも含む。

30

【 0 0 3 0 】

キットは、弱毒化した V S V のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含むウイルス c D N A 発現ベクターと、D N A 依存性 R N A ポリメラーゼをコードしているベクターとをさらに含有し得る。一部の実施形態では、D N A 依存性 R N A ポリメラーゼは T 7 R N A ポリメラーゼである。特定の実施形態では、キットは、N タンパク質、P タンパク質、L タンパク質、M タンパク質、および G タンパク質から選択される V S V タンパク質をコードしている 1 つまたは複数の支持ベクターをさらに含む。

40

【 0 0 3 1 】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、天然の V S V G タンパク質のコード配列 ( インディアナ血清型 ) であり、

配列番号 2 は、天然の V S V G タンパク質のコード配列 ( ニュージャージー血清型 ) であり、

配列番号 3 は、コドン最適化した V S V G タンパク質のコード配列 ( o p t 1、インディアナ血清型 ) であり、

配列番号 4 は、R N A を最適化した V S V G タンパク質のコード配列 ( R N A o p t、インディアナ血清型 ) であり、

50

配列番号 5 は、RNA を最適化した V S V G タンパク質のコード配列 (RNA opt、ニュージャージー血清型) であり、

配列番号 6 は、野生型 V S V G タンパク質の細胞質ドメインである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0032】

【図 1】水疱性口内炎ウイルス (V S V) の RNA ゲノムの模式図を示す図である。V S V ゲノムは、ヌクレオカプシド (N)、リンタンパク質 (P)、マトリックスタンパク質 (M)、糖タンパク質 (G) および大タンパク質 (L) をコードしている。

【図 2】本発明の方法で使用するために適切な、繁殖欠損 V S V ベクターの例 (V S V - G s t e m および V S V - G) の模式図を示す図である。H I V G a g コード配列を外来遺伝子の例として使用している。

【図 3】本明細書中に記載の RNA 最適化方法によって得られた、インディアナ血清型の V S V G タンパク質のコード配列を示す図である。小文字は、最適化中に行った置換を示す。X h o I (5') 制限部位 (すなわち c t c g a g) および X b a I (3') 制限部位 (すなわち t c t a g a) を最適化中に付加した。E c o R I (5') 制限部位 (すなわち g a a t t c) は最適化後に付加した。翻訳された V S V G タンパク質に対応する RNA を最適化した V S V G 遺伝子 (インディアナ) の領域は、配列番号 4 によって表される。

【図 4】本明細書中に記載の RNA 最適化方法によって得られた、ニュージャージー血清型の V S V G タンパク質のコード配列を示す図である。小文字は、最適化中に行った置換を示す。X h o I (5') および X b a I (3') 制限部位を最適化中に付加した。E c o R I (5') 制限部位は最適化後に付加した。翻訳された V S V G タンパク質に対応する RNA を最適化した V S V G 遺伝子 (ニュージャージー) の領域は、配列番号 5 によって表される。

【図 5】本明細書中に記載のコドン最適化方法 (最適化 1) によって得られた、インディアナ血清型の V S V G タンパク質のコード配列を示す図である。X h o I (5') 制限部位 (すなわち c t c g a g) および X b a I (3') 制限部位 (すなわち t c t a g a) を最適化中に付加した。V S V G タンパク質のアミノ酸配列 (インディアナ血清型) を、Seq Web 配列解析スイート (Accelrys, Inc.) 中に提供されるヒトコドン頻度表を用いて逆翻訳した。A T G 翻訳開始シグナル (四角で囲み、K o z a k、J Biol Chem、266:19867~70、1991)、および翻訳ターミネーター (二重下線、K o c h e t o v ら、F E B S L e t t、440:351~5、1998) の配列構成を示す。スプライシング部位のコンセンサスとの類似度を低下させるために、下線で示すように 4 個のコドンを変更した。変更したコドンは以下のとおりであった: 190 の C A G から C A A (アクセプター部位)、277 の C G C から C G G (ドナー部位)、400 の C A G から C A A (アクセプター部位)、および 625 の A C C から A C G (アクセプター部位)。翻訳された V S V G タンパク質に対応するコドンを最適化した V S V G 遺伝子 (インディアナ) の領域は、配列番号 3 によって表される。

【図 6】パネル A は、CMV プロモーターおよびエンハンサーによって制御される、V S V G タンパク質 (インディアナ血清型) をコードしているプラスミドベクターの模式図である。p C M V - G i n は、天然の V S V 膜糖タンパク質 (G i n) の遺伝子を含む一方で、p C M V - G i n / O p t - 1 および p C M V - G i n / R N A o p t は、本明細書中に記載のコドンを最適化する (O p t - 1) または RNA を最適化する (R N A o p t) 方法のどちらかによってそれぞれ得られた、最適化した V S V G 遺伝子を含む。パネル B は、V e r o 細胞を、p C M V - G i n / O p t 1 (それぞれレーン 2 および 7)、p C M V - G i n / R N A o p t (それぞれレーン 3 および 8)、または p C M V - G i n (それぞれレーン 1 および 6) を用いて電気穿孔した 24 時間および 72 時間における、抗 V S V ポリクローナル抗血清を用いた G タンパク質発現のウエスタンブロット分析を示す図である。偽形質移入した V e r o 細胞 (陰性対照) の 24 時間および 72 時間で

10

20

30

40

50

のVSVタンパク質発現をそれぞれレーン4および9に示し、VSVに感染したVero細胞（陽性対照）のそれを、それぞれレーン5および10に示す。

【図7】図の上部は、CMVプロモーターおよびエンハンサーによって制御される、インディアナ血清型に由来するVSV Gタンパク質（G<sub>in</sub>）をコードしているプラスミドベクターの模式図であり、pCMV-G<sub>in</sub>は、天然のVSV膜糖タンパク質（G<sub>in</sub>）の遺伝子を含み、pCMV-G<sub>in</sub>/Opt-1およびpCMV-G<sub>in</sub>/RNAoptは、本明細書中に記載のコドン最適化（Opt-1）およびRNA最適化（RNAopt）方法によってそれぞれ得られた、最適化したVSV G遺伝子を含む。図の下部のグラフは、天然のVSV糖タンパク質G<sub>in</sub>のコード配列（1）、本明細書中に記載のOpt-1方法によって得られた、最適化したVSV G<sub>in</sub>遺伝子（2）または本明細書中に記載のRNA Opt方法によって得られた、最適化したVSV G<sub>in</sub>遺伝子（3）を含めたG発現プラスミドを用いて電気穿孔した細胞から得られた、rVSV-Gag1-G（斜線のバー）またはrVSV-Gag1-Gstem（ベタのバー）のパッケージング収量の比較を示すグラフである。

【図8】ニュージャージー血清型（G<sub>nj</sub>）またはインディアナ血清型（G<sub>in</sub>）に由来する、天然のまたは最適化したVSV Gタンパク質のコード配列の一過性発現の比較を示すウエスタンブロット分析の図である。分析は、Vero細胞を、pCMV-G<sub>in</sub>（それぞれレーン3および4）、pCMV-G<sub>in</sub>/RNAopt（それぞれレーン5および6）、pCMV-G<sub>nj</sub>（それぞれレーン8および9）、ならびにpCMV-G<sub>nj</sub>/RNAopt（それぞれレーン10および11）を用いて電気穿孔した24時間および48時間に、抗VSVポリクローナル抗血清を用いて行った。Vero偽形質移入細胞（陰性対照）のVSVタンパク質発現をレーン2および7に示し、Vero-VSVに感染した細胞（陽性対照）のそれを、レーン1に示す。

【図9】図のパネルAは、ニュージャージー血清型（G<sub>nj</sub>）またはインディアナ血清型（G<sub>in</sub>）に由来する天然のまたは最適化したVSV Gタンパク質のコード配列をコードしているプラスミドベクターの模式図である。パネルBは、パネルAに示すGタンパク質発現ベクターを用いて電気穿孔した細胞から得られたrVSV-Gstem-gag1のパッケージング収量の比較を示す図であり、pCMV-G<sub>in</sub>（a）、pCMV-G<sub>in</sub>/RNAopt（b）、pCMV-G<sub>nj</sub>（c）、およびpCMV-G<sub>nj</sub>/RNAopt（d）に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0033】

定義

明細書および特許請求の範囲で使用する単数形「a」、「an」および「the」には、内容により明らかにそうでないと指示される場合以外は、複数形の言及が含まれる。たとえば、用語「細胞」には、その混合物を含めた複数の細胞が含まれる。

【0034】

本明細書中で使用する用語「含む」とは、組成物および方法が列挙した要素を含むことを意味するが、他の要素を排除しないことを意図する。

【0035】

本明細書中で使用する用語「弱毒化したウイルス」などとは、*in vitro*または*in vivo*で成長または複製するその能力において制限されているウイルスをいう。

【0036】

用語「ウイルスベクター」などとは、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のいずれかで宿主細胞内に送達するポリヌクレオチドが含まれる、組換えによって産生したウイルスまたはウイルス粒子をいう。

【0037】

本明細書中で使用する用語「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを意味し、DNA分子ならびにHnRNAおよびmRNA分子のセンスおよびアンチセンス鎖の両方を含めた対応するRN

A分子が含まれ、cDNA、ゲノムDNAおよび組換えDNA、ならびに完全にまたは部分的に合成のポリヌクレオチドが包含される。HnRNA分子はイントロンを含有し、一般に1対1の様式でDNA分子に対応する。mRNA分子は、イントロンを切り出したHnRNAおよび/またはDNA分子に対応する。ポリヌクレオチドは、遺伝子全体、またはその任意の一部分からなり得る。作動可能なアンチセンスポリヌクレオチドは対応するポリヌクレオチド断片を含む場合があり、したがって、「ポリヌクレオチド」の定義には、すべてのそのような作動可能なアンチセンス断片が含まれる。アンチセンスポリヌクレオチドおよびアンチセンスポリヌクレオチドに關与する技術は当分野で周知であり、たとえば、Robinson-Benionら、「Antisense technique」、Methods in Enzymol. 254:363~375、1995、およびKawasakiら、Artific. Organs、20:836~848、1996に記載されている。

10

**【0038】**

本明細書中で使用する「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAへと転写され、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳されるプロセスをいう。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合は、適切な真核宿主が選択された場合、発現にはmRNAのスプライシングが含まれ得る。

**【0039】**

用語「一過性発現」、「一過的に発現された」などとは、タンパク質またはRNA種を発現させる目的で細胞によって取り込まれるように、クローニングした遺伝子が細胞内に導入されることを意味することを意図し、発現は時間と共に減衰し、遺伝しない。形質移入は、クローニングしたDNAを細胞内に導入する一手法である。DNAを細胞内に導入するために有用な形質移入剤には、たとえば、リン酸カルシウム、リボソーム、DEAEデキストラン、および電気穿孔が含まれる。

20

**【0040】**

用語「構成的発現」、「構成的に発現された」などとは、遺伝子産物の定発現を意味する。

**【0041】**

用語「誘導可能な発現」とは、誘導性プロモーターからの遺伝子産物の発現を意味する。たとえば、誘導性プロモーターは、化学誘導因子または熱に応答して遺伝子産物の発現を促進し得る。

30

**【0042】**

本明細書中で使用する用語「プロモーター」とは、RNAポリメラーゼの結合部位として役割を果たす遺伝子の5'末端から短い距離の調節領域をいう。

**【0043】**

本明細書中で使用する用語「エンハンサー」とは、隣接プロモーターからの転写のレベルを上昇させることができるシス調節配列をいう。

**【0044】**

用語「作動可能に連結している」とは、記載した構成要素が、その通常の機能が行われるように構成されている、エレメントの配置をいう。一部の例では、用語「作動可能に連結している」とは、一方の機能が他方によって影響を受けるように、単一の核酸断片上で2つ以上の核酸断片が会合していることをいう。たとえば、プロモーターは、調節タンパク質および適切な酵素が存在する場合、そのコード配列の発現に影響を与えることができる場合に、コード配列に作動可能に連結している。一部の例では、特定の制御エレメントは、その発現を誘導するように機能する限りは、コード配列と連続している必要はない。たとえば、介在性の非翻訳であるが転写される配列がプロモーター配列とコード配列との間に存在することができ、プロモーターはそれでもコード配列に「作動可能に連結している」とみなすことができる。したがって、コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAへと転写し、これが、その後、トランスRNAスプライシングされ、コード配列によってコードされているタンパク質へと翻訳される場合に、細胞中で転写および翻

40

50

訳制御配列に「作動可能に連結している」。別の例として、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの転写が転写終結配列によって終結されることができるときに、転写終結配列に作動可能に連結している場合がある。さらに別の例として、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの転写がリボザイム配列での切断に影響を与える場合に、リボザイム配列に作動可能に連結している場合がある。

#### 【0045】

用語「抗原」とは、動物において抗体もしくはT細胞応答、または両方の生成を刺激することができる化合物、組成物、または免疫原性物質をいい、動物に注射または吸収された組成物が含まれる。免疫応答は、全分子に対して、または分子の一部（たとえば、エピトープもしくはハプテン）に対して生じさせ得る。この用語は、個々の巨大分子または抗原性巨大分子の同種もしくは異種の集団をいうために使用し得る。抗原は、特異的な液性および/または細胞性免疫の産物と反応する。用語「抗原」には、タンパク質、ポリペプチド、抗原性タンパク質断片、核酸、オリゴ糖、多糖類、有機または無機の化学物質または組成物などを含めた部分が、広く包含される。用語「抗原」には、すべての関連する抗原性エピトープが含まれる。所定の抗原のエピトープは、当分野で周知の任意の数のエピトープマッピング技術を用いて同定することができる。たとえば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻（Glenn E. Morris編、1996）Human a Press、ニュージャージー州Totowaを参照されたい。たとえば、直鎖状エピトープは、たとえば、タンパク質分子の部分に対応する多数のペプチドを固体担体上で同時に合成し、ペプチドが支持体に付着しているままでペプチドを抗体と反応させることによって、決定し得る。そのような技術は当分野で知られており、たとえば、すべてその全体で本明細書中に参考として組み込まれている、米国特許第4,708,871号、Geysenら、(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:3998~4002、Geysenら、(1986) Molec. Immunol. 23:709~715に記載されている。同様に、立体構造エピトープは、たとえば、X線結晶構造解析および二次元核磁気共鳴などによって、アミノ酸の空間的な立体構造を決定することによって同定する。たとえば、Epitope Mapping Protocols、上記を参照されたい。さらに、本発明の目的のために、「抗原」とは、タンパク質が免疫学的応答を誘発する能力を維持している限りは、天然の配列への、欠失、付加および置換などの修飾（一般に保存的な性質であるが、非保存的であり得る）が含まれるタンパク質をいう。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発、もしくは特定の合成手順、もしくは遺伝子操作手法などによる意図的なものであってよく、または、抗原を産生する宿主の突然変異などによる偶発的なものであってもよい。さらに、抗原は、任意のウイルス、細菌、寄生生物、原虫、または真菌に由来またはそれから得ることができ、全生物であり得る。同様に、核酸免疫化用途などにおける、抗原を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドも、この定義内に含まれる。合成抗原、たとえば、ポリエピトープ、隣接するエピトープ、および他の組換えまたは合成によって誘導した抗原も含まれる（Bergmannら、(1993) Eur. J. Immunol. 23:2777~2781、Bergmannら、(1996) J. Immunol. 157:3242~3249、Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75:402~408、Gardnerら、(1998) 12th World AIDS Conference、スイスGeneva、1998年6月28日~7月3日）。

#### 【0046】

本明細書中で使用する用語「異種抗原」とは、抗原がその生物に由来しないか、またはその正常な位置もしくはその天然の形態でコードされていない、核酸配列にコードされている抗原である。

#### 【0047】

本明細書中で使用する用語「最適化したVSV G遺伝子」、「最適化したVSV Gコード配列」などとは、天然のGタンパク質オープンリーディングフレームと比較して増

10

20

30

40

50

加した量のVSV Gタンパク質の発現をもたらす、改変されたVSV Gタンパク質のコード配列をいう。

【0048】

本明細書中で使用する用語「Gタンパク質補完」とは、ウイルスを、補完細胞系、ヘルパーウイルス、形質移入または失われたG機能を提供する何らかの他の手段によって補完する方法をいう。

【0049】

本明細書中で使用する用語「成長させること」とは、様々な種類の培地上またはその中における、細胞の*in vitro*繁殖をいう。実験室での細胞の維持および成長は、生命を支持し、微生物汚染および機械的ストレスなどの損傷を与える影響を回避する環境を再現することを含む。細胞は、通常、培養容器（接着細胞にはフラスコもしくは皿または懸濁液中の細胞には常に動かすボトルもしくはフラスコなど）内の成長培地中で成長させ、一定の温度、湿度および気体組成を有する細胞インキュベーター内で維持した。しかし、培養条件は細胞種に応じて変動することができ、また、細胞の変化を誘導するために変更することができる。本明細書中で使用する「拡大」などとは、細胞の増殖または分裂を意味することを意図する。

10

【0050】

本明細書中で使用する用語「細胞」、「宿主細胞」などには、ベクターまたは外因性の核酸分子、ポリヌクレオチドおよび／もしくはタンパク質の取り込みのレシピエントであり得る、またはそうであった、任意の個々の細胞または細胞培養物が含まれることを意図する。また、単一の細胞の子孫も含まれることを意図する。しかし、子孫は、天然、偶発的、または意図的な突然変異が原因で、元の親細胞と必ずしも完全に同一でなくてもよい（形態学またはゲノムもしくは全DNA補体において）。細胞は原核または真核であってよく、それだけには限定されないが、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞（たとえば、ネズミ、ラット、サルまたはヒト）が含まれる。

20

【0051】

本明細書中で使用する用語「適格な産生細胞」とは、細胞が首尾よく適格となっており、ヒトで使用するための免疫原性組成物または遺伝子治療ベクターを産生するために使用されていることを意味する。そのような細胞の例には、たとえば、Ver o細胞、WI-38、PERC.6、293-ORF6、CHO、FRhLまたはMRC-5が含まれる。

30

【0052】

用語「細胞変性効果」または「CPE」とは、ウイルス感染が原因の、宿主細胞における任意の検出可能な変化として定義される。細胞変性効果は、細胞の円形化、混乱、腫脹または収縮、死滅、表面からの剥離などからなり得る。

【0053】

用語「感染多重度」または「MOI」とは、感染性因子（たとえばウイルス）対感染標的（たとえば細胞）の比である。

【0054】

VSVの「感染性クローン」または「感染性cDNA」とは、感染性ウイルスまたはサブウイルス粒子のゲノムを生じるための鋳型として役割を果たすことができるゲノムまたはアンチゲノムウイルスRNAへと転写されることができる、感染性ビリオン内に直接取り込まれることができる、合成または他の様式のcDNAまたはその産物、およびRNAを意味する。

40

【0055】

上述のように、VSVは多くの特徴を有し、それにより、これが免疫原性組成物の魅力的なベクターとなる。たとえば、VSVは、ヒトの病原体とみなされていない。また、VSVは細胞培養で安定して複製することができ、宿主細胞DNA内に組み込まれることも、遺伝的組換えを受けることもできない。さらに、複数のVSVの血清型が存在し、プライム-ブースト免疫化戦略の可能性が許容される。さらに、目的の外来遺伝子をVSVゲ

50



ノム内に挿入し、ウイルス転写酵素によって豊富に発現させることができる。さらに、ヒト集団におけるVSVに対する既存の免疫は稀である。

【0056】

本発明は、細胞培養物中で弱毒化した水疱性口内炎ウイルス(VSV)を産生する方法を提供する。本発明の方法は、弱毒化したVSVにGタンパク質補完を提供する。一部の実施形態では、Gタンパク質補完は、Gタンパク質を欠くまたは機能的でないGタンパク質を発現する弱毒化したVSVに、G機能を提供する。そのようなベクターは、Gタンパク質を発現する細胞内に「パッケージング」する必要がある。

【0057】

本発明の方法は、プラスミドDNAからのより高いレベルの一過性Gタンパク質発現の達成に基づいている。この方法は、 $1 \times 10^6$  IU/mlを超えて産生するGstемおよびGrVSVベクターの生成に適用されている。

10

【0058】

本発明の方法は、製造用に拡張可能である。一部の実施形態では、本発明の方法は、免疫原性組成物の産生の十分に特徴づけた基質であり、許可されているロタウイルスワクチン(Merck、RotaTeq(Rotavirus Vaccine, Live, Oral, Pentavalent)FDA、Online、投函日2006年、Sheets, R. (History and characterization of the Vero cell line)FDA、Online、投函日2000年)を産生するために使用されている、Vero細胞を用いる。

20

【0059】

一過性発現による遺伝子補完

本発明は、弱毒化したVSVのパッケージング手順を提供する。本発明の方法は、VSV-GおよびVSV-Gstемなどの繁殖欠損組換えVSVのパッケージングに適用されている。VSV-Gは、G遺伝子が完全に欠失しているベクターである一方で(Robertsら、J Virol、73:3723~32、1999)、VSV-Gstемは、G遺伝子が切断されて細胞外ドメインのほとんどを欠くGタンパク質をコードしているベクターである(VSV-Gstем、RobisonおよびWhitt、J Virol、74:2239~46、2000)。そのような事例では、失われたG機能を補償する手段としてGタンパク質の一過性発現を提供することに基づいたベクターのパッケージング手順は、いくつかの基準が満たされている限りは、VSVベクター候補のさらなる臨床開発を支援する。

30

【0060】

これらの基準には、とりわけ、すべての材料および手順が、ヒトに投与するための免疫原性組成物の産生を管理している規制に準拠しているべきであることがある。さらに、Gタンパク質発現プラスミドを細胞内に導入するために使用する方法は、製造に適応するために効率的かつ拡張可能であるべきである。さらに、Gタンパク質発現は、GstемまたはGベクターの効率的なパッケージングを促進するために十分であるべきである。また、ウイルス粒子の収量は、好ましくは、日常的に $1 \times 10^6$  IU/mlに達するまたはそれを超えるべきである。より好ましくは、ウイルス粒子の収量は、ほとんどの場合で日常的に $1 \times 10^7$  IU/mlに達するまたはそれを超えるべきである。本発明の組成物および方法はこれらの基準を満たす。

40

【0061】

本発明は、 $1 \times 10^7$  IU/mlが再現可能に得られる、拡張可能な一過性発現方法を提供する。候補VSVベクターの臨床開発に関して、一過性Gタンパク質発現は、安定な細胞系を利用する補完方法を越える2つの注目すべき利点を提供する。第1に、本発明の一過性発現方法は複数の細胞種に適応可能である。これにより、ベクター複製に許容される宿主であるべきである、細胞基質の選択に際して柔軟性が提供される。第2に、妥当性確認した細胞種は、大規模なさらなる認定または試験なしに、一過性発現に直接使用できる。安定な補完細胞系は、それを誘導した後に、産生で使用するための妥当性確認をする

50

ために、大規模な試験（すなわち、網羅的な偶発的薬剤の試験、核型分析、腫瘍原性の試験）を必要とする可能性が高い。

#### 【0062】

驚くべきことに、最適化したVSV G遺伝子を含むプラスミドからのGタンパク質の発現が、GおよびGstем繁殖欠損ベクターのどちらの収量も顕著に向上させたことが発見された。さらに、Gstемベクターの収量は、一般に、同等のGベクターと比較して著しく高かった。これらを合わせると、Ver o細胞の電気穿孔、最適化したVSV G発現プラスミド、およびGstемベクターを合わせた本発明の一実施形態は、収量を $1 \times 10^8$  IUと高く押し上げ、繁殖欠損VSVベクターを製造する実現可能な道が提供される。

10

#### 【0063】

上述のように、本発明のパッケージング方法は、繁殖欠損VSV GstемおよびGベクターの産生に有用であることが見出された。本発明の一過性Gタンパク質発現方法は、HIV gagをコードしているGstемベクターをパッケージングした場合に、 $1 \times 10^7$  IU/mlを超えて産生することができた。また、HIV gagをコードしているVSV Gベクターのパッケージングも、Gタンパク質発現の一過性方法で試験し、効率が下がることが見出されたが、それでも収量は一部の試験で $1 \times 10^7$  /mlを超えた。本発明のパッケージング方法を用いて $1 \times 10^7$  IU/mlを超える収量がどちらのベクターでも観察されたこと、およびこれがVer o細胞で達成されたことは、GstемおよびGベクターを製造スケールで産生することが可能なことを示している。

20

#### 【0064】

本発明によるVSV G補完の方法をVSV GstемおよびGベクターの産生に適用したが、本発明はこれらの実施形態に限定されない。たとえば、本発明の方法を他の弱毒化したVSV粒子の産生に適用することができる。様々な組換えVSVベクターの例は、本明細書中に提供されている。

#### 【0065】

さらに、その天然の付着タンパク質を欠く他の繁殖欠損パラミクソウイルスまたはラウドウイルスベクター（すなわち、センダイウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、パラインフルエンザウイルス、またはベシクロウイルス）は、本明細書中に記載の補完系を用いて、その表面上にVSV Gタンパク質を有してパッケージングし得る。実際、VSV Gタンパク質は、複製能力のある組換え麻疹ウイルスの付着タンパク質として機能することが示されており（Spielhoferら、J Virol、72:2150~9、1998）、このことは、これが繁殖欠損モルビリウイルスベクターのコンテキストでも同様に機能するはずであることを示している。また、VSV Gタンパク質は、レトロウイルス粒子を「偽型」にして、広範囲の細胞種の感染を媒介することができる付着タンパク質を提供するためにも幅広く使用されている（Croninら、Curr Gene Ther、5:387~98、2005、Yeeら、Methods Cell Biol、43 Pt A:99~112、1994）。本明細書中に記載の方法は、レトロウイルス粒子の産生に適応可能であるはずであり、VSV Gタンパク質を含むウイルス粒子の産生を顕著に単純化し、その収量を改善させ得る。

30

40

#### 【0066】

本発明の補完方法は、Ver o細胞におけるVSV Gタンパク質発現のために開発されているが、この技術は、他のウイルス、細胞種、および補完タンパク質に容易に適用可能であろう。本明細書中に記載した方法によりVSV Gの毒性性質が回避され、繁殖欠損VSVベクターの効率的なパッケージングが可能となったことは、特に注記するに値する。このことは、本方法が、トランスの毒性タンパク質の制御された発現を必要とする他の補完系に適応可能であろうことを示唆している。

#### 【0067】

水疱性口内炎ウイルスを回収する方法

本発明によるセグメント化されていないマイナス鎖RNAウイルスを回収するための一

50

般手順は、以下のように要約することができる。所望のウイルスゲノムのクローニングしたDNA均等物（プラス鎖、メッセージセンスである）を、適切なDNA依存性RNAポリメラーゼプロモーター（たとえば、T7、T3またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーター）と自己切断リボザイム配列（たとえばデルタ型肝炎リボザイム）との間に配置し、これを適切な転写ベクター（たとえば繁殖可能な細菌プラスミド）内に挿入する。この転写ベクターは、容易に操作可能なDNA鋳型を提供し、これから、RNAポリメラーゼ（たとえばT7 RNAポリメラーゼ）が、正確またはほぼ正確な5'および3'末端を有するウイルスアンチゲノム（またはゲノム）の一本鎖RNAコピーを忠実に転写することができる。ゲノムのウイルスDNAコピーならびに隣接するプロモーターおよびリボザイム配列の配向により、アンチゲノムまたはゲノムのRNA均等物のどちらが転写されるかが決定される。

10

#### 【0068】

また、本発明による新しいウイルス子孫の救済には、裸の一本鎖のウイルスアンチゲノムまたはゲノムRNA転写物を機能的なヌクレオカプシド鋳型内に包むために必要な、ウイルスに特異的なトランス作用性支持タンパク質も必要である。これらには、一般に、ウイルスヌクレオカプシド（N）タンパク質、ポリメラーゼ関連リンタンパク質（P）およびポリメラーゼ（L）タンパク質が含まれる。

#### 【0069】

機能的なヌクレオカプシドは、ゲノムの複製、すべてのウイルスmRNAの転写、およびウイルスタンパク質の蓄積の鋳型として役割を果たして、ウイルスのアセンブリおよび出芽を含めた、ウイルス複製サイクル中の後に続いて起こる事象を始動する。成熟ウイルス粒子は、感受性細胞におけるさらなる繁殖に必要なウイルスRNAポリメラーゼを含有する。

20

#### 【0070】

本発明は、弱毒化したVSVの回収を対象とする。救済に選択された特定の弱毒化したウイルスは、ウイルスのアセンブリおよび出芽のために、GおよびMなどの支持タンパク質の付加を必要とする。たとえば、弱毒化したVSVは、Gタンパク質全体（G）またはGタンパク質外部ドメインのほとんど（Gstem）をコードしている配列の欠失を含む、繁殖欠損VSVベクターであり得る。GおよびGstemは、どちらもin vivoで一次感染細胞を越えて伝播することができない。その結果、トランス補完するGタンパク質の存在下でのみ繁殖することができるウイルスがもたらされる。

30

#### 【0071】

また、典型的には、必ずしも排他的ではないが、セグメント化されていないマイナス鎖RNAウイルスの救済には、cDNAを含有する転写ベクターおよび支持タンパク質をコードしているベクターの転写を駆動するために、RNAポリメラーゼがウイルスcDNAを保有する宿主細胞中で発現されることも必要である。

#### 【0072】

本発明内では、弱毒化したVSVの救済は、典型的には、宿主細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含有するウイルスcDNA発現ベクター、VSVのN、P、LおよびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の支持プラスミド、ならびにT7 RNAポリメラーゼなどのDNA依存性RNAポリメラーゼをコードしているプラスミドで形質移入することを含む。ウイルス救済中に用いる支持プラスミドによってコードされているVSV Gタンパク質は、天然のVSV G遺伝子によってコードされていてもよい。しかし、ウイルス救済中に使用する支持プラスミドのVSV Gタンパク質が、最適化したVSV G遺伝子によってコードされていてもよいことも、十分に本発明の意図の範囲内にある。一部の実施形態では、細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持プラスミドでも形質移入する。形質移入した細胞を培養で成長させ、弱毒化したVSVを培養物から救済する。その後、救済された物質は、以下にさらに詳述するように、さらなるウイルス拡大のためにブランク拡大細胞と同時培養し得る。

40

50

## 【 0 0 7 3 】

ウイルス救済に使用する宿主細胞は、しばしば、さらなるウイルス拡大を支持するその能力が損なわれている。したがって、細胞培養物中で弱毒化したVSVを産生する方法には、典型的には、プラーク拡大細胞を救済された弱毒化したVSVに感染させることがさらに含まれる。本発明の一部の実施形態では、最適化したVSV G遺伝子によってコードされているVSV Gタンパク質を発現する細胞を、救済された弱毒化したVSVに感染させ、感染した細胞を成長させ、弱毒化したVSVを感染した細胞の培養物から回収する。

## 【 0 0 7 4 】

ウイルス救済の一部の実施形態では、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドは、cDNA発現ベクターからのRNA転写物の合成を誘導するための発現制御配列に作動可能に連結しているポリヌクレオチドが含まれる、ウイルスcDNA発現ベクターの形態で細胞内に導入する。一部の実施形態では、発現制御配列は適切なDNA依存性RNAポリメラーゼプロモーターである（たとえば、T7、T3またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーター）。

## 【 0 0 7 5 】

一部の実施形態では、支持プラスミドおよびウイルス救済中に使用するウイルスcDNA発現ベクターは、DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーターの制御下にある。たとえば、RNAポリメラーゼがT7 RNAポリメラーゼである実施形態では、支持プラスミドおよびウイルスcDNA発現ベクターは、好ましくはT7プロモーターの制御下にある。

## 【 0 0 7 6 】

一部の他の実施形態では、DNA依存性RNAポリメラーゼの発現は、サイトメガロウイルスに由来するRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある。前初期ヒトサイトメガロウイルス[hCMV]プロモーターおよびエンハンサーは、たとえば、本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第5,168,062号に記載されている。

## 【 0 0 7 7 】

一部の実施形態では、弱毒化したVSVをcDNAから回収する方法は、対象ウイルスのゲノムまたはアンチゲノムをコードしているウイルスcDNA発現ベクターを宿主細胞内に導入することと、RNAポリメラーゼをコードしており、その発現を誘導するポリメラーゼ発現ベクターを協調的に導入することを含む。このコンテキストにおいて有用なRNAポリメラーゼには、それだけには限定されないが、T7、T3、またはSP6ファージポリメラーゼが含まれる。また、宿主細胞は、ウイルスcDNA発現ベクターの協調的導入の前、その間、またはその後、ポリメラーゼ発現ベクター、ならびに宿主細胞における成熟した弱毒化したVSV粒子の産生に必要なN、P、L、MおよびG支持タンパク質も発現する。

## 【 0 0 7 8 】

典型的には、ウイルスcDNA発現ベクターおよびポリメラーゼ発現ベクターを、支持タンパク質をコードしており、その発現を誘導する1つまたは複数の追加の発現ベクターと共に、宿主細胞内に協調的に形質移入する。支持タンパク質は、救済するウイルスの野生型もしくは突然変異タンパク質であってよく、または、異種のセグメント化されていないマイナス鎖RNAウイルスの対応する支持タンパク質（複数可）から選択されてもよい。代替の実施形態では、追加のウイルスタンパク質、たとえば、ポリメラーゼ伸長因子（RSVにはM2-1など）、または、対象の方法および組成物内の回収を可能にするもしくは増強し得る、または他の所望の結果を提供し得る他のウイルスタンパク質を、宿主細胞中で同時発現させ得る。他の実施形態では、支持タンパク質のうちの1つまたは複数は、タンパク質（複数可）を宿主細胞中で構成的に発現させることによって、または、宿主細胞を、支持タンパク質（複数可）をコードしているヘルパーウイルスで同時感染させることによって、宿主細胞中で発現させ得る。

## 【 0 0 7 9 】

本発明のより詳細な態様では、ウイルス cDNA 発現ベクターは、cDNA 発現ベクターからのウイルス RNA 転写物の合成を誘導するための発現制御配列に作動可能に連結している VSV のゲノムまたはアンチゲノムをコードしているポリヌクレオチドを含む。ウイルス cDNA ベクターを、RNA ポリメラーゼならびに以下の VSV 支持タンパク質：N タンパク質、P タンパク質、L タンパク質、M タンパク質および G タンパク質を一過的に発現する宿主細胞内に導入する。RNA ポリメラーゼならびに N、P、L、M および G タンパク質のそれぞれは、1 つまたは複数の形質移入した発現ベクターから発現させ得る。多くの場合、RNA ポリメラーゼおよび支持タンパク質のそれぞれは、別々の発現ベクター、一般的には一過性発現プラスミドから発現される。適切な条件下で十分な時間の後、アセンブルされた感染性の弱毒化した VSV が宿主細胞から救済される。

10

#### 【0080】

cDNA を発現したゲノムまたはアンチゲノムから感染性の弱毒化した VSV 粒子を産生するために、ゲノムまたはアンチゲノムを、RNA 複製が可能なヌクレオカプシドを産生し、また、子孫に、RNA の複製および転写のどちらについてもコンピテントなヌクレオカプシドを与えるために必要なウイルスタンパク質で同時発現する。そのようなウイルスタンパク質には、N、P および L タンパク質が含まれる。本発明では、失われた G 機能を有する弱毒化した VSV ベクターも、G ウイルスタンパク質の付加を必要とする。さらに、生産的な感染のために M タンパク質も付加し得る。G および M ウイルスタンパク質は同時発現によって供給することができる。一部の実施形態では、ウイルス救済中に用いる VSV G 支持プラスミドは、最適化されていない VSV G 遺伝子を含む。しかし、他の実施形態では、以下に記載のように、ウイルス救済中に用いる VSV G 支持プラスミドは、最適化した VSV G 遺伝子を含む。

20

#### 【0081】

本発明の特定の実施形態では、転写し、複製するウイルスヌクレオカプシド（すなわち、L、P および N）を生じるために必要なタンパク質、ならびに M および G タンパク質をコードしている補完配列は、発現プラスミドによって提供される。他の実施形態では、そのようなタンパク質は、1 つまたは複数のヘルパーウイルスによって提供される。そのようなヘルパーウイルスは、野生型または突然変異体であり得る。特定の実施形態では、ヘルパーウイルスは、組換えウイルス cDNA によってコードされているウイルスとは、表現型で区別することができる。たとえば、ヘルパーウイルスとは免疫学的に反応するが、組換えウイルス cDNA によってコードされているウイルスと反応しないモノクローナル抗体を提供することが望ましい場合がある。そのような抗体は中和抗体であり得る。一部の実施形態では、抗体を、ヘルパーウイルスを組換えウイルスから分離するためのアフィニティークロマトグラフィーで 사용할 ことができる。そのような抗体の獲得を支援するために、突然変異をウイルス cDNA 内に導入して、糖タンパク質遺伝子などにおけるように、ヘルパーウイルスからの抗原性の多様性を提供することができる。

30

#### 【0082】

組換えウイルスゲノムまたはアンチゲノムは、たとえば、クローニングした cDNA セグメントをアセンブルして、全体として完全なゲノムまたはアンチゲノムを表すことによって、ウイルス mRNA またはゲノム RNA の逆転写されたコピーのポリメラーゼ連鎖反応など（PCR、たとえば、米国特許第 4,683,195 号および第 4,683,202 号、ならびに PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Innis ら編、Academic Press、San Diego、1990 に記載）によって、本発明で使用するために構築し得る。たとえば、適切なプロモーター（たとえば、T7、T3、または SP6 RNA ポリメラーゼプロモーター）にわたり、適切な発現ベクター（プラスミド、コスミド、ファージ、または DNA ウイルスベクターなど）中でアセンブルされた、アンチゲノムの左側末端を含む cDNA を含む、第 1 の構築体を作製し得る。ベクターは、アセンブリを容易にするために設計された唯一の制限部位を含む合成ポリリンカーの突然変異誘発および/または挿入によって、改変し得る。アンチゲノムプラスミドの右側末端は、隣接するリ

40

50

ボザイムおよび単一またはタンデム型の T7 転写ターミネーターなど、所望に応じて付加配列を含有し得る。リボザイムは、単一の非ウイルスヌクレオチドを含有する 3' 末端を与えるハンマーヘッド型であるか、または、デルタ型肝炎ウイルスのもの (Perrotta ら、Nature、350:434~436、1991) など、非ウイルスヌクレオチドを含まない 3' 末端を与える他の適切なリボザイムのうちの任意のものであり得る。

#### 【0083】

ウイルスゲノムまたはアンチゲノムをコードしている cDNA を構築するための代替手段には、サブユニット cDNA 構成要素の数を、わずか 1 個または 2 個の部分まで低下させるための、改善された PCR 条件を用いた逆転写 PCR が含まれる (たとえば、本明細書中に参考として組み込まれている Cheng ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:5695~5699、1994 に記載)。他の実施形態では、様々なプロモーターを使用することができる (たとえば、T3 または SPQ)。様々な DNA ベクター (たとえばコスミド) を繁殖に使用して、より大きなゲノムまたはアンチゲノムにより良好に適合することができる。

10

#### 【0084】

上述のように、定義された突然変異は、様々な慣用技術 (たとえばゲノムまたはアンチゲノムの cDNA コピー内への部位特異的突然変異誘発) によって、感染性ウイルスクローン内に導入することができる。完全なゲノムまたはアンチゲノム cDNA をアセンブルするために、本明細書中に記載のようにゲノムまたはアンチゲノム cDNA 細断片を使用することは、それぞれの領域を別々に操作できるという利点を有する一方で、小さな cDNA 構築体は、大きな cDNA 構築体よりも良好な操作の容易性をもたらし、その後、完全な cDNA 内に容易にアセンブルされる。

20

#### 【0085】

本発明の弱毒化したウイルスの特定のもは、組換えウイルスの成長の潜在性、複製能力、または感染力が制限されるように、構築または改変する。そのような弱毒化したウイルスおよびサブウイルス粒子はベクターおよび免疫原として有用であるが、他の場合で完全に感染性の (すなわち、ほぼ野生型の成長および / または複製能力のレベルを有する) ウイルスを宿主に投与した場合に伴う特定の危険性をもたらさない。弱毒化したとは、宿主細胞もしくは哺乳動物対象において成長または複製するその能力が制限されている、または他の様式で細胞内もしくは細胞間で感染および / もしくは繁殖するその能力が欠損している、ウイルスまたはサブウイルス粒子を意味する。例として、G および G stem は、繁殖欠損であるが複製能力を有する、弱毒化したウイルスである。多くの場合、弱毒化したウイルスおよびサブウイルス粒子は、本明細書中以下に詳述するように、「ベクター」として用いる。

30

#### 【0086】

したがって、弱毒化した VSV 粒子を産生するための様々な方法および組成物を提供する。より詳細な実施形態では、弱毒化したウイルスは、対応する野生型または親ウイルスの成長、複製および / または感染力と比較して実質的に損なわれた成長、複製および / または感染力の特徴を示す。このコンテキストでは、成長、複製、および / または感染力は、in vitro および / または in vivo で、野生型または親の成長、複製および / または感染力のレベルと比較して少なくとも約 10~20%、20~50%、50~75% および 95% まで、またはそれを超えて損なわれている場合がある。

40

#### 【0087】

一部の実施形態では、様々な度合の成長または複製の欠損を有するウイルスは、以下に詳述する組合せ熱ショック / T7 - プラスミド救済系を用いて救済し得る。例示的な株には、以下に記載の改変 (たとえば、C 末端 G タンパク質切断、または転座した遺伝子) が取り込まれている、VSV の高度に弱毒化した株が含まれる (たとえば、それぞれが本明細書中に参考として組み込まれている、Johnson ら、J. Virol. 71:5060~5078、1997、Schneill ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:11359~11365、1996、Schneill ら、Cell、9

50

0 : 8 4 9 ~ 8 5 7、1 9 9 7、R o b e r t s ら、J . V i r o l . 7 2 : 4 7 0 4 ~ 4 7 1 1、1 9 9 8、および R o s e ら、C e l l、1 0 6 : 5 3 9 ~ 5 4 9、2 0 0 1 を参照)。

#### 【0088】

弱毒化したウイルスのさらなる例を、以下にさらに詳述する。弱毒化したウイルスは、たとえば、異種抗原決定基を組換えベクターゲノムまたはアンチゲノム内に取り込ませることによって、「ベクター」として有用である。具体的な例では、麻疹ウイルス(MV)またはヒト免疫不全ウイルス(HIV)の糖タンパク質、糖タンパク質ドメイン、または1つもしくは複数の抗原決定基が、VSVベクターまたは「主鎖」内に取り込まれる。

#### 【0089】

調製を容易にするため、N、P、L、MおよびGウイルスタンパク質は、1つまたは複数の別々のベクター中でアセンブルすることができる。たとえば、プラスミド、コスミド、またはファージベクター、欠損ウイルスベクター、いわゆる「レプリコン」(たとえば、シンドビスまたはベネズエラウマ脳炎レプリコン)ならびに一過性および/または構造的な発現の誘導に有用な他のベクターを含めた、RNAポリメラーゼおよび支持タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを取り込み、その発現を誘導するのに有用な、多くの適切な発現ベクターが当分野で知られている。RNAポリメラーゼ、ならびに適用される場合はN、P、L、MおよびGタンパク質の一過性発現は、ポリメラーゼおよび/または支持ベクター(複数可)と共に作動可能に組み込まれた一過性発現制御エレメントによって誘導される。例示的な一実施形態では、RNAポリメラーゼの一過性発現制御エレメントは、前初期ヒトサイトメガロウイルス[hCMV]プロモーターおよびエンハンサーによって例示される、RNAポリメラーゼII調節領域である(たとえば米国特許第5,168,062号参照)。他の例示的な実施形態では、N、P、L、MおよびGタンパク質のうちの1つまたは複数の一過性発現制御エレメントは、T7プロモーターなどのDNA依存性RNAポリメラーゼプロモーターである。

#### 【0090】

ウイルスcDNA、一過的に発現されたRNAポリメラーゼ、ならびにN、P、L、MおよびGタンパク質をコードしているベクターは、形質移入、電気穿孔、機械的挿入、形質導入などを含めた、当分野で知られている様々な方法のうちの任意のものによって、適切な宿主細胞内に導入し得る。一部の好ましい実施形態では、対象ベクターは、電気穿孔によって細胞内に導入する。他の実施形態では、対象ベクターは、リン酸カルシウム媒介形質移入(Wiglerら、Cell、14:725、1978、Corsaroら、Somatic Cell Genetics、7:603、1981、Grahamら、Virology、52:456、1973)、電気穿孔(Neumannら、EMBO J、1:841~845、1982)、DEAE-デキストラン媒介形質移入(Ausubelら、(編)Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons, Inc.、NY、1987)、またはカチオン性脂質媒介形質移入(Hawley-Nelsonら、Focus、15:73~79、1993)によって培養細胞内に導入する。代替の実施形態では、細胞によるDNAの取り込みを増加させるために形質移入促進試薬を加える。これらの試薬の多くは当分野で知られている。LIPOFECTACE(登録商標)(Life Technologies、メリーランド州Gaithersburg)およびEFFECTENE(登録商標)(Qiagen、カリフォルニア州Valencia)が一般的な例である。これらの試薬は、DNAをコーティングし、細胞によるDNAの取り込みを増強する、カチオン性脂質である。LIPOFECTACE(登録商標)は、DNAを取り囲むリポソームを形成する一方で、EFFECTINE(登録商標)はDNAをコーティングするがリポソームを形成しない。DNAの取り込みを促進する別の有用な市販試薬は、LIPOFECTAMINE-2000(登録商標)(Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)である。

#### 【0091】

10

20

30

40

50

本発明内で使用するための適切な宿主細胞は、対象の弱毒化したVSVの生産的な感染を支援することができ、また、必須のベクターおよびウイルス産生を支援するために必要なそのコードされている産物の発現を可能にする。本発明の方法で使用するための宿主細胞の例を、以下にさらに詳述する。

#### 【0092】

本明細書中に提供する方法および組成物内では、RNAポリメラーゼベクター、ウイルスcDNAクローン、および支持ベクター（複数可）（たとえば、N、P、L、MおよびGタンパク質をコードしているプラスミド（複数可））の宿主細胞内への協調的導入は同時である。たとえば、対象DNAのすべてを単一のDNA形質移入（たとえば電気穿孔）混合物中で合わせ、宿主細胞培養物に同時に加えて協調的な形質移入を達成し得る。代替の実施形態では、対象のポリメラーゼおよび支持ベクターおよびウイルスcDNAベクターのうちの任意の2つ以上で、別々の形質移入を行い得る。典型的には、別々の形質移入は、近い時系列で実施して、有効な同時形質移入手順においてポリメラーゼおよび支持ベクターおよびウイルスcDNAベクターを協調的に導入する。1つのそのような協調的形質移入プロトコルでは、ウイルスcDNAならびに/またはN、P、L、MおよびG支持プラスミド（複数可）は、RNAポリメラーゼプラスミドの形質移入の前に宿主細胞内に導入する。他の実施形態では、ウイルスcDNAならびに/またはN、P、L、MおよびP支持プラスミド（複数可）は、RNAポリメラーゼプラスミドを細胞内に形質移入すると同時にまたはその後であるが、宿主細胞中でRNAポリメラーゼの実質的な発現が開始される前（たとえば、検出可能なレベルのT7ポリメラーゼが蓄積される前、またはT7プロモーターによって駆動されるプラスミドの発現を活性させるために十分なT7のレベルが蓄積される前）に、宿主細胞内に導入する。

#### 【0093】

一部の実施形態では、感染性の弱毒化したRNAウイルスを産生する方法は、組換えウイルスの回収を増加させるための宿主細胞の追加の熱ショック処理を含み得る。ウイルスcDNA発現ベクターのうちの1つまたは複数ならびにRNAポリメラーゼ、Nタンパク質、Pタンパク質、Lタンパク質、Mタンパク質およびGタンパク質をコードしている1つまたは複数の一過性発現ベクターを宿主細胞内に導入した後、宿主細胞を、組換えウイルスの回収を増加させる有効な熱ショック刺激に曝露し得る。

#### 【0094】

1つのそのような方法では、宿主細胞を、有効な熱ショック温度に、細胞の熱ショックを達成するために十分な時間曝露し、ひいてはこれが増強されたウイルス回収を刺激する。有効な熱ショック温度とは、対象ウイルスの救済を行うための、当分野で許容される、推奨されるまたは最適であるとみなされる温度よりも高い温度である。多くの場合では、有効な熱ショック温度は37℃よりも高い。本発明の改変した救済方法を有効な熱ショック温度で実施する場合は、温度上昇の非存在下で救済を行った場合の組換えウイルスの回収レベルを超える、所望の組換えウイルスの回収の増加がもたらされる。有効な熱ショック温度および曝露時間は、使用する救済系に応じて変動し得る。そのような温度および時間の変動は、選択されたウイルスまたは宿主細胞種の差異から生じる場合がある。

#### 【0095】

温度は変動し得るが、有効な熱ショック温度は、特定の組換えウイルスを用いていくつかの試験救済手順を実施し、温度および曝露時間の変動に伴った所望の組換えウイルスの回収の割合パーセンテージを確立することによって、容易に確認することができる。もちろん、救済を行うための任意の温度範囲の上限は、形質移入体の構成要素が破壊される、またはそれらが形質移入体中で機能する能力が枯渇もしくは減衰する温度である。本発明の本態様内で使用するための例示的な有効な熱ショック温度の範囲は、約37℃～約50℃、約38℃～約50℃、約39℃～約49℃、約39℃～約48℃、約40℃～約47℃、約41℃～約47℃、約41℃～約46℃である。多くの場合、選択された有効な熱ショック温度の範囲は約42℃～約46℃である。より具体的な実施形態では、約43℃、44℃、45℃または46℃の有効な熱ショック温度を用いる。



## 【 0 0 9 6 】

選択された有効な熱ショック温度または温度範囲を確立するための試験の実施において、熱ショック手順を実施する有効な時間も選択することができる。有効な熱ショック温度を適用するために十分な時間とは、上述のように温度上昇の非存在下で救済を行った場合の組換えウイルスの回収レベルを超える、所望の組換えウイルスの回収の検出可能な増加が存在するためにかかる時間である。有効な熱ショック時間は、選択されたウイルスおよび宿主細胞を含めた救済系に応じて変動し得る。時間は変動し得るが、有効な熱ショック温度を適用する時間の量は、特定の組換えウイルスを用いていくつかの試験救済手順を実施し、温度および時間の変動に伴った所望の組換えウイルスの回収の割合またはパーセンテージを確立することによって、容易に確認することができる。救済を行うための任意の時間変数の上限は、形質移入体の構成要素が破壊される、またはそれらが形質移入体中で機能する能力が枯渇もしくは減衰する時間の量である。熱ショック手順の時間の量は、組換えウイルスの回収の所望の増加が得られる限りは、数分間から数時間まで変動し得る。本発明の本態様内で使用するための例示的な有効な熱ショック時間は、約 5 ~ 約 5 0 0 分間、約 5 ~ 約 2 0 0 分間、約 1 5 ~ 約 3 0 0、約 1 5 ~ 約 2 4 0、約 2 0 ~ 約 2 0 0、約 2 0 ~ 約 1 5 0 分間である。多くの場合、有効な熱ショック時間は約 3 0 分間 ~ 約 1 5 0 分間である。

10

## 【 0 0 9 7 】

数々の手段を用いて、宿主細胞を有効な熱ショックに曝露することによる、組換えの弱毒化した V S V の改善された回収のレベルを決定することができる。たとえば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ( C A T ) レポーター遺伝子を用いて、既知の方法による組換えウイルスの救済を監視することができる。レポーター遺伝子の対応する活性により、ベースラインおよび組換えウイルスの改善された発現レベルが確立される。他の方法には、得られた組換えウイルスのプラークの数を検出し、救済されたウイルスの産生を配列決定によって検証することが含まれる。改善された回収を決定する 1 つの例示的な方法は、いくつかの同じように形質移入した細胞培養物を調製し、それらを熱ショックの様々な条件 ( 時間および温度の変数 ) に曝露し、その後、これらの培養物の回収値と対照細胞 ( たとえば、37 の一定温度で形質移入および維持した細胞 ) の対応する値とを比較することを含む。形質移入の 7 2 時間後、形質移入した細胞を、約 7 5 % コンフルエントな V e r o 細胞 ( または組換えウイルスのプラーク形成を決定するための選択された細胞種 ) の単層を含有する 1 0 c m のプレートに移し、プラークが可視となるまでインキュベーションを続ける。その後、プラークを計数し、対照細胞から得られた値と比較する。最適な熱ショック条件はプラークの数を最大にするはずである。

20

30

## 【 0 0 9 8 】

本発明のこれらの実施形態によれば、改善されたウイルス回収は、少なくとも約 1 0 % または 2 5 %、しばしば少なくとも約 4 0 % である。特定の実施形態では、有効な熱ショックへの曝露に起因する回収された組換えウイルスの増加は、観察または回収された組換えウイルスの量の 2 倍、5 倍、および 1 0 倍までまたはそれを超える増加によって反映される。

## 【 0 0 9 9 】

40

## プラーク拡大手順

本発明の一部の実施形態では、ウイルス c D N A、R N A ポリメラーゼベクターおよび支持タンパク質をコードしている 1 つまたは複数のベクターが導入された宿主細胞を、「プラーク拡大」ステップに供する。この手順は、典型的には、ウイルス c D N A 発現ベクター、ならびに R N A ポリメラーゼ、N タンパク質、P タンパク質、L タンパク質、M タンパク質および G タンパク質をコードしており、その一過性発現を誘導する 1 つまたは複数の発現ベクターの発現を可能にするために十分な時間の後 ( たとえば形質移入後 ) に実施する。プラーク拡大を達成するために、多くの場合はさらなるウイルス拡大を支持するその能力が損なわれている宿主細胞を、同じまたは異なる細胞種のプラーク拡大細胞と同時に培養する。同時培養ステップにより、ウイルスの活発な拡大をより受け入れやすいプラ

50

ーク拡大細胞への救済されたウイルスの伝播が可能となる。典型的には、宿主細胞の培養物を、ブランク拡大細胞の1つまたは複数の層上に移す。たとえば、宿主細胞の培養物をブランク拡大細胞の単層上に伝播させることができ、その後、弱毒化したVSVがブランク拡大細胞に感染し、その中でさらに拡大される。一部の実施形態では、宿主細胞は、ブランク拡大細胞と同じまたは異なる細胞種である。

#### 【0100】

特定の実施形態では、ウイルス救済に使用する宿主細胞およびブランク拡大細胞は、どちらも最適化したVSV Gタンパク質のコード配列を一過的に発現する。他の実施形態では、ウイルス救済に使用する宿主細胞は、同時培養ステップ中に救済されたウイルスに感染させるブランク拡大細胞が、最適化したVSV Gコード配列を一過的または構成的に発現する限りは、機能的であるが最適化されていないGコード配列（たとえば天然のGコード配列）を発現し得る。一部の実施形態では、ブランク拡大細胞における最適化したVSV G配列からのVSV Gタンパク質の発現は、サイトメガロウイルスに由来するRNAポリメラーゼIIプロモーターの制御下にある。

10

#### 【0101】

本発明のブランク拡大方法および組成物は、それだけには限定されないが繁殖欠損VSVなどを含めた、弱毒化したVSVを産生する改善された救済方法を提供する。典型的には、ウイルス救済方法は、宿主細胞を、弱毒化したVSVのゲノムまたはアンチゲノムをコードしている単離した核酸分子を含むウイルスcDNA発現ベクターと、RNAポリメラーゼをコードしており、その発現を誘導する発現ベクターと、機能的なGタンパク質をコードしている核酸分子を含む発現ベクター（たとえば、最適化されていないまたは最適化したVSV G遺伝子）とで形質移入することを伴う。ウイルス救済方法は、宿主細胞内に、カプシド形成、転写および複製に必要なトランス作用性タンパク質（すなわち、VSVのN、PおよびLタンパク質）をコードしている少なくとも1つの単離した核酸分子を含む1つまたは複数の他の支持発現ベクターを導入することをさらに含む。ウイルス救済方法は、生産的な感染のために、細胞を、VSVのMタンパク質をコードしている支持ベクターで形質移入することをさらに含み得る。ベクターは、前記ベクターの同時発現および弱毒化した成熟ウイルス粒子の産生を可能にするために十分な条件下で、宿主細胞内に導入する。

20

#### 【0102】

弱毒化したVSVを救済し、その後、救済された物質を、好ましくはブランク拡大細胞と同時培養する。これにより、感染によるブランク拡大細胞への救済されたウイルスの伝播が可能となる。ブランク拡大細胞は、ウイルスの活発な拡大をより受け入れやすい。その後、弱毒化したVSVを同時培養物から回収し得る。一部の実施形態では、ウイルス救済細胞を、最適化したVSV G遺伝子を含むプラスミドで一過的に形質移入した、または最適化したVSV G遺伝子によってコードされているVSV Gタンパク質を構成的に発現する、ブランク拡大細胞の少なくとも1つの層上に移す。

30

#### 【0103】

ブランク拡大を達成するために、形質移入した細胞を、典型的には、ブランク拡大細胞の同時培養容器に移す。当分野で知られている様々なプレートまたは容器のうちの任意のものを、ブランク拡大ステップに用いることができる。特定の実施形態では、形質移入した細胞は、少なくとも約50%コンフルエントであるブランク拡大細胞の単層上に移す。あるいは、ブランク拡大細胞は、少なくとも約60%コンフルエント、またはさらには少なくとも約75%コンフルエントである。特定の実施形態では、ブランク拡大細胞の表面積は、形質移入したウイルスの調製に使用した表面積よりも大きい。2:1~100:1の増強した表面積比を所望に応じて用いることができる。少なくとも10:1の増強した表面積が多くの場合望ましい。

40

#### 【0104】

最適化したVSV G遺伝子

繁殖欠損ウイルスは、ヒトで使用するための明らかな安全性の利点を提供する。これら

50

のベクターは1回のラウンドの複製に限定されており、一次感染細胞を越えて伝播することができない。以下に詳述する1つのそのようなベクターは、G遺伝子全体が欠失しており（G）、したがって、感染性ウイルス粒子が*in vitro*で繁殖するためにGタンパク質トランス補完を必要とする。以下に詳述する別のベクターは、Gタンパク質外部ドメインのほとんどが欠失しており（G stem）、細胞質尾部（CT）領域、膜貫通ドメイン、および膜近位外部ドメインの42個のアミノ酸を保持している。このベクターも繁殖欠損であり、*in vitro*での感染性粒子の産生にトランスのGタンパク質を必要とする。

#### 【0105】

繁殖欠損ウイルスは安全性の利点を提供することが知られているが、本発明以前には、工業的スケールでの製造中に効率的なベクター増幅を可能にするために十分な量の補完Gタンパク質を提供することにおいて、問題があった。実施例中に詳述するように、最大のGタンパク質発現を支援する条件を同定するために、本発明者らによって広範囲の研究が実施された。コード配列を最適化する2つの方法を分析して、これらがVSV Gタンパク質の一過性発現が改善され得るかどうかを決定した。RNA最適化（RNA opt）として記載され、GC含有量を増加させ、核外移行を阻害する配列モチーフを破壊するために同義のヌクレオチド置換を使用した一方法は、翻訳を減少させる、またはmRNAを不安定にする（Schneiderら、J Virol、71：4892～903、1997）、Schwartzら、J Virol、66：7176～82、1992、Schwartzら、J Virol、66：150～9、1992）。インディアナおよびニュージャージー血清型のVSV G（RNAを最適化した）コード配列を、たとえば、それぞれ図3（配列番号4）および図4（配列番号5）に示し、小文字は最適化中に行った置換を示す。最適化の第2の方法は、以下の表1に詳述するコドン最適化方法である（Opt-1）。コドン最適化方法を用いて得られたVSV Gコード配列（インディアナ血清型）を、たとえば図5（配列番号3）に示す。

#### 【0106】

##### 【表1】

表1

最適化方法 1(Opt-1)	
ステップ1	高頻度のヒトコドンからなるGコード配列を作製する。 VSV-Gin アミノ酸配列の逆翻訳を SeqWeb ソフトウェアスイート (Accelrys Software, Inc) 中の Backtranslate プログラムで行った。
ステップ2	予測された mRNA スプライシングシグナルを破壊する同義の塩基置換を導入する。 www.fruitfly.org の Berkeley ショウジョウバエ (Drosophila) ゲノムプロジェクトから入手可能なインターネットツールを用いてスプライシング部位の予測を行った (Reese ら、J Comput Biol、4:311～23、1997)
ステップ3	Kozak によって記載されているように翻訳開始コドンを好都合な構成に配置する (Kozak J Biol Chem、266:19867～70、1991)
ステップ4	翻訳終結シグナルを好都合な構成に配置する (Kochetov ら、FEBS Lett、440:351～5、1998)

#### 【0107】

実施例中にさらに詳述されているように、最適化したVSV Gのコード配列を含有するプラスミドの電気穿孔により、天然のGinオープンリーディングフレームと比較して、Vero細胞中でより高いレベルのGタンパク質発現が生じたことが判明した。その後、増加したGの存在量が繁殖欠損ベクターのパッケージング収量を増強したかどうかを決定するために、研究を実施した。実施例および図7中にさらに詳述されているように、結果は、最適化したVSV Gのコード配列を含有するどちらのプラスミドも（pCMV -

Gin/Opt1およびpCMV-Gin/RNAopt)、天然のGinオープンリーディングフレームを含有するプラスミド(pCMV-Gin)と比較して、より効率的なパッケージングを促進したことを示している。

【0108】

一部の実施形態では、最適化したVSV G遺伝子は、配列番号3、配列番号4、および配列番号5から選択される。

【0109】

細胞

#### 1. ウイルス救済細胞

ウイルス救済に使用する宿主細胞は、原核細胞または真核細胞から選択することができる。適切な細胞には、Sf9およびSf21などの昆虫細胞、大腸菌(E. coli)などの適切なプロモーターを有する細菌細胞、ならびに出芽酵母(S. cerevisiae)などの酵母細胞が含まれる。宿主細胞は、典型的には、脊椎動物、たとえば霊長類の細胞から選択される。典型的には、生存可能なウイルスの救済が容易に検出され得るように、検出可能な細胞変性効果をもたらす細胞系を用いる。多くの場合、宿主細胞は、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞などのヒト細胞に由来する。Vero細胞(アフリカミドリザル腎細胞)、および多くの他の種類の細胞も宿主細胞として使用することができる。一部の例示的な実施形態では、Vero細胞を宿主細胞として使用する。VSVの場合、ウイルスがVero細胞上で迅速に伝播し、容易に検出可能なプラークを作製するため、形質移入した細胞をVero細胞上で成長させる。さらに、Vero細胞は、ヒトに投与するための産生に適格である。他の適切な宿主細胞の例は以下のとおりである：(1)ヒト二倍体初代細胞系、たとえば、WI-38およびMRC-5細胞、(2)サル二倍体細胞系、たとえば、Cos、アカゲザル胎児肺(FRL)細胞、(3)準初代連続継代細胞系、たとえば、AGMK-アフリカミドリザル腎細胞、(4)ヒト293細胞(適格)ならびに(5)げっ歯類(たとえば、CHO、BHK)、イヌ科動物、たとえば、マディンダービーイヌ科腎臓(MDCK)、および原発性ニワトリ胚線維芽細胞。本発明の方法および組成物内で有用な例示的な具体的な細胞系には、HEp-2、HeLa、HEK(たとえばHEK293)、BHK、FRL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、およびVero細胞が含まれる。

【0110】

#### 2. プラーク拡大細胞

本明細書中でさらに詳述するように、本発明による弱毒化したVSV粒子を産生する方法には、ウイルス粒子の救済に使用する宿主細胞をプラーク拡大細胞と成長させることが含まれ得る。プラーク拡大細胞への回収された弱毒化したVSV粒子の伝播が可能となる。一部の実施形態では、プラーク拡大細胞は、ウイルス救済に使用する宿主細胞と同じまたは異なる細胞種である。

【0111】

プラーク拡大細胞は、そのような細胞における天然のまたは組換えウイルスの成長の成功に基づいて選択する。多くの場合、形質移入の実施に用いる宿主細胞は、所望の組換えの弱毒化したウイルスの成長の最適な宿主ではない。したがって、形質移入した細胞からの組換えの弱毒化したウイルスの回収は、天然のウイルスまたは組換えウイルスが増強した成長を示すプラーク拡大細胞を選択することによって、増強することができる。前述の説明に従って、様々なプラーク拡大細胞を、本発明の本態様内で使用するために選択することができる。本発明の組換えの弱毒化したVSVの回収および拡大を支援するために使用することができる、例示的な具体的なプラーク拡大細胞は、HEp-2、HeLa、HEK、BHK、FRL-DBS2、LLC-MK2、MRC-5、およびVero細胞から選択される。本発明内で使用するための熱ショックおよびプラーク拡大方法に関するさらなる詳細は、本明細書中に参考として組み込まれているPCT公開WO99/63064号に提供されている。

【0112】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ブランク拡大細胞を、最適化したVSV G遺伝子を含む発現プラスミドで一過的に形質移入する。その後、形質移入した細胞を、典型的には終夜、37、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベーションした後、ウイルス救済細胞との同時培養物を確立するために使用した。救済された弱毒化したウイルスは、同時培養ステップ中にブランク拡大細胞に感染し、ウイルスは其中でさらに拡大する。一部の他の実施形態では、ブランク拡大細胞は、最適化したVSV G遺伝子によってコードされているVSV Gタンパク質を構成的に発現し得る。

#### 【0113】

弱毒化した水疱性口内炎ウイルス

##### 1. 切断されたG細胞質尾部(CT)領域

特定の実施形態では、本発明で使用するための弱毒化したVSVは、切断された細胞質尾部(CT)領域を有するGタンパク質を発現する。たとえば、細胞質ドメインのカルボキシ末端を切断するG遺伝子の突然変異が、VSVの出芽に影響を与え、ウイルス産生を弱毒化することは、当分野で知られている(Schneidlら、The EMBO Journal、17(5):1289~1296、1998、Robertsonら、J Virol、73:3723~3732、1999)。野生型VSV Gタンパク質の細胞質ドメインは、29個のアミノ酸を含む(RVGILHLCKLKHTKKRQIYTDEIMNRLGK-COOH、配列番号6)。

#### 【0114】

一部の実施形態では、弱毒化したVSVは、1個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有するGタンパク質(G-CT1)を発現する。たとえば、弱毒化したVSVは、細胞質ドメインの最後の28個のアミノ酸残基が欠失しているGタンパク質(配列番号6の29個のアミノ酸の野生型細胞質ドメインからアルギニンのみを保持する)を発現し得る。

#### 【0115】

一部の他の実施形態では、弱毒化したVSVは、9個のアミノ酸に切断された細胞質尾部領域を有するGタンパク質(G-CT-9)を発現する。たとえば、弱毒化したVSVは、細胞質ドメインの最後の20個のカルボキシ末端のアミノ酸が欠失しているGタンパク質(配列番号6の29個のアミノ酸の野生型細胞質ドメインと比較して)を発現し得る。

#### 【0116】

##### 2. G遺伝子の欠失

一部の実施形態では、弱毒化したVSVは、VSV Gタンパク質を欠く(VSV-G)。たとえば、本発明の弱毒化したVSVは、VSV G遺伝子がゲノムから欠失しているウイルスであり得る。この観点から、Robertsonらは、Gタンパク質をコードしている遺伝子の全体が欠失しており(G)、インフルエンザ赤血球凝集素(HA)タンパク質で置換されているVSVベクターを記載しており、VSVベクター(G-HA)は弱毒化した病因を実証した(Robertsonら、Journal of Virology、73:3723~3732、1999)。

#### 【0117】

##### 3. G-STEM突然変異

一部の他の実施形態では、弱毒化したVSVは、切断された細胞外ドメインを有するGタンパク質を発現する(VSV-Gstem)。たとえば、本発明の弱毒化したVSVには、G遺伝子中の突然変異が含まれていてもよく、コードされているGタンパク質は、Gタンパク質外部ドメインの膜近位の基部領域中に突然変異を有し、G-stemタンパク質と呼ばれる。G-stem領域は、Gタンパク質のアミノ酸残基421~462を含む。以前の研究により、Gタンパク質のG-stem中の挿入および/または欠失(たとえば切断)の突然変異によってVSVの弱毒化が実証されている(RobinsonおよびWhitt、J Virol、74(5):2239~2246、2000、Jeeten draら、J Virol、76(23):12300~11、2002、Jeeten

10

20

30

40

50

draら、J Virol、77(23):12807~18、2003)。

【0118】

一部の実施形態では、弱毒化したVSVとは、Gコード配列が、GのC末端の91個のアミノ酸と融合したシグナル配列の18個のアミノ末端残基のみをコードしている、改変された変形で置き換えられており、そのうちの約42個の残基が切断された細胞外ドメイン(G-stem)を形成するものである。この種のG遺伝子改変は、RobisonおよびWhitt、J Virol、74(5):2239~2246、2000の方法を用いて構築し得る。

【0119】

4. 遺伝子シャフリング突然変異

特定の実施形態では、本発明の弱毒化したVSVは、そのゲノム中に遺伝子シャフリング突然変異を含む。本明細書中で定義する用語「遺伝子シャフリング」、「シャフリングされた遺伝子」、「シャフリングされた」、「シャフリング」、「遺伝子再配置」および「遺伝子転座」は、互換性があるように使用してよく、野生型VSVゲノムの順序の変化(突然変異)をいう。本明細書中で定義する、野生型VSVゲノムは、図1に示す、3'-NPMGL-5'の遺伝子の順序を有する。

【0120】

3'プロモーターに対するVSV遺伝子の位置により発現レベルおよびウイルス弱毒化が決定されることは、当分野で知られている(それぞれ具体的に本明細書中に参考として組み込まれているWertzらの米国特許第6,596,529号、およびWertzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:3501~6、1998)。発現の勾配が存在し、3'プロモーターに近位の遺伝子は3'プロモーターに遠位の遺伝子よりも豊富に発現される。VSV G、M、N、PおよびLタンパク質をコードしているヌクレオチド配列は、当分野で知られている(RoseおよびGallione、J Virol、39:519~528、1981、Gallioneら、J Virol、39:529~535、1981)。たとえば、米国特許第6,596,529号は、Nタンパク質の遺伝子とその野生型プロモーターから転座した(シャフリングされた)遺伝子シャフリング突然変異(Nタンパク質発現を次々に低下させるために、近位の第1の位置から、次々にゲノム上のより遠位の位置)を記載している(たとえば、3'-PNMGL-5'、3'-PMNGL-5'、3'-PMGNL-5'、それぞれN2、N3およびN4と呼ぶ)。位置シフトしたVSV突然変異体は、たとえばBallらの米国特許第6,136,585号にも記載されている。

【0121】

したがって、特定の実施形態では、弱毒化したVSVは、そのゲノム中に遺伝子シャフリング突然変異を含む。遺伝子シャフリング突然変異は、N遺伝子の転座(たとえば、3'-PNMGL-5'または3'-PMNGL-5')を含み得る。たとえば、一部の実施形態では、弱毒化したVSVは、ウイルスゲノム中のその野生型の位置から下流に転座しているN遺伝子を含み、それによってNタンパク質発現が低下している。

【0122】

本明細書中では、N、P、M、GまたはL遺伝子のうちの任意のものの3'側のVSVゲノムに外来核酸配列(たとえばHIV gag)を挿入することにより、上記定義した「遺伝子シャフリング突然変異」が有効にもたらされることに言及したい。たとえば、HIV gag遺伝子を位置1(たとえば3'-gag<sub>1</sub>-NPMGL-5')でVSVゲノム内に挿入する場合、N、P、M、GおよびL遺伝子は、それぞれ、その野生型の位置からゲノム上のより遠位の位置に移動される。したがって、本発明の特定の実施形態では、遺伝子シャフリング突然変異には、N、P、M、GまたはL遺伝子のうちの任意のものの3'側のVSVゲノムに外来核酸配列を挿入することが含まれる(たとえば、3'-gag<sub>1</sub>-NPMGL-5'、3'-N-gag<sub>2</sub>-PMGL-5'、3'-NP-gag<sub>3</sub>-MGL-5'など)。

【0123】

10

20

30

40

50

## 5. 非細胞変性性M遺伝子突然変異

特定の他の実施形態では、本発明の弱毒化したVSVには、M遺伝子中に非細胞変性性突然変異(Mncp)が含まれる。VSV(インディアナ血清型)M遺伝子は、229個のアミノ酸のM(マトリックス)タンパク質をコードしている。

### 【0124】

MのmRNAがM2およびM3と呼ばれる2つの追加のタンパク質をさらにコードしていることは、当分野で知られている(JayakarおよびWhitt、J Virol、76(16):8011~8018、2002)。M2およびM3タンパク質は、229個のアミノ酸のMタンパク質(M1と呼ぶ)をコードしているものと同じリーディングフレーム中で、下流のメチオニンから合成され、M1タンパク質の最初の32個(M2タンパク質)または50個(M3タンパク質)のアミノ酸を欠く。Mタンパク質を発現するがM2およびM3を発現しない組換えVSVに感染した細胞は、(特定の細胞種で)遅延細胞変性効果の開始を示すが、それでも正常なウイルス収量を生じることが観察されている。

10

### 【0125】

したがって、特定の実施形態では、本発明の弱毒化したVSVには、M遺伝子中に非細胞変性性の突然変異が含まれ、M遺伝子突然変異は、内部AUGでタンパク質合成を開始することによって、Mタンパク質のmRNAから発現される2つの重複するインフレームのポリペプチドの発現を低下させる。そのようなM遺伝子突然変異の結果、M2またはM3タンパク質を発現しないウイルスがもたらされる。また、これらの突然変異は、IFN誘導、核輸送、および他の機能にも影響を与える。たとえば、JayakarおよびWhitt、J Virol、76(16):8011~8018、2002を参照されたい。

20

### 【0126】

#### 異種抗原

一部の実施形態では、弱毒化したVSVは、VSVがベクターとして役割を果たすように、異種抗原を発現する。たとえば、特定の実施形態では、弱毒化したVSVには、複製に必須でないゲノムの部位内に挿入されたまたはそれを置き換える、別個の転写単位としての外来RNA配列が含まれる場合があり、外来RNA配列(マイナスのセンスである)は、VSVに感染した宿主細胞中で発現させることができるタンパク質の産生を誘導する。この組換えゲノムは、タンパク質をコードしている外来DNAをVSV cDNA内に挿入することによって最初に産生する。特定の実施形態では、本発明の弱毒化したVSV中で融合または非融合タンパク質として発現させた場合に、単独でまたは同じもしくは異なるVSVによって発現された他の抗原と組み合わせて、疾患または障害に対する予防的または治療的免疫を生じる免疫原性抗原をコードしている任意のDNA配列を単離し、本発明の免疫原性組成物で使用するためのVSVベクター中に取り込ませる。

30

### 【0127】

特定の実施形態では、弱毒化した組換えVSVによる抗原の発現は、病原性微生物に対する免疫応答を誘導する。たとえば、抗原は、疾患または障害の原因物質である細菌、寄生生物、ウイルス、または真菌上に見つかる抗原の免疫原性または抗原性を示し得る。一実施形態では、ヒトの病原体の抗原または他の目的抗原の抗原性または免疫原性を示す抗原を使用する。

40

### 【0128】

一部の実施形態では、弱毒化したVSVによってコードされている異種抗原は、麻疹ウイルス、サブグループAおよびサブグループBの呼吸器合胞体ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、1型または2型のヒトパピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エプスタインバーウイルス、フィロウイルス、ブニヤウイルス、フラビウイルス、アルファウイルス、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルスおよびトラコーマ病原体(C. trachomatis)のうちの1つまたは複数から

50

選択される。

【0129】

抗体との結合を検出することによって免疫原性または抗原性を決定するために、それだけには限定されないが、ラジオイムノアッセイ、E L I S A（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、*in situ*免疫アッセイ（たとえば、コロイド金、酵素または放射性同位体標識を用いたもの）、ウエスタンブロット、免疫沈降反応、凝集アッセイ（たとえば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、タンパク質 A アッセイ、および免疫電気泳動アッセイ、中和アッセイなどの技術を用いた、競合的および非競合的アッセイ系を含めた、当分野で知られている様々な免疫アッセイを使用する。一実施形態では、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって測定する。別の実施形態では、一次抗体は、二次抗体または試薬と一次抗体との結合を測定することによって検出する。さらなる実施形態では、二次抗体を標識する。免疫アッセイにおける結合を検出するための、多くの手段が当分野で知られている。免疫原性を検出する一実施形態では、T細胞媒介性応答を、標準方法、たとえば、*in vitro*もしくは*in vivo*の細胞毒性アッセイ、四量体アッセイ、*elispot*アッセイまたは*in vivo*遅延型過感受性アッセイによってアッセイする。

10

【0130】

弱毒化した V S V によって発現されるエピトープ（抗原決定基）を発現する寄生生物および細菌（外来 R N A が、寄生生物または細菌の抗原またはそのエピトープを含有するその誘導体の産生を誘導するもの）には、それだけには限定されないが、表 2 に記載のものが含まれる。

20

【0131】



【表 2】

表 2

VSV によって発現させることができるエピトープを発現する寄生生物および細菌

寄生生物	
プラスモジウム(Plasmodium)spp.	
エイメリア(Eimeria)spp.	
線形動物	10
住血吸虫(Schistosoma)spp.	
リーシュマニア(Leishmania)spp.	
細菌	
コレラ菌(Vibrio cholerae)	
肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)	
化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)	20
ストレプトコッカス・アガラクチア(Streptococcus agalactiae)	
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)	
表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis)	
髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)	30
淋菌(Neisseria gonorrhoeae)	
ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)	
破傷風菌(Clostridium tetani)	
百日咳菌(Bordetella pertussis)	
ヘモフィルス(Haemophilus)spp.(たとえばインフルエンザ菌(influenzae))	40
クラミジア(Chlamydia)spp.	
毒素原性大腸菌(Escherichia coli)	
ピロリ菌(Helicobacter pylori)	
マイコバクテリア	

【0132】

別の実施形態では、抗原は、線虫によって引き起こされる障害に対して保護するために 50

、線形動物の抗原のエピトープを含む。別の実施形態では、組換えVSVによって発現された場合に脊椎動物宿主中で免疫原性である、プラスモジウム (*Plasmodium*) エピトープをコードしている任意のDNA配列を単離して、本発明によるVSV(-)DNA内に挿入する。DNA源として役割を果たすプラスモジウム (*Plasmodium*) の種には、それだけには限定されないが、ヒトマラリア寄生生物の熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、および動物マラリア寄生生物のネズミマラリア原虫 (*P. berghei*)、ネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*)、二日熱マラリア原虫 (*P. knowlesi*)、およびサルマラリア原虫 (*P. cynomolgi*) が含まれる。さらに別の実施形態では、抗原は、コレラ毒素の - サブユニットのペプチドを含む。

10

**【0133】**

弱毒化したVSVによって発現されるエピトープを発現するウイルス(外来RNAが、ウイルスの抗原またはそのエピトープを含むその誘導体の産生を誘導するもの)には、それだけには限定されないが、表3に記載のものが含まれ、これは、利便性のためにそのようなウイルスを科ごとに記載し、限定するものではない。

**【0134】**

【表 3 - 1】

表 3

VSVによって発現させることができるエピトープを発現するウイルス

<b>I.ピコルナウイルス科(Picornaviridae)</b>
エンテロウイルス
ポリオウイルス
コクサッキーウイルス
エコーウイルス
ライノウイルス
A型肝炎ウイルス
<b>II.カリシウイルス科(Caliciviridae)</b>
ノーウォークウイルス群
<b>III.トガウイルス科(Togaviridae)およびフラビウイルス科(Flaviviridae)</b>
トガウイルス(たとえばデングウイルス)
アルファウイルス
フラビウイルス(たとえばC型肝炎ウイルス)
風疹ウイルス
<b>IV.コロナウイルス科(Coronaviridae)</b>
コロナウイルス
<b>V.ラブドウイルス(Rhabdoviridae)</b>
狂犬病ウイルス
<b>VI.フィロウイルス科(Filoviridae)</b>
マールブルグウイルス
エボラウイルス
<b>VII.パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)</b>
パラインフルエンザウイルス
流行性耳下腺炎ウイルス
麻疹ウイルス
呼吸器合胞体ウイルス
メタニューモウイルス
<b>VIII.オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)</b>
オルトミクソウイルス(たとえばインフルエンザウイルス)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

<b>IX. ブンヤウイルス科(Bunyaviridae)</b>
ブンヤウイルス
<b>X. アレナウイルス科(Arenaviridae)</b>
アレナウイルス
<b>XI. レオウイルス科(Reoviridae)</b>
レオウイルス
ロタウイルス
オルビウイルス
<b>XII. レトロウイルス科(Retroviridae)</b>
I 型ヒト T 細胞白血病ウイルス
II 型ヒト T 細胞白血病ウイルス
ヒト免疫不全ウイルス(たとえば、I 型および II 型
サル免疫不全ウイルス
レンチウイルス
<b>XIII. パポバウイルス科(Papovaviridae)</b>
ポリオーマウイルス
パピローマウイルス
<b>XIV. パルボウイルス科(Parvoviridae)</b>
パルボウイルス
<b>XV. ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)</b>
単純ヘルペスウイルス
エプスタイン-バーウイルス
サイトメガロウイルス
水痘帯状疱疹ウイルス
ヒトヘルペスウイルス-6
ヒトヘルペスウイルス-7
オナガザルヘルペスウイルス 1(B ウイルス)
<b>XVI. ポックスウイルス科(Poxviridae)</b>
ポックスウイルス
<b>XVIII. ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)</b>
B 型肝炎ウイルス
<b>XIX. アデノウイルス科(Adenoviridae)</b>

10

20

30

40

具体的な実施形態では、弱毒化したVSVによる宿主の感染の際に発現される、外来配列によってコードされている抗原は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素、ヒト呼吸器合胞体ウイルスG糖タンパク質(G)、麻疹ウイルス赤血球凝集素または2型単純ヘルペスウイルス糖タンパク質gDの抗原性または免疫原性を示す。

#### 【0137】

弱毒化したVSVによって発現される他の抗原には、それだけには限定されないが、ポリオウイルスI VP1、HIV Iの外被糖タンパク質、B型肝炎表面抗原、ジフテリア毒素、ストレプトコッカス24Mエピトープ、SpeA、SpeB、SpeCまたはC5aペプチダーゼ、および淋菌性ピリンの抗原の抗原性または免疫原性を示すものが含まれる。

10

#### 【0138】

他の実施形態では、弱毒化したVSVによって発現された抗原は、仮性狂犬病ウイルスg50(gpD)、仮性狂犬病ウイルスII(gpB)、仮性狂犬病ウイルスgIII(gpC)、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質H、仮性狂犬病ウイルス糖タンパク質E、伝染性胃腸炎糖タンパク質195、伝染性胃腸炎マトリックスタンパク質、ブタロタウイルス糖タンパク質38、ブタパルボウイルスカプシドタンパク質、セルブリナ・ハイディセンテリア(*Serpulina hydodysenteriae*)保護抗原、ウシウイルス性下痢糖タンパク質55、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素-ノイラミニダーゼ、ブタインフルエンザ赤血球凝集素、またはブタインフルエンザノイラミニダーゼの抗原性または免疫原性を示す。

20

#### 【0139】

特定の実施形態では、弱毒化したVSVによって発現された抗原は、それだけには限定されないが、ネコ白血病ウイルス、イヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス、イヌパルボウイルスなどを含めた、イヌ科動物またはネコ科動物の病原体などに由来する抗原の抗原性または免疫原性を示す。

#### 【0140】

特定の他の実施形態では、弱毒化したVSVによって発現された抗原は、セルブリナ・ハイオディセンテリア(*Serpulina hydodysenteriae*)、口蹄疫ウイルス、ブタコレラウイルス、ブタインフルエンザウイルス、アフリカブタ発熱ウイルス、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、感染性ウシ鼻気管炎ウイルス(たとえば、感染性ウシ鼻気管炎ウイルス糖タンパク質Eもしくは糖タンパク質G)、または感染性喉頭気管炎ウイルス(たとえば、感染性喉頭気管炎ウイルス糖タンパク質Gもしくは糖タンパク質I)に由来する抗原の抗原性または免疫原性を示す。

30

#### 【0141】

別の実施形態では、抗原は、ラクロスウイルス、新生子ウシ下痢ウイルス、ベネズエラウマ科動物脳脊髄炎ウイルス、プンタトロウイルス、ネズミ白血病ウイルスまたはマウス乳癌ウイルスの糖タンパク質の抗原性または免疫原性を示す。

#### 【0142】

他の実施形態では、抗原は、それだけには限定されないが、ヒトヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス-1、単純ヘルペスウイルス-2、ヒトサイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス-6、ヒトヘルペスウイルス-7、ヒトインフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(1型および/または2型)、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)、ならびに百日咳菌(*Bordetella pertussis*)を含めた、ヒトの病原体の抗原の抗原性または免疫原性を示す。

40

#### 【0143】

弱毒化したVSVによって発現される抗原として使用するための、潜在的に有用な抗原またはその誘導体は、病原体の感染力の中和における抗原の関与、種類または群の特異性

50

、患者の抗血清もしくは免疫細胞による認識、および／または抗原に特異的な抗血清もしくは免疫細胞の保護効果の実証などの、様々な基準によって同定する。

【0144】

別の実施形態では、弱毒化したVSVの外来RNAは、エピトープを含む抗原の産生を誘導し、これは、弱毒化したVSVを所望の宿主内に導入した際に、エピトープを含有する部分によって引き起こされる状態または障害に対して保護する免疫応答を誘導する。たとえば、抗原は、腫瘍（たとえば悪性腫瘍）に対する保護的免疫応答を誘導するために、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原であり得る。そのような腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原には、それだけには限定されないが、KS1/4汎癌腫（pan-carcinoma）抗原、子宮癌抗原（CA125）、前立腺酸性ホスファターゼ、前立腺特異抗原、黒色腫関連抗原p97、黒色腫抗原gp75、高分子量黒色腫抗原および前立腺特異的膜抗原が含まれる。

10

【0145】

弱毒化したVSV DNAの非必須部位内に挿入される、抗原をコードしている外来DNAは、弱毒化したVSVに感染した宿主において発現され、免疫応答を刺激することができるサイトカインをコードしている外来DNA配列を、さらに含んでもよい。たとえば、そのようなサイトカインには、それだけには限定されないが、インターロイキン1、1、2、4、5、6、7、8、10、12、13、14、15、16、17および18、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子ならびに腫瘍壊死因子 および

20

【0146】

免疫原性および医薬組成物

特定の実施形態では、本発明は、薬学的に許容できる担体中に、本発明の方法に従って産生した、免疫原的に有効な量の弱毒化したVSV粒子を含む免疫原性組成物を対象とする。一部の実施形態では、少なくとも1つの外来RNA配列は、複製に必須でないVSVゲノムの領域内に挿入されている、またはそれを置き換える。

【0147】

本発明の弱毒化したVSV粒子は、哺乳動物対象（たとえばヒト）に投与するために配合する。そのような組成物は、典型的には、VSVベクターと薬学的に許容できる担体とを含む。本明細書中で以降使用する言葉「薬学的に許容できる担体」には、薬学的投与に適合している任意かつすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれることが意図される。薬学活性のある物質用のそのような媒体および薬剤の使用は、当分野で周知である。任意の慣用の媒体または薬剤がVSVベクターと不適合である場合を除いて、そのような媒体を本発明の免疫原性組成物中で使用する。また、補助活性化化合物も組成物中に取り込ませ得る。

30

【0148】

したがって、本発明のVSV免疫原性組成物は、その意図する投与経路に適合するように配合する。投与経路の例には、非経口（たとえば、静脈内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内）および粘膜（たとえば、経口、直腸、鼻腔内、頬側、経腔、呼吸器）が含まれる。非経口、皮内、または皮下の施用に使用する液剤または懸濁液には、以下の構成要素が含まれる：注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの無菌的な希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗細菌剤、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤、アセテート、シトレートまたはホスフェートなどの緩衝液、ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性を調節するための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調節する。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量のバイアルに封入することができる。

40

【0149】

50

注射使用に適した医薬組成物には、無菌的な水溶液（水溶性の場合）または分散液、および無菌的な注射用液剤または分散液を即時調製するための無菌的な散剤が含まれる。静脈内投与では、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、ニュージャージー州 Parsippany）またはリン酸緩衝溶液（PBS）が含まれる。すべての場合で、組成物は無菌的でなければならず、容易な注射針通過性が存在する程度に流体であるべきである。これは製造および保存の条件下で安全でなければならず、また、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されていなければならない。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒である。たとえば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合は所要の粒子径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって、適切な流動性が維持される。微生物の作用の予防は、様々な抗細菌および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸などによって達成する。多くの場合、組成物中に等張化剤、たとえば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによってもたらされる。

10

#### 【0150】

無菌的な注射用液剤は、所要量（または用量）のVSVベクターを、適切な溶媒中に、必要に応じて上記列挙した成分のうちの1つまたは組合せと共に取り込ませ、続いて滅菌濾過することによって調製する。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒および上記列挙したものの中からの所要の他の成分を含有する無菌的なビヒクル中に取り込ませることによって調製する。無菌的な注射用液剤を調製するための無菌的な散剤の場合は、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、事前に滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意の追加の所望の成分の散剤が得られる。

20

#### 【0151】

吸入による投与では、化合物は、適切な噴霧剤（たとえば、二酸化炭素または霧化剤などの気体）を含有する加圧容器またはディスペンサーから、エアロゾルスプレーの形態で送達する。また、全身投与は、粘膜または経皮手段によるものであり得る。粘膜または経皮投与では、透過させるバリアに対して適切な浸透剤を配合物中で使用する。そのような浸透剤は一般に当分野で知られており、たとえば、粘膜投与では、洗剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬を使用することによって達成される。また、化合物は、坐薬（たとえば、カカオ脂および他のグリセリドなどの慣用の坐薬基剤を用いて）または直腸送達のための保留浣腸の形態でも調製する。

30

#### 【0152】

特定の実施形態では、投与の容易性および用量の均一性のために、経口または非経口の組成物を単位剤形で配合することが有利である。本明細書中で以降使用する単位剤形とは、治療する対象の単位用量として適切な、物理的に別々の単位をいい、それぞれの単位は、所望の治療効果が生じるように計算した、事前に決定された量の活性化合物を、所要の薬学担体と会合して含有する。本発明の単位剤形の仕様は、活性化合物の特有の特徴および達成する特定の治療効果、ならびに個体を治療するための活性化合物などの、配合の分野に特有な制限によって指示され、それに直接依存する。

40

#### 【0153】

本明細書中で引用するすべての特許および出版物は、本明細書中に参考として組み込まれている。

#### 【実施例】

#### 【0154】

#### （実施例1）

#### 組換えDNAの調製

T7 RNAPをコードしているプラスミドベクター（pCMV-T7）は、ポリメラ

50

ーゼオープンリーディングフレーム (ORF) を、pCI-neo (Promega) 内の、hCMV 前初期プロモーター/エンハンサー領域の 3' 側にクローニングすることによって調製した。T7 RNAP の ORF を挿入する前に、pCI-neo を改変して複数クローニング部位の 5' 側に位置する T7 プロモーターを除去して、ベクター pCI-neo-Bcl を作製した。T7 RNAP コード配列を増幅するために使用した PCR プライマー内に取り込ませた EcoR I および Xba I 制限部位を用いて、T7 RNAP 遺伝子を pCI-Neo-Bcl 内に挿入した。翻訳に最適な配列構成を提供するために、コザック (Kozak, J Cell Biol, 108, 229~241, 1989) コンセンサス配列を開始因子 ATG の 5' 側に含めた。

#### 【0155】

VSV N、P、L、M および G ポリペプチドをコードしているプラスミドは、Parks ら (Parks ら, Virus Res, 83, 131~147, 2002) に記載のように、適切な ORF を、プラスミドベクター pT7 中の T7 バクテリオファージプロモーターおよび脳心筋炎ウイルス内部リボソーム進入部位 (IRES) (Jang ら, J Virol, 62, 2636~2643, 1988, Pelletier および Sonenberg, Nature, 334, 320~325, 1988) の 3' 側に挿入することによって調製した。挿入されたコード配列は、3' 末端がプラスミドにコードされているポリ-A 配列および T7 RNAP ターミネーターに隣接している。VSV N、P、L、M、および糖タンパク質 (G) をコードしているプラスミドは、インディアナ血清型ゲノム cDNA クローン (Lawson ら, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 4477~4481, 1995) またはニュージャージー血清型クローン (Rose ら, J Virol, 74, 10903~10910, 2000) に由来していた。

#### 【0156】

hCMV プロモーター/エンハンサー (それぞれ、pCMV-G または pCMV-Opt1、pCMV-RNAopt) によって制御される、VSV 天然の G または VSV 最適化 G コード配列をコードしている発現プラスミドは、以下の実施例 2 に記載されている。これらのプラスミドは、トランスの糖タンパク質を提供する一方で、VSV G または VSV-G system ベクターを繁殖させるために使用した。G タンパク質のコード配列を、本実施例中で上述した改変した pCI-neo ベクター内にクローニングした。G コード配列を増幅するために使用した PCR プライマー内に取り込ませた Xho I (5') および Xba I (3') 制限部位を用いて、G コード配列を改変した pCI-neo ベクター内に挿入した。

#### 【0157】

組換え VSV ゲノムクローンは、標準のクローニング手順 (Ausubel ら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1987) および出発物質としてインディアナ血清型 pVSV-XN2 ゲノム cDNA クローンを使用して、調製した (Lawson ら, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 4477~4481, 1995)。G 遺伝子を欠く (G) ゲノムクローンは、Robertson ら (Robertson ら, J Virol, 73, 3723~3732, 1999) によって記載されたものに類似であった。第 2 の種類の G 遺伝子改変は、G コード配列が、C 末端の 91 個のアミノ酸と融合したシグナル配列の 18 個のアミノ末端 (N 末端) 残基のみをコードしている、改変された変形で置き換えられており、そのうちの約 42 個の残基が切断された細胞外ドメイン (G system) を形成する Robison および Whitt (Robison および Whitt, J Virol, 74, 2239~2246, 2000) の手法を用いて構築した。一部の組換え VSV 構築体では、G タンパク質遺伝子をニュージャージー血清型からの同等の遺伝子で置き換えた (Rose ら, J Virol, 74, 10903~10910, 2000)。



## 【0158】

## (実施例2)

## パッケージング方法の改善の調査

パッケージング方法の改善の調査では、方法中の2つの主要なステップに焦点をおいた：1) プラスミドDNAによって駆動される一過性タンパク質の産生、および2) ビリオン形態形成の効率。以下の実施例3に記載する方法では、これらのステップの効率を改善させる改変を同定し、その結果、収量が日常的に $1 \times 10^7$  IU/mlのVero細胞培地を超える手順がもたらされた。

## 【0159】

最大のGタンパク質発現を支援する条件を同定するために、研究を実施した。以前に行った経験的研究により、電気穿孔が、プラスミドDNAのVero細胞内への、再現性のある効率的な導入を促進した方法として同定されており(Parksら、2006、Method for the recovery of non-segmented, negative-stranded RNA viruses from cDNA、公開米国特許出願第20060153870号、Witkoら、J Virol Methods、135:91~101)、また、電気穿孔は拡張可能な技術であり(Frattantonioら、Cytotherapy、5:208~10、2003)、Vero細胞は、生口タウウイルスワクチンの産生に用いられている十分に特徴づけられた細胞基質であるため(Merck、RotaTeq (Rotavirus Vaccine, Live, Oral, Pentavalent) FDA. Online、投函日2006年、Sheets, R. (History and characterization of the Vero cell line) FDA. Online、投函日2000年)、後の方法の洗練はこの発見に依存していた。

## 【0160】

この発見を改良するために、コード配列を最適化する2つの方法を分析して、VSV G (インディアナ血清型、Gin) の一過性発現が改善され得るかどうかを決定した。RNA最適化(RNAopt)として記載され、GC含有量を増加させ、核外移行を阻害する配列モチーフを破壊するために同義のヌクレオチド置換を使用する一方法は、翻訳を減少させる、またはmRNAを不安定にする(Schneiderら、J Virol、71:4892~903、1997、Schwartzら、J Virol、66:7176~82、1992、Schwartzら、J Virol、66:150~9)。最適化の第2の方法は、表1に詳述するコドン最適化方法である(Opt-1)。その後、改変したコード配列、および天然のGinオープンリーディングフレームを、ヒトサイトメガロウイルス(hCMV)プロモーターおよび前初期領域1からのエンハンサー(Boschartら、Cell、41:521~30、1985、MeierおよびStinski、Intervirology、39:331~42、1996)の3'側にクローニングして、3つのベクターを作製した(図6A上部)。Gタンパク質の発現を比較するために、50 µgのプラスミドDNAを約 $1 \times 10^7$ 個のVero細胞内に電気穿孔し(Witkoら、J Virol Methods、135:91~101、2006)、全細胞タンパク質を電気穿孔の24または72時間後に収集した。抗VSVポリクローナル抗血清を用いたウエスタンブロット分析(図6B)により、どちらの最適化方法によってもGタンパク質の存在量が顕著に増加したことが明らかになった。これらの結果により、電気穿孔(Witkoら、J Virol Methods、135:91~101、2006)を、最適化したVSV Gタンパク質のコード配列を含有するプラスミドの使用と組み合わせることによって、より高くより持続したGタンパク質発現のレベルがVero細胞で達成される可能性があることが実証された。

## 【0161】

最適化した遺伝子を含有するプラスミドの電気穿孔により、Vero細胞において高レベルのGタンパク質発現が生じたことが発見された後、増加したGの存在量がベクターのパッケージングを増強したかどうかを決定するために、研究を実施した。この実験でもや

10

20

30

40

50

はり重要なことは、パッケージング収量の比較を G および G s t e m ベクターで行ったことである (図 2)。G s t e m ベクターは、R o b i s o n および W h i t t ( R o b i s o n および W h i t t、J V i r o l、74:2239~46、2000) により、G タンパク質の膜近位の細胞外の 42 個のアミノ酸 (基部領域) が粒子の形態形成を增強したことが実証されたため、開発された。したがって、細胞内ドメイン、膜貫通領域、および 42 個のアミノ酸の細胞外ドメインからなる切断された G タンパク質 (G s t e m) を発現する V S V 発現ベクターが、より効率的な成熟を受け、パッケージング収量が改善される可能性があるとして仮定された。4 つの独立した実験からの結果を図 7 に示す。細胞を、天然の G 配列 (p C M V - G i n、ベタもしくは斜線の # 1 のバー)、G i n / O p t 1 (ベタもしくは斜線の # 2 のバー) または G i n / R N A o p t (ベタもしくは斜線の # 3 のバー) を含有するプラスミドベクターを用いて電気穿孔し、電気穿孔の 24 時間後に、単層を約 0.1 I U の r V S V - G a g 1 - G (斜線のバー) または r V S V - G a g 1 - G s t e m (ベタのバー) に感染させた。この発見により、最適化した配列を含有するどちらのプラスミドも、より効率的なパッケージングを促進したことが明らかとなった。収量は、S c h n e l l ら (S c h n e l l ら、C e l l、90:849~57、1997) に記載されているブランク滴定方法によって決定して、G または G s t e m ベクターのいずれについても 0.5 ~ 1.0 l o g<sub>10</sub> I U 増加した。さらに、G s t e m ベクターの収量は、G よりも 0.2 ~ 1 l o g<sub>10</sub> 単位高かった。これらの結果により、V S V - G s t e m ベクターを、最適化した V S V G 遺伝子を含有するプラスミドを用いて電気穿孔した V e r o 細胞中で繁殖させた場合に、 $1 \times 10^8$  I U と高いパッケージング収量が達成可能であったことが実証された。

#### 【0162】

G タンパク質に対する抗ベクター免疫の効果を減らすために、様々な血清型に由来する G タンパク質をコードしている、生きた複製する V S V ベクターを作製することができる (R o s e ら、J V i r o l、74:10903~10、2000)。同様に、G および G s t e m ベクターを、様々な血清型からの G タンパク質と共にパッケージングすることができる。一過性発現パッケージング方法が、異なる株に由来する糖タンパク質で容易に作動するかどうかを決定するために、ニュージャージー血清型からの V S V G タンパク質 (G n j) をコードしているプラスミドベクターを、天然のコード配列または R N A 最適化に供した配列のいずれかを用いて構築した。G n j プラスミドベクターは、最初に、電気穿孔後の一過性タンパク質発現を評価することによって試験した。図 8 は、ニュージャージー血清型 (G n j) またはインディアナ血清型 (G i n) に由来する、天然のまたは最適化した V S V G タンパク質のコード配列の一過性発現の比較を示すウエスタンブロット分析である。ウエスタンブロット分析により、R N A 最適化が G n j タンパク質の発現の規模を顕著に改善したことが示され (図 8)、これは、p C M V - G n j / R N A o p t がウイルスベクターのパッケージングを増強することを示唆している。V S V - G s t e m - g a g 1 のパッケージングを試験した場合 (図 9)、R N A 最適化は収量を約 10 倍向上させ、粒子力価が  $1 \times 10^8$  I U / m l まで押し上げられた。

#### 【0163】

##### (実施例 3)

電気穿孔媒介の形質移入による V e r o 細胞における水疱性口内炎ウイルスの救済

D N A の調製:

それぞれの電気穿孔について、以下のプラスミド D N A を微量遠心チューブ中で合わせた: 25 ~ 50  $\mu$  g の、T 7 (p C I - N e o - B c l - T 7) を発現するプラスミド「h C M V - T 7 発現プラスミド」、10  $\mu$  g の V S V 完全長プラスミド、8  $\mu$  g の N プラスミド、4  $\mu$  g の P プラスミド、1  $\mu$  g の L プラスミド、1  $\mu$  g の M プラスミドおよび 1  $\mu$  g の G プラスミド。パイオセーフティーフード内で作業しながら、D N A の体積を、無菌的なヌクレアーゼを含まない水で 250  $\mu$  l に調節した。次に、50  $\mu$  l の 3 M の酢酸ナトリウム (p H 5) を加え、チューブの内容物を混合した。続いて、750  $\mu$  l の 100 % のエタノールを加え、チューブの内容物を混合した。これに続いて、- 20 で 1 時

間～終夜のチューブのインキュベーションを行った。その後、微量遠心器内で、14,000rpm、4で20分間、DNAをペレット化した。バイオセーフティフード内で作業しながら、DNAペレットを乱さずに上清を廃棄した。残留エタノールをチューブから除去し、その後、DNAペレットをバイオセーフティフード内で5～10分間空気乾燥させた。乾燥したDNAペレットを、50μlの無菌的なヌクレアーゼを含まない水に再懸濁させた。

【0164】

溶液

以下の溶液を細胞培養およびウイルス救済中に用いた：トリプシン/EDTA、ハンクス緩衝溶液、1mg/mlのPBS中で調製したダイズトリプシン阻害剤、および以下の表4に示す培地。

【0165】

【表4】

表4

培地1	培地2	培地3
ダルベッコ改変最小必須培地(DMEM)	イスコヴ改変ダルベッコ培地(IMDM)	ダルベッコ改変最小必須培地(DMEM)
10%の熱失活ウシ胎児血清	220μMの2-メルカプトエタノール(組織培養グレード)	10%の熱失活ウシ胎児血清
220μMの2-メルカプトエタノール(組織培養グレード)	1%のDMSO(組織培養グレード)	220μMの2-メルカプトエタノール(組織培養グレード)
1%の非必須アミノ酸(10mMの溶液)	1%の非必須アミノ酸(10mMの溶液)	1%の非必須アミノ酸(10mMの溶液)
1%のピルビン酸ナトリウム(100mMの溶液)	1%のピルビン酸ナトリウム(100mMの溶液)	1%のピルビン酸ナトリウム(100mMの溶液)
		50μg/mlのゲンタマイシン

【0166】

細胞培養およびウイルス救済

Vero細胞は、10%の熱失活ウシ胎児血清(Cellgro)、1%のピルビン酸ナトリウム(Invitrogen)、1%の非必須アミノ酸および0.01mg/mlのゲンタマイシン(Invitrogen)を添加したダルベッコ改変イーグル最小必須培地(DMEM、InvitrogenまたはCellgro)からなる、完全DMEM中で維持した。これは培地3に対応する。細胞は、電気穿孔を実施する前日に継代培養を行い、37、5%のCO<sub>2</sub>中でインキュベーションした。

【0167】

ウイルス救済は、電気穿孔によってプラスミドDNAをVero細胞内に導入した後に開始した。電気穿孔の最適条件は、www.btxonline.com(BTX Molecular Delivery Systems)から入手可能なDavid Pascoによるオンラインプロトコル0368でVero細胞に推奨される条件から開始して、経験的に決定した。

【0168】

単一の電気穿孔では、ほぼコンフルエントな単層(T150フラスコ)からのVero細胞を、約5mlのハンクス緩衝溶液で1×洗浄した。その後、細胞を、4mlのトリブ

シン - E D T A ( 0 . 0 5 % の ブ タ ト リ プ シ ン 、 0 . 0 2 % の E D T A 、 I n v i t r o g e n ) 中 で フ ラ ス コ から 剥 離 し た 。 具 体 的 に は 、 ト リ プ シ ン / E D T A 溶 液 を 単 層 に 加 え た 後 、 フ ラ ス コ を 振 動 さ せ て 溶 液 を 均 等 に 分 配 し 、 続 い て 、 室 温 で 3 ~ 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン し た 。 そ の 後 、 ト リ プ シ ン / E D T A 溶 液 を 吸 引 し 、 フ ラ ス コ の 側 面 を 軽 く 叩 い て 細 胞 を 外 し た 。 そ の 後 、 培 地 1 ( 1 0 m l ) を 用 い て 細 胞 を フ ラ ス コ から 収 集 し 、 細 胞 を 5 0 m l の コ ニ カ ル チ ュ ー ブ に 移 し た 。 続 い て 、 1 m l の ト リ プ シ ン 阻 害 剤 ( 1 m g / m l ) を 、 細 胞 を 含 有 す る チ ュ ー ブ に 加 え 、 内 容 物 を 穏 や か に 混 合 し た 。 3 0 0 × g で 5 分 間 、 室 温 で 遠 心 分 離 す る こ と に よ っ て 細 胞 を 懸 濁 液 か ら 収 集 し 、 そ の 後 、 上 清 を 吸 引 し 、 ペ レ ッ ト を 1 0 m l の 培 地 2 に 再 懸 濁 さ せ た 。 次 に 、 1 m l の ト リ プ シ ン 阻 害 剤 ( 1 m g / m l ) を 細 胞 懸 濁 液 に 加 え 、 懸 濁 液 を 穏 や か に 混 合 し た 。 続 い て 、 3 0 0 × g で 5 分 間 、 室 温 で 遠 心 分 離 す る こ と に よ っ て 、 懸 濁 液 か ら 細 胞 を 収 集 し た 。 上 清 を 吸 引 し 、 細 胞 ペ レ ッ ト を 0 . 7 0 m l の 培 地 2 の 最 終 体 積 に 再 懸 濁 さ せ た 。

10

#### 【 0 1 6 9 】

上 述 の よ う に 調 製 し た 、 2 5 ~ 5 0 μ g の 、 T 7 ( p C I - N e o - B c l - T 7 ) を 発 現 す る プ ラ ス ミ ド 「 h C M V - T 7 発 現 プ ラ ス ミ ド 」 、 1 0 μ g の V S V 完 全 長 プ ラ ス ミ ド 、 8 μ g の N プ ラ ス ミ ド 、 4 μ g の P プ ラ ス ミ ド 、 お よ び 1 μ g の L 、 M お よ び G プ ラ ス ミ ド の そ れ ぞ れ を 含 有 す る 、 ヌ ク レ ア ー ゼ を 含 ま ない 水 中 の 、 5 0 μ l の D N A 溶 液 を 、 0 . 7 m l の 細 胞 懸 濁 液 と 合 わ せ た 。 細 胞 お よ び D N A を 穏 や か に 混 合 し 、 混 合 物 を 電 気 穿 孔 キ ュ ベ ッ ト ( 4 m m の ギ ャ ッ プ 、 V W R ま た は B T X ) に 移 し た 。 一 部 の 実 施 形 態 で は 、 G プ ラ ス ミ ド は 、 最 適 化 さ れ て い ない V S V G コ ー ド 配 列 ( た と え ば 天 然 の G オ ー プ ン リ ー デ ィ ン グ フ レ ー ム ) を 含 有 す る 。 一 部 の 他 の 実 施 形 態 で は 、 G プ ラ ス ミ ド は 、 本 明 細 書 中 に 記 載 の も の な ど の 、 最 適 化 し た V S V G コ ー ド 配 列 を 含 有 す る 。 B T X 方 形 波 電 気 穿 孔 器 ( B T X E C M 8 2 0 ま た は 8 3 0 、 B T X M o l e c u l a r D e l i v e r y S y s t e m s ) を 用 い て 細 胞 を バ ル ス し ( 4 回 、 1 4 0 ~ 1 4 5 V 、 7 0 m s ) 、 そ の 後 、 こ れ ら を 室 温 で 約 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー シ ョ ン し た 後 、 1 m l の 培 地 1 を 加 え 、 キ ュ ベ ッ ト の 内 容 物 を 1 0 m l の 培 地 1 を 含 有 す る 無 菌 的 な 1 5 m l の 遠 心 チ ュ ー ブ に 移 し 、 続 い て 穏 や か に 混 合 し た 。 そ の 後 、 3 0 0 × g で 5 分 間 、 室 温 で 遠 心 分 離 す る こ と に よ っ て 電 気 穿 孔 し た 細 胞 を 収 集 し 、 1 0 m l の 培 地 1 に 再 懸 濁 さ せ た 後 、 2 5 m l の 培 地 1 を 含 有 す る T 1 5 0 フ ラ ス コ に 移 し た 。 フ ラ ス コ を 終 夜 、 3 7 ° C 、 5 % の C O <sub>2</sub> で イ ン キュベーションした。翌日、培地を 1 5 ~ 3 0 m l の 培 地 3 に 置 き 換 え た 。 C P E が 明 白 に な る ま で 、 定 期 的 に 培 地 を 変 え な が ら 、 イ ン キュベーションを 3 7 ° C 、 5 % の C O <sub>2</sub> で 続 け た 。 V S V の 複 製 は 、 典 型 的 に は 、 早 く も 3 ~ 4 日 で 明 白 で あ っ た が 、 一 部 の 例 で は 、 6 日 と 長 く か か る 場 合 が あ っ た 。 ま た 、 一 部 の 例 で は 、 細 胞 変 性 効 果 ( C P E ) が 明 白 と な る 前 に 同 時 培 養 ス テ ッ プ が 必 要 で あ っ た 。

20

30

#### 【 0 1 7 0 】

同 時 培 養 は 、 1 0 m l を 残 し た す べ て の 培 地 を フ ラ ス コ から 吸 引 し 、 そ の 後 、 掻 爬 に よ っ て 細 胞 を 剥 離 す る こ と に よ っ て 、 電 気 穿 孔 の 約 4 8 ~ 7 2 時 間 後 に 開 始 し た 。 細 胞 凝 集 体 の 大 き さ を 最 小 に す る た め に 、 剥 離 し た 細 胞 を 複 数 回 ピ ペ ッ ト 操 作 し 、 最 適 化 し た V S V G 遺 伝 子 に よ っ て コ ー ド さ れ て い る V S V G タ ン パ ク 質 を 一 過 的 ま た は 構 成 的 に 発 現 す る 、 確 立 さ れ た 5 0 % コ ン フ ル エ ン ト な V e r o 細 胞 の 単 層 を 含 有 す る フ ラ ス コ に 移 し た 。

40

#### 【 0 1 7 1 】

た と え ば 、 機 能 的 な G タ ン パ ク 質 を 欠 く 繁 殖 欠 損 r V S V ( G お よ び G s t e m ウ イ ル ス ) の 救 済 に 用 い た 適 切 な 同 時 培 養 方 法 で は 、 最 初 に 、 最 適 化 し た V S V G 遺 伝 子 を 含 有 す る 5 0 μ g の プ ラ ス ミ ド ベ ク タ ー ( た と え ば 、 上 記 実 施 例 1 お よ び 2 か ら の p C M V - O p t 1 ま た は p C M V - R N A o p t ) を 含 む コ ン フ ル エ ン ト な T 1 5 0 フ ラ ス コ か ら の V e r o 細 胞 を 電 気 穿 孔 す る こ と に よ っ て 調 製 し た 、 同 時 培 養 単 層 を 用 い た 。 電 気 穿 孔 は 上 述 の よ う に 行 っ た 。 電 気 穿 孔 し た 細 胞 を 洗 浄 し た 後 、 細 胞 を 終 夜 、 3 7 ° C 、 5 % の C O <sub>2</sub> で イ ン キュベーションして、V S V G タ ン パ ク 質 を 発 現 さ せ た 。 同 時 培 養 物 を 確 立 す る 前 に 、 培 地 を 1 5 m l の 培 地 3 で 置 き 換 え た 。 こ れ ら の 細 胞 は 、 本 明 細 書 中 で 「

50

ブランク拡大細胞」と呼び、先行する段落中に記載したウイルス救済細胞との同時培養物を確立するための単層として使用する。

【0172】

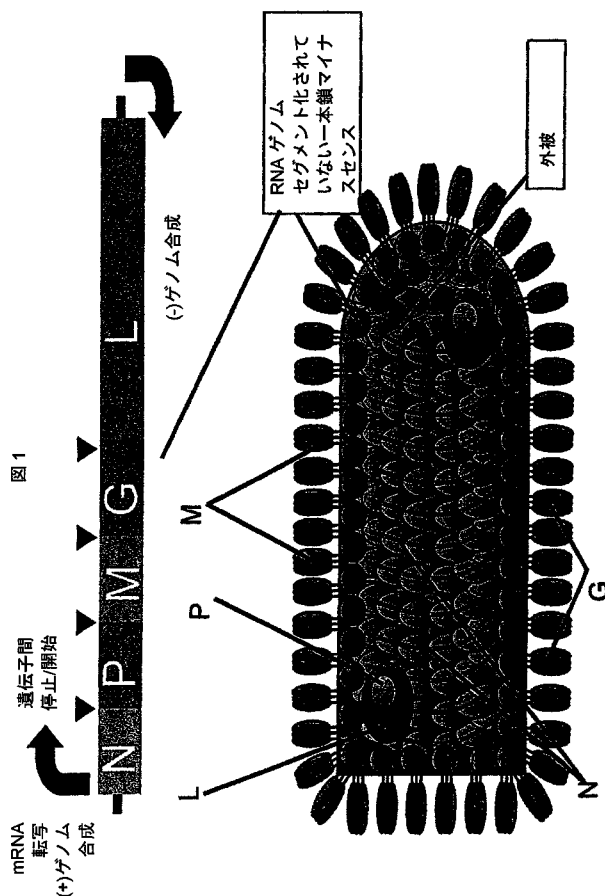
ブランク拡大細胞の単層は、同時培養ステップ中に、ウイルスを用いて、0.1～0.01の感染多重度(MOI)に感染させる。CPEが明白になるまで、同時培養物を32～37℃、5%のCO<sub>2</sub>でインキュベーションし、これは、一般に約24～48時間かかった。その後、ウイルスを、当分野で周知の方法を用いて、スクロースクッションを通した遠心分離によって精製した。

【0173】

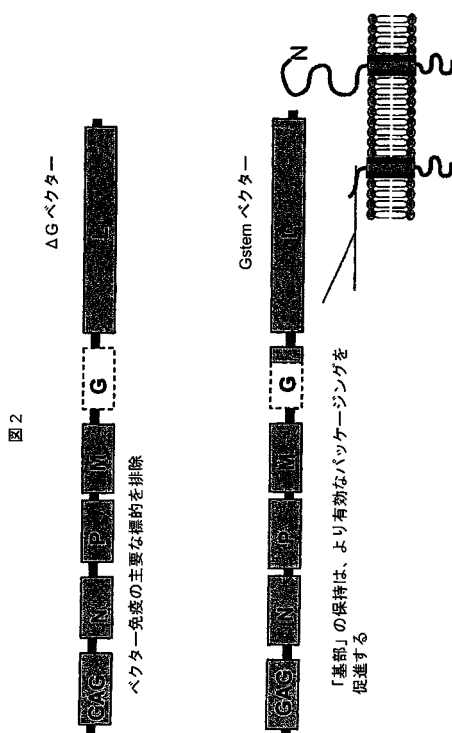
特許および特許出願を含めた、本明細書中で言及したすべての論文または参考文献は、すべての目的のためにその全体で本明細書中に組み込まれている。

10

【図1】

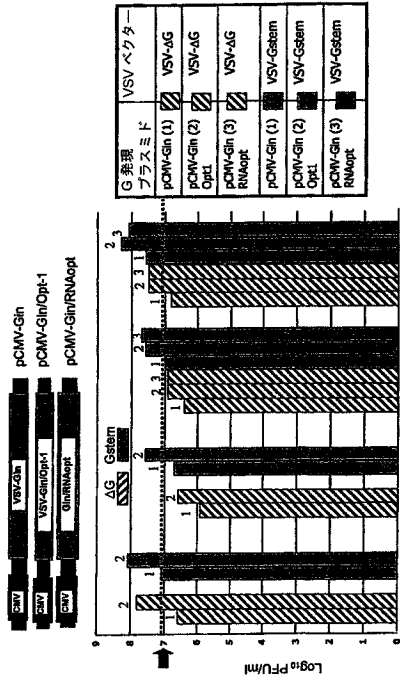


【図2】



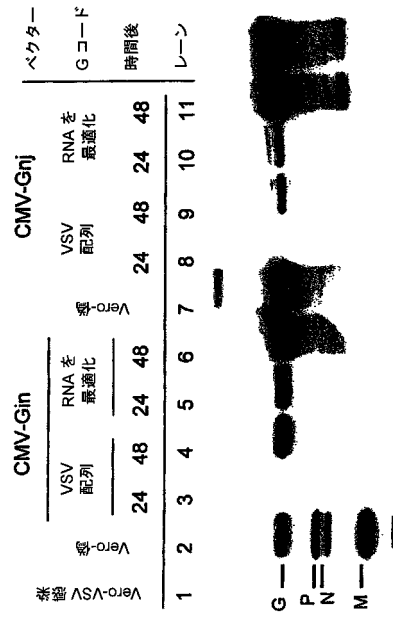


【 図 7 】

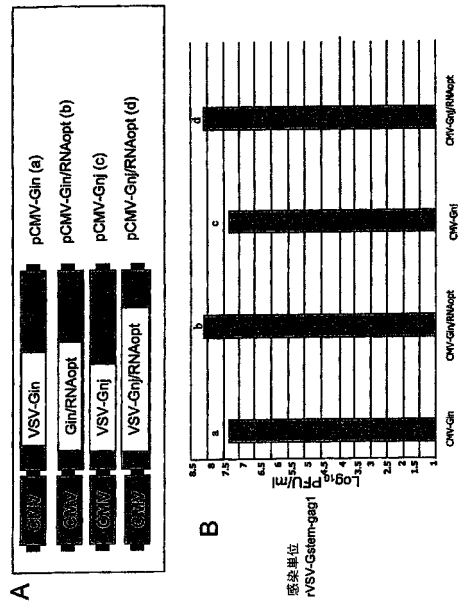


\*pCMV-Gin/RNAopt は実験 1 および 2 で試験しなかった

【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2011507515000001.app



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/013834

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N7/04 C07K14/145		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/113517 A (WYETH CORP [US]; PARKS CHRISTOPHER L [US]; UDEM STEPHEN A [US]; SIDHU) 29 December 2004 (2004-12-29) page 48, line 2 - line 9; example X	1-12, 14-41, 43-57
X	WITKO S ET AL: "An efficient helper-virus-free method for rescue of recombinant paramyxoviruses and rhadoviruses from a cell line suitable for vaccine development" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 135, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 91-101, XP005444677 ISSN: 0166-0934 abstract, materials and methods; ----- -/-	1-12, 14-41, 43-57
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 March 2009		27/03/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Sommer, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/013834

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TERNETTE N ET AL: "Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps" VIROLOGY JOURNAL, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 4, no. 1, 5 June 2007 (2007-06-05), page 51, XP021030395 ISSN: 1743-422X abstract; results; figure 1; conclusion;	1-57
A	BRADEL-TRETHEWAY B G ET AL: "Effects of codon-optimization on protein expression by the human herpesvirus 6 and 7 U51 open reading frame" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 111, no. 2, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 145-156, XP002995771 ISSN: 0166-0934 abstract	1-57

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/013834

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004113517 A	29-12-2004	AU 2004250129 A1	29-12-2004
		BR PI0411247 A	25-07-2006
		CA 2528002 A1	29-12-2004
		CN 1871355 A	29-11-2006
		EP 1633860 A2	15-03-2006
		JP 2007500017 T	11-01-2007
		KR 20060028691 A	31-03-2006
		MX PA05013141 A	17-03-2006
<hr/>			

## フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クルストファー エル . パークス

アメリカ合衆国 07005 ニュージャージー州 ブラントントン市 サウス・テラス 118

(72)発明者 スーザン イー . ウィットウコ

アメリカ合衆国 10956 ニューヨーク州 ニュー・シティ市 タマラック・アヴェニュー 3

(72)発明者 マニンダー ケイ . シドゥ

アメリカ合衆国 10956 ニューヨーク州 ニュー・シティ市 ローウェル・ドライブ 35

(72)発明者 ジェイ . エリック ジョンソン

アメリカ合衆国 07044 ニュージャージー州 ヴェローナ市 ハミルトン・ロード 49

(72)発明者 ロジャー マイケル ヘンドリー

アメリカ合衆国 10990 ニューヨーク州 ウォーウィック市 ルート 17エー 384

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 EA02 EA04 GA11 GA14

HA01 HA11

4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 BA03 CA24 CA44

4C085 AA06 BA64 DD01 DD62

## 【要約の続き】

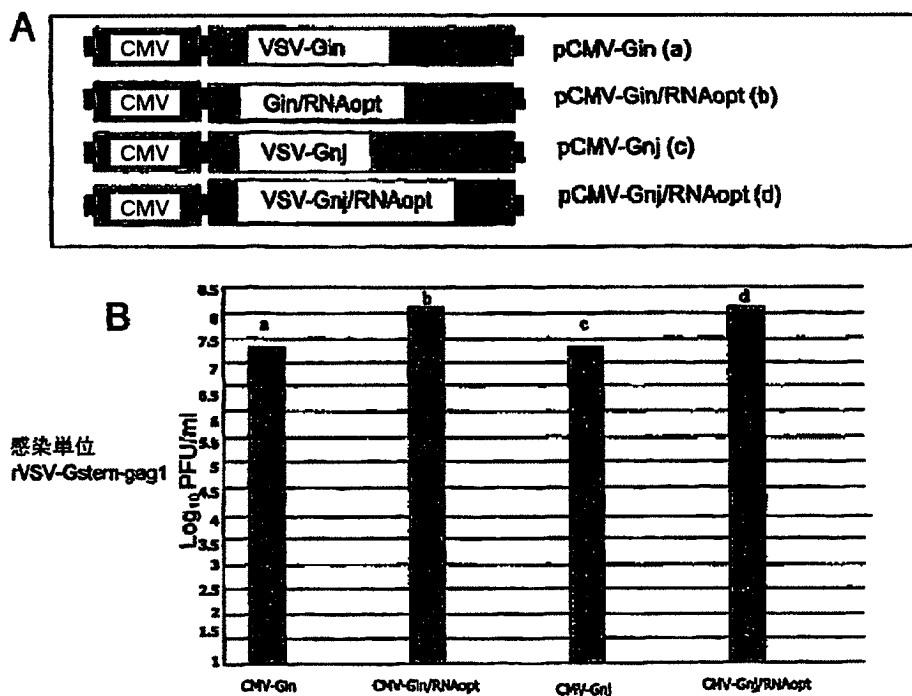


図 9