

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4866526号
(P4866526)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
A 6 1 K 39/155	(2006.01)	A 6 1 K	39/155
C 1 2 N 7/04	(2006.01)	C 1 2 N	7/04
C 1 2 R 1/93	(2006.01)	C 1 2 N	7/04
		C 1 2 R	1:93

請求項の数 6 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2001-568240 (P2001-568240)	(73) 特許権者	504333972
(86) (22) 出願日	平成13年3月21日 (2001.3.21)		メディミュン、エルエルシー
(65) 公表番号	特表2003-527122 (P2003-527122A)		アメリカ合衆国 20878 メリーラン
(43) 公表日	平成15年9月16日 (2003.9.16)		ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/009091		ュン ウェイ
(87) 国際公開番号	W02001/070032	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成20年2月13日 (2008.2.13)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	09/531, 375		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成12年3月21日 (2000.3.21)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えパラインフルエンザウイルス発現系とワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) カンサス (K a n s a s) 株ウシパラインフルエンザウイルス 3 型ゲノムの 1 - 5 0 4 1 位のヌクレオチドおよび 8 5 2 9 - 1 5 4 5 6 位のヌクレオチドからなる該カンサス (K a n s a s) 株ウシパラインフルエンザウイルス 3 型ゲノムのヌクレオチド配列 ; ならびに

(i i) ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型の F および H N 遺伝子配列 ; を含む、キメラパラインフルエンザウイルス。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のキメラパラインフルエンザウイルスであって、

(a) 該キメラパラインフルエンザウイルスの 5 2 5 5 - 6 2 5 5 位のヌクレオチドを P C R 増幅することによって、S a c 1 と B g 1 I I の制限酵素により認識される D N A 断片を生じ ; かつ

(b) 該キメラパラインフルエンザウイルスの 9 0 7 5 - 1 0 4 6 9 位のヌクレオチドを P C R 増幅することによって、P v u I I と B a m H 1 の制限酵素により認識される D N A 断片を生じる、上記キメラパラインフルエンザウイルス。

【請求項 3】

さらに、R S V に由来する一または複数の配列を含む、請求項 1 または 2 に記載のキメラパラインフルエンザウイルス。

【請求項 4】

10

20

R S VがヒトR S Vである、請求項3に記載のキメラパラインフルエンザウイルス。

【請求項5】

R S Vに由来する一または複数の配列が、ヒトR S VのF遺伝子配列である、請求項3または4に記載のキメラパラインフルエンザウイルス。

【請求項6】

製薬上許容される賦形剤および請求項1～5のいずれか1項に記載のキメラパラインフルエンザウイルスを含む、医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. 序論

本発明は、適当な宿主細胞系において異種遺伝子産物を発現するためならびに/または異種遺伝子産物を発現しパッケージしおよび/もしくは提示するマイナス鎖RNA組換えウイルスをレスキューするために使用し得る組換えパラインフルエンザウイルス(PIV) cDNAまたはRNAに関する。そのキメラウイルスおよび発現産物は、広範囲の病原体および抗原に対するワクチン製剤に有利に利用し得る。本発明は、ヒトPIVまたはウシPIVゲノム配列および異種抗原をコードするヌクレオチド配列を含んでなるキメラウイルスに関する。特に、本発明は、PIVの他の種もしくは他のウイルスの抗原性糖タンパク質を発現するキメラPIVを含んでなるワクチン調製物を包含する。一実施形態においては、本発明は、生存しかつ感染性のある交雑種bPIV3/hPIV3に関する。

【0002】

本発明はまた、組換えウイルスをワクチン製剤への使用に適したものにする、弱毒化表現型または免疫原性増強などの改変および/または突然変異を含有する、遺伝子操作したパラインフルエンザウイルスにも関する。本発明は、腫瘍特異性抗原を含む広範囲の病原体および/または抗原に対する組換えパラインフルエンザウイルスおよびウイルスベクターの使用に関する。一実施例では、プラスまたはマイナス極性(positive or negative polarity)で配列をコードする異種遺伝子を含有するパラインフルエンザウイルスcDNAまたはRNAを構築し、次にこれを用いてマイナス鎖RNAキメラウイルス粒子をレスキューし、および/または異種遺伝子産物を発現し、次いでこれをワクチン調製物に使用する。特に、そのような異種遺伝子配列はPIVの他の種由来の配列が挙げられる。

【0003】

2. 発明の背景

パラインフルエンザウイルス感染は乳児および小児に重篤な気道疾患をもたらす(Taoら, 1999, Vaccine 17:1100-08)。感染性パラインフルエンザウイルス感染は、世界中の気道感染症を患う小児科の全入院患者のほぼ20%に当たる(同上)。PIV関係疾患予防用のワクチンはまだ承認されていないし、発病したときの有効な抗ウイルス治療法もない。

【0004】

PIVはパラミクソウイルス科のパラミクソウイルス属のメンバーである。PIVは、2つの構造モジュール:(1)ウイルスゲノムを含有する内部リボ核タンパク質コア、もしくはヌクレオカプシド、および(2)外側のほぼ球状のリボタンパク質エンベロープから成る。そのゲノムは一本鎖のマイナスセンスRNAで、ほぼ15,456ヌクレオチドの長さであって少なくとも8つのポリペプチドをコードする。これらのタンパク質は、ヌクレオカプシド構造タンパク質(属に依ってNP、NC、またはN)、リンタンパク質(P)、マトリックスタンパク質(M)、融合糖タンパク質(F)、赤血球凝集素-ノイラミニダーゼ糖タンパク質(HN)、大ポリマーゼタンパク質(L)、および未知の機能のCおよびDタンパク質が挙げられる(同上)。

【0005】

パラインフルエンザのヌクレオカプシドタンパク質(NP、NCまたはN)は2つのドメインからなり、それぞれのタンパク質ユニット内には分子のほぼ3分の2を含有して直接RNAと相互作用するアミノ末端ドメイン、および組立てたヌクレオカプシドの表面上に横たわるカルボキシル末端ドメインを含む。これらの2ドメインの接合部にヒンジが存在し、それに

10

20

30

40

50

よってこのタンパク質に若干のフレキシビリティを与えると考えられる（参照により本明細書にその全文が組み入れられる、Fieldsら（編），1991，「基礎ウイルス学（Fundamental Virology）」第2版，Raven Press，New Yorkを参照）。マトリックスタンパク質（M）は外見上のウイルス組立に関わり、ウイルス膜ならびにヌクレオカプシドタンパク質の両方と相互作用する。リン酸化を受けたリンタンパク質（P）は転写に調節的役割を果たしかつメチル化、リン酸化およびポリアデニル化にも関わると考えられる。融合糖タンパク質（F）はウイルス膜と相互作用し、最初は不活性前駆体として産生し、次いで翻訳後に切断されて2つのジスルフィドで連結されたポリペプチドを産生する。活性Fタンパク質はまた、ウイルスエンベロープと宿主細胞形質膜の融合を容易にすることによって、宿主細胞中へのパラインフルエンザビリオンの侵入にも関わる（同上）。糖タンパク質である赤血球凝集素ノイラミニダーゼ（HN）はエンベロープから突出して、ウイルスに赤血球凝集素とノイラミニダーゼの両方の活性を持たせる。HNはそのアミノ末端が強い疎水性を持ち、HNタンパク質を脂質二重層に固定する機能を果たす（同上）。最後に、大ポリメラーゼタンパク質（L）は転写と複製の両方に重要な役割を果たす（同上）。

【0006】

一実施形態においては、本発明は、交雑種ウシPIV3/ヒトPIV3キメラウイルスワクチンの構築に関する。ウシパラインフルエンザウイルスは、最初に1959年に船積み熱(shipping fever)の徴候を示す子牛から単離された。その後、正常なウシ、流産胎仔、および呼吸器疾患の徴候を示すウシから単離されている（Breker-Klassenら，1996，Can. J. Vet. Res. 60:228-236）。Shibuta, 1977, Microbiol. Immunol. 23 (7), 617-628も参照すること。ヒトとウシPIV3は中和エピトープを共有するが、異なる抗原特性を示す。ヒトとウシウイルス株の間の有意な差はHNタンパク質にある。実際、ウシ株はhPIV3感染に対して若干の中和抗体を誘発するが、ヒト株はヒトPIV3に対してもっと広いスペクトルの中和抗体を誘発するようである（Klippmarkら，1990，J. Gen. Vir. 71:1577-1580）。従って、本発明のbPIV3/hPIV3キメラウイルスワクチンもhPIV3感染に対する広いスペクトルの中和抗体を誘発する一方、ヒトの使用に対して弱毒化されかつ安全であると期待される。他のキメラパラインフルエンザウイルスワクチンも本発明に包含される。

【0007】

PIVを含む全てのマイナス鎖RNAウイルスの複製は、RNAを複製するために必要な細胞機構が不在のため複雑である。さらに、マイナス鎖ゲノムはタンパク質に直接翻訳できないので、最初にプラス鎖（mRNA）コピーに転写しなければならない。従って、宿主細胞中に侵入しても、ゲノムRNA単独では必要なRNA依存性RNAポリメラーゼを合成できない。感染時に、ゲノムと共にL、PおよびNタンパク質が細胞に侵入しなければならない。

【0008】

PIV mRNAを転写するウイルスタンパク質のほとんどまたは全ては、それらの複製も実施すると仮定される。タンパク質の同じ相補体（complement）の異なる使用（すなわち、転写または複製）を調節する機構は明確に同定されていないが、遊離型の1以上のヌクレオカプシドタンパク質の存在量に関わると思われる。ウイルスの侵入後に直ぐ、Lタンパク質によりヌクレオカプシド中のマイナスセンスRNAを鋳型として使って転写が開始される。ウイルスRNA合成は、転写の間、モノシストロン性mRNAを産生するように調節される。

【0009】

転写の後、ウイルスゲノム複製がマイナス鎖RNAウイルスによる感染における第2の必須事象である。他のマイナス鎖RNAウイルスのように、PIVのウイルスゲノム複製にはウイルスに特異的なタンパク質が介在する。複製RNA合成の最初の産物はPIVゲノムRNA（cRNA）の相補コピー（すなわち、プラス-極性）である。これらのプラス鎖コピー（アンチゲノム）はプラス鎖mRNA転写物と末端構造が異なる。アンチゲノムcRNAはmRNA転写物と異なり、5'末端がキャップ構造化およびメチル化されていないかつ3'末端で末端切断およびポリアデニル化されていない。cRNAはそのマイナス鎖鋳型と共末端であって、全ての相補型の遺伝子情報を含む。cRNAはPIVマイナス鎖ウイルスゲノム（vRNA）の合成用鋳型として作用する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

bPIVマイナス鎖ゲノム (vRNA) とアンチゲノム (cRNA) の両方が、ヌクレオカプシドタンパク質によりカプシド化される；唯一のカプシド化されないRNA種はウイルスmRNAである。bPIVについては、細胞質は、転写場所であると同様に、ウイルスRNA複製の場所である。ウイルス構成要素の組立ては宿主細胞原形質膜で行われるようであり、成熟ウイルスは出芽 (budding) により放出される。

【 0 0 1 1 】

2.1. マイナス鎖RNAウイルスの遺伝子工学

動物ウイルスのRNA指令 (directed) RNAポリメラーゼは、タンパク質構造と反応条件の多くの態様について広範に研究されている。しかし、ポリメラーゼによる最適な発現を促進する鋳型RNAの要素は、既存のウイルスRNA配列を用いる推論によってしか研究できない。このプロモーター分析は重要である。何故ならば、ウイルスポリメラーゼが、感染細胞中にある多数の宿主がコードするRNAの中から特定のウイルスRNAをどのようにして認識するかは未知だからである。

10

【 0 0 1 2 】

プラスセンスのゲノムRNAを含有する動物ウイルスは、プラスミド由来のRNAをトランスフェクションにより細胞中に導入すると、複製することができる (例えば、Racanielloら, 1981, Science 214:916-919; Levisら, 1986, Cell 44:137-145)。ポリオウイルスの場合、精製ポリメラーゼは、in vitro反応でゲノムRNAを複製し得、そしてこのプラスセンスRNA調製物を細胞中にトランスフェクトした場合に感染性がある (Kaplanら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8424-8428)。しかし、RNAホモポリマーでもコピーするので、ポリオウイルスがコードするポリメラーゼに対する転写プロモーターとして供される鋳型要素は未知である (Wardら, 1988, J. Virol. 62:558-562)。SP6転写物も、シンドビスウイルス (Sindbis virus) ゲノムに対するモデル欠陥妨害 (DI) RNAを作るために使用されている。該RNAを感染細胞中に導入すると、RNAは複製されかつパッケージングされる。シンドビスウイルスポリメラーゼによる認識およびゲノムのウイルス粒子中へのパッケージングの両方に関わるRNA配列は、ゲノムの5'末端の162ヌクレオチド (nt) 内および3'末端の19nt内にあることが示された (Levisら, 1986, Cell 44:137-145)。プロムモザイクウイルス (brome mosaic virus) (BMV)、プラス鎖RNA植物ウイルスの事例では、SP6転写物を用いて、プロモーターを134 nt tRNA様の3'末端として同定している (DreherおよびHall, 1988, J. Mol. Biol. 201:31-40)。ポリメラーゼ認識と合成は、配列と二次構造特性の両方に依存することが示された (Dreherら, 1984, Nature 311:171-175)。

20

30

【 0 0 1 3 】

マイナスセンスRNAウイルスは、レプリカーゼの配列の要件について研究するのが非常に困難である。水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus) の精製ポリメラーゼは、ウイルス由来のリボ核タンパク質複合体 (RNP) が鋳型として含まれるときだけ転写に活性がある (DeおよびBanerjee, 1985, Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:40-49; EmersonおよびYu, 1975, J. Virol. 15:1348-1356; NaitoおよびIshihama, 1976, J. Biol. Chem. 251:4307-4314)。インフルエンザウイルスについては、ウイルスから精製した裸RNAを用いてRNPを再構成したと報告された。ウイルスのヌクレオカプシドとポリメラーゼタンパク質をゲル精製して、ウイルスRNA上にチオレドキシンを用いて再生した (Szeczykら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7907-7911)。しかし、これらの報告者は、調製物の活性がインフルエンザウイルスRNAに特異的であることを示さなかったし、転写を促進するシグナルを分析しなかった。

40

【 0 0 1 4 】

現在では、組換え逆遺伝学 (recombinant reverse genetics) 手法を利用して、マイナス鎖RNAウイルスを回収することが可能である。本明細書に参照によりその全文が組み入れられるPaleseらの米国特許第5,166,057号を参照すること。この方法は元来インフルエンザウイルスゲノムを遺伝子操作するのに応用されたが (Luytjesら, 1989, Cell 59:1107-

50

1113 ; Enamiら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11563-11567)、その後、成功裏に広範囲の分節型 (segmented) および非分節型マイナス鎖RNAウイルスに適用されており、狂犬病 (Schneilら, 1994, EMBO J. 13:4195-4203); 呼吸器合胞体ウイルス (Collinsら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9663-9667); およびセンダイウイルス (Parkら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5537-5541; Katoら, 1996, Genes Cells 1:569-579) が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

逆遺伝学は、PIV3の他のミニゲノム、すなわち全てのウイルス遺伝子がCAT遺伝子のマイナスセンスコピーにより置換えられたvRNAをコードするcDNA、をレスキューするのに応用されて成功している (Dimockら, 1993, J. Virol. 67:2772-2778)。この研究においては、逆遺伝学を利用して、PIVの複製、遺伝子発現および伝達に必要な最小のPIV3の3'末端および5'末端ヌクレオチド配列を同定した。感染性ヒトPIV3をレスキューした例では、逆遺伝学手法を応用して、完全なhPIV3ゲノム、hPIV3ヌクレオカプシドタンパク質N、リンタンパク質Pおよびポリマーゼタンパク質Lを別々にコードするcDNAを用いてトランスフェクトした細胞からウイルスを回収するのに成功した (Durbin & Banerjee, 1997, J. Virol. 235:323-332)。

【 0 0 1 6 】

逆遺伝学手法はまた、ワクチンを作成する目的で組換えヒトPIVを産生するために、組換えパラインフルエンザゲノムを遺伝子操作するのもにも応用されている。Murphyらによる標題「クローニングしたヌクレオチド配列から弱毒化パラインフルエンザウイルスワクチンの生産 (Production of Attenuated Parainfluenza Virus Vaccines From Cloned Nucleotide Sequences)」のWO 98/53078を参照すること。しかしこの手法は、異種配列を含有しかつヒト投与用ワクチンに利用するのに適した性質を有するPIV3を遺伝子操作するための応用には今まで成功してない。

【 0 0 1 7 】

3. 発明の概要

適当な宿主細胞において異種遺伝子産物を発現しおよび/またはウイルス粒子の異種遺伝子をレスキューするために、発現プラスミドおよび/またはヘルパーウイルスとともに利用し得る、組換えパラインフルエンザウイルスcDNAおよびRNAを記載した。一実施形態においては、本発明は、異種抗原を発現する組換えウシまたはヒトパラインフルエンザウイルスを遺伝子操作することに関する。特に、本発明は、異種配列ならびに異種配列をコードするcDNAおよびRNA分子を含有するカンサス (Kansas) 株ウシパラインフルエンザ3型ウイルスを遺伝子操作することに関する。本発明はまた、キメラウイルスをワクチン製剤での使用にさらに適したものにする表現型が得られる改変を含有し、かつPIVの他の種の遺伝子、他のウイルス、病原体、細胞遺伝子、腫瘍抗原などを含む異種遺伝子を含有する組換えPIVにも関する。

【 0 0 1 8 】

本発明は、本明細書に記載のキメラウイルスおよびベクターを含んでなるワクチンに関する。本発明はまた、ヒトへの投与、ならびに獣医学用途に適当なワクチン製剤にも関する。例えば、本発明のワクチンは、小児を含むヒト、ネコおよびイヌを含む家庭動物; キツネおよびアライグマを含む野生動物; ウマ、ウシ、ヒツジ、七面鳥およびニワトリを含む家畜および家禽へ投与するために設計することができる。

【 0 0 1 9 】

他の実施形態においては、本発明は、PIVの異なる株からの遺伝子の組合せをコードする、または他のウイルス、病原体、細胞遺伝子、腫瘍抗原などの異種遺伝子を含有する、組換えパラインフルエンザウイルスおよびウイルスベクターを遺伝子操作することに関する。従って、本発明は、遺伝子操作されて、ヒトPIV3のFおよびHN遺伝子を含む、パラインフルエンザウイルスの異なる種および株からの遺伝子をコードする組換えパラインフルエンザベクターおよびウイルスを包含する。

【 0 0 2 0 】

さらなる実施形態においては、キメラウイルスまたは発現産物のレスキューは、宿主細胞がキメラcDNAまたはRNA構築物を用いてトランスフェクトされている宿主細胞系の逆遺伝学により達成することができる。本発明のRNA鋳型は、DNA指令RNAポリメラーゼによる適当なDNA配列の転写によって調製される。得られるRNA鋳型はマイナス極性であってウイルスRNA合成器(viral RNA-synthesizing apparatus)に鋳型を認識させる適当な末端配列を有する。あるいは、ウイルスRNA合成器に鋳型を認識させる適当な末端配列を有するプラス極性RNA鋳型を用いてもよい。プラス極性RNA鋳型からの発現は、DNA依存性RNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターを有するプラスミドのトランスフェクションにより達成することができる。例えば、T7プロモーターの制御下でプラスRNA鋳型をコードするプラスミドDNAを、ワクシニアウイルスT7系と一緒に使用してもよい。

10

【0021】

ピシストロンmRNAを構築して、ウイルス配列の翻訳を内部開始させかつ外来タンパク質コード配列の発現を正規の末端開始部位から行わせてもよく、または逆であってもよい。あるいは、外来タンパク質を、開始部位とポリアデニル化部位を有する内部転写ユニットから発現してもよい。他の実施形態においては、外来遺伝子をPIV遺伝子中に挿入して、得られる発現タンパク質が融合タンパク質となるようにする。

【0022】

本発明の組換え突然変異パラインフルエンザウイルスcDNAとRNA鋳型を利用してRNA依存性RNAポリメラーゼを発現する形質転換細胞系をトランスフェクトし、そして補完(completion)させることができる。あるいは、適当なプロモーターから発現するプラスミドを、ウイルス特異的(キメラ)RNAトランスフェクションに利用してもよい。補完はまた、RNA依存性RNAポリメラーゼを与えるヘルパーウイルスを用いて達成してもよい。さらに、パラインフルエンザウイルス用の非ウイルス依存性複製系も記載する。ウイルスの特異的複製と発現に必要なパラインフルエンザウイルスタンパク質の最小サブセットは、3タンパク質、L、P、およびNもしくはNPであって、ワクシニアウイルスT7または他の系によってプラスミドから発現させることができる。PIVゲノムのアンチゲノムコピーをコードするプラスミドを使用してウイルスゲノムを供給するときは、ウイルスの特異的複製と発現に必要なウイルスタンパク質の最小サブセットは、LおよびPタンパク質である、というのはゲノムのアンチゲノムコピーが転写されるとき、NもしくはNPポリメラーゼタンパク質は転写される最初のタンパク質であるので、さらにNもしくはNPポリメラーゼをin transに与える必要がないからである。

20

30

【0023】

得られる発現産物および/またはキメラビリオンはワクチン製剤に有利に利用することができる。本発明の発現産物とキメラビリオンを遺伝子操作して広範囲の病原体に対するワクチンを作製することができ、その病原体としてはウイルスおよび細菌抗原、腫瘍抗原、アレルギー抗原、ならびに自己免疫障害に関わる自己抗原が挙げられる。特に、本発明のキメラビリオンを遺伝子操作して抗ヒトパラインフルエンザワクチンを作製することで、この場合、ウシパラインフルエンザ融合(F)と赤血球凝集素(HN)糖タンパク質をヒトFとHN糖タンパク質により置換してヒト用のキメラbPIV/hPIVワクチンを構築する。他の実施形態においては、本発明のキメラビリオンを遺伝子操作して抗HIVワクチンを作製

40

【0024】

3.1. 定義

本明細書で使用される次の用語は示した意味を有する：

cDNA = 相補DNA

50

L = 大タンパク質

M = マトリックスタンパク質 (エンベロープの内側ライニング)

F = 融合糖タンパク質

HN = 赤血球凝集素ノイラミニダーゼ糖タンパク質

N、NPまたはNC = 核タンパク質 (RNAと関連してポリメラーゼ活性に必要)

P = リンタンパク質

MOI = 感染多重度

NA = ノイラミニダーゼ (エンベロープ糖タンパク質)

PIV = パラインフルエンザウイルス

bPIV = ウシパラインフルエンザウイルス

hPIV = ヒトパラインフルエンザウイルス

bPIV/hPIV = hPIV配列による組換えbPIV

nt = ヌクレオチド

RNP = リボ核タンパク質

rRNP = 組換えRNP

vRNA = ゲノムウイルスRNA

cRNA = アンチゲノムウイルスRNA

4. 図面の説明

(図面の説明については下記参照)

5. 発明の説明

本発明は、組換えパラインフルエンザcDNAおよびRNA構築物であって、さらに特定すれば、組換えカンサス (Kansas) 株ウシPIV3 cDNAおよびRNA構築物を含み、かつ異種遺伝子産物を適当な宿主細胞系内で発現しならびに / または異種遺伝子産物を発現しパッケージングしおよび / もしくは提示するマイナス鎖RNA組換えウイルスをレスキューするために使用し得る、前記組換えパラインフルエンザcDNAおよびRNA構築物に関する。これらのキメラウイルスおよび発現産物は、ヒトまたは動物に投与するために適当なワクチンとして使用することができる。本発明の特定の実施形態においては、異種遺伝子産物はヒト免疫不全ウイルスのゲノム由来のペプチドまたはタンパク質である。

【0025】

一実施形態においては、本発明は、様々な種のウイルスの糖タンパク質をコードする遺伝子を含む、外来抗原ならびに様々な病原体、細胞遺伝子、腫瘍抗原およびウイルスからの他の産物をコードする異種遺伝子を発現するために使用し得る、ヒトまたはウシPIV変異体由来のPIV cDNA構築物に関する。従って、本発明は、パラインフルエンザウイルスの様々な種または株からの遺伝子ならびに病原体、腫瘍、アレルゲン、および自己免疫障害に関わる自己抗原由来の外来抗原をコードするように遺伝子操作された組換えパラインフルエンザベクターおよびウイルスを包含する。本発明はまた、同じ種または株の組換えパラインフルエンザウイルスベクターおよびウイルスをコードするように遺伝子操作した組換えパラインフルエンザウイルスベクターおよびウイルスにも関する。

【0026】

さらなる実施形態においては、キメラウイルスまたは発現産物のレスキューは、宿主細胞をキメラcDNAまたはRNA構築物を用いてトランスフェクトした宿主細胞系における逆遺伝学によって達成することができる。本発明のRNA鋳型は、DNA指令RNAポリメラーゼによる適当なDNA配列の転写によって調製される。本発明のRNA鋳型は、in vitroまたはin vivoで、バクテリオファージT7、T3、SP6ポリメラーゼなどのDNA指令RNAポリメラーゼまたはポリメラーゼIなどの真核生物ポリメラーゼを用いて、適当なDNA配列の転写によって調製することができる。得られるRNA鋳型はマイナス極性であり、ウイルスRNA合成装置に鋳型を認識させる適当な末端配列を含有する。あるいは、ウイルスRNA合成装置に鋳型を認識させる適当な末端配列を含有するプラス極性RNA鋳型を使用してもよい。プラス極性RNAからの発現は、DNA依存性RNAポリメラーゼが認識するプロモーターを有するプラスミドのトランスフェクションにより達成してもよい。例えば、T7プロモーターの制御下でプラスRN

10

20

30

40

50

A鑄型をコードするプラスミドDNAを、ワクシニアウイルスT7系と組合せて使用してもよい。

【0027】

ビストロロンmRNAを構築して、ウイルス配列の翻訳を内部開始させかつ外来タンパク質コード配列の発現を正規の末端開始部位から行わせてもよく、または逆であってもよい。あるいは、外来タンパク質を、開始部位とポリアデニル化部位を有する内部転写ユニットから発現してもよい。他の実施形態においては、得られる発現タンパク質が融合タンパク質となるように、外来遺伝子をPIV遺伝子中に挿入する。

【0028】

本発明の組換え突然変異パラインフルエンザウイルスcDNAおよびRNA鑄型を使って、RNA依存性RNA-ポリメラーゼを発現する形質転換細胞系をトランスフェクトし、そして補完させることができる。例えば、組換えRNA鑄型を用いてRNA指令RNAポリメラーゼタンパク質を発現する連続トランスフェクト細胞系をトランスフェクトし、補完させてもよい。好ましい実施形態においては、非ウイルス依存複製系を利用してキメラPIVを回収し、この場合、PIVゲノムもしくはアンチゲノムをコードするプラスミドDNAを、ウイルスの特異的複製と発現に必要なPIVタンパク質の最小サブセットをコードするプラスミドDNAとともに同時発現する。このことは、以下に記載の実施例に示される。

【0029】

あるいは、適当なプロモーターから発現するプラスミドを、ウイルス特異的(キメラ)cDNAまたはRNAトランスフェクションに使用することができる。補完はまた、RNA依存性RNAポリメラーゼを与えるヘルパーウイルスを使用して達成することもできる。さらにパラインフルエンザウイルス用の非ウイルス依存複製系も記載する。ウイルスの特異的複製と発現に必要なパラインフルエンザウイルスタンパク質の最小サブセットは、3タンパク質、L、P、およびNもしくはNPであって、これらはワクシニアウイルスT7または他の系により発現することができる。

【0030】

得られる発現産物および/またはキメラビリオンは、ワクチン製剤に好適に利用することができる。本発明の発現産物およびキメラビリオンを遺伝子操作して広範囲の病原体に対するワクチンを作製することができ、前記病原体はウイルスおよび細菌抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原、および自己免疫障害に関わる自己抗原が挙げられる。特に、本発明のキメラビリオンを遺伝子操作して、ウシパラインフルエンザ融合(F)および赤血球凝集素(HN)糖タンパク質をヒトFおよびHN糖タンパク質により置換された抗ヒトパラインフルエンザワクチンを作製し、ヒトに使用するキメラbPIV/hPIVワクチンを構築することができる。他の実施形態においては、本発明のキメラビリオンを遺伝子操作して、抗HIVワクチンを作製することができ、この場合gp160から、および/またはHIVの内部タンパク質からの免疫原性ポリペプチドを糖タンパク質HN中に遺伝子操作し、脊椎液および細胞介在免疫応答の両方を誘発しうるワクチンを構築することができる。さらに他の実施形態においては、本発明は、遺伝子操作されて突然変異パラインフルエンザウイルス遺伝子をコードするかまたはパラインフルエンザウイルスの様々な株からの遺伝子の組合せをコードする組換えパラインフルエンザウイルスベクターおよびウイルスに関する。

【0031】

さらに広い実施形態においては、本発明の発現産物とキメラビリオンを遺伝子操作して広範囲の病原体に対するワクチンを作製することができ、前記病原はウイルス抗原、腫瘍抗原、アレルゲン抗原、および自己免疫障害に関わる自己抗原が挙げられる。この目的を達成する1つの方法は、現存PIV遺伝子がそれらの関係細胞外ドメインに外来配列を含有するように改変することである。異種配列が病原体のエピトープまたは抗原であれば、これらのキメラウイルスを使用してこれらの決定因子が由来する疾患因子に対する保護免疫応答を誘発することができる。

【0032】

このように、本発明は、腫瘍抗原を含む広範囲のウイルスおよび/または抗原に対するワ

10

20

30

40

50

クチンを製剤するためのウイルスベクターおよびキメラウイルスの使用に関する。本発明のウイルスベクターおよびキメラウイルスを使用して体液性免疫応答、細胞免疫応答を刺激することによって、または抗原への耐性を刺激することによって被験体の免疫系をモジュレーションすることができる。本明細書に使用した被験体は、ヒト、霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、鳥類およびげっ歯類を意味する。腫瘍抗原を送達するとき、本発明を使用して、非固体腫瘍または小サイズの固体腫瘍などの免疫が介在する拒絶が受入れ得る疾患を有する被験体を治療することができる。本明細書に記載したウイルスベクターおよびキメラウイルスによる腫瘍抗原の送達は大きな固体腫瘍を除去した後の治療にも有用でありうると意図する。本発明はまた、癌の疑いがある被験体を治療するのにも利用することができる。

10

【0033】

本発明は、説明の目的だけで次の段階に区分することができるが、これは限定するものではない：(a)組換えcDNAおよびRNA鋳型の構築；(b)組換えcDNAとRNAを使用する異種遺伝子産物の発現；および(c)組換えウイルス粒子中の異種遺伝子のレスキュー。

【0034】

5.1. 組換えcDNAおよびRNAの構築

本発明の特定の実施形態はbPIV3のカンサス(Kansas)株などのウシパラインフルエンザウイルスゲノム由来のヌクレオチド配列によりコードされた主鎖を含んでなるキメラウイルスであって、ウシパラインフルエンザウイルスヌクレオチド配列が異種配列を用いて置換されているか、または異種配列が完全bPIV3ゲノムに加えられているキメラウイルスである。本発明はまた、bPIVゲノム由来のヌクレオチド配列によってコードされた主鎖を含んでなるキメラウイルスであって、ヌクレオチド配列が、異種配列に加えて、ワクチン製剤での使用により適当な表現型、例えば弱毒化表現型また抗原性の増強を有するキメラウイルスをもたらす突然変異もしくは改変を含有するキメラウイルスも包含する。本発明のこの特定の実施形態によれば、ウシPIV3主鎖のコンテキストにおける異種配列はbPIV3に対して異種であればいずれの配列であってもよい。

20

【0035】

本発明の他の特定の実施形態は、ヒトPIV1、2、または3由来のヌクレオチド配列によりコードされた主鎖を含んでなるキメラウイルスであって、hPIVヌクレオチド配列が異種配列を用いて置換されているかまたは異種配列が完全なhPIVゲノムに加えられているキメラウイルスである。この場合、得られるキメラウイルスは赤血球凝集素ノイラミニダーゼおよび融合糖タンパク質がhPIV1のそれらによって置換えられているキメラhPIV3ではないことを条件とする。本発明はまた、hPIVゲノム由来のヌクレオチド配列によってコードされた主鎖を含んでなるキメラウイルスであって、ヌクレオチド配列が、異種配列に加えて、ワクチン製剤での使用に一層適当な表現型、例えば弱毒化表現型また抗原性の増強を有するキメラウイルスをもたらす突然変異もしくは改変を含有するキメラウイルスも包含する。

30

【0036】

ウイルスポリメラーゼ結合部位/プロモーターの相補体、例えば、本発明の3'-PIVウイルス末端の相補体または3'-および5'-PIVウイルス末端の相補体がフランキングする異種遺伝子コード配列は、当業界で周知の技術を利用して構築することができる。得られるRNA鋳型はマイナス極性であってもよく、ウイルスRNA合成装置に鋳型を認識させ得る適当な末端配列を含有する。あるいは、ウイルスRNA合成装置に鋳型を認識させる適当な末端配列を含有するプラス極性RNA鋳型を用いてもよい。これらのハイブリッド配列を含有する組換えDNA分子をクローニングし、そしてバクテリオファージT7、T3、SP6ポリメラーゼなどのDNA指令RNAポリメラーゼまたはポリメラーゼIなどの真核生物ポリメラーゼによって転写して、in vitroまたはin vivoでウイルスポリメラーゼ認識と活性を可能にする適当なウイルス配列を持つ組換えRNA鋳型を作ることができる。

40

【0037】

本発明によれば、本発明のキメラウイルス中に構築しうる異種配列は：1)細菌およびウイルスなどの病原体を特徴付ける抗原；2)自己免疫疾患を特徴付ける抗原；3)アレルゲンを

50

特徴付ける抗原；4)腫瘍を特徴付ける抗原、が挙げられる。

【0038】

好ましい実施形態においては、本発明のキメラウイルス中に発現させうる異種遺伝子配列は、限定されるものでないが、インフルエンザ糖タンパク質などの呼吸器疾患をもたらすウイルスの抗原性エピトープおよび糖タンパク質、特に赤血球凝集素H5、H7、呼吸器合胞体ウイルスエピトープ、ニューキャッスル（New Castle）病ウイルスエピトープ、センダイウイルスおよび感染性喉頭気管炎ウイルス（ILV）が挙げられる。本発明のさらに他の実施形態においては、本発明のキメラウイルス中に遺伝子操作しうる異種遺伝子配列は、限定されるものでないが、B型肝炎ウイルス表面抗原、A型もしくはC型肝炎ウイルスなどのウイルスエピトープおよびウイルスの糖タンパク質、エプスタイン・バー・ウイルスの表面糖タンパク質、ヒトパピローマウイルス、シミアンウイルス5型またはムンプス・ウイルスの糖タンパク質、ヘルペスウイルスの糖タンパク質、ポリオウイルスのVPI、ならびにヒト免疫不全症ウイルス（HIV）、好ましくは1型もしくは2型由来の配列が挙げられる。さらに他の実施形態においては、本発明のキメラウイルス中に遺伝子操作しうる異種遺伝子配列は、限定されるものでないが、マレク（Marek）病ウイルス（MDV）エピトープ、感染性パーサル（Bursal）病ウイルス（IBDV）のエピトープ、ニワトリ貧血ウイルスのエピトープ、感染性咽頭気管炎ウイルス（ILV）、鳥類インフルエンザウイルス（AIV）、狂犬病、ネコ白血病ウイルス、イヌ・ジステンパーウイルス、水疱性口内炎ウイルス、およびブタ・ボックスウイルスが挙げられる（本明細書にその全文が参照により組み入れられる、Fieldsら（編）、1991、「基礎ウイルス学（Fundamental Virology）」第2版、Raven Press, New Yorkを参照）。

10

20

【0039】

本発明の他の異種配列は自己免疫疾患を特徴付ける抗原が挙げられる。これらの抗原は、典型的には細胞表面、細胞質、核、ミトコンドリアおよび哺乳類組織のそれら由来であり、糖尿病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性関節リュウマチ、悪性貧血、アジソン（Addison）病、強皮症、自己免疫萎縮性胃炎、若年性糖尿病、および円板状エリテマトーデスを特徴付ける抗原が挙げられる。

【0040】

アレルゲンである抗原は一般的にタンパク質または糖タンパク質であって、花粉、かび、孢子、ふけ、昆虫および食物由来の抗原が挙げられる。さらに、腫瘍抗原を特徴付ける抗原は典型的には細胞表面、細胞質、核、オルガネラ、および腫瘍組織の細胞のそれら由来である。例としては、腫瘍タンパク質を特徴付ける抗原が挙げられ、突然変異癌遺伝子によりコードされたタンパク質、腫瘍に関連するウイルスタンパク質、および糖タンパク質が挙げられる。腫瘍には、限定されるものでないが、様々なタイプの癌：唇、上咽頭、喉頭（pharynx）および口腔、食道、胃、大腸、直腸、肝、胆嚢、膵、咽頭（larynx）、肺および気管支、皮膚の黒色腫、乳房、子宮頸部、卵巣、膀胱、腎、子宮、脳および神経系の他の部分、甲状腺、前立腺、精巣、ホジキン（Hodgkin）病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫および白血病由来のものが挙げられる。

30

【0041】

本発明の特定の実施形態においては、異種配列は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、好ましくはヒト免疫不全ウイルス1型またはヒト免疫不全ウイルス2型のゲノム由来である。本発明の他の実施形態においては、異種ペプチド配列を含有するキメラ遺伝子産物がPIVウイルスタンパク質内に発現されるように、異種コード配列をPIV遺伝子コード配列内に挿入してもよい。そのような本発明の実施形態においては、異種配列はまた、ヒト免疫不全ウイルス、好ましくはヒト免疫不全ウイルス1型またはヒト免疫不全ウイルス2型のゲノム由来であってもよい。

40

【0042】

異種配列がHIV由来である場合には、そのような配列は、限定されるものでないが、env遺伝子（すなわち、gp160、gp120、および/もしくはgp41の全てまたは部分をコードする配列）、pol遺伝子（すなわち、逆転写酵素、エンドヌクレアーゼ、プロテアーゼおよび/

50

もしくはインテグラーゼの全てまたは部分をコードする配列)、gag遺伝子(すなわち、p7、p6、p55、p17/18、p24/25の全てまたは部分をコードする配列)、tat、rev、nef、vif、vpu、vpr、および/またはvpx由来の配列が挙げられる。

【0043】

さらに他の実施形態においては、キメラウイルス中に遺伝子操作しうる異種遺伝子配列は、免疫増強活性をもつタンパク質をコードするものが挙げられる。免疫増強タンパク質の例は、限定されるものでないが、サイトカイン、インターフェロン1型、インターフェロン、コロニー刺激因子、およびインターロイキン-1、-2、-4、-5、-6、-12が挙げられる。

【0044】

さらに、キメラウイルス中に遺伝子操作し得る他の異種遺伝子配列は、細菌表面糖タンパク質などの細菌由来の抗原、真菌由来の抗原、および様々な他の病原体および寄生体由来の抗原が挙げられる。細菌病原体由来の異種遺伝子配列の例は、限定されるものでないが、以下の属：サルモネラ (*Salmonella*)、赤痢菌 (*Shigella*)、クラミジア (*Chlamydia*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、エルシニア (*Yersinia*)、ボルダテラ (*Bordetella*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、ナイセリア (*Neisseria*)、ビブリオ (*Vibrio*)、ヘモフィルス (*Haemophilus*)、マイコプラズム (*Mycoplasma*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、トレポネーマ (*Treponema*)、コクシエラ (*Coxiella*)、エールリヒア (*Ehrlichia*)、ブルセラ (*Bruceella*)、連鎖桿菌 (*Streptobacillus*)、紡錘菌スピロヘータ (*Fusospirocheta*)、スピリルム (*Spirillum*)、ウレアプラスマ (*Ureaplasma*)、スピロヘータ (*Spirochaeta*)、マイコプラズム (*Mycoplasma*)、放線菌 (*Actinomycetes*)、ボレリア (*Borrelia*)、バクテロイデス (*Bacteroides*)、トリコモナス (*Trichomonas*)、ブランハメラ (*Branhamella*)、パストツレラ (*Pasteurella*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、リステリア (*Listeria*)、バシラス (*Bacillus*)、エリジペロスリックス (*Erysipelothrix*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、大腸菌 (*Escherichia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、セラチア (*Serratia*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*)、レジオネラ (*Legionella*)、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*)、プロテウス (*Proteus*)、カンピロバクター (*Campylobacter*)、エンテロコッカス (*Enterococcus*)、アシネトバクター (*Acinetobacter*)、モルガネラ (*Morganella*)、モラクセラ (*Moraxella*)、シトロバクター (*Citrobacter*)、リケッチア (*Rickettsia*)、ロシャリメア (*Rochlimea*) の種、ならびに緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、大腸菌 (*E. coli*)、シュードモナス・セバシア (*P. cepacia*)、ストレプトコッカス・エピデルミス (*S. epidermis*)、*E. faecalis*、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)、化膿連鎖球菌 (*S. pyogenes*)、パストツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、およびプロテウス・ミラビリス (*P. mirabilis*) 由来の抗原が挙げられる。

【0045】

病原真菌由来の異種遺伝子配列の例は、限定されるものでないが、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*) ; プラストミセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis*) ; アイエロミセス・デルマチチジス (*Aiellomyces dermatitidis*) ; ヒストプラスマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*) ; コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*) ; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* および *C. krusei* を含むカンジダ (*Candida*) 種 ; *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* を含むアスペルギルス (*Aspergillus*) 種 ; クモノスカビ (*Rhizopus*) 種 ; リゾムコル (*Rhizomucor*) 種 ; クニンガメラ (*Cunninghamella*) 種 ; *A. saksenaea*, *A. mucor* および *A. absidia* を含むアポフィソミセス (*Apophysomyces*) 種 ; スポロトリクス・シェッキ (*Sporothrix schenckii*)、ブラジルパラコクシジオイデス (*Paracoccidioides brasiliensis*) ; シュードアレシェリア・ボイジ (*Pseudallescheria boydii*)、トル

10

20

30

40

50

ロブシス・グラブラタ (*Torulopsis glabrata*) ; 白癬菌 (*Trichophyton*) 種、小孢子菌 (*Microsporium*) 種およびデルマトフィレス (*Dermatophytes*) 種などの真菌、ならびに病原性であることが既知であるかまたは今後同定されたいずれか他の酵母または真菌由来の抗原が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

最後に、寄生体由来の異種遺伝子配列の例は、限定されるものでないが、例えば *Babesia*、*Toxoplasma*、*Plasmodium*、*Eimeria*、*Isospora*、*Atoxoplasma*、*Cystoisospora*、*Hammondia*、*Besnoitia*、*Sarcocystis*、*Frenkelia*、*Haemoproteus*、*Leucocytozoon*、*Theileria*、*Perkinsus* および *Gregarina* 種などのアピコンプレキサ門 (*Apicomplexa phylum*) のメンバー ; ニューモシスティス・カリニイ (*Pneumocystis carinii*) ; 例えば *Nosema*、*Eizterocytozoon*、*Encephalitozoon*、*Septata*、*Mrazekia*、*Amblyospora*、*Ameson*、*Glugea*、*Pleistophora* および *Microsporidium* 種などの微孢子虫門 (*Microspora phylum*) のメンバー ; 例えば *Haplosporidium* 種、ならびに熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、*P. vivax*、*P. ovale*、*P. malaria* を含む種などのアセトスポーラ門 (*Ascetospora phylum*) のメンバー ; トキソプラズマ・ゴンジ (*Toxoplasma gondii*) ; メキシコリーシュマニア (*Lishmania mexicana*)、*L. tropica*、*L. major*、*L. aethiopica*、*L. donovani*、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、*T. brucei*、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、*S. haematobium*、*S. japonium* ; 旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) ; バンクロフト糸状虫 (*Wuchereria bancrofti*) ; マレー糸状虫 (*Brugia malayi*) ; 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) ; 線虫 *Enterobius vermicularis* ; 有鉤条虫 (*Taenia solium*)、*T. saginata*、クルーズトリパノソーマ (*Trichomonas vaginatis*)、*T. hominis*、*T. tenax* ; ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) ; クリプトスポリジウム・パルブム (*Cryptosporidium parvum*) ; ニューモシスティス・カリニイ (*Pneumocystis carinii*)、バベシア症病原種 *Babesia bovis*、*B. divergens*、*B. microti* ; イソボラ・ベリ (*Isospora belli*) ; *L. hominis* ; 二核アメーバ (*Dientamoeba fragilis*) ; 回旋糸状虫 (*Onchocerca volvulus*) ; 回虫 (*Ascaris lumbricoides*) ; アメリカ鉤虫 (*Necator americanus*) ; 鉤虫アンシロストーマ・ジュオデナル (*Ancylostoma duodenale*) ; 糞線虫ストロンギロイデス・ステコラリス (*Strongyloides stecoralis*) ; フィリピン毛頭虫 (*Capillaria philippinensis*) ; アンギオストロラギルス・カントネンシス (*Angiostrongylus cantonensis*) ; 矮小条虫 (*Hymenolepis nana*) ; 広節裂頭条虫 (*Diphyllobothrium latum*) ; 蝟粒条虫 (*Echinococcus granulosus*)、*E. multilocularis* ; パラゴイジムス・ウエステルマニ (*Paragoyzimus westermani*)、*P. caliensis* ; クロノルキス・シネンシス (*Chlonorchis sinensis*) ; ネコ肝吸虫 (*Opisthorchis felinae*)、*G. Viverini*、肝蛭 (*Fasciola hepatica*)、ヒゼンダニ (*Sarcoptes scabiei*)、ヒトシラミ *Pediculus humanus* ; ケジラミ属 *Phthirus pubis* ; およびヒトヒフバエ (*Dermatobia hominis*)、ならびに病原性があることが既知であるかまたは今後同定された他の寄生体由来の抗原が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

これらのハイブリッド分子を構築するための一方法は、異種配列がウイルスポリメラーゼ活性を必要とするウイルス配列 ; すなわち、ウイルスポリメラーゼ結合部位 / プロモーター (本明細書では以後ウイルスポリメラーゼ結合部位と呼ぶ) およびポリアデニル化部位にフランキングするように、異種コード配列を PIV 遺伝子の DNA 相補体中に挿入することである。好ましい実施形態においては、異種コード配列に、5' および 3' 末端の複製プロモーター、遺伝子開始および遺伝子終結配列、ならびに 5' および / または 3' 末端に見出されるパッケージングシグナルを含んでなるウイルス配列がフランキングする。代替の方法においては、ウイルスポリメラーゼ結合部位、例えば、ウイルスゲノムセグメントの 3' 末端または両方の末端の相補体をコードするオリゴヌクレオチドを、異種コード配列に連結してハイブリッド分子を構築することもできる。外来遺伝子または外来遺伝子のセグメントの標的配列内の配置は、以前は、標的配列内の適当な制限酵素切断部位の存在によって指定していた。しかし、分子生物学の最近の進歩により、この問題は著しく軽減された。制限酵素切断部位は、部位特異的突然変異誘発を利用すると、標的配列内のいずれの場所に

10

20

30

40

50

でも容易に配置できる（例えばKunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:488に記載の技術を参照）。以下に記載したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術の変化も配列の特定の挿入（すなわち、制限酵素部位）を可能にし、ハイブリッド分子の容易な構築を可能にする。あるいは、PCR反応を利用してクローニングの必要なしに組換え鋳型を調製することができる。例えば、PCR反応を利用して、DNA指令RNAポリメラーゼプロモーター（例えば、バクテリオファージT3、T7またはSP6）ならびに異種遺伝子とPIVポリメラーゼ結合部位を含有するハイブリッド配列を含有する二本鎖DNA分子を調製することができる。次いでRNA鋳型は、この組換えDNAから直接転写することができる。さらに他の実施形態においては、組換えRNA鋳型は、異種遺伝子のマイナス極性を規定するRNAとウイルスポリメラーゼ結合部位とをRNAリガーゼを用いて連結することによって調製することができる。

10

【0048】

さらに、1以上のヌクレオチドを、ウイルスをレスキューするために重要な「ルール・オブ・シックス（Rule of Six）」を満たすまで未翻訳領域のHN遺伝子の3'末端に加えてもよい。「ルール・オブ・シックス」は、多くのパラミクソウイルスに適用され、RNAヌクレオチドゲノムは機能性であるには6で割切れなければならないと規定する。ヌクレオチドの付加は、クイックチェンジ（QuikChange）変異誘発キット（Stratagene）などの市販の変異誘発キットを用いるなどの当業界に周知の技術によって実施することができる。適当な数のヌクレオチドを付加した後、次いで正しいhPIV3のFおよびHN遺伝子DNA断片は、適当な制限酵素を用いる消化とゲル精製によって単離することができる。本発明によって利用しうるウイルスポリメラーゼ活性および構築物に対する配列要件を以下に記載する。

20

【0049】

5.1.1. 異種遺伝子配列の挿入

外来遺伝子配列のPIV非分節型ゲノム中への挿入は、ウイルスコード領域の外来遺伝子による完全置換かまたは部分置換によって、達成することができる。完全な置換は恐らくPCR誘導性突然変異誘発の利用によって最もうまく達成できるであろう。簡単に説明すると、PCRプライマーAは、5'端から3'端方向へ、次の配列を含有する：クラスIIS制限酵素切断部位（すなわち、「シフター（shifter）」酵素；特定配列を認識するがその配列の上流または下流でDNAを切断する酵素）などのユニークな制限酵素切断部位；PIV遺伝子の領域と相補的なヌクレオチド範囲；および外来遺伝子産物のカルボキシ末端コード部分と相補的なヌクレオチド範囲。PCRプライマーBは、5'端から3'端方向へ、次の配列を含有する：ユニークな制限酵素切断部位；PIV遺伝子と相補的なヌクレオチド範囲；および外来遺伝子の5'コード部分と対応するヌクレオチド範囲。これらのプライマーを用いた外来遺伝子のクローン化コピーについてのPCR反応後に、PCR産物をユニークな制限酵素切断部位を使って切り出してクローニングする。クラスIIS酵素を用いる消化と精製ファージポリメラーゼを用いる転写によって、外来遺伝子が挿入されたPIV遺伝子の正確な非翻訳末端を含有するRNA分子を作製しうる。別の実施形態においては、PCRから開始する反応を利用してバクテリオファージプロモーター配列とハイブリッド遺伝子配列とを含有する二本鎖DNAを調製して、RNAテンプレートをクローニングすることなしに直接転写されるようにすることができる。

30

【0050】

5.1.2. 異種遺伝子配列のHN遺伝子中への挿入

PIVの赤血球凝集素とノイラミニダーゼ活性は単一遺伝子HNによりコードされる。HNタンパク質はウイルスの主要表面糖タンパク質である。パラインフルエンザなどの様々なウイルスについて、赤血球凝集素とノイラミニダーゼタンパク質は複数の抗原性部位を含有することが実証されている。それ故に、このタンパク質は、感染後の体液性免疫応答の潜在的標的である。従って、HN内の抗原性部位を外来タンパク質の部分によって置換すると、この外来ペプチドに対する高活性の体液性免疫応答をもたらすことができる。もしある配列をHN分子内に挿入して、HNの外側表面に発現させると、その配列は免疫原性になるであろう。例えば、HIVのgp160由来のペプチドをHNタンパク質の抗原性部位と置き換えると、両方の体液性免疫応答を誘発しうる。異なる手法においては、外来ペプチド配列を、いずれのウ

40

50

ウイルス配列も削除することなしに、抗原性部位内に挿入することができる。そのような構築物の発現産物は、外来抗原に対するワクチンにおいて有用であって、実際、最初に考察した問題、すなわちワクチン接種した宿主内の組換えウイルスの増殖の問題を回避することができる。抗原性部位内でのみ置換した無傷のHN分子はHN機能があり、従って生存可能なウイルスの構築が可能である。それ故に、このウイルスはさらなるヘルパー機能を必要とせずに増殖できる。このウイルスはまた、他の方法で弱毒化して偶発的な漏出の危険を避けることもできる。

【 0 0 5 1 】

他のハイブリッド構築物は、細胞表面上にタンパク質を発現させるか、またはそのタンパク質が細胞から放出されうるようにしてもよい。表面糖タンパク質として、HNは細胞表面への輸送のために必要な切断可能なアミノ末端シグナル配列および膜固定に必要なカルボキシ末端配列を有する。細胞表面上に無傷の外来タンパク質を発現させるためには、これらのHNシグナルを用いてハイブリッドタンパク質を作製することが必要である。この場合、融合タンパク質は、追加の内部プロモーターとは別個の融合タンパク質として発現させてもよい。あるいは、輸送シグナルだけが存在し、膜固定ドメインが存在しない場合には、タンパク質は細胞から外へ分泌される。

【 0 0 5 2 】

5.1.3. ビスストロンRNAの構築

ビスストロンmRNAを構築して、ウイルス配列の翻訳を内部開始させることによって、外来タンパク質コード配列を通常の末端開始部位から発現させることができる。あるいは、ウイルス配列が通常の末端オープンリーディングフレームから翻訳されるのに対して、外来遺伝子は内部部位から開始されるようなビスストロンmRNA配列を構築してもよい。ある特定の内部リボソーム侵入部位 (IRES) 配列を利用してもよい。選ばれるIRES配列はラインフルエンザのパッケージング限界に対して妨害しない程度に十分短くなければならない。従って、そのようなビスストロン手法のために選ばれるIRESは、長さが500ヌクレオチドより大きくないことが好ましく、250ヌクレオチド未満であることが好ましい。さらに、利用するIRESはピコルナウイルスエレメントと配列または構造的相同性を共有しないことが好ましい。好ましいIRESエレメントは、限定されるものでないが、哺乳類Bip IRESおよびC型肝炎ウイルスIRESが挙げられる。

【 0 0 5 3 】

あるいは、外来タンパク質は、開始部位とポリアデニル化部位とを有する新しい内部転写単位から発現させてもよい。別の実施形態においては、外来遺伝子をPIV遺伝子中に挿入して、得られる発現タンパク質が融合タンパク質となるようにする。

【 0 0 5 4 】

5.2. 組換えcDNAとRNAテンプレートとを用いる、異種遺伝子産物の発現

上に記載の通り調製した組換えテンプレートを様々な方法に用いて、異種遺伝子産物を適当な宿主細胞内で発現させるかまたは異種遺伝子産物を発現するキメラウイルスを作製することができる。一実施形態においては、組換えcDNAを用いて適当な宿主細胞にトランスフェクトして、得られるRNAが高レベルでの異種遺伝子産物の発現を指令し得るようにすることができる。高レベルの発現を与える宿主細胞系は、PIVを用いて重感染させた細胞系などのウイルス機能を供給する連続細胞系、PIV機能を補完するように遺伝子操作した細胞系などが挙げられる。

【 0 0 5 5 】

本発明の別の実施形態においては、異種遺伝子産物の発現を達成するために、ウイルスポリメラーゼタンパク質を発現する細胞系に、組換えテンプレートを用いてトランスフェクトする。この目的には、Lタンパク質などのポリメラーゼタンパク質を発現する形質転換細胞系を適当な宿主細胞として使用すればよい。宿主細胞を同様に遺伝子操作して、他のウイルス機能またはHN、NPもしくはNなどのさらなる機能を与えてもよい。

【 0 0 5 6 】

他の実施形態においては、ヘルパーウイルスが、異種遺伝子産物の発現を達成するために

10

20

30

40

50

、細胞が利用するRNAポリメラーゼタンパク質を提供する。さらに別の実施形態においては、細胞に、NまたはNP、PおよびLタンパク質などのウイルスタンパク質をコードするベクターを用いてトランスフェクトしてもよい。

【0057】

5.3. 組換えウイルス粒子のレスキュー

キメラウイルスを作製するためには、プラスまたはマイナスセンス鎖にPIVゲノムおよび/または外来タンパク質をコードする改変cDNA、ウイルスRNA、またはRNAを用いて、複製およびレスキューのために必要なウイルスタンパク質および機能を与える細胞にトランスフェクトすることができる。あるいは、PIVゲノムおよび/または外来タンパク質をコードするDNAまたはRNA分子によるトランスフェクションの前、その際、または後に、ヘルパーウイルスを用いて細胞にトランスフェクトしてもよい。合成組換えプラスミドPIV DNAおよびRNAは、当業界で周知の複数の技術によって複製され、かつ感染性ウイルス粒子中にレスキューすることができ、それらの技術は、1992年11月24日に発行された米国特許第5,166,057号；1998年12月29日に発行された米国特許第5,854,037号；1996年2月20日に公開された欧州特許公開EP 0702085A1；米国特許出願第09/152,845号；1997年4月3日に公開された国際特許公開PCT W097/12032；1996年11月7日に公開されたW096/34625；欧州特許公開EP-A780475；1999年1月21日に公開されたWO 99/02657；1998年11月26日に公開されたWO 98/53078；1998年1月22日に公開されたWO 98/02530；1999年4月1日に公開されたWO 99/15672；1998年4月2日に公開されたWO 98/13501；1997年2月20日に公開されたWO 97/06270；および1997年6月25日に公開されたEPO 780 475A1に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書にその全体が組み入れられる。

【0058】

本発明の一実施形態においては、ウイルスポリメラーゼによる認識のためにおよび成熟ピリオンを産生するのに必要なパッケージングシグナルのために必須であるマイナス鎖ウイルスRNAの非コード領域を含有する、合成組換えウイルスRNAを作製してもよい。マイナス鎖RNAウイルスをレスキューするために逆遺伝学的手法を適用する上で多数の様々な手法を用いることができる。第一に、組換えDNAテンプレートから組換えRNAを合成し、精製ウイルスポリメラーゼ複合体を用いてin vitroで再構成して組換えリボ核タンパク質(RNP)を形成し、これを用いて細胞にトランスフェクトする。他の手法においては、ウイルスポリメラーゼタンパク質がin vitroまたはin vivoで合成RNAの転写中に存在すれば、さらに効率的なトランスフェクションが達成される。この手法を用いて合成RNAをcDNAプラスミドから転写してもよく、この合成RNAはポリメラーゼタンパク質をコードするcDNAプラスミドを用いてin vitroで同時転写されるか、またはポリメラーゼタンパク質の存在下、すなわち、一過性または構成的にポリメラーゼタンパク質を発現する細胞内で、in vivoで転写される。

【0059】

本明細書に記載のさらなる手法においては、感染性キメラウイルスの産生をPIVウイルスポリメラーゼタンパク質を発現する宿主細胞系内で(例えば、ポリメラーゼタンパク質を発現するように遺伝子操作された、ウイルス/宿主細胞発現系；形質転換細胞系等で)繰り返して、結果として感染性キメラウイルスをレスキューしてもよい。この事例では、ヘルパーウイルスは使用する必要はない、というのは、この機能は発現したウイルスポリメラーゼタンパク質により与えられるからである。

【0060】

本発明によれば、当業者に周知のいずれの技術を用いてキメラウイルスの複製とレスキューを達成してもよい。1つの手法は、宿主細胞にトランスフェクトする前に、in vitroで複製に必要なウイルスタンパク質および機能を提供することに関する。そのような実施形態においては、ウイルスタンパク質は、野生型ウイルス、ヘルパーウイルス、精製ウイルスタンパク質または組換え発現ウイルスタンパク質の形態で供給することができる。ウイルスタンパク質は、キメラウイルスをコードする合成cDNAまたはRNA分子の転写の前、その際、または後に供給してもよい。全体の混合物を用いて宿主細胞にトランスフェクトし

てもよい。他の手法においては、複製に必要なウイルスタンパク質および機能は、キメラウイルスをコードする合成cDNAもしくはRNA分子の転写の前に、間に、または後に供給してもよい。そのような実施形態においては、複製に必要なウイルスタンパク質と機能は、野生型ウイルス、ヘルパーウイルス、ウイルス抽出物、ウイルスタンパク質を発現する合成cDNAもしくはRNAの形態で供給され、感染またはトランスフェクションによって宿主細胞中に導入される。この感染/トランスフェクションは、キメラウイルスをコードする合成cDNAまたはRNAの導入の前に、またはそれと同時にされる。

【0061】

特に望ましい手法においては、全PIVウイルス遺伝子を発現するように遺伝子操作した細胞は、所望の遺伝子型を含有する感染性キメラウイルスの産生をもたらすことができ；従って、選択系の必要性がなくなる。理論的には、PIVの構造タンパク質をコードする6つの遺伝子の任意の1つまたは6遺伝子の任意の1つの一部を、外来配列と置き換えてもよい。しかし、この問題の必要な要素は、欠陥ウイルス（通常のウイルス遺伝子産物が失われているかまたは改変されているために欠陥となっている）を増殖させることができることである。この問題を回避する複数の可能な手法がある。1つの手法では、突然変異タンパク質を有するウイルスを、同タンパク質の野生型バージョンを構成的に発現するように構築した細胞系で増殖してもよい。この方法によって、前記細胞系はウイルスの突然変異を補完する。同様の技術を用いて、PIV遺伝子のいずれかを構成的に発現する形質転換細胞系を構築してもよい。ウイルスタンパク質を発現するように作られたこれらの細胞系を用いて組換えウイルスの欠陥を補完し、それによって該ウイルスを増殖させてもよい。あるいは、特定の自然宿主範囲の系を組換えウイルスの増殖に利用してもよい。

【0062】

さらに他の実施形態においては、複製に必要なウイルスタンパク質および機能を合成cDNAもしくはRNAの形態の遺伝子材料として供給し、その結果、それらを、キメラウイルスをコードする合成cDNAまたはRNAと同時に転写させてもよい。特に好ましい手法では、キメラウイルスとウイルスポリメラーゼおよび/または他のウイルス機能を発現するプラスミドを宿主細胞中に同時トランスフェクトする。例えば、は野生型または改変したゲノムまたはアンチゲノムPIV RNAをコードするプラスミドを、宿主細胞中にPIVウイルスポリメラーゼタンパク質NPもしくはN、PまたはLをコードするプラスミドとともに同時トランスフェクトしてもよい。あるいは、キメラPIV3/PIV3ウイルスのレスキューを、改変したワクシニアウイルスのアンカラ（Ankara）（MVA）、またはMVAとポリメラーゼタンパク質をコードするプラスミドとの組合せを用いて達成してもよい。例えば、MVAをHeLaまたはVero細胞中にトランスフェクトしてもよい。MVAによる感染後に、完全長アンチゲノムbPIV3/hPIV3 cDNAを、NP、P、およびLをコードする発現プラスミドと一緒に、HeLaまたはVero細胞中にトランスフェクトしてもよい。次に、細胞と細胞上清を回収し、1回の凍結-解凍サイクルにかける。次いで得られる細胞溶解物を用いて、新鮮なHeLaまたはVero細胞単層を、1-β-D-アラビノフラノシルシトシン(ara C)、ワクシニアウイルスの複製インヒビターの存在下で感染させて、ウイルスストックを作製する。次いでこれらのプレートから上清と細胞を回収し、凍結-解凍を1回行い、そして、bPIV3ウイルス粒子の存在を、PIV3特異的抗血清を用いてウイルスプラークの免疫染色によってアッセイすることができる。

【0063】

組換えウイルスを増殖させる他の手法は、野生型ウイルスとの共培養用いるものでもよい。これは、単に、組換えウイルスを採取し、このウイルスおよび他の野生型ウイルス（好ましくはワクチン株）を用いて細胞を重感染することによって行えばよい。野生型ウイルスは欠陥ウイルス遺伝子産物を補完するに違いなく、したがって野生型と組換えウイルスの両方の増殖が可能になる。あるいは、ヘルパーウイルスを用いて組換えウイルスの増殖を支援してもよい。

【0064】

他の手法では、合成テンプレートを、PIVウイルスポリメラーゼタンパク質を発現する複数種の組換えウイルスを用いて同時感染した細胞内で複製してもよい。実際、この方法を

10

20

30

40

50

用いて、本発明による組換え感染ウイルスをレスキューすることができる。この目的には、PIVポリメラーゼタンパク質を任意の発現ベクター/宿主細胞系で発現させてもよく、そのような発現ベクター/宿主細胞系には、限定されるものでないが、ポリメラーゼタンパク質を発現するウイルス発現ベクター（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、バキュロウイルスなど）または細胞系（例えば、Krystalら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2709-2713を参照）が挙げられる。さらに、6つのPIVタンパク質全てを発現する宿主細胞の感染は、感染性キメラウイルス粒子の産生をもたらすことができる。この系では、産生する全ての組換えウイルスが所望の遺伝子型であるので、選択系の必要性が無くなるであろう。ウイルスの生存度を変えることなく、組換えウイルスを構築することが可能であることは特記すべきである。そして、これらの改変ウイルスは、増殖能力があることから、複製するためのヘルパー機能を必要としないであろう。

10

【0065】

5.4. キメラウイルスを用いるワクチン製剤

本発明は、遺伝子操作した本発明のマイナス鎖RNAウイルスを含んでなるワクチン製剤を包含する。本発明の組換えPIVウイルスを媒体として使用して、様々な病原体のいずれかに対する防御応答を誘発する外来エピトープを発現させることができる。特定の実施形態においては、本発明は、改変されている組換えbPIVウイルスの、hPIV感染に対する防御を与えるワクチン製剤における使用を包含する。

【0066】

本発明は、PIV、インフルエンザ、RSV、センダイウイルス、ムンプス・ウイルス、喉頭気管炎ウイルス、シミアンウイルス5、ヒトパピローマウイルス、ならびに他のウイルスおよび病原体に対する防御のために有用である、ヒトおよび動物に投与するワクチン製剤を包含する。

20

【0067】

一実施形態においては、本発明は、狂犬病ウイルス、ネコ白血病ウイルス（FLV）およびイヌ・ジステンパーウイルスを含む家畜疾患を引き起こす病原体に対して有用なワクチン製剤を包含する。さらに他の実施形態においては、本発明は、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、牛痘ウイルス、豚痘ウイルスから家畜を保護するため、さらに狂犬病ウイルスから野生動物を保護するために有用であるワクチン製剤を包含する。

【0068】

逆遺伝学的手法によって作製される弱毒化ウイルスを、本明細書に記載のワクチンおよび医薬製剤に使用することができる。逆遺伝学技術を利用して、ワクチン生産に重要な他のウイルス遺伝子を遺伝子操作してさらなる突然変異を起こさせることができる、すなわち、有用なワクチン株変異体のエピトープを弱毒化ウイルス中へと遺伝子操作することができる。あるいは、他のウイルスまたは非ウイルス病原体由来の抗原を含む完全に外来のエピトープを、弱毒化株中へと遺伝子操作することができる。例えば、HIV（gp160、gp120、gp41）のような非近縁ウイルスの抗原、寄生虫抗原（例えば、マラリア）、細菌もしくは真菌抗原、または腫瘍抗原を、弱毒化株中へと遺伝子操作してもよい。あるいは、*in vivo*でのウイルス親和性を変更するエピトープを、本発明のキメラ弱毒化ウイルス中へと遺伝子操作してもよい。

30

40

【0069】

ワクチンに使用するために、実質的に任意の異種遺伝子配列を本発明のキメラウイルス中に構築することができる。好ましくは、様々な病原体、または中和抗体と結合する抗原の任意のものに対する防御免疫応答を誘発するエピトープを、キメラウイルスによりまたは部分として、発現させてもよい。例えば、本発明のキメラウイルス中に構築し得る異種遺伝子配列としては、限定されるものでないが、ヒトPIV3のHNおよびF遺伝子などのインフルエンザおよびパラインフルエンザ赤血球凝集素ノイラミニダーゼおよび融合糖タンパク質のものが挙げられる。さらに他の実施形態においては、キメラウイルス中へと遺伝子操作し得る異種遺伝子配列は、免疫増強活性をもつタンパク質をコードするものが挙げられる。免疫増強タンパク質の例は、限定されるものでないが、サイトカイン、1型インター

50

フェロン、 インターフェロン、コロニー刺激因子、インターロイキン-1、-2、-4、-5、-6、-12が挙げられる。

【0070】

さらに、ワクチンに使用するために、本発明のキメラウイルス中に構築し得る異種遺伝子配列としては、限定されるものでないが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、好ましくは1型または2型、に由来する配列が挙げられる。好ましい実施形態においては、抗原の供給源となり得る免疫原性HIV由来ペプチドをキメラPIV中に構築し、次いでそれを用いて脊椎動物免疫応答を誘発することができる。そのようなHIV由来ペプチドとしては、限定されるものでないが、env遺伝子由来配列(すなわち、gp160、gp120、および/またはgp41の全てまたは部分をコードする配列)、pol遺伝子由来配列(すなわち、逆転写酵素、エンドヌクレアーゼ、プロテアーゼ、および/またはインテグラーゼの全てまたは部分をコードする配列)、gag遺伝子由来配列(すなわち、p7、p6、p55、p17/18、p24/25の全てまたは部分をコードする配列)、tat、rev、nef、vif、vpu、vpr、および/またはvpx由来配列が挙げられる。

10

【0071】

他の異種配列は、いくつか例を挙げると、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)；AまたはC型肝炎ウイルス表面抗原、エプスタイン・バー・ウイルスの糖タンパク質；ヒトパピローマウイルスの糖タンパク質；呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、センダイウイルス、シミアンウイルス5またはムンプス・ウイルスの糖タンパク質；インフルエンザウイルスの糖タンパク質；ヘルペスウイルスの糖タンパク質(例えば、gD、gE)；ポリオウイルスのVP1；細菌および寄生虫などの非ウイルス病原体の抗原決定基から得ることができる。別の実施形態においては、免疫グロブリン遺伝子の全てまたは部分を発現させてもよい。例えば、そのようなエピトープを模倣する抗イディオタイプ免疫グロブリンの可変領域を本発明のキメラウイルス中に構築してもよい。

20

【0072】

他の異種配列を腫瘍抗原から得て、作製したキメラウイルスを用いてin vivoでの腫瘍退行をもたらす腫瘍細胞に対する免疫応答を生起させてもよい。これらのワクチンは他の治療計画と組合せて使用してもよく、前記治療計画としては限定されるものでないが、腫瘍治療のための化学療法、放射線療法、外科手術、骨髄移植などが挙げられる。本発明にしたがって、組換えウイルスを遺伝子操作して腫瘍関連抗原(TAA)を発現させてもよく、前記抗原としては、限定されるものでないが、T細胞が認識するヒト腫瘍抗原(本明細書にその全体が参照により組み入れられるRobbinsおよびKawakami, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8:628-636)；gp100、MART-1/MelanA、TRP-1(gp75)、チロシナーゼを含むメラニン細胞系タンパク質；腫瘍特異的に広く共有される抗原である、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-1、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V、p15；腫瘍特異的な突然変異抗原である、 β -カテニン、MUM-1、CDK4；乳癌、卵巣癌、子宮頸癌および膀胱癌に対する非黒色腫瘍抗原である、HER-2/neu、ヒトパピローマウイルス-E6、-E7、MUC-1が挙げられる。

30

【0073】

生組換えウイルスワクチンまたは不活化組換えウイルスワクチンを製剤化することができる。生ワクチンが好ましい、というのは、宿主内で増殖することによって自然感染で起こると類似した種類および量の長期化された刺激をもたらし、従って、十分な長期にわたる免疫性を与えるからである。そのような生組換えウイルスワクチン製剤の製造は、細胞培養物中またはニワトリ胚の尿膜中のウイルス増殖とその後の精製を伴う通常の方法を用いて実施することができる。さらに、bPIVはヒトで非病原性であることが実証されているので、生ワクチンとして利用するのに非常に適している。

40

【0074】

この点で、遺伝子操作したPIV(ベクター)をワクチンに使用するためには、これらの株が弱毒化特性を有することが望ましい。トランスフェクションに使用するテンプレート中に適当な突然変異(例えば欠失)を導入すると、弱毒化特性をもつ新規ウイルスを提供す

50

ることができる。例えば、温度感受性または寒冷順応に関連する特定のミスセンス突然変異を欠失突然変異として作ってもよい。これらの突然変異は、寒冷もしくは温度感受性突然変異体に関連する点突然変異よりもっと安定であるに違いなく、そして復帰頻度は極端に低いに違いない。

【 0 0 7 5 】

あるいは、「自殺」特性をもつキメラウイルスを構築することができる。そのようなウイルスは宿主内で1または数ラウンドしか複製を行わないであろう。ワクチンとして利用すると、組換えウイルスは限定された複製サイクルを経て十分なレベルの免疫応答を誘発するが、さらにヒト宿主内で複製を進行して発病することはないであろう。1以上のPIV遺伝子を欠くかまたは突然変異PIV遺伝子を持つ組換えウイルスは連続ラウンドの複製を行うことができないであろう。そのような遺伝子を常時発現する細胞系においては、欠陥ウイルスが産生されうる。必須遺伝子を欠くウイルスはこれらの細胞系においては複製されるが、ヒト宿主に投与されると、1ラウンドの複製を完了できないであろう。そのような調製物は、この不完全サイクルで、免疫応答を誘発するのに十分な数の遺伝子を転写しかつ翻訳することができる。あるいは、これらの調製物が不活化（死滅）ウイルスワクチンとして作用するように、さらにその株を大量に投与することができる。不活化ワクチンについては、異種遺伝子産物をウイルス構成成分として発現させて、その遺伝子産物がピリオンに組み込まれるようにすることが好ましい。そのような調製物の利点は、それらが天然タンパク質を含有しかつ死滅ウイルスワクチンの製造で使用されるホルマリンまたは他の試薬で処置することによって不活化されないことである。あるいは、cDNAから作られる突然変異PIVを、数ラウンドしか複製しないように高度に弱毒化してもよい。

【 0 0 7 6 】

本発明のこの態様の他の実施形態においては、キメラウイルスを「死滅させる」通常の技術を用いて、不活化ワクチン製剤を製造することができる。不活化ワクチンは、それらの感染性が破壊されているという意味で「死んで」いる。理想的には、ウイルスの感染性は、免疫原性に影響を与えることなく破壊される。不活化ワクチンを製造するためには、キメラウイルスを細胞培養物中またはニワトリ胚の尿膜中で増殖させ、ゾーナル超遠心によって精製し、ホルムアルデヒドまたは -プロピオラクトンによって不活化し、そしてプールする。得られるワクチンは通常、筋肉接種される。

【 0 0 7 7 】

不活化ウイルスは、免疫応答を増強するために適当なアジュバントを用いて製剤化することができる。そのようなアジュバントは、限定されるものでないが、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウム；リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオンなどの界面活性剤；ペプチド；油乳剤；およびBCGおよび挫瘡菌（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

上記のワクチン製剤を導入するために多数の方法が使用でき、これらは、限定されるものでないが、経口、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下および鼻腔内経路が挙げられる。キメラウイルスワクチン製剤は、ワクチンを設計する対象の病原体の自然感染経路を經由して導入するのが好ましい。

【 0 0 7 9 】

6. 実施例1：ウシパラインフルエンザ3/ヒトパラインフルエンザ3 キメラcDNAの構築とクローニング

bPIV3のFおよびHN遺伝子をhPIV3のものと同様に相互交換するために、追加の制限酵素切断部位を感染性bPIV3 cDNA中に導入した。部位特異的突然変異誘発を利用して、bPIV3 cDNAについて、ユニークなNhe 1部位をヌクレオチド位置5041に導入しかつSal 1部位をヌクレオチド位置8529に導入した。改変した完全長bPIV3 cDNAをNhe 1とSal 1を用いて処理し、そしてFおよびHN遺伝子を除くウイルスbPIV3配列の全てを含むほぼ14 kbのDNA断片をゲル精製により単離した。

【 0 0 8 0 】

hPIV3 FおよびHN遺伝子配列を得るために、10 cmディッシュのコンフルエントなVero細胞をhPIV3/Tex/12084/1983を用いて感染させた。37 °Cでのインキュベーションの3日後、細胞を回収し、全RNAをRNA STAT-LS 50 (Tel-Test社)を用いて単離した。ウイルスcDNAを、hPIV3ゲノムの位置4828にアニーリングするhPIV3特異的オリゴを用いて、逆転写により作製した。hPIV3 FおよびHN遺伝子を、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) によりTaqポリメラーゼを用いて増幅した。PCR産物をpT/A TOPOクローニングベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、2クローン (#11と#14) からhPIV3 FおよびHN遺伝子の配列を決定した。クローン#11について示された配列では、F遺伝子は正しかったが、HN遺伝子は異常配列を含有した。一方、第2のクローン#14については、HN遺伝子は正しかったが、F遺伝子は異常な終止コドン含有した。そこで、機能性hPIV3 FおよびHN遺伝子を含有するプラスミドは、#11の正しいF遺伝子と#14の正しいHN遺伝子とを次の要領で組合せて構築した。両方のhPIV3プラスミド (#11と#14) をNhe1とEcoR1を用いて消化した。正しいF遺伝子を有する1.6 kb断片をクローン#11から単離し、正しいHN遺伝子とプラスミド配列を含有する8.5 kb断片をクローン#14から単離した。2つの断片を連結して完全なhPIV3 FおよびHN遺伝子を含有するプラスミドを作った。正しい配列をDNA配列分析により確認した。最後に、単一ヌクレオチドを非翻訳領域であるHN遺伝子の3'末端に付加して、「ルール・オブ・シックス」を満たした。単一ヌクレオチドの付加は、クイックチェンジ (QuikChange) 突然変異誘発キット (Stratagene) を用いて実施して、DNA配列決定によって確認した。次いで、正しいhPIV3 FおよびHN遺伝子のDNA断片をNhe 1とSal 1を用いる消化によって単離して、3.5 kb DNA断片をゲル精製した。

【 0 0 8 1 】

全長bPIV3/hPIV3キメラcDNAは、上記のbPIV3配列を有する14.5 kb DNA断片とhPIV3 FおよびHN遺伝子を含有する3.5 kb DNA断片を連結することにより構築した (図1参照)。全長キメラプラスミドDNAは、詳細な制限酵素マッピングにより確認した。さらに、キメラ構築物のM/FおよびHN/L遺伝子の連結部は、DNA配列決定によって、両方がbPIV3およびhPIV3配列を含み、それぞれがNhe 1およびSal 1制限酵素切断部位を含むことを確認した。

【 0 0 8 2 】

7. 実施例 2 : HeLa細胞およびVero細胞内のウシパラインフルエンザ3型/ヒトパラインフルエンザ3型キメラウイルスのレスキュー

キメラbPIV3/hPIV3ウイルスのレスキューをbPIV3レスキューと類似の方法を使って行った。逆遺伝学によるbPIV3/hPIV3キメラウイルスのレスキューを、HeLa細胞中でLipofectACE (Gibco/BRL) を用いて実施した。80%コンフルエントのHeLa細胞またはVero細胞をMVAを用いて4のMOIにて感染させた。感染の1時間後に、完全長アンチゲノムbPIV3/hPIV3 cDNA (4 µg) を、NP (0.4 µg)、P (0.4 µg)、およびL/pCTTE (0.2 µg) 発現プラスミドと一緒に、感染させたHeLaまたはVero細胞中にトランスフェクトした。トランスフェクションの40時間後に、細胞と細胞上清を回収し (P0)、1回の凍結-解凍サイクルにかけた。次に、得られた細胞溶解物を用いて新鮮なVero細胞単層を、1-β-D-アラビノフラノシルシトシン (ara C)、ワクシニアウイルスの複製インヒビターの存在下で感染させて、P1ウイルスストックを作製した。これらのプレートから上清と細胞を回収し、凍結-解凍を1回行い、そして、bPIV3ウイルス粒子の存在を、PIV3特異的抗血清を用いてウイルスプラークの免疫染色によってアッセイした。P1回収物の細胞溶解物は、Vero細胞単層の完全なCPEをもたらし、免疫染色は広範囲のウイルス感染の存在を示した。

【 0 0 8 3 】

8. 実施例 3 : RT-PCRによるウシパラインフルエンザ3型/ヒトパラインフルエンザ3型キメラウイルスレスキューの確認

レスキューしたウイルスが実際にキメラであること、すなわち、ウイルスがbPIV3主鎖にhPIV3 FおよびHN遺伝子配列を含有することを確かめるために、ウイルスRNAゲノムをさらにRT-PCRによって分析した。3つの独立に取得したbPIV3/hPIV3単離物のP1ウイルスストックを用いて感染させたVero細胞を回収し、全RNAを単離した。ウイルスRNAを、bPIV3の位置4757にアニーリングするオリゴを用いて増幅した。ヌクレオチド位置5255~6255のウイ

10

20

30

40

50

ルス領域をPCRにより増幅した。得た1kb PCR断片はhPIV3配列を含有するはずである。これを、hPIV3に特異的でありかつbPIV3の相補性領域を切断しない酵素 (Sac I と Bgl II) により消化して確認した (図1参照)。予想通り、Sac I と Bgl II はPCR断片をより小さい断片に切断し、単離した配列がhPIV3に由来することを立証した (レーン3、5、7を参照)。さらに、ポリメラーゼL遺伝子中の領域ヌクレオチド位置9075~10469をPCRにより増幅した。この領域はbPIV3配列を含有するはずである。同様に、得た1.4kb断片を、bPIV3に特異的でありかつhPIV3の相当する領域を切断しない酵素 (PvuII と BamHI) により消化した (図2参照)。1.4 kb断片は実際、PvuII と BamHIの両方により消化されて、ポリメラーゼ遺伝子がbPIV3由来であることを立証した (図2のレーン3、4、6、7、9および10を参照)。まとめると、RT-PCR分析は、レスキューしたbPIV3/hPIV3ウイルスが実際にキメラであることを示す。これはbPIV3遺伝子主鎖中にhPIV3 FおよびHN遺伝子を含有する。

【0084】

9. 実施例4：キメラウシPIVは弱毒化表現型を示しかつin vivo投与されると強力な防御応答を誘発する

5週齢のSyrian Goldenハムスターを、 5×10^5 pfuの野生型bPIV3、組換えbPIV3、hPIV3、ヒト/ウシPIV3、およびプラセボを用いて感染させた。5つの異なる動物グループを別々に微生物遮断ケージ内に維持した。感染の4日後に、動物を犠牲にした。動物の鼻甲介と肺をホモジナイズして-80 にて保存した。組織に存在するウイルスをMDBK細胞中、37 におけるTCID₅₀アッセイによって測定した。ウイルス感染をモルモット赤血球を用いる血球吸着により確認した。表1は、ハムスターの肺と鼻甲介における異なるPIV3株の複製力価を示す。組換えbPIV3ウイルスとbPIV3/hPIV3キメラウイルスはハムスターの肺で弱毒化していることに注目すること。

【0085】

【表1】

Syrian Golden ハムスターの鼻甲介および肺における PIV3 ウイルスの複製

動物を感染させるために用いたウイルス	鼻甲介 Log ₁₀ TCID ₅₀ /g 組織	肺 Log ₁₀ TCID ₅₀ /g 組織
野生型 bPIV3	5.47 +/- 0.001	5.22 +/- 0.014
組換え bPIV3	5.00 +/- 0.361	2.90 +/- 0.490
野生型 hPIV3	4.86 +/- 0.072	4.81 +/- 0.123
bPIV3/hPIV3 キメラウイルス	4.68 +/- 0.104	3.73 +/- 0.418
プラセボ	0	0

さらに、感染前および感染の21日後にハムスターから採集した血清サンプルを赤血球凝集素化阻害アッセイで分析した。血清サンプルは受容体破壊酵素 (RDE, DENKA Seiken Co.) を用いて処理して、非特異的アグルチニンモルモット赤血球とともに氷上1時間のインキュベーションによって除去した。野生型bPIV3とhPIV3を2倍に連続希釈したハムスター血清サンプルに加えた。最後に、モルモット赤血球 (0.5%) を加えて、室温で赤血球凝集を起こさせた。表2は、異なるPIV3株を用いて感染させた際にハムスターで起こした抗体応答を示す。bPIV3/hPIV3キメラウイルスは、hPIV3に対して野生型hPIV3に対する場合と同程度に強い抗体応答を起こし、これは組換えまたは野生型bPIV3によって引き起こされる応答を遥かに超えることに注目すること。

【0086】

【表2】

様々な PIV3 ウイルスを用いて感染させたハムスターからの血清を用いる
赤血球凝集阻害アッセイ

ハムスターの接種に用いたウイルス	ハムスター血清力価	
	野生型 bPIV3	hPIV3
組換え bPIV3	1:16	1:16
野生型 bPIV3	1:16	1:8
野生型 hPIV3	1:4	1:128
bPIV3/hPIV3 キメラウイルス	1:8	1:128
プラセボ	<1:4	<1:4

10

これらの結果は本発明のbPIV3/hPIV3キメラウイルスの性質、すなわち、これらの組換え体がワクチン製剤における利用に適していることを示す。bPIV3/hPIV3キメラウイルスは、*in vivo*投与したときに、弱毒化表現型を示すだけでなく、野生型hPIV3と同程度に強い抗体応答も生起するのである。従って、本発明のキメラウイルスは弱毒化表現型を示しかつ野生型hPIV3と同程度に強い免疫応答を誘発するというユニークな組合せを示すので、これらのキメラウイルスはヒトにおけるPIVによる感染を阻害および/またはそれから防御するために首尾よく使用する上で必要な特性を備える。

20

【0087】

10. 実施例5：ヒトPIV2 FおよびHN遺伝子を含有するキメラbPIV3/hPIV2ウイルスの構築
hPIV2 (Greer株) のFおよびHN遺伝子を、hPIV2感染LLC-MK2細胞からRT-PCRによって単離した。3.5 kb PCR断片を配列決定してオープンリーディングフレームの存在を確認した。bPIV3遺伝子停止/遺伝子開始領域を有するbPIV3 F/HN遺伝子間(intergenic)領域をhPIV2 FおよびHN遺伝子の間にオーバーラッピング(overlapping)PCRによって導入した。このプラスミドをさらにオーバーラッピングPCR法を用いて改変し、FおよびHNタンパク質の細胞外ドメイン(ectodomain)がhPIV2から誘導されかつ膜貫通および細胞質領域がbPIV3由来となるようにキメラFおよびHN遺伝子を構築した。キメラhPIV2/bPIV3 FおよびHN遺伝子を含有するプラスミドを配列決定して、ルール・オブ・シックスに適合させた。キメラFおよびHN遺伝子をAvr2およびSal1を用いて消化して単離した。次に、得た3.2 kb断片を、Nhe1およびSal1を用いて処理したbPIV3/L cDNA中に導入した。全長bPIV3/hPIV2 cDNAのM/FおよびHN/L遺伝子接合部を配列決定してFおよびHN遺伝子の正しい挿入を確認した。

30

【0088】

キメラbPIV3/hPIV2ウイルスを、逆遺伝学によりHeLa細胞において33℃にて回収した。得たウイルスを生物学的に2回、希釈を制限してVero細胞にクローニングした。高力価ウイルスストックをVero細胞で増殖した。ウイルスを*in vitro*および*in vivo*でさらに特性決定した。

【0089】

11. 実施例6：温度感受性および弱毒化表現型を付与するbPIV3 L遺伝子中のアミノ酸置換の決定

40

この実施例は、bPIV3ゲノムのポリメラーゼ(L)遺伝子中に導入して感染性ウイルスとしてレスキューしたときに、温度感受性およびハムスター肺における複製の減少を示す組換えbPIV3ウイルスが回収される、単一アミノ酸突然変異を説明する。

【0090】

ウイルスワクチンベクターとして開発した組換えbPIV3 (r-bPIV3) の温度感受性および弱毒化表現型の遺伝学的基礎を規定する研究を開始した。遺伝学的データは、突然変異体r-bPIV3のRNAゲノムが4つの点突然変異を有することを示した。それらのうちの1つだけが、ウイルスタンパク質、bPIV3ポリメラーゼの単一アミノ酸に改変があった。ポリメラーゼ中のこの単一アミノ酸置換が、r-bPIV3の温度感受性または弱毒化表現型を規定するかど

50

うかを決定するために、ポリメラーゼタンパク質中に野生型アミノ酸を含有した新しいウイルスr-bPIV3/Lを回収した。この新しい組換えbPIV3/Lは組織培養において温度感受性を欠いた。r-bPIV3/Lの複製は、シリアンゴールデン(Syrian golden)ハムスターの下気道または上気道において制限されなかった。まとめると、bPIV3ポリメラーゼ中の単一アミノ酸置換は、r-bPIV3に対して観察される温度感受性および弱毒化表現型の原因であった。これらの結果は、bPIV3のポリメラーゼ遺伝子がウイルスワクチンベクターの主な弱毒化成分を構成することを示す。bPIV3ポリメラーゼタンパク質中のこの単一アミノ酸改変の弱毒化効果は、挿入遺伝子の発現レベルをモジュレートするためにおよび弱毒化ワクチンおよびベクターの開発などの他の目的のために、ワクチンベクターに有利に使用することができる。

10

【0091】

ウシパラインフルエンザウイルス3型(bPIV3)(パラミクソウイルス科のメンバー)は、エンベロープをもつ、マイナスセンス、一本鎖RNAウイルスである。bPIV3ゲノム(Kansas 15626/84)は、長さ15,456ヌクレオチドのキャップ構造を持たないRNAである(Hallerら, 2000)。ウイルスゲノムの3'半分は、ウイルスRNAをカプシド化する核タンパク質(NP)およびリンタンパク質(phosphoprotein)(P)(ポリメラーゼ関連タンパク質)をコードする。Pタンパク質は、ウイルス転写および複製において役割を果たす。さらに、Pオープンリーディングフレームは、選択的分子機構によって3つの小さいタンパク質、C、DおよびVをコードする。bPIV3のLポリメラーゼは長さで2233アミノ酸の大きなポリペプチドであり、Pタンパク質、RNA結合、RNAポリアデニル化、RNA転写、RNA複製との関連で必要なドメインを含む多重ドメインからなる多機能タンパク質であると考えられる。

20

【0092】

bPIV3(Kansas/15626/84)は、ウシの病原体として単離され、近年、hPIV3(幼児の急性呼吸器疾患を起こす感染性外的病原因子)に対するワクチン候補として重要視されている。bPIV3を用いて免疫感作したワクチン受給者は、交差中和化研究によって示されたように、ウシとヒトPIV3が抗原として25%関係しているためhPIV3から保護された。実施された第II相臨床試験は、2月齢の乳児がbPIV3を用いて免疫感作されると、hPIV3に対する防御免疫を受けた。従って、bPIV3はヒトにおいて免疫応答を誘発するのに十分なレベルまで複製しうるようである。進化の間に、bPIV3は、ヒトにおいて自然宿主病原制限(natural host pathogenic restriction)を提示する遺伝的変化を獲得したのであろう。NP、FおよびHNタンパク質をコードする3つの遺伝子は霊長類におけるbPIV3の複製制限に寄与しうる。それぞれの遺伝子内に存在する決定因子は、単独では、bPIV3に観察された弱毒化表現型をもたらすには不十分である。bPIV3をhPIV3ワクチン候補として評価する第II相臨床試験から得た有望な結果によって、bPIV3をさらに外来ウイルス抗原を送達するウイルスワクチンベクターとして開発した(実施例1~5を参照)。

30

【0093】

新規のウイルスワクチンベクターであるr-bPIV3の温度感受性および弱毒化表現型に関わる遺伝的決定因子を規定した。bPIV3の感染性cDNAを構築して、感染性組換えウイルスを逆遺伝学によってレスキューした。r-bPIV3ゲノムの線形遺伝子組織は、15,456ヌクレオチド長さのRNAゲノムである。bPIV3 cDNAの配列決定によって、生物学的に得られたbPIV3の配列から異なった4つの配列変化を同定した。これらの点突然変異の2つ(ヌクレオチド6460および6463)を遺伝子工学的に操作してウイルスRNA中にゲノムマーカー、F遺伝子におけるXhoI制限酵素部位を作製した。これらのヌクレオチド変化はいずれも、Fタンパク質のアミノ酸置換をもたらさなかった。第3のヌクレオチド変化は、L遺伝子の非コード領域の位置ヌクレオチド15354に位置した。このヌクレオチド変化は、L遺伝子の保存遺伝子停止配列またはbPIV3ゲノムの保存トレイラー(trailer)領域を変化しなかったため、ウイルス表現型の改変を生じると予想されなかった。第4の単一ヌクレオチド改変は、ウイルスポリメラーゼをコードするr-bPIV3のL遺伝子の位置11946に同定された。このヌクレオチド変化は、r-bPIV3のLタンパク質におけるイソロイシンのバリンへの単一アミノ酸置換を起こした。このポリメラーゼ突然変異の、先に記載したベクター化ワクチンウイルス、

40

50

ウシ/ヒトPIV3の温度感受性および弱毒化表現型に対する寄与を、組織培養およびハムスターにおいて研究した。

【0094】

材料と方法

ウイルスと細胞

bPIV3(Kansas/15626/84)、r-bPIV3、r-bPIV3/L、およびウシ/ヒトPIV3/Lを、抗生物質を含有するOpti-MEM培地(Gibco/BRL)中のVero細胞で増殖した。ファージT7 RNAポリメラーゼを発現する改変ワクシニアウイルスAnkara(MVA-T7)をニワトリ胎児腎細胞(SPAFAS)中で増殖した。VeroおよびHeLa細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)、2 mM L-グルタミン、非必須アミノ酸、および抗生物質を補充したMEM培地(JRH Biosciences)中で維持した。

10

【0095】

pbPIV3/CATミニレプリコンの構築

デルタ肝炎リボザイム(RZ)およびT7ポリメラーゼ終結(T7T)シグナルと連結したマイナスセンスbPIV3リーダーがフランキングしたアンチセンスCAT遺伝子を含有し、そのbPIV3トレイラー配列の前にT7 RNAポリメラーゼプロモーターが先行するpbPIV3/CATミニレプリコンを構築した。pbPIV3/CATのT7T、RZおよびbPIV3リーダー領域を含有するDNA断片は、2つのオーバーラッピングPCR断片により、KpnI制限酵素部位およびXbaI部位をコードする2対のプライマーをそれぞれ用いて生産した。T7T/RBZ断片はpRSV/CAT(RSVミニゲノムプラスミド)から増幅し、そしてbPIV3リーダー領域はbPIV3 cDNAからPCR増幅した。これらの2つのPCR断片はオーバーラッピング配列を含有するので、限られたサイクルのPCRを通してのアニーリング/伸長によって1つの断片に連結した。PCR産物はKpnIおよびXbaIを用いて切断して、KpnIおよびXbaIを用いて切断したpRSV/CATプラスミド中に導入し、それによってpRSV/CATにT7T/RZ/RSVリーダーを置換えた。T7 RNAポリメラーゼプロモーターおよびbPIV3トレイラー領域をコードするDNA断片は、PstI制限酵素部位をコードするbPIV3トレイラー領域またはHindIII制限酵素部位をコードするT7 RNAポリメラーゼプロモーターと相補的な2つのオリゴを使って増幅した。PCR産物をPstIおよびHindIIIを用いて消化し、これらを使ってpRSV/CATプラスミドの相補的断片を置換えて、pbPIV3/CATミニレプリコン・プラスミドを得た。

20

【0096】

全長r-bPIV3/Lおよびウシ/ヒトPIV3/L cDNAの構築

QuickChange突然変異誘発キット(Stratagene)を使用して、r-bPIV3 L遺伝子のヌクレオチド位置11946における単一G残基を、先に記載したプラスミドL/pCITEにおいてA残基へ変化させた。ヌクレオチド変化はDNA配列決定によって確認した。改変したL/pCITEプラスミドを、次に、制限酵素SacIおよびPacIを用いて消化し、単一ヌクレオチド変化を有する2.5 kbDNA断片を遊離させた。次いで、このDNA断片を、SacIおよびPacIを用いて切断した2つの先に記載したプラスミド、bPIV3/N/S、および全長ウシ/ヒトPIV3 cDNAを含有するプラスミド中に導入した。全長プラスミドr-bPIV3/Lおよびウシ/ヒトPIV3/LのL遺伝子の導入した配列を配列決定して単一ヌクレオチド変化の存在を確認した。

30

【0097】

感染性全長ウイルスのアンチゲノムを含有するプラスミドr-bPIV3/Lおよびウシ/ヒトPIV3/Lのトランスフェクション

HeLa細胞(80%コンフルエント)を、MVA-T7を用いて4のMOIにて感染した。感染後1時間に、全長アンチゲノムr-bPIV3/Lプラスミド(4 μg)またはウシ/ヒトPIV3/L cDNAを有するプラスミドを、MVA-T7感染HeLa細胞中に、NP/pCITE(0.4 μg)、P/pCITE(0.4 μg)、およびL/pCITE(0.2 μg)発現プラスミドと一緒に、9 μlのLipofectACE(Gibco/BRL)を含む200 μlのOpti-MEM(Gibco/BRL)の存在のもとでトランスフェクトした。トランスフェクション後48時間に、継代0(P0)細胞と培地と一緒に回収して1回の凍結-解凍サイクルに供した。次に、得られたP0細胞溶解物を使用して、40 μg/μl 1-β-D-アラビノフラノシルシトシン(ara C)、ワクシニアウイルスの複製インヒビターの存在のもとで、新鮮なVero細胞単層を感染し、P1ウイルスストックを作製した。この感染サイクルからの培地と細胞を回収し、

40

50

1回凍結-解凍し、そしてbPIV3感染の存在をPIV3特異的抗血清（VMRD）を用いたウイルスブランクの免疫染色によって確認した。

【0098】

組換えウイルスストック調製

P1（継代1）r-PIV3/Lまたはウシ/ヒトPIV3/Lウイルスストックを、P0（継代0）を用いて感染した細胞から回収した。P0ウイルスストックはトランスフェクトした細胞から得た。2サイクルのVero細胞でのブランク精製後に、高力価P2（継代2）ウイルスストックをVero細胞で調製して、-80 で保存した。

【0099】

r-bPIV3/Lおよびウシ/ヒトPIV3/Lの遺伝子型決定

r-bPIV3/Lまたはウシ/ヒトPIV3/LのウイルスRNAを、感染Vero細胞からRNA STAT-50™ LS 試薬(Tel-Test社)を使って単離した。r-bPIV3/Lまたはウシ/ヒトPIV3/Lの遺伝子型を確認するために、nt 4500で始まるr-bPIV3/LのウイルスDNAをスーパースク립ト（Superscript）逆転写酵素(Gibco/BRL)を用いて調製した。nt 11000～nt 13000の領域を包含するDNA断片をPCRより増幅して1.7 kb PCR産物を得た。PCR産物を配列決定して、ウイルスポリメラーゼ遺伝子中に単一のヌクレオチド変化の存在を確認した。ウシ/ヒトPIV3/LのhPIV3 FおよびHN遺伝子の存在も、RT-PCRおよび続いてのPCR産物の配列決定によって、先に記載したように確認した。

【0100】

bPIV3ミニゲノムアッセイ

サブコンフルエントHeLa細胞を改変ワクシニアウイルスAnkara（MVA）を用いて、5のMOIにて感染した（Wyattら,1995）。感染細胞を、LipofectACE(Gibco BRL/Life Sciences)を使用して、P、NPおよびL bPIV3遺伝子をコードする3つのプラスミドならびにbPIV3リーダーおよびトレイラーがフランキングするクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子のアンチゲノム配列をコードする1つのレポータープラスミドを用いて同時トランスフェクトした。これらのプラスミドは先に詳しく記載した。プラスミドを次の量のDNA：NP/pCITE(200 ng)、P/pCITE(200 ng)、L/pCITE(200～600 ng)およびbPIV3/CAT(500 ng)を用いてトランスフェクトした。細胞を5時間、33 にてインキュベートした。培地を変えた後に、トランスフェクトした細胞のインキュベーションを、33、37 および39 にて継続した。トランスフェクション後24または40時間後に、細胞を溶解し、産生したCATタンパク質の量を、CAT ELISAs(Roche Molecularのキット)を実施して分析した。

【0101】

増殖曲線

Vero細胞を90%コンフルエンスまで増殖し、0.01のMOIにてbPIV3、r-bPIV3、またはr-bPIV3/Lを用いて感染した。感染した単層を37、39、および40 にてインキュベートした。感染後0、24、48、72、96および120時間後に、細胞と培地を一緒に回収し、-80 にて保存した。各時点の回収に対するウイルス力価をVero細胞においてTCID₅₀アッセイによって決定した。

【0102】

ブランク形成アッセイの効率

Vero細胞におけるブランクアッセイを、bPIV3、r-bPIV3、r-bPIV3/L、およびウシ/ヒトPIV3/Lを用いて実施した。感染した単層を、35、37、38、39、39.5、および40 にてインキュベートした。感染後4日後に、感染した単層をbPIV3特異的抗血清（VMRD）を用いて免疫染色した。ブランクを定量化し、異なる温度で力価を決定してウイルスのシャットオフ温度を同定した。

【0103】

小動物研究

5週齢シリアンゴールデンハムスター（1グループ当たり4動物）を、5 x 10⁵ pfu のbPIV3、r-bPIV3、r-bPIV3/Lまたはウシ/ヒトPIV3/Lを含む100 μl容積を用いて感染した。3つの

10

20

30

40

50

異なるグループを別々にマイクロ隔離ケージの中に維持した。感染後4日後に、動物の鼻甲介と肺を回収し、ホモジナイズし、-80℃にて保存した。組織に存在するウイルスの力価を、Vero細胞におけるTCID₅₀アッセイにより決定した。

【0104】

結果

異なる温度でのCATレポーターミニゲノムアッセイにおける野生型および突然変異体bPIV3ポリメラーゼによるRNA合成

最初、本発明者らは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) レポーターミニゲノムアッセイにおいてr-bPIV3のポリメラーゼ中に存在する単一アミノ酸置換が全体的なウイルスRNA合成に対して影響を与えうることを実証したかった。r-bPIV3 L遺伝子コード領域のヌクレオチド11946における単一点突然変異を、L遺伝子を有する発現プラスミド (L/pCITE) において野生型配列に復帰させた。修正したL遺伝子のDNA配列決定により、クローニングプロセスで新しい突然変異が導入されていないことが確認された。MVA-T7感染HeLa細胞を、野生型bPIV3 P、NP、および野生型または突然変異体Lタンパク質をコードするプラスミド、ならびにbPIV3/CATミニゲノムプラスミドを用いてトランスフェクトし、そして細胞を33、37、または39℃にてインキュベートした。T7 RNAポリメラーゼは、bPIV3ゲノムRNAの3'および5'末端を含有するマイナスセンスCAT RNAを転写する。NPタンパク質はCAT転写産物と結合して、ウイルスポリメラーゼ複合体による複製と転写に対する鋳型として作用できるようにする。細胞溶解物中に存在するCATタンパク質を、CAT ELISAによってアッセイした。ミニゲノムアッセイを使用して、鋳型のウイルス転写/複製活性ならびにbPIV3のNP、PおよびLタンパク質、ポリメラーゼ活性に必要なタンパク質をコードするヘルパープラスミドの機能性を試験することができた。

【0105】

高いCATタンパク質収率を得る最適な野生型L遺伝子濃度を決定するために、ミニゲノムアッセイ系で野生型L遺伝子を含有するプラスミドの量を増加させて試験した。200ngの野生型Lを加えると、産生したCATタンパク質により測定すると高いレベルのミニゲノム転写と複製を得た。bPIV3/CATだけを用いるかまたはL、NPもしくはPプラスミドをそれぞれ含まないトランスフェクションではCATタンパク質は観察されなかった。突然変異体L遺伝子プラスミドを用いたHeLa細胞のトランスフェクションは、野生型L遺伝子を用いたトランスフェクションから誘導された溶解物と比較して、33℃にてCATタンパク質の産生の減少を示した。突然変異体bPIV3 L遺伝子を用いたトランスフェクションは、野生型bPIV3 L遺伝子を33、37および39℃にて用いたときに観察された活性の約30%であった。突然変異体bPIV3ポリメラーゼによるCATタンパク質産生は、温度を上昇してもさらに増加しなかった。これらの結果は、r-bPIV3において観察された温度感受性欠損はLタンパク質とNPもしくはPとの相互作用によるものでなく、むしろLタンパク質とウイルスライフサイクルに関わる他のウイルスもしくは細胞構成成分との相互作用によることを示唆した。

【0106】

野生型L遺伝子を有する全長組換えbPIV3の構築

野生型コード配列を有するL遺伝子を全長bPIV3 cDNAに導入し、r-bPIV3/Lウイルスを逆遺伝学によって回収した。r-bPIV3/Lゲノム中の野生型L遺伝子コード配列の存在を、単離したr-bPIV3/L RNAから得たRT-PCR断片を配列決定して確認した。r-bPIV3/LをVero細胞で2回ブランク精製し、10⁷pfu/mlの高力価ウイルスストックをVero細胞で作製した。興味深いことに、生物学的に誘導したbPIV3、r-bPIV3およびr-bPIV3/Lの免疫染色ブランクの形態により、r-bPIV3/Lのブランクはr-bPIV3とサイズが類似し、生物学的に誘導したbPIV3のブランクのサイズよりさらに小さいことが示された。従って、bPIV3のバーストサイズを規定する決定因子は、r-bPIV3/Lになお存在するヌクレオチド変化を包含するゲノム範囲 (stretch) に位置しうる。

【0107】

組織培養中のr-bPIV3/L複製の温度感受性

野生型L遺伝子と上記の3つのヌクレオチド変化を有するr-bPIV3/Lがなお温度感受性表現

型を提示することを実証するために、そのプラーク形成能力を許容されるおよび制限される温度にて試験した。bPIV3、r-bPIV3およびr-bPIV3/Lのプラークアッセイを、37、38、39、39.5、および40にてインキュベートし、インキュベーションの4日後に、プラークをbPIV3ヤギポリクローナル抗血清を用いた免疫ペルオキシダーゼ染色によって可視化した。結果は、r-bPIV3が先に観察されたように温度感受性であることを示した。r-bPIV3の力価は、生物学的に誘導したbPIV3と比較して、39で約 $1 \log_{10}$ だけ減少し40で $>3 \log_{10}$ だけ低下した。生物学的に誘導したbPIV3は温度を増加しても力価は有意に変化しなかった。興味深いことに、r-bPIV3/Lは野生型ウイルス挙動を提示し、温度を増加しても力価の低下は起こらなかった。このデータは、r-bPIV3/LのLタンパク質中のアミノ酸の野生型コンテキストへの復帰は、r-bPIV3に観察された温度感受性表現型を抹消することを示した。

10

【0108】

bPIV3、r-bPIV3およびr-bPIV3/Lのマルチサイクル複製をVero細胞で研究した。簡単に説明すると、サブコンフルエントなVero細胞を0.01のMOIにて感染し、37、39および40でインキュベートした。感染後0、24、48、72、および96時間に細胞ならびに培地を回収して、各時点をとった。次に、各時点におけるウイルスの量をTCID₅₀アッセイによって決定した。

【0109】

37にて、r-bPIV3/Lは、生物学的に得られたbPIV3、またはr-bPIV3に対して観察されたレベルで複製した。3つのウイルスは全て、 $8 \log_{10}$ TCID₅₀/mlのピーク力価に感染後48時間までに到達した。全ての3つのウイルスの力価は、37では感染後96時間まで安定であった。r-bPIV3/LとbPIV3は39で類似した力価を生じた。これらのピーク力価はそれぞれ感染後48時間に、 8.1 および $8.6 \log_{10}$ TCID₅₀/mlであった。39で、r-bPIV3は、bPIV3と比較して、複製開始の遅延および低下したピーク力価 $7.0 \log_{10}$ TCID₅₀/mlを提示した。r-bPIV3は、先に観察したように、Vero細胞で39で温度感受性表現型を提示した。r-bPIV3の温度依存性表現型は、40でさらに明瞭になった。r-bPIV3は、それぞれ37および39でのピーク力価と比較して、40にてウイルス力価の7および $5 \log_{10}$ の著しい低下を提示した。生物学的に得られたbPIV3も、37でのピーク力価と比較して、40で $2.3 \log_{10}$ だけ低下した。bPIV3の力価の40におけるこの減少は、40でのVero細胞の生存度にも関わらず先に観察された。興味深いことに、r-bPIV3/Lは、40にて、生物学的に得られたbPIV3と同じく効率的に複製し、感染後72時間にピーク力価に到達した。このデータはさらに、r-bPIV3/LのLタンパク質の野生型コンテキストへのアミノ酸変化は、温度感受性表現型を欠く組換えウイルスをもたらすことを実証した。

20

30

【0110】

ハムスターにおけるr-bPIV3/Lの弱毒化表現型の決定

r-bPIV3/Lにおけるポリメラーゼタンパク質の野生型コンテキストへのアミノ酸変化はr-bPIV3の弱毒化表現型に対して影響を与えることを実証する目的で、本発明者らは、bPIV3、r-bPIV3およびr-bPIV3/Lの複製をシリアンゴールデンハムスターにおいてin vivoで試験した。簡単に説明すると、ハムスターに 5×10^5 pfuのbPIV3、r-bPIV3またはr-bPIV3/Lを鼻腔内に接種し、感染後4日に動物を屠殺した。肺と鼻甲介を回収し、ウイルス力価をTCID₅₀アッセイによりVero細胞を用いて決定した。r-bPIV3/Lは、ハムスターの鼻甲介および肺において $5.3 \log_{10}$ TCID₅₀/g組織で複製し、生物学的に得られたbPIV3で観察された複製と同じレベルであった。r-bPIV3は、鼻甲介において $5.0 \log_{10}$ TCID₅₀/g組織で複製したが、先に観察したように、肺ではbPIV3と比較して $1.8 \log_{10}$ だけ減少した力価を示した。これらの結果は、r-bPIV3ポリメラーゼの単一アミノ酸置換が温度感受性表現型だけでなくr-bPIV3の弱毒化表現型も規定することを示した。

40

【0111】

ポリメラーゼ遺伝子における突然変異の位置の分析

複数のパラインフルエンザウイルスのポリメラーゼ遺伝子の配列アラインメントを実施して、様々なウイルスの間の、Lタンパク質の位置1103およびその周辺領域における改変ア

50

ミノ酸残基の保存度を決定した。興味深いことに、イソロイシンのバリンへのアミノ酸置換は、bPIV3、hPIV3、hPIV1およびセンダイウイルスの間で高度に保存されたポリメラーゼ遺伝子の20個のアミノ酸範囲に存在した。生物学的に得られたbPIV3とhPIV3はアミノ酸位置1103にイソロイシンを提示し、この位置にr-bPIV3はバリンを有し、そしてhPIV1およびセンダイウイルスはロイシン残基を提示した。ヒトパラインフルエンザウイルス2型、おたふく風邪、または麻疹ウイルスなどのそれほど近い関係にないウイルスは、バリンもしくはロイシンをそれぞれこの位置に提示した。対照的に、hRSVのポリメラーゼタンパク質は、ポリメラーゼタンパク質のこの領域について、パラインフルエンザウイルスのそれらとアミノ酸レベルで相同性を示さなかった。

【0112】

さらに、置換アミノ酸を有するr-bPIV3 Lタンパク質の領域を、温度感受性および弱毒化表現型に関わるcp45 hPIV3に存在する突然変異の位置と比較した。hPIV3のLタンパク質中の3つのアミノ酸置換、Y942H、L992F、T1558Iは単独でまたは組合せで、温度感受性表現型をもたらした。ポリメラーゼタンパク質の線形コンテキストにおいて、r-bPIV3のV1103I変化は、cp45 hPIV3に観察された改変に近接した近位になかった。cp45 hPIV3の最も近接したアミノ酸置換はL992Fであったが、それですらr-bPIV3に観察されたI1103V変化の100アミノ酸を超える上流にあった。しかし、ポリメラーゼタンパク質の自然のコンフォメーションにおいて、これら4つのアミノ酸置換は全てお互いに近接した近位にありうる。

【0113】

ベクター化ワクチンウイルス、ウシ/ヒトPIV3に対するポリメラーゼ突然変異の影響
bPIV3のワクチンウイルスベクターとしての1つの適用は、hPIV1、2および3に対するワクチンを作製するための、ヒトパラインフルエンザウイルス、hPIV1、2および3の3つの血清型の表面糖タンパク質の導入である。本発明者らは先に、hPIV3 FとHN遺伝子をbPIV3のそれら遺伝子と置換えて含有するhPIV3用推定ワクチン、ウシ/ヒトPIV3の表現型を記載した。ウシ/ヒトPIV3は39.5 のシャットオフ温度を提示し、ハムスター肺内の複製に対して1.5 log₁₀ TCID₅₀/g組織だけ制限された。本発明者らは、観察したウシ/ヒトPIV3の表現型の原因がポリメラーゼ突然変異によるのか外来糖タンパク質遺伝子によるのかを区別できなかった。そこで、ポリメラーゼ突然変異を、ウシ/ヒトPIV3の全長cDNAの野生型コンテキストに修正した。組換えウイルス、ウシ/ヒトPIV3/Lを逆遺伝学によってレスキューし、ハムスターにおける温度感受性と複製について特性決定をした。ブランク形成効率の実験をVero細胞を使って実施して、ウシ/ヒトPIV3/Lが温度感受性であるか否かを決定した。結果は、ウシ/ヒトPIV3/Lは40 の高い温度にて有意なウイルス力価の減少を提示しないことを示した。ウシ/ヒトPIV3/Lはまた、シリアンゴールデンハムスターの下気道および上気道における複製も評価した。

【0114】

考察

この実施例は、bPIV3のポリメラーゼ遺伝子中の単一ヌクレオチド改変によって、ハムスターの下気道において温度依存性ならびに複製制限を提示する組換えウイルスを生じたことを示す。これらの表現型に最も関わるとされるL遺伝子のアミノ酸変化を部位特異的突然変異誘発によって野生型コンテキストに復帰して、得られた野生型遺伝子をbPIV3ミニゲノムアッセイにおいて活性と機能をアッセイした。このアッセイから得た結果は、実に突然変異体L遺伝子は野生型L遺伝子と比較して3~4倍低いウイルスRNA合成活性を提示することを示した。突然変異体L遺伝子の活性量が温度上昇に伴ってさらに減少しなかったという観察結果は、NPおよびPとの相互作用がr-bPIV3の温度感受性表現型の原因でなく、むしろLタンパク質と他の細胞もしくはウイルス因子との相互作用が原因であることを示唆した。

【0115】

修正したL遺伝子を全長bPIV3 cDNA中に導入すると、野生型L遺伝子コード領域を有する組換えウイルス、r-bPIV3/Lが回収された。r-bPIV3/Lはr-bPIV3と野生型コンテキストへ復帰した単一アミノ酸だけが異なった。従って、r-bPIV3/Lはr-bPIV3のF遺伝子およびL遺伝

10

20

30

40

50

子の非翻訳領域に存在する他の3つのヌクレオチド改変をまだ維持した。r-bPIV3/Lの *in vitro*複製表現型の特性決定は、r-bPIV3/Lが組織培養における増殖に対して温度感受性でないことを示した。r-bPIV3/Lは、37、38、39、39.5および40 で生物学的に得られたbPIV3と同じ力価を生じた。マルチサイクル増殖曲線において、r-bPIV3/LとbPIV3は類似のウイルス複製反応速度論を提示した。両方のウイルスは同じ時点でピーク力価に到達し、複製の開始は全温度において匹敵した。r-bPIV3/Lは、組織培養における増殖に対して温度感受性表現型を提示しなかった。r-bPIV3はハムスター肺で2 log₁₀ だけ減少した複製を提示したので、r-bPIV3/Lのシリアンゴールデンハムスターの上気道および下気道における複製能力も試験した。再び、r-bPIV3/Lは、生物学的に誘導したbPIV3と類似しかつr-bPIV3と異なる挙動を示した。r-bPIV3/Lはハムスターの下気道および上気道の両方において野生型レベルで複製した。従って、r-bPIV3/Lはハムスターにおける複製に対して弱毒化表現型を提示しなかった。まとめると、野生型L遺伝子配列を反映するため単一アミノ酸だけ改変したウイルスゲノムを有するr-bPIV3/Lは、先に単離され特性決定されて39 での増殖に対して温度感受性を示したr-bPIV3よりも、生物学的に得られたbPIV3によく似ていた。

【 0 1 1 6 】

bPIV3、hPIV3、hPIV1およびセンダイウイルスのLタンパク質のアラインメントは、アミノ酸1103が高度に保存されたポリメラーゼ遺伝子の範囲に位置することを示した。しかしアミノ酸1103は4つの保存されたポリメラーゼモチーフ(motives)A、B、CまたはDの1つに位置しなかった。ウシおよびヒトPIV3はこの位置にイソロイシンを提示したが、hPIV1およびセンダイウイルスはロイシンを有した。bPIV3ポリメラーゼの1103でのイソロイシンのバリンによる保存的置換は、驚異的な著しい影響をr-bPIV3にもたらした。イソロイシンとバリンはメチル基が1つだけ異なる類似の側鎖を持つ。しかし、パラインフルエンザウイルスにとって、この位置のイソロイシンまたはロイシンは絶対要件であると思われる。対照的に、hPIV2、おたふく風邪、および麻疹などの関係するパラミクソウイルスは、ポリメラーゼタンパク質のこの位置のバリンまたはロイシンを許容することができる。アミノ酸置換によるウイルス複製に対する同様の著しい影響が先に観察されている。hPIV1のポリメラーゼの保存的アミノ酸置換は、ウイルス転写と複製の両方に影響を与えた。ここでは、hPIV1ポリメラーゼの位置1558におけるロイシンのイソロイシンへの置換はウイルス複製に著しい影響を示した。このアミノ酸置換は、hPIV1ポリメラーゼによる許容される温度でのウイルス転写に影響を与えなかったが、39.6 では50%だけ転写を低下した。hPIV1ポリメラーゼの *in vitro*複製活性は許容される温度で85%だけ低下した。対照的に、*in vivo*の複製活性は許容される温度では野生型Lより良かったが、37 で急速に減少し、39.6 では不活性となった。これらの結果は、ウイルスポリメラーゼタンパク質における合理的に設計しかつ導入した突然変異に基づいて、ウイルスの表現型を予測することが非常に難しいことを示した。また、ウイルス欠陥の重大さとアミノ酸置換の重大さの程度との間の相関を確立することも難しい。

【 0 1 1 7 】

本発明は、ポリメラーゼ(L)遺伝子が位置1103にロイシンまたはイソロイシンでない他の残基を規定し；かつ一般的に、位置1103にグリシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、システイン、セリン、トレオニン、アルギニン、リシン、ヒスチジン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、およびアスパラギンから成る群から選択される天然のアミノ酸残基をコードすることを特徴とする組換えゲノムを含有する温度感受性弱毒化bPIV3ウイルスを提供する。好ましい実施形態においては、アミノ酸1103はバリンである。

【 0 1 1 8 】

ここで研究したポリメラーゼ突然変異はさらに、ウシ/ヒトPIV3、先に記載したベクター化ワクチンウイルス(前掲、およびHallら、2000)の温度感受性かつ弱毒化表現型を規定した。bPIV3とhPIV3の表面糖タンパク質遺伝子FおよびHNは密接に関係していて、アミノ酸レベルでそれぞれ77および80%アミノ酸同一性を提示する。ウシとヒトのPIV3のタン

パク質における表面糖タンパク質の密接な関係は、bPIV3中への外来遺伝子導入の影響を最小限にすると予想された。従って、ウシ/ヒト PIV3に存在するポリメラーゼ突然変異は、このウイルスの得られる表現型の原因であった。bPIV3のウイルスワクチンベクターとしての利用に対するこのポリメラーゼ突然変異の意味は、導入遺伝子の発現レベルを規定する分子ツールの利用可能性にある。目的のタンパク質の低レベルが必要な場合には、r-bPIV3ベクターを使用しうる。しかし外来タンパク質のより高いレベルが所望であれば、r-bPIV3/Lを使用しうる。まとめると、本実施例で、本発明者らはbPIV3ベクター主鎖中の目的遺伝子の発現度を微細に調整することを可能にするであろうbPIV3のポリメラーゼ突然変異を同定した。これはウイルスワクチンおよび他の用途にとって有利であろう。

【0119】

本発明は、本発明の個々の態様の1つの説明を意図している記載した特定の実施形態によって範囲が限定されるものでなく、かつ機能的に等価であるいずれの構築物、ウイルスまたは酵素も本発明の範囲内にある。実際、本明細書に示し、かつ記載したものに加えて、本発明の様々な改変が以上の説明と添付の図面から当業者には明らかであろう。そのような改変は、添付の特許請求の範囲内にあると意図される。

【0120】

様々な刊行物を本明細書に引用したが、これらの開示はそれらの全体が参照により組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 bPIV3/hPIV3キメラウイルスの3つの異なる単離体由来のPCR断片nt5255~nt6255を増幅した。得られた1kb DNA断片をヒトPIV3のF遺伝子に特異的な酵素を用いて消化した。これらの酵素は対応するウシPIV3の断片を切断しない。1%アガロースゲルは、無消化の断片(レーン2、5、および6)およびSacIまたはBglIIで消化した断片(それぞれレーン4、6ならびにレーン9、10、および11)を示す。レーン10のサンプルは無消化であるが、BglIIにより反復消化するとこのサンプルは切断された(データは載せてない)。レーン1と8はDNAサイズマーカーである。

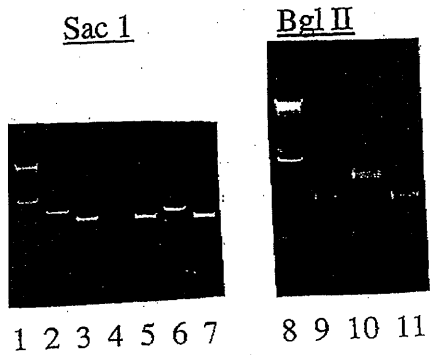
【図2】 bPIV3/hPIV3キメラウイルスの3つの異なる単離体由来のPCR断片nt9075~nt10469を増幅した。得られた1.4kb DNA断片をウシPIV3のL遺伝子に特異的な酵素を用いて消化した。これらの酵素は対応するヒトPIV3の断片を切断しない。1%アガロースゲルは、無消化の1.4kb断片を(レーン2、5、および8)に、BamHIとPvuIIによる消化で作られたより小さいDNA断片を(レーン3、4、6、7、9および10)に示した。レーン1はDNAサイズマーカーである。

10

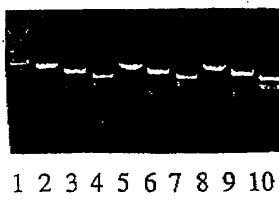
20

30

【 1】



【 2】



フロントページの続き

- (72)発明者 ハラー, オーレリア
アメリカ合衆国 94062 カリフォルニア州, レッドウッド シティ, ヒルビュー アヴェニ
ュー 313
- (72)発明者 コーリンフ, キャサリン, エル.
アメリカ合衆国 94110 カリフォルニア州, サン フランシスコ, ドロース ストリート
1507

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 国際公開第98/053078(WO, A1)
J. Infectious Diseases, (1988), Vol. 157, No. 4, p. 655-662

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