

(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2019-535311

(P2019-535311A)

(43) 公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 N 15/863 (2006.01)	C 1 2 N 15/863 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁)		

(21) 出願番号 特願2019-545700 (P2019-545700)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月2日 (2017.11.2)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月25日 (2019.6.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/059782
 (87) 国際公開番号 W02018/085582
 (87) 国際公開日 平成30年5月11日 (2018.5.11)
 (31) 優先権主張番号 62/434,794
 (32) 優先日 平成28年12月15日 (2016.12.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/416,577
 (32) 優先日 平成28年11月2日 (2016.11.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 519156225
 エバンス, デイビッド
 カナダ国 ティー6ジー 2イーアイ アル
 バータ, エドモントン, カッツ グ
 ループ センター O2O-6, ユニバ
 ーシティ オブ アルバータ
 (71) 出願人 519156236
 ノイス, ライアン
 カナダ国 ティー6ジー 2イーアイ アル
 バータ, エドモントン, カッツ グ
 ループ センター O2O-6, ユニバ
 ーシティ オブ アルバータ

最終頁に続く

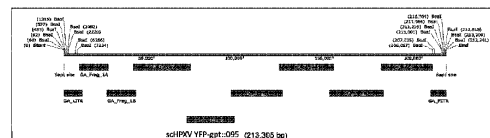
(54) 【発明の名称】 合成キメラボックスウイルス

(57) 【要約】

本発明は一般に、合成キメラボックスウイルス、かかるウイルスを含む組成物、ならびにかかる合成キメラボックスウイルスを産生するためのシステムおよび方法の開発および使用に関する。合成キメラボックスウイルスは、生ウイルスワクチンおよび医薬製剤に十分適している。化学的ゲノム合成は、天然の鋳型に依存しないので、ウイルスゲノムの大量の構造的および機能的改変が可能である。天然の鋳型が、従来の分子生物学の方法による遺伝的複製または改変に利用可能でない場合、化学的ゲノム合成は特に有用である。

Figure 1B

schIPXV genome used for DNA synthesis



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

合成 DNA に由来する DNA から複製および再活性化される合成キメラボックスウイルス (s c P V) であって、前記ウイルスのウイルスゲノムは、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記ウイルスの野生型ゲノムとは異なり、前記改変は、化学的に合成された DNA、c DNA またはゲノム DNA を含む群に由来する、s c P V。

【請求項 2】

前記合成 DNA が、化学的に合成された DNA、PCR 増幅された DNA、操作された DNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち 1 つまたは複数から選択される、請求項 1 に記載の s c P V。

10

【請求項 3】

前記合成 DNA が、化学的に合成された DNA である、請求項 1 に記載の s c P V。

【請求項 4】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の s c P V。

【請求項 5】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の独自の制限部位を導入する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の s c P V。

【請求項 6】

前記ウイルスゲノムが、異種末端ヘアピンループを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の s c P V。

20

【請求項 7】

前記ウイルスゲノムが、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の s c P V。

【請求項 8】

左および右末端ヘアピンループが、

a) それぞれ、スロー形態およびファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b) それぞれ、ファスト形態およびスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c) 共にスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、または d) 共にファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ループを含む、請求項 7 に記載の s c P V。

30

【請求項 9】

前記ウイルスが、前記 s c P V のウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学的に合成された DNA 断片から複製および再活性化される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の s c P V。

【請求項 10】

前記ウイルスが、1 ~ 14 個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項 9 に記載の s c P V。

【請求項 11】

前記ウイルスが、8 ~ 12 個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項 9 に記載の s c P V。

40

【請求項 12】

前記ウイルスが、10 個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項 9 に記載の s c P V。

【請求項 13】

前記ウイルスが、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の s c P V。

【請求項 14】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス (S F V)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から

50

選択される、請求項 13 に記載の s c P V。

【請求項 15】

合成 DNA に由来する DNA から複製および再活性化される合成キメラオルソボックスウイルス (s c O P V) であって、前記ウイルスのウイルスゲノムは、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記ウイルスの野生型ゲノムとは異なり、前記改変は、化学的に合成された DNA、c DNA またはゲノム DNA を含む群に由来する、s c O P V。

【請求項 16】

前記合成 DNA が、化学的に合成された DNA、PCR 増幅された DNA、操作された DNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち 1 つまたは複数から選択される、請求項 15 に記載の s c O P V。

10

【請求項 17】

前記合成 DNA が、化学的に合成された DNA である、請求項 15 に記載の s c O P V。

【請求項 18】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、ラクダ痘 (C M L V) ウイルス、牛痘ウイルス (C P X V)、奇肢痘ウイルス (E C T V)、馬痘ウイルス (H P X V)、サル痘ウイルス (M P X V)、ワクシニアウイルス (V A C V)、痘瘡ウイルス (V A R V)、ウサギ痘ウイルス (R P X V)、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングিশュー病ウイルスおよびハタネズミ痘ウイルスからなる群から選択される O P V に基づく、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の s c O P V。

20

【請求項 19】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、V A C V に基づく、請求項 15 から 18 のいずれか一項に記載の s c O P V。

【請求項 20】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、V A C V 株 A C A M 2 0 0 0 のゲノムに基づき、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記 A C A M 2 0 0 0 ゲノムとは異なる、請求項 19 に記載の s c O P V。

【請求項 21】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、V A C V 株 I O C のゲノムに基づき、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記 I O C ゲノムとは異なる、請求項 19 に記載の s c O P V。

30

【請求項 22】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、V A C V 株 M V A のゲノムに基づき、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記 M V A ゲノムとは異なる、請求項 19 に記載の s c O P V。

【請求項 23】

前記 s c O P V のウイルスゲノムが、V A C V 株 M V A - B N のゲノムに基づき、1 つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記 M V A - B N ゲノムとは異なる、請求項 19 に記載の s c O P V。

【請求項 24】

前記野生型 V A C V ゲノムが、Western Reserve、Clone 3、Tian Tian、Tian Tian クローン TT9、Tian Tian クローン TP3、NYCBH、Wyeth、Copenhagen、Lister 107、Lister - LO、IHD - W、LC16m18、Lederle、Tashkent クローン TKT3、Tashkent クローン TKT4、USSR、Evans、Praha、LIVP、Ikeda、EM - 63、Malbran、Duke、3737、CV - 1、Connaught Laboratories、Serro 2、CM - 01、Dryvax クローン DPP13、Dryvax クローン DPP15、Dryvax クローン DPP20、Dryvax クローン DPP17、Dryvax クローン DPP21 および漿尿膜ワクシニアウイルス Ankara からなる群から選択される株のゲノムである、請求

40

50

項 19 に記載の s c O P V。

【請求項 25】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む、請求項 15 から 24 のいずれか一項に記載の s c O P V。

【請求項 26】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の独自の制限部位を導入する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 15 から 25 のいずれか一項に記載の s c O P V。

【請求項 27】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 15 から 26 のいずれか一項に記載の s c O P V。

10

【請求項 28】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の A a r I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 27 に記載の s c O P V。

【請求項 29】

前記 1 つまたは複数の改変が、全ての A a r I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 28 に記載の s c O P V。

【請求項 30】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の B s a I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 15 から 29 のいずれか一項に記載の s c O P V。

【請求項 31】

前記ウイルスゲノムが、異種末端ヘアピンループを含む、請求項 15 から 30 のいずれか一項に記載の s c O P V。

20

【請求項 32】

前記ウイルスゲノムが、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む、請求項 15 から 30 のいずれか一項に記載の s c O P V。

【請求項 33】

左および右末端ヘアピンループが、a) それぞれ、スロー形態およびファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b) それぞれ、ファスト形態およびスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c) 共にスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、または d) 共にファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ループを含む、請求項 32 に記載の s c O P V。

30

【請求項 34】

前記スロー形態が、配列番号 11 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 85 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 12 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 85 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の s c O P V。

【請求項 35】

前記スロー形態が、配列番号 11 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 12 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 90 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の s c O P V。

40

【請求項 36】

前記スロー形態が、配列番号 11 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 95 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 12 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 95 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の s c O P V。

【請求項 37】

前記スロー形態が、配列番号 11 のヌクレオチド配列からなり、前記ファスト形態が、配列番号 12 のヌクレオチド配列からなる、請求項 33 に記載の s c O P V。

【請求項 38】

前記ウイルスが、前記 O P V のウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学

50

的に合成されたDNA断片から複製および再活性化される、請求項15から37のいずれか一項に記載のscOPV。

【請求項39】

前記ウイルスが、1～14個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項38に記載のscOPV。

【請求項40】

前記ウイルスが、8～12個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項38に記載のscOPV。

【請求項41】

前記ウイルスが、10個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項38に記載のscOPV。

10

【請求項42】

前記ウイルスが、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される、請求項15から41のいずれか一項に記載のscOPV。

【請求項43】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される、請求項42に記載のscOPV。

【請求項44】

合成DNAから複製および再活性化される合成キメラ馬痘ウイルス(scHPXV)であって、ウイルスゲノムは、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でHPXVの野生型ゲノムとは異なり、前記改変は、化学的に合成されたDNA、cDNAまたはゲノムDNAを含む群に由来する、scHPXV。

20

【請求項45】

前記合成DNAが、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち1つまたは複数から選択される、請求項44に記載のscHPXV。

【請求項46】

前記合成DNAが、化学的に合成されたDNAである、請求項44に記載のscHPXV。

30

【請求項47】

前記ウイルスゲノムが、HPXV株MNR-76のゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点で前記MNR-76ゲノムとは異なる、請求項44から46のいずれか一項に記載のscHPXV。

【請求項48】

前記1つまたは複数の改変が、1つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む、請求項44から47のいずれか一項に記載のscHPXV。

【請求項49】

前記1つまたは複数の改変が、1つまたは複数の独自の制限部位を導入する1つまたは複数の改変を含む、請求項44から48のいずれか一項に記載のscHPXV。

40

【請求項50】

前記1つまたは複数の改変が、HPXV044またはHPXV095中に存在する、請求項49に記載のscHPXV。

【請求項51】

前記1つまたは複数の改変が、表3に列挙される1つもしくは複数の変異を含む、請求項44から50のいずれか一項に記載のscHPXV。

【請求項52】

前記1つまたは複数の改変が、1つまたは複数の制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む、請求項44から51のいずれか一項に記載のscHPXV。

【請求項53】

50

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の A a r I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 5 2 に記載の s c H P X V。

【請求項 5 4】

前記 1 つまたは複数の改変が、全ての A a r I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 5 3 に記載の s c H P X V。

【請求項 5 5】

前記 1 つまたは複数の改変が、1 つまたは複数の B s a I 制限部位を排除する 1 つまたは複数の改変を含む、請求項 4 4 から 5 4 のいずれか一項に記載の s c H P X V。

【請求項 5 6】

前記 1 つまたは複数の改変が、表 2 に列挙される 1 つまたは複数の変異を含む、請求項 4 4 から 5 5 のいずれか一項に記載の s c H P X V。

【請求項 5 7】

前記ウイルスゲノムが、異種末端ヘアピンループを含む、請求項 4 4 から 5 6 のいずれか一項に記載の s c H P X V。

【請求項 5 8】

前記ウイルスゲノムが、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む、請求項 5 7 に記載の s c H P X V。

【請求項 5 9】

左および右末端ヘアピンループが、a) それぞれ、スロー形態およびファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b) それぞれ、ファスト形態およびスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c) 共にスロー形態の前記ワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、または d) 共にファスト形態の前記ワクシニアウイルス末端ループを含む、請求項 5 8 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 0】

前記スロー形態が、配列番号 1 1 の配列に対して少なくとも 8 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 8 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 9 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 1】

前記スロー形態が、配列番号 1 1 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 9 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 2】

前記スロー形態が、配列番号 1 1 の配列に対して少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含み、前記ファスト形態が、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 9 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 3】

前記スロー形態が、配列番号 1 1 のヌクレオチド配列からなり、前記ファスト形態が、配列番号 1 2 のヌクレオチド配列からなる、請求項 5 9 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 4】

前記ウイルスゲノムが、ラクダ痘ウイルス、牛痘ウイルス、奇肢症ウイルス、サル痘ウイルス、痘瘡ウイルス、ウサギ痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシユ病ウイルスまたはハタネズミ痘ウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む、請求項 5 7 に記載の s c H P X V。

【請求項 6 5】

前記ウイルスが、前記 H P X V のウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学的に合成された D N A 断片から複製およびアセンブルされる、請求項 4 4 から 6 4 のいずれか一項に記載の s c H P X V。

【請求項 6 6】

前記ウイルスが、1 ~ 1 4 個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項 6 5 に記載の s c H P X V。

10

20

30

40

50

【請求項 67】

前記ウイルスが、8～12個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項65に記載のscHPXV。

【請求項 68】

前記ウイルスが、10個の重複する断片から複製および再活性化される、請求項65に記載のscHPXV。

【請求項 69】

前記ウイルスが、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される、請求項44から68のいずれか一項に記載のscHPXV。

【請求項 70】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される、請求項69に記載のscHPXV。

【請求項 71】

合成キメラボックスウイルス(scPV)を産生する方法であって、

(i) ボックスウイルスのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複するDNA断片を化学的に合成するステップ；

(ii) 前記重複するDNA断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；

(iii) 前記細胞を培養して、前記細胞においてヘルパーウイルスおよび合成キメラボックスウイルス粒子の混合物を産生するステップ；ならびに

(iv) 前記混合物を、scPVに特異的な宿主細胞上にプレーティングして、前記scPVを回収するステップ

を含む、方法。

【請求項 72】

前記ヘルパーウイルスがレポリボックスウイルスである、請求項71に記載の方法。

【請求項 73】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される、請求項72に記載の方法。

【請求項 74】

前記レポリボックスウイルスがSFVである、請求項73に記載の方法。

【請求項 75】

前記ヘルパーウイルスが鶏痘ウイルスである、請求項71に記載の方法。

【請求項 76】

前記ヘルパーウイルスが、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである、請求項71に記載の方法。

【請求項 77】

前記ヘルパーウイルス感染細胞がBGMK細胞である、請求項71から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

ステップ(i)が、ボックスウイルス由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、前記ウイルスゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む、請求項71から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

合成キメラオルソボックスウイルス(scOPV)を産生する方法であって、

(i) OPVのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複するDNA断片を化学的に合成するステップ；

(ii) 前記重複するDNA断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；

10

20

30

40

50

(i i i) 前記細胞を培養して、前記細胞においてヘルパーウイルスおよび s c O P V 粒子の混合物を産生するステップ；ならびに

(i v) 前記混合物を、O P V に特異的な宿主細胞上にプレーティングして、前記 s c O P V を回収するステップを含む、方法。

【請求項 8 0】

前記ヘルパーウイルスがレポリボックスウイルスである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス (S F V)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される、請求項 8 0 に記載の方法。

10

【請求項 8 2】

前記レポリボックスウイルスが S F V である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記ヘルパーウイルスが鶏痘ウイルスである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記ヘルパーウイルスが、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記ヘルパーウイルス感染細胞が B G M K 細胞である、請求項 7 9 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8 6】

前記 O P V に特異的な宿主細胞が B S C - 4 0 細胞である、請求項 7 9 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記 O P V が、ラクダ痘ウイルス、牛痘ウイルス、奇肢症ウイルス、馬痘ウイルス、サル痘ウイルス、ワクシニアウイルス、痘瘡ウイルス、ウサギ痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシシュー病ウイルス、ハタネズミ痘ウイルスからなる群から選択される、請求項 7 9 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8 8】

ステップ (i) が、O P V 由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、前記ウイルスゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む、請求項 7 9 から 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

合成キメラ馬痘ウイルス (s c H P X V) を産生する方法であって、

(i) H P X V ゲノムの実質的に全てに対応する重複する D N A 断片を化学的に合成するステップ；

(i i) 前記重複する D N A 断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；

40

(i i i) 前記細胞を培養して、前記細胞においてヘルパーウイルスおよび s c H P X V 粒子の混合物を産生するステップ；ならびに

(i v) 前記混合物を、H P X V に特異的な宿主細胞上にプレーティングして、前記 s c H P X V を回収するステップを含む、方法。

【請求項 9 0】

前記ヘルパーウイルスがレポリボックスウイルスである、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記レポリボックスウイルスが、ショープ線維腫ウイルス (S F V)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から

50

選択される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記レポリボックスウイルスが SFV である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記ヘルパーウイルスが鶏痘ウイルスである、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 94】

前記ヘルパーウイルスが、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 95】

前記ヘルパーウイルス感染細胞が BGMK 細胞である、請求項 89 から 92 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 96】

前記 HPXV に特異的な宿主細胞が BSC-40 細胞である、請求項 89 から 95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

ステップ (i) が、OPV 由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、前記 HPXV ゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む、請求項 89 から 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記重複する DNA 断片が、

i) 配列番号 1 ~ 10 の配列に対して少なくとも 85 % 同一であるヌクレオチド配列；

ii) 配列番号 1 ~ 10 の配列に対して少なくとも 90 % 同一であるヌクレオチド配列；

(iii) 配列番号 1 ~ 10 の配列に対して少なくとも 95 % 同一であるヌクレオチド配列；または

(iv) 配列番号 1 ~ 10 の配列からなるヌクレオチド配列を含む、請求項 89 から 97 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

合成キメラ馬痘ウイルス (scHPXV) を産生する方法であって、

(i) HPXV ゲノムの実質的に全てに対応する重複する DNA 断片を化学的に合成するステップ； 30

(ii) 前記重複する DNA 断片を、ショーブ線維腫ウイルス (SFV) 感染細胞中にトランスフェクトするステップ；

(iii) 前記細胞を培養して、前記細胞において SFV および scHPXV 粒子の混合物を産生するステップ；ならびに

(iv) 前記混合物を、HPXV に特異的な宿主細胞上にプレーティングして、前記 scHPXV を回収するステップを含む、方法。

【請求項 100】

前記 SFV 感染細胞が BGMK 細胞である、請求項 99 に記載の方法。 40

【請求項 101】

前記 HPXV に特異的な宿主細胞が BSC-40 細胞である、請求項 99 または 100 に記載の方法。

【請求項 102】

請求項 71 から 78 のいずれか一項に記載の方法によって生成された、合成キメラボックスウイルス (scPV)。

【請求項 103】

請求項 79 から 88 のいずれか一項に記載の方法によって生成された、合成キメラオルソボックスウイルス (scOPV)。

【請求項 104】

請求項 89 から 101 のいずれか一項に記載の方法によって生成された、合成キメラ馬痘ウイルス (s c H P X V)。

【請求項 105】

薬学的に許容される担体ならびに請求項 1 から 14 および 102 のいずれか一項に記載の s c P V を含む組成物。

【請求項 106】

薬学的に許容される担体ならびに請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物。

【請求項 107】

痘瘡ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 108】

ワクシニアウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 109】

サル痘ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

20

【請求項 110】

ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から前記対象を保護する方法であって、前記対象に、請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から前記対象を保護する方法。

【請求項 111】

痘瘡ウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に、請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 112】

薬学的に許容される担体ならびに請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物。

30

【請求項 113】

痘瘡ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 114】

ワクシニアウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 115】

サル痘ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 116】

ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から前記対象を保護する方法であって、前記対象に、請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から前記対象を保護する方法。

【請求項 117】

50

痘瘡ウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に、請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 118】

請求項 1 から 13 および 102 のいずれか一項に記載の s c P V を含む組成物を含むキット。

【請求項 119】

請求項 15 から 43 および 103 のいずれか一項に記載の O P V を含む組成物、ならびにその使用指示を含むキット。

【請求項 120】

請求項 44 から 70 および 104 のいずれか一項に記載の s c H P X V を含む組成物、ならびにその使用指示を含むキット。

【請求項 121】

前記組成物が、ボックスウイルス処置施設において投与される、請求項 107 から 111 または 113 から 117 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記組成物が、天然痘有害事象の専門家によって投与される、請求項 107 から 111、113 から 117 または 121 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

前記天然痘有害事象が、種痘性湿疹、進行性ワクシニア、ワクチン後脳炎、心筋炎および拡張型心筋症から選択される、請求項 122 に記載の方法。

【請求項 124】

請求項 1 から 70 および 102 から 106 のいずれか一項に記載のウイルスを含む組成物または請求項 105、106 もしくは 112 のいずれか一項に記載の組成物による免疫化または処置を必要とする対象が、免疫化または処置されることを意図しない他の対象から隔離されるような環境において免疫化または処置することができる、ボックスウイルス処置施設。

【請求項 125】

天然痘有害事象の専門家が前記免疫化または処置を施すことを特徴とする、請求項 124 に記載のボックスウイルス処置施設。

【請求項 126】

前記天然痘有害事象が、種痘性湿疹、進行性ワクシニア、ワクチン後脳炎、心筋炎および拡張型心筋症から選択される、請求項 124 または 125 に記載のボックスウイルス処置施設。

【請求項 127】

免疫化または処置を必要とする前記対象が、請求項 107 から 111 または 113 から 117 のいずれか一項に記載の方法に従って免疫化または処置される、請求項 124 から 126 のいずれか一項に記載のボックスウイルス処置施設。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

ボックスウイルス (Poxviridae 科のメンバー) は、ヒトおよび動物の両方に感染できる二本鎖 DNA ウイルスである。ボックスウイルスは、宿主範囲に基づいて 2 つの亜科に分割される。脊椎動物宿主に感染する Chordopoxviridae 亜科は、8 つの属からなり、そのうち 4 つの属 (Orthopoxvirus、Parapoxvirus、Molluscipoxvirus および Yatapoxvirus) は、ヒトに感染することが公知である。天然痘は、Orthopoxvirus (OPV) 属のメンバーである痘瘡ウイルス (VARV) による感染によって引き起こされる。OPV 属は、ラクダ痘ウイルス (CMLV)、牛痘ウイルス (CPXV)、奇肢症ウイルス (E

10

20

30

40

50

ＣＴＶ、「マウス痘因子」、馬痘ウイルス（ＨＰＸＶ）、サル痘ウイルス（ＭＰＸＶ）、ウサギ痘ウイルス（ＲＰＸＶ）、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病（Uasin Gishu disease）ウイルス、ワクシニアウイルス（ＶＡＣＶ）、痘瘡ウイルス（ＶＡＲＶ）およびハタネズミ痘ウイルス（ＶＰＶ）を含む、いくつかの遺伝的に関連し形態学的に同一なウイルスを含む。ＶＡＲＶ以外では、ＶＡＣＶ、ＭＰＸＶおよびＣＰＸＶを含む少なくとも３種の他のＯＰＶが、ヒトに感染することが公知である。これまでのところ、「生」ＶＡＣＶによるワクチン接種は、天然痘に対する唯一の証明された保護である。ワクチン接種の積極的なプログラムは、１９８０年に天然痘の根絶をもたらし、公共の慣用的な天然痘ワクチン接種は停止された。しかし、ＶＡＲＶおよび他のＯＰＶに対して個体をワクチン接種する、新たな安全かつ有効な手段を見出す必要が依然としてある。

10

ＶＡＣＶの種々の調製物が、天然痘ワクチンとして使用されてきた。これらのほとんどは、いくつかの関連するウイルスから構成され（例えば、Dryvax）、１つは、単一の分子クローンＡＣＡＭ２０００を含む。しかし、Dryvaxおよび他のＶＡＣＶワクチンと同様に、ＡＣＡＭ２０００でさえも、心筋症および心膜炎を含む重篤な副作用と関連する。リスクを低減させるために、ＡＣＡＭ２０００ワクチンは、他の生ワクチンと同様、がん、免疫不全を有する個体、臓器移植レシピエント、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、心臓状態を有する患者、および免疫抑制薬使用中の患者を排除する多数の禁忌を有する。米国人口の１５～５０％がこれらのカテゴリーの１つに入ると推定されており、従って、より安全なワクチンまたはワクチン接種プロトコルの開発の必要性が確認される（Kennedyら、２００７年 Kennedy R、Poland GA. ２００７年. T-Cell epitope discovery for variola and vaccinia viruses. Rev Med Virol 7巻：９３～１１３頁）。従って、有効性においてDryvaxまたはＡＣＡＭ２０００（商標）と等価であるがより安全なワクチンの開発が必要とされている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００２】

【非特許文献１】Kennedyら、２００７年 Kennedy R、Poland GA. ２００７年. T-Cell epitope discovery for variola and vaccinia viruses. Rev Med Virol 7巻：９３～１１３頁

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００３】

本発明は、化学的に合成されたＤＮＡからアセンブルおよび複製されるキメラボックスウイルスを提供する。化学的ゲノム合成は、天然の鋳型に依存しないので、ウイルスゲノムの大量の構造的および機能的改変が可能である。天然の鋳型が、従来の分子生物学の方法による遺伝的複製または改変に利用可能でない場合、化学的ゲノム合成は特に有用である。

【０００４】

発明の要旨

40

本発明は、合成キメラボックスウイルス（例えば、合成キメラＯＰＶ即ちｓｃＯＰＶ）、かかるウイルスを産生するための方法、およびかかるウイルスの、例えば、免疫原としての、免疫原性製剤における、in vitroアッセイにおける、異種遺伝子発現のためのビヒクルとしての、または腫瘍溶解剤としての使用を提供する。本発明の合成キメラボックスウイルスは、野生型ボックスウイルスと比較した１つまたは複数の改変を特徴とする。

【０００５】

一部、本発明は、合成キメラボックスウイルス（例えば、ｓｃＯＰＶ）を、ボックスウイルスゲノムの化学的に合成された重複する断片から産生することができるという発見に関する。従って、本発明は一部、化学的に合成された核酸から複製およびアセンブルされ

50

る合成キメラボックスウイルス（例えば、s c O P V）を提供する。本開示は、かかるウイルスを含む組成物もまた提供する。本開示は、本開示の方法に従って産生されたボックスウイルスを使用する方法をさらに提供する。

【0006】

別の態様では、本発明は、本発明の合成キメラボックスウイルスを使用して、天然痘、シュードタイプの天然痘ウイルスおよび他のO P Vによる感染の結果に対して個々のヒトおよびヒトの集団を保護するための方法を提供する。別の態様では、本発明は、本発明の合成キメラボックスウイルスを使用することによって、入手可能なV A C Vベースのワクチンよりも少ない毒性、罹患率および死亡率で、天然痘（V A R V）およびシュードタイプの天然痘ウイルスによる感染の結果に対して個々のヒトおよびヒトの集団を保護するための方法である。ある特定の態様では、本発明は、合成DNAに由来するDNAから複製および再活性化される合成キメラボックスウイルス（s c P V）であって、ウイルスのウイルスゲノムは、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でウイルスの野生型ゲノムとは異なり、改変は、化学的に合成されたDNA、c DNAまたはゲノムDNAを含む群に由来する、s c P Vを提供する。

10

【0007】

一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち1つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNAである。

20

【0008】

一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数の独自の制限部位を導入する1つまたは複数の改変を含む。

【0009】

一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、異種末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、左および右末端ヘアピンループは、a)それぞれ、スロー形態およびファスト形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b)それぞれ、ファスト形態およびスロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c)共にスロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、またはd)共にファスト形態のワクシニアウイルス末端ループを含む。

30

【0010】

一部の実施形態では、ウイルスは、s c P Vのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学的に合成されたDNA断片から複製および再活性化される。

【0011】

一部の実施形態では、ウイルスは、1～14個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、8～12個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、10個の重複する断片から複製および再活性化される。

40

【0012】

一部の実施形態では、ウイルスは、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショープ線維腫ウイルス（S F V）、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。

【0013】

ある特定の態様では、本発明は、合成DNAに由来するDNAから複製および再活性化される合成キメラオルソボックスウイルス（s c O P V）であって、ウイルスのウイルスゲノムは、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でウイルスの野生型ゲノムとは異なり、改変は、化学的に合成されたDNA、c DNAまたはゲノムDNAを含む群に由来

50

する、s c O P Vを提供する。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち1つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNAである。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、OPVは、ラクダ痘(CMLV)ウイルス、牛痘ウイルス(CPXV)、奇肢症ウイルス(ECTV)、馬痘ウイルス(HPXV)、サル痘ウイルス(MPXV)、ワクシニアウイルス(VACV)、痘瘡ウイルス(VARV)、ウサギ痘ウイルス(RPXV)、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシユー病ウイルスおよびハタネズミ痘ウイルスからなる群から選択される。

10

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、OPVは、VACVである。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、VACV株ACAM2000のゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でACAM2000ゲノムとは異なる。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、VACV株IOCのゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でIOCゲノムとは異なる。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、VACV株MVAのゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でMVAゲノムとは異なる。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、VACV株MVA-BNのゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でMVA-BNゲノムとは異なる。一部の実施形態では、野生型VACVゲノムは、Western Reserve、Clone 3、Tian Tian、Tian TianクローンTT9、Tian TianクローンTP3、NYCBH、Wyeth、Copenhagen、Lister 107、Lister-LO、IHD-W、LC16m18、Lederle、TashkentクローンTKT3、TashkentクローンTKT4、USSR、Evans、Praha、LIVP、Ikeda、EM-63、Malbran、Duke、3737、CV-1、Connaught Laboratories、Serro 2、CM-01、DryvaxクローンDPP13、DryvaxクローンDPP15、DryvaxクローンDPP20、DryvaxクローンDPP17、DryvaxクローンDPP21および漿尿膜ワクシニアウイルスAnkaraからなる群から選択される株のゲノムである。

20

30

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数の独自の制限部位を導入する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数の制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数のAarI制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、全てのAarI制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数のBsaI制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。

40

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、異種末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、左および右末端ヘアピンループが、a)それぞれ、スロー形態およびファスト形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b)それぞれ、ファスト形態およびスロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c)共にス

50

ロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、またはd)共にファスト形態のワクシニアウイルス末端ループを含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11のヌクレオチド配列に対して少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11の配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11のヌクレオチド配列からなり、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列からなる。

10

【0020】

一部の実施形態では、ウイルスは、OPVのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学的に合成されたDNA断片から複製および再活性化される。

【0021】

一部の実施形態では、ウイルスは、1~14個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、8~12個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、10個の重複する断片から複製および再活性化される。

20

【0022】

一部の実施形態では、ウイルスは、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショーブ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。

【0023】

ある特定の態様では、本発明は、合成DNAから複製および再活性化される合成キメラ馬痘ウイルス(sCHPXV)であって、ウイルスゲノムは、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でHPXVの野生型ゲノムとは異なり、改変は、化学的に合成されたDNA、cDNAまたはゲノムDNAを含む群に由来する、sCHPXVを提供する。

30

【0024】

一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、およびヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドのうち1つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、合成DNAは、化学的に合成されたDNAである。

【0025】

一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、HPXV株MNR-76のゲノムに基づき、1つまたは複数の改変を特徴とするという点でMNR-76ゲノムとは異なる。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含む。

40

【0026】

一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数の独自の制限部位を導入する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、HPXV044またはHPXV095中に存在する。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、表3に列挙される1つもしくは複数の変異を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数の制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数のAarI制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、全てのAarI制限部位を排除する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、1つまたは複数のBsaI制限部位を排除する1つまたは複数

50

の改変を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、表2に列挙される1つまたは複数の変異を含む。

【0027】

一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、異種末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、ワクシニアウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む。一部の実施形態では、左および右末端ヘアピンループが、a)それぞれ、スロー形態およびファスト形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、b)それぞれ、ファスト形態およびスロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、c)共にスロー形態のワクシニアウイルス末端ヘアピンループを含み、またはd)共にファスト形態のワクシニアウイルス末端ループを含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11の配列に対して少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11の配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11の配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含み、ファスト形態が、配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、スロー形態は、配列番号11のヌクレオチド配列からなり、ファスト形態は、配列番号12のヌクレオチド配列からなる。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、ラクダ痘ウイルス、牛痘ウイルス、奇肢症ウイルス、サル痘ウイルス、痘瘡ウイルス、ウサギ痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病ウイルスまたはハタネズミ痘ウイルスに由来する末端ヘアピンループを含む。

10

20

【0028】

一部の実施形態では、ウイルスは、HPXVのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複する化学的に合成されたDNA断片から複製およびアセンブルされる。

【0029】

一部の実施形態では、ウイルスは、1~14個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、8~12個の重複する断片から複製および再活性化される。一部の実施形態では、ウイルスは、10個の重複する断片から複製および再活性化される。

30

【0030】

一部の実施形態では、ウイルスは、レポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化を使用して再活性化される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。

【0031】

ある特定の態様では、本発明は、合成キメラボックスウイルス(s c P V)を産生する方法であって、(i)ボックスウイルスのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複するDNA断片を化学的に合成するステップ；(ii)重複するDNA断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；(iii)細胞を培養して、細胞においてヘルパーウイルスおよび合成キメラボックスウイルス粒子の混合物を産生するステップ；ならびに(iv)混合物を、s c P Vに特異的な宿主細胞上にプレーティングして、s c P Vを回収するステップを含む、方法を提供する。

40

【0032】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはレポリボックスウイルスである。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスはSFVである。

【0033】

50

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは鶏痘ウイルスである。

【0034】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである。

【0035】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルス感染細胞はBGMK細胞である。

【0036】

一部の実施形態では、ステップ(i)は、ボックスウイルス由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、ウイルスゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む。

【0037】

ある特定の態様では、本発明は、合成キメラオルソボックスウイルス(scOPV)を産生する方法であって、(i)OPVのウイルスゲノムの実質的に全てに対応する重複するDNA断片を化学的に合成するステップ；(ii)重複するDNA断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；(iii)細胞を培養して、細胞においてヘルパーウイルスおよびscOPV粒子の混合物を産生するステップ；ならびに(iv)混合物を、OPVに特異的な宿主細胞上にプレーティングして、scOPVを回収するステップを含む、方法を提供する。

【0038】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはレポリボックスウイルスである。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショープ線維腫ウイルス(SFV)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスはSFVである。

【0039】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは鶏痘ウイルスである。

【0040】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである。

【0041】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルス感染細胞はBGMK細胞である。

【0042】

一部の実施形態では、OPVに特異的な宿主細胞はBSC-40細胞である。

【0043】

一部の実施形態では、OPVは、ラクダ痘ウイルス、牛痘ウイルス、奇肢症ウイルス、馬痘ウイルス、サル痘ウイルス、ワクシニアウイルス、痘瘡ウイルス、ウサギ痘ウイルス、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシユー病ウイルス、ハタネズミ痘ウイルスからなる群から選択される。

【0044】

一部の実施形態では、ステップ(i)は、OPV由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、ウイルスゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む。

【0045】

ある特定の態様では、本発明は、(i)HPXVゲノムの実質的に全てに対応する重複するDNA断片を化学的に合成するステップ；(ii)重複するDNA断片を、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトするステップ；(iii)前記細胞を培養して、前記細胞においてヘルパーウイルスおよびscHPXV粒子の混合物を産生するステップ；ならびに(iv)混合物を、HPXVに特異的な宿主細胞上にプレーティングして、scHPXVを回収するステップ、を含む、合成キメラ馬痘ウイルス(scHPXV)を産生する方法を提供する。

【0046】

10

20

30

40

50

ある特定の態様では、本発明は、(i) H P X V ゲノムの実質的に全てに対応する重複する D N A 断片を化学的に合成するステップ；(i i) 重複する D N A 断片を、ショープ線維腫ウイルス(S F V) 感染細胞中にトランスフェクトするステップ；(i i i) 前記細胞を培養して、前記細胞において S F V および s c H P X V 粒子の混合物を産生するステップ；ならびに(i v) 混合物を、H P X V に特異的な宿主細胞上にプレーティングして、s c H P X V を回収するステップ、を含む、合成キメラ馬痘ウイルス(s c H P X V) を産生する方法を提供する。

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはレポリボックスウイルスである。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは、ショープ線維腫ウイルス(S F V)、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスおよび粘液腫ウイルスからなる群から選択される。一部の実施形態では、レポリボックスウイルスは S F V である。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは鶏痘ウイルスである。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、ヘルパーウイルス感染細胞は B G M K 細胞である。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、H P X V に特異的な宿主細胞は B S C - 4 0 細胞である。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、ステップ(i) は、O P V 由来の末端ヘアピンループを化学的に合成するステップ、およびそれらを、H P X V ゲノムの左および右末端を含む断片にライゲートさせるステップ、をさらに含む。

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態では、重複する D N A 断片は、i) 配列番号 1 ~ 1 0 の配列に対して少なくとも 8 5 % 同一であるヌクレオチド配列；i i) 配列番号 1 ~ 1 0 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるヌクレオチド配列；(i i i) 配列番号 1 ~ 1 0 の配列に対して少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列；または(i v) 配列番号 1 ~ 1 0 の配列からなるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、S F V 感染細胞は B G M K 細胞である。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、H P X V に特異的な宿主細胞は B S C - 4 0 細胞である。

【 0 0 5 6 】

ある特定の態様では、本発明は、本開示の方法によって生成された、合成キメラボックスウイルス(s c P V) を提供する。

【 0 0 5 7 】

ある特定の態様では、本発明は、本開示の方法によって生成された、合成キメラオルソボックスウイルス(s c O P V) を提供する。

【 0 0 5 8 】

ある特定の態様では、本発明は、本開示の方法によって生成された、合成キメラ馬痘ウイルス(s c H P X V) を提供する。

【 0 0 5 9 】

ある特定の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体ならびに本開示の s c P V を含む組成物を提供する。

【 0 0 6 0 】

ある特定の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体ならびに本開示の s c O P V を含む組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

ある特定の態様では、本発明は、痘瘡ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 6 2 】

ある特定の態様では、本発明は、ワクシニアウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 6 3 】

ある特定の態様では、本発明は、サル痘ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

10

【 0 0 6 4 】

ある特定の態様では、本発明は、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から対象を保護する方法であって、対象に、本開示の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から対象を保護する方法を提供する。

【 0 0 6 5 】

ある特定の態様では、本発明は、痘瘡ウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c O P V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

20

【 0 0 6 6 】

ある特定の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体ならびに本開示の s c H P X V を含む組成物を提供する。

【 0 0 6 7 】

ある特定の態様では、本発明は、痘瘡ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 6 8 】

ある特定の態様では、本発明は、ワクシニアウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

30

【 0 0 6 9 】

ある特定の態様では、本発明は、サル痘ウイルスに対する免疫応答を誘発またはブーストする方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 7 0 】

ある特定の態様では、本発明は、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から対象を保護する方法であって、対象に、本開示の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、ヒト対象を免疫化して、痘瘡ウイルス感染から対象を保護する方法を提供する。

【 0 0 7 1 】

ある特定の態様では、本発明は、痘瘡ウイルス感染を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本開示の s c H P X V を含む組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

40

【 0 0 7 2 】

ある特定の態様では、本発明は、本開示の s c P V を含む組成物を含むキットを提供する。

【 0 0 7 3 】

ある特定の態様では、本発明は、本開示の O P V を含む組成物を含むキットを提供する。

【 0 0 7 4 】

50

ある特定の態様では、本発明は、本開示の s c H P X V を含む組成物を含むキットを提供する。

【 0 0 7 5 】

ある特定の態様では、本発明の組成物は、ボックスウイルス処置施設において投与される。ある特定の態様では、ボックスウイルス処置施設は、本発明の組成物または方法による免疫化または処置を必要とする対象が、免疫化もしくは処置されることを意図しない他の対象、または処置された対象によって潜在的に感染され得る他の対象（例えば、介護者および家族）から隔離されるような環境において免疫化または処置することができる施設である。一部の実施形態では、免疫化されることを意図しない対象または処置された対象によって潜在的に感染される対象は、H I V 患者、化学療法を受けている患者、がん、リウマチ学的障害または自己免疫性障害に対する処置を受けている患者、臓器または組織移植を受けているまたは受けた患者、免疫不全を有する患者、小児、妊娠女性、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、心臓状態を有する患者、および免疫抑制薬使用中の患者などが含まれる。一部の実施形態では、ボックスウイルス処置施設は、オルソボックスウイルス処置施設である。一部の実施形態では、ボックスウイルス処置施設は、天然痘処置施設である。

10

【 0 0 7 6 】

ある特定の態様では、本発明の組成物は、天然痘有害事象の専門家によって投与される。一部の実施形態では、天然痘有害事象には、種痘性湿疹、進行性ワクシニア、ワクチン後脳炎、心筋炎および拡張型心筋症が含まれるがこれらに限定されない。

20

【 0 0 7 7 】

上述の概要ならびに以下の本発明の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むと、より良く理解される。本発明を例示することを目的として、本発明で好ましい実施形態が図面に示される。しかし、本発明は、示された正確な配置および手段に限定されないことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 8 】

【図 1 A】図 1 A および 1 B。直鎖 d s D N A H P X V ゲノム（株 M N R ; G e n b a n k 受託番号 D Q 7 9 2 5 0 4）の模式図。A. 図 1 A は、個々の H P X V 遺伝子（紫色）ならびに天然に存在する A a r I および B s a I 部位が示された、H P X V ゲノムの未改変のゲノム配列を示す。B. 図 1 B は、重複するゲノム D N A 断片（赤色で示される）を使用して化学的に合成された、改変された合成キメラ H P X V（s c H P X V）ゲノムを示す。V A C V 末端ヘアピンループを I T R にライゲートさせるために使用した操作された S a p I 制限部位もまた、左および右 I T R 断片中の未改変の B s a I 部位と共に示される。S a p I 部位は、プラスミドベクター部位中の、それぞれ左末端逆位配列（L I T R）および右末端逆位配列（R I T R）のすぐ左側終端および右側終端に位置した。

30

【図 1 B】図 1 A および 1 B。直鎖 d s D N A H P X V ゲノム（株 M N R ; G e n b a n k 受託番号 D Q 7 9 2 5 0 4）の模式図。A. 図 1 A は、個々の H P X V 遺伝子（紫色）ならびに天然に存在する A a r I および B s a I 部位が示された、H P X V ゲノムの未改変のゲノム配列を示す。B. 図 1 B は、重複するゲノム D N A 断片（赤色で示される）を使用して化学的に合成された、改変された合成キメラ H P X V（s c H P X V）ゲノムを示す。V A C V 末端ヘアピンループを I T R にライゲートさせるために使用した操作された S a p I 制限部位もまた、左および右 I T R 断片中の未改変の B s a I 部位と共に示される。S a p I 部位は、プラスミドベクター部位中の、それぞれ左末端逆位配列（L I T R）および右末端逆位配列（R I T R）のすぐ左側終端および右側終端に位置した。

40

【 0 0 7 9 】

【図 2】図 2 A ~ 2 C。改変された s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムおよび V A C V（W R 株）末端ヘアピンループの詳細な模式図。A. 図 2 A は、改変された s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムを示す。未改変の B s a I 部位は、ゲノム上に青色の線として示される。H P X V 0 4 4（V A C V F 4 L ホモログ）中に創出さ

50

れた新規 A v a I および S t u I 制限部位もマークされる（緑色の線）。断片__3の H P X V 0 9 5 遺伝子座（V A C V J 2 R ホモログ）中の選択可能なマーカー黄色蛍光タンパク質 / グアノシンホスホリボシルトランスフェラーゼ（y f p / g p t）の位置もまた示される（黄色）。B．図 2 B は、S（配列番号 1 1）形態および F（配列番号 1 2）形態の末端ヘアピンループのヌクレオチド配列を示し、色コード化は、（C）で説明される。C．図 2 C は、V A C V の直鎖 d s D N A ゲノムの末端終端に共有結合される F 形態および S 形態の末端ヘアピンループの二次構造予測を示す。末端ループ配列は、緑色で強調される。コンカテマー分割（concatamer resolution）配列は、赤色で囲まれる。

【0080】

【図 3 A】図 3 A および 3 B。約 7 0 b p の V A C V 末端ヘアピンが、左および右 H P X V I T R 断片にライゲートされ得る。A．図 3 A は、S a p I および P v u I I 認識部位の位置をマークする、左および右 H P X V I T R 断片の模式図を示す。S a p I および P v u I I による消化後の D N A の予測された断片サイズが示される。B．図 3 B は、S a p I によって切断された 1 4 7 2 b p の I T R 断片への約 7 0 b p の末端ヘアピンのライゲーション後の、左および右 I T R 断片のアガロースゲル電気泳動を示す。ライゲートされた D N A を、P v u I I によって引き続いて切断して、ヘアピンの付加によって引き起こされた、サイズにおける小さい変化の検出を促進した。

【図 3 B】図 3 A および 3 B。約 7 0 b p の V A C V 末端ヘアピンが、左および右 H P X V I T R 断片にライゲートされ得る。A．図 3 A は、S a p I および P v u I I 認識部位の位置をマークする、左および右 H P X V I T R 断片の模式図を示す。S a p I および P v u I I による消化後の D N A の予測された断片サイズが示される。B．図 3 B は、S a p I によって切断された 1 4 7 2 b p の I T R 断片への約 7 0 b p の末端ヘアピンのライゲーション後の、左および右 I T R 断片のアガロースゲル電気泳動を示す。ライゲートされた D N A を、P v u I I によって引き続いて切断して、ヘアピンの付加によって引き起こされた、サイズにおける小さい変化の検出を促進した。

【0081】

【図 4 A】図 4 A ~ 4 C。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムの P C R 分析および制限消化は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の首尾よい再活性化を確認する。A．図 4 A は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンの P C R 分析の結果を示す。V A C V および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の両方における保存された B s a I 制限部位に隣接するプライマーを使用して、一連の約 1 k b p の産物を増幅した。P C R 産物を、B s a I によって引き続いて消化し、得られた D N A 断片を、アガロースゲル電気泳動によって分離した。V A C V は切断されるが、全ての B s a I 部位が、2 つの異なる s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンから欠失されていた。B．図 4 B は、V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A のパルスフィールドゲル電気泳動（P F G E）を示す。ウイルス D N A を、B s a I、H i n d I I I によって消化し、または未処理のままにし、次いで、1 ~ 1 0 秒の切り替え時間で、5 . 7 V / c m で 1 4 で 1 4 時間、1 % S e a k e m g o l d アガロースゲル上で分離した。インタクトな V A C V ゲノムと s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムとの間で、サイズにおける僅かな差異が観察された。アスタリスク（*）でマークされたかすかなバンドは、不完全な D N A 消化産物であるか、または V A C V ビリオン調製物にしばしば混入する切断されたミトコンドリア D N A 断片であり得る。C．図 4 C は、B s a I または H i n d I I I によって消化した V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A の従来のアガロースゲル電気泳動を示す。D N A 断片を、S y b r G o l d D N A 染色でゲルを染色することによって可視化した。

【図 4 B】図 4 A ~ 4 C。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムの P C R 分析および制限消化は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の首尾よい再活性化を確認する。A．図 4 A は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンの P C R 分析の結果を示す。V A C V および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の両方における保

存された B s a I 制限部位に隣接するプライマーを使用して、一連の約 1 k b p の産物を増幅した。P C R 産物を、B s a I によって引き続いて消化し、得られた D N A 断片を、アガロースゲル電気泳動によって分離した。V A C V は切断されるが、全ての B s a I 部位が、2 つの異なる s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンから欠失されていた。B . 図 4 B は、V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A のパルスフィールドゲル電気泳動 (P F G E) を示す。ウイルス D N A を、B s a I、H i n d I I I によって消化し、または未処理のままにし、次いで、1 ~ 1 0 秒の切り替え時間で、5 . 7 V / c m で 1 4 で 1 4 時間、1 % S e a k e m g o l d アガロースゲル上で分離した。インタクトな V A C V ゲノムと s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムとの間で、サイズにおける僅かな差異が観察された。アスタリスク (*) でマークされたかすかなバンドは、不完全な D N A 消化産物であるか、または V A C V ビリオン調製物にしばしば混入する切断されたミトコンドリア D N A 断片であり得る。C . 図 4 C は、B s a I または H i n d I I I によって消化した V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A の従来のアガロースゲル電気泳動を示す。D N A 断片を、S y b r G o l d D N A 染色でゲルを染色することによって可視化した。

【図 4 C】図 4 A ~ 4 C。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムの P C R 分析および制限消化は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の首尾よい再活性化を確認する。A . 図 4 A は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンの P C R 分析の結果を示す。V A C V および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の両方における保存された B s a I 制限部位に隣接するプライマーを使用して、一連の約 1 k b p の産物を増幅した。P C R 産物を、B s a I によって引き続いて消化し、得られた D N A 断片を、アガロースゲル電気泳動によって分離した。V A C V は切断されるが、全ての B s a I 部位が、2 つの異なる s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 クローンから欠失されていた。B . 図 4 B は、V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A のパルスフィールドゲル電気泳動 (P F G E) を示す。ウイルス D N A を、B s a I、H i n d I I I によって消化し、または未処理のままにし、次いで、1 ~ 1 0 秒の切り替え時間で、5 . 7 V / c m で 1 4 で 1 4 時間、1 % S e a k e m g o l d アガロースゲル上で分離した。インタクトな V A C V ゲノムと s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノムとの間で、サイズにおける僅かな差異が観察された。アスタリスク (*) でマークされたかすかなバンドは、不完全な D N A 消化産物であるか、または V A C V ビリオン調製物にしばしば混入する切断されたミトコンドリア D N A 断片であり得る。C . 図 4 C は、B s a I または H i n d I I I によって消化した V A C V - W R および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 ゲノム D N A の従来のアガロースゲル電気泳動を示す。D N A 断片を、S y b r G o l d D N A 染色でゲルを染色することによって可視化した。

【0082】

【図 5 A】図 5 A および 5 B。V A C V 末端ヘアピンを、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 I T R 断片に首尾よくライゲートさせた。A . I l l u m i n a 配列読み取りを、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 参照配列にマッピングした。S a p I 部位 (ベクター中、上の鎖の配列) を切断して、左および右 I T R 断片へのテロメアヘアピンのライゲーションのための点を創出した。V A C V 由来末端ヘアピンの末端ループの位置が、コンカテマー分割部位と共に示される。コンカテマー分割部位中の最初の A は、H B X V (N C B I D Q 7 9 2 5 0 4) の報告された最初のヌクレオチドでもあり、その「A」の左側の配列の残部は、参照として V A C V を使用して設計した。「C」は、アセンブリプログラムによる読み取りの短縮を回避するための足場として単に付加したことに留意されたい。B . 公知の H P X V 配列を超えて伸びる最も長い I l l u m i n a 配列決定読み取りを含むサブセットが、ポリ d C 鋳型に対してアラインされて示される。これらの読み取りは、合成オリゴヌクレオチドを使用して元々提供されたアンフォールディングされたヘアピンの全長に及ぶ。ボックスウイルス中の末端逆位重複に起因して、左および

右終端からの読み取りの全てが一緒に「集積」し、元の配向も分布も失われている。F形態およびS形態の両方のVACVヘアピンが検出され、この領域中のF読み取りのS読み取りに対する比は、8つの異なるウイルス配列決定反応において 1.03 ± 0.01 (SEM) であったことが明らかである。

【図5B】図5Aおよび5B。VACV末端ヘアピンを、scHPXV YFP - gpt : : 095 ITR断片に首尾よくライゲートさせた。A. Illumina配列読み取りを、scHPXV YFP - gpt : : 095参照配列にマッピングした。SapI部位(ベクター中、上の鎖の配列)を切断して、左および右ITR断片へのテロメアヘアピンのライゲーションのための点を創出した。VACV由来末端ヘアピンの末端ループの位置が、コンカテマー分割部位と共に示される。コンカテマー分割部位中の最初のAは、HBXV(NCBI DQ792504)の報告された最初のヌクレオチドでもあり、その「A」の左側の配列の残部は、参照としてVACVを使用して設計した。「C」は、アセンブリプログラムによる読み取りの短縮を回避するための足場として単に付加したことに留意されたい。B. 公知のHPXV配列を超えて伸びる最も長いIllumina配列決定読み取りを含むサブセットが、ポリdC鋳型に対してアラインされて示される。これらの読み取りは、合成オリゴヌクレオチドを使用して元々提供されたアンフォールディングされたヘアピンの全長に及ぶ。ボックスウイルス中の末端逆位重複に起因して、左および右終端からの読み取りの全てが一緒に「集積」し、元の配向も分布も失われている。F形態およびS形態の両方のVACVヘアピンが検出され、この領域中のF読み取りのS読み取りに対する比は、8つの異なるウイルス配列決定反応において 1.03 ± 0.01 (SEM) であったことが明らかである。

【0083】

【図6A】図6A~6C。scHPXV YFP - gpt : : 095領域96,050~96,500中のBsai部位を、集合的に変異させた。A. 図6Aは、HPXV(DQ792504)ゲノムの1つの領域にマッピングされたIllumina配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。96,239位および96,437位における配列決定読み取りの矛盾は、それぞれ青色および黄色で強調される。B. 図6Bは、96,239位近傍の、HPXV(DQ792504)にマッピングされたscHPXV YFP - gpt : : 095からのIllumina配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換(T96239C)が検出された(表2を参照のこと)。C. 図6Cは、96,437位における、HPXV(DQ792504)にマッピングされたscHPXV YFP - gpt : : 095からのIllumina配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換(A96437C)が検出された(表2を参照のこと)。これらの変異を、scHPXV YFP - gpt : : 095をアセンブルするのに使用するクローン中に導入して、望ましくないBsai認識部位(GGTC TC)を欠失させた。

【図6B】図6A~6C。scHPXV YFP - gpt : : 095領域96,050~96,500中のBsai部位を、集合的に変異させた。A. 図6Aは、HPXV(DQ792504)ゲノムの1つの領域にマッピングされたIllumina配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。96,239位および96,437位における配列決定読み取りの矛盾は、それぞれ青色および黄色で強調される。B. 図6Bは、96,239位近傍の、HPXV(DQ792504)にマッピングされたscHPXV YFP - gpt : : 095からのIllumina配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換(T96239C)が検出された(表2を参照のこと)。C. 図6Cは、96,437位における、HPXV(DQ792504)にマッピングされたscHPXV YFP - gpt : : 095からのIllumina配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換(A96437C)が検出された(表2を参照のこと)。これらの変異を、scHPXV YFP - gpt : : 095をアセンブルするのに使用するクローン中に導入して、望ましくないBsai認識部位(GGTC TC)を欠失させた。

【図6C】図6A~6C。scHPXV YFP - gpt : : 095領域96,050~96,500中のBsai部位を、集合的に変異させた。A. 図6Aは、HPXV(DQ

7 9 2 5 0 4) ゲノムの 1 つの領域にマッピングされた I l l u m i n a 配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。9 6, 2 3 9 位および 9 6 4 3 7 位における配列決定読み取りの矛盾は、それぞれ青色および黄色で強調される。B. 図 6 B は、9 6 2 3 9 位近傍の、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換 (T 9 6 2 3 9 C) が検出された (表 2 を参照のこと)。C. 図 6 C は、9 6 4 3 7 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。ヌクレオチド置換 (A 9 6 4 3 7 C) が検出された (表 2 を参照のこと)。これらの変異を、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 をアセンブルするのに使用するクローン中に導入して、望ましくない B s a I 認識部位 (G G T C T C) を欠失させた。

【 0 0 8 4 】

【図 7 A】図 7 A ~ 7 C。独自の制限部位 A v a I および S t u I を創出するために使用した s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の H P X V 0 4 4 遺伝子中のヌクレオチド変化。A. 図 7 A は、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) ゲノム中の H P X V 0 4 4 遺伝子にマッピングされた I l l u m i n a 配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。H P X V 0 4 4 は、V A C V F 4 L の H P X V ホモログをコードする。配列読み取りが元の H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) 配列と一致しない部位は、黄色の垂直線で強調される。B. 図 7 B は、4 4, 5 1 2 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。A v a I 部位 (C Y C G R G ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T 4 4 5 1 2 G) が同定された。C. 図 7 C は、4 5, 0 6 1 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。S t u I 部位 (A G G C C T ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T 4 5 0 6 1 G) が検出された。

【図 7 B】図 7 A ~ 7 C。独自の制限部位 A v a I および S t u I を創出するために使用した s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の H P X V 0 4 4 遺伝子中のヌクレオチド変化。A. 図 7 A は、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) ゲノム中の H P X V 0 4 4 遺伝子にマッピングされた I l l u m i n a 配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。H P X V 0 4 4 は、V A C V F 4 L の H P X V ホモログをコードする。配列読み取りが元の H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) 配列と一致しない部位は、黄色の垂直線で強調される。B. 図 7 B は、4 4, 5 1 2 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。A v a I 部位 (C Y C G R G ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T 4 4 5 1 2 G) が同定された。C. 図 7 C は、4 5, 0 6 1 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。S t u I 部位 (A G G C C T ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T 4 5 0 6 1 G) が検出された。

【図 7 C】図 7 A ~ 7 C。独自の制限部位 A v a I および S t u I を創出するために使用した s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の H P X V 0 4 4 遺伝子中のヌクレオチド変化。A. 図 7 A は、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) ゲノム中の H P X V 0 4 4 遺伝子にマッピングされた I l l u m i n a 配列読み取りを示す。読み取りのごく一部のみが示される。H P X V 0 4 4 は、V A C V F 4 L の H P X V ホモログをコードする。配列読み取りが元の H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) 配列と一致しない部位は、黄色の垂直線で強調される。B. 図 7 B は、4 4, 5 1 2 位における、H P X V (D Q 7 9 2 5 0 4) にマッピングされた s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 からの I l l u m i n a 配列決定読み取りの拡大図を示す。A v a I 部位 (C Y C G R G ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T 4 4 5 1 2 G) が同定された。C. 図 7 C は、4 5, 0 6 1 位にお

10

20

30

40

50

ける、HPXV (DQ792504) にマッピングされた scHPXV YFP - gpt : : 095 からの Illumina 配列決定読み取りの拡大図を示す。StuI 部位 (AGGCTT ; 表 2 を参照のこと) を創出するヌクレオチド置換 (T45061G) が検出された。

【0085】

【図 8 A】図 8 A ~ 8 C。scHPXV YFP - gpt : : 095 は、BSC - 40 細胞において、他のオルソボックスウイルスのように増殖するが、小さいプラークの表現型を示す。A. 図 8 A は、BSC - 40 (左上パネル)、HeLa (中央上パネル)、初代HEL (右上パネル) および Vero (左下パネル) 細胞株における VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 の多段階増殖を示す。B. 図 8 B は、VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 間でのプラークサイズ比較を示す。BSC - 40 細胞に、示されたウイルスを感染させ、感染の 48 時間後に、細胞を固定および染色した。3 回の独立した実験を通じた 24 個のプラークの面積 (任意単位 [A.U.]) を、各ウイルスについて測定した。データは、平均プラーク直径として表される。* *、 $P < 0.01$; * * * *、 $P < 0.0001$ 。C. 図 8 C は、示されたウイルスを 72 時間感染させた BSC - 40 細胞のプラーク形態学を示す。細胞を固定し、染色し、可視化のためにスキャンした。

10

【図 8 B】図 8 A ~ 8 C。scHPXV YFP - gpt : : 095 は、BSC - 40 細胞において、他のオルソボックスウイルスのように増殖するが、小さいプラークの表現型を示す。A. 図 8 A は、BSC - 40 (左上パネル)、HeLa (中央上パネル)、初代HEL (右上パネル) および Vero (左下パネル) 細胞株における VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 の多段階増殖を示す。B. 図 8 B は、VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 間でのプラークサイズ比較を示す。BSC - 40 細胞に、示されたウイルスを感染させ、感染の 48 時間後に、細胞を固定および染色した。3 回の独立した実験を通じた 24 個のプラークの面積 (任意単位 [A.U.]) を、各ウイルスについて測定した。データは、平均プラーク直径として表される。* *、 $P < 0.01$; * * * *、 $P < 0.0001$ 。C. 図 8 C は、示されたウイルスを 72 時間感染させた BSC - 40 細胞のプラーク形態学を示す。細胞を固定し、染色し、可視化のためにスキャンした。

20

【図 8 C】図 8 A ~ 8 C。scHPXV YFP - gpt : : 095 は、BSC - 40 細胞において、他のオルソボックスウイルスのように増殖するが、小さいプラークの表現型を示す。A. 図 8 A は、BSC - 40 (左上パネル)、HeLa (中央上パネル)、初代HEL (右上パネル) および Vero (左下パネル) 細胞株における VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 の多段階増殖を示す。B. 図 8 B は、VACV - WR、DPP15、CPXV および scHPXV YFP - gpt : : 095 間でのプラークサイズ比較を示す。BSC - 40 細胞に、示されたウイルスを感染させ、感染の 48 時間後に、細胞を固定および染色した。3 回の独立した実験を通じた 24 個のプラークの面積 (任意単位 [A.U.]) を、各ウイルスについて測定した。データは、平均プラーク直径として表される。* *、 $P < 0.01$; * * * *、 $P < 0.0001$ 。C. 図 8 C は、示されたウイルスを 72 時間感染させた BSC - 40 細胞のプラーク形態学を示す。細胞を固定し、染色し、可視化のためにスキャンした。

30

【0086】

【図 9】図 9。VACV (株 ACAM2000 ; Genbank 受託番号 AY313847) の直鎖 dsDNA ゲノムの模式図。VACV ACAM2000 の未改変のゲノム配列が、天然に存在する AarI および BsaI 認識部位をマークして示される。重複する DNA 断片は、青色で示される。左 (LITR __ ACAM2000) および右 (RITR __ ACAM2000) 断片は、橙色で示される。

40

【0087】

【図 10】図 10。マウスへの種々の組成物および用量の投与後の経時的な % 体重減少のグラフ表示。示されたデータは、10 μ l の PBS 中の、示された用量の scHPXV

50

YFP - gpt : : 095 (s c H P X V (H P X V _ 095 / J 2 R) または s c H P X V (y f p / g p t) とも称する)、s c H P X V (野生型)、D r y v a x D P P 15 または V A C V W R が接種された 5 匹の雌性 B A L B / c マウスの群から生成される。マウスを、28 日間にわたって毎日体重測定し、初期体重の > 25 % を失ったいずれのマウスも安楽死させる。データポイントは平均スコアを示し、エラーバーは標準偏差を示す。

【0088】

【図 11A】図 11A および 11B。マウスへの種々の組成物および用量の投与後の経時的な % 体重減少のグラフ表示。示されたデータは、先にワクチン接種され (図 10)、次いで、致死用量の V A C V W R (10^6 P F U) で鼻腔内抗原投与されるマウスから生成される。図 11A は、13 日間にわたって毎日記録した、マウスにおける体重変化を示し、図 11B は、臨床スコアを示す。初期体重の > 25 % を失ったいずれのマウスも安楽死させる。マウスに、被毛の乱れ (ruffled fur)、猫背の姿勢、呼吸困難および減少した運動性の出現に基づいて臨床スコアを割り当てた。データポイントは、体重またはスコアにおける平均差異を示し、エラーバーは標準偏差を示す。† は、所与の日に V A C V 感染で死亡するマウスの数を示す。

10

【図 11B】図 11A および 11B。マウスへの種々の組成物および用量の投与後の経時的な % 体重減少のグラフ表示。示されたデータは、先にワクチン接種され (図 10)、次いで、致死用量の V A C V W R (10^6 P F U) で鼻腔内抗原投与されるマウスから生成される。図 11A は、13 日間にわたって毎日記録した、マウスにおける体重変化を示し、図 11B は、臨床スコアを示す。初期体重の > 25 % を失ったいずれのマウスも安楽死させる。マウスに、被毛の乱れ (ruffled fur)、猫背の姿勢、呼吸困難および減少した運動性の出現に基づいて臨床スコアを割り当てた。データポイントは、体重またはスコアにおける平均差異を示し、エラーバーは標準偏差を示す。† は、所与の日に V A C V 感染で死亡するマウスの数を示す。

20

【0089】

【図 12】図 12。マウスへの種々の組成物および用量の投与後の経時的な % 生存のグラフ表示。示されたデータは、先にワクチン接種され (図 10)、次いで、致死用量の V A C V W R (10^6 P F U) で鼻腔内抗原投与されるマウスから生成される。図 12 は、致死用量の V A C V W R (10^6 P F U) で鼻腔内抗原投与されるマウスの生存曲線を示す。† は、示された日に V A C V 感染で死亡するマウスの数を示す。

30

【0090】

【図 13A】図 13A および 13B。V A C V - H P X V ハイブリッドウイルスの特徴付け。A. V A C V 株 W R 中の H P X V 挿入物。ウイルスゲノムを、I l l u m i n a プラットフォームを使用して配列決定し、アセンブルし、L A G A N ^{3 2} および「B a s e - b y - B a s e」^{3 3} ソフトウェアを使用してアラインさせ、示されたマップを生成した。V A C V 配列 (白色) が H P X V 配列によって置き換えられた場所は、差異に従って色コード化する。最初のハイブリッドウイルス (「V A C V / H P X V + 断片 3」) は、V A C V D N A を H P X V 断片 _ 3 と共に S F V 感染細胞中に共トランスフェクトすることによって得た。緑色でタグ付けした挿入物は、Y F P - g p t 選択マーカーをコードする。クローン 1 ~ 3 を、この最初のハイブリッドゲノムから D N A を精製し、それを H P X V 断片 2、4、5 および 7 と共に S F V 感染細胞中に再度トランスフェクトすることによって得た。B. ハイブリッドおよび再活性化されたウイルスを同定するための、P C R ベースのスクリーニングアプローチ。H P X V および V A C V の両方を標的化するように設計され、合成 H P X V クローン中の変異された B s a I 部位にまたがる D N A セグメントを増幅するために使用された P C R プライマー。P C R 増幅後、産物を B s a I によって消化して、H P X V (切断しない) から V A C V 配列 (切断する) を区別する。V A C V / H P X V ハイブリッドは、B s a I 感受性部位および抵抗性部位のミックスを示すが、再活性化された s c H P X V Y F P - g p t : : 095 クローンは、完全に B s a I 抵抗性である。

40

50

【図13B】図13Aおよび13B。VACV-HPXVハイブリッドウイルスの特徴付け。A. VACV株WR中のHPXV挿入物。ウイルスゲノムを、Illuminaプラットフォームを使用して配列決定し、アセンブルし、LAGAN³²および「Base-by-Base」³³ソフトウェアを使用してアラインさせ、示されたマップを生成した。VACV配列（白色）がHPXV配列によって置き換えられた場所は、差異に従って色コード化する。最初のハイブリッドウイルス（「VACV/HPXV+断片3」）は、VACV DNAをHPXV断片__3と共にSFV感染細胞中に共トランスフェクトすることによって得た。緑色でタグ付けした挿入物は、YFP-gpt選択マーカーをコードする。クローン1~3を、この最初のハイブリッドゲノムからDNAを精製し、それをHPXV断片2、4、5および7と共にSFV感染細胞中に再度トランスフェクトすることによって得た。B. ハイブリッドおよび再活性化されたウイルスを同定するための、PCRベースのスクリーニングアプローチ。HPXVおよびVACVの両方を標的化するように設計され、合成HPXVクローン中の変異されたBsaI部位にまたがるDNAセグメントを増幅するために使用されたPCRプライマー。PCR増幅後、産物をBsaIによって消化して、HPXV（切断しない）からVACV配列（切断する）を区別する。VACV/HPXVハイブリッドは、BsaI感受性部位および抵抗性部位のミックスを示すが、再活性化されたscHPXV YFP-gpt::095クローンは、完全にBsaI抵抗性である。

【0091】

【図14A】図14A~14C。scHPXV対scHPXV YFP-gpt::095の増殖特性。A. プラークサイズ測定。相同組換えを使用して、scHPXV YFP-gpt::095中のYFP-gpt遺伝子座を、チミジンキナーゼ遺伝子配列で置き換えた。これは、HPXV遺伝子の完全に野生型の相補体を有するウイルス（scHPXV）を産生した。BSC-40細胞に、示されたウイルスを感染させ、3日間培養した。培養皿を染色し、プラーク面積を、スキャンされたデジタル画像を使用して測定した。統計的有意差が注記される（****P<0.0001）。B. プラーク画像。C. 培養物における多段階ウイルス増殖。示された細胞株に、0.01の感染多重度でscHPXVまたはscHPXV YFP-gpt::095を感染させ、示された時点でウイルスを収集し、BSC-40細胞に対して三連で力価決定した。これらのウイルスの増殖には、これらのin vitroアッセイでは有意差は検出されなかった。

【図14B】図14A~14C。scHPXV対scHPXV YFP-gpt::095の増殖特性。A. プラークサイズ測定。相同組換えを使用して、scHPXV YFP-gpt::095中のYFP-gpt遺伝子座を、チミジンキナーゼ遺伝子配列で置き換えた。これは、HPXV遺伝子の完全に野生型の相補体を有するウイルス（scHPXV）を産生した。BSC-40細胞に、示されたウイルスを感染させ、3日間培養した。培養皿を染色し、プラーク面積を、スキャンされたデジタル画像を使用して測定した。統計的有意差が注記される（****P<0.0001）。B. プラーク画像。C. 培養物における多段階ウイルス増殖。示された細胞株に、0.01の感染多重度でscHPXVまたはscHPXV YFP-gpt::095を感染させ、示された時点でウイルスを収集し、BSC-40細胞に対して三連で力価決定した。これらのウイルスの増殖には、これらのin vitroアッセイでは有意差は検出されなかった。

【図14C】図14A~14C。scHPXV対scHPXV YFP-gpt::095の増殖特性。A. プラークサイズ測定。相同組換えを使用して、scHPXV YFP-gpt::095中のYFP-gpt遺伝子座を、チミジンキナーゼ遺伝子配列で置き換えた。これは、HPXV遺伝子の完全に野生型の相補体を有するウイルス（scHPXV）を産生した。BSC-40細胞に、示されたウイルスを感染させ、3日間培養した。培養皿を染色し、プラーク面積を、スキャンされたデジタル画像を使用して測定した。統計的有意差が注記される（****P<0.0001）。B. プラーク画像。C. 培養物における多段階ウイルス増殖。示された細胞株に、0.01の感染多重度でscHPXVまたはscHPXV YFP-gpt::095を感染させ、示された時点でウイルスを

収集し、BSC-40細胞に対して三連で力価決定した。これらのウイルスの増殖には、これらの*in vitro*アッセイでは有意差は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0092】

発明の詳細な説明

一般技術

本明細書で特に定義しない限り、本出願で使用する科学用語および技術用語は、当業者が一般に理解する意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載される薬理学、細胞および組織培養、分子生物学、細胞およびがん生物学、神経生物学、神経化学、ウイルス学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学と併せて使用される命名法、ならびにそれらの技術は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。

10

【0093】

本発明の実施は、特記しない限り、当業者の技術範囲内の、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を使用する。かかる技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版（Sambrookら、1989年）Cold Spring Harbor Press；Oligonucleotide Synthesis（M.J. Gait編、1984年）；Methods in Molecular Biology、Humana Press；Cell Biology: A Laboratory Notebook（J.E. Cellis編、1998年）Academic Press；Animal Cell Culture（R.I. Freshney編、1987年）；Introduction to Cell and Tissue Culture（J.P. MatherおよびP.E. Roberts、1998年）Plenum Press；Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures（A. Doyle、J.B. GriffithsおよびD.G. Newell編、1993～1998年）J. Wiley and Sons；Methods in Enzymology（Academic Press, Inc.）；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells（J.M. MillerおよびM.P. Calos編、1987年）；Current Protocols in Molecular Biology（F.M. Ausubelら編、1987年）；PCR: The Polymerase Chain Reaction（Mullisら編、1994年）；SambrookおよびRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY（2001年）；Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY（2002年）；HarlowおよびLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY（1998年）；Coliganら、Short Protocols in Protein Science、John Wiley & Sons、NY（2003年）；Short Protocols in Molecular Biology（Wiley and Sons、1999年）などの文献中で完全に説明されている。

20

30

【0094】

酵素反応および精製技術は、当技術分野で一般に達成されるように、または本明細書に記載されるように、製造業者の仕様書に従って実施される。本明細書に記載される分析化学、生化学、免疫学、分子生物学、合成有機化学ならびに医薬品化学および製薬化学と併せて使用される命名法、ならびにそれらの実験室手順および技術は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技術が、化学的合成および化学的分析のために使用される。

40

【0095】

本明細書および実施形態を通じて、単語「含む（comprise）」、または変化形、例えば、「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」は、述べられた整数または整数の群を含むことを意味するが、任意の他の整数または整数の群を排除することを意味しないと理解される。

【0096】

実施形態が言語「含む（comprising）」を用いて本明細書に記載される場合、「～からなる」および/または「～から本質的になる」で記載される、他の点では類似の実施形態もまた提供されることが理解される。

50

【0097】

用語「含む (i n c l u d i n g) 」は、「～が含まれるがこれらに限定されない」を意味するために使用される。「含む (i n c l u d i n g) 」および「～が含まれるがこれらに限定されない」は、相互交換可能に使用される。

【0098】

用語「例えば (e . g .) 」または「例えば (f o r e x a m p l e) 」の後の任意の例は、徹底的でも限定的でもないことを意味する。

【0099】

文脈が他を要求しない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【0100】

冠詞「1つの (a) 」、「1つの (a n) 」および「この (t h e) 」は、その冠詞の文法的対象の1つまたは1つよりも多く (即ち、少なくとも1つ) を指すために本明細書で使用される。例として、「1つの要素 (a n e l e m e n t) 」は、1つの要素または1つよりも多い要素を意味する。本明細書の「約」値またはパラメーターに対する言及は、その値またはパラメーター自体に対する実施形態を含む (および記載する) 。例えば、「約 X 」に言及する記載は、「 X 」の記載を含む。数的範囲は、その範囲を規定する数を含む。

【0101】

本発明の広い範囲を示す数的範囲およびパラメーターが近似であるものの、具体例で示される数値は、可能な限り正確に報告される。しかし、任意の数値は、そのそれぞれの試験測定値において見出される標準偏差から必然的に生じるある特定の誤差を固有に含む。さらに、本明細書に開示される全ての範囲は、その中に含まれる任意のおよび全ての下位範囲を包含することを理解すべきである。例えば、「1～10」の述べられた範囲は、1の最小値と10の最大値との間 (それらを含む) の任意のおよび全ての下位範囲 ; 即ち、1またはそれよりも大きい最小値、例えば、1～6、1で始まり、10またはそれ未満の最大値、例えば、5、5～10で終わる全ての下位範囲、を含むとみなすべきである。

【0102】

本発明の態様または実施形態が、マーカッシュ群または選択肢の他の群分けで記載される場合、本発明は、列挙された群全体を全体として包含するだけでなく、群の各メンバーを個々に、および主要群の全ての可能な下位群を包含し、群メンバーのうち1つまたは複数が存在しない主要群もまた包含する。本発明は、具現化された本発明における、群メンバーのいずれかの1つまたは複数の明確な排除もまた想定する。

【0103】

例示的な方法および材料が本明細書に記載されるが、本明細書に記載される方法および材料と類似または等価な方法および材料もまた、本発明の実施または試験において使用され得る。材料、方法および例は、例示に過ぎず、限定を意図しない。

【0104】

定義

以下の用語は、特記しない限り、以下の意味を有すると理解するものとする :

本明細書で使用する場合、用語「野生型ウイルス」、「野生型ゲノム」、「野生型タンパク質」または「野生型核酸」は、ある特定の集団 (例えば、特定のウイルス種など) 内に天然に存在するアミノ酸または核酸の配列を指す。

【0105】

用語「キメラ」もしくは「操作された」もしくは「改変された」 (例えば、キメラポックスウイルス、操作されたポリペプチド、改変されたポリペプチド、操作された核酸、改変された核酸) またはそれらの文法上の変化形は、ネイティブ配列と比較して1つまたは複数の変化を有するように操作された非ネイティブ配列を指すために、本明細書で相互交換可能に使用される。

【0106】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「合成ウイルス」は、合成DNA（例えば、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、ヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドなど、またはそれらの組合せ）に当初由来するウイルスを指し、その子孫を含み、この子孫は、天然の、偶発的なまたは計画的な変異に起因して、元の親合成ウイルスと必ずしも完全に同一（形態学において、またはゲノムDNA相補体において）でない場合がある。一部の実施形態では、合成ウイルスは、ウイルスゲノムの実質的に全てが化学的に合成されたDNAに当初由来するウイルスを指す。

【0107】

本明細書の他の場所で概説したように、ウイルスゲノムのある特定の位置（position）は、変更され得る。「位置（position）」は、本明細書で使用する場合、ゲノム配列中の位置（location）を意味する。対応する位置（position）は、一般に、他の親配列とのアラインメントによって決定される。

10

【0108】

本明細書で使用する場合、「残基」は、タンパク質中の位置およびそれに関連するアミノ酸同一性に言及するのに用いられる。

【0109】

当技術分野で公知のように、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書で相互交換可能に使用する場合、任意の長さのヌクレオチドの鎖を指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変されたヌクレオチドもしくは塩基、および/またはそれらのアナログ、あるいはDNAまたはRNAポリマーゼによって鎖中に取り込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、改変されたヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびそれらのアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変は、鎖のアセンブリの前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列には、非ヌクレオチド成分が割り込み得る。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識成分とのコンジュゲーションによって、さらに改変され得る。他の型の改変には、例えば、「キャップ」、アナログによる1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間改変、例えば、非荷電連結（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート（phosphoramidate）、カルバメートなど）によるもの、および荷電連結（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）によるものなど、例えばタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシンなど）などのペンダント部分を含むもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）によるもの、キレーター（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化的金属など）を含むもの、アルキル化薬を含むもの、改変された連結によるもの（例えば、アルファアノマー核酸など）、ならびに未改変形態のポリヌクレオチドが含まれる。さらに、糖中に通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基によって置き換えられ得、標準的な保護基によって保護され得、またはさらなるヌクレオチドへのさらなる連結を調製するために活性化され得、あるいは固体支持体にコンジュゲートされ得る。5'および3'末端のOHは、リン酸化され得、またはアミン、もしくは1~20炭素原子の有機キャップ基部分で置換され得る。他のヒドロキシルは、標準的な保護基へと誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドはまた、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、アルファ-またはベータ-アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロースまたはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式アナログおよび脱塩基ヌクレオシドアナログ、例えばメチルリボシドを含む、当技術分野で一般に公知の類似の形態のリボースまたはデオキシリボース糖を含み得る。1つまたは複数のホスホジエステル連結は、代替的な連結基によって置き換えられ得る。これらの代替的な連結基には、ホスフェートがP(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタール」）によって置き換えられる実施形態が含まれるがこれらに限定されず、式中、各Rまたは

20

30

40

50

R' は、独立してHであるか、またはエーテル(- O -) 連結、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルもしくはアラリジル(araldyl) を任意選択で含む置換もしくは未置換アルキル(1 ~ 20C) である。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。先行する説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0110】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸の鎖を指すために、本明細書で相互交換可能に使用される。鎖は、直鎖でも分枝鎖でもよく、改変されたアミノ酸を含み得、および/または非アミノ酸によって中断され得る。これらの用語は、天然に改変された、あるいは介入、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは改変、例えば、標識成分とのコンジュゲーションによって改変されたアミノ酸鎖もまた包含する。アミノ酸の1つまたは複数のアナログ(例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、ならびに当技術分野で公知の他の改変を含むポリペプチドなどもまた、この定義内に含まれる。ポリペプチドは、単一の鎖または会合した鎖として存在できることが理解される。

10

【0111】

「相同な」は、その全ての文法的形態およびつづりの変化形で、「共通の進化的起源」を有する2つのタンパク質間の関係を指し、このタンパク質には、同じ種の生物中のスーパーファミリー由来のタンパク質、ならびに異なる種の生物由来の相同なタンパク質が含まれる。かかるタンパク質(およびそれらをコードする核酸)は、パーセント同一性であれ、特定の残基またはモチーフおよび保存された位置の存在によってであれ、それらの配列類似性に反映される配列相同性を有する。

20

【0112】

しかし、一般的な用法および本出願では、用語「相同な」は、「高度に」などの副詞で修飾される場合、配列類似性を指し得、共通の進化的起源に関連していてもいなくてもよい。

【0113】

用語「配列類似性」は、その全ての文法的形態で、共通の進化的起源を共有していてもいなくてもよい核酸またはアミノ酸配列間の同一性または対応の程度を指す。

30

【0114】

参照ポリペプチド(またはヌクレオチド)配列に関する「パーセント(%)配列同一性」は、配列をアラインし、最大のパーセント配列同一性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後の、いずれの保存的置換も配列同一性の一部とはみなさない、参照ポリペプチド(ヌクレオチド)配列中のアミノ酸残基(または核酸)と同一である、候補配列中のアミノ酸残基(または核酸)の百分率として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定することを目的としたアラインメントは、例えば、公に利用可能なコンピューターソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して、当業者の技術範囲内の種々の方法で達成され得る。当業者は、比較されている配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメーターを決定できる。

40

【0115】

本明細書で使用する場合、「宿主細胞」は、ポリヌクレオチド挿入物の取り込みのためのベクターのレシピエントであり得るまたはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれ、この子孫は、天然の、偶発的なまたは計画的な変異に起因して、元の親細胞と必ずしも完全に同一(形態学において、またはゲノムDNA相補体において)でない場合がある。宿主細胞には、本発明の核酸でin vivoでトランスフェクトおよび/または形質転換された細胞が含まれる。

【0116】

50

本明細書で使用する場合、「ベクター」は、目的の1つまたは複数の遺伝子または配列を、宿主細胞に送達することが可能な、好ましくは、それらを宿主細胞において発現させることが可能な構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、ネイキッドDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤と関連するDNAまたはRNA発現ベクター、リボソーム中に封入されたDNAまたはRNA発現ベクター、およびある特定の真核生物細胞、例えば産生細胞が含まれるがこれらに限定されない。

【0117】

本明細書で使用する場合、「発現制御配列」は、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現制御配列は、プロモーター、例えば、構成的もしくは誘導性プロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現制御配列は、転写される核酸配列に作動可能に連結している。

10

【0118】

本明細書で使用する場合、「単離された分子」（分子が、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの断片である場合）は、その起源または派生の供給源のおかげで、（1）そのネイティブ状態でそれに付随する1つもしくは複数の天然に関連する成分と関連しない、（2）同じ種由来の1つもしくは複数の他の分子を実質的に含まない、（3）異なる種由来の細胞によって発現される、または（4）天然に存在しない、分子である。従って、化学的に合成される、またはそれが天然に起源する細胞とは異なる細胞系において発現される分子は、その天然に関連する成分から「単離される」。分子はまた、当技術分野で周知の精製技術を使用する単離によって、天然に関連する成分を実質的に含まないようにされ得る。分子の純度または均一性は、当技術分野で周知のいくつかの手段によってアッセイされ得る。例えば、ポリペプチド試料の純度は、当技術分野で周知の技術を使用する、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびポリペプチドを可視化するためのゲルの染色を使用してアッセイされ得る。ある特定の目的のために、より高い解像度が、HPLC、または精製のための当技術分野で周知の他の手段を使用することによって提供され得る。

20

【0119】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、ウイルスに関して、単一の親ウイルスに由来するウイルスを指す。ウイルスは、ブランク精製および限界希釈に基づく方法が含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の慣用的な方法を使用して単離され得る。

30

【0120】

本明細書で使用する場合、語句「感染多重度」または「MOI」は、感染細胞当たりのウイルスの平均数である。MOIは、添加されたウイルスの数（添加したml×ブランク形成単位（PFU））を、添加した細胞の数（添加したml×細胞/ml）によって除算することによって決定される。

【0121】

本明細書で使用する場合、「精製する」およびその文法上の変化形は、完全にであれ部分的にであれ、それによって組成物中のポリペプチドの純度のレベルを改善する（即ち、組成物中の不純物の量（ppm）を減少させることによって）、ポリペプチドおよび1つまたは複数の不純物を含む混合物からの、少なくとも1つの不純物の除去を指す。本明細書で使用する場合、「精製された」は、ウイルスに関して、そのウイルスが由来する細胞または組織供給源由来の細胞性材料および培養培地を実質的に含まないウイルスを指す。言語「細胞性材料を実質的に含まない」は、ウイルスが、それが単離されるまたは組換え産生される細胞の細胞性成分から分離されている、ウイルスの調製物を含む。従って、細胞性材料を実質的に含まないウイルスは、約30%、20%、10%または5%未満（乾燥重量）の細胞性タンパク質（本明細書で「混入タンパク質」とも呼ばれる）を有するタンパク質の調製物を含む。ウイルスはまた、培養培地を実質的に含まない、即ち、培養培地は、ウイルス調製物の体積の約20%、10%または5%未満を占める。ウイルスは、

40

50

クロマトグラフィーおよび遠心分離が含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の慣用的な方法を使用して精製され得る。

【0122】

本明細書で使用する場合、「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋（即ち、混入物を含まない）、より好ましくは、少なくとも90%純粋、より好ましくは、少なくとも95%純粋、なおより好ましくは、少なくとも98%純粋、最も好ましくは、少なくとも99%純粋である材料を指す。

【0123】

用語「患者」、「対象」または「個体」は、本明細書で相互交換可能に使用され、ヒトまたは非ヒト動物のいずれかを指す。これらの用語は、哺乳動物、例えば、ヒト、霊長類、家畜動物（ウシ、ブタ、ラクダなどを含む）、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ、ネコなど）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含む。

10

【0124】

本明細書で使用する場合、用語「予防する（prevent）」、「予防する（preventing）」および「予防」は、治療（例えば、予防剤または治療剤）の投与の結果としての、対象における、疾患（例えば、ボックスウイルス感染）の再発もしくは発症の予防、またはその1つもしくは複数の症状における低減を指す。例えば、感染について、対象への治療の投与に関して、「予防する（prevent）」、「予防する（preventing）」および「予防」は、治療（例えば、予防剤または治療剤）の投与、または治療の組合せ（例えば、予防剤または治療剤の組合せ）の投与から生じる、対象における、感染（例えば、ボックスウイルス感染またはそれと関連する状態）の発達もしくは発症における阻害もしくは低減、または感染（例えば、ボックスウイルス感染またはそれと関連する状態）の1つもしくは複数の症状の再発、発症もしくは発達の予防を指す。

20

【0125】

状態または患者を「処置する」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのステップをとることを指す。感染（例えば、ボックスウイルス感染）に関して、処置は、感染性因子（例えば、ボックスウイルス）の複製の根絶もしくは制御、感染性因子の数における低減（例えば、ボックスウイルスの力価における低減）、感染（例えば、ボックスウイルス感染またはそれと関連する状態もしくは症状）の進行、重症度および/もしくは持続時間の低減もしくは寛解、または1つもしくは複数の治療の投与（1つもしくは複数の予防剤または治療剤の投与が含まれるがこれに限定されない）から生じる1つもしくは複数の症状の寛解を指す。がんに関して、処置は、本発明の1つまたは複数の治療剤の投与から生じる、原発性、限局性または転移性がん組織の根絶、除去、改変または制御を指す。ある特定の実施形態では、かかる用語は、かかる疾患を有する対象への本発明の1つまたは複数の治療剤の投与から生じる、がんの広がり、最小化または遅延を指す。他の実施形態では、かかる用語は、疾患を引き起こす細胞の排除を指す。

30

【0126】

対象に物質、化合物もしくは薬剤を「投与する」または対象への物質、化合物もしくは薬剤「の投与」は、当業者に公知の種々の方法の1つを使用して実施され得る。例えば、化合物または薬剤は、舌下もしくは鼻腔内で、肺中への吸入によって、または直腸で投与され得る。投与することはまた、例えば、1回、複数回、および/または1つもしくは複数の延長された期間にわたって、実施され得る。一部の態様では、投与は、自己投与を含む直接的投与、および薬物を処方する行動を含む間接的投与の両方を含む。例えば、本明細書で使用する場合、薬物を自己投与するようにもしくは他者に薬物を投与してもらうように患者に指導する医師、および/または薬物の処方箋を患者に提供する医師は、患者に薬物を投与している。

40

【0127】

本明細書に記載される各実施形態は、個々に、または本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせて使用され得る。

概要

50

【0128】

ボックスウイルスは、感染細胞の原形質中で複製する大きい（約200kbp）DNAウイルスである。Orthopoxvirus（OPV）属は、異なる宿主に感染する能力が大きく異なる、いくつかのボックスウイルスを含む。例えば、ワクシニアウイルス（VACV）は、広い群の宿主に感染できるが、天然痘の原因因子である痘瘡ウイルス（VARV）は、ヒトにのみ感染する。全てではないが多くのボックスウイルスに共通する特色は、宿主内で非遺伝的に「再活性化する」能力である。非遺伝的再活性化は、1つのボックスウイルスが感染した細胞が、それ自体では非感染性である第2の「死」ウイルス（例えば、熱によって不活性化されたもの）の回復を促進できるプロセスを指す。

【0129】

ウイルスのライフサイクルは、ビリオン中にパッケージングされるウイルスにコードされたRNAポリメラーゼを介した初期遺伝子の転写を必要とするので、精製されたボックスウイルスDNAは、感染性ではない。しかし、この欠陥は、ヘルパーボックスウイルスが先に感染した細胞中にウイルスDNAがトランスフェクトされる場合には克服され得、トランスフェクトされたゲノムをin transに転写、複製およびパッケージングするために必要な因子を提供する（Sam CK、Dumbell KR. Expression of poxvirus DNA in coinfecting cells and marker rescue of thermosensitive mutants by subgenomic fragments of DNA. Ann Virol (Inst Past). 1981年；132巻：135～50頁）。これは、混合ウイルス子孫を産生するが、この問題は、両方のウイルスの繁殖を支持する細胞株において再活性化反応を実施し、次いで、ウイルスの混合物を、ヘルパーウイルスの増殖を支持しない細胞上にプレーティングすることによって、ヘルパーウイルスを排除することによって克服できる（Scheifflinger F、Dorner F、Falkner FG. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992年；89巻（21号）：9977～81頁）。

【0130】

以前から、Leporipoxvirusであるショープ線維腫ウイルス（SFV）によって高頻度組換え反応が触媒される方法が、ウイルスDNAの複数の重複する断片を使用して組換えVACV株を迅速にアセンブルするために、SFV触媒される再活性化反応とカップリングされ得る（Yao XD、Evans DH. High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. Journal of virology. 2003年；77巻（13号）：7281～90頁）。初めて、化学的に合成された重複する二本鎖DNA断片を使用した、機能的ボックスウイルス（合成キメラ馬痘ウイルス[s cHPXV]）の再活性化および特徴付けが記載される。これらの原理は、ラクダ痘ウイルス（CMLV）、牛痘ウイルス（CPXV）、奇肢痘ウイルス（ECTV、「マウス痘因子」）、馬痘（HPXV）、サル痘ウイルス（MPXV）、ウサギ痘ウイルス（RPXV）、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシユール病ウイルス、ワクシニアウイルス（VACV）およびハタネズミ痘ウイルス（VPV）が含まれるがこれらに限定されない他のボックスウイルスに同様に適用および外挿され得る。

【0131】

本発明の合成キメラボックスウイルス（例えば、合成キメラ馬痘ウイルス）の一実施形態は、マウスに感染でき、致死VACV抗原投与に対してマウスを免疫化でき、初回免疫化ステップの間にいずれの疾患も引き起こすことなくそれを行うことができることが、本明細書でさらに示される。

本発明の合成キメラボックスウイルス

【0132】

本発明は、化学的に合成されたDNAから当初複製およびアセンブルされる機能的合成キメラボックスウイルス（scPV）を提供する。本発明の方法に従って産生され得るウ

10

20

30

40

50

イルスは、そのゲノムが大部分配列決定された、またはそれについての天然の単離体が入手可能な、任意のボックスウイルスであり得る。本発明の s c P V は、天然に存在する株、バリエーションもしくは変異体、変異誘発されたウイルスまたは遺伝的に操作されたウイルスのゲノム配列に基づき得る。本発明の s c P V のウイルスゲノムは、前記ウイルスの野生型ゲノムまたは基本的ゲノム配列と比較して、1つまたは複数の改変を含む。改変は、1つもしくは複数の欠失、挿入、置換、またはそれらの組合せを含み得る。改変は、当技術分野で一般に公知のいくつかの方法で導入されることが理解される。ゲノムの改変された部分は、化学的に合成された DNA、cDNA またはゲノム DNA に由来し得る。

【0133】

化学的ゲノム合成は、天然の鋳型が、従来の分子生物学の方法による遺伝的改変、増幅または複製に利用可能でない場合に、特に有用である。例えば、馬痘ウイルス (HPXV) の天然の単離体は、鋳型 DNA を得るために容易に利用可能ではないが、HPXV (株 MNR-76) のゲノム配列は記載されている。しかし、HPXV ゲノム配列は不完全である。末端ヘアピンループの配列は決定されなかった。驚くべき結果として、機能的合成キメラ HPXV (scHPXV) が、HPXV 末端ヘアピンループ配列の代わりに、VACV テロメアに基づく末端ヘアピンループを使用することによって生成された。一部の実施形態では、ボックスウイルスは、Chordopoxviridae 亜科に属する。一部の実施形態では、ボックスウイルスは、Avipoxvirus、Capripoxvirus、Cervidpoxvirus、Crocodylipoxvirus、Leporipoxvirus、Molluscipoxvirus、Orthopoxvirus、Parapoxvirus、Suipoxvirus または Yatapoxvirus から選択される Chordopoxviridae 亜科の属に属する。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Orthopoxvirus である。一部の実施形態では、Orthopoxvirus は、ラクダ痘ウイルス (CMLV)、牛痘ウイルス (CPXV)、奇肢痘ウイルス (ECTV、「マウス痘因子」、HPXV、サル痘ウイルス (MPXV)、ウサギ痘ウイルス (RPXV)、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシュー病ウイルス、ワクシニアウイルス (VACV)、痘瘡ウイルス (VARV) およびハタネズミ痘ウイルス (VPV) から選択される。好ましい実施形態では、ボックスウイルスは HPXV である。別の好ましい実施形態では、ボックスウイルスは VACV である。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Parapoxvirus である。一部の実施形態では、Parapoxvirus は、オルフウイルス (ORFV)、偽牛痘ウイルス (PCPV)、牛丘疹性口炎ウイルス (BPSV)、リスパラボックスウイルス (SPPV)、アカシカパラボックスウイルス、Aussdyk ウイルス、シャモア伝染性膿瘡 (Chamois contagious ecythema) ウイルス、トナカイパラボックスウイルスまたはアザラシ痘ウイルス (sealpox virus) から選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Molluscipoxvirus である。一部の実施形態では、Molluscipoxvirus は伝染性軟属腫 (mollusum contagiousum) ウイルス (MCV) である。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Yatapoxvirus である。一部の実施形態では、Yatapoxvirus は、タナボックスウイルス (Tanapox virus) またはヤバサル腫瘍ウイルス (YMTV) から選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Capripoxvirus である。一部の実施形態では、Capripoxvirus は、羊痘 (sheepox)、山羊痘またはランピースキン病ウイルスから選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Suipoxvirus である。一部の実施形態では、Suipoxvirus はブタボックスウイルスである。一部の実施形態では、ボックスウイルスは Leporipoxvirus である。一部の実施形態では、Leporipoxvirus は、粘液腫ウイルス、ショープ線維腫ウイルス (SFV)、リス線維腫ウイルスまたは野兎線維腫ウイルスから選択される。新たなボックスウイルス (例えば、オルソボックスウイルス) が、なおも絶えず発見されている。本発明の s c P V は、かかる新たに発見されたボックスウイルスに基づき得ることが理解される。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

化学的ウイルスゲノム合成は、得られたゲノムに、またはその特定の一部に、多数の有用な改変を導入する可能性も切り開く。改変は、ウイルスを生成するためのクローニングの容易さを改善し得、組換え遺伝子産物の導入のための部位を提供し得、再活性化されたウイルスクロンの同定の容易さを改善し得、および／または大量の他の有用な特色（例えば、所望の抗原を導入する、腫瘍溶解性ウイルスを産生するなど）を付与し得る。一部の実施形態では、改変は、１つまたは複数のビルレンス因子の弱毒化または欠失を含み得る。一部の実施形態では、改変は、１つまたは複数のビルレンス調節遺伝子、または遺伝子がコードする調節因子の付加または挿入を含み得る。

【 0 1 3 5 】

これまで、ボックスウイルスの末端ヘアピンは、クローニングおよび配列することが困難であり、従って、公開されたゲノム配列（例えば、VACV、ACAM 2000およびHPXV MNR - 76）の一部が不完全であることは意外ではない。HPXVゲノムの公開された配列もまた、おそらくは末端終端から約60bpを欠いて、不完全である。従って、HPXVヘアピンは、本発明の前には正確に複製できず、HPXVが、HPXVゲノムの公知の部分のみに基づいてポリヌクレオチドから複製およびアセンブルできるかどうかは知られていなかった。１つのウイルス由来のヘアピンが別のウイルスにおいて作動可能であることも知られていなかった。例示的な実施形態では、129ntのssDNA断片を、VACVテロメアの公開された配列をガイドとして使用して化学的に合成し、HPXVゲノムの左および右終端を含むdsDNA断片にライゲートさせた。一部の実施形態では、本発明のscPVの末端ヘアピンは、VACVに由来する。一部の実施形態では、末端ヘアピンは、CMLV、CPXV、ECTV、HPXV、MPXV、RPXV、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病ウイルスまたはVPVに由来する。一部の実施形態では、末端ヘアピンは、そのゲノムが完全に配列決定された任意のボックスウイルス、またはゲノム配列決定のために利用可能な天然の単離体の末端ヘアピンに基づく。

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、改変は、１つまたは複数の制限部位の欠失を含み得る。一部の実施形態では、改変は、１つまたは複数の制限部位の導入を含み得る。一部の実施形態では、ゲノムから欠失されるまたはゲノムに付加される制限部位は、例えば、AanI、AarI、AasI、AatI、AatII、AbaSI、AbsI、Acc65I、AccI、AccII、AccIII、AciI、AclI、AciI、AfeI、AflII、AflIII、AgeI、AhdI、AleI、AluI、AlwI、AlwNI、ApaI、ApalI、ApeKI、ApoI、AscI、AseI、AsiSI、AvaI、AvaII、AvrII、BaeGI、BaeI、BamHI、BanI、BanII、BbsI、BbvCI、BbvI、BccI、BceAI、BcgI、BciVI、BclI、BcoDI、BfaI、BfuAI、BfuCI、BglI、BglII、BlpI、BmgBI、BmrI、BmtI、BpmI、Bpu10I、BpuEI、BsaAI、BsaBI、BsaHI、BsaI、BsaJI、BsaWI、BsaXI、BseRI、BseYI、BsgI、BsiEI、BsiHKAI、BsiWI、BslI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BsmI、BsoBI、Bsp1286I、BspCNI、BspDI、BspeI、BspHI、BspMI、BspQI、BsrBI、BsrDI、BsrFI、BsrGI、BsrI、BsshII、BssSI、BstAPI、BstBI、BstEII、BstNI、BstUI、BstXI、BstYI、BstZ17I、Bsu36I、BtgI、BtgZI、BtsI、BtsCI、BtsIMutI、Cac8I、ClaI、CspCI、CviAII、CviKI-1、CviQI、DdeI、DpnI、DpnII、DraI、DrdI、EaeI、EagI、EarI、EciI、Eco53kI、EcoNI、EcoO109I、EcoP15I、EcoRI、EcoRV、FatI、FauI、Fnu4HI、FokI、FseI、FspEI、FspI、HaeII、HaeIII、HgaI、HhaI、H

10

20

30

40

50

incII、HindIII、HinfI、HinfI、HpaI、HpaII、HphI、Hpy166II、Hpy188I、Hpy188III、Hpy99I、HpyAV、HpyCH4III、HpyCH4IV、HpyCH4V、I-CeuI、I-SceI、KasI、KpnI、LpnPI、MboI、MboII、MfeI、MluCI、MluI、MlyI、MmeI、MnlI、MscI、MseI、MslI、MspA1I、MspI、MspJI、MwoI、NaeI、NarI、NciI、NcoI、NdeI、NgoMI、NheI、NlaIII、NlaIV、NmeAIII、NotI、NruI、NsiI、NspI、PacI、PaeR7I、PciI、PflFI、PflMI、PleI、PluTI、PmeI、PmlI、PpuMI、PshAI、PsiI、PspGI、PspOMI、PspXI、PstI、PvuI、PvuII、RsaI、RsrII、SacI、SacII、SalI、SapI、Sau3AI、Sau96I、SbfI、ScrFI、SexAI、SfaNI、SfcI、SfiI、SfoI、SgrAI、SmaI、SmlI、SnaBI、SpeI、SphI、SrfI、SspI、StuI、StyD4I、StyI、SwaI、TaqI、TfiI、TseI、Tsp45I、TspMI、TspRI、Tth111I、XbaI、XcmI、XhoI、XmaI、XmnIまたはZraIであるがこれらに限定されない1つまたは複数の制限部位から選択され得る。任意の所望の制限部位または制限部位の組合せが、ゲノム中に挿入され得るもしくは変異され得る、および/またはゲノムから排除され得ることが理解される。一部の実施形態では、1つまたは複数のAarI部位が、ウイルスゲノムから欠失される。一部の実施形態では、1つまたは複数のBsaI部位が、ウイルスゲノムから欠失される。一部の実施形態では、1つまたは複数の制限部位が、ゲノムから完全に排除される（例えば、ウイルスゲノム中の全てのAarI部位が排除され得る）。一部の実施形態では、1つまたは複数のAvaI制限部位が、ウイルスゲノム中に導入される。一部の実施形態では、1つまたは複数のStuI部位が、ウイルスゲノム中に導入される。一部の実施形態では、1つまたは複数の改変は、loxPまたはFRT部位が含まれるがこれらに限定されないリコンビニアリング（recombineering）標的の取り込みを含み得る。

【0137】

一部の実施形態では、改変は、蛍光マーカー、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、高感度GFP、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン/青色蛍光タンパク質（BFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、またはそれらのバリエーションなどであるがこれらに限定されない；選択可能なマーカー、例えば、薬物耐性マーカー（例えば、E.coliキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（gpt）、Streptomyces albonigerピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（pac）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼI遺伝子（nptI）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（nptII）、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（hpt）、shble遺伝子などであるがこれらに限定されない；タンパク質またはペプチドタグ、例えば、MBP（マルトース結合タンパク質）、CBD（セルロース結合ドメイン）、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）、ポリ（His）、FLAG、V5、c-Myc、HA（ヘマグルチニン）、NE-タグ、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）、DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）、HSV（単純ヘルペスウイルス）、VSV-G（水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質）、ルシフェラーゼ、プロテインA、プロテインG、ストレプトアビジン、T7、チオレドキシン、酵母ツーハイブリッドタグ、例えば、B42、GAL4、LexAまたはVP16であるがこれらに限定されない；局在化タグ、例えば、NLS-タグ、SNAP-タグ、Myr-タグなど、の導入を含み得る。当技術分野で公知の他の選択可能なマーカーおよび/またはタグが使用され得ることが理解される。一部の実施形態では、改変は、再活性化されたウイルスクローンの選択を補助するための、再活性化されたクローンの選択を補助するための1つまたは複数の選択可能なマーカー（例えば、YFPなどの蛍光マーカー、gptなどの薬物選択マーカーなど）を含む。一部の実施形態では、1つまた

は複数の選択可能なマーカーは、選択ステップ後に、再活性化されたクローンから欠失される。

【0138】

本発明の s c P V は、病原性ポックスウイルス感染（例えば、V A R V、M P X V、M C V、O R F V、A u s d y k ウイルス、B P S V、アザラシ痘ウイルスなど）に対して保護するためのワクチンとして、病原性ポックスウイルス感染（例えば、V A R V、M P X V、M C V、O R F V、A u s d y k ウイルス、B P S V、アザラシ痘ウイルスなど）を処置もしくは予防するための治療剤として、異種遺伝子発現のためのビヒクルとして、または腫瘍溶解剤として、使用され得る。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、V A R V 感染に対して保護するためのワクチンとして使用され得る。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、V A R V 感染を処置または予防するために使用され得る。

10

【0139】

合成キメラポックスウイルスを産生する方法

本発明は、ウイルスゲノムの化学的に合成された重複する二本鎖 D N A 断片から、機能的合成キメラポックスウイルス（s c P V）を合成、再活性化および単離するためのシステムおよび方法を提供する。ウイルスゲノムの重複する D N A 断片の組換えおよび機能的 s c P V の再活性化は、ヘルパーウイルスに先に感染した細胞において実施される。簡潔に述べると、s c P V のウイルスゲノムの全てまたは実質的に全てを包含する重複する D N A 断片は、化学的に合成され、ヘルパーウイルス感染細胞中にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた細胞は、ヘルパーウイルスおよび再活性化された s c P V を含む混合ウイルス子孫を産生するために培養される。次に、混合ウイルス子孫は、ヘルパーウイルスを排除し、合成キメラポックスウイルスを回収するために、ヘルパーウイルスの増殖を支持しないが合成キメラポックスウイルスを増殖させる宿主細胞上にプレATING される。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、宿主細胞に感染しない。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、宿主細胞に感染できるが、宿主細胞中ではあまり増殖しない。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、s c P V と比較して、宿主細胞においてより緩徐に増殖する。

20

【0140】

一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムの実質的に全てが、化学的に合成された D N A に由来する。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムの約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、99 % 超または 100 % が、化学的に合成された D N A に由来する。一部の実施形態では、ポックスウイルスゲノムは、化学的に合成された D N A および天然に存在する D N A の組合せに由来する。

30

【0141】

本発明の方法において使用される重複する D N A 断片の数は、ポックスウイルスゲノムのサイズに依存する。実務上の考慮事項、例えば、一方では断片の数が増加するにつれた、組換え効率における低減、および他方では断片の数が減少するにつれた、非常に大きい D N A 断片を合成する際の困難もまた、本発明の方法において使用される重複する断片の数についての情報を与える。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、単一の断片として合成され得る。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、2 ~ 14 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、4 ~ 12 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、6 ~ 10 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、8 ~ 12 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、8 ~ 10、10 ~ 12 または 10 ~ 14 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラポックスウイルスゲノムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 個の重複する D N A 断片からアセンブルされる。一部の実施形態では、合成キメラ

40

50

ボックスウイルスゲノムは、10個の重複するDNA断片からアセンブルされる。本開示の例示的な実施形態では、合成キメラ馬痘ウイルス(s c H P X V)は、10個の化学的に合成された重複する二本鎖DNA断片から再活性化される。一部の実施形態では、末端ヘアピンループは、別々に合成され、ボックスウイルスゲノムの左および右終端を含む断片にライゲートされる。一部の実施形態では、末端ヘアピンループは、天然に存在する銹型に由来し得る。一部の実施形態では、本発明のs c P Vの末端ヘアピンは、V A C Vに由来する。一部の実施形態では、末端ヘアピンは、C M L V、C P X V、E C T V、H P X V、M P X V、R P X V、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病ウイルスまたはV P Vに由来する。一部の実施形態では、末端ヘアピンは、そのゲノムが完全に配列決定された任意のボックスウイルス、またはゲノム配列決定のために利用可能な天然の単離体の末端ヘアピンに基づく。一部の実施形態では、ボックスウイルスゲノムを包含する断片の全てが、化学的に合成される。一部の実施形態では、1つまたは複数の断片が化学的に合成され、1つまたは複数の断片が、天然に存在するDNAに由来する(例えば、P C R増幅によって、または十分確立された組換えDNA技術によって)。

10

【0142】

本発明の方法において使用される重複する断片のサイズは、ボックスウイルスゲノムのサイズに依存する。断片サイズには広いバリエーションが存在し得、種々の実務上の考慮事項、例えば、非常に大きいDNA断片を化学的に合成する能力が、断片サイズの選択についての情報を与えることが理解される。一部の実施形態では、断片は、約2,000bp~約50,000bpのサイズ範囲である。一部の実施形態では、断片は、約3,000bp~約45,000bpのサイズ範囲である。一部の実施形態では、断片は、約4,000bp~40,000bpのサイズ範囲である。一部の実施形態では、断片は、約5,000bp~35,000bpのサイズ範囲である。一部の実施形態では、最も大きい断片は、約20,000bp、21,000bp、22,000bp、23,000bp、24,000bp、25,000bp、26,000bp、27,000bp、28,000bp、29,000bp、30,000bp、31,000bp、32,000bp、33,000bp、34,000bp、35,000bp、36,000bp、37,000bp、38,000bp、39,000bp、40,000bp、41,000bp、42,000bp、43,000bp、44,000bp、45,000bp、46,000bp、47,000bp、48,000bp、49,000bpまたは50,000bpである。本開示の例示的な実施形態では、s c H P X Vは、約8,500bp~約32,000bpのサイズ範囲の、10個の化学的に合成された重複する二本鎖DNA断片から再活性化される(表1)。

20

30

【0143】

ヘルパーウイルスは、トランスフェクトされたDNAからボックスウイルスを再活性化するために必要なトランス作用性の酵素機構を提供できる任意のボックスウイルスであり得る。ヘルパーウイルスは、産生されるs c P Vとは異なるまたはそれよりも狭い宿主細胞範囲を有し得る(例えば、ショーブ線維腫ウイルス(S F V)は、オルソボックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス(V A C V)またはH P X Vと比較して、非常に狭い宿主範囲を有する)。ヘルパーウイルスは、産生されるs c P Vと比較して、異なるブランク表現型を有し得る。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはL e p o r i p o x v i r u sである。一部の実施形態では、L e p o r i p o x v i r u sは、S F V、野兎線維腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス、リス線維腫ウイルスまたは粘液腫ウイルスである。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはS F Vである。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはO r t h o p o x v i r u sである。一部の実施形態では、O r t h o p o x v i r u sは、ラクダ痘ウイルス(C M L V)、牛痘ウイルス(C P X V)、奇肢症ウイルス(E C T V、「マウス痘因子」、H P X V、サル痘ウイルス(M P X V)、ウサギ痘ウイルス(R P X V)、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病ウイルス、V A C Vおよびハタネズミ痘ウイルス(V

40

50

PV)である。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、Avipoxvirus、Capripoxvirus、Cervidpoxvirus、Crocodylipoxvirus、Molluscipoxvirus、Parapoxvirus、SuipoxvirusまたはYatapoxvirusである。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは鶏痘ウイルスである。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、Alphaentomopoxvirus、BetaentomopoxvirusまたはGammaentomopoxvirusである。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスは、ソラレンで不活性化されたヘルパーウイルスである。本開示の例示的な実施形態では、scHPXVは、SFV感染BGMK細胞中にトランスフェクトされた重複するDNA断片から再活性化される。次いで、SFVは、BSC-40細胞上に混合ウイルス子孫をブレイディングすることによって排除される。

10

【0144】

当業者は、scPVの再活性化ならびにscPVの選択および/または単離に使用される適切な宿主細胞が、ヘルパーウイルスおよび本発明の方法によって産生されるキメラボックスウイルスの特定の組合せに依存することが理解される。ヘルパーウイルスおよびscPVの両方の増殖を支持する任意の宿主細胞が、再活性化ステップに使用され得、ヘルパーウイルスの増殖を支持しない任意の宿主細胞が、ヘルパーウイルスを排除するため、ならびにscPVを選択および/または単離するために使用され得る。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはLeporipoxvirusであり、再活性化ステップに使用される宿主細胞は、ウサギ腎臓細胞（例えば、LLC-RK1、RK13など）、ウサギ肺細胞（例えば、R9ab）、ウサギ皮膚細胞（例えば、SF1Ep、DRS、RAB-9）、ウサギ角膜細胞（例えば、SIRC）、ウサギ癌腫細胞（例えば、Oc4T/cc）、ウサギ皮膚/癌腫細胞（例えば、CTPS）、サル細胞（例えば、Ver0、BGMKなど）またはハムスター細胞（例えば、BHK-21など）から選択され得る。一部の実施形態では、ヘルパーウイルスはSFVである。

20

【0145】

本発明のscPVは、本明細書に記載されるscPVの使用を可能にする力価までウイルスを増殖させる任意の基質中で繁殖され得る。一実施形態では、基質は、対応する野生型ウイルスについて決定された力価と匹敵する力価まで、scPVを増殖させる。本発明のscPVは、ボックスウイルスによる感染に対して感受性である細胞（例えば、トリ細胞、コウモリ細胞、ウシ細胞、ラクダ細胞、カナリア細胞、ネコ細胞、シカ細胞、ウマ細胞、野禽細胞、スナネズミ細胞、ヤギ細胞、ヒト細胞、サル細胞、ブタ細胞、ウサギ細胞、アライグマ細胞、アザラシ細胞、ヒツジ細胞、スカンク細胞、ハタネズミ細胞など）において増殖され得る。かかる方法は、当業者に周知である。代表的な哺乳動物細胞には、BHK、BGMK、BRL3A、BSC-40、CEF、CEK、CHO、COS、CVI、HaCaT、HEL、HeLa細胞、HEK293、ヒト骨骨肉腫細胞株143B、MDCk、NIH/3T3、Ver0細胞などが含まれるがこれらに限定されない。ウイルス単離のために、scPVは、典型的には周知の清澄化手順、例えば、勾配遠心分離およびカラムクロマトグラフィーなどによって細胞培養物から除去され、細胞性成分から分離され、当業者に周知の手順、例えばブランクアッセイを使用して、必要に応じてさらに精製され得る。

30

40

【0146】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は、機能的合成キメラボックスウイルス(scPV)を産生するためのポリヌクレオチド（例えば、二本鎖DNA断片）を提供する。本発明は、合成DNA（例えば、化学的に合成されたDNA、PCR増幅されたDNA、操作されたDNA、ヌクレオシドアナログを含むポリヌクレオチドなど）から機能的scPVを産生するための方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、ウイルスゲノムの化学的に合成された重複する二本鎖DNA断片から機能的scPVを産生するための方法を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、公に利用可能なゲノム配列に基づいて設計され得る。ボックスウイルスの天然

50

の単離体が容易に入手可能である場合、ウイルスゲノムが、本発明のポリヌクレオチドを選択および設計する前に配列決定され得る。あるいは、ボックスウイルスの部分的DNA配列が、例えば、臨床的単離体から、法医学的試料から、または感染した人と関連する材料からPCR増幅されたDNAから入手可能である場合、部分的ウイルスゲノムが、本発明のポリヌクレオチドを選択および設計する前に配列決定され得る。本発明のscPV、および従って、本発明のポリヌクレオチドは、天然に存在する株、バリエーションもしくは変異体、変異誘発されたウイルスまたは遺伝的に操作されたウイルスのゲノム配列に基づき得る。

【0147】

本発明は、参照ボックスウイルスゲノム配列またはその相補体の全てまたは一部分に対して少なくとも90%同一（例えば、少なくとも91%、92%、93%または94%同一）、少なくとも95%同一（例えば、少なくとも96%、97%、98%または99%同一）または100%同一であるヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明の単離されたポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチド分子（例えば、参照ボックスウイルスゲノムまたはその断片）の、少なくとも5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000bpまたはそれよりも大きい連続するまたは非連続のヌクレオチドを含み得る。当業者は、これらの核酸に対して相補的な核酸配列、およびこれらの核酸のバリエーションもまた本発明の範囲内であることを理解する。さらなる実施形態では、本発明の核酸配列は、単離された、組換えの、および/もしくは異種ヌクレオチド配列と融合された、またはDNAライブラリー中であり得る。

【0148】

一部の態様では、本発明は、ボックスウイルスが、Avipoxvirus、Capripoxvirus、Cervidpoxvirus、Crocodylipoxvirus、Leporipoxvirus、Molluscipoxvirus、Orthopoxvirus、Parapoxvirus、SuipoxvirusまたはYatapoxvirus属から選択される、scPVを産生するためのポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ボックスウイルスはOrthopoxvirusである。一部の実施形態では、Orthopoxvirusは、ラクダ痘ウイルス(CMLV)、牛痘ウイルス(CPXV)、奇肢症ウイルス(ECTV、「マウス痘因子」、HPXV、サル痘ウイルス(MPXV)、ウサギ痘ウイルス(RPXV)、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシギシュー病ウイルス、VACV、痘瘡ウイルス(VARV)およびハタネズミ痘ウイルス(VPV)から選択される。好ましい実施形態では、ボックスウイルスはHPXVである。別の好ましい実施形態では、ボックスウイルスはVACVである。別の好ましい実施形態では、ボックスウイルスは、VACVのACAM2000クローンである。別の好ましい実施形態では、ボックスウイルスは、VACV株IOC(VACV-IOC)(Genbank受託番号KT184690およびKT184691)である。別の好ましい実施形態では、scVACVゲノムは、改変ワクシニアウイルスAnkara(Genbank受託番号U94848; Genbank受託番号AY603355)に基づく。さらに別の好ましい実施形態では、scVACVゲノムは、MVA-BN(Genbank受託番号DQ983238)に基づく。一部の実施形態では、ボックスウイルスはParapoxvirusである。一部の実施形態では、Parapoxvirusは、オルフウイルス(ORFV)、偽牛痘ウイルス(PCPV)、牛丘疹性口炎ウイルス(BPSV)、リスバラボックスウイルス(SPPV)、アカシカバラボックスウイルス、Ausdykウイルス、シャモア伝染性膿瘡ウイルス、トナカイバラボックスウイルスまたはアザラシ痘ウイルスから選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスはMolluscipoxvirusである。一部

の実施形態では、Molluscipoxvirusは伝染性軟属腫ウイルス(MCV)である。一部の実施形態では、ボックスウイルスはYatapoxvirusである。一部の実施形態では、Yatapoxvirusは、タナボックスウイルスまたはヤバサル腫瘍ウイルス(YMTV)から選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスはCapripoxvirusである。一部の実施形態では、Capripoxvirusは、羊痘、山羊痘またはランピースキン病ウイルスから選択される。一部の実施形態では、ボックスウイルスはSuipoxvirusである。一部の実施形態では、Suipoxvirusはブタボックスウイルスである。一部の実施形態では、ボックスウイルスはLeporipoxvirusである。一部の実施形態では、Leporipoxvirusは、粘液腫ウイルス、ショーブ線維腫ウイルス(SFV)、リス線維腫ウイルスまたは野兎線維腫ウイルスから選択される。新たなボックスウイルス(例えば、オルソボックスウイルス)が、なおも絶えず発見されている。本発明のscPVは、かかる新たに発見されたボックスウイルスに基づき得ることが理解される。

【0149】

一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株CMS(Genbank受託番号AY009089.1))に基づくCMLVである。一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株Brighton Red(Genbank受託番号AF482758)、株GRI-90(Genbank受託番号X94355))に基づくCPXVである。一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株Moscow(Genbank受託番号NC_004105))に基づくECTVである。一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株Zaire-96-1-16(Genbank受託番号AF380138))に基づくMPXVである。一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株Utrecht(Genbank受託番号AY484669))に基づくRPXVである。一部の態様では、scPVは、そのゲノムが公開されたゲノム配列(例えば、株Dahomey 1968(Genbank受託番号NC_008291))に基づくアレチネズミ痘ウイルスである。

【0150】

一態様では、本発明は、合成キメラ馬痘ウイルス(scHPXV)を産生するためのポリヌクレオチドを提供する。具体的な実施形態では、scHPXVゲノムは、HPXV株MNR-76について記載されたゲノム配列(配列番号49)に基づき得る(Tulman ER、Delhon G、Afonso CL、Lu Z、Zsak L、Sandybaev NTら、Genome of horsepox virus. Journal of virology. 2006年; 80巻(18号): 9244~58頁)。このゲノム配列は、不完全であり、末端ヘアピンループの配列を含まないようである。ワクシニアウイルス(VACV)由来の末端ヘアピンループは、本発明の方法を使用して機能的scHPXV粒子を産生するために、HPXVゲノムの終端にライゲートされ得ることが、本明細書で示される。HPXVゲノムは、本開示の実施例に記載され、表1に示されるように、10個の重複する断片へと分割され得る。一部の実施形態では、ゲノムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の重複する断片へと分割され得る。一部の実施形態では、ゲノム全体が、1つの断片として提供され得る。例示的な重複する断片のゲノム位置および断片サイズは、表1に示される。表2は、基礎的配列と比較してこれらの断片においてなされ得る改変の一部を示す。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1~10に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸配列を含む。一部の実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、これらの配列のバリエーションを含み、かかるバリエーションは、ミスセンス変異、ナンセンス変異、重複、欠失および/または付加を含み得る。配列番号11および配列番号12は、VACV(WR株)末端ヘアピンループのヌクレオチド配列を示す。一部の実施形態では、末端ヘアピンループは、配列番号11または配列番号12に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、9

3 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %同一である核酸配列を含む。

【0151】

本発明は、参照HPXVゲノム配列（例えば、配列番号49）の全てまたは一部分に対して少なくとも90 %同一（例えば、少なくとも91 %、92 %、93 %または94 %同一）、少なくとも95 %同一（例えば、少なくとも96 %、97 %、98 %または99 %同一）または100 %同一であるヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、参照配列のバリエーションを含み、かかるバリエーションは、ミスセンス変異、ナンセンス変異、重複、欠失および/または付加を含み得る。本発明の単離されたポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチド分子（例えば、配列番号49またはその一部分が含まれるがこれらに限定されない参照HPXVゲノム）の、少なくとも5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000 bpまたはそれよりも大きい連続するまたは非連続のヌクレオチドを含み得る。

10

【0152】

別の態様では、本発明は、合成キメラVACV (scVACV) を産生するためのポリヌクレオチドを提供する。具体的な実施形態では、scVACVゲノムは、公開されたVACVゲノムに基づく。具体的な実施形態では、scVACVゲノムは、株ACAM2000 (Genbank 受託番号AY313847) に基づく。具体的な実施形態では、scVACVゲノムは、VACV - IOC (Genbank 受託番号KT184690およびKT184691) に基づく。具体的な実施形態では、scVACVゲノムは、改変ワクシニアウイルスAnkara (Genbank 受託番号U94848; Genbank 受託番号AY603355) に基づく。具体的な実施形態では、scVACVゲノムは、MVA - BN (Genbank 受託番号DQ983238) に基づく。VACVゲノムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の重複する断片へと分割され得る。一部の実施形態では、ゲノム全体が、1つの断片として提供され得る。具体的な実施形態では、VACVゲノムは、表7に示される9個の重複する断片へと分割される。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号50～58に対して少なくとも65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %同一である核酸配列を含む。一部の実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、これらの配列のバリエーションを含み、かかるバリエーションは、ミスセンス変異、ナンセンス変異、重複、欠失および/または付加を含み得る。他の実施形態では、scVACVゲノムは、Western Reserve (Genbank 受託番号NC006998; Genbank 受託番号AY243312)、CL3 (Genbank 受託番号AY313848)、Tian Tian (Genbank 受託番号AF095689.1)、Tian TianクローンTT9 (JX489136)、TP3 (Genbank 受託番号KC207810) およびTP5 (Genbank 受託番号KC207811)、NYCBH、Wyeth、Copenhagen (Genbank 受託番号M35027)、Lister 107 (Genbank 受託番号DQ121394)、Lister - LO (Genbank 受託番号AY678276)、改変ワクシニアウイルスAnkara (MVA) (Genbank 受託番号U94848; Genbank 受託番号AY603355)、MVA - BN (Genbank 受託番号DQ983238)、Lederle、TashkentクローンTKT3 (Genbank 受託番号KM044309) およびTKT4 (KM044310)、USSR、Evans、Praha、LIVP、Ikeda、IHD - W (Genbank 受託番号KJ125439)、LC16m8 (AY678275)、EM - 63、IC、Malbran、Duke (Genbank 受託番号DQ439815)、37

20

30

40

50

37 (Genbank 受託番号 DQ377945)、CV-1、Connaught Laboratories、CVA (Genbank 受託番号 AM501482)、Serror ウイルス (Genbank 受託番号 KF179385)、Cantaglo ウイルス単離体 CM-01 (Genbank 受託番号 KT013210)、Dryvax クローン DPP15 (Genbank 受託番号 JN654981)、DPP20 (Genbank 受託番号 JN654985)、DPP13 (Genbank 受託番号 JN654980)、DPP17 (Genbank 受託番号 JN654983)、DPP21 (Genbank 受託番号 JN654986) から選択される VACV 株に基づく。VACV ゲノムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 個の重複する断片へと分割され得る。一部の実施形態では、ゲノム全体が、1つの断片として提供され得る。

10

【0153】

一実施形態では、本発明は、参照ゲノム配列またはその相補体 (例えば、VACV) の全てまたは一部分に対して少なくとも 90% 同一 (例えば、少なくとも 91%、92%、93% または 94% 同一)、少なくとも 95% 同一 (例えば、少なくとも 96%、97%、98% または 99% 同一) または 100% 同一であるヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、参照配列のバリエーションを含み、かかるバリエーションは、ミスセンス変異、ナンセンス変異、重複、欠失および/または付加を含み得る。本発明の単離されたポリヌクレオチドは、参照ゲノムまたはその部分の、少なくとも 5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000 bp またはそれよりも大きい連続するまたは非連続のヌクレオチドを含み得る。

20

【0154】

本明細書に開示されるポリヌクレオチド配列のいずれかに対して相補的なポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。ポリヌクレオチドは、一本鎖 (コードまたはアンチセンス) または二本鎖であり得、DNA (ゲノムまたは合成) または RNA 分子であり得る。RNA 分子には、mRNA 分子が含まれる。さらなるコードまたは非コード配列が、本発明のポリヌクレオチド内に存在し得るが、しなくてもよく、ポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持体材料に連結され得るが、されなくてもよい。

30

【0155】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、2つの配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、以下に記載されるように最大の対応を求めてアラインした場合に同じである場合、「同一」とされ得る。2つの配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局所的領域を同定し比較するために、比較ウィンドウにわたって配列を比較することによって実施される。本明細書で使用する場合、「比較ウィンドウ」は、2つの配列が最適にアラインされた後に、配列が、同じ数の連続する位置の参照配列と比較され得る、少なくとも約 20 連続する位置、通常は 30 ~ 約 75 または 40 ~ 約 50 連続する位置のセグメントを指す。ポリヌクレオチドまたはバリエーションもまた、またはあるいは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドに対して実質的に相同であり得る。かかるポリヌクレオチドバリエーションは、本発明のポリヌクレオチド (またはその相補体) に、中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが可能である。

40

【0156】

適切な「中程度にストリンジェントな条件」は、5 × SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0) の溶液中で事前洗浄すること; 50 ~ 65 °C、5 × SSC で一晩ハイブリダイズさせること; その後、0.1% SDS を含む 2 ×、0.5 × および 0.2 × SSC の各々で、65 °C で 20 分間 2 回洗浄することを含む。

【0157】

50

本明細書で使用する場合、「高度にストリンジェントな条件」または「高いストリンジェンシーの条件」は、(1)洗浄のために、低いイオン強度および高い温度、例えば、50 で、0.015 M 塩化ナトリウム / 0.0015 M クエン酸ナトリウム / 0.1 % デシル硫酸ナトリウムを使用するもの；(2)ハイブリダイゼーションの間に、42 で、750 mM 塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む pH 6.5 の 0.1 % ウシ血清アルブミン / 0.1 % Ficoll / 0.1 % ポリビニルピロリドン / 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液と共に、変性剤、例えば、ホルムアミド、例えば、50 % (v/v) ホルムアミドを使用するもの；または(3)42 の $0.2 \times \text{SSC}$ (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム) および 55 の 50 % ホルムアミド中での洗浄と、その後の、55 での、EDTA を含む $0.1 \times \text{SSC}$ からなる高いストリンジェンシーの洗浄と共に、42 で、50 % ホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ (0.75 M NaCl、0.075 M クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1 % ピロリン酸ナトリウム、 $5 \times$ デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子 DNA ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$)、0.1 % SDS および 10 % デキストラン硫酸を使用するものである。当業者は、例えばプローブ長さなどの因子を適応させるために、必要に応じて、温度、イオン強度などを調整する方法を認識する。

【0158】

本発明のポリヌクレオチドは、化学的合成、組換え法または PCR を使用して得ることができる。化学的ポリヌクレオチド合成の方法は、当技術分野で周知であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。当業者は、所望の DNA 配列を産生するために、本明細書で提供される配列、および市販の DNA 合成機を使用できる。

【0159】

組換え法を使用してポリヌクレオチドを調製するために、所望の配列を含むポリヌクレオチドが、本明細書でさらに議論されるように、適切なベクター中に挿入され得、このベクターが次に、複製および増幅に適切な宿主細胞中に導入され得る。ポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の任意の手段によって宿主細胞中に挿入され得る。細胞は、直接的取込み、エンドサイトーシス、トランスフェクション、F 接合またはエレクトロポレーションによって外因性ポリヌクレオチドを導入することによって形質転換される。いったん導入されると、外因性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター (例えば、プラスミド) として細胞内に維持され得、または宿主細胞ゲノム中に組み込まれ得る。そうして増幅されたポリヌクレオチドは、当技術分野で周知の方法によって、宿主細胞から単離され得る。例えば、Sambrookら、1989年を参照のこと。

【0160】

あるいは、PCR が、DNA 配列の再生産を可能にする。PCR テクノロジーは、当技術分野で周知であり、米国特許第 4,683,195 号、同第 4,800,159 号、同第 4,754,065 号および同第 4,683,202 号、ならびに PCR: The Polymerase Chain Reaction、Mullisら編、Birkhäuser Press、Boston、1994年に記載されている。

【0161】

RNA は、適切なベクター中の単離された DNA を使用し、それを適切な宿主細胞中に挿入することによって得ることができる。細胞が複製し、DNA が RNA に転写される場合、RNA は、例えば、Sambrookら、1989年、上記に示されるように、当業者に周知の方法を使用して単離され得る。

【0162】

他の実施形態では、本発明の核酸は、高度にストリンジェントな条件下で、配列番号 1 ~ 10 もしくは 50 ~ 58 に示されるヌクレオチド配列、またはそれに対して相補的な配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列もまた含む。当業者は、DNA ハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジェンシーの条件が変動し得ることを容易に理解する。例えば、約 45 で $6.0 \times$ 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) でハイブリダイゼーションを実施し、その後、50 で $2.0 \times \text{SSC}$ での洗浄を実施することが

できる。例えば、洗浄ステップにおける塩濃度は、50 で約 $2.0 \times SSC$ の低いストリンジェンシーから、50 で約 $0.2 \times SSC$ の高いストリンジェンシーまでで選択され得る。さらに、洗浄ステップにおける温度は、室温、約 22 での低いストリンジェンシーの条件から、約 65 での高いストリンジェンシーの条件まで増加し得る。温度および塩は共に変動し得、または温度もしくは塩濃度は、他の変数を変化させながら、一定に維持され得る。一実施形態では、本発明は、室温で $6 \times SSC$ の低いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズし、その後室温で $2 \times SSC$ で洗浄される核酸を提供する。

【0163】

遺伝コードにおける縮重に起因して異なる単離された核酸もまた、本発明の範囲内である。例えば、いくつかのアミノ酸は、1つよりも多い三つ組によって指定される。同じアミノ酸または同義語を特定するコドン（例えば、CAUおよびCACは、ヒスチジンについて同義語である）は、タンパク質のアミノ酸配列を変更しない「サイレント」変異を生じ得る。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1つまたは複数のヌクレオチド（ヌクレオチドの最大で約3~5%）におけるこれらのバリエーションが、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、所与の種のメンバー間に存在し得ることを理解する。任意のおよび全てのかかるヌクレオチドのバリエーションおよび生じるアミノ酸多型は、本発明の範囲内である。

10

【0164】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングする際に有用な組換えクローニングベクターおよび発現ベクターをさらに提供する。本発明は、本発明のポリヌクレオチド分子もしくは組換えベクターを含む形質転換された宿主細胞、およびそれらに由来する新規株または細胞株をさらに提供する。

20

【0165】

宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、糸状菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞であり得る。一部の実施形態では、宿主細胞はE. coliである。とりわけ、ファージ、高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミドおよびシャトルベクターが含まれる種々の異なるベクターが、これらの宿主細胞の各々における特異的な使用のために開発されており、これらのいずれかが、本発明を実施するために使用され得る。

【0166】

適切なクローニングベクターは、標準的な技術に従って構築され得、または当技術分野で入手可能な多数のクローニングベクターから選択され得る。選択されるクローニングベクターは、使用が意図される宿主細胞に従って変動し得るが、有用なクローニングベクターは一般に、自己複製する能力を有し、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する単一の標的を保有し得、および/またはベクターを含むクローンを選択する際に使用され得るマーカーの遺伝子を保有し得る。適切な例には、プラスミドおよび細菌ウイルス、例えば、pBAD18、pUC18、pUC19、Bluescript（例えば、pBS SK+）およびその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびにシャトルベクター、例えば、pSA3およびpAT28が含まれる。これらのおよび多くの他のクローニングベクターが、BioRad、StratageneおよびInvitrogenなどの販売業者から入手可能である。

30

40

【0167】

本発明のクローニングベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を補助するために、ベクターは、レポーター遺伝子産物または他の選択可能なマーカーのコード配列をさらに含むように操作され得る。かかるコード配列は、好ましくは、上記のように、調節エレメントコード配列と、動作可能な関連状態にある。本発明において有用なレポーター遺伝子は、当技術分野で周知であり、とりわけ、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、xy1Eおよびチロシナーゼをコードするものが含まれる。選択可能なマーカーをコードするヌクレオチド配列は、当技術分野で周知であり、抗生物質もしくは代謝拮抗薬に対する耐性を付与する遺伝子産物をコードするもの、または栄養要求性の要件

50

を満たすものが含まれる。かかる配列の例には、とりわけ、アンピシリン、エリスロマイシン、チオストレプトンまたはカナマイシンに対する耐性をコードするものが含まれる。

【0168】

目的のポリヌクレオチドを含むベクターおよび/またはポリヌクレオチド自体は、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランまたは他の物質を使用するトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染（例えば、ベクターが、ワクシニアウイルスなどの感染性因子である場合）を含む、いくつかの適切な手段のいずれかによって、宿主細胞中に導入され得る。ベクターまたはポリヌクレオチドを導入する選択肢は、宿主細胞の特色にしばしば依存する。

10

【0169】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド分子もしくは組換えベクターを含む形質転換された宿主細胞、およびそれらに由来する新規株または細胞株をさらに提供する。一部の実施形態では、本発明の実施において有用な宿主細胞は、E.coli細胞である。典型的には、American Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110、USAおよび市販の供給源から入手可能な、例えば、E.coli TOP10またはE.coli BL21 (DE3)、DH5などのE.coliの株が、使用され得る。一部の実施形態では、他の原核生物細胞または真核生物細胞が使用され得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、Clostridium、Zymomonas、Escherichia、Salmonella、Serratia、Erwinia、Klebsiella、Shigella、Rhodococcus、Pseudomonas、Bacillus、Lactobacillus、Enterococcus、Alcaligenes、Paenibacillus、Arthrobacter、Corynebacterium、Brevibacterium、Schizosaccharomyces、Kluyveromyces、Yarrowia、Pichia、Candida、PichiaまたはSaccharomycesから選択される属のメンバーである。かかる形質転換された宿主細胞には、典型的には、微生物、例えば、とりわけ、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAもしくはコスミドDNAベクターで形質転換された細菌、または組換えベクターで形質転換された酵母が含まれるがこれらに限定されない。好ましい真核生物宿主細胞には酵母細胞が含まれるが、哺乳動物細胞または昆虫細胞もまた、効率的に利用され得る。適切な宿主細胞には、原核生物（例えば、E.coli、B.subtilis、S.lividansまたはC.glutamicum）および酵母（例えば、S.cerevisiae、S.pombe、P.pastorisまたはK.lactis）が含まれる。

20

30

【0170】

一態様では、本発明は、scPV、その組換え体のゲノム、またはそれらの機能的一部もまた含む。ウイルスゲノムの機能的一部は、タンパク質またはその部分（例えば、ドメイン、エピトープなど）をコードするゲノムの一部分、プロモーター、エンハンサー、シスもしくはトランス作用性エレメントなどの調節エレメント、または調節エレメントの成分を含む一部分などであり得る。かかるウイルス配列は、例えば、PCR、ハイブリダイゼーションテクノロジーを使用することによって、またはELISAアッセイを確立することによって、ウイルスまたはその組換え体を同定または単離するために使用され得る。

40

【0171】

例示的な使用

病原性ポックスウイルス感染の予防または処置

本発明の合成キメラポックスウイルス（scPV）は、病原性ポックスウイルス感染に対する対象の免疫化において使用され得る。本発明のscPVは、対象において1つまたは複数の病原性ポックスウイルス感染を予防、管理または処置するために使用され得る。一部の実施形態では、病原性ポックスウイルスは、Orthopoxvirus（例えば

50

、ラクダ痘ウイルス（CMLV）、牛痘ウイルス（CPXV）、奇肢症ウイルス（ECTV、「マウス痘因子」）、HPXV、サル痘ウイルス（MPXV）、ウサギ痘ウイルス（RPXV）、アライグマ痘ウイルス、スカンク痘ウイルス、アレチネズミ痘ウイルス、ウアシングシュー病ウイルス、ワクシニアウイルス（VACV）、痘瘡ウイルス（VARV）およびハタネズミ痘ウイルス（VPV）である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスは、Parapoxvirus（例えば、オルフウイルス（ORFV）、偽牛痘ウイルス（PCPV）、牛丘疹性口炎ウイルス（BPSV）、リスバラボックスウイルス（SPPV）、アカシカパラボックスウイルス、Ausdykウイルス、シャモア伝染性膿瘡ウイルス、トナカイパラボックスウイルスまたはアザラシ痘ウイルス）である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスは、Molluscipoxvirus（例えば、伝染性軟属腫ウイルス（MCV））である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスは、Yatapoxvirus（例えば、タナボックスウイルスまたはヤバサル腫瘍ウイルス（YMTV））である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスは、Capripoxvirus（例えば、羊痘、山羊痘またはランピースキン病ウイルス）である。一部の実施形態では、ボックスウイルスは、Suipoxvirus（例えば、ブタボックスウイルス）である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスは、Leporipoxvirus（例えば、粘液腫ウイルス、ショープ線維腫ウイルス（SFV）、リス線維腫ウイルスまたは野兎線維腫ウイルス）である。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスはVARVである。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスはMPXVである。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスはMCVである。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスはORFVである。一部の実施形態では、病原性ボックスウイルスはCPXVである。病原性ボックスウイルスは、ボックスウイルスのシュードタイプまたはキメラであり得る。一部の実施形態では、対象はヒト対象である。一部の実施形態では、対象は動物対象である。新たなボックスウイルス（例えば、オルソボックスウイルス）が、なおも絶えず発見されている。本発明のscPVは、新たに発見された病原性ボックスウイルスに対する対象の免疫化において、または新たに発見された病原性ボックスウイルスによる感染の予防、管理もしくは処置において使用され得ることが理解される。

10

20

30

40

50

【0172】

本発明のscPVは、免疫原性製剤、例えば、ワクチン製剤において使用され得る。製剤は、病原性ボックスウイルス感染を予防、管理、中和、処置および／または寛解するために使用され得る。免疫原性製剤は、本発明の生または不活性化scPVのいずれかを含み得る。scPVは、当業者に周知の方法によって不活性化され得る。一般的な方法は、不活性化のためにホルマリンおよび熱を使用する。一部の実施形態では、免疫原性製剤は、生ワクチンを含む。かかる生免疫原性製剤の産生は、細胞培養物におけるscPVの繁殖とその後の精製を含む従来の方法を使用して達成され得る。例えば、scPVは、当業者によって決定されるように、BHK、BGMK、BRL3A、BSC-40、CEF、CEK、CHO、COS、CVI、HaCaT、HEL、HeLa細胞、HEK293、ヒト骨骨肉腫細胞株143B、MDCK、NIH/3T3、Vero細胞などにおいて培養され得る。

【0173】

一態様では、本発明のscPVは、天然痘を予防、管理または処置するために使用され得る。本発明のscPV（例えば、合成キメラHPXV（scHPXV）または合成キメラVACV（scVACV））は、天然痘に曝露された、潜在的に曝露される、または曝露のリスクがある個体または集団における天然痘の予防のためのワクチンとして使用され得る。本発明のscPV（例えば、本発明のscHPXVまたはscVACV）は、天然痘ワクチンの新たな国家備蓄品を創出するために使用され得る。一部の実施形態では、本発明のscPVは、ファースト・レスポnderなどの防衛職員に、予防的に投与され得る。

【0174】

一実施形態では、本発明の s c H P X V を含む組成物は、天然痘ワクチンとして使用される。本発明の方法に従って産生された s c H P X V は、小さいブランクの表現型を有することが本明細書で示される。一般に、小さいブランクの表現型は、弱毒化を反映するとみなされる。従って、本発明の方法に従って産生された s c H P X V は、既存の天然痘ワクチンに対する安全な代替法を提供する。一部の実施形態では、ワクチンは、既存の天然痘ワクチンからの重症合併症に罹患し得、従って、既存の天然痘ワクチンが禁忌である、免疫抑制対象（例えば、H I V 患者、化学療法を受けている患者、がん、リウマチ学的障害または自己免疫性障害に対する処置を受けている患者、臓器または組織移植を受けているまたは受けた患者、免疫不全を有する患者、小児、妊娠女性、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、心臓状態を有する患者、および免疫抑制薬使用中の患者など）への投与にとって安全であり得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、1 つまたは複数の抗ウイルス処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、プリンシドホビル処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、テコピリマット (tecovirimat) / S I G A - 2 4 6 処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、非環式ヌクレオシドホスホネート (シドホビル)、非環式ヌクレオシドホスホネート (acyclic nucleoside or phosphonates) の経口アルコキシアルキルプロドラッグ (プリンシドホビルまたは C M X 0 0 1) と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ワクシニア免疫グロブリン (V I G) と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、V A C V、V A R V または H P X V に由来するペプチドまたはタンパク質抗原で先に免疫化された対象において使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、死滅または不活性化された V A C V で先に免疫化された対象において使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、複製欠損 (d e f i c i e n t / d e f e c t i v e) V A C V ウイルス株である M V A (改変ウイルス A n k a r a) で先に免疫化された対象において使用され得る。本発明の s c H P X V を含むワクチン製剤は、生または不活性化 s c H P X V のいずれかを含み得る。

10

20

30

40

50

【0175】

一実施形態では、本発明の s c V A C V を含む組成物は、天然痘ワクチンとして使用される。s c V A C V は、A C A M 2 0 0 0 (G e n b a n k 受託番号 A Y 3 1 3 8 4 7)、W e s t e r n R e s e r v e (G e n b a n k 受託番号 N C 0 0 6 9 9 8; G e n b a n k 受託番号 A Y 2 4 3 3 1 2)、C L 3 (G e n b a n k 受託番号 A Y 3 1 3 8 4 8)、T i a n T i a n (G e n b a n k 受託番号 A F 0 9 5 6 8 9 . 1)、T i a n T i a n クローン T T 9 (J X 4 8 9 1 3 6)、T P 3 (G e n b a n k 受託番号 K C 2 0 7 8 1 0) および T P 5 (G e n b a n k 受託番号 K C 2 0 7 8 1 1)、N Y C B H、W y e t h、C o p e n h a g e n (G e n b a n k 受託番号 M 3 5 0 2 7)、L i s t e r 1 0 7 (G e n b a n k 受託番号 D Q 1 2 1 3 9 4)、L i s t e r - L O (G e n b a n k 受託番号 A Y 6 7 8 2 7 6)、改変ワクシニアウイルス A n k a r a (M V A) (G e n b a n k 受託番号 U 9 4 8 4 8; G e n b a n k 受託番号 A Y 6 0 3 3 5 5)、M V A - B N (G e n b a n k 受託番号 D Q 9 8 3 2 3 8)、L e d e r l e、T a s h k e n t クローン T K T 3 (G e n b a n k 受託番号 K M 0 4 4 3 0 9) および T K T 4 (K M 0 4 4 3 1 0)、U S S R、E v a n s、P r a h a、L I V P、I k e d a、I H D - W (G e n b a n k 受託番号 K J 1 2 5 4 3 9)、L C 1 6 m 8 (A Y 6 7 8 2 7 5)、E M - 6 3、I C、M a l b r a n、D u k e (G e n b a n k 受託番号 D Q 4 3 9 8 1 5)、3 7 3 7 (G e n b a n k 受託番号 D Q 3 7 7 9 4 5)、C V - 1、C o n n a u g h t L a b o r a t o r i e s、C V A (G e n b a n k 受託番号 A M 5 0 1 4 8 2)、S e r r o 2 ウイルス (G e n b a n k 受託番号 K F 1 7 9 3 8 5)、C a n t a g l o ウイルス単離体 C M - 0 1 (G e n b a n k 受託番号 K T 0 1 3 2 1 0)、D r y v a x クローン D P P 1 5 (G e n b a n k 受託番号 J N 6 5 4 9 8 1)、D P P 2 0 (G e n b a n k 受託番号 J N 6 5 4 9 8 5)、D P P 1 3 (G e n b a n k 受託番号 J N 6 5 4 9 8 0)、D P P 1 7 (G e n b a n k 受託番号 J N 6 5 4 9 8 3)、

D P P 2 1 (G e n b a n k 受託番号 J N 6 5 4 9 8 6) ならびに I O C (G e n b a n k 受託番号 K T 1 8 4 6 9 0 および K T 1 8 4 6 9 1) から選択される V A C V 株であり得る。一実施形態では、天然痘ワクチンとして使用される s c V A C V は、株 A C A M 2 0 0 0 (G e n b a n k 受託番号 A Y 3 1 3 8 4 7) に基づく。一実施形態では、天然痘ワクチンとして使用される s c V A C V は、株 V A C V - I O C (G e n b a n k 受託番号 K T 1 8 4 6 9 0 および K T 1 8 4 6 9 1) に基づく。一実施形態では、天然痘ワクチンとして使用される s c V A V C は、株 M V A (G e n b a n k 受託番号 U 9 4 8 4 8 ; G e n b a n k 受託番号 A Y 6 0 3 3 5 5) に基づく。一実施形態では、天然痘ワクチンとして使用される s c V A C V は、株 M V A - B N (G e n b a n k 受託番号 D Q 9 8 3 2 3 8) に基づく。本発明の s c P V を含むワクチン製剤は、生または不活性化 s c V A C V のいずれかを含み得る。

10

【 0 1 7 6 】

一部の実施形態では、本発明の s c P V (例えば、s c H P X V または s c V A C V) を含む組成物は、V A C V 感染、M P X V 感染または C P X V 感染に対するワクチンとして使用される。

【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、本発明の s c P V は、異種抗原またはエピトープを発現するように設計され得、かかる抗原および / またはエピトープの供給源生物に対するワクチンとして使用され得る。

【 0 1 7 8 】

本発明の免疫原性製剤 (例えば、ワクチン) は、有効量の本発明の s c P V 、および薬学的に許容される担体を含む。用語「薬学的に許容される」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用のために、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認識された薬局方に列挙されていることを意味する。用語「担体」は、医薬組成物 (例えば、免疫原性またはワクチン製剤) がそれを用いて投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。食塩水溶液ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射用溶液のために使用され得る。適切な賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。適切な医薬担体の例は、E. W. Martin による「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。製剤は、投与の様式に適していなければならない。特定の製剤は、s c P V が生であるか不活性化されているかにも依存し得る。精製された本発明の s c P V は、後の使用のために凍結乾燥され得る、または医薬溶液中で即座に調製され得る。s c P V はまた、アジュバントまたは担体ありまたはなしで、無菌食塩水などの生理学的に許容される溶液中に希釈され得る。

20

30

【 0 1 7 9 】

本発明の免疫原性製剤 (例えば、ワクチン) は、乱切によって患者に投与され得る。ワクチンは、任意の他の標準的な投与経路によっても投与され得る。多くの方法が、免疫原性製剤 (例えば、ワクチン) を導入するために使用され得、これらには、鼻腔内、気管内、経口、真皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、結膜および皮下経路が含まれるがこれらに限定されない。鳥類では、これらの方法は、後鼻孔接種をさらに含み得る。非経口投与の代替法として、本発明は、飲用水を介してまたはスプレー中などの、農業目的のための大量投与の経路もまた包含する。あるいは、本発明の s c P V を、その天然の感染経路を介して導入することが好ましい場合がある。一部の実施形態では、本発明の免疫原性製剤は、注射用液体、ワクチンを発現する吸収可能なトランスジェニック植物、徐放性ゲル、またはインプラント可能な封入された組成物、固体インプラントもしくは核酸として投与される。免疫原性製剤は、クリーム、ローション、軟膏、皮膚パッチ、ロゼンジまたは経口液体、例えば、懸濁液、溶液および乳濁液 (水中油または油中水) 中でも投与され得る。

40

50

【0180】

ある特定の実施形態では、本発明の免疫原性製剤（例えば、ワクチン）は、感染からの完全な保護を生じないが、未処置の対象と比較して、より低い力価または低減された数の病原体（例えば、病原性ボックスウイルス）を生じる。ある特定の実施形態では、本発明の免疫原性製剤の投与は、未処置の対象と比較して、病原体の力価における、0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、25倍、50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、200倍、300倍、400倍、500倍、750倍もしくは1,000倍またはそれよりも大きい低減を生じる。病原体の力価、数または総負荷における低減の利益には、感染の症状の重症度の低下、および感染と関連する疾患または状態の長さにおける低減が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0181】

ある特定の実施形態では、本発明の免疫原性製剤（例えば、ワクチン）は、感染からの完全な保護を生じないが、未処置の対象と比較して、より低い数の症状もしくは症状の減少した強度、または減少した罹患率もしくは減少した死亡率を生じる。

【0182】

種々の実施形態では、本発明の免疫原性製剤（例えば、ワクチン）または本発明の s c P V によって生成される抗体は、感染（例えば、病原性ボックスウイルス感染）の予防のために、1つまたは複数の他の治療（例えば、抗ウイルスまたは免疫調節治療）と組み合わせて対象に投与される。他の実施形態では、本発明の免疫原性製剤または本発明の s c P V によって生成される抗体は、感染（例えば、病原性ボックスウイルス感染）の処置のために、1つまたは複数の他の治療（例えば、抗ウイルスまたは免疫調節治療）と組み合わせて対象に投与される。さらに他の実施形態では、本発明の免疫原性製剤または本発明の s c P V によって生成される抗体は、感染（例えば、病原性ボックスウイルス感染）の管理および/または寛解のために、1つまたは複数の他の治療（例えば、抗ウイルスまたは免疫調節治療）と組み合わせて対象に投与される。具体的な実施形態では、本発明の免疫原性製剤または本発明の s c P V によって生成される抗体は、天然痘の予防のために、1つまたは複数の他の治療（例えば、抗ウイルスまたは免疫調節治療）と組み合わせて対象に投与される。別の具体的な実施形態では、本発明の免疫原性製剤または本発明の s c P V によって生成される抗体は、天然痘の処置のために、1つまたは複数の他の治療（例えば、抗ウイルスまたは免疫調節治療）と組み合わせて対象に投与される。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、1つまたは複数の抗ウイルス処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、プリンシドホビル処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ウイルス複製を抑制するために、テコピリマット / S I G A - 2 4 6 処置と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、非環式ヌクレオシドホスホネート（シドホビル）、非環式ヌクレオシドホスホネートの経口アルコキシアルキルプロドラッグ（プリンシドホビルまたは C M X 0 0 1）と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、ワクシニア免疫グロブリン（V I G）と組み合わせて使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、V A C V、V A R V または H P X V に由来するペプチドまたはタンパク質抗原で先に免疫化された対象において使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、死滅または不活性化された V A C V で先に免疫化された対象において使用され得る。一部の実施形態では、ワクチンは、複製欠損（deficient/defective）V A C V ウイルス株である M V A（改変ウイルス A n k a r a）で先に免疫化された対象において使用され得る。

20

30

40

【0183】

当業者に周知の任意の抗ウイルス剤は、本発明の製剤（例えば、ワクチン製剤）および方法において使用され得る。抗ウイルス剤の非限定的な例には、その受容体へのウイルスの付着、細胞中へのウイルスの内在化、ウイルスの複製、または細胞からのウイルスの放出を阻害および/または低減する、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、抗体、核酸分子、有機分子、無機分子および小分子が含まれる。特に、抗ウイルス剤

50

には、細胞外ウイルス成熟化を遮断する抗ウイルス薬（テコビリマット／S I G A - 2 4 6）、非環式ヌクレオシドホスホネート（シドホビル）、非環式ヌクレオシドホスホネートの経口アルコキシアルキルプロドラッグ（プリンシドホビルまたはC M X 0 0 1）またはワクシニア免疫グロブリン（V I G）が含まれるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、抗ウイルス剤には、ヌクレオシドアナログ（例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル（gangcyclovir）、ピダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジンおよびリバビリン）、ホスカルネット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、アルファ - インターフェロンおよび他のインターフェロン、ならびにA Z Tが含まれるがこれらに限定されない。

【0184】

用量および投薬レジメンは、処置される対象の要求に従って、当業者によって決定され得る。当業者は、考慮因子、例えば、対象の年齢または体重、処置されている疾患または状態の重症度、および処置に対する対象の応答を考慮し得る。本発明の組成物は、例えば、必要に応じて、または毎日、投与され得る。投薬は、変動する期間にわたって行われ得る。例えば、投薬レジメンは、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間またはそれよりも長く持続し得る。一部の実施形態では、投薬レジメンは、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間またはそれよりも長く持続する。

【0185】

本発明のs c P Vは、受動免疫療法、診断または予後判定イムノアッセイなどに有用な抗体を産生するためにも使用され得る。抗体を産生する方法は、当技術分野で周知である。抗体は、免疫療法における使用前に、さらに改変（例えば、キメラ化、ヒト化など）され得る。

腫瘍溶解剤

【0186】

本発明の合成キメラボックスウイルス（s c P V）は、がん細胞において選択的に複製しそれを死滅させる腫瘍溶解剤として使用され得る。迅速に分裂している細胞、例えばがん細胞は一般に、非分裂細胞よりも、ボックスウイルス感染に対して許容的である。ボックスウイルスの多くの特色、例えば、ヒトにおける安全性、高力価ストックの産生の容易さ、ウイルス調製物の安定性、および腫瘍細胞における複製後に抗腫瘍免疫を誘導する能力は、ボックスウイルスを望ましい腫瘍溶解剤にする。本発明の方法に従って産生されたs c P Vは、それらをがんの処置にとって適切なものにする1つまたは複数の改変を含み得る。従って、一態様では、本開示は、がん細胞において死を誘導する方法であって、細胞を、単離されたs c P V、または本発明のs c P Vを含む医薬組成物と接触させるステップを含む方法を提供する。一態様では、本開示は、がんを処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の本発明のs c P Vを投与するステップを含む方法を提供する。別の態様は、がん細胞などの新生物障害細胞において死を誘導するため、またはがんなどの新生物障害を処置するための、本明細書に記載されるs c P Vまたは組成物の使用を含む。一部の実施形態では、ボックスウイルス腫瘍溶解治療は、1つまたは複数の従来のがん治療（例えば、手術、化学療法、放射線療法、温熱療法および生物学的／免疫学的治療）と組み合わせて投与される。具体的な実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本発明の合成キメラV A C V（s c V A C V）である。一部の実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本発明の合成キメラ粘液腫ウイルスである。一部の実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本発明の合成キメラH P X V（s c H P X V）である。一部の実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本発明の合成キメラアライグマ痘ウイルスである。一部の実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、本発明の合成キメラヤバ様疾患ウイルスである。

【0187】

本発明の方法を使用して、1つまたは複数の望ましい遺伝子が容易に導入され得、1つまたは複数の望ましくない遺伝子が、合成キメラボックスウイルスゲノムから容易に欠失

10

20

30

40

50

され得る。一部の実施形態では、腫瘍溶解剤としての使用のための本発明の s c P V は、それらの免疫反応性、抗腫瘍標的化および / もしくは効力、細胞から細胞への広がりならびに / またはがん特異性を増強する導入遺伝子を発現するように設計される。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、免疫調節遺伝子（例えば、G M - C S F、または T N F 機能を遮断するウイルス遺伝子）を発現するように設計または操作される。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、ビルレンスを弱毒化する因子を発現する遺伝子を含むように設計される。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、治療剤（例えば、h E P O、B M P - 4、特異的腫瘍抗原に対する抗体またはその部分など）を発現するように設計または操作される。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、弱毒化のために改変されている。一部の実施形態では、本発明の s c P V は、ウイルス T K 遺伝子を欠如するように設計または操作される。一部の実施形態では、本発明の s c V A C V は、ワクシニア増殖因子遺伝子を欠如するように設計または操作される。一部の実施形態では、本発明の s c V A C V は、ヘマグルチニン遺伝子を欠如するように設計または操作される。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 8 】

本発明の s c P V は、種々の新生物障害および / またはがんを処置するために有用である。一部の実施形態では、がんの型には、骨がん、乳がん、膀胱がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、食道がん、神経膠腫、胃がん、胃腸がん、頭頸部がん、肝がん、例えば肝細胞癌、白血病、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、皮膚がん、例えば黒色腫、精巣がんなど、または処置され得る任意の他の腫瘍もしくはブレ新生物病変が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 1 8 9 】

別の実施形態では、方法は、本明細書に記載される単離されたもしくは組換えウイルスまたは組成物が投与された対象由来の新生物障害もしくはがん細胞中および / または試料中の、投与された s c P V の存在を検出するステップをさらに含む。例えば、対象は、例えば感染の進行を評価するために、本明細書に記載される s c P V または組成物の投与前および / または投与後に試験され得る。一部の実施形態では、本開示の s c P V は、検出力セットを含み、投与されたキメラボックスウイルスの存在を検出するステップは、検出力セットにコードされたタンパク質を検出することを含む。例えば、検出力セットが蛍光タンパク質をコードする場合、対象または試料は、蛍光を可視化するための方法を使用して画像化される。

【 0 1 9 0 】

本発明の腫瘍溶解剤は、有効量の本発明の s c P V、および薬学的に許容される担体を含む。用語「薬学的に許容される」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用のために、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認識された薬局方に列挙されていることを意味する。用語「担体」は、医薬組成物（例えば、腫瘍溶解剤）がそれを用いて投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。食塩水溶液ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射用溶液のために使用され得る。適切な賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。適切な医薬担体の例は、E. W. Martin による「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。製剤は、投与の様式に適していないなければならない。

組換え遺伝子発現のためのウイルスベクター

【 0 1 9 1 】

本発明の合成キメラボックスウイルス（s c P V）は、異種配列を保有するように操作され得る。異種配列は、異なるボックスウイルス種由来または任意の非ボックスウイルス供給源由来であり得る。一態様では、異種配列は、任意の非ボックスウイルス供給源から選択される抗原性エピトープである。一部の実施形態では、組換えウイルスは、P l a s

modium falciparum、マイコバクテリア、Bacillus anthracis、Vibrio cholerae、MRSA、ラブドウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス科のウイルス、パラミクソウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスが含まれるがこれらに限定されない非ボックスウイルス供給源由来の、あるいは出血熱を引き起こすウイルス、例えば、ハンタウイルスまたはフィロウイルス、即ち、エボラもしくはマールブルグウイルス由来の、1つまたは複数の抗原性エピトープを発現し得る。別の態様では、異種配列は、異なるボックスウイルス種由来の抗原性エピトープである。これらのウイルス配列は、scPVの宿主スペクトルまたは免疫原性を改変するために使用され得る。

【0192】

一部の実施形態では、本発明のscPVは、治療的核酸（例えば、アンチセンス核酸）または治療的ペプチド（例えば、所望の生物学的活性を有するペプチドまたはタンパク質）を発現する異種遺伝子/核酸をコードし得る。

【0193】

一部の実施形態では、異種核酸配列の発現は、好ましくは、ボックスウイルスプロモーターの転写制御下にあるが、排他的にはない。一部の実施形態では、異種核酸配列は、好ましくは、ウイルスゲノムの非必須領域中に挿入される。異種配列をボックスウイルスゲノム中に挿入するための方法は、当業者に公知である。一部の実施形態では、異種核酸は、化学的合成によって導入される。例示的な実施形態では、異種核酸は、本発明のscHPXVのHPXV095/J2RまたはHPXV044遺伝子座中にクローニングされ得る。

【0194】

本発明のscPVは、標的細胞中への異種核酸配列の導入のために使用され得、この配列は、標的細胞に対して相同または異種のいずれかである。標的細胞中への異種核酸配列の導入は、その配列によってコードされる異種ペプチドもしくはポリペプチドおよび/または完全なウイルスをin vitroで産生するために使用され得る。この方法は、scPVによる宿主細胞の感染；適切な条件下での感染宿主細胞のカルチベーション；ならびに宿主細胞によって産生されるペプチド、タンパク質および/またはウイルスの単離および/または富化を含む。

【0195】

記載されてきた本発明の実施形態は、本発明の原理の適用の一部の単なる例示であることを理解すべきである。多数の改変が、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に示された教示に基づいて、当業者によってなされ得る。

【0196】

以下の実施例は、本発明の代表として示される。これらおよび他の等価な実施形態が、本開示、図面および添付の実施形態を考慮して明らかになるので、これらの実施例は、本発明の範囲を限定すると解釈すべきではない。

【実施例】

【0197】

（実施例1）

ウイルスゲノムの重複する断片の選択および設計

材料および方法

合成キメラHPXV（scHPXV）ゲノム設計

scHPXVゲノムの設計は、HPXVについて先に記載されたゲノム配列に基づく（株MNR-76；図1A）[GenBank受託番号DQ792504]（Tulman ER、Delhon G、Afonso CL、Lu Z、Zsak L、Sandybaev NTら、Genome of horsepox virus. Journal of virology. 2006年；80巻（18号）：9244～58頁）。212,633bpのゲノムを、10個の重複する断片へと分割する（図1B）。相同組換えが全長ゲノムのアセンブリを駆動する部位を提供するために、これらの断片が各隣接断片と少なくとも1.0kbpの重複する配列（即ち、相同性）を共有するように、それ

10

20

30

40

50

らを設計した（表 1）。これらの重複する配列は、共トランスフェクトされた断片間での組換えを正確に実施するのに十分な相同性を提供する（Yao XD、Evans DH. High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. Journal of virology. 2003 年；77 巻（13 号）：7281～90 頁）。より短いまたはより長い重複が同様の目的を果たすことが可能である。HPXV ゲノム配列由来の末端 40 bp（5' - TTTATTAAATTTTACTATTATTTAGTGCTAGAAA - 3'）（配列番号 59）は、合成された末端逆位配列（ITR）断片中には含まれない。その代わり、SapI 制限部位が、ITR 断片の 5' 末端（GA__LITR）および 3' 末端（GA__RITR）において付加され、TGT 配列が後に続く。これらの SapI 制限部位を使用して、VACV 末端ヘアピンを ITR 断片にライゲートさせる（以下に記載される）。

10

【0198】

各断片を化学的に合成し、各断片上の末端 SfiI 制限部位を使用してプラスミド中にサブクローニングする。これらの断片のサブクローニングを補助するために、AarI および BsaI 制限部位を、2つの ITR コード断片を除く全ての断片においてサイレントに変異させる（表 2）。これらの領域が、効率的な DNA 複製およびコンカテマー分割にとって重要なヌクレオチド配列特異的認識部位を含む場合、2つの ITR コード断片中の BsaI 制限部位は変異させない。

20

【0199】

ボックスウイルス初期後期プロモーターの制御下にある yfp / gpt カセットを、GA__断片__3 内の HPXV 095 / J2R 遺伝子座中に導入すると、HPXV (scHPXV YFP - gpt : : 095) の再活性化を蛍光顕微鏡下で可視化することが容易になる。gpt 遺伝子座は、薬物選択を使用して再活性化されたウイルスを選択するための有望なツールも提供する。HPXV 095 は、非必須 VACV J2R 遺伝子の HPXV ホモログをコードし、SFV 感染 BGMK 細胞中に、断片__3 および他の HPXV クローンを VACV DNA と共に共トランスフェクトすることによって、種々のハイブリッドウイルスを回収して、選択戦略を検証する（図 13A および 13B）。サイレント変異を HPXV 044 (VACV^{WR} F4L) 配列 (GA__断片__2) 中にも導入して、GA__断片__2 内に 2つの独自の制限部位を創出する（表 3）。一部の実施形態では、これらの独自の制限部位は、HPXV の再活性化の前に、組換え遺伝子産物（例えば、選択可能なマーカー、蛍光タンパク質、抗原などであるがこれらに限定されない）を GA__断片__2 中に迅速に導入するために使用され得る。

30

【表 1】

表 1: この研究で使用する HPXV ゲノム断片。各断片のサイズおよび HPXV ゲノム内の位置が示される。

断片名	サイズ (bp)	HPXV[DQ792504] 内の位置 (bp)
GA_左 ITR (配列番号 1)	10,095	41 - 10,135
GA_断片 1A (配列番号 2)	16,257	8505 - 24,761
GA_断片 1B (配列番号 3)	16,287	23764 - 40,050
GA_断片 2 (配列番号 4)	31,946	38,705 - 70,650
GA_断片 3 (配列番号 5)	25,566	68,608 - 94,173
GA_断片 4 (配列番号 6)	28,662	92,587 - 121,248
GA_断片 5 (配列番号 7)	30,252	119,577 - 149,828
GA_断片 6 (配列番号 8)	30,000	147,651 - 177,650
GA_断片 7 (配列番号 9)	28,754	176,412 - 205,165
GA_右 ITR (配列番号 10)	8,484	204,110 - 212,593

40

50

【表 2】

表 2: HPXV ゲノムから AarI および BsaI 制限部位を除去するために scHPXV YFP-gpt::095 断片において創出されるサイレント変異。

GA_HP XV 断片	除去された制限エンドヌクレアーゼ認識部位	HPXV ゲノムのコード鎖中のヌクレオチド変化	HPXV 遺伝子	HPXV ゲノム [DQ792504] 中の位置	全ゲノム配列決定によって検証された変異
GA_断片_1A	BsaI	A から G	HPXV011a	11, 228	✓
GA_断片_1B	BsaI	A から G	HPXV025	27, 845	✓
GA_断片_2	BsaI	A から G	HPXV040	41, 232	✓
	BsaI	G から A	HPXV059	56, 775	✓
	BsaI	G から A	HPXV066	67, 836	✓
GA_断片_3	BsaI	G から A	HPXV083	84, 361	✓
	AarI	T から C	HPXV091	89, 368	✓
GA_断片_4	BsaI	T から C	HPXV099	96, 239	✓
	BsaI	A から G	HPXV099	96, 437	✓
	BsaI	A から G	HPXV110	109, 492	✓
	BsaI	A から G	HPXV111	110, 661	✓
	BsaI	G から A	HPXV111	110, 840	✓
GA_断片_4 GA_断片_5	BsaI	C から T	HPXV119	120, 933	✓
GA_断片_5	BsaI	A から G	HPXV123	123, 035	✓
	BsaI	T から C	HPXV145	144, 834	✓
GA_断片_5 GA_断片_6	BsaI	T から C	HPXV146d	149, 727	✓
GA_断片_6	BsaI	G から A	HPXV178b	175, 070	✓
GA_断片_7	BsaI	G から A	HPXV182	180, 573	✓
	BsaI	A から G	HPXV192	187, 476	✓
	AarI	G から A	HPXV193	188, 761	✓
	BsaI	C から T	HPXV197	195, 680	✓
	AarI	T から C	HPXV200	199, 873	✓

10

20

30

【表 3】

表 3: GA_断片_2 中に独自の制限エンドヌクレアーゼ部位を創出するための、HPXV044 (VACV F4L) 遺伝子中のサイレントヌクレオチド変異の導入。

HPXV 遺伝子	創出された制限エンドヌクレアーゼ部位	HPXV コード鎖中のヌクレオチド変化	HPXV ゲノム中の位置
HPXV044	AvaI	A から C	44, 512
	StuI	A から C	45, 061

40

【0200】

VACV (株 WR) 由来のスロー (S) 形態およびファスト (F) 形態の末端ヘアピンループの合成

VACV (株 WR) 由来のスロー (S) 形態およびファスト (F) 形態の末端ヘアピンループを、157 nt の ssDNA 断片として合成する (Integrated DNA Technologies; 図 2B)。DNA 合成を介して、3 ヌクレオチドから構成される 5' オーバーハングが、各ヘアピンの終端に残される (5' - ACA; 図 2C)。

50

HPXV配列 [DQ792504] 由来のコンカテマー分割部位 (contatemer resolution site) もまた、末端ヘアピンループ中に合成する (図2B)。

【0201】

s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 断片の消化および精製

合成HPXV断片を、50 でSfiIで一晩消化する。s c H P X V I T R断片を、SapI (ThermoFisher Scientific) で1時間個々に消化し、65 で10分間不活性化し、その後、50 でSfiIで一晩消化する。およそ1UのFastAPアルカリホスファターゼを、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 I T R消化物に添加し、37 でもう1時間インキュベートする。全てのs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5断片を、QiaexII DNA cleanupキット (Qiagen) を使用して引き続いて精製する。全てのs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5断片を、10mM トリス-HCl中でQiaexII懸濁液から溶出させる。DNA濃度を、NanoDrop (ThermoFisher Scientific) を使用して推定する。

10

【0202】

結果

ボックスウイルスは、ウイルス複製のプロセスに密接に関連する非常に高頻度の相同組換え反応を触媒する。本明細書では、化学的に合成されたHPXV二重鎖DNAの大きい断片を、機能的s c H P X Vゲノムを形成するために、ウイルスにより触媒される組換えおよび複製反応を使用して接合することができることが実証される。

20

【0203】

HPXVゲノム (株WNR-76) の公開された配列を使用して、212,633bpのゲノムを、10個の重複する断片へと分割する (図2)。この領域内の配列特異的部位が効率的なゲノム複製およびコンカテマー分割に知らずに必要とされる場合、ITRを除く全ての断片中の全てのBsaIおよびAarI部位を変異させる。上記のように、VACV由来の末端ヘアピンループ構造の、ITRの終端への付加を促進するために、SapI認識部位を、それぞれLITRおよびRITR断片の両方の左側末端終端および右側末端終端の隣に含める (図2A)。これらのSapI部位は、隣接するベクター配列内に包埋され、SapI酵素は、認識配列の外側かつHPXV DNA中で、この部位の下流を切断する。従って、DNAをSapIで切断すると、HPXV配列からコピーされたDNA内に粘着終端が残り、従って、無関係な制限部位を含まない、正確な配列コピーの (引き続くライゲーションを介した) アセンブリが可能になる。LITRおよびRITR断片の他方の終端 (ゲノムマップに関して内部終端) は各々、残りのHPXV断片の両終端と同様、SfiI認識部位によって境界される。これらのDNAは全て、容易な繁殖のためにプラスミド形態で供給される。SFV感染細胞中へのトランスフェクションのための内部断片を調製するために、これらのプラスミドをSfiIで消化して、各s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5断片からプラスミドを放出させる (LITRおよびRITR断片をどのようにプロセッシングするかについては、以下を参照のこと)。消化後、各反応は、いずれの混入酵素をも除去するために精製されるが、プラスミドは、消化物から除去されず、各s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5断片と一緒に共トランスフェクトされる。これは、反応を妨害せず、DNA操作の量、およびこれらの大きいDNA断片の可能な断片化を最小化するために実施される。

30

40

【0204】

反応効率は、トランスフェクトされた断片の数によって影響され得るが、10個よりも多いまたは少ない重複する断片が、本発明の方法において使用され得る。理論に束縛されないが、約15個の断片が、再活性化反応のさらなる最適化なしの実務的上限を示し得る。理想的な下限は単一のゲノム断片であるが、実務上、テロメアは、より控えめなサイズの断片 (例えば、約10kb) として最も容易に操作される。

【0205】

50

(実施例 2)

s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 左および右 I T R 断片への V A C V F 末端
および S 末端ヘアピンループのライゲーション

材料および方法

s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 I T R 断片への S 形態および F 形態の末端
ヘアピンループのライゲーション

およそ 1 マイクログラムの末端 V A C V ヘアピンループの各々を、9 5 で 5 分間イン
キュベートし、その後、氷上での「即座の」冷却によってヘアピン構造を形成させる。ヘ
アピンループを、それらの 5 ' 終端において引き続いてリン酸化し、その後ライゲートさ
せる。簡潔に述べると、1 μ g の V A C V F - ヘアピンまたは V A C V S - ヘアピン
のいずれか、2 μ l の 1 0 × T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 (T h e r m o F i s h e r
S c i e n t i f i c)、1 m M A T P、および 1 0 単位の T 4 ポリヌクレオ
チドキナーゼ (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を含む別々の 2 0 μ
l 反応を、3 7 で 1 時間インキュベートする。反応を、7 5 での熱不活性化によって
終結させる。

10

【0206】

およそ 1 マイクログラムの左 I T R または右 I T R のいずれかを、5 % P E G - 4 0 0
0 および 5 単位の T 4 D N A リガーゼの存在下で、2 0 倍モル過剰の各末端ヘアピンと
共に、1 6 で一晩別々にインキュベートする。各ライゲーション反応を、6 5 で 1 0
分間熱不活性化し、その後、細胞中にトランスフェクトする準備ができるまで、氷上でイ
ンキュベートする。

20

【0207】

結果

オルソボックスウイルスは、ゲノムの各終端において変動する長さの末端逆位配列 (I
T R) を保有する直鎖 d s D N A ゲノムをコードする。二重鎖ゲノムの 2 つの鎖をヘアピ
ンループによって接続して、共有結合的に連続的なポリヌクレオチド鎖を形成させる。ル
ープは、A + T リッチであり、完全に塩基対合した構造を形成できず、配列が反転した形
態および相補的な形態の 2 つの形態で存在する (Baroudy B M、Venkatesan S、Moss B.

Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA st
rands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotid
e chain. Cell. 1 9 8 2 年 ; 2 8 巻 (2 号) : 3 1 5 ~ 2 4 頁) (図 2 B)。これら
は、それらの電気泳動特性に基づいてスロー [S] 形態およびファスト [F] 形態と呼ば
れ、おそらくは、直鎖 d s D N A ゲノムの終端をキャップする、部分的に二重鎖のヘアピ
ン構造へとフォールディングする (図 2 C)。H P X V ゲノムの公開された配列は不完全
であり、おそらくは末端終端から約 6 0 b p を欠くために、H P X V ヘアピンを正確に複
製することが不可能になっている。その代わり、1 5 7 n t の s s D N A 断片を、V A C
V テロメアの公開された配列をガイドとして使用して化学的に合成し、各ヘアピンの終端
に、3 ヌクレオチドから構成される 5 ' オーバーハングを残した (5 ' - A C A ; 図 2 C
) (Baroudy B M、Venkatesan S、Moss B. Incompletely base-paired flip-flop
terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome
into one uninterrupted polynucleotide chain. Cell. 1 9 8 2 年 ; 2 8 巻 (2 号) : 3 1 5 ~ 2 4 頁)。このオーバーハングは、クローニングされた L I T R および
R I T R 断片を S a p I で切断することによって生成された終端に対して相補的である。

30

40

【0208】

V A C V に由来する配列を、H P X V と V A C V との間の近い共通の祖先を示唆するデ
ータに基づいて使用する。異なるコードボックスウイルスのヘアピン終端間で共通して保
存された配列特色が存在するので、他のボックスウイルス由来の他の末端ヘアピンを使用
することが可能であり得る。例えば、ヘアピン終端中の分割部位は、配列および機能性の
両方が高度に保存されている (これらは後期プロモーターと似ている)。

【0209】

50

これらの一本鎖オリゴヌクレオチドを95 に加熱し、次いで、氷上で迅速に冷却して、不完全に塩基対合した末端ヘアピンを形成させる(図2C)。次に、各オリゴヌクレオチドをリン酸化し、SapIおよびSfiIの両方で先に消化した左または右ITR断片のいずれかと、20倍モル過剰で別々にライゲートさせる。これらの酵素によるITRの消化は、各ITRの5'末端に5'-TGTオーバーハングを生じ、これは、末端ヘアピンループ構造中の5'-ACAオーバーハングに対して相補的であった。これは、各ITRのヘアピン終結したコピーを生成する。

【0210】

ヘアピン終結した構造が両方のITR断片に付加されたことを確認するために、ITR断片のPvuIIによる制限消化を実施する。約10kbのITRの末端への約70bpの末端ヘアピンの付加をゲル電気泳動によって可視化することは不可能なので、少量の各ライゲーションを、PvuIIで消化する。ITRに末端ヘアピンがライゲートされていない場合、PvuIIによる消化は、1472bpの産物を生じる(図3Aおよび3B、レーン2および5)。しかし、末端ヘアピンループがHPXV ITRに首尾よく付加された場合、ITR断片のサイズにおける増加がアガロースゲル上で見られる(図3B、レーン2を3および4と比較する;レーン5を6および7と比較する)。これらのデータは、これらの条件下で、HPXV ITRのほぼ全てが、断片の一方の終端において末端ヘアピンループを含むことを示唆している。

10

【0211】

(実施例3)

20

化学的に合成されたdsDNA断片からのscHPXV YFP-gpt::095の再活性化

材料および方法

ウイルスおよび細胞培養

SFV株KaszaおよびBSC-40は、元々American Type Culture Collectionから得た。バッファローミドリザル腎臓(BGMK)細胞は、G.McFadden(University of Florida)から得た。BSC-40およびBGMK細胞を、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質および抗真菌薬、ならびに5%ウシ胎仔血清(FCS; Thermo Fisher Scientific)を補充した最小必須培地(MEM)中で、5%CO₂中で37 で繁殖させる。

30

【0212】

ショープ線維腫ウイルス感染細胞におけるscHPXV YFP-gpt::095の再活性化

バッファローミドリザル腎臓(BGMK)細胞を、およそ80%の培養密度に達するまで、MEM含有60mm組織培養皿中で増殖させる。細胞に、0.5のMOIで、37で1時間、無血清MEM中でショープ線維腫ウイルス(SFV)を感染させる。接種材料を、5%FCSを含む温MEM 3mlで置き換え、もう1時間インキュベーターに戻す。一方で、トランスフェクション反応を以下のように設定する。Lipofectamine複合体を、1ml Opti-MEM中およそ5μgの総合成HPXV DNA断片を、3:1の比(Lipofectamine 2000の総DNAに対する比)で、1ml Opti-MEM中に希釈したLipofectamine 2000と混合することによって調製する。各HPXV断片の相対的な量を決定するための計算例は、表4に示される。複合体を室温で10分間インキュベートし、次いで、先にSFVを感染させたBGMK細胞に滴下した。感染のおよそ16時間後、培地を、5%FCSを含む新鮮なMEMで置き換える。細胞を、37でさらに4日間(合計で5日間)培養する。感染細胞を細胞培養培地中に掻き取り、3サイクルの凍結および解凍を実施することによって、ウイルス粒子を回収した。粗製抽出物を、無血清MEM中に10⁻²希釈し、4mlの接種材料を、BSC-40細胞の9~16枚の150mm組織培養プレート上にプレーティングして、再活性化されたscHPXV YFP-gpt::095を回収する。感染の1時間

40

50

後、接種材料を、5% FCS および 0.9% Noble Agar を含む MEM で置き換える。黄色蛍光プラークを、倒立顕微鏡下で可視化し、個々のプラークを、さらなる分析のためにピックする。scHPXV YFP-gpt : : 095 プラークを、黄色蛍光選択を用いて 3 回プラーク精製する。

【表 4】

表 4: SFV 感染 BGMK 細胞中にトランスフェクトされた各 GA_HP XV 断片の量の計算例。

断片	断片長	比 (断片長:ゲノム長)	トランスフェクトする DNA の量 (ng)		
			約 1 μg	約 3 μg	約 5 μg
GA_LITR + F-ヘアピン	10,165	0.05	50	150	250
GA_LITR + S-ヘアピン	10,165	0.05	50	150	250
GA_断片_1A	16,257	0.08	80	240	400
GA_断片_1B	16,287	0.08	80	240	400
GA_断片_2	31,946	0.15	150	450	750
GA_断片_3	25,566	0.12	120	450	600
GA_断片_4	28,662	0.13	130	390	650
GA_断片_5	30,252	0.14	140	420	700
GA_断片_6	30,000	0.14	140	420	700
GA_断片_7	28,754	0.13	130	390	650
GA_RITR + F-ヘアピン	8,554	0.04	40	120	200
GA_RITR + S-ヘアピン	8,554	0.04	40	120	200

【0213】

結果

組換えワクシニアウイルスをアSEMBL するための、オルソボックスウイルス DNA の SFV により触媒される組換えおよび再活性化は、先に記載されている (Yao XD、Evans DH. High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. Journal of virology. 2003 年; 77 巻 (13 号): 7281 ~ 90 頁; および Yao XD、Evans DH. Construction of recombinant vaccinia viruses using leporipoxvirus-catalyzed recombination and reactivation of orthopoxvirus DNA. Methods Mol Biol. 2004 年; 269 巻: 51 ~ 64 頁)。いくつかの生物学的

特徴が、これを魅力的なモデル系にしている。第 1 に、SFV は、狭い宿主範囲を有し、ウサギ細胞およびある特定のサル細胞株、例えば BGMK に生産的に感染する。これは、BSC-40 などの細胞に感染できるが、そこでの増殖は非常に悪い。第 2 に、SFV は、オルソボックスウイルスと比較してより緩徐に増殖し、細胞の単層中に形質転換された「病巣」を形成するのにおよそ 4 ~ 5 日間かかり、これは、培養物中で 1 ~ 2 日以内にプラークを生じるオルソボックスウイルスとは非常に異なる特徴である。レボリボックスウイルスとオルソボックスウイルスとの間の増殖におけるこの差異により、BGMK 細胞において再活性化アッセイを実施し、BSC-40 細胞上に子孫をプレーティングすることによって、これらのウイルスを区別することが可能になる。一部の実施形態では、他のヘルパーウイルス (例えば鶏痘ウイルスであるがこれに限定されない) が使用され得る。一部の実施形態では、異なる細胞組合せが使用され得る。

【0214】

BGMK細胞に、0.5のMOIでSFVを感染させ、次いで、2時間後に5 µgの消化したGA__HPXV断片(表4)をトランスフェクトする。トランスフェクションの5日後、全ての感染性粒子を細胞溶解によって回収し、HPXV(または他のオルソポックスウイルス)の増殖のみを効率的に支持するBSC-40細胞上に再プレATINGする。得られた再活性化されたscHPXV YFP-gpt::095ブランクを、蛍光顕微鏡下で可視化する。可視化は、断片__3内のHPXV095/J2R遺伝子座中のyfp/gpt選択可能なマーカーによって可能になる(図2A)。ウイルスブランクが、トランスフェクションの48時間以内にBSC-40単層において検出される。scHPXV YFP-gpt::095を回収する効率は、DNAトランスフェクション効率を含むいくつかの因子に依存するが、最大で数PFU/µgのトランスフェクトされたDNAまでの範囲である。

10

【0215】

(実施例4)

PCRおよび制限断片分析によるscHPXV YFP-gpt::095ゲノム配列の確認

材料および方法

scHPXVのPCRおよび制限消化分析

再活性化されたブランクピック中のscHPXV YFP-gpt::095の存在を迅速に確認するために、PCRプライマーを、scHPXV中の変異された個々のBsai部位に隣接するように設計する(表5)。ゲノムscHPXV YFP-gpt::095 DNAを、scHPXV YFP-gpt::095に感染したBSC-40細胞から単離し、鋳型として使用する。VACV感染BSC-40細胞由来のゲノムDNAを、各PCR産物内のBsai部位の存在を確認するための対照として使用する。PCR増幅後、反応を、37で1時間、Bsaiで引き続いて消化する。PCR反応を、SYBR(登録商標)safe染色を含む1%アガロースゲル上で分離して、DNAバンドを可視化する。

20

【0216】

制限消化とその後のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)によるscHPXV YFP-gpt::095ゲノムのさらなる分析を、スクロース勾配精製を使用して単離されたゲノムDNAに対して実施する(Yao XD, Evans DH. Construction of recombinant vaccinia viruses using leporipoxvirus-catalyzed recombination and reactivation of orthopoxvirus DNA. Methods Mol Biol. 2004年; 269巻: 51~64頁)。簡潔に述べると、100 ngの精製されたウイルスゲノムDNAを、37で2時間、5 UのBsaiまたはHindIIIで消化する。消化されたDNAを、1% Seakem Goldアガロースゲルキャスト上で、0.5xトリス-ホウ酸-EDTA電気泳動(TBE)緩衝液[110 mMトリス; 90 mMホウ酸; 2.5 mM EDTA]中で泳動する。DNAを、1~10秒の切り替え時間勾配、直線的傾斜因数および120°角度を使用して、14で9.5時間、5.7 V/cmでCHEF DR-I装置(Biorad)で分離する。このプログラムは、1 kbp~>200 kbpのDNA種の分離を可能にする。75 bp~5 kbpの断片を分離するために、1.5%アガロースゲルキャスト上での、1.0xTBE中で115 Vで室温で2時間泳動する電気泳動を実施する。DNAを、SYBR(登録商標)gold染色で可視化する。消化されたscHPXV YFP-gpt::095 DNA断片のサイズを、対照VACVゲノムDNAと比較する。

30

40

【表 5 - 1】

表5: GA_断片_1A、GA_断片_1B、GA_断片_2、GA_断片_3、GA_断片_4、GA_断片_5、GA_断片_6およびGA_断片_7中に見出されるBsaI制限部位を囲むVACVおよびHPXV内の領域を増幅するためにこの研究で使用するプライマー。

プライマー名	プライマー配列 (5' から 3')	VACV [NC_006 998] 中 の BsaI 部 位 の 位置	HPXV [DQ792504] 中の BsaI 部 位の位置
HPXV 1A – FWD (配列番号 13)	CTGTATACCCATACTGAATTGATG AAC	16,756	27,849
HPXV 1A – REV (配列番号 14)	GAGTTAATATAGACGACTTTACT AAAGTCATG		
HPXV 1B – FWD (配列番号 15)	GGTTCTTTTTATTCTTTTAAACAG ATCAATGG	23,076	N/A
HPXV 1B – REV (配列番号 16)	TTCTTATTAAGACATTGAGCCCAG C		
HPXV 2A – FWD (配列番号 17)	AGTCATCAATCATCATTTTTTCAC C	30,073	41,225
HPXV 2A – REV (配列番号 18)	ATATAACGGACATTTCCACCACC		
HPXV 2B – FWD (配列番号 19)	GTAACATATACAACTTTTATTATG GCGTC	45,485	56,778
HPXV 2B – REV (配列番号 20)	CTAATCCACAAAAAATAGAATGT TTAGTTATTTTG		
HPXV 2C – FWD (配列番号 21)	AGTGA CTGTATCCTCAAACATCC	56,576	67,839
HPXV 2C – REV (配列番号 22)	TTTATAAAGGGTTAACCTTTGTCA CATC		
HPXV 3A – FWD (配列番号 23)	TTGTGTAGCGCTTCTTTT TAGTC	60,981	N/A
HPXV 3A – REV (配列番号 24)	AAACGGATCCATGGTAGAATATG		
HPXV 3B – FWD	TATTTGCATCTGCTGATAATCATC	84,916	84,353

10

20

30

【表 5 - 2】

(配列番号 25)	C		
HPXV 3B – REV (配列番号 26)	CGATGGATTCAAATGACTTGTTA ATG		
HPXV 4A – FWD (配列番号 27)	ATGCCTTTACAGTGGATAAAGTT AAAC	85,101	96,243 & 96,428
HPXV 4A – REV (配列番号 28)	CTGGATCCTTAGAGTCTGGAAG		
HPXV 4B – FWD (配列番号 29)	CGGAAAATGAAAAGGTACTAGAT ACG	98,134	109,485
HPXV 4B – REV (配列番号 30)	TGAATAGCCGTTAAATAATCTATT TCGTC		
HPXV 4C – FWD (配列番号 31)	TATGGATACATTGATAGCTATGA AACG	99,302 & 99,481	110,653 & 110,832
HPXV 4C – REV (配列番号 32)	AATACATCTGTAAAAATTGTTTGA CCCG		
HPXV 5A – FWD (配列番号 33)	CATTTTATTTCTAGACGTTGCCAG	111,686	123,037
HPXV 5A – REV (配列番号 34)	CGATATGAAACTTCAGGCGG		
HPXV 5B – FWD (配列番号 35)	ACAAAACGATTTAATTACAGAGT TTTCAG	122,484	N/A
HPXV 5B – REV (配列番号 36)	GTCCGGTATGAGACGACAG		
HPXV 5C – FWD (配列番号 37)	TTAGGGATCACATGAATGAAATT CG	133,505	144,838
HPXV 5C – REV (配列番号 38)	TATGGAAGTTCCGTTTCATCCG		
HPXV 5D – FWD (配列番号 39)	GACTTGATAATCATATATTAAC ACATTGGATC	138,306	149,718
HPXV 5D – REV (配列番号 40)	AGATCTCCAGATTTTCATAATATGA TCAC		
HPXV 6A – FWD (配列番号 41)	ATGATACGTACAATGATAATGAT ACAGTAC	163,521	175,062
HPXV 6A – REV (配列番号 42)	TGATTTTTGCAATTGTCAGTTAAC ACAAG		
HPXV 7A – FWD (配列番号 43)	TACTGTACCCACTATGAATAACG C	169,035	180,578
HPXV 7A – REV (配列番号 44)	GATATCAACATCCACTGAAGAAG AC		
HPXV 7B – FWD (配列番号 45)	ATCTTACCATGTCCTCAAATAAAT ACG	175,849	187,467
HPXV 7B – REV (配列番号 46)	ATAGCTCTAGGTATAGTCTGCAA G		
HPXV 7C – FWD (配列番号 47)	GCGAACTCCATTACACAAATATTT G	181,952	195,683
HPXV 7D – REV (配列番号 48)	GATGTTTCTAAATATAGGTTCCGT AAGC		

【 0 2 1 7 】

結果

再活性化アッセイから増殖したブランクから単離されたウイルスのゲノム配列を、P C R、制限消化および全ゲノム配列決定によって確認する。P C R 分析は、I T R H P X

10

20

30

40

50

V断片を除いた全ての内部の変異されたB s a I部位に基づく。プライマーセットを、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5中の各B s a I部位に隣接するように設計する(表5)。これらのプライマーセットは、V A C V W R内の類似の領域もまた増幅することが確認される。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5内のこれらの変異されたB s a I部位を囲むおよそ1 k bの領域のP C R増幅の後、各反応をB s a Iで消化し、得られたD N A断片を、ゲル電気泳動によって分析する。V A C V(野生型)中には変異されたB s a I部位が存在しないので、酵素消化は、各P C R産物を首尾よく消化し、より小さいD N A断片を生じる(図4 A、V A C V)。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5ゲノムD N Aから生成されたP C R産物は、B s a I消化に対して抵抗性であり、これは、B s a I認識部位が、これらのゲノムにおいて首尾よく変異されたことを示唆している(図4 A、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5(P P 1)およびs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5(P P 3))。プライマーセット7 Cのプライマー産物は、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 P P 1およびP P 3試料において、D N Aのいずれの増幅も生じなかった。このプライマーセットが非機能的であったかどうか、または断片7のこの領域が、得られたs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5ゲノムへとアセンブルしなかったかどうかを確認するために、P C Rを元のG A断片7プラスミドD N Aに対して実施したが、この反応もまた、産物の増幅において不首尾であった。

10

【0218】

次に、ゲノムD N Aを、スクロース勾配精製されたs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5ゲノムから単離し、B s a IまたはH i n d I I Iで消化し、アガロースゲル電気泳動によって分離して、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5中のB s a I部位の大部分が首尾よく変異されたことを確認する。興味深いことに、3つの異なるs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5クローン由来の未消化のゲノムD N Aは、V A C Vと比較してゲル上で著しく緩徐に泳動し、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5のゲノム(213, 305 b p)がV A C V - W R(194, 711 b p)よりも大きいことが確認される(図4 B、レーン2~4をレーン5と比較する)。これらのs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5クローンは、B s a I消化に対して抵抗性であり、P F G Eによる分離後に、1つの大きいD N A断片(約198000 b p)およびおよそ4000 b pのより小さいD N A断片を生じる(図4 A、レーン7~9)。これは、B s a Iで消化した場合にゲル上で分離されるいくつかのD N A断片をもたらすV A C V - W Rゲノムとは対照的である(図4 B、レーン10)。B s a Iによるs c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5ゲノムの消化後の予想されるD N Aサイズは比較的小さいので(表6)、これらの消化産物を従来のアガロースゲル電気泳動によって分離すると、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5が適切なサイズの断片を生成することが確認される(図4 C、レーン2~4)。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5が、H i n d I I I消化後に正確なサイズのD N A断片を生じることも確認され、これは、これらの認識が、大きいD N A断片の合成の間維持されることを示唆している(表6; 図4 B、レーン12~14; 図4 C、レーン6~8)。全体として、s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5ゲノムのi n v i t r o分析は、化学的に合成されたD N A断片からのH P X Vの再活性化が首尾よいことを示唆している。

20

30

40

【表 6】

表 6: BsaI または HindIII のいずれかで消化された scHPXV YFP-gpt::095 DNA 断片の予想されるサイズ。

断片番号	BsaI で消化された scHPXV YFP-gpt::095 (bp)	HindIII で消化された scHPXV YFP-gpt::095 (bp)
1	198,833	53,822
2	4046	24,848
3	4046	19,283
4	968	16,056
5	968	15,176
6	778	13,836
7	778	13,558
8	767	12,679
9	767	8877
10	391	8637
11	391	6493
12	138	5803
13	138	4631
14	64	4115
15	60	2216
16	54	1560
17	54	1442
18	32	273
19	32	

10

20

【0219】

HPXV095は、非必須VACV-J2R遺伝子のHPXVホモログをコードするので、SFV感染BGMK細胞中に、断片__3および他のHPXVクローンをVACV-DNAと共に共トランスフェクトすることによって、種々のハイブリッドウイルスを回収し、選択戦略を検証する(図13Aおよび13B)。最初のハイブリッドウイルス(「VACV/HPXV+断片3」)を、VACV-DNAをHPXV断片__3(図1)と共にSFV感染細胞中に共トランスフェクトすることによって得る。緑色でタグ付けした挿入物は、YFP-gpt選択マーカーをコードする。クローン1~3を、この最初のハイブリッドゲノムからDNAを精製し、それをHPXV断片2、4、5および7と共にSFV感染細胞中に再度トランスフェクトすることによって得る。HPXVおよびVACVの両方を標的化するように設計されたPCRプライマー(表5)を使用して、scHPXVクローン中の変異されたBsaI部位にまたがるDNAセグメントを増幅する。PCR増幅後、産物をBsaIで消化して、HPXV(切断しない)からVACV配列(切断する)を区別する。VACV/HPXVハイブリッドは、BsaI感受性部位および抵抗性部位のミックスを示すが、再活性化されたscHPXV-YFP-gpt::095クローンは、完全にBsaI抵抗性である。

30

40

【0220】

(実施例5)

全ゲノム配列分析によるscHPXV-YFP-gpt::095ゲノム配列の確認
材料および方法

ウイルスDNAの単離および配列決定

HPXV-YFP-gpt::095クローン(ブランクピック[PP]1.1、PP2.1およびPP3.1)のストックを、スクロース勾配上で調製および精製する。ウ

50

イルスDNAを、プロテイナーゼK消化とその後のフェノール-クロロホルム抽出を使用して、各精製されたウイルス調製物から抽出する。dsDNAの量を、Qubit dsDNA HSアッセイキット(ThermoFisher Scientific)を使用して決定する。各ウイルスゲノムを、University of AlbertaのMolecular Biology Facility(MBSU)で配列決定する。配列決定ライブラリーを、Nextera Tagmentationシステム(Epicentre Biotechnologies)を使用して生成する。およそ50ngの各試料を剪断し、ゲノムにわたって3,100読み取り/ntならびにF-ヘアピンおよびS-ヘアピンにおいて約190読み取り/ntの平均読み取り深度でIllumina MiSeqプラットフォームを使用するペアードエンド配列決定(2x300bp)のためにライブラリーを調製する。

10

【0221】

配列アセンブリ、分析およびアノテーション

CLC Genomics Workbench 8.5ソフトウェアを使用して、生配列決定読み取りから低品質の配列スコアをトリミングし、HPXV参照配列[GenBank受託番号DQ792504]に最初にマッピングする。scHPXV YFP-gpt::095配列内の全てのヌクレオチド挿入、欠失および置換を、HPXV参照配列に対して検証する。Genome Annotation Transfer Utility(GATU)(Tcherepanov V, Ehlers A, Upton C. Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. BMC Genomics. 2006年;7巻:150頁、電子出版2006年6月15日)を使用して、参照アノテーションをscHPXVゲノム配列に移行させる。

20

【0222】

結果

精製されたscHPXV YFP-gpt::095ゲノムを、多重アプローチおよびIllumina MiSeqシーケンサーを使用して配列決定する。配列読み取りを、野生型HPXV(DQ792504)およびscHPXV YFP-gpt::095参照配列上にマッピングして、scHPXV YFP-gpt::095ゲノム中の具体的な改変の存在を確認する。VACV末端反復配列が左ITRの末端終端に正確にライゲートされたことを確認するために、ゲノムのこの領域中の配列決定読み取りを分析する。CのストリングをscHPXV YFP-gpt::095ゲノム参照配列の先頭に付加して、この領域中のマッピングされた全ての配列読み取りを捕捉する(図5Aおよび5B)。配列読み取りをアセンブルするために使用されるプログラムは、そうしなければ、scHPXV YFP-gpt::095ゲノム参照配列が終わるポイントにおいて配列の表示を短縮するので、これを実施する。

30

【0223】

SapI認識部位は、scHPXV YFP-gpt::095参照ゲノム中に存在するが、全ての配列決定読み取りがこの配列を欠くことが、マッピングされた読み取りから明らかである。これにより、本明細書に記載されるアプローチが、合成ヘアピンがITRの終端にライゲートされた部位において、信頼できるHPXV配列を生じることが確認される。ITR終端にライゲートされた合成ssDNAの配列に対して同一であることが判明した、VACV WR末端ヘアピンループの完全な配列もまた首尾よく得られる。全体として、これらのデータは、VACV-WR末端ヘアピンループが、HPXV ITR配列に首尾よくライゲートされ、感染性ウイルスにおいて回復されることを示唆している。さらに、5つのウイルスの各々におけるF-読み取りおよびS-読み取りの1:1分布は、両方の終端がウイルスを産生するために必要であることを示唆した(図5B)。

40

【0224】

次に、BsaI部位をサイレントに変異させる各ヌクレオチド置換が、scHPXV YFP-gpt::095ゲノム中に正確に取り込まれたことを検証する(図6)。配列

50

決定読み取りを、HPXV (DQ792504) 参照配列にマッピングする。領域 96, 050 ~ 96, 500 の scHPXV YFP - gpt : : 095 中の Illumina 配列決定読み取りカバー度全体が、図 6 A に示される。この領域中に参照 HPXV と正確にアラインしない 2 つの矛盾が存在することが、本明細書から明らかである (図 6 A、青色および黄色の垂直線)。これらの領域の拡大図から、scHPXV YFP - gpt : : 095 ゲノム中の 96, 239 位に T から C への置換が存在し (図 6 B)、96, 437 位に A から G への置換が存在する (図 6 C) ことが明らかである。選択された BsaI および AarI 認識部位を変異させるために導入されるヌクレオチド置換が全て、scHPXV YFP - gpt : : 095 ゲノム中に創出されていることが検証された (表 2)。

10

【0225】

最後に、GA__断片__2 中に独自の制限部位を創出するために設計された HPXV 044 中のヌクレオチド置換もまた scHPXV YFP - gpt : : 095 ゲノム中に取り込まれることが決定される。HPXV 044 (領域 44, 400 ~ 45, 100) にマッピングされる配列決定読み取りが図 7 A に示される。この領域内には、配列決定読み取りが HPXV YFP - gpt : : 095 参照配列中の配列の配列決定読み取りと矛盾する 2 つの領域が存在する (図 7 A、黄色の垂直線)。これらの領域の拡大図から、T から G への置換 2 つが、44, 512 位および 45, 061 位において HPXV 044 の非コード鎖中に導入され、そうして、断片__2 中に AvaI および StuI 制限部位を創出することが明らかである (図 7 B および 7 C)。全体として、配列決定データは、in vitro ゲノム分析データを裏付け、scHPXV YFP - gpt : : 095 が SFV 感染細胞において首尾よく再活性化されることを確認する。

20

【0226】

(実施例 6)

scHPXV YFP - gpt : : 095 は、HeLa 細胞において、他のボックスウイルスと比較して緩徐に複製する

材料および方法

BSC - 40、HeLa および HEL 線維芽細胞は、元々 American Type Culture Collection から得た。BSC - 40 細胞を、L - グルタミン、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質および抗真菌薬、ならびに 5 % ウシ胎仔血清 (FCS; ThermoFisher Scientific) を補充した最小必須培地 (MEM) 中で、5 % CO₂ 中で 37 °C で繁殖させる。HeLa および HEL 細胞を、L - グルタミン、抗生物質および抗真菌薬、ならびに 10 % FCS を補充したダルベッコ改変イーグル培地中で、5 % CO₂ 中で 37 °C で繁殖させる。

30

【0227】

結果

多段階増殖曲線およびプラークサイズ測定値を使用して、scHPXV YFP - gpt : : 095 が、他のオルソボックスウイルスと同様に in vitro で複製し広がるかどうかを評価する。天然の HPXV 単離体は入手不能であるので、scHPXV YFP - gpt : : 095 の増殖を、プロトタイプボックスウイルスである VACV (株 WR)、HPXV と密接に関連するボックスウイルスである牛痘ウイルス (CPX)、および Dryvax ウイルスのクローンである DPP15 と比較する。サル腎臓上皮細胞 (BSC - 40)、Vero 細胞、ヒト癌腫細胞株 (HeLa) および初代ヒト線維芽細胞 (HEL) に、低 MOI で VACV WR、CPX、DPP15 または scHPXV YFP - gpt : : 095 を感染させ、感染細胞を、72 時間の時間経過にわたって収集する。BSC - 40 細胞では、ウイルスの複製および広がり速度は、試験した全てのウイルス間で同等である (図 8 A)。重要なことに、試験した他のボックスウイルスのいずれかだけでなく、scHPXV YFP - gpt : : 095 も複製する。ウイルスは、HEL 細胞および Vero 細胞上でいくらかより低い力価まで増殖し、HeLa 細胞上では最も増殖が低かった。HeLa 細胞では、ウイルス産生における最大で 1.5 log の減少が、

40

50

他のオルソボックスウイルスと比較して見られる。

【0228】

次に、BSC-40細胞において増殖したscHPXV YFP-gpt::095のプラークサイズを測定する。VACV WRおよびさらには牛痘ウイルスと比較して、scHPXV YFP-gpt::095のプラークサイズにおける統計的に有意な減少(図8B)が観察される。興味深いことに、BSC-40細胞では、scHPXV YFP-gpt::095は、試験した全ての他のオルソボックスウイルスと比較した場合、最も小さいプラークを生じる(図8C)。また、異なるVACV株は、より小さい二次プラークを形成する細胞外ウイルスを生じるが、これらは、scHPXV YFP-gpt::095によっては生成されない(図8C)。全体として、これらのデータは、本明細書に記載される系を使用したscHPXV YFP-gpt::095の再活性化が、他のオルソボックスウイルスと比較した場合、*in vitro*でのウイルスの複製および広がりにおいて、いずれの明らかな欠陥も導入しないことを示唆している。さらに、scHPXV YFP-gpt::095のプラークサイズは牛痘ウイルス(CPV)のものと類似しており、これは、合成ウイルスの再活性化が、他のHPXV様クローンで先に観察された小さいプラークの表現型に対して、いずれの有害な影響も有さないことを示唆している(Medaglia ML, Moussatche N, Nitsche A, Dabrowski PW, Li Y, Damon IKら、Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. Journal of virology. 2015年; 89巻(23号): 11909~25頁)。

【0229】

(実施例7)

yfp/gpt選択マーカーの除去

scHPXV YFP-gpt::095の再活性化後、HPXV095遺伝子座中のyfp/gpt選択マーカーを除去する。これを行うために、HPXV(DQ792504)中のヌクレオチド位置91573~92921に対応する配列の1349bp領域を合成する(ThermoFisher Scientific)(配列番号60)。この断片は、野生型HPXV095/J2R遺伝子のいずれかの側に隣接する、およそ400bpの相同性を含んだ。DNAのこの配列を、GeneArtによって提供される市販のベクター中にクローニングする。HPXV095遺伝子配列でyfp/gptカセットを置き換えるために、BSC-40細胞に、0.5のMOIでscHPXV YFP-gpt::095を感染させ、次いで、2時間後に、Lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific)を使用して、野生型HPXV095配列を含む直鎖化されたプラスミド2μgをトランスフェクトする。ウイルス組換え体を、感染の48時間後に収集し、組換えウイルス(scHPXV(野生型))を、寒天下での3ラウンドの非蛍光プラーク精製を使用して単離する。HPXV095遺伝子遺伝子座に隣接するプライマーを使用するPCRを使用して、scHPXV(野生型)の同一性を確認する。HPXV095遺伝子の正確な置き換えを確認するために使用されるプライマーは、HPXV095__check-FWD 5'-CCTATTAGATACATA GATCCTCGTCG-3'(配列番号61)およびHPXV095__check-REV 5'-CGGTTTATCTAACGACACACATC-3'(配列番号62)である。

【0230】

(実施例8)

scHPXV(野生型)対scHPXV YFP-gpt::095の増殖特性

実施例6に上記したように実施した実験では、scHPXV(野生型)は、*in vitro*でscHPXV YFP-gpt::095と顕著には異ならない増殖特性を示す(図14A~C)。VACV WRと比較して、scHPXV(野生型)のプラークサイズにおける統計的に有意な減少が観察される(図14A)。scHPXV(野生型)は、

s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 と同様、細胞外ウイルスを産生せず（図 1 4 B）、B S C - 4 0 細胞、H E L 細胞、H e L A 細胞および V e r o 細胞上での s c H P X V（野生型）および s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 の増殖には、有意差は存在しない（図 1 4 C）。s c H P X V（野生型）が細胞外ウイルスを産生しないという知見は、この特性がビルレンスに影響を与えることを考慮すると適切である。

【 0 2 3 1 】

（実施例 9）

マウス鼻腔内モデルにおける s c H P X V（野生型）のビルレンスの決定

s c H P X V（野生型）の毒性効果をこの研究で決定する。この実験のために、6 群の B a l b / c マウスに、実施例 1 ~ 7 に記載した s c H P X V（ H P X V _ 0 9 5 / J 2 R ）または s c H P X V（野生型）の 3 つの異なる用量を投与し、P B S 対照群ならびに V A C V（W R）対照群および V A C V（D r y v a x 株 D P P 1 5）対照群と比較する（合計で 9 つの処置群）。研究の持続時間にわたっていずれの処置も受けない 3 匹のさらなるマウスを、この実験に含める。全てのマウスから、実験を通じた所定の時点において血液を試料採取し、さらなるマウスが、血清分析のためのベースラインとして機能する。

【 0 2 3 2 】

B a l b / c マウスの接種の前に、全てのウイルス株を、B S C - 4 0 細胞（アフリカミドリザル腎臓）中で増殖させ、トリプシン処理によって収集し、P B S 中で洗浄し、ダウンス型のホモジナイゼーションによって細胞から抽出し、3 6 % スクロースクッションを介した遠心分離によって精製し、P B S 中に再懸濁し、最終濃度が以下になるように力価決定する：1）V A C V（W R）- 5×10^5 P F U / m l；2）V A C V（D P P 1 5）- 10^9 P F U / m l；3）s c H P X V（ H P X V _ 0 9 5 / J 2 R ）- 10^7 P F U / m l、 10^8 P F U / m l および 10^9 P F U / m l、ならびに 4）s c H P X V（野生型）- 10^7 P F U / m l、 10^8 P F U / m l および 10^9 P F U / m l。

【 0 2 3 3 】

この研究のために選択された s c H P X V 用量（ 10^5 P F U / 用量、 10^6 P F U / 用量および 10^7 P F U / 用量）は、D r y v a x および I O C を含む、V A C V の公知のワクチン株を使用した以前の研究に基づく（Medaglia ML、Moussatche N、Nitsche A、Dabrowski PW、Li Y、Damon IKら、Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. Journal of virology. 2 0 1 5 年；8 9 巻（2 3 号）：1 1 9 0 9 ~ 2 5 頁；Qin L、Favis N、Famulski J、Evans DH. Evolution of and evolutionary relationships between extant vaccinia virus strains. Journal of virology. 2 0 1 5 年；8 9 巻（3 号）：1 8 0 9 ~ 2 4 頁）。

Journal of virology. 2 0 1 5 年；8 9 巻（2 3 号）：1 1 9 0 9 ~ 2 5 頁；Qin L、Favis N、Famulski J、Evans DH. Evolution of and evolutionary relationships between extant vaccinia virus strains. Journal of virology. 2 0 1 5 年；8 9 巻（3 号）：1 8 0 9 ~ 2 4 頁）。

【 0 2 3 4 】

体重減少は、マウスにおけるビルレンスの測定値として使用されるので、V A C V（株 W R）を、およそ 2 0 ~ 3 0 % の体重減少をもたらす 5×10^3 P F U の用量で鼻腔内投与する。V A C V D r y v a x クローン D P P 1 5 もまた、この周知の天然痘ワクチンのビルレンスを s c H P X V（野生型）と直接比較できるように、 10^7 P F U / 用量で鼻腔内投与する。マウスは C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s から購入し、受取り後、ウイルス投与の前に少なくとも 1 週間にわたって環境に順化させる。

【 0 2 3 5 】

各マウスは、麻酔下での鼻腔内注射を介して投与される単一用量のウイルス（約 1 0 u l）を受ける。マウスを、感染の徴候、例えば、腫脹、分泌（discharge）または他の異常について、3 0 日間の期間にわたって毎日モニタリングする。各マウスを、ウイルス投与後毎日、体重減少について具体的にモニタリングする。他の罹患率因子に加えて、体重の 2 5 % よりも多くを失うマウスは、U n i v e r s i t y o f A l b e r t aにおいて動物ヘルスケア施設プロトコールに従って安楽死に供する。

【0236】

試験した最も高い用量の s c H P X V でさえ、B a l b / c マウスにおける病気の明白な徴候が存在しない場合がある。s c H P X V と最も密接に関連する V A C V 株である旧南アメリカウイルス (old South American virus) は、一部の場合には、 10^7 P F U で疾患を生じなかった (Medaglia ML, Moussatche N, Nitsche A, Dabrowski PW, Li Y, Damon IKら、Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. Journal of virology. 2015 年; 89 巻 (23 号): 11909 ~ 25 頁)。 10^9 P F U / m L を超える力価を有する精製されたストックを作製することは困難であるので、これよりもかなり高い用量を試験することは実用的ではない。

【0237】

(実施例 10)

s c H P X V が致死 V A C V - W R 抗原投与に対する免疫保護を付与するかどうかを決定する

実施例 9 に記載される初回ウイルス投与によって影響されなかったように見えるマウスは、実験を通じて正常に体重が増加し続けた。ウイルス接種の 30 日後、マウスを、鼻腔内接種を介して致死用量の V A C V - W R (10^6 P F U / 用量) で引き続いて抗原投与する。マウスを、上記のように、感染の徴候について入念にモニタリングする。マウスを毎日体重測定し、他の罹患率因子に加えて、体重の 25 % よりも多くを失うマウスは安楽死に供する。本発明者らは、致死用量の V A C V - W R の投与の前に P B S を接種したマウスは、接種後 7 ~ 10 日以内に、顕著な体重減少および他の罹患率因子の徴候を示すと予想している。V A C V - W R による致死抗原投与のおよそ 14 日後、全てのマウスを安楽死させ、血液を収集して、標準的なブラック減少アッセイによって血清中の V A C V に特異的な中和抗体の存在を確認する。

【0238】

(実施例 11)

S F V により触媒される組換えおよび再活性化反応を使用した、合成キメラ V A C V (株 A C A M 2000) (s c A C A M 2000) の構築

V A C V (A C A M 2000) ゲノムの重複する断片の設計

V A C V ゲノムの公開された配列 (株 A C A M 2000; Genbank 受託番号 A Y 313847) を使用して、ゲノムを、15,979 bp ~ 28,795 bp 長のサイズ範囲の 9 個の重複する断片 (図 9) へと分割する (表 7)。これらの断片を、相同組換えが全長ゲノムのアセンブリを駆動できる部位を提供するために、各隣接断片と少なくとも 1.0 k b p の重複する配列相同性を共有するように設計する (表 7)。これらの重複は、共トランスフェクトされた断片間での正確かつ効率的な組換えを支持するのに十分でなければならない。

【0239】

これらの大きい断片を首尾よく合成およびサブクローニングするために、V A C V _ A C A M 2000 断片 1 ~ 7 中の各 B s a I および A a r I 部位をサイレントに変異させる。s c H P X V の創出と同様、効率的な D N A 複製およびコンカテマー分割にとって重要であった D N A 配列特色が存在する場合、2 つの I T R コード断片中の B s a I 制限部位は変異させない。

【0240】

初回再活性化のために、V A C V (A C A M 2000) 中のチミジンキナーゼを y f p / g p t カセットで置き換えて、新たに再活性化された V A C V 粒子の回収を助ける。

【表 7】

表 7: この研究で使用する VACV ACAM2000 ゲノム断片。サイズ、VACV ACAM2000 ゲノム [GenBank 受託番号 AY313847]内の位置、および隣接断片との重複が記載される。

断片名	サイズ (bp)	位置 (bp)	隣接断片との重複 (bp)
GA_LITR (A2000) (配列番号 50)	18,073	1 - 18,073	-- 断片_1 (2287)
GA_断片_1 (A2000) (配列番号 51)	24,895	15,787 - 40,681	LITR (2287) 断片_2 (1342)
GA_断片_2 (A2000) (配列番号 52)	23,297	39,340 - 62,636	断片_1 (1342) 断片_3 (2453)
GA_断片_3 (A2000) (配列番号 53)	24,971	60,184 - 85,154	断片_2 (2453) 断片_4 (1604)
GA_断片_4 (A2000) (配列番号 54)	26,575	83,551 - 110,125	断片_3 (1604) 断片_5 (1896)
GA_断片_5 (A2000) (配列番号 55)	24,635	108,230 - 132,864	断片_4 (1896) 断片_6 (2129)
GA_断片_6 (A2000) (配列番号 56)	25,934	130,736 - 156,669	断片_5 (2129) 断片_7 (2183)
GA_断片_7 (A2000) (配列番号 57)	28,801	154,487 - 183,287	断片_6 (2183) RITR (1403)
GA_RITR (A2000) (配列番号 58)	15,957	181,885 - 199,234	断片_7 (1403) --

10

20

【0241】

VACV ITRの左および右終端へのS形態およびF形態の末端ループ(VACV株 ACAM2000由来)のライゲーション

SFV感染細胞中にトランスフェクトされるVACV ITR断片を調製するために、末端ヘアピンループを、VACVヘアピンをHPXVテロメアに結合させるのに使用した、記載された同じ方法を使用して、左および右ITR断片にライゲートさせる。簡潔に述べると、DNA合成を介して、3ヌクレオチドから構成される5'オーバーハングが、各ヘアピンの終端に残される(5'-ACA;実施例1および2に記載されるとおり)。一方、左および右VACV ITR断片をコードするプラスミドクローンを、VACVゲノムの開始をコードする最初のヌクレオチドにすぐ隣接する位置にあるSapI認識部位をコードするように設計する。ITRクローンをSapIで消化することで、末端ヘアピンループ構造中の5'-ACAオーバーハングに対して相補的な3塩基オーバーハング(5'-TGT)を創出する。左または右ITR断片を、約20倍モル過剰の末端ループと混合し、ライゲートさせる。これは、各ITRのヘアピン終結したコピーを生成する。

30

【0242】

scACAM2000のレポリボックスウイルスにより触媒される組換えおよび再活性化

VACVゲノムDNA断片の消化およびDNA浄化後、これらをSFV感染BGMK細胞中にトランスフェクトする。先に記載したように、SFVヘルパーウイルスは、隣接する相同な配列を共有する断片間での組換えを触媒して、パッケージングされ細胞から放出され得る全長VACVゲノムの創出を生じる。ハイブリッドウイルスがこのアッセイで産生される可能性は低い。4日後、BGMK細胞を収集し、再活性化されたVACVウイルス粒子を、凍結-解凍によって放出させ、その後感受性BSC-40細胞上にプレーティングする。再活性化されたVACV(ACAM2000)プラークは、BSC-40細胞上でプラークを形成する唯一のウイルスである。プラークをピックしてクローン性ウイル

40

50

ストックを産生し、その後、next Gen Illumina 配列決定によって配列決定されるゲノムDNAを単離して、回収されたウイルスの完全性を確認し、scACAM2000が首尾よく再活性化されたかどうかを同定する。

【0243】

(実施例12)

小動物モデルにおけるscHPXVの安全性および免疫原性

材料および方法

scHPXV感染のマウス鼻腔内モデル。6～8週齢のBALB/cマウスをCharles River Laboratoriesから購入する。5匹のマウスの群に、10 μ lのPBS中5 \times 10³ PFUのVACV(株WR)、1 \times 10⁷のVACV(Dryvax DPP15)、または1 \times 10⁵ PFU、1 \times 10⁶ PFUもしくは1 \times 10⁷ PFUのscHPXV YFP-gpt::095(実施例1～6に記載される)もしくはscHPXV(野生型)(実施例7および8に記載される)を、鼻腔内感染させる(またはモック感染させる)。マウスを、28日間にわたって毎日体重測定し、以下の臨床的徴候をスコアする:被毛の乱れ、呼吸困難、低減された運動性およびボックス病変。初期体重の25%を失うマウスは安楽死させる。これらのワクチン接種マウスを、1 \times 10⁶ PFUのVACV(株WR)で引き続いて鼻腔内抗原投与し、上記のように13日間にわたって毎日、体重測定し、疾患の臨床的徴候についてモニタリングする。初期体重の25%を失うマウスは、現地の動物実験委員会によって承認されたプロトコールに従って安楽死させる。

【0244】

結果

scHPXV株は、ボックスウイルス感染の鼻腔内マウスモデルにおいて体重減少を引き起こさない

scHPXV YFP-gpt::095またはscHPXV(野生型)の毒性効果を、ボックスウイルス感染の鼻腔内マウスモデルにおいて試験する。マウスに、示された用量のscHPXV(野生型)を鼻腔内接種し、その体重を28日間の期間にわたってモニタリングする。28日間の期間にわたって、scHPXV YFP-gpt::095またはscHPXV(野生型)の用量のいずれを接種したマウスにおいても体重減少は見られない(図10)。これは、それぞれ初期体重の平均で15%および10%を失う、Dryvax DPP15(10⁷ PFU)またはVACV WR(5 \times 10³ PFU)のいずれかを接種した動物とは対照的である。これらのデータは、試験したscHPXV(野生型)およびscHPXV YFP-gpt::095の最も高い用量(10⁷ PFU)であっても、有害効果が観察されないことを示唆している。しかし、公知の天然痘ワクチン株DPP15を用いると、一過的な体重減少が、接種の約7日後までにマウスにおいて検出されるが、これらのマウスは、接種の約10日後までに初期体重に戻る。

【0245】

scHPXV YFP-gpt::095(10⁶ および10⁷ PFU)およびscHPXV(野生型)(10⁵、10⁶、10⁷ PFU)は、BALB/cマウスにおいて致死VACV WR抗原投与に対する免疫保護を付与する

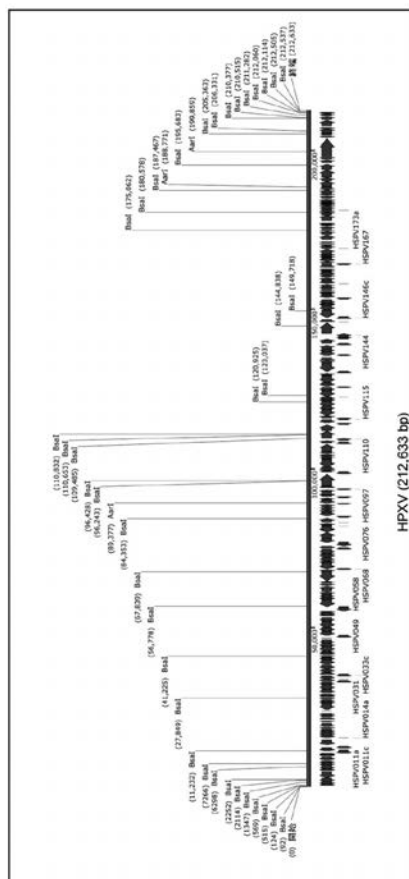
scHPXV YFP-gpt::095、scHPXV(野生型)、DPP15およびVACV WRの示された株によるBALB/cマウスの28日間の免疫化(図10)後、マウスを、致死鼻腔内用量のVACV WR(10⁶ PFU)で引き続いて抗原投与して、マウスにおけるscHPXV(野生型)またはscHPXV YFP-gpt::095の保護有効性を評価する。PBSで最初に処置したマウスは全て、感染で死亡するが、10⁷ PFUのDryvax(DPP15)または5 \times 10³ PFUのVACV WRに最初に曝露させた動物は、体重減少を示さず(図11A)、病気の徴候を示さない(図11B)。2つのより低い用量のscHPXV YFP-gpt::095でワクチン接種した動物は、体重減少(図11A)および臨床スコアに基づく重症の病気の徴候(図11B)を示し、最も低いscHPXV YFP-gpt::095用量の2匹の動物も

感染で死亡することが観察される（図 1 2）。s c H P X V Y F P - g p t : : 0 9 5 のこれらの低用量群中の残りの動物は、感染から回復することが最終的に観察されるが、その体重は、群の残りにおける平均体重よりも低いままである。10⁵ ~ 10⁷ PFU の s c H P X V（野生型）に先に曝露させた動物は、ボックスウイルス抗原投与後の最初の数日間に軽微な一過的な体重減少のみを示し（図 1 1 A）、病気の臨床的徴候は示さない（図 1 1 B）。これらのデータは、s c H P X V がマウスに感染でき、致死 V A C V 抗原投与に対してマウスを免疫化でき、初回免疫化ステップの間に疾患を引き起こすことなくそれを行うことができることを示す。

【 図 1 A 】

Figure 1A

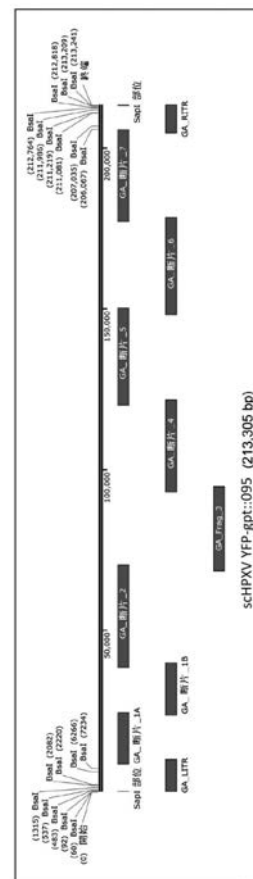
未改変のHPXVゲノム(株MNR-76; GI DQ792504)



【 図 1 B 】

Figure 1B

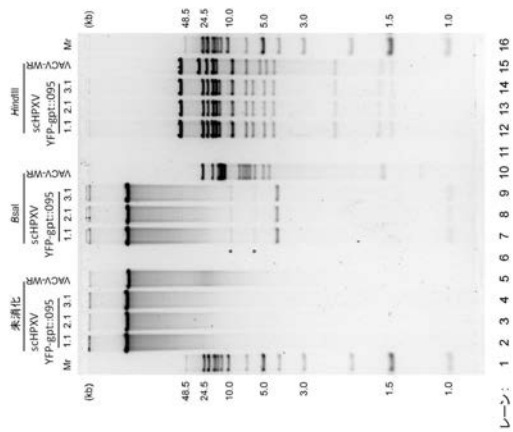
DNA合成に使用したscHPXVゲノム



【図 4 B】

Figure 4B

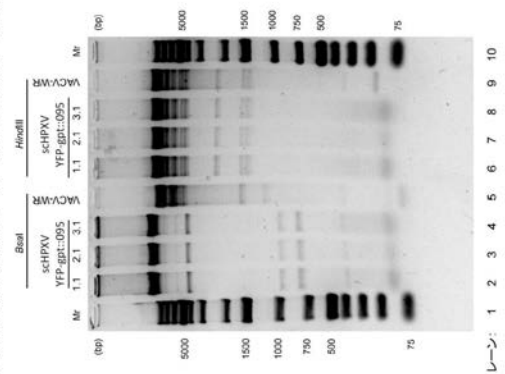
BsaIおよびHindIII消化後のschHPXV YFP-gpt::095のPFGE



【図 4 C】

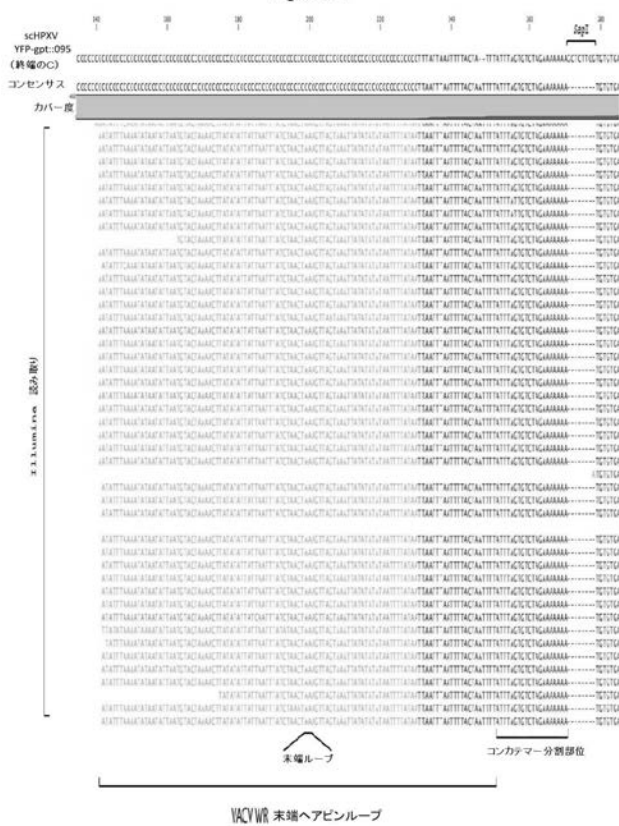
Figure 4C

BsaIおよびHindIII消化後のschHPXV YFP-gpt::095のアガロース電気泳動



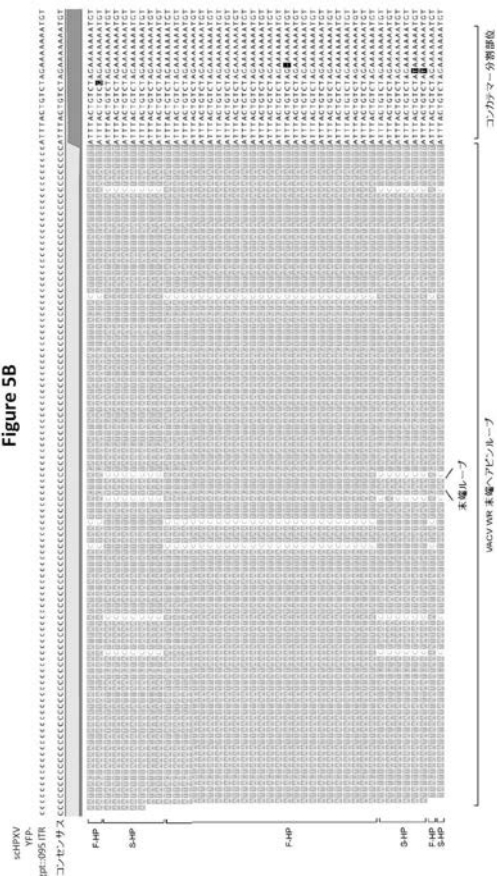
【図 5 A】

Figure 5A



【図 5 B】

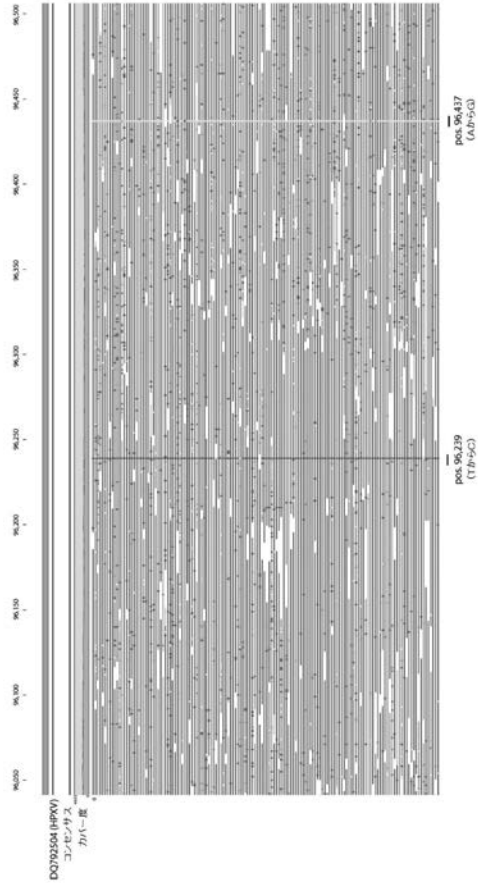
Figure 5B



【図 6 A】

Figure 6A

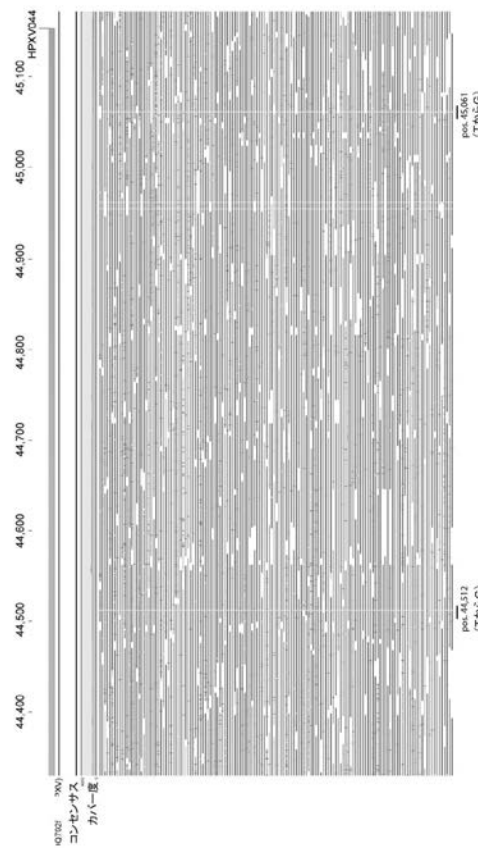
scHPXV YFP-gpt::095領域96, 050~96, 500における全体的Alumina読み取りカバー度



【図 7 A】

Figure 7A

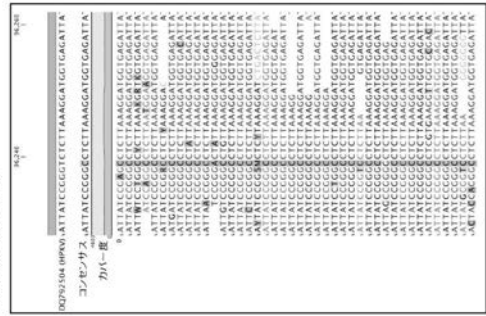
scHPXV YFP-gpt::095中に独自の制限部位を創出するためのHPXV044中のヌクレオチド変化



【図 6 B】

Figure 6B

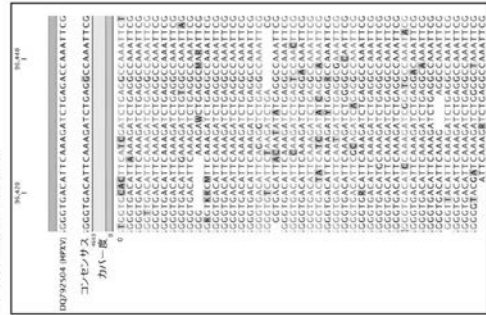
96239位におけるBsal変異



【図 6 C】

Figure 6C

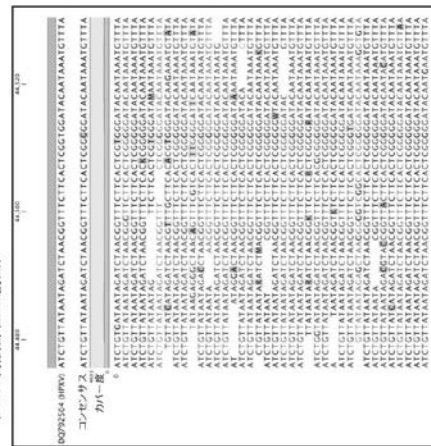
96437位におけるBsal変異



【図 7 B】

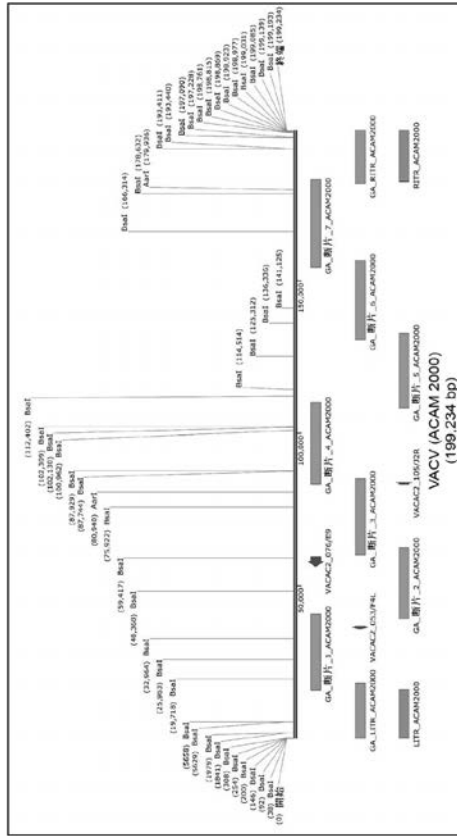
Figure 7B

44, 512位におけるHPXV044中のヌクレオチド変化
(Aval制限部位の創出)



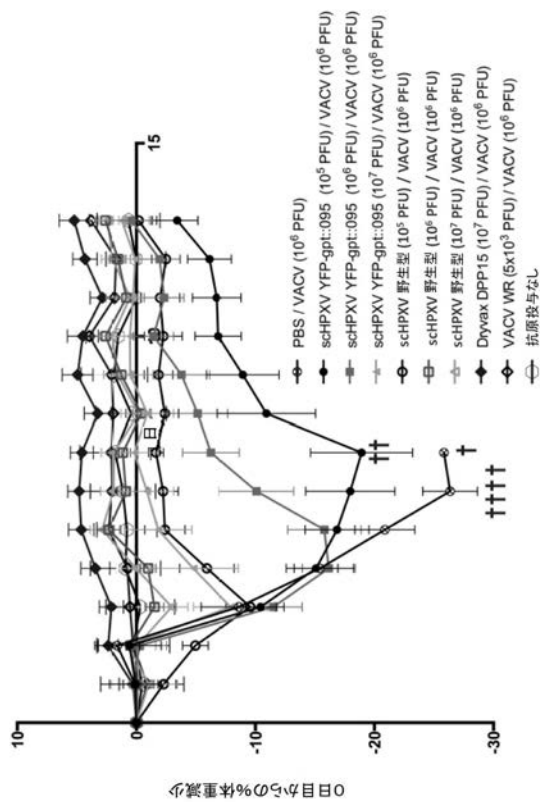
【図 9】

Figure 9



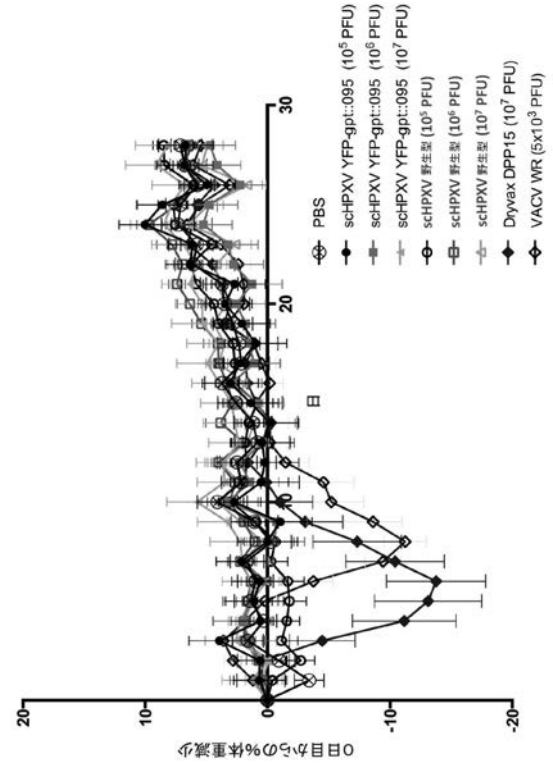
【図 11 A】

Figure 11A



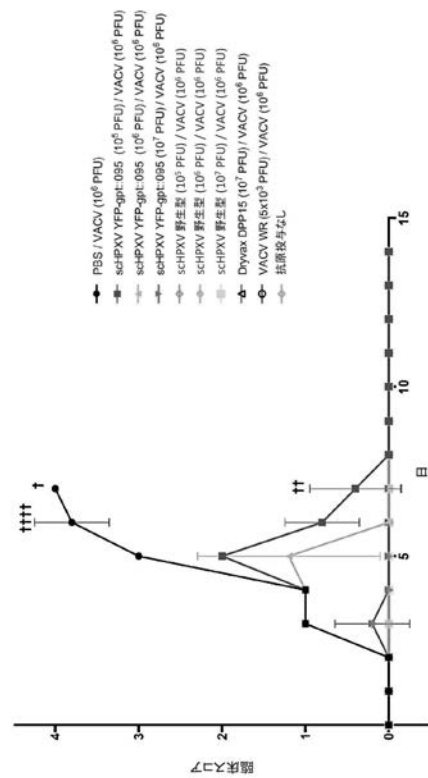
【図 10】

Figure 10

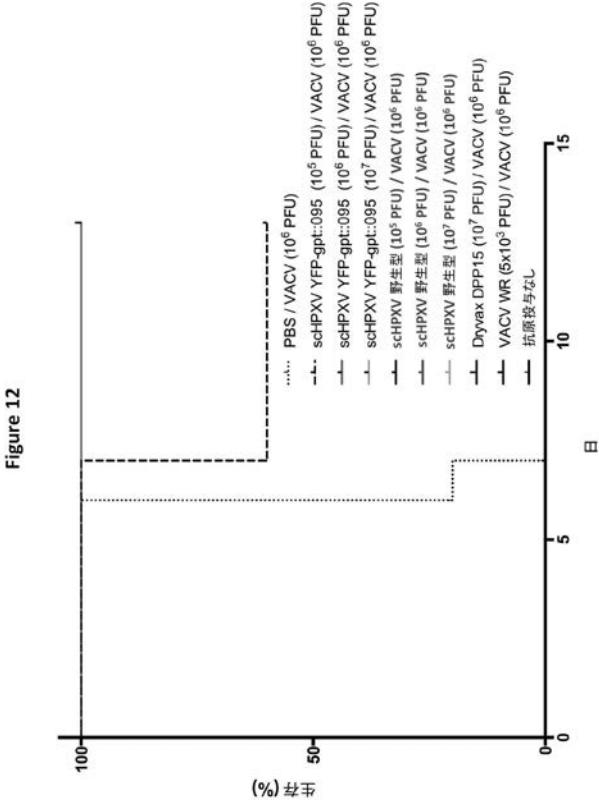


【図 11 B】

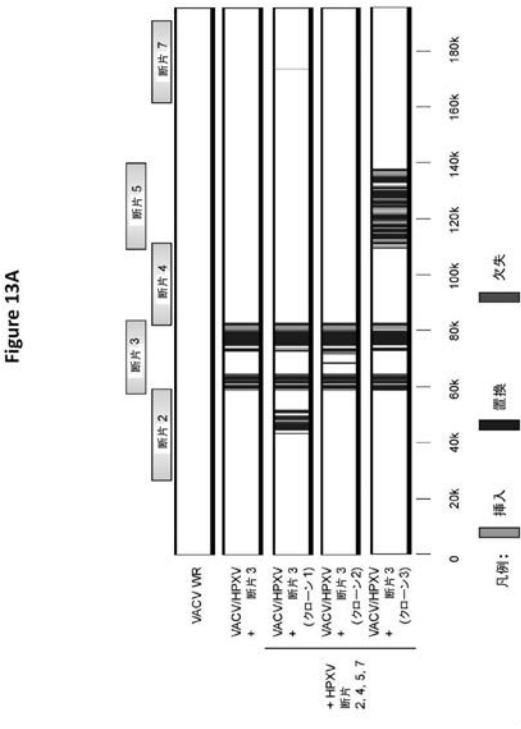
Figure 11B



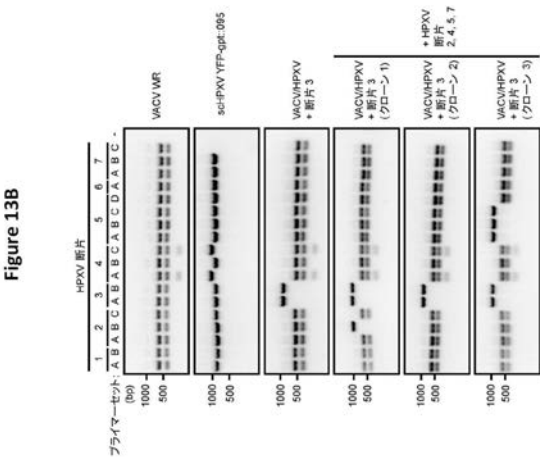
【 図 1 2 】



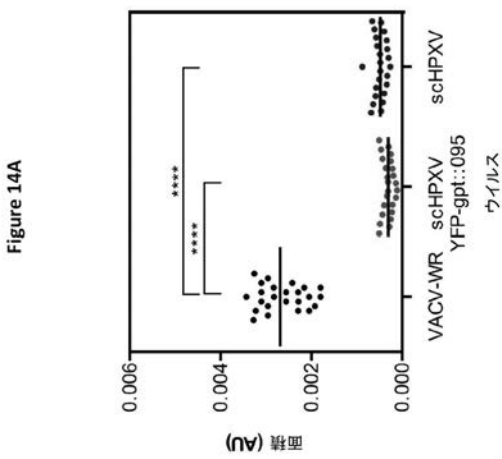
【 図 1 3 A 】



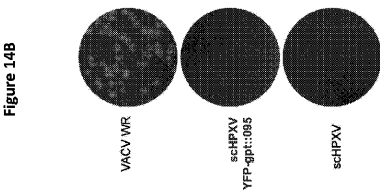
【 図 1 3 B 】



【 図 1 4 A 】

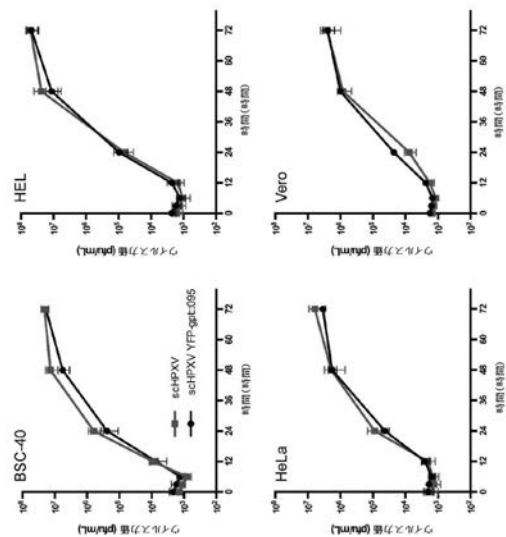


【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】

Figure 14C



【 配 列 表 】

2019535311000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/059782
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 7/01 (2006.01) A61K 39/275 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PATENW, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE: Poxvirus, orthopox, horsepox, terminal hairpin loop, chimeric, overlapping fragments and like terms; CPC: C12N2710/24011, A61K39/275. AUSPAT, ESPACENET, PUBMED, Internal databases: Inventor names.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 29 January 2018		Date of mailing of the international search report 29 January 2018
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Richard Filmer AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832735

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/059782

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☐ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- No Sequence Listing was filed, although the specification describes some of the sequences referred to by their SEQ ID NOs.
- No sequences defined in the specification were the subject of a search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/059782

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☒ Claims Nos.: **34-37, 60-63**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Box
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2017/059782
Supplemental Box	
<p>Continuation of Box II Claims 34-37 and 60-63 make reference to SEQ ID NOs: 11 and 12, however no Sequence Listing was filed with the specification and these sequences do not appear to be defined anywhere in the specification. The scope of these claims is thus so unclear that no meaningful search or exam can be conducted.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/US2017/059782
Category*	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0014034 A1 (EVANS et al.) 22 January 2004 [0006]-[0012], [0017], [0018], [0041], [0042], [0049], [0061], [0083]-[0126], Figs. 1, 2	1-5, 7-30, 32, 33, 38-43, 71-88, 102, 103, 105-111, 118, 119, 121-127
X	YAO, X.-D. et al., "High-Frequency Genetic Recombination and Reactivation of Orthopoxviruses from DNA Fragments Transfected into Leporipoxvirus-Infected Cells", Journal of Virology, 2003, vol. 77, no. 13, pages 7281-7290 Abstract; page 7281, column 2; Materials and Methods	1-5, 7-30, 32, 33, 38-43, 71-88, 102, 103, 105-111, 118, 119, 121-127
X	YAO, X.-D. et al., "Construction of Recombinant Vaccinia Viruses Using Leporipoxvirus-Catalyzed Recombination and Reactivation of Orthopoxvirus DNA", Methods in Molecular Biology, 2004, vol. 269, pages 51-64 Materials; Methods	1-5, 7-30, 32, 33, 38-43, 71-88, 102, 103, 105-111, 118, 119, 121-127
A	LI, X.-D. et al., "Recovery of a chemically synthesized Japanese encephalitis virus reveals two critical adaptive mutations in NS2B and NS4A", Journal of General Virology, 2014, vol. 94, pages 806-815 Methods: Plasmid construction	
A	TULMAN, E. R. et al., "Genome of Horsepox Virus", Journal of Virology, 2006, vol. 80, no. 18, pages 9244-9258	
P,X	"WHO Advisory Committee on Variola Virus Research: Report of the Eighteenth Meeting", 2-3 November 2016, Geneva, Switzerland, World Health Organisation. [Retrieved from Internet 13 December 2017] <URL: http://www.who.int/csr/resources/publications/smallpox/variola-research-november-2016/en/ > Chapter 18, Pages 29-31	1-33, 38-59, 64-127
P,X	KOBLENTZ, G. D. "The De Novo Synthesis of Horsepox Virus: Implications for Biosecurity and Recommendations for Preventing the Reemergence of Smallpox". Health Security, 2017, vol. 15, no. 5, pages 620-628, Epub 24 August 2017 Abstract; "The Synthesis of Horsepox Virus"; Fig. 1	1-33, 38-59, 64-127
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2017/059782	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2004/0014034 A1	22 January 2004	US 2004014034 A1	22 Jan 2004
		CA 2431349 A1	06 Dec 2003
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(71)出願人 519156247

レーダーマン, セス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10128, ニューヨーク, イー. 96ティーエイチ ス
トリート 166, アpartment 17エー

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 エバンス, デイビッド

カナダ国 ティー6ジー 2イーアイ アルバータ, エドモントン, カッツ グループ セン
ター 020-6, ユニバーシティ オブ アルバータ

(72)発明者 ノイス, ライアン

カナダ国 ティー6ジー 2イーアイ アルバータ, エドモントン, カッツ グループ セン
ター 020-6, ユニバーシティ オブ アルバータ

(72)発明者 レーダーマン, セス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10128, ニューヨーク, イー. 96ティーエイチ ス
トリート 166, アpartment 17エー

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA93X AA95X AA95Y AB01 AC14 AC20 BA01 BA05 BA30

BB12 BB25 BB32 BB37 BC03 BC07 CA24 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA17 MA66 NA14 ZB07 ZB33