

(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2008-533988

(P2008-533988A)

(43) 公表日 平成20年8月28日(2008.8.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/125 (2006.01)	A 6 1 K 39/125 Z N A	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
C O 7 K 14/085 (2006.01)	C O 7 K 14/085	4 H O 4 5
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 121 頁) 最終頁に続く		

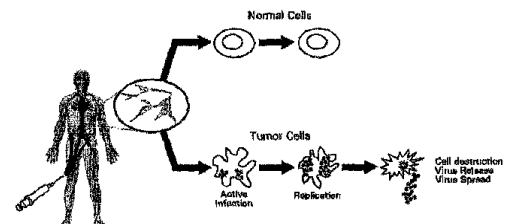
(21) 出願番号	特願2008-503027 (P2008-503027)	(71) 出願人	507318554
(86) (22) 出願日	平成18年3月13日 (2006.3.13)		ネオトロピックス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月21日 (2007.11.21)		アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/009142		3 5 5 モルヴァーン フェニックスヴィ
(87) 国際公開番号	W02006/101841		ル パイク 3 5 1
(87) 国際公開日	平成18年9月28日 (2006.9.28)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	60/664, 442		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成17年3月23日 (2005.3.23)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小川 信夫
(31) 優先権主張番号	60/726, 313	(74) 代理人	100084663
(32) 優先日	平成17年10月13日 (2005.10.13)		弁理士 箱田 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100093300
(31) 優先権主張番号	11/335, 891		弁理士 浅井 賢治
(32) 優先日	平成18年1月19日 (2006.1.19)	(74) 代理人	100114007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セネカバレーウイルスを基盤とする組成物及び疾患を治療する方法

(57) 【要約】

本発明は、セネカバレーウイルス（「SVV」）と呼ばれる新規RNAピコルナウイルスに関連する。本発明は、単離したSVV核酸及びこれらの核酸でコードされるタンパク質を提供する。更に、本発明はSVVタンパク質に対して発生された抗体を提供する。SVVが腫瘍の幾つかの種類を選択的に死滅させる能力を有するので、本発明は、SVV及びSVVポリペプチドを使用して癌を治療する方法を提供する。SVVが特定の腫瘍を特異的に標的にするので、本発明は、SVV核酸及びタンパク質を使用して癌を検出する方法を提供する。加えて、SVVの腫瘍特異的な機構により提供される情報によって、本発明は、新たな腫瘍溶解ウイルス誘導体を作製する方法、及び腫瘍特異的親和性を有するようにウイルスを変える方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号： 1 6 8 又は (i i) 少なくとも 2 0 個のヌクレオチドの長さの配列番号： 1 6 8 の連続する部分と少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する核酸配列を含む単離核酸。

【請求項 2】

前記核酸が R N A 又は D N A である、請求項 1 記載の単離核酸。

【請求項 3】

(i) 配列番号： 1 6 9 又は (i i) 少なくとも 1 0 個のアミノ酸の長さの配列番号： 1 6 9 の連続する部分と少なくとも 7 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

10

【請求項 4】

配列番号： 1 6 8 と少なくとも 9 5 % 、 9 0 % 、 8 5 % 、 8 0 % 、 7 5 % 、 7 0 % 又は 6 5 % の同一性がある配列を含むゲノムを有する、単離セネカバレーウイルス又はその誘導体若しくは類縁体。

【請求項 5】

次の特徴：腫瘍細胞における複製能、腫瘍細胞親和性及び正常な細胞における細胞溶解の欠如を含む、請求項 4 記載のウイルス。

【請求項 6】

前記ウイルスが神経内分泌特性を有する腫瘍細胞型において複製能を有する、請求項 5 記載のウイルス。

20

【請求項 7】

請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項記載のウイルスの有効量及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 3 記載のポリペプチドに、又は請求項 4 若しくは 5 記載の単離ウイルスのいずれかのエピトープに特異的に結合する単離抗体。

【請求項 9】

癌の治療のための少なくとも 1 0 0 個のヌクレオチドの配列番号： 1 6 8 の連続する配列と少なくとも 7 5 % の同一性がある配列を含むゲノムを有するウイルスの使用。

30

【請求項 1 0】

前記ウイルスがピコルナウイルスである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

前記ピコルナウイルスがカルジオウイルスである、請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】

前記カルジオウイルスがヴィリユイスクヒト脳脊髄炎ウイルス、タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス及び脳心筋炎ウイルスからなる群より選択される、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ピコルナウイルスが、セネカバレーウイルスが属する属のメンバーである、請求項 1 2 記載の方法。

40

【請求項 1 4】

前記ピコルナウイルスがセネカバレーウイルスである、請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ピコルナウイルスがセネカバレーウイルス様ピコルナウイルスである、請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記セネカバレーウイルス様ピコルナウイルスが、M N 8 8 - 3 6 6 9 5 、 N C 8 8 - 2 3 6 2 6 、 I A 8 9 - 4 7 5 5 2 、 N J 9 0 - 1 0 3 2 4 、 I L 9 2 - 4 8 9 6 3 、 C A 1 3 1 3 9 5 、 L A 1 2 7 8 、 I L 6 6 2 8 9 、 I L 9 4 - 9 3 5 6 、 M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6 、 M N 9 9 1 9 7 及び S C 3 6 3 6 4 9 からなる分離株の群より選択される

50

、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

異常増殖性細胞を請求項 4～6 のいずれか 1 項記載のウイルスと接触させることを含む、前記細胞を死滅させる方法。

【請求項 18】

(a) セネカバレーウイルスゲノムが配列番号：168 と少なくとも 95% の同一性がある配列を含むセネカバレーウイルスゲノム配列を、試験ウイルスゲノム配列と比較すること；

(b) セネカバレーウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドと試験ウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドとの間の少なくとも最初のアミノ酸の差を同定すること；

(c) 試験ウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドがセネカバレーウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドに対して少なくとも 1 つ少ないアミノ酸の差を有するように、試験ウイルスゲノム配列を突然変異させること；

(d) 突然変異試験ウイルスゲノム配列を腫瘍細胞に形質移入すること；及び

(e) 腫瘍細胞が突然変異試験ウイルスゲノム配列により細胞溶解的に感染しているかを判断すること；

を含む腫瘍溶解ウイルスを作製する方法。

【請求項 19】

前記試験ウイルスがピコルナウイルスである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記試験ウイルスがセネカバレーウイルス様ピコナウイルスである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記のアミノ酸の差がセネカバレーウイルスカプシドタンパク質と試験ウイルスカプシドタンパク質との間にある、請求項 18 記載の方法。

【請求項 22】

試験ウイルスゲノム配列を突然変異することが試験ウイルスゲノム配列を有する cDNA を突然変異することを含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】

前記突然変異試験ウイルスゲノム配列を形質移入することが RNA を形質移入することを含み、前記 RNA が突然変異試験ウイルスゲノム配列を有する cDNA から生成される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 24】

(a) 少なくとも 100 個のヌクレオチドの長さの配列番号：168 の連続する部分と少なくとも 75% の同一性がある核酸配列を含む親配列から作り出される、複数個の核酸配列を含むウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すこと；

(b) ウイルス突然変異体のライブラリーを複数の突然変異ウイルスが産生されるように許容細胞に形質移入すること；

(c) 複数の突然変異ウイルスを単離すること；

(d) 単離した複数の突然変異ウイルスを非許容細胞と共にインキュベートすること；及び

(e) 非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収し、それによって変化した親和性を有する突然変異ウイルスを作製すること；

を含む変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法。

【請求項 25】

(f) 回収した突然変異ウイルスを非許容細胞でインキュベートすること；及び

(g) 非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収すること；

を更に含む、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

(f) 及び (g) を繰り返し反復することを更に含む、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

インキュベーションがマルチウエルハイスループットプラットフォームで実施され、前記プラットフォームがそれぞれのウエルに異なる非許容細胞型を含む、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記プラットフォームをスクリーニングしてどのウエルが細胞を死滅させる突然変異ウイルスを含有するかを同定することを更に含む、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記スクリーニングがそれぞれのウエルにおける吸光度を分析することによって実施される、請求項 2 8 記載の方法。

10

【請求項 3 0】

前記非許容細胞が腫瘍細胞である、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記ウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことが、

(i) 親配列の一部と配列同一性を有するポリヌクレオチドを提供すること；

(i i) ポリヌクレオチドを突然変異して複数の異なる突然変異ポリヌクレオチド配列を生成すること；及び

(i i i) 複数の突然変異ポリヌクレオチドを (i) でポリヌクレオチドが含有するウイルスのゲノム配列部分以外のウイルスのゲノム配列を有するベクターと連結し、それによってウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すこと；

20

を含む、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 2】

(i) において、ウイルスのゲノム配列がピコルナウイルスからのものである、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ピコルナウイルスがセネカバレーウイルス様ピコルナウイルスである、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 (i i) の突然変異がポリヌクレオチドへのヌクレオチドのランダム挿入により実施される、請求項 3 1 記載の方法。

30

【請求項 3 5】

前記 (i i) の突然変異がポリヌクレオチドのカプシドコード領域で実施される、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記のヌクレオチドのランダム挿入がトリヌクレオチド突然変異誘発 (T R I M) により実施される、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 7】

前記ポリヌクレオチドに挿入される前記ヌクレオチドの少なくとも一部がエピトープタグをコードする、請求項 3 6 記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、2005年3月23日に出願された米国特許出願第60/664,442号、2005年10月13日に出願された米国特許出願第60/726,313号、及び2006年1月19日に出願された米国特許出願第11/335,891号の優先権を主張する。これらの出願は、その全体が参考として本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、著作権保護の対象となるものを含む。著作権所有者は、米国特許商標庁の特許ファイル又は記録に現れている、特許文献又は特許開示のいずれかのファクシミリ複製

50

に対して異議はないが、そうでない場合はあらゆる全ての著作権を保持する。

【 0 0 0 3 】

本明細書に引用される全ての特許出願、公開特許出願、発行及び付与された特許、テキスト及び参考文献は、本発明が関わる技術の状態をより完全に記載するため、それらの全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

ウイルス療法は癌を治療するのに大いに有望である。癌細胞に特異的に感染し、死滅させることを目的とする腫瘍溶解ウイルスは、天然及び/又は操作されているかにかかわらず、化学療法及び放射線のような代替的治療よりも効果的であり、毒性が少ない。加えて、複製能ウイルスを使用する腫瘍溶解ウイルス療法は、薬理学的に望ましい部位で治療を増強できることが知られている唯一の療法である。

【 0 0 0 5 】

癌療法の主な態様は、正常な細胞に対して高い率で癌細胞の死滅を達成することである。この目標を達成することは、関与する細胞型が広範囲であること、転移による癌細胞の全身的な播種、及び正常な細胞と癌細胞との生物学的な差が狭いことを含む多くの理由によって困難であった。進展はあったが、現行の癌治療を改善するには依然として多くのことをする必要がある。

【 0 0 0 6 】

過去に、外科医は、患者を実質的に傷つけることなく外科的に腫瘍を除去しようと試みた。原発性腫瘍の完全な除去でさえも、体内の未知の部位への早期の転移が未検出のまま残されるので、生存を確実にしない。また、外科的介入は、血管形成インヒビターを産生する腫瘍細胞の除去のために、遠隔転移の増殖を増強する場合があることを幾つかの研究が示唆している。最後に、多くの場合に、腫瘍は、外科的除去の後に元の部位で再び増殖する。放射線は、最も急速に増殖する細胞を他を犠牲にして選択的に破壊することを目的としている。しかし、腫瘍細胞は、治療の間に抵抗性になるか又は非分化状態になって、放射線療法を回避することができる。加えて、放射線は、多くの正常な細胞が活性的に分化し、治療により死滅する点において（骨髄の細胞、胃腸細胞、毛嚢など）、必ずしも選択的ではない。

【 0 0 0 7 】

放射線と同様に、化学療法は完全に選択的ではなく、したがって多くの正常な細胞を破壊し、薬剤耐性及び/又は細胞の分化状態に起因して全ての腫瘍細胞は死滅させない。したがって、化学療法及び放射線療法は、正常な細胞と癌細胞との間に存在する小さな分差感を利用し、治療指数が狭い。小さな治療指数は、癌を治療するあらゆるモダリティーにとって明らかに望ましくない特性である。したがって、これらの制限を克服する新規の癌治療の手法が望まれる。

【 0 0 0 8 】

そのような新規の手法の一つは、腫瘍溶解ウイルス療法である。最初に、細胞毒性導入遺伝子を持つ複製欠損ウイルスを利用して、癌を治療しようと試みた。しかし、これらは、腫瘍の形質導入が不十分であること、腫瘍腫瘍内の拡散が不十分であること、及び癌に対する選択性が不十分であることが見出された。この制限を克服するために、ウイルスを腫瘍細胞内で選択的に複製するように修飾したか、又は天然に腫瘍選択性を有するウイルスを発見した。したがってこれらの腫瘍溶解ウイルスは、ウイルスを局所的に注入すること又はウイルスを全身的に送達することによって、腫瘍体積の全体にわたって複製し、拡散し、腫瘍細胞を選択的に死滅させる特性を有した（図 1）。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

この新たに定義された種類の抗癌療法に対する初期の期待にもかかわらず、癌療法として使用するのを制限する可能性がある幾つかの制限が依然として存在する。したがって、

癌療のために利用できる新規腫瘍溶解ウイルスの継続的な必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要約)

新規RNAピコルナウイルスが発見され(本明細書以降ではセネカバレーウイルス(Seneca Valley virus)(「SVV」)と呼ぶ)、この天然の特性には、幾つかの種類の腫瘍を選択的に死滅させる能力が含まれる。下記の実施例で実証されているように、SVVは、神経親和性をもって、ほとんどの場合、正常な細胞に対して腫瘍細胞の50%を死滅させるのに必要なウイルスの量(すなわち、 EC_{50} 値)で10,000倍を超える差をもって、腫瘍株を選択的に死滅させる。この結果は、インビボにも置き換えられ、マウスにおける腫瘍外植片は、選択的に排除されている。更に、インビボの結果は、SVVは、 1×10^{14} vp/kg(1kgあたりのベクター又はウイルス粒子)までの全身投与が、免疫欠損又は免疫適格マウスにおいて死亡及び目に見える臨床症状を引き起こさないもので、正常な細胞に毒性ではないことを示す。

10

【0011】

SVVは、 1×10^8 vp/kgの低い濃度で効力を誘発し、したがって、 $>100,000$ の非常に高い治療指数が達成される。効力は、マウスに既に確立している大型の腫瘍の100%を完全に消滅させることができるという点において、非常に強力である(実施例11を参照すること)。この効力は、あらゆる補助療法なしでSVVの単回全身注入により仲介することができる。更に、SVV注入マウスは、注入後少なくとも200日間は臨床症状も、腫瘍の再発も示していない。SVVを精製してより高い力価にすることもでき、許容細胞株において1細胞あたり $>200,000$ 個のウイルス粒子を産生することができる。したがって、SVVを基盤とするウイルス療法は、選択された種類の癌の治療において安全で有効な新規治療方針としてかなり有望である。更に、SVVは、小型で容易に操作できるゲノム、簡素で速い生活環、及びよく理解されている複製の生態学を有し、したがって修飾を受けやすい。これらの特性は、少なくとも部分的には、SVVを基盤とする治療法が元のSVV分離株による感染に抵抗性のある新規腫瘍型を対象とすることができるように、新規細胞及び組織特異的親和性を有する修飾SVVを生成する方法を可能にする。

20

【0012】

したがって、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168に、若しくは少なくとも50個のヌクレオチドの長さのこれらの配列のうちのいずれか1つの連続する部分に少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の配列同一性を有するか、又は少なくとも10、15若しくは20個のヌクレオチドの長さのこれらの配列のうちのいずれか1つの連続する部分に95%の同一性を有する核酸配列を含む単離核酸を提供する。本発明の単離核酸は、RNA又はDNAであってもよい。

30

【0013】

本発明の全ての態様において、単離核酸は、本明細書のSVV核酸配列番号の配列のうちのいずれか1つの連続する部分に少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する核酸配列を含むことができ、ここで連続する部分は、例えば、少なくとも約20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、750、1000、1250、1500、2000又は2500個のヌクレオチドの長さである。SVV核酸配列番号の配列としては、例えば、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21及び168が挙げられる。

40

【0014】

本発明の全ての態様において、単離タンパク質又はペプチドは、本明細書のSVVアミノ酸配列番号の配列のうちのいずれか1つの連続する部分に少なくとも約50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%

50

又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができ、ここで連続する部分は、例えば、少なくとも約 5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300 又は 350 個のアミノ酸の長さである。SVV アミノ酸配列番号の配列としては、例えば、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 169 が挙げられる。

【0015】

別の態様において、本発明は、配列番号：168 に、又は少なくとも 20、50、100 若しくは 200 個のヌクレオチドの長さの配列番号：168 の連続する部分に少なくとも 95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有する核酸配列を含む単離核酸を提供する。単離核酸は、配列番号：168 の SVV 架橋ヌクレオチド 1～666 の 5' 非翻訳領域 (UTR)；配列番号：168 の SVV ポリタンパク質架橋ヌクレオチド 667～7209 のコード配列；配列番号：168 の SVV 架橋ヌクレオチド 667～903 のリーダーペプチドのコード配列；配列番号：168 の SVV VP4 タンパク質架橋ヌクレオチド 904～1116 のコード配列；配列番号：168 の SVV VP2 タンパク質架橋ヌクレオチド 1117～1968 のコード配列；配列番号：168 の SVV VP3 タンパク質架橋ヌクレオチド 1969～2685 のコード配列；配列番号：168 の SVV VP1 タンパク質架橋ヌクレオチド 2686～3477 のコード配列；配列番号：168 の SVV 2A タンパク質架橋ヌクレオチド 3478～3504 のコード配列；配列番号：168 の SVV 2B タンパク質架橋ヌクレオチド 3505～3888 のコード配列；配列番号：168 の SVV 2C タンパク質架橋ヌクレオチド 3889～4854 のコード配列；配列番号：168 の SVV 3A タンパク質架橋ヌクレオチド 4855～5124 のコード配列；配列番号：168 の SVV 3B タンパク質架橋ヌクレオチド 5125～5190 のコード配列；配列番号：168 の SVV 3C タンパク質架橋ヌクレオチド 5191～5823 のコード配列；配列番号：168 の SVV 3D タンパク質架橋ヌクレオチド 5824～7209 のコード配列；及び配列番号：168 の SVV 架橋ヌクレオチド 7210～7280 の 3' UTR が挙げられるが、これらに限定はされない配列番号：168 の特定の部分を含むことができる。

【0016】

一つの態様において、本発明は、SVV 2A、SVV リーダーペプチド又は他の SVV タンパク質若しくはそのペプチド部分を使用して、宿主細胞タンパク質翻訳を遮断する方法を提供する。一つの態様において、そのような SVV タンパク質を使用して、宿主細胞においてキャップ結合タンパク質複合体で妨害又は阻害することによって宿主細胞タンパク質翻訳を遮断することができる。

【0017】

別の態様において、本発明は、SVV 2A 又は他の SVV タンパク質若しくはそのペプチド部分を使用して、ペプチド又はタンパク質を開裂する方法を提供する。

【0018】

他の態様において、本発明は、高度、中度のストリンジェンシー又は低度のストリンジェンシー条件下で配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168 とハイブリダイズするか、又は少なくとも 50 個のヌクレオチドの長さのこれらの配列のうちのいずれか 1 つの連続する部分とハイブリダイズする単離核酸を提供する。

【0019】

別の態様において、本発明は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168 に、又は少なくとも 50 個のヌクレオチドの長さのこれらの配列のうちのいずれか 1 つの連続する部分に、少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は 99% の配列同一性を有する核酸配列を含むベクターを提供する。ベクター組成物は、SVV タンパク質をコードする配列番号：168 の核酸領域を含むこともできる。

【0020】

本発明は、また、配列番号：１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１を含む核酸配列に、又は少なくとも５０個のヌクレオチドの長さのこれらの配列のうちのいずれか１つの連続する部分に、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の配列同一性を有する核酸でコードされる単離ポリペプチドを提供する。本発明は、また、ＳＶＶタンパク質をコードする配列番号：１６８の核酸領域に少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有する核酸でコードされる単離ポリペプチドを提供する。

【００２１】

一つの態様において、本発明は、配列番号：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、１６９に、又は少なくとも１０個のアミノ酸の長さのこれらの配列のうちのいずれか１つの連続する部分に、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。

10

【００２２】

別の態様において、本発明は、少なくとも９、１０、１５、２０又は５０個のアミノ酸の長さの配列番号：１６９の連続する部分に、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。例示的な配列番号：１６９の連続する部分には、リーダーペプチド架橋残基１～７９；ＶＰ４架橋残基８０～１５０；ＶＰ２架橋残基１５１～４３４；ＶＰ３架橋残基４３５～６７３；ＶＰ１架橋残基６７４～９３７；２Ａ架橋残基９３８～９４６；２Ｂ架橋残基９４７～１０７４；２Ｃ架橋残基１０７５～１３９６；３Ａ架橋残基１３９７～１４８６；３Ｂ架橋残基１４８７～１５０８；３Ｃ架橋残基１５０９～１７１９；及び３Ｄ架橋残基１７２０～２１８１のようなＳＶＶタンパク質を含む領域が挙げられるが、これらに限定はされない。

20

【００２３】

別の態様において、本発明は、配列番号：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、１６９に、又は少なくとも９、１０、１５若しくは２０個のアミノ酸の長さのこれらの配列のうちのいずれか１つの連続する部分に、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離抗体を提供する。単離抗体は、配列番号：２又は１６９の任意のタンパク質エピトープ又は抗原に結合するように生成することができる。更に、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はキメラ抗体であることができる。

30

【００２４】

一つの態様において、本発明は、配列番号：１又は配列番号：１６８に少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する、単離ＳＶＶ又はその誘導体若しくは類縁体を提供する。

【００２５】

別の態様において、本発明は、全て同定されている特徴及びアメリカ培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ）特許寄託番号ＰＴＡ－５３４３の核酸配列を有する単離ウイルスを提供する。本発明の幾つかのウイルスは、ＰＴＡ－５３４３分離株、ＰＴＡ－５３４３分離株の変種、同族体、類縁体、誘導体及び突然変異体、並びに腫瘍溶解性の原因であると決定されている、ＳＶＶ（野生型と突然変異体の両方）の配列に対して修飾されている他のウイルスの変種、同族体、誘導体及び突然変異体を対象とする。

40

【００２６】

本発明は、更に、以下の特性を含む単離ＳＶＶを提供する：約７．５又は約７．３キロベース(kb)の一本鎖ＲＮＡゲノム（プラスセンス(+)鎖)；直径約２７ナノメートル(nm)；約３１kDa、３６kDa及び２７kDaのおおよその分子量を有する少なくとも３個のタンパク質を含むカプシド；およそ１．３４g/mLの塩化セシウム(CsCl)勾配の浮遊密度；並びに腫瘍細胞における複製能。この態様において、３１kDaカプシドタンパク質(

50

V P 1) は、配列番号： 8 に又は配列番号： 1 6 9 の残基 6 7 4 ~ 9 3 7 に少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 又は 9 9 % の同一性があるアミノ酸配列を含むことができ、3 6 Da カプシドタンパク質 (V P 2) は、配列番号： 4 に又は配列番号： 1 6 9 の残基 1 5 1 ~ 4 3 4 に少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 又は 9 9 % の同一性があるアミノ酸配列を含むことができ、2 7 kDa カプシドタンパク質 (V P 3) は、配列番号： に 6 又は配列番号： 1 6 9 の残基 4 3 5 ~ 6 7 3 に少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 又は 9 9 % の同一性があるアミノ酸配列を含むことができる。

【0027】

別の態様において、本発明は、次の特徴：腫瘍細胞における複製能、腫瘍細胞親和性及び正常な細胞における細胞溶解の欠如を含む単離 S V V 誘導体又は類縁体を提供する。S V V 類縁体には、次の U S D A 分離株：M N 8 8 - 3 6 6 9 5、N C 8 8 - 2 3 6 2 6、I A 8 9 - 4 7 5 5 2、N J 9 0 - 1 0 3 2 4、I L 9 2 - 4 8 9 6 3、C A 1 3 1 3 9 5、L A 1 2 7 8、I L 6 6 2 8 9、I L 9 4 - 9 3 5 6、M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6、M N 9 9 1 9 7 及び S C 3 6 3 6 4 9 からのウイルスが挙げられる S V V 様ピコナウイルスが含まれる。S V V 様ピコナウイルスが、腫瘍細胞における複製能、腫瘍細胞親和性及び非腫瘍細胞における細胞溶解の欠如という特性を天然には有さない場合、S V V 様ピコナウイルスをこれらの特性を得るように突然変異することができる。そのような突然変異は、S V V 様ピコナウイルスと S V V との配列を比較し、アミノ酸配列が S V V と (特定の領域において) 同一か又は実質的に同一であるように S V V 様ピコナウイルスにおいて突然変異を起こすことによって設計することができる。別の態様において、ウイルスは、神経内分泌特性を有する腫瘍細胞型において複製能がある。

【0028】

他の態様において、本発明は、本発明のウイルスの有効量と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物；本発明のウイルスを含む細胞；本発明のウイルスの抗原を含有するウイルス性溶解産物；並びに本発明のウイルスから得られる単離及び精製ウイルス抗原を提供する。

【0029】

なお別の態様において、本発明は、細胞をウイルスで感染すること；細胞溶解産物を採取すること；細胞溶解産物を勾配遠心分離に少なくとも一回付すこと；及び勾配からウイルスを単離することを含む、本発明のウイルスの精製方法を提供する。

【0030】

別の態様において、本発明は、ウイルス又はその誘導体の有効量を癌の治療するために投与することを含む癌の治療方法を提供し、ここでウイルスは、配列番号： 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168 に、又は配列番号： 1 若しくは配列番号： 1 6 8 の一部に、少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 又は 9 9 % の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する。一つの態様において、本発明は、癌を治療する方法であって、ウイルス又はその誘導体を癌の治療のために投与することを含む方法を提供し、ここでウイルスは、配列番号： 1 に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性があるゲノム配列を有する。配列番号： 1 に少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性があるゲノム配列を有するウイルスは、例えば、S V V 突然変異体、S V V 様ピコルナウイルス又はカルジオウイルスであることができる。S V V 様ピコルナウイルスは、例えば、次の分離株、M N 8 8 - 3 6 6 9 5、N C 8 8 - 2 3 6 2 6、I A 8 9 - 4 7 7 5 2、N J 9 0 - 1 0 3 2 4、I L 9 2 - 4 8 9 6 3、C A 1 3 1 3 9 5、L A 1 2 7 8、I L 6 6 2 8 9、I L 9 4 - 9 3 5 6、M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6、M N 9 9 1 9 7 及び S C 3 6 3 6 4 9 のウイルスのうちの 1 つのウイルスであることができる。S V V 様ピコルナウイルスは、野生型又は突然変異体であることができる。

【0031】

別の態様において、本発明は、配列番号： 3、5、7 に、配列番号： 1 6 9 のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド 904 ~ 3477 に、又は少なくとも 75、100、200 若しくは 500 個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性がある配列を含むカプシド領域を含むウイルスの有効量を投与することを含む、癌を治療する方法を提供する。本発明は、また、配列番号：4、6、8 に、配列番号：169 の残基 80 ~ 937 に、又は少なくとも 25、50 若しくは 100 個のアミノ酸の長さのその連続する部分に、少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性があるアミノ酸配列を含むカプシドを含むウイルスの有効量を投与することを含む、癌の治療方法を提供する。

【0032】

一つの態様において、本発明は、癌細胞をウイルス又はその誘導体と接触させることを含む癌の進行を阻害する方法を提供し、ここで、ウイルス又はその誘導体は、癌細胞に特異的に結合し、ウイルスは、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 又は 168 に少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は 99% の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する。

【0033】

別の態様において、本発明は、癌細胞をウイルス又はその誘導体と接触させることを含む癌の進行を阻害する方法を提供し、ここで、ウイルス又はその誘導体は、癌細胞に特異的に感染し、ウイルスは、配列番号：168 に、又は少なくとも 50、100、200 若しくは 500 個のヌクレオチドの長さの配列番号：168 の連続する部分に、少なくとも 95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する。

【0034】

別の態様において、本発明は、癌細胞を有効量のウイルス又はその誘導体と接触させることを含む癌細胞を死滅させる方法を提供し、ここでウイルスは、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 又は 168 に少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は 99% の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する。

【0035】

別の態様において、本発明は、癌細胞を有効量のウイルス又はその誘導体と接触させることを含む癌細胞を死滅させる方法を提供し、ここでウイルスは、配列番号：168 に、又は少なくとも 50、100、200 若しくは 500 個のヌクレオチドの長さの配列番号：168 の連続する部分に、少なくとも 95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性がある配列を含むゲノム配列を有する。

【0036】

これらの癌を対象とする方法において、ウイルスはピコルナウイルスであることができる。ピコルナウイルスは、カルジオウイルス、エルボウイルス、アフトウイルス、コブウイルス、ヘパトウイルス、パレコウイルス、テッショウウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、SVV 又は SVV 様ピコルナウイルスであることができる。カルジオウイルスは、ヴィリュイスクヒト脳脊髄炎ウイルス、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス及び脳心筋炎ウイルスからなる群より選択することができる。SVV は、ATCC 寄託番号 PTA-5343 を有するウイルスであることができるか、或いは配列番号：1 若しくは配列番号：168 に、又は少なくとも 50、100、200 若しくは 500 個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性がある核酸配列を含むウイルスであることができる。SVV 様ピコルナウイルスは、配列番号：168 に、又は少なくとも 50、100、200 若しくは 500 個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも 95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性がある核酸配列を含むウイルスであることができる。SVV 様ピコルナウイルスは、例えば、次の分離株、MN 88 - 36695、NC 88 - 23626、IA 89 - 47752、NJ 90 - 1032

10

20

30

40

50

4、IL92-48963、CA131395、LA1278、IL66289、IL94-9356、MN/GA99-29256、MN99197及びSC363649のウイルスのうちの1つのウイルスであることができる。SVV様ピコルナウイルスは、野生型又は突然変異体であることができる。

【0037】

本発明は、また、細胞を本発明のウイルスと接触させることを含む、異常増殖する細胞を死滅させる方法を提供する。一つの態様において、異常増殖する細胞は腫瘍細胞である。この方法の多様な態様において、腫瘍細胞は、ヒト小型細胞肺癌、ヒト網膜芽細胞腫、ヒト神経芽細胞腫、ヒト髄芽腫、マウス神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍及びヒト非小型細胞肺癌からなる群より選択される。

10

【0038】

本発明は、哺乳動物に有効量の本発明のウイルスを被験者に投与することを含む、被験者における新生物形成状態を治療する方法も提供する。一つの態様において、新生物形成状態は神経内分泌癌である。別の態様において、被験者は哺乳動物である。別の態様において、哺乳動物はヒトである。

【0039】

本発明は、ウイルスの複製を可能にする条件下でウイルスに感染された細胞を培養し、細胞又は上澄みからウイルスを回収することを含む、本発明のウイルスを産生する方法も提供する。この方法の一つの態様において、細胞はPER.C6細胞である。この方法の別の態様において、細胞はH446細胞である。この方法の多様な態様において、細胞は、細胞1つあたり200,000個を超えるウイルス粒子を産生することができる。

20

【0040】

別の態様において、本発明は、本発明のウイルスを含有すると推定される試験材料からRNAを単離すること、配列番号：1又は配列番号：168の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに対応するRNAを標識すること、試験材料を標識RNAでプローブすること、及び標識RNAと、試験材料から単離されたRNAとの結合を検出することを含み、結合がウイルスの存在を示す、本発明のウイルスの検出方法を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号：1若しくは配列番号：168、又はその補体の少なくとも15個の連続するヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を含む核酸プローブを提供する。

30

【0041】

本発明は、腫瘍溶解ウイルスを作製する方法であって、(a)SVVゲノム配列を試験ウイルスゲノム配列と比較すること；(b)SVVゲノム配列によりコードされるポリペプチドと、試験ウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドとの間で少なくとも最初のアミノ酸の差を同定すること；(c)試験ウイルスゲノム配列によりコードされるポリペプチドが、SVVゲノム配列によりコードされるポリペプチドに対して少なくとも1つ少ないアミノ酸の差を有するように、試験ウイルスゲノム配列を突然変異させること；(d)突然変異試験ウイルスゲノム配列を腫瘍細胞に形質移入すること；及び(e)腫瘍細胞が突然変異試験ウイルスゲノム配列により細胞溶解的に感染しているかを判断することを含む方法も提供する。一つの態様において、試験ウイルスで突然変異したアミノ酸は、カプシドコード領域のような構造領域のアミノ酸である。別の態様において、試験ウイルスで突然変異したアミノ酸は、非構造領域のアミノ酸である。

40

【0042】

腫瘍溶解ウイルスを作製する方法の一つの態様において、SVVゲノム配列は、ATCC寄託番号PTA-5343を有する単離SVVから得られるか、又は配列番号S：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168若しくはその連続する部分に少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の同一性がある配列を含むウイルスから得られる。一つの態様において、SVVゲノム配列は、ATCC寄託番号PTA-5343を有する単離SVVから得られるか、或いは配列番号：168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500個のヌクレオ

50

チドの長さのその連続する部分に、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性がある配列を含むウイルスから得られる。本発明の別の態様において、試験ウイルスゲノム配列を突然変異することは、試験ウイルスゲノム配列を有するcDNAを突然変異することを含む。本発明の別の態様において、突然変異試験ウイルスゲノム配列を形質移入することは、RNAを形質移入することを含み、ここでRNAは、突然変異試験ウイルスゲノム配列を有するcDNAから生成される。

【0043】

腫瘍溶解ウイルスを作製する方法の別の態様において、試験ウイルスはピコルナウイルスである。試験ピコルナウイルスは、テッショウウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、カルジオウイルス、エルボウイルス、アフトウイルス、コブウイルス、ヘパトウイルス、パレコウイルス又はテッショウウイルスであることができる。別の態様において、試験ウイルスはカルジオウイルスである。別の態様において、試験ウイルスはSVV様ピコルナウイルスである。SVV様ピコルナウイルスは、例えば、以下の分離株：MN88-36695、NC88-23626、IA89-47552、NJ90-10324、IL92-48963、CA131395、LA1278、IL66289、IL94-9356、MN/GA99-29256、MN99197及びSC363649のうちの1つのウイルスであることができる。別の態様において、腫瘍溶解ウイルスを作製する方法で同定されるアミノ酸の差は、SVVカプシドタンパク質と試験ウイルスカプシドタンパク質配列との間である。腫瘍溶解ウイルスを作製する別の態様において、試験ウイルスゲノム配列は、ヴィリユスクヒト脳脊髄炎ウイルス、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス及び脳心筋炎ウイルスからなる群より選択される。別の態様において、試験ウイルスゲノム配列は脳心筋炎ウイルスから選択される。なお別の態様において、脳心筋炎ウイルス、SVV様ピコルナウイルス、又は他の任意の試験ウイルスは、ATCC寄託番号PTA-5343のSVVに、又は配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%の配列同一性を含む核酸配列を有する分離株から選択することができる。

【0044】

腫瘍溶解カルジオウイルスを作製する方法の別の態様において、試験ウイルスとSVVとのアミノ酸の差は、SVVのカプシドタンパク質領域においてであり、アミノ酸の差は、SVV配列番号：4、6、8、配列番号：169の残基80~937、配列番号：169の残基80~150、配列番号：169の残基151~434、配列番号：169の残基435~673、又は配列番号：169の残基674~937の範囲内で整列化される。

【0045】

本発明は、変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法であって、(a)複数個の核酸配列を含むウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すこと；(b)ウイルス突然変異体のライブラリーを、複数の突然変異ウイルスが産生されるように、許容細胞に形質移入すること；(c)複数の突然変異ウイルスを単離すること；(d)非許容細胞を、単離した複数の突然変異ウイルスと共にインキュベートすること；及び(e)非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収し、それによって変化した親和性を有する突然変異ウイルスを作製することを含む方法も提供する。一つの態様において、この方法は、(f)回収した突然変異ウイルスを非許容細胞でインキュベートすること；及び(g)非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収することを更に含む。別の態様において、この方法は、(f)及び(g)を繰り返し反復することを更に含む。別の態様において、ウイルス突然変異体のライブラリーは、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168又はその連続する部分を含む親配列から作り出される。

【0046】

変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法の一つの態様において、インキュベーションは、マルチウエルハイスルーブットプラットフォームで実施され、ここでプラットフォームは、それぞれのウエルに異なる非許容細胞型を含む。この態様において、方法は、プラットフォームをスクリーニングして、どのウエルが細胞を死滅させる突然変異ウイルスを含有するかを同定することを更に含むことができる。別の態様において、スクリーニングは、それぞれのウエルにおける吸光度を分析することによって実施される。

【0047】

変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法の別の態様において、非許容細胞は腫瘍細胞である。

10

【0048】

変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法の別の態様において、ウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことは、(i) ウイルスのゲノム配列の一部に配列同一性を有するポリヌクレオチドを提供すること；(ii) ポリヌクレオチドを突然変異して、複数の異なる突然変異ポリヌクレオチド配列を生成すること；及び(iii) 複数の突然変異ポリヌクレオチドを、(i) でポリヌクレオチドが含有するウイルスのゲノム配列部分以外のウイルスのゲノム配列を有するベクターと連結し、それによってウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことを含む。一つの態様において、ウイルスのゲノム配列はピコルナウイルスからのものである。別の態様において、ウイルスのゲノム配列は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168又はその連続する部分に少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99%の同一性がある配列を含む。別の態様において、ウイルスのゲノム配列は、配列番号：168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性がある配列を含む。一つの態様において、配列番号：168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性がある配列を含むウイルスは、SVV様ピコナウイルスである。別の態様において、ウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことにおいて、(ii) の突然変異は、ポリヌクレオチドへのヌクレオチドのランダム挿入により実施される。一つの態様において、ヌクレオチドのランダム挿入は、トリヌクレオチド突然変異誘発(TRIM)により実施される。別の態様において、ポリヌクレオチドに挿入されるヌクレオチドの少なくとも一部は、エピトープタグをコードする。別の態様において、ウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことにおいて、(ii) の突然変異は、ポリヌクレオチドのカプシドコード領域で実施される。

20

30

【0049】

本発明は、変化した細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法であって、(a) ウイルスの突然変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーを作り出すことであり、作り出すことが、ウイルスのカプシド領域をコードするポリヌクレオチドを提供すること、ポリヌクレオチドを突然変異させて複数の異なる突然変異カプシドコードポリヌクレオチド配列を生成すること、及び複数の突然変異カプシドコードポリヌクレオチドを、ウイルスの、カプシドコード領域以外のゲノム配列を有するベクターと連結し、それによってウイルスの突然変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーを作り出すことを含むこと；(b) 複数の突然変異ウイルスが産生されるように、突然変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーを許容細胞に形質移入すること；(c) 複数の突然変異ウイルスを単離すること；(d) 非許容細胞を単離した複数の突然変異ウイルスと共にインキュベートすること；及び(e) 非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収し、それによって変化した親和性を有する突然変異ウイルスを作製することを含む方法も提供する。一つの態様において、この方法は、(f) 回収した突然変異ウイルスを非許容細胞でインキュベートすること；及び(g) 非許容細胞で産生された突然変異ウイルスを回収することを更に含む。別

40

50

の態様において、この方法は、(f)及び(g)を繰り返し反復することを更に含む。別の態様において、突然変異は、カプシドコードポリヌクレオチドへのヌクレオチドのランダム挿入により実施される。別の態様において、カプシドコードポリヌクレオチドに挿入されたヌクレオチドの少なくとも一部は、エピトープタグをコードする。別の態様において、ヌクレオチドのランダム挿入は、TRIMにより実施される。別の態様において、複数の異なる突然変異カプシドコードポリヌクレオチド配列は、 10^8 又は 10^9 を越える異なるカプシドコードポリヌクレオチド配列を含む。突然変異ポリヌクレオチド配列のライブラリーは、例えば、カルジオウイルス又はSVV様ピコルナウイルスからのものであることができる。

【0050】

一つの態様において、変化した細胞型親和性を有する突然変異SVVを作製する方法は、(a)SVV突然変異体のcDNAライブラリーを作り出すこと；(b)SVV突然変異体のcDNAライブラリーからSVV RNAを生成すること；(c)複数の突然変異SVVが産生されるように、SVV RNAを許容腫瘍細胞に形質移入すること；(d)複数の突然変異SVVを単離すること；(e)非許容腫瘍細胞を、複数の単離した突然変異SVVと共にインキュベートすること；及び(f)非許容腫瘍細胞に細胞溶解的に感染した突然変異SVVを回収し、それによって変化した親和性を有する突然変異SVVを作製することを含む。別の態様において、この方法は、(g)回収した突然変異SVVを非許容細胞でインキュベートすること；及び(h)非許容腫瘍細胞に細胞溶解的に感染した突然変異SVVを回収することを更に含む。別の態様において、この方法は、(g)及び(h)を繰り返し反復することを更に含む。一つの態様において、インキュベーションは、マルチウエルハイスループットプラットフォームで実施され、プラットフォームは、それぞれのウエルに異なる非許容腫瘍細胞型を含む。別の態様において、この方法は、プラットフォームをスクリーニングして、どのウエルが細胞に細胞溶解的に感染する突然変異SVVを含有するかを同定することを更に含む。別の態様において、スクリーニングは、それぞれのウエルにおける吸光度を分析することによって実施される。一つの態様において、SVV突然変異体のcDNAライブラリーは、複数の突然変異SVVカプシドポリヌクレオチド配列を含む。別の態様において、複数の突然変異SVVカプシドポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチドのランダム挿入によって生成される。別の態様において、ランダム挿入されたヌクレオチドの配列の少なくとも一部は、エピトープタグをコードする。一つの態様において、ヌクレオチドのランダム挿入は、TRIMにより実施される。別の態様において、SVV突然変異体のcDNAライブラリーは、ATCC寄託番号PTA-5343のSVVから生成される。別の態様において、SVV突然変異体のcDNAライブラリーは、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%又は65%の配列同一性を有する配列を含むSVVから生成される。一つの態様において、SVV突然変異体のcDNAライブラリーは、配列番号：168に、又は少なくとも50、100、200若しくは500個のヌクレオチドの長さのその連続する部分に、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列を含むSVVから生成される。別の態様において、非許容腫瘍細胞は、腫瘍細胞株又は親から単離された腫瘍細胞型である。

【0051】

本発明は、インビボで腫瘍細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法であって、(a)複数の核酸配列を含むウイルス変異体のライブラリーを作り出すこと；(b)複数の突然変異ウイルスが産生するように、ウイルス変異体のライブラリーを許容細胞に形質移入すること；(c)複数の突然変異ウイルスを単離すること；(d)単離した複数の突然変異ウイルスを、腫瘍を有する哺乳動物に投与すること(ここで哺乳動物は、突然変異ウイルスの未変異形態の天然宿主ではない)；及び(e)腫瘍で複製されたウイルスを回収し、それによってインビボで腫瘍細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製

10

20

30

40

50

することを含む方法も提供する。一つの態様において、ウイルス変異体のライブラリーを作り出すことは、ウイルスのカプシド領域をコードするポリヌクレオチドを提供すること、ポリヌクレオチドを突然変異して、複数の異なる突然変異体カプシドコードポリヌクレオチド配列を生成すること、及び複数の突然変異カプシドコードポリヌクレオチドを、ウイルスの、カプシドコード領域以外のゲノム配列を有するベクターと連結し、それによって、ウイルス突然変異体のライブラリーを作り出すことを含む。別の態様において、(e)で回収されるウイルスは、腫瘍の細胞に細胞溶解的に感染する。インビボで腫瘍細胞型親和性を有する突然変異ウイルスを作製する方法の別の態様において、腫瘍は、異種移植腫瘍、同系腫瘍、同所性腫瘍、又は遺伝子形質転換性腫瘍である。別の態様において、哺乳動物はマウスある。

10

【0052】

本発明の全ての方法において、ウイルスはピコルナウイルスであることができる。ピコルナウイルスは、カルジオウイルス、エルボウイルス、アフトウイルス、コブウイルス、ヘパトウイルス、パレコウイルス、テッショウウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、又はSVVが属する属に属するウイルスであることができる。ウイルスはカルジオウイルスであることができる。ウイルスはSVV様ピコルナウイルスであることができる。ウイルスはSVVであることができる。SVVは、ATCC特許寄託番号PTA-5343を有するSVVであることができるか、又は配列番号：1、3、6、7、9、11、13、15、17、19、21、168若しくはその連続する部分に少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%の同一性がある配列を含むSVVであることができる。更に、カルジオウイルスは、ヴィリユイスクヒト脳脊髄炎ウイルス、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス及び脳心筋炎ウイルスからなる群より選択することができる。一つの態様において、SVV様ピコルナウイルスは、MN88-36695、NC88-23626、IA89-47552、NJ90-10324、IL92-48963、CA131395、LA1278、IL66289、IL94-9356、MN/GA99-29256、MN99197及びSC363649からなる群より選択される分離株から選択される。別の態様において、本発明は、ATCC寄託番号PTA-5343のSVVに、又は配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、168、若しくはその連続する部分に、少なくとも99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%又は65%の配列同一性を有する分離株から選択されるあらゆるウイルス、そうでなければ配列相同性によりSVVに関連すると考えられるあらゆるウイルスを包含する。

20

30

【0053】

別の態様において、本発明は、ATCC寄託番号PTA-5343のSVVに、配列番号：168に、又は少なくとも100、200、300、400、500、750、1000、1500若しくは2000個のヌクレオチドの長さの配列番号S：1若しくは168の連続する部分に、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の核酸配列同一性を有するあらゆるウイルスを包含する。

【0054】

本発明は、本明細書に開示されている突然変異ウイルスを作製する方法のいずれかによって作製される腫瘍溶解ウイルスも提供する。一つの態様において、本発明は、腫瘍溶解ウイルスにより患者を治療する方法であって、(a)本明細書に開示されている突然変異ウイルスを作製する方法のいずれかによって作製される腫瘍溶解ウイルスを、腫瘍溶解ウイルスが非伝染性となり、かつ腫瘍溶解ウイルスの親和性が影響を受けないように不活性化すること；及び(b)照射した腫瘍溶解ウイルスを、腫瘍に罹患している患者に投与することを含む方法を提供する。別の態様において、患者を治療する方法は、不活性化腫瘍溶解ウイルスに毒素を結合することを更に含む。

40

【0055】

別の態様において、本発明は、SVVにより腫瘍患者を治療する方法であって、(a)

50

ウイルスが非伝染性となり、親和性が影響を受けないように、S V Vを不活性化すること；及び（b）不活性化S V Vを腫瘍に罹患している患者に投与することを含む方法を提供する。別の態様において、腫瘍患者をS V Vで治療する方法は、不活性化S V Vに毒性を結合することを更に含む。

【0056】

別の態様において、本発明は、不活性化S V V又は弱毒S V Vを含むS V V組成物を提供する。別の態様において、本発明は、カプシド領域に組み込まれているエピトープタグを含むS V Vを提供する。

【0057】

本発明は、S V Vにより腫瘍患者を治療する方法であって、（a）カプシドにおいてコードされているエピトープタグを含む突然変異S V Vを作り出すこと；（b）エピトープタグに毒素を結合すること；及び（c）毒素を結合した突然変異S V Vを、腫瘍を罹患している患者に投与することを含む方法も提供する。一つの態様において、作り出すことは、エピトープタグをコードするオリゴヌクレオチドを、S V Vのポリヌクレオチドのカプシドコード領域に挿入することを含む。一つの態様において、突然変異S V Vは変化した細胞型親和性を有さない。別の態様において、この方法は、突然変異S V Vが伝染性でないか又は複製できないように、突然変異S V Vを不活性化することを更に含む。

【0058】

本発明は、（a）患者から腫瘍試料を単離すること；（b）腫瘍試料をエピトープ標識S V Vと共にインキュベートすること；及び（c）腫瘍試料を、エピトープタグを検出することによって結合S V Vについてスクリーニングすることを含む、試料から腫瘍細胞を検出する方法も提供する。

【0059】

一つの態様において、本発明は、（a）不活性化エピトープ標識S V Vを患者に投与すること（ここで標識は、エピトープタグに結合している）；及び（b）患者において標識を検出することを含む、インビボで腫瘍細胞を検出する方法を提供する。本発明の腫瘍細胞を検出する方法において、S V Vは、本明細書に開示されている方法により生成される突然変異S V Vであることができる。

【0060】

一つの態様において、本発明は、（a）被験者から細胞試料を単離すること；（b）細胞試料をS V V（又はS V V様ピコルナウイルス）と共にインキュベートすること；（c）前記（b）の細胞試料をS V Vに特異的な抗体（又はS V V様ピコルナウイルスに特異的な抗体）と共にインキュベートすること；及び（d）細胞試料を結合抗体についてスクリーニングすることを含み、結合抗体が、試料が腫瘍細胞を含有することを示す、試料から腫瘍細胞を検出する方法を提供する。

【0061】

一つの態様において、本発明は、被験者がS V V治療の候補者であるかを判断する方法であって、（a）被験者から細胞を単離すること；（b）細胞をS V Vと共にインキュベートすること；（c）前記（b）の試料を抗S V V抗体と共にインキュベートすること；及び（d）細胞上又は中の抗S V V抗体の存在を検出することを含み、陽性検出は被験者がS V V治療の候補者であることを示す方法を提供する。

【0062】

結合抗体について細胞試料をスクリーニングすること又は抗S V V抗体の存在について検出することは、抗S V V抗体の定常部領域又は非エピトープ結合領域に結合できる第2の抗体を添加することによって実施することができ、ここで第2の抗体は、検出可能なマーカーと結合しているか又はそれにより標識されている。検出可能なマーカーは、例えば、フルオレセインのような蛍光体であることができる。第2の抗体が検出可能なマーカーで標識される場合、検出可能なマーカーは、例えば蛍光顕微鏡検査法により検出することができる。被験者からの細胞は、被験者の生検組織からのものであることができる。生検組織は、被験者の腫瘍からのもの、又は腫瘍細胞を含むと推定される被験者の領域からの

10

20

30

40

50

ものであることができる。蛍光体で直接標識されたSVVを、腫瘍細胞の同定に使用することもできる。

【0063】

更に、新生物形成状態を治療する、新生物形成状態を検出する及びSVVを産生する方法を、本発明の野生型SVV、突然変異（修飾されたもの又は変種を含む）SVV、SVV類縁体、SVV様ピコルナウイルス、及び他の腫瘍特異性ウイルスに適用する。

【0064】

本発明のウイルス及びその組成物を、本明細書で記述されている疾患を治療する薬剤の製造において使用することができる。更に、本発明のウイルス及びその組成物を、本明細書で記述されている疾患の治療のために使用することができるしたがって、本発明の一つの態様において、本発明は、癌の治療における又は癌を治療する薬剤の製造におけるSVV（又はその突然変異体、誘導体、類縁体及び組成物）の使用を提供する。

10

【0065】

遺伝子治療のためのSVV及びSVV様ウイルス：目的の複製欠損SVV発現遺伝子を、遺伝子を送達して遺伝子障害を修正することに使用できる。SVV及びSVV様ウイルスをsiRNAのビヒクルとして使用して、任意の特定の遺伝子発現を防止することもできる。複製欠損ウイルスは、相補細胞株において及び/又はヘルパーウイルスの存在下で増殖して、組み換えウイルスに欠損機能を提供することができる。

【0066】

ピコルナウイルスのIRESは、遺伝子を組織特異的に発現するのに役割を演じることが知られている。SVV及びSVV様ウイルスのIRESを使用して、他のピコルナウイルスのIRESを取り換えることができる。この戦略を使用して、変化した組織親和性を有するウイルスを生成することができる。一つの態様において、本発明は、2つの遺伝子を単一のプロモーターにより組織特異的に発現する目的で、SVVのIRES又はSVV関連ウイルスのIRESを提供する。

20

【0067】

SVVの2Aプロテアーゼの自己開裂性を、単一のプロモーター及び転写終結シグナル配列を用いて、1つ以上の遺伝子を等量で発現するために使用できる。一つの態様において、本発明は、単一のプロモーター及び単一のポリ(A)シグナルの制御下で、2つ以上のタンパク質を等量で発現する目的で、SVV又はSVV関連ウイルスの自己開裂2Aペプチドを提供する。別の態様において、本発明は、真核細胞でタンパク質を産生するためのポリペプチドの開裂における、SVV及びSVV関連ウイルス3Cプロテアーゼの使用を提供する。別の態様において、本発明は、腫瘍細胞又は目的の他の細胞型で細胞タンパク質合成の遮断を引き起こす、SVV又はSVV様ウイルスリーダーペプチドの使用を提供する。

30

【0068】

SVVのウイルス様粒子を、ワクチンとして及び細胞の混合個体群で特定の細胞型を同定するために、生成及び使用することができる。

【0069】

（寄託情報）

40

以下の物質は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に従って、アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）、米国、20110-2209、バージニア州マサチューセッツ、ユニバーシティ・ブルバード10801に寄託されている。寄託物質の利用性の対する全ての制限は、特許の付与によって変更不能に解除される。物質：セネカバレーウイルス（SVV）。ATCC特許寄託番号：PTA-5343。寄託日：2003年7月25日。

【発明を実施するための最良の形態】

【0070】

用語「ウイルス」、「ウイルスの粒子」、「ウイルス粒子」及び「ビリオン」は、互換的に使用される。

50

【0071】

用語「ベクター粒子」及び「ウイルスベクター粒子」は、互換的に使用され、例えば、感染粒子の生成のために例えば本発明のウイルスベクターが適切な細胞又は細胞株に形質導入又は形質移入される場合に形成される感染性ウイルス粒子を意味するように、広義に理解されるべきである。

【0072】

用語「誘導体」、「突然変異体」、「変種」及び「修飾された」は、一般に、誘導体、突然変異体、変種又は修飾ウイルスが、鋳型ウイルス核酸又はアミノ酸配列と異なる核酸又はアミノ酸配列を有することができることを示すように、互換的に使用される。例えば、SVV誘導体、突然変異体、変種又は修飾SVVは、ATCC特許寄託番号PTA-5343の野生型SVV核酸又はアミノ酸配列と異なる核酸又はアミノ酸配列を有するSVVを意味することができる。

10

【0073】

本明細書で使用されるとき、「SVV様ピコルナウイルス」は、核酸レベルでSVVと少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有することができる（配列番号：168、図84及びSVV完全長ゲノム配列については図83を参照すること）、ここで配列比較は、全ゲノム分析に限定されず、5'UTR、構造コード領域、非構造コード領域、3'UTR及びこれらの部分のようなゲノムの特定の領域に焦点を合わせることができる。SVVに対する関連性/類似性を判断するのに適切な配列比較のためのゲノムの特定の長さは、当業者に既知であり、適切な長さは、存在する同一性の率によって変わることができる。配列比較のための長さは、例えば、少なくとも20、50、100、200、300、400、500、750、1000、1500、2000又は2500個のヌクレオチドであることができる。長さが短い場合、当業者は、例えば配列間の同一性は、2つの配列が関連づけられることを考慮すると高くなりうることを理解する。しかし、そのような指針は、関連する種の間でゲノムの特定の領域が他方よりも保存されている点において、少なくとも配列保存を考慮すると適切である。加えて、ウイルスにより生成される抗血清がSVV許容細胞株のSVV感染を中和することができる場合、ウイルスは、SVV様ピコルナウイルスであると考慮される。加えて、ウイルスにより生成される抗血清がSVV許容細胞株のSVV感染を中和することができる場合、及びこの抗血清が他のウイルスに結合することもできる場合（例えば、抗血清を、ウイルスを検出する間接免疫蛍光アッセイに使用することができる場合）、抗血清により結合されうる他のウイルスは、SVV様ピコルナウイルスであると考慮される。本発明の目的において、SVV様ピコルナウイルスにはカルジオウイルスを挙げることができる。SVV許容細胞又は細胞学の例には、Y79、NCI-H446、N1E-115、NCI-H1770、NCI-H82、PER.C6（登録商標）、NCI-H69AR、SK-NEP-1、IMR-32、NCI-H187、NCI-H209、HCC33、NCI-H1184、D283 Med、SK-N-AS、BEK PCB3E1、ST、NCI-H1299、DMS 153、NCI-H378、NCI-H295R、BEK、PPASMC、PCASMC、PAoSMC、NCI-H526、OVCA-R-3、NCI-H207、ESK-4、SW-13、293、Hs 578T、HS 1.Tes及びLOX IMVIが挙げられるが、これらに限定はされない。

20

30

40

【0074】

本明細書で使用されるとき、用語「癌」、「癌細胞」、「新生細胞」、「新生物」、「腫瘍」及び「腫瘍細胞」は、互換的に使用され、細胞増殖の著しい制御不能によって特徴づけられる異常増殖表現型を示すような、相対的に自律増殖を示す細胞を意味する。新生細胞は、悪性又は良性であることができる。本発明によると、好ましい腫瘍細胞の一つの型は、神経親和性を有するものである。

【0075】

2つ以上の核酸又はタンパク質配列の文脈における用語「同一性」又は「同一」率は、

50

Protein-Protein BLAST (ジェンバンクデータベースのProtein-Protein BLAST (Altschul , S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410)) のような配列比較アルゴリズムを使用して又は目視検査により測定して最大一致を求めて比較及び整列化したとき、同じであるか又特定の率のアミノ酸残基若しくはヌクレオチドが同じである2つ以上の配列若しくは部分配列を意味する。BLASTアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)に記載されており、公的に入手可能なBLASTソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)により提供される。

【0076】

10

例えば、本明細書で使用されるとき、用語「少なくとも90%の同一性」は、基準ポリペプチド(又はポリヌクレオチド)に対して90~100の同一率を意味する。90%以上のレベルの同一性は、例示目的において、100個のアミノ酸の長さの試験ポリペプチドと基準ポリペプチドが比較されると仮定すると、試験ポリペプチドの10%以下(すなわち100個のうちの10個)のアミノ酸が基準ポリペプチドのアミノ酸と異なるという事実を示す。同様の比較を、試験ポリヌクレオチドと基準ポリヌクレオチドの間で行うことができる。そのような差は、アミノ酸配列の全長にわたってランダムに分布されている点突然変異として表れることができるか、又は最大許容可能までの異なる長さで、例えば100個のうち10個のアミノ酸の差(90%同一性)で1つ以上の位置に集まることのできる。差は、核酸若しくはアミノ酸置換、挿入又は欠失として定義される。約85~90%を越える同一性のレベルでは、結果は、プログラム及びギャップパラメーターセットと無関係であるべきであり、そのような高レベルの同一性は、多くの場合にソフトウェアに依存することなく容易に評価することができる。

20

【0077】

「高度ストリンジェンシー」、「中度ストリンジェンシー」又は「低度ストリンジェンシー」の概念は、核酸ハイブリダイゼーション条件を意味する。高度ストリンジェンシー条件は、標的とプローブの間に生じるアニーリング又はハイブリダイゼーションのために、標的核酸配列とプローブの核酸配列との間により大きな同一性を必要とする条件を意味する。低度ストリンジェンシー条件は、標的とプローブの間に生じるアニーリング又はハイブリダイゼーションのために、標的核酸配列とプローブの核酸配列との間により低い同一性を必要とする条件を意味する。ストリンジェンシー条件は、緩衝剤の塩濃度により又はハイブリダイゼーションを実施する温度により制御することができ、高塩濃度は、低いストリンジェント条件をもたらす、高温は、よりストリンジェントな条件をもたらす。ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーションを受ける配列の長さ及び核酸内容に基づいて変わり、高度、中度及び低度ストリンジェンシーの代表的な条件は、以下の例示的な条件において記載される。慣用的に使用されるハイブリダイゼーション緩衝剤は、0.3Mのクエン酸三ナトリウム及び3MのNaClに対応する20x貯蔵溶液濃度を有するSSC(塩化ナトリウムクエン酸ナトリウム)である。高度ストリンジェンシー条件では、SSCの処理濃度は、0.1x~0.5x(1.5~7.5mMのクエン酸三ナトリウム、15~75mMのNaCl)であり、ハイブリダイゼーション温度は65℃に設定される。中度ストリンジェンシー条件は、典型的には0.5x~2xSSC濃度(7.5~30mMのクエン酸三ナトリウム、75~300mMのNaCl)を55~62℃の温度で利用する。低ストリンジェンシー条件下で実施されるハイブリダイゼーションは、2x~5xSSC濃度(30~75mMのクエン酸三ナトリウム、300~750mMのNaCl)を50~55℃の温度で使用することができる。これらの条件は、単に例示であり、限定するものとして考慮されるべきではないことに留意すること。

30

40

【0078】

セネカバレーウイルス(SVV)：

SVVは新規であり、今まで未発見のRNAウイルスであり、以前に特徴決定されたピコルナウイルスに関して、SVVはピコルナウイルス科のカルジオウイルス属のメンバー

50

に最も密接に関連する（国際出願 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 3 1 5 9 4 を参照すること）。S V V と他のカルジオウイルスとの配列分析の結果が、P C T / U S 2 0 0 4 / 0 3 1 5 9 4 において考察されており、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。P C T / U S 2 0 0 4 / 0 3 1 5 9 4 に記載された S V V の配列分析の時点から、ピコルナウイルス研究グループは、S V V が新たな属のメンバーであるかを考察し始めた。図 8 9 は、ピコルナウイルス科のメンバー間の遺伝子関連ツリーを表す。

【 0 0 7 9 】

ピコルナウイルスを知るための最初の配列比較において（国際出願 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 3 1 5 0 4 を参照すること）、2つの表現型分類の選択肢が存在し、（1）S V V をカルジオウイルス属の新たな種として含めること、又は（2）S V V を新たな属に指定することであった。その時点及び国際出願において、S V V は、カルジオウイルス属の新規メンバーとして指定されていた。しかし、更なる分析の後、S V V の幾つの特徴がカルジオウイルスと異なることが見出された。例えば、幾つものカルジオウイルスのゲノムは、5' U T R に配列内延長ポリ（C）トラクトを含む。S V V は、ポリ（C）トラクトを含まない。追加的な 5' 配列情報において、S V V の配列内リボソーム進入部位（I R E S）がマッピングされ、他のピコルナウイルスと比較されて、S V V I R E S は I V 型であることが決定されたが、カルジオウイルスの I R E S は、I I 型である。カルジオウイルスは長（150 アミノ酸（a a））2 A プロテアーゼを有し、一方、S V V は、短（9 a a）2 A プロテアーゼを有する。このタンパク質、並びに他（リーダーペプチド、3 A）の大きさは、S V V とカルジオウイルスとは有意に異なる。他のピコルナウイルスの研究から、これらのタンパク質は、親和性及び病原性を含む、宿主細胞との相互作用に関わる可能性があることが知られている。最後に、配列の全体を通してゲノム領域の数が過大に異なり、したがって S V V は、新たな属を形成すると考えるべきであると、現在考えられている。加えて、多数の独特なピコルナウイルスが U S D A によって発見されており、これらは、S V V が他のカルジオウイルスに対するよりも S V V に似ている。したがって、ピコルナウイルス研究グループによる推奨に基づいて国際ウイルス分類委員会（I C V T）の実行委員会によって、S V V は、セネカバレーウイルスと呼ばれる、ピコルナウイルスの新たな種を構成することが決定された。しかし、現在、S V V 及びこれらの独特な U S D A ピコルナウイルスの（本明細書では、S V V 様ピコルナウイルスの群のメンバーと呼ぶ）は、現在、いずれの属にも指定されていない。

【 0 0 8 0 】

U S D A で発見された幾つもの S V V 様ピコルナウイルスは、核酸レベルで S V V と約 9 5 ~ 9 8 % の同一性がある（例えば、図 8 7 ~ 8 9 を参照すること）。1つのウイルス（M N 8 8 - 3 6 6 9 5）に対する抗血清は S V V を中和し、このウイルスは、S V V を中和できる他の抗血清に対して反応性がある。S V V 様ピコルナウイルスをブタから単離し、したがって、ブタは、S V V 及び他の S V V 様ウイルスの許容宿主である可能性がある。ブタから単離される S V V 様ピコルナウイルスの例には、次の U S D A 分離株、M N 8 8 - 3 6 6 9 5、N C 8 8 - 2 3 6 2 6、I A 8 9 - 4 7 5 5 2、N J 9 0 - 1 0 3 2 4、I L 9 2 - 4 8 9 6 3、C A 1 3 1 3 9 5、L A 1 2 7 8、I L 6 6 2 8 9、I L 9 4 - 9 3 5 6、M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6、M N 9 9 1 9 7 及び S C 3 6 3 6 4 9 が挙げられるが、これらに限定はされない。S V V 様ピコルナウイルスには、S V V に密接に関連するカルジオウイルス（配列分析により又は S V V 抗原に対して発生させた抗体との交差反応により決定）を挙げることもできる。したがって、本発明の目的において、S V V は、（1）ピコルナウイルス科のカルジオウイルス属（又はそのメンバー）に密接に関連する、及び（2）ピコルナウイルス科の新たな属のメンバーであると考慮することができ、ここで新たな属のメンバーには、他の属にメンバーであると分類されていない S V V 及び S V V 様ピコルナウイルスを含めることができる。

【 0 0 8 1 】

カルジオウイルスと同様に、S V V は、それらのゲノム構成、共通の病理特性及び 0 . 1 M の N a C l 中、5 ~ 7 の p H でのパイロンの分離性の特別な特性によって他のピコル

10

20

30

40

50

ナウイルスと区別することができる (Scraba, D. et al., "Cardioviruses (Picornaviridae)," in Encyclopedia of Virology, 2nd Edition, R.G. Webster and A. Granoff, Editors, 1999)。S V V のゲノムは、30 個のヌクレオチドの長さのポリ (A) テールを含む、7, 310 個のヌクレオチドの大きさを有する 1 つの一本鎖プラス (+) センス鎖 RNA 分子から構成される (図 83A ~ 83H、図 84A ~ 84D; 配列番号: 168 を参照すること)。S V V はピコルナウイルスであるので、全てピコルナウイルスに保存されている多数の特徴を有する: (i) ゲノム RNA は感染性であり、したがって、細胞に形質移入して、ウイルス-レセプター結合及びウイルス生活環への進入を回避することができる; (ii) ゲノムの 5' 末端 (S V V では、配列番号: 168 のヌクレオチド 1 ~ 666) での長 (約 600 ~ 1200 bp) 非翻訳領域 (UTR) 及び短 3' 非翻訳領域 (約 50 ~ 100 bp; S V V では、配列番号: 168 のヌクレオチド 7210 ~ 7280); (iii) 5' UTR は、配列内リボソーム進入部位 (IRES) として知られているクローバー葉二次構造を含有する (例えば、配列番号: 168 のヌクレオチド約 300 からヌクレオチド約 366 でありうる); カルジオウイルスは I 型 IRES を有し、S V V は I V 型 IRES を有する; (iv) 残りのゲノムは単一のポリタンパク質をコードする (S V V では、配列番号: 168 のヌクレオチド 667 ~ 7209 がポリタンパク質 (配列番号: 169) をコードする)、並びに (v) ゲノムの両端が修飾され、5' 末端は小型の塩基性タンパク質「vp g」と共有結合し、3' 末端はポリアデニル化されている (S V V では、配列番号: 168 のヌクレオチド 7281 ~ 7310)。

10

20

【0082】

本発明は、単離 S V V ウイルス (特許寄託番号 P T A - 5343) 及び S V V からの完全ゲノム内容を提供する。最初に、配列決定されている最大の S V V ゲノムフラグメントは、P T A - 5343 分離株由来の単離 S V V 核酸であり、大多数の S V V ゲノム配列を含み、図 5A ~ 5E 及び図 6A ~ 6D に提示されており、本明細書で配列番号: 1 と指定されている。この核酸配列の翻訳は、S V V の大多数の単一ポリタンパク質が配列番号: 1 でコードされていることを示す。配列番号: 1 のヌクレオチド 1 ~ 5673 でコードされているアミノ酸配列が図 5A ~ E に提示されており、図 7A ~ 7B には、本明細書の配列番号: 2 が指定されている。完全長ゲノム又は完全長ゲノムと思われるものが得られ、図 83A ~ 83H に提示され、配列番号: 168 である。核酸 667 ~ 7209 は S V V の完全長ポリタンパク質をコードし、ポリタンパク質のアミノ酸は、図 83A ~ 83H に提示され、配列番号: 169 である。

30

【0083】

本発明は、配列番号 S: 3、5、7、9、11、13、15、17、19 及び 21 を含む配列番号: 1 の単離 (又は精製) 部分、並びに 5' UTR 領域 (1 ~ 666)、リーダーペプチドのコード領域 (667 ~ 903)、VP4 タンパク質のコード領域 (904 ~ 1116)、VP2 タンパク質のコード領域 (1117 ~ 1968)、VP3 タンパク質のコード領域 (1969 ~ 2685)、VP1 タンパク質のコード領域 (2686 ~ 3474)、2A タンパク質のコード領域 (3478 ~ 3504)、2B タンパク質のコード領域 (3505 ~ 3888)、2C タンパク質のコード領域 (3889 ~ 4854)、3A タンパク質のコード領域 (4855 ~ 5124)、3B タンパク質のコード領域 (5125 ~ 5190)、3C タンパク質のコード領域 (5191 ~ 5823)、3D タンパク質のコード領域 (5824 ~ 7209)、及びポリ (A) テールを含む 3' UTR 領域 (7210 ~ 7310) を含む配列番号: 168 の単離部分を提供する。本発明は、上記に提示した特定の部分の一部である単離核酸も提供する。本発明は、そのような単離した部分の突然変異体又は誘導体も提供する。配列番号: 1 及び 168 の単離部分を、これらの部分でコードされたポリペプチドを単離できるように発現ベクターにサブクローン化することができる。本発明により更に包含されるものは、配列番号: 1 又は配列番号: 168 と、高度、中度又は低度ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズできる単離核酸又はその任意の部分である。以下の表は、S V V タンパク質をコードする配列番号: 168 のヌクレオチドを提示する。本発明は、単離 (又は精製) S V V タンパク質又はその部分を

40

50

提供する。表は、配列番号：１６９に提示されているポリタンパク質配列に関して、ＳＶＶタンパク質のアミノ酸配列も提示する。

【００８４】

【表１】

表Ａ：ＳＶＶゲノム及びタンパク質特徴

SVV特性	配列番号:168の位置	配列番号:169の位置
5'UTR	1-666	N/A (容認されず)
リーダー	667-903 (リーダーペプチドのコード配列)	1-79
VP4	904-1116 (VP4のコード配列)	80-150
VP2	1117-1968 (VP2のコード配列)	151-434
VP3	1969-2685 (VP3のコード配列)	435-673
VP1	2686-3474又は3477 (VP1のコード配列)	674-936又は937
2A	3478-3504 (2Aのコード配列)	938-946
2B	3505-3888 (2Bのコード配列)	947-1074
2C	3889-4854 (2Cのコード配列)	1075-1396
3A	4855-5124 (3Aのコード配列)	1397-1486
3B	5125-5190 (3Bのコード配列)	1487-1508
3C	5191-5823 (3Cのコード配列)	1509-1719
3D	5824-7209 (3Dのコード配列)	1720-2181
3'UTR	7210-7310	N/A

10

20

【００８５】

本発明は、配列番号：１６９の残基１～７９のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶリーダー配列ペプチドを提供し、これは、配列番号：１６８のヌクレオチド６６７～９０３でコードされている。

【００８６】

本発明は、配列番号：１６９の残基８０～１５０のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶ VP4 (1A) タンパク質を提供し、これは、配列番号：１６８のヌクレオチド９０４～１１１６でコードされている。

30

【００８７】

本発明は、配列番号：１６９の残基１５１～４３４のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶ VP2 (1B) タンパク質を提供し、これは、配列番号：１６８のヌクレオチド１１１７～１９６８でコードされている。本発明は、図９で提示されている配列番号：４のアミノ酸配列を有する単離部分ＳＶＶ VP2 (1B) タンパク質も提供する（これは、配列番号：２のアミノ酸２～１４３に対応する）。部分ＳＶＶ VP2 タンパク質のアミノ酸配列は、図８で示されている配列番号：３の核酸配列でコードされている（これは配列番号：１のヌクレオチド４～４２９に対応する）。

【００８８】

本発明は、配列番号：１６９の残基４３５～６７８のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶ VP3 (1C) タンパク質を提供し、これは、配列番号：１６８のヌクレオチド１９６９～２６８５でコードされている。本発明は、図１１で提示されている配列番号：６のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶ VP3 (1C) タンパク質も提供する（これは、配列番号：２のアミノ酸１４４～３８２に対応する）。ＳＶＶ VP3 タンパク質のアミノ酸配列は、図１０で示されている配列番号：５の核酸配列でコードされている（これは配列番号：１のヌクレオチド４３０～１１４６に対応する）。

40

【００８９】

本発明は、配列番号：１６９の残基６７４～９３７のアミノ酸配列を有する単離ＳＶＶ VP1 (1D) タンパク質を提供し、これは、配列番号：１６８のヌクレオチド２６８６～３４７７でコードされている。本発明は、図１３で提示されている配列番号：８のア

50

ミノ酸配列を有する単離部分 S V V V P 1 (1 D) タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 3 8 3 ~ 6 4 1 に対応する)。S V V V P 1 タンパク質のアミノ酸配列は、図 1 2 で示されている配列番号： 7 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 1 1 4 7 ~ 1 9 2 3 に対応する)。

【 0 0 9 0 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 9 3 8 ~ 9 4 6 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 A タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 3 4 7 8 ~ 3 5 0 4 でコードされている。本発明は、図 1 5 で提示されている配列番号： 1 0 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 A タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 6 4 2 ~ 6 5 5 に対応する)。S V V 2 A タンパク質のアミノ酸配列は、図 1 4 で示されている配列番号： 9 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 1 9 2 4 ~ 1 9 6 5 に対応する)。

10

【 0 0 9 1 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 9 4 7 ~ 1 0 7 4 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 B タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 3 5 0 5 ~ 3 8 8 8 でコードされている。本発明は、図 1 7 で提示されている配列番号： 1 2 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 B タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 6 5 6 ~ 7 8 3 に対応する)。S V V 2 B タンパク質のアミノ酸配列は、図 1 6 で示されている配列番号： 1 1 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 1 9 6 6 ~ 2 3 4 9 に対応する)。

20

【 0 0 9 2 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 1 0 7 5 ~ 1 3 9 6 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 C タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 3 8 8 9 ~ 4 8 5 4 でコードされている。本発明は、図 1 9 で提示されている配列番号： 1 4 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 2 C タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 7 8 4 ~ 1 1 0 5 に対応する)。S V V 2 B タンパク質のアミノ酸配列は、図 1 8 で示されている配列番号： 1 3 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 2 3 5 0 ~ 3 3 1 5 に対応する)。

【 0 0 9 3 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 1 3 9 7 ~ 1 4 8 6 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 A タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 4 8 5 5 ~ 5 1 2 4 でコードされている。本発明は、図 2 1 で提示されている配列番号： 1 6 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 A タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 1 1 0 6 ~ 1 1 9 5 に対応する)。S V V 3 A タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 0 で示されている配列番号： 1 5 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 3 3 1 6 ~ 3 5 8 5 に対応する)。

30

【 0 0 9 4 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 1 4 8 7 ~ 1 5 0 8 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 B (V P g) タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 5 1 2 5 ~ 5 1 9 0 でコードされている。本発明は、図 2 3 で提示されている配列番号： 1 8 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 B タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 1 1 9 6 ~ 1 2 1 7 に対応する)。S V V 3 B タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 2 で示されている配列番号： 1 7 の核酸配列でコードされている (これは配列番号： 1 のヌクレオチド 3 5 8 6 ~ 3 6 5 1 に対応する)。

40

【 0 0 9 5 】

本発明は、配列番号： 1 6 9 の残基 1 5 0 9 ~ 1 7 1 9 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 C (「プロ」又は「プロテアーゼ」) タンパク質を提供し、これは、配列番号： 1 6 8 のヌクレオチド 5 1 9 1 ~ 5 8 2 3 でコードされている。本発明は、図 2 5 で提示されている配列番号： 2 0 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 C タンパク質も提供する (これは、配列番号： 2 のアミノ酸 1 2 1 8 ~ 1 4 2 8 に対応する)。S V V 3 C タ

50

ンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 で示されている配列番号：19 の核酸配列でコードされている（これは配列番号：1 のヌクレオチド 3 6 5 2 ~ 4 2 8 4 に対応する）。

【0096】

本発明は、配列番号：169 の残基 1 7 2 0 ~ 2 1 8 1 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 D（「ボル」又は「ポリメラーゼ」）タンパク質を提供し、これは、配列番号：168 のヌクレオチド 5 8 2 4 ~ 7 2 0 9 でコードされている。本発明は、図 2 7 で提示されている配列番号：22 のアミノ酸配列を有する単離 S V V 3 D タンパク質も提供する（これは、配列番号：2 のアミノ酸 1 4 2 9 ~ 1 8 9 0 に対応する）。S V V 3 C タンパク質のアミノ酸配列は、図 2 4 で示されている配列番号：19 の核酸配列でコードされている（これは配列番号：1 のヌクレオチド 4 2 8 5 ~ 5 6 7 3 に対応し、ヌクレオチド 5 6 7 1 ~ 5 6 7 3、「t g a」は、星印「*」でアミノ酸配列リストにおいて示されている終止コドンでコードする）。

10

【0097】

本発明の核酸は、RNA と DNA の両方の形態を含み、暗黙的に、提供されたりリストの相補配列を含む。

【0098】

したがって、配列番号：168 により示される単離 S V V 核酸は、7, 3 1 0 個のヌクレオチドの長さを有し、配列番号：169 により示されるアミノ酸配列を有するポリタンパク質をコードする。配列番号：1 により示される単離 S V V 核酸は、5, 7 5 2 個のヌクレオチドの長さを有し、配列番号：2 により示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。S V V ゲノム配列は、単一のポリタンパク質として翻訳され、多様な下流「翻訳産物」に開裂される。本発明は、配列番号：168 及び配列番号：1 の全ての核酸フラグメントを包含し、そのようなフラグメントでコードされる全てのポリペプチドを包含する。

20

【0099】

完全長 S V V ポリタンパク質アミノ酸配列は、配列番号：169 により示され、配列番号：168 のヌクレオチド 6 6 7 ~ 7 2 0 9 でコードされる。完全長 S V V ポリタンパク質アミノ酸配列の大部分は、配列番号：1 のヌクレオチド 1 ~ 5 6 7 3 でコードされる。ポリタンパク質は、3 つの主な前駆体タンパク質、P 1、P 2 及び P 3 に開裂される（図 4 B を参照すること）。P 1、P 2 及び P 3 は、小さい産物に更に開裂される。構造領域 P 1（1 A B C D 又はカプシド領域）の開裂産物は、1 A B C、V P 0、V P 4、V P 2、V P 3 及び V P 1 である。非構造タンパク質 P 2（2 A B C）の開裂産物は、2 A、2 B C、2 B 及び 2 C である。非構造領域 P 3 ポリタンパク質（3 A B C D）の開裂産物は、3 A B、3 C D、3 A、3 C、3 D、3 C 及び 3 D である。

30

【0100】

特定の実施態様において、本発明は、(i) 1 A B C D 又はカプシド領域のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 9 0 4 ~ 3 4 7 7）；(ii) 1 A B C のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 9 0 4 ~ 2 6 8 5）；(iii) V P 0 のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 9 0 4 ~ 1 9 6 8）；(iv) 2 A B C のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 3 4 7 8 ~ 4 8 5 4；配列番号：1 のヌクレオチド 1 9 2 4 ~ 3 3 1 5）；(v) 2 B C のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 3 5 0 5 ~ 4 8 5 4；配列番号：1 のヌクレオチド 1 9 6 6 ~ 3 3 1 5）；(iii) 3 A B C D のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 4 8 5 5 ~ 7 2 0 9；配列番号：1 のヌクレオチド 3 3 1 6 ~ 5 6 7 3）；(iv) 3 A B のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 4 8 5 5 ~ 5 1 9 0；配列番号：1 のヌクレオチド 3 3 1 6 ~ 3 6 5 1）；及び (v) 3 C D のコード配列（配列番号：168 のヌクレオチド 5 1 9 1 ~ 7 2 0 9；配列番号：1 のヌクレオチド 3 6 5 2 ~ 5 6 7 3）を含む単離核酸を提供する。本発明は、上記のコード配列でコードされる単離タンパク質又はペプチドも提供し、そのフラグメントも含まれる。

40

【0101】

50

ピコルナウイルスの基本的なカプシド構造は、高密度で充填された二十面体配置の60個のプロモーターから構成され、これらはそれぞれ4つのポリペプチド、VP1、VP2、VP3及びVP4から構成されており、全て元のプロモーターVP0の開裂により誘導されている。SVVウイルス粒子は、直径が約27nmであり(図2を参照すること)、直径が約27~30nmである他のピコルナウイルス粒子の大きさと一致している。

【0102】

ピコルナウイルス複製のキネティクスは急速であり、サイクルは、約5~10時間(典型的には8時間)で完了する(ピコルナウイルス複製サイクルの概略図は図68を参照すること)。レセプター結合すると、ゲノムRNAが粒子から細胞質内へ放出される。次にゲノムRNAはポリソームにより直接翻訳されるが、感染後、約30分で細胞タンパク質合成は急激に低下し、ほぼゼロになる。この減少は「遮断」と呼ばれ、細胞変性効果(cpe)の主な原因である。遮断は、翻訳が開始される際に全ての真核細胞のmRNAの5'末端でm7Gキャップ構造に結合することに関わる、宿主細胞の220kDaキャップ結合複合体(CBC)の開裂に起因すると思われる。CBCの開裂は、2Aプロテアーゼにより引き起こされられると思われる。

10

【0103】

5' UTRはIRESを含む。通常、真核細胞翻訳は、リボソームが5'メチル化キャップに結合し、次にmRNAに沿ってスキャンして最初のAUG開始コドンを見つけたときに開始される。IRESは、このプロセスを乗り切って、ピコルナウイルスのRNAがCBCの分解後も続けて翻訳されるようにする。一つの実施態様において、本発明は、SVV IRESを含む単離核酸を提供し、IRESは、5' UTR内に收容されている。一つの態様において、SVV IRESは、配列番号: 168のヌクレオチド300~366からのものでありうる。SVVの5' UTRは、配列番号: 168のヌクレオチド1~666に存在する。

20

【0104】

ウイルスポリタンパク質は、最初に2Aプロテアーゼにより開裂されて、ポリタンパク質P1、P2及びP3となる(図4Bを参照すること)。次に更なる開裂事象が、主なピコルナウイルスプロテアーゼである3Cにより実施される。3Cにより作製される開裂産物の一つは、ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ(3D)であり、これはゲノムRNAをコピーして、マイナス(-)センス鎖を産生する。(-)センス鎖は、(+)センス鎖(ゲノム)RNA合成のために鋳型を形成する。幾つかの(+)鎖は翻訳されて追加のウイルスタンパク質を産生し、(+)鎖の幾つかは、カプシドに詰め込まれて新たなウイルス粒子を形成する。

30

【0105】

ゲノムとカプシドの分子の相互作用は不明であるが、(+)鎖RNAゲノムは、予め形成されたカプシドに詰め込まれると考えられる。空のカプシドは、全てのピコルナウイルス感染において一般的である。カプシドは、P1ポリタンパク質前駆体の、一緒になってゲノムを囲んでいるVP0、VP3及びVP1からなるプロモーターへの開裂によって構築される。ウイルス粒子の成熟及び感染力は、VP0のVP2及びVP4への内部自己触媒性開裂に依存する。新たに形成されたウイルス粒子の放出は、細胞が溶解したときに起こる。

40

【0106】

本発明は、全て同定されている特徴及びATCC特許寄託番号PTA-5343の核酸配列を有する単離ウイルスも提供する。本発明のウイルスは、PTA-5343分離株、PTA-5343分離株の変種、同族体、誘導体及び突然変異体、並びに腫瘍溶解性の原因であると決定されている、SVV(本明細書に開示されている野生型と突然変異体の両方)の配列に対して修飾されている他のピコルナウイルスの変種、同族体、誘導体及び突然変異体を対象とすることができる。

【0107】

本発明は、更に、ATCC特許寄託番号PTA-5343を有する単離SVVに特異性

50

がある、並びにアミノ酸配列配列番号 S : 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 169 (全ポリタンパク質、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D、及びその部分を含む；これらのタンパク質を構成する配列番号：169のアミノ酸は上記の表 A を参照すること) を有する単離 SVV タンパク質からのエピトープに特異性がある抗体を提供する。本発明は、配列番号：1 又は配列番号：168 のフラグメント又は一部でコードされているタンパク質からのエピトープに対して特異性がある抗体も含む。

【0108】

多様なカルジオウイルス分離株からの RNA 配列の比較分析は、ゲノム間で > 45 % のヌクレオチド同一性を示した。カルジオウイルスは、EMC 様ウイルス (「EMCV」、例えば Mengo、B、R；また、MM、ME、Columbia-SK)、タイラー様ウイルス (「TMEV」、例えば BeAn、DA 及び GD V I I 株)、並びにヴィリュスクウイルスに分類することができる。

10

【0109】

SVV 配列を他のウイルスに対して分析すると、SVV はカルジオウイルスであるように見える (実施例 4 及び本明細書で参照される図を参照すること)。EMCV 及び TMEV を標準的なカルジオウイルスであるとする、SVV は明らかに典型的なカルジオウイルスではない。しかし、これら 2 つのウイルスでも差があり、とりわけ 5' UTR において差がある (Pevear et al., 1987, J. Virol., 61: 1507-1516)。系統学的には、SVV はそのポリタンパク質の多くが EMCV 及び TMEV に集まり (P1、2C、3C^{pro} 及び 3D^{pol} 領域；図 31 ~ 37 を参照すること)、SVV はカルジオウイルスである可能性が最も高いことを示す。

20

【0110】

SVV は、系統学的にはカルジオウイルスに類似しているが、現在異なるツリーであることが決定されている (図 86 を参照すること)。SVV は異なる属であることができ、それは、(1) SVV IRES は IV 型である (カルジオウイルスは II 型である)；(2) 多数の特有のウイルス (「SVV 様ピコルナウイルス」) は、SVV が他のカルジオウイルスに対するよりも SVV と類似している (実施例 18 及び図 87 ~ 89 を参照すること)；並びに許容細胞株の SVV 感染を中和できる抗体又は SVV に対して発生された抗体は、SVV 様ピコルナウイルスに結合できるからである。したがって、SVV 様ピコルナウイルスを、癌を治療する方法を含む本発明の方法のいずれかに使用することができ、ここで、SVV 様ピコルナウイルスは、天然に腫瘍溶解性であるか、又は (例えば、SVV 配列に基づいて SVV 様ピコルナウイルスゲノムに突然変異を設計することによって) 腫瘍溶解性にすることができる。一つの実施態様において、MN88-36696 が、癌を治療する本発明の方法に使用される。

30

【0111】

癌の治療方法：

本発明は、ピコルナウイルス (SVV 様ピコルナウイルスを含む)、その誘導体、変種、突然変異体又は同族体を含む SVV の腫瘍溶解性に関して修飾されたウイルスを使用する、癌治療の方法を提供する。本発明は、野生型 SVV (すなわち、ATCC 特許寄託番号 PTA-5343) が、幾つかの種類の腫瘍を選択的に死滅させる能力を有することを示す。例えば、SVV は、小型細胞肺癌 (SCLC) 及び神経芽細胞腫を含む、神経親和性又は神経内分泌性を有する腫瘍細胞を選択的に死滅させることができる。本発明のウイルスで治療されることが考慮される神経内分泌腫瘍の他の例には、副腎褐色細胞腫、ガストリノーマ (ゾリンジャー・エリソン症候群を引き起こす)、グルガゴーマ、インスリノーマ、髄様癌 (髄様甲状腺癌を含む)、多発性内分泌腫瘍症候群、膵内分泌腫瘍、パラングリオーマ、ピポーマ (血管作動性腸管ポリペプチド腫瘍)、島細胞腫及びクロム親和性細胞腫が挙げられるが、これらに限定はされない。

40

【0112】

一つの実施態様において、本発明は、被験者に SVV 又は SVV 様ピコナウイルスを投

50

与することにより神経内分泌腫瘍を治療又は低減する方法を提供し、ここで神経内分泌腫瘍は、NTR（ニューロテンシンレセプター）、ATH（GL11、My c、GRPLレセプター）、GRP、ニューロンエノラーゼ（ニューロン特異性エノラーゼ（NSE））、癌胎児性抗原（CEA）、クロモガニンA、NCAM、IgF2、BCL-2、ソニックヘッジホッグ経路及びケモカインレセプターが挙げられるが、これらに限定はされない1つ以上の神経内分泌腫瘍マーカーを発現（過剰発現）する。

【0113】

また本発明に包含されるものは、4種類の神経内分泌肺腫瘍である。最も重篤な種類である、小型細胞肺癌（SCLC）は、全ての癌のうちで最も急速に増殖し拡散する。大型細胞神経内分泌癌は、希な癌であり、癌を形成する細胞の大きさを除いて、その予後及び

10

【0114】

理論に束縛されることなく、腫瘍細胞を特異的に死滅させるSVVの能力には、選択的複製、細胞タンパク質合成遮断、アポトーシス、腫瘍選択的細胞進入による細胞溶解、腫瘍選択的翻訳、腫瘍選択的タンパク質分解、腫瘍選択的RNA複製及びこれらの組み合わせを挙げることができるが、これらに限定はされない。

【0115】

SVVは、修飾アデノウイルスを含む他の腫瘍溶解ウイルスに対して多くの有益な特性を有し、例えば、(i)SVVは、SCLC、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫及び神経芽細胞腫を含む、神経特性を有する癌に非常に高い選択性を有し、例えば、SVVは、神経内分泌腫瘍細胞に対して10,000倍を超える選択性を示す；(ii)SVVは、化学療法よりも1,000倍良好な細胞死滅特異性を有することが示されている；(iii)SVVは、1キログラムあたり 10^{14} 個の多さのウイルス粒子の全身投与後に、マウスにおいて明らかな毒性を示さない；(iv)予め確立された大型の腫瘍がマウスにおいて100%消滅し、腫瘍増殖の再発がない点において、SVVの効力は非常に強力である；(v)SVVを精製してより高い力価にすることができ、許容細胞株において1細胞あたり200,000個を超える粒子を産生することができる；(vi)SVVは、他の腫瘍溶解ウイルスよりも良好に腫瘍に侵入し拡散することができる小さいサイズを有する（SVVウイルス粒子は直径が30nm未満である）；(vii)SVVは急速に複製する（12時間未満）、及び(viii)特異的な抗腫瘍剤として使用するのに、SVVを修飾する必要がない。

20

30

【0116】

更に、初期研究は（実施例6を参照すること）、SVVを腫瘍溶解ウイルス療法に有益なツールにする幾つかの追加的な要素を示す：(i)ヒト血清試料はSVVに向けられている中和抗体を含有しない；(ii)SVVは補体により阻害されない；及び(iii)SVVはヒト赤血球の赤血球凝集を生じない。これらの要素は、全て、SVVが他の腫瘍溶解ウイルスよりもインビボで長い循環時間を示すという事実に寄与している（例えば、実施例7を参照すること）。

40

【0117】

本発明は、細胞個体群で新生細胞を選択的に死滅させる方法であって、ウイルスを細胞個体群中の新生細胞に形質導入し、複製し、新生細胞を死滅できる条件下で、有効量のSVVを前記細胞個体群に接触させることを含む方法を提供する。SVVが腫瘍細胞をインビボで死滅させる方法の他に、本発明の方法は、腫瘍を、(1)SVVに感染したときインビトロで培養できる、(2)非腫瘍細胞の存在下で培養できる；及び(3)細胞が（腫瘍及び非腫瘍細胞の両方が）哺乳類のものであり、細胞がヒトの細胞である場合を含む実施態様を包含する。細胞のインビトロ培養及びSVVによる感染は、多様な用途を有することができる。例えば、インビトロ感染は、多量のSVVを産生する方法として、新生細胞が細胞個体群に存在するかを判断又は検出する方法として、又は突然変異SVVが多様

50

な腫瘍細胞若しくは組織型を特異的に標的し、死滅させることができるかをスクリーニングする方法として使用される。

【0118】

本発明は、癌を治療するエキソビボ方法を更に提供し、ここで、細胞はヒト癌患者から単離され、インビトロで培養され、癌細胞を選択的に死滅させるSVVにより感染され、非腫瘍細胞が患者に再び導入される。あるいは、SVVを患者に投与方法として、患者から単離された細胞をSVVで感染し、直ぐに患者に再び導入することができる。一つの実施態様において、癌細胞は造血由来のものである。場合によっては、患者は、培養細胞が再び患者に導入される前に、患者の腫瘍細胞をインビボで破壊するために、治療を受ける（例えば、化学療法又は放射線）ことができる。一つの実施態様において、治療を使用して患者の骨髄細胞を破壊することもできる。

10

【0119】

ポリマー被覆SVVを、SVVが任意の特定の細胞型を標的にするために使用することができる。この被覆戦略を使用して、SVVに対する抗体を切り抜けることもできる。

【0120】

SVVは、神経特性を有する腫瘍細胞型に対して強力な抗腫瘍活性を有する。SVVは、試験した正常なヒトに対して細胞溶解活性を示さない。更に、SVVは、初代培養ヒト肝細胞に対して細胞毒性がない。下記の表1は、選択した腫瘍細胞型に対するSVVのインビトロ細胞毒性の効力を決定するために実施された初期研究をまとめる。

20

30

【0121】

40

【表 2】

表 1：選択した腫瘍細胞型に対する S V V の細胞毒性の効力

細胞株	細胞型	EC ₅₀ (VP/細胞)
H446	ヒトSCLC	0.0012
PER.C6	ヒト胎児網膜芽細胞	0.02
H69AR	SCLC-多剤耐性	0.035
293	AD5 DNA形質転換ヒト腎臓	0.036
Y79	ヒト網膜芽細胞腫	0.00035
IMR32	ヒト脳神経芽細胞腫	0.035
D283	ヒト小脳正中髄芽腫	0.25
SK-N-AS	ヒト脳神経芽細胞腫	0.474
N1E-115	マウス神経芽細胞腫	0.0028
BEKPCB3E1	Ad5E1で形質転換されたウシ胎児腎臓細胞	0.99
H1299	ヒト非SCLC	7.66
ST	ブタ精巣	5.9
DMS153	ヒトSCLC	9.2
BEK	ウシ胎児腎臓	17.55
M059K	ヒト脳悪性グリア芽細胞腫	1,061
PK15	ブタ腎臓	1,144
FBRC	ウシ胎児網膜	10,170
HCN-1A	ヒト脳	23,708
H460	ヒトLCLC	>30,000 (不活性)
Neuro 2A	マウス神経芽細胞腫	>30,000 (不活性)
DMS79	ヒトSCLC	>30,000 (不活性)
H69	ヒトSCLC	>30,000 (不活性)
C8D30	マウス脳	>30,000 (不活性)
MRC-5	ヒト胎児肺線維芽細胞	>30,000 (不活性)
HMVEC	新生血管内皮細胞	>30,000 (不活性)
HMVEC	成人血管内皮細胞	>30,000 (不活性)
A375-S2	ヒト黒色腫	>30,000 (不活性)
SK-MEL-28	黒色腫	>30,000 (不活性)
PC3	ヒト前立腺癌	>30,000 (不活性)
PC3M2AC6	ヒト前立腺癌	>30,000 (不活性)
LnCap	ヒト前立腺癌	>30,000 (不活性)
DU145	ヒト前立腺癌	>30,000 (不活性)

10

20

30

【0 1 2 2】

下記の表 1 - A は、S V V 感染に許容性及び非許容性である細胞株のリストを提供する。
表は、S V V の細胞毒性効力及び選択性を示す。

40

【0 1 2 3】

50

【表 3】

表 1-A : S V V のインビトロの細胞毒性効力及び選択性

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*	
許容性 Y79	ヒト	成人	癌	目、網膜	網膜芽細胞腫		0.00035, 0.0007	
NCI-H446	ヒト	成人	転移性癌	肺	変種小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	0.0012, 0.002, 0.0007	10
N1E-115	マウス	成体	癌	脳	神経芽細胞腫		0.0028, 0.001	
NCI-H1770	ヒト	成人	転移性癌	肺	非小型細胞肺癌 (N SCLC)	リンパ節	0.00724	
NCI-H82	ヒト	成人	転移性癌	肺	変種小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	0.015	
PER. C6 (登録商標)	ヒト	胎児	癌	目、網膜	網膜芽細胞		0.02, 0.0049	20
NCI-H69AR	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌、多剤耐性 (SCLC)		0.035, 0.05	
SK-NEP-1	ヒト	成人	転移性癌	腎臓	ウィルムス腫瘍	胸膜滲出液	0.03	
IMR-32	ヒト	成人	癌	脳	神経芽細胞腫		0.035, 0.0059, 0.05	
NCI-H187	ヒト	成人	転移性癌	肺	伝統的な小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	0.00343	
NCI-H209	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髄	0.04	30
NCI-H1184	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	リンパ節	0.155	
D283 Med	ヒト	成人	転移性癌	脳、小脳	髄芽腫	腹膜	0.25	
SK-N-AS	ヒト	成人	転移性癌	脳	神経芽細胞腫	骨髄	0.474	
BEK PCB3E1	ウシ	胎児	正常、Ad5 形質転換	腎臓	Ad5E1形質転換		0.99	
ST	ブタ	胎児	正常、不死 精巢化	精巣			5.9	
NCI-H1299	ヒト	成人	転移性癌	肺	大型細胞肺癌	リンパ節	7.66, 4.8	40
DMS 153	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	肝臓	9.2	
NCI-H295R	ヒト	成人	癌	副腎、皮質	副腎皮質癌		16.5	

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*	
BEK	ウシ	胎児	正常、不死 化	腎臓			17.55	
PPASMC	ブタ	成体	正常、初代	肺、肺動脈	平滑筋細胞		18.4	
PCASMC	ブタ	成体	正常、初代	心臓、冠動脈	平滑筋細胞		11.9	
PAoSMC	ブタ	成体	正常、初代	心臓、大動脈	平滑筋細胞		88	
NCI-H526	ヒト	成人	転移性癌	肺	変種小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髓	46.4	10
OVCAR-3	ヒト	成人	癌	卵巣	腺癌		39	
ESK-4	ブタ	胎児	正常、不死 化	腎臓	線維芽細胞		60	
SW-13	ヒト	成人	癌	副腎、皮質	小型細胞腺癌		<100	
293	ヒト	胎児	正常、Ad5 形質転換	腎臓	Ad5形質転換		0.036, 184.8	
Hs 578T	ヒト	成人	癌	乳房	癌腫		273	
Hs 1. Tes	ヒト	胎児	正常、不死 化	精巣			416	20
LOX IMVI	ヒト	成人	癌	皮膚	黒色腫		569	
PK(15)	ブタ	成体	正常、不死 化	腎臓			1144, 129	
非許容性								
WI-38	ヒト	胎児	正常、不死 化	肺	線維芽細胞		>10,000	
IMR-90	ヒト	胎児	正常、不死 化	肺	線維芽細胞		>10,000	
MRC-5	ヒト	胎児	正常、不死 化	肺	線維芽細胞		>10,000	30
HCN-1A	ヒト	成人	正常、不死 化	脳、皮質ニ ューロン			>10,000	
HMVEC	ヒト	成人 (新生 児)	正常、初代	皮膚	微小血管内皮細胞		>10,000	
HMVEC	ヒト	成人	正常、初代	皮膚	微小血管内皮細胞		>10,000	
HUVEC	ヒト	成人	正常、初代	臍帯静脈	内皮細胞		>10,000	
HRE	ヒト	成人	正常、初代	腎臓	上皮細胞		>10,000	40

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*
HRCE	ヒト	成人	正常、初代	腎臓	皮質上皮細胞		>10,000
PHH	ヒト	成人	正常、初代	肝臓	肝細胞		>10,000
HCASMC-c	ヒト	成人	正常、初代	心臓、冠動脈	平滑筋細胞		>10,000
HCAEC	ヒト	成人	正常、初代	心臓、冠動脈	内皮細胞		>10,000
HAEC	ヒト	成人	正常、初代	心臓、大動脈	内皮細胞		>10,000
HAoSMC-c	ヒト	成人	正常、初代	心臓、大動脈	平滑筋細胞		>10,000
NHA	ヒト	成人	正常、初代	脳	星状膠細胞		1713
HPASMC	ヒト	成人	正常、初代	肺	平滑筋細胞		>10,000
PBMC	ヒト	成人	正常、初代	末梢血	単核細胞		>10,000
SF-295	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫		>10,000
U251	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫		>10,000
SF-539	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫		>10,000
SNB-19	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫		>10,000
SF-268	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫		3103
U-118MG	ヒト	成人	癌	脳	グリア芽細胞腫、星状細胞腫		>10,000
SNB-75	ヒト	成人	癌	脳	星状細胞腫		>10,000
M059K	ヒト	成人	癌	脳、グリア細胞	悪性グリア芽細胞腫		1061
KK	ヒト	成人	癌	脳、グリア細胞	グリア芽細胞腫		>10,000
HCC-2998	ヒト	成人	癌	結腸	癌腫		>10,000
KM12	ヒト	成人	癌	結腸	癌腫		>10,000
HT-29	ヒト	成人	癌	結腸	腺癌		>10,000
HCT 116	ヒト	成人	癌	結腸	癌腫		>10,000
HCT-15	ヒト	成人	癌	結腸	癌腫		>10,000
COLO 205	ヒト	成人	転移性癌	結腸	腺癌	腹水	>10,000
SW620	ヒト	成人	転移性癌	結腸	結腸直腸癌	リンパ節	6503 , >10,000
PC3M-2AC6	ヒト	成人	癌	前立腺			>10,000
PC3M-2AC6 + 2-AP	ヒト	成人	癌	前立腺			ND
PC-3	ヒト	成人	転移性癌	前立腺	腺癌	骨	>10,000
LNCaP, FGC	ヒト	成人	転移性癌	前立腺	腺癌	リンパ節	>10,000

10

20

30

40

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*	
DU 145	ヒト	成人	転移性癌	前立腺	腺癌	脳	>10,000	
Hep3B	ヒト	成人	癌	肝臓	肝細胞癌		>10,000	
Hep G2	ヒト	成人	癌	肝臓	肝細胞癌		>10,000	
786-0	ヒト	成人	癌	腎臓	明細胞腺癌		>10,000	
TK-10	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	
RXF 393	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	
UO-31	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	10
SN12C	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	
A-498	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	
ACHN	ヒト	成人	癌	腎臓	癌腫		>10,000	
SW839	ヒト	成人	癌	腎臓	腎明細胞腺癌		>10,000	
Caki-1	ヒト	成人	転移性癌	腎臓	明細胞腺癌	皮膚	>10,000	
5637	ヒト	成人	癌	膀胱	癌腫		>10,000	
NCI-H1339	ヒト	成人	癌	肺			>10,000	
NCI-H1514	ヒト	成人	癌	肺			>10,000	
A549	ヒト	成人	癌	肺	癌腫		>10,000	
S8	ヒト	成人	癌	肺	癌腫		>10,000	20
NCI-H727	ヒト	成人	癌	肺	カルチノイド		>10,000	
NCI-H835	ヒト	成人	癌	肺	カルチノイド		>10,000	
UMC-11	ヒト	成人	癌	肺	カルチノイド		>10,000	
DMS 114	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		>10,000	
DMS 53	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		>10,000	
NCI-H69	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		>10,000	
NCI-H2195	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髓	>10,000	30
DMS 79	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	>10,000	
NCI-H146	ヒト	成人	転移性癌	肺	伝統的な小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髓	>10,000	
NCI-H1618	ヒト	成人	転移性癌	肺	伝統的な小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髓	>10,000	
NCI-H345	ヒト	成人	転移性癌	肺	伝統的な小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髓	>10,000	
HOP-62	ヒト	成人	癌	肺	非小型細胞肺癌 (NSCLC)		>10,000	40
EKVX	ヒト	成人	癌	肺	非小型細胞肺癌 (NSCLC)		>10,000	
HOP-92	ヒト	成人	癌	肺	非小型細胞肺癌 (NSCLC)		>10,000	

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*
NCI-H23	ヒト	成人	癌	肺	非小型細胞肺癌 (N SCLC)		>10,000
NCI-H322M	ヒト	成人	癌	肺	非小型細胞肺癌 (N SCLC)		>10,000
NCI-H226	ヒト	成人	転移性癌	肺	扁平上皮癌、中皮腫 (NSCLC)	胸膜滲出液	>10,000
NCI-H460	ヒト	成人	転移性癌	肺	大型細胞肺癌	胸膜滲出液	>10,000
HeLa, HeLa S3	ヒト	成人	癌	子宮頸	腺癌		>10,000
CCRF-CEM	ヒト	成人	癌	末梢血、T リンパ芽球	急性リンパ性白血 病 (ALL)		>10,000
MOLT-4	ヒト	成人	癌	末梢血、T リンパ芽球	急性リンパ性白血 病 (ALL)		>10,000
RPMI 8226	ヒト	成人	癌	末梢血、B リンパ芽球	形質細胞腫、骨髄腫		>10,000
SR	ヒト	成人	転移性癌	リンパ芽球	大型細胞リンパ芽 球性リンパ腫.	胸膜滲出液	>10,000
HL-60 (TB)	ヒト	成人	癌	末梢血、前 骨髄芽細胞	急性前骨髄球性白 血病 (APL)		>10,000
K-562	ヒト	成人	転移性癌	骨髄	慢性骨髄性白血病 (CML)	胸膜滲出液	>10,000
UACC-257	ヒト	成人	癌	皮膚	黒色腫		>10,000
M14	ヒト	成人	癌	皮膚	黒色腫		>10,000
UACC-62	ヒト	成人	癌	皮膚	黒色腫		6614
SK-MEL-2	ヒト	成人	癌	皮膚	悪性黒色腫		>10,000
SK-MEL-28	ヒト	成人	癌	皮膚	悪性黒色腫		>10,000
A375. S2	ヒト	成人	癌	皮膚	悪性黒色腫		>10,000
SK-MEL-28	ヒト	成人	癌	皮膚	悪性黒色腫		>10,000
SK-MEL-5	ヒト	成人	転移性癌	皮膚	悪性黒色腫	リンパ節	>10,000
MALME-3M	ヒト	成人	転移性癌	皮膚	悪性黒色腫	肺	>10,000
BT-549	ヒト	成人	癌	乳房	乳管癌		>10,000
NCI/ADR-RE S	ヒト	成人	癌	乳房	癌腫		>10,000
MCF7	ヒト	成人	転移性癌	乳房	腺癌	胸膜滲出液	>10,000
MDA-MB-231	ヒト	成人	転移性癌	乳房	腺癌	胸膜滲出液	>10,000
T-47D	ヒト	成人	転移性癌	乳房	乳管癌	胸膜滲出液	>10,000
MDA-MB-435	ヒト	成人	転移性癌	乳房	乳管腺癌	胸膜滲出液	>10,000
IGR-OV1	ヒト	成人	癌	卵巣	癌腫		>10,000

10

20

30

40

50

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*	
OVCAR-4	ヒト	成人	癌	卵巣	腺癌		>10,000	
OVCAR-5	ヒト	成人	癌	卵巣	腺癌		>10,000	
OVCAR-8	ヒト	成人	癌	卵巣	腺癌		>10,000	
SK-OV-3	ヒト	成人	転移性癌	卵巣	腺癌	腹水	>10,000	
BxPC-3	ヒト	成人	癌	膵臓	腺癌		>10,000	
AsPC-1	ヒト	成人	転移性癌	膵臓	腺癌	腹水	>1000	10
NCI-H295	ヒト	成人	癌	副腎、皮質	副腎皮質癌		>10,000	
TT	ヒト	成人	癌	甲状腺	髄様癌		>10,000	
C8-D30	マウス	成体	正常	脳、小脳			>10,000	
LLC1	マウス	成体	癌	肺	ルイス肺癌		>10,000	
RM-1	マウス	成体	癌	前立腺			>10,000	
MLTC-1	マウス	成体	癌	精巣	ライディッヒ細胞腫		>10,000	
KLN 205	マウス	成体	癌	肺	扁平上皮癌		>10,000	
CMT-64	マウス	成体	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		>10,000	20
CMT-93	マウス	成体	癌	直腸	倍数体癌		>10,000	
B16-F0	マウス	成体	癌	皮膚	黒色腫		>10,000	
RM-2	マウス	成体	癌	前立腺			>10,000	
RM-9	マウス	成体	癌	前立腺			>10,000	
Neuro-2A	マウス	成体	癌	脳	神経芽細胞腫		>10,000	
FBRC	ウシ	胎児		目、網膜			>10,000	
MDBK	ウシ	成体	正常、不死化	腎臓			>10,000	
CSL 503	ヒツジ	成体	正常、不死化	肺	Ad5E1形質転換		>10,000	30
OFRC	ヒツジ	成体	正常、不死化	目、網膜	Ad5E1形質転換		>10,000	
PC-12	ラット	成体	癌	副腎	クロム親和性細胞種		>10,000	
Vero	サル	成体	正常、不死化	腎臓			>10,000	
PAOEC	ブタ	成体	正常、初代	心臓、大動脈	内皮細胞		>10,000	
PCAEC	ブタ	成体	正常、初代	心臓、冠動脈	内皮細胞		>10,000	40
PPAEC	ブタ	成体	正常、初代	肺、肺動脈	内皮細胞		>10,000	
TBD								
NCI-H289	ヒト	成人	癌	肺			TBD	
NCI-H1963	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		TBD	

細胞株	種	段階	状態	器官	型	転移部位	EC50*
NCI-H2227	ヒト	成人	癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)		TBD
NCI-H378	ヒト	成人	転移性癌	肺	伝統的な小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	TBD
NCI-H2107	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髄	TBD
HCC970	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	骨髄	TBD
HCC33	ヒト	成人	転移性癌	肺	小型細胞肺癌 (SCLC)	胸膜滲出液	<1000/TBD
BON	ヒト	成人	癌	膵臓	カルチノイド		TBD
H1T-T15	ハムスター	成体	正常、不死化	膵臓	ランゲルハンス島、b細胞		TBD

10

20

*言及される以外は3日後に決定されたED50

【 0 1 2 4 】

表 1 - A は、8 種類の異なる種から 2 2 種類の組織を表す、1 6 5 個の初代細胞及び細胞株に対する S V V 許容性実験の結果を提示する。結果は、実質的に全ての成人、成体の正常なものが、S V V に対して非許的であることを示す。試験した 1 3 個の初代成人ヒト細胞培養は非許容的であった。試験した 1 2 個のウシ、ヒツジ、ブタ及び霊長類の正常な細胞培養のうち、3 つの細胞培養しか許容性がなく、これらはブタの平滑筋細胞であった。この結果は、S V V の天然の宿主がブタであるという仮説と一致している。ブタ平滑筋細胞の他に、神経内分泌癌細胞株のみか、又は大多数の胎児の株は許容性があった。

30

【 0 1 2 5 】

マウスの研究 (実施例を参照すること) は、S V V がインビボで大きな効力及び特性をもって腫瘍を特異的に死滅できることを示す。これらのインビボ研究は、S V V が他の腫瘍溶解ウイルスに対して数多くの利点を有することを示す。例えば、確立された腫瘍を消滅させる腫瘍溶解ウイルスの能力に影響を与える一つの重要な要素は、ウイルス侵入である。アデノウイルスベクターを用いた研究において、A d 5 に基づいたベクターは、胸腺欠損マウスにおける C L C 腫瘍発症に対して効果がなかった。免疫組織化学的な結果に基づいて、アデノウイルスは確立した腫瘍に侵入したとは思われなかった。対照的に S V V は、単回の全身投与の後、胸腺欠損ヌードマウスにおいて H 4 4 6 S C L C 腫瘍を排除することができた。S V V は、他のウイルスより良好に腫瘍組織に侵入し拡散することを可能にする小さいサイズ (直径 < 3 0 nm) を有し、したがって、S V V の小さいサイズは、確立した腫瘍に成功裏に侵入し、それを消滅させる能力に寄与することができる。

40

【 0 1 2 6 】

更なるインビボ試験は、胸腺欠損ヌードマウス及び免疫適格マウスを使用したマウス腫瘍モデルにおいて、S V V の単回静脈内用量の効力を実証している。試験した腫瘍モデルは、(1) H 4 4 6 (ヒト S C L C) ; (2) Y 7 9 (ヒト網膜芽細胞腫) ; (3) H 6

50

9 A R (ヒト多剤耐性 S C L C) ; (4) H 1 2 9 9 (ヒト N S C L C) ; 及び (5) N 1 E - 1 1 5 (マウス神経芽細胞腫) であった。これらの試験の結果は、図 9 0 A ~ E 及び実施例 1 1 に示されている。試験は、全ての動物モデルにおいて S V V の単回静脈内用量の効力を実証し、ヒト異種移植モデルにおいてインビトロ E D ₅₀ とインビボ効力の相対的な位置づけが一致することを示す。N 1 E - 1 1 5 免疫適格マウス神経芽細胞腫モデルでの結果は、S V V が正常な免疫系を有する被験者の腫瘍に対して有効でありうることを示す。

【 0 1 2 7 】

化学抵抗性は、癌療法の一つの局面として化学療法を受けているあらゆる患者が直面している大きな問題である。化学抵抗性になった患者は、常にではないとしても多くの場合に予後がかなりひどいものになり、代替治療のない状態に置かれる可能性がある。化学抵抗性の主な原因の一つは、多剤耐性タンパク質 (M R P) と呼ばれるタンパク質のファミリーの発現、過剰発現又は活性の増加であることがよく知られている。出願者たちは、特定の腫瘍細胞の S V V に対する感受性も、癌細胞の化学抵抗性及び M R P 発現と関連していることを見出した。H 6 9 は、S V V にインビトロで抵抗性がある化学感受性 (アドリアマイシン) 細胞株であり、一方、H 6 9 A R は、M R P を過剰発現する化学耐性細胞株であり、S V V に感受性がある (表 1 を参照すること) 。証拠は、M D R を含む M R P の過剰発現が S V V 死滅に対する細胞の感受性と関連することを示す。したがって、一つの実施態様において、本発明は、M R P を過剰発現する細胞を S V V が死滅させる、癌治療の方法を提供する。

10

20

【 0 1 2 8 】

本発明は、異常増殖細胞のような異常な細胞によりもたらされる疾患を治療する方法も提供する。この方法は、前記の異常細胞を、異常細胞の一部又は全ての破壊をもたらす方法で S V V と接触させることを含む。S V V を使用して、異常細胞によりもたらされる多様な疾患を治療することができる。これらの疾患の例には、腫瘍細胞が神経内分泌特性及び神経線維腫症を示す癌が挙げられるが、これらに限定はされない。

【 0 1 2 9 】

神経内分泌腫瘍は、多様な方法で同定することができる。例えば、神経内分泌腫瘍は多数のペプチドホルモン及びアミンを産生及び分泌する。これらの物質のうちの幾つかは、特定の臨床症状：カルチノイド、ゾリンジャー・エリソン症候群、高血糖症、グルカゴノーマ及び W D H A 症候群を引き起こす。これらの症候群の特定のマーカーは、尿 5 - H I A A 、血清又は血漿ガストリン、インスリン、グルカゴン及び血管活性腸ポリペプチドそれぞれのベース及び / 又は刺激レベルである。幾つかのカルチノイド腫瘍及び内分泌性腺腫瘍の三分の一は、臨床症状を何も表さず、非機能性腫瘍と呼ばれる。したがって、クロモグラニン A 、膵ポリペプチド、血清神経特異エノラーゼ及び糖タンパク質ホルモンのサブユニットのような一般的な腫瘍マーカーが、明確な臨床ホルモン関連症状のない患者でのスクリーニングのために使用されている。これらの一般的な腫瘍マーカーのうち、クロモグラニン A は、その正確な機能は未だに確立されていないが、多様な神経内分泌腫瘍に非常に感受性があり特異的である血清マーカーであることを示している。これは、既知のホルモンを分泌しない神経内分泌由来のあまり分化していない腫瘍の多くの種類において高値を示すこともできるからである。現在のところ、クロモグラニン A は、診断及び治療評価の両方で利用可能な最適な一般的神経内分泌血清又は血漿マーカーであると考慮され、多様な神経内分泌腫瘍の患者で 5 0 ~ 1 0 0 % 増加される。クロモグラニン A 血清又は血漿マーカーのレベルは腫瘍量を反映し、中腸カルチノイドの患者の予後のための独立したマーカーであることができる。

30

40

【 0 1 3 0 】

本発明は、S V V 及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も提供する。薬学的に許容される担体の中に有効量の S V V を含むことができるそのような組成物は、投与単位形態、滅菌非経口液剤若しくは懸濁剤、滅菌非 - 非経口液剤又は経口液剤若しくは懸濁剤、水中油若しくは油中水乳剤などで個人に局所又は全身投与するのに適している。非経口

50

及び非 - 非経口薬剤送達用の製剤は当該技術で知られている。組成物は、S V V の凍結乾燥及び / 又は再構成形態も含む。許容される医薬担体は、例えば、生理食塩水、硫酸プロタミン (Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, NJ)、水、水性緩衝剤、例えばリン酸緩衝剤及びトリス緩衝剤、又はポリブレン (Sigma Chemical, St. Louis, MO)、及びリン酸緩衝生理食塩水、並びにスクロースである。適切な医薬担体の選択は、本明細書に含まれる教示から当業者には明白であると思われる。これらの溶液は滅菌であり、一般に S V V 以外の粒状物質を含まない。組成物は、生理学的条件に近づける必要がある場合には、pH 調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤などのような薬学的に許容される補助物質を含んでもよく、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどである。S V V による細胞の感染を増強する賦形剤を含めることができる。

10

【0131】

S V V は、腫瘍細胞内でのウイルスの複製を介して腫瘍細胞の増殖を阻害、防止又は破壊するのに有効な量で、宿主又は被験者に投与される。癌治療に S V V を利用する方法には、腫瘍細胞の治療上有用な破壊を誘発する安全で展開性のある耐性用量でウイルスを、全身に、領域的に、又は局所的に送達することが含まれる。全身投与の後でも、S V V の治療指数は、少なくとも 10、好ましくは少なくとも 100、より好ましくは少なくとも 1000 である。一般に、S V V は、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{14}$ vp/kg の量で投与される。投与される正確な用量は、患者の年齢、体重及び性別、並びに治療される腫瘍の大きさ及び重篤度を含む多様な要因により左右される。ウイルスを 1 回以上投与することができ、これは、宿主の免疫反応の可能性によって左右されうる。組成物の単回又は多回投与は、治療する医師により選択された用量レベル及びパターンで実施することができる。必要であれば、ウイルスに対する免疫反応を低減することによって反復投与及び / 又は複製の増強が可能になるように、多様の免疫抑制剤を用いて免疫反応を減少させることができる。本発明の抗新生物性ウイルス療法を他の抗新生物性プロトコールと組み合わせることができる。送達は、リポソーム、直接注射、カテーテル、局所適用、吸入などを用いる多様な方法で達成することができる。S V V ゲノム RNA の DNA コピー又はその一部も送達の方法であることができ、DNA は細胞により実質的に転写されて、S V V ウイルス粒子又は粒状 S V V ポリペプチドを産生する。

20

【0132】

治療有効用量は、症状の減退又は患者の生存延長をもたらすウイルスの量を意味する。ウイルスの毒性及び治療有効性は、細胞培養又は実験動物での標準手順により、例えば LD_{50} (動物又は細胞の個体群の 50% が致死の用量; ウイルスでは、用量は vp/kg の単位) 及び ED_{50} (動物又は細胞の個体群の 50% に治療上有効な用量 - vp/kg) 又は EC_{50} (動物又は細胞の個体群の 50% に有効な濃度 - vp/細胞 (例えば表 1 を参照すること)) を決定することにより決定できる。毒性と治療効果の用量比率は、治療指数であり、 LD_{50} と ED_{50} 又は EC_{50} の比率として表すことができる。高い治療指数を示すウイルスが好ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物研究から得たデータを、ヒトに用いる投与量範囲を処方するのに使用できる。ウイルスの投与量は、好ましくは、毒性がほとんどないか又はまったくない ED_{50} 又は EC_{50} を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、用いられる投与形態及び利用される投与経路に応じて、この範囲内で変更することができる。

30

40

【0133】

なお別の態様において、新生物形成状態を有する宿主生物体を治療する方法が提供され、前記宿主生物体に本発明のウイルス組成物の治療有効量を投与することを含む。一つの態様において、新生組織は異常に増殖しており、新生組織は悪性腫瘍組織であることができる。好ましくは、ウイルスは、腫瘍組織内で選択的に複製するその能力によって組織又は腫瘍体積の全体にわたって分布する。本発明の方法によって潜在的に治療されやすい新生物形成状態には、神経親和性のものが含まれる。

【0134】

本発明のウイルスを産生する方法：

本発明のウイルスを非常に高い力価及び収率で産生する方法は、本発明の更なる態様で

50

ある。記載されているように、SVVを精製してより高い力価にすることができ、許容細胞株において1細胞あたり200,000個を越える粒子を産生することができる。多量のウイルスを産生できる細胞には、PER.C6 (Fallaux et al., Human Gene Therapy, 9:1909-1917, 1998)、H446 (ATCC 番号 HTB-171) 及び EC₅₀ 値が10未満である表1に提示されている他の細胞株が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0135】

例えば、ピコルナウイルスの培養は、以下のように実施することができる。目的のウイルスをブランク精製し、十分に単離されたブランクを取り出して、PER.C6のような許容細胞株で増幅する。感染細胞からの粗ウイルス溶解産物(CVL)は、多サイクルの凍結融解により作製することができ、多数の許容細胞を感染するのに使用できる。許容細胞を、多様な組織培養フラスコにおいて、例えば、10%ウシ胎児血清(Biowhitaker, Walkersville, MD)及び10mM塩化マグネシウム(Sigma, St Louis, MO)を含有するダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA)のような多様な培地を使用する50×150cm²フラスコで増殖することができる。感染細胞を、感染の12~48時間後又は完全な細胞変性効果(CPE)が見られたときに採取することができ、4、1500rpmで10分間の遠心分離により回収する。細胞ペレットを細胞培養上澄みに再懸濁し、多サイクルの凍結融解に付す。得られたCVLを、4、1500rpmで10分間の遠心分離により清澄化する。ウイルスを勾配遠心分離により精製することができる。例えば、2回のCsCl勾配がSVVの精製には十分でありうる：1工程勾配(CsCl密度1.24g/ml及び1.4g/ml)、続く1連続勾配遠心分離(CsCl密度1.33g/ml)。精製されたウイルス濃度は、分光光度的に決定され、1A₂₆₀ = 9.5 × 10¹²粒子であると推定される(Scraba D.G., and Palmenberg, A.C. 1999. *Cardioviruses* (Picornaviridae). In: *Encyclopedia of Virology*, Second edition, R.G. Webster and A. Granoff Eds)。精製ウイルスの感染力価も、PER.C6又は他の任意の適切な細胞型を使用した標準ブランク及び/又は組織培養感染用量50(TCID₅₀)アッセイにより決定される。PER.C6細胞からのSVVの収率は、細胞1個あたり200,000個を越える粒子であり、粒子とPFUの比率は約100である。他の許容細胞(H446 - ATCC 番号 HTB-171)からのSVVの収率は、少なくともこの高さであるか又はこれよりも高い。SVVをカラムクロマトグラフィーにより精製することもできる。

【0136】

加えて、商業的に魅力的な大規模な適性製造方法(Good Manufacturing Processes)(GMP)の幾つかの工程をSVVの精製に適用できる。本発明は、また、アデノウイルスを精製する方法に基づいて、SVVを精製する方法を考慮する。これらの方法には、SVVはアデノウイルスと非常に類似した密度を有し、アデノウイルスと共に精製できるので、その密度に基づいてSVVを単離することが含まれる。

【0137】

腫瘍の検出及び研究方法：

本発明は、本発明のウイルスを使用して、患者において腫瘍又は新生細胞を検出する方法を提供する。細胞試料を患者から得て、試料をエピトープ標識SVV(又は本発明により提供される他の腫瘍特異性ウイルス、すなわち腫瘍特異性突然変異カルジオウイルス)と共にインキュベートし、次にエピトープタグを検出して試料をSVV結合についてスクリーニングすることによって、スクリーニングすることができる。あるいは、試料を、SVVがあらゆる細胞溶解を引き起こすかを検出することによってスクリーニングできる。SVVが細胞溶解を引き起こす場合、又はSVVが試料中の細胞に特異的に結合する場合、このことは、試料が、SVVに結合及び/又は感染されることが知られている新生又は腫瘍細胞を含有する可能性を示す。

【0138】

加えて、SVVを、インビボで腫瘍細胞を検出する方法に使用することができる。そのような方法において、SVVが腫瘍細胞に依然として特異的に結合しているが複製できないような方法で、エピトープ標識SVVを最初に不活性化することができる。SVVと結

合している腫瘍細胞は、エピトープタグを評価することによって検出できる。エピトープタグの検出はエピトープに特異的に結合する抗体により達成することができ、抗体は標識されているか（例えば、蛍光的に）又は抗体は標識した第2抗体によって検出することができる。

【0139】

本発明の検出方法は、本発明の任意のウイルスによって特異的に標的にされるあらゆる種類の腫瘍又は新生細胞を検出することを包含する。特定の腫瘍型には、例えば、網膜芽細胞腫、SCLC、神経芽細胞腫、グリア芽細胞腫及び髄芽腫のような神経内分泌腫瘍が挙げられる。

【0140】

本発明は、腫瘍細胞を研究するツールとしてのSVVの使用も提供する。SVVは、幾つかの腫瘍細胞型を選択的に破壊し、非腫瘍細胞に対して、あるとしても非常に僅かな毒性効果を有する。これらの特性のため、SVVを使用して、腫瘍を研究し、可能であれば新たな腫瘍特異性遺伝子及び/又は経路を発見することができる。換言すると、腫瘍細胞にはSVVの複製を可能にする幾つかの特性があり、正常な細胞は前記特性を示さない。新たな腫瘍特異性遺伝子及び/又は経路を同定すると、治療用抗体又は小型分子を、これらの試薬が抗腫瘍剤であるかを決定するために設計又はスクリーニングすることができる。

【0141】

本発明は、SVVに反応する全ての種類の癌を同定する方法も提供する。一つの実施態様において、SVV反応性細胞を同定する方法は、細胞を得ること、前記細胞をSVVと接触させること、及び細胞死滅を検出する又は細胞複製を検出することを含む。細胞死滅は、当業者に既知の多様な方法を使用して検出することができる（例えば、MTSアッセイ、本明細書のハイスループットの章を参照すること）。ウイルス複製を検出する方法も当業者に既知である（例えば、CPEの観察、ブランクアッセイ、DNA定量化法、腫瘍細胞中のウイルスの量を検出するFACS、ウイルスRNAを検出するRT-PCRアッセイなど）一つの実施態様において、細胞は癌細胞である。癌細胞の例には、哺乳動物から得られる確立された細胞株及び腫瘍細胞が挙げられるが、これらに限定はされない。一つの実施態様において、哺乳動物はヒトである。更なる実施態様において、細胞は、ヒト癌患者から得られる癌細胞である。

【0142】

SVV反応性癌細胞を同定する方法を使用して、SVV複製に許容性がある腫瘍細胞株又は腫瘍組織を発見することができる。また、許容腫瘍細胞の特性を決定することによって、細胞がSVVにより選択的に死滅させられる、腫瘍細胞の特性を同定することができる。これらの特性の発見は、癌薬剤に新たな標的をもたらすことができる。また、SVV反応性癌細胞を同定する方法を、SVVによる治療で利益を受けるヒト癌患者のためのスクリーニングとして使用することができる。

【0143】

例えば、SVV又はSVV様ピコルナウイルス（ポリクロール、モノクロールなど）に対する抗体を、ウイルス結合アッセイに使用して、SVV又はSVV様ピコルナウイルス治療の前に患者をプレスクリーニングすることができる。プレスクリーニングは一般に下記のように実施することができる：（1）患者から細胞を単離する（細胞は例えば腫瘍生検からのものであることができる）、（2）細胞を抗SVV又は抗SVV様ピコルナウイルス抗体で染色する、（3）抗SVV又は抗SVV様ピコルナウイルス抗体に特異的なマーカー（例えば、フルオレセイン又は他の検出可能な染料若しくは蛍光体）と結合している第2抗体を加える（例えば、抗体がウサギで発生される場合、第2抗体はウサギ免疫グロブリンに特異的である）、及び（4）マーカーの検出を実施する - 例えば、マーカーがフルオレセインの場合は蛍光顕微鏡検査法を実施することができる。（抗SVV又は抗SVV様ピコルナウイルス抗体が直接結合している場合、すなわち抗体がモノクロールである場合、工程3は任意である。抗体がポリクロールである場合、間接免疫蛍光法

- 第2抗体の使用 - が提案される。) 患者の腫瘍細胞がSVV又はSVV様ピコルナウイルス感染に許容性がある場合、患者はSVV又はSVV様ピコルナウイルス治療の候補者である。多様な結合アッセイにおいて、細胞が抗体染色に陽性である場合、患者の腫瘍細胞はSVVに許容性があると決定することができる。例えば、図92B～92Cは、SVVに許容性であり、SVVに感染している細胞の免疫蛍光画像を示す。

【0144】

ウイルス結合アッセイにより患者をプレスクリーニングするに際し、患者からの細胞試料は、腫瘍細胞を含有すると推定される組織の組織片であることもできる。次に組織片を切片に調製し、抗SVV又は抗SVV様ピコルナウイルス抗体による組織化学の前に、SVVと共にインキュベートする。

10

【0145】

本発明は、SVVを検出する方法も提供する。一つの実施態様において、検出アッセイは、SVVポリペプチドエピトープに特異的な抗体に基づいている。別の実施態様において、検出アッセイは、核酸のハイブリダイゼーションに基づいている。一つの実施態様において、RNAは、SVVから単離され、標識されて(例えば、放射性、化学発光、蛍光など)プローブとなる。次にRNAは試験材料から単離され、ニトロセルロース(又は同様の若しくは機能的に同等な物質)に結合され、標識SVV RNAによりプローブされ、結合プローブの量が検出される。また、ウイルスのRNAを、直接的又は間接的に配列決定することができ、PCRアッセイをこの配列に基づいて開発することができる。一つの実施態様において、PCRアッセイはリアルタイムPCRアッセイである。

20

【0146】

変化した親和性を有するウイルスの製造方法：

本発明は、SVV突然変異体(又は変種若しくは誘導体)を構築する方法を提供し、これらの突然変異体は変化した細胞型親和性を有する。SVV様ピコルナウイルスを突然変異させて、特定の細胞型親和性をもたらすこともできる。特に、SVV及びSVV様ピコルナウイルス突然変異体は、野生型SVV又は野生型SVV様ピコルナウイルス結合に抵抗性であることが知られている腫瘍又は新生細胞に、特異的に結合する及び/又はそれらを死滅させる能力によって選択される。

【0147】

未変性又は野生型SVVは、他の癌の徴候を標的とする未変性ウイルスの修飾を可能にする簡素なゲノム及び構造を有する。これらの新たな誘導体は、非神経癌に対して拡大した親和性を有し、未変性SVVで見られる高い治療指数を依然として維持する。ターゲッティングの一つの可能な方法は、組織特異性ペプチド又はリガンドをウイルスに含めることである。

30

【0148】

癌標的ウイルス候補を選択するために、本発明は、未変性SVVのカプシド領域のランダムペプチド配列をコードする遺伝子挿入を有する腫瘍溶解ウイルスライブラリーを構築し、スクリーニングする方法を提供する。10⁸の多様性を有するランダムペプチドライブラリーは、ウイルスを腫瘍細胞に特異的に向かわせるペプチドを生じるのに十分であると思われ、生じるべきである。

40

【0149】

腫瘍細胞は正常な細胞と異なる特性を示すことを種々の研究が示しており、例えば：(1)腫瘍細胞は、より透過性のある細胞膜を有する；(2)腫瘍は、細胞型に特異的なレセプターを発現することが以前から示されている血管形成内皮細胞のような特定の間質細胞型を有する；及び(3)腫瘍細胞は、特定のレセプター、抗原及び細胞外マトリックスタンパク質を差次的に発現する(Arap, W. et al., Nat. Med., 2002, 8(2): 121-127; Kolonin, M. et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2001, 5(3): 308-313; St. Croix, B. et al., Science, 2000, 289(5482): 1997-1202)。これらの研究は、腫瘍及び正常組織が分子レベルで区別され、標的薬剤送達及び癌の治療が実現可能であることを実証した。特に、マウスモデルで血管にホーミングすることにより選択される幾つかのペプチドが、細

50

胞毒性薬剤 (Arap, W. et al., Science, 1998, 279(5349): 377-380)、アポトーシス促進性ペプチド (Ellerby, H.M. et al., Nat. Med., 1999, 17(8): 768-774)、メタロプロテアーゼインヒビター (Koivunen, E. et al., Nat. Biotechnol, 1999, 17(8): 768-774)、サイトカイン (Curnis, F. et al., Nat. Biotechnol., 2000, 18(11): 1185-1190)、蛍光体 (Hong, F.D. and Clayman, G.L., Cancer Res., 2000, 60(23): 6551-6556) 及び遺伝子 (Trepel, M. et al., Hum. Gene Ther., 2000, 11(14): 1971-1981) の標的送達に使用されてきた。腫瘍標的ペプチドは、親薬剤の抗力を増大し、毒性を低下することを実証した。

【0150】

S V V 誘導体のライブラリーは、ランダムペプチド配列をウイルスのカプシド領域に挿入することにより生成することができる。図 57 で示されているように、S V V カプシド領域を含むベクター、すなわち「p S V V カプシド」が最初に生成される。次に、例えば、DNA をランダムな位置で切断する制限酵素、すなわち C v i I (プラントカッター) でベクターを切断することによって、このカプシドベクターに突然変異を誘発することができる。ベクターは多数の位置で切断され、C v i I で 1 回しか切断されなかった DNA を、ゲル精製で単離することができる (図 57 を参照すること)。この単離された DNA の個体群は、異なる場所でカプシド領域が切断されている複数の種を含む。次にこの個体群を、一定の割合のオリゴヌクレオチドが多数の異なる位置でベクターのカプシド領域に連結するように、オリゴヌクレオチド及びリガーゼと共にインキュベートする。この方法で、突然変異 S V V カプシドのライブラリーを生成することができる。

【0151】

カプシドコード領域に挿入されるオリゴヌクレオチドは、ランダムオリゴヌクレオチド、非ランダムオリゴヌクレオチド (すなわち、オリゴヌクレオチドの配列が予め決定されている) 又は半ランダム (すなわち、リゴヌクレオチドの一部が予め決定されており、一部がランダム配列を有する) のいずれかであることができる。考慮されるオリゴヌクレオチドの非ランダム態様は、エピトープコード領域を含むことができる。考慮されるエピトープには、c - m y c - ヒトプロトオンコジーン m y c の 10 アミノ酸セグメント (E Q K L I S E E D L (配列番号: 35)); H A - ヒトインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質からの赤血球凝集素 (Y P Y D V P D Y A (配列番号: 36)); 及び H i s₆ (配列番号: 116) - 6 個の連続するヒスチジンをコードする配列が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0152】

次に突然変異カプシドポリヌクレオチドのライブラリー (例えば、図 57 の「p S V V カプシドライブラリー」) を、突然変異カプシドコード領域が切断されるように制限酵素で消化する。次にこの突然変異カプシドコード領域を、完全長ゲノム配列からカプシドコード領域を引いたものを含むベクターと連結する (例えば、図 58 を参照すること)。この連列は、完全長ゲノム配列を有するベクターを生成し、ベクターの個体群 (又はライブラリー) は、複数の突然変異カプシドを含む。図 58 において、異なるカプシドを含むこの S V V 突然変異体ライブラリーは、「p S V V F L カプシド」と示されている。次に p S V V F L カプシドベクターライブラリーを直線化し、インビトロ転写して、突然変異 S V V RNA を生成する (図 59 を参照すること)。次に突然変異 S V V RNA を許容細胞に形質移入し、これによりカプシドにデハビリテーション突然変異体を有さないこれらの S V V 配列は、宿主細胞により翻訳されて複数の突然変異 S V V 粒子を産生する。図 59 には、複数の突然変異 S V V 粒子が「S V V カプシドライブラリー」として示されている。

【0153】

カプシドコード領域に挿入されているオリゴヌクレオチドでコードされているペプチドは、特定のウイルス感染の標的部分として役立つことができる。特定の癌型を標的にするウイルスは、ペプチドに対してレセプターを有する癌細胞のみに選択的に感染し、それらの細胞で複製し、それらの細胞を死滅させ、同じ型の細胞にしか拡散しない。この方法論

は、新規腫瘍標的ペプチド及びリガンド、腫瘍選択的レセプター、治療SVV誘導体、並びにピコルナウイルス誘導体を含む他の誘導体の同定を可能にする。

【0154】

SVV突然変異体ライブラリーのインビトロ及びインビボスクリーニングは、ペプチドビーズライブラリー及びファージライブラリーのような他の技術に対して幾つか利点を有する。これらの他の技術と異なり、望ましい候補、すなわち癌細胞に選択的に結合するSVV誘導体は、その場で複製する。この複製を基盤とするライブラリーの手法は、新たな細胞結合部分を発見する従来の方法、例えばファージディスプレイに対して多数の利点を有する。第一に、SVVライブラリーのスクリーニングは、複製に基づいている。望ましいウイルス誘導体だけが、標的組織において、この場合は、特定の癌細胞において複製することができる。スクリーニング/選択プロセスは、非常に特異的なウイルス候補を生じ、それは、ペプチド部分を標的にし、またそれ自体癌治療性でもありうる。その反対に、ファージディスプレイスクリーニングは、結合事象だけをもたらし、標的ペプチド候補しか生じない。したがって、SVVライブラリーのスクリーニングは、より速く選択的な手法を提供する。第二に、インビトロ又はインビボファージディスプレイスクリーニングにおいて、標的細胞から回収されるファージは、バクテリアで増幅しなければならず、一方、SVV誘導体は、感染細胞から（又は溶解的に感染した細胞の培養上澄みから）直接回収し、精製することができる。第三に、SVVは、より容易な操作を可能にする小型のゲノムを有し、したがってゲノム情報をカプシド領域にランダムに挿入して、最適化された挿入を確実にすることが可能である。したがって、SVVライブラリーの構築及びスクリーニングは、極めて有効なウイルス誘導体を産生する高い可能性を有する。これらの誘導体は、非神経性を有する癌に特異的に感染するために設計及びスクリーニングされる。

10

20

【0155】

オリゴヌクレオチドの、カプシドコード領域への挿入は、幾つかの欠損突然変異体の生成をもたらす。突然変異体は、オリゴヌクレオチド配列の挿入が終止コドンをもたらし、これによりウイルスポリタンパク質が産生されないという意味において欠損がありうる。また、突然変異体は、オリゴヌクレオチド配列の挿入がカプシド構造に変化をもたらし、これによりカプシドがもはや構築できないという意味において欠損がありうる。オリゴヌクレオチド配列の挿入が終止コドン又は支持できないカプシド構造をもたらしうる可能性を減少するため、TRIMのような方法を使用して、終止コドン又は特定のアミノ酸をコードしないようにランダムオリゴヌクレオチドを設計することができる。

30

【0156】

カプシド領域にオリゴヌクレオチドの最適挿入点があるかを決定するため、RGD-SVVライブラリーを生成することができる（実施例16を参照すること）。SVVカプシドをコードするポリヌクレオチドを、例えばCviJIでランダムに切断する。次にランダムに直線化したカプシドポリヌクレオチドを、少なくともRGDアミノ酸配列（アルギニン-グリシン-アスパルギン酸）をコードするオリゴヌクレオチドと連結する。次にこれらのRGDカプシド配列を、カプシド配列を欠いているSVV完全長配列ベクターと連結する。RGD-SVV誘導体ウイルスを産生し、特定のインテグリン発現細胞株で感染及び複製するそれらの能力について試験する（RGDペプチドは、実体をインテグリンレセプターに向けさせることが示されている）。次にインテグリン発現細胞株に成功裏に感染しているRGD-SVV誘導体を、RGDオリゴヌクレオチドの挿入が優性である部位があるかを決定するために分析する。次にこの部位を、ランダム、非ランダム又は半ランダムオリゴヌクレオチドの部位特異的挿入のために使用することができる。

40

【0157】

更に、SVVと他のピコルナウイルスとの間のカプシドコード領域の部分を比較すると（図28を参照すること）、配列類似性が最低である、囲まれていない多様な領域がウイルスの間で存在する。これらの領域は、ウイルスの間で異なる親和性に寄与することにおいて重要でありうる。したがって、これらの領域は、SVVカプシド（及び他のウイルスカプシド）のオリゴヌクレオチド挿入突然変異誘発の候補位置であることができる。

50

【 0 1 5 8 】

腫瘍特異的治療薬としての不活性化 S V V

S V V 及び S V V カプシド誘導体が特定の腫瘍細胞型及び / 又は組織を標的にすることができるので、S V V 粒子それ自体を、治療薬の送達ビヒクルとして使用することができる。そのような方法において、送達された治療薬が標的腫瘍細胞を死滅させることができるので、S V V の腫瘍溶解能力の必要性は任意となる。

【 0 1 5 9 】

例えば、野生型 S V V を不活性化することができ、これによってウイルスは感染細胞をもはや溶解しないが、ウイルスは依然として特異的に結合し、標的腫瘍細胞型に進入することができる。ウイルスの複製機能を不活性化する、当該技術で既知の多くの標準的な方法が存在する。例えば、ウイルスが複製できないように、ウイルスワクチン全体が、ホルマリン又は プロピオラクトンにより不活性化される。野生型 S V V は、それ自体細胞のアポトーシスを引き起こすペプチドを含む場合もある。あるいは、S V V を照射することができる。しかし、特定の照射条件はタンパク質を、したがってカプシドを変化させるので、依然として特異的に腫瘍細胞を標的とすることを確認するために、照射されたウイルスを最初に試験するべきである。更に、突然変異 S V V を生成することができ、パッケージングシグナル配列が欠失される。これらの S V V 突然変異体は、標的細胞に特異的に結合し、進入することができるが、複製 S V V ゲノム R N A は、カプシドに詰め込まれず、構築されない。しかし、この方法は、これらの変異体 S V V の最初の進入が宿主タンパク質合成を遮断し、これによっても腫瘍細胞の死が達成されるので、有用であることを証明することができる。

10

20

【 0 1 6 0 】

突然変異体カプシドを有する誘導体 S V V を不活性化して、癌細胞の死滅に使用することもできる。カプシド領域に挿入されたエピトープタグをコードするオリゴヌクレオチドを有する誘導体 S V V を、毒素を腫瘍細胞に送達するビヒクルとして使用することができる。本明細書で記載されているように、誘導体 S V V に、ランダムに突然変異を誘発し、腫瘍特異的親和性についてスクリーニングすることができる。ウイルスが毒素を腫瘍細胞に送達するように、毒素をエピトープタグに結合することができる。あるいは、ウイルスが治療抗体を腫瘍細胞に送達するように、エピトープタグに特異的に結合する治療抗体を使用することができる。

30

【 0 1 6 1 】

ハイスループットスクリーニング：

本発明は、異なる細胞株に特異的に感染する能力を有するウイルスをスクリーニングするハイスループット法を包含する。感染の特異性は、細胞変性効果を評価することによって検出できる。例えば、多数の異なる腫瘍細胞株を、ハイスループットスクリーニングを受けやすいマルチウエルプレート、例えば 3 8 4 ウエルプレートの異なるウエルで増殖することができる。それぞれのウエルに、ウイルスの試料を加えて、細胞がウイルス仲介溶解により死滅したかを試験する。細胞変性効果を示すこれらのウエルから培地を回収し、これによって、培地中の任意のウイルスを、フラスコ中又は大型組織培養プレート中の許容細胞株に感染させることによって増幅することができる。ウイルスを増殖し、これによって、R N A を単離し、配列分析して、ウイルスの腫瘍細胞型特異的親和性を提供する原因でありうる配列突然変異を決定することができる。

40

【 0 1 6 2 】

蛍光染料系アッセイ、A T P 系アッセイ、M T S アッセイ及び L D H アッセイを含む多様な比色法及び蛍光定量法は、細胞変性効果を素速くアッセイすることができる。蛍光染料系アッセイは、死細胞の個体群を検出する核酸染色を含むことができ、細胞不透過核酸染色は、死細胞個体群を特異的に検出することができる。生存細胞と死細胞の両方の個体群を同時に検出することが望ましい場合、核酸染色を、生存細胞個体群を検出する細胞内エステラーゼ基質、膜透過性核酸染色、膜電位感受性プローブ、オルガネラプローブ又は他の細胞透過性インジケータと組み合わせて使用することができる。例えば、Invitrog

50

en (Carlsbad, CA) は、原形質膜が損われた細胞だけに浸透する多様な SYTOX (商標) 核酸染色を提供する。臭化エチジウム及びヨウ化プロピジウムを使用して、死又は瀕死細胞を検出することもできる。これらの染色は、任意の吸光度読取機で検出することができる高親和性核酸染色である。

【0163】

例えば、溶解は、損傷を受けた細胞のサイトゾルから上澄みへ放出された乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の活性の測定を基盤とすることができる。細胞培養上澄み中の LDH の存在を検出するために、LDH が共役酵素反応によりテトラゾリウム塩 INT をホルマザンに還元するように、基質混合物を加えることができる。次にホルマザン染料を、吸光度読取機で検出することができる。あるいは、フェニジンメトスルフェート (PMS) を電子カップリング試薬として使用する MTS アッセイ [3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 5 (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム、内塩] を、細胞毒性の検出に使用することもできる。Promega (Madison, WI) は、CellTiter 96 (登録商標) AQueous One Solution Cell Proliferation Assay キットを提供し、ここで、溶液試薬が培養ウエルに直接添加され、1 ~ 4 時間インキュベートされ、次に吸光度が 490 nm で記録される。490 nm の吸光度の量で測定されたホルマザン産物の量は、培養中の生存細胞の数に正比例している。

【0164】

吸光度を読み取る多数のハイスループット装置が存在する。例えば、SpectraMax Plus 384 Absorbance Platereader (Molecular Devices) は、1 nm で増加する 190 ~ 1000 nm の波長で検出することができる。この装置は、超高速試料スループットでは、96 ウエルマイクロプレートに 5 秒間で読み取ることができ、384 ウエルマイクロプレートに 16 秒間で読み取ることができる。

【0165】

ウイルス複製を感染が成功した指標としてアッセイすることもでき、そのような検出方法をハイスループットの方法で 사용할 ことができる。例えば、リアルタイム RT - PCR 法を使用して、細胞培養上澄み中のウイルス転写物の存在を検出することができる。ウイルス RNA を cDNA へ逆転写すると、cDNA は、二本鎖 DNA 結合染料 (例えば、SYBR (登録商標) Green, Qiagen GmbH, Germany) を使用した PCR により増幅及び検出することができる。次に PCR 産物の量は、蛍光計を使用して直接測定することができる。

【0166】

細胞変性効果を示すウエルからのウイルスを増殖させ、更に、インビトロモデル (腫瘍及び正常細胞株について再試験する) 及びインビボモデル (ウイルスが、マウスに外植した腫瘍を死滅できるかを試験する) で試験する。

【0167】

抗体：

本発明は、ウイルスのタンパク質を含む、本発明のウイルスに特異的に結合する抗体も対象とする。本発明の抗体には、例えば、単鎖抗体、キメラ抗体、二機能性抗体及びヒト化抗体、並びにそれらの抗原結合フラグメントがあげられる、天然に生じる、並びに非天然に生じる抗体が含まれる。そのような非天然に生じる抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築することができるか、組み換え的に産生することができるか、又は例えば多様な重鎖及び多様な軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして得ることができる (Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989)。例えば、キメラ、ヒト化、CDR グラフト、単鎖及び二機能性の抗体を作製するこれらの及び他の方法は、当業者にはよく知られている (Winter and Harris, Immunol. Today 14:243-246, 1993; Ward et al., Nature 341:544-546, 1989; Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach, IRL Press 1992; Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed., Oxford University Press 1995)。本発明の抗体には、本発明のポリペプチドに存在す

10

20

30

40

50

るエピトープ決定要因に結合することができる、無処置分子、並びに F a b、F (a b) 2 及び F v のようなそのフラグメントが挙げられる。

【 0 1 6 8 】

抗体生成の免疫原として使用される本発明の S V V ポリペプチドのペプチド部分（すなわち、配列番号： 2 若しくは配列番号： 1 6 9 の任意のペプチドフラグメント）又は本発明の別のウイルスポリペプチドのペプチド部分が非免疫原性である場合、ヘプテンをウシ血清アルブミン（ B S A ）若しくはキーホールリンペットヘモシアニン（ K L H ）のような担体分子に結合させることにより、又は融合タンパク質としてペプチド部分を発現させることにより免疫源性にすることができる。ヘプテンを担体分子に結合させる他の多様な担体分子及び方法は、当該技術でよく知られている（例えば、Harlow and Lane, supra, 1988により）。例えば、ウサギ、ヤギ、マウス又は他の動物にポリクローナル抗体を生じる方法は、当該技術でよく知られている（例えば、Manson, ed., Humana Press 1992, pages 1-5; Coligan et al., "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters," in Curr. Protocols Immunol. (1992), section 2.4.1を参照すること）。

10

【 0 1 6 9 】

モノクローナル抗体も当該技術で周知であり慣用の方法を使用して得ることができる（Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975; Coligan et al., supra, 1992, sections 2.5.1-2.6.7; Harlow and Lane, supra, 1988）。例えば、ウイルス、ウイルスポリペプチド又はそのフラグメントで免疫化されたマウスの脾臓細胞を適切な骨髓腫細胞株に融合して、ハイブリドーマ細胞を産生することができる。クローン化ハイブリドーマ細胞株を、例えば標識 S V V ポリペプチドを使用してスクリーニングして、適切な特異性を有するモノクローナル抗体を分泌するクローンを同定することができ、望ましい特異性及び親和性を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離し、抗体の連続供給源として利用することができる。同様にポリクローナル抗体も、例えば免疫化動物の血清から単離することができる。そのような抗体は、本発明の方法を実施するのに有用であることに加えて、例えば、標準的なキットを調製するためにも有用である。例えば単鎖抗体を発現する組み換えファージは、標準的なキットを調製するのに使用できる抗体も提供する。例えばモノクローナル抗体を単離し、例えば、Protein-A SEPHAROSEゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを含む十分に確立された多様な技術によりハイブリドーマ培養から精製することができる（Barnes et al., in Meth. Mol. Biol. 10:79-104, Humana Press 1992); Coligan et al., supra, 1992, sections 2.7.1-2.7.12 and sections 2.9.1-2.9.3を参照すること）。

20

30

【 0 1 7 0 】

抗体の抗原結合フラグメントは、特定の抗原のタンパク質分解加水分解により、又はフラグメントをコードする D N A を発現することにより調製できる。抗体フラグメントは、従来の方法による抗体全体のペプシン又はパパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、ペプシンによる抗体の酵素開裂により、F (a b) 2 と示される 5 S フラグメントを生じることによって産生することができる。このフラグメントを、チオ還元剤を使用し、場合により、ジスルフィド結合の開裂によりもたらされるスルフィドリル基の保護基を使用して更に開裂して、3 . 5 S F a b 一価フラグメントを生成することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素開裂は、2 つの一価 F a b フラグメント及び F C フラグメントを直接産生する（例えば、Goldenberg、米国特許第4,036,945号及び同第4,331,647号; Nisonhoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., Meth. Enzymol., 1:422 (Academic Press 1967); Coligan et al., supra, 1992, sections 2.8.1-2.8.10 and 2.10.1-2.10.4を参照すること）。

40

【 0 1 7 1 】

抗体の抗原結合フラグメントの別の例は、単一の相補性決定用域（ C D R ）をコードするペプチドである。C D R ペプチドは、目的の抗体の C D R をコードするポリヌクレオチ

50

ドを構築することによって得ることができる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、抗体産生細胞から得たRNAによりコードされる可変部領域を合成して調製することができる（例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991）。

【0172】

本発明の抗体は、例えばイムノアッセイでの使用に適しており、ここで水相で利用することができるか又は固相担体に結合することができる。加えて、このイムノアッセイにおける抗体を、多様な方法で検出可能に標識することができる。本発明の抗体を利用できるイムノアッセイの種類の例は、直接的な又は間接的なフォーマットの競合的及び非競合的イムノアッセイである。そのようなイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）及びサンドイッチ（イムノメトリック）アッセイである。本発明の抗体を使用する抗原の検出は、生理学的試料の免疫組織化学アッセイを含む、前方、逆又は同時方式のいずれかで実施されるイムノアッセイを利用して実行することができる当業者は、過剰な実験をすることなく他のイムノアッセイのフォーマットを知るか、又は容易に認識することができる。

10

【0173】

当業者に既知の多くの異なる標識及び抗体を標識する方法が存在する。本発明で利用できる標識の種類の例には、酵素、放射線同位体、蛍光化合物、コロイド物質、化学発光化合物、リン光性化合物及び生物発光化合物が挙げられる。当業者は、抗体に、あるいは抗原に結合する他の適切な標識を知っているか、又は慣用的な実験を使用してそれらを確認することができる。

20

【0174】

記載される本発明の範囲及び精神から逸脱することなく上記の方法及び組成物に多様な変更を加えることができ、上記の記載に含まれるか、添付の図面に示されるか、又は添付の請求項で定義される主題は、全て、例示的であり、制限的ではないことが意図される。

【実施例】

【0175】

下記に記載される実施例は、本発明を説明するために提供され、本発明を制限する目的で含まれるのではない。

【0176】

実施例 1

ウイルスの増幅及び精製

PER.C6でのSVVの培養：SVVを1回ブランク精製し、十分に単離されたブランクを取り出し、PER.C6細胞で増幅した（Fallaux et al., 1998）。感染PER.C6細胞からの粗ウイルス溶解産物（CVL）を、凍結融解の3サイクルにより作製し、PER.C6細胞を感染するのに使用した。PER.C6細胞を、10%ウシ胎児血清（Biowhitaker, Walkersville, MD, USA）及び10mM塩化マグネシウム（Sigma, St Louis, MO, USA）を含有するダルベッコ修飾イーグル培地（DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用して、 $50 \times 150 \text{ cm}^2$ T.C. フラスコ中で増殖した。感染の30時間後か、CPEの完了が見られたとき、感染細胞を採取し、4、1500 rpmで10分間の遠心分離により回収した。細胞ペレットを細胞培養上澄み（30ml）に再懸濁し、凍結融解の3サイクルに付した。得られたCVLを、4、1500 rpmで10分間の遠心分離により清澄化した。ウイルスを2回のCsCl勾配により精製した：1工程勾配（CsCl密度1.24 g/ml及び1.4 g/ml）、続く1連続勾配遠心分離（CsCl密度1.33 g/ml）。精製されたウイルス濃度は、分光光度的に決定され、 $1 A_{260} = 9.5 \times 10^{12}$ 粒子であると推定される（Scraba D.G., and Palmenberg, A.C. 1999. *Cardioviruses* (Picornaviridae). In: Encyclopedia of Virology, Second edition, R.G. Webster and A Granoff Eds）。精製ウイルスの力価も、PER.C6細胞を使用する標準ブランクアッセイにより決される。PER.C6細胞からのSVVの収率は、細胞1個あたり200,000個を越える粒子であり、粒子とPFUの比率は約100であった。他の許容細胞（

40

50

H 4 4 6 - A T C C 番号 H T B - 1 7 1) からの S V V の収率は、少なくともこの高さであるか又はこれよりも高い。

【 0 1 7 7 】

実施例 2

電子鏡検法

S V V を、直接適用法を使用してホルムバールカーボン被覆グリッドに載せ、酢酸ウレニルで染色し、透過型電子顕微鏡で調べた。ウイルスの代表的な顕微鏡写真を高倍率で撮る。透過型電子顕微鏡では、S V V 感染 P E R . C 6 細胞の超薄切片を埋め込みブロックから切り取り、得られた切片を透過型電子顕微鏡で調べた。

【 0 1 7 8 】

精製した S V V 粒子は球状であり、直径が約 2 7 nm であり、グリッド上に単独で又は小型の凝集体として表れる。S V V の代表的な画像を図 2 に示す。幾つかの場所で、染色浸透を有する破壊されたウイルス粒子及び空のカプシドも見られる。感染 P E R . C 6 細胞の超微細構造研究は、細胞質内に結晶質含有物があることを明らかにした。S V V 感染している P E R . C 6 細胞の代表的な画像を図 3 に示す。ウイルス感染細胞は、数個の大型の小胞体（空小胞）を明らかにした。

【 0 1 7 9 】

実施例 3

S V V の核酸単離

R N A 単離：S V V ゲノム R N A を、チオシアン酸グアニジウムを使用し、Trizol (In vitrogen) を用いるフェノール抽出法を使用して抽出した。単離を供給者の推奨に従って実施した。簡潔には、2 5 0 μ l の精製 S V V を 3 容量の TRIZOL 及び 2 4 0 μ l のクロロホルムと混合した。R N A を含有する水相を、6 0 0 μ l のイソプロパノールに沈殿させた。R N A ペレットを 7 0 % エタノールで 2 回洗浄し、乾燥し、D E P C 処理水に溶解した。抽出された R N A の量を、2 6 0 nm での光学密度測定により推定した。R N A のアリコート を 1 . 2 5 % 変性アガロースゲル (Cambrex Bio Sciences Rockland Inc. , Rockland , ME USA) により分割し、バンドを臭化エチジウム染色により可視化し、写真を撮った (図 4) 。

【 0 1 8 0 】

c D N A 合成：S V V ゲノムの c D N A を R T - P C R により合成した。c D N A の合成は、1 μ g の R N A 、A M V 逆転写酵素及びランダム 1 4 - m e r オリゴヌクレオチド又はオリゴ d T を使用する標準的な条件下で実施した。c D N A のフラグメントを増幅し、プラスミドにクローン化し、クローンを配列決定した。

【 0 1 8 1 】

実施例 4

S V V 配列分析及び疫学：

パート I ：S V V 配列番号：1

S V V 配列番号：1 のヌクレオチド配列を分析して、他のウイルスとのその進化関係を決定した。この O R F の翻訳産物（配列番号：2）はピコルナウイルス様であり、V P 2 の中間から 3 D ポリメラーゼの末端の終止コドンまで延びており、1 8 9 0 個のアミノ酸の長さであった（図 5 A ~ 5 E 及び 7 A ~ 7 B）。O R F に続く 3 非翻訳領域（U T R）、ヌクレオチド 5 6 7 1 ~ 5 7 3 4 は、終止コドンを含みポリ（A）テールを除く、6 4 個のヌクレオチド（n t）の長さであり、1 8 個の残基が提供されている（図 5 E）。

【 0 1 8 2 】

S V V の 3 つの部分ゲノムセグメントの予備比較（図示されず）は、S V V がカルジオウイルス属（ピコルナウイルス科）のメンバーに最も密接に関連することを明らかにした。したがって、S V V のポリタンパク質配列、脳心筋炎ウイルス（E M C V、脳心筋炎ウイルス種）、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス（T M E V、サイロウイルス（Theilovirus）種）、ヴィリユイスクヒト脳脊髄炎ウイルス（V H E V、サイロウイルス種）及びラ

10

20

30

40

50

ット T M E V 様作用物質 (T L V、サイロウイルス種) の整列を構築した (図 2 8)。この整列から、S V V ポリタンパク質プロセッシングを、カルジオウイルス属の最も密接に関連するメンバーのポリタンパク質プロセッシングと比較した。個々のポリペプチドの間の開裂部位を、図 2 8 において文字「 / 」で画定した。

【 0 1 8 3 】

ピコルナウイルスでは、大部分のポリタンパク質の開裂は 1 つ以上のウイルスコードプロテアーゼにより実施されるが、カルジオ - 、アフト - 、エルボ - 及びテッショウウイルスでは、P 1 - 2 A と 2 B の間の開裂は、2 A 配列それ自体に関連し、配列「 N P G / P 」が決定的に関連するあまり理解されていないシス作用性機構により実施され、ここで「 / 」は、2 A と 2 B のポリペプチドの間の中断を表す (Donnelly et al., 1997, J. Gen. Virol. 78: 13-21)。パレコウイルスのうちの一つ、ユンガン (Ljungan) ウイルスは、典型的なパレコウイルス 2 A の上流に存在する配列 (N P G P) を有し、追加的な 2 A であるか又は P 1 カプシド領域の C 末端である。現在確認されているピコルナウイルス属の 9 つ全てにおいて、3 C^{Pr°}は、シス作用性自己開裂反応以外の全て実施する (すなわち、2 A は、エンテロ - 及びライノウイルスで N 末端を開裂し、L は、アフトウイルス及びエルボウイルスで C 末端を開裂する)。カプシドペプチド V P 0 ~ V P 4 及び V P 2 の構築後の開裂は、3 C^{Pr°}により実施されないが、ウイルス R N A が関与する可能性がある不明な機構により実施される。V P 0 開裂は、パレコウイルス及びコブウイルスでは生じない。正常なカルジオウイルス 3 C^{Pr°}開裂部位は、- 1 位置のグルタミン (Q) 又はグルタミン酸 (E)、及び + 1 位置のグリシン (G)、セリン (S)、アデニン (A) 又はアスパラギン (N) のいずれかを有する (表 2)。S V V ポリタンパク質の開裂は、ヒスチジン (H) / セリン (S) である V P 3 / V P 1 部位以外はこのパターンに一致するが (表 2)、H / S は、おそらく、ウマ鼻炎 A ウイルス (E E A V、アフトウイルス属) の少なくとも 1 つの株の 3 A と 3 B^{VPg}の間に開裂部位として存在する (Wutz et al., 1996, J. Gen. Virol. 77:1719-1730)。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 4 】

【表 4】

表 2. S V V 及びカルジオウイルスの開裂部位

間	SVV	EMCV	TMEV	ラット TLV	VHEV
L	VP4	不明	LQ/GN (配列番号: 125)	PQ/GN (配列番号: 152)	PQ/GN (配列番号: 163)
VP4	VP2	不明	LA/DQ (配列番号: 126)	LL/DQ (配列番号: 153)	LL/DE (配列番号: 164)
			LM/DQ (配列番号: 140)		
VP2	VP3	EQ/GP (配列番号: 117)	RQ/SP (配列番号: 127)	AQ/SP (配列番号: 141)	PQ/SP (配列番号: 154)
VP3	VP1	FH/ST (配列番号: 118)	PQ/GV (配列番号: 128)	PQ/GV (配列番号: 142)	PQ/GV (配列番号: 155)
			PQ/GI (配列番号: 143)		
			PQ/GS (配列番号: 144)		
VP1	2A	KQ/KM (配列番号: 119)	LE/SP (配列番号: 129)	LE/NP (配列番号: 145)	LQ/NP (配列番号: 156)
2A	2B	NPG/P* (配列番号: 111)	NPG/P* (配列番号: 130)	NPG/P* (配列番号: 146)	NPG/P* (配列番号: 157)
2B	2C	MQ/GP (配列番号: 120)	QQ/SP (配列番号: 131)	PQ/GP (配列番号: 147)	AQ/SP (配列番号: 158)
2C	3A	LQ/SP (配列番号: 121)	AQ/GP (配列番号: 132)	AQ/SP (配列番号: 148)	AQ/SP (配列番号: 159)
			AQ/AP (配列番号: 133)		
3A	3B	SE/NA (配列番号: 122)	EQ/GP (配列番号: 134)	EQ/AA (配列番号: 149)	EQ/AA (配列番号: 160)
3B	3C	MQ/QP (配列番号: 123)	IQ/GP (配列番号: 135)	IQ/GG (配列番号: 150)	IQ/GG (配列番号: 161)
			VQ/GP (配列番号: 136)		
3C	3D	MQ/GL (配列番号: 124)	PQ/GA (配列番号: 137)	PQ/GA (配列番号: 151)	PQ/GA (配列番号: 162)

* 2 A と 2 B の間の中断は開裂事象ではない。

【 0 1 8 5 】

S V V の一次開裂 (P 1 / P 2 及び P 2 / P 3) : これらの一次開裂事象は、カルジオ
- 、アフト - 、エルボ - 及びテッシュウウイルスで生じると予測され、配列 N P G / P (

10

20

30

40

50

配列番号：111) が関わる新規機構による2BからのP1-2Aの分離、及び2BCとP3の間の3C^{Pro}による従来の開裂を含む(表2)。

【0186】

P1開裂：SVV P1カプシドコード領域内の開裂は、EMCV及びTMENVの配列との整列によって比較的容易に予測された(表2)。

【0187】

P2開裂：2Cタンパク質がRNA合成に関与する。SVVの2Cポリペプチドは、推定ヘリカーゼ及び全てのピコルナウイルス2Cに存在する、NTP結合モチーフGxxGxxGKS/T(配列番号：112)(ドメインA)及びhyhyhyxxD(ここで、hyは、任意の疎水性残基である；ドメインB)を含む(図29)。

10

【0188】

P3開裂：P3開裂部位の予測も比較的直接的であった。3Aポリペプチドの機能についてはほとんど知られていない。しかしピコルナウイルスの3Aタンパク質は、全て推定膜貫通ヘリックスを含む。一次配列同一性は、SVVとカルジオウイルスとの間でこのタンパク質については低い(図28の位置1612~1710を参照すること)。

【0189】

3B領域でコードされているゲノム結合ポリペプチド、VPgは、他のカルジオウイルスと共通するアミノ酸がほとんどないが、第3の残基はチロシンであり、ウイルスゲノムの5'末端への結合と一致している(Rothberg et al., 1978)。図28の位置1703~1724を参照すること。

20

【0190】

4つのピコルナウイルス3Cシステインプロテアーゼの三次元構造が解明され、活性部位残基が同定された(HAV, Allaire et al., 1994, Nature, 369: 72-76; Bergmann et al., 1997, J. Virol., 71: 2436-2448; PV-1, Mosimann et al., 1997, J. Mol. Biol., 273: 1032-1047; HRV-14, Matthews et al., 1994, Cell, 77: 761-771; 及びHRV-2, Matthews et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 11000-11007)。図29で太字になっているシステインは求核剤であり、一方、最初の太字のヒスチジンは一般的な塩基であり、グルタミン残基への特異性は、主に第2の太字のヒスチジンにより定義され、3つの残基は全て、SVV配列に保存され(図39)、他は全て既知のピコルナウイルスに保存されている(図28；3C配列比較は、位置1726~1946を参照すること)。

30

【0191】

3Dポリペプチドは、RNA依存性RANポリメラーゼの主な成分であり、SVVは、ピコルナ様ウイルスRNA依存性RANポリメラーゼに保存されたモチーフを含み、すなわち、KDEL/IR(配列番号：113)、PSG、YGDD(配列番号：114)及びFLKR(配列番号：115)である(図3；図28の位置1948~2410)。

【0192】

P1のN末端のミリストイル化：大部分のピコルナウイルスにおいて、P1前駆体ポリペプチドは、そのN-末端グリシン残基により(存在する場合は、N末端メチオニンは除去される)、アミド結合を介してミリスチン酸の分子に共有結合している(Chow et al., 1987, Nature, 327: 482-486)。したがって、P1 N末端を含む開裂産物VP0及びVP4もミリストイル化される。このミリストイル化は、グリシンから始まる8つのアミノ酸シグナルを認識するミリストイルトランスフェラーゼにより実施される。ピコルナウイルスでは、5つの残基コンセンサス配列モチーフG-x-x-x-T/Sが同定されている(Palmenberg, 1989, In Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection, pp. 211-241, Ed. Semler & Ehrenfeld, Washington D.C., Amer. Soc. for Micro.). パレコウイルス(ヒトパレコウイルス及びユンガンウイルス)、並びにVP0の成熟開裂を有さないものは、明らかにミリストイル化されないが、これらのウイルスためにVP0のN末端をブロックしている幾つかの種類の分子があると思われる。

40

【0193】

個々のSVVペプチドと公的な配列データベースとの比較

50

S V V ポリペプチド（配列番号 S : 4、6、8、10、12、14、16、18、20 及び 22）を、それぞれ、ヨーロッパバイオインフォマティクス研究所（EBI; <http://www.ebi.ac.uk/>）の F A S T A オンラインプログラムを使用して公的なタンパク質配列データベースと比較した。これらの比較の結果（最適マッチ）を表 3 に示す。カプシドポリペプチド（V P 2、V P 3 及び V P 1）を、2 C、3 C^{Pro} 及び 3 D^{Pol} と共に全体として考慮すると、カルジオウイルス属のメンバーに最も密接に関連しているが、予測される短 2 A 配列は、ユンガンウイルス（パレコウイルス属）により近い。S V V 2 Aヌクレオチド配列と同様の配列とのより詳細な比較を図 2 8 に示す（2 A 様 N P G / P タンパク質の比較は、図 7 0 も参照すること）。

【 0 1 9 4 】

10

【表 5】

表 3. セネカバレーウイルスの個々の予測ポリペプチドのデータベースマッチ

SVVポリペ プチド	長さ(aa)	同一性 %	ギャップな しの同一性 %	aa重複	生物体	マッチタ ンパク質
L (リーダ ー)	データなし	-	-	-	-	-
VP4 (1A)	データなし	-	-	-	-	-
VP2 (1B)	>142	42.857	44.037	112	TMEV WW	VP2
		~ 51	-	~80	EMCV BEL-2887A/9 1	VP2
VP3 (1C)	239	44.068	46.637	236	EMCV ATCC VR-129 B	VP3
VP1 (1D)	259	31.086	36.404	267	EMCV M100/1/02	VP1
2A	14	71.429	71.429	14	ユンガンウイルス 174F	2A1
2B	128	39.286	41.509	56	ウレアプラズマ・ ウレアリチカム	多重バン ド抗原
2C	322	38.602	40.190	329	EMCV PV21	2C
3A	90	37.838	41.791	74	緑色硫黄細菌 TLS*	エノラー ゼ 2 †
3B ^{VPs}	22	マッチな し	-	-	-	-
3C ^{Pro}	211	37.089	38.537	213	EMCV-R	3Cプロテ アーゼ
3D ^{Pol}	462	58.009	58.515	462	EMCV-PV21	3D ポリメ ラーゼ

20

30

*光合成嫌気緑色硫黄細菌

† 2-ホスホグリセレートデヒドラターゼ 2、2-ホスホ-D-グリセレートヒドロリアーゼ 2

40

【 0 1 9 5 】

S V V 2 B とウレアプラズマ・ウレアリチカム多重バンド抗原とのマッチ、又は 3 A と緑色硫黄細菌エノラーゼ 2 とのマッチの有意性は不明であるが、これらの関連性は、更に調査する価値があると思われる。

【 0 1 9 6 】

S V V ポリペプチドと他のピコルナウイルスとの系統学的比較

カルジオウイルス（V P 2、V P 3、V P 1、2 C、3 C 及び 3 D）と整列化できるこれらの S V V ポリペプチドを、ピコルナウイルス種のそれぞれの代表的なメンバーの幾つ

50

かのタンパク質と比較した（表４）。プログラムBioEdit v5.0.9（Hall, 1999, Nucl. Acids. Symp. Ser., 41: 95-98）及びClustal X v1.83（Thompson et al., 1997, Nucl. Acids Res., 25:4876-4882）を使用して整列化を行い、Saitou及びNei（Saitou and Nei, 1987, Mol. Biol. Evol., 4: 406-425）のアルゴリズムに従って、距離行列を構築し、隣接連結ツリーを脱根した。枝の信頼限界を、ブートストラップ再サンプリング（１０００個の偽複製）により評価した。ツリーはTreeView 1.6.6（Page, 1996）を使用して描いた（図３１～３７）。ツリーを構築するのに使用した距離行列は、多重置換と相関する値を使用した。図３８～４４は、アミノ酸同一性の実際の率を示す。表４は、現在のピコルナウイルス科の分類及びこれらの比較に使用した代表的なウイルス配列を示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

【 表 6 】

表 4. S V V との比較に使用されたピコルナウイルスの分類学的分類

属	種	代表的なウイルス	略語	受入番号	
エンテロウイルス	ポリオウイルス	ポリオウイルス 1	PV-1	V01149	10
	ヒトエンテロウイルス A	コクサッキーウイルス A 1 6	CV-A 16	U05876	
	ヒトエンテロウイルス B	コクサッキーウイルス B 5	CV-BS	X67706	
	ヒトエンテロウイルス C	コクサッキーウイルス A 2 1	CV-A21	D00538	
	ヒトエンテロウイルス D	エンテロウイルス 7 0	EV-70	D00820	
	サルエンテロウイルス A	サルエンテロウイルス A 1	SEV-A	AF201894	
	ウシエンテロウイルス	ウシエンテロウイルス 1	BEV-1	D00214	
	ブタエンテロウイルス	ブタエンテロウイルス 9	PEV-9	AF363453	
新たな属？	未だに指定なし	サルウイルス 2 *	SV2	AY064708	20
	ブタエンテロウイルス A	ブタエンテロウイルス 8 *	PEV-8	AF406813	
ライノウイルス	ヒトライノウイルス A	ヒトライノウイルス 2	HRV-2	X02316	
	ヒトライノウイルス B	ヒトライノウイルス 1 4	HRV-14	K02121	
カルジオウイルス	脳心筋炎ウイルス	脳心筋炎ウイルス	EMCV	M81861	
	サイロウイルス	タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス	TMEV	M20562	
アフトウイルス	口蹄疫ウイルス	口蹄疫ウイルス O	FMDV-O	X00871	30
	ウマ鼻炎 A ウイルス	ウマ鼻炎 A ウイルス	ERAV	X96870	
ヘパトウイルス	A 型肝炎ウイルス	A 型肝炎ウイルス	HAV	M14707	
	トリ脳脊髄炎様ウイルス	トリ脳脊髄炎ウイルス	AEV	AJ225173	
バレコウイルス	ヒトバレコウイルス	ヒトバレコウイルス 1	HPeV-1	L02971	
	ユンガンウイルス	ユンガンウイルス	I-V	AF327920	
コブウイルス	アイチウイルス	アイチウイルス	AiV	AB040749	40
	ウシコブウイルス	ウシコブウイルス	BKV	AB084788	
エルボウイルス	ウマ鼻炎 B ウイルス	ウマ鼻炎 B ウイルス 1	ERBV-1	X96871	
テッショウウイルス	ブタテッショウウイルス	ブタテッショウウイルス 1	PTV-I	AJ011380	

* S V 2 及び P E V - 8 の現在の分類学上の位置は、これらをエンテロウイルス属に置いているが、これらは新たな属に再分類されることが示唆されている (Krumholz et al., 2002; Oberste et al., 2003)。

【 0 1 9 8 】

ツリーの全てのポリペプチドを合わせたとき (図 3 4) 、個々のカプシドタンパク質の

ツリー（図 3 1 ~ 3 3）は、生成されたツリーを全て代表しているわけではない。これは、おそらく、特に V P 2 の場合のように（図 3 1）完全長ではないので、カプシドポリペプチドを整列化するのが困難であることから生じている。しかし、P 1、2 C、3 C^{Pro} 及び 3 D^{Pol} ツリーは、全て一致しており、S V V が E M C V 及び T M E V と群れをなしていることを示す。

【0199】

カルジオウイルス属のメンバーとしてのセネカバレーウイルス

明らかに S V V の 3 D^{Pol} は、E M C V と T M E V が互いに密接であるのとほぼ同じようにカルジオウイルスと関連している（図 3 7；図 4 4）。ピコルナウイルス 2 C 及び 3 C に比較的保存されていると一般に考えられている他のポリペプチドにおいて、S V V もカルジオウイルスに最も密接に関連しているが、M C V と T M E V が互いに密接に関連しているほどではない（それぞれ図 4 2 及び図 4 3）。外側のカプシドタンパク質において（全体として考慮される）、S V V もカルジオウイルスに最も密接に関連しており、2 つのアフトウイルス種、口蹄疫ウイルス及びウマ鼻炎 A ウイルスとほぼ同様の関連性を有する（約 33%）。S V V は 2 B 及び 3 B ポリペプチドではカルジオウイルスから大きく逸脱し、あらゆる既知のピコルナウイルスと検出可能な関連性を有さない。しかし、このことは、前例がないわけではなく、トリ脳脊髄炎様ウイルスは 2 A、2 B 及び 3 A では A 型肝炎ウイルスとかなり異なるが（Marvil et al., 1999, J. Gen. Virol., 80:653-662）、H A V と共にヘパトウイルス属に一時的に分類されている。

【0200】

セネカバレーウイルスは、E M C V 及び T M E V を標準として考えると、明らかに典型的なカルジオウイルスではない。しかし、これら 2 つのウイルスでも差があり、とりわけ 5' UTR において差がある（Pevear et al., 1987, J. Gen. Virol., 61: 1507-1516）。しかし、系統学的には S V V は、そのポリタンパク質の多く（P 1、2 C、3 C^{Pro} 及び 3 D^{Pol} 領域）が E M C V 及び T M E V に集まる。最終的に、ピコルナウイルスの範囲内の S V V の分類学上の位置は、ピコルナウイルス研究グループによる推奨及び支持文献に従って、国際ウイルス分類委員会（ICVT）の実行委員会によって決定されるであろう。2 つの選択肢がある：i) S V V をカルジオウイルス属の新たな種として含めること、又は（2）S V V を新たな属に指定すること。

【0201】

パート II：S V V 配列番号：168

S V V の完全長ゲノム（図 8 3 A ~ 8 3 H；配列番号：168；実施例 15）によって更なる疫学的研究が可能である。更なる疫学的研究の結果が図 8 6 に示されており、S V V は、E M C V 及び T M E V のようなカルジオウイルスと遺伝子的に関連していることが示されているが、異なるツリーである。

【0202】

S V V 完全長ゲノムのその非翻訳及びコード領域に関する特徴は、上記の表 A に提示されている。E M C V 及び T M E V - G D V I I と比較した完全長 S V V の特性を下記の表に提示する。

【0203】

【表 7】

特徴	SVV nt長さ	SVV aa 長さ	EMCV [M81 861] nt長さ	EMCV [M81 861] aa長さ	TMEV-GDVI I [M20562] nt長さ	TMEV-GDVI I [M20562] aa長さ
5' UTR	666	-	833	-	1068	-
リーダー	237	79	201	67	228	76
VP4	213	71	210	70	213	71
VP2	852	284	768	256	801	267
VP3	717	239	693	231	696	232
VP1	792	264	831	277	828	276
2A	27	9	429	143	426	142
2B	384	128	450	150	381	127
2C	966	322	975	325	978	326
3A	270	90	264	88	264	88
3B	66	22	60	20	60	20
3D	1386	462	1380	460	1383	461
3' UTR	71	-	126	-	128	-

10

【0204】

SVVの開裂部位（完全長配列を基盤とする、図83A～83Hのタンパク質の境界線の間の太字アミノ酸も参照すること）を、他のカルジオウイルスの開裂部位と下記の表で比較する。

20

【0205】

【表 8】

間		SVV	EMCV	TMEV	ラットTLV	VHEV
L	VP4	LQ/GN (配列番号:192)	LQ/GN (配列番号:192)	PQ/GN (配列番号:193)	PQ/GN (配列番号:193)	PQ/GN (配列番号:193)
VP4	VP2	LK/DH (配列番号:194)	LA/DQ (配列番号:195)	LL/DQ (配列番号:196) LM/DQ (配列番号:197)	LL/DQ (配列番号:196)	LL/DE (配列番号:198)
VP2	VP3	EQ/GP (配列番号:117)	RQ/SP (配列番号:199)	AQ/SP (配列番号:200)	PQ/SP (配列番号:201)	PQ/SP (配列番号:201)
VP3	VP1	FH/ST (配列番号:118)	PQ/GV (配列番号:202)	PQ/GV (配列番号:202) PQ/GI (配列番号:203) PQ/GS (配列番号:204)	PQ/GV (配列番号:202)	PQ/GV (配列番号:202)
VP1	2A	MQ/SG (配列番号:205)	LE/SP (配列番号:206)	LE/NP (配列番号:207)	LQ/NP (配列番号:208)	LE/NP (配列番号:207)
2A	2B	NPG/P* (配列番号:111)	NPG/P* (配列番号:111)	NPG/P* (配列番号:111)	NPG/P* (配列番号:111)	不明
2B	2C	MQ/GP (配列番号:120)	QQ/SP (配列番号:209)	PQ/GP (配列番号:210)	AQ/SP (配列番号:200)	不明
2C	3A	LQ/SP (配列番号:121)	AQ/GP (配列番号:211) AQ/AP (配列番号:212)	AQ/SP (配列番号:200)	AQ/SP (配列番号:200)	不明
3A	3B	SE/NA (配列番号:122)	EQ/GP (配列番号:213)	EQ/AA (配列番号:214)	EQ/AA (配列番号:214)	不明
3B	3C	MQ/QP (配列番号:123)	IQ/GP (配列番号:215) VQ/GP (配列番号:216)	IQ/GG (配列番号:217)	IQ/GG (配列番号:217)	不明
3C	3D	MQ/GL (配列番号:124)	PQ/GA (配列番号:218)	PQ/GA (配列番号:218)	PQ/GA (配列番号:218)	不明

10

20

30

40

* リボソームスキッピング配列

【 0 2 0 6 】

多数の独特なウイルスがU S D Aによって発見されており、これらは、S V Vが他のカルジオウイルスに対するよりもS V Vに似ている。本明細書において「S V V様ピコルナウイルス」と呼ばれる群のメンバーであると考えられるこれらのU S D Aウイルス分離株は、M N 8 8 - 3 6 6 9 5、N C 8 8 - 2 3 6 2 6、I A 8 9 - 4 7 5 5 2、N J 9 0 - 1 0 3 2 4、I L 9 2 - 4 8 9 6 3、C A 1 3 1 3 9 5、L A 1 2 7 8、I L 6 6 2 8 9、I L 9 4 - 9 3 5 6、M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6、M N 9 9 1 9 7及びS C 3 6 3 6 4 9である。これらのS V V様ピコルナウイルス及びS V Vは、新たなピコルナウイルス属を含むと考えられる。

【0207】

これらのS V V様ピコルナウイルスは、それぞれ独特であり、ヌクレオチドレベルでS V Vと約95～98%の同一性がある（S V VとこれらのU S D A分離株とのヌクレオチド配列比較は、図87～89を参照すること）。

【0208】

パートIII：血清研究

ブタは、上記で同定したU S D Aウイルス分離株の許容宿主である。分離株M N 8 8 - 3 6 6 9 5をノトパイオートブタに接種し、抗血清を生成した（G P 1 0 2）。抗血清は、上記で提示した他の全てのU S D A分離株及びS V Vに結合する。抗血清は、24個の一般的なブタウイルス病原体と反応せず、特異的であることを示す。ブタ血清を、また、中和抗体について1278（プラムアイランドウイルス）で試験した。血清を米国で収集し、血清の8/29が1:57～1:36, 500の範囲の力価で陽性であった。

【0209】

ブタがS V Vの天然供給源であるかを試験するために、多様な動物から血清試料を得て、許容細胞のS V V感染に対して中和抗体として作用するその能力について試験した。血清中和アッセイを以下のように実施した：（1）多様な血清を1:2及び1:4で希釈する；（2）100TCID₅₀のウイルス（S V V；しかし、任意のウイルスを、血清がその感染を中和できるかについて試験することができる）と混合する；（3）37℃で1時間インキュベートする；（4）1×10⁴個のPER.C6細胞（又は他の許容細胞型）に加える；（5）37℃で3日間インキュベートする；及び（6）MTSアッセイを使用してCPEを測定する。中和力価は、S V V（又は他の目的のウイルス）を中和する最も希釈された血清を100%として定義する。

【0210】

血清中和の結果は、ヒト及び霊長類個体群において中和抗体の存在が最小限であるか又は存在しないことを示した。一つの実験では、ヒト血清の0/22が、S V Vに対する中和抗体を含有した。別の実験では、ヒト血清の1/28しか中和抗体を含有しなかった。第3の実験では、アーミッシュ農民からのヒト血清の0/50が中和した。別の実験では、4種の霊長類からの血清の0/52が中和した。

【0211】

血清中和の結果は、家畜個体群において中和抗体が広く存在することを示した。一つの実験において、農場のブタ血清の27/71が中和した。別の実験において、無疾患の農場のブタ血清の4/30が中和した。別の実験において、ウシ血清の10/50が中和した。なお別の実験において、野生マウス血清の5/35が中和した。S V V及び/又はS V V様ピコルナウイルスと交差反応する抗体が、ブタ、ウシ及びマウスにおいてことが見出されたので、これらのデータは、S V V及び/又はS V V様ピコルナウイルスが多種多様な非霊長類動物において広く存在することを示す。

【0212】

M N 8 8 - 3 6 6 9 5の粗ウイルス溶解産物を試験してS V Vの2つの許容性細胞株（N C I - H 4 4 6；H E K 2 9 3）に対する、並びにS V Vの2つの非許容性細胞株（N C I - H 4 6 0及びS 8）に対するその細胞毒性を評価した。M N 8 8 - 3 6 6 9 5の細胞毒性プロファイルは、S V Vと同一であった：N C I - H 4 4 6に対するTCID₅₀は、1.6×10⁻⁶であり；H E K 2 9 3に対するTCID₅₀は、1.3×10⁻²であ

10

20

30

40

50

り、NCI-H446及びS8はMN88-36695に対して非許容性であった。このデータは、SVV様ピコルナウイルスが、癌治療を対象とする本発明の方法に使用される可能性があることを示す。一つの実施態様において、本発明は、癌治療、診断又はスクリーニングを対象とする方法のいずれかにおいて、MN88-36695 SVV様ピコルナウイルスの使用を提供する。

【0213】

MN88-36695及びSVVに対する抗血清を、それぞれウイルスにより血清中和アッセイで試験した。抗SVVマウス血清は、MN88-36695とSVVの両方による感染を中和することができた（感染に対する中和力価は、MN88-36695では1：640であり、SVVでは1：1000であった）。抗MN88-36695ノトバ

10

【0214】

これらのデータは、SVVが、ブタUSD Aウイルス分離株に遺伝子的及び血清学的に関連していることを示す。

【0215】

実施例 4

SVVカプシドタンパク質のSDS-PAGE及びN末端配列分析

精製SVVを、NuPAGEプレキャストビス-トリスポリアクリルアミドミニゲル電気泳動系（Novex, San Diego, Ca, USA）を使用して、電気泳動に付す。ゲルの半分を銀染色で可視化し、一方、他の半分を使用して、カプシドタンパク質のN末端のアミノ酸配列決定のための試料を調製する。タンパク質を膜に移す前に、ゲルを、10 mMのCAPS緩衝剤、pH 11に1時間浸け、PVD F膜（Amersham）をメタノールで湿潤する。タンパク質をPVD F膜に移す。移した後、タンパク質をアミドブラックでおよそ1分間染色して可視化し、目的のバンドを小刀で切除し、空気乾燥する。タンパク質を、パルス位相配列決定機を使用して、エドマン分解により、自動化N末端配列決定に付すことができる。

20

【0216】

精製されたSVVの3つの主な構造タンパク質を図45に示す（およそ36 kDa、31 kDa及び27 kDa）

30

【0217】

実施例 5

ヒト血清試料中のSVVに対する中和抗体のアッセイ

特定のウイルスベクターに予め存在する抗体は転移性癌の治療のような全身送達用途でのそのようなベクターの使用を制限する場合があります、それは、予め存在する抗体は、ベクターが標的組織又は器官に形質導入する機会を得る前に、全身送達ベクターに結合して、それらを中和する場合がありますからである。したがって、ヒトが全身送達のために選択されたウイルスベクターに対する中和抗体を持っていないことを確実にすることが望ましい。ヒト血清試料がSVV特異性中和抗体を含むかを決定するために、無作為に収集したヒト血清試料を使用して中和アッセイを実施した。

40

【0218】

組織培養感染用量50： 実験の1日前に、 1×10^4 個の細胞を含有する180 μ lのPER.C6細胞懸濁液を、96ウエル組織培養皿で平板培養した。SVVの粗ウイルス溶解産物（CVL）を 10^{-0} から 10^{-11} の対数工程でDME培地（ダルベッコー修飾イーグル培地）に希釈し、20 μ lの各希釈を、PER.C6細胞を含有するFalcon 96ウエル組織培養プレートの3つのウエルに移す。プレートを5% CO₂中、37℃でインキュベートし、細胞変性効果（CPE）の顕微鏡証拠を3日間読み取り、組織培養感染用量50（TCID₅₀）を計算した。

【0219】

50

中和アッセイ：最初に、40 μ lの培地を全てのウエルに入れ、次に40 μ lの熱不活性化血清を最初のウエルに加えて、ピペット操作により混合し、スクリーニング目的に使用するために1：4希釈を作る。次に40 μ lを次のウエルに移して、血清試料の2倍希釈を実施した。100 TCID₅₀を含む40 μ lのSVVウイルスを、希釈血清試料を含有するウエルに加えた。プレートを37で1時間インキュベートする。40 μ lの混合物を取り出し、PER.C6細胞を含有するプレート(1×10⁴細胞/160 μ lウエル)に移した。プレートを37で3日間インキュベートする。この時間の後、培養をCPEについて顕微鏡で読み取った。

【0220】

上記で記載されたように実施される代表的な中和アッセイにおいて、米国、ヨーロッパ及び日本で無作為に収集した22個のヒト血清試料を、SVV特異性中和抗体について調べた。血清試料を連続的に希釈し、100 TCID₅₀を含む固定量のSVVと混合した。次に血清ウイルス混合物を使用してPER.C6細胞を感染し、24時間インキュベートした。中和抗体力価は、CPE形成を阻止できた血清の最高希釈の逆数として決定した。この実験では、希釈した血清でCPE形成を阻止したものはなく、ヒト血清試料がSVV中和抗体を含有しないことを示した。

10

【0221】

更に、PER.C6のSVV感染は、ヒト血液とのインキュベーションにより阻害されず(実施例6を参照すること)、SVV感染は、補体又は赤血球凝集により阻害されないことを示した。結果として、SVVは、他の腫瘍溶解ウイルスよりもインビボで長い循環時間を示し、これは腫瘍溶解アデノウイルスを使用するのに重大な問題である。

20

【0222】

実施例6

ヒト赤血球へのSVVの結合及び赤血球凝集

多様なウイルス血清型が、多様な動物種の血液から単離された赤血球のインビトロ赤血球凝集を引き起こすことを示している。赤血球凝集又は赤血球への結合は、インビボで毒性を引き起こす場合があり、また、インビボ体内分布及びウイルスベクターの効力に影響を与える場合がある。したがって、転移性癌を治療するために全身投与される、選択されたウイルスベクターの赤血球凝集性を分析することが望ましい。

30

【0223】

赤血球凝集アッセイ：SVVがヒト赤血球の凝集を引き起こすかを決定するために、赤血球凝集アッセイを、U底96ウエルプレートで実施した。精製したSVVを25 μ lのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で連続して二重に希釈し、等容量の1%赤血球懸濁液をそれぞれのウエルに加えた。赤血球を単離するのに使用した血液試料は、抗凝血薬としてヘパリンを用いて健康な個人から得た。赤血球は、血液を冷PBS中で3回洗浄して、血漿及び白血球を除去することによって調製した。最後の洗浄の後、赤血球をPBSに懸濁して、1%(V/V)細胞懸濁液を作った。ウイルス及び赤血球を穏やかに混合し、プレートを室温で1時間インキュベートし、赤血球凝集のパターンをモニタリングした。

【0224】

全血不活性化アッセイ：血液成分によるSVVの直接的な不活性化を排除するために、ウイルスのアリコートに血漿を分離する前に、A、B、AB及びO血液型に属するヘパリン処理済みヒト血液と共に又はPBSと共に30分間又は1時間室温でインキュベートし、その後PER.C6細胞を感染し、力価を計算した。

40

【0225】

上記のように実施された代表的なアッセイにおいて、異なる血液型(A、B、AB及びO)でのヒト赤血球の赤血球凝集は、試験したSVVの希釈のいずれにおいても見られなかった。SVVがヒト血液試料と混合され、30分間及び1時間インキュベートされたときウイルス力価に僅かな増加が見られ、ウイルスは、血液成分により不活性化されるのではなく、試験条件でより感染性になることを示す。

【0226】

50

実施例 7

インビボクリアランス

血液循環時間：血液循環時間及び腫瘍中のウイルスの量を決定するために、H 4 4 6 腫瘍担持ヌードマウスを尾静脈注射により S V V の 1×10^{12} vp/kg の用量で処置した。マウスを、注射の 0、1、3、6、24、48、72 時間後、及び 7 日目（189 時間後）に出血させ、収集した直後に血液から血漿を分離し、感染培地で希釈し、P E R . C 6 細胞を感染するために使用した。注射マウスを、注射の 6、24、48、72 時間後及び 7 日目に殺処理し、腫瘍を収集した。腫瘍を小型の切片に切断し、1 ml の培地に懸濁し、3 回の凍結融解に付して、感染細胞からウイルスを遊離させた。上澄みの段階対数希釈法を行い、P E R . C 6 細胞で力価をアッセイした。S V V 力価を pfu/ml で表した。腫瘍切片を H & E 染色及び免疫組織化学にも付して、腫瘍中のウイルスカプシドタンパク質を検出した。

10

【0227】

血液中のウイルス粒子の循環レベルを、マウスの体重の 7.3 % が血液であるという仮説に基づいて決定した。実質的に上記に記載されたように実施した代表的なアッセイにおいて、ウイルス投与の 6 時間以内に、S V V の循環レベルはゼロ粒子に低減し、S V V は後の時点では検出できなかった（図 4 6 A）腫瘍では S V V は注射の 6 時間後に検出可能であり、その後、ウイルスの量は 2 対数で一定に増加した（図 4 6 B）。ウイルスは、注射後 7 日目まで検出可能であった（図 4 6 B）。腫瘍切片は、免疫組織化学に付されたとき、腫瘍細胞中に S V V タンパク質があることを明らかにした（図 4 7、上側のパネル）。H & E で染色された場合、腫瘍切片は、幾つかの丸くなった腫瘍細胞があることを明らかにした（図 4 7、下側のパネル）。

20

【0228】

S V V は、静脈内アデノウイルスの同様の用量と比較して、血液中の残留時間が著しく長いことも示す。単回静脈内投与の後、S V V は血液中に 6 時間まで存在し続け（図 4 6 C；図 4 6 C は、図 4 6 D と比較する目的で、図 4 6 A の複製である）、一方、アデノウイルスは、約 1 時間で血液から取り除かれた（図 4 6 D）。

【0229】

実施例 8

腫瘍細胞選択性

30

S V V のインビトロ細胞死滅活性：ヒト、ウシ、ブタ及びマウス細胞の感受性を決定するために、正常及び腫瘍細胞を多様な供給源から得て、S V V で感染した。全ての細胞型を、培地及び供給者により推奨された条件下で培養した。初代ヒト肝細胞は、In Vitro Technologies (Baltimore, MD) から購入することができ、Hepatocyte Culture Media (HCM (商標)、BioWhittaker/Clonetics Inc., San Diego, CA) で培養することができる。

【0230】

インビトロ細胞変性アッセイ：どの種類の細胞が S V V 感染に感受性があるかを決定するために、増殖している正常細胞及び腫瘍細胞の単層を、精製 S V V の段階希釈で感染した。細胞を C P E についてモニタリングし、非感染細胞と比較した。感染の 3 日後、M T S 細胞毒性アッセイを実施し、1 細胞あたりの粒子の有効濃度 50 (EC_{50}) 値を計算する。下記の表 5 及び 6、並びに上記の表 1 A を参照すること。

40

【0231】

【表 9】

表 5. EC₅₀値が100未満の細胞株

EC50 < 1の細胞株	EC50値
H446 (ヒトsc1c)	0.001197
PERC6	0.01996
H69AR (sc1c-多剤耐性)	0.03477
293 (ad5E1で形質転換されたヒト腎臓)	0.03615
Y79 (ヒト網膜芽細胞腫)	0.0003505
IMR32 (ヒト脳; 神経芽細胞腫)	0.03509
D283med (ヒト脳; 小脳; 髄芽腫)	0.2503
SK-N-AS (ヒト脳; 神経芽細胞腫)	0.474
N1E-115 (マウス神経芽細胞腫)	0.002846
SK-NEP-1 (腎臓、ウィルムス腫瘍、胸膜滲出液、ヒト)	0.03434
BEKPCB3E1 (ad5E1で形質転換されたウシ胎児腎臓細胞)	0.99
EC50 < 10 (1-10)の細胞株	EC50値
H1299 (ヒト非sc1c)	7.656
ST (ブタ精巣)	5.929
DMS 153 (ヒトsc1c)	9.233
EC50 < 100 (10-100)の細胞株	EC50値
BEK (ウシ胎児腎臓)	17.55

10

20

【表 10】

表 6. C_{50} 値が 1000 を越える細胞株

M059K (ヒト脳、悪性グリア芽細胞腫)	HUVEC (ヒト静脈内皮細胞)	CMT-64 (マウス-sclc)
KK (ヒトグリア芽細胞腫)	HAEC (ヒト大動脈内皮細胞)	LLC-1 (マウス-LCLC)
U-118MG (ヒトグリア芽細胞腫)	WI38 (ヒト肺線維芽細胞)	RM-1 (マウス-前立腺)
DMS 79 (ヒトsclc)	MRC-5 (ヒト肺線維芽細胞)	RM-2 (マウス-前立腺)
H69 (ヒトsclc)	IMR90 (ヒト肺線維芽細胞)	RM-9 (マウス-前立腺)
DMS 114 (ヒトsclc)	HMVEC (ヒト微小血管内皮細胞-成人)	MLTC-1 (マウス-精巣)
DMS 53 (ヒトsclc)	HMVEC (ヒト微小血管内皮細胞-新生児)	KLN-205 (マウス-sqcc)
H460 (ヒト-LCLC)	HCN-1A (ヒト脳)	CMT-93 (マウス-直腸)
A375-S2 (ヒト黒色腫)	HRCE (ヒト腎皮質上皮細胞)	B16F0 (マウス黒色腫)
SK-MEL-28 (ヒト黒色腫)		Neuro-2A (マウス神経芽細胞腫)
PC3 (ヒト前立腺)		C8D30 (マウス脳)
PC3M2AC6 (ヒト前立腺)		PK15 (ブタ-腎臓)
LNCaP (ヒト前立腺)		FBRC (ウシ胎児網膜)
DU145 (ヒト前立腺)		MDBK (ウシ腎臓)
Hep3B (ヒト肝癌)		CSL 503 (ad5E1で形質転換されているヒツジ肺細胞)
Hep2G (ヒト肝癌)		OFRC (ヒツジ胎児網膜細胞)
SW620 (ヒト結腸)		
SW839 (ヒト腎臓)		
5637 (ヒト膀胱)		
HeLa S3		
S8		

10

20

30

【0232】

M T S アッセイを、製造会社の説明書に従って実施した (Promega, Madison, WI による CellTiter 96 (登録商標) AQ_{ueous} Assay)。CellTiter 96 (登録商標) AQ_{ueous} Assay は、好ましくは、テトラゾリウム化合物 (3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 5 (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム、内塩、M T S) 及び電子カップリング試薬フェニジンメトスルフェート (P M S) を使用する。この研究で評価される接触阻害正常ヒト細胞には、H U V E C (ヒト臍帯静脈内皮細胞)、H A E C (ヒト大動脈内皮細胞、Clonetics/BioWhittaker 番号 C C - 2 5 3 5)、W i 3 8 (正常ヒト胎児肺線維芽細胞、A T C C 番号 C C L - 7 5)、I M R 9 0 (正常ヒト肺線維芽細胞、A T C C 番号 C C L - 1 8 6)、M R C - 5 (正常ヒト肺線維芽細胞、A T C C 番号 C C L - 1 7 1) 及び H R C E (ヒト腎皮質上皮細胞、Clonetics/BioWhittaker 番号 C C - 2 5 5 4) が挙げられる。

40

【0233】

S V V は上記の接触阻害正常細胞のいずれにおいても C P E を生じない。ウイルス誘導 C P E は、以下のヒト腫瘍細胞株において見られなかった: H e p 3 B (A T C C 番号 H B - 8 0 6 4)、H e p G 2 (ヒト肝細胞癌、A T C C 番号 H B - 8 0 6 5)、L N C a P (ヒト前立腺癌、A T C C 番号 C R L - 1 0 9 9 5)、P C 3 M - 2 A C 6、S W 6 2

50

0 (ヒト結腸直腸腺癌、ATCC 番号 CCL - 227)、SW839 (ヒト腎臓腺癌、ATCC 番号 HTB - 49)、5637 (ヒト膀胱癌、ATCC 番号 HTB - 9)、DMS - 114 (小型細胞肺癌、ATCC 番号 CRL - 2066)、DMS153 (ヒト小型細胞肺癌、ATCC 番号 CRL - 2064)、A549 (ヒト肺癌、ATCC 番号 CCL - 185)、HeLa S3 (ヒト子宮頸腺癌、ATCC 番号 CCL - 2.2)、NCI - H460 (ヒト大型肺癌、ATCC 番号 HTB - 177)、KK (グリア芽細胞腫) 及び U - 118MG (ヒトグリア芽細胞腫、ATCC 番号 HTB - 15)。注意 - 1000 を越える EC_{50} 値を有する表 6 の細胞株は、SVV 複製及び / 又はパイロン産生に許容性がない可能性が高いが、SVV がこれらの細胞に結合及び進入することができるが CPE が観察されない可能性も残り、それは、SVV 複製が細胞の中で起こることができないか、又は他の何らかの進入後阻止がある (すなわち、複製 SVV ゲノムのパイロンへの詰め込みがない) ので複製は起こるが CPE は観察されないからである。しかし、これらの細胞株で CPE が不在であることを考えると、これらの細胞株及び潜在的にはその腫瘍型は、どの細胞及び腫瘍型が SVV 複製に対して許容性又は非許容性であるかを試験する良好な候補である。野生型 SVV は腫瘍特異的であり、小型細胞肺癌及び神経芽細胞腫を含む神経内分泌腫瘍を標的にすることが示されているが、SVV が神経内分泌腫瘍のそれらの形態において許容性ではないような病因の型を有する個々の患者が存在してもよい。したがって、本発明は、腫瘍が野生型 SVV に非許容性である個々の患者から単離される腫瘍細胞型を死滅させることができる SVV 誘導体の生成を考慮し、これらの個人から単離される細胞型は、例えば、グリア芽細胞腫、リンパ腫、小型細胞肺癌、大型細胞肺癌、黒色腫、前立腺癌、肝癌、結腸癌、腎癌、結腸癌、膀胱癌、直腸癌及び扁平上皮細胞肺癌を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0234】

初代ヒト肝細胞 (In Vitro Technologies) に対する SVV 仲介細胞毒性を、LDH 放出アッセイ (CytoTox (登録商標) 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, #G1780) により決定した。コラーゲン被覆 12 ウエルプレートで平板培養した初代ヒト肝細胞を、SVV により細胞 1 個あたり 1、10、100 及び 1000 個の粒子 (ppc) で感染させた。感染の 3 時間後、感染培地を 2ml の増殖培地に代えて、CO₂ インキュベーターで 3 日間インキュベートした。細胞関連乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 及び培養上澄み中の LDH を別々に測定した。細胞毒性の率は、最大細胞 LDH + 上澄み LDH に対する上澄み中の LDH 単位の割合として決定する。

$$\text{細胞毒性率} = \frac{\text{培養上澄み中の LDH 単位} \times 100}{\text{上澄み中の LDH 単位と細胞溶解産物の合計}}$$

上澄み中の LDH 単位と細胞溶解産物の合計

図 48 に示されているデータは、試験した多数の感染において SVV 仲介肝毒性の不在を示している。

【0235】

実施例 10

ウイルス産生アッセイ

SVV の複製能力を評価するために、幾つかの選択された接触阻害正常細胞及び活性分化腫瘍細胞を SVV により細胞 1 個あたり 1 個のウイルス粒子 (ppc) で感染させた。72 時間後、細胞及び培地を 3 回の凍結融解サイクルに付し、遠心分離して上澄みを収集した。上澄みの段階対数希釈法を行い、PER.C6 細胞で力価をアッセイした。それぞれの細胞株において、SVV 複製の効力を pfu/ml として表した (図 49)。

【0236】

実施例 10

毒性

最大耐量 (MTD) を、動物 (例えば、マウス) が SVV による処置の後で用量制限毒性 (DLT) を示す用量の直前の投与量として定義する。DLT を、動物が、研究の持続期間中全体にわたって SVV 投与に起因する体重の減少、症状及び死を示す用量として定義する。SVV に対する中和抗体を、ベースライン、15 日目及び 21 日目に評価した。

中和アッセイを前記のように実施した。

【0237】

S V Vの漸増用量 ($1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{14}$ vp/kg) を、Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA) から購入した免疫欠損ヌードマウスと帝王切開由来1 (CD-1) 非近交系免疫適格マウスの両方に、MTDを決定するために1用量レベルあたり10匹のマウスに静脈内投与した。ウイルスは、あらゆる臨床症状を示すことなく、体重の減少もなく、全ての試験用量レベルで耐性が十分であった(図50)。マウスを、15及び21日目に出血させ、血清をS V V特異性中和抗体の存在について中和アッセイでモニタリングした。S V V注射CD1マウスは中和抗体を生じ、力価は、 $1/1024 \sim 1/4095$ 超である。

10

【0238】

別の毒性試験を免疫適性マウス系(A/J)で実施した。S V Vは、N1E-115細胞で細胞死滅活性及び複製を示すことが実証されている(表1を参照すること)。マウス細胞株N1E-115(神経芽細胞腫細胞株、すなわち神経内分泌癌)は、A/Jマウス系から誘導される。このように、N1E-115細胞をA/Jマウスに皮下移植して腫瘍を形成し、次にマウスをS V Vで処理してその効力及び毒性を調査する、同系マウスモデルが確立された。

【0239】

A/J研究において、マウスにS V Vを静脈内注射して、A/JマウスがS V Vの全身投与に耐えられるかを決定した。血液学の結果を得て毒性の徴候を探し、血清化学の結果も得ることができる。研究設計を下記の表7に示す。

20

【0240】

【表11】

表7: A/J研究設計

群番号	動物(雌)	試験品	投与レベル (粒子数/kg)	投与量 (mL/kg)	投与レジメン	剖検日
1	5	ビヒクル	0	10	1日目にIV	15日目
2	5	SVV	10^8	10	1日目にIV	15日目
3	5	SVV	10^{11}	10	1日目にIV	15日目
4	5	SVV	10^{14}	10	1日目にIV	15日目

30

【0241】

A/Jマウスは、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) から得た8~10週齢の雌であった。S V Vは、単離ビリオンを使用するまで-80℃で保存することによって準備した。S V Vは、氷上で融解し、HBSS(ハンクス平衡塩類溶液)で希釈することにより新たに調製した。S V Vを、群2では 10^7 粒子/mL、群3では 10^{10} 粒子/mL、群4では 10^{13} 粒子/mLの濃度に希釈した。HBSSを群1のビヒクル対照として使用した。全ての投与溶液を投与するまでウェットアイス(wet ice)上で保持した。

【0242】

S V Vを、10mL/kg体重の投与量で尾静脈を介して動物に静脈内注射することで投与した。動物を投与日に体重を計り、投与量を体重に基づいて調整した(すなわち、0.0200kgのマウスは、0.200mLの投与溶液を受ける)。マウスを罹患及び死亡について1日2回モニタリングした。マウスの体重を毎週2回計った。瀕死動物及びあらゆる異常な症状(身体的又は行動的)を示す動物に関する情報は直ぐに記録した。

40

【0243】

死後観察及び測定には、標準的な血液学及び血清化学のために殺処理末期で全ての生存動物からの血液の収集が必要である(AST、ALT、BUN、CK、LDH)。殺処理時に次の器官を収集した: 脳、心臓、肺、腎臓、肝臓及び生殖腺。それぞれの器官試料の半分をドライアイスで素速く凍結し、他の半分をホルマリンに入れる。

50

【 0 2 4 4 】

最初の血液学の結果（ＣＢＣ、鑑別）をＳＶＶ注射の２週間後に得て、結果を下記の表 8 にまとめる。各試験群から５匹のマウスを試験した（表 7 を参照すること）。

【 0 2 4 5 】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 8：A／J 毒性結果－血液学

	試験群1	試験群2	試験群3	試験群4
体重の結果±SD (g):				
0日目	21.48± 0.88	21.98 ±1.93	22.58±0.87	21.04±1.67
14日目	20.26± 0.93	20.92±1.71	21.44±0.84	21.26±1.45
CBC Wet (結果± SD (基準範囲)):				
白血球数 (THSN/UL)	3.63±1.57 (2.60-10.69)	4.5±1.57 (2.60-10.69)	4.26±0.94 (2.60-10.69)	4.72±0.62 (2.60-10.69)
赤血球数 (MILL/UL)	9.87±0.03 (6.4-9.4)	9.49±0.07 (6.4-9.4)	9.76±0.37 (6.4-9.4)	9.71±0.32 (6.4-9.4)
ヘモグロビン (GM/DL)	15.37±0.06 (11.5-16.1)	14.78±0.29 (11.5-16.1)	15.12±0.66 (11.5-16.1)	15.02± 0.63 (11.5-16.1)
ヘマトクリット (%)	46.03±0.40 (36.1-49.5)	44.52±0.49 (36.1-49.5)	45.7±1.82 (36.1-49.5)	45.28±1.69 (36.1-49.5)
MCV (FL)	46.67±0.58 (45.4-60.3)	47.00±0.0 (45.4-60.3)	47.0±0.0 (45.4-60.3)	46.6±0.55 (45.4-60.3)
MHC (PICO GM)	15.57±0.06 (14.1-19.3)	15.70±0.17 (14.1-19.3)	15.37±0.06 (14.1-19.3)	15.43±0.15 (14.1-19.3)
MCHC (%)	33.37±0.12 (25.4-34.1)	33.14±0.48 (25.4-34.1)	33.08±0.22 (25.4-34.1)	33.14±0.25 (25.4-34.1)
血小板(THSN/UL)	885.33±28.6 (592-2972)	758.2±146.2 (592-2972)	874.8±56.7 (592-2972)	897.2±105.4 (592-2972)
鑑別(結果±SD(基 準範囲)):				
バンド(THSN/UL)	0.0	0.0	0.0	0.0
分葉核好中球(THSN /UL)	(0.0-0.1) 0.92 ± 0.27	(0.0-0.1) 1.16±0.37	(0.0-0.1) 1.09±0.38	(0.0-0.1) 0.96 ±0.20
リンパ球(THSN/UL)	(0.13-2.57)	(0.13-2.57)	(0.13-2.57)	(0.13-2.57)
単球 (THSN/UL)	2.64±1.26 (1.43-9.94)	2.98±1.41 (1.43-9.94)	3.10±0.56 (1.43-9.94)	3.70±0.41 (1.43-9.94)
好酸球 (THSN/UL)	0.06±0.04 (0.0-0.39)	0.15±0.05 (0.0-0.39)	0.06±0.03 (0.0-0.39)	0.05±0.02 (0.0-0.39)
好塩素球 (THSN/UL)	0.01±0.01 (0.0-0.24)	0.01±0.01 (0.0-0.24)	0.01±0.01 (0.0-0.24)	0.003±0.01 (0.0-0.24)
異型リンパ芽球 (THSN/UL)	0.0 (0.0-0.0)	0.004±0.005 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)
後骨髄球 (THSN/UL)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)
	0.0	0.0	0.0	0.0

10

20

30

40

骨髓球 (THSN/UL)	(0.0-0.0) 0.0	(0.0-0.0) 0.0	(0.0-0.0) 0.0	(0.0-0.0) 0.0
NRBC (/100WBC)	(0.0-0.0) 0.0 (0.0-0.0)	(0.0-0.0) 0.0 (0.0-0.0)	(0.0-0.0) 0.0 (0.0-0.0)	(0.0-0.0) 0.0 (0.0-0.0)
その他(結果±SD (基準範囲)):				
AST (SGOT) (U/L)	1762.8±1129.8 (72-288)	899.0±234.6 (72-288)	779.8±312.2 (72-288)	843.2±653.4 (72-288)
ALT (SGPT) (U/L)	2171.8±2792.9 (24-140)	535.2±272.8 (24-140)	555±350.8 (24-140)	380.2±385.7 (24-140)
BUN (MG/DL)	27.2±0.8 (9-28)			
クレアチンホスホ キナーゼ (U/L)	28312.8± 20534.4 (0-800)	24.8±1.9 (9-28) 12194.4±4049.2 (0-800)	24.6±5.5 (9-28) 10157±5420.5 (0-800)	28.2±12.8 (9-28) 11829±10363.9 (0-800)
LDH (U/L)	6650.2±4788.6 (260-680) 706.6±423.4 (0-70)	3661.6±933.6 (260-680) 477.6±195.7 (0-70)	3450.8±972.6 (260-680) 589.6±198.6 (0-70)	2808.4±1709.1 (260-680) 496.4±321.1 (0-70)
溶血指数 (MG/DL H GB)				

10

20

【0246】

これらの結果は、未処置マウスから得られた血液学プロフィールと比較して、低、中及び高用量のSVVで処置したマウスから得た血液学プロフィールにおいて異常がないことを示す。この研究から、SVVの全身投与の後で毒性の計測可能な徴候がなく、SVVは静脈内注射の後でA/Jマウスに耐性があったと結論づけることができる。

【0247】

実施例11

効力

30

Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) から購入した6～7週齢の胸腺欠損雌ヌードマウス(nu/nu)を、効力研究に使用した。マウスには、手動拘束を使用して、右側腹部に 5×10^6 個のH446細胞を皮下注射した。腫瘍サイズを定期的に測定し、容量を、式： $\frac{1}{6} \times W \times L^2$ (式中、L = 腫瘍の長さ及びW = 腫瘍の幅である)を使用して計算した。腫瘍がおよそ100～150mm³に達したとき、マウス(n=10)を無作為に群に分けた。マウスには、10ml/kgの投与量で尾静脈注射によりSVVの漸増用量を注射した。マウスの対照群には、HBSの等量を注射した。漸増用量は、体重1キログラムあたり 1×10^7 から 1×10^{13} 個の粒子まで続けた。抗腫瘍効力は、SVV投与後に腫瘍量を毎週2回測定して決定した。完全寛解は、異種移植片の完全な消滅、部分反応は腫瘍量の50%以上の退縮、反応なしは対照群と同様の腫瘍の連続的増殖として定義した。

40

【0248】

HBSで処置されたマウスの腫瘍は、急速に増殖し、腫瘍量は、研究の20日目までには2000mm³超に達した(図51, 中空菱形の線を参照すること)。対照的に、SVVの全身注入を全ての試験用量(最低用量を除く)で1回与えたマウスは、研究の20日目までには腫瘍がなくなった。最低用量群では、研究の31日目までには、8匹のマウスでは腫瘍がなくなり、1匹のマウスは非常に大型の腫瘍を有し、他は、小型の触知可能な腫瘍(25mm³)を有した。SVVの大型の腫瘍に対する抗腫瘍活性を評価するために、HBS群の>2000mm³の腫瘍を担持する5匹のマウスに、研究の20日目に 1×10^{11} vp/kgの単回用量で全身注入した。追跡期間の間(SVV注射後11日間)、腫瘍

50

量の劇的な退縮が見られた（図 5 1）。

【 0 2 4 9 】

S V V の単回静脈内用量の効力を試験する追加的な実験を、神経内分泌マーカーを発現するマウス腫瘍モデルで実施した。試験した腫瘍モデルには、H 4 4 6（ヒト S C L C）（図 9 0 A を参照すること）、Y 7 9（ヒト網膜芽細胞腫）（図 9 0 B を参照すること）、H 6 9 A R（ヒト多剤耐性 S C L C）（図 9 0 C を参照すること）、H 1 2 9 9（ヒト N S C L C）（図 9 0 D を参照すること）及び N 1 E - 1 1 5（マウス神経芽細胞腫）（図 9 0 E を参照すること）が挙げられる。

【 0 2 5 0 】

結果は、S V V の単回静脈内用量は、全てのマウス神経内分泌腫瘍モデルにおいて効力を有することを示す。この結果は、S V V が N 1 E - 1 1 5 免疫適性マウス神経芽細胞腫モデルにおいて効果的であることも示す。

10

【 0 2 5 1 】

図 5 2 は、S V V で「未処置」である（すなわち、H B S S で処置された）マウス又は S V V で「処置」されたマウスの写真を示す。見て判るように、未処置マウスは非常に大型の腫瘍を有し、処置マウスは目に見える腫瘍の徴候を示さなかった。更に、S V V で処置した未殺処理マウスでは、研究の期間中、2 0 0 日間で腫瘍の再増殖は観察されなかった。

【 0 2 5 2 】

特定の腫瘍細胞株に対する S V V のインビトロ効力のデータを、表 1、1 A 及び 5 に示す。このデータは、S V V が特定の腫瘍細胞型に特異的に感染し、成人の正常細胞には感染しない（ブタ正常細胞を除く）ことを示し、これは他の任意の既知の腫瘍溶解ウイルスに対する顕著な利点である。S V V は、化学療法処置よりも 1, 0 0 0 倍良好な細胞死滅特異性を有することを示した（S V V の細胞死滅特異性値は、1 0, 0 0 0 を越えることが示されているが、化学療法の細胞死滅特異性値は、およそ 1 0 である）。

20

【 0 2 5 3 】

S V V の特異的細胞毒性活性を、H 4 4 6 ヒト S C L C 細胞で実証した。S V V の増加濃度を用いる 2 日間のインキュベーションの後、細胞生存率を決定した。結果を図 5 3 に示す。図 5 3 は、H 4 4 6 S C L C 腫瘍細胞（上側グラフ）又は正常なヒト H 4 6 0 細胞（下側グラフ）との S V V のインキュベーションの後の細胞生存を示す。S V V は、細胞 1 個あたりおよそ 10^{-3} 個の粒子の EC_{50} で腫瘍細胞を特異的に死滅させた。対照的に、正常なヒト細胞は S V V のいずれの濃度でも死滅しなかった。更に、表 1、1 A ~ 3 でまとめられているように、S V V は、S C L C 多剤耐性腫瘍細胞を含む多数の他の腫瘍細胞株、並びに幾つかの胎児細胞及び細胞株に対しても細胞毒性がある。他の腫瘍細胞株に対する S V V 細胞毒性の EC_{50} 値は、細胞 1 個あたり、 $10^{-3} \sim 20,000$ 個を越える粒子の範囲であった。S V V は、他の多様な非神経性腫瘍及びヒト正常組織に対して非細胞毒性であった。加えて、S V V は、LDH 放出により測定すると、細胞 1 個あたり 1 0 0 0 個の粒子まで初代ヒト肝細胞に対して細胞毒性がなかった（図 4 8 を参照すること）。

30

【 0 2 5 4 】

実施例 1 2

40

齧歯類における体内分布及び薬物動態研究

S V V の薬物動態及び体内分布研究を、正常なマウス及び H 4 4 6 S C L C 腫瘍を担持する免疫無防備状態の胸腺欠損ヌードマウスで実施した。この研究は、正常なマウスと免疫無防備状態の腫瘍担持マウスの両方に単回静脈内投与した後、S V V の体内分布、排除及び残存率を評価した。群のマウスは、それぞれ単回静脈内用量の対照緩衝剤又は 1 ~ 3 用量の S V V（ 10^8 、 10^{10} 又は 10^{12} vp/kg）を摂取し、臨床徴候についてモニタリングした。血液試料を、投与の 1、6、24 及び 48 時間後、並びに投与の 1、2、4 及び 12 週間後に 5 匹のマウスの群から得た。用量レベルには、ウイルス排除の直線性を決定するために、既知の低効用量と 2 つの高用量レベルが含まれていた。マウスの群を、投与の 24 時間後、並びに 2、4 及び 12 週間後に殺処理した。肝臓、肺、脾臓、腎臓、

50

リンパ節、骨髄、脳及び脊髄組織を含む選択された組織を無菌的に収集し、検証済みの RT-PCR アッセイを使用して SVV RNA の存在について試験した。

【0255】

尿及び糞の試料を、殺処理時、投与の 24 時間後、並びに 2、4 及び 12 週間後に得て、感染ウイルスの存在について調べた。この実施例における実験の設計を下記の表 9 に示す。

【0256】

【表 13】

表 9：CD-1 マウス及び SCLC 腫瘍を担持する胸腺欠損ヌードマウスにおける SVV の体内分布

群	処置	用量レベル (vp/kg)	経路	血液サンプリング 時点のマウスの 数	PCR 組織分布 の時点のマウスの 数
正常 CD-1 マウス					
1	生理食塩水	0	静脈内	5	5
2	SVV	10^8	静脈内	5	5
3	SVV	10^{10}	静脈内	5	5
4	SVV	10^{12}	静脈内	5	5
胸腺欠損腫瘍担持マウス					
5	生理食塩水	0	静脈内	5	5
6	SVV	10^8	静脈内	5	5
7	SVV	10^{10}	静脈内	5	5
8	SVV	10^{12}	静脈内	5	5

【0257】

急性静脈内毒性研究も、正常なマウスと、H446 SCLC 腫瘍を担持する免疫無防備状態の胸腺欠損ヌードマウスの両方で実施した。正常なマウスと SCLC 腫瘍担持マウスでの予備静脈内研究は、SVV が 10^{14} vp/kg までの用量で安全であることを示す。有害な臨床徴候は観察されず、単回静脈内用量の 10^{14} vp/kg の 2 週間後まで、体重の減少はなかった。

【0258】

実施例 13

正常な成体及び妊娠マウスにおけるウイルス伝染研究

この実施例の目的は、非感染正常マウスと高濃度の SVV を注射したマウスとの共存の後で、SVV が伝染するかを決定することである。SVV は、正常な非腫瘍担持マウスでは複製しないので、腫瘍担持マウスに高濃度の SVV を注射し、続いて正常で健康な動物に触れさせて臨床のシナリオをより良好にシミュレートすることもできる。第 2 の目的は、感染した雌から非感染妊娠雌親、続いて発育中の胎児への SVV の感染の可能性を評価することである。

【0259】

5 匹の未処置の雄及び雌 CD-1 マウスの 3 つ群を、 10^8 、 10^{10} 又は 10^{12} vp/kg のいずれかで感染された同じ性別の単独のマウスに触れさせ、血液サンプリングにより SVV の存在をモニタリングした。

【0260】

同様に、SVV に暴露した雌を多数の妊娠時期の雌と一緒にして、感染した雌から非感染妊娠雌へ、続いて発育中の胎児へウイルスが伝染する能力を決定した。

【0261】

実施例 14

非ヒト霊長類研究

S V Vの安全性、毒性及び毒物動態を非ヒト霊長類においても決定した。用量範囲発見段階において、個々のサルにS V Vの単回静脈内用量を 10^8 vp/kgで摂取し、感染又は毒性の臨床徴候について密接にモニタリングした。この用量の耐性が十分である場合、更なる動物を 10^{12} vp/kgの用量が達成されるまでより高い静脈内用量で処置した。続いて、主要研究は3匹の雄及び雌サルの群から構成され、それぞれのサルにはビヒクル単独又は3用量のS V Vのいずれかを毎週1回で6週間投与し、毒性の徴候をモニタリングした。追加の雄雌1対の2匹のサルにビヒクル単独又は高用量レベルのS V Vを6週間投与し、殺処理の前に更に4週間回復させた。

【0262】

血液試料を、投与期間の1週目及び6週目に得る。臨床病理学的及び血液学的血液試料を、最初の投与の前及び殺処理の前に得た。S V Vに対する中和抗体の存在を評価するために、更なる血液試料を各投与後に得た。

【0263】

生存サルを安楽死させ、完全な全体屍検に付し、完全な組織リストを主要研究及び回復サルから集めた。対照及び高用量群からの組織を組織病理学的に評価した。尿及び糞試料を、投与後の1週目及び6週目に収集し、感染S V Vの存在について評価した。この実施例の全体的な設計を下記の表10に示す。

【0264】

【表14】

表10：霊長類におけるS V Vの多回用量毒性研究

用量範囲発見段階							
群	処置	用量 (vp/k g)	経路	雄	雌		
1	SVV	10 ⁸	静脈内	1	1		
2	SVV	10 ^{10*}	静脈内	1	1		
3	SVV	10 ^{12*}	静脈内	1	1		
主な段階			主な段階			回復	
群	処置	用量 (vp/k g)	経路	雄	雌	雄	雌
1	対照	—	静脈内	3	3	2	2
2	SVV	10 ^{8*}	静脈内	3	3	—	—
3	SVV	10 ^{10*}	静脈内	3	3	—	—
4	SVV	10 ^{12*}	静脈内	3	3	2	2

* 用量は、用量範囲発見段階の結果に基づいて変わりうる。

【0265】

実施例15

感染性の完全長及び機能ゲノムS V Vプラスミドの構築

配列番号：1によると、S V Vの5' ゲノム配列の約1.5～2 kbしか配列決定されるために残っており、5' UTR、1A (VP4) 及び1B (VP2) の部分を網羅するヌクレオチド領域を表す。5' 末端欠失配列番号：1をクローン化するために、高温で機能するポリメラーゼ及びポリメラーゼが二次構造を読み通すことを可能にする試薬を使用した。更なるS V V cDNAを、ATCC寄託番号PTA-5343の単離S V Vから調製した。S V V粒子を、PER.C6のような許容性細胞株に感染し、ウイルスを単離した。次に、cDNAコピーが作られるように、ウイルスRNAをウイルス粒子から回収した。選択されたcDNAクローンが合わせられて、S V V配列の5' 末端の上流にT7プロモーターを有するプラスミド中で一つの完全長クローンになるように、個々のcDNAクローンを配列決定した。S V Vの完全長ゲノム配列は、図83A～83H及び配列番

号：168に提示されている。このプラスミドからの完全長SVVを、T7ポリメラーゼ及びインビトロ転写系を利用して逆転写し、完全長RNAを生成する（図55を参照すること）。次に完全長RNAを許容性細胞株に形質移入して、完全長クローンの感染力を試験する（図55を参照すること）。

【0266】

方法論は以下であった。RNA単離：SVVゲノムRNAを、チオシアン酸グアニジウムを使用し、Trizol（Invitrogen）を用いるフェノール抽出法を使用して抽出した。簡潔には、250 µlの精製SVV（約 3×10^{12} 個のウイルス粒子）を3容量のTrizol及び240 µlのクロロホルムと混合した。RNAを含有する水相を、600 µlのイソプロパノールに沈殿させた。RNAペレットを70%エタノールで2回洗浄し、乾燥し、滅菌DEPC処理水に溶解した。抽出されたRNAの量は、260 nmでの光学密度測定により推定することができる。RNAのアリコートをして1.25%変性アガロースゲル（Cambrex Bio Sciences Rockland Inc., Rockland, ME USA）により分割し、バンドを臭化エチジウム染色により可視化し、写真を撮ることができる。

【0267】

cDNA合成：SVVゲノムのcDNAをRT-PCRにより合成した。cDNAの合成は、1 µgのRNA、AMV逆転写酵素及びオリゴdTプライマーを使用する標準的な条件下で実施した。ランダム4-merオリゴヌクレオチドを使用することもできる。cDNAのフラグメントを増幅し、プラスミドpGEM-3Z（Promega）にクローン化し、クローンを配列決定した。ウイルスゲノムの5'末端の配列を、RACEによりクローン化して、配列を決定した。配列データをまとめて、SVVの全ゲノム配列を生成した。

【0268】

完全長ゲノムのクローニング：完全長SVVゲノムを表す3つのcDNAのフラグメントを、6セットのSVV特異性プライマーを用いた3回のPCR反応で増幅した。Turbo pfuポリメラーゼ（Stratagene）をPCR反応に使用した。第1に、SVVゲノムの5'末端を表すフラグメントをプライマー5'-SVV-A（配列番号：219）及びSVV1029RT-R1（配列番号：220）で増幅し、得られたフラグメントをApa1及びEcoRIで切断し、ゲル精製した。ゲル精製フラグメントを、Nde-ApaT7SVV（配列番号：221）、5'末端に操作されたNde1部位を含むアニールされたオリゴ二本鎖、中央のT7コアプロモーター配列及び3'末端に使用準備済みのApa1部位を有するSVVの最初の17個のヌクレオチドに連結し、3方向連結によりpGEM-3Z（Promega）のNde1及びEcoRI部位にクローン化してpNTX-03を生成した。第2に、ウイルスゲノムの3'末端を表すフラグメントを、プライマーSVV6056（配列番号：222）及びSVV7309Ns1B（配列番号：223）を用いてPCRで増幅した。アンチセンスプライマーSVV7309Ns1Bを使用して、3'末端の30個のヌクレオチドの長さの導入ポリ（A）テール及びNs1I認識配列を、pGEM-3ZプラスミドのPstI部位にクローン化した。得られたPCR産物をBamHIで消化し、ゲル精製した。ウイルスゲノムの内部部分を網羅するフラグメントを、プライマーSVV911L（配列番号：224）及びSVV6157R（配列番号：225）で増幅した。得られたPCR産物をEcoRI及びBamHIで切断し、ゲル精製した。SVVゲノムの中央及び3'末端を表す2つのゲル精製フラグメントを、3方向連結によりpGEM-4ZのEcoRI及びSmaI部位にクローン化してpNTX-02を生成した。完全長SVV cDNAを生成するために、pNTX-02をEcoRI及びNs1Iで消化し、得られた6.3 kbのフラグメントをゲル精製し、pNTX-03のEcoRI及びPstI部位にクローン化した。得られた完全長プラスミドをpNTX-04と呼んだ。

【0269】

完全長プラスミドpNTX-04を、5'と3'の両方の末端で更に修飾してインビトロ転写を促進し、PER.C6細胞へのRNA転写後のウイルスの救出を促進した。第1に、SmaI制限酵素部位を、ポリ（A）テールの直ぐ下流に挿入して、インビトロ転写の前

10

20

30

40

50

に、プラスミド骨格からSVV-cDNAの3'末端を遊離させた。PCR手法を使用し、プライマー対SVV6056（配列番号：222）及びSVVSwarev（配列番号：226）と、鋳型としてpNTX-04とを利用して部位を挿入した。アンチセンスプライマーSVV3Swarevは、SVV配列の3'末端を表す58個のヌクレオチド及びSwai及びSphI制限酵素部位の認識配列を含有した。得られたPCRフラグメントをBamHI及びSphIで消化し、pNTX-04の対応するフラグメントを代えるために使用して、pNTX-06を生成した。第2に、pNTX-06におけるSVV-cDNAのT7プロモーター転写開始部位と5'末端の間に存在する余分な4個のヌクレオチドを、アニールしたオリゴ二本鎖を使用する手法で除去した。二本鎖ヌクレオチドを、KpnI認識部位、T7コアプロモーター配列及び3'末端に使用準備済みApa1部位を有するSVVの最初の17個のヌクレオチドに含むように操作した（配列番号：227）。アニールしたオリゴを使用し、KpnI及びApaI部位を用いてpNTX-06の対応する部分を代えて、pNTX-07を生成した。最後に、pNTX-07のポリメラーゼコード領域で見つめられた2つの塩基対の欠失は、BamHI及びSphIフラグメントを、PCRによりSVV-cDNAから増幅された対応するフラグメントに代えることによって修復し、pNTX-09を生成した。

10

【0270】

インビトロ転写：インビトロ転写RNAの感染力を、最初にpNTX-09をSwaiで消化して、プラスミド骨格からSVV配列の3'末端を遊離することにより試験した。直線化プラスミドを、T7ポリメラーゼ（Promega）を使用してインビトロ転写に付した。

20

【0271】

インビトロ転写RNAのPER.C6細胞への形質移入：形質移入の1日前に、PER.C6細胞を6ウェル組織培養皿で平板培養した。翌日に、Lipofetamine試薬（Invitrogen）使用し、供給者の推奨に従ってインビトロ転写RNA（1.5 µg）を細胞に形質移入した。ウイルス産生に起因する細胞変性効果（CPE）が、形質移入の36時間後に見られた。形質移入細胞を、3サイクルの凍結融解に付し、PER.C6細胞を感染させることにより、溶解産物中のウイルスを更に確認した。このように、完全長SVV-cDNAクローンは感染性であることを実証した。

30

【0272】

上記に記載したように、SVVの完全長ゲノムを有するプラスミドを、標準的なプロトコルに従って逆転写することができる。ウイルスRNA（100 ng）を使用して、未変性SVVに許容性であることが知られているあらゆる細胞株を形質移入することができるが、ウイルスRNA形質移入に最も効率的な細胞株は、多様な細胞株のうちから経験的に決定することができる。

【0273】

実施例 16

RGD表示SVVライブラリーの構築

ランダムペプチド配列をコードするオリゴヌクレオチドによりランダムに生成されたSVVカプシド突然変異体の構築に最適な挿入位置を見つけるために、簡単なモデル系（RGD）を用いる。RGD（アルギニン、グリシン、アスパラギン酸）は、インテグリンに結合する短ペプチドリガンドである。成功したRGD-SVV誘導体は、以下の特性を含むはずである：（1）遺伝子挿入が、SVVに特有で望ましい特性のいずれも変えるはずではないこと；及び（2）成功したRGD誘導体ウイルスが、細胞を含有するV₅インテグリンに対して親和性を有するはずであること。

40

【0274】

近接するカプシド領域を含有するSVVプラスミドをランダムな位置で一つずつ開裂し、RGDと呼ばれる短モデルペプチド配列を各位置に挿入した。ウイルスSVV-RGDライブラリーを、図56及び57に記載される一般的な技術を利用して、このプラスミドライブラリーから構築した。

50

【0275】

c R G D オリゴヌクレオチドのカプシド領域へのランダム挿入を実施した。簡潔には、プラスミドを S V V の 2 . 1 kb カプシド領域をちょうどコードするように構築した (図 5 6 「p S V V カプシド」を参照すること)。単一のランダム開裂を、下記に記載する C v i J I 又はエンドヌクレアーゼ V 方法を利用してプラスミドを部分的に消化することにより、p S V V カプシド中で行った (図 5 7 を参照すること)。単一開裂プラスミドを単離した後、R G D オリゴヌクレオチドを挿入して、p S V V カプシド - R G D ライブラリーを作り出した。

【0276】

制限酵素 C v i J I は、超音波処理又は剪断のような他のランダム開裂方法に対して幾つかの利点を有する。第 1 に、C v i J I は平滑末端カッターであり、修復の必要性がない。第 2 に、C v i J I は、ホットスポットを生じないようにランダム位置で開裂することが実証されている。手順も簡単で素速い。簡潔には、C v i J I の濃度及び / 又は消化の時間は、開裂された D N A の大部分が直線化プラスミドになるまで、すなわち単一開裂になるまで次第に低下していく。これは、図 5 7 で示されている標準アガロースゲル電気泳動により観察することができる。次にバンドを単離し、生成し、R G D オリゴと連結した。

【0277】

D N A をランダムに開裂するのに利用できる別の方法は、エンドヌクレアーゼ V の方法である (Kiyazaki, K., Nucleic Acids Res., 2002, 30(24): e139)。エンドヌクレアーゼ V は、ウラシル部位への第 2 又は第 3 ホスホジエステル結合 3 において、ウラシル含有 D N A に切れ目を入れた。この方法も D N A をランダムに開裂することが予測され、当該頻度は簡単に、ポリメラーゼ連鎖反応における d U T P の濃度を調整することによって決定される。開裂部位は常にチミジン (ウラシルで置換される) の塩基 2 又は 3 個下流であるが、この方法は、他の方法論よりもかなり少ないホット及びコールドスポットを生じることが予測される。

【0278】

ランダムに直線化されたプラスミドを c R G D オリゴヌクレオチドと連結した。次に得られた p S V V カプシドライブラリーを増幅し、これにより、ランダムに挿入された c R G D 領域を有するカプシド領域をコードするポリヌクレオチドの個体群を精製することができた (図 5 7 及び 5 8 を参照すること)。次にカプシドポリヌクレオチドの個体群を、完全長 S V V 配列からカプシド領域を引いたものを含有するベクターにサブクローン化して、それにより、完全長 S V V 配列のライブラリーが生成された (ライブラリーは、c R G D 配列がランダムに挿入されているので、カプシド領域において配列多様性を表す)。次にこのライブラリーを R N A に逆転写し、R N A を許容細胞株に形質移入して、異なるカプシドを有する S V V 粒子の個体群を生成した (図 5 9 を参照すること)。このウイルス粒子の R G D - S V V 個体群を回収し (「R G D - S V V ライブラリー」) 多数のウイルス (すなわち、10 個以上) を配列決定のために無作為に取り出して、R G D 配列の挿入及び挿入部位の多様性を確認した。

【0279】

R G D 表示 S V V ライブラリーのインビトロ選択。S V V - R G D ライブラリーをスクリーニングして、どの挿入部位が S V V に対する拡大した親和性を可能にするかを決定した。R G D - S V V ライブラリーを、 v_5 インテグリン発現 N S C L C 株 (非小型細胞肺癌細胞株、すなわち A 5 4 9 発現 v_5) に感染させた。機能的であり正常に表示される R G D モチーフを含むこれらの S V V 誘導体しか、これらの細胞に感染し、複製することができない。

【0280】

インビトロスクリーニングを、液体を扱うこと、20 個の細胞株を同時にインキュベートすること及び 384 ウエルプレートを測定することができるハイスループット自動システム (TECAN) で実施した (図 6 2 及び図 6 3 を参照すること)。感染の 30 時間後か、

10

20

30

40

50

C P E の完了が見られたとき、細胞を採取し、次に細胞を 4、1500 rpm で 10 分間の遠心分離により回収した。次に細胞ペレットを細胞培養上澄みに再懸濁し、3 サイクルの凍結融解に付す。得られた懸濁液を、4、1500 rpm で 10 分間の遠心分離により清澄化した。ウイルスを 2 回の C s C l 勾配により精製する：1 工程勾配 (C s C l 密度 1.24 g/ml 及び 1.4 g/ml)、続く 1 連続勾配遠心分離 (C s C l 密度 1.33 g/ml)。精製されたウイルス濃度を分光光度的に決定し、 $1 A_{260} = 9.5 \times 10^{12}$ 粒子であると推定された (Scraba, D.G. and Palmenberg, A.C., 1999)。このプロセスを、十分な量のウイルスを v_5 細胞から回収するまで何回も繰り返すことができる。

【0281】

回収された R G D - S V V 誘導体の分析。個々の R G D 表示 S V V 誘導体の少量のプール (約 10 ~ 50 個の異なる誘導体) を分析した。ウイルス混合物を希釈し、単一のウイルス粒子を分析のために拡大した。それぞれの誘導体を試験して、これらが v_5 発現細胞を効率的かつ特異的に感染する能力を得ているかを判定した。次に、この特性を有するそれぞれの誘導体のカプシド領域を配列決定して、R G D 挿入の部位を決定した。回収された c R G D 表示 S V V 誘導体は以下の特性を有するはずである：(1) ウイルスの元の特性が無傷のままであること；及び (2) 誘導体が、R G D に結合する高レベルのインテグリンを発現する細胞を感染する能力を得ること。この手法は、ランダムオリゴヌクレオチドを部位に挿入して、変化した親和性を有する S V V 誘導体を生成することができるように、R G D 挿入による親和性の拡大を可能にする 1 つ以上の部位を同定することを目的とする。

【0282】

配列決定された c R G D - S V V 誘導体を、インテグリンへの結合能力によって番号付けし順位付けした。結合活性を試験するために、組み換え α_2 インテグリンを、P B S 中の 96 ウエルマイクロタイタープレートに固定化し、P B S で 2 回洗浄し、P B S 中の 3 % B S A でブロックし、次に独特の R G D 表示ウイルスと共にインキュベートした。ペプチド挿入のない未変性ウイルスを、陰性対照として使用する。インキュベーションの 1 ~ 5 時間後、ウェルを P B S で少なくとも 3 回洗浄した。次に、プレートに結合しているウイルスを、抗 S V V 抗体により検出した。インテグリンに対する R G D ペプチド又は抗体は、インテグリン結合プレートへの R G D - S V V 誘導体の結合と競合することができるはずである。

【0283】

インテグリンへの最強の結合を有する c R G D - S V V 誘導体 (20) を分析して、c R G D オリゴヌクレオチドの挿入が「成功する」位置を決定した。挿入部位は S V V の親和性について洞察を提供した。挿入部位及び他の既知の構造の分析にもとづいて、ランダムペプチドライブラリーを配置する理想的な位置を決定した (この方法は、オリゴヌクレオチド (既知の配列又はランダム配列) をカプシド中のランダムな位置に挿入する、S V V 誘導体を生成する代替的な方法である)。ランダム配列オリゴヌクレオチドにより生成される S V V 誘導体を、2 つの追加的で新規な方法論を除いて、上記の R G D - S V V ライブラリーについて記載された方法と実質的に同じ方法で構築した。望ましいコード領域内に不要な終止コドン及び有害なアミノ酸挿入 (例えば、システイン又はプロリン) を避けるために、Morphosys (Munich, Germany) により開発された T R I M (トリヌクレオチド - 突然変異誘発) 技術を使用して、カプシド挿入のためにランダムオリゴヌクレオチドを生成した。T R I M は、所望の位置でアミノ酸をコードするだけのトリ - ヌクレオチドを利用する (Virnekas, B. et al., Nucleic Acids Res, 1994, 22(25): 5600-5607)。 10^8 の多様性で S V V を表示するランダムペプチドは、ウイルスを標的腫瘍組織に特異的に向かわせるペプチドを生じるのに十分であると思われ、生じると予測された。ランダムペプチド表示 S V V を、上記で記載したようにインビトロで又は腫瘍担持マウスを使用してインビトロで試験した。

【0284】

実施例 17：血清研究

10

20

30

40

50

ブタは、上記で同定した U S D A ウイルス分離株の許容宿主である。分離株 M N 8 8 - 3 6 6 9 5 をノトパイオートブタに接種し、抗血清を生成した (G P 1 0 2)。抗血清は、上記で提示した他の全ての U S D A 分離株及び S V V に結合する。抗血清は、24 個の一般的なブタウイルス病原体と反応せず、その特異性を示している。ブタ血清は、また、中和抗体について 1 2 7 8 (プラムアイランドウイルス) で試験した。血清を米国で収集し、血清の 8 / 2 9 が 1 : 5 7 ~ 1 : 3 6 , 5 0 0 の範囲の力価で陽性であった。

【 0 2 8 5 】

ブタが S V V の天然供給源であるかを試験するために、多様な動物から血清試料を得て、許容細胞の S V V 感染に対して中和抗体として作用するその能力について試験した。血清中和アッセイを以下のように実施した：(1) 多様な血清を 1 : 2 及び 1 : 4 で希釈し、必要であれば希釈を増大する；(2) 1 0 0 T C I D₅₀ のウイルス (S V V ; しかし、任意のウイルスを、血清がその感染を中和できるかを決定するために試験することができる) と混合する；(3) 3 7 °C で 1 時間インキュベートする；(4) 混合物を 1×10^4 個の P E R . C 6 (登録商標) 細胞 (又は他の許容細胞型) に加える；(5) 3 7 °C で 3 日間インキュベートする；及び (6) テトラゾリウム系染料細胞毒性 (例えば M T S) アッセイを使用して C P E を測定する。中和力価は、S V V (又は他の目的のウイルス) を中和する最も希釈された血清を 1 0 0 % として定義する。

【 0 2 8 6 】

血清中和の結果は、ヒト及び霊長類個体群において中和抗体の存在が最小限であるか又は存在しないことを示した。一つの実験では、ヒト血清の 0 / 2 2 が、S V V に対する中和抗体を含有した。別の実験では、ヒト血清の 1 / 2 8 しか中和抗体を含有しなかった。第 3 の実験では、アーミッシュ農民からのヒト血清の 0 / 5 0 が中和した。別の実験では、4 種の霊長類の血清の 0 / 5 0 が中和した。

【 0 2 8 7 】

血清中和の結果は、家畜個体群に S V V 中和抗体が広く存在することを示した。一つの実験において、農場のブタ血清の 2 7 / 7 1 が中和した。別の実験において、無疾患の農場のブタ血清の 4 / 3 0 が中和した。別の実験において、ウシ血清の 1 0 / 5 0 が中和した。なお別の実験において、野生マウス血清の 5 / 3 5 が中和した。

【 0 2 8 8 】

M N 8 8 - 3 6 6 9 4 に対する抗血清を、S V V の血清中和アッセイで試験した (実施例 2 を参照すること)。抗 M N 8 8 - 3 6 6 9 5 ノトパイオートブタ血清は、S V V の感染を中和することができた (感染に対する中和力価は S V V では 1 : 1 0 0 であった)。上記で記述したように、抗血清は他の U S D A 分離株の全て及び S V V に結合し、本明細書に開示されている U S D A 分離株は、間接免疫蛍光アッセイで測定されたノトパイオートブタ血清との血清学的交差反応の結果、S V V 様ピコルナウイルスであることが示されている。

【 0 2 8 9 】

これらのデータは、S V V が、ブタ U S D A ウイルス分離株に遺伝子的及び血清学的に関連していることを示す。

【 0 2 9 0 】

実施例 1 8 : S V V 及び S V V 様ピコルナウイルス

次の分離株 : M N 8 8 - 3 6 6 9 5、N C 8 8 - 2 3 6 2 6、I A 8 9 - 4 7 5 5 2、N J 9 0 - 1 0 3 2 4、I L 9 2 - 4 8 9 6 3、C A 1 3 1 3 9 5、L A 1 2 7 8、I L 6 6 2 8 9、I L 9 4 - 9 3 5 6、M N / G A 9 9 - 2 9 2 5 6、M N 9 9 1 9 7 及び S C 3 6 3 6 4 9 の群を、間接免疫蛍光実験で部分的に推定した。抗血清 G P 1 0 2 は、ウイルスをノトパイオートブタに接種することによって、単離 M N 8 8 - 3 6 6 9 5 に対して発生させた。抗血清は 1 2 個の分離株の全てに結合し、これらが互いに血清学的に関連していることを実証する。

【 0 2 9 1 】

G P 1 0 2 抗血清を、S V V による中和アッセイで試験した。このアッセイでは、抗血

10

20

30

40

50

清の段階希釈を既知の量のSVV (100 TCID₅₀) と混合した。混合物を37℃で1時間置いた。次に混合物のアリコートをし、1×10⁴個のPER.C6 (登録商標) 細胞又は同様にSVVに許容性がある別の細胞株に加え、混合物を37℃で3日間置いた。次にウエルを、ウイルスの細胞変性効果 (CPE) について調べた。血清が中和抗体を含有する場合、ウイルスを中和し、ウイルスによるPER.C6 (登録商標) 細胞の感染を阻害するであろう。CPEを、存在する生存細胞の数に基づいて吸光度を変えるテトラゾリウム系染料試薬を使用して定量的に測定した。結果を、血清の対数希釈に対する非感染対照の生存細胞の率として表し、図93に示す。このデータは、SVVが、ブタUSDAウイルス分離株に血清学的に関連していることを示す。

【0292】

加えて、MN88-36695のウイルス溶解産物を、4つの異なる細胞株による細胞毒性アッセイで試験し、結果を表4に示す。許容性プロフィールは、NCI-H446及びHEK293がSVVに許容性であり、NCI-H460及びS8が許容性ではない点において、SVVと同一である。加えて、SVVと同様に、MN88-36695はPER.C6 (登録商標) 細胞に対して細胞毒性であった。更に、マウスで発生されたSVVに対するポリクローナル抗血清を、MN88-36695ウイルスと共に中和アッセイに使用した。結果を図94に示す。抗SVV抗血清はMN88-36695を中和し、更にSVVをUSDAウイルスと血清学的に関連づけた。

【0293】

【表15】

表11：MN88-36695細胞毒性の結果

細胞株	TCID ₅₀ (pfu/ml)	結果
NCI-H446	1.6 x 10 ⁻⁶	許容性
HEK293	1.3 x 10 ⁻²	許容性
NCI-H460	0	非許容性
S8	0	非許容性

【0294】

幾つかのUSDA分離株のゲノム部分配列分析は、これらが全てSVVと密接に関連していることを明らかにした (配列の整列化について図87～89を参照すること)。表12は、SVVと6個の他の分離株との配列同一性の率を示す。3D^{pol}及び3'UTRをコードするゲノムの3'末端の460ntにわたって、ヌクレオチド (nt) レベルで約95～98%の同一性が見出された。USDAウイルスは、それぞれ独特であり、ヌクレオチドレベルでSVVに対して約95～98%の同一性がある。

【0295】

【表16】

表12：SVVと6個のUSDA分離株との配列同一性の率

1	2	3	4	5	6	7		ウイルス名
	96.5	99.1	97.2	97.0	97.4	97.0	1	NJ 90-10324
		97.0	95.7	94.8	95.0	98.3*	2	CA 13195
			97.6	97.2	97.6	97.2	3	IA 89-47752
				95.4	96.1	96.3	4	IL 92-48963
					98.9	95.2	5	MN 88-36695
						95.4	6	NC 88-23626
							7	SVV-001 (SVV)

【0296】

分離株のうちの2つのP1 (図87) 及び2C (図88) 遺伝子の一部分の更なる配列

決定が、S V Vとのこの密接な関係を確認した。U S D A分離株は、カルジオウイルス属のメンバーを含む他のあらゆる既知のウイルスよりもS V Vにより高度に関連する。U S D Aウイルスのうちの7個の幾つかの領域からの配列をS V Vと比較して、隣接連結ツリーを構築した(図9 5 A及び9 5 B)。これらのツリーは、ウイルス間の高度な関係性を更に確認し、C A 1 3 1 3 9 5をS V Vの現在の最も密接な類似体であると同定する。

【図面の簡単な説明】

【0 2 9 7】

【図1】腫瘍溶解ウイルスを使用するウイルス療法の概略図を示す。腫瘍溶解ウイルスは、ウイルスを局所的に注入すること又はウイルスを全身的に送達することによって、腫瘍体積の全体にわたって複製し、拡散し、腫瘍細胞を選択的に死滅させる特性を有する。

【図2】酢酸ウレニルで染色し、透過型電子顕微鏡で調べた精製S V Vを示す。球状ウイルス粒子は直径約2 7 n mである。

【図3】大型の結晶質封入体及び大型の小胞体を有するS V V感染P E R . C 6細胞の電子顕微鏡写真である。

【図4 A】S V V R N Aの分析を示す。S V VゲノムR N Aを、チオシアン酸グアニジウムを使用し、Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)を用いるフェノール抽出法を使用して抽出する。R N Aを1 . 2 5 %変性アガロースゲルで分割する。バンドを臭化エチジウム(E t B r)染色により可視化し、写真を撮る。レーン2では、優勢なS V VゲノムR N Aバンドが観察され、完全長S V Vゲノムの大きさが約7 . 5キロベースであることを示す。

【図4 B】S V Vを含むピコルナウイルスのポリタンパク質プロセッシングで生成されたゲノム構造及びタンパク質産物を示す概略図である。

【図5 A - E】S V V(配列番号: 1)のヌクレオチド配列及びコードされたアミノ酸配列(配列番号: 2)を表す。終止コドンは位置5 6 7 1 ~ 3で「*」により示されている。一般的な注意事項として、正確なヌクレオチドが確認されている位置を含む配列開示において、これらの位置は「n」により表される。したがって、「n」を有するコドンでは、関連するアミノ酸は「x」で示される。

【図6 A - D】S V Vの完全長ゲノムの大部分のヌクレオチド配列(配列番号: 1)を表す。ヌクレオチド配列は、A T C C特許寄託番号P T A - 5 3 4 3を有するS V V分離株から誘導された。寄託日: 2 0 0 3年7月25日。

【図7 A - B】配列番号: 1でコードされるアミノ酸配列(配列番号: 2)を表す。

【図8】S V Vの部分1 B又はV P 2コード領域のヌクレオチド配列(配列番号: 3)を表す。この配列は配列番号: 1のヌクレオチド4 ~ 4 2 9と同一である。

【図9】配列番号: 3でコードされる部分S V V V P 2タンパク質のアミノ酸配列(配列番号: 4)を表す。配列番号: 4で提示される配列は、配列番号: 2のアミノ酸2 ~ 1 4 3と同一である。

【図10】S V Vの1 C又はV P 3コード領域のヌクレオチド配列(配列番号: 5)を表す。この配列は配列番号: 1のヌクレオチド4 3 0 ~ 1 1 4 6と同一である。

【図11】配列番号: 5でコードされるS V V V P 3タンパク質のアミノ酸配列(配列番号: 6)を表す。配列番号: 6で提示される配列は、配列番号: 2のアミノ酸1 4 4 ~ 3 8 2と同一である。

【図12】S V Vの1 D又はV P 1コード領域のヌクレオチド配列(配列番号: 7)を表す。この配列は配列番号: 1のヌクレオチド1 1 4 7 ~ 1 9 2 3と同一である。

【図13】配列番号: 7でコードされるS V V V P 1タンパク質のアミノ酸配列(配列番号: 8)を表す。配列番号: 8で提示される配列は、配列番号: 2のアミノ酸3 8 3 ~ 6 4 1と同一である。

【図14】S V Vの2 Aコード領域のヌクレオチド配列(配列番号: 9)を表す。この配列は配列番号: 1のヌクレオチド1 9 2 4 ~ 1 9 6 5と同一である。

【図15】配列番号: 9でコードされるS V V 2 Aタンパク質のアミノ酸配列(配列番号: 10)を表す。配列番号: 10で提示される配列は、配列番号: 2のアミノ酸6 4 2

10

20

30

40

50

～ 6 5 5 と同一である。

【図 1 6】S V V の 2 B コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：1 1）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 1 9 6 6 ～ 2 3 4 9 と同一である。

【図 1 7】配列番号：1 1 でコードされる S V V 2 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：1 2）を表す。配列番号：1 2 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 6 5 6 ～ 7 8 3 と同一である。

【図 1 8】S V V の 2 C コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：1 3）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 2 3 5 0 ～ 3 3 1 5 と同一である。

【図 1 9】配列番号：1 3 でコードされる S V V 2 C タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：1 4）を表す。配列番号：1 4 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 7 8 4 ～ 1 1 0 5 と同一である。

【図 2 0】S V V の 3 A コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：1 5）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 3 3 1 6 ～ 3 5 8 5 と同一である。

【図 2 1】配列番号：1 5 でコードされる S V V 3 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：1 6）を表す。配列番号：1 6 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 1 1 0 6 ～ 1 1 9 5 同一である。

【図 2 2】S V V の 3 B コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：1 7）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 3 5 8 6 ～ 3 6 5 1 と同一である。

【図 2 3】配列番号：1 7 でコードされる S V V 3 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：1 8）を表す。配列番号：1 8 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 1 1 9 6 ～ 1 2 1 7 と同一である。

【図 2 4】S V V の 3 C コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：1 9）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 3 6 5 2 ～ 4 2 8 4 と同一である。

【図 2 5】配列番号：1 9 でコードされる S V V 3 C タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：2 0）を表す。配列番号：2 0 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 1 2 1 8 ～ 1 4 2 8 と同一である。

【図 2 6】S V V の 3 D コード領域のヌクレオチド配列（配列番号：2 1）を表す。この配列は配列番号：1 のヌクレオチド 4 2 8 5 ～ 5 2 7 3 と同一である。

【図 2 7】配列番号：2 1 でコードされる S V V 3 D タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：2 2）を表す。配列番号：2 2 で提示される配列は、配列番号：2 のアミノ酸 1 4 2 9 ～ 1 8 9 0 と同一である。

【図 2 8 A - H】S V V 配列番号：2 と、カルジオウイルス属の多様なメンバー、例えば脳心筋炎ウイルス（E M C V、脳心筋炎ウイルス種）、タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（T M E V、サイロウイルス種）、ラット T M E V 様作用物質（T L V、サイロウイルス種）及びヴィリュイスクヒト脳脊髄炎ウイルス（V H E V、サイロウイルス種）との間の配列整列化を表す。多様なカルジオウイルスの特定の配列は、配列番号 S：2 3（E M C V - R）、2 4（E M C V - P V 2 1）、2 5（E M C V - B）、2 6（E M C V - D a）、2 7（E M C V - D b）、2 8（E M C V - P V 2）、2 9（E M C V - M e n g o）、3 0（T M E V / D A）、3 1（T M E V / G D V I I）、3 2（T M E V / B e A n 8 3 8 6）、3 3（T L V - N G S 9 1 0）及び 3 4（V H E V / S i b e r i a - 5 5）に表されている。図 2 8 の位置の数字は、配列リストの数字付けに対応していない。符号「/」は、ポリタンパク質が開裂されて最終的な機能性産物になる開裂位置を示す。例えば、位置 1 と 1 5 7 との整列化は 1 A（V P 4）領域においてである。位置間の整列化は以下である：1 5 9 と 4 2 8 は 1 B（V P 2）領域においてであり；4 3 0 と 6 6 8 は 1 C（V P 3）領域においてであり；6 7 0 と 9 6 7 は 1 D（V P 1）領域においてであり；9 6 9 と 1 1 1 1 は 2 A 領域においてであり；1 1 1 2 と 1 2 7 6 は 2 B 領域においてであり；1 2 7 8 と 1 6 0 9 は 2 C 領域においてであり；1 6 1 1 と 1 7 0 0 は 3 A 領域においてであり；1 7 0 2 と 1 7 2 3 は 3 B 領域においてであり；1 7 2 5 と 1 9 4 6 は 3 C 領域においてであり；1 9 4 8 と 2 4 1 0 は 3 D 領域においてである。整列化は、潜在的な保護の領域及びウイルス配列間の類似性も示し、標準配列分析プログラム

10

20

30

40

50

で決定することができる。整列化は、BioEdit 5.0.9及びClustal W 1.81を使用して生成された。

【図29】配列番号：2に関するSVVの最終ポリペプチド産物を提示する。幾つかの保存モチーフが太字になり下線を付けられている：2A/2B「開裂」(NPGP(配列番号：111))；2C ATP-結合(GxxGxGKS/T(配列番号：112)及びhyhyhyxxD)；3B(VPg)/RNA結合残基(Y)；3C(pro)活性残基(H、C、H)；3D(pol)モチーフ(KDEL/IR(配列番号：113)、PSG、YGDD(配列番号：114)、FLKR(配列番号：115))。

【図30】SVVとピコルナウイルスとの統計学的関連性を決定するため配列番号S：1及び2を用いた配列分析に使用されたピコルナウイルス種を提示する(実施例4、パートIを参照すること)。

【図31】VP2配列分析の観点からSVV(配列番号：4)とピコルナウイルスとの統計学的関連性を示す。この表はブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図32】SVV(配列番号：6)と他のピコルナウイルスとの間のVP3のブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図33】SVV(配列番号：8)と他のピコルナウイルスとの間のVP1のブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図34】SVV(すなわち、部分P1-配列番号：2のアミノ酸2~641)と他のピコルナウイルスとの間のP1(すなわち、1A、1B、1C及び1D)のブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図35】SVV(配列番号：14)と他のピコルナウイルスとの間の2Cのブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図36】SVV(配列番号：20)と他のピコルナウイルスとの間の3C(pro)のブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図37】SVV(配列番号：22)と他のピコルナウイルスとの間の3D(pol)のブートストラップ隣接連結ツリーを示す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図38】SVV(配列番号：4)と他のピコルナウイルスとの間のVP2の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図39】SVV(配列番号：6)と他のピコルナウイルスとの間のVP3の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図40】SVV(配列番号：8)と他のピコルナウイルスとの間のVP1の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図41】SVV(部分カプシド又はP1-配列番号：2のアミノ酸2~641)と他のピコルナウイルスとの間のP1の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図42】SVV(配列番号：14)と他のピコルナウイルスとの間の2Cの実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図43】SVV(配列番号：20)と他のピコルナウイルスとの間の3C(pro)の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図44】SVV(配列番号：22)と他のピコルナウイルスとの間の3D(pol)の実際のアミノ酸同一率を表す(実施例4、パートIを参照すること)。

【図45】SDS-PAGEにより分析されるSVVのVP2(約36kDa)、VP1(約31kDa)及びVP3(約7kDa)タンパク質を示す。精製されたSVVをSDS-PAGEに付し、タンパク質を銀染色により可視化した。レーン「MWt」は、分子量マーカーであり、レーン「SVV」は、SVVの構造タンパク質を含む。3つの分子量マーカーの大きさ及びウイルスタンパク質の名称も提示されている。

【図46A-B】全身投与後の血液中及び腫瘍中のSVVの量を示す(実施例7)。H436腫瘍担持ヌードマウスを、SVVの 1×10^{12} vp/kgの用量で尾静脈注射により処置した。マウスを、注射の0、1、3、6、24、48、72時間後、及び7日後に出血さ

10

20

30

40

50

せ、収集した直後に血液から血漿を分離し、感染培地で希釈し、P E R . C 6 細胞を感染するために使用した。腫瘍を、注射の 6、24、48、72 時間後及び 7 日後に採取した。腫瘍を小型の切片に切断し、1 mL の培地に懸濁し、C V L を作製した。

【図 4 6 C - D】S V V インビボクリアランスに関連するデータを表す。この図は、S V V が、静脈内アデノウイルスの同様の用量と比較して著しく長い血中残留時間を示し（実施例 7）、したがって S V V は、インビボでアデノウイルスよりも遅いクリアランス率を有する。単回静脈内投与の後、S V V は血液中に 6 時間まで存在し続け（図 4 6 C；図 4 6 C は、図 4 6 D と比較する目的で、図 4 6 A の複製である）、一方、アデノウイルスは、約 1 時間で血液から排除又は枯渇される（図 4 6 D）。

【図 4 7】H 4 4 6 異種移植片の免疫組織化学、並びにマトキシリン及びエオシン染色を示す（実施例 7）。H 4 3 6 腫瘍担持ヌードマウスを、ハンクス平衡塩類溶液（H B S S）によるか又は S V V の 1×10^{12} vp/kg の用量で尾静脈注射により処置した。マウスを注射の 3 日後に殺処理し、腫瘍を収集した。腫瘍細胞中のウイルスタンパク質を、S V V 特異性マウス抗体を使用して免疫組織化学により可視化する。（上側のパネル）。H B S S 又は S V V 処置マウスから収集した H 4 4 6 腫瘍細胞の一般的な形態を H & E 染色で染色した（下側のパネル）。

【図 4 8】初代ヒト肝細胞における S V V 仲介細胞毒性を示す（実施例 9）。コラーゲン被覆 12 ウェルプレートで平板培養した初代ヒト肝細胞を、S V V により細胞 1 個あたり 1、10、100 及び 1000 個の粒子（ppc）で感染させた。感染の 3 日後、細胞関連乳酸デヒドロゲナーゼ（L D H）及び培養上澄み中の L D H を別々に測定した。細胞毒性の率は、最大細胞 L D H + 上澄み L D H に対する上澄み中の L D H 単位の割合として決定した。

【図 4 9】選択した細胞株における S V V によるウイルス産生を示す。S V V の複製能力を評価するために、選択された正常細胞及び腫瘍細胞を S V V により細胞 1 個あたり 1 個のウイルス粒子（ppc）で感染させた（実施例 9）。72 時間後、細胞を採取し、C V L を P E R . C 6 細胞で力価についてアッセイした。それぞれの細胞株では、S V V 複製の効率を 1 ミリリットルあたりのブラック形成単位（pfu/ml）として表した。

【図 5 0】体重によるヌードマウス及び C D 1 マウスにおける毒性を示す（実施例 10）。それぞれの処置群におけるマウスの平均体重を、ウイルス投与後の異なる日数で測定した。マウスには、1 日目に尾静脈に単回用量の S V V 又は P B S を注射した。

【図 5 1】H 4 4 6 異種移植モデルでの効力を示す。H 4 4 6 腫瘍をヌードマウスに確立し、マウスを群に分け（ $n = 10$ ）、H B S S か又は 6 つの異なる用量の S V V のいずれかで尾静脈注射により処置する（実施例 11）。研究の 20 日目に、大型の腫瘍（平均腫瘍量 = 2000 mm^3 ）を担持する H B S S 群の 5 匹のマウスに、 1×10^{11} vp/kg を注射した（矢印で示す）。データを平均腫瘍量 + 標準偏差（S D）として表す。

【図 5 2】S V V で未処置又は処置された H 4 4 6 異種移植ヌードマウスの写真を示す（実施例 11）。S V V の効力は、既に確立している大型の腫瘍の 100% を完全に消滅させたという点において、非常に強力である。S V V 処置マウスは、注射後少なくとも 200 日間は臨床症状も、腫瘍の再発も示していない。

【図 5 3】S V V 腫瘍特異性及びインビボでの効力に関するデータを表す（実施例 11）。グラフは、H 4 4 6 ヒト小型細胞肺癌（S C L C）腫瘍細胞（上側グラフ）又は正常なヒト H 4 6 0 細胞（下側グラフ）とのインキュベーションの後の細胞生存を示す。S V V は、細胞 1 個あたりおよそ 10^{-3} 個の粒子の EC_{50} で腫瘍細胞を特異的に死滅させた。対照的に、正常なヒト細胞は S V V のいずれの濃度でも死滅しなかった。

【図 5 4】S V V の全ゲノムを含む代表的なプラスミドを示す（実施例 15）。S V V 配列の上流のベクターにおける T7 プロモーターの存在は、S V V 配列のインビトロ転写を可能にし、それにより S V V R N A 分子を生成することができる。

【図 5 5】完全長及び機能ゲノム S V V プラスミドの構築、続く S V V ウイルス産生の概略図を示す（実施例 16）。機能ゲノム S V V クローンを得るために、S V V の全ゲノムを T7 プロモーターによりベクターにクローン化することができる。これは、ウイルスの

10

20

30

40

50

cDNAクローンを作製し、それらを配列決定し、隣接片を一つのプラスミドにクローニングして、「pSVV」と示されるプラスミドをもたらすことによって達成することができる。次にSVVの完全ゲノムを有するプラスミドを逆転写して、SVV RNAを生成することができる。次にSVV RNAを許容性哺乳類細胞に形質移入し、次にSVVウイルス粒子を回収し、精製する。

【図56】SVVカプシドのコード配列（すなわち、1A～1Dのコード領域）を含むベクター（「pSVVカプシド」）を構築する概略図を示す（実施例16）次にpSVVカプシドを使用して、SVVカプシド突然変異体のライブラリーを生成することができる。

【図57】SVVカプシド突然変異体のライブラリーを生成するためにSVVカプシドを突然変異させる一つの方法を示す（実施例16）。この図は、プラスミドのランダム部位へのオリゴヌクレオチド配列の挿入を示す。オリゴヌクレオチドは、ランダムオリゴヌクレオチド、既知の配列を有するオリゴヌクレオチド、又はエピトープタグをコードするオリゴヌクレオチドであることができる。この図において、制限酵素CviJIは、pSVVカプシドDNAをランダムに開裂する。単一部位で切断された直線化pSVVカプシドDNAを単離し、ゲルで精製し、オリゴヌクレオチドと連結する。

【図58】カプシドコード領域に配列突然変異体を含む完全長SVV突然変異体のライブラリーを生成するスキームを表す（実施例16）。例えば、pSVVカプシド突然変異体のライブラリー（例えば、図57で示されているスキームに従って生成された）からのカプシドコード領域を、制限消化により単離し、ゲル精製する。完全長SVV配列を含むベクターも消費され、それによりカプシドコード領域が切り出される。次にpSVVカプシド突然変異体のライブラリーからのカプシドコード領域を、野生型カプシド配列を欠いているpSVVベクターに連結し、それによって、カプシドコード領域に複数の突然変異体を有する完全長SVV突然変異体（「pSVVFL」ベクター）のライブラリーを生成する。

【図59】カプシド突然変異体のライブラリーを含むSVVウイルス粒子を産生する一般的な方法を表す（実施例16）。pSVVFLベクターを逆転写してSVV RNAを生成する。SVV RNAを許容性細胞に形質移入し、SVV突然変異ウイルス粒子を産生する。ウイルス粒子は細胞を溶解し、複数のカプシド突然変異体を含むSVVウイルス粒子の個体群「SVVカプシドライブラリー」を単離する。

【図60】図60は、腫瘍細胞を特異的に感染することができるが、非腫瘍細胞を感染することができないSVVカプシド突然変異体をスクリーニングする一般的な方法を示す。SVVカプシドライブラリーを、目的の腫瘍細胞株又は組織と共にインキュベートする。最初のインキュベーション時間の後、細胞を洗浄し、それにより、細胞に進入できなかったSVVウイルス粒子を排除する。次に、ウイルス溶解産物が観察されるまで、細胞を培養に維持する。次に培養上澄みを収集して、腫瘍細胞を細胞溶解的に感染することができたSVVカプシド変異体を単離する。次にこれらのウイルスを、逆スクリーニングする前に、既知の許容性細胞株に感染させることによって増殖することができる。逆スクリーニングは、腫瘍細胞に感染することができたSVVカプシド突然変異ウイルスと、正常な細胞をインキュベートすることによって実施される。上澄み中で非結合のままでいるウイルスのみを収集し、それによって、腫瘍特異性を有する突然変異SVVウイルスを単離する。このプロセスを繰り返して、SVV腫瘍特異性ウイルスの単離を更に精密化することができる。

【図61】ウイルス変異体が細胞株に結合及び/又は感染するかを試験する伝統的な方法を示す。伝統的な方法は、細胞株を増殖させるには多くの場合非効率な方法、すなわちフラスコを必要とし、それによって多数の異なる細胞株に関するウイルス突然変異体のライブラリーをマスキングすることが煩わしくなる。

【図62】異なる細胞株に特異的に感染する能力を有するウイルス突然変異体をスクリーニングする本発明のハイスループット方法を示す（実施例16）。この図では、多数の異なる腫瘍細胞株を384ウエルプレートで増殖させる。それぞれのウエルに、ウイルスの試料を加える（例えば、SVVカプシドライブラリーの試料）。細胞変性効果を示すこれ

10

20

30

40

50

らのウエルから培地を回収し、これによって、培地中の任意のウイルスを、フラスコ中又は大型組織培養プレート中の許容細胞株（例えば、SVVでは、H446又はPER.C6）に感染させることによって増幅することができる。ウイルスを増殖させ、それによりRNAを単離し、配列分析して、カプシドのオリゴヌクレオチド挿入突然変異誘発により挿入されたコードペプチド配列を決定することができる。次にペプチドそれ自体を試験して、腫瘍細胞型に特異的に結合できるかを決定することができる。

【図63】別のハイスループットスクリーニングの概略図を示す（実施例16）。腫瘍及び正常細胞株をマルチウエルプレートで増殖させる。ウイルスをそれぞれのウエルに加え、細胞がウイルス仲介細胞溶解により死滅するかを試験する。それぞれのウエルで吸光度を読み取ることによって、細胞変性効果を素速く評価することができる。細胞変性効果を示すウエルからのウイルスを増殖させ、更に、インビトロモデル（腫瘍及び正常細胞株について再試験する）及びインビボモデル（ウイルスが、マウスに外植した腫瘍を死滅できるかを試験する）で試験する。

【図64】新たな腫瘍特異的親和性を有するSVVカプシド突然変異体（表れる順番でそれぞれ配列番号S：45～48）を分析して、腫瘍選択的ペプチドを生成することができることを示す。腫瘍細胞の特異的感染を可能にするこれらのSVVカプシド突然変異体を配列決定して、オリゴヌクレオチド挿入によりコードされるペプチドを決定する。それによってアミノ酸コンセンサス配列を、成功したカプシド突然変異体から決定することができる。次にコンセンサス配列を有するペプチドを試験して、これらが目的の腫瘍細胞型に特異的に結合できるかを決定することができる。次に腫瘍選択的ペプチドを毒素又は薬剤に結合して、腫瘍特異性標的ビヒクルとして役立てることができる。

【図65】SVVカプシドライブラリーを最初にインビボで試験できることを示す。マウス（正常、胸腺欠損、ヌード、CD-1トランスジェニックなどを含む）を、特定の腫瘍で外植することができる。次にこれらのマウスに、SVVカプシドライブラリーのようなSVV誘導体ライブラリーを注射する。特定の時点で、腫瘍細胞をマウスから回収し、それにより、腫瘍の排除を示すマウスにおいて、ウイルスを最初の腫瘍試料から単離し、許容細胞で増殖させる。

【図66】本発明のSVV誘導体の臨床試験プログラムを示す。

【図67】カプシドにおいてエピトープタグをコードする（新たな腫瘍親和性を有する）SVV誘導体を、多様な目的に使用できることを示す。これらをスクリーニング試薬として使用して、エピトープの存在をアッセイすることによって特定の腫瘍細胞が組織試料に存在するかを検出することができる。あるいは、毒素又は他の治療薬をエピトープタグに結合し、次にウイルスを患者に投与することができる。更に、SVVの野生型又は誘導体を照射又は不活性化することができ、それによりウイルス粒子それ自体が治療薬剤として使用される。ウイルス粒子は、アポトーシス誘発ペプチドの存在により細胞アポトーシスを誘発するか、又は粒子に毒素又は他の何らかの治療薬を結合させて、それによりウイルスを特異的な標的送達装置として使用することができる。

【図68】ピコルナウイルスの基本的な生活環を示す。

【図69】他のピコルナウイルスと比較したSVVのポリペプチドの長さの比較を示す。

【図70】ピコルナウイルス2A様NPG/Pタンパク質のアミノ酸比較（表れる順番でそれぞれ配列番号S：49～110）を提示する。SVVの配列は、配列番号：2の残基635～656で提示されている。

【図71】EMCV-Rのアミノ酸配列（配列番号：23）を提示する。

【図72】EMCV-PV21（受入番号CAA52361）のアミノ酸配列（配列番号：24）を提示する。

【図73】EMCV-B（受入番号P17593）のアミノ酸配列（配列番号：25）を提示する。

【図74】EMCV-Da（受入番号P17593）のアミノ酸配列（配列番号：26）を提示する。

【図75】EMCV-Dbのアミノ酸配列（配列番号：27）を提示する。

10

20

30

40

50

【図 7 6】E M C V - P V 2 (受入番号 C A A 6 0 7 7 6) のアミノ酸配列 (配列番号 : 2 8) を提示する。

【図 7 7】E M C V - m e n g o (受入番号 A A A 4 6 5 4 7) のアミノ酸配列 (配列番号 : 2 9) を提示する。

【図 7 8】T M E V / D A (受入番号 A A A 4 7 9 2 8) のアミノ酸配列 (配列番号 : 3 0) を提示する。

【図 7 9】T M E V / G D V I I (受入番号 A A A 4 7 9 2 9) のアミノ酸配列 (配列番号 : 3 1) を提示する。

【図 8 0】T M E V / B e A n 8 3 8 6 (受入番号 A A A 4 7 9 3 0) のアミノ酸配列 (配列番号 : 3 2) を提示する。

【図 8 1】T L V - N G S 9 1 0 (受入番号 B A C 5 8 0 3 5) のアミノ酸配列 (配列番号 : 3 3) を提示する。

【図 8 2】V H E V / S i b e r i a - 5 5 (受入番号 A A A 4 7 9 3 1) のアミノ酸配列 (配列番号 : 3 4) を提示する。

【図 8 3 A - H】S V V (配列番号 : 1 6 8) の完全長ゲノム配列及びコードされたポリタンパク質アミノ酸配列 (配列番号 : 1 6 9) を表し、この完全長ゲノム配列は、A T C C 特許寄託番号 P T A - 5 3 4 3 を有する S V V 分離株から増殖された S V V ウイルスから得た。S V V ゲノム配列の特定の特徴、例えばポリタンパク質配列から開裂したタンパク質の特定のコード領域がここで記載されている。

【図 8 4 A - D】S V V (配列番号 : 1 6 8) の完全長ゲノム配列を表す。この配列は、A T C C 特許寄託番号 P T A - 5 3 4 3 を有する S V V 分離株から増殖された S V V から得た。

【図 8 5 A - B】配列番号 : 1 6 8 のヌクレオチド 6 6 7 ~ 7 2 0 9 でコードされた S V V の完全長ポリタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 : 1 6 9) を表す。

【図 8 6】配列番号 : 1 6 8 及び 1 6 9 の S V V の完全長ゲノム及びポリタンパク質配列に関する S V V の統計学的分析又は疫学を提供する。S V V は独特のウイルスであり、系統学的にはカルジオウイルスに類似しているが、異なるツリーである。S V V 様ピコルナウイルスは、S V V と S V V 様ピコルナウイルスの間に高レベルの配列同一性があるので (図 8 7 ~ 8 9 を参照すること) 、及び S V V 様ピコルナウイルスに対して発生された抗体の S V V に結合する能力のために (その逆も同様である) (実施例 4 パート I I I 、血清研究を参照すること) 、S V V と同じツリー又は属である可能性が最も高い。

【図 8 7 A - D】P 1 構造領域及び 2 A の地域で S V V と幾つかの S V V 様ピコルナウイルスとの間の核酸配列の比較を示す。特に、比較は、V P 2 (部分) - V P 3 - V P 1 - 2 A (部分) 領域においてである。提示されている S V V 配列は、配列番号 : 1 7 0 であり、単離 I A 8 9 - 4 7 7 5 2 の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 1 であり ; 単離 C A 1 3 1 3 9 5 の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 2 であり ; 単離 N C 8 8 - 2 3 6 2 6 の配列は、配列番号 : 1 7 3 であり ; 単離 M N 8 8 - 3 6 6 9 5 の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 4 であり ; 単離 N J 9 0 - 1 0 3 2 4 の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 5 であり ; 単離 I L 9 2 - 4 8 9 6 3 の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 6 であり ; 単離 L A 1 2 7 8 (9 7 - 1 2 7 8) の提示されている配列は、配列番号 : 1 7 7 であり ; 提示されているコンセンサス配列は、配列番号 : 1 7 8 である。

【図 8 8】2 C コード領域 (部分) における S V V と単離 I A 9 - 4 7 7 5 2 及び C A 1 3 1 3 9 5 の核酸配列の比較を示す。提示されている S V V 配列は、配列番号 : 1 7 9 であり ; 単離 I A 8 9 - 4 7 7 5 2 の提示されている配列は、配列番号 : 1 8 0 であり ; 単離 C A 1 3 1 3 9 5 の提示されている配列は、配列番号 : 1 8 1 であり ; 提示されているコンセンサス配列は、配列番号 : 1 8 2 である。

【図 8 9 A - B】3 D ポリメラーゼコード領域 (部分) 及び 3' U T R 領域において、S V V と単離 N C 8 8 - 2 3 6 2 6 、M N 8 8 - 3 6 6 9 5 、I A 8 9 - 4 7 7 5 2 、N J 9 0 - 1 0 3 2 4 、I L 9 2 - 4 8 9 6 3 、L A 9 7 - 1 2 7 8 及び C A 1 3 1 3 9 5 との間の核酸配列の比較を示す。提示された配列は、S V V (配列番号 : 1 8 3) 、N C 8

10

20

30

40

50

8 - 2 3 6 2 6 (配列番号: 1 8 4)、MN 8 8 - 3 6 6 9 5 (配列番号: 1 8 5)、I A 8 9 - 4 7 7 5 2 (配列番号: 1 8 6)、N J 9 0 - 1 0 3 2 4 (配列番号: 1 8 7)、I L 9 2 - 4 8 9 6 3 (配列番号: 1 8 8)、L A 9 7 - 1 2 7 8 (配列番号: 1 8 9)、C A 1 3 1 3 9 5 (配列番号: 1 9 0) 及びコンセンサス配列 (配列番号: 1 9 1) である。

【図 9 0 A - E】S V V の単回用量がマウスの外植腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止するのに有効であることを示す。図 9 0 A は、S V V が外植 H 4 4 6 ヒト S C L C 腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止できることを示す ($ED_{50} = 0.0007$)。図 9 0 B は、S V V が外植 Y 7 9 ヒト網膜芽細胞腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止できることを示す ($ED_{50} = 0.0007$)。図 9 0 C は、S V V が外植 H 6 9 A R ヒト S C L C - M D R (多剤耐性) 腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止できることを示す ($ED_{50} = 0.05$)。図 9 0 D は、S V V が外植 H 1 2 9 9 ヒト H S C L C 腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止できることを示す ($ED_{50} = 4.8$)。図 9 0 E は、S V V が A / J マウス (正常な免疫適性マウス) において外植 N 1 E - 1 1 5 マウス神経芽細胞腫瘍の大きさを低減し、増殖を防止できることを示す ($ED_{50} = 0.001$)。

10

【図 9 1】S V V の配列と比較した E M C V 及び T M E V カプシド構造の分子モデルを示す。抗原予測のアルゴリズムの使用を伴う分子モデルは、ペプチド配列をポリクローナル抗体生成のために選択することを可能にする。シートは茶色で示され、ヘリックスは緑色で示され、ポリクローナル生成のために選択される 1 2 - m e r ペプチド配列は、黄色で示される。このモデルによると良好な表面露出を表すので、(V P 2 領域において) 特定の配列が選択される。

20

【図 9 2 A - D】S V V に対するポリクローナル抗体の特異性を示す。図 9 2 A は、陰性対照であり、非特異性抗マウス血清及び第 2 抗体により染色された、S V V で感染された細胞の免疫蛍光画像を表す。図 9 2 B 及び 9 2 C は、1 : 5 0 に希釈されたマウス抗 S V V 血清及び第 2 抗体 (蛍光体に結合した抗マウス I g) により染色された、S V V で感染された細胞を示す。図 9 2 D は、ポリクローナル抗 S V V 抗体をウイルス結合アッセイに使用できることを示し、S V V の内部移行を防止するために細胞を氷の上に置いたので、画像は、細胞の輪郭の周り S V V が集中している免疫蛍光画像を示す。

【図 9 3】S V V の G P 1 0 2 血清の中和アッセイの結果を示す (実施例 1 8 を参照すること)。中和力価 (ウイルスを中和する最も高い希釈を 1 0 0 % として計算) は 1 : 1 0 0 である。

30

【図 9 4】MN 8 8 - 3 6 6 9 5 に対する抗 S V V 抗血清の中和アッセイの結果を示す (実施例 1 8 を参照すること)。中和力価は 1 : 5 6 0 である。

【図 9 5 A - B】隣接連結ツリーを示す。これらのツリーは、P H Y L I P (Phylogeny Inference Package Computer Programs for Inferring Phylogenies) を使用して構築し、P 1 及び部分 2 A (図 9 5 A) の領域、並びにゲノムの 3 末端 (図 9 5 B) の領域からの配列を比較したときの、S V V と 7 個の S V V 様ピコルナウイルスとの間の関係を示す。

【 図 1 】

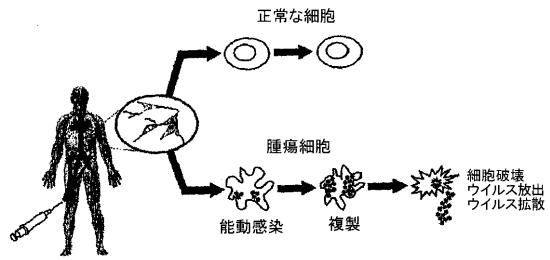


FIG. 1

【 図 2 】

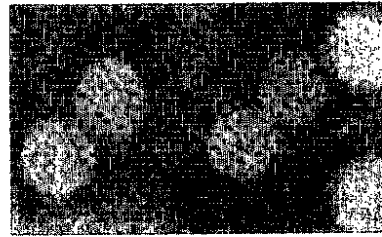


FIG. 2

【 図 3 】

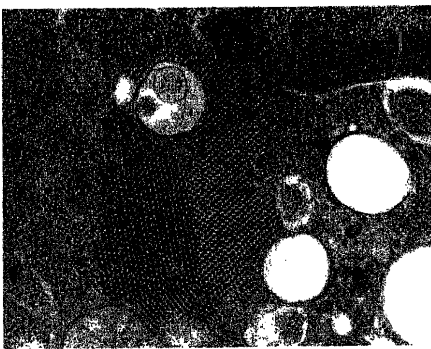


FIG. 3

【 図 4 A 】

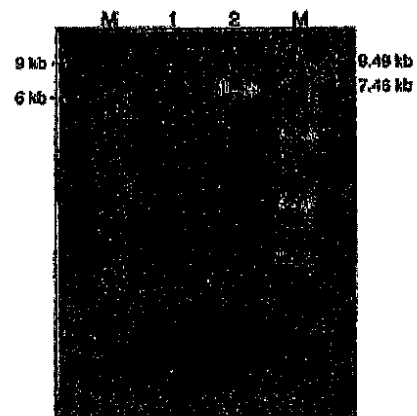


FIG. 4A

【 図 4 B 】

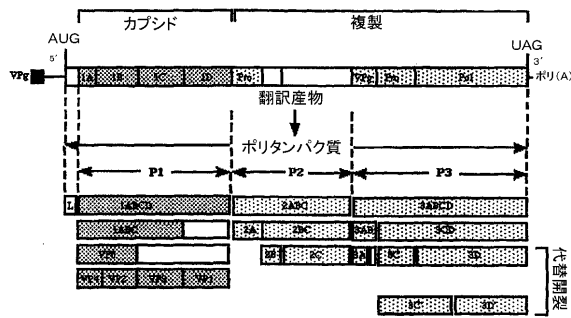


FIG. 4B

【 図 5 A 】

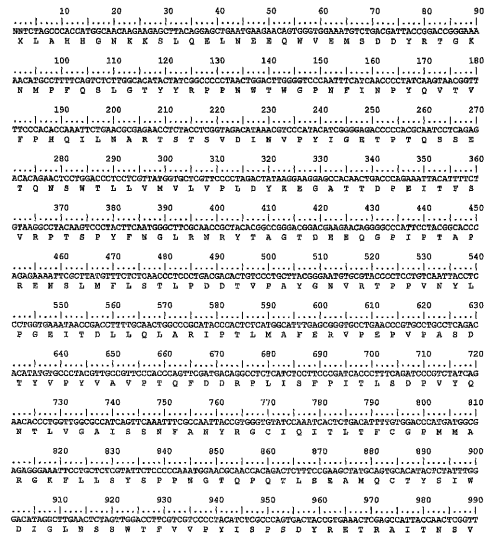


FIG. 5A

【 図 5 B 】

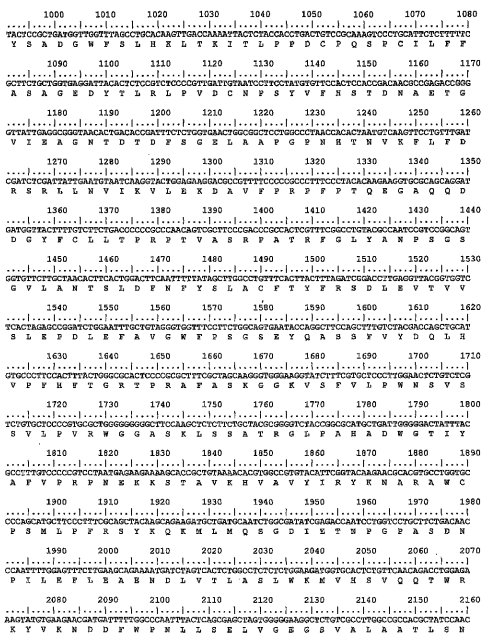


FIG. 5B

【 図 5 C 】

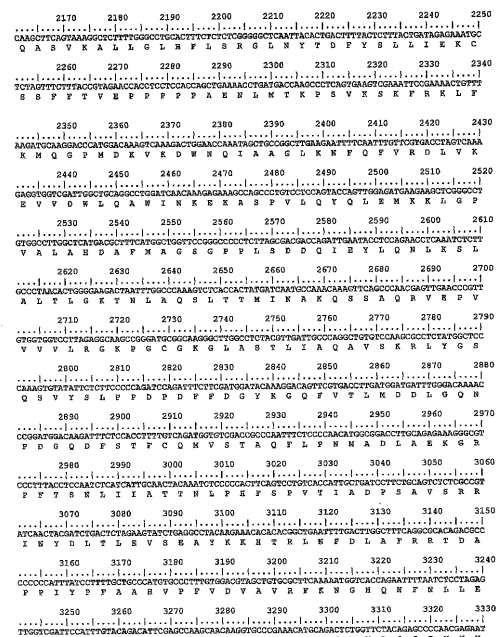


FIG. 5C

FIG. 6B

【 図 6 C 】

ACAAATCTCC CCCACTTCAG TCTGTTCACC ATTGCTGATC CTCTCGAGT CTCTCGCGGT 3060
ATCAACTACG ATCTGACTCT AGAAGTATCT GAGGCTTACA AGAACAACAC ACGGCTGAAT 3120
TTTGACTTGG CTCTCAGGCG CACAGAGGCC CCCCCATTTC ATCTTTTTCG TGCCCATGTG 3180
CCCTTTGTGG ACGTAGCTGT GCGCTTCAAA AATGCTCACC AGAATTTTAA TCTCTAGAG 3240
TTGGTCGATT CCATTGTGAC AGACATTCGA GCCAAGCAAC AAGGTGCCG AAACATGCGAG 3300
ACTCTGGTTC TACAGAGCCC CACGAGAAAT GATGACACCC CGCTGACGA GGGTTGGGT 3360
AGAGTCTCTC CCCCCGCTCG GGTGATGAG GCGCTTSTCG AACTCACTCC AGAGGCCGAC 3420
CCGGTTGGCC GTTTGGCTAT TCTTGCCRAG CTAGTCTCTG CCTAGCTGC GGTCAACCC 3480
GGTCTGATAA TCTTGGCAGT GGGACTCTAC AGGTACTTCT CTGGCTCTGA TGCAGACCAA 3540
GARGAAGCAG AAGTGAGGG ATCTGTCAAG GCACCCAGGA GCGAAATGC TTATGACGGC 3600
CCGAGAGAAA ACTCTAAGCC CCTGTGAGCA CTCTCTCTCA TGGAAATGCA ACAGCCCAAC 3660
GTGACATGG GCTTTGAGGC TGGGTGCTG AAGAAGTGG TCGTCCCAAT TAOTTTGATG 3720
GTCTCCCAACA GACTTCTGG GCTTACACAG TCCGCTCTTC TGGTAGCAG CCGAACCTTC 3780
CTAATCAATG AACATAGATG GTCCATATCC TCTGTGACCA GCTTCACAAT CCGGGTGAG 3840
GTACACACTC GCGATGAGCC CTTCCAAGC GTTCATTICA CTCACCCAGG TATTOCCAGA 3900
GATCTGATGA TGTACGTCT CCGACCGGCG AATCTTTTCC CTAAACAATCT AGACAAGTTT 3960
GGACTTGACC AGATGCCGCG ACGCAATCC CGTGTGGTG GGGTTTGTTC CAGTTACGGA 4020
AACTCTCTCT TCTCTGGAAA TTCTCTCGGA TTGTCTGATT CGCTCACTTC TGAACAAGGA 4080
ACTTACGCAA GACTCTTTAG GTACAGGGTG ACGACCTACA AAGGATGGTG CGGCTCGGCC 4140
CTGGTCTGTG AGGCGGGTGG CGTCCGAGCC ATCAATGGCC TGCATTCTGC TGGCGCCGCC 4200
GGTATCGGCG CCGGACCTTA TATCTCAAAA TTAGGACTAA TCAAAACCCCT GAACAACCTC 4260
GGTGAACCTT TGGCCACAAAT GCAAGAGCTG ATGACTGAAT TAGAGCTGG AATCACCGTA 4320
CATGTACCCC GGAATTCGAA ATTGAGMAAS ACGACCGCAC ACGCGGGTGA CAACCGGAG 4380
TTTGAGCCTG CTGTGTTGTC AAAATTGAT CCAGACTGA ACAAGGATGT TGACTTGGAT 4440
GAAGTAATTT GGTCTAACA CACTGCCAAT GTCCCTTACC AACTCTCTTT GTTCTACACA 4500

FIG. 6C

【 図 6 D 】

TACATGTGAG AGTAGGCTCA TCGAGTCTTC TCCTCTTGG GGAAGACAAA TGACATTCTG 4560
ACCGTCAAG AAGCAATTCT GGGCATCCCG GGACTAGACC CCATGGATCC CCACACAGCT 4620
CGGGTCTGCG CTTACGCCAT CACGGGCTTT GAGCTACTG ATCTCGTCCA TTTTGTGAAC 4680
GGTACAGTAG ATCGGGGCGT GGCTGTACAA ATCCAGAAAT TCTTAGACGG TGACTACTCT 4740
GACCATGTCT TCCAAAGCTT TCTGAAGAT GAGATCAGAC CCTCAGAGAA AGTCCGAGCG 4800
GGAAAAACCC GCATTGTTGA TGTGCCCTCC CTGGCGATT GCATTGTGG GAGAATGTTG 4860
CTTGGGCGCT TTGCTGCCAA GTTTCATCC CATCTGAGT TTCTCCTCGG CTCTGCTATC 4920
GGGTCTGACC CTGATTTTT CTGGACCGTC ATAGGGGCTC AACTCGAGGG GAGAAGAAC 4980
ACGTATGAGG TGGACTACAG TCGCTTTGAC TCTTCACAG GCACTGGCTC CTTCAGGCT 5040
CTCATCTCTC ACTTTTTTAC CGTGACAAAT GGTTTTAGCC CTGGCGTGG ACGGATCTC 5100
AGATCCTGCG CTGTCTGGT GCGCGTTAC GCGAGCGCT GCATCAAGAT TACCGTGGC 5160
CTCCCCCG GTTGTGCGC GAOCAGCGCT CTGAACAG TGTCTAACAA TGTGATCATC 5220
AGGACTGCTC TGGACTTGC TTACAAGGAA TTTGATGAT ACACGGTTGA TATCATCGC 5280
TACGGTAGCG ACCTTCTGAT TGGCAGCAAT TACGATCTGG ACTTCAATGA GGTGAAGCA 5340
CGCGCTGCCA AGTTGGGGTA TAAGATGACT CCTGCCAACA AGGGTCTGT CTTCCTCCG 5400
ACTTCTCTC TTTCGATGC TGTTTTTCTA AAGCGCAAT TGGTCAAAA CAACGAGCG 5460
TTATACAAAC CAGTTATGGA TTTAAAGAT TTGGAAGCA TGCTCTCTTA CTTCAAACA 5520
GGAACACTAC TCGAAGAGCT GCAATCTGT TCTATGTTG CTCACATTC GGTGAAGAA 5580
GAATATGATA GATTGATGA CCCCCTCGCT GACTACGGTG CCGTACCGAG TCACGAGTAC 5640
CTGCGGCAA GATGAGGGC CTGTCTGAC TGACCCAGAT AGCCCAAGC GCTTCGGTG 5700
TGCCGCGAT TCTGGGAGAA CTCAGTCGGA ACAGAAAAA AAAAAAAA AA 5752

(SEQ ID NO:1)

FIG. 6D

【 図 7 A 】

XLAHGNKKS LQELNEENW EMSDDYRKC NMPFQSLTY YRFPNWTWG NFINPYQTV 60
FPBQILNART STSVINVPY IGBTPTQSE TQNSWELLVM VLVLOYKEG ATTDEITFS 120
VRPTSPYFNG LRNRITAGTD EEQSPITPA RENSLMPLST LDDOTVPAY NVRTPPWNYL 180
PGEITDLQL ARIPTLMAFE RVPEVPASD TVYFVAVPT QFDORPLISF PITLSDPYQ 240
NTLVGAISN FANYRGCIQ TLFPGCPMA RGFLLSYF PWTQPFQTL EAMQCTYSIN 300
DIGLNSSWTF VVPISPSDY RETRAITNSV YSADGWFSLB KLTKITLFPD CPQSPCILFF 360
ASAGEDYTLR LRVDCNPSYV PRSTDNASTG VIRAGNTDTD FSGELAAPGF NRTAVKLYD 420
RSRLNVIKV LEKDAVFREF PPTQGAQDD DGYFCLLTPR PTVASRPAIR FGLYNPSSG 480
GVLANTSLOF NFYSLACTFY PRSDLEVTVV SLEPDLFVW GWFPSSEYQ ASSFYDQLH 540
VPFHFTGRFP RAFPASKGKV SFVLFWNSV SVLFWRGGG SKLSNATRGL PAHADWGTIV 600
AFVPRPNEKK STAVKRVAVY IRYKRAAWC FSLPFRSYK QKMLMQSGDI ETNPGFASDN 660
PILEFLEARN DLVTLASLWK MYBSVQQTWR KYKNNDDIWP NLLSELVGG SVALAATLSN 720
QASVKALLGL HFLSRGLANT DFYSLLEKC SSPFTVEPFP PPAENLMIKP SVSKFRKLF 780
KMQGHDKVK DWNQJLAAGL NFQFVRDLVK EYVNLQAWI NKEKASPVLO YOLEMKKLG 840
VALAHDAFMA GSGPFLSDQ IEYLQNLKSL ALTLGKTNLA QSLTMINNK QSSAQRVFPV 900
VVLRGKPGC GKGSLATLIA QAVSKLYGS QSVYSLPDP DFFDGYKGF VTLMDDLQGN 960
PDGQDFSTFC QMVSTAQFLF NSADLAEKGR PPTSNLIAT TNLPHFSPTV IADPSAVSR 1020
INYDLTEVS EAYKEHRLM FDLAFRTDA PPIYFPAHV PFVDVAVRFK NGHQNFLLE 1080
LVDSICTDIR AKQQGARNMQ TIVLQSPNEN DDTFVDEALG RVLSPAAYDE ALVDLTPEAD 1140
PVGRJAILAK LGLALAAVTF GLIILAVGLY RYFSGSDAQ BRTSESGSVK APRSENAYDG 1200

FIG. 7A

【 図 7 B 】

PKNSKPFPA LSLMEMQPN VDMGFRAVA KRVVVPITFM VPNRPSGLTQ SALLVTGRT 1260
LINEHTWNP SWTSFTLRGE VHTRDEFPQT VHTHGIPT DIAMVRLGEG NSFPNLDKF 1320
GLDQMPARNS RVGVSSSYG NFFFSGNFLG FVDSVTSEQC TYARLEIRYV TTYKWCSSA 1380
LVCEAGVRR IIGLESAGAA GIGAGTYISK LGLIKALKHL GEPLATMQGL MTELEPGITV 1440
EVPRKSKLAK TTAHAVIKPE FEPAVLKFP RLNKDVLDD EVINSKHTAN VPYQPLFYT 1500
YMSEYAHNVF SFLEKNDIL TVKEALIGIP GLDPMDPHTA PGLPYAINGL RRTDLVDVFN 1560
GTVDAAALAV IQKFLDGDYS DHVFQFLKD BIRFSKVRK GKTRIVDVFS LAHCIVGRML 1620
LGRFAAKFQS HPGFLGSAI GSDPDVFWTV IGAQLGGRKN TYDVVYSADF SSHGTSFEA 1680
LISHFTTVVD GPSPALGPYL RSLAVSBVHY GERRIKITGS LPSCCAATSL LNTVLNVII 1740
RTALALTYKE FEYDTVDI LA YGDOLLVTD YDLDFNEVAR RAAKLGKMT PANKGVSFPF 1800
TSSLSDAVFL KRKEVQNNDG LYKPVMDLKN LEAMLSYFKP GTLLEKLQSV SMLAQHSGK 1860
RYDRIMRHPA DYGAVFSHEY LQAKWRALFD * (SEQ ID NO:2) 1890

FIG. 7B

【 図 8 】

CTAGCCACAC ATGCCAACAA GAAGAGCTTA CAGGAGCTGA ATGAAGAACA GTGGTGGA 60
ATGCTCTGAG ATTACCGGAC CGGAAAAAC ATGCTTTTTC AGTCTCTTGG CACATACAT 120
CGGCCCCCTA ACTGGACTTG GGTCCCAAT TTCACTAACC CCTATCAAGT AACGGTTTTC 180
CCACACCAA TTCTGACCG GAGAACCTCT ACCTGGTAG ACATAAAGST CCATACATC 240
GGGAGACCC CCACGCAATC CTCAGAGACA CAGAAGCTCT GSAACCTCTT CTTATGATG 300
CTCGTTCCCC TAGACTATAA GGAAGAGACC ACAACTGACC CAGAAATTTAC ATTTCTGTG 360
AGGCTACAA GTCCCTACTT CATTGGGCTT CGCAACGCT ACACGGCCGG GACGAGCAA 420
GARCHG (SEQ ID NO:3) 426

FIG. 8

【 図 9 】

LAHHGNKSKL QELNREQWVE MSDDYRTGKN MFPQSLGTYI RFPNWTWGEN FINPYQVTVF 60
PBQILNARTS TSVDIRNVEYI GSTPPTQBSST QNSWTLIVMV LVPLDYKEGA TTDPEITPFSV 120
RPTSPFYENGL RNRYYTAGTDE EQ (SEQ ID NO:4) 142

FIG. 9

【 図 1 0 】

GGGCCCAITC CTACGGCAC CAGAGAAAT TGCCTTATGT TTCTCTCAAC OCTCCCTGAC 60
GACACTGTCC CTGCTTACGG GAATGTGCGT ACCCTCTCTG TCAATTACCT CCCTGGTGAA 120
ATAACCGACC TTTTGCAACT GGCCCGCAIA CCCACTCTCA TGGCAATTGA GCGGGTGCT 180
GAACCCGTGC CTGCTCAGA CACATATGTG CCGTACGTG CCGYTCACAC CCAGTTCGAT 240
GACAGGCTC TCACTCTCCT CCGATCACCC CTTCAGATC CCGTCTATCA GAACACCCGT 300
GTGGGGCCA TCAGTTCAAA TTTGCGCAAT TACCCTGGGT GTATCCAAAT CACTCTGACA 360
TTTTTGGAC CCATGATGC GAGAGGGAAA TTCTGTCTCT CGTATTCTCC CCCAAATGGA 420
ACCGAACCAAC AGACTCTTTC CGAAGCTATG CAGTGACAT ACTCTATTG GGCATAGGC 480
TTGAACCTCA GTTGACCTT CCGCTCCGCC TACATCTCG CCGATGACTA CCGTGAACT 540
CGAGCCATTA CCAACTCGGT TTACTCGGT GATGCTTGG TTAGCCTGCA CAAGTTGACC 600
AAATATTACT TACCACCTGA CTGTCCGAA AGTCCCTGCA TTCTCTTTT CCGTCTGTCT 660
GGTGAGGATT ACACCTCTCG TCTCCCGTT GATTCATACT CTCTCTATGT GTTCCAC 717
(SEQ ID NO:5)

FIG. 10

【 図 1 1 】

GPITAPREN SIMFLSTLPD DTVFAYGNR TFPVNYLFG ITDLLQLARI PTLMATERVP 60
EPVPASDTYV FYVAVPTQFD DRFLISFPI LSPDVYQNTL VSAISSNFAN YRGCIQITLT 120
FCGFMARK FLISYSPFNG TQPTLSEAM QCTYSINDIG LNSSWTEVP YISPSDYRET 180
RAITNSVISA DGMFSLHKLJ KTLPPDCPQ SPCILFFASA GEDYTLALPV DCPNSYVFH 239
(SEQ ID NO:6)

FIG. 11

【 図 1 5 】

KMLMQSGDIR TNEG (SEQ ID NO:10) 14

FIG. 15

【 図 1 6 】

CCTGCTCTG ACAACCAAT TTTGGAGTTT CTGAAGCAG AAAATGATCT AGTCACTCTG 60
GCCTCTCTCT GGAAGATGGT GCACCTCTGT CAACAGACCT GGAGAAGTA TGTGAAGBAC 120
GATGATTTTT GGGCCAAFTT ACTCAGCGAG CTAGTGGGGG AAGGCTCTGT CGCCTTGGCC 180
GCCACGCTAT CCACCAAGC TTCASTAAAG GCTCTTTTGG GCGTGCACCT TCTCTCTCG 240
GGGCTCAATT ACACTGACCT TTACTCTTTA CTGATAGAGA AATGCTCTAG TTTCTTTACC 300
GTAGAACCAC CTCCTCAACC AGCTGAAAC CTGATGACCA AGCCCTCAGT GAACTCGAAA 360
TTCCGAAAC TGTTAGAT GCAA (SEQ ID NO:11) 384

FIG. 16

【 図 1 7 】

PASDNPILEF LKARNDLVYL ASLNRMVHSV QQTPWKYVKN DDFWNLSE LVGEGSVALA 60
ATLSNQASVK ALLGLFLSR GLNYTDFYSL LIEKCSSPFT VEPFPFARN LMTKPSVKSK 120
FKKLF9MQ (SEQ ID NO:12) 128

FIG. 17

【 図 1 2 】

TCCACCGACA ACGCGAGAC CGGGTTATT GAGGCGGGTA ACACTGACAC CGATTCTCT 60
GGTGAACCTG CGGCTCCTGG CCTAACCCAC ACTAATGTCA AGTTCTGTG TGATCGATCT 120
CGATTATTGA ATGTAATCAA GGTACTGGAG AAGGAGCGCG TTTTCCCGCG CCCTTTCCCT 180
ACACAAGNAG GTGCGCAGCA GGATGATGGT TACTTTTGT TTCTGACCCC CCGCCACACA 240
GTGCGTTCCC GACCCGCCAC TCGTTTCGGC CTGTAGDCA ATCCGTCCGG CAGTGGTGT 300
CTTGCTAACA CTCACTGGA CTTCATTTT TATAGCTTGG OCTGTTTAC TTACTTTAGA 360
TCGGACCTTG AGGTACGGT GGTCTACTA GAGCCGATC TGGAAATTGC TGTAGGGTGG 420
TTTCTTCTG SCAGTGAATA CCAGGCTTCC AGCTTTGTCT ACGACAGCT GCATGTGCC 480
TTCCACTTTA CTGGGCCAC TCCCGCGCT TCGCTAGCA AGGGTGGAA GGTATCTTTC 540
GTGCTCCCTT GGAACCTGT CTGCTCTGT CTCGCCGTG GGTGGGGGG GGCATTCCAG 600
CTCTTCTCTG CTACGCGGGG TGTACCGCG CATGCTGATT GGGGACTAT TTAGGCTTT 660
GTCCGCCGTG CTAATGAGAA GAAAGCAC GCTGTAAAC ACGTGGCCCT GTACATTGCG 720
TACAGAAAC CAGTGGCTG GTGCCACAG ATGCTTCCCT TTCCGACTA CBAAGAG 777
(SEQ ID NO:7)

FIG. 12

【 図 1 3 】

STDNAETGVI EAGNTDTDFS GELAAPGNH TNVKFLFDR LLNVIKVLE KDAVFRPFP 60
TQEGAGQDDG YFCLLTFRPT VASRPATRFG LYANESSGV LANTSLDFNF YSLACTTTFR 120
SDLEVTIVVSL EPDLFAVGV FPGSGEYQAS SFVYDQLHVF FHTGTIFRA FASKGKVSV 180
VLEWNSVSSV LEFVWGASK LSSATFGLPA HADWGTIYAF VPRFNEKST AVNHVAVIR 240
YKNARAWPFS MLFFSTYKQ (SEQ ID NO:8) 259

FIG. 13

【 図 1 4 】

AAGATGCTGA TGCAATCTGG CGATATCGAG ACCAATCTG GT (SEQ ID NO:9) 42

FIG. 14

【 図 1 8 】

GGACCCATGG ACAAGTCAA AGACTGGAC CAATAGCTG CCGCTTGAA GAATTTCAA 60
TTTGTCTGTG ACCTASTCAA AGAGGTGGTC GATTGCTGC AGGCTCGAT CACAAAGAG 120
AAGCCAGGCC CTGTCTCCA GTACCACTTG GAGATGAAGA AGCTCGGGCC TGTGGCCTTG 180
GTCTATGAGC GTTCTATGGC TGTTTCGGG CCGCTCTTA GCGACACCA GATTGAATAC 240
CTCCAGAAC TCATATCTCT TGCCCTAACA CTGGGAGAGA CTAAATTGGC CCAAGTCTC 300
ACCCTATGA TCAATGCCAA ACAAGTTCA GCGCAACGAG TTGAACCGT TGTGTGTG 360
CTTAGAGGCA AGCGGGGATG CGGCAAGGC TTGGCTCTA CGTTGATTGC CCAGGCTGTG 420
TCCAAGCGCC TCTATGGCTC CCAAGTGA TATTCTTTC CCGCAGATCC AGATTTCTTC 480
GATGATACA AAGGACAGTT CGTGACCTTG ATGATGATT TGGGACAAA CCGGATGGA 540
CAAGATTTC CCACCTTTTG TCAGATGCTG TCGACCGCC AATTCTCTCC CACATGGCG 600
GACCTTGCG AGAAGGGCG TCCCTTTACC TCCATCTCA TCAATGCAAC TACAAATCTC 660
CCCCACTTCA GTCTGTGAC CATGCTGAT CTCTCTGCG TATCAACTAC 720
GATCTGACTC TAGAAGTATC TGAGGCTAC AAGAACACA CCGGCTGAA TTTGACTTG 780
GCTTTGAGG GCAAGAGCG CCCCCCAIT TATCCTTTTG CTGCGCATGT GCCCTTTGTG 840
GACSTAGCTG TGCGCTCAA AATGCTCAC CAGAAATTTA ATCTCTAGA GTTGTCTGAT 900
TCCATTGTA CAGACATTG AGCCAAGCAA CAGGTGCC GAAACATGCA GACTCTGCT 960
CTACAG (SEQ ID NO:13) 966

FIG. 18

【 図 1 9 】

GPMDKVDWN QIAAGLNFPQ IVRDLYKEVV DWLQAWINKE KASPVLYQL EMKKLGPVAL 60
AHDAPMAGSG PPLSDQJIEY LQNLKSLALT LKTNLAQSL TTMINAKSS AQRVEFVVV 120
LRGKCCGKG LASTLIAQAV SKLYSSQSV YLELPDPDF DSYKGFVTL MDLGGQNP 180
QDFSTFCMV SVAQFLNMA DLARKGRPT SNLLIATNL FHFSPVTIAD PEAVSRIRNY 240
DLTLEVSAY KKHTRLNFDL AFRTOAPEI YPFAHV?IV DVAVRFKNGH QNFNLLEIVD 300
SICDIZRAQ QGARNMQTLV LQ (SEQ ID NO:14) 322

FIG. 19

【 図 2 0 】

```
AGCCCCAACG AGAATGATGA CACCCCGCTC GAGGAGCGGT TGGTAGAGST TCTCTCCCC 60
GCTGCGSTCG ATGAGGCGCT TGTGCACTTC ACTCCAGAGG CCGACCCGGT TGGCCGTTTG 120
GCTATTCTTG CCAAGCTAGG TCTTGCCCTA GCTGCGGTCA CCGCTGGTCT GATAATCTTG 180
GCAGTGGGAC TCTACAGSTA CTCTCTGGC TCTGATGAG ACCAAGAGAA AACAGAAAGT 240
GAGGAGATCG TCAGGCGACC CAGGAGCGAA (SEQ ID NO:15) 270
```

FIG. 20

【 図 2 1 】

```
SPNENDTFV DEALGRVLSF AAVDEALVDL TPBADPVGRL AILAKLGIAL AAVTFGLLIL 60
AVGLYRYFSG SDADQETES EGSVKAPRSE (SEQ ID NO:16) 90
```

FIG. 21

【 図 2 2 】

```
RAFGCTPATG ACGGCCCGAA GAAAAACTCT AAGCCCGCTG GAGCACTCTC TCTCATGGAA 60
ATGCAA (SEQ ID NO:17) 66
```

FIG. 22

【 図 2 3 】

```
NAYDGPKNRS KPFGALSIHE MQ (SEQ ID NO:18) 22
```

FIG. 23

【 図 2 6 】

```
GGACTGATGA CTGAATTAGA GCGTGAATC ACCGTACATG TACCCCGGAA ATCCAAATTG 60
AGAAAGACGA CGCACACGCG GGTGTACAAA CGGAGTTTGG AGCGTGCTGT GTTGTCARAA 120
TTTGATCCCA GACTGAACAA GGATGTGAC TTGGATGAG TAATTGTGTC TAAACACACT 180
GCCAATGTCC CTTACCAACG TCTTTGTTC TACACATACA TGTCAAGATA CGCTCATCGA 240
GTCTTCTCCT TCTTGGGGAA AGACAATGAC ATCTGTAGCG TCAGAAGAGC AATTCTGGGC 300
ATCCCGGAC TAGACCCCAT GGATCCCGAC ACAGCTCCGCG GTCTGCGTTA CGCATCAAC 360
GGCCTTGCAC GTACTGATCT CGTGATTTT GTGACAGSTA CAGTAGATCG GGCGCTGGCT 420
GTACAAATCC AGAAATCTCT AGACGGTGC TACTCTGACC ATGTCTTCCA AACTTTCTCG 480
AAGATGAGA TCAGACCCCT AGAGAAAGTC CGAGCGGGAA AAACCGGCAT TGTGTATGTG 540
CGCTCCCTGG CGCAATTGCT TGTGGGCAGA ATGTTGCTTG GGCGCTTTC TGCCAAGTTT 600
CAATCCCATC CTGGCTTCTC CCTCGGCTCT GCTATCGGGT CTGACCGTGA TGTTTCTGG 660
ACCGTCAATG GCGCTCAACT CGAGGGGAGA AAGAAACAGT ATGACGTGGA CTACAGTGCC 720
TTTGACTCTT CACACGGCAC TGCTCTCTTC GAGGCTCTCA TCTCTCACTT TTTACCGGTG 780
GACATAGGTT TTAGCCCTGC GCTGGGACCG TATCTCAGAT CCGTGCGTGT CTCGSTGCAC 840
GCTTACGCGG AGCGTCGCTA CAAGATTACC GGTGGCTTCC CCGCGGCTTG TGCGCGACAC 900
AGCGTGC7GA ACACAGTGCT CAACATATG ATCATCAGGA CTGCTCTGSC ATTGACTTAC 960
AAGGAATTTG AGTATGACAC GGTTGATATC ATCGCCTAGC GTAGGACCTT TCTGGTTGCG 1020
ACGGAATTAG ATCTGGACTT CAATGAGTGG GCACGACGCG CTGCGAAGTT GGGGTATAG 1080
ATGACTCTCG CCAACAGGGG TTCTGTCTTC CTTCCGACTT CCGTCTCTTC CGATGCTGTT 1140
TTTCTAAGCG GCRAATCGT CCAAAACAC GACGCGT7AT ACAAAACAGT TATGAT77A 1200
AAGAATT7GG AAGCATGCT CTCTACTTCT AAACACAGAA CACTACTCGA GAAGTGC7AA 1260
TCGTGTTCTA TGT7GGCTCA ACRTTCTGGA AAGAAGAA7T A7GATAGATT GATGCA7CCC 1320
TTGCGTGACT ACGGTGCGGT ACGGAGTCA7 GAT7ACTTGC AGGCAAGATG GAGGCGCTTG 1380
TTGCA7CGA (SEQ ID NO:21) 1389
```

FIG. 26

【 図 2 4 】

```
CAGCCCAACG TGGACATGG CT7TAGGCT GCGTCGCTA AGAAAGTGGT COTCCCAT7 60
ACCTTCATGG TTCCCAACAG ACCTTCTGGG CT7ACACAGT CGCGTCTTCT GGTACCGGC 120
CGGACCTTCC TAA7CAATGA ACATACATGG TCCATCCCT C7TGACACAG CT7CACAT7C 180
CGCGGTGAGG TACACATCG TAT7GAGGCC TTCCAAAGCG TTCAATT7CAC TCACCAAGGT 240
ATTCCACAGG ATCTGATGAT GGTACGTCTC GGACCGGCGA ATTCTT7CCC TACAATCTA 300
GACAA7TTTG GACT7GACCA GATCGCGCA CGCACTGCC GTGTGGTTGG COTTCTG7CC 360
AGTTACGGAA ACTTCTTCTT CTCTGAAAT TTCTCGGAT TTGTTGATTG C7TCACCTCT 420
GAACAAG7AA CT7AGCAAG ACTCT7TAGG TACAGG7TGA CGACCTACAA AGATG7GTGC 480
GGCTCGGCC TGGTCTG7GA GGCGG7TGC GTCCGACGCA TCA7TGGCT GCATTCTGCT 540
GGCGCGCGCG GTATCGGCGC CGGACCTAT ATCTCAAA7 TAGAC7AAT CAAGCGCTG 600
AAACACT7CG GTGACCT7T GGCCCAATG CAA (SEQ ID NO:19) 633
```

FIG. 24

【 図 2 5 】

```
QPNVDMGFEA AVAKKVVVPI TMVFNPRSG L7QSALLV7G RTFLINEHTW SNPSWTSTFI 60
RGEV7H7RDP FQTVH7THG IPTD7MMVRL GEGNSFFNNL DKFLDQMPA RNSRVGVSS 120
SYGNFF7SGN FLGFVD7VTS EQGT7ARLFR YKV7TYKWC GSA7VCEAGG VARI7LHSA 180
GANGIGAGTY ISKLGL7RAL KHLGEPLATM Q (SEQ ID NO:20) 211
```

FIG. 25

【 図 2 7 】

```
GLMTELEPGI TVHVPRKSG RKT7AHAVYK PEPFAVL5K FDPRLNKVD LDEVINSKH7 60
ANVPYQPL7F YTYMSEYHR V7SFLGKND ILTVKEAL7G I7GLD7MDPH TAG7LP7AIN 120
GLR7DL7VDF VNG7VDAALA VQ7KFLDGD YSD7V7Q7FL KDE7R7SEKV RAG7R7VDV 180
FSLA7C7VGR M7LGRFA7K QSH7P7L7GS A7GSDP7VFN TV7GA7LEGR KNY7VDV7SA 240
FDSSH7G7SF EAL7SH7FTV DNG7SPALG Y7L7SLAV7SH AYGER7AKIT GGL7SGCA7T 300
SL7NTV7LNV I7RTALAL7Y NEFYD7VDI 7AYGDD7LVG TDYD7LFNEV ARRA7K7GYK 360
M7PAN7GSVF P7TSS7L7DAV FLR7KFVQNN DGLY7P7MDL KNLE7ML7SF KPG7L7LEK7Q 420
SVS7MLA7HSG KEEY7RLMHP FADY7AVP7SH E7LQAR7RAL 7D * (SEQ ID NO:22) 462
```

FIG. 27

【 図 2 8 A 】

```
SVV 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-1 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-2 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-3 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-4 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-5 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-6 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-7 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-8 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-9 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-10 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-11 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-12 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-13 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-14 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-15 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-16 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-17 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-18 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-19 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-20 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-21 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-22 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-23 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-24 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-25 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-26 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-27 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-28 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-29 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-30 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-31 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-32 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-33 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-34 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-35 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-36 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-37 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-38 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-39 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-40 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-41 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-42 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-43 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-44 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-45 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-46 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-47 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-48 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-49 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-50 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-51 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-52 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-53 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-54 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-55 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-56 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-57 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-58 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-59 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-60 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-61 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-62 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-63 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-64 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-65 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-66 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-67 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-68 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-69 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-70 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-71 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-72 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-73 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-74 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-75 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-76 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-77 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-78 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-79 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-80 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-81 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-82 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-83 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-84 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-85 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-86 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-87 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-88 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-89 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-91 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-92 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-93 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-94 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-95 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-96 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-97 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-98 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-99 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
SVV-100 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
```

Fig. 28A

【 図 2 8 D 】

[illegible]

Fig. 28B

Fig. 28D

```

      432      433      434      435      436      437      438      439      440      441      442      443      444      445      446      447      448      449      450      451      452      453      454      455      456      457      458      459      460      461      462      463      464      465      466      467      468      469      470      471      472      473      474      475      476      477      478      479      480      481      482      483      484      485      486      487      488      489      490      491      492      493      494      495      496      497      498      499      500      501      502      503      504      505      506      507      508      509      510      511      512      513      514      515      516      517      518      519      520      521      522      523      524      525      526      527      528      529      530      531      532      533      534      535      536      537      538      539      540      541      542      543      544      545      546      547      548      549      550      551      552      553      554      555      556      557      558      559      560      561      562      563      564      565      566      567      568      569      570      571      572      573      574      575      576      577      578      579      580      581      582      583      584      585      586      587      588      589      590      591      592      593      594      595      596      597      598      599      600      601      602      603      604      605      606      607      608      609      610      611      612      613      614      615      616      617      618      619      620      621      622      623      624      625      626      627      628      629      630      631      632      633      634      635      636      637      638      639      640      641      642      643      644      645      646      647      648      649      650      651      652      653      654      655      656      657      658      659      660      661      662      663      664      665      666      667      668      669      670      671      672      673      674      675      676      677      678      679      680      681      682      683      684      685      686      687      688      689      690      691      692      693      694      695      696      697      698      699      700      701      702      703      704      705      706      707      708      709      710      711      712      713      714      715      716      717      718      719      720      721      722      723      724      725      726      727      728      729      730      731      732      733      734      735      736      737      738      739      740      741      742      743      744      745      746      747      748      749      750      751      752      753      754      755      756      757      758      759      760      761      762      763      764      765      766      767      768      769      770      771      772      773      774      775      776      777      778      779      780      781      782      783      784      785      786      787      788      789      790      791      792      793      794      795      796      797      798      799      800      801      802      803      804      805      806      807      808      809      810      811      812      813      814      815      816      817      818      819      820      821      822      823      824      825      826      827      828      829      830      831      832      833      834      835      836      837      838      839      840      841      842      843      844      845      846      847      848      849      850      851      852      853      854      855      856      857      858      859      860      861      862      863      864      865      866      867      868      869      870      871      872      873      874      875      876      877      878      879      880      881      882      883      884      885      886      887      888      889      890      891      892      893      894      895      896      897      898      899      900      901      902      903      904      905      906      907      908      909      910      911      912      913      914      915      916      917      918      919      920      921      922      923      924      925      926      927      928      929      930      931      932      933      934      935      936      937      938      939      940      941      942      943      944      945      946      947      948      949      950      951      952      953      954      955      956      957      958      959      960      961      962      963      964      965      966      967      968      969      970      971      972      973      974      975      976      977      978      979      980      981      982      983      984      985      986      987      988      989      990      991      992      993      994      995      996      997      998      999      1000      1001      1002      1003      1004      1005      1006      1007      1008      1009      1010      1011      1012      1013      1014      1015      1016      1017      1018      1019      1020      1021      1022      1023      1024      1025      1026      1027      1028      1029      1030      1031      1032      1033      1034      1035      1036      1037      1038      1039      1040      1041      1042      1043      1044      1045      1046      1047      1048      1049      1050      1051      1052      1053      1054      1055      1056      1057      1058      1059      1060      1061      1062      1063      1064      1065      1066      1067      1068      1069      1070      1071      1072      1073      1074      1075      1076      1077      1078      1079      1080      1081      1082      1083      1084      1085      1086      1087      1088      1089      1090      1091      1092      1093      1094      1095      1096      1097      1098      1099      1100      1101      1102      1103      1104      1105      1106      1107      1108      1109      1110      1111      1112      1113      1114      1115      1116      1117      1118      1119      1120      1121      1122      1123      1124      1125      1126      1127      1128      1129      1130      1131      1132      1133      1134      1135      1136      1137      1138      1139      1140      1141      1142      1143      1144      1145      1146      1147      1148      1149      1150      1151      1152      1153      1154      1155      1156      1157      1158      1159      1160      1161      1162      1163      1164      1165      1166      1167      1168      1169      1170      1171      1172      1173      1174      1175      1176      1177      1178      1179      1180      1181      1182      1183      1184      1185      1186      1187      1188      1189      1190      1191      1192      1193      1194      1195      1196      1197      1198      1199      1200      1201      1202      1203      1204      1205      1206      1207      120
```

Fig. 28C

【 図 2 8 F 】

[illegible]

Fig. 28E

```

1241      1242      1243      1244      1245      1246      1247      1248      1249      1250      1251      1252      1253      1254      1255      1256      1257      1258      1259      1260      1261      1262      1263      1264      1265      1266      1267      1268      1269      1270      1271      1272      1273      1274      1275      1276      1277      1278      1279      1280      1281      1282      1283      1284      1285      1286      1287      1288      1289      1290      1291      1292      1293      1294      1295      1296      1297      1298      1299      1300      1301      1302      1303      1304      1305      1306      1307      1308      1309      1310      1311      1312      1313      1314      1315      1316      1317      1318      1319      1320      1321      1322      1323      1324      1325      1326      1327      1328      1329      1330      1331      1332      1333      1334      1335      1336      1337      1338      1339      1340      1341      1342      1343      1344      1345      1346      1347      1348      1349      1350      1351      1352      1353      1354      1355      1356      1357      1358      1359      1360      1361      1362      1363      1364      1365      1366      1367      1368      1369      1370      1371      1372      1373      1374      1375      1376      1377      1378      1379      1380      1381      1382      1383      1384      1385      1386      1387      1388      1389      1390      1391      1392      1393      1394      1395      1396      1397      1398      1399      1400      1401      1402      1403      1404      1405      1406      1407      1408      1409      1410      1411      1412      1413      1414      1415      1416      1417      1418      1419      1420      1421      1422      1423      1424      1425      1426      1427      1428      1429      1430      1431      1432      1433      1434      1435      1436      1437      1438      1439      1440      1441      1442      1443      1444      1445      1446      1447      1448      1449      1450      1451      1452      1453      1454      1455      1456      1457      1458      1459      1460      1461      1462      1463      1464      1465      1466      1467      1468      1469      1470      1471      1472      1473      1474      1475      1476      1477      1478      1479      1480      1481      1482      1483      1484      1485      1486      1487      1488      1489      1490      1491      1492      1493      1494      1495      1496      1497      1498      1499      1500      1501      1502      1503      1504      1505      1506      1507      1508      1509      1510      1511      1512      1513      1514      1515      1516      1517      1518      1519      1520      1521      1522      1523      1524      1525      1526      1527      1528      1529      1530      1531      1532      1533      1534      1535      1536      1537      1538      1539      1540      1541      1542      1543      1544      1545      1546      1547      1548      1549      1550      1551      1552      1553      1554      1555      1556      1557      1558      1559      1560      1561      1562      1563      1564      1565      1566      1567      1568      1569      1570      1571      1572      1573      1574      1575      1576      1577      1578      1579      1580      1581      1582      1583      1584      1585      1586      1587      1588      1589      1590      1591      1592      1593      1594      1595      1596      1597      1598      1599      1600      1601      1602      1603      1604      1605      1606      1607      1608      1609      1610      1611      1612      1613      1614      1615      1616      1617      1618      1619      1620      1621      1622      1623      1624      1625      1626      1627      1628      1629      1630      1631      1632      1633      1634      1635      1636      1637      1638      1639      1640      1641      1642      1643      1644      1645      1646      1647      1648      1649      1650      1651      1652      1653      1654      1655      1656      1657      1658      1659      1660      1661      1662      1663      1664      1665      1666      1667      1668      1669      1670      1671      1672      1673      1674      1675      1676      1677      1678      1679      1680      1681      1682      1683      1684      1685      1686      1687      1688      1689      1690      1691      1692      1693      1694      1695      1696      1697      1698      1699      1700      1701      1702      1703      1704      1705      1706      1707      1708      1709      1710      1711      1712      1713      1714      1715      1716      1717      1718      1719      1720      1721      1722      1723      1724      1725      1726      1727      1728      1729      1730      1731      1732      1733      1734      1735      1736      1737      1738      1739      1740      1741      1742      1743      1744      1745      1746      1747      1748      1749      1750      1751      1752      1753      1754      1755      1756      1757      1758      1759      1760      1761      1762      1763      1764      1765      1766      1767      1768      1769      1770      1771      1772      1773      1774      1775      1776      1777      1778      1779      1780      1781      1782      1783      1784      1785      1786      1787      1788      1789      1790      1791      1792      1793      1794      1795      1796      1797      1798      1799      1800      1801      1802      1803      1804      1805      1806      1807      1808      1809      1810      1811      1812      1813      1814      1815      1816      1817      1818      1819      1820      1821      1822      1823      1824      1825      1826      1827      1828      1829      1830      1831      1832      1833      1834      1835      1836      1837      1838      1839      1840      1841      1842      1843      1844      1845      1846      1847      1848      1849      1850      1851      1852      1853      1854      1855      1856      1857      1858      1859      1860      1861      1862      1863      1864      1865      1866      1867      1868      1869      1870      1871      1872      1873      1874      1875      1876      1877      1878      1879      1880      1881      1882      1883      1884      1885      1886      1887      1888      1889      1890      1891      1892      1893      1894      1895      1896      1897      1898      1899      1900      1901      1902      1903      1904      1905      1906      1907      1908      1909      1910      1911      1912      1913      1914      1915      1916      1917      1918      1919      1920      1921      1922      1
```

Fig. 28F

【 図 2 8 G 】

[illegible]

Fig. 28G

【図 3 2】

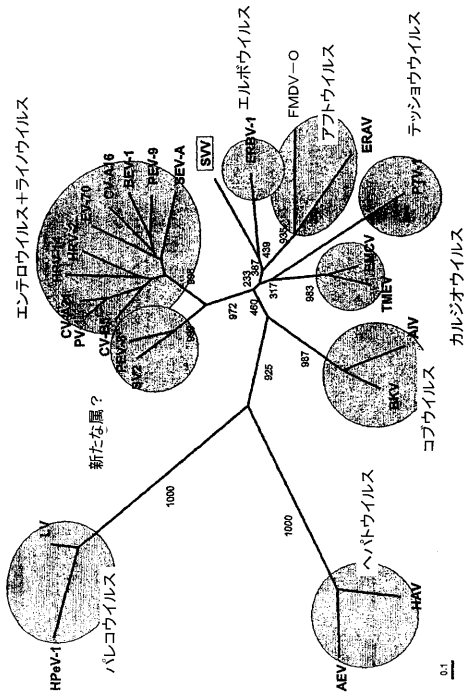


Fig. 32

【図 3 3】

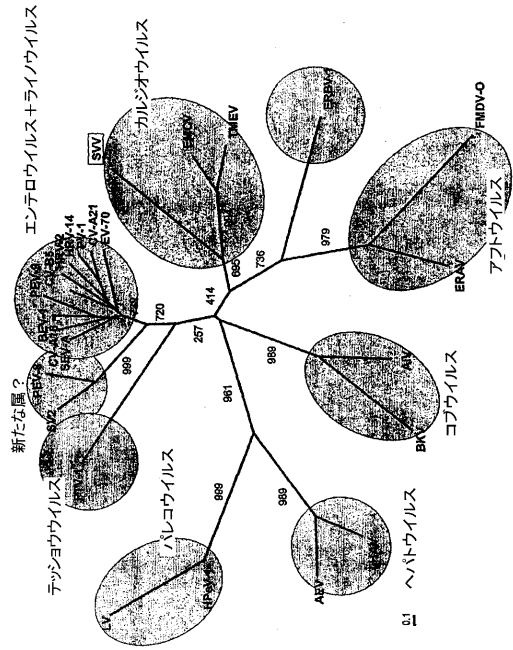
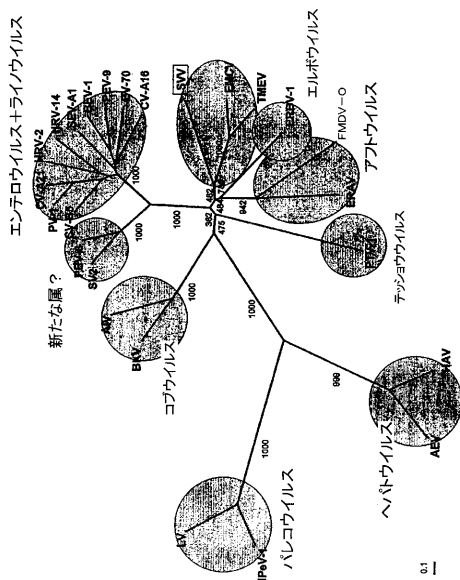


Fig. 33

【図 3 4】



【 図 3 6 】

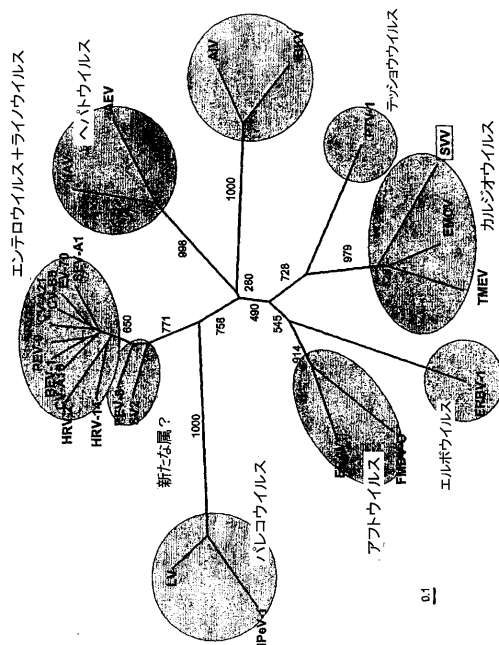


FIG. 36

【 図 3 7 】

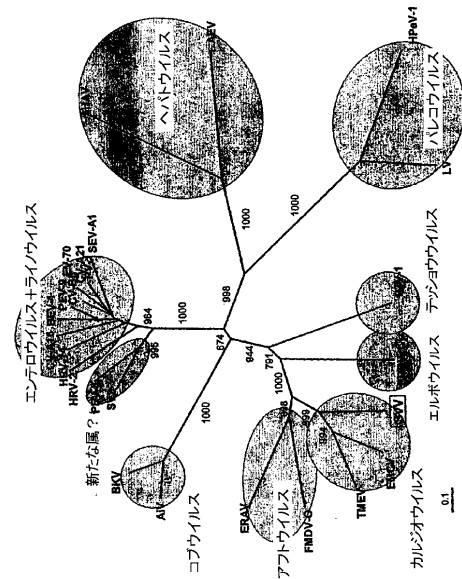


FIG. 37

【 図 3 8 】

	エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス										エンボス									
--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fig. 38

【 図 3 9 】

[illegible]

Fig. 39

【 図 4 0 】

[illegible]

Fig. 40

【 図 4 2 】

[illegible]

Fig. 42

【 図 4 1 】

[illegible]

Fig. 41

【 図 4 3 】

[illegible]

Fig. 43

^c not including VP4 or part of VP2

【 図 4 4 】

エンクロウミス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																
フェイス																

Fig. 44

【 図 4 5 】

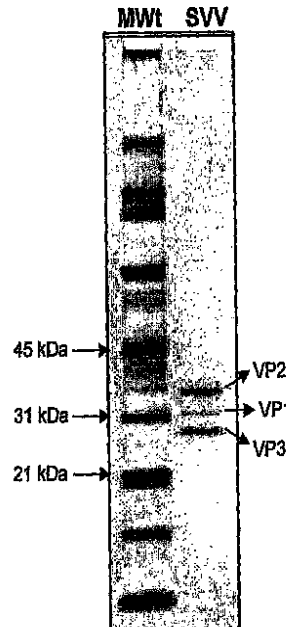


Fig. 45

【 図 4 6 A 】

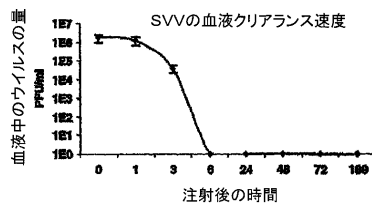


FIG. 46A

【 図 4 6 C 】

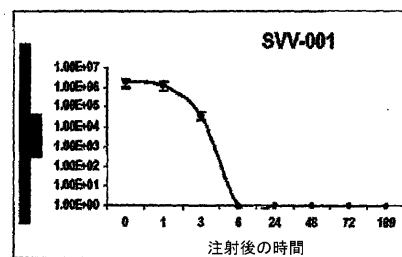


Fig. 46C

【 図 4 6 B 】

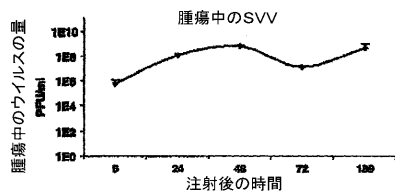


FIG. 46B

【 図 4 6 D 】

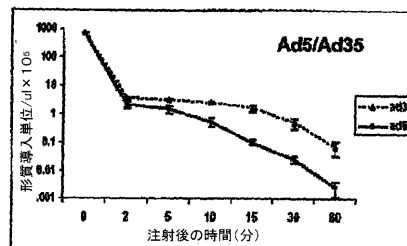


Fig. 46D

【図 5 1】

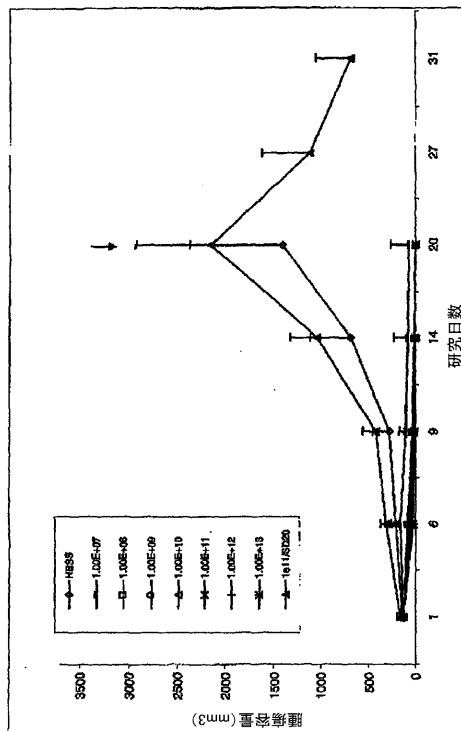


Fig. 51

【図 5 2】



Fig. 52

【図 5 3】

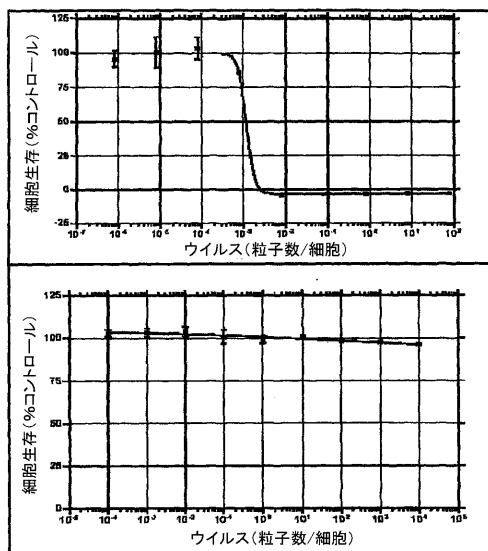
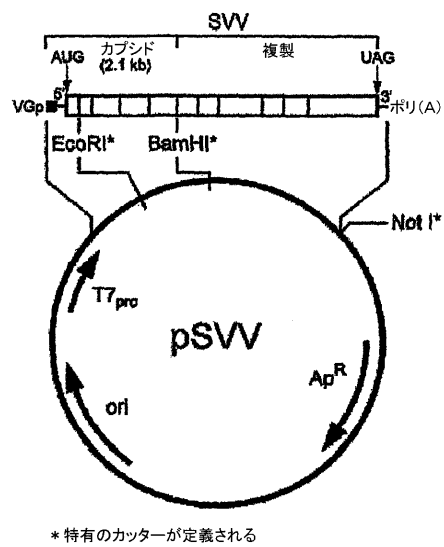


Fig. 53

【図 5 4】



* 特有のカッターが定義される

Fig. 54

【 図 5 5 】

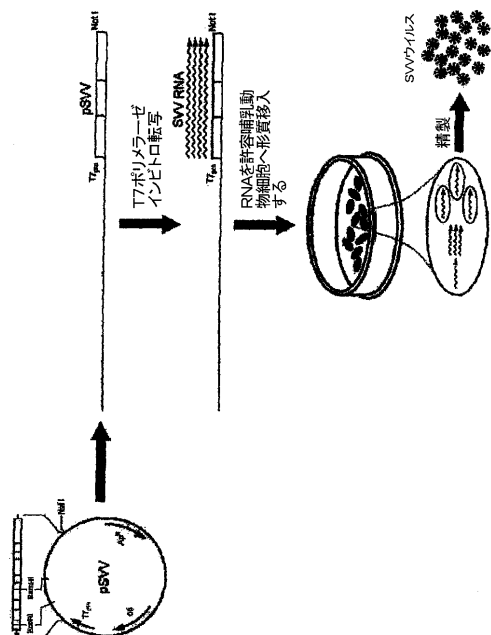


Fig. 55

【 ㄨ 5 6 】

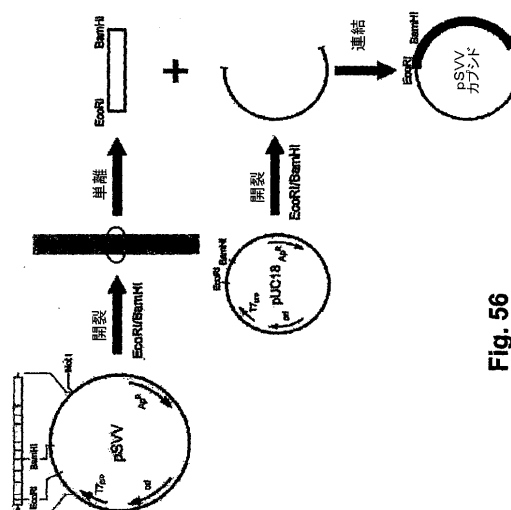


Fig. 56

【 図 5 7 】

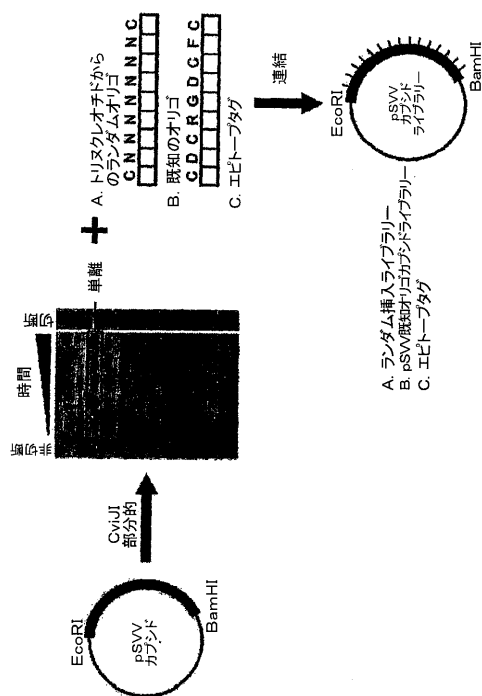


Fig. 57

【 図 5 8 】

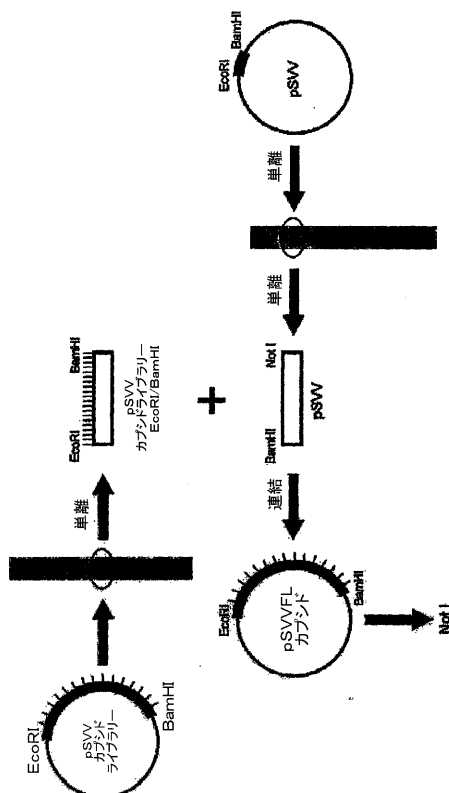


Fig. 58

【図 59】

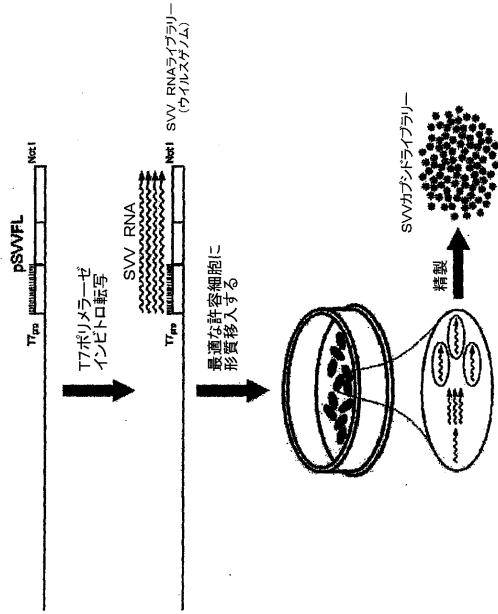


Fig. 59

【図 60】

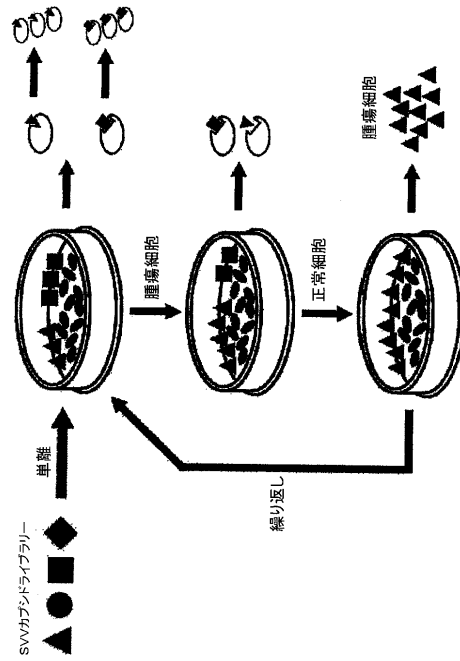


Fig. 60

【図 61】

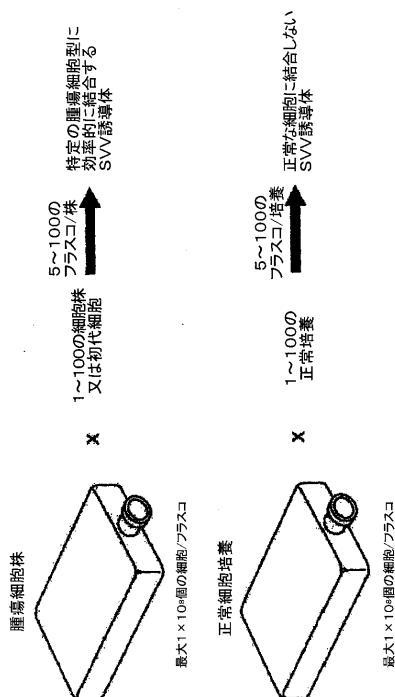


Fig. 61

【図 62】

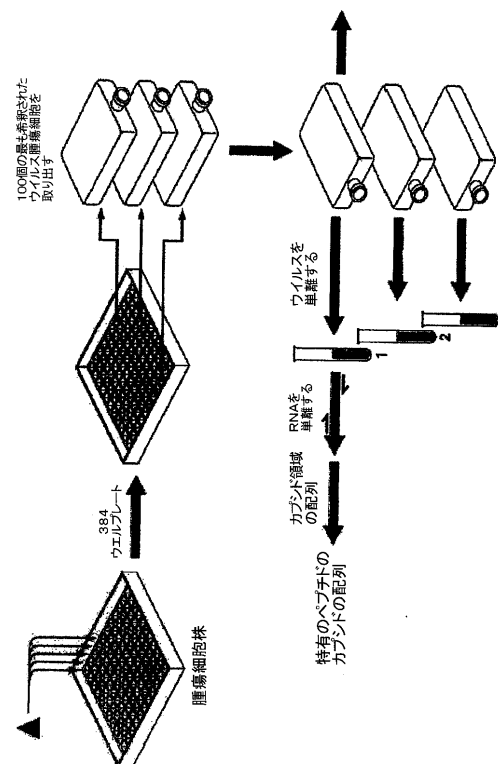


Fig. 62

【図 63】

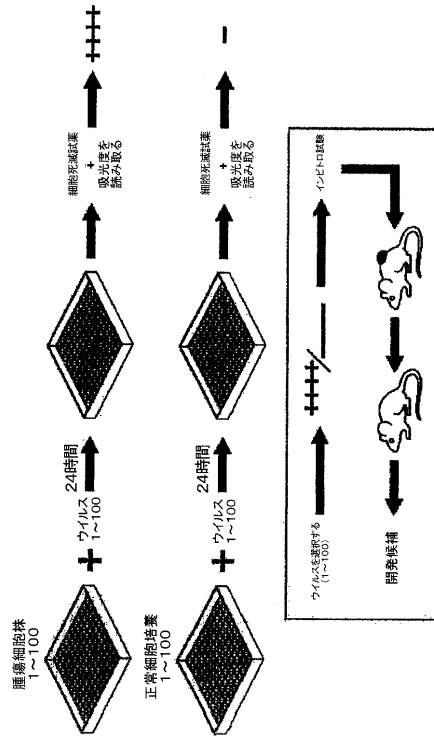


Fig. 63

【図 64】

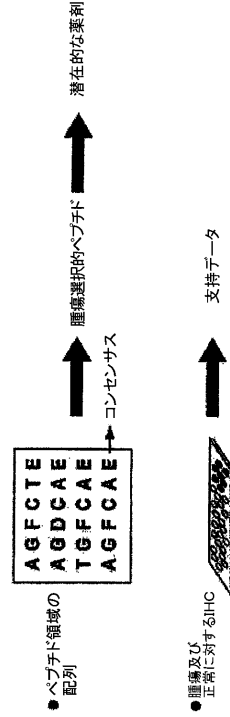


Fig. 64

【図 65】

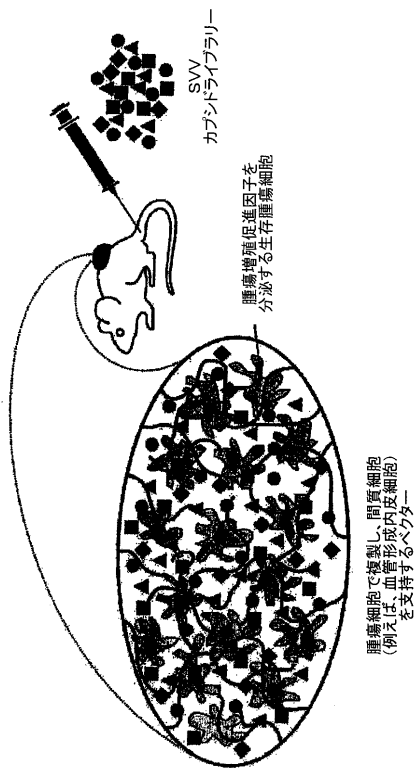


Fig. 65

【図 66】

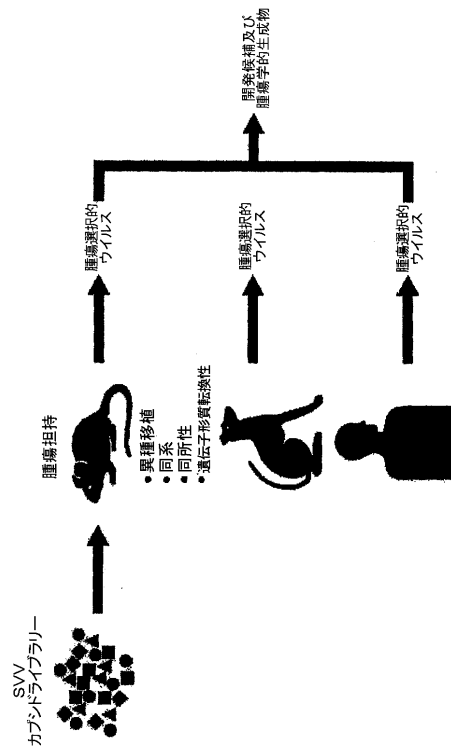


Fig. 66

【 図 7 1 A 】

1 MATTMEQETC AHSLTFFECPC KCSALQYRNG FYLLKYDEEM YPELLLTGGE DDVDFPELDM
61 EVVFEQLQNS TSSDKNNSSS EGNEGVIINN FYSNQYQNSI DLSANAAGSD PPKTYGQFSN
121 LFSGAVNAFS NMLPLIADQN TEEMENLSDR VSGDTAGNTV TMTQSTVGRLL VGYGTVDHGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYY TKVNDWTST QKFFYIRIP LPHVLSGEDG GVFGAALRRH
241 YLVKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE YPTLDATFMD NRMKNDLNF STRTQTINKKG
301 PFAMDBQNFW QNTLYPHQFL NLRNTITVDL EVFYVNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAPIIT
361 YSTGASTSLD ITASIQPVRE VFNGLRHEFL SRQSPIPVTI REHAGTWYST LPDSTVPIYG
421 KTPVAPSNYM VGEYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIERA SNTAVTKIQL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVPTGT AMMKGKFLIA YTPPGAGKPT SRDQAMQATY
541 AINDLGLNSS YSTVFFIISP THFRMVGTQD VNITNADGWV TVMQLTFLTY PPGCPTSAXI
601 LTMVSAGKDF SLRNPISFAP NSPQGVENAE KGVTEWNTAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YNRSSPIGAF TVKSGSLESQ FAFPSNGTGP NSVILTPGQD FDPAYDQLAP QRLTEIWNGG
721 NEETSKEVFFL KSKQDYSEFL FSPFVYKCD LEVTLSPHYS GNGHLLVRMC PTGTPTKPTT
781 QVLEHVSLSL EGRTPQVYSA GPGISNQISF VVPYNSPLSV LSAVWYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDPGTLE FAGTKPDIKF TVYLRYKNKR VFCPRPIVFF PWTSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHVLIQ FNRHGLEVRLL FRHGHFWAET RADVILRSKT KQVSFLSNGN
961 YPSMDSRAPW NFWKNTYQAV LRAEPCRVTM DIYKRVRFPP RLPLVQKEMP VREENVFGLY
1021 RIFNHYAGY FADLLIHDIIE TNPGPFMFRP RKQVFQTOGA AVSMAQTLN PNDLASKAMG
1081 SAFTALLDAN EDAGKAMKII KTLSSLSDAW ENVKETLNNP EFWQQLLSRC VQLIAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAABE TSQTSLSCEBI AAKKTFITIT PPPREFTISL FQQQSPLKQV
1201 NDIFSLAKHL DWAKTVKRV VDMFGTWIVQ EKEKQTLQDQ LQRPFRHAKR ISDLRNGMAA
1261 YVECKESFDF FEKLYNQAVK EKRTGIAAVC EKFRQKHDA TARCEPVIIV LRGDAGQGS
1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLFPDSDFD DGYENQFAAI MDLQGNPDG SDFTTFCQMV
1381 STTNFLPNMA SLERKGTFFT SGLVATTNL PEPRFVTIAR YPAVERRITP DYSVBSAGPVC

Fig. 71A

【 図 7 2 A 】

1 MATTMEQETC AHSLTFFECPC KCSALQYRNG FYLLKYDEEM YPELLLTGGE DDVDFPELDM
61 EVVFEQLQNS TSSDKNNSSS EGNEGVIINN FYSNQYQNSI DLSANAAGSD PPKTYGQFSN
121 LFSGAVNAFS NMLPLIADQN TEEMENLSDR VSGDTAGNTV TMTQSTVGRLL VGYGTVDHGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYY TKVNDWTST QKFFYIRIP LPHVLSGEDG GVFGAALRRH
241 YLVKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE YPTLDATFMD NRMKNDLNF GARTQTINKKG
301 PFAMDBQNFW QNTLYPHQFL NLRNTITVDL EVFYVNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAPIIT
361 YSTGASTSLD ITASIQPVRE VFNGLRHEFL SRQSPIPVTI REHAGTWYST LPDSTVPIYG
421 KTPVAPSNYM VGEYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIERA SNTAVTKIQL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVPTGT AMMKGKFLIA YTPPGAGKPT SRDQAMQATY
541 AINDLGLNSS YSTVFFIISP THFRMVGTQD VNITNADGWV TVMQLTFLTY PPGCPTSAXI
601 LTMVSAGKDF SLRNPISFAP NSPQGVENAE KGVTEWNTAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YNRSSPIGAF TVQSGSLESQ FAFPSNGTGP NSVILTPGQD FDPAYDQLAP QRLTEIWNGG
721 NEETSKEVFFL KSKQDYSEFL FSPFVYKCD LEVTLSPHYS GNGHLLVRMC PTGTPTKPTT
781 QVLEHVSLSL EGRTPQVYSA GPGISNQISF VVPYNSPLSV LPAVWYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDPGTLE FAGTKPDIKF TVYLRYKNKR VFCPRPIVFF PWTSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHVLIQ FNRHGLEVRLL FRHGHFWAET RADVILRSKT KQVSFLSNGN
961 YPSMDSRAPW NFWKNTYQAV LRAEPCRVTM DIYKRVRFPP RLPLVQKEMP VREENVFGLY
1021 RIFNHYAGY FADLLIHDIIE TNPGPFMFRP RKQVFQTOGA AVSMAQTLN PNDLASKAMG
1081 SAFTALLDAN EDARKAMKII KTLSSLSDAW ENVKETLNNP EFWQQLLSRC VQLIAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAABE TSQTSLSCEBI AAKKTFITIT PPPREFTISL FQQQSPLKQV
1201 NDIFSLAKHL DWAKTVKRV VDMFGTWIVQ EKEKQTLQDQ LQRPFRHAKR ISDLRNGMAA
1261 YVECKESFDF FEKLYNQAVK EKRTGIAAVC EKFRQKHDA TARCEPVIIV LRGDAGQGS
1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLFPDSDFD DGYENQFAAI MDLQGNPDG SDFTTFCQMV

Fig. 72A

【 図 7 1 B 】

1441 SKTEAGYKVL DVERAFRPTG EAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRDNRTKEII SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTVQTLVAQG PVDEVSTFHV VQQLKARQQA TDEQLEELQE AFARVQERNSS
1561 VFSDWLKISA MLCATILALS QVVMAKAVK QMVKPDIVRV QLDEQEQQPY NETARVKKPT
1621 LQLLDIQGPN FVMDFEKYA KHVTAPIGEV YPTGVSTQTC LLVRGRTILV NRHMESDWT
1681 SIVVGVVTHA RSTVKILAI A KAGKETDVSF IRLSSGFLFR DNTSKFVKAG DVLPTGAAPV
1741 TGIMNTDIPM MYTGTFLLAG VSVPVETQQT FNHCIIHYKAN TRKGWCGSAL LADLGSSKKI
1801 LGHSAGSMG IAAASIVSQE MIRAVVNAFE PQGALERLDP GPRHIVFRKT ALRPTVARQV
1861 FQPAYAPAVL SKDFPRTAD VDEVAFSKHT SNQESLPPVF RMVAKEYANR VPTILGKONG
1921 RLTVKQALEG LEGMDPMRN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDW ESATLIPFAA ERLKRNMGD
1981 FSEVVYQTFI KDELAPIEKV QAAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGKFASKF QTQPGLELGS
2041 AIGCDPDVHW TAFQVAMQGF ERVYDVVYSN FDSHVSAMF ALLAEFFTP ENGDFPLTRE
2101 YLESIAISTH AFERKRELIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNNI IIRAGLYLTY KNFEPDQVK
2161 LSYGDOLIVA TNYQLDPDKV BASLAKTGK ITPANKTSTF PLNSTLEDVV FLKRFKKEG
2221 PLYRPFVNNRE ALEAMLSYR PGTLSSEKITS ITMLAVHSGK QBYDRLEFAP REVGVVVPFS
2281 ESVSEYRWBSL FW (SEQ ID NO:23)

Fig. 71B

【 図 7 2 B 】

1381 STTNFLPNMA SLERKGTFFT SGLVATTNL PEPRFVTIAR YPAVERRITP DYSVBSAGPVC
1441 SKTEAGYKVL DVERAFRPTG EAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRDNRTKEII SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTVQTLVAQA PVDEVSTFHV VQQLKARQQA TDEQLEELQE AFARVQERNSS
1561 VFSDWLKISA MLCATILALS QVVMAKAVK QMVKPDIVRV QLDEQEQQPY NETARVKKPT
1621 LQLLDIQGPN FVMDFEKYA KHVTAPIGEV YPTGVSTQTC LLVRGRTILV NRHMESDWT
1681 SIVVGVVTHA RSTVKILAI A KAGKETDVSF IRLSSGFLFR DNTSKFVKAG DVLPTGAAPV
1741 TGIMNTDIPM MYTGTFLLAG VSVPVETQQT FNHCIIHYKAN TRKGWCGSAL LADLGSSKKI
1801 LGHSAGSMG IAAASIVSQE MIRAVVNAFE PQGALERLDP GPRHIVFRKT ALRPTVARQV
1861 FQPAYAPAVL SKDFPRTAD VDEVAFSKHT SNQESLPPVF RMVAKEYANR VPTILGKONG
1921 RLTVKQALEG LEGMDPMRN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDW ESATLIPFAA ERLKRNMGD
1981 FSEVVYQTFI KDELAPIEKV QAAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGKFASKF QTQPGLELGS
2041 AIGCDPDVHW TAFQVAMQGF ERVYDVVYSN FDSHVSAMF ALLAEFFTP ENGDFPLTRE
2101 YLESIAISTH AFERKRELIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNNI IIRAGLYLTY KNFEPDQVK
2161 LSYGDOLIVA TNYQLDPDKV BASLAKTGK ITPANKTSTF PLNSTLEDVV FLKRFKKEG
2221 PLYRPFVNNRE ALEAMLSYR PGTLSSEKITS ITMLAVHSGK QBYDRLEFAP REVGVVVPFS
2281 ESVSEYRWBSL FW (SEQ ID NO:24)

Fig. 72B

【 図 7 3 A 】

```

1 MATTMEQEIC AHSILTKGCP KCSALQYRNG FYLLKYDEEM YPEELLTDGE DDVDFPELDM
61 EVVFLQGNSS TSSDKNNSSS DNGEGVIINN FYSNQYQNSI DLSANATGSD PFRTYGQFSN
121 LLSGAVNAFS NMIFLLADQN TEEMENLSDR VLQDTAGNTV TWTQSTVGRL VGYGAVHDGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYY TFKNDWTST QKPFYIRIP LPHVLSGSDG GVFGAALRRH
241 YLVKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE YPTLDAFAMD NRMKDNLEN GTKTQTNRRKG
301 PFAMDHQNFQ QWTLYPHQFL NLRNTNVDL EVPPYNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAFLT
361 YSTGASTSLD ITASIQPVRF VFNGLRHEIL SRQSPFIVTI RSHAGTWYST LPSDTPVIYG
421 KTFVAPANYM VGSYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIYRA SNTAVKTQPL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVFTCT AMMKGFELIA YTPPGAGKPT SRDQAMQATY
541 AINDLGLNSS YSFTVPFISF THFRMVGTDQ VNITNVDCMV TVWQLTPLYT PPGCPTSAXI
601 LTMVSAGKDF SLAMPISAPF WSPQGVENAE RGVTEDTDAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YDRSSPIGAF TVKSGSLSSG FTFFSNQTCF NSVILTPGQF FOPAYDQLAP QRLTEIWONG
721 NEETSKVFFL KSKQDYSCFL FSPFVYKCD LEVTLSPHTS GNGHLLVWMC PTGPTPKPTT
781 QVLEHVSSLS EGRTPQVISA GPGITNQISF VVPYNSPLSV LPNAVYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDFGTLE FAGTKPDIKF TVYLRYKNR VFCPRPTVFF FWPSSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHILQ FNGHGLEILR FRHGMFWAZA HADVILRSRT KQISFIANGS
961 FPSMDARAPF NFWKNTYHAF LRABPYRVIM DVYHKRIREF RLPLVQKERN VREENVFGLY
1021 GTFNAHYAGY FADLLIHDI THNCPFMAKP KKQVFOTQGA AVSSMAQTLL PNDLASKVMG
1081 SAFTALLDAN EDAQKAMRII KTLSSLSDAW ENVKETLNNF EFWKQLLSRC VQLTAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAABE TSQSLCEBI VAKFKKIFTT PPPRFTTISL FQQQSPILKQV
1201 NDVFSLAKML DWAIVKTEKV VDWFGTWVVQ REKQTLIDQL LQRFFPHAKR ISDLRNGMSA
1261 YVECKESFDF FEKLYNQAVK EKRTGLAARC EKFRQKHDA TARCEPVVIV LRGDAGQGKS
1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLPDSDF DYENQFAAI MDLQGNPDG SDFTFQCMV

```

Fig. 73A

【 図 7 4 A 】

```

1 MATTMEQEIC AHSILTKGCP KCSALQYRNG FYLLKYDEEM YPEELLTDGE DDVDFPELDM
61 EVVFLQGNSS TSSDKNNSSS DNGEGVIINN FYSNQYQNSI DLSANATGSD PFRTYGQFSN
121 LLSGAVNAFS NMIFLLADQN TEEMENLSDR VLQDTAGNTV TWTQSTVGRL VGYGAVHDGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYY TFKNDWTST QKPFYIRIP LPHVLSGSDG GVFGAALRRH
241 YLVKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE YPTLDAFAMD NRMKDNLEN GTKTQTNRRKG
301 PFAMDHQNFQ QWTLYPHQFL NLRNTNVDL EVPPYNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAFLT
361 YSTGASTSLD ITASIQPVRF VFNGLRHEIL SRQSPFIVTI RSHAGTWYST LPSDTPVIYG
421 KTFVAPANYM VGSYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIYRA SNTAVKTQPL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVFTCT AMMKGFELIA YTPPGAGKPT SRDQAMQATY
541 AINDLGLNSS YSFTVPFISF THFRMVGTDQ VNITNVDCMV TVWQLTPLYT PPGCPTSAXI
601 LTMVSAGKDF SLAMPISAPF WSPQGVENAE RGVTEDTDAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YDRSSPIGAF AVKSGSLSSG FAPFSNETCP NSVILTPGQF FOPAYDQLAP QRLTEIWONG
721 NEETSKVFFL KSKQDYSCFL FSPFVYKCD LEVTLSPHTS GNGHLLVWMC PTGPTPKPTT
781 QVLEHVSSLS EGRTPQVISA GPGITNQISF VVPYNSPLSV LPNAVYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDFGTLE FAGTKPDIKF TVYLRYKNR VFCPRPTVFF FWPSSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHILQ FNGHGLEILR FRHGMFWAZA HADVILRSRT KQISFIANGS
961 FPSMDARAPF NFWKNTYHAF LRABPYRVIM DVYHKRIREF RLPLVQKERN VREENVFGLY
1021 GTFNAHYAGY FADLLIHDI THNCPFMAKP KKQVFOTQGA AVSSMAQTLL PNDLASKVMG
1081 SAFTALLDAN EDAQKAMRII KTLSSLSDAW ENVKETLNNF EFWKQLLSRC VQLIAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAABE TSQSLCEBI VAKFKKIFTT PPPRFTTISL FQQQSPILKQV
1201 NDVFSLAKML DWAIVKTEKV VDWFGTWVVQ REKQTLIDQL LQRFFPHAKR ISDLRNGMSA
1261 YVECKESFDF FEKLYNQAVK EKRTGLAARC EKFRQKHDA TARCEPVVIV LRGDAGQGKS
1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLPDSDF DYENQFAAI MDLQGNPDG SDFTFQCMV

```

Fig. 74A

【 図 7 3 B 】

```

1381 STTNFLPMA SLERNGTFFT SQIVVATTNL PEFPRVTIAH YPAVERRITF DYSVSAGPVC
1441 SKTEAGYKVL DVERAFRPTG DAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRNRTKEIL SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTVQTLVAQA PVDEVSFHSV VQQLKARQEA TDSQLEELQE AFAPKTQRSS
1561 VFSDDMKISA MLCATLALS QVVMKATVK QMVRPDLVRV QLEDEQEGPY NEAVRAKPKT
1621 LQLLDIQQFN FVMDFEKYA KFVTAPIDFV YPTGVSTQTC LLVKGRTLAV NRHMAESDMS
1681 SIVVRGVTHA RSTVRLAIA KAGKETDVSF IRLSSGFLFR DNTSKFVKAD DVLPTSAPV
1741 IGINMTDIPM MFTGTYLKAG VSPVFTGQT FNHCIFYKAN TRKGWCGSAL LADLGKKKI
1801 LGMHSAGSMG RTAASIVSQE MICAVVSAPF PQGALERLFD GPRIHVPRKT ALRPTVARV
1861 PQPAYAPAVL SKFDPRTAD VDEVAFSKHT SNQESLPPVF RMVAKEYANR VFTLLGRDNG
1921 RLTVKQALEG LEGMDPMDKN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDM ESATLIPYAA DRKKNNEGD
1981 FSDIVVQTFE KDELRFVEKV QAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGRFASKF QTQPLGLSGS
2041 AIGCDPQVHN TAFGVAMQGF ERVIDVDYSN FDSHVSAMF RLLASFEFTF ENGFDPLVKE
2101 YLESILAISTH AFEEKRYLIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNNT IIRAGLYLTY RNFEFDVVKV
2161 LSYGDDLLVA TNYQLNFDKV RASLAKTGYK ITPANKTSTF PLDSLEDDVV FLKRXKPKKG
2221 PLYRFVMNRE ALEAMLSYR PGTLSKELTS ITMLAVHSGK PEYDRLEAPP REVGVVVSF
2281 ESVEYRWRSI FW (SEQ ID NO:25)

```

Fig. 73B

【 図 7 4 B 】

```

1381 STTNFLPMA SLERNGTFFT SQIVVATTNL PEFPRVTIAH YPAVERRITF DYSVSAGPVC
1441 SKTEAGYKVL DVERAFRPTG DAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRNRTKEIL SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTVQTLVAQA PVAEVSFHSV VQQLKARQEA TDSQLEELQE AFAPKTQRSS
1561 VFSDDMKISA MLCATLALS QVVMKATVK QMVRPDLVRV QLEDEQEGPY NEAVRAKPKT
1621 LQLLDIQQFN FVMDFEKYA KFVTAPIDFV YPTGVSTQTC LLVKGRTLAV NRHMAESDMS
1681 SIVVRGVTHA RSTVRLAIA KAGKETDVSF IRLSSGFLFR DNTSKFVKAD DVLPTSAPV
1741 IGINMTDIPM MFTGTYLKAG VSPVFTGQT FNHCIFYKAN TRKGWCGSAL LADLGKKKI
1801 LGMHSAGSMG RTAASIVSQE MICAVVSAPF PQGALERLFD GPRIHVPRKT ALRPTVARV
1861 PQPAYAPAVL SKFDPRTAD VDEVAFSKHT SNQESLPPVF RMVAKEYANR VFTLLGRDNG
1921 RLTVKQALEG LEGMDPMDKN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDM ESATLIPYAA DRKKNNEGD
1981 FSDIVVQTFE KDELRFVEKV QAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGRFASKF QTQPLGLSGS
2041 AIGCDPQVHN TAFGVAMQGF ERVIDVDYSN FDSHVSAMF RLLASFEFTF ENGFDPLVKE
2101 YLESILAISTH AFEEKRYLIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNNT IIRAGLYLTY RNFEFDVVKV
2161 LSYGDDLLVA TNYQLNFDKV RASLAKTGYK ITPANKTSTF PLDSLEDDVV FLKRXKPKKG
2221 PLYRFVMNRE ALEAMLSYR PGTLSKELTS ITMLAVHSGK PEYDRLEAPP REVGVVVSF
2281 ESVEYRWRSI FW (SEQ ID NO:26)

```

Fig. 74B

【 図 7 5 A 】

1 MATTEQEQIC AHSITFKGCP KCSALQYRNG FYLLKYDEEW YPEELLTQGE DOVFDPELDM
61 EVVFELQGNS TSSDKNNSSS DGNBGIINN FYSNQYQNSI DLSANATQSD PPRTYQGFNS
121 LLSGAVNAFS NMIFLIADQN TEEMENLSDR VLDQTAGNVT TNTQSTVGRLL VGYGAHVHGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYI TFKVNDWTST QKPFYIRIP LPHVLSGEDG GVFGAALRRH
241 YLVKTKWRFVQ VQCNAQSFHA GSLLVFMAPE YPTLDAFAMD NBSKXDLNPN GTKTQYNRKG
301 PFAMDQGNFW QWTLYPHQFL NLRNTTVDL EBFYVNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAPLT
361 YSTGASTSLD ITASTIQVVRP VFNGLRHETL SRQSPFIVTI REHAGTWYST LPDSTVPIYG
421 KTFVAPANYM VGEYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIYISA SNTAVKTQPL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVFTGT AMMKGFILIA YTPFGAGKPT SRDQAMQATY
541 AIWDLGLNNS YSFTVPFISF THFPMVGTQD VNINVDGWN TVWQLTEPLY PPGCPTSARI
601 LTMVSAGKDF SLMPISPAF WSPQGVENAE RGVTEEDTAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YDRSSPIGAF TVKSGSLESG FAFPSNETCP NSVILTFGQD FDPAYDQLRP QRLTEIWNGN
721 NEETSKVFFL KSKQDYSFCL FSPFVYYKCD LEVTLSPHST GNGHLLVRMC PTGTPAKPTT
781 QVLEHVSSLS EGRTPQVISA GPGVSNQISF VVPYNSPLSV LEAVWYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDFGTLF FAGTKPDIKF TVYLRYKMMR VFCPRPTVFF PWPSSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHILIQ FNHGGLERL FRHGFQWAEA HADVILASRT KQISFLNNGS
961 FFSMDARAFW NFWKNYTHAV LRAEPYRVTM DVYHKRIRAF RLPLVQKWN VRENVFGLY
1021 GIFNAHYAGY FADLLIHDIE TNPGPFMAKP KKQVFQTOGA AVSSMAQTLL PNDLASKVMG
1081 SAFTALLDAN EDAQKAMRII KTLSSLSDAW ENVKETINNP EFWKQLLSCR VQLIAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAAEI TSQTSICEBI VAKFKIKFTT PPRFPTTISL FQQQSPKQV
1201 NUVFSLAKNL DWAVKTVKRV VDWFGTWVVQ EKEKQTLQQL LQRFFERHAKR ISDLRNGMSA
1261 YVECKSSDFD FEKLYNQAVK EKRGTIAAVC EKFRQKHDA TARCEPVVIV LRGDAGQGS

Fig. 75A

【 図 7 6 A 】

1 MATTEQEQIC AHSITFKGCP KCSALQYRNG FYLLKYDEEW YPEELLTQGE DOVFDPELDM
61 EVVFELQGNS TSSDKNNSSS DGNBGIINN FYSNQYQNSI DLSANATQSD PPRTYQGFNS
121 LLSGAVNAFS NMIFLIADQN TEEMENLSDR VLDQTAGNVT TNTQSTVGRLL VGYGAHVHGE
181 HPASCADTAS EKILAVERYI TFKVNDWTST QKPFYIRIP LPHVLSGEDG GVFGAALRRH
241 YLVKTKWRFVQ VQCNAQSFHA GSLLVFMAPE YPTLDAFAMD NBSKXDLNPN GTKTQYNRKG
301 PFAMDQGNFW QWTLYPHQFL NLRNTTVDL EBFYVNIAPT SSWTQHASWT LVIAVVAPLT
361 YSTGASTSLD ITASTIQVVRP VFNGLRHETL SRQSPFIVTI REHAGTWYST LPDSTVPIYG
421 KTFVAPANYM VGEYKDFLEI AQIPTFIGNK IPNAVPIYISA SNTAVKTQPL ATYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRNFAQYRGS LVYTFVFTGT AMMKGFILIA YTPFGAGKPT SRDQAMQATY
541 AIWDLGLNNS YSFTVPFISF THFPMVGTQD VNINVDGWN TVWQLTEPLY PPGCPTSARI
601 LTMVSAGKDF SLMPISPAF WSPQGVENAE RGVTEEDTAT ADFVAQPVYL PENQTKVAFF
661 YDRSSPIGAF TVKSGSLESG FAFPSNETCP NSVILTFGQD FDPAYDQLRP QRLTEIWNGN
721 NEETSKVFFL KSKQDYSFCL FSPFVYYKCD LEVTLSPHST GNGHLLVRMC PTGTPAKPTT
781 QVLEHVSSLS EGRTPQVISA GPGVSNQISF VVPYNSPLSV LEAVWYNGHK RFDNTGSLGI
841 APNSDFGTLF FAGTKPDIKF TVYLRYKMMR VFCPRPTVFF PWPSSGDKID MTPRAGVIML
901 ESPNALDISR TYPTLHILIQ FNHGGLERL FRHGFQWAEA HADVILASRT KQISFLNNGS
961 FFSMDARAFW NFWKNYTHAV LRAEPYRVTM DVYHKRIRAF RLPLVQKWN VRENVFGLY
1021 GIFNAHYAGY FADLLIHDIE TNPGPFMAKP KKQVFQTOGA AVSSMAQTLL PNDLASKVMG
1081 SAFTALLDAN EDAQKAMRII KTLSSLSDAW ENVKETINNP EFWKQLLSCR VQLIAGMTIA
1141 VMHPDPLTLL CLGTLTAAEI TSQTSICEBI VAKFKIKFTT PPRFPTTISL FQQQSPKQV
1201 NUVFSLAKNL DWAVKTVKRV VDWFGTWVVQ EKEKQTLQQL LQRFFERHAKR ISDLRNGMSA
1261 YVECKSSDFD FEKLYNQAVK EKRGTIAAVC EKFRQKHDA TARCEPVVIV LRGDAGQGS
1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLPDSDFD DGYENQFAAI MDLQGNPDG SDPTTFCQMV

Fig. 76A

【 図 7 5 B 】

1321 LSSQVIAQAV SKTIFGRQSV YSLPDSDFD DGYENQFAAI MDLQGNPDG SDPTTFCQMV
1381 STTNFLPNMA SLERNGTFFT SQLVVATTNL PEFRPVITAH YPAVERRITF DYSVSAGPVC
1441 SKTEAGYKVL DVERAFRPTG DAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRDNRTKEIL SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTQVTLVAQA PVAEVSFHSV VOQLKARQEA TDSQLEELQE AFARTQERS
1561 VFSWMMKISA MLCATLALT QVVMKATVK QMVRPDLVRV QLDBQEQGPY NEAVRAKPKT
1621 LQLLDIQGNP FVMDFEKIYA KFTVAPIDVF YPTGVSTQTC LLVKGRTIAY NRMHESDWS
1681 SIVVRGVTHA RSTVRILAI A KAGKETDVSP IRLSSGPLFR DNFSKFKVAD DVLPAATAPV
1741 IGIMNTDIPM MFTGTFLKAG VSPVETGQT FNHCIRHYKAN TRKGWGSAL LADLGKKKI
1801 LGMHSAGSMG VAAASIVSQE MICAVVSAPF PQGALERLFD GPRIHVPRKT ALRPTVARQV
1861 FQPAYAPAVL SKFDPRTEAD VDEVAFSKHT SNQSSLPPVF RMVAKEYANR VFTLLGRDNG
1921 RLTVRQALEG LEGMDPMDKN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDW ESATILIPYAA DRKMMNEGD
1981 FSDIVYTQFL KDELRPVEKV QAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGRFASKF QTPGLELGS
2041 AICCDPDVHW TAFGVAMQGF ERVYDVVDYN FDSHVSAMF RLIAEEFFTP ENGFDPLVKE
2101 YLESIAISTH AFEKRYLIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNI IIRAGLYLTY KNFFFDVVKV
2161 LSYGDLLVA THYQLNFDKV RASLAKGYK ITPANKTSTF PLDSTLEDDV FLKRKFKEG
2221 PLYRPMNRE ALFAMLSYR PGTLSKLTIS ITMLAVHSGK PEYDRLEAFP REVGVVPSF
2281 ESVEYRWBSL FW (SEQ ID NO:27)

Fig. 75B

【 図 7 6 B 】

1381 STTNFLPNMA SLERKGTFFT SQLVVATTNL PEFRPVITAH YPAVERRITF DYSVSAGPVC
1441 SKTRAGYKVL DVERAFRPTG DAPLPCFQNN CLFLEKAGLQ FRDNRTKEIL SLVDVIERAV
1501 ARIERKKKVL TTQVTLVAQA FVDSVSFHSV VOQLKARQEA TDSQLEELQE AFARTQERS
1561 VFSWMMKISA MLCATLALT QVVMKATVK QMVRPDLVRV QLDBQEQGPY NEAVRAKPKT
1621 LQLLDIQGNP FVMDFEKIYA KFTVAPIDVF YPTGVSTQTC LLVKGRTIAY NRMHESDWS
1681 SIVVRGVTHA RSTVRILAI A KAGKETDVSP IRLSSGPLFR DNFSKFKVAD DVLPAATAPV
1741 IGIMNTDIPM MFTGTFLKAG VSPVETGQT FNHCIRHYKAN TRKGWGSAL LADLGKKKI
1801 LGMHSAGSMG RTAASIVSQE MICAVVSAPF PQGALERLFD GPRIHVPRKT ALRPTVARQV
1861 FQPAYAPAVL SKFDPRTEAD VDEVAFSKHT SNQSSLPPVF RMVAKEYANR VFTLLGRDNG
1921 RLTVRQALEG LEGMDPMDKN TSPGLPYTAL GMRRTDVVDW ESATILIPYAA DRKMMNEGD
1981 FSDIVYTQFL KDELRPVEKV QAKTRIVDV PPFHCILGR QLLGRFASKF QTPGLELGS
2041 AICCDPDVHW TAFGVAMQGF ERVYDVVDYN FDSHVSAMF RLIAEEFFTP ENGFDPLVKE
2101 YLESIAISTH AFEKRYLIT GGLPSGCAAT SMLNTIMNI IIRAGLYLTY KNFFFDVVKV
2161 LSYGDLLVA THYQLNFDKV RASLAKGYK ITPANKTSTF PLDSTLEDDV FLKRKFKEG
2221 PLYRPMNRE ALEAMLSYR PGTLSKLTIS ITMLAVHSGK PEYDRLEAFP REVGVVPSF
2281 ESVEYRWBSL FW (SEQ ID NO:28)

Fig. 76B

【 図 7 7 A 】

1 MATTMQEQIC AHSMTFEECP KCSALQYRNG FYLLKYDEEM YPESLTDGE DDVDFPDLM
61 EVVFSTQGNS TSSDKNNSS EGNKGIINN FYSQYQNSI DLSANATGSD PPKTYQGFSN
121 LLSGAVNAFS NMLPLIADQN TEEMENLSOR VSGDTAGNTV TMTQSTVGRL VGYGVHDGE
181 HPASCAD7AS SKILAVERYT TFKVNDWTST QKPEFYIIRP LPHVLSGEDG GVFGATLRHH
241 YLVKITGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE YPTLOVFAMD NWSKXDLNPN GTRTQTNKRG
301 PFMADHQNFQ QMTLYPEQFL NLRINTTIVDL EVPYVNIAPT SSWTQEASWT LVIAVVAPLT
361 YSTGASTSLD ITASIQVVRP VFNGLRHEVL SRQSPITPVTI REHAGTWYST LPDSTVPFIYG
421 KTFVAPANYM VGEYKDFLEI AQIPTFIGNK VPMNAVPIIDA SNTAVKTQPL AVYQVTLSCS
481 CLANTFLAAL SRMFAQYRGS LVYTFVFTGT AMMKGKFLIA YTFPGAGKPT SRDQAMQATY
541 AINDLGINSS YSFTVPFISF THFMVGTQD ANITNVGQWV TVWQLTFLTY PPGCPTISAKI
601 LTMVSAGKOP SLKMPISPAR WSPQGVENAE KGVTEINDAI ADPVAQPVYL FENQTKVAFF
661 YDRSSPIGAF AVKSGSLESG FAFPSNKACP NSVILTPGQF FDPAYDQLAP QRLTEIWGNG
721 NEETSEVFFL KTKQDYSFCL ESPPVYKCD LEVTLSPHTS GARGLLVRCM PTGTPTKPTT
781 QVLEHVSSLS EGRTPQVYSA GPGTSQISF VPEYNSPLSV LPAVWYNGKH RFDNKGDLGI
841 APNSDFTSLF FAGTKFDIKF TVYLRYKXMR VFPCRPTVFF PWTSGDKTID MTPRAGVIML
901 ESPNFDVSK TYPTLHILLQ FNRHGLEARI FRHQLWAST HAEVVLRSKT KQISFLSNGS
961 YPSMDATFPL NPMKSTYQAV LRAEPHRVTM DVYHKRIREF RLPLVKQEMR TCENVFGLY
1021 HVFETHYAGY FSDLLIHUVE TNGPFTFKP RQRPFVQIQG AAVSSMAQTL LPNDIASKUM
1081 GSAFTALLDA NEDAQKAMKI IKTLSSLSDA WNNVGTINN PEFWKQILSR CVQLIAGMTI
1141 AVMEPDPILT LCLGVLTARE ITSQTSLECE IAAKFKITFT TPTPRFFVIS LFPQQSPLKQ
1201 VNDVFSIAKN LDMAVKTVBK VVDWFGTWA QEEREQTLDQ LJQRFFEHAK RISDLRNGMA
1261 AYVECKESFD FFEKLYNQAV KKKRTGIAAV CERFSQKHEA ATARCEPVVI VLAGDAGQSK

Fig. 77A

【 図 7 8 A 】

1 MACKGYPDV CPICIAVDVT PGFEYLLIAD GEWFDTLLC VLODDOVFP SNSSNQSETM
61 EWTDLPLVSD IVMEFPQGNAS SSKDKSNQSS GNRGVLIINF YNQYQNSID LSASGGNAGD
121 APQNGQLSN ILGGAANAFI TMAPLLIDQN TEEMENLSOR VASDKAGNSA TMTQSTVGRL
181 CGYGEARHGE HPASCADTAT DNVLAAGRYV YIDLASWTTI QEAPSHIRIP LPHVLAGEDG
241 GVFGATLRHH YLCKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE FTYCKGXTG DMEPTDFFTM
301 DTHRAPQGA PTVRYVDSRT GFTFAMHQNQ NQWTVYHQI LMLRNTTVD LEVPVNIAP
361 TSWTQAHMW TLVAVESFQL QVASSSSDV QITASIQPVN PVFNGLAHET VIAQSPIAVT
421 VRSHKGCYFS TNEPTTVPII GKTISTENDY MCGESDILLE LCKLPTFLGN FSNKKRYPY
481 FSATNSVPTT SLVDYQVALS CSCMCNMLA AVARNFNQYR GSNFLPVFT GAAMVKGKFL
541 IAYTFPGAGK PTTDQAMQA TYAINDLGIN SSFVFTAFPI SPHYRQTSY TSATIASVDG
601 WVTWQLTFL TYPGGAPVNS DILTIVSAGD DFTLRMPISF TSWAPQSSN AENGKVSND
661 ASVDFAEPV KLPENQTRVA FFYDRAVPIG MLRPGQNISS TFFVQENDLR LNCLLLTPL
721 SFCPDSISGP VKTKAPVQNR WVRSGGTNF PLMTKQDIAT LCFSPTTYK CDLSVTVSAL
781 GTDTVASVLR WAPTGAADV TDQLIGYPS LGERTNPNMM LVGAGNTQIS FVVPYNSPLS
841 VLPAAWFGW SDPGNTKDFG VAPNADFGL WIGQNTISAV RIRYKMRVF CFPRTLFFFW
901 FVSTRSKINA DNPFTILELE NPAAFYRIDL FITFIDEFT FDKVHGKRV LTRIPGFGD
961 TPAGRMLVCM GEKTAHGFFT SSRLYHVF TATCSSTFSF IYKGRYSWK KPIHDELVD
1021 GYTFGRFFR AVRAYHADYV KQRLIHVSM NPGPVQSVFQ PQGAVLKSL APQAGIQNLL
1081 LRLIGIDGDC SEVSKAITTV TDLFAAWERA KTTIVSPFEW SKLLIKTKF IASVLYLHN
1141 PDTTIVCLLS LMTGVDLLTN DSVFDLKNK LSSFFRTPPP VCPNVLQPOG PLABANRGFT
1201 FAKNIEWAMK TIQSIWNLT SWFKQSEBIP QSKLDKFLME FPDHCRNTMD MRNGRKAYCE
1261 CTASFYKYPE LYNLAVICKR IPLASLCEKF KNHHDHVSRT PEPVVVVLAG AAGQKSVTS
1321 QIIAQSVSM AFGRQSVISM PPDSEYFDGY ENQFSVIMDD LQGNPDGEDF TVFCQMVST

Fig. 78A

【 図 7 7 B 】

1321 SLSSQIIAQ VSKTIFGRQS VYSLFPDSDF FDGYENQFAA IMDDLQGNFD GSDPTTECOM
1381 VSTNLLPAM ASLERKGTFF TSQLVVATTN LPFETPVITA HYFAVERKIT FUYSVSAGFV
1441 CSKTGAGCKV LDVERAFRPT GDAPLPCFQN NCLFLEKAGL QFRNRSKEI LSLVDVIERA
1501 VTRIERKKKV LTAVQTLVAQ GPVDEVSFYS VVQQLKARGE ATDEQLESLQ EAFARVQERS
1561 SVFSNWKIS AMLCATLAL TQVVMKAV KQMVRFDLVR VQLDEQEQGP YNETTRIKEK
1621 TLQLLDVQGP NPTMDFEKIV AKFYIATIGF VYPTGVSTQT CLIVKGRILA VNRHMAESDW
1681 TSIVVRGVSH TRSSVKIIAI AKAGKSTDVS FIRLSSGPLF RDNSTKFKVA SDVLPHSSSP
1741 LIGTMNVDP MMYTGTLKA GVSVPVETGQ TFNHCIIHYA NTRKGCSSA IADIGGSKK
1801 ILGFHSAGSM GVAASIIQ EMIDAVVQAF EPQGALERLP DGFRIHVPRK TALRPTVARQ
1861 VFQAFAPAV LSKFDPRIDA DVDEVAFSKH TSNQETLPPV FRMVAREYAN RVFALLGRDN
1921 GRLSVRQALD GLEMDPMCK NTSQGLEPVT LQMRRTDVVD WEYATLIPFA AERLEKMNK
1981 DFSDIVYQTF LKDKLPIEK VQAAKTRIVD VPFFEHCLIG BQLJGKFAK FQTPGLELG
2041 SAIGCDFDVH WTAPGVAMQS FERVYDVDS NFDSTHVAI IRLAEFFS EENGFDPLVK
2101 DYLESIAISK HAYSEKRYLI TGGPLSGCNA TSMNTIMNN IIRAGLYLT YKNFEFDDVK
2161 VLSVGDDLLV ATNYQLNFDV VRTSLAKTGY KITPANKTST FPLESTLEDV VFLKRFKKKE
2221 GPYRFPVNR EALEAMLXY RQTLSEKLT SITMLAVHSG KQRYDRIEAP FREVGIVPT
2281 FKSVEYHWS LEW (SEQ ID NO:29)

Fig. 77B

【 図 7 8 B 】

1381 NFLPNMAHL RKGTFFTSF IVATTNLEKF RPTVVAHYPA VDRRITDFT VTAGPCTTS
1441 NGMLDIERAF DEIPGSKPL ACFSADCLL HKRGVMPTCN RTKAVYNLQQ VVRMNDTIT
1501 KNTENVKXNM SLVAQSPFDV EHFENILTCL RQNHALLQDQ LDELQRAFAQ ARERSDFLD
1561 WLKVSALIFA GIASLSAVIK LASKFKESIW PSPVRVELSE GEQAAAYAGA RAQKQALQVL
1621 DIQGGGKVA QAGNPFVDFE LFCANMVAF ITFFYPDKAE VTQSCILLRA HLEFVNRHVA
1681 ETEWTAFLK DVREHRTVV TRSVNRSGAE TDLTFIKVK GLPKDNVKN FCSNKDQFEA
1741 RNDAVTGIMN TGLAFYISGN FLIGNQFVMT TTGACFNHCL HYRAQTRRG CGSAVICNVN
1801 GKQAVYGMHS AGGGGLAAAT IITRELIEAA EKSMLELEPQ GAIVDTSTGS VHVPRKTKL
1861 RRTVANDVFQ PKFEPAVLSR YDFRTDKVD VVAFSKHTN MESLFPVEDI VDBEYANRF
1921 TILGKDNGLL TVEQAVLGLP GMDPMKETS PGLFTQOGL RRTDLNENFT AKMPTQLOYA
1981 HSKLVGLVTD DVYVQSFLKD KIRLEKIRE AKTRIVDVFP FARCWGRQL LGRFASKFQT
2041 KPGLELGSAL GTDPDVINTP YAAELSGFNY VYDVYSENF ASHSTAMFEK LKMFPTFSQ
2101 GFDRIAETYL RSLAVSRHAY EDRERVLRG LLSGCAATSM LNTIMNVII RAALVLYSN
2161 FREDIKVLS YGDMLGITN YQIDFNLYKE RLAPFGYKIT PANKTTTFL TSHLDQVTEL
2221 KRFPVRFMSY LFRPQMDAVN LKAMVSYCKP GTLKEKIMSI ALLAVHSGPD IYDEITLFFR
2281 NVGIVVPYYS SMLRWLSLF R (SEQ ID NO:30)

Fig. 78B

【 図 7 9 A 】

1 MACKHGYPDV CPICITAVDAT PDEYLLMAD GEWEPTDLIC VLDDDDVFWP SDTSQTPQYM
61 EWTIDVPLVCD TMMEPQGNAS SSDKSNQS8 GNEGVINNF YSMQYQNSID LSASGQGNAGD
121 APQNGQLSS ILGGANAFPA TMAPLLMDQN TREMEMLSDR VASDKAGNSA TNYQSTVGRL
181 CGYKSHHEGE HPTSCADANT DKVLAERY YIDLASWTIS QEAFTSHIRIP LPHVLAGEDG
241 GVFGATLRHH YLCKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE FYTGGKTKSG TMEPSDPTFM
301 DTWRSFQSA PTGYRYDRQA GFAMNHQNG WQWTVYPHQI LNLRTNTTVD LEVPTVNVAP
361 SSWTQEHANW TLVVAVLSPL QVATGSSPDV QITASLQPVN PVFNGLRHET VLAQSPIPVT
421 VREHQGCFTS TNPDTTVEIY GKTISTPSDY MCGEFSDLLE LCKLPTFLGN PSTDNKRYPY
481 FSATNSVPAT SLVDYQVALS CSCANSMLA AVARNFNQYR GSLNLFLEVFT GAAMVKGKFR
541 IAYTPPGAGK PTTTRDQNMQA TYAINDLGN SSFNFTAPFI SPTHYRQTSY TSPTITSVDG
601 WVTVMQLTFL TYPSGTPHIS DILTLVSAGD DFTLRMPISF TKNVQSGIDN AEGKGVSNDD
661 ASVDFAVEPV KLPENQTRVA FTYDRAVPIG MLRPGQNMET TFSYQENDFR LNCLLLTPLP
721 SYCPDSSSGP VRTKAPQWR WVRSGGANGA NFPLMTQDY AFLCFSPPTY YKCDLEVTVS
781 AMAGSTVSSV LRWAPTGAFA DVTDLQIGY PSIGETRNPH MNLVGSGNSQ ISFVVVPNSP
841 LSVLPAAWFN GWSDFGNED FGVAFTSDFG RIWIQGNSSA SVRIKYKMK VFCPRPTLFF
901 PWTPTTTIKI NADNPVPILE LENPASLYRI DLFITTFDEL ITFDYKVHGR FVLTFRIPGF
961 GLTPAGRMIV CMGAKPAHSE FTSSKSLYHV IFTSTCHSFS FTIYKGRYS WKKPIHDELV
1021 DRGYTTFRF FKAUVGRHAD YYKRLIHV KMNPQGVQSV FQPGQAVLTK SLAPQAGION
1081 ILLRLLGIEG DCSEVSKAIT VVTDLVAWE KAKTTLVSPE FWSKLIAITI KFIASVLVYL
1141 HNPDPFITVC LSLMTGVDLL TNSVFTDLK SKLSSFTFPT PPACPNVMQP OGPLREANEG
1201 FTFARNIENA YKTIQSVVNW LTSWFKQRED HPQSKLDKLL MEFPDCHCRNI MDMRNGRKAY
1261 CECTASFKYF DDLYNLAVTC KRIPLASICE KFKNRHDSHV TRPEPVVAVL RGAAGQKGSV
1321 TSQILAQSVS KMAFGKQSVY SMPFDSBYFD GYENQFSVIM DDLGQNFEDGE DFTVFCQMV5
1381 STNFLNMAH LERKGTPTTS SEIVATTNLE KFRPVTVAHY PAVDRRIITFD FTVTAGPHCK

Fig. 79A

【 図 7 9 B 】

1441 TPAGMLDIK AFDEIPGSKP QLACFSADCP LLHKRGVMFT CNRTKTYVNL QQVVMVNDT
1501 ITRKTENVKK MNSLVAQSP DWQHFNILT CLRQNNALQ DQVDELQBAF TQARERSDFL
1561 SDWLKVSAT FAGTVSLAV IKLASKFKGS IWPTFVRVEL SEGEQAAYAG RARAKQALQ
1621 VLDIQGGGKV LAQAGNPMVD FELPCAKNMV SPITFYYPDK AEVTQSCILL RAHLFVNNR
1681 VAETETAFK LADVHEROT VMRSVNRSG AETDLTFVKV TKGFLFKDNY NKFCSNKDDF
1741 PARNDTVTGI MNTGLAIFVS GNFLIGNQPV NTTTGACFNH CLHYRAQTRR GWCOSAIICN
1801 VNGKKAVYGM HSAGGGGLAA ATITRELIE AAEKSMLELE PQGAIVDIST GSVVHVPRST
1861 KLARTVAHDV FQKFEFAVL SRYDPRTDKD VDVVATSKHT NMESLPEIF DIVCGEYANR
1921 VFTILGKNG LLTVQAVLG LSGMDPMEKD TSPGLPYTQQ GLRRTDLDF NTAHMTPOLD
1981 YAHSKLVIGV YDDVYQSFL KDIRPLEKI HEAKTRIVDV PPFACIWRG QLLGRFASKF
2041 QTKPGFELGS AIGTDPDVW TRYAEELSGF NYVYDVYEN FDASHSTAMF ECLINNFTE
2101 QNGFDRRIAE YLRSIAVSRH AYEDRVLIR GGLPSGCAAT SMLNTIMNV IIRAALYLYT
2161 SNFEDDIKV LSYGDDLLIG TNYQIDFNLV KERLAPFGYK ITPANKTTTF PLTSHLQDVT
2221 FLKRRFVRFN SYLFRPQMDA VNLKAMVSYC KPGTLKEKLM SIALLAHVSG PDYIDEIPLP
2281 FRNVGIVVPT YDSMLYKLS LFR (SEQ ID NO:31)

Fig. 79B

【 図 8 0 A 】

1 MACKHGYPDV CPICITAVDAT PGFEYLLMAD GEWEPTDLIC VLDDDDVFWP SDTSNQSQTM
61 DWTIDVPLRD IMMEPQGNSS SSDKSNQS8 GNEGVINNF YSMQYQNSID LSASGQGNAGD
121 APQNGQLSN ILGGAANAPA TMAPLLMDQN TREMEMLSDR VASDKAGNSA TNYQSTVGRL
181 CGYKSHHEGE HPASCADANT DKVLAERY YIDLASWTIS QEAFTSHIRIP LPHVLAGEDG
241 GVFGATLRHH YLCKTGWRVQ VQCNASQFHA GSLLVFMAPE FYTGGKTKSG TMEPSDPTFM
301 DTEWRSPOGA PTGYRYDSRT GFATNHNQNG WQWTVYPHQI LNLRTNTTVD LEVPTVNVAP
361 SSWTQEHANW TLVVAVLSPL QVATGSSPDV QITASLQPVN PVFNGLRHET VIAQSPIPVT
421 VREHKCCYIS TNPDTTVEIY GKTISTPSDY MCGEFSDLLE LCKLPTFLGN PWTNNKRYPY
481 FSATNSVPAT SMVDYQVALS CSCANSMLA AVARNFNQYR GSLNLFLEVFT GAAMVKGKFL
541 IAYTPPGAGK PTTTRDQMG8 TYAINDLGN SSFNFTAPFI SPTHYRQTSY TSPTITSVDG
601 WVTVMQLTFL TYPSGTPHIS DILTLVSAGD DFTLRMPISF TKNVQSGIDN AEGKGVSNDD
661 ASVDFAVEPV KLPENQTRVA FTYDRAVPIG MLRPGQNMET TENYQENDYR LNCLLLTPLP
721 SYCPDSSSGP QRTKAPQWR WVRSGGVNGA NFPLMTQDY AFLCFSPPTY YKCDLEVTVS
781 ALGNTRVAVS LRWAPTGAFA DVTDLQIGY PSIGETRNPH MNLVGAGNSQ VSFVVVPNSP
841 LSVLPAAWFN GWSDFGNED FGVAFNADFG RLWIQGNSSA SVRIKYKMK VFCPRPTLFF
901 PWTPTTTIKI NADNPVPILE LENPAALYRI DLFITTFDEF ITFDYKVHGR FVLTFRIPGF
961 GLTPAGRMIV CMGQPAHSE FTSSSLYHV IFTATCSFS FSIYKGRYS WKKPIHDELV
1021 DRGYTTFRF FKAUVGRHAD YYKRLIHV ETNPGGVQSV FQPGQAVLTK SLAPQAGION
1081 LLLRLLGIDG DCSEVSKAIT VVTDLVAWE KAKTTLVSPE FWSKLIAITI KFIASVLVYL
1141 HNPDPFITVC LSLMTGVDLL TNSVFTDLK QKLSSFTFPT PPACPNVMQP OGPLREANEG
1201 FTFARNIENA YKTIQSVVNW LTSWFKQRED HPQSKLDKLL MEFPDCHCRNI MDMRNGRKAY
1261 CECTASFKYF DELYNLAVTC KRIPLASICE KFKNRHDSHV TRPEPVVAVL RGAAGQKGSV
1321 TSQILAQSVS KMAFGKQSVY SMPFDSBYFD GYENQFSVIM DDLGQNFEDGE DFTVFCQMV5
1381 STNFLNMAH LERKGTPTTS SEIVATTNLE KFRPVTVAHY PAVDRRIITFD FTVTAGPHCK

Fig. 80A

【 図 8 0 B 】

1441 TPAGMLDVEK AFDEIPGSKP QLACFSADCP LLHKRGVMFT CNRTQTYVNL QQVVMVNDT
1501 ITRKTENVKK MNSLVAQSP DWHEFNILT CLRQNNALQ DQDELQBAF AQARERSDFL
1561 SDWLKVSAT FAGIASLAV IKLASKFKGS IWPTFVRVEL SEGEQAAYAG RARAKQALQ
1621 VLDIQGGGKV LAQAGNPMVD FELPCARNIV APITTYYPDK AEVTQSCILL RAHLFVNNR
1681 VAETDWTAFK LADVHERHT VALSVNRSG AKTDLTFVKV TKGFLFKDNY NKFCSNKDDF
1741 PARNDTVTGI MNTGLAIFVS GNFLIGNQPV NTTTGACFNH CLHYRAQTRR GWCOSAIICN
1801 VMGKKAVYGM HSAGGGGLAA ATITKELIE AAEKSMLELE PQGAIVDIAT GSVVHVPRST
1861 KLARTVAHDV FQKFEFAVL SRYDPRTDKD VDVVATSKHT NMESLPEIF DIVCGEYANR
1921 VFTILKENG LLTVQAVLG LSGMDPMEKD TSPGLPYTQQ GLRRTDLNF IYAKMTFOLO
1981 YAHSKLVIGV YDDVYQSFL KDIRPIEKI HEAKTRIVDV PPFACIWRG QLLGRFASKF
2041 QTKPGLELGS AIGTDPDVW TRYAVELSGF NYVYDVYEN FDASHSTAMF ECLINNFTE
2101 QNGFDRRIAE YLRSIAVSRH AYEDRVLIR GGLPSGCAAT SMLNTIMNV IIRAALYLYT
2161 SNFODDIKV LSYGDDLLIG TNYQIDFNLV KERLAPFGYK ITPANKTTTF PLTSHLQDVT
2221 FLKRRFVRFN SYLFRPQMDA VNLKAMVSYC KPGTLKEKLM SIALLAHVSG PDYIDEIPLP
2281 FRNVGIVVPT YSSMLYKLS LFR (SEQ ID NO:32)

Fig. 80B

FIG. 83E

【 図 8 4 B 】

2281 AGTCAAATT TCGCAATTA CCGTGGGTG ATCCAAATCA CTCTGACATT TTGTGGACCC
 2341 ATGATGGCGA GAGGGAAAT CTGCTCTCGT TATTCTCCCC CAATGGGAAC GCACACACAG
 2401 ACTCTTTCCG AAGCTATGCA GTGCACATAC TGTATTTGGG AGATAGGCTT GAACCTAGAT
 2461 TGGACCTTCG TGTGTCCTTA CATCTGSCC AGTGACATCG GTGAACCTCG AGCAATATCC
 2521 AACTCGGTTT ACTCGGCTGA TGGTTGGTT AGCGTGCACA AGTTGACCAA AATTACTCTA
 2581 CCACTGACT GTCCGCAAG TCCCTGCAAT CTCTTTTTCG CTCTGCTGCG TGAGGATTAC
 2641 ACTCTCCGTC TCCCGCTTGA TTGTAATCTC TCTATATGTG TCCACTCCAC CGACAACGCG
 2701 GAGACCGGGG TTATTGAGCG GGTAAACACT GACACCGATT TCTCTGGTGA ACTGGCGGCT
 2761 CCGTGCCTTA ACCACATTA TTCTAAGTTC CTGTGTGATC GATCTCGATT ATTGAATGTA
 2821 ATCAAGGTAC TGGGAAGGA CGCGCTTTC CCGCGCCTT TCCCTACACA AGAAGGTGCG
 2881 CAGCAGGATG ATGGTTACTT TTGTCTCTCG ACCCGCCGCG CAACAGTGGC TTCCGAGCCG
 2941 GCGACTCGTT TCGGCTGTA CGCAATCCG TCCGCGAGTG GTGTCTTGCG TAACACTTCA
 3001 CTGCACTTCA ATTTTATAG CTTCGCTGCT TTCACTTACT TTAGATCGGA COTTGAGGTT
 3061 ACGGTGGTCT CACTAGAGCG GGTCTGGA TTGTCTGTAG GGTGTCTTCC TTCTGGCAGT
 3121 GAATAACAGG CTTCAGCTT TGTCTAGAC CAGCTGCAAG TGCCTTTCCA CTTTACTGAG
 3181 CGCACTCCCG GCGCTTTGCG TAGCAAGGCT GGAAGGTA TTCTGTGCTC CCGTTGGAAC
 3241 TCTGTCTGCT CTGTGCTGCC CCGGCGTGG GGGGGGCTT CCAAGCTCTC TTCTGCTAGC
 3301 CGGGGTCTAC CGCGCATCG TGAATTGGGG ACTATTTCAG COTTTGTCCC CGCTCCTAAT
 3361 GAGAGAAAGA GCACCGTGT AAACACAGTG GCGCTTACA TTCCGTACAA AAGCGCAAGT
 3421 GCTGCTGCC CCAGCATGCT TCCCTTTCG AGCTACAGTG AGAAGATGCT GATGCAATCT
 3481 GCGGATATCG AGACCAATCT TGGTCTGCT TCTGCAACCG CAATTTTGA GTTCTTGAA
 3541 GCAGAAATG ATCTAGTAC TCTGCGCTCT CTTGGAAGA TGGTGCACTG TGTTCACAG
 3601 ACTTGAGAA AGTAATGTGA GAACAGTAT TTFTTGGCCA ATTTACTCAG CGAGCTAGTG
 3661 GGGGAAGGCT CTGTGCGCTT GCGCGCCAG CTATCCAAAC AAGCTTCACT AAAGGCTCTT
 3721 TTGGGCTGCG ACTTTCTCTC TCGGGGCTC AATTACATCG ACTTTTACTC TTACTGATA
 3781 GAGAAATGCT CTAGTTTCTT TACCCTGAGA CCACCTCTCC CACCGCTGCA AACTCTGATG
 3841 ACCAAGCCTC CAGTGAAGTC GAATTCGGA AAACCTGTTA AGATGCAGG ACCCACTGAC
 3901 AAGTCAAGG ACTGGAACCA AATAGCTGCC GCGTTGAAGA ATTTCAATT TGTCTGTGAC
 3961 CTAGTCAAG AGGTGCTGCA TTGGCTGCG CCGCTGATGA ACAGAGAAA AGCCAGCCTC
 4021 GTCTCCAGT ACCAGTTGGA GATGAAGA GTGGGCGCTG TGGCGTTGGC TCATGACGCT

FIG. 84B

【 図 8 4 C 】

4081 TTCAATGCTG GTTCCGGGCG CCTCTTAGC GACGACAGA TTGAATACCT CGAGAACCTC
 4141 AAATCTCTCG CCGTACACT GGGGAGACT AATTTTGGCG AAGTCTCAC CACTATGATC
 4201 AATGCCAAAC AAGTCTGAG CCAAGAGATT GAACCGGTG TGGTGGPCTT CAAGGCGCTC
 4261 CCGGGATGCG GCAAGAGCTT GCGCTCTAGG TTGATTGCGC AGGCTGTGTC CAAGGCGCTC
 4321 TATGGCTCCC AAGTCTGATA TTCTCTTCCC CAGATGACG ATTTCTTGA TGGATCAAA
 4381 GGACAGTTCG TAGCTTGAT GGAATGTTG GGAACAACCG CGGATGACCA AGATTCTCC
 4441 ACGTTTGTG AGATGSGTGC GACGCGCAA TTCTCCOCCA ACATGCGGGA CCGTGAGAG
 4501 AAGGGGCGTC CCGTTACCTC CAATCTCATC ATTGCACTA CAAATCTCCC CCAGTTGAT
 4561 CCGTCAACCA TTGCTGATCC TTCTGCGTGC TCTCGCGTGA TCAATGACGA TCTGACTTA
 4621 GAGTATCTG AGGCGTACAA GAACACACA CGGCTGAAAT TTGACTTGGC TTTCAGGCGC
 4681 ACAGAGCGCC CCGCCATTTA TCGTTTGTCT GCGCATGTGC CCGTTTGGG CGTAGCTGTG
 4741 CGCTTCAAAA ATGGTCAACA GAATTTTAA CTCTAGAGT TGGTCAATC CATTTGTACA
 4801 GACATTCGAG CCAAGCACCA AGGTGCGCGA AACATGAGA CTCTGCTTCT ACAGAGCGCC
 4861 AAGAGGATG ATGACACCCC CGTGACAGG GCGTTGGGTA GAGTTCTCTC CCGCGCTGCG
 4921 GTGATGAGG CGCTTGTGCA CTTCACTCCA GAGGCGAAC CCGTTGGCGC TTGGCTATT
 4981 CTTGCCAAGC TAGGCTTTCG CTTAGCTGGG GTCAACCGCTG GTCTGATAAT CTTGGCAGT
 5041 GGACTCTACA GGTACTTCTC TGCTCTGATG CGAGACAGG AAGAACAGA AAGTGAAGGA
 5101 TCTGTCAAGG CACCGAGAG GAAATATGCT TATGAGCGCC CGAGAAAGA CTTTAAAGCC
 5161 CCGGAGCAC TCTCTCTCAT GGAATGCAA CAGCGCAAG TGAGCATGGG CTTTGAAGCT
 5221 CGGCTGCTA AGAAAGTGGT CGTCCCGATT ACCTTCATGG TTCCCAACAG ACCCTCTGGG
 5281 CTTACAGAT CCGCTCTTCT GGTGACCGCG CGGACCTTCC TAACTAATGA ACATCATGG
 5341 TCAATCCCT CCGTACAGG CTTCAATC CGCGGTGGG TACACATCG TGAATGAGCC
 5401 TTCCAAAGCG TAGCTTTTAC TACCCAGGT ATTCCACAG ATCTGATGAT GGTAGCTCTC
 5461 GGACCGGACA ATTTCTTCCC TAACATCTA GACAAATTTG GACTTGACCA GATCGCGGCA
 5521 CGCACTGCC GTGTGGTTCG CGTTTCTGCC AGTACGAAA ACTCTCTCTT CTTGGGAAT
 5581 TTCTCTGGA TTGTGATTC CATCTCTCT CATCAAGGAA CTTAGCGAAG ACTCTTTAGG
 5641 TACAGGCTGA CGACTACAA AGATGCTGCG GCGTGGGCG TGGTCTGTA GCGCGTGGG
 5701 GTCCGAAGCA TCAATGCGCT GCAATCTGCT GCGCGCGCG GTATCGCGCG CCGGACTAT
 5761 ATCTCAAAAT TAGAGTAAAT CAAGGCGCTG AAGCACTGCG GTGAGCTTTT GGCACAAATG
 5821 CAAGGACTCA TGAATGAAAT AGAGCTGGA ATCAAGCTAC ATGACCGCG GAAATCCAAA
 5881 TTGAGAAAGA CGACGCGACA CCGGCTGATC AAGCGGAGT TTGAGCTGCG TGTCTGTGCA
 5941 AAATTTGATC CAGAGCTGAA CAGAGTATG GACTTGATG AAGTAATTG GCTTAACAC
 6001 ACTGCCAATG TCCCTTACA ACTCTCTTG TTCTACACT ACATGTCAGA GTAGCTCAT

FIG. 84C

【 図 8 4 D 】

6061 CGAGTCTTCT CCTCTTGGG GAAGAGCAAT GACATCTTGA CGGTCAAGAA AGCAATCTCG
 6121 GGCATCCCGC GACTAGAGCC CATGATGCC CACACAGCTC CGGCTCTGCC TTACGCCATC
 6181 AAGCGCTTC GAGTACTGA TCTGCTGAT TTGTGAAAG GTACAGTAGA TCGGGCGCTG
 6241 GCTGTACAAA TCCGAATAT CTTAGAGCT GACTACTCTG ACCATGCTT CCAAACTTTT
 6301 CTGAAGATG AGATCAGACC CTCAGAGAAA GTCCGAGCGG GAAAAACCGC CATTTGTGAT
 6361 GTGCGCTCCC TGGCGAATG CATTTGGGG AGAATGTTCG TTGGGCGCTT TGTGCCAAG
 6421 TTCAATCCC ATCTGCGCTT TCTCTGCGC CTCGCTAGCG GGTCTGACC TGAATTTTCT
 6481 TGGACCGCTA TAGGGCTCA ACTCGAGGG AGAAAGACA CTAATGACT GACTACAGT
 6541 GCTTTGACT CTTACAGCG CACTGCTCC TTGAGGCTC TCACTCTCA CTTTTTCACC
 6601 GTGGCAATG GTTTTAGGCC TGGCTGGGA CCGTATCTCA GATCCCTGCG TGTCTGGGTG
 6661 CAGGCTTAGG GCGAGCGTGC CATCAAGATT ACCGCTGGCC TCCCTCCGCG TTGTGCCGCG
 6721 ACCAGCTGCG TGAACAGAGT GCTCAAGAT GTGATCATCA GAGCTGCTCT GGCATTGACT
 6781 TACAGGAAT TTGAATAGA CATGTTGAT ATCACTGCTC ACGGTGACCA CTTCTGCTG
 6841 GGCACGATT ACGATCTGSA CTTCAATGAG GTGGCAGCAC CGGCTGCCAA GTTGGGCTAT
 6901 AAGATGACTC CTGCCAACA GGGTCTGCTC TTCCCTCCGA CTTCTCTCTT TTCCGATGCT
 6961 GTTTTCTTAA AGCGCAATAT GCTCCAAAC AAGCAGCGCT TATCAACAAC AGTATGAGAT
 7021 TTAAGAAAT TGAACACAT GCTCTCTTAC TTCAACACAG GAACACTACT CGAGAAGCTG
 7081 CAACTCTGTT CTATGTTGGC TCAACACTCT GGAAGAGAG AATATGATAG ATTGATGCTC
 7141 CCGTCTGCTG ACTAGCTGCG CTAACGAGT CAGCAGTACC TGCAGCAAG ATGGAAGGCC
 7201 TTGTTGACT GACCCAGATA GCGCAAGGCT CTTCGGTCTC GCGCGGATT CTGGGAGAAC
 7261 TCACTCGGAA CAGAAAGGG AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA (SEQ ID NO:168)

FIG. 84D

【 図 8 5 A 】

1 MQNSHFSFDT ASGTFFEDVTG TRVKIVEYPR SVNMVYDSS THLEILNLQG EIEILASFNE
 61 YQIRAAKQQL GLDIVEYLGQ NVQTSKND FDSRGNHNGMT FNYANYQN SVDFSSSSA
 121 SGAGPGNSRG GLAGLLNFS GILNPLGYLK DINTREEMNS ADRVTQTGAT NTAINTQSSL
 181 GVLCAVEDP TKSDFPSSST DQPTTITPAI DRWYTGRLNS WTKAVKTFES QAVPLGAPL
 241 SRQGLANGGA FTATLHRFLP MKCGNQVQVQ CNLTQFHQGA LLVAMVETFT LDVKGKAK
 301 SLQELNBSQW VEMSDDYRTG RMPFPQSLGT YRPPFWTWG PNFIPYQVT VPHQLMAR
 361 TSTSDVINVP YIGETPTQSS ETQNSWLLV MVLVELDYKE GATTDPEITF SVRPTSPYFN
 421 GLRNRYTAGT DERQGPITA PRENSLMFLS TLPDDTVEAY GNVRTPEVNY LRGELIDLLQ
 481 LARIPITMAF ERVPEPVAS DTVVPYVAV TQFDDRFLIS FEITLSDEPY QNTLGRALSS
 541 NFANYRGCIQ IYTLTFOGRM ARGKFLSYS PFWGTQPTL SRAMQCTYSI WDGLSSWTF
 601 FVVEYISPSD YRSBTRATNS VYSADGWFSL BKLTGKTLFP DQPSCEILP PASAGDYTL
 661 RLVPDGNPSY VHSSTDAET GVLEAGTDT DFGSELAPG SMHTNKEFLP DSRLLNVIK
 721 VLEKDAVFER PFTTQGAQQ DDGYFCLLTP RPTVASREPT REGLYANPSG SGVLNATSLD
 781 FNFYSLACTF YFRSLELVTV VSLEPDLEFA VGMFFSGSEY QASSFVYDQL HYVPHETGRT
 841 PRAPSKGKG VSFVLPMNSV SSVLPVWNG ASKLSSATRG LPAHADWGTI YAPVPAKNEK
 901 KSTAVKHAV YIRYKNRAW CFMLPFRSY KQMLMGSQD IETNFGPASD NPILSELAE
 961 NDVLTLASIN KMVHSVQQTW RRYKNDQFPW ENLLSELVGE GSVALAATLS NQASVHALG
 1021 LHFLSRGLMY TDYSLILLEK CSSEFTPEEP PPAENLMATK PSVEKSPKRL PMGGMMDKV
 1081 KWNQIAGL KNFQFVRLV KEVVQNLQAN INKEKASVLI QYQLMKRLG PYALADAFM
 1141 AGSGPPLSDD QIEYLNILKS LAULTGKTNL AQLTMTMINA EQSSAQREVP VVVYLGKPG
 1201 CGKSLASTLI AQAVSKLYG SQSVYSLPFD PDFFDGYKQG FVTLMDDLQG NPDGQDFSTF
 1261 CQMVSTAQTL PMADLAERK RPFTSNLIA TTNLFRHVPF TIADPSAVSR RINYDLTLEV
 1321 SEAYKHKTRL NYDLAFRTD APFIYFFAAS VFFVDVHVPF KNHGQFNLL ELVDICTDI
 1381 RAKQCGARM QTLVLQSPNE NDDTYPDEAL GVLSPAAVD EALVDLTPEA DPVGLALIA
 1441 KLGLALAVT PGLILTAGLV YRYFSGSDAD QETSESGSV KAPFSEAYD GPKNCKKFPF
 1501 ALSLMNQDP NVDMGFEEAV AKKVVPFIF MVFNRPGLT QSALLVTRGT FLINERTWSN
 1561 PSWTSFTING EVHTRDEFTQ TVRHTHGI P TDLMMVRLG GNSFPNNLQK FGLQKMPARN

FIG. 85A

【 図 8 7 A 】

VP2(部分)－VP3－VP1－2A(部分)

[illegible]

FIG. 87A

FIG. 85B

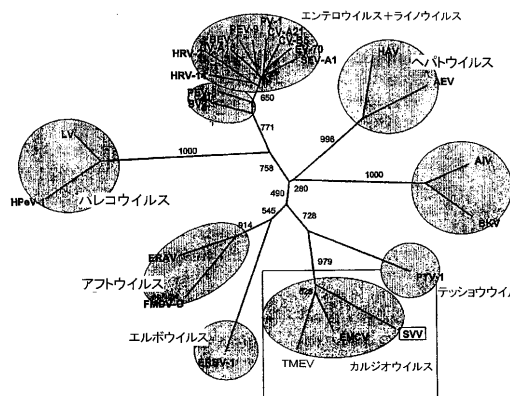


FIG. 86

【 図 8 7 C 】

[illegible]

FIG. 87B

[illegible]

FIG. 87C

【図 87D】

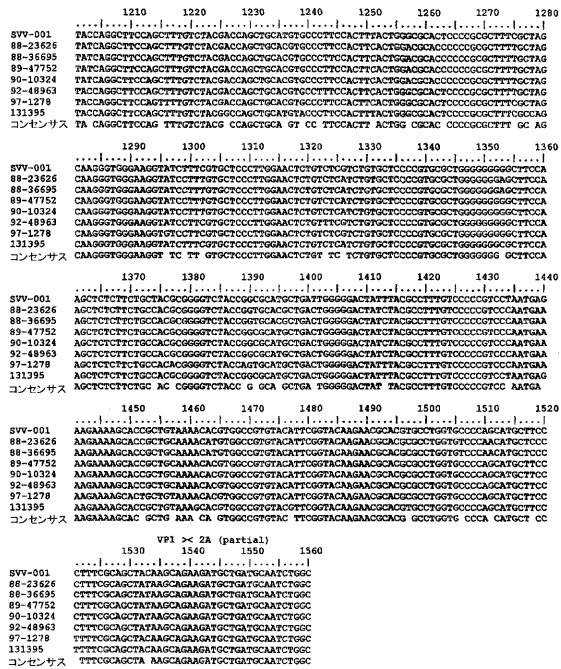


FIG. 87D

【図 89A】

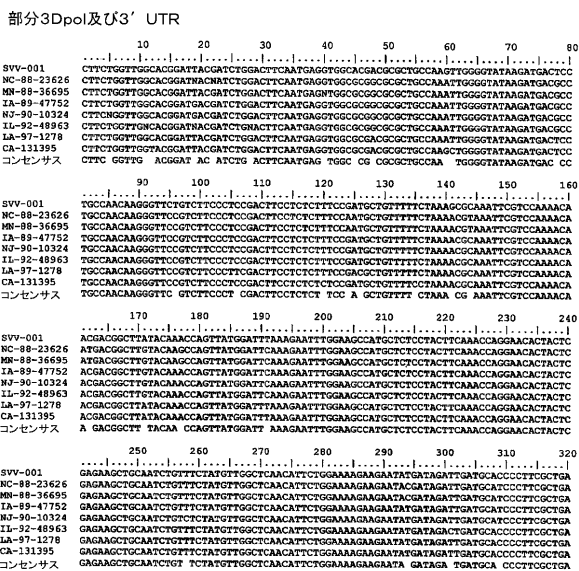


FIG. 89A

【図 88】

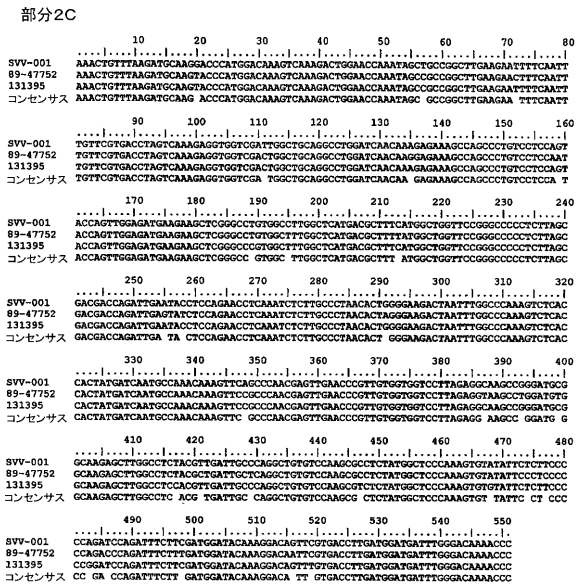


FIG. 88

【図 89B】

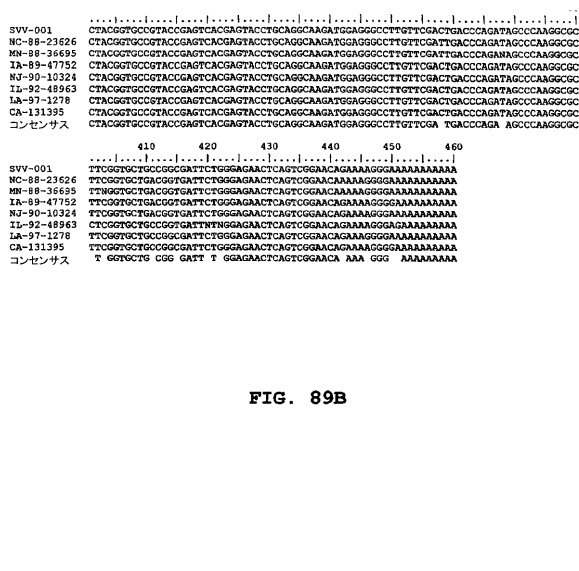


FIG. 89B

【図 90A】

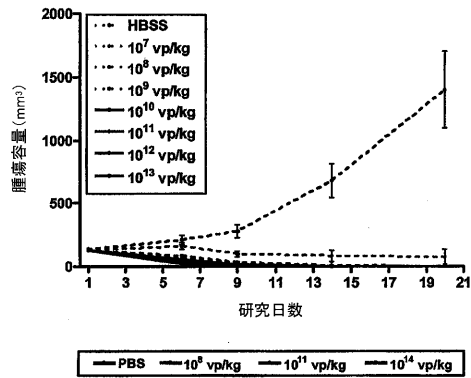


FIG. 90A

【図 90B】

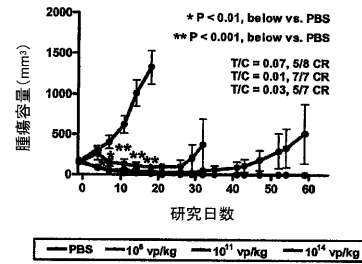


FIG. 90B

【図 90C】

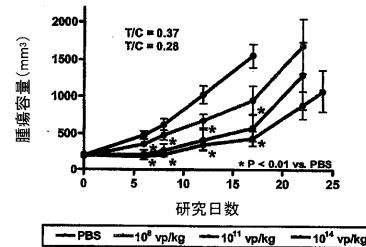


FIG. 90C

【図 90D】

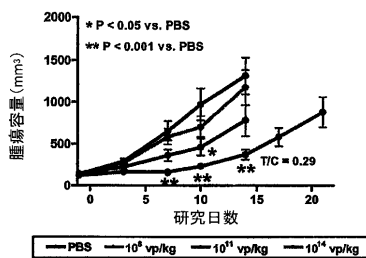


FIG. 90D

【図 90E】

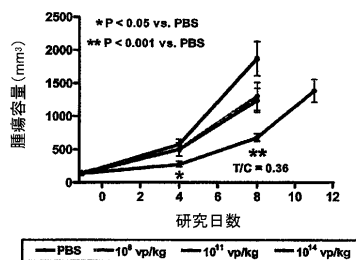


FIG. 90E

【図 91】

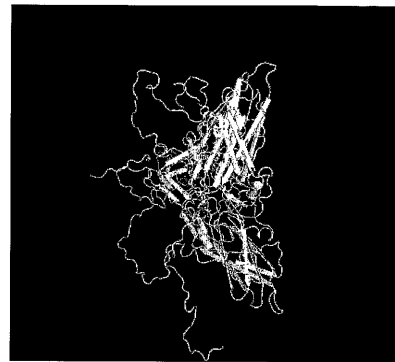


FIG. 91

【図 9 2 A】

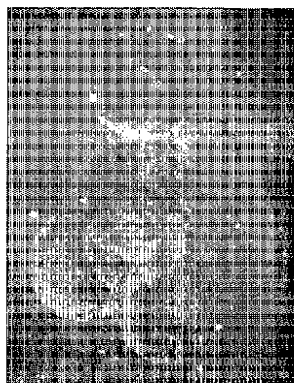


FIG. 92A

【図 9 2 B】

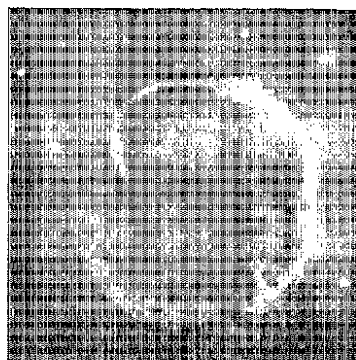


FIG. 92B

【図 9 2 C】

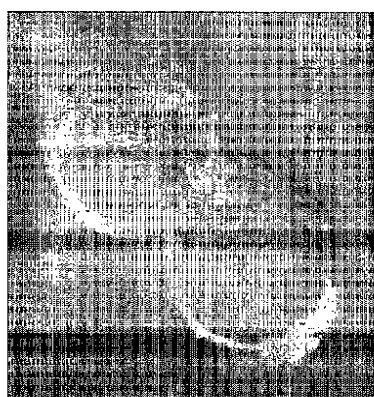


FIG. 92C

【図 9 2 D】

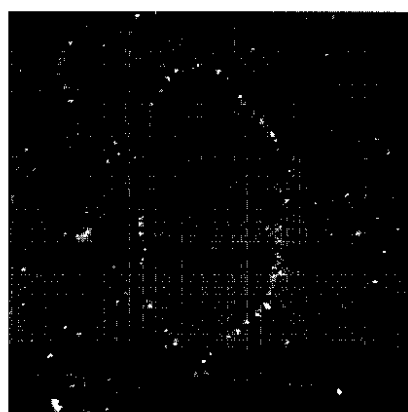


FIG. 92D

【図 9 3】

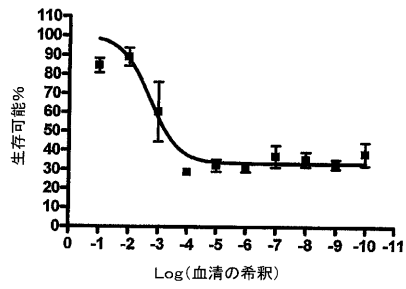


FIG. 93

【図 9 4】

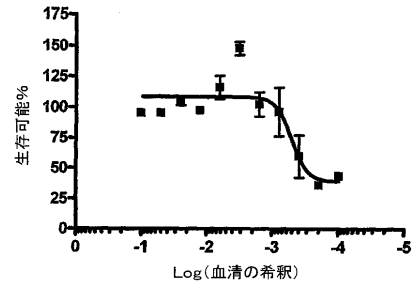


FIG. 94

【図 9 5 A】

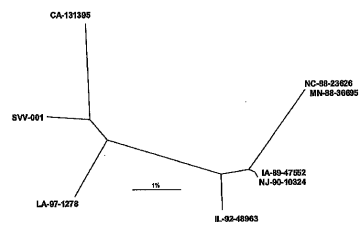


FIG. 95A

【図 9 5 B】

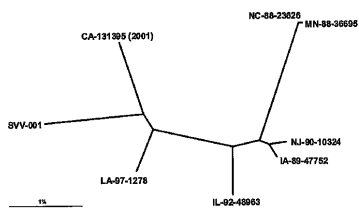


FIG. 95B

【配列表】

2008533988000001.app

【 国際調査報告 】

60800070008



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/09142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC: C07H 21/04(2006.01) A61K 48/00(2006.01)												
USPC: 536/23.1,24.5,514/44,424/93.1												
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) U.S. : 536/23.1,24.5,514/44,424/93.1												
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) STN, caplus, MEDLINE, WEST												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	US 5,708,157A (JACOBS et al.) 13 January 1998 (13.01.1998), SEQ ID NO: 25.	1-3										
X, P	WO2005030139 (HILLENBECK, P. L. A. et al.), 07 April 2005 (07.04.2005). See entire document.	1-37										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"I" 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</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" 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	"B" earlier application or patent 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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" 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											
"B" earlier application or patent 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 01 November 2007 (01.11.2007)		Date of mailing of the international search report 29 NOV 2007										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Bao Qun Li Telephone No. 571-272-1600										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

07.2.2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00

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

(72)発明者 ハレンベック ポール
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 5 5 モルヴァーン フェニックスヴィル パイク
 3 5 1

(72)発明者 ポリス センダー レディー
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 4 2 5 チェスター スプリングス プレスコット ド
 ライヴ 3 1 8

(72)発明者 ヘイルズ ローラ エム
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 4 2 5 チェスター スプリングス サドルブルック
 サークル 4 3 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA02 EA02 EA04 GA13 HA14
 4B065 AA95X BA02 BA05 CA44
 4C085 AA02 BA52 EE03
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA01 DA75 DA86 EA20