(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6280635号
(P6280635)

(45)発行日　平成30年2月14日(2018.2.14)　(24)登録日　平成30年1月26日(2018.1.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/085	(2006.01)	C07K	14/085	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 3　(全 45 頁)

(21)出願番号	特願2016-504621 (P2016-504621)
(86)(22)出願日	平成26年3月25日 (2014.3.25)
(65)公表番号	特表2016-516086 (P2016-516086A)
(43)公表日	平成28年6月2日 (2016.6.2)
(86)国際出願番号	PCT/EP2014/055904
(87)国際公開番号	WO2014/154655
(87)国際公開日	平成26年10月2日 (2014.10.2)
審査請求日	平成27年11月19日 (2015.11.19)
(31)優先権主張番号	13161139.4
(32)優先日	平成25年3月26日 (2013.3.26)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73)特許権者　515265651
ザ・パーブライト・インステイテユート
イギリス国、ウオーキング・ジーユー２４・０エヌエフ、パーブライト、アツシュ・ロード
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森　一輝
(74)代理人　100137213
弁理士　安藤　健司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】安定化ＦＭＤＶキャプシド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスに位置するアミノ酸の、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１個の置換を含むという特徴を有する、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ２タンパク質突然変異体であって、

αＡヘリックスに位置するアミノ酸は、配列番号１においてアミノ酸位置８７から位置９８までのアミノ酸に相当するアミノ酸であり、

ここで、変異体が、

１）血清型Ｏ変異体であり、変異がＨ８７Ｖ、Ｖ９０Ｎ、Ｙ９１Ｆ、Ｓ９３Ｈ、Ｓ９３Ｙ、Ｓ９３Ｆ、Ｓ９３Ｗ、Ｓ９３Ｑ、Ｌ９４Ｖ、Ｓ９７Ｖ、Ｓ９７Ｉ、Ｓ９７ＱまたはＹ９８Ｆ、

２）血清型Ａ変異体であり、変異がＨ９３ＦまたはＨ９３Ｑ、および

３）血清型ＳＡＴ－２変異体であり、変異がＳ９３Ｈ、Ｓ９３Ｙ、Ｓ９３Ｗ、Ｓ９３ＦまたはＹ９８Ｆ、

からなる群より選択される変異体であることを特徴とする、口蹄疫ウイルスＶＰ２タンパク質突然変異体。

【請求項２】

請求項１に記載の口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ２タンパク質突然変異体の調製方法であって、前記ＶＰ２タンパク質突然変異体が、非野生型αＡヘリックスを作製するため

に、ＶＰ２タンパク質の親αＡヘリックスの少なくとも１個のアミノ酸の、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸への置換により作製されることを特徴とする方法。

【請求項３】

請求項１に記載の口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ２タンパク質突然変異体の調製方法であって、前記ＶＰ２タンパク質突然変異体が、非野生型αＡヘリックスを作製するために、前記ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスに位置する１から４個のアミノ酸の置換により作製され、これらの１から４個のアミノ酸のそれぞれが、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸に置換されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、獣医学用医薬およびウイルス学の分野に関する。特に、本発明は、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞、生組換え担体微生物およびＦＭＤに対するワクチンに関する。さらに、本発明は、これらの実施形態のためのいくつかの方法およびこれらの実施形態の使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

口蹄疫（ＦＭＤ）は、偶蹄哺乳動物；偶蹄目を冒す急性の全身性および伝染力の強い疾患である。多くの野生種は別として、主要な関連標的は、ウシ、水牛、ブタ、ヒツジおよびヤギなどの家畜である。典型的な症状は、舌の水疱および鼓腸症であり；それゆえにこれが疾患名となる。これは非常に大きな不快感および二次感染を引き起こすだけでなく、発熱も起こり、時には死亡する。さらに、本疾患は、病に冒された動物が移動および摂食を停止するので、顕著な経済的損害を引き起こす。ＦＭＤは、届出疾患であり、多くの国がＦＭＤ陽性地域からの動物の輸入を拒絶しており、これは、輸出認証の国際的システムにより強制される（Ｐａｔｏｎら、２００９，Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄ．Ｂ　Ｂｉｏｌ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．３６４，ｐ．２６５７）。

【０００３】

ＦＭＤは、ピコルナウイルス科ファミリーのウイルスであり、アフトウイルス属の基準種である、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）により引き起こされる。ビリオンは、約８ｋｂの１本鎖陽性センスＲＮＡゲノムを含み、これは非エンベロープキャプシド中に含有される。キャプシドは、直径約３０ｎｍであり、正二十面体対称を有する。キャプシドは、４つの構造ウイルスタンパク質：ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３およびＶＰ４のそれぞれの６０コピーの非常に規則正しい配置からなる。これらは、ＶＰ１から４の各１個を含有する５Ｓの沈降係数のプロトマーサブユニットに編成され；５個のこれらのプロトマーが１２Ｓの五量体を形成し、完全なキャプシドは１２個の五量体からなる。これは、約７０Ｓの非感染性空キャプシドまたは感染性であり得るウイルスＲＮＡ内容物がある約１４６Ｓのビリオンキャプシドであり得る（Ｆｒｙら、２００５，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍ．，ｖｏｌ．２８８，ｐ．７１）。

【０００４】

正二十面体構造として、ＦＭＤＶキャプシドは、３つの天然のタイプの対称回転軸、プロトマーが集まって五量体に組み立てられる５回回転軸ならびに五量体サブユニットが集まる２つの回転軸、近隣のＶＰ２－ＶＰ２タンパク質が相互作用する対称の２回回転軸、およびＶＰ２－ＶＰ３タンパク質が相互作用する３回回転軸、を有する；図１参照。

【０００５】

ネイティブ複製において、ＦＭＤＶウイルスタンパク質は、Ｐ１と呼ばれる長いポリタンパク質前駆体として発現され、これはＶＰ４－２－３－１を含む。これはまた、ＦＭＤＶ　ＶＰがＰ１上での順序により命名されることがあるからでもあり、これによりＶＰ１

は、１Ｄ、ＶＰ２　１Ｂ、ＶＰ３　１Ｃであり、そして、ＶＰ４は１Ａと呼ばれる。非構造ＦＭＤＶによりコードされるタンパク質２Ａ－Ｃおよび３Ａ－Ｄによって、より小さい部分へのＰ１の翻訳後切断が行われる。（Ｃｈａｐｔｅｒ：Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ，Ｆｉｅｌｄｓ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，４ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，ＩＳＢＮ－１０：０７８１７１８３２５）

ＦＭＤの発生率または重症度を低下させ、並びにＦＭＤＶの蔓延を減少させるために、典型的な手段は、ワクチン接種、選択的殺処分および移動制限である。しかし、一部の国では大流行状態でのみワクチン接種が許可されるが、これは、輸出認証のシステムが動物がＦＭＤＶ血清学について陽性であるか否かによって動物を判断するからである。したがって、ワクチン接種と野生型感染との間の区別を可能にするマーカーワクチンが研究されている。

【０００６】

従来からのＦＭＤワクチンは、不活性化全ウイルス調製物のアジュベーテッドした（ａｄｊｕｖａｔｅｄ）エマルションであり、これは、保護レベルのウイルス中和抗体を誘導する。しかし、ＦＭＤＶ粒子の感染性が高いので、ウイルスの操作およびこのようなワクチンの産生は、高レベルのバイオセキュリティー条件下で行われる必要があり、特にウイルス不活性化において有効な品質管理を必要とする。

【０００７】

ＦＭＤＶは、非常に変化し易い病原体であり、現在、７種類の主要な血清型：Ｏ、Ａ、Ｃ、ＳＡＴ（南アフリカ地域）－１、ＳＡＴ－２およびＳＡＴ－３およびＡｓｉａ　１がある。これらの血清学的グループ内には、多くの抗原性変異体、サブタイプおよび疑似種がある。全ての血清型からの１００種類を超えるＦＭＤＶ分離株の翻訳されたゲノム配列を並列したＣａｒｒｉｌｌｏら（２００５，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７９，ｐ．６４８７）は有益である。

【０００８】

主要な血清型間で交差防御が殆どないので、一般にＦＭＤワクチンは、一般に混合ワクチンとしてそれが防御することを必要とする各血清型に対して個々のコンポーネントを含む。

【０００９】

有病率に関して、血清型ＡおよびＯは殆ど世界的に存在し、一方で血清型Ｃは２００４年以来大流行していない。３種類のＳＡＴ血清型はアフリカおよび中東のいくつかの地域で発生し、血清型Ａｓｉａ　１はアジアおよび中東で発生する。

【００１０】

この７種類の血清型はまた、生物物理学的特性、主にそれらの安定性も異なる。ＦＭＤＶは、伝染力が強いことは別として非常に不安定であり、また、熱、酸性、せん断などにより容易に不活性化されるので、これは実際的に意味がある。やはり、全ＦＭＤワクチンは、厳しいコールドチェーン・ロジスティクス下で輸送され、保管される必要がある。これは、ＦＭＤが風土病である世界の（亜）熱帯および発展途上地域では特別なハンディキャップである。この点において、血清型ＡおよびＡｓｉａ　１のビリオンは、他の血清型のものよりも比較的安定であり、実際的な保存期間は６カ月以上である。しかし、血清型Ｏワクチンの生体半減期は非常に制限されており、一般的には僅か数カ月である。この３種類のＳＡＴ血清型に対する状況はさらに悪く、周知のように安定性が低いために、複数回投与した場合でさえも防御能が低いワクチンしか得られない。

【００１１】

結果的に、安全で安定で効果的なＦＭＤワクチンの開発および改良が必要とし続けられている。

【００１２】

組換えＤＮＡ発現技術により作製されるＦＭＤワクチンも長年にわたり研究されてきた。例えば、細胞フリーでの発現または原核もしくは植物細胞を含む真核細胞での細胞に基づく発現など様々な系において、ＦＭＤＶサブユニットまたは－エピトープの発現によっ

て。

【００１３】

別の選択肢は空ＦＭＤＶキャプシドの使用であり；これらは、全ウイルスよりも作製が安全であり、効果的な免疫原であることが分かった（Ｒｗｅｙｅｍａｍｕら、１９７９，Ａｒｃｈ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．５９，ｐ．６９）。このような空キャプシドは、組換え発現系、例えばＥ．ｃｏｌｉ（Ｌｅｗｉｓら、１９９１，Ｊ．ｏｆ Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．６５，ｐ．６５７２；Ｌｅｅら、２００９，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．１６，ｐ．６９）またはウイルス発現系に基づき、例えば組換えワクシニアウイルス（Ａｂｒａｍｓら、１９９５，Ｊ．ｏｆ Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７６，ｐ．３０８９）；組換えバキュロウイルスを用いて、昆虫細胞（Ｃａｏら、２００９，Ｖｅｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．１３７，ｐ．１；Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎら、ＷＯ２０１１／０４８３５３；Ｓｕｂｒａｍａｎｉａｎら、２０１２，Ａｎｔｉｖｉｒ．Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．９６，ｐ．２８８）またはカイコ（Ｌｉら、２０１２，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１２；７（８）：ｅ４３８４９）；または生組換えベクター、例えば組換えアデノウイルスなど（Ｌｕら、２００８，ｖａｃｃｉｎｅ，ｖｏｌ．２６，Ｓｕｐｐｌ．６，ｐ．Ｇ４８）の何れかを用いて、効率的に作製され得る。

【００１４】

残念ながら、空キャプシドはビリオンキャプシドよりも安定性がかなり低いと判断されることが多く、明らかにウイルスＲＮＡゲノムそれ自身がＦＭＤＶキャプシド構造に対する幾分かの安定化効果を提供する。

【００１５】

いくつかのグループがＦＭＤＶキャプシドの安定性特性を調べており、ＦＭＤＶキャプシドは、生理的温度より上および生理的ｐＨより下で急速に解離して五量体になる。１２Ｓ五量体の免疫原性がインタクトなキャプシドよりもかなり低いので、ワクチン使用のためにこれは不都合である。Ｄｏｅｌら（１９８１，Ａｒｃｈ．ｏｆ Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７０，ｐ．２１）およびＨｅｇｄｅら（２００９，Ｅｄｉｔｏｒｉａｌ，Ｖａｃｃｉｎｅ，ｖｏｌ．２７，ｐ．２１９９）を参照。Ｔｗｏｍｅｙら（１９９５，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２０６，ｐ．６９）は、ＶＰ２タンパク質の位置１３１および１３３でのアミノ酸置換の結果、酸性感受性が低くなったＦＭＤＶ　Ａ血清型の天然の変異体を研究した。

【００１６】

ＦＭＤＶキャプシドの耐熱性および／または酸安定性を向上させるために、いくつかのグループがウイルス構造タンパク質の１以上に突然変異を導入し、次いでＦＭＤＶビリオンキャプシドを作製するためにこのようなＶＰ突然変異体を使用し、生物物理学的特性についてこれらを試験したが、これはいわゆるキャプシド操作である。

【００１７】

一般に、成功はまちまちであり、ＶＰ３の位置１４０から１４５におけるヒスチジン残基に対する突然変異によってある程度まで酸感受性を低下させることができた。Ｍａｒｔｉｎ－Ａｃｅｂｅｓら（２０１１，Ｊ．ｏｆ Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８５，ｐ．２７３３）、Ｌｉｕら（ＣＮ１０１２７０１５５）およびＥｌｌａｒｄら（１９９９，Ｊ．ｏｆ Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８０，ｐ．１９１１）。Ｍａｒｔｉｎ－Ａｃｅｂｅｓら（前出）は、ＶＰ１　Ｎ１７Ｄを置換した（アスパラギン酸による位置１７でのアスパラギンのＶＰ１おける置換を意味する。）。

【００１８】

同様に、ＶＰ２およびＶＰ３タンパク質の多くの領域におけるアミノ酸の突然変異によって、ＦＭＤＶキャプシド耐熱性を幾分向上させることができた。Ｍａｔｅｏら（２００８，Ｊ．ｏｆ Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８２，ｐ．１２２３２）、Ｋｉｎｇら（ＷＯ２００２／０００２５１）およびＦｏｗｌｅｒら（ＷＯ２０１１／０３２３４８）。概論については、Ｍａｔｅｕ（２０１１，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．，Ｄｅｓ．＆ Ｓｅｌ．，ｖｏｌ．２４，ｐ．５３）を参照。Ｍａｔｅｏら（前出）は、置換ＶＰ２　Ａ６５Ｈおよび組み合

わせ置換：ＶＰ３　Ｄ６９Ｅ／ＶＰ２　Ｔ１８８Ａを適用した。Ｆｏｗｌｅｒら（前出）は、ＶＰ２において、Ｌ７８Ｓ、Ｅ７９Ａ、Ｋ８０Ｒ、Ｔ８８Ａ、Ｅ１３１ＫまたはＡ１９３Ｓ；およびＶＰ３において、Ｈ８５ＰまたはＥ１９６Ａを置換した。

【００１９】

Ｋｉｎｇら（前出）によるアプローチは、非共有結合ではなく共有結合の導入によってＦＭＤＶキャプシドを安定化させようと試みた点でこの研究とは異なった。システインに対するＶＰ２アミノ酸の置換によって、Ｋｉｎｇらは、対称の２回回転軸で２個の隣接するＶＰ２タンパク質間に非天然のジスルフィド架橋を導入した。しかし、このアプローチは、空キャプシドを安定化させるために唯一適用可能なものであり、ビリオンキャプシドに対するものではない。これは、この方法において得られるキャプシドが永久に固定され、ビリオンキャプシドが宿主細胞の感染時にはもはや脱殻し得ないからである。

【００２０】

Ｋｉｎｇら（前出）により置換されたアミノ酸は、ＶＰ２タンパク質の位置９３に位置した（その配列番号３８のアミノ酸番号１７９としてＷＯ２００２／０００２５１に記載される。）。このアミノ酸位置は、そのネイティブ構造においてα－ヘリックスに折り畳むＶＰ２タンパク質の領域にあり、ＶＰ２タンパク質αＡヘリックスは、（Ｏ血清型の場合）ＶＰ２アミノ酸８８から９８に及ぶ（Ａｃｈａｒｙａら、１９８９，Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌ．３３７，ｐ．７０９を参照）。この領域はまた、別のピコルナウイルス、ヒトエンテロウイルスの脱殻の機序に関しても研究されたが（Ｗａｎｇら、２０１２，Ｎａｔｕｒｅ　Ｓｔｒ．＆　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．１９，ｐ．４２４）、しかし、その機序はＦＭＤＶの機序とは異なる。Ｗａｎｇらは、この領域において何らかの突然変異を作らないかまたは示唆しなかった。

【００２１】

先行技術におけるあらゆる努力にもかかわらず、改変ＦＭＤＶキャプシドに基づく、現在利用可能な一般に適用可能で免疫原的に効果的なＦＭＤワクチンはない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２２】

【特許文献１】Ｌｉｕら、中国特許第１０１２７０１５５号明細書
【特許文献２】国際公開第２００２／０００２５１号パンフレット
【特許文献３】国際公開第２０１１／０３２３４８号パンフレット

【非特許文献】

【００２３】

【非特許文献１】Ｐａｔｏｎら、２００９，Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄ．Ｂ　Ｂｉｏｌ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．３６４，ｐ．２６５７
【非特許文献２】Ｆｒｙら、２００５，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍ．，ｖｏｌ．２８８，ｐ．７１
【非特許文献３】Ｃｈａｐｔｅｒ：Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ，Ｆｉｅｌｄｓ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，４ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，ＩＳＢＮ－１０：０７８１７１８３２５）
【非特許文献４】Ｃａｒｒｉｌｌｏら、２００５，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７９，ｐ．６４８７
【非特許文献５】Ｒｗｅｙｅｍａｍｕら、１９７９，Ａｒｃｈ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．５９，ｐ．６９
【非特許文献６】Ｌｅｗｉｓら、１９９１，Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．６５，ｐ．６５７２
【非特許文献７】Ｌｅｅら、２００９，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．１６，ｐ．６９
【非特許文献８】Ａｂｒａｍｓら、１９９５，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７６，ｐ．３０８９

【非特許文献９】Ｃａｏら、２００９，Ｖｅｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．１３７，ｐ．１
【非特許文献１０】Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎら、ＷＯ２０１１／０４８３５３
【非特許文献１１】Ｓｕｂｒａｍａｎｉａｎら、２０１２，Ａｎｔｉｖｉｒ．Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．９６，ｐ．２８８
【非特許文献１２】Ｌｉら、２０１２，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．２０１２；７（８）：ｅ４３８４９
【非特許文献１３】Ｌｕら、２００８，Ｖａｃｃｉｎｅ，ｖｏｌ．２６，Ｓｕｐｐｌ．６，ｐ．Ｇ４８
【非特許文献１４】Ｄｏｅｌら、１９８１，Ａｒｃｈ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．７０，ｐ．２１
【非特許文献１５】Ｈｅｇｄｅら、２００９，Ｅｄｉｔｏｒｉａｌ，Ｖａｃｃｉｎｅ，ｖｏｌ．２７，ｐ．２１９９
【非特許文献１６】Ｔｗｏｍｅｙら、１９９５，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２０６，ｐ．６９
【非特許文献１７】Ｍａｒｔｉｎ－Ａｃｅｂｅｓら、２０１１，Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８５，ｐ．２７３３
【非特許文献１８】Ｅｌｌａｒｄら、１９９９，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８０，ｐ．１９１１
【非特許文献１９】Ｍａｔｅｏら、２００８，Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．８２，ｐ．１２２３２
【非特許文献２０】Ｍａｔｅｕ、２０１１，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．，Ｄｅｓ．＆　Ｓｅｌ．，ｖｏｌ．２４，ｐ．５３
【非特許文献２１】Ａｃｈａｒｙａら、１９８９，Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌ．３３７，ｐ．７０９
【非特許文献２２】Ｗａｎｇら、２０１２，Ｎａｔｕｒｅ　Ｓｔｒ．＆　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．１９，ｐ．４２４

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２４】
本発明の目的は、全てのＦＭＤＶ血清型に適用可能であり、そして、ＦＭＤＶ空キャプシドまたはＦＭＤＶビリオンキャプシドの何れかに基づき得る代替的なＦＭＤワクチンを提供することである。さらなる目的は、改良されたＦＭＤワクチンを提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００２５】
発明者らがＫｉｎｇら（前出）により記載の技術を適用することを試みた際、残念ながら、Ａ型以外の血清型の空ＦＭＤＶキャプシドを作製するためにこのアプローチを適用できなかった。例えば、システイン置換は、ヘリックスの位置９３または他の位置の何れかで血清型ＯのＦＭＤＶからのＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスにおいてなされた。空キャプシドの作製が試みられたが、キャプシドが全く形成されないかまたはキャプシドが激しく凝集し、それによってワクチン目的のために使用できなくなる。
【００２６】
驚くべきことに、共有結合の導入を必要とせずに、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスの領域で特異的なアミノ酸置換を含むＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を提供することによって、この目的を満足させ得、結果的に先行技術の短所が克服され得ることが分かった。
【００２７】
このようなＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体が、現在、ＦＭＤＶキャプシドに組み込まれ得、次いで顕著に改良された生物物理学的安定性が得られる。ここで、得られた

安定化ＦＭＤＶキャプシドが、ビリオンキャプシドまたは空キャプシドに基づく有益なＦＭＤワクチンを作製するために使用され得る。

【００２８】

正確な作用の機序が分かっていない一方で、何らかの理論またはモデルに縛られることなく、発明者らは、この領域におけるこのような置換の有益な効果は、これがＦＭＤＶキャプシドに対して分子レベルで疎水性および／または静電気学的安定化を提供することであると推測する。おそらく、これは、ＦＭＤＶキャプシドの２回対称回転軸の領域の２個の隣接するＶＰ２タンパク質間の分子間相互作用を促進することによって生じる。これは、近接する五量体間の相互作用を強化し、その結果、全体としてＦＭＤＶキャプシドの安定性が顕著に向上する。

【００２９】

ＦＭＤＶキャプシドの安定性向上の結果、非修飾親ＶＰ２タンパク質とともにＦＭＤＶキャプシド全体に多くの長所が得られる。ＶＰ２タンパク質突然変異体含有キャプシドは、より大量に作製され得、これらは、コールドチェーン・ロジスティクス時にあまり厳しくない要件で輸送され得、これらは免疫反応の向上をもたらす。

【００３０】

ＶＰ２タンパク質のこの特異的な領域に対して非共有結合突然変異が以前に記載されておらず、またはＦＭＤＶキャプシド安定性およびそれから産生されるＦＭＤワクチンに対してこのような顕著な改良が得られることが予想され得る非共有結合突然変異がなかったので、これは全て予想外であった。

【００３１】

したがって、ある態様において、本発明は、ＶＰ２タンパク質突然変異体が、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスに位置するアミノ酸の、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１個の置換を含むという特徴を有する、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ２タンパク質突然変異体に関する。

【００３２】

本発明のための「口蹄疫ウイルス」は、分類学的種ＦＭＤＶのメンバーの特徴的な特性を有するウイルスである。これは、例えば亜種、疑似種、株、分離株、遺伝子型、血清型、血清型亜型、変異体またはサブタイプなどとして、何らかの方法でそこから細分類されるＦＭＤＶも含む。当業者にとって当然のことながら、微生物が現在ＦＭＤＶと名付けられ得る一方で、これは、新しい知見が新しいかまたは異なる分類学的群への再分類につながる場合に変更され得る分類学的な分類である。しかし、これは、関与する微生物またはその特徴的な特性を変化させず、変化するのはその名称または分類だけなので、このような再分類生物は、本発明の範囲内に留まるとみなされる。

【００３３】

本発明のための「ＶＰ２タンパク質」は、ＦＭＤＶのウイルスタンパク質番号２を指し、これはＦＭＤＶキャプシドの構造タンパク質として知られる。これは、約２１８個のアミノ酸および約２４ｋＤａの分子量を有する。当業者により容易に認められるように、ＦＭＤＶに固有である可変性は、ＶＰ２タンパク質のサイズおよびアミノ酸配列の変動が天然に起こることを意味する。多数のＦＭＤＶ分離株からのＶＰ２タンパク質のアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ（商標）またはＳｗｉｓｓ　Ｐｒｏｔ（商標）などの配列データベースで公開されている。

【００３４】

本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体は、生体または合成由来であり得、単離、精製、アセンブリーなどによって得られ得る。好ましくは、ＶＰ２タンパク質突然変異体は、組換え発現技術の使用を通じて、ＶＰ２タンパク質突然変異体をコードするヌクレオチド配列の発現により得られる。

【００３５】

本発明における使用のためのＶＰ２タンパク質は、ＦＭＤＶから、例えばＦＭＤＶまたはそのヌクレオチド配列からＶＰ２タンパク質をコードする核酸を得ることによって得る

ことができる。このようなＦＭＤＶは同様に、様々なソースから、例えば元の野生分離株として、またはＡＴＣＣまたはＣＮＣＭなどの預託機関から、または様々な研究室および（参照）研究所、例えばＰｉｒｂｒｉｇｈｔ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｐｉｒｂｒｉｇｈｔ，Ｗｏｋｉｎｇ，ＵＫ）などから、ＦＡＯおよびＦＭＤに対する世界参照試験所であるＷＨＯ（ＷＲＬ　ＦＭＤ）から、（適切なバイオセキュリティー基準で）得ることができる。

【００３６】

本発明における使用のためのＦＭＤＶは、Ａ、Ｏ、Ｃ、ＳＡＴ－１、ＳＡＴ－２、ＳＡＴ－３またはＡｓｉａ１血清型の１以上のＦＭＤＶであり；好ましくは本発明における使用のためのＦＭＤＶは、ある時間に野外を循環している１以上のＦＭＤＶである。

【００３７】

これらの血清型に対して、安定性に関する問題がないことがこの分野で最も影響があるので、より好ましいのは、Ｏ、ＳＡＴ－１、ＳＡＴ－２またはＳＡＴ－３血清型からの１以上のＦＭＤＶである。

【００３８】

あるいは、好ましいＦＭＤＶは、優先度の高いワクチン候補としてＷＲＬ　ＦＭＤにより推奨されるものであり、例えば、それらの最新レポートにおいて、これらは、Ｏ　Ｍａｎｉｓａ、Ｏ　ＰａｎＡｓｉａ－２、Ｏ　ＢＦＳ、Ｏ　Ｃａｍｐｏｓ、Ａ　２４　Ｃｒｕｚｅｉｒｏ、Ａｓｉａ　１　Ｓｈａｍｉｒ、Ａ　Ｉｒａｎ－０５、Ａ　２２　Ｉｒａｑ、ＳＡＴ－２　Ｓａｕｄｉ　ＡｒａｂｉａおよびＳＡＴ－２　Ｅｒｉｔｒｅａまたはこれらの何れかの同等物である（ＷＲＬ　ＦＭＤ　Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ　ｒｅｐｏｒｔ，Ｏｃｔｏｂｅｒ－Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１２）。

【００３９】

本発明のための「突然変異体」は、天然からまたは実験室からの何れかにおいても、以前には公然知られていないかまたは利用可能でなかったものである。したがって、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、本発明の前に先行技術で記載されたＶＰ２タンパク質とは異なる。特に、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体として適格とされる、現在知られているＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質アミノ酸配列はない。やはり、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体は天然から得られ得るが、好ましくは人工的である。

【００４０】

したがって、一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスに位置するアミノ酸の、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含むが、ただし、この置換の結果、先行技術で知られるアミノ酸配列を伴うＶＰ２タンパク質は得られないものとする。

【００４１】

したがって、さらなる実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスに位置するアミノ酸の、Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、ＷおよびＨからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含むが、ただし、この置換の結果、次のアミノ酸配列のうち１以上（または全て）を伴うＶＰ２タンパク質は得られないものとする。

【００４２】

・（例えば株Ｏ１ＢＦＳおよび／またはＯ１Ｍ＿８７におけるような）血清型ＯのＦＭＤＶにおける９０Ｖ、および／または血清型Ｃ（例えばＣＳ８ｃ１）における９０Ｖでなく、および／または血清型Ａｓｉａ　１（例えばＡＳＩＡ１＿Ｂａｒ２００３）における９０Ｖではなく、および／または血清型Ａ（例えばＡ２２＿Ｉｒａｑ＿９５）における９０Ｖではなく、および／または血清型ＳＡＴ－１（例えばＳＡＴ１＿ｂｏｔ）における９０Ｉではなく、および／または血清型ＳＡＴ－２（例えばＳＡＴ２＿ＺＩＭ７＿８３）における９０Ｉではなく、および／または血清型ＳＡＴ－３（例えばＳＡＴ３＿ＫＮＰ１０＿

９０）における９０Ｉではないもの。
・９１Ｙ。
・血清型ＡのＦＭＤＶにおける９３Ｈ（例えば株Ａ２２＿Ｉｒａｑ＿９５におけるようなもの）、および／または血清型ＳＡＴ－１（例えばＳＡＴ１＿ｂｏｔ）における９３Ｑではないもの。
・（例えば株Ｏ１ＢＦＳおよび／またはＯ１Ｍ＿８７におけるような）血清型ＯのＦＭＤＶにおける９４Ｌ、および／または血清型Ｃ（例えばＣＳ８ｃ１）における９４Ｌでなく、および／または血清型Ａｓｉａ　１（例えばＡＳＩＡ１＿Ｂａｒ２００３）における９４Ｌではなく、および／または血清型Ａ（例えばＡ２２＿Ｉｒａｑ＿９５）における９４Ｌではなく、および／または血清型ＳＡＴ－１（例えばＳＡＴ１＿ｂｏｔ）における９４Ｌではなく、および／または血清型ＳＡＴ－２（例えばＳＡＴ２＿ＺＩＭ７＿８３）における９４Ｌではなく、および／または血清型ＳＡＴ－３（例えばＳＡＴ３＿ＫＮＰ１０＿９０）における９４Ｍではないもの。
・（例えば株ＣＳ８ｃ１におけるような）血清型ＣのＦＭＤＶにおける９５Ｖ、および／または血清型Ａｓｉａ　１（例えば株ＡＳＩＡ１＿Ｂａｒ２００３におけるような）における９５Ｍではなく、および／または血清型Ａ（例えばＡ２２＿Ｉｒａｑ＿９５）における９５Ｖではなく、および／または血清型ＳＡＴ－１（例えばＳＡＴ１＿ｂｏｔ）における９５Ｖではなく、および／または血清型ＳＡＴ－３（例えばＳＡＴ３＿ＫＮＰ１０＿９０）における９５Ｌではないもの。
・（例えば株Ｏ１ＢＦＳおよび／またはＯ１Ｍ＿８７におけるような）血清型ＯのＦＭＤＶにおける９８Ｙ、および／または血清型Ｃ（例えばＣＳ８ｃ１）における９８Ｙでなく、および／または血清型Ａｓｉａ　１（例えばＡＳＩＡ１＿Ｂａｒ２００３）における９８Ｙではなく、および／または血清型Ａ（例えばＡ２２＿Ｉｒａｑ＿９５）における９８Ｆではなく、および／または血清型ＳＡＴ－１（例えばＳＡＴ１＿ｂｏｔ）における９８Ｈではなく、および／または血清型ＳＡＴ－２（例えばＳＡＴ２＿ＺＩＭ７＿８３）における９８Ｙではなく、および／または血清型ＳＡＴ－３（例えばＳＡＴ３＿ＫＮＰ１０＿９０）における９８Ｈではないもの。
【００４３】
このような本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を得るための方法は、無作為なまたは方向性があるアプローチに基づき得；例えば突然変異体は、無作為の野生分離株から同定および選択され得る。また、例えば突然変異誘発物質の存在下でＦＭＤＶを継代し、続いて本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶに対して選択を行うことによって、突然変異を誘発するためにウイルス－細胞継代が行われ得、その結果、より安定なキャプシドが得られる。このような安定性は、選択的な酸性レベル、温度、せん断、化学物質などを適用し、インタクトであることについておよび感染性について、例えば本明細書中で記載し例示するように、継代した分離株と継代していない分離株を比較することによって試験され得る。
【００４４】
好ましい実施形態において、構造分析のためのインシリコの方法を用いて本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体をランク付けし、例えばクローニング、遺伝子移入、組換え、選択および増幅を含む方向性のある分子生物学的技術を用いて調製した。このような技術は、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ｂａｓｉｃ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．（１９８６）；およびＳａｍｂｒｏｏｋ　＆　Ｒｕｓｓｅｌｌ，２００１：「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｍａｎｕａｌ」，３ｒｄ　ｅｄｎ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓなどの周知のハンドブックに詳しく記載されている。
【００４５】

ＶＰ２タンパク質の突然変異に対する詳細な方法は、本明細書中でも記載し、例示する。したがって、当業者は、従来のものに過ぎない方法および材料を用いて、これらの技術において容易に適用し、適応させ、改変し、改良し得るであろう。

【００４６】

「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」という用語（ならびに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含まれる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」および「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変形物）は、本明細書中で使用される場合、文章セクション、段落、請求項などにおいてカバーされるかまたは含まれる、本発明に対して想定できるあらゆる可能な組み合わせで全ての要素を指すものとし、この用語は、このような要素または組み合わせが明らかに示されない場合でも使用され、いかなるこのような要素または組み合わせの排除も指すものではない。したがって、何らかのこのような文章セクション、段落、請求項なども、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」という用語（またはその変形物）が、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｏｆ）」、「からなること（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」または「を主成分とする（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」などの用語により置き換えられる１以上の実施形態に関し得る。

【００４７】

「置換」は、ある１つの要素の別の要素への置き換えであり、本発明の場合、これは、対象がタンパク質、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子であるかに依存して、ある１個のアミノ酸または核酸の別のものによる置き換えを考慮する突然変異である。置き換えられる要素は、未修飾の親または野生型のタンパク質または核酸において生じる要素である。結果として、本発明による置換は、その親または野生型αＡヘリックスとは異なるαＡヘリックスをもたらし、すなわち、これは、αＡヘリックス野生型とは異なる修飾されたαＡヘリックスをもたらす。何れの野生型αＡヘリックスも本明細書中で上記で取り組む安定性の問題を有する。本発明は、天然では知られておらず、空キャプシドを安定化するというその特性に関して改良されているαＡヘリックスにつながる。

【００４８】

「αＡヘリックス」は、ネイティブキャプシド立体構造においてアルファヘリックス構造に折り畳み得るＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質の領域である。

【００４９】

本発明に対する参照とするために、「配列番号１」は、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＡＡＴ０１７５８のもとで公開されているＦＭＤＶ血清型Ｏ、株１ＢＦＳのＰ１タンパク質から取得されるＶＰ２タンパク質のアミノ酸配列を与え；ＶＰ２タンパク質は、完全なＰ１ポリプロテインのアミノ酸番号２８７から５０４の区画である。配列番号１において、αＡヘリックスは、１２アミノ酸長であり、アミノ酸位置８７から位置９８まで（位置９８を含む。）に位置する。

【００５０】

ＦＭＤＶの固有の可変性は、他のＦＭＤＶ分離株または血清型のＶＰ２タンパク質におけるこのαＡヘリックスの位置が全く同じ位置にはなく、例えばこれがＮ末端またはＣ末端方向の何れかで１以上のアミノ酸によって相殺され得ることを意味する。やはり、αＡヘリックスは、例えば分子生物学的分析のための標準的なコンピュータープログラムを用いて、ＶＰ２アミノ酸配列において容易に同定され得る。結果的に、本発明に対して、ＶＰ２　αＡヘリックスのアミノ酸位置番号は配列番号１に対して指定されるが、異なるＦＭＤＶ分離株において、これらは異なる位置番号に位置し得る。

【００５１】

したがって、本発明に対して、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスは、ＶＰ２アミノ酸位置番号８７と９８との間の範囲に対応する領域に位置する約１２アミノ酸長の領域であり、これらの位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００５２】

好ましくは、ＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスは、アミノ酸位置番号８７から位置９８まで（位置９８を含む）に位置し、これらの位置番号は、配列番号１で与えられるアミ

ノ酸の付番に対するものである。

【００５３】

出願日に公知である異なるＦＭＤＶ分離株間で生じる配列可変性のレベルを単に説明するために、図２は、代表的ないくつかのＦＭＤＶ分離株に対するＶＰ２タンパク質のαＡヘリックスのアミノ酸配列の多重アライメントを与える。Ｃａｒｒｉｌｌｏら（前出）は、ＶＰ２タンパク質αＡヘリックス領域において一般的に保存されるアミノ酸が、位置８９および９２（配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対する）のグリシンのみであることを示す。

【００５４】

アミノ酸：「Ｑ、Ｎ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、Ｙ、WおよびＨ」は、ＩＵＰＡＣ標準に従う周知の一文字コードで表される。三文字ＩＵＰＡＣ標準コードにおいて、この全体は、「Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、ＴｒｐおよびＨｉｓ」と読む。これらのアミノ酸のうち、ＱおよびＮは、通常Ｈも有するように、極性の非荷電側鎖を有し；Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、ＹおよびWは疎水性側鎖を有し；アミノ酸Ｆ、Ｙ、WおよびＨは芳香族側鎖を有する。

【００５５】

置換しようとする好ましいアミノ酸は、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｆ、ＹおよびWからなる群から選択される疎水性側鎖を有する１以上のアミノ酸またはＦ、Ｙ、WおよびＨからなる群から選択される芳香族側鎖を有する１以上のアミノ酸である。置換しようとするより好ましいアミノ酸は、Ｆ、Ｙ、WおよびＨからなる群から選択される芳香族側鎖を有する１以上のアミノ酸である。

【００５６】

この優先傾向は、疎水性側鎖を有するアミノ酸および特に芳香族側鎖を有するアミノ酸が、比較的大きいにもかかわらず、２回回転対称軸のＦＭＤＶキャプシドの領域に予想外に良好に適合するという驚くべき知見に基づいており、このような置換によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドに対して顕著な安定化効果を提供することが分かった。

【００５７】

本発明に対して、芳香族アミノ酸は、芳香族側鎖を有するアミノ酸である。ヒュッケル則に適合する環構造を含む場合、側鎖は芳香族である。

【００５８】

ＶＰ２タンパク質αＡヘリックスのいくつかの位置において、本発明によるアミノ酸置換が特に有利であった。

【００５９】

したがって、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体の好ましい実施形態において、本発明は、８７、９０、９１、９３、９４、９７および９８からなる群から選択される少なくとも１つの位置のアミノ酸の置換を考慮し、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００６０】

好ましい実施形態において、本発明のための置換に対するＶＰ２タンパク質αＡヘリックスにおける位置は、８７および／または９８でのＶＰ２タンパク質αＡヘリックスにおける１以上の位置であり、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。ＶＰ２タンパク質αＡヘリックスのＮ－およびＣ－末端に位置するこれらのアミノ酸位置で、置換は、驚くべきことに、このようなＶＰ２タンパク質突然変異体を含有するＦＭＤＶキャプシドを安定化させることが可能であることが分かった。

【００６１】

好ましい実施形態において、本発明のための置換に対するＶＰ２タンパク質αＡヘリックスにおける位置は、９０、９３および９７のうち１以上の位置であり；ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するもので

ある。発明者らは、ＶＰ２タンパク質αＡヘリックス中のこれらの位置におけるアミノ酸の側鎖が、２回回転対称軸にわたる対立ＶＰ２タンパク質に対して配向されることが分かった。これにより、これらの位置において選択された突然変異がキャプシドでの安定化効果を有することが可能になった。

【００６２】

結果として、これらの位置でのアミノ酸置換により誘導される非共有分子相互作用は、２回回転対称軸にわたる安定化において効果的に作用する。

【００６３】

より好ましい実施形態において、本発明のための置換に対するＶＰ２タンパク質αＡヘリックスにおける位置は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対して位置番号９３である。このアミノ酸位置は、ＶＰ２タンパク質αＡヘリックスの中央に位置し、そのアミノ酸側鎖が対立するＶＰ２タンパク質における同等な残基に向けられることが分かった。結果として、この位置でＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質のアミノ酸配列に対して置換がなされる場合、これは、２回回転対称軸にわたり非共有相互作用を形成し得、これがこのようなＶＰ２タンパク質突然変異体を含有するＦＭＤＶキャプシドを大きく安定化し得る。

【００６４】

実例として、図３は、ＶＰ２　９３Ｗ置換を含むＦＭＤＶキャプシドにおいて２回回転対称軸にわたり形成される非共有（疎水性スタッキング）相互作用の３Ｄ像を与える。

【００６５】

本発明に対して、非共有化学相互作用は、イオン性、水素－、ファンデルワールスまたは疎水性相互作用などの原子間力による分子間相互作用である。

【００６６】

本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体のさらなる好ましい実施形態において、ＶＰ２タンパク質突然変異体は、８７Ｖ、８７Ｍ；９０Ｎ、９０Ｌ；９１Ｆ；９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗ、９３Ｈ、９３Ｖ、９３Ｌ、９３Ｉ、９３Ｍ、９３Ｑ；９４Ｖ；９７Ｉ、９７Ｍ、９７Ｖ、９７Ｑ；９８Ｆおよび９８Ｈからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００６７】

上述のように、この実施形態もまた、ＶＰ２におけるアミノ酸の置換の結果、ＦＭＤＶＶＰ２タンパク質における先行技術において知られる次のアミノ酸配列の１以上（または全て）は得られないという条件のもとにある：

・血清型ＡのＦＭＤＶにおける９３Ｈ、および／または血清型ＳＡＴ－１における９３Ｑではないもの；

・血清型Ａにおける９８Ｆ、および／または血清型ＳＡＴ－１における９８Ｈではないもの、および／または血清型ＳＡＴ－３における９８Ｈではないもの。

【００６８】

本発明に対して、「ＶＰ２　９３Ｆ」などの表記は、アミノ酸位置番号９３のＶＰ２中の何らかの親アミノ酸（配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対する）の、指示されるアミノ酸（ここではフェニルアラニン）への置換を示すものとする。

【００６９】

好ましいアミノ酸置換の複数の組み合わせもまた本発明の範囲内である。したがって、例えば、本発明のＶＰ２タンパク質突然変異体は、９７Ｉまたは９７Ｍおよび／または９０Ｎ置換とともに、９３Ｙ、９３Ｆまたは９３Ｈ置換を含み得る。本発明の範囲内である置換の特異的な組み合わせの他の例としては、９３Ｙおよび９７Ｉ；９０Ｎおよび９３Ｙ；８７Ｖおよび９３Ｆ；９３Ｈおよび９８Ｆ；９３Ｆおよび９８Ｆ；９１Ｆおよび９８Ｆ；９５Ｖおよび９８Ｆ；および８７Ｖおよび９８Ｆからなる群から選択される二重置換を有するＶＰ２タンパク質突然変異体が挙げられる。一実施形態において、本発明は、９３Ｈ、９５Ｖおよび９８Ｆ；９３Ｆ、９４Ｖおよび９８Ｆ；８７Ｖ、９０Ｌおよび９３Ｑ；９０Ｌ、９３Ｑおよび９８Ｆ；および９０Ａ、９３Ｑおよび９８Ｆからなる群から選択さ

れる三重置換を有するＶＰ２タンパク質突然変異体を含む。４つの置換を有するＶＰ２タンパク質突然変異体の例は、８７Ｖ、９０Ｌ、９３Ｙおよび９７ＩがあるＶＰ２タンパク質突然変異体である。全てのＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００７０】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗ、９３Ｈ、９３Ｖ、９３Ｌ、９３Ｉ、９３Ｍおよび９３Ｑからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものであり、ただし、置換の結果、次のアミノ酸配列のうち１以上（または全て）を有するＶＰ２タンパク質は得られないものとする：血清型ＡのＦＭＤＶにおける９３Ｈ、および／または血清型ＳＡＴ－１における９３Ｑではないもの。

【００７１】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗ、９３Ｖ、９３Ｌ、９３Ｉおよび９３Ｍからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つのアミノ酸置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００７２】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗおよび９３Ｈからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものであり、ただし、置換の結果、血清型ＡのＦＭＤＶにおけるアミノ酸配列９３Ｈを有するＶＰ２タンパク質は得られないものとする。

【００７３】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、９８Ｆおよび９８Ｈからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものであり、ただし、置換の結果、次のアミノ酸配列のうち１以上（または全て）を有するＶＰ２タンパク質は得られないものとする：血清型ＡのＦＭＤＶにおける９８Ｆ、および／または血清型ＳＡＴ－１における９８Ｈではないもの、および／または血清型ＳＡＴ－３における９８Ｈではないもの。

【００７４】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、血清型：Ｏ、Ａｓｉａ　１、ＳＡＴ－１、ＳＡＴ－２およびＳＡＴ－３からなる群から選択される血清型のＦＭＤＶからのＶＰ２タンパク質であり、ＶＰ２は、９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗおよび９３Ｈからなる群から選択されるアミノ酸へのアミノ酸置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００７５】

一実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、血清型：Ａ、Ｏ、Ａｓｉａ　１、ＳＡＴ－２およびＳＡＴ－３からなる群から選択される血清型のＦＭＤＶからのＶＰ２タンパク質であり、ＶＰ２は、９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗ、９３Ｈおよび９３Ｑからなる群から選択されるアミノ酸へのアミノ酸置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものである。

【００７６】

好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、任意の血清型のＦＭＤＶからのＶＰ２タンパク質であり、ＶＰ２タンパク質突然変異体は、９３Ｙ、９３Ｆおよび９３Ｗからなる群から選択されるアミノ酸へのアミノ酸置換を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の

付番に対するものである。下記で記載されるように、この位置におけるこれらの置換によって、最大の相対的安定性を有するこのようなＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドが提供された。

【００７７】

本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体の有利なアミノ酸置換は、インシリコ、インビトロおよびインビボ実験を用いた方法の組み合わせにより同定された。

【００７８】

表１は、パネルＡ、ＢおよびＣにおいて、様々なＦＭＤＶ血清型に対するＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドの安定性の評価の結果を列挙する。様々なＶＰ２突然変異体を含むキャプシドの相対的安定性は、任意の値：「０」、「－」または「＋」により示され、ここで、ゼロは未置換の親ＶＰ２タンパク質を有するキャプシドの安定性レベルを表し、－のサインは相対的に不安定なキャプシドを示し、すなわち親キャプシドよりも安定性が低く、そして、＋のサインは、比較的安定なキャプシドを示し、すなわち親キャプシドよりも安定性が高い。突然変異体キャプシド間の相対的な差異は、＋または－のサインの数によって示され、例えば「＋＋＋＋」は「＋」よりも大幅により安定である。

【００７９】

説明のために、表１Ａはまた、ＦＭＤＶキャプシドを安定化するとみなされないＶＰ２タンパク質に対するいくつかの置換の相対的安定性も与え、例えば、Ｏ血清型のＦＭＤＶにおける置換ＶＰ２　Ｈ８７Ｖは、キャプシドの安定性にとって有益であるが（＋の相対スコア）、しかし置換Ｈ８７Ｄは非常に不都合である（－－－の相対スコア）。同様に、αＡヘリックスの外側にあるＶＰ２タンパク質の領域に対する置換の、結果的に生じる相対的安定性が提示される：ＶＰ２　Ｑ５７Ｅ、Ｑ５７Ｌ、Ｒ６０ＧおよびＲ６０Ｌ。これらは－－と－－－との間の相対的安定性を有するので、結果的にこれらの置換はこのような置換があるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドの安定性に対して有害である。

【００８０】

表１Ａ：Ｏ血清型からのＦＭＤＶのキャプシドの相対的安定性

【表１】

	突然変異	相対的安定性
血清型O		
	VP2 wt	0
	VP2 H87V	+
	VP2 H87D	---
	VP2 V90N	+
	VP2 Y91F	++
	VP2 S93H	++
	VP2 S93Y	+++
	VP2 S93F	+++
	VP2 S93W	++
	VP2 S93Q	++
	VP2 L94V	++
	VP2 S97V	++
	VP2 S97I	++
	VP2 S97Q	++
	VP2 Y98F	+++
	VP2 R60G	---
	VP2 R60L	---
	VP2 Q57E	--
	VP2 Q57L	--

【００８１】

表１Ｂ：Ａ血清型からのＦＭＤＶのキャプシドの相対的安定性

【表２】

	突然変異	相対的安定性
血清型A		
	VP2 wt	0
	VP2 H93F	++
	VP2 H93Q	+

【００８２】

表１Ｃ：ＳＡＴ－２血清型からのＦＭＤＶのキャプシドの相対的安定性

【表３】

	突然変異	相対的安定性
血清型SAT-2		
	VP2 wt	0
	VP2 S93H	++
	VP2 S93Y	+++
	VP2 S93W	++++
	VP2 S93F	+++
	VP2 Y98F	++

【００８３】
ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含むキャプシドを作製するために、インビトロ組換えＤＮＡ法を使用して、所望のアミノ酸置換を含む本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体をコードする組換え核酸分子を作製した。都合よく、これは、ＰＣＲ断片を作製してサブクローニングし、例えばＰ１－２Ａポリプロテインのような他のＦＭＤＶタンパク質との関連で、ＦＭＤＶ３Ｃプロテアーゼの同時発現とともにインビトロタンパク質発現を行うことによって行った。
【００８４】
必要とされる分子生物学的技術は、例えば両者とも前出の「Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」および「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｍａｎｕａｌ」などの周知のハンドブックに記載のように、全て当業者にとって周知である。
【００８５】
本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含む感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドを作製するために、例えば、所望のＶＰ２タンパク質置換をコードさせるためにｃＤＮＡとして操作し、次いで適切な宿主細胞に遺伝子移入され得るＦＭＤＶの感染性クローンコンストラクトを用いる、いくつかの技術が利用可能である。ＦＭＤＶの感染性クローンは、長きにわたり知られており、例えばＺｉｂｅｒｔら（１９９０、Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．６４，ｐ．２４６７）；Ｌｉｕら（２００４，Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．１０４，ｐ．１５７）；およびＢｌｉｇｎａｕｔら（２０１０，Ｊ．ｏｆ　Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．９２，ｐ．８４９）である。
【００８６】
あるいは、ＦＭＤＶ空キャプシドは、下記のようなものなど、組換え発現系における適切な核酸の発現によって作製され得る。
【００８７】
これらの技術により、空キャプシドとしてまたはビリオンキャプシドとしての何れかでの、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドが形成され得る。
【００８８】
本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶビリオンキャプシドを細胞培養から単離し、精製し、例えば高温、低ｐＨおよび化学的不活性化に対する安定性について試験した。続いて、試験したビリオンキャプシドを、スクロース勾配とそれに続く電子顕微鏡によって、またはゲル電気泳動によって、１２Ｓ　Ｅｌｉｓａ（Ｈａｒｍｓｅｎら、２０１１，Ｖａｃｃｉｎｅ，ｖｏｌ．２９，ｐ．２６８２）によって、またはサーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイ（Ｗａｌｔｅｒら、２０１２，Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈ．，ｖｏｌ．１８５，ｐ．１６６）によって、インタクト性について

試験した。ビリオンキャプシドをまた、プラークアッセイにおける生存能についても試験した。この結果により、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異がキャプシド安定性を顕著に促進したことが示された。

【００８９】

例えば、本発明ＦＭＤＶによるＶＰ２タンパク質突然変異体を含む感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドは、置換ＶＰ２　Ｓ９３ＨまたはＶＰ２　Ｓ９３Ｙの何れかを含むＳＡＴ－２血清型から得られた。これらの突然変異体ウイルスをサーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイにおいて試験し、非常に安定であることが分かった。Ｓ９３Ｈ突然変異体は、５１℃まで安定であり、Ｓ９３Ｙ突然変異体は５３℃まで安定であった。これは、４７℃まででしか安定ではなかった感染性ＳＡＴ－２親ウイルスの安定性と比較して目覚ましい。これらのＶＰ２タンパク質突然変異体を含む感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドもまた、ＢＨＫ－２１細胞上で良好に複製し、野生型ウイルスと全体的に同等であった。

【００９０】

結果は本明細書中の以下の実施例セクションで記載する。このような手順を行うための方法および材料は当技術分野で周知であり、本明細書中で詳述する。したがって、これらは、従来の方法および材料のみを用いて、当業者により容易に適用され得る。

【００９１】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドに関する。

【００９２】

本発明のためのＦＭＤＶ「キャプシド」は当技術分野で公知であり、ＦＭＤＶ構造ウイルスタンパク質の非常に規則正しい配置からなる正二十面体対称のマクロ分子構造である。本発明によるＦＭＤＶキャプシドは、ＦＭＤＶの空キャプシドまたはＦＭＤＶ　ＲＮＡ含有ビリオンキャプシドであり得る。このようなＦＭＤＶビリオンキャプシドは、それが含むウイルス遺伝物質の状態に依存して、感染性であってもよいし、または感染性でなくてもよい。

【００９３】

好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶキャプシドは、ＦＭＤＶビリオンキャプシドである。

【００９４】

本発明によるＦＭＤＶビリオンキャプシドは、任意の血清型であり得、本発明による任意のＶＰ２タンパク質突然変異体を含み得る。

【００９５】

さらなる好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶビリオンキャプシドは、ＶＰ２タンパク質突然変異体が９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗおよび９３Ｈからなる群から選択されるアミノ酸へのアミノ酸置換を含む本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含み、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものであり、ただし、置換の結果、血清型ＡのＦＭＤＶにおけるアミノ酸配列９３Ｈを有するＶＰ２タンパク質は得られないものとする

【００９６】

好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶキャプシドは、ＦＭＤＶ空キャプシドである。

【００９７】

本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドは、任意の血清型であり得、本発明による任意のＶＰ２タンパク質突然変異体を含み得る。

【００９８】

さらなる好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドは、ＶＰ２タンパク質突然変異体が９３Ｙ、９３Ｆ、９３Ｗおよび９３Ｈからなる群から選択されるアミノ酸へのアミノ酸置換を含む本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含み

、ここで、ＶＰ２タンパク質アミノ酸位置番号は、配列番号１で与えられるアミノ酸の付番に対するものであり、ただし、置換の結果、血清型ＡのＦＭＤＶにおけるアミノ酸配列９３Ｈを有するＶＰ２タンパク質は得られないものとする。

【００９９】

本発明によるＦＭＤＶキャプシドは、様々な方法で得ることができる。例えば、本発明によるＦＭＤＶビリオンキャプシドは、ＦＭＤＶ遺伝物質の操作、適切な宿主細胞への遺伝子移入、および、適切な宿主細胞、例えばＢＨＫ－２１細胞における、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含む、結果として生じる感染性ＦＭＤＶウイルスの増幅により作製され得る。

【０１００】

あるいは、本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドは、収率および安全性に関して長所をもたらすので、インビトロでの細胞に基づく発現系を介して作製し得る。発現系は、原核または真核細胞に基づき得；真核の場合、全て先行技術に記載されるような、酵母、哺乳動物、昆虫または植物からの宿主細胞に基づき得る。

【０１０１】

本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドに対する好ましいインビトロ発現系はバキュロウイルス／昆虫細胞発現系（ＢＶＥＳ）であるが、これは、この系において本発明によるキャプシドの長所となる特性が存分に利用されるからである。これは、ＢＶＥＳの昆虫細胞に対して使用される培地が通常はかなり酸性であり、典型的には約６．５のｐＨであるからである。また、昆虫細胞で進行する典型的な発現は２７℃で最長５日を要する。両条件は、不安定化したＦＭＤＶ空キャプシドにとっては本質的に不都合である。

【０１０２】

実際に、ＢＶＥＳにおけるＯ血清型の、またはＳＡＴ血清型のうち１つの野生型ＦＭＤＶ空キャプシドの発現は、あまり効率的ではないことが分かり、僅かなキャプシド抗原しか得られなかった。しかし、それらが、ＢＶＥＳにおいて本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶ空キャプシドを発現した場合、大量の空キャプシド抗原を得ることができた。その結果、本発明による安定化ＦＭＤＶキャプシドは、ＢＶＥＳの条件によく耐えることができることが分かった。

【０１０３】

本発明による空ＦＭＤＶキャプシドの発現およびアセンブリーは、様々な方法で設定され得るが、ただし、ＦＭＤＶ構造タンパク質、ＶＰ１、３、４およびＶＰ２タンパク質突然変異体は、完全な空キャプシドにそれらを組み立てることが可能であるように組み合わせられる。実際に、これは、ＶＰの同時または個別発現により、および同じまたは異なる宿主細胞での発現により設定され得る。本発明における使用のための発現系の好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドの発現は、同じ宿主細胞における全てのＦＭＤＶ　ＶＰの同時発現によるものである。これにより、得られるキャプシド生成物全体に最適な調節がもたらされる。

【０１０４】

本発明によるＦＭＤＶキャプシドがこれらの方法の何れかにおいて、つまりビリオンキャプシドの複製によるかまたは空キャプシドの発現により作製される場合、これらのキャプシド中のＶＰ２タンパク質は、原理上、完全に本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体からなる。これにより、このようなキャプシドの最も安定な構成がもたらされる。

【０１０５】

したがって、本発明によるＦＭＤＶキャプシドの好ましい実施形態において、キャプシド中のＶＰ２タンパク質は、基本的に本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体からなる。

【０１０６】

やはり、本発明はまた、キャプシド中のＶＰ２タンパク質全てが本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体であるというわけではないＦＭＤＶキャプシドの作製も可能とする。混合によってまたは同時発現によっての何れかで、野生型ＶＰ２タンパク質のいくつかの

分子もまた組み込まれ得、これは、ＶＰ２－キメラキャプシドの形成につながる。これは、特に本発明による感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドと連携する場合、本発明による結果として生じるＦＭＤＶビリオンキャプシドの安定性を微調整するための好都合な方法であるので、有利であり得る。ビリオンキャプシド中にＶＰ２タンパク質突然変異体のみを含むものが、このようなキャプシドを安定にしすぎてＦＭＤＶが複製できなくなり得ることが想像できる。それゆえに、いくつかの野生型ＶＰ２タンパク質のＦＭＤＶビリオンキャプシドへの組み込みを提供することによって、安定性を許容可能なレベルに低下させ得る。しかし、その感染性ＦＭＤＶに対して許容される最大の安定性を保持するために、可能な限り多くの本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含有することが好ましい。

【０１０７】

したがって、本発明によるＦＭＤＶキャプシドの好ましい実施形態において、ＦＭＤＶビリオンキャプシド中のＶＰ２タンパク質は、５０％超の本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体からなる。より好ましくは、好ましい順番に、６０、７０、８０、９０、９５または９９％超である。

【０１０８】

記載される技術の使用の結果、（いくつかまたはそれを超える）本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドが作製される。これは、好都合な特性、およびその生物物理学的安定性の向上による好ましい有用性をキャプシドにもたらす。

【０１０９】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を有するＦＭＤＶキャプシドを提供する段階を含む、ＦＭＤＶキャプシドの安定性を促進するための方法に関する。

【０１１０】

「安定性を促進する」とは、野生型ＶＰ２タンパク質含有キャプシドと比較した場合の、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有ＦＭＤＶキャプシドの生物物理学的安定性の向上を指す。異なる物理学的パラメーター、例えば温度、酸性度、せん断およびその作製過程およびワクチン抗原としてのその使用においてＦＭＤＶキャプシドが曝され得る他の課題に関して、安定性を向上させ得る。

【０１１１】

通常のワクチン技術におけるこのような課題の例は、例えばビリオンキャプシドの場合の化学的不活性化、様々な温度での保管および輸送、ならびにアジュバントを用いた処方である。

【０１１２】

得られる安定性向上のレベルは、本明細書中に記載のように、様々な方法、例えばスクロース勾配、ゲル電気泳動、電子顕微鏡、サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイなどを用いて評価され得る。

【０１１３】

「ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を有するＦＭＤＶキャプシドを提供する」段階に対する詳細および実施形態は、上記で記載されており、様々な組換えＤＮＡ技術、例えば同時発現および混合などを用いて都合よく行い得、同時にＦＭＤＶキャプシドが形成される。

【０１１４】

本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を作製し、適用するこの有用性および他の有用性に対して、好ましい方法は組換えＤＮＡ技術によるものであり、これは、このような本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を発現し得る核酸分子の使用を含む。

【０１１５】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体をコードする単離核酸分子に関する。

【０１１６】

「単離される」という用語は、意図的な活動または人間による介入によって；例えば生化学的精製のためのインビトロ手順によってその天然の状況から単離されるものと解釈されたい。

【０１１７】

典型的には、ここでのタンパク質を「コードする」核酸分子：本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体は、オープン・リーディング・フレーム（ＯＲＦ）であり、タンパク質への翻訳を時期尚早に終結させる望ましくない終止コドンが存在しないことを示す。本発明に対して、本核酸分子は完全なＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質をコードし、これは、天然または合成起源のものであり得る。

【０１１８】

本発明に対して、本発明による核酸分子の正確なヌクレオチド配列は重要ではないが、ただし、このヌクレオチド配列は、所望のアミノ酸配列、ここでは所望のＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体の発現を可能にする。しかし、当技術分野で周知であるように、異なる核酸が、「遺伝コードの縮重」ゆえに同じタンパク質をコードし得る。その結果、２種類の異なる核酸が、依然として同じタンパク質をコードしながら、最大３０％のヌクレオチド配列多様性を有し得る。

【０１１９】

本発明に対して、核酸分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子であり得る。これは、その単離のために使用される原材料および使用目的に依存する。当業者は、１つのタイプの分子を他の分子に変換するために、様々な出発物質から１つのタイプのまたは他のタイプの分子を単離するための方法、および１つのタイプの分子を他のタイプの分子に変換するための方法をよく認識する。

【０１２０】

本発明による単離核酸分子は、それがＤＮＡ形態である場合、ＤＮＡプラスミドのようなベクターとの関連で都合よく操作され得る。これにより、例えば細菌培養物におけるその増幅および様々な分子生物学的技術によるその操作が可能となる。多岐にわたる適切なプラスミドベクターが市販されている。

【０１２１】

本発明による単離核酸分子が本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を実際に発現することができるようにするために、これは正確な発現調節シグナルおよび適切な環境を必要とする。例えば、核酸分子は、上流プロモーターエレメントに操作可能に連結される必要があり、コード配列の末端に翻訳終止を含有する必要がある。一般的には、特定の発現系に関連して使用されるプラスミドおよびベクターは、このようなシグナルを提供する。また、転写および翻訳のための生体分子機構は、典型的にはこのような発現のために使用される宿主細胞により提供される。これらの様々なエレメントを修飾することによって、例えばタイミング、レベルおよび品質において本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体の発現が最適化され得；これは全て、当業者の通常の能力の範囲内である。

【０１２２】

したがって、好ましい実施形態において、本発明による単離核酸分子は、発現調節シグナルをさらに含む。

【０１２３】

本発明での使用のための組換え発現系は、典型的には、インビトロで培養され得る宿主細胞を用いる。細菌、酵母、真菌、植物、昆虫または脊椎動物細胞発現系からの宿主細胞は当技術分野で周知である。

【０１２４】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、本発明によるＦＭＤＶキャプシドおよび／または本発明による単離核酸分子を含む宿主細胞に関する。

【０１２５】

本発明による単離核酸分子の発現によって、本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質

突然変異体を作製するために、本発明による宿主細胞が都合よく使用され得る。好ましくは、本発明による宿主細胞はまた、他のＦＭＤＶ　ＶＰも発現し、本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドのアセンブリーを可能にする。発現系の特徴および設定に依存して、下流プロセシングおよび精製を用いて、宿主細胞から、例えば溶解により、またはその培地からの何れかで、空のキャプシドを得ることができる。あるいは、いずれも本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体またはＦＭＤＶ空キャプシドを含む宿主細胞は、そのようなものとして、例えばワクチンとしての使用などのために使用され得る。

【０１２６】

標的動物に対して、いずれも本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシドおよび／または単離核酸分子を発現させ、および／または送達するための周知のおよび効率的な方法は、生組換え担体微生物（ＬＲＣＭ）によるものである。ＬＲＣＭは、標的動物に感染し、動物において、またはその細胞において複製し得る。この方法により、いずれも本発明による核酸分子、ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体またはＦＭＤＶキャプシドは、処方されたワクチンとしての注射時に生じるものとは異なる方法で標的動物の免疫系に対して提示される。これは、より効果的な免疫刺激を提供し得る。

【０１２７】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明による単離核酸分子を含む生組換え担体微生物（ＬＲＣＭ）に関する。

【０１２８】

このようなＬＲＣＭは、例えば組換え細菌、寄生生物、ウイルスまたは酵母細胞であり、ＦＭＤに対してワクチン接種しようとする動物標的において生存可能である。本発明による核酸分子の送達は、例えば、それを発現させ、効果的な免疫反応を誘導するＭＨＣ１および／またはＭＨＣ２との関連でその免疫系に対して結果として生じるタンパク質を提示させるために、標的の抗原提示細胞を刺激し得る。

【０１２９】

ＬＲＣＭのさらなる長所は、それらの自己増殖であり、そのため、免疫付与に必要な組換え担体の量が少量のみとなる。

【０１３０】

したがって、本発明に対する好ましいＬＲＣＭは、ＦＭＤに対してワクチン接種される必要がある標的動物、好ましくはウシ、水牛、ブタ、ヒツジおよびヤギ中で複製し得る微生物である。さらに、ＬＲＣＭは、標的動物に対して（過剰に）病原性であるべきではない。このような適切なＬＲＣＭの例は、細菌の弱毒化または非病原性分離株：Ｅ．ｃｏｌｉ、サルモネラ；寄生生物：トキソプラズマまたはネオスポラ；またはウイルス：ポックスウイルス（ワクシニア、牛痘）、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたは狂犬病ウイルスである。当業者は、具体的な標的動物に対して適切な選択および適応をなすことができる。

【０１３１】

ＬＲＣＭの構築の場合、本発明による単離核酸分子をＬＲＣＭのゲノムに安定に導入するために、インビトロ相同組換えの周知の技術を使用し得る。あるいは、本発明による単離核酸分子はまた、一過性またはエピソーム性発現を可能にするためにＬＲＣＭに染色体外に導入することもできる。

【０１３２】

上述のように、本発明の実施形態の好ましい有用性は、獣医学の用途におけるもの、特にＦＭＤに対するワクチン接種に対するものである。

【０１３３】

当技術分野で周知であるように、インビトロでより安定であるＦＭＤＶキャプシドはまた、ワクチンとしての使用時に液性免疫反応の向上も提供する。理由は試料中によりインタクトなキャプシドがあるということであるので；効果的に、この結果、免疫原性の質が向上したより高用量の抗原が得られる。

【０１３４】
しかし、確認のため、および本発明の有利な有用性を説明するために、ＦＭＤワクチンに処方された空のものとしてまたはビリオンキャプシドとしての何れかの、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有ＦＭＤＶキャプシドを用いて、多くのインビボ実験を行い、動物ワクチン接種のために使用した。詳細は本明細書中で後で記載する。
【０１３５】
類似のＳＡＴ－２血清型ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体キャプシドから調製されたＦＭＤワクチンは、モルモットにおいて、１カ月にわたる保管後でさえも、その野生型ＳＡＴ－２親株のワクチンにより誘導されたものと比較して非常に多数のワクチネート（ｖａｃｃｉｎａｔｅｓ）でウイルス中和免疫反応を誘導することができ：中和レベルの抗体を有したのは、未置換ＶＰ２タンパク質キャプシドを受けた標的では僅か１０匹中２匹であったのに対し、１０匹中１０匹であった。
【０１３６】
それらが６カ月にわたり保管されていたことを除き、類似の突然変異体および野生型ＳＡＴ－２ワクチンを用いて、この実験を繰り返した。モルモットにワクチン接種し、ワクチン接種後１２日にセロコンバージョンについて試験した。血清学により、野生型ＶＰ２タンパク質含有キャプシドワクチンを接種されたモルモットの中でセロコンバージョンが起こったものはなく、一方でＶＰ２タンパク質突然変異体含有キャプシドワクチンを接種されたモルモットでは１０匹中６匹が顕著なレベルのウイルス中和抗体を有したことが示された。詳細および結果については実施例を参照のこと。
【０１３７】
したがって、さらなる態様において、本発明は、ＦＭＤに対するワクチンとしての使用のための、全て本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞および／またはＬＲＣＭに関する。
【０１３８】
さらなる態様において、本発明は、ＦＭＤに対するワクチン接種のための、全て本発明による、ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞および／またはＬＲＣＭに関する。
【０１３９】
さらなる態様において、本発明は、全て本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞および／またはＬＲＣＭと、医薬的に許容可能な担体とを含む、ＦＭＤに対するワクチンに関する。
【０１４０】
さらなる態様において、本発明は、ＦＭＤに対するワクチンの調製のための、全て本発明による、ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞および／またはＬＲＣＭの使用に関する。
【０１４１】
「ワクチン」は、標的動物において、微生物による感染の結果起こる疾患または障害を防ぐ、改善する、それに対する感受性を低下させる、またはその処置を促進する免疫反応を誘導する。その微生物由来の少なくとも１つの抗原性分子の投与の結果として、ワクチン誘導性の防御が達成される。これにより、標的が、微生物により引き起こされる臨床徴候の数または強度の低減を示すようになる。これは、微生物による侵入または感染率が低下する結果であり得、これは、病変の数または重症度および微生物により、またはそれに対する標的の反応により引き起こされる影響の低下につながる。
【０１４２】
「ワクチン」という用語は、免疫学的有効量の抗原性化合物の使用および医薬的に許容可能な担体の存在を意味する。本発明のための抗原性化合物は、全て本発明による、ＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、宿主細胞および／またはＬＲＣＭである。
【０１４３】

本発明による単離核酸分子の場合、この核酸は、抗原それ自身ではないが、適切な条件下で発現される場合、抗原を産生する。

【０１４４】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンについて免疫学的有効量を構成するものは、所望の効果および使用されているワクチンの特異的な特徴に依存する。有効量の決定は、例えばワクチン接種後の免疫学的反応を監視することにより、または負荷感染後に、例えば標的の疾患の臨床徴候、血清学的パラメーターを監視することにより、または病原体の再分離および偽ワクチン付与動物で見られる反応とこれらの比較により、十分に通常の技術者の技術の範囲内である。

【０１４５】

ワクチン付与および偽ワクチン付与標的動物を比較すると、本発明によるワクチンの有効性が明らかになる。このようなワクチン有効性を評価するための方法は当技術分野で周知である。

【０１４６】

「ＦＭＤ」は、周知の症状を特徴とする疾患であり、全て当技術分野で周知の様々な診断または微生物学的技術により診断され得る。

【０１４７】

当業者は、例えば臨床スコアにおいて表されるような、通常ＦＭＤＶにより引き起こされる疾患の症状を監視することによって、標的動物に対するＦＭＤの臨床徴候のレベルに対して本発明によるＦＭＤに対するワクチンがなす相違を容易に観察し得るので、感染時のワクチン付与および偽ワクチン付与標的動物の臨床スコアにおけるワクチン接種の効果を比較し得るようになる。

【０１４８】

「医薬的に許容可能な担体」は、それが投与される標的動物の健康に対して（重篤な）有害効果を引き起こすことなく、活性ワクチン化合物の効果的な投与を促進する。このような担体は、例えば滅菌水または滅菌生理食塩溶液であり得る。より複雑な形態において、担体は、例えば緩衝液であり得、これは、さらなる添加物、例えば安定化剤または保存剤などを含み得る。詳細および例は、例えば「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：ｔｈｅ ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｙ」（２０００，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔ，ＵＳＡ，ＩＳＢＮ：６８３０６４７２）および「Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ ｖａｃｃｉｎｏｌｏｇｙ」（Ｐ．Ｐａｓｔｏｒｅｔら編、１９９７，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，ＩＳＢＮ ０４４４８１９６８１）などの周知のハンドブックに記載されている。

【０１４９】

本発明に対して記載されるようなワクチン接種のさらなる有利な効果は、地理的地域におけるまたは集団におけるＦＭＤＶの伝播、いわゆる感染の水平伝播の予防または減少である。その結果、これはＦＭＤＶ有病率の低下につながる。この実施形態において、本ワクチンは、ＦＭＤＶ伝染を阻止するかまたは少なくとも減少させる。

【０１５０】

したがって、好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、地理的地域におけるＦＭＤＶ有病率を低下させるために使用され得る。

【０１５１】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、ＤＮＡ形態の本発明による核酸分子を含有する場合、効果的にいわゆる「ＤＮＡワクチン」となる。このような実施形態において、ＤＮＡ分子は標的動物に導入され；それが細胞に取り込まれる場合、それが発現され、結果として生じるタンパク質が免疫反応を生じさせる標的の免疫系に対して提示される。この場合、発現されるタンパク質は、好ましくは、本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドである。ＤＮＡワクチンは、様々な方法で導入され得、裸のＤＮＡとしてまたは修飾されたＤＮＡとしての何れかの異なる形態であり得るか、または、担体、例えば金粒子に連結され得るかまたはこれにより封入され得る。

【０１５２】
ＤＮＡでの直接的ワクチン接種は、例えばＤｏｎｎｅｌｌｙら（１９９３，Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ，ｖｏｌ．２，ｐ．２０－２６）で概説されるように、多くの異なるタンパク質に対して成功している。ＦＭＤＶについては、Ｋｉｍら（２００６，Ｊ．ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．，ｖｏｌ．８，ｐ．１１８２）を参照のこと。
【０１５３】
本発明によるＦＭＤＶキャプシドは生物物理学的安定性が向上しているものの、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、例えば感受性コンポーネントを分解から保護するため、ワクチンの有効期間を延長させるため、および／または凍結乾燥効果を向上させるために、安定剤を含み得る。一般に、安定剤は、脂質、炭水化物またはタンパク質；例えば粉乳、ゼラチン、血清アルブミン、ソルビトール、トレハロース、スペルミジン、デキストランまたはポリビニルピロリドンなど高分子量の大きな分子、および緩衝物質、例えばリン酸アルカリ金属である。
【０１５４】
好ましくは、安定剤は、ＷＯ２００６／０９４，９７４で開示されるように、動物起源のまたはさらに化学的に定められた化合物を含まない。
【０１５５】
また、チメロサール、メルチオラート、フェノール類化合物および／またはゲンタマイシンなどの保存剤も添加され得る。
【０１５６】
言うまでもないが、他の化合物、例えば担体、希釈剤、エマルションなどを本発明によるワクチンに混合することもまた本発明の範囲内である。このような添加物は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ」および「Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｖａｃｃｉｎｏｌｏｇｙ」（両者とも前出）などの周知のハンドブックに記載されている。
【０１５７】
例えば安定性または経済の理由のために、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、凍結乾燥され得る。一般に、これは０℃以上、例えば４℃の温度での長期保存を可能にする。
【０１５８】
凍結乾燥するための手順は、当業者にとって公知であり、様々なスケールでの凍結乾燥用の装置が市販されている。
【０１５９】
したがって、より好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、ワクチンが凍結乾燥形態であることを特徴とする。
【０１６０】
凍結乾燥ワクチン組成物を再構成するために、生理学的に許容可能な希釈剤中でこれを懸濁する。これは、ワクチンの最良の品質を確実にするために通常使用直前に行われる。希釈剤は例えば滅菌水または生理食塩溶液であり得る。ワクチンを再構成するために使用しようとする希釈剤は、それ自身さらなる化合物、例えばアジュバントなどを含有し得る。別の実施形態において、凍結乾燥ワクチンは、ＥＰ３８２．２７１で概説されるようなエマルション中で懸濁され得る。
【０１６１】
本発明による凍結乾燥ワクチンのさらなる実施形態において、ワクチンのための希釈剤は、ワクチンの残りの部分を含む凍結乾燥ケーキとは分けて供給され、好ましくは緩衝希釈剤である。この場合、凍結乾燥ワクチンおよび希釈剤組成物は、本発明を一緒に統合する部品のキットを形成する。
【０１６２】
したがって、本発明によるＦＭＤに対する凍結乾燥ワクチンの好ましい実施形態において、本ワクチンは１つの容器が凍結乾燥ワクチンを含み、１つの容器が水性希釈剤を含む少なくとも２つのタイプの容器を伴う部品のキット中に含まれる。

【０１６３】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、いわゆる「ビヒクル」をさらに含み得；これは、全て本発明によるタンパク質、核酸、宿主細胞および／またはＬＲＣＭが、それに共有結合されることなく付着する化合物である。このようなビヒクルは、とりわけ全て当技術分野で公知の、バイオマイクロカプセル、マイクロアルギン酸塩、リポソーム、マクロソール、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸または酸化アルミニウム、シリカ、カオリン（商標）およびベントナイト（商標）である。
【０１６４】
例としては、抗原が免疫刺激複合体に部分的に埋め込まれるビヒクル、いわゆるＩＳＣＯＭ（商標）（ＥＰ１０９．９４２、ＥＰ１８０．５６４、ＥＰ２４２．３８０）である。
【０１６５】
さらに、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、１以上の適切な界面活性化合物または乳化剤、例えばＳｐａｎ（商標）またはＴｗｅｅｎ（商標）ファミリーからのコンポーネントを含み得る。
【０１６６】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンのための標的は、明らかに上述のようなＦＭＤＶに感染し易い動物である。しかし、年齢、体重、性別、免疫学的状況およびワクチン接種しようとする標的動物の他のパラメーターは重要ではない。しかし、健康な標的にワクチン接種することおよびあらゆる野外感染を予防するためにできるだけ早期にワクチン付与することは明らかに好ましい。本発明によるＦＭＤに対するワクチンのための標的動物は、ＦＭＤＶに対してまたはＦＭＤＶに対する抗体に対して血清反応陽性または陰性であり得る。ＦＭＤＶによる感染は若年で既に確立され得るので、したがって本発明によるＦＭＤに対するワクチンは生後最初の２週間内に適用され得るが、母性由来抗体の存在は、若年での効果的なワクチン接種に対して考慮される必要があり得る。
【０１６７】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、予防としておよび治療処置として同様に使用され得、ＦＭＤＶ感染または疾患のその臨床徴候の確立および／または進行の両方を妨げる。
【０１６８】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、効果的に初回刺激ワクチン接種となり得、これには後に本発明による同じワクチンまたは不活性化全ＦＭＤＶウイルスワクチンの何れかでのブースターワクチン接種が続き、それにより増幅され得る。
【０１６９】
標的動物への本発明によるＦＭＤに対するワクチンの適用のスキームは、必要とされる投与量および処方と適合し、および標的動物に対して免疫学的に有効であるような量での、単回投与または、同時にもしくは連続的に行われ得る複数回投与であり得る。
【０１７０】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンの投与のためのプロトコールは、理想的に、その標的動物に対する他のワクチンの既存のワクチン接種スケジュールに組み入れられる。
【０１７１】
ＦＭＤワクチン接種が一般的である地域において、標準的な手順は、６カ月の間隔で再ワクチン接種するものである。したがって、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、半年に１回の投与で有利に適用される。
【０１７２】
本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、０．１から１０００μｇの間の本発明によるＦＭＤＶキャプシドを含有する用量で投与され得る。より少量または大量の用量が原理的に使用され得；好ましくはワクチン用量は、１０から１０００μｇの本発明によるＦＭＤＶキャプシドを含有する。
【０１７３】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、標的動物にとって許容可能である体積で投与され得、例えば、１回のワクチン用量は、０．１から１０ｍｌであり得る。好ましくは、１回用量の体積が０．２５から５ｍｌである。

【０１７４】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、当技術分野で公知の方法に従い、標的動物に投与され得る。好ましい適用は、皮膚への、または皮膚を通じた全注射経路：例えば筋肉内、静脈内、腹腔内、皮内、粘膜下または皮下を通じてなどの、非経口経路による。

【０１７５】

言うまでもなく、適用の最適経路は、使用される具体的なワクチン処方および標的動物の特定の特徴に依存する。

【０１７６】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンに対する好ましい適用経路は、筋肉内によるかまたは皮下注射による。

【０１７７】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、ワクチンが本発明によるＦＭＤＶ空キャプシドに基づく場合、マーカーワクチンとして有利に使用され得る。マーカーワクチンは、ワクチン接種された対象と感染対象との間の区別を可能にするワクチンとして知られる（いわゆるＤＩＶＡ原理）。例えば、野生型感染病原体に感染することにより誘導される抗体スペクトルとは異なるマーカーワクチンの特徴となる抗体スペクトルの検出により、差別化がなされ得る。本発明に対して、この区別は、例えばＦＭＤＶ非構造タンパク質に対する抗体に関してなされ得；このような抗体は、複製するＦＭＤＶビリオンに感染した場合に発現するが、空キャプシドの接種時には発現しない。これは、ＥＬＩＳＡまたは免疫蛍光アッセイなどの血清学的アッセイによって都合よく検出され得る。

【０１７８】

したがって、好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、マーカーワクチンである。

【０１７９】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンをさらに最適化することは、十分に当業者の可能な範囲内である。一般に、これはワクチンの有効性の微調整を含むので、十分な免疫防御を提供する。これは、ワクチン用量、体積または抗原含量を適応させることによって；別の形態または処方でワクチンを使用することによって；ワクチンの他の構成要素（例えば安定剤またはアジュバント）を適応させることによって；または異なる経路を介した適用によって、行われ得る。

【０１８０】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、他の化合物、例えばアジュバント、さらなる抗原、サイトカインなどをさらに含み得る。あるいは、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、抗生物質、ホルモンまたは抗炎症薬などの医薬コンポーネントと有利に組み合わせられ得る。

【０１８１】

好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、それがアジュバントを含むことを特徴とする。

【０１８２】

「アジュバント」は、周知のワクチン成分であり、一般に非特異的に標的の免疫反応を刺激する物質である。多くの様々なアジュバントが当技術分野で公知である。アジュバントの例は、フロイントの完全および不完全アジュバント、ビタミンＥ、非イオン性ブロックポリマーおよびポリアミン、例えばデキストラン硫酸塩、カルボポールおよびピラン、アルミニウム化合物、例えばリンアルミニウムまたは水酸化アルミニウム、サポニン、好ましくはＱｕｉｌＡ（商標）などである。

【０１８３】

さらに、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシンなどのペプチドがアジュ

バントとして使用されることが多く、鉱物油、例えばＢａｙｏｌ（商標）またはＭａｒｋｏｌ（商標）、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ（商標）または軽パラフィン油、植物油または組み合わせ製品、例えばＳｅｐｐｉｃ（商標）からのＩＳＡ（商標）またはＤｉｌｕｖａｃＦｏｒｔｅ（商標）が有利に使用され得る。エマルションは、例えば油中水（ｗ／ｏ）、水中油（ｏ／ｗ）、水中油中水（ｗ／ｏ／ｗ）またはダブルオイルエマルション（ＤＯＥ）であり得る。

【０１８４】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンに対する好ましいアジュバントは、アルミニウム組成物またはオイルエマルションを含むアジュバントである。アルミニウムコンポーネントおよびオイルエマルションの組み合わせがより好ましい。

【０１８５】

言うまでもないが、アジュベーティング（ａｄｊｕｖａｔｉｎｇ）し、ビヒクル化合物または希釈剤を添加し、ワクチンを乳化するかまたは安定化する他の方法もまた本発明の範囲内にある。このような添加は、例えば周知のハンドブックに記載されている。

【０１８６】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、別の抗原と有利に組み合わせられ得る。

【０１８７】

したがって、より好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、さらなる免疫活性コンポーネントを含む混合ワクチンである。

【０１８８】

「さらなる免疫活性コンポーネント」は、抗原、免疫促進物質および／またはワクチンであり得；これらの何れもアジュバントを含み得る。

【０１８９】

さらなる免疫活性コンポーネントは、抗原の形態である場合、獣医学において重要な何らかの抗原性コンポーネントからなり得る。これは、例えばタンパク質、炭水化物、リポ多糖またはタンパク性の抗原をコードする核酸分子などの生物学的または合成分子を含み得る。また、このような核酸を含む宿主細胞またはこのような核酸分子を含有するＬＲＣＭは、核酸分子またはさらなる免疫活性コンポーネントを送達するための方法であり得る。あるいは、これは、寄生生物、細菌またはウイルスなどの、分画化微生物もしくは死んだ微生物またはこれらの何れかのサブユニットを含み得る。

【０１９０】

さらなる免疫活性コンポーネント（類）は、免疫促進物質、例えばケモカイン、またはＣｐＧモチーフを含む免疫賦活核酸の形態であり得る。あるいは、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、それ自身、ワクチンに添加され得る。

【０１９１】

好ましい実施形態において、本発明によるワクチンは、ある一定のＦＭＤＶ血清型に対する有効な免疫防御を可能にするために、全て本発明による１以上のＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシドおよび／またはワクチンの組み合わせであり得る。

【０１９２】

さらに好ましい実施形態において、本発明によるワクチンは、複数のＦＭＤＶ血清型に対する有効で広範囲の免疫防御を提供するために、様々なＦＭＤＶ血清型由来の、全て本発明による１以上のＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシドおよび／またはワクチンの組み合わせであり得る。

【０１９３】

さらなる好ましい実施形態において、本発明によるワクチンは、ＦＭＤに対する広範囲の混合ワクチンを形成するために、不活性化ＦＭＤＶ－またはＦＭＤＶサブユニットワクチンなど、本発明によるワクチンではないＦＭＤＶワクチンと組み合わせられ得る。

【０１９４】

さらなる好ましい実施形態において、本発明によるＦＭＤワクチンは、複数のＦＭＤＶ血清型からの抗原を含み；より好ましくは、ＦＭＤワクチンは、ある一定のＦＭＤＶ血清

型からの複数の変異体を防御するという点において多価であり、地理的地域での有病率によって抗原の実際の組み合わせが決定される。

【０１９５】

好ましい実施形態において、本発明による混合ワクチンは、さらなる免疫活性コンポーネントまたはさらなる免疫活性コンポーネントをコードする核酸分子が、本発明によるＦＭＤに対するワクチンに対する標的動物でもある動物に感染性がある微生物であるか、またはそれから得られることを特徴とする。

【０１９６】

本発明によるこのような混合ワクチンの長所は、ワクチン接種に対する動物標的の操作が１回しか必要でない一方で、ＦＭＤに対する免疫反応を誘導するだけでなく、他の病原体に対しても免疫反応を誘導し、それによって標的動物に対する無用なワクチン接種ストレスがなくなり、時間および労力のコストが少なくなる、という点である。

【０１９７】

このようなさらなる免疫活性コンポーネントの例は、原則として、本発明によるＦＭＤに対するワクチンに対する標的動物でもある動物のワクチン接種の影響を受け易い、全てのウイルス、細菌および寄生性病原体である。

【０１９８】

例えば、ブタに対しては、ブタサーコウイルス、ブタ繁殖および呼吸障害症候群ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ブタパルボウイルス、ブタコレラウイルス、マイコプラズマ・ヒオニューモニエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｈｙｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、ローソニア・イントラセルラリス（Ｌａｗｓｏｎｉａ　ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｉｓ）、Ｅ．ｃｏｌｉ、連鎖球菌、サルモネラ、クロストリジア、アクチノバチルス・プルロニューモニア（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌｅｕｒｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、パスツレラ、ヘモフィルス、エリシペロスリクス、ボルデテラ、トキソプラズマ、イソスポラ、トリキネラなどである。

【０１９９】

ウシに対しては、ネオスポラ、ディクチオカウルス、クリプトスポリジウム、オステルタギア、バベシア、タイレリア、アナプラズマ、トリパノソーマ、コウドリア、トキソプラズマ、ウシロタウイルス、ウシウイルス性下痢症ウイルス、ウシコロナウイルス、ウシ感染性鼻気管炎ウイルス（ウシヘルペスウイルス）、ウシパラミクソウイルス、ウシパラインフルエンザウイルス、ウシ呼吸器多核体ウイルス、狂犬病ウイルス、ブルータングウイルス、パスツレラ・ヘモリチカ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ　ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ）、Ｅ．ｃｏｌｉ、サルモネラ、ブドウ球菌、ミコバクテリア、ブルセラ、クロストリジア、マンヘミア、ヘモフィルス、フソバクテリアなどである。

【０２００】

ヒツジまたはヤギに対しては、トキソプラズマ、ネオスポラ、コウドリア、バベシア、タイレリア、アナプラズマ、エイメリア、トリパノソーマ、小反芻獣疫ウイルス、ブルータングウイルス、シュマレンベルクウイルス、ミコバクテリア、ブルセラ、クロストリジア、コクシエラ、Ｅ．ｃｏｌｉ、クラミジア、クロストリジア、パスツレラ、マンヘミアなどである。

【０２０１】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、当業者にとって周知の手段によって調製される。

【０２０２】

したがって、さらなる態様において、本発明は、全て本発明によるＦＭＤＶ　ＶＰ２タンパク質突然変異体、ＦＭＤＶキャプシド、単離核酸分子、宿主細胞および／またはＬＲＣＭを医薬的に許容可能な担体と混合することを含む、本発明によるＦＭＤに対するワクチンの調製のための方法に関する。

【０２０３】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、当業者により容易に認識される本明細書中に

記載のような方法によって調製され得る。例えば、本発明によるＦＭＤＶキャプシドは、適切な宿主細胞におけるビリオンキャプシドの複製によるかまたは発現系中の宿主細胞における空キャプシドの発現によるかの何れかで、より小さいかまたはより大きい体積で工業的に生産される。このような培養物は全細胞としてまたは細胞溶解液としての何れかで回収される。

【０２０４】

感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドの場合、インビトロ培養の最終産物は、一般的には最初に不活性化される。これは、いくつかの方法で、一般的には化学的不活性化によって、例えばホルマリン、ベータープロピオラクトン（ＢＰＬ）、バイナリエチレンイミン（ｂｉｎａｒｙ　ｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ）（ＢＥＩ）またはベーターエタノールアミン（ＢＥＡ）などを用いて行われ得る。

【０２０５】

物理的（フレンチプレス、ソニファイヤー）または化学的（界面活性剤）方法により溶解液が作製され得る。縣濁液は、例えば遠心またはろ過によってさらに精製され得るかまたは濃縮され得る。次に、得られる抗原調製物を医薬的に許容可能な賦形剤と組み合わせ、ワクチンに処方され、適切なサイズの容器に充填され得る。製造工程の様々な段階は、適正な試験によって、例えば抗原の品質および量に対する免疫学的試験；不活性化、滅菌性および外来性物質がないことに対する微生物試験；および最終的にはワクチン有効性および安全性についての動物における試験によって監視される。これらは全て、当業者にとって周知である。品質、量および滅菌性に対する広範な試験後、このようなワクチン製品を販売する。

【０２０６】

ワクチンの調製に適用される一般的技術および検討事項は、当技術分野で周知であり、例えば、政府規制（薬局方）および「Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　ｖａｃｃｉｎｏｌｏｇｙ」および「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ」（両者とも前出）などのハンドブックに記載される。

【０２０７】

本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、標的動物への投与のために適切な、そして所望の適用経路および所望の効果に合致する何らかの形態をとり得る。

【０２０８】

好ましくは、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、注射に適切な形態、したがって縣濁液、溶液、分散液またはエマルションなどの注射可能な液体で処方される。一般にこのようなワクチンは滅菌調製される。

【０２０９】

本発明での使用のためのエマルションは、例えばｗ／ｏ、ｏ／ｗ、ｗ／ｏ／ｗまたはＤＯＥであり得る。

【０２１０】

記載のように、本発明によるＦＭＤに対するワクチンは、様々な方法で適切な標的動物に適用され得る。

【０２１１】

したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明によるＦＭＤに対するワクチンを動物に接種する段階を含む、ＦＭＤＶに感染し易い動物のＦＭＤに対するワクチン接種のための方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【０２１２】

【図１】正二十面体ＦＭＤＶキャプシドの概略構造。ＶＰは、１＝ＶＰ１、２＝ＶＰ２および３＝ＶＰ３で示される。五量体サブユニットは太線で輪郭を描く。正二十面体対称回転軸は、５回：五角形、３回：三角形および２回：楕円で示される。（Ｍａｔｅｏら、２００３，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，ｖｏｌ．２７８，ｐ．４１０１９、図１、パネルＡより。）

【図２】複数の代表的なＦＭＤＶ分離株に対するＶＰ２タンパク質αＡヘリックス領域の

アミノ酸配列の多重アライメント；最上部で、番号およびアミノ酸配列は、ＦＭＤＶ血清型Ｏ分離株１　ＢＦＳから示され、これは配列番号１で表される。
【図３】９３Ｗ置換がある２個の隣接するＶＰ２タンパク質突然変異体間の疎水性スタッキング相互作用を示す、ＦＭＤＶキャプシドにおける２回回転対称軸の３次元モデル構造のグラフィック表示。
【図４】血清型ＳＡＴ－２からの生ＦＭＤＶビリオンキャプシドを用いたサーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイの実例となる結果。ピークは、ＲＮＡ特異的な蛍光色素により監視したＲＮＡ最大放出、したがってＦＭＤＶビリオンキャプシドが完全に解離する温度を示す。これは、解離温度を示す。　Ａ２４＝野生型ＦＭＤＶ血清型Ａ、分離株２４；９３Ｙ＝ＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ；９３Ｈ＝ＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｈ；ＷＴ＝野生型ＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２。
【図５】４５℃に１時間加熱するか（パネルＡ）、または５６℃に２時間加熱し（パネルＢ）、次いで１５から４５％スクロース密度勾配に載せた、血清型Ｏ、サブタイプ１　Ｍａｎｉｓａの熱安定なＦＭＤＶ空キャプシドのウエスタンブロット分析。　ＶＰ２　Ｓ９３ＦまたはＶＰ２　Ｓ９３Ｈ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を有するＦＭＤＶ空キャプシドは、４５℃でインタクトなままであり（パネルＡ）、分画４および５へと勾配を通じて移動し、一方で野生型ＶＰ２タンパク質含有キャプシドは熱処理時に分解し、分画１０および１１において勾配の最上部付近に留まる。実験を繰り返した場合、Ｓ９３Ｆ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を含有する空キャプシドは５６℃で２時間後でも顕著に安定であり；ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ含有キャプシドでは約１０％の分解が起こり、ＶＰ２　Ｓ９３Ｈ含有キャプシドは不安定であった。
【図６】Ｓ９３Ｆ置換によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含有する熱処理した空ＦＭＤＶキャプシドの電子顕微鏡写真。突然変異体キャプシドを５６℃で２時間インキュベートし、試料を電子顕微鏡により調べた。キャプシドが完全にインタクトであることが分かった。バーはサイズ基準を示す。
【図７】４９℃で１時間インキュベート中の感染性ＦＭＤＶビリオンの解離のレベルを検出した、ＥＬＩＳＡアッセイの結果。野生型血清型Ｏ　ＦＭＤＶ（パネルＡ）およびＶＰ２タンパク質突然変異体含有血清型Ｏ　ＦＭＤＶ、すなわちＶＰ２　Ｓ９３Ｙ（パネルＢ）を比較した。線は、ブランク対照試料は別にして、経時的に検出された１４６Ｓまたは１２Ｓ粒子の量に対応する。
【図８】４℃で１０日間の不活性化後に保存された、血清型Ｏサブタイプ１　Ｍａｎｉｓａの化学的不活性化ＦＭＤＶビリオンキャプシドの電子顕微鏡写真。パネルＡは、野生型ＦＭＤＶの試料を示し、パネルＢは、置換Ｓ９３ＹがあるＶＰ２タンパク質突然変異体を含んだ同様の初期量の対応するビリオンキャプシドの試料を示す。野生型不活性化キャプシドのうち約８０％が、解離して五量体となったことが分かった。しかし不活性化ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ突然変異体キャプシドは約９０％インタクトであった。
【図９】ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換があるＶＰ２タンパク質突然変異体を含む不活性化ＳＡＴ－２　ＦＭＤＶビリオンキャプシドを用いた動物ワクチン接種試験からの結果のグラフ表示。ワクチン接種後１カ月および６カ月での１０匹のモルモットの群の平均Ｌｏｇ２ウイルス中和力価をプロットする。エラーバーはｓ．ｅ．ｍ．を示す。　ワクチンは、野生型ＳＡＴ－２、またはＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換があるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むビリオンキャプシドの何れかの、不活性化ＳＡＴ２血清型ＦＭＤＶビリオンキャプシドに基づく。５以上のＬｏｇ２ウイルス中和力価を防御力ありとみなす。　ＳＡＴ　Ｓ９３Ｙ＝ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ；ＳＡＴ　ｗｔ＝野生型ＳＡＴ－２。
【図１０】血清型Ｏ、分離株Ｏ１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶビリオンキャプシドを用いたサーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）分析の結果。グラフは、画像が混乱するのを防ぐために２つのパネルに分ける。ｐＨ７．０の緩衝液中でこれらのアッセイを行った。
ＷＴ＝野生型ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ；９３Ｙ＝ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ；９３Ｆ＝ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ　ＶＰ２　Ｓ９３Ｆ；９３Ｗ＝ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ

ＶＰ２　Ｓ９３Ｗ；９７Ｑ＝ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ　ＶＰ２　Ｓ９７Ｑ；９８Ｆ＝ＦＭＤＶ血清型Ｏ、分離株１　Ｍａｎｉｓａ　ＶＰ２　Ｙ９８Ｆ。

【発明を実施するための形態】

【０２１３】

ここで、次の非限定的な実施例を参照して本発明をさらに記載する。

【０２１４】

［実施例］

１．方法および材料

１．１．細胞およびウイルス

標準的な手段に従い、新生仔ハムスター腎臓（ＢＨＫ）クローン１３細胞（株２１；ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１０）を維持した。ＦＭＤＶストックを増幅し、標準的な手段を用いてＢＨＫ－２１細胞を滴定した。培養したＢＨＫ－２１細胞はＲＮＡ遺伝子移入およびウイルス回収のためにも使用した。さらに、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ、Ｄｅｌｔａ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）を供給した、ＲＰＭＩ培地（Ｓｉｇｍａ）およびＨａｍ’ｓ　Ｆ－１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中でそれぞれ増殖させた、ＩＢ－ＲＳ－２（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｏ　ｒｅｎａｌ　ｓｕｉｎｏ）細胞またはチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（株Ｋ１；ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）の何れかにおいて、プラークアッセイを行った。

【０２１５】

ＢＨＫ－２１細胞においてＦＭＤＶビリオンキャプシドの１段階増殖動態解析を行った。簡潔に述べると、２から４ｐｆｕ／細胞のｍ．ｏ．ｉ．で１時間、ＢＨＫ－２１細胞にウイルスを感染させ、ＭＢＳ－緩衝液（２５ｍＭモルホリン－エタンスルホン酸、１４５ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．５）で洗浄した。指定時間間隔にわたる３７℃でのインキュベート後、感染（ｐ．ｉ．）後２、４、６、８、１０、１２、１６および２０時間で感染細胞を回収し、続いて－７０℃で凍結した。ウイルス力価を決定し、プラーク形成単位／ｍＬ（ｐｆｕ／ｍＬ）として表した。

【０２１６】

感染性コピークローニング後のウイルスの分離株は、Ｍａｒｅｅら（２０１０，Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．１５３，ｐ．８２）に記載のような初代ブタ腎臓（ＰＫ）細胞におけるものであった。ＢＨＫ－２１細胞において野生型および組換えＦＭＤウイルスの培養、継代および増幅を行い；感染させるかまたは遺伝子移入した３５ｍｍ　ＢＨＫ－２１細胞単層を凍結し、融解し、新鮮なＢＨＫ－２１単層を接種するために体積の１／１０を使用した。（３７℃で６０分間、周期的に揺らしながら）ウイルス吸着後、ウイルス増殖培地（ＶＧＭ；１％ＦＣＳ、１％ＨＥＰＥＳおよび抗生物質入りのイーグル基礎培地（ＢＭＥ））を添加し、３７℃で４８時間以内に培養物をインキュベートし、その後、ウイルスのその後の継代のために感染細胞を凍結した。

【０２１７】

１．２．ＦＭＤＶの感染性クローン

特異的なＶＰ２タンパク質突然変異体を含む感染性ビリオンキャプシドを作製する好都合な方法として、感染性クローン技術を使用した。適用される手段は、基本的にＲｉｅｄｅｒら（１９９４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．６８，ｐ．７０９２）に記載のとおりである。簡潔に述べると：

１．２．１．構築

記載のとおり（Ｒｉｅｄｅｒら、１９９３，Ｊ．ｏｆ　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．６７，ｐ．５１３９；Ｖａｎ　Ｒｅｎｓｂｕｒｇら、２００２，Ａｎｎ．Ｎ　Ｙ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ｖｏｌ．９６９，ｐ．８３）、鋳型に対してＦＭＤＶ　Ａ１２ゲノム長のクローンを用いて、交換－カセットストラテジー後、ＳＡＴ－２ワクチン株、ＺＩＭ／７／８３のゲノム長のｃＤＮＡコピーを構築した。インビトロで合成されたＲＮＡ転写産物の遺伝子移入と、それに続く感染性ウイルス粒子の回収のために、この最初のコンストラクトを使用した。ＤＮＡを用いたＢＨＫ－２１細胞の直接的な遺伝子移入および外側キャプシド

コード領域の交換を可能にするために、これを後に最適化した。ＢＨＫ－２１細胞の遺伝子移入および生ＳＡＴ－２　ＦＭＤＶの作製のため、および合成ＲＮＡまたはプラスミドＤＮＡを調製するために、この系を使用した。

【０２１８】

１．２．２．部位特異的突然変異誘発：

製造者の説明書（Ｐａｐｗｏｒｔｈら、１９９６、Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，ｖｏｌ．９，ｐ．４）に従い、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＸＬＩＩ（商標）突然変異誘発キット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用して、アンプリコンオーバーラップ－エクステンションＰＣＲおよび部位特異的突然変異誘発を用いて、感染性クローンプラスミドの部位特異的突然変異誘発を行った。簡潔に述べると、ＰＣＲ過程のそれぞれが、個別のＰＣＲ産物に突然変異を導入するために、２つのゲノム特異的な重複（逆相補）オリゴヌクレオチドの使用を含んだ。４０から４９ヌクレオチド長であり、突然変異の両側にウイルス配列に合致する重複配列の約１５から２０ヌクレオチドがある所望の突然変異をコードするように、変異原性プライマーを設計した。Ｐｆｕ　Ｕｌｔｒａ　Ｔａｑ（商標）ポリメラーゼおよび９５℃で５０秒、６０℃で６０秒および６８℃で６分（１８サイクル）を用いるサイクリング条件によって、ＰＣＲを行った。

【０２１９】

適切な制限酵素でＰＣＲアンプリコンを切断し、ウルトラ－コンピーテントＸＬ１０－Ｇｏｌｄ（商標）Ｅ．ｃｏｌｉ細胞に遺伝子移入するために使用した。配列決定を行うことによって導入されたヌクレオチド突然変異を確認した後、さらなる使用のためにＤＮＡクローニングプラスミドにＶＰ２タンパク質突然変異体をコードする領域を含有するＤＮＡ断片を挿入した。

【０２２０】

１．２．３．インビトロＲＮＡ合成、遺伝子移入およびウイルス回収

ＭＥＧＡｓｃｒｉｐｔ（商標）Ｔ７キット（Ａｍｂｉｏｎ）によって直線化プラスミドＤＮＡ鋳型からＲＮＡを合成した。転写ＲＮＡの完全性を評価するために、アガロースゲル電気泳動によって転写ＲＮＡを調べ、分光光度法でＲＮＡ濃度を決定した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（商標）（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、インビトロで作製したＲＮＡを用いて３５ｍｍ細胞培養ウェル（Ｎｕｎｃ（商標））中のＢＨＫ－２１細胞単層に対して遺伝子移入を行った。３から５時間後に遺伝子移入培地を除去し、ウイルス増殖培地に交換し、続いて５％CO_2気流とともに３７℃で最長４８時間インキュベートした。１回凍結融解サイクルを行った後、ＢＨＫ－２１細胞における連続継代のために、遺伝子移入上清を使用した。清澄化した感染上清の１／１０を用いて３５ｍｍ細胞培養ウェル中のＢＨＫ－２１単層に感染させ、３７℃で４８時間インキュベートした。その後、凍結融解サイクルによって感染細胞からウイルスを回収し、ＢＨＫ－２１細胞において前回の継代物からの上清の１０％を用いて４回継代した。生（組換え）ウイルスの回収後、ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ（商標）ＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎキットｖ３．０（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて自動配列決定により、ウイルスの完全性をもう一度確認した。一般的には、分析前にウイルスを４回継代した。

【０２２１】

１．２．４．ＲＮＡ抽出、ｃＤＮＡ合成およびＰＣＲ増幅

標準的なグアニジンによる核酸抽出法または製造者の説明書に従うＴＲＩｚｏｌ（商標）試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の何れかを用いて感染細胞溶解液からＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡ合成のための鋳型として使用した。Ｂａｓｔｏｓら（２００１，Ａｒｃｈ．　Ｖｉｒｏｌ．，ｖｏｌ．１４６，ｐ．１５３７）に記載のように、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によりウイルスｃＤＮＡを合成した。

【０２２２】

１．３．ウイルス中和試験

基本的にＯＩＥ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｓｔａｎｄａｒｄｓ（２００９）に記載のように、マイクロ中和試験を用いることによってワクチン接種動物におけるウイルス中和抗体反応の検出を行った。抗体反応を検出しようとするウイルスと同じまたは同等であるＦＭＤＶでの２回連続ワクチン接種（第０日にワクチン接種、第２８日に免疫促進および第３８日に採血）によって、参照ウシ血清を調製した。中和試験における指標系としてＩＢ－ＲＳ－２細胞を使用した。ウェルの５０％で１００　ＴＣＩＤ５０ウイルスを中和するための血清の最終希釈の逆数として、相同および異種ウイルスに対する血清のエンドポイント力価を計算した。参照血清に対する野生型および改変ＦＭＤＶウイルスの一元配置抗原性関係（Ｒ１－値）を計算し、異種／相同血清力価間の比として表した。全中和力価決定を少なくとも２回繰り返した。

【０２２３】

１．４．スクロース密度勾配精製

ビリオンキャプシドならびに空キャプシドの精製のために、産生、不活性化または回収の様々な段階で、スクロース密度勾配分離を使用した。

【０２２４】

ワクシニアまたはバキュロウイルスからなど、発現系からのＦＭＤＶ空のキャプシドを回収し、１５から４５％スクロース勾配上に載せ、２２．０００ｒｐｍ（ＳＷ４１ローター、Ｂｅｃｋｍａｎ）で１２℃にて２０時間回転させた。

【０２２５】

４℃で８％（ｗ／ｖ）ＰＥＧ６０００を用いて、細胞培養物からのＦＭＤＶビリオンキャプシドを回収し、清澄化し、濃縮した。２００ｍＭ　ＮａＣｌおよび１％ＮＰ４０入りの５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ８．０）中で沈殿物を可溶化し、４℃で１６時間３６．０００ｘｇの速度ゾーン遠心によって、ＨＥＰＥＳ／ＮａＣｌ中の１０から５０％（ｗ／ｖ）スクロース密度勾配上で分離させた。

【０２２６】

次に、各勾配を分画化し、２６０ｎｍの吸収を測定することによって分光光度法で分画を分析した。吸収に基づき１４６Ｓビリオンを含有する分画を定量し、分析のためにプールした。標準的なＳＤＳ－ＰＡＧＥプロトコールを用いるかまたはウエスタンブロッティングを行うことによって、寒天ゲルタンパク質－電気泳動により外側キャプシドタンパク質の存在を確認した。ＲＴ－ＰＣＲおよびＶＰ１コード領域の配列決定によって、ビリオンキャプシド中のＲＮＡの完全性を確認した。

【０２２７】

１．５．バキュロウイルス発現系

親ＶＰ２またはＶＰ２タンパク質突然変異体の何れかとともにＦＭＤＶ空キャプシドを発現させるために、バキュロウイルス／昆虫細胞発現系（ＢＶＥＳ）を使用した。手順は基本的に（Ｐｏｒｔａら、２０１３，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，ｖｏｌ．１８７，ｐ．４０６）に記載のとおりであった。簡潔に述べると、２７．５℃で２％ＦＣＳおよび抗生物質を補給した昆虫－ＸＰＲＥＳＳ（商標）（Ｌｏｎｚａ）中でＳｆ９細胞を増殖させた。３μＬのＦｕｇｅｎｅ（商標）（Ｒｏｃｈｅ）の存在下で室温にて２０分間、移入ベクターおよびＡｃＭＮＰＶバクミドＫＯ１６２９（各０．５μｇ）を混合し、６ウェルプレート中で１．２×１０＾６／ウェルの密度でＳｆ９細胞に対して遺伝子移入を行うために使用した。

【０２２８】

遺伝子１６２９のノックアウトがあるバキュロウイルスＤＮＡはバキュロウイルス移入ベクターでの組換えによりレスキューされない限り感染を開始させないので、５日後に培養上清中で回収されたＡｃＭＮＰＶは１００％組換えウイルスであった。７０％コンフルエンスでＳｆ９細胞単層に感染させることによって、２００μＬ組換えウイルス接種材料／１７５ｃｍ^{2}フラスコを用いてウイルスストックを作製し、５日後に培養上清から回収した。あるいは、ローラーボトル中の接着細胞培養物および２Ｌ縣濁液培養物を使用した。空キャプシドの発現の場合、１／１０体積のバキュロウイルスストックを用いて、１か

ら２　１０＾６／ｍＬの密度でＳｆ９細胞に感染させた。３日後、５μＬ／ｍＬプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ）の存在下で１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を用いてウイルス抽出を行った。

【０２２９】

１．６．ワクシニア発現系

野生型ＶＰ２タンパク質またはＶＰ２タンパク質突然変異体の何れかを含む、ＦＭＤＶ空キャプシドを発現させるために、ワクシニアウイルス発現系を使用した。手順は、基本的にＫｉｎｇら（前出）に記載のとおりであり、これらを血清型Ｏ、ＳＡＴ２およびＡに対して適用した。簡潔に述べると、Ａ２２により代表されるこの手段は次のとおりであった。

【０２３０】

１．６．１．ワクシニアウイルス移入ベクター

ＦＭＤＶ　Ａ２２　Ｉｒａｑの配列に基づく発現カセットを設計し、デノボ合成し（Ｇｅｎｅａｒｔ（商標））、ワクシニアウイルス移入ベクターｐＢＧ２００の、Ｔ７プロモーターの下流にクローニングした。ＶＰ２　Ｈ９３Ｆ突然変異をコードする配列でのＢｓｔＥＩＩ－ＳｐｅＩ断片の置換によって、ｐＢＧ２００－Ａ２２－ｗｔプラスミドがｐＢＧ２００－Ａ２２－Ｈ９３Ｆに変換された。

【０２３１】

１．６．２．ワクシニアウイルス組換え体の作製および選択

ワクシニアウイルス（ＶＶ）株ＷＲを感染させたＣＶ－１細胞にプラスミドｐＢＧ２００－Ａ２２－ｗｔおよびｐＢＧ２００－Ａ２２－Ｈ９３Ｆを遺伝子移入することによって、組換えワクシニアウイルスを作製した。５－ブロモ－２－デオキシウリジンを用いて、ＨｕＴＫ－１４３細胞において（分割されたチミジンキナーゼ遺伝子がある）組換えＶＶを選択した。安定な組換えＶＶを得るために、ＦＭＤＶ特異的プライマーを用いたＰＣＲによるスクリーニングと組み合わせた３回のプラーク精製を行った。ＲＫ１３細胞およびＢＳ－Ｃ－１細胞上でのプラークアッセイにより滴定したウイルスストックにおいてこれらを増幅させた。１０％ＦＣＳおよび適切な抗生物質を補給したＤＭＥＭ中、３７℃で全ての哺乳動物細胞を増殖させた。

【０２３２】

１．６．３．ワクシニアウイルス発現を介して作製された空キャプシドの沈降

ＲＫ１３細胞の１７５ｃｍ^{2}フラスコに、ＭＯＩ　１０でｖＡ２２－ｗｔまたはｖＡ２２－Ｈ９３Ｆの何れか、およびＭＯＩ　５でｖＴＦ７．３、を感染させた。２４時間後、４℃で２．０００ｘｇで５分間の遠心によって細胞を回収し、ペレットを４０ｍＭリン酸ナトリウム、１００ｍＭ　ＮａＣｌ　ｐＨ７．６中の１ｍＬ　０．５％Ｉｐｅｇａｌ（商標）（Ｓｉｇｍａ）中で再懸濁した。氷上で２０分間、試料をインキュベートし、清澄化し、１５から４５％のスクロース勾配上に載せ、１２℃にて２２．０００ｒｐｍ（ＳＷ４１ローター、Ｂｅｃｋｍａｎ）で２０時間回転させた。各勾配を１ｍｌの１２分画に分画化し、アリコートをウエスタンブロッティングにより分析した。

【０２３３】

１．７．キャプシド解離アッセイ

スクロース勾配により精製した、細胞培養上清中または試料中に存在する野生型およびＶＰ２タンパク質突然変異体含有ＦＭＤＶキャプシドを標準的なＴＮＥ緩衝液に溶解させ、それらの安定性を評価するために様々なｐＨまたは温度の条件に供した。

【０２３４】

１．７．１．ビリオンキャプシドのｐＨ安定性

簡潔に述べると、１０＾６から１０＾７ｐｆｕ／ｍＬの感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドを、それぞれ１：５０ｖ／ｖの比率でＴＮＥ緩衝液（好ましくはｐＨ７以上）と混合した。続いて、混合物を室温で３０分間インキュベートした。対照として、ウイルス粒子をウイルス増殖培地とも同じ比率で混合した。続いて試料を１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）１５０ｍＭ　ＮａＣｌで中和し、ＢＨＫ－２１細胞上で滴定した。あるいは、ＴＮＥ緩

衝液中で１：５０希釈した後、スクロース勾配精製した力価がおよそ４から８×１０＾６ｐｆｕ／ｍＬの粒子を、様々な時間間隔でｐＨ６．０で処理した。

【０２３５】

１．７．２．ビリオンキャプシドの温度安定性

あるいは水浴中、２５、３７、４５または５５℃の温度で３０分間、ＴＮＥ緩衝液（ｐＨ７．４）中のＦＭＤＶビリオンキャプシドを処理し、その後、試料を氷上で冷却し、滴定した。スクロース勾配精製粒子の１：５０希釈物から、スクロースの安定化効果は無視できることが確認された。また、力価がおよそ４から８×１０＾６ｐｆｕ／ｍＬのスクロース勾配精製粒子を様々な時間間隔で４２℃または４９℃に加熱した。

【０２３６】

ＢＨＫ－２１細胞上でのプラーク滴定によって、低ｐＨまたは高温処理後に残存する感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドの数を決定した。様々な時間点でのウイルス力価の個々の対数値を直線的にフィットさせ、勾配を決定した。残存感染性粒子のパーセンテージも計算し、指数関数的減少に沿ってプロットし、不活性化速度定数を計算するために使用した。

【０２３７】

１．７．３．空キャプシドの安定性アッセイ

空キャプシド含有分画の２００μＬアリコートを、（ｉ）リン酸緩衝液ｐＨ７．６で１：３希釈して、水浴中で５６℃で２時間インキュベートするか、または（ｉｉ）５０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液ｐＨ４．６で１：３希釈して、最終ｐＨを５．２にして、ＮａＯＨで中和する前に室温で１５分間インキュベートするかの何れかを行った。処理した試料を１５から４５％スクロース勾配に載せ、遠心した。当体積の飽和硫酸アンモニウムを用いて４℃で各分画を沈殿させた。４℃で１５分間の１６．０００ｘｇの遠心によって沈殿物を回収し、ウエスタンブロットにより分析した。

【０２３８】

１．８．ＥＬＩＳＡアッセイ

Ｈａｒｍｓｅｎら（前出）に記載のようにＥＬＩＳＡを行った。簡潔に述べると、これは、１４６Ｓビリオンキャプシド（抗体Ｍ１７０）または１２Ｓ五量体構造（抗体Ｍ３）の何れかのＦＭＤＶ構造に特異的である２つの単ドメインＬｌａｍａ由来抗体断片のうち１つを用いた、ＦＭＤＶキャプシドの定量のための二重抗体サンドイッチＥＬＩＳＡとみなされる。Ｏ血清型株のみが１４６Ｓ特異的なＥＬＩＳＡにおいて検出され得、一方で殆どの血清型の株が１２Ｓ特異的なＥＬＩＳＡで検出される。しかし、熱処理による１４６Ｓの１２Ｓ粒子への前変換による１２Ｓ特異的なＥＬＩＳＡを用いて、血清型ＡおよびＡｓｉａ１　ＦＭＤＶ株の１４６Ｓ濃度を非間接的に測定し得る。サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイによって安定性を決定した。

【０２３９】

１．９．電子顕微鏡：

化学的不活性化後のビリオンキャプシドのインタクト性および熱処理後の空キャプシドのインタクト性のレベルを調べるために、ＥＭを使用した。

【０２４０】

４℃で１０日間の保存期間後に、電子顕微鏡によって野生型およびＶＰ２　Ｓ９３Ｙの精製された化学的不活性化ビリオンキャプシドを調べた。試料を炭素被覆フォルムバー（ｆｏｒｍｖａｒ）グリッド上に３０秒間付着させ、次いで水で２回洗浄した後、１％酢酸ウラニルで４５秒間染色した。ブロッティングによって過剰な染色を除去し、８０ＫｅＶで作動するＦＥＩ　Ｔ１２電子顕微鏡上でグリッドを調べた。空キャプシドに対して、５６℃で２時間にわたり精製された野生型およびＶＰ２　Ｓ９３Ｆキャプシドを加熱し、その後ＥＭにより調べた。

【０２４１】

１．１０．サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイ

感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドの温度安定性を測定し比較するために、記載のよう

に（Ｗａｌｔｅｒら、２０１２、前出）サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）シフトアッセイを行い；ＶＰ２タンパク質突然変異体または野生型ＶＰ２タンパク質の何れかを含むＦＭＤＶを使用して、ＲＮＡ特異的な蛍光色素ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（商標）を監視することによりウイルスＲＮＡの放出を検出することによって、キャプシド安定性を試験した。２５℃から９５℃の温度勾配を適用し、解離して五量体となったキャプシドとして蛍光の増加によりウイルスゲノム放出を検出した。

【０２４２】

１．１１．ＦＭＤＶ不活性化

感染ＢＨＫ－２１細胞単層から突然変異体および野生型ＦＭＤＶを回収し、２６℃で２６時間、５ｍＭバイナリエチレンイミン（ｂｉｎａｒｙ　ｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ）（ＢＥＩ）で不活性化した。次に、これらをＰＥＧ濃縮し、スクロース勾配で精製した。動物ワクチン接種用のワクチンに処方するために、ＢＥＩで不活性化し、スクロース勾配で精製した抗原を使用した。

【０２４３】

１．１２．動物ワクチン接種実験

それらの抗原安定性の関数としてそれらの免疫原性能および抗体反応の持続時間を評価するために、ＦＭＤＶキャプシドから調製したワクチンを標準的なＦＭＤＶ血清学モデルであるモルモットにおいて試験した。ワクチン抗原は、野生型ＦＭＤＶキャプシドまたはＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換突然変異体を含む野生型株のキャプシドの何れかであった。不活性化ビリオンキャプシドとしておよび空のキャプシドとしての両方でこれらを試験し、ＳＡＴ－２血清型またはＯ血清型の何れかに対してそれぞれ試験した。全動物実験は、法的および動物福祉の規制を完全に順守して行った。１０匹のモルモットの群に筋肉内接種によって０．２ｍｌ用量の試験または対照ワクチンを投与し、第０日および一連の実験中に様々な時間点で採血した。ＯＩＥ指針に従い、ウイルス中和（ＶＮ）試験を用いて、血清中のＦＭＤＶ－中和抗体を分析した。

【０２４４】

２．結果および結論

２．１．温度安定性アッセイ

２．１．１．感染性ビリオンキャプシドの安定性

解離反応速度：

感染性ビリオンキャプシドを解離反応速度アッセイに供し、野生型およびＶＰ２タンパク質突然変異体含有ビリオンキャプシドを比較した。約２から１０×１０＾５ｐｆｕ／ｍＬの力価の両タイプのビリオンキャプシドを４９℃で２時間インキュベートした。この処理後にインタクトなままである感染性粒子数を決定した。粒子の温度不活性化プロファイルは直線的な反応速度論に従い、様々なウイルスの不安定性は、実測の不活性化速度定数値に反映され；これらは、野生型ＳＡＴ－２：０．０１５５／分；ＳＡＴ－２　ＶＰ３　Ｅ１９８Ａ：０．０１６３／分；およびＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ：０．００７５／分であった。

【０２４５】

これによって、野生型および（対照）ＶＰ３置換突然変異体の不活性化速度は基本的に同じであり、一方で、ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ突然変異体に対する不活性化速度は顕著により低いことが示された。これは、野生型ＶＰ２タンパク質を有するキャプシドまたは任意の置換があるＶＰ２タンパク質を含有するキャプシドと比較した場合の、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶキャプシドの熱安定性向上を反映する。

【０２４６】

熱処理後に残存する感染性ＦＭＤＶビリオンキャプシドのパーセンテージを決定した場合、４９℃で２時間インキュベート後にＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙビリオンキャプシドでは約１５％が残存し、それに対して野生型ＳＡＴ－２およびＳＡＴ－２　ＶＰ３　Ｅ１９８Ａ置換突然変異体ウイルスでは残存したのは僅か１．４％であったことが分かった。

【０２４７】
サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）アッセイ：
温度変化に対するＦＭＤＶキャプシド安定性の直接測定として、サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）シフトアッセイを使用した。アッセイによって、キャプシドの解離時にウイルスゲノムに結合するＲＮＡ特異的な蛍光色素により監視される、ＲＮＡの放出が検出される。ビリオンをスクロース勾配により精製し、ＢＥＩで不活性化した。ビリオン試料の濃度は、１４０から４２０μｇ／ｍＬであった。対照として、ＦＭＤＶ血清型Ａ、分離株２４ウイルスを含めた。
【０２４８】
一般的には蛍光の一次微分における鋭くはっきりとしたピークが一定加熱下で観察されたので、ピーク温度をウイルスコンストラクトに対する解離温度の直接的な指標とした。実測値は次のとおりであった。ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙは５３℃で解離、ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｈは５１℃で解離、野生型ＳＡＴ－２は４７℃で解離、図４を参照のこと。
【０２４９】
対照試料は、ＦＭＤＶ　Ａ２４ウイルスであり、これは全体的に５５℃の最高解離温度を有したが、これはＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ突然変異体よりも２℃高いだけである。ＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ１１３Ｇ置換突然変異体ビリオンキャプシド（図４では示されない。）は、陰性対照となった。これは、野生型ＳＡＴ－２ウイルスよりもさらに数度低い、４５℃への解離温度の低下を示した。
【０２５０】
したがって、ビリオンキャプシドＳＡＴ－２　ＶＰ２　Ｓ９３Ｙは解離温度上昇が最大であり、対してその野生型ウイルスの場合は６℃であった。これは、熱不活性化速度アッセイで観察される安定化の度合いとよく一致する（前出）。
【０２５１】
サーモフルオル（ｔｈｅｒｍｏｆｌｕｏｒ）分析を用いて、血清型Ｏ、分離株Ｏ１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶビリオンキャプシドの安定性も決定した。ｐＨ７．０の様々な緩衝液中でこれらのアッセイを行ったところ、それらの基礎レベルは図４の場合とは異なる。画像が混乱するのを防ぐために２つのパネルに分け、図１０で結果を表す。実測ピーク値は次のとおりであった。
【０２５２】
パネルＡ：ｗｔ　Ｏ１Ｍ：４０℃；９３Ｆ：４３℃；９３Ｙ：４４℃。
【０２５３】
パネルＢ：ｗｔ　Ｏ１Ｍ：４０℃；９３Ｗ：４２℃；９７Ｑ：４２℃；９８Ｆ：４４℃。
【０２５４】
２．１．２．空キャプシドの安定性
様々な方法でＦＭＤＶ空キャプシドの安定性を試験した。第一に、スクロース勾配精製は、キャプシド完全性の信頼できる指標を既に提供した。キャプシドが崩壊した場合、スクロース勾配遠心を用いてはっきりとしたバンドを得ることができなかった。
【０２５５】
次に、ゲル電気泳動およびウエスタンブロットを用いて耐熱性を試験した。スクロース勾配精製した空キャプシドを、４５℃に１時間（図５、パネルＡ）または５６℃に２時間（図５、パネルＢ）加熱した。次に、試料をさらなる１５から４５％スクロース密度勾配に載せ、遠心し、勾配を１ｍｌの１２分画になるように回収した。各分画から、５００μＬを５００μＬ飽和硫酸アンモニウムで沈殿させ、ペレットをＳＤＳゲルにかけた。最後に、ゲルをブロットし、ＶＰ１に対する抗体とともにブロットをインキュベートした。
【０２５６】
熱インキュベート後にインタクトのままであった空キャプシドは、スクロース勾配の中央部のすぐ下に集まり、分画４および５に落ち着き、これらの分画に対応するゲルレーン

に現れた。一方で（部分的に）分解されたキャプシドはより低密度であり、勾配の最上部付近に留まり、分画１０および１１に対応するゲルレーンで見られた。

【０２５７】

結果から、血清型Ｏ、サブタイプ１　Ｍａｎｉｓａの野生型ＦＭＤＶからの空キャプシドが急速に崩壊し、両温度に対して分画１０から１１で見出されたことが示された。驚くべきことに、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有キャプシドは、熱処理に非常により良好に耐えることができた。置換Ｓ９３ＨおよびＳ９３ＦがあるＶＰ２タンパク質突然変異体を有するＦＭＤＶキャプシドは、４５℃で１時間後、全て完全にインタクトであった（図５、パネルＡ）。５６℃で２時間後、突然変異体Ｓ９３Ｈは、安定ではなく（全物質が分画１０から１１；図５、パネルＢ）；突然変異体Ｓ９３Ｙは部分的に安定であり（約１０％が分画１０、残りは分画４）；Ｓ９３Ｆは完全に安定であった（全て分画４）。

【０２５８】

５６℃で２時間の処理からの、ＶＰ２　Ｓ９３Ｆタンパク質突然変異体を含む空キャプシド物質からの試料も電子顕微鏡により調べ、ゲル電気泳動の結果を確認した。これらのキャプシド全てがインタクトであることが分かり、五量体は見ることができなかった（図６、下記参照）。

【０２５９】

バキュロウイルス－／昆虫細胞発現系を介して血清型Ｏ、分離株Ｏ１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶ空キャプシドを発現させた場合、標準的な５日間の培養条件後に野生型Ｏ１Ｍの空キャプシドを得ることはできなかった。しかし、ローラーボトルまたは２Ｌ縣濁培養物の何れかで、Ｓ９３Ｆ置換を有する突然変異体ＶＰ２タンパク質を含有する空キャプシドを作製することができた。これにより、ウエスタンブロット、スクロース勾配、ＥＬＩＳＡおよびＥＭなどの分析のための、ならびにモルモットにおけるワクチン接種試験のための、適正な量の安定化突然変異体キャプシドが得られた。

【０２６０】

２．２．ＥＬＩＳＡアッセイ

４９℃で１時間インキュベート中の感染性生ＦＭＤＶの解離のレベルを検出するために、ＥＬＩＳＡアッセイを使用した。野生型血清型Ｏ　ＦＭＤＶ（図７、パネルＡ）およびＶＰ２タンパク質突然変異体含有血清型Ｏ　ＦＭＤＶ、すなわちＶＰ２　Ｓ９３Ｙ（図７、パネルＢ）を比較した。線は、ブランク対照試料は別にして、経時的に検出された１４６Ｓまたは１２Ｓ粒子の総量に対応する。１２Ｓシグナルが多いほど、キャプシド破壊が多いことを示す。

【０２６１】

野生型ＦＭＤＶに対して、１時間インキュベート中、ビリオンキャプシドレベルは低下し、１２Ｓレベルは着実に上昇した。ブランク試料は予想通り閾値レベルのままであった。しかし、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有ビリオンキャプシドに対して、１２Ｓ粒子レベルの上昇は検出されず、このことから、野生型ビリオンキャプシドと比較した場合、熱安定性が大きく向上したことが示された。

【０２６２】

２．３．化学的不活性化後の安定性

ＦＭＤＶビリオンキャプシドをＢＥＩによる標準的な化学的不活性化に供し、電子顕微鏡によって分析した。化学的不活性化後に、直接または４℃でのさらなる１０日間の保管後の何れかでこれを行った。試験したＦＭＤＶキャプシドは、血清型Ｏサブタイプ１　Ｍａｎｉｓａの野生型ＦＭＤＶまたは置換ＶＰ２　Ｓ９３Ｙによる対応するＶＰ２タンパク質突然変異体含有ビリオンキャプシドの何れかであった。

【０２６３】

ＥＭ分析から、最初に、五量体の量とインタクトなビリオンキャプシドの量とが、野生型ビリオンキャプシドの場合は１０：９０％であり、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有キャプシドの場合は０：１００％であったことが示された。低温保管後、差異はより大きくなり；野生型物質は８０：２０％五量体対インタクトビリオンキャプシドであり（図８、

パネルＡ）、対して突然変異体ＶＰ２含有ビリオンキャプシドの場合は１０：９０％であった（図８、パネルＢ）。

【０２６４】

２．４．動物ワクチン接種試験からの結果

２．４．１．空キャプシドでのワクチン接種：

バキュロウイルス／昆虫細胞系において血清型Ｏ、サブタイプ１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶ空キャプシドを発現させ；空キャプシドは、野生型のものであるかまたはＶＰ２　Ｓ９３Ｆ置換があるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むかの何れかであった。残念ながら、親血清型Ｏ１Ｍの空キャプシドは非常に不安定であり、これらは昆虫細胞発現後に殆ど検出できないほどであった（２７℃で５日間、標準的なｐＨ６．５の昆虫細胞培養培地を使用）。したがって、モルモットにワクチン接種するために、ＶＰ２タンパク質突然変異体含有空キャプシドのみを使用した。５または２０μｇ　１４６Ｓ抗原／最終ワクチン用量と同等の用量で、標準的なｗ／ｏ／ｗエマルション中でキャプシド抗原を処方した。対照として、Ｏ１Ｍ型の標準的な不活性化全ウイルスＦＭＤＶワクチンも接種した。

【０２６５】

ワクチン接種後３および４週間でのウイルス中和の結果から、Ｓ９３Ｙ突然変異体の空キャプシドワクチンにより生じたモルモットＶＮ力価は、古典的なＦＭＤＶワクチンで得られた力価と同等であった。インビトロで発現されたＶＰ２タンパク質突然変異体を含むＦＭＤＶ空キャプシドに基づくワクチンの効力は、概念実証を明らかにしたと結論付けた。

【０２６６】

２．４．２．不活性化ビリオンキャプシドによるワクチン接種：

野生型からの、およびＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換を保有するＶＰ２タンパク質突然変異体を含むビリオンキャプシドからのＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２血清型のビリオンキャプシドをモルモットにおいて試験した。ビリオンキャプシドをＢＥＩによって不活性化した。最初に、インタクトなビリオンキャプシド抗原の量を決定し、試料を希釈して、最終ワクチン濃度が５μｇ／ｍＬとなるようにした。標準的なｗ／ｏ／ｗエマルション中で試料を処方し、処方後、試料を４℃で１カ月間保存した。２群の１０匹のモルモットに免疫付与し、血液試料を第０日および免疫付与後１および６カ月で採取した。指標系としてＩＢ－ＲＳ－２細胞を使用し、参照ウイルスとして野生型ＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２／ＺＩＭ／７／８３を使用した。この設定で、５以上のＬｏｇ２ウイルス中和力価を防御力ありとみなす。

【０２６７】

接種日にはＦＭＤＶ中和抗体は検出可能ではなかった。野生型ＦＭＤＶビリオンキャプシドを接種されたワクチネート（ｖａｃｃｉｎａｔｅ）接種対象は、防御レベル以上で血清応答しなかったが、一方でＶＰ２タンパク質突然変異体を有するビリオンキャプシドを接種された全動物が、ワクチン接種後１カ月および６カ月の両方で防御レベルの血清応答を示した。群における差は、中和抗体力価が両時間点で有意（ｐ＞０．０５）であったことを意味する（エラーバー＝ＳＥＭ）。結果は図９で示す。

【０２６８】

野生型ＦＭＤＶビリオンキャプシドのワクチンが防御的な血清応答を誘導しなかったという事実は、不活性化後および１カ月保管後のネイティブキャプシドの不安定性により引き起こされた可能性が最も高かった。

【０２６９】

しかし、本発明によるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むビリオンキャプシドは非常に安定なので、これらは、化学的不活性化および保存の両方を乗り切り、単回ワクチン接種のみの後でさえ、そしてワクチン接種後６カ月までででさえも、確かな防御的液性免疫を依然として誘導することが可能であった。ＳＡＴ－２血清型のＦＭＤＶワクチンに対してさえもこれが可能であったことを見出したのは発明者らにとって驚きであった。

【０２７０】

３．継続中および計画される実験：

３．１．モルモットワクチン接種実験

モルモットワクチン接種実験は、親空キャプシドを含有するか、またはＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換があるＶＰ２タンパク質突然変異体を含むかの何れかの、血清型Ｏ　１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶ空キャプシドのワクチンを使用する調製物におけるものである。いくつかの試験および対照群が含まれ；軽鉱物油をアジュベーテッド（ａｄｊｕｖａｔｅｄ）したｗ／ｏエマルション中で処方された異なるキャプシド抗原（野生型または突然変異体）を５匹のモルモットの群にそれぞれ投与する。

【０２７１】

さらに、様々なアジュバント処方物を試験するために、同様のモルモット実験を計画する。軽パラフィン油を用いて、血清型ＯおよびおそらくＡのＦＭＤＶキャプシドを単一の水中油エマルション中に処方する。

【０２７２】

３．２．ウシワクチン接種負荷試験

２種類の個別のウシワクチン接種負荷試験が適切な高封じ込め施設で行われることを計画する。

【０２７３】

最初の試験は、ＶＰ２タンパク質突然変異体ＶＰ２　Ｓ９３ＹありまたはなしのＳＡＴ－２血清型ＦＭＤＶの不活性化ビリオンキャプシドを用いたワクチン接種である。プロトコールに従い、非妊娠若雌ウシにワクチンの単回投与を行い、野生型ＳＡＴ－２　ＦＭＤＶ株を用いて負荷を行う。

【０２７４】

発明者らは、２６匹のウシを５群に分けることを計画する。

【０２７５】

群１：６匹のウシに市販アジュバント中の野生型ＦＭＤＶ　ＳＡＴ－２ワクチンを接種する；

群２：６匹のウシに市販アジュバント中のＳＡＴ－２　９３Ｙ　ＶＰ２タンパク質突然変異体抗原を与える；

群３：６匹のウシに市販アジュバント中のＳＡＴ－２　９３Ｈ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を与える；

群４：６匹のウシに代替的アジュバントとともにＳＡＴ－２　９３Ｈ　ＶＰ２タンパク質突然変異体を与える；

群５：２匹のウシに偽ワクチン接種を行う。

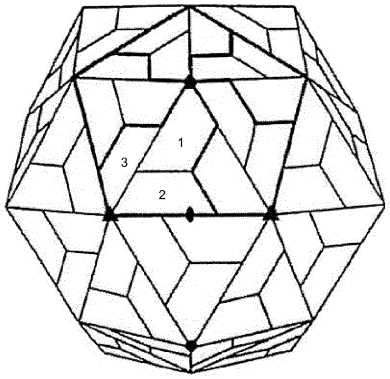
【０２７６】

一定間隔で、最初に２日ごとに、次いで週に１回および月に１回、血清を回収し、ＶＮ試験を用いて評価する。ＶＮ力価が下落し始めたら、１０＾４個のウシ適応生ＦＭＤＶウイルス粒子を用いて、高封じ込め条件でダーモリンガル内に（ｉｎｔｒａｄｅｒｍｏｌｉｎｇｕａｌｌｙ）動物に対して負荷を行う。

【０２７７】

同等の実験において、ＶＰ２　Ｓ９３Ｙ置換を含むＶＰ２タンパク質突然変異体ありまたはなしで、血清型Ｏ　１　ＭａｎｉｓａのＦＭＤＶ空キャプシドを用いて、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａにより記載のとおり、標準的なＰＤ５０タイププロトコールに従い、ウシにワクチン接種する。対照として、１群に標準的な血清型Ｏ　ＦＭＤＶワクチンを投与する。このプロトコールは、ワクチン接種および続く血清型Ｏ野生型ＦＭＤＶ株での負荷感染を組み込む。実験的分析には、完全な血清学ならびに負荷ウイルス再分離が含まれる。

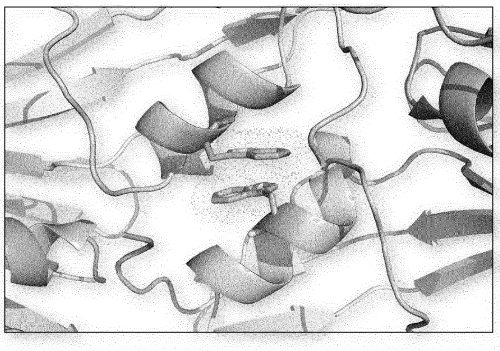
【図１】
Figure 1



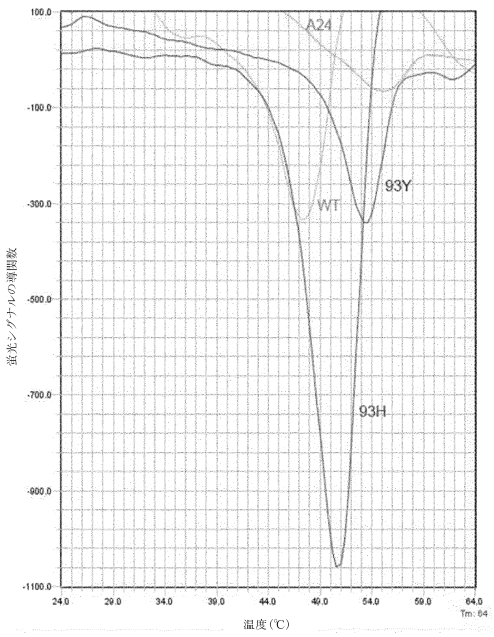
【図２】
Figure 2

FMDV血清タイプ	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
O1BFS	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
O1M_87	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
CS8c1	P	K	G	V	Y	G	G	L	V	K	S	Y
ASIA1_Bar2003	H	K	G	V	Y	G	G	L	M	A	S	Y
A22_Iraq_95	H	K	G	V	Y	G	H	L	V	D	S	F
SAT1_bot	H	K	G	I	Y	G	Q	L	V	D	S	H
SAT2_ZIM7_83	H	K	G	I	Y	G	S	L	T	D	A	Y
SAT3_KNP10_90	H	K	G	I	Y	G	A	M	L	D	S	H

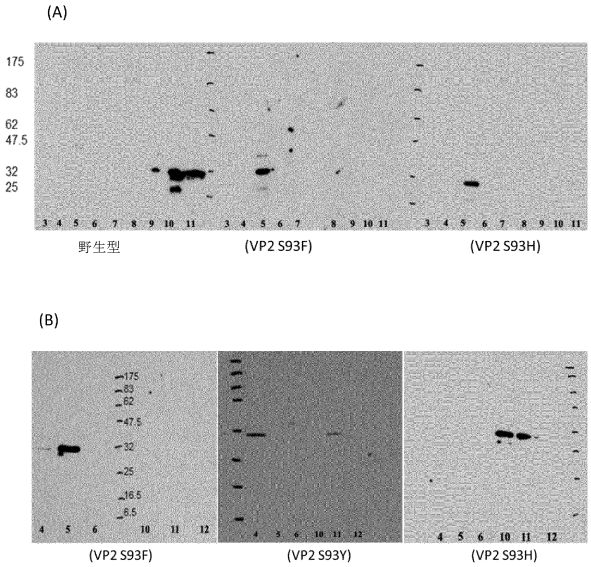
【図３】
Figure 3:



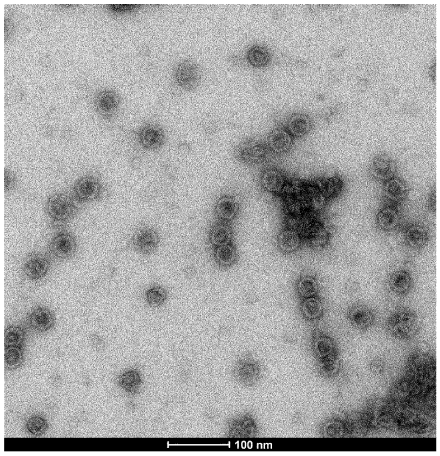
【図４】
Figure 4:



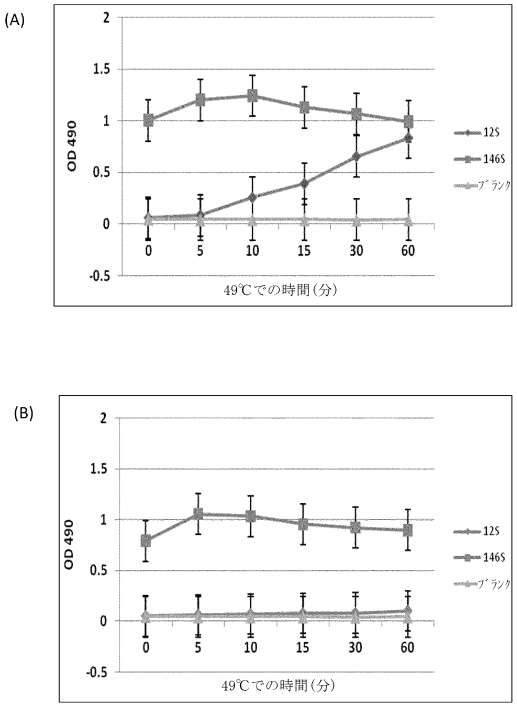
【図５】
Figure 5:



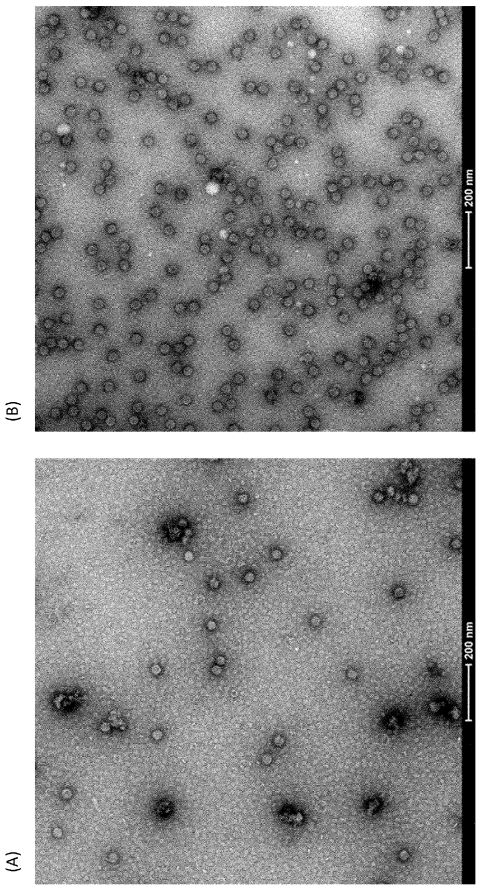
【図６】
Figure 6:



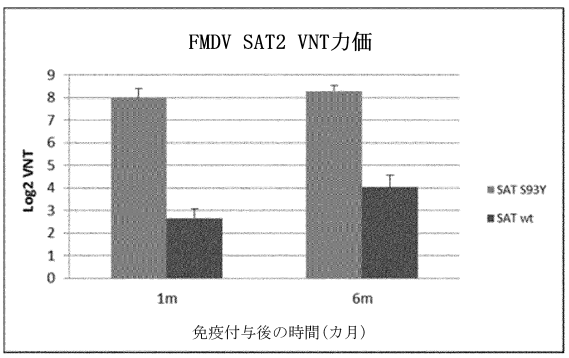
【図７】
Figure 7



【図８】
Figure 8

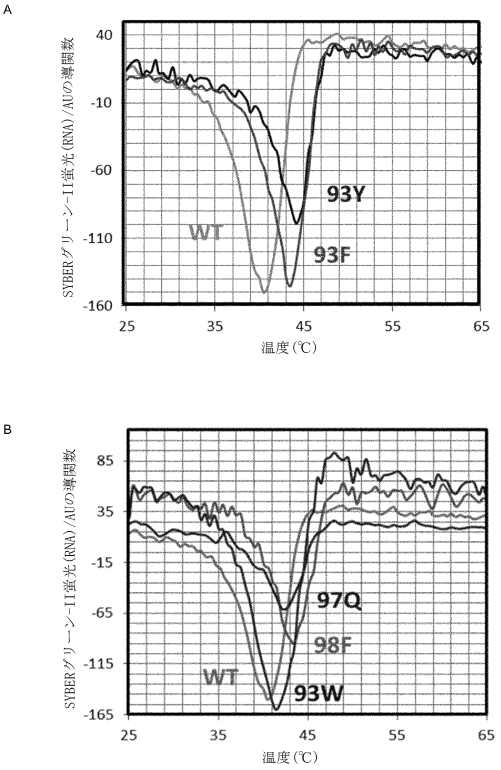


【図９】
Figure 9



【図１０】

Figure 10



【配列表】

0006280635000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
(74)代理人 100196483
弁理士 川嵜 洋祐
(74)代理人 100203035
弁理士 五味渕 琢也
(74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
(72)発明者 コテチヤ，アバイ
イギリス国、オツクスフオードシヤー・オーエツクス１・２ジエーデイー、オツクスフオード、ウエリントン・スクエア
(72)発明者 ステユアート，デイビツド
イギリス国、オツクスフオードシヤー・オーエツクス１・２ジエーデイー、オツクスフオード、ウエリントン・スクエア
(72)発明者 フライ，エリザベス
イギリス国、オツクスフオードシヤー・オーエツクス１・２ジエーデイー、オツクスフオード、ウエリントン・スクエア
(72)発明者 エスノーフ，ロバート
イギリス国、オツクスフオードシヤー・オーエツクス１・２ジエーデイー、オツクスフオード、ウエリントン・スクエア

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 特表２００４－５０１８７４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１２／０３２３４８（WO，Ａ１）
国際公開第２０１１／１１２９４５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１１／００７３３９（WO，Ａ１）
J Virol，１９９５年，Vol.69，No.1，p.430-438

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ

UniProt/GeneSeq
PubMed