(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-540894
(P2024-540894A)
(43)公表日　令和6年11月6日(2024.11.6)

| (51)国際特許分類 | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C12N* | *15/46* | *(2006.01)* | C12N | 15/46 | ZNA | 4B065 |
| *C12N* | *15/62* | *(2006.01)* | C12N | 15/62 | Z | 4C085 |
| *C12N* | *15/33* | *(2006.01)* | C12N | 15/33 | | |
| *C12N* | *15/31* | *(2006.01)* | C12N | 15/31 | | |
| *C12N* | *15/11* | *(2006.01)* | C12N | 15/11 | Z | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全69頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-523176(P2024-523176)
(86)(22)出願日　令和4年10月18日(2022.10.18)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月14日(2024.6.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078305
(87)国際公開番号　WO2023/069950
(87)国際公開日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(31)優先権主張番号　63/256,875
(32)優先日　令和3年10月18日(2021.10.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/256,960
(32)優先日　令和3年10月18日(2021.10.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　520477485
ザ・トラスティーズ・オブ・インディアナ・ユニバーシティー
アメリカ合衆国インディアナ州４７４０５，ブルーミントン，サウス・インディアナ・アベニュー　１０７
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　パットン，ジョン・トーマス
アメリカ合衆国、インディアナ・４７４０１、ブルーミントン、イースト・ファースト・ストリート・１１２０
(72)発明者　フィリップ，アシャ・アン
アメリカ合衆国、インディアナ・４７４０３、ブルーミントン、サウス・ウィロ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　外因性タンパク質を発現する組換えロタウイルス及びその使用

(57)【要約】
本明細書に開示されているものは、組換えロタウイルス（ＲＶ）をコードするポリヌクレオチド、それを使用する方法、及び組換えＲＶを生成するためのシステムである。

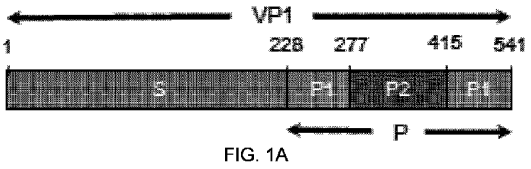


FIG. 1A

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列、及び
異種ポリヌクレオチド、
を含む、ポリヌクレオチド。
【請求項２】
ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結している、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３】
プロモーターが、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４】
プロモーターがＴ７プロモーターである、請求項３に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５】
ポリヌクレオチドが、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項６】
ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列が、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項７】
異種ポリヌクレオチドが、ペプチド又はタンパク質をコードする、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項８】
異種ポリヌクレオチドが、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある、請求項７に記載のポリヌクレオチド。
【請求項９】
ペプチド又はタンパク質が、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む、請求項７に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１０】
ペプチド又はタンパク質が、微生物ペプチド又はタンパク質を含む、請求項７に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１１】
ペプチド又はタンパク質が、細菌ペプチド又はタンパク質を含む、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１２】
ペプチド又はタンパク質が、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１３】
ペプチド又はタンパク質が、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む、請求項１２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１４】
ＮｏＶペプチド又はタンパク質が、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む、請求項１３に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１５】
ＮｏＶペプチド又はタンパク質が、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される、請求項１４に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１６】
ペプチド又はタンパク質が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む、請求項１２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１７】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドが、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される、請求項１６に記載のポリヌクレオチド。

【請求項１８】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質が、Ｓ１タンパク質又はその断片である、請求項１７に記載のポリヌクレオチド。

【請求項１９】

ペプチド又はタンパク質が、切断部位を含む、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２０】

切断部位がプロテアーゼ切断部位である、請求項１９に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２１】

切断部位がトロンビン切断部位（配列番号２８）である、請求項２０に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２２】

切断部位が自己切断型ペプチド配列である、請求項２０に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２３】

自己切断型ペプチド配列が、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である、請求項２２に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２４】

ペプチド又はタンパク質が、リンカーを含む、請求項７に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２５】

リンカーが、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである、請求項２４に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２６】

異種ポリヌクレオチドが、約２．６ｋｂ以下の長さである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２７】

異種ポリヌクレオチドが、約１．５５ｋｂ以下の長さである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２８】

異種ポリヌクレオチドが、約１．３ｋｂ以下の長さである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項２９】

ペプチド又はタンパク質が、糖タンパク質である、請求項７に記載のポリヌクレオチド。

【請求項３０】

ペプチド又はタンパク質が、１つ以上のグリコシル化部位を含む、請求項７に記載のポリヌクレオチド。

【請求項３１】

異種ポリヌクレオチドが、レポーターをコードする、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項３２】

レポーターが、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される、請求項３１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項３３】

レポーターが、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している、請求項３１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項３４】

配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチ

ド。
【請求項３５】
配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む、ポリヌクレオチド。
【請求項３６】
請求項１～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、感染性粒子。
【請求項３７】
請求項１～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを細胞に導入することによって作製される、感染性粒子。
【請求項３８】
請求項３６又は３７に記載の感染性粒子を含み、薬学的に許容される担体又は賦形剤を任意にさらに含む、医薬組成物。
【請求項３９】
対象において１つ以上の微生物に対して免疫応答を誘発する方法であって、請求項３８に記載の医薬組成物の有効量を対象に投与して、１つ以上の微生物に対して免疫応答を誘発することを含む、方法。
【請求項４０】
１つ以上の病原体がＮｏＶを含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
１つ以上の病原体が、ＲＶ及びＮｏＶを含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
１つ以上の病原体がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４３】
１つ以上の病原体が、ＲＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４４】
１つ以上の病原体に対して対象に予防接種する方法であって、請求項３８に記載の医薬組成物の有効量を対象に投与して、１つ以上の病原体に対して対象に予防接種することを含む、方法。
【請求項４５】
１つ以上の病原体がＮｏＶを含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
１つ以上の病原体が、ＲＶ及びＮｏＶを含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
１つ以上の病原体がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
１つ以上の病原体が、ＲＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４９】
組換えロタウイルス（ＲＶ）をインビトロで生成する方法であって、
請求項１～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを細胞に導入すること、細胞がポリヌクレオチドを発現することを可能にすること、細胞を十分な時間にわたってインキュベートして、ＲＶを産生させること、及び細胞により産生されたウイルスを採取して、ＲＶをインビトロで生成することを含む、方法。
【請求項５０】
方法が、可能にするステップの前に、１つ以上の追加のポリヌクレオチドを細胞に導入することをさらに含み、１つ以上の追加のポリヌクレオチドが、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ３、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含み、ＲＶタンパク質をコードするそれぞれの配列が、プロモーターに作動可能に連結している、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】
１つ以上の追加のポリヌクレオチドが、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
１つ以上の追加のポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結しているキャッピング酵素をコードする配列を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
キャッピング酵素が、アフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素である、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
細胞が、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される、請求項４９に記載の方法。
【請求項５５】
細胞が、異種ＲＮＡポリメラーゼを発現する、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
異種ＲＮＡポリメラーゼが、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ及びＴ３　ＲＮＡポリメラーゼから選択される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
細胞が、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞である、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
方法が、細胞中で発現する場合に糖タンパク質に融合しているＲＶタンパク質を産生する、請求項４９に記載の方法。
【請求項５９】
請求項１～３５のいずれか一項に記載の組成物を含む又は請求項３６若しくは３７に記載の感染性粒子を含む、細胞。
【請求項６０】
細胞が、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞又はＢＨＫ－１細胞である、請求項５９に記載の細胞。
【請求項６１】
細胞が、異種ＲＮＡポリメラーゼを発現する、請求項６０に記載の細胞。
【請求項６２】
異種ＲＮＡポリメラーゼが、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ及びＴ３　ＲＮＡポリメラーゼから選択される、請求項６１に記載の細胞。
【請求項６３】
組換えロタウイルス（ＲＶ）を生成するためのシステム、プラットフォーム又はキットであって、
（ａ）請求項１～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド、及び
（ｂ）（ａ）のポリヌクレオチドを発現することができる細胞、
を含む、システム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６４】
ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ３、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む１つ以上の追加のポリヌクレオチドをさらに含み、ＲＶタンパク質をコードするそれぞれの配列が、プロモーターに作動可能に連結している、請求項６３に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６５】
１つ以上の追加のポリヌクレオチドが、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコ

ードする少なくとも１つの配列を含む、請求項６４に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６６】
細胞が、異種ＲＮＡポリメラーゼを含み、アフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素を任意に含む、請求項６４に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６７】
細胞が、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される細胞系からの細胞を含む、請求項６３に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６８】
細胞が、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞を含む、請求項６７に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【請求項６９】
細胞が、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞、ベロ細胞、及びＭＡ－１０４細胞を含む、請求項６８に記載のシステム、プラットフォーム又はキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２１年１０月１８日に出願した米国特許仮出願第６３／２５６，９６０号及び２０２１年１０月１８日に出願した米国特許仮出願第６３／２５６，８７５号の利益を主張し、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
政府の権利についての記述
本発明は、国立衛生研究所により授与されたＴＲ００２５２９及びＡＩ４４８８１の政府援助で行われた。政府は本発明に対して一定の権利を有する。
【０００３】
配列表
配列表が本出願に付随し、１２０，４６９バイトのサイズであり、２０２２年１０月１８日に作成され、「１４４５７８＿００３５１．ｘｍｌ」と名付けられたＳＴ２６フォーマットの配列表のｘｍｌファイルで提出されている。配列表は、出願と共にＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００４】
ロタウイルス（ＲＶ）及びノロウイルス（ＮｏＶ）は、幼児（ｙｏｕｎｇ　ｃｈｉｌｄｒｅｎ）及び高齢者における急性胃腸炎（ＡＧＥ）及び急性下痢エピソードの主因である（１，２）。米国及び多くの他の国々における小児予防接種プログラム（ｃｈｉｌｄｈｏｏｄ　ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ　ｐｒｏｇｒａｍ）における有効なＲＶワクチン－一価ワクチン（ＲＶ１）であるＲｏｔａｒｉｘ（ＧＳＫ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）及び五価ワクチン（ＲＶ５）であるＲｏｔａＴｅｑ（Ｍｅｒｃｋ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ）の開発及び導入は、ＲＶによる入院及び死亡の発生率の低減をもたらし、これらのワクチンは、予防接種を受けた小児中に中和抗体を生成することにかなり成功している（３，４）。ＲＶワクチンが広く使用されている国々では、小児の人生の最初の５年間におけるＮｏＶ媒介下痢性疾患及び入院の増加が、より明白になった（５，６）。ＮｏＶ疾患の発生率は、幼児、高齢者集団及び免疫防御の低い対象において高く、彼らには有効な予防処置が緊急に必要である（７）。ＮｏＶ疾患は非常に伝染性があり、ＡＧＥを引き起こすのにわずか１０個の感染性粒子を要し、高い環境安定性を有し、感染後の排出が数週間にわたって続く（８）。しかし、ウイルス培養に適切な細胞系の欠如のため、並びに薬物及びワクチン評価に成功した動物モデルの欠如のため、有効な抗ＮｏＶ薬又はワクチンを開発することが何年も非常に困難であった（９，１０）。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】

【０００５】
したがって、ＮｏＶに対して免疫を誘発する新規組成物及び方法が当該技術において必要となる。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
（要旨）
本開示の一態様では、ポリヌクレオチドが提供される。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。
【０００７】

本開示の別の態様では、感染性粒子が提供される。一部の実施形態において、感染性粒子は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。

【０００８】

一部の実施形態において、感染性粒子は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転

写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。

【０００９】

本開示の別の態様では、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含み、薬学的に許容される担体又は賦形剤を任意にさらに含む医薬組成物。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の

実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。

【００１０】

一部の実施形態において、医薬組成物は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される感染性粒子を含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク

質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【００１１】

本開示の別の態様では、対象において１つ以上の微生物に対して免疫応答を誘発する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含み、薬学的に許容される担体又は賦形剤を任意にさらに含む医薬組成物の有効量を対象に投与して、１つ以上の微生物に対して免疫応答を誘発することを含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される感染性粒子を含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配

列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。

【００１２】

本開示の別の態様では、１つ以上の病原体に対して対象に予防接種する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含み、薬学的に許容される担体又は賦形剤を任意にさらに含む医薬組成物の有効量を対象に投与して、１つ以上の病原体に対して対象に予防接種することを含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される感染性粒子を含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態におい

て、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＮｏＶを含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。一部の実施形態において、１つ以上の病原体は、ＲＶ及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。

【００１３】

本開示の別の態様では、組換えロタウイルス（ＲＶ）をインビトロで生成する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを細胞に導入すること、細胞がポリヌクレオチドを発現することを可能にすること、細胞を十分な時間にわたってインキュベートして、ＲＶを産生させること、及び細胞により産生されたウイルスを採取して、ＲＶをインビトロで生成することを含む。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、プロモーターは、Ｔ７プロモーター又はＴ３プロモーターである。一部の実施形態において、プロモーターはＴ７プロモーターである。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、ポジティブセンスウイルス転写物をコードする。一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列は、配列番号１をコードする配列又は配列番号１に少なくとも約９０％の同一性を有する配列である。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードする。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ペプチド又はタンパク質をコードし、ＮＳＰ３のインフレームにある。一部の実施形

態において、ペプチド又はタンパク質は、抗原性ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、微生物ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、細菌ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ウイルスペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ノロウイルス（ＮｏＶ）ペプチド又はタンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質を含む。一部の実施形態において、ＮｏＶペプチド又はタンパク質は、配列番号２４、２６又は８０～８４から選択される。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドを含む。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質又はペプチドは、Ｎタンパク質、Ｓタンパク質、又はＮタンパク質若しくはＳタンパク質のいずれかの断片から選択される。一部の実施形態において、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質は、Ｓ１タンパク質又はその断片である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、切断部位を含む。一部の実施形態において、切断部位はプロテアーゼ切断部位である。一部の実施形態において、切断部位はトロンビン切断部位（配列番号２８）である。一部の実施形態において、切断部位は自己切断型ペプチド配列である。一部の実施形態において、自己切断型ペプチド配列は、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号２９）である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、リンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは、ＧＡＧ可動性リンカー又はＧＳＧ可動性リンカーである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約２．６ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．５５ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、約１．３ｋｂ以下の長さである。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、糖タンパク質である。一部の実施形態において、ペプチド又はタンパク質は、１つ以上のグリコシル化部位を含む。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態において、レポーターは、蛍光レポーター、酵素及び抗原タグから選択される。一部の実施形態において、レポーターは、ＲＶタンパク質をコードする配列の３’のインフレームに融合している。一部の実施形態において、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性を有する配列をコードする、ポリヌクレオチド。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２のいずれか１つを含む又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態において、本方法は、可能にするステップの前に、１つ以上の追加のポリヌクレオチドを細胞に導入することをさらに含み、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ３、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含み、ＲＶタンパク質をコードするそれぞれの配列は、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結しているキャッピング酵素をコードする配列を含む。一部の実施形態において、キャッピング酵素は、アフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素である。一部の実施形態において、細胞は、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される。一部の実施形態において、細胞は、異種ＲＮＡポリメラーゼを発現する。一部の実施形態において、異種ＲＮＡポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ及びＴ３　ＲＮＡポリメラーゼから選択される。一部の実施形態において、細胞は、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞である。一部の実施形態において、本方法は、細胞中で発現する場合に糖タンパク質に融合しているＲＶタンパク質を産生する。

【００１４】

本開示の別の態様では、細胞が提供される。一部の実施形態において、細胞は、ロタウ

イルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、細胞は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含む。一部の実施形態において、細胞は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される感染性粒子を含む。一部の実施形態において、細胞は、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞又はＢＨＫ－１細胞である。一部の実施形態において、細胞は、異種ＲＮＡポリメラーゼを発現する。一部の実施形態において、異種ＲＮＡポリメラーゼは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ及びＴ３　ＲＮＡポリメラーゼから選択される。

【００１５】

本開示の別の態様では、組換えロタウイルス（ＲＶ）を生成するためのシステム、プラットフォーム又はキットが提供される。一部の実施形態において、システム、プラットフォーム又はキットは、（ａ）ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、並びに（ｂ）（ａ）のポリヌクレオチドを発現することができる細胞を含む。一部の実施形態において、システム、プラットフォーム又はキットは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ３、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む１つ以上の追加のポリヌクレオチドをさらに含み、ＲＶタンパク質をコードするそれぞれの配列は、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする少なくとも１つの配列を含む。一部の実施形態において、細胞は、異種ＲＮＡポリメラーゼを含み、アフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素を任意に含む。一部の実施形態において、細胞は、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される細胞系からの細胞を含む。一部の実施形態において、細胞は、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞を含む。一部の実施形態において、細胞は、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを含むＢＨＫ－１細胞、ベロ細胞、及びＭＡ－１０４細胞を含む。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１Ａ】ヒトＮｏＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のドメイン。ＶＰ１は、シェル（Ｓ）及び突出（Ｐ）ドメインに細分化され得る。Ｐドメインは、Ｐ１及びＰ２サブドメインにさらに分解される。

【図１Ｂ】色により識別されたＶＰ１のＳドメイン（緑色）、並びにＰ１（シアン色）及びＰ２（青色）サブドメインを有するＮｏＶカプシドの表面提示。

【図１Ｃ】Ｓ（緑色）、Ｐ１（シアン色）及びＰ２（青色）のＮｏＶ　ＶＰ１ダイマーのリボン提示。

【図２】ヒトＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質の部分を発現する組換え（ｒ）ＳＡ１１ウイルスを生成するために使用された、修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｃＤＮＡを有するプラスミド。図解は、ＮＳＰ３（非構造タンパク質３）、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（２Ａ）、３ｘＦＬＡＧ（３ＦＬ）、１ｘＦＬＡＧ（１ＦＬ）若しくは６ｘヒスチジン（６ｘＨｉｓ）タグ、及び／又はトロンビン切断部位（Ｔｈ）、並びに完全ＶＰ１、又はＰ２及びＰのサブドメインのコード配列におけるヌクレオチド位置を示す。赤色矢印は、２Ａ翻訳停止再開部位の位置を示し、星印は、ＯＲＥ（オープンリーディングフレーム）の終点を示す。コードされたＮＳＰ３及びＶＰ１産物のサイズ（コードしたアミノ酸（ａａ）の数で表した）を括弧内に提示する。Ｔ７（Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列）、Ｒｚ（Ｄ型肝炎ウイルスリボザイム）、ＵＴＲ（非翻訳領域）。

【図３Ａ】ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質のＦＬＡＧタグ付き領域を発現するｒＳＡ１１ウイルスの特性。二本鎖ＲＮＡを、ｒＳＡ１１感染ＭＡ１０４細胞から回収し、ゲル電気泳動により分離させ、臭化エチジウム染色により検出した。ｒＳＡ１１／ｗｔ（ｗｔ、野生型）のゲノムセグメントには１～１１が標識されている。修飾セグメント７　ＲＮＡ（黒色

矢印）のサイズ（キロベースペア、ｋｂｐ）が示されている。
【図３Ｂ】プラークアッセイを、ＭＡ１０４細胞を使用して実施し、クリスタルバイオレット染色により検出した。
【図３Ｃ】ｒＳＡ１１プラークの平均直径値が、９５％信頼区間（黒色線）と共に示されている。
【図３Ｄ】ｒＳＡ１１単離物により達成された力価をプラークアッセイにより決定した（プラーク形成単位、ＰＦＵ）。
【図３Ｅ】全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、ｒＳＡ１１ウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製し、ＦＬＡＧ抗体を使用する免疫ブロットアッセイにより検査して、ＶＰ１タンパク質産物（Ｐ２、Ｐ、ＶＰ１）、２Ａリードスルー産物［赤色星印］、並びにＲＶ　ＮＳＰ３、ＶＰ６、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント及びｂ－アクチンに特異的な抗体を検出した。タンパク質分子量マーカー（ＭＷＭ）のサイズ（ｋＤａ）が示されている。
【図４Ａ】Ｈｉｓタグ付きＮｏＶカプシドタンパク質を発現するｒＳＡ１１ウイルスの特性。ｄｓＲＮＡを、Ｈｉｓタグ付きタンパク質を発現するプラーク精製ｒＳＡ１１単離物に感染させたＭＡ１０４細胞から回収し、ゲル電気泳動により分離させ、臭化エチジウム染色により検出した。ｒＳＡ１１／ｗｔのＲＮＡセグメントには１～１１が標識されている。ｒＳＡ１１単離物の修飾セグメント７　ＲＮＡ（黒色矢印）のサイズ（ｋｂｐ）が示されている。
【図４Ｂ】プラークアッセイを、ＭＡ１０４細胞を使用して実施し、クリスタルバイオレット染色により検出した。
【図４Ｃ】プラークの平均直径値であり、９５％信頼区間（黒色線）に注目すること。
【図４Ｄ】ｒＳＡ１１単離物により達成された力価をプラークアッセイにより決定した。
【図４Ｅ】全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、ｒＳＡ１１ウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製し、抗６ｘＨｉｓ抗体を使用する免疫ブロットアッセイにより検査して、ＶＰ１タンパク質産物（Ｐ及びＶＰ１）、並びにＲＶ　ＮＳＰ３、ＶＰ６、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（２Ａ）及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体を検出した。タンパク質マーカー（ＭＷＭ）のサイズ（キロダルトン）が示されている。
【図５Ａ】ＮｏＶ　Ｐタンパク質ｄｓＲＮＡを発現するｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３ウイルスの特性を、プラーク精製ｒＳＡ１１及びｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ単離物に感染させたＭＡ１０４細胞から回収し（プラーク１～３）、ゲル電気泳動により分離させ、臭化エチジウム染色により検出した。ｒＳＡ１１／ｗｔのＲＮＡセグメントには１～１１が標識されている。ｒＳＡ１１単離物の修飾セグメント７　ＲＮＡ（黒色矢印）のサイズ（ｋｂｐ）が示されている。
【図５Ｂ】プラークアッセイを、ＭＡ１０４細胞を使用して実施し、クリスタルバイオレット染色により検出した。
【図５Ｃ】ｒＳＡ１１単離物により達成された力価をプラークアッセイにより決定した。
【図５Ｄ】全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、ｒＳＡ１１及びｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－Ｐ　Ｈｉｓ単離物に感染させたＭＡ１０４細胞から調製し、抗６ｘＨｉｓ抗体を使用する免疫ブロットアッセイにより検査して、Ｐタンパク質、２Ａリードスルー産物、並びにＲＶ　ＳＡ１１　ＮＳＰ３、ＶＰ６、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（２Ａ）及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体を検出した。
【図６Ａ】ｒＳＡ１１により発現されたＮｏＶカプシドタンパク質の二量体化。（Ａ）ＭＡ１０４細胞をモック感染させ、又はｒＳＡ１１／ｗｔ若しくはｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆに感染させ、細胞を採取するときに９時間ｐ．ｉ．までインキュベートした。細胞溶解産物を、ドデシル硫酸ナトリウム及びβ－メルカプトエタノールを含有する試料緩衝液と混合し、２５℃又は９５℃のいずれかで１０分間インキュベートし、４～２０％ポリアクリルアミドゲルのＢｉｏｒａｄ電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットした。ブロットを、Ｍ２　ＦＬＡＧ抗体、

モルモットポリクローナル抗ＮＳＰ３若しくは抗ＶＰ６抗体、又はウサギ抗Ｂアクチンモノクローナル抗体でプローブした。一次抗体は、ＨＲＰ結合二次抗体を使用して検出した。タンパク質分子量マーカー（ＭＷＭ）のサイズ（キロダルトン、ｋＤａ又はｋＤ）が示されている。

【図６Ｂ】ＭＡ１０４細胞をモック感染させ、又はｒＳＡ１１／ｗｔ若しくはｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ＴｈＨｉｓに９ｈ．ｐ．ｉ．で感染させ、細胞を採取した。細胞溶解産物を上記のとおりに調製し、４～２０％ポリアクリルアミドゲルのＢｉｏｒａｄ電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットした。ブロットを、マウス抗６ｘＨｉｓ抗体、モルモットポリクローナル抗ＮＳＰ３若しくは抗ＶＰ６抗体、又はウサギ抗Ｂアクチンモノクローナル抗体でプローブした。一次抗体は、ＨＲＰ結合二次抗体を使用して検出した。タンパク質マーカー（ＭＷＭ）のサイズ（キロダルトン）が示されている。

【図７Ａ】適切に折り畳まれたｒＳＡ１１株から発現したＮｏＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質。（Ａ）ｒＳＡ１１／ｗｔ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製した溶解産物を、折り畳まれたＶＰ１タンパク質の立体構造依存性エピトープを認識するＮｏＶ　ＶＰ１特異的モノクローナル抗体（抗ＮｏＶ　ＧＩＩ．４　ＮＶＢ４３．９、絶対的抗体）を使用する免疫沈降（ＩＰ）アッセイにより解析した。抗原－抗体複合体を磁気ＩｇＡ／Ｇビーズの使用により回収し、ゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットした。ブロットを、免疫沈降ＶＰ１タンパク質を検出するために抗ＦＬＡＧ及び抗６ｘＨｉｓ抗体でプローブし、モルモットポリクローナル抗ＮＳＰ３若しくは抗ＶＰ６抗体、又はウサギ抗Ｂアクチンモノクローナル抗体でプローブした。青色矢印は、免疫沈降ＶＰ１タンパク質を示している。Ｉｇ軽鎖（Ｉｇ／Ｌ）及びＩｇ重鎖（ＩｇＨ）。

【図７Ｂ】溶解産物をＮＳＰ２特異的マウスモノクローナル抗体（＃１７１）により同様に解析し、ブロットを、免疫沈降ＮＳＰ２タンパク質を検出するためにマウス抗ＮＳＰ２抗体（＃５１６）でプローブし、モルモットポリクローナル抗ＮＳＰ３若しくは抗ＶＰ６抗体、又はウサギ抗Ｂアクチンモノクローナル抗体でプローブした。ｋＤａで分子量マーカー（ＭＷＭ）の位置を示している。

【図８Ａ】ＮｏＶタンパク質を発現するｒＳＡ１１株の遺伝子安定性。ｒＳＡ１１株をＭＡ１０４細胞中で５回（Ｐ１～Ｐ５）連続継代させた（Ａ）ゲノムＲＮＡを感染細胞溶解産物から回収し、ゲル電気泳動により解析した。ウイルスゲノムセグメントの位置が標識されている。ｒＳＡ１１株に導入された修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｄｓＲＮＡの位置が、黒色矢印で示されている。

【図８Ｂ】ゲノムＲＮＡを、３つの希釈（１：１０、１：１００及び１：１０００）の溶解産物に感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓの修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｄｓＲＮＡの遺伝子安定性は、連続継代の際に再編成ＲＮＡを生じた（赤色矢印で示されている）。

【図８Ｃ】ゲノムＲＮＡを、３つの希釈（１：１０、１：１００及び１：１０００）の溶解産物に感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓの修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｄｓＲＮＡの遺伝子安定性は、連続継代の際に再編成ＲＮＡを生じた（赤色矢印で示されている）。

【図８Ｄ】ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓウイルスの５溶解産物から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークから調製されたゲノムＲＮＡ。再編成セグメント７　ＲＮＡは、ｆＶＰ１／Ｒ１、ｆＶＰ１／Ｒ２及びＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒとして示されている（赤色矢印）。

【図８Ｅ】ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｖ

Ｐ１ＨｉｓウイルスのＰ５溶解産物から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークから調製されたゲノムＲＮＡ。再編成セグメント７　ＲＮＡは、ｆＶＰ１／Ｒ１、ｆＶＰ１／Ｒ２及びＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒとして示されている（赤色矢印）。
【図８Ｆ】再編成ＲＮＡから調製されたｃＤＮＡをシーケンシングすることによって決定された再編成セグメント７　ＲＮＡ（Ｒ）配列の構成。配列欠失が破線で示されている。
【図９Ａ】ＮｏＶ　ＶＰ１を発現するように修飾されたｒＳＡ１１ウイルスから生成されたｒＳＡ１１バリアントの特徴付け。ゲノムＲＮＡをｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓ感染細胞溶解産物から回収し、ゲル電気泳動により解析した。ウイルスゲノムセグメントの位置が標識されている。ｒＳＡ１１株に導入された修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｄｓＲＮＡの位置が、黒色矢印で示されており、ランダムバリアントの生成が赤色矢印で示されている。
【図９Ｂ】全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、変異ｒＳＡ１１ウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製し、ＲＶ　ＮＳＰ３、ＶＰ６及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体を使用して免疫ブロットアッセイにより検査した。ＮＳＰ３抗血清よるプロービングは、多数のＮＳＰ３タンパク質バンドを示している。
【図９Ｃ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｄ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｅ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｆ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｇ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｈ】ゲノムＲＮＡを、ｆＶＰ１バリアントプール（Ｖ１～Ｖ４）及びＶＰ１Ｈｉｓバリアントプール（Ｖ５～Ｖ６）から単離された大型（Ｌ）及び小型（Ｓ）プラークに感染させた細胞から回収し、ゲル電気泳動により解析した（Ｖ：バリアント）。
【図９Ｉ】変異セグメント７　ＲＮＡから作製されたｃＤＮＡをシーケンシングすることによって決定された再編成セグメント７　ＲＮＡ（Ｒと示されている）配列の構成。配列欠失が破線で示されている。再編成変異セグメントのサイズが括弧内に示されている。
【図１０Ａ】ＲＶ粒子密度に対するゲノムサイズの影響。（Ａ～Ｂ）。ＭＡ１０４細胞を、ｒＳＡ１１／ｗｔ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＰ２、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＰ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＶＰ１、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ＰＨｉｓ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ＶＰ１ＨｉｓウイルスにＭＯＩの５で感染させた。１２時間ｐ．ｉ．（感染後）に、細胞を回収し、非イオン性洗剤で処理して溶解し、ＥＤＴＡで処理して、ＲＶビリオンをＤＬＰに変換した。ＤＬＰをＣｓＣｌ勾配の遠心分離によりバンド形成し、これらの密度（ｇ／ｃｍ$^3$）を屈折計の使用により決定した。粒子密度は図１０Ａ、１０Ｂに埋め込まれた表に示されている。
【図１０Ｂ】ＲＶ粒子密度に対するゲノムサイズの影響。（Ａ～Ｂ）。ＭＡ１０４細胞を、ｒＳＡ１１／ｗｔ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＰ２、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＰ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＶＰ１、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ＰＨｉｓ、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ＶＰ１ＨｉｓウイルスにＭＯＩの５で感染させた。１２時間ｐ．ｉ．（感染後）に、細胞を回収し、非イオン性洗剤で処理して溶解し、ＥＤＴＡで処理して、ＲＶビリオンをＤＬＰに変換した。ＤＬＰをＣｓＣｌ勾配の遠心分離によりバンド形成し、これらの密度

（ｇ／ｃｍ$^3$）を屈折計の使用により決定した。粒子密度は図１０Ａ、１０Ｂに埋め込まれた表に示されている。
【図１０Ｃ】ＣｓＣｌ勾配から回収されたＤＬＰのｄｓＲＮＡゲノムの電気泳動プロファイル。パネルＣのＲＮＡはパネルＡ（図１０Ａ）のＤＬＰに由来し、パネルＤ（図１０Ｃ）のＲＮＡはパネルＢのＤＬＰに由来する。ｒＳＡ１１／ｗｔのＲＮＡセグメントには、１～１１が標識されている。修飾セグメント７　ＲＮＡの位置は黒色矢印で示されており、赤色矢印は、試料中に生成されたバリアントを示している。
【図１０Ｄ】ＣｓＣｌ勾配から回収されたＤＬＰのｄｓＲＮＡゲノムの電気泳動プロファイル。パネルＣのＲＮＡはパネルＡ（図１０Ａ）のＤＬＰに由来し、パネルＤ（図１０Ｃ）のＲＮＡはパネルＢのＤＬＰに由来する。ｒＳＡ１１／ｗｔのＲＮＡセグメントには、１～１１が標識されている。修飾セグメント７　ＲＮＡの位置は黒色矢印で示されており、赤色矢印は、試料中に生成されたバリアントを示している。
【図１１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質をコードするｒＳＡ１１を生成するために使用された修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｃＤＮＡを有するプラスミド。模式は、ＮＳＰ３、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント、３ｘ又は１ｘＦＬＡｇ（ＧＬ）、６ｘＨｉｓ（Ｈｉｓ）及び完全Ｓ１のコード配列のヌクレオチド位置を示す。赤色矢印は、２Ａ翻訳停止－再開部位の位置を示し、星印は、ＯＲＥの終点を示す。コードされたＮＳＰ３及びＳ１タンパク質のサイズ（配列をコードしたアミノ酸（ａａ）の数に関して）を括弧内に示す。Ｔ７（Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列）、Ｒｚ（Ｄ型肝炎ウイルスリボザイム）、ＵＴＲ（非翻訳領域）。
【図１２Ａ】ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質を発現するｒＳＡ１１ウイルスの特性。ｄｓＲＮＡを、プラーク精製ｒＳＡ１１単離物に感染させたＭＡ１０４細胞から回収し、ゲル電気泳動により分離させ、臭化エチジウム染色により検出した。ｒＳＡ１１／重量（ｗｅｉｇｈｔ）（ｗｔ）のＲＮＡセグメントには、１～１１が標識されている。ｒＳＡ１１単離物のセグメント７　ＲＮＡ（黒色矢印）のサイズ（Ｋｂｐ）が示されている。
【図１２Ｂ】細胞溶解産物を、ｒＳＡ１１ウイルス９に感染させた細胞から感染の９時間後（ｈ．ｐ．ｉ．）に調製し、抗ＦＬＡＧ及び抗６ｘＨｉｓ抗体を使用する免疫ブロットアッセイにより検査して、Ｓタンパク質を検出し、同じブロットを、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質、ＲＶ　ＮＳＰ３、ＶＰ６及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体で再プローブした。
【図１２Ｃ】プラークアッセイを、ＭＡ１０４細胞を使用して実施し、クリスタルバイオレット染色により検出した。
【図１２Ｄ】ｒＳＡ１１単離物により達成された力価をプラークアッセイにより決定した。
【図１３】ｒＳＡ１１ウイルスから発現したＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質がグリコシル化される。全細胞溶解産物を、ｒＳＡ１１ウイルスに感染させた細胞から９ｈ．ｐ．ｉに調製し、Ｅｎｄｏ　Ｈ試薬を用いて又は用いることなく処理し、抗ＦＬＡＧ及び抗６ｘＨｉｓ抗体を使用する免疫ブロットアッセイにより検査して、Ｓ１タンパク質を検出し、同じブロットを、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１に特異的な抗体で再プローブする。免疫ブロットを、ＲＶ　ＮＳＰ３及びＶＰ６に特異的な抗体によってもプローブし、同じブロットを、細胞ベータアクチンに特異的な抗体により再プローブする。
【図１４Ａ】ｒＳＡ１１ウイルスから発現したＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質は、ヒトＡＣＥ－２受容体に結合することができる。ｒＳＡ１１／ｗｔ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製した溶解産物を、組換えＡＣＥ－２ヒトＩｇＧタンパク質を使用する免疫共沈降アッセイにより検査した。タンパク質－抗体複合体を、タンパク質ＩｇＡ／Ｇビーズを使用して回収し、ゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットし、抗ＦＬＡＧ及び抗６ｘＨｉｓ抗体、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１抗体、ＲＶ、ＮＳＰ３、ＶＰ６及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体によりプローブした。
【図１４Ｂ】ｒＳＡ１１ウイルスから発現したＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質は

、ヒトＡＣＥ－２受容体に結合することができる。ｒＳＡ１１／ｗｔ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製した溶解産物を、組換えＡＣＥ－２ヒトＩｇＧタンパク質を使用する免疫共沈降アッセイにより検査した。タンパク質－抗体複合体を、タンパク質ＩｇＡ／Ｇビーズを使用して回収し、ゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットし、抗ＦＬＡＧ及び抗６ｘＨｉｓ抗体、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１抗体、ＲＶ、ＮＳＰ３、ＶＰ６及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体によりプローブした。

【図１５】ＲＶ感染細胞におけるＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質の局在化。ＭＡ１０４細胞を、モック感染させた又は組換えＳＡ１１ウイルス：ｗｔ、ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆに感染させた。９ｈ．ｐ．ｉ．に細胞を３．７％ホルムアルデヒドに固定した。その後、全ての細胞をウサギＳ１抗体、マウスＮＳＰ２抗体と共にインキュベートし、続いてＡｌｅｘａ４８８抗ウサギｉＩｇＧ（緑色）及びＴＲＩＴＣ抗マウスＩｇＧ（赤色）とインキュベートして、感染細胞中のＳ１タンパク質及びＮＳＰ２タンパク質の位置を検出した。核は、ＤＡＰＩで染色することによって検出した。細胞を、フルオレセインイソチオシアネート及びテトラメチルロジウムイソチオシアネートウインドウを使用するＥｃｈｏ　Ｒｅｖｏｌｖｅ蛍光顕微鏡（２０×対物レンズ）により解析した。

【図１６Ａ】ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１ｆタンパク質を発現するｒＳＡ１１株の遺伝子安定性。Ｓ１タンパク質を発現するｒＳＡ１１株をＭＡ１０４細胞中で５回連続継代（Ｐ１～Ｐ５）させた。ゲノムＲＮＡを感染細胞溶解産物から回収し、ゲル電気泳動により解析した。ウイルスゲノムセグメントの位置が標識されている。ｒＳＡ１１株に導入された修飾セグメント７（ＮＳＰ３）ｄｓＲＮＡの位置が、黒色矢印で示されている。

【図１６Ｂ】ｒＳＡ１１／ｗｔ及び連続継代ＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆウイルス（Ｐ１～Ｐ５）に感染させたＭＡ１０４細胞から調製された溶解産物を、免疫ブロットアッセイにより検査し、ＦＬＡＧ抗体、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１抗体、ＲＶ、ＮＳＰ３、ＶＰ６及び細胞ベータアクチンに特異的な抗体によりプローブした。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

ゲノム全体又は個別のウイルス遺伝子の遺伝子解析は、７個のＮｏＶ遺伝子群（ｇｅｎｏｇｒｏｕｐ）の確認を導き出し、カプシドタンパク質ＶＰ１及びＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼの配列研究は、３０個を超える遺伝子型を確認した（７）。ヒトに起こるＮｏＶ疾患は、大部分が遺伝子群Ｉ（ＧＩ）、ＩＩ（ＧＩＩ）及びＩＶ（ＧＩＶ）に含まれる株が原因である（１１）。しかし、ＧＩＩは、世界中でヒト疾患を引き起こしている主な遺伝子群である。ＧＩＩ．４遺伝子型は、１９９０年代から優勢であり、全てのヒトＮｏＶ疾患の５５～８５％を占める（１２～１４）。遺伝子群内には高度な遺伝的多様性があり、１つの遺伝子群に含まれる株が原因の感染は、別の遺伝子群に対する保護を一般に与えず、このことは有効な普遍的ワクチンの開発を困難にしている（１５）。

【００１８】

ＮｏＶゲノムは、およそ７．６ｋｂｐであり、３個のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ１～３）を含有し、ＯＲＦ－３は主要な構造タンパク質であるＶＰ１をコードする。ウイルスカプシドは、９０個のＶＰ１ダイマーから構成され、これはシェル（Ｓ）ドメイン及び突出（Ｐ）ドメインから構成される（１６）。Ｓドメインは、最も高度に保存されたＶＰ１ドメインであり、一方、Ｐドメインはより可変性があり、一次アミノ酸配列が不連続であるＰ１及びＰ２サブドメインを含む。高度に可変性のＰ２サブドメインは、タンパク質の免疫優性領域を表し、中和抗体の標的であり、ＮｏＶの定義された受容体結合部位を含有する（１７，１８）。ＮｏＶ感染後の免疫応答は、血清ヒト組織－血液型抗原を測定することによって確認され得る（１９，２０）。

【００１９】

３つのタイプのＮｏＶワクチンが開発されており、非複製ウイルス様粒子（ＶＬＰ）、Ｐ粒子及び組換えアデノウイルスベクター化ワクチンである（２１～２３）。大部分のワクチン研究は、成人において実施され（２４～２６）、一方、免疫原性及び安全性を試験

するために小児及び乳児に実行されたＧＩ．１及びＧＩＩ．４二価ワクチンの第ＩＩ相試験は、調合剤が頑強な免疫応答を誘起することを示した（２７）。ＲＶ及びＮｏＶ疾患の両方を同時に予防する試みでは、２個のＮｏＶ　ＶＬＰ（ＧＩＩ．４及びＧＩ．３）、並びにオリゴマーＲＶ　ＶＰ６を含有する三価ワクチンが動物モデルで試験された（２８，２９）。ＲＶ　ＶＰ６は、高度に保存されたタンパク質であり、ＲＶ感染から保護する有意な免疫応答を誘起することができ、ＮｏＶ抗原に対する免疫応答を増加するアジュバントとして作用することができる（３０）。

【００２０】

近年のＲＶ逆遺伝学的システムの開発は、外来性タンパク質の発現ベクターとしての組換えＲＶの生成をもたらした（３１～３６）。ＲＶゲノムは１１個のセグメントのｄｓＲＮＡからなり、合計サイズは１８．５ｋｂｐである。全てのセグメントは、セグメント１１を除いて単一ＯＲＥを含有する。これらは、６個の構造的（ＶＰ）又は６個の非構造的（ＮＳＰ）ウイルスタンパク質をコードする（３７）。Ａ群ＲＶ（ＲＶＡ）のゲノムセグメント７は、感染細胞中でウイルス（＋）ｍＲＮＡの翻訳エンハンサーとして作用するＲＮＡ結合タンパク質である３６ｋＤａタンパク質のＮＳＰ３をコードする（３８，３９）。

【００２１】

ＲＶをワクチン発現ベクターとして使用するために、本発明者たちは、ＮＳＰ３　ＯＲＦを２Ａ翻訳エレメントの使用により修飾して、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　スパイクタンパク質の領域を発現させることによってＲＶ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ワクチンを作製する可能性を探究した（３１）。ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓタンパク質のドメインを発現する、ウエルで成長させ遺伝子的に安定した組換えＲＶが作製され、これらのウイルスのＮＳＰ３産物は、機能的であり、二量体化することが可能であり、細胞ポリ（Ａ）結合タンパク質の核局在化を誘導することが可能である（３１，３２，４０）。したがって、本発明者たちは、ＲＶ及びＮｏＶ感染の両方に対して免疫保護を誘導することができる混合ＲＶ－Ｎｏｖワクチンを作製するのに有効なベクターシステムとして、ＲＶを開発した。

【００２２】

ポリヌクレオチド

本開示の一態様では、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドが提供される。本発明者たちは、一部の実施形態において、ポリヌクレオチドがポジティブセンスウイルス転写物をコードし、細胞中に発現して、機能性遺伝子産物を生成し得ることを本明細書において開示する。したがって、一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、プロモーター、例えば、Ｔ３プロモーター（配列番号３１）又はＴ７プロモーター（配列番号３０）に作動可能に連結する。

【００２３】

本明細書に使用されるとき、「作動可能に連結する」とは、２個以上の核酸（例えば、ＤＮＡ）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、これは、転写調節エレメント（プロモーター）と転写配列との機能的関係を指す。例えば、プロモーターは、適切な細胞中のコード配列の転写を刺激又は調節する場合、コード配列に作動可能に連結する。一般に、配列に作動可能に連結するプロモーター転写調節エレメントは、転写配列に物理的に近接している、すなわち、シス作用性である。しかし、一部の転写調節エレメント、例えばエンハンサーは、転写が高められるコード配列に物理的に近接する又は密接して配置される必要はない。例示的なプロモーターには、Ｔ７バクテリオファージプロモーター（配列番号１４）及びＴ３バクテリオファージプロモーター（配列番号１５）が挙げられる。好適なプロモーターは、当該技術に公知のプロモーターから選択され得る。一部の実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞であり、ＭＡ－１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される。

【００２４】

一部の実施形態において、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質は、配列番号１である、又は配列

番号１に少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９１％の同一性、少なくとも約９２％の同一性、少なくとも約９３％の同一性、少なくとも約９４％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９６％の同一性、少なくとも約９７％の同一性、少なくとも約９８％の同一性又は少なくとも約９９％の同一性を有する配列である。

【００２５】

一部の実施形態において、ＮＳＰ３をコードする配列、例えば、配列番号９は、異種ポリヌクレオチドが、ＮＳＰ３配列のインフレームのタンパク質又はペプチドをコードし、それによってＮＳＰ３及び異種ポリヌクレオチドの両方をコードする単一ｍＲＮＡの転写を可能にするように、配列の３’末端に融合した異種ポリヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態において、ＮＳＰ３及び異種ポリヌクレオチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドは、切断部位をコードする配列を含む。一部の実施形態において、切断部位は、自己切断型ペプチド、例えば、ブタテッショウウイルス２Ａエレメント（配列番号１３）である。よって、一部の実施形態において、開示されている組成物は、ペプチド又はタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチド配列のインフレームに融合している自己切断型ペプチドをコードする配列のインフレームに融合したＮＳＰ３をコードする、ポリヌクレオチドを５’から３’まで含む。したがって、そのような組成物の転写及び翻訳は、細胞中に、異種ポリヌクレオチドによりコードされたペプチド又はタンパク質に融合している自己切断型ペプチド、例えば配列番号１３に融合したＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質のＮからＣ末端まで含む融合タンパク質の産生をもたらし、翻訳後に、融合タンパク質の自己切断は、２つの別個のタンパク質（１）機能性ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質及び（２）異種ポリヌクレオチドにコードされたタンパク質又はペプチドをもたらす。一部の実施形態において、組成物は、ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列の３’及びインフレームに配置され、切断部位の５’に配置されたリンカー、例えば、可動性リンカーをコードする配列をコードする配列をさらに含む。あらゆる理論又は機構に限定されることなく、本発明者たちは、ＮＳＰ３タンパク質と切断部位との間に可動性リンカーを付加することが切断を改善すると考える。一部の実施形態において、リンカーは、（ＧＡＧ）$_n$リンカー（ＧＡＧリンカーとも称される）であり、ここでｎ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０若しくはそれ以上である、又は（ＧＳＧ）$_n$リンカー（ＧＳＧリンカーとも称される）であり、ここでｎ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０若しくはそれ以上である。

【００２６】

一部の実施形態において、切断部位をコードする配列は、プロテアーゼ切断部位、例えばトロンビン切断部位、例えば配列番号１２をコードする。

【００２７】

一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、少なくとも１つの担体部分をコードする配列を含む。一部の実施形態において、担体部分は、分泌ペプチド、例えば、インターロイキン２分泌タンパク質、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１分泌タンパク質、又は細胞表面受容体のリガンド、例えば、免疫グロブリンＩｇＧ、胎児受容体ＦｃＲｎである。

【００２８】

本発明者たちは、上記に記載された異種ポリヌクレオチド配列が感染性生物体、例えば、ＮｏＶ又はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に由来するタンパク質又はペプチドをコードする配列を含むことをさらに企図する。したがって、一部の実施形態において、開示されている組成物は、ＮｏＶタンパク質又はペプチド、例えば、ＮｏＶをコードする異種ポリヌクレオチドのインフレームに融合した、ＲＶ　ＮＳＰ３をコードする配列を含む。

【００２９】

一部の実施形態において、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質は、配列番号２４又は２６から選択されるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態において、異種ポリヌクレオチドは、ＮｏＶ　ＶＰ１をコードし、配列番号２５を含む。一部の実施形態において、ノロウイルスタンパク質は、配列番号２４又は２６及び８０～８４から選択される。

【００３０】

本発明者たちは、例示的なロタウイルスＮＳＰ３ノロウイルス融合タンパク質を本明細

書にさらに開示する。したがって、本開示の別の態様では、さらなるポリヌクレオチドが提供される。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号２～１１から選択されるタンパク質をコードする、又は配列番号２～１１から選択される配列に少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９１％の同一性、少なくとも約９２％の同一性、少なくとも約９３％の同一性、少なくとも約９４％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９６％の同一性、少なくとも約９７％の同一性、少なくとも約９８％の同一性又は少なくとも約９９％の同一性を有する配列をコードする。

【００３１】

一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１３～２２を含む、又は配列番号１３～２２のいずれか１つに少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９１％の同一性、少なくとも約９２％の同一性、少なくとも約９３％の同一性、少なくとも約９４％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９６％の同一性、少なくとも約９７％の同一性、少なくとも約９８％の同一性又は少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含む。

【００３２】

感染性粒子

本開示の別の態様では、感染性粒子が提供される。一部の実施形態において、感染性粒子は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列、及び異種ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、感染性粒子は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞に導入することによって作製される。

【００３３】

本明細書に使用されるとき、「感染性粒子」とは、生物体又は細胞に感染を引き起こすことができる任意の粒子を指す。例示的な感染性粒子には、ウイルス粒子、ビリオンなどが挙げられるが、これらに限定されない。用語「ウイルス」、「ウイルス粒子」及び「ビリオン」は、本明細書において交換可能に使用され得る。

【００３４】

一部の実施形態において、感染性粒子はＲＶ、例えば、ＲＶ株ＳＡ１１である。

【００３５】

限定されることを望むものではないが、本開示は、プロモーター、例えば、Ｔ７プロモーター（配列番号３０）に作動可能に連結しているＲＶタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態において、組成物を逆遺伝学的手法に用いて、組換えＲＶ、例えば、組換えＲＶ株ＲＩＸ４４１４を生成することができる。よって、一部の実施形態において、組換えＲＶは、本開示の組成物を含んでもよい。

【００３６】

一部の実施形態において、細胞は、ＢＨＫ－１細胞、ＭＡ１０４細胞及びベロ細胞から選択される。一部の実施形態において、細胞は、Ｔ７ポリメラーゼを発現するＢＨＫ－１細胞であり、ＢＨＫ－Ｔ７細胞としても公知である。

【００３７】

医薬組成物

本発明者たちは、対象への投与に好適であり得る組換えロタウイルス（ＲＶ）を作製するのに有用な組成物、方法及びシステムを本明細書に開示する。したがって、本開示の別の態様では、医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、医薬組成物は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、組換えＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞にトランスフェクトすることによって作製される感染性粒子を含む。

【００３８】

本明細書に開示されている組成物及び方法を医薬組成物として投与してよく、したがって、化合物を組み込んだ医薬組成物は、本明細書に開示されている組成物の実施形態であ

ると考慮される。そのような組成物は、薬学的に許容される任意の物理的形態を取ってよく、例証的には、これらは経口投与用医薬組成物であり得る。そのような医薬組成物は、本開示の組成物の有効量を含有し、有効量とは、投与される組成物の１日用量に関する。各投与量単位は、所定の組成物の１日用量を含有してよい、又は各投与量単位は、１日用量の分数、例えば、用量の二分の一又は三分の一を含有してよい。各投与量単位に含有される各組成物の量は、療法に選択される特定の組成物の素性及び他の要因、例えば、これが与えられる適応症に部分的に依存し得る。本明細書に開示されている医薬組成物は、周知の手順を用いて患者に投与した後、活性成分の急速な、持続性の又は遅延性の放出を提供するように処方され得る。

【００３９】

医薬組成物は、免疫応答を誘発する又は病原体、例えば、ＲＶ、ＮｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対して予防接種する方法に利用され得る。本明細書に開示されるとき、用語「処置」又は「処置すること」は、言及された疾患又は障害について、症状を軽減すること、もたらされた症状の原因を一時的若しくは永続的に排除すること、及び／又はもたらされた症状の出現を予防若しくは緩徐すること、若しくは進行若しくは重症度を逆転することを、それぞれ意味する。このように、本明細書に開示されている方法は、治療的及び予防的投与の両方を包含する。例として、対象には、病原体、例えば、ＲＶ、ＮｏＶに感染するリスクがあり得、本開示の医薬組成物の投与は、病原体に対して保護的免疫応答を誘発する又は予防接種する。

【００４０】

本明細書に使用されるとき、用語「有効量」とは、対象への単回又は多回用量の投与の際に、診断又は処置を受けている対象に所望の効果を提供する組成物の量又は用量を指す。開示されている方法は、病原体、例えば、ＲＶ、ＮｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対して免疫応答を誘発する、又は病原体に対して予防接種するための有効量の本開示の組成物（例えば、医薬組成物中に存在する）を投与することを含んでよい。

【００４１】

有効量は、公知の技術の使用によって及び類似の状況下で得られた結果を観察することによって、当業者として担当診断医が容易に決定することができる。投与される組成物の有効量又は用量の決定には、多数の要因が担当診断医により考慮され、例えば、対象の種；大きさ、年齢及び一般的な健康；関与する疾患若しくは障害の関与程度又は重症度；個別の対象の応答；投与される特定の組成物；投与様式；投与される調合剤の生物学的利用性（ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ）；選択される用量レジメン：併用投薬の使用；並びに他の関連する状況であり得る。

【００４２】

経口投与は、本明細書に開示されている組成物及び方法の例証的投与経路である。他の例証的投与経路には、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍｍａｌ）、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、静脈内、筋肉内、鼻腔内、頬側、鞘内、脳内又は直腸内経路が挙げられる。投与経路は、どのようにも変わってよく、用いられる化合物の物理的特性、並びに対象及び介護者の利便性によって制限され得る。

【００４３】

当業者が理解するように、好適な製剤には、２つ以上の投与経路に好適なものが挙げられる。例えば、製剤は、鞘内及び脳内投与の両方に好適なものであり得る。あるいは、好適な製剤には、１つの投与経路のみに好適であるもの、並びに１つ以上の投与経路に好適であるが、１つ以上の他の投与経路に好適ではないものが挙げられる。例えば、製剤は、経口、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍｍａｌ）、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、静脈内、筋肉内、鼻腔内、頬側及び／又は鞘内投与に好適であるが、脳内経路には好適ではないものであり得る。

【００４４】

医薬組成物の内部成分及び処方の方法は慣用的なものである。薬学に使用される通常の処方の方法が、本明細書に使用され得る。全ての通常のタイプの組成物を使用してよく、

錠剤、咀嚼錠、カプセル剤、液剤、非経口用液剤、鼻腔内噴霧剤又は散剤、トローチ剤、坐剤、経皮パッチ剤及び懸濁剤が挙げられる。一般に組成物は、所望の用量及び使用される組成物のタイプに応じて、合計で約０．５％～約５０％の化合物を含有する。しかし、化合物の量は、「有効量」として、すなわち、所望の用量を、そのような処置を必要とする患者に提供する化合物の量として最適に定義される。本明細書に開示されている組成物及び方法に用いられる化合物の活性は、組成物の性質に大きく依存しているとは考えられず、したがって、組成物は、主に又は単に利便性及び経済性のために選択及び処方され得る。

【００４５】

カプセル剤は、化合物を好適な希釈剤と混合し、適切な量の混合物をカプセルに充填することにって調製される。通常の希釈剤には、不活性な粉末物質（例えば、デンプン）、粉末セルロース（とりわけ、結晶性セルロース及び微晶性セルロース）、糖（例えば、フルクトース、マンニトール及びスクロース）、穀物粉及び同様の食用粉末が挙げられる。

【００４６】

錠剤は、直接圧縮、湿式造粒又は乾式造粒により調製される。これらの製剤は、希釈剤、結合剤、滑沢剤及び崩壊剤を通常（化合物の他に）組み込む。典型的な希釈剤には、例えば、様々なタイプのデンプン、ラクトース、マンニトール、カオリン、リン酸又は硫酸カルシウム、無機塩（例えば、塩化ナトリウム）及び粉糖が挙げられる。粉末セルロース誘導体も使用され得る。典型的な錠剤結合剤には、デンプン、ゼラチンなどの物質、及び糖（例えば、ラクトース、フルクトース、グルコースなど）が挙げられる。天然及び合成ゴムを使用することもでき、アカシア、アルギン酸塩、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。ポリエチレングリコール、エチルセルロース及びワックスも結合剤として機能することができる。

【００４７】

錠剤には、例えば、風味増強剤及び封止剤として糖がコーティングされ得る。化合物は、また、大量の美味物質、例えばマンニトールを製剤に使用することによって咀嚼錠として処方されてもよい。即時溶解錠剤様製剤を、例えば、患者が剤形を消費するのを確実にするために及び一部の患者が固形物の嚥下の際に経験する困難さを回避するために用いることもできる。

【００４８】

滑沢剤を錠剤処方に使用して、錠剤及びパンチがダイに固着するのを防止することができる。滑沢剤は、タルクなどの滑りやすい固体、ステアリン酸マグネシウム及びカルシウム、ステアリン酸、並びに水素化植物油から選択され得る。

【００４９】

錠剤は崩壊剤を含有することもできる。崩壊剤は、湿潤すると膨張して錠剤を分解し、化合物を放出する物質である。これらには、デンプン、粘土、セルロース、アルギン及びガムが挙げられる。さらなる例証として、トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、木材セルロース、粉末天然海綿、カチオン交換性樹脂、アルギン酸、グアーガム、柑橘パルプ、ラウリル硫酸ナトリウム、並びにカルボキシメチルセルロースを使用することができる。

【００５０】

組成物は、例えば、活性成分を胃の強い酸分から保護するため、腸溶性製剤として処方され得る。そのような製剤は、酸性雰囲気で不溶性であり、塩基性環境で可溶性であるフィルム又はポリマーにより、固体剤形をコーティングすることによって作り出すことができる。例証的なフィルムには、セルロースアセテートフタレート、ポリビニルアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート及びヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネートが挙げられる。

【００５１】

経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）パッチ剤を化合物の送達に使用することもできる。経皮パッチ剤は、化合物が溶解又は部分的に溶解される樹脂性組成物、及び組成物を保護し

、樹脂性組成物と皮膚との接触を保持するフィルムを含むことができる。薬剤が浸透圧作用により押し出される複数の孔があけられている膜を有するものなど、他のより複雑なパッチ組成物を使用することもできる。

【００５２】

また当業者が理解するように、製剤は、製剤をヒトへの投与に好適にするような特性（例えば、純度）を有する材料（例えば、活性賦形剤、担体（例えば、シクロデキストリン）、希釈剤など）により調製され得る。あるいは、製剤は、製剤を非ヒト対象への投与に好適であるが、ヒトへの投与に好適ではないようにする純度及び／又は他の特性を有する材料によって調製され得る。

【００５３】

組換えロタウイルス（ＲＶ）を生成する方法

本発明者たちは、追加の異種タンパク質、例えばＮｏＶタンパク質に融合したＮＳＰ３をコードするポリヌクレオチドを導入することにより、ＳＡ１１背景で逆遺伝学的システムを使用して組換えＲＶを生成した。したがって、本開示の別の態様では、ＲＶをインビトロで生成する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを細胞に導入すること、細胞がポリヌクレオチドを発現することを可能にすること、細胞を十分な時間にわたってインキュベートして、ＲＶを産生させること、及び細胞により産生されたウイルスを採取して、ＲＶをインビトロで生成することを含む。コンピテントＲＶの生成に成功するためには、１１個のＲＶゲノムセグメントのそれぞれが細胞において発現しなければならない。したがって、一部の実施形態において、本方法は、可能にするステップの前に、１つ以上の追加のポリヌクレオチドを細胞に導入することをさらに含み、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ３、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含み、ＲＶタンパク質をコードするそれぞれの配列は、プロモーターに作動可能に連結している。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５から選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ＶＰ４、ＶＰ６、ＶＰ７、ＮＳＰ１、ＮＳＰ２、ＮＳＰ４及びＮＳＰ５からそれぞれ選択される、ＲＶタンパク質をコードする配列を含む１０個の別個のポリヌクレオチドである。よって、一部の実施形態において、本方法は、一部の実施形態において、別個のポリヌクレオチドでそれぞれコードされている１１個のロタウイルスタンパク質のそれぞれをコードする配列を含むポリヌクレオチドを導入することを含む。一部の実施形態において、１つ以上の追加のポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結しているキャッピング酵素をコードする配列を含む。一部の実施形態において、キャッピング酵素は、アフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素（配列番号２７でコードされている）である。

【００５４】

細胞

本発明者たちは、開示されているポリヌクレオチドを含み、開示されている方法及びシステムに使用することもできる細胞を本明細書に開示する。したがって、本開示の別の態様では、細胞が提供される。一部の実施形態において、細胞は、組換えＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、細胞は、ＭＡ１０４細胞、ベロ細胞及びＢＨＫ－１細胞から選択される。

【００５５】

ＲＶワクチン株は、伝統的にはベロ細胞を使用して生育される。このＲＶを産生する方法は、対象に投与するためのＲＶの生成に好適であることが見出されている。したがって、一部の実施形態において、細胞はベロ細胞である。

【００５６】

一部の実施形態において、本明細書に開示されている細胞は、異種ＲＮＡポリメラーゼをさらに含み、異種ＲＮＡポリメラーゼは、開示されている組成物中でプロモーターと結合し、ポリヌクレオチドが細胞内に導入されたときに、ポリヌクレオチドに基づいて配列依存性ＲＮＡ重合を触媒する。本明細書に使用されるとき、「異種ＲＮＡポリメラーゼ」とは、分子生物学的技術を介して、例えば、形質導入、トランスフェクション、リポフェクションなどを介して細胞に導入されるＲＮＡポリメラーゼを指す。一部の実施形態において、異種ＲＮＡポリメラーゼは、Ｔ７バクテリオファージ ＲＮＡポリメラーゼ又はＴ３バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼを含み、これらはそれぞれ単にＴ７ポリメラーゼ及びＴ３ポリメラーゼとしてより一般的に公知である。

【００５７】

したがって、一部の実施形態において、細胞は、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ又はＴ３　ＲＮＡポリメラーゼをさらに含む。一部の実施形態において、そのような細胞は、例えばＢＨＫ－Ｔ７細胞と称され、それは、これらがＢＨＫ－１細胞に由来するが、異種ＲＮＡポリメラーゼＴ７バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼを発現するからである。よって、本明細書に使用されるとき、「ＢＨＫ－Ｔ７細胞」とは、異種ＲＮＡポリメラーゼＴ７バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼを発現するＢＨＫ－１細胞である。

【００５８】

免疫応答を誘発する方法

本開示は、対象に投与されたときに、抗原が由来する病原体による自然感染に対して保護的であり得る異種抗原を含み得る感染性粒子を含む、医薬組成物を提供する。したがって、本開示の別の態様では、１つ以上の病原体に対して免疫応答を誘発する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含む医薬組成物を対象に投与して、１つ以上の病原体に対して免疫応答を誘発することを含む。

【００５９】

一部の実施形態において、本方法は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクトすることによって作製される感染性粒子を含む、医薬組成物を対象に投与して、１つ以上の病原体に対して免疫応答を誘発することを含む。

【００６０】

本明細書に使用されるとき、「免疫応答を誘発する」とは、投与に応答した自然若しくは適応免疫細胞の活性レベル又は数の増加である、炎症反応の生成を指す。免疫応答の誘発は、また、対象における投与された抗原に対するホルモン免疫の増加として測定することもできる。自然／適応細胞の活性化及び数の増加、及び／又は抗原に対するホルモン免疫の増加の両方を測定する好適なアッセイは、当該技術に公知である。例えば、細胞免疫は、例えば、フローサイトメトリーにより対象における活性化Ｔ細胞の増加数によって測定され得る。ホルモン免疫応答の誘発は、対象に投与される抗原に結合する抗体によって測定してよく、多数の方法が当該技術において公知である。

【００６１】

対象に予防接種する方法

本開示の別の態様では、１つ以上の病原体に対して対象に予防接種する方法が提供される。一部の実施形態において、本方法は、ロタウイルス（ＲＶ）ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む感染性粒子を含む、医薬組成物を投与することを含む。一部の実施形態において、本方法は、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、細胞にトランスフェクトすることによって作製される感染性粒子を含む、医薬組成物を投与することを含む。

【００６２】

本明細書に使用されるとき、「予防接種する」又は「予防接種」とは、病原体に由来する抗原を対象に投与して、対象中で抗原に対する免疫応答を刺激し、それによって、対象

が病原体に感染するような、病原体に対するある程度のレベルの免疫を提供することを含む。よって、予防接種は、予防接種を受けた対象において病原体による感染の徴候若しくは症状を低減し得る、又は中和免疫を提供し、対象における病原体の感染を予防し得る。

【００６３】

組換えロタウイルス（ＲＶ）を生成するためのシステム、プラットフォーム及びキット

本開示の別の態様では、組換えＲＶを生成するためのシステム、プラットフォーム及びキットが提供される。一部の実施形態において、システム、プラットフォーム又はキットは、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、並びにポリヌクレオチドを発現することができる細胞を含む。

【００６４】

一部の実施形態において、本開示のキットは、ＲＶ　ＮＳＰ３タンパク質をコードする配列及び異種ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、並びにポリヌクレオチドを発現することができる細胞を含む。本発明者たちは、本開示のキットが、一部の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドを細胞に導入するために必要な追加の試薬、例えば、トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、形質導入などのための試薬を含有してよいことを想定する。したがって、一部の実施形態において、本開示のキットは、例えば、本開示の方法に従って組換えロタウイルスをインビトロで生成するための試薬を含む。

【００６５】

例証的な実施形態

１．ＲＶ及び１．３ｋｂｐまでの外来性配列の挿入を含む組換えＲＶであって、１．３ｂｐの挿入を担持するＲＶが遺伝子的に安定している、組換えＲＶ。

【００６６】

２．ＲＶがＲＩＸ４４１４である、実施形態１に記載の組換えＲＶ。

【００６７】

３．挿入が、ＮｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、アストロウイルス、エンテロウイルス及びＥ型肝炎からなる群から選択される非ＲＶウイルスの少なくとも１つの抗原をコードする、実施形態１又は２に記載の組換えＲＶ。

【００６８】

４．挿入が少なくとも１つの担体部分をさらにコードする、実施形態１～３のいずれかに記載の組換えＲＶ。

【００６９】

５．少なくとも１つの担体部分が、分泌ペプチド（例えば、インターロイキン２分泌タンパク質、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１分泌タンパク質）、又は細胞表面受容体のリガンド、免疫グロブリンＩｇＧ、胎児受容体ＦｃＲｎ）である、実施形態４に記載の組換えＲＶ。

【００７０】

６．挿入がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質をコードする、実施形態１～５のいずれかに記載の組換えＲＶ。

【００７１】

７．挿入がＮｏＶカプシドタンパク質をコードする、実施形態１～６のいずれかに記載の組換えＲＶ。

【００７２】

８．実施形態１～７のいずれか一項に記載の組換えＲＶを含む、ワクチン。

【００７３】

９．ワクチンが小児に使用するためのものである、実施形態８に記載のワクチン。

【００７４】

１０．ワクチンが、組換えＲＶを安定化する少なくとも１つの化合物をさらに含む、実施形態８～９のいずれかに記載のワクチン。

【００７５】

１１．ＲＶ及びグリコシル化外因性カプシドタンパク質をコードする配列を含み、配列がセグメント７　ＲＮＡに挿入されている、組換えＲＶ。
【００７６】
１２．ＲＶがｒＳＡ１１である、実施形態１１に記載の組換えＲＶ。
【００７７】
１３．外因性コード化グリコシル化タンパク質がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１である、実施形態１１～１２に記載の組換えＲＶ。
【００７８】
１４．外因性コード化タンパク質配列がＣ末端１ｘ－ＦＬＡＧタグを含んだ、実施形態１１～１３に記載の組換えＲＶ。
【００７９】
１５．以下のうちの少なくとも１つ：薬学的に許容される賦形剤、安定剤及び又は担体をさらに含む、実施形態１１～１４に記載の組換えＲＶ。
【００８０】
１６．アジュバントをさらに含む、実施形態１５に記載の組換えＲＶを含む組成物。
【００８１】
１７．アジュバントが、ＣｐＧなどの免疫刺激性オリゴヌクレオチド、ポリアクリル酸ポリマー、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、ステロール、サポニン、モノホスホリル脂質Ａ若しくはその類似体、第四級アミン、水酸化アルミニウムゲルなどの水酸化アルミニウム組成物、又はこれらの組合せである、実施形態１６に記載の組成物。
【００８２】
１８．組成物が、組換えＲＶを安定化する少なくとも１つの化合物を含む、実施形態１５～１７のいずれか一項に記載の組成物。
【００８３】
１９．実施形態１５～１９に記載のいずれかの組成物を投与することを含む、対象を処置するための方法。
【００８４】
２０．対象に実施形態１５～１８のいずれか一項に記載の組成物が少なくとも４週間の間隔を置いて少なくとも２回投与される、実施形態１９に記載の方法。
【００８５】
２１．実施形態１～１４のいずれか一項に記載の組換えＲＶを含む、細胞。
【００８６】
２２．宿主細胞が、組換えＲＶでコードされたグリコシル化タンパク質を発現する、実施形態２１に記載の細胞。
【実施例】
【００８７】
実施例１－ノロウイルスタンパク質を発現する組換えロタウイルス
材料及び方法
細胞培養
サル胚腎臓（ＭＡ１０４）細胞を、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）及び１％ペニシリン－ストレプトマイシンを含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）で成長させた（４１）。Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを構成的に発現するベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ－Ｔ７）は、Ｄｒ．Ｕｌｌａ　Ｂｕｃｈｈｏｌｚ、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｏｆ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ、ＮＩＡＩＤ、ＮＩＨから提供され、５％熱不活性化ＦＢＳ、１０％トリプトン－ペプチドブロス、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、２％非必須アミノ酸及び１％グルタミンを含有するグラスゴー最小必須培地（ＧＭＥＭ）に繁殖させた（４２）。ＢＨＫ－Ｔ７細胞は、２％Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を一継代おきに補充した培地に成長させた。
【００８８】
プラスミドの構築

組換えｒＳＡ１１は、プラスミドのｐＴ７／ＶＰ１ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ２ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ３ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ４ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ６ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ７ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ１ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ２ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ４ＳＡ１１及びｐＴ７／ＮＳＰ５ＳＡ１１［ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／Ｔａｋｅｓｈｉ＿Ｋｏｂａｙａｓｈｉ／］（３６）、並びにｐＣＭＶ／ＮＰ８６８Ｒ（３３）を使用して調製した。プラスミドのｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧは、Ｐ２Ａ－３ｘＦＬ－ＵｎａＧのＯＲＦを含有するＤＮＡ断片を、Ｔａｋａｒａ　Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎクローニングキットを使用して、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１のＮＳＰ３　ＯＲＦの３’末端に融合することによって産生した（３２）。ＮｏＶ　ＧＩＩ．４　ＭＤ１４５－１２株（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ０３２６０５．１）のＶＰ１ゲノムセグメントの完全長ｃＤＮＡを含有するプラスミド（ｐＵＣ５７／ＭＤＡ１４５＿ＶＰ１）は、Ｇｅｎｅｗｉｚから購入した。プラスミドのｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＰ２、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＰ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＶＰ１は、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧのＵｎａＧ　ＯＲＦを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎクローニングにより、ＮｏＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質のＰ２、Ｐ及びＶＰ１領域のＯＲＦにそれぞれ置き換えることによって作製した。プラスミドの主鎖は、プライマーペア：Ｖｅｃｔｏｒ＿Ｆｏｒ及びＶｅｃｔｏｒ＿Ｒｅｖを用いて、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧのＰＣＲ増幅によって生成した（表１）。Ｐ２、Ｐ及びＶＰ１コード配列を含有するＤＮＡ断片は、プライマーペアのｆＰ２＿Ｆｏｒ及びｆＰ２＿Ｒｅｖ、ｆＰ＿Ｆｏｒ及びｆＰ＿Ｒｅｖ、ｆＶＰ１＿Ｆｏｒ及びｆＶＰ１＿Ｒｅｖをそれぞれ使用して、ｐＵＣ５７／ＭＤＡ１４５＿ＶＰ１から増幅した（表１）。プラズマのｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＶＰ１ｆ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－Ｐ－Ｈｉｓ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＶＰ１－Ｈｉｓ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＶＰ１－Ｔｈ－Ｈｉｓを同様に作製した。プラスミドの主鎖は、プライマーペア：Ｖｅｃｔｏｒ　Ｐ２Ａ＿Ｆｏｒ及びＶｅｃｔｏｒ　Ｐ２Ａ＿Ｒｅｖを用いて、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧを増幅することによって生成した（表１）。Ｃ末端ＦＬＡＧを有するＶＰ１、又はＰ、又はＣ末端Ｈｉｓタグを有するＶＰ１を含有するＤＮＡ断片は、プライマーペアのＶＰ１－ｆＦｏｒ及びＶＰ１－ｆＲｅｖ、Ｐ－Ｈｉｓ＿Ｆｏｒ及びＰ－Ｈｉｓ＿Ｒｅｖ、ＶＰ１－ＴｈＨｉｓ＿Ｆｏｒ及びＶＰ１－ＴｈＨｉｓ＿Ｒｅｖ、ＶＰ１－Ｈｉｓ＿Ｆｏｒ及びＶＰ１－Ｈｉｓ＿Ｒｅｖをそれぞれ用いて、ｐＵＣ５７／ＭＤＡ１４５＿ＶＰ１のＰＣＲ増幅によって生成した（表１）。Ｔ７転写プロモーターの制御下でＲＩＸ／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－Ｐ－Ｈｉｓ挿入を含有するｐｕｃ１９プラスミド（ｐｕｃ１９／Ｔ７／ＲＩＸ／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－Ｐ－Ｈｉｓ）は、Ｂｉｏ　Ｂａｓｉｃ　Ｃａｎａｄａ　Ｉｎｃ．から購入した。トランスフェクション品質プラスミドは、商業的に調製された（ｗｗｗ．ｐｌａｓｍｉｄ．ｃｏｍ）又はＱｉａｇｅｎプラスミド精製キットを使用して調製された。プライマーは、ＥｕｒｏＦｉｎｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃにより提供及び配列決定された。

【００８９】

組換えウイルス

組換えＲＶを生成するために使用された逆遺伝学的プロトコールは、上記に詳細に記載された。簡潔には、１２ウエルプレートのＢＨＫ－Ｔ７細胞単層を、Ｍｉｒｕｓ　ＴｒａｎｓＩＴ－ＬＴ１トランスフェクション試薬を使用してＳＡ１１　ｐＴ７プラスミド及びｐＣＭＶ－ＮＰ８６８Ｒでトランスフェクトした。トランスフェクション混合物は、３倍高いレベルで使用されたｐＴ７／ＮＳＰ２ＳＡ１１及びｐＴ７／ＮＳＰ５ＳＡ１１を除いて、１１ｐＴ７プラスミドのそれぞれの０．８ｕｇを含有する。トランスフェクションした２日後、ＢＨＫ－Ｔ７細胞にＭＡ１０４細胞を追い播きし、培地のトリプシンを最終濃度の０．５ｕｇ／ｍｌに調整した。３日後、ＢＨＫ－Ｔ７／ＭＡ１０４細胞混合物を３回凍結解凍し、溶解産物を低速遠心分離（８００×ｇ、５分間）で清澄にした。清澄溶解産物中の組換えウイルスを、ＭＡ１０４単層で１回の継代によって増幅し、プラーク精製により回収した。ウイルスｄｓＲＮＡを、ＴＲＩｚｏｌ抽出により感染細胞溶解産物から回収し、Ｔｒｉｓグリシン緩衝液中１０％ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分割し

、臭化エチジウムにより染色して検出し、ＢｉｏＲａｄ　ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して可視化した。

【００９０】

プラークアッセイ

ＲＶプラークアッセイを先に記載されたように実施した。プラークを可視化するため、アガロースオーバーレイを有する細胞単層を、３．７％ホルムアルデヒドを含有するリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）と共に一晩インキュベートした。その後、アガロースオーバーレイを取り除き、単層を、５％エタノールに溶解した１％結晶バイオレットの溶液で３時間染色した。次いで、単層を水ですすぎ、空気乾燥した。プラーク画像を、Ｂｉｏ－ＲａｄＣｈｅｍｉＤｏｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して捕捉し、直径を、ＩｍａｇｅＪソフトウエアを使用して測定し、結果をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン８により解析した。プラークサイズの差の統計的有意性を、独立スチューデントｔ検定を使用して決定し、９５％信頼区間を含めた。

【００９１】

免疫ブロット解析

ＭＡ１０４細胞を、モック感染させ又は組換えＲＶの１細胞あたり５プラーク形成単位（ＰＦＵ）で感染させ、９ｈ．ｐ．ｉで採取した。細胞を冷ＰＢＳで洗浄し、遠心分離（５０００×ｇ、１０分間）でペレット化し、未変性溶解緩衝液（３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００及び１×ＥＤＴＡフリープロテアーゼ阻害剤カクテル［Ｒｏｃｈｅ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ］）中において氷上で３０分間インキュベートすることより溶解した。免疫ブロットアッセイでは、溶解産物を１０％ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移した。５％脱脂粉乳を含有するＰＢＳでブロックした後、ブロットを、マウスモノクローナルＦＬＡＧ　Ｍ２（Ｆ１８０４、Ｓｉｇｍａ、１：２０００）、マウスモノクローナル抗６ｘＨｉｓ抗体（ＭＣＡ１３９６ＧＡ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、１：１０００）、マウス２Ａ抗体（ＮＢＰ２－５９６２７、Ｎｏｖｕｓ、１：１０００）、モルモットポリクローナルＮＳＰ３（Ｌｏｔ　５５０６８、１：２０００）、ＶＰ６（Ｌｏｔ　５３９６３、１：２０００）抗血清又はウサギモノクローナルＢ－アクチン（８４５７Ｓ、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＣＳＴ）、１：１０００）抗体でプローブした。一次抗体を、２．５％脱脂粉乳中のホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合二次抗体（ヤギ抗マウスＩｇＧ（ＣＳＴ）、ヤギ抗モルモットＩｇＧ（ＫＰＬ）若しくはヤギ抗ウサギＩｇＧ（ＣＳＴ）又はＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ結合抗体（ヤギ抗マウスＡｌｅｘａ６４７抗体（ＣＳＴ）の１：１０，０００希釈を使用して検出した。ＨＲＰシグナルは、Ｃｌａｒｉｔｙ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　ＥＣＬ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して発生させ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣｈｅｍｉＤｏｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して検出し、　一方でＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒシグナルは、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣｈｅｍｉＤｏｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して直接可視化した。

【００９２】

ｒＳＡ１１ウイルスにより発現されたＮｏＶタンパク質の二量体化能力を評価するため、細胞溶解産物を、最終濃度の１．５％ドデシル硫酸ナトリウム及び３％β－メルカプトエタノールに調整し、２５℃又は９５℃で１０分間インキュベートした。その後、試料中のタンパク質を１０％ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分離させ、免疫ブロットアッセイにより検出した。

【００９３】

免疫沈降アッセイ

全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、上記に記載されたように、モック感染させた又はｒＳＡ１１ウイルスを感染させた９時間ｐ．ｉ．にＭＡ１単層から調製した。ウサギ抗ＮｏＶＧＩＩ．４モノクローナル抗体［ＮＶＢ４３．９］（Ａｂ００２６９－２３．０、Ａｂｓｏｌｕｔｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ、最終希釈の１：１５０）又はＮＳＰ２マウスポリクローナル抗体（Ｌｏｔ　１７１、最終希釈の１：２００）を、細胞溶解産物に添加した。穏や

かに揺動しながら４℃で１８時間インキュベートした後、抗原－抗体複合体を、Ｐｉｅｒｃｅ磁気ＩｇＡ／ＩｇＧビーズ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して回収し、ゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜にブロットした。ブロットを、抗ＦＬＡＧ抗体（１：２０００）又は抗６ｘＨｉｓ抗体（１：１０００）によりプローブして、ＦＬＡＧタグ付き又はＨｉｓタグ付きＶＰ１タンパク質を検出し、ＮＳＰ２抗体（Ｌｏｔ＃５１６、１：２０００）によりプローブしてＮＳＰ２タンパク質を検出した。

【００９４】

ｒＳＡ１１ウイルスの遺伝子安定性

ウイルスを、無血清ＤＭＥＭ培地で調製された感染細胞溶解産物の１：１０００、１：１００又は１：１０希釈を使用してＭＡ１０４細胞単層において５回連続継代した。細胞を、細胞変性効果が完了に達した（４～５日間）ときに、培地中で３回凍結解凍し、溶解産物を、低速遠心分離により清澄にした。二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を、ＴＲＩｚｏｌ抽出により清澄溶解産物から回収した。精製ｄｓＲＮＡを１０％ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分離させ、ｄｓＲＮＡのバンドを臭化エチジウム染色により検出した。

【００９５】

不安定なバリアントの単離及びシーケンシング

個別のｒＳＡ１１バリアントを、プラーク単離により連続継代ウイルスのプールから回収した（４１）。バリアントをＭＡ１０４細胞における１回の継代で増幅し、これらのゲノムｄｓＲＮＡをＴｒｉｚｏｌ抽出により回収した。試料中の完全長ゲノムセグメント７ＲＮＡを、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを用いるＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ　ＲＴ－ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を同様に使用して、セグメント特異的プライマーペアのＮＳＰ３＿５’ＵＴＲ　５’ＧＧＣＡＴＴＴＡＡＴＧＣＴＴＴＴＣＡＧＴＧ３’（配列番号１）及びＮＳＰ３＿３’ＵＴＲ　５’ＧＧＣＣＡＣＡＴＡＡＣＧＣＣＣＣＴＡＴＡＧ３’（配列番号２）により増幅し、ＮＳＰ３　ＯＲＦのＣ末端から３’ＵＴＲ領域までの短い断片を、プライマーペアのＮＳＰ３　Ｃ末端Ｆ　５’ＣＡＴＴＧＣＡＣＧＣＴＴＴＴＧＡＴＧＡＣＴＴＡＧ３’（配列番号３）及びＮＳＰ３＿３’ＵＴＲ　５’ＧＧＣＣＡＣＡＴＡＡＣＧＣＣＣＣＴＡＴＡＧ３’（配列番号４）により増幅した。増幅されたＰＣＲ産物をＴｒｉｓ酢酸ＥＤＴＡ緩衝液中０．８％アガロースゲルの電気泳動により分離させ、産物をＮｕｃｌｅｏｓｐｉｎゲル及びＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐ（Ｔａｋａｒａ）を使用してゲル精製し、配列をＥｕｒｏＦｉｎｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃにより決定した。

【００９６】

ＣｓＣｌ（塩化セシウム）勾配遠心分離

二重層粒子（ＤＬＰ）の密度を上記のように決定した。簡潔には、１０ｃｍ細胞培養プレート中のＭＡ１０４細胞を１細胞あたり５ＰＦＵのｒＳＡ１１ウイルスに感染させ１２ｈ．ｐ．ｉ．で採取した。細胞を１ｍｌのＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水）に掻き落とし、溶液を最終濃度の０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００に調整することによって溶解させ、氷上で５分間インキュベートした。低速遠心分離して細胞片を除去した後、溶解産物を、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）に調整し、間欠的に混合しながら３７℃で１時間インキュベートして、ＲＶウイルスをＤＬＰに変換した。ＣｓＣｌを試料に添加して、１．３６７ｇ／ｃｍ$^3$の密度にし、試料をＢｅｃｋｍａｎｎ　ＳＷ５５Ｔｉローターにおいて１１０，０００×ｇにより８℃で２２時間遠心分離した。ウイルスバンドを、倒立光源を使用して勾配で検出した。ウイルスバンドを含有する分画をマイクロピペットで回収し、これらのＣｓＣｌ密度を、屈折計を使用して決定した。

【００９７】

ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号

ｒＳＡ１１ウイルスのセグメント７配列は、ＧｅｎＢａｎｋに委託されている：ｗｔ．（ＬＣ１７８５７２）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶｆＰ２（ＭＮ１９０００２）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶｆＰ（ＭＮ１９０００３）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶｆＶＰ１（ＭＮ１９０００４）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶ　ＶＰ１ｆ（ＭＮ２０１５４８）、ＮＳＰ

３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶ　Ｐ－Ｈｉｓ（ＭＮ２０１５４９）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶ　ＶＰ１－ＴｈＨｉｓ（ＭＮ２０１５４７）、ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶ　ＶＰ１－Ｈｉｓ（ＭＺ５６２３０５）、ＲＩＸ／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ＮｏＶ　Ｐ－Ｈｉｓ（ＭＺ６４３９７８）。表２も参照すること。

【００９８】

結果

ＮｏＶカプシドタンパク質を発現する修飾ゲノムセグメント７

ＮｏＶカプシドタンパク質の領域の発現ベクターとしてＲＶを生成するため（図１）、ｗｔ．ＮＳＰ３　ＯＲＦを、ＧＡＧ可動性リンカーに融合したＮＳＰ３　ＯＲＦをブタテッショウウイルス２Ａエレメント（Ｐ２Ａ）及びＮｏＶカプシドタンパク質のコード配列と共に含むカセットに置き換えることによって、ｐＴ７／ＳＡ１１ベクターのゲノムセグメント７を修飾した（図２）。修飾ＯＲＦは、また、ＮｏＶタンパク質のＮ末端に３ｘＦＬＡＧタグ（ｆ）又はＣ末端に１ｘＦＬＡＧタグ（ｆ）のいずれかを含有した（図２）。蛍光タンパク質及びＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現するｒＳＡ１１株の生成に使用される同じ部位において、ＮｏＶ配列をｐＴ７／ＮＳＰ３プラスミドに挿入した。同様に、ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶ配列を、Ｔｈ切断部位の挿入を伴って又は伴うことなく６ｘＨｉｓタグ付きＮｏＶ配列に置き換えることによって、６ｘＨｉｓタグ付きＮｏＶタンパク質を発現するｐＴ７　ＳＡ１１　ＮＳＰ３ベクターを生成した（図２）。この手法は、ＮｏＶタンパク質のＦＬＡＧ又は６ｘＨｉｓタグ付きコード配列を含有したｐＴ７／ＳＡ１１ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶベクターのセットであるＰ２（ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２）、Ｐ（ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ又はｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ）、ＶＰ１（ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１、ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆ、ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１－ＴｈＨｉｓ及びｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓ）の発生をもたらした（図２）。次に、発現プラットフォームとしてヒト株ゲノムセグメント７を生成する可能性を試験するため、現行の新生児ＲＶワクチン株Ｒｏｔａｒｉｘのゲノムセグメント７（ＲＩＸ　ＮＳＰ３）を修飾して、２Ａペプチドの下流にＮｏＶ　ＰＨｉｓタンパク質を発現させ、ｐＵＣ　１９／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－Ｐ　Ｈｉｓを合成した。

【００９９】

ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶカプシドタンパク質を発現するｒＳＡ１１ウイルスの回収及び特徴付け

ＲＶゲノムセグメントの＋ｍＲＮＡをコードする１１個のｐＴ７プラスミドの完全セット及びアフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素（ＮＰ８６８８Ｒ）をコードするＣＭＶ発現ベクターをＢＨＫ－Ｔ７細胞にトランスフェクトすることによって、ＮｏＶカプシドタンパク質を発現する組換えＳＡ１１ウイルスを生成し、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１を、上記に記載されたようにｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶベクターに置き換えた。トランスフェクトされたＢＨＫ－Ｔ７細胞に、トランスフェクションの２日後にＭＡ１０４細胞を追い播きし、細胞混合物を３日後に凍結解凍し、組換えＲＶを、ＭＡ１０４細胞で成長させることによって回収した。ｒＳＡ１１単離物をプラーク精製し、特徴付ける前に大量に増幅した。ｒＳＡ１１ウイルスの特徴を表２に要約する。

【０１００】

ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶタンパク質を発現する修飾ｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶベクターにより生成されたｒＳＡ１１ウイルスは、ＲＮＡゲル電気泳動に基づいて、野生型ウイルス（ｒＳＡ１１／ｗｔ）より大きなセグメント７　ｄｓＲＮＡを含有した（図３Ａ）。配列解析は、ｒＳＡ１１ウイルスのセグメント７がｐＴ７　ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶベクターとマッチしたことを示した。ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶ　Ｐ２及びＰをゲノムセグメント７に導入することは、サイズを１．７ｋｂｐ及び２．１ｋｂｐにそれぞれ増加させ、サイズから予想されたように、ＲＮＡゲルにおいてＲＶゲノムセグメント４（２．４ｋｂｐ）及び５（１．６ｋｂｐ）の間で移動した（表２、図３Ａ）。同様に、１．７ｋｂｐのＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質配列を含有するウイルス単離物（ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１

及びＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆ）の再操作セグメント７は、２．９ｋｂｐの長さを有し、ＲＶゲノムセグメント１の近くの遅い移動位置をもたらした。よって、２Ａ－ｆＶＰ１及びＶＰ１－ｆ配列をセグメント７ゲノムに挿入することは、総ゲノムサイズを２０．３ｋｂｐに増加させ、これはｗｔウイルスのパッケージング能力を９．５％超えている。ｒＳＡ１１のセグメント７　ＲＮＡに以前に導入された最長外来性配列は、ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質を発現するｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ｆＳ１の３．３ｋｂｐのセグメント７　ｄｓＲＮＡであった。

【０１０１】

プラーク解析は、ｒＳＡ１１／ｗｔウイルスにより形成されたプラークがｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆウイルスにより形成されたプラークより大きかったことを示し（図３Ｂ、図３Ｃ）、以前の研究で報告されたデータと一致した。ウイルスピーク力価の定量化は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆウイルスがＭＡ１０４細胞に類似の力価で成長し、０．５×$10^7$～２．６×$10^7$の範囲であったことを実証した（図３Ｄ）。小さいプラーク表現型及び低い力価の正確な理由は不明であるが、ウイルス複製の際に修飾セグメント７ｄｓＲＮＡを転写するウイルスＲＮＡポリメラーゼがより長い伸長時間を必要とすることがおそらく原因であり得る、又は外来性タンパク質配列を含有するセグメント７　ｍＲＮＡを翻訳するためにより長い時間が必要となり得る。あるいは、外来性配列を含有する大きく修飾されたｄｓＲＮＡ及びウイルス粒子の集合体をパッケージングすることに関連した複雑さを反映し得る。

【０１０２】

ＮｏＶタンパク質産物の発現を決定するため、ＭＡ１０４細胞をｒＳＡ１１株に感染させ、全細胞溶解産物（ＷＣＬ）を、ＦＬＡＧ抗体を使用して免疫ブロットアッセイにより検査した（図３Ｅ）。ＦＬＡＧ抗体によりプローブされた免疫ブロットは、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆウイルスが、修飾ＮＳＰ３ＯＲＦの機能性２Ａエレメントの予測タンパク質サイズを有する主産物として、ＮｏＶタンパク質を生成したことを示した：－ｆＰ２（１８．６ｋＤａ）、－ｆＰ（３７．７ｋＤａ）、－ｆＶＰ１（６１．９ｋＤａ）及び－ＶＰ１ｆ（６０．１ｋＤａ）（表２及び図３Ｅ）。抗ＮＳＰ３抗体及び２Ａエレメント抗体によるアッセイは、Ｐ２Ａエレメントのレムナント残基（２ｋＤａ）に連結したＮＳＰ３（３６ｋＤａ）に相当する、３８ｋＤａタンパク質を確認した。しかし、抗ＦＬＡＧ抗体により実施された免疫ブロットアッセイは、ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶタンパク質化カセットのリードスルー産物；ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ及びＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１を表す、小量の大型融合タンパク質を検出した（図３Ｅ、赤色星印）。しかし、リードスルー産物は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆウイルスでは検出されず、２Ａペプチドへの下流ＯＲＦの直接融合が２Ａエレメントの有効な停止－開始活性をもたらすことを示唆した（図３Ｅ）。

【０１０３】

Ｃ末端６ｘＨｉｓタグを含有するＮｏＶカプシドタンパク質を発現するように修飾されたｒＳＡ１１ウイルスの回収及び特徴付け

６ｘＨｉｓタグ付けＮｏＶ　Ｐ及びＶＰ１配列を発現するウイルスのゲノムセグメント７修飾は、これらの長さを２．１ｋｂｐ及び２．８ｋｂｐに増加させた（図４Ａ）。上記に記述されたように、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ、－ＶＰ１　Ｈｉｓ及び－ＶＰ１　Ｔｈ　Ｈｉｓのプラークサイズは、ｒＳＡ１１／ｗｔウイルスより有意に小さかった（図４Ｂ、図４Ｃ）。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ、－ＶＰ１Ｈｉｓ、－ｆＶＰ１　Ｔｈ　Ｈｉｓウイルスのピークウイルス力価の解析は、これらがｒＳＡ１１／ｗｔより０．５～１ｌｏｇまで低い最大力価となったことを示した（図４Ｄ）。

【０１０４】

抗６ｘＨｉｓ抗体により実施された免疫ブロットアッセイは、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｐ　Ｈｉｓ、－ＶＰ１　Ｈｉｓ、－ｆＶＰ１　Ｔｈ　Ｈｉｓウイルスが、機能性２Ａエレメントに予測されるサイズを有するＰ産物（３５．８ｋＤａ）及びＶＰ１産物（６

０ｋＤａ）を生成したことを示した（図４Ｅ及び表２）。一方、抗６ｘＨｉｓ抗体によるプロービングは、これらのウイルスで大型融合リードスルー産物の存在を検出することができず、これは、おそらくＮｏＶ　ＯＲＦが２Ａエレメントの直後に挿入されたためである。ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶタンパク質産物を発現するウイルスについて上記に記載された結果を反映すると、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ、－ＶＰ１　Ｈｉｓ、－ｆＶＰ１　Ｔｈ　Ｈｉｓウイルスの抗ＮＳＰ３抗体及び２Ａエレメント抗体によるアッセイは、３８ｋＤサイズのＮＳＰ３－２Ａタンパク質を確認した（図４Ｅ）。

【０１０５】

ＮｏＶ　Ｐタンパク質を発現するＲｏｔａｒｉｘゲノムセグメント７を含有するｒＳＡ１１ウイルスの生成

ヒトワクチンベクタープラットフォームを作製する可能性を試験するため、ＮｏＶ　Ｐタンパク質を発現するように修飾されたヒトワクチン株Ｒｏｔａｒｉｘゲノムセグメント７（ＲＩＸ　４４１４）を含有する組換えＳＡ１１モノリアソータントウイルスを、上記の逆遺伝学的手法を使用して生成した。ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓを含有するｒＳＡ１１ウイルスを、ＭＡ１０４細胞（アフリカミドリザル腎臓細胞）で成長させることによって回収し、単離物をプラーク精製し、表２に要約されたように特徴付けた。

【０１０６】

ＲＮＡゲル電気泳動（図５Ａ）に基づいて１ｋｂの２Ａ　ＮｏＶ　ＰＨｉｓ配列の導入及び追加の配列導入が総ゲノムサイズを１９．６ｋｂｐに増加したので、ｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓは、ｒＳＡ１１／ｗｔ（１．１ｋｂｐ）より大きなセグメント７　ｄｓＲＮＡ（２．１ｋｂｐ）を含有した（表２）。プラーク解析は、ｒＳＡ１１／　ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓがｒＳＡ１１／ｗｔウイルスより小さなプラークを形成し（図５Ｂ）、ｒＳＡ１１／ｗｔより１ｌｏｇ低いピーク力価となった（図５Ｃ）ことを示した。

【０１０７】

修飾ＲＩＸ　ＮＳＰ３セグメントからのＮｏＶ　Ｐタンパク質の発現を決定するため、ＭＡ１０４細胞を、ｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓウイルスの３つの単離プラークに感染させ、全細胞溶解産物を、抗６ｘＨｉｓ抗体を使用して免疫ブロットアッセイにより検査した（図５Ｄ）。免疫ブロットの結果は、ｒＳＡ１１／ＲＩＸ　ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓウイルスが、主産物として３５．８ｋＤａのＮｏＶ　Ｐタンパク質及び副産物として７４．２ｋＤａリードスルー産物（赤色星印）を、修飾ＲＩＸ　ＮＳＰ３ＯＲＦから発現したことを示した（図５Ｄ及び表２）。抗（ＳＡ１１）ＮＳＰ３抗体によるアッセイは、ｒＳＡ１１／ｗｔのＳＡ１１　ＮＳＰ３タンパク質のみを確認し（図５Ｄ）、抗体は、ＲＩＸ　ＮＳＰ３　ＯＲＦのＮＳＰ３産物と反応しなかった（図５Ｄ）。ＲＩＸ　ＮＳＰ３タンパク質に対する特異的な抗体を有さなかったので、ＲＩＸ　ＮＳＰ３タンパク質の意図的な発現を試験するため、本発明者たちは同じブロットを２Ａ抗体で再プローブし、２ｋＤａの２Ａペプチドに融合した３８ｋＤａのＲＩＸ　ＮＳＰ３タンパク質の頑強な発現を確認した（図５Ｄ）。総体的に、これらの結果は、ＮｏＶなどの別の腸内ウイルスの免疫原性タンパク質を発現するように修飾されたＳＡ１１／ＲＩＸ　ＲＶリアソータント株を生成することが可能であることを示している。

【０１０８】

ｒＳＡ１１ウイルスから発現してダイマーを形成するＶＰ１タンパク質の自己集合

ｒＳＡ１１ウイルスから発現したＮｏＶタンパク質産物が感染細胞中にダイマーを形成することができるか否かを決定するため、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆ感染細胞の溶解産物を未変性試料緩衝液により２５℃で処理した。ＦＬＡＧ抗体による免疫ブロットアッセイは、ＮｏＶ　Ｐ２及びＰタンパク質がダイマーを形成せず、一方、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆ溶解産物のＮ末端及びＣ末端ＦＬＡＧタグ付きＶＰ１タンパク質（ｆＶＰ１及びＶＰ１ｆ）の両方がＶＰ１ダイマーとして移動したことを示し（図６Ａ、レーン１０及び１２）、Ｐドメインによるダイマー内相互作用により調節されたＶＰ１ダイマー形成が、発現されたＶＰ

１タンパク質内で維持されていることを示唆した。同じ電気泳動条件下で、ｒＳＡ１１／ｗｔ、並びにｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆウイルスのＮＳＰ３及びＶＰ６タンパク質の両方は、２５℃で安定したダイマー及びトリマーを形成し（図６Ａ）、以前の報告と一致した。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－ＶＰ１　Ｈｉｓ及び－ＶＰ１　Ｔｈ　Ｈｉｓ感染細胞の溶解産物が抗６ｘＨｉｓ抗体でプローブされたとき、ＶＰ１二量体化について同様の結果が、Ｈｉｓタグ付きＶＰ１タンパク質（ＶＰ１Ｈｉｓ及びＶＰ１Ｔｈ　Ｈｉｓ）で観察された（図６Ｂ）。上記に示された結果を反映すると、ＮＳＰ３及びＶＰ６タンパク質は、同じ電気泳動条件下で安定したダイマー及びトリマーを形成した（図６Ｂ）。

【０１０９】

ＮｏＶ　ＶＰ１カプシドタンパク質の天然構造への折りたたみ

ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ウイルスから発現したＶＰ１産物が天然構造に折りたたむか否かについての洞察を得るため、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１ｆ、－ＶＰ１Ｈｉｓウイルスに感染させたＭＡ１０４細胞から調製された溶解産物を、抗ＮｏＶ　ＶＰ１立体構造依存性中和モノクローナル抗体（ＮＶＢ４３．９、Ａｂｓｏｌｕｔｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ）を使用してプルダウンアッセイによりプローブした。図７Ａ（青色矢印）に示されているように、抗ＮｏＶ　ＧＩＩ．４　ＮＶＢ４３．９抗体はＦＬＡＧ及びＨｉｓタグ付きＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質（ｆＶＰ１及びＶＰ１Ｈｉｓ）の両方を免疫沈降させ、ｒＳＡ１１ウイルスから発現したＶＰ１タンパク質の少なくとも一部は、正確な立体構造に折りたたまれて、保護免疫応答を誘導することができる、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質に見出される確証的な中和エピトープを含むことを示した。抗ＮｏＶ　ＧＩＩ．４抗体によるｆＶＰ１及びＶＰ１Ｈｉｓのプルダウンの成功と異なり、この抗体が、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ｆのＶＰ１ｆ産物を同様に免疫沈殿するか否かは明らかではなかった。これらの結果は、ＶＰ１－ｆの１ｘＦＡＧの低いシグナル強度、又は近くで移動している６０ｋＤａのＶＰ１ｆを不明瞭にしている抗Ｎｏｖ　ＧＩＩ．４抗体のＩｇ／Ｈである重鎖に関係し得る（図７Ａ）。溶解産物を、ＮＳＰ２特異的モノクローナル抗体を使用して同様に解析した（図７Ｂ）。さらなる疑問は、免疫沈殿ＶＰ１タンパク質の低い収率が、抗ＮｏＶ　ＧＩＩ．４　ＮＶＢ４３．９抗体の低い親和性又は溶出条件のいずれかによるものであるか否かであった。この疑問に答えるために、ＷＣＬ及びフロースルーにおけるＶＰ１、ＮＳＰ３及びＶＰ６タンパク質の存在を、ＦＬＡＧ、ＮＳＰ３及びＶＰ６抗体でプローブすることによって解析した。結果は、ＶＰ１タンパク質の主分画がフロースルー中に残り、小量のＶＰ１タンパク質のみが免疫沈降したことを示した（図７Ａ、下側パネル）。このことを、ＮＳＰ２の免疫沈降試料のＷＣＬ及びフロースルー中のＮＳＰ２、ＮＳＰ３及びＶＰ６タンパク質の量を試験することによってさらに検証し、ＮＳＰ２タンパク質の主要部分が成功裏に免疫沈降され、ビーズから回収されたことを示した（図７Ｂ、下側パネル）。まとめると、この結果は、ｒＳＡ１１ウイルスから発現した少なくとも一部のＶＰＩタンパク質が、正確な立体構造で折りたたまれたこと及びＶＰ１免疫沈降物の低い収率が、抗ＮｏＶ　ＧＩＩ．４抗体の不十分な結合親和性のためであり得ることを示唆している。

【０１１０】

ＮｏＶタンパク質を発現するｒＳＡ１１株の遺伝子安定性

ＮｏＶカプシドタンパク質を発現するｒＳＡ１１ウイルスの遺伝子安定性を解析するため、ＦＬＡＧ及びＨｉｓタグ付きタンパク質の両方を発現するｒＳＡ１１ウイルス（ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ、－ＰＨｉｓ、－ｆＶＰ１及びＶＰ１－Ｈｉｓ）を、３つの希釈（１：１０、１：１００又は１：１０００）で５回の連続継代に付した。ＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２、－ｆＰ及びｆＨｉｓに感染させた細胞から回収したｄｓＲＮＡのゲルの電気泳動は、５回の連続継代（Ｐ１～Ｐ５）において、修飾ゲノムセグメント７を含むゲノムセグメントのいずれのサイズにも変化を示さず、１．１ｋｂｐまでの外来性配列を担持するウイルスが遺伝子的に安定していたことを示し（図８Ａ）、前の研究と一致した。対照的に、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１Ｈ

ｉｓの連続継代は、３つの希釈の全てにおいて遺伝子不安定性の証拠を示した（図８Ｂ及び図８Ｃ）。新たなゲノムセグメントが３回目の継代で出現し、これは元の修飾ｇ７セグメントであるＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１　Ｈｉｓの２．９ｋｂｐのサイズより小さかった。後続の継代によって、ゲノムセグメント６の下方に移動したサイズが１．２ｋｂｐのバリアントセグメントが顕著になり、２．９ｋｂｐのセグメント７はＰ５生成によって検出されず、高継代ウイルスプールが、配列欠失を介した２．９ｋｂｐのセグメント７　ＲＮＡに由来するバリアントが優勢であったことを示唆した。内部配列欠失の可能性を試験するため、５個のバリアントをプラーク単離によりＰ５ウイルスプールから回収し、４個が大型（Ｌ）プラーク表現型を有し、１個が小型（Ｓ）プラーク表現型を有した。単離プラークから抽出されたｄｓＲＮＡに実施されたゲル電気泳動は、元の２．９ｋｂｐのゲノムセグメント７　ＲＮＡを含有したものがないことを示した（図８Ｄ、図８Ｅ）。代わりに、ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１　Ｐ５プールのＬ１～Ｌ４バリアントは、再編成（文字Ｒで示される）ｆＶＰ１／Ｒ２セグメントを含有し、一方、Ｓ１バリアントは、－ｆＶＰ１／Ｒ１及び－ｆＶＰ１／Ｒ２セグメントの両方を含有した（図８Ｄ）。同様に、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓ　Ｐ５プールから単離されたｄｓＲＮＡのＲＮＡゲル電気泳動は、大型（Ｌ１、Ｌ３～５）及び小型（Ｓ１）プラーク溶解産物が単一のタイプの小さいバリアントセグメント、ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒのみを含有することを示した（図８Ｅ）。

【０１１１】

バリアントセグメントの配列解析は、－ｆＶＰ１／Ｒ１及び－ｆＶＰ１／Ｒ２が２．９ｋｂｐのセグメント７　ＲＮＡ、ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１に起源し、－ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒが大型ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１　Ｈｉｓセグメントによりもたらされたことを明らかにした（図８Ｆ）。－ｆＶＰ１／Ｒ１（１５５０ｂｐ）及び－ｆＶＰ１／Ｒ２（１，２６３ｂｐ）バリアントセグメントは、セグメント７の完全５’－ＵＴＲ及びＮＳＰ３　ＯＲＦを保持したが、３’－ＵＴＲに１．６ｋｂｐのＮｏＶ　ＶＰ１コード配列及び原基７ｂｐの配列欠失を有した。－ｆＶＰ１／Ｒ１及び－ｆＶＰ１／Ｒ２の配列整列は、Ｒ１がＮＳＰ３　ＯＲＦのＣ末端及び２Ａペプチド配列から２８７塩基の重複を有したこと、及び－ｆＶＰ１／Ｒ２が－ｆＶＰ１／Ｒ１バリアント配列に起源し得ることを実証した（図８Ｆ、表３）。同様に、－ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒのシーケンシングは、ｄｓＲＮＡがセグメント７の完全な５’－ＵＴＲ、ＮＳＰ３　ＯＲＦ及び３’－ＵＴＲを保持するが、ＮｏＶ　ＶＰ１コード配列の１．６ｋｂｐ配列欠失を有することを示した（図８Ｆ）。プラークアッセイにより、ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１ＨｉｓのＰ５プールから単離された５個のバリアントの全てが小さいバリアントセグメントの－ｆＶＰ１／Ｒ２及び－ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｒのそれぞれを含有するという事実は、小さいＲＮＡを有するバリアントが、完全長の又は大きなゲノムセグメントを有するバリアントより有利に成長し得ることを示唆し（図８Ｄ、図８Ｅ）、前の報告と一致した。３個全てのバリアントがＮｏＶコード配列の欠失を有したが、これらのバリアントは、ＮＳＰ３の完全ＯＲＦを含有し、ＮＳＰ３タンパク質がウイルス複製に必須であり得ることを示唆した。直接ＲＮＡシーケンシングによる全ての継代におけるウイルスＲＮＡの全集団のさらなる解析は、長い外来性配列を担持する修飾ゲノムセグメント７（ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１）に導入された欠失の機構及び多様性についてのさらに良好な洞察を提供し得る。

【０１１２】

遺伝不安定性が原因の配列欠失は外来性配列の挿入に限定されない

遺伝子不安定性の潜在的なホットスポット領域及び性質についてのさらに良好な理解を得るため、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１Ｈｉｓウイルスを、低ＭＯＩ（感染多重度）で大量に増幅した。抽出ｄｓＲＮＡのゲル電気泳動解析は、多様なバリアントプール（Ｖと示される）を確認し、これらは、異なるタイプの再編成ゲノムセグメント７を様々なサイズでｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１ウイルス（ｆＶＰ１／Ｖ１～Ｖ４）及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１　Ｈｉｓウイルス（ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ５～Ｖ７）において含有した（図９Ａ、赤色及び青色矢印）。バリアントプールウ

イルス（ｆＶＰ１／Ｖ１～Ｖ４及びＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ５～Ｖ７）に感染させたＭＡ１０４細胞から調製された溶解産物に実施された免疫ブロットアッセイは、ＮＳＰ３抗体でプローブした場合、２つ以上の形態のＮＳＰ３タンパク質を検出した。このことは、予想されたように、バリアントゲノムセグメントがｗｔ．ＮＳＰ３タンパク質に類似した小さいＮＳＰ３タンパク質を発現し、一方、ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１カセットを含有する元のゲノムセグメント７がＮＳＰ３－２Ａタンパク質を発現したことを示唆している（図９Ｂ）。時折、予想されたＮＳＰ３－２Ａタンパク質サイズよりさらに大きい、いくつかの修飾ＮＳＰ３タンパク質が存在し、これはおそらく、配列欠失後のＮＳＰ３－２Ａペプチドへのいくつかの ＶＰ１残基の融合によって引き起こされたと思われる（図９Ｂ）。

【０１１３】

さらなる評価のため、４～５個のｒＳＡ１１単離物を、上記のバリアントプールのそれぞれから回収し、特徴付けた。バリアントプールからのそれぞれのプラーク精製単離物（Ｖ１～Ｖ７）のセグメント７　ｄｓＲＮＡのシーケンシングは、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及び－ＶＰ１　Ｈｉｓウイルスの２．９ｋｂｐのセグメント７　ＲＮＡに由来する再編成ゲノムセグメント（Ｒ）の出現を明らかにした（図９Ｃ～図９Ｈ）。ｆＶＰ１／Ｖ１プールから生成されたＲ１、Ｒ２及びＲ３のＲＮＡは、５’－ＵＴＲ及びＮＳＰ３　ＯＲＦを保持したが、ＶＰ１コード配列の１．３（Ｒ１）、１．６（Ｒ２及びＲ３）ｋｂｐの配列欠失、並びに３’－ＵＴＲに７ｂｐ欠失又は９ｂ重複のいずれかを含有した（図９Ｉ）。興味深いことに、ｆＶＰ１／Ｖ１プールからのＲ２単離物は、１５４ｂｐの重複を示し、ＮＳＰ３　ＯＲＦに存在する最後のいくつかのアミノ酸及び２Ａペプチドの中間に挿入された２Ａエレメントのいくつかの残基と同一であった（図９Ｃ、図９Ｉ及び表３）。バリアント２プールからのプラーク単離物は、一種類の再編成ゲノムセグメント７（ｆＶＰ１／Ｖ３／Ｒ）のみを示した（図９Ｄ）。ｆＶＰ１／Ｖ３／Ｒセグメントは、完全５’－及び３’－ＵＴＲ、並びにセグメント７のＮＳＰ３　ＯＲＦを含有し、３ｘＦＬＡＧ配列全体を欠いていた。２Ａ配列の一部も、ＶＰ１配列に沿って最後の４０個の塩基を除いて全て欠損していた（図９Ｉ）。対照的に、ｆＶＰ１／Ｖ４プール及びＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ５プールから単離されたプラークのｄｓＲＮＡのＲＮＡゲル電気泳動は、様々なＲセグメントを確認し、そのうちの１つ（ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ５／Ｒ３）は、ｒＳＡ１１／ｗｔ（１１０４ｂｐ）より小さなゲノムセグメント７（１０３８ｂｐ）を有した（図９Ｆ、レーン２）。ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ５／Ｒ３の小さいサイズは、２３ｂｐのＮＳＰ３　ＯＲＦ及び４１ｂｐの３’－ＵＴＲ領域を含む挿入外来性配列の１．８ｋｂｐの大きな欠失によって生じた（図９Ｉ及び表３）。同様に、ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ６／Ｒ単離物は、２Ａ－ＶＰ１－Ｈｉｓ外来性配列全体の欠失を伴う、ＮＳＰ３　ＯＲＦからの９ｂｐ及び３’－ＵＴＲからの６ｂｐの欠失（図９Ｉ）が原因で、小さなゲノムセグメント７（１０８７ｂｐ）を含有した（図９Ｇ、レーン２～５）。さらに、ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ７プールから単離されたバリアントプラーク（ＶＰ１　Ｈｉｓ／Ｖ７／Ｒ）は、セグメント７の完全５’－及び３’－ＵＴＲ、並びにＮＳＰ３　ＯＲＦを含有するが、ＮＳＰ３配列の１４ｂｐ重複及びＶＰ１－Ｈｉｓコード配列の１．７ｋｂの欠失を含有する再構成ゲノムセグメント７を確認した（図９Ｈ、図９Ｉ）。まとめると、これらのシーケンシングの結果は、ＲＶ株は、ＮＳＰ３　ＯＲＦの３’末端にある一部のヌクレオチド及び３’ＵＴＲ領域に配置される最初のいくつかを失った場合であっても、依然として効率的に複製できることを示唆している（図９Ｆ、レーン２及び９、図９Ｇ、レーン２～５）。よって、ＮｏＶ　ＶＰ１などの大きな外来性配列を発現するように修飾されたｒＳＡ１１株は、後続継代において遺伝子的に不安定になり、この不安定性は、挿入された外来性配列又はＮＳＰ３配列の欠失によって説明される。

【０１１４】

ＮｏＶカプシド配列を含有するｒＳＡ１１ウイルス粒子の密度

修飾セグメント７からＮｏＶカプシドタンパク質を発現するように再操作されたｒＳＡ１１ウイルスは、ＳＡ１１／ｗｔよりサイズが０．５～２．１ｋｂｐ大きい大型のウイルスゲノムを含有した。ＲＮＡゲル電気泳動は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ修飾ウイルス

が、効率的にパッケージングされ、１１個のゲノムセグメント全ての完全な配置を含有することを示し（図３Ａ、４Ａ及び５Ａ）、コア内の追加の配列のパッケージングは、ウイルス粒子の密度を変化させるはずである。この可能性を探索するため、ｒＳＡ１１／ｗｔ（ゲノムサイズ：１８．６ｋｂｐ）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２（１９．１ｋｂｐ）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ（１９．６ｋｂｐ）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１（２０．３ｋｂｐ）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ（１９．６ｋｂｐ）及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１　Ｈｉｓ（２０．２ｋｂｐ）を、ＭＡ１０４細胞単層で増幅させた。ＥＤＴＡにより処理した後にＲＶ三重層粒子を変換することによって、二重層粒子（ＤＬＰ）を感染細胞溶解産物から調製した。ＤＬＰをＣｓＣｌ勾配で平衡になるまで遠心分離し、ＤＬＰバンドの密度を屈折計の使用により決定した（図１０Ａ、図１０Ｂ）。この解析は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ２　ＤＬＰ（１．３８３１ｇ／ｃｍ$^3$）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＰ　ＤＬＰ（１．３８６３ｇ／ｃｍ$^3$）及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１　ＤＬＰ（１．３８８５ｇ／ｃｍ$^3$）の密度が、ＳＡ１１／ｗｔ　ＤＬＰ（１．３８２ｇ／ｃｍ$^3$）より大きいことを示した（図１０Ａ）。同様に、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＰＨｉｓ（１．３８５２ｇ／ｃｍ$^3$）及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＶＰ１Ｈｉｓ（１．３８８５ｇ／ｃｍ$^3$）の密度は、ＳＡ１１／ｗｔ　ＤＬＰ（１．３８ｇ／ｃｍ$^3$）より大きかった（図１０Ｂ）。ゲル電気泳動によりバンド形成されたＤＬＰから抽出されたｄｓＲＮＡの解析は、１１個のゲノムセグメントの予想された配置を含有することを検証した（図１０Ｃ、図１０Ｄ）。しかし、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１からバンド形成されたＤＬＰは、２つのバンドをＣｓＣｌで示し、これはおそらく、バンド形成されたＤＬＰが、いくつかのバリアントを含む多様なウイルス単離物を含有するという事実によるものである（図１０Ａ）。このことは、サイズが２．９ｋｂｐ（黒色矢印）、１．５５ｋｂｐ及び１．３ｋｂｐ（赤色矢印）の３つの種類のゲノムセグメント７を確認した、バンド形成－ｆＶＰ１　ＤＬＰから抽出されたｄｓＲＮＡのゲル電気泳動によりさらに確証され（図１０Ｃ、レーン４）、図８Ｄのレーン６に示されたものと正確にマッチングした。これらのデータは、余分な１．８ｋｂｐの異種配列を担持するｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ＮｏＶウイルスが、これらのゲノムセグメント７のサイズが野生型ＳＡ１１ウイルスより有意に大きくても完全なゲノム配置を保持することを示した。事実、２０．２ｋｂｐのｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１及びＶＰ１－Ｈｉｓゲノムは、１８．６ｋｂｐのｒＳＡ１１／ｗｔゲノムよりサイズが９．１％大きい（表１）。これらの結果は、ＲＶコアが、例えば以前のリポートと一致する様々なタンパク質をコードすることができる大量の追加の外来性（異種）核酸配列を収容するための空間を有することを示す。ｒＳＡ１１／ゲノムセグメント７に挿入された今までで最大の外来性配列は、２．６ｋｂｐのものであるが（データ示されず）、コアの最大パッケージング能力は、未だ決定されていない。これらの知見は、天然起源の配列重複又は挿入外来性配列を有するＲＶバリアントの密度が野生型ＲＶより大きいことを示す初期研究と一致している。

【０１１５】

考察

本明細書において実証されているように、ゲノムセグメント７の修飾を介して、ＮｏＶカプシドタンパク質の一部分を別個のタンパク質として発現させるｒＲＶを生成することが可能である。これらの結果は、ＲＶを潜在的なワクチン発現ベクターとして使用できることを示している。これらの結果は、例えば、小児においてＲＶ及びＮｏＶ媒介ＡＧＥの両方を予防することができる、混合経口弱毒生ＲＶ－ＮｏＶワクチンを生成するための方法を提供する。近年、一部のＮｏＶワクチン調合剤が成人治験で試験されたが、乳児及び幼児に使用するためのワクチン候補について探索することが強く求められている。この研究において、本発明者たちは、ＮｏＶカプシドドメインを発現するｒＲＶのパネルを生成し、タンパク質の発現及び遺伝子安定性について試験した。全ての組換えＲＶは細胞培養により高い力価で成長し、ＮｏＶタンパク質は高度に発現され、ＲＶ又はＮｏＶに対して既存の免疫がない小児に使用するための優れた発現プラットフォームとなった。さらに、

ＲＶは、ワクチンとして使用している間、極めて高いレベルの抗原発現を有し、強力な免疫応答を生成することができ、したがって、ＮｏＶ抗原に対する免疫応答を増加するアジュバントとして作用することができる。さらに、ＲＶゲノムは、１．３ｋｐｂまでの追加の配列を、遺伝子不安定性を伴うことなく収容することができ、多数の外来性遺伝子の収容を可能にし、多価ワクチンベクターとして開発することができる。このことは、ＣｏＶ－２（ＣＯＶＩＤ－１９としても公知である）ＲＢＤ（受容体結合ドメイン）及びＮｏＶＰ２を含むＳＡＲＳ（ＳＡＲＳ関連コロナウイルスにより引き起こされる重症急性呼吸器症候群）などの他のウイルスの免疫優性領域を発現するようにＲＶを再操作して、乳児及び小児用の多価ワクチン（ＲＶ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　－ＮｏＶワクチン）を生成し、例えば、現行のＲＶワクチンを置き換える可能性を高める。

【０１１６】

この解析は、ＮｏＶカプシドタンパク質を発現する組換えＲＶが細胞培養により高い力価（０．５×１０$^{7}$～２．６×１０$^{7}$ＰＦＵ／ｍｌ）に成長したことを示し、前の報告と一致しており、この高い力価は、ワクチン生産を経済的により実現可能にする。２Ａエレメントの停止－再開活性は、ｒＳＡ１１ウイルスのいくつかの変種を示した。Ｎ末端ＦＬＡＧタグ付きＮｏＶタンパク質を発現するように修飾されたウイルス及びＮｏＶ　Ｐ－Ｈｉｓタンパク質を発現するように修飾されたＲＩＸセグメント７は、小量のＮＳＰ３－２Ａ－リードスルー産物を産生した（図３Ｅ及び５Ｄ、赤色星印）。このことの正確な理由は本発明の実施において不明であるが、おそらくこれらが全て、下流ＮｏＶタンパク質の開始コドンの前に可動性Ａｌａ－Ｓｅｒリンカーを含有したからである。そのような融合リードスルー産物は、図４Ｅに記載されているウイルスの場合には見出されず、配列解析は、これらのウイルスがＡｌａ－Ｓｅｒリンカーを有さないが、下流ＮｏＶタンパク質の開始コドンへのＮＳＰ３－２Ａ配列の直接融合を含有したことを示した（図３Ｅ、レーン６及び図４Ｅ）。

【０１１７】

このデータは、修飾ゲノムセグメント７から発現したＶＰ１タンパク質が、ダイマーを形成し、正確な立体構造での折りたたみが可能であることを示唆している。また、ＮｏＶタンパク質を発現する組換えＲＶのＮＳＰ３タンパク質は、機能的であり、ダイマーを形成する能力を保持し、全てのウイルスタンパク質の完全な補体を発現することができる。

【０１１８】

ＲＶゲノムに収容され得る異種配列の量の上限は、現在決定されていないが、天然の配列重複を有する天然起源ＲＶ株は、追加の０．９ｋｂｐのセグメント７配列を含有し、サイズを２．０ｋｂｐに増加させた（５６）。この研究において、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＶＰ１ウイルスの生成は、ＮｏＶ　ＶＰ１タンパク質をコードするのに十分な１．８ｋｂｐの外来性配列の収容をもたらし、総ゲノムサイズを２０．３ｋｂｐに増加させた。しかし、これは現在までに作製されたうちで最大の組換えＲＶではなく、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質をコードする２．２ｋｂｐの外来性配列を収容することができるｄｓＲＮＡは、以前に作製されていた。このデータは、大きな異種配列を担持する、例えば１．８ｋｂｐのＮｏＶ　ＶＰ１を担持するＲＶが、小さいプラーク表現型を有し、遺伝子的に不安定であり、後続の増幅において新たなバリアントの発生をもたらすことを実証している。小さいプラーク表現型及び遺伝子不安定性の正確な理由は不明であるが、調査中である（データ示されず）。配列再編成について提示された仮説は、ウイルスＲＮＡポリメラーゼが、転写又は複製のいずれかの際にＲＮＡ合成を中断させ、自己の鋳型に戻して、ＲＮＡ合成を再び開始させ得ることを示唆した（５７，５８）。しかし、１．３ｋｂｐまでを担持するＲＶは、５回を超える連続継代で遺伝子的に安定していることが見出されており（４３）、よって、ワクチンプラットフォームに発展させることができる。１．３ｋｂｐの外来性配列により提供されるコード能力は、二次シグナル又はＦｃ結合タンパク質の融合などのいくつかのさらなる修飾と共にＮｏＶ　Ｐタンパク質（１．１ｋｂｐ）を、ＲＶに発現させるのに十分である。この種類のタンパク質修飾、例えば、Ｆｃ免疫グロブリンＧ１（Ｆｃ－ＩｇＧ１）又は細胞表面受容体のリガンドは、発現タンパク質

を特定の細胞タイプ（抗原提示細胞又はＴ細胞）に向けて特異的に標的化することができる。担体部分、例えば、細胞透過性ペプチド又は分泌ペプチド（例えば、インターロイキン－２分泌ペプチド）を有するＮｏＶ　Ｐタンパク質のさらなる修飾は、細胞膜を横断する発現タンパク質の効率的な輸送を達成することができる。

【０１１９】

この結果は、ＮｏＶタンパク質を発現するようにヒトワクチン株ゲノムセグメント７（ＲＩＸ　４４１４）を再操作することが可能であり、小児に使用するためのヒトＲＶ－ＮｏＶワクチン株を開発する方法を提供する。さらに、現行のＲＶワクチンに存在する組換えヒトＲＶ株を生成することができる、修飾ＲＶ逆遺伝学的システムを開発する必要がある。ＮｏＶタンパク質を発現するそのようなヒトｒＲＶワクチン株は、免疫化動物における中和抗体の産生についての洞察を得るために試験され得る。記載されたＲＶシステムを、多数の疾患に対して、又は同じ病原体の２つ以上のバリアントにより引き起こされる同じ疾患に対して、例えば、２つ以上のウイルス又は同じウイルスの２つ以上のバリアントにより引き起こされる２つ以上の疾患に対して保護することができる、混合ワクチンを開発するための有効なベクターシステムとして使用することができる。

【０１２０】

実施例２－機能性糖タンパク質を発現する組換えロタウイルス（ＲＶ）

初期研究は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイク（Ｓ）タンパク質の一部分を発現した組換えＲＶを作製する可能性について調査した（Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２１年）。この研究では、Ｎ末端ドメイン（ＮＴＤ）、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）及びＳタンパク質のコアドメイン（ＣＲ）を発現した、セグメント７修飾を有するｒＳＡ１１ウイルスが回収された（Ｄｕａｎら、２０２０年、Ｈｕａｎｇら、２０２０年）。同様のセグメント７修飾を使用して、ＮＴＤ及びＲＢＤの両方を含み、かつＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の際に産生された中和抗体の一次標的であるＳタンパク質の切断断片であるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質の完全コード配列を含有する、組換えウイルス（ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１）を作製した（Ｂｒｏｕｗｅｒら、２０２０年、Ｌｉｕら、２０２０年、Ｒｏｇｅｒｓら、２０２０年、Ｚｏｓｔら、２０２０年、Ｘｉｎら、２０２１年）。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１ウイルスの修飾セグメント７　ＲＮＡにおけるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、コードカセットＮＳＰ３－２Ａ－３ｘＦＬＡＧ－Ｓ１を含んだ。２Ａ翻訳エレメントの作用を介して、ウイルスのセグメント７ＲＮＡは、２つの産物：２Ａペプチドに融合したＮＳＰ３（ＮＳＰ３－２Ａ）及び３ｘＦＬＡＧタグ付きＳ１（ｆＳ１）を生成することが予想された。ＮＳＰ３－２Ａ－３ｘＦＬＡＧ－Ｓ１カセットでは、３ｘＦＬＡＧタグは、グリコシル化Ｓ産物の合成に重要なエレメントであるＳ１シグナルペプチドの直ぐ上流に位置した（Ｃａｓａｌｉｎｏら、２０２０年）。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１により作製された産物の免疫ブロット解析は、ウイルスがＮＳＰ３－２Ａを効率的に作製したが、おそらく、Ｓ１産物の不安定性若しくは崩壊、又はシグナルペプチドの機能に対するＦＬＡＧタグの影響が原因で予測されたｆＳ１産物を生成するには十分ではなかったことを示した（Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２１年）。本明細書に記載されている研究は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１ウイルスにより作製されたＳ１産物を、末端ペプチドタグの性質が異なるＳ１タンパク質をコードする新たに設計されたｒＳＡ１１ウイルスにより作製された産物と比較する。結果は、ＡＣＥ２受容体の細胞外ドメインの親和性を測定すると、新たに設計されたｒＳＡ１１ウイルスがＳ１タンパク質を効率的に発現すること、及びＳ１タンパク質がグリコシル化され、生体機能性であることを示した（Ｍｅｄｉｎａ－Ｅｎｒｉｑｕｅｚ、２０２０年）。このことは、組換えＲＶをグリコシル化外来性タンパク質の発現ベクターとして使用できることを実証している。

【０１２１】

材料及び方法

細胞培養

サル胚腎臓細胞（ＭＡ１０４）を、４．５ｇ／Ｌグルコース（Ｌｏｎｚａ　１２－６４

０Ｆ又はＣｏｒｎｉｎｇ　１５－１０７－ＣＶ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン［Ｃｏｒｎｉｎｇ］）及び５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）で成長させた（Ａｒｎｏｌｄら、２００９年）。Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼを構成的に発現するベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ－Ｔ７細胞）は、Ｄｒｓ．Ｕｌｌａ　Ｂｕｃｈｈｏｌｚ及びＰｅｔｅｒ　Ｃｏｌｌｉｎｓ、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｏｆ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ、ＮＩＡＩＤ、ＮＩＨから贈呈された。ＢＨＫ－Ｔ７細胞を、１０％トリプトン－ペプチドブロス（Ｇｉｂｃｏ）、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、２％非必須アミノ酸（Ｇｉｂｃｏ）、１％グルタミン及び５％熱不活性化ＦＢＳが補充されたグラスゴー完全培地（ＧＭＥＭ、Ｌｏｎｚａ）に成長させた（Ｐｈｉｌｉｐら、２０２０年）。ＢＨＫ－Ｔ７細胞の培養に使用された培地に、２％Ｇ４１８（Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を一継代おきに補充した。

【０１２２】

プラスミド

ｒＳＡ１１ウイルスの生成に使用されたプラスミドは、Ａｄｄｇｅｎｅ［ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／Ｔａｋｅｓｈｉ＿Ｋｏｂａｙａｓｈｉ／］から得て、ｐＴ７／ＶＰ１ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ２ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ３ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ４ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ６ＳＡ１１、ｐＴ７／ＶＰ７ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ１ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ２ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１、ｐＴ７／ＮＳＰ４ＳＡ１１及びｐＴ７／ＮＳＰ５ＳＡ１１を含んだ。プラスミドのｐＣＭＶ－ＮＰ８６８Ｒ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧ及びｐＴＷＩＳＴ／ＣＯＶＩＤ１９スパイクは上記のとおりに誘導された（Ｐｈｉｌｉｐら、２０１９年、Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２０年、２０２１年）。プラスミドのｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ１は、Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ（２０２１年）に記載されたように生成され、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の完全長ｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ　ＭＮ９０８９４７．３）を含有する。プラスミドのｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１Ｆ及びｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ１－Ｈｉｓは、ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ１と同じであり、同じＳ１　ＯＲＦを含有するが、Ｓ１　ＯＲＦの周囲にあるペプチドタグの配列が異なっている。

【０１２３】

ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆプラスミドは、Ｔａｋａｒａ　Ｉｎ　Ｆｕｓｉｏｎクローニングキットを使用して構築し、これは、ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－ｆＵｎａＧのベクター主鎖（ｐＴ７／ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ領域）（増幅のプライマーペア：配列番号７２ＴＧＡＣＣＡＴＴＴＴＧＡＴＡＣＡＴＧＴＴＧＡＡＣＡＡＴＣＡＡＡＴＡＣＡＧ及び配列番号７３　ＡＧＧＡＣＣＧＧＧＧＴＴＴＴＣＴＴＣＣＡＣ）を、ｐＴＷＩＳＴ／ＣＯＶＩＤ１９スパイクのＳ１　ＯＲＦの挿入（プライマーペア：配列番号７４．ＧＡＡＡＡＣＣＣＣＧＧＴＣＣＴＧＴＧＴＴＴＧＴＴＴＴＴＣＴＴＧＴＴＴＴＡＴＴＧＣＣＡＣＴＡＧＴＣＴ及び配列番号７５．ＧＴＡＴＣＡＡＡＡＴＧＧＴＣＡＣＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＣＴＴＧＴＡＡＴＣＡＣＧＴＧＣＣＣＧＣＣＧ）と組み合わせた。プライマーは、コード化Ｓ１タンパク質のＣ末端として１ｘＦＬＡＧタグを導入するように設計した。ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ１－Ｈｉｓプラスミドは、６ｘＨｉｓタグをコードする配列を、Ｉｎ　Ｆｕｓｉｏｎクローニングキットを使用してｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳのＳ１　ＯＲＦの３’末端に挿入することによって産生した。これは、ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳをプライマーペア：配列番号７６．ＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＴＧＡＣＣＡＴＴＴＴＧＡＴＡＣＡＴＧＴＴＧＡＡＣＡ及び配列番号７７．ＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＴＧＡＣＧＴＧＣＣＣＧＣＣＧＡＧＧＡＧＡにより増幅することによって達成された。トランスフェクション品質プラスミドは、Ｑｉａｇｅｎプラスミド精製キットを使用して調製された。プライマーはＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｓｃｅｎｔｉｆｉｃから得て、プラスミド配列はＥｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓにより検証された。

【０１２４】

組換えウイルス

組換えｒＳＡ１１を生成及び回収する詳細な手順は、以前に公開されている（Ｐｈｉｌｉｐら、２０２０年、Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２１年）。簡潔には、ＢＨＫ－Ｔ７細胞を、Ｍｉｒｕｓ　ＴｒａｎｓＩＴ－ＬＴ１トランスフェクション試薬を使用してＳＡ１１　ｐＴ７プラスミド及びｐＣＭＶ－ＮＰ８６８Ｒでトランスフェクトした。ｐＴ７／ＮＳＰ２ＳＡ１１及びｐＴ７／ＮＳＰ５ＳＡ１１を、他のプラスミドより３倍高いレベルでトランスフェクション混合物に含めた。必要に応じて、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１プラスミドを、ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ、ｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１Ｆ又はｐＴ７／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆＳ１－Ｈｉｓに置き換えた。トランスフェクトした細胞ＢＨＫ－Ｔ７細胞にＭＡ１０４細胞を感染の２日後に追い播きし、成長培地を最終濃度の０．５ｍｇ／ｍｌチロシン（ブタＴｙｐｅＩＸ膵臓トリプシン、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）に調整した。完全な細胞変性効果（ＣＰＥ）が観察されると、培地オーバーレイ中の細胞を、３回の凍結解凍（ｆｒｅｅ　ｔｈａｗ）に付し、溶解産物を、低速遠心分離により清澄にした。溶解産物中のウイルスをプラーク単離により回収し、ＭＡ１０４細胞における１回の成長により増幅した（Ｐｈｉｌｉｐら、２０２０年）。ウイルスｄｓＲＮＡをＴｒｉｚｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）抽出（Ｐｈｉｌｉｐら、２０２０年）により回収し、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により分離させ、臭化エチジウムで染色することによって検出した。ｃＤＮＡを、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ　ＲＴ－ＰＣＲ　Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）及び適切なセグメント７（ＮＳＰ３）プライマーを使用してｄｓＲＮＡから生成し、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓによりシーケンシングした。

【０１２５】

免疫ブロット解析

ＭＡ１０４細胞溶解産物中に存在するタンパク質を、上記手順（Ｐｈｉｌｉｐら、２０２０年、Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２１年）に従って免疫ブロットアッセイにより検出した。細胞をモック感染させ又は５プラーク形成単位（ＰＦＵ）の組換えウイルスに感染させ、９ｈ．ｐ．ｉ．に収集し、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）無含有プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する免疫沈降（ＩＰ）溶解緩衝液（３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）（Ｒｏｃｈｅ　ｃＯｍｐｌｅｔｅ、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）］に再懸濁することによって溶解した。タンパク質を、１０％ポリアクリルアミド（ＳＤＳ）ゲルの電気泳動により分離させ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｔｒａｎｓ－Ｂｌｏｔ　Ｔｕｒｂｏ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍを使用してニトロセルロース膜に移した。膜を、５％脱脂粉乳を含有するリン酸緩衝食塩水でブロックし、ウサギポリクローナルＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１抗体（Ａ２０１３６、ＡＢｃｌｏｎａｌ、１：１０００希釈）、モルモットポリクローナルＮＳＰ３（ＮＩＨ　Ｌｏｔ　５５０６８、１：２０００希釈）若しくはＶＰ６（ＮＩＨ　Ｌｏｔ　５３９６３、１：２０００）抗血清、マウスモノクローナルＦＬＡＧ　Ｍ２（Ｆ１８０４、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、１：２０００）若しくは抗６ｘＨｉｓ抗体（ＭＣＡ１３９６、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、１：１０００）、又はウサギモノクローナルｂ－アクチン抗体（Ｄ６Ａ８、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１：１０００）によりプローブした。一部の場合では、ブロットを、ＷｅｓｔｅｒｎＳｕｒｅ　ＥＣＩストリッピング緩衝液（ＬＩ－ＣＯＲ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で処理した後に、異なる抗体で再プローブした。一次抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合二次抗体：ウマ抗マウスＩｇＧ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、ヤギ抗モルモットＩｇＧ［Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＫＰＬ）］又はヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）の１：１０，０００希釈を使用して検出した。シグナルを、Ｃｌａｒｉｔｙ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　ＥＣＬ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して発生させ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ＣｈｅｍｉＤｏｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍを使用して検出した。

【０１２６】

エンドグリコシダーゼＨ（Ｅｎｄｏ　Ｈ）アッセイ

６ウエルプレート中のＭＡ１０４細胞単層をモック感染させた、又はｒＳＡ１１ウイルス（細胞１個あたり５ＰＦＵ、ＰＦＵ＝プラーク形成単位）に感染させた。９ｈ．ｐ．ｉ．に細胞単層を洗浄し、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に掻き落とし、低速遠心分離によりペレット化し、ＩＰ溶解緩衝液の１ウエルあたり２５０ｍｌで再懸濁した。細胞溶解産物中のグリコシル化タンパク質の存在を、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｅｎｄｏｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ　Ｈ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｖ４８７１）を使用して決定した。簡潔には、細胞溶解産物の２７ｍｌの試料を３ｍｌの１０Ｘ　Ｄｅｎａｔｕｒｉｎｇ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎと組み合わせ、９５℃に５分間加熱し、室温に冷却した。加熱処理溶解産物を、３ｍｌのヌクレアーゼ無含有水、４ｍｌの１０Ｘ　Ｅｎｄｏ　Ｈ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ及び３ｍｌのＥｎｄｏ　Ｈ酵素と混合し、次いで３７℃で１６時間インキュベートした。処理試料中のタンパク質を、上記に記載されたように免疫ブロットアッセイにより検出した。

【０１２７】

Ｓ１－ＡＣＥ２相互作用アッセイ

Ｔａｋａｒａ　Ｃａｐｔｕｒｅｍ　ＩＰ　ａｎｄ　Ｃｏ－ＩＰキット（Ｃａｔ　Ｎｏ：６３５７２１）を使用して、ｒＳＡ１１ウイルスにより発現されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｓ１のＡＣＥ２に対する親和性を査定した。プロテインＡスピンカラム及び全ての必要な緩衝液がＣａｐｔｕｒｅｍキットに含まれた。ＭＡ１０４細胞単層をモック感染させた、又はｒＳＡ１１ウイルス（５ＰＦＵ／細胞）に感染させた。９ｈ．ｐ．ｉ．に、細胞を洗浄し、ＰＢＳに掻き落とし、低速遠心分離によりペレット化し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するＬｙｓｉｓ／Ｅｑｕｉｌｉｂｒａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒに再懸濁した。氷上で１５分間インキュベートした後、溶解産物を１７，０００ｇで１０分間遠心分離して清澄にした。ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に融合したヒトＡＣＥ２の細胞外ドメインからなる組換えタンパク質である、可溶性のｈＡＣＥ２－Ｆｃ（ｆｃｈａｃｅ２、ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）を、清澄溶解産物に添加して、１ｍｌあたり２０ｍｇの最終濃度にし、混合物を４℃で一晩インキュベートした。ｈＡＣＥ２－Ｆｃ及びＳ１タンパク質で形成された複合体を回収するため、溶解産物試料を前平衡プロテインＡスピンカラムに充填し、次いで１０００ｇにより室温で１分間遠心分離した。カラムをＷａｓｈ　Ｂｕｆｆｅｒによりすすいだ後、タンパク質を、Ｅｌｕｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒの添加によりカラムから溶出させ、１０００×ｇにより室温で１分間遠心分離した。溶出試料をＮｅｕｔｒａｌｉｚａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒの添加により直ぐに中和した。溶出試料中のタンパク質を、上記に記載されたように免疫ブロットアッセイにより検出した。

【０１２８】

免疫蛍光アッセイ

遺伝子安定性

組換えＲＶの遺伝子安定性を、無血清ＤＭＥＭ及び０．５μｇ／ｍｌトリプシンで調製された感染細胞溶解産物の１：１０希釈を使用して、ＭＡ１０４細胞単層における連続継代により査定した（Ｐｈｉｌｉｐ及びＰａｔｔｏｎ、２０２１年）。ウイルスｄｓＲＮＡを、ＲＮアーゼＴ１で処理して一本鎖ＲＮＡを除去した清澄細胞溶解産物からのＴｒｉｚｏｌ抽出により回収した（Ｐｈｉｌｉｐら、２０１９年）。ウイルスｄｓＲＮＡを、８％ポリアクリルアミドゲルの電気泳動により解析し、臭化エチジウムで染色することによって検出した。

【０１２９】

ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号

ＧｅｎＢａｎｋに委託されているｒＳＡ１１ウイルスの修飾セグメント７：ｒＳＡ１１／ｗｔ．（ＬＣ１７８５７２）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆ－Ｓ１（ＭＷ０５９０２６）、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１－１ｆ（ＭＺ５１１６９０）及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－３ｆ－Ｓ１－Ｈｉｓ（ＭＺ５１１６８９）。他のアクセッション番号には、ｐＴＷＩＳＴ／ＣＯＶＩＤ１９スパイク中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ配列（Ｇ

ｅｎＢａｎｋ　ＭＮ９０８９４７）、ｐＣＭＶ－ＮＰ８６８Ｒ中のアフリカブタ熱ウイルスキャッピング酵素の配列、及びｒＳＡ１１－ＮＳＰ３－Ｐ２Ａ－３ｆＵｎａＧの修飾セグメント７　ＲＮＡ（ＭＫ８５１０４２）が挙げられる。

【０１３０】

結果

Ｓ１タンパク質をコードする組換えウイルスの生成

以前の研究において、ｒＳＡ１１ウイルス（ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１）は、融合Ｎ末端３ｘＦＬＡＧタグを有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ１タンパク質（３ｘＦＬＡＧ－Ｓ１）をコードする修飾セグメント７　ＲＮＡにより生成された。このウイルスによる不十分なＳ１発現の基礎を理解するため、セグメント７　ＲＮＡのＳ１　ＯＲＦの上流及び下流でコードされているペプチドタグの性質のみが異なる、２個の類似したｒＳＡ１１ウイルスを生成した。ウイルスのうちの一方のｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈｉｓは、セグメント７　ＲＮＡのＯＲＦが６ｘＨｉｓタグをＳ１産物の末端に配置し、よって３ｘＦＬＡＧ－Ｓ１－６ｘＨｉｓをコードするように操作されていることを除いて、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１と同一であった。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈｉｓウイルスは、Ｓ１産物からのシグナルペプチドの切断が原因でＮ末端３ｘＦＬＧタグが失われ、抗ＦＬＡＧ抗体を用いる免疫ブロットアッセイを介した、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１ウイルスによるｆＳ１合成の正確な査定を妨げる可能性に対処するために生成された。代わりに、Ｓ１産物の産生は抗６ｘＨｉｓ抗体で査定することができる。作製された第２の組換えウイルスであるｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１は、Ｃ末端１ｘＦＬＡＧタグを有するが、任意のＮ末端タグを有さないＳ１（Ｓ１－１ｘＦＬＡＧ）を発現するように設計されたセグメント７　ＲＮＡを含有した。このウイルスの有用性では、Ｓ１シグナルペプチドの上流に位置するタグが、小胞体によるＳ１タンパク質の合成及びグリコシル化を妨害し得る可能性について検査した。

【０１３１】

組換えウイルスのｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈｉｓは、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈｉｓ及び野生型ウイルスｒＳＡ１１／ｗｔの生成に以前に使用されたものと同じ逆遺伝学的手順に従って産生した。この手順は、ＳＡ１１プラスセンス（＋）ＲＮＡを発現するＴ７転写ベクター（ｐＴ７）及びアフリカブタ熱ウイルスのキャッピング酵素をコードするＣＭＶ発現プラスミド（ｐＣＭＶ－ＮＰ８６８Ｒ）のセットによるＢＨＫ－Ｔ７細胞のトランスフェクションを含んだ。トランスフェクション混合物では、ＮＳＰ２及びＮＳＰ５　＋ＲＮＡのＴ７転写ベクター（それぞれ、ｐＴ７／ＳＡ１１ＮＳＰ２及びｐＴ７／ＳＡ１１ＮＳＰ５）が、他のｐＴ７ベクターより３倍大きなレベルで使用された。Ｓ１産物をコードするｒＳＡ１１の産生に使用された修飾セグメント７転写ベクター（図１１）を、ｐＴ７／ＮＳＰ３ＳＡ１１の代わりにトランスフェクション混合物に添加した。トランスフェクトされたＢＨＫ－Ｔ７細胞に形成された組換えウイルスは、ＭＡ１０４細胞を追い播きすることによって増幅し、次いでプラーク精製により単離した。

【０１３２】

ｒＳＡ１１のゲノム及び成長特徴

組換えウイルスのｄｓＲＮＡゲノムセグメントを、ゲル電気泳動により分離させて、修飾セグメント７　ＲＮＡの存在を検証した（図１２）。この解析は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈｉｓの全てが、ｒＳＡ１１／ｗｔに典型的な１．１Ｋｂｐのセグメント７ｄｓＲＮＡを欠いていたことを示した。代わりに、予想されたように、全てのＳ１コードｒＳＡ１１ウイルスは、セグメント１　ｄｓＲＮＡの位置の近くにポリアクリルアミドゲルで移動し、かつ３．３Ｋｂｐのサイズを有したセグメント７　ｄｓＲＮＡを含有した。シーケンシングは、組換えウイルスのセグメント７　ＲＮＡが、回収に使用されたｐＴ７転写ベクターのものと同一であったことを検証した。ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－Ｓ１ｆ及びｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１－Ｈ

ｉｓそれぞれのゲノムセグメントの合計サイズは、２０．７～２０．８Ｋｂｐであり、野生型ウイルスより２．１～２．２Ｋｂｐ（又は約１１％）大きい。

【０１３３】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のグリコシル化Ｓ１タンパク質を発現するｒＳＡ１１ウイルス

続いて、ＭＡ１０４細胞における２回目の増幅。組換えウイルスをウイルスプールからプラーク精製し、ｈｅのＮ末端３ｘＦＬＡＧタグによるＳ１　ＲＮＡの翻訳をｆＳ１に融合した。この設計では、３ｘＦＬＡＧタグを、グリコシル化Ｓ１の合成に重要なエレメントであるＳ１シグナル配列（ＳＳ）の直ぐ上流に位置付けした。以前の研究では、感染細胞中のｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１により発現されたＳ１産物の性質は確実ではなく、おそらく、Ｓ１産物の不安定性若しくは切断、又はＳＳ配列の機能性に対するＦＬＡＧタグの影響が原因であった。本研究は、ｒＳＡ１１／ＮＳＰ３－２Ａ－ｆＳ１ウイルスにより作製されたＳ１産物を再検査し、この産物を、Ｎ末端タグ配列を欠いているＳ１タンパク質をコードする新たに設計されたｒＳＡ１１ウイルスにより生成された産物と比較した。この解析は、新たに設計されたｒＳＡ１１ウイルスが、ＡＣＥ２の細胞外ドメインに結合する能力を有するグリコシル化Ｓ１タンパク質を効率的に発現したことを示している。これらの結果は、ＲＶセグメント７発現プラットフォームを使用して、グリコシル化カプシドタンパク質の発現の方向付けができることを実証している。

【０１３４】

開示されている主題は、様々な変更及び代替的形態を受け入れるが、特定の実施形態が本明細書において詳細に記載されている。しかし、この意図は、記載されている特定の実施形態に本開示が限定されないことである。本開示は、添付の特許請求の範囲に定義されている本開示の範囲内に入る、全ての変更、同等物及び代替物を網羅することが意図される。

【０１３５】

同様に、例証的な方法が本明細書に記載され得るが、この方法の記載は、本明細書に開示されている様々なステップの任意の要件又は特定の順序を意味すると解釈されるべきではない。しかし、ある特定の実施形態は、本明細書に明確に記載され得るように及び／又はステップそれ自体の性質によって理解され得るように、ある特定のステップ及び／又はある特定のステップにおけるある特定の順序を必要とし得る（例えば、一部のステップの実施は、前のステップの結果に依存し得る）。加えて、項目（例えば、入力、アルゴリズム、データ値など）の「セット」、「サブセット」又は「群」は、１つ以上の項目を含んでよく、同様に、項目のサブセット又は部分群は、１つ以上の項目を含んでよい。「複数」は、２つ以上を意味する。

【０１３６】

範囲に関して本明細書に使用される用語として、「約」及び「およそ」は交換可能に使用され、測定値を指すことができ、測定値は、記述された測定値を含む、また、記述された測定値にかなり近いが、測定誤差、測定及び／又は製造機器較正の差、読取り及び／又は測定設定の人的誤差、他の構成要素と関連する、特に実現シナリオ、人間又は機械による不正確な調整及び／又は物体の操作などに関連する測定における差の観点から性能及び／又は構造パラメーターを最適にするために行われた調整に起因する、関連技術に通常の技能を有する個人に理解され、容易に確認されるなどのかなり小さい量が異なり得る任意の測定値も含む。

【０１３７】

【表１】

表1.プライマーの名称及び対応する配列

| 配列番号 | プライマーの名称 | 配列 |
|---|---|---|
| 32 | ベクター_For | CCATTTTGATACATGTTGAACAATCAAATACAGTGT |
| 33 | ベクター_Rev | GCTAGCCTTGTCATCGTCATCCT |
| 34 | fP2_For | GATGACAAGGCTAGCACTACCCAGCTGTCAGCTG |
| 35 | fP2_Rev | CATGTATCAAAATGGTCACAGGTGCACATTATGACCAGTTCT |
| 36 | fP_For | GATGACAAGGCTAGCAAACCATTCACCGTCCCAATCT |
| 37 | fP_Rev | CATGTATCAAAATGGTTATAATGCACGCCTGCGCCC |
| 38 | fVP1_For | GATGACAAGGCTAGCATGAAGATGGCGTCGAGTGAC |
| 39 | fVP1_Rev | CATGTATCAAAATGGTTATAATGCACGCCTGCGCCC |
| 40 | ベクター P2A_For | CCATTTTGATACATGTTGAACAATCAAATACAGTGT |
| 41 | ベクター P2A_Rev | AGGACCGGGGTTTTCTTCCAC |
| 42 | VP1-fFor | GAAAACCCCGGTCCTGCTAGCGTGAAGATGGCGTCGAG |
| 43 | VP1-fRev | CATGTATCAAAATGGTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCTAATGCACGCCTGCGC |
| 44 | P His_For | AGAAAACCCCGGTCCTGCTAGCAAACCATTCACCGTCC |
| 45 | P His_Rev | CATGTATCAAAATGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTAATGCACGCCTGCGCC |
| 46 | VP1-ThHisFor | GAAAACCCCGGTCCTGTGAAGATGGCGTCGAGTGAC |
| 47 | VP1-ThHisRev | ACATGTATCAAAATGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCGAGCCACGGGGGACCAATAATGCACGCCT |
| 48 | VP1-HisFor | GAAAACCCCGGTCCTGTGAAGATGGCGTCGAGTGAC |
| 49 | VP1-HisRev | CATGTATCAAAATGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTAATGCACGCCT |

【０１３８】

【表２】

表2. 組換えrRV/NSP3-2A-NoV株の特性

| ウイルス株 | | | ゲノムセグメント7 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | RNA (bp) | タンパク質産物 | | | | NCBIアクセッション番号 (#) |
| 省略名 | 正式名* | ゲノムサイズ/ wtに対する増加(bp) | | 非切断 (aa) | 2A切断 (aa) | 非切断 (kDa) | 2A切断 (kDa) | |
| rSA11/ wt | RVA/サル-lab/USA/SA11wt/2019/G3P[2] | 18,559/ 0 | 1105 | 315 | nd | 36.4 | nd | LC178572 |
| rSA11/ NSP3-fP2 | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:fP2)/2019/G3P[2] | 19,126/ 567 | 1672 | 504 | 336 + 168 | 57.1 | 38.5 +18.6 | MN190002 |
| rSA11/ NSP3-fP | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:fP)/2019/G3P[2] | 19,642/ 1083 | 2188 | 676 | 336 + 340 | 76.1 | 38.5 + 37.7 | MN190003 |
| rSA11/ NSP3-fVP1 | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:fVP1)/2019/G3P[2] | 20,314/ 1755 | 2860 | 900 | 336 + 564 | 100.3 | 38.5 + 61.9 | MN190004 |
| rSA11/ NSP3-VP1f | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:VP1f)/2019/G3P[2] | 20.272/ 1713 | 2818 | 886 | 336 + 550 | 98.6 | 38.5 + 60.1 | MN201548 |
| rSA11/ NSP3-PHis | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:PHis)/2019/G3P[2] | 19,594/ 1035 | 2140 | 660 | 336 + 324 | 74.2 | 38.5 + 35.8 | MN201549 |
| rSA11/ NSP3-Th-VP1His | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:VP1ThHis)/2019/G3P[2] | 20,278/1719 | 2824 | 888 | 336 + 552 | 98.8 | 38.5 + 60.4 | MN201547 |
| rSA11/ NSP3-VP1His | RVA/サル-lab/USA/SA11(NSP3-2A-NoV:VP1His)/2019/G3P[2] | 20,260/ 1701 | 2806 | 882 | 336 + 546 | 98.2 | 38.5 + 59.8 | MZ562305 |
| rSA11/ RIX NSP3-PHis | RVA/サル-lab/USA/SA11(RIX NSP3-2A-NoV:PHis)/2021/G3P[2] | 19,563/ 1004 | 2109 | 655 | 331 + 324 | 74.2 | 38 + 35.8 | MZ643978 |

*株の正式名はMatthijnssensら(2011)に従って割り当てられた。nd:未定、2A切断部位が存在しない; wt: 野生型

【０１３９】

【表３】

表3. バリアントの特徴、並びに配列重複及び/又は欠失の詳細

| 不安定なバリアントセグメントの特徴 | | | | | | | | | 配列重複の詳細 | | 配列欠失の詳細 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 各領域における bp 数 | | | | | | | | | | |
| ゲノムセグメントの名称 | dsRNAセグメントのサイズ | 5'-UTR (bp) | NSP3 ORF (bp) | 2Aペプチド (bp) | Flag (bp) | NoV VP1配列 (bp) | His (bp) | 3'-UTR (bp) | 配列重複 (bp) | 配列重複の領域 | 配列欠失 (bp) | 配列欠失の性質 |
| rSA11/wt | 1105 | 25 | 948 | 0 | 0 | 0 | 0 | 132 | 0 | | 0 | |
| rSA11/NSP3-fVP1 | 2860 | 25 | 945 | 66 | 66 | 1626 | 0 | 132 | 0 | | 0 | |
| fVP1/R1 | 1550 | 25 | 945 | 66 | 66 | 36 | 0 | 125 | 287 | 287bp (NSP3 ORF 及び 2A) | 7 | 7bp (3'-UTR) |
| fVP1/R2 | 1263 | 25 | 945 | 66 | 66 | 36 | 0 | 125 | 0 | | 7 | 7bp (3'-UTR) |
| fVP1/V1/R1 | 1551 | 25 | 945 | 66 | 66 | 308 | 0 | 132 | 9 | | 0 | |
| fVP1/V1/R2 | 1417 | 25 | 945 | 66 | 66 | 36 | 0 | 125 | 154 | 154 bp (NSP3 ORF 及び 2A) | 7 | 7bp (3'-UTR) |
| fVP1/V1/R3 | 1263 | 25 | 945 | 66 | 66 | 36 | 0 | 125 | 0 | | 7 | 7bp (3'-UTR) |
| fVP1/V3/R | 1167 | 25 | 945 | 25 | 0 | 40 | 0 | 132 | 0 | | 0 | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| fVP1/V4/R1 | 1320 | 25 | 945 | 66 | 66 | 77 | 0 | 132 | 9 | 9 bp (3'-UTR) | 0 | |
| fVP1/V4/R3 | 1110 | 25 | 940 | 0 | 0 | 8 | 0 | 132 | 5 | 5 bp (NSP3 ORF) | 0 | |
| rSA11/NSP3-VP1 His | 2806 | 25 | 945 | 66 | 0 | 1620 | 18 | 132 | 0 | | 0 | |
| VP1His/R | 1259 | 25 | 945 | 22 | 0 | 99 | 18 | 132 | 18 | 18 bp (NSP3 ORF) | 0 | |
| VP1His/V5/R1 | 1849 | 25 | 945 | 66 | 0 | 621 | 16 | 132 | 44 | 44 bp (NSP3 ORF) | 0 | |
| VP1His/V5/R2 | 1485 | 25 | 945 | 66 | 0 | 281 | 18 | 132 | 18 | 18 bp (VP1) | 0 | |
| VP1His/V5/R3 | 1038 | 25 | 922 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 | 0 | | 64 | 23 bp (NSP3 ORF), 41 bp (3'-UTR) |
| VP1His/V6/R | 1087 | 25 | 936 | 0 | 0 | 0 | 0 | 126 | 0 | | 15 | 9 bp (NSP3 ORF), 6 bp (3'-UTR) |
| VP1His/V7/R | 1121 | 25 | 945 | 2 | 0 | 3 | 0 | 132 | 14 | 14 bp (NSP3 ORF) | 0 | |

【図面】

【図１Ａ】

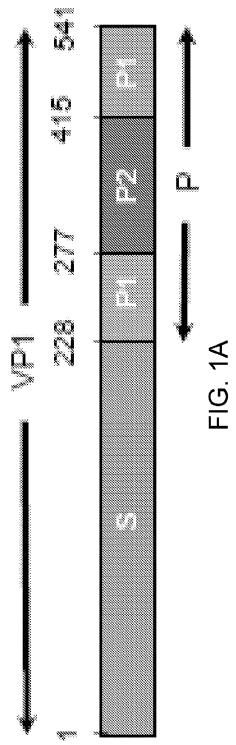



FIG. 1A

【図１Ｂ】

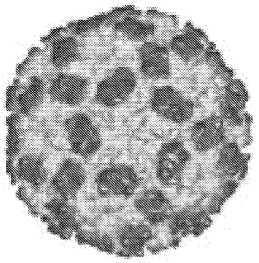



FIG. 1B

【図１Ｃ】

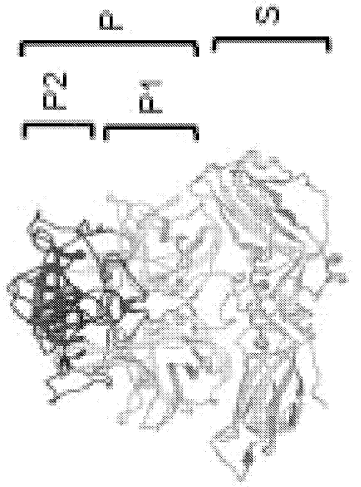



FIG. 1C

【図２】

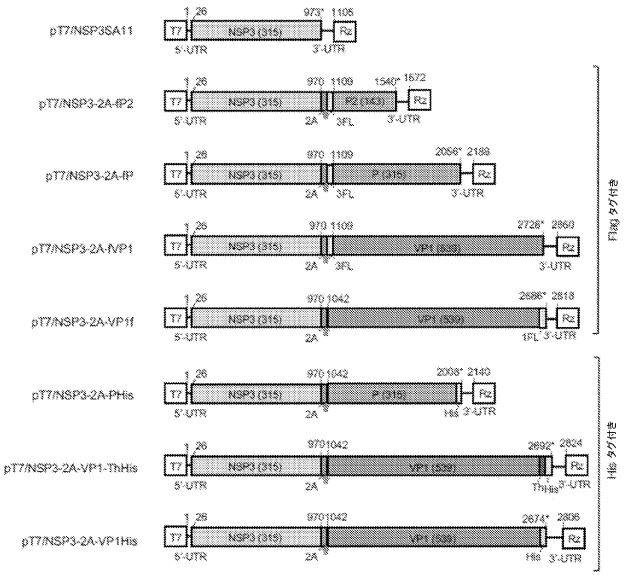



FIG. 2

【図３Ａ】

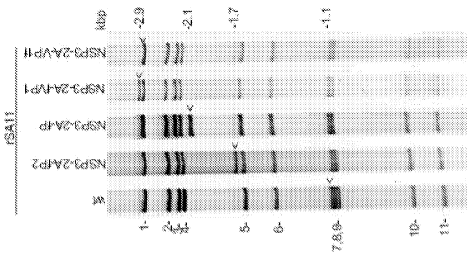



FIG. 3A

【図３Ｂ】

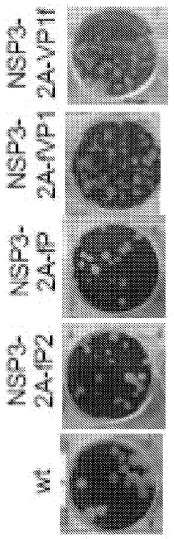



FIG. 3B

【図３Ｃ】

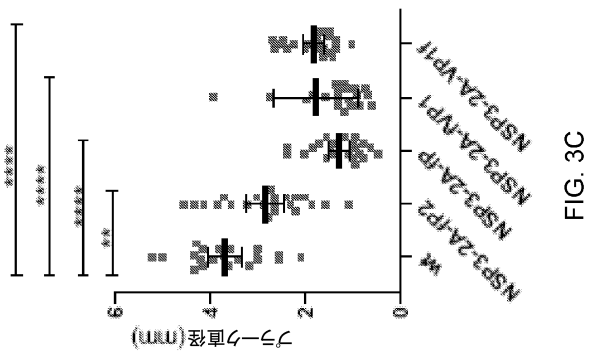



FIG. 3C

【図３Ｄ】

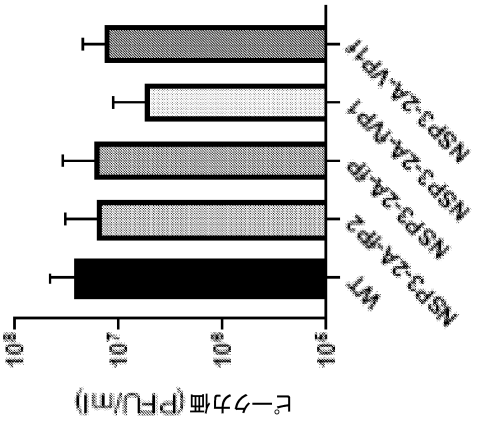



FIG. 3D

【図３Ｅ】

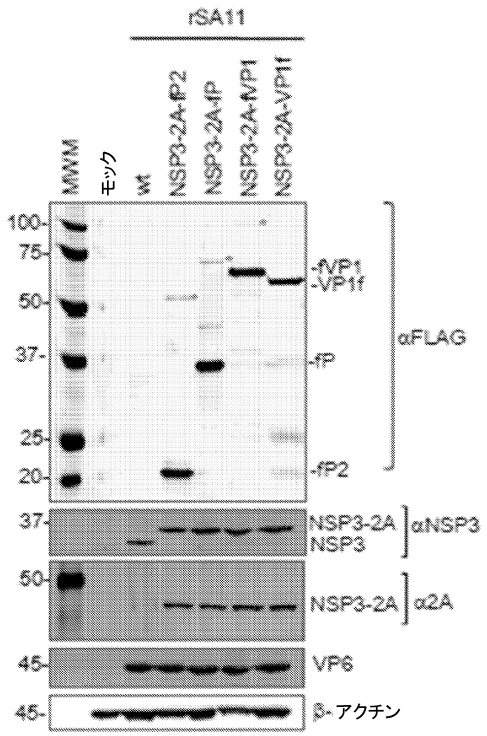



FIG. 3E

【図４Ａ】

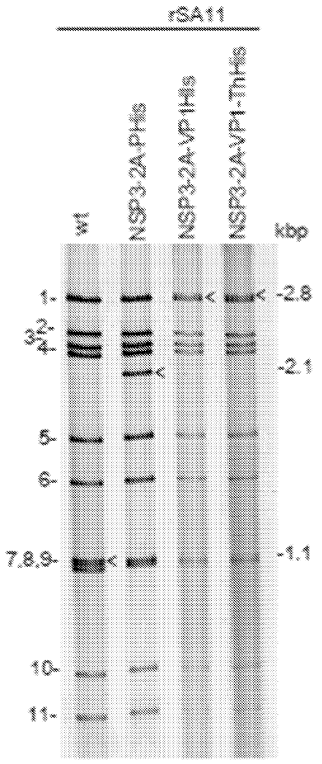



FIG. 4A

【図４Ｂ】

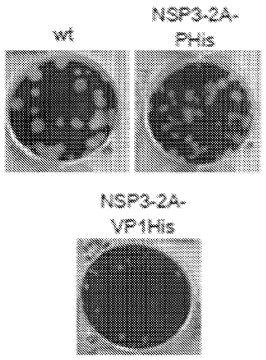



FIG. 4B

【図４Ｃ】

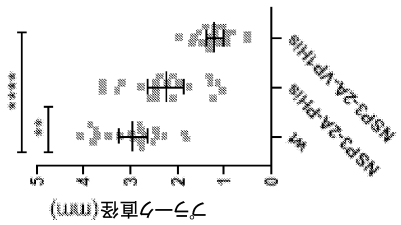



FIG. 4C

【図４Ｄ】

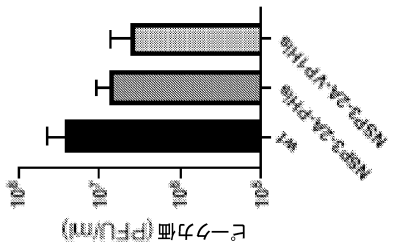



FIG. 4D

【図４Ｅ】

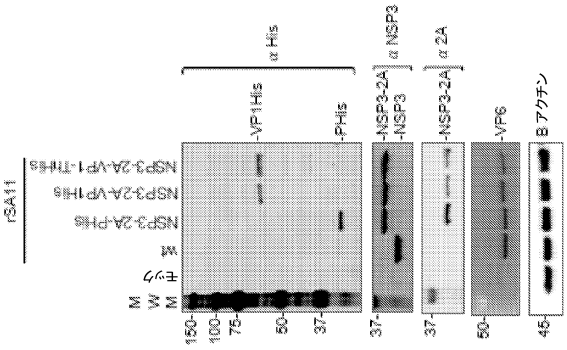



FIG. 4E

【図５Ａ】

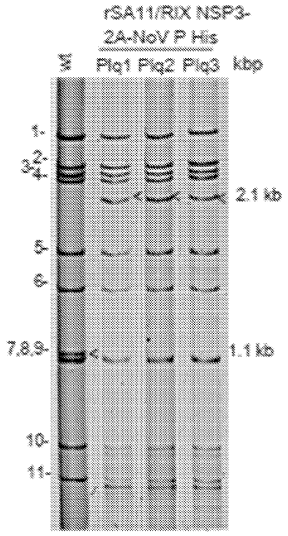



FIG. 5A

【図５Ｂ】

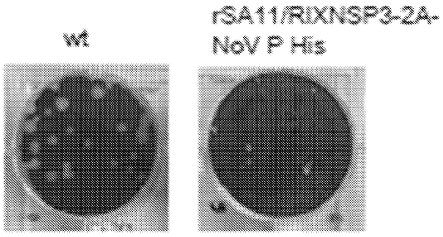



FIG. 5B

【図５Ｃ】

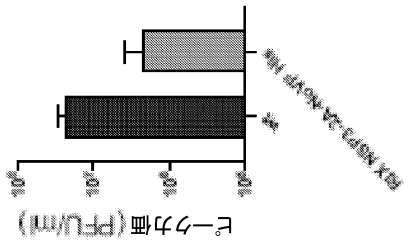



FIG. 5C

【図５Ｄ】

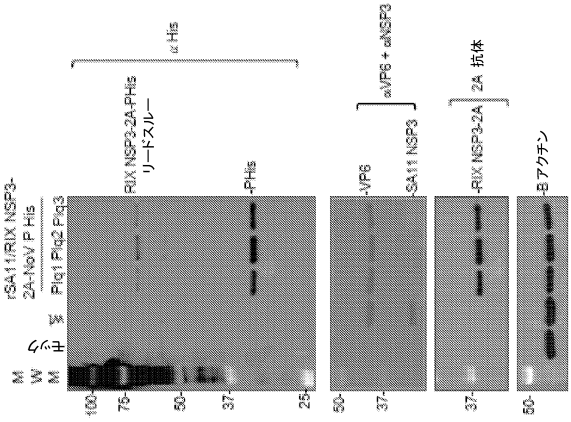



FIG. 5D

【図６Ａ】

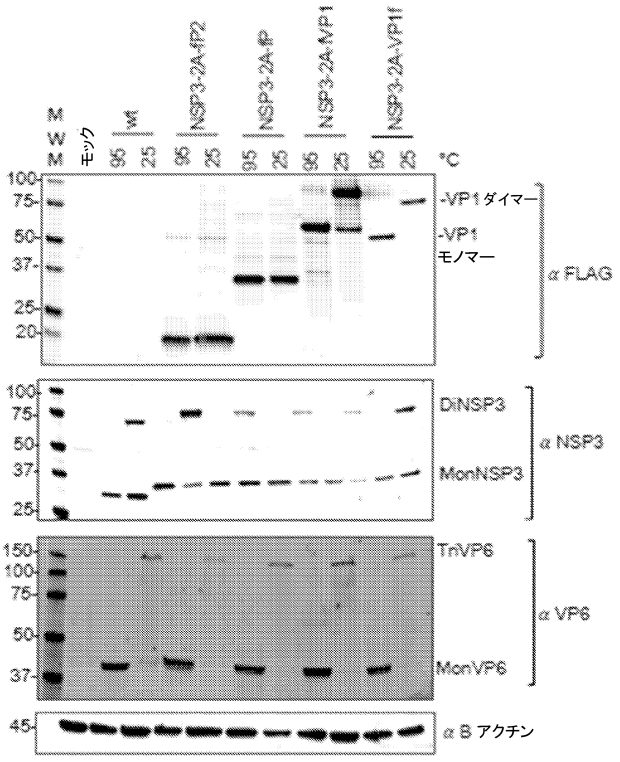



FIG. 6A

【図６Ｂ】

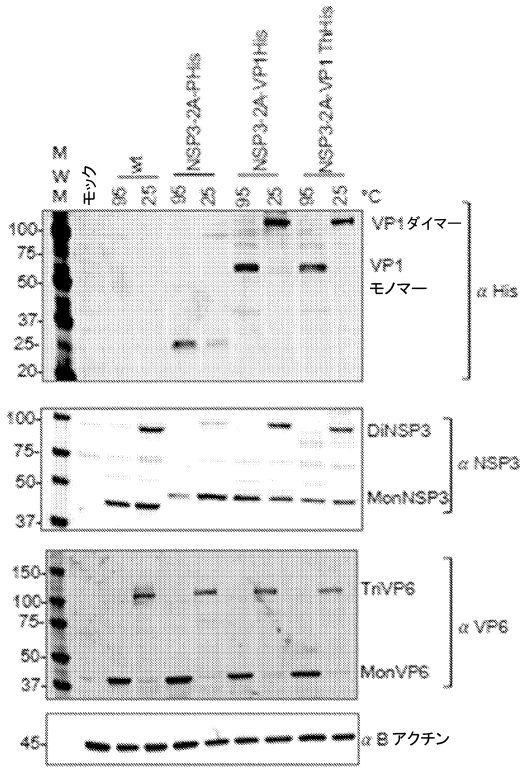



FIG. 6B

【図７Ａ】

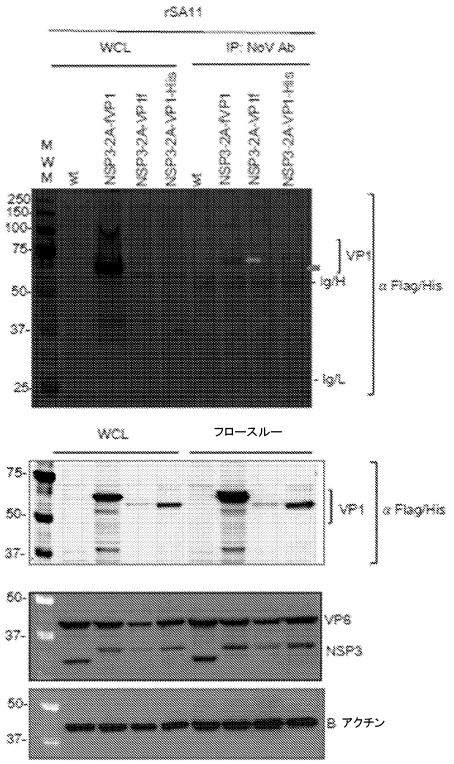



FIG. 7A

【図７Ｂ】

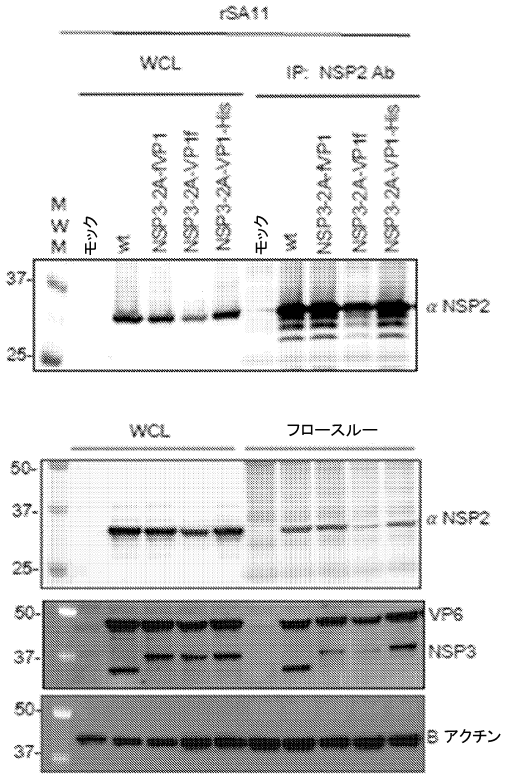



FIG. 7B

【図８Ａ】

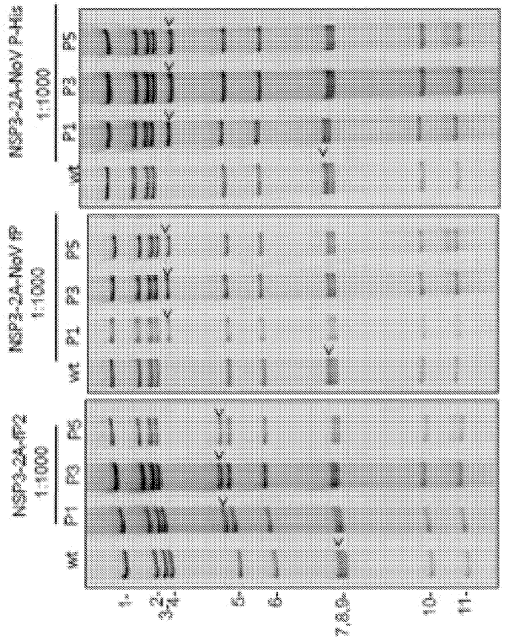



FIG. 8A

【図８Ｂ】

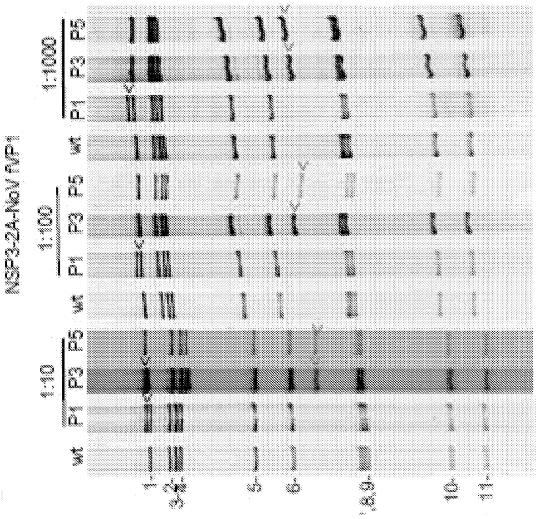



FIG. 8B

【図８Ｃ】

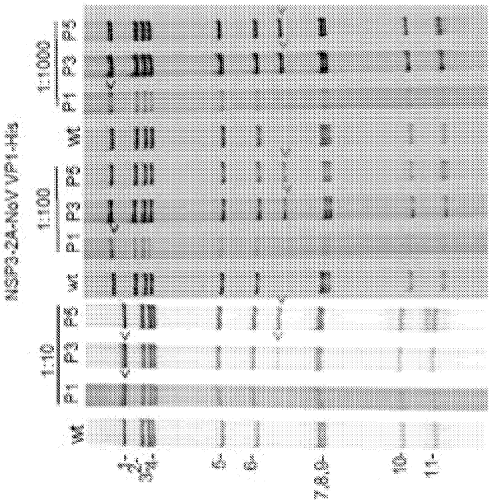



FIG. 8C

【図８Ｄ】

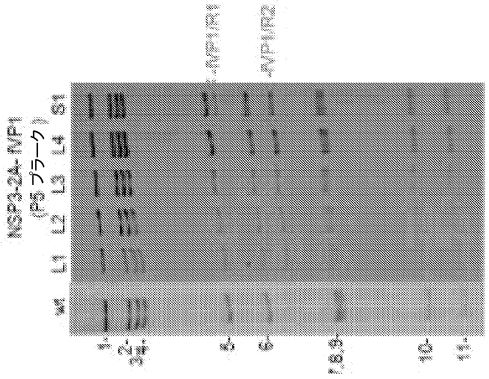



FIG. 8D

【図８Ｅ】

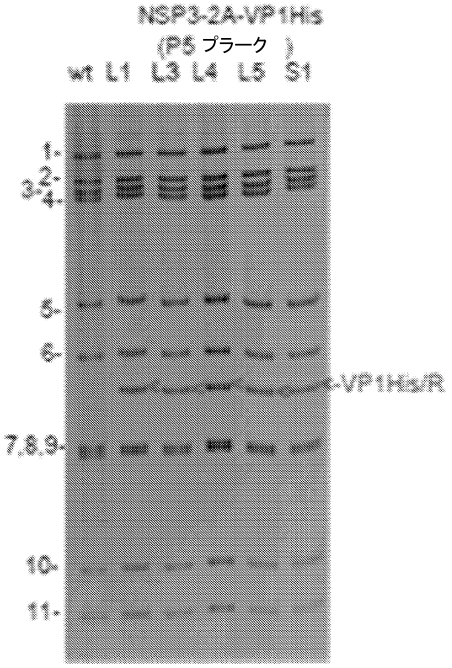



FIG. 8E

【図８Ｆ】

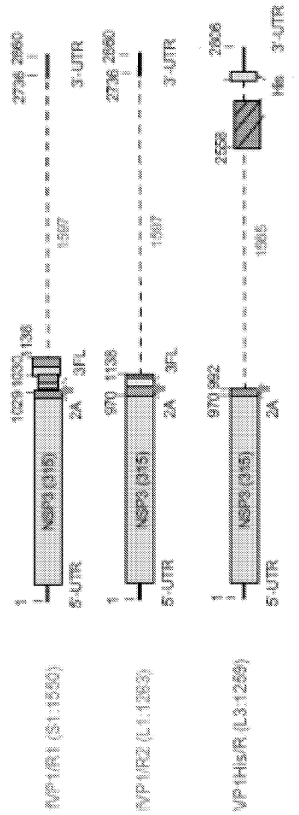



FIG. 8F

【図９Ａ】

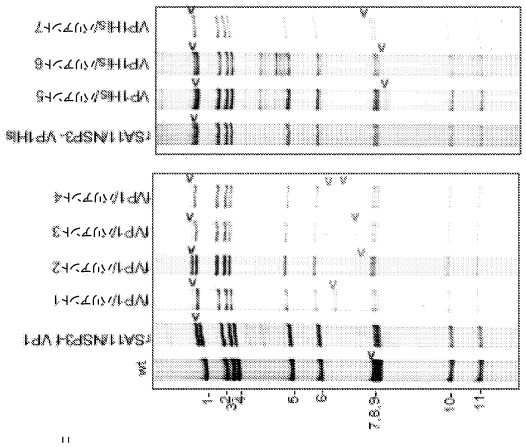



FIG. 9A

【図９Ｂ】

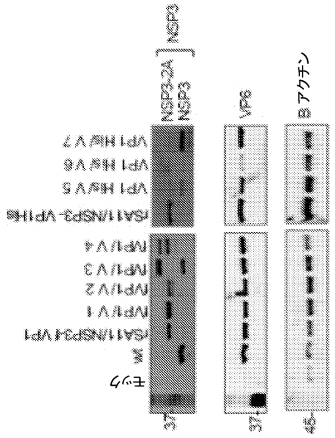



FIG. 9B

【図９Ｃ】

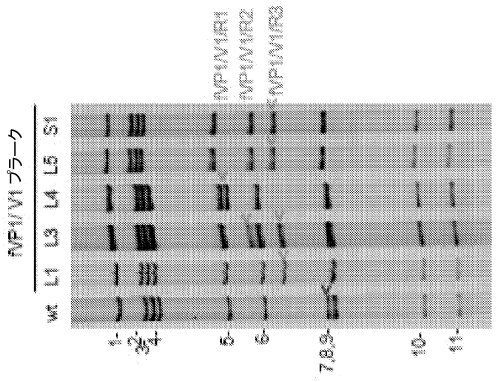



FIG. 9C

【図９Ｄ】

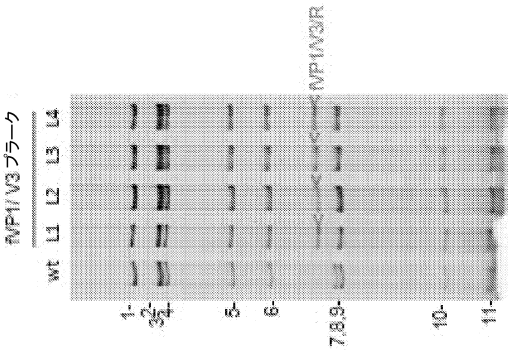



FIG. 9D

【図９Ｅ】

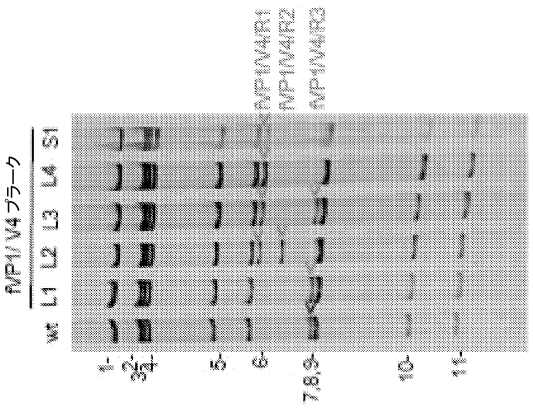



FIG. 9E

【図９Ｆ】

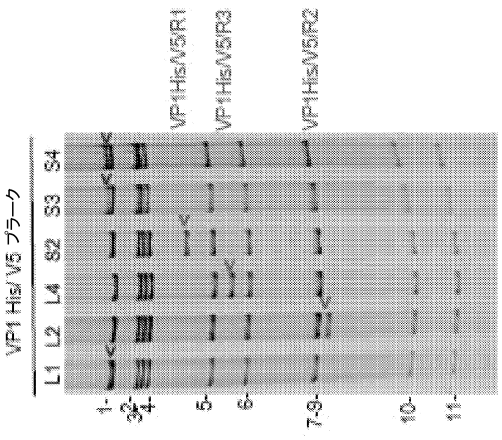



FIG. 9F

【図９Ｇ】

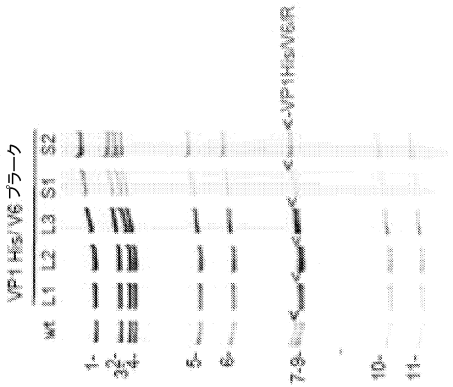



FIG. 9G

【図９Ｈ】

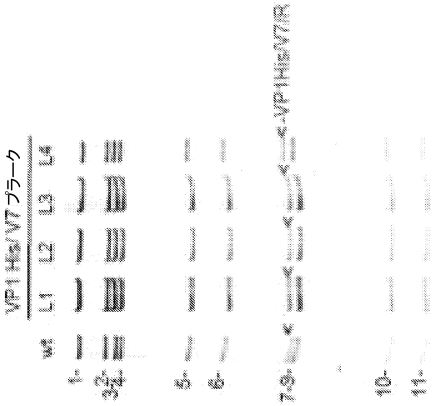



FIG. 9H

【図９Ｉ】

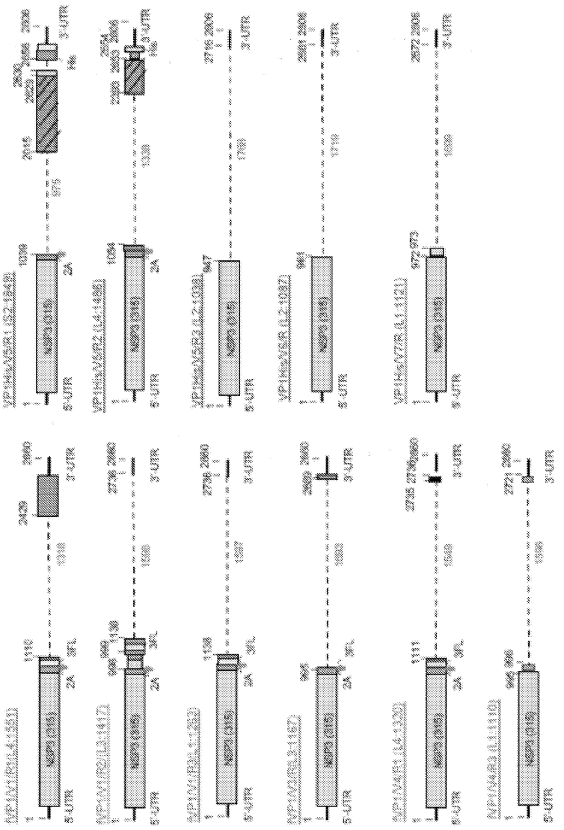


FIG. 9I

【図１０Ａ】

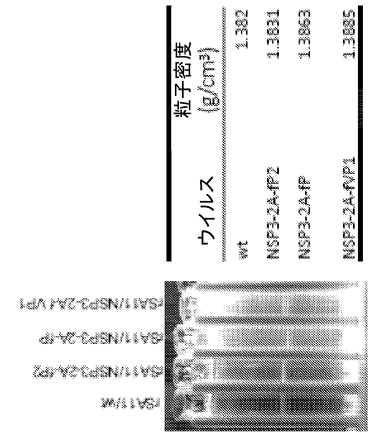



FIG. 10A

【図１０Ｂ】

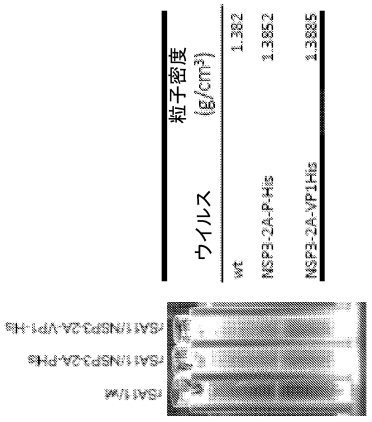



FIG. 10B

【図１０Ｃ】

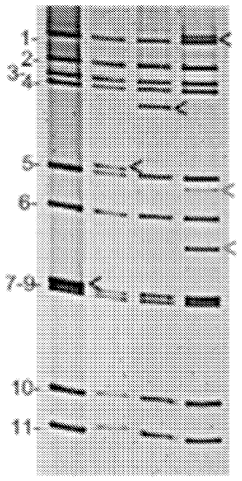



FIG. 10C

【図１０Ｄ】

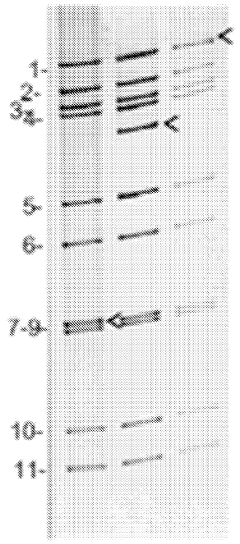



FIG. 10D

【図１１】

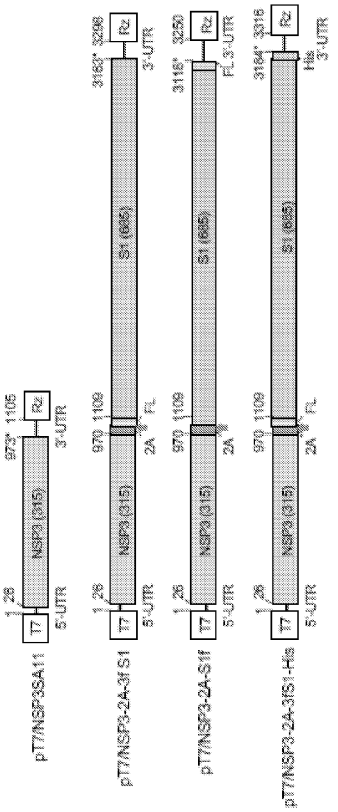



FIG. 11

【図１２Ａ】

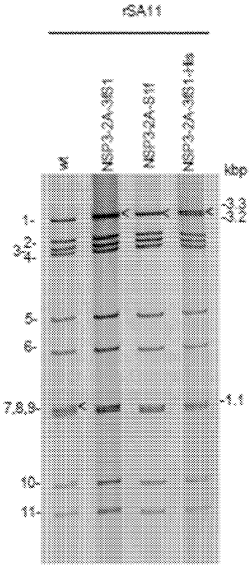



FIG. 12A

【図１２Ｂ】

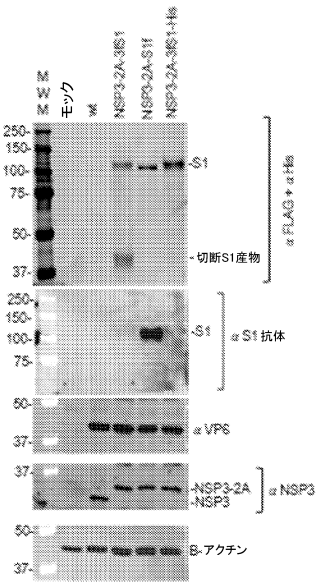



FIG. 12B

【図１２Ｃ】

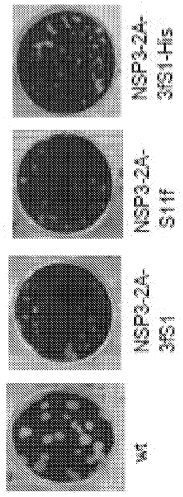



FIG. 12C

【図１２Ｄ】

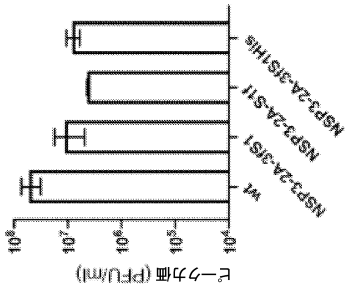



FIG. 12D

【図１３】

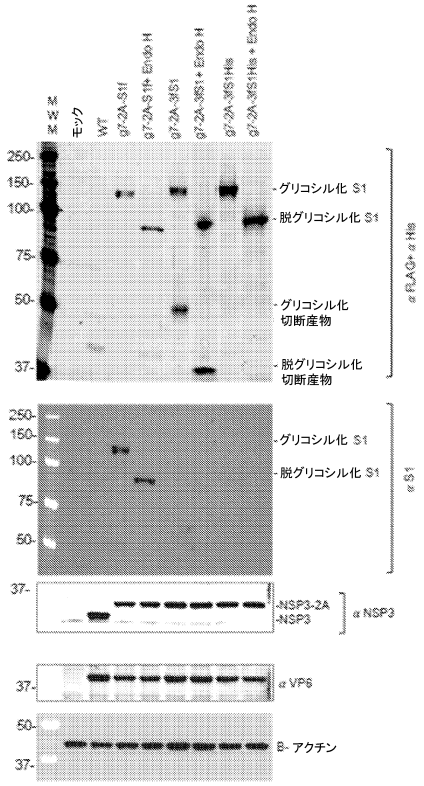



FIG. 13

【図１４Ａ】

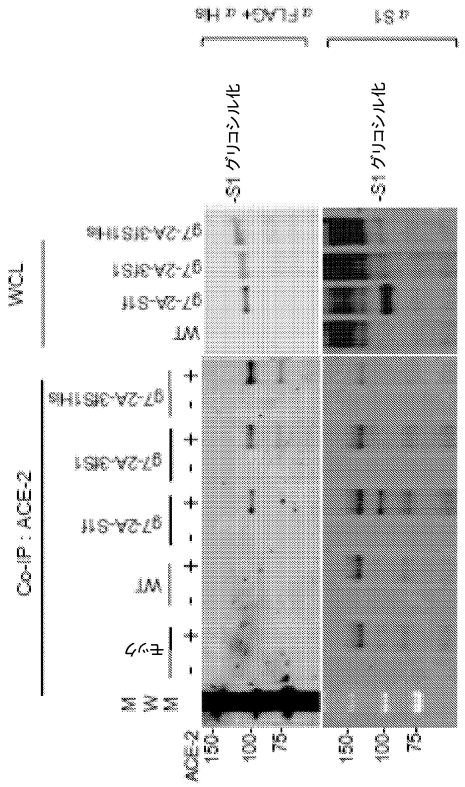



FIG. 14A

【図１４Ｂ】

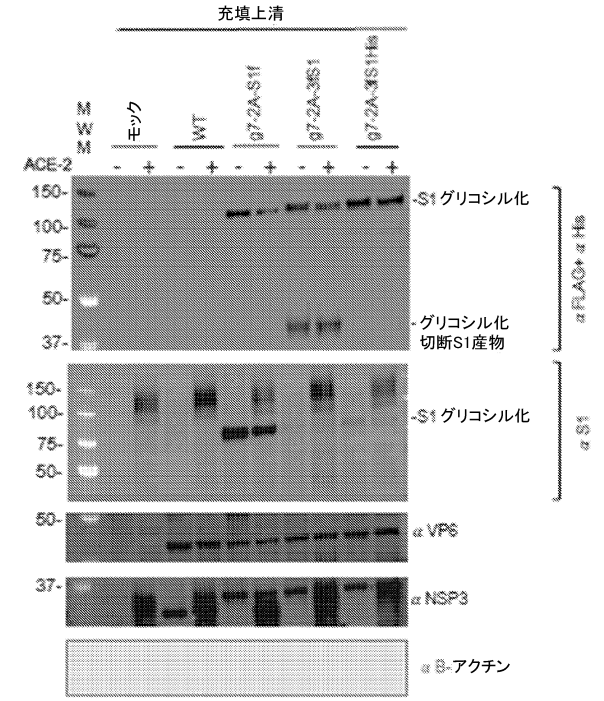



FIG. 14B

【図１５】

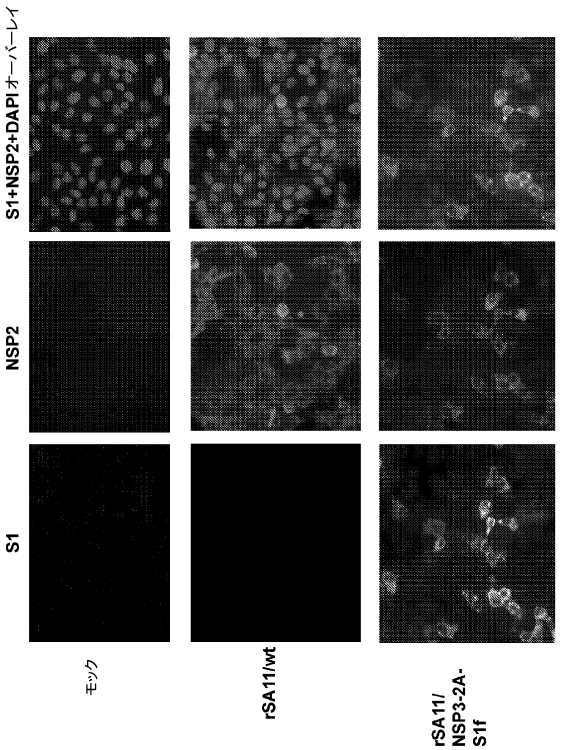



FIG. 15

【図１６Ａ】

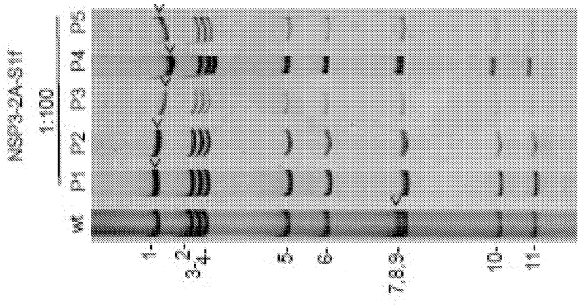



FIG. 16A

【図１６Ｂ】

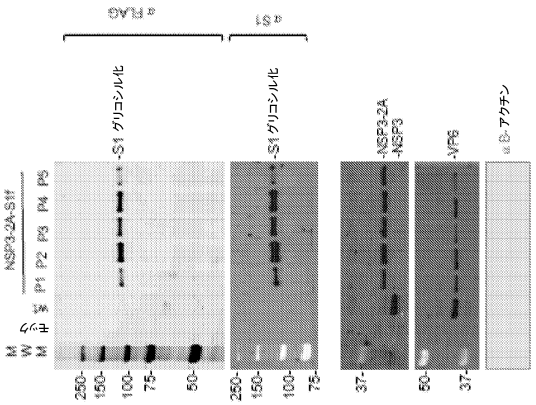



FIG. 16B

【配列表】
20245408940000001.xml

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/78305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 39/00, A61K 39/12 (2023.01)
ADD. C07K 14/005, A61K 39/15 (2023.01)
CPC - INV. C07K 14/005
ADD. C07K 2319/00, C12N 2720/12322, A61K 2039/5258
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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>Y | US 2021/0269488 A1 (THE TRUSTEES OF INDIANA UNIVERSITY) 02 September 2021 (02.09.2021); para [0006], [0066], [0093], [0100], [0103], [0105], [0115]; Figure 6A; claim 1-2, 7, 9, 29 | 1-5, 7-11, 19-20, 22, 24-28, 31-33, (36-37)/(1-5, 7-11, 19-20, 22, 24-28, 31-33)<br>6, 21, 23, 29-30, (36-37)/(6, 21, 23, 29-30) |
| Y | WO 2008/009727 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECERCHE SCIENTIFIQUE) 24 January 2008 (24.01.2008); pg 6, ln 19-24 | 6, (36-37)/(6) |
| Y | US 5,952,474 A (KAYMAN et al.) 14 September 1999 (14.09.1999); abstract; col 6, ln 49-52; col 24, ln 18-26 | 21, 29-30, (36-37)/(21, 29-30) |
| Y | WO 2010/042490 A1 (BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION) 15 April 2010 (15.04.2010); para [0121]; claim 14 | 23, (36-37)/(23) |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 05 January 2023 | FEB 22 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Kari Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/78305

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/78305

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 38-48, 59-62
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---See Supplemental Box ---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-11, 19-33, (36-37)(in part), limited to sequence encoding an RV NSP3 of SEQ ID NO:1 and a bacterial peptide or protein

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 22/78305

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-37, directed to a polynucleotide comprising:
a sequence encoding a rotavirus (RV) NSP3 protein; and a heterologous polynucleotide. The polynucleotide will be searched to the extent that the polynucleotide encompasses wherein the sequence encoding an RV NSP3 is a sequence encoding SEQ ID NO: 1, and wherein the heterologous polynucleotide comprises a bacterial peptide or protein (note, these are the first claimed viral polypeptide sequence encoded by the inventive polynucleotide). The first named invention was determined based on combination of the first claimed viral polypeptide sequence encoded by the inventive polynucleotide sequence (claim 6) and the heterologous polynucleotide (claim 11) for the inventive polynucleotide embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-11, 19-33, (36-37)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the polynucleotide encompasses wherein the sequence encoding an RV NSP3 is a sequence encoding SEQ ID NO: 1, and wherein the heterologous polynucleotide comprises a bacterial peptide or protein. Additional polynucleotide(s) encoding additional polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected polynucleotide(s) encoding additional polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a polynucleotide wherein the sequence encoding an RV NSP3 is a sequence encoding SEQ ID NO: 1, and wherein the heterologous polynucleotide comprises a NoV VP1 protein of SEQ ID NO:24 (claims 1-10, 12-15, 19-33, (36-37)(in part)).

Group II, claims 49-58, directed to a method of generating recombinant rotavirus (RV) in vitro.

Group III, claims 63-69, directed to a system, platform, or kit for generating recombinant rotavirus (RV).

The inventions listed as Groups I+, II and III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features
The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid and/or nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence encodes a unique peptide, and is considered a distinct technical feature. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.
Additionally,
Group I+ has the special technical feature of a polynucleotide comprising:
a sequence encoding a rotavirus (RV) NSP3 protein; and a heterologous polynucleotide, that is not required by Groups II and III.
Group II has the special technical feature of a method of generating recombinant rotavirus (RV) in vitro, that is not required by Groups I+ and III.
Group III has the special technical feature of a system, platform, or kit for generating recombinant rotavirus (RV), that is not required by Groups I+ and II.

Common technical features

Groups I+, II and III share the technical features of including:
a polynucleotide comprising:
a sequence encoding a rotavirus (RV) NSP3 protein; and a heterologous polynucleotide.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2021/0269488 A1 to The Trustees of Indiana University (hereinafter "Indiana Univ").

Indiana Univ discloses a polynucleotide comprising: a sequence encoding a rotavirus (RV) NSP3 protein (claim 1 - "A recombinant rotavirus comprising a gene segment including a nucleotide sequence encoding rotavirus nonstructural protein 3 (NSP3)"); and a heterologous polynucleotide (claim 1 - "and a nucleotide sequence encoding a non-rotavirus polypeptide, wherein the NSP3 and the non -rotavirus polypeptide are encoded by a single open reading frame"). Indiana Univ further discloses wherein the heterologous polynucleotide encodes peptide or protein comprises a bacterial peptide or protein (para [0115] - "cloning of bacterial genes into the rotavirus genome could lead to the recombinant viruses capable of inducing protective immune responses against bacteria in vaccines").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I+, II and III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 38-48, 59-62 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/40* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/40 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/50* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/50 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/52* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/52 | Ｚ | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *7/01* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 7/01 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *39/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 39/00 | Ｈ | |
| *Ａ６１Ｐ* | *31/12* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 31/12 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *31/14* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 31/14 | | |

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

ー・ツリー・プレイス・１１１０

Ｆターム（参考） 4B065 AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA45

4C085 AA03 BA99 GG01