

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6246199号
(P6246199)

(45) 発行日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(24) 登録日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/115 (2006.01)	C O 7 K 14/115
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 28 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-520648 (P2015-520648)
(86) (22) 出願日	平成25年7月2日(2013.7.2)
(65) 公表番号	特表2015-528697 (P2015-528697A)
(43) 公表日	平成27年10月1日(2015.10.1)
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/049069
(87) 国際公開番号	W02014/008263
(87) 国際公開日	平成26年1月9日(2014.1.9)
審査請求日	平成27年6月22日(2015.6.22)
(31) 優先権主張番号	61/667,194
(32) 優先日	平成24年7月2日(2012.7.2)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	501051125
	ザ ヘンリー エム. ジャクソン ファ ウンデーション フォー ザ アドヴァン スメント オブ ミリタリー メディシン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド州 ベセス ダ ロックレッジ ドライブ 6720ー エイ スイート 100

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パラミクソウイルスおよび使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 1 のヌクレオチド配列の少なくとも 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,050、1,100、1,150、1,200、1,250、1,300、1,350、1,400、1,450、1,500、1,550、1,600、1,650、1,700、1,750、1,800、1,850、1,900、1,950、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、5,500、6,000、6,500、7,000、7,500、8,000、8,500、9,000、9,500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、または 18,000 個の連続したヌクレオチドまたはその相補体のヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

分子が DNA である、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

前記宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 10】

ポリペプチドを産生するための方法であって、タンパク質産生を促進する条件下で請求項 6 に記載の宿主細胞を培養することと、培養物から前記ポリペプチドを単離することと、を含む、方法。

【請求項 11】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 12】

単離されたポリペプチドであって、

a. 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの N タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

20

b. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

c. 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

d. 配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの P タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

e. 配列番号 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

f. 配列番号 3 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

g. 配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの C タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

h. 配列番号 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

i. 配列番号 4 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

30

j. 配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの M タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

k. 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

l. 配列番号 5 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

m. 配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの F タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

n. 配列番号 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

o. 配列番号 6 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

p. 配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの G タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

40

q. 配列番号 7 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、

r. 配列番号 7 のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

s. 配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスの L タンパク質の抗原性を有するポリペプチド、

t. 配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および、

u. 配列番号 8 のアミノ酸配列からなるポリペプチド

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のポリペプチドまたはその相補体をコードする単離されたポリヌクレオチド。

50

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記分子がDNAである、請求項 14 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 19】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

前記宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 12 に記載のポリペプチドを産生するための方法であって、タンパク質産生を促進する条件下で請求項 17 に記載の宿主細胞を培養することと、培養物から前記ポリペプチドを単離することと、を含む、方法。

【請求項 22】

請求項 12 に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片であって前記ペプチドに特異的に結合する断片。

20

【請求項 23】

前記抗体が、モノクローナル抗体もしくはその断片、ポリクローナル抗体もしくはその断片、ヒト化抗体もしくはその断片、組換えにより産生された抗体もしくはその断片、またはキメラ抗体もしくはその断片である、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスのNタンパク質の抗原性を有するポリペプチドに特異的に結合する請求項 22 に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含むワクチン。

【請求項 25】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を有し、パラミクソウイルスのNタンパク質の抗原性を有するポリペプチドに特異的に結合する請求項 22 に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、ヘンドラウイルス、ニパウイルス、シダーウイルス、または他のパラミクソウイルスの感染の治療用または予防用組成物。

30

【請求項 26】

試料中のパラミクソウイルスを検出する方法であって、配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチドの少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドからなる断片を含むプローブ又はプライマーを用いて検出する方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む組換えウイルス。

40

【請求項 28】

前記ウイルスが弱毒化ウイルスである、請求項 27 に記載の組換えウイルス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本発明は、シダーウイルスと呼ばれる新規のウイルス、およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

50

ヘニパウイルスは、オーストラリアおよびマレーシアでの家畜およびヒトにおける病気の発生で1990年代に最初に発見された(1、2)。これらのウイルスは、パラミクソウイルス科の唯一の既知のバイオセーフティレベル4(BSL4)剤を含み(3)、死亡率は、ウイルス、動物種、および発生の地理的位置に応じて、ヒトおよび動物の両方ともに40%~100%である(4、5)。パラミクソウイルス亜科のヘニパウイルス属は、現在、これら両ウイルスの主な天然リザーバーと特定されている、一般にフオオコウモリとして知られているフルーツコウモリのヘンドラウイルス(HeV)およびニパウイルス(NiV)の2員のメンバーを含む。しかしながら、血清学的証拠は、ヘニパウイルスが他のタイプのコウモリ(7~10)においても循環し得ることを示唆する。

【0003】

10

ヘニパウイルスの発見は、我々のパラミクソウイルスの総合的な理解に大きな影響を及ぼしている。実際、麻疹ウイルスおよびイヌジステンパーウイルスなどのパラミクソウイルスは、狭い宿主範囲を有し、パラミクソウイルスの全てのメンバーによって共有される均一なゲノムサイズに近く、遺伝的に安定していることで知られている(3)。しかしながら、ヘニパウイルスは、これらのウイルスがはるかに広い宿主範囲および著しく大きいゲノムを有するため、これらのパラダイムをシフトさせた(6)。

【0004】

近年、ヘニパウイルスの研究で、機能細胞受容体を識別することに成功し、新しい診断、ワクチン、および治療法の開発を推進してきた(15~25)。しかしながら、一つには生の感染症研究を行うために必要な高いセキュリティ(BSL4)の施設の必要性により、また一つには現在の動物モデルで使用される利用可能な研究手段の限られた数により、これらの非常に致死的なウイルスの病因についてはほとんど理解されていない。ヘニパウイルス病因の機構の研究はまた、比較病原研究に用いることができる、関連する非病原性または低病原性のウイルスの欠如によって妨げられている。

20

【0005】

中国や他の地域における最近の血清学的調査は、異種のコウモリにおけるヘニパウイルスへの、交差反応性だが必ずしも相互中和性でない抗体の存在を示した(8)。アフリカのコウモリにおけるヘニパウイルスのようなゲノム配列の検出は、血清学的調査から取得された結果を更に裏付ける(26)。

【0006】

30

本明細書に開示された本発明は、新たに発見されたヘニパウイルスの単離および特徴付けを対象とする。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、シダーウイルスと呼ばれる新規のウイルス(「CedPV」)、およびその使用方法を対象とする。

【0008】

本発明はまた、個々のタンパク質およびその断片、ならびにCedPVを構成する個々のタンパク質のコード配列を対象とする。

【0009】

40

本発明はまた、CedPVに特異的に結合する抗体または断片を対象とする。

【0010】

本発明はまた、CedPVの少なくとも一部を含むワクチンおよび/または他の治療用組成物を対象とする。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】パラミクソウイルス亜科において既存の5種類の模範ウイルスのものと比較した、CedPVのゲノムサイズおよび組織を示している。コーディングおよび非コーディング領域の各々は、一定の縮尺で描かれている。全てのパラミクソウイルスのゲノムに存在する6個の主要な遺伝子が、以下のように示される: 影付き = RNAポリメラーゼおよび

50

ヌクレオカプシド遺伝子 (N、P、および L)、斜線 = 包絡膜タンパク質遺伝子 (F および 付着タンパク質)、点線 = マトリックスタンパク質 (M)。ムンプスウイルスのゲノムにおける小さなものは、遺伝子 (SH) が通常、亜科のメンバー間で共有されていないことを表す。

【図 2】異なるヘニパウイルス間のゲノムの特徴の比較を示している。(A) リーダおよびトレース配列の整列 (アンチゲノム配列を示す)。(B) 遺伝子間領域 (IGR) の配列、ならびに HeV および NiV のものと比較した、CedPV の転写開始および停止部位。

【図 3】選択したパラミクソウイルスの系統樹を示している。2A: 樹は、N タンパク質配列のウイルス名 (略称) に基づき、GenBank 受託番号は以下の通りである: トリパラミクソウイルス 6 (APMV6) AY029299、大西洋サーモンパラミクソウイルス (AsaPV) EU156171、Beilong ウイルス (BeiPV) DQ100461、ウシパラインフルエンザウイルス 3 (bPIV3) AF178654、イヌジステンパーウイルス (CDV) AF014953、シダーウイルス (CedPV) JQ001776、Fer ドランスウイルス (FdlPV) AY141760、ヘンドラウイルス (HeV) AF017149、ヒトパラインフルエンザウイルス 2 (hPIV2) AF533010、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 (hPIV3) Z11575、ヒトパラインフルエンザウイルス 4a (hPIV4a) AB543336、ヒトパラインフルエンザウイルス 4b (hPIV4b) EU627591、J ウイルス (JPV) AY900001、メナングルウイルス (MenPV) AF326114、麻疹ウイルス (MeV) AB016162、モスマンウイルス (MosPV) AY286409、Mapeura ウイルス (MprPV) EF095490、ムンプスウイルス (MuV) AB000388、ニューカッスル病ウイルス (NDV) AF077761、ニパウイルス、バングラデシュ菌株 (NiV-B) AY988601、ニパウイルス、マレーシア菌株 (NiV-M) AJ627196、パラインフルエンザウイルス 5 (PIV5) AF052755、小反芻獣疫 (PPRV) X74443、ブタルブラウイルス (PorPV) BK005918、牛疫ウイルス (RPV) Z30697、セーラムウイルス (SalPV) AF237881、センダイウイルス (SeV) M19661、シミアンウイルス 41 (SV41) X64275、ティオマンウイルス (TioPV) AF298895、Tupaia パラミクソウイルス (TupPV) AF079780。(B) 樹は、全ゲノム配列に基づく。(C) 樹は、L 遺伝子の 550 ヌクレオチドの領域に基づく。

【図 4】CedPV P 遺伝子の編集部位と比較した、HeV および NiV 用の P 遺伝子の編集部位のための配列決定トレースファイルを示している。トレースファイルは、感染細胞中の HeV および NiV P 遺伝子 (*印で示される) の編集と CedPV P 遺伝子の mRNA における編集の欠如とを示している。CedPV の P 遺伝子の全部の潜在的な編集部位に及ぶ PCR 産物の配列決定は、いかなる RNA 編集活性も明らかにしなかった。CedPV P 遺伝子の代表的な潜在的編集部位が示されている。

【図 5】CedPV および HeV の間の抗原交差反応性を示している。CedPV および HeV に感染したベロ細胞はそれぞれ、各ウイルスの組換え N タンパク質に対して惹起されたウサギ血清で染色された。

【図 6】他のパラミクソウイルスとの CedPV の抗原交差反応性を示している。それぞれの J パラミクソウイルス (JPV)、牛疫ウイルス (RPV)、センダイウイルス (SeV)、メナングルウイルス (MenPV) および CedPV に感染ベロ細胞上の抗 CedPV 血清で実行される間接蛍光抗体 (IFAT) アッセイ。偽感染細胞単層は、陰性制御として含められた。反応性を示す唯一のパネルは、CedPV パネルである。

【図 7】CedPV のエントリ受容体としてエフリン B2 および B3 の機能テストを示している。エフリン遺伝子産物の存在下および非存在下での HeLa-USU 細胞中への CedPV の感染が示されている。受容体機能の間接的測定としての感染の感受性は、合胞体細胞変性効果 (CPE) の形成によって証明される。

【図 8】CedPV 感染フェレットの気管支リンパ節の免疫組織化学的分析を示している

10

20

30

40

50

。6日目に安楽死させられたフェレット#2の気管支リンパ節はそれぞれ、C e d P V (B) および N i V (D) の組換えNタンパク質に対するウサギ抗血清で染色された。(別の実験からのインフルエンザH5N1に感染した)無関係なフェレットの気管支リンパ節は、陰性制御として使用され、同一の条件下で同じ抗C e d P V (A) および抗N i V (C) 抗血清で染色された。

【図9】H e V および N i V 糖タンパク質とのC e d P V 糖タンパク質媒介性細胞-細胞融合およびヘテロ型混合の結果を示している。種々の標的細胞集団が凡例に示されている。

【図10】沈殿し、S D S - P A G E およびクマシーによって分析した、単独でまたはC e d P V - s G と予備混合された精製された可溶性エフリン - F C タンパク質を示している。分離s Gがマークされ、異なるエフリンタンパク質パターンが言及される。C e d P V - s G およびエフリンB2は、レーン3で共に近接で実行される。

10

【図11】エフリン受容体構築物にトランスフェクトすることにより調製され、次いで、C e d P V、H e v、N i V F およびG糖タンパク質のいずれかを発現するエフェクタ細胞を用いた細胞-細胞融合アッセイで使用されるH e l a - U S U 標的細胞集団の結果、および標準的な融合レポータ遺伝子アッセイが行われたことを示している。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、シダーウイルスと呼ばれる新規のウイルス(「C e d P V」)、およびその使用方法を対象とする。本発明はまた、個々のタンパク質およびその断片、ならびにC e d P V を構成する個々のタンパク質のコード配列を対象とする。

20

【0013】

本発明者らは、特定のヘニパウイルス中で新規のパラミクソウイルスを単離した。十分に確立されているように、ヘニパウイルス属は、パラミクソウイルス科のウイルスに属し、ヘンドラウイルス(H e V)およびニパウイルス(N i V)の両方を含む。十中八九、新たに単離されたC e d P V は、系統発生の研究に基づいたヘニパウイルス属に属するであろう(図3を参照されたい)。その分類に関わらず、本発明者らは、数ある特性の中でも、C e d P V がヘンドラウイルスと抗原特性を共有する新型ウイルスであることを本明細書で確立する。新たに発見されたC e d P V は、R N A の一本鎖を含有するR N A ウィルスである。

30

【0014】

ウイルスのゲノムは、配列番号1として本明細書に示される。

【0015】

【表 1】

1	accagacaaa	ggaagtctag	tctccggatt	aatcatatt	cgtatgatta	atcttaggat
61	cccggatatct	agaatctgga	tctggattcg	gtttaattga	attgcatcg	ttataaatt
121	agaaaggaga	tttactactc	aaaatgtctg	acattttcaa	tgagactcaa	tcatttagaa
181	actatcagtc	caacttaggc	agagatggca	gggccagtgc	agcaacgact	actttgacaa
241	ctaaagttag	gatctttggt	ccagcgaata	ataatccaaa	cctcagatgg	cgttttaacac
301	tattcttgat	ggatgtcgtg	aggtcacctg	cctccgcaga	gtctatgaaa	gtgggtgctg
361	ggatatacctt	ggtatctatg	tatgctgaaa	aaccggggc	tcttgtagaa	gcattattga
421	atgaccacga	tgttgaagcg	ataatcatag	atgtttatgg	ctttgatgaa	ggatttccta
481	taatggaacg	aagaggtgat	aaagctacag	atgacatgga	ttccctaaga	aagattgtta
541	aagctgcaca	tgatttcagc	agaggaagga	gtttatttgt	tgatcaaagg	gtccaggata
601	ttgttatgtc	agatatgggg	tcatttgatg	atgctattac	ttccatagag	acgcagatat
661	ggattttgat	cgcaaaggct	gtaactgccc	cagatcacagc	agaagagagc	gaaggaagaa
721	gatgggcaaa	atatgttcag	caaaagaggg	ttatcccttt	gttcttgatt	tctccacaat
781	ggatcaatga	catgagatcc	ctgattgccc	caagtctttc	gcttcgtaaa	ttcatgggtg
841	aactaccaga	ggaagctaag	aaaggacggg	ggacaaaagg	aagaataatg	gagatttgtat
901	ccgatatacg	aaattacggt	gaagagacag	gaatggcagg	gttcttcgct	acaataaagt
961	tcggtcttga	gaccaaattc	cctgctttgg	cacttaatga	gctccagagt	gacttgaaca
1021	caatgaaaag	tctcatgata	ctgtacagaa	gcataggacc	aaaggccccc	tttatgggtg
1081	tggttggaaga	ttcaattcag	accaaatttg	ctccagggaag	ctatccactt	ctttggagtt
1141	ttgcgatggg	tgtaggcaca	actattgaca	gagctatggg	tgcttgaac	attaacagaa
1201	gttatcttga	acctgtctat	tttaggctag	ggcaacaatc	agctaaacat	caagcaggaa
1261	atgttgacaa	agaaatggca	gaaaagttga	gattgacaga	agaccagatc	gtgcacatat
1321	cagctaattgt	gaaggatgca	agtcaaggta	gagatgacaa	tcaaataaac	atccgagaag
1381	ggaagttcac	aaatgttggt	gatgacatcc	aggatcatgc	ccagagttcc	tctgaggatt
1441	acaatcctag	taaaaagagt	ttctcaatat	tgacgagcat	cacatccacc	gtagatagtg
1501	ctgacagtag	gtctgcaatg	aatgagtcac	tgacaacaac	atccttgctg	aaattgagac
1561	agaggctggc	agagaagaaa	ggagactcca	agaacagtca	agacacacct	ccaaaaccac
1621	ccagagcaaa	agatcaaccc	actgatgagg	tctccttcat	ggattccaat	atatgatcag
1681	aatgatgggt	aaaatcaacc	aactaagggc	gcgtagagta	ccttcagata	gaacactaca
1741	ttaatcggtg	gaaacaatag	atttatgggt	ttggtgctta	atcttttatt	aatcttactt
1801	gcaaaacagg	cagctgctac	actcgtaacc	actcctcaca	gtaagggcaa	caagggtcat
1861	agaacttatg	cctatagatt	acctctatct	gtatatctag	ctatgattaa	aatgtatact
1921	tctgctgacc	ggtttttctag	caacagtcac	cattattact	ttatgggtat	tttttaatac
1981	acctttttata	atcaaatata	ttacaaaaaa	cttaggatcc	aagtgggtcca	aacttttttt
2041	gatcaagagt	catattgggt	actttaggag	gacacttta	acacaaattg	ttacaagagg
2101	atattcatca	gatggacaaa	ctacaattga	ttgaagatgg	cctctctact	atcaatttta
2161	tacaggaaaa	taaggaaaaa	ttacagcatt	cttacggaag	atcctccatc	agagagccac
2221	ccacaagtgt	cagggttgaa	gagtgggaga	aatttattcg	aaagatcgct	tctggacctg
2281	aacaagttca	agggggagga	tctgagactg	agatcacagg	cgataatgga	gatagaggca
2341	atttttacca	tcctgatcag	ggagggcgag	tcacaggaca	attcgaagaa	aggtatcaaa

10

20

30

【 0 0 1 6 】

2401 aatgggggtc acaagattca gaattacaac tggaccaaat ggttgtagac gattttcttct
 2461 atgacgagag aagggagaat cccgacaatg gaaaatatga ccgcagctct aaaaaacggg
 2521 ataatatcag agaaggaaca cgacaggata agtacaataa tcagtctact gatgaattac
 2581 tgtcctgcct acaaccatct tctaagaacg atgtcatcaa gaatgaaagt acatcagtgt
 2641 caaatttgca tgttacagga aataaactga atcctgacgc aaaacccttt gaaccacct
 2701 ccagtcgaa agagcaccca accaccacac agcacaacaa aaatgaccat cagaccgatg
 2761 atgattataa gaatagaaga tccagtgaaa acaatgtgat ctctgatcat gccaccacaa
 2821 tggaagacaa caacaatttt atccccggcg ccaaaagaaa gaatgcattg agcgaaccca
 2881 tatacgtcca ggtattgccc tcaaacacag agggtttctc gggaaaagat tatccactcc
 2941 tcaaggacaa ctctgtcaag aagcgtgcag agccagtcac cctagaaact gccaacacc
 3001 ctgcaggctc tgccgaccaa gacacaatc agattgaaga aaacatgcag ttcaaccttc
 3061 caaaactgct cacagaagat acagacgatg aaccagagga taacaatgat tccatgcctc
 3121 ttgaggaaga cattagagag atcggttcca tgctaaaaga tggaaacaaa gatatacaaga
 3181 caaggatgaa tgagatagat gacgcaatca agaagataaa taagaaatca aaaaatagaa
 3241 gtctggatct agaatcagac ggtaaaagatc aggggagaag agatccatca gtagacctcg
 3301 ggattaaaaa aagaaaaggaa gggctaaggc cgcgaatgca aaagacaaaa gagcaattgt
 3361 ctataaaaagt ggagagagag attggattga acgacaggat atgtcaaaat tcgaagatga
 3421 gtacagaaaa gaaattgata tatgtcggga tggaatgga gtatggacaa acgagtactg
 3481 ggtcaggagg tccacaagga tcaaaggatg ggacttctga tgatgtccag gtagacgaag
 3541 actacgatga aggggaagac tatgaggcta tgccgtcaga taggttttat acaacattat
 3601 caggtgaaca aaaggataga tttgatctag atgtcaacca aatgtctcag tatgacctcg
 3661 aggccagggt ggatgaatta accagaatga atctcactat ctattctaga ttagaaacta
 3721 ctaataagtt gcttattgac atattagatc tagctaaaga aatgccaaag ttagttagaa
 3781 aagtggataa tcttgagaga cagatgggta acttgaatat gttaacctct acccttgagg
 3841 gtcacctate ttctgtaatg attatgaatc ccggtaaagg taagagcgaa aaggaaatcc
 3901 ctaaaaatcc ggacctgaga ccaatactgg ggagaagcaa cacgtcgtta actgatgta
 3961 tcgacctaga ccattaccct gataaaggct ccaaaggat caaaccaagt ggatctggag
 4021 acagacagta catcggtctc ttagagagca aattttctat aaatgatgag tacaattttg
 4081 ctccataccc tatcagggac gaactcctat tgccagggtt aagagatgac aaaaccaatg
 4141 cttcatcggt catcccagat gacacggaca ggtctccaat ggtgctcaaa ataataattc
 4201 gacagaacat ccatgatgaa gaagtgaagg atgagctact gtccatacta gaacaacata
 4261 acactgtgga ggaattgaat gaaatatgga atactgtgaa tgattacctc gatggcaaca
 4321 tctgattaac agatattgag attgatccta ttctaataca gtaatctctg ataattgtag
 4381 tatggaataa gaataactat cacactattg tactcttgta gaatcttaac gagtgtctaa
 4441 tgcagatttt tagcaacaca tactaataac ttgtaatcca tttctcctta ttccatttaa
 4501 tctcacatta gaaaaaactt aggatcccag atttgcaaag tcaaaacggg atctactatc
 4561 aggtgttgga gctaacaata gcggagtctg cataacaaat agcgttcaaa gaagtttgaa
 4621 aaccatcata gaatatggat ccgtcagatt tgaggaggat tataatggag gatgataaga
 4681 gtctgtgcaa caatgatgat agtacagaaa ctgattttct cgagaaaaat tggagaaag
 4741 ggagtaagat tgacaagatc acaccagagg ttgatgaaaa cggaatgatg gtccccagt
 4801 acgttgtctt caaccggggg aaaaatgaga ggaaaacatc cggatatcaa tatatgattt
 4861 gttatggttt cattgaggat ggacctatca atggctcacc aagagtcaaa ggtaatatca
 4921 gaaccaccgc ttcttttctt ttgggtgttg gaaaaactta ctctgtctca gaagagatct
 4981 tacaagagct gacaacactc aagatcactg tcagaaggac agccggatca aatgagaagt
 5041 tgggtgatgg aataacaggg ccttttaaatc acctttaccc gtggtataaa gttttgacag
 5101 gtggctccat ttttagtgcg gtgaaggctc gtaggaatgt ggatcaaat ctattagaca
 5161 gaccccaaat acttagagta ttctttctaa gtataactaa attaacagat aaagggtgtg
 5221 atatgatacc caaaagtgtt ctgcacttca gatcggataa ttcatggtcc ttcaatctgc
 5281 ttgtgtatct caagatagac actgacatca ccaaagcagg catcagaggg attgtcaaca
 5341 aagaagggga gaggataacg tcattcatgt tacacatcgg taactttaca agaagaggag
 5401 gaaaacatta ctcatgggag tattgcaaaa ggaaaattga caaaatgaag ctcacattcg
 5461 ccttaggcac tatagcggt ctaagcttac atatcaggat cgatggaagg ataagtaaaa
 5521 ggctccaagc acaagtggc tttcagagaa acatttgcta ctactaatg gacacaaacc
 5581 catggttgaa taaattaacg tggaacaata gttgtgaaat acacaaagtc accgctgtca
 5641 ttcagccatc tgtgcaaaag gacttcatgt tgtatgagga catcttaata gataatacag
 5701 gcaagatctt aaaataaagt aggagagtca gtcattaccc agtatattga atactaatga
 5761 caactttatt aatccaattc tatctccaqt tactagaatt tctaaaacaa ttctactcct

10

20

30

40

5821 cagcaacgca tctcaaacat tgtgatcttc aattatgac gacgcattgt aatctatata
 5881 gcttttagtt catgaaatac taaaaagggc ttaatcttgt aagttctcag caaatactcc
 5941 aatgcaaaag agcgccctca catctcaagc agcaccacaa taaaccacaa tcaatgtgca
 6001 acaagagcaa tcgtctaaag tgtgaaaacc aaaatcacag atcagaaagg gcacatattt
 6061 cagtcctgta aaaataccaa gtgggattaa taaaagagga tcaatcctta tcattttaag
 6121 aaaaacttag gatcccagag atcctaaaga gccaatcctt ttatattttg atcttgaagg
 6181 gctagaagtc aggctgaaac acagagggtg aggaacacag gaactaaaat tgatgaaatc
 6241 aaccttagct caacatctaa tcaatcaagc ttaagtcac ctaatactgt atacaaccag
 6301 cagcgtagag agtggatttg atttcggcac ccttgcgag tgaaggctat tactgcctgt
 6361 cctttcaatc agaaaattac atttaccat aaagtaatct caacatgtct aacaagagga
 6421 caacagattt gatcataata agctatacgt tattttattt gaataatgca gcaattgtag
 6481 ggtttgattt tgataaattg aataaaatag gtgtgggtgca agggagagtc ctaaattata
 6541 aaattaaagg agatccaatg acaaaagacc ttgtcttgaa atttatccct aacatagtga
 6601 atatcactga atgtgtgaga gagcccttga gtaggtacaa tgagaccgtg aggagattgc
 6661 ttttacctat acacaacatg cttgggttat acttgaataa cacaaatgct aaaaatgactg
 6721 ggttgatgat cgcggggtgtg atcatgggtg ggatagcaat aggtatagcc acagcagctc
 6781 agatcacagc aggttttgct ctttatgagg caaaaaagaa cacagaaaaa attcagaaa
 6841 taacagacag catcatgaaa acacaggatg cgattgataa acttactgac agtgtgggga
 6901 caagcactat tatattgaat aagctacaga catacatcaa caatcaactg gtaccaaatc
 6961 tagagcttct atcctgccga caaaacaaaa ttgagtttga tctaattgta accaagtatt
 7021 tgggtgatct tatgactgtt attggctcta atatcaataa tctgtttaat aaagatatga
 7081 ctattcaatc tttgtcactt ctttttgatg gcaattatga tataatgatg tcagaacttg
 7141 gttatacacc tcaggatttc ttagatttga tagagagtaa gagtataaca gggcaataa
 7201 tttatgttga tatggaaaac ttgtacgttg tgatcaggac atatctacct accctaattg
 7261 aagtcactga tgcccaataa tatgagttca acaaaataac tatgagtagc aatggaggag
 7321 aatacttgct aaccatacct aatttcatat taataagagg taattatatg tctaattatg
 7381 atgttgcaac atgttatatg accaaagcaa gcgtaatttg taatcaagat tattcactcc
 7441 cgatgagcca aaacttaaga agctgttatc aagggtgagac agaatactgt cctgttgagg
 7501 cagtcacgcg gtcacactct ccaagatttg ctcttacaaa tggagttatt ttcgcaatt
 7561 gtataaatac aattttagag tgtcaagaca atggtaagac tatcactcaa aacataaacc
 7621 aattcgtaag catgatcgac aacagtactt gtaatgatgt catggtagat aagtttacta
 7681 tcaaggtagg aaaatatatg gggagaaaag atatcaataa tattaatata catagaggac
 7741 cgcagatcat aattgataag gttgacttgt ctaatgaaat aaacaagatg aatcaactct
 7801 taaaagatag tattttctac ctgagagaag ccaagagaat tttagactca gtaaatatca
 7861 gtcttatatc tccaagcgtt caattgtttc taataataat atcagtcctc tcatttatta
 7921 tattattgat tatcatagta tacttgactt gtaaatcaaa acattcatat aaatataaca
 7981 aatttataga tgatcctgat tattacaatg attacaaaag agaacgtatt aatggcaaag
 8041 ccagtaagag taacaatata tattatgtag gtgattaaca atcgataatc taaaggatta
 8101 cctcactatc actaccaagg taacttccat gtaagatcgg accttccccg aagacattaa
 8161 ataaacttta ggatcccaga gtatccctct aagtgatcct tctagattgg ttactgatat
 8221 atatacatat ttatcctctt tccgtcgttg tttattgatc attaataatg ctttctcagc
 8281 tccaaaaaaa ttacttagac aactcaaacc aacaagggtg taaaatgaac aaccagata
 8341 agaaattaag tgtcaacttc aaccctttag aattagataa aggtcaaaaa gatctcaata
 8401 agtcttatta tgttaaaaac aagaattata acgtttcaaa tctattaaat gaaagtctgc
 8461 acgatatcaa gttttgtatt tattgtatat tctcactgct aattatcatt acaataatca
 8521 atataatcac aatatcaatt gttataactc gtctgaaagt acatgaagag aataatggca
 8581 tggaaatctcc taatttaca tctattcaag atagtctctc atctcttact aacatgatca
 8641 atacagagat aactcctaga atagggattt tagttacagc cacttctgtt actctctctt
 8701 catctatcaa ttatgtcggg actaagacaa atcaactggg caatgaatta aaagattata
 8761 taaccaaag ttgtggcttt aagggtccctg aattaaagt acatgaatgc aacataagtt
 8821 gtgctgatcc aaaaattagc aaatctgcaa tgtacagcac caatgcctat gccgagcttg
 8881 ctgggtccacc taagatattt tgtaaaaagt tatccaaaga ccccgacttt agactgaagc
 8941 agatagatta tgtaatacca gtgcagcaag atcgggtctat ttgtatgaac aaccctttat
 9001 tggatatttc tgatgggttt ttacctaca tacattatga aggaataaat agctgtaaaa
 9061 aatcagattc atttaaaagt ctgctgtcac atggtgaaat agttgacagg ggtgattatc
 9121 gaccatcatt atatctatta tcaagtcatt accatcctta ttcaatgcag gtaataaact
 9181 gtgtacctgt gacttgtaac cagtcactct ttgtattctg tcatatctcc aacaacacta

10

20

30

40

9241 aaacattgga caattcagat tactcgctcag acgagtacta cataacatat ttcaatggca
 9301 tagatcgctcc caaaaccaag aagattccca ttaacaatat gacagcagac aatcggtata
 9361 tccattttac attctcaggt gggggagggt tatgtttagg tgaagaattt attattcctg
 9421 ttaccacagt catcaatact gatgtattca cgcattgatta ttgtgagagt ttcaactggt
 9481 cagtccaaac cggtaaaagt ctaaaggaga tatgctctga gtcattaaga tctccaacga
 9541 actcatcgcg atacaattta aacggaatca tgattataag tcaaaacaac atgacagatt
 9601 ttaagattca gttgaatggt ataacttata acaaactgtc attcggaagt cctggaagac
 9661 tgagcaagac actgggccag gtcctttatt accaatcttc aatgagttgg gatacttato
 9721 taaaggcagg atttgtcgag aaatggaaac cctttacccc gaattggatg aacaatactg
 9781 tgatatccag acctaaccac ggtaattgtc caaggatatca taaatgcccc gagatatggt
 9841 atgaggggac atacaatgat attgctcctt tagatctagg aaaagacatg tatgttagcg
 9901 ttattctaga ttcagatcag cttgcagaga atccagagat tacagtattt aactctacta
 9961 ctatacttta taaggagaga gtatccaaag atgaactaaa cacaagaagt actacaacga
 10021 gctgttttct tttcctagat gaaccttggg gtatatcagt attagaaaca aacagattta
 10081 acggcaaatc tattaggccc gagatttatt catacaaaat tcctaagtat tgtaattttg
 10141 atgagcttat tcctcatact tcaatcaaat ttaataaac taatatcaaa ttgttgcaat
 10201 cagctattat taaaactgga tcatcagaca ataaagatgt atacaaagat atatcgaaga
 10261 gggtagtaaa gaaaacttag gatcccagat ccttcaataa ggcagagcct tgattgtatc
 10321 agcgtcattt acaattgaat ctcaattaac aacactgatt aataacttaa gcagataact
 10381 cctattacag tgtttaattg acttaatttt aattgaggat tttataatcc tataattgga
 10441 gcagatctaa actctcacgg attcagttct aatcctttat taactaaaga acaaatctta
 10501 aataattgga tgacgtcaca ggagacaagc tggaaacaat ttagttagaa ggaagaaacc
 10561 tttaccaga tatggaaagt gactttgata tatctgttag cgacgtactg taccagaat
 10621 gtcatattga cagtcctata gtcggcggtg agctcattac ttctcttgag tatgcgaatt
 10681 tgactcataa ccaacctcat gaagatcaga cattgctgac taatataaat gtcataaaa
 10741 agaagaagat aaaaagtcct ctaatatccc aacaatcttt atttggaat gaggttaata
 10801 aggagatttt cgatcttaaa aattattacc atgtccccta tccagaatgt aacagagatt
 10861 tattcttaat ctctgatgac aaaatagcat tcaaaactcag taaaatcatg gataattcta
 10921 ataaactggt tgatggttta gagaggaaac tgagtcgctt aatttcgaat gtagataatc
 10981 aactattaaa tgcaacctct cttcataata attctgagat ggatcggaag ggaaagaac
 11041 atccttgctt ccagaaaaag agcacaattg atgatgtaag acagcagaga cagacacgag
 11101 attttccaaa gaattcaact agagagggaa gatctccaaa acacctgat gccggtccta
 11161 cacctgaaaa cagtgccaaa aacgatttgc atagagacaa cacagacaaat atgccaacag
 11221 gccatagttc gacatctatg aaaaaaccta aaatatctgg agaagaatat cttagtatgt
 11281 ggctagactc agaggatttg ggttctaaac gaatttctgc acaattagggt aaggatgtat
 11341 catgtaagg ccactctcac acgacagaag acaaacggat aatagttcct gacactcgat
 11401 atatccaaaa tcatgaatct aataacgata ttttcccaa aaaagagaaa aaattctgca
 11461 aactccacc gtcacgggat aatttaacca aaatcatggt gaattcaaaa tggtaacaatc
 11521 ctttctttt ttggtttact gtcaagactg aacttagagc ctgccagaag gagaactaca
 11581 aaaggaaaaa cagaaaattg ggaattatca catcgattaa aggttcatgc tataagttga
 11641 tactcaacca gaatctagta gcaatattcg aggaagacag cagtggatac tcagatcata
 11701 aaaaaagaaa aaaacgatgc tactatctaa ctcccgaat ggtccttatg ttctccgatg
 11761 taactgaagg aagattgatg attgatgttg caatgagatt tgacaaaaag tacaaaactc
 11821 tagagaaaaa ggctttgaaa ttatggtttc ttatagacga gttatttctt tctatgggaa
 11881 atagagtgtg taatattata tccatgcttg agcctttgac tctcgcgata ttacaggtta
 11941 aggatgagtc aagggtgttg agaggtgcat tcatgcatca ttgtttagggt gacctcttcg
 12001 aagaacttcg agagtcacag aactaccgg aagatgagat caagagattt gccaacgacc
 12061 taataaatgt catgacctgt cgggacattc atttagtagc agaattcttc tcattcttta
 12121 ggactttcgg acatccaata ttgaacgctc aaactgcagc caggaaagt agagagtaca
 12181 tgtagcaga taaaatcctt gactacgaac ctatcatgaa aggtcatgag attttctgtg
 12241 ctataatcat aaatggattt agagatagac atggaggagt ttggcctcct cttgatcttc
 12301 caaaacattg ttcaaagaac ataatatctc tcaaaaatac aggtgaagggt gtaacttatg
 12361 aagtagcaat aaacaattgg agatcatttg tcgggttaaa gttcaaatgt tttatgggtc
 12421 tcaatttaga caatgatctc agcatgtaca tgaaagataa agcattatca ctttaagggt
 12481 atctttggga ttcaatctat tcacgtgaag taatgtccta ccaaccacct agaaacaaaa
 12541 aatcaagaag attggttgag gttttcgttg atgatcagga ctttgatccc gttgatatga
 12601 taaattatgt tctgaccgga gaatatctca gagatgatga tttcaatgct tcttatagtt

10

20

30

40

```

12661 taaaagagaa agagaccaaa caagttggca ggttggttgc taagatgact tataaaatga
12721 gggcctgtca agttattgct gagaatttaa ttgcacatgg gattgggaga tatttccatg
12781 aaaacgggat ggттаaggat gagcatgagc tcagcaaadc actgtttcaa ttgtctatat
12841 caggaatacc aagaggggaa aaaaacaaca aatcgacgaa cgacacaadc cacgaaagca
12901 agatcgagaa taaccattcc tttaaaaaca tccagaatcg atcatttcga aagacggata
12961 acccatacaa tagattttaac attgataacc caactttctt atcccaaac tgtaaccca
13021 agtataaccg taagaattca gagacaatag gtatattctc tcgtgcagaa accaaaagca
13081 tgattagaga acagaaaagt cacagagaag tcaaaataaa taagctagat atcggcagtg
13141 ataatgaaga gcaaggaaaa gagatagatg ccgccaagta caaaatcacg gacaacccaa
13201 atccacacat aaatcctcaa gatcaaccgc gaatctgtca agaagacaaa ggcaaaagag
13261 gagcaaagtc agatctcaca gaaggcatga gttttctgga gatgcacaca ctctttaacc
13321 cgagtaagag cgatatcaga acaaatctcg aattggaaaa gagttcactt tcaaaccttg
13381 gatttatatc acaaaaagag aaaagaggca aaacttataa tgaatcccat tcaactggga
13441 agttctctaa agaggatgaa gaaagatacg atgtcatcag tgcattcctg acaacagatt
13501 tacgaaaatt ctgcttaaat tggagacatg aatcaatcgg catttttgca agaaggatgg
13561 acgaaatcta tggtttgctt ggtttcttta attggatgca cagaagacta gagcgatctg
13621 tgttatatgt tgcggaccct cattgcccgc cgtctatcaa tgaacatad gatcaaacg
13681 attcaccgga aagagacata tttatacatc atccgaaagg gggatataga ggatacagcc
13741 aaaaactgtg gacaatagcg actatccctt ttctattcct cagtgtcat gagacaaaca
13801 cccggatagc ggcagttgta caagggtgaca atcaatcaat tgcaattaca cataaggtcc
13861 accctcattt gccttacaaa atgaagaaag aactctctgc aatgcaggca aaaaaatatt
13921 tttcaagggt acggcacaa atgaaggcat tagggcatga attgaaggcg accgagacta
13981 tcattagtac tcatttcttc atttattcca agaaaatcca ctatgacggg gctgttttat
14041 cacaatctct gaaatcaatg gcaagggtgtg tattttggtc agaaacccct gttgatgaaa
14101 ctagagcagc atgcagtaat atcagcaca caattgcaaa ggctattgag aatggttata
14161 gcaggagatc tggctatctg ataaatgttc ttaaaacat ccaacaaatt aatatatcat
14221 tgagttttaa tataaatgaa tgcagacag atgacataat cagaccgttt agagataatc
14281 caaactggat caaacatgcc gcattaatcc ccgccagctt gggaggactc aactatatga
14341 acatgtctcg attgtatgtg aggaatatag gggatccagt cacagcatcg atagcagatg
14401 ttaagagaat gattctcggg ggtgtactac ccattggaat actccacaat atcatgttgc
14461 aagaacccgg tgatgccact taattggact ggtgtagtga tccatactcc atcaacctaa
14521 agcagactca aagtatcaca aaagttataa agaacataac ggcaagagtg atactaagga
14581 attcgggtcaa tccactgtc aaaggtctat ttcatgaagg tgcttatgag gaggacactg
14641 aattagcaac attcattttg gacaggagag tcatcttacc acgagtcggg cacgagatct
14701 taaacaactc catcacagga gcaagagaag agatctcggg cttactggat accacaaaag
14761 gattgataag aattggcata gcaaggggag gattaactca gagaacatta tctcgaattt
14821 ccaattatga ttatgaacaa tttttgaacc taatgaatat gttgaagaa aaagaacaaa
14881 acagtgtcat ttccctgtca gcttgcctct ttgactttgc tatagcttta agaagcagga
14941 tgtggaggaa attggcaaaa ggaagattaa tatatggttt agaagtcctt gatccaatag
15001 aagcaatgat tggctttctc attcttggga gtgaaaattg tctactctgt gattcaggaa
15061 gcaaaaacta tacctggttt ttcataccaa aggatgtaca gttggataag attgataaag
15121 atcacgcac aataagggtg ccctatgtcg gatcaactac cgaagaaaga tcagagataa
15181 agttaggatc cgtgaaaaat ccaagcaaat ccctgaaatc tgctataaga ctcgcaactg
15241 tgtacacttg ggcatttggc acaagtgtg ctgaatggg ggaggcttgg tacttgtcta
15301 atcaacgagc aaatataccc ttagatgttc tcaaaacgat aacacctata tctactcaa
15361 cgaatattgc tcatagatta cgagaccgat caacacaggt taaatacgcc agtacatctc
15421 ttaacagagt atcgcgcat gtaacaatta gtaacgataa catgaatttt gaatttgacg
15481 gggttaaaat ggataccaac ttgatttatc aacaagtcac gctgttaggg ctttcatgct
15541 tggagagttt attccgaaat aggaaaatga caaatagtta caatatcgtg taccatttac
15601 acgttcaaga acattgttgt gtaagggtc tgaatgattt accttataca ccgtcaacac
15661 atccagtgcc aaattataca gaagttagag ataataggtt aatttacgat cctcaaccta
15721 tattagaatt tgatgagcta agattagcaa ttcagcaaac aaagaaagta gatttggat
15781 tttcatttgt ggatacaaaa gaacttcatg agaatttagc tcaaagttta gcgattacag
15841 taacggatat tatgacaaaa tctgataaag atcatattaa agaccaaga agtatagatg
15901 ttgatgataa tattaagaca ctaataactg agtttttatt agtagaccct gaaatgtttg
15961 ccgtaaaattt aggattgcat atatcaataa aatggtcatt tgatattcac tttaaaagac
16021 caagaggacg ctatagcatg atagaatact tgactgatct tttggataat acttctctc

```

10

20

30

40

【 0 0 2 0 】

```

16081 atgtttatcg aatccttact aatgtattat ctcatcccag agttatgaga aaattcacta
16141 atgccgggct actagtaccg aaatacgggc cctaccttac aagtcaagat ttcaaaaaaga
16201 tggcggtaga tttcataata acagcgtata ccacattttt gaccaattgg tgttaataata
16261 acaagttttc aattctaata cctgaacaag accctgatat acttgaatta agaaaagaca
16321 tcaactcatgc aaggcattta tgtatgatct cggatcttta ctgctactct ttcaagcaac
16381 cttggataaa ggagcttaca ccacaagaga agatctgcgt catggaggac ttcatagcca
16441 attgtgttgc taatgatcaa acaagtgcgg gctggaacat aacgccctta agagttttaca
16501 atctccctgc atcgaccaca tacatcagga gagggataat aaaacaatta agaatccgtc
16561 aaagcaatga gcctattgat ctggaagata ttaggattgg tcagaacccc gattttgtga
16621 ataaacctat tgagttttgt agcagtgaat tcggtatcac aattttataac cttgaagaaa
16681 ttcttcaatc aaatgtgcat ctcatgttaa atatgaacat tgactcctca acaagtaaca
16741 atactgaaaa tcatttattt agaagggtag gcttgaactc tacttcatct tataaagcac
16801 tatctttaac acctgttatt aaaagatata atcaacagaa cactaatagg ctgtttatag
16861 gagaaggatc aggtcttatg atgtatcttt accagaaaac cttgggggag acaatatgct
16921 tctttaattc gggagttagg tacaatgagg atctgggtca aagggaacaa tcattatacc
16981 cgagtgaata cagtatctgt gaacaaggag taaaaaaga aaacctctc accgggcatg
17041 ataaacctat attcaatgga agaccagaaa ccacatgggt aggcattgat gattcttca
17101 agtatatat tggacataact ataaatagag acatcgggct tgttactcc gatattgaaa
17161 caggaatagg gaaggataat tatactatct taaatgaaca tgcacatct atagcactga
17221 gccttacagt aatgattgat gatggaatct tgggtgctaa ggtagcttat gccctgggt
17281 tttgcatctc ttcattattg aatatgtacc ggacattttt ttcattagtt ctatgtgcgt
17341 ttccaccgta tagcaatttt gaatcaactg aattttacct gatttgcttg caaaaagta
17401 taccgggacc tatcacacca gctagagcca tccaacaaac gacgaagcaa tctagagaag
17461 aggataatag tataactaat aatatcctca aaatcaaaaa tcttgttcag aaagaattta
17521 tcaaaacagt aaagaaaaaa tacgaaatcc atccttcggt taactgtcct atcaacttca
17581 caaaggatga taaatattta atgagtgttg ggtttcaagc caatggtcct gatatgatac
17641 gtaaagagac gggctatgac ataggtagca atgtagagaa tctccgagat gtcttaatca
17701 agttgtttgc agatgcagtc acctctatg atgatgtcac aaataaaaaa aactttttaa
17761 atccttatcc agtctacaca agaactcagt ataaaattct gatggataaa atatgcaaga
17821 aagtcacctt atacacctta atcatatcat gtaaaggatc caatcaatat tgctgggaaa
17881 ttaaattcca aataagaaag cattgtctca tacttgattt gaaaagtaag gtttttacaa
17941 aacttattcc aaaggatta agagaaaggg gtgactcaaa agggatgaag agcatatggt
18001 tcaactaaact aaccagtcaa gaggtgaaaa gatggtggaa gatgatattc tacatcgtga
18061 taataagcaa tccataacca catccaactt gtcagttaaa cacttaaatc acaataaact
18121 tgcatcaga ttaaagaaaa cttataattc ctttttttag gt

```

(配列番号1)

【0021】

本発明は、C e d P Vゲノムに関連する核酸を提供する。具体的には、本発明は、配列番号1のポリヌクレオチド配列と少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

【0022】

本発明はまた、配列番号1のポリヌクレオチドの断片（例えば、プライマーおよびプローブ）を提供する。

【0023】

本発明はまた、本明細書に開示された核酸のいずれかを含有するベクターを含む。本明細書で使用する「ベクター」は、多数の核酸のいずれかであり得、該核酸中で、所望の配列が、異なる遺伝子環境間の輸送のためのまたは宿主細胞における発現のための制限および連結により挿入され得る。RNAベクターもまた利用可能であるが、ベクターは、典型的には、DNAで構成される。ベクターとしては、プラスミドおよびファージミドが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞中で複製することができ、1個以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって更に特徴づけられ、該部位でベクターを判定可能な方法で切ることができ、該部位中に、新しい組換えベクターが宿主細胞中で複製する能力を保持するように所望のDNA配列を連結することができる。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、宿主細胞内でプラスミドの複製数が増加するにつれ何度も発生し得る、または宿主が有糸分裂によって繁殖する前に宿主毎に1回のみ発生し得る。ファージの場合、複製は溶菌相の間に能動的に、または溶原性相の間に受動的に発生

10

20

30

40

50

し得る。発現ベクターは、所望のDNA配列が、それが調節配列に作動可能に結合されてRNA転写物として発現され得るように、制限および連結により挿入され得るものである。ベクターは、ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞の識別および選択での使用に好適な1個以上のマーカー配列を更に含み得る。マーカーとしては、例えば、抗生物質または他の化合物に対して耐性または感受性のいずれかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、活性が当該技術分野で公知の標準的なアッセイにより検出される酵素をコードする遺伝子（例えば、 α -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、ならびに形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型に可視的に影響を与える遺伝子が挙げられる。ベクターの例としては、動作可能に結合されているDNAセグメント中に存在する構造的遺伝子産物の自律複製および発現が可能なものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0024】

上記の配列番号1のゲノム配列は、CedPVのヌクレプラスミド(nucleoplasmid)タンパク質(「Nタンパク質」)、リンタンパク質(「Pタンパク質」)、マトリックスタンパク質(「Mタンパク質」)、融合タンパク質(「Fタンパク質」)、糖タンパク質または付着タンパク質(「Gタンパク質」)、および大型タンパク質(「Lタンパク質」)をコードする。加えて、P遺伝子もまた、CedPVのCタンパク質をコードする。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書において同義的にアミノ酸のポリマーを指す。

【0025】

20

ポリペプチドに関して本明細書で使用されるとき、「実質的に純粋な」という用語は、ポリペプチドが、その意図された使用のために実用的かつ適切な程度に自然またはインビボ系において見出され得る他の物質を本質的に含まないことを意味する。具体的には、ポリペプチドは十分に純粋であり、その宿主細胞の他の生体成分を十分な程度に含まず、例えば、抗体を産生する、配列決定する、または医薬調製物を産生するのに有用である。当該技術分野で周知の技術によって、実質的に純粋なポリペプチドは、本明細書に開示された核酸およびアミノ酸配列に照らして産生され得る。本発明の実質的に精製されたポリペプチドが、医薬調製物中の薬学的に許容される担体と混合され得るので、ポリペプチドは、調製物の重量の一定割合のみを含み得る。それでもなお、ポリペプチドは、それが生物系において関連し得る物質から実質的に分離されているという点で実質的に純粋である。

30

【0026】

核酸およびタンパク質に関して本明細書で使用されるとき、「単離された」という用語は、その天然環境で見出されないことを意味し、これらの状況を含むが、これらに限定されない：(i)例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってインビトロで増幅される(ii)クローニングするおよび/または培養することによって組換え的に産生される(iii)開裂およびゲル分離によって精製される(iv)調製されたプラスミドまたは発現ベクターの一部である、または(v)例えば、化学合成などによって合成される。単離された核酸は、当該技術分野で周知の組換えDNA技術によって容易に操作可能なものである。したがって、ベクターに含まれるヌクレオチド配列であって、5'および3'制限部位がそれで知られているか、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列がそれに関して開示されている、ベクターに含まれるヌクレオチド配列は、単離されていると考えられるが、その自然宿主中にその天然状態で存在する核酸配列はそうではない。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製されてもよいが、そうである必要はない。例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター内で単離された核酸は、それが常駐する細胞内物質の微小な割合のみを含み得るという点で純粋ではない。しかしながら、それは当業者に公知の標準的な技術により容易に操作されるため、この用語が本明細書で使用されるとき、このような核酸は単離されている。

40

【0027】

上記の配列番号1のヌクレオチド配列を参照すると、Nタンパク質のコード配列は、位

50

置 1 4 4 で始まり、1 6 7 6 で終了し、配列番号 2 に開示されているように 5 1 0 アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号 1 の位置 1 4 4 ~ 1 6 7 3 にあるヌクレオチド配列と少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、ポリペプチド、C e d P V N - タンパク質の誘導体および断片を提供する。特に、本発明は、配列番号 2 のポリペプチドと少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のポリペプチドを提供する。本明細書で使用されるとき、参照ポリペプチドの「誘導体」は、参照ポリペプチドと 1 0 0 % 未満のアミノ酸同一性を有するポリペプチドである。例えば、本発明は、本明細書に記載の C e d P V N タンパク質の誘導体を提供する。本発明はまた、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、配列番号 2 のポリペプチドの断片を提供する。本明細書で使用されるとき、参照ポリペプチドの断片は、参照ポリペプチドの長さ未満の長さを有するポリペプチドである。この断片は、断片を含有する分子の全長が参照タンパク質を超えるように、キメラタンパク質などのより大きな分子内にあってもよい。配列番号 2 のポリペプチド断片は、少なくとも約 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5、2 0 0、2 0 5、2 1 0、2 1 5、2 2 0、2 2 5、2 3 0、2 3 5、2 4 0、2 4 5、2 5 0、2 5 5、2 6 0、2 6 5、2 7 0、2 7 5、2 8 0、2 8 5、2 9 0、2 9 5、3 0 0、3 0 5、3 1 0、3 1 5、3 2 0、3 2 5、3 3 0、3 3 5、3 4 0、3 4 5、3 5 0、3 5 5、3 6 0、3 6 5、3 7 0、3 7 5、3 8 0、3 8 5、3 9 0、3 9 5、4 0 0、4 0 5、4 1 0、4 1 5、4 2 0、4 2 5、4 3 0、4 3 5、4 4 0、4 4 5、4 5 0、4 5 5、4 6 0、4 6 5、4 7 0、4 7 5、4 8 0、4 8 5、4 9 0、4 9 5、5 0 0、5 0 5、5 0 6、5 0 7、5 0 8、または 5 0 9 アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号 2 のポリペプチド断片は、少なくとも約 1 5、2 0、2 5、3 0 . . . アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が 1 5 ~ 2 0 アミノ酸長であり得る、および断片が 2 0 ~ 2 5 アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号 2 のポリペプチド断片（例えば、「少なくとも約 . . . 4 4 0、4 4 5 . . . アミノ酸長」）として、4 4 0 ~ 4 4 5 アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

【 0 0 3 0 】

【表 2】

MSDIFNETQS FRNYQSNLGR DGRASAATTT LTTKVRFVFP ANNNPNLRWR LTLFLMDVVR SPASAESMKV
 GAGISLVSMY AEKPGALVRA LLNDPDVEAI IIDVYGFDEG IPIMERRGDK ATDDMDSLRLK IVKAAHDFSR
 GRSLFVDQVR QDIVMSDMGS FVNAITSJET QIWILIKAIV TAPDTAESE GRRWAKYVQQ KRVNPLFLIS
 PQWINDMRSL IAASLSLRKF MVELLMEAKK GRGTKGRIME IVSDIGNYVE ETGMAGFFAT IKFGLETKEP
 ALALNELQSD LNTMKSLMIL YRSIGPKAPF MVLLDSIQI KFAPGSYPLL WSFAMGVGTT IDRAMGALNI
 NRSYLEPVYF RLQQAQSAHQ AGNVDKEMAE KLGLTEDQIV HLSANVKDAS QGRDDNQINI REGKFTNVVD
 DIQDHAQSSS EDYNPSKKSF SILTSITSTV DSADSRSAMN ESMTTTSLLK LRQRLAEKKG DSKNSQDTPP
 KPRAKDQPT DEVSFMDNSI (配列番号2)

【0031】

上記の配列番号1のヌクレオチド配列を参照すると、Pタンパク質のコード配列は、位置2112で始まり、4325で終了し、配列番号3に開示されているように737アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号3のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号1の位置2112～4325にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

10

【0032】

本発明はまた、ポリペプチド、CedPV P-タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号3のポリペプチドと少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

20

【0033】

配列番号3のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、731、732、733、734、735、または736アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号3のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30...アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が15～20アミノ酸長であり得る、および断片が20～25アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号3のポリペプチド断片（例えば、「少なくとも...約

30

40

50

720、725...アミノ酸長」として、720～725アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

【0034】

【表3】

```
MDKLQIEDG LSTINFIQEN KEKLQHSYGR SSIREPPTSV RVEWEKFIK KIASGPEQVQ GGGSETEITG
DNGDRGNFTN PDQGGGVGTGQ FEERYQKWGS QDSELQLDPM VVHDFFYDER RENPDNGKYD RSSKKRDNIR
EGTRQDKYNN QSTDELLSCL QPSSKNDVIK NESTSVSNLH VTGNKLNPD KPFEPSTQSK EHPTTQHNK
NDHQTDDDYK NRRSSENNVI SDHATTMEDN NNFIPATKRK NALSEPIYVQ VLPSNTEGFS GKDYPLLKDN
SVKKRAEPVI LETANHPAGS ADQDTNQIEE NMQFNLPKLL TEDTDDEPED NND SMPLEED IREIGSMLKD
GTDIKTRMN EIDDAIKKIN KSKNSRLDL ESDGKDQGRR DPSVDLGIKK RKEGLKAAMQ KTKQLSIKV
EREIGLNDRI CQNSKMSTEK KLIYAGMEME YGQTSTGSGG PQGSKDGTSD DVQVDEDEYDE GEDYEAMPSD
RFYTTLSGEQ KDRFDLDANQ MSQYDLEAQQ DELTRMNLIL YSRLETNNKL LIDILDLAKE MPKLVRKVDN
LERQMGNLNM LTSTLEGLHS SVMIMIPGKD KSEKEIPKNP DLRPILGRSN TSLTDVIDLD HYPDKGSKGI
KPSGSGDRQY IGSLESKFIS NDEYNFAPYP IRDELLLPGL RDDKTNASSF IPDDTDRSPM VLKIIIRQNI
HDEEVKDELL SILEQHNTVE ELNEIWNTVN DYLDGNI (配列番号3)
```

10

【0035】

Cタンパク質のコード配列は、Pタンパク質をコードする配列内にあり、(配列番号1の)位置2137から始まり、位置2670で終了し、配列番号4に開示されているように177アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号1の位置2137～2670にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

20

【0036】

本発明はまた、ポリペプチド、CedPV C-タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号4のポリペプチドと少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号4のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

30

【0037】

配列番号4のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、166、167m 168、169、170、171、172、173、174、175、または176アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号4のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30...アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が15～20アミノ酸長であり得る、および断片が20～25アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号4のポリペプチド断片(例えば、「少なくとも...約140、145...アミノ酸長」として、140～145アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

40

【0038】

【表 4】

MASLLSILYR KIRKNYSILT EDPPSESHPO VSGLKSGRNL FERSLLDLNK FKGEDLRLRS QAIMEIEAIL
 PILIREAESQ DNSKKGKNG GHKIQYNWT QWLYTISSMT REGRIPTMEN MTAALKNGII SEKEHDIRIST
 IISLLMNYCP AYNHLLRTMS SRMKVHQCQI CMLQEIIN (配列番号4)

【0039】

上記の配列番号1のヌクレオチド配列を参照すると、Mタンパク質のコード配列は、位置4635で始まり、5717で終了し、配列番号5に開示されているように360アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号1の位置4635～5717にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

10

【0040】

本発明はまた、ポリペプチド、CedPV M-タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号5のポリペプチドと少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号5のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

20

【0041】

配列番号5のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、351、352、353、354、355、356、357、358、または359アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号5のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30...アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が15～20アミノ酸長であり得る、および断片が20～25アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号5のポリペプチド断片（例えば、「少なくとも...約280、285...アミノ酸長」として、280～285アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

30

40

【0042】

【表 5】

MDPSDLRRII MEDDKSLVNN DDSTETDFLE KTWREGSKID KITPEVDENG NMVPKYVVFN PGKNERKTSG
 YQYMICYGFI EDGPINGSR VKGNIRTTAS FPLGVGKTY S PEEILQELT TLKITVRRTA GSNEKLVYGI
 TGPLNHLYPW YKVLTTGSIF SAVKVCRNVD QILLDRPQIL RVFFLSITKL TDKGVYMIKP SVLDFRSDNS
 MAFNLLVYLK IDTDITKAGI RGIWNKEGER ITSFMLHIGN FTRRGKHY S VEYCKRKIDK MKLTFALGTI
 GGLSLHIRID GRISKRLQAQ VGFQRNICYS LMDTNPWLNK LTWNNSCEIH KVTAVIQPSV PKDFMLYEDI
 LIDNTGKILK (配列番号5)

【0043】

50

上記の配列番号 1 のヌクレオチド配列を参照すると、F タンパク質のコード配列は、位置 6 4 0 5 で始まり、8 0 7 8 で終了し、配列番号 6 に開示されているように 5 5 7 アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号 1 の位置 6 4 0 5 ~ 8 0 7 8 にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

10

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、ポリペプチド、C e d P V F - タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号 6 のポリペプチドと少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号 6 のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

【 0 0 4 5 】

配列番号 6 のポリペプチド断片は、少なくとも約 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5、2 0 0、2 0 5、2 1 0、2 1 5、2 2 0、2 2 5、2 3 0、2 3 5、2 4 0、2 4 5、2 5 0、2 5 5、2 6 0、2 6 5、2 7 0、2 7 5、2 8 0、2 8 5、2 9 0、2 9 5、3 0 0、3 0 5、3 1 0、3 1 5、3 2 0、3 2 5、3 3 0、3 3 5、3 4 0、3 4 5、3 5 0、3 5 5、3 6 0、3 6 5、3 7 0、3 7 5、3 8 0、3 8 5、3 9 0、3 9 5、4 0 0、4 0 5、4 1 0、4 1 5、4 2 0、4 2 5、4 3 0、4 3 5、4 4 0、4 4 5、4 5 0、4 5 5、4 6 0、4 6 5、4 7 0、4 7 5、4 8 0、4 8 5、4 9 0、4 9 5、5 0 0、5 0 5、5 1 0、5 1 5、5 2 0、5 2 5、5 3 0、5 3 5、5 4 0、5 4 5、5 4 6、5 4 7、5 4 8、5 4 9、5 5 0、5 5 1、5 5 2、5 5 3、5 5 4、5 5 5、または 5 5 6 アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号 6 のポリペプチド断片は、少なくとも約 1 5、2 0、2 5、3 0 . . . アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が 1 5 ~ 2 0 アミノ酸長であり得る、および断片が 2 0 ~ 2 5 アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号 6 のポリペプチド断片（例えば、「少なくとも . . . 約 5 1 5、5 2 0 . . . アミノ酸長」）として、5 1 5 ~ 5 2 0 アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

20

30

40

【 0 0 4 6 】

【表 6】

```

MSNKRTTVLI IISYTLFYLN NAAIVGFDFD KLNKIGVVQG RVLNYKIKGD PMTKDLVLKF IPNIVNITEC
VREPLSRVNE TVRRLLPIH NMLGLYLNNT NAKMTGLMIA GVIMGGIAIG IATAAQITAG FALYEAKKNT
ENIQKLTDSI MKTQDSIDKL TDSVGTSLI LNKLTQYINN QLVNLELLS CRQNKIEFDL MLTKYLVOLM
TVIGPNINNP VNKDMTIQSL SLLFDGNYDI MMSELGYTPQ DFLDLIESKS ITGQIYVDM ENLYVVIRTY
LPTLIEVPDA QIYEFNKITM SSNGGEYLST IPNFILIRGN YMSNIDVATC YMTKASVICN QDYSLPMSQN
LRSCYQGETE YCPVEAVIAS HSPRFALTNG VIFANCINTI CRCQDNGKTI TQNINGFVSM IDNSTCNDVM
VDKFTIKVGK YMGRKDINNI NIQIGPQIII DKVDSLNEIN KMNQSLKDSI FYLREAKRIL DSVNISLISP

SVQLFLIIIS VLSFIILLII IVYLYCKSKH SYKYNKFIDD PDYYNDYKRE RINGKASKSN NIYYVGD
(配列番号 6)

```

50

【 0 0 4 7 】

F タンパク質の断片の一例は、C e d P V の F 糖タンパク質の細胞外ドメインの全部または一部を含む可溶性 C e d P V F 糖タンパク質である。F 糖タンパク質の可溶性形態は、F 糖タンパク質の膜貫通および/または細胞質尾部ドメインの全部または一部を欠失することによって産生され得る。例を挙げると、可溶性 F 糖タンパク質は、C e P V F 糖タンパク質の完全な細胞外領域を含み得る。いくつかの実施形態において、可溶性 F 糖タンパク質は、配列番号 6 において K 4 9 0 の後で切り捨てられ得る。また、例を挙げると、可溶性 F 糖タンパク質は、細胞外領域の全部または一部と C e d P V F 糖タンパク質の膜貫通ドメインの一部とを含み得る。更に例を挙げると、可溶性 F (s F) 糖タンパク質のいくつかのバージョンは、主にタンパク質を固定する細胞質尾部および/または膜貫通ドメインを除去することを介して、構築され得る。本明細書で使用されるとき、「可溶性 F 糖タンパク質」または「F 糖タンパク質の可溶性形態」または「s F 糖タンパク質」は、細胞外ドメインまたはその一部分を含有する天然 F 糖タンパク質の断片または一部ののためのアミノ酸配列を指す。s F 糖タンパク質は、天然ウイルス F 糖タンパク質と構造的に類似している。

10

【 0 0 4 8 】

本発明の s F 糖タンパク質は、天然ウイルス F 糖タンパク質と構造的に類似している。例を挙げると、本発明の s F 糖タンパク質は、C e d P V を対象とするポリクローナル抗体によって認識され得る。例を挙げると、本発明の s F 糖タンパク質は、天然 C e d P V F 糖タンパク質に匹敵する（三量体などの）オリゴマー形態（複数可）で組み立て得る。

20

【 0 0 4 9 】

本発明の s F または s G 糖タンパク質は、例えば、ワクチン開発と、ワクチンとしてまたは組換えモノクローナル抗体の単離に使用されるときに抗ウイルス抗体を生成するために抗原として作用することとに好適である。s F または s G 糖タンパク質は、天然の F または G 糖タンパク質を認識し得る抗体を生成するのに好適である。モノマーまたは三量体などのオリゴマー形態で組み立てられる本発明の s F または s G 糖タンパク質は、例えば、構造に基づく抗ウイルス調査を支援するように更なる情報を提供するために結晶化および構造決定のためなどに更に有用であり得る。本発明の s F または s G 糖タンパク質のオリゴマー形態はまた、天然の F または G 糖タンパク質およびその天然オリゴマー形態を認識し得る抗体を更に生成し得る。「可溶性」という用語は、水性または非水性溶媒中で溶解するタンパク質の能力に関係がない。

30

【 0 0 5 0 】

上記の配列番号 1 のヌクレオチド配列を参照すると、G タンパク質のコード配列は、位置 8 2 6 8 で始まり、1 0 1 3 6 で終了し、配列番号 7 に開示されているように 6 2 2 アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号 7 のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号 1 の位置 8 2 6 8 ~ 1 0 1 3 6 にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

40

【 0 0 5 1 】

本発明はまた、ポリペプチド、C e d P V G - タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号 7 のポリペプチドと少なくとも約 6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、

50

または100%同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号7のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

【0052】

配列番号7のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、612、613、614、615、616、617、618、619、620、または621アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、「配列番号7のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30...アミノ酸長の断片であり得る」によって、断片が15~20アミノ酸長であり得る、および断片が20~25アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号7のポリペプチド断片(例えば、「少なくとも...約300、305...アミノ酸長」として、300~305アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであろう。

【0053】

【表7】

MLSQLOKKNYL DNSNQOGDKM NNPDKKLSVN FNPLELDKGQ KDLNKSYYVK NKNYNVSNLL NESLHDIKFC
IYCIFSLII ITIINIITIS IVITRLKVHE ENNGMESPNL QSIQDSLSSL TNMINTEITP RIGILVTATS
VTLSSSINYV GTKTNQLVNE LKDYITKSCG FKVPFELKLHE CNISCADPKI SKSAMYSTNA YAELAGPPKI
FCKSVSKDPD FRLKQIDYVI PVQQDRSICM NNPLLDISDG FFTYIHYEGI NSCKKSDSFK VLLSHGEIVD

RGDYRPSLYL LSSHYHPYSM QVINCPVPTC NQSSFFVFCI SNNKTLDNS DYSSDEYYIT YFNGIDRPKT
KKIPINNMTA DNRYIHFTFS GGGGVCLGEE FIIPVTTVIN TDVFTHDYCE SFNCVSVQTK SLKEICSESL
RSPTNSSRYN LNGIMIISON NMTDFKIQLN GITYNKLSFG SPGRLSKTLG QVLYYQSSMS WDTYKAGFV
EKWKPFPTNW MNNTVISRPN QGNCPRYHHC PEICYGGTYN DIAPLDLGKD MYVSVILSD QLAENPEITV
FNSTTILYKE RVSKDELNTR STTSCFLFL DEPWCISVLE TNRFNGKSIR PEIYSYKIPK YC

(配列番号7)

【0054】

Gタンパク質CedPVの断片の例としては、ワクチン、診断、およびスクリーニングの迅速な高処理量産生を可能にする天然ウイルスG糖タンパク質の特徴を保持するCedPV Gタンパク質の可溶性形態が挙げられる。

【0055】

CedPV G糖タンパク質の可溶性形態は、G糖タンパク質の外部ドメイン(例えば、細胞外)の少なくとも一部を含む。選択された実施形態において、CedPVは一般に、G糖タンパク質の膜貫通ドメインの全部または一部と、G糖タンパク質の細胞質尾部の全部または一部とを欠失することによって産生される。一実施形態において、CedPVの可溶性Gタンパク質は、完全長のGタンパク質の細胞質領域の任意の部分を含まない。別の実施形態において、CedPVの可溶性Gタンパク質は、膜貫通ドメインの任意の部分を含まない。更に別の実施形態において、CedPVの可溶性Gタンパク質は、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの一部を含まない。本明細書で使用されるとき、「可溶性」という用語は単に、Gタンパク質が、その細胞質尾部の一部または全部を欠落していること、またはGタンパク質が、膜貫通ドメインの全部または一部を欠落していること、

またはその両方を意味する。いくつかの実施形態において、可溶性G糖タンパク質は、配列番号7においてK87の後で切り捨てられる。「可溶性」という用語は、水性または非水性溶媒中で溶解するタンパク質の能力に関係がない。

【0056】

本発明の可溶性CedPV G糖タンパク質は、一般に、対応している天然ウイルス糖タンパク質の1個以上の特徴（ウイルス宿主細胞受容体と相互作用するまたはそれに結合する能力など）を保持し、モノマーおよび/またはオリゴマー形態（複数可）で産生され得るか、または抗体（ウイルス中和抗体を含むが、これに限定されない）を誘発する能力により、天然G糖タンパク質を認識することができる。付加的な特徴の例としては、宿主細胞の感染を阻止または防止する能力が挙げられるが、これに限定されない。従来の方法を用いて、1個以上の特徴について可溶性CedPV G糖タンパク質を評価し得る。使用され得る方法の例としては、本明細書の実施例に記載のアッセイが挙げられるが、これに限定されない。

10

【0057】

上記の配列番号1のヌクレオチド配列を参照すると、Lタンパク質のコード配列は、位置10572で始まり、18077で終了し、配列番号8に開示されているように2501アミノ酸長のポリペプチドをもたらす。したがって、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。加えて、本発明はまた、配列番号1の位置10572～18077にあるポリヌクレオチド配列と少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。

20

【0058】

本発明はまた、ポリペプチド、CedPV L-タンパク質の誘導体および断片をコードする核酸分子を提供する。特に、本発明は、配列番号8のポリペプチドと少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号8のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

30

【0059】

配列番号8のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1005、1010、1015、1020、1025、1030、1035、1040、1045、1050、1055、1060、1065、1070、1075、1080、1085、1090、1095、1100、1105、1110、1115、1120、1125、1130、1135、1140、1145、1150、1155、1160、1165、1170、1175、1180、1185、1190、1195、1200、1205、1210、1215、1220、1225、1230、1235、1240、1245、1250、1255、1260、1265、1270、1275、1280、1285、1290、1295、1300、1305、1310、1315、1320、1325、1330、1335、1340、1345、1350、1355、1360、1365、1370、1375、1380、1385、1390、1395、1400、1405、1410、1415、1420、1425、1430、1435、1440、1445、1450、1455、1460、1465、1470、1475、1480、1485、1490、1495、1500、1505、1510、1515、1520、1525、1530、1535、1540、1545、1550、1555、1560、1565、1570、1575、1580、1585、1590、1595、1600、1605、1610、1615、1620、1625、1630、1635、1640、1645、1650、1655、1660、1665、1670、1675、1680、1685、1690、1695、1700、1705、1710、1715、1720、1725、1730、1735、1740、1745、1750、1755、1760、1765、1770、1775、1780、1785、1790、1795、1800、1805、1810、1815、1820、1825、1830、1835、1840、1845、1850、1855、1860、1865、1870、1875、1880、1885、1890、1895、1900、1905、1910、1915、1920、1925、1930、1935、1940、1945、1950、1955、1960、1965、1970、1975、1980、1985、1990、1995、2000、2005、2010、2015、2020、2025、2030、2035、2040、2045、2050、2055、2060、2065、2070、2075、2080、2085、2090、2095、2100、2105、2110、2115、2120、2125、2130、2135、2140、2145、2150、2155、2160、2165、2170、2175、2180、2185、2190、2195、2200、2205、2210、2215、2220、2225、2230、2235、2240、2245、2250、2255、2260、2265、2270、2275、2280、2285、2290、2295、2300、2305、2310、2315、2320、2325、2330、2335、2340、2345、2350、2355、2360、2365、2370、2375、2380、2385、2390、2395、2400、2405、2410、2415、2420、2425、2430、2435、2440、2445、2450、2455、2460、2465、2470、2475、2480、2485、2490、2495、2500、2505、2510、2515、2520、2525、2530、2535、2540、2545、2550、2555、2560、2565、2570、2575、2580、2585、2590、2595、2600、2605、2610、2615、2620、2625、2630、2635、2640、2645、2650、2655、2660、2665、2670、2675、2680、2685、2690、2695、2700、2705、2710、2715、2720、2725、2730、2735、2740、2745、2750、2755、2760、2765、2770、2775、2780、2785、2790、2795、2800、2805、2810、2815、2820、2825、2830、2835、2840、2845、2850、2855、2860、2865、2870、2875、2880、2885、2890、2895、2900、2905、2910、2915、2920、2925、2930、2935、2940、2945、2950、2955、2960、2965、2970、2975、2980、2985、2990、2995、3000、3005、3010、3015、3020、3025、3030、3035、3040、3045、3050、3055、3060、3065、3070、3075、3080、3085、3090、3095、3100、3105、3110、3115、3120、3125、3130、3135、3140、3145、3150、3155、3160、3165、3170、3175、3180、3185、3190、3195、3200、3205、3210、3215、3220、3225、3230、3235、3240、3245、3250、3255、3260、3265、3270、3275、3280、3285、3290、3295、3300、3305、3310、3315、3320、3325、3330、3335、3340、3345、3350、3355、3360、3365、3370、3375、3380、3385、3390、3395、3400、3405、3410、3415、3420、3425、3430、3435、3440、3445、3450、3455、3460、3465、3470、3475、3480、3485、3490、3495、3500、3505、3510、3515、3520、3525、3530、3535、3540、3545、3550、3555、3560、3565、3570、3575、3580、3585、3590、3595、3600、3605、3610、3615、3620、3625、3630、3635、3640、3645、3650、3655、3660、3665、3670、3675、3680、3685、3690、3695、3700、3705、3710、3715、3720、3725、3730、3735、3740、3745、3750、3755、3760、3765、3770、3775、3780、3785、3790、3795、3800、3805、3810、3815、3820、3825、3830、3835、3840、3845、3850、3855、3860、3865、3870、3875、3880、3885、3890、3895、3900、3905、3910、3915、3920、3925、3930、3935、3940、3945、3950、3955、3960、3965、3970、3975、3980、3985、3990、3995、4000、4005、4010、4015、4020、4025、4030、4035、4040、4045、4050、4055、4060、4065、4070、4075、4080、4085、4090、4095、4100、4105、4110、4115、4120、4125、4130、4135、4140、4145、4150、4155、4160、4165、4170、4175、4180、4185、4190、4195、4200、4205、4210、4215、4220、4225、4230、4235、4240、4245、4250、4255、4260、4265、4270、4275、4280、4285、4290、4295、4300、4305、4310、4315、4320、4325、4330、4335、4340、4345、4350、4355、4360、4365、4370、4375、4380、4385、4390、4395、4400、4405、4410、4415、4420、4425、4430、4435、4440、4445、4450、4455、4460、4465、4470、4475、4480、4485、4490、4495、4500、4505、4510、4515、4520、4525、4530、4535、4540、4545、4550、4555、4560、4565、4570、4575、4580、4585、4590、4595、4600、4605、4610、4615、4620、4625、4630、4635、4640、4645、4650、4655、4660、4665、4670、4675、4680、4685、4690、4695、4700、4705、4710、4715、4720、4725、4730、4735、4740、4745、4750、4755、4760、4765、4770、4775、4780、4785、4790、4795、4800、4805、4810、4815、4820、4825、4830、4835、4840、4845、4850、4855、4860、4865、4870、4875、4880、4885、4890、4895、4900、4905、4910、4915、4920、4925、4930、4935、4940、4945、4950、4955、4960、4965、4970、4975、4980、4985、4990、4995、5000、5005、5010、5015、5020、5025、5030、5035、5040、5045、5050、5055、5060、5065、5070、5075、5080、5085、5090、5095、5100、5105、5110、5115、5120、5125、5130、5135、5140、5145、5150、5155、5160、5165、5170、5175、5180、5185、5190、5195、5200、5205、5210、5215、5220、5225、5230、5235、5240、5245、5250、5255、5260、5265、5270、5275、5280、5285、5290、5295、5300、5305、5310、5315、5320、5325、5330、5335、5340、5345、5350、5355、5360、5365、5370、5375、5380、5385、5390、5395、5400、5405、5410、5415、5420、5425、5430、5435、5440、5445、5450、5455、5460、5465、5470、5475、5480、5485、5490、5495、5500、5505、5510、5515、5520、5525、5530、5535、5540、5545、5550、5555、5560、5565、5570、5575、5580、5585、5590、5595、5600、5605、5610、5615、5620、5625、5630、5635、5640、5645、5650、5655、5660、5665、5670、5675、5680、5685、5690、5695、5700、5705、5710、5715、5720、5725、5730、5735、5740、5745、5750、5755、5760、5765、5770、5775、5780、5785、5790、5795、5800、5805、5810、5815、5820、5825、5830、5835、5840、5845、5850、5855、5860、5865、5870、5875、5880、5885、5890、5895、5900、5905、5910、5915、5920、5925、5930、5935、5940、5945、5950、5955、5960、5965、5970、5975、5980、5985、5990、5995、6000、6005、6010、6015、6020、6025、6030、6035、6040、6045、6050、6055、6060、6065、6070、6075、6080、6085、6090、6095、6100、6105、6110、6115、6120、6125、6130、6135、6140、6145、6150、6155、6160、6165、6170、6175、6180、6185、6190、6195、6200、6205、6210、6215、6220、6225、6230、6235、6240、6245、6250、6255、6260、6265、6270、6275、6280、6285、6290、6295、6300、6305、6310、6315、6320、6325、6330、6335、6340、6345、6350、6355、6360、6365、6370、6375、6380、6385、6390、6395、6400、6405、6410、6415、6420、6425、6430、6435、6440、6445、6450、6455、6460、6465、6470、6475、6480、6485、6490、6495、6500、6505、6510、6515、6520、6525、6530、6535、6540、6545、6550、6555、6560、6565、6570、6575、6580、6585、6590、6595、6600、6605、6610、6615、6620、6625、6630、6635、6640、6645、6650、6655、6660、6665、6670、6675、6680、6685、6690、6695、6700、6705、6710、6715、6720、6725、6730、6735、6740、6745、6750、6755、6760、6765、6770、6775、6780、6785、6790、6795、6800、6805、6810、6815、6820、6825、6830、6835、6840、6845、6850、6855、6860、6865、6870、6875、6880、6885、6890、6895、6900、6905、6910、6915、6920、6925、6930、6935、6940、6945、6950、6955、6960、6965、6970、6975、6980、6985、6990、6995、7000、7005、7010、7015、7020、7025、7030、7035、7040、7045、7050、7055、7060、7065、7070、7075、7080、7085、7090、7095、7100、7105、7110、7115、7120、7125、7130、7135、7140、7145、7150、7155、7160、7165、7170、7175、7180、7185、7190、7195、7200、7205、7210、7215、7220、7225、7230、7235、7240、7245、7250、7255、7260、7265、7270、7275、7280、7285、7290、7295、7300、7305、7310、7315、7320、7325、7330、7335、7340、7345、7350、7355、7360、7365、7370、7375、7380、7385、7390、7395、7400、7405、7410、7415、7420、7425、7430、7435、7440、7445、7450、7455、7460、7465、7470、7475、7480、7485、7490、7495、7500、7505、7510、7515、7520、7525、7530、7535、7540、7545、7550、7555、7560、7565、7570、7575、7580、7585、7590、7595、7600、7605、7610、7615、7620、7625、7630、7635、7640、7645、7650、7655、7660、7665、7670、7675、7680、7685、7690、7695、7700、7705、7710、7715、7720、7725、7730、7735、7740、7745、7750、7755、7760、7765、7770、7775、7780、7785、7790、7795、7800、7805、7810、7815、7820、7825、7830、7835、7840、7845、7850、7855、7860、7865、7870、7875、7880、7885、7890、7895、7900、7905、7910、7915、7920、7925、7930、7935、7940、7945、7950、7955、7960、7965、7970、7975、7980、7985、7990、7995、8000、8005、8010、8015、8020、8025、8030、8035、8040、8045、8050、8055、8060、8065、8070、8075、8080、8085、8090、8095、8100、8105、8110、8115、8120、8125、8130、8135、8140、8145、8150、8155、8160、8165、8170、8175、8180、8185、8190、8195、8200、8205、8210、8215、8220、8225、8230、8235、8240、8245、8250、8255、8260、8265、8270、8275、8280、8285、8290、8295、8300、8305、8310、8315、8320、8325、8330、8335、8340、8345、8350、8355、8360、8365、8370、8375、8380、8385、8390、8395、8400、8405、8410、8415、8420、8425、8430、8435、8440、8445、8450、8455、8460、8465、8470、8475、8480、8485、8490、8495、8500、8505、8510、8515、8520、8525、8530、8535、8540、8545、8550、8555、8560、8565、8570、8575、8580、8585、8590、8595、8600、8605、8610、8615、8620、8625、8630、8635、8640、8645、8650、8655、8660、8665、8670、8675、8680、8685、8690、8695、8700、8705、8710、8715、8720、8725、8730、8735、8740、8745、8750、8755、8760、8765、8770、8775、8780、8785、8790、8795、8800、8805、8810、8815、8820、8825、8830、8835、8840、8845、8850、8855、8860、8865、8870、8875、8880、8885、8890、8895、8900、8905、8910、8915、8920、8925、8930、8935、8940、8945、8950、8955、8960、8965、8970、8975、8980、8985、8990、8995、9000、9005、9010、9015、9020、9025、9030、9035、9040、9045、9050、9055、9060、9065、9070、9075、9080、9085、9090、9095、9100、9105、9110、9115、9120、9125、9130、9135、9140、9145、9150、9155、9160、9165、9170、9175、9180、9185、9190、9195、9200、9205、9210、9215、9220、9225、9230、9235、9240、9245、9250、9255、9260、9265、9270、9275、9280、9285、9290、9295、9300、9305、9310、9315、9320、9325、9330、9335、9340、9345、9350、9355、9360、9365、9370、9375、9380、9385、9390、9395、9400、9405、9410、9415、9420、9425、9430、9435、9440、9445、9450、9455、9460、9465、9470、9475、9480、9485、9490、9495、9500、9505、9510、9515、9520、9525、9530、9535、9540、9545、9550、9555、9560、9565、9570、9575、9580、9585、9590、9595、9600、9605、9610、9615、9620、9625、9630、9635、9640、9645、9650、9655、9660、9665、9670、9675、9680、9685、9690、9695、9700、9705、9710、9715、9720、9725、9730、9735、9740、9745、9750、9755、9760、9765、9770、9775、9780、9785、9790、9795、9800、9805、9810、9815、9820、9825、9830、9835、9840、9845、9850、9855、9860、9865、9870、9875、9880、9885、9890、9895、9900、9905、9910、9915、9920、9925、9930、9935、9940、9945、9950、9955、9960、9965、9970、9975、9980、9985、9990、9995、10000、10005、10010、10015、10020、10025、10030、10035、10040、10045、10050、10055、10060、10065、10070、10075、10080、10085、10090、10095、10100、10105、10110、10115、10120、10125、10130、10135、10140、10145、10150、10155、10160、10165、10170、10175、10180、10185、10190、10195、10200、10205、10210、10215、10220、10225、10230、10235、10240、10245、10250、10255、10260、10265、10270、10275、10280、10285、10290、10295、10300、10305、10310、10315、10320、10325、10330、10335、10340、10345、10350、10355、10360、10365、10370、10375、10380、10385、10390、10395、10400、10405、10410、10415、10420、10425、10430、10435、10440、10445、10450、10455、10460、10465、10470、10475、10480、10485、10490、10495、10500、10505、10510、10515、10520、10525、10530、10535、10540、10545、10550、10555、10560、10565、10570、10575、10580、10585、10590、10595、10600、10605、10610、10615、10620、10625、10630、10635、10640、10645、10650、10655、10660、10665、10670、10675、10680、10685、10690、10695、10700、10705、10710、10715、10720、10725、10730、10735、10740、10745、10750、10755、10760、10765、10770、10775、10780、10785、10790、10795、10800、10805、10810、10815、10820、10825、10830、10835、10840、10845、10850、10855、10860、10865、10870、10875、10880、10885、10890、10895、10900、10905、10910、10915、10920、10925、10930、10935、10940、10945、10950、10955、10960、10965、10970、10975、10980、10985、10990、10995、11000、11005、11010、11015、11020、11025、11030、11035、11040、11045、11050、11055、11060、11065、

5、810、815、820、825、830、835、840、845、850、85
 5、860、865、870、875、880、885、890、895、900、90
 5、910、915、920、925、930、935、940、945、950、95
 5、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1
 005、1010、1015、1020、1025、1030、1035、1040、1
 045、1050、1055、1060、1065、1070、1075、1080、1
 085、1090、1095、1100、1105、1110、1115、1120、1
 125、1130、1135、1140、1145、1150、1155、1160、1
 165、1170、1175、1180、1185、1190、1195、1200、1
 205、1210、1215、1220、1225、1230、1235、1240、1 10
 245、1250、1255、1260、1265、1270、1275、1280、1
 285、1290、1295、1300、1305、1310、1315、1320、1
 325、1330、1335、1340、1345、1350、1355、1360、1
 365、1370、1375、1380、1385、1390、1395、1400、1
 405、1410、1415、1420、1425、1430、1435、1440、1
 445、1450、1455、1460、1465、1470、1475、1480、1
 485、1490、1495、1500、1505、1510、1515、1520、1
 525、1530、1535、1540、1545、1550、1555、1560、1
 565、1570、1575、1580、1585、1590、1595、1600、1
 605、1610、1615、1620、1625、1630、1635、1640、1 20
 645、1650、1655、1660、1665、1670、1675、1680、1
 685、1690、1695、1700、1705、1710、1715、1720、1
 725、1730、1735、1740、1745、1750、1755、1760、1
 765、1770、1775、1780、1785、1790、1795、1800、1
 805、1810、1815、1820、1825、1830、1835、1840、1
 845、1850、1855、1860、1865、1870、1875、1880、1
 885、1890、1895、1900、1905、1910、1915、1920、1
 925、1930、1935、1940、1945、1950、1955、1960、1
 965、1970、1975、1980、1985、1990、1995、2000、2
 005、2010、2015、2020、2025、2030、2035、2040、2 30
 045、2050、2055、2060、2065、2070、2075、2080、2
 085、2090、2095、2100、2105、2110、2115、2120、2
 125、2130、2135、2140、2145、2150、2155、2160、2
 165、2170、2175、2180、2185、2190、2195、2200、2
 205、2210、2215、2220、2225、2230、2235、2240、2
 245、2250、2255、2260、2265、2270、2275、2280、2
 285、2290、2295、2300、2305、2310、2315、2320、2
 325、2330、2335、2340、2345、2350、2355、2360、2
 365、2370、2375、2380、2385、2390、2395、2400、2
 405、2410、2415、2420、2425、2430、2435、2440、2 40
 445、2450、2455、2460、2465、2470、2475、2480、2
 485、2490、2491、2492、2593、2494、2495、2496、2
 497、2498、2499、または2500アミノ酸長の断片であり得る。本明細書で
 使用されるとき、上記で開示された断片の長さはまた、一定の範囲内のいくつかのアミノ
 酸を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、本明細書で使用されるとき、
 「配列番号8のポリペプチド断片は、少なくとも約15、20、25、30...アミノ
 酸長の断片であり得る」によって、断片が15～20アミノ酸長であり得る、および断片
 が20～25アミノ酸長であり得るなどを意味する。配列番号8のポリペプチド断片（例
 えば、「少なくとも...約2050、2055...アミノ酸長」として、2050
 ～2055アミノ酸長であるポリペプチド断片が挙げられることを当業者は認識するであ 50

ろう。

【 0 0 6 0 】

【 表 8 】

```

MESDFDISVS DVLYPECHLD SPIVGGLKIT SLEYANLTHN QPHEDQTLT NINVNKKKKI KSPLISQQSL
FGNEVNKEIF DLKNYYHVPY PECNRDLFLI SDDKIAFKLS KIMDNSNKL DGLERKLSRL ISNVNDQLLN
ATSLHNNSEM DRKGKEHPCF PEKSTIDVVR QQRQTRDFPK NSTREGSPK HPDAGTPEN SAKNDLHRDN
TDNMPTGHSS TSMKKPKISG EYLSMWLDS EDLGSKRISA QLGDVSCVK HLHTTEDKPI IVPDTRYIQN
HESNNDIFPK KEKKFCKLPP SSDNLTKIMV NSKWNPFLL WFTVKTELRA CQKENYKRN RKLGIITSIK
GSCYKLILNQ NLVAIFEEDS SGYS DHKKRK KRCYYLTPEM VLMFSDVTEG RLMIDVAMRF DKKYKTLEKK
ALKLWFLIDE LFPSMGNRVY NIISMLEPLT LAILQVKDES RLLRGAFMH CLGDLFEELR ESKNYPEDEI
KRFANDLINV MTCRDIHLVA EFFSFRTFG HPILNAQTAA RKVREYMLAD KILEYEPIMK GHAI FCAIII
NGFRDRHGGV WPPLDLPKHC SKNIISLKN GEGVTYEVAI NNWRSFVGLK FKCFMGLNLD NDLSMYMKDK
ALSPRLDLDW SIYSREVMSY QPPRNKKSRR LVEVFDDQD FDPVDMINYV LTGEYLRDD FNASYSLKEK
ETKQVGRIFA KMTYKMRACQ VIAENLIAHG IGRYFHENG M VKDEHELKSK LFQLSISGIP RGNKNKSTN
DTIHESKIEN NHSFKNIQNR SFRKTDNPNY RFNIDNPTFL SPNCNPKYNR KNSETIGIFS RAETKSMIRE
QKSHREVKIN KLDIGSDNEE QGKEIDAAKY KITDNPNPHI NPQDQPGICQ EDKGKEGAKS DLTEGMSFLE
MHTLFNPSKS DIRTNLELEK SLSNPGFIS QKEKRGKTYN ESHSLGKFSK EDEERYDVIS AFLTDLRKF
CLNWRHESIG IFARRMDEIY GLPGFFNMWH RRLERSVLYV ADPHCFPSIN EHIDLNSPE RDI FHHPKG
GIEGYSQKLW TIATIPFLFL SAHETNTRIA AVVQGDNQSI AITHKVHPLH PYKMKKELSA MQAKKYFSRL
RHNMKALGHE LKATETIIST HFFIYSKKIH YDGA VLSQSL KSMARCVFWS ETLVDETRAA CSNISTTIAK
AIENGYSRRS GYLINVLKTI QQINISLSFN INECMTDDII RPFDRNPNWI KHAALIPASL GGLNYMMSR
LYVRNIGDPV TASIADVCRM ILGGVLP IGI LHNIMLQEPG DATYLDWCSD PYSINLKQTQ SITKVIKNIT
ARVILRNSVN PLLKGLFHG AYEEDTELAT FILDRRVILP RVGHEILNNS ITGAREEISG LLDTTKGLIR
IGIAKGLTQ RTLSRISNYD YEQFLNLMNM LKNKEQNSVI SLSACSVDA IALRSRMRK LAKGRLIYGL
EVPDPIEAMI GFLILGSENC LLCDSGSKNY TWFFIPKDVQ LDKIDKDHAS IRVPYVGSTT EERSEIKLGS
VKNPSKSLKS AIRLATVYTW AFGTSDAEWW EAWYLSNQRA NIPDLVLKTI TPISTSTNIA HRLRDRSTQV
KYASTSLNRV SRHVTISNDN MNFEFDGVKM DTNLIYQQVM LLGLSCLES FNRNKMNTSY NIVYHLHVQE
HCCVKALNDL PYTPSTHPVP NYTEVRDNR L IYDQPILEF DELRLAIQQT KKVDLEFSLW DTKEHLENLA
QSLAITVTDI MTKSDKDHK DQRSIDVDDN IKTLPITFL VDEPMFAVNL GLHISIKSF DIHFKRPRGR
YSMIEYLTDL LNTSSHVYR ILTNVLSHPR VMKFTNAGL LVPKYGPYLT SODFKKMAVD FIITAYTTFL

TNWCNNKFS ILIPEQDPDI LELRKDITHA RHLCMISDLY CYSFKQPWIK ELTPQEKICV MEDFIANCVA
NDQTSAGWNI TPLRVYNLPA STTYIRRGII KQLRIRQSNE PIDLEDIRIG QNPDFVNKPI EFCSSSEFGIT
IYNLEEILQS NVHLSVNMNI DSSTSNNTEN HLFRRVGLNS TSSYKALSLT PVIKRYHQQN TNRLFIGEGS
GSMYLYQKT LGETICFFNS GVQYNEDLGQ REQSLYPSEY SICEQGVKKE NPLTGHVIPL FNGRPETWV
GNDDSFYKIL EHTINRDIGL VHSDMETGIG KDNYTILNEH AHLIALSLTV MIDDGILVSK VAYAPGFCIS
SLLNMYRTFF SLVLCAPFPY SNFESTEFYL ICLQKSIQGP ITPARAIQQT TKQSREEDNS ITNNILKIKN
LVQKEFIKTV KKKYEIHPF NCPINFTKDD KYLMSVGFQA NGPDMIRKET GYDIGSNVEN LRDVLKLF
DAVTFYDDVT NKKNFLNPYP VYTRTQYKIL MDKICKKVTL YTLIISCKGS NQYCWEIKSQ IRKHCLILDL
KSKVFTKLIP KGLRERGDSK GMKSIWFTKL TSQEVKRWK MISYIVIISN P (配列番号8)

```

10

20

【 0 0 6 1 】

参照アミノ酸配列（例えば、配列番号7）に対して少なくとも、例えば、約95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、アミノ酸配列が参照アミノ酸配列の各100アミノ酸当たり最大約5個の修飾を含み得ることを除いて、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列と同一であることを意味すると理解される。換言すれば、参照アミノ酸配列と少なくとも約95%同一のアミノ酸配列を有するペプチドを得るために、参照配列のアミノ酸残基の最大約5%が欠失し得るもしくは別のアミノ酸で置換され得る、または参照配列中の全アミノ酸の最大約5%のいくつかのアミノ酸が、参照配列中に挿入され得る。参照配列のこれらの修飾は、参照アミノ酸配列のN末端またはC末端の位置またはそれらの末端位置の間のどこかで発生し得、参照配列中のアミノ酸の間で個別に、または参照配列内の1個以上の連続した基中のいずれかにおいて散在する。

30

40

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用されるとき、「同一性」は、参照ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と比較して、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の尺度である。一般的に、配列は、最上位の一致が取得されるように整列される。「同一性」それ自体は、当技術分野で認識された意味を有し、公表された技術を用いて計算することができる。（例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequ

50

ence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York (1991)を参照されたい)。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の同一性を測定するためのいくつかの方法があるが、「同一性」という用語は、当業者に周知である(Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988))。2個の配列間の同一性または類似性を判定するために一般的に使用される方法としては、Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) and Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されない。コンピュータプログラムはまた、同一性および類似性を計算する方法およびアルゴリズムを含み得る。2つの配列間の同一性および類似性を判定するコンピュータプログラム法の例としては、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(i):387 (1984))、BLASTP、Expasy、BLASTN、FASTA(Atschul, S. F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990))、およびFASTDBが挙げられるが、これらに限定されない。同一性および類似性を判定するための方法の例が、参照により組み込まれるMichaels, G. and Garian, R., Current Protocols in Protein Science, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc. (2000)において議論されている。

【0063】

本発明の一実施形態において、2個以上のポリペプチド間の同一性を判定するために使用されるアルゴリズムは、BLASTPである。本発明の別の実施形態において、2個以上のポリペプチド間の同一性を判定するために使用されるアルゴリズムはFASTDBであり、これはBrutlagらのアルゴリズムに基づいている(Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)、参照により組み込まれる)。FASTDB配列整列において、クエリ配列および参照配列は、アミノ酸配列である。配列整列の結果は、パーセント同一性による。一実施形態では、同一性パーセントを計算するためにアミノ酸配列のFASTDB整列において使用され得るパラメータとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マトリックス=PAM、K-タプル=2、不一致ペナルティ=1、結合ペナルティ=20、無作為化グループ長=0、カットオフ得点=1、隙間ペナルティ=5、隙間サイズペナルティ0.05、ウィンドウサイズ=500または対象アミノ配列の長さのうちのいずれか短い方。

【0064】

内部付加または欠失のためではなくN末端またはC末端の付加または欠失のために、参照配列がクエリ配列よりも短いまたは長い場合、FASTDBプログラムが、同一性パーセントを計算するときN末端およびC末端の切断または参照配列の付加を考慮しないために、手動で補正を行うことができる。参照配列に対してN末端またはC末端で切断されたクエリ配列について、同一性パーセントは、クエリ配列の全塩基のパーセントとして、一致/整列していない参照配列に対して、N末端およびC末端であるクエリ配列の残基数を計算することによって補正される。FASTDB配列整列の結果により、一致/整列を判定する。整列パーセンテージは、次いで、同一性パーセントから減算され、最終同一性パーセントの得点に到達するために、指定されたパラメータを用いて上記のFASTDBプログラムによって計算される。この補正された得点は、整列が互いにどれだけ「対応する」か、ならびに同一性パーセンテージを判定する目的のために使用され得る。クエリ配

10

20

30

40

50

列のN末端またはC末端を越えて延在する参照配列の残基は、同一性パーセントの得点を手動で調整する目的のためのものと考えられ得る。すなわち、比較配列のN末端またはC末端と一致／整列しない残基は、同一性パーセント得点または整列番号付けを手動で調整するとき、数えられる。

【0065】

例えば、90アミノ酸残基のクエリ配列は、同一性パーセントを判定するために100残基の参照配列と整列される。欠失がクエリ配列のN末端で起こり、ゆえにFASTDB整列は、N末端の最初の10残基の一致／整列を示さない。10個の不对残基は、参照配列の10%を表し（N末端およびC末端における残基の数は一致しない／参照配列中の残基の総数）、したがって、10%がFASTDBプログラムによって計算された同一性パーセント得点から減算される。残りの90個の残基が完全に一致した（100%整列）場合には、最終的な同一性パーセントは、90%（100%整列、10%不一致の突出）であろう。別の例では、欠失が内部欠失であることを除いて、90残基のクエリ配列は、100参照配列と比較される。この場合、FASTDBによって計算された同一性パーセントは、クエリと整合／整列されない対象配列のN末端またはC末端で残基が存在しないため、手動で補正されない。更に別の実施例において、110アミノ酸のクエリ配列は、同一性パーセントを判定するために100残基の参照配列と整列される。クエリの付加がクエリ配列のN末端で起こり、ゆえにFASTDB整列は、N末端の最初の10残基の一致／整列を示さない場合もある。クエリ配列の残りの100個のアミノ酸残基が、参照配列の全長に対して95%の同一性を有する場合、クエリのN末端付加は無視され、参照配列に対するクエリの同一性パーセントは95%となるであろう。

【0066】

本明細書で使用されるとき、「に対応する（三人称含）」および「に対応している」という用語は、それらが整列配列に関連するとき、参照タンパク質内の列挙された位置を意味することが意図される（例えば、CedPV Gタンパク質、および参照タンパク質上の位置と整列する修飾されるCedPV Gタンパク質におけるそれらの位置）。このように、対象CedPV Gタンパク質のアミノ酸配列が、参照CedPV Gタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号7）と整列するとき、参照配列の一定の列挙された位置「に対応する」対象配列中のアミノ酸は、参照配列（例えば、配列番号7）のこれらの位置で整列するものであるが、参照配列のこれらの正確な数値位置にある必要は必ずしもない。配列間の対応しているアミノ酸を判定するために配列を整列するための方法が、本明細書に記載されている。したがって、本発明は、配列が配列番号7の配列に対応する新規のペプチドを提供する。

【0067】

発現ベクター系中へ本明細書に開示されたタンパク質をコードするポリヌクレオチドの挿入から生じる変異体もまた、企図される。例えば、変異体は（通常、挿入）、修飾されたタンパク質のアミノ末端および／またはカルボキシ末端は、別のポリペプチドに融合されたときから生じ得る。

【0068】

別の態様において、本発明は、修飾されたタンパク質中の1つ以上のアミノ酸残基が、除去される欠失変異体を提供する。欠失は、修飾されたタンパク質の一方または両方の末端で、または修飾されたタンパク質の1つ以上の非末端アミノ酸残基の除去により、もたらされ得る。欠失変異体は、したがって、修飾されたタンパク質の全ての断片を含む。

【0069】

開示された同一性パーセントの制限内で、本発明はまた、本発明の開示されたポリペプチドの置換変異体に関する。置換変異体は、修飾されたタンパク質の1つ以上のアミノ酸残基が除去され、代替の残基と置換されるそれらのポリペプチドを含む。一態様では、置換は本来保存的であるが、しかしながら、本発明はまた、非保存的である置換を包含する。以下の表に記載のように、この目的のための保存的置換が定義され得る。アミノ酸は、物理的特性および二次および三次タンパク質構造に対する寄与に応じて分類され得る。保

存的置換は、類似の特性を有する別のアミノ酸のための1個のアミノ酸の置換として、当該技術分野で認識されている。例示的な保存的置換は、以下の通りである。

【0070】

【表9】

表I 保存的置換

側鎖特徴	アミノ酸
<u>脂肪族</u>	
非極性	G、A、P、I、 L、V
極性 - 非荷電	C、S、T、M、 N、Q
極性 - 荷電	D、E、K、R
<u>芳香族</u>	H、F、W、Y
<u>その他</u>	N、Q、D、E

10

【0071】

代替的に、保存的アミノ酸は、以下の通り、Lehninger, [Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY, N.Y. (1975), pp. 71 77] に説明されるようにグループ化される。

20

【0072】

【表10】

表II 保存的置換

側鎖特徴	アミノ酸
<u>非極性 (疎水性)</u>	
A. 脂肪族:	A、L、I、V、P
B. 芳香族:	F、W
C. 硫黄含有:	M
D. 境界:	G
<u>非荷電極性</u>	
A. ヒドロキシル:	S、T、Y
B. アミド:	N、Q
C. シルフヒドリル (Sylfhydryl):	C
D. 境界:	G
<u>陽性荷電 (塩基性):</u>	K、R、H
<u>陰性荷電 (酸性):</u>	D、E

30

【0073】

更に他の代替的で例示的な保存的置換は、以下の通りである。

【0074】

40

【表 1 1】

表 I I I 保存的置換

元の残基	例示的置換
Ala (A)	Val、Leu、Ile
Arg (R)	Lys、Gln、Asn
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe
Leu (L)	Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys (K)	Arg、Gln、Asn
Met (M)	Leu、Phe、Ile
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala

10

20

【0075】

30

本発明のペプチドまたはペプチドの定義は、アミノ酸残基の挿入、欠失、または置換以外の修飾を有するポリペプチドを含むことが意図されていることを理解すべきである。例を挙げると、修飾は本来共有結合性であり、例えば、ポリマー、脂質、他の有機および無機部分との化学結合を含み得る。このような誘導体は、ポリペプチドの循環半減期を増加させるように調製され得るか、または、所望の細胞、組織、または器官のためのポリペプチドの標的化能力を改善するように設計され得る。同様に、本発明は、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールのような1つ以上の水溶性ポリマー付着を含むように共有結合的に修飾された修飾ペプチドを更に包含する。

【0076】

40

本発明はまた、特に、C e d P Vまたは本明細書で開示された任意のC e d P Vタンパク質の断片に結合する抗体またはその断片を対象とする。

【0077】

具体的には、本発明は、シダーウイルスのG糖タンパク質の頭部の4個の疎水性ポケットに結合する抗体または抗体断片を提供する。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。シダーウイルスは恐らく、とりわけ、少なくとも内皮細胞上に存在するエフリンB2の膜貫通タンパク質に結合することによって、感染過程を開始する。特に、エフリンB2タンパク質は、シダーウイルスのG糖タンパク質の頭部上の4個の疎水性結合ポケット中に挿入する「GH-ループ領域」を含み、したがって、ウイルスが、細胞表面タンパク質に特異的に結合し、感染プロセスを開始することを可能にする。エフリンB

50

2 と結合するシダーウイルスの接触残基は、V 5 0 7、F 4 5 8、および I 4 0 1 であり、文字は標準的なアミノ酸の標準一文字略号を指し、番号は本明細書に開示された配列に従って、配列番号 7 のアミノ酸番号を指す。このように、抗体または抗体断片であり、抗体が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際出願第 P C T / U S 0 5 / 0 4 0 0 5 0 号および同第 P C T / U S 1 2 / 3 5 8 0 6 号に開示されている抗体のいずれでもないのであれば、本発明は、V 5 0 7 / F 4 5 8 / I 4 0 1 で定義されたシダーウイルスの非直線エピトープに結合する抗体または抗体断片を提供する。

【 0 0 7 8 】

例えば、本発明に包含される抗体としては、C e d P V G 糖タンパク質に特異的な抗体、ヘンドラウイルス G 糖タンパク質と交差反応する抗体、およびノまたはニパウイルス G 糖タンパク質および中和抗体が挙げられるが、これらに限定されない。例を挙げると、中和抗体の特徴としては、宿主細胞の感染を阻止または防止する能力が挙げられるが、これに限定されない。本発明の抗体はまた、当該技術分野で公知の方法を使用して特徴付けされ得る。

【 0 0 7 9 】

本発明において有用な抗体は、抗体のグリコシル化変異体、抗体のアミノ酸配列変異体、および共有結合的に修飾された抗体を含め、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片（例えば、F a b、F a b'、F (a b') 2、F v、F c など）、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヘテロ接合抗体、単鎖（S c F v）、それらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、および必要な特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子のあらゆる他の修正された構成を包含することができる。抗体の例は、マウス、ラット、ヒト、霊長類、または（キメラ抗体またはヒト化抗体を含む）他の任意の起源から派生する。

【 0 0 8 0 】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を調製する方法は、当該技術分野において周知である。ポリクローナル抗体は、例えば、免疫剤、必要に応じて、補助剤、の 1 回以上の注射により、哺乳類において高められ得る。補助剤の例としては、キーホールリンペット、ヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、大豆トリプシン阻害剤、フロインド完全補助剤、および M P L - T D M 補助剤が挙げられるが、これらに限定されない。免疫化プロトコルは、当業者によって判定され得る。

【 0 0 8 1 】

抗体は、代替的に、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を用いて産生され得る（例えば、K o h l e r , B . a n d M i l s t e i n , C . (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 を、または B u c k , D . W . , e t a l . , I n V i t r o , 1 8 : 3 7 7 - 3 8 1 (1 9 8 2) による修正として参照されたい）。

【 0 0 8 2 】

所望の場合、目的の抗体が配列決定され得、次いで、ポリヌクレオチド配列が、発現または増殖のためにベクター中にクローニングされ得る。目的の抗体をコードする配列は、宿主細胞中のベクター中に維持され得、次いで、宿主細胞が拡大し、将来の使用のために凍結され得る。代替的な方法では、ポリヌクレオチド配列は、抗体の「ヒト化」または親和性、抗体もしくは他の特徴を改善するように遺伝子操作のために使用され得る（例えば、G 糖タンパク質に対してより大きな親和性、およびノまたは宿主細胞受容体に対してシダーウイルス、ヘンドラ、またはニパウイルスの融合を阻害するより大きな効力を得るように抗体配列を遺伝的に操作する）。

【 0 0 8 3 】

抗体はまた、当該技術分野で既知の方法によってヒト化され得る。例えば、参照により組み込まれる米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号、同第 5 , 8 0 7 , 7 1 5 号、同第 5 , 8 6 6 , 6 9 2 号、同第 6 , 3 3 1 , 4 1 5 号、同第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、および同第 6 ,

10

20

30

40

50

180,370号を参照されたい。更に別の実施形態において、完全なヒト抗体は、特定のヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように操作された市販のマウスを使用することによって取得され得る。

【0084】

別の実施形態において、抗体は、組換え的に生成され、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて発現させることができる。例を挙げると、抗体は、ファージディスプレイ技術により組換え的に生成され得る。例えば、参照により組み込まれる米国特許第5,565,332号、同第5,580,717号、同第5,733,743号、および同第6,265,150号、ならびにWinter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455(1994)を参照されたい。代替的に、ファージディスプレイ技術(McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990))を使用して、インビトロでヒト抗体および抗体断片を産生することができる。ファージディスプレイは多様な形式で実施され得る(審査には、例えば、Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照されたい)。例を挙げると、本明細書中に記載の可溶性G糖タンパク質は、これらの技術によって組換え抗体を単離する目的のための抗原として使用することができる。

【0085】

抗体は、宿主動物から抗体および抗体産生細胞を最初に単離し、遺伝子配列を得て、宿主細胞(例えば、CHO細胞)において組換え的に抗体を発現させる遺伝子配列を用いることによって、組換え的に生成され得る。使用され得る別の方法は、植物(例えば、タバコ)における抗体配列またはトランスジェニックミルクを発現させることである。植物または牛乳中で組換え的に抗体を発現させるための方法が開示されている。例えば、参照により組み込まれるPeeters, et al. Vaccine 19:2756(2001)、Lonberg, N. and D. Huszar Int. Rev. Immunol. 13:65(1995)、およびPollock, et al., J. Immunol. Methods 231:147(1999)を参照されたい。抗体の誘導体(例えば、ヒト化された単鎖など)を作るための方法は、当技術分野で既知である。

【0086】

本発明の抗体は、例えば、生体試料もしくは検体中で、CedPV G糖タンパク質を単離もしくは精製する、またはヘンドラもしくはニパG糖タンパク質を検出するために使用する従来の方法によって担体に結合され得る。代替的に、例を挙げると、本発明の中和抗体は、感染したか、またはヘンドラ、ニパ、および/またはシダーウイルスに感染している疑いのある対象に受動的免疫療法として投与され得る。「対象」および「患者」という用語は同義的に使用され、ヒト、サル、家畜、競技用動物、およびペットを含むが、これらに限定されない。獣医学的使用もまた、本発明によって包含される。

【0087】

診断

【0088】

本発明のタンパク質、タンパク質断片、および/または抗体は、シダーウイルスについて様々な免疫アッセイで使用され得る。本発明の発現された組換えタンパク質の断片は、高品質管理により産生され得、生体試料中の抗体を検出する目的のための抗原として好適である。例を挙げれば、限定ではなく、可溶性CedPV G糖タンパク質は、対象の生体試料中で抗体を検出するためにELISAアッセイにおいて抗原として使用することができる。

【0089】

本発明のプライマーおよびプローブを含む核酸はまた、シダーウイルスのための様々なアッセイで使用される。本発明のプライマーおよびプローブを使用して、対象におけるシダーウイルスをコードするリボ核酸の存在を検出する。本発明はまた、核酸増幅技術(例

えば、逆転写酵素PCR法)を利用するシダーウイルスの存在を検出するための方法を含み、該方法は、DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)を用いて行われる変性、プライマーアニーリング、および拡張の繰り返し周期を利用し、由来する核酸における指数関数的な増加につながり、ウイルスの存在の検出を容易にする。

【0090】

ワクチン

【0091】

本発明はまた、シダーウイルスのためのワクチンに関する。一態様において、ワクチンは、ワクチンに基づくDNAである。当業者は、インビボでの外因性タンパク質の発現を得るために発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第6,436,908号、同第6,413,942号、および同第6,376,471号を参照されたい。所望のポリヌクレオチドの送達および所望の細胞内での発現のためのウイルスに基づくベクターは当該技術分野で周知であり、非限定的な実施例が本明細書に記載されている。別の態様において、ワクチンは、タンパク質に基づき、本発明のタンパク質の1つ以上の断片、またはタンパク質の断片を含む。タンパク質断片の例としては、外部ドメイン、トランス膜ドメイン、細胞質ドメイン、それらの機能部分、ならびに中和抗体に特異的に反応する部分が挙げられるが、それらに限定されない。ワクチンはまた、感染に対するより迅速な処置ならびに予防のための抗体に基づくワクチンであり得る。

【0092】

発現ベクターの投与としては、注射、経口投与、粒子銃、またはカテーテル挿入投与、および局所投与を含む、局所投与または全身投与が挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターまたはサブゲノムのポリヌクレオチドを含有する治療用組成物の標的送達もまた、使用することができる。受容体媒介性DNA送達技術については、例えば、Findenis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11: 202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266: 338に記載されている。

【0093】

非ウイルス送達ビヒクルおよび方法はまた、死滅したアデノウイルスに単独で連結されているまたは連結されていないポリイオン性(polyeationic)濃縮DNA(例えば、Curriel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147を参照されたい)、リガンド連結DNA(例えば、Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985を参照されたい)、真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、米国特許第5,814,482号、PCT国際公開特許第WO95/07994号、同第WO96/17072号、同第WO95/30763号、および同第WO97/42338号を参照されたい)(これらの全てが参照により組み込まれる)、および細胞膜を有する核電荷中和または融合に対して採用され得るが、これらに限定されない。裸のDNAもまた採用され得る。例示的な裸のDNA導入方法は、参照により組み込まれるPCT国際公開特許第WO90/11092号および米国特許第5,580,859号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリポソームは、参照により組み込まれる米国特許第5,422,120号、PCT国際公開特許第WO95/13796号、同第WO94/23697号、同第WO91/14445号、および欧州公開特許第EP0524968号に記載されている。更なる手法が、参照により組み込まれるPhillip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14: 2411、およびWoffending, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581に記載されている。

【0094】

ヒトへの投与のために、タンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むコドンが、ヒトへの使用のために最適化され得る。

【0095】

本発明の別の態様において、可溶性C e d P V G糖タンパク質は、サブユニットのワクチンとして使用される。可溶性C e d P V糖タンパク質またはそれらの組み合わせは、それら自体で、または補助剤と組み合わせて投与され得る。補助剤の例としては、アルミニウム塩、水中土壌乳剤、水中油型乳剤、サポニン、Q u i l Aおよびその誘導体、イスクム、リボソーム、ガンマイインターフェロンまたはインターロイキン12を含むサイトカイン、DNA、固体または半固体粒子でのマイクロカプセル化、フロインド完全および不完全補助剤またはムラミルジペプチドおよび類似体を含むその活性成分、D E A Eデキストラン/鉱物油、アルヒドロゲル、アウスファーム(A u s p h a r m)補助剤、およびアルガムリン(A l g a m m u l i n)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

可溶性C e d P V G糖タンパク質またはそれらの組み合わせを含むサブユニットのワクチンは、経口投与、静脈内投与、皮下投与、動脈内投与、筋肉内投与、心臓内投与、脊髄内投与、胸腔内投与、腹腔内投与、脳室内投与、舌下投与、および/または経皮的に投与することができる。

【0097】

用量および投与のスケジュールは、当該分野で既知の方法によって決定することができる。可溶性C e d P V G糖タンパク質、またはシダー、ヘンドラ、ニパウイルス、または関連ヘニパウイルスウイルスのためのワクチンとしてのそれらの組み合わせの有効性はまた、当該技術分野で既知の方法によって評価され得る。

【0098】

実施例

実施例1

尿(約0.5~1ml)を、オーストラリア南東クイーンズランドのシダーグローブでオオコウモリのコロニーの下に配置されたプラスチックシートから収集した(主に、混合された集団におけるいくつかのペトロパスポリオセファラス(P t e r o p u s p o l i o c e p h a l u s)を有するオオコウモリ属アレクト)0.5mlのウイルス輸送培地(S P G A:スクロース、リン酸塩、グルタミン酸塩、およびアルブミン、ならびにペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾンの混合物)を含有する2mlの管中にプールした。管を、収集後、一時的に氷上で保存し、クイーンズランドの実験室に輸送し、-80℃で凍結した。試料を4℃で解凍し、破片をペレット化し、1分間16,000×gで遠心分離した。上清(約0.5~1ml)中の尿を、細胞培養培地中で1:10に希釈した。

【0099】

希釈された尿を、5分間1,200×gで遠心分離し、75cm²の組織培養フラスコ中でベロ、パキ、PaBr、PaSp、およびPaPl細胞単層の上に均等に分割した。この研究で使用された細胞株は、ベロ(ATCC)、HeLa-USU(22)、および腎臓(パキ)、脳(PaBr)、(脾臓)PaSp、および胎盤(PaPl)から派生したオオコウモリ属アレクトの一次細胞株であった。細胞は、37℃で5%のCO₂の存在下で、二重強度の抗生物質-抗真菌剤(インビトロゲン)、10μg/mlのシプロフロキサシン(MP Biomedicals)、および10%のウシ胎児血清で補充されたDulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham中で増殖した。フラスコを37℃で2時間揺動し、14mlの新鮮な細胞培養培地を添加し、次いで、37℃で7日間インキュベートした。毒性、汚染、またはウイルス細胞変性効果(CPE)について、フラスコを毎日観察した。

【0100】

多核体CPEが、2個の異なる尿試料の接種の5日後(dpi)、腎細胞(パキ)単層

において観察された。C P Eは、4個の他の細胞株のいずれにおいても観察されなかった。上清収穫6 d p iを使用して、新鮮なパキ細胞単層に接種した。パキ細胞内の2回の通過後、ウイルスはベロ細胞中で感染し、C P Eを引き起こすことが可能であった。しかしながら、ベロ細胞におけるウイルスのC P Eの形態は、H e V感染のものとは異なっていた。H e V特異的P C Rプライマーを用いた更なる分析は、新規コウモリウイルスがH e Vの分離株ではないことが示された。

【0101】

実施例2

多核体C P Eを示す実施例1の細胞を、全ての既知のパラミクソウイルスおよびパラミクソウイルスのサブセットのための広く公開されている反応性プライマー(31)を使用してスクリーニングした。P C R産物をゲル抽出し、M13プライマーを使用して、配列決定を容易にするようにp G E M T - E a s y (P r o m e g a)中にクローニングされた。配列を取得し、初期分類を可能にする既知のパラミクソウイルス配列と整列させた。

【0102】

全体のゲノム配列を、454個の配列決定(43)と、従来のサンガー配列決定の組み合わせを使用して分析した。組織培養上清からのピリオンを、30,000×gで60分間の遠心分離により回収し、140μlのP B S中に再懸濁させ、Q I A a m p V i r a l R N Aミニキット(Q i a g e n)を使用して、R N A抽出のための560μlの新たに作られたA V Lと混合した。c D N Aおよび無作為増幅の合成を、公開された手順(44)の改変を用いて実行した。簡潔に述べると、c D N A合成を、17マー定義プライマー配列に連結する無作為オクトマ(o c t o m e r)を使用して実施した:(5'-G T T T C C C A G T A G G T C T C N N N N N N N N - 3')およびS u p e r s c r i p t I I I R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e (L i f e T e c h n o l o g i e s)。8μlのd s - c D N Aを、200μlのP C R反応物中でホットスタートT a q ポリメラーゼ酵素(P r o m e g a)および5'-A * G * C * A * C T G T A G G T T T C C C A G T A G G T C T C - 3'(*はチオール修飾を意味する)を用いて、5分間95度の初期変性ステップの後、95/1分間、48/1分間、72/1分間の40周期、増幅プライマーとして増幅し、その後、Q I A q u i c k P C R精製キット(Q i a g e n)で精製した。ロシュ454配列決定のための試料調製(454 L i f e S c i e n c e s B r a n f o r d、コネチカット州、アメリカ)を、製造業者が示唆するプロトコル(R a p i d L i b r a r y P r e p a r a t i o n a n d e m P C R L i b - L S V)に従って実施した。

【0103】

正確なC e d P Vのゲノム配列を取得するため、(低品質で曖昧なアダプタ配列を除去した後の)454個の生成されたデータが、サンガー配列決定から派生したC e d P Vドラフトのゲノム配列上への未加工の読み取り値の新規アセンブリおよびマッピングの両方によって分析された。454個の読み取りマッピングのため、C L Cソフトウェアで生成されたS N PおよびD I Pが、マップされた未加工の読み取り値を視覚化することによって精度について手動で評価された(無作為のP C Rの誤りは、特に読み取り値範囲が深いときに実際のS N PおよびD I Pと比較して明らかである)。454個の新規および読み取りマッピングアセンブリ方法の両方のためのコンセンサス配列が、次いで、低カバレッジ領域内での競合を解決するためにおよび454個のホモポリマーの誤りを解決するために、使用された後者を有するサンガー配列と比較された。

【0104】

ゲノム末端の配列を、以前に公開されたプロトコル(45)を使用して、3'および5'-R A C Eによって判定した。簡潔に述べると、約100ngのR N Aを、T4 R N Aリガーゼ(P r o m e g a)を用いてアダプタD T 88(配列情報についての参考文献を参照されたい)と連結し、その後、S u p e r s c r i p t I I I R Tキット(L i f e T e c h n o l o g i e s)およびアダプタ特異的プライマー、D T 89を用い

た cDNA 合成を行う。次いで、PCR 増幅を、DT89 および 1 つ以上のゲノム特異的プライマーを使用して行った。PCR 産物を、ABI シーケンサー 3100 上で組織内のサービス基によって DT89 またはゲノム特異的プライマーのいずれかを使用して直接配列決定した。

【0105】

CLC Genomics Workbench v4.5.1 (CLC Inc、オース、デンマーク) を使用して 454 個のアダプタおよび cDNA / PCR プライマー配列を整え、低品質の曖昧で小さな読み取り値 (< 15 bp) を除去して、全て既定のパラメータで、新規および読み取りマッピングアセンブリを実施する。Clone Manager Professional バージョン 9.11 (科学教育ソフトウェア、米国ノースカロライナ州ケアリー) を使用して、新規のアセンブリによって生成された重複するコンティグを結合した。系統樹を、MEGA4 ソフトウェアパッケージ (46) 中での 1000 回の反復によって判定されたブートストラップ値を有する近隣結合アルゴリズムを使用して構築した。

10

【0106】

この新しいウイルスによる多核体 CPE の形成とコウモリの尿からパラミクソウイルスを単離することにおける以前の成功とを考慮しながら、パラミクソウイルス科特異的および属特異的プライマーが、この新しいウイルスがパラミクソウイルス科のメンバーであることを判定するために使用された。予想されるサイズの陽性 PCR 断片を、Tongらによって開発されたパラミクソウイルス、レスピロウイルス (Respirovirus) / モルビリウイルス / ヘニパウイルスプライマーセットから取得した (31)。

20

【0107】

PCR 産物の配列決定は、それが、HeV および NiV と最も密接に関連する新しいパラミクソウイルスであることを示した。これらの予備的データに基づいて、ウイルスは、コウモリのコロニー採取された場所に因んで、シダーウイルス (CedPV) と命名された。

【0108】

図 1 に示されるように、CedPV のゲノムは 18,162ヌクレオチド長であり、科における HeV のものに最も類似している。完全なゲノム配列が、GenBank (受託番号 JQ001776) に堆積された。ゲノムサイズは 6 の倍数であり、これは、パラミクソウイルス亜科の既知の全メンバーについて観察された 6 の法則と完全に一致する (3)。CedPV のゲノムは、7 箇所の全ての位置で完全に保存された CTT の 3ヌクレオチド遺伝子間配列、ならびに HeV および NiV 中に存在するものと類似する高度に保存された遺伝子の開始および停止信号を有する (図 2)。

30

【0109】

また、HeV ゲノムと同様に、CedPV ゲノムに比較的大きな非コード領域が存在する。(図 1 および第 1 表)。CedPV ゲノムの全体的なタンパク質コード容量は、HeV より 82.12% 高い 87.41% である。CedPV および HeV のゲノムサイズが非常に類似しているとき、CedPV の増大したコード能力は、6 個の主要なタンパク質のうちの 5 個についてのタンパク質サイズの増大に起因し、L タンパク質は、更に 257 アミノ酸大きい (第 1 表)。2,501 アミノ酸では、CedPV L タンパク質は、パラミクソウイルス科の中でのみならず、モノネガウイルスの順番においても既知の全ウイルスについて最大である。

40

【0110】

【表 1 2】

第1表 CedPV、HeV、およびNiVの間での共通遺伝子の比較

遺伝子	ウイルス	オープン読み取り枠			非翻訳領域の長さ(ヌクレオチド)	
		長さ(アミノ酸)	CedPVに対する配列同一性%	HeVに対する配列同一性%	5'UTR	3'UTR
N	CedPV	510			88	334
	HeV	532	58		57	568
	NiV	532	59	92	57	586
P	CedPV	737			98	192
	HeV	707	25		105	469
	NiV	709	27	65	105	469
C	CedPV	177				
	HeV	166	26			
	NiV	166	25	83		
M	CedPV	359			114	408
	HeV	352	60		100	200
	NiV	352	60	89	100	200
F	CedPV	557			276	88
	HeV	546	42		272	418
	NiV	546	43	87	284	412
G	CedPV	622			98	139
	HeV	604	29		233	516
	NiV	602	30	78	233	504
L	CedPV	2501			293	63
	HeV	2244	50		153	67
	NiV	2244	50	86	153	67

【0 1 1 1】

完全長のゲノム配列に基づく系統分析および各構造的タンパク質の推定されるアミノ酸配列は、CedPVが科の中でヘニパウイルスに最も密接に関連しているという初期考察を確認した。ヌクレオカプシドタンパク質(N)の推定される配列に基づく系統樹が、図3Aに示されている。全ゲノム配列に基づいた系統樹分析により同様の結果を得た(図3B)。実際に、CedPVは、550ヌクレオチドのL遺伝子断片(図3C)の利用可能な唯一の配列に基づいた系統樹に示されるように、アフリカの Koumori (26、32) に検出されたヘニパウイルス様配列よりもHeVおよびNiVにより密接に関連している。

【0 1 1 2】

実施例 3

パラインフルエンザウイルス5のために最初に発見され(シミアンウイルス5として以前から既知であるPIV5)、パラミクソウイルスのほぼ全てのメンバーがP遺伝子を有し、該P遺伝子は、編集部位(3、33)から下向へ流れる異なる読み取り枠からN末端共直線タンパク質の産生へ導く非鋳型G残基の添加によって、RNA編集機構を介して複数のタンパク質を産生する。これらの複数の遺伝子産物は、感受性宿主の生得的反応に拮抗する上で重要な役割を果たしていることが知られている(3)。

【0 1 1 3】

CedPVゲノムは、737アミノ酸のPタンパク質および177アミノ酸のCタンパク質をコードする。しかしながら、PCR分析は、ほとんどの他のパラミクソウイルスに存在する高度に保存された、システインに富んだVタンパク質ORFを見つけることに失敗した。Vタンパク質ORFの不在はRNA編集部位に起因し、現在までに発見された分離株全ての他の既知のHeVおよびNiVの分離株中に保存されているAAAAAGGGの

配列は、C e d P V P 遺伝子配列から欠落している。

【 0 1 1 4 】

C e d P V P 遺伝子から産生される複数の m R N A s が存在していないことを確認するために、P 遺伝子転写の直接配列決定を、P 遺伝子のコード領域全体をカバーする重複断片を生成するプライマーの複数のセットを使用して、C e d P V 感染ベロ細胞から実行した。簡潔に述べると、定量的 P C R アッセイ (q P C R) を、高スループット配列決定から取得された C e d P V 特異的配列に基づいて確立した。P 遺伝子の T a q M a n アッセイが開発され、全てのその後の研究に使用された。プライマー/プローブの配列は、次の通りである：順方向プライマー、5' - T G C A T T G A G C G A A C C C A T A T A C ; 逆方向プライマー、5' - G C A C G C T T C T T G A C A G A G T T G T ; プローブ、5' - T C C C G A G A A A C C C T C T G T G T T T G A - M G B 。

10

【 0 1 1 5 】

R N A 編集活性の欠如を示す各産生される均一なトレースファイル、これは、編集部位の直後に H e V および N i V によって生成された混合ピークから非常に異なる (図 4) 。C e d P V が、その P 遺伝子中の R N A 編集および任意の V 関連コード配列の両方が欠如しているパラミクソウイルスの最初に識別されたメンバーであると思われる。

【 0 1 1 6 】

実施例 4

ゲノムサイズと組織との顕著な類似性と、C e d P V とヘニパウイルスとの間の N、M、および L タンパク質の間の高度に保存されたタンパク質ドメインの存在とは、C e d P V が、H e V および / または N i V に抗原的に関連し得ることを示すであろう。C e d P V を対象とした抗体を調製するために、C e d P V N タンパク質のためのコード領域を、前述した G S T 融合発現ベクター中へのクローニングのために、A s c I (5' 端部) および N o t I (3' 端部) 部位によって隣接する一対のプライマーで P C R によって増幅した (4 7) 。前に説明されたように、ゲル溶出による発現および精製を実行した (4 8) 。抗体産生のために、精製タンパク質を、0 および 2 7 日目に 2 匹の大人の雌のニュージーランド白兔の 4 箇所異なる部位に (動物 1 匹あたり 1 0 0 マイクログラムの用量で) 皮下注射した。以前に公開された三重補助剤 (4 9) を免疫化のために使用した。動物は、5 および 4 2 日後に特異的抗体を調べ、最終的な血液採取のために 6 9 日で安楽死させた。

20

30

【 0 1 1 7 】

免疫蛍光抗体試験のため、3 0 0 μ l の細胞培地中で 3 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの濃度で播種して、3 7 °C で一晩インキュベートすることで、ベロ細胞単層を 8 ウェルのチャンバースライド中で調製した。細胞単層を C e d P V、H e V、または N i V の 0 . 0 1 の M O I で感染させ、感染後 2 4 時間 1 0 0 % 氷冷メタノールで固定した。チャンバースライドを、P B S 中の 1 % B S A の 1 0 0 μ l / ウェルを用いて 3 0 分間 3 7 °C で遮断した後、1 : 1 0 0 0 で希釈された C e d P V N または N i V N に対して 5 0 μ l / ウェルのウサギ血清を添加した。3 0 分間 3 7 °C でインキュベートした後、スライドを、P B S - T で 3 回洗浄し、1 : 1 0 0 0 で希釈された 5 0 μ l / ウェルの抗ウサギ 4 8 8 アレクサフロ (A l e x a f l u o r e) 接合体 (L i f e T e c h n o l o g i e s) と共に 3 0 分間 3 7 °C でインキュベートした。次いで、スライドを P B S - T 中で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡下での観察のために 5 0 % グリセロール / P B S 中に装着した。

40

【 0 1 1 8 】

ウイルス中和試験のために、血清の連続 2 倍希釈液を、5 0 μ l の細胞培地 (アール塩を含有し、2 m M のグルタミン、抗生物質 - 抗真菌剤、および 1 0 % のウシ胎児血清で補充された最小必須培地) 中で 9 6 ウェル組織培養プレートに二連で調製した。標的ウイルスの 2 0 0 T C I D ₅₀ を含有する等量を添加し、ウイルス血清混合物を加湿された 5 % の C O ₂ インキュベーター中で、3 7 °C で 3 0 分間インキュベートした。2 × 1 0 ⁵ 細胞 / m l を含有するベロ細胞懸濁液 1 0 0 μ l を添加し、プレートを加湿された 5 % の C

50

O₂ インキュベーター中で、37℃ でインキュベートした。4日後、プレートをウイルス CPE について検査した。CPE の完全な阻害を生成する最高血清希釈を、最終的な中和力価として定義した。

【0119】

ウサギ抗ヘニパウイルス抗体を用いてベロ細胞に感染させた CedPV - の染色は、交差反応性の存在を示した。この交差反応性は、組換え CedPV Nタンパク質に対して惹起されたウサギ血清を用いた HeV 感染ベロ細胞を染色することによって逆に、更に確認された (図5)。しかしながら、ウイルス中和試験による分析は、ヘニパウイルス中和抗体が CedPV を中和することができなかったこと、その逆も同様であることを見出した。Jパラミクソウイルス (JPV)、牛痘ウイルス (RPV)、センダイウイルス (SeV)、メナングルウイルス (MenPV) および CedPV にそれぞれ感染したベロ細胞上の抗 CedPV 血清で実行された IFAT を示す図6もまた参照されたい。偽感染細胞単層は、陰性制御として含められた。

【0120】

実施例 5

CedPV と認識されたヘニパウイルスとの間の関係を更に調べるために、エフリン B2 および B3 宿主細胞タンパク質の CedPV の使用を検査した。典型的には、HeV および NiV は、CedPV 感染に対する感染についてのエントリのポイントとしてエフリン B2 受容体を使用する (22、34)。ヒトのエフリン B2 および B3 遺伝子を pQCXIH (Clontech) 中にクローニングし、結果として得られたプラスミドを、GP2-293 パッケージ細胞株 (Clontech) 中のレトロウイルス粒子中にパッケージし、製造業者の指示に従って水疱性口内炎ウイルス G 糖タンパク質 (VSV-G) でシュードタイプした。HeLa-USU 細胞株 (22) を、1 µg/ml のポリブレン (Sigma) の存在下で VSV-G シュードタイプレトロウイルス粒子で感染させた。感染の8時間後、培地を交換して、細胞を24時間置いて再生させた (これは、細胞ゲノムへのレトロウイルスの挿入の完了のための、かつハイグロマイシン耐性遺伝子の発現のための時間を与える)。

【0121】

感染から24時間後、レトロウイルスによって形質転換された細胞を、培地中で200 µg/ml のハイグロマイシンを添加することによって選択した。ハイグロに耐性であった細胞の株を調製し、凍結した。HeLa-USU 細胞およびエフリン発現 HeLa-USU 細胞を、6-ウェル組織培養プレート中で250,000細胞/ウェルの密度で一晩播種した。ウイルス (HeV および CedPV) を0.01のMOIを得るために希釈し、ウェルに接種した。細胞単層を多核体 CPE について毎日検査した。

【0122】

CedPV について、同様の観察をエフリン B2 受容体に関して行った。図7に示されるように、CedPV は、HeLa-USU を感染させることに失敗したが、ヒトエフリン B2 遺伝子が発現したとき、感染させ、多核体 CPE を引き起こすことが可能であった。対照的に、エフリン B3 分子を導入したとき、感染の証拠はなかった。

【0123】

実施例 6

フェレット、モルモット、およびマウスは、HeV および NiV 感染に対する異なる応答を呈し、フェレットおよびモルモットは、全身性血管炎に特徴付けられる重度の疾患を発症したが、マウスは発症しなかった (20, 35, 36, 37, 38)。コウモリのパキ細胞内を2回通過した CedPV (2×10^6 TCID₅₀/ml) を2匹の雄のフェレット (1ml、口腔鼻に)、4匹の雌のモルモット (1ml、腹腔内に)、および5匹の雌の Balb-C マウス (50 µl、口腔鼻に) に投与した。モルモットおよびマウスに温度感知マイクロチップ (LifeChip Bio-thermo (登録商標)、Destron Fearling) を移植し、毎日計量した。フェレットの直腸温度および体重を試料時間で記録した。動物は、病気の臨床徴候を毎日観察し、接種後21日目に

安楽死させた。C e d P Vに対する中和抗体について試験するために10、15、および21日目に血清を収集した。

【0124】

フェレットにおいて言及されたC e d P Vへの無症候性セロコンバージョンに基づいて、7匹の追加の雌フェレットを、 3×10^3 TCID₅₀の低用量で口腔鼻経路によって暴露した。2匹の動物を、接種後6、8、および10日目の各日、1匹は20日目に安楽死させた。鼻洗浄物、口腔スワブ、直腸スワブを2、4、6、8、および10日目に収集し、尿を安楽死の日に採取した。各採取した検体をC e d P Vゲノムについて評価した。広い範囲の組織試料が、死後の検査で収集され、ルーチン組織学、免疫組織化学（それぞれ、組換えC e d P VおよびNiV Nタンパク質に対して惹起されたウサギ抗体を用いた）、qPCR（上記参照）、ならびに試薬および以前に確立された手順を用いたウイルス分離によって評価された（16）。

【0125】

NiVおよびHeVへの暴露からの応答とは対照的に、C e d P Vに曝露されたフェレットおよびモルモットは、中和抗体が10～21日の間に血清中に検出されたが、臨床的に健康なままであった（第2表）。C e d P Vに曝露されるBalb-Cマウスもまた臨床的に健康なままであったが、21日目までに血清中に中和抗体を発症しなかった。選択的にそれ以前の時点で安楽死させたフェレットにおいて、浮腫および赤血球増加を伴う、扁桃リンパ組織、咽頭後気管支リンパ節の反応性過形成が存在した。C e d P V抗原が、6日目に安楽死させられた1匹の動物の気管支リンパ節で検出され、その組織におけるウイルス複製と一致した。抗NiV Nタンパク質抗体に対する交差反応免疫染色にも言及した（図8）。他の有意な組織学的病変は確認されなかった。

【0126】

【表13】

第2表 C e d P V感染フェレットおよびモルモットにおける抗体応答

動物#	接種後の日数	中和抗体タイター	
		CedPV	HeV
フェレット1	0	-ve	-ve
	10	1:320	-ve
	15	1:640	-ve
	21	1:1280	-ve
フェレット2	0	-ve	-ve
	10	1:320	-ve
	15	1:640	-ve
	21	1:1280	-ve
モルモット1	0	-ve	-ve
	10	-ve	-ve
	21	1:80	-ve
モルモット2	0	-ve	-ve
	10	-ve	-ve
	21	-ve	-ve
モルモット3	0	-ve	-ve
	10	-ve	-ve
	21	-ve	-ve
モルモット4	0	-ve	-ve
	10	-ve	-ve
	21	1:160	-ve

【0127】

ウイルスRNAは、6～8日目に試料として採取された3～4匹の雌フェレットの、咽頭、脾臓、および咽頭後気管支リンパ節を含めた選択されたリンパ組織内、ならびに20日目に安楽死させたフェレットの顎下リンパ節に検出された。C e d P Vゲノムは、影響

を受けた動物の鼻洗浄物、口腔スワブ、咽頭、または肺組織から回収されなかったが、リンパ性関与のパターンは、上下気道に過渡的複製が存在し得ることを示唆している。

【 0 1 2 8 】

実施例 7

オーストラリアのクイーンズランド州から 2 0 0 3 ~ 2 0 0 5 年の間に収集された 1 0 0 匹のオオコウモリの血清を、C e d P V に対する中和抗体についてスクリーニングした。上で説明されるように (抗体試験)、ウイルス中和試験を実行した。全ての血清試料を 1 : 2 0 の希釈で試験した。上で説明された H e V および C e d P V の間で観察される抗原の交差反応性のために、ウイルス中和試験を、各ウイルスについてより正確な感染データを取得するために実行した。全体的に、血清の 2 3 % が C e d P V 陽性、3 7 % H e V 陽性であった。同時感染が試験された血清の 8 % に反映されていた。

10

【 0 1 2 9 】

実施例 8

C e d P V - G および F 糖タンパク質はまた、ヘニパウイルス G および F 機能ドメインのマッピングを探索する重要な体系を代表する。C e d P V - F は、H e V - F および N i V - F とそれぞれ 4 2 % および 4 3 % 同一であり、C e d P V - G は、H e V - G および N i V - G と 2 9 % および 3 0 % 同一である。C e d P V 機能エフリン受容体の使用量は、C e d P V、H e V、および N i V の組み合わせを使用して、ヘテロ型 F および G 共発現および融合アッセイと共に特徴付けられた。コドン最適化クローンを p C D N A ベクター中で調製し、S - ペプチドタグで検出のためにタグ付けした。両方の構築物を発現し、検出し、我々のレポータ遺伝子の細胞 - 細胞融合アッセイにおいて機能的であることが見出された。パイロットアッセイ (図 9) は、この手法のこの実現可能性を示している。エフリン B 2 および B 3 陰性 H e L a - U S U 細胞は、細胞株 H e L a - B 3 を発現するエフリン B 3 を有する陰性 C e d P V 細胞 - 細胞融合である。

20

【 0 1 3 0 】

融合は、2 9 3 T 標的細胞および H e L a - B 2 細胞株を発現するエフリン B 2 と共に観察される。重要なことには、C e d P V - F は、H e V - G および N i V - G の両方を伴うヘテロ型機能を有するが、更に、C e d P V - G は、H e V - F のみを伴うヘテロ型機能を有し、N i V - F (図 9) は伴わず、エフリン使用とも関連する。

30

【 0 1 3 1 】

実施例 9

有意な詳細は、H e V と N i V - G との間の結合について利用可能であり、G のエフリン B 2 または B 3 変異のうちのいずれかは、茎または球状頭部内の位置でエフリン受容体結合能力を保持したまま、それを融合促進活性およびウイルス感染性において非機能的にすることができる。一連のエフリン受容体と共に 3 s G タンパク質 (H e V、N i V、および C e d P V) を用いる共同 I P アッセイにおいて、C e d P V - s G が、B 1、B 2、B 3 - 弱、A 1、A 2、A 4 - 弱、および A 5 を含む複数のエフリン亜型に結合することが可能であることが観察された (図 1 0)。この著しく広い受容体結合プロファイルは、エフリン B 2 および B 3 のみと結合する N i V および H e V - G に対して明らかに対照的である。

40

【 0 1 3 2 】

実施例 1 0

H e L a - U S U 標的細胞意志を使用したパイロット細胞 - 細胞融合実験、トランスフェクトされ、発現された様々なエフリン受容体構築物が、図 1 1 に示されている。H e L a - U S U 標的細胞集団が、示されるエフリン受容体構築物にトランスフェクトすることにより調製され、次いで、C e d P V、H e v、N i V F および G 糖タンパク質のいずれかを発現するエフェクタ細胞を用いて細胞 - 細胞融合アッセイで使用され、標準的な融合レポータ遺伝子アッセイが行われた。H e V および N i V がエフリン B 2 および B 3 のみを利用することを我々は知っているが、C e d P V G および F 媒介性融合は、エフリン A 1 または A 2 のいずれかであるとき (またはエフリン B 1 または B 2 が利用された)

50

、非常に寛容であった。

【 0 1 3 3 】

更に、He l a - U S U細胞における（遺伝子配列データに基づく）エフリン A 1 の背景内因性レベルは、非トランスフェクト細胞中の融合シグナルの原因である。この実験の結果は、C e d P V G糖タンパク質（図 1 0 ）を有するエフリン受容体結合データが、インビトロで行われる C e d P V 受容体結合および機能的細胞 - 細胞融合と良好に相関することを示している。これまでに得られたエフリン受容体結合および融合データの要約が以下の表 3 に示される。

【 0 1 3 4 】

【表 1 4 】

エフリン	結合	融合
A1	+	+
A2	+	+
A3	-	-
A4	+/-	-
A5	+	
B1	+	+
B2	+	+
B3	+/-	-

10

20

【 0 1 3 5 】

以下の参考文献は、本明細書で番号により参照され、その全体が参照により組み込まれる。

【 0 1 3 6 】

1 . Murray K , Selleck P , Hooper P , Hyatt A , Gould A , et al . (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans . Science 268 : 94 - 97 .

30

【 0 1 3 7 】

2 . Chua KB , Bellini WJ , Rota PA , Harcourt BH , Tamin A , et al . (2000) Nipah virus : a recently emergent deadly paramyxovirus . Science 288 : 1432 - 1435 .

【 0 1 3 8 】

3 . Lamb RA , Parks GD (2007) Paramyxoviridae : The viruses and their replication . In : Knipe DM , Griffin DE , Lamb RA , Straus SE , Howley PM et al . , editors . Fields Virology . Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins . p . 1449 - 1496 .

40

【 0 1 3 9 】

4 . Eaton BT , Broder CC , Middleton D , Wang LF (2006) Hendra and Nipah viruses : different and dangerous . Nat Rev Microbiol 4 : 23 - 35 .

【 0 1 4 0 】

50

5. Pallister J, Middleton D, Broder CC, Wang L-F (2011) Henipavirus vaccine development. *Journal of Bioterrorism and Biodefense*: S1:005.

【0141】

6. Eaton BT, Mackenzie JS, Wang L-F (2007) Henipaviruses. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1587-1600.

10

【0142】

7. Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissey C, van der Heide B, et al. (2001) Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7:439-441.

【0143】

8. Li Y, Wang J, Hickey AC, Zhang Y, Li Y, et al. (2008) Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China. *Emerg Infect Dis* 14: 1974-1976.

20

【0144】

9. Hayman DT, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, et al. (2008) Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS One* 3:e2739.

【0145】

10. Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, et al. (2011) Pteropid Bats are Confirmed as the Reservoir Hosts of Henipaviruses: A Comprehensive Experimental Study of Virus Transmission. *Am J Trop Med Hyg* 85:946-951.

30

【0146】

11. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, et al. (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438:575-576.

【0147】

12. Towner JS, Pourrut X, Albarino CG, Nkogue CN, Bird BH, et al. (2007) Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS ONE* 2:e764.

40

【0148】

13. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, et al. (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-679.

【0149】

14. Chua KB, Crameri G, Hyatt A, Yu M, Tomp

50

ang M R, et al. (2007) A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11424-11429.

【0150】

15. Weingartl H M, Berhane Y, Caswell J L, Loosmore S, Audonnet JC, et al. (2006) Recombinant Nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J Virol* 80:7929-7938.

10

【0151】

16. Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Bingham J, Halpin K, et al. (2006) Feline model of acute Nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol* 80:12293-12302.

【0152】

17. McEachern JA, Bingham J, Crameri G, Green DJ, Hancock TJ, et al. (2008) A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* 26:3842-3852.

20

【0153】

18. Pallister J, Middleton D, Wang LF, Klein R, Haining J, et al. (2011) A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine* 29:5623-5630.

30

【0154】

19. Bossart KN, Geisbert TW, Feldmann H, Zhu Z, Feldmann F, et al. (2011) A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. *Sci Transl Med* 3:105ra103.

【0155】

20. Bossart KN, Zhu Z, Middleton D, Klippel J, Crameri G, et al. (2009) A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute Nipah virus infection. *PLoS Pathog* 5:e1000642.

40

【0156】

21. Bossart KN, McEachern JA, Hickey AC, Choudhry V, Dimitrov DS, et al. (2007) Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex Protein Array Systems. *J Virol* 142:29-40.

50

【0157】

22. Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Mungall BA, et al. (2005) Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10652-10657.

【0158】

23. Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, et al. (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436:401-405.

10

【0159】

24. Negrete OA, Wolf MC, Aguilar HC, Enterlein S, Wang W, et al. (2006) Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog* 2:e7.

【0160】

25. Guillaume V, Contamin H, Loth P, Georges-Courbot MC, Lefeuvre A, et al. (2004) Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J Virol* 78:834-840.

20

【0161】

26. Drexler JF, Corman VM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Annan A, et al. (2009) Henipavirus RNA in African bats. *PLoS ONE* 4:e6367.

【0162】

27. Crameri G, Todd S, Grimley S, McEachern JA, Marsh GA, et al. (2009) Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS ONE* 4:e8266.

30

【0163】

28. Chua KB, Wang LF, Lam SK, Crameri G, Yu M, et al. (2001) Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. *Virology* 283:215-229.

【0164】

29. Chua KB, Lek Koh C, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, et al. (2002) Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect* 4:145-151.

40

【0165】

30. Chua KB (2003) A novel approach for collecting samples from fruit bats for isolation of infectious agents. *Microbes Infect* 5:487-490.

【0166】

50

31. Tong S, Chern SW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LI (2008) Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol* 46:2652-2658.

【0167】

32. Baker KS, Todd S, Marsh G, Fernandez-Loras A, Suu-Ire R, et al. (2012) Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J Gen Virol* 93:850-856.

10

【0168】

33. Thomas SM, Lamb RA, Paterson RG (1988) Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *細胞* 54:891-902.

【0169】

34. Bossart KN, Tachedjian M, McEachern JA, Crameri G, Zhu Z, et al. (2008) Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. *Virology* 372:357-371.

20

【0170】

35. Pallister J, Middleton D, Crameri G, Yamada M, Klein R, et al. (2009) Chloroquine administration does not prevent Nipah virus infection and disease in ferrets. *J Virol* 83:11979-11982.

【0171】

30

36. Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Westbury HA, Slocombe RF (2000) Experimental Hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 122:201-207.

【0172】

37. Westbury HA, Hooper PT, Selleck PW, Murray PK (1995) Equine morbillivirus pneumonia: susceptibility of laboratory animals to the virus. *Aust Vet J* 72:278-279.

40

【0173】

38. Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquie B, Fevre-Montange M, et al. (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163:2127-2137.

【0174】

39. Negredo A (2011) Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathogens* 7:e1002304.

50

【0175】

40. Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, Melero JA, Nagai Y, et al. (2005) Family Paramyxoviridae. In: Fauquet CM, Mayo J, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus Taxonomy: 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press. pp. 655 - 668.

【0176】

41. Chambers R, Takimoto T (2009) Antagonism of innate immunity by paramyxovirus accessory proteins. *Viruses* 1: 574 - 593.

10

【0177】

42. Matsuoka Y, Curran J, Pelet T, Kolakofsky D, Ray R, et al. (1991) The P gene of human parainfluenza virus type 1 encodes P and C proteins but not a cysteine-rich V protein. *J Virol* 65: 3406 - 3410.

【0178】

43. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376 - 380.

20

【0179】

44. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, et al. (2007) Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 13: 73 - 81.

【0180】

45. Li Z, Yu M, Zhang H, Wang HY, Wang LF (2005) Improved rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping both the 5' and 3' terminal sequences of paramyxovirus genomes. *J Virol Methods* 130: 154 - 156.

30

【0181】

46. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596 - 1599.

40

【0182】

47. Wang LF, Yu M, White JR, Eaton BT (1996) BTag: a novel six-residue epitope tag for surveillance and purification of recombinant proteins. *Gene* 169: 53 - 58.

【0183】

48. Wang LF, Gould AR, Selleck PW (1997) Expression of equine morbillivirus (EMV) matrix and fusion proteins and their evaluation as diagnostic reagents. *Arch Virol*

50

1 4 2 : 2 2 6 9 - 2 2 7 9 .

【 0 1 8 4 】

4 9 . P r o w s e S (2 0 0 0) A n e w a d j u v a n t . A N Z C C A
R T N e w s 1 3 : 7 .

【 0 1 8 5 】

連邦政府支援の研究または開発に関する記述

【 0 1 8 6 】

本発明の開発中に実施された作業の一部は、国立衛生研究所の助成金番号 A I 0 5 4 7
1 5 のもとで米国政府の資金を利用した。米国政府は、本発明においてある特定の権利を
有する。

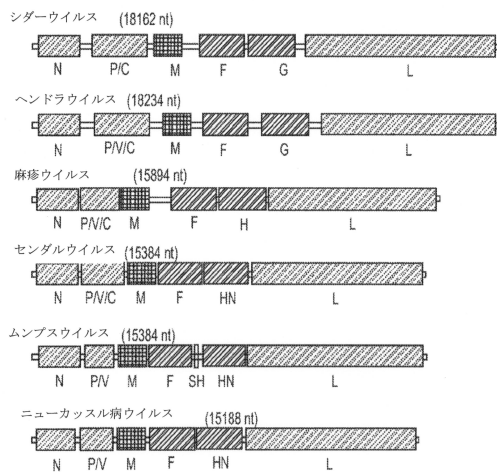
E F S - W e b 経由での配列表の提出

【 0 1 8 7 】

2 0 1 3 年 7 月 2 日またはその前後に作成された「 0 4 4 5 0 8 - 5 0 4 5 - W O - S
e q u e n c e L i s t i n g . t x t 」と題される約 7 0 キロバイトのコンピュータ可
読テキストファイルは、本出願用の配列表を含み、その全体が参照より本明細書に組み込
まれる。

10

【 図 1 】



【 図 2 】

A. アンチゲノム配列のリーダーおよびトレーラー領域

CedPV	5'-ACCAGAAAAAGG.....CCTTTTTCAGGA-3'
HeV	5'-ACCGAACCAAGG.....CCCTTGTCGGA-3'
NiV	5'-ACCAACAAGG.....CCCTTGTCGGA-3'

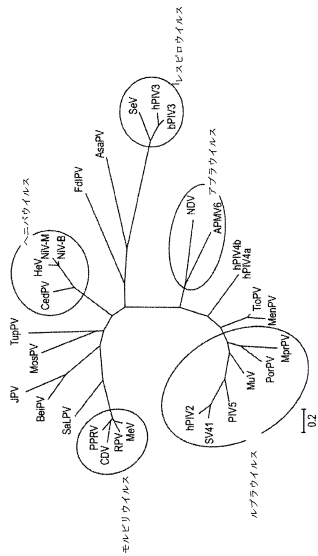
B. 遺伝子間領域 (IGR) の配列ならびに転写開始および停止信号
START AND STOP SIGNALS

遺伝子	遺伝子開始	IGR	遺伝子停止
/N		CTT	AGGATCCCGG
N/P	TTACAAAAA	CTT	AGGATCCAAG
P/M	TTAGAAAAA	CTT	AGGATCCCAG
M/F	TTAGAAAAA	CTT	AGGATCCCAG
F/G	TTAATAAAA	CTT	AGGATCCCAG
G/L	TTAAGAAAA	CTT	AGGATCCCAG
L/	TTAAGAAAA	CTT	

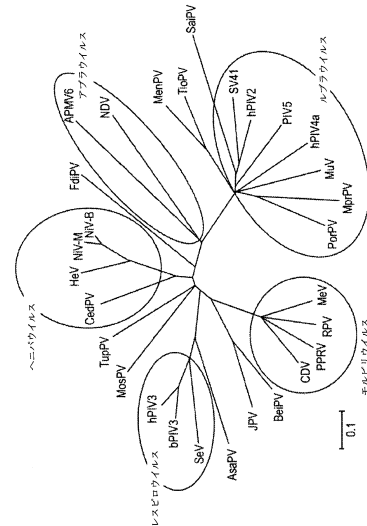
コンセンサス

CedPV	TTAvrdAAAA	CTT	AGGATCCmrG
HeV	TTAmrDAAAA	CTT	AGGAmrCArG
NiV	TwAwrdAAAA	CTT	AGGAmrCArG

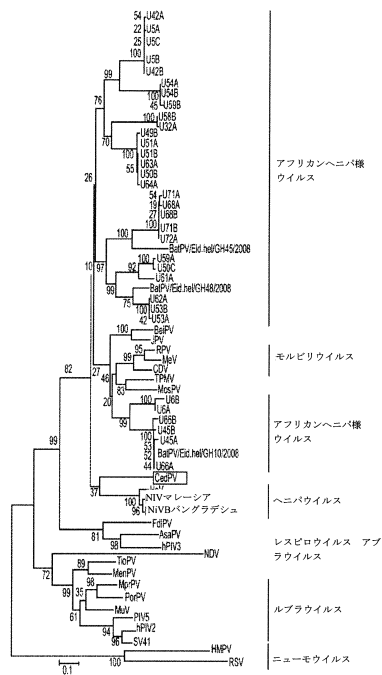
【図 3 A】



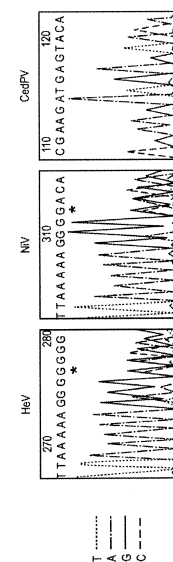
【図 3 B】



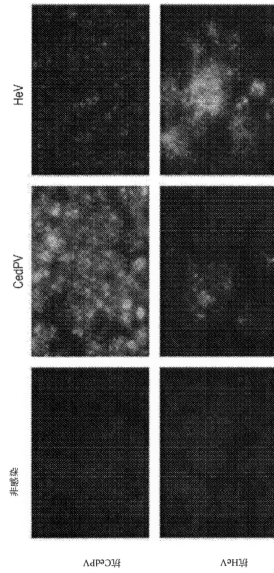
【図 3 C】



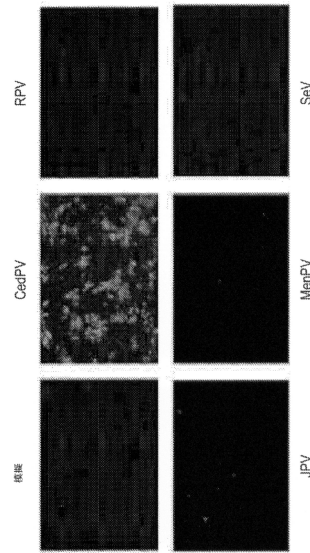
【図 4】



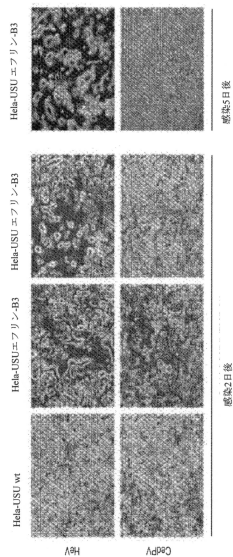
【図 5】



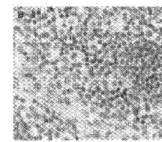
【図 6】



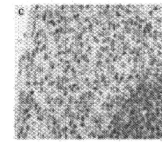
【図 7】



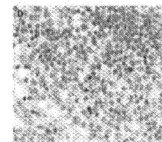
【図 8 B】



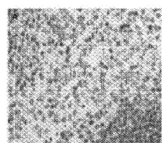
【図 8 C】



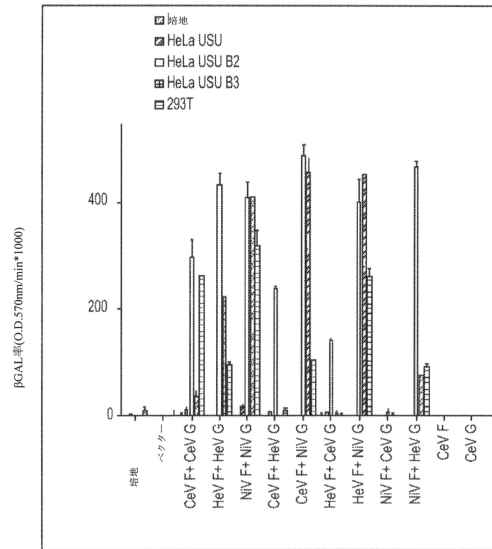
【図 8 D】



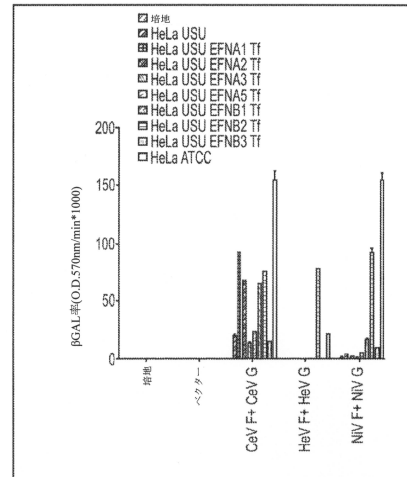
【図 8 A】



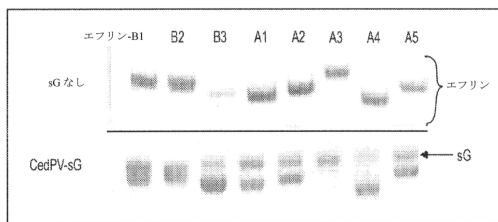
【図 9】



【図 11】



【図 10】



【配列表】

0006246199000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	7/04	(2006.01)	C 1 2 N	7/04	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	39/155	(2006.01)	A 6 1 K	39/155	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
			C 1 2 P	21/08	

(73)特許権者 590003283

コモンウェルス サイエнтиフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガナイゼーション
 オーストラリア 2 6 0 1 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー、アクトン、クルーニーズ・ロース・ストリート（番地なし）

(73)特許権者 515000719

ザ ステイト オブ クイーンズランド
 オーストラリア国 4 0 0 0 ブリスベン アン ストリート 8 0

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 ワン リンファ

オーストラリア国 3 2 1 6 ワンダナ ハイッ リージェンシー クローズ 6

(72)発明者 マーシュ グレン エー .

オーストラリア国 3 2 2 4 レオポルド ポラード ドライブ 9

(72)発明者 フィールド ヒューム

オーストラリア国 4 1 6 0 クイーンズランド オーミストン カウニハン ストリート 1 9

(72)発明者 プロダー クリストファー

アメリカ合衆国 2 0 9 0 5 メリーランド州 シルバー スプリング リザーブ ゲート テラス 3 2 9

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 5 3 5 0 1 (US, A1)

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 3 1 4 5 5 (US, A1)

国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 9 7 7 8 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 0 7 K 1 4 / 1 1 5

C 0 7 K 1 6 / 1 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq