

(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 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K 14/115	(2006.01)	C 07 K	14/115	
C 07 K 16/10	(2006.01)	C 07 K	16/10	
C 12 N 7/00	(2006.01)	C 12 N	7/00	
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 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) 國際出願番号 PCT/US2013/049069
 (87) 國際公開番号 WO2014/008263
 (87) 國際公開日 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)

(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—
 エイ スイート 100

前置審査

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、
 0、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、
 0、7,500、8,000、8,500、9,000、9,500、10,000、1
 0,500、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、

20

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、

20

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 タンパクの質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、

30

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、

40

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 1 2 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 1 4】

前記ポリヌクレオチドが R N A である、請求項 1 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

前記分子が D N A である、請求項 1 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 8】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 1 7 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 1 9】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 1 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 0】

前記宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項 1 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 2 に記載のポリペプチドを產生するための方法であって、タンパク質產生を促進する条件下で請求項 1 7 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 2 2】

請求項 1 2 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 2 3】

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、組換えにより產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 2 2 に記載の抗体。

【請求項 2 4】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 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 2 2 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 2 5】

30

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 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 2 2 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。

【請求項 2 6】

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 1 5 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 2 7】

40

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。

【請求項 2 8】

前記ウイルスが弱毒化ウイルスである、請求項 2 7 に記載の組換えウイルス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

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】

【0 0 0 2】

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、一般にフォ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ンジスタ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】

20

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。

【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 (S H) 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ラ配列の整列(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 (Fd1PV) AY141760、ヘンドラウイルス (HeV) AF017149、ヒトパライフルエンザウイルス2 (hPIV2) AF533010、ヒトパライフルエンザウイルス3 (hPIV3) Z11575、ヒトパライフルエンザウイルス4a (hPIV4a) AB543336、ヒトパライ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、パライフルエンザウイルス5 (PIV5) AF052755、小反芻獣痘 (PPRV) X74443、ブタルブラウイルス (PorPV) BK005918、牛痘ウイルス (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 (TiopPV) AF298895、Tupaiaparamikso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日目に安樂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】He 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、SDS-PAGE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-Fc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。

【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、He 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He la-USSU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。

【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(He 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、RNAの一本鎖を含有するRNAウイルスである。

【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】

10

20

30

【表1】

1 accagacaaa ggaagtctag tctccggatt aaatcatatt cgtatgatta atcttaggat		
61 cccggtatct agaatctgga tctggattcg gtttaattga attgcgatcg tttataaatt		
121 agaaaggaga tttactactc aaaatgtctg acatttcaa tgagactcaa tcatttagaa		
181 actatcagtc caacttaggc agagatggca gggccagtgc agcaacgact actttgacaa		
241 ctaaagttag gatctttgtt ccagcgaata ataatccaaa cctcagatgg cgtttaacac		
301 tattcttgat ggatgtcgtg aggtcacctg cctccgcaga gtctatgaaa gtgggtctg		
361 ggatattcctt ggtatctatg tatgctgaaa aaccggggc tcttgtgaga gcattattga		
421 atgaccaga ttttgaagcg ataatcatag atgtttatgg ctttgtgaa ggtattccta		
481 taatggaaacg aagaggtgat aaagctacag atgacatggaa ttccctaaga aagattgtt		
541 aagctgcaca tgatttcagc agaggaagga gtttatttgc tgatcaaagg gtccaggata		
601 ttgttatgtc agatatgggg tcattttgtt atgctattac ttccatagag acgcagat		
661 ggattttgat cgccaaaggct gtaactgccc cagatacagc agaagagagc gaaggaagaa		
721 gatggccaaa atatgttcag caaaagaggg ttaatcctt gttcttgatt tctccacaat		10
781 ggatcaatga catgagatcc ctgattgcgg caagtcttc gcttcgtaaa ttcatgggt		
841 aactactgat ggaagctaag aaaggacggg ggacaaaagg aagaataatg gagattgtat		
901 ccgatatcgg aaattacgtt gaagagacag gaatggcagg gttctcgct acaataaaagt		
961 tcggcttga gaccaaattc cctgctttgg cacttaatga gctccagatg gacttgaaca		
1021 caatgaaaag tctcatgata ctgtacagaa gcataaggacc aaaggcccccc tttatgggt		
1081 tggggaaaga ttcaatttcag accaaatttg ctccaggaag ctatccactt ctttggagtt		
1141 ttgcgttggg ttttggcaca actattgaca gagctatggg tgccttgaac attaacagaa		
1201 gttatcttga acctgtctat tttaggatgg ggcacaaatc agctaaacat caagcaggaa		
1261 atgttgcacaa agaaatggca gaaaagttttag gattgacaga agaccagatc gtgcacat		
1321 cagctaattgtt gaaggatgca agtcaaggtt gagatgacaa tcaaataac atccgagaag		
1381 ggaagttcac aaatgtttgtt gatgacatcc aggatcatgc ccagagttcc tctgaggatt		
1441 acaatcttag taaaaagagt ttctcaatat tgacgagcat cacatccacc gtatagatg		
1501 ctgacagtag gtctgcaatg aatgagtcgaa tgacaacaac atccttgctg aaattgagac		20
1561 agaggcttgc agagaagaaa ggagactcca agaacatcg agacacacctt cccaaaccac		
1621 ccagagccaa agatcaaccc actgtatggg tctccttcat ggattccaat atatgtatcg		
1681 aatgtatgggtt aaaatcaacc aactaaggcc gctgtatcgat ctttcagata gaacactaca		
1741 ttaatccgggt gaaacaatag atttatgggt ttgggtctt attttttattt aatcttactt		
1801 gcaaaacagg cagctgtctac actcgtaacc actccctaca gtaagggcaa cacgggtcat		
1861 agaactttagt cctatagatt acctctatct gtatatctatg ctatgattaa aatgtataact		
1921 tctgctgacc ggttttctatc caacagttcc cattattact ttatgggtat tttttaatca		
1981 accttttata atcaaatata ttacaaaaaa ctttaggatcc aagtggtcca aacttttttt		
2041 gatcaagatg catattggct acttttaggag gacactttaa acacaaaatttgg ttacaagagg		
2101 atatttcatca gatggacaaa ctacaatttga ttgaagatgg cctctctact atcaattttta		
2161 tacagggaaaa taaggaaaaaa ttacagcattt cttacggaaag atcctccatc agagagccac		
2221 ccacaagtgtt cagggttggaa gagggggaga aattttatcg aaagatcgct tctgacat		
2281 aacaaggatca agggggagga tctgagactg agatcacagg cgataatggaa gataaggc		
2341 attttaccaa tcctgatcg ggaggcggag tcacaggaca attcgaagaa aggtatcaaa		30

【0016】

2401 aatgggggtc acaagattca gaattacaac tggacccaat ggttgtacac gatttcttct
 2461 atgacgagag aaggagaat cccgacaatg gaaaatatga ccgcagctt aaaaaacggg
 2521 ataatatcag agaaggaaca cgacaggata agtacaataa tcagtctact gatgaattac
 2581 tgcctgcct acaaccatct tctaagaacg atgtcatca gaatgaaagt acatcagtgt
 2641 caaatttgc atttacagga aataaaactga atcctgacgc aaaaaccctt gaaccaccc
 2701 cccagtcgaa agagcaccca accaccacac agcacaacaa aaatgaccat cagaccgatg
 2761 atgattataa gaatagaaga tccagtggaaa acaatgtgat ctctgatcat gccaccacaa
 2821 tggaaagacaa caacaatttt atccccggcga ccaaaaagaaa gaatgcattg agcgaacccca
 2881 tatacgtcca ggtattgccc tcaaacacag aggtttctc gggaaaagat tatccactcc
 2941 tcaaggacaa ctctgtcaag aagcgtgcag agcagtcata cctagaaaact gccaaccacc
 3001 ctgcaggctc tgccgaccaa gacacaaatc agattgaaga aaacatgcag ttcaacccctc
 3061 caaaaactgtc cacagaagat acagacgtg aaccagagga taacaatgtat tccatgcctc
 3121 ttgaggaaga cattagagag atcggttca tgctaaaaga tggaaacccaa gatatacaga 10
 3181 caaggatgaa tgagatagat gacgcatac aagaagataaa taagaaatca aaaaatagaa
 3241 gtctggatct agaattcagac ggttaaagatc aggggagaag agatccatca gtagacctcg
 3301 ggattaaaaa aagaaaggaa gggctaaagg ccgcaatgc aagacaaaaa gagcaattgt
 3361 ctataaaagt ggagagagag attggattga acgacaggat atgtcaaat tcgaagatga
 3421 gtacagaaaa gaaatttgcata tatgctggga tggaaatggaa gtatggacaa acgagtaactg
 3481 ggtcaggagg tccacaagga tcaaaggatc ggacttctga tgatgtccag gtagacgaag
 3541 actacgtga aggggaagac tatgaggcta tgccgtcaga taggttttat acaacattat
 3601 caggtgaaca aaaggataga ttgtatctatc atgctaaacc aatgtctcata tatgacctcg
 3661 aggcccagggt ggtatgatcata accagaatgc atctcataact ctattctaga ttggaaacta
 3721 ctaataagtt gcttatttgcata atattagatc tagctaaaga aatgcacaaat ttagtttagaa
 3781 aagtggataa tcttggagaga cagatggta acttgaatattt gttaacctt acccttgagg
 3841 gtcacctatc ttctgtatgc attatgatcata ccgtaaaggga taagagcgaa aaggaaatcc
 3901 ctaaaaatcc ggacctgaga ccaatactgg ggagaagcaa cacgtcgta actgtatgtt 20
 3961 tcgacccatcata ccattaccct gataaaggct ccaaaggatc caaaccaatg ggtatggag
 4021 acagacatgtca catcggtctc ttagagagca aattttctat aaatgtatgatc tacaattttg
 4081 ctccatcaccc tatcaggggac gaactccat tgccagggtt aagagatgac aaaaaccaatg
 4141 cttcatcgatcata ccattccatgat gacacggaca ggtctccat ggtgctcaaa ataataattc
 4201 gacagaacat ccatgtatgc gaaatggggatc atggactact gtcacataacta gaacaacata
 4261 acactgtggaa ggaatttgcata gaaatatggaa atactgtgaa tgattaccc gatggcaaca
 4321 tctgatataac agatatttgcata attgtatctatc ttctaaacaa gtaatctctg ataatgtatg
 4381 tatggatataa gaataactatc acacatttgcata tactttgtatc gatcttaac gagggtctaa
 4441 tgcgtatgtt tagcaacaca tactaataac ttgtatccat tttctccat tttccattttaa
 4501 tctcacatca gaaaaaaactt aggtccatcatttgcata gtaaaacggg atctactatc
 4561 aggtgttgcata gctaacaata gcccggatctg ctaacaaat acggttcaaa gaagtttgaa
 4621 aaccatcata gaatatggat ccgtcgatcata tgaggaggat tataatggag gatgataaga
 4681 gtcgttgcata caatgtatgc gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata 30
 4741 gggatataatc tgatcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 4801 acgttgcata caacccgggg aaaaatggatc gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 4861 gttatgggtt catttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 4921 gaaccaccgc ttctttccat ttgggtgtt gaaaaactt ctcgtctccat gaagatctc
 4981 tacaagatgt gacaacactc aagatctatc tcagaaggac agccggatc aatgagaatgt
 5041 tgggttatgg aataacaggatc ctttacccat acctttaccc gttgtataaa gttttgacag
 5101 gtggctccat ttgtatgtatc gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5161 gaccccaat acttagatc ttctttccat gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5221 atatgtatgcata ctttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5281 ttgtgtatctt caagatgtatgcata actgtatgcata ctttgcata gtttgcata gtttgcata
 5341 aagaaggggatc gaggataacg tcattcatgt tacacatcgatcata gtttgcata gtttgcata
 5401 gaaaacatca ctcgttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5461 ctttaggcac tataggcggt ctttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5521 ggctccaaatc acaagttggc ttgtatgtatgcata acatgtatgcata ctttgcata gtttgcata
 5581 catgggttgcata taaatgtatgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5641 ttcttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5701 gcaagatctt aaaaatggatc gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata
 5761 caacttattt aatccatcata tatctccatcata tacttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata gtttgcata

9241 aaacatttgg acaattcagat tactcgtcag acgagacta cataacatata ttcaatggca
 9301 tagatcgcc caaaaaccaag aagattccca ttaacaatata gacagcagac aatcggtata
 9361 tccatttac attctcaggt gggggaggtg tatgttttagg tgaagaattt attattcctg
 9421 ttaccacagt catcaatact gatgtattca cgcattgatta ttgtgagagt ttcaactgtt
 9481 cagttccaaac cggtaaaagt ctaaaggaga tatgtctga gtcatcataa tctccaaacga
 9541 actcatcgcc atacaattta aacggaatca tgattataag taaaacaac atgacagatt
 9601 ttaagattca gttgaatggt ataacttata acaaactgtc attcggaaatg ccttggaaac
 9661 tgagcaagac actgggccag gtcctttt accaatctt aatggatgg gatacttata
 9721 taaaggcagg atttgcgaa aatggaaac cctttacccc gaattggatg aacaatactg
 9781 tggatattccag acctaaccaa ggttaattgtc caaggatataa taaatgcccc gagatgtt
 9841 atggagggac atacaatgtt attgctcctt tagatctagg aaaaagacatg tatgttagcg
 9901 ttattctaga ttcagatcg ctgcagagaa atccagagat tacagtattt aactctacta
 9961 ctatacttta taaggagaga gtatccaaag atgaactaaa cacaagaatg actacaacga
 10021 gctgtttctt tttccatagat gaaccttgggt gtatatacgat attagaaaca aacagattta
 10081 acggccaaatc tattaggccc gagattttt catacaaaat tcctaagtat tgtaatttg
 10141 atgagcttat tcctcatact tcaatcaaata ttaatataac taatataaaa ttgttgact
 10201 cagctattat taaaactgg atcagacata aaaaagatgt atacaagat atatcgaaag
 10261 gggttttaaa gaaaacttag gatcccagat cttcaataa ggcagagcc tgattgtatc
 10321 agcgtcattt acaatttgaat ctcaattaaac aacactgtt aataactttaa gcagaataact
 10381 cctattacag tggtaatttggt acttaattttt aattggatgg tttataatcc tataatttgg
 10441 gcagatctaa actctcaccg attcagttt aatccctttaa taactaaaga acaaattctt
 10501 aataatttgg atgacgtcaca ggagacaagc tggaaacaat ttagttggaa ggaagaaacc
 10561 ttttaccaga tatggaaatg gactttgata tatctgttag cgacgtactg tacccagaat
 10621 gtcatttggg cagtcctata gtcggccggta agtcattttt ttcttttgag tatgcgaatt
 10681 tgactcataa ccaacccat gaagatcaga cattgctgac taatataaaat gtcaataaaa
 10741 agaagaagat aaaaagtctt ctaatatccc aacaatctt atttggaaat gaggtaata
 10801 aggagattttt cgtttaaaa aatttattacc atgtccccca tccagaatgt aacagagatt
 10861 tattcttaat ctctgtatc aaaaatagcat tcaaactcag taaaatcatg gataattctt
 10921 ataaactgtt tgatggtttta gagagggaaac tgagtgcctt aatttcaatg gtagataatc
 10981 aactttaaaa tgcaacctctt cttcataata attctgagat ggatcggaaag ggaaaagaac
 11041 atccttgctt cccagaaaag agcacaattt gatgttaag acagcagaga cagacacag
 11101 attttccaaa gaatttcaact agagggggaa gatctccaaa acaccctgtt gccggcttca
 11161 cacctggaaaaa cagtggccaaa aacgatttgc atagagacaa cacagacata atgccaacag
 11221 gccatagttt gacatctatg aaaaaaccta aatatctgg agaagaatataat cttagtatgt
 11281 ggcttagactc agaggatttgg tttctaaac gatatttgc acaatttaggg aaggatgtat
 11341 catgtttaagg ccatttcac acggacacaaag acaaaccatg aatagttctt gacactcgat
 11401 atatccaaaaa tcatgaatct aataacgata ttttccccca aaaaagagaaaa aaattctgca
 11461 aacttccacc gtcatcggtt aattttaacca aatcatgtt gatcaaaaaa ttgtacaatc
 11521 ctttccctttt ttggttact gtcagactg aacttagagc ctggcagaag gagaactaca
 11581 aaaggaaaaaa cagaaaatttgg ggaatttatca catcgattaa aggttcatgc tataagttga
 11641 tactcaacca gaatcttagt gcaatattcg aggaagacag cagtggatac tcagatcata
 11701 aaaaaagaaaaa aaaaacgatgc tactatctaa ctccccaaat ggtcctttagt ttctccgtatg
 11761 taacttgaagg aagattgtt gatgtttttt gatgtttttt gatgtttttt tttttttttt
 11821 tagagaaaaaa ggcttggaaa ttatggtttcc ttatagacga gttttttttt tttttttttt
 11881 atagagtgtt taatattata tccatgtttt ggtttttttt gatgtttttt tttttttttt
 11941 aggttggatc aaggttggatc aggttggatc tcatgtatca ttgtttttttt gatgtttttt
 12001 aagaacttcg aggttccaaag aacttcccg ggtttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12061 taataaaatgtt catgttccatc cgggacattt tttttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12121 ggactttccgg acatccaata ttggacgttc aaactgcacg cggaaatgtt agagagtaca
 12181 ttgttagcaga taaaatccctt ggttccatc tttttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12241 ctataatcat aatgttccatc aggttggatc tttttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12301 caaaaacatttgg ttcaaaagaac ataataatctt tcaaaaataac aggttgggg gtaactttag
 12361 aagttagcaat aaacaatttgg agatcatttgg tttttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12421 tcaattttaga caatgtatc acgttggatc tttttttttt gatgtttttt tttttttttt
 12481 atctttgggg ttcaatctt tttttttttt gatgtttttt tttttttttt gatgtttttt
 12541 aatcaagaag attgggttgg gttttttttt gatgtttttt tttttttttt gatgtttttt
 12601 taaattatgtt tttttttttt gatgtttttt tttttttttt gatgtttttt tttttttttt

【 0 0 2 0 】

16081 atgtttatcg aatccttact aatgtattat ctcatccag agttatgaga aaattcacta
 16141 atgcgggct actagtaccg aaatacggtc cttacccat aagtcaagat ttcaaaaaga
 16201 tggcggtaga tttcataata acagcgtata ccacatccc gaccaattgg tgtaataata
 16261 acaagtttc aattctata cctgaacaag accctgatct acttgaattt agaaaagaca
 16321 tcactcatgc aaggcattt tttatgatct cggatctt ctgctactct ttcaagcaac
 16381 cttggataaa ggagcttaca ccacaagaga agatctgcgt catggaggac ttcatagcca
 16441 attgtgtgc taatgtcaa acaagtgcgg gctggaacat aacgcctta agagtttaca
 16501 atctccctgc atcgaccaca tacatcgga gagggataat aaaacaattt agaatccgtc
 16561 aaagcaatga gcctattgtat ctggaagata ttaggattgg tcagaacccc gattttgtga
 16621 ataaacctat tgatgtttgtt agcagtgaat tcgttatcac aatttataac cttgaagaaa
 16681 ttcttcatac aatgtgcat ctcagtgtaa atatgaacat tgactcctca acaagtaaca
 16741 atactgaaaa tcatttattt agaagggttag gcttgaactc tacttcatct tataaagcac
 16801 tatcttaac acctgttattt aaaaagatatc atcaacagaa cactaatagg ctgtttag
 16861 gagaaggatc agggctatg atgtatctt accagaaaac cttggggag acaatatgtc
 16921 tcttttaattt gggagttcag tacaatgagg atctgggtca aagggaacaa tcattatacc
 16981 cgagtgaata cagtatctgt gaacaaggag taaaaaaaaga aaacccttc accgggcatg
 17041 ttataccact attcaatggaa agaccagaaa ccacatgggtt aggcaatgtat gattttca
 17101 agtatataattt ggaacataact ataaatagag acatcggtt tggtactcc gatatggaaa
 17161 caggaatagg gaaggataat tatactatct taaatgaaca tgacatctt atagcactga
 17221 gccttacagt aatgtattgtat gatggatct tgggtctaa ggttagctt gcccctgggt
 17281 tttgcatttc ttcatattt aatatgtacc ggacatttt ttcatattt ctatgtgcgt
 17341 ttccaccgtt tagcaattttt gaatcaactt aattttaccc gatttgctt caaaaaaaaagta
 17401 taccggacc ttcacaccca gctagagcca tccaaacaaac gacgaagccaa tctagagaag
 17461 aggataatag tataactaat aatatcctca aaatcaaaaaa tcttgggtcag aaagaattta
 17521 tcaaaacagt aaagaaaaaaa tacgaaatcc atccttcgtt taactgtcct atcaacttca
 17581 caaaggatga taaatatttta atgagtgtt ggttcaagc caatggtcct gatatgata
 17641 gtaaagagac ggctatgac ataggtagca atgttagagaa tctccgagat gtcttaatca
 17701 agttgtttgc agatgcagtc accttctatg atgtatgtcac aaataaaaaag aactttttaa
 17761 atccttattcc agtctacaca agaactcaatg ataaaatttct gatggataaaa atatgcaaga
 17821 aagtcacccat atacacccat atcatatcat gtaaaggatc caatcaatat tgctggaaaa
 17881 ttaaatccca aataagaaaag cattgtctca tacttgattt gaaaagtaag gttttacaa
 17941 aacttattcc aaagggttta agagaaaagggtt gttactcaaa agggatgaag agcatatgtt
 18001 tcactaaact aaccagtcaa gaggtgaaaa gatgggtggaa gatgatatct tacatcggt
 18061 taataagcaa tccataacca catccaaactt gtcagttaaa cacttaatc acaataaaact
 18121 tgtcatcaga ttaaagaaaaa cttataattt ccttttttag 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、宿主細菌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、L-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、またはブ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。

【0024】

上記の配列番号1のゲノム配列は、CedPVのヌクレオチド（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】

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オ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。

【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。

【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

10

20

30

40

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 % 同一のポリヌクレオチド配列を有する核酸を提供する。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 】

10

20

30

40

【表2】

MSDIFNETQS FRNYQSNLGR DGRASAAATT LTTKVRIFVP ANNNPNLWR LTLFLMDVVR SPASAESMKV
 GAGISLVS MY AEKPGALVRA LLNDPDVEAI IIDVYGFDEG IPIMERRGDK ATDDMDSLRK IVKAADFSR
 GRSLFVDQRV QDIVMSDMGS FVNAITSIET QIWIILIAKAV TAPDTAEESE GRRWAKYVQQ KRVNPLFLIS
 PQWINDMRS L IAASLSLRKF MVELLMEAKK GRGKGRIME IVSDIGNYVE ETGMAGFFAT IKFGLETKFP
 ALALNELQSD LNTMKSLMIL YRSIGPKAPF MVLLDESIQT KFAPGSYPLL WSFAMGVTT IDRAGALNI
 NRSYLEPVYF RLQQSAKHO AGNVDEKMAE KLGLTEDQIV HLSANVKDAS QGRDDNQINI REGKFTNVVD
 DIQDHAQSSS EDYNPSKKSF SILTSITSTV DSADSRSA MN ESMTTTSLLK LRQRRLAEKKG DSKNSQDTPP
 KPPRAKDQPT 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。

【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。

【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

10

20

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】

MDKIQQLIEDG LSTINFIQEN KEKLQHSYGR SSIREPPTSV RVEEWEKFIR KIASGPEQVQ GGGSETEITG
DNGDRGNFTN PDQGGGVGTGQ FEERYQKWS QDSELQLDPM VVHDFFYDER RENPDNGKYD RSSKKRDNIR
EGTRQDKYNN QSTDLELLSCL QPSSKNDVIK NESTSVSNLH VTGNKLNPD A KPFEPTSQSK EHPTTTQHDK
NDHQTDYDYK NRRSSENNVI SDHATTMEDN NNFIPATKRK NALSEPIYVQ VLPSNTEGFS GKDYPPLKDN
SVKKRAEPVI LETANHPPAGS ADQDTNQIEE NMQFNLPKLL TEDTDDEPED NNDSMPLEED IREIGSMLKD
GTKDIKTRMN EIDDAIKKIN KKSKNRSLDL ESDGKDQGRR DPSVDLGIKK RKEGLKAAMQ KTKEQLSIKV
EREIGLNDRI CQNSKSMSTEK KLIYAGMEME YGQTSTGSGG PQGSKDGTSD DVQVDEDYDE GEDYEAMPSD
RFYTTLSGEQ KDRFDLLDANQ MSQYDLEAQV DELTRMNLIL YSRLETTNKL LIDILDLAKE MPKLVRKVDN
LERQMGNLNM LTSTLEGHLS SVMIMIPGKD KSEKEIPKNP DLRPILGRSN TSLTDVIDLD HYPDKGSKGI
KPSGSGDRQY IGSLESKFSI 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 EDPPSESHPQ VSGLKSGRNL FERSLILDLNK FKGEDLRLRS QAIMEIEAIL
PILIREAESQ DNSKKGIKNG GHKIQNYNWT QWLYTISSMT REGRIPTMEN MTAALKNGII SEKEHDRIST
IISLLMNYCP AYNHLLRTMS SRMKVHQCQI CMLQEIN (配列番号4)

【0039】

上記の配列番号1のス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にあるポリス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%同一のポリスクレオチド配列を有する核酸を提供する。

【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。

【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、355、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。

【0042】

【表5】

MDPSDLRRII MEDDKSLVNN DDSTETDFLE KTWREGSKID KITPEVDENG NMVPKYVVFN PGKNERKTSG
YQYMICYGFY EDGPINGSYR VKGNIRTTAS FPLGVGKTY SSEEILQELT TLKITVRRTA GSNEKLVYGI
TGPLNHLYPW YKVLTGGSIF SAVKVCRNVD QILLLDRPQIL RVFFLSITKL TDKGVYMPK SVLDFRSDNS
MAFNLLVYLK IDTDITKAGI RGIVNKEGER ITSFMLHIGN FTRRGKGKHS VEYCKRKIDK MKLTFALGTI
GGLSLHIRID GRISKRLQAO VGFQQRNICY S LMDTNPWLNK LTWNNSCIEH KVTAVIQPSV PKDFMLYEDI
LIDNTGKILK (配列番号5)

【0043】

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6405で始まり、8078で終了し、配列番号6に開示されているように557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6405～8078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

【0044】

本発明はまた、ポリペプチド、CedPV 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。

【0045】

20

配列番号6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、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、または556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6のポリペプチド断片（例えば、「少なくとも...約515、520...アミノ酸長」）として、515～520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

【0046】

40

【表6】

```

MSNKRTTVLIIISYTLFYLN NAAIVGFDKL KLNKIGVVQG RVLNYKIKGDPMTKDLVLKF IPNIVNITECVREPLSRYNE TVRRLLLPIH NMLGLYLNNT NAKMTGLMIA GVIMGGIAIG IATAAQITAG FALYEAKKNTENIQKLTDSI MKTQDSIDKL TDSVGTSILILNKLQTYINN QLVPNLELLS CRQNKIEFDL MLTKYLVLDLMTVIGPNINNP VNKDMTIQSL SLLFDGNYDI MMSELGYTPQ DFLDLIESKS ITGQIYVDM ENLYVVIRTYLPTLIEVPDA QIYEFNKITM SSNGGEYLST IPNFILIRGN YMSNIDVATC YMTKASVICN QDYSLPMMSNLRSCYQGETE YCPVEAVIAS HSPRFALTNG VIFANCINTI CRCQDNGKTI TQINQFVSM IDNSTCNDVMDVKFTIKVGK YMGRKDINNNI NIQIGPQIII DVKDLNEIN KMNQSLKDSI FYLREAKRIL DSVNISLISP
SVQLFLIIIS VLSFIILLII IVYLYCKSKH SYKYNKFIDD PDYYNDYKRE RINGKASKSN NIYYVGD
(配列番号6)

```

50

【0047】

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產生され得る。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K490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(sF)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「sF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ためのアミノ酸配列を指す。sF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

【0048】

本発明のsF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sF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sF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

【0049】

本発明のsFまたはsG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。sFまたはsG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sFまたはsG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sFまたはsG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關係がない。30

【0050】

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8268で始まり、10136で終了し、配列番号7に開示されているように622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8268~10136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。40

【0051】

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。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】

MLSQLQKNYL DNSNQQGDKM NNPDKKLSVN FNPLELDKGQ KDLNKSYYVK NKNYNVSNLL NESLHDIKFC IYCIFSLLII ITIINIITIS IVITRLKVHE ENNGMESPNL QSIQDSLSSL TNMINTEITP RIGILVTATS VTLSSSINYV GTKTNQLVNE LKDYITKSCG FKVPELKLHE CNISCADPKI SKSAMYSTNA YAELAGPPKI FCKSVSKDPD FRLKQIDYVI PVQQDRSICM NNPLLDISDG FFTYIHYEGI NSCKKSDFK VLLSHGEIVD

RGDYRPSLYL LSSHYHPYSM QVINCPVTC NQSSFVFCHI SNNTKTLDNS DYSSDEYYIT YFNGIDRPKT KKIPINNMTA DNRYIHFTFS GGGGVCLGEE FIIPVTTVIN TDVFTHDYCE SFNCVQVTGK SLKEICSESL RSPTNSSRYN LNGIMIISQN NMTDFK1QLN GITYNKLSFG SPGRLSKTLG QVLYYQSSMS WDTYLKAGFV EKWKPFPTPNW MNNTVISRPN QGNCPRYHCKC PEICYGGTYN DIAPLDLGKD MYVSVILDSD QLAENPEITV FNSTTILYKE RVSKDELNTR STTTSCFLFL DEPWICISVLE 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分を含まない。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、

10

20

30

40

50

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 K 8 7 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。

【 0 0 5 6 】

本発明の可溶性 C e d P V 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 C e d P V 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。

【 0 0 5 7 】

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 1 0 5 7 2 で始まり、1 8 0 7 7 で終了し、配列番号 8 に開示されているように 2 5 0 1 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 1 0 5 7 2 ～ 1 8 0 7 7 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。

【 0 0 5 8 】

本発明はまた、ポリペプチド、C e d P V 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 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 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。

【 0 0 5 9 】

配列番号 8 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 5 0、5 5 5、5 6 0、5 6 5、5 7 0、5 7 5、5 8 0、5 8 5、5 9 0、5 9 5、6 0 0、6 0 5、6 1 0、6 1 5、6 2 0、6 2 5、6 3 0、6 3 5、6 4 0、6 4 5、6 5 0、6 5 5、6 6 0、6 6 5、6 7 0、6 7 5、6 8 0、6 8 5、6 9 0、6 9 5、7 0 0、7 0 5、7 1 0、7 1 5、7 2 0、7 2 5、7 3 0、7 3 5、7 4 0、7 4 5、7 5 0、7 5 5、7 6 0、7 6 5、7 7 0、7 7 5、7 8 0、7 8 5、7 9 0、7 9 5、8 0 0、8 0 5

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。

【0060】

【表8】

MESDFDISVS DVLYPECHLD SPIVGGKLIT SLEYANLTHN QPHEDQTLLT NINVNKKKKI KSPLISQQSL
 FGNEVNKEIF DLKNYYHVPI PECNRDLFLI SDDKIAFKLS KIMDNSNKLIF DGLERKLSRL ISNVDNQLLN
 ATSLHNNSEM DRKGKEHPCF PEKSTIDDVR QQRQTRDFPK NSTREGRSPK HDAGPTPEN SAKNDLHRDN
 TDNMPTGHSS TSMKKPKISG EYELSMWLDS EDLGSKRISA QLGKDVSCKG HLHTTEDKPI IVPDTRYIQN
 HESNNDFPK KEKKFCKLPP SSDNLTKIMV NSKWYNPFLF WFTVKTELRA CQKENYKRKN RKLGIITSIK
 GSCYKLILNQ NLVAIFEEDS SGYSDHKKRK KRCYYLTPEM VLMFSDVTEG RLMIDVAMRF DKKYKTLEKK
 ALKLWFLIDE LFPMSGNRVY NIISMPLT LAILQVKDES RLLRGAFMHM CLGDLFEELR ESKNYPEDI
 KRFANDLINV MTCRDIHLVA EFFSFFRTFG HPILNAQTA RKVREYMLAD KILEYEPIMK GHAIFCAIII
 NGFRDRHGGV WPPLDLPKHC SKNIISLKN GEGVTYEVAI NNWRSFVGGLK FKCFMGLNLD NDLSMYMKDK
 ALSPLRDLWD SIYSREVMSY QPPRNKKSRR LVEVFVDDQD FDPVDMINYV LTGEYLRRDD FNASYSLKEK
 ETKOVGRILFA KMTYKMRACQ VIAENLIAHG IGRYFHENG VKDEHELSKS LFQLSISGIP RGNKNNKSTN
 DTIHESKIEN NHFSFKNIQNR SFRKTDNPYN RFNIDNPTFL SPNCNPKYNR KNSETIGIFS RAETKSMIRE
 QKSHREVKIN KLDIGSDNEE QGKEIDAAYK KITDNPNPNI NPQDQPGICQ EDKGKEGAKS DLTEGMSFLE
 MHTLFNPSKS DIRTNLELEK SSSLNPNGFIS QKEKRGKTYN ESHSLGKFSK EDEERYDVIS AFLTTDLRKF
 CLNWRHESIG IFARRMDEIY GLPFFNWMH RRRLERSVLYV ADPHCPPSIN EHIDLNSPE RDIFIHHPKG
 GIEGYSQKLW TIATIPFLF SAHETNTRIA AVVQGDNQSI AITHKvhPHL PYKMKKELSA MQAKKYFSRL
 RHNMKALGHE LKATETIIST HFFIYSKIH YDGAVLSQL KSMARCVFWS ETLVDETRA CSNISTTIAK
 AIENGYSRRS GYLINVLKTI QOINISLSFN INECMTDDII RPFRDNPNW KHAALIPASL GGLNYMMNSR
 LYVRNIGDPV TASIADVKRM ILGGVLPIGI LHNIMLQEPG DATYLDWCSD PYSINLKQTQ SITKVIKNIT
 ARVILRNSVN PLLKGLFHEG AYEEDETELAT FILDERRVILP RVGHEILNNS ITGAREEISG LLDTTKGLIR
 IGIAKGGLTQ RTLSRISNYD YEQFLNLMNM LKNKEQNSVI SLSACSVFDA IALRSRMWRK LAKGRRIYGL
 EVPDPIEAMI GFLILGSENC LLCDSGSKNY TWFFIPKDVQ LDKIDKDHAS IRVPYVGSTT EERSEIKLGS
 VKNPSKSLKS AIRLATVYT WAFGTSDAEWW EAWYLSNQRA NIPLDVLKTI TPISTSTNIA HRLRDRSTQV
 KYASTSLNRV SRHVTISNDN MNFEFDGVKM DTNLIYQQVM LLGLSCLESF FRNRKMTNSY NIVYHLHVQE
 HCCVKALNDL PYTPSTHPVP NYTEVRDNRL IYDPQPILEF DELRLAIQQT KKVDLEFSLW DTKELHENLA
 QSLAITVTDI MTKSDKDHIC DQRSIDVDDN IKTLITEFLL VPPEMFAVNL GLHISIKWSF DIHFKRPRGR
 YSMIEYLTDL LDNTSSHVYR ILTNVLSHPR VMRKFTNAGL LVPKYGPYLT SODFKKMAVD FIITAYTTFL
 TNWCNNNKFS ILIPEQDPDI LELRKDITHA RHLCMISDL CYSFKQPWIK ELTPQEKEICV MEDFIANCVA
 NDQTSAGWNI TPLRVYNLPA STTYIRRGII KQLRIRQSNE PIDLEDIRIG QNPDFVNKP EFCSEFGIT
 IYNLEEILQS NVHLSVNMNI DSSTSNNTEN HLFRRVGLNS TSSYKALSLT PVIKRYHQON TNRLFIGEWS
 GSMMYLYQKT LGETICFFNS GVQYNEDLGQ REQSLYPSEY SICEQGVKKE NPLTGHVIPL FNGRPETTWV
 GNDDSFYKYL EHTINRDRIGL VHSDMETGIG KDNYTILNEH AHLIALSLTV MIDDGILVSK VAYAPGFCIS
 SLLNMYRTFF SLVLCAFPPY SNFESTEFYL ICLQKSIPGP ITPARAIQQT TKQSREEDNS ITNNILKIKN
 LVQKEFIKTV KKKYEIHPSF NCPIINFKDD KYLMSVGFQA NGPDMIRKET GYDIGSNVEN LRDVLIKLFA
 DAVTFYDDVT NKKNFLNPYP VYTRTQYKIL MDKICKKVTL YTLIISCKGS NQYCWEIKSQ IRKHCLIDL
 KSKVFTKLIP KGLRERGDSK GMKSIWFTKL TSQEVRWWK MISYIVIISN P (配列番号8)

10

20

30

40

【0061】

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。

【0062】

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 Michaelis, 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に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

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】

例えは、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個の不対残基は、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（例えは、C e d P V 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C e d P V G タンパク質におけるそれらの位置）。このように、対象C e d P V G タンパク質のアミノ酸配列が、参照C e d P V G タンパク質のアミノ酸配列（例えは、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（例えは、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。例えは、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

10

20

30

40

50

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	10
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	

【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. N.Y., N.Y. (1975), pp. 71-77] に説明されるようにグループ化され得る。

【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>		30
A. ヒドロキシル :	S、T、Y	
B. アミド :	N、Q	
C. シルフヒドリル (Sylphydryl) :	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	

【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	10
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	20
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	

【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 B 2 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 B 2 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「G H - 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。

【0078】

例えは、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/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。

【0079】

本発明において有用な抗体は、抗体のグリコシリ化変異体、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（例えは、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、靈長類、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。

【0080】

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、例えは、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、フロイント完全補助剤、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。

【0081】

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產生され得る（例えは、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）。

【0082】

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（例えは、G糖タンパク質に対してより大きな親和性、および/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は抗体配列を遺伝的に操作する）。

【0083】

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。例えは、参考により組み込まれる米国特許第4,816,567号、同第5,807,715号、同第5,866,692号、同第6,331,415号、同第5,530,101号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、同第5,585,089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., *Annals Rev. Immunology* 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产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. Immunology* 13: 65 (1995)、およびPollock, et al., *J. Immunology 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バ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、ニバ、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、高品質管理により產生され得、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、核酸增幅技術(例

10

20

30

40

50

えば、逆転写酵素 P C R 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、D N A ポリメラーゼ (例えは、T a q 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。

【 0 0 9 0 】

ワクチン

【 0 0 9 1 】

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D N A 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。例えは、米国特許第6 , 4 3 6 , 9 0 8 号、同第6 , 4 1 3 , 9 4 2 号、および同第6 , 3 7 6 , 4 7 1 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。

【 0 0 9 2 】

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D N A 送達技術については、例えは、Fine deis et al . , Trends Biotechnol . (1 9 9 3) 1 1 : 2 0 2 ; Chiou et al . , Gene Therapeutics : Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J . A . Wolff , ed .) (1 9 9 4) ; Wu et al . , J . Biol . Chem . (1 9 8 8) 2 6 3 : 6 2 1 ; Wu et al . , J . Biol . Chem . (1 9 9 4) 2 6 9 : 5 4 2 ; Zenke et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A (1 9 9 0) 8 7 : 3 6 5 5 ; Wu et al . , J . Biol . Chem . (1 9 9 1) 2 6 6 : 3 3 8 に記載されている。

【 0 0 9 3 】

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ーショニック (polyeationic) 濃縮D N A (例えは、Curie et al . , Hum . Gene Ther . (1 9 9 2) 3 : 1 4 7 を参照されたい) 、リガンド連結D N A (例えは、Wu , J . Biol . Chem . (1 9 8 9) 2 6 4 : 1 6 9 8 5 を参照されたい) 、真核細胞送達ビヒクル細胞 (例えは、米国特許第5 , 8 1 4 , 4 8 2 号、P C T国際公開特許第W O 9 5 / 0 7 9 9 4 号、同第W O 9 6 / 1 7 0 7 2 号、同第W O 9 5 / 3 0 7 6 3 号、および同第W O 9 7 / 4 2 3 3 8 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D N A もまた採用され得る。例示的な裸のD N A 導入方法は、参照により組み込まれるP C T国際公開特許第W O 9 0 / 1 1 0 9 2 号および米国特許第5 , 5 8 0 , 8 5 9 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ボソームは、参照により組み込まれる米国特許第5 , 4 2 2 , 1 2 0 号、P C T国際公開特許第W O 9 5 / 1 3 7 9 6 号、同第W O 9 4 / 2 3 6 9 7 号、同第W O 9 1 / 1 4 4 4 5 号、および欧州公開特許第E P 0 5 2 4 9 6 8 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Philip , Mol . Cell . Biol . (1 9 9 4) 1 4 : 2 4 1 1 、およびWoffendin , Proc . Natl . Acad . Sci . (1 9 9 4) 9 1 : 1 5 8 1 に記載されている。

【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

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、水中土壤乳剤、水中油型乳剤、サポニン、Q u i 1 A およびその誘導体、イスコム、リポソーム、ガンマイインターフェロンまたはインターロイキン 1 2 を含むサイトカイン、D N A 、固体または半固体粒子でのマイクロカプセル化、フロイント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。

10

【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、当技術分野で既知の方法によって評価され得る。

20

【0098】

実施例

実施例 1

尿 (約 0 . 5 ~ 1 m l) 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ら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 . 5 m l 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 2 m l 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、- 8 0 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 1 6 , 0 0 0 × g で遠心分離した。上清 (約 0 . 5 ~ 1 m l) 中の尿を、細胞培養培地中で 1 : 1 0 に希釈した。

30

【0099】

希釈された尿を、5 分間 1 , 2 0 0 × g で遠心分離し、7 5 c m ² の組織培養フラスコ中でベロ、パキ、P a B r 、P a S p 、およびP a P 1 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 (A T C C) 、H e L a - U S U (2 2) 、および腎臓 (パキ) 、脳 (P a B r) 、(脾臓) P a S p 、および胎盤 (P a P 1) 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、3 7 で 5 % の C O ₂ 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) 、1 0 μ g / m l のシプロフロキサシン (M P B i o m e d i c a l s) 、および 1 0 % のウシ胎児血清で補充された D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m N u t r i e n t M i x t u r e F - 1 2 H a m 中で増殖した。フラスコを 3 7 で 2 時間振動し、1 4 m l の新鮮な細胞培養培地を添加し、次いで、3 7 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 (C P E) について、フラスコを毎日観察した。

40

【0100】

多核体 C P E が、2 個の異なる尿試料の接種の 5 日後 (d p i) 、腎細胞 (パキ) 単層

50

において観察された。CPE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 dpi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、CPE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CPEの形態は、HeV感染のものとは異なっていた。HeV特異的PCR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HeVの分離株ではないことが示された。

【0101】

実施例2

多核体CPE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。PCR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pGEM-T-Easy(Promega)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。

10

【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ビリオンを、30,000×gで60分間の遠心分離により回収し、140μlのPBS中に再懸濁させ、QIAamp Viral RNAミニキット(Qiagen)を使用して、RNA抽出のための560μlの新たに作られたAVLと混合した。cDNA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、cDNA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(octomer)を使用して実施した：(5'-GTTTCCCCAGTAGGTCCTC NNNNNNN-3')およびSuperscript III Reverse Transcriptase(Life Technologies)。8μlのds-cDNAを、200μlのPCR反応物中でホットスタートTaqポリメラーゼ酵素(Promega)および5'-A*G*C*A*C TGTAGGTTTCCCCAGTAGGTCCTC-3'(*はチオール修飾を意味する)を用いて、5分間95°で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、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)で精製した。ロシュ454配列決定のための試料調製(454 Life Sciences Branford、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(Rapid Library Preparation and emPCR Lib-L SV)に従って実施した。

20

【0103】

正確なCedPV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CedPV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、CLCソフトウェアで生成されたSNPおよびDIP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PCRの誤りは、特に読み取り値範囲が深いときに実際のSNPおよびDIP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。

30

【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' - RACEによって判定した。簡潔に述べると、約100ngのRNAを、T4 RNアリガーゼ(Promega)を用いてアダプタDT88(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、Superscript III RTキット(Life Technologies)およびアダプタ特異的プライマー、DT89を用い

40

50

たcDNA合成を行う。次いで、PCR增幅を、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.、オーフス、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(<15bp)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。

【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か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らによつ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)。

【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)。

【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。

【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

【0111】

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、アフリカのコウモリ(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。

【0112】

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)。

【0113】

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AAAAGGGの

10

20

30

40

50

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、 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 。

【 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 匹の大鼠のニュージーランド白兎の 4 箇所の異なる部位に（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 日で安樂死させた。

【 0 1 1 7 】

免疫蛍光抗体試験のため、 3 0 0 μ l の細胞培地で 3 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの濃度で播種して、 3 7 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 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 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 アレクサフオレ (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 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。

【 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 D₅₀ 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 O₂ インキュベーター中で、 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。 2 \times 1 0⁵ 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

10

20

30

40

50

O_2 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、最終的な中和力値として定義した。

【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 C e d P V - 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 C e d P V - N タンパク質に対して惹起されたウサギ血清を用いた H e V 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 C e d P V 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（J P V）、牛痘ウイルス（R P V）、センダイウイルス（S e V）、メナングルウイルス（M e n P V）および C e d P V にそれぞれ感染したベロ細胞上の抗 C e d P V 血清で実行された I F A T 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。

10

【0120】

実施例 5

C e d P V 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 B 2 および B 3 宿主細胞タンパク質の C e d P V の使用を検査した。典型的には、H e V および N i V は、C e d P V 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 B 2 受容体を使用する（22、34）。ヒトのエフリン B 2 および B 3 遺伝子を p Q C X I H (C l o n t e c h) 中にクローニングし、結果として得られたプラスミドを、G P 2 - 293 パッケージ細胞株（C l o n t e c h ）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（V S V - G ）でシュードタイプした。H e L a - U S U 細胞株（22）を、1 μ g / m l のポリブレン（Sigma）の存在下で V S V - 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）。

20

【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、培地で200 μ g / m l 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。H e L a - U S U 細胞およびエフリン発現 H e L a - U S U 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（H e V および C e d P V ）を0.01のM O I 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。

30

【0122】

C e d P V について、同様の観察をエフリン B 2 受容体に関して行った。図7に示されるように、C e d P V は、H e L a - U S U を感染させることに失敗したが、ヒトエフリン B 2 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 B 3 分子を導入したとき、感染の証拠はなかった。

【0123】

40

実施例 6

フェレット、モルモット、およびマウスは、H e V および N i V 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 C e d P V (2×10^6 T C I D₅₀ / m l) を2匹の雄のフェレット（1 m l 、口腔鼻に）、4匹の雌のモルモット（1 m l 、腹腔内に）、および5匹の雌の B a l b - C マウス（50 μ l 、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）、D e s t r o n F e a r i n g ）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

50

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 T C I D₅₀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N i V Nタンパク質に対して惹起されたウサギ抗体を用いた）、q P C R（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）。

10

【0125】

N i VおよびH e V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B a l b - 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N i V 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。

20

【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	中和抗体タイトラー	
		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

30

【0127】

ウイルスR N A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頸下リンパ節に検出された。C e d P Vゲノムは、影響

40

50

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。

【0128】

実施例7

オーストラリアのクイーンズランド州から2003～2005年の間に収集された100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1:20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23%がC e d P V陽性、37%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。

【0129】

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42%および43%同一であり、C e d P V - Gは、H e V - GおよびN i V - Gと29%および30%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ニングをp C D N Aベクター中に調製し、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B2およびB3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B3を有する陰性C e d P V細胞 - 細胞融合である。

【0130】

融合は、293T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B2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、エフリン使用とも相関する。

【0131】

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B2またはB3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3sG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、B1、B2、B3 - 弱、A1、A2、A4 - 弱、およびA5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10）。この著しく広い受容体結合プロファイルは、エフリンB2およびB3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。

【0132】

実施例10

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11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B2およびB3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A1またはA2のいずれかであるとき（またはエフリンB1またはB2が利用された）

、非常に寛容であった。

【0133】

更に、HeLa - USU細胞における（遺伝子配列データに基づく）エフリンA1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、CedPV G糖タンパク質（図10）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CedPV受容体結合および機能的細胞・細胞融合と良好に相關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。

【0134】

【表14】

10

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

20

【0135】

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。

【0136】

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

【0137】

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.

【0138】

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

【0139】

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

【0140】

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, Morrisey 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* 80:7929-79310.

【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, Klippen 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, Levronay 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, Lefevre 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 J H, 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-lre 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 non-template nucleotides encode the amino c-terminal 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】

36. Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Westbury HA, Slocumbe RF (2000) Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 122:201-207. 30

【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, Blanquier 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 ebola virus-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 hV protein. *J Virol* 65: 3406 - 3410.

【0178】

43. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiyah 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. 13

【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) BT tag: 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。

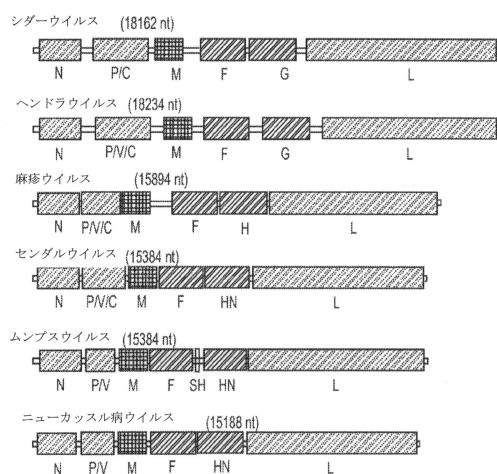
10

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。

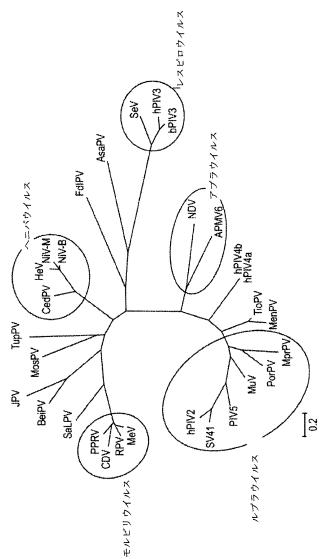
【 図 1 】



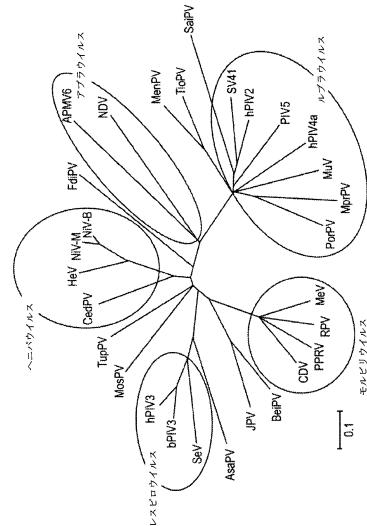
【 図 2 】

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'-ACCAAGAAAAAGG....CCTTTTTAGGA-3'	
HeV	5'-ACCGAACAAAGGG....CCCTTGTGCGA-3'	
NiV	5'-ACCAAACAAAGGG....CCCTTGTGCGA-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	AGGATCCCG
N/P	TTACAAAAAA	CTT
P/M	TTAGAAAAAA	CTT
M/F	TTAAGAAAAA	CTT
F/G	TTAAATAAAA	CTT
G/L	TTAAAGAAAA	CTT
L/	TTAAGAAAAA	CTT
C. コンセンサス		
CedPV	TTAvrdAAAA	CTT AGGATCCmrg
HeV	TTAmrDAAAA	CTT AGGAhmCarg
NiV	TwAwrdAAAA	CTT AGGAhmCarg

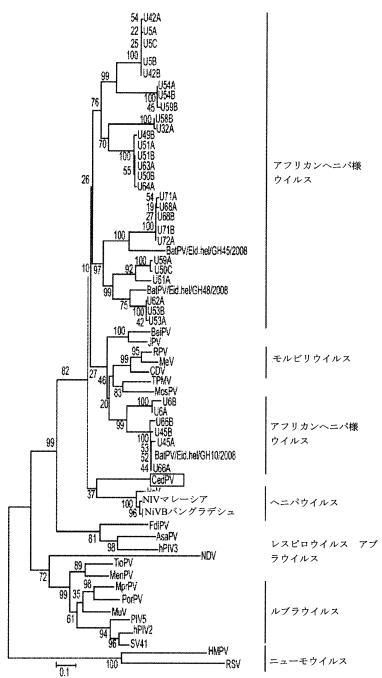
【図3A】



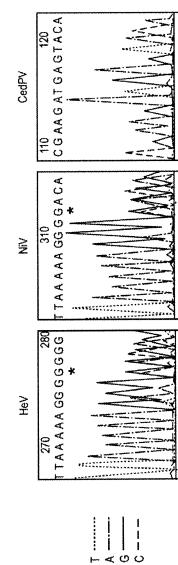
【図3B】



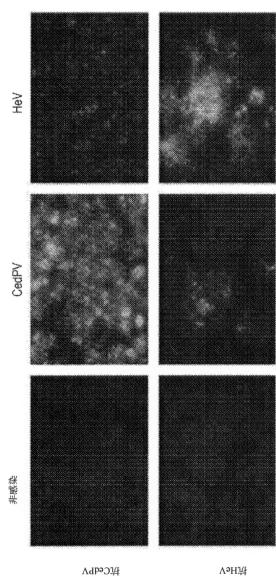
【図3C】



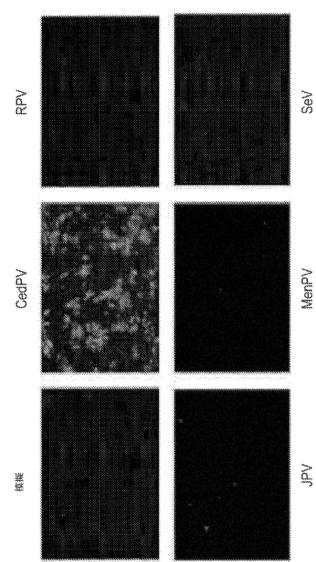
【 四 4 】



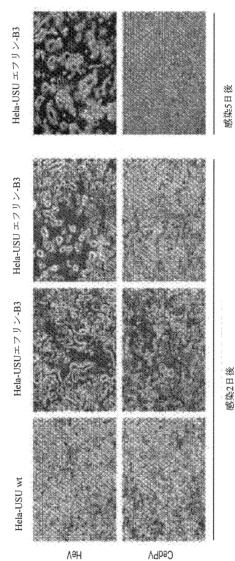
【図5】



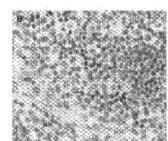
【図6】



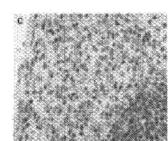
【図7】



【図8 B】



【図8 C】



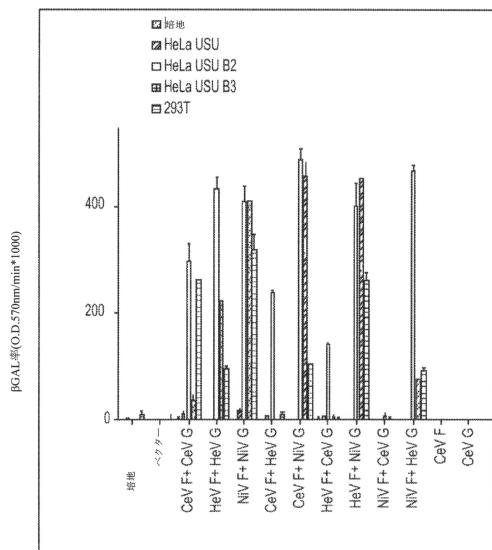
【図8 D】



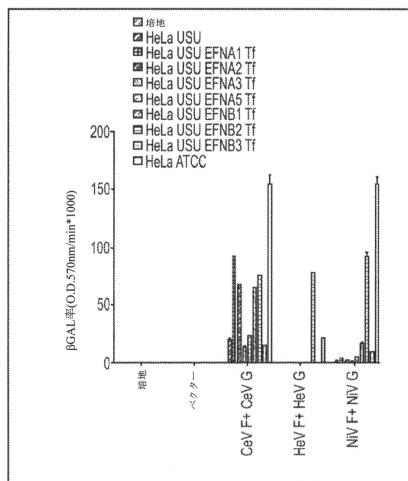
【図8 A】



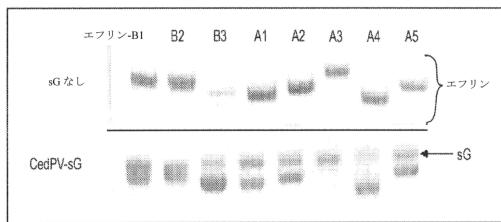
【図9】



【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 サイエンティフィック 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 2601 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 4000 ブリスベン アン ストリート 80

(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 3216 ワンダナ ハイツ 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 3224 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 4160 クイーンズランド オーミストン カウニハン ストリート 19

(72)発明者 ブロダー クリストファー

アメリカ合衆国 20905 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 329

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0053501(US, A1)

米国特許出願公開第2007/0031455(US, A1)

国際公開第2010/039778(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 09

C 0 7 K 14 / 115

C 0 7 K 16 / 10

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q