(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-529337
(P2018-529337A)
(43)公表日　平成30年10月11日(2018.10.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A01K 67/033	***(2006.01)***	A01K	67/033	501	4B029
C12N 15/11	***(2006.01)***	C12N	15/11	Z	4B064
C12M 1/00	***(2006.01)***	C12M	1/00	A	4B065
C12M 1/26	***(2006.01)***	C12M	1/26		
C12P 21/02	***(2006.01)***	C12P	21/02	C	

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 60 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-513860 (P2018-513860)
(86)(22)出願日　平成28年9月19日 (2016.9.19)
(85)翻訳文提出日　平成30年5月11日 (2018.5.11)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/072143
(87)国際公開番号　WO2017/046415
(87)国際公開日　平成29年3月23日 (2017.3.23)
(31)優先権主張番号　15382451.1
(32)優先日　平成27年9月17日 (2015.9.17)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　518085933
オルタナティブ　ジーン　エクスプレッション，　エセ．エレ．
スペイン国　２８２２３　マドリード　ポスエロ　デ　アラルコン　キャンパス　デ　モンテガンセド　ユニベルシタット　ポリテクニカ　デ　マドリード　パルケ　シエンティフィコ　イェ　テクノロジコ　セントロ　エンプレサリアル
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トリコプルシア・ニの蛹における組み換えタンパク質の発現

(57)【要約】
本発明は、組み換えタンパク質の発現効率を増すための、特に、昆虫蛹における、特にトリコプルシア・ニ（Ｔ．ニ）の蛹における組み換えタンパク質の工業生産を最適化するための手段及び方法を包含する。またさらに、本発明は、バキュロウイルスを含む蛹自体、バキュロウイルス又はバクミドに感染した、それらにより形質転換された、形質導入された又はトランスフェクトされた蛹、並びに本発明の方法を実施するのに適した装置に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドを含む蛹であって、該蛹がトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属に属する、蛹。
【請求項２】
前記組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドが組み換えタンパク質をコードする核酸配列を含み、該組み換えタンパク質が、好ましくはサブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択され、及び／又は前記組み換えタンパク質が、好ましくは蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではない、請求項１に記載の蛹。
【請求項３】
前記バキュロウイルス及び／又はバクミドが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含み、
前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする前記核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、請求項１又は２に記載の蛹。
【請求項４】
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む蛹であって、
該蛹が、トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属又はヘリコベルパ属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種又はラキプルシア・ヌ種に属し、
前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは

少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、

（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、

（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、

からなる群から選択される、蛹。

【請求項５】

前記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターが、

（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、

（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、

を含む核酸の群から選択される、及び／又は、

前記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、

請求項２～４のいずれか一項に記載の蛹。

【請求項６】

組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項２～５のいずれか一項に記載の蛹。

【請求項７】

前記蛹が、好ましくはサブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、請求項３～６のいずれか一項に記載の蛹。

【請求項８】

請求項１～７のいずれか一項に規定される蛹の使用であって、好ましくはサブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される、組み換えタンパク質の発現のための、及び／又は該組み換えタンパク質が、好ましくは蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではない、使用。

【請求項９】

（ａ）蛹、好ましくは絹を含まない蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、

（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、

（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、

（ｅ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する工程と、

（ｆ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製する工程と、

を含み、
前記蛹が、トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、又はラキプルシア・ヌ種に属する、少なくとも１つの組み換えタンパク質を産生する方法。
【請求項１０】
前記組み換えバキュロウイルスが、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、
組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）と、
を含み、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする前記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された前記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項３及び／又は４に規定されるようなものである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む前記核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記蛹が、好ましくは、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含み、及び／又は前記組み換えタンパク質が、好ましくは蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではない、請求項９～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
（ａ）絹繭に含まれる蛹を準備する工程と、
（ｂ）蛹を含む前記絹繭を次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液で処理する工程と、
（ｃ）絹を含まない、外部殺菌された蛹を得る工程と、
を含む、鱗翅目、好ましくはＴ．ニ種に属する絹を含まない蛹を産生する方法。
【請求項１４】
（ａ）トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、又はラキプルシア・ヌ種に属する蛹、好ましくは絹を含まない蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したバクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、
（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）前記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、前記組み換えバキュロウイルスを採取する工程と、
（ｆ）任意に、前記組み換えバキュロウイルスを精製する工程と、
を含む、組み換えバキュロウイルスを産生する方法。
【請求項１５】

オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適した前記バクミドが、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、
組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）と、
を含み、或いはそれらからなり、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする前記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された前記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項３及び／又は４に規定されるようなものである、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
精密ポンプと、モバイル機械アームと、トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、又はラキプルシア・ヌ種に属する蛹に流体を注入するのに適した（移動可能な）針とを備え、好ましくは該蛹がマトリクス又はアレイで提供される、装置。
【請求項１８】
前記装置が、前記針の位置を規定する、及び／又は前記針から前記蛹までの距離及び／又は前記蛹への針の穿通距離及び／又は前記蛹に接種する液体（好ましくは組み換えバキュロウイルス又はバクミドを含む）の容量を計算するコンピュータプログラムを更に備え、
前記装置が、好ましくは、例えば前記接種針の座標を決定する、及び／又は前記蛹の前記接種の容量及び／又は時間及び／又は接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備える、請求項１７に記載の装置。
【請求項１９】
絹溶解液を含む少なくとも１つのコンテナを備える絹選除装置であって、該装置が、好ましくは洗浄コンテナであり、蛹から微量の絹及び絹溶解液を除去するのに適した溶液を含む及び／又は該溶液を分散する第２のコンテナと、任意に、蛹を乾燥するために空気を与えるシステムとを備える、絹選除装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、バイオテクノロジーの分野に含まれるものとすることができ、また特に、昆虫蛹、特にトリコプルシア・ニ（Trichoplusia ni）（Ｔ．ニ）の蛹における組み換えタンパク質の工業生産に関する、組み換えタンパク質の発現効率を増すための（その工業生産の最適化を含む）手段及び方法を包含する。またさらに、本発明は、バキュロウイルスを含む蛹自体、バキュロウイルス又はバクミドに感染した、それらにより形質転換された、形質導入された、又はトランスフェクトされた蛹に関する。
【背景技術】
【０００２】
バキュロウイルス発現ベクター系（ＢＥＶＳ）は、組み換えタンパク質、例えばワクチン、治療用分子又は診断用試薬として使用されるタンパク質の産生に対する確立した方法

である。その過剰発現の可能性及び急速な発生により、ＢＥＶＳは、任意の目的の組み換えタンパク質の産生に対する最も魅力的な選択肢の１つである。組み換えタンパク質発現の業界で最も採用されるバキュロウイルスベクターは、好適な発現宿主としてスポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）９（Ｓｆ９）又は２１（Ｓｆ２１）の昆虫細胞を用いるオートグラファ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス（Autographa californica multinuclear polyhedrosis virus）（ＡｃＭＮＰＶ）（非特許文献１）、及び生体バイオファクトリーとしてのトリコプルシア・ニ（Ｔ．ニ）の昆虫幼虫（非特許文献２）に基づくものである。ＢＥＶＳが８０年代に開発されてから（非特許文献３）、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞においてサイトゾル酵素から膜結合型タンパク質に及ぶ何百もの組み換えタンパク質の産生に成功してきた。

【０００３】

最近、新たなバキュロウイルスベクターが記載された。例えば、特許文献１及び特許文献２は、昆虫及び昆虫細胞における組み換えタンパク質の発現に対する組み換えＤＮＡエレメントを記載している。

【０００４】

低価値の基材である桑の葉を高価値のタンパク質系製品である絹へと変換するプロセスで毎年約７００００トンの絹が世界的に生産される。昆虫は加速した代謝のため、非常に効果的なタンパク質生産者である。ボムビークス・モリ（Bombyx mori）（Ｂ．モリ、カイコ）、又はＴ．ニ（イラクサキンウワバ（cabbage looper））等の鱗翅目は、バイオテクノロジーで最も使用される昆虫のうちの２つである。それらは、２週間未満のうちに約５０００倍にサイズを増し、Ｂ．モリ昆虫１匹当たり１キロメートル超の絹を産生する。絹糸腺に由来する細胞が１日当たり１細胞当たり約８０μｇのタンパク質を産生し得るのに対し、最良の哺乳動物細胞培養系は１日当たり１細胞当たりわずか約５０ｐｇのタンパク質を産生するにすぎない。

【０００５】

したがって、生体バイオファクトリーとしての昆虫は、産生汎用性、拡張性、自動化可能性、発生の効率及び速度により、昆虫細胞、従来の発酵技術、また植物由来タンパク質に対する有望な代替物を構成する。例えば、生体バイオファクトリーとしての昆虫は、例えば昆虫細胞におけるタンパク質発現のためのバイオリアクターの必要を回避する。バイオリアクターは、非効率的で高価であり、技術的に複雑である（構築に数年を要し、検証が困難であり、操作に高い技術を持つ個人を必要とし、汚染を生じやすく、信頼がおけない）ことから、新たな及び既存の組み換えタンパク質の産生に対して技術的及び経済的な障壁である。さらに、バイオリアクターは、拡張性の制限という問題に直面する。

【０００６】

Ｂ．モリの幼虫は、バキュロウイルス発現ベクター系を使用する組み換えタンパク質発現用の生体バイオファクトリーとして広く使用されている（非特許文献４、非特許文献５、非特許文献６、非特許文献７、非特許文献８、非特許文献９）。

【０００７】

また、Ｔ．ニの幼虫も組み換えタンパク質の発現に使用される（非特許文献１０、非特許文献２、非特許文献１１、非特許文献１２、非特許文献１３、非特許文献１４、非特許文献１５、非特許文献１６、非特許文献１７）。

【０００８】

カイコにおいては、比較研究は、大半のタンパク質について、蛹に代えて幼虫で最も高い発現収率（expression yields）が得られたことを実証した（非特許文献１８、非特許文献１９）。また、蛹の齢と関連してカイコにおけるバキュロウイルス感染に対する蛹の感受性の減少が記載された（非特許文献２０）。さらに、幼虫では、生産のスケールアップのため、バキュロウイルスの感染を接種（注入）に代えて一般に経口で行う。蛹は、経口で感染できないことから、手作業で注入しなければならず、この作業は長々しく手間がかかる。さらに、カイコの蛹は、ウイルスの接種が行われる前に、一般的に長々しいプロセスで（手作業で）除去されなければならない厚い繭で覆われている。

【０００９】
一般的なカイコ蛹におけるより低いタンパク質発現収率及びその操作の難しさのため、組み換えタンパク質の産生に対する幼虫の使用が普遍的に好まれるようになった。
【００１０】
ヒアロフォラ・セクロピア（Hyalophora cecropia）の蛹等の他の系で同様の不利益が見られる。Ｈ．セクロピアの蛹における特定のタンパク質の発現は、Ｔ．ニ幼虫よりも低い（非特許文献２１）。さらに、ヒアロフォラ・セクロピアの蛾は飼育が難しく、厳密に一化性（１年当たり１世代）であり、１サイクル当たりの卵が非常に少量であり、繭が高密度である（ウイルスの接種を行う前に厚い繭を（手作業で）除去しなければならず、一般に手間のかかる作業である）。これらの不利益は全て、組み換えタンパク質の発現に対して、ヒアロフォラ・セクロピアの蛹を不十分な系、特に組み換えタンパク質の発現に対して効率、拡張性及び自動化に乏しい系とする。
【００１１】
ＢＥＶＳを使用する昆虫での組み換えタンパク質の発現のため、特にＢＥＶＳを使用する昆虫での組み換えタンパク質の工業的発現のためのシステムをより効率的で容易に自動化（スケールアップ）する要求が存在する。
【００１２】
徹底的な研究の後、本発明者らは、上記の課題の解決策、すなわち鱗翅目に属する、より好ましくはトリコプルシア・ニ種に属する蛹における、幼虫での発現よりも効率的で、更にはほぼ完全な自動化（スケールアップ）を可能とし、特に工業規模で、効率を増し、組み換えタンパク質の発現に関連するコストを下げる、タンパク質発現系を見出した。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１３】
【特許文献１】国際公開第２０１２／１６８４９３号
【特許文献２】国際公開第２０１２１６８４９２号
【非特許文献】
【００１４】
【非特許文献１】Nettleship, J.E., Assenberg, R., Diprose, J.M., Rahman-Huq, N., Owens, R.J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. J. Struct. Biol. 2010, 172, 55-65
【非特許文献２】Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Nunez MC, Lasa-Covarrubias R, Martinez-Pulgarin S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. Protein Expr Purif. 79: 35-43. 2011
【非特許文献３】Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165
【非特許文献４】Wang, DN; Liu, JW; Yang, GZ; Zhang, WJ; Wu, XF. 2002. Cloning of anti-LPS factor cDNA from Tachypleus tridentatus, expression in Bombyx mori larvae and its biological activity in vitro. Molecular Biotechnology, 21(1), 1-7
【非特許文献５】Wu, XF; Kamei, K; Sato, H; Sato, S; Takano, R; Ichida, M; Mori, H; Hara, S. 2001. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (Bombyx mori L.) using recombinant baculovirus. Protein Expression And Purification, 21(1), 192-200
【非特許文献６】Kulakosky, PC; Hughes, PR; Wood, HA. 1998. N-linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. Glycobiology, 8(7), 741-745
【非特許文献７】Suzuki, T; Kanaya, T; Okazaki, H; Ogawa, K; Usami, A; Watanabe, H; KadonoOkuda, K; Yamakawa, M; Sato, H; Mori, H; Takahashi, S; Oda, K. 1997. Efficient protein production using a Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus lackin

g the cysteine proteinase gene. Journal Of General Virology, 78, 3073-3080
【非特許文献８】Sumathy, S; Palhan, VB; Gopinathan, KP. 1996. Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. Protein Expression And Purification, 7(3), 262-268
【非特許文献９】U. Reis, B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, J. Collins, Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, Biotechnology (NY) 10 (1992) 910-912
【非特許文献１０】Perez-Martin, E., Gomez-Sebastian, S., Argilaguet, J.M., Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Kurtz, S., Escribano, J.M., Segales, J., Rodriguez, F., 2010. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in Trichoplusia ni-larvae. Vaccine 28 (11), 2340-2349
【非特許文献１１】Medin, JA; Hunt, L; Gathy, K; Evans, RK; Coleman, MS. 1990. Efficient, low-cost protein factories - expression of human adenosine-deaminase in baculovirus-infected insect larvae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(7), 2760-2764
【非特許文献１２】Shafer, AL; Katz, JB; Eernisse, KA. 1998. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. Avian Diseases, 42(1), 28-34
【非特許文献１３】Cha, HJ; Pham, MQ; Rao, G; Bentley, WE. 1997. Expression of green fluorescent protein in insect larvae and its application for heterologous protein production. Biotechnology and Bioengineering, 56(3), 239-247
【非特許文献１４】Burden, JP; Hails, RS; Windass, JD; Suner, MM; Cory, JS. 2000. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of Trichoplusia ni. Journal of Invertebrate Pathology, 75(3), 226-236
【非特許文献１５】Perez-Filgueira, D. M.; Resino-Talavan, P.; Cubillos, C.; Angulo, I.; Barderas, M. G.; Barcena, J.; Escribano, J. M.. 2007. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. Virology, 364(2), 422-430
【非特許文献１６】Perez-Filgueira, D. A.; Gonzalez-Camacho, F.; Gallardo, C.; Resino-Talavan, P.; Blanco, E.; Gomez-Casado, E.; Alonso, C.; Escribano, J. M.. 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in Trichoplusia ni larvae. Journal of Clinical Microbiology, 44(9), 3114-3121
【非特許文献１７】Hellers, M; Gunne, H; Steiner, H. 1991. Expression and posttranslational processing of preprocecropin-a using a baculovirus vector. European Journal of Biochemistry, 199(2), 435-439
【非特許文献１８】Akihiro Usami et al (Akihiro Usami, Seiji Ishiyama, Chiaki Enomoto, Hironobu Okazaki, Keiko Higuchi, Mashahiro Ikeda, Takeshi Yamamoto, Mutsumi Sugai, Yukiko Ishikawa, Yumiko Hosaka, Teruyuki Koyama, Yoneko Tobita, Syoko Ebihara, Toshiko Mochizuki, Yoshimi Asano and Hidekazu Nagaya, Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm, J. Biochem. 2011;149(2):219-227
【非特許文献１９】Chazarra S, Aznar-Cervantes S, Sanchez-del-Campo L, Cabezas-Herrera J, Xiaofeng W, Cenis JL, Rodriguez-Lopez JN, Purification and kinetic properties of human recombinant dihydrofolate reductase produced in Bombyx mori chrysalides, Appl Biochem Biotechnol. 2010 Nov;162(7):1834-46
【非特許文献２０】Journal of General Virology (1992), 73, 3195-320

【非特許文献２１】Hellers, M. and Steiner, H.; Insect Biochem. Molec. Biol., Vol 22, Bo.1, pp. 35-39, 1992

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

したがって、本発明は、診断薬、ワクチン及び治療的処置に使用される組み換えタンパク質を産生するため、オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus）（ＡｃＭＮＰＶ）に由来するバキュロウイルスベクターと組み合わせた、鱗翅目に属する、より好ましくはトリコプルシア・ニ種に属する蛹（サナギ（chrysalises））の使用に関する。組み換えタンパク質発現に対するトリコプルシア・ニ種に由来する蛹（サナギ）の使用、特に組み換えタンパク質発現に対するトリコプルシア・ニ種に由来する蛹（サナギ）の工業的使用については、まだ報告されていない。

【課題を解決するための手段】

【００１６】

本発明は、オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はトランスファーベクター／バクミドを含む蛹を提供する。

【００１７】

さらに、本発明は、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む蛹を提供する。

【００１８】

また、本発明は、組み換えタンパク質の発現に対する、本発明の蛹の使用に関する。

【００１９】

さらに、本発明は、

（ａ）蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、

（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、

（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、

（ｅ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する工程と、

（ｆ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製する工程と、

を含む、少なくとも１つの組み換えタンパク質を産生する方法を提供する。

【００２０】

さらに、本明細書には、

（ａ）繭に含まれる蛹を準備する工程と、

（ｂ）好ましくは特別に設計した装置によって、繭に含まれる蛹を次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液で処理する工程と、

（ｃ）絹を含まない（また任意に、本質的に外部殺菌された）蛹を得る工程と、

を含む、鱗翅目に属する絹を含まない蛹を産生するための操作を減らすように自動化し得る方法が提供される。

【００２１】

組み換えバキュロウイルスを産生する方法が、

（ａ）蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したトランスファーベクタ

ー／バクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、
（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）上記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを採取する工程と、
（ｆ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを精製する工程と、
を含む。
【００２２】
また、本発明は、精密ポンプと、モバイル機械アームと、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア（Trichoplusia）属、ラキプルシア（Rachiplusia）属、スポドプテラ（Spodoptera）属、ヘリオチス（Heliothis）属、マンズカ（Manduca）属、ヘリコベルパ（Helicoverpa）属、アスカラファ（Ascalapha）属、又はサミア（Samia）属、より好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ（Trichoplusia ni）種、ラキプルシア・ヌ（Rachiplusia nu）種、スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）種、ヘリオチス・ヴィレッセンス（Heliothis virescens）種、ヘリコベルパ・アルミゲラ（Helicoverpa armigera）種、ヘリコベルパ・ジー（Helicoverpa Zea）種、マンズカ・セクスタ（Manduca sexta）種、アスカラファ・オドラタ（Ascalapha odorata）種、又はサミア・シンシア（Samia cynthia）種に属する蛹に流体を注入するのに適した（移動可能な）針（複数の場合がある）とを備える装置に関する。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１】大規模使い捨てＴ．ニ昆虫飼育モジュールの図である。昆虫飼育モジュールにおいて成長している５齢期幼虫の図である。
【図２】ボムビークス・モリ及びトリコプルシア・ニ鱗翅目によって形成された繭（画像の左部分）及び絹を含まない蛹（画像の右部分）の比較の図である。
【図３】Ｔ．ニの繭からの絹の除去のための半自動式装置の図である。使い捨ての飼育モジュールが配置される、２個のコンテナと１つの機械アームとを備える機械の略図である。第１のコンテナは次亜塩素酸と、繭を含む飼育モジュールを通して液体を放出するシステム（該システムは、蛹を取り囲む絹をより効率的に溶解することを補助する）とを備える。第２のコンテナは蛹を洗浄するためであり、該コンテナはサナギに水を噴霧する。このコンテナの蓋には、蛹を乾燥するために空気を与えるシステムがある。プロセスの終わりには、蛹は絹を含まず、感染に使用する用意ができている、又は使用まで冷蔵保存する用意ができている。
【図４】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の産生に使用したバキュロウイルス発現カセットの図である。Ａ）ポリヘドリンプロモーター（例えば配列番号２３）を使用する従来のバキュロウイルス発現カセットの図である。Ｂ）ポリヘドリンプロモーターの制御下で発現されるトランス活性化因子のＩＥ１及びＩＥ０をコードするＡｃ－ｉｅ－０１のｃＤＮＡ；ＧＦＰの発現を駆動するエンハンサー配列ｈｒ１及びキメラプロモーターｐ６．９－ｐ１０（例えば配列番号１７及びＧＰＦをコードする核酸配列、例えば配列番号３８）を含むＴＢ発現カセットの図である。
【図５】組み換えバキュロウイルスを注入するロボットによるＴ．ニ蛹の自動接種の図である。Ａ）接種ロボットの略図である。Ｂ）昆虫蛹が配置される小孔のマトリクスの略図である。蛹を含むこれらの小孔は、穴の開いた蓋を有し、積み重ねが可能であり、生産実験室への蛹の輸送を容易にし、接種ロボットと適合性である。同じパネルにおいて、蛹を含む小孔の及び蓋を含む実際の写真画像を示す。Ｃ）ロボットアームと接続される針による蛹の接種の略図である。
【図６】従来のバキュロウイルスＴＢ（－）（ポリヘドリンプロモーター、例えば配列番号２３）又はＴＢ改変バキュロウイルスＴＢ（＋）を使用することによる感染した蛹におけるＧＦＰタンパク質の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（－）又はＴＢ（＋）

のバキュロウイルスに感染した蛹に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）蛹バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される、分析した各バキュロウイルスに感染した蛹で得られたＧＦＰ産生収率の定量の図である。

【図７】ブタサーコウイルス２型由来カプシドタンパク質（Ｃａｐ）（例えば配列番号２６）又はインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニン（ＨＡ）（例えば配列番号３０）を産生するため使用したバキュロウイルス発現カセットの図である。Ａ）ポリヘドリンプロモーターを使用する従来のバキュロウイルス発現カセットの図である。Ｂ）ポリヘドリンプロモーターの制御下で発現されるトランス活性化因子のＩＥ１及びＩＥ０をコードするＡｃ－ｉｅ－０１のｃＤＮＡ；上で言及されるタンパク質の発現を駆動するエンハンサー配列ｈｒ１及びキメラプロモーターｐ６．９－ｐ１０を含むＴＢ発現カセットの図である。

【図８】従来のバキュロウイルスＴＢ（－）（ポリヘドリンプロモーター、配列番号１０、配列番号２８）、又はＴＢ改変バキュロウイルスＴＢ（＋）（例えば配列番号２７又は配列番号２９）を使用することによる感染した蛹におけるＣａｐタンパク質（例えば配列番号２６）の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（－）又はＴＢ（＋）のバキュロウイルスに感染した蛹に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）蛹バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される、分析した各バキュロウイルスに感染した蛹で得られたＣａｐ産生収率の定量の図である。

【図９】従来のバキュロウイルスＴＢ（－）（ポリヘドリンプロモーター、配列番号１０）又はＴＢ改変バキュロウイルスＴＢ（＋）（例えば配列番号３１）を使用することによる感染した蛹におけるＨＡタンパク質（配列番号３０）の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（－）又はＴＢ（＋）のバキュロウイルスに感染した蛹に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）蛹バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される、分析した各バキュロウイルスに感染した蛹で得られたＨＡ産生収率の定量の図である。

【図１０】Ｔ．ニの幼虫及び蛹において、ＧＦＰ、Ｃａｐ（配列番号２６）、ＨＡ（配列番号３０）、及びウサギ出血性疾患ウイルス（ＲＨＤＶ、配列番号３２又は配列番号３３）に由来するＶＰ６０タンパク質を産生するため使用したバキュロウイルス発現カセットの図である。ポリヘドリンプロモーターの制御下で発現されるトランス活性化因子のＩＥ１及びＩＥ０をコードするＡｃ－ｉｅ－０１のｃＤＮＡ；上で言及されるタンパク質の発現を駆動するエンハンサー配列ｈｒ１及びキメラプロモーターｐ６．９－ｐ１０を含むＴＢ発現カセットの略図である。

【図１１】感染した蛹及び幼虫におけるＧＦＰタンパク質の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染した蛹（Ｐ）又は感染した幼虫（Ｌ）に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）感染した蛹又は幼虫で得られたＧＦＰ産生収率の定量の図であり、昆虫バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される。

【図１２】感染した蛹及び幼虫におけるＣａｐタンパク質の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染した蛹（Ｐ）又は感染した幼虫（Ｌ）に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）感染した蛹又は幼虫で得られたＣａｐ産生収率の定量の図であり、昆虫バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される。

【図１３】感染した蛹及び幼虫におけるＨＡタンパク質の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染した蛹（Ｐ）又は感染した幼虫（Ｌ）に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）感染した蛹又は幼虫で得られたＨＡ産生収率の定量の図であり、昆虫バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表される。

【図１４】感染した蛹及び幼虫におけるＲＨＤＶカプシドＶＰ６０タンパク質（Ｇ１及びＲＨＤＶｂ）の発現収率の比較分析の図である。Ａ）ＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染した蛹（Ｐ）又は感染した幼虫（Ｌ）に由来するタンパク質抽出物を分離するＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色の図である。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）感染した蛹又は幼虫で得られたＲＨＤＶカプシドタンパク質産生収率の定量の図であり、ＴＢ（＋）バキュロウイルスによる昆虫バイオマス（Ｌ）１ｇ当たりのｍｇで表す。（－）は感染していない対照蛹に由来する抽出物に対応する。Ｂ）感染した蛹又は幼虫で得られたＲＨＤＶカプシドタンパク質産生収率の定量の図であり、昆虫バイオマス１ｇ当たりのｍｇで表す。

【図１５】ＲＨＤＶ　Ｇ１及びＲＨＤＶｂに由来するＶＰ６０タンパク質を発現するＴＢ（＋）バキュロウイルスによるＴ．ニ蛹の感染後に形成されたＶＬＰの図である。最適な生産時間での各バキュロウイルスに感染した蛹からの抽出物をＶＬＰ精製用に処理した。陰性染色を使用して電子顕微鏡法によって試料を観察した。図は２種類の倍率でＶＬＰを示す。２つのバキュロウイルスにより得られたＶＬＰは同一のサイズ及び形状を提示した。顕微鏡写真は分析した視野を代表するものである。

【図１６】昆虫細胞培養物がない状態で感染した蛹からウイルスの接種物を得る手順の概要例の図である。

【図１７】３工程で感染した蛹から精製された組み換えタンパク質を得るための上流及び下流処理手順の概要例の図である。Ａ）Ｔ．ニのサナギの産生、それらの操作及び組み換えタンパク質産生に対する最終目的地（例えば製薬会社）への任意の輸送の図である。Ｂ）ｉｎ　ｓｉｔｕでの処理前に数ヶ月に亘って保存が可能な、又は下流処理を進めるため他の場所へと容易に輸送することが可能な、蛹の保存、本発明の装置を使用する組み換えバキュロウイルスのロボット接種、インキュベーション、及び昆虫バイオマス凍結の図である。Ｃ）均質化、接線流濾過、及びタンパク質精製を含む、凍結バイオマスの従来の手段による下流処理の図である。

【図１８】昆虫細胞及び昆虫蛹において従来のバキュロウイルス及びＴｏｐＢａｃによって改変されたバキュロウイルスを使用することによる昆虫細胞でのブタサーコウイルスのＣａｐタンパク質の発現収率の比較の図である。

【図１９】感染した蛹からウイルス接種物を得る手順の概要例の図である。

【図２０】感染した蛹から精製された組み換えタンパク質を得る下流処理手順の概要例の図である。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

定義

本明細書で使用される「蛹（pupa）」は、変態を経る或る昆虫の生活段階を指す。蛹期は、完全変態を経る昆虫（完全変態型昆虫）で見られる。これらの昆虫は、胚、幼虫、蛹及び成虫の４つの生活段階を経る。蝶の蛹もサナギ（chrysalis）と呼ばれる。昆虫は、多くの昆虫の蛹を保護する絹糸のケーシングである繭で覆って蛹を保護する場合がある。

【００２５】

本明細書で使用される「バキュロウイルス」は、無脊椎動物に対する感染性ウイルスのファミリー（主に昆虫及び節足動物に感染する）を指す。「組み換えバキュロウイルス」は、例えば相同組み換え又は遺伝子転位を通じて更に導入された組み換えＤＮＡを有する。組み換えバキュロウイルスはオートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）から生じるものであってもよい。

【００２６】

本明細書で使用される「発現カセット」は、遺伝子自体及び／又はこの遺伝子の発現を制御するエレメント（例えばプロモーター）等の特定の遺伝子の発現に関与する組み換えＤＮＡエレメントを含む。例えば、本発明において有用な発現カセットは以下の組み換えＤＮＡエレメントを含む。

１．本明細書において下記の組み換えタンパク質等の組み換えタンパク質の発現を可能

とする核酸配列、及び好ましくはその発現を制御する核酸配列（少なくともプロモーター）、並びに、

２．昆虫細胞又は昆虫のバキュロウイルス感染の間に得られる上記調節因子の正常な、すなわち内因性のレベルを超えるＩＥ－１及びＩＥ－０等のバキュロウイルス転写調節因子の発現を可能とする核酸配列。

【００２７】

幾つかの実施形態では、上記発現カセットは、組み換えタンパク質をコードする上記配列のプロモーターに作動可能に連結されたｈｒ１等のエンハンサー相同領域（ｈｒ）を更に含む。本発明の発現カセットの組み換えＤＮＡエレメント形成部は、単一の核酸分子中に存在してもよい。発現カセットの組み換えＤＮＡエレメント形成部は異なる核酸分子中に存在してもよい。異なる核酸分子が同じ細胞内に存在することが好ましい。

【００２８】

本明細書で使用される「組み換えＤＮＡ」は、１以上のＤＮＡ鎖の組み合わせ又は挿入によって操作されることにより通常は共に生じないＤＮＡが組み合わせられた人工ＤＮＡの形態を指す。

【００２９】

本明細書で使用される「組み換えＤＮＡエレメント」は、プロモーター、エンハンサー又は遺伝子等の組み換えＤＮＡ内の機能エレメントを指す。

【００３０】

本明細書で使用される「転写調節因子」は、例えばエンハンサー又はリプレッサーの領域に結合すること及び／又は転写に関与する更なるタンパク質を補充することによって、特定遺伝子の転写を調節する能力を有する調節タンパク質を指す。ＩＥ－１及びそのスプライス変異体ＩＥ－０は、バキュロウイルス感染の間に内因性に発現される転写調節因子である。タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現レベルは、定量的ＰＣＲ又はウェスタンブロット分析等の当業者に従来知られている方法によってｍＲＮＡとタンパク質の両レベルにおいて特定され得る。

【００３１】

本発明によれば、ＩＥ－１、ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントは、バキュロウイルス感染の間に内因性レベルを超えてこれらのタンパク質の総レベルを増加させるように組み換え発現され得る。これは、例えば内因性遺伝子の更なるコピーを導入すること、又は内因性遺伝子のプロモーターの発現を操作することによって達成され得る。内因性遺伝子の更なるコピーを、ｐｏｌｈ又はｐＢ２９等の好適なプロモーターの制御下の導入遺伝子として導入することができる。

【００３２】

ＩＥ－１、ＩＥ－０及びそれらのフラグメントは、配列番号１（Ａｃ－ｉｅ－０１とも呼ばれる）～配列番号５の核酸によってコードされ得る。配列番号１は、ＩＥ－１及びＩＥ－０の両方をコードするＡｃ－ｉｅ－０１のｃＤＮＡであり、配列番号２はＩＥ－１のコード配列（ＣＤＳ）であり、配列番号３はＩＥ－０のＣＤＳである。配列番号４及び配列番号５は、それぞれ、触媒的転写調節活性を保持するＩＥ－１及びＩＥ－０のＮ末端ドメインのＣＤＳである。配列番号２～配列番号５によってコードされるタンパク質は、それぞれ配列番号６～配列番号９によって表される。

【００３３】

本発明で参照される核酸及びアミノ酸の配列は、それぞれデフォルトパラメーターでＥＭＢＯＳＳ　Ｎｅｅｄｌｅを使用して特定される（http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/）それらの配列同一性又は配列類似性の程度によって他の核酸配列及びアミノ酸配列と識別されるものとする。かかる変異体の生成方法として、ランダム突然変異誘発又は部位特異的突然変異誘発、部位飽和突然変異誘発、ＰＣＲベースフラグメントアッセンブリ、ＤＮＡシャフリング、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏでの相同組み換え、及び遺伝子合成の方法が挙げられる。

【００３４】

本明細書で使用される「変異体」は、その核酸又はアミノ酸の配列が親核酸又は親アミノ酸の配列と１以上の位置で異なる核酸又はアミノ酸であり、相違は核酸又はアミノ酸の残基の付加、欠失及び／又は置換であり得る。

【００３５】

本明細書で使用される「相同領域」（ｈｒ）は、それらの中心近くの不完全な３０ｂｐのパリンドロームを有する約７０ｂｐの反復単位で構成される。例えば、相同領域は、両側に２回～８回の繰り返しを伴ってＡｃＭＮＰＶゲノム中の８つの場所で繰り返される。相同領域は、転写エンハンサーとバキュロウイルスＤＮＡ複製開始点の両方として意味づけられる。

【００３６】

本明細書で使用される「エンハンサー領域」は、転写調節因子が結合することにより関連する遺伝子の転写レベルを増加させる制御配列を指す。

【００３７】

本明細書で使用される「組み換えタンパク質」は、組み換えＤＮＡから生じるタンパク質を指す。かかるタンパク質をヒト及び動物の利益のため使用することができ、工業上、商業上又は治療の用途を有してもよい。

【００３８】

本明細書で使用される「作動可能に連結される」は、例えば転写調節の点で、一方が他方に影響を及ぼすように接続される２つの核酸配列を指す。

【００３９】

本明細書で使用される「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼが結合することで転写を開始させることができるＤＮＡ配列を指す。該配列は、転写因子等の転写を調節する様々なタンパク質に対する結合部位を更に含んでもよい。プロモーター配列は、ＤＮＡ配列において密接に局在する種々のプロモーターフラグメント（異なる又は同一のフラグメントのいずれか）で構成されていてもよく、リンカー又はスペーサーによって分離されていてもよい。かかるプロモーターはキメラプロモーターと呼ばれる。

【００４０】

本明細書で使用される「トランスファーベクター」は、バキュロウイルスゲノム中への遺伝子情報の挿入を可能とするベクター（すなわち遺伝物質を保持するためのビヒクルとして使用されるＤＮＡ分子）である。

【００４１】

本明細書で使用される「バクミド」は、細胞又は昆虫へトランスフェクトされた場合にバキュロウイルスを生成するのに十分なＤＮＡ配列を含むプラスミド構築物を指す。

【００４２】

本明細書で使用される「クローニングベクター」は、クローニングに適した任意のベクターを指し、一般に制限部位、細菌増殖用の複製開始点、及び選択マーカーの存在を含む。

【００４３】

本発明で使用され得るクローニングベクターは、（ｉ）タンパク質ＩＥ－０、タンパク質ＩＥ－１及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現に対する配列に加えて、（ｉｉｉ）組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適したプロモーターに連結された（ｉｉ）組み換え相同領域（ｈｒ）を含むことが好ましい。例えば、クローニングベクターは、組み換えタンパク質をコードする核酸配列を含んでいてもよい（すなわち発現カセットを含むクローニングベクターである「ドナーベクター」とも呼ばれる）。或いは、クローニングベクターはかかる配列を欠く。

【００４４】

本明細書で使用される「ワクチン」は、好ましくは、特定の疾患に対して能動的後天性免疫を提供する組み換えタンパク質を含む生物学的製剤として定義され得る。

【００４５】

本明細書で使用される「約」の用語は、その値の表示値±１％を意味する、又は「約」

の用語はその値の表示値±２％を意味する、又は「約」の用語はその値の表示値±５％を意味する、「約」の用語はその値の表示値±１０％を意味する、又は「約」の用語はその値の表示値±２０％を意味する、又は「約」の用語はその値の表示値±３０％を意味する、好ましくは「約」の用語は正確に表示値（±０％）を意味する。

【００４６】

詳細な説明

本発明は、組み換えバキュロウイルス及び／又はトランスファーベクター／バクミドを含む蛹を提供する。本発明は、驚いたことに、組み換えバキュロウイルス、特に内因性レベルを超えるバキュロウイルス転写調節因子の発現を引き起こす配列の昆虫蛹への導入、及び任意に、エンハンサー相同領域（ｈｒ）配列、プロモーター又はプロモーターの組み合わせの導入が、組み換えタンパク質の産生を先例がないレベルに増加させることができることを示す。これは、ｉｎ　ｖｉｖｏでの組み換えタンパク質の発現に対する、特にｉｎ　ｖｉｖｏでの組み換えタンパク質の工業生産に対するこの系の有用性を示す。

【００４７】

本発明の蛹

本発明は、組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドを含む蛹を提供する。組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは、オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来することが好ましい。蛹は、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種に属することが好ましい。蛹はトリコプルシア・ニ種に属することがより一層好ましい。好ましい実施形態では、本発明の蛹はボムビークス・モリ種に属さない。好ましい実施形態では、本発明の蛹はヒアロフォラ・セクロピア種に属さない。

【００４８】

好ましい実施形態では、本発明の蛹は、オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はトランスファーベクター／バクミドを含む、トリコプルシア属、好ましくはトリコプルシア・ニ種に属する蛹である。

【００４９】

本発明の蛹、特にＴ．ニの蛹は、特に自動化され拡張可能なプロセスにおいて、組み換えタンパク質の発現に対して幾つかの利点を与える。例えば、Ｔ．ニの蛾のつがいは、１サイクル当たり約１０００個の卵を持つ場合がある。さらに、Ｔ．ニの蛹によって産生される繭は、他の種（例えばボムビークス・モリ、又はヒアロフォラ・セクロピア等）の蛹を覆う繭ほど厚くなく、このため、自動化され拡張可能な生産プロセス（組み換えタンパク質の工業生産）での蛹の使用に対してＴ．ニの蛹は特に適している。したがって、好ましくはオートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドに感染したＴ．ニの蛹は、組み換えタンパク質産生に対して効率的で拡張可能であり、自動化が容易な系を提供する。この系の更なる利点は、その高い生産能（バイオリアクターの最大２０倍の生産力）、技術的に単純で実施及び検証が容易であるという事実、費用削減（バイオリアクターの使用に関する固定資本投資の９０％超の減少）、より低価の商品、短時間の発生（バキュロウイルス系）、産生困難なタンパク質の高効率化、並びに製造された製品の高い品質及び安全性である。

【００５０】

本出願の発明者らは、驚いたことに、蛹、特に鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、

ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種に属する蛹における組み換えタンパク質の発現が幼虫における発現に匹敵し、更にはそれよりも高いことを見出した。

【００５１】

特許文献２として公開された特許出願は、本発明の蛹に含まれ得る組み換えバキュロウイルス及びトランスファーベクター及びバクミドを開示している。

【００５２】

本発明による蛹に含まれる組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは組み換えＤＮＡを含み得ることが好ましい。例えば、本発明による蛹に含まれる組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは、組み換えタンパク質をコードする核酸配列を含み、該組み換えタンパク質は、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択されることが好ましく、及び／又は、該組み換えタンパク質は、以下に記載されるように、蛹によって内因性に産生されるタンパク質でないことが好ましい。例えば、本発明による蛹に含まれる組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０、及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列を含む（例えば、内因性レベルを超える発現は、組み換えバキュロウイルスにおいて、タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０、及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列の追加のコピーの存在によって得ることができる）。本発明による蛹に含まれる組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）を更に含むことが好ましい。

【００５３】

本発明の蛹に含まれ得るトランスファーベクターは、（ｉ）タンパク質ＩＥ－０、タンパク質ＩＥ－１、及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現に対する配列に加えて、（ｉｉｉ）組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適したプロモーターに連結された（ｉｉ）組み換え相同領域（ｈｒ）を含むことが好ましい。好ましい一態様では、トランスファーベクターは上記組み換えタンパク質をコードする核酸配列を含むが、別の好ましい実施形態では、トランスファーベクターはかかる配列を欠く。好ましい実施形態では、トランスファーベクターはバクミドである。

【００５４】

トランスファーベクター及び／又はバクミドは、商業的に入手可能なバキュロウイルス発現系である「Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（商標）」（invitrogen（商標））、「ＢａｃＰＡＫ（商標）」（Clontech（商標））、「ＦｌａｓｈＢＡＣ（商標）」（Oxford Expression Technologies（商標））、「ＢａｃｕＶａｎｃｅ（商標）」（GenScript（商標））、「Ｂａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅ　ＤＮＡ（商標）」（invitrogen（商標））、「ＢａｃｕｌｏＤｉｒｅｃｔ（商標）」（invitrogen（商標））、「ＢａｃＶｅｃｔｏｒ（商標）」１０００、２０００、３０００（Novagen（商標））、「ＤｉａｍｏｎｄＢａｃ（商標）」（Sigma-Aldrich（商標））、又は「ＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ（商標）」（BD biosciences（商標））のいずれかに由来してもよい。

【００５５】

本発明の蛹（好ましくは鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポ

ドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、若しくはヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、若しくはサミア・シンシア種、又はＡｃＭＮＰＶに感染しやすい他の鱗翅目、より一層好ましくはトリコプルシア属、及びトリコプルシア・ニ種に属する）は、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０、及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列を含んでもよい。上に記載される組み換えＤＮＡエレメントは、組み換えバキュロウイルスによって蛹に導入されることが好ましい。

【００５６】

本発明によるバキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列は、

（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、

（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、

（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、

（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、

からなる群から選択されることが好ましい。

【００５７】

配列番号１～配列番号５の変異体の配列は、配列番号１～配列番号５の配列に対して少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％同一である。

【００５８】

配列番号６～配列番号９の変異体の配列は、配列番号６～配列番号９の配列に対して少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％類似する。

【００５９】

本発明の蛹は、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）を更に含む、核酸配列、及び／又は組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドを更に含んでもよい。

【００６０】

組み換え相同領域（ｈｒ）は、配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）であることが好ましい。

【００６１】

上記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターは、

（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～

配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、
（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択されることが好ましい。
【００６２】
好ましい実施形態では、組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列（本発明の蛹に含まれる核酸配列）が、配列番号１５～配列番号２０からなる群から選択される。
【００６３】
本発明の組み換えプロモーター、転写調節因子をコードする配列、及びエンハンサー領域である、は、単一分子の一部を形成する必要はなく、代わりに、これらの配列は、それらが作動可能に連結される、すなわち、蛹内の同じ細胞内に含まれる限り、異なる分子の一部を形成してもよい。
【００６４】
本発明の蛹、及び／又は組み換えバキュロウイルス、及び／又はトランスファーベクター、及び／又はバクミドは、組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含んでもよい。この核酸配列は、タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０、及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列、及び任意に相同領域（ｈｒ）に作動可能に連結されることが好ましく、これらの配列は上に記載されるものである。
【００６５】
組み換えタンパク質は、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択されることが好ましい。
【００６６】
好ましい実施形態では、組み換えタンパク質はウイルス様粒子タンパク質であり、好ましくは以下からなる群から選択される：
（ａ）ブタサーコウイルス、好ましくはブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質（例えば配列番号２６）、
（ｂ）口蹄疫ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ３タンパク質又はＶＰ０タンパク質、
（ｃ）イヌパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｄ）ブタパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｅ）ヒトノロウイルス（ジェノグループＩ又はＩＩ）カプシドタンパク質、
（ｆ）カリシウイルスカプシドタンパク質、
（ｇ）ヒトパピローマウイルス、好ましくはヒトパピローマウイルス１６に由来するＬ１タンパク質、
（ｈ）Ｅ型肝炎タンパク質Ｅ２、
（ｉ）伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ２タンパク質及びＶＰ３タンパク質、
（ｊ）アストロウイルスＯＲＦ２コード化タンパク質、
（ｋ）インフルエンザウイルスＨＡタンパク質（例えば配列番号３０）、ＮＡタンパク質及びＭ１タンパク質、
（ｌ）Ｂ型肝炎のコア抗原及び表面抗原、
（ｍ）ウサギカリシウイルス、好ましくはウサギ出血性疾患ウイルスＲＨＤＶｂ及びＲＨＤＶＧ１（例えば配列番号３２及び配列番号３３）に由来するＶＰ６０タンパク質、

（ｎ）ヒトパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質。

【００６７】

例えば、組み換えタンパク質は、下記のものであってもよい。

【００６８】

ブタサーコウイルス、好ましくはブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列によって表わされる、又は配列番号２５の核酸配列によってコードされる。

【００６９】

口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）ＶＰ１、ＶＰ３及びＶＰ０のタンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：

－ＦＭＤＶ血清型Ｏ全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＪＸ５７０６５０．１
－ＦＭＤＶ血清型Ａ全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＱ８３２５９２．１
－ＦＭＤＶ血清型Ｃ全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＹ５９３８１０．１
－ＦＭＤＶ血清型ＳＡＴ１全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＹ５９３８４６．１
－ＦＭＤＶ血清型ＳＡＴ２全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＪＸ０１４２５６．１
－ＦＭＤＶ血清型ＡＳＩＡ１全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＱ６３１３６３．１。

【００７０】

イヌパルボウイルスＶＰ１及びＶＰ２タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：

－カプシドタンパク質ＶＰ１に対するイヌパルボウイルスＶＰ１遺伝子、部分ｃｄｓ、株：１８８７／ｆ／３。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ４３７４３４．１。
－カプシドタンパク質ＶＰ１に対するイヌパルボウイルスＶＰ１遺伝子、部分ｃｄｓ、株：１８８７／Ｍ／２。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ４３７４３３．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＮＩ－２－１３。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２４．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＮＩ－３－４。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２５．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＮＩ－３－１１。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２６．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＮＩ－４－１。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２７．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＮＩ－１－１８。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２８．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２タンパク質（ＶＰ２）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ３５４０６８．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＣＭ－６。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２０．１。
－イヌパルボウイルス単離株Ｔａｉｃｈｕｎｇ　ＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ８６９７２４．１。
－イヌパルボウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ、株：ＨＣＭ－８。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ１２０７２１．１。
－イヌパルボウイルス１型タンパク質ＶＰ１及びＶＰ２：ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＢ５１８８８３．１
－イヌパルボウイルス２ａ型ＶＰ１及びＶＰ２。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｍ２４００３．１
－イヌパルボウイルス２ｂ型ＶＰ２：ＧｅｎＢａｎｋ　ＦＪ００５２６５．１
－イヌパルボウイルス２Ｃ型ＶＰ２：ＧｅｎＢａｎｋ　ＦＪ００５２４８．１

【００７１】

ブタパルボウイルスＶＰ１及びＶＰ２タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：

－ブタパルボウイルス株６９３ａ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＮ４００５１９．１

－ブタパルボウイルス株８ａ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＮ４００５１７．１
【００７２】
ヒトパルボウイルスＶＰ１及びＶＰ２タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ヒトパルボウイルスＢ１９株ＶＰ１全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＦ２６４１４９．１
－ヒトパルボウイルスＢ１９単離株Ｖｎ１１５　ＮＳ１（ＮＳ１）、７．５ｋＤａタンパク質（ＮＳ１）、ＶＰ１（ＶＰ１）、９．５ｋＤａタンパク質（ＶＰ１）、及びＶＰ２（ＶＰ２）の遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ３５７０６５．１
－Ｂ１９ウイルス単離株ＦｏＢｅ　ＶＰ１（ＶＰ１）及びＶＰ２（ＶＰ２）の遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ７６８５３５．１
－Ｂ１９ウイルス単離株Ｂｒ５４３　ＮＳ１（ＮＳ１）、ＶＰ１（ＶＰ１）及びＶＰ２（ＶＰ２）の遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ６４７９７７．１
－ヒトパルボウイルス４単離株ＶＥＳ０６５ＣＳＦ　ＮＳ１、ＶＰ１及びＶＰ２の遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＨＱ５９３５３２．１
－ヒトパルボウイルス４単離株ＶＥＳ０８５ＣＳＦ　ＮＳ１遺伝子、部分ｃｄｓ；並びにＶＰ１遺伝子及びＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＨＱ５９３５３１．１
－パルボウイルスＢ１９株ＢＢ－２　ＮＳ１、ＶＰ１及びＶＰ２の遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＦ７２４３８７．１
【００７３】
ヒトノロウイルス（ジェノグループＩ又はＩＩ）カプシドタンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ノーウォークウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｍ８７６６１、ＮＰ０５６８２１
－サザンプトンウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｌ０７４１８
－メキシコウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｕ２２４９８
－セトウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＢ０３１０１３
－チバウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＢ０４２８０８
－ローズデールウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｘ８６５５７
－スノーマウンテンウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｕ７００５９
－ハワイウイルス：ＧｅｎＢａｎｋ　Ｕ０７６１１
【００７４】
ウサギ出血性疾患ウイルスＶＰ６０タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ＲＨＤＶ　ＡＳＴ／８９全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ：Ｚ４９２７１．２
－ＲＨＤＶ　Ｎ１１全ゲノム：ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＭ８７８６８１．１
－ＲＨＤＶ　ＣＢＶａｌ１６全ゲノム；ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＭ９７９４４５．１
－配列番号３２
－配列番号３３
【００７５】
ヒトパピローマウイルスＬ１タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ＨＰＶ６：ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＮ２５２３２３．１
－ＨＰＶ１１：ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＱ７７３４１１．１
－ＨＰＶ１６：ＧｅｎＢａｎｋ　ＤＱ１５５２８３．１
－ＨＰＶ１８：ＧｅｎＢａｎｋ　ＦＪ５２８６００．１
【００７６】
Ｅ型肝炎ウイルスＥ２タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－Ｅ型肝炎ウイルス、全ゲノムＮＣＢＩ参照配列：ＮＣ＿００１４３４．１
－ブタＥ型肝炎ウイルス単離株ＩＴＦＡＥ１１カプシドタンパク質遺伝子。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＮ８６１８０６．１

【００７７】
伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスのＶＰ１タンパク質、ＶＰ２タンパク質及びＶＰ３タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ１（ＶＰ１）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ０９９４５７．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株ＰＴ　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ６７９８１４．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株ＯＥ／Ｇ２　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ６７９８１３．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株ＯＡ／Ｇ１　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ６７９８１２．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株ＨＯＬ　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ６７９８１１．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス株ＴＬ２００４　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ１１８３７４．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株ＣＡ－Ｋ７８５　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＦ９０７７０５．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス単離株Ｄ４９５　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＦ９０７７０４．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス株Ａ－ＢＨ８３　ＶＰ１　ｍＲＮＡ、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＥＵ５４４１４９．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス株Ｃｒｏ－Ｐａ／９８　ＶＰ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＥＵ１８４６９０．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ２　ｍＲＮＡ、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ３２１５０９．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ２遺伝子、ＶＰ３遺伝子、ＶＰ４遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｍ９７３４６．１
－伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ２遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＦ５０８１７７．１
【００７８】
カリシウイルスカプシドタンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ネコカリシウイルスカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｌ０９７１９．１
－ネコカリシウイルスカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｌ０９７１８．１
－カプシドタンパク質（ＯＲＦ２）に対するヒトカリシウイルスＨＵ／ＮＬＶ／Ｗｏｒｔｌｅｙ／９０／ＵＫ　ＲＮＡ、株ＨＵ／ＮＬＶ／Ｗｏｒｔｌｅｙ／９０／ＵＫ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＪ２７７６１８．１
－カプシドタンパク質（ＯＲＦ２）に対するヒトカリシウイルスＨＵ／ＮＬＶ／Ｔｈｉｓｔｌｅｈａｌｌ／９０／ＵＫ　ＲＮＡ、株ＨＵ／ＮＬＶ／Ｔｈｉｓｔｌｅｈａｌｌ／９０／ＵＫ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＪ２７７６２１．１
－カプシドタンパク質（ＯＲＦ２）に対するヒトカリシウイルスＨＵ／ＮＬＶ／Ｖａｌｅｔｔａ／９５／Ｍａｌｔａ　ＲＮＡ、株ＨＵ／ＮＬＶ／Ｖａｌｅｔｔａ／９５／Ｍａｌｔａ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＪ２７７６１６．１
－ヒトカリシウイルスＮＬＶ／Ｓｔａｖ／９５／Ｎｏｒカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＦ１４５７０９．１
－ウシ腸カリシウイルス株Ｂｏ／ＣＶ５００－ＯＨ／２００２／ＵＳカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ５４９１５５．１

－ヒトカリシウイルスＮＬＶ／Ｍｏｒａ／９７／ＳＥカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ０８１１３４．１
－ヒトカリシウイルスＮＬＶ／Ｐｏｔｓｄａｍ　１９６／２０００／ＤＥカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＦ４３９２６７．１
－ヒトカリシウイルスＮＬＶ／１５８１－０１／ＳＷＥカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ２４７４４２．１
－ヒトカリシウイルス、Ｈｕ／ＮＬＶ／ＧＩＩ／ＭＤ１３４－１０／１９８７／ＵＳカプシドタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ０３０３１３．１
【００７９】
アストロウイルスＯＲＦ２コード化タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－ブタアストロウイルス４　ＯＲＦ１ｂ遺伝子、部分ｃｄｓ；及びＯＲＦ２遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＪＸ６８４０７１．１
－アストロウイルスＭＬＢ１　ＨＫ０５、全ゲノム。ＮＣＢＩ参照配列：ＮＣ＿０１４３２０．１
－アストロウイルスｗｉｌｄ　ｂｏａｒ／ＷＢＡｓｔＶ－１／２０１１／ＨＵＮ、全ゲノム。ＮＣＢＩ参照配列：ＮＣ＿０１６８９６．１
－ヒトアストロウイルスＢＦ３４、全ゲノム。ＮＣＢＩ参照配列：ＮＣ＿０２４４７２．１
－アストロウイルスＭＬＢ１株Ｈｕ／ＩＴＡ／２００７／ＰＲ３２６／ＭＬＢ１　ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（ＯＲＦ１ｂ）遺伝子、部分ｃｄｓ；及びカプシドタンパク質（ＯＲＦ２）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＦ４１７７１３．１
－ヒトアストロウイルス５株Ｈｕ／Ｂｕｄａｐｅｓｔ／ＨＵＮ５１８６／２０１２／ＨＵＮ　非構造タンパク質（ＯＲＦ１ａ）遺伝子及び非構造タンパク質（ＯＲＦ１ｂ）遺伝子、部分ｃｄｓ；並びにカプシドタンパク質（ＯＲＦ２）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＦ１５７９６７．１。
－ヒトアストロウイルス１単離株Ｓｈａｎｇｈａｉカプシドタンパク質（ＯＲＦ２）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＦＪ７９２８４２．１
－カプシドタンパク質に対するヒトアストロウイルス８型ｏｒｆ２遺伝子。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｚ６６５４１．１
【００８０】
インフルエンザウイルスＨＡタンパク質、ＮＡタンパク質及びＭ１タンパク質、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－配列番号３０
－ヘマグルチニンに対するインフルエンザＡウイルス（Ａ／ｄｕｃｋ／Ｃｈｉｂａ／２５－５１－１４／２０１３（Ｈ７Ｎ１））ＨＡ遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ８１３０６０．１
－合成構築物ヘマグルチニン（ＨＡ）ｍＲＮＡ、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ８６８３７４．１
－インフルエンザウイルスＡ（Ａ／ｓｗｉｎｅ／Ｓｈａｎｄｏｎｇ／２／０３（Ｈ５Ｎ１））ヘマグルチニン（ＨＡ）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ６４６４２４．１
－インフルエンザＡ型のＨＡをコードするｃＤＮＡ。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｅ０１１３３．１
－インフルエンザＡウイルス（Ａ／ｓｗｉｎｅ／Ｋｏｒｅａ／Ｓ４５２／２００４（Ｈ９Ｎ２））ＮＡ遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ７９０３０７．１
－インフルエンザＡウイルス（Ａ／Ｔｈａｉｌａｎｄ／２（ＳＰ－３３）／２００４（Ｈ５Ｎ１））ノイラミニダーゼ（ＮＡ）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＹ５５５１５２．３
－ノイラミニダーゼに対するインフルエンザＡウイルス（Ａ／ｓｗｉｎｅ／Ｂｉｎｈ　Ｄｏｕｎｇ／０２＿１６／２０１０（Ｈ１Ｎ２））ＮＡ遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ６２８０８２．１

－インフルエンザＡウイルス（Ａ／ｃｈｉｃｋｅｎ／Ｊａｌｇａｏｎ／８８２４／２００６（Ｈ５Ｎ１））ノイラミニダーゼ（ＮＡ）遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ８８７０６３．１
－インフルエンザＡウイルスＳＣ３５Ｍ　Ｍ２遺伝子及びＭ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ２６６１００．１
－インフルエンザウイルス型／Ｌｅｎｉｎｇｒａｄ／１３４／４７／５７（Ｈ２Ｎ２）Ｍ１及びＭ２　ＲＮＡ、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：Ｍ８１５８２．１
－インフルエンザＡウイルスＳＣ３５Ｍ　Ｍ２遺伝子及びＭ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＤＱ２６６１００．１
－マトリクスタンパク質２、マトリクスタンパク質１に対するインフルエンザＡウイルス（Ａ／Ｔｏｃｈｉｇｉ／２／２０１０（Ｈ１Ｎ１））Ｍ２遺伝子、Ｍ１遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ７０４４８１．１

【００８１】

Ｂ型肝炎のコア抗原及び表面抗原、その配列は、例えば、以下の配列に示されるか、又はそれらに由来してもよい：
－Ｂ型肝炎ウイルス株ＨＢＶ２４８プレコアタンパク質遺伝子及びコアタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＰ８５７１１８．１
－Ｂ型肝炎ウイルス株ＨＢＶ４０１プレコアタンパク質遺伝子及びコアタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＰ８５７１１３．１
－Ｂ型肝炎ウイルス株ＨＢＶ４０３プレコアタンパク質遺伝子及びコアタンパク質遺伝子、全ｃｄｓ。ＧｅｎＢａｎｋ：ＫＰ８５７０６８．１
－Ｂ型肝炎表面抗原に対するＢ型肝炎ウイルスＳ遺伝子、部分ｃｄｓ、単離株：Ｂ０５０３３２７（ＰＴＫ）。ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＢ４６６５９６．１

【００８２】

上記組み換えタンパク質は、蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではないことが好ましい。例えば、組み換えタンパク質は、ヒアロフォラ・セクロピア種の蛹等の蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではない。例えば、組み換えタンパク質はセクロピンＡ又はアタシン（attacin）ではない。

【００８３】

本発明の蛹は、絹を含まない蛹であってもよく、又は絹繭の内部にあってもよい。蛹が絹を含まない蛹でない場合、当業者は繭糸（cocoon silk）を除去する方法を知っている。例えば、繭糸を好ましくは塩、好ましくは次亜塩素酸（ＨＣｌＯ）の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウム（ＮａＣｌＯ）の溶液（本明細書では「溶解液（dissolving solution）」とも呼ぶ）で溶解してもよい。図３に示されるように、この手順は特別に設計された装置によって自動化されてもよい。

【００８４】

組み換えタンパク質の発現のための本発明の蛹の使用

本発明の蛹は、そのあらゆる変異体で、組み換えタンパク質の発現に使用され得る。したがって、本発明は、組み換えタンパク質、好ましくは本明細書において上に詳述される組み換えタンパク質の発現のための本発明の蛹の使用を提供する。

【００８５】

本発明の組み換えタンパク質を産生する方法

また、本発明は、組み換えタンパク質（既に上に記載されるように、蛹によって内因性に産生されるタンパク質ではないことが好ましい）を産生する方法を提供する。例えば、本発明による少なくとも１つの組み換えタンパク質を得る方法は、

（ａ）蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、

（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、

（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する工程と、
（ｆ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製する工程と、
を含む、或いはそれらからなる。

【００８６】

上記の方法の工程（ａ）の蛹は、好ましくは、上に詳細に記載されるように、本発明による蛹であり得る。工程（ａ）の蛹は、鱗翅目に属することが好ましい。蛹は、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種に属することが好ましい。既に上に記載されるように、上記蛹は組み換えタンパク質の発現を可能とする核酸配列を含んでもよい。既に上に記載されるように、上記蛹は、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列を含んでもよい（上記「本発明の蛹」を参照されたい）。

【００８７】

上記の工程（ａ）の蛹は、卵から発達させてもよい。例えば、上記の工程ａ）の蛹は、例えば特別に設計された使い捨て又は再利用可能な飼育器において、１５日間～１８日間、卵から蛹まで発達させてもよい。また、工程ａ）の蛹は、既に蛹の形態で提供されてもよい。

【００８８】

上記の工程（ａ）の蛹が繭の内部にある場合、本発明の組み換えタンパク質を産生する方法は、蛹から繭糸を除去する工程を更に含んでもよい。例えば、繭糸を、好ましくは例えば０．１％～５％重量／体積、例えば０．１％、０．２％、０．５％、１％、３％又は５％重量／体積等の濃度の次亜塩素酸（ＨＣｌＯ）を含む塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウム（ＮａＣｌＯ）の溶液で溶解し得ることが好ましい。例えば、蛹を０．１％～５％重量／体積の濃度の次亜塩素酸ナトリウムの溶液に浸漬してもよく、又は該溶液を蛹に噴霧してもよい。繭糸の溶解は、数秒間～数分間を要する場合がある。工程（ａ）の蛹からの繭糸の選除は、蛹が繭の内部にいる場合、半自動化又は自動化の形態（ロボット化された絹の選除）で行われることが好ましい。この点について、ヒアロフォラ・セクロピア又はボムビークス・モリ等の幾つかの種の繭が、厚い繭であるという事実は、他の属又は種（トリコプルシア属、特にトリコプルシア・ニ種等）に対して不利である。トリコプルシア属、特にトリコプルシア・ニ種の蛹は、それほど密ではない絹の繭を有し、容易に溶解され得る。これは、自動化又は半自動化の形態で全プロセスを行うことができため、効率を増加させ、全体のコストを下げることができる利点を意味する

【００８９】

上記繭は、絹繭の溶解に要する時間を減少させるため、好ましくは圧縮された空気擾乱（air turbulence）によって繭に適用される溶解液を含むレシピエントを備えてもよい、半自動式機械で除去され得る。その後、微量の溶解液を除去するため、絹を含まない蛹を洗浄コンテナで洗浄した後、風乾してもよい。

【００９０】

したがって、後に工程（ｂ）を行うのがより容易であることから、絹を含まない蛹が好ましい。したがって、非常に密な繭を有する蛹はあまり好ましくはない。例えば、ボムビークス・モリの蛹は非常に密で厚い、緻密な繭を有し、上に記載されるように、数分間、塩溶液で溶解することによって容易に除去することができない。ヒアロフォラ・セクロピアの蛹についても同じことが言える。ボムビークス・モリ及び／又はヒアロフォラ・セク

ロピアの蛹の繭は、手作業で除去しなくてはならない。

【００９１】

これに反して、Ｔ．ニ等の他の種の蛹はそれほど密ではない絹の繭を含み、上に記載されるように容易に溶解することができる。したがって、自動又は半自動の手順によってそれらの繭を除去することができることから、これらの蛹は本発明の組み換えタンパク質を産生する方法に対して好ましく、組み換えバキュロウイルスを注入する（工程（ｂ））用意ができている蛹の取得に対してスケールアップを容易にする。

【００９２】

繭糸を除去した後、微量の塩溶液（例えば次亜塩素酸ナトリウム）を除去するため蛹を水で洗浄することが好ましい。絹を含まない蛹をその後乾燥し、工程（ｂ）を行う前に、低温（例えば４℃）で保存してもよい。例えば、絹を含まない蛹を、工程（ｂ）を行う前に、低温（例えば４℃）で最長１ヶ月間保存してもよい。

【００９３】

したがって、また本発明は、

（ａ）繭に含まれた蛹（好ましくは上に記載される本発明の蛹）を準備する工程と、

（ｂ）上に詳細に記載されるように、塩の溶液、好ましくは次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液で繭に含まれる上記蛹を処理する工程と、

（ｃ）絹を含まない（好ましくは本質的に殺菌された）蛹を得る工程と、

を含む、絹を含まない蛹（好ましくは鱗翅類に属する絹を含まない蛹、好ましくは本発明の蛹）を産生する方法を提供する。

【００９４】

したがって、本発明はまた、本質的に絹を含まない（すなわち繭を有しない）本発明の蛹を提供する。好ましい実施形態では、本発明の本質的に絹を含まない蛹はボムビークス・モリ種に属さない。好ましい実施形態では、本発明の本質的に絹を含まない蛹はヒアロフォラ・セクロピア種に属さない。好ましい実施形態では、本発明の本質的に絹を含まない蛹は、トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属に属する。好ましい実施形態では、本発明の本質的に絹を含まない蛹は、トリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種に属する。

【００９５】

本発明の方法の工程（ｂ）は、オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスによる、工程（ａ）の蛹の接種に関する。本発明の蛹に含まれ得る組み換えバキュロウイルスは上に詳細に記載され、また例示的な模式図を図４Ｂに示す。したがって、工程（ｂ）では、上に記載される組み換えバキュロウイルスを含む本発明による蛹を提供するため、本発明の蛹に組み換えバキュロウイルスを接種することが好ましい。特許文献２として公開された特許出願は、本発明の組み換えタンパク質を産生する方法の工程（ｂ）において、本発明による蛹に接種され得る組み換えバキュロウイルスを開示している。組み換えバキュロウイルスは、組み換えタンパク質、好ましくは本明細書において上に定義される群から選択される組み換えタンパク質をコードする核酸配列（発現カセット）を含む。

【００９６】

後の組み換えバキュロウイルスによる接種がより容易で、自動又は半自動で行うことが可能であり、上記方法のスケールアップ及び再現性を促すことから、絹を含まない蛹が好ましい。

【００９７】

工程（ｂ）による組み換えバキュロウイルスの接種は、当業者に対して当該技術分野で知られている技術によって行われ得る。本明細書で定義される「接種」は、身体への物質

の導入であり、この場合、蛹への組み換えバキュロウイルスの導入を指す。また、接種を「注入」と呼ぶ場合もある。幼虫はバキュロウイルスによる接種を受けることから、このプロセスもまた本明細書では「バキュロウイルスによる幼虫の感染」と呼ぶ場合がある。

【００９８】

上記接種は、少なくとも１つのバキュロウイルスを含む所定量の溶液を蛹に注入することによって行われることが好ましい。注入は、蛹を穿孔し、蛹の体内にバキュロウイルスを含む所定量の溶液を投与する針を用いて行われることが好ましい。この工程も自動化することができ、蛹は例えば、小孔のマトリクス又はアレイに置かれてもよく、接種の装置又はロボット（以下に記載される）は自動的に蛹内にバキュロウイルスを投与してもよい。例えば、蛹を小孔のマトリクス（又はアレイ）に置いてもよく、接種の装置又はロボット（例えばロボットアームに針を備える）が小孔に自動的に針を配置して、針が蓋の穴を通って蛹にアクセスするように、該マトリクスは中心に穴を有する蓋を備える。上記針は蛹の体を、例えば約１ミリメートル～５ミリメートル、好ましくは約３ｍｍ穿通し（これも自動化可能である）、蛹内部にバキュロウイルスを含む溶液を投与する。上記装置又はロボットは、蛹に正確な量のバキュロウイルス（例えばバキュロウイルスを含む約０．５マイクロリットル～１０マイクロリットルの量の溶液、好ましくは約５μｌ）を投与することができる精密ポンプを備えてもよい。上記ロボットは、精密位置で蛹にバキュロウイルスを注入することができる１以上の針を備えるアームを備えてもよい。一旦これが行われると、ロボットを小孔から出しても、蛹が置かれるマトリクスの蓋のおかげで、容易に蛹をマトリクス小孔に残し、また、針だけが穴を通り抜けることができるようにマトリクスの蓋の穴は蛹より小さいため、ロボットアームが蛹から針を取り除く際に蛹は小孔から取り除かれず、したがって、針は蛹及び小孔マトリクスから取り除かれて、小孔に蛹が残る。この好ましい配置により、接種プロセスは自動で迅速であり、効率的で、高度に再現可能である（蛹はいずれも、同じ手順でバキュロウイルスを含む同じ量の溶液を受ける）。上記ロボットは、移動可能であってもよく、毎時、蛹約３０００個～約１００００個の速度で蛹にバキュロウイルスを接種し得る、幾つかの接種針（すなわち精密位置で蛹にバキュロウイルスを接種又は注入することができる針）を有してもよい。

【００９９】

例えば、約５０超のプラーク形成単位（ＰＦＵ）の量のバキュロウイルスを各蛹に接種する。例えば、約５０、約１００、約５００、約１０００、約５０００、約１００００、約１５０００、約２００００、約２５０００、約３００００、約４００００、約５００００、約６００００、約７５０００以上のＰＦＵ（更には約１０００００）を各蛹に接種する。例えば、既に上に言及されるように、バキュロウイルスは溶液に含まれるため、バキュロウイルスを含む特定量の溶液を蛹に注入する。例えば、該溶液はバキュロウイルスを含む細胞培養液であってもよい。例えば、該溶液は、バキュロウイルスを含む１×ＰＢＳ　ｐＨ７．４、１ｍＭ　ＰＭＳＦ（プロテアーゼ阻害剤）、及び５ｍＭ　ＤＴＴの溶液等のバキュロウイルスを含む緩衝溶液であってもよい。例えば、上記蛹には、約０．５μｌ～１０μｌ、例えば約０．５μ１、例えば１μｌ～１０μｌ、例えば約１μｌ、約２μｌ、約３μｌ、約５μｌ、約７μｌ又は約１０μｌの量のバキュロウイルスを含む溶液が接種され得る。例えば、各蛹は、５０ＰＦＵ～１０００００００ＰＦＵを含む０．５μｌ～１０μｌの溶液を受ける。

【０１００】

接種の自動化のおかげで、上記ロボットは、毎時約３０００個以上、例えば毎時約３０００個～約１００００個の蛹の接種を行い得る。上記ロボットは、マトリクス又はアレイで提供される蛹に流体を送達するのに適している。

【０１０１】

本発明の方法の工程（ｃ）は、少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートすることを含む。このインキュベーション工程は、少なくとも約７２時間、例えば（接種後）約７２時間、約９６時間、約１００時間、約１２５時間、約１５０時間、約１６８時間以上の期間に亘って行

われ得ることが好ましい。上記インキュベーション時間は、接種後約９６時間～１６８時間、又は接種後約７２時間～１６８時間であることが好ましい。接種工程は、好ましくは光又は湿度管理の必要のないインキュベーターにおいて約２２℃～２８℃の温度で行われることが好ましい。接種を受けた蛹（好ましくはマトリクスの小孔に置かれる）は、上記の期間（インキュベーション）に亘ってマトリクスの小孔に残されてもよい。別の実施形態では、蛹はマトリクスから取り除かれ、インキュベーション時間の間、袋又は蒸散可能な任意のレシピエント等のどこか他の場所に入れられる（インキュベーションは、完全に閉じたコンテナ中ではなくガス交換があるコンテナで行われることが好ましいとされる）。

【０１０２】

当業者は、発現するタンパク質に応じ、先の実験に基づいて各蛹及び各組み換えタンパク質に対して必要なインキュベーション時間及びインキュベーション条件を計算する。

【０１０３】

本発明の方法の工程（ｄ）は、インキュベーション工程（ｃ）の間に発現した少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得ることを含む。少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹は、マトリクス／アレイ（又はインキュベーション場所）から収集し得る。少なくとも１つの組み換えタンパク質を含むこれらの蛹は、後の処理用に（凍結又は凍結乾燥されて）保存してもよい。例えば、少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹は、（好ましくは真空下で）パッケージに包装してもよい。蛹を含むパッケージを保存し、輸送し、及び／又は更に処理してもよい。

【０１０４】

また本発明は、本発明の蛹を含み、好ましくは該蛹が少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む、パッケージを提供する。好ましくは、上記蛹は、真空下で包装され、本発明のパッケージは、したがって、例えば、酸化を回避するため凍結又は凍結乾燥された真空の蛹を含む。これは、より容易な操作及びより長い保存期間を可能とする。

【０１０５】

また、上記の方法の工程（ｄ）に従って得られた蛹を凍結し、更なる処理のために保存してもよい。例えば、蛹を、更に処理するまで、蛹を収集した直後に約－２０℃、又は約－８０℃で凍結してもよい。例えば、少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を、組み換えタンパク質を抽出するまで、例えば約－２０℃～－７０℃の温度で凍結してもよい。組み換えタンパク質を含む蛹を、例えば１年超等に亘って長期間凍結保存してもよい。

【０１０６】

本発明の方法の（任意の）工程（ｅ）は、任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取することを含む。当業者は、工程（ｄ）で得られた蛹に含まれる少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する方法及びプロトコルを知っている。当然ながら、これらの方法及び／又はプロトコルは、発現した組み換えタンパク質の性質に依存し得る。

【０１０７】

例えば、タンパク質は、好ましくは中性ｐＨのバッファーの存在下で、蛹をホモジナイズすることによって（例えば、ブレンダーホモジナイザー又はローターステータホモジナイザー等のホモジナイザー機又はホモジナイザーミキサーにおいて少なくとも数秒間／数分間）抽出してもよく、該バッファーは酸化防止剤（還元剤）、プロテアーゼ阻害剤及び適切な洗浄剤を含むことが好ましい。例えば、上記バッファーは、約１ｍＭ～２５ｍＭの還元剤、及び約０．０１％～２％（体積／体積）の洗浄製品を含む。該バッファーは、プロテアーゼ阻害剤の混合物を更に含むことが好ましい。

【０１０８】

均質化の後、抽出物を超音波処理及び／又は遠心分離（例えば１５０００Ｇ～２０００００Ｇ）して、昆虫の残骸を排除し、濾過してもよい。

【０１０９】

例えば、抽出手段（蛹に含まれる少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する方法

及びプロトコル）は、物理的に蛹を破砕すること、遠心分離、接線流濾過工程、超音波処理、クロマトグラフ法、及び／又は滅菌濾過を含む。

【０１１０】

好ましい実施形態では、ホモジェネートの粘度は珪藻土（例えばＣｅｌｉｔｅ）を用いるインキュベーション（濾過）によって減少し得る。タンパク質沈澱工程を含めることもできる。

【０１１１】

抽出物は、当業者が組み換えタンパク質の性質に応じて選択するのに利用可能なフィルタを使用する、接線流濾過によって浄化され得る。ダイアフィルトレーションプロセスによって（例えば同じ接線流濾過装置において）バッファーを変更してもよい。

【０１１２】

本発明の方法の（任意の）工程（ｆ）は、任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製することを含む。当業者は、タンパク質の精製技術を知っている。例えば、精製はクロマトグラフィー精製、濾過又は超遠心分離によって達成され得る。

【０１１３】

精製した組み換えタンパク質はこのように得ることができる。この方法の一実施形態の模式図を図１７に示す。

【０１１４】

本発明の方法によって入手可能な組み換えタンパク質は、高純度を有し、ワクチン、診断、化粧品、又は治療において使用され得る。

【０１１５】

本発明の組み換えバキュロウイルスを産生する方法

本発明はさらに、

（ａ）蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したバクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、

（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、

（ｄ）上記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、

（ｅ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを採取する工程と、

（ｆ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを精製する工程と、

を含む、組み換えバキュロウイルスを産生する方法を提供する。

【０１１６】

工程（ａ）で準備した蛹は、上に規定される絹を含まない蛹であることが好ましい。蛹は、トリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種に属することが好ましい。

【０１１７】

工程（ｂ）では、工程（ａ）の蛹をオートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したバクミドベクターでトランスフェクトする。

【０１１８】

またこの工程（ｂ）は、上に記載される組み換えタンパク質を産生する方法の工程（ｂ）と同じように（しかし、バキュロウイルスを接種する代わりに、バクミドベクターを接種する）、すなわち本発明の装置を使用して自動的に又は半自動的に（下記にも記載され

る）行われ得ることから、「接種工程」と呼ばれることがある。該装置は、上に記載されるように針で注入することによって蛹に接種されるトランスファーベクター及び／又はバクミドを含む所定量の溶液を蛹（好ましくは穴を有する蓋（tap）を備える小孔のマトリクスに入れられる）に接種してもよい。

【０１１９】

バクミドベクターは、例えば、クローニングベクター、ドナーベクター、トランスファーベクター、及び最終的にバクミドベクターを連続して生成することにより、当業者に知られている手順によって生成され得る。例えば、バクミドベクターの生成は国際公開第２０１４／０８６９８１号として公開された特許出願に記載される。

【０１２０】

好ましい実施形態では、このトランスファーベクター及び／又はバクミドが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む、或いはそれらからなる。これらの核酸配列は既に上に記載されている。例えば、タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列は、

（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、

（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、

（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、

（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、

からなる群から選択されることが好ましい。

【０１２１】

さらに、上記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターは、

（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、

（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、

を含む核酸の群から選択されることが好ましい。

【０１２２】

上記組み換え相同領域（ｈｒ）は配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）であることが好ましい。組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列は、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択されることが好ましい。

【０１２３】

蛹に接種するベクターはバクミドであることが好ましい。

【０１２４】

工程（ｃ）は、組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘る、工程（ｂ）の接種を受けた蛹のインキュベーションを指す。例えば、Ｔ．ニの蛹に対するこの期間は、ウイルス用量及び温度に応じて約７２時間～約７日間とし得る。当業者は、組み換えバキュロウイルスが産生されるのに十分な期間を計算することができる。

【０１２５】

その後、組み換えバキュロウイルスを含む蛹が得られる（工程（ｄ））。組み換えバキュロウイルスを含む蛹を更なる処理のため保存してもよい。例えば、酸化プロセスを抑え、それらの操作を容易にして、安全な保存時間を延ばすため、上記蛹を真空で包装してもよい。例えば、更に処理する前に、組み換えバキュロウイルスを含む蛹を凍結してもよい（例えば－２０℃～－８０℃で）。例えば、更に処理する前に、組み換えバキュロウイルスを含む蛹を凍結乾燥してもよい。

【０１２６】

任意に、組み換えバキュロウイルスを採取し、精製してもよい（工程（ｅ）及び工程（ｆ））。

【０１２７】

本発明の装置

また、本発明は、精密ポンプと、モバイル機械アームと、蛹に（好ましくは本発明の蛹に、ここで、該蛹は絹を含まないことが好ましく、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、又はサミア属、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、又はヘリコベルパ属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、ラキプルシア・ヌ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ヘリコベルパ・アルミゲラ種、ヘリコベルパ・ジー種、マンズカ・セクスタ種、アスカラファ・オドラタ種、又はサミア・シンシア種に属することが好ましい）流体（好ましくはバキュロウイルス又はバクミドベクターを含む溶液）を注入するのに適した（移動可能な）針とを備える、装置（本発明ではロボットとも呼ばれる）を提供する。

【０１２８】

上記に詳細に記載されるように、上記装置が自動的に蛹を容易に配置することができるように、蛹はマトリクス（又はアレイ）で提供され得る、すなわち蛹をマトリクスの小孔に置くことが好ましい。上記マトリクスは、蛹よりも小さい穴を有する蓋（taps）を備えることが好ましい（すなわち、蛹はその穴を通過することができない）。

【０１２９】

上記装置は、針の位置（及び／又は機械アームの位置）を規定する、及び／又は針の先端（末端）から蛹まで距離及び／又は蛹への針の穿通距離及び／又は蛹に接種する液体（好ましくはバキュロウイルス又はバクミドベクターを含む溶液）の容量を計算するコンピュータプログラムを更に備えてもよい。さらに、本発明の装置は、蛹への接種時間及び／又は種々の接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備えてもよい。上記装置は、針の位置を規定するカメラを更に備えてもよい。

【０１３０】

好ましい実施形態では、本発明の装置によって注入される流体は、組み換えバキュロウイルスを含む。別の実施形態では、本発明の装置によって注入される流体は、本明細書において上に記載される、ＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルスの産生に適したバクミドベクターを含む。

【０１３１】

本発明の装置は、本発明の組み換えタンパク質を産生する方法の工程（ｂ）、及び本発明の組み換えバキュロウイルスを得る方法の工程（ｂ）の実施に適している。

【０１３２】

例えば、本発明の装置は、約０．５μＬ～約１０．０μＬの範囲、例えば約０．５μＬ、例えば約１μＬ～約１０μＬ、例えば約１μＬ、約２μＬ、約３μＬ，約５μＬ、約７μＬ、又は約１０μＬの流体の量を蛹に注入（接種）するのに適している。

【０１３３】
例えば、本発明の装置に備えられる針は、蛹に約１ｍｍ～約４．５ｍｍ、好ましくは約３ｍｍの距離で穿通され得る。
【０１３４】
例えば、本発明の装置は、幾つかの移動可能な接種針を備え、１時間当たり蛹約３０００個～１００００個の速度で流体（好ましくはバキュロウイルス又はバクミドベクターを含む溶液）を接種することができる。
【０１３５】
例えば、本発明の装置によって注入される流体は、好ましくは各蛹に注入される用量当たり５０ＰＦＵ～10^6ＰＦＵの量でバキュロウイルスを含む。例えば、本発明の装置は、約５０超、又は約１００超、又は約５００超のプラーク形成単位（ＰＦＵ）のバキュロウイルスの量を各蛹に注入（接種）する。例えば、約５０、約１００、約３００、約５００、約１０００、約５０００、約１００００、約１５０００、約２００００、約２５０００、約３００００、約４００００、約５００００、約１０００００、約５０００００以上のＰＦＵ、例えば約１０００００００ＰＦＵを各蛹に接種する。
【０１３６】
本発明の装置は、該装置が高精度で蛹に所望の容量の流体（好ましくはバキュロウイルス又はバクミドベクターを含む溶液）を接種することを可能とする高精密ポンプを備えることが好ましい。
【０１３７】
本発明の装置は、マトリクス又はアレイで提供される蛹に流体を送達するのに適している。
【０１３８】
本発明の装置は、各蛹にバキュロウイルスを含む液体を投与するのに十分な時間とされる、蛹への接種時間及び／又は接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備えることが好ましい。
【０１３９】
本発明の装置は、針の位置を規定するカメラを更に備えることが好ましい。
【０１４０】
本発明は、絹を選除する装置（絹選除装置）を更に提供する。本発明の絹選除装置の例の略図を図３に表す（Ｔ．ニの繭から絹選除を行う半自動式装置）。
【０１４１】
上に説明されるように、本発明の絹選除装置（「絹選除機」とも呼ばれる）は、絹溶解液を含む少なくとも１つのコンテナを備える。例えば、該コンテナは次亜塩素酸を含む。また、第１のコンテナは、繭を含む飼育モジュールを通して液体を放出するシステム（該システムは、蛹を囲む絹をより効率的に溶解することを補助する）を備えることが好ましい。圧縮された空気擾乱によって溶解液を繭に適用し、絹繭を溶解するのに要する時間を減少させることが好ましい。
【０１４２】
本発明の絹選除装置は、第２のコンテナを更に備えることが好ましく、該コンテナは洗浄コンテナであり、蛹から微量の絹及び絹溶解液を除去するのに適した、水等の溶液を含む及び／又は該溶液を分散させる。溶液（好ましくは水）をサナギ（蛹）に噴霧することが好ましい。このコンテナの蓋に蛹を乾燥するため空気を与えるシステムが存在することが好ましい。したがって、蛹の洗浄後、該蛹を風乾させることが好ましい。プロセスの終わりに、蛹は絹を含まず、感染に対して又は使用までの保存（冷蔵）に対して用意ができている。
【０１４３】

【表１】

配列の要約

配列番号	名称
１	全Ａｃ－ｉｅ－０１ｃＤＮＡ
２	ＩＥ－１のタンパク質コード配列（ＣＤＳ）
３	ＩＥ－０のＣＤＳ
４	ＩＥ－１　Ｎ末端ドメインのＣＤＳ
５	ＩＥ－０　Ｎ末端ドメインのＣＤＳ
６	ＩＥ－１タンパク質
７	ＩＥ－０タンパク質
８	ＩＥ－１　Ｎ末端ドメインタンパク質
９	ＩＥ－０　Ｎ末端ドメインタンパク質
１０	ｐｏｌｈ（プロモーター）
１１	ｐ１０（プロモーター）
１２	ｐＢ２$_{9}$ｐ１０（プロモーター）
１３	ｐ６．９ｐ１０（プロモーター）
１４	ｐＢ２$_{9}$（プロモーター）
１５	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ１０
１６	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐＢ２$_{9}$ｐ１０
１７	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０
１８	ｐＢ２$_{9}$Ａｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ１０
１９	ｐＢ２$_{9}$Ａｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐＢ２$_{9}$ｐ１０
２０	ｐＢ２$_{9}$Ａｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０
２１	相同領域エンハンサー　ｈｒ１
２２	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１
２３	ｐｏｌｈＧＦＰ
２４	ｈｒ１ｐＢ２$_{9}$ｐ１０
２５	ブタサーコウイルス２型に由来するＯＲＦ２
２６	ブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質（Ｃａｐ）
２７	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０Ｃａｐ（Ｃａｐ遺伝子の後にｐ１０遺伝子に由来するポリアデニル化シグナルを含む）
２８	ｐｏｌｈＣａｐ
２９	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０Ｃａｐ
３０	Ｈ１インフルエンザウイルスＰＲ８株に由来する膜貫通領域のないヘマグルチニンタンパク質（ＭｅｌＨＡＨｉｓ）
３１	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０ＨＡ１（Ｈ１遺伝子の後にｐ１０遺伝子に由来するポリアデニル化シグナルを含む）（ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０ＭｅｌＨＡ）
３２	ＲＨＤＶ　ＡＳＴ７８９に由来するＶＰ６０（ジェノグループＧ１）
３３	ＲＨＤＶ　Ｎ１１に由来するＶＰ６０（ジェノグループＲＨＤＶｂ）
３４	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０ＶＰ６０Ｇ１（Ｈ１遺伝子の後にｐ１０遺伝子に由来するポリアデニル化シグナルを含む）
３５	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０ＶＰ６０ＲＨＤＶｂ（Ｈ１遺伝子の後にｐ１０遺伝子に由来するポリアデニル化シグナルを含む）
３６	ＲＨＤＶ　ＡＳＴ７８９に由来するＶＰ６０（ジェノグループＧ１）（アミノ酸配列）
３７	ＲＨＤＶ　Ｎ１１に由来するＶＰ６０（ジェノグループＲＨＤＶｂ）（アミノ酸配列）
３８	ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０ＧＦＰ

【実施例】

【０１４４】

実施例１．Ｔ．ニの蛹の産生

卵から蛹まで１５日間～１８日間に亘って発達させた数百匹の幼虫を含む、再利用可能な又は使い捨ての飼育器で昆虫幼虫を育てた（図１）。その後、飼育器全体又は集めた蛹を、０．１％重量／体積～５％重量／体積の濃度の次亜塩素酸ナトリウムの溶液に浸漬するか、又は蛹に該溶液を噴霧して繭の絹繊維を溶解した。数分で絹を溶解した後、蛹を水で洗浄して微量の次亜塩素酸塩を除去した。その後、蛹を乾燥し、バキュロウイルス接種まで４℃で保存した。図２に見られるように、このプロセスは、Ｔ．ニ鱗翅目の絹トリーツ（silk treats：絹処理物）の密度が低いことから、ボムビークス・モリの繭と同じ操作に対してより簡単となる。ボムビークス・モリの繭は蛹を解放するのに手作業の介入を必要とするのに対し、Ｔ．ニの絹は溶解するのが容易であり、自動又は半自動の手順によって除去され、組み換えタンパク質産生用の組み換えバキュロウイルスを注入する用意ができている蛹の取得をスケールアップすることを容易にする。

【０１４５】

実施例２．キメラプロモーター（ｐ６．９及びｐ１０）に作動可能に連結されたエンハンサー配列（ｈｒ１）を含むデュアル組み換えバキュロウイルス、並びに過剰発現したＩＥ－１及びＩＥ－０トランス活性化因子は、昆虫蛹における組み換えタンパク質の産生において非常に効率的である

バキュロウイルス相同反復配列ｈｒ１によって増強され、過剰発現したＩＥ－１因子及びＩＥ－０因子によってトランス活性化されたキメラプロモーターの制御下で駆動される組み換えタンパク質発現を、従来のバキュロウイルスを使用して得られたものと昆虫蛹（Ｔ．ニ）において比較した。組み換え緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする遺伝子を、従来の手段によりポリヘドリンプロモーターの制御下で従来のＡｃＭＮＰＶバキュロウイルスにクローニングした（図４Ａ）。上で言及された調節エレメントを含むカセット（ＴＢ発現カセット）によって改変された別のＡｃＭＮＰＶバキュロウイルスもＧＦＰをコードする遺伝子を含んで生成された（図４Ｂ）。マイクロリットル量のウイルス接種物を投与可能な精密ポンプと、精密位置でウイルスを注入可能なロボットアームとを備える接種ロボットによって蛹に５００００ＰＦＵの各バキュロウイルスを感染させた（図５Ａ）。各小孔の中心に、穴を有する蓋と共に小孔のマトリクスに蛹を配置した（図５Ｂ）。接種針（移動可能）は穴を通って蛹にアクセスし、蛹に数ミリメートル穿通してバキュロウイルスを注入した（図５Ｃ）。０．５マイクロリットル～１０マイクロリットル（μｌ）に含まれる組み換えウイルスを蛹へ投与し、針を引き抜く間、蛹を蓋により小孔に保持した。この接種ロボットは、当業者による手作業での接種の少なくとも６倍の速度である、毎時少なくとも蛹３０００個の接種速度を示した。

【０１４６】

接種後９６時間～１６８時間のインキュベーション期間の後、蛹を収集し、酸化防止剤、プロテアーゼ阻害剤、及び非イオン性界面活性剤を含む中性ｐＨバッファー（例えば、１×ＰＢＳ　ｐＨ　７．４＋５ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）＋１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）＋０．１％Ｂｒｉｊ３５＋０．５％サルコシル）の存在下、ホモジナイザー機でタンパク質を抽出した。抽出物を１５０００ｇ～２００００ｇで遠心分離し、濾過した。抽出物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動によって分析し、ゲルをクマシーブルーで染色した（図６Ａ）。感染した蛹における各バキュロウイルスによって産生されたＧＦＰタンパク質の産生収率（バイオマス単位当たりのミリグラムとして表される）をウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）曲線を使用するデンシトメトリーによって計算した。この分析は、従来のバキュロウイルス（すなわち、例えば発現カセット中にいかなる他の調節エレメントも有しないポリヘドリンプロモーターを含むバキュロウイルス）を用いて得られたものに対して、ＴＢカセットで遺伝子改変されたバキュロウイルスによって得られた蛹のＧＦＰ生産能を約５．６倍増加させた（図６Ｂ）。

【０１４７】

実施例３．Ｔ．ニ蛹におけるＴＢ改変バキュロウイルスによる種々のタンパク質の発現

ＴＢ（ＴｏｐＢａｃ）発現カセット（配列番号１７）を更なるタンパク質発現に使用する利益を分析するため、２つの遺伝子をＴＢカセットにクローニングし、ポリヘドリンプ

ロモーター（ｐｏｌｈ）の制御下で遺伝子を発現する従来のバキュロウイルスと同様に、対応する組み換えバキュロウイルスを得た（図７）。組み換えバキュロウイルスを得るために使用した２つの遺伝子は、ＰＣＶ２ａ　ＧＥＲ３株に由来するブタサーコウイルス２型によるタンパク質Ｃａｐ（配列番号２５及び配列番号２７）、及びウイルス株Ａ／ＰＲ／８／３４に由来するインフルエンザウイルス（Ｈ１）によるヘマグルチニン（配列番号３０及び配列番号３１）をコードするものであった。得られたＴＢ（－）（すなわち発現カセット中にタンパク質を発現するためのポリヘドリンプロモーターを含むが、ＴｏｐＢａｃ（ＴＢ）発現カセットによって改変されていない従来のバキュロウイルス）及びＴＢ（＋）のバキュロウイルスをＴ．ニ蛹におけるそれらの生産能について、実施例２で使用され記載されるものと同じ感染及びタンパク質抽出のプロトコルを使用して比較した。

【０１４８】

従来の（ＴＢ（－））バキュロウイルス又はＴＢ改変（ＴＢ（＋））バキュロウイルスによって媒介された感染した蛹における産生収率（バイオマス単位当たりミリグラムで表される）の比較は、両方のタンパク質について、発現カセットＴＢが産生収率を増加させたことを示した。ブタサーコウイルスＣａｐタンパク質の場合、従来のバキュロウイルスに感染した蛹と比較して、蛹がＴＢ改変バキュロウイルスに感染した時のタンパク質産生は２．７９倍増加した（図８）。インフルエンザウイルスによるＨＡタンパク質については、この増加は２．０４倍であった（図９）。これらの結果は、ＴＢカセットがＴ．ニ蛹における組み換えタンパク質の産生を著しく増加させることを確認した。

【０１４９】

実施例４．バキュロウイルス感染Ｔ．ニ蛹における組み換えタンパク質の産生は幼虫よりも効率的である

Ｔ．ニの蛹及び幼虫におけるＴＢ（＋）バキュロウイルス中の５つの組み換えタンパク質の相対的な発現を行った。発現したタンパク質は次の通りであった：ＧＦＰ（配列番号２３）、Ｃａｐ（配列番号２５）、ＨＡ（配列番号３０）、及び２つのウサギ出血カリシウイルス株（ＲＨＤＶジェノグループ１及びＲＨＤＶｂ；配列番号３２及び配列番号３３）に由来するＶＰ６０（カプシドタンパク質）（図１０）。蛹及び幼虫を５００００ＰＦＵの対応するＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染させた。感染した昆虫（幼虫及び蛹）を感染の９６時間後に収集した。可溶性タンパク質抽出物をクマシーブルーで染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動によって分析した（図１１Ａ、図１２Ａ、図１３Ａ及び図１４Ａ）。ＢＳＡ曲線を使用するデンシトメトリーにより組み換えタンパク質を定量し、産生収率をバイオマス単位当たりのミリグラムとして表した（図１１Ｂ、図１２Ｂ、図１３Ｂ及び図１４Ｂ）。いずれの場合にも、蛹は１．０６～３．６４の増加比率で幼虫よりも多い量の組み換えタンパク質を発現した。

【０１５０】

実施例５．Ｔ．ニ蛹における組み換えウイルス様粒子（ＶＬＰ）の産生

感染した蛹におけるＶＬＰの産生の実証するため、実施例４で分析した２つのウサギカリシウイルス株に由来するＶＰ６０タンパク質を発現するＴＢ（＋）バキュロウイルスに感染させた蛹からのタンパク質抽出物をＶＬＰ精製のため処理した。洗浄剤（ＰＢＳ（０．２Ｍリン酸ナトリウム、０．１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０）中２％サルコシル（Sigma）及び５ｍＭ　ＥＤＴＡ（Sigma））、及びプロテアーゼ阻害剤（RocheのＣｏｍｐｌｅｔｅ（商標）の存在下での遠心分離によって、感染から９６時間後に感染した蛹からＶＬＰを抽出し、４℃で一晩インキュベートした。その後、それらを３７℃で１時間ＤＮＡｓｅＩ（Roche Diagnostics）で処理した。追加の遠心分離（２０００×ｇ、５分間）の後、上清を超遠心分離（１３１４５３×ｇ；２．５時間）に供した。沈殿物をＶｅｒｔｒｅｌ（Sigma）で２回抽出し、２度目の超遠心分離（１３１４５３×ｇ；２．５時間）を行った。最後に、沈殿物を１×ＰＢＳに再懸濁し、分析まで４℃で保存した。

【０１５１】

従来の手段によって行われる透過型電子顕微鏡法により沈殿物を分析した。簡潔には、精製したＶＬＰ（およそ５μｌ）をグロー放電炭素被覆グリッドに２分間適用した。試料

を２％（重量／体積）水性酢酸ウラニルで陰性染色した。顕微鏡写真図をＥＭ　２０００Ｅｘ顕微鏡（日本国のJEOL）により記録した。図１４に示されるように、ＲＨＤＶに対応する予想されたサイズ及び形状のＶＬＰが観察され、バキュロウイルスに感染した蛹組織において修正されたフォールディング及び自己組織化が行われることを実証した（図１５）。

【０１５２】

実施例６．感染したＴ．ニ蛹におけるウイルス接種物の産生

スポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｆ２１及びＳｆ９）の細胞株を１０％熱不活性化ウシ胎児血清（PAN Biotech GmbH）及びゲンタマイシン（５０μｇ／ｍｌ）（PAN Biotech GmbH）を含むＴＮＭＦＨ培地（ドイツ国のPAN Biotech GmbH）中、２７℃で培養した。細胞の密度及び生存率をトリパンブルー染色によって判断した。細胞生存率を感染後の様々な時間において細胞総数に関する生存細胞の割合に基づいて計算した。

【０１５３】

懸濁液中で培養したＳｆ９細胞を、2×10^{6}細胞／ｍｌの細胞密度でスピナーフラスコ（８０ｍｌの培養液）において感染させた。感染時の細胞の生存率は、懸濁液中で９９％超であった。Ｓｆ９細胞を０．０１～０．１の感染効率（ＭＯＩ：multiplicity of infection）で組み換えバキュロウイルスによりｉｎ　ｖｉｔｒｏで感染させた。感染後７２時間～９６時間にウイルス接種物を遠心分離した後、上清から回収した。ウイルス力価をプラーク形成単位（ｐｆｕ）アッセイによって計算し、１ｍｌ当たり10^{7}ウイルス～10^{8}ウイルスのウイルス力価を得た。

【０１５４】

5×10^{2}ｐｆｕ～10^{4}ｐｆｕの範囲の用量でウイルスを使用してＴ．ニ蛹を感染させた。３日後～７日後、蛹を細胞培養液中、又はＤＴＴ及びプロテアーゼ阻害剤ＰＭＳＦを含む特殊なＰＢＳバッファー中でホモジナイズして感染性ウイルスを収集した。蛹ホモジェネートを５０００×ｇで３０分間遠心分離して蛹の残骸を排除した。その後、ウイルスを含む上清を０．４５ミクロン及び０．２２ミクロンのフィルタによって連続して濾過し、得られたウイルス調製物をグリセロールと混合することにより保存した後、凍結又は凍結乾燥することができた。Ｔ．ニの５齢幼虫においてウイルスストックを力価測定し（titrated）、具体的にはＫａｒｂｅｒ法を使用してＬＩＤ５０（幼虫感染量（larvae infectious dose）５０）を特定した。このように計算した１感染量の統計学的意味は、ＩＤ５０で感染した幼虫の集団が５０％の感染した個体を示すであろうということである。臨床症状を検出し、蛹までのそれらの発達を経過観察するため、少なくとも９６時間に亘って幼虫を観察した。典型的なウイルス力価はウイルス調製物１ｍｌ当たり10^{6}ｐｆｕ～10^{8}ｐｆｕであった。さらに、細胞培養物において先のバキュロウイルスベクターの生成なしにバキュロウイルス接種物を得ることができる。遺伝子転位の手順によって細菌において得られたバクミドを用いて蛹をトランスフェクトすることができる。図１６は、無細胞系によって蛹でウイルスストックを得るための基本手順を表す。

【０１５５】

実施例７．細胞培養物及びウイルス

スポドプテラ・フルギペルダＳｆ２１又はＳｆ９の細胞株を６ウェル組織培養プレート（1×10^{6}細胞／ウェル）において、１０％熱不活性化ウシ胎児血清（ドイツ国のPan Biotech（商標））を含むＴＮＭ－ＦＨ昆虫培地（ドイツ国のPan Biotech（商標））中、２７℃にて培養した。「Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（商標）」バキュロウイルス発現系（米国のinvitrogen（商標））によってＡｃＭＮＰＶ組み換えバキュロウイルスを得た。組み換えＤＮＡ調節エレメントを含む種々のＴＢ（＋）トランスファーベクターはｐＦａｓｔＢａｃ（商標）－ＤＵＡＬプラスミド（invitrogen（商標））を使用して生成された。これらのトランスファーベクターを使用してＣｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（商標）（米国のinvitrogen（商標））によりＳｆ２１細胞をトランスフェクトした。その後、Ｓｆ２１細胞の感染の結果得られた組み換えバキュロウイルスを細胞において２回継代し、プラークアッセイ法によって力価測定した。得られたＴＢ（＋）バキュロウイルス発現カセットの遺伝子構

築物を、遺伝子発現に関与する遺伝子調節エレメントの組み合わせ（ｐｏｌｈＡｃ－ｉｅ－０１／ｈｒ１ｐ６．９ｐ１０、配列番号１７、加えて所望のタンパク質をコードする遺伝子の配列、例えば配列番号２６、配列番号３０、配列番号３２及び配列番号３３）を示す図４、図７及び図１０に概略的に示す。種々の発現カセットを使用して、図６、図８、図９、図１１、図１２、図１３及び図１４に示される実施例で使用される組み換えバキュロウイルスを生成した。

【０１５６】

実施例８．クローニングベクターの生成

クローニングベクターは、ビヒクル及び外来ＤＮＡを、同じオーバーハングを作る制限酵素で処理した後、フラグメントを共にライゲートすることによって外来ＤＮＡフラグメントを挿入することができる、ＴＢ（＋）バキュロウイルス発現カセットを含むＤＮＡの小片である。クローニングベクターの本質的な特徴は、それが選択された向きの外来遺伝子、細菌において実際に形質転換された細胞及び増殖用の機能的な複製開始点（ＯＲＩ）の選択を可能とする、抗生物質耐性のもの等の選択マーカーの挿入を容易にする合成マルチクローニングサイト（ＭＣＳ）を含まなければならないことである。

【０１５７】

実施例９．本発明のバキュロウイルス発現カセットを含むドナーベクターの生成

ドナーベクターは、適切な制限酵素を使用して外来遺伝子がクローニングされたバキュロウイルス発現カセットを含むクローニングベクター、例えばｐＵＣ５７プラスミドからなる。使用されるＴＢ（＋）バキュロウイルス発現カセットを、次のＤＮＡ配列のライゲーションにより合成した：（ｉ）ｐｏｌｈプロモーター（例えば配列番号１０）等のプロモーター配列の下流及びＨＳＶ　ＴＫポリアデニル化シグナルの上流に配列Ａｃ－ｉｅ－０１をコードするバキュロウイルス転写調節因子（例えば、配列番号１～配列番号５）、並びに（ｉｉ）別の遺伝子座において、エンハンサー配列、例えば（ｉｉｉ）プロモーター配列、例えばｐ６．９ｐ１０（例えば配列番号１３）の上流の相同領域ｈｒ１に続く、目的の遺伝子のクローニング用のマルチクローニングサイト（ＭＣＳ）、及びＭＣＳの下流のｐ１０ポリアデニル化シグナル（図４、図７及び図１０）。バキュロウイルス発現カセットは、市販のバキュロウイルス生成システムのトランスファーベクターへのサブクローニングを容易にするため（遺伝子転位、例えば「Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（商標）」システム（invitrogen（商標））に基づく、又は相同組み換え、例えば「ｆｌａｓｈＢＡＣ（商標）」（Oxford Expression Technologies（商標））、「Ｂａｃｕｌｏｇｏｌｄ（商標）」（BD Biosciences（商標））、「ＢａｃＰＡＫ６（商標）」（Clontech（商標））、「Ｂａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅ　ＤＮＡ（商標）」（invitrogen（商標））に基づく）、特定の制限部位によって挟まれる（例えば５’末端のＢｇｌ　ＩＩ及びＢｓｔＺ１７ｌと、３’末端のＢｇｌ　ＩＩ及びＳｇｆ　Ｉ）。

【０１５８】

コーディング外来遺伝子をＮｃｏ　Ｉ及びＳｐｅ　Ｉの制限部位を使用してクローニングベクターのＭＣＳへとクローニングし、ドナープラスミドベクターを生成した。

【０１５９】

実施例１０．本発明のバキュロウイルスの発現カセットを含むトランスファーベクターの生成

トランスファーベクターを、５’フランキング部位のＢｓｔＺ１７　１とＸｂａ　Ｉとを含むドナーベクターを消化し、同様に同じ酵素で消化したトランスファーベクターｐＦａｓｔＢａｃ（商標）１へとクローニングすることにより生成した。この場合、サブクローニングの結果、バキュロウイルス発現カセットのＳＶ４０ポリアデニル化シグナルはトランスファーベクターに由来するｐ１０ポリアデニル化シグナルと交換される。これとは別に、発現カセットの全てのエレメントはｐＦａｓｔＢａｃトランスファーベクターに含まれ、オリジナルの市販のトランスファーベクターのｐｏｌｈプロモーター及びＭＣＳを置換する。

【０１６０】

実施例１１．「Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（商標）」システムを使用する本発明のバキュロウイルス発現カセットを含むバキュロウイルス発現ベクターの生成

改変トランスファーベクターｐＦａｓｔＢａｃ（商標）１及びＴＢ（＋）バキュロウイルス発現カセットを用いて、「Ｂａｃ－ｔｏ－Ｂａｃ（商標）」バキュロウイルス発現系を使用することによって組み換えバキュロウイルスを生成した。より具体的には、バキュロウイルスシャトルベクター（バクミド）及びヘルパープラスミドを含む改変トランスファーベクターを使用してＥ．コリ（E.coli）宿主株ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）を形質転換し、発現カセットの遺伝子転位に続いて組み換えのバクミドを生成させた。その後、本発明のＴＢ（＋）バキュロウイルス発現カセットと、種々の外来コード遺伝子とを含む組み換えバクミドのＤＮＡを使用し、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（商標）を使用して昆虫細胞、例えばＳｆ２１細胞をトランスフェクトした。また、そのバクミドを使用して昆虫の蛹をトランスフェクトした。１日齢～５日齢のトリコプルシア・ニ（イラクサキンウワバ）蛹をこの実験に使用した。トランスフェクションの７２時間後、細胞又は蛹を採取して処理し、最初の組み換えバキュロウイルスの生成を得た。その後、従来のプロトコルに従って、この組み換えバキュロウイルスを更に増幅及び／又は力価測定をすることができた。同様の手順を用いて、市販のＢＥＶＳによって提供される他のトランスファーベクターによる組み換えバキュロウイルスを生成することができる。

【０１６１】

実施例１２．昆虫蛹の感染

１日齢～５日齢のトリコプルシア・ニ（イラクサキンウワバ）の蛹を全ての実験に使用した。各蛹の標準体重はおよそ２００ｍｇ～３００ｍｇであり、手動で又は特別に設計したロボットによって、選択した用量当たりのプラーク形成単位（ＰＦＵ）の数に達するように細胞培養液又は１×ＰＢＳで希釈した組み換えバキュロウイルス１μｌ～１０μｌを蛹に注入した。蛹を感染後７２時間～１６８時間に収集した。収集した蛹を直ちに凍結し、組み換えタンパク質の定量のため処理するまで－２０℃又は－８０℃で保存した。バキュロウイルスに感染した凍結Ｔ．ニ蛹に由来する全可溶性非変性タンパク質（ＴＳＮＤＰ：Total soluble, non-denatured proteins）を、抽出バッファーの存在下で、数分間、ブレンダー又はホモジナイザーミキサーを使用する均質化によって得た。

【０１６２】

実施例１３．昆虫蛹の下流処理

凍結した蛹をホモジナイザーで破砕して、１ｍＭ～２５ｍＭの濃度の還元剤、０．０１％～２％の濃度の洗浄剤、及びプロテアーゼ阻害剤の混合物を含む粗抽出物を得た。粗抽出液の粘度を、その所定期間に亘る珪藻土とのインキュベーションによって減少させた後、遠心分離により昆虫の残骸を除去し、濾過して珪藻土を除去した。その後、該抽出物を、組み換えタンパク質の性質に応じて適切なフィルタを使用する接線流濾過によって浄化した。最後に、同じ接線流濾過装置でダイアフィルトレーションプロセスを行い、更なるクロマトグラフィー精製の前にバッファーを変更した。図１７は、バキュロウイルスに感染した蛹から可溶性組み換えタンパク質抽出物を得る一般的な手順を表す。

【０１６３】

本発明の項目（Ｉ）：

１．オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドを含む蛹。

【０１６４】

２．上記蛹が鱗翅目に属する、項１に記載の蛹。

【０１６５】

３．上記蛹がトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶ

に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、項１に記載の蛹。
【０１６６】
４．上記バキュロウイルスが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む、項１～３のいずれか一項に記載の蛹。
【０１６７】
５．バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む蛹。
【０１６８】
６．上記蛹が鱗翅目に属する、項５に記載の蛹。
【０１６９】
７．上記蛹がトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、項６に記載の蛹。
【０１７０】
８．上記蛹がトリコプルシア・ニ種に属する、項１～７のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７１】
９．上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、項４～８のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７２】
１０．上記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターが、
（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、
（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７

５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択される、項４～９のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７３】
１１．上記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、項４～１０のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７４】
１２．組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項４～１１のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７５】
１３．組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、項４～１２のいずれか一項に記載の蛹。
【０１７６】
１４．上記組み換えタンパク質が、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される、項１３に記載の蛹。
【０１７７】
１５．上記組み換えタンパク質が、
（ａ）ブタサーコウイルス、好ましくはブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質（例えば配列番号２６）、
（ｂ）口蹄疫ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ３タンパク質又はＶＰ０タンパク質、
（ｃ）イヌパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｄ）ブタパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｅ）ヒトノロウイルス（ジェノグループＩ又はＩＩ）カプシドタンパク質、
（ｆ）カリシウイルスカプシドタンパク質、
（ｇ）ヒトパピローマウイルス、好ましくはヒトパピローマウイルス１６に由来するＬ１タンパク質、
（ｈ）Ｅ型肝炎タンパク質Ｅ２、
（ｉ）伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ２タンパク質及びＶＰ３タンパク質、
（ｊ）アストロウイルスＯＲＦ２コード化タンパク質、
（ｋ）インフルエンザウイルスＨＡタンパク質（例えば配列番号３０）、ＮＡタンパク質及びＭ１タンパク質、
（ｌ）Ｂ型肝炎のコア抗原及び表面抗原、
（ｍ）ヒトパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、並びに、
（ｎ）ウサギカリシウイルス、好ましくはウサギ出血性疾患ウイルスに由来するＶＰ６０タンパク質（例えば配列番号３２及び配列番号３３）、
からなる群から選択されるウイルス様粒子タンパク質である、項１４に記載の蛹。
【０１７８】
１６．組み換えタンパク質の発現のための、項１～１５のいずれか一項に規定される蛹の使用。
【０１７９】
１７．上記組み換えタンパク質が、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される、項１６に記載の使用。
【０１８０】

１８．上記組み換えタンパク質が、
（ａ）ブタサーコウイルス、好ましくはブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質（例えば配列番号２６）、
（ｂ）口蹄疫ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ３タンパク質又はＶＰ０タンパク質、
（ｃ）イヌパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｄ）ブタパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｅ）ヒトノロウイルス（ジェノグループＩ又はＩＩ）カプシドタンパク質、
（ｆ）カリシウイルスカプシドタンパク質、
（ｇ）ヒトパピローマウイルス、好ましくはヒトパピローマウイルス１６に由来するＬ１タンパク質、
（ｈ）Ｅ型肝炎タンパク質Ｅ２、
（ｉ）伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ２タンパク質及びＶＰ３タンパク質、
（ｊ）アストロウイルスＯＲＦ２コード化タンパク質、
（ｋ）インフルエンザウイルスＨＡタンパク質（例えば配列番号３０）、ＮＡタンパク質及びＭ１タンパク質、
（ｌ）Ｂ型肝炎のコア抗原及び表面抗原、
（ｍ）ヒトパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、並びに、
（ｎ）ウサギカリシウイルス、好ましくはウサギ出血性疾患ウイルスに由来するＶＰ６０タンパク質（例えば配列番号３２及び配列番号３３）、
からなる群から選択されるウイルス様粒子タンパク質である、項１７に記載の使用。

【０１８１】

１９．
（ａ）蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、
（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する工程と、
（ｆ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製する工程と、
を含む、少なくとも１つの組み換えタンパク質を産生する方法。

【０１８２】

２０．上記蛹が鱗翅目に属する、項１９に記載の方法。

【０１８３】

２１．上記蛹がトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、及びサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、項２０に記載の方法。

【０１８４】

２２．上記蛹がトリコプルシア・ニ種に属する、項２１に記載の方法。

【０１８５】

２３．上記組み換えバキュロウイルスが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む、項１９～２２のいずれか一項に記載の方法。

【０１８６】
２４．上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする上記核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、項２３に記載の方法。
【０１８７】
２５．上記組み換えタンパク質の発現を駆動する上記プロモーターが、
（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、
（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択される、項２３又は２４に記載の方法。
【０１８８】
２６．上記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、項２３～２５のいずれか一項に記載の方法。
【０１８９】
２７．組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項２３～２６のいずれか一項に記載の方法。
【０１９０】
２８．上記蛹が組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、項１９～２７のいずれか一項に記載の方法。
【０１９１】
２９．上記組み換えタンパク質が、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される、項２８に記載の方法。
【０１９２】
３０．上記組み換えタンパク質が、
（ａ）ブタサーコウイルス、好ましくはブタサーコウイルス２型に由来するカプシドタンパク質（例えば配列番号２６）、
（ｂ）口蹄疫ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ３タンパク質又はＶＰ０タンパク質、
（ｃ）イヌパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、
（ｄ）ブタパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、

（ｅ）ヒトノロウイルス（ジェノグループＩ又はＩＩ）カプシドタンパク質、
（ｆ）カリシウイルスカプシドタンパク質、
（ｇ）ヒトパピローマウイルス、好ましくはヒトパピローマウイルス１６に由来するＬ１タンパク質、
（ｈ）Ｅ型肝炎タンパク質Ｅ２、
（ｉ）伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＶＰ１タンパク質、ＶＰ２タンパク質及びＶＰ３タンパク質、
（ｊ）アストロウイルスＯＲＦ２コード化タンパク質、
（ｋ）インフルエンザウイルスＨＡタンパク質（例えば配列番号３０）、ＮＡタンパク質及びＭ１タンパク質、
（ｌ）Ｂ型肝炎のコア抗原及び表面抗原、
（ｍ）ヒトパルボウイルスＶＰ１タンパク質及びＶＰ２タンパク質、並びに、
（ｎ）ウサギカリシウイルス、好ましくはウサギ出血性疾患ウイルスに由来するＶＰ６０タンパク質（例えば配列番号３２及び配列番号３３）、
からなる群から選択されるウイルス様粒子タンパク質である、項２９に記載の方法。

【０１９３】
３１．上記蛹が絹を含まない蛹である、項１９～３０のいずれか一項に記載の方法。

【０１９４】
３２．上記絹を含まない蛹が、次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液でＴ．ニの蛹を含む繭の絹を溶解することによって入手可能である、項３１に記載の方法。

【０１９５】
３３．組み換えバキュロウイルスによる上記蛹の接種が、上記蛹に上記バキュロウイルスを注入することにより行われる、項１９～３２のいずれか一項に記載の方法。

【０１９６】
３４．工程（ｂ）の接種を受けた上記蛹が、項１～１５のいずれか一項に規定される蛹である、項１９～３３のいずれか一項に記載の方法。

【０１９７】
３５．上記蛹に蛹１匹当たり５０ＰＦＵ～10^6ＰＦＵの量のバキュロウイルスを接種する、項１９～３４のいずれか一項に記載の方法。

【０１９８】
３６．
（ａ）繭に含まれる蛹を準備する工程と、
（ｂ）蛹を含む上記繭を次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液で処理する工程と、
（ｃ）絹を含まない、殺菌された蛹を得る工程と、
を含む、鱗翅目に属する絹を含まない蛹を産生する方法。

【０１９９】
３７．上記蛹がボムビークス・モリ種に属さない、項３６に記載の方法。

【０２００】
３８．上記蛹がトリコプルシア・ニ種に属する、項３６又は３７に記載の方法。

【０２０１】
３９．上記蛹がマトリクス（又はアレイ）で提供される、項３６～３８のいずれか一項に記載の方法。

【０２０２】
４０．
（ａ）蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したバクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、

（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）上記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを採取する工程と、
（ｆ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを精製する工程と、
を含む、組み換えバキュロウイルスを産生する方法。
【０２０３】
４１．上記蛹が項３６～３９のいずれか一項に規定される蛹である、項３９に記載の方法。
【０２０４】
４２．上記蛹が鱗翅目に属する、項４０又は４１に記載の方法。
【０２０５】
４３．上記蛹がトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、項４２に記載の方法。
【０２０６】
４４．上記蛹がトリコプルシア・ニ種に属する、項４３に記載の方法。
【０２０７】
４５．オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスの産生に適した上記バクミドが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む、或いはそれらからなる、項４０～４４のいずれか一項に記載の方法。
【０２０８】
４６．上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする上記核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、項４５に記載の方法。
【０２０９】
４７．上記組み換えタンパク質の発現を駆動する上記プロモーターが、
（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、

（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択される、項４５又は４６に記載の方法。
【０２１０】
４８．上記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、項４５～４７のいずれか一項に記載の方法。
【０２１１】
４９．組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項４５～４８のいずれか一項に記載の方法。
【０２１２】
５０．上記蛹が絹を含まない蛹である、項４０～４９のいずれか一項に記載の方法。
【０２１３】
５１．上記絹を含まない蛹が、次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液でＴ．ニの蛹を含む繭を溶解することによって入手可能である、項５０に記載の方法。
【０２１４】
５２．工程（ｂ）の上記トランスフェクトされた蛹が項５～１５のいずれか一項に規定される蛹である、項４０～５１のいずれか一項に記載の方法。
【０２１５】
５３．上記蛹がマトリクスで提供される、項４０～５２のいずれか一項に記載の方法。
【０２１６】
５４．精密ポンプと、モバイル機械アームと、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する蛹、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹に流体を注入するのに適した（移動可能な）針とを備える、装置。
【０２１７】
５５．上記蛹がマトリクス又はアレイで提供される、項５４に記載の装置。
【０２１８】
５６．上記装置が、上記針の位置を規定する、及び／又は上記針から上記蛹までの距離及び／又は上記蛹への針の穿通距離及び／又は上記蛹に接種する液体の容量を計算する、及び／又は上記接種針の座標を決定する、及び／又は上記蛹の上記接種の容量及び／又は時間及び／又は接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備える、項５４又は５５に記載の装置。
【０２１９】
５７．上記蛹の接種時間及び／又は接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備える、項５６に記載の装置。
【０２２０】
５８．上記装置が上記針の位置を規定するカメラを更に備える、項５４～５７のいずれか一項に記載の装置。
【０２２１】
５９．上記蛹が項１～１５のいずれか一項に規定される蛹である、項５４に記載の装置。
【０２２２】

６０．上記注入した流体が組み換えバキュロウイルス又はバクミドを含む、項５４～５９のいずれか一項に記載の装置。
【０２２３】
６１．上記装置が項１９及び／又は項４０のいずれか一項に規定される工程（ｂ）を行うのに適している、項５４～６０のいずれか一項に記載の装置。
【０２２４】
６２．上記蛹に注入される流体が約０．５μＬ～約１０．０μＬ、好ましくは約５μＬの範囲である、項５４～６１のいずれか一項に記載の装置。
【０２２５】
６３．上記針が約１ｍｍ～約５ｍｍ、好ましくは約３ｍｍの距離で上記蛹に穿通する、項５４～６２のいずれか一項に記載の装置。
【０２２６】
６４．上記蛹に注入される流体が、好ましくは各蛹に注入される用量当たり５０ＰＦＵ～10^6ＰＦＵの量でバキュロウイルスを含む、項５４～６３のいずれか一項に記載の装置。
【０２２７】
本発明の項目（ＩＩ）：
１．オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドを含む蛹であって、好ましくは、該蛹が鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、蛹。
【０２２８】
２．上記バキュロウイルスが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む、項１に記載の蛹。
【０２２９】
３．バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む蛹であって、好ましくは、該蛹が鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、蛹。
【０２３０】
４．上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは

少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択され、
上記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターが、
（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、
（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示される、好ましくは配列番号１１～配列番号１３のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、及び最も好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択され、
上記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、項２又は３に記載の蛹。
【０２３１】
５．上記組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項２～４のいずれか一項に記載の蛹。
【０２３２】
６．上記蛹が、好ましくはサブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、項２～５のいずれか一項に記載の蛹。
【０２３３】
７．項１～６のいずれか一項に規定される蛹の使用であって、好ましくはサブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される組み換えタンパク質の発現のための、蛹の使用。
【０２３４】
８．
（ａ）蛹、好ましくは絹を含まない蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、
（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を採取する工程と、
（ｆ）任意に、少なくとも１つの組み換えタンパク質を精製する工程と、
を含み、

好ましくは、上記蛹が鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹である、少なくとも１つの組み換えタンパク質を産生する方法。

【０２３５】

９．上記組み換えバキュロウイルスが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含み、好ましくは、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする上記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された上記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項４に規定されるようなものである、項８に記載の方法。

【０２３６】

１０．組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項１１に記載の方法。

【０２３７】

１１．上記蛹が、好ましくは、サブユニット単量体ワクチン、サブユニット多量体ワクチン、ウイルス様粒子、治療用タンパク質、抗体、酵素、サイトカイン、血液凝固因子、抗凝血剤、受容体、ホルモン、診断用タンパク質試薬、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）からなる群から選択される組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、項８～１０のいずれか一項に記載の方法。

【０２３８】

１２．

（ａ）絹繭に含まれる蛹を準備する工程と、

（ｂ）蛹を含む上記絹繭を次亜塩素酸の塩、好ましくは次亜塩素酸ナトリウムの溶液で処理する工程と、

（ｃ）絹を含まない、殺菌された蛹を得る工程と、

を含む、鱗翅目、好ましくはＴ．ニ種に属する絹を含まない蛹を産生する方法。

【０２３９】

１３．

（ａ）好ましくは鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する蛹、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹、好ましくは絹を含まない蛹を準備する工程と、

（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスの産生に適したバクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、

（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、

（ｄ）上記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、
（ｅ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを採取する工程と、
（ｆ）任意に、上記組み換えバキュロウイルスを精製する工程と、
を含む、組み換えバキュロウイルスを産生する方法。

【０２４０】

１４．オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適した上記バクミドが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含み、或いはそれらからなり、好ましくは、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する上記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする上記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された上記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項４に規定されるようなものである、項１３に記載の方法。

【０２４１】

１５．組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、項１４に記載の方法。

【０２４２】

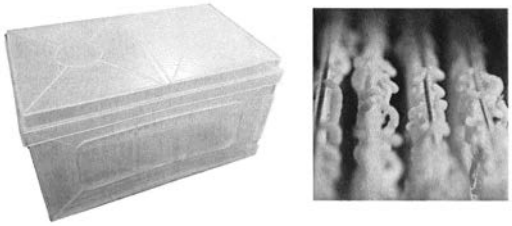
１６．精密ポンプと、モバイル機械アームと、鱗翅目、好ましくはトリコプルシア属、ラキプルシア属、スポドプテラ属、ヘリオチス属、マンズカ属、ヘリコベルパ属、アスカラファ属、若しくはサミア属、より一層好ましくはトリコプルシア・ニ種、マンズカ・セクスタ種、スポドプテラ・フルギペルダ種、スポドプテラ・リトラリス種、アスカラファ・オドラタ種、ヘリコベルパ・ジー種、ヘリオチス・ヴィレッセンス種、ラキプルシア・ヌ種、若しくはサミア・シンシア種に属する蛹、又はＡｃＭＮＰＶに由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドに感染しやすい任意の他の蛹に流体を注入するのに適した（移動可能な）針とを備え、好ましくは該蛹がマトリクス又はアレイで提供される、装置。

【０２４３】

１７．上記装置が、上記針の位置を規定する、及び／又は上記針から上記蛹までの距離及び／又は上記蛹への針の穿通距離及び／又は上記蛹に接種する液体（好ましくは組み換えバキュロウイルス又はバクミドを含む）の容量を計算するコンピュータプログラムを更に備え、上記装置が、好ましくは、例えば上記接種針の座標を決定する、及び／又は上記蛹の上記接種の容量及び／又は時間及び／又は接種間の時間を計算するコンピュータプログラムを更に備える、項１６に記載の装置。

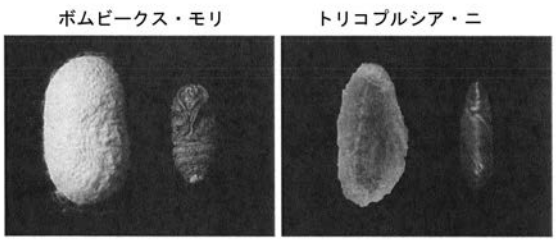
【図１】

Figure 1



【図２】

Figure 2



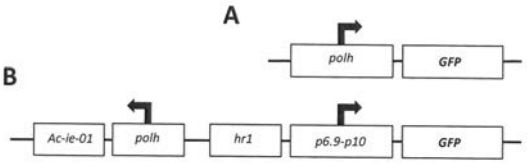
【図３】

Figure 3



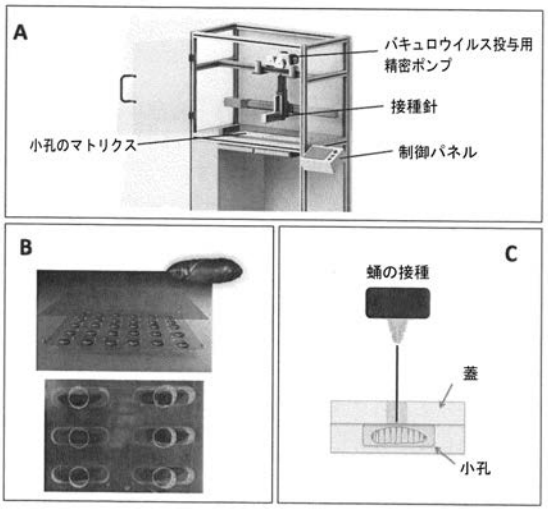
【図４】

Figure 4



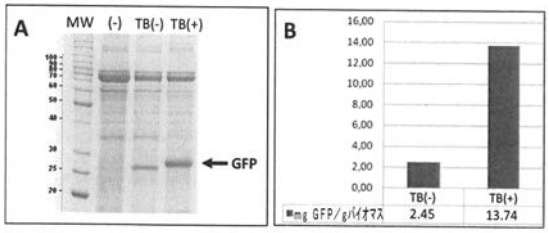
【図５】

Figure 5



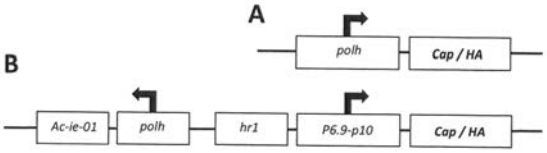
【図６】

Figure 6



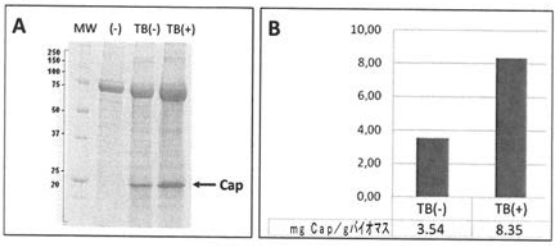
【図７】

Figure 7



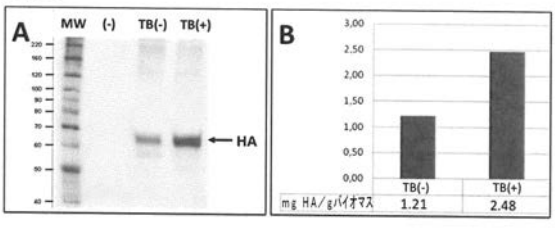
【図８】

Figure 8



【図９】

Figure 9



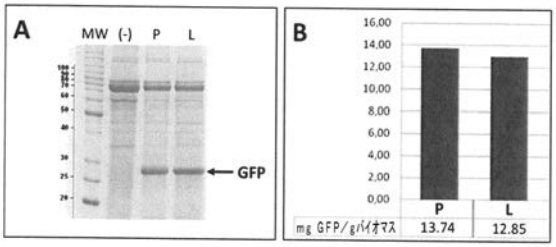
【図１０】

Figure 10



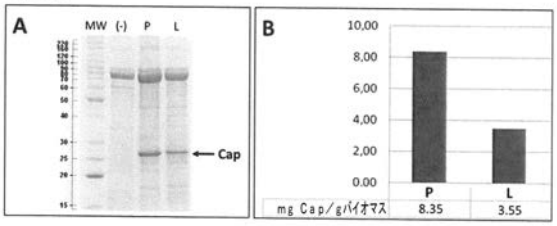
【図１１】

Figure 11



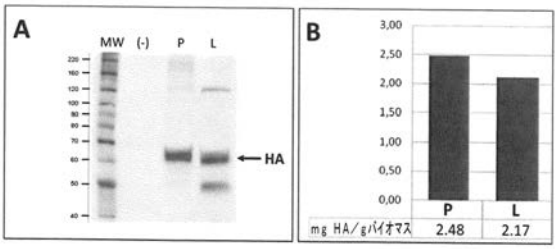
【図１２】

Figure 12



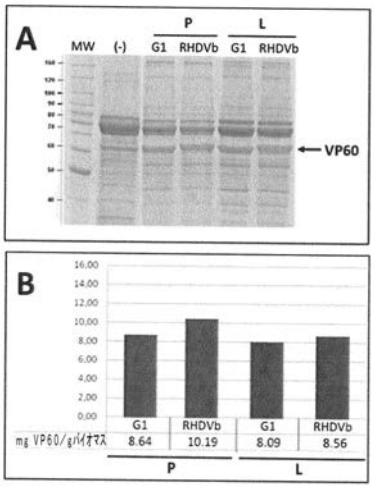
【図１３】

Figure 13



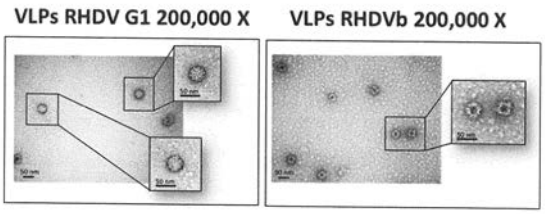
【図１４】

Figure 14



【図１５】

Figure 15



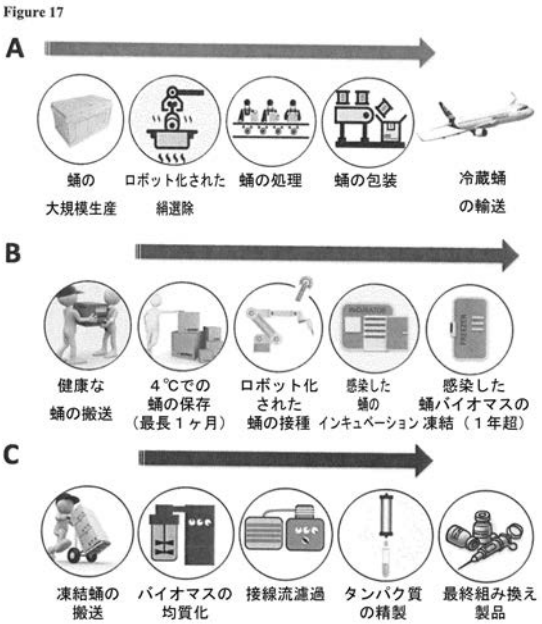
【図１６】

Figure 16



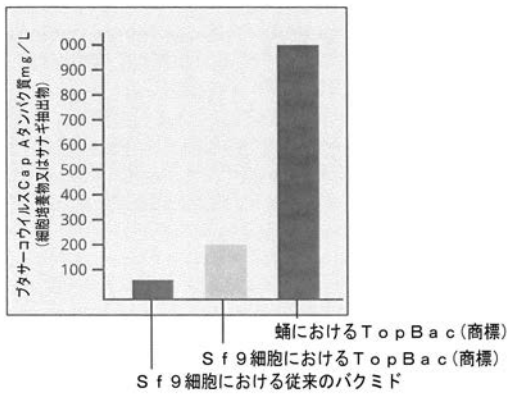
【図１７】

Figure 17



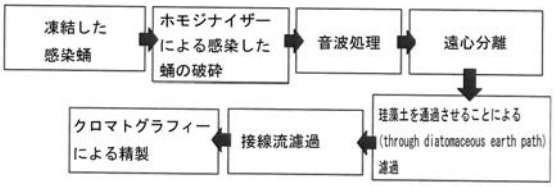
【図１８】

Figure 18



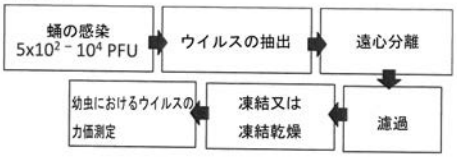
【図２０】

Figure 20.



【図１９】

Figure 19.



【配列表】

2018529337000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月20日(2017.12.20)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドを含む蛹であって、該蛹がトリコプルシア属に属する、蛹。

【請求項２】

前記組み換えバキュロウイルス及び／又はバクミドが組み換えタンパク質をコードする核酸配列を含む、請求項１に記載の蛹。

【請求項３】

前記バキュロウイルス及び／又はバクミドが、バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含み、

前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする前記核酸配列が、

（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、請求項１又は２に記載の蛹。
【請求項４】
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）とを含む蛹であって、
該蛹が、トリコプルシア属に属し、
前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの発現を可能とする核酸配列が、
（ａ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、
（ｂ）配列番号１～配列番号５のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％の配列同一性を有し、組み換えバキュロウイルスにおける転写調節因子として機能し得るタンパク質をコードする、核酸配列、
（ｃ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸をコードする核酸配列、並びに、
（ｄ）配列番号６～配列番号９のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の配列類似性を有し、組み換えバキュロウイルスにおいて転写調節因子として機能し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列、
からなる群から選択される、蛹。
【請求項５】
前記組み換えタンパク質の発現を駆動するプロモーターが、
（ａ）配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む核酸、並びに、
（ｂ）組み換えバキュロウイルスにおいてプロモーターとして機能することができ、配列番号１０～配列番号１４のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも７０％の配列同一性を有する核酸配列、
を含む核酸の群から選択される、及び／又は、
前記組み換え相同領域（ｈｒ）が配列番号２１に示される配列（ｈｒ１）である、
請求項２～４のいずれか一項に記載の蛹。
【請求項６】
組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項２～５のいずれか一項に記載の蛹。
【請求項７】
前記蛹が、組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、請求項３～６のいずれか一項に記載の蛹。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか一項に規定される蛹の使用であって、組み換えタンパク質の発現のための使用。
【請求項９】

（ａ）蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを工程（ａ）の蛹に接種する工程と、
（ｃ）少なくとも１つの組み換えタンパク質が発現するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）少なくとも１つの組み換えタンパク質を含む蛹を得る工程と、
を含み、
前記蛹が、トリコプルシア属に属する、少なくとも１つの組み換えタンパク質を産生する方法。
【請求項１０】
前記組み換えバキュロウイルスが、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、
組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された組み換え相同領域（ｈｒ）と、
を含み、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする前記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された前記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項３及び／又は４に規定されるようなものである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む前記核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記蛹が、組み換えタンパク質をコードする核酸配列を更に含む、請求項９～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
（ａ）絹繭に含まれる蛹を準備する工程と、
（ｂ）蛹を含む前記絹繭を次亜塩素酸の塩の溶液で処理する工程と、
（ｃ）絹を含まない、外部殺菌された蛹を得る工程と、
を含む、トリコプルシア属に属する絹を含まない蛹を産生する方法。
【請求項１４】
（ａ）トリコプルシア属に属する絹を含まない蛹を準備する工程と、
（ｂ）オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適したバクミドで工程（ａ）の蛹をトランスフェクトする工程と、
（ｃ）組み換えバキュロウイルスを産生するのに十分な期間に亘って工程（ｂ）の接種を受けた蛹をインキュベートする工程と、
（ｄ）前記組み換えバキュロウイルスを含む蛹を得る工程と、
を含む、組み換えバキュロウイルスを産生する方法。
【請求項１５】
オートグラファ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）に由来する組み換えバキュロウイルスを産生するのに適した前記バクミドが、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能するタンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする核酸配列と、
組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結

された組み換え相同領域（ｈｒ）と、
を含み、或いはそれらからなり、
バキュロウイルス感染の間に得られる内因性レベルを超えて転写調節因子として機能する前記タンパク質ＩＥ－１、タンパク質ＩＥ－０及び／又はそれらのフラグメントの内因性レベルを超える発現を可能とする前記核酸配列、並びに組み換えタンパク質の発現を駆動するのに適した任意のプロモーターに作動可能に連結された前記組み換え相同領域（ｈｒ）が、請求項３及び／又は４に規定されるようなものである、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
組み換えプロモーターと、転写調節因子をコードする配列と、エンハンサー領域との組み合わせを含む核酸配列が、配列番号１５～配列番号２０を含む群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
精密ポンプと、モバイル機械アームと、トリコプルシア属に属する蛹に流体を注入するのに適した針とを備える、装置。
【請求項１８】
前記装置が、前記針の位置を規定する、及び／又は前記針から前記蛹までの距離及び／又は前記蛹への針の穿通距離及び／又は前記蛹に接種する液体の容量を計算するコンピュータプログラムを更に備える、請求項１７に記載の装置。
【請求項１９】
絹溶解液を含む少なくとも１つのコンテナを備える絹選除装置であって、該装置が、洗浄コンテナであり、トリコプルシア属に属する蛹から微量の絹及び絹溶解液を除去するのに適した溶液を含む及び／又は該溶液を分散する第２のコンテナとを備える、絹選除装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/072143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/866 A01K67/033 C12N15/85 A61M5/20 B01L99/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A01K A61M

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WÖLTJE MICHAEL ET AL: "Transgenic protein production in silkworm silk glands requires cathepsin and chitinase of Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY MAY 2014, vol. 98, no. 10, May 2014 (2014-05), pages 4571-4580, XP002756203, ISSN: 1432-0614 page 4571 abstract ----- -/--	1

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 November 2016	11/07/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sitch, David

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/072143

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOTOHASHI T ET AL: "Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus bacmid system", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 326, no. 3, 21 January 2005 (2005-01-21), pages 564-569, XP004679934, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2004.11.060 page 565, paragraph 2 page 565, right-hand column, last paragraph - page 567, right-hand column, paragraph 1 figure 2 -----	1
X	HELLERS M ET AL: "Expression of post-translational processing of preprocecropin A using a baculovirus vector.", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS 15 JUL 1991, vol. 199, no. 2, 15 July 1991 (1991-07-15) , pages 435-439, XP002756204, ISSN: 0014-2956	1,2,8,9, 12,14
Y	Abstract; page 435 page 435, right-hand column, paragraph 1 page 435, last paragraph - page 436, paragraph 1 page 439, paragraph 2 -----	1,3-7, 10,11, 15,16
A	DATABASE Taxonomy [Online] "Autographa californica nucleopolyhedrovirus", XP002756205, retrieved from NCBI Database accession no. 46015 the whole document -----	1
A	DATABASE Taxonomy [Online] "Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)", XP002756206, retrieved from UniProt Database accession no. 46015 the whole document ----- -/--	1

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/072143

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GÓMEZ-SEBASTIÁN SILVIA ET AL: "Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette.", PLOS ONE 2014, vol. 9, no. 5, E96562, 2014, pages 1-10, XP002756207, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0096562 page 1 abstract page 3; figure 1 page 5; figure 3 -----	3-7,10, 11,15,16
Y	JINN TZYY-RONG ET AL: "Aerosol infectivity of a Baculovirus to Trichoplusia ni larvae: An alternative larval inoculation strategy for recombinant protein production.", BIOTECHNOLOGY PROGRESS 2009 MAR-APR, vol. 25, no. 2, March 2009 (2009-03), pages 384-389, XP002756208, ISSN: 1520-6033 page 384 abstract page 384, last paragraph - page 385, paragraph 2 page 389; figure 5 -----	1
A	Anonymous: "Bac-to-Bac® TOPO® Expression System. An efficient cloning and site-specific transposition system to generate recombinant baculovirus for high-level protein expression Catalog nos. A11101, A11100", invitrogen - User Manuel , 15 December 2008 (2008-12-15), pages i-51, XP002756209, Retrieved from the Internet: URL:https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_topo_exp_system_man.pdf [retrieved on 2016-04-05] the whole document -----	1

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/072143

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

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

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

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12, 14-16

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2016/072143

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12, 14-16

A (a) pupa of the genus Trichoplusia, Rachiplusia, Spodoptera, Heliothis or Helicoverpa comprising (b) a baculovirus or bacmid derived from Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus;
A (a) pupa of the genus Trichoplusia, Rachiplusia, Spodoptera, Heliothis or Helicoverpa comprising (b) a nucleic acid sequence that allows for the expression of above endogenous levels of the proteins IE-1, IE-0 or fragments thereof functioning as transcriptional regulators above endogenous levels obtained during baculovirus infection, and (c) a recombinant homologous region (hr) operably linked to (d) any promoter that is suitable for driving the expression of a recombinant protein;
A method to produce a recombinant protein comprising (a) providing a pupa , (b) inoculating the pupa with a baculovirus derived from Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus, and (c) incubating the pupa so that the recombinant protein is expressed;
A method to produce a baculovirus comprising (a) providing a pupa , (b) transfecting the pupa with a bacmid suitable for producing a recombinant baculovirus derived from Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus, (c) incubating the pupa of step (b)
Use of a pupa as defined in any of claims 1-7 for the expression of recombinant proteins.

---

2. claim: 13

A method to produce a silk free pupa of the order Lepidoptera comprising (a) providing a pupa in a silk cocoon, (b) treating (b) with a solution of a salt of hypochlorous acid, and (c) obtaining a silk-free, disinfected pupa.

---

3. claims: 17, 18

A device comprising (a) a precision pump, (b) a mobile mechanic arm, (c) a needle suitable for injecting a fluid into a pupa of the order Lepidoptera.

---

4. claim: 19

A 'silk-eliminating device' comprising a container which contains a silk-dissolving solution.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***7/01***	***(2006.01)***	C12N	7/01		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/10		
C12N	*15/34*	*(2006.01)*	C12N	15/34		
			C12N	15/34	ZNA	

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

(72)発明者 マルチネス エスクリバノ ホセ アンヘル
スペイン国 ２８２２３ マドリード ポスエロ デ アラルコン キャンパス デ モンテガンセド ユニベルシタット ポリテクニカ デ マドリード パルケ シエンティフィコ イェ テクノロジコ セントロ エンプレサリアル
(72)発明者 アルバラード フラデュア カルメン
スペイン国 ２８２２３ マドリード ポスエロ デ アラルコン キャンパス デ モンテガンセド ユニベルシタット ポリテクニカ デ マドリード パルケ シエンティフィコ イェ テクノロジコ セントロ エンプレサリアル
(72)発明者 レイター サアベドラ イーデル
スペイン国 ２８２２３ マドリード ポスエロ デ アラルコン キャンパス デ モンテガンセド ユニベルシタット ポリテクニカ デ マドリード パルケ シエンティフィコ イェ テクノロジコ セントロ エンプレサリアル
(72)発明者 シード フェルナンデス ミゲル
スペイン国 ２８２２３ マドリード ポスエロ デ アラルコン キャンパス デ モンテガンセド ユニベルシタット ポリテクニカ デ マドリード パルケ シエンティフィコ イェ テクノロジコ セントロ エンプレサリアル

Ｆターム(参考) 4B029 AA09 AA23 AA27 BB11 BB13 GB05 HA01
4B064 AG01 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01 DA20
4B065 AA87X AA95X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA60