

(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2010-514698

(P2010-514698A)

(43) 公表日 平成22年5月6日(2010.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12 Z N A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/18 (2006.01)	C O 7 K 14/18	4 B O 6 4
C O 7 K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	4 C O 8 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 175 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-543249 (P2009-543249)	(71) 出願人	390039192
(86) (22) 出願日	平成19年12月21日 (2007.12.21)		ダウ・アグロサイエンス・エル・エル・シー
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月24日 (2009.8.24)		ー
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/088512		D o w A g r o S c i e n c e s L L C
(87) 国際公開番号	W02008/143713		C
(87) 国際公開日	平成20年11月27日 (2008.11.27)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(31) 優先権主張番号	60/871, 518		6 8 インディアナポリス ザイオンズビル
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2006.12.22)		ロード9330
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物によって製造されるウエストナイルウイルス (WNV) ワクチン、ベクターおよび植物コードン最適化配列

(57) 【要約】

本願は、ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルス (W N V) ポリペプチドおよびそのフラグメントに関する多様な組成物、ならびに本明細書に記載のW N V ポリペプチドの発現をコード、指令するか、またはW N V ポリペプチドを産生するポリヌクレオチド、ベクターおよび形質転換された宿主細胞を提供する。本明細書では、個体における免疫応答を起こすためにポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用する方法、またはW N V 特異的もしくは中和抗体の存在を検出する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 を含んでなる単離された、精製された、および / または組み換えポリペプチド；
- b) 配列番号 5、9、11、13、15 に記載のポリペプチドのフラグメント、または「Y から Z」である配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のフラグメントであって、Y は指定配列の N - 末端アミノ酸であり、そして Z は表 9、10、11、もしくは 12 のいずれか 1 つに記載の特定の配列の C - 末端アミノ酸であるフラグメント、または表 15 もしくは 16 に記載のポリペプチドのフラグメント；
- c) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；
- d) 異種ポリペプチド配列をさらに含んでなる、a)、b) または c) に記載のポリペプチド；
- e) a)、b)、c) または d) に記載の植物由来のポリペプチド；
- f) キャリア、および a)、b)、c)、d) または e) のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含んでなる組成物であって、前記キャリアは、緩衝液中に懸濁されていてもよい植物、哺乳動物もしくは細菌発現系由来の細胞材料、アジュバントまたは薬学的に許容可能な賦形剤を含んでなる組成物；
- g) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 を含んでなるポリペプチドをコードするか、または (b) または (c) に記載の配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の 1 つもしくはそれ以上のポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列であって、前記ポリヌクレオチド配列は、少なくとも 40 % かつ 50 % 未満の G + C 含有量または表 13 に記載の G + C 含有量を有してもよいポリヌクレオチド配列；
- h) 配列番号 1 に少なくとも 70 % (または表 14 において特定されるパーセンテージ) 同一であり、配列番号 2 を含んでなるポリペプチドをコードし、そして約 40 % ~ 約 50 % の間の G + C 含有量 (または表 13 において特定される特定の G + C 含有量) を有するポリヌクレオチド配列；
- i) (g) または (h) に記載のポリヌクレオチド配列のポリヌクレオチド配列少なくとも 8 連続ヌクレオチド；
- j) 配列番号 3、4、6、7、8、10、12、もしくは 14、または配列番号 3、4、6、7、8、10、12、もしくは 14 の少なくとも 8 連続ヌクレオチドのフラグメントを含んでなるポリヌクレオチド配列；
- k) (g)、(h)、(i)、または (j) に記載のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド；
- l) 低、中もしくは高ストリンジェンシー下で、(g)、(h)、(i)、(i) または (k) に記載のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド；
- m) (g)、(h)、(i)、(i) または (k) に記載のポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子構築物；
- n) (g)、(h)、(i)、(i)、(j)、(k) もしくは (l) に記載のポリヌクレオチドまたは遺伝子構築物を含んでなるベクター；
- o) (n) に記載のベクター、(m) に記載の遺伝子構築物、または (g)、(h)、(i)、(j) もしくは (k) のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞；
- p) (n) に記載のベクター、(m) に記載の遺伝子構築物、または (g)、(h)、(i)、(j) もしくは (k) のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを含んでなるトランスジェニック植物、植物細胞、または植物部分；あるいは
- q) (g)、(h)、(i)、(j)、(k) もしくは (l) に記載のポリヌクレオチド、および任意選択的に、標識またはマーカーを含んでなるプローブ、を含んでなる、組成物。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが植物細胞において産生され、

- a) 前記ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含んでなる組み換えベクターで植物細胞を形質転換して、形質転換植物細胞を形成すること；
- b) 前記ポリペプチドの発現に適切な条件下で前記形質転換植物細胞を培養すること；および

c) 前記形質転換植物細胞から前記ポリペプチドを回収すること
を含んでなる、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントが異種ポリペプチド配列に融合される、請求項 2 または 3 に記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項 4】

ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対して個体を免疫するための方法であって、前記個体において免疫応答を誘導するのに十分な量の組成物を投与することを含んでなり、前記組成物は：キャリア、および (i) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15；(ii) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；(iii) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 連続アミノ酸のフラグメント；あるいは (iv) 表 9、10、11、12、15、もしくは 16 に記載のフラグメントを含んでなるポリペプチドを含んでなり、前記ポリペプチドもしくはフラグメントは、感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対する免疫防御応答または感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスを中和する抗体応答を誘導する、方法。

20

【請求項 5】

前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドフラグメントが異種ポリペプチド配列に融合される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ポリペプチドまたはそのフラグメントが、植物産生ポリペプチドまたは植物産生ポリペプチドフラグメントである、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

30

ウエストナイル (West Nile) ウイルス (WNV) 株に対する免疫応答を誘導する方法であって：(A)：(i) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15；(ii) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；(iii) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 連続アミノ酸のフラグメント；あるいは (iv) 表 9、10、11、12、15、もしくは 16 に記載のフラグメントを含んでなるポリペプチドをコードする核酸配列（ここで、前記ポリペプチドもしくはフラグメントは、感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対する免疫防御応答または感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対する中和抗体応答を誘導する）；(B)：配列番号 5、9、11、13 もしくは 15；(ii) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；(iii) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 連続アミノ酸のフラグメント；または (iv) 表 9、10、11、12、15、もしくは 16 に記載のフラグメントを含んでなるポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなるウイルスベクター（ここで、前記ポリペプチドもしくはフラグメントは、感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対する免疫防御応答または感染性ウエストナイル (West Nile) ウイルスに対する中和抗体応答を誘導する）；あるいは (C)：配列番号 5、9、11、13 もしくは 15；(ii) 個体に投与する場合中和抗体応答を生

40

50

じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；(i i i) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 連続アミノ酸のフラグメント；または(i v) 表 9、10、11、12、15、もしくは 16 に記載のフラグメントを含んでなる少なくとも 1 つのポリペプチド(ここで、前記ポリペプチドもしくはフラグメントは、感染性ウエストナイル(W e s t N i l e) ウイルスに対する免疫防御応答または感染性ウエストナイル(W e s t N i l e) ウイルスに対する中和抗体応答を誘導する)を個体に、前記動物において免疫応答を誘導するのに十分な量で投与することを含んでなる、方法。

【請求項 8】

前記方法が、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15；(i i) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；(i i i) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 連続アミノ酸のフラグメント；あるいは(i v) 表 9、10、11、12、15、もしくは 16 に記載のフラグメントを含んでなるポリペプチドを含んでなる組成物の投与によって、前記動物の免疫応答を追加免疫することをさらに含んでなり、前記ポリペプチドもしくはフラグメントは、感染性ウエストナイル(W e s t N i l e) ウイルスに対する免疫防御応答または感染性ウエストナイル(W e s t N i l e) ウイルスに対する中和抗体応答を誘導する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリペプチドまたは前記ポリペプチドのフラグメントが、異種ポリペプチド配列に融合される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドの前記ポリペプチドまたはフラグメントが植物由来であるか、またはトランスジェニック植物もしくは植物部分から得られる、請求項 7、8 または 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリペプチドが原核細胞または真核細胞において調製される、請求項 4、5、8 または 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

抗体をポリペプチドに結合させる方法であって、抗体を含有するサンプルと、a) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 を含んでなる単離された、精製された、および/または組み換えポリペプチド；b) 配列番号 5、9、11、13、15 に記載のポリペプチドのフラグメント、または「Y から Z」である配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のフラグメント(ここで、Y は指定配列の N - 末端アミノ酸であり、そして Z は表 9、10、11、もしくは 12 のいずれか 1 つに記載の指定配列の C - 末端アミノ酸である)、表 15 もしくは 16 に記載のポリペプチドのフラグメント；c) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；あるいは d) 抗体 - 抗原複合体の形成を可能にする条件下で異種ポリペプチド配列をさらに含んでなる a)、b) または c) のいずれか 1 つに記載のポリペプチドを含んでなるポリペプチドとを接触させることを含んでなる、方法。

【請求項 13】

前記抗体 - 抗原複合体の形成を検出する工程をさらに含んでなる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記方法がイムノアッセイである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記イムノアッセイが、酵素免疫測定法(E L I S A)、ラジオイムノアッセイ(R I

10

20

30

40

50

A)、側方流動アッセイ、免疫クロマトグラフストラップアッセイ、自動化流動分析、ウエスタンブロット、免疫沈降アッセイ、逆流クロマトグラフィー結合アッセイ、凝集アッセイ、およびバイオセンサからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記方法が、同じポリペプチドを含んでなるポリペプチド、あるいは他のウイルスから誘導されるポリペプチドを含んでなるポリペプチドと、a)配列番号5、9、11、13もしくは15を含んでなる単離された、精製された、および/または組み換えポリペプチド；b)配列番号5、9、11、13、15に記載のポリペプチドのフラグメント、または「YからZ」である配列番号5、9、11、13もしくは15のフラグメント(ここで、Yは指定配列のN-末端アミノ酸であり、そしてZは表9、10、11、もしくは12のいずれか1つに記載の指定配列のC-末端アミノ酸である)、表15もしくは16に記載のポリペプチドのフラグメント；c)個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号5、9、11、13もしくは15のいずれか1つに記載のE-ペプチド、または配列番号5、9、11、13もしくは15のいずれか1つに記載のE-ペプチドのフラグメント；あるいはd)異種ポリペプチド配列をさらに含んでなるa)、b)またはc)のいずれか1つに記載のポリペプチドから選択される1つもしくはそれ以上のポリペプチドとの組み合わせのアレイを使用して実施される、請求項12に記載の方法。

10

【請求項17】

ポリペプチドを製造する方法であって：

a) (i)配列番号5、9、11、13もしくは15；(ii)配列番号5、9、11、13、15に記載のポリペプチドのフラグメント、または「YからZ」である配列番号5、9、11、13もしくは15のフラグメント(ここで、Yは指定配列のN-末端アミノ酸であり、そしてZは表9、10、11、もしくは12のいずれか1つに記載の指定配列のC-末端アミノ酸である)、または表15もしくは16に記載のポリペプチドのフラグメント；(iii)個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号5、9、11、13もしくは15のいずれか1つに記載のE-ペプチド、または配列番号5、9、11、13もしくは15のいずれか1つに記載のE-ペプチドのフラグメント；あるいはiv)異種ポリペプチド配列をさらに含んでなる(i)、(ii)または(iii)のいずれか1つに記載のポリペプチドを含んでなる少なくとも1つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで細胞を形質転換すること；

20

30

b) 前記形質転換植物細胞の増殖および前記ポリペプチドの蓄積を可能にする条件下で、前記形質転換細胞を培養すること；ならびに

c) 前記細胞から前記少なくとも1つのポリペプチドを回収または精製することを含んでなる、方法。

【請求項18】

細胞が、下等植物細胞、単子葉植物細胞、および双子葉植物細胞；原核細胞；または哺乳動物細胞系統からなる群から選択される形質転換植物細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

形質転換植物細胞がタバコ細胞系統である、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

前記タバコ細胞系統がNT-1である、請求項19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2006年12月22日に出願されたU.S. Provisional Application Serial No. 60/871,518の利益を要求し、すべての図面、表およびアミノ酸または核酸配列を含むその開示内容は、出典明示により本明細書に援用される。

【0002】

50

本発明は、U S D A - A R S C R A D A 協定番号 5 8 - 3 K 9 5 - M - 1 0 4 0 下、政府の支援により行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

抗体によるウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルス (W N V) 中和の理解は、W N V およびその近縁の種のセントルイス (S a i n t L o u i s) 脳炎ウイルス、マレー渓谷 (M u r r a y V a l l e y) 脳炎ウイルス (M V E V) 、および日本脳炎ウイルス、ならびにデングウイルス、黄熱病ウイルス、およびダニ媒介脳炎ウイルス (T B E V) のようなより遠縁の種の研究から生じている。フラビウイルスエンベロブタンパク質の配列において強い類似性が認められることとエンベロブタンパク質内の分子内結合を形成するシステインの位置がほぼ同一であること (非特許文献 1) から、すべてのフラビウイルスのエンベロブタンパク質は極めて類似の構造を有するべきであることが示唆される。従って、いずれのフラビウイルスに関する情報についても、一般的に、他のものに適用可能である。

10

【0004】

非特許文献 2 および非特許文献 3 は、フラビウイルスが、3 つのタンパク質のみ、エンベロブタンパク質 (E) 、膜タンパク質 (M) 、およびカプシドタンパク質 (C) を含有することを示した。デングウイルスに関する最近の構造研究 (非特許文献 4) により、このことが確認され、そしてビリオンにおけるこれらのタンパク質の物理的な関連が示された。E タンパク質のみが、ビリオン表面上に暴露される (非特許文献 4) 。これまでに、W N V 、T B E V 、およびデングの E タンパク質の 3 次元構造が解明されている (非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 非特許文献 6) 。これらは、3 つの明確に異なるドメインを有するフィンガー様構造を有し、ドメイン I は、ドメイン I I および I I I の間の中間に存在する。E タンパク質の個々の分子は、分子のペアが反対方向で相互に隣り合わせに横たわり、3 つのペアが並んで横たわりながら、ビリオン表面に沿って平坦な状態で横たわる。

20

【0005】

フラビウイルス E のタンパク質は、すべてのウイルスタンパク質を含むゲノム長のポリタンパク質の部分として合成される。それは、続いて、タンパク質切断によりポリタンパク質から遊離される。ポリタンパク質内部の初期の切断は、プレ膜 (p r) および M タンパク質にまだ結合している E タンパク質を解離し、p r と M タンパク質の組み合わせは「p r M」タンパク質として知られている。生じた p r M - E タンパク質は、小胞体膜に挿入され、ここで、それは、その成熟した立体構造へフォールディングし始める。ウイルスは、細胞内コンパートメントで表面上の p r M - E によって組み立てられる。その後の切断は、E および p r M タンパク質を分離し、p r M を切断して、成熟 M タンパク質を産出する。p r フラグメントはビリオンに組み入れられない。E タンパク質は、グリコシル化配列を有していても、有していなくてもよく、それゆえグリコシル化されてもいても、されていなくてもよい (非特許文献 7) 。

30

【0006】

フラビウイルスは、おそらく、E タンパク質ドメイン I I I の R G D 配列と細胞表面インテグリンとの間の相互作用を介して細胞膜に結合し (非特許文献 8) 、そしてエンドソームを介して進入することにより、細胞に感染する。エンドソームが酸性化する場合、ビリオンのエンベロブタンパク質は、分子内および分子外の立体構造の広範かつ不可逆的な変化を受ける。180 個の個々の E タンパク質分子がそれらの二量体から解離し、それらのドメインを再配向し、次いで接合して、ビリオン膜から突出している 60 個の三量体スパイクを形成し、スパイクの先端をエンドソーム膜に挿入し、次いでビリオン膜とエンドソーム膜とを融合する三量体スパイクの 12 個の五量体環に凝集し、それにより、カプシドは、細胞の細胞質に侵入し、次いで複製を開始することが可能になる (非特許文献 9) 。ビリオン表面由来の二量体の可溶化が、いくつかの中和関連エピトープを除去することは明らかである (非特許文献 10) が、再構築および三量体形成がどのようにして E タ

40

50

ンパク質抗原部位を変更するかについては不明である（非特許文献 1 1）。

【 0 0 0 7 】

E タンパク質のみがビリオン表面上に暴露されるため、無傷（ i n t a c t ）な感染性ビリオンに結合し、中和する抗体は、E タンパク質に結合するはずである。このことは、ウイルスから精製されたタンパク質（非特許文献 1 2）および組み換え系で産生されたウイルスタンパク質（非特許文献 1 3；非特許文献 1 4；非特許文献 2；非特許文献 1 5；非特許文献 1 6；非特許文献 1 7；非特許文献 1 8；非特許文献 1 9；非特許文献 2 0）で免疫した動物における中和抗体の発生を示すことにより、ならびに（非特許文献 2 1；非特許文献 1 4；非特許文献 2 2において総説された）E タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いる受動防御実験により証明された。

10

【 0 0 0 8 】

E タンパク質上のいくつかの領域に結合する抗体は、ウイルスを中和することが予想され、その他の領域に結合する抗体は、ウイルスを中和することが予想され得ない。一次アミノ酸配列に結合する抗体の中和活性と、適切に折りたたまれた E タンパク質の二次および三次構造に結合するそれらとを区別するために、非特許文献 2 3 は、タンパク質の二次および三次構造を破壊するためのジスルフィド結合の還元が、W N V E タンパク質の中和抗体を生じる能力を取り除いたことを示した。この実験は、中和抗体が E タンパク質の線状構造ではなく二次および三次立体構造に結合することを強く示唆した。このことを確認するために、非特許文献 2 4 は、M V E V E タンパク質で推定されるエピトープからペプチドを作製し、たった 1 つの作製された中和抗体を低いレベルのみで見出した。実際、以後の研究により、モノクローナル抗体は、通常、元々の E タンパク質または変性した E タンパク質およびそのペプチドのいずれにも結合することが示されている（非特許文献 2 5；非特許文献 2 6；非特許文献 2 4）。元々の構造に結合する抗体のみがウイルスを中和する。

20

【 0 0 0 9 】

E タンパク質のどの領域が中和抗体により攻撃されるかを正確に示すために、モノクローナル抗体による中和を回避したウイルスの変異が配列決定され、E タンパク質表面上でマッピングされた（非特許文献 2 7；非特許文献 1 2；非特許文献 2 2において総説された）。これらのデータは、おおよその構造モデルの作製を可能にし（非特許文献 2 8；非特許文献 2 9；非特許文献 3 0；非特許文献 2 4；非特許文献 3 1）、続いて、これらを洗練し、変異が X 線結晶学的方法により定義される 3 つのすべての構造ドメインにマッピングされることを示した（非特許文献 3 2；非特許文献 3 3；非特許文献 3 4；非特許文献 3 5；非特許文献 2 6；非特許文献 3 6；非特許文献 3 7；非特許文献 3 0）。このことは、抗体が 3 つのドメインのいずれかに結合することによりフラビウイルスを中和することができることを強く示唆する。それにもかかわらず、ほとんどの研究は、多くの中和モノクローナル抗体が変異の発生を免れたドメイン I I I に注目した（非特許文献 3 8）。ドメイン I I I はまた、いくつかの非中和抗体の結合部位である（非特許文献 3 9）。ドメイン I I I は、トリプシン耐性フラグメントとして精製されたビリオンから単離することができるか（非特許文献 4 0）、または組み換えタンパク質として作製することができる（非特許文献 4 1）が、中和モノクローナル抗体によるその反応性は、その単一のジスルフィド結合によるその立体構造の維持に依存する。いくつかの抗体は、膜融合移行期中のみにドメイン I 上に暴露されるペプチド（非特許文献 4 2）またはドメイン I I I の立体構造の変化を妨害する部位（非特許文献 4 3）に結合することにより、W N V を中和するようである。

30

40

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 1 】 Nowak, T., and G. Wengler (1987) "Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus" Virology 156:127-137.

【 非特許文献 2 】 Heinz, F. X., and C. Kunz (1982) "Molecular epidemiology of tic

50

k-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses" *J Gen Virol* 62 (Pt 2): 271-285.

【非特許文献 3】Heinz, F., and C. Kunz (1977) "Characterization of tick-borne encephalitis virus and immunogenicity of its surface components in mice" *Acta Virol* 21:308-316.

【非特許文献 4】Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss (2002) "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion" *Cell* 108:717-725.

【非特許文献 5】Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann, and R. J. Kuhn (2003) "Structure of West Nile virus" *Science* 302:248.

【非特許文献 6】Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison (1995) "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution" *Nature* 375:291-298.

【非特許文献 7】Sanchez, M. D., T. C. Pierson, D. McAllister, S. L. Hanna, B. A. Puffer, L. E. Valentine, M. M. Murtadha, J. A. Hoxie, and R. W. Doms (2005) "Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus" *Virology* 336:70-82.

【非特許文献 8】Lee, E., and M. Lobigs (2000) "Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry" *J Virol* 74:8867-8875.

【非特許文献 9】Bressanelli, S., K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquerry, J. Lescar, F. X. Heinz, and F. A. Rey (2004) "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation" *Embo J* 23:728-738.

【非特許文献 10】Heinz, F. X., C. W. Mandl, H. Holzmann, C. Kunz, B. A. Harris, F. Rey, and S. C. Harrison (1991) "The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization" *J Virol* 65:5579-5583.

【非特許文献 11】Stiasny, K., S. L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz, and F. X. Heinz (1996) "Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus" *J Virol* 70:8142-8147.

【非特許文献 12】Heinz, F. X., and J. T. Roehrig (1990) *Flaviviruses*, p. 289-305, *Immunochemistry of viruses*, vol. II. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.

【非特許文献 13】Bray, M., B. T. Zhao, L. Markoff, K. H. Eckels, R. M. Chanock, and C. J. Lai (1989) "Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis" *J Virol* 63:2853-2856.

【非特許文献 14】Heinz, F. X. (1986) "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins" *Adv Virus Res* 31:103-168.

【非特許文献 15】Jan, L. R., C. S. Yang, L. S. Henschal, H. Sumiyoshi, P. L. Summers, D. R. Dubois, and C. J. Lai (1993) "Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein" *Am J Trop Med Hyg* 48:412-423.

【非特許文献 16】Konishi, E., S. Pincus, E. Paoletti, R. E. Shope, T. Burrage, and P. W. Mason (1992) "Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV i

10

20

30

40

50

nfection" *Virology* 188:714-720.

【非特許文献 1 7】Mason, P. W., S. Pincus, M. J. Fournier, T. L. Mason, R. E. Shope, and E. Paoletti (1991) "Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection" *Virology* 180:294-305.

【非特許文献 1 8】Men, R. H., M. Bray, and C. J. Lai (1991) "Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice" *J Virol* 65:1400-1407.

【非特許文献 1 9】Pincus, S., P. W. Mason, E. Konishi, B. A. Fonseca, R. E. Shope, C. M. Rice, and E. Paoletti (1992) "Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis" *Virology* 187:290-297.

【非特許文献 2 0】Schlesinger, J. J., J. R. Putnak, and K. H. Eckels (1992) "New approaches to flavivirus vaccine development" *Biotechnology* 20:289-307.

【非特許文献 2 1】Heinz, F., and C. Kunz (1977) "Characterization of tick-borne encephalitis virus and immunogenicity of its surface components in mice" *Acta Virol* 21:308-316.

【非特許文献 2 2】Roehrig, J. T. (1986) The use of monoclonal antibodies in studies of the structural proteins of togaviruses and flaviviruses, p. 251-278. In S. Schlesinger and M. J. Schlesinger (ed.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York.

【非特許文献 2 3】Wengler, G., and G. Wengler (1989) "An analysis of the antibody response against West Nile virus E protein purified by SDS-PAGE indicates that this protein does not contain sequential epitopes for efficient induction of neutralizing antibodies" *J Gen Virol* 70 (Pt 4):987-992.

【非特許文献 2 4】Roehrig, J. T., A. R. Hunt, A. J. Johnson, and R. A. Hawkes (1989) "Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody" *Virology* 171:49-60.

【非特許文献 2 5】Guirakhoo, F., F. X. Heinz, and C. Kunz (1989) "Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH" *Virology* 169:90-99.

【非特許文献 2 6】Holzmann, H., G. Utter, E. Norrby, C. W. Mandl, C. Kunz, and F. X. Heinz (1993) "Assessment of the antigenic structure of tick-borne encephalitis virus by the use of synthetic peptides" *J Gen Virol* 74 (Pt 9):2031-2035.

【非特許文献 2 7】Heinz, F. X., R. Berger, W. Tuma, and C. Kunz (1983) "A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies" *Virology* 126:525-537.

【非特許文献 2 8】Cammack, N., and E. A. Gould (1986) "Topographical analysis of epitope relationships on the envelope glycoprotein of yellow fever 17D vaccine and the wild type Asibi parent virus" *Virology* 150:333-341.

【非特許文献 2 9】Kolaskar, A. S., and U. Kulkarni-Kale (1999) "Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus" *Virology* 261:31-42.

【非特許文献 3 0】Mandl, C. W., F. Guirakhoo, H. Holzmann, F. X. Heinz, and C. Kunz (1989) "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model" *J Virol* 63:564-571.

10

20

30

40

50

【非特許文献 3 1】Roehrig, J. T., J. H. Mathews, and D. W. Trent (1983) "Identification of epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies" *Virology* 128:118-126.

【非特許文献 3 2】Cecilia, D., and E. A. Gould (1991) "Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants" *Virology* 181:70-77.

【非特許文献 3 3】Gao, G. F., M. H. Hussain, H. W. Reid, and E. A. Gould (1994) "Identification of naturally occurring monoclonal antibody escape variants of louping ill virus" *J Gen Virol* 75 (Pt 3):609-614.

【非特許文献 3 4】Hasegawa, H., M. Yoshida, T. Shiosaka, S. Fujita, and Y. Kobayashi (1992) "Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice" *Virology* 191:158-165.

【非特許文献 3 5】Holzmann, H., K. Stiasny, M. Ecker, C. Kunz, and F. X. Heinz (1997) "Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice" *J Gen Virol* 78 (Pt 1):31-37.

【非特許文献 3 6】Jiang, W. R., A. Lowe, S. Higgs, H. Reid, and E. A. Gould (1993) "Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence" *J Gen Virol* 74 (Pt 5):931-935.

【非特許文献 3 7】Lin, B., C. R. Parrish, J. M. Murray, and P. J. Wright (1994) "Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2" *Virology* 202:885-890.

【非特許文献 3 8】Beasley, D. W., and A. D. Barrett (2002) "Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein" *J Virol* 76:13097-13100.

【非特許文献 3 9】Sanchez, M. D., T. C. Pierson, D. McAllister, S. L. Hanna, B. A. Puffer, L. E. Valentine, M. M. Murtadha, J. A. Hoxie, and R. W. Doms (2005) "Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus" *Virology* 336:70-82.

【非特許文献 4 0】Winkler, G., F. X. Heinz, and C. Kunz (1987) "Characterization of a disulphide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein" *J Gen Virol* 68 (Pt 8):2239-2244.

【非特許文献 4 1】Mason, P. W., J. M. Dalrymple, M. K. Gentry, J. M. McCown, C. H. Hoke, D. S. Burke, M. J. Fournier, and T. L. Mason (1989) "Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein" *J Gen Virol* 70 (Pt 8):2037-2049.

【非特許文献 4 2】Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, Koski RA, Modis Y. (2006) "Crystal structure of West Nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes" *J Virol*. Aug 30; [Epub ahead of print]

【非特許文献 4 3】Nybakken et al., 2005

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本願は、ウエストナイル (West Nile) ウイルス (WNV) ポリペプチドおよびそのフラグメントに関する多様な組成物、ならびに本明細書に記載の WNV ポリペプチドの発現をコード、指令するか、または WNV ポリペプチドを産生するポリヌクレオチド、ベクターおよび形質転換された宿主細胞を提供する。本明細書では、個体における免疫応答を生じさせるためのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いる方法、または WNV 特異的もしくは中和抗体の存在を検出する方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

【図 1】図 1 は、WO 97/48819 に記載のキャッサバベインモザイクウイルス (c a s s a v a v e i n m o s a i c v i r u s) (C s V M V) プロモーターおよびオープンリーディングフレーム 3' 非翻訳領域、ORF 23 3' UTR (GenBank 受入番号 X 0 0 4 9 3) v 1 を含有するプラスミド p D A B 2 4 0 6 を示す。C s V M V プロモーターと ORF 23 3' UTR v 1 との間に位置する、独特な部位、N c o I および S a c I を、目的の遺伝子を挿入するために用いた。

【図 2】図 2 は、ベクター p D A B 2 4 1 8 を表す。p D A B 2 4 1 8 は、R B 7 マトリックス付着領域 (M A R) (U.S. Patent No. 5,773,689; U.S. Patent No. 5,773,695; U.S. Patent No. 6,239,328、WO 94/07902、および WO 97/27207) および植物転写単位を 10
含み、ここで、植物選択マーカーホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (P A T) (U.S. Patent Nos: 5,879,903; 5,637,489; 5,276,268; および 5,273,894) は、A t U b i 1 0 プロモーター (Sun C.-W. et al., 1997; Norris, S.R. et al., 1993; Callis, J. et al, 1995) により促進され、下流に A t u O R F 1 3' UTR v 3 (US542 8147; Barker, R.F., et al., 1983; GenBank 受入番号 X 0 0 4 9 3) が配置される。R B 7 M A R 遺伝子と植物 A t U b i 1 0 プロモーターとの間に位置する独特な N o t I 部位を、C s V M V プロモーター、目的の遺伝子、および ORF 23 3' UTR v 1 を含む p D A B 2 4 0 6 から遺伝子フラグメントをクローニングするために使用した。

【図 3】図 3 は、改変された基本バイナリー (b a s i c b i n a r y) ベクター、p D A B 2 4 0 7 を示す。このバイナリーベクターを、p B B V (基本バイナリーベクター) の独特な B a m H I 部位において A g e I リンカーを付加し、T - D N A 境界間で W N V 抗原と選択マーカー発現カセットの A g e I / A g e I 連結を可能にすることにより構築した。 20

【図 4】図 4 は、E R 標的 v 2 および K D E L 残留の v 3 シグナル (配列番号 1 2) を有する、タバココドンでバイアス化された (c o d o n b i a s e d) ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルス膜およびエンベロープペプチド (バージョン 2) からなるキメラタンパク質をコードするウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルス双子葉 (d i c o t) バイナリーベクター p D A B 2 4 7 5 を表す。

【図 5】図 5 は、E R 標的 v 2 および K D E L 残留 v 3 シグナル (配列番号 8) を有する 30
タバココドンでバイアス化された、ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスプレ膜 v 2、膜およびエンベロープペプチド v 2 からなるキメラタンパク質をコードする双子葉バイナリーベクター (p D A B 2 4 7 8) を示す。

【図 6】図 6 は、E R 標的 v 2 および K D E L 残留 v 3 シグナル (配列番号 1 0) を有するタバココドンでバイアス化されたウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスプレ膜 v 2、膜 v 2、およびエンベロープペプチドからなるキメラタンパク質をコードする双子葉バイナリーベクター、p D A B 2 4 8 1 に関する。

【図 7】図 7 は、G a t e w a y (商標) 技術により 9 つのバイナリー構築物を構築するのに用いた目的ベクター、p D A B 3 7 3 6 を表す。

【図 8】図 8 は、G a t e w a y (商標) 技術により 9 つのバイナリー構築物を構築する 40
のに用いたドナーベクター、p D A B 3 9 1 2 を表す。

【図 9】図 9 は、G a t e w a y (商標) 技術により 9 つのバイナリー構築物を構築するのに用いたドナーベクター、p D A B 3 9 1 4 を表す。

【図 10】図 10 は、G a t e w a y (商標) 技術により 9 つのバイナリー構築物を構築するのに用いたドナーベクター、p D A B 3 9 1 6 を表す。

【図 11】図 11 は、G a t e w a y (商標) 技術により 9 つのバイナリー構築物を構築するのに用いたドナーベクター、p D A B 3 7 2 4 を表す。

【図 12】図 12 は、G a t e w a y (商標) W N V M E バイナリーベクター、p D A B 3 9 2 0 を示す。p D A B 3 9 2 0 は、T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V プロモーター v 2 / W N V M E v 2 / A t u O R F 2 3 3' UTR v 50

1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R
v 3 / 複数の T - D N A 境界 A をコードする。

【図 1 3】図 1 3 は、G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 2 2 を示す。p D A B 3 9 2 2 は、以下のエレメント：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / A t u M A S 4 O C S プロモーター v 4 / 1 5 k D a ゼイン E R v 2 - W N V M E v 2 - K D E L v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 1 4】図 1 4 は、G a t e w a y (商 標) ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスバイナリーベクター、p D A B 3 9 2 4 を表す。p D A B 3 9 2 4 ベクターは、以下のエレメント：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / A t U b i 1 0 プロモーター (G e n b a n k 受入番号 L 0 5 3 6 3) v 2 / 1 5 k D a ゼイン E R v 2 - W N V M E v 2 - K D E L v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 1 5】図 1 5 は、以下のエレメント：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V プロモーター v 2 / 1 5 k D a ゼイン E R シグナル v 2 - W N V M E v 2 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 2 7 に関する。

【図 1 6】図 1 6 は、G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 2 9 を提供する。p D A B 3 9 2 9 は、T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V プロモーター v 2 / N t o s m 5 ' U T R v 3 / 1 5 k D a ゼイン E R v 2 - W N V M E v 2 - K D E L v 3 / N t o s m 3 ' U T R v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 1 7】図 1 7 は、G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 3 4 である。このベクターは、以下のエレメント：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / O R F 2 5 / 2 6 3 ' U T R / K D E L v 3 / W N V M E v 3 / 1 5 k D a ゼイン E R シグナル v 2 (配列番号 1 4) / A t u M A S 4 O C S プロモーター v 4 / 1 5 k D ゼイン E R シグナル v 2 - W N V M E v 2 - K D E L v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 1 8】図 1 8 は、G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 4 1 を示す。p D A B 3 9 4 1 は、以下の成分：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V プロモーター v 2 / 1 5 k D ゼイン E R v 2 - W N V M E v 2 - K D E L v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 3 プロモーター v 2 / 1 5 k D ゼイン E R v 2 - W N V M E v 3 - K D E L v 3 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 1 9】図 1 9 は、G a t e w a y (商 標) バイナリーベクター、p D A B 3 9 4 3 を提供する。このベクターは、以下のエレメント：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V v 2 / 改変されたグリコシル化部位 (v 5) を有する W N V M v 2 E / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。

【図 2 0】図 2 0 は、E L I S A により検出されるごとく、p D A B 2 4 7 5 (E R 標的化、M E パージョン 2、K D E L) で形質転換された 1 4 日目のカルス事象の E タンパク質発現を提供する。

【図 2 1】図 2 1 は、E L I S A により検出されるごとく、p D A B 2 4 7 8 (E R 標的化、p r M E パージョン 2、K D E L) で形質転換された 1 4 日目のカルス事象の E タン

10

20

30

40

50

パク質発現を提供する。

【図 2 2】図 2 2 は、E L I S A により検出されるごとく、p D A B 2 4 8 1 (E R 標的化、改変されたグリコシル化部位を有する p r M E (バージョン 4)、K D E L) で形質転換された 1 4 日目のカルス事象の E タンパク質発現を提供する。

【図 2 3】図 2 3 は、p D A B 2 4 7 5、p D A B 2 4 7 8、および p D A B 2 4 8 1 で形質転換された事象間の発現レベルを比較する。p D A B 2 4 7 5 に由来する有意に高いタンパク質回収能を図に示す。

【図 2 4】図 2 4 は、ウエスタンブロットにより分析した選択事象由来のサンプル (1 4 日目のカルス) を示す。p D A B 2 4 7 5 事象の多くから、真正の成熟ビリオン E タンパク質の予想される ~ 5 4 k D a サイズで、全長 E タンパク質が検出された。

【図 2 5】図 2 5 は、p D A B 2 4 7 8 構築物により検出された全長 E タンパク質を発現する事象がより少なかったことを示す。

【図 2 6】図 2 6 は、p D A B 2 4 8 1 構築物により検出された全長 E タンパク質を発現する事象がより少なかったことを示す。

【図 2 7】図 2 7 は、p D A B 3 9 2 0、p D A B 3 9 2 2、p D A B 3 9 2 4、p D A B 3 9 2 7、p D A B 3 9 2 9、p D A B 3 9 4 3、p D A B 3 9 3 4 および p D A B 3 9 4 1 のすべての事象の 1 4 日目のカルス由来の E L I S A の結果を比較する。

【図 2 8】図 2 8 は、ウエスタンブロットにより分析した p D A B 3 9 2 0 および p D A B 3 9 2 2 の事象由来の 1 4 日目のカルスサンプルを示す。

【図 2 9】図 2 9 は、ウエスタンブロットにより分析した p D A B 3 9 2 4 および p D A B 3 9 2 7 の事象由来の 1 4 日目のカルスサンプルを示す。

【図 3 0】図 3 0 は、ウエスタンブロットにより分析した p D A B 3 9 2 9 および p D A B 3 9 3 4 の事象由来の 1 4 日目のカルスサンプルを示す。

【図 3 1】図 3 1 は、1 0 リットルの S T R 発酵実施中 (バッチ I D W N V S R D 0 5 0 0 6) の W N V 事象 1 6 2 2 - 2 0 7 のオンライン発酵プロファイルを示す。撹拌器の速度低下により、発酵終了時付近の酸素取り込み率が減少した。

【図 3 2】図 3 2 は、バッチ I D W N V S R D 0 5 0 0 6 の発酵残存物分析を提供する。

【図 3 3】図 3 3 は、バッチ I D W N V S R D 0 5 0 0 7 の発酵残存物分析を提供する。

【図 3 4】図 3 4 は、組み換えウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルス事象 1 6 2 2 - 2 0 7 および 1 6 2 2 - 2 1 0 について、9 日間にわたり調べられるごときタバコ (N . t o b a c u m) N T - 1 懸濁細胞における M E 産生の反応速度を示す。2 1 8 時間 (9 . 0 8 日間 ; X 軸の時間から 4 2 時間の前播種期間を差し引く) の 1 0 リットル撹拌タンクリアクタ発酵中の W N V エンベロープタンパク質の産生を示す。M E 事象 1 6 2 2 - 2 1 0 および 1 6 2 2 - 2 0 7 の最大容積生産性は、それぞれ、播種後 1 6 4 時間 (2 0 6 - 4 2 時間)、および 1 8 8 時間 (2 3 0 - 4 2 時間) に生じた。

【図 3 5】図 3 5 は、マウス臨床モデル研究 (研究 I) 由来の W N V 血清中和力価の図示を提供する。図を、> 2 5 6 0 の中和力価を 2 5 6 0 に変更し、そして < 2 0 の力価を 2 0 に変更し、各処置グループの血清中和幾何平均力価 (G M T) を算出することにより作製した。

【図 3 6】図 3 6 は、異なる抗原の用量および異なるアジュバントを用いた処方 (研究 I I) により示される変動性の応答を示す。

【0 0 1 3】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、p r M -、M -、および E - ペプチドをコードする G e n B a n k 受入 A F 1 9 6 8 3 5 由来のウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスのフラミンゴ単離体の元々の D N A 配列 (バージョン 1) である。元々の W N V p r M - M - E ペプチドをコードする領域は、2 0 0 4 塩基長であり、p r M ペプチド (塩基 1 ~ 2 7 6)、M - ペプチド (塩基 2 7 7 ~ 5 0 1) および E - ペプチド (塩基 5 0 2 ~ 2 0 0 4) をコー

10

20

30

40

50

ドする。

【 0 0 1 4 】

配列番号 2 は、配列番号 1 によりコードされる元々の p r M - 、 M - 、および E - ペプチドのアミノ酸配列である。p r M ペプチドはアミノ酸 1 ~ 9 2 であり、M - ペプチドはアミノ酸 9 3 ~ 1 6 7 であり、E - ペプチドはアミノ酸 1 6 8 ~ 6 6 8 である。

【 0 0 1 5 】

配列番号 3 は、p r M - 、 M - および E - ペプチドのタバコ最適化 D N A 配列 (バージョン 2) である。配列番号 3 は 2 0 0 4 塩基長であり、p r M - ペプチドは塩基 1 ~ 2 7 6 によりコードされ、M - ペプチドは塩基 2 7 7 ~ 5 0 1 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 5 0 2 ~ 2 0 0 4 によりコードされる。

10

【 0 0 1 6 】

配列番号 4 は、変異 N - グリコシル化部位を伴う p r M - 、 M - および E - ペプチドのタバコ最適化 D N A 配列 (バージョン 4) である。プロリンコドンは n t 9 6 7 ~ 9 6 9 であり、配列は 2 0 0 4 塩基長である。p r M - ペプチドは塩基 1 ~ 2 7 6 によりコードされ、M - ペプチドは塩基 2 7 7 ~ 5 0 1 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 5 0 2 ~ 2 0 0 4 によりコードされる。

【 0 0 1 7 】

配列番号 5 は、配列番号 4 によりコードされ、変異 N - グリコシル化部位を含有する p r M - 、 M - 、および E - ペプチドのアミノ酸配列である。プロリン残基は 3 2 3 位であり、配列は 6 6 8 アミノ酸長である。p r M - ペプチドはアミノ酸 1 ~ 9 2 であり、M - ペプチドはアミノ酸 9 3 ~ 1 6 7 であり、E - ペプチドはアミノ酸 1 6 8 ~ 6 6 8 である。

20

【 0 0 1 8 】

配列番号 6 は、M - および E - ペプチドをコードするタバコ最適化 D N A 配列 (バージョン 2) である。配列は 1 7 2 8 塩基長であり、M - ペプチドは塩基 1 ~ 2 2 5 によりコードされる。E - ペプチドは塩基 2 2 6 ~ 1 7 2 8 によりコードされる。

【 0 0 1 9 】

配列番号 7 は、M - および E - ペプチドをコードするタバコ最適化 D N A 配列 (バージョン 3) である。この配列は 1 7 2 8 塩基長であり、M - ペプチドは塩基 1 ~ 2 2 5 によりコードされる。E - ペプチドは塩基 2 2 6 ~ 1 7 2 8 によりコードされる。

30

【 0 0 2 0 】

配列番号 8 は、1 5 k D a ゼイン E R 標的シグナルペプチド、p r M - 、 M - および E - ペプチド (バージョン 2) 、ならびに K D E L を含むキメラタンパク質をコードするタバコ最適化 D N A 配列である。配列は 2 1 0 6 塩基長であり、1 5 k D a の E R 標的シグナルは塩基 1 ~ 6 6 によりコードされる。p r M - ペプチドは塩基 6 7 ~ 3 4 2 によりコードされ、M - ペプチドは塩基 3 4 3 ~ 5 6 7 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 5 6 8 ~ 2 0 7 0 によりコードされ、K D E L E R 残留シグナルは塩基 2 0 7 1 ~ 2 0 8 2 によりコードされ、6 フレーム停止は塩基 2 0 8 3 ~ 2 1 0 6 に位置する。

【 0 0 2 1 】

配列番号 9 は、配列番号 8 によりコードされるキメラ融合タンパク質のアミノ酸配列である。融合タンパク質は、6 9 4 アミノ酸長であり、1 5 k D a ゼイン E R 標的ペプチド (アミノ酸 1 ~ 2 2) 、p r M - ペプチド (アミノ酸 2 3 ~ 1 1 4) 、M - ペプチド (アミノ酸 1 1 5 ~ 1 8 9) 、E - ペプチド (アミノ酸 1 9 0 ~ 6 9 0) 、N - グリコシル化部位 (アミノ酸 3 4 3 ~ 3 4 5) および K D E L E R 残留シグナル (アミノ酸 6 9 1 ~ 6 9 4) を含有する。

40

【 0 0 2 2 】

配列番号 1 0 は、1 5 k D a ゼイン E R 標的シグナルペプチド、変異 N - グリコシル化部位を伴う p r M - 、 M - および E - ペプチド (バージョン 4) 、ならびに K D E L を含むキメラタンパク質をコードするタバコ最適化 D N A 配列である。配列は 2 1 0 6 塩基長であり、1 5 k D a の E R 標的シグナルは塩基 1 ~ 6 6 によりコードされ、p r M - ペプ

50

チドは塩基 6 7 ~ 3 4 2 によりコードされ、M - ペプチドは塩基 3 4 3 ~ 5 6 7 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 5 6 8 ~ 2 0 7 0 によりコードされ、K D E L E R 残留シグナルは塩基 2 0 7 1 ~ 2 0 8 2 によりコードされ、6 フレーム停止は塩基 2 0 8 3 ~ 2 1 0 6 に位置する。

【 0 0 2 3 】

配列番号 1 1 は、配列番号 1 0 によりコードされるキメラ融合タンパク質のアミノ酸配列である。ポリペプチドは 6 9 4 アミノ酸長であり、1 5 k D a ゼイン E R 標的ペプチドはアミノ酸 1 ~ 2 2 に位置する。p r M - ペプチドはアミノ酸 2 3 ~ 1 1 4 において見出され、M - ペプチドはアミノ酸 1 1 5 ~ 1 8 9 において見出され、E - ペプチドはアミノ酸 1 9 0 ~ 6 9 0 において見出され、変異 N - グリコシル化部位はアミノ酸 3 4 3 ~ 3 4 5 に存在し、K D E L E R 残留シグナルはアミノ酸 6 9 1 ~ 6 9 4 に存在する。

10

【 0 0 2 4 】

配列番号 1 2 は、1 5 k D a ゼイン E R 標的シグナルペプチド、M - および E - ペプチド (パージョン 2) ならびに K D E L を含むキメラタンパク質をコードするタバコ最適化 D N A 配列である。配列は 1 8 3 0 塩基長であり、1 5 k D a の E R 標的シグナルは塩基 1 ~ 6 6 によってコードされ、M - ペプチドは塩基 6 7 ~ 2 9 1 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 2 9 2 ~ 1 7 9 4 によりコードされ、K D E L E R 残留シグナルは塩基 1 7 9 5 ~ 1 8 0 6 によりコードされ、6 フレーム停止は塩基 1 8 0 7 ~ 1 8 3 0 を含んでなる。

20

【 0 0 2 5 】

配列番号 1 3 は、配列番号 1 2 によってコードされるキメラ融合タンパク質のアミノ酸配列である。この配列は 6 0 2 アミノ酸長であり、1 5 k D a ゼイン E R 標的ペプチドはアミノ酸 1 ~ 2 2 である。M - ペプチドはアミノ酸 2 3 ~ 9 7 に位置し、E - ペプチドはアミノ酸 9 8 ~ 5 9 8 に位置し、K D E L E R 残留シグナルはアミノ酸 5 9 9 ~ 6 0 2 において見出される。

【 0 0 2 6 】

配列番号 1 4 は、1 5 k D a ゼイン E R 標的シグナルペプチド、M - および E - ペプチド (パージョン 3) ならびに K D E L を含むキメラタンパク質をコードするタバコ最適化 D N A 配列である。この配列は 1 8 3 2 塩基長であり、1 5 k D a の E R 標的シグナルは塩基 6 ~ 6 8 によりコードされ、M - ペプチドは塩基 6 9 ~ 2 9 3 によりコードされ、E - ペプチドは塩基 2 9 4 ~ 1 7 9 6 によりコードされ、K D E L E R 残留シグナルは塩基 1 7 9 7 ~ 1 8 0 8 によりコードされ、6 フレーム停止は塩基 1 8 0 9 ~ 1 8 3 2 を含んでなる。

30

【 0 0 2 7 】

配列番号 1 5 は、配列番号 1 4 によってコードされるキメラ融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列は 6 0 1 アミノ酸長であり、1 5 k D a ゼイン E R 標的ペプチドはアミノ酸 1 ~ 2 1 である。M - ペプチドはアミノ酸 2 2 ~ 9 6 に位置し、E - ペプチドはアミノ酸 9 7 ~ 5 9 7 に位置し、K D E L E R 残留シグナルはアミノ酸 5 9 8 ~ 6 0 1 において見出される。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 8 】

本願は、以下の非制限的組成物、ならびに免疫原性ポリペプチドの産生においてこれらの組成物を用いる方法および個体において免疫応答を誘導する方法を提供する。それゆえ、本発明は、以下を含んでなる多様な組成物を提供する：

- a) 配列番号 5、9、1 1、1 3 もしくは 1 5 を含んでなる単離された、精製された、および / または組み換えポリペプチド；
- b) 配列番号 5、9、1 1、1 3、1 5 に記載のポリペプチドのフラグメント、または「 Y から Z 」である配列番号 5、9、1 1、1 3 もしくは 1 5 のフラグメント (ここで、Y は指定配列の N - 末端アミノ酸であり、そして Z は指定配列の C - 末端アミノ酸である)。それ故、配列番号 5 では、各フラグメントは、5 連続アミノ酸 ~ 6 6 7 連続アミノ酸

50

長の間であり得る。配列番号 9 および 11 の 5 ~ 693 連続アミノ酸の間を含有する各フラグメントは、本発明によって特に考慮される。同様に、配列番号 13 では、5 ~ 601 連続アミノ酸の間の各ポリペプチドフラグメントは、本発明によって特に考慮される。さらに、配列番号 15 の 5 ~ 600 連続アミノ酸の間に及ぶ各ポリペプチドフラグメントもまた、本発明によって特に考慮される。フラグメント「Y から Z」（ここで、Y は指定配列の N - 末端アミノ酸であり、そして Z は指定配列の C - 末端アミノ酸である）を、配列番号 5 については表 9、配列番号 9 および 11 については表 10、配列番号 13 については表 11 そして配列番号 15 については表 12 に提供する。本出願に記載のポリペプチドフラグメントは、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の全長ポリペプチドの対応する生物活性と実質的に同じである少なくとも 1 つの生物活性を有する。他の多様な例示的なポリペプチドフラグメントを、表 15 または 16 に記載する；

c) 個体に投与する場合中和抗体応答を生じる、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチド、または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のいずれか 1 つに記載の E - ペプチドのフラグメント；

d) 異種ポリペプチド配列をさらに含んでなる、具体例 a)、b) または c) のいずれか 1 つに記載のポリペプチド；

e) 具体例 a)、b)、c) または d) のいずれか 1 つに記載の植物由来のポリペプチド；

f) キャリア、および a)、b)、c)、d) または e) のいずれか 1 つに記載のポリペプチド（ここで、前記キャリアは、（任意選択的に、緩衝液中に懸濁される）植物、哺乳動物もしくは細菌発現系由来の細胞材料、アジュバントまたは薬学的に許容可能な賦形剤である）を含んでなる組成物；

g) 配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 を含んでなるポリペプチドをコードするか、または（b）または（c）に記載の配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の 1 つもしくはそれ以上のポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列（任意選択的に、ここで、前記ポリヌクレオチド配列は、少なくとも 40% および 50% 未満の G + C 含有量または表 13 に記載の G + C 含有量を有する）；

h) 配列番号 1 に少なくとも 70%（または表 14 において指定される百分率）同一であり、配列番号 2 を含んでなるポリペプチドをコードし、そして約 40% ~ 約 50% の間の G + C 含有量（または表 13 において指定される特定の G + C 含有量）を有するポリヌクレオチド配列；

i) （g）または（h）に記載のポリヌクレオチド配列のポリヌクレオチド配列少なくとも 8 連続ヌクレオチド；

j) 配列番号 3、4、6、7、8、10、12、もしくは 14、または配列番号 3、4、6、7、8、10、12、もしくは 14 の少なくとも 8 連続ヌクレオチドのフラグメントを含んでなるポリヌクレオチド配列；

k) （g）、（h）、（i）、または（j）に記載のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド；

l) 低、中もしくは高ストリンジェンシー下で、（g）、（h）、（i）、（i）または（k）に記載のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド；

m) （g）、（h）、（i）、（i）または（k）に記載のポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子構築物；

n) （g）、（h）、（i）、（i）、（j）、（k）もしくは（l）に記載のポリヌクレオチドまたは遺伝子構築物を含んでなるベクター；

o) （n）に記載のベクター、（m）に記載の遺伝子構築物、または（g）、（h）、（i）、（j）もしくは（k）のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞；

p) （n）に記載のベクター、（m）に記載の遺伝子構築物、または（g）、（h）、（i）、（j）もしくは（k）のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチドを含んでなるトランスジェニック植物、植物細胞、または植物部分；あるいは

10

20

30

40

50

q) (g)、(h)、(i)、(j)、(k)もしくは(l)によるポリヌクレオチド、および任意選択的に、標識またはマーカを含んでなるプローブ。

【0029】

本発明に関して、用語「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、同義的に使用することができるが；しかし、本発明は、天然の形態のポリペプチドにかかわるものではない、即ち、それらは、それらの天然の環境では存在しないが、ポリペプチドは、天然の供給源からの精製によって単離もしくは入手されていてもよく、あるいは遺伝子操作によって調製された宿主細胞から入手されていてもよい（例えば、ポリペプチド、またはそれらのフラグメントは、宿主細胞もしくは化学合成によって組み換え的に産生される）と理解すべきである。本発明によるポリペプチドはまた、以下に記載するような非天然アミノ酸を含有してもよい。用語「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」はまた、本明細書において、典型的に、隣接するアミノ酸の - アミノ基とカルボキシル基との間のペプチド結合によって、一方が他方に接続された一連の残基（典型的に、L - アミノ酸）を指し示すのに用いられる。リンカーエレメントは、以下に記載のように、ペプチド結合を介するか、または化学結合（例えば、ヘテロ二官能性化学リンカーエレメント）を介して、本発明のポリペプチドに結合されうる。さらに、用語「アミノ酸」および「残基」は、同義的に使用することができる。

10

【0030】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方に関して、用語「連続的」は、本願を通して用語「連続」または語句「連続スパン」と同義的に使用することができる。それ故、いくつかの具体例において、ポリヌクレオチドフラグメントは、少なくともXヌクレオチドの連続スパンと称されてもよく、ここで、Xは、5からはじまる任意の整数であり；本明細書に記載のフラグメントの上限は、特定のポリペプチド（例えば、配列番号9を含んでなるポリペプチド）をコードする全長配列において見出されるヌクレオチドの総数より1ヌクレオチド少ない。例えば、ポリペプチドフラグメントは、「少なくともXアミノ酸の連続スパン」と称されてもよく、ここで、Xは、5からはじまる任意の整数であり；そのようなポリペプチドフラグメントの上限は、特定のポリペプチド（例えば、配列番号5の667、配列番号9および11の693、配列番号13の601アミノ酸ならびに配列番号15の600アミノ酸）の全長配列において見出されるアミノ酸の総数より1アミノ酸少ない。本明細書で用いられるように、用語「整数」は、数学的な意味における整数（whole number）を指す。

20

30

【0031】

「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は同義的に使用することができ、本発明によると、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物（例えば、RNA分子）のいずれかを意味するものと理解される。また、本発明は、それらの天然の環境または天然の状態におけるゲノムのポリヌクレオチド配列にかかわらないことを理解すべきである。本発明の核酸、ポリヌクレオチド、またはヌクレオチド配列は、イオン交換クロマトグラフィー、分子サイズ排除クロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない分離方法によって、あるいは増幅、サブトラクティブハイブリダイゼーション、クローニング、サブクローニングもしくは化学合成、またはこれらの遺伝子操作方法の組み合わせのような遺伝子操作方法によって、単離、精製（または部分的に精製）することができる。用語「ポリヌクレオチドワクチン」および「DNAワクチン」もまた、本明細書において同義的に使用してもよい。

40

【0032】

用語「含んでなる」、「からなる」および「から本質的になる」は、それらの標準的な意味に従って定義される。各用語に関連する特定の意味に結びつけるために、本出願を通して、これらの用語を相互に置き換えることもできる。語句「単離された」または「生物学的に純粋な」は、それがその元々の状態において見出される場合、通常、材料に付随する成分を実質的または本質的に含まない材料を指す。それ故、本発明の単離されたペプチ

50

ドは、好ましくは、それらの *in situ* での環境において、通常、ペプチドに付随する材料を含有しない。「連結」または「結合」は、組み換え融合、共有結合、ジスルフィド結合、イオン結合、水素結合、および静電結合を含むが、これらに限定されないペプチドを機能的に結合するための当該技術分野において公知の任意の方法を指す。

【0033】

それ故、本発明は、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 を含んでなるポリペプチドおよび / または配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 のポリペプチドフラグメントを提供する。本発明によるポリペプチドフラグメントは、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の少なくとも 5 個の連続アミノ酸の連続スパンを含んでなる。本発明によるポリペプチドフラグメントは、少なくとも 5 個の連続アミノ酸から配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 の全長ポリペプチドより 1 アミノ酸少ない長さの任意の整数であり得る。配列番号 5 のフラグメントは、限界値を含む 5 ~ 667 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）を含有することができる。配列番号 9 または 11 について、ポリペプチドフラグメントは、限界値を含む 5 ~ 693 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）である。配列番号 13 について、ポリペプチドフラグメントは、限界値を含む 5 ~ 601 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）である。配列番号 15 について、ポリペプチドフラグメントは、限界値を含む 5 ~ 600 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）である。

10

【0034】

本発明の各ポリペプチドフラグメントはまた、その N 末端および C 末端位置に関して記載することもできる。さらに、本明細書に記載のポリペプチドフラグメントの具体例は、「少なくとも」、「同等な」、「同等またはそれより少ない」、「より少ない」、「少なくとも__であるが、__より多くない」または「Y から Z」であってもよく、ここで、Y は特定配列の N - 末端アミノ酸であり、Z は特定配列の C - 末端アミノ酸であり、フラグメントは少なくとも 5 アミノ酸長であり、Y および Z は、本明細書で開示される各ポリペプチドの対応するフラグメント長を特定する表（表 9、10、11、12、15、および 16 [表に列挙した位置は、添付の配列表で提供されるアミノ酸位置に対応する] を参照のこと）において同定されるそれらの整数により特定される（またはそれらから選択される）任意の整数である。表 10 から明らかなように、配列番号 9 および 11 のフラグメントの N - 末端アミノ酸は 1 ~ 690 の任意の整数であり得、C - 末端アミノ酸は、（限界値を含む 5 ~ 694 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）であるフラグメント長に依存する）5 ~ 694 の任意の整数である。（表 9 で示される）配列番号 5 のフラグメントについて、N - 末端アミノ酸は 1 ~ 664 の任意の整数であり得、C - 末端アミノ酸は、（限界値を含む 5 ~ 667 の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）であるフラグメント長に依存する）5 ~ 667 の任意の整数である。（表 11 で示される）配列番号 13 のフラグメントについて、N - 末端アミノ酸は 1 ~ 598 の任意の整数であり得、C - 末端アミノ酸は、（限界値を含む 5 ~ 601 アミノ酸の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）であるフラグメント長に依存する）5 ~ 602 の任意の整数である。（表 12 で提供される）配列番号 15 について、N - 末端アミノ酸は 1 ~ 597 の任意の整数であり得、C - 末端アミノ酸は、（限界値を含む 5 ~ 600 アミノ酸の間の連続アミノ酸の任意の数（整数）であるフラグメント長に依存する）5 ~ 601 の任意の整数である。他で特に示さない限り、本発明のいずれの具体例を記載するのに使用されるすべての範囲が含まれ、所定のポリペプチドのフラグメントは任意の整数の長さであり得るが、但し、ポリペプチドフラグメントの長さは、配列番号 5、9、11、13 もしくは 15 において同定されるポリペプチドより少なくとも 1 アミノ酸短いことに注意する。この概念を示すために、表 12 によって提供される 598 アミノ酸長である 4 つのフラグメントを提供する。それ故、多様なポリペプチドフラグメントが次のように定義される：ここで、Y は配列番号 15 の 1 位であり、Z は配列番号 15 の 598 位である（ペプチドは 598 アミノ酸長である）；ここで、Y は配列番号 15 の 2 位であり、Z は配列番号 15 の 599 位である（ペプチドは 598 アミノ酸長である）；ここで、Y は配列番号 15 の 3 位であり、Z は配列番号 15 の 600 位である（ペプチドは 598 アミノ酸長である）；ここで、Y は配列番号 15 の 4 位で

20

30

40

50

あり、Zは配列番号15の601位である（ペプチドは598アミノ酸長である）。

【0035】

本発明はまた、配列番号5、9、11、13もしくは15の特定の残基に及ぶ（連続スパンまたは少なくとも5個の連続アミノ酸の連続スパンを含んでなる）多様なポリペプチドフラグメントを提供する。配列番号9および11では、好適なフラグメントは、1～22位のアミノ酸の少なくとも1個〔即ち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21もしくはすべての22個のアミノ酸〕、配列番号9または11の343～345位のアミノ酸の少なくとも1個、2個もしくは3個、および配列番号9または11に記載のアミノ酸691～694の少なくとも1個、2個、3個もしくはすべての4個を含む少なくとも5個の連続アミノ酸のフラグメントを含む。アミノ酸のこれらの組み合わせのうちのいくつかを例示する非限定的な例を、表15または16に記載する。配列番号5では、特定の具体例は、アミノ酸323に及ぶ少なくとも5個の連続アミノ酸のそれらのフラグメントのいずれかを提供する。配列番号13では、本発明の多様な具体例は、配列番号13の1～22位のアミノ酸の少なくとも1個；および/または配列番号13の599～602位のアミノ酸の少なくとも1個、2個、3個、もしくは4個に及ぶか、あるいはこれらを含む少なくとも5個の連続アミノ酸のポリペプチドフラグメントを提供する。配列番号15に関して、例示的ポリペプチドフラグメントは、配列番号15の1～21位および/または598～601位のアミノ酸の少なくとも1個に及ぶか、あるいはこれらを含むポリペプチドフラグメントを含む。また、さらなるポリペプチドフラグメントを表15および16に記載する。本発明のいくつかの態様では、好適なポリペプチドフラグメントは、配列番号5、9、11、13または15において同定される完全なE-ペプチド配列である。

10

20

【0036】

本明細書に記載のフラグメントは、（トリプシン、キモトリプシン、もしくはコラゲナーゼのような）タンパク質分解酵素または臭化シアン（CNBr）のような化学試薬で本発明のポリペプチドを切断することにより入手することができる。あるいは、ポリペプチドフラグメントは、高酸性環境、例えば、pH2.5で作製することができる。そのようなポリペプチドフラグメントは、化学合成によっても、または本発明による発現ベクターで形質転換された宿主を使用しても、等しく良好に調製することができる。形質転換された宿主細胞は、ポリペプチドフラグメントの調節および/または発現のための適切なエレメントの制御下で、これらのフラグメントの発現を可能にする核酸を含有する。

30

【0037】

一定の好適な具体例では、本明細書において開示するポリペプチドのフラグメントは、そのフラグメントが由来する全長ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的特性または生物活性を残留する（そのようなフラグメントはまた、「生物学的に活性なフラグメント」とも称され得る。それ故、配列番号5、9、11、13もしくは15により提供されるポリペプチドの全長ポリペプチドとフラグメントの両方は、1つもしくはそれ以上の以下の特性または生物学的活性：1）配列番号5、9、11、13もしくは15に特異的な抗体に特異的に結合する；2）ウエストナイル（West Nile）ウイルスに感染した動物もしくは人において見いだされる抗体および/またはウエストナイル（West Nile）感染性ウイルス（ウイルスが宿主もしくは標的細胞に感染する能力）を中和する抗体に特異的に結合する能力；ウエストナイル（West Nile）ウイルスに感染した動物またはヒトから単離または誘導されるMHCクラスIもしくはクラスII抗原に関して、T細胞受容体（CTL（細胞傷害性Tリンパ球）および/またはHTL（ヘルパーTリンパ球受容体））に結合し、活性化する能力；3）動物またはヒトにおいてウエストナイル（West Nile）ウイルスに対する免疫応答を誘導する能力；4）動物またはヒトにおいてウエストナイル（West Nile）ウイルスに対する防御免疫応答を誘導する能力；ならびに/あるいは5）1つもしくはそれ以上の前記ポリペプチドで免疫した動物/個体においてウエストナイル（West Nile）ウイルス中和抗体（中和抗体とも称される）の産生を誘導する能力を有する。

40

50

【 0 0 3 8 】

植物発現系が、本願において提供されるポリペプチド、またはそのフラグメントの産生に用いられる場合、精製されたポリペプチドを含んでなる組成物は、植物細胞成分（例えば、細胞壁、植物細胞膜の細胞マトリックスおよび炭水化物など）または植物細胞マトリックス成分を含むことができる。同様に、真核細胞または原核細胞発現系が、本発明のポリペプチド、またはそのフラグメントの産生に用いられる場合、それぞれの各発現系の細胞膜または細胞壁成分は、部分的に精製されたポリペプチドを含んでなる組成物中に存在してもよい。

【 0 0 3 9 】

本発明のポリペプチド（もしくはそのフラグメント）は、単量体または多量体（例えば、二量体、三量体、四量体、およびより高い多量体）であってもよい。従って、本発明は、本発明のポリペプチドの単量体および多量体、それらの調製、ならびにそれらを含む組成物に関する。本明細書に記載の多量体ポリペプチドは、疎水結合、親水結合、イオン結合および/または共有結合により形成されてもよく、ならびに/あるいは例えば、リポソーム形成により間接的に連結されていてもよい。それ故、1の具体例では、本発明のポリペプチドが溶液中で相互に接触する場合、例えば、ホモ二量体またはホモ三量体のような本発明の多量体が形成される。別の具体例では、本発明のポリペプチドが溶液中で（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）本発明のポリペプチドに対する抗体と接触する場合、例えば、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体のような本発明のヘテロ多量体が形成される。他の具体例では、本発明の多量体は、本発明のポリペプチドとの共有結合および/または本発明のポリペプチド間の共有結合によって形成される。そのような共有結合の1つの非限定的な例は、Ig重鎖に融合された配列番号5、9、11、13もしくは15（またはそのフラグメント）を含んでなるポリペプチドを含んでなる本発明の融合タンパク質によって提供されるような免疫グロブリン重鎖間のジスルフィド結合の形成である（例えば、U.S. Patent No. 5,478,925（その開示内容は出典明示により全体が本明細書に援用される）を参照のこと）。共有結合した多量体を形成することが可能な融合タンパク質の別の例は、オセテオプロテゲリン（osteoprotegerin）である（例えば、International Publication No. WO 98/49305（出典明示によりその全体が本明細書に援用される）を参照のこと）。別の具体例では、本発明の2つもしくはそれ以上のポリペプチドが、ペプチドリンカーを介して結合される。例として、U.S. Patent No. 5,073,627（本明細書において参考として援用される）に記載のペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーにより分離される本発明の多数のポリペプチドを含んでなるタンパク質は、従来の組み換えDNA技術を用いて産生されてもよい。

【 0 0 4 0 】

他の多量体ポリペプチドは、本発明のポリペプチドをロイシンジッパーまたはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合させることにより形成させることができる。ロイシンジッパーおよびイソロイシンジッパードメインは、それらが見出されるタンパク質の多量体形成を促進するポリペプチドである。本発明の可溶性多量体タンパク質を産生するのに適当なロイシンジッパードメインの非限定的な例は、出典明示より援用されるPCT出願 WO 94/10308に記載のものである。溶液中で二量体化または三量体化するポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドを含んでなる組み換え融合タンパク質は、適当な宿主細胞において発現され、生じた可溶性多量体融合タンパク質は、当該技術分野で公知の技術を用いて培養上清から回収される。

【 0 0 4 1 】

多量体ポリペプチドはまた、当該技術分野において公知の化学的技術を使用して、作製することができる。例えば、本発明の多量体に含有されることが所望されるポリペプチドは、当該技術分野において公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を用いて化学的に架橋させてもよい（例えば、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるU.S. Patent Number 5,478,925を参照のこと）。さらに、多量体ポリペプチドは、多量体が

リペプチドを構築するのに用いられるポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間にジスルフィド結合を導入することにより作製することができる（例えば、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるU.S. Patent No. 5,478,925を参照のこと）。さらに、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのC末端またはN末端へのシステインもしくはビオチンの付加により慣用的に改変されてもよく、当該技術分野において公知の技術を適用して、1つもしくはそれ以上のこれらの改変されたポリペプチドを含有する多量体を作製してもよい（例えば、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるU.S. Patent No. 5,478,925を参照のこと）。さらに、当該技術分野において公知の他の技術を適用して、本発明の多量体に含有されることが所望されるポリペプチド成分を含有するリボソームを作製してもよい（例えば、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるU.S. Patent No. 5,478,925を参照のこと）。

10

【0042】

本明細書において提供されるポリペプチド、ならびにそのフラグメントは、さらに、フラグメントの他の分子、アミノ酸、またはポリペプチド配列への結合を容易にするリンカーエレメント（L）を含んでなり得る。また、アフィニティー精製プロトコルの使用のために、リンカーを使用して、ポリペプチド、またはそのフラグメントを固相支持体マトリックスに結合させることができる。本発明の実施に適当な「リンカー」の非限定的な例として、（イリノイ州、ロックフォードのPierceにより市販されるものごとき）化学リンカー、またはポリペプチドの結合組み合わせを可能にするペプチドが挙げられる（出典明示により全体が本明細書に援用されるU.S. Patent Nos. 6,121,424、5,843,464、5,750,352、および5,990,275を参照のこと）。

20

【0043】

他の具体例では、リンカーエレメント（L）は、アミノ酸配列（ペプチドリinker）であり得る。いくつかの具体例では、ペプチドリinkerは、1つもしくはそれ以上の以下の特徴を有する：a）それは、（相互に）連結するポリペプチドの自由な回転を可能にする；b）それは、プロテアーゼによる消化（切断）に耐性または感受性である；ならびにc）それは、互いに結合するポリペプチドに相互作用しない。様々な具体例では、本発明による多量体構築物はペプチドリinkerを含み、ペプチドリinkerは5～60アミノ酸長である。より好ましくは、ペプチドリinkerは10～30アミノ酸長であり；なおより好ましくは、ペプチドリinkerは10～20アミノ酸長である。いくつかの具体例では、ペプチドリinkerは17アミノ酸長である。

30

【0044】

本発明における使用に適当なペプチドリinkerは、Gly、Ser、Asn、ThrおよびAlaからなる群から選択されるアミノ酸から構成される。好ましくは、ペプチドリinkerはGly-Serエレメントを含む。好適な具体例では、ペプチドリinkerは、(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_yを含んでなり、ここで、yは1、2、3、4、5、6、7、または8である。他の具体例は、((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y-Ser-Pro)を含んでなるペプチドリinkerを提供する。一定の好適な具体例では、yは3、4、または5の値である。他の好適な具体例では、ペプチドリinkerは、(Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_yまたは((Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_y-Ser-Pro)を含んでなり、ここで、yは1、2、3、4、5、6、7、もしくは8である。一定の好適な具体例では、yは3、4、または5の値である。切断可能なリンカーエレメントを所望する場合、Factor Xaまたはエンテロキナーゼ（カリフォルニア州、サンディエゴのInvitrogen）のような1つもしくはそれ以上の切断可能なリンカー配列を、単独または上記のリンカーとの組み合わせで使用することができる。

40

【0045】

本発明の多量体構築物はまた、任意選択的に、他のエレメントが散在する一連の反復エレメントを含んでなることができる。当業者に理解されるように、反復エレメントが多量体ポリペプチドにおいて生じる順番はそれほど重要ではなく、本明細書に記載の反復エレ

50

メントのいずれの配置が、本発明により提供されうる。それ故、本発明による「多量体構築物」は、任意選択的に、（化学リンカーエレメントまたはアミノ酸リンカーエレメントのいずれか一方の）リンカーエレメントによって一緒に結合される一連のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントを含んでなる多量体ポリペプチドを提供することができる。

【0046】

本発明による融合タンパク質は、1つもしくはそれ以上の異種ポリペプチド配列（例えば、本発明のポリペプチドの精製を容易にするタグ（例えば、出典明示により全体を本明細書に援用するU.S. Patent No. 6,342,362；それぞれ、出典明示により全体を本明細書に援用するAltendorf et al., (1999-WWW, 2000)；Baneyx, (1999)；Eihauer et al., (2001)；Jones et al. (1995)；Margolin (2000)；Puig et al., (2001)；Sassenfeld (1990)；Sheibani (1999)；Skerra et al., (1999)；Smith (1998)；Smyth et al., (2000)；Unger (1997)を参照のこと）、またはS T R A T A G E N E（カリフォルニア州、ラ・ホイヤ）、N O V A G E N（ウィスコンシン州、マディソン）、Q I A G E N, I n c.（カリフォルニア州、パレンシア）、もしくはI n V i t r o g e n（カリフォルニア州、サンディエゴ）のごとき製造業者から市販されているタグを含んでなる。

10

【0047】

他の具体例では、本発明のポリペプチド（例えば、配列番号5、9、11、13、15またはそのフラグメント）を、アジュバント活性を有する異種ポリペプチド配列（ポリペプチドアジュバント）に融合させることができる。このようなポリペプチドの非限定的な例として、熱ショックタンパク質（h s p）（例えば、出典明示により全体が本明細書に援用されるU.S. Patent No. 6,524,825を参照のこと）が挙げられる。

20

【0048】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントを提供し、ウエストナイル（W e s t N i l e）ウイルスに対する免疫応答を誘発することが可能なペプチドであって、前記免疫応答が、前記ポリペプチドのフラグメントに反応性の成分（B細胞、抗体、および/または細胞性免疫応答の成分（例えば、ヘルパー、細胞傷害性、および/またはサプレッサーT細胞）の成分）を提供するものであるペプチド；本明細書で開示される無傷な全長の改変されていないポリペプチド；あるいはポリペプチドのフラグメントおよび本明細書で開示される無傷な全長の改変されていないポリペプチドの両方を含む。一定の具体例は、ウエストナイル（W e s t N i l e）ウイルス中和抗体を産生する抗体応答を誘導する方法を提供する。

30

【0049】

本願はまた、配列番号5、9、11、13もしくは15（またはそのフラグメント）を含んでなる少なくとも1つの単離された、組み換え、または精製されたポリペプチドおよび少なくとも1つのさらなる成分を含んでなる組成物を提供する。本発明の多様な態様では、さらなる成分は、固相支持体（例えば、マイクロタイターウェル、磁気ビーズ、非磁気ビーズ、アガロースビーズ、ガラス、セルロース、プラスチック、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ニトロセルロース、ナイロン、またはポリスルホン）である。さらなる成分はまた、当業者に公知の薬学的に許容可能な賦形剤またはアジュバントであり得る。本発明のいくつかの態様では、固相支持体は、本発明のポリペプチドのアレイ、または本発明の様々なポリペプチドの組み合わせを含んでなるポリペプチドのアレイを提供する。本発明の他の態様は、植物細胞成分（例えば、細胞壁、植物細胞膜の細胞マトリックスおよび炭水化物など）または植物細胞マトリックス成分を含む精製されたポリペプチドを含んでなる組成物を提供する。同様に、真核細胞または原核細胞発現系が本出願により提供されるポリペプチドまたはポリペプチドのフラグメントの産生に用いられる場合、それぞれの各発現系の細胞膜または細胞壁成分は、部分的に精製されたポリペプチドを含んでなる組成物中に存在してもよい。

40

【0050】

本発明はまた、個体において免疫応答を誘導するのに十分な量で本発明によるポリペ

50

チドを含んでなる組成物の個体への投与を含んでなる、個体において免疫応答を誘発するための方法を提供する。いくつかの具体例では、「防御」または「治療的免疫応答」が個体において誘導される。「防御免疫応答」または「治療的免疫応答」は、感染性ウエストナイル（West Nile）ウイルスを中和するか、またはCTL（もしくはCD8⁺T細胞）および/またはHTL（もしくはCD4⁺T細胞）を誘導する抗体産生の誘導、ならびに/あるいは個体における病態、副作用もしくは進行を予防、減少または少なくとも部分的に停止させる抗体応答を指す。例えば、防御免疫応答が誘導されている個体は、死亡率の減少を示し、および/または免疫されていないコントロール個体と比較して、ウイルス出芽の減少を示すことができる。防御免疫応答はまた、ヘルパーT細胞（またはCD4⁺T細胞）の刺激により促進された抗体応答を含んでもよい。個体において免疫応答を誘導するさらなる方法は、出典明示によりその全体が本明細書で援用されるU.S. Patent No. 6,419,931において教示されている。CTLという用語は、本願を通して、CD8⁺T細胞と同義的に使用することができ、HTLという用語は、CD4⁺T細胞と同義的に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0051】

本出願に関して、個体は、トリ、ならびに/あるいは類人猿、チンパンジー、オランウータン、ヒト、サルまたはイヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ウサギ、フェレット、ウシ、ウマ、ヤギおよびヒツジのごとき愛玩（domesticated）動物（ペット）のごとき哺乳動物を指すが、これらだけに限定されない。鳥類またはトリは、本明細書では、典型的に、翼に改変された前肢、鱗状の肢、くちばしを有し、硬い殻の卵で子を産む鳥綱の温血脊椎動物メンバーとして定義される。本明細書の目的のために、トリの好適な群は、愛玩ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、アヒル、ガチョウ、ハクチョウ、コーニッシュゲームヘンおよびペットとして飼われるかまたは動物園の展示のための珍しい鳥類である。

【0052】

投与することまたは投与するは、個体の体への物質の導入として定義され、経口、経鼻、眼、直腸、膣および非経口経路を含む。組成物は、皮下（SQ）、筋肉内（IM）、静脈内（IV）、腹腔内（IP）、皮内（ID）、経皮（TD）、または経鼻、眼、経口、もしくは直腸粘膜を含むが、これらに限定されない任意の投与経路を介して個々に、または他の薬剤との組み合わせで投与されてもよい。

【0053】

個体に投与される組成物は、任意選択的に、アジュバントを含有してもよく、免疫原の被験体への送達のために、当該技術分野で知られるいずれかの手法で送達されてもよい。組成物はまた、E.W. Martin's Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載のような、例えば、薬学的に許容可能なキャリアを含む任意のキャリアで処方されてもよい。好適な具体例では、組成物は、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、またはアルミニウム（alum）で処方されてもよい。本発明の実施において使用することができる他の非限定的な例として：油-水エマルジョン、Polygen、Carbigen（Carbopol 974P NF）またはTiter-Max（BlockコポリマーCRL-8941、スクアレンおよび独特なマイクロ粒子安定剤）が挙げられる。

【0054】

他の具体例では、本発明は、ウエスタンブロット形式または当業者に公知の標準的なイムノアッセイに基づき、配列番号5、9、11、13もしくは15を含んでなるか、これらから本質的に構成されるか、またはこれらからなるポリペプチドを利用する診断アッセイを提供する。例えば、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、側方流動分析、逆流クロマトグラフィー結合アッセイ（例えば、出典明示により全体が本明細書に援用されるU.S. Pat. No. 5,726,010を参照のこと）、免疫クロマトグラフストラップアッセイ、自動化流動分析、およびペプチド含有バイオセンサを利用するアッセイのような抗体に基づくアッセイを、本発明によって提供されるポリペプチド（または

そのフラグメント)に結合する抗体の検出に用いてもよい。アッセイおよびアッセイを行うための方法は当該技術分野において周知であり、方法は、本発明のポリペプチドに結合する抗体の存在について、生物学的サンプル(例えば、血清、血漿、もしくは血液)を定性的(抗体の有無)または定量的(本発明のポリペプチドを用いて調製される標準曲線に対するサンプルの比較)に試験してもよい。

【0055】

抗体に基づくアッセイは、4つのタイプ:直接結合アッセイ、サンドイッチアッセイ、競合アッセイ、および置換アッセイを考えることができる。直接結合アッセイでは、抗体または抗原のいずれか一方を標識し、形成される複合体の数を測定する手段である。サンドイッチアッセイでは、少なくとも3つの成分の複合体(例えば、抗体-抗原-抗体)の形成を測定する。競合アッセイでは、標識された抗原と標識されていない抗原が抗体への結合について競合し、結合されるかまたは遊離される成分のいずれか一方が測定される。置換アッセイでは、標識された抗原が抗体に予め結合され、標識されていない抗原が受容体に結合され、次いで標識されていない抗原が受容体から結合され標識された抗原と置き換わる時のシグナルの変化を測定する。

10

【0056】

側方流動分析は、U.S. Patent No. 5,712,170および前記文献中で引用される参考文献の教示により行うことができる。U.S. Patent No. 5,712,170および前記文献中で引用される参考文献は、出典明示によりそれらの全体が本明細書に援用される。置換アッセイおよび置換アッセイを行うのに有用なフロー免疫センサについては:Kusterbeck et al., (1990); Kusterbeck et al., (1990a); Ligler et al., (1992); Ogert et al., (1992)に記載されており、それらのすべてはまた、出典明示によりそれらの全体が本明細書に援用される。置換アッセイおよびフロー免疫センサはまた、U.S. Patent No. 5,183,740に記載されており、これもまた、出典明示より全体が本明細書に援用される。置換イムノアッセイは、小分子を検出するために使用されるほとんどの競合イムノアッセイとは異なり、抗原濃度の増加に伴って陽性シグナルを生じることができる。

20

【0057】

本発明はまた、本発明のポリペプチド(例えば、配列番号5、9、11、13もしくは15、またはその抗体結合フラグメント)に抗体を結合させる方法であって、抗体-抗原複合体の形成を可能にする条件下で、抗体を含有するサンプルとポリペプチドとを接触させることを含んでなる、上記方法を提供する。これらの方法は、さらに、前記抗体-抗原複合体の形成を検出する工程を含んでなることができる。この方法の多様な態様では、イムノアッセイは、サンプル中のウエストナイル(West Nile)ウイルス特異的抗体の検出のために行われる。そのようなイムノアッセイの非限定的な例として、酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、側方流動アッセイ、免疫クロマトグラフストラップアッセイ、自動化流動分析、ウエスタンブロット、免疫沈降アッセイ、逆流クロマトグラフィー結合アッセイ、凝集アッセイ、およびバイオセンサが挙げられる。本発明のさらなる態様は、ウエストナイル(West Nile)ウイルスに特異的な抗体を検出する上記の方法を行う場合、ポリペプチドのアレイの使用を提供する(アレイは、配列番号5、9、11、13もしくは15に記載のポリペプチド(またはそのフラグメント)のうちの少なくとも1つを含有することができ、また、同一のまたは異なるウイルス由来の他のポリペプチドを含有することができ)。

30

40

【0058】

本発明はまた、本発明のポリペプチドに結合する抗体に関する。具体的には、本明細書に記載のポリペプチドに免疫特異的である抗体が考えられる。様々な具体例では、他の既知のウエストナイル(West Nile)ウイルスポリペプチドと交差反応しない抗体が好適である。特に好適な抗体は、ウエストナイル(West Nile)ウイルスの既知の株に由来するポリペプチドに対して産生される抗体と交差反応しない。本発明の抗体は、当該技術分野で知られる一般的な材料と方法を使用して調製することができる(例えば、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 1983; Monoclonal Hybridoma

50

Antibodies: Techniques and Applications, 1982; Selected Methods in Cellular Immunology, 1980; Immunological Methods, Vol. II, 1981; Practical Immunology, and Kohler et al., 1975; Letchworth and Appleton, 1984を参照のこと)。これらの抗体は、さらに、固相支持体、キャリアもしくは薬学的に許容可能な賦形剤、または標識のような1つもしくはそれ以上のさらなる成分を含むことができる。

【0059】

用語「抗体」は、所望される生物活性、特に中和活性を示す限り、(全長モノクローナル抗体を含む)モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメントを含む。「抗体フラグメント」は、全長抗体の部分、一般的に、その抗原結合または可変領域を含んでなる。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント;二重特異性抗体(dibody);線状抗体(linear antibody);単鎖抗体分子;ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。特に好適な本発明による抗体は、当該技術分野において改変されていない公知のWNVポリペプチドに結合しない抗体である。

10

【0060】

本明細書に記載の用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、その集団を含んでなる個々の抗体が少量存在し得る天然に存在する可能性のある変異を除いて同一であるものを指す。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して極めて特異的である。さらに加えて、典型的に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物と比較して、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られるものとして抗体の特徴を示し、いずれの特定の方法による抗体の産生を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明により用いられるモノクローナル抗体は、Kohler et al., (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組み換えDNA法(例えば、U.S. Patent No. 4,816,567を参照のこと)によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al. (1991)およびMarks et al. (1991)に記載の技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。

20

【0061】

本明細書に記載のモノクローナル抗体として、所望の生物学的活性を示す限り、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において対応する配列に同一もしくは相同である一方、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において対応する配列に同一もしくは相同である、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびにかかる抗体のフラグメントが挙げられる(U.S. Patent No. 4,816,567; およびMorrison et al., (1984))。また、配列番号5、9、11、13もしくは15に記載のポリペプチド、またはそのフラグメントに特異的に結合するヒト化抗体も含まれる(例えば、出典明示により全体が本明細書に援用され、ヒト化抗体を作製する方法を教示するU.S. Patent Nos. 6,407,213または6,417,337を参照のこと)。

30

40

【0062】

「単鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含んでなり、ここで、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、さらに、V_HおよびV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、sFvが抗原結合に所望される構造を形成することを可能にしている。sFvの総説については、Pluckthun (1994)を参照のこと。

【0063】

用語「二重特異性抗体」は、2つの抗原-結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、このフラグメントは、同一ポリペプチド鎖(V_H-V_L)に軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合された重鎖可変ドメイン(V_H)を含んでなる。二重特異性抗体は、例えば、

50

EP 404,097 ; WO 93/11161 ; および Holliger et al. (1993) により詳細に記載されている。用語「線状抗体」は、Zapata et al. (1995) に記載の抗体を指す。

【0064】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から同定され、分離および/または回収された抗体である。その天然環境の混入した成分は、抗体の診断または治療用途を妨げる材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好適な具体例では、抗体は、(1) ローリー法により調べられる場合、抗体の95重量%を超えるまで、最も好ましくは、99重量%を超えるまで、(2) スピニングカップシーケネーター (spinning cup sequenator) の使用によりN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3) クマシーブルー、または好ましくは、銀染色を使用する、還元または非還元条件下のSDS-PAGEにより均一性となるまで、精製される。抗体の天然環境の少なくとも1つの構成成分が存在しないため、単離された抗体には、組み換え細胞内のin situにおける抗体も含まれる。しかし、通常では、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0065】

上述に記載されるように、「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は同義的に使用することができ、本発明により、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは前記DNAの転写産物(例えば、RNA分子)のいずれかを意味するものと理解される。

【0066】

20.00%~99.99%の間の同一性パーセントの範囲は、0.01%の間隔で、20.00%~99.99%(この値を含む)の間の分画百分率(fractional percentage)のいずれについても、記載要件およびサポート要件を含み、提供するものとみなされる。これらの百分率は純粋な統計であり、2つの核酸配列間の差異は、無作為かつ配列長全体にわたって分布し得る。例えば、相同配列は、本発明の配列と、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99パーセントの同一性パーセントを示すことができる。典型的に、同一性パーセントは、全長の元々のおよび/または天然に存在するポリヌクレオチドを参考にして算出される。2つもしくはそれ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関する用語「同一」または「同一性」パーセントは、同一であるか、あるいは配列比較アルゴリズムを使用するかまたは手動アラインメントおよび目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウにわたり最大の対応について比較され、アラインされる場合、同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定された百分率を有する2つもしくはそれ以上の配列または部分配列を指す。

【0067】

タンパク質および核酸配列相同性の両方は、当該技術分野において公知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムのいずれかをを用いて評価されてもよい。かかるアルゴリズムおよびプログラムとして、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、およびCLUSTALWが挙げられるが、決してこれらに限定されるわけではない(Pearson et al., 1988; Altschul et al., 1990; Thompson et al., 1994; Higgins et al., 1996; Gish et al., 1993)。配列比較は、典型的に、製造業者により提供される初期設定パラメータを用いるか、または出典明示により全体が本明細書に援用される上記の参考文献に記載のパラメータを用いて行われる。

【0068】

「相補的」ポリヌクレオチド配列は、本明細書で用いられるように、一般的に、二本鎖

核酸分子 (DNA - DNA、DNA - RNA、または RNA - RNA) における特定のプリンと特定のピリミジンの間の水素結合から生じる配列を指す。主な特異的な対合は、グアニンとシトシンおよびアデニンとチミンまたはウラシルである。「相補的」ポリヌクレオチド配列はまた、「アンチセンス」ポリヌクレオチド配列または「アンチセンス配列」と称されうる。

【0069】

配列相同性および配列同一性はまた、高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、および/または低ストリンジェンシー下のハイブリダイゼーション実験により決定することができる。様々な程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを用いることができる。条件がより厳しいほど、二重鎖形成に必要とされる相補性も大きくなる。条件の厳しさは、温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間などによって制御することができる。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、低、中、または高ストリンジェンシー条件下で、例えば、Keller and Manak (1987) に記載されるような当該技術分野において周知の技術によって行われる。

【0070】

例えば、³²P 標識遺伝子特異的プローブによるサザンブロット上の固定化された DNA のハイブリダイゼーションは、一般的な方法により実施することができる (Maniatis et al., 1982)。一般に、ハイブリダイゼーションおよび以後の洗浄は、例示されたポリヌクレオチド配列に対して相同性を有する標的配列の検出を可能にする中～高ストリンジェンシー条件下で行うことができる。二本鎖 DNA 遺伝子プローブでは、ハイブリダイゼーションは、6 × SSPE、5 × デンハルト溶液、0.1 % SDS、0.1 mg/ml 変性 DNA 中で DNA ハイブリッドの融解温度 (T_m) より 20 ~ 25 低い温度で一晩行うことができる。融解温度は、以下の式により記載される (Beltz et al., 1983)。

【0071】

$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% G + C) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{塩基対における二重鎖の長さ}。$

【0072】

洗浄は、典型的に以下のように行う：

(1) 室温で 15 分間、1 × SSPE、0.1 % SDS 中、2 回 (低ストリンジェンシー洗浄)；

(2) $T_m - 20$ で 15 分間、0.2 × SSPE、0.1 % SDS 中、1 回 (中ストリンジェンシー洗浄)。

【0073】

オリゴヌクレオチドプローブでは、ハイブリダイゼーションは、6 × SSPE、5 × デンハルト溶液、0.1 % SDS、0.1 mg/ml 変性 DNA 中で、ハイブリッドの融解温度 (T_m) より 10 ~ 20 低い温度で一晩行うことができる。オリゴヌクレオチドプローブの T_m は、以下の式によって決定することができる：

$T_m () = 2 (T / A \text{ 塩基対数}) + 4 (G / C \text{ 塩基対数})$ (Suggs et al., 1981)。

【0074】

洗浄は、典型的に以下のように行うことができる：

(1) 室温で 15 分間、1 × SSPE、0.1 % SDS、2 回 (低ストリンジェンシー洗浄)；

2) ハイブリダイゼーション温度で 15 分間、1 × SSPE、0.1 % SDS 中、1 回 (中ストリンジェンシー洗浄)。

【0075】

一般に、塩および/または温度を変更して、ストリンジェンシーを変えることができる。標識 DNA フラグメント > 70 塩基長もしくはその付近では、以下の条件を使用することができる：

低： 1 もしくは 2 × SSPE、室温

10

20

30

40

50

低： 1もしくは $2 \times \text{SSPE}$ 、42
中： $0.2 \times$ もしくは $1 \times \text{SSPE}$ 、65
高： $0.1 \times \text{SSPE}$ 、65。

【0076】

別の非限定的な例として、高ストリンジェンシーの条件を用いる手順はまた、次のとおりに実施することができる： DNA を含有するフィルターのプレ・ハイブリダイゼーションが、8時間～1晩、65 で、 $6 \times \text{SSC}$ 、50 mMの Tris-HCl (pH 7.5)、1 mMの EDTA 、0.02% PVP 、0.02% Ficoll 、0.02% BSA 、および $500 \mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子 DNA からなる緩衝液中で行われる。フィルターが、48時間、好適なハイブリダイゼーション温度である65 で、 $100 \mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子 DNA および $5 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ の ^{32}P 標識プローブを含有するプレ・ハイブリダイゼーション混合物中でハイブリダイズされる。代替的に、ハイブリダイゼーション工程は、65、 SSC 緩衝液、0.15 Mの NaCl および0.05 Mクエン酸 Na に対応する $1 \times \text{SSC}$ の存在下で、実施することができる。その後、フィルター洗浄が、37 で、1時間、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.01% PVP 、0.01% Ficoll 、および0.01% BSA を含有する溶液において行われ、続いて、 $0.1 \times \text{SSC}$ 中、50での洗浄を45分間行うことができる。代替的に、フィルター洗浄は、 $2 \times \text{SSC}$ および0.1% SDS 、または $0.5 \times \text{SSC}$ および0.1% SDS 、または $0.1 \times \text{SSC}$ および0.1% SDS を含有する溶液において、68 で15分間間隔で実施することができる。洗浄工程後、ハイブリダイズしたプローブは、オートラジオグラフィーにより検出可能である。用いられてもよい高ストリンジェンシーの他の条件は、当該技術分野において周知であり、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるSambrook et al. (1989)およびAusubel et al. (1989)中で引用されている。

【0077】

中ストリンジェンシーの条件を用いる手順の別の非限定的な例は、以下のとおりである： DNA を含有するフィルターをプレ・ハイブリダイズし、次いで、60 の温度、 $5 \times \text{SSC}$ 緩衝液および標識プローブの存在下で、ハイブリダイズさせる。その後、フィルター洗浄を $2 \times \text{SSC}$ を含有する溶液において、50 で実施し、ハイブリダイズしたプローブは、オートラジオグラフィーにより検出可能である。用いられてもよい中ストリンジェンシーの他の条件は、当該技術分野において周知であり、出典明示によりその全体が本明細書に援用されるSambrook et al. (1989)およびAusubel et al. (1989)中で引用されている。

【0078】

二本鎖形成および安定性は、ハイブリッドの二本鎖の間の実質的な相補性に依存し、上述のごとく、ある程度のミスマッチが許容されうる。それゆえ、本発明のプローブ配列として、変異（単一および複数の両方）、欠失、記載される配列の挿入、およびそれらの組み合わせが含まれ、ここで、前記変異、挿入および欠失は、目的の標的ポリヌクレオチドとの安定なハイブリダイズの形成を可能にする。変異、挿入および欠失は、所定のポリヌクレオチド配列において、多くの方法で生じ得るものであって、これらの方法は当業者に公知である。他の方法も将来公知になり得る。

【0079】

制限酵素が目的 DNA 配列の機能的フラグメントを得るのに用いることができることもまた、当該技術分野において周知である。例えば、 Bal 31 エキソヌクレアーゼは、 DNA の時間で制御された限定的消化（一般に、「 erase-base 」手順と称される）のために利便的に用いることができる。例えば、Maniatis et al. (1982); Wei et al. (1983)を参照のこと。

【0080】

本発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチド配列のフラグメントを含んでなる。本発明によるポリヌクレオチド配列の代表的なフラグメントは、それが由来する配列の少なくとも5個の連続するヌクレオチド、好ましくは、少なくとも12個の連続するヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド、なおより好ましくは、少なくとも15、18、もしくは少なくとも20個の連続するヌクレオチドを有する任意のヌクレオチドフラグメントを意味するものと理解される。本明細書に記載のフラグメントの上限は、特定のポリペプチド（例えば、配列番号5のポリペプチドのようなポリペプチド）をコードする全長配列において見出されるヌクレオチドの総数である。

【0081】

いくつかの具体例では、本発明は、ストリンジェンシー条件の様々な条件（例えば、高または中または低ストリンジェンシー）下で、本発明によるヌクレオチド配列とハイブリダイズすることが可能なそれらのフラグメントを含み；本発明のヌクレオチド配列とハイブリダイズするフラグメントは、任意選択的に、以下に記載されるように標識することができる。

10

【0082】

本発明は、1の具体例において、形質転換された宿主細胞またはウエストナイル（West Nile）ウイルスに感染していることが疑わしい個体から単離される細胞において、本発明による核酸の存在の同定のための方法を提供する。これらの変化する具体例において、本発明は、サンプルと、本発明の核酸（ポリヌクレオチド）（例えば、RNA、mRNA、DNA、cDNA、もしくは他の核酸）とを接触させることを含んでなる、（個体または細胞培養から得られる）サンプル中の核酸の検出を提供する。好適な具体例では、ポリヌクレオチドは、任意選択的に、検出系において標識され、使用されるプローブである。核酸の検出のための多くの方法が存在し、検出のための適当な方法のいずれもが本発明に包含される。核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なアッセイ形式として、1）核ランオンアッセイ、2）スロットブロットアッセイ、3）ノーザンブロットアッセイ（Alwine et al., 1977）、4）磁性粒子分離、5）核酸もしくはDNAチップ、6）逆ノーザンブロットアッセイ、7）ドットブロットアッセイ、8）in situ ハイブリダイゼーション、9）RNAaseプロテクションアッセイ（Melton et al., 1984）およびテキサス州、オースチンのAmbion, Inc.の1998年カタログに記載のもの、10）リガーゼ連鎖反応、11）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、12）逆転写酵素（RT）-PCR（Berchtold, 1989）、13）ディファレンシャルディスプレイRT-PCR（DDRT-PCR）あるいは他の技術およびアッセイの適当な組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらの検出方法論における使用に適当な標識として、1）放射性標識、2）酵素標識、3）化学発光標識、4）蛍光標識、5）磁気標識、または以下に記載のものを含むが、これらだけに限定されない他の適当な標識が挙げられる。これらの方法論および標識は、当該技術分野において周知であり、当業者に広く利用可能である。同様に、標識を核酸に取り入れる方法もまた、当業者に周知である。

20

30

【0083】

それ故、本発明はまた、標的配列またはその標的配列から作製される増幅産物（amplicon）とのハイブリダイゼーションのための検出プローブ（例えば、開示するポリヌクレオチド配列のフラグメント）を提供する。そのような検出プローブは、少なくとも8、9、10、11、12、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100個のヌクレオチドの連続的な（contiguous）/連続（consecutive）スパンを含んでなる。標識プローブまたはプライマーは、放射性化合物または上記のような別のタイプの標識（例えば、1）放射性標識、2）酵素標識、3）化学発光標識、4）蛍光標識、もしくは5）磁気標識）で標識される。代替的に、標識されていないヌクレオチド配列は、プローブまたはプライマーとして直接使用されてもよいが；しかし、一般的には、配列が、放射性元素（ ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I ）またはビオチン、アセチルアミノフルオレン、ジゴキシゲニン、5-プロモ-デオキシウリジン、もしくはフルオレセインのような分子で標識されて、多くの応用に用いることができるプローブが提供される。

40

【0084】

50

本発明のポリヌクレオチドはまた、アレイまたは固相支持体に結合するポリヌクレオチドを用いる遺伝子発現の定性および定量分析に使用することもできる。本明細書で用いられるように、用語アレイは、全長ポリヌクレオチド、または遺伝子発現の特異的検出を可能にするのに十分な長さのポリヌクレオチドの1、2、または3次元的配列を意味する。好ましくは、フラグメントは、少なくとも15ヌクレオチド長である。より好ましくは、フラグメントは、少なくとも100ヌクレオチド長である。より好ましくは、フラグメントは100ヌクレオチド長より大きい。いくつかの具体例では、フラグメントは、500ヌクレオチド長より大きくてもよい。

【0085】

例えば、遺伝子発現の定量分析は、Schena et al. (1995, 1996)により記載されるような相補的DNAマイクロアレイにおいて、本発明の全長ポリヌクレオチド、またはそのフラグメントを用いて行われてもよい。ポリヌクレオチド、またはそのフラグメントは、PCRにより増幅され、次いでシリル化顕微鏡スライド上でアレイされる。プリントしたアレイを湿潤チャンバ内でインキュベートして、アレイエレメントの再水和を可能にし、0.2% SDS中で1分間を1回、水中で1分間を2回、次いで5分間、水素化ホウ素ナトリウム溶液中で1回リンスする。アレイを水中に2分間、95℃で潜没させ、0.2% SDSに1分間移し、水で2回リンスし、空気乾燥させ、次いで25℃で暗所に貯蔵する。

【0086】

mRNAは、生物学的サンプルから単離され、プローブが1回の逆転写により調製される。プローブを、14×14mmガラスカバースリップ下の1cm²マイクロアレイに、6~12時間、60℃でハイブリダイズさせる。アレイを、5分間、25℃で低ストリンジェンシー洗浄緩衝液(1×SSC/0.2% SDS)において洗浄し、次いで、10分間、室温で高ストリンジェンシー洗浄緩衝液(0.1×SSC/0.2% SDS)において洗浄する。アレイを、0.1×SSC中、カスタムフィルターセットを具備する蛍光レーザー走査装置を用いて走査する。2つの独立したハイブリダイゼーションの比の平均を求めることにより正確な発現差異測定が得られる。

【0087】

生物学的サンプルに存在するポリヌクレオチドの定量分析もまた、Pietu et al. (1996)に記載の相補的DNAアレイで行うことができる。本発明のポリヌクレオチド、またはそのフラグメントは、PCR増幅され、膜上にスポットされる。次いで、多様な組織または細胞に由来する生物学的サンプルを起源とするmRNAは、放射性ヌクレオチドで標識される。制御された条件におけるハイブリダイゼーションと洗浄後、ハイブリダイズしたmRNAを、ホスホ-イメージング(phospho-imaging)またはオートラジオグラフィによって検出する。複製実験が行われ、次いで異なって発現されるmRNAの定量分析が実施される。

【0088】

代替的に、本発明のポリヌクレオチド配列はまた、DNAチップのような分析系で用いられてもよい。DNAチップおよびそれらの用途は、当該技術分野において周知であり(例えば、出典明示により全体が本明細書に援用されるU.S. Patent Nos. 5,561,071; 5,753,439; 6,214,545; Schena 1996; Bianchi et al., 1997; を参照のこと)、および/またはAffymetrix, Inc. (カリフォルニア州、サンタクララ)のような製造業者により提供される。加えて、本発明の核酸配列は、核酸分析手順における分子量マーカーとして使用することができる。

【0089】

本発明はまた、以下を含んでなる組成物を提供する：

a) 配列番号5、9、11、13もしくは15を含んでなるポリペプチドをコードするか、または表9、10、11、12、15、もしくは16に記載の配列番号5、9、11、13もしくは15の1つもしくはそれ以上のポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列。本発明の様々な態様では、これらのポリヌクレオチドは、少なく

10

20

30

40

50

とも40%かつ50%より少ないG+C含有量または表13に記載のG+C含有量を有することができる；

b) 配列番号1に少なくとも70%（または表14で特定される百分率）同一であり、配列番号2を含んでなるポリペプチドをコードし、約40%～約50%の間のG+C含有量（または表13で特定される特異的なG+C含有量）を有するポリヌクレオチド配列；

c) (a)または(b)に記載のポリヌクレオチド配列のポリヌクレオチド配列少なくとも8個の連続ヌクレオチド；

d) 配列番号3、4、6、7、8、10、もしくは12、または配列番号3、4、6、7、8、10、もしくは12の少なくとも8個の連続ヌクレオチドのフラグメントを含んでなるポリヌクレオチド配列；

e) (a)、(b)、(c)、または(d)に記載のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチド；

f) 低、中もしくは高ストリンジェンシー下で、(a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド；

g) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子構築物；

h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)もしくは(g)に記載のポリヌクレオチドまたは遺伝子構築物を含んでなるベクター；

i) (h)に記載のベクター、(g)に記載の遺伝子構築物、または(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞；

j) (h)に記載のベクター、(g)に記載の遺伝子構築物、または(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドを含んでなるトランスジェニック植物、植物細胞、または植物部分；あるいは

k) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)もしくは(f)によるポリヌクレオチド、任意選択的に、標識またはマーカーを含んでなる、プローブ。

【0090】

本発明はまた：a)配列番号5、9、11、13もしくは15、またはそのフラグメントを含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列；b)配列番号5、9、11、13もしくは15、または配列番号5、9、11、13もしくは15のフラグメントを含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約20%～99.99%同一性を有するポリヌクレオチド配列であって、前記ポリペプチドが、配列番号5、9、11、13もしくは15、またはそのフラグメントを含んでなるポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを有するポリヌクレオチド配列；c)配列番号5、9、11、13もしくは15、または配列番号5、9、11、13もしくは15のフラグメントを含んでなるポリペプチドに対して少なくとも約20%～99.99%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であって、前記ポリペプチドが、配列番号5、9、11、13もしくは15、またはそのフラグメントを含んでなるポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを有するポリヌクレオチド配列；d)配列番号5、9、11、13もしくは15を含んでなるポリペプチドのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列であって、前記フラグメントが、配列番号5、9、11、13もしくは15のポリペプチドの活性の少なくとも1つを有するポリヌクレオチド配列；e)配列番号3、4、6、7、8、10、12、もしくは14を含んでなるポリヌクレオチド配列；f)配列番号3、4、6、7、8、10、12、もしくは14のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約20%～99.99%同一性を有するポリヌクレオチド配列；g)多量体構築物をコードするポリヌクレオチド配列；あるいはh)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、もしくは(g)に記載のポリヌクレオチドに相補的であるポリヌクレオチドを含んでなる、遺伝子構築物を提供する。本発明の遺伝子構築物はまた、プロモーターおよびエンハンサー、任意選択的に、選択マーカーのようなさらなる調節

10

20

30

40

50

エレメントを含有することができる。

【0091】

本明細書に記載の遺伝子構築物もしくは調節エレメントに作動可能に連結された上述のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターまたは発現カセットもまた、本発明の範囲内にある。ベクターおよび発現カセットは、さらなる転写制御配列をも含有してもよい。ベクターおよび発現カセットは、さらに、選択マーカを含んでもよい。発現カセットは、生物体に同時形質転換されるために、制御エレメントに作動可能に連結された少なくとも1つのさらなる遺伝子を含有してもよい。代替的に、さらなる遺伝子および制御エレメントは、複数の発現カセット上で提供することができる。そのような発現カセットは、調節領域の転写調節下にある本発明の配列の挿入のための複数の制限部位と一緒に提供される。発現カセットは、さらに、制御エレメントに作動可能に連結された選択マーカ遺伝子を含有してもよい。

10

【0092】

発現カセットは、5' - 3' 方向の転写において、転写および翻訳開始領域、本発明のDNA配列、ならびに転写および翻訳終結領域を含む。転写開始領域、プロモーターは、宿主細胞に対して元々もしくはアナログ、または外来性もしくは異種であってもよい。さらに、プロモーターは、天然の配列であってもよく、あるいは合成配列であってもよい。「外来性」は、転写開始領域が転写開始領域が導入される元々の植物には見出されないことが意図される。本明細書で用いられるように、キメラ遺伝子は、コーディング配列に対して異種である転写開始領域に作動可能に連結されたコーディング配列を含んでなる。

20

【0093】

本発明の別の態様は、本明細書で教示されるポリヌクレオチド配列のクローニングおよび/または発現のためのベクターを提供する。ワクチンベクターを含む本発明のベクターはまた、所定の宿主細胞における前記ヌクレオチド配列の発現および/または分泌を可能にするのに必要なエレメントを含むことができる。ベクターは、プロモーター、翻訳の開始および終結のためのシグナル、ならびに転写の調節に適当な領域を含有することができる。一定の具体例では、ベクターは、宿主細胞において安定的に維持することができ、任意選択的に、翻訳されたタンパク質の分泌を指令するシグナル配列を含有することができる。これらの異なるエレメントは、使用する宿主細胞により選択される。ベクターは、宿主ゲノムに組み込みことができるか、または、任意選択的に自律的に複製するベクターであり得る。

30

【0094】

本発明はまた、本明細書において開示するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドまたはペプチドフラグメントの発現を提供するものであって、ポリペプチドの発現を可能にし、任意選択的に、発現したポリペプチドを回収する条件下で、本発明のポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞の培養を含んでなる。

【0095】

開示されたポリヌクレオチド配列はまた、タンパク質またはペプチドが組み換えDNA分子で形質転換された宿主で発現できるように、第2の核酸配列により調節されうる。例えば、タンパク質またはペプチドの発現は、当該技術分野で公知の任意のプロモーター/エンハンサーエレメントにより制御されてもよい。発現を制御するのに用いられてもよいプロモーターとして、CMV - IEプロモーター、SV40初期プロモーター領域 (Benoist and Chambon 1981)、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含有されるプロモーター (Yamamoto et al., 1980)、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., 1981)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al., 1982); - ラクタマーゼプロモーター (Villa-Kamaroff et al., 1978)、もしくはtacプロモーター (deBoer et al., 1983) のようなプロモーターを含有する真核細胞ベクター; "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94も参照のこと; ノパリンシンターゼプロモーター領域 (Herrera-Estrella et al., 1983) またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター (Gardner et al.,

40

50

1981)、および光合成酵素リブローズニリン酸カルボキシラーゼのプロモーター (Herrera-Estrella et al., 1984) を含んでなる植物発現ベクター; Gal 4 プロモーター、ADC (アルコールデヒドロゲナーゼ) プロモーター、PGK (ホスホグリセロールキナーゼ) プロモーター、および / またはアルカリホスファターゼプロモーターのような酵母または真菌由来のプロモーターエレメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

本発明によるベクターは、例えば、プラスミドのベクターまたはウイルス由来である。特定の具体例では、開示されるポリヌクレオチド配列内に含有されるタンパク質またはペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター、1つもしくはそれ以上の複製開始点、および任意選択的に、1つもしくはそれ以上の選択マーカー (例えば、抗生物質耐性遺伝子) を含んでなるベクターが使用される。発現ベクターは、所望される宿主細胞における遺伝子発現を含む遺伝子発現を制御する調節配列を含んでなる。本発明のポリペプチドの発現のための典型的なベクターとして、pETタイプのプラスミドベクター (Promega) もしくは pBAD プラスミドベクター (Invitrogen) または以下の実施例において提供されるベクターが挙げられる。さらに加えて、本発明によるベクターは、本発明のポリヌクレオチド配列をクローニングまたは発現させるために宿主細胞を形質転換するのに有用である。

10

【0097】

本発明はまた、本発明によるベクターにより形質転換された宿主細胞を包含する。これらの細胞は、上記で定義したベクターに挿入されたヌクレオチド配列を宿主細胞に導入し、次いで、本発明のポリヌクレオチド配列の複製および / または発現を可能にする条件下で前記細胞を培養することにより得られてもよい。

20

【0098】

宿主細胞は、例えば、細菌細胞 (グラム陰性もしくはグラム陽性)、酵母細胞 (例えば、サッカロマイセス・セレビセエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*))、動物細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞)、植物細胞、および / またはバキュロウイルスベクターを使用する昆虫細胞のような真核細胞あるいは原核細胞系から選択されてもよい。いくつかの具体例では、ポリペプチドの発現のための宿主細胞として、U.S. Patent Nos. 6,319,691、6,277,375、5,643,570、または 5,565,335 (それぞれの各特許文献内で引用されるすべての参考文献を含めて、それぞれその全体が出典明示により援用される) において教示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0099】

さらに加えて、挿入された配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式で遺伝子産物を改変および加工する宿主細胞株が選択されてもよい。一定のプロモーターからの発現は、所定の誘導物質の存在下で上昇させることができ; それにより、遺伝学的に改変されたポリペプチドの発現が制御され得てもよい。さらに加えて、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳ならびに翻訳後プロセッシングおよび修飾 (例えば、グリコシル化、リン酸化) の特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の所望される修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞系統または宿主系を選択することができる。例えば、細菌系における発現は、非グリコシル化コアタンパク質産物を産生するのに用いることができる。酵母における発現は、グリコシル化産物を産生する。哺乳動物細胞における発現は、異種タンパク質の「元々の」グリコシル化を確実にすることに用いることができる。さらに加えて、異なるベクター / 宿主発現系は、異なる程度でプロセッシング反応を生じ得る。

40

【0100】

制御エレメントに作動可能に連結された本明細書で開示される1つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド、またはその生物学的に活性なフラグメントを含んでなる、1つもしくはそれ以上のポリヌクレオチド配列、遺伝子構築物、ベクター、または発現カセットを含有する形質転換植物細胞、トランスジェニック種子、トランスジェニック植物部分および

50

トランスジェニック植物が提供される。本明細書で用いられるように、用語「植物」は、藻類および高等植物（樹木を含むがこれらに限定されない）を含む。それ故、藻類、単子葉植物、および双子葉植物は、本発明の遺伝子構築物、発現カセット、または本発明によるベクターで形質転換されてもよい。一定の好適な具体例では、タバコ植物またはタバコ細胞系統が、本発明による遺伝子構築物で形質転換される。

【0101】

それゆえ、本出願で考察される組成物または免疫プロトコルの生成に有用なポリペプチドは、配列番号5、9、11、13、15、もしくはそのフラグメントを含んでなる（から本質的になる、もしくははからなる）ポリペプチドを発現するように遺伝学的に改変されたトランスジェニック植物細胞から生じるか、または得ることができる。例えば、その内容は出典明示により全体が本明細書に援用されるU.S. Patent Pub. No: 2004/0268442 A1を参照のこと。

10

【0102】

トランスジェニック植物は、植物細胞培養物、植物細胞系統、植物組織培養物、下等植物、単子葉植物、双子葉植物、または形質転換植物細胞もしくはプロトプラストに由来するそれらの子孫もしくは部分として本明細書で定義されるものであって、形質転換植物のゲノムは、研究室技術により誘導される外来DNAを含有し、同じ種の元々のトランスジェニックではない植物細胞には本来存在しないものである。「トランスジェニック植物」および「形質転換植物」という用語は、DNAが外因性DNA分子を含有する植物を定義する同義語として当該技術分野において使用されている。適宜、本明細書に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、形質転換された植物、植物細胞または植物部分における発現のために最適化することができる。すなわち、目的の種に対応する種に好適なコドンを使用して、遺伝子を合成することができる。例えば、植物に好適な遺伝子を合成するための方法が、当該技術分野において利用可能である。例えば、出典明示により本明細書に援用されるU.S. Patent Nos. 5,380,831および5,436,391、ならびにMurray et al. (1989)を参照のこと。

20

【0103】

植物においてポリペプチドを発現させるための遺伝子カセットの構築は、Sambrook et al. (1989)；およびAusubel et al. (1987)で開示される方法のような周知の方法を利用して容易に達成される。

30

【0104】

本発明の構築物を調製する際に、多様なDNAフラグメントは、適した配向において、適切であれば、適したリーディングフレームにおいてDNA配列を提供するように、操作され得る。アダプターまたはリンカーは、DNAフラグメントを接続するために用いてもよく、または他の操作は、簡便な制限部位を提供すること、過分のDNAの取り出し、制限部位の取出しなどに関与し得る。

【0105】

多様な工程を行う際に、所望される宿主細胞への以後の導入のためにプロモーター/目的の遺伝子を含有するベクターを増幅するように、クローニングが用いられる。広範なクローニングベクターが利用可能であり、ここで、クローニングベクターは、大腸菌（*Escherichia coli*（*E. coli*））において機能的である複製系および形質転換細胞の選択を可能にするマーカーを含む。例示的ベクターとして、pBR322、pUC系列、pACYC184、BlueScript系列（Stratagene）などが挙げられる。それ故、配列は、適切な制限部位でベクターに挿入され得、生じるプラスミドを使用して大腸菌（*E. coli*）宿主（例えば、大腸菌（*E. coli*）株HB101、JM101およびDH5）を形質転換し、大腸菌（*E. coli*）は適切な栄養培地において増殖され、そして細胞は回収および溶解され、そしてプラスミドが回収される。解析は、配列解析、制限酵素解析（restriction analysis）、電気泳動などに関与し得る。それぞれの操作後、最終的構築物において使用すべきDNA配列は、制限酵素処理（restricted）され、そして次の配列に接続され得

40

50

、ここで、部分的構築物のそれぞれは、同じまたは異なるプラスミドにクローニングされ得る。

【0106】

ベクターは利用可能であるか、または植物細胞の形質転換のために容易に調製することができる。一般に、プラスミドまたはウイルスベクターは、所定の宿主において異種のDNA配列の維持および発現に必要なすべてのDNA制御配列を含有すべきである。そのような制御配列として、一般的に、リーダー配列、および翻訳開始シグナルコドンにコードするDNA配列、翻訳ターミネーターコドン、ならびにメッセンジャーRNAプロセッシングを制御する3'UTRシグナルにコードするDNA配列が挙げられる。任意の特定の種において発現を最適化するための適切なエレメントの選択は、本開示内容の教義を利用する当業者の問題である。最後に、ベクターは、望ましくは、ベクターを含有する宿主細胞の同定を可能にする表現型特性を提供することが可能であるマーカー遺伝子を有すべきである。

10

【0107】

植物細胞に挿入される外来コーディング配列の活性は、挿入物に隣接する内因性植物DNAの影響に依存する。一般的に、異種遺伝子の挿入は、任意の形質転換技術を使用して無作為であるようであるが；しかし、植物細胞へのDNAの部位特異的組み換えを伴う植物を産生させるための技術が存在する(WO91/09957を参照のこと)。プロモーターの制御下で所望される1つまたは複数の配列の発現を生じる任意の方法または方法の組み合わせが許容可能である。

20

【0108】

本発明は、植物細胞を形質転換するための特定の任意の方法に限定されない。DNAを植物細胞に導入するための技術は、当業者に周知である。外来DNAを植物細胞に送達するための4つの基本的な方法が記載されている。化学的方法(Graham and van der Eb, 1973; Zatloukal et al., 1992)；マイクロインジェクション(Capeocchi, 1980)、エレクトロポレーション(Wong and Neumann 1982; Fromm et al., 1985; U.S. Pat. No. 5,384,253)および遺伝子銃(Johnston and Tang, 1994; Fynan et al., 1993)を含む物理的方法；ウイルス方法(Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis and Anderson 1988; Eglitis et al., 1988)；ならびに受容体仲介方法(Curiel et al., 1991; Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992)。

30

【0109】

エレクトロポレーションによるDNAの植物細胞への導入は、当業者に周知である。ペクチン分解酵素のような植物細胞壁分解酵素は、非処置細胞よりエレクトロポレーションによる形質転換をより受けやすいレシピエント細胞にするために使用される。エレクトロポレーションによって形質転換を行うために、細胞の懸濁培養物のような脆い組織、または胚状カルス(embryogenic callus)、または未熟な胚または他に由来する組織のいずれかを直接用いてもよい。一般的に、ペクチン分解性酵素で標的植物材料の細胞壁を部分的に分解するか、または制御された様式で機械的に損傷することが必要である。そのような処置された植物材料は、エレクトロポレーションによって容易に外来DNAを収容する。

40

【0110】

外来形質転換用DNAを植物細胞に送達するための別の方法は、マイクロプロジェクティルボンバードメントによる。この方法では、微小粒子が外来DNAで被覆され、そして推進力によって細胞に送達される。そのような微粒子は、典型的に、タンゲステン、金、白金、および類似の金属からなる。マイクロプロジェクティルボンバードメントの利点は、プロトプラストの単離(Cristou et al., 1988)も、またアグロバクテリウム(Agrobacterium)感染に対する感受性のいずれも必要としないことである。加速によりDNAをトウモロコシ細胞に送達するための方法の例示的实施態様がBiolistics Particle Delivery Systemであり、懸濁液において培養したトウモロコシ細胞で被覆されたフィルター表面上のスクリーンを介してDNAまた

50

は細胞で被覆された粒子を推進するために使用することができる。スクリーンは、粒子が大きな凝集体としてレシピエント細胞に送達されないように、粒子を分散する。ボンバードメントでは、懸濁液中の細胞を、フィルターまたは固体培養培地に集中させることが好ましい。あるいは、未熟な胚または他の標的細胞を、固体培養培地上に整列してもよい。衝撃しようとする細胞を、マクロプロジェクティル停止プレートの下方の適切な距離に置く。ボンバードメント形質転換では、最大数の安定した形質転換体を得るために、プレボンバードメント培養条件およびボンバードメントパラメータを最適化することができる。ボンバードメントのための物理および生物学的パラメータは、この技術において重要である。物理的要因としては、DNA / マクロプロジェクティル沈降の操作に關与するものまたはマクロプロジェクティルのいずれかの飛行および速度に影響を及ぼすものがある。生物学的因子としては、衝撃前および衝撃直後の細胞の操作に關与する総ての工程、衝撃に關連する損傷の軽減に役立つ標的細胞の浸透圧調整、ならびにまた、線状化DNAまたは無傷なスーパーコイル状プラスミドのような形質転換用DNAの性質が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0111】

アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 仲介トランスファーは、DNAをあらゆる植物組織に導入することができ、プロトプラストからの無傷な植物体を再生せる必要性がなくなるため、外来DNAを植物細胞に導入するための応用範囲の広い系である。DNAを植物細胞に導入するためにアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を仲介して植物体に組み込むベクターを使用することは、当該技術分野において周知である。例えば、Fraley et al. (1985) および Rogers et al. (1987) に記載の方法を参照のこと。さらに、Ti-DNAの組み込みは、比較的正確なプロセスであり、再配列はほとんど起こらない。トランスファーしようとするDNAの領域は、境界配列によって定義され、Spielmann et al. (1986) および Jorgensen et al. (1987) に記載されているように、通常、介在するDNAが植物ゲノムに挿入される。

【0112】

最新のアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 形質転換ベクターは、大腸菌 (*E. coli*) ならびにアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) での複製が可能であり、簡便な操作を可能にする。さらに、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 仲介遺伝子トランスファー用ベクターにおける最近の技術的進歩により、ベクターにおける遺伝子および制限部位のアレンジメントが改善され、多様なタンパク質またはポリペプチドを発現することが可能なベクターの構築を容易にしている。挿入されたポリペプチドコーディング遺伝子の直接発現のためのプロモーターに隣接する簡便なマルチリンカー領域およびポリアデニル化部位は、本目的に適している。さらに、形質転換には、武装化されたおよび武装解除されたTi遺伝子の両方を含有するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を使用することができる。

【0113】

植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール処置、エレクトロポレーション、およびこれらの処置の組み合わせに基づく方法を使用して達成することができる (例えば、Potrykus et al., 1985; Marcotte et al., 1988を参照のこと)。これらの系の異なる植物種への応用は、プロトプラストから特定の種を再生する能力に依存する。

【0114】

一旦、植物細胞を形質転換し、選択し、そして抗原発現について確認したら、場合によって、稔性植物体全体を再生することが可能である。これは、選択される植物種にかなり依存する。多数の植物種を再生するための方法は、文献に報告されており、そして当業者に周知である。本発明の実施のために、培養し、そして一般的に非常に長い再生工程を回避することによって、迅速にスケールアップすることができる植物細胞系統を形質転換することが好適である。加えて、植物細胞培養物の使用は、オープンフィールドでの産生を回避し、遺伝子逃避および食品汚染の可能性を顕著に減少する。これらの系統は、培養における取り扱いに対して特に感受性であり、迅速に形質転換され、安定に組込まれた事象

を産生し、そして凍結保存に従うため、NT-1およびBY-2のようなタバコ懸濁細胞培養(An, 1985)が好適である。

【0115】

タバコ懸濁細胞系統、NT-1は、本発明の実施に適する。NT-1細胞は、本来、タバコ(Nicotiana tabacum)L.c.v.bright yellow 2から開発された。NT-1細胞系統は広範に使用され、容易に利用可能である；尤も、いずれのタバコ懸濁細胞系統も本発明の実施と矛盾しない。以下の実施例における使用に適するNT-1細胞は、受託番号ATCC番号74840下でAmerican Type Culture Collectionから利用可能である。また、U.S.Patent No.6, 140,075(その全体が出典明示によって本明細書に援用される)を参照のこと。

10

【0116】

多くの植物細胞培養技術および実験室規模の振盪フラスコから数千リットルのバイオリアクター容器までの範囲の系が記載されており、植物細胞培養の分野において周知である。例えば、Fischer, R. et al (1999)およびDoran, P. (2000)を参照のこと。形質転換植物細胞を所望される嵩(mass)まで培養した後、それらを回収し、穏やかに洗浄し、そして破碎に適する緩衝液に配置する。異なる多くの緩衝液が本発明に適合可能である。一般に、緩衝液は、膜結合タンパク質を可溶化するための界面活性剤を伴うまたは伴わない中性pH値または中性pH値付近の水性等張性緩衝生理食塩水である。適切な緩衝液として、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水、1mM EDTA、およびMOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)を含有するPBSが挙げられる。

20

【0117】

一具体例では、音波処理によって細胞を破碎することができる。洗浄した細胞を、約0.01mg/ml~約5.0mg/mlの範囲、好ましくは、約0.1mg/ml~約0.5mg/ml(1容積の緩衝液あたりの洗浄した湿重量細胞)の範囲で、緩衝液中に配置する。多くの市販の音波処理装置が本発明と合致し、そして音波処理時間は、約5~約20秒間、好ましくは、約15~約20秒間の範囲である。得られる細胞フラグメントは、数(few)ミクロン~数(several)百ミクロンのサイズの範囲であり得、そしてポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントを暴露する。

【0118】

本発明はまた、免疫応答または防御免疫応答を誘発するために用いることができるDNAワクチン組成物に関する。本発明の本態様では、本明細書において提供されるポリペプチド(もしくはそのフラグメント)をコードする組み換えDNAまたはmRNAを含んでなる組成物の量を、前記個体において免疫応答または防御免疫応答を誘発するのに十分な量で個体に投与する。シグナル配列は、目的の抗原をコードする核酸から欠失させてもよく、そして当該技術分野において公知の方法に従って、免疫応答の誘導のために、個体をモニターしてもよい。「防御免疫応答」または「治療的免疫応答」は、CTL(もしくはCD8⁺T細胞)、HTL(もしくはCD4⁺T細胞)、および/あるいはいくつかの方法で、病態、副作用もしくは進行を防止するかまたは少なくとも部分的に停止する抗原に対する防御体液性免疫応答を指す。本発明に関して、そのような防御または治療的応答は、免疫していない個体と比較して、免疫した個体における生存率の増加(死亡率の減少)、またはウエストナイル(West Nile)ウイルスでチャレンジした免疫した個体におけるウイルス排出の減少を提供する。

30

40

【0119】

別の具体例では、本発明は、本発明のポリペプチド抗原、またはその組成物と併用してのポリヌクレオチド(DNA)ワクチンの投与をさらに含んでなる。好適な具体例では、抗原は、ポリヌクレオチドワクチンとして投与されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである。特に好適な具体例として、ポリペプチド抗原は、ポリヌクレオチドワクチンの初期投与後のブースターとして投与される。

【0120】

本発明のさらなる具体例は、当業者に公知の「プライム-ブースト(prime-boost

50

ost)」ワクチン接種レジメンを使用する、本明細書において開示する新規ウエストナイル (West Nile) ウイルス抗原 (例えば、本明細書に記載のポリペプチドおよびペプチドフラグメントを参照のこと) に対する免疫応答の誘導を提供する。本発明のこの態様では、本発明のDNAワクチンまたはポリペプチド抗原が、個体の免疫応答を「刺激」するのに十分な量で投与される。次いで、個体の免疫応答は、次の投与を介して「追加免疫」される：1) (任意選択的に、免疫刺激分子および/またはアジュバントとの併用で) 本発明のペプチド、ポリペプチド、および/または全長ポリペプチド抗原のうちの1つまたはこれらの組み合わせ；あるいは2) 同じかまたは任意選択的に異なる本明細書に記載の抗原構築物、および/またはペプチド抗原のうちの1つもしくはそれ以上をコードする核酸を含有するウイルスベクター。本発明のいくつかの代替的具体例では、免疫刺激分子をコードする遺伝子は、個体の免疫応答を「追加免疫」するために使用されるウイルスベクターに組み入れられ得る。例示的な免疫刺激分子として、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、IL-24、エリスロポエチン、G-CSF、M-CSF、血小板由来増殖因子 (PDGF)、MSF、FLT-3リガンド、EGF、線維芽細胞増殖因子 (FGF；例えば、aFGF (FGF-1)、bFGF (FGF-2)、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、もしくはFGF-7)、インスリン様増殖因子 (例えば、IGF-1、IGF-2)；血管内皮増殖因子 (VEGF)；インターフェロン (例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)；白血病阻害因子 (LIF)；毛様体神経栄養因子 (CNTF)；オンコスタチン M；幹細胞因子 (SCF)；トランスフォーミング増殖因子 (例えば、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3)、またはケモカイン (例えば、限定されないが、BCA-1/BLC-1、BRACK/Kec、CXCL16、CXCR3、ENA-78/LIX、エオタキシン-1、エオタキシン-2/MPIF-2、エキソダス-2/SLC、フラクタルカイン/ニューロタクチン、GRO α /MGSA、HCC-1、I-TAC、リンホタクチン/ATAC/SCM、MCP-1/MCAF、MCP-3、MCP-4、MDC/STCP-1、ABCD-1、MIP-1、MIP-1、MIP-2/GRO、MIP-3/エキソダス/LARC、MIP-3/エキソダス-3/ELC、MIP-4/PARC/DC-CK1、PF-4、RANTES、SDF1、TARC、もしくはTECK) が挙げられるが、これらに限定されない。これらの免疫刺激分子をコードする遺伝子は当業者に公知であり、そしてコーディング配列は、多様な特許データベース、好適に利用可能なデータベース (例えば、National Library of Medicine or the European Molecular Biology Laboratoryにおいて見出される核酸およびタンパク質データベース)、科学文献、またはGenzyme, Inc., R&D Systems, Inc、またはInvivoGen, Inc.のような会社より作成されるカタログ [例えば、1995 Cytokine Research Products catalog, Genzyme Diagnostics, Genzyme Corporation, Cambridge マサチューセッツ州；2002もしくは1995 Catalog of R&D Systems, Inc (Minneapolis、ミネソタ州)；または2002 Catalog of InvivoGen, Inc (San Diego、カリフォルニア州) (本明細書に記載のすべての参考文献を含め、それぞれその全体が出典明示によって援用される) を参照のこと] に引用される科学文献を含むさまざまな供給源から入手され得る。

【0121】

DNAワクチンを個体に導入する方法は、当業者に周知である。例えば、DNAは、骨格筋または他の体細胞組織に注入することができる (例えば、筋肉内注入)。カチオン性リポソームまたは遺伝子銃のような微粒子銃を使用して、DNAワクチンを送達することができる。あるいは、イオントフォレーシスおよび経皮伝達のための他の手段を、DNAワクチンの個体への導入のために使用することができる。

【0122】

本発明に使用するためのウイルスベクターは、ウイルスの感染性を破壊せずに新たな遺伝子を導入するために欠失されたウイルスゲノムの一部を有し得る。本発明のウイルスベクターは、典型的に、非病原性ウイルスである。実施者の随意で、プロフェッショナルな抗原提示細胞（例えば、マクロファージまたは樹状細胞）のような特定の細胞タイプに感染するようなウイルスベクターを選択することができる。あるいは、個体において任意の細胞に感染することが可能であるウイルスベクターを選択することができる。本発明に使用するのに適切な例示的ウイルスベクターとして、ボックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス、アピボックスウイルス、鶏痘ウイルス、高度に弱毒化されたワクシニアウイルス（例えば、アンカラ（Ankara）またはMVA〔改変ワクシニアアンカラ（Modified Vaccinia Ankara）〕）、レトロウイルス、アデノウイルス、パキウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されない。好適な具体例では、ウイルスベクターは、アンカラ（Ankara）またはMVAである。

10

【0123】

ワクシニアウイルス発現ベクターの構築のための一般的戦略は、当該技術分野において公知である〔例えば、Smith and Moss, 1984; U.S. Patent No. 4,738,846（その全体が本明細書において出典明示によって援用される）を参照のこと〕。Sutter and Moss (1992)およびSutter et al. (1994)は、構築を開示し、そして本発明においてウイルスベクターとして使用することができる非複製組み換え体アンカラ（Ankara）ウイルス（MVA）をベクターとして使用している。

20

【0124】

本発明のポリヌクレオチドを含んでなる組成物は、市販されている適切な核酸ワクチンベクター（プラスミド）（例えば、Vical、San Diego、カリフォルニア州）またはこれも市販されている他の核酸ベクター（プラスミド）（例えば、Valenti、Burlingame、カリフォルニア州）を含むことができる。あるいは、ウイルスベクターおよび本発明によるポリヌクレオチドを含んでなる組成物は、本発明によって提供される。加えて、組成物は、薬学的に許容可能なキャリア、例えば、生理食塩水を含むことができる。薬学的に許容可能なキャリアは当該技術分野において周知であり、そしてまた市販されている。例えば、そのような許容可能なキャリアについては、E. W. Martin's Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載されている。

30

【0125】

本明細書において言及し、または引用したすべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、それらが本明細書の明白な教義と矛盾しない程度で、すべての図および表を含むそれらの全体が出典明示によって援用される。

【0126】

以下の実施例では、本発明を実施するための手順について例示する。これらの実施例は、限定的であるものとして解釈されるべきではない。他に示さない限り、すべてのパーセンテージは重量によるものであり、すべての溶媒混合割合は容積によるものである。

40

【実施例】

【0127】

実施例1 - 植物における発現のための核酸配列の最適化

背景 植物における異種遺伝子の発現のより高いレベルを得るために、遺伝子のタンパク質コーディング配列が植物細胞においてより効率的に発現されるように、それを再操作することが好適であり得る。タバコは、遺伝子の発現レベルおよび植物体におけるコードされたタンパク質のレベルを増加するために、形質転換前に、異種タンパク質コーディング領域を再設計することが好適であるような植物である。従って、哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の設計におけるさらなる工程は、最適な発現のための異種遺伝子の再操作である。

50

【 0 1 2 8 】

タバコにおける発現のための哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の再操作のための1つの動機は、元々の哺乳動物ウイルス遺伝子のG + C含有量が最適でないことによる。例えば、多くの元々の哺乳動物ウイルス遺伝子の低いG + C含有量（および結果的に高いA + T含有量への傾斜）は、高度にA + Tに富むことが公知である植物遺伝子制御配列を模倣または複製する配列の作製を生じる。植物に導入される遺伝子のDNA内のいくつかのA + Tに富む配列の存在（例えば、TATAボックス領域は、通常、遺伝子プロモーターに見出される）は、遺伝子の異常な転写を生じ得る。一方、転写されたmRNA（例えば、ポリアデニル化シグナル配列（AAUAAA）、またはプレ-mRNAスプライシングに關与する小さな核RNAに相補的な配列）に存在する他の調節配列の存在は、RNA不安定性をもたらし得る。従って、タバコ発現のための哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする遺伝子（より好ましくは、植物最適化遺伝子と称される）の設計における1つの目的は、タバコ遺伝子コーディング領域の平均に近いG + C含有量を有するDNA配列を作製することである。哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする植物最適化遺伝子の設計における別の目的は、配列の変異が翻訳を妨害しないDNA配列を作製することである。

10

【 0 1 2 9 】

1343個のタバコ遺伝子のコーディング領域のG + C含有量は、43.6%と算出されている。従って、哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする異種遺伝子を設計する場合、約44%に近いG + C含有量を達成することが好適である。

20

【 0 1 3 0 】

遺伝子暗号の重複/縮重によって付与される可塑性（即ち、いくつかのアミノ酸は、1を超えるコドンによって指定される）のため、異なる生物体または生物体のクラスでは、ゲノムの進化に伴い、重複コドンの使用頻度が異なってくる。この「コドンバイアス」は、タンパク質コーディング領域の平均塩基組成に反映される。例えば、比較的低いG + C含有量を伴う生物体は、重複コドンの第3の位置においてAまたはTを有するコドンを利用するが、一方、より高いG + C含有量を有するものは、第3のコドン位置においてGまたはCを有するコドンを利用する。特に、少数派コドンに対応するチャージしたtRNAの相対量が低い場合、mRNA内の「少数派」コドンの存在は、そのmRNAの絶対的な翻訳速度を減少し得ると考えられる。この概念を広げると、個々の少数派コドンによる翻訳速度の減少は、少数派コドンが複数あると少なくとも加算的になる。従って、相対的に高い含有量の少数派コドンを利用するmRNAは、対応して低い翻訳速度を有する。このような速度の影響は、その後、低いレベルのコードされたタンパク質に現れる。

30

【 0 1 3 1 】

タバコにおける（またはワタ、トウモロコシ、またはダイズのような別の植物における）発現のために哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の操作を支援するために、タバコ遺伝子（または他の関連植物の遺伝子）のコドンバイアスを決定することができる。タバコ遺伝子タンパク質コーディング領域のコドンバイアスを、そのタンパク質をコードするために植物が使用する統計的コドン分布によって表し、そして表1に示す（単一のアミノ酸を指定する各コドンを使用してそのアミノ酸をコードする（パーセンテージでの）頻度として表す）。植物に最も好適なコドンを決定し、ならびに複数の選択が存在する場合、好適なコドンの第2、第3、または第4の選択を決定する。次いで、哺乳動物ウイルスタンパク質のアミノ酸配列をコードする新たなDNA配列を設計することができるが、植物の（第1の好適な、第2の好適な、第3の好適な、もしくは第4の好適な）コドンの置換によって、新たなDNA配列は、元々の哺乳動物ウイルスDNAまたはRNA配列（タンパク質をコードする）とは異なり、タンパク質アミノ酸配列内の各位置で適切なアミノ酸を指定する。次いで、新たな配列を、改変によって作製され得る制限酵素認識部位について分析することができる。同定された部位は、関連のコドンを、第1、第2、第3、または第4の選択の好適コドンで置き換えることによって、さらに改変する。目的の遺伝子の転写または翻訳に影響を及ぼす配列における他の部位は、エキソン：イントロン

40

50

ジャンクション (5 ' もしくは 3 ')、ポリ A 付加シグナル、または R N A ポリメラーゼ終結シグナルを含む。改変された配列をさらに分析し、そしてさらに改変して、T A または C G ダブルットの頻度を減少し、そして T G または C T ダブルットの頻度を増加する。これらのダブルットに加えて、[G + C] もしくは [A + T] の約 5 連続残基を超える配列ブロックは、配列の転写または翻訳に影響を及ぼす。従って、これらの配列ブロックはまた、第 1 または第 2 の選択などのコドン、選択した他の好適なコドンで置き換えることによって改変される。稀にしか使用されないコドンは、遺伝子設計において実質的な程度で含めないが、コドン組成自体とは異なる設計基準 (例えば、制限酵素認識部位の付加または欠失) を適合する必要がある場合にのみ、使用される。

【 0 1 3 2 】

上記の方法は、遺伝子が植物において最適に発現されるように、当業者が、特定の植物に外来性である改変された遺伝子を設計することを可能にする。方法は、US Patent Number 5,380,831 および patent application WO 97/13402 にさらに記載および例示されている。

【 0 1 3 3 】

それ故、哺乳動物ウイルスタンパク質をコードする植物最適化遺伝子を設計するために、特定の 1 つもしくは複数の植物の遺伝子配列から編集したコドンバイアスの表から確立した重複遺伝子暗号を利用して、前記タンパク質のアミノ酸配列をコードするように D N A 配列を設計する。得られる D N A 配列は、より高い程度のコドン使用多様性、所望の塩基組成を有し、戦略的に配置された制限酵素認識部位を含有することができ、そして遺伝子の転写、または産物 m R N A の翻訳を妨害し得る配列を欠く。それ故、本発明のタンパク質 / 遺伝子に機能的に均等である合成遺伝子を使用して、植物を含む宿主を形質転換することができる。合成遺伝子の生成に関するさらなる指針は、例えば、U.S. Patent No. 5,380,831 において見出すことができる。

【 0 1 3 4 】

一旦、前記 D N A 配列を紙面上またはインシリコで設計したら、実際の D N A 分子を、研究室で合成して、配列上、設計された配列に正確に対応させることができる。そのような合成 D N A 分子をクローニングすることができ、そうでなければ、それらがあたかも天然または元々の供給源から誘導されたが如く、正確に操作することができる。

【 0 1 3 5 】

W N V p r M - M - E ペプチドのタバコバイアス化コーディング領域の設計ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスのフラミンゴ単離体のゲノム配列全体を、G e n B a n k 受託 A F 1 9 6 8 3 5 として開示する。ウイルスの p r M - 、M - および E - ペプチドをコードする元々のウイルスゲノムの部分の 2 0 0 4 塩基対 (b p) D N A 配列を、ヌクレオチド 1 ~ 2 7 6 (p r M - ペプチド)、2 7 7 ~ 5 0 1 (M - ペプチド)、および 5 0 2 ~ 2 0 0 4 (E - ペプチド) により配列番号 1 [配列番号 1 は、A F 1 9 6 8 3 5 の塩基 4 6 6 ~ 2 4 6 9 を含んでなる] において表す。本実施例 1 の目的のために、元々のヌクレオチド配列をバージョン 1 と称する。配列番号 1 によってコードされる p r M - 、M - および E - ペプチドのアミノ酸配列を、配列番号 2 として示す。配列番号 1 の元々のゲノム D N A 配列を調べることにより、最適な植物発現に有害と考えられるいくつかの配列モチーフの存在、ならびにタバコにおける発現の非最適コドン組成が示された。タバコにおけるこれらの組み換えタンパク質の産生を改善するために、配列番号 2 の p r M - 、M - 、および E - ペプチドをコードする「タバコ最適化」D N A 配列 (配列番号 3) を開発した。

【 0 1 3 6 】

配列番号 1 における元々のコーディング領域配列および配列番号 3 におけるタバコ最適化コーディング領域によってコードされる p r M - 、M - 、および E - ペプチド (配列番号 2) は同一である。対照的に、p r M - 、M - および E - ペプチドをコードする元々のウイルス D N A 配列およびタバコ最適化 D N A 配列は、僅か 7 8 . 7 % 同一である。

【 0 1 3 7 】

改変された N - グリコシル化部位を伴う WNV p r M - M - E ペプチドのタバコバイアス化コーディング領域の設計。多様な糖またはオリゴ糖がタンパク質分子に結合し得ること（そのようなプロセスは、集散的にグリコシル化と称される）、および哺乳動物に導入される場合、組成およびそのような糖部分の提示は、タンパク質の抗原性に影響を及ぼし得ることは、植物タンパク質生化学の分野内において公知である。短いアミノ酸配列、アスパラギン - X a a - セリン、およびアスパラギン - X a a - スレオニン（A s n - X a a - S e r / T h r または N - X - S / T と略称され、ここで、X a a および X は、タンパク質において通常見出される 20 種類のアミノ酸のいずれかを表す）は、タンパク質上のグリコシル化連結のためのアクセプター部位としての役割を果たし得、ここで、糖は、A s n (N) 残基に結合することがさらに公知である。N - グリコシル化アクセプター配列 A s n - T y r - S e r は、配列番号 2 におけるアミノ酸 321 ~ 323 として見出され、そして E - ペプチドの既知の N - グリコシル化部位である。配列番号 4 は、p r M、M - および E - ペプチドをコードするタバコ最適化 DNA 配列を開示し、ここで、元々の E - ペプチドの N - グリコシル化アクセプター配列 A s n - T y r - S e r をコードする DNA 配列は、A s n - T y r - P r o をコードするように変異されている。それ故、配列番号 3 と配列番号 4 との間の唯一の差異は、塩基 967 ~ 969 における A G C セリンコドンからプロリン C C A コドンへの置換である。N - グリコシル化アクセプター配列を欠き、そして配列番号 4 によってコードされる変異タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号 5 として開示する。

10

20

【0138】

タバコバイアス化 WNV M - および E - ペプチドコーディング領域バージョン 2。いくつかの有用性のために、ウエストナイル (W e s t N i l e) ウイルスの M - および E - ペプチドのみをコードする DNA 配列を利用することが望ましい。タバコ細胞における発現のために、それは、これらのペプチドをコードする配列番号 3 の部分（即ち、配列番号 3 の塩基 277 ~ 2004）を使用するのに十分である。それ故、WNV M - および E - ペプチドをコードするタバコバイアス化コーディング領域の配列を、配列番号 6 として示す。この配列は、配列番号 2 の残基 93 ~ 668 をコードする。M - および E - ペプチドをコードする元々のウイルス DNA 配列（配列番号 1 の塩基 277 ~ 2004）および M - および E - ペプチドをもコードする配列番号 6 のタバコ最適化 DNA 配列は、僅か 78.4 % 同一である一方、コードされるタンパク質は 100 % 同一である。

30

【0139】

タバコバイアス化 WNV M - および E - ペプチドコーディング領域バージョン 3 の設計。より高いレベルの所望されるタンパク質を産生するために、タンパク質をコードする単一コピーを超える遺伝子を植物細胞に導入することは、しばしば、望ましくかつ有利である。個別のコピー数のタンパク質コーディング領域は、個別のプロモーターおよび関連する転写制御エレメントの発現制御下で、各コピーで導入してもよく、またはそれらは、単一の二方向性植物プロモーターの発現制御下で単位として導入してもよい。いずれの場合においても、個別のタンパク質コーディング領域が非同一の DNA 配列を有することが望ましくかつ有利である。これには、2 つもしくはそれ以上の生物学的理由がある。第 1 に、大きな複製した DNA 配列は、分子クローニング宿主（例えば、大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i)) としてまたは植物形質転換（アグロバクテリウム・ツメファシエンス (A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s)) において使用される多くの細菌株において不安定であることが公知である。それ故、同一タンパク質を指定する非同一のコーディング領域の供給は、有害な再配置および / または欠失がこれらの操作中に生じる機会を低減する。第 2 に、トランスジェニック植物における複製した高度に異種のコーディング領域の発現が、遺伝子スプライシングのような機構を経験し得ることが考えられる。それ故、同一タンパク質を指定する非同一のコーディング領域の導入は、より高いレベルの（およびより安定な）タンパク質産生のより大きな機会を提供する。

40

【0140】

上記で概略した原理を使用して、WNV M - および E - ペプチドのための第 2 のタバ

50

コ最適化コーディング領域を設計し、そして配列番号7として開示する。配列番号7によってコードされるタンパク質は、配列番号1の元々の配列の塩基277～2004によってコードされ、そして配列番号6に開示される先のタバコ最適化バージョンによってもまたコードされるタンパク質（即ち、配列番号2の残基93～668）に同一であることを強調する。配列番号7において開示する第2のタバコ最適化配列と配列番号1における元々の配列の塩基277～2004および配列番号6における第1のタバコ最適化バージョンとの比較により、それは、対応する元々のWNV配列に74.6%同一であり、そして第1のタバコ最適化バージョンに69.4%同一であることが示される。それ故、異なる植物最適化コーディング領域設計間において実質的なDNA配列多様性を作製し得る一方、コードされるタンパク質のアミノ酸配列、全体的なコドン組成、および植物遺伝子発現に有害であり得る配列の不在の制限内になお留まることは明らかである。本発明のこのような特徴を、表2に例示し、これは、開示する3つのDNA配列の異なるコドン組成を示す。

【0141】

タバコ最適化WNV prM-、M-およびE-ペプチドコーディング領域のさらなる改変。増大レベルの異種タンパク質は多くの変数に依存し、その変数うちの1つはタンパク質が翻訳中または翻訳後に指向される細胞内局在であることは、トランスジェニック植物遺伝子発現の分野において、当業者に公知である。さらに、異種タンパク質の小胞体（ER）への転位置は、タンパク質の蓄積に対してポジティブな効果を有し得、そしてタンパク質のアミノ末端への短いERターゲティングペプチドの付加によって、異種タンパク質がER内の蓄積に対して標的化され得ることもさらに公知である。トウモロコシの15キロダルトン（kDa）のゼインタンパク質は、そのようなERターゲティングペプチドを所有し、そして異種タンパク質のアミノ末端への15kDaゼインERターゲティングペプチドの結合が、単子葉細胞ならびに双子葉細胞のERへのそのタンパク質の輸送（trafficking）を生じ得ることが示されている。異種タンパク質のアミノ末端にERターゲティングペプチドを結合させる最も率直な方法は、翻訳時に両方のドメインを含有する（キメラ）融合タンパク質を作製する単一のオープンリーディングフレームにおいて、両方のエレメント（ERターゲティングペプチドおよびタンパク質コーディング領域）をコードするタンパク質コーディング領域を構築することである。所定の短いペプチド配列は、ER局在タンパク質のカルボキシ末端に存在する場合、ER内のそれらのタンパク質の残留を指令することができ、それ故、ER内での効率的なタンパク質蓄積およびグリコシル化を提供することが、当該技術分野において当業者にさらに公知である。1つのそのようなER残留シグナルペプチドは、アミノ酸配列リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン（KDELと略称される）である。それ故、3つのすべてのエレメント（ERターゲティングペプチド配列、異種タンパク質コーディング領域配列、およびER残留シグナル配列）をコードし、3つのすべてのドメインを、アミノ末端からカルボキシ末端へ列挙した順に含有する（キメラ）融合タンパク質を翻訳時に産生する単一のオープンリーディングフレームを構築することによって、異種タンパク質のERへの転位置およびER内でのその残留を容易にし得る。

【0142】

異種タンパク質のコーディング領域に隣接する（または内に含まれる）所定のヌクレオチド配列エレメントが異種タンパク質をコードするメッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳に影響を及ぼし得ることもまた、植物の導入遺伝子発現の分野において当業者に周知である。mRNAの翻訳に影響を及ぼす1つのそのような配列エレメントは、翻訳開始コドンAUG（DNAコードではATG）の周りのヌクレオチド配列である。タバコを含む双子葉植物では、最適な翻訳開始配列コンテキストは、ATGの直ぐ後にヌクレオチドGCを含むことが公知である。普遍的な遺伝子暗号では、GCNはアラニンを指定するコドンを表す。それ故、最適な翻訳開始コドンコンテキストは、ATGGCN（メチオニン-アラニンをコードする）として指定される。双子葉mRNAにおける翻訳開始コドンATGより前の最適は配列コンテキストは、AAACAによって表されることもさらに公知で

10

20

30

40

50

ある。最終的に、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームが少なくとも1つの翻訳終結コドン（即ち、普遍的なDNA遺伝子暗号においてTGA、TAAまたはTAG）で終結することが必須であり、そして複数の翻訳終結コドンが、タンパク質コーディング領域（+1フレームと呼ばれる）と同じフレームだけではなく、二本鎖DNAにおいて可能な他の5つのリーディングフレームにおいても存在することが、なおより好適である。

【0143】

配列番号8は、上記のエLEMENTを組み入れる完全なタバコ最適化キメラタンパク質コーディング領域のDNA配列を開示し、15kDaゼインERターゲティングシグナルペプチド、タバコ最適化prM-、M-およびE-ペプチドコーディング領域（配列番号3として開示する）、およびタバコ最適化KDEL ER残留シグナルをコードするタバコ最適化配列を含んでなる。配列番号8によってコードされるキメラ融合タンパク質を、配列番号9として開示する。配列番号8によってコードされ、そして配列番号9に示されるERターゲティングシグナルは、2位にアラニン残基が付加されていることが元々のトウモロコシ15kDaゼインERターゲティングペプチド配列と異なり、上記のコンセンサス翻訳開始コドン配列コンテキストを蓄積する。

10

【0144】

配列番号10は、上記のエLEMENTを組み入れる第2の完全なタバコ最適化キメラタンパク質コーディング領域のDNA配列を開示し、15kDaゼインERターゲティングシグナルペプチド、配列番号4において開示する変異N-グリコシル化アクセプター部位を含むタバコ最適化prM-、M-およびE-ペプチドコーディング領域、およびタバコ最適化KDEL ER残留シグナルをコードするタバコ最適化配列を含んでなる。配列番号10によってコードされるERターゲティングシグナルは、配列番号8において開示するものと同じである。配列番号10によってコードされるキメラ融合タンパク質を、配列番号11として開示する。

20

【0145】

配列番号12は、上記のエLEMENTを組み入れる第3の完全なタバコ最適化キメラタンパク質コーディング領域のDNA配列を開示し、15kDaゼインERターゲティングシグナルペプチド、配列番号6として開示するタバコ最適化M-およびE-ペプチドコーディング領域、およびタバコ最適化KDEL ER残留シグナルをコードするタバコ最適化配列を含んでなる。配列番号12によってコードされるERターゲティングシグナルは、配列番号8において開示するものと同じである。配列番号12によってコードされるキメラ融合タンパク質を、配列番号13として開示する。

30

【0146】

配列番号14は、上記のエLEMENTを組み入れる第4の完全なタバコ最適化キメラタンパク質コーディング領域のDNA配列を開示し、15kDaゼインERターゲティングシグナルペプチド、配列番号7として開示するタバコ最適化M-およびE-ペプチドコーディング領域、およびタバコ最適化KDEL ER残留シグナルをコードするタバコ最適化配列を含んでなる。配列番号14によってコードされるERターゲティングシグナルは、配列番号8において開示するものと同じである。配列番号14によってコードされるキメラ融合タンパク質を、配列番号15として開示する。

40

【0147】

配列番号8、配列番号10、配列番号12、および配列番号14において開示するDNA配列を含んでなるDNA分子は、業者（PicoScript；Houston、テキサス州）によって合成され、そして得られた分子を、標準的な分子生物学的技術によって植物発現および形質転換ベクターにクローニングした。

【0148】

実施例2 - 植物発現ベクター構築

双子葉バイナリー構築物。アグロバクテリウム（Agrobacterium）仲介植物形質転換のための3つの双子葉バイナリーベクター、pDAB2475、pDAB24

50

78、および pDAB2481 を、プラスミド pDAB2406、pDAB2418、および pDAB2407 に基づいて構築した。pDAB2406 (図1) は、WO 97/48819 に記載のキャッサバベインモザイクウイルス (cassava vein mosaic virus) (CsVMV) プロモーターおよびオープンリーディングフレーム 3' 非翻訳領域、ORF23 3' UTR (GenBank 受託番号 X00493) v1 を含有する。目的の遺伝子を挿入するために使用した独特な部位、NcoI および SacI は、CsVMV プロモーターと ORF23 3' UTR v1 との間に局在する。pDAB2418 (図2) は、RB7 マトリックス結合領域 (MAR) (U.S. Patent No. 5,773,689; U.S. Patent No. 5,773,695; U.S. Patent No. 6,239,328、WO 94/07902、および WO 97/27207) ならびに植物転写単位を含有し、ここで、植物選択マーカーホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) (U.S. Patent Nos: 5,879,903; 5,637,489; 5,276,268; および 5,273,894) は、AtUbi10 プロモーター (Sun C.-W. et al., 1997; Norris, S.R. et al., 1993; Callis, J. et al., 1995) によって誘導され、そして下流では、AtuORF1 3' UTR v3 (US5428147; Barker, R.F., et al., 1983; GenBank 受託番号 X00493) によって隣接される。RB7 MAR 遺伝子と植物 AtUbi10 プロモーターとの間に局在する独特な NotI 部位は、CsVMV プロモーター、目的の遺伝子、および ORF23 3' UTR v1 を含有する pDAB2406 から遺伝子フラグメントをクローニングするために使用した。

10

【0149】

改変された基本バイナリーベクター、pDAB2407 (図3) は、pBBV の独特な BamHI 部位において AgeI リンカーを添加し、T-DNA 境界間での WNV 抗原および選択マーカー発現カセットの AgeI / AgeI 連結を可能にすることによって組み立てられた。

20

【0150】

ウエストナイル (West Nile) ウイルス双子葉 (dicot) バイナリーベクター pDAB2475 (図4) は、ER ターゲティング v2 および KDEL 残留 v3 シグナル (配列番号 12) を伴うタバココドンバイアス化 (codon biased) ウエストナイル (West Nile) ウイルス膜およびエンベロープペプチド (バージョン 2) からなるキメラタンパク質をコードする。より具体的には、植物転写単位 (PTU) は: T-DNA 境界 B / RB7 MAR v3 / CsVMV プロモーター v2 / 15 kDa ゼイン ER シグナル v2 - WNV ME v2 - KDEL v3 / Atu ORF23 3' UTR v1 / AtUbi10 プロモーター v2 / PAT v3 / Atu ORF1 3' UTR v3 / T-境界 A を含む。Stratagene's Bluescript ベクターにおける PicoScript から得られるように、一次構築物を DASPICO20 と呼ぶ。その Bluescript 骨格ベクターから 15 kDa ER シグナル v2 - WNV ME v2 - KDEL v3 遺伝子を単離するために、DASPICO20 を NcoI / SacI で消化し、次いで、T4 リガーゼにより NcoI および SacI 部位において pDAB2406 プラスミドに挿入し、ここで、遺伝子フラグメントは、CsVMV プロモーター v2 と、ORF23 3' UTR v1 との間に挟まれ、中間ベクター pDAB2473 を生じた。適切な挿入を伴うクローンを確認するために、単離された DNA を NcoI / SacI で切断し、ゲル電気泳動により同定し、そしてバルクアップした。ER シグナル - WNV ME v2 - KDEL および ORF23 3' UTR を含有する CsVMV プロモーター発現カセットを、NotI により pDAB2473 から取り出し、そして RB7 MAR v3 の下流および AtUbi10 プロモーター v2 - PAT v3 - Atu ORF1 3' UTR 選択マーカーカセットの上流の pDAB2418 の NotI 部位において T4 連結を行い、中間ベクター pDAB2474 において植物転写単位 (PTU) を形成した。次いで、AgeI 消化を使用して、PTU 成分を pDAB2474 から切り出し、逆配向で pDAB2407 の AgeI 部位に連結して、最終双子葉バイナリーベクター、pDAB2475 を得、ここで、PTU エLEMENT は、T-DNA 境界 A および B によって隣接される。

30

40

50

【0151】

双子葉バイナリーベクター、pDAB2478 (図5)は、ERターゲティングv2およびKDEL残留v3シグナル(配列番号8)を伴うタバココドンバイアス化ウエストナイル(West Nile)ウイルスプレ膜v2、膜およびエンベロープペプチドv2からなるキメラタンパク質をコードする。より具体的には、2つのPTUは：T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMVプロモーターv2/15kDaゼインERシグナルv2-prME v2-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/AtuORF1 3'UTR v3/T-境界Aを含む。Stratagene's BluescriptベクターにおけるPICOSCRIPTから得られるように、一次構築物をDASPICO21と呼ぶ。その骨格ベクターからERシグナルv2-prME v2-KDEL v3遺伝子を単離するために、DASPICO21をNcoI/SacIで消化した。次いで、ERシグナルv2-prME v2-KDEL v3遺伝子フラグメントを、NcoIおよびSacI部位においてpDAB2406プラスミドにT4が連結し、ここで、遺伝子フラグメントは、CsVMVプロモーターおよびORF23 3'UTRによって隣接され、中間ベクターpDAB2476を生じた。適切な挿入を伴うクローンを確認するために、単離されたDNAをNcoI/SacIで切断し、ゲル電気泳動により同定し、そしてバルクアップした。ERシグナルv2-prME v2-KDEL v3およびORF23 3'UTRを含有するCsVMVプロモーター発現カセットを、NotIによりpDAB2476から取り出し、そしてRB7 MAR v3遺伝子の下流およびAtUbi10プロモーターv2-PAT v3-AtuORF1 3'UTR選択マーカークセットの上流のpDAB2418のNotI部位においてT4リガーゼを使用して連結し、中間構築物pDAB2477の植物転写単位(PTU)を形成した。次いで、AgeIにより、PTU成分をpDAB2477から切り出し、逆配向でpDAB2407のAgeI部位に連結して、最終双子葉ベクター、pDAB2478を得、ここで、PTU成分は、T-DNA境界AおよびBによって隣接される。

10

20

【0152】

双子葉バイナリーベクター、pDAB2481 (図6)は、ERターゲティングv2およびKDEL残留v3シグナル(配列番号10)を伴うタバココドンバイアス化ウエストナイル(West Nile)ウイルスプレ膜v2、膜v2、およびエンベロープペプチドからなるキメラタンパク質をコードする。より具体的には、PTU単位は：T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMVプロモーターv2/15kDaゼインERシグナルv2-変異N-グリコシル化部位を伴うWNV prM v2 E v4-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/AtuORF1 3'UTR v3/T-境界Aを含む。Stratagene's BluescriptベクターにおけるPICOSCRIPTから得られるように、一次構築物をDASPICO22と呼ぶ。ERシグナルv2-変異N-グリコシル化部位を伴うWNV prM v2 E v4-KDEL v3遺伝子をその骨格ベクターから単離するために、DASPICO22をNcoI/SacIで消化し、そしてゲル精製した。次いで、ERシグナルv2-変異N-グリコシル化部位を伴うWNV prM v2 E v4-KDEL v3遺伝子フラグメントを、NcoIおよびSacI部位においてpDAB2406プラスミドにT4リガーゼによって挿入し、ここで、遺伝子フラグメントは、CsVMVプロモーターv2とORF23 3'UTR v1との間に挟まれ、中間ベクターpDAB2479を生じた。挿入を伴うクローンを確認するために、単離されたDNAをNcoI/SacIで切断し、ゲル電気泳動により同定し、そしてバルクアップした。ERシグナルv2-変異N-グリコシル化部位を伴うWNV prM v2 E v4-KDEL v3およびORF23 3'UTRを含有するCsVMVプロモーター発現カセットを、NotIによりpDAB2479から取り出し、そしてRB7 MAR v3遺伝子の下流およびAtUbi10プロモーターv2-PAT v3-AtuORF1 3'UTR選択マーカークセットの上流のpDAB2418のNot

30

40

50

I 部位において連結し、中間構築物 p D A B 2 4 8 0 の P T U 成分を形成した。次いで、A g e I により、P T U 成分を p D A B 2 4 8 0 から切り出し、逆配向で p D A B 2 4 0 7 の A g e I 部位に連結して、最終双子葉ベクター、p D A B 2 4 8 1 を得、ここで、P T U カセットは、T - D N A 境界 A および B によって隣接される。すべての最終構築物を、はじめに、制限消化によって確認し、続いて、T - D N A 境界間を配列決定して、実際のおよび予想される配列が同一であることを確認した。

【 0 1 5 3 】

G a t e w a y (商 標) 双子葉バイナリー構築物。G a t e w a y (商 標) T e c h n o l o g y (I n v i t r o g e n) を、複数のバージョンの M E ペプチド、プロモーター、ならびにプロモーターおよび U T R に対する目的の遺伝子の配向を含有する次の 9 つの W N V M E 双子葉バイナリーベクターをクローニングするために使用した。目的およびドナーベクターの両方を、I n v i t r o g e n ' s G a t e w a y (商 標) T e c h n o l o g y プロトコルに従って作製した。1 つの目的ベクター、p D A B 3 7 3 6 (図 7)、および 4 つのドナーベクター、p D A B 3 9 1 2 (図 8)、p D A B 3 9 1 4 (図 9)、p D A B 3 9 1 6 (図 1 0)、および p D A B 3 7 2 4 (図 1 1) は、9 つのバイナリー構築物を組み立てるために使用した G a t e w a y (商 標) 構築物の骨格を構成する。

【 0 1 5 4 】

目的ベクター p D A B 3 7 3 6 を p D A B 2 4 0 7 (図 3) から誘導し、これは、L R クロナーゼ反応においてエントリークローンと組み換えて、発現クローンを作製する a t t R 部位を含有する。さらに、p D A B 3 7 3 6 は、複数コピーの T - D N A 境界 A を有する。境界 A および境界 B 領域内に、R B 7 マトリックス結合領域 (M A R) および G a t e w a y (商 標) クローニング部位 a t t R 1 および a t t R 2 が存在する。エントリーベクター p D A B 3 9 1 2 (図 8) は、C s V M V プロモーターおよび O R F 2 3 3 ' U T R カセットを含有する。プロモーターと U T R との間に N c o I および S a c I 部位が局在し、ここで、目的の遺伝子が挿入された。カセットは、エントリークローンの作製のために、G a t e w a y (商 標) クローニング部位 a t t L 1 および a t t L 2 によって隣接される。別のエントリーベクター、p D A B 3 9 1 4 (図 9) は、M A S 4 O C S プロモーター (A t u M a s プロモーター) v 4 (G e n b a n k 受託番号 X 0 0 4 9 3) および O R F 2 3 3 ' U T R カセットを含有する。さらに、プロモーターと U T R との間に、クローニング部位、N c o I および S a c I 部位が存在し、ここで、目的の遺伝子が挿入された。カセットは、G a t e w a y (商 標) a t t L 1 および a t t L 2 部位によって隣接される。他のドナーベクターと同様に、p D A B 3 9 1 6 (図 1 0) は、A t U b i 1 0 プロモーターおよび O R F 2 3 3 ' U T R カセットを含有する G a t e w a y (商 標) 構築物である。プロモーターと U T R との間に N c o I および S a c I 部位が存在し、ここで、目的の遺伝子が挿入された。カセットは、G a t e w a y (商 標) クローニング部位、a t t L 1 および a t t L 2 部位によって隣接される。G a t e w a y ドナーベクター、p D A B 3 7 2 4 (図 1 1) は、C s V M V プロモーター、続いて、連続的に、N t O s m o t i n 5 ' U T R v 3 (G e n b a n k 受託番号 S 4 0 0 4 6)、- グルクロニダーゼ (G U S) レポーター遺伝子 (J e f f e r s o n , 1 9 8 7)、および N t O s m 3 ' U T R v 3 (G e n b a n k 受託番号 S 4 0 0 4 6) を含有する。カセットは、G a t e w a y (商 標) a t t L 1 および a t t L 2 部位によって隣接される。G U S 遺伝子と境界をなす制限部位、N c o I および S a c I を、G U S を目的の遺伝子で置き換えるために使用した。

【 0 1 5 5 】

G a t e w a y (商 標) W N V M E バイナリーベクター、p D A B 3 9 2 0 (図 1 2) は、P T U 単位：T - D N A 境界 B / R B 7 M A R v 3 / C s V M V プロモーター v 2 / W N V M E v 2 / A t u O R F 2 3 3 ' U T R v 1 / A t U b i 1 0 プロモーター v 2 / P A T v 3 / A t u O R F 1 3 ' U T R v 3 / 複数の T - D N A 境界 A を含有する。W N V M E v 2 ペプチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応

(PCR)によって達成した。WNV ME v2配列のみに対して刺激し、そして順方向プライマーのNcoI部位および逆方向プライマーのSacI部位からなるPCRプライマー(順方向: 5' aga gaa cta gta aaa agg aga aa tcca tgg ctt ccc tga cag tgc aaa ctc atg 3'; 逆方向: 5' Ccc tcg agg gag ctc tta tca ctt agc atg aac att tac ag 3')を使用することによって、MEペプチドから、DASPICO20(配列番号12)由来のER v2ターゲティングおよびKDEL v3残留配列を取り出した。Invitrogen's TOPO TACクローニングプロトコルを使用して、WNV ME v2 PCR産物を直接PCR2.1 TOPOベクターにクローニングして、pDAB3918を形成した。次いで、NcoIおよびSacI消化を使用して、TOPO骨格からWNV ME v2遺伝子を単離し、そしてT4リガーゼを使用して、pDAB3912のNcoI/SacI部位に連結して、エントリークローン、pDAB3919を形成した。pDAB3919を、pDAB3736に対してLRクローナーゼ処理して、pDAB3920を形成した。

10

20

30

40

50

【0156】

Gateway(商標)バイナリーベクター、pDAB3922(図13)は、次のエレメント: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/AtUMAS 4OCSプロモーターv4/15kDaゼインER v2-WNV ME v2-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3'UTR v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。DASPICO20(配列番号12)のERシグナルv2-ME v2-KDEL v3ペプチドを、NcoIおよびSacIによってその骨格プラスミドから取り出した。次いで、切り出した遺伝子フラグメントをpDAB3914のNcoI/SacI部位に挿入して、AtUMAS 4OCSプロモーターv4とORF23 3'UTR v1との間に目的の遺伝子が挟まれたエントリークローン、pDAB3921を形成した。次いで、pDAB3921を、pDAB3736目的ベクターに対してLRクローナーゼ処理して、発現およびバイナリーベクター、pDAB3922を形成した。

【0157】

Gateway(商標)ウエストナイル(West Nile)ウイルスバイナリーベクター、pDAB3924(図14)は、次のエレメント: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/AtUbi10プロモーター(Genbank受託番号L05363)v2/15kDaゼインER v2-WNV ME v2-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3'UTR v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。DASPICO20(配列番号12)のERシグナルv2-WNV ME v2-KDEL v3ペプチドを、NcoIおよびSacIによってその骨格プラスミドから取り出した。次いで、切り出した遺伝子フラグメントをpDAB3916のNcoI/SacI部位に挿入して、AtUbi10 v2プロモーターとORF23 3'UTR v1との間に目的の遺伝子が挟まれたエントリークローン、pDAB3923を形成した。次いで、pDAB3923を、pDAB3736目的ベクターと共にLRクローナーゼ処理して、双子葉バイナリーベクター、pDAB3924を形成した。

【0158】

Gateway(商標)バイナリーベクター、pDAB3927(図15)は、次のPTUエレメント: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMVプロモーターv2/15kDaゼインER v2-WNV ME v2-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3'UTR v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。ERシグナルv2-WNV ME v2ペプチドの増幅を、PCRによって達成した。ERシグナルv2-WNV ME v2配列のみに対して刺激し、そしてクローニング目的のために、順方向プライマーのNcoI部位および逆方向プライマーのSacI部位からなるPCRプライマー

(順方向: 5' cat gcc atg gct aag atg gtc att g
t g c t t g t t g t g t g c 3'; 逆方向: 5' c c c t c g a g g
g a g c t c t t a t c a c t t a g c a t g a a c a t t t a c
a g 3') を使用することによって、ME v2 ペプチドから、DASPICO20 (配
列番号12) 由来のKDEL v3 残留配列を取り出した。Invitrogen's
TOPO TA クローニングプロトコルを使用して、ERシグナルv2 - WNV ME
v2 PCR産物を直接PCR2.1 TOPOベクターにクローニングして、pDAB39
25を形成した。次いで、NcoIおよびSacIを使用して、そのTOPO骨格プラス
ミドからERシグナルv2 - WNV ME v2 遺伝子を単離し、そしてT4リガーゼを
使用して、pDAB3912のNcoI/SacI部位に連結して、エントリークローン
、pDAB3926を形成した。pDAB3926を、目的ベクター、pDAB3736
と共にLRクローナーゼ処理して、最終バイナリーベクターpDAB3927を形成した。

10

【0159】

Gateway (商標) バイナリーベクター、pDAB3929 (図16) は、次のP
TU単位: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMVプロモーターv2/N
t o s m 5' UTR v3/15kDaゼインER v2 - WNV ME v2 - K
DEL v3/Nt o s m 3' UTR v3/Atu ORF23 3' UTR v
1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3' UTR
v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。DASPICO20 (配列番号12) のER
シグナルv2 - ME v2 - KDEL v3 ペプチドを、NcoIおよびSacIによっ
てその骨格プラスミドから取り出した。次いで、T4リガーゼを使用して、切り出した遺
伝子フラグメントをpDAB3724のNcoI/SacI部位 (図11) に挿入して、
CsVMV/Nt o s m 5' UTRとNt o s m 3' UTR v3/ORF23
3' UTRとの間に目的の遺伝子が挟まれたエントリークローン、pDAB3928を
形成した。pDAB3928およびpDAB3736目的ベクターとのLRクローナーゼ反
応により、バイナリーベクター、pDAB3929を生成させた。

20

【0160】

Gateway (商標) バイナリーベクター、pDAB3934 (図17) は、次のエ
レメント: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/ORF25/26 3' UTR/
KDEL v3/WNV ME v3/15kDaゼインERシグナルv2 (配列番号14
) /AtuMAS 4OCSプロモーターv4/15kDゼインERシグナルv2 - WN
V ME v2 - KDEL v3/Atu ORF23 3' UTR v1/AtUbi1
0プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3' UTR v3/複数のT
- DNA境界Aを含有する。この構築物の作製のために、多段階クローニングプロセスは
、PCR産物に隣接するHindIII部位を含有したプライマー (順方向: 5' c c c
a a g c t t g g g t g t c c a a c a g t c t c a g g g t t a
a t g t c 3'; 逆方向: c c c a a g c t t g g g g t g g c a c g t
g a g g t c c a t g c g g c t g c) を使用する構築物p501 (Murai
and Kemp, 1982) からのORF25/26 ポリA UTRの増幅を含んだ。次いで、O
RF25/26ポリA PCR産物をPCR2.1 TOPOベクターにクローニングして
、pDAB3930を生成した。DASPICO20 (配列番号12) のERシグナルv
2 - WNV ME v2 - KDEL v3を、NcoIおよびSacIによってその骨格
プラスミドから取り出し、T4リガーゼを使用して、NcoI/SacI部位においてp
DAB3914に挿入して、pDAB3931を形成した。SacIIを使用して、その
Bluescript骨格からDASPICO72 (PicoScript、配列番号1
4) のERシグナルv2 - WNV ME v3 - KDELを取り出し、次いで、遺伝子フ
ラグメントをSacII部位において逆配向でpDAB3931に挿入して、pDAB3
932を形成した。HindIIIを使用して、pDAB3930からORF25/26
ポリA PCR産物を切り出した。次いで、ORF25/26 Poly A UTRを、
逆配向で、pDAB3932にそのHindIII部位において挿入して、エントリーク

30

40

50

ローン、pDAB3933を形成した。pDAB3933を、pDAB3736に対してLRクロナーゼ処理して、発現およびバイナリーベクター、pDAB3934を形成した。

【0161】

Gateway (商標) バイナリーベクター、pDAB3941 (図18) は、次のPTU成分: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMVプロモーターv2/15kDゼインER v2-WNV ME v2-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi3プロモーターv2/15kDゼインER v2-WNV ME v3-KDEL v3/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3'UTR v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。この多段階クローニングプロセスは、PCR産物の5'末端におけるHindIII/NotI部位、および3'末端においてPCR産物に隣接するSacI/XhoI部位を含有するプライマー (順方向: 5' ccc aag ctt at a aga atg cgg ccg cta aac tat agc ttc gga ttt gga gcc aag tc3'; 逆方向: 5' ccg ctc gag cgg tcc ccg ccg gga gct gaa ata aaa caa tag aac aag tag3') を使用して、別の構築物からAtUbi3 v2プロモーターを増幅することを含んだ。次いで、AtUbi3 v2 PCR産物を、PCR2.1TOPOベクターにクローニングして、プラスミドpDAB3935を作製した。XhoIリンカー (センス: cgatccgcctcgaagcggtagg; アンチセンス: gtg acc cta ccg ctc gag ccg atc gag ct) を、pDAB2406にSacI/BstEII部位において付加して、CsVMV v2プロモーターとORF23 3'UTR v1との間にXhoI部位を導入して、ベクター、pDAB3936を作製した。次いで、pDAB3936をXhoIおよびHindIIIで切断して、CsVMVプロモーターを取り出し、そして骨格ベクターを保持した。pDAB3935由来のPCR産物、AtUbi3 v2プロモーターをHindIIIおよびXhoIで切断し、そしてHindIII/XhoI部位においてpDAB3936骨格に連結し、pDAB3937を作製した。DASPICO20 (配列番号12) のERシグナルv2-ME v2-KDEL v3ペプチドを、NcoIおよびSacIによってその骨格プラスミドから取り出し、NcoI/SacI部位においてpDAB3912に連結して、プラスミドベクター、pDAB3939を形成した。DASPICO72 (配列番号14) のERシグナルv2-WNV ME v3-KDEL v3ペプチドを、SacII-XhoIによりそのBluescript骨格プラスミドから取り出し、そしてpDAB3937にSacII/XhoI部位において挿入して、pDAB3938を構築した。次いで、AtUbi3/ERシグナルv2-ME v3-KDEL v3/ORF23遺伝子カセットをpDAB3938からNotIによって切り出し、そしてpDAB3939にNotI部位において挿入して、エントリークローン、pDAB3940を形成した。pDAB3940および目的ベクター、pDAB3736とのLRクロナーゼ反応により、バイナリーベクター、pDAB3941を形成させた。

【0162】

Gateway (商標) バイナリーベクター、pDAB3943 (図19) は、次のエレメント: T-DNA境界B/RB7 MAR v3/CsVMV v2/改変されたグリコシル化部位 (v5) を伴うWNV M v2 E/Atu ORF23 3'UTR v1/AtUbi10プロモーターv2/PAT v3/Atu ORF1 3'UTR v3/複数のT-DNA境界Aを含有する。クローニングプロセスは、AccIおよびAvrII制限酵素を使用して、DASPICO22 (配列番号10) のWNV prM v2 E v4ペプチドの変異N-グリコシル化部位領域を取り出し、そしてpDAB3919 (pDAB3920クローニングストラテジーを指す) にAccI/AvrII部位において連結して、エントリークローン、pDAB3942を確立することを含んだ。pDAB3942を、目的ベクター、pDAB3736に対してLRクロナーゼ処理し

て、最終双子葉バイナリープラスミド、pDAB3943を作製した。

【0163】

すべての最終Gatewayバイナリー構築物を、はじめに、制限消化によって確認し、続いて、T-DNA境界間を配列決定して、実際のおよび予想される配列が同一であることを確認した。

【0164】

実施例3 - 植物発現ベクターによるアグロバクテリウム (AGROBACTERIUM) の形質転換

独立して、各WNV構築物について、1.5 ~ 3 µgのプラスミドDNAを、50 µlのElectromax (登録商標) LBA4404アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 細胞 (Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州) に添加し、そして穏やかに混合した。混合物を、冷たい0.2 cmのGene Pulser (登録商標) キュベット (BioRad Hercules、カリフォルニア州) に移し、そして氷上に置いた。次いで、キュベットを、冷たいGene Pulser (登録商標) ラック (BioRad, Hercules、カリフォルニア州) に置き、そして以下の条件でエレクトロポレートした：

キャパシタンス出力	25 µファラッド
キャパシタンスエクステンダー	960 µファラッド
抵抗	200 オーム
電圧	2.5 キロボルト

【0165】

エレクトロポレーションの直後、950 µlのSOC培地 (Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州) を添加し、そして混合物をFalcon 2059チューブ (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes、ニュージャージー州) または均等物に移した。次いで、形質転換細胞を28 °Cで1時間、インキュベートした。インキュベーション後、50 µl、100 µl、および200 µlの細胞を、適切であれば抗生物質を含有する個別のYEP培地プレート (1リットルの水中10 g イースト抽出物、10 g ペプトン、5 g のNaCl、10 g スクロース、および15 g 寒天) 上でプレート化した。プレートを、28 °Cで約36 ~ 48時間、倒置培養した。単一のコロニーを拾い出し、そして適切であれば抗生物質を含有する50 mlの液体YEP (1リットルの水中10 g イースト抽出物、10 g ペプトン、5 g のNaCl、および10 g スクロース) において、28 °Cで約36時間、増殖させた。Qiagen (登録商標) 低コピーミニ-プレッププロトコル (Qiagen, Valencia、カリフォルニア州) 後、精製したプラスミドDNAを、細菌培養物から調製した。制限消化によって、DNA保全を評価した。予想される結合パターンを伴うクローンを同定し、そして500 µlの細菌培養物を500 µlの滅菌グリセロール (Sigma Chemical Co., St. Louis、ミズーリ州) に添加し、反転して混合することによって、グリセロールストックを調製した。グリセロールストックをドライアイス上で凍結し、そして-80 °Cで貯蔵した。

【0166】

実施例4 - WNVタンパク質の発現のためのタバコ (NICOTIANA TABACUM) 細胞培養の安定な形質転換

2 mlのNT-1培養物または1 mlのパック細胞 (packed cell) を250 mlフラスコ中40 mlのNT-1B培地 (表3) に添加することによって、タバコ (Nicotiana tabacum) NT-1細胞培養を、1週間のサブ培養サイクル上で無菌的に維持した。懸濁物を、25 ± 1 °Cの暗所で、125 rpmで維持した。

【0167】

NT-1培養物の形質転換のための調製では、目的の発現ベクターを含有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens)

）の50%グリセロールストックを使用して、20～500 μ lのグリセロールストックを、50mg/lスペクチノマイシンおよび100 μ Mアセトシリンゴンを含む30mlのYEP液体培地（1リットルの水中10gイースト抽出物、10gペプトン、5gのNaCl、および10gスクロース）に添加することによって、液体細菌培養を開始した。細菌培養物を、28℃の暗所で、150～200rpmで、OD₆₀₀が0.5～0.6となるまで、インキュベートした。これは、約18～20時間を要した。

【0168】

形質転換の当日、NT-1サブ培養の4日後に、20mMアセトシリンゴン（エタノール中）を、1mlのNT-1培養物あたり1 μ lの濃度で細胞懸濁液に添加した。形質転換効率を増加させるために、滅菌10ml標準口径ピペットを介して細胞を20回上下させることによって、NT-1細胞を傷つけた。4ミリリットルの懸濁液を10枚の60×20mmペトリプレートそれぞれに移した。1枚のプレートを別にとっておき、非形質転換コントロールとして使用した。残りの9枚のプレートのそれぞれに、100 μ lのアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）懸濁液を添加した。プレートをパラフィンで包み、そして暗所にて、100rpmおよび25±1℃で3日間、インキュベートした。

10

【0169】

トランスジェニック事象もまた、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）培養物の増殖においてアセトシリンゴンを使用せず、また植物細胞形質転換プロセス中にもそれを使用しない代替的方法によって、作製した。4ミリリットルのタバコ懸濁液（無傷）を10枚の100×25mmペトリプレートのそれぞれに移した。9枚のプレートのそれぞれに、OD₆₀₀ = 1.5±0.2の100 μ lのアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）懸濁液を添加し、再度、1枚のプレートを非形質転換コントロールとして保持した。プレートを旋回させて混合し、パラフィンで包み、そして25±1℃の暗所で、3日間、振盪を伴わずに培養した。

20

【0170】

いずれの形質転換方法の共培養期間後も、すべての液体を取り出し、次いで、細胞を8mlのNTC培地（オートクレーブ後に添加した500mg/lカルベニシリンを含むNT-1B培地）に再懸濁した。懸濁液の1ミリリットルアリコートをし、NTC+B5培地 [オートクレーブ後に5mg/lホスフィノトリシルアラニルアラニン（phosphinothricylalanylalanine）ナトリウム（ピアラホス）を補充し、8g/lのTC寒天で固化したNTC培地] を含む8枚のペトリプレート（100×25mm）のそれぞれに分配した。パラフィンで包んだまたは包まずに放置したすべての選択プレートを、25～28℃の暗所で維持した。包む前に、過度に湿潤したいずれのプレートからも液体を取り出した。

30

【0171】

2～8週間後、推定形質転換体は、死滅した非形質転換細胞のバックグラウンドに対して、カルスの小さなクラスターとして出現した。これらの生存カルスを新鮮NTC+B5培地に移し、識別番号を割り当て、そして個々の形質転換事象として維持した。プレートを包まずに放置し、28±1℃の暗所でインキュベートし、そして事象を、新鮮NTC+B5培地上で、2週間ごとに、合計で3継代サブ培養し、その後、将来のサブ培養のために、カルベニシリンを培地から取り出した。各推定形質転換体の部分を、タンパク質発現解析のために使用した。選択した事象を、カルスとしてバルクアップし、そして懸濁培養で樹立した。

40

【0172】

500mgの7日齢、増殖トランスジェニックカルスを、20mlのNT1B+10mg/lピアラホスを含む125mlフラスコに移すことによって、懸濁を開始した。50mlピペットで3～5回ピペッティングして、組織を破壊することによって、細胞および液体を混合し、次いで、シェーカー上で、130rpmで、25±1℃の暗所にて撹拌した。1mlのバック細胞を、125mlフラスコ中10mg/lピアラホスを伴う20

50

mlのNT1Bに移すことによって、懸濁物を週単位でサブ培養した。懸濁物を、 25 ± 1 の暗所で、125rpmで維持した。

【0173】

実施例5 - WNVタンパク質発現解析

不活化WNV対照標準。公開された方法(Blitvich, et al., 2003)を改変することによって、対照抗原を調製した。WNVを、約0.01の感染多重度で、5つのローターボトル中のVERO細胞に播種し、そしてローターラック上、37℃でインキュベートした。2つの同一ボトルの非播種VERO細胞に、同じ増殖培地(アール(Earles)塩、5%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシンを伴う培地199)を供給し、そして同じ条件下でインキュベートした。5日後、播種および非播種細胞を、それらのボトルの内側から掻き取った。培地および細胞を50ml遠心チューブに置き、そして2000rpmでペレット化した。上清を捨て、そして細胞を15mlの増殖培地にプールし、そして-80℃で、均等な5つのアリコートにおいて凍結した。

10

【0174】

感染細胞の1つのチューブおよびコントロール細胞の1つのチューブを、37℃で融解した。細胞を3500rpmで、10分間、ペレット化し、そして6mlの氷冷ホウ酸塩(borate saline)緩衝液(120mM塩化ナトリウム、50mMホウ酸、24mM水酸化ナトリウム、pH9.0)で2回洗浄し、3500rpmで10分間、4℃で遠心分離を行った。細胞を900μlの0.1%ドデシル硫酸ナトリウムに再懸濁し、次いで、100μlのTriton X-100および2mlのホウ酸塩緩衝液を懸濁物に添加した。懸濁物を、20%出力で、30秒間、氷上で音波処理し、エッペンドルフチューブに移し、そしてマイクロ遠心分離機において、最高速度で10分間、遠心分離した。最終的に、上清を、透明なエッペンドルフチューブに、1本のチューブあたり500μlに移し、そして-80℃で凍結した。WNV感染材料を含有するエッペンドルフチューブに、「WNV/VERO Antigen」のラベルを付した。非播種コントロール細胞を含有するエッペンドルフチューブに、「Control VERO Antigen」のラベルを付した。

20

【0175】

50μlおよび25μlの量のWNV/VERO Antigenを、150cm²フラスコ中VERO細胞の単層上に播種し、5~6日間、インキュベートし、次いで培地を新鮮VERO細胞上に通過させ、そして6日間、インキュベートすることによって、WNVの不活化を確認した。不活化のために使用した界面活性剤に起因するいくつかのVERO細胞損傷が、第1継代において観察された。第2の継代において細胞変性効果が認められなかったことから、連続的なウイルス不活化が示された。

30

【0176】

ウエストナイル(West Nile)ウイルスEタンパク質ウエスタンブロット。市販の抗体を使用してEタンパク質を検出するためのウエスタンブロットプロトコルを開発した。不活化ウエストナイル(West Nile)ウイルス(WNV/VERO Antigen、5.1μg/ml)を、Leamml iサンプル緩衝液(125mMのTris-HCl、pH6.8、40mMのDTT、1mMのEDTA、2%SDS、10%グリセロール)中に調製し、そして4~12%Bis-Trisゲル(Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州)上でのSDS-PAGEによって分離した。タンパク質を、エレクトロブロットによって、0.2μmニトロセルロース膜に移した。膜ブロットを、ブロッキング緩衝液(Western Breeze Blocker/Diluent(AおよびB部)、Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州)においてブロックし、続いて、ウエストナイル(West Nile)ウイルスモノクローナル抗体(ブロッキング緩衝液中1:5000に希釈したMab8151 Ms X West Nile/Kunj in Virus, Chemicon International, Temecula、カリフォルニア州またはブロッキング緩衝液中1:500に希釈したWNV Monoclonal Antibody 7H

40

50

2、アフィニティー精製、BioReliance Invitrogen BioServices, Rockville、メリーランド州)と共に、少なくとも1時間、インキュベーションを行った。3回の5分間洗浄工程(WesternBreeze Wash Solution (16X), Invitrogen, Carlsbad、カリフォルニア州)後、プロットを、検出抗体においてインキュベートした。アルカリホスファターゼ検出プロットのために、ヤギ抗マウスアルカリホスファターゼ標識抗体(カタログ番号075-1806, KPL, Gaithersburg、メリーランド州)を、ブロッキング緩衝液中1:1000に希釈した。西洋ワサビペルオキシダーゼ検出プロットのために、ヤギ抗西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体(カタログ番号074-1806, KPL, Gaithersburg、メリーランド州)を、ブロッキング緩衝液中1:1000に希釈した。検出抗体とのインキュベーション後、プロットを洗浄し、そして適切な基質:バンドを可視化するためのアルカリホスファターゼ検出用NBT/BCIP Phosphatase Substrate(カタログ番号50-81-08, KPL, Gaithersburg、メリーランド州)または西洋ワサビペルオキシダーゼ用Pierce SuperSignal(カタログ番号34080, Pierce, Rockford、イリノイ州)で展開した。

【0177】

ウエストナイル(West Nile)ウイルスEタンパク質ELISA。Nunc Maxisorp 96ウェルマイクロタイターELISAプレートは、プレートを炭酸緩衝液中2 μ g/mlの濃度のウマ抗WNV(Novartis #215-006, Webster Veterinary Supply, Sterling、マサチューセッツ州)で、1ウェルあたり100 μ lで被覆することによって、Beacon Analytical Systems Inc. (Portland、メイン州)により調製された。プレートを、PBST(0.05% Tween20を含有する1xPBS、Sigma カatalog番号P-1379)中1%BSA(Serologicals Corporation Inc., Norcross、ジョージア州)でブロックし、乾燥し、そして4 $^{\circ}$ Cでの貯蔵のために包装した。アッセイの当日、サンプルを充填する前に、プレートを室温まで加温した。WNV参照抗原(WNV/VERO Antigen、5.1 μ g/ml)を、PBST中で200ng/mlに希釈した。植物サンプルを、PBSTで予め希釈した。200 μ lのサンプルをA列の2回反復ウェルに適用し、そして100 μ lのブロッキング緩衝液を残りのウェルに適用することによって、希釈した参照抗原および試験抗原サンプルをプレートに添加した。1ウェルあたり100 μ lを混合および移すことによって、2倍系列希釈を作製した;合計で7回希釈ならびに参照抗原についてはblankおよび試験サンプルについては4回もしくはそれ以上の希釈。次いで、プレートを、1時間、室温でインキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄した。モノクローナル抗体(WNV Monoclonal Antibody 7H2、アフィニティー精製、BioReliance Invitrogen BioService, Rockville、メリーランド州、PBS-グリセロール中75 μ g/ml)を、1%BSA-PBSTで1:500に希釈し、そして100 μ g/ウェルで添加し、続いて、1時間、室温でインキュベーションを行った。プレートをPBSTで3回洗浄した。1%BSA-PBST中1:10,000に希釈したヤギ抗マウスIgGペルオキシダーゼ標識抗体コンジュゲート(BioRad 170-6516, Hercules、カリフォルニア州)を、100 μ l/ウェルで添加し、そしてプレートを1時間、室温でインキュベートした。プレートをPBSTで3回洗浄し、そして100 μ lのTMB基質(BioFX Laboratories Inc., Cowings、メリーランド州)を各プレートに添加し、そして室温で約5~10分間、インキュベートした。反応を、1NのHClで停止した。Vmax Kinetic Micro Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale、カリフォルニア州)を使用して、光学密度を、450nm-650nm波長参照で読み取った。データを、SoftMaxPro4.0ソフトウェアにトランスポートし、そしてサンプル

10

20

30

40

50

定量のために、標準曲線を、4パラメータの算術式に適合した。

【0178】

推定形質転換体のスクリーニング。カルスサンプルを、推定形質転換体（実施例4）から、2回反復で、サブ培養後、7日目および14日目に回収した。先端を切り離した1mlシリンジ（BD, Franklin Lakes, ニュージャージー州）を使用して、各サンプルについて、200μlのカルスを、カルスの均質化されたプールから回収した。サンプルを、96ウェルクラスターチューブボックス（1.2mlチューブ、Costar, Corning, ニューヨーク州）に回収し、ドライアイス上で凍結し、そして-80で貯蔵した。

【0179】

分析時、サンプルを、Klecoビーズビーター（Garcia Machine, Visalia, カリフォルニア州）を使用して、PBS中0.1%DBDM（n-ドデシルb-D-マルトシド、Sigma D4611）において抽出した。2つの鋼鉄製BB（Daisy 4.5mm）を、200μlのDBDM-PBSを伴う各チューブに追加した。サンプルを、最大速度で4分間、撹拌し、続いて、10分間、3000×gで遠心分離を行った。上清を、新たなチューブに取り出した。得られたペレットを、再抽出（200μl緩衝液、4分間の撹拌、10分間のスピン）した。両抽出物由来の上清をプールし、そして分析に使用した。14日目のカルス由来のサンプルを、1:10、1:20、1:40、1:80希釈系列で分析した。発現序列の確認のために、7日目のカルスサンプルを、1:40希釈で分析した。構築物pDAB2475、pDAB2478、およびpDAB2481由来の事象の発現スクリーニングの結果を、図20～22に概略する。3つのベクター間における最上位の発現事象の比較（図23）により、pDAB2475からの有意に高いEタンパク質回収可能性が示された。

【0180】

これらの構築物の選択事象由来のサンプルもまた、ウエスタンブロットによって分析した（14日目のカルス）。構築物間の結合パターンの差異が明確に認められた。pDAB2475事象の多くから、予想される約54kDaサイズで、全長Eタンパク質が検出された（図24）。他のバンド約35kDaおよびそれ未満についてもまた、再現性のある検出が得られた。pDAB2478およびpDAB2481構築物によって検出された全長Eタンパク質を発現する事象がより少なかった（図25および26）。

【0181】

図27は、残りの8構築物由来のEタンパク質発現の比較図である。ELISAにより検出されるように、すべて、タバコ植物細胞において発現されたEタンパク質を実証した。さらに、ウエスタンブロット分析は、全長Eタンパク質ならびにトランケーションを示した（図28～30）。

【0182】

実施例6 - 植物細胞産生WNV抗原のスケールアップ

細胞培養のスケールアップおよび発酵。全長Eタンパク質を発現するpDAB2475およびpDAB2481構築物由来の形質転換体を、スケールアップのために同定した。個々の事象のタバコ（Nicotiana tobaccum）NT1懸濁培養を、「フラスコバック細胞容積」に基づいて、125ml三角フラスコ中20ml稼動体積から70mlへ、次いで250mlフラスコ中140ml全容積へスケールアップした。無菌条件下で10mlサンプルをウェル混合フラスコ（well mixed flask）から血清学用ピペット（serological pipette）に10mlの最終容積まで吸引することによって、7日間インキュベーション期間後のフラスコバック細胞容積を決定した。30秒間静止した後、ピペット中の細胞の容積に10を掛け、そして「フラスコバック細胞容積」として記録して、測定値を遠心分離バック細胞容積（PCV）測定値と区別する。フラスコバック細胞容積の正常範囲は、個々の事象についてばらつきがある（15～60%）が、15%のバック細胞容積が14日間以内に達成されなかった場合、事象を中断した。

10

20

30

40

50

【0183】

細胞を、7日間フラスコから5%の最終フラスコバック細胞容積へ移すことによって、培養の維持およびスケールアップを実施した。50%バック細胞容積を伴う培養では、播種転移容積 (inoculum transfer volume) は10% v : vであった。すべての三角フラスコ培養は、26℃で、2インチストローク長を伴うオービタルシェーカー上、120 rpmで、7日間、インキュベートした。2,800 mlのフェルンバッハ (Fernbach) フラスコ (稼動体積1,000 ml) を利用する発酵を、2インチストローク長を伴うオービタルインキュベーター/シェーカー上、110 rpmで7日間、26℃で行った。10 l Braun Biostat C10リットル発酵槽で行った発酵は、200 rpmの撹拌速度、1分間あたり4リットルの通気量、および26℃の容器温度で開始した。200 ~ 450 rpmの間で撹拌速度を自動的に増加するPID制御ループによって、溶存酸素を30%より高く維持した。

10

【0184】

発酵槽によって増殖される培養物を、プロセス中に評価および特徴付けするために、10 mlのサンプルを、無菌条件下、24時間間隔で、15 ml目盛り付遠心チューブに回収した。各サンプルのうち、外来物増殖の評価のためのトリプシンダイズ寒天上への単離のために10 µlを抜き取った (struck)。ペトリプレートで、30℃で、2日間、インキュベートし、次いで、細菌または真菌の増殖の存在について評価した。外来物増殖を含有するサンプルを、以後のサンプル回収では、1,000 xの倍率で光学顕微鏡により確認した。外来物増殖を含有することが確認された発酵槽をオートクレーブし、そして培養物を適切に廃棄した。

20

【0185】

各発酵サンプルの残りの部分を、2,500 x gで10分間、遠心分離して、細胞培養液から植物細胞を分離した。遠心分離後、チューブ内のバック細胞の容積 (ml) の直接観察によって、PCVを決定した。最終容積測定値に10を掛け、そして回収時点のPCVとして記録した。チューブ由来の透明な上清相の約3 ~ 4 mlを、3 mlシリンジに移し、そして透明な1.5 mlマイクロ遠心チューブにろ過 (Corning PTFE #431231) した。チューブの内容物を、Bioprofile 300A Biochemistry Analyzer (Nova Biomedical, Boston、マサチューセッツ州) を使用して、グルコース、pH、酢酸塩、オルト-リン酸、アンモニア、ナトリウム、カリウム、および乳酸塩について分析した。

30

【0186】

全可溶性タンパク質および組み換えタンパク質濃度について、上清およびバック細胞の残りのサンプルを、2 ~ 3 mmのステンレス製ショット材を添加し、次いで、15 mlのサンプルチューブをGeno Grinderに、2分間、最大回転速度で配置することによって、処置した。10,000 rpmで5分間の遠心分離後、無細胞画分を回収し、そしてペレット画分を、PBS、pH 6.8よりなり、0.1% - D - ドデシルマルトシドを伴う緩衝液に再懸濁した。再懸濁したペレットをGeno Grinderに戻して配置し、そして2分間、撹拌した。10,000 rpmで5分間の遠心分離後、上清画分をプールし、そしてBradford方法を使用して、全可溶性タンパク質を分析した。抽出物はまた、ELISAおよびウエスタンブロットによって、WNV Eタンパク質についても分析した (実施例5を参照のこと)。

40

【0187】

2つの構築物、pDAB2475およびpDAB2481由来の事象を、10 L撹拌タンクリアクタに調製した。発酵バッチの概要を表4に示す。

【0188】

発酵槽における組み換えタンパク質生産の時間に基づく測定は、事象1622 - 207では188時間に、および事象1702 - 525では172時間に最も高い容積力価を生じたことを示した。最適容積生産性に基づく回収基準を：(1) 発酵槽における残留グルコース、(2) バック細胞容積、(3) 呼吸気分析、(4) 溶存酸素、および(5) pH

50

の変化に基づいて開発した（図 3 1 ~ 3 3）。容積生産性に基づく最適回収時間は、すべての事象で類似し、そしてグルコースの枯渇の 4 6 時間後に生じた。炭素源の枯渇は、 $5.90 \pm 0.12 - \log H^+$ から $6.5 \pm 0.24 - \log H^+$ への pH の増加、発酵ブロスの可視的暗化、および酸素取り込みによって認められる呼吸活性の $> 85\%$ の減少、二酸化炭素放出、および溶存酸素に対応する。事象 1 6 2 2 - 2 0 7 は、 1.570 ± 0.077 （平均 \pm 標準偏差）mg「E」タンパク質 / l 発酵槽稼働体積の容積分価、および 0.200 ± 0.010 （平均 \pm 標準偏差）mg「E」タンパク質 / l 発酵槽稼働体積 / 日を示した（表 4、バッチ WNV - SRD 0 5 0 0 6 を指す）。

【0189】

タバコ（*N. tabacum*）NT - 1 懸濁細胞における ME および pr ME（-）産生の速度論を、組み換えウエストナイル（West Nile）ウイルス事象 1 6 2 2 - 2 0 7 および 1 6 2 2 - 2 1 0 について、9 日間の期間に決定した（図 3 4）。組み換えタンパク質の有意な消失（50%まで）が、8 日間の期間を超えた発酵（グルコースの枯渇を > 70 時間超える）で観察された。経時した発酵サンプルのウエスタンブロットは、「E」タンパク質の有意なトランケーション、および細胞破壊後、 $8,000 \times g$ 上清中のトランケート型および全長「E」タンパク質のより高いパーセンテージを示した（データ示さず）。図 3 4 に示される容積生産性の下方傾向は、一次 ELISA 抗体とトランケート型「E」タンパク質との反応性の差異、および / またはタンパク質の分配特性の変化による「E」タンパク質の消失の増加の結果であり得る。この現象を調べるために、さらなる研究を実施するべきである。

【0190】

実施例 7 - 植物細胞産生 WNV 抗原のプロセッシング

10 リットルのバイオリアクターにおいて増殖した細胞培養の下流のプロセッシングは、並行して行われる 6 つの手順よりなった。すべての手順は、無菌条件下、0 ~ 4 で完了した。不活な三量体の形成を生じる E タンパク質の四次構造への報告された pH 誘導性変化（Modis et al., 2004）のため、すべての細胞培養およびプロセスサンプルの pH を、他で述べない限り、すべての条件について標準的な緩衝液として 50 mM（pH 7.5）3 -（N - モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS； $pK_a = 7.2$ ）を使用することによって、 7.0 ± 0.2 に維持した。

【0191】

プロセス方法 1（PM1）：30 μ m の Spectramesh の層および 25 cm 直径のプフナー漏斗を使用して、使用培地から植物懸濁細胞を回収した。湿潤ケーキを、等容積の溶解緩衝液（50 mM の MOPS、pH 7.5 + 1 mM の EDTA）で洗浄し、フィルター乾燥（25 インチ水カラムの減圧下で 70 秒間）し、次いで、溶解緩衝液（50 mM の MOPS、pH 7.5 + 1 mM の EDTA）に、33%（w : v）の最終濃度で再懸濁した。3 cm のローター - スターターヘッド部を具備し、そして 1,500 rpm で操作される Silverson L4R 実験用ホモジナイザーを使用して、細胞懸濁液を、簡単に（3 分間）均質化した。プレ - 均質化細胞を、16,000 psi（測定フローパス圧）で操作される Microfluidics 110 - L 細胞破砕機への 2 回の通過により、破砕した。 $8,000 \times G$ 、15 分間の溶解物の遠心分離澄名化後、上清をペレット（廃棄されるペレット）からデカントし、そしてアッセイを実施するまで - 20 で貯蔵した。

【0192】

プロセス方法 2（PM2）：回収した細胞を、 $8,000 \times G$ で 15 分間、遠心分離し、そして使用培地を、細胞ペレットからデカントした。細胞ペレットを 150 mL の溶解緩衝液に再懸濁し、- 20 で最短で 16 時間凍結し、次いで、25 の水浴で融解した。融解した細胞を、33%（w : v）の最終濃度で溶解緩衝液に再懸濁し、そして 3 cm のローター - スターターヘッド部を具備し、1,500 rpm で操作される Silverson L4R 実験用ホモジナイザーを使用して、簡単に（3 分間）均質化した。均質化した細胞スラリーを、Microfluidics 110 - L 細胞破砕機への 2 回の通過に

より16,000psiで破碎し、そして溶解物を、PM1に記載のように透明化した。

【0193】

プロセス方法3(PM3): Agrimul NRE-1406(464g/mol; Cognis Corp., Cincinnati、オハイオ州)およびMOPS、pH 7.5(最終濃度50mM)を、500mL三角(Erlenmeyer)フラスコ中0.3%(w:v)の最終濃度の回収した細胞培養に直接添加した。フラスコを、5.08cmの撹拌子を使用して、30分間、磁気撹拌プレート上で、100rpmで撹拌した。3cmのローター-スターターヘッド部を具備し、そして1,500rpmで操作されるSilverston L4R実験用ホモジナイザーを使用して、細胞懸濁液を、簡単に(3分間)均質化した。プレ-均質化懸濁液を、16,000psiで操作されるMicrofluidics 110-L細胞破碎機への2回の通過により、破碎した。8,000×g、15分間の溶解物の遠心分離澄名化後、上清をペレット(廃棄されるペレット)からデカントし、そしてアッセイを実施するまで-20で貯蔵した。

10

【0194】

プロセス方法4(PM4): 実験用ホモジナイザーによる均質化の前に、0.3%(w:v) Deriphat 160(Cognis Corp., Cincinnati、オハイオ州)を融解した細胞ペレットに添加したことを除いて、プロセス方法4は、プロセス方法2に記載のプロセスに従った。他のすべての手順は、PM2と同一であった。

【0195】

プロセス方法5(PM5): 次の3つの分離分画工程を使用して、PM2透明化画分において、硫酸アンモニウム沈殿を行った: 工程1: 硫酸アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)の20%飽和溶液(25の温度に基づく)を、114g/Lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をPM2透明化画分に直接添加することによって、調製した。溶液(測定温度=15)を、100rpmで10分間、撹拌し、次いで、10,000×gで25分間、遠心分離して、沈殿したタンパク質を取り出した。ウエストナイル(West Nile)ウイルスEタンパク質を含有する上清を、s0~20%画分と称し、回収して、工程2に移った。工程2: 59g/Lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をs0~20%画分に直接添加することによって、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の30%飽和溶液を調製した。溶液(測定温度=15)を、100rpmで10分間、撹拌し、次いで、10,000×gで25分間、遠心分離して、沈殿したタンパク質を取り出した。ウエストナイル(West Nile)ウイルスEタンパク質を含有する上清を、s20~30%画分と称し、回収して、工程3に移った。工程3: 62g/Lの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をs20~30%画分に直接添加することによって、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の40%飽和溶液を調製した。溶液(測定温度=8)を、100rpmで10分間、撹拌し、次いで、10,000×gで25分間、遠心分離して、沈殿したタンパク質を取り出した。ウエストナイル(West Nile)ウイルスEタンパク質を含有し、そしてp30~40%沈殿物と称される、遠心分離工程から獲得されるペレットを、上清(廃棄される上清)からデカントし、そして、アッセイを実施するまで-20で貯蔵した。

20

30

【0196】

プロセス方法7(PM7): プロセス方法7は、細胞破碎および遠心分離後の上清画分を廃棄し、そして沈殿画分をさらに処理して、組み換えWNVタンパク質を回収したことを除いて、プロセス方法1に記載のプロセスに従った。沈殿画分を、50mMのMOPS、pH 7.5および1mMのEDTA中20%(w:v)の最終濃度に希釈した。Deriphat 160(N-ラウリル-イミノジプロピオン酸モノナトリウム[Cognis Corporation, Cincinnati、オハイオ州]の両性界面活性剤)を、希釈した懸濁液に直接添加して、1mgの全可溶性タンパク質あたり1.30±0.14mgのDeriphat 160の界面活性剤対全可溶性タンパク質比を達成した。主要なプロセッシング工程を促進するために、線形方程式に基づく相関関係を、無細胞沈殿画分中の全可溶性タンパク質と発酵槽についての回収バック細胞容積との間で展開させた。Deriphat 160界面活性剤の要求量は、式1に基づく最終遠心分離バック細胞

40

50

容積測定値を使用して、直ちに計算された：

式 1 : $Deriphath_ (g) = \%最終_PCV \times サンプル_容積 (L) \times 0.0341$

【式中：Deriphath_ (g) は、再懸濁した沈殿画分に添加された Deriphath 160 の量である。

%最終_PCV は、パーセントとしての細胞培養物由来の遠心分離 PCV 測定値である。

サンプル_容積 (L) は、回収時の細胞培養物のリットルでの全容積である。

0.0341 = 最終タンパク質濃度対回収 PCV 勾配変換定数。

【0197】

懸濁液を、3 cm のローター - スターターヘッド部を具備し、そして 1,500 rpm で 10 分間操作される Silver son L4R 実験用ホモジナイザーを使用して均質化し、次いで、8,000 x g で 25 分間、遠心分離した。上清を、ペレット (廃棄されるペレット) からデカントし、そしてアッセイを実施するまで -20 で貯蔵した。

【0198】

すべての調製 (>40 ml) サンプルは、3 リットルステンレス製トレイにおける凍結乾燥によって、容積を減少させた。サンプルを、ステンレス製トレイに移し、そして -80 で 16 時間、凍結融解し、次いで、-44 のコンデンサ温度および -10 の初期棚温度を伴うモデル 422116 Genesis Vertis 凍結乾燥機に移した。乾燥プログラムは、次の温度温度：-10 で 20 分間、-5 で 200 分間、0 で 400 分間、5 で 200 分間、10 で 200 分間、15 で 200 分間、および 25 で 4000 分間における 7 つの時間設定された工程からなる。(25 の棚温度を使用する) 最終的減圧が 100 mTorr 未満で維持され得る場合、生成物は乾燥状態であるとみなした。3 L トレイ由来の乾燥調製画分を、最小容積 (<40 ml) の滅菌蒸留水に再懸濁し、次いで、滅菌 100 mL 血清バイアルに移した。バイアルを、傾斜している (25 °) 凍結ラック上の -80 凍結装置に、16 時間、移した。調整乾燥プログラムに従って、バイアルを乾燥させた。

【0199】

表 5 は、臨床治験 (研究 I) における評価のために調製された異なるサンプルを概要する。これらのサンプルは、ネガティブおよびポジティブコントロールと共に、2 つの植物発現構築物、3 つの事象および 5 つのプロセス方法を表す。

【0200】

実施例 8 - 植物細胞産生 WNV 抗原の処方、研究 I

2 つの植物発現構築物、3 つの事象および 5 つのプロセス方法を使用して、マウスにおける植物細胞産生 WNV 抗原の臨床評価のためのワクチンおよびネガティブコントロールワクチンを作製した。すべてのワクチンを、第 1 の用量についてフロイント完全アジュバントと組み合わせ、そして第 2 の用量についてフロイント不完全アジュバントと組み合わせた。不活化 WNV を、ポジティブコントロールとして使用するために処方した。

【0201】

植物細胞産生抗原の処方。ワクチン処方の初期では、100 または 50 μg 用量の調製が好適であった。従って、凍結乾燥した植物材料を、シリンジ針を通過させるのに必要な最小限の量の蒸留水に再水和させた。1 用量あたり 100 μl 抗原容積の最大値については、結果的に、植物材料の溶解度によって、用量を決定した (表 6)。処置グループ 3 について凍結乾燥した抗原は、不溶性であり、研究から取り除いた；グループ 1 について凍結乾燥した抗原は要求された 100 μl 容積中 100 μg 用量を達成するほど濃縮されず、研究から脱落させた。ネガティブコントロール調製物を、さらなる水で約 1 ml にするのに必要な最小限の量の水で再水和した。

【0202】

再水和した抗原のアリコート、2 つの 2 ml ガラスシリンジおよび 2 7/8 インチ 20 ゲージの微小乳化針を使用して、等容積の完全フロイントアジュバント (ICN 642851) で乳化させた。全体を通して、ワクチンを氷上で保持し、そして、再水和し

たストック懸濁液を、使用直後に - 80 で凍結した。第2の使用のために、予め再水和した植物材料を、室温で融解し、そして先と同じシリンジおよび針を使用して、等容積の不完全フロイントアジュバント (ICN 642861) で乳化させた。エマルジョンを、氷上で保持し、そして、すべてのワクチンの調製後直ちに注入した。

【0203】

参照抗原の処方。不活化WNV参照標準 (実施例5に記載されている) から、ワクチンとしての用途のための処方の前に、Chemicon International「Detergent-OUT」スピンカラムによってTriton X-100を取り出した。用量は、1 mLあたり27.2 µgのWNV Eタンパク質濃度に基づいた (表6)。

【0204】

実施例9 - 植物細胞産生抗原によるWNV中和血清の作製、研究I

マウスのワクチン接種。雌性CD-1異系交配SPFマウス (Charles River) を獲得し、そしてワクチン接種接種前に研究施設に順応させた。マウスを、1ケージあたり5匹収容し、そして、耳パンチによってグループ番号を識別した。日齢0日目、50日目に、すべてのマウスに、表6に記載の200 µL用量の多様な処置を施した (実施例8)。27ゲージ針を伴う1 mLシリンジで、皮下投与により腹部領域の4つの部位にそれぞれ50 µLをワクチン接種した。試薬のアベイラビリティの遅延のため、グループ12のマウスを、他のマウスより1箇月後にワクチン接種し、従って、日齢80日にワクチン接種した。17日目に、マウスに、表6に記載の2回目の200 µL用量の多様な処置を施した (実施例8)。皮下投与により腹部の領域の4つの部位にそれぞれ50 µLをワクチン接種した。グループ12は、18日ではなく、14日に再ワクチン接種した。グループ4の2匹のマウスは、2回目のワクチン接種後に疾患が認められ、そして1匹は30時間後に死亡した。

【0205】

血清回収。31日目、マウスを、CO₂への短期の暴露により麻酔し、そして心穿刺により放血させた。血液を、ラベルを付したエッペンドルフチューブに回収し、凝固させ、そして遠心分離を行って、残留する細胞を沈降させた。血清を、アッセイの時間まで - 80 で維持した。グループ12のマウスを、32ではなく28日目に放血させた。

【0206】

WNV血清中和アッセイ。すべての血清中和アッセイを、BL-3実験室で実施した。一定のウイルスにおいて、VERO細胞に対する血清アッセイを変動して、中和力価を測定した。熱不活化血清 (56 で30分間) を、マイクロタイタープレート中、1希釈あたり2ウェルで、5%ウシ胎児血清 (FBS) を伴うMedium 199において2倍工程で1:10から1:1280へ希釈した。ストックWNVウイルス、ワイオミング (Wyoming) キジオリチョウ単離体を、同じ培地において1:10に希釈し、そして等容積を、各ウェル中の血清に添加して、1:20 ~ 1:2560の最終血清希釈物を得た。プレートを、30分間インキュベートして、血清が、ウイルスを中和することを可能にし、次いで、等容積の同じ培地中の12,000個のVERO細胞をすべてのウェルに添加して、非中和ウイルスを検出した。コントロール (既知のポジティブ血清、非感染ウェル、ウイルス滴定) を、個別のプレートに含めた。プレートを、37、5%CO₂中13日間、インキュベートし、そして細胞変性効果 (CPE) の存在について、間隔的に顕微鏡下で観察した。

【0207】

最終アッセイの読み取りは13日であった。非感染細胞コントロールは、CPEを有さなかった。試験サンプルの中和力価を、50%エンドポイントで血清-ウイルス混合物に存在する血清の最終希釈の対応物として表した。WNV逆的定は、1ウェルあたり > 128 TCID₅₀ であった。ウサギ抗WNVポジティブコントロール血清は、> 2560の力価を有した。ワクチン接種したマウス由来の血清は、表7に示されるような中和力価を有した。> 2560の中和力価を2560 (アッセイが測定し得る最大の力価) へ、そして < 20の力価を20 (アッセイが測定し得る最小の力価) へ変更し、そして1グループ

10

20

30

40

50

あたりの幾何平均力価を計算することによって、図 3 5 を作成した。図 3 5 は、W N V 血清中和力価のグラフ図を提供する。

【 0 2 0 8 】

スチューデントの t 検定は、グループ 2 の力価が、グループ 5 を除く他のすべてのグループより有意に高く、そしてグループ 4 および 5 では、統計的差異が認められなかったことを示した。不活化 W N V ポジティブコントロール（グループ 1 2）は、より高いエンドポイント希釈を伴う個別のアッセイにおいて測定し、従って、他の結果とは、厳密に比較できなかった。

【 0 2 0 9 】

結果として、存在する E タンパク質の量またはプロセス方法、操作された中和抗体にかかわらず、植物細胞産生 W N V E タンパク質のすべての調製物がワクチン接種に使用される。ネガティブコントロール調製物は、中和抗体を生じさせなかった（グループ 8、9、11、および 13）。

【 0 2 1 0 】

一般に、注入は、動物に良好に忍容された。グループ 4 の 2 回目の注入後の疾患および単一の死亡例が、物理的外傷または抗原、アジュバント、もしくはワクチンの他の成分の有害作用によるものであるかどうかは不明である。

【 0 2 1 1 】

実施例 10 - 植物細胞産生抗原による W N V 中和血清の作製、研究 I I

マウスモデルにおける植物細胞産生 W N V 抗原の効力を確認、およびさらに理解するために、さらなるグループのマウスを獲得し、そして表 8 に列挙した異なる 5 つのアジュバントで処方した高、中、低用量の抗原で免疫した。形質転換事象および抗原回収のためのプロセス方法は確認しなかった。P M 7 によって回収した事象（p D A B 2 4 7 5）1 6 2 2 - 2 0 7 を、本研究において広範に使用した。

【 0 2 1 2 】

ワクチンの処方。ワクチン処方は、凍結乾燥した W N V 植物抽出物を再水和することによって、開始した。十分な水を 5 つのバイアルのそれぞれに添加して、 $125 \mu\text{g} / \text{ml}$ 抗原溶液を生成した。再水和は、滅菌水を使用し、そして水添加には、滅菌針およびシリンジを使用して行った。再水和させた溶液を、新たな滅菌ボトルにプールした。次いで、溶液を、2 つの滅菌シリンジを使用する滅菌三方栓に 50 回通過させることによって、均質化した。均質化した溶液を、新たな滅菌ボトルにプールした。

【 0 2 1 3 】

各 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ 用量ワクチンの 6 つのミリリットルバッチを、まず、 3.0 ml の抗原溶液を、新たな滅菌 10 ml ディスポーザブルシリンジに採取することによって調製した。次に、 3.0 ml の滅菌したアジュバントを、第 2 の新たな滅菌 ディスポーザブルシリンジに採取した。両方のシリンジを、新たな滅菌三方栓に固定した。次いで、栓を介して、植物抽出物を、アジュバントシリンジに移動させた。ワクチンを、2 つのシリンジの間で、50 サイクル通過させることによって、ワクチンを乳化した。最後にサイクルの完了時に、ワクチンを含有するシリンジを栓から取り出した。ワクチンを、滅菌血清バイアルに移し、シールし、そしてラベルを付した。包装したワクチンを、4 で貯蔵した。使用するまで、ワクチンを 4 で保持した。

【 0 2 1 4 】

$5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 用量ワクチンを処方するために、本来の $125 \mu\text{g} / \text{ml}$ 植物抽出物溶液の一部を、水で希釈して、 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ 溶液を生成した。この希釈した抗原溶液を使用して、これらのワクチンを処方した。5 つの試験ワクチンのそれぞれについて、新たな滅菌シリンジおよび各ワクチンの三方栓を使用して、上記で概略した手順を反復した。

【 0 2 1 5 】

$5 \mu\text{g} / \text{ml}$ に希釈した $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ 抗原溶液の一部を使用して、 $0.5 \mu\text{g}$ 用量のワクチンを処方した。この希釈した抗原溶液を使用して、これらのワクチンを処方した。予め概略した同じ手順を使用して、この用量レベルで 5 つの試験用ワクチンを生成した。

【0216】

T i t e r - M a x アジュバントは、ネオプレンゴムとは適合しない。T i t e r - M a x アジュバントを含有するワクチンは、ネオプレンゴムと接触しないようにしなければならない。従って、すべてのプラスチックシリンジは、処方中に使用し、そしてテフロン（登録商標）表装した中隔を使用して、包装したワクチンのための血清バイアルをシールした。

【0217】

植物細胞コントロールの処方。凍結乾燥した非トランスジェニック N T - 1 タバコ細胞抽出物の 2 つのバイアルを、滅菌水で再水和して、 $125 \mu\text{g} / \text{mL}$ 抗原溶液に類似の溶液を生成した。このブランクコントロール溶液を、抗原溶液と同じ様式で均質化した。25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 用量ワクチンと同じ手順を使用して、コントロールワクチンを処方した。上述のように、すべてのプラスチックシリンジおよびテフロン（登録商標）表装中隔を、このワクチンと共に使用した。

10

【0218】

マウスのワクチン接種。それぞれが 40 匹のマウスの出荷容器における単一のコロニー由来の雌性 C D - 1 異系交配 S P F マウス (C h a r l e s R i v e r) を受領した。マウスを、1 ゲージあたり 5 匹収容し、研究施設に順応させ、そしてそれらのグループの番号を耳パンチで識別した。10 ~ 11 週齢に、すべてのマウスに、表 8 に記載の 200 μL 用量の多様な処置を施した。27 ゲージ針を伴う 1 mL シリンジで、皮下投与により腹部領域の 4 つの部位にそれぞれ 50 μL をワクチン接種した。

20

【0219】

1 回目のワクチン接種後 48 時間以内に、グループ 6 ~ 8 のマウスは、注入に対して局所的および全身的に反応していたことが明確に認められた。カルボポール処方されたワクチンを投与されたマウスは、飲食を停止し、共に群がり、そして体毛を逆立てていた。これらのマウスには、追加のワクチン接種はしなかった。

【0220】

15 日目、グループ 1 ~ 5 および 9 ~ 17 のマウスに、表 8 に記載の 2 回目の 200 μL 用量の多様な処置を施した。皮下投与により腹部の領域の 4 つの部位にそれぞれ 50 μL をワクチン接種した。これらのグループでは、有害な作用は観察されなかった。

【0221】

血清回収。22 日目、グループ 6 ~ 8 のマウスを、 CO_2 への短期の暴露により麻酔し、そして心穿刺により放血させた。28 日目、他のすべてのグループのマウスも同様に麻酔し、そして放血させた。血液を、ラベルを付したエッペンドルフチューブに回収し、凝固させ、そして遠心分離を行って、残留する細胞を沈降させた。血清を、 -80°C で維持した。

30

【0222】

W N V 血清中和アッセイ。すべての血清中和アッセイを、B S L - 3 実験室で実施した。一定のウイルスにおいて、V E R O 細胞に対する血清アッセイを変動して、中和滴定を測定した。熱不活化血清 (56 $^\circ\text{C}$ で 30 分間) を、マイクロタイタープレート中、1 希釈あたり 5 ウェルで、2 % ウシ胎児血清 (F B S) を伴う D M E M において、適切に希釈した。ストック W N V ウイルス、ワイオミング (W y o m i n g) キジオリチョウ単離体を希釈して、同じ希釈培地において 100 ~ 300 T C I D ₅₀ / 25 μL の範囲を入手し、そして、等容積を各ウェルの血清に添加した。プレートを、60 分間インキュベートして、血清が、ウイルスを中和することを可能にし、次いで、150 μL の培地中の 20,000 ~ 30,000 個の V E R O 細胞をすべてのウェルに添加して、非中和ウイルスを検出した。コントロール (既知のポジティブ血清、非感染ウェル、ウイルス滴定) を、個別のプレートに含めた。プレートを、37 $^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2 中 4 ~ 7 日間、インキュベートし、そして細胞変性効果 (C P E) の存在について、間隔的に顕微鏡下で観察した。非感染細胞コントロールは、C P E を有さなかった。W N V 逆的定は、1 ウェルあたり 194 T C I D ₅₀ であった。不明物の中和力価を、細胞が感染しなかった希釈における血清

40

50

- ウイルス混合物に存在する血清の最終希釈の対応物として表した。

【0223】

多くのワクチン接種したマウスは、高レベルの中和抗体および抗原用量およびアジュバントにより変動した応答を発達した（図36）。抗体は、アジュバントおよびNT-1細胞単独を投与したマウス（グループ1、データ示さず）では生じなかった。植物細胞産生WNVEタンパク質は、高度に免疫原性であり、そして中和抗体を発生させるのに必要な少なくとも1つのエピトープを所有することが明らかである。単回の注入が、カルボボール処方（グループ6～8）を注入したマウスにおいて中和抗体を生じさせたという事実は、抗原が防御レベルのIgMを誘導したことを示唆する。いくつかのグループの間の誤差は、 $p < 0.05$ で統計的に有意であったが、明白なパターンは、アッセイ内に固有の変動性のため、不明であった。

10

【0224】

実施例11 - ウマにおける植物細胞産生抗原の防御有効性の実証

ウマ種における植物細胞産生WNVE抗原の有効性を確認およびさらに理解するために、ウマを獲得し、そして表17に列挙した2つの異なるアジュバントで処方した高および低用量の抗原をワクチン接種した。PM7によって回収した事象（pDAB 2475）1622-207を、本研究において広範に使用した。

【0225】

ワクチンの処方。研究II（実施例10）と同じロットの抗原を使用して、凍結乾燥したWNVE植物抽出物を再水和することによって、ワクチン処方を開始した。ワクチンの標的濃度は、10および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。凍結乾燥した抗原を、滅菌水で再水和して、抽出物凍結乾燥前のELISAによって決定されるEタンパク質の濃度に基づき70ml用量および $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度とした。再水和後、抗原ストック溶液を均質化して、均質な溶液を提供した。三方栓に接続された2つの20mlシリンジを使用して、均質化を実施した。溶液を、シリンジ間の前後に50サイクル通過させ、次いで、新たな滅菌100mlボトルに配置した。一旦均質化したら、ストックを、新たな滅菌プラスチックボトルに滅菌ろ過した。Millipore Sterivex-GV、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターユニット（ロット番号H4NN92488）を使用して、滅菌ろ過を実施した。この点において、ELISAおよび滅菌性（Sterility）試験の両方の滅菌技術を使用して、材料をサンプル採取した。滅菌性（Sterility）試験は、完了するまで2週間を要し、そして溶液が、下記の試験の限界値内の滅菌状態であることが確認された。ELISAアッセイにより、ストック溶液が約 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含有したことが確認された。この濃度値は、この材料の先の値と一致した。

20

30

【0226】

Carbopol 974 P NFストック溶液。まず、100mlのFisher Scientific Brand PBS：リン酸緩衝食塩水10x溶液（ロット番号044924-36）をDI水中1リットルに希釈することによって、1xPBS滅菌緩衝液を調製した。500mlの1xPBSを、磁気攪拌子を具備する透明な600mlビーカーに移した。5.0グラムのCarbopol 974 P NF（Novon、ロット番号CC52NAB635）を、磁気スターラーを使用して、PBS緩衝液に分散させた。混合物を30分間攪拌して、粉体の分散を確実にした。攪拌したビーカーに、pHプローブを適合し、そして水酸化ナトリウム溶液、50%w/w（Fisher Brand、ロット番号0430451-24）を使用して、溶液のpHを6.8～7.6のpH範囲内にあるように調整した。一旦、pHを調整したら、溶液をさらに30分間攪拌させて、pHが安定であることを確実にした。この手順により、中和されたCarbopol 974 P NFの $10 \text{mg}/\text{ml}$ （10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）ストック溶液を得た。最終溶液を、多様なサイズの透明なPyrex Media Bottleに移し、そしてラベルを付した。次いで、ボトルを、45分間、121、および18psiでオートクレーブして、滅菌性を確実にした。オートクレーブから取り出すとき、ボトルをシールし、そしてフード内で冷却した。ワクチン集成前に、Carbopol 974 P NFスト

40

50

ック溶液の1つのボトルを選択し、そして下記のような滅菌性試験に供した。

【0227】

Polygen 30%ストック溶液。Polygenは、市販のアジュバントである。Polygenの製造者は、処方前に製品を30%溶液に希釈することを推奨している。また、アジュバントパッケージとして15% v/v Polygenを含有するようにワクチンを処方することが推奨されている。140mlの滅菌水を滅菌250mlポリカーボネートボトルに移すことによって、BL2 BiosafetyキャビネットにPolygen 30%ストック溶液を調製した。60mlのPolygen (MVP Laboratories, Inc. Ralston、ネブラスカ州、ロット10011)を、滅菌水に添加し、そして混合して、30% Polygen溶液を得た。次いで、この溶液を、250ml Pyrex Media Bottleに移し、そしてオートクレーブした。オートクレーブから取り出すとき、ボトルをシールし、そしてBL2フードに移して、そして室温まで冷却させた。ワクチン集成前に、この容器を、滅菌性について試験した。

10

【0228】

滅菌水。透明なPyrex Media BottlesにDI水を部分的に充填することによって、滅菌水を調製した。次いで、ボトルを、45分間、121 および18 psiでオートクレーブした。オートクレーブから取り出すとき、ボトルをシールする一方、なお加温し、そしてフード内で冷却した。ワクチン集成前に、滅菌水のボトルを選択し、そして下記のような滅菌性試験に供した。

20

【0229】

滅菌性試験。処方したワクチンの無菌性を確実にするために、処方において使用するすべての滅菌原材料、および処方したワクチン自体を、滅菌性について試験した。

【0230】

寒天およびペトリプレート調製 ベネット (Bennett) の寒天を、滅菌プレーティングのために使用した。ベネットの寒天は、以下の様式で調製した：

【0231】

【表1】

ベネットの寒天	量
イースト抽出物	1.0g/L
ビーフ抽出物	1.0g/L
NZアミンA	2.0g/L
グルコース	10.0g/L
寒天	15.0g/L
DI水	1.0L

30

寒天が溶解するまで攪拌プレート上で加熱する。(ホイルで軽く覆うと加熱し易くなる。)

容器の約半分まで満たし、緩く栓をし、そして液体サイクル、20分間、121℃および18psiでオートクレーブする。

40

【0232】

100×15mmペトリディッシュにベネットの寒天を約3/4充填し、そして固化させた。試験の少なくとも4日前に、プレートを調製して、試験の使用前に、それらが滅菌状態であることを確実にする。

【0233】

原材料および処方したワクチンのプレーティング。滅菌10μl播種ループを使用して、試験する生成分または処方したワクチンのサンプルを入手する。四分円画線方法、単一のコロニー単離体を得るための一般的な微生物学的技術を、サンプルのプレート化に使用

50

した。試験の感受性を増加する努力において、 $200\mu\text{l}$ のサンプルを伴う第2のプレートを確認した。滅菌細胞スプレッダーにより、プレートに沿って、サンプルを均質に広げた。プレートを、30インキュベーターにおいて、倒置してインキュベートした。混入増殖の何らかの兆候について、それらを毎日（週末を除く）確認した。一旦、2週間の間、プレートが清浄を保持したら、プレート化した原材料は、無菌的であり、そして使用の用意ができていとみなした。

【0234】

試験開始日の2～3週間前に、ワクチンを集成した。表18は、このバッチのワクチンについての計算および使用した各成分の容積を示す。まず、水および必要なアジュバント溶液を滅菌250ml滅菌プラスチックボトルにピPETTINGすることによって、ワクチンを集成した。ボトルを閉じ、そして振盪して、2つの成分を混合した。次いで、ボトルを開け、そしてピPETTにより抗原を添加した。ボトルを再度閉じ、そして振盪して、徹底的に成分を混合した。最終ワクチンを、10または25mlのいずれかのワクチンを含有する滅菌バイアルに移す。ストッパーを取り扱うためのオートクレーブした1対の鉗子を使用して、中隔ストッパーを、バイアルに配置した。一旦、ストッパーがバイアルに着座したら、それらをアルミニウムクリンブシールでシールした。バイアルに、先に承認されたラベルを付し、そして冷蔵庫に貯蔵し、そして出荷前に2～7に維持した。各ワクチンの1つのバイアルを、滅菌性試験（Sterility Testing）セクションに記載のように、滅菌性について試験した。滅菌性試験が完了した後、ワクチンサンプルをpH、密度、および重量オスモル濃度について評価した。物理的特性試験の結果を表19に示す。

【0235】

ウマのワクチン接種。46のWNV血清中性抗体ネガティブウマ（雄性および雌性；月齢6～12箇月；WNV SN力価 1：20）を、外部の供給者から購入した。ウマは、防蚊対策が施された施設において一緒に配置され、そしてインプラントされたマイクロチップによって個々に識別された。研究0日目、血液サンプルをすべてのウマから採取し、次いで、すべてのウマに、表17に記載の1mlの処方された処置を施した。ワクチン接種を、頸部の左側の筋肉内に投与した。血液を処理して血清にし、そしてさらなる分析のために -20°F で貯蔵した。ワクチン接種に対する有害作用の何らかの兆候について、ウマを毎日モニターした。有害作用は認められなかった。

【0236】

研究14日目、血液サンプルをすべてのウマから採取し、次いで、すべてのウマに、表17に記載の1mlの処方された処置を施した。ワクチン接種を、頸部の右側の筋肉内に送達した。血液を処理して血清にし、そしてさらなる分析のために -20°F で貯蔵した。ワクチン接種に対する有害作用の何らかの兆候について、ウマを毎日モニターした。有害作用は認められなかった。

【0237】

研究0および14日目に回収した血液サンプルに加えて、血液サンプルを、研究7、21、28、35、42および49日目にすべてのウマから回収した。すべての血液サンプルを、頸静脈から回収し、そして約12mlの血液を、各サンプル採取日に回収した。すべての血液を処理して血清にし、そしてさらなる分析のために -20°F で貯蔵した。

【0238】

WNV血清中和アッセイ。すべての血清中和アッセイを、BSL-3実験室で実施した。一定のウイルスにおいて、VERO細胞に対する血清アッセイを変動して、中和滴定を測定した。熱不活化血清（56で30分間）を、マイクロタイタープレート中、1希釈あたり5ウェルで、2%ウシ胎児血清（FBS）を伴うDMEMにおいて、適切に希釈した。ストックWNVウイルス、ワイオミング（Wyoming）キジオリチョウ単離体を希釈して、同じ希釈培地において100～300TCID₅₀/ $25\mu\text{l}$ の範囲を入手し、そして、等容積を各ウェルの血清に添加した。プレートを、60分間インキュベートして、血清が、ウイルスを中和することを可能にし、次いで、 $150\mu\text{l}$ の培地中の20

、000～30,000個のVERO細胞をすべてのウェルに添加して、非中和ウイルスを検出した。コントロール（既知のポジティブ血清、非感染ウェル、ウイルス滴定）を、個別のプレートに含めた。プレートを、37℃、5%CO₂中4～7日間、インキュベートし、そして細胞変性効果（CPE）の存在について、間隔的に顕微鏡下で観察した。非感染細胞コントロールは、CPEを有さなかった。試験サンプルの中和力価を、50%細胞が感染しなかった希釈における血清-ウイルス混合物に存在する血清の最終希釈の対応物として表した。WNV逆滴定は、50～300の範囲内である。ウマ抗WNVポジティブコントロール血清は、150～450の力価範囲を有した。幾何平均力価（GMT）を計算するために、力価2に2を割り当て、そして力価356に356を割り当てた。ワクチン接種したウマ由来の血清は、表20に示されるような中和滴定を有した。アジュバントNT-1細胞コントロールワクチンが投与されたウマ（グループ1および2）では、血清中和力価は生じなかった。アジュバント化WNV Eタンパク質を投与されたウマ（グループ3、4、5および6）は、WNV中和抗体を生じた（表20）。植物細胞産生WNV Eタンパク質は、高度に免疫原性であり、そして中和抗体を発生させるのに必要な少なくとも1つのエピトープを所有することが明らかである。

10

20

30

40

50

【0239】

研究101日目、グループ1および3由来のウマのすべて、ならびにグループ2由来の2頭のウマ（全体で15頭のウマ）を、チャレンジのためにBSL-3施設に出荷した。研究105日目、すべてのウマを、1mLのPBS中107,000プラーク形成単位（pfu）WNV NY99の髄腔内播種によってチャレンジした。ウマを、14日間、1日2回モニターし、そして血清への処理およびウイルス血症の評価のために、血液サンプルを、1～6日目には1日2回、チャレンジ後0（チャレンジの日）、7、10および14日目には1日1回、採取した。チャレンジ後14日間の観察期間中に重度の神経症状を実証するウマを、バルビツール酸の過剰投与により安楽死させた。残りのすべてのウマは、研究の終了時（14～17日目）に安楽死させた。ウマは、チャレンジ後0～7、10および14日目に採取した血液サンプルから2回連続ポジティブ培養物が認められた場合、ウマは、WNVに感染し、そして非防御であるものとみなした。さらに、疾患の防御について、温度測定を含む1日2回の臨床モニタリングによって評価した。組織病理学は、すべてのウマ由来の脳の切片において実施した。

【0240】

ウイルス血症のデータを表21に示す。すべてのワクチン接種していないコントロールのウマ（グループ1および2）は、チャレンジ期間後少なくとも連続する2日間、ウイルス血症であった。チャレンジ後のモニタリング期間中にワクチン接種したいずれのウマにおいても、ウイルス血症は検出されなかった。

【0241】

温度データを表22に示す。2連続温度測定値が、102.5°Fを超えるかまたは等しい場合、ウマは、発熱しているものとみなした。5頭のワクチン接種していないコントロールのウマ（グループ1および2）のうち4頭が、チャレンジ後期間中に発熱した。コントロールのウマのうち1頭は、102.5°Fの2連続温度測定値の基準に基づいて、発熱していないとみなされた；しかし、このウマは、いくらかの独立した発熱事象を有し、そしてチャレンジの観察期間の終了前に、重度の臨床徴候ため、安楽死させた。グループ3の10頭のワクチン接種したウマのうち9頭は、チャレンジ後期間中に発熱が認められなかった。10頭のワクチン接種したウマ（グループ3）のうちの1頭は、2連続温度測定値102.5°Fを有した。

【0242】

臨床評価データを表23に示す。ウマを、嗜眠、抑うつ、振戦、食欲低下、過敏、運動制限、瀕死状態を含む疾患の臨床徴候について、1日2回モニターした。臨床疾患の徴候が認められず、そしてウマが臨床的に正常であった場合、それらを、快活および応答性（BAR）であると評価した。疾患の臨床徴候が認められる2連続評価が存在する場合、ウマは、WNVの臨床徴候を有するものとみなした。5頭のワクチン接種していないコント

ロールのウマ（グループ 1 および 2）のうちの 3 頭は、疾患の臨床徴候を実証した。これらの臨床徴候の重症度は有意に進行し、そしてこれらの 3 頭のウマを、チャレンジ後期間中、安楽死させた。5 頭のコントロールのウマのうち 2 頭は、疾患の臨床徴候を実証しなかった。グループ 3 の 10 頭のワクチン接種したウマのうち 9 頭は、チャレンジ後期間中無症状であった。10 頭のワクチン接種したウマ（グループ 3）のうち 1 頭は、疾患の軽度の臨床徴候が明確に認められる 2 連続評価を示した。これらの臨床徴候は、進行せず、そしてウマは B A R に回復した。

【 0 2 4 3 】

（橋および髄中部（mid - medulla）を介する）脳の 2 切片の組織学的検査を、各ウマにおいて実施した。これらの組織学的検査の結果を、表 2 4 に示す。両方の切片が軽度、中度、重度の変化の徴候を示した場合、組織学は、異常であるものとみなした。5 頭のワクチン接種していないコントロールのウマ（グループ 1 および 2）のうち 5 頭は、組織学的に異常であり、検査した両切片は、脳炎に関連する中度～重度組織学的変化を有した。グループ 3 の 10 頭のワクチン接種したウマのうちの 3 頭は、検査した 2 脳切片が異常な組織学を呈した。これらのウマのうちの 2 頭では、これらの異常所見は、検査した両切片において軽度であった。ウマの 1 頭は、中度の脳炎を示した。重度の明確な病巣は認められなかった。10 頭のワクチン接種したウマのうち 7 頭は、正常な組織学または試験した切片の 1 つのみにおいてごく軽度の組織学的変化を有した。これらの軽度の片側性の変化は、W N V 感染とは一致しないと思われた。

10

【 0 2 4 4 】

本明細書に記載の実施例および具体例は、単に例示目的であり、それに照らして行われる多様な修飾および変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨および範囲に含まれることが理解されるべきである。さらに、本明細書において開示した任意の発明またはその具体例の任意の要素もしくは限定は、本明細書において開示した任意のおよび／または他のすべての要素または限定（個々にもしくは任意の組み合わせで）あるいは他の任意の発明またはその具体例と組み合わせることができ、そのようなすべての組み合わせは、それらに限定されることなく、本発明の範囲にあるとみなされる。

20

【 0 2 4 5 】

【表 2】

表1. タバコ遺伝子タンパク質コーディング領域におけるコドン分布					
アミノ酸	コドン	タバコ 使用頻度 %	アミノ酸	コドン	タバコ 使用頻度%
ALA (A)	GCA	31.0	LEU (L)	CTA	10.5
	GCC	17.3		CTC	13.0
	GCG	8.1		CTG	11.2
	GCT	43.6		CTT	25.9
ARG (R)	AGA	31.7		TTA	15.3
	AGG	24.6		TTG	24.0
	CGA	11.9	LYS (K)	AAA	50.0
	CGC	8.1		AAG	50.0
	CGG	7.7	MET (M)	ATG	100.0
	CGT	16.0	PHE (F)	TTC	41.9
ASN (N)	AAC	39.4		TTT	58.1
	AAT	60.6	PRO (P)	CCA	38.9
ASP (D)	GAC	31.1		CCC	13.6
	GAT	68.9		CCG	10.0
CYS (C)	TGC	42.6		CCT	37.5
	TGT	57.4	SER (S)	AGC	12.5
END	TAA	42.6		AGT	17.3
	TAG	19.6		TCA	22.6
	TGA	37.8		TCC	14.1
GLN (Q)	CAA	58.9		TCG	7.2
	CAG	41.1		TCT	26.2
GLU (E)	GAA	55.7	THR (T)	ACA	32.7
	GAG	44.3		ACC	19.1
GLY (G)	GGA	34.6		ACG	8.8
	GGC	16.2		ACT	39.4
	GGG	15.4	TRP (W)	TGG	100.0
	GGT	33.7	TYR (Y)	TAC	41.4

10

20

30

【 0 2 4 6 】

【表 3】

表1. タバコ遺伝子タンパク質コーディング領域におけるコドン分布					
アミノ酸	コドン	タバコ 使用頻度 %	アミノ酸	コドン	タバコ 使用頻度%
HIS (H)	CAC	38.3	VAL (V)	TAT	58.6
	CAT	61.7		GTA	18.3
ILE (I)	ATA	25.8		GTC	17.0
	ATC	24.6		GTG	24.3
	ATT	49.6		GTT	40.4

10

【 0 2 4 7 】

【表 4】

表2. 元々のWNV配列(配列番号1の塩基277～2004)ならびに2つのタバコ最適化遺伝子バージョン(配列番号6および配列番号7)のMーおよびEーペプチドコーディング領域のコドン組成の比較									
アミノ酸	コドン	配列番号 1	配列番号 6	配列番号 7	アミノ酸	コドン	配列番号 1	配列番号 6	配列番号 7
ALA (A)	GCA	10	19	17	LEU (L)	CTA	7	0	0
	GCC	15	10	10		CTC	10	8	8
	GCG	6	0	0		CTG	9	7	7
	GCT	21	23	25		CTT	5	15	16
ARG (R)	AGA	10	10	8	LYS (K)	TTA	1	9	9
	AGG	5	7	6		TTG	22	15	14
	CGA	0	2	2		AAA	10	18	14
	CGC	2	0	0	MET (M)	AAG	20	12	16
	CGG	1	0	0		ATG	15	15	15
ASN (N)	CGT	3	2	5	PHE (F)	TTC	11	10	10
	AAC	15	7	8		TTT	13	14	14
ASP (D)	AAT	6	14	13	PRO (P)	CCA	7	8	8
	GAC	16	8	7		CCC	2	3	3
CYS (C)	GAT	5	13	14		CCG	1	0	0
	TGC	9	5	5		CCT	9	8	8
END	TGT	3	7	7	SER (S)	AGC	13	6	6
	TAA					AGT	3	7	8

20

30

【 0 2 4 8 】

【表 5】

表2. 元々のWNV配列(配列番号1の塩基277~2004)ならびに2つのタバコ最適化遺伝子バージョン(配列番号6および配列番号7)のM-およびE-ペプチドコーディング領域のコードン組成の比較

アミノ酸	コードン	配列番号1	配列番号6	配列番号7	アミノ酸	コードン	配列番号1	配列番号6	配列番号7
	TAG					TCA	14	10	10
	TGA					TCC	5	7	8
GLN (Q)	CAA	6	9	10		TCG	3	0	0
	CAG	9	6	5		TCT	5	13	11
GLU (E)	GAA	15	14	14	THR (T)	ACA	14	17	18
	GAG	10	11	11		ACC	13	11	10
GLY (G)	GGA	34	20	20		ACG	9	0	0
	GGC	14	11	10		ACT	13	21	21
	GGG	8	7	9	TRP (W)	TGG	12	12	12
	GGT	3	21	20	TYR (Y)	TAC	8	7	7
HIS (H)	CAC	8	4	5		TAT	6	7	7
14	CAT	6	10	9	VAL (V)	GTA	1	11	10
ILE (I)	ATA	5	5	6		GTC	12	6	9
	ATC	9	5	6		GTG	32	11	14
	ATT	7	11	9		GTT	10	27	22

10

【 0 2 4 9 】

【表 6】

20

表3. NT-1 B培地	
試薬	1 リットルあたり
MS塩(10×)	100 ml
MES	0.5 g
チアミン-HCl (1 mg/ml)	1 ml
ミオ-イノシトール	100 mg
K ₂ HPO ₄	137.4 mg
2,4-D (10 mg/ml)	222 μl
スクロース	30 g
pHを5.7 ± 0.03に調整	

30

【 0 2 5 0 】

【表 7】

表4. 攪拌タンクリアクタ(STR)発酵作業の概要					
事象	バッチID	発酵槽 容器	回収 PC V%	回収 容積(L)	容積回収率 (mg 抗原 /L 稼動体積)
1622-21 0δ	WNV SRD 05005	Biostat C 20	50	9.9	1.846
1622-20 7δ	WNV SRD 05006	Biostat B 10	38	9.3	1.574
1622-21 0	WNV SRD 05007	Bioflo 30 00	56	9.8	1.997
1622-20 7	WNV SRD 05008	Biostat B 10	36	9.3	1.645
1622-20 7	WNV SRD 05009	Biostat B 10	38	9.4	1.492
1702-52 5δ	WNV SRD 05010	Biostat K B10	41	9.5	0.966

10

20

δ =すべての1622事象を、MEタンパク質をコードするpDAB2475で形質転換した一方、すべての1702事象を、Eタンパク質変異グリコシル化部位を伴うprMEタンパク質(prME(-))をコードするpDAB2481で形質転換した。

【 0 2 5 1 】

【表 8】

表5. 研究Iのために作製した組み換えウエストナイル (West Nile) ウイルス抗原のサンプル				
処理グル ープ、 n =5	細胞培養 事象	プロセス方法	E タンパク 質 濃度 (mg)	ロットID番号、 バイアル標識
1	1622-207	PM7	3.38	SRD05005
2	1622-207	PM7	3.38	SRD05005
3	1622-207	PM3	0.71	SRD05006
4	1622-210	PM4	0.48	SRD05007
5	1622-210	PM2	0.51	SRD05008
6	1702-525	プールしたPM2お よびPM3	0.93	SRD05009
7	1602-207	PM5	0.18	SRD05010
8	NT1 野生型	PM2	0	SRD05011
9	NT1 野生型	PM3	0	SRD05012
10	NT1 野生型	PM4Ψ	0	SRD05013Ψ
11	NT1 野生型	PM7	0	SRD05014
12	不活性化WNV	Blitvich et al (3)	2.72 μg/100 μl	SRD05015
13	PBS	NA	0	SRD05016

30

40

Ψ=凍結乾燥後に利用可能なサンプル質量が不十分であるために省略したサンプル。

【 0 2 5 2 】

50

【表 9】

表6. 研究Iのために処方した組み換えウエストナイル (West Nile) ウイルス抗原のサンプル							
処理グループ、 n=5	細胞培養事象	プロセス方法	E タンパク質濃度 (mg)	ロットID番号、バイアル標識	水添加量 (ml)	再水和する能力	マウス 1 匹あたりのおよそのEタンパク質用量(μg)
1	1622-207	PM7	3.38	SRD05005	-	所望される100 μgの用量ではなし	-
2	1622-207	PM7	3.38	SRD05005	6.8	容易	50
3	1622-207	PM3	0.71	SRD05006	14.2	不溶性	-
4	1622-210	PM4	0.48	SRD05007	24	あり	3
5	1622-210	PM2	0.51	SRD05008	10.2	あり	5
6	1702-525	プールしたPM2およびPM3	0.93	SRD05009	21.6	あり	4
7	1602-207	PM5	0.18	SRD05010	3.6	あり	5
8	NT1 野生型	PM2	0	SRD05011	1.02	あり	0
9	NT1 野生型	PM3	0	SRD05012	1.22	あり	0
11	NT1 野生型	PM7	0	SRD05014	3.38	あり	0
12	不活化 WN V	Blitvich et al (3)	2.72 μg/100 μl	SRD05015	-	あり	2.72
13	PBS	NA	0	SRD05016	0	あり	0

【 0 2 5 3 】

【表 10】

表7. 植物細胞産生WNV抗原によるワクチン接種から作製されるWNV中和力価、研究I						
処理 グループ	マウス番号 1	マウス番号 2	マウス番号 3	マウス番号 4	マウス番号 5	平均力価
2	1280	1920	>2560	1920	>2560	>2560
4	1280	960	640	1280	ND	1040
5	>2560	>2560	1280	1920	80	656
6	120	480	40	<20	240	176
7	480	480	1280	320	1280	768
8	<20	<20	<20	<20	<20	<20
9	<20	<20	<20	<20	<20	<20
11	<20	<20	<20	<20	<20	<20
12	>20480	>20480	>20480	>20480	>20480	>20480
13	<20	<20	<20	<20	<20	<20

10

【 0 2 5 4 】

20

【表 1 1】

表8. 多数の用量および多数のアジュバント(CFA、完全フロイントアジュバント； IFA、不完全フロイントアジュバント； OW、水中油型)を試験する第2のマウス研究のための処理グループ				
グループ	処理	抗原の用量	アジュバント	動物数
1	NT-1植物細胞コントロール	NA	Titer-max	5
2	植物細胞ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	CFA IFA	5
3	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	Titer-max	10
4	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	5 μ g	Titer-max	10
5	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	0.5 μ g	Titer-max	10
6	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	Carbopol	10
7	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	5 μ g	Carbopol	10
8	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	0.5 μ g	Carbopol	10
9	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	Carbigen	10
10	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	5 μ g	Carbigen	10
11	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	0.5 μ g	Carbigen	10
12	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	OW	10
13	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	5 μ g	OW	10
14	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	0.5 μ g	OW	10
15	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	25 μ g	Polygen	10
16	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	5 μ g	Polygen	10
17	植物細胞産生 WNV ワクチン (1622-207 事象)	0.5 μ g	Polygen	10

【表 1 2】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
5	1 ～ 664	Y+4
6	1 ～ 663	Y+5
7	1 ～ 662	Y+6
8	1 ～ 661	Y+7
9	1 ～ 660	Y+8
10	1 ～ 659	Y+9
11	1 ～ 658	Y+10
12	1 ～ 657	Y+11
13	1 ～ 656	Y+12
14	1 ～ 655	Y+13
15	1 ～ 654	Y+14
16	1 ～ 653	Y+15
17	1 ～ 652	Y+16
18	1 ～ 651	Y+17
19	1 ～ 650	Y+18
20	1 ～ 649	Y+19
21	1 ～ 648	Y+20
22	1 ～ 647	Y+21
23	1 ～ 646	Y+22
24	1 ～ 645	Y+23
25	1 ～ 644	Y+24
26	1 ～ 643	Y+25

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
53	1 ～ 616	Y+52
54	1 ～ 615	Y+53
55	1 ～ 614	Y+54
56	1 ～ 613	Y+55
57	1 ～ 612	Y+56
58	1 ～ 611	Y+57
59	1 ～ 610	Y+58
60	1 ～ 609	Y+59
61	1 ～ 608	Y+60
62	1 ～ 607	Y+61
63	1 ～ 606	Y+62
64	1 ～ 605	Y+63
65	1 ～ 604	Y+64
66	1 ～ 603	Y+65
67	1 ～ 602	Y+66
68	1 ～ 601	Y+67
69	1 ～ 600	Y+68
70	1 ～ 599	Y+69
71	1 ～ 598	Y+70
72	1 ～ 597	Y+71
73	1 ～ 596	Y+72
74	1 ～ 595	Y+73

10

20

30

【 0 2 5 6 】

【表 13】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
27	1 ～ 642	Y+26
28	1 ～ 641	Y+27
29	1 ～ 640	Y+28
30	1 ～ 639	Y+29
31	1 ～ 638	Y+30
32	1 ～ 637	Y+31
33	1 ～ 636	Y+32
34	1 ～ 635	Y+33
35	1 ～ 634	Y+34
36	1 ～ 633	Y+35
37	1 ～ 632	Y+36
38	1 ～ 631	Y+37
39	1 ～ 630	Y+38
40	1 ～ 629	Y+39
41	1 ～ 628	Y+40
42	1 ～ 627	Y+41
43	1 ～ 626	Y+42
44	1 ～ 625	Y+43
45	1 ～ 624	Y+44
46	1 ～ 623	Y+45
47	1 ～ 622	Y+46
48	1 ～ 621	Y+47
49	1 ～ 620	Y+48
50	1 ～ 619	Y+49
51	1 ～ 618	Y+50
52	1 ～ 617	Y+51

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
75	1 ～ 594	Y+74
76	1 ～ 593	Y+75
77	1 ～ 592	Y+76
78	1 ～ 591	Y+77
79	1 ～ 590	Y+78
80	1 ～ 589	Y+79
81	1 ～ 588	Y+80
82	1 ～ 587	Y+81
83	1 ～ 586	Y+82
84	1 ～ 585	Y+83
85	1 ～ 584	Y+84
86	1 ～ 583	Y+85
87	1 ～ 582	Y+86
88	1 ～ 581	Y+87
89	1 ～ 580	Y+88
90	1 ～ 579	Y+89
91	1 ～ 578	Y+90
92	1 ～ 577	Y+91
93	1 ～ 576	Y+92
94	1 ～ 575	Y+93
95	1 ～ 574	Y+94
96	1 ～ 573	Y+95
97	1 ～ 572	Y+96
98	1 ～ 571	Y+97
99	1 ～ 570	Y+98
100	1 ～ 569	Y+99

10

20

30

【 0 2 5 7 】

【表 1 4】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
101	1 ～ 568	Y+100
102	1 ～ 567	Y+101
103	1 ～ 566	Y+102
104	1 ～ 565	Y+103
105	1 ～ 564	Y+104
106	1 ～ 563	Y+105
107	1 ～ 562	Y+106
108	1 ～ 561	Y+107
109	1 ～ 560	Y+108
110	1 ～ 559	Y+109
111	1 ～ 558	Y+110
112	1 ～ 557	Y+111
113	1 ～ 556	Y+112
114	1 ～ 555	Y+113
115	1 ～ 554	Y+114
116	1 ～ 553	Y+115
117	1 ～ 552	Y+116
118	1 ～ 551	Y+117
119	1 ～ 550	Y+118
120	1 ～ 549	Y+119
121	1 ～ 548	Y+120
122	1 ～ 547	Y+121
123	1 ～ 546	Y+122
124	1 ～ 545	Y+123

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
149	1 ～ 520	Y+148
150	1 ～ 519	Y+149
151	1 ～ 518	Y+150
152	1 ～ 517	Y+151
153	1 ～ 516	Y+152
154	1 ～ 515	Y+153
155	1 ～ 514	Y+154
156	1 ～ 513	Y+155
157	1 ～ 512	Y+156
158	1 ～ 511	Y+157
159	1 ～ 510	Y+158
160	1 ～ 509	Y+159
161	1 ～ 508	Y+160
162	1 ～ 507	Y+161
163	1 ～ 506	Y+162
164	1 ～ 505	Y+163
165	1 ～ 504	Y+164
166	1 ～ 503	Y+165
167	1 ～ 502	Y+166
168	1 ～ 501	Y+167
169	1 ～ 500	Y+168
170	1 ～ 499	Y+169
171	1 ～ 498	Y+170
172	1 ～ 497	Y+171

10

20

30

【 0 2 5 8 】

【表 15】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
125	1 ～ 544	Y+124
126	1 ～ 543	Y+125
127	1 ～ 542	Y+126
128	1 ～ 541	Y+127
129	1 ～ 540	Y+128
130	1 ～ 539	Y+129
131	1 ～ 538	Y+130
132	1 ～ 537	Y+131
133	1 ～ 536	Y+132
134	1 ～ 535	Y+133
135	1 ～ 534	Y+134
136	1 ～ 533	Y+135
137	1 ～ 532	Y+136
138	1 ～ 531	Y+137
139	1 ～ 530	Y+138
140	1 ～ 529	Y+139
141	1 ～ 528	Y+140
142	1 ～ 527	Y+141
143	1 ～ 526	Y+142
144	1 ～ 525	Y+143
145	1 ～ 524	Y+144
146	1 ～ 523	Y+145
147	1 ～ 522	Y+146
148	1 ～ 521	Y+147

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
173	1 ～ 496	Y+172
174	1 ～ 495	Y+173
175	1 ～ 494	Y+174
176	1 ～ 493	Y+175
177	1 ～ 492	Y+176
178	1 ～ 491	Y+177
179	1 ～ 490	Y+178
180	1 ～ 489	Y+179
181	1 ～ 488	Y+180
182	1 ～ 487	Y+181
183	1 ～ 486	Y+182
184	1 ～ 485	Y+183
185	1 ～ 484	Y+184
186	1 ～ 483	Y+185
187	1 ～ 482	Y+186
188	1 ～ 481	Y+187
189	1 ～ 480	Y+188
190	1 ～ 479	Y+189
191	1 ～ 478	Y+190
192	1 ～ 477	Y+191
193	1 ～ 476	Y+192
194	1 ～ 475	Y+193
195	1 ～ 474	Y+194
196	1 ～ 473	Y+195

10

20

30

【 0 2 5 9 】

【表 16】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
197	1 ~ 472	Y+196
198	1 ~ 471	Y+197
199	1 ~ 470	Y+198
200	1 ~ 469	Y+199
201	1 ~ 468	Y+200
202	1 ~ 467	Y+201
203	1 ~ 466	Y+202
204	1 ~ 465	Y+203
205	1 ~ 464	Y+204
206	1 ~ 463	Y+205
207	1 ~ 462	Y+206
208	1 ~ 461	Y+207
209	1 ~ 460	Y+208
210	1 ~ 459	Y+209
211	1 ~ 458	Y+210
212	1 ~ 457	Y+211
213	1 ~ 456	Y+212
214	1 ~ 455	Y+213
215	1 ~ 454	Y+214
216	1 ~ 453	Y+215
217	1 ~ 452	Y+216
218	1 ~ 451	Y+217
219	1 ~ 450	Y+218
220	1 ~ 449	Y+219
221	1 ~ 448	Y+220
222	1 ~ 447	Y+221
223	1 ~ 446	Y+222
224	1 ~ 445	Y+223

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
245	1 ~ 424	Y+244
246	1 ~ 423	Y+245
247	1 ~ 422	Y+246
248	1 ~ 421	Y+247
249	1 ~ 420	Y+248
250	1 ~ 419	Y+249
251	1 ~ 418	Y+250
252	1 ~ 417	Y+251
253	1 ~ 416	Y+252
254	1 ~ 415	Y+253
255	1 ~ 414	Y+254
256	1 ~ 413	Y+255
257	1 ~ 412	Y+256
258	1 ~ 411	Y+257
259	1 ~ 410	Y+258
260	1 ~ 409	Y+259
261	1 ~ 408	Y+260
262	1 ~ 407	Y+261
263	1 ~ 406	Y+262
264	1 ~ 405	Y+263
265	1 ~ 404	Y+264
266	1 ~ 403	Y+265
267	1 ~ 402	Y+266
268	1 ~ 401	Y+267
269	1 ~ 400	Y+268
270	1 ~ 399	Y+269
271	1 ~ 398	Y+270
272	1 ~ 397	Y+271

10

20

30

【 0 2 6 0 】

40

【表 17】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
225	1 ~ 444	Y+224
226	1 ~ 443	Y+225
227	1 ~ 442	Y+226
228	1 ~ 441	Y+227
229	1 ~ 440	Y+228
230	1 ~ 439	Y+229
231	1 ~ 438	Y+230
232	1 ~ 437	Y+231
233	1 ~ 436	Y+232
234	1 ~ 435	Y+233
235	1 ~ 434	Y+234
236	1 ~ 433	Y+235
237	1 ~ 432	Y+236
238	1 ~ 431	Y+237
239	1 ~ 430	Y+238
240	1 ~ 429	Y+239
241	1 ~ 428	Y+240
242	1 ~ 427	Y+241
243	1 ~ 426	Y+242
244	1 ~ 425	Y+243

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
273	1 ~ 396	Y+272
274	1 ~ 395	Y+273
275	1 ~ 394	Y+274
276	1 ~ 393	Y+275
277	1 ~ 392	Y+276
278	1 ~ 391	Y+277
279	1 ~ 390	Y+278
280	1 ~ 389	Y+279
281	1 ~ 388	Y+280
282	1 ~ 387	Y+281
283	1 ~ 386	Y+282
284	1 ~ 385	Y+283
285	1 ~ 384	Y+284
286	1 ~ 383	Y+285
287	1 ~ 382	Y+286
288	1 ~ 381	Y+287
289	1 ~ 380	Y+288
290	1 ~ 379	Y+289
291	1 ~ 378	Y+290
292	1 ~ 377	Y+291

10

20

30

【 0 2 6 1 】

【表 18】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
293	1 ～ 376	Y+292
294	1 ～ 375	Y+293
295	1 ～ 374	Y+294
296	1 ～ 373	Y+295
297	1 ～ 372	Y+296
298	1 ～ 371	Y+297
299	1 ～ 370	Y+298
300	1 ～ 369	Y+299
301	1 ～ 368	Y+300
302	1 ～ 367	Y+301
303	1 ～ 366	Y+302
304	1 ～ 365	Y+303
305	1 ～ 364	Y+304
306	1 ～ 363	Y+305
307	1 ～ 362	Y+306
308	1 ～ 361	Y+307
309	1 ～ 360	Y+308
310	1 ～ 359	Y+309
311	1 ～ 358	Y+310
312	1 ～ 357	Y+311
313	1 ～ 356	Y+312
314	1 ～ 355	Y+313
315	1 ～ 354	Y+314
316	1 ～ 353	Y+315
317	1 ～ 352	Y+316
318	1 ～ 351	Y+317
319	1 ～ 350	Y+318
320	1 ～ 349	Y+319

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
341	1 ～ 328	Y+340
342	1 ～ 327	Y+341
343	1 ～ 326	Y+342
344	1 ～ 325	Y+343
345	1 ～ 324	Y+344
346	1 ～ 323	Y+345
347	1 ～ 322	Y+346
348	1 ～ 321	Y+347
349	1 ～ 320	Y+348
350	1 ～ 319	Y+349
351	1 ～ 318	Y+350
352	1 ～ 317	Y+351
353	1 ～ 316	Y+352
354	1 ～ 315	Y+353
355	1 ～ 314	Y+354
356	1 ～ 313	Y+355
357	1 ～ 312	Y+356
358	1 ～ 311	Y+357
359	1 ～ 310	Y+358
360	1 ～ 309	Y+359
361	1 ～ 308	Y+360
362	1 ～ 307	Y+361
363	1 ～ 306	Y+362
364	1 ～ 305	Y+363
365	1 ～ 304	Y+364
366	1 ～ 303	Y+365
367	1 ～ 302	Y+366
368	1 ～ 301	Y+367

10

20

30

【 0 2 6 2 】

【表 19】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
321	1 ～ 348	Y+320
322	1 ～ 347	Y+321
323	1 ～ 346	Y+322
324	1 ～ 345	Y+323
325	1 ～ 344	Y+324
326	1 ～ 343	Y+325
327	1 ～ 342	Y+326
328	1 ～ 341	Y+327
329	1 ～ 340	Y+328
330	1 ～ 339	Y+329
331	1 ～ 338	Y+330
332	1 ～ 337	Y+331
333	1 ～ 336	Y+332
334	1 ～ 335	Y+333
335	1 ～ 334	Y+334
336	1 ～ 333	Y+335
337	1 ～ 332	Y+336
338	1 ～ 331	Y+337
339	1 ～ 330	Y+338
340	1 ～ 329	Y+339

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
369	1 ～ 300	Y+368
370	1 ～ 299	Y+369
371	1 ～ 298	Y+370
372	1 ～ 297	Y+371
373	1 ～ 296	Y+372
374	1 ～ 295	Y+373
375	1 ～ 294	Y+374
376	1 ～ 293	Y+375
377	1 ～ 292	Y+376
378	1 ～ 291	Y+377
379	1 ～ 290	Y+378
380	1 ～ 289	Y+379
381	1 ～ 288	Y+380
382	1 ～ 287	Y+381
383	1 ～ 286	Y+382
384	1 ～ 285	Y+383
385	1 ～ 284	Y+384
386	1 ～ 283	Y+385
387	1 ～ 282	Y+386
388	1 ～ 281	Y+387

10

20

【表 20】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
389	1 ~ 280	Y+388
390	1 ~ 279	Y+389
391	1 ~ 278	Y+390
392	1 ~ 277	Y+391
393	1 ~ 276	Y+392
394	1 ~ 275	Y+393
395	1 ~ 274	Y+394
396	1 ~ 273	Y+395
397	1 ~ 272	Y+396
398	1 ~ 271	Y+397
399	1 ~ 270	Y+398
400	1 ~ 269	Y+399
401	1 ~ 268	Y+400
402	1 ~ 267	Y+401
403	1 ~ 266	Y+402
404	1 ~ 265	Y+403
405	1 ~ 264	Y+404
406	1 ~ 263	Y+405
407	1 ~ 262	Y+406
408	1 ~ 261	Y+407
409	1 ~ 260	Y+408
410	1 ~ 259	Y+409
411	1 ~ 258	Y+410
412	1 ~ 257	Y+411
413	1 ~ 256	Y+412
414	1 ~ 255	Y+413

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
437	1 ~ 232	Y+436
438	1 ~ 231	Y+437
439	1 ~ 230	Y+438
440	1 ~ 229	Y+439
441	1 ~ 228	Y+440
442	1 ~ 227	Y+441
443	1 ~ 226	Y+442
444	1 ~ 225	Y+443
445	1 ~ 224	Y+444
446	1 ~ 223	Y+445
447	1 ~ 222	Y+446
448	1 ~ 221	Y+447
449	1 ~ 220	Y+448
450	1 ~ 219	Y+449
451	1 ~ 218	Y+450
452	1 ~ 217	Y+451
453	1 ~ 216	Y+452
454	1 ~ 215	Y+453
455	1 ~ 214	Y+454
456	1 ~ 213	Y+455
457	1 ~ 212	Y+456
458	1 ~ 211	Y+457
459	1 ~ 210	Y+458
460	1 ~ 209	Y+459
461	1 ~ 208	Y+460
462	1 ~ 207	Y+461

10

20

30

【表 2 1】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
415	1 ~ 254	Y+414
416	1 ~ 253	Y+415
417	1 ~ 252	Y+416
418	1 ~ 251	Y+417
419	1 ~ 250	Y+418
420	1 ~ 249	Y+419
421	1 ~ 248	Y+420
422	1 ~ 247	Y+421
423	1 ~ 246	Y+422
424	1 ~ 245	Y+423
425	1 ~ 244	Y+424
426	1 ~ 243	Y+425
427	1 ~ 242	Y+426
428	1 ~ 241	Y+427
429	1 ~ 240	Y+428
430	1 ~ 239	Y+429
431	1 ~ 238	Y+430
432	1 ~ 237	Y+431
433	1 ~ 236	Y+432
434	1 ~ 235	Y+433
435	1 ~ 234	Y+434
436	1 ~ 233	Y+435

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
463	1 ~ 206	Y+462
464	1 ~ 205	Y+463
465	1 ~ 204	Y+464
466	1 ~ 203	Y+465
467	1 ~ 202	Y+466
468	1 ~ 201	Y+467
469	1 ~ 200	Y+468
470	1 ~ 199	Y+469
471	1 ~ 198	Y+470
472	1 ~ 197	Y+471
473	1 ~ 196	Y+472
474	1 ~ 195	Y+473
475	1 ~ 194	Y+474
476	1 ~ 193	Y+475
477	1 ~ 192	Y+476
478	1 ~ 191	Y+477
479	1 ~ 190	Y+478
480	1 ~ 189	Y+479
481	1 ~ 188	Y+480
482	1 ~ 187	Y+481
483	1 ~ 186	Y+482
484	1 ~ 185	Y+483

10

20

30

【 0 2 6 3 】

【表 2 2】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
485	1 ～ 184	Y+484
486	1 ～ 183	Y+485
487	1 ～ 182	Y+486
488	1 ～ 181	Y+487
489	1 ～ 180	Y+488
490	1 ～ 179	Y+489
491	1 ～ 178	Y+490
492	1 ～ 177	Y+491
493	1 ～ 176	Y+492
494	1 ～ 175	Y+493
495	1 ～ 174	Y+494
496	1 ～ 173	Y+495
497	1 ～ 172	Y+496
498	1 ～ 171	Y+497
499	1 ～ 170	Y+498
500	1 ～ 169	Y+499
501	1 ～ 168	Y+500
502	1 ～ 167	Y+501
503	1 ～ 166	Y+502
504	1 ～ 165	Y+503
505	1 ～ 164	Y+504
506	1 ～ 163	Y+505
507	1 ～ 162	Y+506

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
533	1 ～ 136	Y+532
534	1 ～ 135	Y+533
535	1 ～ 134	Y+534
536	1 ～ 133	Y+535
537	1 ～ 132	Y+536
538	1 ～ 131	Y+537
539	1 ～ 130	Y+538
540	1 ～ 129	Y+539
541	1 ～ 128	Y+540
542	1 ～ 127	Y+541
543	1 ～ 126	Y+542
544	1 ～ 125	Y+543
545	1 ～ 124	Y+544
546	1 ～ 123	Y+545
547	1 ～ 122	Y+546
548	1 ～ 121	Y+547
549	1 ～ 120	Y+548
550	1 ～ 119	Y+549
551	1 ～ 118	Y+550
552	1 ～ 117	Y+551
553	1 ～ 116	Y+552
554	1 ～ 115	Y+553
555	1 ～ 114	Y+554

10

20

30

【 0 2 6 4 】

【表 2 3】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
508	1 ～ 161	Y+507
509	1 ～ 160	Y+508
510	1 ～ 159	Y+509
511	1 ～ 158	Y+510
512	1 ～ 157	Y+511
513	1 ～ 156	Y+512
514	1 ～ 155	Y+513
515	1 ～ 154	Y+514
516	1 ～ 153	Y+515
517	1 ～ 152	Y+516
518	1 ～ 151	Y+517
519	1 ～ 150	Y+518
520	1 ～ 149	Y+519
521	1 ～ 148	Y+520
522	1 ～ 147	Y+521
523	1 ～ 146	Y+522
524	1 ～ 145	Y+523
525	1 ～ 144	Y+524
526	1 ～ 143	Y+525
527	1 ～ 142	Y+526
528	1 ～ 141	Y+527
529	1 ～ 140	Y+528
530	1 ～ 139	Y+529
531	1 ～ 138	Y+530
532	1 ～ 137	Y+531

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
556	1 ～ 113	Y+555
557	1 ～ 112	Y+556
558	1 ～ 111	Y+557
559	1 ～ 110	Y+558
560	1 ～ 109	Y+559
561	1 ～ 108	Y+560
562	1 ～ 107	Y+561
563	1 ～ 106	Y+562
564	1 ～ 105	Y+563
565	1 ～ 104	Y+564
566	1 ～ 103	Y+565
567	1 ～ 102	Y+566
568	1 ～ 101	Y+567
569	1 ～ 100	Y+568
570	1 ～ 99	Y+569
571	1 ～ 98	Y+570
572	1 ～ 97	Y+571
573	1 ～ 96	Y+572
574	1 ～ 95	Y+573
575	1 ～ 94	Y+574
576	1 ～ 93	Y+575
577	1 ～ 92	Y+576
578	1 ～ 91	Y+577
579	1 ～ 90	Y+578
580	1 ～ 89	Y+579

10

20

30

【 0 2 6 5 】

【表 2 4】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
581	1 ～ 88	Y+580
582	1 ～ 87	Y+581
583	1 ～ 86	Y+582
584	1 ～ 85	Y+583
585	1 ～ 84	Y+584
586	1 ～ 83	Y+585
587	1 ～ 82	Y+586
588	1 ～ 81	Y+587
589	1 ～ 80	Y+588
590	1 ～ 79	Y+589
591	1 ～ 78	Y+590
592	1 ～ 77	Y+591
593	1 ～ 76	Y+592
594	1 ～ 75	Y+593
595	1 ～ 74	Y+594
596	1 ～ 73	Y+595
597	1 ～ 72	Y+596
598	1 ～ 71	Y+597
599	1 ～ 70	Y+598
600	1 ～ 69	Y+599
601	1 ～ 68	Y+600
602	1 ～ 67	Y+601
603	1 ～ 66	Y+602
604	1 ～ 65	Y+603
605	1 ～ 64	Y+604
606	1 ～ 63	Y+605
607	1 ～ 62	Y+606
608	1 ～ 61	Y+607
609	1 ～ 60	Y+608
610	1 ～ 59	Y+609

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
629	1 ～ 40	Y+628
630	1 ～ 39	Y+629
631	1 ～ 38	Y+630
632	1 ～ 37	Y+631
633	1 ～ 36	Y+632
634	1 ～ 35	Y+633
635	1 ～ 34	Y+634
636	1 ～ 33	Y+635
637	1 ～ 32	Y+636
638	1 ～ 31	Y+637
639	1 ～ 30	Y+638
640	1 ～ 29	Y+639
641	1 ～ 28	Y+640
642	1 ～ 27	Y+641
643	1 ～ 26	Y+642
644	1 ～ 25	Y+643
645	1 ～ 24	Y+644
646	1 ～ 23	Y+645
647	1 ～ 22	Y+646
648	1 ～ 21	Y+647
649	1 ～ 20	Y+648
650	1 ～ 19	Y+649
651	1 ～ 18	Y+650
652	1 ～ 17	Y+651
653	1 ～ 16	Y+652
654	1 ～ 15	Y+653
655	1 ～ 14	Y+654
656	1 ～ 13	Y+655
657	1 ～ 12	Y+656
658	1 ～ 11	Y+657

10

20

30

40

【 0 2 6 6 】

【表 2 5】

表9. 配列番号5のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
611	1 ～ 58	Y+610
612	1 ～ 57	Y+611
613	1 ～ 56	Y+612
614	1 ～ 55	Y+613
615	1 ～ 54	Y+614
616	1 ～ 53	Y+615
617	1 ～ 52	Y+616
618	1 ～ 51	Y+617
619	1 ～ 50	Y+618
620	1 ～ 49	Y+619
621	1 ～ 48	Y+620
622	1 ～ 47	Y+621
623	1 ～ 46	Y+622
624	1 ～ 45	Y+623
625	1 ～ 44	Y+624
626	1 ～ 43	Y+625
627	1 ～ 42	Y+626
628	1 ～ 41	Y+627

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
659	1 ～ 10	Y+658
660	1 ～ 9	Y+659
661	1 ～ 8	Y+660
662	1 ～ 7	Y+661
663	1 ～ 6	Y+662
664	1 ～ 5	Y+663
665	1 ～ 4	Y+664
666	1 ～ 3	Y+665
667	1 ～ 2	Y+666

10

20

【 0 2 6 7 】

【表 2 6】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
5	1 ~ 690	Y+4
6	1 ~ 689	Y+5
7	1 ~ 688	Y+6
8	1 ~ 687	Y+7
9	1 ~ 686	Y+8
10	1 ~ 685	Y+9
11	1 ~ 684	Y+10
12	1 ~ 683	Y+11
13	1 ~ 682	Y+12
14	1 ~ 681	Y+13
15	1 ~ 680	Y+14
16	1 ~ 679	Y+15
17	1 ~ 678	Y+16
18	1 ~ 677	Y+17
19	1 ~ 676	Y+18
20	1 ~ 675	Y+19
21	1 ~ 674	Y+20
22	1 ~ 673	Y+21
23	1 ~ 672	Y+22
24	1 ~ 671	Y+23
25	1 ~ 670	Y+24

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
53	1 ~ 642	Y+52
54	1 ~ 641	Y+53
55	1 ~ 640	Y+54
56	1 ~ 639	Y+55
57	1 ~ 638	Y+56
58	1 ~ 637	Y+57
59	1 ~ 636	Y+58
60	1 ~ 635	Y+59
61	1 ~ 634	Y+60
62	1 ~ 633	Y+61
63	1 ~ 632	Y+62
64	1 ~ 631	Y+63
65	1 ~ 630	Y+64
66	1 ~ 629	Y+65
67	1 ~ 628	Y+66
68	1 ~ 627	Y+67
69	1 ~ 626	Y+68
70	1 ~ 625	Y+69
71	1 ~ 624	Y+70
72	1 ~ 623	Y+71
73	1 ~ 622	Y+72

10

20

30

【 0 2 6 8 】

【表 27】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
26	1 ~ 669	Y+25
27	1 ~ 668	Y+26
28	1 ~ 667	Y+27
29	1 ~ 666	Y+28
30	1 ~ 665	Y+29
31	1 ~ 664	Y+30
32	1 ~ 663	Y+31
33	1 ~ 662	Y+32
34	1 ~ 661	Y+33
35	1 ~ 660	Y+34
36	1 ~ 659	Y+35
37	1 ~ 658	Y+36
38	1 ~ 657	Y+37
39	1 ~ 656	Y+38
40	1 ~ 655	Y+39
41	1 ~ 654	Y+40
42	1 ~ 653	Y+41
43	1 ~ 652	Y+42
44	1 ~ 651	Y+43
45	1 ~ 650	Y+44
46	1 ~ 649	Y+45
47	1 ~ 648	Y+46
48	1 ~ 647	Y+47
49	1 ~ 646	Y+48
50	1 ~ 645	Y+49
51	1 ~ 644	Y+50
52	1 ~ 643	Y+51

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である :	Z
74	1 ~ 621	Y+73
75	1 ~ 620	Y+74
76	1 ~ 619	Y+75
77	1 ~ 618	Y+76
78	1 ~ 617	Y+77
79	1 ~ 616	Y+78
80	1 ~ 615	Y+79
81	1 ~ 614	Y+80
82	1 ~ 613	Y+81
83	1 ~ 612	Y+82
84	1 ~ 611	Y+83
85	1 ~ 610	Y+84
86	1 ~ 609	Y+85
87	1 ~ 608	Y+86
88	1 ~ 607	Y+87
89	1 ~ 606	Y+88
90	1 ~ 605	Y+89
91	1 ~ 604	Y+90
92	1 ~ 603	Y+91
93	1 ~ 602	Y+92
94	1 ~ 601	Y+93
95	1 ~ 600	Y+94
96	1 ~ 599	Y+95
97	1 ~ 598	Y+96
98	1 ~ 597	Y+97
99	1 ~ 596	Y+98
100	1 ~ 595	Y+99

10

20

30

【 0 2 6 9 】

【表 2 8】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
101	1 ～ 594	Y+100
102	1 ～ 593	Y+101
103	1 ～ 592	Y+102
104	1 ～ 591	Y+103
105	1 ～ 590	Y+104
106	1 ～ 589	Y+105
107	1 ～ 588	Y+106
108	1 ～ 587	Y+107
109	1 ～ 586	Y+108
110	1 ～ 585	Y+109
111	1 ～ 584	Y+110
112	1 ～ 583	Y+111
113	1 ～ 582	Y+112
114	1 ～ 581	Y+113
115	1 ～ 580	Y+114
116	1 ～ 579	Y+115
117	1 ～ 578	Y+116
118	1 ～ 577	Y+117
119	1 ～ 576	Y+118
120	1 ～ 575	Y+119
121	1 ～ 574	Y+120
122	1 ～ 573	Y+121
123	1 ～ 572	Y+122
124	1 ～ 571	Y+123

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
149	1 ～ 546	Y+148
150	1 ～ 545	Y+149
151	1 ～ 544	Y+150
152	1 ～ 543	Y+151
153	1 ～ 542	Y+152
154	1 ～ 541	Y+153
155	1 ～ 540	Y+154
156	1 ～ 539	Y+155
157	1 ～ 538	Y+156
158	1 ～ 537	Y+157
159	1 ～ 536	Y+158
160	1 ～ 535	Y+159
161	1 ～ 534	Y+160
162	1 ～ 533	Y+161
163	1 ～ 532	Y+162
164	1 ～ 531	Y+163
165	1 ～ 530	Y+164
166	1 ～ 529	Y+165
167	1 ～ 528	Y+166
168	1 ～ 527	Y+167
169	1 ～ 526	Y+168
170	1 ～ 525	Y+169
171	1 ～ 524	Y+170
172	1 ～ 523	Y+171

10

20

30

【 0 2 7 0 】

【表 2 9】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
125	1 ～ 570	Y+124
126	1 ～ 569	Y+125
127	1 ～ 568	Y+126
128	1 ～ 567	Y+127
129	1 ～ 566	Y+128
130	1 ～ 565	Y+129
131	1 ～ 564	Y+130
132	1 ～ 563	Y+131
133	1 ～ 562	Y+132
134	1 ～ 561	Y+133
135	1 ～ 560	Y+134
136	1 ～ 559	Y+135
137	1 ～ 558	Y+136
138	1 ～ 557	Y+137
139	1 ～ 556	Y+138
140	1 ～ 555	Y+139
141	1 ～ 554	Y+140
142	1 ～ 553	Y+141
143	1 ～ 552	Y+142
144	1 ～ 551	Y+143
145	1 ～ 550	Y+144
146	1 ～ 549	Y+145
147	1 ～ 548	Y+146
148	1 ～ 547	Y+147

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
173	1 ～ 522	Y+172
174	1 ～ 521	Y+173
175	1 ～ 520	Y+174
176	1 ～ 519	Y+175
177	1 ～ 518	Y+176
178	1 ～ 517	Y+177
179	1 ～ 516	Y+178
180	1 ～ 515	Y+179
181	1 ～ 514	Y+180
182	1 ～ 513	Y+181
183	1 ～ 512	Y+182
184	1 ～ 511	Y+183
185	1 ～ 510	Y+184
186	1 ～ 509	Y+185
187	1 ～ 508	Y+186
188	1 ～ 507	Y+187
189	1 ～ 506	Y+188
190	1 ～ 505	Y+189
191	1 ～ 504	Y+190
192	1 ～ 503	Y+191
193	1 ～ 502	Y+192
194	1 ～ 501	Y+193
195	1 ～ 500	Y+194
196	1 ～ 499	Y+195

10

20

30

【 0 2 7 1 】

【表 3 0】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
197	1 ～ 498	Y+196
198	1 ～ 497	Y+197
199	1 ～ 496	Y+198
200	1 ～ 495	Y+199
201	1 ～ 494	Y+200
202	1 ～ 493	Y+201
203	1 ～ 492	Y+202
204	1 ～ 491	Y+203
205	1 ～ 490	Y+204
206	1 ～ 489	Y+205
207	1 ～ 488	Y+206
208	1 ～ 487	Y+207
209	1 ～ 486	Y+208
210	1 ～ 485	Y+209
211	1 ～ 484	Y+210
212	1 ～ 483	Y+211
213	1 ～ 482	Y+212
214	1 ～ 481	Y+213
215	1 ～ 480	Y+214
216	1 ～ 479	Y+215
217	1 ～ 478	Y+216
218	1 ～ 477	Y+217
219	1 ～ 476	Y+218
220	1 ～ 475	Y+219
221	1 ～ 474	Y+220
222	1 ～ 473	Y+221

フラグメント長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
245	1 ～ 450	Y+244
246	1 ～ 449	Y+245
247	1 ～ 448	Y+246
248	1 ～ 447	Y+247
249	1 ～ 446	Y+248
250	1 ～ 445	Y+249
251	1 ～ 444	Y+250
252	1 ～ 443	Y+251
253	1 ～ 442	Y+252
254	1 ～ 441	Y+253
255	1 ～ 440	Y+254
256	1 ～ 439	Y+255
257	1 ～ 438	Y+256
258	1 ～ 437	Y+257
259	1 ～ 436	Y+258
260	1 ～ 435	Y+259
261	1 ～ 434	Y+260
262	1 ～ 433	Y+261
263	1 ～ 432	Y+262
264	1 ～ 431	Y+263
265	1 ～ 430	Y+264
266	1 ～ 429	Y+265
267	1 ～ 428	Y+266
268	1 ～ 427	Y+267
269	1 ～ 426	Y+268
270	1 ～ 425	Y+269

10

20

30

【 0 2 7 2 】

【表 3 1】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
223	1 ～ 472	Y+222
224	1 ～ 471	Y+223
225	1 ～ 470	Y+224
226	1 ～ 469	Y+225
227	1 ～ 468	Y+226
228	1 ～ 467	Y+227
229	1 ～ 466	Y+228
230	1 ～ 465	Y+229
231	1 ～ 464	Y+230
232	1 ～ 463	Y+231
233	1 ～ 462	Y+232
234	1 ～ 461	Y+233
235	1 ～ 460	Y+234
236	1 ～ 459	Y+235
237	1 ～ 458	Y+236
238	1 ～ 457	Y+237
239	1 ～ 456	Y+238
240	1 ～ 455	Y+239
241	1 ～ 454	Y+240
242	1 ～ 453	Y+241
243	1 ～ 452	Y+242
244	1 ～ 451	Y+243

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
271	1 ～ 424	Y+270
272	1 ～ 423	Y+271
273	1 ～ 422	Y+272
274	1 ～ 421	Y+273
275	1 ～ 420	Y+274
276	1 ～ 419	Y+275
277	1 ～ 418	Y+276
278	1 ～ 417	Y+277
279	1 ～ 416	Y+278
280	1 ～ 415	Y+279
281	1 ～ 414	Y+280
282	1 ～ 413	Y+281
283	1 ～ 412	Y+282
284	1 ～ 411	Y+283
285	1 ～ 410	Y+284
286	1 ～ 409	Y+285
287	1 ～ 408	Y+286
288	1 ～ 407	Y+287
289	1 ～ 406	Y+288
290	1 ～ 405	Y+289
291	1 ～ 404	Y+290
292	1 ～ 403	Y+291

10

20

30

【 0 2 7 3 】

【表 3 2】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
293	1 ～ 402	Y+292
294	1 ～ 401	Y+293
295	1 ～ 400	Y+294
296	1 ～ 399	Y+295
297	1 ～ 398	Y+296
298	1 ～ 397	Y+297
299	1 ～ 396	Y+298
300	1 ～ 395	Y+299
301	1 ～ 394	Y+300
302	1 ～ 393	Y+301
303	1 ～ 392	Y+302
304	1 ～ 391	Y+303
305	1 ～ 390	Y+304
306	1 ～ 389	Y+305
307	1 ～ 388	Y+306
308	1 ～ 387	Y+307
309	1 ～ 386	Y+308
310	1 ～ 385	Y+309
311	1 ～ 384	Y+310
312	1 ～ 383	Y+311
313	1 ～ 382	Y+312
314	1 ～ 381	Y+313
315	1 ～ 380	Y+314
316	1 ～ 379	Y+315
317	1 ～ 378	Y+316
318	1 ～ 377	Y+317
319	1 ～ 376	Y+318
320	1 ～ 375	Y+319

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
341	1 ～ 354	Y+340
342	1 ～ 353	Y+341
343	1 ～ 352	Y+342
344	1 ～ 351	Y+343
345	1 ～ 350	Y+344
346	1 ～ 349	Y+345
347	1 ～ 348	Y+346
348	1 ～ 347	Y+347
349	1 ～ 346	Y+348
350	1 ～ 345	Y+349
351	1 ～ 344	Y+350
352	1 ～ 343	Y+351
353	1 ～ 342	Y+352
354	1 ～ 341	Y+353
355	1 ～ 340	Y+354
356	1 ～ 339	Y+355
357	1 ～ 338	Y+356
358	1 ～ 337	Y+357
359	1 ～ 336	Y+358
360	1 ～ 335	Y+359
361	1 ～ 334	Y+360
362	1 ～ 333	Y+361
363	1 ～ 332	Y+362
364	1 ～ 331	Y+363
365	1 ～ 330	Y+364
366	1 ～ 329	Y+365
367	1 ～ 328	Y+366
368	1 ～ 327	Y+367

10

20

30

【 0 2 7 4 】

【表 3 3】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
321	1 ～ 374	Y+320
322	1 ～ 373	Y+321
323	1 ～ 372	Y+322
324	1 ～ 371	Y+323
325	1 ～ 370	Y+324
326	1 ～ 369	Y+325
327	1 ～ 368	Y+326
328	1 ～ 367	Y+327
329	1 ～ 366	Y+328
330	1 ～ 365	Y+329
331	1 ～ 364	Y+330
332	1 ～ 363	Y+331
333	1 ～ 362	Y+332
334	1 ～ 361	Y+333
335	1 ～ 360	Y+334
336	1 ～ 359	Y+335
337	1 ～ 358	Y+336
338	1 ～ 357	Y+337
339	1 ～ 356	Y+338
340	1 ～ 355	Y+339

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から選択される整数である：	Z
369	1 ～ 326	Y+368
370	1 ～ 325	Y+369
371	1 ～ 324	Y+370
372	1 ～ 323	Y+371
373	1 ～ 322	Y+372
374	1 ～ 321	Y+373
375	1 ～ 320	Y+374
376	1 ～ 319	Y+375
377	1 ～ 318	Y+376
378	1 ～ 317	Y+377
379	1 ～ 316	Y+378
380	1 ～ 315	Y+379
381	1 ～ 314	Y+380
382	1 ～ 313	Y+381
383	1 ～ 312	Y+382
384	1 ～ 311	Y+383
385	1 ～ 310	Y+384
386	1 ～ 309	Y+385
387	1 ～ 308	Y+386
388	1 ～ 307	Y+387

10

20

【 0 2 7 5 】

30

【表 3 4】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
389	1 ～ 306	Y+388
390	1 ～ 305	Y+389
391	1 ～ 304	Y+390
392	1 ～ 303	Y+391
393	1 ～ 302	Y+392
394	1 ～ 301	Y+393
395	1 ～ 300	Y+394
396	1 ～ 299	Y+395
397	1 ～ 298	Y+396
398	1 ～ 297	Y+397
399	1 ～ 296	Y+398
400	1 ～ 295	Y+399
401	1 ～ 294	Y+400
402	1 ～ 293	Y+401
403	1 ～ 292	Y+402
404	1 ～ 291	Y+403
405	1 ～ 290	Y+404
406	1 ～ 289	Y+405
407	1 ～ 288	Y+406
408	1 ～ 287	Y+407
409	1 ～ 286	Y+408
410	1 ～ 285	Y+409
411	1 ～ 284	Y+410
412	1 ～ 283	Y+411
413	1 ～ 282	Y+412
414	1 ～ 281	Y+413
415	1 ～ 280	Y+414
416	1 ～ 279	Y+415
417	1 ～ 278	Y+416
418	1 ～ 277	Y+417

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
437	1 ～ 258	Y+436
438	1 ～ 257	Y+437
439	1 ～ 256	Y+438
440	1 ～ 255	Y+439
441	1 ～ 254	Y+440
442	1 ～ 253	Y+441
443	1 ～ 252	Y+442
444	1 ～ 251	Y+443
445	1 ～ 250	Y+444
446	1 ～ 249	Y+445
447	1 ～ 248	Y+446
448	1 ～ 247	Y+447
449	1 ～ 246	Y+448
450	1 ～ 245	Y+449
451	1 ～ 244	Y+450
452	1 ～ 243	Y+451
453	1 ～ 242	Y+452
454	1 ～ 241	Y+453
455	1 ～ 240	Y+454
456	1 ～ 239	Y+455
457	1 ～ 238	Y+456
458	1 ～ 237	Y+457
459	1 ～ 236	Y+458
460	1 ～ 235	Y+459
461	1 ～ 234	Y+460
462	1 ～ 233	Y+461
463	1 ～ 232	Y+462
464	1 ～ 231	Y+463
465	1 ～ 230	Y+464
466	1 ～ 229	Y+465

10

20

30

40

【 0 2 7 6 】

【表 3 5】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
419	1 ～ 276	Y+418
420	1 ～ 275	Y+419
421	1 ～ 274	Y+420
422	1 ～ 273	Y+421
423	1 ～ 272	Y+422
424	1 ～ 271	Y+423
425	1 ～ 270	Y+424
426	1 ～ 269	Y+425
427	1 ～ 268	Y+426
428	1 ～ 267	Y+427
429	1 ～ 266	Y+428
430	1 ～ 265	Y+429
431	1 ～ 264	Y+430
432	1 ～ 263	Y+431
433	1 ～ 262	Y+432
434	1 ～ 261	Y+433
435	1 ～ 260	Y+434
436	1 ～ 259	Y+435

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
467	1 ～ 228	Y+466
468	1 ～ 227	Y+467
469	1 ～ 226	Y+468
470	1 ～ 225	Y+469
471	1 ～ 224	Y+470
472	1 ～ 223	Y+471
473	1 ～ 222	Y+472
474	1 ～ 221	Y+473
475	1 ～ 220	Y+474
476	1 ～ 219	Y+475
477	1 ～ 218	Y+476
478	1 ～ 217	Y+477
479	1 ～ 216	Y+478
480	1 ～ 215	Y+479
481	1 ～ 214	Y+480
482	1 ～ 213	Y+481
483	1 ～ 212	Y+482
484	1 ～ 211	Y+483

10

20

【 0 2 7 7 】

【表 3 6】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
485	1 ～ 210	Y+484
486	1 ～ 209	Y+485
487	1 ～ 208	Y+486
488	1 ～ 207	Y+487
489	1 ～ 206	Y+488
490	1 ～ 205	Y+489
491	1 ～ 204	Y+490
492	1 ～ 203	Y+491
493	1 ～ 202	Y+492
494	1 ～ 201	Y+493
495	1 ～ 200	Y+494
496	1 ～ 199	Y+495
497	1 ～ 198	Y+496
498	1 ～ 197	Y+497
499	1 ～ 196	Y+498
500	1 ～ 195	Y+499
501	1 ～ 194	Y+500
502	1 ～ 193	Y+501
503	1 ～ 192	Y+502
504	1 ～ 191	Y+503
505	1 ～ 190	Y+504
506	1 ～ 189	Y+505
507	1 ～ 188	Y+506
508	1 ～ 187	Y+507
509	1 ～ 186	Y+508

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
533	1 ～ 162	Y+532
534	1 ～ 161	Y+533
535	1 ～ 160	Y+534
536	1 ～ 159	Y+535
537	1 ～ 158	Y+536
538	1 ～ 157	Y+537
539	1 ～ 156	Y+538
540	1 ～ 155	Y+539
541	1 ～ 154	Y+540
542	1 ～ 153	Y+541
543	1 ～ 152	Y+542
544	1 ～ 151	Y+543
545	1 ～ 150	Y+544
546	1 ～ 149	Y+545
547	1 ～ 148	Y+546
548	1 ～ 147	Y+547
549	1 ～ 146	Y+548
550	1 ～ 145	Y+549
551	1 ～ 144	Y+550
552	1 ～ 143	Y+551
553	1 ～ 142	Y+552
554	1 ～ 141	Y+553
555	1 ～ 140	Y+554
556	1 ～ 139	Y+555
557	1 ～ 138	Y+556

10

20

30

【 0 2 7 8 】

【表 3 7】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
510	1 ～ 185	Y+509
511	1 ～ 184	Y+510
512	1 ～ 183	Y+511
513	1 ～ 182	Y+512
514	1 ～ 181	Y+513
515	1 ～ 180	Y+514
516	1 ～ 179	Y+515
517	1 ～ 178	Y+516
518	1 ～ 177	Y+517
519	1 ～ 176	Y+518
520	1 ～ 175	Y+519
521	1 ～ 174	Y+520
522	1 ～ 173	Y+521
523	1 ～ 172	Y+522
524	1 ～ 171	Y+523
525	1 ～ 170	Y+524
526	1 ～ 169	Y+525
527	1 ～ 168	Y+526
528	1 ～ 167	Y+527
529	1 ～ 166	Y+528
530	1 ～ 165	Y+529
531	1 ～ 164	Y+530
532	1 ～ 163	Y+531

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
558	1 ～ 137	Y+557
559	1 ～ 136	Y+558
560	1 ～ 135	Y+559
561	1 ～ 134	Y+560
562	1 ～ 133	Y+561
563	1 ～ 132	Y+562
564	1 ～ 131	Y+563
565	1 ～ 130	Y+564
566	1 ～ 129	Y+565
567	1 ～ 128	Y+566
568	1 ～ 127	Y+567
569	1 ～ 126	Y+568
570	1 ～ 125	Y+569
571	1 ～ 124	Y+570
572	1 ～ 123	Y+571
573	1 ～ 122	Y+572
574	1 ～ 121	Y+573
575	1 ～ 120	Y+574
576	1 ～ 119	Y+575
577	1 ～ 118	Y+576
578	1 ～ 117	Y+577
579	1 ～ 116	Y+578
580	1 ～ 115	Y+579

10

20

30

【 0 2 7 9 】

【表 3 8】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
581	1 ～ 114	Y+580
582	1 ～ 113	Y+581
583	1 ～ 112	Y+582
584	1 ～ 111	Y+583
585	1 ～ 110	Y+584
586	1 ～ 109	Y+585
587	1 ～ 108	Y+586
588	1 ～ 107	Y+587
589	1 ～ 106	Y+588
590	1 ～ 105	Y+589
591	1 ～ 104	Y+590
592	1 ～ 103	Y+591
593	1 ～ 102	Y+592
594	1 ～ 101	Y+593
595	1 ～ 100	Y+594
596	1 ～ 99	Y+595
597	1 ～ 98	Y+596
598	1 ～ 97	Y+597
599	1 ～ 96	Y+598
600	1 ～ 95	Y+599
601	1 ～ 94	Y+600
602	1 ～ 93	Y+601
603	1 ～ 92	Y+602
604	1 ～ 91	Y+603

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
629	1 ～ 66	Y+628
630	1 ～ 65	Y+629
631	1 ～ 64	Y+630
632	1 ～ 63	Y+631
633	1 ～ 62	Y+632
634	1 ～ 61	Y+633
635	1 ～ 60	Y+634
636	1 ～ 59	Y+635
637	1 ～ 58	Y+636
638	1 ～ 57	Y+637
639	1 ～ 56	Y+638
640	1 ～ 55	Y+639
641	1 ～ 54	Y+640
642	1 ～ 53	Y+641
643	1 ～ 52	Y+642
644	1 ～ 51	Y+643
645	1 ～ 50	Y+644
646	1 ～ 49	Y+645
647	1 ～ 48	Y+646
648	1 ～ 47	Y+647
649	1 ～ 46	Y+648
650	1 ～ 45	Y+649
651	1 ～ 44	Y+650
652	1 ～ 43	Y+651

10

20

30

【 0 2 8 0 】

【表 3 9】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
605	1 ～ 90	Y+604
606	1 ～ 89	Y+605
607	1 ～ 88	Y+606
608	1 ～ 87	Y+607
609	1 ～ 86	Y+608
610	1 ～ 85	Y+609
611	1 ～ 84	Y+610
612	1 ～ 83	Y+611
613	1 ～ 82	Y+612
614	1 ～ 81	Y+613
615	1 ～ 80	Y+614
616	1 ～ 79	Y+615
617	1 ～ 78	Y+616
618	1 ～ 77	Y+617
619	1 ～ 76	Y+618
620	1 ～ 75	Y+619
621	1 ～ 74	Y+620
622	1 ～ 73	Y+621
623	1 ～ 72	Y+622
624	1 ～ 71	Y+623
625	1 ～ 70	Y+624
626	1 ～ 69	Y+625
627	1 ～ 68	Y+626
628	1 ～ 67	Y+627

フラグメント 長 (アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
653	1 ～ 42	Y+652
654	1 ～ 41	Y+653
655	1 ～ 40	Y+654
656	1 ～ 39	Y+655
657	1 ～ 38	Y+656
658	1 ～ 37	Y+657
659	1 ～ 36	Y+658
660	1 ～ 35	Y+659
661	1 ～ 34	Y+660
662	1 ～ 33	Y+661
663	1 ～ 32	Y+662
664	1 ～ 31	Y+663
665	1 ～ 30	Y+664
666	1 ～ 29	Y+665
667	1 ～ 28	Y+666
668	1 ～ 27	Y+667
669	1 ～ 26	Y+668
670	1 ～ 25	Y+669
671	1 ～ 24	Y+670
672	1 ～ 23	Y+671
673	1 ～ 22	Y+672
674	1 ～ 21	Y+673
675	1 ～ 20	Y+674
676	1 ～ 19	Y+675

10

20

30

【 0 2 8 1 】

【表 4 0】

表10. 配列番号9および11のフラグメント

フラグメント 長（アミノ酸）	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
677	1 ～ 18	Y+676
678	1 ～ 17	Y+677
679	1 ～ 16	Y+678
680	1 ～ 15	Y+679
681	1 ～ 14	Y+680
682	1 ～ 13	Y+681
683	1 ～ 12	Y+682
684	1 ～ 11	Y+683
685	1 ～ 10	Y+684
686	1 ～ 9	Y+685
687	1 ～ 8	Y+686
688	1 ～ 7	Y+687
689	1 ～ 6	Y+688
690	1 ～ 5	Y+689
691	1 ～ 4	Y+690
692	1 ～ 3	Y+691
693	1 ～ 2	Y+692

10

20

【 0 2 8 2 】

【表 4 1】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
5	1 ～ 598	Y+4
6	1 ～ 597	Y+5
7	1 ～ 596	Y+6
8	1 ～ 595	Y+7
9	1 ～ 594	Y+8
10	1 ～ 593	Y+9
11	1 ～ 592	Y+10
12	1 ～ 591	Y+11
13	1 ～ 590	Y+12
14	1 ～ 589	Y+13
15	1 ～ 588	Y+14
16	1 ～ 587	Y+15
17	1 ～ 586	Y+16
18	1 ～ 585	Y+17
19	1 ～ 584	Y+18
20	1 ～ 583	Y+19
21	1 ～ 582	Y+20
22	1 ～ 581	Y+21
23	1 ～ 580	Y+22
24	1 ～ 579	Y+23
25	1 ～ 578	Y+24
26	1 ～ 577	Y+25
27	1 ～ 576	Y+26
28	1 ～ 575	Y+27
29	1 ～ 574	Y+28

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
53	1 ～ 550	Y+52
54	1 ～ 549	Y+53
55	1 ～ 548	Y+54
56	1 ～ 547	Y+55
57	1 ～ 546	Y+56
58	1 ～ 545	Y+57
59	1 ～ 544	Y+58
60	1 ～ 543	Y+59
61	1 ～ 542	Y+60
62	1 ～ 541	Y+61
63	1 ～ 540	Y+62
64	1 ～ 539	Y+63
65	1 ～ 538	Y+64
66	1 ～ 537	Y+65
67	1 ～ 536	Y+66
68	1 ～ 535	Y+67
69	1 ～ 534	Y+68
70	1 ～ 533	Y+69
71	1 ～ 532	Y+70
72	1 ～ 531	Y+71
73	1 ～ 530	Y+72
74	1 ～ 529	Y+73
75	1 ～ 528	Y+74
76	1 ～ 527	Y+75
77	1 ～ 526	Y+76

10

20

30

【 0 2 8 3 】

【表 4 2】

表 11. 配列番号 13 のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
30	1 ～ 573	Y+29
31	1 ～ 572	Y+30
32	1 ～ 571	Y+31
33	1 ～ 570	Y+32
34	1 ～ 569	Y+33
35	1 ～ 568	Y+34
36	1 ～ 567	Y+35
37	1 ～ 566	Y+36
38	1 ～ 565	Y+37
39	1 ～ 564	Y+38
40	1 ～ 563	Y+39
41	1 ～ 562	Y+40
42	1 ～ 561	Y+41
43	1 ～ 560	Y+42
44	1 ～ 559	Y+43
45	1 ～ 558	Y+44
46	1 ～ 557	Y+45
47	1 ～ 556	Y+46
48	1 ～ 555	Y+47
49	1 ～ 554	Y+48
50	1 ～ 553	Y+49
51	1 ～ 552	Y+50
52	1 ～ 551	Y+51

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
78	1 ～ 525	Y+77
79	1 ～ 524	Y+78
80	1 ～ 523	Y+79
81	1 ～ 522	Y+80
82	1 ～ 521	Y+81
83	1 ～ 520	Y+82
84	1 ～ 519	Y+83
85	1 ～ 518	Y+84
86	1 ～ 517	Y+85
87	1 ～ 516	Y+86
88	1 ～ 515	Y+87
89	1 ～ 514	Y+88
90	1 ～ 513	Y+89
91	1 ～ 512	Y+90
92	1 ～ 511	Y+91
93	1 ～ 510	Y+92
94	1 ～ 509	Y+93
95	1 ～ 508	Y+94
96	1 ～ 507	Y+95
97	1 ～ 506	Y+96
98	1 ～ 505	Y+97
99	1 ～ 504	Y+98
100	1 ～ 503	Y+99

10

20

30

【 0 2 8 4 】

【表 4 3】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
101	1 ～ 502	Y+100
102	1 ～ 501	Y+101
103	1 ～ 500	Y+102
104	1 ～ 499	Y+103
105	1 ～ 498	Y+104
106	1 ～ 497	Y+105
107	1 ～ 496	Y+106
108	1 ～ 495	Y+107
109	1 ～ 494	Y+108
110	1 ～ 493	Y+109
111	1 ～ 492	Y+110
112	1 ～ 491	Y+111
113	1 ～ 490	Y+112
114	1 ～ 489	Y+113
115	1 ～ 488	Y+114
116	1 ～ 487	Y+115
117	1 ～ 486	Y+116
118	1 ～ 485	Y+117
119	1 ～ 484	Y+118
120	1 ～ 483	Y+119
121	1 ～ 482	Y+120
122	1 ～ 481	Y+121
123	1 ～ 480	Y+122
124	1 ～ 479	Y+123
125	1 ～ 478	Y+124

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
149	1 ～ 454	Y+148
150	1 ～ 453	Y+149
151	1 ～ 452	Y+150
152	1 ～ 451	Y+151
153	1 ～ 450	Y+152
154	1 ～ 449	Y+153
155	1 ～ 448	Y+154
156	1 ～ 447	Y+155
157	1 ～ 446	Y+156
158	1 ～ 445	Y+157
159	1 ～ 444	Y+158
160	1 ～ 443	Y+159
161	1 ～ 442	Y+160
162	1 ～ 441	Y+161
163	1 ～ 440	Y+162
164	1 ～ 439	Y+163
165	1 ～ 438	Y+164
166	1 ～ 437	Y+165
167	1 ～ 436	Y+166
168	1 ～ 435	Y+167
169	1 ～ 434	Y+168
170	1 ～ 433	Y+169
171	1 ～ 432	Y+170
172	1 ～ 431	Y+171
173	1 ～ 430	Y+172

10

20

30

【 0 2 8 5 】

【表 4 4】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
126	1 ～ 477	Y+125
127	1 ～ 476	Y+126
128	1 ～ 475	Y+127
129	1 ～ 474	Y+128
130	1 ～ 473	Y+129
131	1 ～ 472	Y+130
132	1 ～ 471	Y+131
133	1 ～ 470	Y+132
134	1 ～ 469	Y+133
135	1 ～ 468	Y+134
136	1 ～ 467	Y+135
137	1 ～ 466	Y+136
138	1 ～ 465	Y+137
139	1 ～ 464	Y+138
140	1 ～ 463	Y+139
141	1 ～ 462	Y+140
142	1 ～ 461	Y+141
143	1 ～ 460	Y+142
144	1 ～ 459	Y+143
145	1 ～ 458	Y+144
146	1 ～ 457	Y+145
147	1 ～ 456	Y+146
148	1 ～ 455	Y+147

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
174	1 ～ 429	Y+173
175	1 ～ 428	Y+174
176	1 ～ 427	Y+175
177	1 ～ 426	Y+176
178	1 ～ 425	Y+177
179	1 ～ 424	Y+178
180	1 ～ 423	Y+179
181	1 ～ 422	Y+180
182	1 ～ 421	Y+181
183	1 ～ 420	Y+182
184	1 ～ 419	Y+183
185	1 ～ 418	Y+184
186	1 ～ 417	Y+185
187	1 ～ 416	Y+186
188	1 ～ 415	Y+187
189	1 ～ 414	Y+188
190	1 ～ 413	Y+189
191	1 ～ 412	Y+190
192	1 ～ 411	Y+191
193	1 ～ 410	Y+192
194	1 ～ 409	Y+193
195	1 ～ 408	Y+194
196	1 ～ 407	Y+195

10

20

30

【 0 2 8 6 】

【表 4 5】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
197	1 ～ 406	Y+196
198	1 ～ 405	Y+197
199	1 ～ 404	Y+198
200	1 ～ 403	Y+199
201	1 ～ 402	Y+200
202	1 ～ 401	Y+201
203	1 ～ 400	Y+202
204	1 ～ 399	Y+203
205	1 ～ 398	Y+204
206	1 ～ 397	Y+205
207	1 ～ 396	Y+206
208	1 ～ 395	Y+207
209	1 ～ 394	Y+208
210	1 ～ 393	Y+209
211	1 ～ 392	Y+210
212	1 ～ 391	Y+211
213	1 ～ 390	Y+212
214	1 ～ 389	Y+213
215	1 ～ 388	Y+214
216	1 ～ 387	Y+215
217	1 ～ 386	Y+216
218	1 ～ 385	Y+217
219	1 ～ 384	Y+218
220	1 ～ 383	Y+219
221	1 ～ 382	Y+220
222	1 ～ 381	Y+221
223	1 ～ 380	Y+222
224	1 ～ 379	Y+223

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
245	1 ～ 358	Y+244
246	1 ～ 357	Y+245
247	1 ～ 356	Y+246
248	1 ～ 355	Y+247
249	1 ～ 354	Y+248
250	1 ～ 353	Y+249
251	1 ～ 352	Y+250
252	1 ～ 351	Y+251
253	1 ～ 350	Y+252
254	1 ～ 349	Y+253
255	1 ～ 348	Y+254
256	1 ～ 347	Y+255
257	1 ～ 346	Y+256
258	1 ～ 345	Y+257
259	1 ～ 344	Y+258
260	1 ～ 343	Y+259
261	1 ～ 342	Y+260
262	1 ～ 341	Y+261
263	1 ～ 340	Y+262
264	1 ～ 339	Y+263
265	1 ～ 338	Y+264
266	1 ～ 337	Y+265
267	1 ～ 336	Y+266
268	1 ～ 335	Y+267
269	1 ～ 334	Y+268
270	1 ～ 333	Y+269
271	1 ～ 332	Y+270
272	1 ～ 331	Y+271

10

20

30

【 0 2 8 7 】

【表 4 6】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
225	1 ～ 378	Y+224
226	1 ～ 377	Y+225
227	1 ～ 376	Y+226
228	1 ～ 375	Y+227
229	1 ～ 374	Y+228
230	1 ～ 373	Y+229
231	1 ～ 372	Y+230
232	1 ～ 371	Y+231
233	1 ～ 370	Y+232
234	1 ～ 369	Y+233
235	1 ～ 368	Y+234
236	1 ～ 367	Y+235
237	1 ～ 366	Y+236
238	1 ～ 365	Y+237
239	1 ～ 364	Y+238
240	1 ～ 363	Y+239
241	1 ～ 362	Y+240
242	1 ～ 361	Y+241
243	1 ～ 360	Y+242
244	1 ～ 359	Y+243

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
273	1 ～ 330	Y+272
274	1 ～ 329	Y+273
275	1 ～ 328	Y+274
276	1 ～ 327	Y+275
277	1 ～ 326	Y+276
278	1 ～ 325	Y+277
279	1 ～ 324	Y+278
280	1 ～ 323	Y+279
281	1 ～ 322	Y+280
282	1 ～ 321	Y+281
283	1 ～ 320	Y+282
284	1 ～ 319	Y+283
285	1 ～ 318	Y+284
286	1 ～ 317	Y+285
287	1 ～ 316	Y+286
288	1 ～ 315	Y+287
289	1 ～ 314	Y+288
290	1 ～ 313	Y+289
291	1 ～ 312	Y+290
292	1 ～ 311	Y+291

10

20

【 0 2 8 8 】

30

【表 4 7】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
293	1 ～ 310	Y+292
294	1 ～ 309	Y+293
295	1 ～ 308	Y+294
296	1 ～ 307	Y+295
297	1 ～ 306	Y+296
298	1 ～ 305	Y+297
299	1 ～ 304	Y+298
300	1 ～ 303	Y+299
301	1 ～ 302	Y+300
302	1 ～ 301	Y+301
303	1 ～ 300	Y+302
304	1 ～ 299	Y+303
305	1 ～ 298	Y+304
306	1 ～ 297	Y+305
307	1 ～ 296	Y+306
308	1 ～ 295	Y+307
309	1 ～ 294	Y+308
310	1 ～ 293	Y+309
311	1 ～ 292	Y+310
312	1 ～ 291	Y+311
313	1 ～ 290	Y+312
314	1 ～ 289	Y+313
315	1 ～ 288	Y+314

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
341	1 ～ 262	Y+340
342	1 ～ 261	Y+341
343	1 ～ 260	Y+342
344	1 ～ 259	Y+343
345	1 ～ 258	Y+344
346	1 ～ 257	Y+345
347	1 ～ 256	Y+346
348	1 ～ 255	Y+347
349	1 ～ 254	Y+348
350	1 ～ 253	Y+349
351	1 ～ 252	Y+350
352	1 ～ 251	Y+351
353	1 ～ 250	Y+352
354	1 ～ 249	Y+353
355	1 ～ 248	Y+354
356	1 ～ 247	Y+355
357	1 ～ 246	Y+356
358	1 ～ 245	Y+357
359	1 ～ 244	Y+358
360	1 ～ 243	Y+359
361	1 ～ 242	Y+360
362	1 ～ 241	Y+361
363	1 ～ 240	Y+362

10

20

30

【 0 2 8 9 】

【表 4 8】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
316	1 ～ 287	Y+315
317	1 ～ 286	Y+316
318	1 ～ 285	Y+317
319	1 ～ 284	Y+318
320	1 ～ 283	Y+319
321	1 ～ 282	Y+320
322	1 ～ 281	Y+321
323	1 ～ 280	Y+322
324	1 ～ 279	Y+323
325	1 ～ 278	Y+324
326	1 ～ 277	Y+325
327	1 ～ 276	Y+326
328	1 ～ 275	Y+327
329	1 ～ 274	Y+328
330	1 ～ 273	Y+329
331	1 ～ 272	Y+330
332	1 ～ 271	Y+331
333	1 ～ 270	Y+332
334	1 ～ 269	Y+333
335	1 ～ 268	Y+334
336	1 ～ 267	Y+335
337	1 ～ 266	Y+336
338	1 ～ 265	Y+337
339	1 ～ 264	Y+338
340	1 ～ 263	Y+339

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
364	1 ～ 239	Y+363
365	1 ～ 238	Y+364
366	1 ～ 237	Y+365
367	1 ～ 236	Y+366
368	1 ～ 235	Y+367
369	1 ～ 234	Y+368
370	1 ～ 233	Y+369
371	1 ～ 232	Y+370
372	1 ～ 231	Y+371
373	1 ～ 230	Y+372
374	1 ～ 229	Y+373
375	1 ～ 228	Y+374
376	1 ～ 227	Y+375
377	1 ～ 226	Y+376
378	1 ～ 225	Y+377
379	1 ～ 224	Y+378
380	1 ～ 223	Y+379
381	1 ～ 222	Y+380
382	1 ～ 221	Y+381
383	1 ～ 220	Y+382
384	1 ～ 219	Y+383
385	1 ～ 218	Y+384
386	1 ～ 217	Y+385
387	1 ～ 216	Y+386
388	1 ～ 215	Y+387

10

20

30

【 0 2 9 0 】

【表 4 9】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
389	1 ～ 214	Y+388
390	1 ～ 213	Y+389
391	1 ～ 212	Y+390
392	1 ～ 211	Y+391
393	1 ～ 210	Y+392
394	1 ～ 209	Y+393
395	1 ～ 208	Y+394
396	1 ～ 207	Y+395
397	1 ～ 206	Y+396
398	1 ～ 205	Y+397
399	1 ～ 204	Y+398
400	1 ～ 203	Y+399
401	1 ～ 202	Y+400
402	1 ～ 201	Y+401
403	1 ～ 200	Y+402
404	1 ～ 199	Y+403
405	1 ～ 198	Y+404
406	1 ～ 197	Y+405
407	1 ～ 196	Y+406
408	1 ～ 195	Y+407
409	1 ～ 194	Y+408
410	1 ～ 193	Y+409
411	1 ～ 192	Y+410
412	1 ～ 191	Y+411
413	1 ～ 190	Y+412
414	1 ～ 189	Y+413
415	1 ～ 188	Y+414

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
437	1 ～ 166	Y+436
438	1 ～ 165	Y+437
439	1 ～ 164	Y+438
440	1 ～ 163	Y+439
441	1 ～ 162	Y+440
442	1 ～ 161	Y+441
443	1 ～ 160	Y+442
444	1 ～ 159	Y+443
445	1 ～ 158	Y+444
446	1 ～ 157	Y+445
447	1 ～ 156	Y+446
448	1 ～ 155	Y+447
449	1 ～ 154	Y+448
450	1 ～ 153	Y+449
451	1 ～ 152	Y+450
452	1 ～ 151	Y+451
453	1 ～ 150	Y+452
454	1 ～ 149	Y+453
455	1 ～ 148	Y+454
456	1 ～ 147	Y+455
457	1 ～ 146	Y+456
458	1 ～ 145	Y+457
459	1 ～ 144	Y+458
460	1 ～ 143	Y+459
461	1 ～ 142	Y+460
462	1 ～ 141	Y+461
463	1 ～ 140	Y+462

10

20

30

【 0 2 9 1 】

【表 5 0】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
416	1 ～ 187	Y+415
417	1 ～ 186	Y+416
418	1 ～ 185	Y+417
419	1 ～ 184	Y+418
420	1 ～ 183	Y+419
421	1 ～ 182	Y+420
422	1 ～ 181	Y+421
423	1 ～ 180	Y+422
424	1 ～ 179	Y+423
425	1 ～ 178	Y+424
426	1 ～ 177	Y+425
427	1 ～ 176	Y+426
428	1 ～ 175	Y+427
429	1 ～ 174	Y+428
430	1 ～ 173	Y+429
431	1 ～ 172	Y+430
432	1 ～ 171	Y+431
433	1 ～ 170	Y+432
434	1 ～ 169	Y+433
435	1 ～ 168	Y+434
436	1 ～ 167	Y+435

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
464	1 ～ 139	Y+463
465	1 ～ 138	Y+464
466	1 ～ 137	Y+465
467	1 ～ 136	Y+466
468	1 ～ 135	Y+467
469	1 ～ 134	Y+468
470	1 ～ 133	Y+469
471	1 ～ 132	Y+470
472	1 ～ 131	Y+471
473	1 ～ 130	Y+472
474	1 ～ 129	Y+473
475	1 ～ 128	Y+474
476	1 ～ 127	Y+475
477	1 ～ 126	Y+476
478	1 ～ 125	Y+477
479	1 ～ 124	Y+478
480	1 ～ 123	Y+479
481	1 ～ 122	Y+480
482	1 ～ 121	Y+481
483	1 ～ 120	Y+482
484	1 ～ 119	Y+483

10

20

30

【 0 2 9 2 】

【表 5 1】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
485	1 ～ 118	Y+484
486	1 ～ 117	Y+485
487	1 ～ 116	Y+486
488	1 ～ 115	Y+487
489	1 ～ 114	Y+488
490	1 ～ 113	Y+489
491	1 ～ 112	Y+490
492	1 ～ 111	Y+491
493	1 ～ 110	Y+492
494	1 ～ 109	Y+493
495	1 ～ 108	Y+494
496	1 ～ 107	Y+495
497	1 ～ 106	Y+496
498	1 ～ 105	Y+497
499	1 ～ 104	Y+498
500	1 ～ 103	Y+499
501	1 ～ 102	Y+500
502	1 ～ 101	Y+501
503	1 ～ 100	Y+502
504	1 ～ 99	Y+503
505	1 ～ 98	Y+504
506	1 ～ 97	Y+505
507	1 ～ 96	Y+506
508	1 ～ 95	Y+507
509	1 ～ 94	Y+508
510	1 ～ 93	Y+509

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
533	1 ～ 70	Y+532
534	1 ～ 69	Y+533
535	1 ～ 68	Y+534
536	1 ～ 67	Y+535
537	1 ～ 66	Y+536
538	1 ～ 65	Y+537
539	1 ～ 64	Y+538
540	1 ～ 63	Y+539
541	1 ～ 62	Y+540
542	1 ～ 61	Y+541
543	1 ～ 60	Y+542
544	1 ～ 59	Y+543
545	1 ～ 58	Y+544
546	1 ～ 57	Y+545
547	1 ～ 56	Y+546
548	1 ～ 55	Y+547
549	1 ～ 54	Y+548
550	1 ～ 53	Y+549
551	1 ～ 52	Y+550
552	1 ～ 51	Y+551
553	1 ～ 50	Y+552
554	1 ～ 49	Y+553
555	1 ～ 48	Y+554
556	1 ～ 47	Y+555
557	1 ～ 46	Y+556
558	1 ～ 45	Y+557

10

20

30

【 0 2 9 3 】

【表 5 2】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
511	1 ～ 92	Y+510
512	1 ～ 91	Y+511
513	1 ～ 90	Y+512
514	1 ～ 89	Y+513
515	1 ～ 88	Y+514
516	1 ～ 87	Y+515
517	1 ～ 86	Y+516
518	1 ～ 85	Y+517
519	1 ～ 84	Y+518
520	1 ～ 83	Y+519
521	1 ～ 82	Y+520
522	1 ～ 81	Y+521
523	1 ～ 80	Y+522
524	1 ～ 79	Y+523
525	1 ～ 78	Y+524
526	1 ～ 77	Y+525
527	1 ～ 76	Y+526
528	1 ～ 75	Y+527
529	1 ～ 74	Y+528
530	1 ～ 73	Y+529
531	1 ～ 72	Y+530
532	1 ～ 71	Y+531

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
559	1 ～ 44	Y+558
560	1 ～ 43	Y+559
561	1 ～ 42	Y+560
562	1 ～ 41	Y+561
563	1 ～ 40	Y+562
564	1 ～ 39	Y+563
565	1 ～ 38	Y+564
566	1 ～ 37	Y+565
567	1 ～ 36	Y+566
568	1 ～ 35	Y+567
569	1 ～ 34	Y+568
570	1 ～ 33	Y+569
571	1 ～ 32	Y+570
572	1 ～ 31	Y+571
573	1 ～ 30	Y+572
574	1 ～ 29	Y+573
575	1 ～ 28	Y+574
576	1 ～ 27	Y+575
577	1 ～ 26	Y+576
578	1 ～ 25	Y+577
579	1 ～ 24	Y+578
580	1 ～ 23	Y+579

10

20

30

【 0 2 9 4 】

【表 5 3】

表11. 配列番号13のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
581	1 ～ 22	Y+580
582	1 ～ 21	Y+581
583	1 ～ 20	Y+582
584	1 ～ 19	Y+583
585	1 ～ 18	Y+584
586	1 ～ 17	Y+585
587	1 ～ 16	Y+586
588	1 ～ 15	Y+587
589	1 ～ 14	Y+588
590	1 ～ 13	Y+589
591	1 ～ 12	Y+590
592	1 ～ 11	Y+591
593	1 ～ 10	Y+592
594	1 ～ 9	Y+593
595	1 ～ 8	Y+594
596	1 ～ 7	Y+595
597	1 ～ 6	Y+596
598	1 ～ 5	Y+597
599	1 ～ 4	Y+598
600	1 ～ 3	Y+599
601	1 ～ 2	Y+600

10

20

30

【 0 2 9 5 】

【表 5 4】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
5	1 ～ 597	Y+4
6	1 ～ 596	Y+5
7	1 ～ 595	Y+6
8	1 ～ 594	Y+7
9	1 ～ 593	Y+8
10	1 ～ 592	Y+9
11	1 ～ 591	Y+10
12	1 ～ 590	Y+11
13	1 ～ 589	Y+12
14	1 ～ 588	Y+13
15	1 ～ 587	Y+14
16	1 ～ 586	Y+15
17	1 ～ 585	Y+16
18	1 ～ 584	Y+17
19	1 ～ 583	Y+18
20	1 ～ 582	Y+19
21	1 ～ 581	Y+20
22	1 ～ 580	Y+21
23	1 ～ 579	Y+22
24	1 ～ 578	Y+23
25	1 ～ 577	Y+24
26	1 ～ 576	Y+25
27	1 ～ 575	Y+26
28	1 ～ 574	Y+27
29	1 ～ 573	Y+28

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
53	1 ～ 549	Y+52
54	1 ～ 548	Y+53
55	1 ～ 547	Y+54
56	1 ～ 546	Y+55
57	1 ～ 545	Y+56
58	1 ～ 544	Y+57
59	1 ～ 543	Y+58
60	1 ～ 542	Y+59
61	1 ～ 541	Y+60
62	1 ～ 540	Y+61
63	1 ～ 539	Y+62
64	1 ～ 538	Y+63
65	1 ～ 537	Y+64
66	1 ～ 536	Y+65
67	1 ～ 535	Y+66
68	1 ～ 534	Y+67
69	1 ～ 533	Y+68
70	1 ～ 532	Y+69
71	1 ～ 531	Y+70
72	1 ～ 530	Y+71
73	1 ～ 529	Y+72
74	1 ～ 528	Y+73
75	1 ～ 527	Y+74
76	1 ～ 526	Y+75
77	1 ～ 525	Y+76

10

20

30

【 0 2 9 6 】

【表 5 5】

表 12. 配列番号 15 のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
30	1 ～ 572	Y+29
31	1 ～ 571	Y+30
32	1 ～ 570	Y+31
33	1 ～ 569	Y+32
34	1 ～ 568	Y+33
35	1 ～ 567	Y+34
36	1 ～ 566	Y+35
37	1 ～ 565	Y+36
38	1 ～ 564	Y+37
39	1 ～ 563	Y+38
40	1 ～ 562	Y+39
41	1 ～ 561	Y+40
42	1 ～ 560	Y+41
43	1 ～ 559	Y+42
44	1 ～ 558	Y+43
45	1 ～ 557	Y+44
46	1 ～ 556	Y+45
47	1 ～ 555	Y+46
48	1 ～ 554	Y+47
49	1 ～ 553	Y+48
50	1 ～ 552	Y+49
51	1 ～ 551	Y+50
52	1 ～ 550	Y+51

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
78	1 ～ 524	Y+77
79	1 ～ 523	Y+78
80	1 ～ 522	Y+79
81	1 ～ 521	Y+80
82	1 ～ 520	Y+81
83	1 ～ 519	Y+82
84	1 ～ 518	Y+83
85	1 ～ 517	Y+84
86	1 ～ 516	Y+85
87	1 ～ 515	Y+86
88	1 ～ 514	Y+87
89	1 ～ 513	Y+88
90	1 ～ 512	Y+89
91	1 ～ 511	Y+90
92	1 ～ 510	Y+91
93	1 ～ 509	Y+92
94	1 ～ 508	Y+93
95	1 ～ 507	Y+94
96	1 ～ 506	Y+95
97	1 ～ 505	Y+96
98	1 ～ 504	Y+97
99	1 ～ 503	Y+98
100	1 ～ 502	Y+99

10

20

30

【 0 2 9 7 】

【表 5 6】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
101	1 ～ 501	Y+100
102	1 ～ 500	Y+101
103	1 ～ 499	Y+102
104	1 ～ 498	Y+103
105	1 ～ 497	Y+104
106	1 ～ 496	Y+105
107	1 ～ 495	Y+106
108	1 ～ 494	Y+107
109	1 ～ 493	Y+108
110	1 ～ 492	Y+109
111	1 ～ 491	Y+110
112	1 ～ 490	Y+111
113	1 ～ 489	Y+112
114	1 ～ 488	Y+113
115	1 ～ 487	Y+114
116	1 ～ 486	Y+115
117	1 ～ 485	Y+116
118	1 ～ 484	Y+117
119	1 ～ 483	Y+118
120	1 ～ 482	Y+119
121	1 ～ 481	Y+120
122	1 ～ 480	Y+121
123	1 ～ 479	Y+122
124	1 ～ 478	Y+123
125	1 ～ 477	Y+124

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
149	1 ～ 453	Y+148
150	1 ～ 452	Y+149
151	1 ～ 451	Y+150
152	1 ～ 450	Y+151
153	1 ～ 449	Y+152
154	1 ～ 448	Y+153
155	1 ～ 447	Y+154
156	1 ～ 446	Y+155
157	1 ～ 445	Y+156
158	1 ～ 444	Y+157
159	1 ～ 443	Y+158
160	1 ～ 442	Y+159
161	1 ～ 441	Y+160
162	1 ～ 440	Y+161
163	1 ～ 439	Y+162
164	1 ～ 438	Y+163
165	1 ～ 437	Y+164
166	1 ～ 436	Y+165
167	1 ～ 435	Y+166
168	1 ～ 434	Y+167
169	1 ～ 433	Y+168
170	1 ～ 432	Y+169
171	1 ～ 431	Y+170
172	1 ～ 430	Y+171
173	1 ～ 429	Y+172

10

20

30

【 0 2 9 8 】

【表 5 7】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
126	1 ～ 476	Y+125
127	1 ～ 475	Y+126
128	1 ～ 474	Y+127
129	1 ～ 473	Y+128
130	1 ～ 472	Y+129
131	1 ～ 471	Y+130
132	1 ～ 470	Y+131
133	1 ～ 469	Y+132
134	1 ～ 468	Y+133
135	1 ～ 467	Y+134
136	1 ～ 466	Y+135
137	1 ～ 465	Y+136
138	1 ～ 464	Y+137
139	1 ～ 463	Y+138
140	1 ～ 462	Y+139
141	1 ～ 461	Y+140
142	1 ～ 460	Y+141
143	1 ～ 459	Y+142
144	1 ～ 458	Y+143
145	1 ～ 457	Y+144
146	1 ～ 456	Y+145
147	1 ～ 455	Y+146
148	1 ～ 454	Y+147

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
174	1 ～ 428	Y+173
175	1 ～ 427	Y+174
176	1 ～ 426	Y+175
177	1 ～ 425	Y+176
178	1 ～ 424	Y+177
179	1 ～ 423	Y+178
180	1 ～ 422	Y+179
181	1 ～ 421	Y+180
182	1 ～ 420	Y+181
183	1 ～ 419	Y+182
184	1 ～ 418	Y+183
185	1 ～ 417	Y+184
186	1 ～ 416	Y+185
187	1 ～ 415	Y+186
188	1 ～ 414	Y+187
189	1 ～ 413	Y+188
190	1 ～ 412	Y+189
191	1 ～ 411	Y+190
192	1 ～ 410	Y+191
193	1 ～ 409	Y+192
194	1 ～ 408	Y+193
195	1 ～ 407	Y+194
196	1 ～ 406	Y+195

10

20

30

【 0 2 9 9 】

【表 5 8】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
197	1 ～ 405	Y+196
198	1 ～ 404	Y+197
199	1 ～ 403	Y+198
200	1 ～ 402	Y+199
201	1 ～ 401	Y+200
202	1 ～ 400	Y+201
203	1 ～ 399	Y+202
204	1 ～ 398	Y+203
205	1 ～ 397	Y+204
206	1 ～ 396	Y+205
207	1 ～ 395	Y+206
208	1 ～ 394	Y+207
209	1 ～ 393	Y+208
210	1 ～ 392	Y+209
211	1 ～ 391	Y+210
212	1 ～ 390	Y+211
213	1 ～ 389	Y+212
214	1 ～ 388	Y+213
215	1 ～ 387	Y+214
216	1 ～ 386	Y+215
217	1 ～ 385	Y+216
218	1 ～ 384	Y+217
219	1 ～ 383	Y+218
220	1 ～ 382	Y+219

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
245	1 ～ 357	Y+244
246	1 ～ 356	Y+245
247	1 ～ 355	Y+246
248	1 ～ 354	Y+247
249	1 ～ 353	Y+248
250	1 ～ 352	Y+249
251	1 ～ 351	Y+250
252	1 ～ 350	Y+251
253	1 ～ 349	Y+252
254	1 ～ 348	Y+253
255	1 ～ 347	Y+254
256	1 ～ 346	Y+255
257	1 ～ 345	Y+256
258	1 ～ 344	Y+257
259	1 ～ 343	Y+258
260	1 ～ 342	Y+259
261	1 ～ 341	Y+260
262	1 ～ 340	Y+261
263	1 ～ 339	Y+262
264	1 ～ 338	Y+263
265	1 ～ 337	Y+264
266	1 ～ 336	Y+265
267	1 ～ 335	Y+266
268	1 ～ 334	Y+267

10

20

30

【 0 3 0 0 】

【表 5 9】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
221	1 ～ 381	Y+220
222	1 ～ 380	Y+221
223	1 ～ 379	Y+222
224	1 ～ 378	Y+223
225	1 ～ 377	Y+224
226	1 ～ 376	Y+225
227	1 ～ 375	Y+226
228	1 ～ 374	Y+227
229	1 ～ 373	Y+228
230	1 ～ 372	Y+229
231	1 ～ 371	Y+230
232	1 ～ 370	Y+231
233	1 ～ 369	Y+232
234	1 ～ 368	Y+233
235	1 ～ 367	Y+234
236	1 ～ 366	Y+235
237	1 ～ 365	Y+236
238	1 ～ 364	Y+237
239	1 ～ 363	Y+238
240	1 ～ 362	Y+239
241	1 ～ 361	Y+240
242	1 ～ 360	Y+241
243	1 ～ 359	Y+242
244	1 ～ 358	Y+243

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
269	1 ～ 333	Y+268
270	1 ～ 332	Y+269
271	1 ～ 331	Y+270
272	1 ～ 330	Y+271
273	1 ～ 329	Y+272
274	1 ～ 328	Y+273
275	1 ～ 327	Y+274
276	1 ～ 326	Y+275
277	1 ～ 325	Y+276
278	1 ～ 324	Y+277
279	1 ～ 323	Y+278
280	1 ～ 322	Y+279
281	1 ～ 321	Y+280
282	1 ～ 320	Y+281
283	1 ～ 319	Y+282
284	1 ～ 318	Y+283
285	1 ～ 317	Y+284
286	1 ～ 316	Y+285
287	1 ～ 315	Y+286
288	1 ～ 314	Y+287
289	1 ～ 313	Y+288
290	1 ～ 312	Y+289
291	1 ～ 311	Y+290
292	1 ～ 310	Y+291

10

20

30

【 0 3 0 1 】

【表 6 0】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
293	1 ～ 309	Y+292
294	1 ～ 308	Y+293
295	1 ～ 307	Y+294
296	1 ～ 306	Y+295
297	1 ～ 305	Y+296
298	1 ～ 304	Y+297
299	1 ～ 303	Y+298
300	1 ～ 302	Y+299
301	1 ～ 301	Y+300
302	1 ～ 300	Y+301
303	1 ～ 299	Y+302
304	1 ～ 298	Y+303
305	1 ～ 297	Y+304
306	1 ～ 296	Y+305
307	1 ～ 295	Y+306
308	1 ～ 294	Y+307
309	1 ～ 293	Y+308
310	1 ～ 292	Y+309
311	1 ～ 291	Y+310
312	1 ～ 290	Y+311
313	1 ～ 289	Y+312
314	1 ～ 288	Y+313
315	1 ～ 287	Y+314
316	1 ～ 286	Y+315
317	1 ～ 285	Y+316
318	1 ～ 284	Y+317
319	1 ～ 283	Y+318

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
341	1 ～ 261	Y+340
342	1 ～ 260	Y+341
343	1 ～ 259	Y+342
344	1 ～ 258	Y+343
345	1 ～ 257	Y+344
346	1 ～ 256	Y+345
347	1 ～ 255	Y+346
348	1 ～ 254	Y+347
349	1 ～ 253	Y+348
350	1 ～ 252	Y+349
351	1 ～ 251	Y+350
352	1 ～ 250	Y+351
353	1 ～ 249	Y+352
354	1 ～ 248	Y+353
355	1 ～ 247	Y+354
356	1 ～ 246	Y+355
357	1 ～ 245	Y+356
358	1 ～ 244	Y+357
359	1 ～ 243	Y+358
360	1 ～ 242	Y+359
361	1 ～ 241	Y+360
362	1 ～ 240	Y+361
363	1 ～ 239	Y+362
364	1 ～ 238	Y+363
365	1 ～ 237	Y+364
366	1 ～ 236	Y+365
367	1 ～ 235	Y+366

10

20

30

【 0 3 0 2 】

【表 6 1】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
320	1 ～ 282	Y+319
321	1 ～ 281	Y+320
322	1 ～ 280	Y+321
323	1 ～ 279	Y+322
324	1 ～ 278	Y+323
325	1 ～ 277	Y+324
326	1 ～ 276	Y+325
327	1 ～ 275	Y+326
328	1 ～ 274	Y+327
329	1 ～ 273	Y+328
330	1 ～ 272	Y+329
331	1 ～ 271	Y+330
332	1 ～ 270	Y+331
333	1 ～ 269	Y+332
334	1 ～ 268	Y+333
335	1 ～ 267	Y+334
336	1 ～ 266	Y+335
337	1 ～ 265	Y+336
338	1 ～ 264	Y+337
339	1 ～ 263	Y+338
340	1 ～ 262	Y+339

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
368	1 ～ 234	Y+367
369	1 ～ 233	Y+368
370	1 ～ 232	Y+369
371	1 ～ 231	Y+370
372	1 ～ 230	Y+371
373	1 ～ 229	Y+372
374	1 ～ 228	Y+373
375	1 ～ 227	Y+374
376	1 ～ 226	Y+375
377	1 ～ 225	Y+376
378	1 ～ 224	Y+377
379	1 ～ 223	Y+378
380	1 ～ 222	Y+379
381	1 ～ 221	Y+380
382	1 ～ 220	Y+381
383	1 ～ 219	Y+382
384	1 ～ 218	Y+383
385	1 ～ 217	Y+384
386	1 ～ 216	Y+385
387	1 ～ 215	Y+386
388	1 ～ 214	Y+387

10

20

30

【 0 3 0 3 】

【表 6 2】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
389	1 ～ 213	Y+388
390	1 ～ 212	Y+389
391	1 ～ 211	Y+390
392	1 ～ 210	Y+391
393	1 ～ 209	Y+392
394	1 ～ 208	Y+393
395	1 ～ 207	Y+394
396	1 ～ 206	Y+395
397	1 ～ 205	Y+396
398	1 ～ 204	Y+397
399	1 ～ 203	Y+398
400	1 ～ 202	Y+399
401	1 ～ 201	Y+400
402	1 ～ 200	Y+401
403	1 ～ 199	Y+402
404	1 ～ 198	Y+403
405	1 ～ 197	Y+404
406	1 ～ 196	Y+405
407	1 ～ 195	Y+406
408	1 ～ 194	Y+407
409	1 ～ 193	Y+408
410	1 ～ 192	Y+409
411	1 ～ 191	Y+410
412	1 ～ 190	Y+411
413	1 ～ 189	Y+412
414	1 ～ 188	Y+413

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
437	1 ～ 165	Y+436
438	1 ～ 164	Y+437
439	1 ～ 163	Y+438
440	1 ～ 162	Y+439
441	1 ～ 161	Y+440
442	1 ～ 160	Y+441
443	1 ～ 159	Y+442
444	1 ～ 158	Y+443
445	1 ～ 157	Y+444
446	1 ～ 156	Y+445
447	1 ～ 155	Y+446
448	1 ～ 154	Y+447
449	1 ～ 153	Y+448
450	1 ～ 152	Y+449
451	1 ～ 151	Y+450
452	1 ～ 150	Y+451
453	1 ～ 149	Y+452
454	1 ～ 148	Y+453
455	1 ～ 147	Y+454
456	1 ～ 146	Y+455
457	1 ～ 145	Y+456
458	1 ～ 144	Y+457
459	1 ～ 143	Y+458
460	1 ～ 142	Y+459
461	1 ～ 141	Y+460
462	1 ～ 140	Y+461

10

20

30

【 0 3 0 4 】

【表 6 3】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
415	1 ～ 187	Y+414
416	1 ～ 186	Y+415
417	1 ～ 185	Y+416
418	1 ～ 184	Y+417
419	1 ～ 183	Y+418
420	1 ～ 182	Y+419
421	1 ～ 181	Y+420
422	1 ～ 180	Y+421
423	1 ～ 179	Y+422
424	1 ～ 178	Y+423
425	1 ～ 177	Y+424
426	1 ～ 176	Y+425
427	1 ～ 175	Y+426
428	1 ～ 174	Y+427
429	1 ～ 173	Y+428
430	1 ～ 172	Y+429
431	1 ～ 171	Y+430
432	1 ～ 170	Y+431
433	1 ～ 169	Y+432
434	1 ～ 168	Y+433
435	1 ～ 167	Y+434
436	1 ～ 166	Y+435

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
463	1 ～ 139	Y+462
464	1 ～ 138	Y+463
465	1 ～ 137	Y+464
466	1 ～ 136	Y+465
467	1 ～ 135	Y+466
468	1 ～ 134	Y+467
469	1 ～ 133	Y+468
470	1 ～ 132	Y+469
471	1 ～ 131	Y+470
472	1 ～ 130	Y+471
473	1 ～ 129	Y+472
474	1 ～ 128	Y+473
475	1 ～ 127	Y+474
476	1 ～ 126	Y+475
477	1 ～ 125	Y+476
478	1 ～ 124	Y+477
479	1 ～ 123	Y+478
480	1 ～ 122	Y+479
481	1 ～ 121	Y+480
482	1 ～ 120	Y+481
483	1 ～ 119	Y+482
484	1 ～ 118	Y+483

10

20

30

【 0 3 0 5 】

【表 6 4】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
485	1 ～ 117	Y+484
486	1 ～ 116	Y+485
487	1 ～ 115	Y+486
488	1 ～ 114	Y+487
489	1 ～ 113	Y+488
490	1 ～ 112	Y+489
491	1 ～ 111	Y+490
492	1 ～ 110	Y+491
493	1 ～ 109	Y+492
494	1 ～ 108	Y+493
495	1 ～ 107	Y+494
496	1 ～ 106	Y+495
497	1 ～ 105	Y+496
498	1 ～ 104	Y+497
499	1 ～ 103	Y+498
500	1 ～ 102	Y+499
501	1 ～ 101	Y+500
502	1 ～ 100	Y+501
503	1 ～ 99	Y+502
504	1 ～ 98	Y+503
505	1 ～ 97	Y+504
506	1 ～ 96	Y+505
507	1 ～ 95	Y+506
508	1 ～ 94	Y+507
509	1 ～ 93	Y+508
510	1 ～ 92	Y+509

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
533	1 ～ 69	Y+532
534	1 ～ 68	Y+533
535	1 ～ 67	Y+534
536	1 ～ 66	Y+535
537	1 ～ 65	Y+536
538	1 ～ 64	Y+537
539	1 ～ 63	Y+538
540	1 ～ 62	Y+539
541	1 ～ 61	Y+540
542	1 ～ 60	Y+541
543	1 ～ 59	Y+542
544	1 ～ 58	Y+543
545	1 ～ 57	Y+544
546	1 ～ 56	Y+545
547	1 ～ 55	Y+546
548	1 ～ 54	Y+547
549	1 ～ 53	Y+548
550	1 ～ 52	Y+549
551	1 ～ 51	Y+550
552	1 ～ 50	Y+551
553	1 ～ 49	Y+552
554	1 ～ 48	Y+553
555	1 ～ 47	Y+554
556	1 ～ 46	Y+555
557	1 ～ 45	Y+556
558	1 ～ 44	Y+557

10

20

30

【 0 3 0 6 】

【表 6 5】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
511	1 ～ 91	Y+510
512	1 ～ 90	Y+511
513	1 ～ 89	Y+512
514	1 ～ 88	Y+513
515	1 ～ 87	Y+514
516	1 ～ 86	Y+515
517	1 ～ 85	Y+516
518	1 ～ 84	Y+517
519	1 ～ 83	Y+518
520	1 ～ 82	Y+519
521	1 ～ 81	Y+520
522	1 ～ 80	Y+521
523	1 ～ 79	Y+522
524	1 ～ 78	Y+523
525	1 ～ 77	Y+524
526	1 ～ 76	Y+525
527	1 ～ 75	Y+526
528	1 ～ 74	Y+527
529	1 ～ 73	Y+528
530	1 ～ 72	Y+529
531	1 ～ 71	Y+530
532	1 ～ 70	Y+531

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
559	1 ～ 43	Y+558
560	1 ～ 42	Y+559
561	1 ～ 41	Y+560
562	1 ～ 40	Y+561
563	1 ～ 39	Y+562
564	1 ～ 38	Y+563
565	1 ～ 37	Y+564
566	1 ～ 36	Y+565
567	1 ～ 35	Y+566
568	1 ～ 34	Y+567
569	1 ～ 33	Y+568
570	1 ～ 32	Y+569
571	1 ～ 31	Y+570
572	1 ～ 30	Y+571
573	1 ～ 29	Y+572
574	1 ～ 28	Y+573
575	1 ～ 27	Y+574
576	1 ～ 26	Y+575
577	1 ～ 25	Y+576
578	1 ～ 24	Y+577
579	1 ～ 23	Y+578
580	1 ～ 22	Y+579

10

20

30

【 0 3 0 7 】

【表 6 6】

表12. 配列番号15のフラグメント

フラグメント 長(アミノ酸)	Yは、限界値を含む以下の間から 選択される整数 である：	Z
581	1 ～ 21	Y+580
582	1 ～ 20	Y+581
583	1 ～ 19	Y+582
584	1 ～ 18	Y+583
585	1 ～ 17	Y+584
586	1 ～ 16	Y+585
587	1 ～ 15	Y+586
588	1 ～ 14	Y+587
589	1 ～ 13	Y+588
590	1 ～ 12	Y+589
591	1 ～ 11	Y+590
592	1 ～ 10	Y+591
593	1 ～ 9	Y+592
594	1 ～ 8	Y+593
595	1 ～ 7	Y+594
596	1 ～ 6	Y+595
597	1 ～ 5	Y+596
598	1 ～ 4	Y+597
599	1 ～ 3	Y+598
600	1 ～ 2	Y+599

10

20

【 0 3 0 8 】

30

【表 6 7】

表 13. G + C 含有量 (%)

40.0	45.1
40.1	45.2
40.2	45.3
40.3	45.4
40.4	45.5
40.5	45.6
40.6	45.7
40.7	45.8
40.8	45.9
40.9	46.0
41.0	46.1
41.1	46.2
41.2	46.3
41.3	46.4
41.4	46.5
41.5	46.6
41.6	46.7
41.7	46.8
41.8	46.9
41.9	47.0
42.0	47.1
42.1	47.2
42.2	47.3
42.3	47.4
42.4	47.5
42.5	47.6
42.6	47.7
42.7	47.8
42.8	47.9
42.9	48.0

10

20

30

【 0 3 0 9 】

【表 6 8】

表 13. G + C 含有量 (%)

43.0	48.1
43.1	48.2
43.2	48.3
43.3	48.4
43.4	48.5
43.5	48.6
43.6	48.7
43.7	48.8
43.8	48.9
43.9	49.0
44.0	49.1
44.1	49.2
44.2	49.3
44.3	49.4
44.4	49.5
44.5	49.6
44.6	49.7
44.7	49.8
44.8	49.9
44.9	50.0
45.0	

10

20

【 0 3 1 0 】

【表 6 9】

表14. 同一性パーセント

70.0	75.1	80.2	85.3	90.4	95.5
70.1	75.2	80.3	85.4	90.5	95.6
70.2	75.3	80.4	85.5	90.6	95.7
70.3	75.4	80.5	85.6	90.7	95.8
70.4	75.5	80.6	85.7	90.8	95.9
70.5	75.6	80.7	85.8	90.9	96.0
70.6	75.7	80.8	85.9	91.0	96.1
70.7	75.8	80.9	86.0	91.1	96.2
70.8	75.9	81.0	86.1	91.2	96.3
70.9	76.0	81.1	86.2	91.3	96.4
71.0	76.1	81.2	86.3	91.4	96.5
71.1	76.2	81.3	86.4	91.5	96.6
71.2	76.3	81.4	86.5	91.6	96.7
71.3	76.4	81.5	86.6	91.7	96.8
71.4	76.5	81.6	86.7	91.8	96.9
71.5	76.6	81.7	86.8	91.9	97.0
71.6	76.7	81.8	86.9	92.0	97.1
71.7	76.8	81.9	87.0	92.1	97.2
71.8	76.9	82.0	87.1	92.2	97.3
71.9	77.0	82.1	87.2	92.3	97.4
72.0	77.1	82.2	87.3	92.4	97.5
72.1	77.2	82.3	87.4	92.5	97.6
72.2	77.3	82.4	87.5	92.6	97.7
72.3	77.4	82.5	87.6	92.7	97.8
72.4	77.5	82.6	87.7	92.8	97.9
72.5	77.6	82.7	87.8	92.9	98.0

10

20

30

【 0 3 1 1 】

【表 7 0】

表14. 同一性パーセント

72.6	77.7	82.8	87.9	93.0	98.1
72.7	77.8	82.9	88.0	93.1	98.2
72.8	77.9	83.0	88.1	93.2	98.3
72.9	78.0	83.1	88.2	93.3	98.4
73.0	78.1	83.2	88.3	93.4	98.5
73.1	78.2	83.3	88.4	93.5	98.6
73.2	78.3	83.4	88.5	93.6	98.7
73.3	78.4	83.5	88.6	93.7	98.8
73.4	78.5	83.6	88.7	93.8	98.9
73.5	78.6	83.7	88.8	93.9	99.0
73.6	78.7	83.8	88.9	94.0	99.1
73.7	78.8	83.9	89.0	94.1	99.2
73.8	78.9	84.0	89.1	94.2	99.3
73.9	79.0	84.1	89.2	94.3	99.4
74.0	79.1	84.2	89.3	94.4	99.5
74.1	79.2	84.3	89.4	94.5	99.6
74.2	79.3	84.4	89.5	94.6	99.7
74.3	79.4	84.5	89.6	94.7	99.8
74.4	79.5	84.6	89.7	94.8	99.9
74.5	79.6	84.7	89.8	94.9	100.0
74.6	79.7	84.8	89.9	95.0	
74.7	79.8	84.9	90.0	95.1	
74.8	79.9	85.0	90.1	95.2	
74.9	80.0	85.1	90.2	95.3	
75.0	80.1	85.2	90.3	95.4	

10

20

30

【 0 3 1 2 】

【表 7 1】

例示的ポリ ペプチドま たはフラグ メント	表15. 配列番号9の以下の連続アミノ酸を含有する例示的フラグメン トまたはポリペプチド範囲				
1	1-22				
2	1-22	343			
3	1-22	343	344		
4	1-22	343	344	345	
5	1-22	343	344	345	691-694
6		343			
7		343	344		
8		343	344	345	
9		343	344	345	691-694
10			344		
11			344	345	691-694
12				345	
13				345	691-694
14					691-694

10

20

【 0 3 1 3 】

【表 7 2】

表 16. 配列番号 5、9、11、13 および 15 の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
5	93	668	9また は11	1	690	9また は11	3	692
5	168	668	9また は11	2	690	9また は11	4	692
9また は11	1	114	9また は11	3	690	9また は11	5	692
9また は11	2	114	9また は11	4	690	9また は11	6	692
9また は11	3	114	9また は11	5	690	9また は11	7	692
9また は11	4	114	9また は11	6	690	9また は11	8	692
9また は11	5	114	9また は11	7	690	9また は11	9	692
9また は11	6	114	9また は11	8	690	9また は11	10	692
9また は11	7	114	9また は11	9	690	9また は11	11	692
9また は11	8	114	9また は11	10	690	9また は11	12	692
9また は11	9	114	9また は11	11	690	9また は11	13	692
9また は11	10	114	9また は11	12	690	9また は11	14	692

10

20

30

【 0 3 1 4 】

【表 7 3】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	11	114	9また は11	13	690	9また は11	15	692
9また は11	12	114	9また は11	14	690	9また は11	16	692
9また は11	13	114	9また は11	15	690	9また は11	17	692
9また は11	14	114	9また は11	16	690	9また は11	18	692
9また は11	15	114	9また は11	17	690	9また は11	19	692
9また は11	16	114	9また は11	18	690	9また は11	20	692
9また は11	17	114	9また は11	19	690	9また は11	21	692
9また は11	18	114	9また は11	20	690	9また は11	22	692
9また は11	19	114	9また は11	21	690	9また は11	1	693
9また は11	20	114	9また は11	22	690	9また は11	2	693
9また は11	21	114	9また は11	1	691	9また は11	3	693
9また は11	22	114	9また は11	2	691	9また は11	4	693

10

20

30

【 0 3 1 5 】

【表 7 4】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	1	189	9また は11	3	691	9また は11	5	693
9また は11	2	189	9また は11	4	691	9また は11	6	693
9また は11	3	189	9また は11	5	691	9また は11	7	693
9また は11	4	189	9また は11	6	691	9また は11	8	693
9また は11	5	189	9また は11	7	691	9また は11	9	693
9また は11	6	189	9また は11	8	691	9また は11	10	693
9また は11	7	189	9また は11	9	691	9また は11	11	693
9また は11	8	189	9また は11	10	691	9また は11	12	693
9また は11	9	189	9また は11	11	691	9また は11	13	693
9また は11	10	189	9また は11	12	691	9また は11	14	693

10

20

【 0 3 1 6 】

30

【表 7 5】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	11	189	9また は11	13	691	9また は11	15	693
9また は11	12	189	9また は11	14	691	9また は11	16	693
9また は11	13	189	9また は11	15	691	9また は11	17	693
9また は11	14	189	9また は11	16	691	9また は11	18	693
9また は11	15	189	9また は11	17	691	9また は11	19	693
9また は11	16	189	9また は11	18	691	9また は11	20	693
9また は11	17	189	9また は11	19	691	9また は11	21	693
9また は11	18	189	9また は11	20	691	9また は11	22	693
9また は11	19	189	9また は11	21	691	9また は11	1	694
9また は11	20	189	9また は11	22	691	9また は11	2	694
9また は11	21	189	9また は11	1	692	9また は11	3	694
9また は11	22	189	9また は11	2	692	9また は11	4	694

10

20

30

【 0 3 1 7 】

【表 7 6】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	5	694	13	14	97	13	16	599
9また は11	6	694	13	15	97	13	17	599
9また は11	7	694	13	16	97	13	18	599
9また は11	8	694	13	17	97	13	19	599
9また は11	9	694	13	18	97	13	20	599
9また は11	10	694	13	19	97	13	21	599
9また は11	11	694	13	20	97	13	22	599
9また は11	12	694	13	21	97	13	1	600
9また は11	13	694	13	22	97	13	2	600

10

20

【 0 3 1 8 】

【表 77】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	14	694	13	1	598	13	3	600
9また は11	15	694	13	2	598	13	4	600
9また は11	16	694	13	3	598	13	5	600
9また は11	17	694	13	4	598	13	6	600
9また は11	18	694	13	5	598	13	7	600
9また は11	19	694	13	6	598	13	8	600
9また は11	20	694	13	7	598	13	9	600
9また は11	21	694	13	8	598	13	10	600
9また は11	22	694	13	9	598	13	11	600
9また は11	23	690	13	10	598	13	12	600
9また は11	23	691	13	11	598	13	13	600

10

20

30

【 0 3 1 9 】

【表 7 8】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
9また は11	23	692	13	12	598	13	14	600
9また は11	23	693	13	13	598	13	15	600
9また は11	23	694	13	14	598	13	16	600
9また は11	115	690	13	15	598	13	17	600
9また は11	115	691	13	16	598	13	18	600
9また は11	115	692	13	17	598	13	19	600
9また は11	115	693	13	18	598	13	20	600
9また は11	115	694	13	19	598	13	21	600
9また は11	190	690	13	20	598	13	22	600
9また は11	190	691	13	21	598	13	1	601
9また は11	190	692	13	22	598	13	2	601
9また は11	190	693	13	1	599	13	3	601
9また は11	190	694	13	2	599	13	4	601

10

20

30

【 0 3 2 0 】

【表 7 9】

表 16. 配列番号 5、9、11、13 および 15 の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
13	1	97	13	3	599	13	5	601
13	2	97	13	4	599	13	6	601
13	3	97	13	5	599	13	7	601
13	4	97	13	6	599	13	8	601
13	5	97	13	7	599	13	9	601
13	6	97	13	8	599	13	10	601
13	7	97	13	9	599	13	11	601
13	8	97	13	10	599	13	12	601
13	9	97	13	11	599	13	13	601
13	10	97	13	12	599	13	14	601
13	11	97	13	13	599	13	15	601
13	12	97	13	14	599	13	16	601
13	13	97	13	15	599	13	17	601

10

20

【 0 3 2 1 】

【表 8 0】

表 16. 配列番号 5、9、11、13 および 15 の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
13	18	601	15	12	96	15	16	598
13	19	601	15	13	96	15	17	598
13	20	601	15	14	96	15	18	598
13	21	601	15	15	96	15	19	598
13	22	601	15	16	96	15	20	598
13	1	602	15	17	96	15	21	598
13	2	602	15	18	96	15	1	599
13	3	602	15	19	96	15	2	599
13	4	602	15	20	96	15	3	599
13	5	602	15	21	96	15	4	599
13	6	602	15	1	597	15	5	599
13	7	602	15	2	597	15	6	599
13	8	602	15	3	597	15	7	599
13	9	602	15	4	597	15	8	599
13	10	602	15	5	597	15	9	599
13	11	602	15	6	597	15	10	599
13	12	602	15	7	597	15	11	599
13	13	602	15	8	597	15	12	599
13	14	602	15	9	597	15	13	599
13	15	602	15	10	597	15	14	599
13	16	602	15	11	597	15	15	599
13	17	602	15	12	597	15	16	599
13	18	602	15	13	597	15	17	599
13	19	602	15	14	597	15	18	599
13	20	602	15	15	597	15	19	599

10

20

30

【 0 3 2 2 】

【表 8 1】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列番 号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
13	21	602	15	16	597	15	20	599
13	22	602	15	17	597	15	21	599
13	23	599	15	18	597	15	1	599
13	23	600	15	19	597	15	2	599
13	23	601	15	20	597	15	3	599
13	23	602	15	21	597	15	4	599
13	98	599	15	1	598	15	5	599
13	98	600	15	2	598	15	6	599
13	98	601	15	3	598	15	7	599
13	98	602	15	4	598	15	8	599
15	1	96	15	5	598	15	9	599
15	2	96	15	6	598	15	10	599
15	3	96	15	7	598	15	11	599
15	4	96	15	8	598	15	12	599
15	5	96	15	9	598	15	13	599
15	6	96	15	10	598	15	14	599
15	7	96	15	11	598	15	15	599
15	8	96	15	12	598	15	16	599
15	9	96	15	13	598	15	17	599
15	10	96	15	14	598	15	18	599
15	11	96	15	15	598	15	19	599

【 0 3 2 3 】

【表 8 2】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基	配列 番号	N－末 端アミ ノ酸残 基	C－末 端アミ ノ酸残 基
15	20	599	15	22	600
15	21	599	15	22	601
15	1	600	15	97	598
15	2	600	15	97	599
15	3	600	15	97	600
15	4	600	15	97	601

【 0 3 2 4 】

10

20

30

40

【表 8 3】

表16. 配列番号5、9、11、13および15の多様な例示的フラグメント

配列 番号	N-末 端アミ ノ酸残 基	C-末 端アミ ノ酸残 基
15	5	600
15	6	600
15	7	600
15	8	600
15	9	600
15	10	600
15	11	600
15	12	600
15	13	600
15	14	600
15	15	600
15	16	600
15	17	600
15	18	600
15	19	600
15	20	600
15	21	600
15	1	601
15	2	601
15	3	601
15	4	601
15	5	601
15	6	601
15	7	601
15	8	601
15	9	601
15	10	601
15	11	601
15	12	601
15	13	601
15	14	601
15	15	601
15	16	601
15	17	601
15	18	601
15	19	601
15	20	601
15	21	601
15	22	598
15	22	599

10

20

30

40

【表 8 4】

表17. 2つの用量レベルおよび2つの異なるアジュバント(Polygen (商標) およびCarbopol)を試験するウマ有効性研究のための処置グループ

グループ	処置	抗原の用量	アジュバント	ウマの数
1	植物細胞コントロール1	NA	Carbopol	3
2	植物細胞コントロール2	NA	Polygen (商標)	3
3	植物細胞産生 WNV ワクチン - 高用量 PM7	10 μ g	Carbopol	10
4	植物細胞産生 WNV ワクチン - 低用量 PM7	1 μ g	Carbopol	10
5	植物細胞産生 WNV ワクチン - 高用量 PM7	10 μ g	Polygen (商標)	10
6	植物細胞産生 WNV ワクチン - 低用量 PM7	1 μ g	Polygen (商標)	10

10

【 0 3 2 6 】

【表 8 5】

標的用量 (μg/用量)	10				
標的注入容積 (μl)	1000				
容積/必要とされるワクチン (ml)	120			抗原再水和	
# inj/ml	1			所望される再水和濃度	20
ストック溶液				凍結乾燥前のアッセイ (μg/ml)	20
バルク抗原含有量 : (μg/ml)	20	NB C2004-6A		本来の容積	70
Carbopol ストック	1000	Lot CC52NAB635		全 μg/バイアル	1400
Polygen 30% ストック	30	MVP Lot 10011		再水和容積	70
				再水和濃度	20
				再水和するための全バイアル	1.7
処方標的 :	μg/ml Vac.	μg/用量		注 :	
高抗原 (μg/ml)	10	10		抗原を再水和しない場合、抗原アッセイ細胞B9に侵入する	
低抗原 (μg/ml)	1	1			
Carbopol	4000	4000			
Polygen 30%	15	15		Polygen値は容積%であり、標的はワクチン中の15%Polygenである	
ブランク抗原					

【表 8 6】

表18. (続き)
すべての容積をmlで表す

処方	NT-1 Control + Carbopol	NT-1 Control + Polygen	高用量 + Carbopol	低用量 + Carbopol	高用量 + Polygen	低用量 + Polygen
産生するための容積	120	120	120	120	120	120
ブラシクNT-1	60.000	60.000				
抗原-高用量			60.000		60.000	
抗原-低用量				6.000		6.000
Carbopol ストック	48.000		48.000	48.000		
Polygen 30% ストック		60.000			60.000	60.000
水	12.000	0.000	12.000	66.000	0.000	54.000
合計	120.000	120.000	120.000	120.000	120.000	120.000
シリアル番号	C1670-40-A	C1670-40-B	C1670-40-C	C1670-40-D	C1670-40-E	C1670-40-F

【 0 3 2 8 】

10

20

30

40

【表 8 7】

表19. 血清学研究用ワクチンの物理特性

シリアル番号	20℃における密度	pH	重量オスモル濃度
C1670-40-A	1.0080	7.66	222
C1670-40-B	1.0040	7.79	136
C1670-40-C	1.0088	7.41	220
C1670-40-D	1.0055	7.29	157
C1670-40-E	1.0046	7.54	127
C1670-40-F	1.0010	7.28	60
PM7 NT-1コントロール	1.0040	8.47	143
バルク抗原	1.0057	7.97	141

10

【 0 3 2 9 】

【 表 8 8 】

表20. ウエストナイル (West Nile) ウイルス血清中和力価、ウマ有効性研究											
グループ番号	ウマ番号	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目	49日目		
1	132663371	2	2	3	4	2	2	2	2		
1	133134514	2	2	2	2	2	2	2	2		
1	133218532	2	2	2	3	2	2	2	2		
GMT		2.0	2.0	2.3	2.9	2.0	2.0	2.0	2.0		
STD		0.0	0.0	0.6	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
2	132761220	2	2	2	3	2	2	2	2		
2	133125371	2	2	2	2	2	2	2	2		
2	133339624	2	2	2	2	2	2	2	2		
GMT		2.0	2.0	2.0	2.3	2.0	2.0	2.0	2.0		
STD		0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0		
3	132713454	2	13	22	21	32	32	27	32		
3	132725167	2	22	46	49	89	128	49	51		
3	133132466	2	2	2	4	7	22	12	14		
3	133167527	2	3	22	22	54	41	32	38		
3	133169647	2	2	5	6	22	21	10	9		
3	133215467	2	3	6	13	21	27	16	22		
3	133216291	2	6	12	16	20	25	11	1		
3	133334763	2	163	326	282	101	157	89	57		
3	133352724	2	2	6	18	21	18	11	9		
3	133353395	2	2	6	8	20	36	24	24		
GMT		2.0	5.8	13.4	18.5	29.0	37.4	21.5	22.5		
STD		0.0	50.0	99.5	84.6	32.1	49.4	24.7	17.0		

【 0 3 3 0 】

10

20

30

40

【表 8 9】

表20. ウエストナイル (West Nile) ウイルス血清中和力価、ウマ有効性研究										
グループ番号	ウマ番号	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目	49日目	
4	132714272	2	2	6	11	45	54	41	45	
4	132724335	2	11	112	97	355	256	300	163	
4	132725096	2	2	3	8	41	45	25	24	
4	132752597	2	5	32	49	71	45	32	45	
4	132863266	3	3	9	7	22	25	24	32	
4	133125091	2	12	89	140	202	178	81	162	
4	133133383	2	2	3	6	73	108	73	56	
4	133133523	2	2	10	19	54	97	128	89	
4	133167760	2	2	7	22	45	45	36	36	
4	133213152	5	5	6	21	20	25	8	27	
GMT		2.3	3.5	12.1	21.5	61.2	65.6	46.9	53.7	
STD		1.0	3.8	39.6	45.4	105.7	75.6	86.7	53.2	
5	132668226	2	2	3	3	16	21	4	6	
5	132675665	2	2	2	3	3	4	2	2	
5	132725594	2	2	2	2	3	3	2	2	
5	132844457	2	2	3	2	2	6	2	2	
5	133126771	2	3	5	6	3	5	3	2	
5	133131652	2	2	2	2	2	2	2	2	
5	133164716	2	4	5	6	5	7	4	6	
5	133223315	2	2	2	3	2	2	2	2	
5	133333646	2	18	25	14	8	18	6	6	
5	133349224	2	5	8	9	3	6	5	2	

【0 3 3 1】

10

20

30

40

【表 9 0】

表20. ウエストナイル (West Nile) ウイルス血清中和力価、ウマ有効性研究											
グループ番号	ウマ番号	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目	49日目		
GMT		2.0	3.0	3.9	4.0	3.6	5.4	2.9	2.8		
STD		0.0	5.0	7.1	3.9	4.4	6.6	1.5	1.9		
6	132652471	2	3	6	10	9	16	10	6		
6	132722692	2	2	2	3	5	7	10	4		
6	132722714	2	2	3	4	10	20	6	3		
6	132728113	2	2	2	9	14	22	11	22		
6	132735313	2	6	7	11	10	7	6	6		
6	132822260	2	3	5	6	6	7	6	4		
6	133125493	2	3	5	6	7	9	5	4		
6	133126691	2	2	5	10	11	14	10	12		
6	133136216	2	2	2	3	4	6	3	3		
6	133162564	2	2	2	45	3	6	3	5		
GMT		2.0	2.5	3.5	7.5	7.2	10.1	6.4	5.5		
STD		0.0	1.3	1.9	12.4	3.5	6.1	3.0	5.9		

【 0 3 3 2】

10

20

30

【表 9 1】

表21. ウイルス血症データ、ウマ有効性研究

ウイルス血症 (pfu/mL血清)

	グループ1			グループ2			グループ3								
	ウマ			ウマ			ウマ								
チャレンジ 後の日 (am/pm)	132663371	133134514	133218532	132761220	133339624	133167527	133353395	133334763	133169647	133132466	133215467	133352724	132725167	132713454	133216291
0.0	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
1(am)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
1(pm)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
2(am)	50	60	5	70	100	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
2(pm)	5	140	5	5	425	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
3(am)	<5	75	<5	40	340	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
3(pm)	5	25	10	10	375	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
4(am)	<5	50	<5	25	350	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
4(pm)	<5	45	<5	<5	115	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
5(am)	<5	<5	<5	<5	5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
5(pm)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	ND	<5	<5
6(am)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
6(pm)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
7(am)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
10(am)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
14(am)	<5	-	<5	-	-	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5

【 0 3 3 3 】

10

20

30

40

【表 9 2】

表22. 温度データ、ウマ有効性研究

チャレンジ後の温度

日	グループ1 ウマ			グループ2 ウマ			グループ3 ウマ								
	132663371	133134514	133218532	132761220	133339524	133167527	133353395	133334763	133169647	133132466	133215467	133352724	132725167	132713454	133216291
-1 (am)	101.4	100.6	102.2	100.8	102.5	101.0	101.1	100.9	101.0	101.7	100.6	100.9	101.2	100.6	102.2
0 (am)	101.8	101.3	102.2	101.5	102.1	101.0	101.6	101.7	100.4	102.0	100.6	100.5	100.8	100.7	101.2
1 (am)	101.6	100.2	100.9	100.4	100.4	101.6	101.0	101.8	100.2	101.6	101.3	101.6	101.8	100.4	100.2
1 (pm)	101.6	101.2	102.6	100.6	100.9	101.4	100.2	102.6	101.2	101.0	101.2	100.2	101.6	100.8	100.2
2 (am)	100.2	100.6	100.8	99.9	101.0	100.2	100.6	102.0	100.0	100.2	100.8	101.0	100.2	100.1	100.9
2 (pm)	102.0	99.8	99.6	100.0	100.9	102.8	100.6	102.4	99.6	100.2	99.8	100.6	102.0	101.6	100.6
3 (am)	101.2	100.0	100.2	100.8	100.2	100.6	99.2	101.2	100.6	99.6	100.8	100.2	100.0	100.1	100.2
3 (pm)	100.0	100.3	99.7	99.9	100.3	102.3	101.0	101.4	99.8	100.0	100.2	99.8	100.9	100.1	100.3
4 (am)	100.2	99.8	100.2	100.3	100.7	100.1	100.7	101.2	101.0	99.6	100.6	101.2	100.2	100.5	100.6
4 (pm)	99.9	100.6	100.7	100.0	101.2	100.8	100.2	101.4	99.6	100.0	100.6	100.0	101.0	100.2	100.3
5 (am)	100.2	100.3	99.7	100.2	100.1	99.8	100.3	101.4	99.6	102.0	100.0	100.2	100.1	100.4	99.8
5 (pm)	100.5	100.7	99.8	100.6	100.2	100.1	101.0	102.2	100.8	100.3	100.2	99.9	ND	100.0	100.5
6 (am)	99.9	100.5	99.9	99.5	100.2	99.7	100.6	100.8	99.8	99.6	100.1	99.6	99.9	100.1	100.2
6 (pm)	99.6	100.1	101.4	100.9	99.8	100.6	100.2	101.8	100.0	100.6	100.6	100.0	100.2	100.2	100.7
7 (am)	100.6	100.4	100.6	100.2	99.6	100.1	98	100.4	100.2	102.2	100.0	99.4	100.6	100.7	99.9
7 (pm)	100.2	101.4	100.2	101.0	99.8	100.6	100.2	102.4	100.2	100.6	101.0	100.4	100.6	100.0	100.6
8 (am)	100.6	100.5	100.0	100.1	100.7	100.3	99.5	101.0	99.6	99.2	99.7	99.6	100.1	100.2	99.9
8 (pm)	102.2	101.0	101.2	101.0	101.4	99.6	100.0	101.0	100.2	100.6	100.6	99.8	100.2	100.0	100.6
9 (am)	103.0	101.1	101.6	100.0	101.6	100.8	99.6	100.7	100.3	100.1	99.8	100.0	100.1	100.5	100.2
9 (pm)	104.0	103.4	103.6	101.6	104.4	102.6	100.2	100.0	102.0	100.4	100.8	100.2	101.8	99.9	100.6
10 (am)	102.5	103.7	104.0	102.4	104.2	100.6	100.1	100.2	100.2	100.0	100.0	100.4	101.5	99.4	100.9
10 (pm)	102.8		103.7	104.6		100.8	101.0	102.1	100.8	102.8	100.6	100.2	100.3	100.6	101.4
11 (am)	101.4		101.6	102.0		100.7	100.2	100.1	101.0	100.9	100.0	99.8	99.6	100.2	101.6
11 (pm)	101.8		103.2	103.2		100.6	101.0	100.0	101.4	102.2	101.0	100.9	100.5	101.4	102.2
12 (am)	100.2		101.2	100.7		100.1	100.5	100.6	100.3	102.0	99.6	100.1	101.4	100.6	102.7
12 (pm)	100.0		101.0			100.2	99.8	99.9	100.2	100.6	100.0	100.5	100.2	101.7	103.0
13 (am)	100.6		100.8			100.6	100.0	100.2	100.3	100.0	100.0	100.0	99.6	101.0	101.8
13 (pm)	100.2		99.6			99.9	100.7	101.6	100.2	100.0	100.3	100.6	100.5	100.8	103.0
14 (am)	100.8		99.6			100.0	100.6	101.0	100.4	100.2	100.7	100.5	100.2	100.3	101.2

【表 9 3】

表23. 臨床評価データ、ウマ有効性研究

ウマ	グループ	-1日目	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目	11日目	12日目	13日目	14日目
132663371	1	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133134514	1	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	am - ひきつり pm - 極めて 純い、 衰弱 安楽死させた	死亡	死亡	死亡	死亡
133218532	1	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
132761220	2	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133339524	2	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133167527	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133353395	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133334763	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133169647	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133132466	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133215467	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133352724	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
132725167	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
132713454	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR
133216291	3	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR	BAR

【表 9 4】

表24. 組織学的検査所見、ウマ有効性研究			
ウマ	グループ	安楽死させた日	組織学的所見
132663371	1	15	軽度～中度の脳炎（両切片）
133134514	1	10	重度の脳炎（両切片）
133218532	1	14	中度～重度の脳炎（両切片）
132761220	2	12	重度の脳炎（両切片）
133339624	2	10	重度の脳炎（両切片）
133167527	3	17	正常
133353395	3	17	軽度の脳炎（1切片）
133334763	3	14	軽度の脳炎（1切片）
133169647	3	14	正常
133132466	3	17	軽度の脳炎（両切片）
133215467	3	14	軽度の脳炎（両切片）
133352724	3	15	軽度の脳炎（1切片）
132725167	3	14	正常
132713454	3	17	軽度の脳炎（1切片）
133216291	3	15	中度の脳炎（両切片）

10

20

30

【 0 3 3 6 】

参考文献

U.S. Patent No. 5,773,689
 U.S. Patent No. 5,773,695
 U.S. Patent No. 6,239,328
 U.S. Patent No. 5,879,903
 U.S. Patent No. 5,637,489
 U.S. Patent No. 5,276,268
 U.S. Patent No. 5,273,894
 U.S. Patent No. 5,478,925
 U.S. Patent No. 5,073,627
 U.S. Patent No. 6,121,424
 U.S. Patent No. 5,843,464
 U.S. Patent No. 5,750,352
 U.S. Patent No. 5,990,275
 U.S. Patent No. 6,342,362
 U.S. Patent No. 6,524,825
 U.S. Patent No. 6,419,931
 U.S. Patent No. 5,712,170

40

50

- U.S. Patent No. 5,183,740
 U.S. Patent No. 4,816,567
 U.S. Patent No. 5,380,831
 U.S. Patent No. 5,436,391
 U.S. Patent No. 6,319,691
 U.S. Patent No. 6,277,375
 U.S. Patent No. 5,643,570
 U.S. Patent No. 5,565,335
 U.S. Patent No. 5,561,071
 U.S. Patent No. 5,753,439 10
 U.S. Patent No. 6,214,545
 U.S. Patent No. 5,384,253
 U.S. Patent No. 5,428,147
 U.S. Patent Publication No. 2004/0268442 A1
 EP 404,097
 WO 93/11161
 WO 94/10308
 WO 94/07902
 WO 97/27207
 WO 98/49305 20
 WO 91/09957
 Altendorf et al. (1999-WWW, 2000) "Structure and Function of the Fo Complex of the ATP Synthase from Escherichia Coli" J. of Experimental Biology 203:19-28.
 Altschul, S. F. et al. (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" J. Mol. Biol. 215(3):403-410.
 Alwine, J. C. et al. (1977) "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes" Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5350-5354.
 An, G. (1985) "High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells" Plant Physiol., 79:568-570. 30
 Ausubel, M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, NY.
 Ausubel, M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.
 Baneyx, F. (1999) "Recombinant Protein Expression in Escherichia coli" Biotechnology 10:411-21.
 Barker, R. F. et al. (1983) "Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955" Plant Molecular Biology 2:335-350.
 Beasley, D. W., and A. D. Barrett (2002) "Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein" J Virol 76:13097-13100. 40
 Beltz, G. et al. (1983) "Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods" Methods of Enzymology, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285.
 Benoist, C., Chambon, P. (1981) "In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region" Nature 290:304-310.
 Berchtold, M. W. (1989) "A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction (PCR)" Nuc. Acids. Res. 17:453. 50

- Bianchi, N. et al. (1997) "Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction" *Clin. Diagn. Virol.* 8(3):199-208.
- Blitvich, B. J. et al. (2003) "Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species" *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1041-1047.
- Bray, M., B. T. Zhao, L. Markoff, K. H. Eckels, R. M. Chanock, and C. J. Lai (1989) "Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis" *J Virol* 63:2853-2856. 10
- Bressanelli, S., K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquerroy, J. Lescar, F. X. Heinz, and F. A. Rey (2004) "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation" *Embo J* 23:728-738.
- Brinster, R. L. et al. (1982) "Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs" *Nature* 296:39-42.
- Callis, J. et al. (1995) "Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia" *Genetics* 139(2):921-939.
- Cammack, N., and E. A. Gould (1986) "Topographical analysis of epitope relationships on the envelope glycoprotein of yellow fever 17D vaccine and the wild type Asibi parent virus" *Virology* 150:333-341. 20
- Capecchi, M. R. (1980) "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells" *Cell* 22(2):479-488.
- Cecilia, D., and E. A. Gould (1991) "Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants" *Virology* 181:70-77.
- Clackson, T. et al. (1991) "Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries" *Nature* 352:624-628.
- Clapp, J. F. (1993) "Somatic gene therapy into hematopoietic cells. Current status and future implications" *Clin. Perinatol.* 20(1):155-168. 30
- Curiel, D. T. et al. (1991) "Adenovirus Enhancement of Transferrin-Polylysine-Mediated Gene Delivery" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(19):8850-8854.
- Curiel, D. T. et al. (1992) "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes" *Hum. Gen. Ther.* 3(2):147-154.
- deBoer, H. A. et al. (1983) "The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(1):21-25.
- Doran, P. M. (2000) "Foreign protein production in plant tissue cultures" *Current Opinions in Biotechnology*, 11:199-204.
- Eglitis, M. A. et al. (1988) "Retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic cells" *Adv. Exp. Med. Biol.* 241:19-27. 40
- Eglitis, M. A., Anderson, W. F. (1988) "Retroviral Vectors for Introduction of Genes into Mammalian Cells" *Biotechniques* 6(7):608-614.
- Eihauer, A. et al. (2001) "The FLAG (商標) Peptide, a Versatile Fusion Tag for the Purification of Recombinant Proteins" *J. Biochem Biophys Methods* 49:455-65.
- Fischer, R. et al. (1999) "Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:109-112.
- Fraley, R. T. et al. (1985) "The SEV system: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation" *Biotechnology* 3:629-635. 50

- Fromm, M. et al. (1985) "Expression of Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17):5824-5828.
- Fynan, E. F. et al. (1993) "DNA Vaccines: Protective Immunizations by Parenteral, Mucosal, and Gene-Gun Inoculations" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482.
- Gao, G. F., M. H. Hussain, H. W. Reid, and E. A. Gould (1994) "Identification of naturally occurring monoclonal antibody escape variants of louping ill virus" *J Gen Virol* 75 (Pt 3):609-614.
- Gardner, R. C. et al. (1981) "The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing" *Nucl. Acids Res.* 9(12):2871-2888. 10
- Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973) "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5" *Virology* 54(02):536-539.
- Gish, W. et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" *Nature Genetics* 3:266-272.
- Guirakhoo, F., F. X. Heinz, and C. Kunz (1989) "Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH" *Virology* 169:90-99.
- Hanna, Sheri L, Theodore C. Pierson, Melissa D. Sanchez, Asim A. Ahmed, Mariam M. Murtadha, and Robert W. Doms (2005) "N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity" *J Virol.* 79:13262-13274. 20
- Hasegawa, H., M. Yoshida, T. Shiosaka, S. Fujita, and Y. Kobayashi (1992) "Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice" *Virology* 191:158-165.
- Heinz, F., and C. Kunz (1977) "Characterization of tick-borne encephalitis virus and immunogenicity of its surface components in mice" *Acta Virol* 21:308-316.
- Heinz, F. X. (1986) "Epitope mapping of flavivirus glycoproteins" *Adv Virus Res* 31:103-168. 30
- Heinz, F. X., R. Berger, W. Tuma, and C. Kunz (1983) "A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies" *Virology* 126:525-537.
- Heinz, F. X., and C. Kunz (1982) "Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses" *J Gen Virol* 62 (Pt 2):271-285.
- Heinz, F. X., C. W. Mandl, H. Holzmann, C. Kunz, B. A. Harris, F. Rey, and S. C. Harrison (1991) "The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization" *J Virol* 65:5579-5583. 40
- Heinz, F. X., and J. T. Roehrig (1990) *Flaviviruses*, p. 289-305, *Immunochimistry of viruses*, vol. II. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- Herrera-Estrella, L. et al. (1983) "Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector" *Nature* 303:209-213.
- Herrera-Estrella, L. et al. (1984) "Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector" *Nature* 310:115-120.
- Higgins, D. G. et al. (1996) "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments" *Methods Enzymol.* 266:383-402.
- Holliger, P. et al. (1993) "'Diabodies': small bivalent and bispecific anti 50

body fragments" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

Holzmann, H., K. Stiasny, M. Ecker, C. Kunz, and F. X. Heinz (1997) "Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice" *J Gen Virol* 78 (Pt 1):31-37.

Holzmann, H., G. Utter, E. Norrby, C. W. Mandl, C. Kunz, and F. X. Heinz (1993) "Assessment of the antigenic structure of tick-borne encephalitis virus by the use of synthetic peptides" *J Gen Virol* 74 (Pt 9):2031-2035.

Jan, L. R., C. S. Yang, L. S. Henchal, H. Sumiyoshi, P. L. Summers, D. R. Dubois, and C. J. Lai (1993) "Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein" *Am J Trop Med Hyg* 48:412-423.

Jefferson, R.A. (1987) "Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system" *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.

Jiang, W. R., A. Lowe, S. Higgs, H. Reid, and E. A. Gould (1993) "Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence" *J Gen Virol* 74 (Pt 5):931-935.

Johnston, S. A., Tang, D. C. (1994) "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization" *Methods Cell. Biol.* 43(A):353-365.

Jones, C. et al. (1995) "Current Trends in Molecular Recognition and Bioseparation" *J. of Chromatography A.* 707:3-22.

Jorgensen, R. A. et al. (1987) "T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives" *Mol. Gen. Genet.* 207:471-477.

Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M, Fikrig E, Koski RA, Modis Y. (2006) "Crystal structure of West Nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes" *J Virol.* Aug 30; [Epub ahead of print]

Keller, G.H., M.M. Manak (1987) *DNA Probes*, Stockton Press, New York, NY., pp. 169-170.

Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity" *Nature* 256(5517):495-497.

Kolaskar, A. S., and U. Kulkarni-Kale (1999) "Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus" *Virology* 261:31-42.

Konishi, E., S. Pincus, E. Paoletti, R. E. Shope, T. Burrage, and P. W. Mason (1992) "Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection" *Virology* 188:714-720.

Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss (2002) "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion" *Cell* 108:717-725.

Kusterbeck, A. W. et al. (1990a) "A Continuous Flow Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of Small Molecules" *Journal of Immunological Methods* 135(1-2):191-197.

Kusterbeck, A. W. et al. (1990) "Antibody-Based Biosensor for Continuous Monitoring" In *Biosensor Technology*, R. P. Buck et al., eds., Marcel Dekker, N.Y. pp. 345-350.

Lee, E., and M. Lobigs (2000) "Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry" *J Virol* 74:8867-8875.

Letchworth, G. J. and J. A. Appleton (1984) *Methods for Production of Monoclonal Antibodies*. USDA Handbook #630.

Ligler, F. S. et al. (1992) "Drug Detection Using the Flow Immunosensor" In *Biosensor Design and Application*, J. Findley et al., eds., American Chemical Society Press, pp. 73-80.

Lin, B., C. R. Parrish, J. M. Murray, and P. J. Wright (1994) "Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2" *Virology* 202:885-890.

Lu, L. et al. (1993) "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34 (3+) hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood" *J. Exp. Med.* 178(6):2089-2096.

Mandl, C. W., F. Guirakhoo, H. Holzmann, F. X. Heinz, and C. Kunz (1989) "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model" *J Virol* 63:564-571.

Maniatis, J.-M. et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Marcotte, W. R. et al. (1988) "Regulation of a wheat promoter by abscisic acid in rice protoplasts" *Nature* 335:454-457.

Margolin, W. (2000) "Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells" *Methods* 20:62-72.

Marks, J. D. et al. (1991) "By-Passing Immunization: Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage" *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597.

Mason, P. W., J. M. Dalrymple, M. K. Gentry, J. M. McCown, C. H. Hoke, D. S. Burke, M. J. Fournier, and T. L. Mason (1989) "Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein" *J Gen Virol* 70 (Pt 8):2037-2049.

Mason, P. W., S. Pincus, M. J. Fournier, T. L. Mason, R. E. Shope, and E. Paolletti (1991) "Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection" *Virology* 180:294-305.

Melton, D. A. et al. (1984) "Efficient In Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes From Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter" *Nuc. Acids Res.* 12:7035-7036.

Men, R. H., M. Bray, and C. J. Lai (1991) "Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice" *J Virol* 65:1400-1407.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. (2004) "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion" *Nature* 427:313-319.

Morrison, S. L. et al. (1984) "Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains with Human Constant Region Domains" *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 81:6851-6855.

Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann, and R. J. Kuhn (2003) "Structure of West Nile virus" *Science* 302:248.

Murai et al. (1982) "T-DNA of pTi-15955 from *Agrobacterium tumefaciens* is transcribed into a minimum of seven polyadenylated RNAs in a sunflower crown gall tumor" *Nucleic Acids Res.* 10(5):1679-1689.

Murray, E. E. et al. (1989) "Codon usage in plant genes" *Nucleic Acids Res.* 17(2):477-498.

Norris, S. R. et al. (1993) "The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric ge

10

20

30

40

50

ne expression" *Plant Mol. Biol.* 21(5):895-906.

Nowak, T., and G. Wengler (1987) "Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus" *Virology* 156:127-137.

Ogert, R. A. et al. (1992) "Detection of Cocaine Using the Flow Immunosensor" *Analytical Letters* 25:1999-2019.

Pearson, W. R. et al. (1988) "Improved Tools for Biological Sequence Comparison" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448.

Pietu, G. et al. (1996) "Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array" *Genome Research* 6(6):492-503.

Pincus, S., P. W. Mason, E. Konishi, B. A. Fonseca, R. E. Shope, C. M. Rice, and E. Paoletti (1992) "Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis" *Virology* 187:290-297.

Pluckthun, A. (1994) In *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113:269-315, Rosenberg and Moore eds. Springer Verlag, New York.

Potrykus, I. et al. (1985) "Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot" *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188.

Puig, O. et al. (2001) "The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification" *Methods* 24:218-29.

Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison (1995) "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution" *Nature* 375:291-298.

Roehrig, J. T., J. H. Mathews, and D. W. Trent (1983) "Identification of epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies" *Virology* 128:118-126.

Roehrig, J. T. (1986) The use of monoclonal antibodies in studies of the structural proteins of togaviruses and flaviviruses, p. 251-278. In S. Schlesinger and M. J. Schlesinger (ed.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York.

Roehrig, J. T., A. R. Hunt, A. J. Johnson, and R. A. Hawkes (1989) "Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody" *Virology* 171:49-60.

Rogers, S. G. et al. (1987) "Improved Vector for plant transformation: expression cassette vectors and new selectable markers" *Meth. in Enzymol.* 153:253-277.

Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57.

Sanchez, M. D., T. C. Pierson, D. McAllister, S. L. Hanna, B. A. Puffer, L. E. Valentine, M. M. Murtadha, J. A. Hoxie, and R. W. Doms (2005) "Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus" *Virology* 336:70-82.

Sassenfeld, H. M. (1990) "Engineering Proteins for Purification" *TibTech* 8:88-93.

Schena, M. et al. (1995) "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns With a Complementary DNA Microarray" *Science* 270:467-470.

Schena, M. et al. (1996a) "Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(20):10614-10619.

Schena, M. (1996b) "Genome analysis with gene expression microarrays" *BioEssays* 18(5):427-431.

10

20

30

40

50

- Schlesinger, J. J., J. R. Putnak, and K. H. Eckels (1992) "New approaches to flavivirus vaccine development" *Biotechnology* 20:289-307.
- Sheibani, N. (1999) "Prokaryotic Gene Fusion Expression Systems and Their Use in Structural and Functional Studies of Proteins" *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29(1):77-90.
- Skerra, A. et al. (1999) "Applications of a Peptide Ligand for Streptavidin: the Strep-tag" *Biomolecular Engineering* 16:79-86.
- Smith, C. (1998) "Cookbook for Eukaryotic Protein Expression: Yeast, Insect, and Plant Expression Systems" *The Scientist* 12(22):20.
- Smith, G. L. and B. Moss (1984) "Vaccinia Virus expression Vectors: Construction, Properties, and applications" *Bio Techniques* Nov/Dec:306-312. 10
- Smyth, G. K. et al. (2000) "Eukaryotic Expression and Purification of Recombinant Extracellular Matrix Proteins Carrying the Strep II Tag" *Methods in Molecular Biology* 139:49-57.
- Spielmann, A. et al. (1986) "T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites" *Mol. Gen. Genet.* 205:34-41.
- Stiasny, K., S. L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz, and F. X. Heinz (1996) "Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus" *J Virol* 70:8142-8147.
- Suggs, S. V. et al. (1981) *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-693. 20
- Sun C.-W. et al. (1997) "Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes" *Plant J.* 11(5):1017-1027.
- Sutter, G. et al. (1994) "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus" *Vaccine* 12(11):1032-1040.
- Sutter, G., Moss, B. (1992) "Nonreplicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Recombinant Genes" *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10847-10851.
- Thompson, J. et al. (1994) "Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice" *Nucleic Acids Res.* 22(2):4673-4680. 30
- Unger, T. F. (1997) "Show Me the Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems" *The Scientist* 11(17):20.
- Villa-Kamaroff, L. et al. (1978) "A bacterial clone synthesizing proinsulin" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75(8):3727-3731.
- Wagner, M. J. et al. (1981) "Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(3):1441-1445.
- Wagner, E. et al. (1992) "Coupling of Adenovirus to Transferrin-Polylysine/DNA Complexes Greatly Enhances Receptor-Mediated Gene Delivery and Expression of Transfected Genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(13):6099-6103. 40
- Wei, C. F. et al. (1983) "Isolation and comparison of two molecular species of the BAL 31 nuclease from *Alteromonas espejiana* with distinct kinetic properties" *J. Biol. Chem.* 258:13506-13512.
- Wengler, G., and G. Wengler (1989) "An analysis of the antibody response against West Nile virus E protein purified by SDS-PAGE indicates that this protein does not contain sequential epitopes for efficient induction of neutralizing antibodies" *J Gen Virol* 70 (Pt 4):987-992.
- Winkler, G., F. X. Heinz, and C. Kunz (1987) "Characterization of a disulphide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural 50

glycoprotein" J Gen Virol 68 (Pt 8):2239-2244.

Wong, T. K., Neumann, E. (1982) Electric field mediated gene transfer" Biochim . Biophys. Res. Commun., 107(2):584-587.

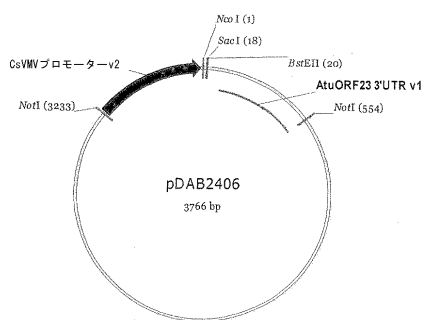
Yamamoto, T. et al. (1980) "Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus" Cell 22(3):787-797.

Zapata, G. et al. (1995) "Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity" Protein Eng. 8(10):1057-1062.

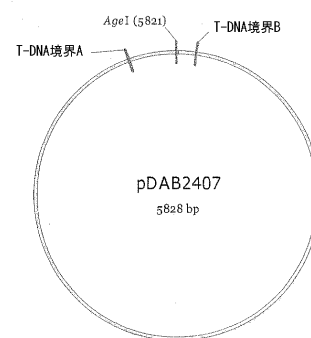
Zatloukal, K. et al. (1992) "Transferrin infection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells" Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:136-153.

10

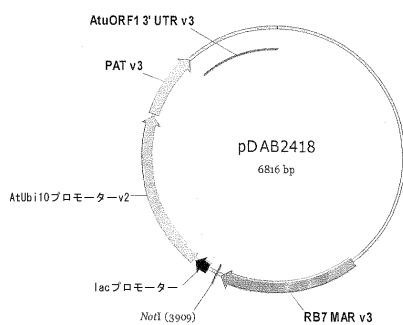
【図1】



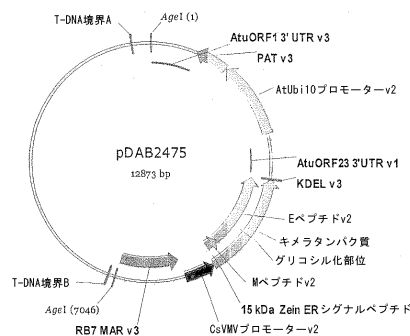
【図3】



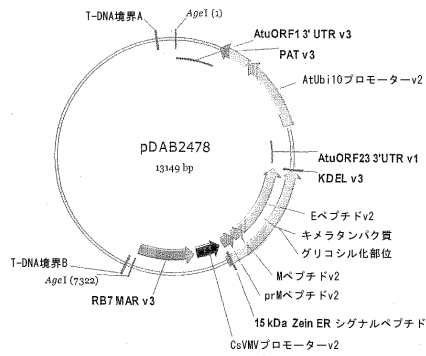
【図2】



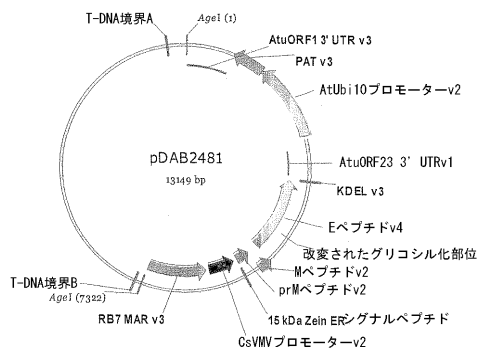
【図4】



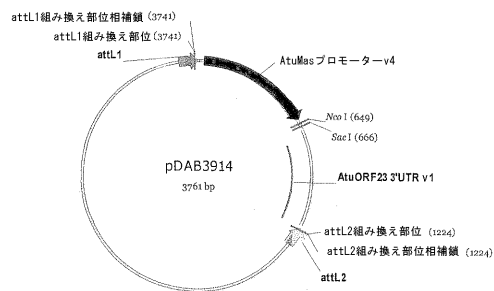
【図 5】



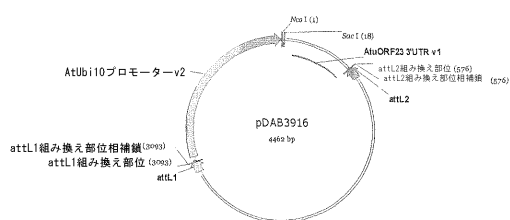
【図 6】



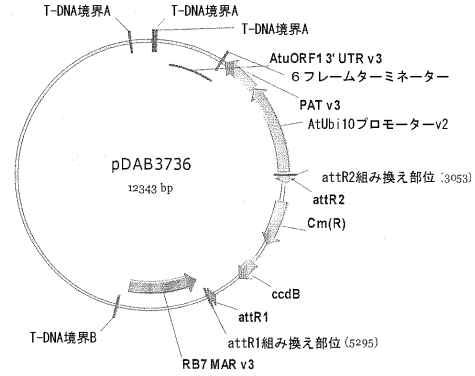
【図 9】



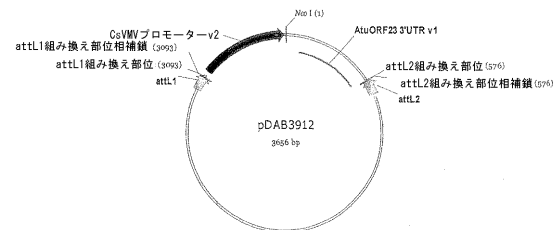
【図 10】



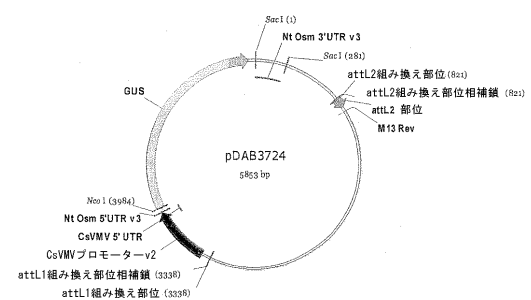
【図 7】



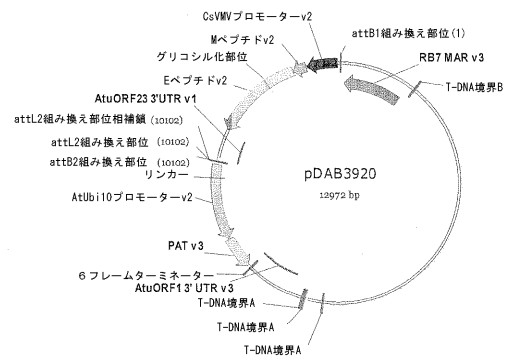
【図 8】



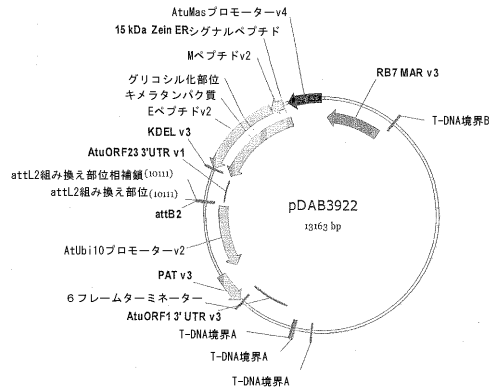
【図 11】



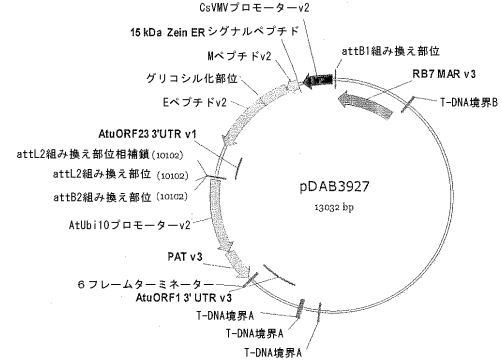
【図 12】



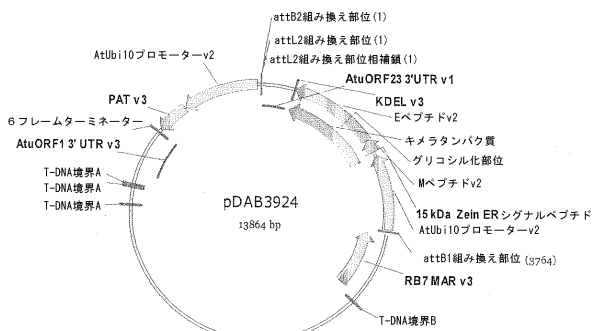
【図 13】



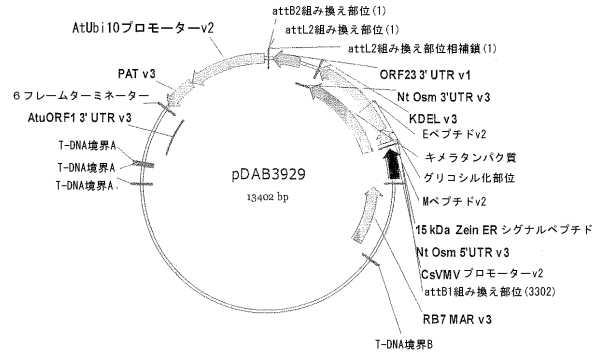
【図 15】



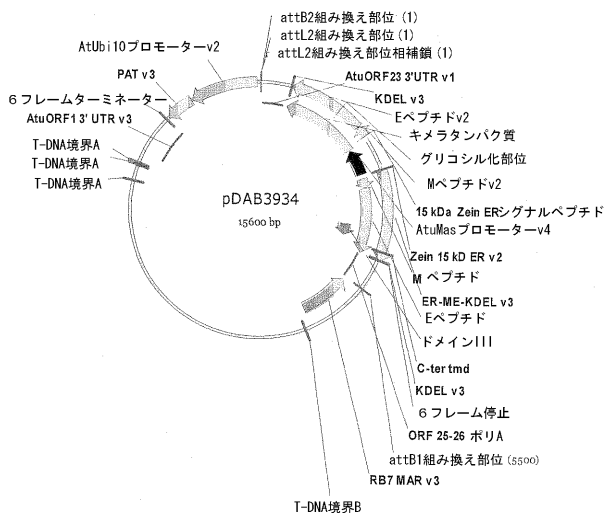
【図 14】



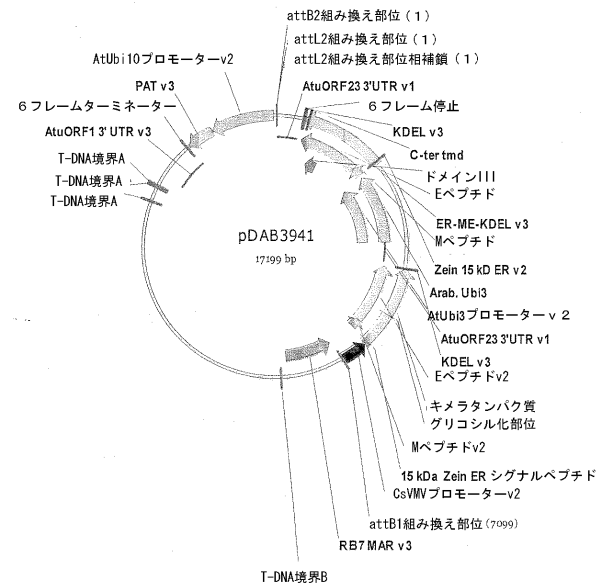
【図 16】



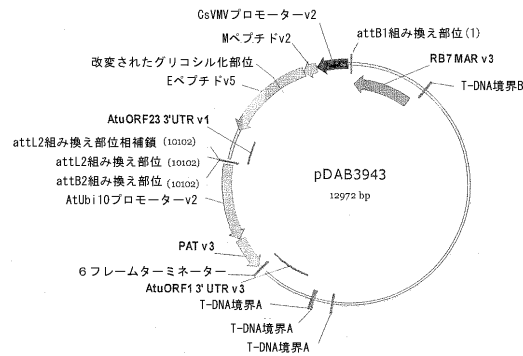
【図 17】



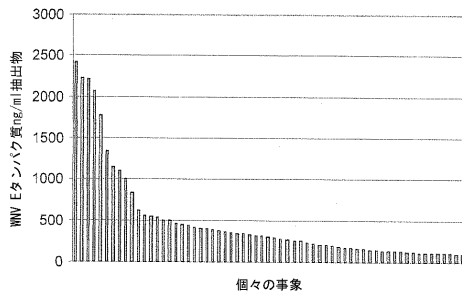
【図 18】



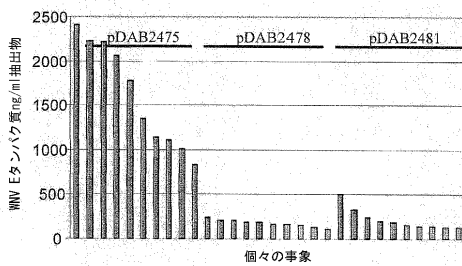
【図 19】



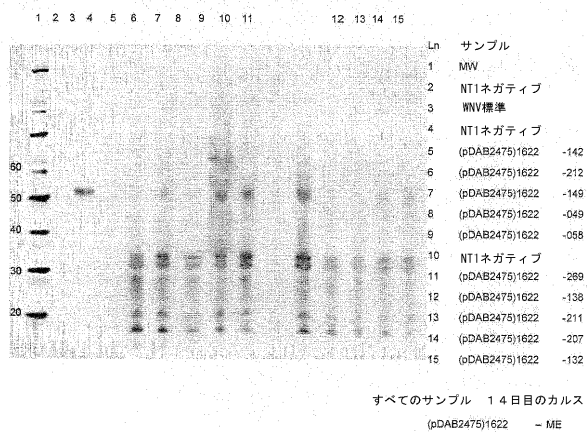
【図 20】



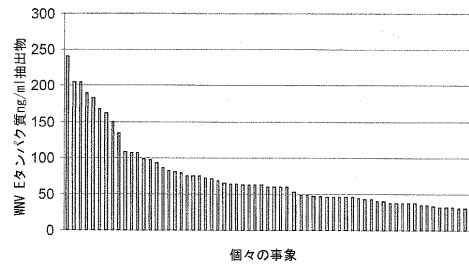
【図 23】



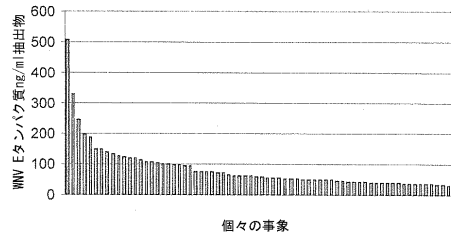
【図 24】



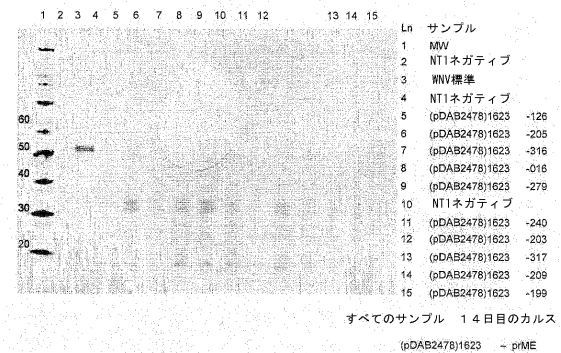
【図 21】



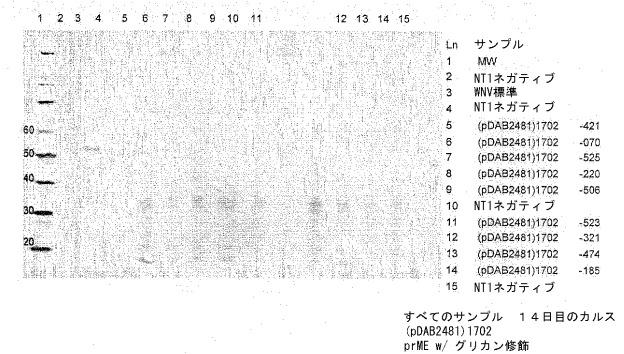
【図 22】



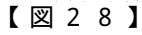
【図 25】



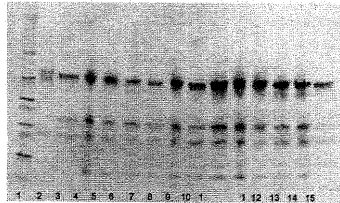
【図 26】



WNV 1A 構築物比較(14日目のカルス)

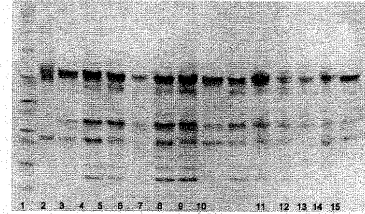


1	See Blue/Magic Mark
2	植物参照 (15 ng)
3	(pDAB2475) 1622 -207
4	(pDAB3920) 1960 -001
5	(pDAB3920) 1960 -005
6	(pDAB3920) 1960 -013
7	(pDAB3920) 1960 -015
8	(pDAB3920) 1960 -024
9	(pDAB2475) 1622 -207
10	(pDAB3922) 1961 -001
11	(pDAB3922) 1961 -002
12	(pDAB3922) 1961 -004
13	(pDAB3922) 1961 -006
14	(pDAB3922) 1961 -017
15	(pDAB2475) 1622 -207



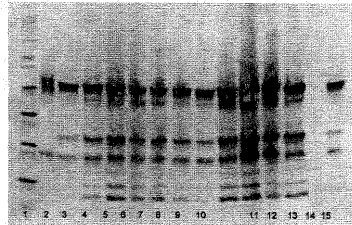
すべてのサンプル 14日目のカルス
充填量を全可溶性タンパクに対して正規化

1	See Blue/Magic Mark	
2	植物参照 (15 ng)	
3	(pDAB2475) 1622	-207
4	(pDAB3924) 1982	-001
5	(pDAB3924) 1992	-009
6	(pDAB3924) 1982	-014
7	(pDAB3924) 1982	-018
8	(pDAB3924) 1982	-024
9	(pDAB2475) 1622	-207
10	(pDAB3927) 1953	-004
11	(pDAB3927) 1963	-009
12	(pDAB3927) 1993	-013
13	(pDAB3927) 1983	-015
14	(pDAB3927) 1963	-023
15	(pDAB3927) 1622	-207



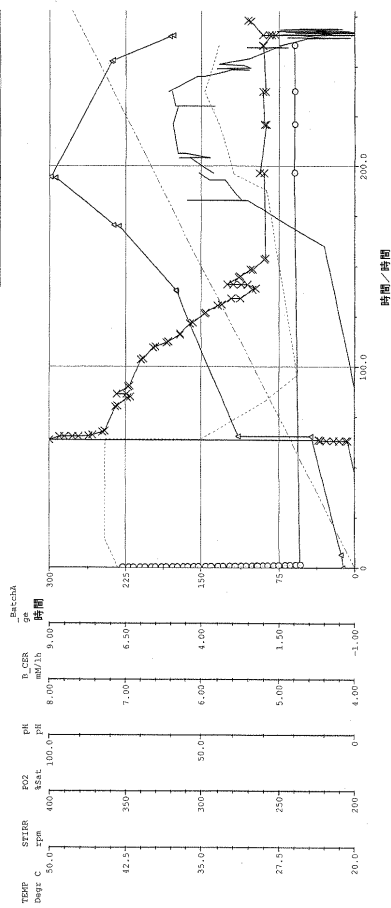
すべてのサンプル 14日目のカルス
充填量を全可溶性タンパクに対して正規化

レーン	Blue/BlueMagic Mark
1	
2	植物参照 (15 ng)
3	(pDAB2475) 1622 -207
4	(pDAB3929) 1964 -001
5	(pDAB3929) 1964 -008
6	(pDAB3929) 1964 -013
7	(pDAB3929) 1964 -018
8	(pDAB3929) 1964 -024
9	(pDAB2475) 1622 -027
10	(pDAB3934) 2040 -003
11	(pDAB3934) 2040 -005
12	(pDAB3934) 2040 -007
13	(pDAB3934) 2040 -008
14	(pDAB3934) 2040 -009
15	(pDAB2475) 1622 -207

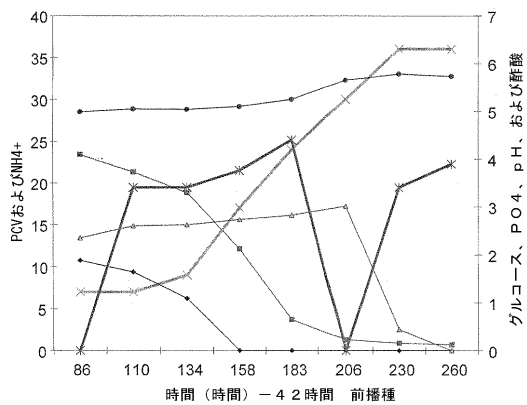


すべてのサンプル 14日目のカルス
充填量を全可溶性タンパクに対して正規化

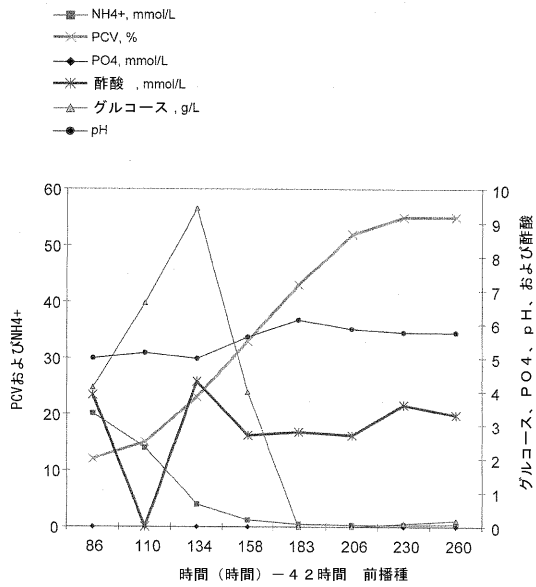
	Batchage, Value; Db 0.20 時間
—○—	E. CER. 値 ; Db *2.0 m%/lh
.....	pH. 値 ; Db *0.40 pH
✕	FCO ₂ . 値 ; Db *4.0 %Sat
—●—	STIRR. 値 ; Db *20 rpm
—○—	TEMP. 値 ; Db *1.0 Degr C



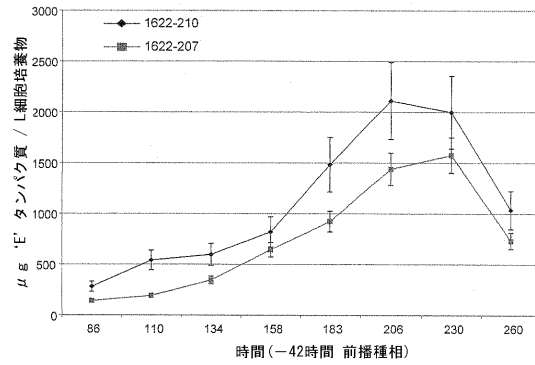
- NH₄⁺, mmol/L
- ×— PCV, %
- ◆— PO₄, mmol/L
- ※— 酢酸, mmol/L
- △— グルコース, g
- pH



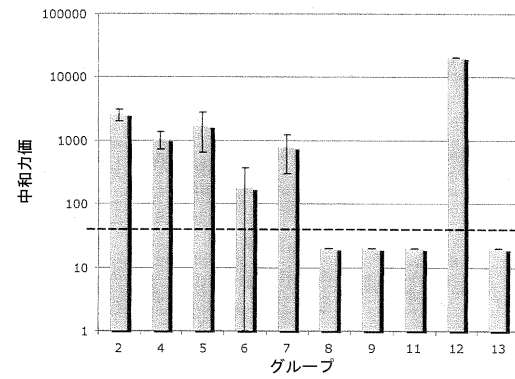
【図 3 3】



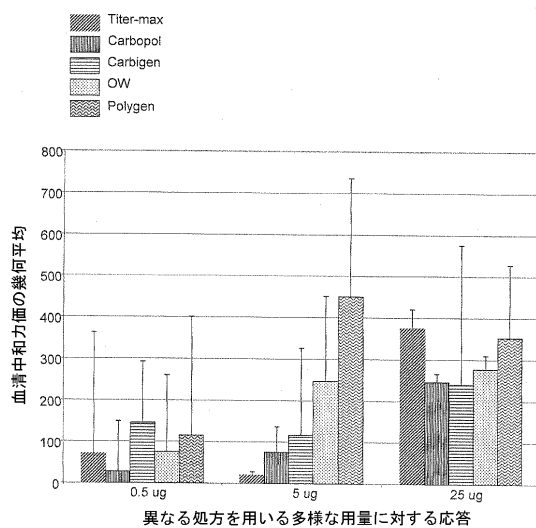
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



【手続補正書】

【提出日】平成21年8月24日(2009.8.24)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2010514698000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/088512															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/18 C12N15/82 ADD. A01H5/00																	
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) C07K C12N																	
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2004/112694 A (CHIRON CORP [US]; ANDREWS WILLIAM [US]; CHIEN DAVID Y [US]; CHOO QUI-L) 29 December 2004 (2004-12-29)</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>page 46, line 1, paragraph 33 page 54, line 4 - page 62, line 12; sequences page 22, line 29 - page 23, line 10</td> <td>17-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>STREATFIELD S J: "Plant-based vaccines for animal health" REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, vol. 24, no. 1, April 2005 (2005-04), pages 189-199, XP009110074 ISSN: 0253-1933 the whole document, especially page 196 second column, second paragraph</td> <td>17-20</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-/--</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2004/112694 A (CHIRON CORP [US]; ANDREWS WILLIAM [US]; CHIEN DAVID Y [US]; CHOO QUI-L) 29 December 2004 (2004-12-29)	1-16	Y	page 46, line 1, paragraph 33 page 54, line 4 - page 62, line 12; sequences page 22, line 29 - page 23, line 10	17-20	Y	STREATFIELD S J: "Plant-based vaccines for animal health" REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, vol. 24, no. 1, April 2005 (2005-04), pages 189-199, XP009110074 ISSN: 0253-1933 the whole document, especially page 196 second column, second paragraph	17-20	-/--		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2004/112694 A (CHIRON CORP [US]; ANDREWS WILLIAM [US]; CHIEN DAVID Y [US]; CHOO QUI-L) 29 December 2004 (2004-12-29)	1-16															
Y	page 46, line 1, paragraph 33 page 54, line 4 - page 62, line 12; sequences page 22, line 29 - page 23, line 10	17-20															
Y	STREATFIELD S J: "Plant-based vaccines for animal health" REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, vol. 24, no. 1, April 2005 (2005-04), pages 189-199, XP009110074 ISSN: 0253-1933 the whole document, especially page 196 second column, second paragraph	17-20															
-/--																	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. "A" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 7 January 2009		Date of mailing of the international search report 15/01/2009															
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Burkhardt, Peter															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/088512

C(Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHILLBERG S ET AL: "Opportunities for recombina nt antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 23, no. 15, 7 March 2005 (2005-03-07), pages 1764-1769, XP004768051 ISSN: 0264-410X the whole document	17-20
Y	WARZECHA H ET AL: "Oral Immunogenicity of Human Papillomavirus-Like Particles Expressed in Potato" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 77, no. 16, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 8702-8711, XP002993767 ISSN: 0022-538X the whole document	17-20
A	CHANG G-J J ET AL: "RECENT ADVANCEMENT IN FLAVIVIRUS VACCINE DEVELOPMENT" EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 3, no. 2, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 199-220, XP009061787 ISSN: 1476-0584 the whole document	1-20
A	PLOTKIN STANLEY A: "Vaccines, vaccination, and vaccinology." JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 187, no. 9, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 1349-1359, XP009070448 ISSN: 0022-1899 the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/088512

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004112694 A	29-12-2004	CA 2526640 A1 EP 1626708 A2	29-12-2004 22-02-2006

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. P Y R E X

(71) 出願人 509175425
 ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ・アズ・リプレゼンテッド・バイ・ザ・セクレタリー・オブ・アグリカルチャー
 The United States of America as Represented
 by the Secretary of Agriculture
 アメリカ合衆国 4 6 0 4 イリノイ州ベオリア、ノース・ユニバーシティ・ストリート 1 8 1 5 番
 、ユナイテッド・ステイツ・デパートメント・オブ・アグリカルチャー

(74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

(74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行

(74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

(74) 代理人 100156100
 弁理士 西野 満

(74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生

(72) 発明者 ケリー・エイ・スミス
 アメリカ合衆国 4 6 0 5 2 インディアナ州レバノン、イースト 7 5 0 ノース 7 2 9 番

(72) 発明者 チャールズ・エイ・ミハリアク
 アメリカ合衆国 2 7 5 0 2 ノースカロライナ州アベックス、グラッシー・ポイント・ロード 3 1 4 番

(72) 発明者 スティーブン・ロバート・ウェブ
 アメリカ合衆国 4 6 0 7 4 インディアナ州ウエストフィールド、ブルームフィールド・コート 1 5 4 1 6 番

(72) 発明者 ドナルド・ジェイ・マーロ
 アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、ダービン・ドライブ 1 1 8 4 5 番

(72) 発明者 スティーブン・エル・エバンズ
 アメリカ合衆国 4 6 0 7 7 インディアナ州ザイオンズビル、ロックレス・コート 4 6 5 4 番

(72) 発明者 ジェフリー・ジェイ・レッチワース
 アメリカ合衆国 8 2 0 7 2 ワイオミング州ララミー、レイノルズ・ストリート 3 6 1 9 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 BA79 CA07 DA01 FA02 FA15 GA11
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01
4C085 AA03 BA51 CC01 DD21 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05
GG06 GG08 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 CA30 DA75 DA86 EA29 EA53
FA74