

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6886291号  
(P6886291)

(45) 発行日 令和3年6月16日(2021.6.16)

(24) 登録日 令和3年5月18日(2021.5.18)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 12 N</b>	<b>15/40</b>	<b>(2006.01)</b>	C 12 N	15/40	Z N A
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/76</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K	35/76	
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	39/12	
<b>A 6 1 P</b>	<b>31/14</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	31/14	
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	37/04	

請求項の数 8 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-540591 (P2016-540591)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月19日 (2014.12.19)  
 (65) 公表番号 特表2017-502662 (P2017-502662A)  
 (43) 公表日 平成29年1月26日 (2017.1.26)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/078929  
 (87) 國際公開番号 WO2015/092058  
 (87) 國際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)  
 審査請求日 平成29年12月19日 (2017.12.19)  
 審判番号 不服2019-17216 (P2019-17216/J1)  
 審判請求日 令和1年12月20日 (2019.12.20)  
 (31) 優先権主張番号 13199177.0  
 (32) 優先日 平成25年12月20日 (2013.12.20)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 505258715  
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ  
 ディカ ゲーエムペーハー  
 B e r i n g e r I n g e l h e i  
 m V e t m e d i c a G m b H  
 ドイツ国 5 5 2 1 6 インゲルハイム  
 アム ライン ビンゲル シュトラーセ  
 1 7 3  
 (74) 代理人 100094569  
 弁理士 田中 伸一郎  
 (74) 代理人 100109070  
 弁理士 須田 洋之  
 (74) 代理人 100119013  
 弁理士 山崎 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P R R S ウイルス変異株、ヨーロッパ型 P R R S ウイルス c D N A クローンおよびそれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

遺伝子型 I 型 PRRS ウイルスをコードし、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる DNA 分子であって、配列番号 48 の核酸配列と配列番号 48 の全長にわたって少なくとも 99.6% の配列同一性を有する核酸配列を含む、前記 DNA 分子。

## 【請求項 2】

ウイルスが弱毒化されている、請求項 1 に記載の DNA 分子。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の DNA 分子を含む DNA 構築物。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の DNA 構築物の RNA 転写産物。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載の DNA 構築物または請求項 4 に記載の RNA 転写産物を含む細胞。

## 【請求項 6】

遺伝子型 I 型 PRRS ウイルスであって、そのゲノムが請求項 1 または 2 のいずれか 1 項記載の DNA 分子によってコードされる RNA 分子を含むか、またはそのゲノムが請求項 1 または 2 のいずれか 1 項記載の DNA 分子によってコードされる、遺伝子型 I 型 PRRS ウイルス。

## 【請求項 7】

請求項 3 に記載の DNA 構築物で細胞をトランスフェクトすることを含むか、または請求項 4 に記載の RNA 転写産物で宿主細胞をトランスフェクトすることを含む、遺伝子型 I 型 P R

10

20

RSウイルスを產生する方法。

【請求項 8】

適切な量の薬学的に許容される希釈剤または賦形剤に懸濁した、請求項 1 または 2 に記載のDNA分子を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物の健康の分野に関する。

【0002】

第一の考慮態様において、本発明は新規PRRSウイルス変異株に関する。本発明はまた、イノシシ科動物のウイルス病である豚繁殖・呼吸障害症候群(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)(PRRS)を研究するための前記PRRSウイルスの使用、ならびにPRRSの予防、治療および診断のためのワクチン、治療薬および診断法の開発における前記PRRSウイルスの使用に関する。

10

【0003】

第二の考慮態様において、本発明は、感染性遺伝子型I型(EU)PRRSウイルスクローンのゲノムを含む核酸配列に関する。本発明はまた、イノシシ科動物の豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)を予防または治療するのに有用な弱毒生ウイルスを產生するための感染性遺伝子型I型PRRSウイルスクローンの核酸配列の使用、ならびにPRRSの予防、治療および診断のためのワクチン、治療薬および診断法の開発における感染性遺伝子型I型PRRSウイルスクローンの核酸配列の使用に関する。

20

【0004】

本発明の第三の考慮態様において、さらに、前記両考慮態様を組み合わせることによって、改善された特性を有する新規PRRSウイルスが提供される。

【背景技術】

【0005】

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PPRSV)は、アルテリウイルス科のメンバーの1つであり、コロナウイルス科と共に、ニドウイルス目に属する。PPRSVは、9つのオーブンリーディングフレーム(ORF)、すなわちORF1a、ORF1ab、ORF2a、ORF2abおよび、ORF3からORF7までを含む約15キロベースの一本鎖プラスセンスRNAゲノムを有するエンベロープウイルスである。ORF1aおよび1abは、ウイルス性プロテアーゼnsp1、nsp2およびnsp4の自己切断およびトランス切断によってウイルス非構造タンパク質(nsp)にプロセシングされる大きなポリタンパク質をコードする(Snijder and Meulenberg, 1998)。ORF4は、大きな糖タンパク質(GP5)および2つの他の小さな糖タンパク質(GP2aおよびGP3)に隣接する、ウイルスエンベロープ中に見いだされる小さな糖タンパク質(GP4)をコードするが、前記糖タンパク質はすべて感染性ウイルスの產生に重要である。

30

【0006】

PPRSVは、雌豚において後期(late-term)繁殖障害を引き起こし、肥育豚において呼吸器疾患を誘導する、ブタにおける経済的に最も重要な感染性病原体の1つと考えられている。PPRSV感染症は、多くの場合、このウイルスの免疫抑制性に起因する細菌の二次感染を伴う。同様に、PPRSVウイルス血症は数週間持続し、次いで、数カ月間、リンパ組織においてウイルスが検出される場合があり、このことは、宿主の免疫応答によってこのウイルスを取り除くことが困難であるかまたはできないことを示している(Allende et al., 2000)。

40

【発明の概要】

【0007】

ヌクレオチド配列レベルで約40%異なるが、類似した臨床症状を誘導する、2つの異なるウイルスPPRSV遺伝子型、遺伝子型I型(EU型)および遺伝子型II型(US型)が存在する。北米型(US型)プロトタイプ株はVR-2332であり、ヨーロッパ型(EU型)プロトタイプ株はレリックタット(Lelystad)ウイルスである。

50

## 【0008】

しかしながら、第一の考慮態様において、PRRSウイルス株は、高い生物学的多様性を有し、個々の飼育場で急速に進化する(Badaoui et al. BMC Veterinary Research 2013, 9: 58)ので、PRRSのより良い理解のために、その異なる形態における前記疾患を再現するために、比較試験のために、PRRSの予防、治療および診断のための新規ワクチン、医薬および診断法の開発のためのプラットフォームとして、新規PRRSV分離株が求められている。

## 【0009】

第二の考慮態様において、ますます多くのPRRSウイルスの感染性cDNAクローンが科学界に利用可能となりつつあるが、それらの大部分はこのウイルスのUS型に基づいている。しかしながら、EU型には、利用可能なクローンがほとんどない。従って、PRRSのより良い理解のために、比較試験のために、PRRSの予防、治療および診断のための新規ワクチン、医薬および診断法の開発のためのプラットフォームとして、ヨーロッパ型(遺伝子型I型)PRRSウイルスの新規感染性cDNAクローンであって、前記cDNAクローンの使用によって高収量のウイルス産生がもたらされる前記cDNAクローンが強く求められている。従って、PRRSワクチン研究における実験上の便利さのために、大量の遺伝子型I型PRRSウイルスの産生を可能にする感染性cDNAクローンが必要と考えられる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0010】

【図1】A . BI EU cDNAクローンから回収された感染性ウイルスが、MA104細胞に対して強いCPEを誘導したことを示す明視野観察(bright field microscopy)の図である。B . BI EUに感染したMA104細胞のPRRSVカプシドタンパク質特異的免疫蛍光法(IF)染色を示す図である。

【図2】MA104細胞に対する感染性cDNAクローンBI EUから回収したウイルスの増殖を示す図である。

【図3】いくつかのUS型(II型、上部)およびEU型(I型、下部)PRRSV株のnsp1 N末端ドメイン(NTD)のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。BI EUのNTDアミノ酸配列は最下部に示されている。アミノ酸R22、PR24、E32、SFPおよびH52が、このアラインメントの上に示されており、これらはnsp1 ホモ二量体化に非常に重要であることが示されている(Xue et al., 2010)。nsp1 変異誘発の標的領域を赤枠で囲んだ。SDGRSRモチーフは、PRRSV EU cDNAクローンLoN94-13を用いるWO 2013017570 A1に記載されている領域に対応する。

【図4】BI EU-nsp1 欠失変異株のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図5】IFNコンピテントMA104細胞におけるBI EU-nsp1 欠失変異株の増殖を示す図である。

【図6】BI EU-nsp1 欠失変異株または親BI EUウイルスに感染したMA104細胞の細胞培養上清における、種々の時点で測定したIFN- レベルを示す図である。

【図7】ORF4タンパク質内に欠失または挿入を含む組換えBI EUウイルスの増殖動態を示す図である。

【図8】組換えウイルスBI EU-GP5-36-46-AtoCおよび親ウイルスBI EUに対する血清中和を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0011】

配列表において：

配列番号1~24は、欠失を有するPRRSV ORF4タンパク質の外部ドメインの配列に対応する；

配列番号25および配列番号26は、PRRSV(遺伝子型I型)ORF4タンパク質の最初の2つの予測N末端シートの配列に対応する；

配列番号27および配列番号28は、PRRSV(遺伝子型II型)ORF4タンパク質の最初の2つの予測N末端シートの配列に対応する；

配列番号29および配列番号30は、PRRSV(遺伝子型I型)ORF4タンパク質の最初の2つの予測N

10

20

30

40

50

末端 シートの配列に対応する；  
配列番号31および配列番号32は、PRRSV(遺伝子型II型)ORF4タンパク質の最初の2つの予測  
N末端 シートの配列に対応する；  
配列番号32は、最初の2つの予測N末端 シートの間の領域における11アミノ酸残基の欠失  
を有するPRRSV(遺伝子型I型)ORF4タンパク質の(部分)配列に対応する；  
配列番号33は、最初の2つの予測N末端 シートの間の領域における7アミノ酸残基の欠失  
を有するPRRSV(遺伝子型II型)ORF4タンパク質の(部分)配列に対応する；  
配列番号34は、11アミノ酸残基の欠失を有するPRRSV(遺伝子型I型)ORF4タンパク質の外部  
ドメインの配列に対応する；  
配列番号35は、7アミノ酸残基の欠失を有するPRRSV(遺伝子型II型)ORF4タンパク質の外部 10  
ドメインの配列に対応する；  
配列番号36は、11アミノ酸残基の欠失を有するPRRSV(遺伝子型I型)ORF4タンパク質の配列  
(それぞれ、配列番号34の配列を含む)に対応する；  
配列番号37は、配列番号36の配列をコードするヌクレオチド配列に対応する；  
配列番号38は、ゲノムが配列番号36の配列をコードする核酸分子を含む遺伝子型IV型PRRS  
をコードするヌクレオチド配列に対応する；  
配列番号39は、PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドの配列に対応す  
る；  
配列番号40は、PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドの配列に対応す  
る；  
配列番号41は、レリストットウイルス (Lelystad virus) 完全ゲノムに対応する；  
配列番号42は、VR2332ウイルス完全ゲノムに対応する；  
配列番号43は、レリストットウイルスのORF4タンパク質の配列に対応する；  
配列番号44は、VR2332ウイルスのORF4タンパク質の配列に対応する；  
配列番号45は、本明細書に記載の第1核酸配列に対応する；  
配列番号46は、第1核酸配列の5'末端に隣接する、本明細書に記載の第2核酸配列に対応  
する；  
配列番号47は、第1核酸配列の3'末端に隣接する、本明細書に記載の第3核酸配列に対応  
する；  
配列番号48は、BI EU完全ウイルスcDNAインサートに対応する；  
配列番号49は、欠失を有する配列番号48の配列であって、13aa(aa57～69)の欠失を有する 30  
ORF4タンパク質をコードする前記配列に対応する；  
配列番号50は、位置9に置換N->Qを有する配列番号39の配列に対応する；  
配列番号51は、配列番号39のaa1～11の配列に対応する；  
配列番号52は、位置9に置換N->Qを有する配列番号51の配列に対応する；  
配列番号53は、Gly-Glyリンカーを有する配列番号51の配列に対応する；  
配列番号54は、Gly-Glyリンカーを有する配列番号52の配列に対応する；  
配列番号55は、N末端プロリン残基を有する配列番号53の配列に対応する；  
配列番号56は、インサートを有する配列番号49の配列であって、配列番号53の配列をコ  
ードする前記配列に対応する；  
配列番号57は、インサートを有する配列番号49の配列であって、配列番号54の配列をコ  
ードする前記配列に対応する；  
配列番号58は、欠失を有する配列番号48の配列の配列であって、14aa(aa56～69)の欠失を  
有するORF4タンパク質をコードする前記配列において、配列番号55の配列をコードするイ  
ンサートが含まれる前記配列に対応する。 40

【 0 0 1 2 】

#### 発明の詳細な説明

上記技術的課題に対する解決策は、本願請求項において特徴づけられる詳細な説明およ  
び実施形態によって達成される。

従って、本発明は、その異なる側面および実施形態において、本願請求項に従って実施 50

される。

【0013】

1. 本発明の第一の考慮態様

本セクションにおいて詳述される第一の考慮態様によれば、本発明は、驚くべきことに、雄ブタにおいて重篤な臨床徵候を誘導することができる新規PRRSウイルスの単離に基づく。本PRRSウイルス変異株の綿密な分析によって、前記ウイルスのORF4遺伝子内の著しい欠失が明らかとなった。

【0014】

従って、一側面において、本発明は、豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)ウイルスであって、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)からなる群から選択される前記ウイルスに関する：

(a)配列番号1～12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むORF4タンパク質を含むPRRSウイルス；

(b)野生型遺伝子型I型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含むPRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルス；

(c)野生型遺伝子型II型PRRSウイルスと比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含む遺伝子型II型PRRSウイルス；

(d)アミノ酸位置50～71の間の9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質であって、そのアミノ酸位置のナンバリングがレリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである、前記ORF4タンパク質を含むPRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルス；

(e)アミノ酸位置50～67の間の5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質であって、そのアミノ酸位置のナンバリングがPRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである、前記ORF4タンパク質を含む遺伝子型II型PRRSウイルス；

(f)(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかの組み合わせ。また更なる側面において、本発明は、それぞれ、以下のA)、B)、C)、D)、E)およびF)からなる群から選択される豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)ウイルスに関する：

A)PRRSウイルスであって、そのゲノムが配列番号1～12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むPRRSウイルス；

B)PRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルスであって、そのゲノムが野生型遺伝子型I型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むPRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルス；

C)遺伝子型II型PRRSウイルスであって、そのゲノムが、野生型遺伝子型II型PRRSウイルスと比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含む遺伝子型II型PRRSウイルス；

D)PRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルスであって、そのゲノムが、アミノ酸位置50～71の間の9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質であって、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記ORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むPRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルス；

E)遺伝子型II型PRRSウイルスであって、そのゲノムが、アミノ酸位置50～67の間の5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質であって、そのアミノ酸位置のナンバリングが、PRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記ORF4タンパク質をコードする核酸分子を含む遺伝子型II型PRRSウイルス；

10

20

30

40

50

F)A)、B)、C)、D)およびE)のいずれかの組み合わせ。

好ましくは、以後”本発明のPRRSウイルス”とも呼ぶ前記PRRSウイルスは、単離されたPRRSウイルスである。

【0015】

本発明の文脈において、それぞれ、語句”領域におけるアミノ酸残基”と語句”領域に位置するアミノ酸残基”とは同義であると理解され、それぞれ、用語”アミノ酸位置の間のアミノ酸残基”と用語”アミノ酸位置の間の領域に位置するアミノ酸残基”とはとりわけ同義であると理解されよう。

さらに、用語”遺伝子型I型”および”遺伝子型II型”は、用語”遺伝子型I型”および”遺伝子型II型”とは同義であると理解され、PRRSVとの関係において文献において頻繁に使用される用語”1型”および”2型”とも同義であると理解されよう。

【0016】

第1の側面((a))によれば、本発明のPRRSウイルスは、従って、配列番号1～12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むORF4タンパク質を含み、前記ORF4タンパク質が好ましくは配列番号13～24からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、例示的な限定するものではない実施形態において、前記ORF4タンパク質が、配列番号31のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質を含む、PRRSウイルスである。

【0017】

別に、第1の側面((A))によれば、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、配列番号1～12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むORF4タンパク質をコードする核酸分子を含み、前記ORF4タンパク質が好ましくは配列番号13～24からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、例示的な限定するものではない実施形態において、前記ORF4タンパク質が、配列番号31のアミノ酸配列を含む前記核酸分子を含む、PRRSウイルスである。

【0018】

第2の側面((b))によれば、本発明のPRRSウイルスは、野生型遺伝子型I型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含み、前記最初の2つの予測N末端シートが、好ましくは配列番号25および配列番号26に示す2つのアミノ酸配列であるか、または好ましくは配列番号29および配列番号30に示す2つのアミノ酸配列であり、例示的な限定するものではない実施形態において、前記ORF4タンパク質が、配列番号32のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質を含む、PRRSウイルス、特に遺伝子型I型PRRSウイルスである。

【0019】

別に、第2の側面((B))によれば、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、野生型遺伝子型I型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含み、前記最初の2つの予測N末端シートが、好ましくは配列番号25および配列番号26に示す2つのアミノ酸配列であるか、または好ましくは配列番号29および配列番号30に示す2つのアミノ酸配列であり、例示的な限定するものではない実施形態において、前記ORF4タンパク質が、配列番号32のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むPRRSウイルス、特に遺伝子型I型PRRSウイルスである。

【0020】

本明細書においては、比較の目的上、野生型遺伝子型I型PRRSウイルスは、好ましくは原型遺伝子型Iレリスタートウイルスである。レリスタートウイルスのゲノムは、配列番号41の核酸配列によってコードされる。

【0021】

第3の側面((c))によれば、本発明のPRRSウイルスは、野生型遺伝子型II型PRRSウイルスと比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含み、最初の2つの予測N末端シートが、好ましくは配列番号27および配列番号28に示す2つのアミノ酸配列であり、例示的な限定する

10

20

30

40

50

ものではない例において、前記ORF4タンパク質が、配列番号33のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質を含む遺伝子型II型PRRSウイルスである。

【0022】

別に、第3の側面((C))によれば、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、野生型遺伝子型II型PRRSウイルスと比較して、最初の2つの予測N末端シートの間の領域における5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含み、最初の2つの予測N末端シートが、好ましくは配列番号27および配列番号28に示す2つのアミノ酸配列であり、前記ORF4タンパク質が例示的な限定するものではない例において配列番号33のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質をコードする核酸分子を含む、遺伝子型II型PRRSウイルスである。

10

【0023】

本明細書においては、比較の目的上、野生型遺伝子型II型PRRSウイルスは、好ましくは原型遺伝子型II型ウイルスVR2332である。ウイルスVR2332のゲノムは、配列番号42の核酸配列によってコードされる。

【0024】

本発明との関係において、アミノ酸残基の欠失は、好ましくは連続アミノ酸残基の欠失である。従って、例えば、9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失は、本明細書においては、好ましくは9、10または11以上の連続アミノ酸残基の欠失であり、それぞれ、5、6または7以上のアミノ酸残基の欠失は、本明細書においては、好ましくは5、6または7以上の連続アミノ酸残基の欠失である。

20

【0025】

第4の側面((d))によれば、本発明のPRRSウイルスは、アミノ酸位置50～71の間の9、10もしくは11以上のアミノ酸残基の欠失または好ましくは11、12、13、14、15、16もしくは17アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングがレリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、限定するものではない例示的な実施形態において、アミノ酸位置50～71の間の11アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質が配列番号34のアミノ酸配列を含むORF4タンパク質である、前記PRRS ORF4ウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルスである。

【0026】

別に、第4の側面((D))によれば、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、アミノ酸位置50～71の間の9、10もしくは11以上のアミノ酸残基の欠失または好ましくは11、12、13、14、15、16もしくは17アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングがレリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、限定するものではない例示的な実施形態においてアミノ酸位置50～71の間の11アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質が配列番号34のアミノ酸配列を含む前記ORF4タンパク質をコードする核酸配列を含む、PRRSウイルス、好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルスである。

30

本明細書においては、レリスタートウイルスに関するアミノ酸位置のナンバリングは、レリスタートウイルスの完全長ORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである。故に、本文脈で記述されているアミノ位置のナンバリングは、アミノ酸位置1(N末端)にメチオニン残基を含む183アミノ酸残基を有するレリスタートタンパク質のORF4タンパク質に関する。

40

従って、本発明との関係において用いられる語句“そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである”は、配列番号43に示したORF4タンパク質の配列に関する。

【0027】

第5の側面((e))によれば、本発明のPRRSウイルスは、アミノ酸位置50～67の間の5、6もしくは7以上のアミノ酸残基の欠失または好ましくは8、9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングがPRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、限定するもの

50

ではない例示的な実施形態においてアミノ酸位置50～67の間の7アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質が配列番号35のアミノ酸配列を含むORF4タンパク質である前記ORF4タンパク質を含む、遺伝子型II型PRRSウイルスである。

【0028】

別に、第5の側面((E))によれば、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、アミノ酸位置50～67の間の5、6もしくは7以上のアミノ酸残基の欠失または好ましくは8、9、10もしくは11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングがPRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、限定するものではない例示的な実施形態においてアミノ酸位置50～67の間の7アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質が配列番号35のアミノ酸配列を含むORF4タンパク質である前記ORF4タンパク質をコードする核酸分子を含む、遺伝子型II型PRRSウイルスである。 10

【0029】

本明細書においては、PRRSウイルスVR2332に関するアミノ酸位置のナンバリングは、PRRSウイルスVR2332の完全長ORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである。故に、本文脈で記述されているアミノ位置のナンバリングは、アミノ酸位置1(N末端)にメチオニン残基を含む178アミノ酸残基を有するVR2332ウイルスのORF4タンパク質に関する。

従って、本発明との関係において用いられる語句”そのアミノ酸位置のナンバリングが、178アミノ酸残基を有するPRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである”は、配列番号44に示したORF4タンパク質の配列に関する。 20

【0030】

第6の側面((f))によれば、本発明のPRRSウイルスは、側面(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかの組み合わせであり、本明細書においては、好ましくは側面(a)、(b)および(d)のいずれかの組み合わせであるか、または側面(a)、(c)および(e)のいずれかの組み合わせである。本文脈においては、語句”(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかの組み合わせ”ならびに”側面(a)、(b)、(c)、(d)および(e)のいずれかの組み合わせ”は、それぞれ、(a)、(b)、(c)、(d)および(e)の任意のPRRSウイルスの特徴の組み合わせを有するPRRSウイルスを意味し、本明細書においては、側面(a)、(b)および/または(c)のPRRSウイルスのいずれかの特徴の組み合わせまたは側面(a)、(c)および(e)のPRRSウイルスのいずれかの特徴の組み合わせが特に好ましい。 30

【0031】

別に、第6の側面((F))によれば、本発明のPRRSウイルスは、側面(A)、(B)、(C)、(D)および(E)のいずれかの組み合わせであり、本明細書においては、好ましくは、側面(A)、(B)および(D)のいずれかの組み合わせまたは側面(A)、(C)および(E)のいずれかの組み合わせである。本文脈においては、特に、語句”(A)、(B)、(C)、(D)および(E)のいずれかの組み合わせ”および”側面(A)、(B)、(C)、(D)および(E)のいずれかの組み合わせ”は、それぞれ、(A)、(B)、(C)、(D)および(E)の任意のPRRSウイルスの特徴の組み合わせを有するPRRSウイルスを意味し、本明細書においては、側面(A)、(B)および/または(D)のPRRSウイルスのいずれかの特徴の組み合わせまたは側面(A)、(C)および(E)のPRRSウイルスのいずれかの特徴の組み合わせが特に好ましいと理解される。 40

【0032】

本発明のPRRSウイルスは、好ましくは、

配列番号36のアミノ酸配列との少なくとも84.5%好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなるORF4タンパク質、または、

配列番号37の核酸配列との少なくとも83.5%好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むかもしくはそれ 50

からなるORF4タンパク質であって、前記PRRSウイルスが好ましくは遺伝子型I型PRRSウイルスであり、

前記PRRSウイルスが特に遺伝子型I型PRRSウイルスである前記ORF4タンパク質を含む。

【0033】

本明細書において、用語”配列番号36のアミノ酸配列との配列同一性”は、特に、それぞれ、用語”配列番号36の長さにわたる配列番号36のアミノ酸配列との配列同一性”または用語”配列番号36の全長にわたる配列番号36のアミノ酸配列との配列同一性”と同義であることは理解されよう。

さらにまた、本明細書において、用語”配列番号37の核酸配列との配列同一性”は、特に、それぞれ、用語”配列番号37の長さにわたる配列番号37の核酸配列との配列同一性”または用語”配列番号37の全長にわたる配列番号37の核酸配列との配列同一性”と同義であることは理解されよう。

本発明の第一の考慮態様との関係において、配列同一性は、プログレッシブアライメント(progressive alignment)(Feng, D. F. and Doolittle, R. F. (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*, 25(4):351-360、(参照により本願に組み込まれる))に基づくものとして理解される。本方法は、配列がアライメントに結び付けられ、次いでそれが他の配列またはアライメントに結び付けられてより広範なアライメントを形成することができるに基づく。この手順は、すべてのインプットされた配列が单一のマルチプルアライメントになるまで繰り返される。本発明の目的のために、配列同一性パーセントは、ソフトウェアCLC MAIN WORKBENCH 4.1.1 (CLC BIO)を用いて決定される。

【0034】

例示的な限定するものではない一実施形態において、本発明のPRRSウイルスは、そのゲノムが、配列番号38の核酸配列との少なくとも84.5%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸分子によってコードされるRNA分子を含む遺伝子型I型PRRSである。

本明細書において、用語”配列番号38の核酸配列との配列同一性”は、それぞれ、特に、用語”配列番号38の長さにわたる配列番号38の核酸配列との配列同一性”または用語”配列番号38の全長にわたる配列番号38の核酸配列との配列同一性”と同義であることは理解されよう。

他の好ましい側面によれば、本発明のPRRSウイルスは、妊娠雌豚の繁殖障害症状および/または子豚の呼吸障害症状を誘導することができる。

さらなる好ましい側面によれば、本発明のPRRSウイルスは、雄ブタの呼吸障害症状を誘導することができる。

従って、本発明のPRRSウイルスは、好ましくは感染性PRRSウイルスである。

本発明において、用語”感染性PRRSウイルス”は、特に、イノシシ科動物に感染し、関連疾患である豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)を誘導するPRRSウイルスとして理解される。

本発明のPRRSウイルスによるイノシシ科動物の前記感染は、特に、宿主細胞へのウイルスの結合、該細胞へのウイルスの侵入、該ビリオンのディスアセンブリー、該ウイルスゲノムの複製および転写、該ウイルスタンパク質の発現ならびに新規感染性ウイルス粒子のアセンブリおよび放出を含む。

【0035】

他の側面において、本発明はさらに、外因性RNAをその中に含むように遺伝子改変されたPRRSウイルス、好ましくは本発明のPRRSウイルスであって、外因性RNAが、前記ウイルスのORF4遺伝子に挿入され、外因性RNAが、好ましくは、

a)配列番号1～12または13～24からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする前記ウイルスのORF4遺伝子の領域；

b)野生型遺伝子型I型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間に位置する領域をコードする前記ウイルスのORF4遺伝子の領域；

10

20

30

40

50

- c) 野生型遺伝子型II型PRRSウイルスのORF4タンパク質と比較して、最初の2つの予測N末端シートの間に位置する領域をコードする前記ウイルスのORF4遺伝子の領域；
- d) アミノ酸位置50～71の間に位置する領域をコードする前記ウイルスのORF4遺伝子の領域であって、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記領域；または
- e) アミノ酸位置50～67の間に位置する領域をコードする前記ウイルスのORF4遺伝子の領域であって、そのアミノ酸位置のナンバリングが、PRRSウイルスVR2332のORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記領域、  
に挿入された前記ウイルスに関する。

## 【0036】

10

本明細書において、用語”外因性RNA”または”外因性核酸配列”は、特に、組換え配列などの外部起源からPRRSウイルスのゲノムに導入された核酸配列のことをいう。このような外部起源の例は、PRRSV由来配列だけでなく、非PRRSV由来配列も含む。さらに具体的には、外因性核酸配列の導入は、それぞれ、天然に存在しない部分を有するゲノムまたは遺伝子を生じる。本明細書において、用語”外因性RNA”は、従って、特に、PRRSウイルスゲノムにおいて天然には見いだされないヌクレオチド配列のことをいう。このような天然に存在しない部分または天然には見いだされない配列は、それぞれ、天然に存在する他のヌクレオチド配列への、天然に存在するヌクレオチド配列の1つの挿入の結果であることもできる。

本明細書においては、外因性RNAは、特に、対象エピトープ(epitope of interest)、生物学的反応調節因子、増殖因子、認識配列および融合タンパク質からなる群から選択される発現産物をコードし、前記対象エピトープは、好ましくは抗原または獣医学的病原体または毒素由来の対象エピトープである。

## 【0037】

20

好ましい一実施形態において、前記対象エピトープは、PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドであり、前記PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドは、特に、配列番号39に示す配列の少なくとも4連続アミノ酸残基を含むかもしくはそれからなり、または、さらに具体的には、前記PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドは、配列番号39のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。

他の好ましい実施形態において、前記対象エピトープは、異なるPRRSウイルス株のORF4タンパク質(GP4)の外部ドメインであり、前記異なるPRRSウイルス株のGP4の外部ドメインは、特に、配列番号40に示す配列の少なくとも4連続アミノ酸残基を含むかもしくはそれからなり、または、さらに具体的には、前記異なるPRRSウイルス株のGP4の外部ドメインは、配列番号40のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。

本発明はさらに、本明細書においては、医薬として使用するための、外因性RNAをその中に含むように遺伝子改変されたPRRSウイルスを提供する。

## 【0038】

30

本発明はまた、特に、動物に投与されたとき、前記PRRSウイルスが生得的にワクチン接種の効果を誘導する場合に、チャレンジウイルスとして使用するための本明細書に記載のPRRSウイルスを提供する。

本発明はさらに、特に、動物に投与されたとき、前記PRRSウイルスがワクチン接種の効果を誘導しない場合に、チャレンジウイルスとしての本発明のPRRSウイルスの使用を提供する。

本明細書においては、用語”動物”は、特にイノシシ科動物に関し、さらに具体的には豚、好ましくは家畜豚に関する。

好ましくは、PRRSウイルスは、それぞれ、鼻腔内、筋肉内、経口または子宮内経路で動物に投与されるべきであるかまたは投与される。

同様に、本発明は、検出マーカーとしての、好ましくは感染動物とワクチン接種動物(DIVA)との区別のための、本明細書に記載のPRRSウイルスの使用を提供する。

## 【0039】

40

50

さらなる側面によれば、本発明はまた、本明細書に記載のPRRSウイルスをコードするDNA分子であって、好ましくは単離されたDNA分子であり、および／または、好ましくは、配列番号38の核酸配列との少なくとも84.5%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、よりさらに好ましくは少なくとも97%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸分子を含む前記DNA分子に関する。

本発明はさらに、本明細書に記載のDNA分子を含むDNA構築物であって、前記DNA構築物が、特に、プラスミドなどのDNAベクターである前記DNA構築物を提供する。本発明のDNA分子を挿入することができるDNAベクターまたはプラスミドは、当業者には明らかであろう。本明細書においては、DNA構築物は、好ましくは単離されたDNA構築物である。本明細書において、用語“DNA分子を含む”は、特に、用語“DNA分子の配列を含む”と同義であることは理解されよう。 10

さらにまた、本発明は、本明細書に記載のDNA構築物のRNA転写産物であって、前記RNA転写産物が好ましくは単離されたRNA転写産物である前記RNA転写産物を提供する。

本発明はまた、本明細書に記載のDNA構築物でトランスフェクトされた細胞であって、前記細胞が、好ましくは単離された細胞である前記細胞を提供する。

さらにまた、本発明は、本明細書に記載のRNA転写産物でトランスフェクトされた細胞であって、前記細胞が、好ましくは単離された細胞である前記細胞を提供する。

#### 【0040】

本明細書においては、用語“細胞(単数または複数)”は、好ましくは哺乳動物細胞に関し、特にブタ細胞またはサル細胞、例えばMA-104細胞またはMARC-145細胞またはベロ細胞に関する。より好ましくは、用語“細胞(単数または複数)”は、PRRSウイルスの宿主細胞、すなわちブタマクロファージに関することは理解されよう。故に、本明細書においては、細胞は、好ましくはブタ細胞、サル細胞、MA-104細胞、MARC-145細胞、ベロ細胞およびブタマクロファージからなる群から選択される。 20

他の側面において、本発明は、本明細書に記載のPRRSウイルスを產生する方法であって、前記方法が、本明細書に記載のDNA構築物で細胞をトランスフェクトし、場合によりその細胞および／または培地からウイルスを採取する工程を含む前記方法を提供する。

他の側面において、本発明は、本明細書に記載のPRRSウイルスを產生する方法であって、前記方法が、本明細書に記載のRNA転写産物で宿主細胞をトランスフェクトし、場合によりその細胞および／または培地からウイルスを採取する工程を含む前記方法を提供する。 30

本明細書に記載の核酸/DNA分子の產生は、当該分野の技術の範囲内であり、とりわけ、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, et al., 2003, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis et al. (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego;およびErlich (ed), 1994, PCR Technology, Oxford University Press, New York に記載されている組換え技術に従って実施することができる(これらはすべて参考により本願に組み込まれる)。 40

#### 【0041】

##### 2. 本発明の第二の考慮態様

本セクションにおいて詳述される第二の考慮態様によれば、本発明は、一側面において、遺伝子型I型PRRSウイルスをコードし、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる核酸分子であって、

- 配列番号45の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第1核酸配列、
- 第1核酸配列の5'末端に隣接し、配列番号46の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第2核酸配列、
- 第1核酸配列の3'末端に隣接し、配列番号47の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第3核酸配列および
- 第3核酸配列の3'末端に隣接するポリアデニンヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含む前記分子を提供する。

【0042】

好ましくは、

-前記第1核酸配列は、配列番号45の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；および／または

-前記第2核酸配列は、配列番号46の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；および／または

-前記第3核酸配列は、配列番号47の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；および／または

-前記ポリアデニンヌクレオチド配列はnのアデニンヌクレオチドで構成され、ここでnは1と51の間の任意の整数であり、好ましくはnは12、13または14である。

本発明の核酸分子は、好ましくはDNA分子である。好ましくは、前記核酸分子は、単離された核酸分子である。

【0043】

本発明の文脈において、特に、用語“ポリアデニンヌクレオチド配列”は、それぞれ、用語“ポリアデニル酸配列”または“ポリA尾部”と同義であることは理解されよう。用語“アデニンヌクレオチド(単数または複数)”は、本明細書においては、特に、用語“デオキシアデニル酸(単数または複数)”と同義であることは理解されよう。

本明細書においては、語句“5'末端に隣接するヌクレオチド配列”は、特に、それぞれ、語句“その5'末端と共有結合したヌクレオチド配列”または語句“その3'末端ヌクレオチドが5'末端ヌクレオチドと共有結合したヌクレオチド配列”と同義であり、特に、前記2つの末端ヌクレオチドは、ペントースの5'炭素に結合したリン酸基と隣接ペントースの3'炭素原子との間で共有結合していることは理解されよう。

本明細書においては、特に、語句“3'末端に隣接するヌクレオチド配列”は、それぞれ、語句“3'末端と共有結合したヌクレオチド配列”または語句“その5'末端ヌクレオチドが3'末端ヌクレオチドと共有結合したヌクレオチド配列”と同義であり、特に、前記2つの末端ヌクレオチドは、ペントースの3'炭素原子と、隣接するペントースの5'炭素に結合したリン酸基との間で共有結合していることは理解されよう。

さらに、特に、本明細書において、語句“核酸配列との100%の配列同一性を有する”は、それぞれ、語句“の核酸配列と同一である”または“の核酸配列からなる”と同義であることは理解されよう。

特に好ましい側面において、本発明の核酸分子は、配列番号48の核酸配列との少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む。あるいは、特に好ましい側面において、前記核酸分子は、配列番号48の核酸配列との少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列のRNAコピーを含むかもしくはそれからなる。

【0044】

本明細書においては、用語“細胞(単数または複数)”は、好ましくは哺乳動物細胞に関し、特にブタ細胞またはサル細胞、例えばMA-104細胞またはMARC-145細胞またはベロ細胞に関する。より好ましくは、用語“細胞(単数または複数)”は、PRRSウイルスの宿主細胞、すなわちブタマクロファージに関することは理解されよう。故に、本明細書においては、細胞は、好ましくはブタ細胞、サル細胞、MA-104細胞、MARC-145細胞、ベロ細胞およびブタマクロファージからなる群から選択される。

本発明によれば、用語“生ウイルス”は、特に、(不活化(死滅)ウイルスとは対照的に)適切な被験者に感染する能力を有し、および／またはその感染性が天然ウイルスと同様または同一であるPRRSウイルスとして理解される。特に、生ウイルスは、その天然宿主細胞に感染することができる。

【0045】

10

20

30

40

50

本発明の核酸分子によって產生されるPRRSウイルスによる宿主細胞の前記感染は、特に、宿主細胞へのウイルスの結合、該細胞へのウイルスの侵入、該ビリオンのディスアセンブリー、該ウイルスゲノムの複製および転写、該ウイルスタンパク質の発現ならびに新規感染性ウイルス粒子のアセンブリおよび放出を含む。本発明の核酸分子によって產生されるPRRSウイルスによる宿主細胞の前記感染はさらに、好ましくは、特に、機能性RNA分子を生じるBHK細胞におけるcDNA配列の転写、前記RNA分子による培養細胞、好ましくはブタ細胞、サル細胞、MA-104細胞、MARC-145細胞、ベロ細胞およびブタマクロファージのトランスフェクション、前記培養細胞におけるウイルス複製による生ビリオンの產生、このようなビリオンの単離ならびに宿主細胞の感染を含む。

特に、本発明の核酸分子は、好ましくは弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする。  
または、本発明の核酸分子は、それぞれ、細胞にトランスフェクトしたとき弱毒生ウイルスを產生することができる。

さらに具体的には、本発明の核酸分子は、イノシシ科動物において重篤な豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)を誘導することができない遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする。または、本発明の核酸分子は、それぞれ、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができ、ここで前記生ウイルスは、悪性の野外PRRSウイルスによって引き起こされるようなイノシシ科動物の重篤な野生型ウイルス様豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)を誘導することができない。

#### 【0046】

特定の一実施形態において、本発明の核酸分子は、MA104細胞に感染後24時間以内に、1ミリリットル(ml)当たり少なくとも $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)の力値に達することができる遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする。ここで前記MA104細胞は、好ましくは、0.001~0.1のMOI(感染多重度)で前記ウイルスに感染させる。

特に、本発明の核酸分子は、MA104細胞に感染後48時間以内に1ミリリットル(ml)当たり $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 以上の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)の力値に達することができる遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする。ここで前記MA104細胞は、好ましくは0.001~0.1のMOI(感染多重度)で前記ウイルスに感染させる。

従って、本発明の核酸分子は、好ましくは、MOI(感染多重度)0.001~0.1で、特に、MOI 0.001または0.01または0.1で、

-MA104細胞に感染後24時間以内に1ミリリットル(ml)当たり少なくとも $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)の力値に達することができ、および/または  
-MA104細胞に感染後48時間以内に1ミリリットル(ml)当たり少なくとも $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)に達することができる  
遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする。

本明細書に記載のPRRSウイルスとの関係において、用語”遺伝子型I型”は、PRRSVとの関係において文献に頻繁に使用される語”遺伝子型1型”または”1型”または”ヨーロッパ型(EU型)”とは同義であると理解されよう。

#### 【0047】

他の好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号48に示す核酸配列との少なくとも99.1%または99.2%、好ましくは少なくとも99.3%または99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%または99.6%、よりさらに好ましくは少なくとも99.8%または99.9%、特に好ましくは少なくとも99.95%の配列同一性を有する核酸配列を含む。

本発明の第二の考慮態様との関係において、配列同一性は、対比較で求めたヌクレオチド配列間の類似度に基づくものと理解される。2つの配列間の同一性パーセントの決定は、好ましくは、数学的アルゴリズム、特に、公知のSmith-Watermanアルゴリズム(Smith and Waterman, M. S. (1981) J Mol Biol, 147(1):195-197)を用いて達成される。本発明の目的上、ヌクレオチド配列の配列同一性パーセントは、Smith-Watermanホモロジー検索アルゴリズムを用い、ギャップ開始ペナルティ:25、ギャップ伸長ペナルティ:5を用いて決定される。Smith-Watermanホモロジー検索アルゴリズムは、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2:482-489に教示されている(参照により本願に組み込まれる)。こ

10

20

30

40

50

のような配列同一性の決定は、例えば、TimeLogic Version GからのDeCypher Hardware Acceleratorを用いて行うことができる。あるいはこのような配列同一性は、ソフトウェア CLC MAIN WORKBENCH 4.1.1 (CLC BIO)によって決定される。

#### 【0048】

本明細書において、特に、用語”配列番号Yの核酸配列との少なくともX%の配列同一性を有する”(または代わりに、用語”配列番号Yに示す核酸配列との少なくともX%の配列同一性を有する”)は、それぞれ、用語”配列番号Yの長さにわたる配列番号Yの核酸配列との少なくともX%の配列同一性を有する”または用語”配列番号Yの全長にわたる配列番号Yの核酸配列との少なくともX%の配列同一性を有する”と同義であることは理解されよう。これに関連して、”X”は、95~100の任意の数、特に95~99から選択される任意の整数であり、”X%の配列同一性”は、本明細書に記載の配列同一性パーセントのいずれかを表す。これに関連して、それぞれ、”Y”は、1~6から選択される任意の整数であり、”配列番号Y”は、本明細書に記載の配列番号を表す。

特に好ましい一実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号48の核酸配列を含む。

他の好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、イノシシ科動物において豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)を誘導することができない遺伝子型I型PPRSウイルスをコードする。または、それぞれ、本発明の核酸分子は、細胞にトランスフェクトしたとき、生ウイルスを生成することができ、ここで前記感染性ウイルスは、イノシシ科動物において、豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)を誘導することができない。

#### 【0049】

本明細書において、用語”豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)を誘導することができない”は、特に、野生型PPRSウイルスと比較して、それぞれ、例えば子豚の肺病変、妊娠雌豚の繁殖障害および/または長期のPRRSVウイルス血症などのPRRSの臨床徴候またはPRRSV感染症に関連する徴候が低下することをいう。一側面において、イノシシ科動物のPPRSを誘導することができない遺伝子型I型PPRSウイルスは、従って、イノシシ科動物に投与された野生型PPRSウイルスと比較して、イノシシ科動物に投与されたとき1以上の臨床徴候の低下を示すウイルスである。本明細書においては、特に、用語”野生型PPRSウイルス”は、野生型遺伝子型I型PPRSウイルスに関する。

本発明はさらに、本発明の核酸分子を含むDNA構築物であって、前記DNA構築物が、特にDNAベクター、例えばプラスミドである前記DNA構築物を提供する。本発明のスクレオチド分子を挿入することができるDNAベクターまたはプラスミドは、当業者には明らかであろう。本明細書においては、DNA構築物は、好ましくは単離されたDNA構築物である。本明細書において、用語”核酸分子を含む”または”DNA分子を含む”は、それぞれ、特に、用語”核酸分子の配列を含む”または”DNA分子の配列を含む”とそれぞれ同義であることは理解されよう。

さらにまた、本発明は、本明細書に記載のDNA構築物のRNA転写産物であって、前記RNA転写産物が好ましくは単離されたRNA転写産物である前記RNA転写産物を提供する。

#### 【0050】

本発明はまた、本明細書に記載のDNA構築物でトランスフェクトされた細胞であって、前記細胞が、好ましくは単離された細胞である前記細胞を提供する。

従って、本発明はまた、前述の細胞によって產生される遺伝子型I型PPRSウイルスであって、前記遺伝子型I型PPRSウイルスが、好ましくは単離された遺伝子型I型PPRSウイルスである前記遺伝子型I型PPRSウイルスを提供する。

さらにまた、本発明は、本明細書に記載のRNA転写産物でトランスフェクトされた細胞であって、前記細胞が、好ましくは単離された細胞である前記細胞を提供する。

故に、本発明はまた、前述の細胞によって產生される遺伝子型I型PPRSウイルスであって、前記遺伝子型I型PPRSウイルスが、好ましくは単離された遺伝子型I型PPRSウイルスである遺伝子型I型PPRSウイルスを提供する。

#### 【0051】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、遺伝子型I型PRRSウイルスであってそのゲノムが本発明の核酸分子を含むか、またはそのゲノムが本発明の核酸分子によってコードされるRNA分子を含む遺伝子型I型PRRSウイルスであって、前記遺伝子型I型PRRSウイルスが、好ましくは単離された遺伝子型I型PRRSウイルスである前記伝子型I型PRRSウイルスを提供する。

他の側面において、本発明は、遺伝子型I型PRRSウイルスを產生する方法であって、前記方法が、本明細書に記載のDNA構築物で細胞をトランスフェクトすることを含む前記方法を提供する。

さらに、本発明は、遺伝子型I型PRRSウイルスを產生する方法であって、前記方法が、本明細書に記載のRNA転写産物で細胞をトランスフェクトすることを含む前記方法を提供する。

さらに他の側面において、本発明は、組成物であって、前記組成物が、適切な量の薬学的に許容される希釈剤または賦形剤に懸濁した本発明の核酸分子を含む前記組成物を提供する。

#### 【0052】

本明細書に記載の核酸分子の產生は、当該分野の技術の範囲内であり、とりわけ、Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, et al., 2003, *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Innis et al. (eds), 1995, *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., San Diego; およびErlich (ed), 1994, *PCR Technology*, Oxford University Press, New York に記載されている組換え技術に従って実施することができる(これらはすべて参照により本願に組み込まれる)。

さらに他の側面において、本発明はさらに、弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを產生するための、本発明の核酸分子または本明細書に記載のDNA構築物の使用であって、前記核酸分子または前記DNA構築物に1以上の変異が導入された前記核酸分子または前記DNA構築物の使用に関する。

本発明はまた、弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを產生する方法であって、本発明の核酸分子または本明細書に記載のDNA構築物に1以上の変異を導入する工程を含む前記方法を提供する。

好ましくは、本明細書に記載の1以上の変異は、配列番号45の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第1核酸配列に導入される。

用語”弱毒PRRSウイルス”は、本明細書において、特に、*in vitro*および/または*in vivo*での弱毒化されたPRRSウイルスに関し、さらに具体的には感受性細胞株および/または感受性宿主での弱毒化されたPRRSウイルスに関する

#### 【0053】

本明細書において、用語”宿主”は、特に、PRRSウイルスに感染可能な動物、特にイノシシ科動物に関し、さらに具体的には豚、例えば家畜豚に関する。

本明細書において、”弱毒”は、特に、病原体、特に野生型PRRSウイルスのビルレンス低下に関する。ここで”ビルレンス”は、病原性の程度であると理解され、”病原性”は、宿主または宿主の子孫における臨床徵候、例えば繁殖障害を誘導する病原体の能力に関する。

用語”野生型PRRSウイルス”または”野生型PRRSV”は、それぞれ本明細書において、特に、とりわけイノシシ科動物においてPRRSを誘導することができる感染性病原性PRRSウイルスに関する。特に好ましい一実施形態において、用語”野生型PRRSウイルス”は、ゲノムがRNA配列を含むかまたはRNAポリヌクレオチドからなるPRRSウイルスであって、前記RNA配列またはRNAポリヌクレオチドが、配列番号41(レリストットウイルス完全ゲノムに対応する)のRNAコピーである前記PRRSウイルスに関する。

好ましくは、1以上の変異は、本明細書においては、1以上の点突然変異および/もしくは1以上のゲノム欠失および/もしくは1以上の挿入を含むかまたはそれからなる。

#### 【0054】

10

20

30

40

50

また、本発明は、ゲノムが本発明の核酸分子によってコードされるRNA分子を含む弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスであって、配列番号45の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する前記第1核酸配列が、コードされるPRRSウイルスを弱毒化し、および/またはコードされるPRRSウイルスを無力化して、前記ウイルスによって感染した細胞によるI型インターフェロンの産生および分泌を抑制する1以上の変異を含み、前記弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスが、好ましくは単離された弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスである前記弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを提供する。

本発明はさらに、医薬、特にワクチンもしくはワクチン組成物の製造のための本明細書に記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスの使用であって、例えば、PRRSV感染症の臨床徴候を低下させることによって、例えばPRRSVウイルス血症の持続期間を短縮することによって、PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防するための前記使用を提供する。

用語”予防すること”または”低下させること”は、それぞれ、本明細書において、限定するものではないが、PRRSV抗原、すなわち本明細書に記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスの動物への投与を含むプロセスであって、前記PRRSV抗原が前記動物に投与されたとき、前記動物においてPRRSVに対する免疫応答を誘発するかまたは誘発することができる前記プロセスを意味する。概して、このような治療は、それぞれ、PRRSの臨床徴候またはPRRSV感染症に関連する徴候の低下をもたらす。より具体的には、用語”予防することは”、本明細書において、一般に、疾患プロセス(PRRS)の誘発または発症の前に本発明の免疫原性組成物に動物が暴露される予防のプロセスを意味する。

#### 【0055】

本明細書においては、”PRRSV感染症の臨床徴候を低下させること”は、限定するものではないが、野生型PRRSウイルス感染症と比較して、ある群における感染した被験者の数を低下させるか、感染症の臨床徴候を示す被験者の数を低下させるかもしくはなくさせるか、または被験者に存在する任意の臨床徴候の重症度を低下させることを意味する。例えば、それは、当然ながら、病原体負荷、病原体排出の任意の低下、病原体伝播の低下、またはPRRSV感染症、特に繁殖障害および/肺病変の誘発に特有な任意の臨床徴候の低下を指す。好ましくはこれらの臨床徴候は、本組成物の投与を受けず、感染する可能性のある被験者と比較して、本発明の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスの投与を受けた被験者において少なくとも10%低下する。より好ましくは、本発明の組成物の投与を受けた被験者において、臨床徴候は、少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、よりさらには少なくとも50%、よりさらに好ましくは少なくとも60%、よりさらに好ましくは少なくとも70%、よりさらに好ましくは少なくとも80%、よりさらに好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは100%低下する。

用語”被験者”は、本明細書においては、特に動物に関する。

用語”動物”は、本明細書において特にイノシシ科動物に関し、さらに具体的には豚、好ましくは家畜豚に関する。

#### 【0056】

用語”PRRSVウイルス血症の持続期間を短縮すること”は、限定するものではないが、組成物の投与を受けず、野生型PRRSVに感染する可能性のある被験者と比較して、ある動物の血流に侵入したPRRSウイルスの持続期間を少なくとも1日短縮することを意味する

用語”ウイルス血症”は、例えば血清中のPRRSV RNAコピー数の検出によって反映される感染動物の血液中のPRRSVの存在のことを行う。

また、本発明は、適切な量の薬学的に許容される希釈剤または賦形剤に懸濁した本明細書に記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを含むワクチン組成物に関する。

本明細書においては、1以上の薬学的に許容される担体または賦形剤は、好ましくは、溶媒、分散媒、アジュバント、安定化剤、希釈剤、防腐剤、抗菌剤、抗真菌薬、等張剤および吸着遲延剤からなる群から選択される。

#### 【0057】

好ましい一側面において、本発明の免疫原性組成物は、1用量当たり本明細書に記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを $10^1$ ~ $10^7$ ウイルス粒子の量含み、好ましくは1用量当たり

10

20

30

40

50

$10^3 \sim 10^6$ 粒子、より好ましくは1用量当たり $10^4 \sim 10^6$ 粒子の量含む。

他の好ましい側面において、本発明の免疫原性組成物は、1用量当たり少なくとも約 $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL、好ましくは1用量当たり $10^3 \sim 10^5$ TCID<sub>50</sub>/mLのウイルス力価と同等な本発明のPRRSウイルスの量を含む。

【0058】

本明細書において、用語”ワクチン組成物”は、特に、その組成物に暴露された動物において防御免疫応答を誘発する組成物のことをいう。免疫応答は、抗体の誘発および/またはT細胞応答の誘発を含むことができる。

通例、”免疫応答”は、限定するものではないが、以下の効果の1以上を含む：対象組成物もしくはワクチンに含まれる抗原(单数または複数)に特異的に結合する抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞および/もしくは細胞傷害性T細胞の產生または活性化。好ましくは、該宿主は、新規感染症に対する抵抗性が増し、および/またはその疾患の臨床的重症度が低下するような治療または防御免疫(記憶)応答のいずれかを示すこのような防御は、ウイルス血症の発症の遅延、ウイルス持続感染の短縮化、全ウイルス量の低下および/またはウイルス排出の低下において、その病原体の感染症に関連する臨床徴候の数もしくは重症度の低下またはそれらの1以上の欠如のいずれかによって明らかにされる。

従って、”免疫応答”は、特に、限定するものではないが、対象組成物またはワクチンに対する細胞性および/または抗体性免疫応答のサブセットの発生を意味する。

【0059】

さらにまた、本発明は、例えば、PRRSV感染症の臨床徴候を低下させることによって、例えばPRRSVウイルス血症の持続期間を短縮することによって、PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防する方法に使用するための本発明のワクチン組成物に関する。

さらに、本発明は、PRRSV感染症の臨床徴候を低下させることによって、例えばPRRSVウイルス血症の持続期間を短縮することによって、PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防する方法であって、前記方法が、それを必要とする動物に本発明のワクチンを投与する工程を含む前記方法を提供する。

【0060】

本発明の第二の考慮態様に記載の実施形態

以下の項目もまた本明細書に記載されている：

項目1. 遺伝子型I型PRRSウイルスをコードし、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる核酸分子であって、

-配列番号45の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第1核酸配列、

-第1核酸配列の5'末端に隣接し、配列番号46の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第2核酸配列、

-第1核酸配列の3'末端に隣接し、配列番号47の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する第3核酸配列および

第3核酸配列の3'末端に隣接するポリアデニンヌクレオチド配列を含む前記分子。

項目2. -前記第1核酸配列が、配列番号45の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；および/または

-前記第2核酸配列が、配列番号46の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；かつ/または

-前記第3核酸配列が、配列番号47の核酸配列との少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、よりさらに好ましくは少なくとも99%、特に好ましくは100%の配列同一性を有し；および/または

-前記ポリアデニンヌクレオチド配列がnのアデニンヌクレオチドで構成され、ここでnは1と51の間の任意の整数であり、好ましくはnは12、13または14である、項目1に記載の核酸

10

20

30

40

50

分子。

項目3. 前記ウイルスが弱毒化され、および／または前記ウイルスが、イノシシ科動物の豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)ウイルス感染後の疾患の呼吸障害および／または繁殖障害徴候に対して防御免疫応答を誘導することができる、項目1または2に記載の核酸分子。

項目4. 前記ウイルスが、好ましくはMOI(感染多重度)0.001～0.1でMA104細胞に感染後24時間以内に、1ミリリットル(mL)当たり少なくとも $5 \times 10^5$ ～ $1 \times 10^6$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)の力値に達することができる、項目1～3のいずれか1つに記載の核酸分子。

項目5. 前記ウイルスが、好ましくはMOI(感染多重度)0.001～0.1でMA104細胞に感染後48時間以内に、1ミリリットル(mL)当たり少なくとも $5 \times 10^6$ ～ $1 \times 10^7$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)の力値に達することができる、項目1～4のいずれか1つに記載の核酸分子。 10

項目6. 前記分子が、配列番号48の核酸配列との少なくとも91%または92%、好ましくは少なくとも93%または94%、より好ましくは少なくとも95%または96%、よりさらに好ましくは少なくとも98%または99%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目1～5のいずれか1つに記載の核酸分子。

項目7. 前記分子が、配列番号48の核酸配列との少なくとも99.1%または99.2%、好ましくは少なくとも99.3%または99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%または99.6%、よりさらに好ましくは少なくとも99.8%または99.9%、特に好ましくは少なくとも99.95%の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目1～6のいずれか1つに記載の核酸分子。

項目8. 前記分子が、配列番号48の核酸配列を含む、項目1～7のいずれか1つに記載の核酸分子。 20

項目9. 前記ウイルスが、悪性の野外PPRSウイルスによって引き起こされるようなイノシシ科動物の重篤な豚繁殖・呼吸障害症候群(PPRS)を誘導することができない、項目1～8のいずれか1つに記載の核酸分子。

項目10. 前記分子がDNA分子である、項目1～9のいずれか1つに記載の核酸分子。

項目11. 項目10に記載のDNA分子を含むDNA構築物。

項目12. 項目11に記載のDNA構築物のRNA転写産物。

項目13. 項目11に記載のDNA構築物でトランスフェクトされた細胞。

項目14. 項目12に記載のRNA転写産物でトランスフェクトされた細胞。

項目15. 項目13に記載の細胞によって產生される遺伝子型I型PPRSウイルス。

項目16. 項目14に記載の細胞によって產生される遺伝子型I型PPRSウイルス。 30

項目17. ゲノムが、項目1～9のいずれか1つに記載の核酸分子を含むか、またはゲノムが、項目1～10に記載の核酸分子によってコードされるRNA分子を含む遺伝子型I型PPRSウイルス。

項目18. 項目11に記載のDNA構築物で細胞をトランスフェクトすることを含む、遺伝子型I型PPRSウイルスを產生する方法。

項目19. 項目12に記載のRNA転写産物で宿主細胞をトランスフェクトすることを含む、遺伝子型I型PPRSウイルスを產生する方法。

項目20. 適切な量の薬学的に許容される希釈剤または賦形剤に懸濁した、項目1～10のいずれか1つに記載の核酸分子を含む組成物。

項目21. 弱毒遺伝子型I型PPRSウイルスを產生するための、項目1～10のいずれか1つに記載の核酸分子または項目11に記載のDNA構築物の使用であって、1以上の変異が前記核酸分子または前記DNA構築物に導入されている、前記使用。 40

項目22. 項目1～10のいずれか1つに記載の核酸分子または項目11に記載のDNA構築物に1以上の変異を導入する工程を含む、弱毒遺伝子型I型PPRSウイルスを產生する方法。

項目23. ウィルスゲノムが、項目1～10のいずれか1つに記載の核酸分子によってコードされるRNA分子を含む弱毒遺伝子型I型PPRSウイルスであって、配列番号45の核酸配列との少なくとも95%の配列同一性を有する前記第1核酸配列が、コードされるPPRSウイルスを無力化して前記ウイルスによって感染された細胞によるI型インターフェロンの產生および分泌を抑制する1以上の変異を含む、前記弱毒遺伝子型I型PPRSウイルス。

項目24. PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防するための医薬の製造のための、項目21 50

~23のいずれか1つに記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスの使用。

項目25. 適切な量の薬学的に許容される希釈剤または賦形剤に懸濁した、項目21~23のいずれか1つに記載の弱毒遺伝子型I型PRRSウイルスを含むワクチン組成物。

項目26. PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防する方法に使用するための、項目25に記載のワクチン組成物。

項目27. PRRSV感染症の臨床徴候から動物を予防する方法であって、それを必要とする動物に、項目26に記載のワクチン組成物を投与する工程を含む前記方法。

#### 【0061】

##### 3. 本発明の第三の考慮態様

本セクションにおいて詳述される第三の考慮態様によれば、本発明は、本発明の第一の考慮態様を本発明の第二の考慮態様と組み合わせることができるという所見に基づく。従って、本発明の第三の考慮態様は、(1)本発明の第一の考慮態様の側面および実施形態と(2)本発明の第二の考慮態様の側面および実施形態との組み合わせに関する。故に、本発明の第一の考慮態様の全ての可能な特徴および定義、特に遺伝子型I型PRRSウイルスに関する特徴および定義は、本発明の第二の考慮態様のすべての特徴および定義と任意に組み合わせできることは理解されよう。

一側面において、本発明の第二の考慮態様に記載の核酸分子は、従って、請求項36~42のいずれか1つに記載の本発明の第一の考慮態様に記載の豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)ウイルスをコードする。

他の側面において、それぞれ、本発明の第一の考慮態様に記載の豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)ウイルスは、従って、請求項56または57に記載の本発明の第二の考慮態様に記載の核酸分子によってコードされる。

故に、本発明の第一の考慮態様の全ての可能な側面と本発明の第二の考慮態様の全ての可能な側面との組み合わせは、特に、前記請求項およびそれに従属する請求項にも反映される。

#### 【0062】

さらにまた、本発明は、そのゲノムが、遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする核酸分子によってコードされ、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる遺伝子型I型PRRSウイルス、特に前述のPRRSウイルスであって、前記分子が、配列番号48の核酸配列との少なくとも91%または92%、好ましくは少なくとも93%または94%、より好ましくは少なくとも95%または96%、よりさらに好ましくは少なくとも98%または99%、特に好ましくは少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸配列が、アミノ酸位置50~71の間の9、10または11以上のアミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含む前記ウイルスの產生をもたらす変異を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記ウイルスに関する。

本発明はまた、ゲノムが遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする核酸分子によってコードされ、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる遺伝子型I型PRRSウイルスであって、前記分子が、配列番号48の核酸配列と少なくとも91%または92%、好ましくは少なくとも93%または94%、より好ましくは少なくとも95%または96%、よりさらに好ましくは少なくとも98%または99%、特に好ましくは少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸配列が、アミノ酸位置50~71の間の11、12、13、14、15、16もしくは17アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含む前記ウイルスの產生をもたらす変異を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記ウイルスに関する。

#### 【0063】

本発明はさらに、ゲノムが遺伝子型I型PRRSウイルスをコードする核酸分子によってコードされ、細胞にトランスフェクトしたとき生ウイルスを生成することができる遺伝子型I型PRRSウイルスであって、前記分子が、配列番号48の核酸配列と少なくとも91%または92%

10

20

30

40

50

%、好ましくは少なくとも93%または94%、より好ましくは少なくとも95%または96%、よりさらに好ましくは少なくとも98%または99%、特に好ましくは少なくとも99%または100%の配列同一性を有する核酸配列を含み、前記核酸配列が、アミノ酸位置56～70の間またはアミノ酸位置57～69の間の13アミノ酸残基の欠失を有するORF4タンパク質を含む前記ウイルスの產生をもたらす変異を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである前記ウイルスを考える。

前記変異は、本明細書において、好ましくは欠失である。

【0064】

好ましくは、本発明のPRRSウイルスは、外因性RNAをその中に含むように遺伝子改変され、前記外因性RNAは前記ウイルスorf4遺伝子に挿入され、前記外因性RNAは、特に、アミノ酸位置50～71の間に位置する領域をコードする前記ウイルスのorf4遺伝子の領域に挿入され、そのアミノ酸位置のナンバリングは、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングである。

他の好ましい側面において、前記外因性RNAは、前記ウイルスのorf4遺伝子に挿入され、本発明の文脈において、欠失されるアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列と置換される。

さらなる好ましい側面によれば、前記外因性RNAは、対象エピトープ、生物学的反応調節因子、増殖因子、認識配列、融合タンパク質からなる群から選択される発現産物をコードし、ここで対象エピトープは、好ましくは抗原または獣医学的病原体または毒素由来の対象エピトープである。

特に、前記対象エピトープは、PRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるペプチドであるか、またはPRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされるアミノ酸配列であり、ここでPRRSウイルスのorf5遺伝子によってコードされる前記ペプチドまたはアミノ酸配列は、好ましくは配列番号39もしくは配列番号50のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなり、または好ましくは配列番号39もしくは配列番号50に示す配列の少なくとも4連続アミノ酸残基を含むかもしくはそれからなり、または好ましくは配列番号51もしくは配列番号52のアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる。

【0065】

他の好ましい側面によれば、前記外因性RNAは、配列番号53～55からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする。

特に好ましい側面において、本発明は、限定するものではない例として、ウイルスゲノムが、配列番号56～59のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列を含む核酸分子によってコードされる遺伝子型I型PRRSウイルスを提供する。

前記ウイルスが単離されたウイルスであり、および/または前記変異が欠失である、請求項58～73のいずれか1つに記載のPRRSウイルス。

PRRSウイルスは、本明細書においては、好ましくは単離されたウイルスであり、および/または天然に存在しないウイルスである。

さらにまた、本発明は、遺伝子型I型PRRSウイルスであって、前記ウイルスが、アミノ酸位置56にプロリン残基を有し、および/またはアミノ酸位置66にグルタミン残基を有するORF4タンパク質を含み、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列が配列番号43に示す配列である前記ウイルスに関する。

【0066】

本発明はまた、そのゲノムが、アミノ酸位置56にプロリン残基を有し、および/またはアミノ酸位置66にグルタミン残基を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含む遺伝子型I型PRRSウイルスであって、そのアミノ酸位置のナンバリングが、レリスタートウイルスのORF4タンパク質のアミノ酸配列を参照するナンバリングであり、前記ウイルスのゲノムが、好ましくは核酸分子によってコードされ、前記分子が、配列番号45または配列番号48の核酸配列と少なくとも91%または92%、好ましくは少なくとも93%または94%、より

10

20

30

40

50

好ましくは少なくとも95%または96%、よりさらに好ましくは少なくとも98%または99%、特に好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列を含む前記遺伝子型I型PRRSウイルスに関する。

ゲノムがアミノ酸位置56にプロリン残基を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むこのような遺伝子型I型PRRSウイルスは、例示的な限定するものではない側面において、ゲノムが核酸配列配列番号58を含む核酸分子によってコードされるPRRSウイルスである。

#### 【 0 0 6 7 】

他の例示的な限定するものではない側面において、ゲノムがアミノ酸位置66にグルタミン残基を有するORF4タンパク質をコードする核酸分子を含むこのような遺伝子型I型PRRSウイルスは、ゲノムが核酸配列配列番号57を含む核酸分子によってコードされるPRRSウイルスである。

本発明のPRRSウイルスは、好ましくは、医薬として使用されるか、または特にイノシシ科動物において豚繁殖・呼吸障害症候群の予防または治療に使用され、場合により、前記ウイルスは、それぞれ、鼻腔内、筋肉内、経口または子宮内経路で動物に、特に豚に、投与されるべきであるかまたは投与される。

本開示を通じて言及されている医薬は、好ましくはワクチンである。

他の側面によれば、好ましくは、本発明のPRRSウイルスは、好ましくは感染動物とワクチン接種動物(DIVA)との区別のための検出マーカーとして用いられる。

よりさらなる側面において、本発明は、本発明のPRRSウイルスをコードするDNA分子であって、前記DNA分子が、好ましくは配列番号56～58からなる群から選択される配列を有する核酸分子を含む前記DNA分子に関する。

よりさらなる側面において、本発明は、好ましくは前記DNA分子を含む単離されたDNA構築物に関し、好ましくはその単離されたRNA転写産物に関する。

さらに他の側面によれば、本発明はまた、好ましくは、前記DNA構築物または前記RNA転写産物でトランスフェクトされた単離された細胞に関する。

本発明はさらに、本発明のPRRSウイルスを產生する方法であって、前記方法が、前記DNA構築物で細胞をトランスフェクトする工程または前記RNA転写産物で宿主細胞をトランスフェクトする工程を含む前記方法に関する。

#### 【 0 0 6 8 】

結論として、PRRSウイルス、例えば遺伝子型IV型PRRSのGP4の外部ドメインをコードする配列に本発明に記載の範囲で欠失を挿入する可能性を有するという知識は、いまや多くの有益な用途を提供する：

-この知識に基づくウイルスは、非経口、経口、鼻腔内、子宮内感染症のためのチャレンジ分離株として、さらにPRRSV陽性種およびPRRSVナイーブ種および/またはPRRSV感受性種の精子による感染症のためのチャレンジ分離株として用いることができる。

-本発明は、それぞれの部位に欠失がすでに存在するか否かにかかわらず、遺伝子型II型のPRRSV株に対するそれぞれ考えられるPRRSV株の血清学的分化または配列分化のための欠失マーカー(DIVA概念)を提供する。

-さらにまた、他のエピトープと関連して、またはそれと組み合わせて、血清学的分化のための欠失マーカーが提供される。例えば、このエピトープに対する抗体を用いることによって、これらのエピトープ(例えば、配列番号43に含まれているレリスタートGP4のaa60～aa71:AAQEK1SFGKS)の完全または部分欠失を有するPRRSウイルスから欠失のないPRRSウイルスを血清学的に区別することができる。例えば、この領域/ドメインに欠失を有する2つのPRRSウイルスは、他のエピトープと組み合わせて互いに識別することができる。

#### 【 0 0 6 9 】

本発明はさらに、本発明の欠失が位置する部位(GP4の外部ドメイン)におけるウイルスRNAの代わりの、外来RNAの導入のための挿入領域/ドメインを提供する。

前記挿入は、種々の目的で、あらゆる考えられるPRRSV株に対して行うことができ、また、この領域にすでに小さな欠失を有する遺伝子型II型のPRRSV株に対しても行うことが

10

20

30

40

50

できる。

前記外来配列の挿入は、例えば本明細書に記載のPRRSV遺伝子型I型株BI EUにおいて行って、前記株のGP4の外部ドメインをコードする配列を、アミノ酸(aa)配列aa54～aa70(QS HRASTAQGTTPLRRS(配列番号40))またはその短縮もしくは変異誘導体で置換することができる。

#### 【0070】

さらに、免疫応答の改善のために、

a)PRRSVの他の遺伝子/ゲノム領域から、例えば(i)本明細書に記載のPRRSV遺伝子型I型株B I EUの糖タンパク質5(aa)をコードする領域から、例えば、アミノ酸(aa)aa36～aa52(SSHL QL1YNLTICELNG(配列番号39))またはその短縮もしくは変異誘導体をコードする配列に適切なリンカー(単数または複数)、例えばaaモチーフGSSを付けて；従って他のPRRSV分離株、例えばPRRSV遺伝子型I型原型分離株レリストットから、従って他のPRRSV遺伝子型、例えばPRRSV遺伝子型II型原型分離株VR2332から；

10

b)他の病原体、例えば他のイノシシ科動物病原体から、前記病原体(単数または複数)に対する免疫応答を確立または促進するために；

c)遺伝学的もしくは血清学的陽性マーカーとして、非PRRSV特異的T細胞もしくはB細胞エピトープから、a)とも組み合わせて；

d)a)とは異なる免疫促進物質、例えばサイトカイン、例えばインターロイキンから、b)とも組み合わせて、

1以上の連続したT細胞またはB細胞エピトープを挿入することも可能である。

20

免疫応答の改善のために、そのウイルスの病原性を低下させるために、1以上の連続したT細胞またはB細胞エピトープを挿入することも可能である。

#### 【実施例1】

#### 【0071】

a)PRRSVの単離

PRRSV EU型検出PCRで以前に検査陽性であった血液試料(bS-720789)からPRRSVが単離された。ウイルスの単離はMA104細胞で行った。MA104細胞で単離されたEU型PRRSVを増殖させた後、ショ糖クッショングで超遠心分離し、次いでRNアーゼ処理し、DNアーゼ処理して、全ゲノム配列決定のためのウイルスストックを調製した。最後に、このウイルスストックからウイルスRNAを抽出し、全ゲノム配列決定(Roche 454プラットフォーム)にかけた。得られたゲノム配列(14854ヌクレオチド)をレリストット株のEU型参照ゲノム配列と比較して、ORF4における33ヌクレオチドの欠失が明らかになった。

30

#### 【0072】

b)感染

a)のウイルスによる雄ブタの感染によって、重篤なPRRS臨床徴候が生じる。

#### 【実施例2】

#### 【0073】

a)新規感染性EU型PRRSV cDNAクローンの作製と解析

本実施例において、新規感染性EU型PRRSV cDNAクローン(以後"BI EU"と呼ぶ)の作製と解析について説明する。BI EUは、弱毒EU型PRRSV株に基づいているが同一ではなく、又クレオチドレベルで、それぞれ、EU型原型株レリストットウイルスとは89%同一であり、感染性EU型PRRSV cDNAクローンLoN94-13(WO 2013017568 A1)のPRRSV cDNAインサートとは87%同一である。BI EUのcDNA配列は配列番号48で示される。

40

合成したキャップ構造を持つ転写産物をBHK21細胞にトランスフェクトし、次いでトランスフェクトされた細胞からの細胞培養上清をPRRSV感受性MA104細胞に添加した後、cDNAクローンBI EUからの生ウイルスを回収した。トランスフェクトされたBHK21細胞からの細胞培養上清をMA104細胞に添加した後、3～4日以内に強い細胞変性効果(CPE)が検出された(図1A)。PRRSVカプシドタンパク質特異的モノクローナル抗体SDOW17(Rural Technologies社)でこの細胞を染色した後、CPE陽性MA104細胞において強いシグナルが検出されたが(図1B)、偽トランスフェクトされたBHK21細胞の上清を添加した細胞では検出されなかった(

50

図示せず)。

#### 【0074】

BI EU cDNAクローン由来ウイルスの増殖を試験するために、それぞれ感染多重度(MOI)0.001、0.01または0.1で、前記の回収したウイルスを用いてMA104細胞に感染させた。感染後0、24、48、72および96時間で感染細胞の上清を採取し、MA104細胞を含む96ウェルプレート上でウイルス段階希釈液によってウイルス力価を測定した。BI EUから回収したウイルスから得られた増殖曲線を図2に示す。

MA104細胞の感染に用いたMOIとはかわりなく、ウイルスBI EUは、感染後24時間以内に、1ミリリットル(ml)当たり $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)に達した。力価は、感染後およそ48時間で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mlのピークに達し、MA104細胞におけるBI EUウイルスの高い複製効率が明らかになった。

この所見は、PRRSVワクチン研究のためのプラットフォームとして、例えば、多くの応用の1つとしてウイルス感染に対する宿主の免疫応答とのPRRSVの相互作用を研究するためには、BI EUを使用することを可能にする。

#### 【0075】

##### b)PRRSVワクチン研究における新規感染性EU型PRRSV cDNAクローンの使用

PRRSV感染に対する特異的免疫応答は、中和抗体の遅延誘発(Lopez and Osorio, 2004)および迅速な細胞性免疫応答(Xiao et al., 2004)を特徴とする。これらの効果は、一部分において、デコイエピトープの提示(Ostrowski et al., 2002;Ansari et al., 2006)およびウイルスエンベロープタンパク質のグリカン遮蔽(Ansari et al., 2006)と共に、宿主の自然免疫系のウイルス抑制に帰することは一般に認められている。感受性細胞株(ブタ肺胞マクロファージ、サル腎細胞MARC-145)および/または豚(Buddaert et al., 1998)において、PRRSV感染は、I型インターフェロン(IFN)、(インターフェロン-およびインターフェロン- ;(Miller et al., 2004))またはII型IFN、(インターフェロン- ;(Meier et al., 2003))の産生を誘導しないか、または弱くしか誘導しないか、または遅延して誘導することが明らかにされている。

IFNは、ウイルス感染に対して有効な適応免疫応答の達成に重要な役割を果たしており、従って、多くのウイルスは、宿主の自然免疫系の攻撃を妨げる戦略を開発している(Haile and Weber, 2009)。予想されるPRRSV IFNアンタゴニスト(単数または複数)を同定する目的で、対象遺伝子を安定的に発現する細胞株またはタンパク質発現プラスミドでトランسفェクトされた細胞に基づく大規模なスクリーニング解析によって、I型IFN誘発の遮断に関与しているnsp1(下記参照)、nsp2(Beura et al., 2010;Li et al., 2010)、nsp4(Beura et al., 2010)およびnsp11(Beura et al., 2010;Shi et al., 2011a)を含むいくつかのPRRSV非構造タンパク質(nsp)が明らかになった。

#### 【0076】

nsp1は、PRRSV ORF1a由来ポリタンパク質1aのN末端に位置し、これは2つの多機能性サブユニット、nsp1 およびnsp1 にプロセシングされ、そのそれぞれは、ウイルスポリタンパク質からの自己放出に必須なパパイン様システインプロテアーゼ(PCP)ドメインを含む(den Boon et al., 1995;Chen et al., 2010)。nsp1 は、N末端ジンクフィンガードメインおよびPCP プロテアーゼドメインを含むが、nsp1 はPCP を含む。両nsp1サブユニット、nsp1 およびnsp1 に関して、3次元結晶構造が解明されている(Sun et al., 2009 ;Xue et al., 2010)。これらの解析によれば、nsp1 は、N末端ドメイン(NTD)、リンカードメイン(LKD)、PCPドメイン(PCP )およびC末端伸長部(CTE);(Xue et al., 2010)からなる。nsp1のnsp2からのnsp1 媒介切断部位であるC末端は、PRRSV US株に関しては部位WYG/AGRに存在する(Kroese et al., 2008)が、PRRSV EU株に関しては部位WYG/AAGに存在すると予測されている(Chen et al., 2010)。一方で、nsp1 /nsp1 切断は、PRRSV US株に関しては、部位ECAM/AxVYDで生じるが、PRRSV EU株に関しては、部位EEAH/SxVYRで生じると予測されている(Chen et al., 2010)。

#### 【0077】

PRRSV nsp1および/またはその自己切断由来サブユニットnsp1 および/またはnsp1

10

20

30

40

50

は、IFN転写に干渉することによってI型IFN産生を抑制するという機構の詳細がいくつかの研究によって明らかにされている(Song et al., 2010;Kim et al., 2010;Chen et al., 2010;Beura et al., 2010)。さらに、nsp1は、インターフェロンへの細胞応答(インターフェロンシグナル伝達)に干渉するということが明らかにされている;(Chen et al., 2010)。さらに、in vitroで、PRRSV感染が、PRRSV感染細胞におけるIFN- $\alpha$ および/またはIFN- $\beta$ 産生を抑制することが明らかにされ(Kim et al., 2010;Beura et al., 2010)、nsp1(サブユニット)の細胞内局在化が測定され(Song et al., 2010;Chen et al., 2010)、他の人間によって単一のタンパク質発現実験において得られたI型IFN抑制の機構的側面が、PRRSVに感染した細胞において確認された(Shi et al., 2010)。最後に、nsp1タンパク質発現に基づくnsp1変異誘発研究によって、ウイルスによるIFN抑制に対する効果が研究された(Shi et al., 2011b)。

#### 【0078】

以前に、感受性細胞(MARC145)においてI型IFN(IFN- $\alpha$ )産生を誘導するnsp1遺伝子の変異(欠失)を含み、I型IFN(IFN- $\alpha$ )に対して感受性が高い生存PRRSV(EU型)株を(WO 2013017570 A1に記載されたように)作製した。

この新規感染性クローンBI EUに基づいて、同様ではあるが異なるIFN誘発性ウイルスが作製され得るかどうかを試験するために、nsp1遺伝子において欠失を有する一連のウイルスを設計した。より正確には、これらの欠失は、該タンパク質のホモ二量体化に必要であることが示されているnsp1のN末端ドメイン(NTD)に位置していた(Xue et al., 2010)。図3に、いくつかのUS型およびEU型PRRSV株のnsp1のアミノ酸配列のアラインメントを示す。ストランド(青色)またはヘリックス(赤色)を形成することが予測されているアミノ酸が示されている。

感染性cDNAクローンBI EUに基づいて、10のnsp1欠失変異株が作製された。欠失には、ストランドまたはヘリックス形成に関与しないと予測され、アラインメントにおいて解析されたすべてのEU型PRRSV株内に(部分的に)保存されたアミノ酸(図3において赤枠で囲んだ)を含ませた。

#### 【0079】

前記nsp1遺伝子に導入した欠失を、図4に示すアミノ酸配列のアラインメントにおいて視覚化した。BI EU-nsp1欠失変異株は、それぞれ、BI EU-nsp1-de1ALEV、BI EU-nsp1-de1EV、BI EU-nsp1-de1LEV、BI EU-nsp1-de1LE、BI EU-nsp1-de1DD、BI EU-nsp1-de1SDDS、BI EU-nsp1-de1HH、BI EU-nsp1-de1GRSR、BI EU-nsp1-de1RSRおよびBI EU-nsp1-de1SDGRSRと呼ぶ。

nsp1欠失変異株の生存性を試験するために、それぞれの欠失を含むBI EU cDNAの合成転写産物をBHK21細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞からの細胞培養上清をPRRSV感受性MA104細胞に加えた後、作製されたnsp1欠失変異株10の内9に関して、PRRSV変異株の生存性を示す細胞変性効果(CPE)およびヌクレオカプシド特異的免疫蛍光染色が検出された(図示せず)。BI EU-nsp1-de1LEVを除いては、すべてのnsp1欠失変異株が生存していたことをこれらの所見は明らかにしている。nsp1欠失変異株が、IFNコンピテントMA104細胞に対して高力価に増殖することができるかどうかをさらに解析するために、本質的にBI EUウイルスに関して前述したように増殖曲線を作製した。簡潔に言えば、9つのnsp1欠失変異株の1つまたは対照としてのウイルスBI EUをMA104細胞に感染させた。感染後0、24、48、72および93時間で細胞培養上清を採取し、96ウェルプレート上でMA104細胞に関して滴定した。CPE陽性ウェルに基づいてウイルス力価を算出した。図5は、2つの独立した実験を示す。BI EU-nsp1欠失変異株は、親BI EUウイルスと同様な効率でMA104細胞で増殖することができることを図5は示している。感染後48時間で、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ のピーク力価が観察された。

#### 【0080】

次いで、nsp1遺伝子に導入した欠失が、実際に、nsp1タンパク質のIFNアンタゴニスト活性を破壊するかどうかを解析した。従って、ヒトIFN- $\alpha$ に特異的な市販のELISA(In vitro社)を用いて、前述の増殖曲線実験を通じて、感染後0、24、48、72および93時間

10

20

30

40

50

で採取した100 μlの試料でIFN- $\beta$ レベルを測定した。製造業者によれば、このELISAは非ヒト靈長類IFN- $\beta$ の検出にも適用することができるが、ミドリザル(Green Monkey)腎臓上皮細胞由来のMA104細胞からの試料でもよく機能した(図6参照)。得られた結果の定量のために、ELISA製造業者の陽性対照を用いた検量線も含めた。

9つの生存nsp1 $\beta$ 欠失変異株の1つまたは親BI EUウイルスに感染させたMA104細胞の上清において測定し、2つの独立した実験から得たIFN- $\beta$ レベルを、図6に示す。

予想されたように、親BI EUは、感染期間を通じてIFN- $\beta$ の分泌を効率的に遮断したが、これは機能性ウイルスIFNアンタゴニスト(単数または複数)に起因する。種々のBI EU-nsp1 $\beta$ 欠失変異株での感染後0、24および48時間での細胞培養上清において、IFN- $\beta$ は、まったくか、またはごく少量しか検出されなかった。しかしながら、後の時点において、感染したMA104細胞におけるIFN- $\beta$ の発現を一部の変異株が抑制することができなかったが、これはnsp1 $\beta$ IFNアンタゴニスト活性の欠損を示している。興味深いことに、解析された9つのBI EU-nsp1 $\beta$ 欠失変異株の間でこの欠損は著しく異なっていた。変異株の大部分は、細胞培養上清100 μl当たり50国際単位(IU)以下のIFN- $\beta$ レベルを誘導したが、変異株BI EU-nsp1 $\beta$ -deIALEVは、感染したMA104細胞において、IFN- $\beta$ の発現に全く拮抗できなかった。感染後72および93時間で測定されたIFN- $\beta$ の量は、100 μl当たり~200IUに設定してあるELISA試験の限界を超えてさえいた。BI EU感染性cDNAクローンにおけるアミノ酸A30LEV33を欠失させることによって、nsp1 $\beta$ タンパク質のIFNアンタゴニスト活性を破壊することができることをこの結果は明確に示している。

#### 【0081】

総合すれば、ミドリザル腎臓MA104細胞において、1 $\times$ 10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>/mlの力価まで効率的に増殖させることができる新規感染性EU型PRRSV cDNAクローンが作製された。このクローンに基づいて、該タンパク質のホモ二量体化に必要であることが示されているnsp1 $\beta$ のNTDにおいて欠失を有する9つの生存BI EU-nsp1 $\beta$ 変異株が作製された(Xue et al., 2010)。これらの変異株は、すべて、MA104細胞で高力価に増殖することができた。変異株BI EU-nsp1 $\beta$ -deIALEV、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIEV、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIIE、BI EU-nsp1 $\beta$ -deISDDS、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIGRSR、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIRSRおよびBI EU-nsp1 $\beta$ -deISGDSRはすべて、感染後期の時点でIFN- $\beta$ の分泌を誘導したが、これは親BI EUウイルスとは全く対照的である。これらの7つの変異株の中から、4つの変異株BI EU-nsp1 $\beta$ -deIALEV、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIEV、BI EU-nsp1 $\beta$ -deIIEおよびBI EU-nsp1 $\beta$ -deISDDSは、以前のWO 2013017570 A1に記載されていない変異株の新規クラスである。特に、変異株BI EU-nsp1 $\beta$ -deIALEVでの感染は、MA104細胞において極めて大量のIFN- $\beta$ を誘導したが、これにより、このウイルスが、IFN I型の誘発の遮断において著しい損傷を受けている結論が導かれる。

この所見は、PRRSVワクチン開発に密接に関わっている。なぜなら、PRRSVに対する自然宿主の免疫応答は、欠失を導入することによって、例えば遺伝子型IV型PRRS株のnsp1 $\beta$ タンパク質におけるアミノ酸A30LEV33を欠失させることによって、著しく高めることができるからである。

ここに記載されているnsp1 $\beta$ 欠失変異株は、単独で、あるいは他の弱毒変異株との組み合わせで、弱毒生PRRSVワクチンの有望な候補である。

#### 【実施例3】

#### 【0082】

##### a)EU型PRRSV感染性cDNAクローンBI EUのORF4タンパク質内への欠失の導入

ウイルス複製に負の影響を与えないで任意のPRRSウイルス株のORF4遺伝子に本発明の第一の考慮態様に記載の欠失を導入することができるかどうかを試験した。そのために、EU型PRRSV感染性cDNAクローンBI EU(配列番号48の配列を含む)のアミノ酸位置50~71の間のORF4タンパク質の外部ドメインをコードするゲノム領域に欠失を導入した。BI EUのORF4タンパク質内に欠失には、アミノ酸57~69(配列番号49によってコードされる)が含まれた。

前記ORF4欠失変異株の生存性を試験するために、前記欠失を含むBI EU cDNAの合成転写産物をBHK21細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞からの細胞培養

10

20

30

40

50

上清をPRRSV感受性MA104細胞に添加した後、トランスフェクトされたBHK21細胞からの細胞培養上清をMA104細胞に添加した後3~4日以内に細胞変性効果(CPE)が検出された。PRRSVカプシドタンパク質特異的モノクローナル抗体SDOW17(Rural Technologies社)で細胞を染色した後、CPE陽性MA104細胞において強いシグナルが検出されたが、偽トランスフェクトされたBHK21細胞の上清を加えた細胞では検出されなかった(図示せず)。これらの所見は、BI EU-ORF4欠失変異株が生存していることを明らかにした。回収された変異株ウイルスは、以下においてBI EU-GP5-36-46-ctrと呼ぶ(実施例bと対照されたい)。

#### 【 0 0 8 3 】

BI EU-GP5-36-46-ctrがMA104細胞で高力価に増殖することができるかどうかをさらに解析するために、増殖動態を解析した。そのために、感染多重度(MOI)0.01を用いて、前記の回収したウイルスおよび対照としての親BI EUウイルスをMA104細胞に感染させた。感染後0、24、48、72および96時間で感染細胞の上清を採取し、MA104細胞を含む96ウェルプレート上でウイルス段階希釈液によってウイルス力価を測定した。図7は、3つの独立した実験の結果を示す。図7は、BI EU-GP5-36-46-ctrが、親BI EUウイルスと同様に効率的にMA104細胞で増殖することができることを示している。感染後48時間で、両ウイルスのピーク力価~ $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/mlが観察された。

#### 【 0 0 8 4 】

総合すれば、ORF4タンパク質内のアミノ酸57~69の欠失は、BI EUの増殖に負の影響を与えない。このことは、この領域内の配列変化は、in vitroで、PRRSVによりよく許容されることを示している。これらの結果から結論すれば、BI EU ORF4タンパク質のアミノ酸位置50~71の間に位置する領域は、外因性配列の挿入部位として使用することも可能である。

#### 【 0 0 8 5 】

b)外因性RNAを挿入するためのORF4タンパク質欠失部位の使用：感染性cDNAクローンBI EUのORF4遺伝子へのPRRSV ORF5タンパク質中和エピトープ配列の挿入

本実施例において、BI EU ORF4タンパク質アミノ酸位置50~71の間に位置する領域への外因性RNAの挿入を説明する。本実施例における外因性RNAは、PRRSウイルスのORF5タンパク質(Ostrowski, M. et al.)内に位置し、配列番号39のアミノ酸1~11からなる中和エピトープをコードする。この配列(配列番号51)は、潜在的ワクチン候補におけるORF5中和エピトープの接触性を増加させ、ワクチン接種動物における免疫応答の改善を可能にする目的で、ORF4タンパク質の外部ドメインに挿入するために選択された。

組換えウイルスを作製するために、実施例a)において説明したORF4欠失部位に外因性配列を導入し、GGリンカーに隣接する配列番号39のアミノ酸1~11(2型PRRSV株のORF5タンパク質内のアミノ酸36~46である)によってBI EU ORF4タンパク質のアミノ酸57~69と置換した。この挿入によって、BI EUのORF4タンパク質内の最終配列Gly57-Ser-Ser-His-Leu-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asn-Leu-Thr-Gly69(配列番号53)が生じた。この挿入を含む組換えウイルスは、以下において、BI EU-GP5-36-46(配列番号56の配列を含む)と呼ぶ。

#### 【 0 0 8 6 】

BI EU-GP5-36-46を回収することができるかどうかを試験するために、この変異を含むBI EU cDNAの合成転写産物をBHK21細胞にトランスフェクトした。この組換えウイルスは、前述と同じ方法によってレスキューすることができた。PRRSV感受性MA104細胞に、トランスフェクトされたBHK21細胞からの細胞培養上清を添加した後3~4日以内に細胞変性効果(CPE)を観察することができた。さらにまた、CPE陽性MA104細胞において、PRRSVカプシドタンパク質特異的染色が検出できたが、偽トランスフェクトされたBHK21細胞の上清を加えた細胞においては検出できなかった(図示せず)。

この組換えウイルスが高力価に増殖することができるかどうかを試験するために、増殖動態を解析した。そのために、MOI 0.01を用いて、BI EU-GP5-36-46および対照としての親BI EUウイルスをMA104細胞に感染させた。感染後0、24、48、72および96時間で感染細胞の上清を採取し、MA104細胞を含む96ウェルプレート上でウイルス段階希釈液によってウイルス力価を測定した。3つの独立した実験の結果を図7に示す。感染後48時間で、ウイ

10

20

30

40

50

ルス変異株BI EU-GP5-36-46は、親BI EUウイルスと同様なピーク力価～ $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>/mlに達した。

#### 【 0 0 8 7 】

MA104細胞に関するさらなる実験によって、この外因性RNA配列が、多継代培養にわたって安定して維持されたことが明らかにされた。配列解析によって、解析されたすべての継代培養にわたって、このインサートの安定性が証明された。興味深いことに、独立した実験において、継代第1世代後に、挿入部位の上流で、位置56におけるHisからProへのアミノ酸交換を生じるアデニンからチミンへの单一ヌクレオチド変異が検出された。そのためには、このさらなる変異を、逆遺伝学によってBI EU-GP5-36-46に挿入した。この組換えウイルスの作製のために、実施例a)に記載されているORF4欠失部位に外因性配列を導入し、N末端でアミノ酸配列PGに隣接し、C末端でGリンカーに隣接する配列番号39のアミノ酸1～11(2型PRRSV株のORF5タンパク質内のアミノ酸36～46である)によってBI EU ORF4タンパク質のアミノ酸56～69と置換した。この挿入によって、BI EUのORF4タンパク質内に最終配列Pro56-Gly-Ser-Ser-His-Leu-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asn-Leu-Thr-Gly69(配列番号55)が生じた。以下において、得られた組換えウイルスは、BI EU-GP5-36-46-AtoC(配列番号58の配列を含む)と呼ぶ。図7に示した増殖動態により、BI EU-GP5-36-46-AtoCが、それぞれBI EU-GP5-36-46およびBI EU野生型と同様な力価に増殖することができることが証明された。

10

#### 【 0 0 8 8 】

BI EU-GP5-36-46-AtoCにおけるORF4の外部ドメインコード領域のORF5由来配列が、変異株ウイルスを血清中和に対してより感受性を高くするかどうかを試験するために血清中和試験(SNT)を行った。ORF4タンパク質外部ドメインに位置する挿入されたORF5由来中和エピトープの接触性の増加が、親ウイルスBI EUと比較して、中和抗体の作用に対する組換えウイルスの感受性を増加させると仮定した。

20

#### 【 0 0 8 9 】

SNTのために、BI EU野生型ウイルスでワクチン接種した後48日目に6頭の雌豚から採取した血清を段階希釈し、BI EU-GP5-36-46-AtoCまたは野生型BI EUのいずれかと混合した。

#### 【 0 0 9 0 】

37、5%CO<sub>2</sub>で1時間インキュベートした後、これらの試料にMA104細胞を添加した。4日後に、中和されていないウイルスによって誘導されたCPEに基づいて血清力価を測定した。ワクチン接種の前に同じ動物から採取した血清を陰性対照として用いた(図示せず)。2つの独立した実験の平均値および標準偏差値を図8に示す。

30

#### 【 0 0 9 1 】

解析された6頭の動物間に変動が観察されたにもかかわらず、BI EU-GP5-36-46-AtoCは、BI EU野生型ウイルスと比較して、in vitro中和に対して一貫してより感受性が高かったことを証明することができた。BI EU-GP5-36-46-AtoCに関して測定した血清力価は、親ウイルスBI EUに関して測定した力価よりも3～15倍高かった(図8)。さらに、異なる実験から得られたデータによって、N-グリコシル化は、ORF5中和エピトープを天然に遮蔽するので、Asn9からGln9までのORF5由来配列(配列番号50および52)に存在するN-グリコシル化部位(配列番号39のアミノ酸N9)を変異させることによって、BI EU-GP5-36-46-AtoCに対する血清力価はさらに増強されうることが示唆された((Ansari et al., 2006)、データは示さず)。要約すれば、図8に示された所見は、ORF4タンパク質外部ドメインに挿入されたORF5由来中和エピトープは、組換えウイルスBI EU-GP5-36-46-AtoCにおいて大変入手が容易であり、後者が有望なワクチン候補であることを強く示唆した。PRRSV特異的中和抗体を含む血清に対して示された高い感受性は、このワクチンウイルスのより急速なクリアランスおよび安全性の増強を可能にするであろう。

40

#### 【 0 0 9 2 】

また、PRRSV特異的中和抗体は、親ウイルスBI EUでワクチン接種された動物と比較して、BI EU-GP5-36-46-AtoCでワクチン接種された子豚または雌豚において、より高いレベルで、かつより速い時点で誘導されるであろうことが予想できる。ワクチン接種後より早

50

期の中和抗体の誘発は、より急速なクリアランスをもたらし、それによって、ワクチンウイルスの排出抑制(安全性の増加)をもたらし、さらに、PRRSVでの自然感染後のより効率的な免疫応答(有効性の増強)をもたらすであろう。

組換えウイルスB1 EU-GP5-36-46-AtoCは、従って、改善された安全性と有効性を有する弱毒生PRRSVワクチンの有望な候補である。

【0093】

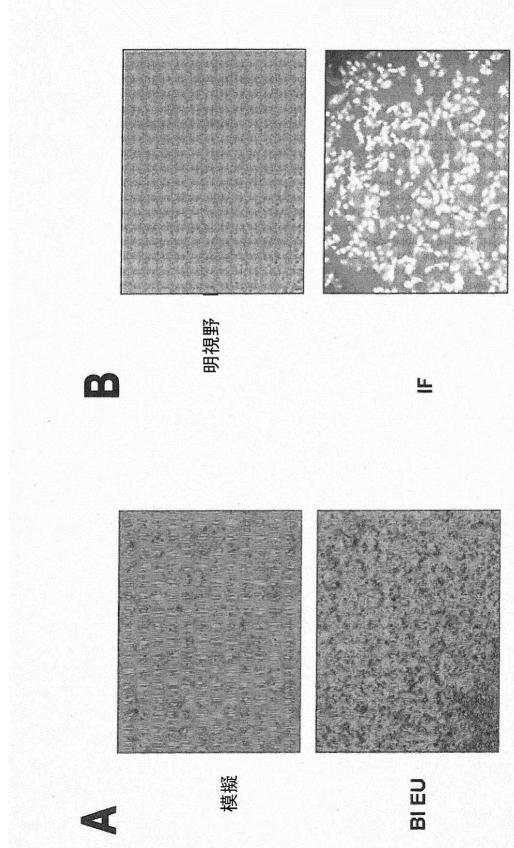
引用文献リスト

- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74, 10834-10837. 10
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994-4004.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574-1584.
- Buddaert, W., Van, R.K., Pensaert, M., 1998. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Biol.* 440, 461-467. 20
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y., 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, 87-97.
- den Boon, J.A., Faaberg, K.S., Meulenberg, J.J., Wassenaar, A.L., Plagemann, P.G., Gorbatenya, A.E., Snijder, E.J., 1995. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two painlike cysteine proteases. *J. Virol.* 69, 4500-4505. 30
- Haller, O., Weber, F., 2009. The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh. K. Acad. Geneeskd. Belg.* 71, 73-86.
- Kim, O., Sun, Y., Lai, F.W., Song, C., Yoo, D., 2010. Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology* 402, 315-326.
- Kroese, M.V., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Bos-de Ruijter, J.N., Peeters, B.P., Meulenberg, J.J., Cornelissen, L.A., Snijder, E.J., 2008. The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteinases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 89, 494-499. 40
- Li, H., Zheng, Z., Zhou, P., Zhang, B., Shi, Z., Hu, Q., Wang, H., 2010. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes interferon regulatory factor 3 activation. *J. Gen. Virol.* 91, 2947-2958.
- Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 155-163.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31. 50

- Miller, L.C., Laegreid, W.W., Bono, J.L., Chitko-McKown, C.G., Fox, J.M., 2004. Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch. Virol.* 149, 2453-2463.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.
- Shi, X., Wang, L., Li, X., Zhang, G., Guo, J., Zhao, D., Chai, S., Deng, R., 2011a. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN-beta induction. *Mol. Immunol.* 48, 1568-1572. 10
- Shi, X., Wang, L., Zhi, Y., Xing, G., Zhao, D., Deng, R., Zhang, G., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) could be sensed by professional beta interferon-producing system and had mechanisms to inhibit this action in MARC-145 cells. *Virus Res.* 153, 151-156.
- Shi, X., Zhang, G., Wang, L., Li, X., Zhi, Y., Wang, F., Fan, J., Deng, R., 2011b. The Nonstructural Protein 1 Papain-Like Cysteine Protease Was Necessary for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 1 to Inhibit Interferon-beta Induction. *DNA Cell Biol.* 30, 355-362.
- Snijder, E.J., Meulenberg, J.J., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 5), 961-979. 20
- Song, C., Krell, P., Yoo, D., 2010. Nonstructural protein 1alpha subunit-based inhibition of NF-kappaB activation and suppression of interferon-beta production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 407, 268-280.
- Sun, Y., Xue, F., Guo, Y., Ma, M., Hao, N., Zhang, X.C., Lou, Z., Li, X., Rao, Z., 2009. Crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus leader protease Nsp1alpha. *J. Virol.* 83, 10931-10940.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923-5933. 30
- Xue, F., Sun, Y., Yan, L., Zhao, C., Chen, J., Bartlam, M., Li, X., Lou, Z., Rao, Z., 2010. The crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein Nsp1beta reveals a novel metal-dependent nuclease. *J. Virol.* 84, 6461-6471.

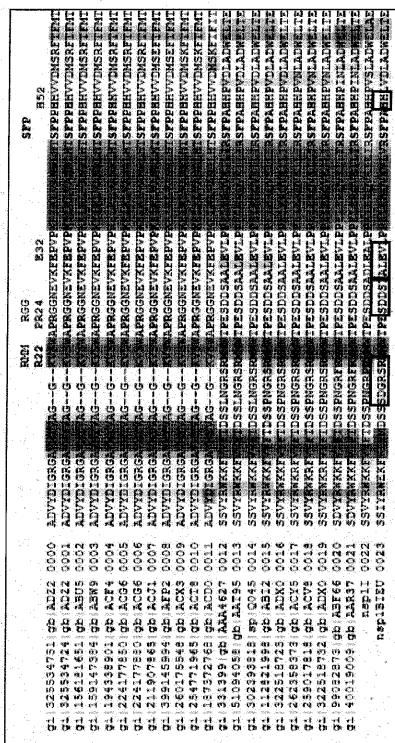
【 図 1 】

**Figure 1**



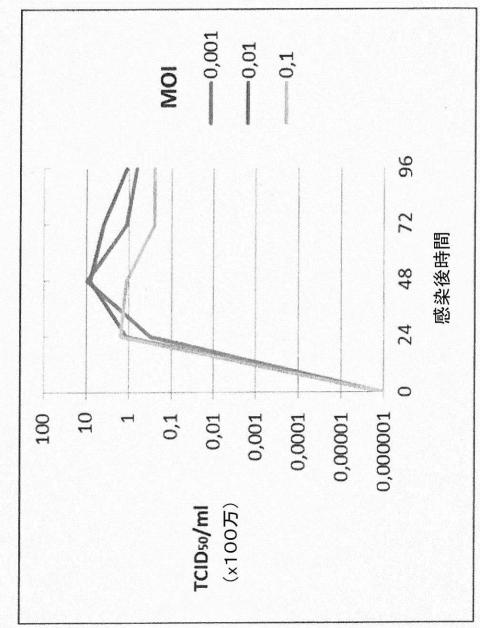
【図3】

**Figure 3**



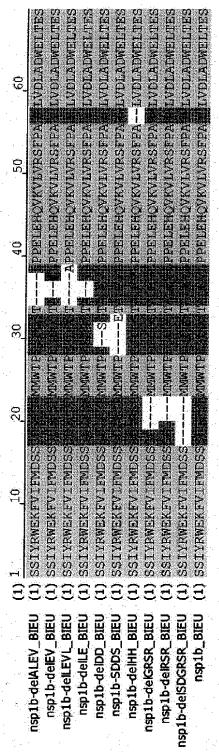
【図2】

Figure 2



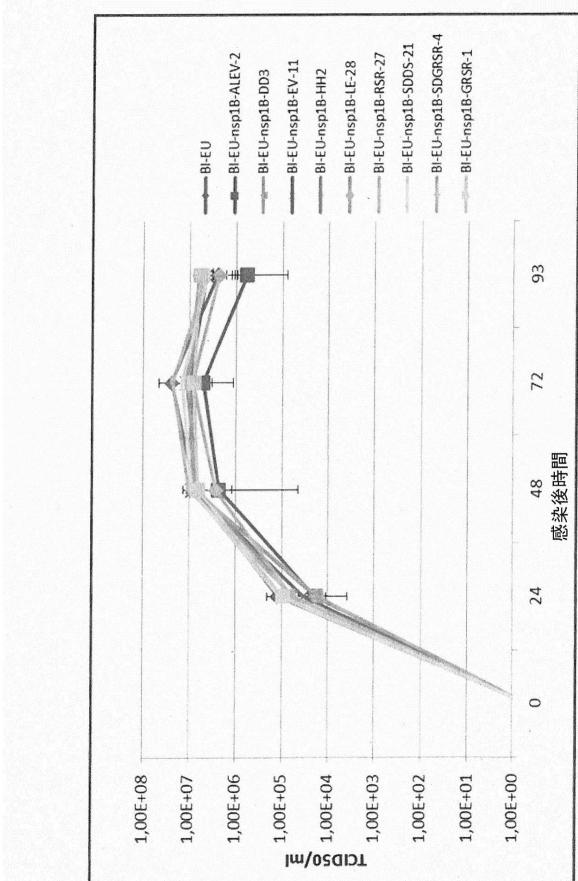
【図4】

**Figure 4**



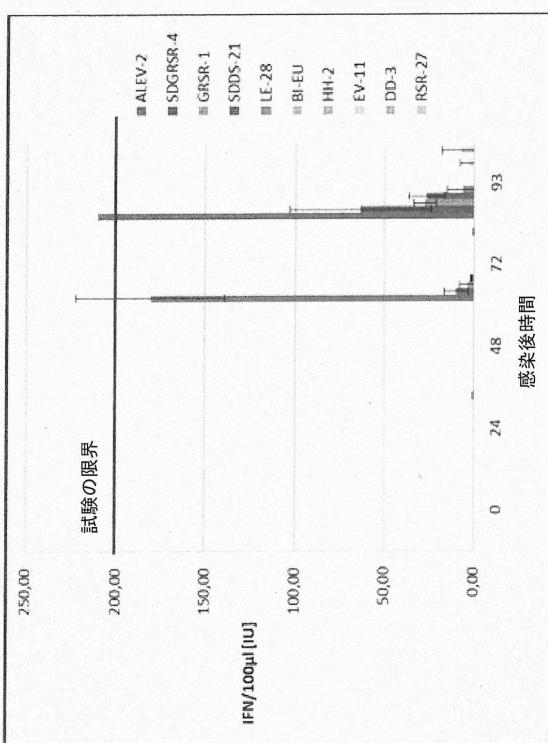
【図5】

Figure 5



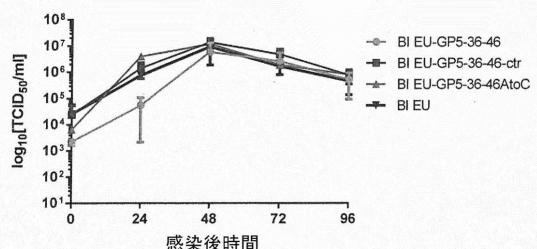
【図6】

Figure 6



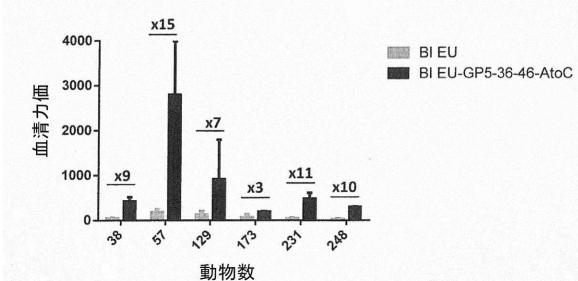
【図7】

Figure 7



【図8】

Figure 8



【配列表】

0006886291000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.CI.			F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	7/04	(2006.01)	C 1 2 N	7/04
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/68

(31)優先権主張番号 14175691.6

(32)優先日 平成26年7月3日(2014.7.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧洲特許庁(EP)

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ガレイ アンドレアス

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 17

3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

コーポレート パテンツ内

(72)発明者 ケラー クリストフ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 17

3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

コーポレート パテンツ内

(72)発明者 シャハト エリク

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 17

3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

コーポレート パテンツ内

(72)発明者 ヘレル マリーケ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 17

3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

コーポレート パテンツ内

## 合議体

審判長 田村 聖子

審判官 大久保 智之

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0213810(US, A1)

特開2008-289485(JP, A)

特表2010-531143(JP, A)

国際公開第2013/173443(WO, A1)

国際公開第2013/123242(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C12N15/09, C12N15/15, C12N15/21, C12N5/10  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
M E D L I N E / C A p l u s / B I O S I S / E M B A S E / W P I D S ( S T N )