

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5624465号
(P5624465)

(45) 発行日 平成26年11月12日(2014.11.12)

(24) 登録日 平成26年10月3日(2014.10.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 7/04	(2006.01)	C 12 N 7/04	
C 12 N 7/02	(2006.01)	C 12 N 7/02	
C 07 K 14/11	(2006.01)	C 07 K 14/11	
A 61 K 39/145	(2006.01)	A 61 K 39/145	

請求項の数 14 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-516334 (P2010-516334)
(86) (22) 出願日	平成20年7月11日 (2008.7.11)
(65) 公表番号	特表2010-533001 (P2010-533001A)
(43) 公表日	平成22年10月21日 (2010.10.21)
(86) 國際出願番号	PCT/CA2008/001281
(87) 國際公開番号	W02009/009876
(87) 國際公開日	平成21年1月22日 (2009.1.22)
審査請求日	平成23年7月8日 (2011.7.8)
(31) 優先権主張番号	60/959,414
(32) 優先日	平成19年7月13日 (2007.7.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/990,603
(32) 優先日	平成19年11月27日 (2007.11.27)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	502121395 メディカゴ インコーポレイテッド カナダ国 ジー1ブイ 3ブイ9, ケベック, ケベック, ルート ド レグリース 1020, スイート 600
(74) 代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一
(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】植物内で生成されるヘマグルチニンを含むインフルエンザウイルス様粒子(VLP)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 以下の工程を含む、インフルエンザウイルス様粒子(VLP)を植物中で製造する方法：a)
) シグナルペプチドを含むインフルエンザヘマグルチニン(HA)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を前記植物又はその部分に導入する工程であって、前記ヌクレオチド配列が、前記植物中で活性な調節領域と、ターミネータ配列とに機能的に連結され、前記調節領域がプロモータエレメントを含んでいる、該工程、
 b) 前記核酸の発現を許容する条件下で前記植物をインキュベートし、それによりVLPを製造する工程、
 c) 前記植物を採取する工程、及び
 d) 前記VLPを精製する工程であって、前記VLPのサイズが80～300nmの範囲である工程。

【請求項2】

前記ヌクレオチド配列が、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16から成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で一過性に発現される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で安定的に発現される、請求項1又は2に記載の方法。

10

20

【請求項 5】

インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）タンパク質及び1つ以上の植物由来脂質を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法により製造されたウイルス様粒子（VLP）。

【請求項 6】

前記インフルエンザHAタンパク質が、H5インドネシアである、請求項5に記載のVLP。

【請求項 7】

免疫応答を誘発させるための請求項5又は6に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

【請求項 8】

インフルエンザウイルスHAが、植物特異的N-グリカン又は改変N-グリカンを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法により製造されたVLP又は請求項5若しくは6に記載のVLP。

【請求項 9】

インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するのに使用するための、請求項5、6及び8のいずれか1項に記載のVLP。

【請求項 10】

前記VLPが、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されることに適している、請求項9に記載のVLP。

【請求項 11】

免疫応答を誘発させるための請求項8に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

【請求項 12】

インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するのに使用するための、請求項7又は11に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物が、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されることに適している、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項5、6又は8のいずれか1項に記載のVLPを含む食品補助物。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はウイルス様粒子の製造に関する。より具体的には、本発明は、インフルエンザ抗原を含むウイルス様粒子の製造を目的とする。

【背景技術】**【0002】**

インフルエンザウイルスは、呼吸器系ウイルスによるヒトの死亡原因の主要なものである。共通症状には、とりわけ熱、喉の痛み、促迫呼吸及び筋肉痛が含まれる。インフルエンザシーズン中には、世界中で人口の10 - 20%がインフルエンザウイルスに感染し、毎年250万から500万人が死亡する。

40

インフルエンザウイルスはエンベロープを有し、感染した哺乳動物細胞の形質膜から出芽する。それらは、存在する核タンパク質及びマトリックスタンパク質抗原を基準にA、B、又はC型に分類される。インフルエンザA型ウイルスは、提示されるヘマグルチニン（HA）及びノイラミニダーゼ（NA）表面糖タンパク質の組み合わせにしたがってさらに亜型に分類することができる。HAは、ウイルスが宿主細胞と結合しこれに侵入する能力を支配する。NAは、宿主細胞及びウイルス表面タンパク質上のグリカン鎖から末端シアリン酸残基を除去し、これによってウイルスの凝集を防ぎ、ウイルスの可動性を促進する。これまでのところ、16のHA（H1 - H16）及び9つのNA（N1 - N9）亜型が知られている。A型インフルエンザウイルスの各々は、HAの1つの型及びNA糖タンパク質の1つの型を提示する。一般的

50

には、各亜型は種特異性を示す。例えば、全てのHA及びNA亜型は鳥に感染することが知られているが、一方、亜型H1、H2、H3、H5、H7、H9、H10、N1、N2、N3及びN7のみがヒトに感染することが知られている (Horimoto 2006 ; Suzuki 2005)。H5、H7及びH9を含むインフルエンザウイルスは、インフルエンザAウイルスでもっとも病原性が強い型であると考えられ、更なる大流行を引き起す可能性が極めて高い。

【0003】

インフルエンザ大流行は通常、強い伝播性及び毒性をもつインフルエンザウイルスによって引き起こされ、重大レベルの疾患及び死亡を世界的にもたらしえる。新規なインフルエンザA亜型の出現によって、4つの主要な大流行が20世紀にもたらされた。1918年 - 1919年 10 のスペイン風邪 (H1N1ウイルスによって引き起こされた) は、1917年から1920年の間に世界中で5千万人を超える死者を出した。現時点で、新規な亜型の出現又は動物の地方病性亜型のヒトへの伝播のリスクは常に存在する。特に気がかりなものは、トリインフルエンザ (いわゆる“バードフル”) の強毒性型であり、その発生は世界的にいくつかの国で報告されている。多くの事例で、このトリインフルエンザは、48時間以内に100%に達する死亡率をもたらす能力を有する。最初に香港で1997年に確認されたトリインフルエンザウイルス (H5N1) の他のアジア諸国及びヨーロッパへの拡大は、野鳥の移動パターンと関連があると説明された。

従来のヒトにおけるインフルエンザ撲滅方法は毎年のワクチン接種による。ワクチンは従来、来るべき“インフルエンザシーズン”に対して優勢株と予想されるいくつかの株の組合せである。この予想は世界保健機構によって一元化される。一般的には、毎年製造されるワクチン数量は世界の全人口にワクチン接種するには十分ではない。例えば、カナダ及びアメリカ合衆国は、それらの全人口の約1/3の免疫に十分なワクチン量を入手するが、一方、欧州連合の全人口の17%しかワクチン接種を受けられない。世界的なインフルエンザ大流行に直面したとき、インフルエンザワクチンの全世界におけるこれまでの製造では不十分であろうということは明白である。たとえ必要な年間製造がある年にはいくらか間に合ったとしても、優勢株は毎年変化し、したがって一年間で必要性の低い時期における備蓄は実際的ではない。有効なインフルエンザワクチンの経済的で大規模な製造は、政府にとって、さらに私企業にとっても同様に重大な関心事である。

【0004】

ワクチンに使用されるウイルスストックは受精卵で生産される。ウイルス粒子を採集し、さらに、不活化ウイルスワクチンのために、界面活性剤によって破壊して不活化させる。生弱毒ワクチンは、低温での増殖に適応させたインフルエンザウイルスから製造され、これは、正常な体温でワクチンが弱毒化されることを意味している。そのようなワクチンは、USAでは5歳から49歳の個体での使用が認可されている。不活化完全ウイルスワクチンは化学薬剤による不活化によって無害にされ、それらは発育鶏卵又は哺乳動物細胞培養で製造されている。これらのタイプの全てのワクチンがいくつかの固有の利点及び欠点を示す。全ウイルスに由来するワクチンの1つの利点は、そのようなワクチンによって誘発される免疫のタイプである。一般的に、分割ワクチンは強力な抗体応答を誘発するが、一方、完全ウイルスから製造されるワクチンは、抗体(液性)及び細胞性応答の両方を誘発する。ワクチンによって誘発される防御と相関性を示す機能的抗体応答が認可のための基準であるとしても、T細胞応答もまたインフルエンザ免疫で重要であるという証拠が増えつつある (T細胞応答はまた高齢者により良好な防御を提供しそう)。

細胞性免疫応答を誘発するために、完全ウイルスで製造されたワクチンが開発された。インフルエンザ株 (例えばH5N1) の強い病原性のために、これらのワクチンはBL3+の施設で製造される。H5N1のような病原性の強い株のために、いくつかの製造業者はヘマグルチニン遺伝子の配列を変更し、インフルエンザ株の病原性を低下させて無毒化し、発育鶏卵又は哺乳動物細胞培養でより容易に製造した。他の業者はまた再組合せインフルエンザ株を使用している。この株では、ヘマグルチニン及びノイラミニダーゼタンパク質の遺伝子配列は、高収量低病原性インフルエンザドナー株 (A/PR/8/34 ; Quan F-S et al. 2007) でクローニングされる。これらの方法は有用なワクチンを製造することができるが、一方

10

20

30

40

50

、それらの方法は、高容量、低コスト、及び通常の年の世界的要求の充足に必要な規模での迅速なワクチン生産要求に対して解決を提供せず、さらに大流行に直面したときにはほぼ確実に十分ではないであろう。

【0005】

この逆遺伝学技術を用いるときは、HAの遺伝子配列を変異させて、無毒化することが必要かもしれない。病原性の強いインフルエンザ株の場合、完全ウイルスワクチンの製造は、封じ込め工程を必要とするか、又は製造ワクチンは循環ウイルスの遺伝子配列と厳密には一致しない。生弱毒ワクチンの事例では、投与ワクチンと宿主由来のインフルエンザウイルスとの組換えが生じ、新規ウイルスをもたらすリスクがなお存在する。

この方法は、抗原性エピトープ及び翻訳後修飾を維持するが、一方、この方法には、完全ウイルスを使用することによる汚染のリスク及びウイルス株による収量の変動を含む多くの欠点が存在する。卵への導入のために、最適に達しないレベルの防御が、ウイルスの遺伝的不均一性から生じる可能性がある。他の欠点には、膨大な卵の入手計画、精製に使用される化学物質による汚染のリスク及び製造期間の長さが含まれる。卵のタンパク質に対して過敏性を有する人々はこのワクチンを受容する候補者になりえない可能性がある。

大流行の場合には、分割ワクチンの製造は、卵での増殖に株を順化させる必要があるために制限され、製造収量は変動しそう。この方法は季節性ワクチンの製造に数年間用いられてきたけれども、大流行に対しては合理的な時間枠でほとんど応答することができず、世界的な製造能力に限界がある。

卵の使用を避けるために、インフルエンザウイルスはまた哺乳動物細胞、たとえばMDCK又はPERC.6細胞などで製造されている。別の方法は逆遺伝学であり、この方法では、ウイルスはウイルス遺伝子による細胞の形質転換によって製造される。これらの方法はしかしながら、複雑な方法及び特殊な培養環境とともに完全ウイルスの使用もまた必要とする。

いくつかの組換え製品が組換えインフルエンザワクチン候補として開発されてきた。これらの方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞を用いるHA及びNAタンパク質の発現 (Crawford et al. 1999 ; Johansson, 1999) 、ウイルスベクター及びDNAワクチン構築物 (Olsen et al. 1997) を含む、インフルエンザA型HA及びNAタンパク質の発現、製造及び精製に焦点が当てられていた。

【0006】

インフルエンザウイルス感染の詳細は周知である。略記すれば、感染サイクルは、シアリル酸含有細胞レセプター（糖タンパク質及び糖脂質）にビリオン表面のHAタンパク質が付着することによって開始する。NAタンパク質はシアリル酸レセプターのプロセッシングを仲介し、ウイルスの細胞内への侵入は、HA依存レセプター仲介エンドサイトーシスによる。インフルエンザビリオンを含む内在化されたエンドソームの酸性範囲内で、HAタンパク質は形状変化を受け、ウイルス及び細胞膜の融合、並びにウイルス脱外被及びヌクレオカプシド結合リボ核タンパク質 (RNP) からのM1タンパク質のM2仲介遊離に至る (RNPはウイルスRNA合成のために細胞核に移動する)。HAタンパク質に対する抗体は、ウイルス感染性を中和することによってウイルス感染を防ぐが、一方、NAタンパク質に対する抗体は、ウイルス複製の初期工程におけるNAタンパク質の作用に干渉する。

Crawfordら (1999) は、バキュロウイルス感染昆虫細胞でのインフルエンザHAの発現を開示している。発現されたタンパク質は、トリH5及びH7インフルエンザ亜型による致死的インフルエンザ症状を予防できると記載されている。Johanssonら (1999) は、バキュロウイルス発現インフルエンザHA及びNAタンパク質は、通常のワクチンによって誘発される免疫応答より優れた応答を動物で誘発する。ウマインフルエンザウイルスのバキュロウイルス発現ヘマグルチニンの免疫原性及び有効性は、相同なDNAワクチン候補薬剤に匹敵した (Olsen et al. 1997)。総合すれば、これらのデータは、インフルエンザウイルスチャレンジに対する高度な防御が、種々の動物モデルで多様な実験的方法を用いた組換えHA又はNAタンパク質により誘発できることを示している。

以前の研究によって、表面インフルエンザ糖タンパク質 (HA及びNA) はインフルエンザウイルスに対する防御免疫誘引のための主要な標的であり、さらにM1はインフルエンザに

10

20

30

40

50

に対する細胞性免疫のための保存された標的を提供することが示されたので、新規なワクチン候補は、巨大分子のタンパク質粒子（例えばウイルス様粒子（VLP））としてこれらのウイルス抗原を含むことができる。ワクチン製品として、VLPは、サブユニット抗原又は組換え抗原よりも免疫原性が強いという利点を提供し、さらに液性及び細胞性免疫応答の両応答を刺激することができる（Grgacic and Anderson, 2006）。さらにまた、これらのインフルエンザ抗原を含む粒子は、多数のインフルエンザウイルス株に対する中和抗体を誘引する形状性エピトープを提示することができる。

【0007】

ワクチンを目的とする非感染性インフルエンザウイルスの製造は不慮の感染を回避する1つの方法である。また別に、培養ウイルスの代用としてウイルス様粒子（VLP）の研究が行われてきた。VLPはウイルスカプシドの構造に類似するがゲノムを欠き、したがって複製又は二次感染の手段を提供することはできない。

いくつかの研究によって、組換えインフルエンザタンパク質は、哺乳動物発現プラスミド又はバキュロウイルスベクターを用いた細胞培養でセルフアッセンブリングしてVLPを形成することが示された（Gomez-Puertas et al. 1999；Neumann et al. 2000；Latham and Galarza, 2001）。Gomez-Puertasら（1999）は、十分なインフルエンザVLPの形成はいくつかのウイルスの発現レベルに左右されることを開示している。Neumannら（2000）は、クローニングされたcDNAにもっぱら由来する感染性インフルエンザウイルス様粒子を生成するための哺乳動物細胞発現プラスミドをベースにした系を確立させた。Latham and Galarza（2001）は、HA、NA、M1及びM2遺伝子を同時発現する組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞でのインフルエンザVLPの形成を報告した。これらの実験は、インフルエンザビリオンタンパク質は、真核細胞での同時発現でセルフアッセンブリングできることを示した。

Gomez-Puertasら（2000）は、ヘマグルチニン（HA）に加えて、インフルエンザウイルスのマトリックスタンパク質（M1）が昆虫細胞からVLPが出芽するために必須であることを教示している。しかしながら、Chenら（2007）は、M1はVLP形成に必要ではない可能性を教示し、さらにM1及びVLPの十分な遊離には、HAの存在及びNAによって提供されるシアリダーゼ活性が必要であることを観察した。NAは、VLPを生成しさらにVLPを培養液に遊離させる細胞の表面で糖タンパク質のシアリン酸を切断する。

【0008】

Quanら（2007）は、バキュロウイルス発現系（昆虫細胞）で製造されるVLPワクチンはインフルエンザウイルスのいくつかの株（A/PR8/34 (H1N1)）に対して防御免疫を誘発することを教示している。QuanらによるVLP実験では、形質膜からの発芽が観察され、哺乳動物細胞系（MDCK細胞）で得られるものと類似する正確なサイズ及び形態であると考えられた。

エンベロープを有するウイルスは、感染細胞から“発芽”するときにそれらウイルスの脂質エンベロープを入手し、形質膜に由来するか又は細胞内小器官の膜に由来する膜を獲得することができる。インフルエンザウイルス粒子及びVLPは宿主細胞の形質膜から発芽する。例えば哺乳動物細胞系又はバキュロウイルス細胞系では、インフルエンザは形質膜から発芽する（Quan et al. 2007）。エンベロープを有するウイルスでほんの少しが植物に感染することが判明している（例えばトボウイルス及びラブドウイルスのメンバー）。エンベロープを有する既知の植物ウイルスに関して、それらは宿主細胞の内部の膜から発芽することを特徴とし、形質膜から発芽しない。小数の組換えVLPが植物宿主で生成されたが、いずれも形質膜から誘導されず、形質膜由来VLP（インフルエンザVLPを含む）が植物中で製造されえるかという疑問が生じた。

これまでのインフルエンザVLP製造技術は多数のウイルスタンパク質の同時発現に依存し、この依存性はこれらの技術の欠点となる。なぜならば、大流行及び毎年の流行の場合、応答期間がワクチン接種に極めて重要だからである。1つのウイルスタンパク質の発現のみを必要とすることが、ワクチン開発を加速するために所望される。世界の人口をインフルエンザから防御するために、さらに将来の大流行を食い止めるために、ワクチン製造

10

20

30

40

50

業者は、効率的で迅速なワクチン製造方法を開発しなければならないであろう。ワクチン製造にこれまでのような受精卵の使用は、不十分であり、冗長な工程を必要とする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、改善されたインフルエンザウイルス様粒子（VLP）を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明にしたがえば、植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、エンベロープウイルス由来の抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。前記抗原はインフルエンザヘマグルチニン（HA）でもよい。10

本発明はまた、以下の工程を含む、インフルエンザウイルス様粒子（VLP）を製造する方法を提供する：

a) 植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、エンベロープウイルス由来抗原（例えばインフルエンザヘマグルチニン（HA））をコードする核酸を、植物又はその部分に導入する工程、及び

b) 前記植物又はその部分を、前記核酸の発現を許容する条件下でインキュベートし、それによってVLPを製造する工程。

本発明はさらに、前記植物を採集する工程及び前記植物組織からVLPを分離する工程を含むことができる。20

本発明は、上記方法の導入工程（工程a）で、核酸を植物中で一過性に発現するか、又は核酸を植物中で安定的に発現することができる上記方法を含む。さらにまた、VLPはサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製することができる。

本発明はまた、インフルエンザウイルスHAタンパク質及び1つ以上の植物脂質を含むウイルス様粒子（VLP）を提供する。

さらに本発明に含まれるのは、インフルエンザウイルスHAタンパク質を含む有効用量のVLP、1つ以上の植物脂質、及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物である。

本発明はまた、植物中でVLPを形成するHAタンパク質のフラグメント又は部分を意図する。30

【0011】

VLPは、1つ以上の亜型（H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15又はH16を含む）のHAタンパク質、又はそのフラグメント若しくは部分を含むことができる。そのようなHAタンパク質を含む亜型の例には以下が含まれる：A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) A/インドネシア/5/2006 (H5N1)、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/カモメ (herring gull) /DE/677/88 (H2N8)、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/上海/1/2000、A/キタオナガガモ/TX/828189/02、A/シチメンチョウ/オンラインリオ/6118/68 (H8N4)、A/ハシビロガモ/イラン/G54/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949 (H10N7)、A/アヒル/イギリス/56 (H11N6)、A/アヒル/アルバータ/60/76 (H12N5)、A/カモメ/メリーランド/704/77 (H13N6)、A/マガモ/グルジェブ (Gurjev) /263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83 (H15N8)、A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99 (H16N3)、B/リー (Lee) /40、C/ヨハネスブルグ/66、A/プエルトリコ/8/34 ((H1N1)、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1)、A/プリスペーン10/2007 (H3N2)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57 (H2N2)、A/アンフイ (Anhui) /1/2005 (H5N1)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)、A/ウマ/プラハ/56 (H7N7)、A/香港/1073/99 (H9N2)）。40

本発明のある特徴では、HAタンパク質はH1、H2、H3、H5、H6、H7又はH9亜型であってもよい。別の特徴では、H1タンパク質は、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1)、A/プエルトリコ/8/34 (H1N1)、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1)、又はA/ソロモン諸島3/2006 (H150

N1) 株に由来することができる。H3タンパク質はまた、A/プリスペーン10/2007 (H3N2) 又はA/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2) 株に由来することができる。本発明のさらに別の特徴では、H2タンパク質はA/シンガポール/1/57 (H2N2) 株に由来することができる。H5タンパク質は、A/アンフイ (Anhui) /1/2005 (H5N1) 、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1) 、又はA/インドネシア/5/2005株に由来することができる。H6タンパク質はA/コガモ/香港/W312/97 (H6N1) 株に由来することができる。H7タンパク質はA/ウマ/プラハ/56 (H7N7) 株に由来することができる。本発明のある特徴では、H9タンパク質はA/香港/1073/99 (H9N2) 株に由来することができる。本発明のさらに別の特徴では、HAタンパク質は、B/マレーシア/2506/2004又はB/フロリダ/4/2006を含むインフルエンザウイルスB型に由来することができる。H1、H2、H3、H5、H6、H7又はH9亜型由来のHAタンパク質のアミノ酸配列の例には配列番号:48 - 59が含まれる。

10

【 0 0 1 2 】

インフルエンザウイルスHAタンパク質はH5インドネシアであってもよい。

本発明はまた、HAタンパク質をコードする配列を含む核酸分子を提供する。核酸分子はさらに、HAタンパク質をコードする配列に機能的に連結された1つ以上の調節領域を含むことができる。前記核酸分子は、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15又はH16をコードする配列を含むことができる。本発明のある特徴では、前記核酸分子によってコードされるHAタンパク質はH1、H2、H3、H5、H6、H7又はH9亜型であってもよい。前記核酸分子によってコードされるH1タンパク質は、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 、A/ペルトリコ/8/34 (H1N1) 、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1) 、又はA/ソロモン諸島3/2006 (H1N1) 株に由来する。本発明のある特徴では、前記核酸分子によってコードされるH3タンパク質は、A/プリスペーン10/2007 (H3N2) 、又はA/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2) 株に由来することができる。本発明のさらに別の特徴では、前記核酸分子によってコードされるH2タンパク質は、A/シンガポール/1/57 (H2N2) 株に由来することができる。前記核酸分子によってコードされるH5タンパク質はまた、A/アンフイ/1/2005 (H5N1) 、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1) 、又はA/インドネシア/5/2005株に由来することができる。本発明のある特徴では、前記核酸分子によってコードされるH6タンパク質はA/コガモ/香港/W312/97 (H6N1) 株に由来することができる。前記核酸分子によってコードされるH7タンパク質はまたA/ウマ/プラハ/56 (H7N7) 株に由来することができる。さらにまた、前記核酸分子によってコードされるH9タンパク質はA/香港/1073/99 (H9N2) 株に由来することができる。H1、H2、H3、H5、H6、H7又はH9亜型由来のHAタンパク質をコードする核酸分子の配列の例には配列番号:36 - 47及び60 - 73が含まれる。

20

前記核酸配列は、インフルエンザウイルスHAタンパク質H5インドネシアをコードすることができる。

30

【 0 0 1 3 】

HAタンパク質をコードする配列に機能的に連結することができる調節領域には、植物細胞、昆虫細胞又は酵母細胞で作動するものが含まれる。そのような調節領域には、プラストシアニン調節領域、リブロース1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) の調節領域、クロロフィルa/b結合タンパク質 (CAB) 、ST-LS1、ポリヘドリン調節領域、又はgp64調節領域が含まれる。他の調節領域には、5' UTR、3' UTR又はターミネータ配列が含まれる。プラストシアニン調節領域はアルファルファプラストシアニン調節領域であってもよい。5' UTR、3' UTR又はターミネータ配列もまたアルファルファ配列であってもよい。

40

対象者 (subject) においてインフルエンザウイルス感染に対する免疫を誘発する方法もまた提供され、前記方法は、インフルエンザウイルスHAタンパク質、1つ以上の植物脂質、及び医薬的に許容可能な担体を含むウイルス様粒子を投与する工程を含む。前記ウイルス様粒子は、対象者に経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与してもよい。

本発明はまた、インフルエンザ、麻疹、エボラ、マルブルク及びHIVから成る群から選択されるウイルス由来の1つ以上のタンパク質、並びに非シアリル化宿主の製造細胞由來

50

の1つ以上の脂質を含むウイルス様粒子（VLP）に関する。HIVタンパク質はp24、gp120又はgp41で、エボラウイルスタンパク質はVP30又はVP35で、マルブルクウイルスタンパク質はGp/SGPで、麻疹ウイルスタンパク質はH-タンパク質又はF-タンパク質であってもよい。

さらにまた、本発明は、インフルエンザウイルスHAタンパク質及び1つ以上の宿主脂質を含むウイルス様粒子（VLP）に関する。例えば、宿主が昆虫である場合、前記ウイルス様粒子（VLP）はインフルエンザウイルスHAタンパク質及び1つ以上の昆虫脂質を含むことができ、または宿主が酵母である場合は、前記ウイルス様粒子（VLP）はインフルエンザウイルスHAタンパク質及び1つ以上の酵母脂質を含むことができる。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、2つ以上のインフルエンザ株又は亜型のVLPを含む組成物に関する。2つ以上の亜型又は株は以下を含む群から選択することができる：A/ニューカレドニア/20/99（H1N1）A/インドネシア/5/2006（H5N1）、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/カモメ（herring gull）/DE/677/88（H2N8）、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/上海/1/2000、A/キタオナガガモ/TX/828189/02、A/シチメンチョウ/オンタリオ/6118/68（H8N4）、A/ハシビロガモ/イラン/G54/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949（H10N7）、A/アヒル/イギリス/56（H11N6）、A/アヒル/アルバータ/60/76（H12N5）、A/カモメ/メリーランド/704/77（H13N6）、A/マガモ/グルジェブ（Gurjev）/263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83（H15N8）、A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99（H16N3）、B/リー（Lee）/40、C/ヨハネスブルグ/66、A/エルトリコ/8/34（H1N1）、A/ブリスベーン/59/2007（H1N1）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）、A/ブリスベーン10/2007（H3N2）、A/ウィスコンシン/67/2005（H3N2）、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57（H2N2）、A/アンフイ（Anhui）/1/2005（H5N1）、A/ベトナム/1194/2004（H5N1）、A/コガモ/香港/W312/97（H6N1）、A/ウマ/プラハ/56（H7N7）、A/香港/1073/99（H9N2）。2つ以上の亜型又は株のVLPはほぼ等量で存在することができる。あるいは、1つ以上の亜型又は株が、提示される株又は亜型の大半であってもよい。

本発明はまた、動物又は標的生物でインフルエンザウイルス感染に対する免疫を誘発する方法に関する。前記方法は、1つ以上のVLPを含むワクチンの有効量を投与する工程を含み、前記VLPは、非シアリル化宿主（例えば植物宿主、昆虫宿主又は酵母宿主）を用いて製造される。前記ワクチンは、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与することができる。標的生物は、ヒト、靈長類、ウマ、ブタ、鳥（鳥類）、水鳥、渡り鳥、ウズラ、アヒル、ガン、家禽、ニワトリ、ラクダ、イヌ科の動物、イヌ、ネコ科の動物、ネコ、トラ、ヒョウ、ジャコウネコ、ミンク、イシテン、フェレット、家庭用ペット、家畜、マウス、ラット、アザラシ、クジラなどを含む群から選択することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明は、種々のインフルエンザ株由来のヘマグルチニン（HA）を含むVLPを、VLPを製造することができる適切な宿主、例えば植物、昆虫又は酵母で製造する方法を提供する。植物中で製造されるVLPは植物起源の脂質を含み、昆虫細胞で製造されるVLPは昆虫細胞の形質膜由来の脂質（一般的には“昆虫脂質”と称される）を含み、さらに酵母で製造されるVLPは酵母細胞の形質膜に由来する脂質（一般的には“酵母脂質”と称される）を含む。

植物中のVLPの製造は、昆虫細胞培養でこれらの粒子を製造するよりもいくつかの利点を提供する。植物脂質は特定の免疫細胞を刺激し、誘発される免疫応答を強化することができる。植物膜は、脂質、ホスファチジルコリン（PC）及びホスファチジルエタノールアミン（PE）で構成され、さらにまた、植物並びにいくつかの細菌及び原生動物に固有のグリコスフィンゴ脂質を含む。スフィンゴ脂質は、PC又はPEのようなグリセロールのエステルではなく、むしろ長鎖アミノアルコールから成り、このアミノアルコールは18を超える炭素を含む脂肪酸鎖とアミド結合を形成するという点で珍しい。PC及びPEはグリコスフィンゴ脂質と同様に、哺乳動物の免疫細胞（例えば樹状細胞のような抗原提示細胞（APC）並びにマクロファージ及び他の細胞（胸腺及び肝臓のB及びTリンパ球を含む））によつ

10

20

30

40

50

て発現されるCD1分子と結合することができる(M. Tsuji, 2006)。さらにまた、植物脂質の存在による潜在的なアジュバント効果に加えて、植物N-グリカンの抗原提示細胞による糖タンパク質抗原の捕捉促進能力(Saint-Jore-Dupas, 2007)は、植物中のVLPの製造の利点でありえる。

理論に拘束されないが、植物生成VLPは、他の製造系で製造されるVLPよりも強い免疫反応を誘発するであろうということ、及びこれら植物生成VLPによって誘発される免疫反応は、生又は弱毒完全ウイルスワクチンによって誘発される免疫反応と比較したときいつも強いであろうということが予想される。

【0016】

完全ウイルスで製造されたワクチンとは反対に、VLPは非感染性であり、したがって制限的な生物学的封じ込めは、完全な感染性ウイルスを用いて作業する場合ほど重要な問題ではなく、前記封じ込めは製造に要求されないのでVLPは有利である。植物生成VLPは、発現系を温室又は野外で生育させることを可能にし、したがってきわめて経済的であること及びスケールアップに極めて適切であることによって更なる利点を提供する。10

さらにまた、植物は、シアリル酸残基を合成しこれをタンパク質に付加するために必要な酵素を含まない。VLPはノイラミニダーゼ(NA)の非存在下で製造することができ、NAを同時発現させる必要がなく、製造細胞をシアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)で処理又は抽出して植物中のVLPの生成を確認する必要もない。

本発明にしたがって製造されたVLPは、RNAと結合することが知られているM1タンパク質を含まない。RNAはVLP調製物の夾雑物であり、VLP製品の規制承認を得るときには望ましいものではない。20

本発明のこの概要は必ずしも本発明の全ての特徴を記載しているわけではない。

本発明の上記の特徴及び他の特徴は、添付の図面に論及する以下の記述からより明らかとなるであろう。前記図面は以下のとおりである：

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】図1Aは本発明の実施態様にしたがってH1の発現のために使用されるアルファルファのプラスチアニンを土台とする発現カセットの配列を示す(配列番号:8)。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)シグナルペプチドには下線が付されている。クローニングに用いられるBgIII(AGATCT)及びSacI(GAGCTC)制限部位は太字で示されている。30

【図1B】図1Bは、インフルエンザヘマグルチニンの機能的ドメインの模式図を示す。HA0の切断後、HA1及びHA2フラグメントはジスルフィド架橋によって結合したままである。

【図2A】図2AはHA亜型H1の発現のためにアッセンブリングしたプラスミド540を図示する。

【図2B】図2BはHA亜型H5の発現のためにアッセンブリングしたプラスミド660を図示する。

【図3A】図3AはヘマグルチニンH1又はH5を生成する葉のタンパク質抽出物のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。図3AはH1の溶出プロファイルを示す；ブルーデキストラン2000(三角形)及びタンパク質(ひし形)。40

【図3B】図3Bは、サイズ排除クロマトグラフィー(S500HRビーズ)に続くH1溶出分画の免疫的検出(ウェスタンプロット；抗H1)を示す。

【図3C】図3CはH5の溶出プロファイルを示す；ブルーデキストラン2000(三角形)及びタンパク質(ひし形)。

【図3D】図3Dは、サイズ排除クロマトグラフィー(S500HRビーズ)に続くH5溶出分画の免疫的検出(ウェスタンプロット；抗H5)を示す。

【図4A】図4Aは、サイズ排除カラムの溶出分画9由来の大きなヘマグルチニンH1及びH5構造物の電子顕微鏡写真を示す。図4Aは、多数の類似構造の存在を示す、H1のVLPの50,000倍拡大を示す(バーは200nmを表す)。

【図4B】図4BはH1 VLPの150,000倍拡大を示す(バーは100nmを表す)。50

【図4C】図4Cは、多数の類似構造の存在を示す、H5 VLPの50,000倍拡大を示す（バーは50nmを表す）。

【図5A】図5AはH1のN末端フラグメントの配列を示す（配列番号:1）。

【図5B】図5BはH1のC-末端フラグメントを示す（配列番号:2）。

【図5C】図5CはH1のHA0をコードする完全な配列を示す（配列番号:28）。

【図6】最初のATGの直ぐ上流でHindIII部位によって、さらに終止（TAA）コドンの直ぐ下流でSacI部位によってフランкиングされる、H5をコードする配列を示す（配列番号:3）。

【図7A】図7AはプライマーPlasto-443cの配列を示す（配列番号:4）。

【図7B】図7BはプライマーSpHA(Ind)-Plasto.rの配列を示す（配列番号:5）。

10

【図7C】図7CはプライマーPlasto-SpHA(Ind).cの配列を示す（配列番号:6）。

【図7D】図7DはプライマーHA(Ind)-Sac.rの配列を示す（配列番号:7）。

【図8A】図8AはHA1ペプチド配列のアミノ酸配列を示す（配列番号:9）。

【図8B】図8BはHA5ペプチド配列のアミノ酸配列を示す（配列番号:10）。天然のシグナルペプチドは太字で示されている。

【図9】インフルエンザA、H7亜型のHAの配列を示す（配列番号:11）。

【図10A】図10AはインフルエンザA HA、H2亜型の配列を示す（配列番号:12）。

【図10B】図10BはインフルエンザA HA、H3亜型の配列を示す（配列番号:13）。

【図10C】図10CはインフルエンザA HA、H4亜型の配列を示す（配列番号:14）。

【図10D】図10DはインフルエンザA HA、H亜型5の配列を示す（配列番号:15）。

20

【図10E】図10EはインフルエンザA HA、H6亜型の配列を示す（配列番号:16）。

【図10F】図10FはインフルエンザA HA、H8亜型の配列を示す（配列番号:17）。

【図10G】図10GはインフルエンザA HA、H9亜型の配列を示す（配列番号:18）。

【図10H】図10HはインフルエンザA HA、H10亜型の配列を示す（配列番号:19）。

【図10I】図10IはインフルエンザA HA、H11亜型の配列を示す（配列番号:20）。

【図10J】図10JはインフルエンザA HA、H12亜型の配列を示す（配列番号:21）。

【図10K】図10KはインフルエンザA HA、H13亜型の配列を示す（配列番号:22）。

【図10L】図10LはインフルエンザA HA、H14亜型の配列を示す（配列番号:23）。

【図10M】図10MはインフルエンザA HA、H15亜型の配列を示す（配列番号:24）。

【図10N】図10NはインフルエンザA HA、H16亜型の配列を示す（配列番号:25）。

30

【図10O】図10OはインフルエンザB HAの配列を示す（配列番号:26）。

【図10P】図10PはインフルエンザC HAの配列を示す（配列番号:27）。

【図10Q】図10QはプライマーXmaI-pPlas.cの配列を示す（配列番号:29）。

【図10R】図10RはプライマーSacI-pPlas.rの配列を示す（配列番号:30）。

【図10S】図10SはプライマーSacI-PlasTer.cの配列を示す（配列番号:31）。

【図10T】図10TはプライマーEcoRI-PlasTer.rの配列を示す（配列番号:32）。

【図11】本明細書で用いられるいくつかの構築物の模式図を示す。構築物660は、プラストシアニンプロモータ（plasto）及びターミネータと機能的に連結されている、HA亜型H5をコードするヌクレオチド配列を含む。構築物540は、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド（SP PDI）と結合し、さらにプラストシアニンプロモータ（Plasto）及びターミネータ（Pter）と機能的に連結されている、HA亜型H1をコードするヌクレオチド配列を含む。構築物544はHA亜型H1の発現のためにアッセンブリングされ、H1をコードする前記ヌクレオチド配列は、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド（SP PDI）及びGCN4pII ロイシンジッパー（HIのトランスメンブレンドメイン及び細胞質テールの代用）と結合し、さらにプラストシアニンプロモータ（Plasto）及びターミネータ（Pter）と機能的に連結されている。さらに、インフルエンザA/PR/8/34由来のM1コード領域発現用構築物750は、タバコエッチウイルス（TEV）の5'UTRと結合し、さらに2組の35Sプロモータ及びNosターミネータと機能的に連結されている。

【図12】構築物660（レーン3）で形質転換したN. benthamianaの葉

40

50

のタンパク質抽出物における、抗H5(ベトナム)抗体を用いたH5の免疫的検出を示す。インフルエンザA/ベトナム/1203/2004由来の市販H5を検出陽性コントロールとして用い(レーン1)、さらに空ベクターで形質転換した葉由来のタンパク質抽出物を陰性コントロールとして用いた(レーン2)。

【図13】サイズ排除クロマトグラフィーによるヘマグルチニン構造の性状決定を示す。H5、H1、可溶性H1、又はH1及びM1を産生する別個のバイオマスのタンパク質抽出物を、S-500HRでゲルろ過によって分離した。ロゼット型の市販H1もまた分画した(H1ロゼット)。図13Aは、相対的タンパク質含有量についての溶出分画の分析を示す(相対的タンパク質レベル:バイオマス分画の標準的タンパク質溶出プロファイルが示されている)。ブルーデキストラン2000(2MDa参照標準物)溶出ピークが表示されている。図13Bは、抗H5(ベトナム)抗体(H5用)を用いたイムノプロッティングによるヘマグルチニンの存在についての溶出分画の分析を示す。図13Cは、抗インフルエンザA抗体による溶出分画のH1についての分析を示す。図13Dは、抗インフルエンザA抗体による可溶性H1についての溶出分画の分析を示す。図13Eは、抗インフルエンザA抗体による溶出分画のH1ロゼットについての分析を示す。図13Fは、抗インフルエンザA抗体による溶出分画のH1+M1についての分析を示す。

【図14 A】図14はシュクロースグラディエント遠心によるインフルエンザH5構造物の濃縮、及びヘマグルチニン濃縮分画の電子顕微鏡試験を示す。図14Aは、シュクロース濃度勾配遠心から得た分画の性状決定を示す。抗H5(ベトナム)抗体を用いたイムノプロッティングによって、H5の存在について(上段パネル)並びにそれらの相対的タンパク質含有量及び血球凝集能力について(グラフ)各分画を分析した。

【図14 B】図14Bは、シュクロースグラディエント遠心の17、18及び19分画プールの陰性染色透過電子顕微鏡試験を示す。バーは100nmを表す。

【図15 A】図15はインフルエンザH5 VLPの精製を示す。図15Aは、タンパク質含有物のクマシープルーカー染色SDS-PAGE分析を示す:清澄化工程 - レーン1 = 粗抽出物、レーン2 = pH 6調整抽出物、レーン3 = 熱処理抽出物、レーン4 = DEろ過抽出物;フェュチュイン親和性精製工程 - レーン5 = ローディング、レーン6 = 洗浄、レーン7 = 溶出(10×濃縮)。

【図15 B】図15Bは、精製H5 VLPサンプルの陰性染色透過電子顕微鏡試験を示す。バーは100nmを表す。

【図15 C】図15Cは、構造の詳細を示すために拡大した単離H5 VLPを示す。

【図15 D】図15Dは、A/ベトナム/1203/2004(H5N1)株のHAに対して作製したウサギポリクローナル抗体を用いたクマシーカー染色還元SDS-PAGE(レーンA)及びウェスタンプロット(レーンB)におけるH5 VLP生成物を示す。

【図16】インフルエンザAウイルス(A/ニューカレドニア/20/99(H1N1))ヘマグルチニン(HA)遺伝子のヌクレオチド配列(完全コード)を示す。GenBankアクセスションNo. AY289929(配列番号:33)。

【図17】タンパク質ジスルフィドイソメラーゼのメディカゴ・サチヴァ(Medicago sativa)mRNAのヌクレオチド配列を示す。GenBankアクセスションNo. Z11499(配列番号:34)。

【図18】インフルエンザAウイルス(A/ブルートリコ/8/34(H1N1))セグメント7のヌクレオチド配列(完全な配列)を示す。GenBankアクセスションNo. NC_002016.1(配列番号:35)。

【図19】H5産生組織の陽性染色透過電子顕微鏡観察によるVLP蓄積の局在を示す。CW:細胞壁、ch:クロロプラスト、pm:形質膜、VLP:ウイルス様粒子。バーは100nmを表す。

【図20】図20は植物生成インフルエンザH5 VLP又は組換え可溶性HAでワクチン接種したBalb/cマウスでの追加免疫14日後の血清抗体応答の誘発を示す。

【図20 A】図20(A):筋肉内注射により免疫したマウスの抗体応答。

【図20 B】図20(B):鼻内投与により免疫したマウスの抗体応答。抗体応答は、不活性完全H5N1ウイルス(A/インドネシア/5/05)に対して測定した。GMT:相乗平均力値。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。バーは平均偏差を表す

10

20

30

40

50

。 * 組換え可溶性HAと比較して $p < 0.05$ 。

【図21A】図21は植物生成インフルエンザH5 VLP又は組換え可溶性HAでワクチン接種したBalb/cマウスでの追加免疫14日後の血球凝集阻害抗体応答(HAI)を示す。図21(A)：筋肉内注射により免疫したマウスの抗体応答。

【図21B】図21(B)：鼻内投与により免疫したマウスの抗体応答。HAI抗体応答は、不活化完全H5N1ウイルス(A/インドネシア/5/05)を用いて測定した。GMT：相乗平均力値。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。バーは平均偏差を表す。組換え可溶性HAと比較して* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図22A】図22はVLPのマウスにおける免疫原性に対するアジュバントの効果を示す。

図22(A)：筋肉内注射により免疫されたマウスにおけるミョウバンの効果。

10

【図22B】図22(B)：鼻内投与により免疫されたマウスにおけるキトサンの効果。HAI抗体応答は、不活化完全H5N1ウイルス(A/インドネシア/5/05)を用いて測定した。GMT：相乗平均力値。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。バーは平均偏差を表す。* 対応する組換え可溶性HAと比較して $p < 0.05$ 。

【図23A】図23はVLP投与に対する抗体応答を示す。図23(A)：筋肉内注射によりワクチン接種したマウスでの追加免疫後30日の抗インドネシア/5/05免疫グロブリンアイソタイプ。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。コーティング薬剤として完全不活化ウイルス用いELISAを実施した。バーは平均偏差を表す。対応する組換え可溶性HAと比較して* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図23B】図23(B)：完全不活化ウイルスに対する抗体力値。全ての群が陰性コントロールと統計的に異なっている。

20

【図24】最初の投与後2週間(週2)、追加免疫後14日(週5)、又は追加免疫後30日(週7)の同種の完全不活化ウイルス(A/インドネシア/5/05)に対する抗体力値を示す。GMT：相乗平均力値。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。* 組換え可溶性HAと比較して $p < 0.05$ 。

【図25A】図25は血清抗体のin vitro交差反応性を示す。(A)完全不活化ウイルスに対する抗体力値。

【図25B】(B)種々の完全不活化ウイルスに対する血球凝集阻害力値。値は、1群につき5匹のマウスの逆終末点力値のGMT(\log_2)である。バーは平均偏差を表す。全ての群が陰性コントロールと統計的に異なっている。対応する組換え可溶性HAと比較して* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

30

【図26A】図26は植物生成H5 VLPの有効性を示す。(A)インフルエンザ株A/トルコ/58/2/06(H5N1)の 10LD_{50} ($4.09 \times 10^5 \text{ CCID}_{50}$)によるチャレンジ後のマウスの生存率。

【図26B】(B)チャレンジ後の免疫マウスの体重。値は生存マウスの平均体重である。

【図27A】図27は植物由来インフルエンザVLPの起源を示す。(A)精製インフルエンザVLPの極性脂質組成。タンパク質 $40 \mu\text{g}$ 相当量に含まれる脂質を記載のようにVLPから抽出し、HP-TLCで分離し、高度に精製したタバコの形質膜(PM)から単離した脂質の泳動プロファイルと比較した。脂質の略語は以下のとおりである：DGDG、ジガラクトシルジアシルグリセロール；gluCER、グルコシリル-セラミド；PA、リン酸(phosphatic acid)；PC、ホスファチジルコリン；PE、ホスファチジルエタノールアミン；PG、ホスファチジルグリセロール；PI、ホスファチジルイノシトール；PS、ホスファチジルセリン；SG、ステリル-グリコシド。

40

【図27B】(B)精製インフルエンザVLPの中性脂質組成。タンパク質 $20 \mu\text{g}$ 相当量に含まれる脂質を記載のようにVLPから抽出し、HP-TLCで分離し、シトステロールの泳動と比較した。

【図27C】(C)精製VLP並びにタバコの葉(PM_L)及びBY2タバコ細胞($\text{PM}_{\text{BY}2}$)由来の高度精製PMの形質膜マーカーATPase(PMA)の免疫的検出。18マイクログラムのタンパク質を各レーンにロードした。

【図28】クローン774(A/ブリスベーン/59/2007(H1N1))のヌクレオチド配列(配列番

50

号:36)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図29】クローン775(A/ソロモン諸島3/2006(H1N1))のヌクレオチド配列(配列番号:37)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図30】クローン776(A/プリスペーン10/2007(H1N1))のヌクレオチド配列(配列番号:38)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図31】クローン777(A/ウィスコンシン/67/2006(H3N2))のヌクレオチド配列(配列番号:39)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図32】クローン778(B/マレーシア/2506/2004)のヌクレオチド配列(配列番号:40)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図33】クローン779(B/フロリダ/4/2006)のヌクレオチド配列(配列番号:41)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図34】クローン780(A/視bがポール/1/57(H2N2))のヌクレオチド配列(配列番号:42)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図35】クローン781(A/アンフィ/1/2005(H5N1))のヌクレオチド配列(配列番号:43)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図36】クローン782(A/ベトナム/1194/2004(H5N1))のヌクレオチド配列(配列番号:44)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図37】クローン783(A/コガモ/香港/W312/97(H6N1))のヌクレオチド配列(配列番号:45)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランкиングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図38】クローン784(A/ウマ/プラハ/56(H7N7))のヌクレオチド配列(配列番号:46)) のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(

10

20

30

40

50

5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランギングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図39】クローン785(A/香港/1037/99(H9N2))のヌクレオチド配列(配列番号:47))のDraIIIからSacI部位に及ぶ配列を示す。コード配列は、プラスティアニン調節領域(5'末端のDraIII制限部位で始まる)及び終止コドンと3'末端のSacI部位によってフランギングされている。制限部位には下線が付されている。ATGは太字で下線が付されている。

【図40A】図40Aは、クローン774(A/ブリスベーン/59/2007(H1N1))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:48)を示す。クローン774のオープンリーディングフレームは、図28に表示したATGで開始する。

【図40B】図40Bは、クローン775(A/ソロモン諸島3/2006(H1N1))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:49)を示す。クローン775のオープンリーディングフレームは、図29に表示したATGで開始する。

【図41A】図41Aは、クローン776(A/ブリスベーン/10/2007(H3N2))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:50)を示す。クローン776のオープンリーディングフレームは、図30に表示したATGで開始する。

【図41B】図41Bは、クローン777(A/ウィスコンシン/67/2005(H3N2))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:51)を示す。クローン777のオープンリーディングフレームは、図31に表示したATGで開始する。

【図42A】図42Aは、クローン778(B/マレーシア/2506/2004)から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:52)を示す。クローン778のオープンリーディングフレームは、図32に表示したATGで開始する。

【図42B】図42Bは、クローン779(B/フロリダ/4/2006)から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:53)を示す。クローン779のオープンリーディングフレームは、図33に表示したATGで開始する。

【図43A】図43Aは、クローン780(A/シンガポール/1/57(H2N2))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:54)を示す。クローン780のオープンリーディングフレームは、図34に表示したATGで開始する。

【図43B】図43Bは、クローン781(A/アンフィ/1/2005(H5N1))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:55)を示す。クローン781のオープンリーディングフレームは、図35に表示したATGで開始する。

【図44A】図44Aは、クローン782(A/ベトナム/1194/2004(H5N1))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:56)を示す。クローン782のオープンリーディングフレームは、図36に表示したATGで開始する。

【図44B】図44Bは、クローン783(A/コガモ/香港/W312/97(H6N1))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:57)を示す。クローン783のオープンリーディングフレームは、図37に表示したATGで開始する。

【図45A】図45Aは、クローン784(A/ウマ/プラハ/56(H7N7))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:58)を示す。クローン784のオープンリーディングフレームは、図38に表示したATGで開始する。

【図45B】図45Bは、クローン785(A/香港/1073/99(H9N2))から翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号:59)を示す。クローン785のオープンリーディングフレームは、図39に表示したATGで開始する。

【図46】サイズ排除クロマトグラフィーに続く植物生成VLPの溶出分画の免疫的検出(ウェスタンプロット)を示す。ヘマグルチニン亜型H1、H2、H5、H6及びH9が示されている。ヘマグルチニンは、VLPの溶出に対応する分画7-14で検出される。

【図47】毎年流行する株に由来する一連のH1ヘマグルチニンの発現のイムノプロット分析を示す。レーン1及び2にそれぞれ10 μg及び20 μgのタンパク質抽出物をロードした。

【図48】潜在的大流行株に由来する一連のH5ヘマグルチニンの発現のイムノプロット分

10

20

30

40

50

析を示す。レーン1及び2にそれぞれ10 µg及び20 µgのタンパク質抽出物をロードした。

【図 4 9】AGL1/660によりアグロバクテリア浸透を実施したニコチアナ・タバコム (*Nicotiana tabacum*) の葉のタンパク質抽出物中のA/インドネシア/5/2005株由来のH5のイムノプロットを示す。2つの植物に浸透を実施し、各植物から得た10及び20 µgのタンパク質抽出物をレーン1及び2にそれぞれロードした。

【図 5 0 A】図50は血清抗体のin vitro交差反応性を示す。(A) 植物生成インフルエンザH5 VLPによる第1回の免疫後14日におけるフェレット血清中の血球凝集阻害(HI)力価。HAI抗体応答は、以下の不活化完全H5N1ウイルスを用いて測定した:A/シチメンチョウ/トルコ/1/05、A/ベトナム/1194/04、A/アンフィ/5/05及び同種株A/インドネシア/5/05。値は、1群につき5匹のフェレットの逆終末点力価のGMT(\log_2)である。斜線 - A/インドネシア/6/06(クレード2.1.3); 市松模様 - A/シチメンチョウ/トルコ/1/05(クレード2.2); 白棒線 - A/ベトナム/1194/04(クレード1); 黒棒線 - A/アンフィ/5/05。応答個体が表示されている。バーは平均偏差を表す。
10

【図 5 0 B】(B) 植物生成インフルエンザH5 VLPによる2回目の追加免疫後14日におけるフェレット血清中の血球凝集阻害(HI)力価。HAI抗体応答は、以下の不活化完全H5N1ウイルスを用いて測定した:A/シチメンチョウ/トルコ/1/05、A/ベトナム/1194/04、A/アンフィ/5/05及び同種株A/インドネシア/5/05。値は、1群につき5匹のフェレットの逆終末点力価のGMT(\log_2)である。斜線 - A/インドネシア/6/06(クレード2.1.3); 市松模様 - A/シチメンチョウ/トルコ/1/05(クレード2.2); 白棒線 - A/ベトナム/1194/04(クレード1); 黒棒線 - A/アンフィ/5/05。応答個体が表示されている。バーは平均偏差を表す。
20

【図 5 1】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/インドネシア/5/2005由来H5のヘマグルチニンコード配列(構築物#660)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 2】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/ニューカレドニア/20/1999由来H1のヘマグルチニンコード配列(構築物#540)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 3】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/ブリスベーン/59/2007由来H1のヘマグルチニンコード配列(構築物#774)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。
30

【図 5 4】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)由来H1のヘマグルチニンコード配列(構築物#775)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 5】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/シンガポール/1/57(H2N2)由来H2のヘマグルチニンコード配列(構築物#780)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 6】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/アンフィ/1/2005(H5N1)由来H5のヘマグルチニンコード配列(構築物#781)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 7】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/ベトナム/1194/2004(H5N1)由来H5のヘマグルチニンコード配列(構築物#782)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。
40

【図 5 8】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/コガモ/香港/W312/97(H6N1)由来H6のヘマグルチニンコード配列(構築物#783)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 5 9】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/香港/1073/99(H9N2)由来H9のヘマグルチニンコード配列(構築物#785)、アルファルファプラスティニアニン3' UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットの核酸配列を示す。

【図 6 0】アルファルファプラスティニアニンプロモータ及び5' UTR、A/ブリスベーン/10/2007(H3N2)由来H3のヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスティニアニン3' U
50

TR及びターミネータ配列を含むHA発現カセッタの核酸配列を示す。

【図61】アルファルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、A/ウィスコンシン/67/2005(H3N2)由来H3のヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセッタの核酸配列を示す。

【図62】アルファルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、A/ウマ/プラハ/56(H7N7)由来H7のヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセッタの核酸配列を示す。

【図63】アルファルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、B/マレーシア/2506/2004由来HAのヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセッタの核酸配列を示す。 10

【図64】アルファルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、B/フロリダ/4/2006由来HAのヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセッタの核酸配列を示す。

【図65】A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)のHA(配列番号:33)によってコードされる)、A/ブリスベーン/59/2007(H1N1)のHA(配列番号:48)、A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)のHA(配列番号:49)、及び配列番号:9のコンセンサスアミノ酸配列(配列番号:74)を示す。X1(3位)はA又はV; X2(52位)はD又はN; X3(90位)はK又はR; X4(99位)はK又はT; X5(111位)はY又はH; X6(145位)はV又はT; X7(154位)はE又はK; X8(161位)はR又はK; X9(181位)はV又はA; X10(203位)はD又はN; X11(205位)はR又はK; X12(210位)はT又はK; X13(225位)はR又はK; X14(268位)はW又はR; X15(283位)はT又はN; X16(290位)はE又はK; X17(432位)はI又はL; X18(489位)はN又はDである。 20

【図66】配列番号:33によってコードされるH1ニューカレドニア(AAP34324.1)のアミノ酸配列を示す。

【図67】配列番号:35によってコードされるH1ペルトリコ(NC_0409878.1)のアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明はウイルス様粒子の製造に関する。より具体的には、本発明はインフルエンザ抗原を含むウイルス様粒子の製造を目的とする。

以下の記載は好ましい実施態様である。 30

本発明は、エンベロープを有するウイルスの抗原(例えばインフルエンザヘマグルチニン(HA))をコードするヌクレオチド配列(前記は植物中で活性な調節領域と機能的に連結されている)を含む核酸を提供する。

さらにまた、本発明は植物中でウイルス様粒子(VLP)を製造する方法を提供する。前記方法は、植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、抗原をコードする核酸を植物又はその部分に導入する工程、及び前記核酸の発現を許容する条件下で前記植物又は植物の部分をインキュベートし、それによってVLPを製造する工程を必要とする。

VLPはインフルエンザウイルスから製造できる。しかしながら、VLPはまた、形質膜から誘導される他のウイルス(麻疹、エボラ、マルブルク及びHIVを含むがただしこれらに限定されない)から製造することができる。 40

本発明は、ヒトに感染することができるインフルエンザウイルスの全ての型を含む。前記には例えば、非常に一般的なA(H1N1)亜型(例えばA/ニューカレドニア/20/99(H1N1))、A/インドネシア/5/05亜型(H5N1)(配列番号:60)、並びに前記よりも普遍性が低いB型(例えば配列番号:26、図100)及びC型(配列番号:27、図10P)、及び他のインフルエンザ亜型から得られるHAが含まれる(ただしこれらに限定されない)。他のインフルエンザ亜型のVLPもまた本発明に含まれる。前記は、例えばA/ブリスベーン/59/2007(H1N1;配列番号:48)、A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1;配列番号:49)、A/シンガポール/1/57(H2N2;配列番号:54)、A/アンフィ/1/2005(H5N1;配列番号:55)、A/ベトナム/1194/2004(H5N1;配列番号:56)、A/コガモ/香港/W312/97(H6N1;配列番号:57)、A/香港/1073/99(H9N2;配列番号:59)、A/ブリスベーン/10/2007(H3N2;配列番号:50)、A/ウィス

コンシン/67/2005 (H3N2 ; 配列番号:51) 、 A/ウマ/プラハ/56 (H7N7 ; 配列番号:58) 、 B/マレーシア/2506/2004 (配列番号:52) 、 又はB/フロリダ/4/2006 (配列番号:53) である。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、他の哺乳動物又は宿主動物、例えばヒト、靈長類、ウマ、ブタ、鳥、水鳥、渡り鳥、ウズラ、アヒル、ガン、家禽、ニワトリ、ラクダ、イヌ科の動物、イヌ、ネコ科の動物、ネコ、トラ、ヒョウ、ジャコウネコ、ミンク、イシテン、フェレット、家庭用ペット、家畜、マウス、ラット、アザラシ、クジラなどに感染するインフルエンザウイルスに関する。

形質膜誘導ウイルスで発現することができる他の抗原の非限定的な例には以下が含まれる：HIVのカプシドタンパク質p24；gp120、gp41（エンベロープタンパク質）、構造タンパク質VP30及びVP35；フィロウイルス（例えばエボラ又はマルブルク）のGp/SPG（グリコシル化必須膜タンパク質）又はHタンパク質、及びパラミクソウイルス（例えば麻疹）のFタンパク質。

本発明にはまたインフルエンザ由来VLP（ただし前記に限定されない）が含まれ、前記VLPは、当該VLPタンパク質が発現される細胞の形質膜から脂質エンベロープを獲得する。例えば、VLPが植物を土台とする系で発現される場合、VLPは当該細胞の形質膜から脂質エンベロープを獲得することができる。

一般的には、“脂質”という用語は、脂肪溶解性（親油性）で天然に存在する分子を指す。前記用語はまた、より具体的に、脂肪酸及びそれらの誘導体（トリ-、ジ-、及びモノグリセリド並びにリン脂質を含む）とともに他の脂肪溶解性ステロール含有代謝物質又はステロールを指すために用いられる。リン脂質は、糖脂質、ステロール及びタンパク質とともに全ての生物学的な膜の主要成分である。リン脂質の例には、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリンなどが含まれる。ステロールの例には、ズーステロール（例えばコレステロール）及びフィトステロールが含まれる。200を超えるフィトステロールが多様な植物種で確認され、もっとも一般的なものは、カンペステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、プラシカステロール、デルタ-7-スチグマステロール、デルタ-7-アベナステロール、ダウノステロール、シトステロール、24-メチルコレステロール、コレステロール又はベータ-シトステロールである。当業者には理解されるところであるが、細胞の形質膜の脂質組成は、細胞又は当該細胞を提供する生物の培養条件又は生育条件にしたがって変動しえる。

【 0 0 2 0 】

細胞膜は一般的に、脂質二重層を多様な機能のためのタンパク質とともに含む。個々の脂質の局在的濃縮が脂質二重層で見いだされることがあり、「リピドラフト」と称される。理論に拘束されないが、リピドラフトは、エンド及びエキソサイトーシス、ウイルス又は他の感染性因子の侵入及び放出、細胞間シグナルransダクション、細胞又は生物の他の構造成分（例えば細胞内及び細胞外マトリックス）との相互作用において重要な役割を有する可能性がある。

インフルエンザウイルスとの関係では、本明細書で用いられる“ヘマグルチニン”又は“HA”という用語は、インフルエンザウイルス粒子の外側で見出される糖タンパク質を指す。HAは膜のホモトリマーI型糖タンパク質であり、一般的にはシグナルペプチド、HA1ドメイン及びHA2ドメインを含み、後者はC-末端の膜縦断固着部位及び短い細胞質テールを含む（図1B）。HAをコードするヌクレオチド配列は周知であり、入手可能である。例えば以下を参照されたい：BioDefence Public Health base（インフルエンザウイルス；URL：biohealthbase.org を参照されたい）、又はNational Center for Biotechnology Information（URL：ncbi.nlm.nih.govを参照されたい）（前記は両者とも参照により本明細書に含まれる）。

【 0 0 2 1 】

“ホモトリマー”又は“ホモトリマー型”という用語は、3つのHAタンパク質分子によ

10

20

30

40

50

ってオリゴマーが形成されることを示している。理論に拘束されないが、HAタンパク質は、約75kDaのモノマー型前駆体タンパク質(HA0)として合成され、前記は表面でアッセンブリングして長いトリマータンパク質を形成する。トリマー化が生じる前に、前駆体タンパク質は、保存された活性化切断部位(融合ペプチドとも称される)で2つのポリペプチド鎖(HA1及びHA2(トランスメンブレン領域を含む))を形成し、前記はジスルフィド結合によって連結されている。HA1セグメントは長さが328アミノ酸であり、HA2セグメントは長さが221アミノ酸である。この切断はウイルスの感染性には重要である可能性があるが、タンパク質のトリマー化には必須でないかもしれない。宿主細胞の小胞体(ER)膜内へのHAの挿入、シグナルペプチド切断、及びタンパク質のグリコシル化は共働的翻訳事象である。HAの正確な再折りたたみには、タンパク質のグリコシル化及び6つの鎖内ジスルフィド結合の形成が必要である。HAトリマーはcis-及びtrans-ゴルジ複合体内でアッセンブリングし、トランスメンブレンドメインがトリマー化プロセスで役割を果たす。プロメライン処理HAタンパク質の結晶構造(トランスメンブレンドメインを欠く)は、インフルエンザ株の間で高度に保存された構造を示した。HAは感染過程で主要な形状変化を受けることもまた確認された(この過程では、前駆体HA0が2つのポリペプチド鎖HA1及びHA2に切断されることが必要である)。HAタンパク質は、プロセッシングされても(すなわちHA1及びHA2ドメインを含む)、プロセッシングされなくてもよい(すなわちHA0ドメインを含む)。

本発明はトランسدメインを含むHAタンパク質の使用に関し、さらにHA1及びHA2ドメインを含む(例えばHAタンパク質はHA0であっても、HA1及びHA2を含むプロセッシングされたHAでもよい)。HAタンパク質は、植物又は植物細胞の発現系を用いたVLPの製造又は形成で利用することができる。

【0022】

本発明のHAは任意の亜型から得ることができる。例えば、HAは、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16亜型であってもよい。本発明の組換えHAはまた、当分野で周知の任意のヘマグルチニン配列(例えば以下を参照されたい: BioDefence Public Health base(インフルエンザウイルス; URL: biohealthbase.org を参照されたい)、又はNational Center for Biotechnology Information(URL: ncbi.nlm.nih.govを参照されたい))を土台にしたアミノ酸配列を含むことができる。さらによると、HAは、1つ以上の新規出現又は新規に同定されたインフルエンザウイルスから単離されたヘマグルチニンの配列を土台にすることができる。

本発明はまた、1つ以上のインフルエンザ亜型から得られたHAを含むVLPを含む。例えば、VLPは、以下の亜型に由来する1つ以上のHAを含むことができる:H1(配列番号:28によってコードされる)、H2(配列番号:12によってコードされる)、H3(配列番号:13によってコードされる)、H4(配列番号:14によってコードされる)、H5(配列番号:15によってコードされる)、H6(配列番号:16によってコードされる)、H7(配列番号:11によってコードされる)、H8(配列番号:17によってコードされる)、H9(配列番号:18によってコードされる)、H10(配列番号:19によってコードされる)、H11(配列番号:20によってコードされる)、H12(配列番号:21によってコードされる)、H13(配列番号:27によってコードされる)、H14(配列番号:23によってコードされる)、H15(配列番号:24によってコードされる)、H16(配列番号:25によってコードされる)、又は前記の組合せ。1つ以上のインフルエンザ亜型に由来する1つ以上のHAを、植物または昆虫細胞で同時に発現させて、1つ以上のHAの合成が、1つ以上のインフルエンザ亜型由來のHAの組合せを含むVLPの形成をもたらすことを担保することができる。HAの組合せの選択は、当該VLPから調製されるワクチンの使用目的によって決定することができる。例えば、鳥の接種に使用するワクチンは任意のHA亜型の組合せを含むことができるが、一方、ヒトの接種に有用なVLPは、1つ以上の亜型H1、H2、H3、H5、H7、H9、H10、N1、N2、N3及びN7の亜型を含むことができる。しかしながら、接種物の使用に応じて他の亜型の組合せもまた調製することができる。

したがって、本発明は1つ以上のHA亜型を含むVLPを目的とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、植物中で発現させたときVLPを形成するヘマグルチニンをコードする核酸を提供する。

インフルエンザHAタンパク質は、分子量、等電点、サイズ、グリカン補完成分などに関する程度の類似性および相違を示す。種々のヘマグルチニンの物理化学的特性は、植物、昆虫細胞又は酵母系で発現されるHA間の区別を可能にするために有用であり、2つ以上のHAを单一系で発現させるときは特に有用でありえる。そのような物理化学的特性は表1に提供される。

【 0 0 2 4 】

【表1】

クローン 番号	型	インフルエンザ株	アミノ酸				グリカン				分子量(kDa)				等電点
			HA0	HA1	HA2	HA0 HA1 HA2	HA0	HA0 ¹	HA1	HA1 ¹	HA2	HA2 ¹	HA0	HA1	HA2
774	H1	A/ブリスベーン/59/2007	548	326	222	9 7 2	61	75	36	47	25	28	6.4	7.5	5.3
775	H1	A/ソロモン諸島/3/2006	548	326	222	9 7 2	61	75	36	47	25	28	6.1	6.7	5.3
776	H3	A/ブリスベーン/10/2007	550	329	221	12 11 1	62	80	37	54	25	27	8.5	9.6	5.2
777	H3	A/ウイスコンシン/67/2005	550	329	221	11 10 1	62	79	37	52	25	27	8.8	9.6	5.3
778	B	B/マレーシア/25/06/2004	570	347	223	12 8 4	62	80	38	50	24	30	8.0	9.7	4.5
779	B	B/フロリダ/4/2006	569	346	223	10 7 3	62	77	38	48	24	29	8.0	9.7	4.5
780	H2	A/シンガポール/1/57	547	325	222	6 4 2	62	71	36	42	25	28	6.0	7.5	4.9
781	H5	A/アンフィ/1/2005	551	329	222	7 5 2	62	73	37	45	25	28	6.2	8.9	4.7
782	H5	A/ベトナム/11/94/2004	552	330	222	7 5 2	63	74	38	45	25	28	6.4	9.1	4.8
783	H6	A/コガモ/香港/W312/97	550	328	222	8 5 3	62	75	37	45	25	30	5.7	5.9	5.6
784	H7	A/ウマ/ブラハ/56	552	331	221	6 4 2	62	71	37	43	25	28	8.9	9.7	4.9
785	H9	A/香港/1073/99	542	320	199	9 7 2	61	75	36	46	23	26	8.4	9.5	5.3

【0025】

本発明はまた、H1、H5又はH7由来のHAをそれぞれコードするヌクレオチド配列、配列番

号:28、配列番号:3、配列番号:11；配列番号:28、配列番号:3、配列番号:11とストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；又は配列番号:28、配列番号:3、配列番号:1の相補物（compliment）とストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、ここで前記ヌクレオチド配列は、発現させたときVLPを形成するヘマグルチニンタンパク質をコードし、前記VLPは対象動物に投与されたとき抗体の産生を誘発する。例えば、植物細胞内での前記ヌクレオチド配列の発現はVLPを形成し、このVLPは、HA（インフルエンザの1つ以上の型又は亜型の成熟HA、HA0、HA1又はHA2を含む）と結合することができる抗体の製造に用いることができる。前記VLPは、対象動物に投与したとき免疫応答を誘発する。

ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションは当分野では周知である（例えば以下を参照されたい：Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. 1995 and supplements ; Maniatis et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 ; Sambrook and Russell, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition 2001；前記文献の各々は参照により本明細書に含まれる）。そのようなストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の1例は以下でもよい：4×SSC中で65°にて約16-20時間のハイブリダイゼーション、続いて0.1×SSC中で65°にて1時間の洗浄又は0.1×SSC中で65°にて各20若しくは30分間の2回の洗浄。また別のストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の例は以下でもよい：50%ホルムアミド、4×SSC中で42°にて一晩（16 - 20時間）、続いて0.1×SSC中で65°にて1時間の洗浄又は0.1×SSC中で65°にて各20若しくは30分間の2回の洗浄、又は一晩（16 - 20時間）、又はチャーチリン酸緩衝水溶液（7%のSDS；0.5MのNaPO₄緩衝液（pH7.2）；10mMのEDTA）中で65°にてハイブリダイゼーション、0.1×SSC、0.1%SDS中で50°にてそれぞれ20若しくは30分間の2回の洗浄、又は2×SSC、0.1%SDS中で65°にてそれぞれ20若しくは30分の2回の洗浄。

【0026】

さらにまた、本発明は、H1（配列番号:28）、H5（配列番号:3）又はH7（配列番号:11）由来のHAをコードするヌクレオチド配列と、約70、75、80、85、87、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%、又はその間の任意の値の配列同一性又は配列類似性を有することを特徴とするヌクレオチドを含み、ここで、前記ヌクレオチド配列は、発現させたときVLPを形成するヘマグルチニンをコードし、さらに前記VLPは抗体の産生を誘発する。例えば、植物細胞内での前記ヌクレオチド配列の発現はVLPを形成し、このVLPは、HA（成熟HA、HA0、HA1又はHA2を含む）と結合することができる抗体の製造に用いることができる。前記VLPは、対象動物に投与したとき免疫応答を誘発する。

同様に、本発明は、以下の亜型[H1（配列番号:28によってコードされる）、H2（配列番号:12によってコードされる）、H3（配列番号:13によってコードされる）、H4（配列番号:14によってコードされる）、H5（配列番号:15によってコードされる）、H6（配列番号:16によってコードされる）、H7（配列番号:11によってコードされる）、H8（配列番号:17によってコードされる）、H9（配列番号:18によってコードされる）、H10（配列番号:19によってコードされる）、H11（配列番号:20によってコードされる）、H12（配列番号:21によってコードされる）、H13（配列番号:27によってコードされる）、H14（配列番号:23によってコードされる）、H15（配列番号:24によってコードされる）、H16（配列番号:25によってコードされる）（図10Aから10Pを参照）]に関連するHA、及びH1（配列番号:28によってコードされる）、H2（配列番号:12によってコードされる）、H3（配列番号:13によってコードされる）、H4（配列番号:14によってコードされる）、H5（配列番号:15によってコードされる）、H6（配列番号:16によってコードされる）、H7（配列番号:11によってコードされる）、H8（配列番号:17によってコードされる）、H9（配列番号:18によってコードされる）、H10（配列番号:19によってコードされる）、H11（配列番号:20によってコードされる）、H12（配列番号:21によってコードされる）、H13（配列番号:27によってコードされる）、H14（配列番号:23によってコードされる）、H15（配列番号:24によってコードされる）、H16（配列番号:25によってコードされる）]と約70から100%又はその間

10

20

30

40

50

の任意の値、80から100%又はその間の任意の値、90から100%又はその間の任意の値、又は95から100%又はその間の任意の値の配列同一性を有することを特徴とするヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドは発現させたときVLPを形成するヘマグルチニンタンパク質をコードし、前記VLPは抗体の産生を誘発する。例えば、植物細胞内の前記ヌクレオチド配列の発現はVLPを形成し、このVLPは、HA（成熟HA、HA0、HA1又はHA2を含む）と結合することができる抗体の製造に用いることができる。前記VLPは、対象動物に投与したとき免疫応答を誘発する。

【0027】

“免疫応答”は、一般的には後天的免疫系の応答を指す。後天的免疫系は、一般的に液性応答及び細胞媒介応答を含む。液性応答は、Bリンパ球系列（B細胞）の細胞で產生される、分泌抗体によって媒介される免疫相である。分泌抗体は、侵入微生物（例えばウイルス又は細菌）の表面の抗原と結合し、前記抗体は破壊のためにそれら微生物に目印を付ける。液性免疫は、抗体产生及び抗体產生に付随するプロセスとともに、抗体のエフェクター機能（Th2細胞活性化及びサイトカイン產生、メモリー細胞生成、ファゴサイトーシスのオプソニン亢進、病原体排除などを含む）を指すために用いられる。“調節する”又は“調節”などという用語は、一般的に公知であるか又は用いられるいくつかのアッセイのいずれか（それらのいくつかは本明細書で実施される）によって決定される、個々の応答又はパラメータの増加又は低下を指す。

細胞媒介応答は、抗体を必要としないが、それに代わってマクロファージ、ナチュラルキラー細胞（NK）、抗原特異的細胞傷害性T-リンパ球、及び種々のサイトカインの放出を抗原応答で必要とする免疫応答である。細胞媒介免疫は一般的には、何らかのTh細胞活性化、Tc細胞活性化及びT-細胞媒介応答を指すために用いられる。細胞媒介免疫は、ウイルス感染の応答で特に重要である。

例えば、抗原特異的CD8陽性Tリンパ球の誘発はELISPOTアッセイを用いて測定することができ、CD4陽性T-リンパ球の刺激は増殖アッセイを用いて測定することができる。抗インフルエンザ抗体力価はELISAアッセイを用いて定量することができる。抗原特異的抗体又は交差反応性抗体のアイソタイプはまた、抗アイソタイプ抗体（例えば抗IgG、IgA、IgE又はIgG）を用いて測定することができる。そのようなアッセイを実施するための方法及び技術は当分野では周知である。

【0028】

血球凝集阻害（HI又はHAI）アッセイはまた、組換えHAによる赤血球（RBC）の凝集を阻害することができるワクチン又はワクチン組成物によって誘発された抗体の有効性を示すために用いることができる。血清サンプルの血球凝集阻害抗体力価は、マイクロタイマーHAIによって判定することができる（Aymard et al. 1973）。いくつかの種のいずれか（例えばウマ、シチメンチョウ、ニワトリなど）に由来する赤血球を用いることができる。このアッセイは、VLPの表面のHAトリマーのアッセンブリに関する間接的情報を提供し、HA上の抗原性部位の適切な提示が確認される。

交差反応性HAI力価はまた、当該ワクチン亜型と関係を有する他のウイルス株に対する免疫応答の有効性を示すために用いることができる。例えば、第一の株のワクチン組成物（例えばA/インドネシア5/05のVLP）で免疫した対象動物の血清を、第二の株の完全ウイルス又はウイルス粒子（例えばA/ベトナム/1194/2004）によるHAIアッセイで用い、HAI力価を決定することができる。

サイトカインの有無又はレベルもまた定量することができる。例えば、T-ヘルパー細胞応答（Th1/Th2）は、ELISA（例えばBD Biosciences OptEIAキット）を用いてIFN- γ およびIL-4分泌細胞を測定することによって特徴が明らかにされるであろう。対象動物から入手される抹消血の単核細胞（PBMC）又は脾臓細胞を培養して、上清を分析してもよい。Tリンパ球はまた、マーカー特異的蛍光標識を用いて蛍光活性化細胞仕分け（FACS）によって定量することができ、その方法は当分野では公知である。

微量中和アッセイもまた対象動物での免疫応答の特徴を明らかにするために実施することができる。例えばRoweら（1973）の方法を参照されたい。ウイルス中和力価は、以下を

10

20

30

40

50

含むいくつかの方法によって入手することができる：1) 細胞のクリスタルバイオレット固定／着色に続く溶解ラークの計測(ラーカッセイ)；2) 培養中の細胞溶解の顕微鏡観察；3) ELISA及びNPウイルスタンパク質のスペクトロフォトメーターによる検出(宿主細胞のウイルス感染に相関する)。

【0029】

配列同一性及び配列類似性は、ヌクレオチド配列比較プログラムを用いて決定することができる(前記は例えればDNASISで提供され、例えば、以下のパラメータを用いる(ただしこれらに限定されない)：GAPペナルティ5、トップダイアゴナル数5、固定ギャップペナルティ10、k-tuple 2、フローティングギャップ10、及びウインドウサイズ5)。しかしながら、他の配列比較アラインメント方法、例えばSmith & Waterman(1981, Adv. Appl. Math. 2:482)、Needleman & Wunsch(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)、Pearson & Lipman(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85:2444)の方法、及びこれらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(例えばGAP、BESTFIT、FASTA及びBLAST)又は手動アラインメントと目視精査も当分野では周知である。10

“ヘマグルチニンドメイン”という用語は、HA0ドメイン又はHA1及びHA2ドメインのどちらかを含むペプチドを指す。ヘマグルチニンドメインは、天然に存在するタンパク質で見出されるシグナルペプチド、ransmembraneドメイン又は細胞質テールを含まない。。

“ウイルス様粒子”(VLP)又は“VLP”という用語は、セルフアッセンブリングし、構造タンパク質(例えればインフルエンザHAタンパク質)を含む構造物を指す。VLPは、一般的には、感染で生成されるビリオンと形態学的及び抗原的に類似するが、複製に十分な遺伝情報を欠き、したがって非感染性である。いくつかの事例では、VLPはただ1種のタンパク質又は1つよりも多いタンパク質種を含むことができる。2つ以上のタンパク質種を含むVLPについては、前記タンパク質種は同じウイルス種に由来してもよく、又は異なる種、属、亜科又は科のウイルス(CTVの命名法によって指定される)に由来するタンパク質を含んでいてもよい。他の例では、VLPを構成する1つ以上のタンパク質種は、天然に存在する配列から改変されてあってもよい。VLPは、植物及び昆虫宿主細胞を含む適切な宿主細胞で製造することができる。宿主細胞の抽出後、並びに適切な条件下での単離及び更なる精製時に際して、VLPは完全な構造物として精製することができる。20

【0030】

本発明にしたがってインフルエンザ由来タンパク質から生成されるVLPはM1タンパク質を含まない。M1タンパク質は、VLP調製物の夾雑物であるRNAと結合することが知られている(Wakefiwld and Brownlee, 1989)。VLP製品についての規制承認を得ようとするとき、RNAの存在は望ましくなく、したがってRNAを欠くVLP調製物は有利でありえる。

本発明のVLPは、タンパク質をシアリル化する能力を欠く(例えればシアリダーゼを欠く)ことを特徴とする宿主細胞、例えば植物細胞、昆虫細胞、菌類及び他の生物で製造することができる。前記他の生物には、グリコフォーラムで同定された、海綿動物、空腸動物、環形動物、節足動物、軟体動物、線形動物、輪形動物、板形動物、毛顎動物、触手動物、クラミジア、スピロヘータ、グラム陽性細菌、シアノバクテリア、古細菌が含まれる(例えれば以下を参照されたい：URL: glycoforum.gr.jp/science/word/evolution/ES-A03E.html)。本明細書の記載にしたがって生成されるVLPは典型的にはノイラミニダーゼ(NA)を含まない。しかしながら、HA及びNAを含むVLPが所望される場合は、NAはHAと同時発現させることができる。40

本発明のいくつかの特徴にしたがって植物中で製造されるVLPは、植物由来脂質と複合体を形成することができる。前記VLPはHA0、HA1又はHA2ペプチドを含むことができる。植物由来脂質は脂質二重層の形態を有することができ、さらにVLPを取り巻くエンベロープを構成することができる。植物由来脂質は、VLPが生成される植物形質膜の脂質成分を含むことができ、前記成分にはホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、グリコスフィンゴ脂質、フィトステロール又は前記の組合せが含まれる(ただしこれらに限定されない)。植物由来脂質は、また別には‘植物脂質’と称することが50

できる。フィトステロールの例は当分野では公知であり、例えばスチグマステロール、シトステロール、24-メチルコレステロール、及びコレステロールである。例えばMongrandら(2004)の論文を参照されたい。

【0031】

VLPは、例えば血球凝集アッセイ、電子顕微鏡検査、又はサイズ排除クロマトグラフィーによって構造及びサイズについて判定することができる。

サイズ排除クロマトグラフィーのために、凍結粉碎植物組織を抽出緩衝液中でサンプルを均質化(Polytron)し、さらに不溶性物質を遠心により除去することによって全可溶性タンパク質を植物組織から抽出することができる。PEGによる沈殿もまた有益でありえる。可溶性タンパク質を定量し、抽出物をSephacrylTMカラムに通す。ブルーデキストラン2000を目盛り付け標準物質として用いることができる。クロマトグラフィーに統いて、分画をイムノブロッティングによってさらに分析し、分画中のタンパク質補完物を決定することができる。

理論に拘束されないが、種々の動物のRBCと結合するHAの能力は、シアリル酸2,3又は2,6に対するHAの親和性、及びRBC表面のこれらシアリル酸の存在によって発揮される。インフルエンザウイルスのウマ及びトリHAは、いくつかの種(シチメンチョウ、ニワトリ、アヒル、モルモット、ヒト、ヒツジ、ウマ及びウシを含む)の全ての赤血球を凝集させるが、一方、ヒトHAはシチメンチョウ、ニワトリ、アヒル、モルモット、ヒト及びヒツジの血球と結合するであろう(さらに以下を参照されたい:T. Ito et al. 1997, Virology, 227:493-499; 及びR. Medeiros et al. 2001, Virology, 289:74-85)。種々のインフルエンザ株のHAの種反応性の例は表2A及び表2Bに示されている。

【0032】

表2A：季節性インフルエンザ選択株のHAが結合するRBC種

季節型	株名	No	由来	ウマ	シチメンチョウ
H1	A/ブリスベーン/59/2007(H1N1)	774	ヒト	+	++
	A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)	775	ヒト	+	++
H3	A/ブリスベーン/10/2007(H3N3)	776	ヒト	+	++
	A/ウィスコンシン/67/2005(H3N2)	777	ヒト	+	++
B	B/マレーシア/2506/2004	778	ヒト	+	++
	B/フロリダ/4/2006	779	ヒト	+	++

10

20

30

【0033】

表2B：大流行型インフルエンザ選択株のHAが結合するRBC種

大流行型	株名	No	由来	ウマ	シチメンチョウ
H2	A/シンガポール/1/57(H2N2)	780	ヒト	+	++
H5	A/アンフィー/1/2005(H5N1)	781	Hu-Av	++	+
	A/ベトナム/1194/2004(H5N1)	782	Hu-Av	++	+
H6	A/コガモ/香港/W312/97(H6N1)	783	トリ	++	+
H7	A/ウマ/プラハ/56(H7N7)	784	ウマ	++	++
H9	A/香港/1037/99(H9N2)	785	ヒト	++	+

40

【0034】

本明細書で用いられる、“タンパク質”は一般的にペプチド結合によって連結されたアミノ酸の鎖を指す。前記は折りたたまれて二次、三次又は四次構造を形成し、個々の形態を完成させることができる。また別に、ポリペプチド、ペプチド又はペプチドフラグメントという用語を類似の関係で用いることができる。

タンパク質、融合タンパク質又はポリペプチドのフラグメント又は部分は、個々のタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸補完成分のサブセットを含むペプチド又はポリペプチドを含むが、ただし、前記フラグメントは発現させたときVLPを形成することができる条件とする。例えば、フラグメントは、抗原性領域、ストレス応答誘発領域、又はタ

50

ンパク質若しくはポリペプチドの機能的ドメインを含む領域を含む。フラグメントはまた同じ総括的ファミリーのタンパク質と共に領域又はドメインを含むか、又はフラグメントは、当該フラグメントが誘導された完全長タンパク質を特定するために十分なアミノ酸配列を含むことができる。

例えば、フラグメント又は部分は、タンパク質の完全長の長さの約60%から約100%、又はその間の任意の値を含むことができるが、ただし前記フラグメントは発現させたときVLPを形成することができることを条件とする。例えば、タンパク質の完全長の長さの約60%から約100%、約70%から約100%、約80%から約100%、約90%から約100%、約95%から約100%、又はその間の任意の値である。あるいは、フラグメント又は部分は、HAに応じて約150から約500アミノ酸、又はその間の任意の値であることができるが、ただし前記フラグメントを発現させたときVLPを形成することができることを条件とする。例えばフラグメントは、HAに応じて150から約500アミノ酸、又はその間の任意の値、約250から約500アミノ酸、又はその間の任意の値、約300から約500アミノ酸、又はその間の任意の値、約350から約500アミノ酸、又はその間の任意の値、約400から約500、又はその間の任意の値、約450から約500、又はその間の任意の値であることができるが、ただし前記フラグメントを発現させたときVLPを形成することができることを条件とする。例えば、HAタンパク質のC末端、N末端又はN及びC末端の両末端から約5、10、20、30、40又は50アミノ酸、又はその間の任意の量を除去することができるが、ただし前記フラグメントを発現させたときVLPを形成することができることを条件とする。

【0035】

10

与えられたいずれの配列におけるアミノ酸の番号付与も具体的な配列に対応するが、当事者は、構造及び／又は配列を基準にして配列内の個々のアミノ酸の等価物を容易に決定できよう。例えば、結晶学のためにあるクローンを構築するときに6つのN末端アミノ酸を除去した場合、これによって当該アミノ酸の個々の数字的な実体は、（例えばタンパク質の完全長に対応して）変化するであろうが、構造内のアミノ酸の相対的な位置には変化はないであろう。

20

1つの配列又は複数の配列の比較はBLASTアルゴリズムを用いて実施することができる（Altschul et al. 1990, J Mol Biol 215:403-410）。BLASTアルゴリズムは、あるクエリーア配列と特定の配列若しくは配列群との比較、又はより大きな配列ライブラリー又は配列（例えばGenBank又はGenPept）データベースとの比較を可能にし、100%同一を示す配列だけでなく同一性の低い配列の識別を可能にする。核酸又はアミノ酸配列はBLASTアルゴリズムを用いて比較することができる。さらにまた、2つ以上の配列の同一性は、配列と一緒にアラインメントしそれら配列間の%同一性を測定することによって決定することができる。アラインメントは、BLASTアルゴリズム（例えばGenBank（URL: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST）から入手可能；以下のデフォルトパラメータを使用：プログラム：blastn；データベースnr；期待値10；フィルター：デフォルト；アラインメント：ペア毎；クエリー遺伝子コード：スタンダード（1））又はBLAST2（EMBL（URL: embl-heidelberg.de/Services/index.html）から入手可能；以下のデフォルトパラメータを使用：BLOSUM62行列；フィルター：デフォルト、エコフィルター：on、期待値10、カットオフ：デフォルト；鎖：両鎖；詳細：50、アラインメント：50；又はFASTA（デフォルトパラメータ使用））、又は配列手動比較及び%同一性の算出によって実施することができる。

30

【0036】

40

本発明は、HAをコードする核酸の植物発現ベクターでのクローニング、及びワクチン製造に適したインフルエンザVLPの前記植物による生成を述べる（ただしこれらに限定されない）。そのような核酸の例には例えば以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：インフルエンザA/ニューカレドニア/20/99（H1N1）ウイルスHA（例えば配列番号：61）、A/インドネシア/5/05（H5N1）HA（例えば配列番号：60）、A/プリスペーン/59/2007（H1N1）HA（例えば配列番号：36、48、62）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）HA（例えば配列番号：37、49、63）、A/シンガポール/1/57（H2N2）HA（例えば配列番号：42、54、64）、A/アンフィ/1/2005（H5N1）HA（例えば配列番号：43、55、65）、A/ベトナム/1194/2004（H

50

5N1) HA (例えば配列番号:44、56、66)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1) HA (例えば配列番号:45、57、67)、A/香港/1073/99 (H9N2) HA (例えば配列番号:47、59、68)、A/ブリスベーン10/2007 (H3N2) HA (例えば配列番号:38、50、69)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2) HA (例えば配列番号:39、51、70)、A/ウマ/プラハ/56 (H7N7) HA (例えば配列番号:46、58、71)、B/マレーシア/2506/2004 HA (例えば配列番号:40、52、72)、B/フロリダ/4/2006 HA (例えば配列番号:41、53、73)。これらの株に対する対応するクローニング又は構築物番号は表1に提供されている。配列番号:36 - 47に対応する核酸配列は、図28 - 39に図示されるように、各HA型又は亜型のコード配列の上流でかつ機能的に連結されたプラスチックアミンを含む。配列番号:60 - 73に対応する核酸配列は、図51 - 64に図示するように、アルファルファプラスチックアミンプロモータ及び5'UTR、HAのヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチックアミン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセットを含む。
10

VLPはまた、組換えインフルエンザ構造タンパク質を含む試薬の製造に用いることができる。前記構造タンパク質は、形質転換宿主細胞（例えば植物細胞又は昆虫細胞）で、セルフアッセンブリングして機能的で免疫原性のホモタイプ巨大分子性タンパク質構造物（部分的インフルエンザウイルス粒子及びインフルエンザVLPを含む）を形成する。

したがって、本発明は、VLP及び植物発現系で単一エンベロープタンパク質の発現によりウイルスVLPを製造する方法を提供する。前記VLPは、インフルエンザVLPでも、他の形質膜誘導ウイルス（麻疹、エボラ、マルブルク及びHIVを含むが、ただしこれらに限定されない）から生成されるVLPでもよい。
20

【0037】

当業者に公知の他のエンベロープウイルス（例えばフィロウイルス科（例えばエボラウイルス、マルブルクウイルスなど）、パラミクソウイルス科（例えば麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、肺炎ウイルスなど）、レトロウイルス科（例えばヒト免疫不全ウイルス-1、ヒト免疫不全ウイルス-2、ヒトT細胞白血病ウイルス-1など）、フラビウイルス科（例えば西ナイル脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、黄熱病ウイルスなど）、ブンヤウイルス科（例えばハンタウイルスなど）、コロナウイルス科（例えばコロナウイルス、SARSなど）を含むがただしこれらに限定されない）由来のタンパク質もまた用いることができる。形質膜誘導ウイルスで発現されえる抗原の非限定的な例には以下が含まれる：HIVのカプシドタンパク質p24；HIV gp120又はgp41、エボラウイルスのVP30若しくはVP35、又はマルブルクウイルスのGp/SGPを含むフィロウイルスタンパク質、又は麻疹パラミクソウイルスのHタンパク質若しくはFタンパク質。例えば、HIVのP24（例えばGenBank参照gi : 19172948）は、HIV配列ゲノム（例えばGenBank参照gi : 9629357）のgag配列の翻訳及び切断によって得られるタンパク質である。HIVのgp120及びgp41は、HIVウイルスゲノムのenvによってコードされるgp160タンパク質（例えばGenBank参照gi : 9629363）の翻訳及び切断によって得られる糖タンパク質である。エボラウイルスのVP30（GenPept参照gi : 55770813）は、エボラウイルスゲノム（例えばGenBank参照gi : 55770807）のvp30配列の翻訳によって得られるタンパク質である。エボラウイルスのVP35（GenPept参照gi : 55770809）は、エボラウイルスゲノムのvp35配列の翻訳によって得られるタンパク質である。マルブルクウイルスのGp/SGP（GenPept参照gi : 296965）は、マルブルクウイルスゲノム（GenBank参照gi : 158539108）の配列の翻訳によって得られるタンパク質である。Hタンパク質（GenPept参照gi : 9626951）は、麻疹ウイルスゲノム（GenBank参照gi : 9626945）のH配列のタンパク質である。Fタンパク質（GenPept参照gi : 9626950）は、麻疹ウイルスゲノムのF配列のタンパク質である。
30
40

しかしながら、当業者に公知の他のコートタンパク質も本発明の方法で用いることができる。

【0038】

したがって、本発明は、HIV-p24、HIV-gp120、HIV-gp41、エボラウイルス-VP30、エボラウイルス-VP35、マルブルクウイルスGp/SGP、麻疹ウイルス-Hタンパク質、又は麻疹ウイルス-Fタンパク質をコードする配列を含む核酸分子を提供する。前記核酸分子は、昆虫
50

、酵母又は植物細胞、又は特に植物組織で活性な調節領域と機能的に連結させることができる。

さらに本発明は、HAをコードする核酸（例えばヒトインフルエンザA/インドネシア/5/05ウイルスHA（H5N1）であるが、ただし前記に限定されない）の植物又は昆虫発現ベクター（例えばバキュロウイルス発現ベクター）でのクローニング及びインフルエンザワクチン候補物又は試薬の製造を提供する。前記候補物又は試薬は、形質転換植物細胞又は形質転換昆虫細胞で、セルファッセンプリングして機能的で免疫原性のホモタイプ巨大分子性タンパク質構造物（部分的インフルエンザウイルス粒子及びインフルエンザVLPを含む）を形成する組換えインフルエンザ構造性タンパク質を含む。

インフルエンザ亜型（例えばインフルエンザA/ニューカレドニア/20/99（H1N1）、A/インドネシア/5/05亜型（H5N1）、A/ブリスベーン/59/2007（H1N1）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）、A/シンガポール/1/57（H2N2）、A/アンフィ/1/2005（H5N1）、A/ベトナム/1194/2004（H5N1）、A/コガモ/香港/W312/97（H6N1）、A/香港/1073/99（H9N2）、A/ブリスベーン10/2007（H3N2）、A/ウィスコンシン/67/2005（H3N2）、A/ウマ/プラハ/56（H7N7）、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006であるが、ただしこれらに限定されない）のHAをコードする核酸を、例えばバキュロウイルス発現系を用いて適切な細胞株（例えばス波ドブテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞、例えばSf-9細胞株（ATCC PTA-4047））で発現させることができる。他の昆虫細胞株もまた用いることができる。

【0039】

あるいは、HAをコードする核酸は植物細胞又は植物中で発現させてもよい。HAをコードする核酸は、HA RNAを用いて逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により合成することができる。例として、RNAは、ヒトインフルエンザA/ニューカレドニア/20/99（H1N1）ウイルス若しくはヒトインフルエンザA/インドネシア/5/05（H5N1）ウイルス、又は他のインフルエンザウイルス、例えばA/ブリスベーン/59/2007（H1N1）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）、A/シンガポール/1/57（H2N2）、A/アンフィ/1/2005（H5N1）、A/ベトナム/1194/2004（H5N1）、A/コガモ/香港/W312/97（H6N1）、A/香港/1073/99（H9N2）、A/ブリスベーン10/2007（H3N2）、A/ウィスコンシン/67/2005（H3N2）、A/ウマ/プラハ/56（H7N7）、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、又はインフルエンザウイルス感染細胞から単離することができる。逆転写及びPCRのために、HA RNA（例えばヒトインフルエンザA/ニューカレドニア/20/99（H1N1）ウイルスHA配列若しくはヒトインフルエンザA/インドネシア/5/05（H5N1）ウイルスHA配列、又は、インフルエンザ亜型A/ブリスベーン/59/2007（H1N1）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）、A/シンガポール/1/57（H2N2）、A/アンフィ/1/2005（H5N1）、A/ベトナム/1194/2004（H5N1）、A/コガモ/香港/W312/97（H6N1）、A/香港/1073/99（H9N2）、A/ブリスベーン10/2007（H3N2）、A/ウィスコンシン/67/2005（H3N2）、A/ウマ/プラハ/56（H7N7）、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006由来のHAであるが、ただしこれらに限定されない）に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。さらにまた、HAをコードする核酸は、当業者に公知の方法を用いて化学的に合成してもよい。

得られたこれらの遺伝子のcDNAコピーを、宿主発現系によって要求される適切な発現ベクターでクローニングすることができる。植物に適した発現ベクターの例は下記で述べるが、又は別にはバキュロウイルス発現ベクター、例えばpFastBac1（Invitrogen）（公知の方法及び製造業者の指示書に提供される情報を用いてpFastBac1系プラスミドで得られる）を用いてもよい。

【0040】

本発明はさらに、上記に記載のHAをコードする核酸（植物中で作動する調節エレメントに機能的に連結されている）を含む遺伝子構築物を目的とする。植物細胞で作動し、本発明にしたがって用いることができる調節エレメントの例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：プラスティアニン調節領域（US7,125,978；前記文献は参照により本明細書に含まれる）、又はリプロース1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ/オキシ

10

20

30

40

50

ゲナーゼ (RuBisco ; US4,962,028 ; 前記文献は参照により本明細書に含まれる)、クロロフィルa/b結合タンパク質 (CAB ; Leutwiler et al. 1996 ; 前記文献は参照により本明細書に含まれる)、ST-LS1 (光化学系IIの酸素発生複合体と結合、Stockhausら (1987及び1989) が記載 ; 前記文献は参照により本明細書に含まれる)。プラスティニアニン調節領域の例は、配列番号:36のヌクレオチド10 - 85、又は配列番号:37 - 47のいずれかの配列の類似の領域を含む配列である。

構築物が昆虫細胞で発現される場合は、昆虫細胞で作動する調節エレメントの例には、ポリヘドリンプロモータ (Possee and Howard 1987, Nucleic Acids Research 15:10233-10248)、gp64プロモータ (Kogan et al. 1995, J Virology 69:1452-1461) などが含まれる (ただしこれらに限定されない)。

したがって、本発明のある特徴は、調節領域及びインフルエンザHAをコードする配列を含む核酸を提供する。調節領域はプラスティニアニン調節エレメントでもよく、インフルエンザHAは、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1)、A/インドネシア/5/05亜型 (H5N1)、A/ブリスベーン/59/2007 (H1N1)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1)、A/シンガポール/1/57 (H2N2)、A/アンフィ/1/2005 (H5N1)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)、A/香港/1073/99 (H9N2)、A/ブリスベーン10/2007 (H3N2)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、A/ウマ/ブラハ/56 (H7N7)、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006を含むインフルエンザ株又は亜型の群から選択することができる。プラスティニアニン調節エレメント及びインフルエンザHAを含む核酸配列は、本明細書では配列番号:36 - 47によって具体化される。

【0041】

インフルエンザウイルスが卵又は哺乳動物細胞 (例えばMDCK細胞) で培養されたとき、又は感染対象動物から単離されたとき、インフルエンザヘマグルチニンのアミノ酸配列又はそれらをコードする核酸の配列には配列の相違が存在しえることが知られている。そのような相違の非限定的な例は、実施例18を含む本明細書で図示されている。さらにまた、当業者には理解されるところであるが、さらに別の変異が発生し続けているので、新たな別の変型が新しい株から得られるインフルエンザヘマグルチニンで観察されえる。種々のインフルエンザヘマグルチニン間の公知の配列変動性のために、本発明は、任意のインフルエンザヘマグルチニンを用いて生成することができるVLPを含むが、ただし、当該インフルエンザヘマグルチニンが本明細書に記載の宿主で発現させたときVLPを形成することを条件とする。

配列アラインメント及びコンセンサス配列は、当分野で公知のいくつかのソフトパッケージ (例えばMULTALIN (F. Corpet, 1988, Nucl Acids Res, 16(22):10881-10890) のいずれかを用いて決定するか、又は配列を手動でアラインメントして配列間の類似性及び相違を決定してもよい。

【0042】

ヘマグルチニンの構造はよく研究されていて、その構造は高度に保存されていることが知られている。ヘマグルチニン構造を重ね合わせたとき、高度の構造保存が観察される (rmsd < 2Å)。この構造的保存は、アミノ酸配列がいくつかの位置で変異したとしても観察される (例えば以下を参照されたい : Skehel and Wiley, 2000 Ann Rev Biochem 69:531-69 ; Vaccaro et al. 2005)。ヘマグルチニンの領域もまた、例えば以下のとおり良好に保存されている :

- 構造ドメイン : HA0ポリプロテインは切断されて成熟HAが提供される。HAはホモトリマーであって、各モノマーはレセプター結合ドメイン (HA1) 及びただ1つのジスルフィド結合によって連結された膜固着ドメイン (HA2) を含む。HA2サブユニットのN-末端20残基はまたHA融合ドメイン又は配列と称することができる。‘テール’領域 (膜エンベロープに対して内側) もまた存在する。各ヘマグルチニンはこれらの領域又はドメインを含む。個々の領域又はドメインは典型的には長さが保存されている。

- 全てのヘマグルチニンは同じ数及び同じ位置の分子内及び分子間ジスルフィド架橋を含む。ジスルフィド架橋ネットワークに参画するシステインのアミノ酸上の量及び位置はHA

10

20

30

40

50

間で保存されている。特徴的な分子内及び分子間ジスルフィド架橋を示す構造例、並びに他の保存アミノ酸及びそれらの相対的位置は、例えばGambliらの論文 (Science 2004, 303:1838-1842) に記載されている。典型的構造及び配列には、1RVZ、1RVX、1RVT、1RV0、1RUY、1RU7が含まれる (タンパク質データバンク (URL: www.rcsb.org) から入手可能)。

- 細胞質テール：ヘマグルチニンの大半が保存された位置に3つのシステインを含む。これらのシステインの1つ以上が、翻訳後修飾としてパルミトイル化される可能性がある。

【 0 0 4 3 】

アミノ酸変動はインフルエンザウイルスのヘマグルチニンで許容される。この変動が切れ目なく確認される新規な株を提供する。新規な株の感染性は変動しそう。しかしながら、ヘマグルチニントリマー (続いてVLPを形成する) の形成は維持される。したがって、本発明は、ヘマグルチニンのアミノ酸配列又はヘマグルチニンアミノ酸配列をコードする核酸を提供する。前記アミノ酸配列は植物中でVLPを形成し、公知の配列及び開発可能な変種配列を含む。

図65はそのような公知の変型例を示している。本図は、以下のH1N1株のHAのコンセンサスアミノ酸配列 (配列番号:74) を示す : A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) (配列番号:33によってコードされる)、A/ブリスベーン/59/2007 (H1N1) (配列番号:48)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1) (配列番号:49) 及び配列番号:9。X1 (3位) はA又はV ; X2 (52位) はD又はN ; X3 (90位) はK又はR ; X4 (99位) はK又はT ; X5 (111位) はY又はH ; X6 (145位) はV又はT ; X7 (154位) はE又はK ; X8 (161位) はR又はK ; X9 (181位) はV又はA ; X10 (203位) はD又はN ; X11 (205位) はR又はK ; X12 (210位) はT又はK ; X13 (225位) はR又はK ; X14 (268位) はW又はR ; X15 (283位) はT又はN ; X16 (290位) はE又はK ; X17 (432位) はI又はL ; X18 (489位) はN又はDである。

そのような変型のまた別の例として、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) (配列番号:33によってコードされる)、A/ブリスベーン/59/2007 (H1N1) (配列番号:48)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1) (配列番号:49)、A/ブルートリコ/8/34 (H1N1) 及び配列番号:9の HAの配列アラインメント及びコンセンサス配列が下記の表3に示されている。

【 0 0 4 4 】

【表2】

表3:H1N1選択株のHAの配列アラインメント及びコンセンサス配列

配列番号	配列	
1		50
75	MKA KLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL	
9	MKA KLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL	
48	MKV KLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL	
49	MKV KLLVLLC TFTATYADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL	10
76	
コンセンサス	mkxkllvllc tftatyadti cigyhannst dtvdtvlekn vtvthsvnll	
51		100
75	EDSHNGKLCL LKGIA PLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK EWSYIVETP	
9	EDSHNGKLCL LKGIA PLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK EWSYIVETP	
48	ENSHNGKLCL LKGIA PLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK EWSYIVEKP	
49	EDSHNGKLCL LKGIA PLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK EWSYIVEKP	
76	
コンセンサス	exshngklcl lkgiaplqlg ncsvagwilg npecellis. eswsyive.p	
101		150
75	NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA	
9	NPENGTCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA	
48	NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTVTGVSA	
49	NPENGTCYPG HFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHTTGVS A	
76	
コンセンサス	npengtcypg xfadyeelre qlssvssfer feifpkessw pnhtxtgvsa	
151		200
75	SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YVNNKEKEVL VLWGVHHPPN	
9	SCSHNGKSSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YVNNKEKEVL VLWGVHHPPN	
48	SCSHNGESSF YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN	
49	SCSHNGESSF YKNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL VLWGVHHPPN	30
76	
コンセンサス	scshngxssf yxnllwltgk nglypnlsks yxnnkekevl vlwgvhppn	
201		250
75	IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL	
9	IGNQRALYHT ENAYVSVVSS HYSRRFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL	
48	IGDQKALYHT ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL	
49	IGDQRALYHK ENAYVSVVSS HYSRKFTPEI AKRPKVRDQE GRINYYWTLL	
76 MSLLT EVETYVLSII PSGPLKAEIA QRLEDVFAGK	
コンセンサス	igxqkalyhx enayvsvvss hysrxftpeI akrPkvr#qe gRi#yywtll	
251		300
75	EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRGFGSG IITSNAPMDE CDAKCQTPQG	
9	EPGDTIIFEA NGNLIAPWYA FALSRGFGSG IITSNAPMDE CDAKCQTPQG	
48	EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRGFGSG IINSNAPMDK CDAKCQTPQG	
49	EPGDTIIFEA NGNLIAPRYA FALSRGFGSG IINSNAPMDE CDAKCQTPQG	
76	NTDLEVLMEW ...LKTRPIL SPLTKGILGF VFTLTVPSER GLQRRRFVQN	
コンセンサス	#pgdt!ifEa ngnLiapxya faLsrGfgsg !itsnaPm#x cdakcqtpQg	

【0045】

(表3つづき)

【表3】

	301	350	
75	AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI		
9	AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI		
48	AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI		
49	AINSSLPFQN VHPVTIGECP KYVRSAKLRM VT.GLRNIPS IQSRGLFGAI		
76	ALNG.....N GDPNNMDKAV KLYRKLKREI TFHGAKEISL SYSAGALASC		
コンセンサス	AiNsslpfqN vhPvtigecp KyvRsaKlrm vtxGlr#Ips iqSrGlfgai		
	351	400	
75	AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNNSVI		
9	AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNNSVI		10
48	AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNNSVI		
49	AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQGSGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNNSVI		
76	MGLIYNRM.G AVTTEVAFGL VCATCEQIAD SQHRSHRQMV TTTNPLIRHE		
コンセンサス	aGfIeggwtG mVdgwyg%hh qneqgsgyAa dQkstqnain giTNkvnsvi		
	401	450	
75	EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER		
9	EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLLENER		
48	EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLLENER		
49	EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFIDIWTYNA ELLVLLENER		
76	NRMVLASTTA .KAMEQMAGS SEQAAEAMEV A.....S QARQMVQAMR		20
コンセンサス	#kMntqftav gKef#k\$err mE#lnkkv#d gfxdiwtyna #llv\$1#neR		
	451	500	
75	TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMEVKNGT		
9	TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ KNNAKEIGNG CFEFYHKCNN ECMEVKNGT		
48	TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ KNNAKEIGNG CFEFYHKCND ECMEVKNGT		
49	TLDFHDSNVK NLYEKVKSQ KNNAKEIGNG CFEFYHKCND ECMEVKNGT		
76	TIGTHPSSSA GLKNDLLENL QAYQKRMGVQ MQRFK.....		
コンセンサス	Tldfhdsnvk nLy#kvks#L knnaKeiGng cfeFyhkcnx ecmevkngt		
	501	550	
75	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMSGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI		
9	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMSGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI		30
48	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMSGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI		
49	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMSGVYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI		
76		
コンセンサス	ydypkysees klnrekidgv klesmsgvq laiystvass lvllvslgai		
	551	566	
75	SFWMCNSNGSL QCRICI		
9	SFWMCNSNGSL QCRICI		
48	SFWMCNSNGSL QCRICI		
49	SFWMCNSNGSL QCRICI		
76		40
コンセンサス	sfwmcnsngsl qcrici		

【0046】

コンセンサス配列は、指定した位置で全ての配列に共通のアミノ酸を小文字で示し、大文字は少なくとも半分の配列又は大半の配列に共通のアミノ酸を示し、記号！はI又はVのどちらかであり、記号\$はL又はMのどちらかであり、記号%はF又はYのどちらかであり、記号#はN、D、Q、E、B又はZのいずれかであり、記号“ ”ではアミノ酸は存在せず（例えば欠失）、3位のXはA又はVのどちらかであり；52位のXはE又はNのどちらかであり；90位のXはK又はRであり；99位のXはT又はKであり；111位のXはY又はHのどちらかであり；145位のXはV又はTのどちらかであり；157位のXはK又はEであり；162位のXはR又はKであり；1

82位のXはV又はAであり；203位のXはN又はDであり；205位のXはR又はKであり；210位のXはT又はKであり；225位のXはK又はYであり；333位のXはH又は欠失であり；433位のXはI又はLであり；49位のXはN又はDである。

そのような変型のまた別の例として、A/アンフィ/1/2005 (H5N1) (配列番号:55)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1) 及びA/インドネシア/5/2006 (H5N1) (配列番号:10) のHAの配列アラインメント及びコンセンサス配列が下記の表4に示されている。

【 0 0 4 7 】

【 表 4 】

表4:H1N1選択株の HA の配列アラインメント及びコンセンサス配列

10

配列番号	配列	
1		50
10 MEKIVLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE		
56 MEKIVLLFAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE		
55 MEKIVLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE		
コンセンサス MEKIVLLLAI VSLVKSDQIC IGYHANNSTE QVDTIMEKNV TVTHAQDILE		
51		100
10 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIIVEKAN		
56 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIIVEKAN		
55 KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIIVEKAN		
コンセンサス KTHNGKLCDL DGVKPLILRD CSVAGWLLGN PMCDEFINVP EWSYIIVEKAN		
101		150
10 PTNDLCYPGS FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA		
56 PVNDLCYPGD FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSS HEASLGVSSA		
55 PANDLCYPGN FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA		
コンセンサス PxNDLCYPGx FNDYEELKHL LSRINHFEKI QIIPKSSWSD HEASSGVSSA		
151		200
10 CPYLGSPSFF RNVVWLICKN STYPTIKSY NNTNQEDLLV LWGIHHpNDA		
56 CPYQGKSSFF RNVVWLICKN STYPTIKRSY NNTNQEDLLV LWGIHHpNDA		
55 CPYQGTPSFF RNVVWLICKN NTYPTIKRSY NNTNQEDILLI LWGIHHSNDA		
コンセンサス CPYqGxpSFF RNVVWLICKN sTYPTIKrSY NNTNQEDILL! LWGIHHpNDA		
201		250
10 AEQTRLYQNP TTYISIGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RM#FFWTILK		
56 AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPRIA TRSKVNGQSG RM#FFWTILK		
55 AEQTKLYQNP TTYISVGTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RM#FFWTILK		
コンセンサス AEQTKLYQNP TTYIS!GTST LNQRLVPKIA TRSKVNGQSG RM#FFWTILK		
251		300
10 PNDAINFESN GNFIAPAYAY KIVKKGDSAI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA		
56 PNDAINFESN GNFIAPAYAY KIVKKGDSTI MKSELEYGNC NTKCQTPMGA		
55 PNDAINFESN GNFIAPAYAY KIVKKGDSAI VKSEVEYGNC NTKCQTPIGA		
コンセンサス PNDAINFESN GNFIAPAYAY KIVKKGDSAI mKSELEYGNC NTKCQTPmGA		

20

30

40

【 0 0 4 8 】

(表 4 つづき)

【表5】

		301		350	
10	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKSNRVLVA	TGLRNSPQRE	SRRKKRGLFG
56	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKSNRVLVA	TGLRNSPQRE	RRRKRRGLFG
55	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKSNKLVLA	TGLRNSPLRE	RRRK.RGLFG
コンセンサス	INSSMPFHNI	HPLTIGECPK	YVKSNRVLVA	TGLRNSPqRE	rRRKkRGLFG
		351		400	
10	AIAGFIEGGW	QGMVDGWYGY	HHSNEQGSGY	AADKESTQKA	IDGVTNKVNS
56	AIAGFIEGGW	QGMVDGWYGY	HHSNEQGSGY	AADKESTQKA	IDGVTNKVNS
55	AIAGFIEGGW	QGMVDGWYGY	HHSNEQGSGY	AADKESTQKA	IDGVTNKVNS
コンセンサス	AIAGFIEGGW	QGMVDGWYGY	HHSNEQGSGY	AADKESTQKA	IDGVTNKVNS
		401		450	
10	IIDKMNTQFE	AVGREFNNLE	RRIENLNKKM	EDGFLDVWWTY	NAELLVLMEN
56	IIDKMNTQFE	AVGREFNNLE	RRIENLNKKM	EDGFLDVWWTY	NAELLVLMEN
55	IIDKMNTQFE	AVGREFNNLE	RRIENLNKKM	EDGFLDVWWTY	NAELLVLMEN
コンセンサス	IIDKMNTQFE	AVGREFNNLE	RRIENLNKKM	EDGFLDVWWTY	NAELLVLMEN
		451		500	
10	ERTLDFHDSN	VKNLYDKVRL	QLRDNAKELG	NGCFEFYHKC	DNECMESIRN
56	ERTLDFHDSN	VKNLYDKVRL	QLRDNAKELG	NGCFEFYHKC	DNECMESVRN
55	ERTLDFHDSN	VKNLYDKVRL	QLRDNAKELG	NGCFEFYHKC	DNECMESVRN
コンセンサス	ERTLDFHDSN	VKNLYDKVRL	QLRDNAKELG	NGCFEFYHKC	DNECMES!RN
		501		550	
10	GTYNYPQYSE	EARLKREEIS	GVKLESIGTY	QILSIYSTVA	SSLALAIMMA
56	GTYDYPQYSE	EARLKREEIS	GVKLESIGIY	QILSIYSTVA	SSLALAIMVA
55	GTYDYPQYSE	EARLKREEIS	GVKLESIGTY	QILSIYSTVA	SSLALAIMVA
コンセンサス	GTY#YPQYSE	EARLKREEIS	GVKLESIGtY	QILSIYSTVA	SSLALAIMvA
		551	568		
10	GLSLWMCSNG	SLQCRICI			
56	GLSLWMCSNG	SLQCRICI			
55	GLSLWMCSNG	SLQCRICI			
コンセンサス	GLSLWMCSNG	SLQCRICI			

【0049】

コンセンサス配列は、指定した位置で全ての配列に共通のアミノ酸を小文字で示し、大文字は少なくとも半分の配列又は大半の配列に共通のアミノ酸を示し、記号！はI又はVのどちらかであり、記号\$はL又はMのどちらかであり、記号%はF又はYのどちらかであり、記号#はN、D、Q、E、B又はZのいずれかであり、102位のXはT、V又はAのいずれかであり；110位のXはS、D又はNのいずれかであり；156位のXはS、K又はTのいずれかである。

上記に例示したアラインメント及びコンセンサス配列は、植物中でVLPを製造するためには本発明の多様な実施態様で用いることができる、ヘマグルチニンアミノ酸配列における非制限的な変型例である。

各アミノ酸のコドンは当分野では公知があるので、アミノ酸配列をコードする核酸は容易に決定することができる。したがって、アミノ酸配列の提供は、それをコードする縮退核酸配列を教示する。したがって、本発明は、本明細書で開示する、例えば以下のインフルエンザ株及び亜型のヘマグルチニンをコードする核酸配列とともに、それらヘマグルチニンをコードする縮退配列を提供する：A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) A/インドネシア/5/2006 (H5N1)、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/カモメ/DE/677/88 (H2N8)、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/上海/1/2000、A/キタオナガガモ/TX/828189/02、A/シチメンチョウ/オントリオ/6118/68 (H8N4)、A/ハシビロガモ/イラン/G54/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949 (H10N7)、A/アヒル/イギリス/56 (H11N6)、A/アヒル/

10

20

30

40

50

アルバータ/60/76 (H12N5)、A/カモメ/メリーランド/704/77 (H13N6)、A/マガモ/グルジエブ/263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83 (H15N8)、A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99 (H16N3)、B/リー/40、C/ヨハネスブルグ/66、A/エルトリコ/8/34 ((H1N1)、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1)、A/プリスペーン10/2007 (H3N2)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57 (H2N2)、A/アンフィ/1/2005 (H5N1)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)、A/ウマ/プラハ/56 (H7N7)、A/香港/1073/99 (H9N2)。

【0050】

さらにまた、各アミノ酸のコドンは当分野では公知であるので、核酸配列によってコードされるアミノ酸配列は容易に決定することができる。したがって、核酸の提供は、それによってコードされるアミノ酸配列を教示する。したがって、本発明は、本明細書で開示する、例えば以下のインフルエンザ株及び亜型のヘマグルチニンのアミノ酸配列を提供する：A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1)、A/インドネシア/5/2006 (H5N1)、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/カモメ/DE/677/88 (H2N8)、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/上海/1/2000、A/キタオナガガモ/TX/828189/02、A/シチメンチョウ/オンタリオ/6118/68 (H8N4)、A/ハシビロガモ/イラン/G54/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949 (H10N7)、A/アヒル/イギリス/56 (H11N6)、A/アヒル/アルバータ/60/76 (H12N5)、A/カモメ/メリーランド/704/77 (H13N6)、A/マガモ/グルジエブ/263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83 (H15N8)、A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99 (H16N3)、B/リー/40、C/ヨハネスブルグ/66、A/エルトリコ/8/34 ((H1N1)、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1)、A/プリスペーン10/2007 (H3N2)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57 (H2N2)、A/アンフィ/1/2005 (H5N1)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)、A/ウマ/プラハ/56 (H7N7)、A/香港/1073/99 (H9N2)。

【0051】

植物では、インフルエンザのVLPは形質膜から発芽し（実施例5及び図19を参照されたい）、したがってVLPの脂質組成はそれらの起源を反映する。本発明にしたがって生成されるVLPは、植物由来の脂質と複合体を形成した、1つ以上の型又は亜型のインフルエンザのHAを含む。植物脂質は特定の免疫細胞を刺激し、誘発される免疫応答を強化することができる。植物膜は、脂質、ホスファチジルコリン(PC)及びホスファチジルエタノールアミン(PE)で構成され、さらにまたグリコスフィンゴ脂質、サポニン及びフィトステロールを含む。さらに、リピドラフトがまた植物形質膜で見出される（これら微小ドメインはスフィンゴリビド及びステロールに富む）。植物では、多様なフィトステロールが出現することが知られている。前記にはスチグマステロール、シトステロール、24-メチルコレステロール及びコレステロールが含まれる(Mongrand et al. 2004)。

PC及びPEは、グリコスフィンゴリビドと同様に、哺乳動物の免疫細胞（例えば抗原提示細胞(APC)様樹状細胞及びマクロファージ並びに胸腺及び肝臓のB及びTリンパ球を含む他の細胞）によって発現されるCD1分子と結合することができる(M. Tsuji, 2006)。CD1分子は、クラスIの主要組織適合性複合体(MHC)と構造的に類似し、それらの役割はNKT細胞(ナチュラルキラーT細胞)に糖脂質抗原を提示することである。活性化に際して、NKT細胞は、先天的な免疫細胞（例えばNK細胞及び樹状細胞）を活性化し、さらにまた後天的免疫細胞（例えば抗体産生B細胞及びT細胞）を活性化する。

形質膜には多様なフィトステロールが見出される。特異的な補完成分は、種、生育条件、栄養源、又は病原体の状態（いくつかの因子が挙げられる）に応じて変動しそう。一般的にはベータ-シトステロールがもっとも豊富なフィトステロールである。

脂質二重層（例えば形質膜由来エンベロープ）と複合体を形成したインフルエンザVLPに存在するフィトステロールは、有利なワクチン組成物を提供する。理論に拘束されないが、脂質二重層（例えば形質膜由来エンベロープ）と複合体を形成した、植物生成VLPは、他の発現系で生成されたVLPよりも強力な免疫反応を誘発することができ、生又は

10

20

30

40

50

弱毒完全ウイルスワクチンによって誘発される免疫反応と類似しそう。

【0052】

したがって、いくつかの実施態様では、本発明は、植物由来脂質二重層と複合体を形成したVLPを提供する。いくつかの実施態様では、植物由来脂質二重層はVLPのエンベロープを含むことができる。

植物内で生成されたVLPは、植物特異的N-グリカンを含むHAを誘発することができる。したがって、本発明はまた、植物特異的N-グリカンを有するHAを含むVLPを提供する。

さらにまた、植物内でのN-グリカンの改変は公知であり（例えばUS60/944,344（前記文献は参照により本明細書に含まれる））、改変N-グリカンを有するHAを生成することができる。改変グリコシル化パターンを含むHA（例えばフコシル化低下、キシロシル化低下、又はフコシル化とキシロシル化の両方が低下したN-グリカンを有する）を得ることができ、タンパク質がフコシル化、キシロシル化又はその両方を欠き、さらにガラクトシル化の増加を含む、改変グリコシル化パターンを有するHAを得ることができる。さらにまた、翻訳後改変、例えば末端ガラクトースの付加の調節によって、野生型の植物発現HAと比較して、発現されたHAのフコシル化及びキシロシル化の低下をもたらすことができる。

10

【0053】

例えば（限定とみなすべきではないが）、改変グリコシル化パターンを有するHAの合成は、対象のタンパク質をペータ-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ（GaIT）をコードするヌクレオチド配列と一緒に同時発現させることによって達成することができる。GaITは、例えば哺乳動物GaIT又はヒトGaITであるが（ただしこれらに限定されない）、別の起源のGaITもまた用いることができる。さらにまた、GaITの触媒ドメインをN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GNT1）のCTSドメイン（すなわち細胞質テール、トランスマンプレンドドメイン、幹領域）と融合させて、GNT1-GaITハイブリッド酵素を生成し、このハイブリッド酵素をHAと同時発現させてもよい。HAはまた、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnT-III）をコードするヌクレオチド配列と同時発現させてもよい。GnT-IIIは、例えば哺乳動物GnT-III又はヒトGnT-IIIであるが（ただしこれらに限定されない）、他の起源のGnT-IIIもまた用いることができる。さらにまた、GnT-IIIが融合したGNT1のCTSを含むGNT1-GnT-IIIハイブリッド酵素を用いてもよい。

20

したがって、本発明はまた改変N-グリカンを有するHAを含むVLPを含む。

理論に拘束されないが、HAにおける植物N-グリカンの存在は、HAと抗原提示細胞との結合を促進することによって免疫応答を刺激することができる。植物Nグリカンを用いた免疫応答の刺激は、Saint-jore-Dupasら（2007）が提唱した。さらにまた、VLPの形状は抗原の提示に有利であり、植物由来脂質二重層と複合体を形成したときVLPのアジュバント効果を高めることができる。

30

【0054】

“調節領域”、“調節エレメント”又は“プロモータ”とは、核酸の部分、典型的には遺伝子のタンパク質コード領域の上流（常にそうであるとは限らないが）を意味し、DNA又はRNA、又はDNAとRNAの両方で構成されれる。調節領域が活性を有し、さらに対象の遺伝子と作動できるように結合しているか又は機能的に連結されているときは、対象遺伝子の発現をもたらすことができる。調節エレメントは、器官特異性を仲介するか、又は発育性若しくは一過性遺伝子活性化を制御することができる。“調節性領域”には、プロモータエレメント、基準プロモータ活性を示すコアプロモータ、外部刺激に対する応答において誘導することができるエレメント、プロモータ活性を仲介するエレメント（例えば負の調節エレメント又は転写エンハンサー）が含まれる。本明細書で用いられる“調節領域”にはまた、転写後に活性なエレメントが含まれ、例えば、遺伝子発現を調節する調節エレメント、例えば翻訳及び転写エンハンサー、翻訳及び転写リプレッサー、上流の活性化配列、及びmRNA安定性決定因子である。これら後者のエレメントのいくつかはコード領域の近位に位置することができる。

40

本開示の関係では、“調節エレメント”又は“調節領域”は典型的にはDNAの配列を指し、通常は（常にというわけではないが）、構造遺伝子のコード配列の上流（5'側）に

50

あり、RNAポリメラーゼ及び／又は特定部位での転写開始に必要な他の因子のための認識を提供することによって、コード領域の発現を制御する。しかしながら、配列のイントロン内又は3'側に位置する他のヌクレオチド配列もまた、対象のコード領域の発現の調節に寄与しえることは理解されよう。RNAポリメラーゼ、又は特定部位での開始を担保する他の転写因子のための認識を提供する調節エレメントの例はプロモータエレメントである。大半の（全部というわけではないが）真核細胞のプロモータエレメントはTATAボックスを含む。TATAボックスは、アデノシン及びチミジンヌクレオチド塩基対で構成される保存核酸配列であり、通常は転写開始部位のほぼ25塩基対上流に位置する。プロモータエレメントには、転写の開始に必要な基準プロモータエレメントとともに遺伝子発現を改変する他の調節エレメント（上記に列挙）が含まれる。

10

【0055】

いくつかのタイプの調節領域が存在し、前記には発育により調節されるもの、誘導性のもの又は構成性のものが含まれる。発育により調節されるか、又は遺伝子の弁別的発現をその制御下で制御する調節領域は、一定の器官又は器官の組織内で、当該器官又は組織の発育時の特定の時期に活性化される。しかしながら、発育により調節されるいくつかの調節領域は、特定の発育段階にある一定の器官又は組織内で優先的に活性なが、それら調節領域はまた、当該植物内の他の器官又は組織においても発育的に調節された様で、又は基準レベルで同様に活性なこともできる。組織特異的調節領域、例えば種子特異的調節領域の例には、ナピン（napin）プロモータ及びクルシフェリンプロモータが含まれる（例えば以下を参照されたい：Rask et al. 1998, J Plant Physiol 152:595-599；Bilodeau et al. 1994, Plant Cell 14:125-130）。葉特異的プロモータの例には、プラストシアニンプロモータが含まれる（図1b又は配列番号：23；US7,125,978、前記文献は参考により本明細書に含まれる）。

20

【0056】

誘導性調節領域は、誘導物質に応答して1つ以上のDNA配列又は遺伝子の転写を直接又は間接的に活性化することができる領域である。誘導物質の非存在下では、DNA配列又は遺伝子は転写されないであろう。典型的には、誘導性調節領域と特異的に結合して転写を活性化するタンパク質因子が不活性な形態で存在し、誘導物質によって直接的又は間接的に活性な形態に変換させることができる。しかしながら、前記タンパク質因子はまた存在しなくてもよい。誘導物質は化学的物質であってもよい。前記は例えば、タンパク質、代謝物質、成長調節因子、除草剤若しくはフェノール化合物、又は生理的ストレスであり、後者は、熱、寒冷、塩若しくは有害エレメントによって直接与えられるか、又は病原体若しくは発病因子（例えばウイルス）の作用により間接的に与えられる。誘導性調節領域を含む植物細胞は、細胞又は植物に外部から誘導性物質を、例えば噴霧、灌水、加温又は同様な方法によって適用することにより誘導性物質に暴露することができる。誘導性調節エレメントは、植物又は非植物遺伝子から誘導することができる（例えば、C. Gatz and I.R. P. Lenk, 1998, Trends Plant Sci 3:352-358；前記文献は参考により本明細書に含まれる）。潜在的な誘導性プロモータの例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：テトラサイクリン誘導性プロモータ（C. Gatz, 1997, Am Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108；前記文献は参考により本明細書に含まれる）、ステロイド誘導性プロモータ（T. Aoyama and N.H. Chua, 1997, Plant J 2:397-404；前記文献は参考により本明細書に含まれる）及びエタノール誘導性プロモータ（M.G. Salter et al. 1998, Plant Journal 16:127-132；M.X. Caddick et al. 1998, Nature Biotech 16:177-180；前記文献は参考により本明細書に含まれる）サイトカイン誘導性IB6及びCKII遺伝子（I. Brandstatter and J.J. Kieber, 1998, Plant Cell 10:1009-1019；T. Kakimoto, 1996, Science 274:982-985；前記文献は参考により本明細書に含まれる）、及びオーキシン誘導性エレメント、DR5（T. Ulmasov et al. 1997, Plant Cell 9:1963-1971；前記文献は参考により本明細書に含まれる）。

30

【0057】

構成的調節領域は、植物の多様な部分全体で、かつ植物の全発育を通して継続的に遺伝

40

50

子の発現を指令する。公知の構成的調節エレメントの例には以下に関連するプロモータが含まれる：CaMV 35S転写物（Odell et al. 1985, Nature, 313:810-812）、イネのアクチン1（Zhang et al. 1991, Plant Cell, 3:1155-1165）、アクチン2（An et al. 1996, Plant J, 10:107-121）、又はtms2（US5,428,147；前記文献は参照により本明細書に含まれる）、及びトリオースホスフェートイソメラーゼ1（Xu et al. 1994, Plant Physiol 106:459-467）遺伝子、トウモロコシのユビキチン1遺伝子（Cornejo et al. 1993, Plant Mol Biol 29:637-646）、シロイヌナズナ（Arabidopsis）のユビキチン1及び6遺伝子（Holtorf et al. 1995, Plant Mol Biol 29:637-646）、及びタバコ翻訳開始因子4A遺伝子（Mandel et al. 1995, Plant Mol Biol, 29:995-1004）。本明細書で用いられる“構成的”という用語は、構成的調節領域の制御下にある遺伝子が必ずしも全ての細胞タイプで同じレベルで発現されることを示しているわけではなく、しばしば量に変動が観察されるとしても遺伝子が広範囲の細胞タイプで発現されることを示している。10

“機能的に連結される”とは、個々の配列、例えば調節エレメントと対象のコード領域が直接又は間接的に相互作用して、目的の機能（例えば遺伝子発現の仲介又は調節）を実行することを意味する。機能的に連結された配列の相互作用は、例えば機能的に連結された配列と相互作用するタンパク質によって仲介されえる。

本発明の1つ以上のヌクレオチド配列は、本発明のヌクレオチド配列又は構築物又はベクターによって形質転換した適切な任意の植物宿主で発現させることができる。適切な宿主の例には、農作物（アルファルファ、キャノーラ、ブロッサム（Brassica） spp.、トウモロコシ、ニコチアナ（Nicotiana） spp.、アルファルファ、ジャガイモ、ショウセンニンジン、エンドウマメ、エンバク、コメ、ダイズ、コムギ、オオムギ、ヒマワリ、綿などを含む）が含まれるが、ただし前記に限定されない。20

【0058】

本発明の1つ以上のキメラ遺伝子構築物は3' 非翻訳領域を含む。3' 非翻訳領域は、ポリアデニル化シグナル及びmRNAプロセッシング又は遺伝子発現を実行することができる任意の他の調節シグナルを含むDNAセグメントを含む遺伝子の部分に該当する。ポリアデニル化シグナルは、通常は、mRNA前駆体の3' 末端へのポリアデニル酸鎖の付加の実行を特徴とする。ポリアデニル化シグナルは、一般的には、基準型5' AATAAA-3'（ただし変種も珍しくはないが）に対する相同意の存在によって認識される。本発明の1つ以上のキメラ遺伝子構築物はまたさらに別のエンハンサー（翻訳又は転写エンハンサー）を必要に応じて含むことができる。これらのエンハンサー領域は当業者に周知であり、ATG開始コドン及び近接配列を含むことができる。開始コドンは、コード配列の読み枠と一致し完全な配列の翻訳を担保しなければならない。30

適切な3' 領域の非限定例は、アグロバクテリウム（Agrobacterium）腫瘍誘発プラスミド遺伝子、例えばノパリンシンターゼ遺伝子（Nos遺伝子）及び植物遺伝子（例えばダイズ貯蔵タンパク質遺伝子）、リブロース-1,5-ビスホスフェートカルボキシラーゼの小サブユニット（ssRUBISCO；US4,962,028（前記文献は参照により本明細書に含まれる））遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む3' 転写非翻訳領域、プラストシアニン発現の調節に用いられるプロモータ（Pwee and Gray 1993；前記文献は参照により本明細書に含まれる）である。プラストシアニンプロモータの例はUS7,125,978（前記文献は参照により本明細書に含まれる）に記載されている。40

本明細書に記載するように、葉の発現で明示の有効性を有するエンハンサー配列を含むプロモータは一過性発現で有効であることが示された。理論に拘束されないが、核マトリックスへの固着による光合成遺伝子の上流調節エレメントの固着は強力な発現を仲介する。例えば、エンドウマメのプラストシアニン遺伝子の翻訳開始部位から-784までを用いて、強力なレポーター遺伝子発現を仲介することができる。

【0059】

形質転換した植物細胞の識別を容易にするために、本発明の構築物は植物中で選別可能なマーカーを含むようにさらに操作することができる。有用な選別可能マーカーには、化学物質、例えば抗生物質（例えばゲンタマイシン、ヒグロマイシン、カナマイシン）又は50

除草剤（例えばホスフィノスリシン、グリフォセート、クロロスルフロン）などに対する耐性を提供する酵素が含まれる。同様に、色の変化によって識別することができる化合物の生成を提供する酵素、例えばGUS（ベータ-グルクロニダーゼ）、又はルミネセンスの生成によって識別することができる酵素、例えばルシフェラーゼ又はGFPを用いてもよい。

さらにまた本発明の考慮される部分は、本発明のキメラ遺伝子構築物を含むトランスジェニック植物、植物細胞又は種子である。植物細胞から全植物を再生する方法もまた当分野で公知である。一般的に、形質転換させた植物細胞は適切な培養液で培養される。前記培養液は選別薬剤（例えば抗生素質）を含むことができ、この場合、選別性マーカーは形質転換植物細胞の識別を容易にするために用いられる。いったんカルスが形成されたら、シート形成は、公知の方法にしたがって適切な植物ホルモンを利用することによって促進することができ、植物を再生するためにシートを発根培地に移す。続いて、前記植物を用いて、種子から又は栄養生殖技術を用いる反復生殖を確立させる。トランスジェニック植物はまた組織培養を用いることなく作製することができる。10

【 0 0 6 0 】

さらにまた本発明の考慮される部分は、本発明にしたがってVLPを生成するために、組換えHAOをコードする核酸を含むキメラ遺伝子構築物を含むトランスジェニック植物、樹木、酵母、細菌、菌類、昆虫及び動物細胞である。

本発明の調節エレメントはまた、形質転換又は一過性発現に馴染みやすい一連の宿主生物での発現のために対象のコード領域と結合させることができる。そのような生物には、植物（单子葉及び双子葉の両植物、例えばトウモロコシ、穀類植物、コムギ、オオムギ、ニコチアナ spp.、ブラシカ spp.、ダイズ、インゲンマメ、エンドウマメ、アルファルファ、ジャガイモ、トマト、チョウセンニンジン及びシロイヌナズナ（ただしこれらに限定されない）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。20

安定な形質転換及びこれらの生物の再生のための方法は当分野では確立され、当業者には公知である。植物を形質転換し再生植物入手する方法は本発明にとって重大ではない。。

“形質転換”とは、遺伝型として、表現型として、又はその両方において表される、遺伝情報（ヌクレオチド配列）の安定な種間移転を意味する。キメラ構築物から宿主への遺伝情報の種間移転は遺伝性であって遺伝情報の移転は安定であると考えられるか、又は移転は一過性であって遺伝情報の移転は遺伝性ではない。30

“植物材料”という用語は、植物に由来する任意の素材を意味する。植物材料は完全な植物、組織、細胞、又はその任意の部分を含むことができる。さらにまた、植物材料は、細胞内植物成分、細胞外植物成分、植物の液体又は固体抽出物、又は前記の組合せを含むことができる。さらにまた、植物材料は、植物の葉、茎、果実、根又はその組合せ由來の植物、植物細胞、組織、液体抽出物を含むことができる。植物材料は、何らの加工工程に付されていない植物又はその部分を含むことができる。しかしながら、植物材料は、下記に規定する最小限の加工工程、又はより激しい加工（当分野で一般的に知られている技術（クロマトグラフィー、電気泳動などを含むがただしこれらに限定されない）を用いた部分的又は実質的なタンパク質の精製を含む）に付されてもよい。

【 0 0 6 1 】

“最小限の加工”という用語は、例えば植物材料、例えば植物又は対象のタンパク質を含むその部分を部分的に精製して、植物抽出物、ホモジネート、植物ホモジネートの分画などを得る（すなわち最小限で加工する）ことを意味する。部分的精製は、植物の細胞構造を破壊して、それによって可溶性植物成分及び不溶性植物成分を含む組成物を精製することを含むが、ただし前記に限定されない。前記可溶性植物成分及び不溶性植物成分は、例えば遠心、ろ過又は前記の組合せ（ただしこれらに限定されない）によって分離することができる。これに関しては、葉又は他の組織の細胞外間隙に分泌されたタンパク質は、真空又は遠心抽出によって容易に入手することができる。又は、加圧下でローラーを通して組織を抽出するか、又はすり潰すなどしてタンパク質を搾り出すか、又は細胞外間隙内から遊離させることができよう。最小限の加工はまた可溶性タンパク質4050

の粗抽出物の調製を含む。なぜならば、これらの調製物は二次的な植物産物由来の夾雜物をほとんど含まないと思われるからである。さらにまた、最小限の加工は、葉の可溶性たんぱく質の水性抽出、前記に続く任意の適切な塩による沈殿を含むことができる。他の方法には、抽出物の直接使用を可能にするための大規模な離解及び液汁抽出が含まれえる。

植物素材又は組織の形態を有する植物材料は対象動物に経口的にデリバーすることができる。植物材料は、食事用サプリメントの部分として他の食物と一緒に又は被包化して投与することができる。植物材料又は組織はまた濃縮して嗜好性を改善又は高めるか、又は要請に応じて他の素材、成分又は医薬賦形剤と一緒に提供することができる。

本発明のVLPを投与することができる対象動物又は標的生物の例には、ヒト、靈長類、鳥、水鳥、渡り鳥、ウズラ、アヒル、ガン、家禽、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ウマ科の動物、ウマ、ラクダ、イヌ科の動物、イヌ、ネコ科の動物、ネコ、トラ、ヒョウ、ジャコウネコ、ミンク、イシテン、フェレット、家庭用ペット、家畜、ウサギ、マウス、ラット、モルモット又は他のげっ歯類、アザラシ、クジラなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記のような標的生物は例示であり、本発明の適用及び使用の制限とみなされるべきではない。

【 0 0 6 2 】

対象のタンパク質を含む植物、又は対象タンパク質を含むVLPを発現する植物を対象動物又は標的生物にその必要及び状況に応じた多様な方法で投与しえることが意図される。例えば、植物から得られる対象のタンパク質は、未加工、部分精製又は精製形態で使用前に抽出することができる。タンパク質が精製される場合は、当該タンパク質は食用又は非食用植物中で製造することができる。さらにまた、タンパク質が経口投与される場合は、植物組織を収穫して対象動物に飼料として直接与えるか、又は飼料として与える前に収穫組織を乾燥させるか、又は事前に収穫することなく動物に当該植物を食べさせてもよい。さら、収穫した植物組織を食品補助物として動物飼料中に提供することもまた、本発明の範囲内であると考えられる。ほんのわずかに加工して又は更なる加工を施すことなく植物組織を動物に飼料として与える場合は、投与される植物組織は食用であることが好ましい。

転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) は植物内でのトランスジーンの発現の制限に中心的に関与する可能性があり、ジャガイモウイルスY由来のサイレンシングサプレッサーの同時発現を、トランスジーンmRNAの特異的分解を相殺するために用いることができる (Baigneti et al. 1998)。また別のサイレンシングサプレッサーも当分野では周知であり、本明細書に記載するとおり用いることができ (Chiba et al. 2006, Virology 346:7-14; 前記文献は参照により本明細書に含まれる)、それらは例えば以下である (ただしこれらに限定されない) : TEV-p1/HC-Pro (タバコエッチウイルス-p1/HC-Pro)、BTV-p21、トマトブッシースタントウイルスのp19 (TCV-CP)、キウリモザイクウイルスの2b (CMV-2b)、ジャガイモウイルスXのp25 (PVX-p25)、ジャガイモウイルスMのp11 (PVM-p11)、ジャガイモウイルスSのp11 (PVS-p11)、ブルーベリースコーチウイルスのp16 (BScV-p16)、かんきつ類トリステキサウイルスのp23 (CTV-p23)、ブドウのリーフロール関連ウイルス-2のp24 (GLRaV-2 p24)、ブドウウイルスAのp10 (GVA-p10)、ブドウウイルスBのp14 (GBV-p14)、ヘラクレウム (Heracleum) 潜在ウイルスのp10 (HLV-p10)、ニンニク共通潜在ウイルスのp16 (GCLV-p16)。したがって、サイレンシングサプレッサー、例えばHcPro、TEV-p1/HC-Pro、BYV-p21、TBSV p19、TCV-CP, CMV-2b、PVX-p25、PVM-p11、PVS-p11、BScV-p16、CTV-p23、GLRaV-2 p24、GBV-p14、HLV-p10、GCLV-p16又はGVA-p10 (ただしこれらに限定されない) を、対象タンパク質をコードする核酸配列と一緒に発現させて、植物内での高レベルのタンパク質製造をさらに担保することができる。

【 0 0 6 3 】

さらにまた、HA亜型の組合せを含むVLPを生成することができる。例えば、VLPはH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16亜型又はその組合せの1つ以上のHAを含むことができる。HAの組合せの選択は、VLPから調製されるワクチンの使用目的によって決定することができる。例えば、トリの接種に使用されるワクチンは

10

20

30

40

50

任意のHAの組合せを含むことができるが、一方、ヒトの接種に有用なVLPは、H1、H2、H3、H5亜型の1つ以上の亜型を含むことができる。しかしながら他のHA亜型の組合せもVLPの使用に応じて調製することができる。HA亜型の組合せを含むVLPを製造するために、所望のHA亜型を同じ細胞、例えば植物細胞内で同時発現させることができる。

さらにまた、本明細書の記載にしたがって製造されたVLPはノイラミニダーゼ（NA）を含まない。しかしながら、HA及びNAを含むVLPを所望するならば、NAをHAと一緒に同時発現させてもよい。

したがって、本発明はさらに、安定的又は一過性発現系とともに使用するために適したキメラ構築物を含む適切なベクターを含む。遺伝情報はまた、1つ以上の構築物内で提供することができる。例えば、対象のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を1つの構築物に導入し、さらに対象のタンパク質のグリコシル化を改変するタンパク質をコードする第二のヌクレオチド配列を別個の構築物を用いて導入することができる。続いてこれらのヌクレオチド配列を植物内で同時発現させることができる。しかしながら、対象のタンパク質及び対象タンパク質のグリコシル化プロファイルを改変するタンパク質の両方をコードする1つのヌクレオチド配列を含む1つの構築物を用いてもよい。この事例では、ヌクレオチド配列は、プロモータ又は調節領域と機能的に連結された対象タンパク質をコードする第一の核酸配列を含む第一の配列、及び対象タンパク質のグリコシル化プロファイルを改変するタンパク質をコードする第二の核酸配列（前記第二の配列はプロモータ又は調節領域と機能的に連結される）を含むであろう。

【0064】

“同時発現”とは、2つ以上のヌクレオチド配列が、植物内でほぼ同じときに、かつ当該植物の同じ組織内で発現されることを意味する。しかしながら、ヌクレオチド配列は、厳密に同じときに発現される必要はない。そうではなくてむしろ、この2つ以上のヌクレオチド配列は、コードされた生成物が相互作用する機会を持つような態様で発現される。例えば、対象のタンパク質のグリコシル化を改変するタンパク質は、対象タンパク質のグリコシル化の改変が生じえるように、対象タンパク質が発現される前又は発現中に発現させることができる。2つ以上のヌクレオチド配列は一過性発現系を用いて同時発現させることができ、この場合、2つ以上の配列は、両配列が発現される条件下でほぼ同じ時に植物内に導入される。あるいは、ヌクレオチド配列の一方、例えば対象タンパク質のグリコシル化プロファイルを改変するタンパク質をコードする配列を含むプラットフォーム植物を、一過性又は安定的態様で、対象タンパク質をコードする追加の配列で形質転換してもよい。この事例では、対象タンパク質のグリコシル化プロファイルを改変するタンパク質をコードする配列を所望の発育段階中に所望の組織内で発現させるか、又は誘導性プロモータを用いてその発現を誘導し、さらに類似の条件下でかつ同じ組織で対象のタンパク質をコードする追加の配列を発現させて、ヌクレオチド配列が同時発現されることを担保することができる。

【0065】

本発明の構築物は、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接DNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを用いて植物細胞に導入することができる。そのような技術を概括するために例えば以下を参照されたい：Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988) ; Geierson and Corey, Plant Molecular Biology, 2d Ed. (1988) ; 及びMiki and Iyer, Fundamentals of Gene Transfer in Plants. In Plant Metabolism, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997)。他の方法には、直接DNA取込み、リポソームの使用、エレクトロポレーション（例えばプロトプラストを使用する）、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクタイル又はホイスカー、及び真空浸透が含まれる。例えば以下を参照されたい：Bilang, et al. (Gene 100: 247-250 (1991) ; Scheid et al. (Mol. Gen. Genet. 228: 104-112, 1991) ; Guerche et al. (Plant Science 52: 111-116, 1987) ; Neuhause et al. (Theor. Appl. Genet. 75: 30-36, 1987) ; Klein et al.,

10

20

30

40

50

Nature 327: 70-73 (1987) ; Howell et al. (Science 208: 1265, 1980) ; Horsch et al. (Science 227: 1229-1231, 1985) ; DeBlock et al., Plant Physiology 91: 694-701, 1989) ; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988) ; Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989) ; Liu and Lomonossoff (J. Virol Meth, 105:343-348, 2002,) ; U.S. Pat. Nos. 4,945,05、5,036,006及び5,100,792；米国特許出願08/438,666 (1995年5月10日出願) 及び同07/951,715 (1992年9月25日出願)。

【 0 0 6 6 】

一過性発現方法を用いて本発明の構築物を発現させることができる（以下を参照されたい：Liu and Lomonossoff, 2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348（前記文献は参照により本明細書に含まれる））。あるいは、真空による一過性発現方法（Kapilaら（1997）が記載（前記文献は参照により本明細書に含まれる））を用いてもよい。これらの場合には、例えばアグロバクテリア接種又はアグロバクテリア浸透の方法が含まれる。しかしながら、他の一過性方法もまた、上記に記載したように用いることができる。アグロバクテリア接種又はアグロバクテリア浸透のどちらかを用いて、所望の核酸を含むアグロバクテリア（Agrobacterium）の混合物を、組織（例えば葉）、植物の気生部分（茎、葉及び花を含む）、他の植物部分（茎、根、花）、又は全植物の細胞内間隙に侵入させる。表皮に十字の切れ込みを入れた後、アグロバクテリアが感染してt-DNAコピーが細胞内に移される。このt-DNAはエピソームとして転写され、mRNAは翻訳されて感染細胞内で対象タンパク質が生成されるが、核内へのt-DNAの移送は一過性である。

対象のヌクレオチド配列が、植物にとって直接的又は間接的に有毒である生成物をコードする場合は、そのような毒性は、本発明の方法を用いて対象のヌクレオチド配列を所望の組織内で又は植物の所望の発育段階で選択的に発現させることによって、植物全体で低下させることができる。さらにまた、一過性発現による発現期間の限定は、植物中で有毒生成物を產生させるとき、その作用を低下させることができる。誘導性プロモータ、組織特異的プロモータ、又は細胞特異的プロモータを用いて、対象配列の発現を選択的に指令することができる。

【 0 0 6 7 】

本発明の組換えHA VLPを既存のインフルエンザワクチンと併用して、ワクチンを補足してそれらをさらに有効にし、必要な投与用量を減少させることができる。当業者には理解されるところであるが、ワクチンは1つ以上のインフルエンザウイルスに対して作製することができる。適切なワクチンの例には、Sanofi-Pasteur、ID Biomedical、Merial、Sinnovac、Chiron、Roche、MedImmune、GlaxoSmithKline、Novartis、Sanofi-Aventis、Serono、Shire Pharmaceuticalsなどから市販されているものが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

所望の場合は、本発明のVLPは、当業者に公知の適切なアジュバントと混合することができる。さらにまた、前記VLPを、上記に規定した標的生物の処置のために有効用量のVLPを含むワクチン組成物で用いてもよい。さらにまた、本発明にしたがって製造したVLPを、異なるインフルエンザタンパク質（例えばノイラミニダーゼ（NA））を用いて得られたVLPと組み合わせてもよい。

したがって、本発明は、動物又は標的生物でインフルエンザウイルス感染に対する免疫を誘発する方法を提供する。前記方法は、1つ以上のVLPを含む有効用量のワクチンを投与する工程を含む。ワクチンは、経口的、皮内、鼻内、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は皮下に投与することができる。

【 0 0 6 8 】

本発明にしたがって生成したVLPの投与は実施例6に記載されている。植物生成H5 VLPの投与は、可溶性HAの投与と比較したとき顕著に高い応答をもたらした（図21A及び21B参照）。

図26A及び26Bに示すように、A/インドネシア/5/05 H5 VLPを投与された対象動物は、インフルエンザA/トルコ/582/06 (H5N1；“トルコH5N1”）によるチャレンジに対して交差

10

20

30

40

50

防御を提供した。チャレンジ前のインドネシアH5 VLPの投与は体重低下をまったくもたらさなかった。しかしながら、H5 VLPを投与しなかったが、トルコH5N1でチャレンジした対象動物は、顕著な体重低下を示し、対象動物のいくらかは死亡した。

これらのデータはしたがって、H5へマグルチニンウイルスタンパク質を含む植物生成インフルエンザVLPは、病原性インフルエンザ株に特異的な免疫応答を誘発し、さらにウイルス様粒子は植物形質膜から発芽しえることを示している。

したがって、本発明は、インフルエンザウイルスHAタンパク質、1つ以上の植物脂質、及び医薬的に許容し得る担体を含む有効用量のVLPを含む組成物を提供する。このインフルエンザウイルスHAタンパク質はH5インドネシア/5/2006であってもよい。さらにまた提供されるものは、インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象動物で誘発する方法である。本方法は、インフルエンザウイルスHAタンパク質、1つ以上の植物脂質、及び医薬的に許容し得る担体を含むウイルス様粒子を投与する工程を含む。ウイルス様粒子は、対象動物に対して経口的、皮内、鼻内、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は皮下に投与することができる。
10

【0069】

本発明の多様な実施態様の組成物は、1つ以上のインフルエンザ株又は亜型のVLPを含むことができる。“2つ以上”とは、2、3、4、5、6、7、8、9、10若しくはそれより多い株又は亜型を指す。提示される株又は亜型はただ1つの亜型であっても（例えば全てがH1N1又は全てがH5N1）、又は亜型の組合せであってもよい。例示的な亜型及び株には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) A/インドネシア/5/2006 (H5N1)、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/カモメ/DE/677/88 (H2N8)、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/上海/1/2000、A/キタオナガガモ/TX/828189/02、A/シチメンチョウ/オントリオ/6118/68 (H8N4)、A/ハシビロガモ/イラン/G5 4/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949 (H10N7)、A/アヒル/イギリス/56 (H11N6)、A/アヒル/アルバータ/60/76 (H12N5)、A/カモメ/メリーランド/704/77 (H13N6)、A/マガモ/グレジエブ/263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83 (H15N8)、A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99 (H16N3)、B/リー/40、C/ヨハネスブルグ/66、A/プエルトリコ/8/34 (H1N1)、A/プリスペーン/59/2007 (H1N1)、A/ソロモン諸島3/2006 (H1N1)、A/プリスペーン10/2007 (H3N2)、A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57 (H2N2)、A/アンフィ/1/2005 (H5N1)、A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)、A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)、A/ウマ/プラハ/56 (H7N7)、A/香港/1073/99 (H9N2)）。
20

株及び亜型の組合せの選択は、インフルエンザに暴露される可能性が高い対象動物の地理上の場所、免疫されるべきヒト集団の身近に存在する動物種（例えば水鳥の種、農産業用動物（例えばブタ）など）及びそれらが保持しているか、暴露又は暴露の可能性が高い株、亜型又は株内での抗原の趨勢の予測、又はそれら因子の組合せに左右されれる。過去に用いられた組合せの例を利用することができる（例えば以下を参照されたい：URL: who.int/csr/disease/influenza/vaccine_recommendations1/en）。ワクチン組成物の製造で、これらの株のいくつか又は全てを示された組合せ又は他の組合せで用いることができる。
30

より具体的には、例示的組合せは、以下を含む群から選択される2つ以上の株又は亜型由来のVLPを含むことができる：

A/プリスペーン/59/2007(H1N1)、A/プリスペーン/59/2007(H1N1)-様ウイルス、
A/プリスペーン/10/2007(H3N2)、A/プリスペーン/10/2007(H3N2)-様ウイルス、
B/フロリダ/4/2006又はB/フロリダ/4/2006-様ウイルス。
40

【0070】

別の例示的組合せは、以下を含む群から選択される2つ以上の株又は亜型由来のVLPを含むことができる：A/インドネシア/5/2005、A/インドネシア/5/2005-様ウイルス、A/ベトナム/1194/2004、A/ベトナム/1194/2004-様ウイルス、A/アンフィ/1/05、A/アンフィ/1/05-様ウイルス、A/ガン/ゲイян/337/2006、A/ガン/ゲイян/337/2006-様ウイルス、A/
50

ニワトリ/シャンクシ/2/2006、又はA/ニワトリ/シャンクシ/2/2006-様ウイルス。

別の例示的組合せは、インフルエンザA/ニワトリ/イタリア/1347/99(H7型)又はA/ニワトリ/ブリティッシュ=コロンビア/04(H7N3)株のVLPを含むことができる。

別の例示的組合せは、A/ニワトリ/香港/G9/97又はA/香港/1073/99のVLPを含むことができる。別の例示的組合せは、A/ソロモン諸島3/2006のVLPを含むことができる。別の例示的組合せは、A/ブリスベーン/10/2007のVLPを含むことができる。別の例示的組合せは、A/ウィスコンシン/67/2005のVLPを含むことができる。別の例示的組合せは、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006又はB/ブリスベーン/3/2007株又は亜型のVLPを含むことができる。

2つ以上のVLPは個々に発現させ、続いて精製又は半精製VLPを組み合わせることができる。あるいは、所望の比率で(例えばほぼ等しい割合で)VLPを組み合わせるか又は製造してもよいが、又は1つの亜型又は株が組成物のVLPの大半を構成するような態様で組み合わせててもよい。

したがって、本発明は、2つ以上の株又は亜型のVLPを含む組成物を提供する。

エンベロープウイルスのVLPは一般的に、それらが発芽する膜からそれらのエンベロープを獲得する。植物形質膜は、免疫刺激性作用を有することができるフィトステロール複合体を有する。この可能性を調べるために、植物生成H5 VLPをアジュバントの存在下又は非存在下で動物に投与し、HAI(血球凝集阻害抗体応答)を決定した(図22A、22B)。添加アジュバントの非存在下では、植物生成H5 VLPは顕著なHAIを提示し、抗原投与に対する全身的免疫応答を示した。さらにまた、アジュバントの存在下又は非存在下で投与されたVLPの抗体アイソタイププロファイルは類似している(図23)。

表5は、本発明の多様な実施態様で提供される配列を列挙する。

【0071】

表5：配列アイデンティファイアのための配列の詳細

10

20

配列番号	配列の詳細	開示図面
1	N末端H1フラグメント	図5a
2	C末端H1フラグメント	図5b
3	H5コード配列	図6
4	プライマーPlato-443c	図7a
5	プライマーSpHA(Ind)-Plasto.r	図7b
6	プライマーPlasto -SpHA(Ind).r	図7c
7	プライマーHA(Ind)-Sac.r	図7d
8	H1発現に用いられルアルファアルファプラスチアニン系 発現カセットの配列	図1
9	HA1ペプチド配列 (A/ニューカレドニア/20/99)	図8a
10	HA5ペプチド配列 (A/インドネシア/5/2006)	図8b
11	インフルエンザA亜型H7コード配列 (A/ニワトリ/ニューヨーク/1995)	図9
12	インフルエンザA亜型H2コード配列 (A/カモメ (herring gull) /DE/677/88 (H2N8))	図10a
13	インフルエンザA亜型H3コード配列 (A/テキサス/32/2003)	図10b
14	インフルエンザA亜型H4コード配列 (A/マガモ/MN/33/00)	図10c
15	インフルエンザA亜型H5コード配列 (A/アヒル/上海/1/2000)	図10d
16	インフルエンザA亜型H6コード配列 (A/キタオナガガモ/TX/828189/02)	図10e
17	インフルエンザA亜型H8コード配列 (A/シチメンチョウ/オントリオ/6118/68(H8N4))	図10f
18	インフルエンザA亜型H9コード配列 (A/ハシビロガモ/イラン/G54/03)	図10g
19	インフルエンザA亜型H10コード配列 (A/ニワトリ/ドイツ/N/1949(H10N7))	図10h
20	インフルエンザA亜型H11コード配列 (A/アヒル/イギリス/56(H11N6))	図10ai
21	インフルエンザA亜型H12コード配列 (A/アヒル/アルバータ/60/76(H12N5))	図10j
22	インフルエンザA亜型H13コード配列 (A/カモネ/メリーランド/704/77(H13N6))	図10k
23	インフルエンザA亜型H14コード配列 (A/マガモ/グルジエブ/263/82)	図10l
24	インフルエンザA亜型H15コード配列 (A/アヒル/オーストラリア/341/83(H15N8))	図10m
25	インフルエンザA亜型H16コード配列 (A/コクトウカモメ/スウェーデン/5/99(H16N3))	図10n

26	インフルエンザB HAコード配列 (B/リー/40)	図10o
27	インフルエンザC HAコード配列 (C/ヨハネスブルク/66)	図10p
28	完全HAO H1配列	図5c
29	プライマーXmaI-pPlas.c	図10q
30	プライマーSacI-ATG-pPlas.r	図10r
31	プライマーSacI-PlasTer.c	図10s
32	プライマーEcoRI-PlasTer.r	図10t
33	A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) GenBankアクセスションNo. AY289929	図16
34	M. Sativaタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ GenBankアクセスションNo. Z11499	図17
35	A/ペルトリコ/8/34 (H1N1) GenBankアクセスションNo. NC_002016.1	図18
36	クローン774 : A/ブリスペーン/59/2007(H1N1)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraI IIからSacIまでのDNA	図28
37	クローン775 : A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraI IIからSacIまでのDNA	図29
38	クローン776 : A/ブリスペーン/10/2007(H3N2)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraI IIからSacIまでのDNA	図30
39	クローン777 : A/ウィスコンシン/67/2005(H3N2)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIからSacIまでのDNA	図31
40	クローン778 : B/マレーシア/2506/2004のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図32
41	クローン779 : B/フロリダ/4/2006のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図33
42	クローン780 : A/シンガポール/1/57(H2N2)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図34
43	クローン781 : A/アンフィー/1/2005(H5N1)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図35
44	クローン782 : A/ベトナム/1194/2004(H5N1)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図36
45	クローン783 : A/コガモ/香港/W312/97(H6N1)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraI IIからSacIまでのDNA	図37

46	クローン784 : A/ウマ/プラハ/56(H7N7)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSaclまでのDNA	図38
47	クローン785 : A/香港/1073/99(H9N2)のHAをコードする配列と機能的に連結されたプラスチアニン調節領域を含むDraIIIからSacIまでのDNA	図39
48	クローン774 HAアミノ酸配列 A/ブリスベーン/59/2007 (H1N1)	図40A
49	クローン775 HAアミノ酸配列 A/ソロモン諸島/3/2006 (H1N1)	図40B
50	クローン776 HAアミノ酸配列 A/ブリスベーン/10/2007 (H3N2)	図41A
51	クローン777 HAアミノ酸配列 A/ウィスコンシン/67/2005 (H3N2)	図41B
52	クローン778 HAアミノ酸配列 A/マレーシア/2506/2004	図42A
53	クローン779 HAアミノ酸配列 B/フロリダ/4/2006	図42B
54	クローン780 HAアミノ酸配列 A/シンガポール/1/57 (H2N2)	図43A
55	クローン781 HAアミノ酸配列 A/アンフィ/1/2005 (H5N1)	図43B
56	クローン782 HAアミノ酸配列 A/ベトナム/1194/2004 (H5N1)	図44A
57	クローン783 HAアミノ酸配列 A/コガモ/香港/W312/97 (H6N1)	図44B
58	クローン784 HAアミノ酸配列 A/ウマ/プラハ/56 (H7N7)	図45A
59	クローン785 HAアミノ酸配列 A/香港/1073/99 (H9N2)	図45B
60	アルファアルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、A/インドネシア/5/2005由来H5 (構築物#660) のヘマグルチニンコード配列、アルファアルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図51
61	アルファアルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、A/ニューカレドニア/20/1999由来H1 (構築物#540) のヘマグルチニンコード配列、アルファアルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図52
62	アルファアルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、A/ブリスベーン/59/2007由来H1 (構築物#774) のヘマグルチニンコード配列、アルファアルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図53

10

20

30

40

63	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)由来H1（構築物#775）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図54
64	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/シンガポール/1/57(H2N2)由来H2（構築物#780）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図55
65	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/アンフィ/1/2005(H5N1)由来H5（構築物#781）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図56
66	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/ベトナム/1194/2004(H5N1)由来H5（構築物#782）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図57
67	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/古河も/香港/W312/97(H6N1)由来H6（構築物#783）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図58
68	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/香港/1073/99(H9N2)由来H9（構築物#785）のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図59
69	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/ブリスベン/10/2007(H3N2)由来H3のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図60
70	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/ウィスコンシン/67/2005(H3N2)由来H3のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図61
71	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、A/ウマ/プラハ/56(H7N7)由来H7のヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図62
72	アルファルファアラストシアニンプロモータ及び5'UTR、B/マレーシア/2506/2004由来HAのヘマグルチニンコード配列、アルファルファアラストシアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図63

10

20

30

40

73	アルファルファプラスチアニンプロモータ及び5'UTR、B/フロリダ/4/2006由来HAのヘマグルチニンコード配列、アルファルファプラスチアニン3'UTR及びターミネータ配列を含むHA発現カセット	図64
74	配列番号:49、48、33及び9のコンセンサス	図65
75	配列番号:33によってコードされるH1ニューカレドニア (AAP342 4.1) のアミノ酸配列	図67
76	配列番号:35によってコードされるH1ペルトリコ (NC_0409878. 1) のアミノ酸配列	図68

10

【0072】

これから、下記の非制限的な例を単に参照として本発明が説明されるであろう。

材料と方法1. 発現カセットのアッセンブリ

全ての操作は、SambrookとRussel (2001；前記文献は参考により本明細書に含まれる) の一般的な分子生物学プロトコルを用いて実施した。

第一のクローニング工程は、アルファルファのプラスチアニン遺伝子の上流及び下流の調節エレメントを含むレセプタープラスミドをアッセンブリングすることであった。プラスチアニンプロモータ及び5'UTR配列は、オリゴヌクレオチドプライマー-XbaI-pPlas.c (配列番号:29；図10Q) 及びSacI-ATG-pPlas.r (配列番号:30；図10R) を用いて、アルファルファのゲノムDNAから増幅した。得られた增幅生成物をXbaI及びSacIで消化して、以前に同じ酵素で消化したpCAMBIA2300 (Cambia, Canberra, Australia) に連結し、pCAMBIAPromoPlastoを作製した。同様に、プラスチアニン遺伝子の3'UTR配列及びターミネータを、以下のプライマー (SacI-PlasTer.c (配列番号:31；図10S) 及びEcoRI-PlasTer.r (配列番号:32；図10T)) を用いアルファルファのゲノムDNAから増幅し、生成物をpCAMBIAPromoPlastoの同じ部位に挿入する前にSacI及びEcoRIで消化してpCAMBIAPlastoを作製した。

20

【0073】

インフルエンザ株A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)のH1遺伝子のオープンリーディングフレームは2つのフラグメントとして合成された (Plant Biotechnology Institute, National Research Council, Saskatoon, Canada)。合成された第一のフラグメントは、5'末端のシグナルペプチドコード及び3'末端のトランスマンプレンドメインコード配列を欠く野生型H1コード配列 (GenBankアクセション番号AY289929；配列番号:33；図16) に一致する。前記コード配列の5'末端にBgIII制限部位を付加し、さらに前記フラグメントの3'末端の終止コドンの直ぐ下流に二元性SacI/StuI部位を付加した。トランスマンプレンドメイン及び細胞質テールを含む、H1タンパク質のC末端をコードする第二のフラグメント (KpnI部位から終止コドンまで、SacI及びStuI制限部位が3'にフランкиングしている) もまた合成された (配列番号:2；図5B)。

30

第一のH1フラグメントをBgIII及びSacIで消化し、二元ベクター (pCAMBIAPlasto) (アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子 (ヌクレオチド32 - 103；アクセション番号Z11499；配列番号:34；図17) のシグナルペプチドと融合したプラスチアニンプロモータ及び5'UTRを含む) の同じ部位でクローニングし、プラスチアニン調節エレメント下流のPDI-H1キメラ遺伝子を得た。PDIシグナルペプチドを含むプラスチアニンを土台とするカセットの配列は図1 (配列番号:8) に提示されている。得られたプラスミドは、PDIシグナルペプチドと融合しプラスチアニン調節エレメントによってフランкиングされたH1コード領域を含んでいた。C-末端コード領域 (トランスマンプレンドメイン及び細胞質テールをコードする) の付加は、以前にKpnI及びSacIで消化した合成フラグメント (配列番号:2；図5B) をH1発現プラスミドに挿入することによって達成された。得られたプラスミド (540と呼ぶ) は図11に提示されている (図2Aもまた参照されたい)。

40

50

【0074】

2. H5発現カセットのアッセンブリ

インフルエンザ株A/インドネシア/5/05 (H5N1; アクセッション番号LANL ISDN125873) 由来のヘマグルチニンをコードするフラグメントは、Epoch Biolabs (Sugar Land, TX, USA) が合成した。得られたフラグメントは配列番号:3 (図6) に示されている (前記フラグメントは、開始ATGの直ぐ上流のHindIII部位と終止(TAA)コドンの直ぐ下流のSacI部位によってフランкиングされた天然のシグナルペプチドを含む完全なH5コード領域を含む)。H5コード領域を、Darveauら (1995) が提示したPCR系連結方法によりプラスチアニアニンを土台とする発現カセットでクローニングした。略記すれば、第一のPCR増幅は、プライマーPlato-443c (配列番号:4; 図7A) 及びSpHA(Ind)-Plasto.r (配列番号:5; 図7B)、並びに鋳型としてpCAMBIA promoPlastoを用いて達成された。平行して、プライマーPlasto-SpHA(Ind).c (配列番号:6; 図7C) 及びHA(Ind)-Sac.r (配列番号:7; 図7D) を鋳型としてH5コードフラグメントとともに用いて第二の増幅を実施した。両反応で得られた増幅物を混合し、この混合物を、プライマーとしてPlato-443c (配列番号:4; 図7A) 及びHA(Ind)-Sac.r (配列番号:7; 図7D) を用いる第三の反応の鋳型として供した。得られたフラグメントをBamHI (プラスチアニアニンプロモータ内) 及びSacI (前記フラグメントの3'末端) で消化し、以前に同じ酵素で消化したpCAMBIAPlastoでクローニングした。得られたプラスミド (660と呼ぶ) は図2Bに提示されている (図11もまた参照されたい)。

H1の可溶型をコードするカセットは、540のトランスマンプレンドメイン及び細胞質テールをコードする領域を、ロイシンジッパーGCN4 pII変種 (Harbury et al. 1993, Science 262:1401-1407) をコードするフラグメントによって置き換えることにより調製した。このフラグメントはフランкиングするKpnI及びSacI部位とともに合成してクローニングを容易にした。この置き換えにより得られたプラスミドを544と呼び、発現カセットは図11に図示されている。

【0075】

タバコエッチウイルス (TEV) の5'UTR及びインフルエンザA/PR/8/34 M1遺伝子 (アクセッション番号NC_002016) のオープンリーディングフレームの融合物を、終止コドンの下流に付加したフランキングするSacI部位とともに合成した。このフラグメントをSwal (TEVの5'UTR内) 及びSacIで消化し、pCAMBIA二元プラスミド中の2X35S/TEVを土台とする発現カセットでクローニングした。得られたプラスミドは、2X35S/TEVプロモータ及び5'UTR、並びにNOSターミネータの制御下にあるM1コード領域を保持する (構築物750; 図11)。

HcPro構築物 (35HcPro) は、Hamiltonら (2002) の記載にしたがって調製した。全てのクローンの配列を決定して構築物の完全性を確認した。これらのプラスミドを用い、エレクトロポレーション (Mattanovich et al. 1989) によりアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA)) を形質転換した。全てのA.ツメファシエンス株の完全性は制限マッピングによって確認した。

【0076】

3. 植物バイオマスの調製、接種物、アグロバクテリア浸透及び採集

植物ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*) 又はニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) を、市販の泥炭ゴケ基質を満たした平箱で種子から育てた。前記植物を16/8の光周期及び25 日中 / 20 夜間の温度スケジュールの下で温室にて生育させた。播種から3週間後に、個々の幼植物を採取して鉢に移植し、さらに3週間同じ環境条件下で温室にて生育させた。形質転換前に、下記に表示した種々の時期に、植物から芽を摘み取ることによって又は植物を化学的に処理することによって、頂芽及び側芽を除去した。

10mMの2-[N-モルフォリノ]エタンスルホン酸 (MES)、20 μMアセトシリソングン、50 μg/mLカナマイシン及び25 μg/mLのカルベニシリン (pH5.6) を補充したYEB培地で、構築物660、540、544、750又は35SHcProをトランスマンプレンドメインを含むアグロバクテリアをOD₆₀₀が0.6から1.6に達するまで増殖させた。アグロバクテリア懸濁液を使用前に遠心し、浸透培養液

(10mMのMgCl₂及び10mMのMES (pH5.6))に再懸濁した。注射筒浸透は、Liu and Lomonosoffの記載(2002、Journal of Virological Methods, 105:343-348)にしたがって実施した。真空浸透については、A.ツメファシエンス懸濁液を遠心し、浸透培養液に再懸濁して4で一晩保存した。浸透の日に、培養バッチを2.5培養体積に希釈し、使用前に温めた。N.ベンタミアナ又はN.タバクムの全植物を気密なステンレススチールタンク中の細菌懸濁液に上下さかさまにして20-40トルの真空下に2分静置した。注射筒又は真空浸透に統いて、植物を温室に戻し、採集まで4-5日間インキュベートした。

【0077】

4. 葉のサンプリング及び全タンパク質抽出:

インキュベーションに統いて、植物の気生部分を採集し、-80で凍結し、小片に粉碎した。凍結粉碎した植物材料の各サブサンプルを、3体積分の冷却50mMトリス(pH7.4)、0.15MのNaCl及び1mMフェニルメタンスルフォニルフロリド中で均質化することによって(Polytron)、全可溶性タンパク質を抽出した。均質化後に、スラリーを4で20分、20,000gで遠心し、さらにこれらの清澄粗抽出物(上清)を分析のために維持した。参照標準物としてウシ血清アルブミンを用い、Bradfordアッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA)によって、清澄粗抽出物の全タンパク質含有量を決定した。

【0078】

5. タンパク質抽出物のサイズ排除クロマトグラフィー

32mLのSephacryl™ S-500高解析ビーズ(S-500HR: GE Healthcare, Uppsala, Sweden, Cat. No. 17-0613-10)のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラムを充填し、平衡/溶出緩衝液(50mMトリス(pH8)、150mM NaCl)で平衡させた。1.5mLの粗タンパク抽出物をカラムにロードし、統いて45mLの平衡/溶出緩衝液を用いて溶出工程を実施した。溶出液を1.5mLの分画で収集し、溶出分画のタンパク質含有量を、希釈したBio-Radタンパク質染色試薬(Bio-Rad, Hercules, CA)の200μLと10μLの分画とを混合することによってモニターした。カラムを、2カラム体積の0.2NのNaOH、統いて10カラム体積の50mMトリス(pH8)、150mMのNaCl、20%にエタノールで洗浄した。各分離の後でブルーデキストラン2000(GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA)を用いてカラムの目盛り定めを実施した。ブルーデキストラン及び宿主の可溶性タンパク質の溶出プロファイルを各分離間で比較し、使用したカラム間の溶出プロファイルの均一性を確認した。

【0079】

6. タンパク質分析及び免疫プロッティング

タンパク質濃度はBCAタンパク質アッセイ(Pierce Biochemicals, Rockport IL)によって決定した。タンパク質を還元条件下でSDS-PAGEによって分離し、クマシープルーで染色した。染色ゲルをスキャンし、デンシトメトリー分析はImageJ Software(NIH)を用いて実施した。

SECの溶出分画のタンパク質をアセトンで沈殿させ(Bollag et al. 1996)、1/5体積の平衡/溶出緩衝液に再懸濁し、還元条件下でSDS-PAGEによって分離し、免疫検出のためにポリビニレンジフルオリド(PVDF)メンブレン(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)に電気的に移した。イムノプロッティングの前に、このメンブレンをトリス緩衝食塩水(TBS-T)中の5%脱脂乳及び0.1%トウイーン20で4にて16-18時間プロッキングした。

イムノプロッティングは、TBS-Tween 20(0.1%)中の2%脱脂乳にて2μg/mLとした適切な抗体(表6)とともにインキュベートすることによって実施した。ケミルミネッセンス検出に用いた二次抗体は表4に示し、前記は表示のようにTBS-Tween 20(0.1%)中の2%脱脂乳で表示のように希釈した。免疫反応性複合体は、基質としてルミノール(Roche Diagnostics Corporation)を用いケミルミネセンスによって検出した。ヒトIgG抗体のセイヨウウサギペルオキシダーゼ酵素結合は、EZ-Link Plus(商標)活性化ペルオキシダーゼ結合キット(Pierce, Rockford, IL)を用いて実施した。

【0080】

表6: 発現タンパク質の免疫プロッティングのための電気泳動条件、抗体及び希釈

10

20

30

40

50

HA 亜型	インフルエンザ株	電気泳 動条件	一次抗体	希釈	二次抗体	希釈
H1	A/ブリスベーン/ 59/2007(H1N1)	還元	FII 10-150	4ng/mL	ヤギ抗マウス (JIR 115-035 -146)	1:10 000
H1	A/ゾロモン諸島/ 3/2006(H1N1)	還元	NIBSC 07/104	1:2000	ウサギ抗ヒツ ジ(JIR 313- 035-045)	1:10 000
H1	A/ニューカレドニア /20/99(H1N1)	還元	FII 10-150		ヤギ抗マウス (JIR 115-035 -146)	1:10 000
H2	A/シンガポール/ 1/57(H2N2)	非還元	NIBSC 00/440	1:1000	ウサギ抗ヒツ ジ(JIR 313-0 35-045)	1:10 000
H5	A/インドネシア/5 /2005(H5N1)	還元	ITC IT-0 03-005V	1:4000	ヤギ抗ウサギ (JIR 111-035 -144)	1:10 000
H5	A/アンフィ/1/ 2005(H5N1)	還元	NIBSC 07/338	1:750	ウサギ抗ヒツ ジ(JIR 313-0 35-045)	1:10 000
H5	A/ベトナム/1194 /2004(H5N1)	非還元	ITC IT-0 03-005	1:2000	ヤギ抗ウサギ (JIR 111-035 -144)	1:10 000
H6	A/コガモ/香港/ W312/97(H6N1)	非還元	BEI NR 663	1:500	ウサギ抗ヒツ ジ(JIR 313-0 35-045)	1:10 000
H9	A/香港/1073/ 99(H9N2)	還元	NIBSC 07/146	1:1000	ウサギ抗ヒツ ジ(JIR 313-0 35-045)	1:10 000

FII : Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA ;

30

NISBIC : National Institute for Biological Standards and Control ;

JIR : Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA ;

BEI NR : Biodefense and emerging Infections research resources repository ;

ITC : Immune Technology Corporation, Woodside, NY, USA ;

【 0 0 8 1 】

H5のヘマグルチニンアッセイはNayak and Reich (2004) が記載した方法を土台にした。略記すれば、試験サンプル (100 μL) の連続二倍希釈を、100 μLのPBSを含むV底の96ウェルマイクロタイタープレートで、各ウェルに100 μLの希釈サンプルを残すことにより作製した。0.25%のシチメンチョウ赤血球懸濁液 (Bio Link Inc., Syracuse, NY) の100 μLを各ウェルに添加し、プレートを室温で2時間インキュベートした。完全な凝集を示す最高希釈の逆数をHA活性として記録した。平行して、組換えHA標準物 (A/ベトナム/1203/2004(H5N1)) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) をPBSで希釈し、各プレートでコントロールとして使用した。

40

【 0 0 8 2 】

7 . シュクロースグラディエント超遠心

H5-含有バイオマスのゲルろ過クロマトグラフィーから溶出した分画9、10及び11の1mLをプールし、20 - 60% (w/v) の不連続シュクロース濃度勾配にロードし、125,000gで17.5時間遠心した(4)。このグラディエントを、最上部から開始して3mLずつの19分画として分画し、さらに免疫学的分析及び血球凝集アッセイの実施前にシュクロースを除去するために透析した。

50

【0083】

8. 電子顕微鏡検査

電子顕微鏡検査(EM)による観察のために、先ず初めに30 MWCO限外ろ過ユニット(Milipore, Billerica, MA, USA)を用いてSECの溶出分画を濃縮した。この濃縮分画を2%のグルタルアルデヒドを含むPBS(pH7.4)で4にて24時間固定した。固定したら、このサンプルをFormvar被覆200メッシュニッケルグリッド(Canemco, Lakefield, Canada)に2分間吸着させ、さらに、1%のリンタンクス滕酸での染色の前にグリッドを2回脱イオン水で洗浄した。観察は、透過型電子顕微鏡下で10,000 \times から150,000 \times の範囲の倍率で実施した(画像については図4A及び4B)。

また別には、100 μ Lの被検サンプルをAirfuge超遠心管(Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA)に入れた。この遠心管の底にグリッドを置き、続いて、遠心管を120,000gで5分遠心した。グリッドを取り出し、穏やかに乾燥させ、染色のために1滴の3%リンタンクス滕酸(pH6)を乗せた。グリッドを日立7100透過型電子顕微鏡(TEM)で調べた(画像については図14B、15B及び15C)。

図19の画像について、ほぼ1mm³の葉のブロックを2.5%グルタルアルデヒド含有PBSで固定し、1.33%の四酸化オスミウム中の固定後工程の前に3%シュクロース含有PBSで洗浄した。固定サンプルをSpurr樹脂に包埋し、超薄層をグリッドに乗せた。観察前にサンプルを5%酢酸ウラニル及び0.2%クエン酸鉛で陽性染色した。グリッドを日立7100透過型電子顕微鏡(TEM)で調べた。

【0084】

20

9. 形質膜の脂質分析

形質膜はタバコの葉から入手し、Mongrandらにしたがって、ポリエチレングリコール3350/デキストランT-500(各々6.6%)を用いる水性ポリマー二相系で分配することにより細胞分画を実施した後、BY2細胞を培養した。全ての工程を4で実施した。

BlighとDyerにしたがって種々の分画から脂質を抽出し精製した。Lefebvreらの論文に記載された溶媒系を用い一次元HP-TLCによって、極性脂質及び中性脂質を分離した。Macalalalaの記載にしたがって酢酸銅で染色した後、PM分画の脂質を検出した。脂質の移動時間を標準物のそれと比較することによって、脂質を同定した(全ての標準物はSigma-Aldrich(St-Louis, MO, USA)から入手したが、ただしSGはMatreya(Pleasant Gap, PA, USA)から入手した)。

30

【0085】

10. H5 VLP精製

凍結させた、N.ベンタミアナの660-浸透葉を、1.5体積の50mMトリス(pH8)、NaCl 150mM及び0.04%メタ重亜硫酸ナトリウム中で市販のブレンダーを用いて均質化させた。得られた抽出物に1mMのPMSFを補充し、42で5分間の加熱の前に1Mの酢酸によりpH6に調整した。前記加熱処理抽出物に珪藻土(DE)を添加して、pHシフト及び加熱処理によって沈殿した夾雑物を吸着させ、スラリーをWhatmanろ紙でろ過した。得られた清澄な抽出物を10,000xgで10分間、室温で遠心して残留DEを除去し、0.8/0.2 μ mのAcropack 20フィルターを通してフェチュイン-アガロースアフィニティカラム(Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA)にロードした。400mMのNaCl、25mMトリス(pH6)中での洗浄工程に続いて、結合タンパク質を1.5MのNaCl、50mM MES(pH6)で溶出させた。溶出VLPに最終濃度0.0005%(v/v)でTween-80を補充した。VLPを100kDa MWCO Amiconメンブレン上で濃縮し、10,000 \times gで30分間4にて遠心し、0.01%のTween-80及び0.01%のチメロサールを含むPBS(pH7.4)に再懸濁させた。懸濁VLPを使用前にろ過滅菌した。

40

【0086】

11. 動物実験マウス:

インフルエンザVLP投与に対する免疫応答に関する実験を、6-8週齢の雌のBALB/cマウス(Charles River Laboratories)を用いて実施した。70匹のマウスを無作為に5匹ずつの14グループに分けた。8グループを筋肉内免疫に用い、6グループを鼻内ルート投与の試

50

験に用いた。全てのグループを2回投与スケジュールで免疫し、追加免疫は最初の免疫後3週間で実施した。

後肢の筋肉内投与のために、無麻酔のマウスを植物生成VLP H5ワクチン(0.1、1、5又は12 μg)又はコントロールヘマグルチニン(HA)抗原のいずれかで免疫した。コントロールHAは、A/インドネシア/5/05 H5N1株を基に生成し、293細胞培養から精製した組換え可溶性ヘマグルチニンを含んでいた(Immune Technology Corp., New York, USA)(特段の指示がなければ1回の注射に付き5 μg で用いられた)。緩衝液コントロールはPBSであった。この抗原はHAタンパク質のアミノ酸18-530から成り、Hisタグ及び改変切断部位を有している。電子顕微鏡検査により、この市販の生成物はVLPの形態ではないことが確認された。

10

【0087】

アジュバントの効果を測定するために、2グループの動物を5 μg の植物生成VLP H5ワクチン+1体積のAlhydrogel 2%(ミヨウバン、Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US)又は293細胞培養から精製した5 μg の組換えヘマグルチニン+1体積のミヨウバンで免疫した。8グループを筋肉内免疫に、6グループを鼻内投与試験に用いた。全てのグループを初回-追加免疫スケジュール(prime-boost regimen)にしたがって免疫し、追加免疫は初回免疫の3週間後に実施した。

後肢の筋肉内投与のために、植物生成VLP H5ワクチン(0.1、1、5又は12 μg)又はコントロールヘマグルチニン(HA)抗原(5 μg)又はPBSで無麻酔のマウスを免疫した。全ての抗原調製物を、Alhydrogel 1%(ミヨウバン、Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US)と1:1の体積比で免疫前に混合した。アジュバントの効果を測定するために、アジュバントを全く含まない、5 μg の植物生成VLP H5ワクチン又は5 μg のコントロールHA抗原のどちらかで2グループの動物を免疫した。

20

鼻内投与のために、自動導入チャンバーを用いるイソフルランの吸入によりマウスを簡単に麻酔した。続いて外鼻孔当たり4 μL の植物生成VLPワクチン(0.1又は μg)、又はコントロール抗原(1 μg)、又はPBSの滴下添加により前記動物を免疫した。全ての抗原調製物を、免疫前にキトサングルタメート1%(Protosan, Novamatrix/FMC BioPolymaer, Norway)と混合した。続いてマウスにこの溶液を吸い込ませた。鼻内投与によるアジュバント効果を立証するために、2グループの動物を、1 μg の植物生成VLP H5ワクチン又は1 μg のコントロールHA抗原で免疫した。

30

【0088】

フェレット:

5匹のフェレットを含む10グループ(オス、18-24週齢、重さ約1kg)を用いた。各グループの処置は表7に記載したとおりである。使用したアジュバントはAlhydrogel(ミヨウバン)(Superfos Biosector, Denmark)2%(最終=1%)であった。ワクチン組成物は、記載のように製造した膜結合A/インドネシア/5/05(H5N1)VLPであった。ワクチンコントロール(陽性コントロール)は、293細胞培養でアデノウイルスを用いてImmune Technology Corporation(ITC)により製造された、インドネシア株由来の完全にグリコシル化された膜結合組換えH5であった。

【0089】

表7: 処置グループ

40

グループ	n	動物に注射した生成物	投与経路	アジュバント
1	5	PBS(陰性コントロール)	i.m.*	—
2	5	ワクチン-植物、 $1\mu\text{g}$	i.m.	—
3	5	ワクチン-植物、 $1\mu\text{g}$	i.m.	ミョウバン
4	5	ワクチン-植物、 $5\mu\text{g}$	i.m.	—
5	5	ワクチン-植物、 $5\mu\text{g}$	i.m.	ミョウバン
6	5	ワクチン-植物、 $7.5\mu\text{g}$	i.m.	—
7	5	ワクチン-植物、 $15\mu\text{g}$	i.m.	—
8	5	ワクチン-植物、 $15\mu\text{g}$	i.m.	ミョウバン
9	5	ワクチン-植物、 $30\mu\text{g}$	i.m.	—
10	5	ワクチン-コントロール、 $5\mu\text{g}$	i.m.	—

* i.m. : 筋肉内

【 0 0 9 0 】

全体的な健康状態及び外観（体重、直腸温度、姿勢、柔毛、運動パターン、呼吸、糞便）について実験中定期的にフェレットを評価した。0、14及び28日目に大腿四頭筋の筋肉内注射（0.5 - 1.0の総体積）によって動物を免疫した。アジュバントを取り入れたプロトコルのために、免疫の直前にワクチン組成物をAlhydrogelと1:1の体積比で混合した。血清サンプルを免疫前の0日目、21日目及び35日目に入手した。40 - 45日目に動物をサクリファイスし（瀉血／心臓穿刺）、脾臓を採集し、剖検を実施した。

同種又は異種不活化H5N1ウイルスを用いて、ELISAアッセイで抗インフルエンザ抗体力価を定量した。

血清サンプル（免疫前、21日目及び35日目）の血球凝集阻害抗体力価を、記載のように（Aymard et al. 1973）、マイクロタイター-HAIによって判定した。略記すれば、血清をレセプター破壊酵素で前処理し、加熱不活化し、さらに赤血球（洗浄赤血球、RBC）懸濁液と混合した。Lampireのウマ洗浄RBC（10%）が推奨される。RBCの起源によりアッセイが変動する可能性（ウマ依存性）があることを考慮して、10頭のウマの洗浄RBCを試験してもっとも感度のよいバッチを選択した。あるいはシチメンチョウのRBCを用いてもよい。抗体力価は、血球凝集を完全に阻害する最高希釈の逆数として表した。

交差反応性HAI力価：A/インドネシア/5/05（クレード2.1）に対するワクチンで免疫したフェレットのHAI力価を、別のサブクレード又はクレード由来の不活化H5N1インフルエンザ株（例えばクレード1ベトナム株A/ベトナム/1203/2004及びA/ベトナム/1194/2004、又はA/アンフィ/01/2005（サブクレード2.3）、又はA/シチメンチョウ/トルコ/1/05（サブクレード2.2））を用いて測定した。全ての分析は個々のサンプルについて実施した。

データ解析：統計解析（ANOVA）は全てのデータに関して実施し、グループ間の相違が統計的に有意か否かを明確にした。

【 0 0 9 1 】

致死的チャレンジ（マウス）のための実験設計：

128匹のマウスを無作為に各8匹の16のグループに分け、1つのグループは免疫せずにかつチャレンジもしなかった（陰性コントロール）。全グループを2回投与スケジュールにより筋肉内投与で免疫し、2回目の免疫は初回免疫の2週間後に実施した。

後肢の筋肉内投与のために、無麻酔のマウスを植物生成H5 VLP（1、5又は $15\mu\text{g}$ ）、又は $15\mu\text{g}$ のコントロールHA抗原、又はPBSで免疫した。免疫前に、全ての抗原調製物を1体積のAlhydrogel（ミョウバン、Accurate Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY, US）と混合した。

免疫期間中、週に1回マウスを秤量し、観察し、さらに注射部位の局所反応をモニターした。

二回目の免疫から22日後に、BL4封じ込め施設（P4-Jean Merieux-INSERM, Lyon, France）にて、麻酔したマウスの鼻内にインフルエンザA/トルコ/582/06ウイルス（Dr. Bruno

10

20

30

40

50

Lina (Lyon University, Lyon, Franceより贈与) の 4.09×10^6 の 50% 細胞感染用量 (CCID50) でチャレンジした。チャレンジ後、14日間にわたってマウスの症状を観察し、さらに毎日秤量した。重篤な感染症状及び25%以上の体重減少を示すマウスを麻酔後安楽死させた。

【 0 0 9 2 】

血液採集、肺及び鼻内洗浄、並びに脾臓採集 :

外側伏在静脈採血は、1回目の免疫から14日後及び2回目の免疫から14日後に無麻酔動物で実施した。血清は、8000gで10分間の遠心により採集した。

2回目の免疫から4週間後に、CO₂ガスでマウスを麻酔し、終了後直ちに心臓穿刺を用いて血液を採集した。

最後の採血後、カテーテルを肺方向に挿入し、前記カテーテルに結合させた1ccの注射筒に1mLの冷PBS-プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液を注入して肺に入れ、続いて分析のために取り出した。肺洗浄物を遠心して細胞屑を除去した。鼻内洗浄のために、カテーテルを鼻内域に向けて挿入し、0.5mLのPBS-プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液をカテーテルから鼻道へ押し込み、続いて採集した。鼻内洗浄物を遠心して細胞屑を除去した。脾臓採集は、5μgのアジュバント添加植物生成ワクチン又は5μgのアジュバント添加組換えH5抗原で筋肉内免疫したマウスとともに、1μgのアジュバント添加植物生成ワクチン又は1μgのアジュバント添加組換えH5抗原で鼻内免疫したマウスで実施した。採集した脾臓をゲンタマイシン補充RPMI中に入れ、50mLの円錐管で10mL注射筒のプランジャーを用いてすり潰した。すり潰した脾臓を2回すすぎ、2000rpmで5分間遠心し、さらにACK溶解緩衝液に室温で5分間再懸濁した。前記脾臓細胞をPBS-ゲンタマイシンで洗浄し、5%RPMIに再懸濁し、計測した。脾臓細胞を増殖アッセイに用いた。

【 0 0 9 3 】

抗体力価 :

血清の抗インフルエンザ抗体力価を1回目の免疫から14日後に、さらに2回目の免疫から14及び28日後に測定した。力価は、被覆抗原として不活化ウイルスA/インドネシア/5/05を用いて酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって決定した。終末点力価は、陰性コントロールサンプルのOD値よりも少なくとも0.1倍高いOD値に達した最高希釈の逆数として表した。

抗体クラスの決定 (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgGM) のために、力価を以前に記載されたようにELISAによって判定した。

血球凝集阻害 (HI) 力価 :

血清の血球凝集阻害 (HI) 力価は、2回目の免疫から14及び28日後に、以前に記載 (WHO 2002 ; Kendal 1982) されたように測定した。A/インドネシア/5/05又はA/ベトナム/1203/2004株由来の不活化ウイルス調製物を用いて、HI活性についてマウス血清サンプルを試験した。血清は、ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae) (Kendal 1982) から調製したレセプター破壊酵素II (RDE II) (Denka Seiken Co., Tokyo, Japan) で前処理した。HIアッセイは、0.5%のシチメンチョウ赤血球を用いて実施した。HI抗体力価は、完全な凝集阻害を引き起こす最高希釈の逆数と定義される。

【 実施例 】

【 0 0 9 4 】

実施例 1 : 植物N.ベンタミアナのアグロバクテリア浸透によるインフルエンザウイルスA/インドネシア/5/05(H5N1)のヘマグルチニンの一過性発現

インフルエンザヘマグルチニンを生成する一過性発現系の能力を、A/インドネシア/5/05(H5N1)株のH5亜型の発現により決定した。図11に提示したように、ヘマグルチニン遺伝子コード配列 (Acc. #EF541394) (その天然のシグナルペプチド及びトランスマンプレンドメインを含む) を、先ず初めにプラスティニアニン発現カセット (アルファアルファプラスティニアニン遺伝子由来のプロモータ、5' UTR、3' UTR、及び転写終結配列) でアッセンブリングし、このアッセンブリングしたカセット (660) をpCAMBIA二元プラスミドに挿入した。続いてこのプラスミドをアグロバクテリウムにトランスフェクトし、組換え株AGL1/6

10

20

30

40

50

60を作製し、前記を一過性発現に用いた。

植物N.ベンタミアナにAGL1/660を浸透させ、6日間のインキュベーション期間の後で葉を採集した。アグロバクテリア浸透が施された葉でH5が蓄積しているか否かを決定するために、先ず初めに浸透を受けた葉からタンパク質を抽出し、抗H5（ベトナム）ポリクローナル抗体を用いてウェスタンプロットティングによって分析した。約72kDaの固有バンドが抽出物で検出され（図12）、前記はインフルエンザヘマグルチニンの未切断HA0型とサイズが一致した。陽性コントロールとして用いた市販のH5（A/ベトナム/1203/2004；Protein Science Corp., Meriden, CT, USA）は、約48及び28kDa（それぞれHA1及びHA2フラグメントの分子量と一致する）の2つのバンドとして検出された。前記は、浸透葉におけるH5の発現が未切断翻訳生成物の蓄積をもたらしたことを見ている。10

活性なHAトリマーの形成は、AGL1/660-形質転換葉の粗タンパク抽出物のシチメンチョウ赤血球凝集能力によって明示された（データは示されていない）。

【0095】

実施例2：サイズ排除クロマトグラフィーを用いた植物抽出物中のヘマグルチニン含有構造物の性状決定

植物生成インフルエンザヘマグルチニンの高分子量構造物へのアッセンブリをゲルろ過によって判定した。AGL1/660-浸透葉の粗タンパク抽出物（1.5mL）を、SephacrylTM S-50 OHRカラム（GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA）でのサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって分画した。溶出分画を、それらの全タンパク質含有量及びHA量についてアッセイした（抗HA抗体による免疫検出を利用）（図13A）。図13Aに示したように、ブルーデキストラン（2MDa）の溶出ピークは分画10の初期で、一方、宿主タンパク質の大部分はカラム内に保持され、分画14及び22の間に溶出した。各SEC溶出分画の200 μL中のタンパク質をアセトン沈殿により濃縮（5倍）し、ウェスタンプロットティングにより分析したとき（図15A、H5）、ヘマグルチニン（H5）は主として分画9から14で見出された（図13B）。理論に拘束されないが、前記は、HAタンパク質はアッセンブリングして大きなスーパー構造物を形成したか、又は高分子量構造物と結合したことを示唆している。20

A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)（配列番号:33；図16；GenBankアクセスション番号AY289929）のH1核酸配列を用いて第二の発現カセットをアッセンブリングし、構築物540（図11）を作製した。キメラ遺伝子構築物を設計してH1の可溶性トリマー型を作製した。前記構築物では、植物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ遺伝子に由来するシグナルペプチド及びH1のトランスメンブレンドメインが、GCN4ロイシンジッパーのpII変種（セルフアッセンブリングしてトリマーを形成することが示されたペプチド（Harbury et al. 1993）によって置き換えられていた（カセット544、図11）。トランスメンブレンドメインを欠くが、この可溶性トリマー型は血球凝集能力を有する（データは示されていない）。30

【0096】

AGL1/540又はAGL1/544を浸透させた植物のタンパク質抽出物をSECによって分画し、H1溶出分画の存在を抗インフルエンザA抗体（Fitzgerald, Concord, MA, USA）によるウェスタンプロットティングで調べた。AGL1/540-浸透葉では、H1は主として非常に高分子の構造物として蓄積され、ピークはよりサイズの小さな構造物側へとゆがんでいたH1（図13C）。AGL1/544-浸透葉では、H1の可溶型は、ゲルろ過の溶出パターンによって示されるよう（H1可溶型は宿主のタンパク質溶出プロファイル類似する）単離トリマーとして蓄積された（可溶性H1；図13D）。比較すれば、H1ロゼット（Protein Science Corp., Meriden, CT, USA）は分画12から16で溶出する5-6個のヘマグルチニントリマーのミセルとして存在し、これはH1の可溶型（図13D）よりも早く、天然のH1（図13C）よりも遅い。40

ヘマグルチニンの構造物へのアッセンブリに対するM1同時発現の影響を評価するために、A/PR/8/34(H1N1) M1（配列番号:35；図18；GenBankアクセスション番号NC_002016）のコード配列に対応する核酸を用いて、M1発現カセットをアッセンブリングした。構築物を750と呼び、図11に提示する。M1及びH1の同時発現のために、浸透の前に、AGL1/540及びAGL1/750の懸濁液を等体積で混合した。複数のアグロバクテリア懸濁物の浸透によって、50

複数のトランスジーンの同時発現が可能になる。SEC溶出分画のウェスタンプロット分析は、M1の同時発現はH1構造物の溶出プロファイルを改変しないが、アグロバクテリア浸透葉におけるH1蓄積の低下をもたらすことを示している（図13F）。

【0097】

実施例3：シュクロースグラディエントでの遠心によるH5構造物の単離と電子顕微鏡下での観察

電子顕微鏡（EM）下でのヘマグルチニン構造物の観察は、葉の未精製タンパク抽出物のSECから得られた濃度及び純度レベルよりも高い濃度及び純度を必要とした。H5構造物のEM観察を可能にするために、葉の未精製タンパク抽出物を先ず初めにPEG沈殿（20%PEG）によって濃縮し、続いて1/10体積の抽出緩衝液に再懸濁させた。この濃縮タンパク抽出物をS-500HRゲルろ過によって分画し、分画9、10及び11（カラムの空間体積に対応する）をプールし、さらに20 - 60%シュクロース濃度勾配上での超遠心によって宿主タンパク質から単離した。シュクロースグラディエントは最上部から開始して分画して得られた分画を透析し、さらに100 NMWL遠心フィルターユニットで分析の前に濃縮した。ウェスタンプロット及び血球凝集の結果（図14A）から示されたように、H5は主としてほぼ60%シュクロースを含む分画16から19に蓄積し、一方、宿主タンパク質の大半のピークは分画13であった。分画17、18及び19をプールし、陰性染色を施し、EM下で観察した。サンプル試験によって、サイズが80から300nmの範囲でスパイクを有する球状構造物（インフルエンザVLPの形態学的特徴と一致する）の存在がはっきりと示された（図14B）。

【0098】

実施例4：植物バイオマスからインフルエンザH5 VLPの精製

大量の可溶性タンパク質に加えて、植物の葉の抽出物は、可溶性の糖、核酸及び脂質の複雑な混合物を含んでいる。粗抽出物を、pHシフト及び熱処理と前記に続く珪藻土上のろ過によって清澄化した（清澄方法の詳細については材料と方法の項を参照されたい）。図15A（レーン1 - 4）は、種々の清澄化工程におけるタンパク質内容物を比較したクマシープルーカラム染色ゲルを示している。粗抽出物（レーン1）及び清澄化抽出物（レーン4）におけるタンパク質内容物の比較によって、全体的なタンパク質含有量を減少させ、大半の主要夾雜物（葉の粗抽出物において50kDaで見ることができる）を除去する清澄化工程の性能が明示される。前記50kDaバンドはRuBisCO大サブユニットに対応し、前記は葉の全タンパク質の30%までを占める。

インフルエンザH5 VLPを、これら清澄化抽出物からフェチュインのアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。ロード分画（図15A、レーン5）とフローアウト（図15A、レーン6）及び溶出VLP（図15A、レーン7）との比較によって、清澄化植物抽出物中のインフルエンザH5 VLPに対するフェチュインアフィニティカラムの特異性が明示される。

【0099】

精製工程によりH5の75%を超える純度（クマシープルーカラム染色SDS-PAGEゲルでのデンシティメトリーにより決定）が得られた（図15A、レーン7）。精製した生成物の構造的品質を判定するために、100 NMWL（通常の分子量限界）遠心フィルターユニットで精製H5を濃縮し、陰性染色した後でEM下で調べた。図15Bは豊富なVLPの存在を示す代表的な切片を示している。より精密な検査によって、VLP上のスパイクの存在が確認された（図15C）。

図15Dに示されているように、クマシープルーカラム染色H5ヘマグルチニンの濃度及びBCA法による全タンパク質含有量測定を基準にすれば、H5 VLPはフェチュインカラムのアフィニティクロマトグラフィーによって葉の清澄化抽出物からほぼ89%の純度で精製された。

HA VLPの生物活性は、シチメンチョウ赤血球を凝集させるその能力によって確認された（データは示されていない）。

抗H5ポリクローナル血清を用いたウェスタンプロッティング及び免疫検出によって可視化された精製VLPの実体もまた、図20Bによって確認される（A/ベトナム/1203/2004）。ほぼ72kDaの固有バンドが検出され、インフルエンザヘマグルチニンの未切断HA0型とサイズが一致する。図15cは、その構造を覆うヘマグルチニンスパイクを有するワクチンのVLP構造を示している。

10

20

30

40

50

VLPは0.22 μmフィルターでろ過することによってマウスの免疫用に処方した。エンドトキシン含有量は、エンドトキシンLAL（アメリカカブトガニアメーバ様細胞溶解物）検出キット（Lonza, Walkerville, MS, USA）を用いて測定した。ろ過ワクチンは $105.8 \pm 11.6\%$ EU/mL（エンドトキシンユニット/mL）を含んでいた。

【0100】

実施例5：植物内のインフルエンザVLPの分布

VLPの分布を知り、それらの形質膜起源を確認するために、H5生成植物の葉の薄片を固定し、陽性染色後にTEM下で調べた。葉の細胞の観察によって、形質膜の重積により形成された細胞外空隙にVLPが存在することが示された（図19）。観察されるVLPの形状及び配置から、細胞壁にVLPの形質膜が付着しているにもかかわらず、植物細胞は、それらの形質膜から誘導されるインフルエンザVLPの生成に必要な柔軟性を有し、VLPをアポプラスト間隙に蓄積することが示された。10

【0101】

実施例6：形質膜の脂質の分析

植物インフルエンザVLPの組成及び起源の更なる確認は脂質の内容の分析から得られた。精製VLPから脂質を抽出し、それらの組成を高度に精製したタバコの形質膜の組成と高速薄層クロマトグラフィー（HP-TLC）によって比較した。VLP及びコントロール形質膜の極性及び中性脂質の移動パターンは類似していた。精製VLPは、形質膜で見出される主要なリン脂質（ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミン）及びスフィンゴミエリン（グルコシルセラミド）を含み（図27A）、さらに両者はただ1つの中性脂質として遊離ステロールを含んでいた（図27B）。しかしながら、精製VLP抽出物における形質膜タンパク質マーカー（ATPase）の免疫検出によって、VLP脂質二重層は植物形質膜に結合する主要タンパク質の1つを含まないことが示され、植物細胞からVLPが発芽する過程で宿主タンパク質は排除される可能性を示した（図27C）。20

【0102】

実施例7：H5 VLPの免疫原性及び投与経路の影響

マウスに植物生成H5 VLPを筋肉内注射又は鼻内吸入によって投与した。記載された方法に従い、アジュvantとしてミョウバンとともに、0.1から12 μgのVLPをマウスの筋肉内に注射した。ピーク抗体力価は、もっとも低い抗原量で5 μgの組換え可溶性ヘマグルチニン（HA）のピークと類似する強さで観察された（図20A）。30

0.1から1 μgの植物生成H5 VLPをキトサンアジュvantとともに筋肉内投与した。前記キトサンアジュvantは、ミョウバンアジュvantを含む組換え可溶性HAの抗体応答よりも強い抗体応答のために提供された（図20B）。

両投与経路について、さらに全抗原量にわたって、セロコンバージョンを全被検マウスで観察した。組換えH5可溶性抗原は、低い（1/40未満）又は無視しえる程度（アジュvant無添加組換えH5の場合1<1/10）のHI力価を付与した。

【0103】

実施例8：H5 VLPによる血球凝集阻害抗体力価

図21A、Bは、植物生成H5 VLP又は組換え可溶性HAによる“追加免疫”から14日後の血球凝集阻害（HAI）抗体応答を図示している。筋肉内に投与したとき、もっとも低い抗原用量（0.1 μg）によって、10倍高い組換え可溶性HA（5 μg）を超える優れたHAI応答がもたらされた。H5 VLPの用量を高めたとき、最低用量よりわずかに高いHAIが提供された。40

鼻内投与後のHAI応答は、1 μgの組換え可溶性HAを投与されたマウス（陰性コントロールと同様であった）と比較したとき、植物生成H5 VLP（1.0又は0.1 μg）投与マウスで有意に増加した。H5 VLPの筋肉内注射によって免疫された全マウス（0.1から12 μg）が、コントロールHA抗原で免疫されたマウスよりも高いHAI力価を有した（図21A）。同じ用量の5 μgについては、VLPは、コントロールのHA抗原の対応する用量より20倍高いHAI力価を誘発した。VLPはまた、鼻内ルートでデリバリーしたとき、コントロールHA抗原よりも有意に高いHAI力価を誘発した（図21B）。H5 VLPのある用量について、HAI力価レベルは、筋肉内免疫マウスよりも鼻内免疫マウスで低かった。すなわち、1 μgのVLPは筋肉内投与され50

たとき210の平均HAI力価を誘発し、一方、鼻内投与では同じ用量が34の平均HAI力価を誘発した。

筋肉内に投与したとき、全てのVLP用量が、同種の不活化完全ウイルスと結合することができる高レベルの抗体を誘発した（図20b及び24）。両抗原調製物が同種の株に対して高い結合抗体力価を誘発するので、植物生成VLPワクチンとコントロールHA抗原との間で有意な相違は見出されなかった（追加免疫から14日後の12 µgのVLPグループを除く）。しかしながら、鼻内に投与したとき、VLPは、コントロールHA抗原よりも高い結合抗体力価を誘発した（図20b）。キトサンと混合したとき、1 µgのVLPによる免疫によって、5500の相対平均Ab力価が誘発され、これは、1 µgのコントロールHA抗原で免疫されたマウスで見出されたレベル（920の相対平均Ab力価）より8.6倍高い。

続いて、植物由来インフルエンザVLPの免疫原性を、マウスでの一連の用量実験により精査した。各グループで5匹のBALB/cマウスを含むグループを、3週間間隔で2回、ミョウバン（1:1）中で処方したインフルエンザA/インドネシア/5/05(H5N1)のHAを含む、0.1 µgから12 µgのVLPで筋肉内免疫した。血球凝集阻害力価（HI）（不活化完全ウイルス抗原A/インドネシア/5/05(H5N1)を使用する）は、2回目の免疫後14日で採集した血清で測定した。わずか0.1 µgのVLP用量での免疫によって、高希釈でウイルスの赤血球凝集を阻害する抗体の産生が誘発された（図21A）。平行して実施した、5 µgの非VLPミョウバンアジュバント添加コントロールH5抗原（同様にA/インドネシア/5/05由来）でのマウスの免疫によって、もっとも低いVLP用量で達成されたHI応答よりも2 - 3 log低いHI応答が誘発される。

両投与ルートについてさらに全抗原量にわたって、HAI応答はVLP投与マウスで優れている。

【0104】

実施例9：H5 VLPの免疫原性に対するアジュバントの影響

植物生成H5 VLPは形質膜起源を有する（図19、実施例5）。理論に拘束されないが、エンベロープウイルス又はエンベロープウイルスのVLPは、一般的に、それらが発芽する膜からそれらのエンベロープを獲得する。植物形質膜はフィトステロール補完成分を含み、これは、動物細胞ではたとえ見出されたとしても稀なものであり、これらステロールのいくつかは免疫刺激性作用を有することが示された。

植物生成H5 VLPを、アジュバントの存在下又は非存在下でマウスの筋肉内（図22A）又は鼻内（図22B）に投与し、HAI（血球凝集阻害抗体応答）を決定した。添加アジュバントの存在下又は非存在下（これらの例ではミョウバン又はキトサン）のいずれの投与系においても、VLPは、組換え可溶性HAよりも有意に高いHAIへマグルチニン阻害を示した。添加アジュバント（すなわちミョウバン又はキトサン）の非存在下においてすら、植物生成H5 VLPは有意なHAIを示し、抗原の投与に対する全身的免疫応答を提示した。

ミョウバンは、HAI力価の平均レベルを、VLPの筋肉内投与については5倍（図22a）、コントロールHA抗原については3.7倍強化した。筋肉内に投与したとき、5 µgのVLPは、対応する用量のコントロールHA抗原よりも12倍高い平均HAI力価を誘発した。キトサンは、コントロールHA抗原の平均HAIレベルを押し上げなかつたが（図22b）、一方、1 µgのVLPの鼻内投与により免疫されたマウスの平均HAIレベルを5倍増加させた。

【0105】

実施例10：抗体のアイソタイプ

添加アジュバントとしてミョウバンの存在下又は非存在下で植物生成H5 VLP又は組換え可溶性HAを投与されたマウスは、多様な免疫グロブリンアイソタイプを提示する（図23A）。

添加アジュバントの存在下では、VLP及びHAの抗体アイソタイププロファイルは類似し、IgG1が主要なアイソタイプである。VLP又はHAを添加アジュバントの非存在下で投与したとき、IgG1応答は低下するが、VLPに対しては主要なアイソタイプ応答であり続け、IgM、IgG2a、IgG2b及びIgG3は添加アジュバントの存在下と同じ力価を維持する。HAを添加アジュバントの非存在下で投与するとき、IgG1、IgG2a及びIgG2b力価は顕著に低下する。

10

20

30

40

50

したがって、これらのデータは、植物生成VLPは、宿主で抗体応答を誘引するために添加アジュバントを必要としないことを示している。

添加抗原の存在下における、植物生成VLP又は可溶性組換えHAの筋肉内投与マウスの不活化完全ウイルス株（A/ベトナム/5/05；A/ベトナム/1203/04）に対する抗体力価は図23Bに示されている。1μg若しくは5μgのVLP又は5μgの可溶性HAを投与されたマウスでは、これらのインフルエンザ株に対する抗体力価に有意な相違は認められない。

【0106】

実施例11：H5 VLPワクチンによって誘発された血清抗体の交差反応性

H5 VLPによって誘発された血清抗体の交差反応性を、種々の株の不活化完全インフルエンザウイルスに対して判定した。全ての用量のVLP（0.1から12μg）が、5μgのコントロール抗原も同様、クレード1株（A/ベトナム/1194/04）、クレード2.1の同種株A/ベトナム/5/05、及びクレード2.2株のA/シチメンチョウ/トルコ/1/05に対して高い結合抗体力価を誘発した（図25A）。 10

しかしながら、植物生成VLPのみがA/シチメンチョウ/トルコ/1/05株に対してHAI力価を誘発した（図25b）。A/インドネシア/5/05に対するHAI力価はVLPで高い。

【0107】

実施例12：植物生成H5 VLPでの免疫によって付与される交差防御

記載のようにA/インドネシア/5/05 H5 VLPの2回投与スケジュールを以前に受けたマウスに、続いてインフルエンザA/トルコ/582/06(H5N1)（“トルコH5N1”）の感染性ウイルスで鼻内チャレンジを実施し、観察した。動物当たりの投与用量は10 LD₅₀（4.09 × 10⁵ C 20 CID₅₀）であった。

トルコH5N1暴露で、PBSワクチンコントロール投与マウスの37.5%のみがチャレンジ後7日まで生存した（図26A）。コントロール抗原（HA）又はインドネシアH5 VLPの1、5若しくは15μgを投与した動物の100%が、チャレンジ後17日まで（このとき実験終了）生存した。

マウスの体重もまた実験中にモニターし、生存マウスの平均体重をプロットした（図26B）。チャレンジ前にインドネシアH5 VLPの1、5又は15μgを投与したマウスは、実験経過中に認知しえる体重減少を示さず、特に5μgのVLPを投与したマウスは有意な体重増加を示したようである。陰性コントロールマウス（トルコH5N1のチャレンジ無し）は、認知しえる体重増加も減少も示さなかった。陽性コントロールマウス（VLPを投与されながらトルコH5N1でチャレンジされた）は実験経過中に有意な体重減少を示し、これらマウスのうち3匹が死亡した。体重は一群の全てのマウスの平均であるので、“重症”マウスの除去（死亡した3匹）は見かけの全体的な体重増加をもたらす可能性があるが、陽性コントロール群の平均体重はなお、陰性群又はVLP処置群の平均体重を有意に下回っていることに注目されたい。 30

【0108】

したがって、これらのデータは、H5ヘマグルチニンウイルスタンパク質を含む植物生成インフルエンザVLPは、病原性インフルエンザ株に特異的な免疫応答を誘発すること、及びウイルス様粒子は植物形質膜から発芽しえることを示している。

これらのデータは、したがって、植物はインフルエンザウイルス様粒子を生成することができる事を示し、さらにまた初めて、ウイルス様粒子が植物形質膜から発芽できることを示している。 40

さらにまた、従来の一過性発現技術を用いて、標的HAの配列を入手してからわずか16日後に最初の抗原ロットが製造された。H5 VLPのこれまでの収量、及び対象動物当たり5μgの例示的用量の下で、1kgの浸透葉によって約20,000回分のワクチンを製造することができる。プラットフォームの単純性、極めて高い性能、及び強力な免疫原性のこのユニークな組合せは、大流行においてとりわけ新規な体系的応答を提供する。

【0109】

実施例13：植物抽出物中のヘマグルチニン含有構造物のサイズ排除クロマトグラフィーを用いた性状決定

種々の亜型の植物生成インフルエンザヘマグルチニンの高分子量構造物へのアッセンブリをゲルろ過によって評価した。AGL1/660-、AGL1/540-、AGL1/783-、AGL1/780-、及びAGL1/785-浸透植物の未精製又は濃縮タンパク抽出物(1.5mL)を、Sephacryl™ S-500HRカラム(GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA)でサイズ排除クロマトグラフィーによって分画した。図46に示したように、ブルーデキストラン(2MDa)の溶出のピークは分画10の初期であった。200 μLの各SEC溶出分画からタンパク質をアセトン沈殿によって濃縮し(5倍)、ウェスタンプロットティングによって分析したとき(図46)、ヘマグルチニンは主として分画7から14に見出され、HAのVLPへの取込が示めされた。理論に拘束されないが、これは、生成された亜型にかかわりなく、HAタンパク質がアッセンブリングして大きなスーパー構造物を形成したか、又は高分子量構造物と結合したことを示唆している。
10

【0110】

実施例14：アグロバクテリア浸透による植物N.ベンタミアナにおける季節性インフルエンザウイルスヘマグルチニンの一過性発現

季節性インフルエンザのヘマグルチニンを生成する一過性発現系の能力を、A/プリスペーン/59/2007(H1N1)(プラスミド#774)、A/ニューカレドニア/20/1999(H1N1)(プラスミド#540)及びA/ソロモン諸島/3/2006(H1N1)(プラスミド#775)株のH1亜型の発現から決定した。ヘマグルチニン遺伝子コード配列を先ず初めにプラスティニアニン発現カセット(プラスティニアニン由来のプロモータ、5'UTR、3'UTR及び転写終結配列)でアッセンブリングし、前記アッセンブリングさせたカセットをpCAMBIA二元プラスミドに挿入した。続20いてこのプラスミドをアグロバクテリウム(AGL1)にトランスフェクトし、AGL1/774、AGL1/540及びAGL1/775アグロバクテリウム株をそれぞれ作製した。

N.ベンタミアナ植物にAGL1/774、AGL1/540及びAGL1/775を浸透させ、6日間のインキュベーション期間後にその葉を採取した。アグロバクテリア浸透葉にH1が蓄積したか否かを決定するために、先ず初めに浸透葉の組織からタンパク質を抽出し、抗H1抗体を用いウェスタンプロットティングによって分析した。ほぼ72kDaの固有バンドが抽出物で検出され(図47)、インフルエンザヘマグルチニンの未切断HA0とサイズが一致した。前記は、毎年発生する種々の流行株のヘマグルチニンの浸透葉における発現が未切断の翻訳生成物の蓄積をもたらすことを示している。

【0111】

実施例15：アグロバクテリア浸透による植物N.ベンタミアナにおける潜在的大流行型インフルエンザウイルスヘマグルチニンの一過性発現

潜在的インフルエンザヘマグルチニンを生成する一過性発現系の能力を、A/アンフィ/1/2005(H5N1)(プラスミド#781)、A/インドネシア/5/2005(H5N1)(プラスミド#660)及びA/ベトナム/1194/2004(H5N1)(プラスミド#782)株のH5亜型の発現から決定した。ヘマグルチニン遺伝子コード配列を先ず初めにプラスティニアニン発現カセット(プラスティニアニン由来のプロモータ、5'UTR、3'UTR及び転写終結配列)でアッセンブリングし、前記アッセンブリングさせたカセットをpCAMBIA二元プラスミドに挿入した。続いてこのプラスミドをアグロバクテリウム(AGL1)にトランスフェクトした。

N.ベンタミアナ植物にAGL1/781、AGL1/660及びAGL1/782を浸透させ、6日間のインキュベーション期間後にその葉を採取した。アグロバクテリア浸透葉にH5が蓄積したか否かを決定するために、先ず初めに浸透葉の組織からタンパク質を抽出し、抗H5抗体を用いウェスタンプロットティングによって分析した。ほぼ72kDaの固有バンドが抽出物で検出され(図48)、インフルエンザヘマグルチニンの未切断HA0とサイズが一致した。前記は、種々の潜在的大流行株のヘマグルチニンの浸透葉における発現が未切断の翻訳生成物の蓄積をもたらすことを示している。
40

【0112】

実施例16：アグロバクテリア浸透による植物N.タバクムにおけるH5の一過性発現

ニコチアナ・タバクムの葉でインフルエンザヘマグルチニンを生成する一過性発現系の能力を、A/インドネシア/5/2005(H5N1)(プラスミド#660)株のH5亜型の発現から分析し
50

た。ヘマグルチニン遺伝子コード配列を先ず初めにプラスティニアニン発現カセット（プラスティニアニン由来のプロモータ、5'UTR、3'UTR及び転写終結配列）でアッセンブリングし、前記アッセンブリングさせたカセットをpCAMBIA二元プラスミドに挿入した。続いてこのプラスミドをアグロバクテリウム（AGL1）にトランスフェクトした。

N.タバクムの植物にAGL1/660を浸透させ、6日間のインキュベーション期間後にその葉を採取した。アグロバクテリア浸透葉にH5が蓄積したか否かを決定するために、先ず初めに浸透葉の組織からタンパク質を抽出し、抗H5抗体を用いウェスタンブロッティングによって分析した。ほぼ72kDaの固有バンドが抽出物で検出され（図49）、インフルエンザヘマグルチニンの未切断HA0とサイズが一致した。前記は、N.タバクム浸透葉におけるヘマグルチニンの発現が未切断の翻訳生成物の蓄積をもたらすことを示している。

10

【0113】

実施例17：A/インドネシア/5/05(H5N1)に由来する植物生成H5N1 VLPワクチンのフェレットにおける免疫原性

フェレットにおける投与用量上昇実験を実施し、植物誘導VLPの免疫原性を評価した。3通りの用量（1、5及び15μg）のH5 VLPワクチンによって誘発される血清抗体のin vitro 交差反応性を、ワクチンの最初の投与後14日（図50A）及び2回目の投与後14日（図50B）で採取した血清を用い、他の3種のH5N1株（A/シチメンチョウ/トルコ/1/05（クレード2.2）、A/ベトナム/1194/04（クレード1）及びA/アンライ/5/05（いずれも不活化完全ウイルス））の血球凝集阻害によって判定した。3通りの用量濃度のいずれについても交差反応性が観察される。

20

【0114】

実施例17：CHMP基準による免疫原性分析結果

ヒトで使用される医薬品のためのEMEA委員会（EMEA's Committee for Medicinal Products for human Use）（CHMP）（<http://www.emea.europa.eu/htms/general/contacts/CHMP/CHMP.html>）は、ワクチンの有効性について以下の3つの基準を設けた（2回目の投与後に適用される）：1 - セロコンバージョンの数又はHI力値の有意な増加（4倍）が40%を超えること；2 - 平均幾何増加が少なくとも2.5であること；3 - HI力値が1/40に達した対象者の割合が少なくとも70%であること。フェレットのモデルにおけるこれらの基準の分析は表8-11に示されている（*）はCHMP基準に合致するか又はそれを超えることを示す。認可のためのCHMP基準に関する交差免疫原性分析のまとめは表12に示されている。

30

体重、体温及び全体的状態について動物を毎日評価した。病気又は具合の悪さを示すものは実験中に記録されなかった。体重及び体温は実験中正常な範囲内であった。ワクチンは安全であり、実験動物で許容された。

【0115】

【表 6】

日数	基準	実験グループ					
		1 μg ジユバン ト	1 μg ア ジユバン ト	5 μg ア ジユバン ト	5 μg ア ジユバン ト	15 μg ア ジユバン ト	30 μg ア ジユバン ト
14 (1回 目の注射 後)	HI 力値 4 倍増加の%	0%	100%*	0%	100%*	20%	80%*
	平均幾何増加	0%	7.6	0%	15.6*	1.3	11.2*
	HI 力値 1/40 の%	0%	60%	0%	100%*	20%	80%
平均 HI 力値		38		78		56	
	HI 力値 4 倍増加の%	0%	100%*	0%	60%*	0%	40%*
	平均幾何増加	0%	10.8*	0%	5.9*	0.7	4*
35 (追 加免疫後 14 日)	HI 力値 1/40 の%	0%	100%*	0%	100%*	0%	100%*
	平均 HI 力値	411		465		217	

表 8：同種株 (A/インドネシア/5/05) に関するデータ

【 0 1 1 6 】

10

20

30

40

【表7】

日数	基準	実験グループ							
		1 μg	1 μg アジュベント	5 μg	5 μg アジュベント	7.5 μg	15 μg	15 μg アジュベント	30 μg
14 (1回 目の注射 後)	HI 力値 4倍增加の% 平均幾何増加 HI 力値 1/40 の% 0%	0%	1.2	0%	1.2	0%	0%	1.3	0%
35 (追加 免疫後)	HI 力値 4倍增加の% 平均幾何増加 HI 力値 1/40 の% 0%	60% 2.3	80%* 5.1*	80%* 80%*			60% 1.78	20%	

【0 1 1 7】

10

20

30

40

【表 8】

日数	基準	実験グループ					
		1 μg アジュバント	1 μg アジュバント	5 μg アジュバント	7.5 μg アジュバント	15 μg アジュバント	30 μg アジュバント
14 (1 回 目の注射 後)	HI 力値 4 倍增加の% 平均幾何增加 HI 力値 1/40 の% 40%	40% 1.9 40%		20% 1.7 20%			60% 2.8 40%
35 (追加 免疫後)	HI 力値 4 倍增加の% 平均幾何增加 HI 力値 1/40 の% 100%*	80%* 10.6* 100%*		100%* 20.8* 100%*			80%* 7.7* 100%*

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

【表9】

日数	基準	実験グループ					
		1 μg アジュバント	1 μg アジュバント	5 μg アジュバント	7.5 μg アジュバント	15 μg アジュバント	30 μg アジュバント
14 (1回 目の注射 後)	HI 力値 4倍増加の% 平均幾何増加 HI 力値 1/40 の% 20%	40% 1.8 20%		20% 1.3 20%			80%* 6.4* 80%*
35 (追加 免疫後)	HI 力値 4倍増加の% 平均幾何増加 HI 力値 1/40 の% 100%* 11.8* 100%*		100%* 14.4* 80%*				60%* 3* 80%*

表11：異種株（A/アンブライ/5/05）に関するデータ

10

20

30

40

【0119】

表12：認可のためのCHMP基準に関する交差免疫原性分析のまとめ

株	基準	実験グループ		
		1 μg アジ ュバント	5 μg アジ ュバント	15 μg ア ジュバント
A/シチメンチョ ウ/トルコ/1/05(クレード2.2)	HI力価の4倍増加の%	80%*	100%*	80%*
	平均幾何増加	10.6*	20.8*	7.7*
	1/40のHI力価の%	100%*	100%*	100%*
A/アンフィ/1/05(クレード2.3)	HI力価の4倍増加の%	100%*	100%*	60%*
	平均幾何増加	11.8*	14.4*	3*
	1/40のHI力価の%	100%*	80%*	80%*
A/ベトナム/1194/04(クレード1)	HI力価の4倍増加の%	60%	80%*	60%
	平均幾何増加	2.3	7.1*	1.78
	1/40のHI力価の%	0%	80%*	20%

10

【0120】

実施例18：ヘマグルチニンヌクレオチド配列の選別

HAのヌクレオチド配列をインフルエンザの配列データベース（URL（[flu.lanl.gov](http://fluenet.lanl.gov)）を参照されたい）、又はNCBIインフルエンザウイルスリソース（URL（ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html）を参照されたい）から回収した。HA核酸配列のいくつかについて、種々の記載事項がデータベースに列挙されている（表13）。いくつかの変異が主として培養系と密接に関連している（由来：MDCK、卵、不明、ウイルスRNA/臨床単離株）。例えば、HAの194位（成熟タンパク質における番号）のグリコシリ化は、インフルエンザB型ウイルスが卵の尿囊液で発現されるとき認められない（以下もまた参照されたい：Chen et al. 2008）。いくつかの配列についてはドメインが欠落している（例えば不完全クローニング、配列決定の偶発人工産物など）。ヘマグルチニン配列は5つのドメインに分割することができる：シグナルペプチド（SP）、HA1、HA2、トランスマembrane（DTm）及び細胞質テール。第一の配列のドメインは、存在する第二の配列由来のドメインと結合することができる。例えば、第一の株の配列のシグナルペプチドは第二の株のヘマグルチニンコード配列の残余部分と結合して、完全なコード配列を提供することができる。

20

【0121】

30

【表 10】

株	配列データベース 参照番号	由来	SP	HA1	HA2	DTm	相違
H1 A/ゾロモン諸島/3/2006	ISDN231558 (ワクチン処方)	MDCK	Y	Y	Y	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	ISDN238190	卵	Y	Y	Y	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	EU100724	?	Y	Y	Y	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	ISDN220951	MDCK	Y	N	N	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	ISDN220953	卵	Y	N	N	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	EU124137	卵	Y	N	N	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	EU124135	MDCK	Y	N	N	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
A/ゾロモン諸島/3/2006	EU124177	MDCK	Y	Y	Y	189 : R Xは G ; 220 : K (MDCK)、T (卵) ; 249 : Q (MDCK)、R (卵) ; 550 : L (MDCK)、R (卵)	
H1 A/ブリスペン/59/2007	ISDN282676	MDCK	Y	Y	Y	203 : D/N Dが H1に關してもっとも多い	
A/ブリスペン/59/2007	ISDN285101	卵	Y	Y	N	203 : D/N Dが H1に關してもっとも多い	
A/ブリスペン/59/2007	ISDN285777	卵	Y	Y	Y	203 : D/N Dが H1に關してもっとも多い	
A/ブリスペン/59/2007	ISDN282677	卵	Y	Y	Y	203 : D/N Dが H1に關してもっとも多い	

【0122】
(表13つづき)

【表1-1】

株	配列データベース 参照番号	由来	SP	HA1	HA2	DTm	相違
H3 A/ブリスベン/10/2007	ISDN274893	卵	Y	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN257648	MDCK	N	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN256751	卵	Y	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN273757	卵	Y	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN273759	卵	Y	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	EU199248	卵	N	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	EU199366	卵	Y	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN257043	卵	N	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	EU199250	MDCK	N	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN275357	卵	N	Y	N	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	
A/ブリスベン/10/2007	ISDN260430	卵	N	Y	Y	202 : V/G ; 210 : L/P ; 215 : 欠失、Ala ; 242 : S/I	

H3 A/ヴィスコシン /67/2005	ISDN131464 (ワクチン処方)	?	N	Y	Y	N	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y
A/ヴィスコシン /67/2005	DQ86594	?	N	Y	partiel	N	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y
A/ヴィスコシン /67/2005	EF473424	?	N	Y	Y	N	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y
A/ヴィスコシン /67/2005	ISDN138723	卵	N	Y	Y	Y	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y
A/ヴィスコシン /67/2005	EF473455	卵	N	Y	Y	Y	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y
A/ヴィスコシン /67/2005	ISDN138724	?	N	Y	Y	Y	138 : A/S ; 156 : H/Q ; 186 : G/V ; 196 : H/Y

【0 1 2 3】

(表1-3つづき)

【表12】

株		配列データベース 参照番号	由来	SP	HA1	HA2	DTm	相違
B	B/マレーシア/2506/2004	ISDN126672 (ワクチン処方)	卵	Y	N	N	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	EF566433	卵	Y	N	N	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	ISDN231265	卵	Y	Y	Y	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	ISDN231557	MDCK	Y	Y	Y	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	EF566394	MDCK	Y	N	N	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	EU124274	卵	Y	Y	Y	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	EU124275	MDCK	Y	Y	Y	120 : KN ; 210 : T/A	
	B/マレーシア/2506/2004	ISDN124776	MDCK	Y	N	N	120 : KN ; 210 : T/A	
<hr/>								
B	B/フロリダ/4/2006	ISDN261649	卵	Y	Y	Y	N	211位のグリコシル化部位；DTm/細胞質テールを欠く
	B/フロリダ/4/2006	EU100604	MDCK	N	Y	N	N	
	B/フロリダ/4/2006	ISDN218061	MDCK	N	Y	N	N	
	B/フロリダ/4/2006	ISDN285778	卵	Y	Y	Y	N	細胞質テールを含む
<hr/>								
B	B/ブリスベン/3/2007	ISDN256628	卵	N	Y	N	N	211位のグリコシル化部位を欠く
	B/ブリスベン/3/2007	ISDN263732	卵	Y	Y	Y	Y	211位のグリコシル化部位を欠く
	B/ブリスベン/3/2007	ISDN263783	MDCK	Y	Y	Y	Y	
<hr/>								
H6	A/ベトナム/1194/2004	ISDN38686 (ワクチン処方)	?	Y	Y	Y	Y	
	A/ベトナム/1194/2004	AY651333	?	Y	Y	Y	Y	
	A/ベトナム/1194/2004	EF541402	?	Y	Y	Y	Y	
<hr/>								
H6	A/アンソフィ/1/2005	DQ37928 (ワクチン処方)	?	Y	Y	Y	Y	
	A/アンソフィ/1/2005	ISDN131465	卵	Y	Y	Y	Y	
<hr/>								
H7	A/エトリア/タリア /1374/1999	AJ91720	ARNgen	Y	Y	Y	Y	
<hr/>								
H7	A/ウマ/ブラハ/56	AB298277(実験室 再組合せ株)	?	Y	Y	Y	Y	152 (R/G) : 169 (VI) ; 208 (ND) (グリコシル化部位停止)
	A/アンソフィ/1/2005	ISDN131465	?	Y	Y	Y	Y	

【0124】
(表13つづき)

【表 1 3】

株	配列データベース 参照番号	由来	SP	HA1	HA2	Df _m	相違
H9 A/香港/1073/1999	AJ404626	?	Y	Y	Y	Y	
A/香港/2506/2004	AB080226	?	N	Y	N	N	

H2 A/シンガポール/1/1957	AB296074	?	Y	Y	Y	Y	
A/シンガポール/1/1957	LG20410	RNA	Y	Y	Y	Y	
A/シンガポール/1/1957	L11142	?	Y	Y	Y	Y	

H2 A/日本/305/1957	L20406	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	L20407	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	CY014976	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	AY209953	?	Y	Y	N	N	
A/日本/305/1957	J02127	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	DQ508841	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	AY643086	?	Y	Y	Y	N	
A/日本/305/1957	AB289337	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	AY643085	?	Y	Y	Y	Y	
A/日本/305/1957	AY643087	薬剤耐性	Y	Y	Y	N	

H6 A/コモモ/香港	AF250479	卵	Y	Y	Y	Y	
/W312/1997(H6N1)							

Y、N：それぞれ、イエス、ノー

SP：シグナルペプチド配列の存在、Y/M

HA1：完全なHA1ドメイン、Y/N

HA2：完全なHA2ドメイン、Y/N

DTm：完全なトランスマンプレンドメイン、Y/N

【 0 1 2 5 】

A/ソロモン諸島/3/2006のH1株

8つのアミノ酸配列を比較し変異を同定した（表14）。171位は、いくつかの配列でグリシン（G）又はアルギニン（R）の変異を提示した。

【 0 1 2 6 】

表14：A/ソロモン諸島/3/2006のアミノ酸変異

アミノ酸番号*	MDCK	卵
212	K	T
241	Q	R
542	L	R

10

*開始Mからの番号

【 0 1 2 7 】

A/プリスペーン/59/2007のH1株

203位はアスパラギン酸（D）、イソロイシン（I）又はアスパラギン（N）の変異を提示した。

A/プリスペーン/10/2007のH3株

20

配列変異が5つの位置で観察された（表15）。215位では、欠失が2つのサンプル配列で観察される。

【 0 1 2 8 】

表15：A/プリスペーン/10/2007のH3のアミノ酸変異

	由来	202、210、215、235、242*				
ISDN274893	卵	V	L	—	Y	I
ISDN273759	卵	G	P	A	S	I
EU199248	卵	G	P	A	S	I
EU199366	卵	G	P	A	S	I
ISDN273757	卵	V	L	—	S	S
ISDN257043	卵	G	P	A	S	I
EU199250	MDCK	G	L	A	S	I
ISDN375357	卵	G	P	A	S	I
ISDN260430	卵	G	P	A	S	I
ISDN256751	卵	G	P	A	S	I
ISDN257648	MDCK	G	L	A	S	I

30

*開始Mからの番号

【 0 1 2 9 】

A/ウィスコンシン/67/2005のH3株

40

この株の配列変異は4つの位置で観察された（表16）。

表16：A/ウィスコンシン/67/2005のH3のアミノ酸変異

	由来	138、156、186、196			
ISDN138724	不明	A	H	G	H
DQ865947	不明	S	H	V	Y
EF473424	不明	A	H	G	H
ISDN138723	卵	S	Q	V	Y
ISDN131464	不明	A	H	G	H
EF473455	卵	A	H	G	H

*成熟タンパク質からの番号

【0130】

B/マレーシア/2506/2004のB株

2つの位置で変異が観察される（表17）。120位はグリコシル化部位ではなく、210位はグリコシル化に中心的に関与する。このグリコシル化は、卵での培養後認められなくなる。

表17：B/マレーシア/2506/2004のヘマグルチニンのアミノ酸変異

アミノ酸番号*	MDCK	卵
120	K	N
210	T	A

10

*SPの中央からの番号

【0131】

B/フロリダ/4/2006、ISDN261649のヘマグルチニン株

観察された変異には、培養系に応じて211位のアミノ酸配列変異が含まれる。アスパラチン（N）はMDCK細胞から単離された配列で見出され、一方、グルタミン酸（D）は卵から単離された配列で見出される。211位はグリコシル化部位であり、卵での培養後グリコシル化は認められなくなる。

A/シンガポール/1/1957のH2株

配列変異は6つの位置で観察された（表18）

表18：A/シンガポール/1/1957のH2のアミノ酸変異

20

30

	由来	アミノ酸番号					
		166	168	199	236	238	358
L20410	ウイルスRNA	K	E	T	L	S	V
L11142	不明	E	G	K	L	S	I
AB296074	不明	K	G	T	Q	G	V
コンセンサスA/日本/305/1957		K	G	T	Q/L	G	V

*成熟タンパク質からの番号

【0132】

A/ベトナム/1194/2004のH5及びA/アンフィー/1/2005のH5株

40

これらのH5株のどちらの一次配列アラインメントでもアミノ酸配列変異は認められなかった。

A/コガモ/香港/W312/1997のH6株

ただ1つの記載事項のみが株について利用できただけであった（AF250179）。

A/ウマ/プラハ/56のH7のH7株

合計2つの配列記載がデータベースで見出された。AB298877は、実験室で再組合せされた株であるので排除した。

A/香港/1037/1999、AJ404626のH9株

合計2つの配列記載がデータベースで見出された。1つだけが完全であった。

【0133】

50

全ての引用が参照により本明細書に含まれる。

本発明を1つ以上の実施態様に関して説明してきた。しかしながら、特許請求の範囲で規定される本発明の範囲から逸脱することなく多数の変更及び改変を為しえることは当業者には明白であろう。

本発明の一態様として、例えば以下のものがある。

[1] 植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、インフルエンザヘマグルチニン(HA)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

[2] 前記インフルエンザヘマグルチニンが、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16から成る群から選択される、前記[1]に記載の核酸。

[3] 以下の工程を含む、インフルエンザウイルス様粒子(VLP)を植物中で製造する方法：
a) 前記[1]に記載の核酸を前記植物又はその部分に導入する工程、及び
b) 前記核酸の発現を許容する条件下で前記植物をインキュベートし、それによりVLPを製造する工程。

[4] 前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で一過性に発現される、前記[3]に記載の方法。

[5] 前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で安定的に発現される、前記[3]に記載の方法。

[6] (c) 宿主を採取し、VLPを精製する工程をさらに含む、前記[3]に記載の方法。

[7] インフルエンザウイルスHAタンパク質及び1つ以上の植物由来脂質を含むウイルス様粒子(VLP)。

[8] 前記インフルエンザHAタンパク質が、H5インドネシアである、前記[7]に記載のウイルス様粒子(VLP)。

[9] 前記[7]に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

[10] 前記[7]に記載のウイルス様粒子を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発する方法。

[11] 前記ウイルス様粒子が、対象者に対し、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与される、前記[10]に記載の方法。

[12] 植物特異的N-グリカン又は改変N-グリカンをもつインフルエンザウイルスHAを含むウイルス様粒子(VLP)。

[13] 前記[12]に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

[14] 前記[13]に記載の組成物を投与する工程を含む、インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発する方法。

[15] 組成物が、対象者に対して、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与される、前記[11]に記載の方法。

[1'] 植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、インフルエンザヘマグルチニン(HA)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

[2'] 前記インフルエンザHAが、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16から成る群から選択される、前記[1']に記載の核酸。

[3'] 以下の工程を含む、インフルエンザウイルス様粒子(VLP)を植物中で製造する方法：
a) 前記[1']に記載の核酸を前記植物又はその部分に導入する工程、及び

b) 前記核酸の発現を許容する条件下で前記植物をインキュベートし、それによりVLPを製造する工程。

[4'] 前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で一過性に発現される、前記[3']に記載の方法。

[5'] 前記導入工程(工程a)において、前記核酸が前記植物中で安定的に発現される、前記[3']に記載の方法。

[6'] (c) 宿主を採取し、VLPを精製する工程をさらに含む、前記[3']に記載の方法。

[7'] インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)タンパク質及び1つ以上の植物由来

10

20

30

40

50

脂質を含む、前記〔3'〕に記載の方法により製造されたウイルス様粒子（VLP）。

〔8'〕前記インフルエンザHAタンパク質が、H5インドネシアである、前記〔7'〕に記載のウイルス様粒子（VLP）。

〔9'〕免疫応答を誘発させるための前記〔7'〕に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

〔10'〕インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するための薬剤の製造のための、前記〔7'〕に記載のウイルス様粒子の使用。

〔11'〕前記薬剤が、対象者に対し、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されるものである、前記〔10'〕に記載の使用。

〔12'〕植物特異的N-グリカン又は改変N-グリカンをもつインフルエンザウイルスHAを含む、前記〔3'〕に記載の方法により製造されたウイルス様粒子（VLP）。 10

〔13'〕免疫応答を誘発させるための前記〔12'〕に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

〔14'〕インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するための薬剤の製造のための、前記〔13'〕に記載の組成物の使用。

〔15'〕前記組成物が、対象者に対して、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されるものである、前記〔14'〕に記載の使用。

〔1''〕以下の工程を含む、インフルエンザウイルス様粒子（VLP）を植物中で製造する方法：a) 前記植物中で活性な調節領域に機能的に連結された、インフルエンザヘマグルチニン

20

（HA）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を前記植物又はその部分に導入する工程、

b) 前記核酸の発現を許容する条件下で前記植物をインキュベートし、それによりVLPを製造する工程、

c) 前記植物を採取する工程、及び

d) 前記VLPを精製する工程であって、前記VLPのサイズが80～300nmの範囲である工程。

〔2''〕前記ヌクレオチド配列が、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15及びH16から成る群から選択される、前記〔1''〕に記載の方法。

〔3''〕前記導入工程（工程a）において、前記核酸が前記植物中で一過性に発現される、前記〔1''〕又は〔2''〕に記載の方法。 30

〔4''〕前記導入工程（工程a）において、前記核酸が前記植物中で安定的に発現される、前記〔1''〕又は〔2''〕に記載の方法。

〔5''〕インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）タンパク質及び1つ以上の植物由来脂質を含む、前記〔1''〕～〔4''〕のいずれか1項に記載の方法により製造されたウイルス様粒子（VLP）。

〔6''〕前記インフルエンザHAタンパク質が、H5インドネシアである、前記〔5''〕に記載のVLP。

〔7''〕免疫応答を誘発させるための前記〔5''〕又は〔6''〕に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

〔8''〕インフルエンザウイルスHAが、植物特異的N-グリカン又は改変N-グリカンを含む、前記〔1''〕～〔4''〕のいずれか1項に記載の方法により製造されたVLP又は前記〔5''〕若しくは〔6''〕に記載のVLP。 40

〔9''〕インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するのに使用するための、前記〔4''〕～〔6''〕若しくは〔8''〕のいずれか1項に記載のVLP又は前記〔7''〕に記載の組成物。

〔10''〕前記VLPが、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されることに適している、前記〔9''〕に記載のVLP。

〔11''〕免疫応答を誘発させるための前記〔8''〕に記載のVLPの有効用量及び医薬的に許容し得る担体を含む組成物。

〔12''〕インフルエンザウイルス感染に対する免疫を対象者において誘発するのに使用

20

30

40

50

するための、前記〔11'']に記載の組成物。

〔13'']前記組成物が、経口的に、皮内に、鼻内に、筋肉内に、腹腔内に、静脈内に又は皮下に投与されることに適している、前記〔12'']に記載の組成物。

〔14'']前記〔5'']、〔6'']又は〔8'']のいずれか1項に記載のVLPを含む食品補助物。

【0134】

参考文献

Aymard, H. M., M. T. Coleman, W. R. Dowdle, W. G. Laver, G. C. Schild, and R. G. Webster. 1973. Influenza virus neuraminidase-inhibition test procedures. Bull. W.H.O. 48: 199-202

Bollag, D.M., Rozicki, M.D., and Edelstein, S.J. (1996) *Protein methods (2nd edition)*. Wiley-Liss, New York, USA.

Bligh, E.G., & Dyer, W.J. *Can. J. Med. Sci.* 37, 911-917 (1959).

Chen, B.J., Leser, G.P., Morita, E., and Lamb R.A. (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J. Virol.* 81, 7111-7123.

Chen Z, Aspelund A, Jin H. 2008 Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs. *Vaccine* vol 26 p 361-371

Crawford, J. , Wilkinson, B. , Vosnesensky, A. , Smith, G. , Garcia, M. , Stone, H. , and Perdue, M. L. (1999). Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17,2265-2274.

Darveau, A., Pelletier, A. & Perreault, J. PCR-mediated synthesis of chimeric molecules. *Methods Neurosc.* 26, 77-85 (1995).

Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 2006; 40: 60-65.

Gillim-Ross, L., and Subbarao, K. (2006) Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 614-636.

Gomez-Puertas, P., Mena, I., Castillo, M., Vivo, A., Perez-Pastrana, E. and Portela, A. (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression level of viral proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 1635-1645.

Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A., and Portela, A. (2000) Influenza Virus protein is the major driving force in virus budding. *J Virol.* 74, 11538-11547.

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679 (2002).

Höfgen, R. & Willmitzer, L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acid Res.* 16, 9877 (1988).

Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T. (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*; 262: 1401-1407)

Horimoto T., Kawaoka Y. Strategies for developing vaccines against h5N1 influenza a viruses. *Trends in Mol. Med.* 2006; 12(11):506-514.

Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. Virus-like

particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*. 2005 Mar 7;23(15):1851-8.

Johansson, B. E. (1999). Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine. *Vaccine* 17, 2073-2080.

Latham, T. , and Galarza, J. M. (2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75, 6154-6165.

10

Lefebvre, B. et al. *Plant Physiol.* 144, 402-418 (2007).

Leutwiler LS et al 1986. Nucleic Acid Sresearch 149(10):4051-64

Liu, L & Lomonossoff, G.P. Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *J. Virol. Methods* 105, 343-348 (2002).

Macala, L.J., Yo, R.K. & Ando, S. *J Lipid Res.* 24, 1243-1250 (1983)

Mattanovich, D., Rüker, F., da Câmara Machado, A., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmeler, G., and Katinger, H. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By electroporation. *Nucl. Ac. Res.* 17, 6747.

20

Mena, I., Vivo, A., Perez, E., and Portela, A. (1996) Rescue of synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids. *J. Virol.* 70, 5016-5024.

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA et al.. Lipid rafts in higher plant cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(35): 36277-36286.

Neumann, G., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2000) Plasmid-driven formation of virus-like particles. *J. Virol.* 74, 547-551.

30

Nayak DP, Reichl U. (2004) Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *J Virol Methods* 122(1):9-15.

Olsen, C. W. , McGregor, M. W. , Dybdahl-Sissoko, N. , Schram, B. R. , Nelson, K. M. , Lunn, D., Macklin, M. D. , and Swain, W. F. (1997). Immunogenicity and efficacy of baculovirus- expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149-1156.

Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *Journal of Virology* 2007; 81(7): 3514-3524.

40

Rowe, T. et al. 1999. Detection of antibody to avian influenza a (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J. Clin Microbiol* 37(4):937-43

Saint-Jore-Dupas C et al. 2007. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in Biotechnology* 25(7) :317-23

Sambrook J, and Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Stockhaus J et al 1987. Analysis of cis-active sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.S. 84(22):7943-7947.

Stockhaus J et al 1989. Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. Plant Cell. 1(8):805-13.

Suzuki, Y. (2005) Sialobiology of influenza. Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol. Pharm. Bull 28, 399-408. 10

Tsuji M., Cell. Mol. Life Sci., 63 (2006); 1889-1898

Wakefield L., G.G. Brownlee Nuc Acid Res. 17 (1989); 8569-8580.

Kendal, AP, Percira MS, Skehel J. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta:CDC; 1982. p.B17-B35

WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Department of communicable disease surveillance and response. World Health Organisation Global Influenza Program. 2002. 20

Skehel JJ and Wildy DC Ann Rev Biochem 2000 69:531-69

Vaccaro L et al 2005. Biophysical J. 88:25-36.

Gamblin, S.J., Haire, L.F., Russell, R.J., Stevens, D.J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D.A., Daniels, R.S., Elliot, A., Wiley, D.C., Skehel, J.J. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 303: 1838-1842

30

【図 1 A】

AGAGGTACCCGGGCTGGTATTTATGTTGCAATAACTCAAAACATA
AAAGTTAAAGTTAGCAAGTGTCATTTTACTTGTGACA AAAAATTACACCTAC
TACTGTATAATCATATTAAACATTAGAGTAAGAAATAGTGATGATAAGAAC
AAGAGTAGTGATATTGACACAAATTGTTGTCACATTTGAGAGAAAATTGTTGTT
GTTCTCTTTTCAATTGGTCAAAACAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
ATAAAACACATAATGAGATGAGAGAGAGTGACAAAGTTGACCAAA
ATAGTTGACAAATAATCATTGAGGAATTGACAAAGCTACACAAATAAGGGTT
AATGCTGAAATAAAAGGAGACGCAATTAGAGATGTAACATTAGAGAAAT
TTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAGATAAATTATTAAATAAAAGTTGAG
TCATTGATTAACATGTTGATTAAATGAAATTGATGAAAGTTGAGATTAAAG
TTGTTAGTAGAATTAGAAATTGTTGTCAAAATTAAATTGACATTGATCTTTCT
ATATAATTGCCCCTAGACTTCAATTATTTATATTCACTAGATCAAATAAA
GAGAAATAACGTTATTAATCCCTCAAAAMAAAAGCGTATAACATCCCA
AAATCTAACGCAAGTAGGAGGATAACAGGATTCGGCTAGAGATAACATCCCA
ATCCAACCAATCACACAAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAGCCCAAGGATC
TGTCGAGCATCTCATTTCAACACATACAAAGAGAGAGAGACTAAATTAAAT
TCAACACTTTGATTCCTCTAAACACATACAAAGAGAGAGAGACTAAATTAAAT
TAATCATCTGAGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCTTATTGTT
TCGAATTCAATTAAACATCACTAACGTTAAACTAACTAAATTATCATCCC
CTTGTATAATGATAGTACA

GAGCTCTAAGTTAAATGCTCTCGCTCTTATAATATGGTTGTTATT
TTAATTGTTCTGAGAGAGCTTAATTAACTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
TGATGAGATGACTGTGAAATGTAATTCAATTACATAAGTGAGACTGAGAATC
AGAAATGTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGAGACCTGGCGTACAATTGTC
TTATTTGAAACAACTAAATTGAACTATTTGCCACACTTTATAAGTGTAA
ATATAGCTCAAATATAATGTCAGTTCAAGTTAAATGAAATATCAGTTA
TCGAATTCAATTAAACATCACTAACGTTAAACTAACTAAATTATCATCCC
CTTGTATAATGATAGTACA

【図 1 B】

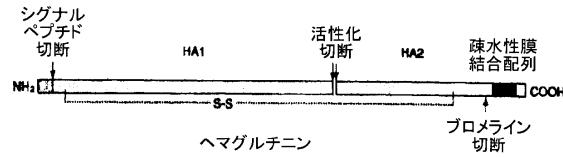
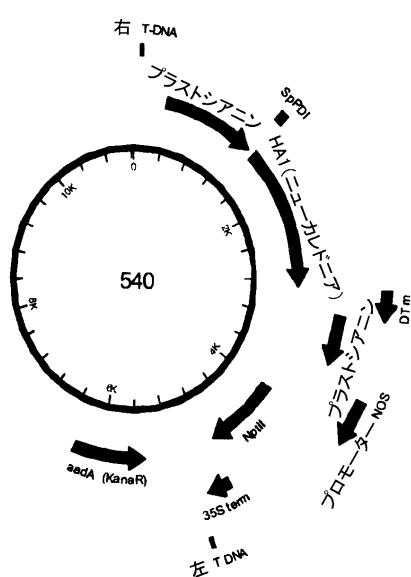


Fig. 1B

Fig. 1A

【図 2 A】



【図 2 B】

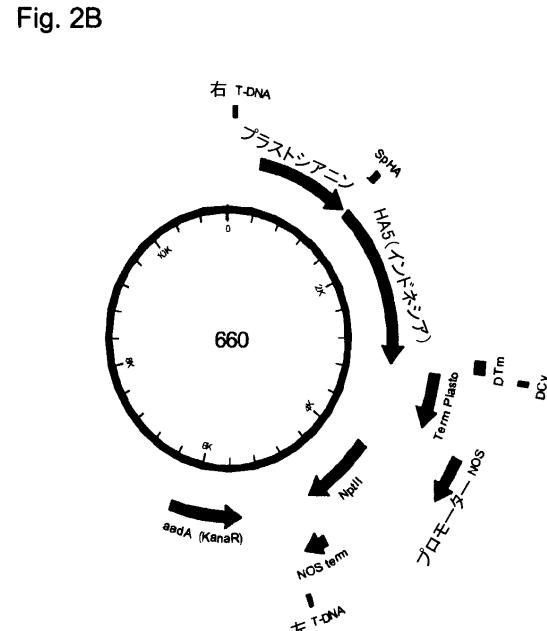
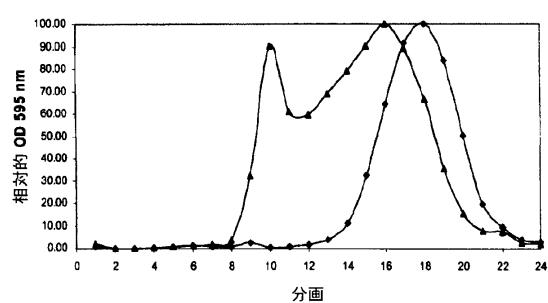


Fig. 2A

Fig. 2B

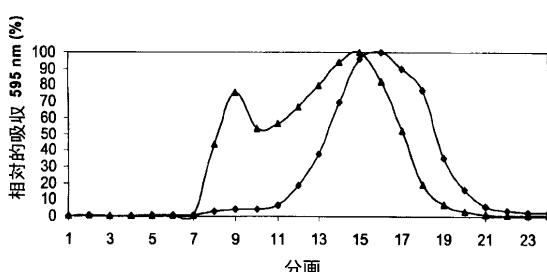
【図 3 A】

Fig. 3A



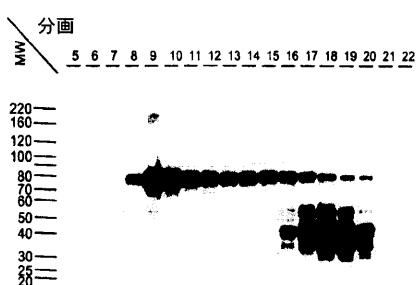
【図 3 C】

Fig. 3C



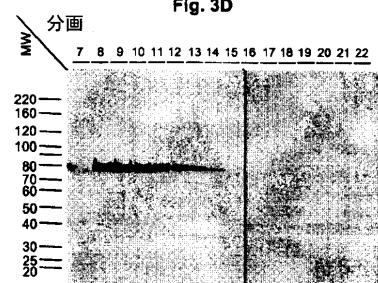
【図 3 B】

Fig. 3B



【図 3 D】

Fig. 3D



【図 4 A】

Fig. 4A



【図 4 C】

Fig. 4C



【図 4 B】

Fig. 4B



【図9】

Fig. 9

H7亚型(配列番号:11)

>BHB940420|gb:AF071776| 記号:HA|名称:ヘマグルチニン前駆体|生物:インフルエンザAウイルスA/ニワトリ/ニューヨーク/1995|染色体:4|亜型:H7|宿主:トリ

GACAAAATATGCTCTGGGCCACATGCTGGCAATGGAACAAAGTGACACATTAAACAGAGGGGGGA
TGTAAAGTGTGGACGCCAACAGAGCGTCGAAATCTGGCAATTAGAAGAAATATGTTAAGCAGGGAAAG
GCCAACATCTGGGCAATCTGGACTCTTGAAGCCATTAGGACCTCCCTTAAGGCTCATATCTCGG
GATTTTACTCTGTGTTAGGAACTCTGGGCAATGGGAGAAAGGGCAGTGTGCTATCCCTGGAAATTCAAA
ATGAAAGATCTACTGGCAGCATCTTCCGAGGGTCAAGGAAATGATAAGGAACTGATGGGTTTCACTA
TAGTGGGAAATAGGCAACAACTGGGCCAACATGGCTGTAAAGGATCAGGTCTCTTCTTATGAGGAGATG
AATGGTCTCTGCTCAATTGGGAGGATCTGGGCAATTCTCCTGGAAATGAGGAACTGGTAAAGGAACTGG
ACAACACAGCTCTAAATTGGGAGGATCTACTCTGGGCAATTCTCCTGGAAATGAGGAACTGGTAAAGGAACTGG
AATGGGAAACAGATGAACTAGGAACTGGGCAATTCTCCTGGGCAATTCTCCTGGGCAATTCTCCTGG
GGGCCAACATGTGAACTAGGAACTGGGAGAATCTGGGCAATTCTCCTGGGCAATTCTCCTGGGCAATTCTCCTGG
GGCTTCTTCACTTCAAGGGCTATGGCTCCCTGGACGGGAACTTCTTCTTGGGAGGAAATCTAGCTGG
AGTCCAGGGATGATGTTCTCTGGTACTGGGAGGATCTGGGCAATTCTCCTGGGAGGAAATCTAGCTGG
AGTGGGCTCTGGCAATCTTCAAACTAACCTAGAACCTGGAGACTCTGGGGAGATGCCCTCGCTGATCAAAGCACAA
GCTCTTCTTGGCTCAAGGAACTGAGAATGAGGAACTGGGAGGAGGCTTCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
TGTCTGGGATCATAGGAACTGGGAGGAGGCTTCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
ATGCTGCTGATGACAACAAACTGAGCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
AATAGGAAATCTGGCTTAATCTGGGAGGACGAGCCTGACAAACCCAACTCTGGCTAAATGAGCATACTGAGGAACTGG
GGCTGCAATGGGAAATCATGACATCAATGAGCTGGGAGGACTGAGGAACTTCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
GAAAGAACACTGGGAGGAAATCTGGGAGGACTGAGGAACTGAGGAACTTCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
TAGTGTGATGAGGAGCATAGGAAACACTTATGACCATACTAACATGAGCAGACGATCTGGGAGGATCTGG
AGATGAGCATGAGTACGGGAACTTATGAGGATCTGGGAGGACTGAGGAACTTCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
CATGCTGTTCTCTTCTGGCTGTTGATGAGGAACTTATGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGGGAGGATCTGG
GTCGCACTTGTGATATAA

【図10A】

Fig. 10A

H2亞型(配列番号:12)

>gi|408516|gb|L11132.1|FLADE88HA インフルエンザAウイルス(A/カモメ/DE/677/88(H2N8))ヘマグルチニン(HA)遺伝子,完全コード

ACGAAAGCAGGGGTATACCATAGAACCAAGGCAGAACATGGCCATCTATTCTAATTCTTCGTT
TCACGACAGTGACAGGGGACAATAATTCGATTGAGACCTTACCAAACTTCAGCAAGAAAAGGTGTC
ATCATCGAGGAAGATGTACTGTGACTCAGCGTAGGACATCTTCGAGAGACTCATCAAGGGAAATG
ATGCAAGAATTTGGAACTTCCCGATCTGGATTAAGGGATTCGACGCTTCCGGCGATGCTTGGGAT
CGAAGATGTGATATCTAATCTGGCAGAATGGTCATCATATAGGAAAAGAAATTCAGGAAACG
GCTTCTTCACCCAGGCACTTCAATGATTGAGAATTCACCATCTTATCAGCAGGCTTCACCATTT
TGAAAGAATGGAAAGTGGCAAGAATGAGTCAGCAAGTCAACAACTTGAGGAGTTCACAGGCTT
GCAAGATGTGGCTTCGCACTTCTGGCAACATGGCTTGGTGCAGAACAGGAGTCGAAATTCTAC
TGGCCAAAGATTTACACAACTACATGGGAACTTGGCTGATCTCTGGGACATACATCCACCAAA
TGTAGGAAATGGACAAAGAGCTTGTGATAGTGGGCACTTATGTCAGTACAGGACATACATCA
ACAAAGAATGGTACCTCCCGAAAGATTCAGGAAACAGGAACTTGGGAAAGGAGGAGAATTC
GCTGGGACTCTTGTGATATTTGGACACAAATTGTTGAGACTGTGCAACTTAACTTGTACCAAGATA
TGGTTGAAAGATAATCCAGGAGGTAGTCAGGAGCATGAGTCAGGAAAGGAGGAAACTTGGAAACTTGG
ACAGGACTTCTTCAGGCTTCTTGGGAACTTAAACAACTACATTCCTTCAACTTACCCACCTGGACCA
TTGGTAGTGGCCCCAAATTTGGAAAGATTAGTAGTCGACAGACTGAAAGACCTGGCTTC
GGTGTGGTGGTGTGATCATCACAGCAATCAGCAGGAACTTGGTAGTGGTGGAGAAAGGATGGTGG
AGCCAATGATGGAACTTCAACAAAGGCTTCAAGTGGTCAAGGAACTTGGTAGTGGGAACTTGG
TGGAAAATGATGGAACTTCAAGTGGAGAGGAGTGGCAAGACTTGGTAGTGGGAACTTGG
GAATGIGGACATACAACTGGCAGCTTCAGTTGATGAAATGAGGAGGACTTGGTAGTGGGAACTTGG
ATCTGGTCAAGTCAATTTGATAGTCAAGTGGCACTTCAGCAAGTCACTGGCAAGTCACTGG
AATGTTTGAAATTTCATACAAATGGTAGATGAACTGATGAGTCAGTGGAGAACTTGGGAACTTGG
TCAAGATGGAGGAGGACTTCAAACTAACAGGCTTCAAGGAACTTGGGAACTTGGGAACTTGG
TTTACAAATCTTGGCACTTGTACTGATCAGTCAGGTTCTCTGATCTGGCAATCATGATCTGG
TCTTATGATGGATGGCTTCAACAGGGGCTCTGCAATGGCAAGATCTGCAATGATGCTTGG
TAAAAACACCTTGTCTTCT

【 义 1 0 B 】

Fig. 10B

H3亚型(配列番号:13)

>BEB21072991_gb_EF4735741 記号:[HA]名前:ヘマグルチニン|生物:インフルエンザAウイルス/A/キサズ/2003/Sセグメント-4/亜型:H3宿主:ヒト
CAAAAATCTCCGGAAATGACAACAGCAGCGAACGCTGCTCTGGCACCATGAGTACCAAAACGGAA
CGTAGTACCAAAACATCAGGAATGACCAATTGAGATTACTGAGTCTAGGTCGAGAGTTCTC
AACAGGTGGAAATATGCGCACGTCCTCATCAGATCCTTGATGAGAAGAAACTGCACACTAAATGAGTCCTA
TTGGGGAGACCCCTAGTGATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGACCTTTTGTGAAACGAGCAGAAAGCCT
ACAGCAACTGTTACCCCTATGATGTCGGGATTATGCCCTCCCTAGGTCACTAGTGTCTCATCCGGCAC
ACTGGTGGATTTAAACATGAAAGCTTCGATTTGGACTGAGTCACTTCAAGAAAGCACTTGTCTGGAA
AGGAGATCTAAATAAAGTTCTTGTAGATGAGTAAATGGTGACCACACTAAATAACATACCCAGCAT
TGGAGCTGACTATGCGAACAACTGAAATAATGGCAAAATTTGAGCTATTTGGGGGTTTACCAACCGGGTAC
GGCAGTGCACCAAATCGCCCTATATGCCCTAAGCATCAGGAAGATCACAGCTCTACCAAAGAGGCCA
CAAATGCTTAATCCCGAATATCGGATCTAGACCCAGGGTAAGGGATGTCTCCAGCGCAATAAGCTATTT
GGRAATAGTAAACCCGGGAGACATACTTTGATTAACAGCACAGGAATCTAATTGCTCTGGGTTA
CTTCAAAATCAGGAAGTGGAAAGCTCAATAATGAGATCAGATGCCACCATGGCAATGCAATTCCGAA
TGGCATACTCTCAAAATGGAAAGCATCCCCAATGACAAACCCATTCTAAATGTAACAGGATCACATATGGG
CTCTGGCCAGATTTGAGAACAAACTCTGAAATTGGCAACAGGGATGCGAAATGTACCAAGGAAACA
AACTAGAGGCTATTTGGCGGAAACTCGGGGTTTCAAGAAAATGGTGGGGAGGGAATGGTGGGACCGTTGG
TACGGTTICAGGGCATCAAAATCTGAGGCCACAGGA

【図10C】

Fig. 10C

H4亞型(配列番号:14)

>BBH10501621gb:DQ0218591 記号:HA|名称:ヘマグルチニン|生物:インフルエンザ
Aウイルス/A:マガモ/MN/33/00/セグメント:4|亜型:|+宿主:トリ
ATGCTCATACATCAGATTCTGTTCTGCTCATAGCAGAGGGTCCTCTCAGAAATACACGGGAATCCCG
TATGATCTCTGGGACATCATGGGCTATCCATGGGACATGGGAAACCTGGTCATGACCAAAGTAGA
AGTGTGACTCAGGGAACTTATGGTGATGCCAACTTATCCTGGGAGTTGTCTCAGCTTCTTAAGATA
TAGATGATGGCAAACTTACGGATGACATCTGGCTTACCTGGGGCTCAGGGCTGATCATGATTAAGTG
CAAGATGGGATCTTATAGAACGGCCACCTGCTGGACATGGTGAATCTTACCTTATGTTGCTGGGAGTA
CGAACGGCTTACGGGATCTTACGGACAACTTACGGGAAATCTGGGAGCATGCAAAAGGAACTTACCATGG
ACAGCTTACACAAAATGGGAAATCTGGGAGCATGCAAAAGGAACTTGTGAATGACTTTTCAACAGATIGA
ACTGGCTTACACAAAATCTGGGAAATCTGGGAGCATGCAAAAGGAACTTGTGAATGACTTTTCAACAGATIGA
TCTGACAGTTTACATGGGGGATCTTACATGGCTTACCTACGACACAGAACCTTACGACACAGAAC
CTTACGGGATCTTACGGGAACTTACGGGAAATCTGGGAGCATGCAAAAGGAACTTACCATGGGAGCTA
CATGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGACATTTATGGGACAGGGCAGGACCTTAC
CTTACGGGACACTTACGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCAGGAC
ATTCTGAGTACTGGGATTTACGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCACA
ATTCTGAGTACTGGGATTTACGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCACA
CTAACCAAAACCTGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCACA
CTAACCAAAACCTGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCACA
CTAACCAAAACCTGGGAACTTACGGGAAACAGGGCAGGATTTAGCTTCTTATGGGACAGGGCACA

【 図 1 0 D 】

Fig. 10D

H5亚型(配列番号:15)

>BBH950029 qb:AF5012351 記号:HA|名称:ヘマグルチニン|生物:インフルエンザウイルス/アヒル/上海/1/2000|セグメント:4|亜型:H5宿主:トリ
ATGGAGAAAATAGTCCTTCTTCGCAATTAGTCAGTTCTTAAAGGATCATGGATTCGATTCATTGGTTAC
ATGCCAACACTCGCAGAGCAGGTGAACTTGTGAAATGGAAAGAAGCTGTCTTACATGCCAACAGA
CATACTGGAAAAGCACACAGGGAAACTCTGGCATCTAGATGGAGTGAGCCCTATTTTCAAGAGT
TGTAGTGTAGCTGGATGGCTCTCGGAAACCCATAGTGTGAGCAAATTCATCAATGTGCGGAATGGTCTT
ACATAGTGGAGAGGCCAGTCAGGCCAATGACCTCTGTACCGGGATTTCAACGACTATGAGAAACT
GAAACACCTATTGAGCAGAAATAACCACTTGGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAGATCTTGGTCCAAT
CATGAGGCTCATCAGGGTGGCCAGCATGTCACCATGGGAAGGCCCTCTTTCAGAAATGTGG
TATGGCTTATCAAAGAACAGTCATCCCAACATAAAGGGAGCTAACATAACCAACCAAGAGA
TCTTCTTGTAGCTGTGGGGATTCACCATCTAAATGATGCCAGAGCAGAACAGCTCATACCAAAACCA
ACACCATTAATTCCTGGAGCATCAACACTAAAGGAGATGGTCTTGGCAAAATATGGTACTAGATCCA
AGTAGAACAGGGCAAGTGGAAAGATGGTTCTTGGCAAAATTAAAGCGGAATGATGCCATAAAATT
CGAGAGTAATGGAAATTCTATGGTCCAGAAATGATGCATAACAAATTGTCAAGRAAGGGGACTCGCAATT
ATGAAAGTCAATTGGATATGGTACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAACTGGGGCATAAAACTCTA
GTATGCCATTCCACACATACACCCCTCTCACAACTGGGGATGCCCAAATATGTYGAATCAACAGATT
AGTCCTTCTGCAGTGCCTAGCAAAATCCCCTAAAGAGATAGAAGAGAAAAGAGGAGCTATTGG
GTCATAGCAGTTTATAGGGGGAGATGCCAGGAAGTGTGATGGTTATGGGTACCACTAGCA
ATGACCCAGGGACTGTACCTCCATCACAGAACATCCACTAAAGGCAATAGTGTGACTCACCATAA
GGTCAACTCGATATTGACAAATGAACACTCAGTTGGCCCTTGGAAAGGGAAATTAACTTACCTAGAA
AGGGAGGATGAAAATTAAACAGAAGATGGAGACGGGATTCTAGATGTCTGGACTTAAATGCTGAC
TCTGGTTCTCAAGGAAATGAGAGAACCTAGACTTTCATGATTCATGTCAAGAACCTTACACAA
GGTCCGACTACAGCTTGGGATATGCACAGGAGCTGGTAATGGTTTCTGGAGTTATCACAATGT
GATAATGATGTATGGAAAGTGGAAAAACAGGGACGTATGACTACCCCGCATTTAGCAAGAACGCAAGAC
TAACACAGGAGGAAATGAGGATTAATGGGAAATTCAGTGGACTTACATGGGAACTTACCAAAACTGTCAATT
AACAGTGGCTGAGTCTCTGGATCATGGTCAAGGAGCTGGTAATGGTTTCTGGAGTTATCACAATGT
TCTGTTACATGAGGAAATTGCTTAA

【図10E】

Fig. 10E

H6型(配列番号:16)

【図10F】

Fig. 10F

H8型(配列番号:17)

>gi|221317|dbJ|D90304.1|FLAHAH8N4 インフルエンザAウイルス
(A/シチメンチョウ/オントリオ/6118/68(H8N4))のヘマグルーチニン前駆体遺伝子
完全コード

ATGGAAAATTCATCGCAATAGCAACCTTGGCAGCACAAATGCATACGATAGGATATGCATTGGTACCC
AACTCAAACACTCCACAGACACAGTGAACTCTCATAGAACAGAATGTACCGACTCACCACAAATGGAA
GCTCGTGGAAACAGAGAAACATCCGGTTTATTGTAACTGTATTGGTGCCTCCATTTGGAACTCGGAGAC
TGCAGATTGAGGCGTAGTAACTATGGAAACCCCAGTGTGACCATCCTGAAGGAACTGGTGGTCTCAT
ACATAGTGGAGGAGGCCAGCGCACAGGAGGTGGTATCCTCTGGATCTGGAAATACTGAGAAGACT
GAGGTTTGTCTCTCCAGTCGTCATCTAACAGAAATAAGGACTATTGGTACTATTCTGGTGGAAAT
ACTAGATCTGGAAACAGGTAACAGCATGCAATGCATCACAGGGCCCAATCTCTTATAGGACCATCAATT
GGTTGACCAAAAAGGAAACAGACACTTATGACTTCATGAAGGAGCTTATGTTAATATGAAGATGGAGA
CATCATTTCTTATGGGGATCTCATCATCGCCGGACACAAAGGAGCAGAACACTATATAAAATGCA
AACACTTCTTGTGGTGTACTAACATATAACAGGCTTCACAAACATATAATGGTCCAGACCAAA
TAGTAAAGGGAGCACGAAGGGAGGTGGTACTATTTGGGGCATCTGAAAGGAGGAGACTCTGGAGAT
CAGGACCAACCGGAAATTAACTGGCACCTGGTAACTTGTGGCCATCTGAAAGGAGGAGACTCTGGAGAT
ATTCAAATGAGGATATACCCATCGGGACTGTAAACAAAAATGTCAACAAATATGGGGAGCACTAAAT
GCAGCAACCCCTTCTAGAATGCAAGTAGGGCATACATGGGAAATGTCCCAAATATGTGAAGAGGGCA
CTTGGCAGCTTGCAGTTGGCTTGGAAATACGGCTTCTGTGAACCCAGGAGCTTGGAGGACATTGCT
GGTTTCAATTGAGGGAGGTGCTGGAAATGATGTAATGGGGTGTATGGATTTCATCACAGCAATTAGGG
GAACAGGAAATGGCAGCTGGCAGAACAAACAGGACCTCGATAAGATCCACAACTTAAAGTCAACAA
TATGTTGACAGACATGAAACGGAGTTGTGAAGTTGTAACTGAGTTCTGTCAAGTTGGAAATAAGA
AACATGATAAACGAAATAATGAGTGGCAAAATTGAGATCTTGGCTTCAATGGCCTTAACTGGAGCT
TCITAGAGAACCGAAAACCTAGACGCAACATGATTCCTGTCAAAACCTTTTGTAGAAGTAAAGA
GAGACTGTGAGGAACTTACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TGTATGGAAACTTAAAGAACGGAACTTACGATCATAGGAAATATGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GCAAGATAATGGAGTAAACAGAAGAACACCAACTTACAAATAATTCTTACGATTTACAGTACAGTGG
GGCAACTTCTGGCTTGGCAACCTCTGTGCTGGAGGTTTAACTCTGGCAATGCAAAATGGATCTGTGAG
TGCAGATTCTCTTGTGAG

【図10G】

Fig. 10G

H9亚型(配列番号:18)

>BPH954830_gb:AM0872181 記号:HA|名称:ヘマグルチニン|生物:インフルエンザ
Aウイルス/A/ヒンボガ/ミラン/G54/03|セグメント:4|亜型:H9宿主:トリ
ATGGAAACAGTACTAATGACTATACTACTAGTGACCAAGCAGAACATGCAAATACTGTGATCG
GCCACAGTCACAAACATCCACAGAACATGGACAGCGTACAGAACACATTGTTCTGTGACATCG
CAAAGAGTTCCTCCACAGCACAACTGAGACAGTGTTGGACACAAATCTGGACACATCCCCTAACTTAA
GACACGTGCACTATTGAGGACTGATCATGGTAACTCCCTTGTGACTTGCTGTTGGGAGGAAGAAA
GGTCTCATCTGTCGAAAGGTATCAGCTGTAAATGGAACTGTGTTACCCCTGGGAATGTAGAGAACCTAGA
GGAAACTCAGGACATTTTGTACTGGCTAGTCTCCACGGAAATCCTAACTCCACAGCACAACTGTG
AATGTGACTTACATGGAAACAGAACATGGTCAAGTATCCTACAGGAGTATGAGATGGTCACTGG
AAAAAAAGGGCTTCATCTGGTCAAGGAGTCAATACAAATAATAGGGAAAGGAGATCTTTCG
GTGGGGCATCATCACCCCCCAGTGAAGCTGCACGACAAATTGATCACAAACAGCCGACACRACA
AGCGTGCACAAAGAACAGTAAATAGGTATCTAACCGATGGTAGGGCAAGGCCCTTGTCAATGGT
TCGAGGGAAAGATTAATTATTTATGGTCTGGTCAAAACAGGCCAGACACTGGAGTAAGATCCAATGG
GAATCTAACTGGTCTGGTCAATGGACCATTCCTGGAGGGAGGCCATGGAGAACTCTGGAGACTGAT
TTAAAAGTACTATTTGGCTAGTCSATCTGCACTGGTCAAGTAAAGGGCCTTAAACAGTACATTCGGCTCC
ACAAATCTGCAATTAATGCTTGGAAAGTCTGCAAAATATGTTAGAGTAAAGTCATCAACTGGCGAT
AGGGTTGGAGAACGGTCTGCTAGATCAAGTGGAGACTATTGGCAGGACATCTGGTGAATTCTAGAGGA
GGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGTTGGTATGGTTCTGGCATTCAGCATCAATGATCAAGGGTTGGTATTCGCG
CAGATGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATGAGAAATACARCCAAGGGTGAATAATAGTCGACAAAT
GAACAAACAAATGTAATAATTGATCATCTGAACTAGCTAGGGTGAATAATAGTCGAGGTGCTAGTACTTGT
AGAGTATGATGGCAGAACATACAGACATGGCATATAATGCAAGGTTGGTGAATAATAGTCGACAAAT
AACACTCTGGAGGAGTCAAGGCAATTGAGA
AACACTCTGGAGGAGTCAAGGCAATTGAGA

【図10H】

Fig. 10H

H10型(配列番号:19)

>gi|3243651gb|M21647.1|FLAM84HA インフルエンザAウイルス
(A/ニワトリ/ドイツ/N/1949(H10N7))ヘマグルチニン前駆体.遺伝子.完全コード

【図10】

Fig. 10I

H11亞型(配列番号:20)

>gi|221307|dbJ|D90306.1|FLAHAH11N インフルエンザAウイルス(A/アヒル/イギリス/56(H11N6))のヘマグルチニン前駆体遺伝子.完全コード

ATGGGAAACACTCTATTGGCACTTTCCTTGTGAAAGCAGATGACTTGTGATTGAGGTTAT
TAAGCAACACTGACAGAACAGAATGGCACATAATGGAGAACATGTGCGGTTCTAGCTCAGGGAT
ACTGGTGGAGCACAAACACTGGGATCATCTTGTCATCAATGGGAAACCAAACCTGGAGGTTCTGGAGAT
TGTTCTATGGTGGAGGTTGGATTAATGGGAAACCAAACCTGGTGTGAACTTATGGGAAACGACTTGTGCT
ACATTTGGRAAAACCCATCCACAAATGGGATCTGTGACCCAGGAACCTTATGGAGGAGTGGAGAAGRACT
AAGACGTAATGAACTTGGAGGTTGGATTAATGGGAAACCAAATCTGGTGTGAACTTATGGGAAACGACTTGTGCT
GTATTTACAGGAGTAGGGATTAACCTGGCTCGATGCAAAATTCGGGGGTTCTATTTCTTCTTCTGGGAAACATGG
TGATTTGCTGATACACCACTGGAGGTTGGATTAATGGGAAACCAAATCTGGGATTAACCTGGGAAACGACTTGTGCT
TGATCTAGGTTGGGGATCATCATCTCGTCACTAGCGACATCACTGGAGGTTCTATGGGAAACGACTTGTGCT
AGCTCTTAATGGAGCTGGTGTGACCCAGGACCTAACACAGGAATCTTCCAGAACACTTGGGAAACGACTTGTGCT
GAGCTTGACGACGGCCGGAGGATGATCATCTTGGAAGAATGTGGAGAACCTGGGAAACGACTTGTGCT
CGAATCTATGGGGCTTCTGAGCTCTAGATATGCTTTGAGATTTCTGTGTTGGAAATGGGAACCTGTGCT
TTCAGGAGCAGTACGAACTTGGGATCATCTGGTCTACCAAAACGAGGAAATAGGAGGAAATTAATGGGAAACGACTTGTGCT
CAAAACATCTTCAACATGGTACAGAACACTTGGGGGATCTGGCCCAAGTATGGTGAATGCTTCAACATGG
AAAGCTTGGCAACAGGACTTGGGAACTTGGGAGGCTTCTGGGAAATCTGGGAAACGACTTGTGCT
TTCAAGAGGGGGATGGCCGAGCTGATCATGGTGTGATCTGGGTCACACAGGGACAGGAGGAACTTGGGAAACGACTTGTGCT
CAGGGCATTCAGGGGGACAGGACTTGGGAGGCTTCTGGGAAATCTGGGAAACGACTTGTGCT
CAGGCACTTGGGGGGACAGGACTTGGGAGGCTTCTGGGAAATCTGGGAAACGACTTGTGCT
CTGGGAGGATGAACTAACAACTTGGGAGGCTTCTGGGAAACGAGGAAATCTGGGAAACGACTTGTGCT
CAATTTAACAAACAGCTGGATGATCTGTGTTGGACATCTGTGCTATATAGGACAGCTTCTGTGTTGG
TTGAAAATGGAGAACACTGGGACCTGGCATGACCAAATGTGCAAGGAACTTCTGGGAAACGACTTGTGCT
GCTTAAAGGAGCAATGCCAAAGATGGAGGGGGACAGGCTTCTACCTTTTACAGATGGCAAAATGGG
ATTGAGCAGGATGAAACGGGACATATGATCATTAAGAAGGATTCGGGAGGAGGAACTTAAATCATTCAGGG
AGGATTAAGGGGGGAAACATGGTCTGGGGAGGATGTGAAATTAATCATTCAGGGGGCTGATGAGG
AAGCAGCTGTGTTATGGGAGCAGCTCATCATGGGGTTCTGTTGGGGCAAGCAGTAATGGATCATGAG
TGTCAGGTTCTGGGAACTTGGGAGGCTTCTGGGAAACGACTTGTGCT

【 図 1 0 J 】

Fig. 10J

H12型(配列番号:21)

>gi|221309|dbj|D90307.|I|FLAHAH12N インフルエンザAウイルス(A/アヒル/アルバータ/60/76/(H12N1))のヘマグロビン前駆体遺伝子、完全コード
ATGGAAAATTCTACATTGAGTACTGCTTGGCAGCAAGCTTGCATATGACAATTGGATTTGGAT
ACCAACAAACACAACTGGACTAACAGGTCACACACATAACTGACAAACAAAATTCGGTGTGCGCAGTGGGA
AGAACTTGATCATCTGGTGGATTGATCCGATCTGTGTTGACAGGAATAGGATCACACTAGTGTCTGAT
GACTGTTCTTAGAGGGTCTAACTCCTAGGCAATCCAAATGTGATCTTATTGTAATGGCAGGGATGGT
CATACATAGTAGAGGSCCAAAAGGAGTGGAGGAGTGTCTATCCAGGGTCAATTGAAAACCRGGAAGA
GCTAAGACTCTCTGTTTCTTCATCAA AAAATATGAAAGAGTGTGAAAGTGTGTTGATTTCACCAAATGGAT
GTCAACATACATGGGACACCAGAACGGCTCAATACATCACCAACAGGCTCATTCTATAGGRCATGA
GATGGTGACCTTAAATCACGACAAATTCCAGTCTAACACAGATGACTGACAGAACCCAGAGATTCAGA
CATTTGTTATTCACTGGSCCATTCACCCACCAACATCTGATGACAATGAACTTAAATTAAACCCATCT
GACTCTCTCTTCACTGACACCGCTGAAATCAATGAGGCTCTAACGGCTTAATATAGGGCAACAGCTAAC
TCGTGAGAGGACAAACAGGGAAATGGATTACTACTGGCTGTCTTAAACCTGGACAAACAGCTAAC
ACAAACCAATGTAATCTTATGACCTGATATGGTCACTTAATCACAGGGAAATCAGTGGCAGGATA
CTCAAGAAATAATTGCCCCATGGACAGTGTGACTGAATGTCATTGAAAGGGGTGTAATGACCAA
GCAACACCTTCCAGACACTAGAACCTATATTGGGAAATGGCCCAAATACATACCATCAGGGAGTTT
AAAAATTGGCAATAGGGCTCAGGAATTTGGCTCCACAGTCAAGTGTGGGGCTCTTGGAGCAATTGCAAGT
TTCATAGAGGGCGGGTGGCCAGGGCTAGTGGCTTGGTGGCTCAGGATTCTGGCATTCAAAATGGGGGG
CAGGGCTAGTCGAGACAGAGCACGCCAACAGGGCAATAGAACATAATGCAACAAATCACAATGT
CATCGCAAAATGAATTAACAAATTGAGTGTGAACTCATGAGTGTGTTTCAAGGAGGAAAGCAGAAATTAAC
ATGATTAACTTCCAAATTGATGATCAGATAACTGACATATGGCCTACATACTGTCATTGCTTGTCTTAA
TGGAAAATCAGAGACAACTAGATGAGCAGTGCCTAATGTAAGGAATCTACATGATCCTGGTCAAGAGT
CTTGAGGGAAATGCAATTGACACAGGGAGCAGGCCTGCTTGGAGATTTCATATAATGTCACAAATGT
ATGGACACGAGTAGAACAGGGCAGATCACAACTCAGAACAAAGATATGAGGAAGAARGCAGAAATCAG
AAGTCTAATGGTGTGAAACTTGGAGAATCTACATATAAAATCTGAGCATCTACAGCAGTGTGCTC
AAAGCTTGTCTACTGGCTCATGATTATGGGGTTTCTATTTCTGGGTGTCAAAATGGAAATGTTGCTTGT
ACTTCTCTGTTTAA

【図10K】

Fig. 10K

H13型(配列番号:22)

-gi-212311_01.flah[909813] インフルエンザA/ワイルス(ア/カモメ/メリーランド/704/77[H1N3])のヘマグリニン前駆体遺伝子.完全コード ATGGCTCTAAATGTCATTGCAACTTGCACACTTAACTGTATGTGTCATGCAGCAGAACATATCGCTGG GGTATTCGACGCCAACTTCACTGAAAGGGTCGACCAACCTCTGAAAATGGGTCCTCAGCTCACCGCTC CATTGATCTGTTGAGACAACACCACAGGAACTACTCTCTCAATGGAGTCAGTCCTGAGTCATTG GGGATTCGAGCTTGAGGGTAGTTGAGAAAACCCAGCTGACCGAACACTTGGGATCAGAGGAT GGTCTACCTGATTTGAGGACCCCCGGCCCCCTCATGGCTTTCTACCTCTGGAAATTAAACACATGG TGAACTCAGACACTTGTTCAGTGGAACTCAGGTCATCTAGTAGAACGGAAATTGATCCACCTACCTCTGG GGGGAAGTACTTGCCTGACAGGATAACACCTCTGCTTCAGAGATAACACGGGAACTCACCTTCTATCGAAATT TAGTTCTGTTTATAAAGGAACTACTAGATATCTCTGTTAGTACAGTACCTACARACATACACGGGAAAG AGTGTGTTTGTATTTGGGAAATCATCTACCTGGCTCTGCTGTAGAGAACAGAAGACTCTGTATGCTCAT AGTGTCTCATACACACTGGCTTCCACCAAGCTTGGAGCAGGAAATAATAACTAGAAACGGGAGTCSCAC CTGGCTATAATGGACAGAGGAGCTGGATGAAAATTATTGGCTTCTGTACATCCAGGGAGATGATTAC TTTCGAGACTATCTGGTGGATTTTGTAGGCCAAGATACTGGTAGATACTTGTAGGAACTATCTGGAAAGG ATTTCCTCAGAGCTGCTCATCAAGATCTGAGGCTACACCAAGTGGCAGACTTGGGTTGGGAGATAACCA CAAACAGAACGCTTCACAAACATCGTAAGAATGCTTCTGGCTGTGCGAACATAGTAACTGGCCA ACCTCAAGCTGCACTGGACTCAGAAATGTCGCACTGTTGGAGCTTATCTGGCTATAGACGATTGGGAGCAATTGCA GGGTTCTAGAAGGAGGCTGGCCAGGTTTAACTAATGGTTGGCTACGGTTTCTGACATCAAAATGAAACAGG GAACAGGAATGCTGCAAGAACAGAATCAACACAGAAAGCTATAGCAGATAACACAAAAATAATAA CATTATTGTATAAAATGAGGAACTATGTTGCAATTAGGGGTTGAAATTCTAAGGTTGAGAACGGCTATA AACATGCTTGCAGCAGAATGATGATGTCGGTGCAGGGACATTGGCTACATCAACGGCAAATTCTTGTAT TGCTGGAAAATGATAAAACTTTAGATATGCTATGCTATGTCATGTCATGTCATGAAATTCTACAGCAGTACAGGAG AAGAATTGAGAACGCTGCAAGAACAGGAAATGGCTTTGGACTCTTCATATAATGCAATGACTGCTC TGCATGGAAACTATAGAAAGTGGAACGCTGACCTGACCAACTGAGATATGCGAGGGAGTCAAGGTTAAAGGGC AAGAAATGCTGGGATCAGACTCAGAACAGGCTTCAAGGCAATTCTACAGTGGCTAGTGGGAAATTGCGA CTTGCAAGTAGTGTGCTAGTAGTGGAGCTCATACTCTCTTCTCATGTTGGCCCTGTTAGTGGGAAATTGCGA CTTGCAAGTAGTGTGCTAGTAGTGGAGCTCATACTCTCTTCTCATGTTGGCCCTGTTAGTGGGAAATTGCGA

【図10L】

Fig. 10L

H14型(配列番号:23)
-gt;1|324045|gb|M35997_1|PLAH1424 インフルエンザA/マガモ/グルジエ/263/82
ヘマグロブチニンH14型遺伝子
AGCAAGAACGAGGGAAATGATGCCATCATAATTGTTGCACITGGCTCTGAGGCCACTGTATTCTCA
GATCACAAATGGGACACAGGAAACCCCATATTATGCTTGGGGCATCATGAGTGGAAAACGGCACATTG
GTTAAAACACTAACAGACAATCACGTAGAAGTTGTGCAGCTAAAGAATTAGTGTGAGCAGAACACATG
ATGAACTGTGCCAACGGCCCTTGAGCTTGTGCAGGGCAAGACTGCCACTCATCAATGGTCATTGGG
GAGTCGAGCTGTGACCGTTTGAGCACCACTTGGGTGTTCTATTGAAAGGGCCACTSGCATAGAC
ACATGTTATCCATGCGACGTTCCAGATTACCGAGCTCACAGGACATCTAGAACGAGTGGGAGTTGG
AGTCATGCGCCAAACATTCTACCTGGGAAATGGTGTCAAAGTTCAGGATCAAGCAGTGTGTTGGAGGG
CGGTCGCAAAACAGCTTCTCCGGACTAAATGGTCAACCAAAACAAATGGGAAACTATGGACCTATT
AAAGTCACTAAAGAAAATACGGGCTTATGTCAGGCTTCTATTCCTGGGGAGTCATCCACCATCAAGGG
ATAATGAGCAACGGGATCTCACAGGTGCAACAGGGAGACTACAGTAATCTACCCCTCGGAAACAA
CAGTATTGTCCTAAATAGGAAGTAGACCGGAGGTAAAGGAATCAGAGCGGCCAGGATAAGCATCTACTGG
ACCCCTAGTAACCCAGGGACTCCATCTTCAACAGTATTGGGAAATTGTGACCAAGAGGCCACT
ACAAAATAAGCAAACTTACTAACGACACTGCTTAAAGTGCACAAAGGATTTGGGTCTGACCAAGCCC
TTGCTTAACGTATAAAGGGTGTCACTTAAAGGCTTCTGATTTGCAAGTATGCAAGGATTTCTATAGGA
ATACGGCCAAATNTSTAACAGGGTGTCACTTAAAGGCTTCTGATTTGCAAGTATGCAACATGGC
AGGCAAAAGGGCTTATTTGGGCAATTGCTGGATTCTATTGAAATGGTTGGCAAGGCCATTGTTGGG
GTATGGGATTCTGGGCCAAATGCTGGAAAGCAGGACTCTGCTCAAGCTGAGTCACACTCAGGCC
ATTGATCAGATAATGGCAAGCTGAAACGATTGATAGAGAAGACAAATGAAATACCAATGAGAAA
AGGAATTGCAACAGGTGGAAGGAGAAATCACAGCTTGGAGAGTCTGGTGGAGACAAATGAGTGT
GTGGTCTACAACTCTGAAATTGCTAGTACTAGACAGAATCAGCACACAAATAGATGTCACAGACTCCGAA
ATGAAACAGCTTTTGTAAAGGTAAAGGAGCCTAAAGGAGAACTCAGAGATCAAGGCAACGGTTGT
TGGAGATATTCTACAGTGGACAACTTGTAGAAGGAGCTTAAAGGAGATCAAGGCAACACT
CTACAGGGGTAGACGCCATCAACATGCAAAATGAACTTAAATCTGTCAGTCTTGGAGATGGGATCAAGGC
ATAATCTCTGTTGTTCTTCTTCACTGTCAGTCTTGGTCTCTGGCAGTGTNTCTGGGATTCTTAT
GGGCTTGTCACAAACGGGAAATTCGGATGCCAACTTGTATATAAGGAAAACACCTTGTGTTCTACTC

【图10M】

Fig. 10M

H15亞型(配列番号:24)
>g!1226068|gb!L43916.1|[FLAHEMAC インフルエンザA/アヒル/オーストラリア/341/
83(H15N8)ヘマグルテニンmRNA_完全コード
AGCAAAAGCAGGGATACAAATGACACTCAAATCATCGTCATTCTAGTCTCGGACTGTGATGGTA
GATCTGAAGAATTGTCCTCGGCACCATCCCGTAGCAAAATGGGACAAGTCACACACTAACTAGAGAA
AGGAGTGGGACTGGTCACTGGCAACCGGAGACAGTGGGAGTACAGGAAATAAATAGTGCGAACAGGG
AAGAAAAGCGGTGGAACCTGGGAACTCTGGGAAACTGGGAACTATCATCTGGGCTCCTCAACAGTGACTCTC
ATCTTAAATCAAAGCTGATCTGATAATAAGAGAAATTCTAAGTGGACATCTGTTAACAGGGAAATT
CATAATGAGGAAAGCAGTGGACAAATAATCAGAGAATTCTGGGAAATTGACAAGGCCATGGGATT
AGATATTCAAGGAAATAAACAGAGCGGGCAACAGTGGCTGTAAGAGAACAGTGTCTCTTCTACTCAG
AAATGAAATGGCTTTATCCAGCAAGGCTAACAGGTTTCCCAACACTGAATCAGACATACAGGAAACAA
CAAGAAAAGACAGGCCCTAAATGGGAGTACATCTAACAGTCTGGTACGAAATAAGCTTCTGGTACGAA
TATGGGACTGGGAAACAGTGTAAACAGTGGAGGCTAACAAACATCAGGAACTCAGGCTCAG
GGGACAGGCSAACATGTAATGGCTACGGCGGGAGTACGAACTTCAATGGATGTATGGGACAGGGCAG
TACAGTCACCTTACCTTCATGTGTCATTCAAGCCCAGATAGAGGCCACCTTCTCGGCTTAATGGC
CCATGGGGAGTTGGTACATGGGAGTCACTGGGAAATCACAGGTGTGATGCAACAAATTGTGATCATGTTG
AAGGGGAATGCTTCAACTGGGAACTAAACAGCCCTTGGCAATTCAAACCTGCAATGAGT
TGTGGAGAAGGTCGGGAGATATGTAAGGAACTCAAGCTCGCGCTGGCCTAGAATGAAATGTAACCA
GAGAAAATACACTAGGGGAGTCTCGGTCAATTGAGGAACTCATCGAGAAATGATGGGAAGGACTCA
TTGATGGATGGTATGCTTCTAGGCATCAAAATGCAAGGGCAGGCGAACNGCTGCTGACTAACAGGATAC
TCAGGGCTGCAATTGAGGAACTAACAGGAACTTATGATTAATGAAACAAAACACGTTGAG
CTCATGAGACATGAGTTCATGAGGTGGAGCAGCAGATAGGCAATGTAATAAACTGGCAACAGGACTCTT
TGACTGAGATCTGTCATCAATGTCGAATTCTAGTAGCAATGGGAAATCAGCATAACATTGACCTTGC
AGATTCTGAAATGACAACAACTCTATGAGGAGTGTGAGAAGRCAGCTAACGGGAGATGCGGAGGAGTGG
ACTGGGATGTTTGGATTTCTACCGGAGTGTGAGCAGTCAGTGTATGGAGAGCATCGAAATAATACTTACA
ATCACACTGAAATCTGCAAGGAGGCCCTAACAGAACTGGGAGTACATGTCATCTGGCTTACAGGAA
CTTCAAGAGTGTGAACTATGGTCTGGGGCATCTGTGAGTGTGCTTACAGGAACTTCTGATCTGGT
CTTAAATTCTAGTGTGGAAAAACGGGAACTCTGGGCTGCACTATCTGTTATAATAATTGGAAAACACC
CTTGTGTTCTACT

【図10N】

Fig. 10N

【図100】

Fig. 100

インフルエンザB(配列番号:26)
>gi|2521575|gb|K0423.1|FLBHAZO インフルエンザB/リー/40.ヘマグルチニン(セグメント4).
完全セグメント
AGCCAGGACGGCTGCATTTCTAATATCCCAAAATGAGGCCAATTGTACTACTCATGGTAGAACAT
CCAACTGGCAGATGAACTCGCACTGGGATAACATCGTCAACCTCACCTCATGGTTAAACCTGCACATCA
AGGGGAAGTCATGTGACTGTGATACCACAAACACCTACCAAACTCATTCATTGCAAATCTC
AAAGAACACACAGGACGAAACATGGCCAAACATGTTACTCGCACAGCTTGACGCTGGCCCTAG
GACAGGAAACAAATGGGACGACACCCCCATGCCGAAAGACTCTCATTCATCTGAGAACCTACGGCTAC
ATCTGATGCTCTCTCATTAATGCAGCAGCAGAAACAAAATGCCAACACTTACATCTCTCAGAAGGAAAT
GAAACATCAGGGTATCACCAGAACTTGTATCAATCAGCAGGCCGACGGGACCTAACAGGTTG
GGACCTGAGGGTCTGGGCAACCTGGTCAATACACACATGGCCTGGGTTATCCC
AAAAAGAACACACAGCACGACAAATTCAGGACTTACAGTAAAGGATACCATCTATGGTCAAGGGGTTAC
GGACCAAACTTGGGTTCTGGGCAACCTGGTCAATACACACATGGCCTGGGTTATCCC
AAATCCTAAAGGTCTACCTCATCAGGAACTGGAGTAACCCAGCATTTGTTCTGTTGCTCC
AAATCACACRGAGAACGGAACTGGTCAAAACAGGCGCAGATTTGTTGTTGTTACATGGTACAANAAACCT
GGAAAGAACGACGAACTTGTATCAAGGGCTTATTTGCTCAAAAGGTGGTGGCCAAAGTGGCA
GGAGCAAGGTAAATAAGGGCTTCTGGGTTATTTGCTGAGGATCTGGCTCCAGAACAGGTGG
ATTAAAGAACACAGAACCTTACACTACAGGAGGACATGCCAACGGCTCAATGGAGATTCCCAAAATTCGGT
AAAAACCCCCCTGAGGACTGGCCCTATGGAAACAAATTAATGAGCCGGCTGCAAAAGATTATGGAGG
GACCAAACTTGGGTTCTGGGCAACCTGGTCAATACACACATGGCCTGGGTTATCCC
ATCTCAGGAGGACATGGAGGACTGGCAGCTGGCAGACGCCATTAGACTACAGAAGGATACAC
AAACAAAGTCATCTACATTAACTGAGGCTGAGACTAAACACCTTCAGAGCTAAACGGGACATTAAGTGG
AGCTTCAGCAGCAAAACTTCAGCTGAGCAGAACAGGATGCTATGAGCTGATCAAAACTGCTCA
AAATGAGCTTGTGACTCTGGTCTTCCACAGGAGGATTAACATGAGGATGAGCATCTTCTGGACTT
GAAGGAAACAACTGGGAAACTTGTGGGCCCCCTGCTGAGGAGGATGTTGGCTGTTGGAAACCAAC
AAACAACTGCAACGACTGGCTGAGCAGGACTGACTCTGGCAACCTTTAATGGAGGAGATTTTCTTCTCC
CACTTGTGATCAACTGCTGAGGACTGGCTGATCTTAAATGAGTGTGCTGATGAACTCATCTACTG
CTCTACTACTGCTGCTGAGGACTGGCTGATCTTAAATGAGTGTGCTGATGAACTCATCTACTG
CTCTACTGAGGACTGGCTGAGGAGGATTAACGGCTGTTGGTCTTACATCTGCTACATCT
AGTGGCTCTTCTGGCTGAGGACTGGCTGAGGAGGATTAACGGCTGTTGGTCTTACATCT
AGTGGCTCTTCTGGCTGAGGACTGGCTGAGGAGGATTAACGGCTGTTGGTCTTACATCT

【図10P】

Fig. 10P

インフルエンザC(配列番号:27)

>gi|3253171gb|M17868.1|FLCHAO インフルエンザC/ヨハネスブルグ/66/
ヘマグルチニンエヌテラーゼRNA(セグメント4)、完全コード
AGCAGAAGCAGGGGTTAAATATGTTTCTCATTAACCTTGTTGGGCTCACAGAGCTGAAAAAA
TAAGAGATGCCCTCAAAACGAAAGTAGTCAGACTAGTTCTAGCCACACAATGGCTCGAGGAAATTGTA
TGCACAGAAGAAAAGAATGTTGAAGCCAAAAGCTGAGGCTCTGTCTGAATCAGAAT
ACATGGATTCGGCTTGGGATTCAGAGACTGACAAACGAAATTCACTGTTTCTAGTCGCTGATGTTT
CAGAGAGGTAGACCTACCTTACCAAGAGATGGAAATAAACATTGTTTATGAAGGAGTTAACGGAGT
CCACATGCTGCTATAATTGTTACAGAAAATGGACTGATCAAACTGAACTTACCTTACAGT
GACTGCTGGGACTCAGGAAATTGCAACACAGCTCTTAAJAACTCAGCATGACACAAAGAACATT
ATGAATGGCTTCAACATCACATGCTGGGATTCGCTTGGCACAACAACTATTCCTTACAGT
AGGCTTCAGAAAACAAATCTGCTGGGCTTCTGCTATTICATCTAGTATGAGTAAAGAAGTGTACAATAAAG
AGGATGTCACAACTGATCTGCTGGGAAACTTCAACTTGGATATTGAGTAAAGAAGTGTACAATAAAG
GTATCACCTTACACAGGAAATTCTGGGACACCCAAACATGCAATGACATGCTCAGCTGAAACCTG
GAAGATCTAGTAAAGGAAACTTCTGGGAAACGGGAAAGGAGATCTGGGAAAGTGTGTTGGACATGAA
AGGAAAGGAGGACTGACTCTGCTGCAATGCAATGAGCTGACTCTGAGCTGGATGGAT
CAAGCTTGGGACTCAGGAGCTGGGATGGCTGAGGAGCTGGGATGGCTGAGGAGCTGGGATGGAT
ATCACCATGGGAGTCAAAAGAATGAGGGAGTTGCTGCTGGGACTATGAGGCTGATATCACA
ATCAGGGTGGGTGATGAAACCAGTCCTTACGGAGAAATACCTCTCTCCCAAATTGGAGATGC
CTTTCAGGATGGGAAAGGAAATCCCTGAGGAGGAAATCTGGGAAAGTGTGAACTTGGGAAACCG
ATACACTGTAAACAAACCTAGAGGAAATTCTGGGAAATCTGGGAAAGTGTGAACTTGGGAAACCG
TGAATGGTGGGAAAGGAAATCTGGGAAAGTGTGAACTTGGGAAAGTGTGAACTTGGGAAACCG
AAAGAATCAGTGAAGGTTGGAAATTTGGAAATGACAATGACAATTTGGAAATTTGGAAATTTGGAAAT
TGGCAATGAAAGAAACTAATGACAGAATCTGAGTGGGAAAGGCAATCAGAGATCTAACCTTGAAGAAT
TGAAGATGGCAAGATCTGAAAGCTTATGGGAAATATGGGAAATATGGGAAATATGGGAAATATGGGAAAT
AGCATAGGATACAGGAATCTTATGGGAAACTAGCTTCTGAGAAATJACAAATGAGCAGGAGATCTGAG
TTGAAGTCAAGGAAACTGCACTTGTCAACCAATTCCTCCCTCTGACACAAAATGATCTGCAATCAGA
CTTTCAGTGGGAAAGCAGCTGGGCTAGCAAAACTGCTACTATTTCTGAGCAGCTTGGTGTGATCT
CTGGGATGCCCATTCGAGAACTAAATGATTTGAGACAAATTGAGAATATGGGAAATATGGTGTGGTCAATAT
TTGTACAGTTTATAAAAACAAAAACCCCTTGCTACTGCT

【図10Q】

Fig. 10Q

配列番号:29

5'-AGTTCCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTC-3'

【図10R】

Fig. 10R

配列番号:30

5'-AATAGAGCTCCATTTCTCTCAAGATGATTAATTAAATTAGTC-3

【図10S】

Fig. 10S

配列番号:31

5'-AATAGAGCTCGTTAAATGCTCTCGTCTCTTATAATATGG-3'

【図10T】

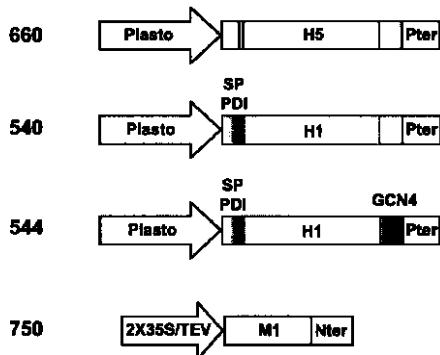
Fig. 10T

配列番号:32

5'-TTACGAATTCTCTTCTTAATTGGTGTACTATCATTATCAAAGGGGA-3'

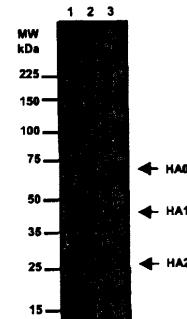
【図11】

Fig. 11



【図12】

Fig. 12

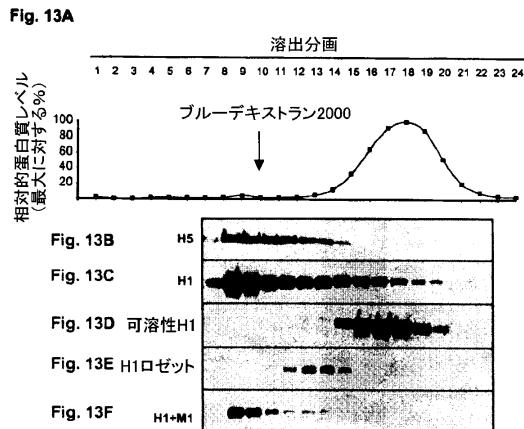


1-市販のH5(A/ベトナム/1203/2004)(750ng)

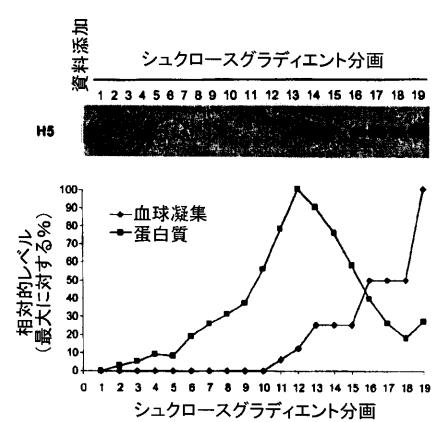
2-擬似処理した葉のタンパク抽出物(37.5 μg)

3-R660浸透植物の葉のタンパク抽出物(37.5 μg)

【図13】



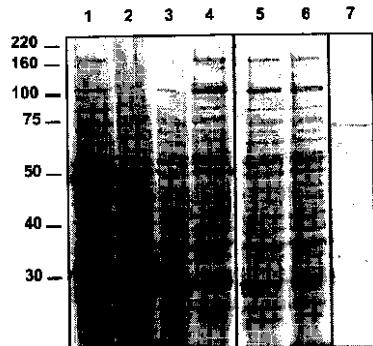
【図14A】



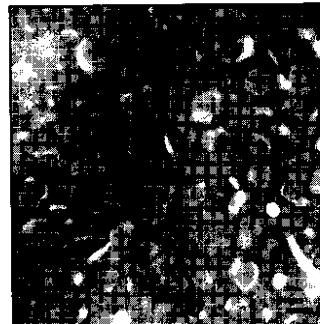
【図14B】



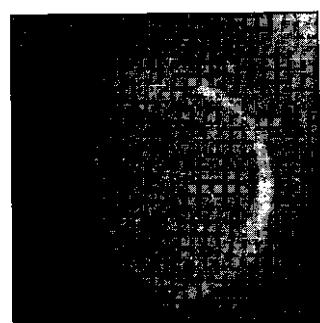
【図15A】



【図15B】

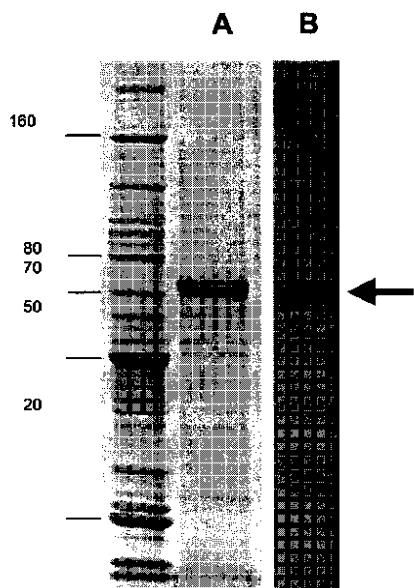


【図15C】



【図15D】

Fig. 15D



【図16】

Fig. 16

配列番号:33

ATGAAAGCAAAACTACTGGTCTTGTATGTACATTACAGCTACATATGCAGA
CACAAATATGTATAGGCTTACCATGCCAACACTCAACCGACACTGTGACACAG
TACTTGAGAAGAATGTGACAGTGCACACTCTGTCACCTACTTGAGGAGACAGT
CACAAATGGAAAATCTATGTCTACTAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGTAA
TTGAGCGGTGCGGAGATCTTAGGAAACCCAGAATGCCAATTACTGATT
CCAAGGAATCATGGTCTTACATTGTGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAA
TGTTACCCAGGGTATTGGCGACTATGAGGAACGTGAGGGAGCAATGAGTC
AGTATCTTCAATTGGAGAATTCGAATATTCCCCAAAGGAAGCTCATGGCCCA
ACCACACCCGTAACCGGAGATCAGCATCTGCAATTGGAAATGGGAA
TTTTACAGAAATTGCTATGGCTGACGGGAAGATGGTTGACCCAACT
GAGCAAGTCTTGTAAACAAACAAAGGAAAGAAGTCTTGTACTATGGGTG
TTCATCACCCTGCTTACATAGGGAACCCCTCTATCATACAGAA
GCTTATGTCCTGTAGTGTCTTACATTATAGGAAAGATTACCCAGTC
AGCAGGAAAGCCAAAGTAAGAGATCAGGAGGAAGAATCAACTACTGGA
CTCTGCGGAACCTGGGAGATAACAAATTGGAGGAAATGGAAATCTAATA
GCGCCATGGTATGGCTTGTACTGAGTAGGGCTTGGATCAGGAATCATCAC
CTCAAATGCAACATGGATGATGTGATGCCAGTGTCAAACACCTCAGGGAG
CTATAAACAGCAGTCTCTTCCAGAATGTACACCCAGTCACAAATAGGAGAG
TGTTCAAGACTATGTCAGGAGTCAAATTAAGGATGGTACAGGACTAAGGAA
CATCCCATTCATCAATCCAGGGTTGGGAGGATCTGGCGGTTTCATTG
AAGGGGGGTTGGACTGGATGGTAGATGGGGTATGGTTATCATCAGAAT
GAGCAAGGATCTGGTATGCTGAGATCAGGAAAGGATCAGGAA
CGGGATTACAAACAAAGGTAATTCTGTAATTGAGAAAATGAAACACTCAATTC
CAGCTGGGCAAGGAATCACAATTGGAAAGGAAGGATGGAAAAGCTTAAT
AAAAAAAGTGTATGGTTCTAGACATTGGACATATAATGCAAGATTGTT
GGTTCTACTGAAAGTAAAGGACTTTGGATTTCATGACTCTAACATGTGAA
ATCTGTATGAGAAAAGTAAAGGCAATTAAAGAATAATGCCAAAGGAAATAGGA
AACGGGTGTTGAAATTCTATCACAGTGTAAACATGAATGATGGAGAGTGT
GAAAATGGAACCTTATGACTATCCAAATTATCCGAAGAATCAAAGTAAACA
GGGAGAAAATTGATGGAGTGAAATTGGAAATCAATGGAGTCTATGAGATTG
GCGAATCTACTCAATGTCAGGAGTCTTGTCTGGTCTCCCTGGGCTGGGG
AATCAGCTCTGGATGTTCAATGGGTCTTGCAGTGTAGAATATGCACT
GAGACCCAGAAATTTC

【図17】

Fig. 17

配列番号:34

CCAAATCTTAACTCTTCAACACCAACAATGGGAAAAACGTTGGGATT
TTGGTTTATGTTTCTCTTCTTGTGGTCTTCTCAGATCTCGCTG
AGGAATCATCAACTGACGCTAAGGAATTGTTCTTACATGGATAACACTAA
TTTCCCACTGACATGTTAAGGACAGATTCTCGTGTGAATTCTACGCA
CCTGGTGTGGACACTGTAAGAAGCTAGGCCAGACTATGAGAAGGCTGCTT
CTATCTTGTGACTCACGGCCACCAAGTGTGTTGGCTAAAGTGTGTC
TGAGGAGCACACAAAGACCTCGCATGGAAATGATGTTAGGGATTCCA
ACCCATTAAGATTGGAGGATGGGAAAGAACATTCAAGAATACAAAGGTC
CCCGTGAAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAG
ATCCACAGAAATTAAATCTGCTGATGTCGACCGTTTGTGTTGACAAC
AAAGTTGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAGGTTAG
ACTCTGATGCACTAGCAGAGAATTGTTGACTATGACTTGTCTCACAC
TTGAATGCCAAACCTTCCAAAGGGAGACTCATGAGTGTCTGGCTGTG
GTTAGGTTATTAAGCATTGAGGAGCTCTTGTGACTCAAAGGATTCA
ATGTAAGGCTAGAGAAATTCACTGAAGAACCTCAAGTACCCAAATTGTGAC
TGTCTTCAACAACTGAGCTAGCAATCCCTTGTGTTGCAATTCTTAAAC
TCTCCCAACGCAAGGCTATGTTGTCATCACTTACTACGGAAAGGTCTG
AATCTTCAAAACAAACATGAGTGGCTGAGCAATACAACAAACAGGG
AGTGTAGCTTCTGTGAGGATGTTGAGTCTAGTCAAGGTGCTCCACTAT
TTGGACTGAAGGAAGAACAGTACCTTCAATTATTCAGCATATAATGATG
GCAAGAAGTTTCAACCAATTGGAACTTGTGACTCAACCTCAATTGGT
GAAGGCATACAAGGATGGCAAGGTTGAACCATTGTCAAGTCTGAACTTATT
CTGAAACTAACACAGGCTTAAAGTGGTGGGGCAAACACTCTTGAGG
ACGTTGTTTCAAGTGTGGAAAGATGTTGATAGAGTTTATGCTCTTG
GTGTTGTCATGCAAGCTGGCTTCAACTTGGATGAGTTGCTGTC
TCCAAAGCAGTGTGTTATTGCAAAACTGGATGCAACTGCCAACG
ATATCCCACCCACACCTTGTGTTGCAAGGCTATCAACCTTGACTTCAG
GTCAGCAAGTGGAAAATCTACAAATACGACGGTGGTAGGACAAGGAAGAC
ATCATAGAATTCAATTGAAAGAACAGGATAAACTGGTGTGTC
AAGTAGAACAACCAAAGCTGTCAGGCCAGAAGCAGAACACCAAAAGA
TGAGCTTCAAGGAAAGTCCGTTGGAGGATATCGCACACAGTCATCTGGGG
CTTACAACCTCTTGTATCTCAGAATCAGAAGTAGGAAATCTTAGTGC
ATCTATCTATTGCTTGTCTTATCTTGTGTTACTCTAATGATT
ACTGAATAATGTGAGTTGGGGAGTTAGTAGTCTAGGAACTTTGTTCTG
AAAAAA

【図18】

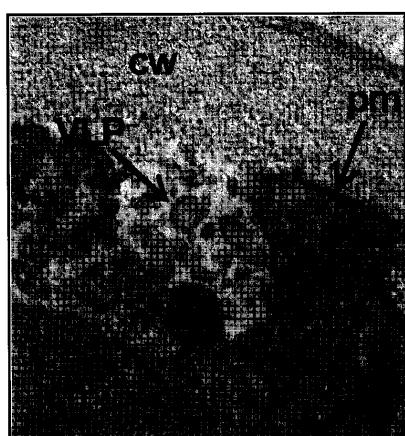
Fig. 18

配列番号:35

AGCGAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTAC
GTTCTCTATCATCCCGTCAAGGCCCTCAAAGCGAGATGCAACAGAGACTTG
AAGATGTTGCAAGGAGAACACCCGATCTGGAGGTTCTCATGGAAATGGCTAAA
GACAAGACCAATTCTGTCACCTGCTAAGGGATTGTTGCTTCAAG
CTCACCGTGCCTAGTGAGCAGGACTGCACTGAGCTAGCCTTGTCCAAAATGCC
TTAATGGAAACGGGGATCCTAAACATGACAAAGCAGTTAAACTGTATAGGAA
GCTCAAGGGAGATAACATCCATGGGGCAAAGGAAATCTCACTCAGTTATCT
GCTGGTCACTGGCAGTTGATGGGCTCATACACAGGATGGGGCTGTG
CCACTGAAAGTGCATTGGCCTGGTATGTCACCTGTAACAGAGATTGCTGACTC
CCAGCATGGCTCATAGCAGAAATGGGACAAACAAACCAACCCACTAATCAGACAT
GAGAACAGAAATGGTTAGCAGGACTACAGCTAAGGCTATGGACCAAATGGCTG
GATCGAGTGGAGCAAGCAGCAGAGGGCATGGAGGTTGCTAGTGCAGGCTAGGCAAAT
GGTCAAGGAGATGAGAACCTGGGACTCACTCTAGTCCAGTGTGGCTG
AATGATCTTGTGAAATTGGAGGCTATCAGAAACGAATGGGGTGAGATG
AACGGTTCAAGTGTATCTCGTATTGGCAAAATATCATGGGATCTGCACT
TGATATTGAGGATTCTGATCGTCTTGTCAATGCAATTACCGTC
ATACGGACTGAAAGGAGGGCCCTTCACTGGAGGAGTGCCAAAGTCTATGAGGGAA
GAATATGCCAAAGGAAACAGCAGACTGTTGAGGATCTGACGATGGTC
GCATAGAGCTGGAGTAAAAAAACTACCTTGTCTACT

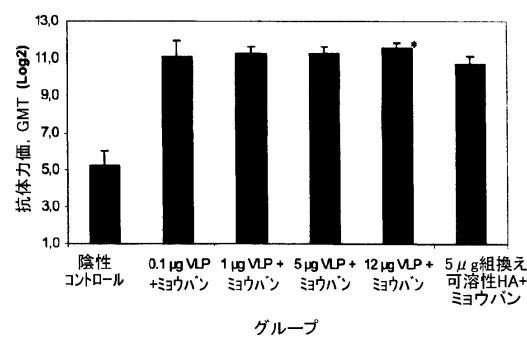
【図19】

Fig. 19



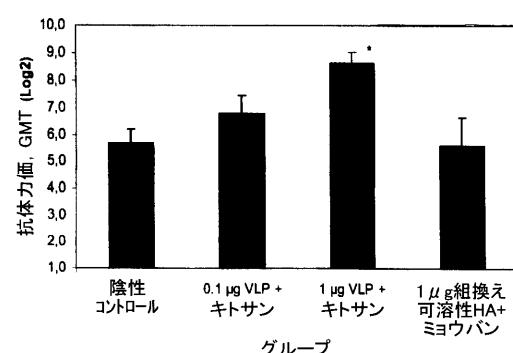
【図20A】

Fig. 20A



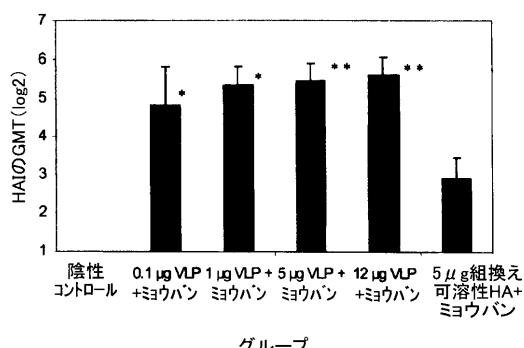
【図20B】

Fig. 20B



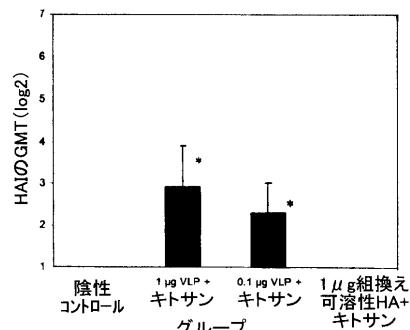
【図21A】

Fig. 21A



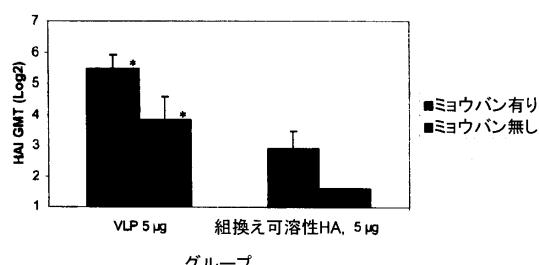
【図21B】

Fig. 21B

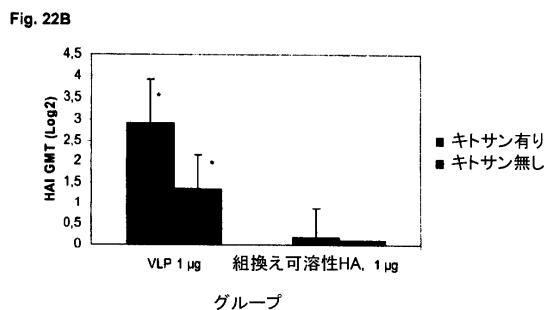


【図22A】

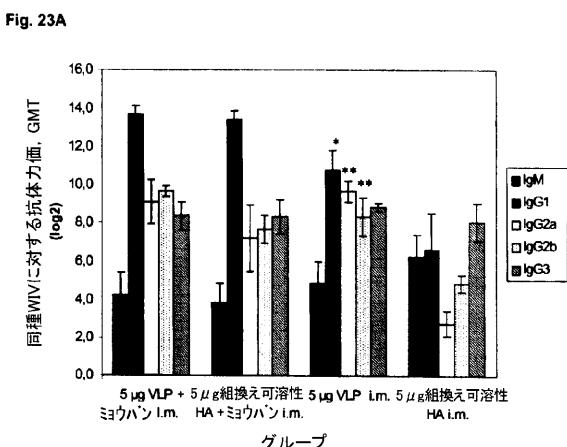
Fig. 22A



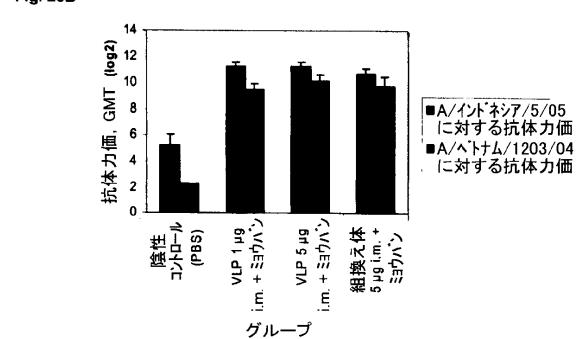
【図 2 2 B】



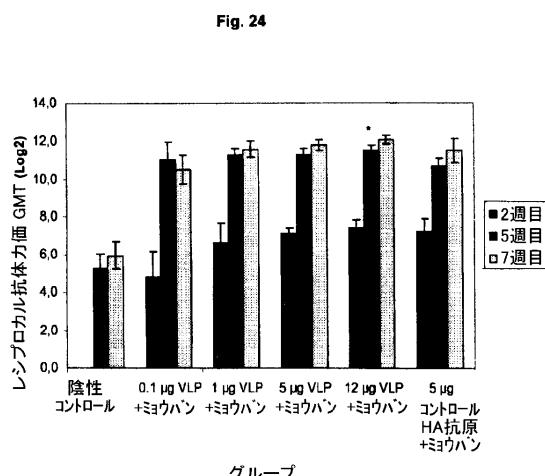
【図 2 3 A】



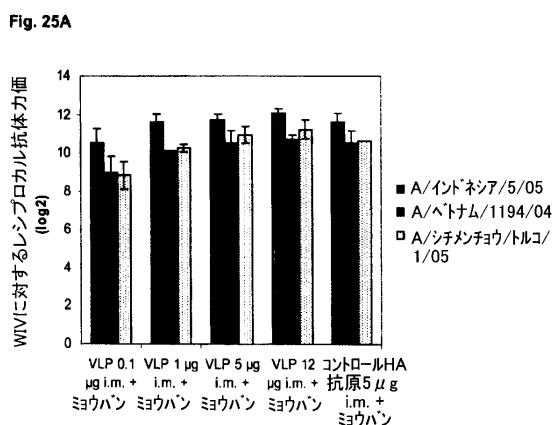
【図 2 3 B】



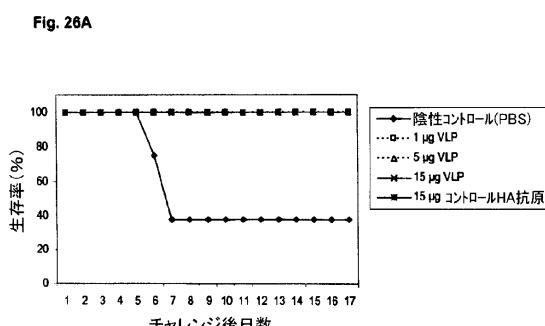
【図 2 4】



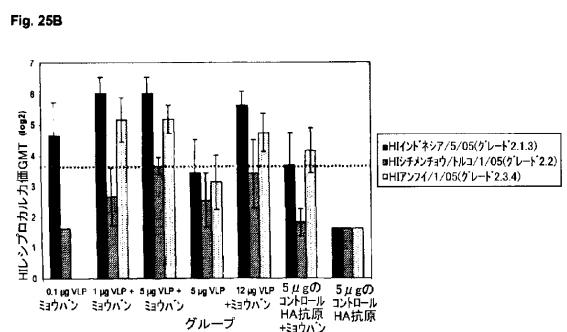
【図 2 5 A】



【図 2 6 A】

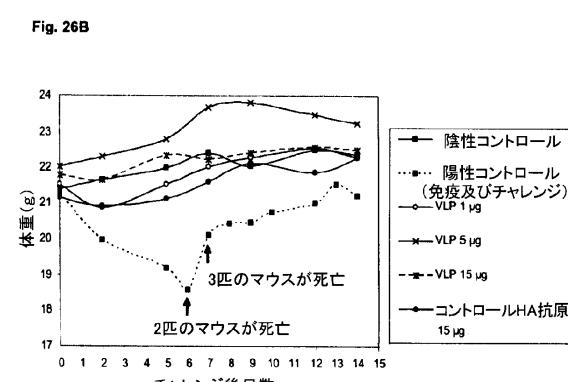


【図 2 5 B】



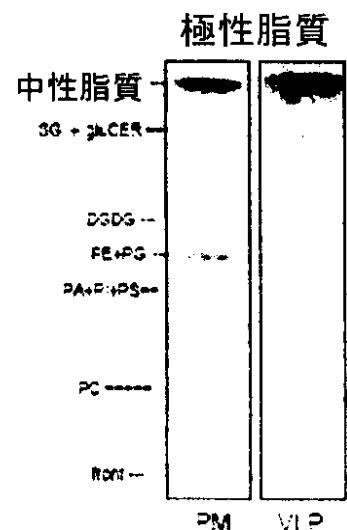
10未満のすべての値に任意の権5(log2で1.6)が付与され、陰性とみなされる。

【図 2 6 B】



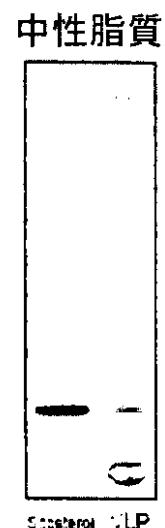
【図27A】

Fig. 27A



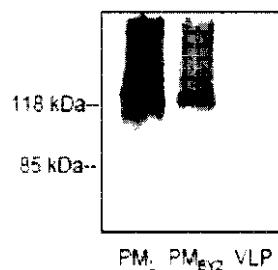
【図27B】

Fig. 27B



【図27C】

Fig. 27C



【図28】

Fig. 28

配列番号: 36

```

CACTTTGTAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATAAAAGAGAAGAGA
CTAATTAAATAATCATCTGGAGAAAATGAAAGTAAACTACTGTC
TGTTATGCACATTACAGCTACATATGCAGACACAATATGTATAGGTACCAT
GCTAACACTCGACCGACACTGTGACACAGTACTTGAAGAATGTGACAG
TGACACACTCTGTCACCTGCTTGAGAACAGTCACATGAAAATATGTC
ATAAAAGGAATAGCCCCACTACAAATTGGTAATTGAGCGTTGCGGGGTG
GATCTAGGAAACCCAGAATGCGAATTACTGATTTCAGGGAGTCATGGTC
TACATTGAGAAAACCAAATCCTGAGAATGGAACATGTTACCCAGGGCATT
TCGCTGACTATGAGGAAGTGGAGGAGCAATTGAGTTCAAGTATCTTCATTG
GAGGTTGAAATATCCCCAAAGAAAGCTCATGCCCAACACCACACCGTAAC
GGAGTGTAGCATCATGCTCCCATATGGGGAAAGCAGTTTACAGAAATT
TGCTATGGCTGACGGGAAGAATGGTTGTACCCAAACCTGAGGAAGTCCT
ATGCAACACAAACAAAAAGAAGTCTGTACTATGGGTGTTCATCACCC
GCCAAACATAGGTGACAAAAGGCCCTCATCATACAGAAAATGCTTATGTC
TCTGTAGTCTTCACATATAGCAGAAAATTCAACCCAGAAATAGCCTAAAG
ACCCAAAGTAAGAGATCAAAGGAAGATCAATTACTACTGACTCTGCTT
GAACCCGGGGACATAAATATTGAGGCAATGGAAACTCTAAATAGCGCCA
GATATGCTTCCGACTGAGGCTTGGATCAGGAATCATCAACTCAA
TGCACCAATGATAAATGTGTCAGGCTTGGATCAGGAATCATCAACTCAA
AACAGCAGTCTCTTCCAGAACGTCACCCAGTCACAAATAGGAGAGTGT
CAAAGTAGTGTAGGAGTGCAAATTAAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACAT
CCCATTCAATCCAGAGGTTGTTGGAGCCATTGCCGTTTATTGAA
GGGGGTGACTGGAGATGGAGATGGTTATGGTTATCATCATCAGAAAT
GAGCAAGGGATCTGGCTATGTCAGATCAAAGCAACACAAATGCCATTAA
ATGGGATTACAACAAGGCAATTCTGTAATTGAGAAAATGAACACTCAATT
ACAGCAGTGGGCAAAGAGTTCACAAATTTGAAAGAAGGGATGGAAAACCTG
AATAAAAAAGTTGATGATGGGTTTATAGACATTGGACATATAATGCGAAACT
GTTGGTTACTGGAAATGAAAGGACTTGGATTTCCATGACTCCATGTG
AAGAATCTGTAGGAAAGTAAAGGCACTTAAAGGAAATGCTAAAGGAAT
AGGAAATGGGTGTTGAGTTCTATCACAAGTGTAAAGGATGAATGCGAG
AGTGTAAAGAATGGAACCTTACTGACTATCCAAAATTTCCGAGAATCAAGTT
AAACAGGGAGAAAATTGATGGAGTGGAAATTGGAATCAATGGGAGTCTATCAG
ATTCTGGCGATCTACTCAACAGTCGCCAGTTCTGGTTCTTTGGTCTCC
TGGGGCAATCAGCTCTGGATGTTCAATGGGTTTACAGTGTAGAAT
ATGCATCTAAGAGCTC

```

【図29】

Fig. 29

配列番号:37

CACTTGTGAGTCTACACTTGTATTCCTCAAACACATAACAAAGAGAAGAGACT
AATTAAATTAATTCATCTGGAGAGAAAATGAGAAGAAACTACTGTCTCTGTA
TGTCACATTACAGCTACATATGCGACACAAATATGTATAGGTCATCCCAAACA
ACTAACCGCAGACTGTGACACAGTACTTGTGAGAAAATGTGACAGTACACT
CTGTCACCTGGCTTGGAGACAGTCACAACTGGAAAATTATGTCTTAAAGGAAT
AGCCCCACTACATACTGGGTTATGGCAGCTGGGGATGAGTCATTTAAAGGAAT
AGAATGCGAAATTACTGGATTTCTCAGGGACATCTGTCCTACATTGTAGAAAAACCA
ATACCTGGAACTGGGAACTATGTTACCTGGGACTTCTGCCGACTATGAGGAACGT
AGGGGAGCAATTGAGTTCTGAGTATCTCTATTGAGAGATTGCGAAATATCTCCAAAG
AAAGCTCATGGCCCAACACACACACACACACGGGAGTACTGAGCATCTGCTCCATA
ATGGGGAAAGCAGTTTACAAAATAATTGCTATGGCTGAGCGGGAAAGATGTTT
GTACCCAAACTCTGAGCAAGTCTATGCAACAAACAAAGAGAAAAGTCTTGTAA
CTATGGGGTGTCTACACCCTGCTAACATGGTACCCAAGGGCTCTCATCAT
AAGAAAAGTCCTGTTGCTCTGAGTCTGTCATTCACATTAGCAGAAAATTACCCAC
AGAAAATGCGAAAAGGCCAAAGTAAGAGATCAAGAAGGAAAGAATCAACTACTAC
TGGACTCTACTGTCACCCGGGATACATAATATTGAGGCAATTGGAAGAACTTCAA
TAGGCCAAGATATGCTTCGCACTGAGTAGGAGCTTGGATCAGGAATCATCA
ACTCAAAATGCGATCATGGATGAATGTGTCAGGAACTTCAACACCTGGGAG
CTTAAACAGCAGTCTCTTCTTCCAGAATGTCACCCCTGTCACATAAGGAGACT
TCCAAAGTATGTCAGGAGTGCACAAATTAAAGGATGGTTACAGGACTAAGGAACAT
CCCTACATTCACTAACCGAGGTTGGATGGGAGCTTGGGGCTTCTTCAAGG
GGGGTGGACTCTGGATGTTGAGATGGTTGGATGGTTATCATCATGAGATGCGA
AGGATCTGGCTATGCTGCGAGATCAAAGGACACACAAATTGGCCTTAATGGGATT
ACAAAACAGGTCATTCTGTAATTGAGAAAATGAAACACTCAATTGAGCTTGG
GCAAGAAGTCTCAACAAATTGGAAAGGAGATGCGAAAATTAAATAAGGAGTGA
TGATGGGGTTATAGACATTGGACATATAATGCGAAATGTTGGTTCTACTGGAA
ATGAAAGGACTCTGGATTTCTCATGACTCACCTGGTGAAGAAATCTGTAGGAGAAG
TAAAAAGGCCATTAAAGAATAATGCCAAAGAAGAATAGGAATATTGGTTCTTGGAT
CTATCATGAGTAAAGCTGATGCGAGGAGTGTAAAGGAAATTGGGACTATTGAC
TATCCAAAATATTGGCAAGGAACTCAAGTGTAAACGGGAGAAAATTGTGAGTGA
AATTGGGAATCAATGGGAGTCTCATGAGTTCTGCCGATCTACTCAACAGTCGCCAG
TCTCTGGTTTCTTGGCTCCCTGGGGCAATCAGCTCTGGATGTGTTCCAAAT
GGGTCTTGTGAGTGTAGAAATGTCATGAGACGTC

【 図 3 0 】

Fig. 30

列番号:38

CACTTGTGAGTCACACTTGTATCCCTCAAAACACATACAAGAGAAGAGA
CTAAATTAAATAATCATCTTGAGAGAAAAATGAAGACTATCATTGTTGAG
CTACATTCCTATGCTGGTTTCACTCAAAAATCCCGGAATGACAAACAGCA
CGCGAACGCTGCTGGCCTGGCACCATGCAGTACCAAAACGGAAAGATGAG
AAACAACTCACGAATGCCAAATTTGAAGTTCAATGCTACTGAGCTGGTCA
AGTTCTCAACAGGTAAATGCCGAGCTCCCTCATCAGATCTTGTGGATGGAG
AAACTGCACACTAAATGATGCTTATGGGGACCTCTGGTCAAGTGTGGCTT
CCAAAATAAGGAAATGGGACCTTTGTGAAACGCAGCAAGCCTACAGCAACT
GTTCGGCTTATGATGTCGGCATTGCTCCCTTGGTCACTAGTGGCTCA
TCGGCGCACACTGGAGTTAACATGAAAGATTCTTAATTGGACTGGAGTC
AAACCGGAACAAAGCTCTGCTTCATAAAGGGAGATCTAATAACAGTTTCTTAGA
GATTGAAATTGGTGGCCACTTAAATTCACCCAGCATGGACGTC
ATGCCAAACATGAAATTTGCAAAATTCATATTGGGGGGTCCCC
GGGGTACGGCAACTGACCAAAATCTTCTGTGTCGCAAGCATCAGGAAAGATC
ACAGTCCTACCAAAAGGAGCAACAAACTGTAAATCCGAATATCGGATCTAG
ACCCAGAGTAAGGAAATTCGGCAGCAAAAGCATCTATTGGACAATGAA
AACCCTGGGAGACATCTTGTAAACACAGGGAACTCTAATTGCTCTAG
GGTTTACTCTAAACATGCAAGTGGAAAAGACTCTAAATGAGATCATGTC
CCCATTGGCAATGCAATTCTGAATGCACTCATCCTCAAACGGGAAGCATTCCCA
TGACCAAAACATTCCAAGGAAACAGGATCACATCGGGGGCTGTCCCCAGA
TATGTTGAAACCAAAACACTCTGAAATTGGCACACGGGATGGCAATGTC
AGAAAACAAACTAGAGGATCATTTGGCAGCAATTGGGGGTTCTAGAAAAATGG
TTGGGAGGGAAATGGTGGATGTTGTTGTTGAGCTTCAAAATTCTGAG
GGAAATGGACAGCACGGAGCATCTGGAAAGACTCTAACAGCAGCATGTC
TCAATGGGAAAGCTGAATAGGTGATCGGGAAAACCAACGGAAAGATTC
GATTGAAAAGAGTTCTCAGAGTCGAAGGGAAATCTCAGGACCTGGAGAAA
TATGTTGGAGGACCAAAATGATCTCTGGTCAATCACAGCGGAGCTTGT
TGGCTTGGAGGACCAAAACATCAATTGTCATGACTCAGAAATGAAACAAAC
TGTGTTGAAAACAAACAGCAACTGGGAAAATGCTGGAGATTTGGGCA
TGGTTGTTCAAAATACCCACAATGTCAGAATGCTGCAATTGGGCA
GAATGGAAAGCTTACGACCAAGTGTACAGAGATGAAGCTTAAACACCG
TFTCCAGATCAAGGGCTGGTGGCTGAAGTCAAGGATCAAAAGGTGAT
TGGATTTCCTTGGCCATATCATGTTTGTGTTGCTTGTGGGGTTC
ATCATGTTGGGCTGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTGCAATTG
AGCTC

【図3-1】

Fig. 31

配列番号:39

CACTTGTGAGTCACACTTTGATCCCTAACACACATAACAAAGAGAAGAG
ACTAATTAAATTAAATCCTGGAGAAAATGAGAAGCTATTGCTTGG
ACCTACATTCTATGCTGGTTTCACTCAAACATTCCCGGAATGACA
GCACGGCACGCTGTGCCCTGGGACCATCGAGTACCAAACGGAACGATA
GTGAAAACATCAGGAATGGGAAATTGAGATTCTAATGCTACTGAGCTG
GTTCAGAGTCTCAACAGCTGGAAATTCGCAAGCTCTCAAGATCCTT
GATGGAGAAAATGACACTAATAGATGCTTATGGGAGACCTCTAGTG
GATGGCTTCCAAAATAAGAAATGGGACCTTTTGTGAAACGCAAGGCC
TACAGCACTTACCCCTATGATGTCGGGATTATGCTCCCTTGTGCA
CTAGTGGCTCATCGGCACACTGGAGTTAACGATGAAAGTTCATGG
ACTGGAGTCACCAAATGGAAACAGCTCTGGTCAAAGGAGATCTAAT
AACAGTTCTTAGTGGATGTTGGTGGGAACTTAAATTCACAAAC
CAGCATTGAAAGTCACTGGGAAACATGAAAAATTGACAAATTTGACAT
TTGGGGGTTTACCCACCCGGTACGGACAATGACCAAATCTCCCTGATG
CTCAAGCATTGGAAGAACATCAGCTCTACCCAAAGGCAACAAACTG
TAATCCGGAATATGGGATCTAGCCCCGAAATAGGAATATCCCAGCAGAA
TAAGCATCTATTGGACAAATAGTAAACCCGGGAGACATACTTTGATTAACAG
CACAGGGAACTTATGCTCTAGGGGTTCTTAAACAGGAAGTGGGAA
AGCTCAATAATAGGATCATGGACCTTGGCAATGCAATTCTGAACTG
CATCACCTCAAATGGAAAGCATTCCAATGACAAACCATTCTAAATGTAAC
AGGATCACATATGGGGCTCTCCGGAGATGTGAAACCAAACACTCTGAA
TTGGCAACAGGGATGGCAAAATGACCGAGAAACAAACATAGGGCATATT
GGCGCAATCGGGGTTTATAGAAAATGGTGGGAGGGATTTGGGGATGG
TTGGTACGGGTTTACGGGCAATCAAATTCTGAGGGATAAGGACAAGCAGCAGA
CTTCAAAAGCACTACAGCAGCAATCAATCAAATCAATGGGAAGCTGAAATG
GTTGATCGGGAAAACCAACAGGAAAATTCATCATGATTTGAAAAGAGTCTC
AAAGAGTAGAGGGGAGAACCTCAGGGACCTCGAGAAATATGGTGGAGGACACTAA
ATATAGATCTGGTACATACAGCGGGACTTGTGGCCCTGGAGAACCA
ACATACAATTGATCTAACTGACTCGAGAAATGAAACACTGTTGAAAAGAAC
AAGAAGCCTAGGGAAAATGCTGAGGGATATGGGCAATGGTTGTTCAA
ATATACACCAAAATGTGACATGGCTCATGATCAACGAGGAAATGGGAACTT
ATGACCCATGATGTACAGAGATGGAGCATTAAACACGGGGTCCAGATCA
AAGGGCTGGAGCTGAAAGTCAGGAGATAACAAAGATTGGAGACTATGGATTCT
TTGGCCATATCATGTTTGTGGTGTGTTGGGGGTTCATGTC
GGCTCGCCAAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTGCTATTGGAGAGCTC

【 図 3-2 】

Fig. 32

CACCTTGTGAGTCTACACTTTGATCCCTAACACACATAACAAAGAGAAGA
GACTAATTAAATAATTAACTCTGGAGAAAATGGAGGAATAATTGTA
TACTCTGATGTAACCTCAATGCAGATCGAATCTGCACTGGAAACAT
CGTCAAACTCACCACATGTTGTCAAAATGCTACTCAAGGGGAGGTCAAT
CTGACTGGTGTAACCTACTGACAACACACCACCAAACTCTACATTTGCA
AATCTCAAAGGAACAGAACACAGGGAAACATGCCCCAAATGCCCTCA
CTGCAAGAGCTGGACGTCGGCTGGCAGACCAAAATGCACGGGGAAC
ATACCTCTGGCAAGGAGTTTCAACTCTGAGTCAGACCTGTTACATCT
GGGTGCTTCTTCTATAATGCAAGCAGAACAAAATAGACAGTCGCTAA
CTTCTCAGAGGATACGAACATATCAGGTTACAATCTAACGTTATCAAT
GCAGAAAATGCCACAGGAGGACCCATACAAATTGGAACCTCAGGGCTTG
CCCTAACGTTACCAATGGAACAGGATTTCGCAACATGGCTGGGCGC
TCCCCAAAACGCACAAACACAAACACGCAACAAATTCTAACATAGAG
TACCATACATTGATCAGAGGAGAACGACCAAAATTACCGTTGGGGGTT
CACTCTGATAACGAAACCCAAATGGCAAGGCTATGGGGACTAACGG
CCAGAAGITCACCTCTGCAACGGAGTACACCATACGTTTAC
AGATGGTGTGGCTTCCCAATCAACAGAAGACGGGAGTACACCAAAAGC
GGTAGAATTGTTGTTGATTACATGGTCAAAATCTGGGAAACAGGAC
AATTACCTATAAGAGGTATTTTATTGCTCAAAATGTTGTCGCAAG
TTCAGGAGGCAAGGTAAATAAAGGATCGTGGCTTAAATTGGAGAAGCAG
ATTGCTCCACGAAAATAACGGGATTAACAAACAGGACGCTACTACAA
CAGGGGAACATGCAAGGCCATAGGAAAATTGCCCATTAGGGGAAACAA
CCCTTGAAGCTGGCCAATGGAACCAAATATAGACCTCTGCAAAACTTAA
AAGGAAGGGGTTTCTCGGAGCTATGGCTGGTTTAAAGGGAGGATG
GGAGGAATGGTCTCGAGGTTGGCAGGATACACATCCCTGGGGCACAT
GGAGTAGCGGGTGGCAGGACCTTAAGAGGACTCAAGAGGCCATAAAC
AGATAACAAAATACTCAACTCTTGTAGTGGCTGAGTAAGAACATCTC
AAAGACTAACGGCTGGCATGGTGAATGACCTAACACGAAATACTAGA
GACGAGAAAATGGGATGATCTCAGAGCTGATACAATAAGCTCACAAATAGA
ACTCGCAGTCTGCTTCAATGAGGAATAATAAACAGTGAAAGATGAGC
ATCTCTGGCTGGCTGAAAGAAAGCTGAAGAAAATGCTGGGCCCCCTCTG
GTAGAGATAGGGAATGGATGCTTGTGAAACCAACACAGTGCAACAGAC
CTGTCGCAAGAATAGCTGCTGGTACCTTGTAGTCAGGAGAATTTCTCT
CCCCCATTTGTTGATTCTGAATTAATCTGCTGATCTTAAATGACGATG
ATTTGATAATCATACTATGCTTTACTACTCAACTGCTGCTCAGGTT
GGGTGTAACATGATGAGGATCTCTGGTTTATGGTCTCCAGAGA
CAATGTTCTGCTCCATCTGCTATAAGAGCTC

【図33】

Fig. 33

配列番号:41

CACTTTGTGAGTCTACACTTGATCCCCCAAACACATAAAAGAGAA
GAGACTAAATTAAATTAAATCATCTGGAGAGAAAATGAAGGCATAATT
GTACTACTGGTAACTACCAATCGACAGATCGAACATGCACTGGAA
TAACATCTCAAACACTCACCTCATGGTCAAAACAGCCACTCAAGGGGA
GGTCATGTGACTGGTGTGACCTAACTACAACAAACACCACAAATCT
TATTTGGCAATTCTCAAAGGAACAGGACCAAGGGGAACTATGCCCCA
GACTGCTCAACTGCACAGATCTGGATGGCTTGGCAGACCAATG
TGTGTGGGACCCACCTTCGGCAAGGGCTCAACTCTACCGAAGTC
AAACCTGTTACATCCGGGTGCTTCTATAATGCGACAGAACAAAAA
TCAGGCAACTTCCAATCTTCAGGGATATGAAAATATCAGGCTATC
AACCCAAAACGTCATCGATGCCAAAAGGCCACCAAGGAGGACCC
GACTTGGAAACCTCAGGATCTGGCTTCAACTGCTCAGGCTAAGGGGAT
TTTCCGCAACACTGGCTGGGCTGCTTCAACAGGACAAACAAAATG
CAACGACCCACTAACAGTAGAAGTACCATACATTGTACAGAAGGGG
AAGACCAATCTACTGGTGGGGGTTCTTCAAGGATACAAACAAAAT
GAAAGACCTTCTAGGGACTCAATCTCAAAGGTCTACATCTGCT
AATGGAGTAACCACACATATTGTTCTCAGATTGGCAGCTCCCAGATC
AACAGAAGACGGGAGGACTACCAAAAGGCCGAGATTGTTGATT
ACATGTCGAAACACTGGGAAAACAGGAAACATTGTCTACCAAAAGG
GTGTTTGTGCTCAAAGGTGTGGTGGCGAGTGGCAGGAGCAA
GTAATAAAAGGGTCTTCGCTTAAATTGGTGAAGCAGATTGCTTCTAG
AAAAATACGGGGATAACAAAAGCAAGGCTTACTACACAGGAGAAC
TGCAAAAGCCTAGGAAATTGCCAAATATGGTGAACACATTCTTGA
GCTCGCAATGGAAACAAATATAGACCTCTGCAAACATTAAAAGGAA
AGGGGTTTCTCGGAGCTATTGCTGGTTCTAGAAGGGAGATTGGGAA
GGAATGATTGGCAGGGTCTGGCAAGGATACATCTCAGGGACCATG
AGTGGCACTGGCGCGGACCTTAAGGTACGCAAGAAGCTATAACAA
GATAACAAAATCTCAATTCTTGTGAGTGAAGTCAAGAAGATT
CAAAAGACTAATGGTGGCCTGGATGAGACTAACAAACTCTGAG
CTGGATGAGAAAATGGATGATCTCAGACGTGACACTATAAGTCGCAA
ATAGAACCTTGAGCTTGTGCTTCAACAGGAAGGAAATAAACAGTGAAG
ATGAGCATCTATTGGCACTTGGAGAGAAAACATAAGGAAATGCTGGTC
CCTCTGCTGTAGAGATAGGGAAATGGATGCTGCGAACCTTAATGCG
GAAAGATTCTCTCCCAACTTTGATTCACTGACACTATTACTGCTGAC
TTAAATGATGATGGATTGGATAACCATACTATGCTTACTACTACAC
TGTGCTCTAGTTGGTGTGAACTATTGATGCTGAGCTATTGTTATTGTT
ATGGTCTCCAGAGACAACTGGTTCATGCTCCATGCTATAAGGCT
C

【図3-4】

Fig. 34

CACCTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATAACAAAGAGAA
CACCTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATAACAAAGAGAA
ATGGCCATCATTTC
TCTAATTCTCTGTTCACAGCAGTGAGAGGGGACCAATATGCTTAGCTGG
ATACCAGCCTAAATTCCACAGAGAACGGTGCACACAATTCTAGAGCG
GAACGTCACTGTGACTCATGCCAAGGACATTCTTGAGAACGCCCCATAA
CGGAAAGTATGCAAACTAACGGAACTCCCTCCACTTGAGACTGGGGG
CTGTAGCATTCGGGGATGGCTCTTGGAAATGAGTATGGCT
TCTAAGTGTGCCAGAATGGCTTATATAATGGAGAACGAAAACCCGAG
AGACGGTTGTGTATCCAGGAGCTTCATGATTGAGAACGAAATTGAAA
CATCTCTCAGCAGCGTGAACATTCAGGAAAGTAAAGATTCTGCC
AAAGATAGATGGACACAGCATAACAAACACTGGAGGTTCACGGGGCTG
CGCGGTGTCGGTAATCCATCATTCTCAGGAACATGGCTGGCTGAC
AAAGAAGAACATCAAATTCTGGGGTCCAAAGGATCCTACAAACAAAC
AACGGCAGAACAAATGCTAAATTGGGGGGTGCACCATCCCAATG
TGAGACAGAACAAAGAACATTGTACCGAATGTGGGAACTTATGTT
CGTGGCCACATCACACATTGAAACAAAAGGTCACCCCGACATAGCAAC
AAGGCTAAAGTAAAGTGGAGCTAGGAGAATGGAGGTTCTCTGGAC
CCTATTGGATATGTGGGACACCATAAATTGGAGACTACTGGTAATCTA
ATTGCAACAGAGTATGGATTCAAATATCGAAAAGAGGGTAGTTGAGGG
ATCATGAAACACAGAACAGGAAACACTTGGAGAACATGTTGAGGAAATGCCAA
ACTCTTGGGAGCAATAAACACATTGCTTTCACATGTCAC
CACTGACAATAGGTGACTGCCAAATATGTTAAACCGGAAAGTGG
TCTTAGCAACAGGACTAAGGAATGTTCCCAGATTGAATCAAGAGGGAT
TGTGTTGGGCAATAGCTGGTTTATAGAGGGGAGTGGCAAGGAATG
TGTGATGGTTGTGATGGATACCATCACAGCAATGGCAGGAGTCA
GTATGCAGCAGAACAAAGAACATTCAACTCAAAGGCATTGATGGAAATC
CAACAAAGGAAATTCTGTGATTGAAAGATGAACACCCAATTGAGGCT
FTGGGGAAAGAGTCTCACTTGTAGAGAACGACTGGAGAACCTGGAC
AAAAAGATGGAAAGCAGGGTTCTAGATGTGTGGACATACAACTGTCAG
CTTCTAGTCTGATGGAAAATGAGAGGGACACTTGACTTCATGATTCTA
ATGTCAGAACATCTGTGATGAAATGAGAACGAGCTGGAGAACAGC
TCAAAAGAACATTGGAAATGGATTGTTGAAATTATCACAAATGTGATG
TGAATGCATGAATAGTGTGAAACACGGGACGTTGATGATTATCCTTCAAGTA
TGAAGAAGAGCTAAACAAATAGAAATGAATCAAGGGGAAATGG
AGCAGCATGGGGTTTATCAATCTTGGCATTATGCTACAGTAGCA
GGTCTCTGTCAGTGGCAATCATGATGGCTGGATCTTCTGGATG
TGCTCCAACGGGCTCTGCACTGAGTCAGGATCTGCATATGAGAGCTC

【図35】

Fig. 35

配列番号:43

CACTTTGTGAGTCACACTTGTATCCCTAACACATACAAAGAGAAC
AGAGATAATTAAATAATTATCCTGGAGGAAAATGGAAAAATAGCTG
TCTCTTGCAATAGTCAGCCTGTTAAAGTGTAGCATGATTGCTTGA
CCATGCAAACAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAAC
GTTACTGTAAACATGCCAACAGACATCTGGAAAAGACACACAAACGGGA
AGCTCTGCATGCTAGATGGAGTAGGAGCTCTGATTAAAGAGATTGAGT
GTAGCTGGATGGCTCTCGAAACCCATGTGTGACGAGTCTCATATG
TCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCACCCAGGCCAATGACCT
CTGTTACCCAGGAATTCAACAGCTATGGAAAAGACTGAAACACCTTATGA
GCAGAATAAACCATTTGAGAAAATTAGCATTCACCCAAAAGTCTTGG
TCCGATCATGAGGCCCTCATCAGGGTCAGCTGAGCATGTCATCACCGG
GAACGCCCTCTTTCAGAAATTGTGGTCTAGCTTAAAGAACAT
ACATACCCAAACATAAGAGAAGCTACAAATAACCAACCGAAGAACAT
TTTGTACTGTGGGGATTCTCATCTTAATGATGCGGCAGACCGAGACAA
AGCTCTATAACCAACCCACCCATATTCCGGTGGGACATCAACACTA
AACCAGAGATTGGTACCAAAATAGCTACTAGTACCAAGTAACGGCCA
AAGTGGAGAAGGGGAGTATTCTCTGGACATAATTAAACCGAATGATC
TCAACTTGGAGATGTAATTGAAATTCTGTCAGAAATTCATGACATAAAA
ATTGTCAGAAAGGGGACTCAGCAATTGTTAAAGTGAAGTGGAAATTGG
TAACCTGCAATAACAAAGTGTCAAACCTCAAATGGGGCGATAACTCTAGTA
TGCCATTCCACACATACACCCCTCACCATTGGGGGAATGCCCAAATAT
GTGAAATCAAACAAATTAGTCTTGGCAGTGGCTCAGAAATTAGTCTCT
AAGAGAAAAGAAGAAAAGAGGACTATTGGAGCTATGCAAGGGTTT
ATAGAGGGAGGATGGCAGGAATGGTAGATGGTTGGTGGGACTAC
CATAGCAATGAGCAGGGGGTGGGCTACCTGCGAGAACAGAATCCACTC
AAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCTGACAAA
ATGAACACTCAGTTGGGGCTTGGGAAGGGGAAATTAAACTTAAAGAAG
GAGAATGAGAAAATTAAACAAAGAAAATGGAAAGCAGGGATTCTAGATGCT
GGACTTAAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGGAAACTCTA
GACTCTCATGATTCAAATGCAAGAACCTTACGCAAGGTCGACTAC
CAGTGGGGATAATGCAAGGAGCTGGGTAACGGTTGGTGGAGTTCT
ACAAATGTGATAATGATGTAGTGGAAAGTGTAGAAGAACGGAGCTGT
CTACCCGCACTTACAGAGAAGGAGCAAGTTAAAAGAGGAGGAAATAAGT
GGAGTAAATTGGAAATCAATGGAAACTTACCAAAATGTCATAATTCTCA
ACAGTTGCGAGTTCTGACTGGCAATCATGGTGTGGTCTATCTT
GTGAGTGTGCTTCAATGGGTGTTACAATGCAAGAATTGCAATTAAAGAGC
TC

【図36】

Fig. 36

CACCTTGTGAGTCTACACTTTGATCCCTCAACACACATAACAAAGAGAAGA
GACTAATTAAATAATTAAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTCCTC
TTTTGGCAATAGTCCTGAGTCTTAAAGTCAGATTGTCATGGTACCGTACCA
TCGAACAAACACTCGACAGCAGGTTGACACAATAATGCAAAGAACGCTA
CTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAATGGGAAGGCTC
TCGCAGTCTAGGGATGGTGAAGCCTCTAAATTGGAGAGTTGAGTGTAGCT
GGATGGCTCTCGGAACACCAATAATGTCAGAGTCATCAATGTCGGGGA
ATGGTCTTACATAGTGAGAAGGCCAATCCAGTCATGACCTCTGGTCA
CAGGGGATTCTCAATGACTGAGAAGAAATGGAAACACCTATTGAGCAGAATAA
ACCATTGGAAATAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTGGTCCAGTCATG
AAGCCTCTGGGGGTCAGCTCAGCATGTCATCAGGGGAAAGTCCTCC
TTTTGAGAAATGTTGATGGCTTATCAAAGAAGACAGTACATACCCAACA
ATAAAAGGGAGGCTACAATAATACCAACCAAGGAAGATCTTGGTACTGTTG
GGGATTCACCATCTCAATGTCAGCGGAGCAGACACAAAGCTCTATACAA
CCCAACCCACTTATTCCTGGTGGGACATCTACACTAAACAGAGATTGGT
ACCAAGAATGACTAGCTAGCTAACCGGAAAGTGGGAAGGATGG
AGTCTTCCTGGCAATTTAAACCGGAATGTCATCAACTCTGGAGATA
ATGGAATTTCTTGCTCCAGAATATGTCATACAAAATTGTCAGAAAGGGG
ACTCAACCTTAATGAGAAGTGGATTTGGAAATGTCAGTCAACTAACCAAGT
TCGAAACTCTAACGGGGCGATAAACCTAGCATGTCATCCACAAATATAC
ACCCCTCTCACCATGGGGATGCCCAATATGTAACATCAACAGGATTA
GTCCCCTGGCACTGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAGAGAGAGAAGAAGAAA
AAAGAGGAGGATTGGGATGGCTAGATGAGGTTTATAGGGGAGGATGGC
AGGGAAATGGTAGGGTGTGGTGGGACCCATAGCAGGACGGAGCAGGG
GAGTGGGACTGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGG
TCACCAATAAGGTCACCTGCTTATGGACAAATGGACACTCTGGTGGG
CGCTGGGAAGGGAATTAAACACTAGGAAGGGAATAGGAAATTAAACAA
AGAAGATGGAGAGCAGGGTCTAGATGTCGGACTTATAATGCTGAACCT
CTAGTCTCTGGAAACAGGAGAGAATCTGACTTCTGACTCAATGTC
AACAGACCTTACGACAAAGGTCGGACTACAGCTTGGGATAATGCAAAGGA
GCTGGGTAACGGTTGTCAGGTTCTGAGTTCTATCATAAATGTCATAATGAT
GGGAAAGTGTAGAAGAACGGAAAGCTGACTGACTCCGGCAGTATTGAGAAGAAG
CAAGACTAAAAGAGGAAATAAGTCAGGATAAAATTGGAAATCAATAGGA
ATTACCAATAATTGTCATAATTCTACAGTGGGAGCAGCTCCATGACCTG
GCAACTATGGTAGCTGGTACCTCTTATGGATGTGTCCTCAATGGTCGTT
ACCATGCGAAATTGCAATTAGGCT

【図37】

Fig. 37

配列番号:45

CACTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATACAAGAGAAGA
GACTAATTAAATAATTAAATCATCTTGAGAGAAAATGATTCGAATCATTGTA
TAGCAACTACTGCAGCAGCGGAAAGTCAGACAAGATCTGCATTGGTAA
CATGCCAACATTCAACACACAGGTAGATACGATACTTGAGAAGAATGT
GACTGTACACACTCAATTGAACTTGCTGAAAATCAGAAGGGAAAGAAT
TCTGCAAGATATTGAAACAGGCCCTCTGCACTTAAGGGAAATGACCATA
GAGGGTGGATCTGGGAATCCCCTGCACTTAAGGGAAATGACCATA
AAGCTGGTCATATTGAAAGACCTACTGCTCAAACAGGGATCTGCT
ACCCAGGAACCTTAAATGAGGTAGAAGAAGTGGGACTTATTGGATCA
GGAGAAGGGTAGAGGATTTGAGATTTCCCAAAAGCAGCTGGAAAG
GAGTTGACCAACAGTGGAAACAAAGATCTGCCCTTATTACTGGT
GGCTCTTCAAGAACACTCTTATGGATAATAAAACCAAGACAGCAGA
ATATCCAGTAATTAGGAAATTCAACAAACACTGGAAACCCAGCCAATCCT
CTATTCTGGGGTGTGATCATCTCTCAACCGACGAGCAAGATACTC
TGTATGGCTCTGGTGTGATCGATACTGTTAGAATGGGAACTGAAAGCATGA
TTGGCAAGGTGGAAATGGCGCAAGGGCTGTGATGGAGA
GAGGGCAGAATTGATTATTGGTGGCTTTAAACCAAGGGAAACCTT
AATGTGGAATCTAATGGAAATCTAATGCCCTTGGTGTGATCAACAAATT
GTCAACACAAATTAGAAGGGCTCTGGTGTGAGTGGTACATTACCAATCGA
GAACATGCGATGCCACATGCCAGACTTATGGGGGTTAAGGCAACATA
AAACATTCAAGATGTGAGTCCCTGTGGATAGGAGAATGCCCCAAT
GTGAAAAGTGAAGGTCTGGGACTCTGGGACTAAGGAATGTCCCACA
GATTGAAACTAGAGGACTCTGGGACTTGGGACTATGGAGGAG
GATGGACTGGGATGATAGTGGGCTATGGCTATCACCATGAAAATTCT
CAAGGGTCAGGATATGCAACAGAGAGAAGCAGTCAAAAGGCTGTA
ACAGAATTCAAAATAAGGTCATCCATCAACAAATGAAACACACAAAT
TTGAAGCTGTGATCAGCAATTCAATCTGGAGAGGAGAATTGACAAT
CTGAACAAAAGAATGCAAGATGGATTTCTGGATGTTGGACATACATGC
TGAACCTGGTGGTCTCTGGAAACAGGAAACACTAGACATGCGATGACG
CAAAATGTAAGAACCTACATGAAAGGTCAAACACTACAACAAAGGACAAT
GCTACGATCTAGGGAAATGGTGTCTTGAATTGGCATAATGTTGACAAT
GAATGCTAGATGGTCTGGTACATGACTATGACTATCCCAAATACAG
ACTGAAAGCAAAATTACAGGCTAAAGATAGATCAGTAAGCTAGAGA
CTTGGTGTGATCAAATTCTGCCATTATGATCAGGTTACGAGCAGCCTA
GTGTTGGTAGGGCTGATCATGCAATGGGCTTTGGATGTTGTCATAG
TTCAATGCACTGCAAGGATATGTAAAGCT

【図38】

Fig. 38

配列番号:46

CACTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATACAAGAGAAGA
GACTAATTAAATAATTAAATCATCTTGAGAGAAAATGAAACACTCAAATTCTAA
TATTAGCCACTTCGGGACTTCTCTATGTCAGTGCAGATAAAAATCTGCCTAG
GACATCATGCTGTGCTAAATGGAACCAAAGTAGACACCCCTACTGAAAAA
GGAATAGAAGTGTGCAATGCAACAGAAACAGTGTGACAAACAAACATCCC
TAAGATGCTCTAAAGGAAAACAGACTGTGGACCTTGGTCAATGTGGAT
TACTAGGGACGGTTATTGGTCTCCCAATGTGACCAATTCTTGAGTCT
CTGCTAATTAAATAGTGTGAAAGAAGGGAAAGTGTGACATTGTTATCAG
GCAAAATTGACAACAGGAAACATTGGGAAACAAACTCAGAAAATCCGA
GGAATTTAAAGGAGAATGGGATTCACATATACCGGAGTGAACACCAA
TGGAGAGACTAGCGCATGTAGAAGGTCAGATCTCTTATGAGGAGA
TGAAATGCTCTTCAAGCACAGACATGGGACATTCCACAAATGACA
AAGTCTACAAAGAACACTAGAAGGTACAGCTCTGATAATCTGGGAAAT
CCACCACTCAGGATCAACTGCAACAGACTAGATTATGAAAGTGGGA
ATAAATTGATAACAGTTGGAGTCCAAATACCAAAATCTTTGTCCAA
ATCCTGGGACAGGCGCAAATGATCAGTGTGACATCAGGAAAGATTGAC
CACTGGCTGTGATGTCAGTGTGACATGTCAGTGTGACATGTCAG
TGAATGGGGTGGGAAAGGATAATAGACGGATGGTATGGGATAAAGCATC
GACTACAAAGGAGAAGGGACTGCTGAGACTACAAAGACTACAAACAACT
GCTATCACAAATAACCGGAAATTGAAACAGACTATGAAAAGGACAAC
CAGCAATTGCAACTAATGAGATAATGAGTTCAATGAAATGAAAACAAATT
GGCAATGTTAAACTGGACTAGAGATTCTATCATGAAAGTGTGAT
AATGCAAGGTTCTGCTGAGTGGGAAATCAACACTATTGATTTAACT
GACTCAGGAAATGAAACAAACTATGAAAAGGTAAGAAGACAACTGAGAGA
AAATGCAAGGAGAAGTGTGAAATGGCTTTGAAATATCCACCAATGTG
ACAATGATGGCTGACCTGAGGAAACACATGACCATGACATGAC
ACAGAAAAGGGCAATACAAACAGACATTGACGGTAAAGCTGGGATCATG
AGCAGTGGTGTGATGGCTTACAAAGATATAATCTGGTGTGTTGATGTT
GGAAACATGCGGTGCACTATTGATATAAAGCT

【図39】

Fig. 39

配列番号:47

CACTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCTCAAACACATACAAGAGAAGA
GACTAATTAAATAATTAAATCATCTTGAGAGAAAATGAAACACATGAA
TAACATACTACTAGTAGAACAGCAAGTAATGCAAGATAAAACTCTGATCG
GCCACAGTCACAAACACTCCACAGAAACTGTGGACACCTCAACAGAAAC
AATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAATTGCTCCACAGGATAATGGA
ATGCTGTGCAACAGCTGGGACATCCCTCTTCTGACCTGCTGTTGGAG
TATTGAAGGACTAGTCTATGGCAACCCCTTGTGACCTGCTGTTGGAG
GAAGAGAATGGCTCATCTGGCAAGGATCATCAGCTGAAATGAGGACG
TGTACCTGGGAACTGAGAAAACCTAGAGGAACTCAGGACACTTTAGT
TCCGCTAGTCTACCAAAGAATCCAATCTTCCAGACACAACTCTGGAA
GTGACTCTACGGAAACAGCAGAGCATGGTCACTGGTCTGGAGGAG
TAGAGATGGCTGACTAAAGGGAGCGGTTTACCCCTGTGAGCAGCCC
AATACACAAATAACAGGGGAAAGAGCATTCTTCTGTGAGGAGCATAC
CCCCACCCACCTACGGGAAACAGGAACTTGTACATAAGGAAACGACACA
ACAAACAGCTGACAACAGAAATTGAAATGGGACCTTCAACCACTGGATA
GGGCAAGGCCCTGTCAATGGTCTGGAGGAGTGGCAACTGGAAATC
TAATTGCTCATGGTATGGACACGTTCTTCAAGGGGAGGACATGGAAAGA
ATCCTGAAGACTGATTTAAAGGTTGAAATTGTTGAGTGTGAACTGTCAG
GAAAAGGTTGCTTAAACAGTACATTGCTTCCACAAATGAACTGAAATAT
GCATTGGAACCTGGCCCAAATGTAAGAGTTAATGACTGAACTGGCA
GTGGCTGAGGAACTGGCTGCTGAGTCAAGTGAAGGACTATTGGAGC
CATAGCTGGACTCATAGAAGGGTGGCCAGGACTAGTCGCTGGCTGG
TATGGTTCCAGGACATTCAATGATCAAGGGGTTGGTATGGCTGAG
GGATTCAACTAAAGGCAATTGATAAAACATCAAGGTAATGAAATAT
AGTCGACAAGGATGAAACAGCAATGAAATAATGATCATGAAATTGAG
GGTTGAAAAGTACTCAATATGATCAATAAGGTTGATGACCAAAATACA
AGACGATGGGCTATAATGCAAGAATTGCTAGTACTACTTGAAGGAA
AAACACTGATGAGCATGCGAACGTGAACAAATCTATATAACAGGTGA
AGAGGGCAGTGGCTCCAATGCTATGGAAAGTGGGAAAGGGCTGTGCTG
GCTATACCATTAATGATGATCATGCTGAGGAAACATTCGGAACGGGAA
CTTATAATAGGAGAAAGTATAGAGGAGAATCAAGACTAGAAGGGAGAAA
ATAGAGGGGTTAAGCTGGAATCTGAGGGAACTTACAAAATCTCACC
TTATCAGACTGCTGCCATCTCTGTGCTGCAATGGGTTCTGCTCCT
CTGTTCTGGGCAATGCTCAATGGATCTGCACTGCAACATTGATATA
AAGCT

【図40A】

Fig. 40A

配列番号:48

MVKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTTHSVNLLESH
NGKLCLKGIAPIQLGNCSVAGWLGNPECELLISKESWSYIVEKPNPENGTCY
PGHFADYELREQLSSVSSFERFEIIPKESWPNHTTVGSASCNSHGESSF
YRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYSANNKEKEVLVWLGVVHPPNIDQRALYHKENA
AYVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIA
YAFALSRGFGSGIINSNAPMDECDAKCTPQGAINSSLFPQNVPVTIGECP
YVRSALKRMTGLRNIPSIQSRLGFLGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGHNEQ
GSCYAADQKSTONAINGITKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRMENLNK
VDDGFIDWVYNAELLVLENERTLDFHDSDNVKNLYEKVSQLKNNAKEIGNG
CEFVHKCNDCECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNRKEDGVKLESMGVYQILAI
YSTVASSLVLVSLGAISFWMCNSGLQCRCI

【図40B】

Fig. 40B

配列番号:49

MVKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTTHSVNLLESH
NGKLCLKGIAPIQLGNCSVAGWLGNPECELLISRESWSYIVEKPNPENGTCY
PGHFADYELREQLSSVSSFERFEIIPKESWPNHTTVGSASCNSHGESSF
YRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYSANNKEKEVLVWLGVVHPPNIDQRALYHKENA
YVSVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNLIA
YAFALSRGFGSGIINSNAPMDECDAKCTPQGAINSSLFPQNVPVTIGECP
YVRSALKRMTGLRNIPSIQSRLGFLGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGHNEQ
GSCYAADQKSTONAINGITKVNSVIEKMTQFTAVGKEFNKLERRMENLNK
VDDGFIDWVYNAELLVLENERTLDFHDSDNVKNLYEKVSQLKNNAKEIGNG
CEFVHKCNDCECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNRKEDGVKLESMGVYQILAI
YSTVASSLVLVSLGAISFWMCNSGLQCRCI

【図41A】

Fig. 41A

配列番号:50

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHAVPNTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYDVDPDYASLRSVLASSGTLEFNNEFVNWTGVQTNGTSSA
CIRRSNSFSRSLNWLTBLKFQPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTD
NDQIFLYAQASGRITVSTKRSQTVIPNIGSRPRVRNIPSRISIYTIVKPGDI
LILNSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGCKNSECITPNSGIPNDKPFQ
NNVRITYGACPRYVQKNTLKLATGMNRNPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGRFHQNSEGIGQAADLKSTQAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIE
KEFSEVEGRIQDLEKYEDTIDLWSYNAELLLALENQHTIDLTDSEMMNLF
ERTKQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNN
RFQIKGVELKSGYKDWLWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

【図41B】

Fig. 41B

配列番号:51

MKTIIALSYILCLVFTQKLPGNDNSTATLCLGHAVPNTIVKTITNDQIEVTN
ATELVQSSTGEICDSPHQILDGENCTLIDALLGDPQCDGFQNKKWDLFVE
RSKAYSNCYDVDPDYASLRSVLASSGTLEFNNEFVNWTGVQTNGTSSA
CIRRSNSFSRSLNWLTBLKFQPALNVTMPNNEKFDKLYIWGVHHPGTD
NDQIFLYAQASGRITVSTKRSQTVIPNIGSRPRVRNIPSRISIYTIVKPGDI
LILNSTGNLIAPRGYFKIRSGKSSIMRSDAPIGCKNSECITPNSGIPNDKPFQ
NNVRITYGACPRYVQKNTLKLATGMNRNPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEG
MVDGWYGRFHQNSEGIGQAADLKSTQAIDQINGKLNRLIGKTNEKFHQIE
KEFSEVEGRIQDLEKYEDTIDLWSYNAELLLALENQHTIDLTDSEMMNLF
ERTKQLRENAEDMGNGCFKIHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNN
RFQIKGVELKSGYKDWLWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

【図42A】

Fig. 42A

配列番号:52

MKAIIVLLMVTSNADRICTGITSSNSPHV/KTATQGEVNVTGVIPLTTPTKS
HFANLKGTETRGKLCPKCLNCTLDVALGRPKCTGNIPSARVSILHEVRPVT
SGCFPMHDRTKIRQLPKLRLGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCP
NVTNQNGFFATMAWAVPKNDNNKTATNSLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHS
DNETQMAKLYGDSPKPKFTSSANGVTHYVQIGGPNTQEDGGLPQSGRI
VVDMVQKSGKTGTTITYQRGILLPKVWCASGRSKV/KGSLPLIGEADCLHE
KYGGLNKSCKPYYTGEHAKAIGNCPIVVKTLKLANGTKYRPPAKLLKERGF
GAIAFLEGGWEGMAGWHGHTSHGAHVAAADLKSTQEAINKITKNLN
LSELEVKNLQRSGAMDELHNEILEDEKVDLRADTISSQIELAVLLSNEGIIN
SEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGE
FSLPTFDLSNITAASLNDDLDNHILLYSTAASSLAVTLMIAIFVYMSRD
NVSCSICL

【図42B】

Fig. 42B

配列番号:53

MKAIIVLLMVTSNADRICTGITSSNSPHV/KTATQGEVNVTGVIPLTTPTKS
YFANLKGTETRGKLCPKCLNCTLDVALGRPMCVGTPSAKASILHEVKPV
SGCFPMHDRTKIRQLPKLRLGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCP
PNATSKSGFFATMAWAVPKDNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHS
DNKTQMKNLYGDSPKPKFTSSANGVTHYVQIGGPNTQEDGGLPQSGRI
VVDMVQKSGKTGTTITYQRGILLPKVWCASGRSKV/KGSLPLIGEADCLHE
EKYGGLNKSCKPYYTGEHAKAIGNCPIVVKTLKLANGTKYRPPAKLLKERGF
FGAIAFLEGGWEGMAGWHGHTSHGAHVAAADLKSTQEAINKITKNLN
LSELEVKNLQRSGAMDELHNEILEDEKVDLRADTISSQIELAVLLSNEGIIN
NSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGE
FSLPTFDLSNITAASLNDDLDNHILLYSTAASSLAVTLMIAIFVYMSRD
NVSCSICL

【図43A】

Fig. 43A

配列番号:54

MAIYLILLFTAVERGDQICIGYHANNSTEKVDTILERNTVTHAKDILEKTHNGKL
KLNGIPPLELGDCSIAGWLLNPEDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGSF
NDYEELKHLLSSVKHFEK/VILPKDRWTQHTTGGSRACAVGNPSFFRNMV
WLTCKNPNVYAKGSYNTTGEQMLIWIWGVHHPNDETEQRTLYQNVTGYSV
GTSTLNKRSTPDIATRPKVNGLGSRMESFWTLDMDWTINFESTGNLAPEYGF
KISKRGSSGIMKTECTLNCETKCQTPGAINNTLPFHNVHPLTIGECPKVYKF
KLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFIEGGWQGMWDGWYGHHSNDQGSYVA
ADKESTQKAQDFGTNKVNVSIEKMTQFEEAVGKEFSNLERRLENLKKMEDGFL
DWVTTNAELLLVMENERTLDFHDNSVKNLYDKVRMLQRDNVKELGNGCFEFYH
HKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
SLSLAIMMAGISFWMCNSNGSLQCRCI

【図43B】

Fig. 43B

配列番号:55

MEKIVLLAISLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGK
LCDLGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDDEFINVPEWSYIMEKENPANDLCYPG
NFDYEEALKHLLSRINHFEKIQIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGTSFFRN
WLIKKNNNTYPTIKRSYNNNTQGEDLLWLGHIHHSNDAEQTLYQNPTTYISV
TUNQRLVPKIASTRKVKNGQSGRMDFWTILKPNDAINFESNGNFIAPHEYAYKVK
KGDSA/VKSEVEYGNCTKQTPGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKVYKSNKL
ATGLRNSPLRERRRKRGFLFGAIAGFIEGGWQGMWDGWYGHHSNEQGSYVA
ADKESTQKAQDFGTNKVNVSIDKMTQFEEAVGREFNLLERRENIENLKKMEDGFL
DWVTTNAELLLVMENERTLDFHDNSVKNLYDKVRMLQRDNVKELGNGCFEFYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
ALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRCI

【図44A】

Fig. 44A

配列番号:56

MEKIVLLAISLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGK
CLDQGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDDEFINVPEWSYIMEKENPANDLCYPG
NDYEELKHLLSRINHFEKIQIPKSSWSSHEASLGVSACPYQGKSSFRNVV
LKKNSTYPTIKRSYNNNTQGEDLLWLGHIHHSNDAEQTLYQNPTTYISV
QRLVPATRSTKVNQGSGRMEEFWTILKPNDAINFESNGNFIAPHEYAYKVK
GKDSTIMKSELEYGNCTKQCPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKVYKSNRLV
LTGRRNQSPQERRRKRGFLFGAIAGFIEGGWQGMWDGWYGHHSNEQGSYVA
ADKESTQKAQDFGTNKVNVSIDKMTQFEEAVGREFNLLERRENIENLKKMEDGFL
DWVTTNAELLLVMENERTLDFHDNSVKNLYDKVRMLQRDNVKELGNGCFEFYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
ALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRCI

【図44B】

Fig. 44B

配列番号:57

MAIIVIAILAAAGKSDQICIGYHANNSTTQVDILEKNVTVTHSIELLENQKEERFCK
ILNKAPLDLRECTIEGWLGNPQCDLLGDQSQWSYIVERPTAONGICYPGLTNEV
EELRALIGSGERVERFEMFPQSTWQGVTDTNSGTTCSRCPYSTGASFYRNLLWIK
TKTAEPVIGIYNTNTGTOPILYFWGVHHPNTDEQDTLYGSGDRYVRMGTESM
NFAKSPEJAARPAPVNGQGRIDYYWSVLKPGETLNVESNGNLIAPWYAYKFVNT
NSKGAFAVRSLDPIENCDCATCQTIAGVLRNTKTFQNVSPWLGECPKVYKSESRL
ATGLRNPVQIETRGLFGAIAGFIEGGWQGMWDGWYGHHSNEQGSYVA
ADKESTQKAQDFGTNKVNVSIDKMTQFEEAVGREFNLLERRENIENLKKMEDGFL
DWVTTNAELLLVMENERTLDFHDNSVKNLYDKVRMLQRDNVKELGNGCFEFYH
KCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSL
ALAIMVAGLSLWMCNSNGSLQCRCI

【図45A】

Fig. 45A

配列番号:58

MNTQILALATSAFFYVRADKICLGHHAWSNGTKVDTLTEKGIEVVNATEVETVEQT
NIPKICSKGKQTVDLGQCGLLGTIVGPPQCDQFLEFSANLIVERREGNDICYPG
KFDNEETLRKIRKSGGIKKENMGFTYTGVRTNGETSACRRSRSSFYAEWKW
LLSSTDNGTTPQMTKSYKNTKKVPAIIWGIHHSGSTTEQTRLYGSGNKLITV
WSSKYQQSFVNPNGPQRPMQNGQSGRIDFHWMILDPNPDNTVTFSFNGAFIAPD
RASFLRGKSLGIQSDAQLDNCEGECYHIGGTISNLFPQNINSRAIGKCPRYV
KOKSLMLATGMKVPEAPAHKQLTHHMRKKRGLFGAIAGFINGWEGLIDG
WYGYKHQNAQGEGTAADYKSTOSAINQITGKLNRLEKTNQQFELIDNEFNEI
EKQIGNV/NWTRDSIIEVWSYNAEFLVALENQHTIDLTDSEMNKLYEKVRRQL
RENAEEDGNGCFEIFHQCDNDCMASIRNNTYDHKKYRKEAIQNRIQDAVKLS
SGYKDIIILWFSFGASCFLFLAIAMGLVFICIKNGMNRCTCI

【図45B】

Fig. 45B

配列番号:59

METISLITILLVVTASNADKICIGHQSNTNSTETVDTLTETNVPVTHAKELLHTEHN
GMLCATSLGHPLIILDTCIEGLVYGNPSCDLLLGGREWSYIVERSSSAVNGTCY
PGNVENLEELRTLFSASSYQRQIFPDTTWNVYTGTTSRACSGSFYRSMRW
LTQKSGFYPVQDAQYTNNRGKSLFVWGIHHPPTYTEQTNLYIRNDTTSVTT
EDLNRTFKPVIGPRPLVNGLQGRIDYYWSVLKPQGQTLRVRSNGNLIAPWYGH
VLSGGSHGRILKTLKGNCVVCQOTEKGGLNSTLPFHNIISKYAFGTCPKYV
RVNSLKLAVGLRNVPARSSRGLFGAIAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQG
VGMAADRDSTQKAIDKITSKVNNIVDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKID
DQIQDVWVYNAEELLVLENQKTLDEHDANVNNLYNKVKRALGSNAMEDGKG
CFELYHKCDDQCMETIRNGTYNRRKYREESRLERQKIEGVKLESEGTYKILT
YSTVASSLVLAMGFAFLFWAMSNGSCRNCI

【図46】

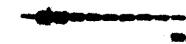
Fig. 46

ブルーデキストラン(2MDa)
↓ 分画

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



A/インドネシア/5/2005(H5)



A/ニューカレドニア/20/1999(H1)



A/コガモ/香港/W312/1997(H6)



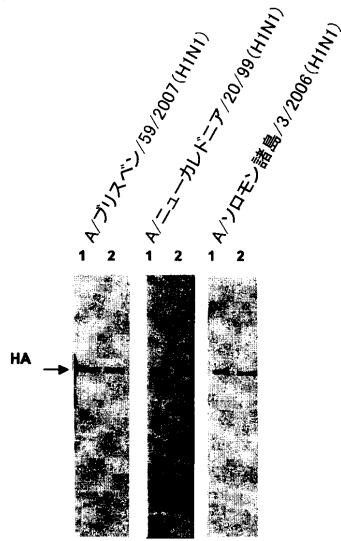
A/シンガポール/1/1957(H2)



A/香港/1073/1999(H9)

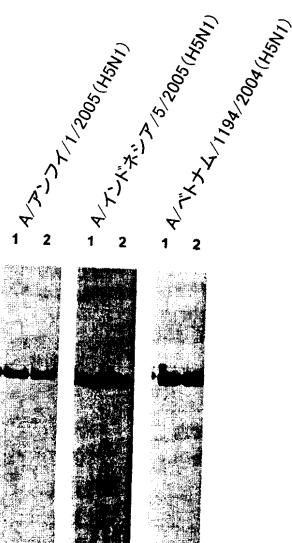
【図47】

Fig. 47



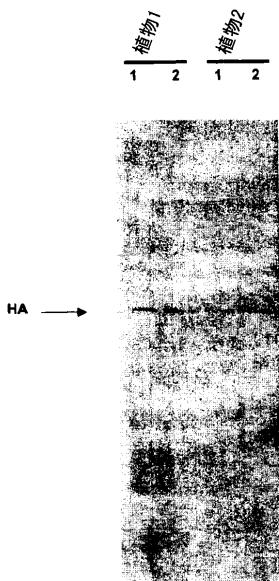
【図48】

Fig. 48



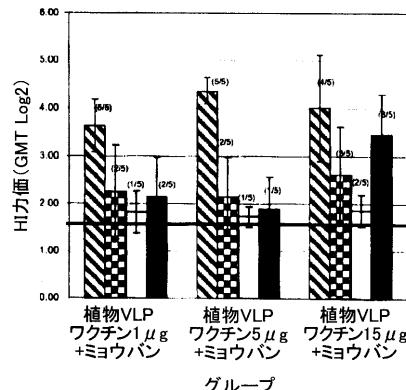
【図49】

Fig. 49



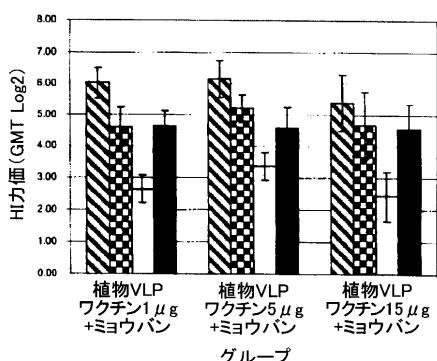
【図50A】

Fig. 50A



【 50B 】

Fig. 50B



【 5 1 】

Fig. 51

【図52】

Fig. 52

配列番号: 61

【 図 5 3 】

Fig. 53

【 四 5 4 】

Fig. 54

配列番号: 63

【 四 5 5 】

Fig. 55

【 図 5 6 】

Fig. 56

配列番号:65

【 図 5 7 】

Fig. 57

配列番号: 66

【 四 5 8 】

Fig. 58

配列番号: 67

【 囮 5 9 】

Fig. 59

配列番号: 68

【 四 60 】

Fig. 60

配列番号: 69

【図 6-2】

Fig. 62

【図 6-1】

Fig. 61

【図 6 3】

Fig. 63

【図 6 4】

Fig. 64

配列番号:73

【 図 6 5 】

Fig. 65

配列番号:49、48、33及び9のコンセンサス
配列番号:74
MK(X₁)KLLVLLCTFTATYADTCIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLL
E(X₂)SHNGKLCLLKGIAPIQLQGNCSVAGWILGNPECELLIS(X₃)JESWSYIVE(X₄)P
NPENGTCYPG(X₅)FADYEELREQLSSVSSFERFEIPKESSWPNHT(X₆)JTGVA
SCSHNG(X₇)SSFY(X₈)JNLWLTGKGLYPNLSKSY(X₉)NNKEKEVVLVLGWVHHPPN
IG(X₁₀)Q(X₁₁)ALY(HQ₁₂)JENAYSVVSSHYSR(X₁₃)FTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTLL
EPGDTIIFEANGNLIAPI(X₁₄)YAFAISRGFGSII(X₁₅)JSNAPMD(X₁₆)CDAKCQTPOQG
AINSSLPLQNVHPVTECPCVKYRSRAKLRMVTGLRNPIQSQRGLFGAIA
GFIEGGWTGMWDGYHGHHQNEQGSYAAQDCSTQNAINGITKVNNSVIE
KMNTQFSTAVGKEFKNLRRMENLNKKVDDGF(X₁₇)DIWTYNAELLVLLERNT
LDFHDSSKVNLYEKVKSQKNNAEIGNGCFEFYHKCN(X₁₈)ECMESVKNGTY
DYPKYSEESKLNRKIDGVKLEMGSYQYLAIYSTVASSLVLVLSLGAS
FWMCNSQSLQCRICI

【図 6 6】

Fig. 66

配列番号: 75
MIKAKLVLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVTLEKNVTITHSVNLLEDHSNGAKLCLLKGIA
PLOLNSCGNSVAGWLGNPCECILLESKWSVYIETPNFENGTYPRGFAYDELEERQLSWSSEPFIEF
PKESSWPWHTVTGVSACSHINGKSPFYNLNWLTCGKLYGPNLSKSYVNNKEKEVLWLVGHHPNI
GNORALYHTENAVSVSSHSYRSRTPTEIAKRKPVRQDGEGRINYWTLTPEGLPTDFIEANGNLJAPWYAFALS
FGFSGSITNSNAPMDECDAKCGPOGAINSPLFQNVHPVTPIGECPKYVRSANLRMVTLGRNIPSDORG
LGFAAIGIEFGWVGMGVWDGWGYHWHNORECGGSYAJQDKSTGNAWNTKVNVSYEMMCFNTTAVGSK
EFLKMLERMEMLNKKWDGFDLWTYNAELLENTERLNGDHSNPKGNTKYLTKVTSQKLKNAIKEGNGOFEF
YHKNCNCMECSVKNGTGDYPKYSEESKLNRKEDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLVSLGAISFWMC
SNGLSLOCMSVICI

【 四 6 7 】

Fig. 67

配列番号: 76
MSLLTEVTVSIIIPSGPLKAEIARQLEDVFAGKNTDLEVLMEWLKRPIISPLTKIGLGFVFTLTVPSE
ERGLRQKQGKQGPKGGPNMDKAVKLYRKLUKEITFHGMSSYASAGALCSMGLYNNRMGAV
TEFAVGFLGCATCQEIQADSDHRSRHCWVTTTNPRLHREHNRMLVLASTTAKAMEQMGSSEQAEMEVAS

【配列表】

0005624465000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 31/16 (2006.01) A 6 1 P 31/16
 A 0 1 H 1/00 (2006.01) A 0 1 H 1/00 A

(31)優先権主張番号 61/013,272
 (32)優先日 平成19年12月12日(2007.12.12)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 2,615,372
 (32)優先日 平成20年1月21日(2008.1.21)
 (33)優先権主張国 カナダ(CA)
 (31)優先権主張番号 61/022,775
 (32)優先日 平成20年1月22日(2008.1.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100162422
 弁理士 志村 将
 (72)発明者 ダオウスト マーク - アンドレ
 カナダ ジー 1 ダヴリュー 2 ピー 8 ケベック ケベック カレ ビガー 1043
 (72)発明者 クチュール マノン
 カナダ ジー 1 エス 2 エックス 2 ケベック ケベック アヴェニュー ド マンリーセ 5 -
 985
 (72)発明者 オルス フレデリック
 カナダ ジー 1 ワイ 2 ジェイ 8 ケベック ケベック リュー マシュー ダムール 3940
 (72)発明者 トレパニエ ソニア
 カナダ ジー 7 エー 2 ピー 8 ケベック セント - ニコラス リュー ド ラ セイン 314
 (72)発明者 ラヴォア ピエール - オリビエ
 カナダ ジー 1 エス 2 ゼット 9 ケベック ケベック アヴェニュー ブラウン 3 - 1180
 (72)発明者 ダルジス ミッシェル
 カナダ ジー 1 エス 3 エム 7 ケベック ケベック アヴェニュー モンク 4 - 765
 (72)発明者 ヴェジナ ルイ - フィリップ
 カナダ ジー 0 エー 2 アール 0 ケベック ヌーヴィル ルート 138 206
 (72)発明者 ランドリー ナタリー
 カナダ ジー 6 ゼット 1 ケイ 9 ケベック セント - ジーン - クリソストム リュー ド ラ
 ポア ウエスト 1060

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第 2004 / 098533 (WO , A2)
 国際公開第 2005 / 086667 (WO , A2)
Influenza Other Respi Viruses(2007 Jan), Vol.1, No.1, p.19-25
Methods. (2006), Vol.40, No.1, p.60-65

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
 C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

(104)

JP 5624465 B2 2014.11.12

C12N 1/00 - 7/08
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPI/IDS(STN)