

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6250649号
(P6250649)

(45) 発行日 平成29年12月20日 (2017.12.20)

(24) 登録日 平成29年12月1日 (2017.12.1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12 Z N A
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12 1 7 1
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04

請求項の数 15 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2015-515159 (P2015-515159)	(73) 特許権者	505258715
(86) (22) 出願日	平成25年5月29日 (2013.5.29)		ベーリンガー インゲルハイム フェトメ
(65) 公表番号	特表2015-519367 (P2015-519367A)		ディカ ゲーエムベーハー
(43) 公表日	平成27年7月9日 (2015.7.9)		Boehringer Ingelheim
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/043146		m Vetmedica GmbH
(87) 国際公開番号	W02013/181270		ドイツ国 55216 インゲルハイム
(87) 国際公開日	平成25年12月5日 (2013.12.5)		アム ライン ビンゲル シュトラーセ
審査請求日	平成28年5月27日 (2016.5.27)		173
(31) 優先権主張番号	12170631.1	(74) 代理人	100092093
(32) 優先日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		弁理士 辻居 幸一
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	13157875.9		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成25年3月5日 (2013.3.5)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シュマレンベルクウイルス (SBV) ワクチン、その製造方法及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

不活化シュマレンベルクウイルス (SBV) およびサポニンを含むワクチン組成物。

【請求項 2】

SBVが以下を含む、請求項 1 に記載のワクチン組成物：

- (a) 配列番号：1又は配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、小 (S) RNAセグメント；
- (b) 配列番号：2の核酸配列と少なくとも82.2%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、中 (M) RNAセグメント；
- (c) 配列番号：3の核酸配列と少なくとも93%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、大 (L) RNAセグメント；又は
- (d) (a) ~ (c) のいずれかの組合せ。

【請求項 3】

SBVが以下を含む、請求項 1 に記載のワクチン組成物：

- (a) 配列番号：4又は配列番号：8と少なくとも97.8%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、小 (S) RNAセグメント；
- (b) 配列番号：5と少なくとも82.2%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、中 (M) RNAセグメント；
- (c) 配列番号：6と少なくとも93%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、大 (L) RNAセグメント；又は

10

20

- (d) (a) ~ (c) のいずれかの組合せ。

【請求項 4】

SBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を予防又は軽減するための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

SBVの伝播を予防又は軽減するための請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

1用量当たり少なくとも 10^5 TCID₅₀/mLのウイルス力価と等価の量のSBVを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

10

【請求項 7】

1用量当たり少なくとも 10^6 TCID₅₀/mLのウイルス力価と等価の量のSBVを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

さらに1つ以上の医薬的に許容できる担体又は賦形剤を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

1つ以上の医薬的に許容できる担体又は賦形剤が溶媒、分散媒体、アジュバント、安定化剤、希釈剤、保存料、等張剤、および吸着遅延剤からなる群より選ばれる、請求項 8 記載のワクチン組成物。

20

【請求項 10】

さらに抗菌または抗カビ剤を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

非ヒト動物でSBVに対する免疫応答を発生させる方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物を非ヒト動物に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 12】

SBVを非ヒト動物で治療又は予防する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物を非ヒト動物に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 13】

30

SBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を治療又は予防する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物を非ヒト動物に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物の、SBVを治療または予防する、および / またはSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を治療又は予防する、および / またはSBVの伝播を予防又は軽減するための医薬の調製のための使用。

【請求項 15】

非ヒト動物の群れでSBVの伝播を予防又は軽減する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物を前記群れの非ヒト動物に投与する工程を含む、前記方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染症を予防又は治療するワクチン及び医薬の分野に属する。特に、本発明は、シュマレンベルクウイルスによって誘発されるウイルス血症、伝播及び臨床症状、特に新生反芻動物（例えばウシ、ヒツジ及びヤギ）の奇形を予防又は治療するワクチン若しくは医薬として有用な不活化ウイルスに関する。

【背景技術】

【0002】

50

新規なオルトブニヤウイルス、シュマレンベルクウイルス (SBV) は、2011年11月にヨーロッパで発見された。最初の検出から、ヒツジ、ウシ及びヤギのSBVの報告例は、ヨーロッパの数カ国でPCR陽性奇形を示す仔ヒツジ及び仔ウシの数千例にまで劇的に増えた (1, 2)。このウイルスはフリードリッヒ-レフラー-インスチテュート (Friedrich-Loeffler-Institute (FLI)) で乳汁漏れ及び発熱を示すウシのサンプルからメタゲノミクスによって検出された。前記調査サンプルはシュマレンベルク (Schmallenberg, North Rhine-Westphalia, Germany) の街に近い農場で収集され、その結果このウイルスはシュマレンベルクウイルス (SBV) と命名された。SBVは、ブニヤウイルス科のオルトブニヤウイルス属のメンバーである。前記ウイルスは、いわゆるシンプ (Simbu) 血清グループウイルスに関する (1)。

10

【0003】

オルトブニヤウイルスは分節マイナス鎖RNAゲノムを有し、主に昆虫ベクター (例えば小昆虫及び蚊) によって伝播される。オルトブニヤウイルスゲノムの3つのセグメント (S、M及びL) は遺伝的再組合せを可能にする。前記再組合せは自然に発生し、新しい生物学的特性を有するウイルスの出現をもたらす (3)。もっとも大きなセグメントLはRNA依存性RNAポリメラーゼをコードする。Mセグメントはウイルスの表面糖タンパク質Gn及びGcをコードし、これらは細胞融合、ウイルス付着及び中和抗体の誘発に必要である。小さなSセグメントはヌクレオキャプシドNをコードし、前記はまた補体の固定に関与する (4)。オルトブニヤウイルス間の関係はしばしば血清学的な交差反応性によってのみ決定される (5)。DNA配列を決定するこの時代では、系統学は、部分的なゲノム配列 (完全なN遺伝子及び部分的なGc遺伝子) の比較によって補足的に評価されている (6)。したがって、完全長ゲノムに関する利用可能な発表済みのゲノム配列情報は極めて少ない。結果として、詳細な系統学的分析は困難である。結論すれば、詳細で信頼に足る分類学的なSBVの分類は達成できなかった。予備的調査では、Mセグメント及びLセグメント配列とAKAV及びアイノ (Aino) ウイルス (AINOV) の部分配列との類似性が示された。N遺伝子はシャモンダ (Shamonda) ウイルス (SHAV) と最も密接な関係を示した (1)。

20

【0004】

SBVは、妊娠したウシ及びヒツジの胎盤障壁を通過して胎児に感染し、妊娠の感受性期に胎児の先天性欠陥をもたらす得るアカバネウイルス (AKAV) と類似する (2)。シンプ血清グループ (当該プロトタイプウイルスに因んで命名された) はオルトブニヤウイルスの最大の血清グループであり、少なくとも25ウイルスを含む。前記ウイルスで、医学的に重要なウイルスは、例えばアカバネウイルス、オロポーシェ (Oropouche) ウイルス、サシュペリ (Sathuperi) ウイルス又はダグラス (Douglas) ウイルスであり、それらの大半は、新生反芻動物で奇形を引き起こすが、人間もまた罹患し得る。例えば、アカバネウイルスは反芻動物で先天性欠陥を引き起こし、アジア、オセアニア及びアフリカで広がっているが、一方、オロポーシェウイルスは、南アメリカの人々のオロポーシェ熱 (デング熱に類似する人畜共通疾患) の広範囲の流行病の原因であった。サシュペリ血清グループの名称はサシュペリウイルスから取られ、ダグラスウイルス及びSBVはまた前記血清グループに属する。

30

【0005】

SBVは、ヨーロッパで検出されたシンプ血清グループの最初のオルトブニヤウイルスであった。該ウイルスは明らかに節足動物ベクターによって伝播される。刺す小昆虫がおそらく伝播に重要な役割を果たす。これまでの情報状況によれば、反芻動物はSBV感染に感受性を有する。成獣は、生じるとすれば軽度の症状を示す可能性がある。しかしながら、経胎盤感染は頻繁に発生し、仔ヒツジ、仔ヤギ及び仔ウシの脊柱 (脊柱後弯症、脊柱前弯症、脊柱側弯症、斜頸) 及び頭蓋 (大頭蓋、下部下顎短小 (brachgnathia inferior)) の重篤な先天性奇形、或いは脳 (水頭症、脳空洞症、小脳形成不全、脳幹形成不全 (haploplasia of the brain stem)) 及び脊髄の多様な奇形をもたらす得る。感染は北西ヨーロッパの大部分に急速に拡大している。これまでのところベルギー、ドイツ、フランス、イタリア、ルクセンブルグ、オランダ、スペイン及び英国で該疾患が存在する。

40

50

したがって、現在はワクチンが利用できないので、SBVは反芻動物家畜にとって重大な脅威である。

したがって、シュマレンベルクウイルス感染の予防及び治療のために中和抗体の迅速な誘発を達成するワクチン及び医薬が希求される。

【発明を実施するための形態】

【0006】

発明の詳細な説明

上記の技術的な問題の解決は、本特許請求の範囲で特徴が示される本記述及び実施態様によって達成される。

したがって、本発明の種々の特徴は、本特許請求の範囲の記載にしたがって実行される。

ある特徴では、本発明は、シュマレンベルクウイルス（SBV）の1つ以上の抗原を含む免疫原性組成物を提供し、前記免疫原性組成物は好ましくはSBVを含む。

したがって好ましくは、それぞれ、SBVは本発明の組成物にSBVの1つ以上の抗原として含まれるか、又はSBVの1つ以上の抗原は好ましくはSBVである。したがって、本発明の免疫原性組成物は特にシュマレンベルクウイルス（SBV）を含む免疫原性組成物である。

本明細書で用いられるように、“抗原”という用語は、特に免疫応答を誘引することができる任意の分子、成分又は実体を指す。前記応答には細胞性及び/又は液性免疫応答が含まれる。該組成物の意図される機能に応じて、1つ以上の抗原が含まれ得る。

さらに別の好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物に含まれるSBVの抗原又はSBVは不活化される。

ある特徴にしたがえば、本発明の免疫原性組成物はしたがって、好ましくは不活化シュマレンベルクウイルス（SBV）を含む免疫原性組成物である。

本明細書で用いられる“不活化”という用語は、哺乳動物宿主に投与されたときに疾患を引き起こさないか、又は宿主細胞で複製しないことを意味する。

【0007】

本発明はまた、SBV又はSBVの抗原を含む免疫原性組成物を提供し、該SBVは以下を含む：

- 配列番号：1又は配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、小（S）RNAセグメント

；
- 配列番号：2の核酸配列と少なくとも82.2%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、中（M）RNAセグメント；及び/又は

- 配列番号：3の核酸配列と少なくとも93%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、大（L）RNAセグメント。

好ましくは、前記SBVは、前記小（S）RNAセグメント、前記中（M）RNAセグメント及び前記大（L）RNAセグメントを含む。

【0008】

別の特徴にしたがえば、SBV又はSBVの抗原は、SBV又はSBVの抗原の不活化によって入手でき、前記SBVは以下を含む：

- 配列番号：1又は配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、小（S）RNAセグメント

；
- 配列番号：2の核酸配列と少なくとも82.2%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、中（M）RNAセグメント；及び/又は

- 配列番号：3の核酸配列と少なくとも93%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、大（L）RNAセグメント。

配列表の全ての配列が5'から3'方向で記載されている。配列番号：1から3及び7の配列は正の極性を有するcDNA（+鎖）をコードする。“逆相補性”という用語は、当該配列が参照配列に対してアンチパラレルであることを意味する。

10

20

30

40

50

【0009】

好ましくは、前記SBVは、前記小(S) RNAセグメント、前記中(M) RNAセグメント及び前記大(L) RNAセグメントを含む。

本明細書で用いられる“RNAセグメント”という用語は、シュマレンベルクウイルスに関してしばしば用いられ、“ゲノムセグメント”又は“セグメント”と同意義と理解される。

好ましくは本明細書に記載の小(S) RNAセグメントは、配列番号：1の核酸配列と少なくとも97.8%、より好ましくは少なくとも98.5%、さらに好ましくは少なくとも99%、さらに好ましくは少なくとも99.5%、又は特に100%の配列同一性を有するDNA配列と逆相補性であるRNA配列を有するか、又は好ましくは、本明細書に記載の小(S) RNAセグメントは、配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%、より好ましくは少なくとも98.5%、さらに好ましくは少なくとも99%、さらに好ましくは少なくとも99.5%、又は特に100%の配列同一性を有するDNA配列と逆相補性であるRNA配列を有する。

10

【0010】

好ましくは本明細書に記載の中(M) RNAセグメントは、配列番号：2の核酸配列と少なくとも83%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、又は特に100%の配列同一性を有するDNA配列と逆相補性であるRNA配列を有する。

好ましくは本明細書に記載の大(L) RNAセグメントは、配列番号：3の核酸配列と少なくとも94%、より好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは少なくとも98%、又は特に100%の配列同一性を有するDNA配列と逆相補性であるRNA配列を有する。

20

本明細書で用いられるように、“免疫原性組成物”という用語は、特に、該組成物に暴露された哺乳動物及び/又は昆虫で免疫応答を誘引する組成物を指す。免疫応答は抗体の誘発及び/又はT細胞応答の誘発を含むことができる。

【0011】

本発明との関係において、配列同一性は、ペアワイズ配列アラインメントを基礎にすると理解される。本発明の目的のためには、ペアワイズ配列アラインメントは、Mega5 (K. Tamura et. al., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol.

28, 2731-2739, 2011) で提供されるClustalWにより実施され、ClustalWは、以下の規定値設定を用いる(ギャップ開始ペナルティ-15及びギャップ伸長ペナルティ-6.66; DNAウェイトマトリックス; ClustalW 1.6; トランジションウェイト0.5)。アラインメント実施配列の配列同一性はBioEditバージョン7.0.9.0を用いて計算する。

30

【0012】

本明細書で用いられる“～に対する配列同一性”という用語は、“～の核酸配列との配列同一性”という用語と同意義と理解される。したがって、本明細書の“配列番号：4又は配列番号：8に対する配列同一性”という用語は、“配列番号：4又は配列番号：8の核酸配列との配列同一性”という用語と同意義で、“配列番号：5に対する配列同一性”という用語は“配列番号：5の核酸配列との配列同一性”という用語と同意義で、さらに“配列番号：6に対する配列同一性”という用語は“配列番号：6の核酸配列との配列同一性”という用語と同意義である。

40

本明細書で用いられるように、“配列番号：Xの核酸配列との配列同一性”という用語は、“配列番号：Xの長さにわたって、配列番号：Xの核酸配列との配列同一性”という用語、又は“配列番号：Xの全長にわたって、配列番号：Xの核酸配列との配列同一性”という用語とそれぞれ同意義であることは特に理解されよう。本明細書の関係では、“X”は1から8から選択される任意の整数であり、したがって“配列番号：X”は本明細書のいずれかの配列番号を表す。

【0013】

本発明のさらに別の好ましい特徴では、本明細書に記載のSBVは、
- S RNAセグメントが配列番号：4又は配列番号：8と少なくとも97.8%、好ましくは少な

50

くとも99%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該S RNAセグメント；
- M RNAセグメントが配列番号：5と少なくとも82.2%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該M RNAセグメント；及び/又は
- L RNAセグメントが配列番号：6と少なくとも93%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該L RNAセグメント、
を含み、特に、前記SBVは、前記小（S）RNAセグメント、前記中（M）RNAセグメント及び前記大（L）RNAセグメントを含む。

【0014】

好ましくは、本明細書に記載のSBVは以下を含む：

- S RNAセグメントであって、該S RNAセグメントが
 - 配列番号：4と少なくとも97.8%、より好ましくは少なくとも98.5%、さらに好ましくは少なくとも99%、さらに好ましくは少なくとも99.5%、又は特に100%の配列同一性を有するRNA配列を有するか、又は
 - 配列番号：8と少なくとも97.8%、より好ましくは少なくとも98.5%、さらに好ましくは少なくとも99%、さらに好ましくは少なくとも99.5%、又は特に100%の配列同一性を有するRNA配列を有する、ことを特徴とする、該S RNAセグメント；及び/又は
- M RNAセグメントであって、該M RNAセグメントが、配列番号：5と少なくとも83%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%、又は特に100%の配列同一性を有するRNA配列を有することを特徴とする、該M RNAセグメント；及び/又は
- L RNAセグメントであって、該L RNAセグメントが配列番号：6と少なくとも94%、より好ましくは少なくとも96%、さらに好ましくは少なくとも98%、又は特に100%の配列同一性を有するRNA配列を有することを特徴とする、該L RNAセグメント。

本明細書で用いられる、“100%の配列同一性を有する”という用語はまた、“同一である”という用語と同意義であると理解される。

【0015】

好ましくは、不活化SBVは、熱処理によって又は好ましくは不活化剤を用いてSBVを不活化することによって入手でき、特にアジリジン化合物、もっとも好ましくはバイナリーエチレンイミン（BEI）が不活化に用いられる。

ある好ましい特徴にしたがえば、BEIは、10mM以下の最終濃度で該抗原に添加され、驚くべきことに、4mM未満の最終濃度が該抗原の不活化に十分であることが見出された。したがって、BEIは、好ましくは4mM未満の最終濃度で、より好ましくは0.5から3.5mMの最終濃度で、もっとも好ましくは1から3mMの最終濃度で該抗原に添加される。

BEIの添加後、該混合物は、好ましくは48時間以内、好ましくは24時間以内、もっとも好ましくは6時間から18時間、例えば12時間攪拌され続ける。該混合物が攪拌されている間、該混合物の温度は好ましくは 37 ± 5 、もっとも好ましくは 37 ± 1 である。

さらにまた、ただ1つの不活化工程（例えばBEIの該抗原への添加による）が該抗原の不活化に十分であることが見出された。

不活化の手順の後で、残留するウイルス不活化剤は、好ましくは、該混合物に中和剤を添加することによって、特に該抗原に添加されたウイルス不活化剤の量と比較してモル過剰で添加することによって中和される。不活化にアジリジン化合物が用いられる場合は、3員環を開環する求核物質が該中和に用いられる。BEIは、好ましくはチオ硫酸ナトリウムの添加によって、特に該抗原に添加されたBEIの量と比較して1.1から10倍モル過剰、もっとも好ましくは2から8倍モル過剰での添加によって中和される。

【0016】

好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物は、1用量当たり少なくとも約 10^5 TCID₅₀/mL、好ましくは1用量当たり 10^5 から 10^7 TCID₅₀/mL、より好ましくは1用量当たり約 10^6 TCID₅₀/mLのウイルス力価と等価の量のSBVを含む。

驚くべきことに、1用量当たり $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL未満、好ましくは1用量当たり 10^5 TCID₅₀

10

20

30

40

50

0/mL未満のウイルス力価と等価の量のSBVを含む本発明の免疫原性組成物が、動物（特にヒツジ）でSBV RNA血症を予防するために十分であることが見出された。

したがって、本発明の免疫原性組成物は、好ましくは1用量当たり $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL未満、好ましくは1用量当たり 10^5 TCID₅₀/mL未満、より好ましくは1用量当たり 10^3 から 10^5 TCID₅₀/mL、もっとも好ましくは1用量当たり 10^4 から 10^5 TCID₅₀/mLのウイルス力価と等価の量のSBVを含み、前記は特に、SBVに対する免疫応答を誘発する方法、及び/又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を予防又は軽減する方法、及び/又はSBVの好ましくはヒツジにおける伝播を予防又は軽減する方法で使用される。

【0017】

本明細書で用いられる“RNA血症”は特に、動物のサンプル、特に血漿、血清又は全血サンプルにおけるRNAの検出と理解される（前記検出は、例えば増幅又は逆転写PCRに依拠する核酸によって実施される）。

したがって、本発明にしたがえば、SBVによって誘発されるウイルス血症は、動物の血清サンプルのSBV RNA血症とそれぞれ緊密に関係するか又は前記RNA血症に併発することは特に理解されよう。したがって、SBVによって誘発されるウイルス血症は、動物の血清で特異的なSBV RNAを検出することによって試験することができる。

別の好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物は、少なくとも約 10^6 SBV粒子/mL、好ましくは 10^6 から 10^8 TCID₅₀/mL SBV粒子/mL、より好ましくは約 10^7 SBV粒子/mLの不活化前力価を有するSBVを含む。

本明細書で用いられる“不活化前力価”という用語は、特に不活化される懸濁SBVの量を指す。

【0018】

具体的には、本発明の免疫原性組成物はさらに1つ以上の医薬的に許容できる担体又は賦形剤を含み、前記1つ以上の医薬的に許容できる担体又は賦形剤は、好ましくは、溶媒、分散媒体、アジュバント、安定化剤、希釈剤、保存料、抗菌及び抗カビ剤、等張剤、並びに吸着遅延剤から成る群から選択される。

特に好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物はさらに、1つ以上のアジュバント、好ましくは水酸化アルミニウム及び/又はサポニン、例えばアルヒドロゲル（Alhydrogel）及び/又はキール-A（Quil-A）を含み、水酸化アルミニウム及びサポニンの組合せがもっとも好ましい。

別の特徴は、医薬として、好ましくはワクチンとして使用される本発明の免疫原性組成物に関する。

さらに別の特徴は、SBVに対する免疫応答を誘発する方法、及び/又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を予防又は軽減する方法、及び/又はSBVの伝播を予防又は軽減する方法で使用される本発明の免疫原性組成物に関する。

特にこの特徴は、反芻動物及び/又は昆虫でSBVに対する免疫応答を誘発する方法、及び/又は反芻動物及び/又は昆虫でウイルス血症を予防又は軽減する方法、及び/又は反芻動物胎児又は新生獣で誘発される奇形を予防又は軽減する方法、及び/又は節足動物ベクター（好ましくは昆虫）によるSBVの伝播を予防又は軽減する方法、及び/又は妊娠動物（母親）から胎児へのSBVの伝播を予防又は軽減する方法で使用される本発明の免疫原性組成物に関する。

【0019】

本明細書で用いられる、抗原又は組成物に対して“免疫応答を誘発する”という用語は、問題の組成物に存在する抗原に対する液性及び/又は細胞性免疫応答の動物における発生である。

本明細書で用いられる、“予防”若しくは“軽減”又は“予防する”若しくは“軽減する”という用語は、SBV抗原（すなわち本発明の組成物に含まれる本発明のSBVの抗原）の動物への投与を含む過程を意味し（ただし前記に限定されない）、ここで前記SBV抗原は、前記動物に投与されたとき、前記動物でSBVに対して免疫応答を誘引するか又は誘引することができる。総合すれば、そのような処置は、SBVによって引き起こされる疾患の臨

10

20

30

40

50

床徴候又はSBV感染に付随する臨床徴候の軽減をそれぞれもたらす。より具体的には、本明細書で用いられる“予防”又は“予防する”という用語は、一般的には、動物が、SBVによって引き起こされる疾患の誘発又は開始前に本発明の免疫原性組成物に曝露される予防処置の過程を意味する。

【0020】

ここで、“SBV感染に付随する臨床徴候の軽減”は、野生型の感染と比較して、グループ内の感染対象動物の数の軽減、感染の臨床徴候を示す対象動物数の排除、又は対象動物に存在する任意の臨床徴候の重篤度の軽減を意味する（ただしこれらに限定されない）。例えば、前記は、病源体負荷、病原体排出の任意の軽減、病源体伝播の軽減、又はSBV感染を示す任意の臨床徴候の軽減、特に母親から胎児へのSBVの伝播又は反芻動物胎児若しくは新生獣におけるSBV感染によって誘発される奇形の軽減を指すはずである。好ましくは、これら臨床徴候は、本発明の組成物を投与されず感染が成立し得る対象動物と比較して、前記組成物を投与された対象動物で少なくとも10%軽減される。より好ましくは、臨床徴候は、本発明の組成物を投与された対象動物で少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、さらに好ましくは少なくとも50%軽減される。

【0021】

“SBVによって誘発されるウイルス血症の軽減”（或いはまた“SBVによって誘発されるRNA結晶の軽減”）という用語は、動物の血流に進入するSBVウイルスの減少を意味し（ただし前記に限定されない）、ここで、ウイルス血症レベル（すなわち血清1mL当たりのSBV RNAコピーの数又は血清1デシリットル当たりのプラーク形成コピーの数）は、本発明の組成物を投与された対象動物の血清で、該組成物を投与されず感染が成立し得る対象動物と比較して少なくとも50%減少する。より好ましくは、該ウイルス血症レベルは、本発明の組成物を投与された対象動物で少なくとも90%、好ましくは少なくとも99.9%、より好ましくは少なくとも99.99%、さらに好ましくは少なくとも99.999%減少する。

本明細書で用いられる“ウイルス血症”という用語は、特にシュマレンベルクウイルス粒子が増殖して、動物（特に哺乳動物又は昆虫）の血流中で循環する状態と理解される。

本明細書で用いられる“動物”という用語は哺乳動物又は昆虫に関する。

【0022】

好ましくは、本明細書に記載の哺乳動物は反芻動物である。より好ましくは、本明細書に記載の反芻動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ、ヘラジカ、キリン、バイソン、ムース、ヤク、スイギュウ、ラクダ、アルパカ、ラマ、アンテロープ、レイヨウ、及びニルガイから成る群から選択される。もっとも好ましくは、本明細書に記載の哺乳動物又は反芻動物は、ウシ、ヒツジ及びヤギから成る群から選択される。

本明細書に記載の昆虫は、好ましくは小昆虫、特にクリコイデス種（*Culicoides* spp.）、サシバエ及び蚊から成る群から選択される。

さらにまた、本発明は、SBVの治療又は予防用、又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形の予防又は軽減用、及び/又はSBVの伝播の予防又は軽減用ワクチン組成物を提供し、該ワクチン組成物は本発明の免疫原性組成物を含む。

【0023】

特に本発明は、SBVに対する免疫応答を反芻動物及び/又は昆虫で誘発する方法、及び/又はウイルス血症を反芻動物及び/又は昆虫で予防又は軽減する方法、及び/又はSBVによって誘発される奇形を反芻動物胎児又は新生獣で予防又は軽減する方法、及び/又は節足動物ベクター（好ましくは昆虫）によるSBVの伝播を予防又は軽減する方法で使用されるワクチン組成物を提供し、前記ワクチン組成物は本発明の免疫原性組成物を含む。

本明細書で用いられる“奇形”という用語は、特に、脊柱の先天性奇形（脊柱後弯症、脊柱前弯症、脊柱側弯症、斜頸）、及び/又は頭蓋の先天性奇形（大頭蓋、下部下顎短小）、脳（水頭症、脳空洞症、小脳形成不全、脳幹形成不全（*hapoplasia of the brain stem*））及び脊髄の多様な奇形、前肢及び/又は後肢の奇形及び/又は硬直から選択される奇形に関する。より詳細には、“奇形”という用語は、仔ヒツジ、仔ヤギ及び仔ウシの奇形に関する。

【 0 0 2 4 】

本発明はまた感染性SBVを製造する方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

- 細胞（好ましくは哺乳動物細胞又は昆虫細胞）をSBVに感染させる工程；
- 該感染細胞を培養する工程；
- 前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

本明細書で用いられる“感染させる”という用語は、特に細胞をSBVに、例えば接種によって接触させる過程を指す。

細胞のSBVによる前記感染は、該ウイルスの細胞への付着、該細胞へのウイルスの進入、細胞質内での該ピリオンの脱外被、ウイルスゲノムの複製及び転写、ウイルスタンパク質の発現及びアッセムリー、並びに新感染性ウイルス粒子の放出を含む。

10

本明細書で用いられる“培養する”という用語は、特に適切な条件下での細胞の維持及び好ましくは増殖を指す。

本明細書で用いられる“採集する”という用語は、特にウイルス粒子を含む細胞上清の採取を指し、前記採取は、例えば、ウイルス感染細胞の培養を含む容器の遠心分離及びその後の該細胞上清のデカンテーションによって実施される。

【 0 0 2 5 】

驚くべきことに、SBVは、昆虫細胞及び哺乳動物細胞で交互に継代したとき、感染性を維持すること、したがってまたその抗原性潜在能力を維持することが見出された。

したがって、本発明は特に、好ましくは感染性SBVを製造する方法、特に上記に記載の方法に関し、ここで該SBVは昆虫細胞及び哺乳動物細胞で交互に継代される。

20

したがって、本発明の感染性SBVの製造方法は以下の工程を含む：

- (a) 昆虫細胞をSBVに感染させる工程；
- (b) 工程(a)の感染細胞を培養する工程；
- (c) 工程(b)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
- (d) 哺乳動物細胞を工程(c)で採集したウイルス粒子に感染させる工程；
- (e) 工程(d)の感染細胞を培養する工程；及び
- (f) 工程(e)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

又は、前記方法は以下の工程を含む：

- (d) 哺乳動物細胞をSBVに感染させる工程；
- (e) 工程(d)の感染細胞を培養する工程；
- (f) 工程(e)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
- (g) 昆虫細胞を工程(f)で採集したSBVに感染させる工程；
- (h) 工程(g)の感染細胞を培養する工程；及び
- (i) 工程(h)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

30

【 0 0 2 6 】

前記に関しては、工程(d) - (i)の番号付けは(a') - (f')の番号付けと同等であり、本明細書に記載するさらに別の工程（工程“(j)”で始まる）を考慮して明確性を期するために選択された。

好ましくは、本発明のSBVの製造方法は以下の工程を含む：

- (a) 昆虫細胞をSBVに感染させる工程；
- (b) 工程(a)の感染細胞を培養する工程；
- (c) 工程(b)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
- (d) 哺乳動物細胞を工程(c)で採集したSBVに感染させる工程；
- (e) 工程(d)の感染細胞を培養する工程；
- (f) 工程(e)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
- (g) 昆虫細胞を工程(f)で採集したSBVに感染させる工程；
- (h) 工程(g)の感染細胞を培養する工程；及び
- (i) 工程(h)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

40

【 0 0 2 7 】

より好ましくは、本発明の感染性SBVの製造方法はさらに以下の工程を含む：

50

(j) 哺乳動物細胞を工程(i)で採集したSBVに感染させる工程；
 (k) 工程(j)の感染細胞を培養する工程；及び
 (l) 工程(k)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程、
 及び場合によって、
 (m) 昆虫細胞を工程(l)で採集したSBVに感染させる工程；
 (n) 工程(m)の感染細胞を培養する工程；及び
 (o) 工程(n)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

【0028】

したがって、ある特徴では、本発明の感染性SBVの製造方法は以下の工程を含む：

(a) 昆虫細胞をSBVに感染させる工程；
 (b) 工程(a)の感染細胞を培養する工程；
 (c) 工程(b)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
 (d) 哺乳動物細胞を工程(c)で採集したSBVに感染させる工程；
 (e) 工程(d)の感染細胞を培養する工程；
 (f) 工程(e)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；
 (g) 昆虫細胞を工程(f)で採集したSBVに感染させる工程；
 (h) 工程(g)の感染細胞を培養する工程；
 (i) 工程(h)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。
 (j) 哺乳動物細胞を工程(i)で採集したSBVに感染させる工程；
 (k) 工程(j)の感染細胞を培養する工程；及び
 (l) 工程(k)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程、
 及び場合によって、
 (m) 昆虫細胞を工程(l)で採集したSBVに感染させる工程；
 (n) 工程(m)の感染細胞を培養する工程；及び
 (o) 工程(n)で前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程。

【0029】

本発明のSBVの製造方法で用いられる昆虫細胞は好ましくはKC細胞である。

哺乳動物細胞、好ましくはBHK細胞（特にBHK-21細胞）が、本発明のSBVの製造方法で用いられる。

もっとも好ましくは、本発明のSBVの製造方法では、昆虫細胞はKC細胞であり、哺乳動物細胞はBHK細胞（特にBHK-21細胞）である。

さらに、本発明はまた本発明のSBVの製造方法によって入手できるSBVを含む。

本発明はさらに、本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

(A) 細胞をSBVに感染させる工程であって、前記細胞が特にサル腎細胞、好ましくはMa104細胞又はMa104-AK細胞であるか、又は前記細胞がBHK細胞、好ましくはBHK-2細胞である、前記工程；
 (B) 該感染細胞を培養する工程；
 (C) 前記細胞によって生成されたSBVを採集する工程；及び
 (D) 前記SBVを熱処理によって又はウイルス不活化剤を用いて不活化する工程。

【0030】

本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法で、好ましくはMa104細胞又はMa104-AK細胞が用いられるとしたら、このことは、前記方法によって製造される不活化SBV又は免疫原性組成物が動物に投与される場合、不利な反応（特にアレルギー反応）を減少させるか又は最小限にとどめることができるという利点を有する。

特に、本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法の工程(A)で、細胞が本発明のSBV製造方法によって入手できるSBVで感染させられる場合が好ましい。

したがって、本発明はまた、(i) 本発明の感染性SBVの製造方法及び(ii) 本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法の組み合わせを提供し、ここで前記方法は引き続いて実施される。

10

20

30

40

50

好ましくは、本発明の感染性SBVの製造方法で、及び／又は本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法で、細胞は、0.00001 - 0.01のMOIで、好ましくは0.0001 - 0.001のMOIでSBVに感染させられる。

特に、本発明のSBVの製造方法で、及び／又は本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法で、細胞が、1 - 10%のFCS、より好ましくは2 - 6%のFCSを含む媒体で培養される場合が、及び／又は細胞が、25 - 38 の温度で、好ましくは36 - 38 の温度で、より好ましくは約37 の温度で培養される場合が好ましい。細胞をFCSの非存在下で培養することもまた可能である。

【0031】

本発明はまた、本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法によって入手できるSBVを含み、さらに本発明はまた、(i)本発明の感染性SBVの製造方法及び(ii)本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法の組み合わせによって入手できる不活化SBVを提供し、ここで前記方法は引き続いて実施される。

別の特徴では、本発明の感染性SBVの製造方法で、及び／又は本発明の不活化SBV又は免疫原性組成物の製造方法で、該SBVが、

- 配列番号：1又は配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、小(S)RNAセグメント；

- 配列番号：2の核酸配列と少なくとも82.2%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、中(M)RNAセグメント；及び／又は

- 配列番号：3の核酸配列と少なくとも93%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、大(L)RNAセグメント；

を含む場合が、及び／又は前記SBVが以下を含む場合が好ましい：

- S RNAセグメントが配列番号：4又は配列番号：8と少なくとも97.8%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該S RNAセグメント；

- M RNAセグメントが配列番号：5と少なくとも82.2%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該M RNAセグメント；及び／又は

- L RNAセグメントが配列番号：6と少なくとも93%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該L RNAセグメント。

【0032】

本発明はまた、以下を含むSBV、好ましくは単離されたSBVを提供する：

- 配列番号：1又は配列番号：7の核酸配列と少なくとも97.8%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、小(S)RNAセグメント；

- 配列番号：2の核酸配列と少なくとも82.2%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、中(M)RNAセグメント；及び／又は

- 配列番号：3の核酸配列と少なくとも93%の配列同一性を有する核酸配列と逆相補性である配列を有する、大(L)RNAセグメント。

本発明はさらに、以下を含む、好ましくは単離されたSBV、特に上述のSBVを提供する：

- S RNAセグメントが配列番号：4又は配列番号：8と少なくとも97.8%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該S RNAセグメント；

- M RNAセグメントが配列番号：5と少なくとも82.2%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該M RNAセグメント；及び／又は

- L RNAセグメントが配列番号：6と少なくとも93%の配列同一性を有する配列を有することを特徴とする、該L RNAセグメント。

【0033】

本発明はまた、上述の方法のいずれかによって入手できる材料の組成物を含み、ここで該組成物は、好ましくは免疫原性組成物、好ましくはワクチンである。

本発明のさらに別の特徴は、SBVを治療又は予防し、及び／又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を治療又は予防し、及び／又は前記の治療の必要がある動物でSBV

10

20

30

40

50

の伝播を予防又は軽減するための医薬の調製のために、本発明の免疫原性組成物を使用することに関する。

本発明はまた、動物でSBVに対する免疫応答を発生させる方法を提供し、前記方法は本発明の免疫原性組成物を前記動物に投与する工程を含む。

別の特徴では、本発明は、SBVを治療又は予防し、又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を前記治療の必要がある動物で治療又は予防する方法を提供し、前記方法は、本発明のワクチン組成物の治療的に有効な量を前記動物に投与する工程を含む。

本発明はさらに、SBVに対する免疫応答を誘発し、及び/又はSBVによって誘発されるウイルス血症又は奇形を予防又は軽減し、及び/又は動物又は動物の群れでSBVの伝播を予防又は軽減する方法を提供し、前記方法は、その必要がある動物に本発明の免疫原性組成物を投与する工程を含む。

前述の方法で、本発明の免疫原性組成物又は本発明のワクチンは、好ましくはそれぞれ1用量で又はより好ましくは2用量で投与される。

【実施例1】

【0034】

最初のSBV単離に関する詳細

BHK-21細胞がオルトプニヤウイルスの増殖に広く用いられた。その結果、FLIの研究者らは、前記細胞株を用いて2011年11月に初めてSBVウイルスの単離に成功した。BHK以外では、クリコイデス・パリイペンニス (*Culicoides variipennis*) の幼虫細胞 (KC細胞と称される (Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany)) が用いられた。KC細胞は、シュナイダー培養液 (Schneider's medium) で希釈した超音波破壊血液とともに10日間インキュベートされた。続いて、前記細胞を凍結融解によって溶解させた。単層のベビーハムスター腎-21細胞 (BHK、クローン13) に前記溶解物を接種した。1時間後に前記接種物を除去し、イーグル最少必須培養液 (Eagle minimal essential medium, EMEM) で置き換えた。強い細胞変性効果を5日後に見ることができ、試験した培養上清はこの新規なウイルスについて陽性で、特異的なcRT-qPCR (単離株2) でほぼ14のCq値及び 3×10^6 TCID₅₀/mLを示した。

【0035】

製造プロセス：一般的説明

下記に記載する製造プロセスは、標準的な製造方法にしたがって、例えば無菌条件下で及び適切な操作条件 (例えば空気の流れ) の確認後に実施される。

製造プロセスの説明：

1. MSV (マスターストックウイルス) の製造

SBV単離株2をMSV (マスターストックウイルス) 製造に用いた。BHK-21細胞 (5×10^7 細胞) を播種したローラーボトルを0.0001のMOIで感染させた。54時間のインキュベーションの後で、ローラーボトルを-20で凍結し、融解して2000gで5分遠心分離した。上清を収集し、1mLのアリコットを更なるプロセスまで-80 で保存した。

2. SBV抗原の製造

BHK-21細胞 (作業細胞ストック (WCS)) は液体窒素中で凍結保存した。WCSを融解し、EMEM培養液及び10%のガンマ照射FCSを用いて細胞培養フラスコ (T160cm²) で増やした。細胞を組換え (非動物起源) トリプシンを用いてトリプシン消化した。1本のT160フラスコをトリプシン消化し、2%FCS含有EMEM培養液の150mLに再懸濁させた。この細胞懸濁物を用いて、1本のローラーボトル (495cm²) にシードした。細胞懸濁物を含む複数のローラーボトルを37 インキュベーターに置き、0.5rpmで回転させた。プレート後12から16時間して、細胞を 5×10^7 /ボトルの密度でプレーティングした。0.0001のMOIによる感染を用いた。細胞を持続的に37 でインキュベートし、特異的なSBV細胞変性効果 (CPE) が細胞の約60 - 70%に達する前まで、0.5rpmで50 - 56時間回転させた。この時点で、ローラーボトルフラスコ全体を-20 で凍結し、37 の水浴中で融解し、更なる処理まで-80 で保存した。

【0036】

ウイルスの力価測定は以下の手順で実施した。

必要な材料：

1. BHK-21細胞（クローン13）
2. T75フラスコ
3. 平底96ウェルプレート
4. 平底48ウェルプレート
5. テルモ8-チャンネルマトリックスピペット及びチップ
6. エッペンドルフ8-チャンネルピペット50 - 1250及びチップ
7. マルチチャンネルピペット用レザバー
8. トリプシン及びEDTA
9. 媒体ZB5
10. ピペット5mL、10mL及び25mL
11. ピペットボーイ
12. 倒立顕微鏡

10

手順：

- 極めてコンフルエントなT75フラスコをトリプシン消化し、細胞を入念に20mLの培養液（10%FCS）に再懸濁する；
- 100mLの培養液（0%FCS）を加え、よく混合する；
- 前記細胞懸濁物をマルチチャンネルピペット用のレザバーに注ぎ入れる；
- マルチチャンネルピペットを用いて、100 μ Lの細胞懸濁物を96ウェルプレートの第一の8縦列のウェルに充填する；
- 付着させるためにプレートをCO₂インキュベーターに37℃で6 - 12時間置く；
- この後で、48ウェルプレートを用意し、各ウェルに1080 μ Lの無血清培養液を充填する；
- 前記プレートの第一の縦列のウェルに、120 μ Lの滴定材料を接種する；
- プログラムP/Mでエッペンドルフ8チャンネルピペットを用いて、最初に前記第一の縦列（この列に滴定材料が接種されている）を混合する（プログラムP/M：120 μ Lをピペットし、620 μ Lで4回混合する）；
- チップを捨てる；
- 前記第一の縦列のウェルから（新しいチップを用いて）120 μ Lを第二の縦列のウェルにピペットで移し、混合する；
- チップを捨てる；
- 前記操作を最後の縦列が終了するまで繰り返す；
- マトリックスピペットを用いて、48ウェルプレートの第一の横列（1つのサンプルの連続希釈を含む）から800 μ Lを吸引する；
- チップを付けるときにはしっかりと押しつける、ただしマトリックス機能が作動しないので強くし過ぎないこと；
- 96ウェルプレートの8つの横列に100 μ Lを分配する；
- 37℃で3 - 4日間インキュベートする；
- 倒立顕微鏡で結果を読み取る。

20

30

40

【0037】

3. ワクチン処方物

3.1 不活化手順：

最終抗原の不活化プロセスは合計72時間続き、用いられるBEIの濃度は15mMである。最終抗原は、不活化される抗原1リットル当たり100mLの割合で0.1MのBEIを添加することによって不活化される（最終濃度10mM）。BEIの添加後、混合物を少なくとも15分間均質化し、pHを確認する。均質化プロセスの後で、混合物を滅菌容器にデカントし、前記容器で該混合物を37 \pm 1℃で攪拌し続ける。24時間後に、該最終抗原の第二の不活化が、不活化される抗原1リットル当たり50mLの割合で0.1MのBEIを添加することによって実施される（最終濃度5mM）。BEIの第二の添加後、このプロセスは、第一の添加について上記に記載し

50

た条件と同じ条件下で繰り返されるが、ただし混合物の攪拌は48時間維持される。

3.2 残留BEIの中和：

不活化プロセスが完了したら、1Mのチオ硫酸ナトリウム溶液を不活化抗原1リットル当たり5mLの割合で添加し（最終濃度5mM）、BEIを中和する。該混合物を均質化した後、pHを確認する。必要な場合には、 7.2 ± 0.2 のpHを得るために塩酸を用いて調整する。

【0038】

3.3 アジュバント：

アルヒドロゲル（水酸化アルミニウム）及びキル-A（サポニン）がアジュバントとして用いられる。

ウシでの理論実証実験

18匹の7カ月齢のウシを実験に用いる。動物を各グループに4匹ずつの4つのグループに分け、他の2匹のウシを接触コントロールとして用いる。全ての動物が、実験開始時にSBV血清陰性である。第一のグループ（4匹の動物）に 10^6 SBV TCID₅₀/mLを含むワクチン用量で、第二のグループに 10^5 SBV TCID₅₀/mLで、第三のグループに 10^4 SBV TCID₅₀/mLでワクチンを接種し、さらに最後の第四のグループには接触コントロールの2匹の動物と同様にワクチンを接種しない。各グループの4匹の動物には皮下ルート（2mL）でワクチンを接種し、3週間後に再度ワクチンを接種する。本実験では再ワクチン接種後2週間して、接触コントロールの動物を除いて全ての動物でチャレンジを実施する（チャレンジ用量＝生ウイルス 10^7 SBV TCID₅₀/動物）。全ての非ワクチン接種動物がSBVチャレンジに際してウイルス血症を発症し、ウイルス血症は3dpi（dpi＝感染後日数）で開始し、2 - 3日持続する。ワクチン接種動物は、SBVチャレンジ後の非ワクチン接種動物と比較して、有意により軽度のウイルス血症及び臨床的に無症状までの緩和を示す。

【実施例2】

【0039】

1. 序

本実験では、いくつかの不活化ワクチン処方物を作製し、続いてヒツジ及びウシで中和抗体誘発能力及び実験的チャレンジ感染後のウイルス血症の予防能力に関して試験した。

2. 材料と方法

ワクチン：

5つの別個のプロトタイプワクチン処方物を作製した（表1）。それらはいずれも水性溶液中の不活化SBVであった。SBVは、2つの異なるベビーハムスター腎（BHK-21）細胞株で増殖させるか（ワクチン“BHKT-HT”、ワクチン“BHK13-HT”、ワクチン“BHK13-LT”）、又はMA-104細胞で増殖させた（ワクチン“MA-HT”及びワクチン“MA-LT”）。

抗原濃度は不活化前にSBVの感染性力価を用いて処方し、長時間プロトコール（37℃で72時間、10mMのBEIを使用）又は短時間プロトコール（37℃で12時間、2mMのBEI使用）のどちらかを用いるバイナリーエチレンイミン（BEI）によって不活化した。

ワクチン候補物は以下の濃度の抗原を含んでいた： $6.1 \log_{10}$ 50%組織培養感染用量/mL（TCID₅₀/mL）（MA-HT）又は $5.7 \log_{10}$ TCID₅₀/mL（BHKT-HT、BHK13-HT、MA-LT）又は $4.7 \log_{10}$ TCID₅₀/mL（BHK13-LT）。サポニン及び水酸化アルミニウムをアジュバントとして用いた（全ワクチン候補処方物で $0.125 \mu\text{g}$ サポニン/mL及び6.65mg水酸化アルミニウム/mL）。全ての処方物を細菌汚染が存在しないことについて試験し、さらに引き続いてBHK-21細胞で2継代することによって不活化の成功をデュープリケートで試験した。各プロトタイプワクチンのpH値を20、6.8 - 7.2で調整した。

【0040】

表1：ワクチン及び動物グループ

10

20

30

40

ワクチン				動物	
ワクチン 名称	細胞株	使用した 感染性力価	不活化	動物グループ	動物番号
BHKCT-HT	BHK-21ク ローンCT	5.7 log10 TCID ₅₀ /mL	長時間プロ トコール	A(ヒツジ) G(ウシ)	S01-S05 C01-C06
BHK13-HT	BHK-21ク ローン13	5.7 log10 TCID ₅₀ /mL	短時間プロ トコール	B(ヒツジ)	S06-S10
BHK13-LT	BHK-21ク ローン13	4.7 log10 TCID ₅₀ /mL	短時間プロ トコール	C(ヒツジ)	S11-S15
MA-HT	MA-104	6.1 log10 TCID ₅₀ /mL	短時間プロ トコール	D(ヒツジ) H(ウシ)	S16-S20 C07-C10
MA-LT	MA-104	5.7 log10 TCID ₅₀ /mL	長時間プロ トコール	E(ヒツジ) I(ウシ)	S21-S25 C11-C16
非ワクチン接種コントロール				F(ヒツジ) K(ウシ)	S26-S30 C17-C22

10

【 0 0 4 1 】

動物

ヨーロッパの家畜品種である25匹のSBV未感染ヒツジ（7 - 9カ月齢）を各グループ5匹で5グループに割り当て、さらに皮下ルートでそれらをプロトタイプワクチンの1つで免疫した（表1参照）。別の5匹のヒツジは非ワクチン接種コントロールとして維持した。雄及び雌の動物を等分に分配した。

20

さらに別に、22匹のSBV抗体陰性の雌のホルスタイン-フリーシアン種のウシを各々4匹又は6匹の4つのグループ（グループG、I及びK）に割り当てた。グループG、H及びIの動物は、それぞれワクチンBHKCT-HT、MA-HT及びMA-LTで皮下ルートにより免疫した。グループKのウシは非ワクチン接種コントロールとして維持した。最初のワクチン接種の日に、これら動物は8から12カ月齢であった。

各々の事例で、これら動物を2回、3週間離してワクチン接種し、2回目のワクチン接種から3週間後に、ワクチン接種及びコントロールの両動物に2 × 0.5mLのSBV野外株（自然の宿主でのみ継代された）を接種した。全実験を通して、直腸体温を毎日測定し、さらに臨床的徴候についてこれら動物を獣医が調べた。

30

【 0 0 4 2 】

サンプル採取、リアルタイムRT-PCR及び血清学

最初のワクチン接種に続いて、血清サンプルを0、3、4、7日目及びその後は毎週収集した。2回目のワクチン接種後、血清サンプルは1週間間隔で採取した。

チャレンジ感染に続いて、血清サンプルを最初の8日間は毎日、さらに14日目及び21日目に採集した。脾臓、扁桃並びに腸間膜及び下顎リンパ節のサンプルを、チャレンジ感染後22 - 29日目の剖検時に採取し、1mLのMEM中で均質化させた。

自動化抽出用マグアトラクト（MagAttract）ウイルスミニM48キット（Qiagen, Germany）を製造業者の推奨にしたがって用いて、血清及び剖検時採取組織サンプルからRNAを抽出した。SBVゲノム量は、Sゲノムセグメントによる外部標準を用い、逆転写リアルタイムPCR（RT-qPCR）（7）によって決定した。さらにまた、血清サンプルを、市販のSBV抗体ELISA（ID Screen(商標)Schmallenberg virus Indirect, IDvet, France）（陽性コントロールと比較した70%相対的光学密度の推奨カットオフを用いる）及び標準的なマイクロ中和アッセイで分析した。

40

【 0 0 4 3 】

3. 結果臨床観察及び死亡後試験

ワクチンプロトタイプによる最初のワクチン接種後、有害な副作用は観察されなかった。動物はいずれも発熱又は他の任意の臨床徴候を示さなかった。第二のワクチン接種後、

50

ワクチンMA-HT（グループH）で免疫した1匹のウシが注射部位の軽度の腫脹を2日間示した。

チャレンジ感染後、1匹の非ワクチン接種ウシが3日目に発熱し、別のウシが軽度の下痢を3日間示した。グループIの1匹の動物が1日間鼻汁排出を示した。

動物の剖検で顕著な肉眼病巣は全く示されなかった。1匹（S30）を除く全ての非ワクチン接種動物の腸間膜リンパ節がPCR陽性であり、平均して $2.86\text{E}+03$ ゲノムコピー/mg（コピー/mg）が検出された。さらにまた、SBV RNAは、5匹の非ワクチン接種ヒツジのうち3匹（S27 - S29）及び全コントロールウシの下顎リンパ節（平均 $2.68\text{E}+01$ コピー/mg）で、S27 - S29及びC18 - C20の扁桃（平均 $9.90\text{E}+01$ コピー/mg）で、さらに5匹の非ワクチン接種ヒツジのうち4匹の脾臓（S26 - S29；平均 $4.57\text{E}+03$ コピー/mg）で、及び、2匹のコントロールウシの脾臓（C17、C21；平均 $1.40\text{E}+01$ コピー/mg）で見出された。ワクチン接種動物のいずれにおいてもウイルスRNAは検出されなかった。

【0044】

抗体応答

最初のワクチン接種の日に、全動物が両血清学的アッセイで陰性であった。

チャレンジ感染の前には、非ワクチン接種動物で抗体は検出できなかった。感染後3週間で、1匹（S30）を除いてコントロールヒツジ及びウシの全動物が中和アッセイで陽性を示した。ELISAでも同様に、ウシで及び5匹の非ワクチン接種ヒツジのうち2匹（S26、S29）で抗体が見出された。陽性コントロールのOD値（S/P）に比較してサンプルODでの増加にもかかわらず、コントロールヒツジS27及びS28の両方がELISAで陰性を示した。

ワクチンBHKCT-HT、BHK13-HT又はBHK13-LT（BHK細胞で増殖させたSB）による免疫後3週間で、全てのヒツジ及びウシがELISAで陰性であったが、一方、S07、S08、S10（BHKCT-HT）、及びS04（BHK13-HT）では、低い抗体力価が中和アッセイで検出された。第二のワクチン接種に続いて、抗体は少なくとも1つの血清学的アッセイで検出され、ほとんどの事例で、中和抗体の顕著な増加が認められた。チャレンジ感染後3週間で、15匹のヒツジのうち8匹（S04、S06、S07、S09、S10、S11、S12、S15）及び6匹のウシのうち5匹（C01 - C05）が両アッセイで陽性であり、7匹のヒツジ（S01 - S03、S05、S08、S13、S14）及び残りのウシ（C6）が中和試験でのみ陽性であり、S15はELISAアッセイでのみ陽性であった。

ワクチンMA-HT又はMA-LT（MA-104細胞で増殖させたSBV）による1回の免疫後、全てのウシ及び2匹を除くすべてのヒツジが両血清学アッセイで陰性を示した。S22及びS23は、中和アッセイでそれぞれ1：5及び1：7の力価を有した。2回目のワクチン接種の後、S19、S24、C08及びC14では抗体を検出できなかった。S16、S21、C07、C09及びC10は両血清学アッセイで陽性を示したが、残りの動物は中和アッセイでのみ陽性であった。チャレンジ感染後3週間で、グループDの全てのヒツジ及びグループEの5匹のヒツジのうちの4匹が中和アッセイで陽性で、動物S16では抗体はELISAで検出でき、さらに動物S24は両アッセイで陰性であった。グループH（高力価のSBV）の全てのウシで、抗体はELISA及び中和アッセイで検出された。同じことがC12及びC13（グループI、低SBV力価）についても当てはまり、C11、C15及びC16は中和アッセイでのみ陽性であり、C14ではいずれの試験でも抗体は検出できなかった。

2回目の免疫後、平均中和抗体力価の上昇が観察されたが、チャレンジ感染後、全てのワクチン接種グループで中和力価の大半が変わらなかった。

【0045】

リアルタイムRT-PCR

1回目のワクチン接種の後で、いずれの動物でもSBVゲノムは検出されず（データは示されていない）、短時間及び長時間BEI不活化手順によるSBVの不活化の成功が確認された。

チャレンジ感染後には、1匹（S30）を除く全ての非ワクチン接種ヒツジが、2日目から4日目に（S27 - S29）、又は5日目に（S26）RT-qPCRで陽性を示した。6匹の非ワクチン接種ウシのうち1匹で、SBVゲノムが感染後1日目に初めて検出され、他の5匹の仔ウシは2日目に初めて陽性を示した。SBVゲノムは、5日目まで（C17、C19 - C21）、6日目まで（C22）又は7日目まで（C18）検出可能であり続けた。ワクチンMA-LTで免疫した6匹のウシのうち

3匹（C12、C13、C16）は3日目にRT-qPCRで陽性であったが、ワクチンMA-HTでワクチン接種した動物は、チャレンジに際してRNA血症（血中RNA）を生じなかった。

全てのワクチン接種ヒツジ、コントロールヒツジS30及びグループG及びH（高力価ワクチングループ）の全てのウシから採取した血清サンプルでは、チャレンジ感染後にウイルスRNAは検出できなかった。

【0046】

結論

5つの異なる不活化ワクチン処方物を創出し、続いてウシ及びヒツジで試験した。実験では、いずれの動物も顕著な有害作用を示さず、さらに全ての動物がワクチン接種に際して血清変換を示した。さらにまた、ワクチン接種に際して大半の（全てではないが）動物が検出可能なSBV中和抗体レベルを生じた。重要なことには、チャレンジ感染に際して、RNA血症は4つのプロトタイプワクチンによって完全に予防され、さらに5番目のワクチンによってかなり軽減された。これらのデータは、ウイルス感染防御は部分的には中和抗体を介して達成されること、及びまだ明らかではないまた別のメカニズム（おそらくは細胞性免疫に関連する）が、SBVチャレンジ時のウイルス除去に本質的に貢献することを示唆している。不活化ワクチンの2つの重要な特徴は、（i）感染ウイルスの完全な不活化（細胞培養継代及び1回目免疫後にRNA血症が存在しないことによって示された）、及び（ii）防御免疫の誘発、である。中和抗体は全てのワクチン接種動物でチャレンジ感染前には検出されなかったが、RNA血症は4つのプロトタイプワクチンで完全に予防され、5番目のワクチンによってかなり軽減された。リンパ網内系におけるウイルスRNAの検出が、本実験ではRNA血症とはまた別の診断ツールとして用いられた。コントロールとは対照的に、全てのワクチン接種動物は、類リンパ系（剖検時の類リンパ器官）、例えば腸間膜リンパ節でSBV-RNAについて明瞭に陰性であった。非ワクチン接種コントロールヒツジの1匹は、RNA血症もRT-qPCR陽性組織サンプルもチャレンジ感染後の血清変換も示さず、そのような観察が得られた理由は不明である。あり得る説明は、感染の失敗又はSBV感染に対する（天然の）耐性状態である。

とはいえ、ほとんどのワクチングループで検出可能なRNAが存在しないということは、ウイルスゲノムすらも（血清中で）検出できないのであればチャレンジウイルスは胎児に伝播され得ない、という結論を引き出すことを可能にする。

【0047】

RNA血症はワクチン接種によって予防又は顕著に軽減されたが、抗体はチャレンジ感染前には全ての動物において全ての試験で検出されなかった。全体として、ELISA試験と中和アッセイとの相関性は、特に非ワクチン接種動物のチャレンジ感染後のヒツジサンプルよりもウシサンプルで高かった。

全ヒツジグループで最高の抗体レベルは、非ワクチン接種ヒツジのチャレンジ感染後の中和試験で検出された。同じことが、いくつかのリフトバレー熱ワクチンによる免疫及びその後のチャレンジ後に観察され（8）、ここでは、しかしながら不妊免疫を提供せずウイルス血症の軽減のみが提供された。前記とは反対であるが、本実験で特徴的なSBVプロトタイプワクチンは、低レベルの中和抗体レベルにもかかわらずヒツジでRNA血症を完全に予防した。

我々の実験では、中和抗体の力価は、製造細胞株及び不活化前のウイルス力価によって影響を受けた。ワクチン調製に用いられた細胞培養上清の用量依存性はAKAVについても同様に報告され、用いられるものが不活化ウイルスであるか弱毒生ウイルスであるかに無関係であった（9,10）。少なくとも $10^{5.5}$ TCID₅₀/mLのウイルスがワクチンの創出に必要であると報告された。MA-104細胞で増殖させた $6.1 \log_{10}$ TCID₅₀/mLのウイルスを含むワクチンの2mLがRNA血症を完全に予防したが、 $5.7 \log_{10}$ TCID₅₀/mLで免疫した仔ウシの半分でウイルスゲノムが1日間検出されたので、同様な最少用量がSBVについて想定され得る。しかしながら、BHK-21細胞で製造されたワクチンでは、より低いウイルス力価（ $5.7 \log_{10}$ TCID₅₀/mL）が両動物種でRNA血症を完全に予防し、ヒツジでは単に $4.7 \log_{10}$ TCID₅₀/mLを要した。

結論すれば、種々のワクチン候補物におけるこの理論実証特徴付けで、5つのSBVワクチンプロトタイプのうち4つについて両主要標的種で高い有効性を提示できた。結果としてシュマレンベルクウイルスに対する死菌ワクチン（ウシ及びヒツジで有効かつ安全である）の創出が開示される。本実験で得られた結果は、不活化SBVワクチンを首尾よく用いて、反芻家畜におけるSBVの蔓延制御とともに疾患予防のための努力の支援が可能であることを示している。

【実施例3】

【0048】

以下では、また別の不活化手順及びその後の中和プロセスを述べる。前記手順及び中和プロセスはまた、SBV感染予防を成功させる有効なワクチンの製造を可能にした（製造に関する前記以外の工程は実施例1にしたがって実施した）。

不活化手順

最終抗原の不活化プロセスは合計12時間続き、用いたBEIの濃度は2mMであった。最終抗原は、不活化される抗原1リットル当たり11.9mLの割合でBEI 0.17M（最終濃度2mM）を添加することによって不活化した。BEIの添加後、混合物を 37 ± 1 で12時間攪拌し続けた。

残留BEIの中和

不活化工程が完了したら、BEIを中和するために、1Mのチオ硫酸ナトリウム溶液を不活化抗原1リットル当たり10mLの割合で添加した（最終濃度10mM）。

【実施例4】

【0049】

以下では、また別のMSV（マスターストックウイルス）の製造を述べる。これにより、SBV感染予防を成功させる有効なワクチンの工業的製造が可能になった（当該工業的製造プロセスのさらなる工程は実施例1にしたがって実施し、当該不活化手順は実施例3に記載したとおり実施した）。

5. MSV（マスターストックウイルス）の製造

SBV単離株2をMSV（マスターストックウイルス）の製造に用いた。Ma104-AK（ 5×10^7 細胞）をプレーティングしたローラーボトルをMOI 0.0001で感染させた。54時間インキュベートした後で、ローラーボトルを-20で凍結して融解し、2000gで5分遠心分離した。上清を収集し、1mLのアリコットを更なるプロセスまで-80 で保存した。

6. SBV抗原の製造

Ma104-AK（作業細胞ストック（WCS））は液体窒素で保存する。WCSを融解し、EMEM培養液及び10%のガンマ照射FCSを用いて細胞培養フラスコ（T160cm²）で増やした。組換えトリプシン（非動物起源）を用いて細胞をトリプシン消化した。1本のT160フラスコをトリプシン消化し、2%FCS含有EMEM培養液（150mL）に再懸濁させた。この細胞を用いて1本のローラーボトル（495cm²）にシードした。細胞懸濁物を含む複数のローラーボトルを37インキュベーターに置き、0.5rpmで回転させた。プレーティングしてから12 - 16時間後に細胞を 5×10^7 /ボトルの密度でプレーティングした。MOI 0.001による感染を用いた。感染細胞を持続的に37Cでインキュベートし、特異的なSBV細胞変性効果（CPE）が細胞の約60 - 70%に達する前まで、0.5rpmで72 - 96時間回転させた。この時点で、ローラーボトルフラスコ全体を-20 で凍結し、37 の水浴中で融解し、さらに更なるプロセスまで-80 で保存した。

【0050】

配列表：

配列番号：1は、感染性シュマレンベルクウイルス（BH80/11-4）のSセグメントの完全なゲノム配列と一致する；

配列番号：2は、感染性シュマレンベルクウイルス（BH80/11-4）のMセグメントの完全なゲノム配列と一致する；

配列番号：3は、感染性シュマレンベルクウイルス（BH80/11-4）のLセグメントの完全なゲノム配列と一致する；

配列番号：4は、配列番号：1のアンチパラレル（すなわち相補的かつ逆向き）RNA配

10

20

30

40

50

列と一致する；

配列番号：5は、配列番号：2のアンチパラレルRNA配列と一致する；

配列番号：6は、配列番号：3のアンチパラレルRNA配列と一致する；

配列番号：7は、配列番号：1と一致し、ここで9位のヌクレオチドは“g”の代わりに“a”である；

配列番号：8は配列番号：7のアンチパラレルRNA配列と一致し、したがって配列番号：4と一致し、ここで831位のヌクレオチドは“c”の代わりに“u”である。

【 0 0 5 1 】

参考文献

本明細書に引用した全ての参考文献は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

10

1. B. Hoffmann ., M. Scheuch, D. Höper, R. Jungblut, M. Holsteg, H. Schirrmeier, M. Eschbaumer, K. V. Goller, K. Wernike, M. Fischer, A. Breithaupt, T.C. Mettenleiter, M. Beer, Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 469–472 (2012).

2. M.-M. Gariglinany et al., Schmallerberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (2012), doi: 10.3201/eid1806.120104.

3. M. D. Bowen et al., A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology.* 291, 185–190 (2001).

4. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz, Eds., *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (Elsevier, San Diego, USA, 2011), pp 725–731.

20

5. R. M. Kinney, C. H. Calisher, Antigenic relationships among Simbu serogroup (Bunyaviridae) viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1307–1318 (1981).

6. M. F. Saeed, L. Li, H. Wang, S. C. Weaver, A. D. Barrett, Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus Bunyavirus. *J. Gen. Virol.* 82, 2173–2181 (2001).

7. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallerberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary microbiology* 2012 Mar 30.

8. Kortekaas J, Antonis AF, Kant J, Vloet RP, Vogel A, Oreshkova N, et al. Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep. *Vaccine* 2012 May 14;30(23):3423–9.

9. Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y, Satoda K, et al. Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *National Institute of Animal Health quarterly* 1978 Winter;18(3–4):97–108.

30

10. Kurogi H, Inaba Y, Akashi H, Takahashi E, Sato K, Satoda K, et al. Immune response of various animals to Akabane disease live virus vaccine. *National Institute of Animal Health quarterly* 1979 Summer;19(1–2):23–31.

【 配列表 】

0006250649000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
- (72)発明者 ニコリン ヴェルコ
ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテンツ内
- (72)発明者 シュタードラー コンラート
ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテンツ内
- (72)発明者 リシェウスキー アクセル
ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテンツ内
- (72)発明者 ブリクス アレクサンダー
アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コ
ーポレーション ヴィピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 ニッテル ジェフリー ピー
アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ
ード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コ
ーポレーション ヴィピー アイピー リーガル内
- (72)発明者 テブファー カタリーナ ヘートヴィヒ
ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテンツ内

審査官 参鍋 祐子

- (56)参考文献 特開平 0 5 - 3 2 8 9 6 7 (J P , A)
特表 2 0 1 1 - 5 0 4 1 7 4 (J P , A)
特開昭 6 3 - 0 4 1 4 2 8 (J P , A)
特開 2 0 0 3 - 1 7 6 2 3 8 (J P , A)
Emerging Infectious Diseases , 2 0 1 2 年 3 月 , Vol.18, No.3 , pp.469-472
Genbank:HE649912.1 , [online] , 2 0 1 2 年 3 月 , [平成 2 9 年 2 月 2 2 日検索] , インターネ
ット < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/he649912> >
Genebank:HE649913.1 , [online] , 2 0 1 2 年 3 月 , [平成 2 9 年 2 月 2 2 日検索] , インター
ネット < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/he649913> >
Genebank:HE649914.1 , [online] , 2 0 1 2 年 3 月 , [平成 2 9 年 2 月 2 2 日検索] , インター
ネット < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/he649914> >
J. Vet. Med. Sci. , 2 0 0 6 年 , Vol.68(6) , pp.543-548
Vaccine , 2 0 0 9 年 , Vol.27 , pp.D69-D72

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 9 / 1 2

A 6 1 K 3 9 / 3 9

A 6 1 P 3 1 / 1 2

A 6 1 P 3 1 / 1 4

C 1 2 N 7 / 0 4

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

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