

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-506699

(P2012-506699A)

(43) 公表日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/14 (2006. 01)	C 0 7 K 14/14 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 7/00 (2006. 01)	C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-533331 (P2011-533331)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月22日 (2009. 10. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年6月16日 (2011. 6. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/061669
 (87) 国際公開番号 W02010/048394
 (87) 国際公開日 平成22年4月29日 (2010. 4. 29)
 (31) 優先権主張番号 61/108, 075
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008. 10. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/163, 517
 (32) 優先日 平成21年3月26日 (2009. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

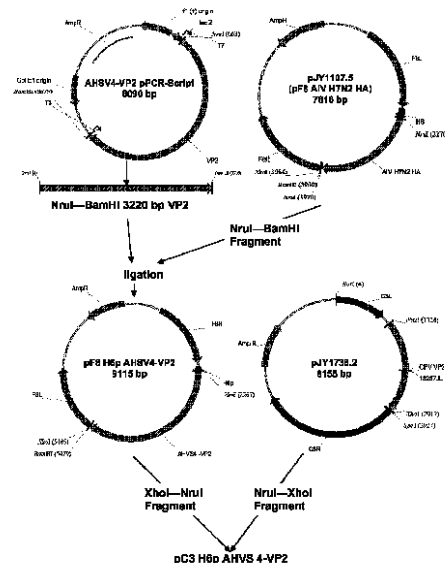
(71) 出願人 304040692
 メリアル リミテッド
 アメリカ国 ジョージア 30096 ダ
 ルース サテライトブルーバード 323
 9
 (71) 出願人 592130699
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 The Regents of The
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフリカウマ病ウイルスに対するワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ウマにおいてアフリカウマ病ウイルスに対抗する免疫応答を誘引する、アフリカウマ病ウイルスのVP2およびVP5またはそのエピトープをコードする遺伝子を含み、さらに前記遺伝子をin vivoで発現するベクター、前記ベクターを含む組成物、アフリカウマ病ウイルスに対してワクチン接種する方法、並びにそのような方法および組成物とともに使用されるキットを提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下のa)およびb)を含む医薬組成物：

a) AHSV VP、AHSV VPの変種またはフラグメント、およびその混合物から成る群から選択される1つまたは2つ以上のポリペプチドをコードする1つまたは2つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

および

b) 医薬的または獣医的に許容できるビヒクル、希釈剤または賦形剤。

【請求項 2】

発現ベクターがin vivoまたはin vitro発現ベクターである、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項 3】

ポリヌクレオチドがAHSV VP2またはVP5をコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

ベクターが、AHSV VP2およびAHSV VP5をコードする2つのポリヌクレオチドを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

ポリヌクレオチドが、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項 6】

ポリヌクレオチドが、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 7】

ポリヌクレオチドが、配列番号：3、4、5、6、17、18、19、22、27、28、29、32、33、34、41、42、43、48または50に記載の配列を有するポリヌクレオチドと少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

ベクターが、vCP2377（配列番号：17）、vCP2383（配列番号：27）、vCP2398（配列番号：41）およびその混合物から成る群から選択される、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項 9】

医薬的または獣医的に許容できるビヒクル、希釈剤または賦形剤がCARBOPOLである、請求項1に記載の組成物。

【請求項 10】

AHSV VP、前記AHSV VPの変種またはフラグメント、およびその混合物から成る群から選択される1つまたは2つ以上のポリペプチドをコードする1つまたは2つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 11】

ポリヌクレオチドが、
a) 配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
b) 配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；および
c) 配列番号：3、4、5、6、17、18、19、22、27、28、29、32、33、34、41、42、43、48または50に記載の配列を有するポリヌクレオチドと少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチドから成る群から選択され、

40

50

ベクターがin vivo発現ベクターまたはin vitro発現ベクターである、請求項10に記載のベクター。

【請求項 1 2】

ベクターがウイルスベクターであり、前記ウイルスベクターがアビボックス、カナリアボックスまたは鶏痘ベクターである、請求項11に記載のベクター。

【請求項 1 3】

ベクターが2つのポリヌクレオチドを含み、前記2つのポリヌクレオチドが、配列番号：4、42および18から成る群から選択されるポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するAHSV VP2、並びに配列番号：5、43および19から成る群から選択されるポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するAHSV VP5をコードする、請求項12に記載のベクター。

10

【請求項 1 4】

ポリヌクレオチドが、H6ワクシニアプロモーター、13Lワクシニアプロモーター、42Kボックスウイルスプロモーター、7.5KワクシニアプロモーターおよびPiワクシニアプロモーターから成る群から選択されるプロモーターに作動できるように連結されている、請求項13に記載のベクター。

【請求項 1 5】

AHSV VP2をコードするポリヌクレオチドがH6ワクシニアプロモーターに作動できるように連結され、さらにAHSV VP5をコードするポリヌクレオチドが42Kボックスウイルスプロモーターに作動できるように連結される、請求項14に記載のベクター。

20

【請求項 1 6】

請求項10に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の組成物の有効量を宿主に投与する工程を含む、動物において免疫学的応答を誘発する方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の組成物を少なくとも 1 回投与する工程を含む、アフリカウマ病感受性動物にワクチン接種する方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の組成物を少なくとも 2 回投与する工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

30

【請求項 2 0】

単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが

a) 配列番号：48または50に記載の配列を有するポリヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列；

b) 配列番号：49または51に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または

c) 配列番号：49または51に記載の配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも70%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、前記単離ポリヌクレオチド。

40

【請求項 2 1】

実質的に精製されたAHSV VPであって、

a) 配列番号：49または51に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

b) 配列番号：49または51に記載のアミノ酸配列の保存的変種；

c) 配列番号：49または51に記載のアミノ酸配列と特異的に結合する抗体と特異的に結合する、配列番号：49または51に記載のアミノ酸配列の少なくとも8つの保存アミノ酸を含む免疫原性フラグメント；または

d) 配列番号：49または51に記載のアミノ酸配列を有し、

さらに前記ポリペプチドの対象動物への投与がAHSVに対する免疫応答を生じる、前記精製

50

AHSV VP。

【請求項 2 2】

単離されたアフリカウマ病ウイルスAHSV4-Jane株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

参照により含まれる事柄

本出願は、米国仮特許出願番号61/108,075（2008年10月24日出願）および米国仮特許出願番号61/163,517（2009年3月26日出願）の権利を主張する。

前述の出願、およびそれらにおいてまたはそれらに審査の間に引用された全ての文書（“出願引用文書”）並びに前記出願引用文書中の全ての文書および参考文献、並びに本明細書で引用または参照された全ての文書（“本明細書引用文書”）並びに本明細書引用文書中で引用または参照された全ての文書は、本明細書または参照により本明細書に含まれる一切の文書に記載された一切の製品についての一切の製造業者による指示、記載、製品明細書およびプロダクトシートとともに参照により本明細書に含まれ、さらに本発明の実施に利用することができる。

【0002】

本発明は、アフリカウマ病ウイルス（African Horse Sickness Virus）（AHSV）に対して対象動物にワクチン接種することに関する。特に、本発明は、アフリカウマ病ウイルスの1つまたは2つ以上の免疫原性タンパク質を含みそれらをウマで発現する組換えベクターの構築および使用に関する。本発明はさらに、アフリカウマ病ウイルスに対して免疫応答を誘発する免疫学的組成物またはワクチンに関する。本発明はさらに、アフリカウマ病ウイルスによる感染に対する防御免疫を付与する組成物またはワクチンに関する。

いくつかの刊行物が本明細書で引用される。これら文書の完全な引用は、特許請求の範囲に先行する詳細な説明の最後、および/または当該文書が引用されてある箇所で見出される。これらの文書は本発明の分野に属し、本明細書で引用または参照されるそれら文書（“本明細書引用文書”）の各々および本明細書引用文書で引用または参照される各文書は、参照により本明細書に含まれる。

【背景技術】

【0003】

アフリカウマ病（AHS）は、重篤でしばしば致死性の、ウマおよびラバの節足動物媒介ウイルス性疾患である（African Horse Sickness, The Merck Veterinary Manual）。致死率はこの疾患のいくつかの形態では95%の高率であり得る。無症状または軽度の感染が、シマウマおよびロバと同様にウマで、特に以前にこのウイルスの異なる血清型に感染したウマで生じ得る。感染動物または媒介動物はこのウイルスをAHS非汚染地域に運び入れることができる。何人かの著者らは、関連するブルータングウイルスで最近発生したように、気候の変化が節足動物媒介疾患（例えばアフリカウマ病）の拡散リスクを高める可能性があると推測している（A. Wilson et al. 2008, Parasitol Res, 103:69-77）。クリコイデス・イミコラ（Culicoides imicola）（この疾患の主要な媒介動物）は、北アフリカおよび南ヨーロッパへの侵入を果たした。潜在的な節足媒介動物はまた、世界の本質的に全地域（米国の大半およびアメリカの残りの地域を含む）に存在する。

アフリカウマ病は、アフリカウマ病ウイルス（レオウイルス科のオルビウイルス属のメンバー）の感染により生じる。今日までにアフリカウマ病ウイルスの9つの血清型が知られている。アフリカウマ病ウイルスの血清型9は固有の地域で広範囲に蔓延しているが、一方、血清型1から8は地理的に限定的な領域で主として見出される。血清型9はアフリカ以外の大半のアフリカウマ病流行の原因であった。血清型4は1987年から1990年の間にスペインおよびポルトガルで1つの流行を引き起こした（J. Lubroth, 1998, Equine Pract, 10:26-33）。

【0004】

アフリカウマ病ウイルスの初期の研究によって、1930年代にアフリカウマ病ウイルスに

対するマウス脳弱毒化改変生ウイルスワクチンが開発された。これらのワクチンは洗練され、1960年代に組織培養弱毒化改変生ウイルス（MLV）ワクチンが開発された。

このワクチンの有効性にもかかわらず、前記ワクチンは以下を含む固有の限界を有する：個々の動物におけるワクチン反応（死亡を含む）、個々の動物における多様な免疫応答、母体由来受動免疫を有する若年動物の免疫の困難性、ワクチンウイルスのビルレンスへの復帰の可能性、およびビルレンスへの起こり得る復帰を伴うワクチン接種後のワクチン株の組換え（M. du Plessis et al. 1998, Onderstepoort Journal of Veterinary Research 65:321-329）。さらにまたMLVの使用に関して社会経済学的示唆が存在する。南アフリカは、欧州連合および他の多くの国へのウマの輸出を許容するプロトコルを有する。このプロトコルはまたウマが他国から南アフリカに入り多様な事象で競合するかまたは一時的に繁殖用となることを可能にする。前記プロトコルは、アフリカウマ病に対してウマが適切にワクチン接種されていることの保証を基本にしている。獣医機関はMLVワクチン使用により起こり得る危険性を認識している。これらの問題の多くは、代替アフリカウマ病ウイルスワクチンの開発によって大きく緩和されよう。

【0005】

アフリカウマ病ウイルスゲノムは、少なくとも10個のウイルスタンパク質をコードする10個の二本鎖RNAセグメントで構成される（R.A. Oellermann et al. 1970 ; C.W. Bremer et al. 1976）。前記ゲノムセグメントは、PAGEでのそれらの泳動順に1 - 10の番号が付与されている。前記ウイルスタンパク質のうち7つは構造タンパク質であり、二重の外殻を有するウイルス粒子を形成する。外側キャプシドは2つの主要ウイルスタンパク質、VP2およびVP5（前記はアフリカウマ病ウイルスの抗原変動性を決定する）で構成され、一方、内側キャプシドは、2つの主要ウイルスタンパク質（VP3およびVP7）および3つの微量ウイルスタンパク質（VP1、VP4およびVP6）で構成される（SA Lewis and MJ Grubman, 1991 ; JL Martinez-Torrecuadrada et al. 1994 ; CW Bremer et al. 1990 ; MJ Grubman & SA Lewis, 1992）。VP3とVP7は9つの血清型間で高度に保存されている（Oellermann et al. 1970 ; Bremer et al. 1990）。少なくとも3つの非構造タンパク質（NS1、NS2およびNS3）が認定された（H. Huismans & HJ Els, 1979 ; V. van Staden & H Huismans, 1991 ; N. Mizukoshi et al. 1992）。

弱毒化ウイルスに由来する組換えカナリアボックスウイルスが、異種性ウイルス遺伝子の発現用ベクターとして開発された。爾来、これらの多数のカナリアボックス構築物が、多くの国々（南アフリカ、欧州連合およびアメリカ合衆国を含む）でウマ（JM Minke et al. 2004aおよび2004b ; JM Minke et al. 2007 ; L Siger et al. 2006）および他の種（H Poulet et al. 2003）での使用について認可された。

【0006】

これらのワクチンが問題の生物の遺伝子しか含まないという事実により、それらのワクチンは本質的に安全である（M Minke et al. 2004b）。さらにまた、検出可能な中和抗体の開始はただ1回のワクチン用量の投与後でも迅速である（JM Minke et al. 2004b）。そのようなワクチンの固有の安全性および中和抗体の出現の特質は、家畜流行病での使用についてそのようなワクチンを特に有望なものにする（Minke et al. 2004a）。

以前の研究によって、ウマは、外因的に発現させたVP2および適切なアジュバントを接種されたときAHSに対する中和抗体を出現させることが示された（M Scanlen et al. 2002）。ヒツジでの研究によって、ブルータングウイルスに対する中和抗体の応答は、VP2およびVP5を同時発現するウイルス様粒子をヒツジに接種することによって強化されることが示された（LD Pearson, P Roy, 1993）。ブルータングウイルスのVP2およびVP5外側キャプシドタンパク質をコードする遺伝子を同時発現する組換えカナリア痘瘡ウイルスワクチンは、高レベルの防御を誘発することが最近示された（JD Boone et al. 2007）。

AHSV VP2およびVP5を含み、前記を同時発現するベクターを接種したとき、ウマはアフリカウマ病ウイルスに対する中和抗体を出現させることはまだ示されていない。したがって、組換えボックスウイルス（前記由来の組成物および生成物を含む）、特にALVAC系組換え体並びに前記由来の組成物および生成物、特にAHSV VP2および5またはその任意の組

10

20

30

40

50

合せを発現する組換え体並びに前記に由来する組成物および生成物を提供することによって、本発明は当業界の要請を満たすことは理解し得よう。

本出願におけるいずれの文書の引用または検証も当該文書が本発明の先行技術として利用可能であることを容認するものではない。

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、組換えベクターまたはウイルス、および、そのような組換えベクターまたはウイルスの製造方法を提供すること、さらにアフリカウマ病ウイルスによる感染を治療および予防するための組成物および/またはワクチン、および、前記治療および予防のための方法を提供すること、のいずれか1つまたは全部であり得る。

本発明は、少なくとも1つの外因性核酸分子を含み、これを発現する組換えベクター、例えば組換えウイルス（例えば組換えボックスウイルス）を提供する。前記少なくとも1つの外因性核酸分子は、アフリカウマ病ウイルスに由来する問題の免疫原またはエピトープ、特にアフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質またはその部分をコードする核酸分子を含むことができる。

本発明はさらに、前記アフリカウマ病ウイルス株が1、2、4または9である組換えベクターを提供する。

本発明はさらに、そのようなウイルスまたはそのようなウイルスの発現生成物を含む免疫学的（または免疫原性）またはワクチン組成物を提供する。

本発明はさらに、アフリカウマ病ウイルスに対抗する免疫学的（または免疫原性）または防御応答を誘発する方法、および、アフリカウマ病ウイルスまたはアフリカウマ病ウイルスによって引き起こされる症状を予防または治療する方法を提供する。前記方法は、前記ウイルスもしくは前記ウイルスの発現生成物、または前記ウイルスを含む組成物、または前記ウイルスの発現生成物を含む組成物を投与する工程を含む。

本発明はまた、前記ウイルスの発現生成物、前記発現生成物またはそのin vivo発現から生みだされる抗体、並びにそのような生成物および抗体の例えば診断的利用における使用を包含する。

本発明はさらに、AHSV VP2およびVP5ポリペプチド並びにAHSV VP2およびVP5ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、新規なAHS株のAHSV4-Janeを提供する。

これらの実施態様および他の実施態様は以下の詳細な説明に記載されているか、または詳細な説明から明白であり前記に含まれている。

以下の詳細な説明（例示として提供されるが記載した特定の実施態様にのみ本発明を限定しようとするものではない）は、添付の図面と一緒にして最良の理解を提供しよう。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】 pLHD3460.4（合成AHSV-4-VP2（配列番号：1）および合成AHSV-4-VP5（配列番号：2）タンパク質を発現するALVAC組換え体を作製するためのC3ドナープラスミド）の構築模式図を提供する。

【図2】 pLHD3460.4（pC3 H6P合成AHSV-4-VP2/42Kp合成AHSV-4-VP5）のマップおよび対応する配列番号を提供する。pLHD3460.4 = 配列番号：6；AHSV-4VP2 DNA（pLHD3460.4） = 配列番号：4；AHSV-4VP5 DNA（pLHD3460.4） = 配列番号：5；AHSV-4VP2 PRT（pLHD3460.4）の予想されるAA配列 = 配列番号：1；AHSV-4VP5 PRT（pLHD3460.4）の予想されるAA配列 = 配列番号：2。

【図3】 vCP2377（ALVAC C3 H6P-合成AHSV-4-VP2/42Kp-合成AHSV-4-VP5）のin vitro組換えの模式図を提供する。

【図4】 ベクターNT1中に作出されたゲノムDNAの理論的制限酵素ゲルを提供する。

【図5】 vCP2377.6.1.1のP3ストックを抽出した後でBamHI、HindIIIまたはPstIにより消化したゲノムDNAの0.8%アガロースゲル電気泳動の結果を提供する。

【図6】 AHSV-4-VP2プローブを用いたvCP2377.6.1.1のサザンブロット分析を提供する。

【図 7】AHSV-4-VP5タンパク質の発現を示す、組換えvCP2377のウェスタンブロット分析の結果を提供する。

【図 8】マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代9を1：100の希釈で用いたとき、vCP2377.6.1.1集団の100%均一性を示すイムノブランクの結果を提供する。

【図 9】C3R-AHSV挿入物-C3Lフラグメントの増幅に用いられたプライマーのマップ、および組換えvCP2377.6.1.1配列のための配列番号参照（配列番号：17 - 21）を提供する。

【図 10】pCXL2415.1（配列番号：22）（AHSV9-VP2（配列番号：20）およびAHSV9-VP5（配列番号：21）タンパク質を発現するALVAC組換え体を作製するためのC3ドナープラスミド）の構築模式図を提供する。

【図 11】pCXL2415.1（pALVAC C3 AHSV-9 H6 VP2 42K VP5）のマップおよび関連する配列番号（18 - 21）を提供する。

【図 12】vCP2383（ALVAC C3 H6-合成AHSV9 VP2/42K-合成AHSV9 VP5）のin vitro組換えの模式図を提供する。

【図 13】ベクター-NTI中に作出されたゲノムDNAの理論的制限酵素ゲルを提供する。

【図 14】vCP2383.3.1.1.1およびvCP2383.9.1.1.1から抽出した後でBamHI、HindIIIまたはXbaIにより消化したゲノムDNAの0.8%アガロースゲル電気泳動の結果を提供する。

【図 15】AHSV-4-VP5プローブを用いたvCP2383のサザンブロット分析を提供する。

【図 16】AHSV9 VP5タンパク質の発現を示す、組換えvCP2383のウェスタンブロット分析の結果を提供する。

【図 17】マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代9を1：100の希釈で用いたとき、vCP2383.3.1.1.1集団の100%均一性を示すイムノブランクの結果を提供する。

【図 18】全C3L-H6 AHSV9 VP2-42K AHSV9 VP5-C3Rフラグメントの増幅に用いられたプライマーのマップ、および組換えvCP2383配列に対して対応する配列番号（27 - 31）を提供する。

【図 19】感染CEF細胞における抗VP2および抗VP5 IFIによる免疫蛍光の結果を提供する。

【図 20 A - B】抗VP2（A）および抗VP5（B）を用いた、感染およびトランスフェクトさせたCEFにおけるウェスタンブロットの結果を示す。

【図 21】cpAHSV-4（vCP2377）を用いてワクチン接種された6頭のウマについてのAHSV-4に対する血清-中和試験の結果を提供する。結果は0、28および42日目について示されている。

【図 22】pJSY2247.2（AHSV5-VP2およびVP5タンパク質を発現するALVAC組換え体を作製するためのC3ドナープラスミド）の構築模式図を提供する。

【図 23】pJSY2247.2（pALVAC C3 AHSV5 H6 VP2 42K VP5）配列のマップおよび対応する配列番号を提供する。

【図 24】vCP2398（ALVAC C3 H6-合成AHSV5 VP2/42K-合成AHSV5 VP5）のin vitro組換えの模式図を提供する。

【図 25】ベクター-NTI中に作出されたゲノムvCP2398 DNAの理論的制限酵素ゲルを提供する。

【図 26】vCP2398.2.1.1.1および3.1.1から抽出しBamHI、HindIIIまたはPstIにより消化したゲノムDNAの0.8%アガロースゲル電気泳動の結果を提供する。

【図 27】AHSV5 VP2特異的プローブを用いたvCP2398のサザンブロット分析を提供する。

【図 28】AHSV5 VP5タンパク質の発現を示す、組換えvCP2398のウェスタンブロット分析の結果を提供する。

【図 29】マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代を1：100の希釈で用いたとき、vCP2383.2.1.1集団の100%均一性を示すイムノブランクの結果を提供する。

【図 30】組換えvCP2398のために全C3L-H6 AHSV5 VP2-42K AHSV5 VP5-C3Rフラグメントを増幅するために用いられたプライマーのマップを提供する。

【図 31】vCP2377（部分的に配列番号：17で示されている）でワクチン接種された8頭のウマおよびEIV-CPで免疫された1頭のウマのAHSVチャレンジの結果に関する3つのパネルを

10

20

30

40

50

提供する。 パネルA：AHSV NS2およびVP7タンパク質をコードする遺伝子についてのqRT-PCRのサイクル閾値（NS2およびVP7プロファイルの平均が示されている）。ウマの血液中のAHSVの存在は、AHSVのVP7およびNS2タンパク質をコードする個々の遺伝子を検出するqRT-PCRによって決定され、最大40サイクル以内で蛍光が0.1の閾値を越えた場合にサンプルは陽性と分類された。 パネルB：体温、IDEM。 パネルC：ビルレント野外株AHSV血清型4。IDEMでチャレンジした後の、8頭のvCP2377ワクチン接種ウマおよび1頭のワクチン未接種コントロールウマの血小板数。

【図32】配列表に存在する配列番号を要約した図表を提供する。

【図33】AHSV-4/5/9 VP2タンパク質（配列番号：1、44、30）のClusta1Wアラインメントを提供する。

【図34】AHSV-4/5/9 VP5タンパク質（配列番号：2、45、31）のClusta1Wアラインメントを提供する。

【図35】合成AHSV-4-VP2タンパク質（配列番号：1）と野外単離株AHSV4 Jane株（配列番号：49）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性もまた示される。

【図36】合成AHSV-4-VP5タンパク質（配列番号：2）と野外単離株AHSV4 Jane株（配列番号：51）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性もまた示される。

【図37】合成AHSV-4-VP2タンパク質（配列番号：1）と多数の寄託AHSV-4-VP2タンパク質（配列番号：59 - 63）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性の表が提供される。

【図38】合成AHSV-4-VP5タンパク質（配列番号：2）と多数の寄託AHSV-4-VP5タンパク質（配列番号：52 - 58）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性の表が提供される。

【図39】コドン最適化AHSV-4-VP2（配列番号：04）と野外単離株AHSV-4-VP2（配列番号：48）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性が提供される。

【図40】コドン最適化AHSV-4-VP5（配列番号：05）と野外単離株AHSV-4-VP5（配列番号：50）とのClusta1Wアラインメントを提供する。パーセント同一性が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0009】

詳細な説明

本開示および特に特許請求項および／または文書で、例えば“comprise”、“comprised”、“comprising”などの用語は、米国特許法で前記用語に帰された意味を有し、例えば、それらは“include”、“included”、“including”などを意味することができ、さらに、例えば“consisting essentially of”および“consists essentially of”、のような用語は、米国特許法でそれらに帰された意味を有し、例えば、それらは明示的に列挙されていない要素も考慮するが、先行技術において見出されたかまたは本発明の基礎的または新規な特徴に影響を及ぼす要素を排除することが特筆される。

特段の記載がなければ、技術用語は慣例にしたがって用いられる。分子生物学における一般的用語の定義は以下で見出すことができる：Benjamin Lewin, Genes V, 1994年Oxford University Press発行（ISBN 0-19-854287-9）；Kendrew et al.編、The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994年Blackwell Science Ltd.発行（ISBN 0-632-02182-9）；およびRobert A. Meyers編、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995年VCH Publishers, Inc.発行（ISBN 1-56081-569-8）。

単数用語の“a”、“an”および“the”には、文脈が明白にそうでないことを示していないかぎり複数の対象が含まれる。同様に、“or”という語は、文脈が明白にそうでないことを示していないかぎり“and”を含むことが意図される。“or”という語は、具体的なリストの任意の1つのメンバーを意味し、当該リストのメンバーの任意の組合せもまた含む。

【0010】

標的種または対象動物（宿主）には動物およびヒトが含まれる。本明細書で用いられる動物は、ウマ科の動物（例えばウマ）、イヌ科の動物（例えばイヌ、オオカミ、キツネ、

10

20

30

40

50

コヨーテ、ジャッカル)、ネコ科の動物(例えばライオン、トラ、イエネコ、野生ネコ、他の大型のネコ類および他のネコ科の動物(チーターおよびオオヤマネコを含む))、羊類(例えばヒツジ)、ウシ科の動物(例えばウシ)、豚類(例えばブタ)、鳥類(例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ダチョウ、エミユおよびヒクイドリ)、霊長類(例えばキツネザル、メガネザル、有尾猿、テナガザル、無尾猿)および魚類から成る群から選択することができる。“動物”という用語にはまた全ての発育段階(胚性期および胎児期を含む)の個々の動物が含まれる。

“ポリペプチド”および“タンパク質”という用語は本明細書では相互に用いられ、連続するアミノ酸残基のポリマーを指す。

“核酸”、“ヌクレオチド”および“ポリヌクレオチド”という用語はRNAまたはDNAおよびそれらの誘導体(例えば改変骨格を含むもの)を指す。本発明は、本明細書に記載した配列に相補的な配列を含むポリヌクレオチドを提供することは理解されよう。本発明のポリヌクレオチドは、種々の方法で(例えば化学的合成によって、遺伝子クローニングによって)調製することができ、多様な形態(例えば線状または分枝、一本鎖または二本鎖、または前記のハイブリッド、プライマー、プローブなど)をもつことができる。

【0011】

“遺伝子”という用語は広く用いられ、生物学的機能と密接に関連するポリヌクレオチドの任意のセグメントを指す。したがって、遺伝子またはポリヌクレオチドは、ゲノム配列の場合にはイントロンおよびエクソン、cDNAの場合には単にコード配列、例えばオープンリーディングフレーム(ORF)(開始コドン(メチオニンコドン)から始まり終了シグナル(停止コドン)で終わる)を含む。遺伝子およびポリヌクレオチドはまたそれらの発現、例えば転写開始、翻訳および転写終了を調節する領域を含むことができる。したがって、プロモーターおよびリボソーム結合領域(一般的にはこれらの調節エレメントはコード配列または遺伝子の開始コドンのほぼ60から250ヌクレオチド上流に存在する(SM Dore et al.; K Pandher et al.; JY Chung et al.))、転写ターミネーター(一般的にはターミネーターはコード配列または遺伝子の停止コドンのほぼ50ヌクレオチド下流に位置する; CK Ward et al.)もまた含まれる。遺伝子またはポリヌクレオチドはまた、mRNAまたは機能的なRNAを発現するか、または特異的なタンパク質をコードする核酸フラグメントを指し、前記には調節配列が含まれる。

本明細書で用いられる“免疫原性ポリペプチド”または“免疫原性フラグメント”という用語は、対立遺伝子特異的モチーフ、エピトープまたは他の配列を含むポリペプチドまたはポリペプチドのフラグメントであって、前記ポリペプチドまたはフラグメントがMHC分子と結合し、細胞傷害性Tリンパ球(“CTL”)応答、および/またはB細胞応答(例えば抗体産生)、および/またはT-ヘルパーリンパ球応答、および/または免疫原性ポリペプチドまたは免疫原性フラグメントが由来した抗原に対する遅延型過敏(DTH)応答を誘発するようなものを指す。DTH応答は、T-細胞依存マクロファージ活性化および炎症が組織の損傷を引き起こす免疫反応である。抗原の皮下注射に対するDTH反応は、細胞媒介免疫のためのアッセイとしてしばしば用いられる。

【0012】

定義すれば、エピトープとは、いったん宿主に投与されると液性(B細胞)および/または細胞性タイプ(T細胞)の免疫応答を引き起こすことができるという意味で免疫学的に活性な抗原決定基である。これらは、抗原性を有する分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体はポリペプチド上の特定の抗原性エピトープと特異的に結合する。エピトープの具体的で非限定的な例には、ポリペプチド中のテトラペプチドからペンタペプチドの配列、多糖類中のトリグリコシドからテトラグリコシドの配列が含まれる。動物では、大半の抗原がいくつかの、場合によって多数の抗原決定基を同時に提示するであろう。そのようなポリペプチドはまた免疫原性ポリペプチドとみなされ、エピトープはさらに詳述するように認定することができる。

本明細書で用いられる“精製”という用語は絶対的純度を要求せず、むしろ相対的用語

10

20

30

40

50

とされる。したがって、例えば精製ポリペプチド調製物は、当該ポリペプチドがその天然の環境に存在する場合よりも濃縮されている調製物である。ポリペプチド調製物は、いくつかの実施態様では、当該ポリペプチドが調製物の全ポリペプチド含有量の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%を占めるように実質的に精製される。同じことがポリヌクレオチドにも当てはまる。本明細書に開示したポリペプチドは当分野で公知の任意の手段によって精製することができる。

【0013】

組換えポリヌクレオチドは、天然には生じない配列を有するか、または人工的に結合させなければ分離している2つの配列セグメントの人工的結合によって生成される配列を有するポリヌクレオチドである。この人工的結合は、化学的合成によって、またはより一般的には核酸の単離セグメントの人工的操作によって、例えば遺伝子操作技術によってしばしば達成される。ある実施態様では、組換えポリヌクレオチドは融合タンパク質をコードする。

ある特徴では、本発明はアフリカウマ病ウイルス由来のポリペプチドを提供する。別の特徴では、本発明は、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドおよびその変種またはフラグメントを提供する。

本明細書で用いられるように、“アフリカウマ病ウイルスタンパク質またはアフリカウマ病ウイルスポリペプチド(AHSV VP)”という用語には、AHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2並びにそれらのホモログ、フラグメントおよび変種が含まれる。

アフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質のホモログは本発明の範囲内にあると考える。本明細書で用いられるように、“ホモログ”という用語は、オルトログ、アナログおよびパラログを含む。“アナログ”という用語は、同じまたは類似の機能を有するが無関係の生物で別個に進化した2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。“オルトログ”という用語は、異なる種に由来するが共通の先祖遺伝子から種分化によって進化した2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。通常は、オルトログは同じまたは類似の機能を有するポリペプチドをコードする。“パラログ”という用語は、ゲノム内での重複によって関連性を有する2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。パラログは通常異なる機能を有するが、これらの機能は関連を有することがある。野生型のアフリカウマ病ウイルスポリペプチドのアナログ、オルトログおよびパラログは、翻訳後修飾により、アミノ酸配列の相違により、またはその両方により野生型アフリカウマ病ウイルスポリペプチドとは相違することがある。具体的には、本発明のホモログは、野生型アフリカウマ病ウイルスポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の全部または部分に関して一般的少なくとも80 - 85%、85 - 90%、90 - 95%または95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を示し、類似の機能を示すであろう。

【0014】

別の特徴では、本発明は、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するAHSV VPを提供する。

さらに別の特徴では、本発明は、上記に認定のAHSV VP(配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63)のフラグメントおよび変種を提供し、前記は当業者により周知の分子生物学的技術を用いて容易に調製することができる。

変種は、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する相同なAHSV VPである。

10

20

30

40

50

【0015】

変種には対立遺伝子変種が含まれる。“対立遺伝子変種”という用語は、タンパク質のアミノ酸配列における変化をもたらし、天然の集団（例えばウイルスの種または変種）に存在する多形成をもつポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。そのような天然の対立遺伝子変種は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおいて典型的には1 - 5%の変異度をもたらし得る。対立遺伝子変種は多数の異なる種で問題の核酸配列をシーケンシングすることによって認定することができ、シーケンシングは、ハイブリダイゼーションプローブを用いてそれらの種で同じ遺伝子の遺伝子座を識別することによって容易に達成することができる。天然の対立遺伝子の変異の結果であり機能的活性を変化させない、任意のおよび全ての核酸変異並びにその結果のアミノ酸多形性または変異は、必要ならば本発明の範囲内であると考える。

10

変種はワクチン接種した動物（例えばウマ）においてアフリカウマ病ウイルスによる刺激時にインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）の分泌を特徴とする特異的な細胞系免疫応答を誘導することができるアフリカウマ病ウイルス由来の任意のポリペプチドである。そのようなIFN-ガンマ分泌はin vitro方法論（すなわちR&D Systems Inc.のQUANTIKINE（商標）イムノアッセイ（カタログ番号CAIF00）；JF Djoba Siaway et al.）を用いて示すことができる。

【0016】

本明細書で用いられるように、“誘導體”または“変種”という用語は、1つまたは2つ以上の保存的アミノ酸変異または他の小さな改変を有するポリペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸を指し、前記変異または改変は、(1)対応するポリペプチドが野生型ポリペプチドと比較したとき実質的に等価の機能を有するか、または(2)当該ポリペプチドに対して生じた抗体が野生型ポリペプチドと免疫反応性を有するものである。これらの変種または誘導體には、未改変の対応ポリペプチドと比較したとき実質的に等価の活性を有するペプチドを生じることができる小さな改変をアフリカウマ病ウイルスポリペプチドの一次アミノ酸配列に有するポリペプチドが含まれる。そのような改変は、位置指定変異導入による場合のように意図されたものでもよく、または偶発的なものでもよい。“変種”はさらに、当該ポリペプチドが機能して本明細書に定義するように免疫学的応答を生じることが配列に対する欠失、付加および置換も含む。

20

アフリカウマ病ウイルスポリペプチドの免疫原性フラグメントは、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するアフリカウマ病ウイルスポリペプチドまたはその変種の少なくとも8、10、15または20の連続するアミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、または少なくとも30アミノ酸を含む。別の実施態様では、アフリカウマ病ウイルスのフラグメントは完全長のアフリカウマ病ウイルスポリペプチドで見出される特異的な抗原性エピトープを含む。

30

【0017】

ポリペプチドのフラグメントおよびエピトープを決定する方法、例えばオーバーラップペプチドライブラリーの作製（B. Hemmer et al.）、ペプスキャン（Pepscan）（H.M. Geysen et al. 1984；H.M. Geysen et al. 1985；R. Van der Zee et al.；H.M. Geysen）およびアルゴリズムを、煩雑な実験を実施することなく本発明の実施に用いことができる。一般的には、抗体は特定の抗原性エピトープに特異的に結合することができる。具体的な非限定的エピトープの例には、ポリペプチド中のテトラペプチドからペンタペプチドの配列、多糖類中のトリグリコシドからテトラグリコシドの配列が含まれる。動物では、大半の抗原がいくつかの、場合によって多数の抗原決定基を同時に提示するであろう。エピトープがより大きな分子のタンパク質フラグメントである場合、好ましくは、エピトープは全タンパク質と同じ免疫学的活性を有するであろう。

40

別の特徴では、本発明は、AHSV VPをコードするポリヌクレオチド、例えば配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するAHSV VPをコードするポリヌクレオチドを提供す

50

る。さらに別の特徴では、本発明は、配列番号：1、2、20、21、30、31、35、36、44、45、49、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62または63に記載の配列を有するポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリペプチド、または保存的変種、対立遺伝子変種、ホモログもしくはこれらポリペプチドの1つの少なくとも8つまたは少なくとも10の連続するアミノ酸を含むフラグメント、またはこれらのポリペプチドの組合せをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

別の特徴では、本発明は、配列番号：3、4、5、6、17、18、19、22、27、28、29、32、33、34、41、42、43、48または50に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその変種を提供する。さらに別の特徴では、本発明は、配列番号：3、4、5、6、17、18、19、22、27、28、29、32、33、34、41、42、43、48または50に記載の配列を有するポリヌクレオチドの1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、またはその変種を提供する。

これらのポリヌクレオチドには、AHSV VPをコードするDNA、cDNAおよびRNA配列が含まれ得る。アフリカウマ病ウイルスポリペプチドをコードするいずれのポリヌクレオチドも、それらが認知された活性（例えば当該ポリペプチドを認識する抗体との結合、当該ポリペプチドに対する免疫応答の誘発、またはアフリカウマ病ウイルスに暴露されたかもしくはアフリカウマ病の徴候もしくは症状の減退を示す対象動物に投与されたときアフリカウマ病で生存する効果）を有するポリペプチドをコードするかぎり本発明に含まれることは理解されよう。

【0019】

本開示のポリヌクレオチドは、遺伝暗号の結果として縮退配列、例えば特定の宿主のための最適化コドン使用頻度を含む。本明細書で用いられるように、“最適化”とは、ある種においてその発現を増加させるために遺伝的に操作されたポリヌクレオチドをいう。アフリカウマ病ポリペプチドをコードする最適化ポリヌクレオチドを提供するために、アフリカウマ病ウイルスタンパク質遺伝子のDNA配列を以下のように改変することができる：

(1) 特定の種で高度に発現される遺伝子が好むコドンを含む；(2) ヌクレオチド塩基組成のA+TまたはG+C含量を前記種で実質的に見出されるものに構成させる；(3) 前記種の開始配列を形成する；または(4) RNAの脱安定化、不適切なポリアデニル化、分解および終了を引き起こすか、または二次構造ヘアピンもしくはRNAスプライス部位を形成する配列を排除する。前記種におけるアフリカウマ病タンパク質の発現の増加は、真核細胞および原核細胞における、または特定の種におけるコドン使用頻度の分布頻度を利用することによって達成することができる。“好ましいコドン使用頻度の頻度”とは、あるアミノ酸を指定するためにヌクレオチドコドン使用頻度において個々の宿主細胞が示す優先性を指す。20の天然のアミノ酸が存在し、その大半は2つ以上のコドンによって指定される。したがって、全ての縮退ヌクレオチド配列が、当該ヌクレオチド配列によってコードされるアフリカウマ病ウイルスポリペプチドのアミノ酸配列が機能的に変化しないかぎり本開示に含まれる。

【0020】

2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、NCBI (National Cancer for Biotechnology Information) のペアワイズブラストおよびブロサム62マトリックスで標準的なパラメーターを用いて確立させることができる（例えば、“National Cancer for Biotechnology Information” (NCBI, Bethesda, Md, USA) サーバーの他に論文 (Altschul et al.) で入手可能なBLASTまたはBLASTXアルゴリズムを参照されたい、したがって本明細書は前記アルゴリズムまたはBLASTもしくはBLASTXおよびBLOSUM62マトリックスの使用を“ブラスト (blasts)” という用語によって述べる)。

2つのヌクレオチド間の配列同一性はまた、Myers and Miller (“Optimal Alignments in Linear Space”, CABIOS 4, 11-17, 1988) の“Align”プログラム (NCBIで入手可能

）の他に、インターネットを介してそれらのサイト（例えばNCBIサイト）で利用できる同じまたは別のプログラムを用いて決定することができる。

前記とは別にまたは前記に加えて、例えばヌクレオチドまたはアミノ酸配列に関して“同一性”という用語は、2つの配列間の相同性の定量的測定値を示すことができる。パーセント配列相同性は以下のように計算することができる： $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$ 、式中 N_{dif} はアラインメントを実施したときの2つの配列中の非同義残基の総数であり、 N_{ref} は当該配列の一方の残基の数である。したがって、DNA配列AGTCAGTCは、配列AATCAATCについて75%の配列同一性を有するであろう（ $N_{ref} = 8$ ； $N_{dif} = 2$ ）。

【0021】

前記とは別にまたは前記に加えて、配列に関して“同一性”は、同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸を有する位置の数を2つの配列の短い方の配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の数で割ったものを指す。この場合、2つの配列のアラインメントは、Wilbur and Lipmanアルゴリズム（Wilbur and Lipman）にしたがい、例えば20ヌクレオチドのウィンドウサイズ、4ヌクレオチドのワード長および4のギャップペナルティを用いて決定することができる。さらにアラインメントを含むコンピュータ支援解析および配列データの解釈は市販プログラム（例えばIntelligenetics™ Suite（Intelligenetics Inc. CA））を用いて簡便に実施することができる。RNA配列が、DNA配列と類似またはある程度の配列同一性もしくは相同性を有するというとき、DNA配列中のチミジン（T）はRNA配列中のウラシル（U）と等価であるとみなされる。したがって、DNA配列中のチミジン（T）をRNA配列中のウラシル（U）と等価であるとみなすことによって、RNA配列は本発明の範囲内にあり、DNA配列から誘導することができる。

2つのアミノ酸配列の配列同一性もしくは配列類似性、または2つのヌクレオチド配列間の配列同一性は、Vector NTIソフトウェアパッケージ（Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA）を用いて決定することができる。

以下の文書は配列の相対的同一性または相同性を比較するためのアルゴリズムを提供し、さらにこれらの参考文献中の教示は、前述の記載に加えまたは前記とは別にパーセント相同性または同一性の決定に用いることができる：SB Needleman and CD Wunsch；TF Smith and MS Waterman；TF Smith, MS Waterman and JR Sadler；DF Feng and RF Dolittle；DG Higgins and PM Sharp；JD Thompson, DG Higgins and TJ Bibson；およびJ Devereux, P Haeberlie and O Smithies。さらに煩雑な実験を実施することなく、当業者はパーセント相同性の決定のために他のプログラムまたは参考文献を用いることができる。

【0022】

アフリカウマ病ウイルスポリヌクレオチドは、ベクター、自律的複製プラスミドまたは原核細胞もしくは真核細胞のDNAゲノムに取り込まれるか、または他の配列から独立した別個の分子（例えばcDNA）に存在する組換えDNAを含むことができる。

本明細書に開示する組換えベクターは、ポリペプチド、その変種またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。組換えベクターにはプラスミドおよびウイルスベクターが含まれ、in vitroまたはin vivo発現に用いることができる。組換えベクターはさらにシグナルペプチドを含むことができる。シグナルペプチドは、ある細胞器官（例えば核、ミトコンドリアマトリックス、小胞体、葉緑体、アポプラストおよびペルオキシソーム）へのタンパク質（サイトゾルで合成される）の翻訳後輸送を指令する。シグナル配列は、アフリカウマ病ウイルスタンパク質由来の天然の配列であっても、または分泌タンパク質由来のペプチドシグナル、例えば組織プラスミノーゲン活性化因子タンパク質（pTA）、具体的にはヒトpTA由来のシグナルペプチド（S. Friezner Degen et al.；R. Rickles et al.）、またはインスリン様増殖因子1（IGF1）由来のシグナルペプチド、具体的にはウマIGF1（K Otte et al.）、イヌIGF1（P Delafontaine et al.）、ネコIGF1（W0003/022886）、ウシIGF1（S Lien et al.）、ブタIGF1（M Muller et al.）、ニワトリIGF1（Y Kajimoto et al.）、シチメンチョウIGF1（GenBank accession No. AF084980）であってもよい。IGF1由来のシグナルペプチドは天然であっても最適化されていてもよい。最適化は、隠ぺいスプラス部位の除去および／またはコドン使用頻度の調

整によって達成することができる。翻訳に際して、プロセッシングを経ていないポリペプチドは切断部位で切断され成熟ポリペプチドを生じることができる。切断部位はVon Heijne (1986)の方法を用いて予測することができる。

【0023】

プラスミドは、DNA転写ユニット、例えば宿主細胞でのその複製を可能にする核酸配列、例えば複製起点（原核細胞または真核細胞性）を含むことができる。プラスミドはまた、1つまたは2つ以上の選別可能なマーカー遺伝子および当分野で公知の他の遺伝エレメントを含むことができる。本発明には環状形および線状形プラスミドが含まれる。

さらに別の特徴ではワクチン組成物または医薬組成物に関し、前記は当該組成物を接種された宿主動物で免疫学的または防御的応答を誘発する。前記組成物は、担体または希釈剤または賦形剤および/またはアジュバント、並びに組換えベクター、例えば組換えウイルスを含む。前記組換えウイルスは、改変組換えウイルス、例えばウイルスがコードする遺伝的機能をその中で既に不活化（例えば破壊または欠失）させたウイルス組換え体であり得る。改変組換えウイルスは、例えば毒性が低下し安全性が強化されるように、ウイルスがコードする非本質的な遺伝的機能がその中で不活化されてもよい。本発明の組成物で用いられるウイルスは、有利にはボックスウイルス、例えばワクシニアウイルスまたはアライグマボックスウイルス、または好ましくはアピボックスウイルス、例えば鶏痘ウイルス、またはより好ましくはカナリアボックスウイルス、より有利にはALVACウイルスである。組換えベクターまたは組換えウイルスは哺乳動物種で複製されずに発現することが有利である。別の特徴では、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原をコードする少なくとも1つの核酸分子を含む組換えベクターに関する。本発明はさらに、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原をコードする少なくとも1つの核酸分子を含む組換えアピボックスベクターの、対象動物で防御的免疫応答を誘引するために有効な量を含むワクチンまたは免疫原性組成物に関する。本発明はさらに、アフリカウマ病ウイルスに対抗して対象動物にワクチン接種する対応する方法に関する。

【0024】

使用される医薬的に許容できるビヒクルまたは賦形剤は通常のものである。本明細書に開示したポリペプチド、プラスミド、ウイルスベクターの医薬的デリバリーに適した組成物および処方物が文献（Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Ed., 1975）に記載されている。一般的には、ビヒクルまたは賦形剤の性質は、用いられる具体的な投与態様に左右される。例えば、非経口処方物には通常、医薬的および生理学的に許容できる液体、例えば水、生理学的食塩水、均衡塩類溶液、デキストロス水溶液、グリセロールなどを含む注射可能な液体がビヒクルとして含まれる。固体組成物（例えば凍結乾燥トローチ、散剤、ピル、錠剤またはカプセル形）については、通常、非毒性固形ビヒクルまたは賦形剤は、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中立のビヒクルまたは賦形剤の他に、投与される免疫原性組成物は微量の非毒性補助物質、例えば湿潤もしくは乳化剤、保存料、およびpH緩衝剤、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどを含むことができる。

【0025】

本発明の組成物またはワクチンは、本発明にしたがって上記に記載の1つまたは2つ以上のAHSV VPをコードする1つまたは2つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターを含むことができる。

別個の挿入部位を用いるかまたは同じ挿入部位を用いて多数の挿入を同じベクターで実施することができる。同じ挿入部位を用いるときは、各ポリヌクレオチド挿入物（前述の本発明の任意のポリヌクレオチドであり得る）を、同じおよび/または別個のプロモーターの制御下に挿入することができる。挿入は、尾尾、頭頭、尾頭または頭尾で実施できる。IRESエレメント（内部リボソーム侵入部位、EP0803537参照）もまた、同じおよび/または別個のプロモーターに作動できるように連結した多数の挿入物を分離させ、さらにそれらを発現させるために用いることができる。

ある実施態様では、本発明は上述の1つまたは2つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。前記発現ベクターはin vivo発現ベクターであってもin vitro発現ベクターであってもよい。

ある実施態様では、前記組換えベクターまたはウイルスは、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原、免疫原（そのエピトープまたはフラグメントを含む）をコードする1つまたは2つ以上の異種核酸分子を含むことができる。前記組換えベクターまたは改変組換えウイルスは、例えばウイルスゲノム内に（例えばウイルスゲノムの非本質的領域内に）異種DNA配列を含むことができ、前記異種DNA配列は、例えばアフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2、NS3またはその任意の組合せ、好ましくはAHSV VP2および5に由来する免疫原性タンパク質をコードする（この場合、前記免疫原性タンパク質は、問題のエピトープ、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2、NS3の任意の1つまたは2つ以上によって発現されるタンパク質の問題のエピトープ、例えばAHSV VP2および/または5の問題のエピトープであり得る）。前記ベクターまたはウイルスは、有利にはボックスウイルス、例えばワクシニアウイルスまたは好ましくはアビボックスウイルス、例えば鶏痘ウイルスまたはより好ましくはカナリアボックスウイルスであり、より有利にはALVACウイルスである。

10

【0026】

別の実施態様では、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原、免疫原（そのエピトープまたはフラグメントを含み、前記は、例えばアフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2、NS3またはその任意の組合せ、好ましくはAHSV VP2および5に由来し、前記免疫原性タンパク質は、問題のエピトープ、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2またはNS3の任意の1つまたは2つ以上によって発現されるタンパク質の問題のエピトープ、例えばAHSV VP2および/または5の問題のエピトープであり得る）をコードする異種核酸分子は、プロモーター配列および場合によってエンハンサーに作動できるように連結される。有利な実施態様では、プロモーター配列は、H6ワクシニアプロモーター、13Lワクシニアプロモーター、42Kボックスウイルスプロモーター、7.5KワクシニアプロモーターおよびPiワクシニアプロモーターから成る群から選択される。より有利には、プロモーター配列はH6ワクシニアプロモーターまたは42Kボックスウイルスプロモーターである。より好ましくは、VP2はH6ワクシニアプロモーターに作動できるように連結され、VP5は42Kボックスウイルスプロモーターに作動できるように連結される。

20

30

【0027】

別の実施態様では、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原、免疫原（そのエピトープまたはフラグメントを含み、前記は、例えばアフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2、NS3またはその任意の組合せ、好ましくはAHSV VP2および5に由来し、前記免疫原性タンパク質は、問題のエピトープ、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2またはNS3の任意の1つまたは2つ以上によって発現されるタンパク質の問題のエピトープ、例えばAHSV VP2および/または5の問題のエピトープであり得る）をコードする異種核酸分子はある挿入座位に挿入され、この場合、前記挿入座位はC5および/またはC6および/またはC3を含み、さらにC6、C5および/またはC3挿入座位のフランキング配列は、同族の挿入座位を有するアフリカウマ病ウイルス抗原の相同性組換えを促進する。

40

別の実施態様では、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルス（AHSV）抗原、免疫原（そのエピトープまたはフラグメントを含み、前記は、例えばアフリカウマ病ウイルスのウイルスタンパク質、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2、NS3またはその任意の組合せ、好ましくはAHSV VP2および5に由来し、前記免疫原性タンパク質は、問題のエピトープ、例えばAHSV VP1、VP2、VP3、VP4、NS1、VP5、VP6、VP7、NS2またはNS3の任意の1つまたは2つ以上によって発現されるタンパク質の問題のエピトープ、例えばAHSV VP2および/または5の問題のエピトープであり得る）をコードする異種核酸

50

分子はある挿入座位に挿入され、この場合、前記挿入座位はC5および／またはC6および／またはC3を含み、さらにC6、C5および／またはC3挿入座位のフランキング配列は、同族の挿入座位を有するアフリカウマ病ウイルス抗原の相同性組換えを促進し、さらに前記フランキング配列は、アビボックスのC3LおよびC3Rオープンリーディングフレームを含む。

【0028】

別の実施態様では、アビボックスベクターはvCP2377またはvCP2383またはvCP2398である。

特段の指示がなければ、本発明の実施には分子生物学、微生物学、細菌学、組換えDNA工学および免疫学の一般的な技術が用いられ、前記技術は当業者の技量範囲内である。そのような技術は刊行物に詳しく説明されている。例えば以下を参照されたい：Sambrook et al. 1989および1985；MJ Gait ed., 1984；BD Hames & SJ Higgins eds. 1984；RK Freshney ed. 1986；IRL Press, 1986；B Perbal, 1984；DM Weir and CC Blackwell eds. 1986。

ある特徴では、本発明は、組換えベクター、例えばウイルス、例えばアフリカウマ病ウイルスのDNA配列を、例えばウイルス（例えばボックスウイルス）ゲノム内に、有利にはウイルスの非本質的領域内、例えばボックスウイルスゲノム内に含む組換えボックスウイルスを提供する。前記ボックスウイルスはワクシニアウイルス、例えばNYVACまたはNYVAC系ウイルスを含むことができ、前記ボックスウイルスは、有利にはアビボックス、例えば鶏痘ウイルス（特に弱毒化鶏痘ウイルス、例えばTROVAC）、またはカナリアボックスウイルス（好ましくは弱毒化カナリアボックスウイルス、例えばALVAC）である。しかしながら、本発明のベクターは、任意の適切な組換えウイルスまたはウイルスベクター、例えばボックスウイルス（例えばワクシニアウイルス、アビボックスウイルス、カナリアボックスウイルス、鶏痘ウイルス、アライグマボックスウイルス、ブタボックスウイルスなど）、アデノウイルス（例えばイヌアデノウイルス）、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルスなど（本明細書に参照により含まれる文書にあるとおり）であり得る。またはベクターはプラスミドでもよい。

【0029】

組換えウイルスは、改変組換えウイルス、例えばウイルスがコードする遺伝的機能がその中で不活化（例えば破壊または欠失）されてあるウイルスの組換え体であり得る。改変組換えウイルスは、例えば毒性が低下し安全性が強化されるように、ウイルスがコードする非本質的な遺伝的機能がその中で不活化され得る。本発明の組成物で用いられるウイルスは、有利にはボックスウイルス、例えばワクシニアウイルスまたは好ましくはアビボックスウイルス、例えば鶏痘ウイルス、またはより好ましくはカナリアボックスウイルス、より有利にはALVACウイルスである。組換えベクターまたは組換えウイルスは哺乳動物種で複製されずに発現することが有利である。

ある具体的な実施態様では、ウイルスベクターはボックスウイルス、例えばワクシニアウイルスまたは弱毒化ワクシニアウイルス（例えばMVA、ニワトリ胚線維芽細胞でAnkara ワクチン株を570代より多く継代した後で得られた改変Ankara株（以下を参照されたい：Stickl & Hochstein-Mintzel, Munch. Med. Wschr., 1971, 113:1149-1153；Sutter et al. Proc Natl Acad Sci, USA, 1992, 89:10847-10851）で、ATCC VR-1508として入手できる；またはNYVAC（以下を参照されたい：米国特許5,494,807号、例えば同特許の実施例1から6およびその後続の記載、前記はNYVACの構築、ワクシニアウイルスコペンハーゲン株のゲノムから欠失させたORFが付加されたNYVACの変異とともにこの組換え体の複数部位への異種コード核酸分子の挿入並びに適合プロモーターの使用を考察する；W096/40241もまた参照されたい）、アビボックスウイルスまたは弱毒化アビボックスウイルス（例えばカナリアボックス、鶏痘、ハトボックス、ピジョンボックス、ウズラボックス、ALVACまたはTROVAC；例えば米国特許5,505,941号、5,494,807号を参照されたい）、ブタボックス、アライグマボックス、ラクダボックスまたは粘液腫症ウイルスである。

【0030】

組換えボックスウイルスは当分野で公知の2つの工程で構築することができる。さらに

前記工程は、米国特許4,769,330号、4,722,848号、4,603,112号、5,110,587号、5,174,993号、5,494,807号、5,942,235号及び5,505,941号（前記文献は参照により本明細書に含まれる）に記載された、ボックスウイルス（例えばワクシニアウイルスおよびアビボックスウイルス）の合成組換え体を作製する方法に類似する。或いは、本発明の遺伝子の遺伝子生成物のin vivoまたはin vitro発現のためのベクター、組換え体またはプラスミドの製造および/または投与方法は所望されるいずれの方法であってもよい。例えば前記方法は、以下の文献に開示されてあるか、または前記文献に引用された文書に開示されてある方法またはそれらに類似する：米国特許6,130,066号、5,494,807号、5,514,375号、5,744,140号、5,744,141号、5,756,103号、5,762,938号、5,766,599号、5,990,091号、6,004,777号、6,130,066号、6,497,883号、6,464,984号、6,451,770号、6,391,314号、6,387,376号、6,376,473号、6,368,603号、6,348,196号、6,306,400号、6,228,846号、6,221,362号、6,217,883号、6,207,166号、6,207,165号、6,159,477号、6,153,199号、6,090,393号、6,074,649号、6,045,803号、6,033,670号、6,485,729号、6,103,526号、6,224,882号、6,312,682号、6,312,683号、6,348,450号、4,603,112号、4,769,330号、5,174,993号、5,505,941号、5,338,683号、5,494,807号、4,394,448号、4,722,848号、4,745,051号、4,769,331号、5,591,639号、5,589,466号、4,945,050号、5,677,178号、5,591,439号、5,552,143号、5,580,859号、WO94/16716、WO 96/39491、WO91/11525、WO 98/33510、WO 90/01543、EP0370573、EP265785、(Paoletti 1996)、(Moss 1996)、Richardson (Ed) (1995)、(Smith, Summers et al. 1983)、(Pennock, Shoemaker et al. 1984)、(Roizman 1996)、(Andreansky, He et al. 1996)、(Robertson, Ooka et al. 1996)、(Frolov, Hoffman et al. 1996)、(Kitson, Burke et al. 1991)、(Ballay, Levrero et al. 1985)、(Graham 1990)、(Prevec, Schneider et al. 1989)、(Felgner, Kumar et al. 1994)、(Ulmer, Donnelly et al. 1993)、(McClements, Armstrong et al. 1996)、(Ju, Edelstein et al. 1998) および(Robinson and Torres 1997)。

10

20

30

40

50

【0031】

有利にはポリヌクレオチドの発現のためのエレメントが本発明のベクターに存在する。最低限として前記は、開始コドン(ATG)、停止コドンおよびプロモーター、並びに場合によってある種のベクター（例えばプラスミド）およびある種のウイルスベクター（例えばボックスウイルス以外のウイルスベクター）のためのポリアデニル化配列を含むか、本質的に前記から成るか、または前記から成る。ポリヌクレオチドが、（例えば有利にはベクター内で）タンパク質フラグメントをコードするとき、ATGはリーディングフレームの5'に配置され、停止コドンは3'に配置される。発現を制御するための他のエレメント、例えばエンハンサー配列、安定化配列およびタンパク質の分泌を可能にするシグナル配列も存在し得る。

特許出願WO90/11092、WO93/19183、WO94/21797およびWO95/20660は、最近開発されたポリヌクレオチドワクチンの技術を利用する。これらのワクチンは、プラスミドに挿入された抗原を宿主細胞で発現することができるプラスミドを使用することが分かっている。全ての投与ルート（腹腔内、静脈内、筋肉内、経皮、皮内、粘膜ルートなど）が提唱されている。多様なワクチン接種手段もまた用いることができる。前記は例えば、金粒子の表面に沈積させて動物の皮膚を貫通するように発射されるDNA(Tang et al. 1992)、および皮膚、筋肉、脂肪組織の他に乳房組織へのトランスフェクションを可能にする液体ジェットインジェクター(Furth et al. 1992)である。（さらにまた以下を参照されたい：米国特許5,846,946号、5,620,896号、5,643,578号、5,580,589号、5,589,466号、5,693,622号および5,703,055号；JB Ulmer et al. 1993；Robinson et al. 1997；Luke et al. 1997；Norman et al. 1997；Bourne et al. 1996；さらにまた一般的にワクチンまたは免疫学的組成物のためのプラスミドは、宿主細胞（例えば哺乳動物細胞）の抗原の発現または発現および分泌を制御する調節配列に作動できるように連結された抗原をコードするDNAを含むことができることに留意されたい（例えば上流から下流に、プロモーターのためのDNA、分泌のために真核細胞リーダーペプチドのためのDNA、抗原のためのDNAおよびターミネーターをコードするDNA））。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施態様にしたがえば、ボックスウイルスベクターはカナリアボックスウイルスまたは鶏痘ウイルスベクター、有利には弱毒化カナリアボックスウイルスまたは鶏痘ウイルスである。これに関しては、アクセス番号VR-111でATCCから入手可能なカナリアボックスが引用される。弱毒化カナリアボックスウイルスは米国特許5,756,103号 (ALVAC) およびWO01/05934に記載されている。多数の鶏痘ウイルスワクチン株がまた入手可能である。前記は、例えばMERIALによって販売されているDIFTOSEC CT株およびINTERVETによって販売されているNOBILIS VARIOLEワクチンであり、さらに弱毒化鶏痘株TROVACに関する米国特許5,766,599号もまた参照できる。

発現ベクターがワクシニアウイルスのとき、発現されるべきポリヌクレオチドのための挿入部位はチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子にあるか、または挿入部位はヘマグルチニン (HA) 遺伝子であるか、または挿入部位はA型封入体 (ATI) をコードする領域である (本明細書に引用した文書、特にワクシニアウイルスに関するものをまた参照されたい)。カナリアボックスの場合には、挿入部位はORF、C3、C5および/またはC6であり得る (本明細書に引用した文書、特にカナリアボックスウイルスに関するものをまた参照されたい)。鶏痘の場合、挿入部位はORF7および/またはF8であり得る (本明細書に引用した文書、特に鶏痘ウイルスに関するものをまた参照されたい)。MVAウイルス挿入部位領域は、多様な刊行物に記載されたとおりであり得る。前記刊行物には以下の文献が含まれ (MW Carroll et al., Vaccine 1997, 15(4):387-394; KJ Stittelaar et al., J Virol 2000, 74(9):4236-4243; G. Sutter et al., 1994, Vaccine, 12(11):1032-1040)、さらに前記に関連して、完全なMVAゲノムが以下の文献に記載されている: G. Antoine, Virology 1998, 244:365-396 (前記文献は当業者が他の挿入部位または他のプロモータを使用することを可能にする)。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の実施態様では、発現されるべきポリヌクレオチドは、特定のボックスウイルスプロモーター、とりわけ例えばワクシニアプロモーター7.5kDa; Cochran et al., J Virology 1985, 54:30-35)、ワクシニアプロモーター13L (Riveere et al., J Virology 1992, 6:3424-3434)、ワクシニアプロモーターHA (Shida, Virology 1986, 150:451-457)、牛痘プロモーターATI (Funahashi et al., J Gen Virol 1988, 69:35-47)、ワクシニアプロモーターH6 (J Taylor et al., Vaccine 1988, 6:504-508; P Guo et al., J Virol 1989, 63:4189-4198; M. Perkus et al., J Virol 1989, 63:3829-3836) の制御下に挿入される。

別の実施態様では、ウイルスベクターはアデノウイルス、例えばヒトアデノウイルス (HAV) またはイヌアデノウイルス (CAV) である。

組換えウイルスベクター系ワクチンは、fMLP (N-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン; 米国特許6,017,537号) および/またはCARBOMERアジュバント (Pharmeuropa Vol.) と併せることができる。

【 0 0 3 4 】

別の実施態様では、ウイルスベクターはヒト、ブタ、オパイン (opine)、ウシまたはトリのアデノウイルスであり得る (ただしこれらに限定されない)。ヒトアデノウイルスについては、特にアデノウイルス血清型5が、ウイルスゲノムのE1領域 (特にアクセッション番号M73260によりGenBankにおいて、および参考文献 (J Chroboczek et al., Virology 1992, 186:280-285) において開示されているhAD5の配列を参照してヌクレオチド約459からヌクレオチド約3510) における欠失によって複製不能にされた。前記欠失アデノウイルスはE1発現293 (F. Graham et al., J Gen Virol 1977, 36:59-72) またはPER細胞、特にPER.C6 (F Falloux et al., Human Gene Therapy 1998, 9:1909-1917) で増殖させる。ヒトアデノウイルスは、E3領域 (具体的にはヌクレオチド約28592からヌクレオチド約30470) において欠失させることができる。E1領域の欠失はE3領域の欠失と一緒に実施することができる (例えば以下を参照されたい: J. Shriver et al. Nature, 2002, 415, 331-335; F. Graham et al Methods in Molecular Biology Vol .7: Gene Transfer and Exp

ression Protocols (E. Murray Ed.), The Human Press Inc, 1991, p 109-128 ; Y. Ilan et al Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94, 2587-2592 ; 米国特許6,133,028号 ; 米国特許6,692,956号 ; S. Tripathy et al Proc. Natl. Acad. Sci. 1994, 91, 11557-11561 ; B. Tapnell Adv. Drug Deliv. Rev.1993, 12, 185-199 ; X. Danthinne et al Gene Therapy 2000, 7, 1707-1714 ; K. Berkner Bio Techniques 1988, 6, 616-629 ; K. Berkner et al Nucl. Acid Res. 1983, 11, 6003-6020 ; C. Chavrier et al J. Virol. 1996, 70, 4805-4810)。挿入部位は、E1および / またはE3座位 (領域) の部分的または完全な欠失後、結局E1および / またはE3領域であり得る。発現ベクターがアデノウイルスのとき、発現されるべきポリヌクレオチドは、真核細胞で機能するプロモーター、例えば強力なプロモーター、例えばサイトメガロウイルス極初期遺伝子プロモーター (CMV-IEプロモーター)、具体的にはヌクレオチド約-734からヌクレオチド約+7のエンハンサー / プロモーター領域 (M Boshart et al., Cell 1985, 41:521-530) またはpCIベクター (Promega Corp.) のエンハンサー / プロモーター領域の制御下に挿入される。CMV-IEプロモーターは有利にはネズミまたはヒト起源である。伸長因子1 のプロモーターもまた用いることができる。筋特異的プロモーターもまた用いることができる (X. Li et al., Nat Biotechnol 1999, 17:241-245)。強力なプロモーターはまたプラスミドベクターに関連して本明細書で考察される。ある実施態様では、スプライシング配列はエンハンサー / プロモーター領域の下流に配置することができる。前記は例えば、CMV-IE遺伝子から単離したイントロン1 (R. Stenberg et al., J Virol 1984, 49:190)、ウサギまたはヒト グロビン遺伝子、特に

グロビン遺伝子のイントロン2、免疫グロブリン遺伝子から単離されたイントロン、SV40初期遺伝子のスプライシング配列、またはpCIベクター (Promega Corp.) から単離されたキメライントロン (マウス免疫グロブリンアクセプター配列と融合させたヒト グロビン遺伝子ドナー配列を含む) (GenBankアクセッション番号CVU47120のヌクレオチド約890からヌクレオチド約1022) である。ポリ(A)配列およびターミネーター配列は発現されるべきポリヌクレオチドの下流に挿入することができる。前記は例えば、ウシ成長ホルモン放出ホルモン遺伝子 (特にGenBankアクセッション番号BOVGHRH (AF242855) のヌクレオチド約2339からヌクレオチド約2550)、ウサギ グロビン遺伝子またはSV40後期遺伝子ポリアデニル化シグナルである。

10

20

30

40

50

【0035】

別の実施態様では、ウイルスベクターはイヌアデノウイルス、特にCAV-2である (例えば以下を参照されたい : L. Fischer et al. Vaccine, 2002, 20, 3485-3497 ; 米国特許5,529,780号 ; 米国特許5,688,920号 ; PCT出願番号WO95/14102)。CAVの場合、挿入部位は、E3領域および / またはE4領域と右ITR領域との間に位置する領域に存在し得る (米国特許6,090,393号 ; 米国特許6,156,567号を参照されたい)。ある実施態様では、挿入物は、プロモーター (例えばサイトメガロウイルス極初期遺伝子プロモーター (CMV-IEプロモーター) またはヒトアデノウイルスベクターについて既に述べたプロモーター) の制御下にある。ポリ(A)配列およびターミネーター配列は発現されるべきポリヌクレオチドの下流に挿入でき、前記は例えばウシ成長ホルモン遺伝子またはウサギ グロビン遺伝子ポリアデニル化シグナルである。

別の具体的な実施態様では、ウイルスベクターは、ヘルペスウイルス、例えばウマヘルペスウイルス (EHV1 - 5)、ブタヘルペスウイルス (PRV)、イヌヘルペスウイルス (CHV) またはネコヘルペスウイルス (FHV) である。挿入部位は、チミジンキナーゼ遺伝子、ORF3またはUL43 ORF (CHVのためのUL43 ORF ; 米国特許6,159,477号を参照されたい) に存在し得る。ある実施態様では、発現されるべきポリヌクレオチドは、真核細胞で機能するプロモーター、有利にはCMV-IEプロモーター (ネズミまたはヒト) の制御下で挿入される。ポリ(A)配列およびターミネーター配列は発現されるべきポリヌクレオチドの下流に挿入でき、前記は例えばウシ成長ホルモン遺伝子またはウサギ グロビン遺伝子ポリアデニル化シグナルである。

より一般的には、本発明は任意のプラスミド (EP-A2-1001025 ; P. Chaudhuri) を含む *in vivo* 発現ベクターを包含し、前記は、アフリカウマ病ウイルスポリペプチド、その変種

またはそのフラグメントのポリヌクレオチドまたは遺伝子およびその *in vivo* 発現に必要なエレメントを含み、さらにこれを宿主細胞で *in vivo* 発現させる。

【0036】

本発明のさらに別の実施態様にしたがえば、発現ベクターは、プラスミドベクターまたはDNAプラスミドベクター、特に *in vivo* 発現ベクターである。具体的で非限定的な例では、pVR1020または1012プラスミド (VICAL Inc.; Luke C. et al., Journal of Infectious Diseases, 1997, 175, 91-97; Hartikka J. et al., Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205-1217; 例えば米国特許5,846,946号および6,451,769号を参照されたい) を、ポリヌクレオチド配列の挿入用ベクターとして用いることができる。pVR1020プラスミドはpVR1012から誘導され、ヒトtPAシグナル配列を含む。ある実施態様では、ヒトtPAシグナルはGenBankアクセッション番号HUMTPA14のアミノ酸M(1)からアミノ酸S(23)を含む。別の具体的で非限定的な例では、ポリヌクレオチド配列の挿入用ベクターとして用いられるプラスミドは、GenBankアクセッション番号U28070のアミノ酸M(24)からアミノ酸A(48)のウマIGF1シグナルペプチド配列を含むことができる。参考にするか、または実際に用いることができるDNAプラスミドに関する更なる情報は、例えば米国特許6,852,705号、6,818,628号、6,586,412号、6,576,243号、6,558,674号、6,464,984号、6,451,770号、6,376,473号および6,221,362号で見出される。

本明細書で用いられるように、“プラスミド”という用語は、本発明のポリヌクレオチドおよび所望の宿主または標的の細胞でのその *in vivo* 発現に必要なエレメントを含む任意のDNA転写ユニットを含むことができる。前記に関連して、スーパーコイルまたは非スーパーコイル、環状プラスミドが、線状形と同様に本発明の範囲内に含まれることを特記しておく。プラスミドはまた、他の転写調節エレメント、例えばイントロン型の安定化配列を含むことができる。いくつかの実施態様では、プラスミドは、CMV-IEの第一のイントロン (WO89/01036)、ウサギベータグロビン遺伝子のイントロンII (van Ooyen et al.)、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA, Montgomery et al.) によってコードされるタンパク質のシグナル配列、および/またはポリアデニル化シグナル (ポリA)、具体的にはウシ成長ホルモン (bGH) 遺伝子のポリA (米国特許5,122,458号) またはウサギベータグロビン遺伝子もしくはSV40ウイルスのポリAを含むことができる。

【0037】

各プラスミドは、AHSV抗原、エピトープまたは免疫原 (場合によって異種ペプチド配列と融合されてある) をコードするポリヌクレオチドの他に、変種、アナログまたはフラグメントを含むかまたは本質的にそれらから成り、それらはプロモーターと作動できるように連結されてあるか、またはプロモーターの制御下にあるか、またはプロモーターに依存している。一般的には、真核細胞で機能する強力なプロモーターを利用することが有利である。好ましい強力なプロモーターは、ヒトまたはネズミ起源、または場合によって別の起源 (例えばラットまたはモルモット) の極初期サイトメガロウイルスプロモーター (CMV-IE) である。CMV-IEプロモーターは実際に存在するプロモーター部分を含むことができる (前記はエンハンサー部分と結合していてもなくてもよい)。EP-A-260 148; EP-A-323 597; 米国特許5,168,062号、5,385,839号および4,968,615号をPCT出願WO87/03905と同様に参照することができる。CMV-IEプロモーターは有利にはヒトCMV-IE (M Boshart et al., Cell 1985, 41:521-530) またはネズミCMV-IEである。本発明の実施で有用に利用できる強力な細胞性プロモーターは、細胞骨格遺伝子のプロモーター、例えばデスミンプロモーター (M Kwissa et al.) またはアクチンプロモーター (J Miyazaki et al.) である。これらプロモーターのサブフラグメント、すなわち適切なプロモーター活性を維持するこれらプロモーターの部分 (例えばWO98/00166または米国特許6,156,567号の切端CMV-IEプロモーター) は本発明の範囲内に含まれ、本発明の実施に用いることができる。結果として、本発明の実施で有用なプロモーターには、誘導体および/または完全長プロモーターのサブフラグメントであって、適切なプロモーター活性したがってプロモーターとしての機能を維持し、さらに有利には、前記誘導体またはサブフラグメントが誘導された実際のもしくは完全長のプロモーターの活性と実質的に類似する、例えば、完全長のCMV-

IEプロモーターの活性に匹敵する米国特許6,156,567号の切端CMV-IEプロモーターの活性と類似するプロモーター活性を有し得る前記誘導体および/またはサブフラグメントが含まれる。したがって、本発明の実施で用いられるCMV-IEプロモーターは、完全長プロモーターのプロモーター部分および/または完全長プロモーターのエンハンサー部分をその誘導体および/またはサブフラグメントと同様に含むか、または本質的に前記から成るか、または前記から成り得る。

【0038】

より一般的に言えば、プロモーターはウイルスまたは細胞起源である。本発明の実施で有益に用いることができるCMV-IE以外の強力なウイルスプロモーターは、SV40ウイルスの初期/後期プロモーターまたはラウス肉腫ウイルスのLTRプロモーターである。本発明の実施で有益に用いることができる強力な細胞プロモーターは、細胞骨格遺伝子のプロモーター、例えばデスミンプロモーター (M Kwissa et al., Vaccine 2000, 18:2337-2344) またはアクチンプロモーター (J Miyazaki et al., Gene 1989, 79:269-277) である。

これらプロモーターのサブフラグメント、すなわち適切なプロモーター活性を維持するこれらプロモーターの部分は本発明の範囲内に含まれ、例えばPCT出願WO98/00166または米国特許6,156,567号の切端CMV-IEプロモーターを本発明の実施に用いることができる。結果として、本発明の実施で用いられるプロモーターには、誘導体および完全長のプロモーターのサブフラグメントであって、適切なプロモーター活性したがってプロモーターとしての機能、好ましくは、前記誘導体またはサブフラグメントが誘導された実際のまたは完全長のプロモーターの活性と実質的に類似するプロモーター活性を維持するもの、例えば、完全長のCMV-IEプロモーターの活性に匹敵する米国特許6,156,567号の切端CMV-IEプロモーターの活性と類似するものが含まれる。したがって、本発明の実施で用いられるCMV-IEプロモーターは、完全長プロモーターのプロモーター部分および/または完全長プロモーターのエンハンサー部分を誘導体およびサブフラグメントと同様に含むか、または本質的に前記から成るか、または前記から成り得る。

好ましくは、プラスミドは他の発現制御エレメントを含むかまたは本質的に前記から成る。安定化配列、例えばイントロン配列、好ましくはCMV-IEの第一のイントロン (PCT出願WO89/01036)、ウサギベータグロビン遺伝子のイントロンII (van Ooyen et al. Science 1979, 206:337-344) を含むことは特に有利である。

プラスミドおよびボックスウイルス以外のウイルスベクターのためのポリアデニル化シグナル (ポリA) に関しては、ウシ成長ホルモン (bGH) 遺伝子のポリAシグナル (米国特許5,122,458号参照) またはウサギベータグロビン遺伝子のポリ(A)シグナルまたはSV40ウイルスのポリ(A)シグナルがより多く利用され得る。

【0039】

本発明の別の実施態様にしたがえば、発現ベクターは、適切な細胞系でタンパク質の *in vivo* 発現に用いられる発現ベクターである。発現タンパク質は、分泌後にまたは分泌後ではなく (分泌されない場合は典型的には細胞溶解が起こるかまたは細胞溶解を実施する) 培養上清においてまたは培養上清から採集し、場合によっては濃縮方法 (例えば限外濾過) によって濃縮し、および/または精製手段 (例えばアフィニティー、イオン交換またはゲルろ過型クロマトグラフィー方法) によって精製する。

組換え発現ポリペプチドの単離および精製は、調製用クロマトグラフィー (例えばサイズ排除、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィー)、選択性沈殿および限外濾過を含む慣用的な手段によって実施することができる。使用することができる当業界の技術の例は以下の文献で見出すことができるが、ただしこれらに限定されない: "Protein Purification Applications", Second Edition, Simon Roe Ed., Oxford University Press. そのような組換え発現ポリペプチドは本発明の部分である。上記に記載の本発明の全てのポリペプチドの製造方法が、特に本発明のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターの使用および宿主細胞の使用が包含される。

【0040】

本発明の組換えウイルスベクターを含むワクチンは、有利には安定化剤とともに凍結乾

燥することができる。凍結乾燥は、周知の標準的凍結乾燥方法にしたがって実施できる。医薬的にまたは獣医的に許容できる安定化剤は、炭水化物（例えばソルビトール、マンニトール、ラクトース、シュクロース、グルコース、デキストラン、トレハロース）、グルタミン酸ナトリウム（T. Tsvetkov et al. ; E. Israeli et al.）、タンパク質（例えばペプトン、アルブミン、ラクトアルブミンまたはカゼイン）、タンパク質含有剤（例えば脱脂乳；CK Mills et al. ; E Wolff et al.）、および緩衝剤（例えばリン酸緩衝剤、アルカリ金属リン酸塩緩衝剤）であり得る。アジュバントを用いて凍結乾燥調製物を溶解させることができる。

有利には、本発明の組成物またはワクチンはまた1つまたは2つ以上のアジュバントを含むことができる。

プラスミド系ワクチンは、陽イオン性脂質、有利にはDMRIE(N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアンモニウム (W096/34109) と、または中性脂肪、例えばDOPE (ジオレオイル-ホスファチジル-エタノールアミン；JP B ehr) とDMRIE-DOPEを生成させて、一緒に処方することができる。ある実施態様では、混合物を即席的に作製し、さらに混合物の適切な複合体形成のために投与前に約10分から約60分、例えば約30分待つのが有利である。DOPEを用いるときは、DMRIE / DOPEのモル比は95 / 5から5 / 95であり、有利には1 / 1であり得る。プラスミド / DMRIEまたはDMRIE-DOPEアジュバントの重量比は、例えば50 / 1から1 / 10、10 / 1から1 / 5または1 / 1から1 / 2である。

【0041】

場合によってサイトカイン、特にGM-CSFまたはTh1（例えばIL12）を誘発するサイトカインを組成物に添加することができる。これらのサイトカインは、サイトカインタンパク質をコードするプラスミドとして添加することができる。ある実施態様では、サイトカインはイヌ起源、例えばイヌGM-CSFである（前記の遺伝子配列はGenBankデータベース（アクセッション番号S49738）に寄託されている）。この配列を用いて、W000/77210で実施されたものと類似の態様で前記プラスミドを作製することができる。

“宿主細胞”は、外因性ポリヌクレオチド（例えば組換えプラスミドまたはベクター）の投与によって遺伝的に変異させた、または遺伝的に変異させることができる原核細胞または真核細胞を指す。遺伝的に変異させた細胞というとき、前記用語は最初に変異させた細胞とその子孫の両方を指す。有利な宿主細胞には、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、大腸癌（Caco-2）細胞、COS7細胞、MCF-7細胞、MCF-10A細胞、Madin-Darbyイヌ腎（MDCK）株、ミンク肺（Mv1Lu）細胞、MRC-5細胞、U937細胞およびVERO細胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。所望の配列を含むポリヌクレオチドは適切なクローニングまたは発現ベクターに挿入でき、当該ベクターを順次適切な宿主細胞に導入し複製および増幅させることができる。ポリヌクレオチドは当分野で公知の任意の手段によって宿主細胞に導入できる。問題のポリヌクレオチドを含むベクターは多数の適切な任意の手段によって宿主細胞に導入できる。前記手段には、直接取り込み；エンドサイトーシス；トランスフェクション；f-接合；エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランまたは他の物質を利用するトランスフェクション；微小発射体ボンバードメント；リポフェクション；および感染（この場合ベクターは感染性で例えばレトロウイルスベクターである）が含まれる。ベクターまたはポリヌクレオチドの導入の選択はしばしば宿主細胞の特性に左右される。

【0042】

ポリヌクレオチドワクチンは、裸のDNAおよび例えばリポソーム内もしくは陽イオン性脂質内にまたはCpGとともに処方されたDNAの両方を利用することができる。

遺伝暗号の縮退により天然のアフリカウマ病ウイルス核酸とは相違する核酸もまた本発明の範囲内に包含される。例えば、多数のアミノ酸が2つ以上のトリプレットによって指定される。同じアミノ酸を規定するコドンまたは同義コドン（例えばCAUおよびCACはヒスチジンの同義コドンである）は、タンパク質のアミノ酸配列に影響を与えない“サイレント”変異を生じる。本発明の組換えベクターによってコードされるアフリカウマ病ウイル

10

20

30

40

50

スの対象タンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらすDNA配列変異体もまた本発明に包含される。そのようなヌクレオチド変異体並びに生成されるアミノ酸変異体のいずれかおよびいずれも本発明の範囲内に包含される。

本発明の組換えベクターによってコードされるアフリカウマ病ウイルスの対象ポリペプチドの構造を、治療的または予防的有効性を強化する（例えば前記ポリペプチドの免疫原性を高める）目的のために改変することもまた可能である。そのような改変ポリペプチドは、当該タンパク質の天然に存在する形態の少なくとも1つの活性を保持するように設計されるとき、本明細書でさらに詳細に記載するアフリカウマ病ウイルスポリペプチドの機能的等価物とみなされる。そのような改変ポリペプチドは、例えばアミノ酸置換、欠失または付加によって作製することができる。

10

【0043】

例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる、アスパラギン酸のグルタミン酸による、スレオニンのセリンによる隔離された置換、またはあるアミノ酸の構造的に関連するアミノ酸による同様な置換（すなわち保存的変異導入）は、生じる分子の生物学的活性に大きな影響を与えないであろうということを予想するのは合理的である。保存的置換は、それらの側鎖が関連性を有するアミノ酸ファミリー内で生じる置換である。遺伝的にコードされるアミノ酸は以下の4つのファミリーに分類することができる：（1）酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；（2）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）非荷電極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはときに芳香族アミノ酸として一緒に分類される。同様な態様で、アミノ酸一覧は以下のように分類することができる：（1）酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；（2）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）脂肪族＝グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン（セリンおよびスレオニンは場合によって鎖式ヒドロキシルとして別個に分類される）；および（4）芳香族＝フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；（5）アミド＝アスパラギン、グルタミン；および（6）硫黄含有＝システインおよびメチオニン（例えば以下を参照されたい：Biochemistry, 2nd ed., L. Stryer ed., W.H. Freeman and Co., 1981）。ポリペプチドのアミノ酸配列の変化が機能的ホモログを生じるか否かは、変種ポリペプチドが野生型タンパク質と類似の態様で細胞の応答を引き起こす能力を判定することによって容易に決定することができる。

20

30

【0044】

問題のエピトープに関しては、以下を参照できる：Kendrew, THE ENCYCLOPEDIA OF MOLECULAR BIOLOGY (Blackwell Science Ltd., 1995) および Sambrook et al. 1982。問題のエピトープは、例えば獣医もしくは人間に関係がある病原体または毒素、例えばアフリカウマ病ウイルス由来の免疫原の免疫学的に関連する領域またはその免疫学的に活性なフラグメントである。当業者は、ペプチドまたはポリペプチドしたがってそのコードDNAのエピトープまたはイムノドミナント領域を、煩雑な実験を実施することなく当該ペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸および対応するDNA配列の情報から、さらに具体的なアミノ酸の性質（例えばサイズ、電荷など）およびコドンディクショナリーから決定することができる。

40

好ましくは、DNA配列は少なくとも抗体応答またはT細胞応答を生じる領域をコードする。T細胞およびB細胞エピトープを決定するある方法はエピトープのマッピングを必要とする。問題のタンパク質は短いオーバーラップペプチドとして合成される（PEPSCAN）。続いて個々のペプチドは、天然のタンパク質によって誘導された抗体との結合能力またはT細胞もしくはB細胞活性化を誘導する能力について試験される（Janis Kuby, 1992）。

問題のエピトープを決定する別の方法は親水性タンパク質領域の選別である。親水性残基はしばしばタンパク質の表面に存在し、したがって抗体が近づくことができるタンパク質の領域である（Janis Kuby, 1992）。T細胞応答を生じることができる問題のエピトー

50

プを選別するまた別の方法は、当該タンパク質配列から潜在的なHLAアンカー結合モチーフを認定することである（前記モチーフはMHC分子とおそらく結合することが知られているペプチド配列である）。

【0045】

問題の推定的エピトープであってT細胞応答を生じるペプチドはMHC複合体で提示されるはずである。前記ペプチドは、好ましくはMHC分子との結合のために適切なアンカーモチーフを含み、十分に強い親和性で結合して免疫応答を生じるはずである。

タンパク質がT細胞応答を刺激する問題のエピトープであるか否かを決定する際のいくつかの指針には以下が含まれる。ペプチドの長さ：ペプチドは、MHCクラスI複合体に適合するために少なくとも8または9アミノ酸長、MHCクラスII複合体に適合するために少なくとも13 - 25アミノ酸長である。この長さは、MHC複合体と結合するペプチドについて最小ある。細胞は発現されたペプチドを切断することができるので、ペプチドはこれらの長さよりも長いことが好ましい。種々のクラスIまたはクラスII分子と十分に強い特異性でペプチドを結合させて免疫応答を生じさせる適切なアンカーモチーフをペプチドは含むはずである（以下を参照されたい：M Bocchia et al. ; VH Englehard, 1994）。前記は、問題のタンパク質の配列をMHC分子と密接に関連するペプチドの発表された構造と比較することによって煩雑な実験を行うことなく実施することができる。

さらにまた、当業者は、当該タンパク質配列をタンパク質データベースに列挙された配列と比較することによって問題のエピトープを確認することができる。

さらにまた別の方法は、単純に問題のタンパク質の部分を作製または発現させ、問題のタンパク質のそれらの部分に対するモノクローナル抗体を作製し、続いてそれら抗体が、当該タンパク質が由来した病原体のin vitro増殖を阻害するか否かを確認するものである。当業者は、問題のタンパク質の部分を作製または発現させ、前記タンパク質に対する抗体がin vitro増殖を阻害するか否かについて解析するために、本明細書または当分野で示された他の指針を用いてもよい。

【0046】

さらに別の実施態様では、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルスタンパク質、例えばVP2および/またはVP5（前記は、イムノドミナント非中和エピトープを抑えこむためにその天然の形態から改変されている）をコードする1つまたは2つ以上の核酸を含む組換えベクターを提供する。イムノドミナント非中和エピトープは、例えば免疫応答を中和エピトープから別の方向に誘導することによって中和エピトープに対抗するおとりとして作用する。イムノドミナント非中和エピトープは、病原体（例えばアフリカウマ病ウイルス）の免疫原性タンパク質で見出され得る。

本発明は、例えば天然の配列のアミノ酸残基の欠失および/または挿入および/または置換によってその天然の形態から改変されてある、1つまたは2つ以上のアフリカウマ病ウイルスタンパク質をコードする核酸を含む組換えベクターおよび改変組換えウイルスを包含する。

“免疫原性組成物”、“免疫学的組成物”および“ワクチン”に関して、前記ベクター（またはその発現生成物）を含む免疫学的組成物は、免疫学的応答（局所的または全身的）を誘引する。前記応答は防御的であり得るが、かならずしも防御的である必要はない。本発明の組換え体またはベクター（またはその発現生成物）を含む免疫原性組成物は、同様に局所的または全身的免疫学的応答（防御的である得るが、そうであるとは限らない）を誘引する。ワクチン組成物は局所的または全身的防御応答を誘引する。したがって、“免疫学的組成物”および“免疫原性組成物”という用語は“ワクチン組成物”を含む（前の2つの用語は防御性組成物であり得るので）。本発明は免疫学的、免疫原性またはワクチン組成物を包含する。

【0047】

本発明にしたがえば、組換えベクター、例えばウイルス（例えばボックスウイルス）は、外来性のアフリカウマ病ウイルス遺伝子または核酸分子の遺伝子生成物発現する。アフリカウマ病ウイルス特異的ウイルスタンパク質または特異的アフリカウマ病ウイルスタン

バク質由来エピトープをコードする特異的核酸分子が、組換えベクター、例えばウイルス（例えばボックスウイルスベクター）に挿入され、生じたベクター、例えば組換えウイルス（例えばボックスウイルス）を用いて動物に感染させるか、または動物に投与するために *in vitro* で生成物を発現させる。アフリカウマ病ウイルス遺伝子生成物の動物での発現は、アフリカウマ病ウイルスに対する免疫応答を動物で生じる。したがって、組換えベクター、例えばウイルス、例えば本発明の組換えボックスウイルスを免疫学的組成物またはワクチンで用い、免疫応答を誘発する手段を提供することができる。

組換えベクター、例えば組換えウイルス、例えば組換えボックスウイルス-AHSV、またはその発現生成物のための投与手段は、本発明の組成物、例えば免疫学的もしくはワクチン組成物または治療用組成物（例えば組換えベクターまたは組換えウイルス、例えばボックスウイルスまたはその発現生成物を含む）の投与のための投与手段と同様に、非経口的ルート（皮内、筋肉内または皮下）によることができる。

【0048】

ベクターまたは組換えウイルス-AHSV、例えばボックスウイルス-AHSV、またはその発現生成物、またはそのような発現生成物および/またはベクターまたはウイルスを含む組成物を任意の年齢または性別のウマに投与して、例えばアフリカウマ病ウイルスに対する免疫学的応答を誘引し、それによって例えばアフリカウマ病ウイルスおよび/またはアフリカウマ病ウイルスに付随する他の病原性続発症を予防することができる。有利には、ベクターまたは組換えウイルス-AHSV、例えばボックスウイルス-AHSV、またはその発現生成物、またはそのような発現生成物および/またはベクターまたはウイルスを含む組成物をウマ（新生仔を含む）および/または妊娠雌馬に投与して、妊娠期間中の能動免疫および/または母体抗体から新生仔への受動免疫が付与される。好ましい実施態様では、本発明は、アフリカウマ病ウイルス由来の免疫原、またはそのような免疫原の問題のエピトープ（例えばAHSV VP2および/またはVP5由来の免疫原）、および/またはこれらVpの任意の1つもしくは2つ以上またはVpの組み合わせによって発現される問題のエピトープを含む組成物による、および/またはそのような免疫原または問題のエピトープを発現するベクターによる雌ウマ（例えば成熟雌馬）の接種を提供する。前記接種は、出産前、および/または交尾前、および/または妊娠期間中、および/または周産期前でもよく、および/または一生にわたって反復してもよい。有利には、交尾前に少なくとも1回の接種が実施される。さらにまた有利には、続いて1回の接種が、妊娠期間中、例えば妊娠中期（妊娠約5 - 6カ月）および/または妊娠終了時（または妊娠約10 - 11ヶ月）に実施される。したがって、有利な接種計画は交尾前の接種および妊娠中のブースター接種である。その後は再接種が、各交尾前および/または妊娠期間中（ほぼ妊娠中期（妊娠約5 - 6カ月）および/または妊娠終了時（または妊娠約10 - 11ヶ月））に実施し得る。好ましくは、再接種は妊娠期間中のみであり得る。別の好ましい実施態様では、仔馬、例えばワクチン接種雌馬（例えば本明細書で考察したように接種）に由来する仔馬は、誕生後最初の数カ月以内に、例えば誕生後3および/または4カ月、および/または4および/または5カ月、および/または5および/または6カ月、および6カ月で接種される。より有利には、そのような仔馬は続いて（最初の接種から）2から8週間後にブースターを受ける。したがって、仔と雌ウマ（例えば成熟雌馬）の両方に本発明の組成物を投与することができ、および/または仔と雌ウマの両方が本発明の方法の実施の対象であり得る。接種は本明細書に記載の用量で実施できる。ボックスウイルスまたはウイルス組成物の投与および母体免疫に関しては、米国特許5,338,683号を参照されたい。

【0049】

組換えウイルスおよびその発現生成物の投薬量、投与経路、処方、アジュバントおよび使用に関連して、本発明の組成物は、好ましくは皮内、皮下または筋肉内ルートによる非経口的投与または粘膜投与のために用いることができる。粘膜投与を用いるときは、口、眼または鼻のルートを用いることができる。さらに別の特徴では、本発明は、本発明の組換え体またはベクター（例えばウイルス、例えば組換えボックスウイルス）の発現生成物、および使用（したがって例えば治療、予防、診断または検査用の免疫学的またはワクチン

10

20

30

40

50

ン組成物を作製するため)、および組換え体または本発明のウイルス(例えばボックスウイルス)由来のDNA(DNAプローブおよびPCRプライマーの構築で有用)に関する。

本発明の組換えベクターまたはウイルス-AHSV(例えばボックスウイルス-AHSV組換え体)免疫学的もしくはワクチン組成物または治療用組成物は、医薬または獣医分野の業者によく知られた標準的技術にしたがって調製することができる。そのような組成物は、年齢、性別、重量および投与経路のような因子を考慮しながら、獣医分野の業者によく知られた調剤および技術によって投与することができる。前記組成物は、単独で投与することができるが、また複数の組成物とともに、例えば“他の”免疫学的組成物または弱毒化、不活化組換えワクチンもしくは治療用組成物とともに同時投与、または連続投与をことができ、それによって本発明の多価または“カクテル”またはコンビネーション組成物およびそれらを用いる方法を提供する。前記組成物は、アフリカウマ病ウイルス成分(例えば、アフリカウマ病ウイルスの免疫原もしくは問題のエピトープを発現する組換えベクター(例えばプラスミドまたはウイルス)、またはアフリカウマ病ウイルス免疫原もしくは問題のエピトープを発現するボックスウイルス、および/またはアフリカウマ病ウイルス免疫原もしくは問題のエピトープ)、および1つまたは2つ以上の無関係のウマ病原体ワクチン(例えば問題のエピトープ、免疫原および/またはそのような問題のエピトープまたは免疫原を発現する組換えベクターまたはウイルス(例えば組換えウイルス、例えば組換えボックスウイルス))の組合せを含むことができる。前記1つまたは2つ以上の無関係のウマ病原体ワクチンは、例えば1つまたは2つ以上のウマの細菌性および/またはウイルス性病原体の1つまたは2つ以上の免疫原または問題のエピトープであり、前記ウマの問題のエピトープまたは免疫原は、例えば以下の1つまたは2つ以上に由来する:ウマヘルペスウイルス(EHV)、ウマインフルエンザウイルス(EIV)、ウマ西ナイルウイルス(WNV)、東部ウマ脳脊髄炎(EEE)、西部ウマ脳脊髄炎(WEE)およびベネズエラウマ脳脊髄炎(VEE)、破傷風、狂犬病およびボトムマックウマ熱+EPM。繰り返せば、成分および投与態様(連続投与または同時投与)は、投薬量と同様に年齢、生物、重量および投与ルートのような要件を考慮しながら決定することができる。これに関しては、米国特許5,843,456号を参照できる(前記特許は参照により本明細書に含まれ、前記は狂犬病組成物および組み合わせ組成物およびその使用に関する)。

10

20

30

40

50

【0050】

本発明の組成物の例には、粘膜投与(例えば口、鼻、眼などの投与)用の液体調製物(例えば懸濁物)、および非経口、皮下、皮内、筋肉内(例えば注射可能)投与用調製物、例えば無菌的懸濁物または乳液が含まれる。そのような組成物では、組換えボックスウイルスまたは免疫原は、適切な担体、希釈剤または賦形剤(例えば滅菌水、生理学的食塩水など)と混合することができる。組成物はまた、凍結乾燥または凍結することができる。組成物は、補助物質、例えば湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、アジュバント、保存料などを投与ルートおよび所望の調製物に応じて含むことができる。

組成物は以下から選択される少なくとも1つのアジュバント化合物を含むことができる:水酸化アルミニウム、代謝性油(テルペン炭化水素およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマーを含む)、アクリル酸またはメタクリル酸のポリマー、無水マレイン酸とアルケニル誘導体のコポリマー、および免疫刺激複合体マトリックス(ISCOTM)(QUIL Aノグリコシド、コレステロール、抗原および/またはリン脂質を含む)。

【0051】

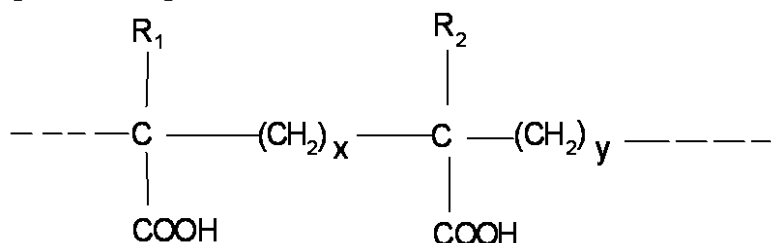
好ましいアジュバント化合物はアクリル酸またはメタクリル酸のポリマーであり、前記は特に糖またはポリアルコールのポリアルケニルエーテルで架橋される。これらの化合物はCARBOMER(Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996)という名称で知られている。当業者はまた米国特許2,909,462号(前記文献は参照により本明細書に含まれる)を参照できる。前記文献には、少なくとも3つ(好ましくは8つを越えない)のヒドロキシル基を含み、少なくとも3つのヒドロキシル基の水素原子は少なくとも2つの炭素原子を有する不飽和脂肪族ラジカルによって置換されてあるポリヒドロキシル化合物で架橋されたアクリル

酸ポリマーが記載されている。好ましいラジカルは2から4の炭素原子を含むもの、例えばビニル、アリルおよび他のエチレン誘導不飽和基である。前記不飽和ラジカルはそれら自体他の置換基、例えばメチルを含むことができる。CARBOPOL(商標)(BE Goodrich, Ohio, USA)の名称で販売されている製品が特に適切である。それらは、アリルシュクロースまたはアリルペンタエリトロールで架橋される。それらの中で特にCARBOPOL(商標)974P、934Pおよび971Pが挙げられる。

無水マレイン酸とアルケニル誘導体のコポリマーの中で、無水マレイン酸とエチレンのコポリマーであって線状または架橋(例えばジビニルエーテルで架橋)されているコポリマー-EMA(商標)(Monsanto)が好ましい。以下の文献を参照することができる: J Fields et al. 1990(前記文献は参照により本明細書に含まれる)。

それらの構造を見れば、アクリル酸またはメタクリル酸のポリマーおよびコポリマー-EMA(商標)は、好ましくは以下の式の基本単位から形成される:

【0052】



10

20

【0053】

式中、

R_1 および R_2 は同一でも異なっていてもよく、Hまたは CH_3 を表し;

$x = 0$ または1で、好ましくは $x = 1$ であり;

$y = 1$ または2で、 $x + y = 2$ である。

コポリマー-EMA(商標)については、 $x = 0$ で、 $y = 2$ である。カルボマーについては $x = y = 1$ である。

【0054】

これらポリマーを水に溶解することによって酸性溶液が生じ、この溶液は、ワクチン自体をその中に取り込むアジュバント溶液を生成するために中和され、好ましくは生理学的pHに中和されるであろう。ポリマーのカルボキシル基は続いて部分的に COO^- 形となる。

30

好ましくは、本発明のアジュバント溶液(特にカルボマー溶液)は、蒸留水中で、好ましくは塩化ナトリウムの存在下で調製され、得られる溶液は酸性pHである。このストック溶液は、前記をまたはその実質的部分を所望の量のNaCl含有水、好ましくは生理学的食塩水(NaCl 9g/L)にいくつかの部分に分けて一度に全部添加することによって希釈され、同時にまたは引き続いて好ましくはNaOHで中和(pH7.3から7.4)される。この生理学的pHの溶液はそのままワクチンと混合するために用いられ、特に凍結乾燥形、液体形または凍結形で保存されるであろう。

40

最終ワクチン組成物におけるポリマー濃度は0.01%から2%w/v、より具体的には0.06%から1%w/v、好ましくは0.1%から0.6%w/vである。

本発明の組成物はまた、文献(V Ganne et al. 1994)に記載されているように、水中油としてまたは油中水として懸濁水状態で処方することができる。

標準的な成書、例えば"Remington's Pharmaceutical Science"(17th, edition, 1985)(前記文献は参照により本明細書に含まれる)を参考にして、煩雑な実験を実施することなく適切な調製物を作製することができる。

多様な投与ルートに適した形態の組成物が本発明に包含される。さらにまた、有効な投与量および投与ルートは、既知の要件、例えば年齢、性別、重量、および公知でありさらに煩雑な実験を必要としない他のスクリーニング方法によって決定される。各活性物質の投与量は、本明細書に引用した文書(または本明細書に引用した文書に参照または引用された文書)に記載されたとおりであり得る。

50

DNA挿入物、プラスミドおよび組換えウイルスベクターの構築は、以下のJ. Sambrookらの成書に記載された標準的な分子生物学技術を用いて実施した (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。本発明で使用した全ての制限フラグメントは“GeneClean”キット (BIO 101 Inc., La Jolla, Calif) を用いて単離した。

【実施例 1】

【0058】

カナリアボックス組換えウイルスベクターの構築

アフリカウマ病ウイルスのVP1およびVP5をコードする合成遺伝子を組換えカナリアボックスウイルスベクターの構築で用いた。簡単に記せば、アフリカウマ病ウイルスの血清型 4、5および9のVP2およびVP5をそれぞれコードするL2およびM5遺伝子セグメントを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅させ、文献 (KR Bonneau, BA Mullens (2001)、KR Bonneau et al. (1999)) に以前に記載されたプロトコルを用いてシーケンシングを実施した。

AHSV-4のビルレント野外株 (以後“AHSV4 Jane株”と称する) のL2/VP2 (配列番号: 48) およびM5/VP5 (配列番号: 50) 遺伝子の配列を、GenBankで入手できるAHSV血清型4の他の株の同じ遺伝子の公表されている配列と比較し、続いてGeneOptimizer (商標) ソフト (Geneart GmbH) を用いて最適化合成配列を誘導し、個々の遺伝子の各々を包含するオリゴヌクレオチドアレーを化学的に合成した。PCRによる手法を用いて前記オリゴヌクレオチドをアッセンブリングさせ、完全な完全長合成VP2およびVP5コード配列を作製した。続いて、本質的にカナリアボックスウイルスベクター媒介西ナイルウイルス (WNV-CP) ワクチンについて以前に記載 (JM Minke et al. 2004a) されたように、この合成VP2およびVP5コード遺伝子をカナリアボックスウイルスベクターに再クローニングし、AHSV-カナリアボックスウイルス組換え体 (AHSV-CP) を作製した。

簡単に記せば、AHSV-4のVP2をコードする合成遺伝子 (配列番号: 4) をカナリアボックスC3挿入ベクター (ワクシニアウイルスH6プロモーターおよびカナリアボックスC3座位のフランキングアームを含むプラスミド) にサブクローニングし、H6プロモーターの制御下にVP2 (配列番号: 4) 遺伝子を含む発現カセットを作製した。続いて、エントモボックスウイルスアムサクタ・ムーレイ (Amsacta moorei) の42Kプロモーターの制御下に合成VP5遺伝子 (配列番号: 5) を含む発現カセットを構築し、H6-VP2ドナープラスミドでクローニングした。得られた挿入プラスミドは、2つの発現カセット (H6プロモーターの制御下のVP2 (配列番号: 4) 遺伝子および42Kプロモーターの制御下のVP5遺伝子 (配列番号: 5)) を頭-尾の向きで含んでいた。

AHSV-CPウイルス組換え体を作製するために、前記挿入プラスミドを初代ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) にトランスフェクトし、続いて前記にカナリアボックスウイルスを感染させた。24時間後、トランスフェクトした感染細胞を採集し、超音波処理して組換えウイルスのスクリーニングに用いた (A Piccini et al, (1987)。AHSV-特異的プローブを用い、組換え体のブランクをin situブランクリフトハイブリダイゼーション法 (Sambrook et al. 1982) によりスクリーニングした。4回連続ブランク精製の後、アフリカウマ病ウイルス挿入物について100%陽性であることをハイブリダイゼーションによって確認したこの組換え体を増幅させてワクチンストックの調製に用い、-80 で保存した。

【実施例 2】

【0059】

H6プロモーター駆動合成AHSV-4-VP2および42Kプロモーター駆動合成AHSV-4-VP5を発現するpLHD3460.4ドナープラスミドの構築

図1はpLHD3460.4 (配列番号: 6) の構築模式図を示す (pLHD3460.4はAHSV-4-VP2およびAHSV-4-VP5ウイルスタンパク質を発現するALVAC組換え体を作製するためのC3ドナープラスミドである)。AHSV-4-VP2 (配列番号: 4) およびAHSV-4-VP5 (配列番号: 5) をコードする遺伝子は、哺乳動物細胞における発現のためのコドン最適化を有する合成物である。合成AHSV-4-VP2 (配列番号: 4) 遺伝子をワクシニアpC3H6プロモーターの制御下に置き

、合成AHSV-4-VP5（配列番号：5）遺伝子をワクシニア42Kプロモーターの制御下に置いた。前記プラスミドはまたアンピシリン耐性を付与する遺伝子を含む。

合成AHSV-4-VP2遺伝子を含むプラスミドをBamHIおよびNruIで消化した。得られた3.2KbのAHSV-4-VP2挿入物を単離し、pJY1107.5（pF8 AIV H7N2 HA）から調製したシャトルベクターのBamHI/NruI部位にクローニングし、pLHD3410.9（pF8 H6p AHSV-4-VP2）を作製した（前記はH6プロモーターのNruI部位およびその後にXhoI部位が続く完全長のAHSV-4-VP2を含む）。

pLHD3410.9を再度NruIおよびXhoIで消化し、H6プロモーターの3' NruIおよび完全長のAHSV-4-VP2遺伝子を含む3.2KbのDNAフラグメントを単離し、pJY1738.2から調製したALVAC C3ドナープラスミド（pC3 H6p CPV-VP2）のNruI/XhoI部位にクローニングし、pLHD3426.1（H6p-AHSV-4-VP2発現カセットを含むALVAC C3ドナープラスミド）を作製した。

AHSV-4-VP5を含むプラスミドを鋳型として、さらに用いプライマー対、13599.JY（配列番号：7）および13600.JY（配列番号：8）を用いて、SpeI部位にフランキングされる発現カセット42Kp-AHSV-4-VP5を増幅させた。プライマー3599.JY（配列番号：7）は、SpeI部位およびその後にVP5の5'配列が続く42Kプロモーターの配列を含む。プライマー13600.JY（配列番号：8）は、その後にT5NTおよびSpeI部位が続くVP5の3'配列から成る。続いて増幅発現カセットをpCR2.1（TOPOベクター）でクローニングし、pCR2.1 42Kp AHSV-4-VP5を作製した（前記が正確な配列を含むことを確認した）。

プラスミドpCR2.1 AHSV-4-VP5をSpeIで消化し、続いて42Kp-VP5発現カセットを単離し、プラスミドpLHD3426.1のSpeI部位でクローニングし、二重発現カセットH6p-AHSV-4-VP2/42Kp-Vp5を含むALVAC C3ドナープラスミド（pLHD3460.4）を作製した。前記をシーケンシングし、配列番号：6に示される正確な配列を含むことを確認した。

42Kp-AHSV-4-VP5発現カセットの増幅用プライマーは以下のとおりである：

13599.JY（配列番号：7）

5' TGACTAGTTCAAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGGGCAAGTTTACCAGCTTCCTGAAG
SpeI 42Kp

13600.JY（配列番号：8）

5' TTAAGTCTAGTAGAAAAATCATCAGGCGATCTTCACGCCGTACAG
SpeI T5NT

予想される分子量はAHSV-4-VP2（配列番号：1）については124.3kDaさらにAHSV-4-VP5（配列番号：2）については57kDaであった。等電点はAHSV-4-VP2については6.75さらにAHSV-4-VP5については5.8であった。両ウイルスタンパク質は主として細胞質で発現された。

【実施例3】

【0060】

組換えウイルスベクターvCP2377（ALVAC C3 H6p-合成AHSV-4-VP2/42Kp-合成AHSV-4-VP5）の構築

vCP2377組換えウイルスベクターを作製するために、初代ニワトリ胚線維芽細胞（初代CEFまたはCEF）を用いドナープラスミド（pLHD3460.4（配列番号：6））および親ウイルス（ALVAC、 4.4×10^{10} pfu/mL）のin vitro組換えを実施した。図3はこの方法の概略である。AHSV-4-VP5特異的プローブによるブランクハイブリダイゼーションを用いて組換えウイルスベクターを確認した。

Fugene試薬（Roche, Palo Alto, California 94304-1353）を用いNotI線状化ドナープラスミドpLHD3460.4（15 μ g）を初代CEF細胞にトランスフェクトすることによって、in vitro組換えを実施した。続いてこのトランスフェクトした細胞にレスキューウイルスとしてALVAC（ 4.4×10^{10} pfu/mL）を感染数（MOI）10で感染させた。24時間後に、このトランスフェクション-感染実施細胞を採集して超音波処理し、組換えウイルスのスクリーニン

グのために用いた。

AHSV-4-VP5特異的プローブを用いブランクリフトハイブリダイゼーション法 (Sambrook et al. 1982) により組換え体ブランクをスクリーニングした。前記プローブは、製造業者 (Amersham, Alpharetta, GA 30058, Cat #RPN3001) のプロトコルにしたがいセイヨウワサビペルオキシダーゼで標識した。3回連続ブランク精製の後、vCP2377.6.1.1 (配列番号: 17によって提供される部分配列) と称される組換え体が生成され、AHSV挿入物について100%陽性であることおよび空C3部位について100%陰性であることがハイブリダイゼーションによって確認された。

最終回のブランク精製から単ブランクを選択して増やし、vCP2377.6.1.1増幅のためにP1 (T-25フラスコ)、P2 (T-75フラスコ) およびP3 (ローラーボトル) ストックを得た。P2レベルでハイブリダイゼーションにより組換え体を再確認し、挿入物について100%陽性であることおよび空C3座位について100%陰性であることを見出した。ローラーボトルから感染細胞培養液を採集し、濃縮してウイルスストックを作製した (1.2×10^{10} pfu/mLのvCP2377.6.1.1.が3.2mL)。マウス抗BTV4-VP2 mAbおよびマウス抗VP5 AHSV mAb 10AE12継代9 (Martinez-Torrecuadrada et al. 1999, Virology 257:449-459) をウェスタンブロットおよびイムノブランクに用いた (それぞれ図7および図8)。

in vitro組換えに用いた細胞は初代ニワトリ胚線維芽細胞 (初代CEF) であり、前記細胞を10%ウシ胎児血清 (FBS) (JRH bioscience, Lenexa, KS 66215: 照射カタログ番号12107、ロット番号1L0232)、4mMグルタミン (Invitrogen/BRL/Gibco, Carlsbad, California, 92008-7321, cat#11960) および1mMピルビン酸ナトリウム (Invitrogen/BRL/Gibco, cat#11360-070) 補充ダルベッコー改変イーグル培養液 (DMEM) (Invitrogen/BRL/Gibco, Carlsbad, California, 92008-7321, cat#25030-081) で1x抗生物質 / 抗菌剤 (P/S/A/A, Invitrogen/BRL/Gibco, cat#15240-062)、Fugene (Roche, Lot#181444) の存在下に増殖させた。最終ウイルス濃縮物を1mMトリス (pH9.0) に再懸濁させた。

【実施例4】

【0061】

組換えウイルスベクター-vCP2377 (ALVAC C3 H6p-合成AHSV-4-VP2/42Kp-合成AHSV-4-VP5) の解析

P3ストックが、AHSV-4-VP2およびAHSV-4-VP5挿入物について100%陽性であることおよび空C3座位について100%陰性であることをハイブリダイゼーションによって再確認した。ゲノムDNAの理論的制限マップ (図4) をベクターNTI (Invitrogen, Carlsbad, California) で作製した。実際の実験を行うために、ゲノムDNAをvCP2377.6.1.1.ウイルス濃縮物から抽出してBamHI、HindIIIまたはPstIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって分離した (図5)。前記の結果は、外来遺伝子配列が正確に挿入されていることを示した。

サザンブロット: BamHI、HindIIIまたはPstIで消化したゲノムDNAをナイロン膜に移し、AHSV-4-VP2プローブを用いることによってサザンブロット分析を実施した。予想サイズのバンドが観察された (すなわち16047bp、6971bp BamHI; 20660bp HindIII; および13658bp、4061bp PstI)。前記の結果は、AHSV-4-VP2およびAHSV-4-VP5がC3座位に正確に挿入されていることを示した (図6)。

発現解析: 初代CEF細胞にvCP2377.6.1.1.のP3ストックをMOI10で感染させ、37℃で24時間インキュベートした。続いて細胞および培養上清を採集した。サンプルタンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、IMMOBILIONナイロン膜に移し、AHSV (アフリカウマ病ウイルス) 10AE12継代9 (Martinez-Torrecuadrada et al. 1999) のマウス抗VP5抗体の1:100希釈で別個に調べた。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗血清を二次抗体として用い、バンドはAmersham検出試薬を用いて可視化した。マウス抗AHSV VP5 mAbの使用により、55から70kDaの間のタンパク質バンドがvCP2377.6.1.1.の細胞ペレットで検出され、AHSV-4-VP5タンパク質の発現が示された (図7)。培養液ではAHSV-4-VP5タンパク質の発現は検出されなかった。AHSV-4-VP2の発現は抗BTV4-VP2 mAb (Merical私有物質) では検出されなかった。

イムノブランク: vCP2377.6.1.1.集団の均質性は、マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代9 (Martinez-Torrecuadrada et al. 1999) の1:100希釈を用いてイムノブランクアッセイ

によって証明されたように100%であった（図8）。抗AHSV VP2抗体は入手できなかった。

配列解析：PCR増幅並びにC3座位のフランキングアームおよびAHSV-4-VP2、AHSV-4-VP5挿入物の配列解析を用いることによって、P3ストックゲノムDNAのより詳細な解析を実施した。プライマー-8103JY（配列番号：13）/13616.LH（配列番号：15）および13637.LH（配列番号：16）/8104JY（配列番号：14）を用いて全C3R-AHSV-4-VP2/VP5-挿入物-C3Lフラグメントを増幅した（図9）。得られた配列（すなわち配列番号：17）は、vCP2377.6.1.1.のAHSV-4-VP2およびAHSV-4-VP5挿入物、並びにAHSV挿入物の周辺のC3左および右アームの配列が正確であることを示した。

AHSV-4-VP2プローブを増幅するためのプライマー

13625.LH（配列番号：9）5' TACGACCACGGCACCGACATCATCT 3'

13632.LH（配列番号：10）5' TTTTCAGCTTCTTAAAGGCGTACTC 3'

AHSV-4-VP5プローブを増幅するためのプライマー

13615.LH（配列番号：11）5' AAGAAGATGTACAAGCTGGCCGGCA 3'

13620.LH（配列番号：12）5' GCCGCTCGTATTCTGCTTCACGAT 3'

vCP2377 C3アーム + 挿入物のPCR増幅のためのプライマー

8103.JY（配列番号：13）5' GAGGCATCCAACATATAAAGAAGACTAAAG 3'

8104.JY（配列番号：14）5' TAGTTAAATACTCATAACTCATATCTG 3'

13616.LH（配列番号：15）5' TGCCGGCCAGCTTGTACATCTTCTT 3'

13637.LH（配列番号：16）5' CACCACACTGAAGCTGGACAGAAGA 3'

【実施例5】

【0062】

H6プロモーター駆動合成AHSV-9-VP2および42Kプロモーター駆動合成AHSV-9-VP5を発現するpCXL2415.1ドナープラスミドの構築

pCXL2415.1（配列番号：22）の全体的な構築模式図は図10に示されている。合成AHSV-9-VP2（配列番号：28）を含むプラスミドをNruI / BamHIで消化して3188bpフラグメントを単離し、NruI/BamHI-線状化pJY1107.5（pF8 H6p-AIV H7N2 HA）でクローニングした。得られたプラスミド、pCXL2275.1（pF8 H6p-AHSV-9-VP2）はH6プロモーターのNruI部位および完全長AHSV-9-VP2とその後続くXhoI部位を含んでいる。配列確認の後、pCXL2275.1をNruI / XhoIで消化して3194bpのAHSV-9-VP2フラグメントを単離し、NruI / XhoI消化pJY1378.2（C3 ALVACドナープラスミド）でクローニングした。得られたプラスミド、pCXL2328.4（pC3 H6p-AHSV-9-VP2）は発現カセットH6p-AHSV-9-VP2を含んでいる。

42Kp-AHSV-9-VP5発現カセットを作製するために、18020CXL（配列番号：23）および18021CXL（配列番号：24）プライマーを用いて、AHSV-9合成VP5遺伝子をコードするDNAを増幅した。続いて、このPCR生成物をTOPO pCR2.1ベクターを用いてクローニングし、プラスミドpCXL2313.2（pCR2.1 42Kp-VP5）を作製した。しかしながら、pCXL2313.2はプライマー-18020CKLの設計に起因してVP5遺伝子の末端にTN5T配列を含まないことが判明した。したがって、新しいプライマーセット、18041CXL（配列番号：46）および18042CXL（配列番号：47）を合成し、前記を用いてプラスミドpCXL2313.2のVP5遺伝子の末端にT5NT配列を導入した。部位指定変異導入はStratagene社のQuickChangeキットを用いて実施し、得られたプラスミド、pCXL2399.3をシーケンシングして、SpeI部位にフランキングする正確な42K-AHSV-9-VP5を含むことを確認した。

続いて、プラスミドpCXL2399.3をSpeIで消化して42Kp-AHSV-9-VP5発現カセットを含む1556bpフラグメントを単離し、プラスミドpCXL2328.4のSpeI部位にクローニングしてpCXL2425.1（配列番号：22）を作製した。前記は、二重発現カセットH6p-AHSV-9-VP2/42Kp-AHSV-9-VP5を頭尾の向きで含むALVAC C3ドナーである（図11）。AHSV-9-VP2およびAHSV-9-VP5の予想される分子量はそれぞれ123.5kDaおよび56.8kDaである。VP2およびVP5の等電点はそれぞれ8.14および5.96であり、タンパク質は主として細胞質で発現した。

【実施例6】

【0063】

組換えウイルスベクターvCP2383（ALVAC C3 H6p-合成AHSV-9-VP2/42Kp-合成AHSV-9-VP5

）の構築

図12に示されているin vitro組換え（IVR）模式図にしたがって、vCP2383組換えウイルスベクターを作製した。IVRは、初代ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）にFuGENE（商標）HDトランスフェクション試薬（Roche, Cat#04709705001）を用いて13.2 µgのSapI-線状化ドナープラスミドpCXL2415.1をトランスフェクトすることによって実施した。続いてトランスフェクトした細胞にレスキューウイルスとしてALVAC（ 4.4×10^{10} pfu/mL）を感染多重度（MOI）10で感染させた。24時間後に、このトランスフェクション-感染実施細胞を採集して超音波処理し、組換えウイルスのスクリーニングのために用いた。

AHSV-9-VP5特異的プローブを用いブランクリフトハイブリダイゼーション法（Sambrook et al. 1982）により組換え体ブランクをスクリーニングした。前記プローブは、製造業者（Amersham, Cat #RPN3001）のプロトコルにしたがいセイヨウワサビペルオキシダーゼで標識した。4回連続ブランク精製の後、vCP2383.3.1.1.1およびvCP2383.9.1.1.1と称される組換え体が生成され、AHSV挿入物について100%陽性であることおよびC3座位について100%陰性であることがハイブリダイゼーションによって確認された。

最終回のブランク精製から単ブランクを選択して増やし、vCP2383.3.1.1.1増幅のためにP1（T-25フラスコ）、P2（T-75フラスコ）およびP3（6×ローラボトル）ストックを得た。ローラボトルから感染細胞培養液を採集し、濃縮してウイルスストックを作製した（ 2.2×10^{10} pfu/mLのvCP2383.3.1.1.1が4.5mL）。

【実施例7】

【0064】

組換えウイルスベクターvCP2383（ALVAC C3 H6p-合成AHSV-9-VP2/42Kp-合成AHSV-9-VP5）の解析

P3ストックが、AHSV-9-VP2およびAHSV-9-VP5挿入物について100%陽性であることおよびC3座位について100%陰性であることをハイブリダイゼーションによって再確認した。

ゲノム解析：ベクターNTIを用いてvCP2383ゲノムDNAの理論的制限酵素ゲルを作製した（図13）。実際の実験を行うために、ゲノムDNAをvCP2383.3.1.1.1およびvCP2383.9.1.1.1から抽出してBamHI、HindIIIまたはXbaIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって分離した。前記の結果は、外来遺伝子配列が正確に挿入されていることを示した（図14）。

サザンブロット：BamHI、HindIIIまたはXbaIで消化したゲノムDNAをナイロン膜に移し、AHSV-9-VP5プローブを用いることによってサザンブロット分析を実施した。予想サイズのバンドが観察された（すなわち4940bp BamHI；20633bp HindIII；および9559bp XbaI）。前記の結果は、AHSV-9-VP2およびAHSV-9-VP5がC3座位に正確に挿入されていることを示した（図15）。

発現解析：初代CEF細胞にvCP2383.3.1.1.1のP3ストックをMOI10で感染させ、37℃で26時間インキュベートした。細胞および培養上清を採集し、サンプルタンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、IMMOBILIONナイロン膜に移し、AHSV（アフリカウマ病ウイルス）10AE12継代9（Martinez-Torrecuadrada et al. 1999）のマウス抗VP5抗体の1：100希釈で別個に調べた。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗血清を二次抗体として用い、バンドはAmersham検出試薬を用いて可視化した。マウス抗AHSV VP5 mAbの使用により、55から72kDaの間のタンパク質バンドがvCP2383.3.1.1.1の細胞ペレットで検出され、AHSV-9-VP5タンパク質の発現が示された（図16）。培養液中にはAHSV-9-VP5タンパク質の発現は検出されなかった。AHSV-9-VP2の発現はマウス抗BTV4-VP2 mAb（Merial私有物質）では検出されなかった。

イムノブランク：マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代9（Martinez-Torrecuadrada et al. 1999）の1：100希釈を用いてイムノブランクアッセイによって証明されたように、vCP2383.3.1.1.1集団の均質性は100%であった（図17）。

配列解析：PCR増幅並びにC3座位のフランキングアームおよびAHSV-9-VP2（配列番号：28）とAHSV-9-VP5（配列番号：29）の挿入物の配列解析を用いることによって、P3ストックゲノムDNAのより詳細な解析を実施した。プライマー8103JY（配列番号：13）および810

10

20

30

40

50

4JY (配列番号: 14) (図 18) を用いて全C3L - AHSV-9-VP2 - 42K-AHSV-9-VP5 - C3R フラグメントを増幅した。得られた配列 (すなわち配列番号: 27) は、vCP2383.3.1.1.1のAHSV-9-VP2 (配列番号: 28) およびAHSV-9-VP5 (配列番号: 29) 挿入物、並びにAHSV挿入物の周辺のC3左および右アームの配列が正確であることを示した。

AHSV-9-VP5プローブを増幅するためのプライマー

18020CXL (配列番号: 23) 5' CTAGACTAGTTTACTATCATTTTCACGCCGAACAGCA

18021CXL (配列番号: 24) 5' GCAAGGACCAGAGCGAGCGGATCA

AHSV-9-VP2プローブを増幅するためのプライマー

13660CXL (配列番号: 25) 5' AGGCCTTCGCCGCAACAGCCTGCT

13665CXL (配列番号: 26) 5' AGGGCATCGATCAGGAACCTCGCTCT

10

vCP2383 C3アーム + 挿入物のPCR増幅のためのプライマー

8103.JY (配列番号: 13) 5' GAGGCATCCAACATATAAAGAAGACTAAAG 3'

8104.JY (配列番号: 14) 5' TAGTTAAATACTCATAACTCATATCTG 3'

【実施例 8】

【0065】

H6プロモーター駆動合成AHSV-5-VP2および42Kプロモーター駆動合成AHSV-5-VP5を発現するpJSY2247.2ドナープラスミドの構築

pJSY2247.2 (配列番号: 32) の全体的な構築模式図は図 22 に示されている。合成AHSV-5-VP2 (配列番号: 33) 遺伝子を含むプラスミドをXhoIおよびNruIで消化した。得られたAHSV-5-VP2 (配列番号: 33) 挿入物を単離し、pJY1738.2 (pC3 H6p CPV-VP2) から調製したALVAC C3ドナープラスミドのNruI/XhoI部位でクローニングし、pJSY2245.1 (H6p-AHSV-5-VP2発現カセットを含むALVAC C3ドナープラスミド) を作製した。

20

合成AHSV-5-VP5 (配列番号: 34) を含むプラスミドからSpeI部位にフランキンゲされる発現カセット42Kp-AHSV-5-VP5をSpeI消化によって単離し、続いてプラスミドpJSY2245.1のSpeI部位にクローニングして、二重発現カセットpJSY2247.2 (配列番号: 32、H6p-AHSV-5-VP2/42Kp-VP5) を含むALVAC C3ドナープラスミドを作製した。前記をシーケンシングして正確な配列を含むことを確認した。プラスミド pJSY2247.2 の図および対応する配列番号は図 23 に示されている。合成AHSV-5-VP2 (配列番号: 35) および合成AHSV-5-VP5 (配列番号: 36) の分子量はそれぞれ約122.9kDaおよび約57.1kDaである。合成AHSV-5-VP2 (配列番号: 35) および合成AHSV-5-VP5 (配列番号: 36) の等電点はそれぞれ約8.4および5.77である。両ウイルスタンパク質は主として細胞質で見出された。

30

【実施例 9】

【0066】

組換えウイルスベクターvCP2398 (配列番号: 41) (H6-合成AHSV-5-VP2 - 42K-合成AHSV-5-VP5) の構築

図 24 に示されているin vitro組換え (IVR) の模式図にしたがって、vCP2398 (配列番号: 41) 組換えウイルスベクターを作製した。IVRは、初代CEFにFuGENE試薬 (Roche, Cat #04709705001) を用いて15 µgのNotI-線状化pJSY2247.2 (配列番号: 32) ドナープラスミドをトランスフェクトすることによって実施した。続いてトランスフェクトした細胞にレスキューウイルスとしてALVAC (1) (2×10^{10} pfu/mL HM1355) を感染数 (MOI) 10で感染させた。24時間後に、このトランスフェクション-感染実施細胞を採集して超音波処理し、組換えウイルスのスクリーニングのために用いた。

40

製造業者 (Amersham, Cat #RPN3001) のプロトコルにしたがいセイヨウワサビペルオキシダーゼで標識したAHSV-5-VP2特異的プローブを用いブランクリフトハイブリダイゼーション法 (Sambrook et al. 1982) により組換え体ブランクをスクリーニングした。。3回連続ブランク精製の後、vCP2398.2.1.1と称される組換え体が生成され、AHSV挿入物について100%陽性であることおよび空C3座位について100%陰性であることがハイブリダイゼーションによって確認された。

最終回のブランク精製から単ブランクを選択して増やし、vCP2398.2.1.1増幅のためにP1 (T-25フラスコ)、P2 (T-75フラスコ) およびP3 (ローラーボトル) ストックを得た。P

50

2レベルでハイブリダイゼーションにより組換え体を再確認し、挿入物について100%陽性であることおよび空C3座位について100%陰性であることを見出した。ローラーボトルから感染細胞培養液を採集し、濃縮してウイルスストックを作製した (3.3×10^{10} pfu/mLのvCP2398.2.1.1が2.6mL)。

【実施例 10】

【0067】

組換えウイルスベクターvCP2398 (配列番号: 41) (H6-合成AHSV-5-VP2 - 42K-合成AHSV-5-VP5) の解析

P3ストックが、AHSV-5-VP2およびAHSV-5-VP5挿入物について100%陽性であることおよび空C3座位について100%陰性であることをハイブリダイゼーションによって再確認した。

ゲノム解析: ゲノムDNAの理論的制限酵素ゲルをベクターNTIで作製し、図25に示した。ゲノムDNAをvCP2398.2.1.1から抽出してBamHI、HindIIIまたはPstIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によって分離した。前記の結果は、外来遺伝子配列が正確に挿入されていることを示した (図26)。

サザンブロット: BamHI、HindIIIまたはPstIで消化したゲノムDNAをナイロン膜に移し、AHSV-5-VP2プローブを用いることによってサザンブロット分析を実施した。特異的な20975bpおよび11899bpのBamHI、4980bpのHindIII、および1818bpのPstIバンドが予想サイズで観察された。前記の結果は、AHSV-5-VP2およびAHSV-5-VP5がC3座位に正確に挿入されていることを示した (図27)。

発現解析: 初代CEF細胞にvCP2398.2.1.1のP3ストックをMOI10で感染させ、37℃で24時間インキュベートした。続いて細胞および培養上清を採集した。サンプルタンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、IMMOBILIONナイロン膜に移し、AHSV (アフリカウマ病ウイルス) 10AE12継代9 (Martinez-Torrecuadrada et al. 1999) のマウス抗VP5抗体の1:100希釈で別個に調べた。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗血清を二次抗体として用い、バンドはAmersham検出試薬を用いて可視化した。マウス抗AHSV VP5 mAbの使用により、55から72kDaの間のタンパク質バンドがvCP2398.2.1.1の細胞ペレットで検出され、AHSV-5-VP5タンパク質の発現が示された (図28)。培養液ではAHSV-5-VP5タンパク質の発現は検出されなかった。

イムノブランク: マウス抗AHSV VP5 mAb 10AE12継代9 (Martinez-Torrecuadrada et al. 1999) の1:100希釈を用いてイムノブランクアッセイによって証明されたように、vCP2398.2.1.1集団の均質性は100%であった (図29)。

配列解析: PCR増幅並びにC3座位のフランキングアームおよびAHSV-5-VP2とAHSV-5-VP5の挿入物の配列解析を用いることによって、P3ストックゲノムDNAのより詳細な解析を実施した。プライマー8103.JY / 8104.JYを用いて全C3R-AHSV-5-VP2/VP5挿入物-C3Lフラグメントを増幅した。プライマーマップは図30に示されている。得られた配列 (すなわち配列番号: 41) は、vCP2398.2.1.1のAHSV-5-VP2およびAHSV-5-VP5挿入物、並びにAHSV挿入物の周辺のC3左および右アームの配列が正確であることを示した。

AHSV-5-VP2プローブを増幅するためのプライマー

18098.JY (配列番号: 37) 5' GGATCGAGCGGGACGAGCTGGACG 3'

18103.JY (配列番号: 38) 5' GCCAGCCGTACTGGAAGTGTAGC 3'

AHSV-5-VP5プローブを増幅するためのプライマー

18115.JY (配列番号: 39) 5' TGCTGGACCTGAGCGCCGAGGTGA 3'

18120.JY (配列番号: 40) 5' TCAGGCGATCTTCACGCCGAACAG 3'

vCP2398 C3アーム + 挿入物のPCR増幅のためのプライマー

8103.JY (配列番号: 13) 5' GAGGCATCCAACATATAAAGAAGACTAAAG 3'

8104.JY (配列番号: 14) 5' TAGTTAAATACTCATAACTCATATCTG 3'

【実施例 11】

【0068】

実験的ワクチンの作製

ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) のコンフルエントな単層でvCP2377 (実施例6にしたがっ

て作製)を4日間培養して採集し処理した後、種ウイルスマスターストックから5継代目(MSV+5)で得られた活性成分を用いて3種の異なるワクチンを作製した。MSV+5継代は、(ゲノム/遺伝子の構造安定性から)市販ワクチン製品の好例であり、典型的には市販バッチの製造に用いられる。3種のワクチン(GMP条件で作製)はアジュバントとしてCARBOMERを用い(4mg/mL)、それらはその抗原濃度が相違する。用いた具体的なCARBOMERは、CARBOMER(商標)/CARBOPOL(商標)974P(医薬品グレード、Goodrich Chemicals Europe NV(ベルギー)製)であった。使用濃度は、1用量=1mLの場合4mg/mLであった。本明細書を通じてCARBOMER(商標)974PはCARBOPOL(商標)974Pと互換的に用いられる。

ワクチン処方物で用いた活性成分vCP2377の感染力価は $8.89 \text{ Log}_{10} \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$ であった。ワクチン処方物はまた以下の成分を含んでいた:0.1%のNaClを含む注射用水で1.5%カルボマー溶液で作製したアジュバント;pH7.1で生理学的に緩衝させた希釈液;pH調節のための0.1NのNaOH。

-70 で保存した活性成分を水浴(37)で使用前72時間以内に融解させた。融解後直ちに、それらを+5 で保存した。攪拌系を備えた滅菌容器に、処方物に対して80%の緩衝生理学的食塩水(pH7.1)を室温で導入した。活性成分を攪拌下で添加した。均質化後に、1NのNaOHを用いてpHを調節しながら、CARBOMER(商標)974Pの15%溶液をゆっくりと添加した。処方中に、pH値を好ましくは6.5から7.3に維持しCARBOMERの最終濃度を4mg/mLにした。CARBOMER(商標)974Pを全て添加したとき、緩衝生理学的食塩水(pH7.1)の残量を攪拌しながら添加して最終体積を完成させた。

必要ならば、水酸化ナトリウム(1N)または塩酸(1N)の添加によりpHを 7.1 ± 0.2 に調整することができる。前記バルク物質を+2 を下らない温度で少なくとも2時間攪拌することによって均質化させた。得られたバルク物質を+5 (±3)で充填まで保存した。ワクチンの組成の要旨を表1に示す。

【0069】

表 1

ワクチンバッチ87859A010、標的の処方: $7.5 \text{ Log}_{10} \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$			
コード	名称	バッチ	体積 (mL)
	vCP2377	8C23775E05	40.7
	CARBOMER(商標)947P (1.5%溶液)	8CB011311H50	266.7
1045001007	緩衝生理学的食塩水 (pH7.1)	285142	668.6
1045000842	NaOH (1N)	283938	47.9
ワクチンバッチ87859A020、標的の処方: $7.2 \text{ Log}_{10} \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$			
コード	名称	バッチ	体積 (mL)
	vCP2377	8C23775E05	20.4
	CARBOMER(商標)947P (1.5%溶液)	8CB011311H50	266.7
1045001007	緩衝生理学的食塩水 (pH7.1)	285142	689.2
1045000842	NaOH (1N)	283938	47.7
ワクチンバッチ87859A030、標的の処方: $6.8 \text{ Log}_{10} \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$			
コード	名称	バッチ	体積 (mL)
	vCP2377	8C23775E05	8.1
	CARBOMER(商標)947P (1.5%溶液)	8CB011311H50	266.7
1045001007	緩衝生理学的食塩水 (pH7.1)	285142	701.3
1045000842	NaOH (1N)	283938	47.9

【実施例 12】

【0070】

合成AHSV-4-VP2および合成AHSV-4-VP5キャプシドタンパク質を発現するvCP2377組換えウイルスペクターを含む3種のワクチンバッチの同一性の立証

10

20

30

40

50

974Pアジュバント添加vCP2377を含む前記3種のワクチンは以下のとおりであった：バッチ87859A011、標的の力価：7.5 Log_{10} DICC₅₀/mL、バッチ87859A021、標的の力価：7.2 Log_{10} DICC₅₀/mLおよびバッチ87859A031、標的の力価：6.8 Log_{10} DICC₅₀/mL。処方前のvCP2377はvCP2377-1-CEPI 7007/17/07/07で、力価は8.3 Log_{10} DICC₅₀/mLであった。

CARBOPOL (商標)974Pアジュバントが添加された2つの“無関係”組換えカナリアボックスを含むワクチンを陰性コントロールとした用いた（バッチ-76435V191、力価7.34 Log_{10} DICC₅₀/mL）。

方法：ウイルスタンパク質AHSV-4-VP2およびAHSV-4-VP5の発現は間接免疫蛍光およびウェスタンブロットによって立証し、さらにワクチンの同一性確認のために用いた。試薬には以下が含まれていた：抗AHSV VP5 10AE12（INGENASA, 28037 Madrid）、ブタポリクローナル血清抗VP2血清型4 AHSV（GENOVAC）、抗cMycクローン4A6（マウスモノクローナルIgG1、Upstate, Cat #05-724）、抗マウスIRDye800、抗モルモットIRDye800、抗マウスCy3および抗モルモットCy3。合成AHSV-4-VP2（配列番号：1）およびAHSV-4-VP5（配列番号：2）タンパク質をコードするプラスミドを陽性コントロールとして用いた：pVR1012（挿入物を含まないコントロールプラスミド）；pCG050（pVR1012に合成AHSV-4-VP2（配列番号：4）を挿入）；pCG042（pVR1012に合成AHSV-4-VP5（配列番号：5）を挿入）；およびpCG049（pVR1012に合成AHSV-4-VP2（配列番号：4）+vMyc-タグを挿入）。

間接免疫蛍光のためには、組換えウイルスベクター感染/プラスミドトランスフェクションニワトリ胚線維芽細胞（CEF）を96ウェルプレートに播種した（25000細胞/ウェル）。トランスフェクションの約24時間後（感染後約72時間に匹敵する）に細胞を固定した。続いて細胞を抗VP2および抗VP5一次抗体を用いて標識し、続いてCy3結合二次抗体で標識した。標識細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロットのためには、組換えウイルスベクター感染/プラスミドトランスフェクションニワトリ胚線維芽細胞（CEF）を6 cmディッシュに播種した（1.10e6細胞/ディッシュ）。トランスフェクションの約24時間後（感染後約72時間に匹敵する）に細胞を採集した。貫通処理後、採集したサンプルをアクリルアミドトリス-グリシン4-20%ゲルに静置した。泳動後、ゲルをニトロセルロース膜に移し、抗VP2、抗VP5および抗cMyc一次抗体プローブで、その後IRDye800結合二次抗体プローブで調べた。読み取りはOdyssey-LiCor スキャナーを用いて実施した。

結果：図19に示した免疫蛍光の結果によれば、VP5タンパク質は、CARBOPOLアジュバント添加vCP2377の3バッチおよび処方前のvCP2377によってCEF感染細胞で発現した（陰性コントロールとしてvCP EIVを使用）。VP2は、処方前vCP2377およびvCPの3バッチの処方後にモルモットの3血清のプールを用いて正確に検出された。それにもかかわらず、抗VP5モノクローナル抗体と比較してポリクローナル抗体のプールを用いたときに蛍光は弱く、さらにvCP EIV陰性コントロールで少しのノイズが示された。

さらに、試薬の有効性は個々のタンパク質（挿入物を含まないコントロールプラスミド（pVR1012）、pVR1012中の合成AHSV-4-VP2（配列番号：4）（pCG050）、pVR1012中の合成AHSV-4-VP5（配列番号：5）（pCG042）およびpVR1012中の合成AHSV-4-VP2 + his-タグ（pCG049）を含む）をコードするプラスミドをトランスフェクトしたCEFを用いて立証した。VP5タンパク質はpCG042プラスミドをトランスフェクトしたCEFでのみ示された。VP2タンパク質は、pCG050およびpCG049プラスミドをトランスフェクトしたCEFで正確に検出された。これらの結果は技術および試薬の有効性を立証した。

図20Aは、感染およびトランスフェクションCEFの溶解物で実施したウェスタンブロットであり、AHSV血清型4のVP2タンパク質の発現を示している。VP2タンパク質は、CARBOPOLアジュバント添加vCP2377の3バッチの各々（9A011、9A021および9A031）および処方前のvCP2377で検出された。プラスミドpCG050（pVR1012中のVP2）およびpCG049（pVR1012中のVP2 + c-myc）は陽性コントロールとして用いられ、それらもまたVP2を発現した。pCG049プラスミドをトランスフェクトしたCEFの抗c-mycによる処理はトランスフェクション陽性コントロールとして用いられた。

予想した通り、vCP EIV感染CEFまたはpVR1012およびpCG042トランスフェクトCEFについ

でシグナルは検出されなかった。さらに、抗VP2ポリクローナル抗体はAHSV血清型4のVP2タンパク質に特異的であった。

図20Bは、感染およびトランスフェクションCEFの溶解物で実施したウェスタンブロットであり、AHSV血清型4のVP5タンパク質の発現を示している。

図20Aは感染およびトランスフェクションCEFの抗VP5ウェスタンブロットの結果を示す。VP5タンパク質は、CARBOPOL(登録商標)974Pアジュバント添加vCP2377の3バッチの各々および処方前のvCP2377で検出された。プラスミドpCG042(pVR1012中のVP5)をトランスフェクトしたCEFもまたVP5を発現した。

予想した通り、vCP EIV感染CEFでも、pVR1012、pCG050およびpCG049トランスフェクションCEFでもシグナルは検出されず、文献(Martinez-Torrecuadrada et al. 1999, Virology 257:449-459)に記載されているように、抗VP5抗体はAHSV血清型4のVP5タンパク質に明確に特異的であることを示した。

IV結論：間接免疫蛍光およびウェスタンブロットによって提供された結果はいずれも、CARBOPOL(商標)974Pアジュバントを添加した3種のvCP2377ワクチンはAHSV血清型4のVP2およびVP5タンパク質を発現することを示している。

【実施例13】

【0071】

ウマにおけるワクチン用量応答

A 実験動物

総数6頭の以前にワクチンを接種されていないウマを免疫原性実験に用いた。前記動物を標準的方法で飼養し取り扱った。

B ワクチン未接種動物における免疫原性

候補ワクチンに対するウマの免疫応答を評価するために、以前にワクチンを接種されていない6頭の仔馬を任意に2頭ずつの3グループに分けた。0日目に候補ワクチン(AHSV-CP)のそれぞれ別個の3種のバッチ調製物(バッチ:87859A011、87859A021および87859A031)の1つの3用量を2頭ずつの各群に接種した。それぞれのバッチは、図21に示すようにそれらの標的力価が異なっていた(すなわち7.3、6.96および6.28 $\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50}/\text{mL}$)。各群で、該当用量のうち2用量を頸部の一方の側の筋肉内(IM)に投与し、さらに1用量を頸部の他方の側にIM投与した。0日目に投与したワクチンと同じバッチの1用量を用いて28日目に頸部筋肉内でウマを免疫した。ワクチンの初回用量の接種前に、頸静脈穿刺によって血液サンプルを2×7mLチューブ(SST VACUTAINERチューブ)に採取した。さらにまた、28日目および42日目に、全てのウマから頸静脈穿刺によって血液サンプルを2×7mLのSST VACUTAINERチューブに採取した。

C 解析

最初のワクチン接種の前、最初のワクチン接種期間中、2回目のワクチン接種時、および2回目のワクチン接種期間中に採集した血清サンプルを、アフリカウマ病ウイルスに対するグループ特異的ELISA試験(C Hamblin et al. 1990, Epidemiology and Infection 104:303-312)およびAHS血清型4特異的血清-ウイルス中和試験(PG Howell, 1962)に付した。

結果は図21に示されている。0日目には、全てのウマがAHSV-4に対して検出可能な血清抗体をもたず陰性であった。28日目(初回免疫後4週間)には、最高力価($\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 7.3)を含むバッチのワクチンで免疫されたウマの全てが中和力価を生じた。28日目には、中間力価($\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 6.96)を含むバッチのワクチンで免疫された2頭のウマの1頭が中和力価を生じた。最後に、最低力価($\text{Log}_{10}\text{CCID}_{50}/\text{mL}$ 6.28)を含むバッチのワクチンで免疫されたウマはいずれも中和力価を生じなかった。42日目(ブースター用量の投与後2週間)には、6頭のうち5頭が良好な抗体力価を生じた(図21)。最低力価のバッチ(87859A031)のワクチンで免疫された1頭のウマ(#53761)は、アフリカウマ病ウイルスに対する抗体が陰性であった。

【実施例14】

【0072】

組換えカナリアボックスウイルスによるウマのワクチン接種

9頭のボーアパード (Boerperd) 馬 (雄5頭、雌4頭) の1年子を南アフリカノザンケーププロビンス (少なくとも先行する12ヶ月間はAHSVが報告されていない地域) から入手した。これらのウマは、間接酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によってAHSV特異抗体をもたないことが確認された (前記ELISAは、AHSV血清グループのウイルスに共通のVP7コアタンパク質に対する抗体を検出する (S Maree and JT Paweska, 2005))。病原媒介動物を防ぐ隔離施設に前記のウマをこれらの実験を通して収容した。各々4頭のウマを含む2つのグループ (雄2頭および雌2頭) にCARBOPOLアジュバントを含むほぼ1mLの希釈液中の $10^{7.1}$ または $10^{6.4}$ TCID₅₀/用量のAHSV-CPをそれぞれ筋肉内接種した。動物愛護的理由から、チャレンジ接種物の病毒性の確認にはただ1頭のコントロールのウマを用いた (このウイルス株は、接種したウマで重篤または致死的な症状を引き起こすことが以前に示されたからである: JP Nurton et al. 2001)。コントロールのウマにはウマインフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質を発現する組換えカナリアボックスウイルス (EI-CP; P ROTEQFLU (商標) ウマインフルエンザウイルスワクチン; Merial) が接種された (製造業者の指示にしたがって投与)。対応するワクチン構築物を28日後に全てのウマに再接種した。ワクチンのタイプに関係なく動物と一緒に収容した。全ての実験室試験はワクチン接種情報から独立して実施された。

10

A 方法

ウマのAHSV感染およびサンプル採集

2回目のワクチン接種から28日後に $10^{5.5}$ TCID₅₀のAHSV-4を静脈内接種することによって、9頭全てのウマをチャレンジした。接種後毎日23日間、アフリカウマ病の症状発現についてウマを判定した。チャレンジ感染前並びに感染後2、5、7、9、12、14、16、19、21および23日 (DPI) に完全血球算定 (CBC) のために、血液をEDTA VACUTAINER™チューブ (Becton Dickinson) に採集した。定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) およびBHK-21細胞でのウイルス単離のために、血液サンプルはまた0日目から23DPIまでEDTA VACUTAINER™チューブ (Becton Dickinson) に毎日採集した。ワクチン接種直前およびその後は2週間間隔で全てのウマからSST血清セパレーターチューブ (Becton Dickinson) に血清を採集した。

20

臨床検査室アッセイ

血液学的分析は細胞電子計測装置 (Coulter Electronics Inc.) を用いて実施した。

30

ウイルス検出

ウマ血中のAHSVの存在は、AHSVのVP7およびNS2をコードする個々の遺伝子を検出するqRT-PCRを用いて決定した (M Quan and AJ Guthrie, 2009)。サンプルは、最大40サイクル以内で蛍光が0.1の閾値を越えた場合に陽性に分類した。血液のウイルス単離は、文献 (M Quan et al. 2008) に記載されたようにBHK-21細胞で実施した。

血清学的アッセイ

AHSVの血清型特異的中和抗体は、文献 (PG Howell et al. 2002) に記載されたように、チャレンジウイルスとしてAHSV-4を用いたマイクロ中和アッセイによって検出した。抗体力価は、BHK-21細胞の少なくとも50%防御を提供する最高の最終血清希釈の逆数として記録した。10を超える力価を有意とみなした。

40

統計解析

初回ワクチン接種から8週間後およびAHSV感染から6週間後のAHSV-4中和抗体力価をマン-ホイットニー-U検定 ($P > 0.05$ を有意とみなす) によってワクチングループ間で比較した。

B 解析

AHSV-CPの免疫原性

ワクチン接種前には、全てのウマがELISAおよびAHSV-4マイクロ中和アッセイの両方で血清陰性であった。さらに表2で2頭を除く全てが、AHSV-CP組換えベクターによる免疫後AHSV-4に対する中和抗体を生じたが、一方、EIV-CPで免疫したウマはAHSV-4に対する中和抗体を生じなかった (表2)。ワクチン接種後8週間で、AHSV-4力価は、低用量群の力価よ

50

りも高ワクチン用量を投与したウマで優位に高かったが ($P=0.021$)、この違いは感染後6週間では同様には明瞭でなかった ($P=0.057$)。全てのウマが健康を維持し、さらにワクチン接種後の副作用を示さなかった。

【0073】

表2：アフリカウマ病血清型4中和抗体の力価

処理／ウマID	ワクチン接種後力価 ^a 初回ワクチン接種後週数			感染後力価 ^a AHSV感染後週数		
	0	4	8	2	4	6
ワクチン接種 (AHSV-CP-10 ^{7.1})						
1	≤10	≤10	28	20	40	20
2	≤10	≤10	40	40	10	14
3	≤10	≤10	20	40	28	40
4	≤10	≤10	40	80	56	80
ワクチン接種 (AHSV-CP-10 ^{6.4})						
5	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10
6	≤10	≤10	≤10	10	≤10	≤10
7	≤10	≤10	14	40	20	10
8	≤10	≤10	10	56	56	14
コントロール (EIV-CP)						
9	≤10	≤10	≤10	10	160	224

^a BHK-21単層細胞の50%を越える防御を提供した最高希釈の逆数として表現

【0074】

C AHSV-CPで免疫したウマの防御

ウマに防御免疫を付与するAHSV-CPの能力を、AHSV-CP (ワクチン接種) およびEIV-CP (コントロール) で免疫したウマのチャレンジ感染後の血中AHSV核酸量 (Ct値) を比較することによって判定した (図31、パネルA)。AHSV核酸はコントロールのウマ (EIV-CP) で感染後8日 (DPI) から検出されたが、一方、ワクチン接種したウマの血液では全く検出されなかった。同様に、AHSV-4はコントロールのウマの血液からは繰り返し単離されたが、ワクチン接種したウマからは全く検出されなかった。

コントロール (EIV-CP) のウマは、“ディックコップ (dikkop)” またはアフリカウマ病の心臓形状と合致する臨床症状を発したが、一方、ワクチン接種したウマはいずれも実験中ずっと正常を維持した。特に、コントロールのウマは高熱および血小板減少症を発し、この症状は血中のウイルス負荷の上昇と一致した (図31、それぞれパネルBおよびC)。コントロールのウマはまた12DPIに眼窩上窩の著名な浮腫を発し、前記は21DPIまで持続した。

D AHSV-4チャレンジ暴露後のAHSV-CPワクチン接種およびコントロールのウマの血清学的応答

ワクチン接種 (AHSV-CP) およびコントロール (EIV-CP) のウマの血清学的応答をAHSV-4チャレンジ感染後にSN (表2) およびELISA (データは示されていない) によって決定した。コントロールのウマは、SNアッセイで決定したときチャレンジ後4週間でAHSVに対して血清転換したが、一方、ワクチン接種ウマはいずれも血清転換を示さなかった。さらにまた、実験期間中ワクチン接種した全てのウマがELISAでVP7に対する抗体について陰性のままであった。ワクチン接種したウマのSNアッセイにおける血清転換の欠如およびELISAによるVP7に対する抗体検出の失敗は、ワクチン接種したウマではウイルス複製が起こらないかまたは極めて低いことを示唆している。同様に、チャレンジ前には血清が陰性であったコントロール (WNV-CP) のウマではチャレンジ感染後のAHSV-4中和抗体は、ワクチン接種ウマで感染から4および6週間後に観察された力価よりも顕著に高かった。

【 0 0 7 5 】

参考文献

- 1 Andreansky, S.S., He, B. et al., *The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21): 11313-8.
- 2 Ballay, A., Levrero, M. et al., *In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses* (1985). Embo J 4(13B): 3861-5.
- 3 Bocchia, M. et al., *Specific Binding of Leukemia Oncogene Fusion Protein Peptides to HLA Class I Molecules* (2000). Blood 85: 2680-2684. 10
- 4 Bonneau, K.R., Zhang, N., Zhu, J., Zhang, F., Li, Z., Zhang, K., Xiao, L., Xiang, W., MacLachlan, N.J., *Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from the United States and the People's Republic of China* (1999). Virus Research 61: 153-160.
- 5 Bonneau, K.R., Mullens, B.A, MacLachlan, N.J., *Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/NS3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep, cattle, and Culicoides sonorensis* (2001). Journal of Virology 75: 8298-8305.
- 6 Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I.A., MacLachlan, N.J., *Recombinant canarypox virus vaccine coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep* (2007). Vaccine 25: 672-678. 20
- 7 Bourne, N., Stanberry, L.R., Bernstein, D.I. & Lew, D., *DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus infection* (1996). Journal of Infectious Diseases 173,800 -7.
- 8 Bremer, C.W., *A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African horsesickness virus* (1976). Onderstepoort Journal of Veterinary Research 43, 193-199.
- 9 Bremer, C.W., Huismans, H. & Van Dijk, A.A., *Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome* (1990). Journal of General Virology 71, 793-799. 30
- 10 du Plessis, M., Cloete M., Aitchison, H., Van Dijk, A.A., *Protein aggregation complicates the development of baculovirus-expressed African horsesickness virus serotype 5 VP2 subunit vaccines* (1998). Onderstepoort Journal of Veterinary Research 65: 321-329.
- 11 Englehard, V.H., *Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules* (1994). Ann. Rev. Immunol. 12:181.
- 12 Felgner, J.H., Kumar, R. et al., *Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations* (1994). J Biol Chem 269(4): 2550-61. 40
- 13 Fields, J., et al., *Synthetic polyelectrolytes as tumour inhibitors* (June 4, 1960). Nature 186, 778-780.
- 14 Frolov, I., Hoffman, T. A., et al., *Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21), 11371-7.

- 15 Furth, Pa, Shamay A, Wall RJ, Hennighausen L., Gene transfer into somatic tissues by jet injection (1992). Analytical Biochemistry, 205, 365-368.
- 16 Ganne, V. et al., Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants (1994). Vaccine, 12, 1190-1196.
- 17 Graham, F.L., *Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines* (1990). Trends Biotechnol 8(4), 85-7.
- 18 Grubman, M.J. & Lewis, S.A., *Identification and characterization of the structural and nonstructural proteins of African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments* (1992). Virology 186, 444-451. 10
- 19 Hamblin, C., Graham, S.D., Anderson, E.C., Crowther, J.R., *A competitive E LISA for the detection of group-specific antibodies to African horse sickness virus*, (1990). Epidemiology and Infection 104(2), 303-312 and an AHS serotype 4 specific serum-virus neutralization test.
- 20 Howell, PG, *The isolation and identification of further antigenic types of African horsesickness virus*, (1962) Onderstepoort Journal of Veterinary Research 29, 139-149.
- 21 Kuby, Janis (1992). Immunology, p. 81.
- 22 Kuby, Janis, (1992). Immunology, pp. 79-80.
- 23 Ju, Q., Edelstein, D., et al., *Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector* (1998). Diabetologia 41(6): 736-9. 20
- 24 Kendrew, John, (1995). The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd.)
- 25 Kitson, J.D., Burke, K.L., et al., *Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs* (1991). J Virol 65(6), 3068-75.
- 26 Lewis, S.A. and Grubman, M.J., *VP2 is the major exposed protein on orbiviruses* (1991). Archives of Virology 121, 233-236.
- 27 Luke, et al., *An OspA-based DNA vaccine protects mice against infection with Borrelia burgdorferi* (1997). J. Infect. Dis. 175(1):91-97. 30
- 28 Martinez-Torrecedrada, J.L., Iwata, H, Venteo, A., Casal, I., Roy, P., *Expression and characterization of the two outer capsid proteins of African horsesickness virus: The role of VP2 in virus neutralization* (1994). Virology 202: 348-359.
- 29 McClements, W.L., Armstrong, M.E. et al., *Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21), 11414-20.
- 30 Minke, J.M., Siger, L., Karaca, K., Austgen, L., Gordy, P., Bowen, R., Renshaw, R.W., Loosmore, S., Audonnet, J.C., Nordgren, B., *Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge* (2004a). Arch. Virol. Suppl. 22 1-230. 40

- 31 Minke, J.M., Audonnet, J.C., Fischer, L., *Equine viral vaccines: the past, present and future* (2004b). Veterinary Research 35: 425-443.
- 32 Minke, J.M., Toulemonde, C.E., Coupie, H., Guigal, P.M., Dinic, S., Sindle, T., Jessett, D., Black, L., Bublot, M., Pardo, M.C., Audonnet, J.C., *Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge* (2007). American Journal of Veterinary Research 68: 213-219.
- 33 Moss, B., *Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21), 11341-8.
- 34 Norman, JA, Hobart P, Manthorpe M, Felgner P, Wheeler C., Development of Improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications (1997). Vaccine, 15(8):801-803. 10
- 35 Oellermann, R.A., Els, H.J. & Erasmus, B.J., *Characterization of African horse sickness virus* (1970). Archiv für die gesamte Virusforschung 29, 163-174.
- 36 Paoletti, E., *Applications of pox virus vectors to vaccination: an update* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21): 11349-53.
- 37 Pearson, L.D., Roy, P., *Genetically engineered multi-component virus-like particles as veterinary vaccines* (1993). Immunol.Cell Biol. 71 (Pt 5), 381-389.
- 38 Pennock, G.D., Shoemaker, C. et al., *Strong and regulated expression of Escherichia coli beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector* (1984). Mol Cell Biol 4(3): 399-406. 20
- 39 Piccini, A., Perkus, M.E., Paoletti, E., *Vaccinia virus as an expression vector*, (1987) Methods. Enzymol. 153: 545-563.
- 40 Poulet, H., Brunet, S., Boularand, C., Guiot, A.L., Leroy, V., Tartaglia, J., Minke, J., Audonnet, J.C., Desmettre, P., *Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia* (2003). Veterinary Record 153: 141-145.
- 41 Prevec, L., Schneider, M. et al., *Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals* (1989). J Gen Virol 70 (Pt 2), 429-34.
- 42 Quan M, Van Vuuren M, Howell PG, Groenewald D, Guthrie AJ. *Molecular epidemiology of the African horse sickness virus S10 gene* (2008). J Gen Virol May;89(Pt 5):1159-68. 30
- 43 Quan M, Guthrie AJ., *Development and optimisation of a quantitative duplex real-time RT-PCR assay for African horse sickness virus* (2009) J Virol Methods.
- 44 Richardson, C.D., *Methods in Molecular Biology* (1995). Baculovirus Expression Protocols, Humana Press Inc. Vol. 39.
- 45 Robertson, E.S., Ooka, T., et al., *Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21), 11334-40.
- 46 Robinson, H.L. and Torres, C.A., *DNA vaccines* (1997). Semin Immunol 9(5), 271-83.
- 47 Roizman, B., *The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors* (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93(21), 11307-12. 40
- 48 Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982

- 49 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.K. Freshney ed. 1986)
- 50 Scanlen, M., Paweska, J.T., Verschoor, J.A., Van Dijk, A.A., *The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant* (2002). *Vaccine* 20, 1079-1088.
- 51 Siger, L., Bowen, R., Karaca, K., Murray, M., Jagannatha, S., Echols, B., Nordgren, R., Minke, J.M., *Evaluation of the efficacy provided by a Recombinant Canarypox-Vectored Equine West Nile Virus vaccine against an experimental West Nile Virus intrathecal challenge in horses* (2006). *Vet. Ther.* 7, 249-256.
- 52 Smith, G.E., Summers, M.D., et al., *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector* (1983). *Mol Cell Biol* 3(12), 2156-65.
- 53 Tang, D.C., DeVit, M. et al., *Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response* (1992). *Nature* 356(6365), 152-4.
- 54 Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., et al., *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein* (1993). *Science* 259(5102): 1745-9.

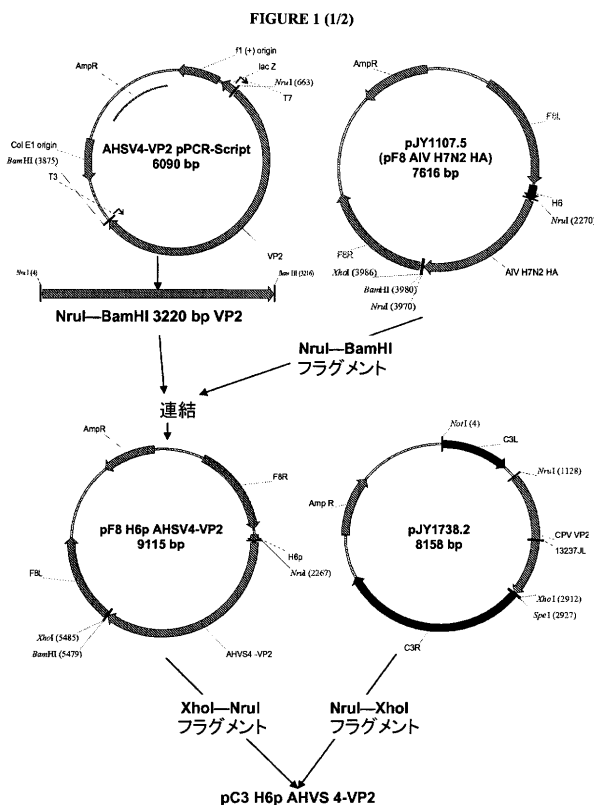
10

20

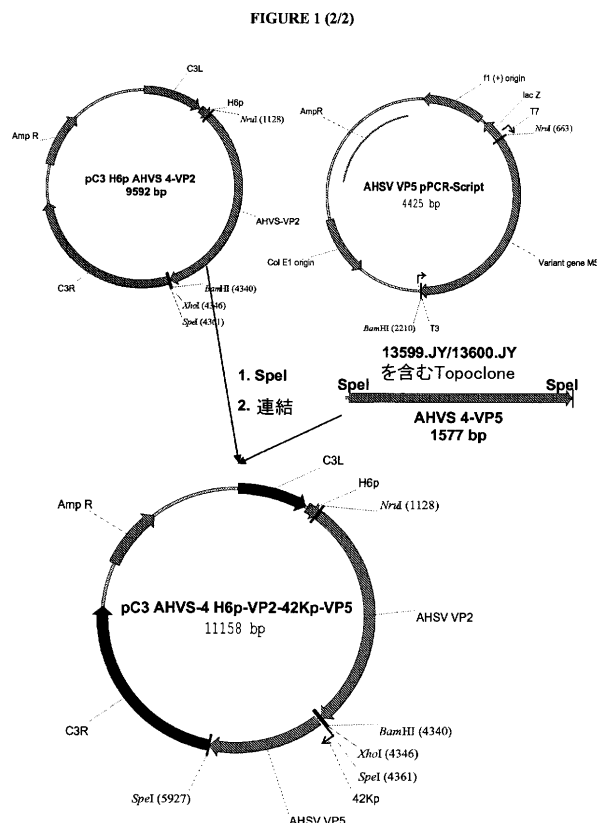
【 0 0 7 6 】

本発明の好ましい実施態様を上記のように詳細に述べてきたが、添付の文書によって規定される本発明は、本発明の真髄または範囲を逸脱することなく多くの明確なそれらの変型が可能であるので、上記の記述に示す具体的な事柄に限定されるべきではないことは理解されよう。

【 図 1 - 1 】

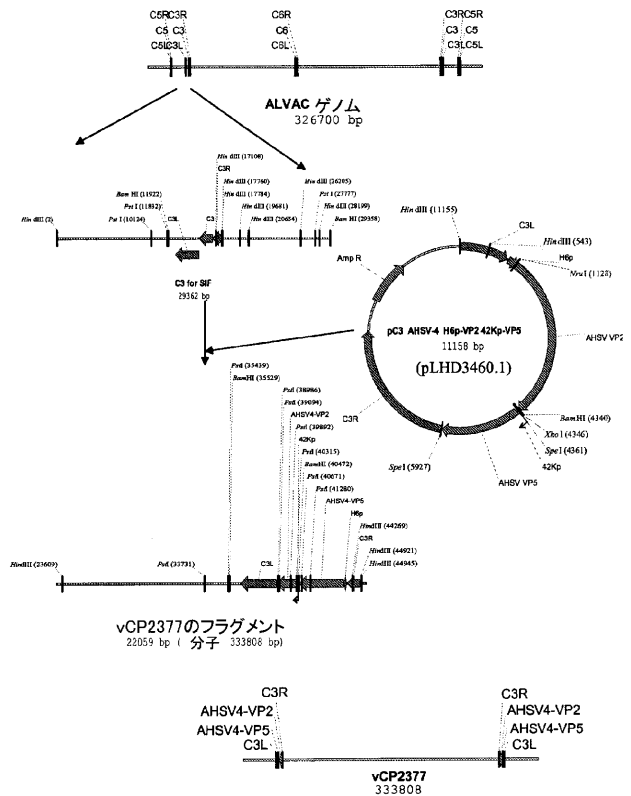


【 図 1 - 2 】



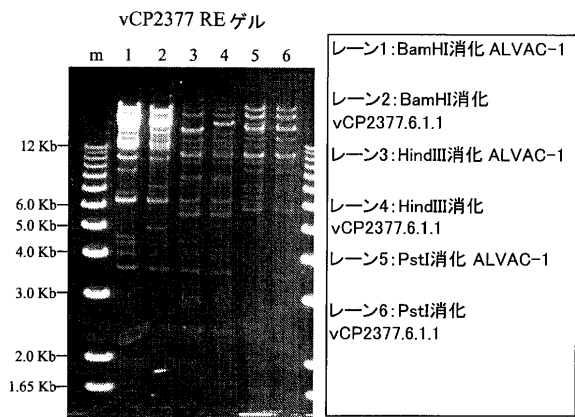
【 図 3 】

FIGURE 3



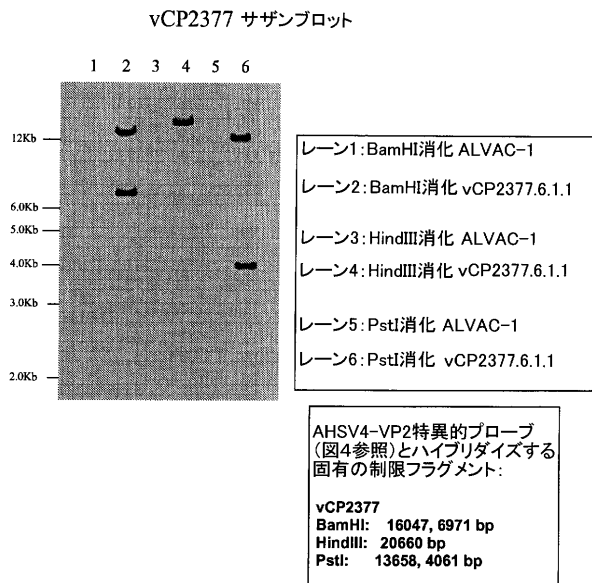
【 図 5 】

FIGURE 5



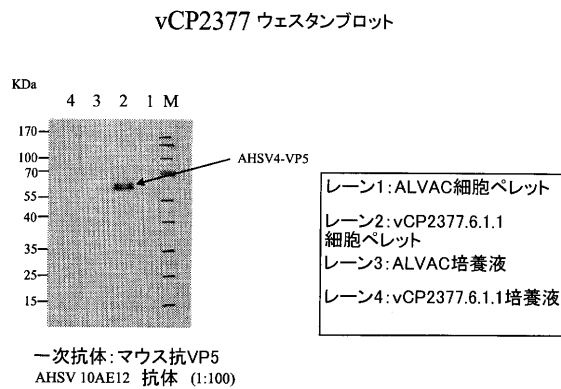
【 図 6 】

FIGURE 6



【 図 7 】

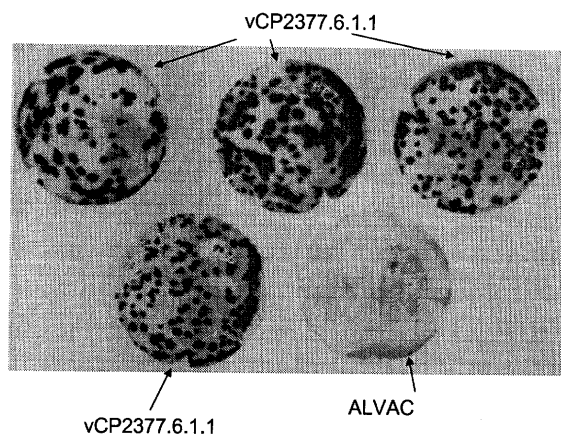
FIGURE 7



【 図 8 】

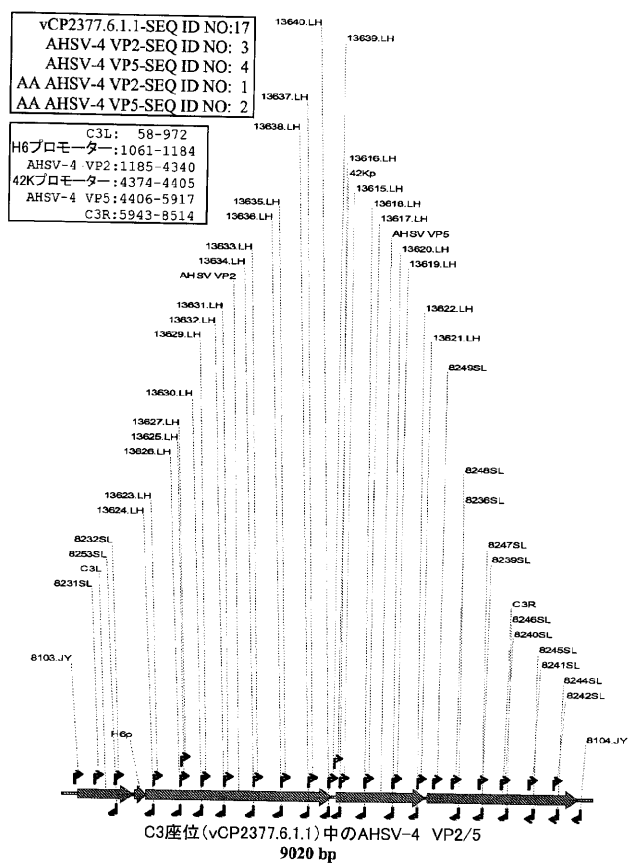
FIGURE 8

抗VP5 SHSV 10AE12継代9抗体(1:100)を
 用いたvCP2377 IP

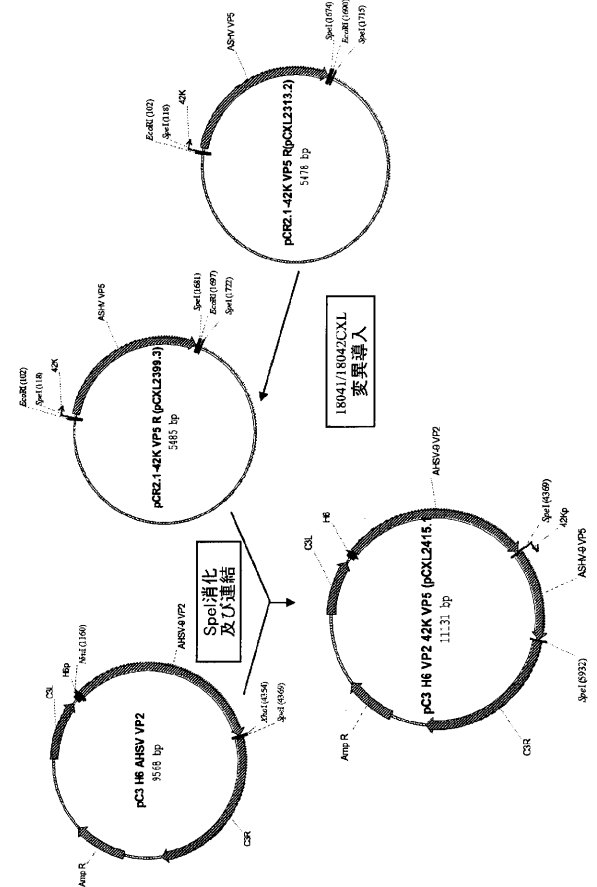


【 図 9 】

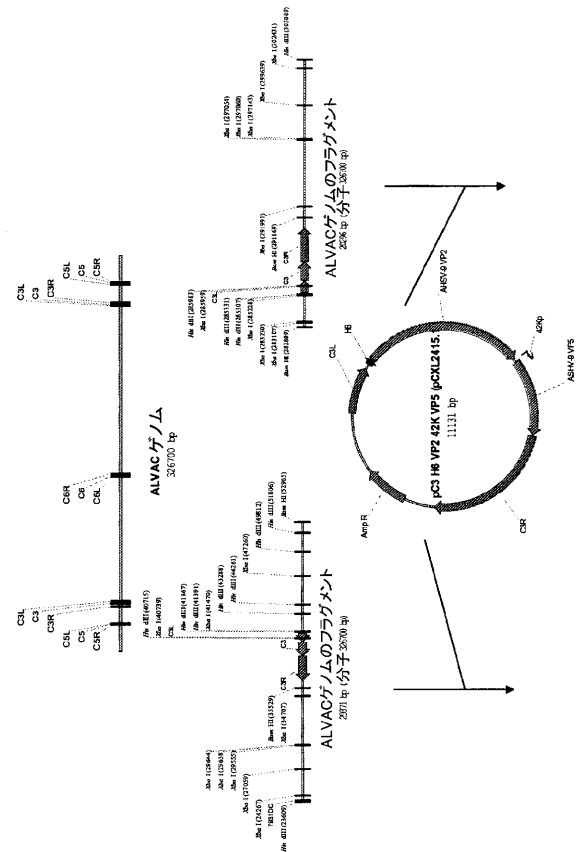
FIGURE 9



【 図 1 0 - 2 】



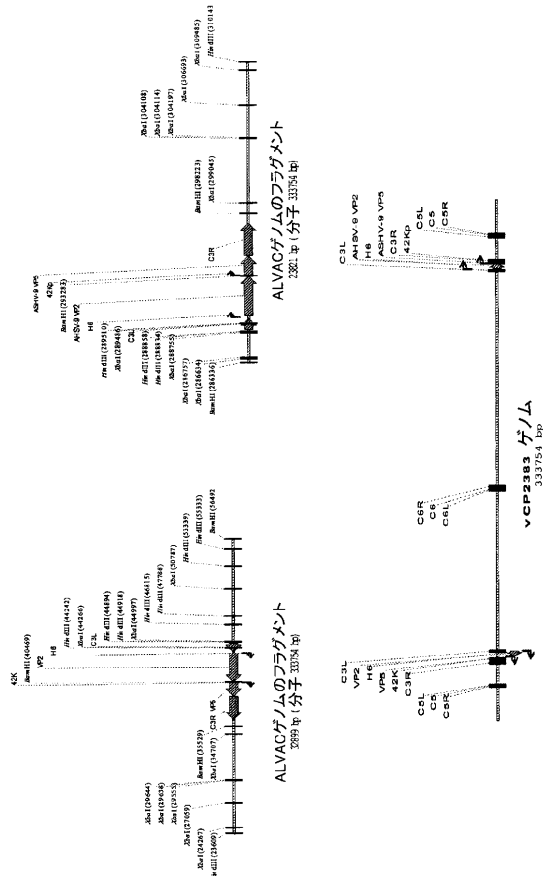
【 図 1 2 - 1 】



pCXL2415.1 中の AHSV-9 VP2 DNA 配列番号:18
pCXL2415.1 中の AHSV-9 VP5 DNA 配列番号:19
pCXL2415.1 中の AHSV-9 VP2 PRT の予想AA配列:配列番号20
pCXL2415.1 中の AHSV-9 VP5 PRT の予想AA配列:配列番号21

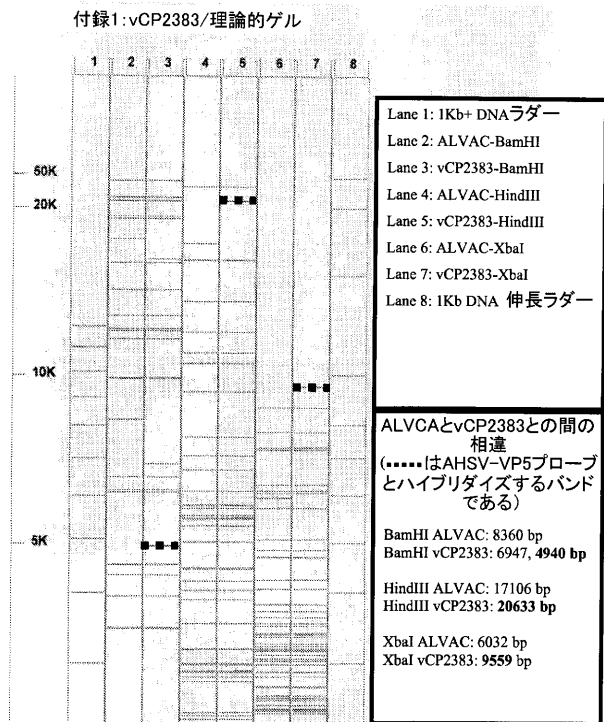
【図 12 - 2】

FIGURE 12 (2/2)



【図 13】

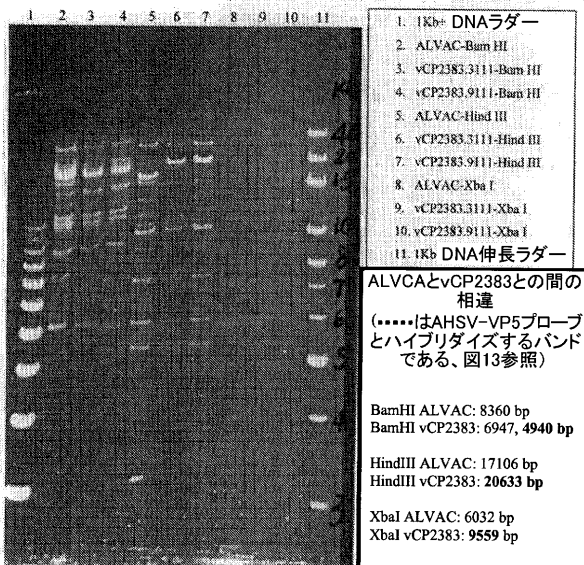
FIGURE 13



【図 14】

FIGURE 14

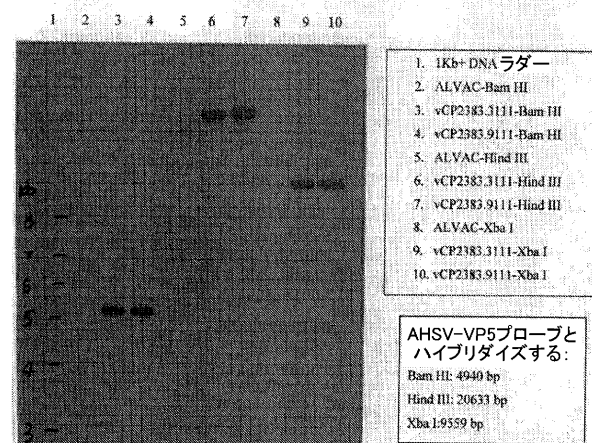
付録Ⅱ: vCP2383制限分析



【図 15】

FIGURE 15

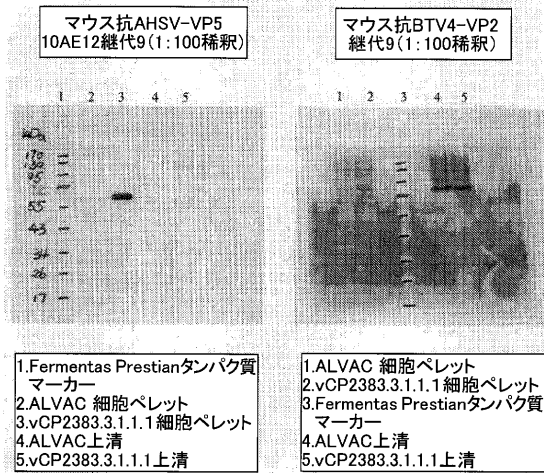
付録Ⅲ: vCP2383サザンプロット分析



【 図 1 6 】

FIGURE 16

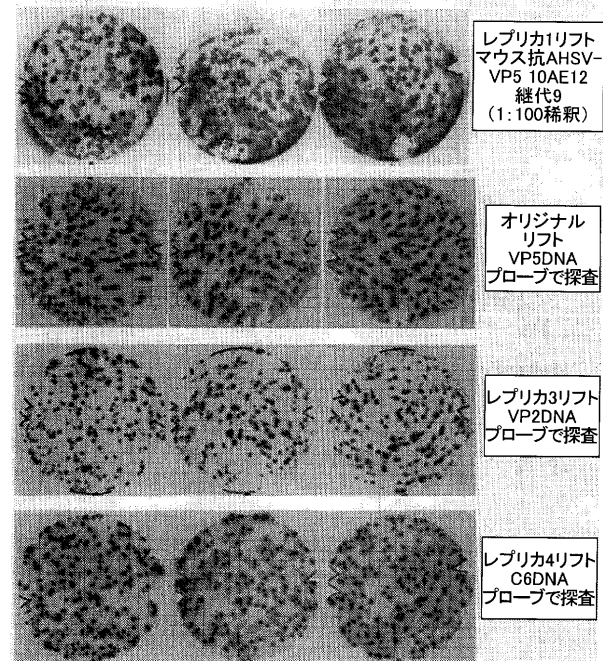
付録Ⅳ: vCP2383 ウェスタンブロット分析



【 図 1 7 】

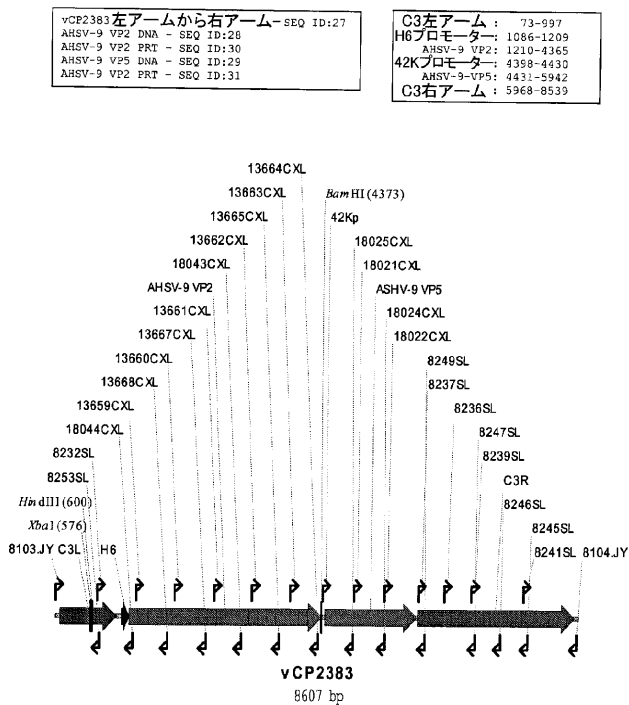
FIGURE 17

付録 V : vCP2383 イムノブランクアッセイ



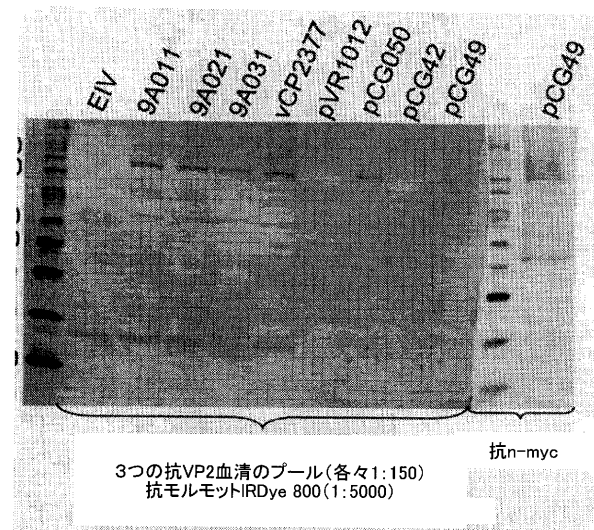
【 図 1 8 】

FIGURE 18



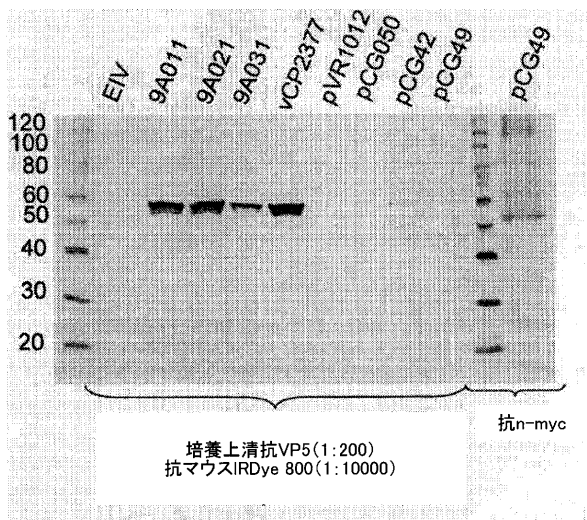
【 図 2 0 A 】

FIGURE 20A (1/2)



【図20B】

FIGURE 20B (2/2)



【図21】

FIGURE 21

AHSV4に対する cpAHSV4 (vCP2377) 中和抗体力価

ウマ	0日目	28日目	42日目	ワクチン	
				バッチ	力価 (Log ₁₀ CCID ₅₀ /ml)
54365	Neg	1:28	1:224	87859A011	7.3
24903	Neg	1:56	1:224		
73420	Neg	1:56	1:224	87859A021	6.96
45671	Neg	Neg	1:160		
54017	Neg	Neg	1:40	87859A031	6.28
53761	Neg	Neg	Neg		

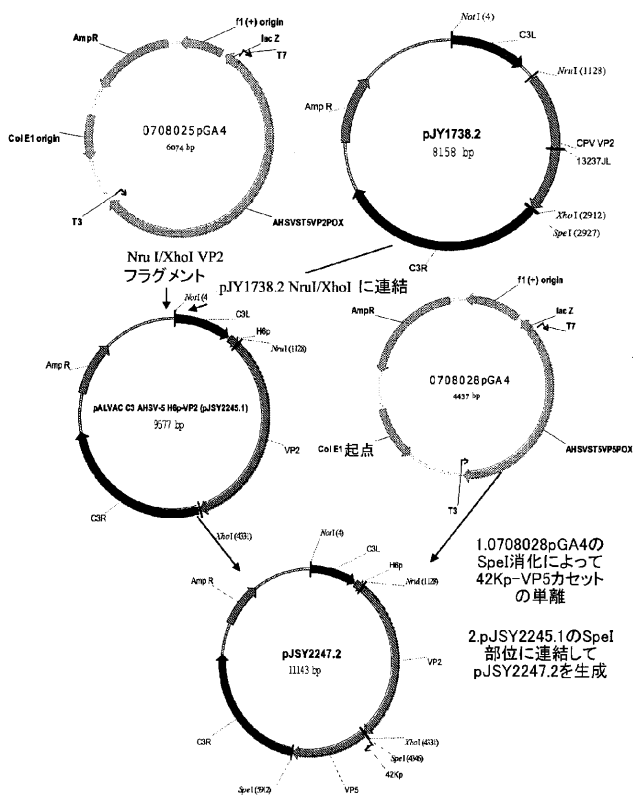
0日目: 3用量のワクチン。頸部の一方の側の筋肉内に2用量、他方の側の筋肉内に1用量を投与

28日目: 1用量のワクチンを頸部の筋肉内に投与

0日目、28日目および42日目に血液サンプル採取

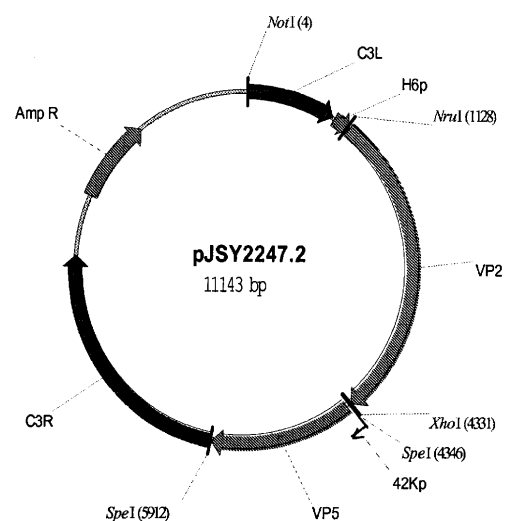
【図22】

FIGURE 22



【図23】

FIGURE 23



pC3 H6p-AHSV 5-VP2/42Kp-VP5 (pJSY2247.2) - SEQ ID NO: 32

CDS (合計3)

VP2 - Start: 1153 End: 4329 - SEQ ID NO: 33

AHSV-5 VP2の予想アミノ酸配列 - SEQ ID NO: 35

VP5 - Start: 4383 End: 5903 - SEQ ID NO: 34

AHSV-5 VP5の予想アミノ酸配列 - SEQ ID NO: 36

Amp R - Start: 9105 End: 9961

その他の特徴(合計2)

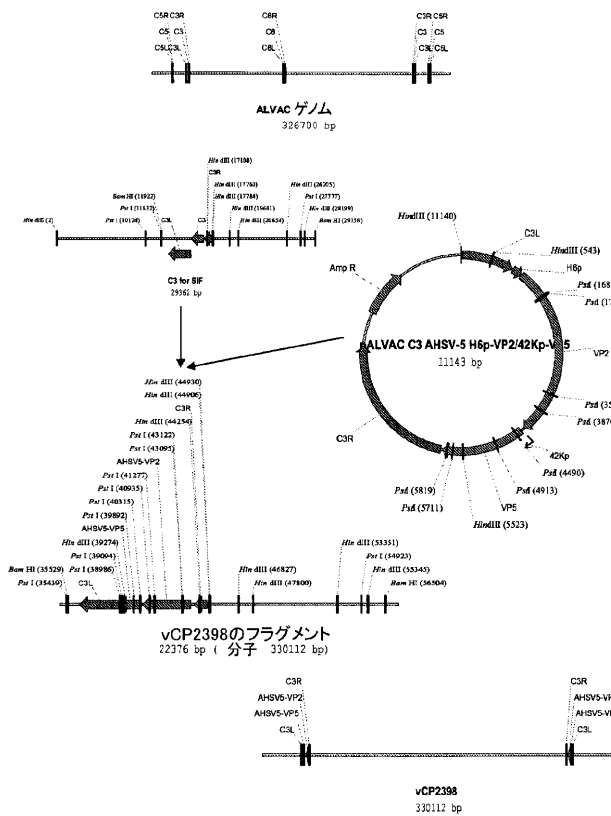
C3L - Start: 3 End: 942; C3R - Start: 5932 End: 8494

真核細胞プロモーター(合計2)

H6p - 開始: 967 終了: 1152; 42Kp - 開始: 4351 終了: 4382

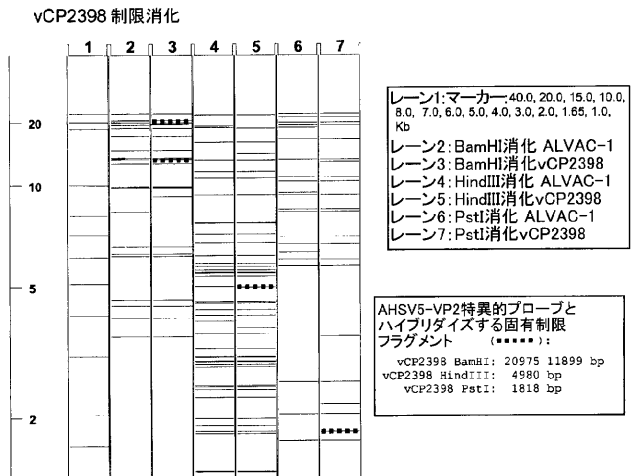
【図 24】

FIGURE 24



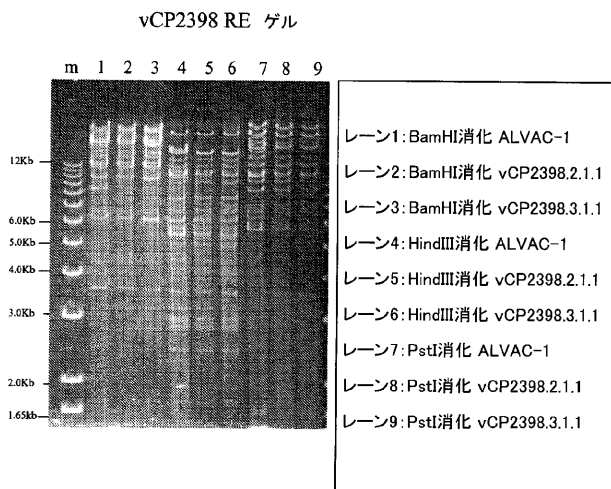
【図 25】

FIGURE 25



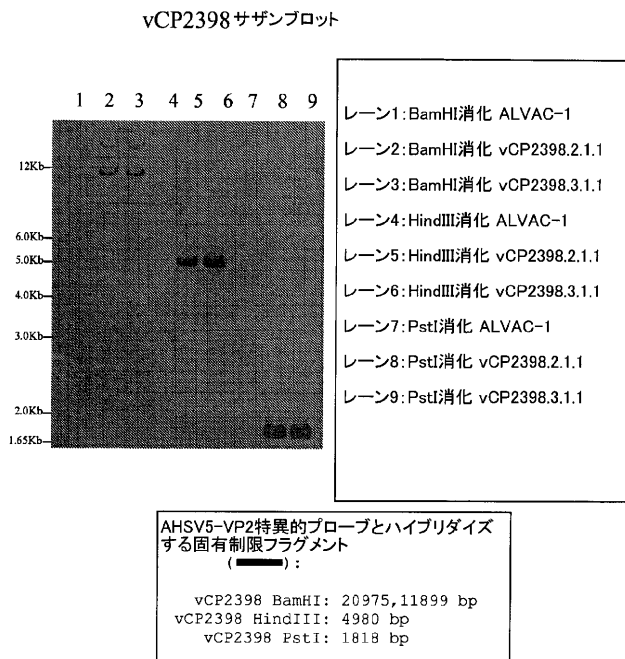
【図 26】

FIGURE 26



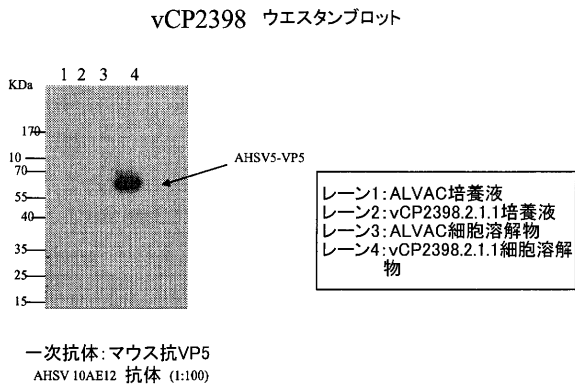
【図 27】

FIGURE 27



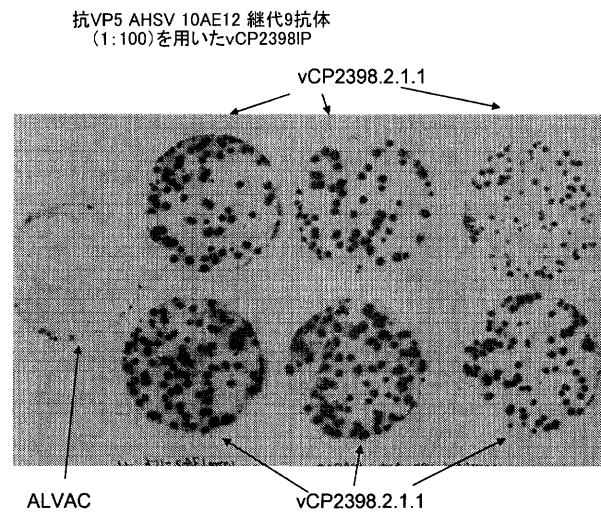
【図 28】

FIGURE 28



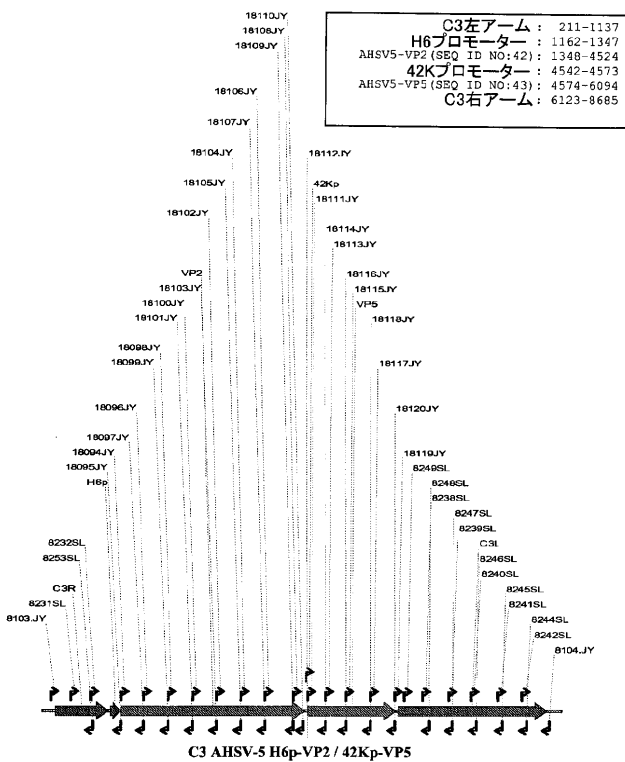
【図 29】

FIGURE 29



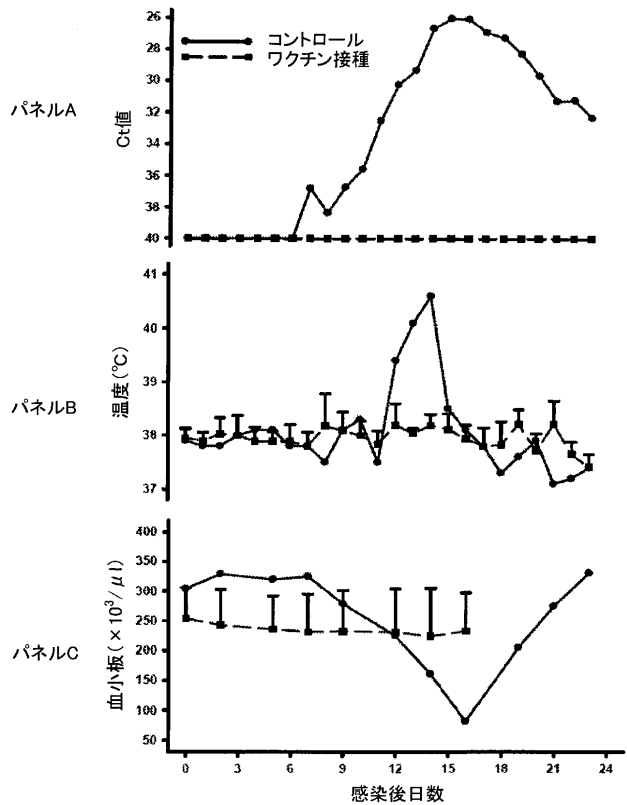
【図 30】

FIGURE 30



【図 31】

FIGURE 31



【図 3 2 - 1】

図 32 配列 番号	タイプ	詳細
1	PRT	pLHD460.4 由来 AHSV-4 VP2
2	PRT	pLHD460.4 由来 AHSV-4 VP5
3	DNA	pLHD460.4 のための左アームから右アームまでのスクレイナ配列
4	DNA	pLHD460.4 中の AHSV-4 VP2 遺伝子
5	DNA	pLHD460.4 中の AHSV-4 VP5 遺伝子
6	DNA	42Kp-AHSV4 VP5 変異バリエーションの増幅のための 13690JY プライマー
7	DNA	42Kp-AHSV4 VP5 変異バリエーションの増幅のための 13690JY プライマー
8	DNA	AHSV4 VP2 プローブを増幅するための 13625LH プライマー
9	DNA	AHSV4 VP2 プローブを増幅するための 13625LH プライマー
10	DNA	AHSV4 VP5 プローブを増幅するための 13615LH プライマー
11	DNA	AHSV4 VP5 プローブを増幅するための 13615LH プライマー
12	DNA	CP2376/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 8103JY プライマー
13	DNA	CP2376/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 8103JY プライマー
14	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
15	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
16	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
17	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
18	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
19	DNA	CP2377/CP2383/CP2388 C3 ターミナル 1 挿入物の PCR 増幅のための 13616LH プライマー
20	PRT	pXJ2415.1 400 の AHSV-9 VP5
21	PRT	pXJ2415.1 400 の VP2 の予備される AHSV-9 VP5 / 配列
22	DNA	完全な VP2 ミニド pXJ2415.1
23	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP5 プローブの増幅のための 18020CXI プライマー
24	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP5 プローブの増幅のための 18020CXI プライマー
25	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP2 プローブの増幅のための 18660CXI プライマー
26	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP2 プローブの増幅のための 18660CXI プライマー
27	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP2 プローブの増幅のための 18660CXI プライマー
28	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP2 プローブの増幅のための 18660CXI プライマー
29	DNA	CP2383.3.1.1.1 ベクターのための AHSV-9 VP2 プローブの増幅のための 18660CXI プライマー
30	PRT	CP2383 の AHSV-9 VP5
31	PRT	CP2383 の AHSV-9 VP2 の予備される AA 配列
32	DNA	pJST2247.2 フラミド
33	DNA	pC3 H6p-AHSV 5-VP2/42Kp-VP5 (pJST2247.2) 中の AHSV-5 VP2
34	DNA	pC3 H6p-AHSV 5-VP2/42Kp-VP5 (pJST2247.2) 中の AHSV-5 VP5
35	PRT	pC3 H6p-AHSV 5-VP2/42Kp-VP5 (pJST2247.2) 中の AHSV-5 VP2 の予備される AA 配列

【図 3 2 - 2】

図 32 配列 番号	タイプ	詳細
36	PRT	pC3 H6p-AHSV 5-VP2/42Kp-VP5 (pJST2247.2) 中の AHSV-5 VP5 の予備される AA 配列
37	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP2 プローブの増幅のための 18098JY プライマー
38	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP2 プローブの増幅のための 18098JY プライマー
39	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP5 プローブの増幅のための 18115JY プライマー
40	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP5 プローブの増幅のための 18115JY プライマー
41	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP5 プローブの増幅のための 18115JY プライマー
42	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP5 プローブの増幅のための 18115JY プライマー
43	DNA	CP2388.2.1.1.1 ウイルスベクターのための AHSV-5 VP5 プローブの増幅のための 18115JY プライマー
44	PRT	CP2388 の AHSV-5 VP2
45	PRT	CP2388 の AHSV-5 VP5 の予備される AA 配列
46	DNA	CP2388 の AHSV-5 VP5 の予備される AA 配列
47	DNA	18042 CXI プライマー
48	DNA	AHSV4-Jane 株 12VP2 遺伝子
49	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP2 の予備される AA 配列
50	DNA	AHSV4-Jane 株 12VP5 遺伝子
51	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
52	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
53	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
54	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
55	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
56	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
57	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
58	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
59	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
60	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
61	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
62	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列
63	PRT	AHSV4-Jane 株 12VP5 の予備される AA 配列

* 配列は、"Variation within the VP2, VP5 and NS3 proteins of five African horse sickness virus field isolates." (DA Ruckwiska et al.) に記載され、EMBL/GenBank/DBP に提出されている (JUL 2006)。

【図 3 3 - 1】

FIGURE 33 (1/2)

配列番号 01	(1)	MASEFGILDMNEKFDPSLEKTIQDVIVKKGKRVKHKVGVGCGYERDEN
配列番号 44	(1)	MASEFGILDMNEKFDPSLEKTIQDVIVKKGKRVKHKVGVGCGYERDEN
配列番号 30	(1)	MASEFGILDMNEKFDPSLEKTIQDVIVKKGKRVKHKVGVGCGYERDEN
配列番号 01	(51)	HRPGLGVEVDHMSISEDMNEIRCEGAYRIFPFIIDTLKYEKFDEN
配列番号 44	(51)	HRPGLGVEVDHMSISEDMNEIRCEGAYRIFPFIIDTLKYEKFDEN
配列番号 30	(51)	HRPGLGVEVDHMSISEDMNEIRCEGAYRIFPFIIDTLKYEKFDEN
配列番号 01	(101)	QIVVRDQDNEMRKLLOFYAGEMTFSEPCPSVFLRREARSQKLDRI
配列番号 44	(101)	QIVVRDQDNEMRKLLOFYAGEMTFSEPCPSVFLRREARSQKLDRI
配列番号 30	(101)	QIVVRDQDNEMRKLLOFYAGEMTFSEPCPSVFLRREARSQKLDRI
配列番号 01	(151)	IGRVEFYFEKSKRKAILEDQKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYD
配列番号 44	(151)	IGRVEFYFEKSKRKAILEDQKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYD
配列番号 30	(151)	IGRVEFYFEKSKRKAILEDQKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYD
配列番号 01	(201)	GTHIYIFPINKLRFQGMYPHYVYVLSYDQICVFNKGGTSGISWHIRKRTG
配列番号 44	(201)	GTHIYIFPINKLRFQGMYPHYVYVLSYDQICVFNKGGTSGISWHIRKRTG
配列番号 30	(201)	GTHIYIFPINKLRFQGMYPHYVYVLSYDQICVFNKGGTSGISWHIRKRTG
配列番号 01	(251)	DAKASAMYSKGPINDLRVKIERDDLSRETIQIIEYKKNSSAGDQK
配列番号 44	(251)	DAKASAMYSKGPINDLRVKIERDDLSRETIQIIEYKKNSSAGDQK
配列番号 30	(251)	DAKASAMYSKGPINDLRVKIERDDLSRETIQIIEYKKNSSAGDQK
配列番号 01	(301)	NISIEKVEYCDPLTFVFAKKKEGEDDTARQEKIRKAVKGMFYDFSK
配列番号 44	(301)	NISIEKVEYCDPLTFVFAKKKEGEDDTARQEKIRKAVKGMFYDFSK
配列番号 30	(301)	NISIEKVEYCDPLTFVFAKKKEGEDDTARQEKIRKAVKGMFYDFSK
配列番号 01	(351)	PKMTIGFNRMLTFAALDSFRKRGVVDVFNKGGKKEHIEVTEKIKKA
配列番号 44	(351)	PKMTIGFNRMLTFAALDSFRKRGVVDVFNKGGKKEHIEVTEKIKKA
配列番号 30	(351)	PKMTIGFNRMLTFAALDSFRKRGVVDVFNKGGKKEHIEVTEKIKKA
配列番号 01	(401)	QTEKGGGQVSDIGVNLVNDVGTGNHIDHVDIIMVQVTRVYV
配列番号 44	(401)	QTEKGGGQVSDIGVNLVNDVGTGNHIDHVDIIMVQVTRVYV
配列番号 30	(401)	QTEKGGGQVSDIGVNLVNDVGTGNHIDHVDIIMVQVTRVYV
配列番号 01	(451)	AKKSKSEMLAGNSIVGVLRCDGCLAIYDFYEGTIDGKKSNAS
配列番号 44	(451)	AKKSKSEMLAGNSIVGVLRCDGCLAIYDFYEGTIDGKKSNAS
配列番号 30	(451)	AKKSKSEMLAGNSIVGVLRCDGCLAIYDFYEGTIDGKKSNAS
配列番号 01	(501)	AKIETVAGVDFRRELVEKFGIDRMKEITRELVYKSKSTKFMEEGY
配列番号 44	(501)	AKIETVAGVDFRRELVEKFGIDRMKEITRELVYKSKSTKFMEEGY
配列番号 30	(501)	AKIETVAGVDFRRELVEKFGIDRMKEITRELVYKSKSTKFMEEGY
配列番号 01	(551)	GKFAKGNRRDGFVAMEDYGEITKERVADLYKGVLLGRKWEDEVDPSY
配列番号 44	(551)	GKFAKGNRRDGFVAMEDYGEITKERVADLYKGVLLGRKWEDEVDPSY
配列番号 30	(551)	GKFAKGNRRDGFVAMEDYGEITKERVADLYKGVLLGRKWEDEVDPSY
配列番号 01	(601)	FYDDLYTNEZHRVFLSAGKDVNDNITLRSISQAETTLISKRFVSYWRIS
配列番号 44	(601)	FYDDLYTNEZHRVFLSAGKDVNDNITLRSISQAETTLISKRFVSYWRIS
配列番号 30	(601)	FYDDLYTNEZHRVFLSAGKDVNDNITLRSISQAETTLISKRFVSYWRIS

【図 3 3 - 2】

FIGURE 33 (2/2)

配列番号 01	(651)	QVEVTKARNEVLDMNEKQKQPFYEFYEDDQKPCSIGELGSHASTYIXONLL
配列番号 44	(651)	QVEVTKARNEVLDMNEKQKQPFYEFYEDDQKPCSIGELGSHASTYIXONLL
配列番号 30	(651)	QVEVTKARNEVLDMNEKQKQPFYEFYEDDQKPCSIGELGSHASTYIXONLL
配列番号 01	(701)	VGRNGEELDSKELVMMMSLINTGAVSHORSHISSVAIEVNLRAL
配列番号 44	(701)	VGRNGEELDSKELVMMMSLINTGAVSHORSHISSVAIEVNLRAL
配列番号 30	(701)	VGRNGEELDSKELVMMMSLINTGAVSHORSHISSVAIEVNLRAL
配列番号 01	(751)	IVRIRSRFDMMSERETFTILEKVMEDVMDLRFPTTIRHYTLETQVFN
配列番号 44	(751)	IVRIRSRFDMMSERETFTILEKVMEDVMDLRFPTTIRHYTLETQVFN
配列番号 30	(751)	IVRIRSRFDMMSERETFTILEKVMEDVMDLRFPTTIRHYTLETQVFN
配列番号 01	(801)	BERRLEVDFYMLYDVQVTEQAINTFTDHRRCVSELLPTIKLNFLLH
配列番号 44	(801)	BERRLEVDFYMLYDVQVTEQAINTFTDHRRCVSELLPTIKLNFLLH
配列番号 30	(801)	BERRLEVDFYMLYDVQVTEQAINTFTDHRRCVSELLPTIKLNFLLH
配列番号 01	(851)	IVFEMENVEVNAAYKHPHLLISARGLAVIGVHIFNSQISISMGMPIYV
配列番号 44	(851)	IVFEMENVEVNAAYKHPHLLISARGLAVIGVHIFNSQISISMGMPIYV
配列番号 30	(851)	IVFEMENVEVNAAYKHPHLLISARGLAVIGVHIFNSQISISMGMPIYV
配列番号 01	(901)	ERMCAESKQVTKLTADLKLKRWFSYITTLKLDORRAEPFMSFPEGLST
配列番号 44	(901)	ERMCAESKQVTKLTADLKLKRWFSYITTLKLDORRAEPFMSFPEGLST
配列番号 30	(901)	ERMCAESKQVTKLTADLKLKRWFSYITTLKLDORRAEPFMSFPEGLST
配列番号 01	(951)	WIGSNCGGVQVYVQMLPRTKPKGALMVVYARDSRIENIEATLSQWLQ
配列番号 44	(951)	WIGSNCGGVQVYVQMLPRTKPKGALMVVYARDSRIENIEATLSQWLQ
配列番号 30	(951)	WIGSNCGGVQVYVQMLPRTKPKGALMVVYARDSRIENIEATLSQWLQ
配列番号 01	(1001)	EGSLGLTLVDSGSIINKSVLRATLKIYNRGSMOTLILISGVTYEGNKF
配列番号 44	(1001)	EGSLGLTLVDSGSIINKSVLRATLKIYNRGSMOTLILISGVTYEGNKF
配列番号 30	(1001)	EGSLGLTLVDSGSIINKSVLRATLKIYNRGSMOTLILISGVTYEGNKF
配列番号 01	(1051)	LLSKLARTK
配列番号 44	(1051)	LLSKLARTK
配列番号 30	(1051)	LLSKLARTK

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性:

	配列番号 1	配列番号 44	配列番号 30
AHSV4 VP2 - SEQ ID NO:1		53	52
AHSV5 VP2 - SEQ ID NO:44			53
AHSV9 VP2 - SEQ ID NO:30			

【図 3 4】

FIGURE 34

配列番号	02	1	50
配列番号	45	(1)	MCKTSTFLKAGNATKRALTSDAKMYKLAGTKLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	31	(1)	MCKTSTFLKAGNATKRALTSDAKMYKLAGTKLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	02	(51)	VMQGAIQSTIQGNNIGDSIKQAVILNVAGTLESAPDPLSPGQLLYNNKVS
配列番号	45	(51)	VMQGAIQSTIQGNNIGDSIKQAVILNVAGTLESAPDPLSPGQLLYNNKVS
配列番号	31	(51)	VMQGAIQSTIQGNNIGDSIKQAVILNVAGTLESAPDPLSPGQLLYNNKVS
配列番号	02	(101)	ETKMKKEDRVIEHNAKIEEFKGLLAIRKIVKGEVDAEKLGNIEIKY
配列番号	45	(101)	ETKMKKEDRVIEHNAKIEEFKGLLAIRKIVKGEVDAEKLGNIEIKY
配列番号	31	(101)	ETKMKKEDRVIEHNAKIEEFKGLLAIRKIVKGEVDAEKLGNIEIKY
配列番号	02	(151)	VEKALSGLLEIGDQSERITKLYALQTEEDLATRDETRMINEYREKFD
配列番号	45	(151)	VEKALSGLLEIGDQSERITKLYALQTEEDLATRDETRMINEYREKFD
配列番号	31	(151)	VEKALSGLLEIGDQSERITKLYALQTEEDLATRDETRMINEYREKFD
配列番号	02	(201)	LKEATIEPQATHEAIEQEMLDLSAEVIEEASVEVPIFGAGANVIATTR
配列番号	45	(201)	LKEATIEPQATHEAIEQEMLDLSAEVIEEASVEVPIFGAGANVIATTR
配列番号	31	(201)	LKEATIEPQATHEAIEQEMLDLSAEVIEEASVEVPIFGAGANVIATTR
配列番号	02	(251)	AIQGGKLEKEIVDKLTGIDLSHLKVADIPHIIEKAMLRDTVIDKDLAMA
配列番号	45	(251)	AIQGGKLEKEIVDKLTGIDLSHLKVADIPHIIEKAMLRDTVIDKDLAMA
配列番号	31	(251)	AIQGGKLEKEIVDKLTGIDLSHLKVADIPHIIEKAMLRDTVIDKDLAMA
配列番号	02	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVQHVDAVLEIPVKQYEREDNKYHVRIPGALKIHSE
配列番号	45	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVQHVDAVLEIPVKQYEREDNKYHVRIPGALKIHSE
配列番号	31	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVQHVDAVLEIPVKQYEREDNKYHVRIPGALKIHSE
配列番号	02	(351)	HTPKIRIYITTFWDSQSVFMCRALAPHQQRSTFIQDLEIYVHEDTSV
配列番号	45	(351)	HTPKIRIYITTFWDSQSVFMCRALAPHQQRSTFIQDLEIYVHEDTSV
配列番号	31	(351)	HTPKIRIYITTFWDSQSVFMCRALAPHQQRSTFIQDLEIYVHEDTSV
配列番号	02	(401)	EGSILHGGAITVEGRCGFRQATPEMAANGMPTTPELKKRLQSRMGTHP
配列番号	45	(401)	EGSILHGGAITVEGRCGFRQATPEMAANGMPTTPELKKRLQSRMGTHP
配列番号	31	(401)	EGSILHGGAITVEGRCGFRQATPEMAANGMPTTPELKKRLQSRMGTHP
配列番号	02	(451)	TYHSSMDYAIISYQLVSNAMRLVYDSELOMECLRGPLKQRTILNALLY
配列番号	45	(451)	TYHSSMDYAIISYQLVSNAMRLVYDSELOMECLRGPLKQRTILNALLY
配列番号	31	(451)	TYHSSMDYAIISYQLVSNAMRLVYDSELOMECLRGPLKQRTILNALLY
配列番号	02	(501)	GVKIA
配列番号	45	(501)	GVKIA
配列番号	31	(501)	GVKIA

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性:

	配列番号 2	配列番号 45	配列番号 31
AHSV4 VP5 - SEQ ID NO:2		84	84
AHSV5 VP5 - SEQ ID NO:45			96
AHSV9 VP5 - SEQ ID NO:31			

【図 3 5 - 2】

FIGURE 35 (2/2)

配列番号	1	681	720
配列番号	49	(681)	PCSIGKIGIHASTYIYQNLIVGRNRGEITLDSKELVWMDM
配列番号	1	(721)	SLLNFGAVSHDRCNISSSVAIEVNLRHAILVRIISRFDM
配列番号	49	(721)	SLLNFGAVSHDRCNISSSVAIEVNLRHAILVRIISRFDM
配列番号	1	(761)	MSERETFTTILEKVMEDVKELRFPPTTYRYHYLETLQRVFM
配列番号	49	(761)	MSERETFTTILEKVMEDVKELRFPPTTYRYHYLETLQRVFM
配列番号	1	(801)	DERRELVDDFYMLRYDVOTREQALNTFTDFHRCVSELLI
配列番号	49	(801)	DERRELVDDFYMLRYDVOTREQALNTFTDFHRCVSELLI
配列番号	1	(841)	PFLKLNKLLMIVTEMENVEVNAAYKRHPILLISTAKGLRVI
配列番号	49	(841)	PFLKLNKLLMIVTEMENVEVNAAYKRHPILLISTAKGLRVI
配列番号	1	(881)	GVDFINSQLSISMSGNIPYVERMCAESKVQTKLTADRLKI
配列番号	49	(881)	GVDFINSQLSISMSGNIPYVERMCAESKVQTKLTADRLKI
配列番号	1	(921)	KRWFIISYITTLKIDRRAPMNSFKFEGLSHWIGSNOCQVR
配列番号	49	(921)	KRWFIISYITTLKIDRRAPMNSFKFEGLSHWIGSNOCQVR
配列番号	1	(961)	DYVIQMLPTRPRKPGALMVVYARDSRIEWIILAEISQWLQ
配列番号	49	(961)	DYVIQMLPTRPRKPGALMVVYARDSRIEWIILAEISQWLQ
配列番号	1	(1001)	EGSILGLLVHDSGIINKSVLRARTLKIYNRGSMOTLILIS
配列番号	49	(1001)	EGSILGLLVHDSGIINKSVLRARTLKIYNRGSMOTLILIS
配列番号	1	(1041)	SGVYTFGNKFLSKLLAKTE
配列番号	49	(1041)	SGVYTFGNKFLSKLLAKTE

パーセント同一性=99.8%

【図 3 5 - 1】

FIGURE 35 (1/2)

合成AHSV4-VP2対野外単離株 (Jane株) のAHSV4-VP2

配列番号	1	1	40
配列番号	49	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVIVTKGRVKKHKEVDG
配列番号	1	(41)	VCGYKWDETHHFGICVEVHDMSTSEPMYNEIRCEGAYPI
配列番号	49	(41)	VCGYKWDETHHFGICVEVHDMSTSEPMYNEIRCEGAYPI
配列番号	1	(81)	FFRYEIDTLKYEKIDRNDHQIRVDRDDNEMKRIITQPYA
配列番号	49	(81)	FFRYEIDTLKYEKIDRNDHQIRVDRDDNEMKRIITQPYA
配列番号	1	(121)	GEMYSPCEYPSVFLAREARSQGLDRIRNYIGKRVETFEZ
配列番号	49	(121)	GEMYSPCEYPSVFLAREARSQGLDRIRNYIGKRVETFEZ
配列番号	1	(161)	ESKRAKILDQNMKSKVEQWDAVNERIVSIRPKRGCEYDH
配列番号	49	(161)	ESKRAKILDQNMKSKVEQWDAVNERIVSIRPKRGCEYDH
配列番号	1	(201)	GTDIIYQFIKKLAFGMNTHYIYVLESYDCLVFNKGGTISG
配列番号	49	(201)	GTDIIYQFIKKLAFGMNTHYIYVLESYDCLVFNKGGTISG
配列番号	1	(241)	BWHIRKRTGDAKASAMYSCKGQPLNDLVKIERDLSRET
配列番号	49	(241)	BWHIRKRTGDAKASAMYSCKGQPLNDLVKIERDLSRET
配列番号	1	(281)	TIQTIKYEKKFNSGAGQKQGISIEKLVYECDFITTFVHA
配列番号	49	(281)	TIQTIKYEKKFNSGAGQKQGISIEKLVYECDFITTFVHA
配列番号	1	(321)	KKEZEGDDTARQIRKAWVKGPMHOFKPKMTIRGPNR
配列番号	49	(321)	KKEZEGDDTARQIRKAWVKGPMHOFKPKMTIRGPNR
配列番号	1	(361)	NMLFPAALDSFNKRGVDVDFNKGKKEHLEKVEKLAKA
配列番号	49	(361)	NMLFPAALDSFNKRGVDVDFNKGKKEHLEKVEKLAKA
配列番号	1	(401)	GTNGGGQPCQVSDIGVNLTVVDYGVVNHMIDWVDLIMV
配列番号	49	(401)	GTNGGGQPCQVSDIGVNLTVVDYGVVNHMIDWVDLIMV
配列番号	1	(441)	VQTRLVKEVAFKGLKSENLAGNSLVGLVACTMYCLAL
配列番号	49	(441)	VQTRLVKEVAFKGLKSENLAGNSLVGLVACTMYCLAL
配列番号	1	(481)	AIYDFTYEGTIDGFKGGSNASHATIEVQAQMPDFRRLVEK
配列番号	49	(481)	AIYDFTYEGTIDGFKGGSNASHATIEVQAQMPDFRRLVEK
配列番号	1	(521)	FGIDLRMKEITRELIVGKSNSTSFMEKEGYGYKFAVGNR
配列番号	49	(521)	FGIDLRMKEITRELIVGKSNSTSFMEKEGYGYKFAVGNR
配列番号	1	(561)	DGFVMDYCELLTEKVEDLYGVILGRKWEDEVDPDSY
配列番号	49	(561)	DGFVMDYCELLTEKVEDLYGVILGRKWEDEVDPDSY
配列番号	1	(601)	FYDDLYTNRPHRVFLSAGKVDNNITLRISQAEITYLSK
配列番号	49	(601)	FYDDLYTNRPHRVFLSAGKVDNNITLRISQAEITYLSK
配列番号	1	(641)	RIYSYVYRISQVETIKARNEVLDMEKQKPYFTEYDDFF
配列番号	49	(641)	RIYSYVYRISQVETIKARNEVLDMEKQKPYFTEYDDFF

【図 3 6】

FIGURE 36

合成AHSV4-VP5対野外単離株のAHSV4-VP5

配列番号	02	(1)	MCKTSTFLKAGNATKRALTSDAKMYKLAGTKLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	51	(1)	MCKTSTFLKAGNATKRALTSDAKMYKLAGTKLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	02	(51)	VMQGAIQSTIQGNNIGDSIKQAVILNVAGTLESAPDPLSPGQLLYNNKVS
配列番号	51	(51)	VMQGAIQSTIQGNNIGDSIKQAVILNVAGTLESAPDPLSPGQLLYNNKVS
配列番号	02	(101)	ETKMKKEDRVIEHNAKIEEFKGLLAIRKIVKGEVDAEKLGNIEIKY
配列番号	51	(101)	ETKMKKEDRVIEHNAKIEEFKGLLAIRKIVKGEVDAEKLGNIEIKY
配列番号	02	(151)	VEKALSGLLEIGDQSERITKLYALQTEEDLATRDETRMINEYREKFD
配列番号	51	(151)	VEKALSGLLEIGDQSERITKLYALQTEEDLATRDETRMINEYREKFD
配列番号	02	(201)	LKEATIEPQATHEAIEQEMLDLSAEVIEEASVEVPIFGAGANVIATTR
配列番号	51	(201)	LKEATIEPQATHEAIEQEMLDLSAEVIEEASVEVPIFGAGANVIATTR
配列番号	02	(251)	AIQGGKLEKEIVDKLTGIDLSHLKVADIPHIIEKAMLRDTVIDKDLAMA
配列番号	51	(251)	AIQGGKLEKEIVDKLTGIDLSHLKVADIPHIIEKAMLRDTVIDKDLAMA
配列番号	02	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVQHVDAVLEIPVKQYEREDNKYHVRIPGALKIHSE
配列番号	51	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVQHVDAVLEIPVKQYEREDNKYHVRIPGALKIHSE
配列番号	02	(351)	HTPKIRIYITTFWDSQSVFMCRALAPHQQRSTFIQDLEIYVHEDTSV
配列番号	51	(351)	HTPKIRIYITTFWDSQSVFMCRALAPHQQRSTFIQDLEIYVHEDTSV
配列番号	02	(401)	EGSILHGGAITVEGRCGFRQATPEMAANGMPTTPELKKRLQSRMGTHP
配列番号	51	(401)	EGSILHGGAITVEGRCGFRQATPEMAANGMPTTPELKKRLQSRMGTHP
配列番号	02	(451)	TYHSSMDYAIISYQLVSNAMRLVYDSELOMECLRGPLKQRTILNALLY
配列番号	51	(451)	TYHSSMDYAIISYQLVSNAMRLVYDSELOMECLRGPLKQRTILNALLY
配列番号	02	(501)	GVKIA
配列番号	51	(501)	GVKIA

パーセント同一性=100%

【図 37 - 1】

FIGURE 37 (1/4)

合成AHSV4-VP2対他の寄託AHSV4-VP2タンパク質

配列番号	01	1	50
配列番号	61	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVITVKGRVVKHVEVDCVCGEWDEN
配列番号	59	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVITVKGRVVKHVEVDCVCGEWDEN
配列番号	60	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVITVKGRVVKHVEVDCVCGEWDEN
配列番号	63	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVITVKGRVVKHVEVDCVCGEWDEN
配列番号	62	(1)	MASEFGILMTNEKFDPSLEKTIQDVITVKGRVVKHVEVDCVCGEWDEN
配列番号	01	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	61	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	59	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	60	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	63	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	62	(51)	HRPGLCEVHEHMSISEPMNEIRCEGAYPIFFRYIIDTLKYEKFIIDNRH
配列番号	01	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	61	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	59	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	60	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	63	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	62	(101)	QIRVDRDNEMRKELIQPIYAGEMYSPCEYSPVSLRREARSQKLDRIENY
配列番号	01	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	61	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	59	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	60	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	63	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	62	(151)	IGKRVETVYEESSKRAKILDNKMSKVEQNRDAVNERIVSIEPKRGEYDH
配列番号	01	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	61	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	59	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	60	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	63	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	62	(201)	GTHIYQFIKALRAGGMYPHYVYPSDYCIIVNKGGTSGSWHRRRTRE
配列番号	01	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	61	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	59	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	60	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	63	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	62	(251)	DAKASAMYSKGGPNDLVRKIERDDLSRETIQIIEYKGFNSAGDRQG
配列番号	01	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK
配列番号	61	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK
配列番号	59	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK
配列番号	60	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK
配列番号	63	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK
配列番号	62	(301)	NISIEKVEYFCDFITTFVHAKKKEGDDTARQIRKAVNKGMYHDFSK

【図 37 - 3】

FIGURE 37 (3/4)

合成AHSV4-VP2対他の寄託AHSV4-VP2タンパク質

配列番号	01	701	750
配列番号	61	(699)	ELVGRNGEELISKELVWDMSLNFGAVRSHDRWISSVAIEVNLKH
配列番号	59	(699)	ELVGRNGEELISKELVWDMSLNFGAVRSHDRWISSVAIEVNLKH
配列番号	60	(699)	ELVGRNGEELISKELVWDMSLNFGAVRSHDRWISSVAIEVNLKH
配列番号	63	(699)	ELVGRNGEELISKELVWDMSLNFGAVRSHDRWISSVAIEVNLKH
配列番号	62	(699)	ELVGRNGEELISKELVWDMSLNFGAVRSHDRWISSVAIEVNLKH
配列番号	01	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	61	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	59	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	60	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	63	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	62	(749)	ALIVRIISFDMMSERETFTSTLEKVMEDVKELRFTPTVHAYILETLQV
配列番号	01	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	61	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	59	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	60	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	63	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	62	(799)	FNDERRLEVDFFYMLRYDVQREQAINTFTDFHRCVSELLIPTLKLNF
配列番号	01	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	61	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	59	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	60	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	63	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	62	(849)	LIVFEMENVEVNAAYKRHPLISTAKGLRVIGVDFNSQLSIEMSGWIP
配列番号	01	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	61	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	59	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	60	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	63	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	62	(899)	FVERMCAESKVQTKTADLKLKRWETSYTTLLKDRRAEPMSFKFEG
配列番号	01	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	61	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	59	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	60	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	63	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	62	(949)	STNIGSNCGGVREYVQMLPTRKKPKGALMVVYARDRIENIAELSQWL
配列番号	01	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN
配列番号	61	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN
配列番号	59	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN
配列番号	60	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN
配列番号	63	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN
配列番号	62	(999)	QMESSIGLILVHDSGIINKSVLRARTLKIYNGSMOTLILISSGVYTFGN

【図 37 - 2】

FIGURE 37 (2/4)

合成AHSV4-VP2対他の寄託AHSV4-VP2タンパク質

配列番号	01	351	400
配列番号	61	(351)	PKKITRGFNRLMLEAALDSFRKRNQVDVDFNKGKWEHKEHVKTEKLKA
配列番号	59	(351)	PKKITRGFNRLMLEAALDSFRKRNQVDVDFNKGKWEHKEHVKTEKLKA
配列番号	60	(351)	PKKITRGFNRLMLEAALDSFRKRNQVDVDFNKGKWEHKEHVKTEKLKA
配列番号	63	(351)	PKKITRGFNRLMLEAALDSFRKRNQVDVDFNKGKWEHKEHVKTEKLKA
配列番号	62	(351)	PKKITRGFNRLMLEAALDSFRKRNQVDVDFNKGKWEHKEHVKTEKLKA
配列番号	01	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	61	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	59	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	60	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	63	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	62	(401)	QTEGGGQCVQSIDGVNVLINVDYGTNENHIDWTDIIMVQTKRLVREY
配列番号	01	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	61	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	59	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	60	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	63	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	62	(451)	AFKKKXENILAGNSLVGLRCDYCLALAYDYFEGTIDGFKKSNAS
配列番号	01	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	61	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	59	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	60	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	63	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	62	(501)	AIETVACMFDPFRRRLVKEKIDRMRKETRELIVCKSTSKFMEEGEY
配列番号	01	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	61	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	59	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	60	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	63	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	62	(551)	GKXAYGWRDGFVAMEDYGEITLTKVEDLYKGVLLGRKWEDEVDDPESY
配列番号	01	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	61	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	59	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	60	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	63	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	62	(601)	FYBDEYTNEDHVRVLSAGVVDNNITLRS--ISQAETTYLSKRFVSYMYR
配列番号	01	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN
配列番号	61	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN
配列番号	59	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN
配列番号	60	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN
配列番号	63	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN
配列番号	62	(649)	ISQVEVTKARNEVLDMNEKQKPYFEFEYDDFKPCSCIGLHASTYTIQN

【図 37 - 4】

FIGURE 37 (4/4)

合成AHSV4-VP2対他の寄託AHSV4-VP2タンパク質

配列番号	01	1051	1063
配列番号	61	(1049)	KFLSKLAKTE
配列番号	59	(1049)	KFLSKLAKTE
配列番号	60	(1049)	KFLSKLAKTE
配列番号	63	(1049)	KFLSKLAKTE
配列番号	62	(1049)	KFLSKLAKTE

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性:

	配列番号1	配列番号61	配列番号59	配列番号60	配列番号63	配列番号62
SEQ ID NO:01	100	100	52	51	52	52
SEQ ID NO:61		100	51	51	52	51
SEQ ID NO:59			100	51	51	51
SEQ ID NO:60				100	62	52
SEQ ID NO:63					100	53
SEQ ID NO:62						100

【図 38 - 1】

FIGURE 38 (1/3)

合成AHSV4-VP5対他の寄託AHSV4-VP5タンパク質

50

配列番号	02	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	52	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	58	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	54	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	56	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	53	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	55	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	57	(1)	MGKTSFLKRAAGATKRALTSDSAKMYKLAKGTLQVVESEVGSAAIDG
配列番号	02	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	52	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	58	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	54	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	56	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	53	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	55	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	57	(51)	VMQATQSIHQENLGDSIKQAVILNVAGTLESADPLSPGCEQLLYNKVS
配列番号	02	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	52	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	58	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	54	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	56	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	53	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	55	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	57	(101)	EIEKMEKEDRVITENAKTEKPKDILLAIRKIVKGVDAKLEGNRIKY
配列番号	02	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	52	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	58	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	54	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	56	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	53	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	55	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	57	(151)	VEKALSGLEIPIGQDSERITKLRYALQTEEDLATRDETMINERYEKFDA
配列番号	02	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	52	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	58	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	54	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	56	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	53	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	55	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	57	(201)	LEKALSLGQATHEKAVGMDLSAEVITAAAEVRIFGAANVATATR
配列番号	02	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	52	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	58	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	54	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	56	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	53	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	55	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA
配列番号	57	(251)	ALGGKLMKIIIDKLTGIDLSHLKVADIRPHIEKAMKDKIPDELAMA

【図 38 - 3】

FIGURE 38 (3/3)

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性:

	配列番号 2	配列番号 52	配列番号 58	配列番号 54	配列番号 56	配列番号 53	配列番号 55	配列番号 57
配列番号2	100							
配列番号52		100						
配列番号58			100					
配列番号54				100				
配列番号56					100			
配列番号53						100		
配列番号55							100	
配列番号57								100

【図 38 - 2】

FIGURE 38 (2/3)

配列番号	02	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	52	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	58	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	54	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	56	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	53	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	55	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	57	(301)	IKSKVDVIDEMNVEVETQHVDAVLRIKQIEYERHDKNYEVRIGALKIHSE
配列番号	02	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	52	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	58	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	54	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	56	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	53	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	55	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	57	(351)	HFPKIHIIYITPNDSDSVIMCRATAPHHQQRSTFIQFDLEIEYVHFEDTSV
配列番号	02	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	52	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	58	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	54	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	56	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	53	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	55	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	57	(401)	EGHIMHGGAVSIEGRGFRQAYSEFMNAANSMPSTPELHKRLQRLSGSHF
配列番号	02	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	52	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	58	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	54	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	56	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	53	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	55	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	57	(451)	IYMGSMYIAISYDQLVSNAMRLVYDSEIQMCHLGRFLPQRTTLMNALLF
配列番号	02	(501)	GVKIA
配列番号	52	(501)	GVKIA
配列番号	58	(501)	GVKIA
配列番号	54	(501)	GVKIA
配列番号	56	(501)	GVKIA
配列番号	53	(501)	GVKIA
配列番号	55	(501)	GVKIA
配列番号	57	(501)	GVKIA

【図 39 - 1】

FIGURE 39 (1/4)

コドン最適化AHSV4-VP2(配列番号:04)対野外単離株AHSV4-VP2(配列番号:48)

配列番号	04	(1)	ATGGCCACGAGTTCGGCATCTCGATGACACACAGAGATTCGACCCAG
配列番号	48	(1)	ATGGCCCTCGAGTTTGGATATAGATGACAAATGAAATTTGACCCAG
配列番号	04	(51)	CTCGAAGAGACCATTCGGACCTGATCGGACACAGAGAGGCCGTC
配列番号	48	(51)	CTTAGAGAAACCATTTGGCATGTATATAGTACAGAGAGAGGAGAGTGA
配列番号	04	(101)	AGCACAGGAGTGGACGGGTGCGCGCTAGAGTGGGACGAGACACAC
配列番号	48	(101)	AGCATAAAGGTTGGATGCGCATGTATGATAGATGAGTGGGATGAACGAT
配列番号	04	(151)	CACCGCTCGGCTCTGCGAGGTGGAGCAGCATGAGCATCAGCGAT
配列番号	48	(151)	CACCGATCGGATTTGTATAGGTGGAGCAGCATGCTTATATCGGAT
配列番号	04	(201)	CATGTACACGAGATCAGATGCGAGGCGCTTACCCCTCTTCCCGGT
配列番号	48	(201)	TATGTACATGAGATCAGATGCGAGGCGCTTATCCATTTTCGCGGT
配列番号	04	(251)	ACATCATCGACCCCTCAAGTATGAGAGTTTATCGACCGGAAAGGAC
配列番号	48	(251)	ATATAATGATACGTATATATACGACAAATTTATGATAGGATGACAT
配列番号	04	(301)	CAGATCGGGTGGACCGGACGACAGGATCGGAGATTCCTGATCCA
配列番号	48	(301)	CAAAATAGAGTGGATGACATGATAGAGAAAGAGGAGAAATTTGATACA
配列番号	04	(351)	GCCTACCGCGCGGAGATGACGTCAGCGCGGATGCTTACCGAGCGT
配列番号	48	(351)	GCCTATCGAGGTGAGATGACGTTTCGCGGGAATGTTATCGAGCGT
配列番号	04	(401)	TCCTCGCGCGGAGCGCGGAGGACGAGGATCGACCGGATCAGGACAC
配列番号	48	(401)	TCCTCGGAGGAGCGCGGAGGACGAGGATCGATCGGATTCGGAATAT
配列番号	04	(451)	ATCGCGAGCGGTTGGATGCTACGCGAGAGAGAGAGCGGAGGCGAT
配列番号	48	(451)	ATTGGAGAGAGATCGAATTTATGAGAGGAGAGTATAGAGAAACAT
配列番号	04	(501)	CTCGGACGAGAGAGATGAGAGGATGAGAGGAGGCGGAGCGCGTGA
配列番号	48	(501)	CTTGATCAGAAATAGATGCTTATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(551)	ACGACCGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(551)	ATGAAAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(601)	GGACCGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(601)	GGACCGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(651)	GTACCGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(651)	GTACCGGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(701)	AGGCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(701)	AGGCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(751)	GACCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(751)	GACCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	04	(801)	CGGCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
配列番号	48	(801)	CGGCGGAGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT

【図 39 - 2】

FIGURE 39 (2/4)

配列番号	04	(851)	851	900
配列番号	48	(851)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(901)	901	950
配列番号	48	(901)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(951)	951	1000
配列番号	48	(951)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1001)	1001	1050
配列番号	48	(1001)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1051)	1051	1100
配列番号	48	(1051)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1101)	1101	1150
配列番号	48	(1101)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1151)	1151	1200
配列番号	48	(1151)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1201)	1201	1250
配列番号	48	(1201)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1251)	1251	1300
配列番号	48	(1251)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1301)	1301	1350
配列番号	48	(1301)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1351)	1351	1400
配列番号	48	(1351)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1401)	1401	1450
配列番号	48	(1401)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1451)	1451	1500
配列番号	48	(1451)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1501)	1501	1550
配列番号	48	(1501)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1551)	1551	1600
配列番号	48	(1551)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1601)	1601	1650
配列番号	48	(1601)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1651)	1651	1700
配列番号	48	(1651)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1701)	1701	1750
配列番号	48	(1701)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	

【図 39 - 4】

FIGURE 39 (4/4)

配列番号	04	(2651)	2651	2700
配列番号	48	(2651)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2701)	2701	2750
配列番号	48	(2701)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2751)	2751	2800
配列番号	48	(2751)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2801)	2801	2850
配列番号	48	(2801)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2851)	2851	2900
配列番号	48	(2851)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2901)	2901	2950
配列番号	48	(2901)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2951)	2951	3000
配列番号	48	(2951)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(3001)	3001	3050
配列番号	48	(3001)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(3051)	3051	3100
配列番号	48	(3051)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(3101)	3101	3150
配列番号	48	(3101)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(3151)	3151	3200
配列番号	48	(3151)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性は73%

【図 39 - 3】

FIGURE 39 (3/4)

配列番号	04	(1751)	1751	1800
配列番号	48	(1751)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1801)	1801	1850
配列番号	48	(1801)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1851)	1851	1900
配列番号	48	(1851)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1901)	1901	1950
配列番号	48	(1901)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(1951)	1951	2000
配列番号	48	(1951)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2001)	2001	2050
配列番号	48	(2001)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2051)	2051	2100
配列番号	48	(2051)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2101)	2101	2150
配列番号	48	(2101)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2151)	2151	2200
配列番号	48	(2151)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2201)	2201	2250
配列番号	48	(2201)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2251)	2251	2300
配列番号	48	(2251)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2301)	2301	2350
配列番号	48	(2301)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2351)	2351	2400
配列番号	48	(2351)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2401)	2401	2450
配列番号	48	(2401)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2451)	2451	2500
配列番号	48	(2451)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2501)	2501	2550
配列番号	48	(2501)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2551)	2551	2600
配列番号	48	(2551)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	
配列番号	04	(2601)	2601	2650
配列番号	48	(2601)	TCATCGAGTACGGCAAGTTCACAGCTCTGCCGCGCAACAGCAGGGC	

【図 40 - 1】

FIGURE 40 (1/2)

コドン最適化AHSV4-VP5(配列番号: 05)対野外単離株AHSV4-VP5(配列番号: 50)

配列番号	05	(1)	1	50
配列番号	50	(1)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(51)	51	100
配列番号	50	(51)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(101)	101	150
配列番号	50	(101)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(151)	151	200
配列番号	50	(151)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(201)	201	250
配列番号	50	(201)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(251)	251	300
配列番号	50	(251)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(301)	301	350
配列番号	50	(301)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(351)	351	400
配列番号	50	(351)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(401)	401	450
配列番号	50	(401)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(451)	451	500
配列番号	50	(451)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(501)	501	550
配列番号	50	(501)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(551)	551	600
配列番号	50	(551)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(601)	601	650
配列番号	50	(601)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(651)	651	700
配列番号	50	(651)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(701)	701	750
配列番号	50	(701)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	
配列番号	05	(751)	751	800
配列番号	50	(751)	ATGGGCAAGTTTACAGCTTCTGGAAGAGGCGCGCAACGACACCAAGCG	

【図 40 - 2】

FIGURE 40 (2/2)

		801		850
配列番号 05	(801)	CATCGACCTGAGCCACCTGAAGGTGGCGGACATCCACCCGACATCATCG		
配列番号 50	(801)	CATAGATTGAGCCATTGGAAGGTGGCGGACATTCATCCACATCATTCG		
		851		900
配列番号 05	(851)	AGAGGCCATGCTGCGGACACCGTGACCGACAGGACCTGGCTATGGCC		
配列番号 50	(851)	AAAGGCCATGCTAGGTGATAGTGTAAAGGACAAAGATTGGCGATGGCA		
		901		950
配列番号 05	(901)	ATCAAGAGCAAGGTGGACGTGATCAGCAGATGACCTGGAGCCAGCA		
配列番号 50	(901)	ATTAAATCAAAAGTGGATGTAATTGACGAGATGACCTAGAAACCCAGCA		
		951		1000
配列番号 05	(951)	CGTGTCGATGCGGTCCAGCCCATCGTGAAGCAGGAATACAGCGGACCG		
配列番号 50	(951)	CGTAATCGATGCGGTCTACCGATAGTTAAACAAGATATAGAGAGATG		
		1001		1050
配列番号 05	(1001)	ACACAGCTACCGCTGAGAAATCCCTGGCGCTGAGATCCACAGCGAG		
配列番号 50	(1001)	ATACAAATATCATGTTAGATCCGAGGTGCATTGAAGATACATTCAGAG		
		1051		1100
配列番号 05	(1051)	CACACCCCAAGATCCACATCFACACACCCCTGGGACAGCGACTCCGT		
配列番号 50	(1051)	CACACGCTAAGATACATATATATACACCCCATGGGATTCGATAGCGT		
		1101		1150
配列番号 05	(1101)	GATCATGTGCGGGCCATCGCCGCCATCATACGACGGGAGCTTCTCA		
配列番号 50	(1101)	CTTCATGTGTAGAGCCATTGCACCGCATCATACACAGGAGCTTTCTCA		
		1151		1200
配列番号 05	(1151)	TGGCTTCACCTGGAAATCGAGTACGTGCACTTCGAGGACACGAGCTG		
配列番号 50	(1151)	TTGGATTTGATCTAGAAATGAATATGTCATTTTGAAGATAGTTCACTT		
		1201		1250
配列番号 05	(1201)	GAGGCGCATACCTGCACGCGGAGCCATCACCGTGAGGGCAGGGCTT		
配列番号 50	(1201)	GAGGGCATATATTACATGGAGGGCAATAACCGTTAGGGTAGAGATT		
		1251		1300
配列番号 05	(1251)	CGGCGAGGCTACACCGAGTTTCATGATCCCGCTGGGGCATGCTACCA		
配列番号 50	(1251)	TGGACAGGCTATAGTGAAGTTTCATGATTCAGCGTGGGGATGCCAAGAA		
		1301		1350
配列番号 05	(1301)	CCCCGAGCTGCACAGCGGAGCTGCAGCGGAGCATGGGCACCCACCC		
配列番号 50	(1301)	CCCCAGAGCTCCATAAAGTAAAGCTACAAAGGAGTATGGGAATCATCG		
		1351		1400
配列番号 05	(1351)	ATCTACATGGGCAGCATGGACTACGCCATCAGCTACGAGCAGCTGCTGC		
配列番号 50	(1351)	ATCTATATGGGATCGATGGATTAAGCTATAAGCTACGACAGCTGGTTTC		
		1401		1450
配列番号 05	(1401)	CAATGCCATGCGGCTGCTGACACACCTAGCTGCAGATGCCATGCCAGA		
配列番号 50	(1401)	TAAAGCATGAGATTAGTTATGATTCCGAGTACAAATGCATTGTCTCC		
		1451		1500
配列番号 05	(1451)	TAAGCCCTTGAAGTTCCAGCGCGGAGCTGATGAACGCCCTGCTCTAC		
配列番号 50	(1451)	GTGGCCCTTAAAAATTCAGCGCGCGAGCTAATGAACGCCCTTCTATAT		
		1501		1515
配列番号 05	(1501)	GGCTGAGGATCCGC		
配列番号 50	(1501)	GGTGTGAATAGCT		

上記配列アラインメントについてのパーセント同一性=73%

【 図 1 9 】

FIGURE 19

CEP	vCP EIV (vCP1533 + vCP2242)	vCP2377 9A011	vCP2377 9A021	vCP2377 9A031	vCP2377 処方前
Anti VP5	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性
3 sera anti VP2 St 4	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性

【 配 列 表 】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/15 C07K14/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZA 9 706 424 A (AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL) 22 January 1999 (1999-01-22) the whole document	1-3,5-7, 9-11, 16-19
Y	DATABASE EMBL 15 October 1992 (1992-10-15), Iwata H. et al.: "African Horse Sickness Virus 4, capsid protein VP2" XP002574276 Database accession no. M94680 abstract	1-3,5-7, 9-11, 16-19
Y	US 7 163 926 B1 (AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE FRANCIS ET AL) 16 January 2007 (2007-01-16) example 1	9
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 April 2010		05/07/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Mandl, Birgit

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061669

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL 1 October 1993 (1993-10-01), Iwata H. et al.: "African Horse Sickness Virus 4, capsid protein VP2" XP002574277 Database accession no. P32553 abstract</p>	1-19
A	<p>MACLACHLAN ET AL: "Experiences with new generation vaccines against equine viral arteritis, West Nile disease and African horse sickness" VACCINE, vol. 25, no. 30, 10 July 2007 (2007-07-10), pages 5577-5582, XP022148595 ISSN: 0264-410X page 5580, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, line 1</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/061669**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet(s)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009 /061669

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTASA/ 210

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

1. claims: 1-19(partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 1 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:1 or a polynucleotide having 80% sequence identity with SEQ ID NO:4.

2. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 2 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:2.

3. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 20 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:20.

4. claims: 1-19(partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 21 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:21 or a polynucleotide having 80% sequence identity with SEQ ID NO:19.

5. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 30 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:30.

6. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 31 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:31.

7. claims: 1-12, 16-19(all partially)

International Application No. PCT/US2009 /061669

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 35 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:35.

8. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 36 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:36.

9. claims: 1-19(partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 44 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:44
Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 1 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:1 or a polynucleotide having 80% sequence identity with SEQ ID NO:42.

10. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 45 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:45.

11. claims: 1-12, 16-22(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP of strain "AHSV-4 Jane" as represented by SEQ ID NOs: 49,51 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NOs: 49 or 51; an isolated polynucleotide having at least 80% identity with SEQ ID NOs: 48 or 50 or encoding the polypeptide of SEQ ID NOs: 49 or 51, corresponding polypeptides and African Horse Sickness Virus AHSV-4 strain.

12. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 52 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:52.

International Application No. PCT/US2009 /061669

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

13. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 53 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:53.

14. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 54 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:54.

15. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 55 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:55.

16. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 56 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:56.

17. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 57 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:57.

18. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 58 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:58.

19. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 59 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:59.

International Application No. PCT/US2009 /061669

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

20. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 60 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:60.

21. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 61 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:61.

22. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 62 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:62.

23. claims: 1-12, 16-19(all partially)

Pharmaceutical composition comprising an expression vector which comprises a polynucleotide encoding AHSV VP as represented by SEQ ID NO: 63 or a protein having at least 80% sequence identity with SEQ ID NO:63.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/061669

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ZA 9706424	A	22-01-1999	NONE
US 7163926	B1	16-01-2007	AT 353670 T 15-03-2007
		AU 744964 B2 07-03-2002	
		AU 2844899 A 25-10-1999	
		BR 9909342 A 12-12-2000	
		CA 2327389 A1 14-10-1999	
		DE 69935136 T2 29-11-2007	
		DK 1066055 T3 11-06-2007	
		EP 1066055 A1 10-01-2001	
		ES 2283105 T3 16-10-2007	
		FR 2776928 A1 08-10-1999	
		WO 9951269 A1 14-10-1999	
		JP 2002510651 T 09-04-2002	
		PL 343602 A1 27-08-2001	
		PT 1066055 E 31-05-2007	
		ZA 9902478 A 10-10-2000	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12 1 7 1	
A 6 1 K 39/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/15	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

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

(71) 出願人 511102479
ユニヴァーシティー オブ プレトリア
南アフリカ共和国 0 0 0 2 プレトリア リンウッド ロード デパートメント オブ リサーチ アンド イノベーション サポート

(74) 代理人 100092093
弁理士 辻居 幸一

(74) 代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男

(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(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 ミンク ジュール マールテン
フランス エフ - 6 9 9 6 0 コルバ リュー ニコラ ボワロー 1 6

(72) 発明者 オードネ ジャン クリストフ
フランス エフ - 6 9 0 0 6 リヨン リュー ド クレキ 1 1 9

(72) 発明者 ガスリー アラン ジョン
南アフリカ共和国 0 0 3 6 ハウテン スワヴェルポート プロット 3 4 7

(72) 発明者 マクラ克蘭 ナイジェル ジェイムズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 6 1 6 デイヴィス ジェローム ストリート 6 3 9

(72) 発明者 ヤオ ジャンシェン
カナダ エム 2 エイチ 3 エイチ 1 オンタリオ ノース ヨーク ローガンベリー クレッセン
ト 7 4

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 CA05 CA20 DA02 EA02 EA04 GA11 GA13
HA12
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02
BA05 CA24 CA45
4C084 AA13 MA56 MA66 NA14 ZB331 ZB332

4C085	AA03	BA56	CC31	DD62	EE05	GG03	GG04	GG05	GG10
4H045	AA11	BA10	CA01	DA86	EA31	FA74			