

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5054384号
(P5054384)

(45) 発行日 平成24年10月24日(2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月3日(2012.8.3)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C O 7 K 14/165 (2006.01)	C O 7 K 14/165
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08

請求項の数 16 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-541980 (P2006-541980)	(73) 特許権者	501474748
(86) (22) 出願日	平成16年12月2日(2004.12.2)		インスティティ・パスツール
(65) 公表番号	特表2007-536907 (P2007-536907A)		I N S T I T U T P A S T E U R
(43) 公表日	平成19年12月20日(2007.12.20)		フランス、エフ-75724 パリ セデ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/003106		ックス 15、リュ デュ ドクトール
(87) 国際公開番号	W02005/056584		ル 28
(87) 国際公開日	平成17年6月23日(2005.6.23)		28, rue du Docteur R
審査請求日	平成19年11月7日(2007.11.7)		oux, F-75724 Paris C
(31) 優先権主張番号	0314151		edex 15 FRANCE
(32) 優先日	平成15年12月2日(2003.12.2)	(73) 特許権者	502205846
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
(31) 優先権主張番号	0314152		ルシュ シアンティフィク
(32) 優先日	平成15年12月2日(2003.12.2)		フランス国 エフ-75016 パリ リ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ュ ミシエール-アンジュ 3
微生物の受託番号	CNCM CNCM I-3328		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SARS関連コロナウイルスの新規系統及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のポリヌクレオチドの配列の28375位～28390位(センスプライマー、配列番号62)及び28702位～28687位(アンチセンスプライマー、配列番号63)にそれぞれ相当するプライマー対No.2であることを特徴とする、SARS関連コロナウイルスのゲノム配列又はそのDNA等価物のフラグメントを増幅し得るプライマー対。

【請求項2】

以下のハイブリドーマ：

- ー モノクローナル抗体87を産生するハイブリドーマ(2004年12月1日に、番号I-3328でCNCMに寄託)、
- ー モノクローナル抗体86を産生するハイブリドーマ(2004年12月1日に、番号I-3329でCNCMに寄託)、及び
- ー モノクローナル抗体57を産生するハイブリドーマ(2004年12月1日に、番号I-3330でCNCMに寄託)

から選択されることを特徴とする重症急性呼吸器症候群(SARS)関連ヒトコロナウイルスの核タンパク質(Nタンパク質)に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】

請求項2に記載のハイブリドーマにより産生されることを特徴とする重症急性呼吸器症候群(SARS)関連ヒトコロナウイルスの核タンパク質(Nタンパク質)を指向するモノクローナル抗体又は抗体フラグメント。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の抗体又は抗体フラグメントを含んでなることを特徴とするチップ又はフィルター。

【請求項 5】

SARS 関連コロナウイルスの天然型ウイルス核タンパク質(Nタンパク質)の中央領域及び/又は構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体を使用し、該モノクローナル抗体が請求項 3 に記載の抗体であることを特徴とする SARS 関連コロナウイルス感染を検出することを意図する免疫捕捉検査。

【請求項 6】

Nタンパク質の捕捉に使用する抗体が2004年12月1日に、番号I-3328でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb87であることを特徴とする請求項 5 に記載の免疫捕捉検査。

10

【請求項 7】

Nタンパク質の捕捉に使用する抗体が2004年12月1日に、番号I-3329でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb86であることを特徴とする請求項 5 に記載の免疫捕捉検査。

【請求項 8】

モノクローナル抗体mAb86及びmAb87がNタンパク質の捕捉に使用されることを特徴とする請求項 5 に記載の免疫捕捉検査。

【請求項 9】

20

Nタンパク質の可視化に使用する抗体が2004年12月1日に、番号I-3330でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生され、可視化分子又は粒子と接合されているモノクローナル抗体mAb57であることを特徴とする請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の免疫捕捉検査。

【請求項 10】

可視化分子又は粒子と接合されているmAb57抗体とmAb87抗体との組合せがNタンパク質の可視化に使用されることを特徴とする請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の免疫捕捉検査。

【請求項 11】

以下：

(a) 請求項 1 に記載のプライマー対、

30

(b) 請求項 3 に記載の抗体又は抗体フラグメント、

(c) モノクローナル抗体mAb86及び/又はmAb87とモノクローナル抗体mAb57を含んでなる抗体の組合せ、

(d) 請求項 4 に記載のチップ又はフィルター

からなる群より選択されることを特徴とする SARS 関連コロナウイルスの検出用試薬。

【請求項 12】

少なくとも、

(a) 生物学的サンプル中に存在する核酸の抽出、

(b) 請求項 1 に記載のプライマー対を用いる RT-PCR による ORF-N のフラグメントの増幅、及び

40

(c) 任意の適切な手段による (b) で得られる増幅産物の検出

を含んでなることを特徴とする生物学的サンプルからの SARS 関連コロナウイルスの検出方法。

【請求項 13】

検出工程(c)が、配列番号1のポリヌクレオチド配列の以下の位置：28541位～28563位及び28565位～28589位に相当するフラグメント(それぞれ配列番号66及び67)からなる群より選択される少なくとも1つのプローブを用いて実施されることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体又は抗体フラグメントと SARS 関連コロナウイルスタ

50

ンパク質又はペプチドとから形成された免疫複合体。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載のプライマー対及び請求項 1 3 に規定のプローブを含んでなることを特徴とする SARS 関連コロナウイルス検出キット又はボックス。

【請求項 1 6】

以下の位置：7919 位と 23220 位、7919 位と 25298 位、16622 位と 23220 位、19064 位と 23220 位、16622 位と 25298 位、19064 位と 25298 位、23220 位と 24872 位、23220 位と 26857 位、24872 位と 25298 位、25298 位と 26857 位に相当する塩基対を少なくとも含むことを特徴とする配列番号 1 の配列を有するポリヌクレオチドのフラグメント。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、No.031589 で記録され、ハノイ(ベトナム)で収集されたサンプルに由来する重症急性呼吸器症候群(SARS)関連コロナウイルスの新規系統、そのゲノムに由来する核酸分子、該核酸分子によりコードされるタンパク質及びペプチド、及びそれらの利用、特に診断試薬及び/又はワクチンとしての利用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

コロナウイルスは、宿主細胞の細胞質中で複製する約 30 キロベースのプラス鎖の一本鎖 RNA を含有するウイルスである；そのゲノムの 5' 末端は、キャップ構造(capped structure)を有し、3' 末端はポリ A テイルを含有する。このウイルスはエンベロープに被われ、その表面に、針(spicule)と呼ばれるペプロマー構造を含んでなる

20

【0 0 0 3】

ゲノムは、5' 末端から 3' 末端へ、以下のオープンリーディングフレーム又は ORF：転写-複製複合体のタンパク質に対応する ORF1a 及び ORF1b、並びに構造タンパク質 S、E、M、及び N に対応する ORF-S、ORF-E、ORF-M、及び ORF-N を含んでなる。ゲノムはまた、ORF-S と ORF-E との間に ORF-E に重複して位置する領域、ORF-M と ORF-N との間に位置する領域、並びに ORF-N に含まれる領域によりコードされる未知の機能のタンパク質に対応する ORF を含んでなる。

【0 0 0 4】

30

S タンパク質は、ウイルスエンベロープの表面から出現する針又は棘の形態で存在する膜糖タンパク質(200~220kDa)である。これは、宿主細胞のレセプターへのウイルスの付着及びウイルスエンベロープと細胞膜との融合の誘導を担う。

【0 0 0 5】

約 10kDa の非グリコシル化膜貫通タンパク質である小さなエンベロープタンパク質(E)は、sM(小膜)とも呼ばれ、ビリオン中に最も少ない量で存在するタンパク質である。これは、小胞体及びゴルジ装置中の中間区画のレベルで生じるコロナウイルスの出芽プロセスにおいて強力な役割を演じる。

【0 0 0 6】

M タンパク質又はマトリクスタンパク質(25~30kDa)は、M/E 相互作用によりウイルス粒子中に組み込まれている、より豊富な膜糖タンパク質である。一方、ウイルス粒子への S の組み込みは、S/M 相互作用により導かれる。これは、コロナウイルスのウイルス成熟に、及びウイルス粒子が組み立てられる部位の決定に重要でありそうである。

40

【0 0 0 7】

コロナウイルスの構造タンパク質の中で最も保存されている N タンパク質又はヌクレオキャプシドタンパク質(45~50kDa)は、ゲノム RNA をキャプシド化するために、そして次いでビリオン中への組み込みを導くために必要である。このタンパク質はまた、おそらく、RNA の複製にも関与する。

【0 0 0 8】

宿主細胞が感染すると、ウイルスゲノムの 5' 側に位置するリーディングフレーム(ORF)

50

が、ポリタンパク質に翻訳され、このポリタンパク質はウイルスポテアーゼにより切断され、次いで幾つかの非構造タンパク質、例えばRNA依存性RNAポリメラーゼ(Rep)及びATPアーゼヘリカーゼ(Hel)を遊離する。これら2つのタンパク質は、ウイルスゲノムの複製に、及びウイルスタンパク質の合成に使用される転写物の生成に関与する。これらサブゲノムmRNAが産生される機序は、完全には理解されていない；しかし、最近の事実により、各遺伝子の5'末端の転写調節用配列は、サブゲノムmRNAの不連続転写を調節するシグナルを表していることが示されている。

【0009】

ウイルス膜のタンパク質(S、E、及びMタンパク質)が中間区画に挿入される一方で、複製したRNA(+鎖)は、N(ヌクレオキャプシド)タンパク質と共に組み立てられる。このタンパク質-RNA複合体は、次いで、小胞体の膜に含有されるMタンパク質と組み合わせ、ヌクレオキャプシド複合体が小胞体中に出芽するときにウイルス粒子が形成する。次いで、ウイルスはゴルジ複合体を横切って移動し、最後には、例えばエクソサイトーシスにより、細胞を出る。ウイルスの宿主細胞への付着部位は、Sタンパク質のレベルである。

【0010】

コロナウイルスは、ヒトの風邪の15~30%の原因であり、動物、特にネコ(FIPV：ネコ感染性腹膜炎ウイルス)、家禽(IBV：トリ感染性気管支炎ウイルス)、マウス(MHV：マウス肝炎ウイルス)、ブタ(TGEV：伝染性胃腸炎ウイルス、PEDV：ブタ流行性下痢症ウイルス、PRCoV：ブタ呼吸器コロナウイルス、HEV：赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス)、及びウシ(BCoV：ウシコロナウイルス)の呼吸器及び消化器感染の原因である。

【0011】

一般に、各コロナウイルスは1つの種にのみ影響する；免疫応答性個体では、感染は、場合によっては、感染細胞を破壊し得る中和化抗体及び細胞免疫を誘導する。

【0012】

重症急性呼吸器症候群(SARS)と呼ばれる異型肺炎の流行が、最初の発生源(2002年の第4四半期の中国のようである)から、2003年の第1四半期の間に、種々の国々(ベトナム、香港、シンガポール、タイ、及びカナダ)で広がった。この疾患の重篤度は、死亡率が約3~6%である。この疾患の原因物質の決定は、世界中の多くの研究所により進行中である。

【0013】

2003年3月に、重症急性呼吸器症候群の症例に関連して新たなコロナウイルス(SARS-CoV又はSARSウイルス)が単離された(T.G. KSIAZEKら、The New England Journal of Medicine, 2003, 348, 1319-1330；C. DROSTENら、The New England Journal of Medicine, 2003, 348, 1967-1976；Peirisら、Lancet, 2003, 361, 1319)。

【0014】

このようにして、この新たなコロナウイルスのゲノム配列、特にUrbani単離株(Genbank受理No.AY274119.3、及びA. MARRAら、Science, May 1, 2003, 300, 1399-1404)、及びToronto単離株(Tor2、Genbank受理No.AY278741、及びA. ROTAら、Science, 2003, 300, 1394-1399)のものが得られた。

【0015】

ゲノムの構造は、他の既知のコロナウイルスのものに匹敵するので、SARS-CoVがCoronaviridae科に属していることを確認することができる；オープンリーディングフレームORF1a及び1b、並びにS、E、M、及びNタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム、並びにORF-SとORF-Eとの間に位置する領域によりコードされるタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF3)、ORF-SとORF-Eとの間にORF-Eに重複して位置する領域によりコードされるタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF4)、ORF-MとORF-Nとの間に位置する領域によりコードされるタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF7~ORF11)、及びORF-Nに対応する領域によりコードされるタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF13及びORF14)が、特に同定されている。

【0016】

Tor2単離株及びUrbani単離株の配列間に7つの差異が同定されている；3つはサイレント変異(ORF1bの16622位のc/t及び19064位のa/g、ORF-Sの24872位のt/c)に相当し、4つはそれぞれ、ORF1aによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列(A/V変異に対応する7919位のc/t)、Sタンパク質のアミノ酸配列(A/S変異に対応する23220位のg/t)、ORF3によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列(R/G変異に対応する25298位のa/g)、及びMタンパク質のアミノ酸配列(S/P変異に対応する26857位のt/c)を改変する。

【0017】

加えて、系統発生分析により、SARS-CoVが他のコロナウイルスから遠縁であること、及びヒト呼吸器コロナウイルスの変異により出現したのでも、既知のコロナウイルス間の組換えによって出現したのでもないことが示される(概説には、Holmes、J.C.I., 2003, 111, 1605-1609を参照)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

新たな変種の決定及び考慮は、十分な感度且つ特異性であるSARS検出及び診断用の試薬の開発、並びにSARSの流行に対して人々を保護し得る免疫原性組成物の開発に重要である。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明者らは、ここに、Tor2単離株及びUrbani単離株と区別できる別の系統のSARS関連コロナウイルスを同定した。

【0020】

したがって、本発明の主題は、ゲノムが、相補DNAの形態で、Sタンパク質の遺伝子の3220位～23222位にセリンコドン又はORF3の遺伝子の25298位～25300位にグリシンコドン、及びORF1aの7918位～7920位にアラニンコドン又はMタンパク質の遺伝子の26857位～26859位にセリンコドンを有することを特徴とする、重症急性呼吸器症候群関連ヒトコロナウイルスの単離又は精製した系統である。ここで、前記位置は、Genbank配列AY274119.3を参照にして示される。

【0021】

この系統の有利な実施形態によれば、そのゲノムのDNA等価物は配列番号1の配列に相当する配列を有する；このコロナウイルス系統は、No.031589で記録されハノイ(ベトナム)フランス病院で収集された、SARSに罹患している患者からの気管支肺胞洗液から収集されたサンプルに由来する。

【0022】

本発明によれば、この配列番号1の配列は、上記で規定した単離したコロナウイルス系統のゲノムのリボ核酸分子に対応するデオキシリボ核酸の配列である。

【0023】

配列番号1の配列は、以下の変異を保有するという点で、Genbank配列AY274119.3(Tor2単離株)と区別できる：

- 23220位のg/t；Tor2 Sタンパク質のアミノ酸配列の577位のアラニンコドン(gct)がセリンコドン(tct)で置換されている、
- 25298位のa/g；Tor2 ORF3によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列の11位のアルギニンコドン(aga)がグリシンコドン(gga)で置換されている。

【0024】

加えて、配列番号1の配列は、以下の変異を保有するという点で、Genbank配列AY278741(Urbani単離株)と区別できる：

- 7919位のt/c；ORF1aによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列の2552位のバリンコドン(gtt)がアラニンコドン(gct)で置換されている、
- 16622位のt/c：この変異はORF1bによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を改変しない(サイレント変異)、

- ー 19064位のg/a：この変異はORF1bによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を改変しない(サイレント変異)、
- ー 24872位のc/t：この変異はSタンパク質のアミノ酸配列を改変しない、及び
- ー 26857位のc/t；Mタンパク質のアミノ酸配列の154位のプロリンコドン(ccc)がセリンコドン(tcc)で置換されている。

【0025】

特に言及しなければ、ヌクレオチド配列及びペプチド配列の位置は、Genbank配列AY274119.3を参照して示す。

【0026】

本発明の主題はまた、その配列が上記で規定した単離したコロナウイルス系統ゲノムの配列であることを特徴とする単離又は精製したポリヌクレオチドである。

このポリヌクレオチドの有利な実施形態によれば、該ポリヌクレオチドは配列番号1の配列を有する。

【0027】

本発明の主題はまた、その配列が、上記で規定したポリヌクレオチドの配列と、高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズすることを特徴とする単離又は精製したポリヌクレオチドである。

【0028】

用語「単離又は精製した(された)」は、天然の状態から「ヒトの手によって」改変されたとの意である；換言すれば、目的物が天然に存在する場合、それは、その天然環境から改変若しくは抽出され又はその両方がされたとき、単離又は精製されたといえる。例えば、生きている生物中に天然に存在するポリヌクレオチド又はタンパク質/ペプチドは、単離も精製もされていない；他方、その天然環境で同時に存在する分子から分離されるか、クローニング、増幅、及び/又は化学合成により得られた同じポリヌクレオチド又はタンパク質/ペプチドは、本発明のために単離されている。更に、形質転換、遺伝子操作、又は他の任意の方法により生物に導入されているポリヌクレオチド又はタンパク質/ペプチドは、生物中に存在しても「単離」されている。本発明において使用される用語「精製した(された)」は、本発明によるタンパク質/ペプチドが、例えば組換え宿主細胞の培養物から精製した産物又は非組換え供給源から精製した産物のように、他のタンパク質又はポリペプチドと本質的に結合していないことを意味する。

【0029】

本発明のためには、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、相補ポリヌクレオチド間の特異的且つ選択的なハイブリダイゼーションを維持することを可能にするように選択された温度条件及びイオン強度条件を意味すると理解される。

【0030】

説明のために、上記ポリヌクレオチドを規定するための高ストリンジエンシー条件は、有利には、以下である：DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーションは、2つの工程で実施される：(1) 42℃にて3時間、5×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl+0.015Mクエン酸ナトリウム溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×Denhardt溶液、5%硫酸デキストラン、及び1%サケ精子DNAを含有するリン酸緩衝液(20mM、pH7.5)中でのプレハイブリダイゼーション；(2) 42℃にて20時間のハイブリダイゼーション、続いて2×SSC+2%SDS中での20℃にて20分間の2回の洗浄、0.1×SSC+0.1%SDS中での20℃にて20分間の1回の洗浄。最後の洗浄は、60℃にて30分間、0.1×SSC+0.1%SDS中で実施する。

【0031】

本発明の主題はまた、認識部位及び切断部位が上記で規定したポリヌクレオチド中に存在する制限酵素の使用によるか、又は上記で規定したポリヌクレオチドに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅によるか、又はインビトロでの転写によるか、又は化学合成によるかのいずれかにより取得され得ることを特徴とする、上記で規定したポリヌクレオチドの代表的フラグメントである。

【0032】

このフラグメントの有利な実施形態によれば、これは、前記ポリヌクレオチドのORF1a、ORF1b、ORF-S、ORF-E、ORF-M、ORF-N、ORF3、ORF4、ORF7～ORF11、ORF13及びORF14から選択される少なくとも1つのオープンリーディングフレーム(ORF)に相当するcDNA並びに非コード5'又は3'末端に相当するcDNAからなる群より選択される。

【0033】

この実施形態の有利な特徴によれば、前記フラグメントは、以下からなる群より選択される配列を有する：

- Sタンパク質をコードするORF-Sに相当するcDNAを表す配列番号2及び4の配列、
- Eタンパク質をコードするORF-Eに相当するcDNAを表す配列番号13及び15の配列、
- Mタンパク質をコードするORF-Mに相当するcDNAを表す配列番号16及び18の配列、
- Nタンパク質をコードするORF-Nに相当するcDNAを表す配列番号36及び38の配列、
- ORF1a及びORF1bに相当するcDNAを表す配列(ORF1ab、配列番号31)、ORF3及びORF4に相当するcDNAを表す配列(配列番号7、8)、ORF7～11に相当するcDNAを表す配列(配列番号19、20)、ORF13に相当するcDNAを表す配列(配列番号32)、並びにORF14に相当するcDNAを表す配列(配列番号34)、並びに
- 前記ポリヌクレオチドの非コード5'末端に相当するcDNAを表す配列(配列番号39及び72)及び非コード3'末端に相当するcDNAを表す配列(配列番号40、73)。

10

【0034】

本発明の主題はまた、配列番号5及び6の配列からなる群より選択される配列を有することを特徴とする、上記で規定したSタンパク質をコードするcDNAフラグメントである(Sa及びSbフラグメント)。

20

【0035】

本発明の主題はまた、配列番号41～54の配列からなる群より選択される配列を有することを特徴とする、上記で規定したORF1a及びORF1bに相当するcDNAフラグメントである(L0～L12フラグメント)。

【0036】

本発明の主題はまた、7979位、16622位、19064位、23220位、24872位、25298位、及び26857位に位置する塩基の少なくとも1つを含む前記系統のゲノム配列の少なくとも15の連続塩基又は塩基対を有することを特徴とする、上記で規定したポリヌクレオチドフラグメントである。好ましくは、これは、20～2500、好ましくは20～400の塩基又は塩基対のフラグメントである。

30

【0037】

このフラグメントの有利な実施形態によれば、これは、以下の位置：7919位と23220位、7919位と25298位、16622位と23220位、19064位と23220位、16622位と25298位、19064位と25298位、23220位と24872位、23220位と26857位、24872位と25298位、25298位と26857位に相当する少なくとも一对の塩基又は塩基対を含む。

【0038】

本発明の主題はまた、SARS関連コロナウイルスのゲノム又はそのDNA等価物のフラグメントを増幅することができる少なくとも18塩基のプライマーである。

40

【0039】

このプライマーの1つの実施形態によれば、それらは、以下からなる群より選択される：

- 上記で規定したポリヌクレオチドの配列の28507位～28522位(センスプライマー、配列番号60)及び28774位～28759位(アンチセンスプライマー、配列番号61)にそれぞれ相当するプライマー対No.1、
- 上記で規定したポリヌクレオチドの配列の28375位～28390位(センスプライマー、配列番号62)及び28702位～28687位(アンチセンスプライマー、配列番号63)にそれぞれ相当するプライマー対No.2、並びに
- 配列番号55及び56の配列からなるプライマー対。

50

【0040】

本発明の主題はまた、上記で規定したフラグメント並びに上記で規定したポリヌクレオチド配列の以下の位置：28561位～28586位、28588位～28608位、28541位～28563位、及び28565位～28589位(配列番号64～67)に相当するフラグメントからなる群より選択されることを特徴とする、SARS関連コロナウイルスのゲノム又はそのフラグメントの存在を検出することができるプローブである。

【0041】

本発明によるプローブ及びプライマーは、検出可能及び/又は定量可能なシグナルを得るように、当業者に周知の方法により放射活性又は非放射活性の化合物で直接又は間接に標識されてもよい。使用される放射活性アイソトープの内、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^3H 又は ^{125}I を挙げることができる。非放射活性物は、リガンド、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、顔料、発光物質、例えば放射線ルミネセンス物質、化学発光物質、生物発光物質、蛍光物質、及びリン光物質から選択される。

10

【0042】

本発明は、前述の配列に由来する標識したプローブ及びプライマーを包含する。

このようなプローブ及びプライマーは、SARS関連コロナウイルスによる感染の診断に有用である。

【0043】

本発明の主題はまた、生物学的サンプルからのSARS関連コロナウイルスの検出方法である。この方法は、少なくとも：

20

(a) 生物学的サンプル中に存在する核酸の抽出、

(b) 上記で規定したプライマー対を用いるRT-PCRによるORF-Nのフラグメントの増幅、及び

(c) 任意の適切な手段による、(b)で取得した増幅産物の検出を含んでなることを特徴とする。

【0044】

(b)における増幅産物(アンプリコン)は、プライマー対No.1では268bpであり、プライマー対No.2では328bpである。

【0045】

この方法の有利な実施形態によれば、検出工程(b)は、上記で規定したポリヌクレオチドの配列の28561位～28586位、28588位～28608位、28541位～28563位、及び28565位～28589位に相当する少なくとも1つのプローブを用いて実施される。

30

【0046】

好ましくは、SARS関連コロナウイルスのゲノムは、プライマー対No.2並びに異なる化合物(特に異なる蛍光物質)で標識された28541位～28563位及び28565位～28589位に相当するプローブを用いるリアルタイムでのPCRにより検出され、任意に定量される。

【0047】

このプライマー対及びこのプローブを使用するリアルタイムRT-PCRは、 10^2 コピーのRNA及び10コピーまでのRNAの検出を可能にするので、非常に高感度である；加えて、信頼性及び再現性がある。

40

【0048】

本発明は、上記で規定したコロナウイルスの単離した系統のゲノム及びそのフラグメントの配列及びそれらのセンス又はアンチセンスの相補配列に対応する一本鎖、二本鎖及び三本鎖のポリデオキシリボヌクレオチド及びポリリボヌクレオチド、特に上記で規定したゲノム及びそのフラグメントの配列に対応するRNA及びcDNAを包含する。

【0049】

本発明はまた、上記で規定した精製又は単離した系統のゲノムに特異的なプライマーを用いて、特に上記で規定したプライマー又はプライマー対を用いて取得される増幅フラグメント、上記で規定したフラグメントの配列により形成されるか又は該配列を含んでなる制限フラグメント、配列番号1の配列又は上記で規定したフラグメントを含有するベクタ

50

ーからインビトロでの転写により取得されるフラグメント、及び化学合成により取得されるフラグメントを包含する。制限フラグメントの例は、図13に示す配列番号1の配列の制限地図から推定される。本発明によれば、前記フラグメントは、単離したフラグメントの形態か、又はフラグメントの混合物の形態のいずれかである。本発明はまた、改変されたヌクレオチドフラグメントが上記で規定した単離株のゲノム又はアンチゲノム(antigenomic)RNA配列とハイブリダイズする能力を保持する限り、前述のヌクレオチドフラグメントの長さに対して約15%の割合でヌクレオチドを除去又は付加することによって前述のものに関して改変され、及び/又はヌクレオチドの性質に関して改変されたフラグメントを包含する。

【0050】

10

本発明による核酸分子は、それ自体は公知の従来方法により、標準的なプロトコル、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology(Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc., Library of Congress, USA)に記載のものに従って取得される。例えば、それらは、PCR又はRT-PCRによる核酸配列の増幅によって、或いは完全又は部分的な化学合成によって取得される。

【0051】

本発明の主題はまた、少なくとも1つの上記で規定したポリヌクレオチド又はそのフラグメントを含んでなることを特徴とするDNA又はRNAのチップ又はフィルターである。

本発明によるDNA又はRNAのチップ又はフィルターは、それ自体は公知の従来方法により、例えばガラス又はナイロンの支持体上にオリゴヌクレオチドを化学的又は電気化学的にグラフトすることにより製造される。

20

【0052】

本発明の主題はまた、上記で規定した核酸フラグメントを含んでなる組換えクローニングベクター及び/又は発現ベクター、特にプラスミド、ウイルス、ウイルスベクター、又はファージである。好ましくは、この組換えベクターは、その中で前記核酸フラグメントが転写及び翻訳を調節する適切なエレメントの制御下に配置されている発現ベクターである。加えて、このベクターは、前記挿入物の5'末端及び/又は3'末端とインフーズ(in phase)で融合した配列(タグ)を含んでなっている。タグは、このベクターから発現されるタンパク質の固定及び/又は検出及び/又は精製に有用である。

【0053】

30

これらベクターは、それ自体は公知の従来の組換えDNA法及び遺伝子操作法により構築され、宿主細胞中に導入される。宿主細胞に導入して維持するために目的の核酸分子を挿入することができる多くのベクターは、それ自体公知である；適切なベクターの選択は、ベクターに想定する使用(例えば、目的の配列の複製、この配列の発現、染色体外形態での配列の維持、或いは宿主の染色体材料中への統合)に依存し、宿主細胞の性質にも依存する。

【0054】

本発明によれば、このプラスミドは、特に、以下のプラスミドから選択される：

ー 2003年6月20日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3059で寄託した細菌系統に含有される SARS-Sと称すプラスミド；これは、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のSタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列AY274119.3を参照にして、21406位～25348位(配列番号4)のヌクレオチドに相当する、

40

【0055】

ー 2003年5月12日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3020で寄託した細菌系統に含有される SARS-S1と称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のSタンパク質をコードするcDNA配列の5'フラグメントを含有する。このフラグメントは、Genbank配列AY274119.3 Tor2を参照にして、21406位～23454位(配列番号5)のヌクレオチドに相当する、

50

【0056】

－ 2003年5月12日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3019で寄託した細菌系統に含有される SARS-S2と称すプラスミド；これは、上記で規定した番号No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のSタンパク質をコードするcDNA配列の3'フラグメントを含有する。このフラグメントは、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、23322位～25348位(配列番号6)のヌクレオチドに相当する、

【0057】

－ 2003年11月13日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3126で寄託した細菌系統に含有される SARS-SEと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のORF-SとORF-Eとの間にORF-Eに重複して位置する領域に相当するcDNA配列を含有する。この領域は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、25110位～26244位(配列番号8)のヌクレオチドに相当する、

【0058】

－ 2003年5月28日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3046で寄託した細菌系統に含有される SARS-Eと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のEタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、26082位～26413位(配列番号15)のヌクレオチドに相当する、

【0059】

－ 2003年5月28日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3047で寄託した細菌系統に含有される SARS-Mと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のMタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、26330位～27098位(配列番号18)のヌクレオチドに相当する、

【0060】

－ 2003年11月13日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3125で寄託した細菌系統に含有される SARS-MNと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のORF-MとORF-Nとの間に位置する領域に相当するcDNA配列を含有する。この領域は、Genbank配列受理番号AY274119.3を参照にして、26977位～28218位(配列番号20)のヌクレオチドに相当する、

【0061】

－ 2003年6月5日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3048で寄託した細菌系統に含有される SARS-Nと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のNタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、28054位～29430位(配列番号38)のヌクレオチドに相当する；このように、このプラスミドは、配列番号38の配列の挿入物を含んでなり、2003年6月5日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3048で寄託した細菌系統に含有されている、

【0062】

－ 2003年11月7日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3124で寄託した細菌系統に含有される SARS-5'NCと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムの非コード5'末端に相当するcDNAを含有する。この配列は

、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、1位～204位(配列番号39)のヌクレオチドに相当する、

【0063】

－ 2003年11月7日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3123で寄託した細菌系統に含有される SARS-3'NCと称すプラスミド；これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムの非コード3'末端に相当するcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、28933位～29727位(配列番号40)のヌクレオチドに相当し、ヌクレオチドaの連続で終結する、

【0064】

－ ポリヒスチジンタグとのNタンパク質(配列番号37)のC末端融合体をコードするcDNAフラグメントを含有するpIV2.3Nと称す発現プラスミド、

－ ポリヒスチジンタグとのSタンパク質(配列番号3)のアミノ酸配列の475位～1193位に相当するフラグメントのC末端融合体をコードするcDNAフラグメントを含有するpIV2.3S_Cと称す発現プラスミド、

【0065】

－ ポリヒスチジンタグとのSタンパク質(配列番号3)のアミノ酸配列の14位～1193位に相当するフラグメントのC末端融合体をコードするcDNAフラグメントを含有するpIV2.3S_Lと称す発現プラスミド、

－ ポリヒスチジンタグとのNタンパク質(配列番号3)のN末端融合体をコードするcDNAフラグメントを含有するpIV2.4Nと称す発現プラスミド、

【0066】

－ ポリヒスチジンタグとのSタンパク質(配列番号3)のアミノ酸配列の475位～1193位に相当するフラグメントのN末端融合体をコードする挿入物を含有するpIV2.4S_C又はpIV2.4S_Lと称す発現プラスミド、及び

－ ポリヒスチジンタグとのSタンパク質(配列番号3)のアミノ酸配列の14位～1193位に相当するフラグメントのN末端融合体をコードするcDNAフラグメントを含有するpIV2.4S_Lと称す発現プラスミド。

【0067】

上記で規定した発現プラスミドの有利な特徴によれば、この発現プラスミドは、2003年10月23日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3117で寄託した細菌系統に含有されている。

【0068】

上記で規定した発現プラスミドの別の有利な特徴によれば、この発現プラスミドは、2003年10月23日に、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)にNo.I-3118で寄託した細菌系統に含有されている。

【0069】

上記で規定した発現プラスミドの別の特徴によれば、この発現プラスミドは、以下の番号でCNCM(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した細菌系統中に含有されている：

- a) 2003年10月23日に寄託した系統No.I-3118、
- b) 2003年5月12日に寄託した系統No.I-3019、
- c) 2003年5月12日に寄託した系統No.I-3020、
- d) 2003年6月20日に寄託した系統No.I-3059、
- e) 2004年11月22日に寄託した系統No.I-3323、
- f) 2004年11月22日に寄託した系統No.I-3324、
- g) 2004年12月1日に寄託した系統No.I-3326、
- h) 2004年12月1日に寄託した系統No.I-3327、
- i) 2004年12月1日に寄託した系統No.I-3332、
- j) 2004年12月1日に寄託した系統No.I-3333、

10

20

30

40

50

- k) 2004年12月 1 日に寄託した系統No.I-3334、
- l) 2004年12月 1 日に寄託した系統No.I-3335、
- m) 2004年12月 1 日に寄託した系統No.I-3336、
- n) 2004年12月 1 日に寄託した系統No.I-3337、
- o) 2004年12月 2 日に寄託した系統No.I-3338、
- p) 2004年12月 2 日に寄託した系統No.I-3339、
- q) 2004年12月 2 日に寄託した系統No.I-3340、
- r) 2004年12月 2 日に寄託した系統No.I-3341。

【0070】

本発明の主題はまた、上記 a)～r) で規定した系統のいずれかに含有されていることを特徴とするウイルス起源の核酸挿入物である。

10

【0071】

本発明の主題はまた、配列番号140の配列を保有することを特徴とする、真核細胞における S タンパク質の最適化された発現を可能にする合成遺伝子を含有する核酸である。

【0072】

本発明の主題はまた、S タンパク質の最適化された発現を可能にする合成遺伝子を含有する核酸を含有する発現ベクターである。このベクターは、2004年12月 1 日に、No.I-3333でCNCMに寄託した細菌系統に含有されている。

この発現ベクターの 1 つの実施形態によれば、この発現ベクターは、ウイルス粒子の形態又は組換えゲノムの形態のウイルスベクターである。

20

【0073】

この実施形態の有利な特徴によれば、この発現ベクターは、適切な細胞系における、すなわち、例えば該ベクターにおいて欠失しかつウイルス粒子の形成に必要である或る種のウイルス機能をトランス補完(transcomplement)することを意図される 1 以上の他のプラスミドでトランスフェクトした細胞における、上記の段落 g)、h) 及び k)～r) に従うプラスミドのトランスフェクションにより取得することができる組換えウイルス粒子又は組換えウイルスゲノムである。

【0074】

語句「S タンパク質ファミリー」は、本明細書では、好ましくは真核生物系で産生された、完全な S タンパク質、そのエクトドメイン、及びこのエクトドメインのフラグメントを意味すると理解される。

30

【0075】

本発明の主題はまた、上記で規定した S タンパク質ファミリーのポリペプチドをコードするレンチウイルスベクターである。

本発明の主題はまた、上記で規定した S タンパク質ファミリーのポリペプチドをコードする組換え麻疹ウイルスである。

本発明の主題はまた、上記で規定した S タンパク質ファミリーのポリペプチドをコードする組換えワクシニアウイルスである。

【0076】

本発明の主題はまた、真核生物系におけるSARS関連コロナウイルス S タンパク質又はこのタンパク質のフラグメントの産生のための、上記の段落 e)～r) に従うベクター又は上記で規定した S タンパク質の合成遺伝子を含有するベクターの使用である。

40

【0077】

本発明の主題はまた、上記の段落 e)～r) に記載の細胞系統に含有されているベクターから選択されるベクターか又は S タンパク質の最適化された発現を可能にする合成遺伝子を含有するベクターで培養中の真核細胞をトランスフェクトする工程を含んでなる、真核生物系において S タンパク質の産生する方法である。

【0078】

本発明の主題はまた、組換えベクター、特に発現ベクター中にクローニングされた上記で規定したフラグメント、特に増幅フラグメント又は制限フラグメントを含んでなること

50

を特徴とするcDNAライブラリ(特に発現ライブラリ)である。

【0079】

本発明の主題はまた、上記で規定した組換えベクターにより改変された細胞、特に原核細胞である。

【0080】

本発明の主題はまた、上記で規定したタンパク質又はポリペプチドを発現する遺伝的に改変された真核細胞である。全く自明であることではあるが、用語「遺伝的に改変された真核細胞」は、野生型ウイルスで改変された細胞を指すものではない。

【0081】

この細胞の有利な実施形態によれば、この細胞は上記の段落 i)～l)に記載のベクターのいずれかでのトランスフェクションにより取得することができる。

10

この実施形態の有利な特徴によれば、これは、2004年11月22日に、No.I-3325でCNCMに寄託した細胞FRhK4-Ssol-30である。

【0082】

有利には、上記で規定した組換えベクター及びこの発現ベクターで形質転換した細胞は、対応するタンパク質及びペプチドの産生に使用される。有利には、前記ベクターに由来する発現ライブラリ及びこの発現ライブラリで形質転換した細胞は、SARS関連コロナウイルスタンパク質の免疫原性エピトープ(Bエピトープ及びTエピトープ)を同定するために使用される。

20

【0083】

本発明の主題はまた、上記で規定したポリヌクレオチド又はそのフラグメントの1つによりコードされることを特徴とする精製又は単離したタンパク質及びペプチドである。

【0084】

本発明の有利な実施形態によれば、このタンパク質は、以下からなる群より選択される：

- 配列番号3の配列を有するSタンパク質又はそのエクドメイン
- 配列番号14の配列を有するEタンパク質
- 配列番号17の配列を有するMタンパク質
- 配列番号37の配列を有するNタンパク質

— ORF：ORF1a、ORF1b、ORF3、ORF4、ORF7～ORF11、ORF13、及びORF14によりコードされ、それぞれ配列番号74、75、10、12、22、24、26、28、30、33、及び35の配列を有するタンパク質。

30

【0085】

用語「Sタンパク質のエクドメイン」及び「可溶形態のSタンパク質」は、下記で、互換可能に使用される。

【0086】

本発明の有利な実施形態によれば、このポリペプチドは、Sタンパク質のアミノ酸配列の1～1193位に相当するアミノ酸からなる。

【0087】

本発明の別の有利な実施形態によれば、このペプチドは以下からなる群より選択される：

40

- a) Sタンパク質のアミノ酸配列の14位～1193位及び475位～1193位に相当するペプチド、
- b) Mタンパク質のアミノ酸配列の2位～14位(配列番号69)及び100位～221位に相当するペプチド；これらペプチドはそれぞれ、Mタンパク質のエクドメイン及びエンドドメインに相当する、
- c) Eタンパク質のアミノ酸配列の1位～12位(配列番号70)及び53位～76位(配列番号71)に相当するペプチド；これらペプチドはそれぞれ、Eタンパク質のエクドメイン及びC末端部に相当する、
- d) a)、b)又はc)で規定したペプチドの配列を含むか又は部分的に若しくは完全に重

50

複する、5～50の連続アミノ酸の、好ましくは10～30アミノ酸のペプチド。

【0088】

本発明の主題はまた、以下からなる群より選択されるアミノ酸残基を含む7～50アミノ酸の配列を有することを特徴とするペプチドである：

- － ORF1aによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列の2552位に位置するアラニン、
- － 上記で規定したSARS-CoV系統のSタンパク質のアミノ酸配列の577位に位置するセリン、
- － 上記で規定したSARS-CoV系統のORF3によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列の11位に位置するグリシン、
- － 上記で規定したSARS-CoV系統のMタンパク質のアミノ酸配列の154位に位置するセリン。

10

【0089】

本発明の主題はまた、上記で規定したSARS-CoVによりコードされるタンパク質の少なくとも1つに結合することを特徴とする、上記で規定した組換えベクター、上記で規定したcDNAライブラリ、或いは上記で規定したタンパク質又はペプチドでの動物の免疫により取得することができるポリクローナル又はモノクローナルの抗体又は抗体フラグメントである。

【0090】

本発明は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、例えばヒト化抗体、及びそれらのフラグメント(Fab、Fv、scFv)を包含する。

20

【0091】

本発明の主題はまた、以下のハイブリドーマから選択されることを特徴とする、Nタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである：

- － モノクローナル抗体87を産生するハイブリドーマ(ブダペスト条約に基づき、2004年12月1日に番号I-3328でCNCMに国際寄託)、
- － モノクローナル抗体86を産生するハイブリドーマ(ブダペスト条約に基づき、2004年12月1日に番号I-3329でCNCMに国際寄託)、
- － モノクローナル抗体57を産生するハイブリドーマ(ブダペスト条約に基づき、2004年12月1日に番号I-3330でCNCMに国際寄託)、及び
- － モノクローナル抗体156を産生するハイブリドーマ(ブダペスト条約に基づき、2004年12月1日に番号I-3331でCNCMに国際寄託)。

30

【0092】

本発明の主題はまた、上記で規定したハイブリドーマにより産生されることを特徴とする、Nタンパク質を指向するポリクローナル又はモノクローナルの抗体又は抗体フラグメントである。

【0093】

本発明のためには、語句「キメラ抗体」は、特定の動物種の抗体又は特定クラスの抗体に関して、別の動物種の抗体又は別のクラスの抗体の重鎖及び/又は軽鎖の全て又は一部を含んでなる抗体を意味すると理解される。

40

【0094】

本発明のためには、語句「ヒト化抗体」は、抗原結合部位を形成するCDR(相補性決定領域)の残基が、所望の特異性、親和性、又は活性を保有する非ヒトモノクローナル抗体の残基で置換されているヒト免疫グロブリンを意味すると理解される。非ヒト抗体と比較して、ヒト化抗体は、ヒトにおいて、免疫原性が低く、半減期が延長されている。なぜなら、ヒト化抗体は、これら抗体のFR(フレームワーク)領域の残基及び定常(Fc)領域の残基の実質的に全てがヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列の残基であることを考えれば、ほんの僅かな割合でしか非ヒト配列を有さないからである。

【0095】

本発明の主題はまた、上記で規定したタンパク質、ペプチド、或いは抗体を含んでなる

50

ことを特徴とするタンパク質チップ又はフィルターである。

【0096】

本発明によるタンパク質チップは、それ自体は公知の従来方法により製造される。タンパク質が固定され得る適切な支持体の内、特にマイクロプレートの形態で、プラスチック又はガラスで製造された支持体を挙げることができる。

【0097】

本発明の主題はまた、SARS関連コロナウイルスにより引き起こされた感染の研究及び診断に有用である、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS関連コロナウイルスの単離した系統に由来する試薬である。この試薬は、以下からなる群より選択される：

- (a) 上記で規定したプライマー対、プローブ、又はDNAチップ、
- (b) 上記で規定した組換えベクター又は改変した細胞、
- (c) 上記で規定した単離したコロナウイルス系統又はポリヌクレオチド、
- (d) 上記で規定したタンパク質又はペプチド
- (e) 上記で規定した抗体又は抗体フラグメント、及び
- (f) 上記で規定したタンパク質チップ。

10

【0098】

これら種々の試薬は、従来の分子生物学及び免疫学の技法により、標準的なプロトコル、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology(Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and Son Inc., Library of Congress, USA)、Current Protocols in Immunology(John E . Cologan, 2000, Wiley and Son Inc., Library of Congress, USA)、及びAntibodies: A Laboratory Manual(E. Howell and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)に記載のプロトコルに従って調製され、使用される。

20

【0099】

本発明による核酸フラグメントは、上記の従来技法により製造し、使用する。本発明によるペプチド及びタンパク質は、当業者に公知の組換えDNA技法により、特に上記で規定した組換えベクターを用いて製造される。或いは、本発明によるペプチドは、当業者に公知の固相合成又は液相合成の従来技法により製造されてもよい。

【0100】

ポリクローナル抗体は、任意にKLH若しくはアルブミンにカップリングし且つ/又は適切なアジュバント、例えば(完全又は不完全)フロイントアジュバント若しくは水酸化アルミニウムと組み合わせた上記で規定したタンパク質又はペプチドで適切な動物を免疫することにより製造される；従来技法に従って、満足する抗体力価が得られた後、免疫した動物から血清を収集することにより抗体を集め、沈降によりIgGを富化し、次いで任意にSARS-CoVタンパク質に特異的なIgGを上記で規定したペプチド又はタンパク質が付着した適切なカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、単一特異性のIgG調製物を取得する。

30

【0101】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milsteinの技法(Nature, 1975, 256, 495-497)により、上記で規定したタンパク質又はペプチドで免疫した動物からのBリンパ球とミエロマとの融合により取得されるハイブリドーマから産生される；ハイブリドーマは、インビトロで、特に醗酵槽で培養されるか、又はインビボで、腹水の形態で産生される；或いは、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載のように遺伝子操作により製造される。

40

【0102】

ヒト化抗体は、一般的な方法、例えば国際出願WO 98/45332に記載のものにより製造される。

【0103】

抗体フラグメントは、免疫したマウスの脾臓リンパ球又はハイブリドーマのmRNAからクローン化したV_H及びV_L領域から製造される；例えば、Fv、scFv又はFabフラグメントは、Winter and Milsteinの技法(Nature, 1991, 349, 293-299)により、線状ファージの表面に

50

発現される；幾つかの選択工程の後、抗原に特異的な抗体フラグメントは、従来の組換えDNAのクローニング及び発現のための従来技法により、単離され、適切な発現系で発現される。

【0104】

上記で規定した抗体又はそのフラグメントは、当業者に公知の従来技法、例えばアフィニティークロマトグラフィーにより精製される。

【0105】

本発明の主題は、更に、SARS関連コロナウイルスの検出用の試薬の製造及び任意に遺伝子型決定用/血清型決定用の試薬の製造のための、以下の群：上記で規定したプライマー対、プローブ、DNAチップ、組換えベクター、改変された細胞、単離したコロナウイルス系統、ポリヌクレオチド、タンパク質又はペプチド、抗体又は抗体フラグメント、及びタンパク質チップからなる群より選択される生成物の使用である。

10

【0106】

SARS関連コロナウイルスに特異的な抗体を認識し得、及び/又は該抗体の産生を誘導し得る本発明によるタンパク質及びペプチドは、このようなコロナウイルスの感染の診断に有用である；感染は、感染し得る個体から収集した生物学的サンプルにおいて、適切な技法—特にEIA、ELISA、RIA、免疫蛍光—により検出される。

【0107】

この使用の有利な特徴によれば、前記タンパク質は、上記で規定したS、E、M及び/又はNタンパク質並びにペプチドからなる群より選択される。

20

【0108】

上記で規定したS、E、M及び/又はNタンパク質並びにこれらタンパク質(例えばNタンパク質)に由来するペプチドは、特に酵素抗体法(ELISA)による、SARS関連コロナウイルス感染の間接診断(血清学的診断；SARS-CoVに特異的な抗体の検出)に有用である。

【0109】

本発明による抗体及び抗体フラグメント、特に上記で規定したS、E、M及び/又はNタンパク質並びにその誘導ペプチドを指向するものは、SARS関連コロナウイルス感染の直接診断に有用である；SARS-CoVのタンパク質の検出は、感染し得る個体から収集した生物学的サンプルにおいて、適切な技法、特にEIA、ELISA、RIA、免疫蛍光により実施される。

30

【0110】

本発明の主題はまた、生物学的サンプルからSARS関連コロナウイルスを検出する方法である。この方法は、少なくとも：

(a) 生物学的サンプルを、少なくとも1つの上記で規定した抗体又は抗体フラグメント、タンパク質、ペプチド、或いはタンパク質又はペプチドのチップ又はフィルターと接触させ、そして

(b) 任意の適切な手段により、例えばEIA、ELISA、RIA又は免疫蛍光により、(a)で形成された抗原-抗体複合体を可視化することを含んでなることを特徴とする。

【0111】

この方法の1つの有利な実施形態によれば、工程(a)は以下：

(a₁) 生物学的サンプルを、少なくとも、適切な支持体、特にマイクロプレートに付着された第1の抗体又は抗体フラグメントと接触させ、

(a₂) 固相を洗浄し、そして

(a₃) 少なくとも、第1のものとは異なる第2の抗体又は抗体フラグメント(該抗体又は抗体フラグメントは任意に適切に標識されていてもよい)を加えることを含んでなる。

【0112】

生物学的サンプル中に存在するウイルス粒子の捕捉を可能にするこの方法は、免疫捕捉法とも呼ばれる。

50

【0113】

例えば：

－ 工程(a₁)は、少なくとも、S、M及び/又はEタンパク質を指向し、及び/又はこれらの内の1つのタンパク質のエクトドメインに相当するペプチド(M2-14ペプチド又はE1-12ペプチド)を指向する第1のモノクローナル又はポリクローナルの抗体又はそのフラグメントを用いて行われ、

【0114】

－ 工程(a₃)は、同じタンパク質の別のエピトープ又は好ましくは別のタンパク質、好ましくは内部タンパク質(例えばN核タンパク質)又はEタンパク質若しくはMタンパク質のエンドドメインを指向する少なくとも1つの抗体又は抗体フラグメントを用いて行われる。より好ましくは、これらは、ウイルス粒子中に非常に豊富であるNタンパク質を指向する抗体又は抗体フラグメントである；内部タンパク質(N)又はEタンパク質若しくはMタンパク質のエンドドメインを指向する抗体又は抗体フラグメントを使用する場合、抗体は、例えば0.1%のオーダーの濃度の、界面活性剤(例えばTween 20)の存在下でインキュベートされる。

10

【0115】

－ 形成した抗原－抗体複合体を可視化するための工程(b)は、例えばビオチン又は適切な酵素(例えばペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ)で標識した第2の抗体を用いて直接的にか、又は上記のように標識された抗免疫グロブリン血清を用いて間接的にかのいずれかで行う。このように形成した複合体は適切な基質を用いて可視化される。

20

【0116】

本発明のこの観点の好ましい実施形態によれば、生物学的サンプルは、捕捉モノクローナル抗体と接触させる前に、可視化モノクローナル抗体と混合される。適切な場合、血清-可視化抗体混合物は、プレートに適用される前に、少なくとも10分間、室温にてインキュベートされる。

【0117】

本発明の主題はまた、天然型核タンパク質(Nタンパク質)を検出することによって、SARS関連コロナウイルスによる感染を検出することを意図した免疫捕捉検査である。特に、この検査は、天然型ウイルス核タンパク質の捕捉に使用する抗体が中央領域及び/又は構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体であることを特徴とする。

30

【0118】

この検査の1つの実施形態によれば、Nタンパク質の捕捉に使用する抗体は、2004年12月1日に、番号I-3328でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb87である。

【0119】

この免疫捕捉検査の別の実施形態によれば、Nタンパク質の捕捉に使用する抗体は、2004年12月1日に、番号I-3329でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb86である。

【0120】

この免疫捕捉検査の別の実施形態によれば、モノクローナル抗体mAb86及びmAb87がNタンパク質の捕捉に使用される。

40

【0121】

本発明による免疫捕捉検査において、Nタンパク質を可視化するために、可視化分子又は粒子と接合された、2004年12月1日に、番号I-3330でCNCMに寄託したハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体mAb57を使用することが可能である。

【0122】

この免疫捕捉検査によれば、可視化分子又は粒子と接合された抗体mAb57及びmAb87の組合せがNタンパク質の可視化に使用される。

【0123】

可視化分子は、放射活性原子、顔料、蛍光分子、蛍光体、酵素であり得る；可視化粒子

50

は、例えば：コロイド金、磁性粒子又はラテックスビーズであり得る。

【0124】

本発明の主題はまた、以下：

- (a) 上記で規定したプライマー対又はプローブ、
 - (b) 上記で規定した組換えベクター又は上記で規定した改変された細胞、
 - (c) 上記で規定した単離したコロナウイルス系統又は上記で規定したポリヌクレオチド、
 - (d) 上記で規定した抗体又は抗体フラグメント、
 - (e) 上記で規定した、モノクローナル抗体mAb86及び/又はmAb87とモノクローナル抗体mAb57とを含んでなる抗体の組合せ、
 - (f) 上記で規定したチップ又はフィルター
- からなる群より選択されることを特徴とするSARS関連コロナウイルスを検出するための試薬である。

10

【0125】

本発明の主題はまた、Nタンパク質を使用する間接IgG ELISAにより、生物学的サンプルからSARS関連コロナウイルス感染を検出する方法である。この方法は、プレートが、10 mM PBS緩衝液(pH7.2)中で0.5～4 µg/ml、好ましくは～2 µg/mlの濃度のNタンパク質溶液、0.25ml/lのフェノールレッドで感作されることを特徴とする。

【0126】

本発明の主題は、更に、二重エピトープELISAにより、生物学的サンプルから、SARS関連コロナウイルス感染を検出する方法である。この方法は、検査される血清を可視化抗原と混合し、次いで該混合物を固相支持体に付着させた抗原と接触させることを特徴とする。

20

【0127】

SARS関連コロナウイルスを検出するための検査の1つの変形によれば、これら検査は、上記で規定したNタンパク質を使用するELISAと上記で規定したSタンパク質を使用する別のELISAとを組み合わせる。

【0128】

本発明の主題はまた、上記で規定したポリクローナル又はモノクローナルの抗体又は抗体フラグメントとSARS関連コロナウイルスのタンパク質又はペプチドとから形成される免疫複合体である。

30

【0129】

本発明の主題は、更に、以下の群：上記で規定した、プライマー対、プローブ、DNA又はRNAチップ、組換えベクター、改変された細胞、単離したコロナウイルス系統、ポリヌクレオチド、タンパク質又はペプチド、抗体、及びタンパク質チップからなる群より選択される少なくとも1つの試薬を含んでなることを特徴とするSARS関連コロナウイルス検出キットである。

【0130】

本発明の主題は、更に、以下：

- a) 上記で規定したタンパク質又はペプチド
- b) 以下から選択される配列を有する、上記で規定したDNAタイプ若しくはRNAタイプのポリヌクレオチド又はその代表的なフラグメント：
 - (i) 配列番号1の配列又はそのRNA等価物
 - (ii) 配列番号1の配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする配列、
 - (iii) 配列番号1の配列又は高ストリンジェンシー条件下で配列番号1の配列とハイブリダイズする配列に相補的な配列、
 - (iv) (i)、(ii)又は(iii)で規定したポリヌクレオチドの代表的なフラグメントのヌクレオチド配列、
 - (v) 改変された、(i)、(ii)、(iii)又は(iv)で規定した配列、

40

【0131】

50

c) b)で規定したポリヌクレオチドを含んでなる組換え発現ベクター、及び

d) 上記で規定したcDNAライブラリ

からなる群より選択される少なくとも1つの生成物を含んでなることを特徴とする、SARS関連コロナウイルスに特異的な体液性又は細胞性の保護免疫、特にSARS関連コロナウイルスの特異エピトープを指向する抗体の産生を誘導し得る免疫原性組成物である。

【0132】

上記で規定したタンパク質及びペプチド、特にS、M、E、及び/又はNタンパク質及びその誘導ペプチド、並びにそのタンパク質又はペプチドをコードする核酸(DNA又はRNA)分子は、良好な候補ワクチンであり、SARS関連コロナウイルスに対するワクチンの製造のための免疫原性組成物中で使用し得る。

10

【0133】

本発明による免疫原性組成物の有利な実施形態によれば、組成物は、更に、少なくとも1つの医薬的に受容し得るビヒクルと、任意にキャリア物質及び/又はアジュバントを含む。

【0134】

医薬的に許容し得るビヒクル、キャリア物質、及びアジュバントは、従来から使用されるものである。

アジュバントは、有利には、油性エマルジョン、サポニン、鉱物、細菌抽出物、水酸化アルミニウム及びスクアレンからなる群より選択される。

キャリア物質は、有利には、単層リポソーム、多層リポソーム、サポニンのミセル、又はサッカライド若しくは含金性の固体ミクロスフェアからなる群より選択される。

20

【0135】

本発明によるこの組成物は、一般的な経路により、特に筋肉内又は皮下経路により或いは局所的に特に鼻(エアロゾル)経路により投与される。

【0136】

本発明の主題はまた、SARS関連コロナウイルスのエピトープを特異的に指向する抗体と免疫複合体を形成するための、配列番号3、10、12、14、17、22、24、26、28、30、33、35、37、69、70、71、74及び75の配列からなる群より選択される配列を有する単離又は精製したタンパク質又はペプチドの使用である。

【0137】

本発明の主題はまた、配列番号3、10、12、14、17、22、24、26、28、30、33、35、37、69、70、71、74及び75の配列からなる群より選択される配列を有する単離又は精製したタンパク質又はペプチドと、SARS関連コロナウイルスのエピトープを特異的に指向する抗体とからなる免疫複合体である。

30

【0138】

本発明の主題はまた、SARS関連コロナウイルスのエピトープを特異的に認識し得る抗体の産生を誘導するための、配列番号3、10、12、14、17、22、24、26、28、30、33、35、37、69、70、71、74及び75の配列からなる群より選択される配列を有する単離又は精製したタンパク質又はペプチドの使用である。

【0139】

本発明の主題はまた、前記ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を指向しSARS関連コロナウイルスのエピトープを特異的に認識し得る抗体の産生を誘導するための、配列番号1、2、4、7、8、13、15、16、18、19、20、31、36及び38の配列からなる群より選択される配列を有する単離又は精製したタンパク質又はペプチドの使用である。

40

【0140】

本発明の主題はまた、SARS関連コロナウイルスの天然型Sタンパク質を認識するモノクローナル抗体である。

【0141】

本発明の主題はまた、生物学的サンプルにおけるSARS関連コロナウイルスによる感染を検出するための、上記で規定したSタンパク質ファミリーのタンパク質又はポリペプチド

50

或いは上記で規定した天然型 S タンパク質を認識する抗体の使用である。

【0142】

本発明の主題はまた、検出が真核生物系で発現させた組換え S タンパク質を用いる ELISA により実施されることを特徴とする、生物学的サンプルにおける SARS 関連コロナウイルスによる感染を検出する方法である。

【0143】

この方法の有利な実施形態によれば、この方法は二重エピトープ ELISA 法であり、検査すべき血清を可視化抗原と混合し、この混合物を次いで固相支持体に付着させた抗原と接触させる。

【0144】

本発明の主題はまた、天然型 S タンパク質を認識するモノクローナルの抗体又は抗体フラグメントと、SARS 関連コロナウイルスのタンパク質又はペプチドとからなる免疫複合体である。

【0145】

本発明の主題はまた、上記で規定した S タンパク質ファミリーのタンパク質又はポリペプチドと、SARS 関連コロナウイルスのエピトープを特異的に指向する抗体とからなる免疫複合体である。

【0146】

本発明の主題は、更に、以下の群：上記で規定した S タンパク質ファミリータンパク質又はポリペプチド、上記で規定した S タンパク質ファミリーのタンパク質又はペプチドをコードする核酸、上記で規定した S タンパク質ファミリーのタンパク質又はポリペプチドを発現する細胞、又は SARS 関連コロナウイルスの天然型 S タンパク質を認識する抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つの試薬を含んでなることを特徴とする、SARS 関連コロナウイルスの検出キット又はボックスである。

【0147】

本発明の主題は、真核生物発現系で得られる上記で規定した S タンパク質ファミリーのポリペプチド又は組換えタンパク質を含んでなることを特徴とする、免疫原性及び/又はワクチン組成物である。

【0148】

本発明の主題はまた、上記で規定した S タンパク質ファミリーのタンパク質又はポリペプチドを発現するベクター又は組換えウイルスを含んでなることを特徴とする、免疫原性及び/又はワクチン組成物である。

【0149】

前述の特徴に加えて、本発明は更に、以下の記載から明らかになる他の特徴を含んでなる。以下の記載は、番号 031589 で記録されたサンプルに由来する SARS-CoV 系統のゲノムを表すポリヌクレオチド及び本発明の主題である誘導 cDNA フラグメントの使用例、並びに配列表を表す表 I 及び添付の図面に言及にする。

【0150】

10

20

30

【表 1】

表I: 配列表

同定番号	配 列	Genbank AY274119.3 を参照とする cDNA位置	対応するプラスミドの CNCMへの寄託番号
配列番号1	サンプル 031589 に由来する系統の ゲノム	-	-
配列番号2	ORF-S*	21406-25348	-
配列番号3	S タンパク質	-	-
配列番号4	ORF-S**	21406-25348	I-3059
配列番号5	Saフラグメント	21406-23454	I-3020
配列番号6	Sbフラグメント	23322-25348	I-3019
配列番号7	ORF-3+ORF-4*	25110-26244	-
配列番号8	ORF-3+ORF-4**	25110-26244	I-3126
配列番号9	ORF3	-	-
配列番号10	ORF-3タンパク質	-	-
配列番号11	ORF4	-	-
配列番号12	ORF-4タンパク質	-	-
配列番号13	ORF-E*	26082-26413	-
配列番号14	E タンパク質	-	-
配列番号15	ORF-E**	26082-26413	I-3046
配列番号16	ORF-M*	26330-27098	-
配列番号17	M タンパク質	-	-
配列番号18	ORF-M**	26330-27098	I-3047
配列番号19	ORF7 à 11*	26977-28218	-
配列番号20	ORF7 à 11**	26977-28218	I-3125
配列番号21	ORF7	-	-
配列番号22	ORF7 タンパク質	-	-
配列番号23	ORF8	-	-
配列番号24	ORF8 タンパク質	-	-
配列番号25	ORF9	-	-

10

20

30

【表 2】

配列番号26	ORF9 タンパク質	-	-
配列番号27	ORF10	-	-
配列番号28	ORF10 タンパク質	-	-
配列番号29	ORF11	-	-
配列番号30	ORF11タンパク質	-	-
配列番号31	OrF1ab	265-21485	-
配列番号32	ORF13	28130-28426	-
配列番号33	ORF13 タンパク質	-	-
配列番号34	ORF14	-	-
配列番号35	ORF14 タンパク質	28583-28795	-
配列番号36	ORF-N*	28054-29430	-
配列番号37	Nタンパク質	-	-
配列番号38	ORF-N**	28054-29430	I-3048
配列番号39	非コード5' **	1-204	I-3124
配列番号40	非コード3' **	28933-29727	I-3123
配列番号41	ORF1ab フラグメント L0	30-500	-
配列番号42	フラグメント L1	211-2260	-
配列番号43	フラグメント L2	2136-4187	-
配列番号44	フラグメント L3	3892-5344	-
配列番号45	フラグメント L4b	4932-6043	-
配列番号46	フラグメント L4	5305-7318	-
配列番号47	フラグメント L5	7275-9176	-
配列番号48	フラグメント L6	9032-11086	-
配列番号49	フラグメント L7	10298-12982	-
配列番号50	フラグメント L8	12815-14854	-
配列番号51	フラグメント L9	14745-16646	-
配列番号52	フラグメント L10	16514-18590	-
配列番号53	フラグメント L11	18500-20602	-
配列番号54	フラグメント L12	20319-22224	-
配列番号55	センス N プライマー	-	-
配列番号56	アンチセンス N プライマー	-	-
配列番号57	センス S _C プライマー	-	-
配列番号58	センス S _L プライマー	-	-
配列番号59	アンチセンス S _C 及び S _L プライマー	-	-
配列番号60	センスプライマー シリーズ1	28507-28522	-
配列番号61	アンチセンスプライマー シリーズ1	28774-28759	-
配列番号62	センスプライマー シリーズ2	28375-28390	-
配列番号63	アンチセンス プライマー シリーズ2	28702-28687	-
配列番号64	プローブ 1/シリーズ1	28561-28586	-

10

20

30

40

【表 3】

配列番号65	プローブ 2/ シリーズ1	28588-28608	-
配列番号66	プローブ 1/ シリーズ2	28541-28563	-
配列番号67	プローブ 2/ シリーズ2	28565-28589	-
配列番号68	アンカープライマー 14T		
配列番号69	M2-14 ペプチド	-	-
配列番号70	E1-12 ペプチド	-	-
配列番号71	E53-76 ペプチド	-	-
配列番号72	非コード5' *	1-204	-
配列番号73	非コード3' *	28933-29727	-
配列番号74	ORF1a タンパク質	-	-
配列番号75	ORF1b タンパク質	-	-
配列番号76~139	プライマー		
配列番号140	S の偽遺伝子		
配列番号141~148	プライマー		
配列番号149	S のAa1-13		
配列番号150	ポリペプチド		
配列番号151~158	プライマー		

* PCR増幅産物(アンプリコン)

** CNCMに寄託したプラスミド中にクローニングした挿入物

【0151】

添付の図面において

ー 図1は、発現ベクターpIVEXからの組換えタンパク質N、S_C及びS_Lのインビトロでの発現のウェスタンブロット分析を説明する。レーン1：pIV2.3N。レーン2：pIV2.3S_C。レーン3：pIV2.3S_L。レーン4：pIV2.4N。レーン5：pIV2.4S_L又はpIV2.4S_C。レーン6：pIV2.4S_L。同じベクターから発現したGFPタンパク質の発現をコントロールとして使用する。

【0152】

ー 図2は、発現ベクターpIVEXからのNタンパク質のインビボでの発現の、変性条件(SD S-PAGE)下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動及びクーマシーブルーでの染色による分析を説明する。組換えベクターpIVEXで形質転換されたE.coli BL21(DE3)pDIA17系統を、30℃にてLB培地中で誘導剤(IPTG 1mM)の存在下又は非存在下で培養する。レーン1：pIV2.3N。レーン2：pIV2.4N。

【0153】

ー 図3は、発現ベクターpIVEXからのS_L及びS_Cポリペプチドのインビボでの発現の、変性条件(SDS-PAGE)下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動及びクーマシーブルーでの染色による分析を説明する。組換えベクターpIVEXで形質転換されたE.coli BL21(DE3)pDIA17系統を、30℃にてLB培地中で誘導剤(IPTG 1mM)の存在下又は非存在下で培養する。レーン1：pIV2.3S_C。レーン2：pIV2.3S_L。レーン3：pIV2.4S_L。レーン4：pIV2.4S_L。

【0154】

ー 図4は、組換えベクターpIVEXで形質転換したE.coli BL21(DE3)pDIA17系統中で産生した組換えN、S_L及びS_Cタンパク質の抗原活性を説明する。A：細菌溶解物の電気泳動(SDS-PAGE)。B及びC：SARS-CoVに感染した同じ患者から取得した、SARS症状の発症後それぞれ8日目(J8)(B：血清M12)及び29日目(J29)(C：血清M13)に収集した血清でのウェスタンブロット。レーン1：pIV2.3N。レーン2：pIV2.4N。レーン3：pIV2.3S_C。レーン4

: pIV2.4S₁。レーン 5 : pIV2.3S_L。レーン 6 : pIV2.4S_L。

【0155】

— 図 5 は、ベクター pIV2.3N からの、E.coli BL21(DE3)pDIA17 系統中で産生した組換え N タンパク質の Ni-NTA アガロースカラムでの精製を説明する。レーン 1 : 総細菌抽出物。レーン 2 : 可溶性抽出物。レーン 3 : 不溶性抽出物。レーン 4 : Ni-NTA カラム上に堆積させた抽出物。レーン 5 : 未結合タンパク質。レーン 6 : ピーク 1 の画分。レーン 7 : ピーク 2 の画分。

【0156】

— 図 6 は、pIV2.4S₁ で形質転換した E.coli BL21(DE3)pDIA17 系統中で産生した封入体からの組換え S_C タンパク質の精製を説明する。A. Triton X-100 (2%) での処理: レーン 1 : 総細菌抽出物。レーン 2 : 可溶性抽出物。レーン 3 : 不溶性抽出物。レーン 4 : Triton X-100 (2%) での処理後の上清。レーン 5 及び 6 : Triton X-100 (2%) での処理後のペレット。B : 可溶性及び不溶性抽出物の 4 M、5 M、6 M 及び 7 M 尿素での処理。

【0157】

— 図 7 は、SARS-CoV に感染した細胞の溶解物及び異型肺炎に罹患している患者からの血清を用いて作成したイムノブロットを表す。

【0158】

— 図 8 は、SARS-CoV に感染した細胞の溶解物と核タンパク質 N (A) に特異的なウサギ免疫血清及び針状タンパク質 (spicule protein) S (B) に特異的なウサギ免疫血清とを用いて作成したイムノブロットを表す。I.S. : 免疫血清。p.i. : 免疫前血清。抗 N 免疫血清は 1/50,000 で、抗 S 免疫血清は 1/10,000 で使用した。

【0159】

— 図 9 は、免疫に使用した対応する組換えタンパク質に対する、N タンパク質又は S タンパク質の短いフラグメント (S_C) を指向するウサギ単一特異性ポリクローナル血清の ELISA 反応性を説明する。A : 精製した組換え N タンパク質で免疫したウサギ P13097、P13081 及び P13031。B : S タンパク質の短いフラグメント (S_C) に対応する封入体の調製物で免疫したウサギ P11135、P13042 及び P14001。I.S. : 免疫血清。p.i. : 免疫前血清。

【0160】

— 図 10 は、SARS-CoV により引き起こされた異型肺炎に罹患している患者からの血清に対する、精製した組換え N タンパク質の ELISA 反応性を説明する。図 10a : 4 µg/ml 及び 2 µg/ml の濃度の N タンパク質で調製した ELISA プレート。図 10b : 1 µg/ml の濃度の N タンパク質で調製した ELISA プレート。A、B、D、E、F、G、H で示される血清は表 IV のものに対応する。

【0161】

— 図 11 は、プライマー対 No. 1 (N/+ /28507、N/- /28774) (A) 及びプライマー対 No. 2 (N/+ /28375、N/- /28702) (B) を用いた漸減量 (10⁷ ~ 1 コピー) の SARS-CoV N 遺伝子の合成 RNA の RT-PCR による増幅を説明する。T : RNA の非存在下で実施した増幅。MW : DNA マーカー。

【0162】

— 図 12 は、SARS-CoV N 遺伝子の合成 RNA のリアルタイムでの RT-PCR による増幅を説明する: レプリカとしての漸減量の合成 RNA (repli.; レーン 16 ~ 29) 及び漸減量の 1/20 × 10⁻⁴ に希釈したウイルス RNA (レーン 32) を、実施例 8 に記載の条件下で、キット「Light Cycle r RNA Amplification Kit Hybridization Probes」と No. 2 シリーズのプライマー対及びプローブとを用いてリアルタイムで RT-PCR により増幅した。

【0163】

— 図 13 (図 13.1 ~ 13.7) は、番号 031589 で記録されたサンプルに由来する SARS-CoV 系統のゲノムの DNA 等価物に相当する配列番号 1 の配列の制限地図を表す。

【0164】

— 図 14 は、間接 N ELISA による SARS 血清学検査の結果を示す (第 1 シリーズの血清を検査)。

— 図 15 は、間接 N ELISA による SARS 血清学検査の結果を示す (第 2 シリーズの血清を検査)

)。

【0165】

— 図16は、二重エピトープN ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す(第1シリーズの血清を検査)。

— 図17は、二重エピトープN ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す(第2シリーズの血清を検査)。

【0166】

— 図18は、SARS-CoVの天然型核タンパク質Nに対するELISAによる抗Nモノクローナル抗体の反応性の検査を説明する。抗体を、ハイブリドーマ培養上清の形態で、抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の照射した溶解物を用いる間接ELISAにより検査した(SARS溶解物曲線)。反応性に関する陰性コントロールは、非感染VeroE6細胞の溶解物に対して各抗体について実施する(陰性溶解物曲線)。既知の特異性の幾つかのモノクローナル抗体を陰性コントロール抗体として使用した：パラインフルエンザウイルスタイプ1-3の抗原を指向するpara1-3(Bio-Rad)及びインフルエンザウイルスタイプBの抗原を指向するインフルエンザB(Bio-Rad)。

10

【0167】

— 図19は、ヒトコロナウイルス229E(HCoV-229E)の天然型抗原に対するELISAによるSARS-CoVのNに対するモノクローナル抗体の反応性の検査を説明する。抗体を、ハイブリドーマ培養上清の形態で、抗原としてヒトコロナウイルス229Eに感染したMRC-5細胞の溶解物を用いる間接ELISA検査により検査した(229E溶解物曲線)。免疫反応性に関する陰性コントロールは、非感染MRC-5細胞の溶解物に対して各抗体について実施した(陰性溶解物曲線)。ヒトコロナウイルス229EのSタンパク質を指向するモノクローナル抗体5-11H.6(Sizunら、1998, J. Virol. Met. 72: 145-152)を陽性コントロール抗体として使用する。パラインフルエンザウイルスタイプ1-3の抗原を指向する抗体para1-3(Bio-Rad)及びインフルエンザウイルスタイプBの抗原を指向するインフルエンザB(Bio-Rad)を、検査したモノクローナル抗体のパネルに加えた。

20

【0168】

— 図20は、SARS-CoVの変性した天然型核タンパク質Nに対するウェスタンブロッティングによるSARS-CoVのNに対するモノクローナル抗体の反応性の検査を示す。SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を、Laemmliに従うローディング緩衝液中に調製し、12%SDSポリアクリルアミドゲル中で移動させ、次いでタンパク質をPVDF膜に移した。検査した抗Nモノクローナル抗体を、0.05 µg/mlの濃度で免疫アッセイに使用した。可視化は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgG(H+L)抗体(NA93IV、Amersham)及びECL+システムで行った。2つのモノクローナル抗体を、反応性に関する陰性コントロールとして使用した：インフルエンザウイルスタイプBの抗原を指向するインフルエンザB(Bio-Rad)及びパラインフルエンザウイルスタイプ1-3の抗原を指向するpara1-3(Bio-Rad)。

30

【0169】

— 図21は、SARS-CoV Sタンパク質の哺乳動物細胞での発現用のプラスミドを示す。SARS-CoV SのcDNAを、プラスミドpcDNA-Sを取得するために発現プラスミドpcDNA3.1(+)(Clontech)のBamH1部位とXho1部位との間に、プラスミドpCI-Sを取得するために発現プラスミドpCI(Promega)のNhe1部位とXho1部位との間に挿入した。それぞれプラスミドpcDNA-S-CTE、pcDNA-S-WPRE、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPREを取得するために、WPRE配列及びCTE配列を、2つのプラスミドpcDNA-S及びpCI-Sの各々のXho1部位とXba1部位との間に挿入した。

40

【0170】

SP：ソフトウェアsignalP v2.0(Nielsenら、1997, Protein Engineering, 10: 1-6)で予測されたシグナルペプチド(aa1~13)。

TM：ソフトウェアTMHMM v2.0(Sonnhammerら、1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp.175-182, AAAI Press)で予測された膜貫通領域(aa1196~1218)。アミノ酸W1194及びP1195はそれぞれ0.13及び0.42の確率で膜貫通領域の一部である可能性があることに留意すべきである。

50

P-CMV：サイトメガロウイルス即時/初期プロモーター。BGH pA：ウシ成長ホルモン遺伝子のポリアデニル化シグナル。

SV40後期pA：SV40ウイルス後期ポリアデニル化シグナル。

SD/SA：スプライスドナー及びアクセプター部位。

WPRES：ウッドチャック肝炎ウイルスの「ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント」の配列。

CTE：マソン-ファイザーシミアンレトロウイルスの「構成性輸送エレメント」の配列。

【0171】

ー 図22は、VeroE6細胞のトランスフェクション後のSタンパク質の発現を説明する。細胞抽出物を、プラスミドpcDNA、pcDNA-S、pCI及びpCI-SでのVeroE6細胞のトランスフェクションの48時間後に調製した。細胞抽出物をまた、組換えワクシニアウイルスVV-TF7.3での感染及びプラスミドpcDNA又はpcDNA-Sでのトランスフェクションの18時間後に調製した。コントロールとして、VeroE6細胞の抽出物を、SARS-CoVでの感染多重度3での感染の8時間後に調製した。これらを8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。分子量ラダー(kDa)を図に示す。

SARS-CoV：SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の抽出物

Mock：非感染細胞のコントロール抽出物

【0172】

ー 図23は、VeroE6細胞及び293T細胞のトランスフェクション後のSタンパク質の発現に対するCTE配列及びWPRES配列の効果を示す。細胞抽出物を、プラスミドpcDNA、pcDNA-S、pcDNA-S-CTE、pcDNA-S-WPRES、pCI-S、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPRESでのVeroE6細胞(A)又は293T細胞(B)のトランスフェクションの48時間後に調製し、8%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。分子量ラダー(kDa)を図に示す。

SARS-CoV：SARS-CoVでの感染多重度3での感染の8時間後に調製したVeroE6細胞の抽出物。

Mock：非感染VeroE6細胞のコントロール抽出物。

【0173】

ー 図24は、SARS-CoV Sの発現のための中央DNAフラップを有する欠損レンチウイルスベクターを示す。プラスミドpTRIP-Sを取得するために、SARS-CoV Sタンパク質のcDNAを、中央DNAフラップを有する欠損レンチウイルスベクターTRIP(Sirvenら、2001, Mol. Ther., 3: 438-448)を含有するプラスミドpTRIPΔU3-CMV中に、BamH1-Xho1フラグメントの形態でクローニングした。プラスミドpTRIP-SD/SA-S-CTE及びpTRIP-SD/SA-S-WPRESを取得するために、CMVウイルス即時/初期プロモーター、スプライスシグナル、SのcDNA及び転写後シグナルCTE又はWPRESのいずれかからなる最適発現カセットを、中央DNAフラップを有する欠損レンチウイルス発現ベクターTRIPΔU3-EF1α(Sirvenら、2001, Mol. Ther., 3: 438-448)のカセットEF1α-EGFPと置換した。

【0174】

SP：シグナルペプチド

TM：膜貫通領域

P-CMV：サイトメガロウイルス即時/初期プロモーター

P-EF1α：EF1α遺伝子プロモーター

SD/SA：スプライスドナー及びアクセプター部位

WPRES：ウッドチャック肝炎ウイルスの「ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント」の配列

CTE：マソン-ファイザーシミアンレトロウイルスの「構成性輸送エレメント」の配列

LTR：長末端反復

10

20

30

40

50

ΔU3：「プロモーター/エンハンサー」配列について欠失したLTR

cPPT：「ポリプリン路シス活性配列」

CTS：「中央終結配列」

【0175】

ー 図25は、レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-S-WPRE及びTRIP-SD/SA-S-CTEで形質導入した細胞株によるSARS-CoV Sの発現のウェスタンブロット分析を示す。細胞抽出物を、レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-S-CTE及びTRIP-SD/SA-S-WPREでの形質導入後に、それぞれ樹立株FrhK4-S-CTE及びFrhK4-S-WPREから調製した。これらを8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)接合体を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。分子量ラダー(kDa)を図に示す。

T-：FrhK-4細胞のコントロール抽出物。

T+：SARS-CoVでの感染多重度3の感染の24時間後に調製したFrhK-4細胞の抽出物。

【0176】

ー 図26は、レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-CTEで形質導入した細胞株によるSsolポリペプチドの発現の分析に関する。Ssolポリペプチドの分泌を、レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-CTEでFrhK-4細胞の形質導入後に単離した一連の細胞クローンの上清中で決定した。Laemmliに従うローディング緩衝液中に1/2に希釈した5 µlの上清を、抗FLAGモノクローナル抗体(M2, Sigma)及びペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgG(H+L)接合体で可視化したウェスタンブロッティングにより分析した。T-：親FrhK-4株の上清。T+：Ssolポリペプチドを発現する組換えワクシニアウイルスに感染したBHK細胞の上清。黒塗り矢印はSsolポリペプチドを示し、白抜き矢印は細胞起源のタンパク質との交差反応を示す。

【0177】

ー 図27は、精製したSsolポリペプチドの分析に関連する結果を示す。

A. 抗FLAGアフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過(G75)により精製した8、2、0.5及び0.125 µgの組換えSsolポリペプチドを、8%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した。Ssolポリペプチド及び種々の量の分子量マーカー(MM)を、硝酸銀での染色により可視化した(Gelcode SilverSNAP stain kit II, Pierce)。

【0178】

B. SELDI-TOF質量分析による分析用の標準マーカー

IgG：MM 147300のウシIgG

ConA：MM 77490のコナルブミン

HRP：コントロールとして分析されるMM 43240の西洋ワサビペルオキシダーゼ

【0179】

C. 組換えSsolポリペプチドの質量分析(SELDI-TOF)による分析。

ピークA及びBは単一荷電及び二重荷電のSsolポリペプチドに相当する。

D. 組換えSsolポリペプチドのN末端部の配列決定。液相中での5回のEdman分解サイクルを、ABI494シーケンサ(Applied Biosystems)で実施した。

【0180】

ー 図28は、SARS-CoV SをコードするプラスミドDNAを用いる遺伝子免疫の効力に対する、スプライシングシグナル並びにCTE配列及びWPRE配列の影響を説明する。

A. 7匹のBALB/cマウスの群を、pCI、pcDNA-S、pCI-S、pcDNA-N及びpCI-HAの50 µgのプラスミドDNAを用いて4週間の間隔で2回免疫した。

B. 6匹のBALB/cマウスの群を、pCI、pCI-S、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPREの2 µg、10 µg又は50 µgのプラスミドDNAを用いて4週間の間隔で2回免疫した。

【0181】

2回目の免疫の3週間後に収集した免疫血清を、抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を用いて間接ELISAにより分析した。抗SARS-CoV抗体力価は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgGポリクローナル抗体(NA931V, Amersham)及びTMB(KPL

10

20

30

40

50

)での可視化後に0.5の比ODを生じる希釈率の逆数として算出する。

【0182】

— 図29は、SARS-CoV SをコードするプラスミドDNAを用いる遺伝子免疫後にマウスで誘導された抗体でのSARS-CoVの感染性の血清中和化(seroneutralization)を示す。2回目の免疫の3週間後に収集した免疫血清のプールを、図28に記載した実験の群の各々について調製し、FRhK-4細胞に対する100 TCID₅₀のSARS-CoVの感染性を血清中和化する能力について評価した。検査した1/20からの2倍希釈率の各々について4点を作成した。血清中和化力価は、Reed and Munschの方法に従って、4ウェル中2ウェルの感染性を中和する希釈率の逆数として算出する。

【0183】

A. pCI、pcDNA-S、pCI-S、pcDNA-N及びpCI-HAの50 µgのプラスミドDNAを用いて4週間の間隔で2回免疫したBALB/cマウスの群。□：免疫前血清。■：免疫血清。

B. pCI、pCI-S、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPREの2 µg、10 µg又は50 µgのプラスミドDNAを用いて4週間の間隔で2回免疫したBALB/cマウスの群。

【0184】

— 図30は、SARSに罹患している患者からの血清に対する組換えSsolポリペプチドの免疫反応性を説明する。患者からの血清の反応性を、精製した組換えSsolポリペプチドを用いて調製した固相に対する間接ELISA検査により分析した。1/400の希釈率で固相と反応する患者からの抗体を、ペルオキシダーゼにカップリングしたヒト抗IgG(H+L)ポリクローナル抗体(Amersham NA933V)及びTMB+H2O2(KPL)で可視化する。SARS症例の可能性が高い血清を、National Reference Center for Influenza Virusesの通し番号並びに適切な場合には患者のイニシャル及び症状の発症からの経過日数により同定する。TV血清は、2003年に発生したSARS流行の前にフランスで収集した患者からのコントロール血清である。

【0185】

— 図31は、組換えSsolポリペプチドでの免疫後のSARS-CoVを指向する抗体の誘導を示す。6匹のマウスの2群を、3週間の間隔で、水酸化アルミニウムをアジュバントとする10 µgの組換えSsolポリペプチド(Ssol群)又はコントロールとしてアジュバント単独(mock群)で免疫した。3回の連続免疫を行い、3回の免疫の各々の3週間後に免疫血清を収集した(IS1、IS2、IS3)。免疫血清を、2群の各々について、抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を用いる間接ELISAにより、プールごとに分析した。抗SARS-CoV抗体力価は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgGポリクローナル抗体(Amersham)及びTMB(KPL)での可視化後に0.5の比ODを生じる希釈率の逆数として算出する。

【0186】

— 図32は、合成遺伝子040530の配列とSARS-CoV単離株031589の野生型遺伝子の配列とのヌクレオチドアラインメントを表す。I-3059は、番号I-3059でC.N.C.M.に寄託したSARS-CoV単離株031589のヌクレオチド21406～25348(配列番号4、プラスミドpSARS-S)に相当する。S-040530は合成遺伝子040530の配列である。

【0187】

— 図33は、SARS-CoV Sの発現のための合成遺伝子の使用を説明する。プラスミドpCI、pCI-S、pCI-S-CTE、pCI-S-WPRE及びpCI-SsynthでのVeroE6細胞(A)又は293T細胞(B)のトランスフェクションの48時間後に調製した細胞抽出物を、8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗ウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。ウェスタンブロットは、発光(ECL+、Amersham)及びデジタル画像化デバイス(FluorS、BioRad)上への獲得により可視化した。Sタンパク質の発現レベルを、画像上で同定した2つの優勢なバンドを定量化することにより測定した。

【0188】

— 図34は、組換えワクシニアウイルスVV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN-S及びVV-TN-Ssolの構築のための図解を示す。

A. プラスミドpTG-S及びpTG-Ssolを取得するために、SARS-CoVのSタンパク質及びSsol

10

20

30

40

50

ポリペプチドのcDNAを、トランスファープラスミドpTG186のBamH1部位とSma1部位との間に挿入した。

B. トランスファープラスミドpTN480、pTN-S及びpTN-Ssolを取得するために、合成プロモーター480の配列を、次いで、プラスミドpTG186poly、pTG-S及びpTG-SsolのNde1-Pst1フラグメントの交換により、7.5プロモーターの配列と置換した。

C. pTNシリーズのトランスファープラスミドのNde1部位とPst1部位との間に含有される合成プロモーター480の配列。後の取扱を容易にするためにAsc1部位を挿入した。制限部位及びプロモーター配列に下線を付した。

【0189】

D. 組換えワクシニアウイルスは、pTGシリーズ及びpTNシリーズのトランスファープラスミドのTKカセットとコペンハーゲン系統のワクシニアウイルスのTK遺伝子との間のインビボ二重相同組換えにより取得する。

SP：ソフトウェアsignalP v2.0(Nielsenら、1997, Protein Engineering, 10: 1-6)で予測したシグナルペプチド(aa 1～13)

TM：ソフトウェアTMHMM v2.0(Sonnhammerら、1998, Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp.175-182, AAAI Press)で予測した膜貫通領域(aa196～1218)。アミノ酸W1194及びP1195は膜貫通領域の一部を形成する可能性があり、その確率はそれぞれ0.13及び0.42であることに留意すべきである。

TK-L、TK-R：ワクシニアウイルスチミジンキナーゼ遺伝子の左側部分及び右側部分

MCS：多クローニング部位

PE：初期プロモーター

PL：後期プロモーター

PL synth：合成後期プロモーター480

【0190】

一 図35は、ウェスタンブロッティングにより分析した、組換えワクシニアウイルスによるSタンパク質の発現を説明する。細胞抽出物を、組換えワクシニアウイルスVV-TG、VV-TG-S及びVV-TN-Sでの2のM.O.I.でのCV1細胞の感染の18時間後に調製した(A)。コントロールとして、VeroE6細胞の抽出物を、2の感染多重度でのSARS-CoVでの感染の8時間後に調製した。細胞抽出物をまた、組換えワクシニアウイルスVV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN、VV-TN-S及びVV-TN-SsolでのCV1細胞の感染の18時間後に調製した(B)。これらを、8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。「1 µl」及び「10 µl」は、ゲル上に堆積した細胞抽出物の量を示す。分子量ラダー(kDa)を図に示す。

SARS-CoV：SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の抽出物

Mock：非感染細胞のコントロール抽出物

【0191】

一 図36は、組換えワクシニアウイルスによるSsolポリペプチドの分泌のウェスタンブロット分析の結果を示す。

A. 組換えワクシニアウイルスVV-TN(VV-TN-Ssolウイルスの種々のクローン)及びウイルスVV-TG-Ssol又はVV-TN-Sflagに感染したCV1細胞の上清を、2のM.O.I.でのCV1細胞の感染の18時間後に収穫した。

B. 2のM.O.I.での組換えワクシニアウイルスVV-TN-Ssolに二連で(in duplicate)(1、2)感染した293T細胞、FRhK-4細胞、BHK-21細胞及びCV1細胞の上清を、感染の18時間後に収穫した。また、ウイルスVV-TNに感染したCV1細胞をコントロールとして収穫した(M)。

【0192】

全ての上清を、Laemmliに従う8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗FLAGマウスモノクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA931V、Amersham)(A)、又は抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)(B)を

10

20

30

40

50

用いてウェスタンブロッティングにより分析した。
分子量ラダー(kDa)を図に示す。

【0193】

ー 図37は、SDSポリアクリルアミドゲル上で精製したSsolポリペプチドの分析を示す。

抗FLAGアフィニティークロマトグラフィーにより精製した10、5及び2 µlの組換えSsolポリペプチドを、4～15%勾配SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した。Ssolポリペプチド及び種々の量の分子量マーカー(MM)を、硝酸銀での染色により可視化した(Gelcode SilverSNAP stain kit II、Pierce)。

【0194】

ー 図38は、SARSに罹患している患者の血清に対する、組換えワクシニアウイルスVV-TN-Ssolにより産生された組換えSsolポリペプチドの免疫反応性を説明する。患者からの血清の反応性を、精製した組換えSsolポリペプチドを用いて調製した固相に対する間接ELISA検査により分析した。1/100及び1/400の希釈率で固相と反応する患者からの抗体が、ペルオキシダーゼにカップリングしたヒト抗IgG(H+L)ポリクローナル抗体(Amersham NA933V)及びTMB+H2O2(KPL)で可視化されている。可能性が高いSARS症例の血清が、National Reference Center for Influenza Virusの通し番号並びに適切な場合には患者のイニシャル及び症状の発症からの経過日数により同定される。TV血清は、2003年に発生したSARS流行の前にフランスで収集した患者からのコントロール血清である。

【0195】

ー 図39は、組換えワクシニアウイルスでの免疫後のマウスにおける抗SARS-CoV抗体応答を示す。7匹のBALB/cマウスの群を、10⁶pfuの組換えワクシニアウイルスVV-TG、VV-TG-HA、VV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN、VV-TN-S、VV-TN-Ssolで、i.v.経路により4週間の間隔で2回免疫した。

A. 2回の免疫の各々の3週間後に収集された免疫血清のプールを、群の各々について調製し、抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を使用する間接ELISAにより分析した。抗SARS-CoV抗体力価は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgGポリクローナル抗体(NA931V、Amersham)及びTMB(KPL)での可視化後に0.5の比ODを生じる希釈率の逆数として算出する。

B. 免疫血清のプールを、FRhK-4細胞に対するSARS-CoVの100 TCID₅₀の感染性を血清中和化する能力について評価した。1/20から検査した2倍希釈率の各々について4点を作成した。血清中和化力価は、Reed and Munschの方法に従って、4ウェル中2ウェルの感染性を中和する希釈率の逆数として算出する。

【0196】

ー 図40は、組換えウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolの構築を記載する。

A. 麻疹ベクターは、追加の転写ユニットが導入されている、Schwarzワクチン系統の麻疹ウイルス(MV)の完全ゲノムである(Combredet, 2003, Journal of Virology, 77: 11546-11554)。追加のオープンリーディングフレーム(ORF)の発現は、N/P接合部に存在するエレメントからコピーされた、転写、キャップの形成及び導入遺伝子のポリアデニル化に必要なシス作用性エレメントにより制御される。2つの異なるベクターは、一方ではP(リンタンパク質)遺伝子とM(マトリクス)遺伝子との間への挿入を、他方ではH(ヘマグルチニン)遺伝子とL(ポリメラーゼ)遺伝子との間への挿入を可能にする。

B. 麻疹ウイルスの組換えゲノムMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolを、前記ベクターのP遺伝子とM遺伝子との間に位置する追加の転写ユニット中にSタンパク質のORF及びSsolポリペプチドのORFを挿入することにより構築した。

【0197】

麻疹ウイルス(MV)の種々の遺伝子を示す：N(核タンパク質)、PVC(V/Cリンタンパク質及びタンパク質)、M(マトリクス)、F(融合)、H(ヘマグルチニン)、L(ポリメラーゼ)。T7 = T7 RNAポリメラーゼプロモーター、hh = ハンマーヘッドリボザイム、T7t = T7ファージRNAポリメラーゼターミネーター配列、δ = 肝炎δウイルスのリボザイム、(2)、(3) = 追加の転写ユニット(ATU)。

10

20

30

40

50

MVゲノムのサイズ：15,894nt

SP：シグナルペプチド

TM：膜貫通領域

FLAG：FLAGタグ

【0198】

ー 図41は、ウェスタンブロッティングにより分析した、組換え麻疹ウイルスによるSタンパク質の発現を説明する。

細胞質抽出物を、異なる継代数のウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssol並びにコントロールとしての野生型ウイルスMWSchwによるVero細胞の感染後に調製した。また、Laemmliに従うローディング緩衝液中の細胞抽出物を、3の感染多重度でのSARS-CoVでのVeroE6細胞の感染の8時間後に調製した。これらを、8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。

分子量ラダー(kDa)を図に示す。

Pn：293-3-46細胞及びVero細胞の共培養後のウイルスのn代継代

SARS-CoV：SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の抽出物

Mock：非感染VeroE6細胞のコントロール抽出物

【0199】

ー 図42は、免疫蛍光により分析した、組換え麻疹ウイルスによるSタンパク質の発現を示す。

ガラススライド上の単層のVero細胞を、野生型ウイルスMWSchw(A)又はウイルスMVSchw2-SARS-S(B)及びMVSchw2-SARS-Ssol(C)に感染させた。シンシチウムが30~40%コンフルエンス(A、B)又は90~100%(C)に達したとき、細胞を固定し、透過化処理し、抗SARS-CoVウサギポリクローナル抗体及びFITCにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)接合体(Jackson)で標識した。

【0200】

ー 図43は、ペプチドE1-12、E53-76及びM2-14を指向するウサギ血清の免疫反応性のウェスタンブロット分析を説明する。ウサギ20047をKLHにカップリングしたペプチドE1-12で免疫した。ウサギ22234及び22240をKLHにカップリングしたペプチドE53-76で免疫した。ウサギ20013及び20080をKLHにカップリングしたペプチドM2-14で免疫した。免疫血清を、SARS-CoVに感染した細胞の抽出物(B)又はSARS-CoV 031589単離株のタンパク質E(A)若しくはタンパク質M(C)を発現する組換えワクシニアウイルスに感染した細胞の抽出物を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。イムノブロットを、ペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)接合体(NA934V、Amersham)を用いて可視化した。

Eタンパク質及びMタンパク質の位置を矢印で示す。

分子量ラダー(kDa)を図に示す。

【0201】

しかし、これらの実施例は、本発明の主題を説明するためにのみ提供され、如何なる様式でも本発明に対する制限を構成するものではないと理解すべきである。

【実施例】

【0202】

実施例1：番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムのクローニング及び配列決定

SARS-CoV系統のRNAを、ハノイ(ベトナム)のフランス病院でSARSに罹患している患者に対して行った番号031589で記録された気管支肺胞洗液のサンプルから抽出した。

単離したRNAを鋳型として使用して、ゲノムの種々のオープンリーディングフレーム(ORF1a、ORF1b、ORF-S、ORF-E、ORF-M、ORF-N(ORF-13及びORF-14を含む)、ORF3、ORF4、ORF7~ORF11)、及び非コード5'及び3'末端に相当するcDNAを増幅した。増幅/検出に使用したプライマー及びプローブの配列は、入手可能なSARS-CoVヌクレオチド配列に基づいて規定

10

20

30

40

50

した。

【0203】

下記では、プライマー及びプローブは、文字S、続いて、ゲノムの対応領域を示す文字(ORF1a及びORF1bを含む5'末端についてはL; ORF-S、ORF-M、ORF-NについてはS、M及びN; 対応する遺伝子間領域(intergene region)についてはSE及びMN)、任意ではあるがその後、Fn、Rn(nは、ネステッドPCRに使用したプライマーに対応する1~6であり、第1の増幅についてはF1+R1対、第2の増幅についてはF2+R2対という具合である)、それから、センスプライマー又はアンチセンスプライマーに対応する+/又は-/、そして最後に、Genbank配列AY27411.3を参照にしたプライマーの位置、により示す。センス及びアンチセンスのS及びNプライマー並びにその他のセンスプライマーのみについては、単一位置が示されている場合、それは、約20塩基のプローブ又はプライマーの5'末端の位置に対応し; S及びNプライマー以外のアンチセンスプライマーについては、単一位置が示されている場合、それは、約20塩基のプローブ又はプライマーの3'末端の位置に対応する。

【0204】

このように作製した増幅産物を、番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムの完全配列を決定するために、特異的プライマーを用いて配列決定した。これら増幅産物は、ORF1a及びORF1bに相当するものを除き、次いで、対応するウイルスタンパク質及びこれらタンパク質を指向する抗体(特に、DNAに基づく免疫による)を産生するために、発現ベクター中にクローニングした。

【0205】

1. RNAの抽出

QIamp viral RNA extraction mini kit(QIAGEN)を製造業者の推奨に従って用いて、RNAを抽出した。より具体的には: 140 µlのサンプル及び560 µlのAVL緩衝液を、15秒間激しく混合し、10分間、室温でインキュベートし、次いで最大速度で短く遠心分離した。560 µlの100%エタノールを上清に加え、このように取得した混合物を15秒間非常に激しく攪拌した。630 µlの混合物を次いでカラムに堆積した。

【0206】

カラムを2 mlチューブに入れ、8000rpmにて1分間遠心分離し、次いで前記混合物の残りを同じカラムに堆積し、再度8000rpmにて1分間遠心分離し、カラムを清浄な2 mlチューブに移した。次に、500 µlのAW1緩衝液をカラムに加え、次いでカラムを8000rpmにて1分間遠心分離し、溶出物を廃棄した。500 µlのAW2緩衝液をカラムに加え、次いでカラムを14,000rpmにて3分間遠心分離し、1.5 mlチューブに移した。最後に、60 µlのAVE緩衝液をカラムに加え、カラムを室温にて1~2分間インキュベートし、次いで8000rpmにて1分間遠心分離した。精製したRNAに相当する溶出物を回収し-20°Cに凍結した。

【0207】

2. cDNAの増幅、配列決定及びクローニング

2.1) Sタンパク質をコードするcDNA

サンプルから抽出したRNAを、ランダム配列のヘキサマーオリゴヌクレオチド(pdN6)を用いる逆転写に付し、cDNAフラグメントを生成した。

SARS-CoV S糖タンパク質をコードする配列を、2つの重複DNAフラグメント: 5'フラグメント(SARS-Sa、配列番号5)及び3'フラグメント(SARS-Sb、配列番号6)の形態で、ネステッドプライマーを用いる2連続増幅を行うことにより増幅した。このように取得したアンプリコンを配列決定し、PCRプラスミドベクター2.1-TOPO™(INVITROGEN)中にクローニングし、次いでクローニングしたcDNAの配列を決定した。

【0208】

a) Saフラグメント及びSbフラグメントのクローニング及び配列決定

a.1) cDNAの合成

RNA(5 µl)と、注入用のH₂O(3.5 µl)と、5×逆転写酵素緩衝液(4 µl)と、5 mM dNTP(2 µl)と、pdN6 100 µg/ml(4 µl)と、RNasin 40 IU/µl(0.5 µl)と、逆転写酵素AMV-RT 10 IU/µl、PROMEGA(1 µl)とを含有する反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件

: 42℃にて45分間、55℃にて15分間、95℃にて5分間の条件下でインキュベートし、次いで得られたcDNAを+4℃に維持した。

【0209】

a.2) 第1のPCR増幅

S遺伝子の5'末端及び3'末端を、それぞれ、プライマー対S/F1+/21350-21372及びS/R1/-/23518-23498、S/F3+/23258-23277及びS/R3/-/25382-25363で増幅した。cDNA(2 µl)と、50 µMプライマー(0.5 µl)と、10×緩衝液(5 µl)と、5 mM dNTP(2 µl)と、Taq Expand High Fidelity(Roche)(0.75 µl)と、H₂O(39、75 µl)とを含有する50 µlの反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件下で増幅した: 94℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて30秒間の変性工程と、55℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて2分30秒間の伸長工程とを含んでなる40サイクル(各サイクルで10秒間の追加の伸長)、次いで72℃にて5分間の最終の伸長工程。

【0210】

a.3) 第2のPCR増幅

第1のPCR増幅の産物(5'アンプリコン及び3'アンプリコン)を、第1の増幅条件と同一の条件下で、5'アンプリコン及び3'アンプリコンについてそれぞれプライマー対S/F2+/21406-21426及びS/R2/-/23454-23435、S/F4+/23322-23341及びS/R4/-/25348-25329で第2のPCR増幅工程(ネステッドPCR)に付した。

【0211】

a.4) Saフラグメント及びSbフラグメントのクローニング及び配列決定

このように取得したSa(5'末端)アンプリコン及びSb(3'末端)アンプリコンを、QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)を製造業者の指示に従って用いて精製し、次いでベクターPCR2.1-TOP0(Invitrogen kit)中にクローニングして、SARS-S1及びSARS-S2と呼ぶプラスミドを得た。

【0212】

Saクローン及びSbクロンのDNAを単離し、次いで対応する挿入物を、Big Dyeキット(Applied Biosystem(登録商標))並びにユニバーサルプライマーM13フォワードとM13リバーズ及び以下のプライマー: S/S+/21867、S/S+/22353、S/S+/22811、S/S+/23754、S/S+/24207、S/S+/24699、S/S+/24348、S/S-/24209、S/S-/23630、S/S-/23038、S/S-/22454、S/S-/21815、S/S-/24784、S/S+/21556、S/S+/23130及びS/S+/24465を製造業者の指示に従って用いて配列決定した; このように取得したSaフラグメント及びSbフラグメントの配列は、添付の配列表の配列番号5及び6の配列に相当する。

【0213】

SARS-S1と呼ぶプラスミドは、2003年5月12日に、No.I-3020で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した; これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のS遺伝子の配列の5'フラグメントを含有する。Saと呼ぶフラグメントは、Genbank配列AY274119.3 Tor2を参照にして、21406位~23454位のヌクレオチド(配列番号5)に相当する。

【0214】

TOP10F'-SARS-S2と呼ぶプラスミドは、2003年5月12日に、No.I-3019で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した; これは、上記で規定したNo.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のS遺伝子の配列の3'フラグメントを含有する。Sbと呼ぶフラグメントは、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、23322位~25348位のヌクレオチド(配列番号6)に相当する。

【0215】

b) 完全cDNA(4 kbのSARS-Sクローン)のクローニング及び配列決定

完全SのcDNAを上記クローンSARS-S1及びSARS-S2から、以下の様式で得た:

1) PCR増幅反応をSARS-S2クローンで、上記プライマーS/R4/-/25348-25329及びプライマ

10

20

30

40

50

ーS/S/+24696-24715の存在下で行った：633bpのアンプリコンが得られた、

2) 別のPCR増幅反応を、別のSARS-S2クローンで、上記のプライマーS/F4/+23322-23341及びS/S/-24803-24784の存在下で行った：1481bpのアンプリコンが得られた。

増幅反応を、94℃にて20秒間の変性工程及び72℃にて2分30秒間の伸長工程を含んでなる30の増幅サイクルを行うことを除きSaフラグメント及びSbフラグメントの増幅について上記で規定したような条件下で行った。

【0216】

3) 2つのアンプリコン(633bp及び1481bp)を、Saフラグメント及びSbフラグメントについて上記で規定したような条件下で精製した。

4) 上記プライマーS/F4/+23322-23341及びS/R4/-25348-25329を用いる別のPCR増幅反応を、3)で取得した精製したアンプリコンについて行った。増幅反応を、30の増幅サイクルを実施したことを除いてSaフラグメント及びSbフラグメントの増幅について上記で規定した条件下で行った。

このように取得した2026bpアンプリコンを精製し、ベクターPCR2.1-TOPO中にクローニングし、次いでSaフラグメント及びSbフラグメントについて上記で規定したようなプライマーを用いて上記のように配列決定した。このように取得したクローンをクローン3'と呼んだ。

【0217】

5) 上記の取得したクローンSARS-S1及びクローン3'をEcoR Iで消化し、このように取得した約2kbのバンドをゲル精製し、次いで上記プライマーS/F2/+21406-21426及びS/R4/-25348-25329でPCRにより増幅した。増幅反応を、30の増幅サイクルを実施したことを除きSaフラグメント及びSbフラグメントの増幅について上記で規定した条件下で行った。約4kbのアンプリコンを精製し、配列決定した。これを次いで、SARS-Sと呼ぶプラスミドを得るために、ベクターPCR2.1-TOPO中にクローニングし、このプラスミド中に取得された挿入物を、Saフラグメント及びSbフラグメントについて上記で規定したプライマーを用いて上記のように配列決定した。Sタンパク質をコードするアンプリコン及び挿入物のcDNA配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号2及び4の配列(これらはSタンパク質(配列番号3)をコードする)に相当する。

【0218】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のSタンパク質をコードするcDNAに相当するアンプリコンの配列は、Tor2単離株及びUrbani単離株のそれぞれの対応配列と比較して、以下の2つの変異を有する。変異の位置は、Tor2単離株のゲノムの完全配列(Genbank AY274119.3)を参照にして示されている：

ー 23220位のg/t；Tor2のSタンパク質のアミノ酸配列の577位のアラニンコドン(gct)がセリンコドン(tct)で置換されている、

ー 24872位のc/t：この変異はSタンパク質のアミノ酸配列を改変しない、及び

【0219】

SARS-Sと呼ぶプラスミドを、2003年6月20日に、No.I-3059で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のSタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列AY274119.3を参照にして、21406位～25348位のヌクレオチド(配列番号4)に相当する。

【0220】

2.2) Mタンパク質及びEタンパク質をコードするcDNA

上記のように抽出したサンプル031589に由来するRNAを、同じ工程(Titan One Step RT-PCR(登録商標) kit(Roche)の間にプライマー対：

ー ORF-Eを増幅するためのS/E/F1/+26051-26070及びS/E/R1/-26455-26436、及び

ー ORF-Mを増幅するためのS/M/F1/+26225-26244及びS/M/R1/-27148-27129

を用いるPCR増幅反応と組み合わせた逆転写に付した。

【0221】

10

20

30

40

50

注入用の8.6 μ lのH₂Oと、1 μ lのdNTP(5 mM)と、0.2 μ lの各プライマー(50 μ M)と、1.25 μ lのDTT(100mM)と、0.25 μ lのRNasin(40IU/ μ l)とを含有する第1の反応混合物を、1 μ lのRNAと、注入用の7 μ lのH₂Oと、5 μ lの5 $\times$ RT-PCR緩衝液と、0.5 μ lの酵素混合物とを含有する第2の反応混合物と合わせ、合わせた混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件下でインキュベートした：42℃にて30分間、55℃にて10分間、94℃にて2分間、続いて、94℃にて10秒間の変性工程と、55℃にて30秒間のアニーリング工程と68℃にて45秒間の伸長工程(1サイクル当たり3秒間の増加を伴う)とを含んでなる40サイクル、最後に68℃にて7分間の末端伸長工程。

【0222】

このように取得した増幅産物(Mアンプリコン及びEアンプリコン)を、プライマー対：
ー アンプリコンE用のS/E/F2/+ /26082-26101及びS/E/R2/- /26413-26394、及び
ー アンプリコンM用のS/M/F2/+ /26330-26350及びS/M/R2/- /27098-27078
を用い、Expand High-Fi(登録商標) kit(Roche)を使用して第2のPCR増幅(ネステッドPCR)に付した。

【0223】

2 μ lの第1のPCR産物と、注入用の39.25 μ lのH₂Oと、MgCl₂を含有する5 μ lの10 $\times$ 緩衝液と、2 μ lのdNTP(5 mM)と、0.5 μ lの各プライマー(50 μ M)と、0.75 μ lの酵素混合物とを含有する反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件下でインキュベートした：94℃にて2分間の変性工程に続いて、94℃にて15秒間の変性工程と、60℃にて30秒間のアニーリング工程と72℃にて45秒間の伸長工程(1サイクル当たり3秒間の増加を伴う)とを含んでなる30サイクル、最後に72℃にて7分間の末端伸長工程。Eタンパク質及びMタンパク質をコードするcDNAに対応する取得された増幅産物を、上記のプライマー：S/E/F2/+ /26082及びS/E/R2/- /26394、S/M/F2/+ /26330、S/M/R2/- /27078並びにプライマーS/M/+ /26636-26655及びS/M/- /26567-26548を用いて、上記のように配列決定した。次いで、これらを、SARS-E及びSARS-Mと呼ぶプラスミドを取得するために上記のようにクローニングした。次いで、これらクローンのDNAを単離し、ユニバーサルプライマーM13フォワード及びM13リバース並びに上記のプライマーS/M/+ /26636及びS/M/- /26548を用いて配列決定した。

【0224】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のEタンパク質をコードするcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号13)は、単離株AY274119.3-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。SARS-CoV 031589系統のEタンパク質の配列は、添付の配列表の配列番号14の配列に相当する。

【0225】

SARS-Eと呼ぶプラスミドは、2003年5月28日に、No.I-3046で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記のように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のEタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、26082位～26413位のヌクレオチド(配列番号15)に相当する。

【0226】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統からのMをコードするcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号16)は、単離株AY274119.3-Tor2の対応配列に関して差異を含有しない。対照的に、26857位に、単離株AY278741-Urbaniはcを含有し、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統の配列はtを含有する。この変異は、対応するタンパク質のアミノ酸配列の改変を生じる：154位で、プロリン(AY278741-Urbani)が、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統では、セリンに変化する。No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のMタンパク質の配列は、添付の配列表の配列番号17の配列に相当する。

【0227】

SARS-Mと呼ぶプラスミドは、2003年5月28日に、No.I-3047で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄

託した；これは、上記のように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のMタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、26330位～27098位のヌクレオチド(配列番号18)に相当する。

【0228】

2.3) ORF3、ORF4、ORF7～ORF11に相当するcDNA

同じ増幅、クローニング及び配列決定ストラテジーを使用して、以下のORF：ORF3、ORF4、ORF7、ORF8、ORF9、ORF10及びORF11にそれぞれ相当するcDNAフラグメントを取得した。第1の増幅に使用したプライマー対は：

- － ORF3及びORF4：S/SE/F1/+ /25069-25088及びS/SE/R1/- /26300-26281
- － ORF7～ORF11：S/MN/F1/+ /26898-26917及びS/MN/R1/- /28287-28266

である。

第2の増幅に使用したプライマー対は：

- － ORF3及びORF4：S/SE/F2/+ /25110-25129及びS/SE/R2/- /26244-26225
- － ORF7～ORF11：S/MN/F2/+ /26977-26996及びS/MN/R2/- /28218-28199

である。

【0229】

第1の増幅(RT-PCR)の条件は以下のとおりである：42℃にて45分間、55℃にて10分間、94℃にて2分間、続いて94℃にて15秒間の変性工程と、58℃にて30秒間のアニーリング工程と68℃にて1分間の伸長工程(1サイクル当たり5秒間の増加を伴う)とを含んでなる40サイクル、及び最後に68℃にて7分間の末端伸長工程。

ネステッドPCRの条件は以下のとおりである：94℃にて2分間の変性工程に続いて、94℃にて20秒間の変性工程と、58℃にて30秒間のアニーリング工程と72℃にて50秒間の伸長工程(1サイクル当たり4秒間の増加を伴う)とを含んでなる40サイクル、及び最後に72℃にて7分間の末端伸長工程。

【0230】

ORF3、ORF4及びORF7～11をそれぞれ含有するcDNAに相当する取得した増幅産物を、プライマー：S/SE/+ /25363、S/SE/+ /25835、S/SE/- /25494、S/SE/- /25875、S/MN/+ /27839、S/MN/+ /27409、S/MN/- /27836、S/MN/- /27799を用いて配列決定し、他のORFについての上記のようにクローニングして、SARS-SE及びSARS-MNと呼ぶプラスミドを得た。これらクローンのDNAを、これら同じプライマー及びユニバーサルプライマーM13センス及びM13アンチ

センスを用いて、単離し、配列決定した。

【0231】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF3及びORF4を含有する領域のcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号7)は、単離株AY274119-Tor2の対応配列に関してヌクレオチドの差異を含有する。25298位のこの変異は、対応するタンパク質(ORF3)のアミノ酸配列の改変を生じる：11位で、アルギニン(AY274119-Tor2)が、サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統では、グリシンに変化する。対照的に、単離株AY278741-Urbaniの対応配列に関しては変異は同定されなかった。サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF3及びORF4の配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号10及び12の配列に相当する。

【0232】

SARS-SEと呼ぶプラスミドは、2003年11月13日に、No.I-3126で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記で規定したように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のORF-SとORF-Eとの間でORF-Eに重複して位置する領域に相当するcDNA配列を含有する。この領域は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、25110位～26244位のヌクレオチド(配列番号8)に相当する。

【0233】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF7～ORF11を含有する領域に相当するcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号19)は、単離株AY274119-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF

7～ORF11の配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号22、24、26、28及び30の配列に相当する。

【0234】

SARS-MNと呼ぶプラスミドは、2003年11月13日に、No.I-3125で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記で規定したように、No.031589で記録されハノイで収集されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のORF-MとORF-Nとの間に位置する領域に相当するcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、26977位～28218位のヌクレオチド(配列番号20)に相当する。

【0235】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF7～ORF11を含有する領域に相当するcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号19)は、単離株AY274119-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF7～ORF11の配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号22、24、26、28及び30の配列に相当する。

【0236】

2.4) Nタンパク質をコードし、ORF13及びORF14を含むcDNA

cDNAを合成し、フラグメントSa及びSbについて上記で記載したように増幅した。より具体的には、5 µlのRNAと、注入用の5 µlのH₂Oと、4 µlの5×逆転写酵素緩衝液と、2 µlのdNTP(5 mM)と、2 µlのオリゴ20T(5 µM)と、0.5 µlのRNasin(40IU/µl)と、1.5 µlのAMV-RT(10IU/µl Promega)とを含有する反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件：42℃にて45分間、55℃にて15分間、95℃にて5分間の条件下でインキュベートし、次いで+4℃に維持した。

【0237】

第1のPCR増幅を、プライマー対S/N/F3/+ /28023及びS/N/R3/- /29480で実施した。

S1フラグメント及びS2フラグメントの増幅についての上記のような反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件下でインキュベートした：94℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて20秒間の変性工程と、55℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて1分30秒間の伸長工程(各サイクルで10秒間の追加の伸長を伴う)とを含んでなる40サイクル、次いで72℃にて5分間の最終の伸長工程。

【0238】

第1のPCR増幅で取得したアンプリコンを、第1の増幅の条件と同一の条件下で、プライマー対S/N/F4/+ /28054及びS/N/R4/- /29430で第2のPCR増幅工程(ネステッドPCR)に付した。

【0239】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のNタンパク質をコードするcDNAに相当する取得した増幅産物を、プライマー：S/N/F4/+ /28054、S/N/R4/- /29430、S/N/+ /28468、S/N/+ /28918及びS/N/- /28607を用いて配列決定し、他のORFについての上記のようにクローニングして、SARS-Nと呼ぶプラスミドを得た。これらクローンのDNAを、ユニバーサルプライマーM13センス及びM13アンチセンス並びにプライマーS/N/+ /28468、S/N/+ /28918及びS/N/- /28607を用いて、単離し、配列決定した。

【0240】

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF-Nに相当しORF13及びORF14を含むcDNAを表すアンプリコンの配列(配列番号36)は、単離株AY274119.3-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のNタンパク質の配列は、添付の配列表の配列番号37の配列に相当する。

サンプルNo.031589に由来するSARS-CoV系統のORF13及び14の配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号32及び34の配列に相当する。

【0241】

SARS-Nと呼ぶプラスミドは、2003年6月5日に、No.I-3048で、Collection Nationale

10

20

30

40

50

de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記で規定したように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のNタンパク質をコードするcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、28054位～29430位のヌクレオチド(配列番号38)に相当する。

【0242】

2.5) 非コード5'末端及び3'末端

a) 非コード5'末端(5'NC)

a₁) cDNAの合成

上記のように抽出したサンプル031589に由来するRNAを、以下の条件下で逆転写に付した：

RNA(15 µl)及びプライマーS/L/-/443(5 µmの濃度で3 µl)を、75℃にて10分間インキュベートした。

次に、5×逆転写酵素緩衝液(6 µl、INVITROGEN)、10mM dNTP(1 µl)、0.1M DTT(3 µl)を加え、混合物を50℃にて3分間インキュベートした。

【0243】

最後に、逆転写酵素(3 µlのSuperscript(登録商標)、INVITROGEN)を前記混合物に加え、50℃にて1時間30分間、次いで90℃にて2分間インキュベートした。

このようにして取得したcDNAを、QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)を製造業者の推奨に従って用いて精製した。

【0244】

b₁) ターミナルトランスフェラーゼ反応(TdT)

cDNA(10 µl)を100℃にて2分間インキュベートし、水中で保存し、次いで以下のものを加えた：H₂O(2.5 µl)、5×TdT緩衝液(4 µl、AMERSHAM)、5mM dATP(2 µl)及びTdT(1.5 µl、AMERSHAM)。このように取得した混合物を、37℃にて45分間、次いで65℃にて2分間インキュベートする。

【0245】

取得した産物を、プライマー：S/L/-225-206及びアンカー14T：5'-AGATGAATTCGGTACCTTTTTTTTTTTTTT-3'(配列番号68)を用いる第1のPCR反応により増幅する。増幅条件は以下のとおりである：94℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて10秒間の変性工程と、45℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて30秒間の伸長工程とを含んでなる10サイクル、その後94℃にて10秒間の変性工程と、50℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて30秒間の伸長工程とを含んでなる30サイクル、次いで72℃にて5分間の最終の伸長工程。

【0246】

第1のPCR増幅の産物を、第1の増幅の条件と同一の条件下で、プライマー：S/L/-/204-185及び上記アンカー14Tを用いる第2の増幅工程に付した。このように取得したアンプリコンを精製し、プライマーS/L/-/182-163を用いて配列決定し、次いで異なるORFについての上記のようにクローニングして、SARS-5'NCと呼ばれるプラスミドを得た。このクローンのDNAを単離し、ユニバーサルプライマーM13センス及びM13アンチセンス並びに上記のプライマーS/L/-/182-163を用いて配列決定した。

【0247】

No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統の5'NC末端に相当するcDNAを表すアンプリコンは、添付の配列表の配列番号72の配列に相当する；この配列は、単離株AY274119.3-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。

【0248】

SARS-5'NCと呼ぶプラスミドは、2003年11月7日に、No.I-3124で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記で規定したように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムの非コード5'末端に相当するcDNA配列を含有する。この配列は、

Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、1位～204位のヌクレオチド(配列番号39)に相当する。

【0249】

b) 非コード3'末端(3'NC)

a₁) cDNAの合成

上記のように抽出したサンプル031589に由来するRNAを、以下のプロトコルに従って逆転写に付した：RNA(5 µl)と、H₂O(5 µl)と、5×逆転写酵素緩衝液(4 µl)と、5 mM dNTP(2 µl)と、5 µMオリゴ20T(2 µl)と、40U/µl RNasin(0.5 µl)と、10IU/µl RT-AMV(1.5 µl、PROMEGA)とを含有する反応混合物を、サーモサイクラー中、以下の条件：42℃にて45分間、55℃にて15分間、95℃にて5分間の条件下でインキュベートし、次いで+4℃に維持した。

10

【0250】

取得したcDNAを、プライマーS/N+/28468-28487及び上記のアンカー14Tを用いて第1のPCR反応により増幅した。増幅条件は以下のとおりである：94℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて20秒間の変性工程と、45℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて50秒間の伸長工程とを含んでなる10サイクル、その後94℃にて20秒間の変性工程と、50℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて50秒間の伸長工程とを含んでなる30サイクル、72℃にて5分間の最終の伸長工程。

【0251】

第1のPCR増幅の産物を、第1の増幅の条件と同一の条件下で、プライマーS/N+/28933-28952及び上記のアンカー14Tを用いて第2の増幅工程に付した。このように取得したアンプリコンを精製し、プライマーS/N+/29257-29278を用いて配列決定し、異なるORFについての上記のようにクローニングして、SARS-3'NCとよぶプラスミドを得た。このクローンのDNAを単離し、ユニバーサルプライマーM13センス及びM13アンチセンス並びに上記のプライマーS/N+/29257-29278を用いて配列決定した。

20

【0252】

No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統の3'NC末端に相当するcDNAを表すアンプリコンは、添付の配列表の配列番号73の配列に相当する；この配列は、単離株AY274119.3-Tor2及びAY278741-Urbaniの対応配列に関して差異を含有しない。

【0253】

SARS-3'NCと呼ぶプラスミドは、2003年11月7日に、No.I-3123で、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15)に寄託した；これは、上記で規定したように、No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムの非コード3'末端に相当するcDNA配列を含有する。この配列は、Genbank配列受理No.AY274119.3を参照にして、28933位のヌクレオチドと29727位のヌクレオチドとの間に位置する配列(配列番号40)に相当し、一連のヌクレオチドaで終結する。

30

【0254】

2.6) ORF1a及びORF1b

サンプル031589に由来するSARS-CoVゲノムのORF1a及びORF1bを含有する5'領域の増幅を、他のORFについて上記で記載されたものと同じ原理に従って、RT-PCR反応に続いてネステッドPCRを行うことにより実施した。増幅したフラグメントは数十の塩基が重複し、したがってゲノムのこの部分の完全配列のコンピュータによる再構築が可能である。平均すると、増幅したフラグメントは2キロベースである。

40

【0255】

14の重複フラグメント(I0～I12と呼ぶ)を、以下のプライマーを用いてこのように増幅した：

【0256】

【表 4】

表II: 5'領域(ORF1a及びORF1b)の増幅に
使用したプライマー

増幅及び配列 決定した領域 (プライマーは 含まず)	RT-PCR センスプライマー	RT-PCR アンチセンス プライマー	ネステッドPCR センスプライマー	ネステッドPCR アンチセンス プライマー
L0 50-480	S/L0/F1/+30	S/L0/R1/-481		
L1 231-2240	S/L1/F1/+147	S/L1/R1/-2336	S/L1/F2/+211	S/L1/R2/-2241
L2 2156-4167	S/L2/F1/+2033	S/L2/R1/-4192	S/L2/F2/+2136	S/L2/R2/-4168
L3 3913-5324	S/L3bis/F1/+3850	S/L3bis/R1/-5365	S/L3bis/F2/+3892	S/L3bis/R2/-5325
L4b 4952-6023	S/L4b/F1/+4878	S/L4b/R1/-6061	S/L4b/F2/+4932	S/L4b/R2/-6024
L4 5325-7318	S/L4/F1/+5272	S/L4/R1/-7392	S/L4/F2/+5305	S/L4/R2/-7323
L5 7296-9156	S/L5/F1/+7111	S/L5/R1/-9253	S/L5/F2/+7275	S/L5/R2/-9157
L6 9053-11066	S/L6/F1/+8975	S/L6/R1/-11151	S/L6/F2/+9032	S/L6/R2/-11067
L7 10928-12962	S/L7/F1/+10883	S/L7/R1/-13050	S/L7/F2/+10928	S/L7/R2/-12963
L8 12835-14834	S/L8/F1/+12690	S/L8/R1/-14857	S/L8/F2/+12815	S/L8/R2/-14835
L9 14765-16624	S/L9/F1/+14688	S/L9/R1/-16678	S/L9/F2/+14745	S/L9/R2/-16625
L10 16534-18570	S/L10/F1/+16451	S/L10/R1/-18594	S/L10/F2/+16514	S/L10/R2/-18571
L11 18521-20582	S/L11/F1/+18441	S/L11/R1/-20612	S/L11/F2/+18500	S/L11/R2/-20583
L12 20338-22205	S/L12/F1/+20279	S/L12/R1/-22229	S/L12/F2/+20319	S/L12/R2/-22206

【0257】

上記でORF-Mについて記載したように増幅したフラグメントL0を除き、全てのフラグメントを以下の条件下で増幅した：

ー RT-PCR：42℃にて30分間、55℃にて15分間、94℃にて2分間、次いで取得したcDNAを以下の条件下で増幅する：94℃にて15秒間の変性工程と、58℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで68℃にて1分30秒間の伸長工程とを含んでなる40サイクル(各サイクルで5秒間の追加の伸長を伴う)、次いで68℃にて7分間の最終の伸長工程。

【0258】

ー ネステッドPCR：94℃にて2分間の最初の変性工程に続いて、94℃にて15秒間の変性工程と、60℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて1分30秒間の伸長工程とを含んでなる35サイクル(各サイクルで5秒間の追加の伸長を伴う)、次いで72℃にて7分間の最終の伸長工程。

【0259】

増幅産物を下記の表IIIに規定のプライマーを用いて配列決定した：

【0260】

10

20

30

40

【表 5】

表III: 5'領域(ORF1a及びORF1b)の配列決定
に使用したプライマー

名称	配列(配列番号76~139)
S/L3/+4932	5'-CCACACACAGCTTGTGGATA-3'
S/L4/+6401	5'-CCGAAGTTGTAGGCAATGTC-3'
S/L4/+6964	5'-TTTGGTGCTCCTTCTTATTG-3'
S/L4/-6817	5'-CCGGCATCCAAACATAATTT-3'
S/L5/-7633	5'-TGGTCAGTAGGGTTGATTGG-3'
S/L5/-8127	5'-CATCCTTTGTGTCAACATCG-3'
S/L5/-8633	5'-GTCACGAGTGACACCATCCT-3'
S/L5/+7839	5'-ATGCGACGAGTCTGCTTCTA-3'
S/L5/+8785	5'-TTCATAGTGCCTGGCTTACC-3'
S/L5/+8255	5'-ATCTTGCGCATGTATTGAC-3'
S/L6/-9422	5'-TGCATTAGCAGCAACAACAT-3'
S/L6/-9966	5'-TCTGCAGAACAGCAGAAAGTG-3'
S/L6/-10542	5'-CCTGTGCAGTTTGTCTGTCA-3'
S/L6/+10677	5'-CCTTGTGGCAATGAAGTACA-3'
S/L6/+10106	5'-ATGTCATTTGCACAGCAGAA-3'
S/L6/+9571	5'-CTTCAATGGTTTGCCATGTT-3'
S/L7/-11271	5'-TGCGAGCTGTCATGAGAATA-3'
S/L7/-11801	5'-AACCGAGAGCAGTACCACAG-3'
S/L7/-12383	5'-TTTGGCTGCTGTAGTCAATG-3'
S/L7/+12640	5'-CTACGACAGATGTCCTGTGC-3'
S/L7/+12088	5'-GAGCAGGCTGTAGCTAATGG-3'
S/L7/+11551	5'-TTAGGCTATTGTTGCTGCTG-3'
S/L8/-13160	5'-CAGACAACATGAAGCACCAC-3'
S/L8/-13704	5'-CGCTGACGTGATATATGTGG-3'
S/L8/-14284	5'-TGCACAATGAAGGATACACC-3'
S/L8/+14453	5'-ACATAGCTCGCGTCTCAGTT-3'
S/L8/+13968	5'-GGCATTGTAGGCGTACTGAC-3'
S/L8/+13401	5'-GTTTGCGGTGTAAGTGCAG-3'
S/L9/-15098	5'-TAGTGGCGGCTATTGACTTC-3'
S/L9/-15677	5'-CTAAACCTTGAGCCGCATAG-3'
S/L9/-16247	5'-CATGGTCATAGCAGCACTTG-3'
S/L9/+16323	5'-CCAGGTTGTGATGTCACTGAT-3'
S/L9/+15858	5'-CCTTACCCAGATCCATCAAG-3'
S/L9/+15288	5'-CGCAAACATAACACTTGCTG-3'
S/L10/-16914	5'-AGTGTTGGGTACAAGCCAGT-3'
S/L10/-17466	5'-GTTCCAAGGAACATGTCTGG-3'
S/L10/-18022	5'-AGGTGCCTGTGTAGGATGAA-3'
S/L10/+18245	5'-GGGCTGTCATGCAACTAGAG-3'
S/L10/+17663	5'-TCTTACACGCAATCCTGCTT-3'
S/L10/+17061	5'-TACCCATCTGCTCGCATAGT-3'
S/L11/-18877	5'-GCAAGCAGAATTAACCCTCA-3'
S/L11/-19396	5'-AGCACCACTAAATTGCATC-3'
S/L11/-20002	5'-TGGTCCCTTTGAAGGTGTTA-3'
S/L11/+20245	5'-TCGAACACATCGTTTATGGA-3'
S/L11/+19611	5'-GAAGCACCTGTTTCCATCAT-3'
S/L11/+19021	5'-ACGATGCTCAGCCATGTAGT-3'
SARS/L1/F3/+800	5'-GAGGTGCAGTCACTCGCTAT-3'
SARS/L1/F4/+1391	5'-CAGAGATTGGACCTGAGCAT-3'

10

20

30

40

【表 6】

SARS/L1/F5/+1925	5'-CAGCAAACCACTCAATTCCT-3'
SARS/L1/R3/-1674	5'-AAATGATGGCAACCTCTTCA-3'
SARS/L1/R4/-1107	5'-CACGTGGTTGAATGACTTTG-3'
SARS/L1/R5/-520	5'-ATTTCTGCAACCAGCTCAAC-3'
SARS/L2/F3/+2664	5'-CGCATTGTCTCCTGGTTTAC-3'
SARS/L2/F4/+3232	5'-GAGATTGAGCCAGAACCAGA-3'
SARS/L2/F5/+3746	5'-ATGAGCAGGTTGTCATGGAT-3'
SARS/L2/R3/-3579	5'-CTGCCTTAAGAAGCTGGATG-3'
SARS/L2/R4/-2991	5'-TTTCTTCACCAGCATCATCA-3'
SARS/L2/R5/-2529	5'-CACCGTTCTTGAGAACAACC-3'
SARS/L3/F3/+4708	5'-TCTTTGGCTGGCTCTTACAG-3'
SARS/L3/F4/+5305	5'-GCTGGTGATGCTGCTAATT-3'
SARS/L3/F5/+5822	5'-CCATCAAGCCTGTGTCGTAT-3'
SARS/L3/R3/-5610	5'-CAGGTGGTGCAGACATCATA-3'
SARS/L3/R4/-4988	5'-AACATCAGCACCATCCAAGT-3'
SARS/L3/R5/-4437	5'-ATCGGACACCATAGTCAACG-3'

10

【0261】

No.031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のフラグメントL0～L12の配列はそれぞれ、添付の配列表の配列番号41～配列番号54の配列に相当する。これら配列のうち、フラグメントL5に相当するものだけが、単離株AY278741-Urbaniの対応配列に関してヌクレオチドの差異を含有する。

20

【0262】

7919位のこのt/c変異は、ORF1aによりコードされる対応タンパク質のアミノ酸配列の改変を生じる：2552位で、バリン(gttコドン；AY278741)は、SARS-CoV系統031589ではアラニン(gctコドン)に変化している。対照的に、単離株AY274119.3-Urbaniの対応配列に関しては変異は同定されなかった。その他のフラグメントは、単離株Tor2及びUrbaniの対応配列に関して差異を示さない。

【0263】

実施例2：番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統の組換えのNタンパク質及びSタンパク質の産生及び精製

番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のNタンパク質全体及びSタンパク質の2つのポリペプチドフラグメントを、E.coli中で、N末端又はC末端のポリヒスチジンを含んでなる融合タンパク質の形態で産生した。2つのSポリペプチドでは、Sタンパク質のN末端及びC末端の疎水性配列(シグナルペプチド：1位～13位及び膜貫通ヘリックス：1196位～1218位)が欠失している一方で、Sタンパク質のβヘリックス(565位～687位)及びコイルドコイル型の2つのモチーフ(895位～980位及び1155位～1186位)は保存されていた。これら2つのポリペプチドは、Sタンパク質のアミノ酸配列の14位～1193位に相当する長いフラグメント(S_L)及びSタンパク質のアミノ酸配列の475位～1193位に相当する短いフラグメント(S_C)からなる。

30

【0264】

1) 発現ベクターpIVEX2.3及びpIVEX2.4中へのN、S_L及びS_CのcDNAのクローニング

40

Nタンパク質に対応するcDNA並びにS_Lフラグメント及びS_Cフラグメントに対応するcDNAを、DNAポリメラーゼPlatinum Pfx(登録商標)(INVITROGEN)を用いて、標準的な条件下でPCRにより増幅した。プラスミドSARS-N及びSARS-Sを鋳型として使用し、以下のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた：

5'-CCCATATGTCTGATAATGGACCCCAATCAAAC-3' (Nセンス、配列番号55)

5'-CCCCCGGGTGCCTGAGTTGAATCAGCAGAAGC-3' (Nアンチセンス、配列番号56)

5'-CCCATATGAGTGACCTTGACCGGTGCACCAC-3' (S_Cセンス、配列番号57)

5'-CCCATATGAAACCTTGACCCACCTGCTC-3' (S_Lセンス、配列番号58)

5'-CCCCCGGGTTTAATATATTGCTCATATTTTCCC-3' (S_C及びS_Lアンチセンス、配列番号29)。

【0265】

50

センスプライマーはNdeI部位(下線)を導入する一方、アンチセンスプライマーはXmaI部位又はSmaI部位(下線)を導入する。3つの増幅産物をカラム精製し(QIAquick PCR Purification kit、QIAGEN)、適切なベクターにクローニングした。3つの構築物から精製した(QIAfilter Midi Plasmid kit、QIAGEN)プラスミドDNAを配列決定により検証し、酵素NdeI及びXmaIで消化した。N、S_L及びS_CのcDNAに対応する3つのフラグメントをアガロースゲル上で精製し、次いで同じ酵素で事前に消化していたプラスミドpIVEX2.3MCS(C末端ポリヒスチジンタグ)及びpIVEX2.4d(N末端ポリヒスチジンタグ)中に挿入した。構築物の検証後、このように取得した6つの発現ベクター(pIV2.3N、pIV2.3S_C、pIV2.3S_L、pIV2.4N、pIV2.4S_C(pIV2.4S_Lとも呼ばれる)、pIV2.4S_L)を使用して、一方でインビトロでのタンパク質の発現を検査し、他方で細菌系統BL21(DE3)pDIA17(NOVAGEN)を形質転換した。これら構築物は、その予想分子量が以下:pIV2.3N(47174Da)、pIV2.3S_C(82897Da)、pIV2.3S_L(132056Da)、pIV2.4N(48996Da)、pIV2.4S_L(81076Da)及びpIV2.4SL(13387Da)であるタンパク質をコードする。pIV2.3Nで形質転換した細菌は、2003年10月23日に、番号I-3117でCNCMに寄託した。pIV2.4S_Lで形質転換した細菌は、2003年10月23日に、番号I-3118でCNCMに寄託した。

10

【0266】

2) インビトロ及びインビボでの組換えタンパク質の発現の分析

6つの組換えベクターからの組換えタンパク質の発現を、第1の例では、インビトロ系(RTS100、Roche)で検査した。RTS100系で30℃にて4時間の組換えベクターpIVEXのインキュベーション後にインビトロで産生したタンパク質を、ペルオキシダーゼにカップリングした抗(his)₆抗体を用いてウェスタンブロッティングにより分析した。インビトロ発現の結果(図1)は、Nタンパク質のみがポリヒスチジンタグの位置(N末端又はC末端)にかかわらず大量に発現されることを示す。第2の工程で、Nタンパク質及びSタンパク質の発現を、LB培地中、誘導剤(1mM IPTG)の存在下又は非存在下で30℃にて、インビボで検査した。Nタンパク質はこの細菌系では非常に良好に産生され(図2)、細菌の溶解後に主として可溶画分に見出される。対照的に、長いバージョンのS(S_L)は、非常に貧弱に産生され、完全に不溶性である(図3)。短いバージョン(S_C)もまた非常に弱い可溶性を示すが、発現レベルは、長いバージョンのレベルよりずっと高い。更に、C末端位でポリヒスチジンタグと融合した構築物S_Cは、予測されるものより小さいサイズを有する。抗ポリヒスチジン抗体での免疫検出実験は、この構築物が不完全であったことを示している。まとめると、2つの構築物pIV2.3N及びpIV2.4S_L(これらはそれぞれ、C末端ポリヒスチジンタグと融合した全体Nタンパク質及びN末端ポリヒスチジンタグと融合した短いSタンパク質を発現する)を、この2つのタンパク質を大量に産生して精製するために選択した。プラスミドpIV2.3N及びpIV2.4S_Lは、2003年10月23日に、それぞれNo.I-3117及びI-3118でCNCM(25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS 15)に寄託した。

20

30

【0267】

3) 組換えタンパク質の抗原活性の分析

Nタンパク質、S_Lタンパク質及びS_Cタンパク質の抗原活性を、SARS-CoVに感染した同じ患者から得た、SARS症状の発症後8日目(M12)及び29日目(M13)に収集した2つの血清サンプルを用いるウェスタンブロッティングにより検査した。実験プロトコルは実施例3に記載のとおりである。図4に示す結果は、(i)患者のセロコンバージョン、及び(ii)Nタンパク質が短いSタンパク質より高い抗原反応性を保有することを示す。

40

【0268】

4) pIV2.3NからのNタンパク質の精製

ベクターpIV2.3Nから産生したNタンパク質を精製するための幾つかの実験を、以下のプロトコルに従って行った。発現ベクターpIV2.3Nで形質転換した細菌BL21(DE3)pDIA17を、0.1mg/mlのアmpiシリンを含有する1リットルの培養培地中で30℃にて培養し、A₆₀₀ = 0.8に等しい細胞密度に到達したとき(約3時間)に1mM IPTGで誘導した。誘導剤の存在下での2時間の培養後、細胞を遠心分離(5000rpmにて10分間)により回収し、溶解緩衝液(50mM NaH₂PO₄、0.3M NaCl、20mMイミダゾール、pH 8、プロテアーゼ阻害剤の混合物Comp

50

lete(登録商標)(Roche)を含有)中に再懸濁し、French press(12,000psi)で溶解した。細菌溶解物の遠心分離(12,000rpmにて15分間)後、上清(50ml)を、溶解緩衝液で平衡化した金属キレートカラム(15ml)(Ni-NTA superflow、Qiagen)上で1ml/分の流量にて堆積させた。カラムを200mlの溶解緩衝液で洗浄後、Nタンパク質を10カラム容量のイミダゾール勾配(20→250mM)で溶出させた。Nタンパク質を含有する画分を集め、変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動に続くクーマシーブルーでの染色により分析した。図5に示す結果は、使用したプロトコルにより、非常に満足な均質性(95%)及び1リットルの培養物当たり15mgのタンパク質の平均収量でNタンパク質を精製することが可能になることを示す。

【0269】

5) pIV2.4S_C(pIV2.4S₁)からのS_Cタンパク質の精製

短いSタンパク質を精製するために従ったプロトコルは、上記のものとは非常に異なる。なぜなら、このタンパク質は、細菌系において高度に凝集するからである(封入体)。発現ベクターpIV2.4S₁で形質転換した細菌BL21(DE3)pDIA17を、0.1mg/mlのアンプシリンを含有する1リットルの培養培地中で30℃にて培養し、A₆₀₀ = 0.8に等しい細胞密度に到達したとき(約3時間)に1mM IPTGで誘導した。誘導剤の存在下での2時間の培養後、細胞を遠心分離(5000rpmにて10分間)により回収し、溶解緩衝液(0.1M Tris-HCl、1mM EDTA、pH7.5)中に再懸濁し、French press(12,000psi)で溶解した。細菌溶解物の遠心分離(12,000rpmにて15分間)後、ペレットを、2%Triton X100及び10mM β-メルカプトエタノールを含有する25mlの溶解緩衝液中に再懸濁し、次いで12,000rpmにて20分間遠心分離した。ペレットを、7M尿素を含有する10mM Tris-HCl緩衝液中に再懸濁し、室温にて30分間穏やかに攪拌した。7M尿素での封入体のこの最終洗浄は、凝集したS_Cタンパク質と共に沈降するE.coli膜タンパク質のほとんどを除去するために必要である。12,000rpmにて20分間の最後の遠心分離後、最終ペレットを10mM Tris-HCl緩衝液中に再懸濁する。この調製物の電気泳動分析(図6)により、短いSタンパク質は、封入体(不溶性抽出物)から満足する均質性(約90%)で精製され得ることが示される。

【0270】

実施例3：Nタンパク質の免疫優性

SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)により引き起こされた異型肺炎に罹患している患者の血清中に存在する抗体の、このウイルスの種々のタンパク質に対する反応性を、下記の条件下でのウェスタンブロッティングにより分析した。

1) 材料

a) SARS-CoVに感染した細胞の溶解物

Vero E6細胞(2×10^6)にSARS-CoV(番号FFM/MA104で記録した単離株)を 10^{-1} 又は 10^{-2} の感染多重度(M.O.I.)で感染させ、次いで5%CO₂を含有する雰囲気下で2%FCSを含有するDMEM培地中35℃にてインキュベートした。48時間後、細胞ローン(cellular lawn)をPBSで洗浄し、次いでLaemmliに従って調製したβ-メルカプトエタノールを含有する500μlのローディング緩衝液で溶解した。次いでサンプルを10分間煮沸し、次いで20秒間で3回超音波処理をした。

【0271】

b) 抗体

b₁) 異型肺炎に罹患している患者からの血清

National Reference Center for Influenza Viruses(Northern region)の参照によりNo.20033168で指称される血清は、症状の発症後38日目に収集したSARS-CoVにより引き起こされた異型肺炎に罹患しているフランス人患者からのものである；SARS-CoV感染の診断はネステッドRT-PCR及び定量PCRにより行った。

【0272】

b₂) Nタンパク質又はSタンパク質を指向する単一特異性ウサギポリクローナル血清

血清は、実施例4に記載の免疫プロトコルに従い、組換えのNタンパク質及びS_Cタンパク質(実施例2)で作成したものである；これらは、ウサギP13097血清(抗N血清)及びウサ

10

20

30

40

50

ギP11135血清(抗S血清)である。

【0273】

2) 方法

SARS-CoVに 10^{-1} 及び 10^{-2} のM.O.I.値で感染した細胞の20 μ lの溶解物、及びコントロールとして、非感染細胞の20 μ lの溶解物(mock)を、10%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いでニトロセルロース膜上に移した。PBS/5%ミルク/0.1%Tweenの溶液中でのブロッキング及びPBS/0.1%Tween中での洗浄後、この膜を、以下：(i)緩衝液PBS/1%BSA/0.1%Tween中で1/300、1/1000及び1/3000希釈した免疫血清No.20033168、(ii)同じ緩衝液中で1/50,000希釈したウサギP13097血清(抗N血清)、及び(iii)同じ緩衝液中で1/10,000希釈したウサギP11135血清(抗S血清)と一晩4℃にてハイブリダイズさせた。PBS/Tween中での洗浄後、ヒト免疫グロブリンGの重鎖及び軽鎖を指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたヒツジポリクローナル抗体(NA933V、Amersham)、又はウサギ免疫グロブリンGの重鎖及び軽鎖を指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたロバポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)のいずれかを用いて二次ハイブリダイゼーションを実施した。結合した抗体を、ECL+ kit(Amersham)及びHyperfilm MPオートラジオグラフィフィルム(Amersham)を用いて可視化した。分子量ラダー(kDa)を図に示す。

10

【0274】

3) 結果

図7は、見かけの分子量35、55及び200kDaの3つのポリペプチドが、SARS-CoVに感染した細胞の抽出物中で特異的に検出されることを示す。

20

これらポリペプチドを同定するために、2つの他のイムノブロット(図8)を同じサンプルについて同じ条件下で、核タンパク質Nに特異的なウサギポリクローナル抗体(ウサギP13097、図8A)及び針状タンパク質Sに特異的なウサギポリクローナル抗体(ウサギP11135、図8B)を用いて調製した。この実験により、200kDaポリペプチドがSARS-CoV針状糖タンパク質Sに相当し、55kDaポリペプチドが核タンパク質Nに相当し、35kDaポリペプチドはおそらくNの短縮形態又は分解形態を表すことが示される。

【0275】

したがって、図7に示すデータは、血清20033168がNと強力に反応し、SARS-CoV Sとは非常に弱くしか反応しないことを示す。なぜなら、35kDaポリペプチド及び55kDaポリペプチドは、1/300、1/1000及び1/3000の希釈率の免疫血清については強いバンドの形態で可視化される一方で、200kDaポリペプチドは、1/300の希釈率について弱く可視化されるのみであるからである。また、他のSARS-CoVポリペプチドは、1/300より高い希釈率の血清20033168に関しては検出されないことに気付く。

30

【0276】

この実験は、SARS-CoV Nに特異的な抗体応答がその他のSARS-CoVポリペプチドに特異的な抗体応答、特にS糖タンパク質を指向する抗体応答より優勢であることを示す。このことは、SARS-CoVへのヒト感染の間の核タンパク質Nの免疫優性を示す。

【0277】

実施例4：SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)のNタンパク質及びSタンパク質を指向する単一特異性ポリクローナル抗体の製造

40

1) 材料及び方法

3匹のウサギ(P13097、P13081、P13031)を、実施例2に記載のプロトコルに従って製造した核タンパク質(N)全体に対応する精製した組換えポリペプチドで免疫した。完全フロイントアジュバント中で乳化した、ウサギ当たり0.35mgのタンパク質の第1回目の注射(皮内経路)の後、動物に、不完全フロイントアジュバント中で乳化した0.35mgの組換えタンパク質を3週間の間隔で、次いで4週間の間隔で3回の追加免疫の注射をした。

【0278】

3匹のウサギ(P11135、P13042、P14001)を、実施例2に記載のように製造したSタンパク質の短いフラグメント(S_C)に対応する組換えポリペプチドで免疫した。このポリペプチドは、細菌の細胞質で封入体の形態で主として見出されるので、動物に、3～4週間の間

50

隔で、不完全フロイントアジュバント中で乳化した0.5mgの組換えタンパク質に対応する封入体の調製物を4回皮内注射した。最初の3回の注射は、実施例2に記載のプロトコルに従って製造した封入体の調製物で行い、4回目の注射は、実施例2に記載のプロトコルに従って製造し、次いでスクロース勾配で精製し、2% Triton X100中で洗浄した封入体の調製物で行った。

【0279】

各ウサギについて、免疫前(p.i.)血清を第1の免疫の前に調製し、免疫血清(I.S.)を第4の免疫の5週間後に調製した。

第1の例では、血清の反応性を、免疫に使用したものと同様な組換えタンパク質の調製物に対するELISA検査により分析した；ELISA検査を、実施例6に記載のプロトコルに従い、そこに記載の試薬を用いて行った。

第2の例では、血清の反応性を、実施例3に記載のプロトコルに従い、SARS-CoVに感染した細胞の溶解物のイムノブロット(ウェスタンブロット)を作成することにより分析した。

【0280】

2) 結果

ELISA検査(図9)は、組換えNタンパク質の調製物及びSタンパク質の短いフラグメント(S_C)の封入体の調製物が動物において免疫原性であること、及び免疫血清の力価が高い(1/25,000より高い)ことを証明する。

【0281】

イムノブロット(図8)は、ウサギP13097免疫血清がSARS-CoVに感染した細胞の溶解物中に存在する2つのポリペプチドを認識することを示す：見かけの分子量(実験に基づいて50~55kDa)が核タンパク質Nのもの(422残基、予想分子量46kDa)に匹敵するポリペプチド、及びおそらくNの短縮されたか又は分解された形態を表す35kDaのポリペプチド。

【0282】

この実験はまた、ウサギP11135血清が、主に、見かけの分子量(実験に基づいて180~220kDa)がグリコシル化形態のS(1255残基、139kDaの非グリコシル化ポリペプチド鎖)に匹敵するポリペプチド、及びおそらく短縮された形態及び/又は非グリコシル化形態のSを表すより軽いポリペプチドを認識することを示す。

【0283】

まとめると、これら全ての実験は、E.coli中で発現され、SARS-CoVのNタンパク質及びSタンパク質に相当する組換えポリペプチドにより、動物において、これらタンパク質の天然型形態を認識し得るポリクローナル抗体を誘導することが可能になることを証明する。

【0284】

実施例5：SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)のMタンパク質及びEタンパク質を指向する単一特異性ポリクローナル抗体の調製

1) Mタンパク質及びEタンパク質の構造の分析

a) Eタンパク質

SARS-CoV Eタンパク質(76アミノ酸)の構造を、種々のソフトウェアパッケージ、例えばsignalP v1.1、NetNGlyc 1.0、THMM 1.0及び2.0(Kroghら、2001, J. Mol. Biol., 305(3):567-580)、或いはTOPPED(von Heijne、1992, J. Mol. Biol. 225, 487-494)を用いてコンピュータで分析した。分析により、この非グリコシル化ポリペプチドは、単一膜貫通ヘリックス(THMMに従うaa12~34)を含有し、そこで親水性ドメイン(42残基)の大部分がC末端部、おそらくウイルス粒子内部(エンドドメイン)に位置するタイプ1膜タンパク質であることが示される。THMMソフトウェアのバージョン1.0(N-terは外部)及びバージョン2.0(N-terは内部)により予測されるトポロジーは正反対であるが、他のアルゴリズム、特にTOPPED及びTHUMBUP(Zhou et Zhou、2003, Protein Science 12:1547-1555)は、EのN末端部の外部配置を確認することに気付く。

【0285】

b) Mタンパク質

SARS-CoV Mタンパク質(221アミノ酸)で行った同様な分析は、このポリペプチドがシグナルペプチド(ソフトウェアsignalP v1.1による)を保有しないが、3つの膜貫通ドメイン(THMM2.0により残基15~37、50~72、77~99)及びウイルス粒子内部に位置する大きな親水性ドメイン(aa100~221)(エンドドメイン)を保有することを示す。これは、おそらく4位(NetNGlyc 1.0による)のアスパラギンでグリコシル化されている。

【0286】

このように、他のコロナウイルスについての既知の実験データと一致して、2つのMタンパク質及びEタンパク質が、このポリペプチドの大部分に相当するエンドドメインを示し、エクトドメインはサイズが非常に小さいことは驚くべきことである。

— Eのエクトドメインは、おそらく、このタンパク質の残基1~11又は1~12に相当する：MYSFVSEETGT(L)、配列番号70。確かに、残基12が膜貫通配置に関係する確率は中程度である(THMM 2.0により0.56)。

— Mのエクトドメインは、おそらく、このタンパク質の残基2~14に相当する：ADNGTITVEELKQ、配列番号69。確かに、MのN末端メチオニンは非常に高い確率で成熟ポリペプチドから切断される。なぜなら、2位の残基はアラニンであるからである(Varshavsky、1996、93:12142-12149)。

【0287】

更に、Eタンパク質の疎水性分析(Kyte & Doolittle、Hopp & Woods)は、EのエンドドメインのC末端部は親水性であり、したがっておそらくこのドメインの表面に露出していることを証明する。したがって、この末端部に相当する合成ペプチドは、動物において、Eのエンドドメインを指向する抗体を誘導するために、良好な免疫原性の候補物である。この結果、EのC末端の24残基に相当するペプチドを合成した。

【0288】

2) Mタンパク質及びEタンパク質のエクトドメインを指向する抗体及びEタンパク質のエンドドメインを指向する抗体の製造

ペプチドM2-14(ADNGTITVEELKQ、配列番号69)、E1-12(MYSFVSEETGTL、配列番号70)及びE53-76(KPTVYVYSRV KNLNSSEGV DLLV、配列番号71)をNeosystemにより合成した。これらを、MBS(m-マレイミド-ベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を用いてKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)と、ペプチドのN末端(E53-76の場合)又はC末端(M2-14及びE1-12の場合)のいずれかで、合成の間に付加したシステインを介してカップリングした。

【0289】

2匹のウサギを、以下の免疫プロトコルに従って、各々の接合体を用いて免疫した：完全フロイントアジュバント中に乳化した、KLHにカップリングした0.5mgのペプチドの最初の注射(皮内経路)後、動物に3又は4週間の間隔で、不完全フロイントアジュバント中に乳化したKLHにカップリングした0.5mgのペプチドの2~4のブースター注射をする。

【0290】

各ウサギについて、免疫前(p.i.)血清を第1の免疫の前に調製し、免疫血清(I.S.)をブースター注射の3~5週間後に調製した。

【0291】

血清の反応性を、SARS-CoVに感染した細胞の抽出物(図43B)、又はSARS-CoV 031589単離株のタンパク質E若しくはMを発現する組換えワクシニアウイルス(VV-TG-E又はVV-TN-M)に感染した細胞の抽出物(図43A又は図43C)を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

【0292】

接合体KLH-E53-76で免疫したウサギ22234及び22240の免疫血清は、SARS-CoVに感染した細胞の抽出物中に存在するが非感染細胞の抽出物には存在しない約9~10kDのポリペプチドを認識する(図43B)。このポリペプチドの見かけの分子量は、Eタンパク質の予測される分子量8.4kDに匹敵する。同様に、接合体KLH-E1-12で免疫したウサギ20047の免疫血清

は、VV-TG-Eウイルスに感染した細胞の抽出物中に存在するポリペプチドを認識する。そのポリペプチドの見かけの分子量は、Eタンパク質のものに匹敵する(図43A)。

【0293】

接合体KLH-M2-14で免疫したウサギ20013及び20080の免疫血清は、VV-TN-Mウイルスに感染した細胞の抽出物中に存在するポリペプチドを認識する(図43C)。そのポリペプチドの見かけの分子量(約18kD)は、25.1kDであり高等電点(裸のポリペプチドに関して9.1)を有する糖タンパク質Mのものに匹敵する。

【0294】

これら結果は、一方でペプチドE1-12及びE53-76により、他方でペプチドM2-14により、動物において、それぞれSARS-CoVのEタンパク質及びMタンパク質の天然型形態を認識し得るポリクローナル抗体を誘導することが可能となることを証明する。

【0295】

実施例6：SARSに罹患している患者からの血清に対する組換えNタンパク質のELISA反応性の分析

1) 材料

固相の調製に使用した抗原は、実施例2に記載のプロトコルに従って調製した精製した組換え核タンパク質Nである。

検査すべき血清(表IV)を、SARS-CoVに感染した細胞に対する免疫蛍光(IF-SARS力価)による反応性の分析結果に基づいて選択した。

【0296】

【表7】

表IV: ELISAにより検査した血清

参照	血清No.	血清の型	血清の日付***	IF-SRAS 力価
3050	A	コントロール	na*	nt**
3048	B	コントロール	na	nt
033168	D	患者1- SRAS	27/04/03 (J38)	320
033397	E	患者-1 SRAS	11/05/03 (J52)	320
032632	F	患者-2 SRAS	21/03/03 (J17)	2500
032791	G	患者-3 SRAS	04/04/03 (J3)	<40
033258	H	患者-3 SRAS	28/04/03 (J27)	160

*na：適用なし。 **nt：検査せず。 ***：示された日にちは、SARS症状の発症後の日数に対応。

【0297】

2) 方法

0.1M炭酸塩緩衝液(pH9.6)中に種々の濃度(1、2又は4 µg/ml)で希釈したNタンパク質(100 µl)をELISAプレートのウェルに分配し、次いでプレートを一晚実験室温度でインキュベートする。プレートをPBS-スキムミルク-スクロース(5%)緩衝液で飽和したPBS-Tween緩衝液で洗浄する。予め希釈(1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600及び1/3200)した検査血清(100 µl)を加え、次いでプレートを1時間37℃にてインキュベートする。3回の洗浄後、1/18,000希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG接合体(参照209-035-098、JACKSON)を加え、次いでプレートを1時間37℃にてインキュベートする。4回の洗浄後、色素原(TMB)及び基質(H₂O₂)を加え、プレートを、遮光して30分間室温でインキュベートする。次いで、反応を停止し、その後450nmの吸光度を自動化リーダーを用いて測定する。

【0298】

3) 結果

ELISA検査(図10)は、組換えNタンパク質調製物が感染の後期(症状の発症の17日以上後)に収集したSARSに罹患している患者からの血清の抗体に特異的に認識される一方、感染の初期(症状の発症の3日後)に収集した患者の血清の抗体にも、SARSに罹患していない患

者からのコントロール血清にも有意には認識されないことを証明する。

【0299】

実施例7：患者の血清からのSARS関連コロナウイルス感染の非常に特異的で高感度な検出のために準備したELISA検査

1) 間接ELISA IgG検査

a) 試薬

プレートの調製

プレートを、10mM PBS緩衝液(pH7.2)中 2 μ g/mlのNタンパク質の溶液、0.25ml/lのフェノールレッドで感作する。100 μ lの溶液をウェル中に堆積し、放置して室温で一晩インキュベートする。10mM PBS/0.1%Tween緩衝液中で予備洗浄し、続いて飽和溶液PBS、25% 10

【0300】

血清希釈剤

緩衝液0.48g/l TRIS、10mM PBS、3.7g/l EDTA、15%v/vミルク、pH6.7

接合体希釈剤

クエン酸緩衝液(15g/l)、0.5%Tween、25%ウシ血清、12%NaCl、6 %v/vスキムミルク pH6.5

接合体

50×抗ヒトIgG接合体(Bio-Radより市販：Platelia H. pylori kit ref 72778)

他の溶液：

洗浄溶液R2、TMBを含む可視化用溶液R8、希釈剤、R9色素原、R10停止溶液：Bio-Radより市販されている試薬(例えば：Platelia pylori kit、ref 72778)

【0301】

b) 手順

血清をサンプル希釈剤中に 1 /200に希釈する

100 μ l/ウェルで分配する

37℃にて1時間のインキュベーション

脱塩水に予め10倍に希釈した10×洗浄溶液R2(すなわち 1 ×洗浄溶液)中での3回の洗浄

100 μ lの接合体(提供された接合体希釈剤中で50×接合体を使用直前に希釈)を分配

37℃にて1時間のインキュベーション 30

1 ×洗浄溶液中での4回の洗浄

200 μ l/ウェルの可視化溶液(使用直前に希釈、例えば10mlのR8中に1 mlのR9)を分配

暗所で、室温にて30分間のインキュベーション

100 μ l/ウェルのR10で反応を停止

450/620nmでの読み取り

結果は、検査された血清を陽性とみなす応答を超える応答を与える閾値血清を採用することにより解釈することができる。この血清は、バックグラウンドノイズより有意に高いシグナルを与えるように選択され、希釈される。

【0302】

2) 二重エピトープELISA検査 40

a) 試薬

プレートの調製

プレートを、10mM PBS緩衝液(pH7.2)中 1 μ g/mlのNタンパク質の溶液、0.25ml/lのフェノールレッドで感作する。100 μ lの溶液をウェル中に堆積し、放置して室温で一晩インキュベートする。10mM PBS/0.1%Tween緩衝液中で予備洗浄し、続いて飽和溶液10mM PBS、25%(V/V)ミルクで洗浄することによって、飽和を得る。

【0303】

血清及び接合体の希釈剤

緩衝液50mM TRIS生理食塩水、pH 8、2 %ミルク

接合体 50

これは、Nakaneのプロトコル(Nakane P.K. and Kawaoi A. ; (1974) : Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol.22, N) 23, pp.1084-1091)に従い、それぞれのモル比 2 / 1 で、ペルオキシダーゼにカップリングした精製した組換えNタンパク質である。このProtN POD接合体は、血清/接合体希釈剤中 2 μ g/mlの濃度で使用する。

【0304】

他の溶液：

洗浄溶液R2、TMBを含む可視化用溶液R8、希釈剤、R9色素原、R10停止溶液：Bio-Radより市販されている試薬(例えば：Platelia pylori kit、ref 72778)

【0305】

10

b) 手順

「予備希釈」プレートにおける第1工程

- ・ 各血清を予備希釈プレート中で 1 / 5 に希釈(48 μ lの希釈剤+12 μ lの血清)。
- ・ 全ての血清を希釈後、60 μ lの接合体を分配。
- ・ 適切な場合には、血清+接合体ミックスを放置してインキュベートする。

「反応」プレートにおける第2工程

- ・ 100 μ lの混合物/ウェルを反応プレート中に移す
- ・ 37℃にて1時間のインキュベーション
- ・ 予め脱塩水中で10倍に希釈した10×洗浄溶液R2(→ 1×洗浄溶液)中での5回の洗浄
- ・ 200 μ l/ウェルの可視化溶液(使用直前に希釈、例えば10mlのR8中に1mlのR9)を分配
- ・ 遮光し、室温にて30分間のインキュベーション
- ・ 100 μ l/ウェルのR10で反応を停止
- ・ 450/620nmでの読み取り

20

【0306】

間接ELISA検査についてと同様に、結果は「閾値」血清を用いて解釈することができる。閾値血清より大きな応答を有する血清を陽性とみなす。

【0307】

2) 結果

ハノイ(ベトナム)のフランス病院(French hospital of Hanoi)からの、又はハノイのフランス病院に関連して(JYK)、SARSの可能性が高い症例として分類された患者の血清を、

30

間接IgG-N検査及び二重エピトープN検査を使用して分析した。

【0308】

間接IgG-N検査(図14及び15)及び二重エピトープN検査(図16及び17)の結果は、これら検査とSARS-CoVに感染したか又は感染していないVeroE6細胞の溶解物に対する血清の反応性を比較する間接ELISA検査(ELISA-SARS-CoV溶解物；下記の表Vを参照)との間の格別良好な相関を示す。症状の発症の12日後又はそれ以上後に収集した全ての血清は、陽性であることが分かった(おそらくサンプルが感染の非常に後期($\geq$ D12)に収集されたために、呼吸器サンプルをRT-PCRにより分析することによっては、SARS-CoVウイルス感染を証拠付けることができなかった患者が含まれている)。D7に収集された鼻サンプルがRT-PCRにより陰性であるとされた患者TTHの症例では、サンプルの質が問題であるかもしれない。

40

【0309】

陰性であるとされたが、SARS-CoVの存在がRT-PCRにより検出された血清もあった。これらは、全ての症例で、症状の発症後10日未満で収集された初期血清である(例えば：血清#032637)。患者PTTH(血清#032673)の症例では、サンプルが収集された時点で初めてSARSの疑いが生じた。

【0310】

まとめると、間接IgG-N検査及びN-二重エピトープ血清学的検査により、全ての患者で、感染の12日又はそれ以上後に収集された血清に関してSARS-CoV感染を証拠付けることが可能になる。

【0311】

50

【表 8】

表V: ELISA検査の結果

サンプル 番号	患者	日	PCR-SARS (1)	ELISA 溶解物 SRAS- CoV (2)	IgG-N (第2シリーズ)	2Xエピトープ (第2シリーズ)
033168	JYK	38	POS	+++	>5000	NT
033597	JYK	74	POS	NT	≈ 5000	NT
032552	VTT	8	NEG- J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032544	CTP	16	NEG J16&J20	++	>5000	>>20
032546	CJF	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032548	PTL	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032550	NTH	17	NEG-J17&J21	++	>5000	>>20
032553	VTT	8	NEG- J3&J8&J12	NEG	<200	<5
032554	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032555	NTBV	4	POS	NEG	<200	
032564	NTP	15	POS	++	>5000	>>20
032629	NVH	4	POS	NEG	<200	<5
032631	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5
032635	NHH	4	POS	NEG	<200	<5
032637	NHB	10	POS	NEG	<200	<5
032642	BTTX	9	POS	NEG	<200	<5

【表 9】

032643	LTDH	1	POS	NEG	<200	<5
032644	NTBV	4	POS	NEG	<200	<5
032646	TTH	12	NEG J7&J12&J16	++	>5000	>>20
032647	DTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032648	NNT	15	NEG J15&J19	++	>5000	>>20
032649	PTH	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032672	LVV	16	NEG J16&J20	+	>5000	>>20
032673	PTTH	NA	NEG	NEG	<200	<5
032674	PNB	17	NEG J17&J21	++	>5000	>>20
032682	VTH	12	NEG J12&J16	++	>5000	>>20
032683	DTV	17	NEG J17&J21	+	>1000	>>20

【0312】

備考:

(1): 鼻スワブ又は咽頭スワブについてネステッドRT-PCR BNI、LC Artus及びLC-NによりRT-PCR分析を行った; POSは、少なくとも1つのサンプルがこの患者において陽性であるとされたことを意味する。

(2): SARS-CoVに感染した細胞の溶解物を用いるELISA検査における血清の反応性は、検査した希釈率で得られたOD値に従って、非常に高い反応性(+++)、高い反応性(++)、反応性(+)及び陰性と分類された。

【0313】

10

20

30

40

50

実施例 8 : RT-PCRによるSARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)の検出

1) スクレオキャプシドタンパク質の遺伝子に特異的なプライマーを用いるリアルタイム RT-PCR条件の開発 — 「Light Cycler N」検査

a) プライマー及びプローブの設計

プライマー及びプローブを、番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノム配列から、プログラム「Light Cycler Probe Design(Roche)」を用いて設計した。したがって、以下の2つのシリーズのプライマー及びプローブを選択した：

【0314】

- シリーズ 1 (配列番号60、61、64、65)：
- センスプライマー：N/+ /28507：5'-GGC ATC GTA TGG GTT G-3' [28507～28522]
- アンチセンスプライマー：N/- /28774：5'-CAG TTT CAC CAC CTC C-3' [28774～28759]
- プローブ 1：5'-GGC ACC CGC AAT CCT AAT AAC AAT GC-フルオレセイン 3' [28561～28586]
- プローブ 2：5' Red705-GCC ACC GTG CTA CAA CTT CCT-ホスフェート [28588～28608]

10

【0315】

- シリーズ 2 (配列番号62、63、66、67)
- センスプライマー：N/+ /28375：5'-GGC TAC TAC CGA AGA G-3' [28375～28390]
- アンチセンスプライマー：N/- /28702：5'-AAT TAC CGC GAC TAC G 3' [28702～28687]
- プローブ 1：SARS/N/FL：5'-ATA CAC CCA AAG ACC ACA TTG GC-フルオレセイン 3' [28541～28563]
- プローブ 2：SARS/N/LC705：5' Red705-CCC GCA ATC CTA ATA ACA ATG CTG C-ホスフェート 3' [28565～28589]

20

【0316】

b) 2つのプライマー対の効力の分析

2つのプライマー対のそれぞれの効力を検査するため、番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムのヌクレオチド28054～29430に相当し、N遺伝子の配列を含有する合成RNAに対してRT-PCR増幅を行った。

30

より具体的には：

【0317】

この合成RNAを、T7ファージRNAポリメラーゼ、酵素Bam H1でのプラスミドSRAS-Nの線状化により取得したDNA鋳型を用いるインビトロ転写により調製した。DNase 1を用いる消化によりDNA鋳型を排除した後、フェノールクロロホルム抽出、続いて酢酸アンモニウム及びイソプロパノール中での2連続の沈降により合成RNAを精製する。次いで、これらを260nmでの吸光度を測定することにより定量し、それらの質を260nm及び280nmの吸光度の比並びにアガロースゲル電気泳動により確認した。こうして、これらの研究に使用する合成RNA調製物の濃度は1.6mg/mlであり、これは 2.1×10^{15} コピー/mlのRNAに相当する。

【0318】

40

「Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum(登録商標) Taq」キット並びにプライマー対No.1(N/+ /28507、N/- /28774)(図11A)及びNo.2(N/+ /28375、N/- /28702)(図11B)を供給業者の指示に従って用いて漸減量の合成RNAをRT-PCRにより増幅した。使用した増幅条件は以下である：cDNAを45℃にて30分間、55℃にて15分間、次いで94℃にて2分間のインキュベーションにより合成し、次いでこれを以下によって増幅した：94℃にて15秒間の変性工程と、45℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて30秒間の伸長工程とを含んでなる5サイクル、続いて、94℃にて15秒間の変性工程と、55℃にて30秒間のアニーリング工程と、次いで72℃にて30秒間の伸長工程(各サイクルに2秒間の追加の伸長を伴う)とを含んでなる35サイクル、及び72℃にて5分間の最終の伸長工程。得られた増幅産物を次いで10℃に維持した。

50

【0319】

図11に示した結果は、プライマー対No.2(N+/28375、N-/28702)により、プライマー対No.1(N+/28507、N-/28774)の 10^4 コピーに対して、10コピーまでのRNA(弱い輝度のバンド)又は 10^2 コピー(良好な輝度のバンド)を検出することが可能になることを示す。アンプリコンはそれぞれ268bp(対1)及び328bp(対2)である。

【0320】

c) リアルタイムRT-PCRの開発

プライマー対No.2並びにSRAS/N/FL及びSRAS/N/LC705からなる一対のプロープを用いて、リアルタイムRT-PCRを開発した(図12)。

【0321】

「Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes」キット(reference 2015 145、Roche)を用い、LightCyclerTM (Roche)で、以下の最適化された条件で増幅を行った。 H_2O (6.8 μ l)と、25mM $MgCl_2$ (0.8 μ l、4 μ M Mg^{2+} 最終)と、5 $\times$ 反応混合物(4 μ l)と、3 μ MプロープSRAS/N/FL(0.5 μ l、0.075 μ M最終)と、3 μ MプロープSRAS/N/LC705(0.5 μ l、0.075 μ M最終)と、10 μ MプライマーN+/28375(1 μ l、0.5 μ M最終)と、10 μ MプライマーN-/28702(1 μ l、0.5 μ M最終)と、酵素混合物(0.4 μ l)と、サンプル(ウイルスRNA、5 μ l)とを含有する反応混合物を、以下のプログラムに従って増幅した：

【0322】

- 逆転写：50℃ 10:00分間 分析モード：none
- 変性：95℃ 30秒間 $\times$ 1 分析モード：none
- 増幅：95℃ 2秒間]
50℃ 15秒間 分析モード：quantification*] $\times$ 45
72℃ 13秒間 熱ランプ 2.0℃/秒]
- アニールリング： 40℃ 30秒間 $\times$ 1 分析モード：none

* 蛍光は、アニールリングの終了時及び各サイクルに測定する(SINGLEモードで)。

【0323】

図12に示す結果は、このリアルタイムRT-PCRにより、分析した5サンプルの100%(8つの実験で29/29サンプル)で 10^2 コピーの合成RNAを、分析した5サンプルの100%(8つの実験で40/45サンプル)で10コピーまでのRNAを検出することが可能になるので、このリアルタイムRT-PCRが非常に高感度であることを示す。結果はまた、このRT-PCRにより、サンプル中のSARS-CoVゲノムの存在を検出することが可能になり、存在するゲノムの数を定量することが可能になることを示す。例として、Vero E6細胞上で培養したSARS-CoVストックのウイルスRNAを、「Qiaamp viral RNA extraction」キット(Qiagen)を用いて抽出し、 0.05×10^{-14} に希釈し、上記に記載のプロトコルに従ってリアルタイムRT-PCRにより分析した；図12に示す分析は、この値は、ウイルスストックが 6.5×10^9 ゲノム等価物/ml(geq/ml)を含有していることを示す、これはArtusより市販されている「RealArtTM HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents」キットを用いて測定した値 1.0×10^{10} geq/mlに全く類似している。

【0324】

2) RNAポリメラーゼの遺伝子を標的とするネステッドRT-PCR条件の開発 — 「CDC(Centers for Disease Control and Prevention)/IPネステッドRT-PCR」検査

a) ウイルスRNAの抽出

臨床サンプル：製造業者の指示に従いQIAamp viral RNA Mini kit(QIAGEN)、又は等価の技法。RNAを60 μ lの容量で溶出させる。

【0325】

b) 「SNE/SAR」ネステッドRT-PCR

第1工程：「SNE」カップルドRT-PCR

Invitrogenの「SuperscriptTM One-Step RT-PCR with Platinum(登録商標)Taq」キットを使用した、Roche Boehringerの「Titan」キットも同様な結果を伴って適切に使用可能である。

10

20

30

40

50

【0326】

オリゴヌクレオチド：

- － SNE-S1 5' GGT TGG GAT TAT CCA AAA TGT GA 5'
 - － SNE-AS1 5' GCA TCA TCA GAA AGA ATC ATC ATG 5'
- 予想サイズ：440bp

【0327】

1. 以下のミックスを調製：

H ₂ O	6.5 μl
反応ミックス 2×	12.5 μl
オリゴSNE-S1 50 μM	0.2 μl
オリゴSNE-AS1 50 μM	0.2 μl
RNasin 40U/μl	0.12 μl
RT/Platinum Taqミックス	0.5 μl

10

【0328】

2. 20 μlのミックスに、5 μlのRNAを加え、サーモサイクラーで増幅を行う(ABI 9600条件)：

- 2.1 45°C 30分間
 - 55°C 15分間
 - 94°C 2分間
 - 2.2. 94°C 15秒間]
 - 45°C 30秒間] × 5 サイクル
 - 72°C 30秒間]
 - 2.3. 94°C 15秒間]
 - 55°C 30秒間] × 35 サイクル
 - 72°C 30秒間 + 2 秒間/サイクル]
 - 2.4. 72°C 5分間
 - 2.5. 10°C ∞
- + 4 °Cで貯蔵

20

【0329】

PromegaのRNasin(N2511/N2515)をRNase阻害剤として使用した。

30

合成RNAは陽性コントロールとして働いた。コントロールとして、10³、10²及びa10コピーの合成RNA R_{SNE}を各実験で増幅した。

【0330】

第2工程：「SAR」ネステッドPCR

オリゴヌクレオチド：

- － SAR1-S 5' CCT CTC TTG TTC TTG CTC GCA 3'
 - － SAR1-AS 5' TAT AGT GAG CCG CCA CAC ATG 3'
- 予想サイズ：121bp

【0331】

1. 以下のミックスを調製：

40

H ₂ O	35.8 μl
Taq緩衝液 10×	5 μl
MgCl ₂ 25mM	4 μl
ミックスdNTPs 5 mM	2 μl
オリゴSAR1-S 50 μM	0.5 μl
オリゴSAR1-AS 50 μM	0.5 μl
Taq DNA pol 5 U/μl	0.25 μl

Applied BiosystemsのAmpliTaq DNA Polを使用した(MgCl₂を含まない10×緩衝液、ref 27 216601)。

【0332】

50

2. 48 μ l のミックスに、第 1 の PCR の産物 2 μ l を加え、増幅を行う (ABI 9600 条件) :

- 2.1. 94°C 2 分間
- 2.2. 94°C 30 秒間]
- 45°C 45 秒間] $\times$ 5 サイクル
- 72°C 30 秒間]
- 2.3. 94°C 30 秒間]
- 55°C 30 秒間] $\times$ 35 サイクル
- 72°C 30 秒間 + 1 秒間/サイクル]
- 2.4. 72°C 5 分間
- 2.5. 10°C ∞

10

【0333】

3. 3% アガロースを含有する「low-melting」ゲル (Seakem GTG タイプ) 上で 10 μ l の反応産物を分析する

ネステッド検査の感度は、通常、記載した条件下で 10 コピーの RNA である。

4. 次いで、オリゴ SAR1-S 及び SAR1-AS を用いて、フラグメントを QIAquick PCR kit (QIAGEN) で精製し配列決定することができる。

【0334】

3) 呼吸器サンプルからの PCR による SARS-CoV RNA の検出

a) 第 1 の比較研究

National Reference Center for the Influenza Virus (Northern region) が受け取り、SARS-CoV を含有する可能性が高い一連の呼吸器サンプルについて比較研究を行った。これを行うために、「Qiaamp viral RNA extraction」キット (Qiagen) を用いてサンプルから RNA を抽出し、一方で No.2 シリーズのプライマー対及びプローブを上記の条件下で用い、他方で Roche により市販されているキット「LightCycler SARS-CoV quantification kit」(reference 03 604 438) を用いるリアルタイム RT-PCR により分析した。結果を下記の表 VI にまとめる。結果は、2 つのキットについて 26 サンプル中 18 サンプルが陰性であり、26 サンプル中 5 サンプルが陽性である一方で、1 つのサンプルが Roche のキットのみで、2 つが「シリーズ 2」N 試薬のみで陽性であることを示す。加えて、3 つのサンプル (20032701、20032712、20032714) について、検出した RNA の量は、No.2 シリーズの試薬 (プローブ及びプライマー) で、驚く程より高い。これらの結果は、「シリーズ 2」N プライマー及び

20

30

【0335】

表 VI : No.2 シリーズ (「シリーズ 2」N) のプライマー対及びプローブ、又はキット「Lightcycler SARS-CoV quantification kit」(Roche) を用いた、5 人の患者からの一連のサンプルから抽出した RNA のリアルタイム RT-PCR 分析。サンプルの型及び 2 回の検査の各々で測定されたウイルスゲノムのコピー数を示す。NEG : 陰性 RT-PCR。

【表 10】

サンプルNo.	患者	サンプルの型	ROCHEキット	「シリーズ2」N
20033082	K	鼻	NEG	NEG
20033083	K	咽頭	NEG	NEG
20033086	K	鼻	NEG	NEG
20033087	K	咽頭	NEG	NEG
20032802	M	鼻	NEG	NEG
20032803	M	痰	NEG	NEG
20032806	M	鼻又は咽頭	NEG	NEG
20031746ARN2	C	咽頭	NEG	NEG
20032711	C	鼻又は咽頭	39	NEG
20032910	B	鼻	NEG	NEG
20032911	B	咽頭	NEG	NEG
20033356	V	痰	NEG	NEG
20033357	V	痰	NEG	NEG
20031725	K	気管内吸引	NEG	150
20032657	K	気管内吸引	NEG	NEG
20032698	K	気管内吸引	NEG	NEG
20032720	K	気管内吸引	3	5
20033074	K	大便	115	257
20032701	M	咽頭	443	1676
20032702	M	痰	NEG	249
20031747ARN2	C	咽頭	NEG	NEG
20032712	C	不明	634	6914
20032714	C	咽頭	17	223
20032800	B	鼻	NEG	NEG
20033353	V	鼻	NEG	NEG
20033384	V	鼻	NEG	NEG

10

20

【0336】

b) 第2の比較研究

次いで、種々のネステッドRT-PCR法及びリアルタイムRT-PCR法の性能を、ハノイ(ベトナム)のフランス病院でSARSの可能性のある症例から症状の発症後4日目～17日目に採取した121の呼吸器サンプルについて比較した。これらサンプルのうち、14サンプルが、Bernhard Nocht Instituteにより最初に記載されたORF1b(レプリカーゼをコードする)を標的にするネステッドRT-PCR法(BNIネステッドRT-PCR)を用いる第1の検査の間に陽性であるとされた。この検査に関連する情報は、インターネット上(アドレスhttp://www15.bni-hamburg.de/bni2/neu2/getfile.acgi?area_engl=diagnostics&pid=4112)で入手可能である。

30

【0337】

この研究において比較した種々の検査は：

- － 上記の「シリーズ2」Nプライマー及びプローブを用いる、本発明による定量RT-PCR法(LightCycler Nの列)、
- － CDC、BNI及びInstitut Pasteurにより開発された、上記のRNAポリメラーゼ遺伝子を標的とするネステッドRT-PCR検査(CDC/IPネステッドRT-PCR)、
- － 「HPA Corona LC RT-PCR kit #5601-02」で参照されるARTUSキット(これはORF1b遺伝子を標的とするリアルタイムRT-PCR検査である)、
- － BNIネステッドRT-PCR検査(これもまた上記のRNAポリメラーゼ遺伝子を標的する)。

40

【0338】

本発明者らは以下を観察した：

- 1) 繰り返しの解凍の間のRNA調製物(特に最低量のRNAを含有するサンプルについて)の分解に関連する同じ技法の検査間のバラツキ、
- 2) BNIネステッドRT-PCRと比較したCDC/IPネステッドRT-PCRの減少した感度、及び
- 3) Artus LightCycler(LC)検査と比較した本発明による定量RT-PCR検査(LightCycler N)の匹敵する感度。

【0339】

50

下記の表VIIに示すこれら結果は、本発明による定量RT-PCR検査が現在利用可能な検査に対する格別良好な付加を構成するか、又は現在利用可能な検査の代替を構成することを示す。確かに、SARS関連コロナウイルスは、急速に変化し得る新出のウイルスである。特に、SARS関連コロナウイルスのRNAポリメラーゼ遺伝子(これが現在利用可能な検査のほとんどで標的とされている)は、SARSに関連しない他のコロナウイルスのものと組換えが可能である。この遺伝子を標的とする検査の使用は、絶対的に、擬陰性が生じることを導き得る。

【0340】

本発明による定量RT-PCR検査は、Nタンパク質をコードする遺伝子を標的とするので、ARTUSキットと同じゲノム領域を標的としない。SARS関連コロナウイルスの2つの異なる遺伝子を標的とする診断検査を実施することにより、ウイルスの遺伝的進化に起因し得る擬陰性タイプの結果を避けられると期待できる。

【0341】

更に、ヌクレオキャプシドタンパク質の遺伝子を標的とすることは特に有利であるようである。なぜなら、この遺伝子は、このタンパク質に関する高い構造的制約に関連する高い選択圧のために非常に安定であるからである。

【0342】

表VII：ハノイ(ベトナム)のフランス病院でのSARSの可能性が高い症例(2003年の流行)の121サンプルからの遺伝子増幅による種々の分析方法の比較。

【表11】

CNR No.	サンプル型 (1)	サンプル収集日	患者	CDC/IP ネステッド RT-PCR	BNI ネステッド RT-PCR	Artus Light Cycler キット	Light Cycler N (IP)
107サンプル	N 及び P			陰性	陰性	陰性	陰性
032529	P	10	NHB	陰性	陽性	陰性	陰性
032530	N	10	NHB	陽性	陽性	3,10E+01	4,20E+01
032531	P	7	LP	陽性	陽性	7,70E+00	3,10E+00
032534	N	15	BND	陽性	陽性	1,60E+00	陰性
032600	P	4	NHH	陰性	陽性	陰性	1,30E+02
032612	P	17	NTS	陰性	陽性	陰性	陰性
032688	P	9	BTX	陽性	陽性	陰性	陰性
032689	N	4	NVH	陽性	陽性	1,20E+01	2,30E+02
032690	P	4	NVH	陰性	陽性	1,60E+00	陰性
032727	P	8	NVH	陽性	陽性	2,30E+02	4,00E+02
032728	N	8	NVH	陽性	陽性	1,10E+03	1,60E+04
032729	P	14	NHB	陽性	陽性	5,90E+00	3,40E+01
032730	N	14	NHB	陽性	陽性	1,30E+02	4,80E+02
032741	P	8	NHH	陽性	陽性	2,10E+02	1,30E+02
陽性				10	14	10	9
14の陽性から検出した割合				71,4%	100,0%	71,4%	64,3%

(1) P = 咽頭スワブ

N = 鼻スワブ

【0343】

実施例9：Nタンパク質を指向するモノクローナル抗体の産生及び特徴付け

Balb Cマウスを精製した組換えNタンパク質で免疫し、Kohler and Milsteinの技法に従い、脾臓細胞を適切なマウスミエローマと融合させた。

抗N抗体を分泌する19のハイブリドーマを予備選択し、それらの免疫反応性を決定した。これら抗体は確かに、種々の強度で組換えNタンパク質を認識し(ELISAで)、ELISA及び/又はウェスタンブロッティングで天然のウイルスNタンパク質を認識する。図18～20は、これら19のモノクローナル抗体のうちの15についてのこれら検査の結果を示す。

【0344】

高い反応性のクローン12、17、28、57、72、76、86、87、98、103、146、156、166、170、199、212、218、219及び222をサブクローニングした。認識したエピトープを決定し、他のヒトコロナウイルス及び或る種の呼吸器ウイルスに対する反応性がないことを検証するために、適切なツールを用いて特異性研究を行った。

【0345】

エピトープマッピング研究(15aaの重複ペプチドを用いて、スポット膜上で実施した)及びウェスタンブロッティングで天然のNタンパク質について実施した追加研究により、4群のモノクローナル抗体の存在が明らかになった：

【0346】

1. N-ter位の主要リニアエピトープ(75～81、配列：INTNSVP)に特異的なモノクローナル抗体。

10

この群の代表は抗体156である。この抗体を産生するハイブリドーマは、パスツール研究所(Paris、France)のCollection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)に、2004年12月1日、番号I-3331で寄託した。この同じエピトープはまた、この同じNタンパク質を用いる従来の免疫によって取得したウサギ血清(抗Nポリクローナル)により認識される。

【0347】

2. 中央位に位置する主要リニアエピトープ(217位～224位、配列：ETALALL)に特異的なモノクローナル抗体；この群の代表はモノクローナル抗体87及び166である。抗体87を産生するハイブリドーマは2004年12月1日に、番号I-3328でCNCMに寄託した。

20

【0348】

3. C末端位に位置する主要リニアエピトープ(403位～408位、配列：DFRQL)に特異的なモノクローナル抗体。この群の代表は抗体28、57及び143である。抗体57を産生するハイブリドーマは2004年12月1日に、番号I-3330でCNCMに寄託した。

【0349】

4. 不連続構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体。この群の抗体は、Nタンパク質の配列にわたる(spanning)ペプチドをいずれも認識しないが、変性していない天然のタンパク質に対して強力に反応する。この最後の群の代表は抗体86である。この抗体を産生するハイブリドーマは2004年12月1日に、番号I-3329でCNCMに寄託した。

【0350】

30

下記の表VIIIに得られたエピトープマッピング結果をまとめる：

【0351】

表VIII：モノクローナル抗体のエピトープマッピング

【表 1 2】

抗体	エピトープ	位置	領域
28	DFSRQL Q	403 ... 408	C - Ter.
143	DFSRQL Q		
76	DFSRQL Q		
57	DFSRQL Q		
	FFGMS RI	315 ... 319	
146	LPQRQ	383 ... 387	
166	ETALALLL	217 ... 224	中央
87	ETALALL	217... 224	
156	INTNSGP	75... 81	N - Ter.
86	構造		
212	構造		
170	構造		

10

【0 3 5 2】

加えて、特に図18及び19に示したように、これら抗体は、ELISA及び/又はWBで、ヒトコ
ロナウイルス229 EのNタンパク質に対する反応性を示さない。

20

【0 3 5 3】

実施例10：SARS-CoVウイルスに感染した患者の血清又は生物学的流体におけるウイルスN
抗原に特異的な高感度免疫捕捉検査の開発のためのモノクローナル抗体の組合せ

非常に特異的な性質であるので、対象者又は患者の血清におけるウイルスNタンパク質
の追加の捕捉・検出研究用に、下記に列挙した抗体を選択した。

これら抗体をマウスの腹水中で産生し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製
し、単独で又は組み合わせて、捕捉抗体として、またシグナル抗体として使用した。

【0 3 5 4】

選択した抗体のリスト：

30

- － Ab 抗C-ter領域(No.28、57、143)
- － Ab 抗中央領域(No.87、166)
- － Ab 抗N-ter領域(No.156)
- － Ab 抗不連続構造エピトープ(86)

【0 3 5 5】

1) 試薬の調製：

a) 免疫捕捉ELISAプレート

プレートを、0.1M炭酸塩緩衝液(pH9.6)中 5 µg/mlの抗体溶液で感作する。(一価又は
多価の)溶液をウェル中に100 µlの容量で堆積し、一晚室温にてインキュベートする。こ
れらプレートを次いで、PBS緩衝液(10mM pH7.4、0.1%Tween 20を補充し、次いで0.3%BS
A及び5%スクロースを補充したPBS溶液で飽和)で洗浄する。次いで、プレートを乾燥さ
せた後、乾燥剤の存在下でバッグに入れる。これらは直ぐに使用できる。

40

【0 3 5 6】

b) 接合体

精製した抗体は、Nakaneのプロトコル(Nakaneら - 1974、J. of Histo and cytochemist
ry, vol.22, pp.1084-1091)に従い、3分子のペルオキシダーゼ当たり1分子のIgGの比で
ペルオキシダーゼにカップリングした。これら接合体を排除クロマトグラフィーにより精
製し、50%グリセロールの存在下に-20℃にて濃縮して貯蔵した(1～2mg/mlの濃度)。
これらは、アッセイにおいて、1%BSAを補充したPBS緩衝液(pH7.4)中1又は2 µg/mlの
最終濃度で使用するために希釈される。

50

【0357】

c) 他の試薬

- － HIV、HBV、HCV及びTHLVウイルスの全ての血清マーカーについて陰性であるヒト血清
- － 0.5%Triton X 100を補充した陰性ヒト血清のプール
- － 不活化ウイルスAg：照射により不活化し、不活化を感受性細胞での培養後に確認したウイルス培養上清
- － 不活化前の懸濁液の力価 約 10^7 感染粒子/ml抗原、或いは約 5×10^9 物理的ウイルス粒子/ml抗原
- － 陰性ヒト血清で希釈したAgサンプル：これらサンプルは、1:100希釈、次いで5倍系列希釈により調製した。

これら非感染性サンプルは、低濃度～非常に低い濃度のウイルス核タンパク質Nを含有すると考えられるヒトサンプルを模擬する。このようなサンプルは、ルーチンの作業では入手できない。

- － 洗浄溶液R2、可視化用溶液TMB R8、色素原R9及び停止溶液R10は、Bio-Radにより、そのELISAキット(例えば：Platelia pylori kit、ref 72778)として市販されている一般試薬である。

【0358】

2) 手順

不活化ウイルスAgを過剰に負荷したヒト血清サンプルを、100 μ l/ウェルの量で、使用の準備が整っている感作済みプレートに直接分配し、次いで37℃にて1時間インキュベートする(Bio-Rad IPSインキュベーション)。

固相に結合しなかった材料を、3回の洗浄により除去する(希R2溶液で洗浄、自動LP 35洗浄機)。

適切な接合体(1又は2 μ g/mlの最終濃度に希釈)を100 μ l/ウェルの量で分配し、再度プレートを37℃にて1時間インキュベートする(IPSインキュベーション)。

過剰の接合体を4回の連続洗浄により除去する(希R2溶液 — LP 35洗浄機)。

【0359】

プレートに付着した接合体の存在は、使用前に調製した100 μ lの可視化溶液(1mlのR9及び10mlのR8)を加え、室温にて30分間の遮光下でのインキュベーションの後、可視化する。

酵素反応は、最終的に、100 μ lのR10試薬(1 N H_2SO_4)を全てのウェルに加えることによりブロックする。

読み取りは、適切なマイクロプレートリーダーを用いて、2つの波長(450/620nm)で行う。

【0360】

結果は、仮の閾値として、少なくとも2つの陰性コントロールの平均の2倍、或いは100の陰性血清の平均に6 SD(その100の個々の測定値について算出した標準偏差)に相当する増加分を補ったものを使用して解釈することができる。

【0361】

3) 結果

種々の捕捉抗体とシグナル抗体との組合せを、選択した抗体の性質に基づいて検査した。その際、固相中の抗体と接合体としての抗体に同じエピトープに特異的な抗体の組合せを避けた。

最良の結果を下記に列挙する4つの組合せで得た。これら結果を下記の表IXに示す。

【0362】

1. 組合せF/28

固相(Ab166 + 87 中央領域)：接合抗体28(C-ter)

2. 組合せG/28

固相(Ab86 — 構造エピトープ)：接合抗体28(C-ter)

10

20

30

40

50

3. 組合せH/28

固相 (Ab86、166及び87 中央領域及び構造エピトープ) : 接合抗体28(C-ter)

4. 組合せH/28 + 87

固相 (Ab86、166及び87 中央領域及び構造エピトープ) : 混合の接合抗体28(C-ter)及び87 (中央)

5. 組合せG/87

固相 (Ab86 — 構造エピトープ) : 接合抗体87(中央領域)

【0363】

この最初の4つの組合せは、使用した他の組合せ(例えば組合せG/87のような)より大きな、等価で再現される性能レベルを示す。当然のことながら、これら組合せで、モノクローナル抗体は、同じエピトープを認識する別の抗体で置換できる。したがって、以下の変形を挙げることができる：

【0364】

6. 組合せF/28の変形

固相 (Ab87のみ) : 接合抗体57(C-ter)

7. 組合せG/28の変形

固相 (Ab86 — 構造エピトープ) : 接合抗体57(C-ter)

8. 組合せH/28の変形

固相 (Ab86及び87 中央領域及び構造エピトープ) : 接合抗体57(C-ter)

9. 組合せH/28 + 87の変形

固相 (Ab86及び87 中央領域及び構造エピトープ) : 混合の接合抗体57(C-ter)及び87(中央)

【0365】

表IX：抗SARS-CoV核タンパク質Abの免疫反応性の検査：不活化したウイルス抗原の希釈率に従い抗体の各組合せを用いて測定した光学密度

【表13】

No.	希釈率	F/28	G/28	G/87	H/28	H/28+87
0	1/100	5	5	3,495	3,900	5
1	1/500	3,795	3,814	1,379	3,702	3,804
2	1/2500	2,815	2,950	0,275	3,268	2,680
3	1/12500	0,987	1,038	0,135	1,374	0,865
4	1/62500	0,404	0,348	0,125	0,480	0,328
5	1/312500	0,285	0,211	0,123	0,240	0,215
6	コントロール	0,210	0,200	0,098	0,186	0,156
7	コントロール	0,269	0,153	0,104	0,193	0,202

【0366】

これら4つの実験的試行の検出限界は、陰性血清中の抗原希釈率1:62,500に相当する。迅速外挿(rapid extrapolation)により、1mlの血清当たり 10^3 感染粒子未満の検出が示唆される。

この研究から、天然型ウイルス核タンパク質の捕捉に最も適切な抗体は、中央領域及び/又は構造エピトープに特異的な抗体であることが明らかである。両抗体は、天然型抗原に対する高い親和性について選択された抗体でもある。

【0367】

固相の組成物のために最良の抗体が決まると、固相に付着した抗原の検出のために優先的に選択される抗体は、C-ter領域中の優勢なエピトープに特異的な相補抗体である。当

10

20

30

40

50

該タンパク質のN-ter領域に位置するエピトープに特異的な他の相補抗体の使用は、平均的か又は貧弱な結果を導く。

【0368】

実施例11：SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)針状(S)タンパク質用の原核生物発現系
1) 哺乳動物細胞でのSARS-CoV Sの発現条件の最適化

SARS-CoV針状(S)タンパク質の一過性発現の条件を、哺乳動物細胞(293T、VeroE6)中で最適化した。

【0369】

このために、SARS-CoV SのcDNAを含有するDNAフラグメントを、プラスミドpSARS-S(C.N.C.M. No.1-3059)からのオリゴヌクレオチド5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTC TTACTC TCACT-3'及び5'-ATACTCGAGTT ATGTGTAATG TAATTTGACA CCCTTG-3'を用いるPCRにより増幅し、次いでプラスミドpTRIP-Sを取得するために、レンチウイルスベクターTRIP(Sirven, 2001, Mol. Ther., 3, 438-448)を含有するプラスミドpTRIP ΔU3-CMVのBamH1部位とXho1部位との間に挿入した。SのcDNAを含有するBamH1～Xho1フラグメントを、次いで、プラスミドpcDNA-Sを取得するために、原核生物発現プラスミドpcDNA3.1(+)(Clontech)のBamH1とXho1との間にサブクローニングした。SのcDNAを含有するNhe1～Xho1フラグメントを、次いで、プラスミドpCI-Sを取得するために、発現プラスミドpCI(Promega)の対応する部位間にサブクローニングした。ウッドチャック肝炎ウイルスのWPRE配列(「ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント」)及びマソン-ファイザーシミアンレトロウイルスのCTE配列(「構成性輸送エレメント」)を、プラスミドpcDNA-S-CTE、pcDNA-S-WPRE、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPRE(図21)を取得するために、2つのプラスミドpcDNA-S及びpCI-Sの各々に、Xho1部位とXba1部位との間で挿入した。プラスミドpCI-S-WPREは、2004年1月22日、番号I-3323でCNCMに寄託した。BigDye Terminator v1.1 kit(Applied Biosystems)及び自動化配列決定機ABI377を用いて全ての挿入物を配列決定した。

【0370】

哺乳動物細胞におけるSARS-CoV Sの発現を導くプラスミド構築物の能力を、VeroE6細胞のトランスフェクション後に評価した(図22)。この実験では、35mmペトリ皿中の 5×10^5 の単層VeroE6細胞を、2 µgのプラスミドpcDNA(コントロールとして)、pcDNA-S、pCI及びpCI-Sで、6 µlのFugene6試薬を製造業者(Roche)の指示に従って用いてトランスフェクトした。37℃にて5%CO₂下での48時間のインキュベーション後、細胞抽出物をLaemmliに従うローディング緩衝液中に調製し、8%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いでPVDF膜(BioRad)に移した。このイムノブロット(ウェスタンブロット)の検出を、抗Sウサギポリクローナル血清(ウサギP11135からの免疫血清：上記実施例4を参照)及びウサギIgGを指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたロバポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いて行った。結合した抗体を、ECL+キット(Amersham)を用いる発光及びオートラジオグラフィーフィルムHyperfilm MP(Amersham)により可視化した。

【0371】

この実験(図22)は、プラスミドpcDNA-Sは、検出可能なレベルでのSARS-CoV Sの発現を導けない一方、プラスミドpCI-Sは検出限界(フィルムを過剰露出したときに検出され得る)に近い弱い発現を可能にすることを示す。同様な結果が、Sの発現を免疫蛍光により探索したときに得られた(データは示さず)。このように有効なSの発現を検出できなかったことを、使用した検出技法に帰することはできない。なぜなら、Sタンパク質は、SARS-CoVに感染した細胞の抽出物又は組換えワクシニアウイルスVV-TF7.3に感染しプラスミドpcDNA-SでトランスフェクトしたVeroE6細胞の抽出物において予想サイズ(180kDa)で検出することができるからである。この後者の実験では、ウイルスVV-TF7.3はT7ファージのRNAポリメラーゼを発現し、効率的に翻訳され得る非キャップ化RNAの細胞質転写を可能にする。この実験により、上記の発現欠損は、SのcDNAが、本質的に、メッセンジャーRNAへの転写工程が核レベルで行われるとき効率的に発現する能力がないことに起因することが示唆される。

【0372】

第2の実験では、Sの発現に対するCTEシグナル及びWPREシグナルの効果を、VeroE6細胞(図23A)及び293T細胞(図23B)のトランスフェクション後に、上記で記載したものと同様なプロトコルに従って評価した。Sの発現は、pcDNA-Sに由来するプラスミドpcDNA-S-CTE及びpcDNA-S-WPREのトランスフェクション後に検出することができない一方、WPREシグナル及びCTEシグナルの挿入は、発現プラスミドpCI-Sに関して、Sの発現を大いに改善する。

【0373】

この結果を具体的にするため、イムノブロットを発光及びデジタル画像化デバイス(FluorS、BioRad)上への獲得により定量的に可視化する第2シリーズの実験を行った。得られた結果をQuantityOne v4.2.3ソフトウェア(BioRad)で分析することにより、WPRE配列及びCTE配列はそれぞれ、Vero E6細胞で、Sの発現を20～42倍及び10～26倍に増加させることが示される(表X)。293T細胞(表X)では、CTE配列の効果はより穏やか(4～5倍)である一方、WPRE配列の効果は高いままである(13～28倍)。

【0374】

表X SARS-CoV Sの発現に対するCTEシグナル及びWPREシグナルの効果の定量分析：細胞抽出物を、プラスミドpCI、pCI-S、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPREでのVeroE6細胞又は293T細胞のトランスフェクションの48時間後に調製し、図22の説明に記載のようにウェスタンブロッティングにより分析した。ウェスタンブロットは、発光(ECL+、Amersham)及びデジタル画像化デバイス(FluorS、BioRad)上への獲得により可視化する。発現レベルは、1の値がプラスミドpCI-Sのトランスフェクション後に測定したレベルを表す任意のスケールに従って示す。

2つの独立した実験を2つの細胞型の各々について行った。VeroE6細胞についての実験1では、トランスフェクションを2連で行った。結果を、測定した発現レベルの平均値及び標準偏差値の形で示す。

【表14】

プラスミド	細胞	実験1	実験2
PCI	VeroE6	0,0	0,0
pCI-S	VeroE6	1,0±0,1	1,0
pCI-S-CTE	VeroE6	9,8 ±0,9	26,4
pCI-S-WPRE	VeroE6	20,1±2,0	42,3
PCI	293T	0,0	0,0
PCI-S	293T	1,0	1,0
PCI-S-CTE	293T	4,6	4,0
PCI-S-WPRE	293T	27,6	12,8

【0375】

まとめると、これら結果はすべて、哺乳動物細胞において、RNAポリメラーゼIIプロモーター配列の制御下でのSARS-CoV SのcDNAの発現は、効率的であるために、スプライスシグナルの発現並びに配列WPRE及びCTEのいずれかの発現を必要とすることを示す。

【0376】

2) SARS-CoV Sの発現を可能にする安定株の作製

プラスミドpTRIP-Sを取得するために、SARS-CoV Sタンパク質のcDNAを、BamH1-Xho1フラグメントの形態で、中央DNAフラップを有する欠損レンチウイルスベクターTRIPを含有するプラスミドpTRIPΔU3-CMV中にクローニングした(Sirvenら、2001, Mol. Ther., 3: 438-448)(図24)。293T細胞における、このプラスミド、キャプシド形成プラスミド(p8.2)及びVSVエンベロープ糖タンパク質G(pHCMV-G)発現用プラスミドのZennouら(2000, Cell, 101: 173-185)に従う一過性の同時トランスフェクションにより、ベクターTRIP-Sを含有しエンベロープタンパク質Gで偽型化したレトロウイルス偽粒子の製造を可能にした。これら偽型化TRIP-Sベクターを使用して、293T細胞及びFRhK-4細胞に形質導入した：Sタンパク質の発現は、形質導入した細胞で、ウェスタンブロッティング、免疫蛍光により検出

することができなかった(データは示さず)。

【0377】

CMVウイルス即時/初期プロモーターと、スプライスシグナルと、SのcDNAと、上記の転写後シグナルWPRE又はCTEのいずれかとからなる最適発現カセットを、次いで、中央DNAフラップTRIPΔU3-EF1α(Sirvenら、2001, Mol. Ther., 3: 438-448)を有する欠損レンチウイルス発現ベクターのEF1α-EGFPカセットと置換した(図25)。これら置換を、それぞれプラスミドpCT-S-CTE又はpCI-S-WPREから切り出したS発現カセット(BglII-ApaI又はBglII-SalI)の一連の連続サブクローニングにより行い、次いでプラスミドpTRIP-SD/SA-S-CTE及びpTRIP-SD/SA-S-WPRE(2004年12月1日に、それぞれ番号I-3336及びI-3334でCNCMに寄託)を取得するために、プラスミドTRIPΔU3-EF1αのそれぞれMluI部位とKpnI部位との間又はMluI部位とXhoI部位との間に挿入した。偽型化ベクターは、Zennouら(2000, Cell, 101: 173-185)に従って作製し、1サイクル当たり25ng(TRIP-SD/SA-S-CTE)又は22ng(TRIP-SD/SA-S-WPRE)のp24に対応する量のベクターでの一連の5連続形質導入サイクルにより、293T細胞(10,000細胞)及びFRhK-4細胞(15,000細胞)に形質導入するために使用した。

【0378】

形質導入した細胞を、限界希釈によりクローニングし、一連のクローンをSARS-CoV Sの発現について、免疫蛍光により定性分析し(データは示さず)、次いで抗Sウサギポリクローナル血清を用いるウェスタンブロッティングにより定量分析した(図25)。図25に示す結果により、TRIP-SD/SA-S-CTEで形質導入したFRhK4-s-CTE細胞クローン2及び15並びにTRIP-SD/SA-S-WPREで形質導入したFRhK4-S-WPRE細胞のクローン4、9及び12は、SARS-CoV Sの感染の間に観察されるレベルと比較して、それぞれ低レベル又は中程度レベルでSARS-CoV Sの発現を可能にすることが示される。

【0379】

まとめると、ベクターTRIP-SD/SA-S-CTE及びTRIP-SD/SA-S-WPREは、SARS-CoV Sを発現するFRhK-4細胞、同様に293T細胞の安定なクローンの作製を可能にする一方、「親」ベクターTRIP-Sを用いて行ったアッセイは成功しないままであった。このことは、Sタンパク質を発現する安定な細胞クローンの作製に、スプライスシグナル並びに配列CTE及びWPRのいずれかが必要であることを証明する。

【0380】

加えて、ベクターTRIPのこれら改変(スプライスシグナル並びにCTE及びWPREのような転写後シグナルの挿入)は、Sの発現より他のcDNAの発現を改善するに有利であることを証明し得る。

【0381】

3) 可溶形態のSARS-CoV Sの発現を可能にする安定株の作製。この組換え抗原の精製。

可溶形態のSタンパク質(Ssol)をコードするcDNAを、このタンパク質のエクトドメイン(アミノ酸1~1193)をコードする配列とタグ(FLAG: DYKDDDDK)の配列とをSGジペプチドをコードするBspEIリンカーを介して融合することにより取得した。実際には、プラスミドpcDNA-Ssolを取得するために、SARS-CoV SのエクトドメインをコードするDNAフラグメントを、プラスミドpcDNA-Sからのオリゴヌクレオチド5'-ATAGGATCCA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC TCACT-3'及び5'-ACCTCCGGAT TTAATATATT GCTCATATTT TCCCAA-3'を用いるPCRにより増幅し、次いでそのBamHI部位とXhoI部位との間にタグ配列FLAGを含有する改変した原核生物発現プラスミドpcDNA3.1(+)(Clontech)の独特なBamHI部位とBspEI部位との間に挿入した:

【0382】

【化1】

```
// GGATCC ...nnn... TCC GGA GAT TAT AAA GAT GAC GAC GAT AAA TAA
    BamHI          S   G   D   Y   K   D   D   D   D   K   ter
CTCGAG //
XhoI
```

10

20

30

40

50

【0383】

SのcDNAを含有するNheI-XhoIフラグメント及びBamHI-XhoIフラグメントを、次いでプラスミドpcDNA-Ssolから切り出し、プラスミドpTRIP-SD/SA-Ssol-CTE及びpTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE(2004年12月1日に、それぞれ番号I-3337及びI-3335でCNCMに寄託)を取得するために、それぞれプラスミドpTRIP-SD/SA-S-CTE及びプラスミドpTRIP-SD-SA-S-WPREの対応する部位間にサブクローニングした。

【0384】

偽型化ベクターを、Zennouら(2000, Cell, 101:173-185)に従って作製し、1サイクル当たり24ng(TRIP-SD/SA-Ssol-CTE)又は40ng(TRIP-SD/SA-Ssol-WPRE)のp24に対応する量のベクターで一連の5連続形質導入サイクル(15000細胞)に従ってFRhK-4細胞(15,000細胞)に形質導入するために使用した。形質導入した細胞を限界希釈によりクローニングし、TRIP-SD/SA-Ssol-CTEで形質導入した一連の16クローン及びTRIP-SD/SA-Ssol-WPREで形質導入した一連の15クローンを、Ssolポリペプチドの発現について、抗FLAGモノクローナル抗体で可視化したウェスタンブロッティング(図26、データは示さず)及びこの目的のために開発したSsolポリペプチドに特異的な捕捉ELISAにより分析した(表XI、データは示さず)。最良の分泌性クローンを選択するプロセスの部分を図26に示す。捕捉ELISAは、精製し不活化したSARS-CoVで免疫したウサギのポリクローナル抗体をコートした固相を使用することに基づく。これら固相は、細胞上清中に分泌されたSsolポリペプチドの捕捉を可能にする。次いで、その存在を、抗FLAGモノクローナル抗体(M2、SIGMA)、抗マウスIgG(H+L)ビオチン化ウサギポリクローナル抗体(Jackson)及びストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ接合体(Amersham)の付着、次いで色素原及び基質(TMB + H₂O₂、KPL)の添加を逐次含む一連の工程で可視化する。

【0385】

表XI：レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-CTEを形質導入した細胞株によるSsolポリペプチドの発現の分析。Ssolポリペプチドの分泌を、レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-CTEでのFRhK-4細胞の形質導入後に単離した一連の細胞クローンの上清中で評価した。1/50希釈した上清をSARS-CoV Sに特異的な捕捉ELISA検査により分析した。

【表15】

ベクター	クローン	OD (450nm)
コントロール	-	0,031
TRIP- SD/SA-Ssol-CTE	CTE2	0,547
	CTE3	0,668
	CTE9	0,171
	CTE12	0,208
	CTE13	0,133
TRIP- SD/SA-Ssol-WPRE	WPRE1	0,061
	WPRE10	0,134

【0386】

培養上清中に最高量のSsolポリペプチドを分泌する細胞株はFRhK4-Ssol-CTE3株である。これを、上記のものと同様な条件下で、第2シリーズの5サイクルのベクターTRIP-SD/SA-Ssol-CTEでの形質導入に付し、次いでクローニングした。最高量のSsolを分泌するサブクローンをウェスタンブロットと捕捉ELISA分析との組合せにより選択した：これはサブクローンFRhK4-Ssol-30(2004年11月22日に、I-3325の名称でCNCMに寄託)である。

【0387】

FRhK4-Ssol-30株は、組換えSsolポリペプチドの定量的な産生及び精製を可能にする。増殖、産生及び精製の実験条件が最適化された典型的な実験では、FRhK4-Ssol-30株の細胞を標準的な培養培地(4.5g/lのグルコースを含有し、5%FCS、100U/mlのペニシリン及び100 µg/mlのストレプトマイシンが補充されたビルビン酸塩フリーDMEM)に、サブコンフルエントの単層(20mlの培地中で各100cm²当たり1百万細胞)の形態で接種する。コンフルエントになったとき、FCSの量が0.5%に減じられ、培地の量が各100cm²当たり16mlに減じられている標準培地を分泌培地と交換する。培養上清を、35℃にて5%CO₂下での4～5日のインキュベーション後に取り出す。組換えポリペプチドSsolを、上清から、0.1 µmポリエーテルスルホン(PES)膜上での濾過工程、50kDカットオフを有するPES膜上での限外濾過による濃縮工程、TBS(50mM tris、pH7.4、150mM NaCl)中100 µg/mlのFLAGペプチド(DYK DDDDK)の溶液で抽出する抗FLAGマトリクス上でのアフィニティークロマトグラフィー工程、次いでsephadex G-75ビーズ(Pharmacia)上でのTBS中のゲル濾過クロマトグラフィー工程の一連の工程により精製した。精製した組換えSsolポリペプチドの濃度をmicro-BCA検査(Pierce)により決定し、次いでその生化学的特性を分析した。

10

【0388】

硝酸銀で染色した8%SDSアクリルアミドゲルによる分析は、優勢なポリペプチドの分子量が約180kDであり、その純度が98%と評価され得ることを証明する(図27A)。2つの主要なピークがSELDI-TOF質量分析(Cypherger)により検出される：これらは、優勢なポリペプチドの単一荷電形態及び二重荷電形態に対応し、その分子量は182.6±3.7kDと決定される(図27B及びC)。Prosorb膜上に移し0.1%TFA中で濯いだ後、SsolポリペプチドのN末端部を、液相中で、Edman分解により5残基について配列決定し(ABI494、Applied Biosystems)、SDLDRと決定した(図27D)。このことは、ソフトウェアsignalP v2.0(Nielsenら、1997, Protein Engineering, 10:1-6)を用いて実施した分析によればaa 1～13(MFIFLLFLTLTG)から構成される、SARS-CoV Sタンパク質のN末端部に位置するシグナルペプチドが、成熟Ssolポリペプチドから切断されることを証明する。したがって、組換えSsolポリペプチドは、FLAGタグ(下線を付した)の配列を含有する配列SGDYKDDDDDKとC末端で融合したSARS-CoV Sタンパク質のアミノ酸14～1193からなる。裸のSsolポリペプチドの理論上のモル質量(132.0kD)と成熟ポリペプチドの現実のモル質量(182.6kD)との間の差は、Ssolポリペプチドがグリコシル化されていることを示唆する。

20

30

【0389】

精製したSsolポリペプチドの調製物(タンパク質濃度をmicro-BCA検査により決定した)により、上記の捕捉ELISA検査を用いて、培養上清中に存在するSsolの濃度を測定するため、及び分泌性株の特徴を検討するための校正シリーズを調製することが可能になる。この検査によれば、4～5日のコンフルエンスでの培養後に、FRhK4-Ssol-CT3株は4～6 µg/mlのポリペプチドSsolを分泌する一方で、FRhK4-Ssol-30株は9～13 µg/mlのSsolを分泌する。加えて、上記の精製スキームにより、1リットルの培養上清当たり1～2mgのSsolポリペプチドをルーチンで精製することが可能になる。

【0390】

実施例12：SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)針状(S)タンパク質を含む遺伝子免疫スプライスシグナルの効果並びに転写後シグナルWPRE及びCTEの効果をBALB/cマウスの遺伝子免疫後に分析した(図28)。

40

【0391】

このため、BALB/cマウスを、pcDNA-S及びpCI-Sの50 µgのプラスミドDNAの生理食塩水溶液、コントロールとして、pcDNA-N(SARS-CoV Nの発現を導く)又はpCI-HA(インフルエンザウイルスA/PR/8/34のHAの発現を導く)の50 µgのプラスミドDNAの生理食塩水溶液を前脛骨筋中に4週間の間隔で注射することにより免疫し、免疫血清を2回目の注射の3週間後に収集した。SARS-CoV Sを指向する抗体の存在を、抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を使用し、コントロールとして非感染VeroE6細胞の溶解物を使用する間接ELISAにより評価した。抗SARS-CoV抗体力価(TI)を、ペルオキシダーゼにカップリングした抗

50

マウスIgGポリクローナル抗体(NA931V、Amersham)及び H_2O_2 を補充したTMB(KPL)での可視化後に、0.5の比OD(感染細胞の溶解物で測定したODと非感染細胞の溶解物で測定したODとの差)を生じる希釈率の逆数として算出する(図28A)。

【0392】

これら条件下、発現プラスミドpcDNA-Sのみが、6匹のマウス中3匹においてSARS-CoV Sを指向する低い抗体力価($LOG_{10}(TI) = 1.9 \pm 0.6$)の誘導を可能にする一方、プラスミドpcDNA-Nは、全ての動物において高い力価($LOG_{10}(TI) = 3.9 \pm 0.3$)での抗N抗体の誘導を可能にし、コントロールプラスミド(pCI、pCI-HA)は、検出可能な抗体を生じない($LOG_{10}(TI) < 1.7$)。スプライスシグナルを備えたプラスミドpCI-Sは、高い力価($LOG_{10}(TI) = 3.7 \pm 0.2$)での抗体の誘導を可能にし、この力価は、プラスミドpcDNA-Sの注射後に観察される力価の約60倍である($p < 10^{-5}$)。

10

【0393】

免疫原として使用したプラスミドDNAの量(2 μ g、10 μ g及び50 μ g)の関数としてBALB/cマウスで誘導された抗S抗体力価の用量-応答研究を行うことにより、転写後シグナルの効率を研究した。この研究(図28B)は、転写後シグナルWPREが、少ない用量のDNAを使用する場合に遺伝子免疫の効率を大いに向上させる(用量2 μ gのDNAについて $p < 10^{-5}$ 、用量10 μ gについて $p < 10^{-2}$)一方、CTEシグナルの効果はほんの僅かのままである(用量2 μ gのDNAについて $p = 0.34$)ことを証明する。

【0394】

最後に、遺伝子免疫後のマウスで誘導された抗体は、インビトロで、ELISAにより測定される力価と一致する力価で、SARS-CoVの感染性を中和する(図29A及び29B)。

20

まとめると、スプライスシグナルの使用及びウッドチャック肝炎ウイルスの転写後シグナルWPREの使用は、SARS-CoV SのcDNAの発現を導くプラスミドDNAを用いての遺伝子免疫後に、SARS-CoVを指向する中和化抗体の誘導をかなり改善する。

【0395】

実施例13：Sタンパク質の診断適用

SARSに罹患している患者からの血清に関して組換えSsolポリペプチドのELISA反応性を分析した。

SARS-CoVに感染したVeroE6細胞についての免疫蛍光検査及び/又は抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を用いる間接ELISA検査によりSARS-CoVの天然型抗原に対する特異的反応性の分析の結果(陽性又は陰性)に基づいて、SARSの可能性が高い症例からの検査血清を選択した。これら患者の血清は、National Reference Center for Influenza Virusesの通し番号並びに患者のイニシャル及び症状の発症からの経過日数により特定した。3、8及び12日目の呼吸器サンプルについて実施したRT-PCRによりSARS-CoV感染を確証できなかった患者VTTの血清032552を除き、可能性が高い症例の全ての血清(表XIIを参照)がSARS-CoVの天然型抗原を認識する。コントロール血清のパネルをコントロールとして使用した(TV血清)：これらは、2003年に発生したSARS流行の前にフランスで収集した血清である。

30

【0396】

【表 16】

表XII: SARSの可能性が高い症例の血清

血清	患者	サンプル収集 日
031724	JYK	7
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16
032791	JLB	3
033258	JLB	27
032703	JCM	8
033153	JCM	29

【0397】

組換えSsolポリペプチドで感作した固相を、ELISAプレートのウェルでPBS中 2 µg/mlの精製したSsolポリペプチドの溶液の吸着により調製し、次いでプレートを4℃にて一晩インキュベートし、PBS-Tween緩衝液(PBS、0.1%Tween 20)で洗浄する。ELISAプレートをPBS-10%スキムミルク(重量/容量)の溶液で飽和させ、PBS-Tween中で洗浄した後、検査すべき血清(100 µl)をPBS-スキムミルク-Tween緩衝液(PBS、3%スキムミルク、0.1%Tween)中で1/400希釈し、次いで感作したELISAプレートのウェルに加える。プレートを37℃にて1時間インキュベートする。PBS-Tween緩衝液での3回の洗浄後、PBS-スキムミルク-Tween緩衝液中で1/4000希釈したペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG接合体(ref.NA933V、Amersham)を加え、次いでプレートを37℃にて1時間インキュベートする。PBS-Tween緩衝液での6回の洗浄後、色素原(TMB)及び基質(H₂O₂)を加え、プレートを遮光して10分間インキュベートする。1 N H₃PO₄溶液を添加して反応を停止し、次いで吸光度を、620nmを参照にして、450nmで測定する。

【0398】

ELISA検査(図30)は、組換えSsolポリペプチドが、感染の中期又は後期(症状の発症の10日以上後)に収集したSARSに罹患している患者の血清抗体によって特異的に認識される一方で、感染の初期(症状の発症の3～8日後)に収集した2人の患者(JLB及びJCM)の血清抗体にも、SARSに罹患していない患者のコントロール血清にも有意には認識されないことを証明する。患者JLB及びJCMの血清抗体は、前者については症状発症後3～27日目の間、後者については症状発症後8～29日目の間のセロコンバージョンを証明する。このことは、Ssolポリペプチドに対するこれら血清の反応性の特異性を確証する。

【0399】

結論として、これら結果は、組換えSsolポリペプチドが、SARS-CoVの感染の血清学的診断用のELISA検査の開発に抗原として使用できることを証明する。

【0400】

実施例14: 組換え可溶性Sタンパク質のワクチン適用

組換えSsolポリペプチドの免疫原性をマウスにおいて研究した。

このため、1群の6匹のマウスを、3週間の間隔で、PBSに希釈した1mgの水酸化アルミニウム(Alu-gel-S, Serva)をアジュバントとして10 µgの組換えSsolポリペプチドで免疫した。3回の連続免疫を実施し、免疫血清を免疫(IS1、IS2、IS3)の各々の3週間後に

収集した。コントロールとして、1群のマウス(mock群)に、同じプロトコルに従って水酸化アルミニウムのみを与えた。

【0401】

免疫血清を、プールごとに、2群の各々について、SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を抗原として、非感染VeroE6細胞の溶解物をコントロールとして使用する間接ELISAにより分析した。抗SARS-CoV抗体力価は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA931V、Amersham)及びH₂O₂を補充したTMB(KPL)での可視化後に、0.5の比ODを生じる希釈率の逆数として算出する。この分析(図31)は、Ssolポリペプチドでの免疫が、マウスで、1回目の免疫から、感染VeroE6細胞の溶解物中に存在する天然型形態のSARS-CoV針状タンパク質を指向する抗体を誘導することを示す。2回、それ

10

【0402】

免疫血清を、2群の各々について、SARS-CoVの感染性を血清中和化する能力についてプールごとに分析した。FRhK-4細胞についての4点の血清中和化(100 TCID₅₀のSARS-CoV)を、1/20から検査した2倍希釈物のそれぞれに関して作製した。血清中和化力価は、Reed and Munschの方法に従って、4ウェル中2ウェルの感染性を中和する希釈率の逆数として算出する。この分析は、Ssolポリペプチドによりマウスで誘導された抗体が中和化抗体であることを示す：2回、それから3回の免疫後に観察された力価は非常に高い(それぞれ2560及び5120より大きい、表XIII)。

20

【0403】

表XIII：組換えSsolポリペプチドでの免疫後のSARS-CoVを指向する抗体の誘導。免疫血清を、2つの群の各々について、FRhK-4細胞に対する100 TCID₅₀のSARS-CoVの感染性を血清中和化する能力についてプールごとに分析した。1/20から検査した2倍希釈物の各々について4点を作成する。血清中和化力価は、Reed and Munschの方法に従って、4ウェル中2ウェルの感染性を中和する希釈率の逆数として算出する。

【表17】

群	血清	中和化Ab
Mock	pi	< 20
	IS1	< 20
	IS2	< 20
	IS3	< 20
Ssol	pi	< 20
	IS1	57
	IS2	> 2560
	IS3	> 5120

30

【0404】

Ssolポリペプチドで免疫したマウスで観察される中和化力価は、マウスでYangら(2004, Nature, 428:561-564)により観察された力価及びハムスターでBuchholz(2004, PNAS 101:9804-9809)により観察された力価(これら力価はそれぞれ、マウス及びハムスターをSARS-CoVの感染から保護する)より遥かに大きいレベルに達する。したがって、Ssolポリペプチドでの免疫後にマウスで誘導される中和化抗体は、おそらく、これら動物をSARS-CoVの感染から保護する。

40

【0405】

実施例15：哺乳動物細胞におけるSARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)針状(S)タンパク質の発現のための最適化合成遺伝子

1) 合成遺伝子の設計

SARS-CoV針状タンパク質をコードする合成遺伝子を、哺乳動物細胞、特にヒト起源の細

50

胞における高レベル発現を可能にするように、単離株031589の遺伝子(プラスミドpSARS-S、C.N.C.M. No.I-3059)から設計した。

【0406】

このために：

- ー 単離株031589の野生型遺伝子のコドンの使用を、ヒトにおいて観察される偏りに近くなるように、そして対応するmRNAの翻訳の効率が向上するように改変した
- ー この遺伝子の全体GC含量を、対応するmRNAの半減期を延長するように増加させた
- ー この遺伝子の効率的な発現に干渉し得る随意的の潜在モチーフ(optionally cryptic motif)を欠失させた(スプライスドナー及びアクセプター部位、ポリアデニル化シグナル、GCが非常にリッチな(>80%)又は非常に低い(<30%)配列、反復配列、RNA二次構造の形成に
関与する配列、TATAボックス)
- ー 第2の停止コドンが付加して、翻訳の効率的な終結を可能にした。

10

【0407】

加えて、CpGモチーフを、DNAワクチンとしての免疫原性を増加させるように、この遺伝子中に導入した。合成遺伝子の操作を容易にするため、2つのBamH1及びXho1制限部位をSタンパク質のオープンリーディングフレームのいずれの側にも配置し、合成遺伝子中でBamH1、Xho1、Nhe1、Kpn1、BspE1及びSal1の制限部位を避けた。

【0408】

設計した合成遺伝子(遺伝子040530)の配列を配列番号140に示す。

合成遺伝子040530と、C.N.C.M.に番号I-3059で寄託したSARS-CoVの単離株031589の野生型遺伝子の配列(配列番号4、プラスミドpSRAS-S)とのアラインメントを図32に示す。

20

【0409】

2) プラスミド構築物

合成遺伝子(配列番号140)を合成オリゴヌクレオチドから組み立て、プラスミド040530pUC-Kanaを取得するために、プラスミドpUC-KanaのKpn1部位とSac1部位との間にクローニングした。プラスミド040530pUC-Kanaの挿入物のヌクレオチド配列を自動化配列決定(Applied)により確認した。

合成遺伝子040530を含有するKpn1-Xho1フラグメントを、プラスミド040530pUC-Kanaから切り出し、プラスミドpCI-SSYNTH(2004年12月1日に、番号I-3333でCNCMに寄託)を取得するために、発現プラスミドpCI(Promega)のNhe1部位とXho1部位との間にサブクローニングした。

30

【0410】

次いで、Sタンパク質のエクトドメイン(アミノ酸1~1193)をコードする合成配列を、タグ(FLAG: DYKDDDDK)の配列と、ジペプチドSGをコードするリンカーBspE1を介して融合することにより、可溶形態のSタンパク質をコードする合成遺伝子を取得した。実際には、SARS-CoV SのエクトドメインをコードするDNAフラグメントを、プラスミド040530pUC-Kanaからのオリゴヌクレオチド5'-ACTAGCTAGC GGATCCACCATGTTTCATCTT CCTG-3'及び5'-AGTATCCGGAC TTG ATGTACT GCTCGTACTTGC-3'を用いるPCRにより増幅し、Nhe1及びBspE1で消化し、次いでプラスミドpCI-Ssolの独特なNhe1部位とBspE1部位との間に挿入して、プラスミドpCI-SCUBE(2004年12月1日に、番号I-3332でCNCMに寄託)を得た。プラスミドpCI-Ssol、pCI-Ssol-CTE及びpCI-Ssol-WPRE(2004年11月22日に、番号I-3324でCNCMに寄託)は、プラスミドpcDNA-Ssol(DI 2004-106のテクニカルノートを参照)から切り出したKpn1-Xho1フラグメントを、プラスミドpCI、pCI-S-CTE及びpCI-S-WPREのそれぞれのNhe1部位とXho1部位との間にサブクローニングすることにより予め得ていた。

40

プラスミドpCI-Scube及びpCI-Ssolは同じ組換えSsolポリペプチドをコードする。

【0411】

3) 結果

Sタンパク質をコードする合成遺伝子が哺乳動物細胞におけるSARS-CoV Sの発現を効率的に導く能力を、霊長類細胞(VeroE6)及びヒト細胞(293T)の一過性トランスフェクション後に、野生型遺伝子の能力と比較した。

50

図33及び表XIVに示した実験において、35mmペトリ皿中の 5×10^5 の単層VeroE6細胞又は 7×10^5 の単層293T細胞を、2 μ gのプラスミドpCI(コントロールとして)、pCI-S、pCI-S-CTE、pCI-S-WPRE及びpCI-S-Ssynthで、6 μ lのFugene6試薬を製造業者(Roche)の指示に従って用いてトランスフェクトした。37°Cにて5%CO₂下での48時間のインキュベーション後、細胞抽出物をLaemmliに従うローディング緩衝液中に調製し、8%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いでPVDF膜(BioRad)に移した。このイムノブロット(ウェスタンブロット)の検出を、抗Sウサギポリクローナル血清(ウサギP11135の免疫血清：上記実施例4を参照)及びウサギIgGを指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたロバポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いて行った。イムノブロットを、ECL+キット(Amersham)を用いる発光及びデジタル画像化デバイス(FluorS、BioRad)上への獲得により定量的に可視化した。

10

【0412】

得られた結果をソフトウェアQuantityOne v4.2.3(BioRad)で分析することにより、この実験において、プラスミドpCI-SynthがVeroE6細胞及び293T細胞で高いレベルでのSタンパク質の一過性発現を可能にする一方、プラスミドpCI-Sは、検出されるべき十分なレベルでの発現を誘導することができないことが示される。観察された発現レベルは、プラスミドpCI-S-WPREで観察された発現レベルの2倍のオーダー程度高い。

【0413】

表XIV：SARS-CoV Sの発現のための合成遺伝子の使用。プラスミドpCI、pCI-S、pCI-S-CTE、pCI-S-WPRE及びpCI-S-SsynthでのVeroE6細胞又は293T細胞のトランスフェクションの48時間後に調製した細胞抽出物を、8%SDSアクリルアミドゲル上で分離し、抗Sウサギポリクローナル血清及びペルオキシダーゼにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA934V、Amersham)を用いてウェスタンブロットティングにより分析した。ウェスタンブロットは、発光(ECL+、Amersham)及びデジタル画像化デバイス(FluorS、BioRad)上への獲得により可視化する。Sタンパク質の発現レベルを、画像上(図33を参照)で同定される2つの優勢なバンドを定量することにより測定し、値1がプラスミドpCI-S-WPREのトランスフェクション後に測定したレベルを表す任意のスケールに従って示した。

20

【表18】

プラスミド	VeroE6	293T
pCI	0,0	0,0
pCI-S	$\leq 0,1$	$\leq 0,1$
pCI-S-CTE	0,5	$\leq 0,1$
pCI-S-WPRE	1,0	1,0
PCI-Ssynth	1,8	1,9

30

【0414】

第2の例では、合成遺伝子Scubeが哺乳動物細胞によるSsolポリペプチドの合成及び分泌を効率的に導く能力を、ハムスター細胞(BHK-21)及びヒト細胞(293T)の一過性トランスフェクション後に、野生型遺伝子の能力と比較した。

40

【0415】

表XVに示した実験において、35mmペトリ皿中の 6×10^5 の単層BHK-21細胞及び 7×10^5 の単層293T細胞を、2 μ gのプラスミドpCI(コントロールとして)、pCI-Ssol、pCI-Ssol-CTE、pCI-Ssol-WPRE及びpCI-Scubeで、6 μ lのFugene6試薬を製造業者(Roche)の指示に従って用いてトランスフェクトした。37°Cにて5%CO₂下での48時間のインキュベーション後、細胞上清を収集し、Ssolポリペプチドに特異的な捕捉ELISA検査によりSsolポリペプチドの分泌について定量的に分析した。

50

【0416】

結果の分析は、この実験において、プラスミドpCI-Scubeが、プラスミドpCI-Ssolより8倍(BHK-21細胞)～20倍(293T細胞)高いレベルでSsolポリペプチドの発現を可能にすることを示す。観察された発現レベルは、プラスミドpCI-Ssol-WPREで観察された発現レベルの2倍(293T細胞)～5倍(BHK-21細胞)のオーダー程度高い。

【0417】

表XV：Ssolポリペプチドの発現のための合成遺伝子の使用。上清を、プラスミドpCI、pCI-Ssol、pCI-Ssol-CTE、pCI-Ssol-WPRE及びpCI-ScubeでのBHK細胞又は293T細胞のトランスフェクションの48時間後に採集し、Ssolポリペプチドに特異的なELISA検査によりSsolポリペプチドの分泌について定量的に分析した。トランスフェクションは2連で行った。結果は、上清中で測定したSsolポリペプチドの濃度(ng/ml)の平均及び標準偏差の形で示す。

【表19】

プラスミド	BHK	293T
Pci	< 20	< 20
pCI-Ssol	< 20	56 ± 10
pCI-Ssol-CTE	< 20	63 ± 8
pCI-Ssol-WPRE	28 ± 1	531 ± 15
PCI-Scube	152 ± 6	1140 ± 20

【0418】

まとめると、これら結果は、哺乳動物細胞における、RNAポリメラーゼIIプロモーター配列の制御下でのSARS-CoV Sをコードする合成遺伝子040530の発現が、031589単離株の野生型遺伝子の発現よりずっと効率的であることを示す。この発現は、ウッドチャック肝炎ウイルスのWPRE配列の存在下で、野生型遺伝子により導かれる発現よりずっと効率的である。

【0419】

4) 適用

SARS-CoV Sをコードする合成遺伝子040530又はポリペプチドSsolをコードするそのScube変種の使用は、高レベルでのSの発現が必要である多くの適用において野生型遺伝子を有利に置換することができる。より詳細には、以下のために：

- － pCI-Ssynth型のプラスミド(pCI-Ssynth-CTE型又はpCI-Ssynth-WPRE型のプラスミドでさえ)での遺伝子免疫の効率を改善するため
- － それぞれSsynth遺伝子又はScube遺伝子を有する組換えレンチウイルスベクターを用いて、より高量のSタンパク質又はSsolポリペプチドを発現する新規細胞株を樹立するため
- － Sタンパク質の発現又はSsolポリペプチドの発現を可能にする組換えレンチウイルスベクターの免疫原性を改善するため
- － Sタンパク質の発現又はSsolポリペプチドの発現を可能にする、組換えワクシニアウイルス又は組換え麻疹ウイルスのような生ベクターの免疫原性を改善する(下記実施例16及び17を参照)のため。

【0420】

実施例16：組換えワクシニアウイルスを用いるSARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)針状(S)タンパク質の発現

ワクチン適用

可溶形態の針状(S)タンパク質の製造及びSARSについての血清学的検査の設計への適用

1) 導入

この実施例の目的は、種々のSARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)抗原を発現する組換えワクシニアウイルス(VV)がSARSに対する新規ワクチン候補及び哺乳動物細胞で組換え抗原を産生する手段を構成する能力を評価することである。

【0421】

このために、本発明者らは、遺伝子免疫後に、動物で、SARS-CoVの感染性を中和する抗体を誘導することができるSARS-CoV針状(S)タンパク質及びこのタンパク質の可溶性で分泌される形態であるSsolポリペプチド(これは、C-ter端部で、SGジペプチドをコードするBspE1リンカーを介してタグFLAG(DYKDDDDK)と融合したSのエクトドメイン(aa1~1193)から構成される)に着目した。このSsolポリペプチドは、Sタンパク質の抗原性と同様の抗原性を示し、アジュバントとして水酸化アルミニウムと組み合わせた精製したタンパク質の形態でのマウスへの注射後に、SARS-CoVに対する高い中和化抗体力価の誘導を可能にする。

10

【0422】

種々の形態のS遺伝子を、7.5K遺伝子のプロモーターの制御下に配置し、次いでインビボでの二重相同組換えにより、コペンハーゲン系統のワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子座中に導入した。組換えワクシニアウイルスの免疫原性を改善するために、7.5Kプロモーターに代えて合成後期プロモーターを選択し、ウイルスサイクルの後期の間のS及びSsolの産生を増加させた。

20

【0423】

組換えワクシニアウイルスを単離し、SARS-CoV S抗原を発現する能力を確認した後、マウスでSARSに対する免疫応答を誘導する能力を検査した。感染細胞の上清からSsol抗原を精製した後、SARSの血清診断についてのELISA検査を設計し、SARSの可能性が高い症例からの血清を用いてその効率を検査した。

【0424】

2) 組換えウイルスの構築

7.5Kプロモーターの制御下でのSARS-CoVの031589単離株のS糖タンパク質の発現及びこのタンパク質の可溶性で分泌される形態であるSsolポリペプチドの発現を導く組換えワクシニアウイルスを取得した。Sの発現レベル及びSsolの発現レベルを増大させるために、SのcDNA及びSsolのcDNAが後期合成プロモーターの制御下に配置された組換えウイルスもまた取得した。

30

【0425】

プラスミドpTG186polyは、組換えワクシニアウイルスの構築のためのトランスファープラスミドである(Kieny, 1986, Biotechnology, 4:790-795)。そうなので、これは、7.5K遺伝子のプロモーターに続いて異種遺伝子の挿入を可能にする多クローニング部位が挿入されているVVチミジンキナーゼ遺伝子を含む(図34A)。7.5K遺伝子のプロモーターは、事実、縦一列の2つのプロモーター配列を含む。これらは、それぞれワクシニアウイルス複製サイクルの初期(P_E)及び後期(P_L)の間に活性である。BamH1-Xho1フラグメントをそれぞれプラスミドpTRIP-S及びpcDNA-Ssolから切り出し、プラスミドpTG-S及びpTG-Ssolを取得するために、プラスミドpTG186polyのBamH1部位とSma1部位との間に挿入した(図34A)。プラスミドpTG-S及びpTG-Ssolは、2004年12月2日に、それぞれ番号I-3338及びI-3339でCNCMに寄託した。

40

【0426】

7.5Kプロモーターを含むNde1-Pst1フラグメントを、合成後期プロモーター480を含むDNAフラグメントで置換することにより、プラスミドpTG186poly、pTG-S及びpTG-Ssolから、それぞれプラスミドpTN480、pTN-S及びpTN-Ssolを取得した。合成後期プロモーター480を含むDNAフラグメントは、オリゴヌクレオチド5'-TATGAGCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTGGC ATATAAATAG ACTCGGCGCG CCATCTGCA-3'と5'-GATGGCGCGCCGAGTCTATT TATATGCC AA AAAAAAAAAA AAAAAAAGC TCA-3'とのハイブリダイゼーションにより得た(図34B)。BigD

50

ye Terminator v1.1 kit(Applied Biosystems)及び自動化配列決定機ABI377を用いて挿入物を配列決定した。pTNシリーズのトランスファープラスミド中にクローニングした後期合成プロモーター480の配列を図34Cに示す。プラスミドpTN-S及びpTN-Ssolは、2004年12月2日に、番号I-3340及びI-3341でCNCMに寄託した。

【0427】

組換えワクシニアウイルスは、Kienyら(1984, Nature, 312:163-166)により記載された手順に従って、シリーズpTG及びpTNのトランスファープラスミドのTKカセットとワクシニアウイルスのコペンハーゲン系統のTK遺伝子との間のインビボでの二重相同組換えにより取得した。簡潔には、CV-1細胞を、DOTAP(Roche)を用いて、コペンハーゲン系統のワクシニアウイルスのゲノムDNAと上記pTG及びpTNシリーズのトランスファープラスミドの各々とでトランスフェクトし、次いで33℃にて24時間ヘルパーワクシニアウイルスVV-ts7に重複感染させる。ヘルパーウイルスは、40℃にて2日間のインキュベーションにより対抗選択し、次いで組換えウイルス(TK表現型)を、BuDr(25 µg/ml)の存在下に143Btk-細胞について寒天培地で2つのクローニングサイクルにより選択する。6つのウイルスVV-TG、VV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN、VV-TN-S、及びVV-TN-Ssolを、それぞれトランスファープラスミドpTG186poly、pTG-S、pTG-Ssol、pTN480、pTN-S、pTN-Ssolを用いて取得した。ウイルスVV-TG及びVV-TNは異種遺伝子を発現しない。これらを、本実験においてTKコントロールとして使用した。組換えウイルスの調製物を単層のCV-1細胞又はBHK-21細胞について実施し、プラーク形成単位(p.f.u)での力価を、Earl and Moss(1998, Current Protocols in Molecular Biology, 16.16.1- 16.16.13)に従って、CV-1細胞について決定した。

【0428】

3) 組換えウイルスの特徴付け

Sタンパク質及びSsolポリペプチドをコードする導入遺伝子の発現をウェスタンブロットティングにより評価した。

単層のCV-1細胞を、種々の組換えワクシニアウイルスVV-TG、VV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN、VV-TN-S及びVV-TN-Ssolに多重度2で感染させた。37℃にて5%CO₂下での18時間のインキュベーション後、細胞抽出物をLaemmliに従うローディング緩衝液中に調製し、8%SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いでPVDF膜(BioRad)に移した。このイムノブロット(ウェスタンブロット)の検出を、抗Sウサギポリクローナル血清(ウサギP11135からの免疫血清: 実施例4を参照)及びウサギIgGを指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたロバポリクローナル抗体(NA934V, Amersham)を用いて行った。結合した抗体を、ECL+キット(Amersham)を用いる発光及びオートラジオグラフィフィルムHyperfilm MP(Amersham)により可視化した。

【0429】

図35Aに示されるように、組換えウイルスVV-TN-Sは、SARS-CoVの感染の8時間後に観察され得るレベルに匹敵するが、VV-TG-Sの感染後に観察され得るレベルよりずっと高いレベルでSタンパク質の発現を導く。第2の実験(図35B)において、種々の量の細胞抽出物の分析により、TNシリーズのウイルス(VV-TN-S及びVV-TN-Ssol)の感染後に観察される発現レベルは、TGシリーズのウイルス(それぞれVV-TG-S及びVV-TG-Ssol)で観察される発現レベルの約10倍高いことが示される。加えて、Ssolポリペプチドは、VV-TN-Ssolウイルスに感染したCV-1細胞の上清中に、VV-TG-Ssolに感染した細胞の上清より高い効率で分泌される(図36A)。この実験では、VV-TN-Sflagウイルスをコントロールとして使用した。なぜなら、これは、そのC-ter端部でFLAGタグと融合した膜形態のSタンパク質を発現するからである。Sflagタンパク質はVV-TN-Sflagに感染した細胞の上清中で検出されない。このことは、Ssolポリペプチドが確かにVV-TN-Ssolの感染後に能動的に分泌されることを証明する。

【0430】

これら結果は、組換えワクシニアウイルスが確かに導入遺伝子のキャリアであり、膜形態(S)で又は可溶性若しくは分泌される形態(Ssol)でのSRAS糖タンパク質の発現を可能にすることを証明する。合成プロモーター480を有するワクシニアウイルスは、7.5K遺伝子

のプロモーターを有するウイルスよりずっと高いレベルで、Sの発現及びSsolの分泌を可能にする。

【0431】

4) 可溶形態のSARS-CoV Sの製造への適用。この組換え抗原の精製及び診断適用

BHK-21株は、検査した株(BHK-21、CV1、293T及びFrhK-4、図36B)のうち、VV-TN-Ssolウイルスの感染後に最高量のSsolポリペプチド分泌する細胞株である；これは、組換えSsolポリペプチドの定量的産生及び精製を可能にする。感染、産生及び精製の実験条件が最適化された典型的な実験では、BHK-21細胞を標準培養培地(4.5g/lのグルコースを含有し5%TPB、5%FCS、100U/mlのペニシリン及び100µg/mlのストレプトマイシンを補充したピルビン酸塩フリーDMEM)に、サブコンフルエント単層(25mlの培地中各100cm²について10百万細胞)の形態で接種する。37℃にて5%CO₂下での24時間のインキュベーション後、細胞を0.03のM.O.I.で感染させ、標準培地を、FCSの量が0.5%に減じられ、TPBが排除されている分泌培地に交換する。培養上清を35℃にて5%CO₂下での2.5日のインキュベーション後に取り出し、ワクシニアウイルスをTriton X-100(0.1%)の添加により不活化する。0.1µmポリエーテルスルホン(PES)膜上での濾過後、TBS(50mM tris、pH7.4、150mM NaCl)中100µg/mlのFLAGペプチド(DYKDDDDK)の溶液で抽出する抗FLAGマトリクス上でのアフィニティクロマトグラフィーにより組換えSsolポリペプチドを精製する。

【0432】

硝酸銀で染色した8%SDSアクリルアミドゲルによる分析は、分子量が約180kDであり、純度が90%より大きい優勢なポリペプチドを同定した(図37)。精製したSsol組換えポリペプチドの濃度を、分子量マーカーとの比較により決定し、24ng/µlと推定した。

【0433】

この精製したSsolポリペプチド調製物により、捕捉ELISA検査を用いて、培養上清中に存在するSsol濃度を測定するための校正シリーズを製造することが可能になる。この検査によれば、BHK-21株は上記の産生条件下で約1µg/mlのSsolポリペプチドを分泌する。加えて、提示の精製スキームにより、1リットルの培養上清当たり160µgのオーダーのSsolポリペプチドを精製することが可能になる。

組換えSsolポリペプチドのELISA反応性を、SARSに罹患している患者からの血清に対して分析した。

【0434】

検査したSARSの可能性が高い症例の血清を、SARS-CoVに感染したVeroE6細胞に対する免疫蛍光検査及び/又は抗原としてSARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を使用する間接ELISA検査によるSARS-CoVの天然型抗原に対する特異的反応性の分析の結果(陽性又は陰性)に基づいて選択した。これら患者の血清は、National Reference Center for Influenza Virusesの通し番号並びに患者のイニシャル及び症状の発症からの経過日数により同定する。3、8及び12日目の呼吸器サンプルについて実施したRT-PCRによりSARS-CoV感染が確認できなかった患者VTTの血清032552を除き、可能性が高い症例の全ての血清(表XVIを参照)がSARS-CoVの天然型抗原を認識する。コントロール血清のパネルをコントロールとして使用した(TV血清)：これらは、2003年に発生したSARS流行の前にフランスで収集した血清である。

【0435】

【表 20】

表XVI: SARSの可能性が高い症例の血清

血清	患者	サンプル収集 日
033168	JYK	38
033597	JYK	74
032632	NTM	17
032634	THA	15
032541	PHV	10
032542	NIH	17
032552	VTT	8
032633	PTU	16

10

【0436】

20

組換えSsolポリペプチドで感作した固相を、ELISAプレートのウェルにおけるPBS中 4 μ g/mlの精製したSsolポリペプチドの溶液の吸着により調製した。プレートを4℃にて一晩インキュベートし、次いでPBS-Tween緩衝液(PBS、0.1%Tween 20)で洗浄する。PBS-Tweenでの洗浄後、検査すべき血清(100 μ l)をPBS-スキムミルク-Tween緩衝液(PBS、3%スキムミルク、0.1%Tween)中1/100及び1/400希釈し、次いで感作したELISAプレートのウェルに加える。次いでプレートを37℃にて1時間インキュベートする。PBS-Tween緩衝液での3回の洗浄後、PBS-スキムミルク-Tween緩衝液中1/4000希釈したペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG接合体(ref.NA933V、Amersham)を加え、次いでプレートを37℃にて1時間インキュベートする。PBS-Tween緩衝液での6回の洗浄後、色素原(TMB)及び基質(H_2O_2)を加え、プレートを遮光して10分間インキュベートする。 H_3PO_4 の1M溶液を添加して反応を停止し、次いで吸光度を、620nmを参照にして、450nmで測定した。

30

【0437】

ELISA検査(図38)は、組換えSsolポリペプチドは、感染の中期又は後期(症状の発症の10日以上後)に収集したSARSに罹患している患者の血清抗体によって特異的に認識される一方、SARSに罹患していない患者のコントロール血清の血清抗体によって有意には認識されないことを証明する。

【0438】

結論として、これら結果は、組換えSsolポリペプチドを、組換えワクシニアウイルスVV-TN-Ssolに感染した哺乳動物細胞の上清から精製することが可能であり、SARS-CoV感染の血清学的診断用のELISA検査を開発するための抗原として使用できることを証明する。

40

【0439】

5. ワクチン適用

組換えワクシニアウイルスの免疫原性をマウスで研究した。

このため、1群の7匹のBALB/cマウスを、4週間の間隔で2回、i.v.経路により、 10^6 p.f.u.の組換えワクシニアウイルスVV-TG、VV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN、VV-TN-S及びVV-TN-Ssol並びにコントロールとして、A/PR/8/34系統のインフルエンザウイルスのヘマグルチニンの発現を導くVV-TG-HAで免疫した。免疫血清を免疫(IS1、IS2)の各々の3週間後に回収した。

【0440】

免疫血清を、群の各々について、SARS-CoVに感染したVeroE6細胞の溶解物を抗原として

50

、非感染VeroE6細胞の溶解物をコントロールとして使用する間接ELISAにより、プールごとに分析した。抗SARS-CoV抗体力価(TI)は、ペルオキシダーゼにカップリングした抗マウスIgG(H+L)ポリクローナル抗体(NA931V、Amersham)及びH₂O₂を補充したTMB(KPL)での可視化後に、0.5の比ODを生じる希釈率の逆数として算出する。この分析(図39A)は、ウイルスVV-TG-S及びVV-TN-Sでの免疫が、マウスで、1回目の免疫から、感染VeroE6細胞の溶解物中に存在する天然型形態のSARS-CoV針状タンパク質を指向する抗体を誘導することを示す。VV-TN-Sウイルスにより誘導される応答は、1回目の免疫後にVV-TG-Sウイルスにより誘導される応答より高く(それぞれTI = 740及びTI = 270)、また2回目の免疫後にVV-TG-Sウイルスにより誘導される応答より高い(それぞれTI = 3230及びTI = 600)。VV-TN-Ssolウイルスは、2回の免疫後に高い抗SARS-CoV抗体力価を誘導する(TI = 640)一方、ウイルスVV-TG-Ssolは検出限界の応答を誘導する(TI = 40)。

10

【0441】

免疫血清を、群の各々について、SARS-CoVの感染性を血清中和化する能力についてプールごとに分析した。FRhK-4細胞についての4つの血清中和化点(100 TCID₅₀のSARS-CoV)を、1/20から検査した2倍希釈物のそれぞれについて作成する。血清中和化力価は、Reed and Munschの方法に従って、4ウェル中2ウェルの感染性を中和する希釈率の逆数として算出する。この分析は、Sタンパク質又はSsolポリペプチドを発現するワクシニアウイルスによりマウスで誘導された抗体が中和化抗体であること、及び合成プロモーターを有するウイルスが7.5Kプロモーターを有するウイルスより効率的な免疫原であることを示す：最高力価(640)は、ウイルスVV-TN-Sでの2回の免疫後に観察される(図39B)。

20

【0442】

組換えワクシニアウイルスでの免疫後にマウスで誘導された中和化抗体の保護力は、SARS-CoVへの攻撃感染を用いて評価する。

【0443】

6) 他の適用

第3世代組換えワクシニアウイルスは、上記のように、S遺伝子及びSsol遺伝子の野生型配列を哺乳動物細胞での発現に最適化した合成遺伝子で置換することにより構築する。これら組換えワクシニアウイルスは、より大量のS抗原及びSsol抗原を発現することができる、したがって増大した免疫原性を示すことができる。

組換えワクシニアウイルスVV-TN-Ssolは、診断適用(ELISAによる血清学)及びワクチン適用(サブユニットワクチン)のためのSsol抗原の定量的産生及び精製に使用することができる。

30

【0444】

実施例17：SARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)針状(S)タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルス。ワクチン適用。

1) 導入

麻疹ワクチン(MV)は、単回注射後にヒトで持続性保護免疫を誘導する(Hilleman, 2002, Vaccine, 20: 651-665)。付与された保護は非常に強く、抗体応答の誘導並びにCD4及びCD8細胞応答の誘導に基づく。MVゲノムは非常に安定であり、ワクチン系統の毒性への復帰は今まで観察されていない。麻疹ウイルスは、Paramyxoviridae科のMorbillivirus属に属する；これは、ゲノムが16kbの一本鎖RNA(マイナス鎖)であり(図40A)、専ら細胞質で行われる複製サイクルが宿主ゲノムへの組み込みの可能性を排除する、エンベロープに被われたウイルスである。したがって、麻疹ワクチンは、ヒト集団に使用される最も効果的で最も安全な生ワクチンの1つである。Frederic Tangyのチームは、最近、最も安全な減弱系統であり、麻疹に対するワクチンとしてヒトで最も広く使用されているSchwarz系統の麻疹ウイルスに基づいて発現ベクターを開発した。このワクチン系統は、感染性分子クローンから単離され得るが、感染に対して感受性である霊長類及びマウスで免疫原性を保存している。これは、追加の転写ユニットの挿入後、異種配列の発現用ベクター構成する(Combrete, 2003, J. Virol. 77: 11546-11554)。加えて、西ナイルウイルス(WNV)のエンベロープ糖タンパク質を発現する組換えMV Schwarzは、マウスをWNVの致死性攻撃感染から

40

50

保護する効果的で持続性の抗体応答を誘導する(Despresら、2004, J. Infect. Dis., 印刷中)。これら特徴のすべてが、この減弱Schwarz系統の麻疹ウイルスを、新規組換え生ワクチンの構築に大いに見込みのある候補ベクターとする。

【0445】

この実施例の目的は、種々のSARS関連コロナウイルス(SARS-CoV)抗原を発現する組換え麻疹ウイルス(MV)がSARSに対する新規候補ワクチンを構成する能力を評価することである。

本発明者らは、遺伝子免疫後に動物でSARS-CoVの感染性を中和する抗体を誘導することができるSARS-CoV針状(S)タンパク質、及びこのタンパク質の可溶性で分泌される形態であるSsolポリペプチド(これは、C-ter端部で、SGジペプチドをコードするBspEIリンカーを介してFLAGタグ(DYKDDDDK)の配列と融合したSのエクトドメイン(aa 1~1193)から構成される)に着目した。このSsolポリペプチドは、Sタンパク質の抗原性と同様の抗原性を示し、アジュバントとして水酸化アルミニウムと組み合わせた精製したタンパク質の形態でのマウスへの注射後に、SARS-CoVに対する高い中和化抗体力価の誘導を可能にする。

【0446】

種々の形態のS遺伝子を、以前に記載されたSchwarz系統のMV(Combredet、2003, J. Virol. 77: 11546-11554; 2002年6月20日のEP出願No.02291551.6及び2002年6月20日のEP出願No.02291550.8)のcDNA中に、追加の転写ユニットの形態で、P(リンタンパク質)遺伝子とM(マトリクス)遺伝子との間に導入した。組換えウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolを単離し、SARS-CoV S抗原を発現する能力について確認した後、マウス次にサルでSARSに対する保護免疫応答を誘導する能力を検査した。

【0447】

2) 組換えウイルスの構築

プラスミドpTM-MVSchw-ATU2(図40B)は、追加の転写ユニット(ATU)がP(リンタンパク質)遺伝子とM(マトリクス)遺伝子との間に導入されたSchwarzワクチン系統の麻疹ウイルス(MV)のアンチゲノムに相当する感染性cDNAを含有する(Combredet、2003, Journal of Virology, 77: 11546-11554)。Sタンパク質及びSsolポリペプチドのORFをMVSchw-ATU2ベクターの追加の転写ユニット中に挿入することによって麻疹ウイルスの組換えゲノムMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolを構築した。

【0448】

このために、SARS-CoV SのcDNAを含有するDNAフラグメントを、鋳型としてプラスミドp cDNA-Sを使用しオリゴヌクレオチド5'-ATACGTACGA CCATGTTTAT TTTCTTATTA TTTCTTACTC T CACT-3'及び5'-ATAGCGCGCT CATTATGTGT AATGTAATTT GACACCCTTG-3'を用いるPCRにより増幅し、次いでプラスミドpTOP0-S-MVを取得するために、プラスミドpCR(登録商標)2.1-TOP0(Invitrogen)中に挿入した。使用した2つのオリゴヌクレオチドは、麻疹ベクター中への後続の挿入を可能にする制限部位BsiWI及びBssHIIを含有しており、麻疹ウイルスのゲノムの長さは6で割り切れなければならないことを定める6のルール(the rule of 6)(Calain & Roux、1993, J. Virol., 67: 4822-4830; Schneiderら、1997, Virology, 227: 314-322)を観察するために、開始コドン及び終結コドンを含む3774ntの配列を作製するように設計した。BigDye Terminator v1.1 kit(Applied Biosystems)及び自動化配列決定機ABI377を用いて挿入物を配列決定した。

【0449】

SARS-CoV Sの可溶性で分泌される形態を発現するため、次いで、SGジペプチドをコードするBspEIリンカーを介してFLAGタグ(DYKDDDDK)の配列とC-ter端部で融合したSARS-CoV Sのエクトドメイン(aa 1~1193)に相当するSsolポリペプチドのcDNAを含有するプラスミドを取得した。このため、DNAフラグメントを、プラスミドpCDNA-Ssolからのオリゴヌクレオチド5'-CCATTTCAAC AATTGGCCG-3'及び5'-ATAGGATCCG CGCGCTCATT ATTTATCGTC GTCATCT TTA TAATC-3'を用いて増幅し、次いでプラスミドpTOP0-S-MV-SFを取得するために、プラスミドpTOP0-S-MV中にSalI部位とBamHI部位との間で挿入した。生成した配列は、BsiWI部位とBssHII部位との間で3618nt長であり、6のルールが観察される。上記のように挿入物

を配列決定した。

【0450】

次いでSタンパク質及びSsolポリペプチドのcDNAを含有するBsiWI-BssHIIフラグメントを、プラスミドpTOP0-S-MV及びpTOP0-S-MV-SFの消化により切り出し、次いでプラスミドpTM-MVSchw2-SARS-S及びpTM-MVSchw2-SARS-Ssolを取得するために、プラスミドpTM-MVSchw-ATU2の対応する部位間にサブクローニングした(図40B)。これら2つのプラスミドは、2004年12月1日に、それぞれ番号I-3326及びI-3327でC.N.C.M.に寄託した。

【0451】

プラスミドpTM-MVSchw2-SARS-S及びpTM-MVSchw2-SARS-Ssolに対応する組換え麻疹ウイルスは、Radeckeら(1995, Embo J., 14: 5773-5784)により記載されParksら(1999, J. Virol., 73: 3560-3566)により改変されたヘルパー細胞株の使用に基づくシステムに従う逆遺伝学により取得した。簡潔には、ヘルパー細胞293-3-46を、リン酸カルシウム法に従い、5 µgのプラスミドpTM-MVSchw2-SARS-S又はpTM-MVSchw2-SARS-Ssolと、MV Lポリメラーゼの発現を導く0.02 µgのプラスミドpEMC-La(M.A. Billeterからの寄贈)とでトランスフェクトする。37℃にて一晩インキュベートした後、43℃にて2時間熱ショックを生じ、トランスフェクトした細胞を単層のVero細胞上に移した。2つのプラスミドの各々について、2～3日の共培養の後にシンシチウムが現れ、これを、35mmペトリ皿中次いで25cm²フラスコ及び75cm²フラスコ中で70%コンフルエンスの単層Vero細胞上に連続して移した。シンシチウムが80～90%コンフルエンスに達したときに、細胞をスクレーパを用いて回収し、次いで一度凍結・解凍する。低速遠心分離後、ウイルスを含有する上清を小分けして-80℃で貯蔵する。組換えウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolの力価は、Vero細胞に対して限界希釈により決定し、力価を、ウェルの50%を感染させる用量(TCID₅₀)として、Karberの方法に従って算出した。

【0452】

3) 組換えウイルスの特徴付け

Sタンパク質及びSsolポリペプチドをコードする導入遺伝子の発現をウェスタンブロットティング及び免疫蛍光により評価した。

T-25フラスコ中の単層Vero細胞を、種々の継代の2つのウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssol並びにコントロールとしての野生型ウイルスMWSchwに多重度0.05で感染させた。シンシチウムが80～90%コンフルエンスに達したときに、細胞質抽出物を抽出緩衝液(150mM NaCl、50mM Tris-HCl、pH7.2、1% Triton X-100、0.1% SDS、1% DOC)中に調製し、次いでLaemmliに従うローディング緩衝液中に希釈し、8% SDSポリアクリルアミドゲル上で分離し、PVDF膜(BioRad)上に移した。このイムノブロット(ウェスタンブロット)の検出を、抗Sウサギポリクローナル血清(ウサギP11135の免疫血清：上記実施例4を参照)及びウサギIgGを指向し、ペルオキシダーゼにカップリングしたロバポリクローナル抗体(NA934V, Amersham)を用いて行った。結合した抗体を、ECL+キット(Amersham)を用いる発光及びHyperfilm MPオートラジオグラフィフィルム(Amersham)により可視化した。

【0453】

スライドガラス上の単層のVero細胞を、2つのウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssol並びにコントロールとしての野生型ウイルスMWSchwに、0.05の感染多重度で感染させた。シンシチウムが90～100%コンフルエンス(MVSchw2-SARS-Ssolウイルス)又は30～40%コンフルエンス(MVSchw2-SARS-S、MWSchw)に達したときに、細胞を4% PBS-PFA溶液中で固定し、0.2% Tritonを含有するPBS溶液で透過化し、次いで精製し不活化したSARS-CoVピリオンで超免疫化したウサギポリクローナル抗体及びFITCにカップリングした抗ウサギIgG(H+L)ヤギ抗体接合体(Jackson)で標識した。

【0454】

図41及び42に示すように、組換えウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolは、SARS-CoVの感染の8時間後に観察することができるレベルに匹敵するレベルで、それぞれSタンパク質及びSsolポリペプチドの発現を導く。これらポリペプチドの発現は、細胞培養中での組換えウイルスの3継代後でも安定である。これら結果は、組換え麻疹ウイルス

が確かに導入遺伝子のキャリアであり、膜形態(S)又は可溶形態(Ssol)でのSARS糖タンパク質の発現を可能にすることを証明する。Ssolポリペプチドは、この同じポリペプチドが対応する配列の一過性トランスフェクション後に哺乳動物細胞で発現される場合(上記実施例11を参照)と同様に、MVSchw2-SARS-Ssolウイルスに感染した細胞により分泌されると予測される。

【0455】

4) 適用

ウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-SsolがSARS-CoV Sの発現を可能にすることが示されたので、MVによる感染に感受性である

【数1】

10

$CD46^{+/+}$ $IFN-\alpha\beta R^{-/-}$

マウスでSARS-CoVに対する保護免疫応答を誘導する能力を評価する。免疫したマウスの抗体応答を、SARS-CoVの天然型抗原に対するELISA検査により評価し、上記の方法論を使用してインビトロでSARS-CoVの感染性を中和する能力について評価する。応答の保護力は、SARS-CoVの非致死性攻撃感染の2日後に、肺のウイルス量(viral load)の減少を測定することにより評価する。

【0456】

第2世代組換え麻疹ウイルスは、上記実施例15に記載のように、S遺伝子及びSol遺伝子の野生型配列を、哺乳動物細胞での発現に最適化された合成遺伝子に置換することにより構築する。これら組換え麻疹ウイルスは、より大量のS抗原及びSsol抗原を発現することが可能であり、したがって増大した免疫原性を示すことができる。

20

【0457】

或いは、Sタンパク質又はSsolポリペプチドをコードする野生型又は合成の遺伝子は、麻疹ベクターMVSchw-ATU3中に、H遺伝子とL遺伝子との間に位置する追加の転写ユニットの形態で挿入し、次いで組換えウイルスを同様な様式で作製し特徴付けてもよい。この挿入は、異なる特徴(ウイルスの増殖、導入遺伝子の発現レベル)を有する組換えウイルスを生成することができ、おそらくP遺伝子とN遺伝子との間の導入遺伝子の挿入後に得られる免疫原性と比較して向上した免疫原性を生じることができる。

30

【0458】

組換え麻疹ウイルスMVSchw2-SARS-Ssolは、診断適用及びワクチン適用のためのSsol抗原の定量的産生及び精製に使用できる。

【0459】

実施例18: Sタンパク質に関連する他の適用

a) S又はSsolの発現を(Sのフラグメントの発現でさえ)可能にするレンチウイルスベクターは、ヒト又は獣医学上の予防に使用されるべきSARS-CoVに対する組換えワクチンを構成することができる。このようなワクチンの実現可能性を証明するために、組換えレンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-S-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-WPREの免疫原性をマウスで研究する。

40

【0460】

b) モノクローナル抗体は、組換えSsolポリペプチドを用いて産生する。上記の実施例14で提示した結果によれば、これら抗体又はその少なくとも大部分は天然型形態のSARS-CoV Sを認識し、診断及び/又は予防に適用することができる。

【0461】

c) SARSについての血清学的検査を、抗原として使用するSsolポリペプチド及び二重エピトープ法で開発する。

【図面の簡単な説明】

【0462】

【図1】発現ベクターpIVEXからの組換えタンパク質N、S_C及びS_Lのインビトロでの発現

50

のウェスタンブロット分析を説明する。

【図2】発現ベクターpIVEXからのNタンパク質のインビボでの発現の、変性条件(SDS-PAGE)下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動及びクーマシーブルーでの染色による分析を説明する。

【図3】発現ベクターpIVEXからのS_L及びS_Cポリペプチドのインビボでの発現の、変性条件(SDS-PAGE)下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動及びクーマシーブルーでの染色による分析を説明する。

【図4】組換えベクターpIVEXで形質転換したE.coli BL21(DE3)pDIA17系統中で産生した組換えN、S_L及びS_Cタンパク質の抗原活性を説明する。

【図5】ベクターpIV2.3Nからの、E.coli BL21(DE3)pDIA17系統中で産生した組換えNタンパク質のNi-NTAアガロースカラムでの精製を説明する。

【図6】pIV2.4S₁で形質転換したE.coli BL21(DE3)pDIA17系統中で産生した封入体からの組換えS_Cタンパク質の精製を説明する。

【図7】SARS-CoVに感染した細胞の溶解物及び異型肺炎に罹患している患者からの血清を用いて作成したイムノブロットを表す。

【図8】SARS-CoVに感染した細胞の溶解物と核タンパク質N(A)に特異的なウサギ免疫血清及び針状タンパク質S(B)に特異的なウサギ免疫血清とを用いて作成したイムノブロットを表す。

【図9】免疫に使用した対応する組換えタンパク質に対する、Nタンパク質又はSタンパク質の短いフラグメント(S_C)を指向するウサギ単一特異性ポリクローナル血清のELISA反応性を説明する。

【図10a】SARS-CoVにより引き起こされた異型肺炎に罹患している患者からの血清に対する、精製した組換えNタンパク質のELISA反応性を説明する。

【図10b】SARS-CoVにより引き起こされた異型肺炎に罹患している患者からの血清に対する、精製した組換えNタンパク質のELISA反応性を説明する。

【図11】プライマー対No. 1 (N/+ /28507、N/- /28774)(A)及びプライマー対No. 2 (N/+ /28375、N/- /28702)(B)を用いた漸減量(10⁷～1コピー)のSARS-CoV N遺伝子の合成RNAのRT-PCRによる増幅を説明する。

【図12】SARS-CoV N遺伝子の合成RNAのリアルタイムでのRT-PCRによる増幅を説明する。

【図13】番号031589で記録されたサンプルに由来するSARS-CoV系統のゲノムのDNA等価物に相当する配列番号1の配列の制限地図を表す。

【図14】間接N ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す。

【図15】間接N ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す。

【図16】二重エピトープN ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す。

【図17】二重エピトープN ELISAによるSARS血清学検査の結果を示す。

【図18】SARS-CoVの天然型核タンパク質Nに対するELISAによる抗Nモノクローナル抗体の反応性の検査を説明する。

【図19】ヒトコロナウイルス229E(HCoV-229E)の天然型抗原に対するELISAによるSARS-CoVのNに対するモノクローナル抗体の反応性の検査を説明する。

【図20】SARS-CoVの変性した天然型核タンパク質Nに対するウェスタンブロッティングによるSARS-CoVのNに対するモノクローナル抗体の反応性の検査を示す。

【図21】SARS-CoV Sタンパク質の哺乳動物細胞での発現用のプラスミドを示す。

【図22】VeroE6細胞のトランスフェクション後のSタンパク質の発現を説明する。

【図23】VeroE6細胞及び293T細胞のトランスフェクション後のSタンパク質の発現に対するCTE配列及びWPPE配列の効果を示す。

【図24】SARS-CoV Sの発現のための中央DNAフラップを有する欠損レンチウイルスベクターを示す。

【図25】レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-S-WPRE及びTRIP-SD/SA-S-CTEで形質導入した細胞株によるSARS-CoV Sの発現のウェスタンブロット分析を示す。

【図 2 6】 レンチウイルスベクターTRIP-SD/SA-Ssol-WPRE及びTRIP-SD/SA-Ssol-CTEで形質導入した細胞株によるSsolポリペプチドの発現の分析に関する。

【図 2 7 A - C】 精製したSsolポリペプチドの分析に関連する結果を示す。

【図 2 7 D】 精製したSsolポリペプチドの分析に関連する結果を示す。

【図 2 8】 SARS-CoV SをコードするプラスミドDNAを用いる遺伝子免疫の効力に対する、スプライシングシグナル並びにCTE配列及びWPRE配列の影響を説明する。

【図 2 9】 SARS-CoV SをコードするプラスミドDNAを用いる遺伝子免疫後にマウスで誘導された抗体でのSARS-CoVの感染性の血清中和化を示す。

【図 3 0】 SARSに罹患している患者からの血清に対する組換えSsolポリペプチドの免疫反応性を説明する。

10

【図 3 1】 組換えSsolポリペプチドでの免疫後のSARS-CoVを指向する抗体の誘導を示す。

【図 3 2】 合成遺伝子040530の配列とSARS-CoV単離株031589の野生型遺伝子の配列とのヌクレオチドアラインメントを表す。

【図 3 3】 SARS-CoV Sの発現のための合成遺伝子の使用を説明する。

【図 3 4 A - C】 組換えワクシニアウイルスVV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN-S及びVV-TN-Ssolの構築のための図解を示す。

【図 3 4 D】 組換えワクシニアウイルスVV-TG-S、VV-TG-Ssol、VV-TN-S及びVV-TN-Ssolの構築のための図解を示す。

【図 3 5】 ウェスタンブロッティングにより分析した、組換えワクシニアウイルスによるSタンパク質の発現を説明する。

20

【図 3 6】 組換えワクシニアウイルスによるSsolポリペプチドの分泌のウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図 3 7】 SDSポリアクリルアミドゲル上で精製したSsolポリペプチドの分析を示す。

【図 3 8】 SARSに罹患している患者の血清に対する、組換えワクシニアウイルスVV-TN-Ssolにより産生された組換えSsolポリペプチドの免疫反応性を説明する。

【図 3 9】 組換えワクシニアウイルスでの免疫後のマウスにおける抗SARS-CoV抗体応答を示す。

【図 4 0】 組換えウイルスMVSchw2-SARS-S及びMVSchw2-SARS-Ssolの構築を記載する。

【図 4 1】 ウェスタンブロッティングにより分析した、組換え麻疹ウイルスによるSタンパク質の発現を説明する。

30

【図 4 2】 免疫蛍光により分析した、組換え麻疹ウイルスによるSタンパク質の発現を示す。

【図 4 3】 ペプチドE1-12、E53-76及びM2-14を指向するウサギ血清の免疫反応性のウェスタンブロット分析を説明する。

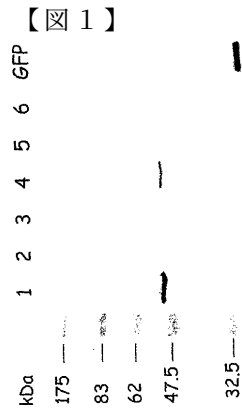
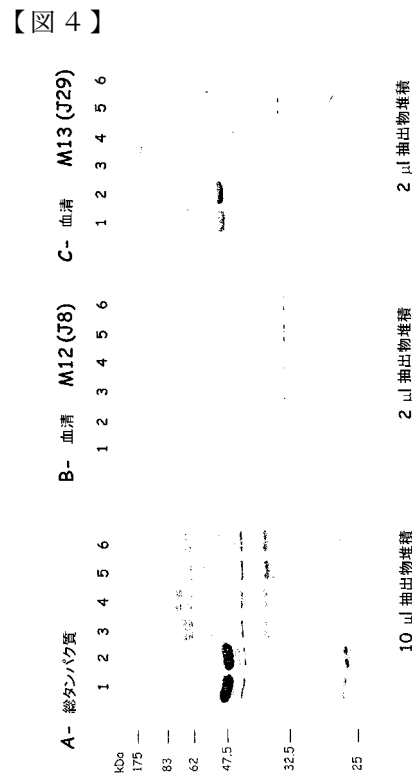
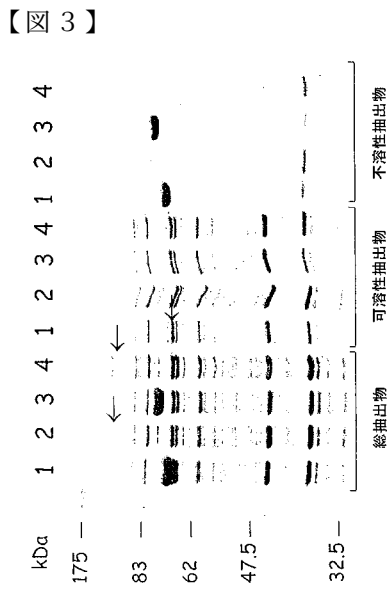
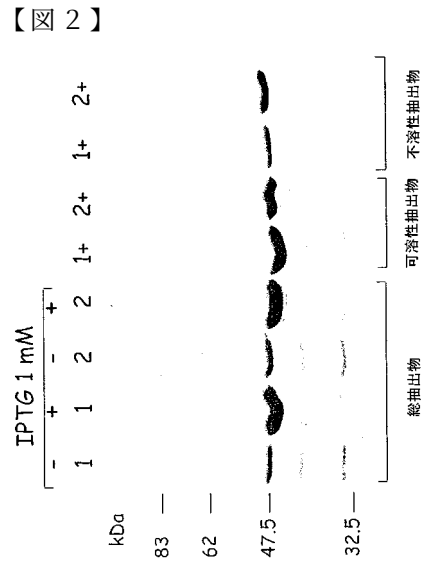


FIGURE 1



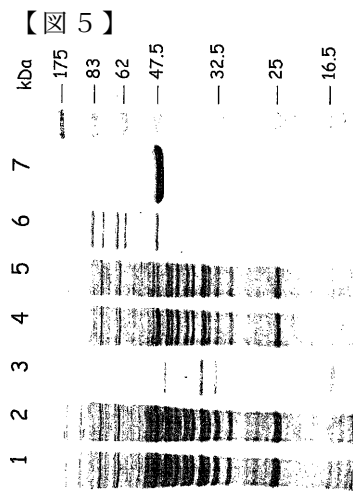
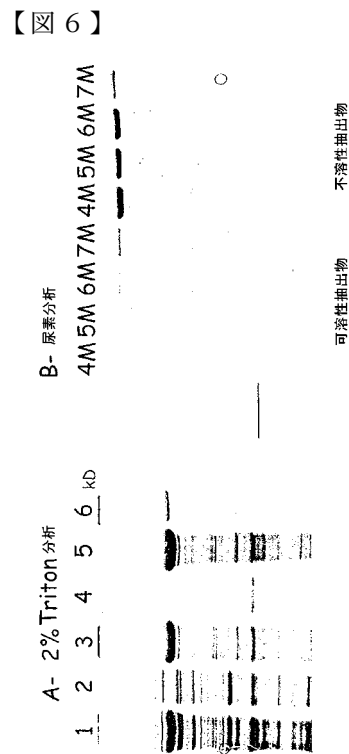
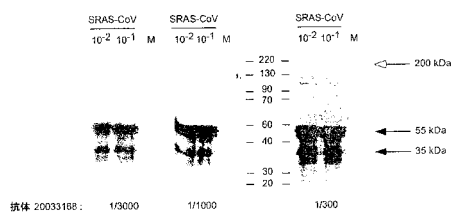


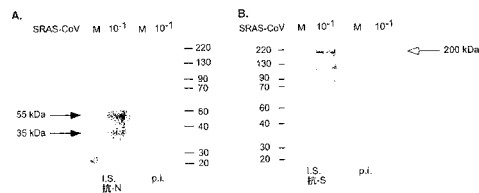
FIGURE 5



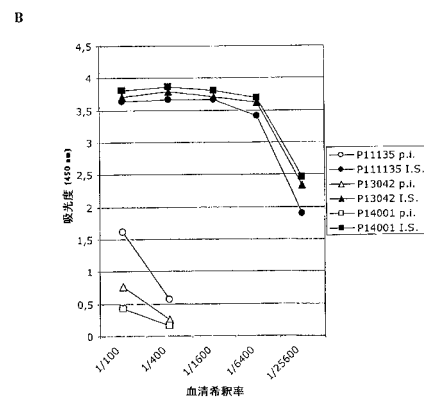
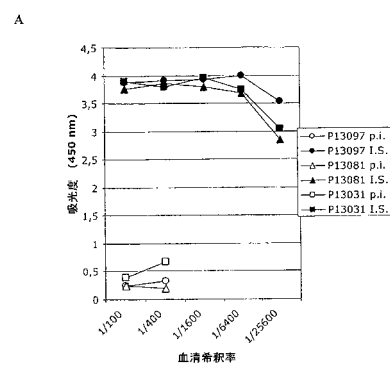
【图 7】



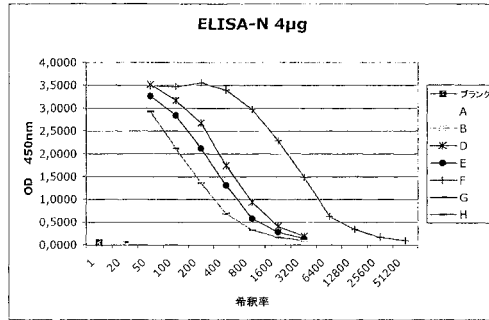
【图 8】



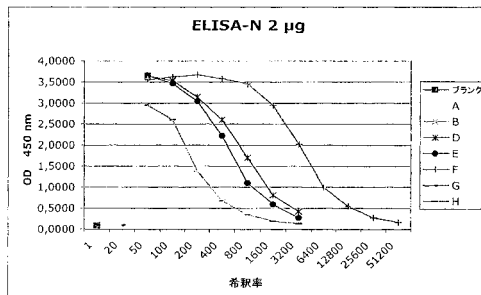
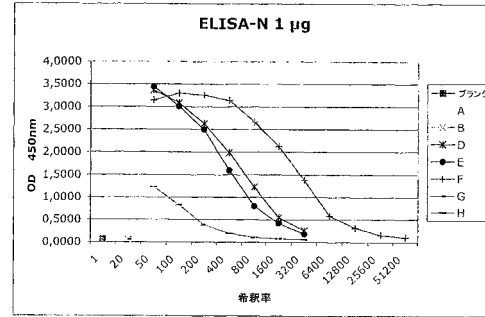
【图 9】



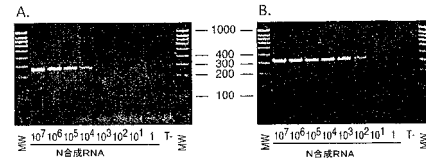
【図 10 a】



【図 10 b】



【図 1 1】



【図 1 2】

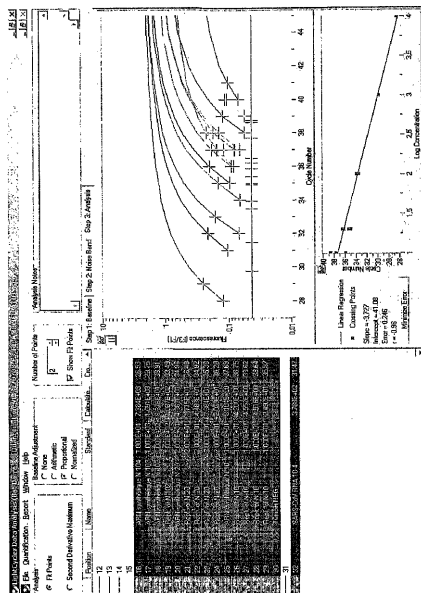


FIGURE 12

【图 13. 1】

```

                                >< XhoII
                                >< Sau3AI
>< SbfI
>< HpaI      > < TthH8BI   >< NdeII
>< EcoRII    > < TaqI     >< MlI
>< Ecl136I   >< Sau3AI   >< MboI
>< DsaV       >< NdeII   >< DpnII
>< BstOI      >< MboI< MlI< DpnI
>< BstNI      >< DpnII   >< BstYI
>< BslII      >< DpnI    >< BspAI
>< BsaJI      >< BspAI   >< Bsp143I
>< ApyI        >< Bsp143I< BglII
ATATTAGGTTT TTTCACCTAC CAGGAARAAG CAACCAACCT CGATCTGTGT TAGACTTGTT CTCTAACAGA
10          20          30          40          50          60          70

                                >< VneI
                                >< SphI
                                >< SnaI
                                >< RmaI
                                >< PaeI   >< SduI
                                >< NspI   >< NspII
                                >< NspHI  >< HgiAI
                                >< MlaIII >< Bsp128BI
                                >< MaeI   >< BvuI
                                >< ApaLI   >< ApaLI
                                >< Alw44I  >< Alw21I
>< DraI         >< BbvI   > < Fnu4HI   >< Alw21I
ACTTTAAAT GTGTGTACT CTCCTCGGC TGCATGGCTA TGACCATC GCACTATAA CAATAATAAA
90          100         110         120         130         140         150

                                >< SfeI
                                >< EspI   >< MnlI
                                >< Ksp632I >< EarI
                                >< HindII  >< MboII
                                >< HincII  >< MaeIII
                                >< BamI104I
TTTTACTGTC GTTAGCAGA ACACGATAC TCGTCCCTCT TCCTGCAGTA GCTTAGCGTT TGTCCCGTGT
150         160         170         180         190         200         210

                                >< TthH8BI
                                >< StyI   >< SbfI
                                >< TaqI    >< RsaI   >< SrfI
                                >< Sau3AI  >< MaeI   >< NciI
                                >< NdeII   >< EcoT14I >< MspI
                                >< MboI    >< Eco130I >< MaeIII
                                >< DpnII   >< BstFI   >< HpaII
                                >< DpnI    >< BsuAI   >< KspI
                                >< BspAI   >< BlnI   >< DsaV
                                >< Bsp143I >< AvrII  >< BcnI
TGACGTCGAT CATCACATA CTAAGTTTTC GTCCGGGTGT GACCAGAAG TAAGATGGAG AGCCTTGTTCT
220         230         240         250         260         270         280

                                >< RmaI
                                >< Esp3I   >< MaeII
                                >< HindII  >< BsmAI   >< MaeI
                                >< HincII  >< AflIII >< DdeI
                                >< TtgI29I >< Alw26I  >< BsmBI
TTGTGTGTCA CAGGAANAACA CAGCTGCAC TCGATTTGCC TGCTGCTTGT GTTAGAGTGA TGTGATGCG
290         300         310         320         330         340         350

```

FIGURE 13.1

FIGURE 13.5

FIGURE 13.9

FIGURE 13.13

【図 13. 15】

FIGURE 13. 14

FIGURE 13.15

【図 13. 17】

FIGURE 13. 16

FIGURE 13.17

FIGURE 13.25

FIGURE 13.29

FIGURE 13.30

FIGURE 13.31

FIGURE 13.32

FIGURE 13.33

FIGURE 13.37

FIGURE 13. 41

FIGURE 13. 49

FIGURE 13.49

【図 13. 51】

FIGURE 13. 50

FIGURE 13.51

【図 13. 53】

FIGURE 13.52

FIGURE 13.53

FIGURE 13.55

FIGURE 13.57

FIGURE 13.61

FIGURE 13. 63

FIGURE 13.65

【図 13. 67】

```
>< Alw21I >< Csp6I >< BlnI >< BshI>< HindIII  
AAATGAAAGA GTCAGCAGCCC AGATTGGTACT TCTATTACCT AGGAACATGCC CCAGAGCGCT CACTTCCCTA  
28430 28440 28450 28460 28470 28480 28490  
  
>< HphI >< AluI >< AfaI >< AvrII >< AsuI >< AluI  
CGGCAGCTCA AAAGAAGGCA TGTTATGTGG TGCAACTGATG GGAGCGCTTGA ATACACCCTAA NGAOCCACAT  
28500 28510 28520 28530 28540 28550  
  
>< HinPII >  
>< HinfI >  
>< HhaI >  
>< HaeFI >  
>< CfoI >>< MnlI >>< NlaIV >  
>< Bsp143II >>< SfaNI >>< DdeI >>< BscBI >  
CGGCAGCTCA AAAGAAGGCA TGTTATGTGG TGCAACTGATG GGAGCGCTTGA ATACACCCTAA NGAOCCACAT  
28500 28510 28520 28530 28540 28550  
  
>< NlaIV >  
>< Eco64I >  
>< BscDI >  
>< BanI >  
>< AclI >  
>< AccBI >>< BbvI >>< Fnu4HI >>< MnlI >  
GGCACCTGCA ATTCTCATRAA CAATCTGTGCC ACCGTGCTCA AACTTCTCTCA AGGAAACA TTGGCAAAGA  
28570 28580 28590 28600 28610 28620 28630  
  
>< MnlI >>< MnlI >  
>< MaeII >>< MvnI >  
>< BstUI >>< Bsp50I >  
>< Bsp632I >>< Eru4HI >>< BspWI >>< Eari >>< BsaAI>>< AclI >  
GCTTCTAGCG AGAGGGAAGC AGAGCGGGCA GTCAAGGCTC TTCTCGTGCTC TCATACAGTA GTCGCGGTAA  
28640 28650 28660 28670 28680 28690 28700  
  
>< SbfI >  
>< MvaI >  
>< EcoRII >>< TthHB8I >  
>< EcII36I >>< RmaI >  
>< BsaVS>>< Fnu4HI >>< NheI >  
>< BstOI >>< MnlI >  
>< BstNI >>< MaeI >  
>< BclI >>< BspMI >  
>< ApyI >>< BbvI >>< TaqI >>< AclI >  
TTCAGAGAAAT TCACCTCTCGT GCAGCAGTAG GGGAAATCT CTCTGCTCGAA TGCTATGCG AGSTGTGTGA  
28710 28720 28730 28740 28750 28760 28770  
  
>< Thai >  
>< WnI >  
>< HphI >>< MnlI >  
>< HinPII >  
>< HinfI >  
>< HhaI >  
>< BstUI >>< RmaI >>< Pali >>< MaeII >>  
>< Bsp50I >>< MaeI >>< BsuRI >>< BshI >>  
>< BbvI >>< CfoI>>< Fnu4HI >>< AluI >  
>< AclI>>< BspMI >>< AluI >  
ACTGCGCTCT CGCTATCTCG GTACAGACCA TTGAACGAC TTGAAGCTCA AGTTTCTGTG TAAGGCGAAC  
28780 28790 28800 28810 28820 28830 28840  
  
>< Pali>>< MaeII >  
>< MaeII >>< Fnu4HI >>< MaeII >  
>< BsuRI >>< DdeI >>< DdeI >  
>< BsuRI >>< DdeI >>< DdeI >
```

FIGURE 13.67

【図 13. 69】

```

>> Pfu4HI
>> BspWI
>> BsaAI
>> Alw26I
>> AclI
AGCCTTTGGC GCAGAGACAA AAGAGCAGC CCACGTGCAC TCTTCTCTCT GCAGCGTGACA TGGATGATT
29270 29280 29290 29300 29310 29320 29330

>> NlaIII
>> FokI
CTCCAGACACA CTTCAAATTT CCATGATGGG AGCTTCTGCT GATTCACTAC AGGCATAAAC ACTCATGATC
29340 29350 29360 29370 29380 29390 29400

>> MaeII
ACCCACACAAG GCAGATGGCG TATGTAAAGC TTTTGCATC TCCGTTTACG ATATCATAGCT TACTCTTGTS
29410 29420 29430 29440 29450 29460 29470

>> Tru9I
>> MseI
>> XmnI
>> EcoRI> MaeIII
>> Bsp70II > BsgI
CAGAAATGAAT TCTCGTAAC TAAACAGACA AGTAGGTGTTA GTTAACTTTA ATCTCACATA GCAATCTTCA
29480 29490 29500 29510 29520 29530 29540

XorII >
TthHB8I >
TaqI >
SmaI >
> TthIpuI >
NdeII >
MnlI >
MvuIMcrI >
MboI >
DpnII >
DpnI >
Csp6I >
> BstUI
> NaeIII BspCI >
BspAT >
> TthHB8I > Bsp50I
> Pali Bsp143I >
> BsuRI BsiEI >
> BshIAfaI >
> NlaII
> MaeIII
ATCAATGTGT AACATTAGGG AGGACTTGA AAGAGCCACCA CATTTCATC GAGGCCACCG GGAGATGAGT
29550 29560 29570 29580 29590 29600 29610

> SduI
> NspII
> MboII > VspI
> Eco24I > Tru9I
> Bsp1286I > MseI
> BmyI > AseI
> AfaI > BbvI > AluI> Eam1104I > BanII > AseI
> Ksp632I > Eco24I > Bsp1286I > BmyI > AseI
> Fnu4HI > EarI
> Bsp6I

```

FIGURE 13.69

【図 14】

SARS血清型: 同種4技法(第1セツト)

OD 450nm/620nm

1/200
1/600
1/3300
1/12800

03124 (CV-27)
03164 (CV-28)
03389 (CV-29)
03362 (CV-30)
03264 (CV-31)
03252 (CV-32)
03351 (CV-33)
03352 (CV-34)
03353 (CV-35)
03354 (CV-36)
03355 (CV-37)
03356 (CV-38)
03357 (CV-39)
03358 (CV-40)
03359 (CV-41)
03360 (CV-42)
03361 (CV-43)
03362 (CV-44)
03363 (CV-45)
03364 (CV-46)
03365 (CV-47)
03366 (CV-48)
03367 (CV-49)
03368 (CV-50)
03369 (CV-51)
03370 (CV-52)
03371 (CV-53)
03372 (CV-54)
03373 (CV-55)
03374 (CV-56)
03375 (CV-57)
03376 (CV-58)
03377 (CV-59)
03378 (CV-60)
03379 (CV-61)
03380 (CV-62)
03381 (CV-63)
03382 (CV-64)
03383 (CV-65)
03384 (CV-66)
03385 (CV-67)
03386 (CV-68)
03387 (CV-69)
03388 (CV-70)
03389 (CV-71)
03390 (CV-72)
03391 (CV-73)
03392 (CV-74)
03393 (CV-75)
03394 (CV-76)
03395 (CV-77)
03396 (CV-78)
03397 (CV-79)
03398 (CV-80)
03399 (CV-81)
03400 (CV-82)
03401 (CV-83)
03402 (CV-84)
03403 (CV-85)
03404 (CV-86)
03405 (CV-87)
03406 (CV-88)
03407 (CV-89)
03408 (CV-90)
03409 (CV-91)
03410 (CV-92)
03411 (CV-93)
03412 (CV-94)
03413 (CV-95)
03414 (CV-96)
03415 (CV-97)
03416 (CV-98)
03417 (CV-99)
03418 (CV-100)

【图 1 6】

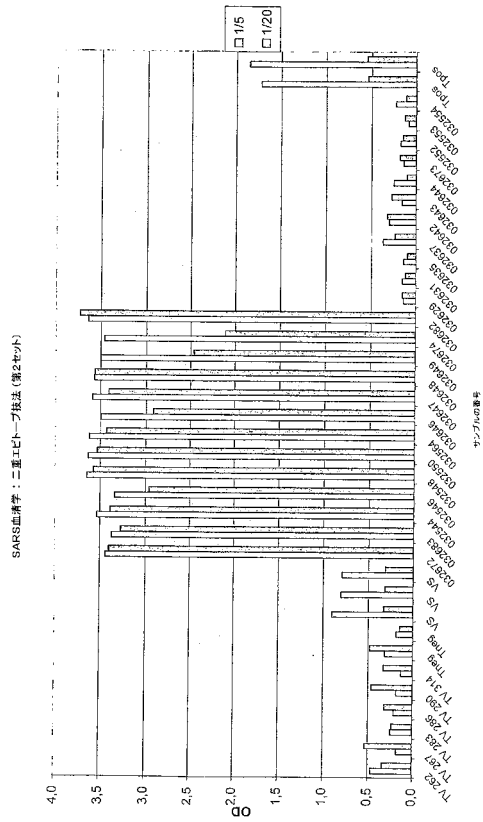
SARS血清型別・簡便測定法(第2セット)

OD 450nm/620nm

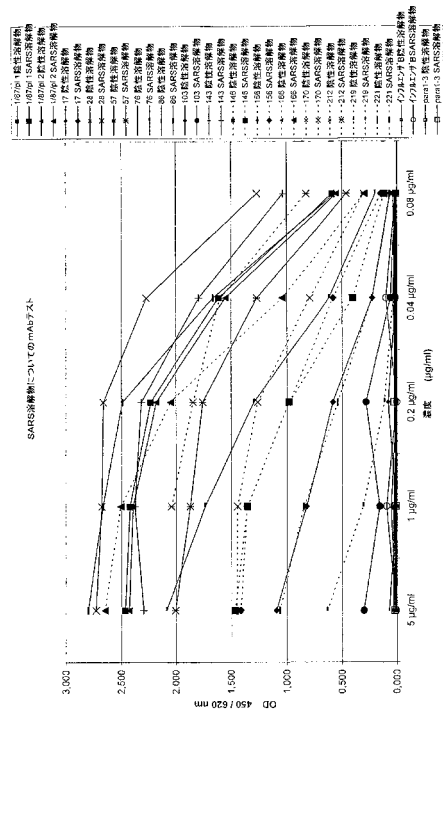
1:100
 1:500

TV 205
 TV 206
 TV 207
 TV 208
 TV 209
 TV 210
 TV 211
 TV 212
 TV 213
 TV 214
 TV 215
 TV 216
 TV 217
 TV 218
 TV 219
 TV 220
 TV 221
 TV 222
 TV 223
 TV 224

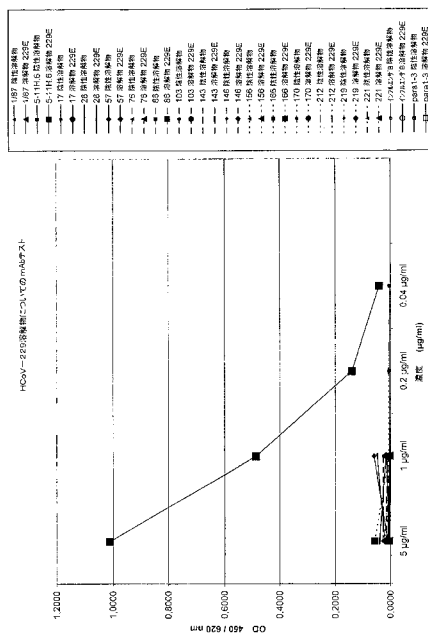
【図 17】



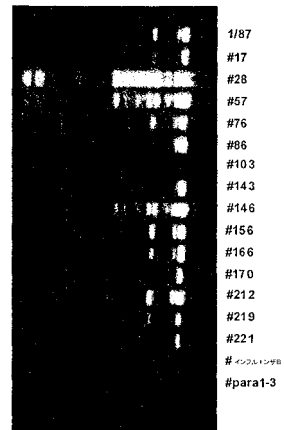
【図 18】



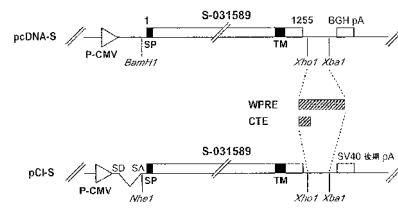
【図 19】



【図 20】



【図 2 1】



【図 2 2】

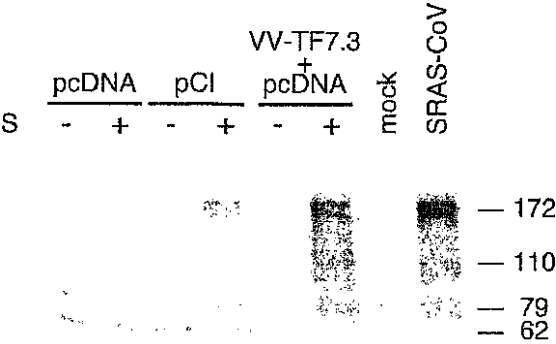


FIGURE 22

【図 2 3】

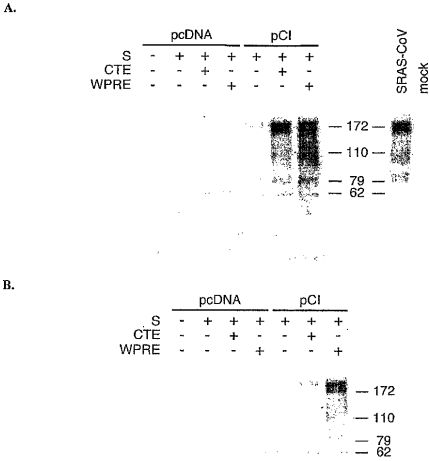


FIGURE 23

【図 2 4】

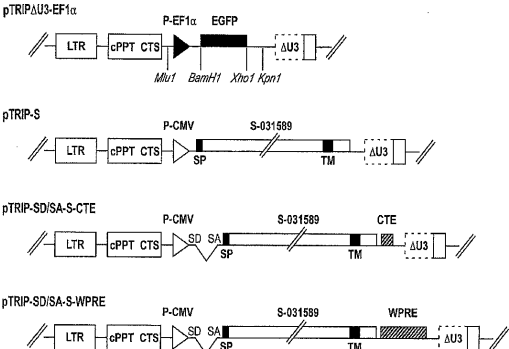


FIGURE 24

【図 2 6】

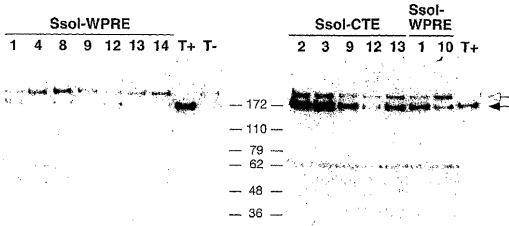


FIGURE 26

【図 2 5】

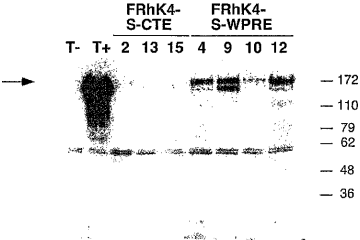
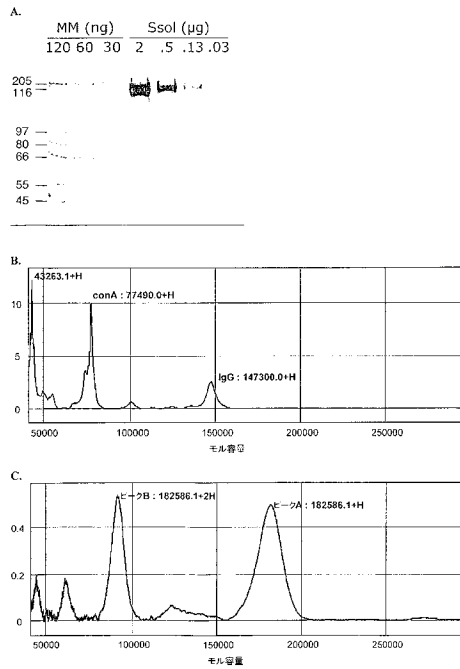
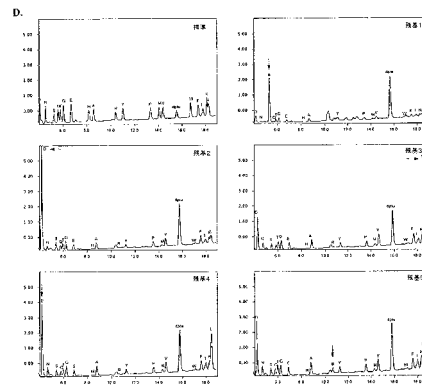


FIGURE 25

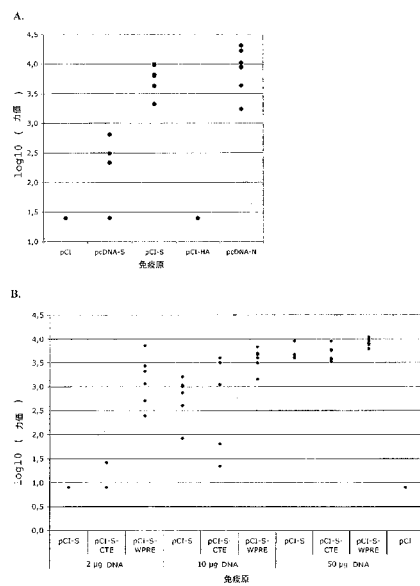
【図 27 A - C】



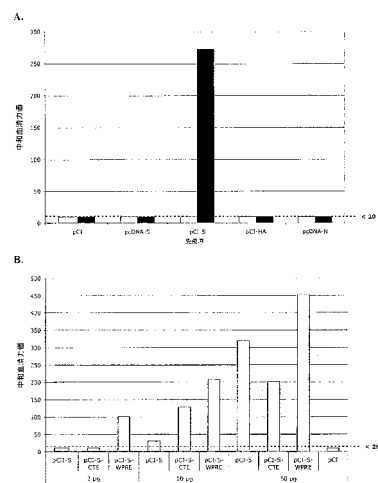
【図 27 D】



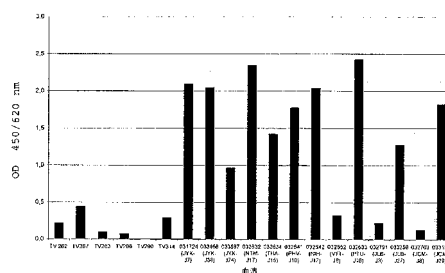
【図 28】



【図 29】



【図 30】



【図 3 1】

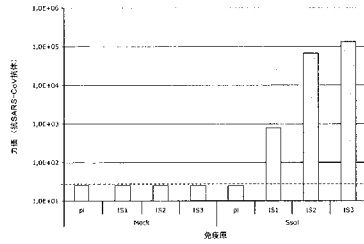


FIGURE 3.2

【図 3 2. 1】

1 CTCTCTGGAAAGGTAGGCTTATCATTAGAGAAACACAGAGTTGTGTTCAAGTG
 I-3059 8-040530
 61 ATATCTCTTTAACAACATAAGAGCACTTTATTTCTATTATTTCTTACTCTCACTA
 Y-3059 8-040530
 121 GTGCTAGTGAOCTTGACCGTGAACACTTTGAGTGTTCAGCTCTTATTAAGTCTC
 I-3059 8-040530
 181 AACATAGTCTCTCTCTGAGGAGGCTTTACTAGCTGATGAATTTTGAATCAGAGCT
 I-3059 8-040530
 240 CTATTTTACTGAGGATTTATTTCTTCAATTTTATTAAGTGAAGGTTGATGATCT
 I-3059 8-040530
 300 ATTAATCTAGCTTTGGCAAGCTCTCATACCTTTTAAAGTGTGTTTATTTGCTGCC
 I-3059 8-040530
 360 ACAGAGAAATCAAAATTTGTCGAGGTTGGGTTTGGTTCTACGATGAACAGAGTCA
 I-3059 8-040530
 420 CAGTCTGATGATTTATTAACAAATCTACTAATGTTGTTTAAAGAGTGAATTTGAA
 I-3059 8-040530
 480 TTGCTGAGCAAGCTTTCTTGTGTTTCTAAAGGAGGTTGAGAGAGAGTATGAGT
 I-3059 8-040530
 540 ATATCTGATATGATTTTAAATGAGCTTTGAGTATGATTTGAGTCTTTTGTGTTAT
 I-3059 8-040530
 600 GTTTCAGAAAGTCAAGTAAATTTAAAGCTTTAGAGAGTTTGTGTTTAAATTAAGAT
 I-3059 8-040530
 660 GGTGTTCTCTATTTTAAAGGCTTCAAGCTTATAGATGATTTGTTGATCTACCTCT
 I-3059 8-040530
 720 GGTTTTAAAGCTTTGAAAGCTTTTAAAGTGTGTTGATTTAAAGTGAATTTT
 I-3059 8-040530
 780 AGAGGATCTTCAAGCTTTTCAAGCTTCAAGCTTTGAGGAGCTTCAAGCTTCAAGC
 I-3059 8-040530
 840 TATTTTGTGCTTATTAAGGAGCTTCAAGCTTCAAGCTTCAAGCTTCAAGCTTCAAGC
 I-3059 8-040530
 900 ATCAAGTCTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTGAT
 I-3059 8-040530
 960 AGCTTTGAGATTTCAAGAGGATTTTCAAGAGCTTTTCAAGAGGTTTCTTCTTCAAG
 I-3059 8-040530
 1020 GATGTTGATGATTTCTTCAATTTTCAAGAGCTTTGATTTGATTTGATTTGATTTGAT
 I-3059 8-040530
 1080 ACTAATTTCTTCTGCTTATGAGTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 I-3059 8-040530
 1140 TACTTCTGCTTCAAGCTTCAAGCTTTTCAAGCTTTTCAAGCTTTTCAAGCTTTTCAAG
 I-3059 8-040530
 1200 ACTAAGTTGAATGATTTTGTGTTTCAAGCTTCAAGCTTTTCAAGCTTTTCAAGCTTT
 I-3059 8-040530
 1260 GATGATTTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 I-3059 8-040530

FIGURE 32.1

【図 3 2. 2】

I-3059 1320 TTGCTGAGATGATTTGAGGAGGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 S-040530 1323
 I-3059 1380 TCAATCTGATATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 S-040530 1383
 I-3059 1440 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 1443
 I-3059 1500 CTAAATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 1503
 I-3059 1560 CAGCTTCAAGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 1563
 I-3059 1620 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 1623
 I-3059 1680 CTCAATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 1683
 I-3059 1740 TCAAGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 1743
 I-3059 1798 TAGAGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 1801
 I-3059 1858 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 1861
 I-3059 1917 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 1920
 I-3059 1977 ACTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 1980
 I-3059 2037 CTGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2040
 I-3059 2097 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2100
 I-3059 2157 AATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2160
 I-3059 2217 GTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2220
 I-3059 2277 TGTGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2280
 I-3059 2337 GATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2340
 I-3059 2397 TACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2400
 I-3059 2457 CTTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2460
 I-3059 2517 GATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2520
 I-3059 2577 CTGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2580
 I-3059 2637 ATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2640

【図 3 2. 3】

I-3059 2697 GTGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2700
 I-3059 2757 ATTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2760
 I-3059 2817 AAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2820
 I-3059 2877 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 2880
 I-3059 2937 AATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 2940
 I-3059 2997 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3000
 I-3059 3057 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3060
 I-3059 3117 ATGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3120
 I-3059 3177 CTGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3180
 I-3059 3237 CAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3240
 I-3059 3297 TGTGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 3300
 I-3059 3357 CTGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3360
 I-3059 3417 GTTATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3420
 I-3059 3477 AAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3480
 I-3059 3537 ATTTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3540
 I-3059 3597 GTGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3600
 I-3059 3657 TATATTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3660
 I-3059 3717 ATGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3720
 I-3059 3777 TGTGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGATGATTTGAT
 S-040530 3780
 I-3059 3837 AATTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3840
 I-3059 3897 CAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
 S-040530 3900

FIGURE 32.3

【図 40】

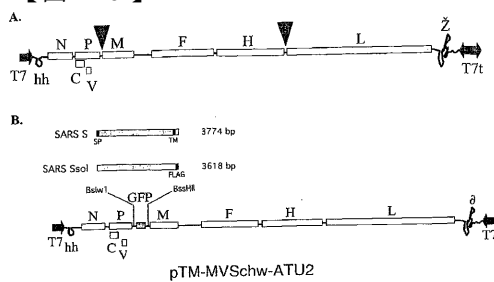


FIGURE 40

【図 4 1】

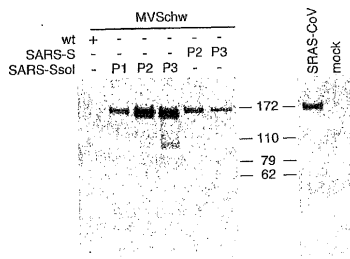


FIGURE 41

【図 4 2】

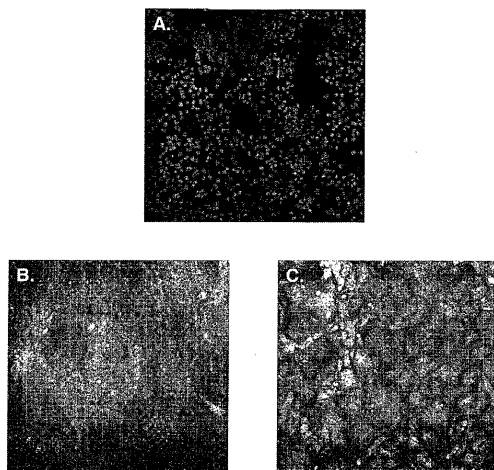


FIGURE 42

【図 4 3】

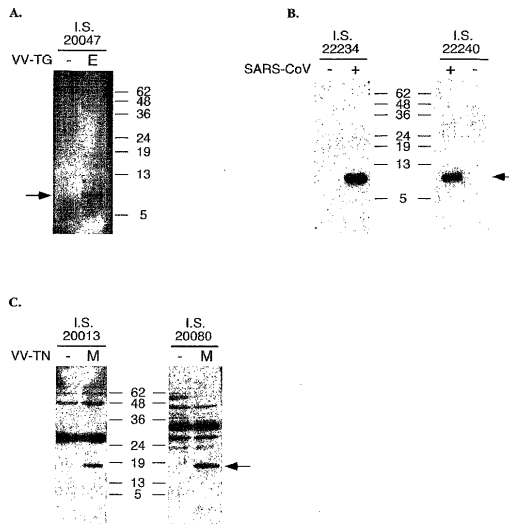


FIGURE 43

【配列表】

0005054384000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/569 L
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08

微生物の受託番号 CNM CNM I-3329

微生物の受託番号 CNM CNM I-3330

微生物の受託番号 CNM CNM I-3331

前置審査

(73)特許権者 506186721

ユニヴェルシテ パリ 7

UNIVERSITE PARIS 7

フランス、エフー75251 セデックス 05 パリ、プレイス ジュシュー、2
2, Place Jussieu, F-75251 Cedex 05 Paris, FRANCE

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 ファン デル ワーフ, シルヴィー

フランス、エフー91190 ジフーシュルイヴェット、アレ デ ラ ポイント ジェネテ、
112

(72)発明者 エスクリオウ, ニコラ

フランス、エフー75014 パリ、リュ ダレシア、201

(72)発明者 クレシェンツォーシェンニュ, バーナデット

フランス、エフー92200 スイイーシュルーセーヌ、リュ デ グラヴィエール、9

(72)発明者 マヌグエラ, ジャンクロード

フランス、エフー75018 パリ、プレイス デ ラ シャペル、16-18

(72)発明者 クンスト, フレデリク

フランス、エフー75724 セデックス 15 パリ、リュ ドゥ ドクトール ル、25-2
8、ビュロー デ ブレベツ エ インベンション、インスティティ パスツール

(72)発明者 カレンドレット, ブノワ

フランス、エフー92000 ナンテール、リュ パスカル、12

(72)発明者 ベットン, ジャンーミシェル

フランス、エフー75014 パリ、リュ レミー デュモンセル、5

(72)発明者 ロリン, ヴアレリー

フランス、エフー92120 モントルージュ、アヴェニュー ド ラ マーン、66

(72)発明者 ジェルボー, シルヴィー

フランス、エフー94100 サン モール、デ フォッセ、リュ ガリバルディ、56

(72)発明者 ブルギエール, アナ マリア

フランス、エフー92140 クラマート、アヴェニュー ヴィクトール ユゴー、95

(72)発明者 アゼビ, サリア

フランス、エフー94400 ヴィトリールーシュルーセーヌ、アパートメント 5123、リュ
ジェルマン デフレネス、48

(72)発明者 シャーニュー, ピエール

フランス、エフー75005 パリ、ビス リュ デ エコール、6

(72)発明者 タンギー, フレデリク

フランス、エフー93260 レ リラス、リュ ギャルド シャッセ、60

- (72)発明者 コンブレデット、シャンタル
フランス、エフー75017 パリ、アヴェニュー ド ヴィリエ、124
- (72)発明者 デラグニュー、ジャンーフランソワ
フランス、エフー78170 ラ セル サン クロード、アヴェニュー デ グレセツ、60
- (72)発明者 マーティン、モニク
フランス、エフー92290 シャトネ マラブリ、アヴェニュー ジャン ジョレス、26

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 Science, (2003), Vol. 300, p. 1399-1404
Science, (2003), Vol. 300, p. 1394-1399
J. Vet. Med. Sci., (1999), Vol. 61, No. 7, p. 827-830
Acta Neuropathol. 2001 Jun;101(6):601-4.

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
C07K 14/165
C12N 5/00
C12N 7/00
C12Q 1/68
G01N 33/569
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
REGISTRY(STN)