

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5758632号  
(P5758632)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00
C 12 N 7/04	(2006.01)	C 12 N	7/04
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00
A 61 K 39/12	(2006.01)	A 61 K	39/12
A 61 P 31/14	(2006.01)	A 61 P	31/14

請求項の数 19 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2010-544350 (P2010-544350)
(86) (22) 出願日	平成21年1月23日 (2009.1.23)
(65) 公表番号	特表2011-523347 (P2011-523347A)
(43) 公表日	平成23年8月11日 (2011.8.11)
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/000458
(87) 国際公開番号	W02009/131604
(87) 国際公開日	平成21年10月29日 (2009.10.29)
審査請求日	平成24年1月19日 (2012.1.19)
(31) 優先権主張番号	61/062,229
(32) 優先日	平成20年1月24日 (2008.1.24)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者 507053954  
ザ・ボード・オブ・リージェンツ・オブ・  
ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・シ  
ステム  
THE BOARD OF REGENT  
S OF THE UNIVERSITY  
OF TEXAS SYSTEM  
アメリカ合衆国、78701 テキサス州  
、オースティン、ウェスト・セブンス・ス  
トリート、201  
(74) 代理人 100082072  
弁理士 清原 義博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】蚊において複製不可能な弱毒化組み換えアルファウイルス属及びそれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アルファウイルス核酸を含む、弱毒化、組換えアルファウイルスであって、  
非構造タンパク質 4 ( n s P 4 ) コード配列の末端及び前記アルファウイルスのサブゲ  
ノム R N A コード配列の開始 A U G との間に ( i ) 不活性化したサブゲノムプロモータ、  
及び ( i i ) 脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム侵入部位 ( E M C V I R E S ) の挿入  
を有し、

前記アルファウイルスは弱毒化していることを特徴とする弱毒化、組換えアルファウイルス。

## 【請求項 2】

非構造タンパク質 4 ( n s P 4 ) コード配列の末端及びアルファウイルス核酸のサブゲ  
ノム R N A コード配列の開始 A U G との間のサブゲノム R N A の 5 ' U T R の欠損により  
前記サブゲノムプロモータが不活性化されていることを特徴とする請求項 1 に記載の弱毒  
化アルファウイルス。

## 【請求項 3】

前記サブゲノム R N A の 5 ' U T R に配されるアルファウイルス核酸への集合点突然変  
異によって前記サブゲノムプロモータが不活性化されていることを特徴とする請求項 1 記  
載の弱毒化アルファウイルス。

## 【請求項 4】

前記アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルスであり、前記集合点突然変異が配

列番号：1である5' c c c c u a u a a c u c u c u a c g g c u a a c c u g a a u g g a c u a c g 3'の5、8、11、12、14、17、20、22、24、25、26、27、28、29、又は30の位置で2以上の突然変異を含む同義の点突然変異であることを特徴とする請求項3記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項5】

サブゲノムプロモータの突然変異は、非構造タンパク質4のカルボキシ末端のアミノ酸配列を修飾しないことを特徴とする請求項3または4記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項6】

ウイルスの複製、放出及びウイルス力価を増加させるのに効果的な非構造タンパク質2(nsP2)における適応変異をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。 10

【請求項7】

前記アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルスであり、同義の適応変異は、T C - 8 3ウイルスnsP2タンパク質においてY<sub>3 7 0</sub>をCに、K<sub>3 7 1</sub>をQに、P<sub>3 4 9</sub>をTに、D<sub>4 1 8</sub>をAに、K<sub>4 2 3</sub>をTに、又はこれらの組合せに対応する1以上のアミノ酸変化をもたらす核酸変異であることを特徴とする請求項6記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項8】

前記アルファウイルスがチクングンヤ熱ウイルスであることを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。 20

【請求項9】

前記アルファウイルスが東部ウマ脳炎ウイルスであることを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項10】

前記アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルスであることを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項11】

前記アルファウイルスが西部ウマ脳炎ウイルスであることを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。

【請求項12】

前記アルファウイルスが蚊及び蚊細胞において複製不可能であることを特徴とする請求項1記載の弱毒化アルファウイルス。 30

【請求項13】

a) エンベロープ糖タンパク質遺伝子の下流と、アルファウイルスの3'UTRの上流に位置付けられるカプシド遺伝子と、

b) エンベロープ糖タンパク質遺伝子の3'末端と、位置付けられたカプシド遺伝子との間に導入されたEMCV IRESと、

を含み、

これらの遺伝子が5'から3'方向へ、エンベロープ糖タンパク質遺伝子、挿入されたEMCV IRES、位置づけられたカプシド遺伝子、3'UTRの順に位置づけられ、 40

c) IRESの上流に位置づけられるエンベロープ糖タンパク質遺伝子がEMCV IRES非依存的な様式で翻訳される一方、位置づけられたカプシド遺伝子がEMCV IRES依存的な様式で翻訳され、

前記アルファウイルスが弱毒化していることを特徴とする弱毒化、組換えアルファウイルス。

【請求項14】

請求項1または13に記載の弱毒化、組換えアルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項15】

請求項14に記載のベクターを包含するとともに発現することを特徴とする宿主細胞。 50

**【請求項 16】**

請求項 1 または 13 に記載の弱毒化、組換えアルファウイルス及び薬学的に許容可能な担体を備えることを特徴とする医薬組成物。

**【請求項 17】**

アルファウイルスへの曝露に起因する感染から被験体を保護する医薬組成物を製造するための、請求項 1 乃至 13 いずれかに記載の弱毒化アルファウイルスの使用。

**【請求項 18】**

前記被験体が人、馬、又は他の家畜であることを特徴とする請求項 17 記載の使用。

**【請求項 19】**

蚊に感染することができない弱毒化、組換えアルファウイルスを作製する方法であって

10

、該方法は、脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム侵入部位 (E M C V I R E S) 及び 3' UTR の上流側に位置するサブゲノム領域の 3' 末端においてカプシド遺伝子を有するエンベロープ糖タンパク質の下流側カプシド遺伝子と、をクローニングする段階を含み、

前記エンベロープ糖タンパク質遺伝子は C A P 依存的様式で翻訳され、カプシドタンパク質は E M C V I R E S 依存的様式で翻訳されることを特徴とする方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

20

本国際出願は、2008年1月24日に出願され、現在放棄された米国仮特許出願 No. 61/062,229 号の利益を主張し、それらの内容の全ては参照として、本出願に組み込まれる。

**連邦政府補助金の説明**

本発明は、米国国立衛生研究所 (N I H) / 米国国立アレルギー・感染症研究所からの補助金 1 U 54 A I 057156 を通じて得られた資金を一部使用してなされた。その結果として、連邦政府は、本発明において一定の権利を有する。

**本発明の分野**

本発明は、分子生物学、ウイルス学及びアルファウイルス属の免疫学に関する。更に具体的には、本発明は、弱毒化、蚊媒介感染能力を有さない組み換えアルファウイルス属を提供し、このようなアルファウイルス属を作り出す方法、及び免疫原性組成物の分野におけるこれら弱毒化アルファウイルス属の使用を開示する。

30

**【背景技術】****【0002】****関連分野の記述**

トガウイルス科におけるアルファウイルス属は、多くの人及び動物の重要な病原体を有している。これらウイルスは、南極区を除いて広く全ての大間に分布し、公共の健康に対する重要な脅威を示している（非特許文献 1、非特許文献 2）。自然状態下では、多くのアルファウイルス属は、蚊により感染し、一生の持続感染の原因となる。この持続的感染は、媒介生物である蚊において生物学的機能において殆ど影響を有さない。蚊による吸血の間に感染される脊椎動物において、アルファウイルス属は急性感染の原因となり、高感染価ウイルス血症を特徴とする。この高感染価ウイルス血症は、自然における新しい蚊の感染及び循環を前提条件としている。

40

**【0003】**

ベネズエラウマ脳炎ウイルス (V E E V) は、アルファウイルス属の最も病原性の強いウイルスの 1 つである。それは、南アメリカ、中央アメリカ及び北アメリカにおいて絶え間なく循環しており、人、馬及び他の家畜を含む散発的な異常発生及び動物間の流行病の原因となる。亜種 I C V E E V を含むベネズエラ及びコロンビア (1995) におけるつい最近の大きな発生の間に、約 100,000 の人症例が発生し、300 を超える致命となる脳炎の症例が試算された（非特許文献 3）。V E E V による動物間流行病の間、脳

50

炎による馬の死亡率が 8.3 % に達し、人における全体の死亡率が低い ( < 1 % ) 間、見当識障害、運動失調、精神的抑鬱及び痙攣を含む神経性疾患が、感染した個人の 14 % まで、特に子供に ( 非特許文献 4 ) 見受けられた。 VEEV を原因とする人の疾患は、発熱性疾患として特徴付けられる。この発熱性疾患は、悪寒、激しい頭痛、筋肉痛、眠気及び咽頭炎を伴う。若年及び老年者は、極端なリンパの喪失を伴う網内系感染を発症し、次いで脳炎に至る。 CNS 感染の結果は、急性髄膜炎であり、その急性髄膜炎が神経細胞の死滅を導くことになる ( 非特許文献 5 ) 。神経兆候は、病気の兆候から 4 - 10 日以内に現れる。神経兆候としては発作、感覚異常、行動変化及び昏睡が挙げられる。

#### 【 0004 】

VEEV の異常発生の継続的な脅威にかかわらず、このウイルスに対する安全で、効果的なワクチンが作られてこなかった。 VEEV の弱毒化 TC - 83 株は、モルモット心臓細胞 ( 非特許文献 6 ) における VEEV の強毒性トリニダードドンキー ( TRD ) 株の連続継代により 40 年以上前に作成された。現在、 TC - 83 は、未だ実験室研究者及び軍関係者のための利用可能な唯一のワクチンである。 8000 人以上の人々が予防接種され ( 非特許文献 7 、非特許文献 8 、非特許文献 9 ) 、その累積データは、全てのワクチン接種者の約 40 % が発熱、全身病及び他の副作用を含む野生の VEEV の典型的な幾つかの兆候を有する疾患を発症することを明らかに示している ( 非特許文献 7 ) 。この TC - 83 株は、脳内及び皮下接種後 ( 非特許文献 10 ) 、一般に新生児マウスを殺すが、成体マウスを殺すことはない。従って、ウイルス病原性に関する更なる弱化及び変異株の効果の研究に対する良い出発物質である。

10

#### 【 0005 】

VEEV ゲノムは、約 12 キロベース長であり、細胞内 mRNA の構造を模倣している正極性の 1 本鎖の RNA 分子である。そのゲノム RNA は、 5' メチルグアニレートキヤップ及び 3' ポリアデニル化された尾部 ( 非特許文献 11 ) を有し、ゲノム RNA のヌクレオカプシドからの放出後、直ちに宿主細胞機構によりウイルスタンパク質の翻訳をすることを特徴としている。そのゲノムの 5' 側 3 分の 2 が非構造タンパク質 ( nsPs ) に翻訳される。この非構造タンパク質は、ウイルスゲノムの複製とサブゲノム RNA の転写に必要な複製酵素複合体のウイルスの成分を含む。サブゲノム RNA は、そのゲノムの 3' 側 3 分の 1 に対応している。サブゲノム RNA は、サブゲノムプロモータから合成され、ウイルス構造タンパク質に翻訳される。 VEEV TC - 83 株の弱毒化表現型は、その株の TRD ゲノム中の 2 つの変異の結果である。その内の 1 つは E 2 糖タンパク質における 120 位のアミノ酸置換であり、もう 1 つは 5' UTR におけるヌクレオチド 3 を変化させたものである ( 非特許文献 12 、非特許文献 13 、非特許文献 11 、非特許文献 14 ) 。従って、アルファウイルスの非常に高い変異率のために、 TC - 83 の病原性の表現型への復帰が、適当な選択状態、例えばインビボでのウイルス継代が生じる場合において大きな懸念を残す。更には、 VEEV TC - 83 は、蚊細胞内で複製が可能であるとともにワクチン接種の後に蚊に感染することが可能であり ( 非特許文献 15 ) 、従って蚊による伝染が可能性として残る。

20

30

#### 【 0006 】

理想的には、生きたアルボウイルスは、媒介節足動物により伝染すべきではない。というのは、保有宿主の間の循環は、増大する病原性を含む予期しない変化を導くからである。復帰しやすい少数の弱毒化変異による野生型ウイルスから作り出された弱毒化株、或は予期しない方法で進化する遺伝的に修飾された株が生物媒介の循環を被る場合、これは特に当てはまる。前者リスクは、テキサスに限定されていた動物間流行病 / 異常発生の域外であるルイジアナにおいて、 1971 の間採取された蚊に VEEV TC - 83 ワクチン株が検出されたことにより強調される ( 非特許文献 15 ) 。

40

#### 【 0007 】

アルファウイルス属に対する感染性 cDNA の進歩によって、広範にウイルスゲノムを修飾することによりそれらの弱毒化を調査する機会が広がり、野生型である病原性の表現型への復帰を最小化又は排除する手法を広げた。更には、このようなアルファウイルス属

50

のゲノムは、脊椎動物の細胞においてのみ機能し、起源である昆虫では機能しないRNA要素を含むよう設計される。従って、このような広範囲な変異は、蚊の媒介により遺伝子を修飾されたウイルスの感染を妨げることができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Griffin, D.E.2001.Alphaviruses, p.917-962. In Knipe and Howley (ed.), Fields' Virology, Fourth Edition. Lippincott, Williams and Wikins, New York

【非特許文献2】Strauss, J. H., E. G. Strauss, 1994., Microbiol. Rev. 58; 491-562 10

【非特許文献3】Rivas, F. et al., 1997, J infect Dis 175:828-32

【非特許文献4】Johnson, K. and D. Martin. 1974. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 18:79-116.

【非特許文献5】Dal Canto, M. C., and S. G. Rabinowitz, 1981, J Neurol Sci 49: 3 97-418.

【非特許文献6】Berge, T. O. et al., 1961, Am. J. Hyg. 73: 209-218.

【非特許文献7】Alevizatos, A. C. et al., 1967, Am J Trop Med Hyg 16: 762-8

【非特許文献8】Burke, D. S. et al., 1977, J Infect Dis 136: 354-9

【非特許文献9】Pittman, P. R. et al., 1996, Vaccine 14: 337-43. 20

【非特許文献10】Paessler, S. et al., 2003, J Virol 77: 9278-86

【非特許文献11】Kinney, R. M. et al., 1983, Virology 170: 19-30

【非特許文献12】Davis, N. L. et al. 1991, Virology 183: 20-31

【非特許文献13】Kinney, R. M. et al., 1993, J. Virol. 67: 1269-1277

【非特許文献14】White, L. J. et al., 2001, J Virol 75: 3706-18

【非特許文献15】Pedersen, C. E. et al., 1972, Am J Epidemiol 95: 490-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

人及び動物の病原体としての重要性、生物兵器としての潜在力、及び弱毒化アルファウイルス属の応用に関する問題にもかかわらず、先行技術は脊椎動物細胞においてのみ複製可能であるアルファウイルス属の弱毒化株を作り出す方法に欠けている。本発明は、この長年のニーズ及び本分野における要望を満たすものである。 30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の一実施形態としては、弱毒化組換えアルファウイルスを作る出す方法を提供することである。このような方法としては、非構造タンパク質4 (nsp4) コード配列の末端及びサブゲノムRNAの野生型5'UTRの代わりにアルファウイルスのサブゲノムRNAコード配列の開始AUGとの間の脳心筋炎ウイルス (EMCV-IRES) の内部リボソーム侵入部位をクローニングする段階を含む。本発明の更なる関連実施形態としては、上記記載された方法により作る出される弱毒化組換えアルファウイルスである。 40

【0011】

更に、もう一つの本発明の関連実施形態としては、弱毒化組換えアルファウイルスをコードする遺伝子配列を含むベクターと、このベクターを含むとともに発現する宿主細胞を提供することである。もう一つの更なる本発明の実施形態としては、医薬組成物を提供することである。この組成物は、上記記載された弱毒化組換えアルファウイルス及び薬学的許容可能な担体を含む。本発明の関連実施形態としては、免疫原性組成物を提供することである。この免疫原性組成物は、本明細書中で記載される弱毒化組換えアルファウイルスを含む。

【0012】

本発明のもう一つの関連実施形態としては、アルファウイルスへの暴露に起因する感染から被験体を保護する方法を提供することである。このような方法としては、免疫学的に効果的な量の免疫原性組成物を投与する段階を含み、該免疫原性組成物は本明細書中で記載される弱毒化組換えアルファウイルスを含むことから、アルファウイルスへの暴露に起因する感染から個人を保護する段階を含む。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1A-1Dは、BHK-21細胞中の組換えEMCV IRESをコードするVEEV TC-83由来のウイルスの複製を示している。図1Aは、設計されたウイルスゲノム、感染性センター・アッセイ法 (Infectious Centre Assay) におけるインビトロ合成RNAの感染力、インビトロ合成RNA 1mgをBHK-21細胞中へトランスフェクション後24時間でのウイルス力価、及びトランスフェクション後48時間でのBHK-21細胞における指示ウイルスにより形成されたプラークのサイズの略図である。矢印は機能性サブゲノムプロモータを指す。黒箱は、EMCV IRESを示す。

【図1B】図1A-1Dは、BHK-21細胞中の組換えEMCV IRESをコードするVEEV TC-83由来のウイルスの複製を示している。図1Bは、VEEV TC-83ゲノムのサブゲノムプロモータを含むフラグメント、及びVEEV / mutSG / IRESの対応するフラグメントのアライメントを示している。プロモータの位置は、開放箱により示されている。VEEV TC-83ゲノムにおけるサブゲノムRNAの開始及びEMCV IRESの開始は矢印により示されている。VEEV / mutSG / IRESゲノムに導入された変異は、小文字により示されている。

【図1C】図1A-1Dは、BHK-21細胞中の組換えEMCV IRESをコードするVEEV TC-83由来のウイルスの複製を示している。図1Cは、ウイルスによりBHK-21細胞中に形成され、トランスフェクション後24時間で採取されたプラークを示している。

【図1D】図1A-1Dは、BHK-21細胞中の組換えEMCV IRESをコードするVEEV TC-83由来のウイルスの複製を示している。図1Dは、BHK-21細胞へのインビトロ合成RNA 1mgのトランスフェクション後のウイルスの複製を示している。

【図2A】図2A-2Cは、プラーク精製VEEV / mutSG / IRES変異株で見つかった変異を示している。これら変異株は、BHK-21細胞においてより効果的な複製、及びVEEV TC-83及びVEEV / mutSG / IRESの複製の明確な適応変異の効果を示している。図2Aは、VEEV TC-83の公開された配列と比較して、プラーク分離のゲノムにおいて見つかった変異のリストを示している。

【図2B】図2A-2Cは、プラーク精製VEEV / mutSG / IRES変異株で見つかった変異を示している。これら変異株は、BHK-21細胞においてより効果的な複製、及びVEEV TC-83及びVEEV / mutSG / IRESの複製の明確な適応変異の効果を示している。図2Bは、1又は両方の同定された変異を備えるVEEV TC-83及びVEEV / mutSG / IRESゲノム、及び感染性センター・アッセイ法におけるインビトロ合成RNAの感染力の略図である。機能的サブゲノムプロモータは矢印により示され、EMCV IRESは黒箱により示されている。

【図2C】図2A-2Cは、プラーク精製VEEV / mutSG / IRES変異株で見つかった変異を示している。これら変異株は、BHK-21細胞においてより効果的な複製、及びVEEV TC-83及びVEEV / mutSG / IRESの複製の明確な適応変異の効果を示している。図2Cは、インビトロ合成RNAウイルスゲノム 1mgのトランスフェクション後のBHK-21細胞における設計されたウイルスの複製を示している。

【図3A】図3A-3Bは、大きなプラークの表現型を示すVEEV / mutSG / IRES変異株のnsp2タンパク質において同定された変異を示す。図3Aは、インビトロ合成RNAのトランスフェクション後24時間で採取されたウイルスストックからプラー

ク精製分離株のゲノム中に同定された変異（原型）、及びベロ細胞において追加的に3回継代されたストックからの分離株のゲノム中に同定された変異（継代）のリストを示している。

【図3B】図3A-3Bは、大きなプラークの表現型を示すV E E V / m u t S G / I R E S変異株のn s P 2タンパク質において同定された変異を示す。図3Bは、V E E V n s P 2における決定された変異の位置を示している。アルファウイルスn s P 2における現在既知の機能的ドメインの位置が示されている。

【図4A】図4A-4Bは、インビトロ合成組換えウイルスRNAと導入されたB H K - 2 1細胞におけるタンパク質及びRNA合成の分析を示している。細胞は、指示されたRNA 4 mgでエレクトロポレーションされ、35 mm皿に播かれた。図4Aにおいては、10トランスフェクション4.5時間で、ウェル中の培地は10% F B S、A c t D (1 g / m l)及び[<sup>3</sup>H]ウリジン(20 C i / m l)で補強された1 m l a M E Mにより置換された。37で4時間インキュベーション後、RNAはアガロース電気泳動法により分離、解析された。ウイルスゲノム及びサブゲノムRNAの位置はG及びS Gにより個々に示されている。V E E V / I R E S特異的サブゲノムRNAは、他のサブゲノムRNA生産ウイルスよりも大きく広がったバンドを形成する。これは、ゲル中で、V E E V / I R E S特異的サブゲノムRNAが28SリボソームRNAと共に移動するからである。

【図4B】図4A-4Bは、インビトロ合成組換えウイルスRNAと導入されたB H K - 2 1細胞におけるタンパク質及びRNA合成の分析を示している。細胞は、指示されたRNA 4 mgでエレクトロポレーションされ、35 mm皿に蒔かれた。図4Bにおいては、20トランスフェクション後12時間で、タンパク質が[<sup>35</sup>S]メチオニンで代謝的に標識され、ドデシル硫酸ナトリウム10%ポリアクリルアミドゲルにて解析された。分子量マーカ(k D a)の位置はゲルの左側に示されている。ウイルス構造タンパク質：C、E 1及びp 6 2 (E 2の前駆体)の位置がゲルの右側に示されている。星印は、細胞タンパク質(熱ショックタンパク質)の位置を示し、I R E Sをコードするウイルスの複製により誘導される。

【図5A】図5A-5Cは、C<sub>7</sub>10細胞における組換え体、E M C V I R E S含有V E E V変異株の継代を示す。図5Aはウイルスの略図を示す。矢印は機能的サブゲノムプロモータの位置を示す。黒箱は、E M C V I R E Sの位置を示す。

【図5B】図5A-5Cは、C<sub>7</sub>10細胞における組換え体、E M C V I R E S含有V E E V変異株の継代を示す。図5BはC<sub>7</sub>10細胞における継代後、組換えウイルスの力価を示している。35 mm皿中の細胞は、インビトロ合成RNA(P 1)を用いてB H K - 2 1細胞のトランスフェクション後24時間で、又はC<sub>7</sub>10細胞の感染後48時間のいずれかで採取したウイルス試料400 m lを感染させられた。破線は、検出限界を示している。

【図5C】図5A-5Cは、C<sub>7</sub>10細胞における組換え体、E M C V I R E S含有V E E V変異株の継代を示す。図5Cは、プラーク精製されたV E E V / I R E Sにおいて同定されたI R E S含有配列の検出を示し、C<sub>7</sub>10細胞における効率的な複製を示している。残りのE M C V I R E S特異的配列は小文字により示されている。

【図6】図6はN I H 3 T 3細胞におけるV E E V / m u t S G / I R E S / 1及びV E E V T C - 8 3の複製を示している。細胞は10 P F U / 細胞のM O Iで感染させた。培地は指示された時点で置換され、ウイルス力価はB H K - 2 1細胞のプラークアッセイにより測定された。同じ試料は、生物学的アッセイにおけるI F N - a / b放出を測定するために使用された。放出されたI F N - a / bの濃度は、1 m l当たりの国際単位(I U)で表されている。

【図7】図7はV E E V T C - 8 3及びV E E V / m u t S G / I R E S / 1ウイルスで感染させたマウスの生存を示している。生後6日目のN I H S w i s sマウスは、示されているウイルスの10<sup>6</sup> P F Uで脳内に接種された。動物は、2ヶ月間監視された。これらの何れの実験においても感染後9日後死亡するものはいなかった。

【図8】図8は、成体マウスのワクチン接種と暴露後の生存率を示している。5週から6

10

20

30

40

50

週のメス N I H S w i s s マウスは、 $10^6$  の用量で V E E V 株 T C - 8 3 又は組換えウイルスを用いて皮下に接種された。免疫 3 週間後、V E E V 株 3 9 0 8 の  $10^4$  P F U をマウスの皮下に暴露し、死亡率が記録された。

【図 9】図 9 は蚊に感染することができない弱毒化組換えアルファウイルスを作り出す概略方法を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、アルファウイルスの弱毒化株を開発する新しい戦略を描くものである。これら弱毒化アルファウイルスは脊椎動物細胞においてのみ複製することができる。この表現型は、ウイルス構造タンパク質の翻訳及び最終的には脳心筋炎ウイルス ( E M C V I R E S ) の内部リボソーム侵入部位に依存するウイルス複製を与えることにより達成される。このような組換えウイルスは、新生児のマウスにおいて増殖可能であり、高い弱毒化の表現型を実証したにもかかわらず、V E E V 感染に対して免疫防御を誘導した。更に、ホルマリン不活性化ワクチンは、高価であるとともに効果のないものである。これに加えて、これらワクチンは、複合的な連続ワクチン接種を必要とする。その上、V E E V 感染に対する唯一利用可能な生弱毒化ワクチンは、ワクチン接種された馬で吸血中の蚊に感染する。明細書中で論じられる本弱毒化アルファウイルスは、不可逆であることから、現在利用可能なワクチンに勝る大きな利点を提供する。更に、遺伝子操作されたアルファウイルスは、蚊細胞で複製することができない。従って、遺伝子操作されたアルファウイルスは、蚊で複製することができないことから、自然界で循環することができない新しい生組換えウイルスを作り出す新規な手法を示唆している。

【0015】

シンドビス・ウイルス及び他のアルファウイルスの感染性 c D N A クローンの開発は、ウイルスの生態及び発病機序の異なる側面を研究することを目的とする逆遺伝学実験だけでなく、新規な組換えワクチンの開発のための機会を広げた。組織培養又は鶏胚のいずれかで継代することによるウイルスの弱毒化は、構造及び非構造遺伝子、並びにウイルスゲノムのシス作用エレメントにおける僅かな点突然変異に起因している。例えば、V E E V

T C - 8 3 ワクチン株は、この株が備える弱毒化を 2 つの点突然変異だけに起因しており、高い反応原性 ( r e a c t o g e n i c i t y ) は、高い確率でこの弱毒化の機構の不安定さを反映している。このことは、ワクチン接種者におけるウイルス複製の間に野生株の病原性の表現型への復帰可能性についての懸念を提起している。変異の数は、化学薬品の突然変異によりさらに増加され得るが、この手法でもまた導入された変更を不可逆とはできない。R N A <sup>+</sup> ウイルスの感染性 c D N A クローンを用いた遺伝子操作は、ウイルスゲノムのより強力な組換えの大きな可能性を開くとともに、野生型ゲノム配列に復帰不可能である広範な欠損、又は変異株の免疫原生を向上する追加の遺伝子物質を導入する機会を提供する。

【0016】

遺伝子的に変化したアルボウイルスは、蚊の媒介により自然の循環に導入され、蚊の中の場合又はウイルス血症の進行の間の脊椎動物の宿主のいずれかでの長期間の複製の間、更に進化することを示している。1つの実施例としては、馬科の動物において蚊に感染させるに十分なウイルス血症のレベルを生み出すことができる V E E V T C - 8 3 の使用である。1971年のテキサスでの異常発生の間ルイジアナで採取された自然に感染した蚊からの T C - 8 3 の分離は弱毒化アルファウイルスの伝染の危険を強調した。従って、生ワクチン株の新しい世代を設計することにおいて、高度に弱毒化されただけでなく、脊椎動物起源の細胞においてのみ複製することができるアルボウイルスを作ることが将来に備えることである。これは、ウイルスゲノム中の細胞特異的 R N A 要素をクローニングすることにより達成され得る。コオロギ麻痺ウイルス ( C r i c k e t p a r a l y s i s v i r u s ) I R E S と対照的に、E M C V 特異的要素は、節足動物細胞において非常に非効率的に機能すると予想された。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明において、EMCV IRESは、IRES従属ウイルス構造遺伝子の翻訳を構成するためにVEEV T C - 83ゲノムにクローニングされた。ゲノムの1つは、機能性サブゲノムプロモータおよびサブゲノムRNAの5'UTRにおいてIRESを含む。このウイルスは、生存能力があるが、サブゲノムRNAを生成するためのその能力は、更なる進化を促進し、この進化は結果として、IRES欠損及び構造タンパク質のCAP依存の標準的な翻訳に対する復帰をもたらす。前者の欠損は、蚊細胞内で複製可能に行われた。サブゲノムプロモータにおける多重突然変異を備える第2の変異株は、CAP依存の翻訳に復帰できなくなる事に関して安定した。このような復帰は、IRES欠損だけでなく、我々が13の変異により不活性化にしたサブゲノムポロモータの復帰を要求することから、これら多重突然変異の直接復帰は、おそらく無視してもよいほどの危険を意味する。しかしながら、この変異株は、nsp2遺伝子における追加の適応突然変異を蓄積することにより更なる効果的な複製表現型に進化する興味深い方法を生み出した。これらの変異は、ウイルスRNAの複製、ウイルス構造タンパク質の合成、又は細胞における区画化を変化させることは全くなかった。検出された変異は、ゲノムのパッケージ化の効率を増大させ得る付加シグナルもまた生み出さなかった。従って、その機能の機構は、明らかになっていない。しかしながら、RNA<sup>+</sup>ウイルスのゲノムのパッケージ化が、複製複合体により強く決定されるとともに、そのゲノムが、機能性nsp2により粒子形成のための構造タンパク質に提供される必要があることを蓄積公開データは示唆している。本明細書中に記載の作業仮説とは、nsp2のヘリカーゼドメイン(Helicase domain)がヌクレオカプシド中のウイルスのパッケージ化のためのウイルスゲノムの提示部に含まれ得、これにより、同定された変異がこのプロセスの効率に関して正の効果を備えることである。

#### 【0018】

注目すべきは、本発明の目的が、媒介節足動物において複製不可能なVEEV変異株を開発することであるとともに、より安定で、より弱毒化の表現型を明示することであった。IFN-アルファ/ベータ-コンピテント細胞及びIFNシグナル欠損BHK-21細胞の両方における設計VEEV/mutSG/IRES/1変異株の緩慢な増殖、組織培養中のIFN-アルファ/ベータの高いレベルを誘導する能力、脳内接種後でも新生児マウスを殺す能力を大幅に減少したこと、及び蚊細胞内で複製不可能であることは、この変異株がそれら必要条件を満たしていることを提示している。変異株の免疫原性は、異なる動物モデルで更に調査される。その上、他の脳炎アルファウイルス(encephalogenic alphaviruses)は、近年開発された他の方法と組み合わせて適用可能なEMCV IRESに基づく類似の方法を使用することにより弱毒化されると考えられる。

#### 【0019】

手短にいえば、本発明の目的は、弱毒化アルファウイルスの開発であり、脳炎誘発性アルファウイルスに対する新型ワクチンとしての応用である。脳炎誘発性アルファウイルスとしては、VEEV、EEEV及びWEEV並びに人や家畜の病気の原因となるチクングンヤ熱ウイルスのような他のアルファウイルスが挙げられる。このようなアルファウイルスの複製はEMCV IRESに依存しており、EMCV IRESはアルファウイルスを蚊細胞内又は媒介蚊中での複製を不可能にする。更に重要なことには、この表現型は、ウイルスゲノムに導入された大幅な組換えにより復帰しないことである。従って、これら新型変異株は、自然の媒介蚊による伝染の可能性の心配がなく予防接種に用いられる。

#### 【0020】

本発明は、弱毒化、組換えアルファウイルスを作製することに関し、本作製方法は非構造タンパク質4(nsp4)コード配列の末端及び野生型5'UTRの代わりにアルファウイルスのサブゲノムRNAコード配列の開始AUGとの間の脳心筋炎ウイルス(EMCV IRES)の内部リボソーム侵入部位をクローニングする段階を含む。本方法は、サブゲノムRNAにおける野生型5'UTRの集合点突然変異及び欠損によりアルファウイルスのサブゲノムプロモータを不活性化する段階を含む。更に、サブゲノムプロモータの

不活性化は、非構造タンパク質4のカルボキシ末端を修飾することができない。加えて、本方法は、更に非構造タンパク質2(nsp2)における適応変異を導入する段階を含み、効果的にウイルスの複製、放出及びウイルス力値を増加させる。非構造タンパク質2における適応変異の実施例としては、Y<sub>370</sub>をCに、K<sub>371</sub>をQに、P<sub>349</sub>をTに、D<sub>418</sub>をAに、K<sub>423</sub>をTに、又はこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。更に、アルファウイルスの実施例としては、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス(EEEV)、西部ウマ脳炎ウイルス(WEEV)又はチクシングンヤ熱ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0021】

本発明は、また上記記載した方法により作製された弱毒化組換えウイルスに関する。このようなアルファウイルスは、蚊において複製せず、媒介蚊により伝染せず、IFN-アルファ/ベータの高いレベルを誘導可能であり、IFN-アルファ/ベータ細胞中での緩慢な増殖であり、IFNシグナル欠損BHK-21細胞における緩慢な増殖であり又はこれらの組合せとなり得る。

10

## 【0022】

本発明は、更に上記記載された弱毒化組換えアルファウイルスをコードするヌクレオチド配列を備えるベクターに関し、該ベクターを包含するとともに発現する宿主細胞に関する。ベクターを構築し、細胞内で発現させることは既知であり、先行技術の標準的な技術である。従って、当該分野の当業者は、当該分野における利用可能な所定の実験及び知識に基づいてこれらベクターを構築することができる。

20

## 【0023】

本発明は、更に、上記記載された弱毒化組換えアルファウイルスを含む医薬組成物と、薬学的に許容可能な担体に関する。本発明はまた、本明細書中に記載される弱毒化組換えアルファウイルスを備える免疫原性組成物に関する。

## 【0024】

本発明は、更にアルファウイルスへの暴露に由来する感染から被験体を保護する方法に関し、該方法は上記記載された免疫原性組成物の免疫学的に効果的な量を投与する段階と、これによりアルファウイルスへの暴露に由来する感染から被験体を保護する段階とを備える。このような方法から利益を得る被験体は人或いは家畜であり得る。

## 【0025】

30

本発明は更に、蚊に感染することができない弱毒化組換えアルファウイルスの作製方法に関し、該方法は、脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム侵入部位及び3'UTRのまさに上流側に位置するサブゲノム領域の3'末端においてカプシド遺伝子を有するエンベロープ糖タンパク質の下流側カプシド遺伝子と、をクローニングする段階を含み、該カプシドは、CAP非依存的様式で発現されるとともにエンベロープタンパク質遺伝子はCAP依存的様式で翻訳されるが、カプシドタンパク質はIRES依存的様式で翻訳された。

## 【0026】

明細書中で使用される用語、「a」又は「A」は、1以上を意味する。特許請求の範囲の中で使用される単語「a」又は「A」は、単語「包含する(comprising)」と同時に使用される場合、1又は1を超えることを意味する。明細書中で使用される「もう1つの(anotherr)」又は「他の(otherr)」は、同じ又は異なる特許請求の範囲の要素又は特許請求の範囲の構成の少なくとも第2の又はそれ以上のものを意味する。

40

## 【0027】

明細書中に記載される組成物とは、当該分野での標準的な任意の方法、例えば、皮下に、静脈内に、非経口で、腹腔内に、皮内に、筋肉内に、局所に又は経鼻的に方法により全身的に又は局所的に何れかで独立に投与され得る。明細書中に記載される組成物の投薬量の処方は、従来の毒性のない、生理学的に又は薬学的に許容可能な担体或いは投与の方法に適した賦形剤を備え、投与量は当該分野の当業者によく知られている。

## 【0028】

50

明細書中に記載される組成物は、治療効果に関する達成、維持又は改善を行うために1回以上個別に投与される。投薬量或いは組成物の最適な投薬量が1回投与又は複数回投与の何れを含むかを決定することは、当該分野の技術者によく知られている。適切な投薬量は、被験体の健康、アルファウイルスにより引起される免疫応答の誘導及び/又は感染の予防、処方の経路及び使用される投与法に依存する。

#### 【0029】

以下の実施例は本発明の様々な実施形態を例示することを目的としているが、本発明を任意の方法に限定することを意味しない。当業者は、本発明を順応させることによって本発明に記載される物、結果、及び利点と同様に目的を実行し、上記の結果及び利点を得ることを直ちに理解する。特許請求の範囲により決定される本発明の精神の中に含まれる変更及び他の使用は、当業者に思い浮かぶ。

10

#### 【実施例】

##### 【0030】

###### [試験1]

###### 細胞培養

BHK-21細胞は、Paul Olivo (Washington University, St. Louis, Mo)により提供され、ベロ細胞 (Vero cell) はCharles Rice (Rockefeller University, NY, NY) により提供された。NIH 3T3細胞は、アメリカン・タイプ・ティッシュ・カルチャー・コレクション (Manassas, VA) から取得した。これら細胞株は、10%ウシ胎仔血清 (FBS) 及びビタミンで補強したアルファ最小必須培地 (aMEM) で37℃に維持された。蚊C<sub>7</sub>10細胞はHenry Huang (Washington University, St. Louis, Mo) から取得し、10%熱不活性FBS及び10%トリプトースリン酸ブイヨン (TPB) で補強されたDMEMで増殖させた。

20

##### 【0031】

###### [試験2]

###### プラスミド構築

標準的な組換えDNA技術は、全てのプラスミド構築に利用された。地図及び配列は、要求により著者から入手できる。SP6 RNAポリメラーゼプロモータの制御下にあるVEEV TC-83ゲノムを有する原型プラスミド、pVEEV TC-83は、文献に記載されている (Petrakova, O. et al., 2005, J Virol 79: 7597-608)。pVEEV/IRESは、EMCVポリタンパク質の最初の4つのコドンを備えるEMCV IRESを包含した。この配列は、5'UTRの末端及び開始AUGの間のVEEVサブゲノムRNAコード配列にクローン化された。pVEEV/mutSG/IRESは、VEEV TC-83ゲノムをコードし、VEEV

30

TC-83ゲノム中のサブゲノムプロモータは、nsp4のカルボキシ末端のアミノ酸配列を修飾しない集合点突然変異により、不活性化された (図1A及び図1B)。このウイルスゲノムは欠損させたサブゲノムRNAの5'UTRを有した。従って、VEEV TC-83の非構造タンパク質及び構造タンパク質が同じゲノムRNAから合成されると期待された。適応変異は、pVEEV/mutSG/IRESをコードするnsp2に、選択された変異株の所望のフラグメントのPCR增幅、次いで原型のゲノムにおける対応するフラグメントの置換により導入された。同様のPCRに基づく技術は、pVEEV/mutSG/IRESのゲノムの3'UTRにおけるSph1領域への異なるフラグメントのクローニング合成に使用された。全てのクローン化されたフラグメントは、レスキューウイルス (rescued virus) での更なる実験前に、配列が決定された。

40

##### 【0032】

###### [試験3]

###### RNA転写

プラスミドはCsCl勾配で遠心分離により精製され、M1ul消化により直線化され

50

た。RNAは、キャップアナログ (New England Biolabs) 存在下で、SP6 RNA ポリメラーゼ (Ambion) により合成された。転写産物の収率及び完全性は、変性させない条件下での電気泳動により解析された。RNA濃度は、FluorChemイメージヤー (Alpha Innotech) で測定され、転写反応は、追加の精製なしにエレクトロポレーションに使用された。

#### 【0033】

##### [試験4]

###### RNAトランスフェクション

BHK-21細胞のエレクトロポレーションは、文献 (Liljestrom, P. et al., 1991, J. Virol. 65: 4107-4113) 記載の条件で実行された。ウイルスをレスキューするために、1gのインビトロで合成されたウイルスゲノムRNAが細胞中にエレクトロポレーションされ、次いで100mm皿に播かれ、細胞変性効果が確認されるまで、インキュベーションされた。ウイルス力価は、BHK-21細胞の標準的なブラークアッセイを使用して決定された。

#### 【0034】

RNA感染力を評価するために、10倍希釀のエレクトロポレーションされたBHK-21細胞は、サブコンフルエント (subconfluent) の未感作細胞を含む6ウェルCostarプレートに播かれた。37、5%CO<sub>2</sub>インキュベータで1時間インキュベーション後、細胞は3%FBSで補強した0.5%超高純度アガロースを含むMEMの2mlで覆われた。ブラークは、37、2日インキュベーション後、クリスタルバイオレットで染色され、感染力は導入RNAの1mg当たりのブラーク形成単位 (PFU) で決定された。

#### 【0035】

##### [試験5]

###### ウイルスゲノムのシークエンシング

大きなブラークは、ウイルスストックの力価を測定する間に無作為に選択された (ニュートラルレッドで染色することなく)。ウイルスは、アガロースプラグからMEMに抽出され、後者の培地の一定分量が使用され、35mm皿のBHK-21細胞に感染させた。広範なCPEの進行の後、ウイルスストックは、さらなる特徴付のために採取され、RNAが、メーク (Invitrogen) の使用説明書に従って、TRizol試薬により感染細胞から単離された。~1000ヌクレオチド-長の重複断片は、標準的なRT-PCR技術を使用するために合成され、アガロースゲル電気泳動により精製され、配列が決定された。5'UTRのシークエンシングは、文献 (Gorchakov, N. et al., 2004, J. Virol. 78: 61-75) に記載されるFirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) を使用して実行された。

#### 【0036】

##### [試験6]

###### ウイルス複製分析

エレクトロポレーションされた細胞の5分の1が、35mm皿に播かれた。図に示される時間で、培地は交換され、ウイルス力価が、BHK-21細胞でのブラークアッセイにより決定された (Lemm, J. A. et al., 1990, J. Virol. 64: 3001-3011)。その他に、BHK-21、NIH3T3又はC<sub>6</sub>10細胞が35mm皿に播かれ、図に示されるMOIで感染させた。培地は、新しい培地に置き換えられ、採取された試料におけるウイルス力価がBHK-21細胞でのブラークアッセイにより決定された。

#### 【0037】

##### [試験7]

###### タンパク質合成の分析

BHK-21細胞は、4mgの指示RNAでエレクトロポレーションされ、エレクトロポレーションされた細胞の5分の1が、6ウェルCostarプレートに播かれた。トラ

10

20

30

40

50

ンスフェクション後12時間の時点で、タンパク質は、0.1%FBS及び20Ci/m1の[<sup>35</sup>S]メチオニンを補強したメチオニン欠如D MEM培地の0.8mlで30分間インキュベーションすることにより代謝的に標識された。インキュベーション後、培地に入れられ、遠心分離によりペレット状にされ、100μlの標準タンパク質添加液に溶解された。等量のタンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)10%ポリアクリルアミドゲルに投入された。電気泳動後、ゲルは乾燥され、オートラジオグラフされた。

#### 【0038】

##### 〔試験8〕

###### RNA分析

ウイルス特異的RNAの合成を解析するために、細胞は、4mgのインビトロ合成ウイルスRNAでエレクトロポレーションされ、エレクトロポレーションされた細胞の5分の1が、同様に35mm皿に播かれた。トランスフェクションの4.5時間後に、ウェル中の培地は、10%FBS、ActD(1μg/ml)及び[<sup>3</sup>H]ウリジン(20Ci/ml)を補強したaMEMの1mlで置換した。37で4時間インキュベーション後、細胞内全RNAがメーカーの手引きに従ってTrizol(Invitrogen)により単離され、ジメチルスルホキシド中のグリオキサールで変性させ、文献に記載の条件(Bredenbeek, P. J. et al., 1993, J. Virol. 67: 6439-6446)を使用してアガロースゲル電気泳動により解析された。ゲルは、2,5-ジフェニルオキサゾール(PPO)に含侵させ、乾燥され、オートラジオグラフされた。

10

#### 【0039】

##### 〔試験9〕

###### IFN-アルファ/ベータ-アッセイ

培地中のIFN-アルファ/ベータ-の濃度は、文献に記載された生物検定(Trigo vciich, J. et al., 1996. Virology 224: 73-83)により測定された。簡潔には、L929細胞は、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルの濃度で、96ウェルプレートに100μlの完全培地に播かれ、37で6時間インキュベーションされた。感染NIH3T3細胞から採取された培地の試料は、1時間UV光で処理され、L929細胞を備えるウェルに直接、2倍の段階で連続希釈された。37で24時間インキュベーション後、 $2 \times 10^5$ PFUの水疱性口内炎ウイルス(VSV)を備える追加の100μlの培地がウェルに添加され、インキュベーションが36-40時間続けられた。細胞はクリスタルバイオレットで染色され、終点はVSV誘導CPEから50%の細胞を保護するのに要求されるIFN<sub>a/b</sub>の濃度として決定された。結果の正規化のIFN-a/b基準は、ATCCから取得し、放出されたウイルスの力価は、BHK-21細胞でのブラークアッセイにより決定された。

20

30

#### 【0040】

##### 〔試験10〕

###### 蚊でのウイルス複製の評価

インビオによる蚊での複製能力を評価するために、1μl量に約 $10^5$ PFUを使用してネッタイシマカ(Aedes aegypti)(テキサス、ガルベストン由来のコロニー)の蚊の胸腔内接種が使用された。経口の感受性はかなりばらつきがあり、それほど感受性が無い一方(Weaver, S. C. 1997. Vector Biology in Viral Pathogenesis, p. 329-352. In N. Nathanson (ed.), Viral Pathogenesis. Lippincott-Raven, New York.)、殆どどんな蚊でも、任意のアルファウイルスによる胸腔内感染に高い感受性があることから、経口暴露を超える胸腔内接種を選択した。ガラスピペットを使用する接種に続き、蚊は、27で10日間インキュベーションし、20%FBS及びファンギゾンを補強したMEMの1ml中で個別に用量設定した。夫々用量設定した蚊の100μl量を、24ウェル状の単層のベロ細胞に添加し、感染を検出するために細胞変性効果を5日間観察した。アッセイコントロール(Asa

40

50

y control) は、TC-83 親ウイルス及び IRES 変異株のいずれをも含んだ。

【0041】

[試験11]

免疫化及び毒性 VEEV での抗原投与

生後6日目の NIH Swiss マウスは、脳内に、総容量  $20 \mu l$  の PBS に約  $10^6$  PFU の用量で VEEV TC-83 株又は設計変異株を接種された。感染後、8-10 動物の夫々の同齢集団を、処置することなく2ヶ月間維持した。21日間、マウスは、疾病（被毛の乱れ、抑鬱、食欲不振及び/又は痙攣）及び/又は死の兆候を毎日観察された。

10

【0042】

8週齢メス NIH Swiss マウスは、VEEV TC-83 又は組換えウイルスを使用してマウス1頭当たり約  $10^6$  PFU の用量でワクチン接種され、次いで高い毒性の VEEV 株 3908 の約  $10^4$  PFU を用いて4週間後皮下に抗原投与された。21日間、マウスは、疾病（被毛の乱れ、抑鬱、食欲不振及び/又は痙攣）及び/又は死の兆候を1日2回観察された。

【0043】

[試験12]

組換え VEEV TC-83 を基にしたウイルス

本研究の論理的根拠は、脊椎動物の細胞では効率的な複製が可能であるが、蚊由来の細胞では複製できないアルファウイルスを開発することである。従って、このようなウイルスの複製は、昆虫細胞ではなく脊椎動物でのみ機能するタンパク質又は RNA 配列に依存する必要がある。これを達成するために、本発明は、EMCV IRES に依存するアルファウイルスの構造タンパク質の発現を行うための方法を設計した。設計された IRES は、ポリ C 配列を含まず、EMCV ポリタンパク質の最初の4つのコドンを保持し、これにより VEEV TC-83 の構造遺伝子の最も効率的な翻訳を達成した。後者の実験において、これら付加的なアミノ酸は、ウイルスの複製に何の弊害も与えないが、ウイルス構造タンパク質の翻訳に検出可能な良好な効果が得られることが確認された（データを示さず）。

20

【0044】

コンストラクトの一つにおいて、VEEV / IRES、IRES 配列は、完全な 5' UTR の下流サブゲノム RNA にクローニングされた（図 1A）。従って、このゲノムはサブゲノム RNA 合成可能であると予測された。もう一つの組換え体、VEEV / mut SG / IRESにおいて、サブゲノムプロモータは、13 の同義の点突然変異（図 1A 及び図 1B）により不活性化され、この点突然変異は、活性 SG RNA プロモータに復帰することを妨げることが予測された。VEEV 構造タンパク質の合成を促進するために、IRES 配列がクローニングされ、26S 5' UTR を置換した。

30

【0045】

VEEV / IRES、VEEV / mut SG / IRES 及び修飾されていない野生型 VEEV TC-83 ゲノム RNA は、インビトロで合成され、BHK-21 細胞中に導入された。感染中心アッセイにおいて、VEEV / IRES RNA は、TC-83 の RNA と同じ感染力を示し、TC-83 のブラークの大きさと同様の均一な大きさのブラークを発現させた（図 1A 及び図 1C）。このことは、追加の適応変異が、設計ウイルスの効率的な複製に必要でないことを強く示唆した。VEEV / IRES は、 $10^9$  PFU / ml を超える力値で複製したが、最終的な力値及びウイルスの複製率は、VEEV TC-83 よりも大幅に緩慢であった（図 1D）。BHK-21 細胞は、もう一つの組換えウイルスゲノム VEEV / mut SG / IRES を導入された。この組換えウイルスゲノム VEEV / mut SG / IRES は、サブゲノムプロモータを欠損し、非常に非効率な感染性ウイルスを生み出した（図 1D）。感染中心アッセイにおいて、このコンストラクトは、大部分はピンの先端ほどのブラークを発生させ、その数を測るのは困難であった。意外に

40

50

も、このウイルスは、連続継代での更なる進化を示し、より大きなブラークを形成した変異株を速やかに生み出した（図1C及びデータを示さず）。図1Dで示された増殖曲線は、小さいブラーク形成ウイルス及び大きなブラーク形成ウイルスの両方の放出を示している。

#### 【0046】

従って、これら実験の結果は、少なくともV E E V / I R E Sゲノムとの関連においては、E M C V I R E Sが、V E E V複製に十分な水準で構造タンパク質を生み出すことができる事を示唆した。突然変異させたサブゲノムプロモータを含むコンストラクト、V E E V / m u t S G / I R E Sは、より効率的な複製のために進化することができる複製欠損ウイルスを作り出した。

10

#### 【0047】

##### [試験13]

###### V E E V / m u t S G / I R E Sにおける適応変異の分析

大きなブラーク表現型へのV E E V / m u t S G / I R E Sの進化は、ウイルスゲノムにおける追加の変異の蓄積を示唆した。野生型ゲノム配列への復帰は、導入された多くの点突然変異により不可能な事象となり、従って適応変異の位置を予測することが困難であった。変異を同定するために、エレクトロポレーション後、24時間で採取されたV E E V / m u t S G / I R E S試料の5つのブラークが、無作為に選択され、2つのブラーク精製された変異株のゲノム全体（3'UTR及び5'UTRを含む）が配列決定された。同定された変異のリストは、図2Aに示されている。これら変異の大部分は、同義であり、既知のシス作用RNA領域の中に含まれていなかった。従って、ウイルス複製についてのそれらの効果は、極めて低いものであった。しかしながら、両方のブラーク分離物のゲノムは、n s P 2タンパク質での同じ変異である、Y<sub>370</sub>からCへの変異を含み、ゲノムの一つは、次にコードするAAを同様に変化させた（K<sub>371</sub>をQに）。

20

#### 【0048】

ウイルス複製に与える変異の効果を試験するために、Y<sub>370</sub>からCへの変異、及びY<sub>370</sub>からCへの変異とK<sub>371</sub>からQへの変異の両方は、原型のV E E V / m u t S G / I R E Sコンストラクト（図2B）にクローン化され、そのRNA感染力、ウイルス複製率及びブラークの大きさを、原型のV E E V / m u t S G / I R E S及び他のコンストラクトのRNA感染力、ウイルス複製率及びブラークの大きさと比較した。同じ変異がV E E V T C - 83ゲノムにもクローン化され、この親ウイルスの複製に関する効果を試験した。ゲノム中に1つの変異又は両方の変異の何れかを備えるI R E SコードゲノムRNA、V E E V / m u t S G / I R E S / 1及びV E E V / m u t S G / I R E S / 2は、V E E V T C - 83 RNAで行った感染中心アッセイでの感染力と同じ感染力を示し、V E E V T C - 83のブラークと同じ均一なブラークの大きさを形成するウイルスがレスキューされた（データを示さず）。V E E V / m u t S G / I R E S / 1及びV E E V / m u t S G / I R E S / 2は、また、増殖率において、力強い増加を示したが（図2C及び図1D）、第2の突然変異の効果はほとんど検出されたかった。従って、まとめると、n s P 2におけるY<sub>370</sub>からCへの突然変異は、ウイルス複製に対して非常に良好な効果を示し、第2の突然変異は殆どその効果を改善しなかったことをデータは示した。V E E V T C - 83ゲノムへの導入の場合、同様の突然変異は、ウイルス複製率又は最終的な力価に対する効果を全く検出できなかった（図2C）。このことは、複製の増強がV E E V / m u t S G / I R E Sに特異的であったことを示唆している。

30

#### 【0049】

同定されたAA変更（Y<sub>370</sub>からC、K<sub>371</sub>からQ）は、サブゲノムプロモータ欠損、I R E S含有ウイルスの効率的な複製をもたらす有力な突然変異のほんの僅かを示しているにすぎない。従って、並列実験において、インビトロ合成RNAのRNAトランスフェクションの24時間後に採取された試料から精製された他の3つのブラークコロニーにおけるヌクレオチド2161～2959の配列が決定されるとともに、ペロ細胞において追加の3回連続継代後ウイルスストックから分離された5つのブラーク精製変異株の又

40

50

クレオチド 2161 ~ 2959 の配列が決定された。このような継代は、最も効率的な複製ウイルスの選択をもたらすことが予測される。同定された突然変異のリストは、図 3 A に示されている。配列決定は、RT - PCR 由来 DNA 断片から直接的に実行された。従って、示された突然変異はブラーク由来ウイルス集団における共通配列を示しており、PCR 由来のものではない（図 3 B）。

#### 【0050】

全ての分離株は、nsp2 の RNA ヘリカーゼドメインのカルボキシ末端断片に対応する配列決定された断片中に突然変異を含んでいた。全ての変化したアミノ酸は、アミノ酸 348 - 424 の間に位置していた。エレクトロポレーション後発生する原型のウイルスストックと継代されたプールの何れにおいても最も一般的な突然変異は、Y<sub>370</sub> から C への変異であった。このことは、おそらく複製に対して最も顕著な影響の一つであることを指摘した。従って、この特定の突然変異、VEEV / mut SG / IRES、を備える上記記載された変異株は、次の節で述べる実験に使用された。

#### 【0051】

##### [試験 14]

###### nsp2 Y<sub>370</sub> から C への変異のウイルス複製に与える効果

nsp2 関連 RNA ヘリカーゼのカルボキシ末端断片における適応変異の同定は、予期しない結果であり、VEEV / mut SG / IRES 複製における増加に対する明確な説明を全く示さなかった。この突然変異は、おそらく RNA 複製、ウイルス構造タンパク質翻訳、ウイルス粒子形成、複製複合体の区画化、等の何れかに対する促進作用を備えることができた。しかしながら、最も予期される効果は、ウイルス RNA 合成の増大である。従って、BHK - 21 細胞は、異なる VEEV 変異株のインビトロ合成ゲノムで導入され、エレクトロポレーション後 4 時間 ~ 4.5 時間で新しく合成されたウイルス RNA を <sup>3</sup>H の存在下 [ <sup>3</sup>H ] ウリジンで代謝的に標識し、その RNA をアガロースゲル電気泳動により解析した（図 4 A）。

#### 【0052】

予想通り、VEEV / IRES は、サブゲノム RNA 合成の能力がある。このことは、サブゲノム RNA 5' UTR の 3' 末端に導入した IRES がサブゲノムプロモータ活性を妨げないことを示唆している。nsp2 における適応変異を有する VEEV / mut SG / IRES 及びその変異株は、検出不可能な SG RNA を作り出した。従って、これらゲノムのプロモータ配列に導入された 13 の変異は、サブゲノム RNA の翻訳を完全に無効にした。意外にも、nsp2 における適応変異は、RNA ゲノム複製に顕著な効果を示さず、VEEV / mut SG / IRES / 1 及び VEEV / mut SG / IRES / 2 ゲノム RNA は、最初に設計した VEEV / mut SG / IRES ゲノムと同様の効率で複製した。更には、全ての変異株のゲノム RNA 複製は、VEEV TC - 83 の複製と極めて酷似していた。その上、これら変異の効果は、原型の VEEV TC - 83 の構成には見つからなかった（VEEV / 1 及び VEEV / 2 に対応する行参照）。この発見は、適応が、RNA 複製での増加をもたらさないことを強く暗示した。

#### 【0053】

ウイルス構造タンパク質の合成を、エレクトロポレーション後 12 時間で評価した（図 4 B）。その時まで、VEEV / IRES 及び VEEV / mut SG / IRES 特異的カプシド及び他の構造タンパク質は、VEEV TC - 83 RNA で導入された細胞中よりも ~ 2 倍悪い効率で合成された。この納得のいく僅かな相違は、( VEEV TC - 83 RNA の効率と比較して ) VEEV / IRES 及び VEEV / mut SG / IRES ウィルス夫々が、4 衡及び 7 衡以上も低い感染力値であることを説明していない。これら感染力値は、トランスフェクションの 12 時間後に採取された試料から検出された。更に、原型の VEEV / mut SG / IRES ゲノムを含む BHK - 21 細胞中のウイルスタンパク質の合成と比較して、nsp2 中に適応変異を有する VEEV / mut SG / IRES / 1 及び VEEV / mut SG / IRES / 2 を含む BHK - 21 細胞中とのウイルスタンパク質の合成の間の差異は、この実験及び他の実験においても検出されなかった。IR

10

20

30

40

50

E S 含有ウイルスで感染させた細胞中での標識されたタンパク質の際立ったパターンの特徴は、二つの追加のバンドの存在であり、これらバンドは質量分析計により熱ショックタンパク質H s p 9 0 及びH s p 7 2として同定された。これらタンパク質の誘導の生物学的意義は、未だ明確ではないが、I R E S から発現する構造タンパク質を備える細胞中で応力成長に至るウイルス構造タンパク質折り畳みにおいてある異常な部分に原因があると考えられる。

【 0 0 5 4 】

追加の実験において、V E E V T C - 8 3 、V E E V / m u t S G / I R E S 及びV E E V / m u t S G / I R E S / 1 で感染させた細胞中のウイルス糖タンパク質の細胞内分布が評価され、細胞表面上のこれらタンパク質の存在がV E E V 特異的抗体で染色されることにより解析された。糖タンパク質の分布における顕著な相違が全く同定されなかつた。適応変異はウイルスゲノム中の追加のパッケージング信号の形成の原因となるという可能性が調べられた。変異含有断片 (V E E V ゲノムのヌクレオチド2 5 3 3 - 2 9 5 0 に対応する) が、V E E V / m u t S G / I R E S ゲノムの3' U T R にクローン化され、組換えインビトロ合成RNAが感染中心アッセイで試験された。原型のV E E V / m u t S G / I R E S のブラークの大きさ又はウイルス力価と比較して、ブラークの大きさ又はウイルス力価の増加は、全く検出されなかつた。

【 0 0 5 5 】

もう一つの変異株において、サブゲノムプロモータ及びV E E V カプシドコード配列は、V E E V / m u t S G / I R E S ゲノムの3' U T R にクローン化され、サブゲノムRNAからの追加のカプシド発現がウイルス複製の効率を増加させるかどうかを試験した。この組換えもウイルス力価に明確な効果を全くもたらさなかつた。最後に、V E E V / m u t S G / I R E S が感染性ウイルスの代わりにゲノムフリーのサブウイルス粒子を生産するかどうかが解析された。V E E V / m u t S G / I R E S で導入され、代謝的に [<sup>3</sup><sup>5</sup> S] で標識化された細胞は、ショ糖密度勾配での超遠心により検出されるサブウイルス粒子を生産しないという、事実に反することが観察された (データを示さず)。従つて、まとめると、上記記載した複雑な分析は、原型のV E E V / m u t S G / I R E S の非常に効率の悪い複製又はI R E S 含有ウイルスの複製に関するV E E V n s P 2 中の検出変異の明確な効果に対する明らかな機構的な説明を提示しなかつた。しかしながら、本発明の主な目的は、E M C V I R E S 機能に依存する複製を行うV E E V 変異株を開発することであり、V E E V / I R E S 及びV E E V / m u t S G / I R E S / 1 の両方がこの目標を達成したと思われる。

【 0 0 5 6 】

〔 試験 1 5 〕

蚊細胞及び蚊中のI R E S 依存V E E V 変異株の複製

アルファウイルスの複製についての蓄積されたデータは、明確に、遺伝的不安定性及び高い進化率を示しており、これらは、特にウイルス複製において悪影響を与える際に、任意の異種遺伝子の欠損をもたらす (G o r c h a k o v , R . e t a l . , 2 0 0 7 , V i r o l o g y 3 6 6 : 2 1 2 - 2 5 、 T h o m a s , J . M . e t a l . , 2 0 0 3 , J V i r o l 7 7 : 5 5 9 8 - 6 0 6 )。従つて、本発明の重大な争点の一つは、設計E M C V I R E S 挿入が安定であり、蚊細胞中でウイルスの複製を不可能な状態にするかどうかであった。これを試験するために、B H K - 2 1 細胞へのインビトロ合成RNAのエレクトロポレーションの2 4 時間後に採取されたV E E V / I R E S 及びV E E V / m u t S G / I R E S ウィルスをC<sub>7</sub> 1 0 蚊細胞に感染させた。V E E V / m u t S G / I R E S は、n s P 2 にY<sub>370</sub> からCへの適応変異を備える上記記載のV E E V / m u t S G / I R E S / 1 の代わりに使用され、蚊細胞中の複製を確立する能力に関して、RNAトランスフェクション後放出される変異株のライブラリーの全てを試験した。

【 0 0 5 7 】

第1の継代では、C<sub>7</sub> 1 0 細胞の感染の4 8 時間後V E E V / I R E S の力価は1 . 5

10

20

30

40

50

$\times 10^{10}$  PFU/m<sup>1</sup>に達し、第2の継代後も同様の力価がストックにおいて検出された(図5A及び5B)。対照的に、VEEV/mutSG/IRESの力価は、第1の継代後では150PFU/m<sup>1</sup>であり(第1の継代後の力価は、蚊細胞中で新生ウイルスが生産されたというよりも感染に使用した残存ウイルスを反映しているように思われる)、次ぐ第2の継代後では検出限界以下であった(図5A及び5B)。追加実験において、nsp2における適応変異を包含するVEEV/mutSG/IRESのブラーク精製変異株が、C<sub>7</sub>10細胞で継代された。2回の盲目継代(blind passage)後、感染性ウイルスが復帰することは全くなかった。

#### 【0058】

もう一つの実験において、Ae. aegypti 蚊は、胸腔内に、約10<sup>5</sup> PFUのVEEV TC-83及びVEEV/mutSG/IRES/1変異株を接種された。IRES変異を接種された17のAe. aegypti 蚊において検出可能に1つも複製できない一方、TC-83親株を接種された17の蚊のうち全ての蚊がCPEアッセイにおいて検出可能なレベルで複製し、その力価は、10<sup>6</sup> PFU/蚊を超える平均力価であった。従って、IRES含有VEEV変異株VEEV/mutSG/IRES/1は、インビトロ及びインビボの両方で、蚊細胞中で複製できなかった。

#### 【0059】

蚊細胞中での継代後、サブゲノムRNA変異株を生産することができるVEEV/IRESの高い力価を説明するために、2つの個別のブラークが無作為に選択され、ゲノムのIRES含有断片の配列を決定した。両方の分離株において、IRES配列は、ウイルスゲノム中に存在しておらず、原型のIRESの13及び15残基が確認されるのみであった(図5C)。従って、蚊細胞中でのVEEV/IRES変異株の継代は、IRESマイナス変異株の蓄積を導き、サブゲノムプロモータを欠損させたVEEV/mutSG/IRESは、蚊細胞中で効率的な複製を可能にする変異株を生む出すことはなかった。

#### 【0060】

##### [試験16]

VEEV/mutSG/IRES/1変異株は弱毒化表現型を示す。

本発明は、蚊由来の細胞及び対応する媒介蚊中での複製不可能であるが、親VEEV TC-83よりも脊椎動物中で弱毒化表現型を示すVEEV変異株の開発を目的とした。VEEV/mutSG/IRES/1変異株の低複製率は、このウイルスがIFNa/b生産及びシグナル伝達を備える脊椎動物細胞中で複製することができないという懸念を引き起こした。しかしながら、これは事実と異なった。図6に示された実験の結果は、VEEV/mutSG/IRES/1がIFN-アルファ/ベータ-分泌及びシグナル伝達において欠損を持たないNIH3T3細胞中で、10<sup>9</sup> PFU/m<sup>1</sup>を超える力価まで複製することを示した。この複製は、より効率的なIFNa/b誘導を引き起こしたが(図6)、IFN放出は、明確に、既存のウイルス複製を無効にしていなかった。BHK-21細胞で示されるように(図2C)、VEEV/mutSG/IRES/1の複製は、VEEV TC-83の複製よりも効率が悪いが、IRES依存変異がインビボで弱毒化され得ることを示唆した。実際に、生後6日目のマウス脳内に約10<sup>6</sup> PFUを接種後、86%が感染症を切り抜け脳炎の兆候を発症しなかった。対照的に、92%のマウスが、VEEV株TC-83の同じ用量により殺された。まとめると、これらデータは、遺伝子的に改良したIRES依存VEEVが、親VEEV TC-83よりも弱毒化したことを示している。

#### 【0061】

にもかかわらず、VEEV/mutSG/IRES/1変異株は、新生児マウス及び成体マウスの両方で免疫原性を残した。VEEV/mutSG/IRES/1の脳内接種を生き抜いた12頭の生後6日目のマウスの内10頭が、投与5週間後、野生型VEEV株3908の10<sup>4</sup> PFUを用いた皮下への暴露を生き抜いた。対照的に、同じ方法で暴露された偽(PBS)感染マウス12頭は、全て生存できなかった(図7)。VEEV/mutSG/IRES/1は、また成体マウスにおいても免疫原性であった。約10<sup>6</sup> PF

10

20

30

40

50

Uを用いた1回の皮下ワクチン接種は、3週間後、VEEV株3908の $10^4$ PFU( $\sim 10^4$ LD<sub>50</sub>)での皮下暴露に対してマウスの80%を保護した(図8)。中和抗体価(PRINT<sub>80</sub>)は、暴露直前にこれら全てのマウスで<1:20で検出できなかった。ここことは、1回のワクチン接種後の不完全な防御は、インビオでのIRES含有ウイルス複製の低いレベルの結果であることを示唆している。従って、弱毒化の高いレベルは、安全性の高い段階を与えるが、反復ワクチン接種が要求されるかもしれない。

## 【0062】

## 【試験17】

## 弱毒化を減じるが蚊の伝染力の欠損を維持する発現戦略

本発明の他の実施形態において、新規な発現戦略が設計され、弱毒化を減じるが蚊の伝染力の欠損を維持することができた。この戦略は、エンベロープ糖タンパク質遺伝子の下流にIRESを配置することを含んだ。このエンベロープ糖タンパク質遺伝子は、3'UTRのまさに上流のサブゲノム領域の3'末端にカブシド遺伝子を備えている(図9)。従って、カブシドタンパク質はIRES依存様式で翻訳されるが、エンベロープ糖タンパク質遺伝子はCAP依存様式で翻訳されるサブゲノムメッセージが作られた。BHK及びベロ細胞中のこの新規なIRES変異の複製は、再度効率的であったが、C<sub>7</sub>10蚊細胞中では検出されなかった。20匹のAedes aegypti生体メス蚊の胸腔内接種は、複製の証拠を示さなかった。IRES2型がマウスをワクチン接種するために用いられた場合、10個体の全ては、通常のTC-83により誘導されるよりも約2倍低い平均力価で抗体陽転するとともに、IRES2型により致死的な皮下の暴露から保護された。従って、新規なIRES発現戦略は、より少ない弱毒化をもたらすと思われる一方、蚊機能不全表現型を保持する。

## 【0063】

## 【表1】

TC-83 IRES変異株の免疫原性及び有効性			
ワクチン株	抗体陽転した 画分	平均中和抗体 価±SD	致死的なVEEV 暴露から保護した 画分
IRES 1型	0/10	<20	8/10
IRES 2型	10/10	224 ± 260	10/10
TC-83	5/5	576 ± 143	5/5
偽	0/5	<20	0/5

10

20

30

40

## 【0064】

## 【参考文献】

- Aguilar, P. V. et al., 2007, J Virol 81: 3866-76
- Barton, D. J. et al., 1999, J Virol 73: 10104-12
- Davis, N. L. et al., 1995, Virology 212: 103-110
- Davis, N. L. et al., 1989, Virology 171: 189

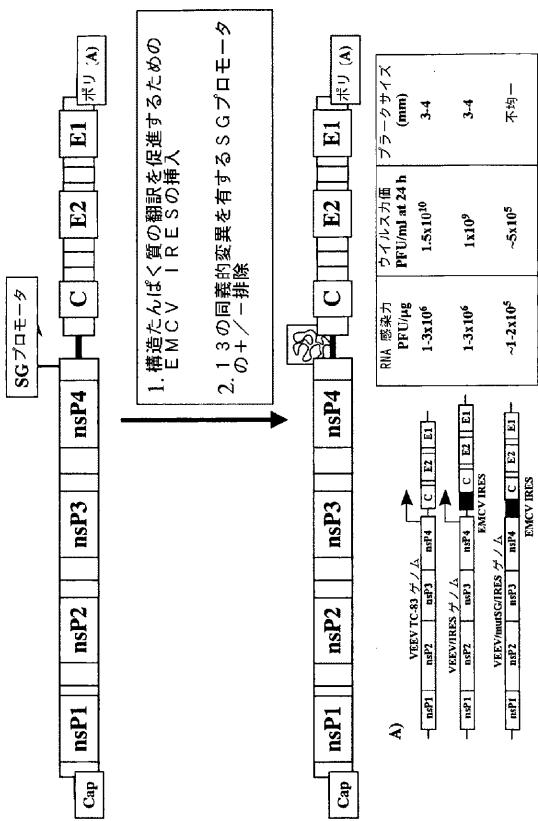
50

- 2 0 4
- G a r m a s h o v a , N . e t a l . , 2 0 0 7 . J V i r o l 8 1 : 1 3 5  
5 2 - 6 5
- G a r m a s h o v a , N . e t a l . , 2 0 0 6 . J V i r o l 8 0 : 5 6 8  
6 - 9 6
- G a r m a s h o v a , N . e t a l . , 2 0 0 7 . J V i r o l 8 1 : 2 4 7  
2 - 8 4
- H a r t , M . K . e t a l . , 2 0 0 0 , V a c c i n e 1 8 : 3 0 6 7 - 7  
5
- J a n , E . , a n d P . S a r n o w . 2 0 0 2 , J M o l B i o l 3 1 0  
2 4 : 8 8 9 - 9 0 2
- K u h n , R . J . e t a l . , 1 9 9 6 , J V i r o l 7 0 : 7 9 0 0 - 9
- L e m m , J . A . e t a l . , 1 9 9 0 , J V i r o l 6 4 : 3 0 0 1 - 3 0  
1 1
- M o r r i l l , J . C . e t a l . , 1 9 9 1 , V a c c i n e 9 : 3 5 - 4 1
- M u r p h y , B . R . a n d R . M . C h a n o c k . 2 0 0 1 . I m m u n i z a t i o n a g a i n s t v i r a l d e s e a s e s , p 4 3 5 - 4 6 7 . I n D . M . K n i p e a n d P . M . H o w l e y ( e d ) , F i e l d s ' V i r o l o g y , F o u r t h E d i t i o n . L i p p i n c o t t , 2 0 W i l l i a m s a n d W i l k i n s , N e w Y o r k .
- N u g e n t , C . L . e t a l . J V i r o l 7 3 : 4 2 7 - 3 5
- P u g a c h e v , K . V . e t a l . , 2 0 0 0 , J V i r o l 7 4 : 1 0 8 1 1 - 5
- R i c e , C . M . e t a l . , 2 0 0 6 , J . V i r o l . 6 1 : 3 8 0  
9 - 3 8 1 9
- R u s s o , A . T . e t a l . , 2 0 0 6 , S t r u c t u r e 1 4 : 1 4 4 9 - 5 8

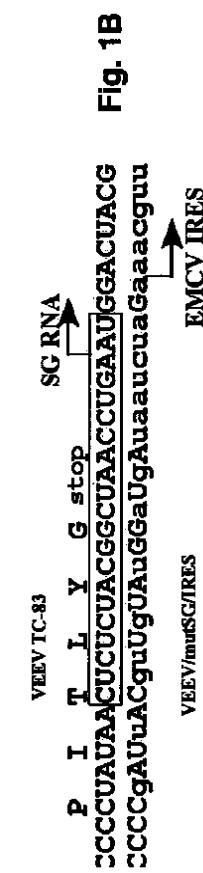
## 【 0 0 6 5 】

本明細書中で言及されている特許文献又は公開文献は、本発明に関連する分野の当業者のレベルを指し示すものである。更に、これら特許文献及び公開文献は、あたかもこれら個々の文献が、具体的に及び個々に参考文献として組み込まれるために示されるように、同様の範囲で明細書中に参考文献として組み込まれる。

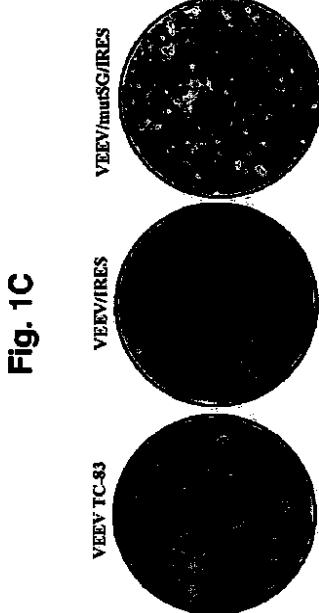
【 図 1 A 】



【図1B】

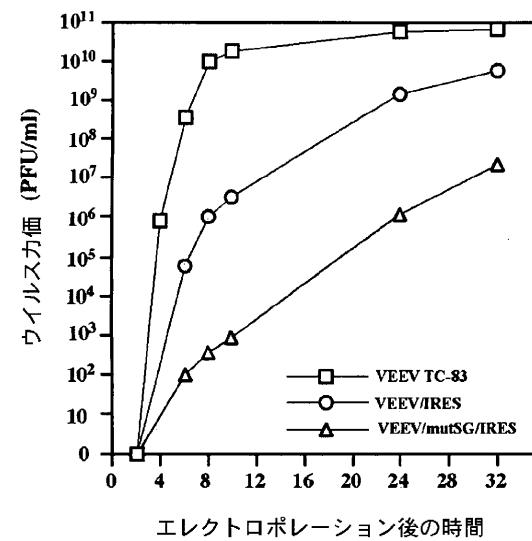


【 図 1 C 】



1C  
Fig

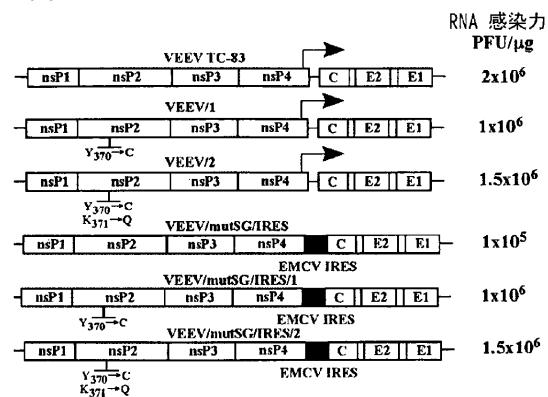
### 【図1D】



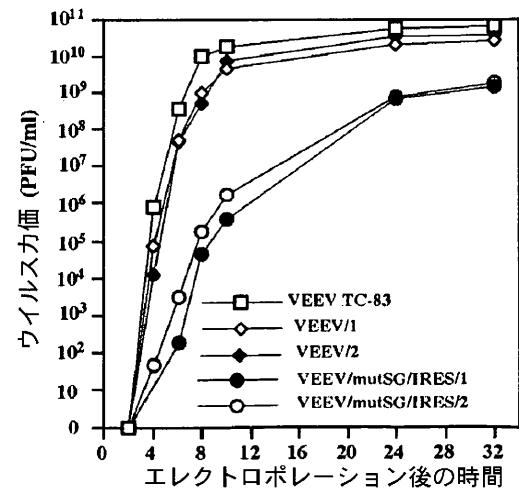
【図2A】

変異	変異株1	変異株2	aa 変更
<b>A<sub>1613</sub>→G</b>	+	+	無変化
<b>C<sub>1616</sub>→A</b>	+	+	無変化
<b>T<sub>1619</sub>→C</b>	+	+	無変化
<b>T<sub>2176</sub>→A</b>	+	-	無変化
<b>A<sub>2758</sub>→G</b>	+	+	Y <sub>370</sub> →C
<b>A<sub>2760</sub>→C</b>	+	-	K <sub>371</sub> →Q
<b>T<sub>9702</sub>→C</b>	+	+	無変化
<b>T<sub>10299</sub>→G</b>	+	+	無変化

【図2B】



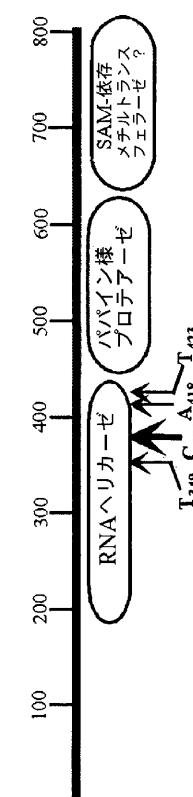
【図2C】



【図3A】

ブラーク分離株	P <sub>349</sub> →T	Y <sub>370</sub> →C	K <sub>371</sub> →Q	D <sub>418</sub> →A	K <sub>423</sub> →T
原型 pl 1	+				
原型 pl 2	+	+			
原型 pl 3	+				
原型 pl 4	+				
原型 pl 5					+
継代 pl 1		+			
継代 pl 2		+			
継代 pl 3		+			
継代 pl 4				+	
継代 pl 5					+

【図3B】



【図4A】

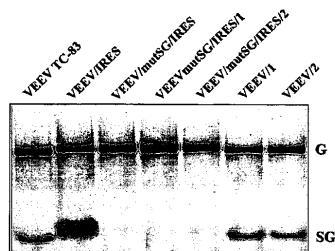


Fig. 4A

【図4B】

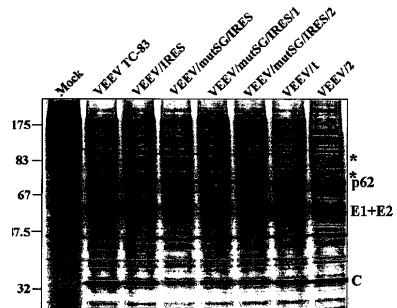
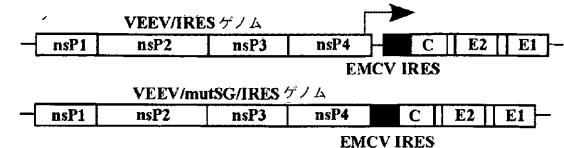
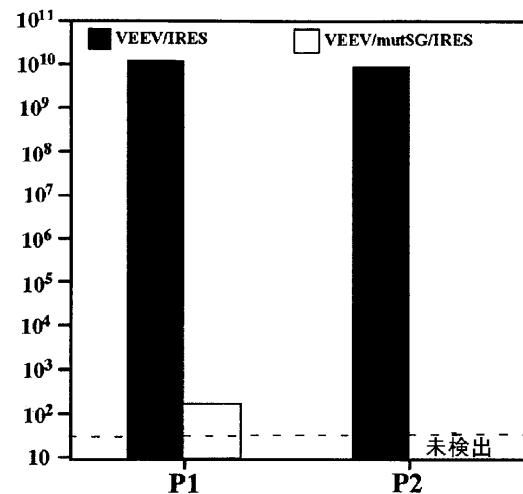


Fig. 4B

【図5A】



【図5B】

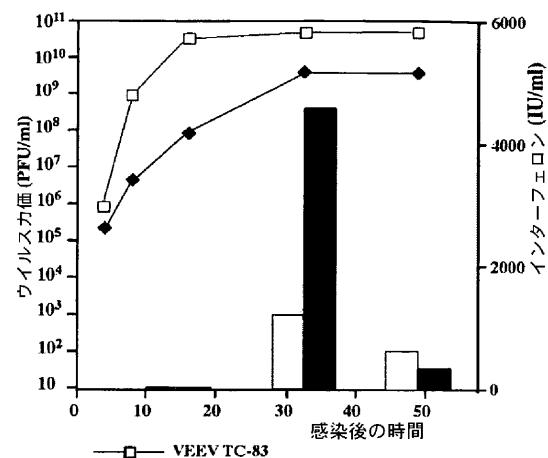


【図5C】

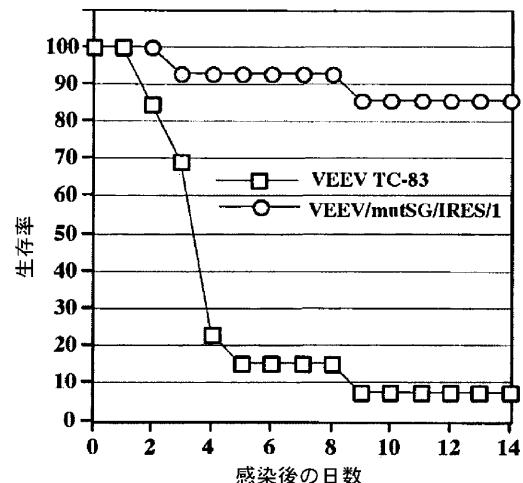
ATGGACTACGACATAGTCTAGTCGGCCA---tatggccacaacc**ATG** pl. 1  
 ATGGACTACGACATAGTCTAGTCGGCCAAG**tatggccacaacc****ATG** pl. 2  
 ATGGACTACGACATAGTCTAGTCGGCCAAG---**ATG** TC-83

Fig. 5C

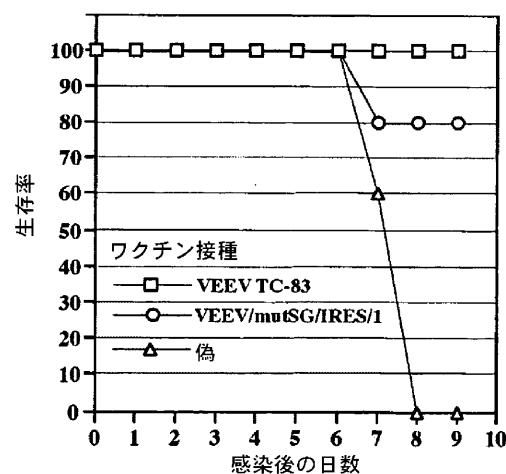
【図6】



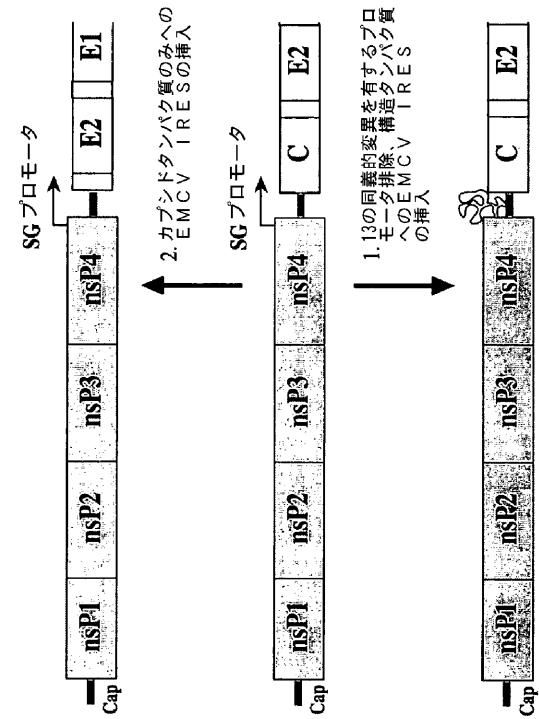
【図7】



【図8】



【図9】



【配列表】

[0005758632000001.app](http://0005758632000001.app)

---

フロントページの続き

(72)発明者 ウィーバー スコット シー。  
アメリカ合衆国 テキサス州 77554 ガルベストン フォアマスト・ドライブ 3541  
(72)発明者 フローロフ イリヤ ブイ。  
アメリカ合衆国 アラバマ州 35222 バーミングハム オルタモント・ロード エス. 4  
916  
(72)発明者 フロロワ エレナ  
アメリカ合衆国 アラバマ州 35222 バーミングハム オルタモント・ロード エス. 4  
916

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表2006-520602 (JP, A)  
米国特許出願公開第2006/0251678 (US, A1)  
J. Virol., 2006年, Vol. 80, No. 8, P. 4088-4098

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C12N 7/00 - 7/08  
CA / MEDLINE / BIOSIS (STN)