(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4101878号
(P4101878)

(45)発行日　平成20年6月18日(2008.6.18)　(24)登録日　平成20年3月28日(2008.3.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 7/04	(2006.01)	C12N	7/04	
C12Q 1/70	(2006.01)	C12Q	1/70	
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z
A61K 39/12	(2006.01)	A61K	39/12	
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00	

請求項の数 3　(全 38 頁)

(21)出願番号　特願平9-521479
(86)(22)出願日　平成8年12月9日(1996.12.9)
(65)公表番号　特表2000-502889(P2000-502889A)
(43)公表日　平成12年3月14日(2000.3.14)
(86)国際出願番号　PCT/US1996/019512
(87)国際公開番号　WO1997/020468
(87)国際公開日　平成9年6月12日(1997.6.12)
審査請求日　平成12年10月13日(2000.10.13)
審判番号　不服2004-857(P2004-857/J1)
審判請求日　平成16年1月13日(2004.1.13)
(31)優先権主張番号　08/569,853
(32)優先日　平成7年12月8日(1995.12.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　399007729
セント・ルイス・ユニバーシティ
ＳＴ．ＬＯＵＩＳ　ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ
アメリカ合衆国６３１１０－０２５０ミズーリ州　セント・ルイス、ビスタ・アベニュー３６３５番
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100076521
弁理士　坪井　有四郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｃｐ４５ＨＰＩＶ―３株に基づいた弱毒化した生ワクチンおよびそのようなワクチンにおける弱毒化を確実にするための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖キメラＲＮＡゲノムを含むハイブリッドウイルスであって、該ゲノムが（ｉ）野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスゲノムの３’リーダー領域の核酸配列と同一である核酸配列；（ｉｉ）該標的ウイルスのヌクレオカプシドタンパク質［ＮＰ］をコードする核酸配列；（ｉｉｉ）該標的ウイルスのリンタンパク質Ｐ［＋Ｃ］をコードする核酸配列；（ｉｖ）該標的ウイルスのマトリクスタンパク質［Ｍ］をコードする核酸配列；（ｖ）該標的ウイルスの融合タンパク質［Ｆ］をコードする核酸配列；（ｖｉ）該標的ウイルスの赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質［ＨＮ］をコードする核酸配列；および（ｖｉｉ）ｃｐ４５のラージタンパク質［Ｌ］をコードする核酸配列をこの順番で含むことを特徴とするハイブリッドウイルス。

【請求項２】

エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖キメラＲＮＡゲノムを含むハイブリッドウイルスであって、該ゲノムが（ｉ）野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスゲノムの３’リーダー領域の核酸配列と同一である核酸配列；（ｉｉ）該標的ウイルスのヌクレオカプシドタンパク質［ＮＰ］をコードする核酸配列；（ｉｉｉ）該標的ウイルスのリンタンパク質Ｐ［＋Ｃ］をコードする核酸配列；（ｉｖ）該標的ウイルスのマトリクスタンパク質［Ｍ］をコードする核酸配列；（ｖ）該標的ウイルスの融合タンパク質［Ｆ］をコードする核酸配列；（ｖｉ）ｃｐ４５の赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質［ＨＮ］をコードする核酸配列；および（ｖｉｉ）該標的ウイルスのラージタンパク質［Ｌ］をコードする核酸配列をこの

順番で含むことを特徴とするハイブリッドウイルス。
【請求項３】
エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖キメラＲＮＡゲノムを含むハイブリッドウイルスであって、該ゲノムが（ｉ）ｃｐ４５ウイルスゲノムの３’リーダー領域の核酸配列と同一である核酸配列；（ii）ｃｐ４５のヌクレオカプシドタンパク質［ＮＰ］をコードする核酸配列；（iii）ｃｐ４５のリンタンパク質Ｐ［＋Ｃ］をコードする核酸配列；（iv）ｃｐ４５のマトリクスタンパク質［Ｍ］をコードする核酸配列；（v）ｃｐ４５の融合タンパク質［Ｆ］をコードする核酸配列；（vi）野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質［ＨＮ］をコードする核酸配列；および（vii）ｃｐ４５のラージタンパク質［Ｌ］をコードする核酸配列をこの順番で含むことを特徴とするハイブリッドウイルス。
【発明の詳細な説明】
本発明を支持する研究助成が、部分的には、米国保健社会福祉省によって提供される。米国政府は本発明中で一定の権利を有するであろう。
発明の背景
本発明はエンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ウイルスにおよび生弱毒化ワクチンなどのウイルスの使用に関する。特に、本発明はパラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、はしかウイルスおよびインフルエンザウイルスなどのエンベロープを有するウイルスに対する新規なヒトワクチンに関する。本発明はまた、投与前の弱毒化を確実にするようなワクチンのスクリーニング方法および投与後に弱毒化した株の安定性を確認するようなワクチンのスクリーニング方法に関する。
多数のウイルスがヒトおよび動物において重篤な感染を引き起こす。例えば、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）およびパラインフルエンザウイルスは新生児および乳幼児における重篤な上部および／または下部気管疾患を引き起こす２つである。他のウイルス、例えば、インフルエンザウイルス、はしかウイルスおよびヒト免疫不全ウイルスなどもまた重要な関心が持たれる。
様々なワクチンが何年もの間、動物およびヒトにおいてウイルス感染を妨害すべく開発されている。ワクチンの２つの主要なタイプが使用されている：殺されたウイルスおよび弱毒化された生ウイルスである。殺されたウイルスは典型的には化学または物理的処置によって不活性化されるが、弱毒化生ワクチンよりも免疫応答持続を刺激することにおいて一般的にそれほど有効でない。弱毒化生ウイルスは典型的には一層有効であるが、体内にてビルレントな状態に戻るかもしれない。殺されたワクチンまたは生ワクチンを開発するのにかかる時間とコストは重要である。
生の、弱毒化したワクチンは感染した動物から単離された子孫ウイルスから直接得ることができる。例えば、ストラウブ（Straub）の米国特許第３，９２７，２０９号は、ウシ気管からのウイルス株として単離されたパラインフルエンザ３型ワクチンを開示している。生弱毒化ワクチンはまた、ウイルスが元々の病原性を失うまで、野生型株を適当な培養により繰り返し冷却継代（cold passaging）することにより得ることができる。例えば、寒冷適応した温度感受性株であるｃｐ４５は、ＨＰＩＶ－３の野生型ウイルス（ＪＳ株）を低温度に４５回通すことにより得られる（ベルシェ（Belshe）およびヒッソム（Hissom）、１９８２）。温度感受性ｃｐ４５株は、現在、ヒトにおける候補ワクチンとしての使用のために評価されつつある（カロン（Karron）ら、１９９５；ホール（Hall）ら、１９９３；ベルシェら、１９９２；クレメンツ（Clements）ら、１９９１；クルックシャンクス－ニューマン（Crookshanks－Newman）およびベルシェ、１９８６）。子供における最近の評価は、ｃｐ４５株が非常によく弱毒化されており免疫応答を刺激することにおいて有効であることを明らかにしている（カロンら、１９９５；ベルシェら１９９２）。
特定のワクチン株における弱毒化は該株の３つの表現型に関して一般に評価されている：すなわち、寒冷適応、温度感受性および組織培養物中でのプラークの大きさまたは収率。寒冷適応はウイルスが２０℃で増殖する能力に関し、温度感受性はそのような増殖が４０℃周辺で抑制されるかどうかに関する。プラーク力価はウイルス増殖の程度を定量的に評

価するためのアッセイであり、一般的に寒冷適応および／または温度感受性表現型の程度を評価するのに使用される。ワクチンが弱毒化されているか否かを決定するための他の方法は霊長類に対してワクチン投与することを含む。例えば、新規のポリオワクチンロットは、販売がＦＤＡによって許可される前に典型的にサルに投与されている。

新規のワクチンを開発するた必要性は依然として存在している。冷却継代による生弱毒化ワクチンを開発する先行技術の方法はしばしば有効ではあるが、それが成功するか否かは予測可能ではなく、単一のウイルスに対する応用に止む無く限定される。ウイルスが十分に弱毒化されたか否かを決定するための別法の必要性が存在する。寒冷適応および温度感受性表現型の特徴付けは決定的なものではない。動物を試験するためのワクチンの投与は同様に決定的でなく、有効でない。

発明の要約

それゆえ、本発明の目的はヒトおよび動物の様々なウイルスに対する使用に適したワクチンの開発および特に、ヒトパラインフルエンザウイルス１型、２型または３型およびＲＳＶなどのウイルスに対する使用に適したワクチンの開発に関する。同様に、ウイルス株が弱毒化されているか否かを決定する一層有効で再現性のある方法を提供することが目的である。

それゆえ、簡単に説明すると、本発明はエンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ＲＮＡハイブリッドウイルス、さらには製薬学的に許容し得る担体と組み合わせて該ハイブリッドウイルスを含む、弱毒化したヒトおよび／または動物ワクチンに関する。ハイブリッドウイルスを含むワクチンは様々な標的ウイルスに対して向けることができ、このウイルスには、ヒトパラインフルエンザ３型（ＨＰＩＶ－３）ウイルスおよびＨＰＩＶ－３以外のウイルスが含まれる。

非ＨＰＩＶ－３標的ウイルスに対して向けられるワクチンは、生存ウイルスを形成するのに必要な任意の他の遺伝子と組み合わせて発現に作動可能に結合した下記遺伝子を含むキメラウイルスゲノムを有する：（ｉ）標的ウイルスの１またはそれ以上の表面抗原をコードする核酸配列および（ii）変異ラージタンパク質（Ｌ）をコードする核酸配列。標的ウイルスは、この場合はＨＰＩＶ－３ウイルスではなく、ｃｐ４５の表面抗原と抗原的に異なる表面抗原またはタンパク質を有する。変異Ｌタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）Ｌタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９０％配列同一性を有するアミノ酸配列を有するＨＰＩＶ－３のＬタンパク質である。さらに、該変異Ｌタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３のＬタンパク質に比較して少なくとも１つのアミノ酸変異を有し、約３９℃の温度で標的ウイルスに通常付随するポリメラーゼ活性より低いポリメラーゼ活性を有する。

上記ハイブリッドウイルスのゲノムは、発現のため作動可能に連結して：

（ｉ）ｃｐ４５の３’リーダー領域の核酸配列と同じ核酸配列；（ii）ｃｐ４５のヌクレオカプシドタンパク質ＮＰをコードする核酸配列；（iii）ｃｐ４５のリンタンパク質Ｐ［＋Ｃ］をコードする核酸配列；（iv）ｃｐ４５のマトリクスタンパク質Ｍをコードする核酸配列；（ｖ）ＨＰＩＶ－１、ＨＰＩＶ－２およびＲＳＶよりなる群から選ばれた標的ウイルスの少なくとも１つの表面抗原をコードする核酸配列；および（vi）約３９℃で標的ウイルスに通常付随するポリメラーゼ活性より低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する変異ラージタンパク質Ｌをコードする核酸配列を含む。この場合、変異Ｌタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）Ｌタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９９．８％の配列同一性を有し、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）Ｌタンパク質に比較してアミノ酸配列中に少なくとも２つの置換を有し、該置換は残基９４２のTyrをHisにおよび残基９９２のＬeuをPheに置換するものである。

非ＨＰＩＶ－３標的ウイルスに対して向けられたワクチンにおける使用に適した他のハイブリッドウイルスは、発現のため作動可能に連結した遺伝子を含むキメラウイルスゲノムを有する。これらの遺伝子には、生存できるウイルスを形成するのに必要な他の遺伝子と組み合わせて以下をコードする核酸配列が含まれる：（ｉ）ｃｐ４５の表面抗原と抗原的に異なる非ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの少なくとも１つの表面抗原および（ii）ｃｐ４５

のＨＮタンパク質の一部。コードされた部分はノイラミニダーゼ活性を有し、ｃｐ４５のＨＮタンパク質の残基１６０から残基３８５のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。本発明はさらに、該標的ウイルスに対する使用に適している生の弱毒化したワクチンに関する。該ワクチンは、上記ハイブリッドウイルスおよび製薬学的に許容し得る担体を含む。本発明はさらに該ハイブリッドウイルスのゲノムを含むゲノムを有するプラスミドベクターおよび該ハイブリッドウイルスを産生するための方法に関する。

本発明はさらにエンベロープを有するマイナス鎖のＨＰＩＶ－３ウイルスに対して向けられたワクチンにおける使用に適したＲＮＡハイブリッドウイルスに関する。１つのそのようなハイブリッドウイルスは、生存可能なウイルスを形成するのに必要な他の任意の遺伝子と組み合わせて発現のために作動可能に連結した下記遺伝子を含む：（ｉ）野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの３’リーダー領域の核酸配列と同じであるか、または標的ウイルスのマトリクスタンパク質Ｍ、標的ウイルスの融合タンパク質Ｆおよび標的ウイルスの赤血球凝集素－ノイラミニダーゼ蛋白質ＨＮよりなる群から選択された少なくとも１つのタンパク質をコードする核酸配列および（ii）変異ＨＰＩＶ－３ラージタンパク質Ｌをコードする核酸配列。変異Ｌタンパク質は標的ウイルスのＬタンパク質に比較してアミノ酸配列中の少なくとも１つの変異を有するアミノ酸配列を有し、約３９℃の温度で標的ウイルスのＬタンパク質に通常付随するＲＮＡポリメラーゼ活性よりも低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する。

同様の点において適当な他のハイブリッドウイルスはエンベロープを有するマイナス鎖の生存可能なウイルスを形成するのに必要である任意の他の遺伝子と組み合わせて発現のために作動可能に連結した以下の遺伝子を含む一本鎖ＲＮＡハイブリッドウイルスである：（ｉ）野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの３’リーダー領域の核酸配列と同じであるか、または標的ウイルスのマトリクスタンパク質Ｍ、標的ウイルス融合タンパク質Ｆおよび標的ウイルスのラージタンパク質Ｌよりなる群から選択された少なくとも１つのタンパク質をコードする核酸配列および（ii）変異赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質ＨＮをコードする核酸配列。変異ＨＮタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ウイルスのＨＮタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、標的ウイルスのＨＮタンパク質に比較してアミノ酸配列において少なくとも１つの変異を有する。変異ＨＮタンパク質はまた、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ウイルスのＨＮタンパク質に比較しても少なくとも１つの変異を有する。ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＨＮタンパク質に比較した変異は、ＪＳのＨＮタンパク質の残基３８４の約５アミノ酸以内である。変異ＨＮタンパク質は、標的ウイルスのＨＮタンパク質に通常付随するノイラミニダーゼ活性よりも低いノイラミニダーゼ活性を有する。

本発明はまた、生存可能なプラスミドを形成するのに必要である他の遺伝子と組み合わせて発現のために作動可能に連結した前記ハイブリッドウイルスのいずれかのための遺伝子を有するプラス鎖またはマイナス鎖ゲノムを含むプラスミドベクターに関する。例えば、本発明の１つのプラスミドベクターのプラスミドゲノムは、以下を含む：（ｉ）標的ウイルスの表面抗原をコードする核酸配列および（ii）変異ラージタンパク質Ｌをコードする核酸配列。標的ウイルス表面抗原は抗原的にｃｐ４５の表面抗原と異なる。変異Ｌタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＬタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９０％の配列同一性を有し、野生型Ｌタンパク質のＬタンパク質と比較しておよび野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）と比較してアミノ酸配列において少なくとも１つの変異を有するアミノ酸配列を有する。変異Ｌタンパク質は、約３９℃の温度で標的ウイルスに通常付随するポリメラーゼ活性よりも低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する。

さらに本発明は、本発明のプラスミドベクターでトランスフェクションした宿主細胞に関する。

本発明はまた、エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ＲＮＡウイルスを産生するための方法に関する。宿主細胞は、上記ハイブリッドウイルス（例えば詳細を上記に記載したようなプラスミドベクターなど）の１つのゲノムを含む本発明のプラスミドベクターでトランスフェクションされる。ついで、宿主細胞は野生型ＨＰＩＶ－３のＮＰ、ＰおよびＬ

タンパク質を発現するプラスミドベクターで同時にトランスフェクションされる。該トランスフェクションした細胞をインキュベートしてハイブリッドウイルスを産生させる。ついで、該ハイブリッドウイルスを製薬学的に許容し得る担体または培地中で単離する。
さらに、本発明はＨＰＩＶ－３またはｃｐ４５ハイブリッドウイルスが弱毒化されているか否かを決定するための方法に関する。該方法は野生型ＨＰＩＶ－３のゲノムに比較してウイルスのゲノムにおいて少なくとも１つの変異の存在を確認することを含む。該変異はＬタンパク質またはＨＮタンパク質をコードするゲノムの領域中に存在する。
本発明はまた、ウイルスが温度感受性表現型を有するか否かを決定するための方法にも関する。ＨＰＩＶ－３またはｃｐ４５ハイブリッドウイルスのサンプルを得、ついで第一のプラークアッセイを行う。宿主細胞を野生型ＨＰＩＶ－３のＬタンパク質を発現するプラスミドベクターでトランスフェクションし、ウイルスで感染させる。インキュベーション後、第二のプラークアッセイを行い、第一のプラークアッセイと比較する。
本発明は種々のウイルスに関連して使用することができる生ワクチンを産生する新規の機会を提供する。本発明のワクチンが好ましい態様においてｃｐ４５によって示される弱毒化傷害を生じるｃｐ４５遺伝子を包含するため、本明細書に開示され請求されているワクチンはヒトまたは動物における使用の間に弱毒化されることが予想される。さらに、本発明はＨＰＩＶ－３ウイルスにおいておよびｃｐ４５ハイブリッドウイルスにおいて温度感受性表現型および弱毒化を決定するための直接的かつ有効な方法を提供する。
本発明の他の特徴および目的は当業者により部分的に明らかであり、部分的に以下に指摘されるであろう。

【図面の簡単な説明】

図１はＨＰＩＶ－３ウイルスゲノムの模式図であり、そのｃＤＮＡセンス配列として垂直方向に５’（上部）から３’（下部）に示してある。ゲノム領域を該リーダー領域、およびヌクレオカプシドタンパク質（ＮＰ）、リンタンパク質（Ｐ（＋Ｃ））、マトリクスタンパク質（Ｍ）、融合タンパク質（Ｆ）、赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質（ＨＮ）およびラージタンパク質（Ｌ）をコードするゲノムの領域に対応して表示してある。リーダー領域におけるヌクレオチドの変化の位置の数値はゲノムに関連した位置に対応するものであり、一方、他のすべての位置の数値は個々の遺伝子内でのヌクレオチド変化の位置を示す。
図２Ａおよび図２Ｂは、ｃｐ４５および野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）の間のＰタンパク質遺伝子のｍＲＮＡレベルを比較したサザンハイブリダイゼーションまたはサザンブロット分析の結果を示す写真である。図２Ａは野生型ＨＰＩＶ－３（レーン１）、ｃｐ４５（レーン２）およびＰ遺伝子を含むプラスミドＤＮＡ（レーン３）からのＰＣＲ増幅の１５サイクル後のｃＤＮＡを示す。増幅されたＤＮＡの大きさは右の矢印によって示されるように、ΦＸ１７４／HaeIII－消化ＤＮＡマーカーの移動に基づいて計算した（データ示さず）。図２Ｂは、モレキュラー・ダイナミクス・リン造影（Molecular Dynamics Phosphor Imager）を用いたリン造影分析を用いたスロットブロットハイブリダイゼーション分析の結果を示す。その上部に示してあるように、左側のレーンはｃｐ４５、右側のレーンは野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）株である。
図３Ａおよび３Ｂはパルスチェイス実験の結果を示す写真であり、ウイルスタンパク質合成の動力学を示している。野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）またはｃｐ４５で感染させた細胞を３９.５℃で２４時間増殖させ、ついで１時間^{35}Ｓ－タンパク質標識でパルスした。図３Ａは、野生型ＪＳ株（最も左側の５レーン）およびｃｐ４５（最も右側の５レーン）の両方について各レーンの下に指示した時点（０、１、２、３および４時間）でのウサギ抗－ＨＰＩＶ－３で免役沈降した細胞溶解物を示す。図３Ｂは、野生型ＪＳ株（最も左側の４レーン）およびｃｐ４５（最も右側の４レーン）の両方について各レーンの下に指示した時点（０、１、２、３および４時間）での野生型ＨＰＩＶ－３のＨＮおよびＮＰに対するプールされたモノクローナル抗体で免役沈降した細胞溶解物を示す。
図４Ａおよび４Ｂは、ＥＬＩＳＡによって決定されるように、ｃｐ４５および野生型ＨＰＩＶ－３とＨＮタンパク質に対するモノクローナル抗体（図４Ａ）およびＦタンパク質に

対するモノクローナル抗体（図４Ｂ）との応答性を示す棒グラフである。結果を抗体の特定の希釈（１：１８００）での３つの異なる実験から平均の光学密度（Ｏ.Ｄ.）として示す。該モノクローナル抗体７.１２.３、９.１.６.２、７.１４.２、５.４.８および９.４.３.６はＨＰＩＶ－３（株４７８８５）の抗原部位を定める。モノクローナル抗体１７０／７、７７／５、ｃ／２６７、ｃ／２１５、ｂ／１０８、ａ／６４０およびａ／５９１はジュディ・ビーラー（Judy Beeler）（ワールド・ヘルス・オーガニゼーション・リージェント・バンク（World Health Organization Reagent Bank）により提供された。

図５Ａおよび５Ｂは、ウサギ抗血清およびモノクローナル抗体でのワクシニアウイルスＴ系により発現されたＨＰＩＶ－３タンパク質の免役沈降を示すゲルの写真である。ＨｅＬａ－Ｔ４細胞をＨＰＩＶ－３のＬ、ＰまたはＮＰ遺伝子を含むプラスミドでトランスフェクションした。トランスフェクションの約２０時間後、該細胞を３７℃で１時間、［^{35}Ｓ］－メチオニン－［^{35}Ｓ］－システインで放射性標識した。細胞溶解物からのＨＰＩＶ－３タンパク質をＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清またはＮＰに対するモノクローナル抗体で免役沈降し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分析した。標識されたタンパク質を、還元剤の２－メルカプトエタノールの存在下、ＳＤＳ－７.５％（図５Ａ）およびＳＤＳ－１０％（図５Ｂ）上で電気泳動した。図５Ａのレーンは、以下のものに対応する：ＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清で免役沈降したベクターＤＮＡ－トランスフェクション細胞溶解物（レーン１）；ＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清で免役沈降したＰ－遺伝子－トランスフェクション細胞溶解物（レーン２）；およびＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清で免役沈降したＬ－遺伝子－トランスフェクション細胞溶解物（レーン３）。図５Ｂのレーンは、以下のものに対応する：ＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清で免役沈降したベクターＤＮＡ－トランスフェクション細胞溶解物（レーン１）；ＨＰＩＶ－３に対するウサギ抗血清で免役沈降したＬ－遺伝子－トランスフェクション細胞溶解物（レーン２）；および特定のモノクローナル抗体で免役沈降したＮＰ－遺伝子－トランスフェクション細胞溶解物（レーン３）。分子量マーカーの位置は、キロダルトンにて左側に示す。

図６Ａ～図６Ｄは、ＨＰＩＶ－３のＮＰタンパク質（図６Ａ）、Ｐタンパク質（図６Ｂ）またはＬタンパク質（図６Ｃ）を一過性に発現する細胞の間接的免疫蛍光染色を表す写真であり、陰性対照（図６Ｄ）に比較したそれらの増殖を示している。ＨＰＩＶ－３のＮＰ、ＰおよびＬタンパク質を発現する細胞およびベクターＤＮＡでトランスフェクションした対照細胞を固定し、一次抗ＨＰＩＶ－３抗体および免疫蛍光のための二次マウス抗ウサギ免疫グロブリンＧ－フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲートで反応させる。

図７Ａおよび７Ｂは、培地に対して外在的な細菌ノイラミニダーゼを添加してまたは添加せずに３２℃でＬ－１３２細胞培養物中でのｃｐ４５（図７Ａ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図７Ｂ）の増殖の特徴づけを示すグラフである。バーは３つの独立した実験の標準誤差を示している。

図８Ａ～図８Ｄは、外在性ノイラミニダーゼなしの培養物中での増殖後にｃｐ４５（図８Ａ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図８Ｂ）で感染させた細胞、および外在性ノイラミニダーゼの存在下での増殖後にｃｐ４５（図８Ｃ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図８Ｄ）で感染させた細胞により発現された細胞変性効果を示している写真である。細胞を０.０１の感染多重度で感染させ、３２℃で３６時間、外在性ノイラミニダーゼの存在下または不在下のいずれかでインキュベートした。

図９Ａ～図９Ｄは、外在性ノイラミニダーゼの存在下での増殖後、組織培養細胞中でｃｐ４５（図９Ａ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図９Ｂ）のＨＮ糖タンパク質および外在性ノイラミニダーゼの存在下での増殖後の組織培養細胞中でのｃｐ４５（図９Ｃ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図９Ｄ）のＨＮ糖タンパク質の分布を示す免疫蛍光法に基づいた写真である。

図１０Ａおよび図１０Ｂは、様々なｐＨでのｃｐ４５（図１０Ａ）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（図１０Ｂ）のノイラミニダーゼ活性の変化を示すグラフである。ノイラミニダーゼ活性アッセイは、フェチュイン（中抜き円）またはノイラミンラクトース（塗りつぶした円）を基質として用いて行った。

図１１Ａおよび図１１Ｂは、２→３結合（図１１Ａ）または２→６結合（図１１Ｂ）のいずれかを有するノイラミンラクトース基質を用いてｃｐ４５（中抜き円）および野生型ＪＳ株（塗りつぶし円）をアッセイした動力学的研究においてノイラミニダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。
図１２Ａおよび１２Ｂは、基質としてフェチュイン（図１２Ａ）かまたはノイラミンラクトース（図１２Ｂ）のいずれかを用い、ｃｐ４５（影を付した領域）およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）（影を付していない領域）をアフィニテイー精製したＨＰＩＶ－３のＨＮ糖タンパク質に対するモノ特異的ウサギ抗血清およびＨＮ糖タンパク質に対する３つのモノクローナル抗体、２－１４－１、１３－９－６－２および１７０／８でアッセイする、ノイラミニダーゼ活性抑制試験の結果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

本明細書で使用する「ＨＰＩＶ－３」はヒトパラインフルエンザ３型を意味し、すべての野生型ＨＰＩＶ－３株およびｃｐ４５などの弱毒化した株を含むすべてのＨＰＩＶ－３株を包含する。「野生型ＨＰＩＶ－３」は野生型株を意味し、弱毒化株は含まない。「ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）」または「ＪＳ株」はＨＰＩＶ－３の野生型ＪＳ株を意味する（ベルシュおよびヒッソム、１９８２）。「ｃｐ４５」は野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）の弱毒化した温度感受性で寒冷適応したｃｐ４５株であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection（ＡＴＣＣ）（ロックビル、メリーランド）に受託番号第＿＿＿＿＿号で寄託してある。本明細書に引用される各文献はその全体が参照のために引用される。

本発明はｃｐ４５のウイルスゲノムにおける特定の遺伝的欠損に対するｃｐ４５の２つの弱毒化傷害の相関に基づく。特に、温度感受性および寒冷適応性の表現型を生じるｃｐ４５の弱毒化の有意なレベルが、野生型ＪＳ株における対応遺伝子に対するラージすなわちＬ遺伝子の突然変異と直接関係していることが今やわかっている。さらにそのうえ、第２の弱毒化傷害は温度感受性の傷害とは独立して存在し、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）株における対応遺伝子に対するｃｐ４５の赤血球凝集素－ノイラミニダーゼ遺伝子（ＨＮ遺伝子）の突然変異と直接関係していることがわかっている。特定の遺伝子に対するこれらの２つのｃｐ４５の弱毒化傷害の相関はいくつかの実際的な応用を可能とする。他の野生型ＨＰＩＶ－３ウイルスに向けられたワクチン、さらには、ＨＰＩＶ－３以外の標的ウイルスに向けられたワクチンを遺伝子操作技術を用いて製造することが今や可能である。例えば、ｃｐ４５の変異したＬおよび／またはＨＮ遺伝子を、標的ウイルスのウイルスゲノムに組み込むことができる。別の態様として、表面抗原をコードする標的ウイルスの遺伝子を、ｃｐ４５のウイルスゲノムに組み入れることができる。さらに、本明細書に記載の方法により製造したＨＰＩＶ－３株またはハイブリッドウイルス株が弱毒化されているかを確認し、そのＬおよび／またはＨＮ遺伝子中の変異の存在または不存在を確認することによって決定することができる。弱毒化の確認は、投与前には新規なワクチンロットのチェックとして、そのような投与後にはワクチンウイルスの安全性（すなわち、非復帰）を確かにするために望ましい。本明細書に記載するハイブリッドウイルスはまた、細胞でのウイルスの感染、増殖および拡散に対する変異ＬおよびＨＮ遺伝子および対応する変異体ＬおよびＨＮタンパク質の効果および役割を研究するうえでも有用である。

ＨＰＩＶ－３は、エンベロープを有し、マイナス鎖で一本鎖のＲＮＡウイルスである。そのウイルスゲノムは少なくとも６つの構造タンパク質をコードしており、３’末端から順に：［３’－ＮＰ－Ｐ（＋Ｃ）－Ｍ－Ｆ－ＨＮ－Ｌ－５’］（ここで３’はゲノムの３’リーダー領域をいい、ＮＰ、Ｐ（＋Ｃ）、Ｍ、Ｆ、ＨＮおよびＬはそれぞれヌクレオカプシドタンパク質、リンタンパク質、マトリクスタンパク質、融合タンパク質、赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質およびラージタンパク質をコードするゲノムの領域をいう）を含む（スプリッグス（Spriggs）およびコリンズ（Collins）、１９８６；ストーレイら、１９８４）。相対的に短く非コードの遺伝子間領域が、機能的タンパク質をコードする該領域のそれぞれを隔てている。

ヌクレオカプシドタンパク質であるＮＰは最も豊富に存在する構造タンパク質である。該

タンパク質はゲノムＲＮＡをカプシド化し、構造の一体性およびゲノムの鋳型機能を維持すると思われる。Ｌタンパク質はＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼとして機能し、Ｐタンパク質はＬの機能を支持する補助調節タンパク質として機能する。Ｐ（＋Ｃ）遺伝子はまた（Ｃ＋）リーディングフレームをも含む。マトリクスタンパク質、融合タンパク質および赤血球凝集素－ノイラミニダーゼータンパク質（それぞれM、ＦおよびＨＮ）は一緒になってヌクレオカプシドのコアを包む脂質エンベロープを形成する。Ｍは該エンベロープの内部構造を形成し、一方、ＦおよびＨＮは表面糖タンパク質である。赤血球凝集素すなわちＨＮタンパク質のＨ部分はＨＰＩＶ－３による宿主細胞への付着または侵入に関与し、一方、ノイラミニダーゼすなわちＨＮタンパク質のＮ部分は複製後の宿主細胞からの子孫ウイルスの放出に関与している。

感染した細胞の細胞質中でのＨＰＩＶ－３などのパラミクソウイルスの複製の間、ヌクレオカプシド（ＲＮＡ－ＮＰ）はウイルスＲＮＡポリメラーゼ、Ｌによる転写の鋳型として機能する。ＬおよびＰタンパク質は、両者ともにＲＮＡ－ＮＰコアに関連し、一次転写の間、Ｌ－Ｐ複合体はヌクレオカプシドコアと相互作用してゲノムＲＮＡをウイルスタンパク質をコードする個々のｍＲＮＡに転写させる。さらに、感染細胞中での複製の間、ＮＰはＰとともに可溶性複合体を形成する。本複合体は転写ヌクレオカプシド複合体と相互作用して一次転写からウイルスＲＮＡの複製へとスイッチすると考えられている。

野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ゲノムおよび温度感受性ｃｐ４５ゲノムの全核酸配列は知られており、比較されている（ストークスら、１９９３；ガリンスキら、１９８８；ガリンスキら、１９８６；ガリンスキら、１９８６’；スプリッグスおよびコリンズ、１９８６；スプリッグスおよびコリンズ、１９８６’；ストーレイら、１９８４）。野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ゲノムとｃｐ４５ゲノムの間に少なくとも１８ヌクレオチドの差異が図１に示されるように存在する。しかしながら、これら１８ヌクレオチドの変化のうちの９つは弱毒化されていない株において認められるか、またはコードするタンパク質においてアミノ酸を変化させない。残りの変化のうちの２つは非コーディング３’リーダー領域において存在するが、制御に重要なようである。従って、ｃｐ４５ゲノムと野生型ゲノムとの間の少なくとも７つの残りのヌクレオチド差異は４つの変異タンパク質：Ｍ、Ｆ、ＨＮおよびＬにおけるアミノ酸配列の変化という結果となる。対応する野生型ＪＳタンパク質に比較した変異ｃｐ４５タンパク質のアミノ酸配列における変化は、以下を含む：Ｍ遺伝子において、残基１９９でプロリン（Ｐｒｏ）をトレオニン（Ｔｈｒ）で置換する；Ｆ遺伝子において、残基４２０でイソロイシン（Ｉｌｅ）をバリン（Ｖａｌ）で置換し、残基４５０でアラニン（Ａｌａ）をトレオニン（Ｔｈｒ）で置換する；ＨＮ遺伝子において、残基３８４でバリンをアラニンで置換する；Ｌ遺伝子において、残基９４２でチロシン（Ｔｙｒ）をヒスチジン（Ｈｉｓ）で置換し、残基９９２でロイシン（Ｌｅｕ）をフェニルアラニン（Ｐｈｅ）で置換し、および残基１５５８でトレオニン（Ｔｈｒ）をイソロイシン（Ｉｌｅ）で置換する。

Ｌタンパク質をコードする野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ゲノムの領域における変異は、現在、ｃｐ４５株の温度感受性表現型に直接相関すると理解されている。すなわち、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のｃｐ４５株の温度感受性表現型は、野生型ＪＳ株の対応する遺伝子に比較してｃｐ４５のラージすなわちＬ遺伝子における変異によって引き起こされる。Ｌ遺伝子はＨＰＩＶ－３ウイルスのＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼをコードする。変異Ｌ遺伝子の遺伝子産物（本明細書で変異Ｌタンパク質という）は、一層高い非許容温度での野生型ＪＳ株のものと比較して低減したポリメラーゼ活性を有する。そのような低減したポリメラーゼ活性は、ウイルスＲＮＡの転写の低減およびウイルスタンパク質の合成の低減となる。転写活性における幾分かの低減は約３７℃で観察され始め、顕著な低減は約３８℃またはそれ以上の温度で起こる。従って、ｃｐ４５の非許容温度は約３７℃より高い温度であると考えられ、一般に約３７℃から約４０℃の範囲である。理論に拘束されるわけではないが、高い温度およびそのように高い温度によってある種の細胞区画で生じるｐＨ変化は、変異ＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼのコンホメーションの変化を引き起こすと思われる。特に、それぞれ残基９４２および残基９９２でのＬタンパク質中のＨｉｓおよびＰｈｅ置換は、温度感受性表現型の存在に重大に寄与していると思われる。ヒスチジン－フェニル

アラニン相互作用はｐＨ依存性であり、細胞内のｐＨの変化は温度によって影響を及ぼされる。一層高い非許容温度およびｐＨにおける対応する変化への移行は、ＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼ（Ｌタンパク質）におけるコンホメーションの変化を引き起こすヒスチジン－フェニルアラニン相互作用という結果となる。そのようなコンホメーション上の変化は、今度は低減されたポリメラーゼ活性および転写および複製における対応する低減となる。ポリメラーゼ活性において観察された低減はより低い許容温度では観察されないので、変異Ｌタンパク質を有するウイルスは弱毒化され、特徴的な温度感受性表現型を示し、それによってワクチンとしての使用に適切になるであろう。野生型ＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼはそのような温度感受性のコンホメーション上の変化を受けるとは思われない。ｃｐ４５株の温度依存性の複製は、明らかにｃｐ４５ワクチンにおいて観察された弱毒化に寄与している。表１に示すように、温度感受性ｃｐ４５株の複製は野生型（“ＷＴ”）ＪＳ株（実施例１）の複製に比較して約10^6の因数で低減させられている。ｃｐ４５は一層高い温度で２４時間後、３９．５℃から３２℃までインキュベーション温度をシフトさせると幾らかの複製を示し、それゆえ特徴的な温度感受性の表現型を示した。ｃｐ４５ウイルス株の低い転写活性は３９．５℃で顕著に低減したｍＲＮＡ合成となり、その結果、タンパク質合成およびウイルス増殖は有意に影響される（実施例１）。

表１　温度シフト実験におけるｃｐ４５および親野生型（ＷＴ）ウイルスの収率の比較

ウイルス株	インキュベーション温度（℃）	ウイルス収率[a]
cp45	32	2.9×10^7
WT	32	1×10^7
cp45	39.5	1.2×10^1
WT	39.5	8×10^6
cp45	39.5 →32[b]	2×10^3
WT	39.5 →32[b]	1.5×10^7

[a]同様の感染多重度で感染したＬ－１３２細胞でのウイルスの収率をインキュベーションの４８時間後に示す。

[b]温度シフト

ｃｐ４５のＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼ（Ｌタンパク質）の温度依存活性および非許容温度（約４０℃）でのｃｐ４５の転写の対応する低減は、Ｌタンパク質をコードするウイルスゲノムの領域での変異と関係していた。ｃｐ４５で単独で感染した細胞では有意には複製しないのに対し、ｃｐ４５および野生型Ｌタンパク質を発現する組換えＤＮＡベクターの両者で同時にトランスフェクションした細胞は有意なレベルの複製を示した（実施例４および実施例５）。表２は、Ｌ－１３２細胞上での相補性プラークアッセイのウイルス複製収率を報告している。簡単に説明すると、ＣＶ－１細胞をＳＶ４０のラージＴ抗原をコードするプラスミドＤＮＡ（ｐＲＳＶ－Ｔ）および組換えプラスミドＤＮＡ（Ｌ、Ｐおよび／またはＮＰ）で同時にトランスフェクションした。ついで、ＣＶ－１細胞をトランスフェクションの２０時間後にｃｐ４５ウイルスで感染させ、３９．５℃で２８時間インキュベートした。表２に示すように、温度感受性ｃｐ４５株を相補性アッセイにおいて非変異野生型Ｌタンパク質で相補した場合、複製レベルは、プラークアッセイ法によって測定されるように、相補していないｃｐ４５に比較して１００より多くの因数で増加した。対照的に、野生型Ｐタンパク質または野生型ＮＰタンパク質で相補したｃｐ４５株は複製

に全く影響を及ぼさなかった。ｃｐ４５と野生型ＬおよびＰタンパク質または野生型Ｌ、ＰおよびＮＰタンパク質とを同時にトランスフェクションした細胞は、ｃｐ４５および野生型Ｌタンパク質単独で同時にトランスフェクションした細胞と比較して収率が同様に増加することを示し、それによってＬタンパク質の中心的役割を示している。

表２　非許容温度（３９．５℃）でのｃｐ４５ウイルスの回収のための相補性アッセイ

相補性に使用された遺伝子	３２℃でのウイルス回収力価（培養培地１ｍｌあたりのＰＦＵ）
なし	<1.0
L, P, および NP	2.3 x 10^3
L and P	1.9 x 10^2
L	3.3 x 10^2
P	<1.0
NP	<1.0

重要なことに、野生型Ｌタンパク質を非許容温度でｃｐ４５株を相補するために同時トランスフェクションに使用した細胞から産生されたｃｐ４５子孫ウイルスは、親ｃｐ４５株の温度感受性表現型を保持していた（実施例６）。さらに、ｃｐ４５のＬタンパク質相補は異型的に排他的である（exclusive）（実施例６）。従って、ｃｐ４５株を野生型Ｌタンパク質で相補することによる一層高温の非許容温度でのｃｐ４５複製の回復は、変異Ｌタンパク質（ＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼ）がｃｐ４５の温度感受性表現型に関与していることを示している。他の弱毒化傷害もｃｐ４５の弱毒化に寄与しているが、変異Ｌタンパク質の寄与が特別に有意である。

ｃｐ４５株の第二の弱毒化傷害は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）株の対応する遺伝子と比較した、ｃｐ４５の赤血球凝集素－ノイラミニダーゼ遺伝子すなわち［ＨＮ］遺伝子における変異と関連付けられている。ＨＮ遺伝子は赤血球凝集素活性およびノイラミニダーゼ活性の両方を有するタンパク質をコードする。変異ＨＮ遺伝子の遺伝子産物（本明細書で変異体ＨＮタンパク質という）は、野生型（ＪＳ）株のＨＮタンパク質に比較して低減したノイラミニダーゼ活性を有している。該ＨＮタンパク質のアミノ酸残基３８４においてバリンがアラニンに置換している。低減したノラミニダーゼ活性は、このアミノ酸置換によるコンホメーション変化によるものであるが、感染した宿主細胞からの子孫ウイルスの放出を抑制し、それによってウイルスが他の細胞に拡散し複製する程度が遅延および減少する。

いくつかの実験は、低減したノイラミニダーゼ活性が変異ＨＮタンパク質と直接関係し、変異Ｌタンパク質と関連する温度感受性傷害とは独立であり相補的であることを示している。３２℃でのｃｐ４５および野生型（ＪＳ）ウイルス株の増殖特性を、外在性ノイラミニダーゼが不在であるかまたは存在する培養で決定した（実施例７）。図７Ａに示すように、外在性ノイラミニダーゼを欠如した培地中での約５０時間のインキュベーション後に測定したｃｐ４５ウイルス力価は、外在性ノイラミニダーゼを含む培地中でのインキュベーション後に測定した対応力価よりも約５倍から１５倍低かった（図７Ｂ）。対照的に、野生型ＪＳウイルスの力価は、培地中に外在性ノイラミニダーゼが存在するか否かにかかわりなく、約２５時間後に実質的に同一であった。

さらに、低い感染多重度でｃｐ４５で感染させ３２℃で増殖させたＬ－１３２細胞は、特徴的な多核巨大細胞とで限局した細胞融合すなわちシンシチウム形成を示した（図８Ａ；実施例８）。一致して、ｃｐ４５で３３℃で感染させたＬ－１３２細胞で発現された変異体ＨＮタンパク質の分布は限局された領域に限られていた。（図９Ａ；実施例９）。しかしながら、上記２つの各実験と平行して行った実験において培地に外在性ノイラミニダーゼを加えると、限局した細胞融合の程度（図８Ｃ）と変異ＨＮタンパク質の制限および限

局された分布の程度（図９Ｃ）の両方で劇的に減少する結果となった。外在性ノイラミニダーゼの存在下でインキュベートしたｃｐ４５感染細胞において観察される細胞変性効果はＪＳ感染細胞において認められる効果と同様であり、外在性ノイラミニダーゼの不在下（図８Ｂ）か外在性ノイラミニダーゼの存在下（図８Ｄ）のいずれでインキュベートされるかにかかわりなく有意に低い限局細胞融合を示した。野生型ＪＳのＨＮ糖タンパク質の均一かつ同様の分布が、外在性ノイラミニダーゼの不在下（図８Ｂ）かまたは外在性ノイラミニダーゼの存在下（図９Ｂ）で観察された。培地中への細菌性ノイラミニダーゼの添加後の融合促進活性の不在は、ｃｐ４５の融合がそのノイラミニダーゼ活性と関連があることを示している。変異ＨＮタンパク質を有するウイルスによって示される培地中の変異ＨＮタンパク質の分布の制限および広範な限局細胞融合は、感染細胞からのウイルス子孫の放出が野生型ＪＳ株で感染した細胞に比較して減少していること、およびウイルスの多細胞複製が変異ｃｐ４５ＨＮタンパク質によって抑制されることを示している。

ノイラミニダーゼ活性試験は、野生型ＪＳ株のＨＮタンパク質に比較してｃｐ４５変異ＨＮタンパク質においてコンホメーションが変化していることを示唆している。表３を参照すると、ＪＳ株に比較したｃｐ４５株のノイラミニダーゼ活性の減少は、非許容温度（３９.５℃）と許容（３２℃）温度の両方にて示されている（実施例２）。一層高い非許容温度では、フェチュインまたはノイラミンラクトースのいずれをアッセイ基質として使用したかにかかわらず、ｃｐ４５のノイラミニダーゼ活性はＪＳ株のノイラミニダーゼ活性とは異なっていた。しかしながら、低い許容温度ではこれら２つの株についてのノイラミニダーゼ活性における差異は、基質としてフェチュインを用いたアッセイにおいてのみ観察された。アッセイに相対的に小さなノイラミンラクトース基質を使用した場合には、ｃｐ４５およびＪＳ株の活性の間での差異は許容温度で観察されなかった。観察された基質依存性は、ｃｐ４５のＨＮタンパク質のノイラミニダーゼ活性付与部位の三次構造がＪＳ株のものと異なっているようであることを示唆している。

表３　ｃｐ４５ウイルスと親野生型（ＷＴ）ウイルスのノイラミニダーゼ活性の比較

ウイルス株	インキュベーション温度（℃）	使用されたＨＡ[a]単位	ノイラミニダーゼ活性[b]: フェチュイン	ノイラミンラクトース
WT	39.5	512	0.24	3.60
cp45	39.5	512	0.03	0.83
WT	32	2,048	1.11	2.30
cp45	32	2,048	0.67	2.30

[a]ＨＡ＝赤血球凝集素活性

[b]結果は５４９ｎｍでの光学密度として示してある。

酵素的特性におけるさらなる差異は、さらなるノイラミニダーゼ研究で観察された。ｃｐ４５およびＪＳ株におけるノイラミニダーゼ活性のｐＨ最適条件をフェチュインまたはノイラミンラクトースのいずれかをアッセイ基質として用いたノイラミニダーゼ活性アッセイを用いて比較した（実施例１０）。図１０Ａおよび図１０Ｂにおけるデータを比較することによってわかるように、ノイラミニダーゼ活性を小さい方の基質であるノイラミンラクトースでアッセイした場合、ｃｐ４５およびＪＳ株の最適ｐＨは同じであり、約５.５であった。しかしながら、大きい方の基質であるフェチュインでアッセイした場合、ｃｐ４５の最適ｐＨが約４.９であったのに対し、ＪＳ株の最適ｐＨは約６.３であった。理論

に拘泥されるものではないが、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）に比較して低いｃｐ４５のノイラミニダーゼ活性のｐＨ最適化はｃｐ４５の弱毒化傷害である変異ＨＮタンパク質と一致し、その際、イン・ビボＨＰＩＶ－３感染は気道の領域において開始されるが、気道の領域はｃｐ４５の最適ｐＨより野生型ＪＳ株の最適ｐＨに近い。酵素動力学的研究において、ｃｐ４５およびＪＳ株のノイラミニダーゼ活性を２→３または２→６結合のいずれかを有するノイラミンラクトース基質でのアッセイを用いて決定した（実施例１０）。動力学的研究は、ノイラミンラクトースのための最適条件であることが示されているｐＨ５．５で行った。ｃｐ４５およびＪＳ株の活性における変化速度の比較は、両方の株が同様に２→３結合を好むが（図１１Ａ）、一方、ｃｐ４５はＪＳ株よりも２→６結合を一層好む（図１１Ｂ）ことを示している。さらに、ｃｐ４５は２→６結合よりも２→３結合を一層好む（図１１Ａおよび図１１Ｂを比較）。

理論に拘泥されるものではないが、ノイラミニダーゼ活性アッセイを含む実験の結果は、ｃｐ４５の変異ＨＮタンパク質がＨＰＩＶ－３（ＪＳ）に比較して変化した三次構造を有すること、および変異ＨＮタンパク質の活性が温度、ｐＨ、基質および／または結合依存性であることを全体として示している。ノイラミニダーゼ活性の減少は感染した細胞表面からの子孫ウイルス粒子の放出を制限する。しかしながら、約５から約１０の範囲の因数での活性の減少は、変異ＨＮタンパク質が変異Ｌタンパク質に比較してあまり重要ではない傷害であることを示唆している。さらに、野生型株に比較してｃｐ４５の３’リーダー領域におけるヌクレオチド変化もまた、ｃｐ４５の寒冷適応で温度感受性および／または弱毒化特性に影響を及ぼすことが考えられる。

ｃｐ４５の転写活性およびノイラミニダーゼ活性は野生型ＨＰＩＶ－３に比較して減少しているが、他の生物学的特性は有意に変化しなかった。初期の研究は、モノクローナル抗体のパネルとの反応性によって定められるエンベロープ糖タンパク質の抗原部位は野生型株に比較してｃｐ４５において影響されないままであることを示した（実施例３）。しかしながら、ｃｐ４５の表面抗原の幾分の変調が、ｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のノイラミニダーゼ活性部位の抗原性との関連を野生型ＨＰＩＶ－３のノイラミニダーゼ活性を抑制することが知られている抗体および抗血清を用いて比較したさらなる研究において示された。ｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のノイラミニダーゼ活性の抑制を、３つのモノクローナ抗体（２－１４－１、１３－９－６－２および１７０／８）およびアフィニティー精製ＨＮに対するモノ特異的ウサギ抗血清を用いて試験した（実施例１１）。フェチュインをノイラミニダーゼ活性の抑制を決定するための基質として使用した場合、抑制抗体または抗血清のいずれについてもｃｐ４５とＨＰＩＶ－３（ＪＳ）とで抗原部位の有意の差異は観察されなかった（図１２Ａ）。しかしながら、相対的に小さなノイラミンラクトース基質を使用した場合、ｃｐ４５株のノイラミニダーゼ活性はＪＳ株の活性に比べてモノクローナル抗体１２－９－６－２および１７０／８によって抑制されなかった（図１２Ｂ）。２つの株におけるノイラミニダーゼ活性の阻害の程度は、モノクローナル抗体２－１４－１およびモノ特異的ウサギ抗血清については同様であった（図１２Ｂ）。

理論に拘泥されるものではないが、ＣＰ４５のＨＮタンパク質の酵素部位のアミノ酸配列における変異はモノクローナル抗体１２－９－６－２および１７０／８によって認識される抗原部位には小さな変化を引き起こすようであるが、例えば２－１４－１抗体によって認識される抗原部位を含む他の抗原部位には検出しうる影響を及ぼさなかった。それにもかかわらず、変異ＨＮタンパク質はエピトープのコンホメーションにおける小さな変化にもかかわらずＨＰＩＶ－３に特異的な免疫応答を引き起こす能力を保持している。同様に、細胞表面へのＨＮおよびＦ糖タンパク質の輸送およびＨＮタンパク質の赤血球凝集素活性（赤血球凝集素活性アッセイによって決定される）は野生型ＪＳ株に比較してｃｐ４５株で実質的に異ならなかった（実施例３）。さらに、限られたウイルス形態形成が非許容温度で観察された。

ｃｐ４５のＬ遺伝子およびＨＮ遺伝子の変異と関連した弱毒化傷害は、他の野生型ＨＰＩＶ－３ウイルスに対するワクチン、さらにはＨＰＩＶ－３以外の標的ウイルスに対するワクチンを作製するのに用いることができる。一般に、標的ウイルスは１またはそれ以上の

表面抗原を有するエンベロープウイルスを含む。本明細書で使用する「表面抗原」とは、イン・ビボにおいて免疫応答を引き起こすことができるタンパク質またはその一部をいい、一般に、宿主細胞にウイルスが付着することに関与し、ウイルスが宿主細胞に侵入して感染を確立することを可能にし、および／または感染した宿主細胞からの子孫ウイルスの放出を容易にする表面タンパク質、表面糖タンパク質および／または他の残基を含む。種々のウイルスまたはウイルス株の表面抗原は、それが異なるイン・ビボでの免疫応答を引き起こすような異なる抗原部位を有するならば、互いに「異なっている」とされる。本発明の目的のためには、差異は、表面抗原が異なる抗体によって選択的にスクリーニングされるかまたは選択的に抑制されることを示すイン・ビトロアッセイを用いて示すことができる。標的ウイルスは一般的には野生型株であろうが、生の弱毒化したワクチンを使用することが望まれる変異体ウイルスをも含むことができる。

好ましい標的ウイルスは、ヒトパラインフルエンザウイルス１型（ＨＰＩＶ－１）、ヒトパラインフルエンザウイルス２型（ＨＰＩＶ－２）、呼吸器合胞性ウイルス（ＲＳＶ）、ヒトインフルエンザウイルスＡ型、ヒトインフルエンザウイルスＢ型、耳下腺炎および麻疹ウイルスなどの関連した、エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ＲＮＡウイルスを含む。ＨＰＩＶ－１、ＨＰＩＶ－２、ＲＳＶ、インフルエンザおよび麻疹などの標的ウイルスは各々、ウイルスが宿主細胞に付着し宿主細胞に侵入することに関与し、ＨＰＩＶ－３のＦおよびＨＮタンパク質に機能的に類似であると考えられる表面タンパク質を有する。これらのウイルスの各々の表面タンパク質をコードする核酸配列は知られている。ＨＰＩＶ－１およびＨＰＩＶ－２はＨＰＩＶ－３同様、各々２つの表面糖タンパク質ＨＮおよびＦを有し、それぞれＨＰＩＶ－３のＨＮおよびＦタンパク質に機能的に類似である。１型および２型パラインフルエンザウイルスの両方に関して、ＨＮタンパク質のＨ部分およびＦタンパク質はそれぞれ付着および侵入に関連し、一方、ＨＮタンパク質のＮ部分は子孫ビリオンの放出に関与している。ＨＰＩＶ－１のＦ遺伝子およびＨＮ遺伝子の核酸配列は以前に決定されている（マーソン（Merson）ら、１９８８；マツオカ（Matsuoka）ら、１９９０）。ＨＰＩＶ－２のＦ遺伝子およびＨＮ遺伝子の核酸配列も同様に決定されている（フー（Hu）ら、１９９０；プレシャス（Precious）ら、１９９０；カワノ（Kawano）ら、１９９０’；カワノら、１９９０）。ＲＳＶ－ＡおよびＲＳＶ－Ｂは各々２つの表面糖タンパク質、ＦおよびＧを有する。Ｇタンパク質はＨＰＩＶ－３のＨＮタンパク質の赤血球凝集素活性に機能的に類似である；該タンパク質は宿主細胞への付着に関連する活性を有する。Ｆは宿主細胞中へのヌクレオカプシドの侵入に関する。ＲＳＶ－ＡのＦ遺伝子およびＧ遺伝子の核酸配列は決定されている（ロペス（Lopez）ら、１９８８；マーチン－ギャラルド（Martin-Gallardo）ら、１９９１；アンダーソン（Anderson）ら、１９９２；マーチン－ギャラルドら、１９９３；コリンズら、１９９３）。ＲＳＶ－ＢのＦ遺伝子およびＧ遺伝子の核酸配列もまた以前に決定されている（ベイバット（Baybutt）およびプリングル（Pringle）、１９８７；サレンダー（Sullender）ら、１９９０；サレンダーら、１９９１）。これらの配列またはその部分はまた充分に比較されている（ジョンソン（Johnson）およびコリンズ、１９８８；ジョンソンおよびコリンズ、１９８８’）。インフルエンザＡ型およびＢ型もまた２つの表面糖タンパク質：ＨおよびＮを有する。Ｈタンパク質は宿主細胞への付着および侵入に関する活性を有する。Ｎタンパク質は感染した宿主からの子孫ビリオンの放出に関する。インフルエンザウイルスの抗原部位は典型的には毎年ごと位に変化するが、現在の株のサンプルは米国センター・フォー・インフェクシャス・ディジーズ・コントロール（Ｕ.Ｓ. Center for Infectious Disease Control）から容易に利用でき、現在の表面糖タンパク質を定める核酸配列はそれらから決定することができる。麻疹ウイルスもまた２つ表面糖タンパク質：ＨＮおよびＦを有する。ＨＰＩＶ－３同様に、ＨＮタンパク質のＨ部分およびＦタンパク質はそれぞれ付着および侵入に関連し、一方、ＨＮタンパク質のＮ部分は子孫ビリオンの放出に関与している。ウシＲＳＶはヒトＲＳＶ株に機能的に類似である２つの表面タンパク質を有する。ウシＲＳＶのＧおよびＦ糖タンパク質の核酸配列は決定されている（ラーチ（Lerch）ら、１９９０；ウォルラベンズ（Walravens）ら、１９９０）。分子的および機能的に類似の表面タンパク

質によりＨＰＩＶ－３に関連する標的ウイルスが好ましいが、本発明の標的ウイルスはまた、他のエンベロープを有するウイルス、例えば他のパラミクソウイルス、他のオルトミクソウイルス、レトロウイルス（例えば、付着機能（ＨＩＶ－ＧＰ１２０）および侵入機能（ＨＩＶ－ＧＰ４１）を有するヒト免疫不全ウイルス、ＨＩＶ）、アレナウイルス、コロナウイルス、ブニヤウイルス、ラブドウイルス、トガウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびヘパドナウイルスを含む。好ましい標的ウイルスは細胞質において増殖するエンベロープを有するウイルスを含む。本発明の標的ウイルスはヒトに特異的であるか、動物に特異的であるか、または動物およびヒトの両方に共通するであろう。ウシＲＳＶおよび畜牛ＨＰＩＶ－３（輸送熱ウイルス（shipping fever virus））は本発明の範囲内に含まれる典型的な動物ウイルスである。

ＨＰＩＶ－３ウイルスに対するワクチンは、好ましくはエンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ＲＮＡウイルスであるハイブリッドウイルスを作製するために遺伝子操作技術を用いることによって作製することができる。そのようなハイブリッドウイルスは、一般に、標的ウイルスのゲノム中の野生型Ｌおよび／またはＨＮ遺伝子を、標的ウイルスに比較して変異し、低減したポリメラーゼおよび／またはノイラミニダーゼ活性をそれぞれ有する変異Ｌおよび／またはＨＮタンパク質をコードするＬおよび／またはＨＮ遺伝子で置換することによって作製できる。ついで、ハイブリッドウイルスを製薬学的に許容し得る担体と組み合わせて弱毒化ワクチンを生成する。

ＨＰＩＶ－３標的ウイルスに対するワクチンに使用するのに適しているハイブリッドウイルスは、ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの３’リーダー領域の核酸配列と同じであるか、または以下のタンパク質の１またはそれ以上をコードする核酸配列を含む：野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスのヌクレオカプシドタンパク質［ＮＰ］、リンタンパク質［Ｐ（＋Ｃ）］、マトリクスタンパク質［Ｍ］、および／または融合タンパク質［Ｆ］。ウイルスゲノムはさらにＨＮおよびＬ遺伝子を含む。ウイルスゲノムのＨＮ遺伝子は、標的ウイルスの野生型ＨＮタンパク質か、または約３９℃の温度で標的ウイルスのＨＮタンパク質に付随するノイラミニダーゼ活性よりも低いノイラミニダーゼ活性を有する変異ＨＮタンパク質のいずれかをコードする。同様に、ウイルスゲノムのＬ遺伝子は、標的ウイルスの野生型Ｌタンパク質か、または約３９℃の温度で標的ウイルスのＬタンパク質に付随するＲＮＡポリメラーゼ活性よりも低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する変異Ｌタンパク質のいずれかをコードする。いずれの場合も、ハイブリッドウイルスが野生型ＨＰＩＶ－３ウイルスに比較して少なくとも１つの弱毒化傷害（変異ＨＮまたは変異Ｌタンパク質のいずれかに基づいて）を有するように、ハイブリッドウイルスのＨＮ遺伝子またはＬ遺伝子のいずれかは変異タンパク質をコードする。

一態様において、ハイブリッドウイルスのゲノムは変異Ｌタンパク質をコードする核酸配列および変異ＨＮタンパク質をコードする核酸配列を含む。そのようなハイブリッドウイルスはｃｐ４５同様に、少なくとも２つの弱毒化傷害を有する。さらにハイブリッドウイルスの３’リーダー領域は、野生型ＨＰＩＶ－３標的ウイルスの３’リーダー領域に比較して少なくとも１つの核酸変異を有する変異３’リーダー領域であってよい。ｃｐ４５の３’リーダー領域は好ましい変異３’リーダー領域である。同様に、ハイブリッドウイルスのゲノムは、野生型タンパク質に比較して少なくとも１つのアミノ酸変異を有する変異ＮＰ、Ｐ（＋Ｃ）、ＭまたはＦタンパク質をコードする核酸配列を含むことができる。ｃｐ４５のＮＰ、Ｐ（＋Ｃ）、ＭおよびＦタンパク質は好ましい変異タンパク質である。

別の態様として、弱毒化のわずかに低いハイブリッドウイルスは、変異Ｌタンパク質をコードする核酸配列および野生型ＨＮタンパク質をコードする核酸配列を含むゲノムを有する。このハイブリッドウイルスの３’リーダー領域は野生型または変異３’リーダー領域であってよく、ウイルスゲノムはまた野生型かまたは変異ＮＰ、Ｐ（＋Ｃ）、ＭおよびＦタンパク質をコードする核酸配列を含むことができる。例示的なハイブリッドウイルスは、ｃｐ４５のＨＮ遺伝子が野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＨＮ遺伝子で置換されている改変ｃｐ４５ウイルスである。詳細には、そのように改変したｃｐ４５ハイブリッドウイルスは、その３’末端から順に（ｉ）ｃｐ４５の３’リーダー領域の核酸配列と同様である

核酸配列、（ii）ｃｐ４５のヌクレオカプシドタンパク質［ＮＰ］をコードする核酸配列、（iii）ｃｐ４５のリンタンパク質［Ｐ（＋Ｃ）］をコードする核酸配列、（iv）ｃｐ４５のマトリクスタンパク質［Ｍ］をコードする核酸配列、（v）ｃｐ４５または標的ウイルスの融合タンパク質［Ｆ］をコードする核酸配列、（vi）標的ウイルスの赤血球凝集素－ノイラミニダーゼタンパク質［ＨＮ］をコードする核酸配列、および（vii）ｃｐ４５のＬタンパク質をコードする核酸配列を含むウイルスゲノムを有する。野生型ＨＮタンパク質および変異Ｌタンパク質を有するハイブリッドウイルスを含むワクチンは、変異ＨＮタンパク質および変異Ｌタンパク質の両者を含むウイルスを含有するワクチンに比べてわずかに低く弱毒化されているであろう。例えば、上記の改変ｃｐ４５ウイルス（野生型（ＪＳ）ＨＮタンパク質およびｃｐ４５のＬタンパク質を有する）は野生型ＪＳ株に比較してｃｐ４５よりも低く弱毒化されている。これらのワクチンは例えば、ｃｐ４５での臨床上の試行が複製のわずかに高いレベルおよびその結果としての一層高い免疫応答が望ましいことを示している場合には商業的に重要である。

ＨＰＩＶ－３以外の他のウイルスに対するワクチンもまた作製できる。例えば、標的ウイルスの１またはそれ以上の表面糖タンパク質または表面抗原（典型的にはウイルスおよびウイルスの子孫の付着、侵入および放出に関与するタンパク質）を、遺伝子操作により、複製および内部構造に関与するタンパク質をコードするｃｐ４５ウイルスゲノムの領域と結合させることができる。得られたハイブリッドウイルスは、ｃｐ４５ウイルスゲノムによって貢献される温度感受性弱毒化特性および標的ウイルスのウイルス特異的抗原特性を有するであろう。そのようにしてハイブリッドウイルスは、予測可能なレベルの安全性および免疫原性を有し、ヒトにおいてワクチンとして使用するのに適しているであろう。

非ＨＰＩＶ－３標的ウイルスと組み合わせてｃｐ４５から開発したワクチンは、エンベロープを有するマイナス鎖の一本鎖ＲＮＡハイブリッドウイルスおよび適当な製薬学的に許容し得る担体を含む。ハイブリッドウイルスは、標的ウイルスの少なくとも１つの表面抗原をコードする核酸配列を含む。コードした表面抗原はｃｐ４５などのＨＰＩＶ－３ウイルスの表面抗原と抗原的に異なる。ハイブリッドウイルスゲノムはまた以下のいずれかまたは両者をコードする核酸配列をも含む：（ｉ）約３９℃の温度で標的ウイルスに付随するポリメラーゼ活性よりも低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する変異ラージタンパク質［Ｌ］、および／または（ii）約３９℃の温度で標的ウイルスのノイラミニダーゼ活性よりも低いノイラミニダーゼ活性を有するｃｐ４５のＨＮタンパク質の部分。ＨＮタンパク質のコードされた部分は、好ましくは少なくとも約５０アミノ酸残基長、より好ましくは少なくとも１００アミノ酸残基長、さらに一層好ましくは少なくとも２００アミノ酸残基長、最も好ましくは少なくとも２２０アミノ酸残基長である。コードされた部分は、好ましくはｃｐ４５のＨＮタンパク質のアミノ酸残基３８４、またはｃｐ４５の残基３８４の約５アミノ酸残基内で機能的に類似の変異残基を含む。コードされた部分は、最も好ましくはｃｐ４５の残基１６０から残基３８５のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む。

非弱毒化株への復帰の可能性は、ハイブリッドウイルスのゲノムが３’リーダー領域並びにＮＰ、Ｐ［＋Ｃ］およびＭタンパク質をコードする領域においてｃｐ４５ゲノムに一層密接に類似している場合には低い。従って、ＨＰＩＶ－３株以外の標的ウイルスに対するワクチンに使用するのに適している好ましいハイブリッドウイルスは、その３’末端から順に：ｃｐ４５ウイルスゲノムの３’リーダー領域の核酸配列と同じ核酸配列；ｃｐ４５のヌクレオカプシドタンパク質、［ＮＰ］、リンタンパク質、Ｐ［＋Ｃ］、およびマトリクスタンパク質、［Ｍ］をコードする核酸配列；ＨＰＩＶ－３ウイルス以外のエンベロープを有する標的ウイルスの少なくとも１つの表面抗原をコードする核酸配列、および変異Ｌタンパク質をコードする核酸配列を含むキメラゲノムを有する。

ＨＰＩＶ－３および非ＨＰＩＶ－３標的ウイルスに対する上記ハイブリッドウイルスにおいて言及したように、変異Ｌタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３のＬタンパク質に構造的に最も密接に関連したタンパク質と比較して（すなわち、変異タンパク質が由来する野生型タンパク質と比較して、または変異タンパク質をコードする変異遺伝子が由来する遺伝子によってコードされた野生型タンパク質に比較して）アミノ酸配列において少なくとも

１つの変異を有するＨＰＩＶ－３のＬタンパク質である。本明細書の目的のためには、ＨＰＩＶ－３のＬタンパク質とは、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＬタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。変異Ｌタンパク質と野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＬタンパク質との間の配列同一性は、好ましさが増加する順に、より好ましくは少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、少なくとも約９９.５％、少なくとも約９９.７％および少なくとも約９９.８％である。ＪＳ株のＬタンパク質は２，２５８アミノ酸を有しているので、そして一般に、たいていのＨＰＩＶ－３のＬタンパク質は２０００を超えるアミノ酸残基を有するので、９９.８％の配列同一性は野生型と変異タンパク質との間のアミノ酸配列の約４の変異に対応する。同様に、変異ＨＰＩＶ－３Ｌタンパク質は標的ウイルスの野生型ポリメラーゼタンパク質と同じタンパク質ではありえない（標的ウイルスがＨＰＩＶ－３ウイルスであるかまたは非ＨＰＩＶ－３ウイルスであるかにかかわらず）。従って、変異Ｌタンパク質は、標的ウイルスのＬタンパク質（または機能的に類似のポリメラーゼタンパク質）に比較してアミノ酸配列において少なくとも１つの変異を有する。さらに、変異Ｌタンパク質は、約３７℃～４０℃の範囲の非許容な温度、好ましくは約３９℃の温度で標的ウイルスに通常付随するポリメラーゼ活性よりも低いＲＮＡポリメラーゼ活性を有する。変異Ｌタンパク質のポリメラーゼ活性は、標的ウイルスのポリメラーゼ活性よりも少なくとも約１０％低いのが好ましい。変異Ｌタンパク質のポリメラーゼ活性はより好ましくは、好ましさが増加する順に、標的ウイルスのポリメラーゼ活性よりも少なくとも10^2、10^3、10^4、10^5および10^6の因数で低い。

変異Ｌタンパク質はもっとも好ましくは変異ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）Ｌタンパク質である。すなわち、好ましい変異Ｌタンパク質は、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＬタンパク質に比較してアミノ酸配列中に少なくとも１つの変異を有する。変異なる語は、アミノ酸残基における付加、欠失または置換を包含することを意図するが、変異は好ましくは野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＬタンパク質と比較してｃｐ４５のＬタンパク質の置換に機能的に類似した置換である。従って、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）に比較したアミノ酸配列における変異は、好ましくは、残基９４２、９９２または１５５８の約（すなわち、プラスまたはマイナス）５つのアミノ酸残基内のものである。さらに詳しくは、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）に比較したアミノ酸配列における変異は、好ましくは以下の置換の１またはそれ以上を含む：残基９４２でのTyrの代わりのHis、残基９９２でのLeuの代わりのPheおよび残基１５５８でのThrの代わりのＩle。変異Ｌタンパク質は、好ましくは、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）タンパク質に比較してアミノ酸配列中に少なくとも２つの変異を有する：残基９４２でのTyrの代わりのHisおよび残基９９２でのLeuの代わりのPhe。変異Ｌタンパク質は、さらに一層好ましくは、ｃｐ４５ Ｌタンパク質のアミノ酸配列における３つの変異を全部有し、他の変異も含んでいてよい。これら記載したものに加えて他の置換または他の変異も変異Ｌタンパク質のアミノ酸配列中に存在してよいが、これら列挙した置換のみを有し、低減されたポリメラーゼ活性を付与する変異ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）タンパク質で一般に十分である。変異Ｌタンパク質は最も好ましくはｃｐ４５のＬタンパク質である。

変異赤血球凝集素－ノイラミニダーゼ（ＨＮ）タンパク質は、上記ハイブリッドウイルスにおいて言及したように、構造的に最も緊密に関連した野生型ＨＰＩＶ－３のＨＮタンパク質に比較してアミノ酸配列中に少なくとも１つの変異を有するＨＮタンパク質である。変異ＨＮタンパク質は、野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＨＮタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。変異ＨＮタンパク質と野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＨＮタンパク質との間の配列同一性は、好ましさが増加する順に、より好ましくは、少なくとも９５％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％および少なくとも約９９.５％である。ＨＰＩＶ－３のＨＮタンパク質は、典型的には少なくとも約４００アミノ酸残基を含むので、９９.５％の配列同一性は、野生型タンパク質と変異型のタンパク質との間でアミノ酸配列中の約２つの変異に対応する。同様に、変異ＨＰＩＶ－３ ＨＮタンパク質は標的ウイルスの野生型ノイラミニダーゼタンパク質と同じタンパク質ではありえない；変異ＨＮタンパク質は、標的ウイ

ルスのノイラミニダーゼタンパク質（または機能的に類似の放出タンパク質）に比較して少なくとも１つの変異を有する。さらに、変異ＨＮタンパク質は、約３７℃～約４０℃の範囲の非許容温度、好ましくは３９℃の温度で標的ウイルスに付随するノイラミニダーゼ活性よりも低いノイラミニダーゼ活性を有する。変異ＨＮタンパク質のノイラミニダーゼ活性は、標的ウイルスのポリメラーゼ活性よりも好ましくは少なくとも約３の因数で、より好ましくは少なくとも約５の因数で、さらにより好ましくは少なくとも約１０の因数で、および最も好ましくは少なくとも約１５の因数で低い。

変異ＨＮタンパク質は、好ましくは、ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のＨＮタンパク質に比較してアミノ酸配列中に少なくとも１つの変異を有する変異ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ＨＮタンパク質である。変異は、付加、欠失または置換であることができるが、該変異は、野生型ＨＰＩＶ－３のＨＮタンパク質に比較してｃｐ４５のＨＮタンパク質の置換に機能的に類似した置換である。従って、置換は好ましくは、ＪＳ株のＨＮタンパク質のアミノ酸残基３８４の約５のアミノ酸残基内（すなわち、プラスまたはマイナス）であるのが好ましい。変異ＨＮタンパク質はより好ましくは、残基３８４でのＶａｌの代わりのＡｌａの置換またはその５残基内での他の機能的に同等の置換を含む。これら記載したものに加えて他の変異もまた変異ＨＮタンパク質のアミノ酸配列に存在していてよい；しかしながら、上記単一のアミノ酸置換を有し、低減したノイラミニダーゼ活性を付与する変異ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ＨＮタンパク質で一般に十分である。変異ＨＮタンパク質は最も好ましくは、ｃｐ４５のＨＮタンパク質である。

ハイブリッドウイルスのゲノムに含まれるものとして上記に挙げた遺伝子は、実際には発現のために作動可能に連結されている。これら遺伝子が連結されている正確な配列はさほど重要ではない。さらに、各種ウイルスゲノムは、さらに各種遺伝子間に非コーディング核酸残基を含むことができる。

弱毒化されたハイブリッドウイルスに加えて、本発明のワクチンはまた、弱毒化ハイブリッドウイルスのための製薬学的に適当または許容し得る担体をも含む。典型的な担体は、ウイルスが増殖する組織培養液、リン酸緩衝食塩水などの希釈剤および／またはゼラチンなどの安定化剤を含む。

標的野生型ウイルスに対するヒトワクチンとしての使用に適した弱毒化ハイブリッドウイルスを産生する方法には、ｃｐ４５ゲノム中の対応する表面糖タンパク質遺伝子の代わりに表面糖タンパク質をコードする標的遺伝子配列をｃｐ４５ゲノム中に挿入するのに応用する遺伝子操作技術、または低減した活性を有する変異タンパク質による標的ウイルス中でのノイラミニダーゼタンパク質またはポリメラーゼタンパク質をコードする天然に存在する遺伝子の置換を含む。以下に詳細に記す方法は、例示的方法である。当業者は本方法においての改変および他の方法もまた、ハイブリッドウイルスの産生に適していることを認識するでろう。それらの目的のために有用な分子生物学における標準的な方法は多様な公知文献に見出すことができ、例えば、サンブルックら、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、第２版、１９８９を含む。これら方法は、とりわけＨＰＩＶ－１、ＨＰＩＶ－２、ＲＳＶ、インフルエンザおよび麻疹標的ウイルスに対するワクチンに使用するための弱毒化ハイブリッドウイルスを産生するために使用することができる。

ｃｐ４５を骨格として使用し、標的ウイルスからの表面抗原と組み合わせたｃｐ４５ハイブリッドウイルスを産生するため、ｃｐ４５のウイルスゲノムをまず完全長ｃＤＮＡクローンに変換する。典型的には、該ゲノムの幾つかの異なる部位をＰＣＲを用いて増幅し、逐次工程で完全長ｃＤＮＡクローン中にライゲーションする。標的表面糖タンパク質をコードする標的ウイルスゲノムの領域もまた、ｃＤＮＡクローンに変換する。ＨＰＩＶ－１、ＨＰＩＶ－２、ＲＳＶ、麻疹およびインフルエンザウイルスなどのマイナス鎖またはプラス鎖の一本鎖ＲＮＡゲノムを有する標的ウイルスのゲノム領域をｃｐ４５と同様の方法で変換する。ＤＮＡゲノムを有するウイルスからのＤＮＡは、ＤＮＡプラスミドベクターに直接ライゲーションできる。

ついで、ｃｐ４５ゲノムのｃＤＮＡクローンをプラスミドベクター中に組み入れる。pBlu

escriptII（ストラタジーン（Stratagene））またはその後の哺乳動物宿主細胞中でのトランスフェクションおよび発現に適している他の市販されて入手可能なベクターを使用できる。簡単に説明すると、ｃＤＮＡクローンおよびプラスミドベクターを制限酵素消化およびライゲーション反応を用いて組み合わせる。ついで、組換えプラスミドをクローニングし、精製する。

遺伝子操作を行って、ＦおよびＨＮタンパク質をコードするｃｐ４５ｃＤＮＡゲノムの領域を標的の１またはそれ以上の表面糖タンパク質をコードする標的ウイルスの遺伝子のｃＤＮＡまたはＤＮＡコピーで置換する。

ついで、マイナス鎖の一本鎖ＲＮＡハイブリッドウイルスは、逆遺伝子技術を用いて子孫ウイルスゲノム、ウイルスタンパク質およびウイルス粒子の合成のために哺乳動物細胞などの細胞にハイブリッドｃＤＮＡプラスミドベクターをトランスフェクションすることによって組換えウイルスゲノムから産生される（パレス（Palese）、１９９５；ローソン（Lawson）ら、１９９５；シュネル（Schnell）ら、１９９４）。簡単に説明すると、ｃＤＮＡコピーを含むプラスミドベクターを、バクテリオファージＴ７のＲＮＡポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスを以前に感染させた宿主細胞中にトランスフェクションする。ＨＰＩＶ－３のＮＰ、ＰおよびＬタンパク質を発現するプラスミドベクター（実施例４に記載される方法により産生）を宿主細胞に同時にトランスフェクションする。ｃＤＮＡは転写されて完全長のマイナス鎖（ゲノム）ＲＮＡを産生する。ＮＰ、ＬおよびＰタンパク質の発現は、子孫ハイブリッドウイルスの合成を容易にする。ついで、ハイブリッドビリオンを単離し、適当な哺乳動物細胞中で増殖させ、ついで温度感受性表現型および関連した弱毒化を確認すべく試験する。

ｃｐ４５の弱毒化損傷がｃｐ４５のＬおよびＨＮ遺伝子中の欠陥と相関するという観察に関連する本発明の他の実際的な応用は、ＨＰＩＶ－３ウイルスまたはｃｐ４５－ハイブリッドウイルスが弱毒化されているか否かを決定する方法である。本明細書において使用する「ｃｐ４５－ハイブリッド」ウイルスは、変異Ｌタンパク質および／または変異ＨＮタンパク質をコードする遺伝子を有するキメラウイルスをいい、そのような変異タンパク質は上記に記載した。そのような決定は、野生型ＨＰＩＶ－３のゲノムの対応領域に比較してＬタンパク質をコードするＨＰＩＶ－３ゲノムの領域中に少なくとも１つの変異の存在を確認することによって行われる。あるいは、ＨＮタンパク質をコードする領域における欠陥、とりわけ残基３８４の約５残基内での欠陥は低減したノイラミニダーゼ活性の指標となりうる。決定はまた、ｃｐ４５－ハイブリッドウイルスが弱毒化されているか否かに関しても同様に行うことができる。弱毒化の評価は様々な状況において必要である。例えば、確認は、研究所において、ワクチンの商業生産における品質制御のチェックとして、規制機関による確認として、および患者に投与する前の新規のワクチンロットに対する最終チェックとして有用である。弱毒化の確認はまた、患者への投与後にワクチンの安定性をチェックするのにも同様に有用である。患者からの単離物を子孫ウイルスが温度感受性弱毒化表現型を保持していることを確認するためにチェックする。

ヌクレオチドの変異の存在を確認するための種々の方法が、当該技術分野において知られている。例えば、Ｌタンパク質をコードする核酸領域をその全体としてシークエンシングし、Ｌの野生型遺伝子と比較されている。あるいは、試験するウイルス株がｃｐ４５またはｃｐ４５ハイブリッドウイルスである場合は、Ｌ遺伝子を残基９４２、９９２および１５５８での予想される変異の近辺で制限酵素で切断し、より小さな断片を野生型ＨＰＩＶ－３またはｃｐ４５のＬ遺伝子と比較するためにシークエンシングされている。より好ましい方法は、試験するウイルス株から核酸を一本鎖形態で単離し、該変異をプランキングするプローブにウイルス核酸をハイブリダイズし、ＰＣＲを用いてプローブ間の領域を増幅し、ついで野生型ＨＰＩＶ－３またはｃｐ４５との比較のためにＬ遺伝子の増幅領域をシークエンシングすることを含むであろう。単一ヌクレオチド伸長（single nucleotide extension）反応などの遺伝子配列における点変異を決定するための別法（クプスワミー（Kuppuswamy）ら、１９９１）もまた当該技術分野において知られている。

本発明の相補性アッセイ（実施例３および４に詳細に記載）もまた、Ｌ遺伝子における少

なくとも１つの変異の存在を確認するために使用することができる。本方法は遺伝子の配列の変異を確認するのみならず、同時にまた、Ｌ遺伝子におけるそのような変異の機能的な効果をも確認する。そのような試験の二重性は、サプレッサー変異の可能性のため、シークエンシングの情報のみに比べて有利である。簡単に説明すると、ウイルス株のサンプルを、新規のワクチンロットから、または精製した患者の単離物として得る。必要ならば、サンプルを細胞培養培地中で増殖させることによって増幅する。標準的な第一のプラークアッセイをコントロールとして非許容温度（約４０℃）でインキュベートし複製を測定することによって行う。ついで相補性アッセイを行うが、その際、宿主細胞を野生型ＨＰＩＶ－３のＬタンパク質を発現するプラスミドベクターでトランスフェクションし、ウイルスサンプルでも感染させる（実施例３および４参照）。野生型ＮＰおよび／またはＰタンパク質を発現するプラスミドベクターを宿主細胞中に同時にトランスフェクションしてもよい。第二のプラークアッセイを相補したウイルスサンプルに対して行い、その結果を第一のプラークアッセイの結果と比較する。サンプルウイルスのＬ遺伝子における変異は、プラークアッセイにおいて測定されるように、相補されないサンプルに比較して相補したウイルスサンプルの複製の有意の増加、好ましくは少なくとも１０倍の増加、最も好ましくは１００倍の増加によって示されるであろう。同様のやり方で、ノイラミニダーゼ増殖実験および活性アッセイを外在性ノイラミニダーゼの不在下および存在下で行ってＨＮ遺伝子における欠陥の存在を確認することができる。

以下の制限されない実施例は本発明の原理および利点を説明する。

実施例

以下の実施例において使用するに際して、ｃｐ４５は野生型ＨＰＩＶ－３（ＪＳ株）、もともと熱病性呼吸器疾患を有する子供から培養した単離物に由来するものであった。寒冷適応変異体は、ウイルスを２０℃で４５回の連続継代後に選択し、プラーク精製によって単離した（ベルシェおよびヒッソム、１９８２）。ｃｐ４５ウイルスを、引き続き持続的な細胞株において３２℃で増殖した。比較アッセイを使用した以下に記載する実験の各々において、アッセイ中に存在する初期ウイルスの量は赤血球凝集素アッセイ分析を用いて決定した。簡単に説明すると、ｃｐ４５ウイルスで感染させ３２℃で７２時間増殖させたＬ－１３２細胞を細胞スクレイパーを用いて細胞培養皿から除去した。ペレット化した細胞をＰＢＳで洗浄し、超音波処理し、ついで血球凝集反応の分析のために使用した。超音波処理したウイルス感染細胞ホモジネートの２倍系列希釈を９６ウエルＶ底マイクロタイタープレート中で１００μｌ ＰＢＳ（Ca^{+2}およびMg^{+2}なし）で行った。ついで、１００μｌ ＰＢＳ（Ca^{+2}およびMg^{+2}なし）中のモルモット赤血球の０．５％浮遊液を各ウエルに加え、ついでそのプレートを４℃で～２時間、正のコントロールおよび負のコントロールでそれぞれ透明なバトン（button）またはＨＡが観察されるまでインキュベートした。

実施例１：ｃｐ４５の温度依存性複製、タンパク質合成およびｍＲＮＡ合成

野生型ＨＰＩＶ－３株とは異なり、ｃｐ４５株は非許容の高い温度（約３７℃より高い）でその複製能を失う。この複製活性の喪失は、ｃｐ４５ワクチンにおいて観察される弱毒化に寄与する。さらに、野生型株に比較してウイルス特異的なｍＲＮＡ合成およびタンパク質合成における関連した減少がｃｐ４５株に存在する。

ｃｐ４５ウイルスを３２℃で１時間、細胞培養培地に吸着させ、３９．５℃で２４時間増殖させた。ついで感染した細胞をさらに２４時間、増殖のため３２℃にシフトした。培養上清におけるウイルス力価をＬ－１３２細胞におけるプラークアッセイによって決定した。感染した細胞の単層をウイルスプラークの可視化のためにヘマトキシリン－エオシンＹ染色するかまたは０．９％アガーおよび０．００５％ニュートラルレッドで重層した。少なくとも３つの独立した実験からの結果は一致したウイルスの回収（５倍未満の変異）を示した。

温度シフトアッセイにおける許容温度（３２℃）および非許容温度（３９．５℃）でのＬ－１３２細胞におけるｃｐ４５および野生型（ＪＳ）ウイルス複製の比較を表１に示す。両ウイルスの正常の増殖は、許容温度で観察された。しかしながら、ウイルスを３９．５

℃でＬ－１３２細胞に吸着させ、同温度で２４時間インキュベートした場合にｃｐ４５の乏しい複製（～10^6倍の減少）が観察された。しかしながら、２４時間後にインキュベーション温度を３９．５℃から３２℃に変えるとウイルスは若干の複製を示した。一方、野生型ウイルスは３９．５℃および３２℃で同様の複製を示した。ｃｐ４５ウイルスは３９．５℃から３２℃への温度シフトで複製し、それによって特徴的な温度感受性表現型を示し、３９．５℃から３２℃で復帰突然変異ウイルスの不在を示した。

ｃｐ４５株で生じるウイルス特異的なＲＮＡ合成は、同様に、野生型株におけるそのような合成より有意に低い。従って、非許容温度では低レベルのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）しか産生されない。非許容温度での全体のウイルス転写活性を決定するため、ｃｐ４５ウイルスのＰタンパク質遺伝子からのｍＲＮＡ合成を、野生型ウイルスと比較するために逆転写ＰＣＲによって調べた。

簡単に説明すると、Ｌ－１３２細胞を同様の感染多重度でｃｐ４５または野生型ウイルスに感染させた。３２℃でのウイルス吸着後、細胞を３９．５℃で２４時間増殖させた。感染した細胞をアクチノマイシンＤ（１０μｇ／ｍｌ）で１４時間処理し、酸性グアニジンチオシアネート－フェノール－クロロホルム抽出によってＲＮＡを調製した。Ｐ ｍＲＮＡの増幅を、同量の全ＲＮＡ（１０μｇ）およびウイルス特異的なセンス（ＣＣＡＡＣＡＡＣＡＡＣＴＣＣＣＡＧＡＴＣ、ヌクレオチド位置２７４０から２７５９）およびアンチセンス（ＴＧＣＣＴＣＣＡＴＡＡＧＴＧＧＧＴＣＡＡ、ヌクレオチド位置３２８０から３２９９）合成オリゴヌクレオチドプライマーから逆転写－ＰＣＲによって行った。増幅反応は、自動サーモサイクラー（パーキン－エルマー・シータス（Perkin-Elmer Cetus）を用い、９４℃で１分の変性、５０℃で１．５分のプライマーアニーリング、および７２℃で２分間のプライマー伸長のサイクルパラメーターで行った。内部標準として、アクチンｍＲＮＡの増幅を逆転写－ＰＣＲにより同様のＲＮＡ調製物、並びにβアクチン遺伝子特異的なセンス（ＧＣＡＴＧＧＡＧＴＣＣＴＧＴＧＧＣＡＴＣＣＡＣＧ、ヌクレオチド位置２５６３から２５８６）およびアンチセンス（ＣＴＡＧＡＡＧＣＡＴＴＴＧＣＧＧＴＧＧＡＣＧＡＴ、ヌクレオチド位置２９７７から３０００）プライマーを用いて同様に行った。ＨＰＩＶ－３のＰタンパク質遺伝子を含むプラスミドＤＮＡ（マーク・エス・ガリンスキ（Mark S. Galinski）（ザ・クリーブランド・クリニック・ファウンデーション（The Cleveland Clinic Foundation）、クリーブランド、オハイオ）の好意により提供された）もまた、ＰＣＲ増幅において正のコントロールとして使用した。Ｐタンパク質遺伝子プラスミドＤＮＡからのＰＣＲ増幅された～５５９bp断片を０．８％アガロースゲル中での電気泳動によって単離した。そのＤＮＡバンドを切り出し、ウルトラフリー（ultrafree）ＭＣカラム（ミリポア・コーポレーション（Millipore Corporation）、ベッドフォード、マサチューセッツ）を用いて溶出し、ついでプローブとしての使用のために市販のキット（ベーリンガー・マンハイム・バイオケミカルズ（Boehringer Mannheim Biochemicals）、インディアナポリス、インディアナ）を用いてランダムプライミングオリゴヌクレオチド標識法により［α－^{32}Ｐ］ｄＣＴＰで放射性標識した。アクチンプローブもサザン・ハイブリダイゼーションに使用するために同様に調製した。

ｍＲＮＡ合成は平行実験において２つのＲＮＡ調製物の間でメッセージのレベルを比較することによって試験した。ＰＣＲ増幅の種々のサイクルからの反応産物をアガロースゲル電気泳動、続いて、エチジウムブロマイド染色によって分析したところ、ｃｐ４５および野生型ウイルスから産生されたメッセージのレベルに有意の差異を示した。一方、内部コントロールとして調べたアクチン遺伝子では同様のメッセージレベルがｃｐ４５および野生型ウイルス感染細胞から単離したＲＮＡについて観察された。同様の観察が、電気泳動したＤＮＡのサザンハイブリダイゼーションの後に認められた。ウイルスｍＲＮＡからのＰＣＲ産物の典型的な増幅プロフィルを図２Ａに示す。これらのメッセージ間の差異を評価するため、単一のｃＤＮＡサンプルの４倍希釈を用いたスロットブロットハイブリダイゼーションにより半定量的なアプローチを行った。これら結果の代表例（図２Ｂに示している）はさらに、ＰＣＲ増幅の１５および２０サイクルでｃｐ４５および野生型ウイルス感染細胞からのＰ遺伝子のメッセージにおける差異を示している。ｃｐ４５ウイルスのＰ

タンパク質遺伝子からのメッセージは、リン造影（Phosphor Imaging）分析によって野性型ウイルスのメッセージの約１７％であると評価された。
一層高温の非許容温度でのタンパク質合成もまた、ｃｐ４５株では野生型株に比較して有意に低いものであった。ｃｐ４５ウイルスのポリペプチド合成の分析は、パルスチェイス実験、ついでＨＰＩＶ－３に対する高度免疫ウサギ抗血清またはＨＮおよびＮＰに対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降により行った。
簡単に説明すると、ウイルス感染細胞を３９．５℃または３２℃で２４時間増殖させ、^{35}Ｓ－タンパク質標識（アマーシャム・コーポレーション（Amersham Corporation）、アーリントン・ハイツ、イリノイ）で１時間パルスした。標識した細胞溶解物を０、１、２、３および４時間チェイスした後、ＨＰＩＶ－３に対する高度免疫ウサギ抗血清または抗－ＨＮおよび抗－ＮＰモノクローナル抗体のプールで免疫沈降させた。免疫沈降物を、ドデシル硫酸－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ついでオートラジオグラフィーにより分析した。
その結果は、野生型およびｃｐ４５ウイルスの間でのウイルスタンパク質合成の重大な差異を示している。パルス期間の間の野生型ウイルスのポリペプチド合成は、４時間のチェイス期間の間にさらに処理または修飾されることはなかった（図３）。一方、ｃｐ４５ウイルスのポリペプチド合成は極めて弱いかまたはほとんど検出不可能であった。しかしながら、細胞を３２℃で増殖した場合にはｃｐ４５および野生型ウイルスのポリペプチド合成は同様であることがわかった。

実施例２：ｃｐ４５の温度依存性ノイラミニダーゼ活性

ｃｐ４５ウイルスを３２℃または３９．５℃でＬ－１３２細胞上で増殖させ、ウイルス感染細胞のホモジネートをノイラミニダーゼ活性に関して分析した。ｃｐ４５株は非許容の高温で低減したノイラミニダーゼ活性を示した。活性におけるそのような低減は感染した細胞の表面からの子孫ウイルス粒子の放出を抑制する。
簡単に説明すると、１００μｌの０．２Ｍの酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ５．５）を赤血球凝集素活性単位数のわかっている等容量の感染細胞ホモジネートと混合した。ついで、同バッファーに溶解した０．１ｍｌのウシフェチュイン（１５ｍｇ／ｍｌ、ＩＶ型；シグマ・ケミカル・カンパニー（Sigma Chemical Company）、セントルイス、ミズーリ）を反応混合物に加え、ついでその混合物を３７℃で一夜インキュベートした。反応混合物中に放出されたノイラミン酸の量を決定した。野生型の親ウイルスもまた、比較のため本実験に含めた。
２つの異なる分子サイズの基質で試験したとき、非許容温度でインキュベートしたｃｐ４５ウイルスのノイラミニダーゼ特性は、野生型ウイルスを感染した細胞よりも約４から約１０の範囲の因数で低い活性を示した（表３）。

実施例３：ｃｐ４５の他の生物学的な特性の評価

ｃｐ４５および野生型親ウイルス株の抗原関連性を、まず、アフィニティー精製したＨＰＩＶ－３のＨＮ糖タンパク質に対するモノ特異的ウサギ抗血清を用いた赤血球凝集素（ＨＡ）抑制および中和アッセイによって比較した。ウサギ抗ＨＮは両ウイルス株で同様のＨＡ抑制活性および中和力価（２倍の変異内）を示した。
引き続き、ＨＮおよびＦ糖タンパク質の別個の抗原部位を認識する代表的な抗－ＨＮおよび抗－Ｆモノクローナル抗体を酵素結合抗体免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）で試験した。ダイナテク・ポリビニル・プレート（Dynatech polyvinyl plates）（イムロンＩ（Immulon Ｉ））を１ウエルあたり１μｇの凍結乾燥破砕ビリオンでコーティングした。モノクローナル抗体を２倍系列希釈で各ウイルス株（ｃｐ４５および野生型）について試験し、その結果を反応性パターンの線形スロープで比較した。
その結果を、３つの独立した実験からの平均光学密度として掲げたが（図４）、０．０５～０．０８内の変異を示した。これら抗体はｃｐ４５ウイルスのＨＮおよびＦ糖タンパク質を認識し、ＥＬＩＳＡにより野生型ウイルスのものと同様の力価を示した。このことは、ｃｐ４５ウイルスの抗原部位が２０℃での増殖への適応の結果として変わっていないことを示唆している。

さらに、ｃｐ４５ウイルスの糖タンパク質は非許容温度であってもプロセシングされ、細胞表面に輸送される。感染したＬ－１３２細胞をＨＮおよびＦに特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光により感染２４時間後に試験した。Ｌ－１３２細胞のコンフルエント単層をカバースリップ上で増殖させ、ウイルスに感染させ、３２℃または３９．５℃でインキュベートした。感染２４時間後、細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、モノクローナル抗体で試験した。両方のインキュベーション温度（３２℃または３９．５℃）で、ｃｐ４５感染細胞は細胞表面上で免疫蛍光を示した。

ＨＡおよび融合活性もまた調べた。３２℃で増殖させたｃｐ４５ウイルスを超遠心によってペレット化し、ＨＮ糖タンパク質の機能的な特性を試験するためのＨＡアッセイに用いた。ｃｐ４５ウイルスは３９．５℃で極めて低い増殖を示したので、本発明者らは、非許容温度でのインキュベーション後に感染細胞のホモジネートのＨＡ活性を試験した。結果は、許容または非許容温度で増殖したｃｐ４５ウイルスの検出可能なＨＡ活性を示した。ｃｐ４５ウイルスを感染させＬＬＣ－MK_2、ベロおよびＬ－１３２細胞もまた、３２℃で増殖させた場合に多核巨細胞の形成すなわち合胞体の形成（ウイルス融合活性の特徴である）を示した。しかしながら、３９．５℃でｃｐ４５ウイルス感染細胞をインキュベーションしたときに、おそらく非許容温度でのウイルスの複製の乏しさにより、融合活性は有意に減少した。

実施例４：ＨＰＩＶ－３のＮＰ、ＰおよびＬ野生型タンパク質の発現

ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）株の野生型ＮＰ、ＰおよびＬタンパク質を同時発現アッセイに使用するために発現させた。ＨＰＩＶ－３のＮＰ、ＰおよびＬ遺伝子の分子クローニングおよび配列分析は以前に記載されている（ガリンスキら、１９８８；ガリンスキら、１９８６；ガリンスキら、１９８６’）。簡単に説明すると、すべての遺伝子を制限エンドヌクレアーゼ消化によってその組換えベクターから取り出し、ｐｃＤＬ－ＳＲβ８．２ベクターＤＮＡの適当な部位にライゲーションした。このベクターは、ｐｃＤＬ－ＳＲα－２９６由来であり、ＳＲαプロモーターから下流のフランキングＴ７およびＳＰ６プロモーター配列とともに多価制限部位を含む。ｐｃＤＬ－ＳＲβ８．２は多機能性ベクターであり、遺伝子発現は、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーターを使用するか、または別法としてＴ７ＲＮＡポリメラーゼを発現するワクシニアウイルスを用いることによって駆動することができる。

ＮＰ、ＰおよびＬタンパク質をコードする核酸領域を含むプラスミドをＤＮＡベクター中に組み込んだ。プラスミドｐＳＰ１８－ＮＰ（ＮＰ遺伝子を含む）をまずＳｐｈＩで消化し、ついで得られた粘着末端をＴ７ＤＮＡポリメラーゼで修復した。ついでその遺伝子をベクターからＢａｍＨＩで放出し、ｐｃＤＬ－ＳＲβ８．２（ＥｃｏＲＩで消化し、引き続いてクレノウフラグメントで修復し、ついでさらにＢａｍＨＩで処理してあった）にライゲーションした。プラスミドｐＳＰ１９－Ｐ（Ｐ遺伝子を含む）をＢａｍＨＩで消化し、ついでＰ遺伝子を放出すべくＰｖｕＩＩで消化した。その遺伝子を引き続き、ｐｃＤＬ－ＳＲβ８．２（ＸｂａＩで消化し、引き続いてクレノウフラグメントで修復し、ついでさらにＢａｍＨＩで処理してあった）にライゲーションした。プラスミドｐＧＥＭ３－Ｌ（Ｌ遺伝子を含む）を、まずHindIIIで消化し、ついで得られた粘着末端をクレノウフラグメントで修復した。ついでＬ遺伝子をベクターからＳａｃＩで放出し、ｐｃＤＬ－ＳＲβ８．２（ＥｃｏＲＩで消化し、引き続いてクレノウフラグメントで修復し、ついでさらにＳａｃＩで処理してあった）にライゲーションした。

すべてのライゲーション反応は適合性の末端を有するベクターおよび遺伝子断片からなっており、インサートのライゲーションをＳＲαおよびＴ７プロモーターに比較して所望の方向に仕向けるものであった。組換えクローンをランダムに取り上げ、さらに制限エンドヌクレアーゼ消化により分析してサブクローニングの方向と有効性を確認した。その遺伝子末端をジデオキシ配列分析（米国バイオケミカル（Ｕ．Ｓ．Biochemical）、クリーブランド、オハイオ）によって確認して、開始コドンメチオニンと終結コドンが維持されることを確実にした。

様々なヌクレオカプシド関連タンパク質の生物学的特性を調べるため、本発明者らはまず

、バクテリオファージＴ７ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子を含む組換えワクシニアウイルス（ｖＴＦ７－３）を用いて一過性の発現系内でのＬ（Ｌ－１１）、Ｐ（Ｐ－１）およびＮＰ（ＮＰ－１）のタンパク質発現に関して試験した。ＨｅＬａ－Ｔ４細胞（ワクシニアウイルスの細胞変性効果に対して比較的耐性がある）をｖＴＦ７－３で感染させ、ついでリポフェクタミン（ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ（Bethesda Research Laboratories）、ゲイザーズバーグ、メリーランド）を用いて、ＨＰＩＶ－３のＬ、ＰまたはＮＰ遺伝子を含むプラスミドにトランスフェクションした。該ウイルスのＬ、ＰおよびＮＰタンパク質の発現を、ＨＰＩＶ－３に対する高度免疫ウサギ抗血清またはＮＰに対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降によって［^{35}Ｓ］メチオニン－［^{35}Ｓ］システイン標識しトランスフェクションした細胞溶解物中で２０時間後に検出した（図５Ａ）。免疫沈降はドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）およびオートラジオグラフィーにより分析した。大分子サイズのＬタンパク質の一層良好な解析を得るため、免疫沈降物はまた低パーセントのポリアクリルアミドゲルでも分離した（図５Ｂ）。対応するＤＮＡトランスフェクションした細胞から免疫沈降したＬ、ＰおよびＮＰポリペプチドは本体のウイルスタンパク質とサイズのうえで区別がつかなかった。Ｌタンパク質の量は、トランスフェクションした細胞溶解物から抗血清によって免疫沈降したＰまたはＮＰタンパク質よりも低いように思われた。

実施例５：野生型タンパク質でのｃｐ４５の相補

本実施例では、一過性にＬ、ＰまたはＮＰタンパク質を発現するＣＶ－１細胞が非許容温度にてｃｐ４５を救済する（すなわち、プラークアッセイによって測定されたように、ウイルスの複製を増加させる）ことができるか否かを考察する。簡単に説明すると、ＣＶ－１細胞をプラスミドベクターｐＲＳＶ－Ｔ（ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列によって駆動されるＳＶ４０ラージＴ抗原をコードする）で同時にトランスフェクションし、ＮＰ、Ｐ、またはＬ遺伝子を含む１またはそれ以上の組換えプラスミドで同時トランスフェクションし、ついで３７℃でインキュベートした。トランスフェクションの２０時間後、発現細胞をＣＰ４５または野生型ウイルスで１の感染多重度で感染させ、ついで感染細胞をさらに３９.５℃で２８時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞培養培地を回収し、ついでＨＰＩＶ－３力価を許容温度（３２℃）および非許容温度（３９.５℃）でＬ－１３２細胞にてプラークアッセイによって決定した。ウイルスプラークの可視化のため、感染細胞の単層をヘマトキシリンおよびエオシン－Ｙで染色するか、または０.９％アガーおよび０.００５％のニュートラルレッドで重層した。

ワクシニアウイルス系は優れた発現レベルを提供するものではあったが、細胞の単層において広範な細胞変性作用を引き起こすウイルスベクターの使用に関する懸念およびワクシニアウイルスの同時感染実験におけるＨＰＩＶ－３複製を測定することに固有の困難性のため、本発明者らは、プラスミドベクターの転写を駆動するためにワクシニアウイルスの使用を必要としない発現系を使用した。

ベクターｐｃＤＬ－ＳＲβ８.２はＳＲαと名付けられたプロモーターを含み、ＳＶ４０初期プロモーターおよびヒトＴ－細胞白血病ウイルス１型の長い末端反復配列のＲセグメントおよびＵ５配列の一部（Ｒ－Ｕ５’）からなる。このベクターはまた、ＳＶ４０複製起点をも含み、ＣＯＳ－１またはＣＯＳ－７細胞におけるタンパク質発現の有意なレベルを提供し、その際、プラスミドは内在的なレベルのＴ抗原によって増幅される。本発現系の有用性は、他のプラスミドベクターｐＲＳＶ－Ｔ（３５）（ジェームズ・パイパス（James Pipas）、ピッツバーグ大学、のご厚意により提供された）からのラージＴ抗原のトランスでの同時発現によってＣＶ－１細胞に拡張された。

トランスフェクションされたＣＶ－１細胞を最初に免疫蛍光によってウイルスタンパク質の細胞内発現に関して試験した。簡単に説明すると、細胞をアセトン－メタノール（１：１）中で－２０℃で１０分間固定した。ＨＰＩＶ－３に対する高度免疫ウサギ抗血清（モック（mock）トランスフェクション細胞で前もって完全に吸着させた）を一次抗体として使用し、フルオレセインイソチオシアネート標識したマウス抗ウサギ免疫グロブリンＧを二次抗体として使用した。細胞をエピフルオレセンス（epifluorescence）を備えたニコ

ン（Nikon）顕微鏡上で倍率６００倍で調べ、コンピューター・イメージング・システム（オンカー・イメージ・システムズ・インク（Oncor Image Systems, Inc.）を用いてデジタル写真をとらえた。
図６に示すように、ＬおよびＰは小さな含有物を形成するようであるが、一方、ＮＰは一層均一な斑点状の染色パターンを与えるようである。負のコントロール細胞は検出可能な免疫蛍光は全く示さなかった。
典型的な相補性実験の結果を表２に示す；同様の結果が３回行われたアッセイにおいて得られた。３９.５℃でのウイルス収量は、非許容温度での有意のレベルのｃｐ４５複製を示した。これらの結果は、野生型Ｌタンパク質は生物学的に機能的であり、ｃｐ４５ Ｌタンパク質の温度感受性変異を補うことが可能であるが、一方、Ｌの不在下ではＰおよびＮＰの発現は非機能的であったことを示している。ウイルス力価は、約９５０の相補性効率および3×10^{0}細胞当たり１１，５００ＰＦＵのウイルスを示す。Ｌ、ＰおよびＮＰでトランスフェクションした細胞は、Ｌ単独またはＬおよびＰでトランスフェクションした細胞と比較してｃｐ４５ウイルス収量の１０倍の増加を示す。これは、有効なウイルス複製のため、ヌクレオカプシド複合体の形成のためのこれらのタンパク質の相互作用のためであるかもしれない。しかしながら、ウイルスの複製の間のそれらの特異的な相互作用は未だ決定されていない。本実施例の結果はさらに、ＨＰＩＶ－３の転写およびライフサイクルに不可欠であるＲＮＡ－依存ＲＮＡポリメラーゼ活性としてのＬタンパク質の役割をさらに支持するものである。Ｌ遺伝子でトランスフェクションしていない他の細胞株は検出可能なウイルス力価を産生することができなかった。
実施例６：ＨＰＩＶ－１のＬタンパク質のｃｐ４５を相補する能力およびｃｐ４５子孫における温度感受性表現型の保持
非許容温度にてＬ－遺伝子トランスフェクションしたＣＶ－１細胞から産生されたｃｐ４５ウイルスは、Ｌ－発現細胞において複製する能力にもかかわらず、細胞増殖に対する温度感受性を保持しているに違いない。救済された子孫ウイルスの少なくとも１０のプラーク精製したウイルスストックを調べたところ、全てのウイルスストックが温度感受性特性を維持していることがわかった。
さらに、ｃｐ４５のＬ－タンパク質相補は異型排他的（heterotypic exclusive）である。Ｌ－１３２または第１代アカゲザル腎臓細胞は、ＨＰＩＶ－１及びｃｐ４５で同時感染させた場合、非許容温度でのｃｐ４５の増殖を救出しなかった。
実施例７：外在性ノイラミニダーゼを用いたまたは用いないｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）のためのプラークアッセイ
ｃｐ４５および野生型（ＪＳ）ウイルスの増殖特徴を外在性ノイラミニダーゼを用いずにまたは用いて決定した。ｃｐ４５および別の実験においてＪＳウイルスをＬ－１３２細胞に３２℃で１時間吸着させ、クロストリジウム・パーフリンゲンス（C. perfringens）から単離した細菌性ノイラミニダーゼを添加したまたは添加していない培地中で、所定の時間枠の間、増殖させた。培養上清中のウイルス力価を以前に記載されたようにＬ－１３２細胞でのプラークアッセイにより決定した（ベルシュおよびヒッソム、１９８２）。ウイルスプラークの可視化のため、感染細胞単層をヘマトキシリンおよびエオシン－Ｙで染色するか、または０.９％アガーおよび０.００５％のニュートラルレッドで重層した。各アッセイを３回繰り返した。
その結果をｃｐ４５に関しては図７ＡおよびＪＳ株に関しては図７Ｂに示すが、エラーバーは３回の独立したアッセイの標準偏差を示す。図７Ａは、外在性ノイラミニダーゼなしの培地中で約５０時間インキュベーションした後のｃｐ４５ウイルス力価が、外在性ノイラミニダーゼを含む培地中でインキュベーションした後の対応する力価より約５～１５倍低かったことを示す。図７Ｂは、対照的に、野生型ＪＳウイルス力価が培地中に外在性ノイラミニダーゼが存在するか否かにかかわらず、約２５時間後に実質的に同一であったことを示す。
実施例８：ｃｐ４５の限局された融合活性および外在性ノイラミニダーゼによるその抑制
Ｌ－１３２細胞をｃｐ４５で低い感染多重度にて感染させ、ウイルスの細胞変性作用を評

価するためにノイラミニダーゼを用いてまたは用いずに増殖させた。比較のためＨＰＩＶ－３（ＪＳ）株を用いた同様の実験を行った。細胞を０.１の感染多重度（moi）で感染させた。低いウイルス感染感染多重度を使用したのは、少数の細胞のみを初期に感染させ、それによって外在性ノイラミニダーゼが不在である培養液中で３２℃で３６時間インキュベーションする間、細胞単層での細胞変性作用をモニターすることができるようにするためであった。別の実験において、感染細胞を１ml当たり５０μg（０.５Ｕ）の細菌性ノイラミニダーゼを含む培地中でインキュベーションした。

その結果を図８Ａから図８Ｄに示す。図８Ａおよび図８Ｂはそれぞれ外在性ノイラミニダーゼが不在である培養液中で増殖させた後のｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）で感染させた細胞の写真である。ｃｐ４５感染細胞は、多核性巨大細胞またはシンシチア形成の存在によって示されるように、有意な限局した融合を示した（図８Ａ）。そのような限局した融合は、ＪＳ株感染細胞においては観察されなかった（図８Ｂ）。図８Ｃおよび図８Ｄはそれぞれ外在性ノイラミニダーゼの存在下の培養液中で増殖させた後のｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）で感染させた細胞の写真である。ｃｐ４５感染細胞の限局した細胞融合の程度は有意に低減し（図８Ｃ）、ＪＳ株感染細胞において観察されたものに類似の細胞変性効果を示した（図８Ｄ）。

実施例９：ｃｐ４５感染細胞におけるノイラミニダーゼの限定された分布を示す免疫蛍光染色

３３℃でｃｐ４５で感染させたＬ－１３２細胞における変異ＨＮタンパク質の分布を表面免疫蛍光技術を用いて調べた。簡単に説明すると、カバースリップ上で増殖させたＬ－１３２細胞を０.０１の感染多重度でｃｐ４５またはＪＳウイルスで感染させた。ウイルスの吸着後、細胞を培地中で外在性ノイラミニダーゼとともにまたはなしで３３℃で３６時間インキュベーションした。感染細胞を洗浄し、ついで表面免疫蛍光のためにＨＰＩＶ－３のＨＮ糖タンパク質に対するモノクローナル抗体（１３－９－６－２）と反応させた。

その結果を図９Ａから図９Ｄに示す。図９Ａおよび図９Ｂは、それぞれ外在性ノイラミニダーゼが不在である培養液中で増殖させた後のｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）で感染させた細胞の写真である。変異ＨＮタンパク質の分布は、野生型ＪＳのＨＮタンパク質の分布（図９Ｂ）に比較して、実質的に限局されていた（図９Ａ）。図９Ｃおよび図９Ｄはそれぞれ、外在性ノイラミニダーゼの存在下で増殖させた後のｃｐ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）で感染させた細胞の写真である。これらの条件下でｐ４５で感染した細胞の変異ＨＮタンパク質の分布（図９Ｃ）は、ＪＳ－株感染細胞における野生型ＨＮタンパク質の分布（図９Ｄ）と類似であった。

実施例１０：ノイラミニダーゼ活性アッセイ：最適pHおよび動力学的試験

ｃｐ４５ウイルスで感染させ３２℃で７２時間増殖させたＬ－１３２細胞を細胞スクレイパーを用いて細胞培養皿から除去した。ペレット化した細胞をＰＢＳで洗浄し、超音波処理し、ついでノイラミニダーゼ活性の分析に使用した。ノイラミニダーゼ活性を既知のｐＨの０.５Ｍリン酸バッファー５０μlと、等容量の既知の赤血球凝集単位の感染細胞ホモジネートとを混合することによって決定した。水に溶かした異なるサイズの基質、フェチュイン（ＩＶ型）（１５mg/ml）、３’－Ｎ－アセチルノイラミン－ラクトース（１mg/ml）または６’－Ｎ－アセチル－ノイラミン－ラクトース（１mg/ml）（シグマ・ケミカル・カンパニー（Sigma Chemical Company）、セントルイス、ミズーリ）を反応混合物に加え、３７℃で一夜インキュベーションした。別個の実験の間、インキュベーションの間にｐＨを様々な値で調節した。反応混合液中に放出されたノイラミン酸を分光測光法を用いて決定した。ＨＰＩＶ－３（ＪＳ）感染細胞をｃｐ４５感染細胞と同様のやり方で処理し、同様の活性分析を比較のために行った。

１つのセットの実験において、ｃｐ４５のノイラミニダーゼ活性の最適pHを分析し、親ＪＳ株のものと比較した。図１０Ａは、非許容温度（３９.５℃）でフェチュインまたはノイラミンラクトースアッセイを用いて試験した場合のｐＨによるｃｐ４５ウイルスのノイラミニダーゼ活性の変異を示している。ｃｐ４５に関しては、ノイラミンラクトースアッセイを使用した場合には最適なｐＨは約５.５であったが（図１０Ａ－黒丸の円）、フ

ェチュインアッセイを使用した場合には（図１０Ａ－白丸の円）低かった（約４．９）。図１０Ｂは、同様の実験におけるＨＰＩＶ－３（ＪＳ）ウイルスのノイラミニダーゼ活性のｐＨによる変異を示す。ＪＳ株に関して、ノイラミニダーゼアッセイを使用した場合には、ｃｐ４５と同様に最適なｐＨは約５．５であった（図１０Ｂ－黒丸の円）。しかしながら、フェチュインアッセイを使用してＪＳ株の最適ｐＨを決定した場合には（図１０Ｂ－白丸の円）、最適なｐＨはより高かった（約６．３）。図１０Ａまたは図１０Ｂのいずれかを参照すると、異なるアッセイ基質によって決定されたノイラミニダーゼ活性の絶対値の比較は、これら基質の各々について報告された絶対活性がそれぞれのアッセイにおいて存在するウイルスの初期量によって影響されたようであるので、特に有益であるわけではない。図１０Ａおよび図１０Ｂ上のバーは３つの別々の実験試行からの標準偏差を示す。

別のセットの実験において、酵素動力学的試験を、低分子量ノイラミンラクトース基質の２つの異なる結合：２→３および２→６結合とのインキュベーションの初期の段階で行った。ｐＨは５．５（ｃｐ４５および野生型ＪＳ株の両者のノイラミンラクトース基質に関しての酵素的な最適ｐＨ）に維持した。図１１Ａはｃｐ４５およびＪＳ株がともに２→３結合への同様の嗜好性を有していることを示している。図１１Ｂはｃｐ４５がＪＳ株に比較して２→６結合への嗜好を有することを示している。図１１Ａと図１１Ｂの比較は、ｃｐ４５が２→６結合よりも２→３結合への嗜好を一層有することを示している。

実施例１１：ｃ４５およびＨＰＩＶ－３（ＪＳ）抗原部位の比較のためのノイラミニダーゼ抑制アッセイ

ｃｐ４５およびそのウイルスの親ＪＳ株のノイラミニダーゼ活性部位の抗原関連性をノイラミニダーゼ抑制抗体を用いて比較した。アフィニティー精製したＨＰＩＶ－３のＨＮ糖タンパク質に対するモノ特異的なウサギ抗血清およびＨＮ糖タンパク質に対するモノクローナル抗体、２－１４－１、１３－９－６－２および１７０／８をノイラミニダーゼ抑制アッセイに使用した。これらの抗体は、プロトタイプＨＰＩＶ－３（４７８８５）株のノイラミニダーゼ活性部位を認識することが知られている。これら抗体を各ウイルス株について２倍系列希釈で試験し、その結果を反応パターンの線形勾配で比較した。ウイルスのＨＡのみを抑制するMab３－８－１を負のコントロールとして使用したが、ノイラミニダーゼ活性の抑制的役割を示さなかった（データ示さず）。図１２Ａは、アッセイの基質としてフェチュインを使用した場合、ｃｐ４５とＨＰＩＶ－３（ＪＳ）の間の抗原部位における有意な差異が、ｃｐ４５とＪＳの間で抑制抗体または抗血清のいずれに関しても観察されなかったことを示す。図１２Ｂは、アッセイ基質として相対的に小さなノイラミンラクトース基質を使用した場合にｃｐ４５株のノイラミニダーゼ活性がＪＳ基質の活性よりもモノクローナル抗体１２－９－６－２および１７０／８によって抑制されにくいことを示している。しかしながら、２つの株の抑制の程度は、モノクローナル抗体２－１４－１およびモノ特異的なウサギ抗血清については同様であった。

本発明の詳細な記載および上記実施例に照らし合わせて、本発明のいくつかの目的が達成されることが認められ得る。本明細書に記載した説明および例示は他の当業者に、その原理および実際的な応用を知らしめることを意図している。当業者は、本発明を実際の使用の必要性に最も適するように、多数の形態に本発明を適応および応用することができる。したがって、提示された本発明の具体的な態様は、網羅することも本発明を制限することも意図したものではない。

参考文献

Anderson, et al. 1992. Intracellular processing of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: Amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. J. Gen. Virol. 73(Pt. 5):1177-88.

Belshe and Hissom 1982. Cold adaptation of parainfluenza virus type induction of three phenotypic markers. J. Med. Virol. 10:235-242.

Belshe, et al. 1992. Evaluation of a live attenuated, cold-adapted parainfluenza virus type 3 vaccine in children. J. Clin. Microbiol. 30:2064-2070

Baybutt and Pringle 1987. Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 68 (Pt 11):2789-96.

Clements, et al. 1991. Evaluation of bovine, cold-adapted human, and wild-type human parainfluenza type 3 viruses in adult volunteers and in chimpanzees. J. Clin. Microbiol. 29:1175-1182.

Collins, et al. 1993. Rescue of a 7502-nucleotide (49.3% of full-length) synthetic analog of respiratory syncytial virus genomic RNA. Virol. 195(1):252-6.

Crookshanks-Newman and Belshe. 1986. Protection of weanling hamsters from experimental infection with wild-type parainfluenza virus type 3 (para 3) by cold-adapted mutants of para 3.J. Med. Virol. 18:131-137.

Galinski et al. 1986. Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus RNA encoding the nucleocapsid protein. Virol. 149:139-151.

Galinski et al. 1986'. Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus mRNA encoding the P and C proteins. Virol. 154:46-60.

Galinski et al. 1988. Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus gene encoding the L protein. Virol. 165:499-510.

Hall et al. 1993. A cold-adapted mutant of parainfluenza virus type 3 is attenuated and protective in chimpanzees. J. Infect. Dis. 167:958-962.

Hu, et al. 1990. Molecular cloning and sequence analysis of the fusion glycoprotein gene of human parainfluenza virus type 2. Virol. 179(2):915-20.

Johnson and Collins 1988. The A and B subgroups of human respiratory syncytial virus: Comparison of intergenic and gene-overlap sequences. J. Gen. Virol. 69(Pt 11):2901-6.

Johnson and Collins 1988'. The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: Sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. J. Gen. Virol. 69(Pt 10):2623-8.

Kawano, et al. 1990. Sequence determination of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of human parainfluenza type 2 virus and the construction of a phylogenetic tree for HN proteins of all the paramyxoviruses that are infectious to humans. Virol. 174(1):303-13.

Kawano, et al. 1990'. Sequence of the fusion protein gene of human parainfluenza type 2 virus and its 3'

intergenic region: Lack of small hydrophobic (SH) gene. Virol. 178(1):289-92.

Kuppuswamy, et al. 1991. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: Experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:1143-1147

Lawson et al. 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4477-4481.

Lerch, et al. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrates that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. J. Virol. 64(11):5559-69.

Lopez, et al. 1988. Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus long strain: Evidence of subtype genetic heterogeneity. Virus Research. 10(2-3):249-61.

Martin-Gallardo, et al. 1991. Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in Escherichia coli: Mapping of a fusion inhibiting epitope. Virol. 184(1):428-32.

Martin-Gallardo, et al. 1993. Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in Salmonella typhimurium. J. Gen. Virol. 74(Pt.3):453-8.

Matsuoka, et al. 1990. Sequence of the hemagglutinin-neuraminidase gene of human parainfluenza virus type 1. Virus Research. 16(1):107-13.

Merson, et al. 1988. Molecular cloning and sequence determination of the fusion protein gene of human parainfluenza virus type 1. Virol. 167(1):97-105

Palese, P. 1995. Genetic engineering of infectious negative-strand RNA viruses. [Review]. Trends in Microbiology. 3(4):123-5.

Precious, et al. 1990. Sequence analysis of the HN gene of parainfluenza virus type 2. J. Gen. Virol. 71(Pt 5):1163-8.

Schnell et al. 1994. Infectious rabies viruses from clone cDNA. EMBO J. 13:4195-4203.

Spriggs and Collins 1986. Human parainfluenza virus type 3: messenger RNAs, polypeptide coding assignments, intergenic sequences, and genetic map. J. Virol. 59:646-654.

Spriggs and Collins 1986.' Sequence analysis of the P and C protein genes of human parainfluenza virus type 3: Patterns of amino acid sequence homology among paramyxovirus proteins. J. Gen. Virol. 67:2705-2719.

Stokes, et al. 1993. The complete nucleotide sequence of two-cold adapted, temperature-sensitive attenuated mutant vaccine viruses (cp12 and cp45) derived from the JS strain of human parainfluenza virus type 3 (PIV3). Virus Res. 30:43-52.

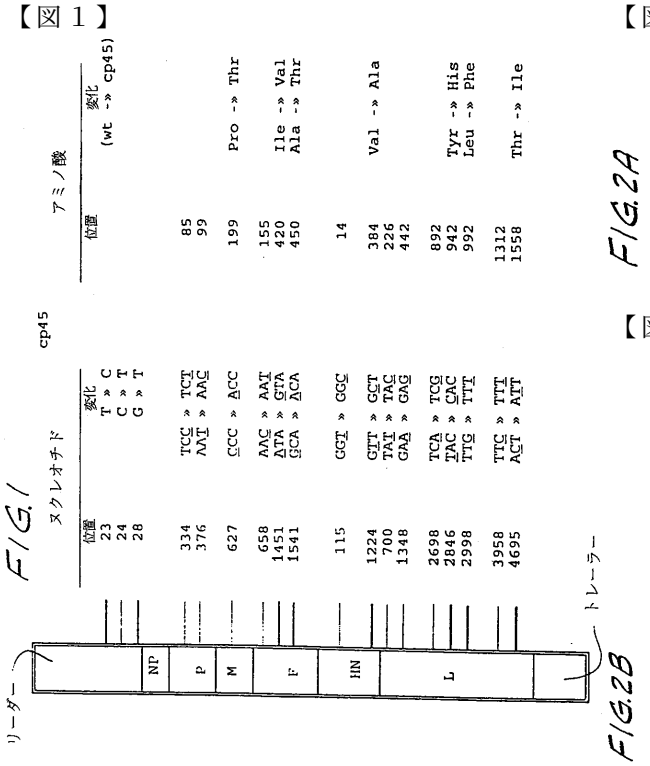
Storey, et al. 1984. Structural characterization of viron proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3. J. Virol. 52:761-766.

Sullender, et al. 1990. The respiratory syncytial virus subgroup B attachment glycoprotein: Analysis of sequence, expression from a recombinant vector, and evaluation as an immunogen against homologous and heterologous subgroup virus challenge. Virol. 178(1):195-203.

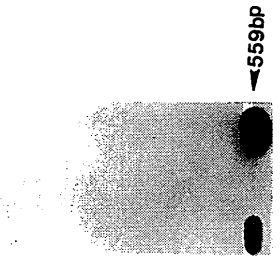
Sullender, et al. 1991. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. J. Virol. 65(10):5425-34.

Walravens, et al. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. J. Gen. Virol. 71 (Pt 12):3009-14.

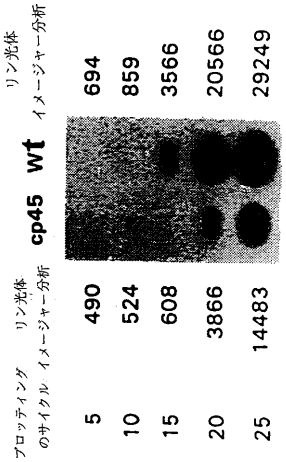
【図１】



【図２Ａ】

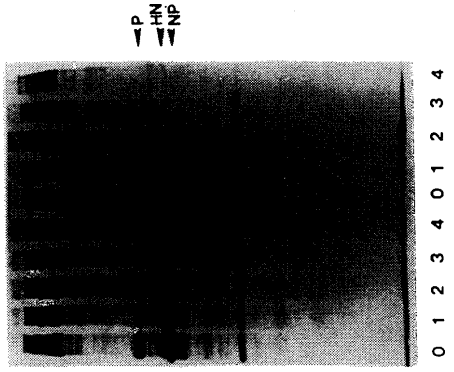


【図２Ｂ】



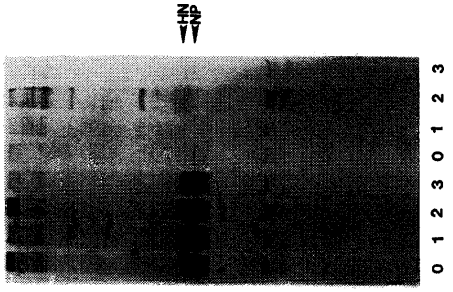
【図３Ａ】

FIG.3A



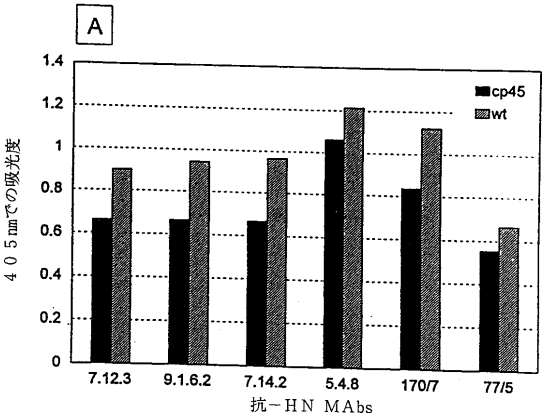
【図３Ｂ】

FIG.3B



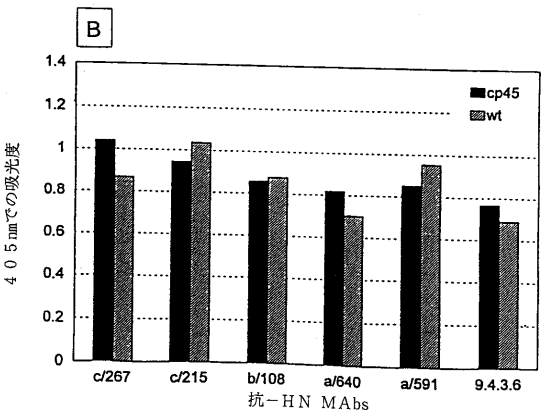
【図４Ａ】

FIG.4A



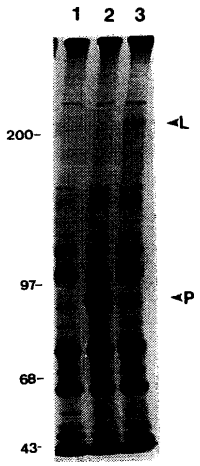
【図４Ｂ】

FIG.4B

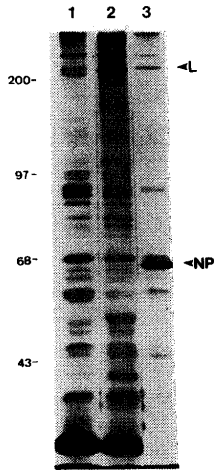


【図５Ａ】

FIG.5A



【図５Ｂ】
FIG.5B



【図６Ａ】
FIG.6A



【図６Ｂ】
FIG.6B



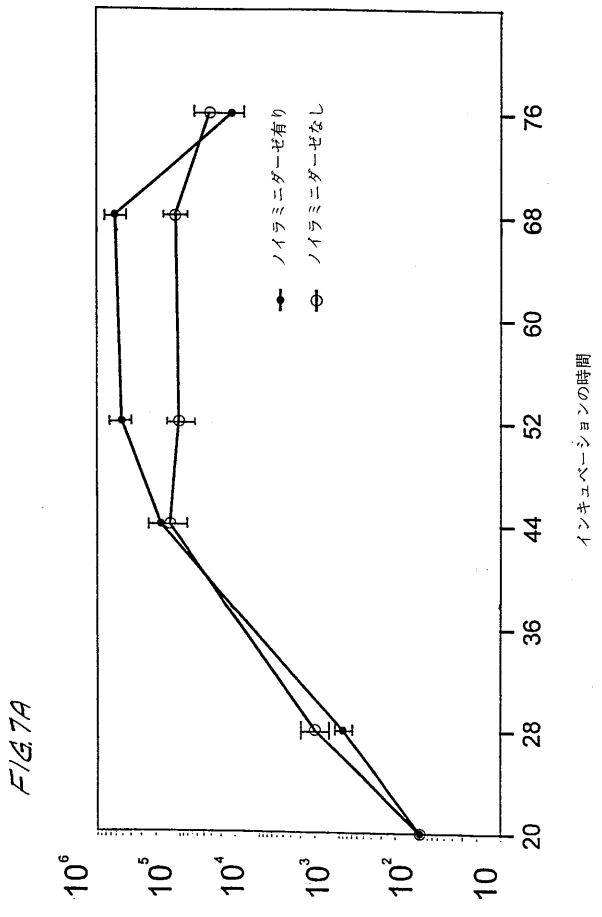
【図６Ｃ】
FIG.6C



【図６Ｄ】
FIG.6D



【図７Ａ】



【図７Ｂ】

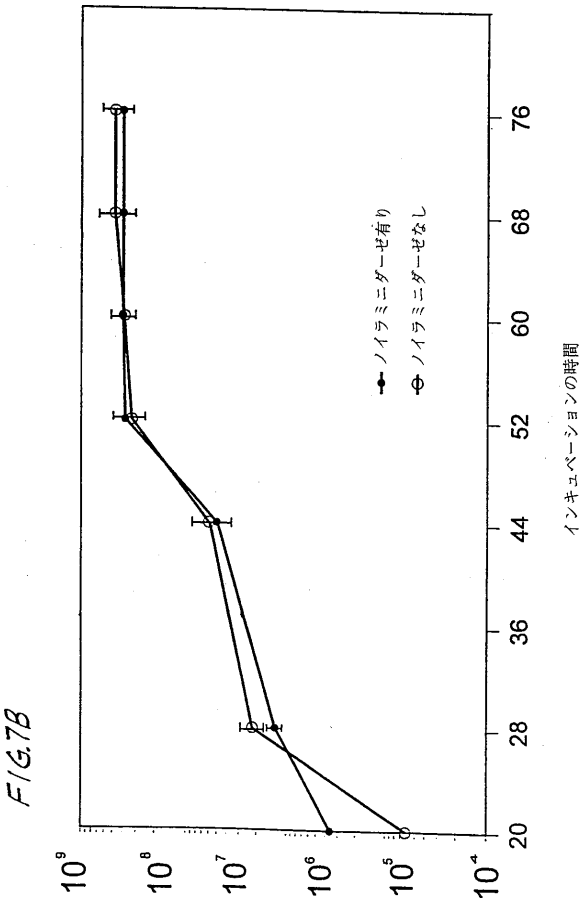
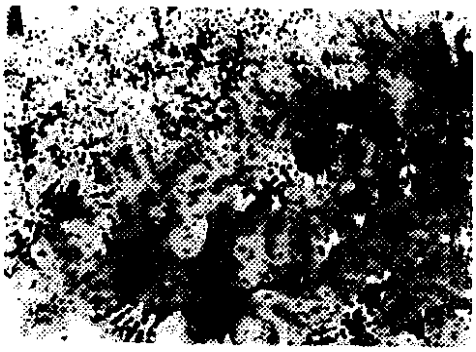


FIG.7B

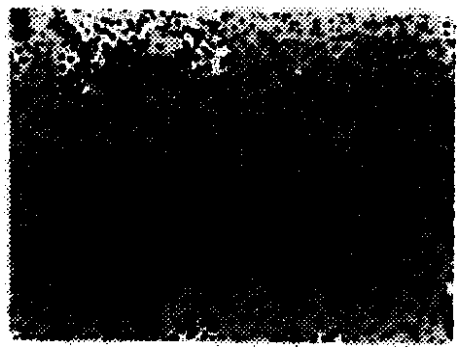
【図８Ａ】

FIG.8A



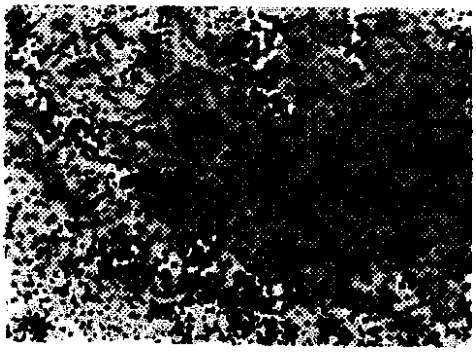
【図８Ｂ】

FIG.8B

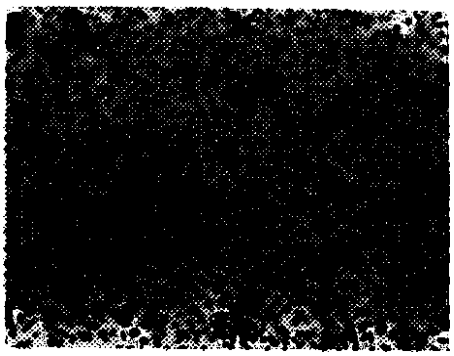


【図８Ｃ】

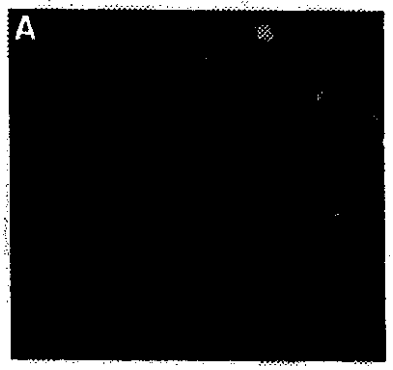
FIG.8C



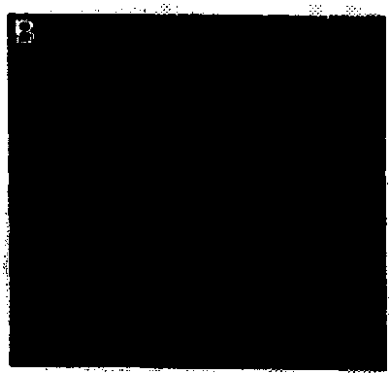
【図８Ｄ】
FIG.8D



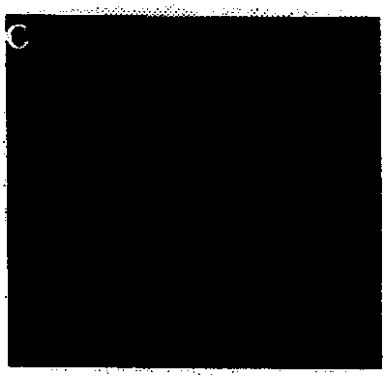
【図９Ａ】
FIG.9A



【図９Ｂ】
FIG.9B



【図９Ｃ】
FIG.9C



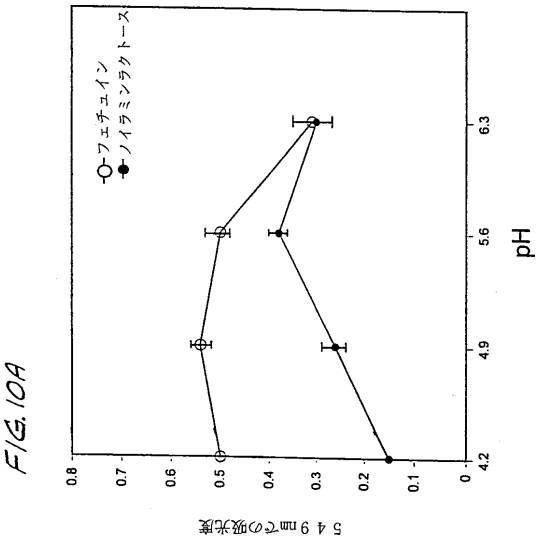
【図９Ｄ】

FIG. 9D



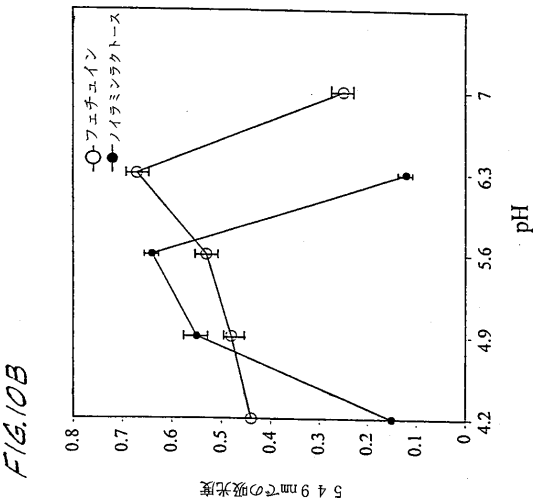
【図１０Ａ】

FIG. 10A



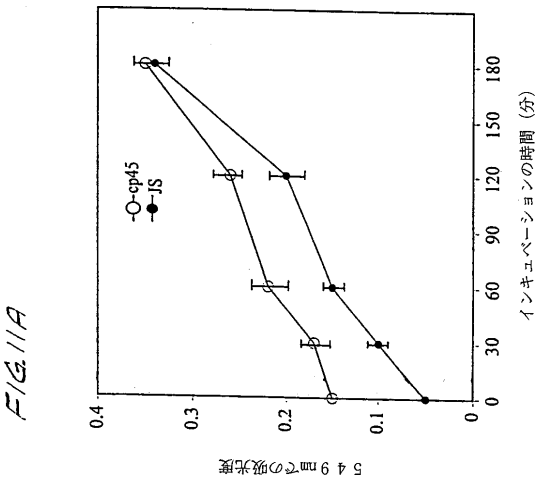
【図１０Ｂ】

FIG. 10B



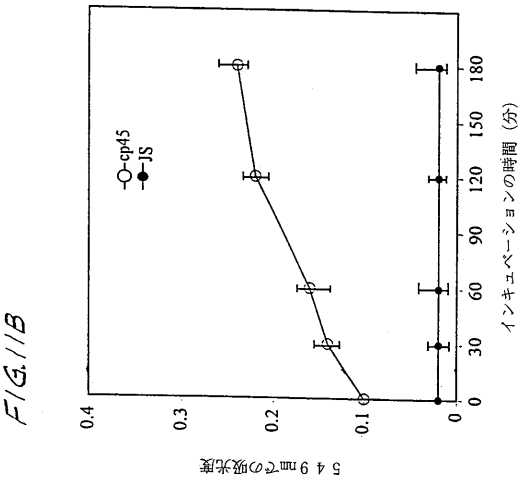
【図１１Ａ】

FIG. 11A



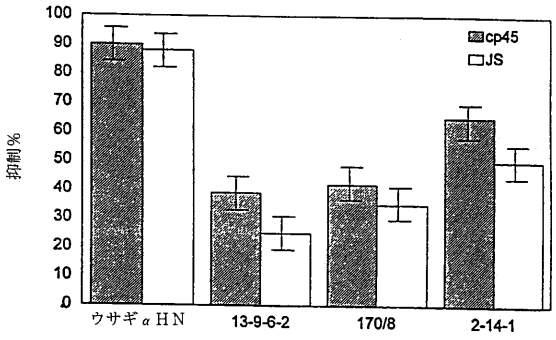
【図１１Ｂ】

FIG.11B



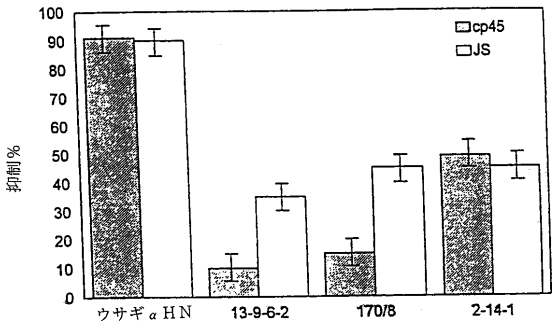
【図１２Ａ】

FIG.12A



【図１２Ｂ】

FIG.12B



フロントページの続き

(72)発明者 ベルシュ，ロバート・ビー
アメリカ合衆国６３１１９ミズーリ州セント・ルイス、オークウッド・アベニュー３３８番
(72)発明者 レイ，ランジット
アメリカ合衆国６３１１９ミズーリ州セント・ルイス、ホリー・ドライブ１６１２番

合議体
審判長 種村 慈樹
審判官 鵜飼 健
審判官 小暮 道明

(56)参考文献 1．Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，Ｍａｒ １９９５，６９（３）、１９５９－１９６３
2．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３０（８）ｐ．２０６４－２０７０（１９９２）
3．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１７２ ｐ．１４４５－１４５０（１９９５）
4．Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．３０ ｐ．４３－５２（１９９３）
5．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７０（１）ｐ．５８０－５８４（１９９６）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N15/00-15/90,C12N7/00-7/08
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS