

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-149393

(P2006-149393A)

(43) 公開日 平成18年6月15日(2006.6.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>CO7K 14/08 (2006.01)</b>	CO7K 14/08 ZNA	4B064
<b>C12P 21/02 (2006.01)</b>	C12P 21/02 Z	4B065
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 B	4C085
<b>GO1N 33/576 (2006.01)</b>	GO1N 33/576 Z	4H045
審査請求 有 請求項の数 16 O L (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-377429 (P2005-377429)	(71) 出願人	502006782
(22) 出願日	平成17年12月28日 (2005.12.28)		アメリカ合衆国
(62) 分割の表示	特願2004-113548 (P2004-113548) の分割		アメリカ合衆国メリーランド州20852 、ロックビル、イグゼキュティブ・プール バード 6011、ナショナル・インステ イチュート・オブ・ヘルス、スウィート 325、オフィス・オブ・テクノロジー・ トランスファー
原出願日	平成5年9月17日 (1993.9.17)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	07/947, 263		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成4年9月18日 (1992.9.18)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 E型肝炎パキスタン株の組換えタンパク質ならびに診断法およびワクチンにおけるそれらの利用

## (57) 【要約】

【課題】腸伝染性非A型、非B型の肝炎（E型肝炎）の流行病に関与するパキスタン（SAR-55）由来のE型肝炎のウイルスが開示される。本発明は、SAR-55の構造領域全体（オープンリーディングフレーム-2；ORF-2）の真核細胞発現系での発現に関する。

【解決手段】発現されたタンパク質はHEVウイルス様粒子を形成することができ、この粒子は、診断免疫分析における抗原およびE型肝炎による感染に対して防御する免疫原またはワクチンとして機能できる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗 H E V 抗体と免疫応答性であり、S D S - P A G E 上で 4 6 . 3 と 7 4 . 7 キロダルトンとの間の分子量を有する E 型肝炎ウイルスのオープンリーディングフレーム 2 タンパク質であって、E 型肝炎ウイルスの完全なオープンリーディングフレーム 2 コード配列を含む組換えバキュロウイルスベクターを含有する昆虫細胞の発現産物から入手可能なタンパク質であって、ここで、当該タンパク質は全長ではない、前記タンパク質。

## 【請求項 2】

S E Q I D N O : 4 の c D N A 配列に含有される完全なオープンリーディングフレーム 2 コード配列によってコードされる、請求項 1 のタンパク質。

10

## 【請求項 3】

組換え H E V O R F 2 タンパク質の製造方法であって、

( a ) E 型肝炎ウイルスの完全なオープンリーディングフレーム 2 コード配列を含む組換えバキュロウイルスベクターを含有する昆虫細胞を、該ベクターからのタンパク質の発現のために適切な条件下で培養し；そして

( b ) 前記タンパク質を回収することを含み、前記製造方法。

## 【請求項 4】

E 型肝炎ウイルスの完全なオープンリーディングフレーム 2 コード配列を含む、組換えバキュロウイルス発現ベクター。

20

## 【請求項 5】

前記コード配列が S E Q I D N O : 4 の c D N A 配列に含有される、請求項 4 の組換えバキュロウイルス発現ベクター。

## 【請求項 6】

p 6 3 - 2 である、請求項 5 の組換えバキュロウイルス発現ベクター。

## 【請求項 7】

請求項 4、5 または 6 の組換え発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた昆虫宿主細胞。

## 【請求項 8】

生物学的サンプル中の E 型肝炎ウイルスに対する抗体の検出方法であって、

30

( a ) 前記サンプルを請求項 1 の E 型肝炎ウイルスのオープンリーディングフレーム 2 タンパク質と接触させ、抗体との免疫複合体を形成させ；そして

( b ) 前記免疫複合体の存在を検出することを含み、前記検出方法。

## 【請求項 9】

前記生物学的サンプルが、全血、血漿、血清、脳脊髄液、組織、尿、及び胸膜液である、請求項 8 の方法。

## 【請求項 10】

I g M または I g G 抗体を検出する、請求項 8 の方法。

## 【請求項 11】

組換え H E V タンパク質が固体支持体に結合されている、請求項 8 の方法。

40

## 【請求項 12】

免疫複合体が標識抗体を用いて検出される、請求項 8 の方法。

## 【請求項 13】

請求項 1 のタンパク質を含む、請求項 8 の方法に用いるキット。

## 【請求項 14】

標識された二次抗体をさらに含む、請求項 13 のキット。

## 【請求項 15】

防御抗体の産生を刺激するために有効な量の請求項 1 のタンパク質、および適当な助剤、希釈剤、または担体を含む、E 型肝炎の治療または予防のための薬剤組成物。

50

## 【請求項16】

請求項1のタンパク質および薬学的に許容される担体を含む、哺乳動物をE型肝炎感染に対して免疫するためのワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の分野

本発明は肝炎ウイルス学の分野に関する。特に、本発明は、腸伝染性のE型肝炎ウイルス株SAR-55由来の組み換えタンパク質、並びにこれらのタンパク質を使った診断法およびワクチン応用に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

従来技術

腸伝染性非A/非B型肝炎であるE型肝炎の流行は、アジア、アフリカおよび中央アメリカにおいて報告されている(バラヤン(Balayan), M.S.(1987), Soviet Medical Reviews, Section E, Virology Reviews, ズダノフ(Zhdanov), V.M.(編)、クール、スイス: Harwood Academic Publishers, vol.2, 235-261; ザッカーマン(Zuckerman), A.J.(編)、パーセル(Purcell), R.G.ら、(1988)、“Viral Hepatitis and Liver Disease”, ニューヨーク: アラン R.リス(Alan R. Liss), 131-137; ブラドレー(Bradley), D.W.(1990), British Medical Bulletin, 46: 442-461; ホリンガー(Hollinger), F.B.、レモン(Lemon), S.M.、マーゴリス(Margolis), H.S.(編)、ティチェハースト(Ticehurst), J.R.(1991): “Viral Hepatitis and Liver Disease”, Williams and Wilkins, バルチモア, 501-513)。散発性肝炎のケース(E型肝炎と推定される)は、E型肝炎ウイルス(HEV)が風土病である国では、報告される肝炎の90%にまで達する。感染した個体の血清中の抗HEV抗体の検出に関する血清学的試験の開発の必要性は、当該分野で広く認識されているが、しかし感染個体もしくは動物から排出されるHEVが非常に低濃度なため、そのようなHEVを血清学的試験用の抗原のソースとして利用することは不可能であった。そして細胞培養でのHEVの増殖において制限付きの成功が報告された(ファン(Huang), R.T.ら(1992), J. Gen. Virol., 73: 1143-1148)が、血清学的試験に必要な量の抗原を生産するには、細胞培養は現行ではあまりにも非能率的である。

20

30

## 【0003】

最近、世界中の多くの労力がE型肝炎に関するウイルスゲノム配列を同定するために払われたことにより、数は限られているが幾つかのHEV株のゲノムがクローン化された(タン(Tam), A.M.ら(1991), Virology, 185: 120-131; ツアレフ(Tsarev), S.A.ら(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 559-563; フライ(Fry), K.E.ら(1992), Virus Genes, 6: 173-185)。DNA配列の解析から、研究者たちは、HEVゲノムが3つのオープンリーディングフレーム(ORF)に組織されているという仮説、並びにこれらのORFがインタクトなHEVタンパク質をコードするという仮説を立てるに至った。

40

## 【0004】

ビルマ(ミャンマー)からのHEV株のゲノムの部分DNA配列がレイエス(Reyes)ら1990, Science, 247: 1335-1339に開示されている。タンら、1991、およびレイエスら、PCT特許出願WO91/15603号(1991年10月17日公開)は、HEVビルマ株の完全なヌクレオチド配列および推定アミノ酸配

50

列を開示している。これらの著者たちは、3つの順方向のオープンリーディングフレーム (ORF) が本株の配列内に含まれると仮説を立てた。

【0005】

イチカワ (Ichikawa) ら、1991, *Microbiol. Immunol.*, 35: 535 - 543 は、HEV 感染したカニクイザルからの血清で gt11 発現ライブラリーをスクリーニングした際に、長さ 240 - 320 ヌクレオチドの一連のクローンが単離されたことを開示している。1つのクローンにより発現される組み換えタンパク質を大腸菌で発現させた。この融合タンパク質は、HEV ミヤンマー株の ORF - 2 の 3' 領域にコードされる。

【0006】

HEV メキシコ株および HEV ビルマ株の ORF - 2 の 3' 領域内にコードされるさらに別のタンパク質の発現について、ヤーボウ (Yarborough) ら、1991 *J. Virology*, 65: 5790 - 5797 が記載している。この論文は、HEV 由来の 2つの cDNA クローンの単離を記載している。これらのクローンが ORF - 2 の 3' 領域のタンパク質群をコードする。そのクローンを大腸菌内で融合タンパク質として発現させた。

【0007】

パーディ (Purdy) ら、1992, *Archives of Virology*, 123: 335 - 349、およびファボロフ (Favorov) ら、1992, *J. of Medical Virology*, 36: 246 - 250 は、ビルマ株からのより大きな ORF - 2 タンパク質断片の大腸菌での発現を開示している。これらの参考文献は、以前に考察したものと同様に、細菌発現系を用いた ORF - 2 遺伝子の一部の発現の開示でしかない。ORF - 2 タンパク質全長を首尾よく発現させることは、本発明までは開示されたことがなかった。

【0008】

HEV のゲノム構成および形態学的構造を他のウイルスのそれと比較することにより、HEV がカリチウイルス (calicivirus) に最も近縁であることがあきらかとなった。興味深いことに、カリチウイルスの構造タンパク質群はゲノムの 3' 部分にコードされる (ネイル (Neil), J. D. ら、(1991) *J. Virol.*, 65: 5440 - 5447; およびカーター (Carter), M. J. ら、(1992), *J. Arch. Virol.*, 122: 223 - 235)。そして HEV ゲノムの 3' 端部分も構造タンパク質群をコードするという直接的証拠は無いが、3' ゲノム領域のある小さな部分を細菌細胞で発現させると、ELISA およびウェスタンブロットにおいて抗 HEV 血清と反応するタンパク質群が生産される (ヤーボウら、(1991); イチカワら、(1991); ファボロフら、(1992) およびドーソン (Dawson), G. J. ら、(1992) *J. Virol. Meth.*, 38: 175 - 186)。しかし、構造タンパク質としての ORF - 2 タンパク質の機能は、本発明までは証明されなかった。

【0009】

ORF - 2 遺伝子の一部によりコードされる小さなタンパク質群は、動物血清中の HEV に対する抗体を検出するイムノアッセイに利用されてきた。細菌で発現された小さなタンパク質群を血清学的なイムノアッセイにおいて抗原として利用することは、幾つかの潜在的な欠点を有している。第1に、細菌細胞でのこれらの小タンパク質の発現は、可溶性に関する問題、ならびにイムノアッセイに大腸菌の粗溶解物を抗原として用いた場合の、患者血清の大腸菌タンパク質との非特異的交差反応をもたらす (パーディら、(1992))。第2に、ルーチン疫学において抗 HEV 抗体に関する血清学的試験の最初のラインとしてウェスタンブロットを用いることは、時間的および経済的制約から実践的ではない。HEV ゲノムの 3' 端部分由来の小ペプチドを用いた ELISA は、既知の HEV 感染患者中の 41% しか陽性として検出できなかった。第3に、Caliciviridae に最も近い科である Picornaviridae を含め、多くのウイルスに関して、重要な抗原および免疫原エピトープは立体構造性が高い (ホリンガー, F. B., レモン (

10

20

30

40

50

Lemon), S. M., マーゴリス, H. S. (編)、レモン, S. M. ら、(1991): "Viral Hepatitis and Liver Disease", Williams and Wilkins, バルチモア、20-24)。それゆえ、インタクトなHEV遺伝子をコードする完全なORFを真核細胞系で発現させれば、HEVウイルス様粒子を形成し得るタンパク質の生産をもたらすのではないかと考えられる。そのような完全なORFタンパク質であれば、上記のより小さなタンパク質(HEV構造タンパク質の一部しか表していない)よりも天然のキャプシドタンパク質(群)の免疫学的構造に近い構造を持つだろう。それ故、これらの完全なORFタンパク質は、現在使われているより小さなタンパク質よりも、より代表的な抗原として並びにより有効な免疫原として役立つであろう。

10

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0010】****発明の概要**

本発明は、分離されて実質的に純粋な、ヒトE型肝炎ウイルス株SAR-55の調製品に関する。

**【0011】**

本発明はまた、分離されて実質的に純粋な、ヒトE型肝炎ウイルス株SAR-55のゲノムRNAの調製品に関する。

本発明はさらに、ヒトE型肝炎ウイルス株SAR-55のcDNAに関する。

20

**【0012】**

本発明の目的は、組み換えHEVタンパク質を生産させることのできる合成核酸配列を、等価な天然核酸配列以外に提供することである。そのような核酸配列は、HEVタンパク質を合成させることのできる遺伝子を同定し分離することのできるcDNAもしくはゲノムライブラリーから分離することができる。

**【0013】**

本発明はさらに、SAR-55 cDNA由来のプライマーを用いたE型肝炎遺伝子断片の選択的増幅に基づいた、生物試料中のE型肝炎ウイルスの検出法に関する。

本発明はまた、SAR-55 cDNA由来の一本鎖アンチセンスのポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを用いて、E型肝炎遺伝子の発現を阻害することに関する。

30

**【0014】**

本発明はまた、SAR-55のHEVゲノムにコードされる、または合成核酸配列によりコードされる、単離され実質的に精製されたHEVタンパク質およびその変異体に、特に少なくとも1つの完全なHEVオープンリーディングフレームにコードされる組み換えタンパク質に関する。

**【0015】**

本発明はまた、核酸をクローン化し、cDNAを発現ベクターに挿入し、そして宿主細胞中で組み換えタンパク質を発現させることによって、HEVゲノム配列由来の組み換えHEVタンパク質を調製する方法に関する。

**【0016】**

本発明はまた、得られた組み換えタンパク質を診断薬およびワクチンとして利用することに関する。本発明はまた、生物試料中のE型肝炎ウイルスに特異的な抗体を検出する方法も含む。そのような方法は、HEVが引き起こす感染症および疾患の診断、並びにそのような疾患の進行の監視に有用である。そのような方法はまた、哺乳動物でのHEV感染症および疾患の治療過程において治療薬の効力をモニターするのに有用である。

40

**【0017】**

本発明はまた、哺乳動物でのE型肝炎の予防もしくは治療に使われる医薬構成物にも関する。

**【課題を解決するための手段】****【0018】**

50

発明の詳細な説明

本発明は、分離されて実質的に純粋な、パキスタンからのE型肝炎ウイルス(HEV) SAR-55株に関する。本発明はまた、HEVタンパク質をコードするウイルス遺伝子のクローン化および発現系を用いた組み換えタンパク質の発現にも関する。

## 【0019】

本発明は分離されたタンパク質に関する。望ましくは、本発明のHEVタンパク質は天然のHEVタンパク質に実質的に相同であり、最も望ましくはそれと生物学的に等価である。本明細書および特許請求の範囲を通して使われる「生物学的に等価」によって意味されることは、その構成物がウイルス様粒子を形成でき、免疫原たりうることである。本発明のHEVタンパク質はまた、哺乳動物に注射すると、野生型HEVに挑戦するとき該哺乳動物を防御してくれる防御抗体の生産を刺激することもできる。本明細書の以下の部分および特許請求の範囲を通して使われる「実質的に相同」によって意味されることは、アミノ酸配列の天然HEVタンパク質との相同性の度合いである。望ましくは相同性の度合いは70%より大きく、好適には90%を越え、特に好適なタンパク質のグループについては天然のHEVタンパク質との相同性が99%を越える。

10

## 【0020】

好適なHEVタンパク質はORF遺伝子にコードされるタンパク質である。HEVのORF-2遺伝子にコードされるタンパク質は特に興味深く、HEVのSAR-55株のORF-2遺伝子にコードされるタンパク質は最も興味深い。ORF-1、ORF-2およびORF-3タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 1、SEQ

20

ID NO: 2およびSEQ ID NO: 3として以下に示される：

SEQ ID NO: 1:

## 【0021】

## 【化 1】

Met	Glu	Ala	His	Gln	Phe	Ile	Lys	Ala	Pro	Gly	Ile	Thr	Thr	Ala	
1				5					10					15	
Ile	Glu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	
				20					25					30	
Ala	Val	Val	Val	Arg	Pro	Phe	Leu	Ser	His	Gln	Gln	Ile	Glu	Ile	
				35					40					45	10
Leu	Ile	Asn	Leu	Met	Gln	Pro	Arg	Gln	Leu	Val	Phe	Arg	Pro	Glu	
				50					55					60	
Val	Phe	Trp	Asn	His	Pro	Ile	Gln	Arg	Val	Ile	His	Asn	Glu	Leu	
				65					70					75	
Glu	Leu	Tyr	Cys	Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Arg	Cys	Leu	Glu	Ile	Gly	
				80					85					90	20
Ala	His	Pro	Arg	Ser	Ile	Asn	Asp	Asn	Pro	Asn	Val	Val	His	Arg	
				95					100					105	
Cys	Phe	Leu	Arg	Pro	Ala	Gly	Arg	Asp	Val	Gln	Arg	Trp	Tyr	Thr	
				110					115					120	
Ala	Pro	Thr	Arg	Gly	Pro	Ala	Ala	Asn	Cys	Arg	Arg	Ser	Ala	Leu	
				125					130					135	30
Arg	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Cys	Phe	Asp	Gly	Phe	
				140					145					150	
Ser	Gly	Cys	Asn	Phe	Pro	Ala	Glu	Thr	Gly	Ile	Ala	Leu	Tyr	Ser	
				155					160					165	
Leu	His	Asp	Met	Ser	Pro	Ser	Asp	Val	Ala	Glu	Ala	Met	Phe	Arg	
				170					175					180	40
His	Gly	Met	Thr	Arg	Leu	Tyr	Ala	Ala	Leu	His	Leu	Pro	Pro	Glu	
				185					190					195	
Val	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Tyr	Arg	Thr	Ala	Ser	Tyr	Leu	Leu	
				200					205					210	

## 【 0 0 2 2 】

## 【化2】

Ile His Asp Gly Arg Arg Val Val Val Thr Tyr Glu Gly Asp Thr		
	215	225
Ser Ala Gly Tyr Asn His Asp Val Ser Asn Leu Arg Ser Trp Ile		
	230	240
Arg Thr Thr Lys Val Thr Gly Asp His Pro Leu Val Ile Glu Arg		
	245	255
Val Arg Ala Ile Gly Cys His Phe Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala		
	260	270
Pro Glu Pro Ser Pro Met Pro Tyr Val Pro Tyr Pro Arg Ser Thr		
	275	285
Glu Val Tyr Val Arg Ser Ile Phe Gly Pro Gly Gly Thr Pro Ser		
	290	300
Leu Phe Pro Thr Ser Cys Ser Thr Lys Ser Thr Phe His Ala Val		
	305	315
Pro Ala His Ile Trp Asp Arg Leu Met Leu Phe Gly Ala Thr Leu		
	320	330
Asp Asp Gln Ala Phe Cys Cys Ser Arg Leu Met Thr Tyr Leu Arg		
	335	345
Gly Ile Ser Tyr Lys Val Thr Val Gly Thr Leu Val Ala Asn Glu		
	350	360
Gly Trp Asn Ala Ser Glu Asp Ala Leu Thr Ala Val Ile Thr Ala		
	365	375
Ala Tyr Leu Thr Ile Cys His Gln Arg Tyr Leu Arg Thr Gln Ala		
	380	390
Ile Ser Lys Gly Met Arg Arg Leu Glu Arg Glu His Ala Gln Lys		
	395	405
Phe Ile Thr Arg Leu Tyr Ser Trp Leu Phe Glu Lys Ser Gly Arg		
	410	420

10

20

30

40

## 【0023】

## 【化3】

Asp Tyr Ile Pro Gly Arg Gln Leu Glu Phe Tyr Ala Gln Cys Arg		
	425	435
Arg Trp Leu Ser Ala Gly Phe His Leu Asp Pro Arg Val Leu Val		
	440	450
Phe Asp Glu Ser Ala Pro Cys His Cys Arg Thr Ala Ile Arg Lys		
	455	465
Ala Val Ser Lys Phe Cys Cys Phe Met Lys Trp Leu Gly Gln Glu		
	470	480
Cys Thr Cys Phe Leu Gln Pro Ala Glu Gly Val Val Gly Asp Gln		
	485	495
Gly His Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Gly Ser Asp Val Asp Pro Ala		
	500	510
Glu Ser Ala Ile Ser Asp Ile Ser Gly Ser Tyr Val Val Pro Gly		
	515	525
Thr Ala Leu Gln Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Asp Leu Pro Ala Glu		
	530	540
Ile Val Ala Arg Ala Gly Arg Leu Thr Ala Thr Val Lys Val Ser		
	545	555
Gln Val Asp Gly Arg Ile Asp Cys Glu Thr Leu Leu Gly Asn Lys		
	560	570
Thr Phe Arg Thr Ser Phe Val Asp Gly Ala Val Leu Glu Thr Asn		
	575	585
Gly Pro Glu Arg His Asn Leu Ser Phe Asp Ala Ser Gln Ser Thr		
	590	600
Met Ala Ala Gly Pro Phe Ser Leu Thr Tyr Ala Ala Ser Ala Ala		
	605	615
Gly Leu Glu Val Arg Tyr Val Ala Ala Gly Leu Asp His Arg Ala		
	620	630

10

20

30

40

## 【0024】

## 【 化 4 】

Val Phe Ala Pro Gly Val Ser Pro Arg Ser Ala Pro Gly Glu Val		
	635	640 645
Thr Ala Phe Cys Ser Ala Leu Tyr Arg Phe Asn Arg Glu Ala Gln		
	650	655 660
Arg Leu Ser Leu Thr Gly Asn Phe Trp Phe His Pro Glu Gly Leu		
	665	670 675
Leu Gly Pro Phe Ala Pro Phe Ser Pro Gly His Val Trp Glu Ser		
	680	685 690
Ala Asn Pro Phe Cys Gly Glu Ser Thr Leu Tyr Thr Arg Thr Trp		
	695	700 705
Ser Glu Val Asp Ala Val Pro Ser Pro Ala Gln Pro Asp Leu Gly		
	710	715 720
Phe Thr Ser Glu Pro Ser Ile Pro Ser Arg Ala Ala Thr Pro Thr		
	725	730 735
Pro Ala Ala Pro Leu Pro Pro Pro Ala Pro Asp Pro Ser Pro Thr		
	740	745 750
Leu Ser Ala Pro Ala Arg Gly Glu Pro Ala Pro Gly Ala Thr Ala		
	755	760 765
Arg Ala Pro Ala Ile Thr His Gln Thr Ala Arg His Arg Arg Leu		
	770	775 780
Leu Phe Thr Tyr Pro Asp Gly Ser Lys Val Phe Ala Gly Ser Leu		
	785	790 795
Phe Glu Ser Thr Cys Thr Trp Leu Val Asn Ala Ser Asn Val Asp		
	800	805 810
His Arg Pro Gly Gly Gly Leu Cys His Ala Phe Tyr Gln Arg Tyr		
	815	820 825
Pro Ala Ser Phe Asp Ala Ala Ser Phe Val Met Arg Asp Gly Ala		
	830	835 840

10

20

30

40

## 【 0 0 2 5 】

## 【化5】

Ala Ala Tyr Thr Leu Thr Pro Arg Pro Ile Ile His Ala Val Ala			
	845	850	855
Pro Asp Tyr Arg Leu Glu His Asn Pro Lys Arg Leu Glu Ala Ala			
	860	865	870
Tyr Arg Glu Thr Cys Ser Arg Leu Gly Thr Ala Ala Tyr Pro Leu			
	875	880	885
Leu Gly Thr Gly Ile Tyr Gln Val Pro Ile Gly Pro Ser Phe Asp			
	890	895	900
Ala Trp Glu Arg Asn His Arg Pro Gly Asp Glu Leu Tyr Leu Pro			
	905	910	915
Glu Leu Ala Ala Arg Trp Phe Glu Ala Asn Arg Pro Thr Cys Pro			
	920	925	930
Thr Leu Thr Ile Thr Glu Asp Val Ala Arg Thr Ala Asn Leu Ala			
	935	940	945
Ile Glu Leu Asp Ser Ala Thr Asp Val Gly Arg Ala Cys Ala Gly			
	950	955	960
Cys Arg Val Thr Pro Gly Val Val Gln Tyr Gln Phe Thr Ala Gly			
	965	970	975
Val Pro Gly Ser Gly Lys Ser Arg Ser Ile Thr Gln Ala Asp Val			
	980	985	990
Asp Val Val Val Val Pro Thr Arg Glu Leu Arg Asn Ala Trp Arg			
	995	1000	1005
Arg Arg Gly Phe Ala Ala Phe Thr Pro His Thr Ala Ala Arg Val			
	1010	1015	1020
Thr Gln Gly Arg Arg Val Val Ile Asp Glu Ala Pro Ser Leu Pro			
	1025	1030	1035
Pro His Leu Leu Leu Leu His Met Gln Arg Ala Ala Thr Val His			
	1040	1045	1050

## 【0026】

## 【 化 6 】

Leu Leu Gly Asp Pro Asn Gln Ile Pro Ala Ile Asp Phe Glu His			
	1055	1060	1065
Ala Gly Leu Val Pro Ala Ile Arg Pro Asp Leu Ala Pro Thr Ser			
	1070	1075	1080
Trp Trp His Val Thr His Arg Cys Pro Ala Asp Val Cys Glu Leu			
	1085	1090	1095
Ile Arg Gly Ala Tyr Pro Met Ile Gln Thr Thr Ser Arg Val Leu			
	1100	1105	1110
Arg Ser Leu Phe Trp Gly Glu Pro Ala Val Gly Gln Lys Leu Val			
	1115	1120	1125
Phe Thr Gln Ala Ala Lys Ala Ala Asn Pro Gly Ser Val Thr Val			
	1130	1135	1140
His Glu Ala Gln Gly Ala Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Ile Ile Ala			
	1145	1150	1155
Thr Ala Asp Ala Arg Gly Leu Ile Gln Ser Ser Arg Ala His Ala			
	1160	1165	1170
Ile Val Ala Leu Thr Arg His Thr Glu Lys Cys Val Ile Ile Asp			
	1175	1180	1185
Ala Pro Gly Leu Leu Arg Glu Val Gly Ile Ser Asp Ala Ile Val			
	1190	1195	1200
Asn Asn Phe Phe Leu Ala Gly Gly Glu Ile Gly His Gln Arg Pro			
	1205	1210	1215
Ser Val Ile Pro Arg Gly Asn Pro Asp Ala Asn Val Asp Thr Leu			
	1220	1225	1230
Ala Ala Phe Pro Pro Ser Cys Glu Ile Ser Ala Phe His Glu Leu			
	1235	1240	1245
Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Pro Ala Pro Val Ala Ala Val Leu			
	1250	1255	1260

10

20

30

40

## 【 0 0 2 7 】

## 【 化 7 】

Pro	Pro	Cys	Pro	Glu	Leu	Glu	Gln	Gly	Leu	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gln	
				1265					1270					1275	
Glu	Leu	Thr	Thr	Cys	Asp	Ser	Val	Val	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Asp	
				1280					1285					1290	
Ile	Val	His	Cys	Arg	Met	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Arg	Lys	Ala	Val	
				1295					1300					1305	10
Leu	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	Arg	Tyr	Gly	Arg	Arg	Thr	Lys	Leu	Tyr	
				1310					1315					1320	
Asn	Ala	Ser	His	Ser	Asp	Val	Arg	Asp	Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Ile	
				1325					1330					1335	
Pro	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Gln	Val	Thr	Thr	Cys	Glu	Leu	Tyr	Glu	
				1340					1345					1350	20
Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Val	Glu	Lys	Gly	Gln	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	
				1355					1360					1365	
Leu	Glu	Leu	Asp	Leu	Cys	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Arg	Ile	Thr	Phe	
				1370					1375					1380	
Phe	Gln	Lys	Asp	Cys	Asn	Lys	Phe	Thr	Thr	Gly	Glu	Thr	Ile	Ala	
				1385					1390					1395	30
His	Gly	Lys	Val	Gly	Gln	Gly	Ile	Ser	Ala	Trp	Ser	Lys	Thr	Phe	
				1400					1405					1410	
Cys	Ala	Leu	Phe	Gly	Pro	Trp	Phe	Arg	Ala	Ile	Glu	Lys	Ala	Ile	
				1415					1420					1425	
Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Gln	Gly	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Ala	Phe	Asp	
				1430					1435					1440	40
Asp	Thr	Val	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ser	Met	
				1445					1450					1455	
Val	Phe	Glu	Asn	Asp	Phe	Ser	Glu	Phe	Asp	Ser	Thr	Gln	Asn	Asn	
				1460					1465					1470	

## 【 0 0 2 8 】

## 【 化 8 】

Phe Ser Leu Gly Leu Glu Cys Ala Ile Met Glu Glu Cys Gly Met		
	1475	1480 1485
Pro Gln Trp Leu Ile Arg Leu Tyr His Leu Ile Arg Ser Ala Trp		
	1490	1495 1500
Ile Leu Gln Ala Pro Lys Glu Ser Leu Arg Gly Phe Trp Lys Lys		
	1505	1510 1515
His Ser Gly Glu Pro Gly Thr Leu Leu Trp Asn Thr Val Trp Asn		
	1520	1525 1530
Met Ala Val Ile Thr His Cys Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Gln Val		
	1535	1540 1545
Ala Ala Phe Lys Gly Asp Asp Ser Ile Val Leu Cys Ser Glu Tyr		
	1550	1555 1560
Arg Gln Ser Pro Gly Ala Ala Val Leu Ile Ala Gly Cys Gly Leu		
	1565	1570 1575
Lys Leu Lys Val Asp Phe Arg Pro Ile Gly Leu Tyr Ala Gly Val		
	1580	1585 1590
Val Val Ala Pro Gly Leu Gly Ala Leu Pro Asp Val Val Arg Phe		
	1595	1600 1605
Ala Gly Arg Leu Thr Glu Lys Asn Trp Gly Pro Gly Pro Glu Arg		
	1610	1615 1620
Ala Glu Gln Leu Arg Leu Ala Val Ser Asp Phe Leu Arg Lys Leu		
	1625	1630 1635
Thr Asn Val Ala Gln Met Cys Val Asp Val Val Ser Arg Val Tyr		
	1640	1645 1650
Gly Val Ser Pro Gly Leu Val His Asn Leu Ile Glu Met Leu Gln		
	1655	1660 1665
Ala Val Ala Asp Gly Lys Ala His Phe Thr Glu Ser Val Lys Pro		

10

20

30

40

## 【 0 0 2 9 】

【 化 9 】

1670

1675

1680

Val Leu Asp Leu Thr Asn Ser Ile Leu Cys Arg Val Glu

1685

1690

【 0 0 3 0 】

SEQ ID NO : 2 :

【 0 0 3 1 】

【 化 1 0 】

Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro

1                    5                                    10                                    15

Met Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg

20                                    25                                    30

Gly Arg Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg

35                                    40                                    45

Val Asp Ser Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn

50                                    55                                    60

Pro Phe Ala Pro Asp Val Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Arg

65                                    70                                    75

Val Arg Gln Pro Ala Arg Pro Leu Gly Ser Ala Trp Arg Asp Gln

80                                    85                                    90

Ala Gln Arg Pro Ala Ala Ala Ser Arg Arg Arg Pro Thr Thr Ala

95                                    100                                    105

Gly Ala Ala Pro Leu Thr Ala Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro

110                                    115                                    120

Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln

125                                    130                                    135

Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr Ser Ser Val Ala Thr Gly

140                                    145                                    150

Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu Ser Pro Leu Leu Pro

155                                    160                                    165

Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala Thr Glu Ala Ser

170                                    175                                    180

10

20

30

40

【 0 0 3 2 】

## 【 化 1 1 】

Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile Arg Tyr Arg  
 185 190 195

Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser Ile Ser  
 200 205 210

Phe Tyr Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met Asn  
 215 220 225

10

Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile  
 230 235 240

Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn  
 245 250 255

Gln Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu  
 260 265 270

20

Ala Thr Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val  
 275 280 285

Asn Ser Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu  
 290 295 300

Asp Phe Ala Leu Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn  
 305 310 315

30

Thr Asn Thr Arg Val Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg  
 320 325 330

Leu Arg Arg Gly Ala Asp Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala  
 335 340 345

Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly  
 350 355 360

40

Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu  
 365 370 375

Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro Thr Glu Leu Ile Ser Ser  
 380 385 390

## 【 0 0 3 3 】

## 【 化 1 2 】

Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro Val Val Ser Ala Asn  
 395 400 405

Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val Glu Asn Ala Gln  
 410 415 420

Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp Leu Gly Glu  
 425 430 435

10

Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu Gln Asp  
 440 445 450

Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu  
 455 460 465

Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr  
 470 475 480

20

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser  
 485 490 495

Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val  
 500 505 510

Ala Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro  
 515 520 525

30

Leu Ser Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro  
 530 535 540

Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala  
 545 550 555

Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu  
 560 565 570

40

Val Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr  
 575 580 585

Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val  
 590 595 600

## 【 0 0 3 4 】

## 【化13】

Leu Ala Pro His Ser Val Leu Ala Leu Leu Glu Asp Thr Met Asp  
                                 605                                610                                615  
 Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys  
                                 620                                625                                630  
 Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val Ala  
                                 635                                640                                645  
 Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys Thr Arg Glu Leu  
                                 650                                655                                660

10

## 【0035】

SEQ ID NO : 3 :

## 【0036】

## 【化14】

Met Asn Asn Met Ser Phe Ala Ala Pro Met Gly Ser Arg Pro Cys  
 1                                5                                10                                15  
 Ala Leu Gly Leu Phe Cys Cys Cys Ser Ser Cys Phe Cys Leu Cys  
                                 20                                25                                30  
 Cys Pro Arg His Arg Pro Val Ser Arg Leu Ala Ala Val Val Gly  
                                 35                                40                                45  
 Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala Val Val Ser Gly Val Thr Gly Leu  
                                 50                                55                                60  
 Ile Leu Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Phe Ile Gln Pro Thr Pro  
                                 65                                70                                75  
 Ser Pro Pro Met Ser Pro Leu Arg Pro Gly Leu Asp Leu Val Phe  
                                 80                                85                                90  
 Ala Asn Pro Pro Asp His Ser Ala Pro Leu Gly Val Thr Arg Pro  
                                 95                                100                                105  
 Ser Ala Pro Pro Leu Pro His Val Val Asp Leu Pro Gln Leu Gly  
                                 110                                115                                120  
 Pro Arg Arg

20

30

40

## 【0037】

3文字の略号は、20の天然に存在するアミノ酸に対する慣例のアミノ酸速記法に従う

50

。

## 【0038】

好適な組み換えH E Vタンパク質は少なくとも1つのO R Fタンパク質を含む。同じもしくは異なるO R Fタンパク質群を複数含む他の組み換えタンパク質を、該タンパク質の生物学的特性を変更するように作製することもできる。種々のアミノ酸もしくは種々のアミノ酸配列の付加、置換もしくは欠失が該H E Vタンパク質の生物学的活性を高めうることも予期される。

## 【0039】

本発明はまた、上述のH E Vタンパク質もしくは該H E Vタンパク質群に実質的に相同なタンパク質群を生産させることのできる核酸配列である。この核酸配列は、S A R - 5 5と名付けられ、S E Q I D N O : 4として以下に示され、1992年9月17日にアメリカンタイプカルチャーコレクション(A T C C)に寄託された。

10

## 【0040】

## 【 化 1 5 】

AGGCAGACCA	CATATGTGGT	CGATGCCATG	GAGGCCCATC	AGTTTATCAA	50	
GGCTCCTGGC	ATCACTACTG	CTATTGAGCA	GGCTGCTCTA	GCAGCGGCCA	100	
ACTCTGCCCT	TGCGAATGCT	GTGGTAGTTA	GGCCTTTTCT	CTCTCACCAG	150	
CAGATTGAGA	TCCTTATTAA	CCTAATGCAA	CCTCGCCAGC	TTGTTTTCCG	200	
CCCCGAGGTT	TTCTGGAACC	ATCCCATCCA	GCGTGTTATC	CATAATGAGC	250	
TGGAGCTTTA	CTGTGCGGCC	CGCTCCGGCC	GCTGCCTCGA	AATTGGTGCC	300	10
CACCCCCGCT	CAATAAATGA	CAATCCTAAT	GTGGTCCACC	GTTGCTTCCT	350	
CCGTCCTGCC	GGGCGTGATG	TTCAGCGTTG	GTATACTGCC	CCTACCCGCG	400	
GGCCGGCTGC	TAATTGCCGG	CGTTCGCGC	TGCGCGGGCT	CCCCGCTGCT	450	
GACCGCACTT	ACTGCTTCGA	CGGGTTTTCT	GGCTGTAACT	TCCCCGCCGA	500	
GACGGGCATC	GCCCTCTATT	CTCTCCATGA	TATGTCACCA	TCTGATGTCG	550	
CCGAGGCTAT	GTCCGCCAT	GGTATGACGC	GGCTTTACGC	TGCCCTCCAC	600	20
CTCCCGCCTG	AGGTCCTGTT	GCCCCCTGGC	ACATACCGCA	CCGCGTCGTA	650	
CTTGCTGATC	CATGACGGCA	GGCGCGTTGT	GGTGACGTAT	GAGGGTGACA	700	
CTAGTGCTGG	TTATAACCAC	GATGTTTCCA	ACCTGCGCTC	CTGGATTAGA	750	
ACCACTAAGG	TTACCGGAGA	CCACCCTCTC	GTCATCGAGC	GGGTTAGGGC	800	
CATTGGCTGC	CACTTTGTCC	TTTTACTCAC	GGCTGCTCCG	GAGCCATCAC	850	
CTATGCCCTA	TGTCCCTTAC	CCCCGGTCTA	CCGAGGTCTA	TGTCCGATCG	900	30
ATCTTCGGCC	CGGGTGGCAC	CCCCTCCCTA	TTCCAACCT	CATGCTCCAC	950	
CAAGTCGACC	TTCCATGCTG	TCCCTGCCCA	TATCTGGGAC	CGTCTCATGT	1000	
TGTTCCGGGGC	CACCCTAGAT	GACCAAGCCT	TTGCTGCTC	CCGCCTAATG	1050	
ACTTACCTCC	GCGGCATTAG	CTACAAGGTT	ACTGTGGGCA	CCCTTGTTGC	1100	
CAATGAAGGC	TGGAACGCCT	CTGAGGACGC	TCTTACAGCT	GTCATCACTG	1150	
CCGCCTACCT	TACCATCTGC	CACCAGCGGT	ACCTCCGCAC	TCAGGCTATA	1200	40
TCTAAGGGGA	TGCGTCGCCT	GGAGCGGGAG	CATGCTCAGA	AGTTTATAAC	1250	
ACGCCTCTAC	AGTTGGCTCT	TTGAGAAGTC	CGGCCGTGAT	TATATCCCCG	1300	
GCCGTCAGTT	GGAGTTCTAC	GCTCAGTGTA	GGCGCTGGCT	CTCGGCCGGC	1350	
TTTCATCTTG	ACCCACGGGT	GTTGGTTTTT	GATGAGTCGG	CCCCCTGCCA	1400	
CTGTAGGACT	GCGATTCGTA	AGGCGGTCTC	AAAGTTTTGC	TGCTTTATGA	1450	

## 【 0 0 4 1 】

## 【 化 1 6 】

AGTGGCTGGG CCAGGAGTGC ACCTGTTTTT TACAACCTGC AGAAGGCGTC 1500  
 GTTGGCGACC AGGGCCATGA CAACGAGGCC TATGAGGGGT CTGATGTTGA 1550  
 CCCTGCTGAA TCCGCTATTA GTGACATATC TGGGTCCTAC GTAGTCCCTG 1600  
 GCACTGCCCT CCAACCGCTT TACCAAGCCC TTGACCTCCC CGCTGAGATT 1650  
 GTGGCTCGTG CAGGCCGGCT GACCGCCACA GTAAAGGTCT CCCAGGTCGA 1700  
 CGGGCGGATC GATTGTGAGA CCCTTCTCGG TAATAAAACC TTCCGCACGT 1750  
 CGTTTGTGTA CGGGGCGGTT TTAGAGACTA ATGGCCCAGA GCGCCACAAT 1800  
 CTCTCTTTTG ATGCCAGTCA GAGCACTATG GCCGCCGGCC CTTTCAGTCT 1850  
 CACCTATGCC GCCTCTGCTG CTGGGCTGGA GGTGCGCTAT GTCGCCGCCG 1900  
 GGCTTGACCA CCGGGCGGTT TTTGCCCCCG GCGTTTCACC CCGGTCAGCC 1950  
 CCTGGCGAGG TCACCGCCTT CTGTTCTGCC CTATACAGGT TTAATCGCGA 2000  
 GGCCCAGCGC CTTTCGCTGA CCGGTAATTT TTGGTTCCAT CCTGAGGGGC 2050  
 TCCTTGCCCC CTTTGCCCCG TTTCCCCCG GGCATGTTTG GGAGTCGGCT 2100  
 AATCCATTCT GTGGCGAGAG CACACTTAC ACCCGCACTT GGTCGGAGGT 2150  
 TGATGCTGTT CCTAGTCCAG CCCAGCCCGA CTTAGGTTTT ACATCTGAGC 2200  
 CTTCTATACC TAGTAGGGCC GCCACACCTA CCCCGGCGGC CCCTCTACCC 2250  
 CCCCCTGCAC CGGATCCTTC CCCTACTCTC TCTGCTCCGG CGCGTGGTGA 2300  
 GCCGGCTCCT GGCCTACCG CCAGGGCCCC AGCCATAACC CACCAGACGG 2350  
 CCCGGCATCG CCGCCTGCTC TTTACCTACC CGGATGGCTC TAAGGTGTTT 2400  
 GCCGGCTCGC TGTTGAGTC GACATGTACC TGGCTCGTTA ACGCGTCTAA 2450  
 TGTTGACCAC CGCCCTGGCG GTGGGCTCTG TCATGCATTT TACCAGAGGT 2500  
 ACCCCGCCTC CTTTGATGCT GCCTCTTTTG TGATGCGCGA CGGCGCGGCC 2550  
 GCCTACACAT TAACCCCCCG GCCAATAATT CATGCCGTCG CTCCTGATTA 2600  
 TAGGTTGGAA CATAACCCAA AGAGGCTTGA GGCTGCCTAC CGGGAGACTT 2650  
 GCTCCCGCCT CGGTACCGCT GCATACCCAC TCCTCGGGAC CGGCATATAC 2700  
 CAGGTGCCGA TCGGTCCCAG TTTGACGCC TGGGAGCGGA ATCACCGCC 2750  
 CGGGGACGAG TTGTACCTTC CTGAGCTTGC TGCCAGATGG TTCGAGGCCA 2800  
 ATAGGCCGAC CTGCCAACT CTCACTATAA CTGAGGATGT TGC GCGGACA 2850  
 GCAAATCTGG CTATCGAACT TGA CTCAGCC ACAGACGTCG GCCGGGCCTG 2900

10

20

30

40

## 【 0 0 4 2 】

50

## 【 化 1 7 】

TGCCGGCTGT CGAGTCACCC CCGGCGTTGT GCAGTACCAG TTTACCGCAG 2950  
 GTGTGCCTGG ATCCGGCAAG TCCCGCTCTA TTACCCAAGC CGACGTGGAC 3000  
 GTTGTCTGG TCCCGACCCG GGAGTTGCGT AATGCCTGGC GCCGCCGCGG 3050  
 CTTGCTGCT TTCACCCCGC AACTGCGGC TAGAGTCACC CAGGGGCGCC 3100  
 GGGTTGTCAT TGATGAGGCC CCGTCCCTTC CCCCTCATTT GCTGCTGCTC 3150  
 CACATGCAGC GGGCCGCCAC CGTCCACCTT CTGGCGACC CGAATCAGAT 3200  
 CCCAGCCATC GATTTTGAGC ACGCCGGGCT CGTCCCGCC ATCAGGCCCG 3250  
 ATTTGGCCCC CACCTCCTGG TGGCATGTTA CCCATCGCTG CCCTGCGGAT 3300  
 GTATGTGAGC TAATCCGGG CGCATACCCT ATGATTCAGA CCACTAGTCG 3350  
 GGTCCCTCCGG TCGTTGTTCT GGGGTGAGCC CGCCGTTGGG CAGAAGCTAG 3400  
 TGTTACCCA GCGGGCTAAG GCCGCCAACC CCGGTTCACT GACGGTCCAT 3450  
 GAGGCACAGG GCGCTACCTA CACAGAGACT ACCATCATTG CCACGGCAGA 3500  
 TGCTCGAGGC CTCATTCAGT CGTCCCGAGC TCATGCCATT GTTGCCTTGA 3550  
 CGCGCCACAC TGAGAAGTGC GTCATCATTG ACGCACCAGG CCTGCTTCGC 3600  
 GAGGTGGGCA TCTCCGATGC AATCGTTAAT AACTTTTCC TTGCTGGTGG 3650  
 CGAAATTGGC CACCAGCGCC CATCTGTTAT CCCTCGCGGC AATCCTGACG 3700  
 CCAATGTTGA CACCTTGGCT GCCTTCCCGC CGTCTTGCCA GATTAGCGCC 3750  
 TTCCATCAGT TGGCTGAGGA GCTTGGCCAC AGACCTGCCC CTGTCGCGGC 3800  
 TGTTCTACCG CCCTGCCCTG AGCTTGAACA GGCCTTCTC TACCTGCCCC 3850  
 AAGAACTCAC CACCTGTGAT AGTGTCGTAA CATTGAATT AACAGATATT 3900  
 GTGCATTGTC GTATGGCCGC CCCGAGCCAG CGCAAGGCCG TGCTGTCCAC 3950  
 GCTCGTGGGC CGTTATGGCC GCCGCACAAA GCTCTACAAT GCCTCCCACT 4000  
 CTGATGTTCTG CCACTCTCTC GCGCGTTTTA TCCCGGCCAT TGGCCCCGTA 4050  
 CAGGTTACAA CCTGTGAATT GTACGAGCTA GTGGAGGCCA TGGTCGAGAA 4100  
 GGGCCAGGAC GGCTCCGCGG TCCTTGAGCT CGACCTTTGT AGCCGCGACG 4150  
 TGTCCAGGAT CACCTTCTTC CAGAAAGATT GTAATAAATT CACCACGGGG 4200  
 GAGACCATCG CCCATGGTAA AGTGGGCCAG GGCATTCGG CCTGGAGTAA 4250  
 GACCTTCTGT GCCCTTTTCG GCCCTGGTT CCGTGCTATT GAGAAGGCTA 4300  
 TCCTGGCCCT GCTCCCTCAG GGTGTGTTTT ATGGGGATGC CTTTGATGAC 4350

10

20

30

40

## 【 0 0 4 3 】

50

## 【 化 1 8 】

ACCGTCTTCT CGGCGGCTGT GGCCGCAGCA AAGGCATCCA TGGTGTTCGA 4400  
 GAATGACTTT TCTGAGTTTG ATTCCACCCA GAATAATTTT TCCTTGGGCC 4450  
 TAGAGTGTGC TATTATGGAG GAGTGTGGGA TGCCGCAGTG GCTCATCCGC 4500  
 TTGTACCACC TTATAAGGTC TGCCTGGATT CTGCAGGCCC CGAAGGAGTC 4550  
 CCTGCGAGGG TTTTGAAGA AACACTCCGG TGAGCCCGGC ACCCTTCTGT 4600  
 GGAATACTGT CTGGAACATG GCCGTTATCA CCCACTGTTA TGATTTCCGC 4650  
 GATCTGCAGG TGGCTGCCTT TAAAGGTGAT GATTCGATAG TGCTTTGCAG 4700  
 TGAGTACCGT CAGAGCCCAG GGGCTGCTGT CCTGATTGCT GGCTGTGGCC 4750  
 TAAAGTTGAA GGTGGATTTC CGTCCGATTG GTCTGTATGC AGGTGTTGTG 4800  
 GTGGCCCCCG GCCTTGGCGC GCTTCCTGAT GTCGTGCGCT TCGCCGGTCG 4850  
 GCTTACTGAG AAGAATTGGG GCCCTGGCCC CGAGCGGGCG GAGCAGCTCC 4900  
 GCCTCGCTGT GAGTGATTTT CTCCGCAAGC TCACGAATGT AGCTCAGATG 4950  
 TGTGTGGATG TTGTCTCTCG TGTTTATGGG GTTCCCCTG GGCTCGTTCA 5000  
 TAACCTGATT GGCATGCTAC AGGCTGTTGC TGATGGCAAG GCTCATTTCA 5050  
 CTGAGTCAGT GAAGCCAGTG CTTGACCTGA CAAATTCAAT TCTGTGTCGG 5100  
 GTGGAATGAA TAACATGTCT TTTGCTGCGC CCATGGGTTC GCGACCATGC 5150  
 GCCCTCGGCC TATTTTGCTG TTGCTCCTCA TGTTTCTGCC TATGCTGCCC 5200  
 GCGCCACCGC CCGGTCAGCC GTCTGGCCGC CGTCGTGGGC GGCAGCGCG 5250  
 CCGTTCCGGC GGTGGTTTCT GGGGTGACCG GGTGATTCT CAGCCCTTCG 5300  
 CAATCCCCTA TATTCATCCA ACCAACCCTT TCGCCCCGA TGTCACCGCT 5350  
 GCGGCCGGGG CTGGACCTCG TGTTCCGCAA CCCGCCGAC CACTCGGCTC 5400  
 CGCTTGGCGT GACCAGGCC AGCGCCCCGC CGCTGCCTCA CGTCGTAGAC 5450  
 CTACCACAGC TGGGGCCGCG CCGCTAACCG CGGTCGCTCC GGCCATGAC 5500  
 ACCCCGCCAG TGCTGATGT TGACTCCCGC GCGCCATCC TGCGCCGGCA 5550  
 GTATAACCTA TCAACATCTC CCCTCACCTC TTCCGTGGCC ACCGGCACAA 5600  
 ATTTGGTTCT TTACGCCGCT CCTCTTAGCC CGCTTCTACC CCTCCAGGAC 5650  
 GGCACCAATA CTCATATAAT GGCTACAGAA GCTTCTAATT ATGCCAGTA 5700  
 CCGGGTTGCT CGTGCCACAA TTCGCTACCG CCCGCTGGTC CCCAACGCTG 5750  
 TTGGTGGCTA CGCTATCTCC ATTTGTTTCT GGCCACAGAC CACCACCACC 5800

10

20

30

40

## 【 0 0 4 4 】

50

## 【化 1 9】

CCGACGTCCG TTGACATGAA TTCAATAACC TCGACGGATG TCCGTATTTT 5850  
 AGTCCAGCCC GGCATAGCCT CCGAGCTTGT TATTCCAAGT GAGCGCCTAC 5900  
 ACTATCGCAA CCAAGGTTGG CGCTCTGTTG AGACCTCCGG GGTGGCGGAG 5950  
 GAGGAGGCCA CCTCTGGTCT TGTCATGCTC TGCATACATG GCTCACCTGT 6000  
 AAATTCTTAT ACTAATACAC CCTATACCGG TGCCCTCGGG CTGTTGGACT 6050  
 TTGCCCTCGA ACTTGAGTTC CGCAACCTCA CCCCCGGTAA TACCAATACG 6100  
 CGGGTCTCGC GTTACTCCAG CACTGCCCCG CACCGCCTTC GTCGCGGTGC 6150  
 AGATGGGACT GCCGAGCTCA CCACCACGGC TGCTACTCGC TTCATGAAGG 6200  
 ACCTCTATTT TACTAGTACT AATGGTGTG GTGAGATCGG CCGCGGGATA 6250  
 GCGCTTACCC TGTTTAACT TGCTGACACC CTGCTTGGCG GTCTACCGAC 6300  
 AGAATTGATT TCGTCGGCTG GTGGCCAGCT GTTCTACTCT CGCCCCGTCG 6350  
 TCTCAGCCAA TGGCGAGCCG ACTGTAAAGC TGTATACATC TGTGGAGAAT 6400  
 GCTCAGCAGG ATAAGGGTAT TGCAATCCCG CATGACATCG ACCTCGGGGA 6450  
 ATCCCGTGTA GTTATTCAGG ATTATGACAA CCAACATGAG CAGGACCGAC 6500  
 CGACACCTTC CCCAGCCCCA TCGCGTCCTT TTTCTGTCTT CCGAGCTAAC 6550  
 GATGTGCTTT GGCTTTCTCT CACCGCTGCC GAGTATGACC AGTCCACTTA 6600  
 CGGCTCTTCG ACCGGCCCAG TCTATGTCTC TGA CTCTGTG ACCTTGGTTA 6650  
 ATGTTGCGAC CGGCGCGCAG GCCGTTGCC GGTCACTCGA CTGGACCAAG 6700  
 GTCACACTTG ATGGTCGCCC CCTTTCCACC ATCCAGCAGT ATTCAAAGAC 6750  
 CTTCTTTGTC CTGCCGCTCC GCGGTAAGCT CTCCTTTTGG GAGGCAGGAA 6800  
 CTAATAAAGC CGGGTACCCT TATAATTATA ACACCACTGC TAGTGACCAA 6850  
 CTGCTCGTTG AGAATGCCGC TGGGCATCGG GTTGCTATTT CCACCTACAC 6900  
 TACTAGCCTG GGTGCTGGCC CCGTCTCTAT TTCCGCGGTT GCTGTTTTAG 6950  
 CCCCCACTC TGTGCTAGCA TTGCTTGAGG ATACCATGGA CTACCCTGCC 7000  
 CGCGCCATA CTTTCGATGA CTCTGCCCC GAGTGCCGCC CCCTTGGCCT 7050  
 CCAGGGTTGT GCTTTTCAGT CTA CTGTCCG TGAGCTTCAG CGCCTTAAGA 7100  
 TGAAGGTGGG TAAAACTCGG GAGTTATAGT TTATTTGCTT GTGCCCCCCT 7150  
 TCTTTCTGTT GCTTATTT 7168

10

20

30

40

## 【 0 0 4 5】

ヌクレオチドに用いた略号は当該分野で標準的に用いられるものである。

50

一方向の配列を、RNAウイルスのタンパク質をコードする鎖であることから、慣習により「プラス」配列と表記するが、これは上でSEQ ID NO: 4として示した配列である。

【0046】

SAR-55のオープンリーディングフレームの推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3である。ORF-1はSEQ ID NO: 4のヌクレオチド28から始まり5078ヌクレオチド広がる。ORF-2はSEQ ID NO: 4のヌクレオチド5147から始まり1979ヌクレオチド広がる。ORF-3はSEQ ID NO: 4のヌクレオチド5106から始まり368ヌクレオチド広がる。

10

【0047】

DNA配列中の変異の結果、ORF-2タンパク質の類似物の産生を指示しうるDNA配列となることもありうると思われる。上述のDNA配列は、本発明の好ましい態様を表すものであることに注意されたい。遺伝コードの縮重により、上記のORFタンパク質またはその類似体の産生を指示しうるDNA配列とするのに、莫大なヌクレオチドの選択を行えることを、理解すべきである。従って、上述の配列と機能的に同じDNA配列、またはORFタンパク質の類似物を上述のアミノ酸配列に準じて産生するよう指示する配列と機能的に同じDNA配列は、本発明に含まれるものとする。

【0048】

本発明は生物試料中のE型肝炎ウイルスを、E型肝炎遺伝子断片の選択的増幅に基づいて検出する方法に関するものである。望ましい形では、本方法はDNA二重鎖断片の相補鎖の非相同領域に由来する一組の一本鎖プライマーを使用するが、そのDNA二重鎖断片はSEQ ID NO: 4に示したSAR-55配列に相同性をもつ領域を含むゲノムを有するE型肝炎ウイルスに由来するものである。これらのプライマーを、米国特許第4,683,202号に規定される特定の核酸配列の増幅過程に従う方法に用いることができる。

20

【0049】

本発明はまた、SAR-55 cDNAに相同性をもつ配列に由来する一本鎖アンチセンスのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを用いて、E型肝炎遺伝子の発現を阻害することに関するものである。これらのアンチセンスのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、DNAでもRNAでもよい。標的とする配列は典型的にはメッセンジャーRNAであり、より好ましいのはRNAのプロセッシングと翻訳に必要なシグナル配列である。アンチセンスのポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、レマイター、Mら(Lemaitre, M. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652)の記述のようにポリリジンなどのポリ陽イオンに結合することができ、この結合物の十分量を哺乳類に投与し、メッセンジャーRNAにハイブリダイズさせ、その機能を阻害することができる。

30

【0050】

本発明はHEVタンパク質の作製のための組換えDNA法を含み、HEVタンパク質として望ましいのは少なくとも一つのORFタンパク質から構成されるタンパク質、最も望ましいのは少なくとも一つのORF-2タンパク質から構成されるタンパク質である。組換えORFタンパク質は一つのORFタンパク質で構成されるか、または同種あるいは異なるORFタンパク質の組合せで構成される。天然の核酸配列または合成核酸配列を用いて、HEVタンパク質の産生を指示することができる。

40

【0051】

本発明の一つの態様では、方法は以下の工程を包含する：

- (a) 宿主生物にHEVタンパク質の産生を指示できる核酸配列を調製し；
- (b) 宿主生物に導入し複製できるベクターで、核酸配列に対する調節要素を含むようなベクターへ核酸配列をクローン化し；
- (c) タンパク質を発現できる宿主生物へ、核酸配列と調節要素を含むベクターを導入

50

し；

(d) ベクターの増幅とタンパク質の発現に適切な条件下で宿主生物を培養し；そして

(e) タンパク質を回収する。

【0052】

本発明のもう一つの態様では、HEVの核酸でコードされるタンパク質の組換えDNA合成法は以下のものを包含する。ここでHEVタンパク質は望ましくは少なくとも一つのHEV ORFでコードされるか、または同種あるいは異なるORFタンパク質の組合せでコードされ、最も望ましくは少なくとも一つのORF-2核酸配列でコードされる；

(a) 宿主生物を形質転換またはトランスフェクションして、宿主生物にタンパク質産生を指示しうる核酸配列を持たせ、タンパク質を産生する条件下でこれを培養すること。ここで前述のタンパク質は、HEVから単離されたSEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3の生来のHEVタンパク質、またはこの組み合わせと実質的に相同性を示すアミノ酸配列を持つものである。

10

【0053】

一つの態様ではHEV株SAR-55のウイルスゲノムのRNA配列を単離し、以下のようにクローン化しcDNAとした。SAR-55を感染させたカニクイザルから集めた生物試料より、ウイルスRNAを抽出した後、ウイルスRNAを逆転写し、Burma (タムラ (Tam et al.)) 由来のHEV株のゲノムまたはSAR-55ゲノムのプラス鎖またはマイナス鎖に相補的なプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅する。PCR断片はpBR322またはpGEM-32にサブクローン化し、二重鎖PCR断片の配列を決定した。

20

【0054】

本発明に用いることが考えられるベクターには、上に記載した核酸配列を望ましいまたは必要な任意の調節要素と共に挿入することが可能で、さらにその後宿主生物に導入し、そうした生物中で複製可能な全てのベクターが含まれる。望ましいベクターは制限部位がよく記録され、核酸配列の転写に望ましいまたは必要な調節要素を含むものである。

【0055】

本明細書で論じる「調節要素」には、少なくとも一つのプロモーター、少なくとも一つのオペレーター、少なくとも一つのリーダー配列、少なくとも一つの終止コドン、およびベクター上の核酸の適当な転写とその後の翻訳に必要なまたは望ましい配列全てを含む。特にこうしたベクターとして考えられるのは、宿主生物が認識する少なくとも一つの複製起点を含み、また少なくとも一つの選択マーカー、核酸配列の転写開始を可能とする少なくとも一つのプロモーター配列が存在するものである。

30

【0056】

本発明のクローン化ベクターの構築では、核酸配列とこれに付随する調節要素を多コピーで各ベクターに挿入できることを、付加的に記さねばならない。こうした態様では宿主生物は、望みのHEVタンパク質をベクターあたり大量に産生する。ベクターに挿入できるDNA配列の多コピー数を制限するのは、結果として生じるベクターがその大きさと、適当な宿主微生物に導入され複製、転写される能力を持つか否かだけである。

【0057】

もう一つの態様では、HEVタンパク質のコーディング配列を含んだ制限酵素消化断片を、原核または真核細胞中で機能する適当な発現ベクターに挿入することができる。ここで適当というのは、HEVタンパク質をコードする完全な核酸配列を、望ましくは少なくとも一つの完全なORFタンパク質をコードする完全な核酸配列を、ベクターが運搬し発現できることを意味する。ORF-2の場合には、発現されたタンパク質はウイルス様の粒子を形成しなければならない。望ましい発現ベクターは、真核細胞で機能するものである。こうしたベクターの例にはワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス、望ましいものとしてバキュロウイルス導入ベクターであるpBlueBacが含まれるが、これらに制限される訳ではない。望ましいベクターは完全なORF-2遺伝子を含むp63-2、および完全なORF-3とORF-2遺伝子を含むP59-4

40

50

である。これらのベクターは1992年9月10日にAmerican Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USAに寄託された。実施例1はORF-2遺伝子をpBlueBacにクローン化しp63-2を作製した例を説明している。この方法に含まれるのは、SAR-55 HEV株のゲノムの制限酵素NruIおよびBglIIによる消化、ベクター上の唯一のNheI部位へのBlnIIおよびBglII部位を含むポリリンカーの挿入、およびNruI-BglII ORF-2断片のBlnI-BglII Pbluebacへのアダプターを用いた挿入である。

#### 【0058】

さらにもう一つの態様では、組換えタンパク質の発現を目的として、選択した組換え発現ベクターを適当な真核細胞系に導入することもできる。こうした真核細胞系に含まれるのは、HeLa、MRC-5またはCv-1などの細胞系であるが、これらに制限される訳ではない。望ましい真核細胞系はSF9昆虫細胞である。一つの望ましい方法にはPbluebac発現ベクターの使用が含まれるが、ここでは昆虫細胞系SF-9を組換えPbluebacとAcMNPVバキュロウイルスDNAでCa沈澱法により同時形質転換する。

#### 【0059】

発現した組換えタンパク質は当該分野で知られる方法で検出することができ、これにはクマジーブルー染色、および実施例2に示すような抗HEV抗体を含んだ血清を用いたウェスタンブロッティングが含まれる。もう一つの方法は実施例3に示すような、免疫電子顕微鏡によるウイルス様粒子の検出である。

#### 【0060】

さらに他の態様では、SF-9細胞で発現された組換えタンパク質を粗抽出物として調製したり、または当該分野で知られる標準的なタンパク質精製操作で精製することも可能であり、こうした操作には分離沈澱、分子ふるいクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、等電点焦点電気泳動、ゲル電気泳動、親和性および免疫親和性クロマトグラフィーなどが含まれる。免疫親和性クロマトグラフィーの場合には、ORFタンパク質に特異的な抗体を結合させたレジンを含むカラムを通過させることで、組換えタンパク質を精製できる。

#### 【0061】

もう一つの態様では、本発明で発現した組換えタンパク質を用いて、哺乳類のE型肝炎の診断、予後のための免疫検定を行うことができる。ここで哺乳類にはヒト、チンパンジー、旧世界サル、新世界サル、その他の霊長類などが含まれるが、これに制限される訳ではない。望ましい態様では、免疫検定はヒトのE型肝炎感染の診断に有用である。HEVタンパク質、特にORFタンパク質、とりわけORF-2タンパク質を用いた免疫検定は、部分的なORFタンパク質を用いた免疫検定とは対照的に、特異性、感受性、再現性の高いHEV感染の診断法を供給する。

#### 【0062】

本発明の免疫検定は放射性免疫検定、ウェスタンブロット検定、免疫蛍光検定、酵素免疫検定、化学発光検定、免疫組織化学検定などでよい。当該技術分野で知られる標準的なELISAの手法は、Methods in Immunodiagnosis, 2nd Editionローズとピガッツ編(Rose & Bigazzi eds.) John Wiley and Sons, 1980とキャンベルら(Campbell et al.) Methods of Immunology W.A. Benjamin, Inc., 1964に記載されており、両者は本明細書に参考文献として取り入れている。こうした検定は当該技術分野に記載されているように、直接、間接、競争または非競争の免疫検定でありうる。(オレリッヒ, M(Ollerich, M. 1984. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 895-904)こうした検出検定に適した生物試料に含まれるのは、組織生検抽出物、全血液、血漿、血清、脳脊髄液、胸膜液、尿などが含まれるが、これらに限定される訳ではない。

10

20

30

40

50

## 【0063】

一つの態様では、試験する血清を固体相試薬と反応させるが、この固体相試薬の表面には組換えHEVタンパク質を抗原として結合しており、特に一つのORFタンパク質またはORF-2およびORF-3といった異なるORFタンパク質の組合せを、抗原として結合してあるのが望ましい。より望ましい形では、HEVタンパク質はウイルス様粒子を形成するORF-2タンパク質である。固体表面試薬は、タンパク質を固体支持物質に結合させる既知の手法により調製できる。こうした結合法にはタンパク質の支持体への非特異的吸収、または支持体上の反応基へのタンパク質の共有結合が含まれる。抗原を抗HEV抗体と反応させた後、結合しなかった血清成分を洗浄して除き、抗原抗体複合体を、標識した抗ヒト抗体などの二次抗体と反応させる。固体支持体を適当な蛍光または比色試薬の存在下でインキュベートすることにより検出できるような酵素を、標識として用いることもできる。放射性標識または金コロイドなどの他の検出標識を用いることもできる。

10

## 【0064】

望ましい態様では、SAR-55のORF-2配列全体を含んだPbluebac組換えベクターにより発現されるタンパク質は、抗HEV抗体、望ましい形ではIgGまたはIgM抗体を検出する特異的な結合試薬として使用できる。実施例4および5は、固体相試薬が組換えORF-2を表面抗原としてもつようなELISAの結果を示す。ORF-2核酸配列全体でコードされるこのタンパク質は、部分的なORF-2タンパク質より優れる。なぜならHEVを感染させた異なる霊長類種のより多くの抗血清に対して、このタンパク質は部分的なORF-2抗原よりも反応するからである。本発明のタンパク質はHEVの異なる株に应答して産生された抗体も検出できるが、A型、B型、C型肝炎またはD型肝炎に应答した抗体は検出しない。

20

## 【0065】

HEVタンパク質およびその類似体は単体として、または二次抗体などの他の試薬との組合せとして、免疫検定用のキットの形で調製できる。

本発明の組換えHEVタンパク質は、望ましい形では単独のORFタンパク質またはORFタンパク質の組合せ、さらに望ましいのはORF-2タンパク質であるが、このタンパク質および実質的に相同性をもつタンパク質、および類似体は、哺乳類のE型肝炎による感染を防ぐワクチンとして用いることができる。免疫原として作用するワクチンは、細胞、組換え発現ベクターで形質転換した細胞の細胞溶解物または発現されたタンパク質を含んだ培養上清が考えられる。この代わりに免疫原は部分的または実質的に精製された組換えタンパク質でもよい。免疫原を純粋な形または実質的に純粋な形で投与することも可能であるが、薬剤組成物、処方薬、製剤として提示する方が望ましい。

30

## 【0066】

本発明の処方薬は、家畜の治療およびヒトへの用法のいずれでも、上に記載の免疫原と薬学的に受理できる一種または複数の担体、および随意に他の治療上の成分を含む。担体は、処方薬中の他の成分と両立し、薬の受血者に有害ではないという意味で「受容できる」ものでなければならない。処方薬は投薬量単位という形で便利に提示することが可能であり、薬学技術分野でよく知られるいかなる方法でも調製できる。

## 【0067】

全ての方法には、活性のある成分を一種または複数の付属成分を構成する担体と結合させる段階が含まれる。一般に処方薬の調製の際には、均一かつ精細に活性のある成分を、液体担体または細かく砕いた固体担体またはその両者に結合させ、後に必要であれば調製物を望みの処方薬の形にする。

40

## 【0068】

静脈、筋肉、皮下、腹腔内投与に適した処方薬は、披投与者の血液と等張であることが望ましい溶液に、活性のある成分を溶かした無菌水溶液を含むのが、便利である。こうした処方薬を調製するには、塩化ナトリウム（たとえば0.1-2.0M）、グリシンなどの生理的に害のない基質を含み、水溶液を作製するのに生理的条件と両立するような緩衝化Phをもつ水に固体活性成分を溶解させ、この水溶液を滅菌するのが便利である。これ

50

らはたとえば封印したアンプルまたはバイアル瓶といった、投薬量単位または複数の投薬量の入った入れ物で提供することもできる。

#### 【0069】

本発明の処方薬は安定剤を含むこともできる。実例となる安定剤はポリエチレングリコール、タンパク質、糖、アミノ酸、無機酸、有機酸であり、これらは単独でまたは添加物として用いることができる。これらの安定剤は免疫原の単位重量あたり0.11 - 10, 000の重量部で取り込ませるのが望ましい。二種またはそれ以上の安定剤を用いるのであれば、その総量を上に規定した範囲内にするのが望ましい。これらの安定剤は適当な濃度とPhの水溶液で用いる。こうした水溶液の特異的浸透圧は一般に0.1 - 3.0オスモルの範囲で、0.8 - 1.2の範囲が望ましい。水溶液のPhは5.0 - 9.0の範囲

10

#### 【0070】

作用の持続期間を制御するために、付加的な薬学的方法を使用することもできる。制御放出製剤は、重合体を用いてタンパク質およびその派生物を複合体とする、または吸収させることで作製することができる。制御された放出を果たすには、適当な巨大分子（たとえばポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニル酢酸、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン）を選択し、巨大分子の濃度と、制御放出のための取り込みの方法を選択すればよい。制御放出製剤による作用の持続期間の制御として可能なもう一つの方法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ハイドロゲル、ポリ酪酸、エチレンビニル酪酸共重合体などの重合体物質の粒子に、タンパク質、タンパク質類似体およびこれらの機能的な派生物を取り込ませることである。一方これらの試薬を重合体粒子に取り込ませる代わりに、これらの物質を微量カプセルまたはコロイド薬剤放出系またはマクロ乳剤に入れることも可能であり、こうしたカプセルの調製はたとえばコアセルベーション技術や界面重合化が考えられ、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン微量カプセル、ポリメチルメタクリレート微量カプセルを例として挙げられるし、コロイド薬剤放出系としてたとえばリポソーム、アルブミン微小球、微小乳剤、ナノ粒子、ナノカプセルが考えられる。

20

#### 【0071】

経口調剤が望ましい場合には、組成物を取りわけラクトース、スクロース、デンプン、ステアリン酸マグネシウムタルク、クリスタリンセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴムといった典型的な担体に結合させることもできる。

30

#### 【0072】

本発明のタンパク質は、キットの形で、単独で、または上に記載した薬剤組成物の形で供給することもできる。

ワクチン化は一般的な方法で行える。たとえば生理的食塩水または水などの適当な希釈剤中で、または完全あるいは不完全なアジュバント中で免疫原を用いることができる。さらに免疫原を担体に結合させて、免疫原タンパク質を作製することもできるし、また特にそのようにしなくてもよい。こうした担体分子の例にはウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、破傷風トキソイドなどが含まれるが、これに制限される訳ではない。免疫原は、静脈、腹腔内、筋肉、皮下などの抗体作製に適当ないかなる経路によっても、投与することができる。免疫原は有意な力価の抗HEV抗体が産生されるまで、一回または定期的な期間で投与する。血清中の抗体は、免疫検定を用いて検出できる。

40

#### 【0073】

本発明の免疫原の投与は予防または治療を目的とすることができる。予防のための供給の場合には、免疫原はHEVへのいかなる被曝よりも先んじて、あるいはHEV感染によるいかなる徴候よりも先んじて投与される。免疫原を予防用として投与することで、哺乳類でのその後のHEVのいかなる感染をも防止あるいは緩和することができる。治療用と

50

して供給する際には、感染の始めに（またはそのすぐ後に）、またはH E Vに起因する感染または症状の始めに、免疫原を投与する。免疫原を治療投与することで、感染または症状を緩和できる。

【0074】

望ましい態様はH E V株S A R - 55のO R F - 2配列で発現される組換えO R F - 2タンパク質、またはその同等物を用いて調製したワクチンである。O R F - 2タンパク質は様々なH E V陽性血清に反応することが既に示されているので、様々なH E V株に対する防御の際のこれらの有用性が指摘される。

【0075】

ワクチンとして用いるのに加えて、本組成はH E V用粒子に対する抗体の調製に用いることができる。抗体は直接抗ウイルス試薬として用いることができる。抗体を調製するには、ウイルス粒子、または適切な場合には、ウイルス粒子の生来の非粒子抗原を上に記載したような担体に結合させてワクチンとしたものを用いて、宿主動物を免疫する。宿主の血清または血漿を、適当な時間間隔の後に集めて、ウイルス粒子に反応する抗体を含む組成物を供給する。ガンマグロブリン画分またはI g G抗体を、たとえば飽和硫酸アンモニウムやD E A E S e p h a d e xまたは当業者の既知の他の手法を用いることで、調製できる。こうした抗体は、薬剤などの他の抗ウイルス試薬に付随する多くの有害な副作用を実質的に持たない。

【0076】

抗体組成物は、潜在する有害な免疫系応答を低減することで、さらに宿主系に害の少ないものとすることができる。これは外来種の抗体のF c部分の全体または一部を取り除くか、宿主動物と同種の抗体たとえばヒト/ヒトハイブリドーマ由来の抗体を用いることにより、可能となる。ヒト化された抗体（すなわちヒトでは免疫原とならない）を作製するには、たとえば抗体の免疫原となる部分を、対応するが免疫原とはならない部分で置換すればよい（すなわちキメラ抗体）。こうしたキメラ抗体は、一つの種由来の抗体の反応性部分または抗原結合部分と、異なる種の抗体のF c部分（免疫原とならない）を含んでいる。キメラ抗体の例には、ヒト以外の哺乳類とヒトのキメラ、齧歯類とヒトのキメラ、マウスとヒトおよびラットとヒトのキメラが含まれるが、これに限定されない。（ロビンソンら（Robinson et al.）国際特許出願（International Patent Application）184,187；タニグチ M.（Taniguchi M.）欧州特許出願（European Patent Application）171,496；モリソンら（Morrison et al.）欧州特許出願（European Patent Application）173,494；ノイバーガーら（Neuberger et al.）PCT出願WO/86/01533；カビリイら（Cabilly et al.），1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439；ニシムラら（Nishimura et al.），1987 Canc. Res. 47:999；ウッドら（Wood et al.），1985 Nature 314:446；ショーら（Shaw et al.）1988 J. Natl. Cancer Inst. 80:15553、これらは全て本明細書に参考文献として取り込んだ。）

”ヒト化”キメラ抗体についての概論は、モリソンおよびオイらにより提供されている。Morrison S., 1985 Science 229:1202およびOiet al., 1986 BioTechniques 4:214

適切な”ヒト化”抗体は、CDRまたはCEA置換によってつくられる（ジョーンズら、Jones et al., 1986 Nature 321:552；ヴァーホイアンら、Verhoeyan et al., 1988 Science 239:1534；ビードレレットら、Biedler et al., 1988 J. Immunol. 141:4053, 参照により本明細書に含まれる）。

【0077】

抗体または抗原結合断片は、また遺伝子工学によってもつくられる。大腸菌で重鎖およ

10

20

30

40

50

び軽鎖遺伝子を発現させる技術は、PCT特許出願の国際公開番号W0901443, W0901443およびW09014424、およびフセラHuse et al., 1989 Science 246:1275-1281の主題とされている。

【0078】

抗体はまた免疫反応を増強させる方法としても使用できる。抗体は、他の治療上の抗体の投与と同程度の量投与できる。例えば、狂犬病、はしか、およびB型肝炎などの他のウイルス病の初期潜伏期に、プールしたガンマグロブリンがウイルスの細胞への侵入を阻止するため、体重1ポンド当たり0.02-0.1ml投与される。そこで、HEVウイルス顆粒と反応する抗体は、HEVが感染した宿主に、免疫反応および/または抗ウイルス薬剤の効果を増強するため、単独で、または他の抗ウイルス薬剤とともに受動的に投与できる。

10

【0079】

また、抗HEV抗体は、抗原として抗イデオタイプ抗体を投与することで誘導できる。好適には、上に記載された様な精製抗HEV抗体の調製物を宿主動物でイデオタイプ抗体を誘導するのに用いる。調製物が適当な希釈で宿主動物へ投与される。投与に続いて、通常は繰り返しの投与に続いて、宿主は抗イデオタイプ抗体を産生する。Fc領域に対する抗原反応を排除するために、宿主動物と同種の動物によって産生された抗体を用いるか、または、投与する抗体のFc領域を除いて用いてもよい。宿主動物での抗イデオタイプ抗体の誘導に続き、血清または血漿を採取して抗体調製物を産する。抗体調製物は、抗HEV抗体について上に記載されたようにして、または親和性マトリクスに結合された抗HEV抗体を用いた親和性クロマトグラフィーによって、精製される。産生された抗イデオタイプ抗体は構造的に本来のHEV抗原に似ており、HEV粒子抗原を用いる代わりにHEVワクチンを調製するのに用いられる。

20

【0080】

動物中で抗HEVウイルス抗体を誘導する方法としてもちられる場合、抗体を注入する方法は、予防接種を目的とする場合と同様である。つまり、アジュバントを用いたり、あるいは用いないで、生理学的に適切な希釈液で希釈した効果的濃度で筋肉、腹腔、皮下などへ行う注射である。1回以上の追加投与を用いるのが望ましい。

【0081】

本発明のHEV由来タンパク質はまた、感染前予防、または感染後予防のために計画的に抗血清を産生するのに用いられる。ここでは、ひとつのHEVタンパク質またはタンパク質の混合物が、ヒト抗血清を産生する既知の方法に従って、適当なアジュバントとともに処方され、志願者(ボランティア)に注射によって投与される。注射されたタンパク質に反応する抗体は免疫処置後数週間にわたって、一定間隔で血清を取り、ここで記載された免疫アッセイを用いて抗HEV血清抗体の存在を同定することでモニターされる。

30

【0082】

免疫された人からの血清は、感染の危機にある人の前予防の方法として投与することもできる。血清はまた、B型肝炎ウイルスに対する高力価の抗血清の後予防としての使用の場合と同様に、後予防で用いるのにも有用である。

【0083】

HEVウイルス様粒子およびタンパク質に対する抗体および抗イデオタイプ抗体の生体内での(in vivo)使用および治療上での使用の両方でモノクローン抗体を用いることが好ましい。モノクローン抗ウイルス粒子抗体または抗イデオタイプ抗体は以下の方法で産生できる。免疫された動物から脾臓またはリンパ球を取り出し、不死化するか、または当業者には既知の方法でハイブリドーマを調製するのに用いる。(ゴードینگ、Goding, J.W. 1983. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Pladermic Press, Inc., NY, NY, pp56-97)。ヒト-ヒトハイブリドーマを産生するために、ヒトリンパ球の提供者が選択される。HEVに感染していることが分かっている提供者は(この場合、感染は例えば血液中の抗ウイルス抗体の存在によって、またはウイルス培養に

40

50

よって示される)、適当なリンパ球の提供者として役立つ。リンパ球は抹消の血液試料から単離できる。また、提供者が脾臓摘出を受けるなら脾臓細胞が用いられる。エプスタイン-バーウイルス(EBV)がヒトリンパ球を不死化するのに用いられる。また、ヒト融合パートナーがヒト-ヒトハイブリドーマを産生するのに用いられる。主に試験管内での(in vitro)ペプチドを用いた免疫化がまた、ヒトモノクローン抗体を産するのに用いられる。

#### 【0084】

不死化細胞から分泌された抗体は、望まれた特異性をもつ抗体を分泌するクローンを決定するために選別される。モノクローン抗ウイルス粒子抗体としては、抗体はHEVウイルス粒子に結合しなければならない。モノクローン抗イデオタイプ抗体としては、抗ウイルス粒子に結合しなければならない。望まれる特異性をもつ抗体を産する細胞が選択される。

10

#### 【0085】

上述の抗体およびその抗原結合断片は単独のキットの形態で、または生体内使用用の薬剤組成物として供給される。抗体は、治療用、免疫アッセイでの診断用、または本明細書中に記載されたようなORFタンパク質を精製するための免疫親和性試薬として用いられる。

#### 【実施例】

#### 【0086】

##### 材料

以下の実施例で用いられる材料はいかのようなものであった：

霊長類 . チンパンジー (Chimp) (Pan troglodytes)。旧世界サル：カニクイザル (Cyno) (Macaca fascicularis)、アカゲザル (Rhesus) (M. mulatta)、ブタオザル (PT) (M. nemestrina)、およびアフリアカミドリザル (AGM) (Cercopithecus aethiops)。新世界サル：クチヒゲタマリン (Tam) (Saguinus mystax)、リスザル (SQM) (Saimirisciureus)、およびヨザル (OWL) (Aotus trivigatus)。霊長類は生物学的危険物の封じ込め条件下で一匹ずつ飼われた。動物の飼育場、飼育、および世話は、霊長類の飼育上のすべての要求にかなっていたか、十分すぎるほど満たしていた。

20

30

#### 【0087】

多くの動物は、ツアレヴら (Tsarev, S. A. et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 559-563、および Tsarev, S. A. et al. (1992), J. Infect. Dis. (投稿中)) によって記載されたようにウシ胎児血清で希釈された 0.5 ml の便 (stool) 懸濁液中に含まれた HEV、SAR-55 株を静脈注射された。Chimp-1313 および 1310 は 7 人のパキスタン人 E 型肝炎の患者から採集した便のプールを接種された。

#### 【0088】

血清試料は接種の前と後のほぼ週 2 回採集された。肝臓の酵素、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、イソシトレートデヒドロゲナーゼ (ICD)、およびガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT) が商品化された試験法を用いてアッセイされた (メドパス社、メリーランド州ロックビル、Medpath Inc., Rockville, MD)。血清学的試験は上記のように行った。

40

#### 【0089】

##### 実施例 1

##### HEV SAR-55 株のゲノムの DNA 配列の同定

PCR 用の鋳型ウイルス RNA の調製 HEV 感染カニクイザルの胆汁 (10 µl)、20% (wt/vol) SDS (最終濃度 1%)、プロテイナーゼ K (10 mg/ml; 最終濃度 1 mg/ml)、1 µl の tRNA (10 mg/ml)、および 3 µl の 0.5 M EDTA を最終的に 250 µl として混合し、30 分間 55 度で保温した。全核酸を胆

50

汁から、フェノール/クロロフォルム、1:1 (vol/vol) を用いて65度で2回、クロロフォルムを用いて1回処理し抽出し、エタノールで沈殿させ、95%エタノールで洗い、RT-PCRに用いた。糞からの、特に血清からのHEV RNAのRT-PCR増幅は、RNAがもっと大量に精製された場合に、より効果的である。血清(100 $\mu$ l)または10%糞懸濁液(200 $\mu$ l)を上記のようにプロテイナーゼKで処理した。30分の保温の後、300 $\mu$ lのCHAOSバッファー(4.2Mグアニジンチオシアネート/0.5N ラウロイルサルコシン/0.025M Tris-HCl, pH 8.0)を加えた。核酸は65度でフェノール/クロロフォルムを用いて2回、続いて室温でクロロフォルムを用いて1回処理し抽出した。そして、上層に7.5M酢酸アンモニウム(225 $\mu$ l)を加え、核酸を0.68mlの2-プロパノールで沈殿させた。沈殿を300 $\mu$ lのCHAOSバッファーで融解し、100 $\mu$ lの水を加えた。クロロフォルム抽出および2-プロパノール沈殿を繰り返した。核酸を水に溶かし、エタノールで沈殿させ、95%エタノールで洗い、RT-PCRに用いた。

10

## 【0090】

プライマー 21-40ヌクレオチド(nt)で、ビルマからのHEV株(BUR-121)(タムら、Tam, A.W. et al. (1991), *Virology*, 185:120-131)のゲノムまたはSAR-55ゲノムのプラスまたはマイナス鎖に相補的である、94個のプライマーをアプライドバイオシステムズモデル391 DNA合成機(Applied Biosystems model 391 DNA synthesizer)を用いて合成した。

20

## 【0091】

これらの94個のプライマーの配列はSEQ ID NO:5からはじまりSEQ ID NO:98まで以下に示してある:

HEVプライマーリスト

## 【0092】

【化 2 0】

		OFR			
	<u>プライマー</u>	<u>領域</u>	<u>配列</u>		
D	3042 B	1	ACATTTGAATTCACAGACAT TGTGC	(SEQ. ID. NO. 5)	
R	3043 B	1	ACACAGATCTGAGCTACATT CGTGAG	(SEQ. ID. NO. 6)	
D	3044 B	1	AAAGGGATCCATGGTGTTTG AGAATGZ	(SEQ. ID. NO. 7)	10
R	3045 B	1	ACTCACTGCAGAGCACTATC GAATC	(SEQ. ID. NO. 8)	
R	261 S	1	CGGTAAACTGGTACTGCACA AC	(SEQ. ID. NO. 9)	
D	260 S	1	AAGTCCCGCTCTATTACCCA AG	(SEQ. ID. NO. 10)	
D	259 S	1	ACCCACGGGTGTTGGTTTTT G	(SEQ. ID. NO. 11)	
R	255 S	1	TTCTTGGGGCAGGTAGAGAA G	(SEQ. ID. NO. 12)	20
R	254 S	2	TTATTGAATTCATGTCAACG GACGTC	(SEQ. ID. NO. 13)	
D	242 S	1	AATAATTCATGCCGTCGCTC C	(SEQ. ID. NO. 14)	
R	241 S	1	AAGCTCAGGAAGGTACAAC C	(SEQ. ID. NO. 15)	
R	231 S	1	AAATCGATGGCTGGGATCTG ATTC	(SEQ. ID. NO. 16)	
R	230 S	1	GAGGCATTGTAGAGCTTTGT G	(SEQ. ID. NO. 17)	30
D	229 S	1	GATGTTGCACGGACAGCAAA TC	(SEQ. ID. NO. 18)	
D	228 S	1	ATCTCCGATGCAATCGTTAA TAAC	(SEQ. ID. NO. 19)	
D	227 B	1	TAATCCATTCTGTGGCGAGA G	(SEQ. ID. NO. 20)	
R	218 B	2	AAGTGTGACCTTGGTCCAGT C	(SEQ. ID. NO. 21)	
D	217 B	2	TTGCTCGTGCCACAATTCGC TAC	(SEQ. ID. NO. 22)	40

【0 0 9 3】

## 【化 2 1】

D	211	B	1	CATTTCACTGAGTCAGTGAA GZ	(SEQ. ID. NO. 23)	
D	202	B	2	TAATTATAACACQACTGCTA G	(SEQ. ID. NO. 24)	
R	201	B	2	GATTGCAATACCCTTATCCT G	(SEQ. ID. NO. 25)	
R	200	S	1	ATTAAACCTGTATAGGGCAG AAC	(SEQ. ID. NO. 26)	
R	199	S	1	AAGTTCGATAGCCAGATTTG C	(SEQ. ID. NO. 27)	10
R	198	S	2	TCATGTTGGTTGTCATAATC C	(SEQ. ID. NO. 28)	
R	193	B	1	GATGACGCACTTCTCAGTGT G	(SEQ. ID. NO. 29)	
R	192	B	1	AGAACAACGAACGGAGAAC	(SEQ. ID. NO. 30)	
D	191	B	1	AGATCCCAGCCATCGACTTT G	(SEQ. ID. NO. 31)	
R	190	S	2	TAGTAGTGTAGGTGAAATA G	(SEQ. ID. NO. 32)	20
D	189	B	2	GTGTGGTTATTCAGGATTAT G	(SEQ. ID. NO. 33)	
D	188	B	2	ACTCTGTGACCTTGGTTAAT G	(SEQ. ID. NO. 34)	
R	187	S	2	AACTCAAGTTCGAGGGCAAA G	(SEQ. ID. NO. 35)	
D	186	S	2	CGCTTACCCTGTTTAACCTT G	(SEQ. ID. NO. 36)	
D	185	B	2,3	ATCCCCTATATTCATCCAAC CAAC	(SEQ. ID. NO. 37)	30
D	184	S	2,3	CTCCTCATGTTTCTGCCTAT G	(SEQ. ID. NO. 38)	
R	181	S	2	GCCAGAACGAAATGGAGATA GC	(SEQ. ID. NO. 39)	
R	180	B	1	CTCAGACATAAAACCTAAGT C	(SEQ. ID. NO. 40)	
D	179	S	1	TGCCCTATACAGGTTTAATC G	(SEQ. ID. NO. 41)	40
D	178	B	1	ACCGGCATATAACCAGGTGC	(SEQ. ID. NO. 42)	
D	177	B	2	ACATGGCTCACTCGTAAATT C	(SEQ. ID. NO. 43)	
R	174	B	1	AACATTAGACGCGTTAACGA G	(SEQ. ID. NO. 44)	

## 【0 0 9 4】

## 【化 2 2】

D	173	S	1	CTCTTTTGATGCCAGTCAGA G	(SEQ. ID. NO. 45)	
D	172	B	1	ACCTACCCGGATGGCTCTAA GG	(SEQ. ID. NO. 46)	
R	166	B	2	TATGGGAATTCGTGCCGTCC TGAAG (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 47)	
R	143	B	1	AGTGGGAGCAGTATACCAGC G	(SEQ. ID. NO. 48)	
D	141	B	1	CTGCTATTGAGCAGGCTGCT C	(SEQ. ID. NO. 49)	10
R	142	S	1	GGGCCATTAGTCTCTAAAAC C	(SEQ. ID. NO. 50)	
D	135	B	1	GAGGTTTTCTGGAATCATC	(SEQ. ID. NO. 51)	
R	134	B	1	GCATAGGTGAGACTG	(SEQ. ID. NO. 52)	
R	133	B	1	AGTTACAGCCAGAAAACC	(SEQ. ID. NO. 53)	
D	132	S	2,3	CCATGGATCCTCGGCCTATT TTGCTGTTGCTCC (Bam HI)	(SEQ. ID. NO. 54)	
D	131	B	5'NC	AGGCAGACCACATATGTG	(SEQ. ID. NO. 55)	20
R	119	B	1	GGTGCACCTCCTGACCAAGCC	(SEQ. ID. NO. 56)	
D	118	B	1	ATTGGCTGCCACTTTGTTC	(SEQ. ID. NO. 57)	
R	117	B	1	ACCCTCATACGTCACCACAA C	(SEQ. ID. NO. 58)	
R	116	B	1	GCGGTGGACCACATTAGGAT TATC	(SEQ. ID. NO. 59)	
D	115	B	1	CATGATATGTCACCATCTG	(SEQ. ID. NO. 60)	
D	114	B	1	GTCATCCATAACGAGCTGG	(SEQ. ID. NO. 61)	
R	112	B	2	AGCGGAATTCGAGGGCGGC ATAAAGAACCAGG (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 62)	30
R	111	B	2	GCGCTGAATTCGGATCACAA GCTCAGAGGCTATGCC (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 63)	
D	110	B	2	GTATAACGGATCCACATCTC CCCTTACCTC (Bam HI)	(SEQ. ID. NO. 64)	
D	109	B	2	TAACCTGGATCCTTATGCCG CCCCTCTTAG (Bam HI)	(SEQ. ID. NO. 65)	
D	108	B	1	AAATTGGATCCTGTGTCGGG TGGAATGAATAACATGTC (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 66)	40
R	107	B	1	ATCGGCAGATCTGATAGAGC GGGACTTGCCGGATCC	(SEQ. ID. NO. 67)	
D	101	B	2	TACCCTGCCC GCCCATAAC TTTTGATG	(SEQ. ID. NO. 68)	

## 【0095】

## 【化 2 3】

R	100 B	1	GGCTGAGATCTGGTTCCGGT CGCCAAGAAGGTG (Bgl II)	(SEQ. ID. NO. 69)	
R	99 B	2	TACAGATCTATACTAA CAGTCGG (Bgl II)	(SEQ. ID. NO. 70)	
R	98 B	2	GCGGCAGATCTCACCGACAC CATTAGTAC (Bgl II)	(SEQ. ID. NO. 71)	
D	97 S	1	CCGTCGGATCCCAGGGGCTG CTGTCCTG (Bam HI)	(SEQ. ID. NO. 72)	
R	96 B	2	AAAGGAATTCAGACCAGAG GTAGCCTCCTC (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 73)	10
D	95 B	2	GTTGATATGAATTCATAAC CTCGACGG	(SEQ. ID. NO. 74)	
R	94 B	3'NC	TTTGGATCCTCAGGGAGCGC GGAACGCAGAAATGAG (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 75)	
D	90 B	2	TCACTCGTGAATTCCTATAC TAATAC (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 76)	
R	89 B	3'NC	TTTGGATCCTCAGGGAGCGC GGAACGCAGAAATG (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 77)	20
R	88 B	1	TGATAGAGCGGACTTGCCG GATCC (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 78)	
R	87 B	1	TTGCATTAGGTTAATGAGGA TCTC	(SEQ. ID. NO. 79)	
D	86 B	1	ACCTGCTTCCTTCAGCCTGC AGAAG	(SEQ. ID. NO. 80)	
R	81 B	1	GCGGTGGATCCGCTCCCAGG CGTCAAAC (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 81)	
D	80 B	1	GGGCGGATCGAATTCGAGAC CCTTCTTG (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 82)	30
R	79 B	1	AGGATGGATCCATAAGTTAC CGATCAG (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 83)	
D	78 B	1	GGCTGGAATTCCTCTGAGGA CGCCCTCAC (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 84)	
R	77 B	1	GCCGAAGATCTATCGGACAT AGACCTC (Bgl II)	(SEQ. ID. NO. 85)	
R	76 B	2	CAGACGACGGATCCCCTTGG ATATAGCCTG (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 86)	
D	75 B	5'NC	GGCCGAATTCAGGCAGACCA CATATGTGGTTCGATGCCATG (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 87)	40
D	72 B	1	GCAGGTGTGCCTGGATCCGG CAAGT (BamHI)	(SEQ. ID. NO. 88)	
R	71 B	1	GTTAGAATTCGGCCCAGCT GTGGTAGGTC (EcoRI)	(SEQ. ID. NO. 89)	

## 【0 0 9 6】

## 【化24】

D	63 B	1	CCGTCCGATTGGTCTGTATG CAGG	(SEQ. ID. NO. 90)	
D	61 B	1	TACCAGTTTACTGCAGGTGT GC	(SEQ. ID. NO. 91)	
D	60 B	1	CAAGCCGATGTGGACGTTGT CG	(SEQ. ID. NO. 92)	
R	59 B	2,3	GGCGCTGGGCCTGGTCACGC CAAG	(SEQ. ID. NO. 93)	
D	50 B	1	GCAGAACTAGTGTGACCC AG	(SEQ. ID. NO. 94)	10
R	49 B	2	TAGGTCTACGACGTGAGGCA AC	(SEQ. ID. NO. 95)	
R	48 B	1	TACAATCTTTCAGGAAGAAG G	(SEQ. ID. NO. 96)	
R	47 B	1	CCCACACTCCTCCATAATAG C	(SEQ. ID. NO. 97)	
D	46 B	1	GATAGTGCTTTCAGTGAGT ACCG	(SEQ. ID. NO. 98)	20

## 【0097】

配列の左の略語は以下のものを表す：RおよびDはそれぞれ逆向き (reverse) および純向き (forward) プライマーを表す；BおよびSはそれぞれE型肝炎のBurma-121株およびE型肝炎のSAR-55株由来の配列を表す；5'NCおよび3'NCはそれぞれHEVゲノムの5'および3'ノンコーディング領域を表す；1,2および3はそれぞれオープンリーディングフレーム1,2および3由来の配列を表す。幾つかの配列の右側に示した( )の記号はこれらの配列に人為的に挿入した制限酵素部位を表す。

## 【0098】

PCR断片のクローニング用に、3-7nt上流にEcoRI, BamHIまたはBglII制限酵素部位をプライマーの5'末端に加えた。

RT-PCR 通常の100μlのRT-PCR混合液は、鋳型、10mM Tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、4種すべてのdNTPs (それぞれ0.2mM)、50pmolのダイレクトプライマー、50pmolのリバースプライマー、40unitsのRNasin (プロメガ Promega)、16unitsの鳥のミエロプラストシスウイルス逆転写酵素 (プロメガ)、4unitsのAmpli Taq (シータス Cetus) からなり、100μlの軽ミネラルオイルをのせた。この混合液を、42度で1時間保温し、35回のPCRサイクルで増幅した；94度1分、45度1分、72度1分。PCR産物を1%アガロースゲルを用いて解析した。

## 【0099】

PCR断片のクローニング 末端に制限酵素部位をもつPCR断片を制限酵素EcoRIおよびBamHI、またはEcoRIおよびBglIIで消化し、EcoRI/BamHIで消化したpBR322またはpGEM-3Z (プロメガ) にクローン化した。あるいは、PCR断片をTAクローニングキット (インビトロゲン Invitrogen) を用いてpCR1000 (インビトロゲン) にクローン化した。

## 【0100】

PCR断片およびプラスミドの塩基配列決定 PCR断片を1%アガロースゲルから切り出し、ジーンクリーン (バイオ101 Bio 101、カリフォルニア州ラ ジョラ

10

20

30

40

50

）によって精製した。2本鎖PCR断片の塩基配列を、ウインシップ (W i n s h i p , P . R . ( 1 9 8 4 ) , N u c l e i c A c i d s R e v . , 1 7 : 1 2 2 6) により記載されているように、シークエナーゼ (ユナイテッドステーツ バイオケミカル U n i t e d S t a t e s B i o c h e m i c a l ) によって決定した。CsCl勾配により精製した2本鎖プラスミドの塩基配列を、シークエナーゼキット (ユナイテッドステーツバイオケミカル) を用いて決定した。

#### 【0101】

塩基配列のコンピュータ解析 HEV株のヌクレオチド配列をジェネティックス コンピュータグループ (ウイスコンシン州マジソン) ソフトウェアパッケージ (デベリユークスら D e v e r e a u x , J . e t a l . ( 1 9 8 4 ) , N u c l e i c A c i d s R e v . , 1 2 : 3 8 7 - 3 9 5 , v e r s i o n 7 . 5 , V A X 8 6 5 0 コンピュータを使用 (国立ガン研究所 the National Cancer Institute、メリーランド州フレデリック)) を用いて比較した。

10

#### 【0102】

##### 実施例2

##### 組換え発現ベクター、P63-2の構築

HEV株 SAR-55のゲノムのORF-2の全長を含むプラスミド (ツアレブラ T s a r e v , S . A . e t a l . ( 1 9 9 2 ) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 9 : 5 5 9 - 5 6 3) を N r u I - B g l I I 制限酵素断片を得るのに用いた。N r u I は HEV cDNAのORF-2のATG開始コドンの5ヌクレオチド上流を切断する。B g l I I 部位は、前以て、HEVゲノムの3'末端のポリA配列の直前に人為的におかれている (ツアレブラ ( 1 9 9 2 ) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 9 : 5 5 9 - 5 6 3)。この断片を p B l u e B a c - T r a n s f e r ベクター (インビトロゲン) に挿入するために、合成ポリリンカーをベクターの唯一の N h e I 部位に導入した。このポリリンカーは、HEV cDNA配列および p B l u e B a c 配列の両方に無い B l n I および B g l I I 部位を含む。N r u I - B g l I I ORF-2断片を、図1に示すようなアダプターを用いて B l n I - B g l I I p B l u e B a c に挿入した。

20

#### 【0103】

##### 実施例3

##### SF9昆虫細胞中でのP63-2の発現

p63-2およびAcMNPVバキュロウイルスDNA (Invitrogen社 (インビトロゲン)) を、インビトロゲン手順に従ったカルシウム沈澱法によってSF9細胞 (インビトロゲン) 中に共形質転換した一本手順に従って; AcMNPVバキュロウイルスDNAはp63-2をパッケージして組換えバキュロウイルスを形成できる生きたバキュロウイルスを生産できる。この組換えバキュロウイルスは、4回ブランク精製した。生じた組換えバキュロウイルス63-2-IV-2を昆虫SF9細胞を感染させるのに使用した。

30

#### 【0104】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット 昆虫細胞をローディング緩衝液 (50 mM トリス - 塩酸、pH 6.8、100 mM DTT、2% SDS、0.1% ブロモフェノールブルーおよび10% グリセロール) 中に再懸濁し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をラムリ (L a e m m l i )、イギリス (1970)、Nature、227:680に記載されたように行った。ゲルをクマシーブルーで染色するまたはタンパク質をBA-85ニトロセルロースフィルター (シュライヒャー (S c h l e i c h e r ) & シュエル (S c h u e l l ) ) 上に電気ブロットした。トランスファーの後、ニトロセルロースメンブレンを10% 胎児牛血清および0.5% ゼラチンを含むPBS中でブロックした。一次抗体として1:1000に希釈したチンパンジー-1313の高度免疫血清を使用した。二次抗体として、1:2000に希釈したヒトIgGに対するホスファターゼでラベルした親和精製済みのやぎ抗体 (K i r k e g a a r d & P e r

40

50

ry Laboratories, Inc.)を使用した。フィルターをアルカリホスファターゼに対する基質を固定したウエスタンブロー (Promega) 中で現像した。全てのインキュベーションはブロッキング溶液中で行い、洗いは0.05% トゥイーン-20 (Sigma) を含むPBSで行った。

#### 【0105】

HEV ORF-2の発現 組換えバキュロウイルス63-2-IV-2を感染させたSF9細胞中で合成される主要なタンパク質は、見かけの分子量74kDのタンパク質であった(図2A)。この大きさはORF-2全体から予測されるものよりも(71kD)少し大きい。大きさの違いは、N末端部分に少なくとも1つの潜在的な糖鎖付加部位(アスパラギン-ロイシン-セリン)が存在するため、タンパク質の糖鎖付加による可能性がある。このタンパク質は感染していない細胞または野生型の組換え体でないバキュロウイルスを感染させた細胞中では検出されなかった。後者の場合には、検出された主要なタンパク質は多面性ウイルス性タンパク質であった。同じ抽出物をチンパンジー-1313血清(HEVで高度に免疫済み)によるウエスタンブロットで解析すると、組換え細胞抽出物中のタンパク質のみが反応し、主要なバンドは再び74kDタンパク質として現れた(図2B)。少ない方のバンドはウエスタンブロットにおいてもまた存在した。これら中には糖鎖付加の程度の違いによる可能性がある74kDよりも大きい分子量のものがあり、また中にはプロセッシングおよび/または分解を反映したと思われるより低い分子量のものもあった。HEVで接種する前のチンパンジー-1313由来の血清は、ウエスタンブロットによるとどのタンパク質とも反応しなかった。

10

20

#### 【0106】

##### 実施例4

##### 組換え体を感染させたSF9細胞の免疫電子顕微鏡観察

組換え体を感染させたSF9細胞  $5 \times 10^6$  を、10mM トリス-塩酸、pH 7.4、0.3% サルコシルを含む塩化セシウム(1.30g/ml)中で音波処理し、68時間40,000rpmで遠心した(SW60Ti)。ELISA反応の最も高く、浮遊密度が1.30g/mlである50 $\mu$ lの画分を1ml PBS中に希釈し、5 $\mu$ lのチンパンジー-1313高度免疫血清を加えた。高度免疫血清は、先に感染させたチンパンジーに肝炎Eの第二の株(メキシコのHEV)で再免疫を行うことによって調製した。試料は1時間室温、それから一晩4でインキュベートした。免疫複合体をSW60Tiローターを使用して30,000rpm、4、2時間で沈澱させた。ペレットを蒸留水中に再溶解し、3%PTAでネガティブに染色し、炭素グリッドに載せて電子顕微鏡EM-10、Carl Zeiss、オーバーコッペン、ドイツ中で40,000倍率にて調べた。

30

#### 【0107】

##### VP Lの検出

野生型または組換え体バキュロウイルス63-2-IV-2を感染させた昆虫細胞由来の細胞抽出液を塩化セシウム密度勾配遠心によって画分化した。組換え体を感染させた昆虫細胞由来の塩化セシウム勾配の画分をチンパンジー-1313高度免疫血清と共にインキュベートすると、抗体で覆われたウイルス様の粒子(VLP)二種類が浮遊密度1.30g/mlの画分中に観察された: 1つは(図3A)、抗体で覆われた、HEVであることを示唆する大きさ(30nm)および形態的構造を持つ個々の粒子、2つ目は(図3B)、HEVより小さい粒子であるがその他はHEVに類似する抗体で覆われた粒子の塊(約20nm)であった。直接的な電子顕微鏡の使用は、ウイルス粒子に似ているが抗体が結合していないのでHEVとして確定できない、直径30および20nm等を含む非常にヘテロな集団の存在を示した。多くのIEM実験は、HEVゲノムのORF-2領域から合成される少なくともいくつかのタンパク質は粒子構造に組み立てられたことを示唆した。小さい方のタンパク質の比率が多い感染後期の昆虫細胞はELISAで常に良い結果を与えたことが観察された。従って、感染後期の組換え昆虫細胞の未分画抽出液を以下の試験におけるELISA用の抗原として使用した。

40

#### 【0108】

50

実施例 5

抗 H E V の完全な O R F - 2 を発現し、後に H E V の異なる株で感染させた昆虫細胞の抗原に基づく E L I S A による検出

63-2-IV-2 ウイルスを感染させた  $5 \times 10^6$  の S F 9 細胞を 1 m l の 10 m M トリス - 塩酸、p H 7 . 5、0 . 15 M 塩化ナトリウム中に再懸濁し、それから 3 回凍結と融解を行った。この懸濁液 10  $\mu$  l を 10 m l の炭酸緩衝液 ( p H 9 . 6 ) 中に溶解し、簡易マイクロタイター測定プレート ( F a l c o n ) を覆うのに使用した。血清試料を 1 : 20、1 : 400 および 1 : 8000、または 1 : 100、1 : 1000 および 1 : 10000 に希釈した。ウエスタンブロット用に上記に記載したのと同様のブロッキング溶液および洗い溶液を E L I S A に使用した。二次抗体として、ヒト I g G に対するペルオキシダーゼを結合させたヤギ I g G 画分または旧または新世界サルに対する西洋わさびペルオキシダーゼでラベルしたヤギ免疫グロブリンを使用した。結果は、405 n m の吸光度 ( O . D . ) を測定することによって決定した。

10

## 【0109】

H E V パキスタン株を代表する昆虫細胞由来の抗原が H E V メキシコ株で感染させたカニクイザル中の抗 H E V 抗体を検出できるかを決定するために、3 匹のサルを調査した ( 図 4 )。サイノ ( カニクイザル ) - 80A82 およびサイノ - 9A97 の二匹のサルをメキシコ'86 H E V 株 ( チセハースト、J . ら . ( 1992 )、J . I n f e c t . D i s . , 165 : 835 - 845 ) を含む沈澱物で感染させ、および 3 匹目のサル、サイノ - 83 を同じ株の二次培養物で感染させた。コントロールとして、パキスタン H E V 株 S A R - 55 で感染させたサイノ - 374 由来の血清試料を同様の実験で試験した。メキシコ株を感染させた 3 匹のサルはすべて抗 H E V に血清が変換した。一次培養物感染由来の動物は 15 週で血清が変換し、二次培養物感染由来のものは 5 週で変換した。興味深いことに、4 匹の動物の中で最も高い抗 H E V 力価はメキシコ株の二次培養物を接種したサイノ - 83 であった。メキシコ株の一次培養物を接種したサイノは最も低い力価を示し、一方パキスタン株の一次培養物を接種したサイノは中間の力価を示した。

20

## 【0110】

実施例 6

完全な O R F - 2 を発現する昆虫細胞由来の抗原に基づく抗 H E V E L I S A の特異性

30

本明細書中で記載した E L I S A が、他の型の肝炎に関連する抗体を除外して、抗 H E V を特異的に検出するかを調べるために、チンパンジーの血清試料を既知の他の肝炎ウイルスで感染させた 4 匹に付いて分析した ( ガルシ、P ら . ( 1992 )、J . I n f e c t . D i s . , 165 : 1006 - 1001 ; ファルシ、P ら . ( 1992 )、S c l e n c e ( 投稿中 ) ; ポンゼット A . ら . ( 1987 ) J . I n f e c t . D i s . , 155 : 72 - 77 ; リゼット ; m ら . ( 1981 ) H e p a t o l o g y 1 : 567 - 574 ; チンパンジー - 1413、1373、1442、1551 ( H A V ) についての参考 ; およびチンパンジー - 982、1442、1420、17110 ( H B V ) についての参考 ; はパーセルらの未発表データである。 ) ( 表 1 )。接種前の血清試料および接種後 5 週および 15 週の血清試料を血清希釈 1 : 100、1 : 1000 および 1 : 10000 にて H E V E L I S A 中で分析した。H A V、H B V、H C V、および H D V で感染させた動物由来の血清はどれも H E V 抗体に対する E L I S A で反応しなかったが、H E V で感染させた 4 匹全てのチンパンジーは抗 H E V の I g M および I g G を発現した。

40

## 【0111】

【表 1】

表 1. 異なる肝炎ウイルス (A, B, C, D, E 型肝炎) に感染したチンパンジーの血清学的アッセイ

チンパンジー	接種したウイルス	接種ウイルスに関する血清学変化までの週	前血清		接種後週							
			IgG	IgM	5	15	20/25	IgG	IgM	IgG	IgM	
Chimp-1413	HAV	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1373	HAV	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1442	HAV	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1451	HAV	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-982	HBV	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1442	HBV	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1420	HBV	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1410	HBV	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-51	HCV	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-502	HCV	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-105	HCV	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-793	HCV	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-904	HDV	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-814	HDV	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-800	HDV	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-29	HDV	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chimp-1313	HEV	5	-	-	1:10000	1:100	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	-	-
Chimp-1310	HEV	5	-	-	1:10000	1:100	1:1000	1:10000	1:10000	1:10000	-	-
Chimp-1374	HEV	3	-	-	1:8000	-	1:8000	1:8000	1:8000	-	-	-
Chimp-1375	HEV	3	-	-	1:8000	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	-	-
Chimp-1313	HEV1st**	5	-	-	1:10000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	-	-
Chimp-1313	HEV2nd**	0.5	1:100	-	1:10000	-	1:10000	1:10000	1:10000	1:10000	-	-

\*チンパンジー-1374 は、接種後3及び4週間後にIgM抗-HEVが陽性であった (図5参照)

\*\*チンパンジー-1313 は、HEVを2回接種した。最初の接種は7名のパキスタン患者のプールで行った。2回目の接種はメキシコ株のHEVで45カ月後に行った。

【0112】

実施例 7

ヒト以外の霊鳥類におけるHEV S A R - 5 5 株の宿主範囲の決定

異なる霊鳥類の種に、HEVの標準的な便懸濁液を接種し、一連の血清試料を感染を測定するために集めた。血清ALTレベルを肝炎の指標として決定し、血清変換は抗HEVの検出によって決定された。

【0113】

HEVで感染させたアカゲザル(表2)はどちらも、血清変換と同様にALT活性の非常に突出したピークを示した。増加するALT活性の最初の徴候は両動物とも14日目に観察され、決定的な血清変換は21日目におきた。抗HEVの最大力価は29日目に得られた。

【0114】

【表2】

表2. 八種の霊長類におけるHEV感染の生化学的及び血清学的プロフィール

種	アラニンアミノトランスフェラーゼ		抗-HEV IgG		
	最初の 上昇日	ピーク値 (U/L)	最初の 検出日	初期 タイター	最大 タイター
AGM-74	14 14,47*	428 189,165	21	1:20 1:400	≤1:8000 ≤1:8000
AGM-230	7,21*	106,141	28	1:400	≤1:8000
PTM-98	21	334	21	1:8000	≤1:8000
PTM-99	21	47	21	1:8000	≤1:8000
Tam-616	14	59	21	1:400	≤1:8000
Tam-636	no no	no no	no no	no no	no no
SQM-868	6,28,47*	288,208,355	41	1:400	1:400
SQM-869	41	679	35	1:400	1:400
OWM-924	6,35,54*	53,97,65	21	1:20	1:8000
OWM-925	6,91*	77,199	21	1:20	1:8000

\*ATLの二相型または三相型上昇; no=ATL又は抗-HEV抗体の上昇検出されず

【0115】

本実験で使用したアカゲザルはどちらも(表2)ALT活性および抗HEVの

10

20

30

40

50

増大を表した。AGM-230は接種後7週で死亡したが、感染の徴候はその時点より前に観察された。AGM-74は他の種で報告されているように(Tsarev, S. A. ら, (1992)、J. Infect. Dis. (印刷中))ALT活性の2型性の増加を示した。AGM-74およびAGM-230の血清変換は各々27日目および21日目に最初に観察された。

#### 【0116】

接種した短い尾のマカク(macaques)はどちらもALT活性が僅かに増加したが、これらの増加は先に記載した動物の場合のように顕著ではなかった。しかし、両サルとも21日目に血清変換し、抗HEV力価はチンパンジーおよび他の旧世界サルと等しかった。

#### 【0117】

本実験で接種したタマリンはどれもALT活性の上昇または抗HEVへの血清変換を示さなかった(表2)。リスザルはチンパンジーおよび旧世界ザルよりも明らかに低い抗HEVレベルで反応した(表2)。血清変換の時期もまたこれら他の動物と比較すると遅延していた。SQM-868は41日目に血清変換し、SQM-869は35日目に血清変換した。抗HEV力価は調査した3カ月以上の間どの時点でも1:400より高くなり、どちらの動物でも47-54日目にピークに達してから明らかに衰微した。しかし、ALT活性の増加は両動物においてかなり際だっていた。

#### 【0118】

フクロウザルはHEV感染に対して旧世界ザル種とほぼ同様の反応を示した(表2)。どちらのOWMも21日目に血清変換し、28日目までには抗HEV力価が1:8000の値まで到達した。ALT活性はOWN-924では35日目にピークになったが、OWM-925では91日目までピークにならなかった。

#### 【0119】

##### 実施例 8

##### チンパンジーにおける抗HEV IgMおよびIgGの検出

両チンパンジーにおいて、血清ALTレベルは接種後約4週で増加した(表2、図5)。両チンパンジーともALT酵素の上昇の時期またはそれより早くに血清変換した(図5A、5C)。抗HEV IgMのレベルもまたチンパンジーについて決定された。チンパンジー-1374では抗HEV IgMの力価(図5B)はIgG力価(図5A)ほど高くなく、2週で衰微した。IgGおよびIgM抗体はこの動物に付いて20日目に最初に検出されたが、その日に抗HEV IgM力価は最も高く、一方、IgG力価はその日に最も低く、それから上昇して3カ月以上およそ同じレベルにとどまった。チンパンジー-1375では、抗HEV IgMのみが20日目に検出された(図5D)。力価はチンパンジー-1374よりも高く、抗HEV IgMは調査の期間中ずっと検出された。抗HEV IgGはこの動物中で27日目に最初に観察され(図5C)、実験中およそ同じレベルを保持した。

#### 【0120】

##### 実施例 9

昆虫細胞中で発現させた完全なORF-2タンパク質に基づくELISAと大腸菌中で発現させた構造タンパク質の断片に基づくELISAの比較

真核細胞中におけるHEVゲノムの完全なORF-2領域の発現は、大腸菌中での構造タンパク質断片の発現に対して何らかの利点があるかを調べるために、細菌中で発現させた抗原断片を使用して(表3)、我々はELISA中で以前の抗原を使用して先に分析したサイノモルガスザルの血清(Tsarev, S. A. ら, (1992)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:559-563; およびTsarev, S. A. ら, (1992) J. Infect. Dis. (投稿中))を再試験した。

#### 【0121】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

昆虫細胞中で発現させた完全なORF-2タンパク質に基づくELISAと  
大腸菌中で発現させた構造タンパク質の断片に基づくELISAの比較

サイノ #	細菌細胞由来の抗原 (部分的ORF-2)	昆虫細胞由来の抗原 (完全なORF-2)		
		最初に抗HEV が検出された日	最初の検出日	抗HEV 力価 最大力価
サイノ-376	28	21	1:400	1:8000
サイノ-369	54	40	1:100	1:8000
サイノ-374	19	19	1:400	1:8000
サイノ-375	26	26	1:400	1:8000
サイノ-379	21	19	1:100	1:8000
サイノ-381	28	28	1:400	1:8000

10

20

【0122】

血清はより感受性の低いORF-3抗原でも試験した。

Tsarev, S. A.ら. (1992)、J. Infect. Dis. (印刷中)

ELISAで調べた6匹のサルに3匹について、昆虫細胞中で発現させた抗原は大腸菌中で発現させた抗原より早く血清変換を検出した。昆虫細胞由来の抗原を使用して、我々は最も高度に希釈した試験(1:8000)ですべての6匹のサル由来の血清中に抗HEV抗体を検出することができた。全ての血清を1:100希釈で試験したが、大腸菌細胞由来の抗原(ブルマ株)では抗HEV力価に付いて何の情報も得られなかった(Tsarev, S. A.ら. (1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 89: 559-563; Tsarev, S. A.ら. (1992) J. Infect. Dis. (投稿中))。

30

【0123】

別の実験で、肝炎EウイルスSAR-55株を10倍ずつ一連に希釈し、 $10^{-1}$ から $10^{-5}$ 希釈をウイルス力価を調べるために2匹のサイノモルガスザルに接種した。血清ALTレベルを測定して肝炎を決定し、HEVに対する血清抗体を本発明のELISA方法(図のデータ)またはGenlabのELISA(図6a-gの下に陽性(+))または陰性(-)試験で示したデータ)によって決定した。全ての試料はコード下で試験した。

40

【0124】

本発明のELISA法は接種した全てのサイノ中の抗HEV IgGへの血清変換および全ての希釈ウイルスを検出した。

反対に、Genlabの結果は以下にまとめたように著しく多様であった。

【0125】

【表 4】

表 4

ウイルス希釈	GenlabのELISA	本発明のELISA	
$10^{-1}$	試験せず	陽性	
$10^{-2}$	限られた期間両動物で陽性	陽性	
$10^{-3}$	両動物で陰性	陽性	
$10^{-4}$	サイノ389: IgMおよび IgGについて陽性	陽性	10
	サイノ383: 陰性	陽性	
$10^{-5}$	サイノ386: 陰性	陽性	
	サイノ385: 陽性	陽性	

## 【0126】

サイノ385 ( $10^{-5}$ ) は Genlab および本発明による両 ELISA 試験において陽性であるので、 $10^{-4}$  (10回以上ウイルス接種した) および  $10^{-3}$  (100回以上ウイルス接種した) もまた陽性であると予想された。サイノ383 および 393 の ALT レベルは活性型の肝炎であることを示唆したが、 $10^{-3}$  および  $10^{-4}$  の一つで両方陽性ではないという Genlab の ELISA とは反対に、本発明はそれらを陽性として数えた。それ故、データは HEV の抗体を検出する先の技術の方法よりも本 ELISA 方法が優ることを支持した。

## 【0127】

## 実施例 10

## ワクチンとしての完全な ORF - 2 タンパク質の使用

以前に上述したように、組換え ORF - 2 タンパク質は免疫反応性がある。さらに、異なる HEV 株で感染させた異なる動物種から得た様々な血清と反応することが示された。これは様々な HEV 株を予防するためのワクチンとしてのこの組換えタンパク質の使用が支持されることを示す。哺乳類は保護抗体の生産を刺激するのに十分な量の精製または部分的に精製した組換え ORF - 2 タンパク質で免疫される。HEV の野生株で免疫性試験した免疫済みの動物は保護される。

## 【0128】

全ての引用文献、すなわち論文刊行物、特許および類似物の内容は、本明細書中に参照として組み入れてある。

本明細書中に記載された実施例および態様は実例を示す目的であり、当該技術分野に従事する人によるこれらの若干の修飾および改変は本出願の思想及び範囲、並びに請求の範囲の範囲内に含むものとする。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0129】

【図 1】図 1 は HEV 株 SAR - 55 の完全な ORF - 2 タンパク質の発現に使われる組み換えベクターを示す。

【図 2】図 2 A および B は、野生型バキュロウイルス若しくは組み換えバキュロウイルス (ORF - 2 をコードする遺伝子を含む) を感染させた昆虫細胞の細胞溶解物を、クマシールで染めた (A) 若しくは HEV 感染チンパンジーの血清でウェスタンブロットにかけた (B)、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル (SDS - PAGE) である。

【図3A】図3Aは、30および20nmのウイルス様粒子（組み換え感染昆虫細胞でORF-2タンパク質の発現結果として形成される）の免疫電子ミクログラフ（IEM）を示す。

【図3B】図3Bは、30および20nmのウイルス様粒子（組み換え感染昆虫細胞でORF-2タンパク質の発現結果として形成される）の免疫電子ミクログラフ（IEM）を示す。

【図4】図4は、完全なORF-2をコードする遺伝子を含む昆虫細胞から発現された組み換えORF-2を抗原として用いた、ELISAの結果を示す。血清中の抗HEV抗体レベルは、HEVメキシコ株（Cyno-80A82, Cyno-9A97およびCyno-83）若しくはパキスタン株（Cyno-374）をカニクイザルに接種してからの様々

10

な時間で決定した。

【図5A】図5Aは、完全なORF-2をコードする遺伝子を含む昆虫細胞から発現された組み換えORF-2を抗原として用いた、ELISAの結果を示す。血清中のIgGもしくはIgMの抗HEVレベルは、HEVを2匹のチンパンジーに接種してからの時間に渡って決定した。

【図5B】図5Bは、完全なORF-2をコードする遺伝子を含む昆虫細胞から発現された組み換えORF-2を抗原として用いた、ELISAの結果を示す。血清中のIgGもしくはIgMの抗HEVレベルは、HEVを2匹のチンパンジーに接種してからの時間に渡って決定した。

【図5C】図5Cは、完全なORF-2をコードする遺伝子を含む昆虫細胞から発現された組み換えORF-2を抗原として用いた、ELISAの結果を示す。血清中のIgGもしくはIgMの抗HEVレベルは、HEVを2匹のチンパンジーに接種してからの時間に渡って決定した。

20

【図5D】図5Dは、完全なORF-2をコードする遺伝子を含む昆虫細胞から発現された組み換えORF-2を抗原として用いた、ELISAの結果を示す。血清中のIgGもしくはIgMの抗HEVレベルは、HEVを2匹のチンパンジーに接種してからの時間に渡って決定した。

【図6A】図6Aは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

30

【図6B】図6Bは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6C】図6Cは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6D】図6Dは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

40

【図6E】図6Eは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6F】図6Fは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株（Gene labs）由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比

50

較を示す。

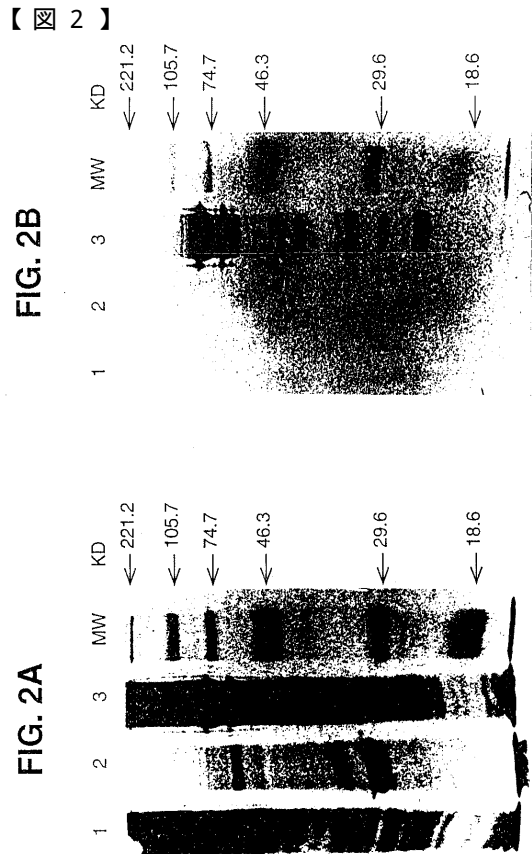
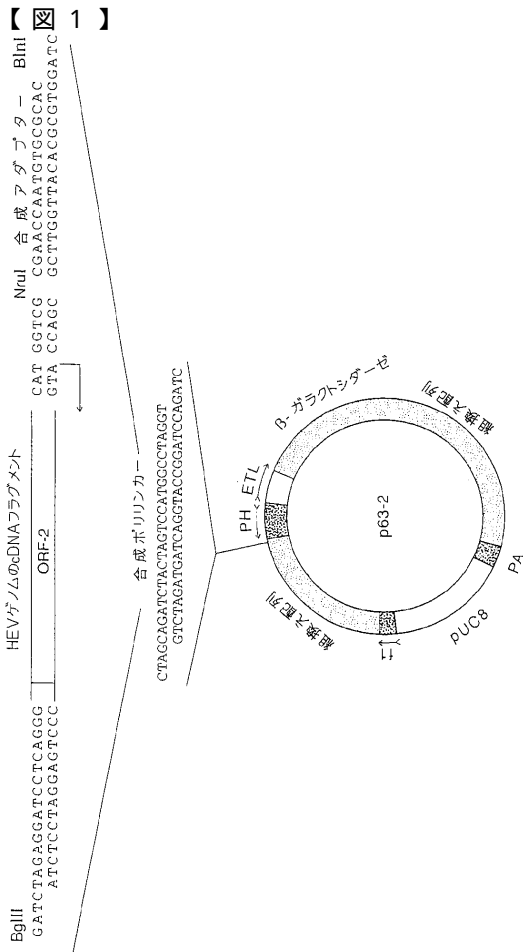
【図6G】図6Gは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株(Gene Labs)由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6H】図6Hは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株(Gene Labs)由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6I】図6Iは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株(Gene Labs)由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

【図6J】図6Jは、SAR-55由来の完全な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータと、HEVビルマ株(Gene Labs)由来の部分的な組み換えORF-2タンパク質を抗原として用いて得られたELISAデータの比較を示す。

10



【 図 3 A 】

FIG. 3A

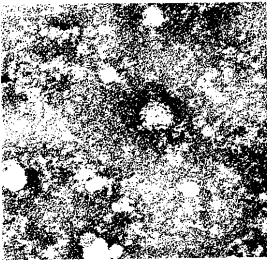


FIG. 3A'

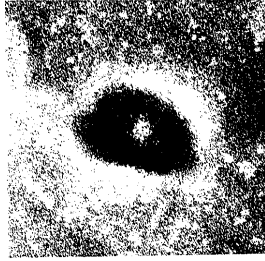
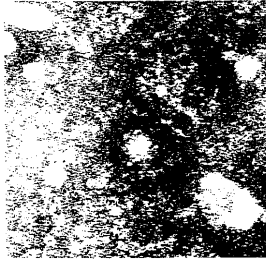


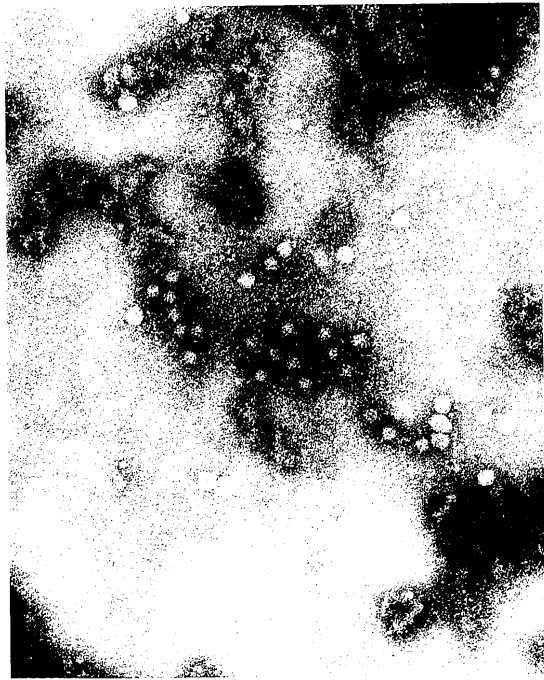
FIG. 3A''



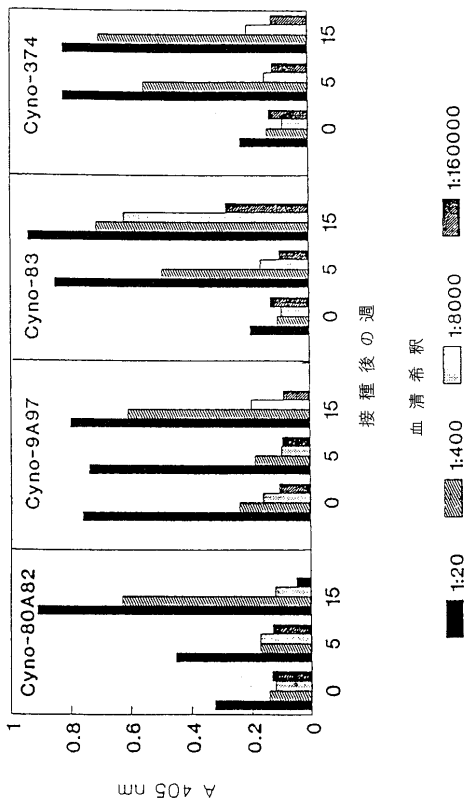
FIG. 3A'''



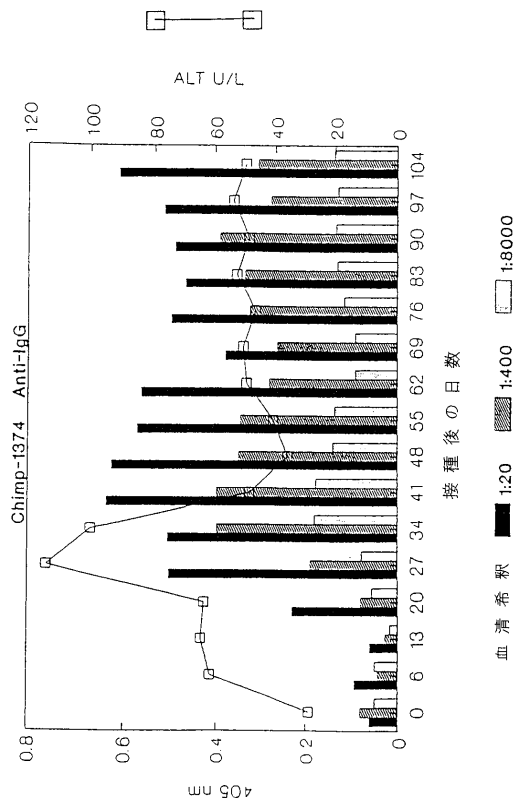
【 図 3 B 】



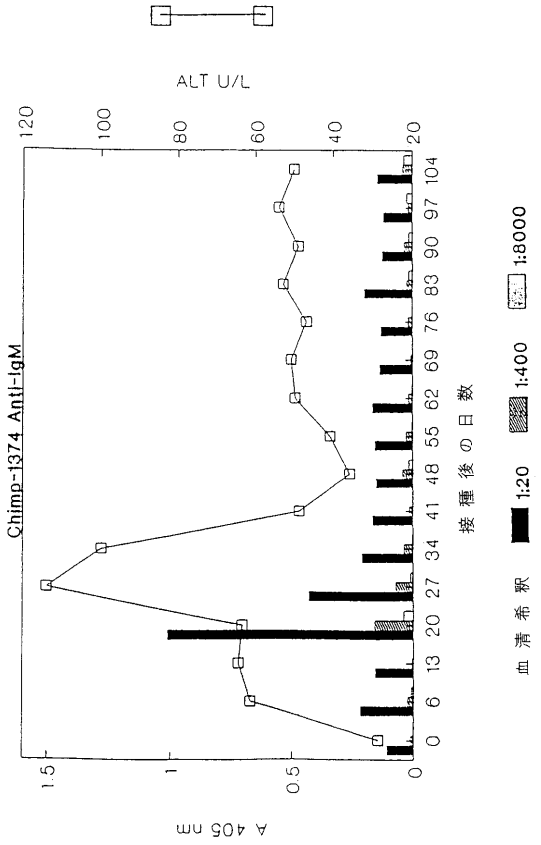
【 図 4 】



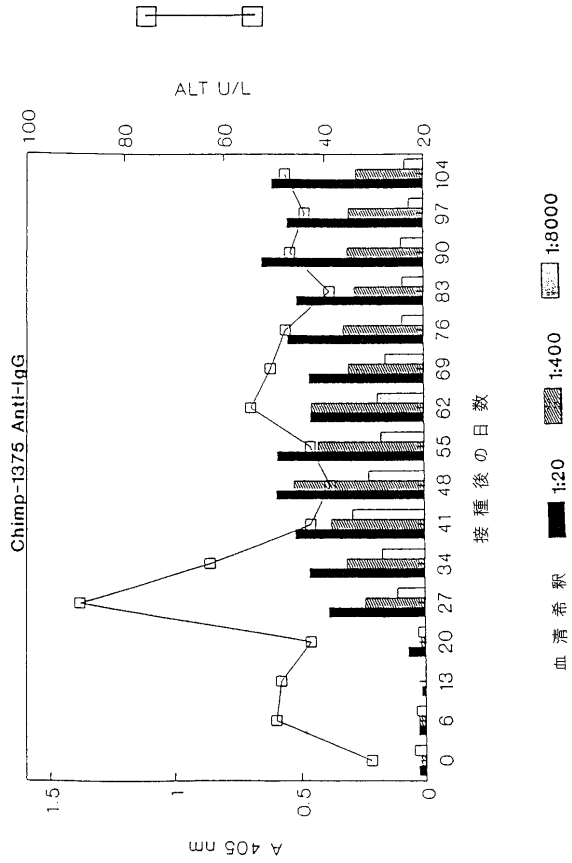
【 図 5 A 】



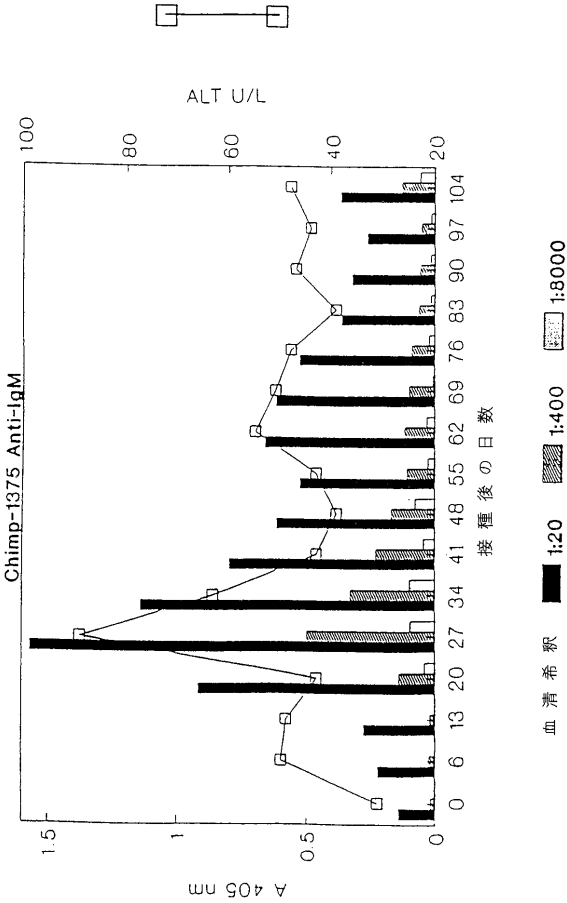
【 5 B 】



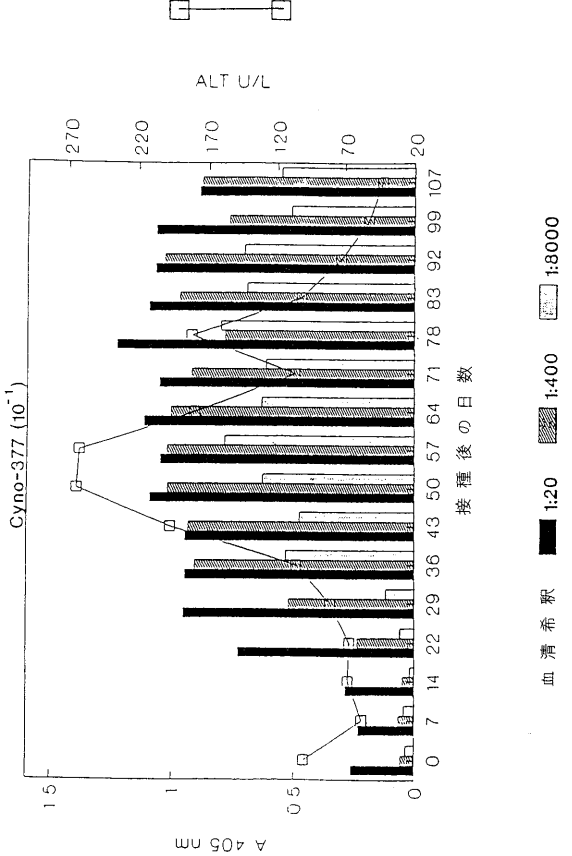
【 5 C 】



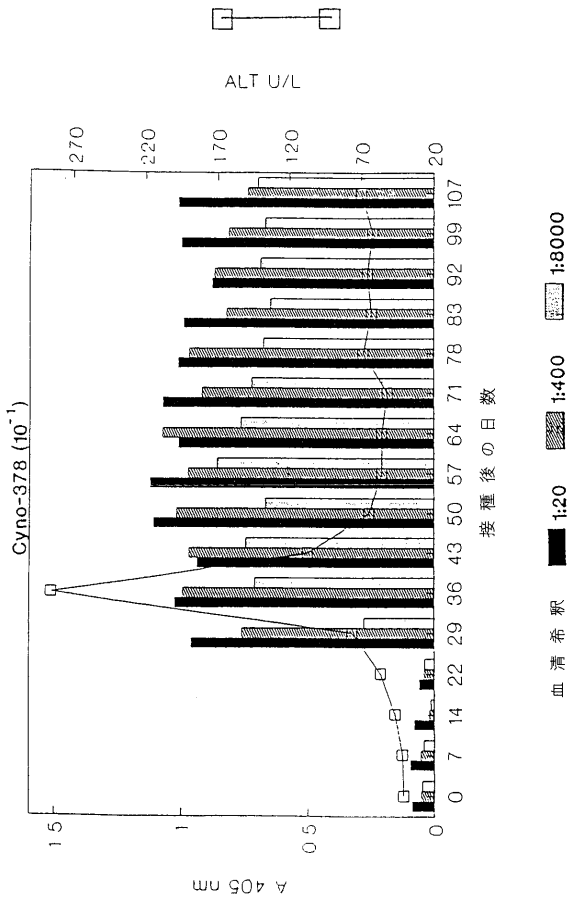
【 5 D 】



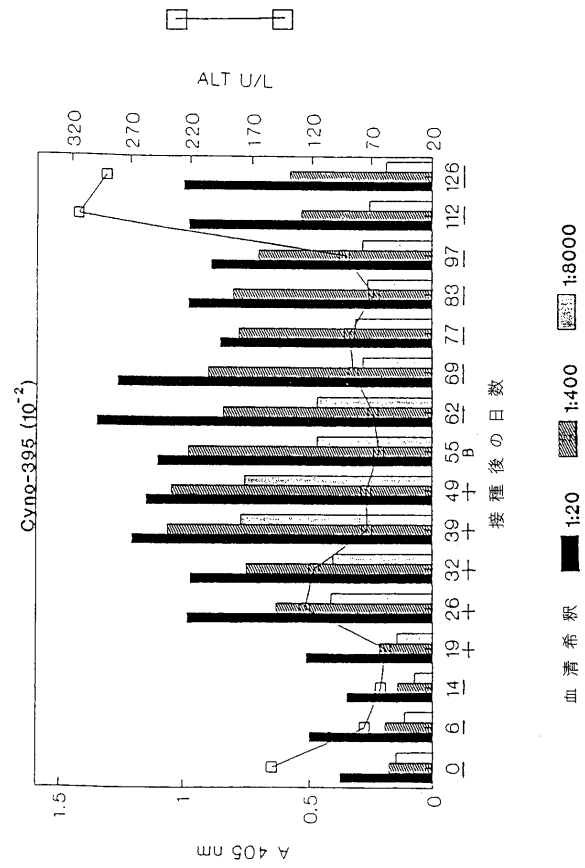
【 6 A 】



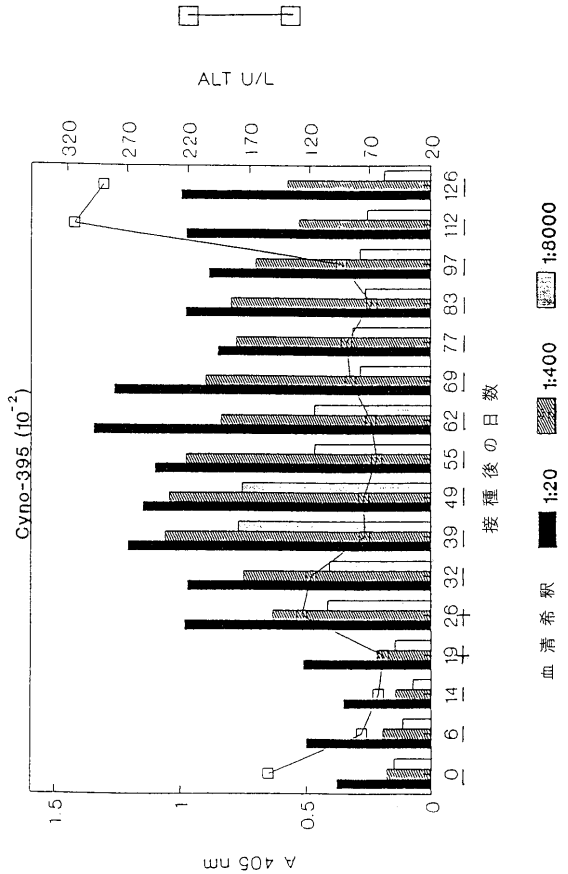
【 6 B 】



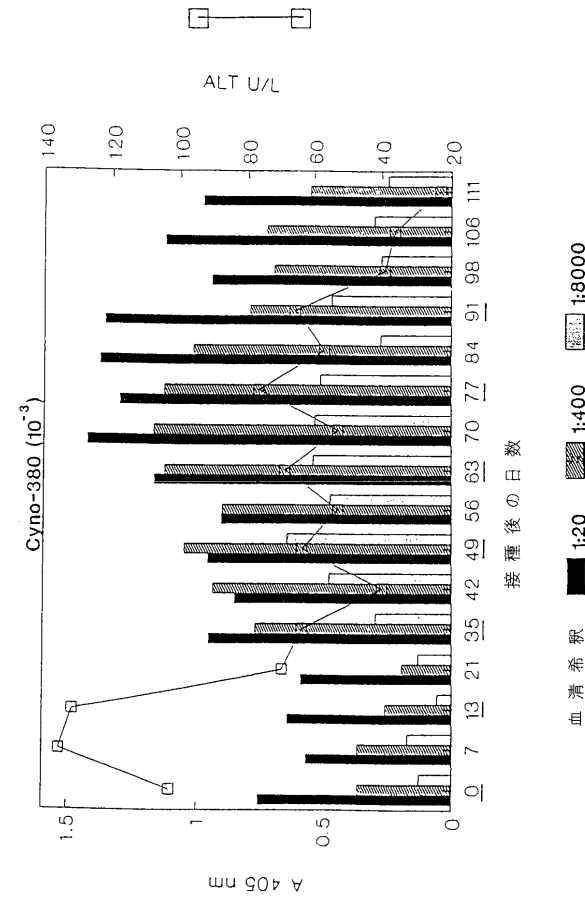
【 6 C 】



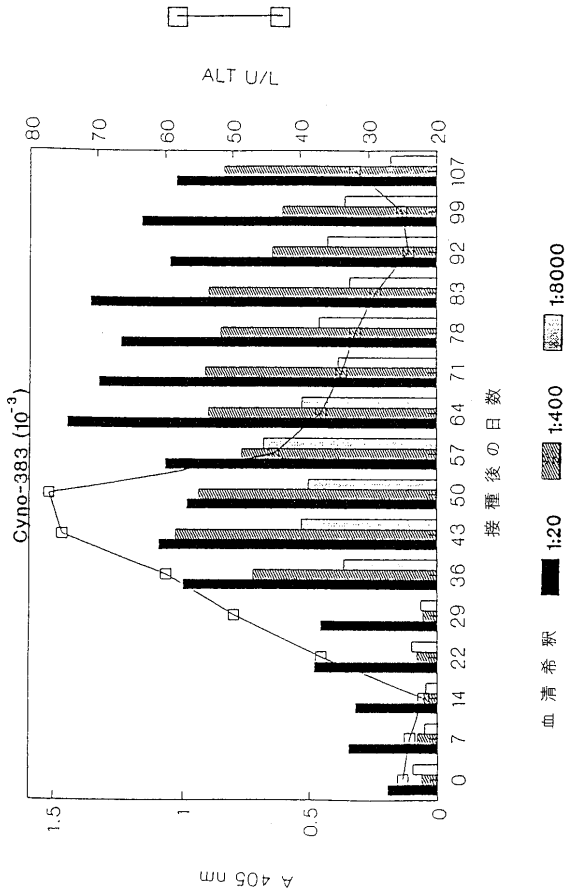
【 6 D 】



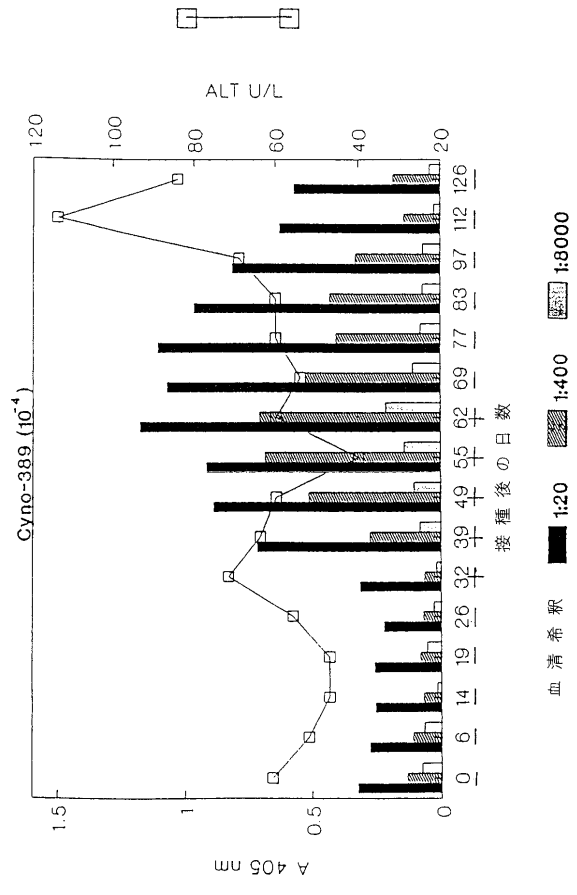
【 6 E 】



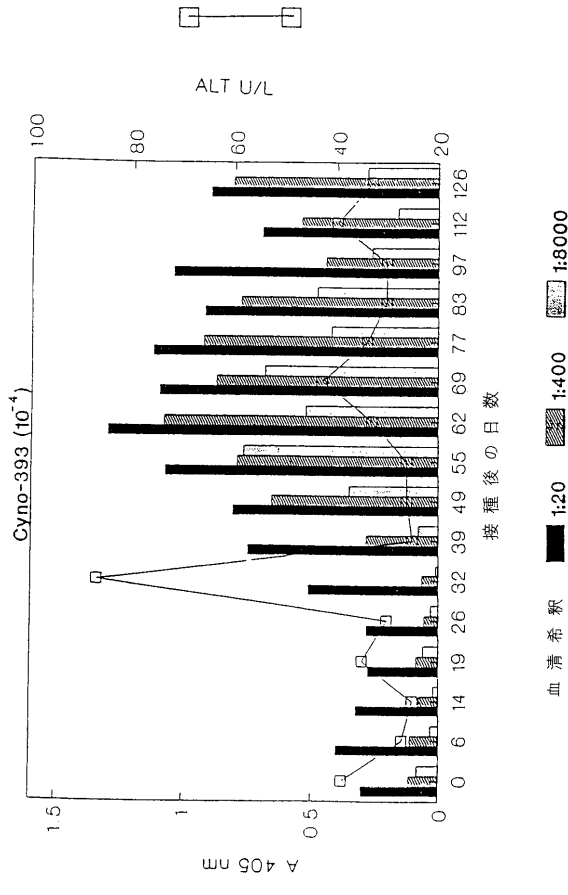
【 6 F 】



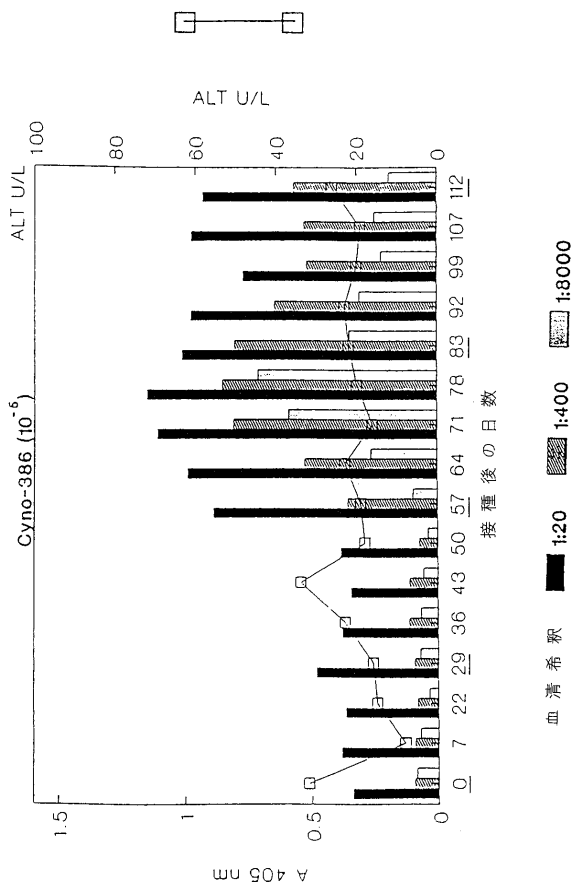
【 6 G 】



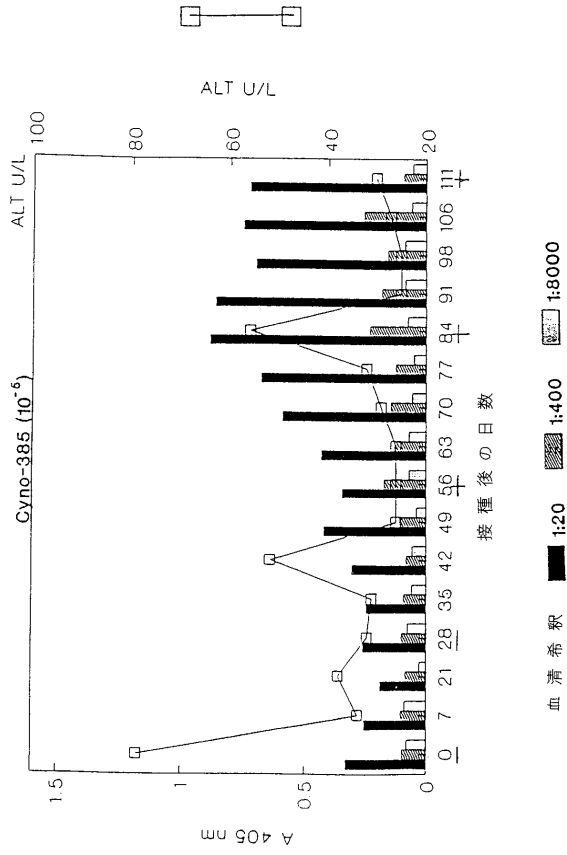
【 6 H 】



【 6 I 】



【図 6 J】



【配列表】

[2006149393000001.app](#)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53		N
<b>A 6 1 K 39/29 (2006.01)</b>		A 6 1 K 39/29		
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>		A 6 1 P 37/04		
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>		A 6 1 P 31/12		
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>		A 6 1 P 1/16		

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 トッサレヴ, セルゲイ・エイ

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 1 4 , ベセズダ, ウェイマウス・ストリート 1 6 5 0 , ナンバー 2 1 0

(72)発明者 エマーソン, スザンヌ・ユー

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 3 , ロックヴィル, ウッドクレスト・ドライブ 1 4 2 0 1

(72)発明者 パーセル・ロバート・エイチ

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 4 1 , ボイズ, ホワイト・グラウンズ・ロード 1 7 5 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 CA04 CA11 DA02 EA02 GA11 HA08

4B064 AG33 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01 DA15

4B065 AA90X AA96Y AB01 BA02 CA24 CA45 CA46

4C085 AA03 BA92 BB11 CC05 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01

4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA02 DA86 EA31 EA53 FA74

专利名称(译)	戊型肝炎病毒重组蛋白及其诊断方法及其在疫苗中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006149393A</a>	公开(公告)日	2006-06-15
申请号	JP2005377429	申请日	2005-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	トゥサレヴセルゲイエイ エマーソンズザンヌユー パーセルロバートエイチ		
发明人	トゥサレヴ,セルゲイ・エイ エマーソン,スザンヌ・ユー パーセル・ロバート・エイチ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/08 C12P21/02 C12N5/10 G01N33/576 G01N33/53 A61K39/29 A61P37/04 A61P31/12 A61P1/16 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P43/00 C07H21/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12N15/113 C12N15/51		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P1/16 A61P31/12 A61P37/04 A61P43/00 C07H21/00 C07K14/005 C12N7/00 C12N15/1131 C12N2310/3125 C12N2310/314 C12N2310/315 C12N2310/321 C12N2310/341 C12N2310/345 C12N2310/346 C12N2710/14143 C12N2770/28021 C12N2770/28022 C12N2770/28122 C12N2770/28123 Y10S436/82 Y10S977/802 C12N2310/3521		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/08.ZNA C12P21/02.Z C12N5/00.B G01N33/576.Z G01N33/53.N A61K39/29 A61P37/04 A61P31/12 A61P1/16 C12N15/113.100.P C12N15/113.100.Z C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG33 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA92 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	07/947263 1992-09-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：披露源自巴基斯坦的戊型肝炎病毒 ( SAR-55 ) 病毒，涉及肠道传染性非A型和非B型肝炎 ( 戊型肝炎 ) 的流行病。本发明涉及真核表达系统中SAR-55 ( 开放阅读框-2; ORF-2 ) 的整个结构区域的表达。表达的蛋白质能够形成HEV病毒样颗粒，其可以作为免疫原或疫苗起作用，在诊断免疫测定中防止抗原和戊型肝炎的感染。【选择图】无

(5) Int. Cl.		F I		テマコー I
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K 14/08	Z N A 4 B 0 6 4
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02	Z 4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	B 4 C 0 8 5
<b>G O 1 N</b>	<b>33/576</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/576	Z 4 H 0 4 5
			審査請求 有	請求項の数 16 O L (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2005-377429 (P2005-377429)	(71) 出願人	502006782
(22) 出願日	平成17年12月28日 (2005.12.28)		アメリカ合衆国
(62) 分割の表示	特願2004-113548 (P2004-113548) の分割		アメリカ合衆国メリーランド 、ロックビル、イグゼキュテ バード G O 1 1、ナショナ イチュート・オブ・ヘルス、 3 2 5、オフィス・オブ・テ トランスファー
原出願日	平成5年9月17日 (1993.9.17)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	07/947,263		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成4年9月18日 (1992.9.18)	(74) 代理人	100140109
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270