

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532023

(P2004-532023A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/12	4 C O 8 5
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	4 H O 4 5
C O 7 K 14/18	C O 7 K 14/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 237 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-579516 (P2002-579516)	(71) 出願人	502372849
(86) (22) 出願日	平成14年4月4日 (2002.4.4)		アメリカ合衆国
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月6日 (2003.10.6)		THE UNITED STATES OF AMERICA
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/010764		アメリカ合衆国30333ジョージア州ア
(87) 国際公開番号	W02002/081754		トランタ、クリフトン・ロード1600番
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		、ノース・イースト・エムエス・イー6
(31) 優先権主張番号	09/826, 115		7、テクノロジー・トランスファー・オフ
(32) 優先日	平成13年4月4日 (2001.4.4)		イス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 フラビウイルス感染症の予防のための核酸ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、一つのフラビウイルスのシグナル配列、および第二のフラビウイルスの免疫原性フラビウイルス抗原、または複数のフラビウイルスからの配列を含むキメラ免疫原性フラビウイルス抗原をコードする転写単位を含む、単離された核酸を含む。本発明は、核酸および蛋白質ワクチン、ならびにフラビウイルス感染症に対して被験者を免疫するためのワクチンの使用をさらに含む。本発明はまた、本発明の核酸によってコードされる抗原、抗原に反応して誘発された抗体、ならびにフラビウイルスの検出またはフラビウイルス感染症の診断における、抗原および/または抗体の使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のフラビウウイルスの構造蛋白質のシグナル配列、および第二のフラビウウイルスの免疫原性フラビウウイルス抗原をコードする転写単位を含み、ここで転写単位は抗原の合成を指示する、単離された核酸。

【請求項 2】

シグナル配列が日本脳炎ウイルスのシグナル配列である、請求項1記載の核酸。

【請求項 3】

免疫原性フラビウウイルス抗原が、黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルスからなる群より選択されるフラビウウイルスの抗原である、請求項1記載の核酸。

10

【請求項 4】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質とをコードする、請求項1記載の核酸。

【請求項 5】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項1記載の核酸。

【請求項 6】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにセントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項1記載の核酸。

20

【請求項 7】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項1記載の核酸。

【請求項 8】

抗原が、フラビウウイルスのM蛋白質、フラビウウイルスのE蛋白質、フラビウウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウウイルスのM蛋白質の一部、フラビウウイルスのE蛋白質の一部、ならびにフラビウウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウウイルスのE蛋白質の一部の双方、またはその任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項1記載の核酸。

【請求項 9】

抗原が、フラビウウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方である、請求項8記載の核酸。

30

【請求項 10】

核酸がDNAである、請求項1記載の核酸。

【請求項 11】

配列番号：15、配列番号：19、配列番号：21、および配列番号：23からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項10記載の核酸。

【請求項 12】

転写単位が、抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含む、請求項1記載の核酸。

【請求項 13】

制御配列がサイトメガロウイルス前初期プロモーターである、請求項12記載の核酸。

40

【請求項 14】

TUによってコードされる抗原を含むポリペプチドの翻訳開始部位に存在するコザックコンセンサス配列を含む、請求項1記載の核酸。

【請求項 15】

転写単位が、ポリ-Aターミネーターを含む、請求項1記載の核酸。

【請求項 16】

請求項1記載の核酸を含む細胞。

【請求項 17】

請求項1記載の核酸および薬学的に許容される担体を含む組成物。

50

【請求項 18】

請求項17記載の組成物の有効量を被験者に投与する段階を含む、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法。

【請求項 19】

フラビウイルス抗原が、黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルスからなる群より選択されるフラビウイルスの抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

抗原がフラビウイルスのM蛋白質、フラビウイルスのE蛋白質、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウイルスのM蛋白質の一部、フラビウイルスのE蛋白質の一部、ならびにフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方、またはその任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

抗原がフラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方であって、被験者の体内の細胞が、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質およびE蛋白質を含むサブウイルス粒子を分泌する、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項18記載の方法。

【請求項 23】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項18記載の方法。

【請求項 24】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにセントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項18記載の方法。

【請求項 25】

転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項18記載の方法。

【請求項 26】

被験者に組成物の1回量を投与する段階を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 27】

組成物が非経口経路によって投与される、請求項18記載の方法。

【請求項 28】

抗原がセントルイス脳炎ウイルス抗原である、請求項1記載の核酸。

【請求項 29】

抗原がセントルイス脳炎ウイルス抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項 30】

抗原が日本脳炎ウイルス抗原である、請求項1記載の核酸。

【請求項 31】

抗原が日本脳炎ウイルス抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項 32】

抗原が黄熱病ウイルス抗原である、請求項1記載の核酸。

【請求項 33】

抗原が黄熱病ウイルス抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項 34】

抗原がデングウイルス抗原である、請求項1記載の核酸。

【請求項 35】

抗原がデングウイルス抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項 36】

抗原が西ナイルウイルス抗原である、請求項1記載の核酸。

【請求項37】

抗原が西ナイルウイルス抗原である、請求項18記載の方法。

【請求項38】

請求項1記載の核酸から産生された抗原。

【請求項39】

以下を含む、試料におけるフラビウイルス抗体を検出する方法：

(a) 抗原 / 抗体複合体が形成されうる条件下で、請求項38記載の抗原に試料を接触させる段階；および

(b) 抗原 / 抗体複合体形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗体を検出する段階。

【請求項40】

請求項38記載の抗原による免疫化に反応して産生された抗体。

【請求項41】

以下を含む、試料におけるフラビウイルス抗原を検出する方法：

(a) 抗原 / 抗体複合体が形成しうる条件下で、請求項40記載の抗体に試料を接触させる段階；および

(b) 抗原 / 抗体複合体形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗原を検出する段階。

【請求項42】

以下を含む、被験者におけるフラビウイルス感染を診断する方法：

(a) 抗原 / 抗体複合体が形成されうる条件下で、請求項38記載の抗原に被験者からの試料を接触させる段階；および

(b) 抗原 / 抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染を診断する段階。

【請求項43】

以下を含む、被験者におけるフラビウイルス感染を診断する方法：

(a) 抗原 / 抗体複合体が形成されうる条件下で、請求項40記載の抗体に被験者からの試料を接触させる段階；および

(b) 抗原 / 抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、1998年6月4日に提出された米国特許仮出願第60/087,908号からの、かつその恩典を主張する、1999年6月3日に提出された国際出願第PCT/US99/12298号の国内段階出願であり、かつ現状は係属中である、2000年11月29日に提出された米国特許出願第09/701,536号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、かつ現状は係属中である、2001年4月4日に提出された米国特許出願第09/826,115号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、これらの出願はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、フラビウイルスによって引き起こされる疾患の治療および予防の双方において用いられる新規ワクチン、診断薬および方法に関する。特に、ワクチンは、日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイルウイルス (WNV)、または関連フラビウイルスのようなフラビウイルスの構造蛋白質の遺伝子を含む組み換え型核酸である。これらのワクチンは、インビボで投与した場合にウイルス蛋白質抗原を生合成するための転写単位として作用する。診断薬は、フラビウイルス感染症を検出するために用いることができる組み換え型核酸から作製した抗原を含む組成物である。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

発明の背景

フラビウイルスは、フラビウイルス科に分類されるフラビウイルス属のメンバーである。フラビウイルスは、ヒトおよび他の哺乳類に対して主として病原性である。ヒトおよび動物に疾患を引き起こすフラビウイルスには、アルフイ (Alfuy)、アポイ (Apoi)、アロア (Aroa)、バガザ (Bagaza)、バンジ (Banzi)、バツ洞 (Batu Cave)、ブブイ (Buboui)、ブカラサコウモリ (Bukalasa bat)、ブスクアラ (Bussuquara)、カシパコア (Cacipacore)、カーリー島 (Carey Island)、カウボーンリッジ (Cowbone Ridge)、ダカルコウモリ (Dakar bat)、デング (Dengue) (血清型1、2、3および4)、エッジヒル (Edge Hill)、エンテベコウモリ (Entebbe bat)、ガジェッツガリー (Gadgets Gully)、イグアペ (Iguape)、イルハウス (Ilheus)、イスラエル七面鳥髄膜脳炎 (Israel turkey meningoencephalitis)、日本脳炎 (Japanese encephalitis)、ジュグラ (Jugra)、ジュチアパ (Jutiapa)、カダム (Kadam)、Karshi (カーシ)、ケドーゴー (Kedougou)、ココベラ (Kokobera)、コウタンゴ (Koutango)、クンジン (Kunjin)、キャサヌール森林病 (Kysanur Forest disease)、ランガト (Langat)、メアバン (Meaban)、モドック (Modoc)、モンタナ筋炎白質脳炎 (Montana myotis leukoencephalitis)、マリーバレー脳炎 (Murray Valley encephalitis)、ナランジャル (Naranjal)、ネギシ (Negishi)、ウンタヤ (Ntaya)、オムスク出血熱 (Omsk hemorrhagic fever)、プノンペンコウモリ (Phnom Penh bat)、ポチスクム (Potiskum)、ポワッサン (Powassan)、リオブラボー (Rio Bravo)、ロシオ (Rocio)、ロイヤルファーム (Royal Farm)、ロシア春夏脳炎 (Russian spring summer encephalitis)、サボヤ (Saboya)、サルビエジャ (Sal Vieja)、サンパーリタ (San Perlita)、サウマレツリーフ (Saumarez Reef)、セピク (Sepik)、ソクルク (Skuluk)、スpondウェニ (Spondweni)、セントルイス脳炎 (St. Louis encephalitis)、ストラトフォード (Stratford)、ダニ媒介脳炎-中欧サブタイプ (Tick-borne encephalitis - Central European subtype)、ダニ媒介脳炎-極東サブタイプ (Tick-borne encephalitis - far eastern subtype)、テンブス (Tembusu)、THCAR、チュレニイ (Tyuleny)、ウガンダS (Uganda S)、ウスツ (Usutu)、西ナイル (West Nile)、ヤウンデ (Yaounde)、黄熱病 (Yellow fever)、ヨコセ (Yokose)、ジキ (Ziki)、細胞融合物質およびKunoら (J. Virol. 72: 73~83 (1998)) に記載される他の関連フラビウイルスが含まれる。

10

20

30

【 0 0 0 4 】

フラビウイルスは、以下の三つの構造蛋白質を含む：prM/M、前膜および膜蛋白質；E、エンペローブ蛋白質；およびC、カプシド蛋白質。(Monath、「Virology」(Fields編)、Raven Press、New York、1990、763~814頁；HeinzおよびRoehrig、「Immunochemistry of Viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines」(van RegenmortelおよびNeurath編)、Elsevier、Amsterdam、1990、289~305頁)。Mは分子量(MW)約7~8キロダルトン(kDa)であり、Eの分子量は約50kDa~60 kDaである。MはprMと呼ばれるより大きい前駆体として合成される。prMのpr部分は、prMが成熟ビリオンにおいてM蛋白質を形成するように処理される際に除去される。MおよびEは、フラビウイルス粒子の膜に存在し、そのため、長い間ウイルスの重要な免疫原性成分を構成すると考えられてきた。

40

【 0 0 0 5 】

フラビウイルスは、様々な種において長さ約10キロベース(kb)の一本鎖RNAを含むRNAウイルスである。分子量12kDa~14 kDaのC蛋白質は、RNAと複合体を形成して、ヌクレオカプシド複合体を形成する。いくつかの非構造蛋白質も同様に、RNAゲノムによってコードされ、それらはNS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、およびNS5と呼ばれるRNAゲノムによってコードされる。ゲノムは、宿主細胞内でポリ蛋白質として翻訳された後、ウイルスまたは宿主特異的プロテアーゼによって翻訳と同時に、または翻訳後個々の遺伝子産物にプロセッシングされる(図1)。

【 0 0 0 6 】

米国特許第5,494,671号に要約されているように、いくつかのフラビウイルスのゲノムの

50

ヌクレオチド配列が既知である。JEVのヌクレオチド配列は、Sumiyoshiら (Virology 161 : 497~510 (1987)) およびHashimotoら (Virus Genes 1 : 305~317 (1988)) によって提供されている。JEVのビルレント株SA-14および中華人民共和国においてワクチンとして用いられている弱毒株SA-14-14-2のヌクレオチド配列は、Nitayaphanら (Virology 177 : 541~552 (1990)) の研究において比較されている。

【0007】

他のフラビウイルス種の構造蛋白質をコードするヌクレオチド配列も既知である。多くの場合、完全なゲノムの配列が報告されている。利用できる配列には、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス (Deubelら、Virology 155 : 365~377 (1986) ; Gruenbergら、J. Gen. Virol. 69 : 1391~1398 (1988) ; Hahnら、Virology 162 : 167~180 (1988))、デング血清型3型ウイルス (Osatomiら、Virus Genes 2 : 99~108 (1988))、デング血清型4型ウイルス (Mackowら、Virology 159 : 217~228 (1987) ; Zhaoら、Virology 155 : 77~88 (1986))、西ナイルウイルス (Lanciottiら、Science 286 : 2331~2333 (1999))、ポワッサンウイルス (Mandlら、Virology 194 : 173~184 (1993))、および黄熱病ウイルス (YFV) (Riceら、Science 229 : 726~733 (1985)) が含まれる。

【0008】

セントルイス脳炎ウイルス (SLEV)、WNVおよびJEVを含む多くのフラビウイルスが、蚊によってヒトおよび他の宿主動物に伝播される。したがって、それらは広い地域にわたって発生し、その伝播は容易に中断または予防されない。

【0009】

西ナイル熱は、主に様々な種のイエカ (Culex mosquitoes) によって脊椎動物に伝播される、蚊媒介性フラビウイルス感染症である。JE、SLE、およびマリーバレー脳炎 (MVE) ウイルスを含むフラビウイルスの日本脳炎 (JE) 抗原性複合体の他のメンバーと同様に、WNVは、節足動物ベクターとトリの間の天然のサイクルにおいて維持される。このウイルスは1937年にウガンダの西ナイル地区で発熱した人から初めて単離された (Smithburnら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 471~492 (1940))。まもなく、これは最も広く分布するフラビウイルスの一つであると認識され、その地理的範囲は、アフリカ、中東、西アジア、ヨーロッパおよびオーストラリアに及ぶ (Hubalekら、Emerg. Infect. Dis. 5 : 643~50 (1999))。臨床的には、ヒトにおける西ナイル熱は、頭痛、筋肉痛、多発性関節症、発疹およびリンパ節症を伴う自己限定性の急性発熱性疾患である (MonathおよびTsai、「Clinical Virology」、(Richman, WhitleyおよびHayden編)、Churchill-Livingstone、New York、1133~1186頁)。急性肝炎または膵炎が時に報告されており、高齢患者におけるWNV感染症の症例は、時に脳炎または髄膜炎を併発する (Asnisら、Clin. Infect. Dis. 30 : 413~418 (2000))。このように、WNVによる感染症は、世界の多くの地域において健康に関する重篤な懸念である。

【0010】

疾患の地理的伝播、特にWNVが1999年にアメリカ合衆国に入ったことは、この疾患のヒトおよび動物の健康への懸念に対する関心を大きく増加させた。1999年の8月の終わりから9月の初めにかけて、ニューヨーク市およびその周辺地域において、ウイルス脳炎が大発生して、確認症例は62例、死亡7例を認めた。この大流行と同時に、地域の保健担当者は、トリ (特にカラス) およびウマにおける死亡率の増加を認めた。大流行はその後、モノクローナル抗体 (Mab) マッピングおよびヒト、トリ、および蚊の標本におけるゲノム配列の検出に基づき、WNVによって引き起こされたことが示された (Andersonら、Science 286 : 2331~2333 (1999) ; Jiaら、Lancet 354 : 1971~1972 (1999) ; Lanciottiら、Science 286 : 2333~2337 (1999))。続く冬の月の間に検出されたウイルス活性は、ウイルスが北米で確立したことを示した (Morb Mortal. Wkly. Rep. 49 : 178~179 (2000) ; Asnisら、Clin. Infect. Dis. 30 : 413~418 (2000) ; Garmendiaら、J. Clin. Micro. 38 : 3110~3111 (2000))。2000年の間に北東部および大西洋中部の州から報告された調査データから、強まった家畜流行性 / 流行性伝播およびウイルスの地理的拡大が確認され、ヒトのみならずトリ、蚊およびウマにおける多数の感染例が報告された (Morb. Mortal. Wk 40

ly. Rep. 49: 820~822 (2000))。

【0011】

現在、WNV感染症を予防するために利用できるヒトまたは獣医用ワクチンはなく、疾患の伝播と闘う唯一の実践的戦略は蚊の制御である。

【0012】

日本脳炎ウイルス (JEV) は、成人および子供に感染し、熱帯および亜熱帯アジア地域では、幼児、子供、および高齢者における死亡率は高い (Tsaiら、「Vaccines」 (Plotkin編)、W.B. Saunders、Philadelphia、Pa、1999年、672~710頁)。生存者において、感染後も持続する脳炎の症状に関連した重篤な神経学的結末が起こる。日本、台湾、および韓国のようなこの地域のより先進国では、JEVは、不活化JEVのワクチンを用いることによってほぼ制御されている。それにもかかわらず、この地域の他の国ではなおも流行している。

10

【0013】

JEV感染症に対して用いるために利用できるワクチンには、ホルマリン処置のような方法によって不活化した生きたウイルスと共に、弱毒化ウイルスが含まれる (Tsaiら、「Vaccines」 (Plotkin編)、W. B. Saunders、Philadelphia、Pa、1994年、671~713頁)。全ウイルスワクチンは有効であるが、特定の問題および/または短所を有する。ウイルスは、マウス脳において、または宿主として哺乳類細胞を用いる細胞培養において培養する。そのような培養法は、厄介で費用がかさむ。さらに、宿主細胞、すなわち脳または他の宿主からの抗原を最終的なワクチン産物に組み入れることに付随したリスクがあり、おそ

20

【0014】

デング熱およびデング出血熱 (DF/DHF) は、同様に蚊が媒介するフラビウイルスであるデングウイルスによって引き起こされる。四つの抗原的に関連した、しかし異なるデングウイルス血清型 (DEN-1、DEN-2、DEN-3およびDEN-4) が存在し、その全てがDF/DHFを引き起こしうる。デング関連疾患の軽症型であるDFの症状には、発熱、発疹、重度の頭痛および関節痛が含まれる。DFを有する被験者の死亡率は低い；しかし、DHFを有する被験者では死亡率は5%もの高さとなりうる。利用可能な証拠から、過去40年間にDHFの300万以上の症例および58,000例以上の死亡例の原因がDHFであり、DHFは主な新たな疾患となっている (Halstead、「Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever」、(GublerおよびKuno編)、CAB International、New York、NY、(1997)、23~44頁)。それにもかかわらず、何十年もの努力にもかかわらず、デングウイルス感染症に対して保護する安全かつ有効なワクチンはなおも利用できない。

30

【0015】

黄熱病は、南米およびサハラ下アフリカの熱帯地域において流行し、蚊によって媒介される。感染によって発熱、悪寒、重度の頭痛および他の疼痛、食欲不振、悪心および嘔吐が起こり、黄疸が出現する。感染させたニワトリ胚において増殖させた生きたウイルスワクチン17Dは、安全かつ有効であると考えられている。それにもかかわらず、ワクチンが最も必要とされるアフリカおよびアメリカの熱帯地域において一般的に遭遇するような不利な条件でも安定であるワクチンがなおも必要である。

40

【0016】

二つのフラビウイルスのキメラである組み換え型フラビウイルスは、PCT出願国際公開公報第93/06214号に開示されている。キメラは、デングウイルスまたはフラビウイルスの一つの「タイプ」または血清型からの非構造蛋白質を、デングウイルスまたは他のフラビウイルスの異なる「タイプ」または血清型からの構造蛋白質と融合した構築物である。

【0017】

近年、いくつかの組み換え型サブユニットおよびウイルスワクチンが考案されている。米

50

国特許第4,810,492号は、ワクチンにおける抗原として用いるためのJEVのE糖蛋白質の産生について記述している。大腸菌、酵母、または高等生物の細胞培養物のような適した宿主細胞において抗原蛋白質を発現させるために、対応するDNAを発現系にクローニングする。米国特許第5,229,293号は、JEV E蛋白質の遺伝子を有する組み換え型とバキュロウイルスを開示する。E蛋白質が産生され、ワクチンとして用いるために回収されるように、ウイルスを用いて培養昆虫細胞に感染させる。

【0018】

米国特許第5,021,347号は、JEV E蛋白質の遺伝子が組み入れられる組み換え型ワクシニアウイルスゲノムを開示する。生きた組み換え型ワクシニアウイルスは、JEVに対して免疫するためのワクチンとして用いる。ウイルスがデング血清型2型、デング血清型4型およびJEVのE蛋白質のC-末端切断型の遺伝子を組み入れる組み換え型ワクシニアウイルスおよびバキュロウイルスは、米国特許第5,494,671号に開示される。米国特許第5,514,375号は、prMからNS2Bに及ぶJEVオープンリーディングフレームの一部を発現する様々な組み換え型ワクシニアウイルスを開示する。これらのボックスウイルスは、プロセシングされたM蛋白質およびE蛋白質を含む細胞外粒子の形成を誘導した。これらのJEV蛋白質をコードする二つの組み換え型ウイルスは、高い力価の中和およびヘムアグルチニン阻害抗体を産生し、マウスにおいて保護免疫を生じた。これらの効果の程度は、1回限りの免疫後より2回免疫処置後のほうが大きかった。JEVのprM/MおよびE蛋白質の遺伝子を含む組み換え型ワクシニアウイルスは、マウスに投与すると保護免疫を付与した (Konishiら、Virology 180 : 401~410 (1991))。JEVからのprMおよびEの遺伝子を有する組み換え型ワクシニアウイルスに感染させたHeLa細胞は、サブウイルス粒子を産生することが示された (Konishiら、Virology 188 : 714~720 (1992))。Dmitrievらは、ダニ媒介脳炎ウイルスの構造蛋白質および特定の非構造蛋白質をコードする組み換え型ワクシニアウイルスによるマウスの免疫を報告した (J. Biotechnology 44 : 97~103 (1996))。

【0019】

組み換え型ウイルスベクターも同様に、デング熱のウイルスワクチンとして役立てるために調製されている。Zhaoら (J. Virol. 61 : 4019~4022 (1987)) は、デング血清型4型からの構造蛋白質およびNS1を有する組み換え型ワクシニアウイルスを調製して、哺乳類細胞を組み換え型ウイルスに感染させた後発現を得た。類似の発現は、標的昆虫細胞に感染させるために組み換え型バキュロウイルスを用いて得られた (Zhangら、J. Virol. 62 : 3027~3031 (1988))。Brayら (J. Virol. 63 : 2853~2856 (1989)) も同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対する保護免疫をマウスに付与する、E蛋白質遺伝子に基づく組み換え型ワクシニアデングワクチンを報告した。Falgoutら (J. Virol. 63 : 1852~1860 (1989)) およびFalgoutら (J. Virol. 64 : 4356~4363 (1990)) は、類似の結果を報告した。Zhangら (J. Virol. 62 : 3027~3031 (1988)) は、デングEおよびNS1蛋白質をコードする組み換え型バキュロウイルスが同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対してマウスを保護することを示した。構造遺伝子と非構造遺伝子とを組み換え型ウイルスワクチンに組み入れた他の組み合わせは、有意な免疫を生じることができなかった (Brayら、J. Virol. 63 : 2853~2856 (1989))。同様に、サルは、E蛋白質を発現する組み換え型バキュロウイルスによって免疫した場合に、デングウイルスチャレンジに対して十分な保護免疫を産生できなかった (Laiら、(1990)、119~124頁、F. Brown, R.M. Chancok, H.S.GinsbergおよびR. Lerner (編) 「Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS」、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

【0020】

組み換え型DNA調製物を用いた免疫は、モデルとして離乳したばかりのマウスを用いて、SLEVおよびデング-2ウイルスに関して報告されている (Phillipottsら、Arch. Virol. 141 : 743~749 (1996) ; Kochelら、Vaccine 15 : 547~552 (1997))。SLEVのprMおよびE遺伝子をコードするプラスミドDNAは、DNA免疫の1回用量または2回用量によるSLEVチャレンジに対して部分的保護を提供した。これらの実験において、対照マウスは約25%の生存を

10

20

30

40

50

示し、DNA免疫マウスには保護抗体は検出されなかった（Phillipottsら、Arch. Virol. 141: 743~749（1996））。prMを含む組み換え型デング-2プラスミドDNAの皮内注射を3回行ったマウスでは、100%が抗デング-2中和抗体を産生し、対応するE遺伝子を投与したマウスの92%が同様に中和抗体を産生した（Kochelら、Vaccine 15: 547~552（1997））。しかし、2用量スケジュールを用いたチャレンジ実験は、致死性デング-2ウイルスチャレンジに対してマウスを保護することができなかった。

【0021】

JEV、SLEV、デングウイルス、および他のフラビウイルスによる感染症に対して免疫するために今日開発されたワクチンは、その使用に伴って多くの短所および問題を有する。不活化ワクチンは費用が高く、調製が不便である。さらに、そのような如何なるワクチンもウイルスを調製するために用いられる宿主細胞の蛋白質に由来するアレルギー反応のリスクを伴う。さらに、そのようなワクチンは、その製造のために雇用される労働者に対してかなりのリスクを呈する。候補弱毒化JEVワクチンは、現在臨床試験中であるが、1996年現在、中華人民共和国外では広く受け入れられていない（Hennessyら、Lancet 347: 1583~1586（1996））。

10

【0022】

JEVのようなフラビウイルスのごく特定の蛋白質を用いることに基づく組み換え型ワクチンは、細胞培養における生合成発現、その後抗原の精製および処置によって産生されるが、高い抗体価を誘導しない。同様に、全ウイルス調製物と同様に、これらのワクチンは、宿主からの抗原またはベクターに対する有害なアレルギー反応のリスクを有する。デングウイルスおよびWNVに対するワクチン開発はあまり進んでおらず、そのようなワクチンに基づくまたは組み換え型蛋白質に基づくワクチンは、先に言及した問題と類似の問題に直面する。

20

【0023】

したがって、調製が安価で、その製造にかかわる労働者に対するリスクが少なく、不純物または外因性の免疫原性成分による有害な免疫反応のリスクが最小限であり、しかも中和抗体および保護免疫を誘発するために非常に有効である、黄熱病ウイルス、デングウイルス、JEV、SLEV、およびWNVのようなフラビウイルスに対して向けられるワクチンまたは改善されたワクチンが必要である。さらに、必要な免疫量を最小限にするJEV、WNV、および関連フラビウイルスに対するワクチンが必要である。

30

【0024】

ワクチンの製造に関して詳細に記述したように現状技術の短所の多くはまた、免疫診断薬の製造のために用いられる抗原および抗体の製造にも当てはまる。特に、ウイルスからの抗原の製造に伴って発生するリスクおよび費用、ならびに現在利用できるほとんどの組み換え型発現抗原が、有効な免疫反応を誘発できないことは、免疫診断薬の分野における、同様のリスク、高い費用および対応する感度の欠如と同等である。このように、高い費用、生きたウイルスの偶発的感染のリスク、およびこれまでに利用可能な試験の感度の所望より低いレベルのために、フラビウイルス感染症および/または混入を検出するための迅速、単純、および高感度の診断試験が必要とされている。

【0025】

本発明は、選択したフラビウイルスに対する抗体を検出するための診断アッセイ法において用いられる、非常に免疫原性の高い組み換え型抗原を提供することによってこれらの需要を満たす。本発明はさらに、フラビウイルス蛋白質に対する抗体を検出するための免疫診断アッセイ法において、フラビウイルス、フラビウイルス遺伝子、またはその模倣体に由来する組み換え型抗原を用いることを提供する。

40

【発明の開示】

【0026】

発明の概要

本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位（TU）を含む核酸分子を提供する。TUは、細胞内に取り込まれた後、宿主細胞に抗原を合成するように指示する。本発明の重要

50

な局面において、フラビウイルスは、黄熱病ウイルス（YFV）、デング血清型1型ウイルス（DEN-1）、デング血清型2型ウイルス（DEN-2）、デング血清型3型ウイルス（DEN-3）、デング血清型4型ウイルス（DEN-4）、セントルイス脳炎ウイルス（SLEV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、西ナイルウイルス（WNV）、ポワッサンウイルスまたは他の如何なるフラビウイルスとなりうる。本発明の重要な態様において、抗原はフラビウイルスprM/M蛋白質、E蛋白質、またはその双方となりうる。本発明の重要な態様において、抗原はキメラフラビウイルス蛋白質となりうる。特に、TUがprM/MとE蛋白質の双方を含む場合、宿主細胞は、prM/MとE抗原とを含むサブウイルス粒子を分泌する。本発明のさらに重要な局面において、核酸はDNA分子である。さらに重要な態様において、核酸TUは、それがprM/MおよびE抗原の発現を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含み、この制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。さらなる態様において、TUのヌクレオチド配列は、TUによって産生されたmRNAの5'末端非翻訳領域における大きいヘアピン構造を模倣することによって、および/またはTUによって産生されたmRNAの翻訳開始部位にコザックコンセンサス配列を含めることによって、真核細胞での翻訳を最適にするように操作される。さらなる態様において、転写単位にはまたポリ-Aターミネーターも含まれる。

10

【0027】

本発明はさらに、免疫原性抗原を合成するように宿主細胞を指示する、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含む宿主細胞を提供する。フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。重要な態様において、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。後者の場合、細胞は、prM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。

20

【0028】

さらに、本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含むフラビウイルスに対して、被験者にワクチン接種するための組成物を提供する。転写単位は、被験者の体内の細胞に、その中に取り込まれた後、免疫原性抗原を合成するように指示する。組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含む。重要な態様において、フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。さらに、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。後者の場合、細胞は、フラビウイルスprM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。これらのサブウイルス粒子はまた、非感染性組み換え型抗原（NRA）とも呼ばれる。重要な態様において、核酸分子はDNA分子である。さらに重要な態様において、転写単位はさらに、核酸が被験者の細胞内に導入された場合にprM/MとE抗原との合成を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含む。この制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。なおさらなる態様において、転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含みうる。

30

【0029】

フラビウイルスに対して被験者にワクチン接種するために本発明によって提供される組成物は、一つ以上のフラビウイルス抗原に対する転写単位を含む、核酸分子、または複数の分子を含みうる。一つ以上の免疫原性フラビウイルス抗原は、異なるフラビウイルス種、株、または単離体の如何なる組み合わせに由来しうる。有意な態様において、含まれるフラビウイルスは、二つもしくはそれ以上、三つもしくはそれ以上、四つもしくはそれ以上、五つもしくはそれ以上、または七つもしくはそれ以上のフラビウイルスとなりうる。そのようなフラビウイルスの例には、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスが含まれるがこれらに限定されない。特定の地理的地域に対して一般的なフラビウイルス疾患に対する免疫を付与するために、複合ワクチンを処方することができる。熱帯および亜熱帯アジアに向けられる特定の態様において、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、WN、およびJEウイルスを選択することができる。アフリカに向けられる特定の態様では、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、WN、およびYFを選

40

50

択することができる。ラテンアメリカに向けられる特定の態様では、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、RocioおよびYFウイルスを選択することができる。

【0030】

本発明は、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法をなおさらに提供する。方法は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含むワクチン接種組成物の有効量を被験者に投与することを含む。転写単位は、被験者の体内において、それらが細胞に取り込まれた後に、免疫原性抗原を合成するように細胞に指示する。組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含む。方法の有意な態様において、フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。方法のなお他の重要な局面において、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。抗原がprM/MとE蛋白質の双方である場合、被験者の体内の細胞は、その中に核酸を組み入れた後、prM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。さらに、方法の重要な態様において、ワクチン接種組成物は非経口経路によって1回量を被験者に投与される。方法のなおさらなる局面において、核酸はDNA分子である。方法のなおさらなる態様において、転写単位はさらに、prM/MとE抗原との合成を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含み、この態様の重要な局面において、制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターである。さらに、転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含んでもよい。

10

【0031】

本発明のこれらの局面および態様は、その異なる属性および長所に基づく。核酸構築物が完全なゲノムを含む配列より、むしろフラビウイルスゲノムのごく一部を含むために、核酸TU含有ワクチンは完全に非生存である。したがって、その製造に関わる労働者またはワクチンを接種された被験者に対するフラビウイルス感染の危険はない。核酸ワクチンは、調製が容易で、投与が容易で、しかも使用前に保存しても安定である。意外にも、本発明の核酸ワクチンは、1回量のための投与後でも哺乳類において保護免疫の付与に本質的に100%成功する。さらに意外な結果は、核酸TUが雌性哺乳類において、乳汁を通してその子孫に伝搬されうる免疫をフラビウイルスに対して産生することができる点である。理論に拘束されたくないが、本発明者らは、核酸が保護免疫の付与に成功するための可能性のあるメカニズムは、ワクチンが投与される被験者の細胞のような、核酸を有する宿主細胞が、フラビウイルスprM/MおよびE抗原を含むサブウイルス粒子を産生するという点である。これらの粒子は、本来のフラビウイルスビリオンの免疫原性属性を模倣する。

20

30

【0032】

本発明はまた、膜貫通シグナル配列が第一のフラビウイルスに由来し、Mおよび/またはE蛋白質が第二のフラビウイルスに由来する、フラビウイルスの非感染性の抗原性ポリペプチド、抗原性ポリペプチド断片、およびprM/MおよびE蛋白質を含むNRAを提供する。さらに、prM/M蛋白質は、第一と第二のフラビウイルスの双方からのアミノ酸配列を含みうる。さらに、E蛋白質は、第一と第二のフラビウイルスの双方からのアミノ酸配列を含みうる。本明細書において用いられる「キメラ」とは、一つ以上のフラビウイルスからの配列を含む如何なる蛋白質または核酸も意味する。本明細書において用いられるように、「非ビルレント」とは、本発明の抗原またはワクチンが疾患を引き起こすことができないことを意味する。より詳しくは、組み換え型蛋白質抗原は、フラビウイルスの感染、複製、および発病にとって必要であるフラビウイルスからの混入ゲノム材料を含まない。

40

【0033】

本発明のポリペプチドは、選択したフラビウイルスのprM、M、および/またはE蛋白質に関して、本明細書に定義した、または当技術分野で既知のアミノ酸配列を含みうる。本発明の核酸は、選択したフラビウイルスのprM、M、および/またはE蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含みうる。

【0034】

本発明の抗原は非結合となりうる、または固相上での抗原の配置を促進する担体分子に結合させることができる。担体分子は、抗原をそれに結合させることができ、ヒトの血清に

50

において抗体と反応しない分子である。そのような担体の例は、ウシ血清アルブミン（BSA）である。

【0035】

本発明の抗原はまた、抗原を産生することができる発現系において、抗原をコードする核酸を発現することによって得られる組み換え型蛋白質となりうる。

【0036】

本発明の抗原のアミノ酸配列は、prM、M、および/またはE抗原の免疫反応性部分を含みうる。これらの抗原はさらに、より堅固な二次構造を提供することによってエピトープの反応性を増加させるためにジスルフィド結合することができるアミノ酸を除去および/または付加するため、その生体内寿命を増加させるため、その細胞障害性を変化させるため、または感染症を予防するためなどの、いくつかのさらなる特性を提供するように設計された配列に結合してもよい。いずれにせよ、抗原は免疫反応性および/または免疫原性を有しなければならない。

10

【0037】

発明の詳細な説明

本発明は、prM/MおよびE蛋白質抗原のようなフラビウウイルス抗原性蛋白質をコードする核酸転写単位を含む。核酸は、特に細胞が被験者の細胞である場合、核酸が適当な細胞に取り込まれると、prM/MおよびE蛋白質抗原を発現するように機能する。本発明はまた、その活性物質が核酸転写単位（TU）であるワクチンを含む。本発明はさらに、TUを含む細胞を含む。本発明はさらに、核酸TU分子を含むワクチンの有効量を被験者に投与することによって、フラビウウイルス感染症に対して被験者を免疫する方法を含む。

20

【0038】

本発明は、転写単位が抗原の合成を指示する、第一のフラビウウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と、第二のフラビウウイルスの免疫原性フラビウウイルス抗原とをコードする転写単位を含む単離された核酸を提供する。本発明はさらに、フラビウウイルス抗原を作製するために核酸転写単位（TU）を用いることおよび核酸TUによって産生されたフラビウウイルス抗原を用いることを含む。本発明に含まれるフラビウウイルス抗原には、第一のフラビウウイルスと、少なくとも一つのさらなるフラビウウイルスからのアミノ酸配列を組み入れた、キメラフラビウウイルス抗原が含まれる。本発明はさらに、フラビウウイルス特異的抗体を産生するため、およびフラビウウイルス特異的抗体の存在を検出するために、本発明のTUによってコードされるフラビウウイルス抗原を用いることを含む。

30

【0039】

一つの態様において、本発明の単離された核酸は、日本脳炎ウイルスシグナル配列をコードする転写単位を含みうる。

【0040】

もう一つの態様において、本発明の転写単位は、以下のフラビウウイルスの一つまたは複数に由来しうる免疫原性フラビウウイルス抗原をコードしうる；黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルス。

【0041】

もう一つの態様において、本発明の転写単位は、以下のフラビウウイルスの一つまたは複数からの配列を含みうる免疫原性キメラフラビウウイルス抗原をコードしうる：黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルス。

40

【0042】

特定の態様において、本発明の核酸は、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルス、SLEV、YFV、および/またはポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードしうる。核酸はまた、フラビウウイルスのM蛋白質、フラビウウイルスのE蛋白質、フラビウウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウウイルスのM蛋白質の一部、フラビ

50

ウイルスのE蛋白質の一部、ならびに／またはフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方となりうる。好ましい態様において、単離された核酸は、フラビウイルスのM蛋白質とE蛋白質の双方をコードする。さらに、本発明の核酸は、DNAであってよく、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、または配列番号：42のヌクレオチド配列を含みうる。

【0043】

もう一つの特定の態様において、本発明の核酸は、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、第二のウイルスのM蛋白質、および第二のウイルスのE蛋白質をコードする核酸の一部を、JEV E蛋白質の対応する部分をコードする核酸に置換することによって形成される、キメラE蛋白質をコードしうる。または、第二のウイルスのE蛋白質の欠失部分に対応する配列の部分は、第三のウイルスから選択した他の配列によって置換することができるか、またはそれは非ウイルス配列となりうる。第二の蛋白質は、西ナイルウイルス、SLEV、YFV、ポワッサンウイルスおよび／またはデングウイルス血清型となりうる。キメラE蛋白質は、カルボキシ末端部分が一つのフラビウイルスに由来し、キメラE蛋白質の残りの部分がもう一つのフラビウイルスに由来する蛋白質を含みうる。カルボキシ末端部分は、キメラE蛋白質の例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、または75%となりうる。本発明の核酸はDNAとなりえて、配列番号：44または配列番号：46のヌクレオチド配列からの蛋白質コード配列を含みうる。本発明の核酸は、配列番号：44または配列番号：46のヌクレオチド配列を含みうる。

10

【0044】

本発明の転写単位はまた、それが抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含みうる。制御配列は、例えば、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。本発明の核酸はまた、転写単位によってコードされる抗原を含むポリペプチドに関する翻訳開始部位に存在する、コザックコンセンサス配列を含みうる。本発明の転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含みうる。

20

【0045】

本発明はさらに、本発明の核酸を含む細胞を提供する。

【0046】

同様に、薬学的に許容される担体と、本発明の核酸、細胞、または抗原とを含む組成物が提供される。本発明はさらに、本発明の組成物の有効量を被験者に投与することを含む、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法を提供する。特定の態様において、被験者を免疫するために用いられる組成物は、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方の合成を指示し、被験者の体内の細胞は、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。または、組成物は、フラビウイルスのM蛋白質および／またはE蛋白質、またはM蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を含みうる。本発明の方法において、免疫組成物は、1回用量を被験者に投与することができ、かつ非経口経路によって投与することができる。

30

【0047】

本発明はさらに、本発明の単離された核酸から産生された抗原を提供する。例として、TUのヌクレオチド配列によってコードされた第二のフラビウイルスからの抗原は、例えば西ナイルウイルスに由来しうるM蛋白質となりうる。抗原はまた、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび／または黄熱病ウイルスに由来する蛋白質となりうる。さらなる態様において、抗原は、第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列と、SLEV、JEV、YFV、WNVおよび／またはポワッサンウイルスに由来しうる、第二のフラビウイルスからのprM/M蛋白質の残りを含む、さらなるアミノ酸配列とを含む。第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列は、高いシグナル配列確率のような所望の特徴を付与する、改善または改変されたシグナル配列となりうる。設計または選択によってこれらの目標を達成することは、隠れたマルコフモデルを用いるプログラムを含むがこれらに限定されない、機械学習コンピュータプログラムを用いて行うことができる。

40

50

【 0 0 4 8 】

TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス抗原、デングウイルス抗原、セントルイス脳炎ウイルス抗原、日本脳炎ウイルス抗原、ポワッサンウイルス抗原および/または黄熱病ウイルス抗原となりうる。

【 0 0 4 9 】

TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、E蛋白質であってもよく、それは西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび/または黄熱病ウイルスに由来するE蛋白質となりうる。コードされる抗原はまた、一つ以上のフラビウイルスから選択されたアミノ酸配列を含む、キメラE蛋白質となりうる。

10

【 0 0 5 0 】

さらに、TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび/または黄熱病ウイルスに由来しうるM蛋白質およびE蛋白質となりうる。

【 0 0 5 1 】

本明細書において用いられるように、「M蛋白質」、「prM蛋白質」、または「prM/M蛋白質」とは、フラビウイルスM蛋白質またはフラビウイルスprM蛋白質を意味する。例には、一つまたは複数のフラビウイルスprM蛋白質からのアミノ酸配列を含むprM蛋白質、さらなるアミノ酸配列を含まないM蛋白質、およびインビトロまたはインビボで成熟M蛋白質を産生するようにプロセシングされる、さらなるアミノ酸配列を含む蛋白質が含まれるが、こ

20

【 0 0 5 2 】

本明細書において用いられるように、「核酸転写単位」または「核酸転写単位分子」は、一つまたは複数の明記された蛋白質をコードする核酸を意味する。TUは、適した細胞に組み入れられた後、核酸が核酸によってコードされる一つまたは複数の明記された遺伝子産物の合成を誘導するような生物活性を有する。遺伝子産物（複数）は、TUに化学的に関連していない蛋白質のような他の生体高分子である。核酸TUは、その細胞成分を用いてTUの核酸によってコードされる特異的遺伝子産物、または複数の産物を生じるように細胞を誘導する。如何なる核酸もTUとして機能する可能性があるが、好ましい態様において、TUは、プラスミドまたはベクターが、実験および生合成のためにTUを用いることを容易にする

30

【 0 0 5 3 】

本明細書において用いられるように、「制御配列」とは、細胞の適当な細胞成分と相互作用して、TUによってコードされる遺伝子産物の増強されたまたは活性化された生合成に至る、TU内に組み入れられた調節ヌクレオチド配列である。このように、適した制御配列は、細胞の成分がそれに対して相互作用することができ、それによって遺伝子産物の合成が得られる配列である。核酸において明記されたコード配列に関して機能的に配置されると、制御配列は、明記された核酸の発現を有効に制御して遺伝子産物を産生する。

【 0 0 5 4 】

本明細書において用いられるように、「プロモーター」は、制御配列として作用するTUにおけるヌクレオチド配列である。

40

【 0 0 5 5 】

本明細書において用いられるように、「コザック配列」または「コザックコンセンサス配列」は、真核細胞mRNAsの翻訳を最適にする翻訳開始部位でのヌクレオチド配列である（Kozak, Mol. Cell Biology 9: 5134~5142 (1989)）。

【 0 0 5 6 】

本明細書において用いられるように、「ターミネーター」は、成熟mRNAの3'末端でのポリアデニル化を誘導するように作用する伸長ヌクレオチド配列である。ターミネーター配列は特定のコード配列の後、またはそこから下流に認められる。

50

【0057】

本明細書において用いられるように、「細胞」は一つもしくは複数の遺伝子産物をコードするTUを含む、または中にそのようなTUが導入されている原核細胞または真核細胞である。このように、細胞は、細胞において成分として天然にまたは内因性に認められない外来または異種物質、すなわちTUを含む。適した細胞は、TUを導入した結果、遺伝子産物を生合成することができる細胞である。特に、適した細胞は、もしあればTU内に含んでもよい制御配列、およびターミネーター配列に反応する細胞である。本発明の重要な態様において、細胞は哺乳類細胞である。本発明の特に重要な態様において、細胞は、TUがワクチンの成分として投与されているヒトまたはヒト以外の被験者の体内に本来存在する細胞である。または、ワクチンとして、もしくは免疫診断アッセイ法において用いるため、または証明目的のために抗原を調製することを含む、分析または診断応用において、細胞は、インビトロで培養されたヒトまたはヒト以外の細胞であってもよい。

10

【0058】

本明細書において用いられるように、特定の病原体に対して特異的な「ワクチン」または「被験者にワクチン接種するための組成物」は、被験者に投与した場合に、被験者において免疫応答を誘導する調製物を意味する。本明細書において用いられるように、「免疫原性」反応は、病原体に対する保護免疫を被験者に付与する反応である。理論に拘束されたくはないが、免疫原性反応は、中和抗体の産生によって（すなわち、液性免疫応答）、免疫系の細胞障害細胞によって（すなわち、細胞性免疫応答）、またはその双方によって起こってもよいと考えられる。本明細書において用いられるように、「免疫原性抗原」は、被験者に導入した場合に、または宿主もしくは被験者の細胞内で合成された場合に、免疫原性反応を誘導する抗原である。本明細書において用いられるように、ワクチンまたはワクチン組成物の「有効量」は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与するために十分である量である。歴史的に、ワクチンは、活性成分として、病原体、特にその表面を含む、一つまたは複数の特異的分子成分または構造を含むと理解されてきた。そのような構造には、病原性生物において一般的に認められる蛋白質、複合糖質、および/または複合脂質のような表面成分が含まれてもよい。

20

【0059】

しかし、本明細書において用いられるように、「ワクチン」または「被験者にワクチン接種するための組成物」という用語は、先行段落において要約した従来の意味を拡大することを強調しなければならない。本明細書において用いられるように、これらの用語はまた、本発明のTUまたはTUを含む組成物にも関する。TUは、病原体の明記された抗原であって、被験者の細胞内でTUによってコードされる一つまたは複数の特異的遺伝子産物の生合成を誘導する。次に、生合成抗原が免疫原として作用する。既に記述したように、TU、したがってワクチンは、明記された免疫原性抗原をコードする如何なる核酸であってもよい。本発明の好ましい態様において、ワクチンのTUはDNAである。TUは、分子生物学、細胞生物学、およびウイルス免疫学の分野の当業者にとって簡便となるように、さらなる遺伝子または特定の配列を組み入れたプラスミドまたはベクターを含みうる（参照として本明細書に組み入れられる、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989；ならびに「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）を参照のこと）。

30

40

【0060】

本発明のTU分子は、WNV、JEV、デングウイルス、黄熱病ウイルス、およびSLEVのような、しかしこれらに限定されないフラビウイルス抗原に関連した特異的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する、核酸または核酸誘導体を含む。如何なる核酸もTUとして作用する可能性があるが、重要な態様において、TUはDNAである。または核酸はRNA分子であってもよい。それらはまた、薬剤としてのTUの安定性を増加するように化学改変されている、ホスホジエステル結合の骨格を有するDNAまたはRNAのいくつかの誘導体の如何なる一つであってもよい。そのように想定される改変には、ホスホロチオエート誘導体またはホ

50

スホネート誘導体が含まれるがこれらに限定されない。誘導体に関するこれらおよび他の例は、核酸化学の当業者に周知である。

【0061】

JEVのゲノムは特徴が調べられ、シーケンシングされている(図1および2)。M構造蛋白質は、プレM蛋白質(pr)を含むポリ蛋白質の一部として発現される。このpr配列は、M蛋白質配列に対して隣接するアミノ末端であるが、ポリ蛋白質のプロセッシングにおける構造上の問題を防止する。特に、pr配列が存在することは、E蛋白質の誤った折り畳みを防止する上で重要である。このように、prMの存在によって、JEV粒子は集合することができる。ビリオンまたは粒子が形成されると、pr配列はprM蛋白質から切断されて、M蛋白質を含む成熟ウイルス粒子を生じることができるが、M蛋白質を生じるためのprM蛋白質の切断は、感染性粒子を産生するためには必ずしも必要ではない。多くの異なる関連するフラビウイルスからのprM配列は、程度は低いものの切断されるが、フラビウイルスそのものはそれにもかかわらず感染性である。類似のゲノム構造および機能を有するそのような関連するフラビウイルスの例には、WNV、YFV、デングウイルス、およびSLEVが含まれるがこれらに限定されない。

10

【0062】

一つの態様において、本発明におけるフラビウイルスMおよびE蛋白質をコードするTUはDNAである。先行段落における考察に従って、このDNAは、プレM配列を含むM蛋白質をコードするヌクレオチド配列と、E蛋白質をコードするヌクレオチド配列とを含む。このようにして、意図される遺伝子産物は、細胞内でサブウイルス粒子を形成させることができる。次に、プレM配列は、充満したビリオンに関して起こる方法と類似の方法で切断することができる。

20

【0063】

インビボでワクチンとして有効に機能するために、TU内に、抗原をコードするヌクレオチド配列の転写を増強または促進する作用を有する制御配列を含めることが都合がよい。そのようなプロモーターを用いることは、分子生物学、細胞生物学、およびウイルス免疫学の分野の当業者に周知である(参照として本明細書に組み入れられる、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989; および「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987(四半期ごとに更新)を参照のこと)。TUを哺乳類宿主においてワクチンとして用いる場合、用いられるプロモーターは、好ましくは哺乳類細胞において有効に機能するプロモーターである。そのようなプロモーターは、転写が促進されるコード配列に関して、そのような転写を機能的に促進する可能性がある位置に配置される。本発明の重要な態様において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス初期プロモーターである。さらに、本発明のさらに好ましい態様において、TU核酸においてコード配列の後にターミネーター配列が続く(Sambrookら)。本発明の特定の態様は、原核細胞および真核細胞の双方に関する。原核細胞または真核細胞のいずれかにおいて有用である多くのプロモーター配列が既知である(Sambrookらを参照のこと)。

30

【0064】

本発明の核酸は、さらに、免疫刺激要素として作用することが当業者に既知であるDNAを含んでもよい。そのような要素の例には、細菌DNAにおける特定のCpGモチーフが含まれるがこれらに限定されない(Satoら、Science 273: 352~354(1996); Klinmanら、Vaccine 17: 19~25(1998))。

40

【0065】

本発明のTUの調製は、分子生物学の分野の当業者に周知の方法によって容易に行われる。含まれる技法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989; および「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987(四半期ごとに更新)に記載されている。フラビウイルスRNA

50

分子は、例えば、フラビウイルスおよび他のグループのウイルスも同様に熟知しているウイルス学者に広く知られている方法によって生きたウイルスの試料から単離してもよい。JEVについて用いられる方法は、Kunoら (J. Virol. 72: 73~83 (1998)) において要約されている。RNAは、逆転写酵素を用いたcDNAの合成のための鋳型として用いられる。cDNAから、prMからEコード領域までを含む断片 (図2) を提供するために適切にcDNAを切断することが知られている、制限ヌクレアーゼによる消化によって、そのような断片が得られる。JEVの制限消化の例は、Nitayaphanら (1990) およびKonishiら (1991) に提供される。サイトメガロウイルスプロモーターのようなプロモーター、コザック配列のような有効な翻訳を促進する配列、およびポリアデニル化シグナルの配列を組み入れることも同様に、分子生物学および組み換え型DNA操作の当業者に周知である (Kozak, Mol. Cell Biol 9: 5134~5142 (1989); Azevedoら, Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 147~153 (1999))。所望のコード配列および制御配列を含むTUを含む核酸を調製する場合、これは核酸を増幅する方法によってより大量に得てもよい。そのような方法は、分子生物学および組み換えDNA操作の当業者に広く既知である。これらの方法の例には、当技術分野で周知であるように、原核細胞のような細胞において培養することによって複製するためにプラスミドに核酸を組み入れること、および培養終了後にプラスミドを回収することと共に、PCRおよび他の増幅プロトコルのような方法による核酸の増幅が含まれる。これらの例は、TUを含む核酸が得られる方法に限定されないと解釈される。

10

【0066】

本発明のTU含有核酸分子は、分子生物学およびウイルス免疫学の分野の当業者に周知の多くの方法で、適当な細胞に導入してもよい。例として、これらには、細胞によって取り込まれるプラスミドもしくは類似の核酸ベクターへの組み込み、リポソーム、特に陽イオン脂質を含むリポソームのような小胞脂質構造内への封入、またはエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる粒子への吸着が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0067】

一般的に、本発明の細胞は、TUを含む、またはその中にTUが導入されている原核細胞または真核細胞である。本発明のTUはコードされるprM/MおよびE抗原の細胞内合成を誘導する。適した細胞は、核酸導入の結果として遺伝子産物の生合成能を有する細胞である。本発明の特定の態様において、適した細胞は、制御配列に、そしてもし存在すれば、TU内に含まれてもよいターミネーター配列に反応する細胞である。この様式で反応するために、そのような細胞は、制御配列およびターミネーター配列と相互作用して、促進および終了機能のそれぞれを実行するように作用する成分をその中に含む。インビトロで培養する場合、細胞は原核細胞、単細胞真核細胞、または多細胞真核細胞であってもよい。本発明の特定の態様において、細胞は哺乳類細胞である。これらの場合、合成されたprM/MおよびE蛋白質遺伝子産物は、ワクチンとしてもしくは免疫診断アッセイにおいて用いるため、または証明目的のために抗原を調製することを含む、分析的または診断応用において用いるために利用できる。

30

【0068】

細胞が培養哺乳類細胞であるような何らかの状況では、prM/MおよびE抗原は、サブウイルス粒子の形で分泌される。これらは、表面の超微細構造形態および免疫原性特性という点で生きたウイルスに類似のprM/MとE蛋白質との凝集体である。しかし、本発明のTUは、フラビウイルスゲノムの残りを含まないため、カプシドが組み入れられることはなく、最も重要なことに感染性のウイルスRNAは存在しない。

40

【0069】

本発明のもう一つの重要な態様において、細胞は、TUがワクチンとして投与されている被験者の天然の細胞成分である。被験者に投与した場合、TUは、被験者の細胞に取り込まれる。被験者の細胞は、如何なるプロモーター配列、および存在すればターミネーターにも反応することができる。いずれにせよ、TUは、フラビウイルスprM/MおよびE遺伝子産物を合成するように被験者の細胞を誘導する。理論的検討に拘束されたくないが、被験者の細胞は、インビトロでの培養哺乳類細胞について起こることが判明しているように、prM/

50

MおよびE抗原からなるサブウイルス粒子をインビボで産生すると考えられている。そのようなサブウイルス粒子は、インビボ免疫原として作用して、被験者の免疫系を刺激して、被験者に保護免疫を付与する免疫応答を生じると考えられている。この場合も、理論に拘束されたくはないが、得られた保護免疫は液性または細胞性免疫のいずれかによって、すなわちそれぞれ、MHCクラスIIもしくはクラスI拘束メカニズムのいずれかによって、または双方のメカニズムによって生じる可能性がある。

【0070】

本発明に従って、prMおよび/またはE抗原をコードする核酸を含むTUの有効量を被験者に投与することによって、JEV、YFV、デングウイルス、SLEV、WNV、または他のフラビウイルスのようなフラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する。核酸は、被験者の細胞に組み入れられた後、フラビウイルスprM/Mおよび/またはE抗原の合成に至る。

10

【0071】

TUを被験者に投与するために、TUは薬学的担体を含む組成物に組み入れられる。「薬学的に許容される」という用語は、生物学的に、またはそれ以外の意味で有害でない材料を意味し、すなわち材料は、如何なる望ましくない生物学的作用も引き起こさなければ、またはそれが含まれるワクチンの他の成分の如何なるものとも有害な相互作用を起こさなければ、免疫原性材料（すなわち、組み換え型フラビウイルス蛋白質抗原またはその一部）と共に被験者に投与してもよい。薬学的に許容される担体またはその成分の例には、水、生理食塩液、および一般的な生理緩衝液が含まれる（さらなる例に関しては、Arnon, R. (編)、「Synthetic Vaccines I」: 83~92頁、CRC Press、Boca Raton、Florida、1987を参照のこと）。

20

【0072】

ワクチン接種量を記述する場合の重要な値は、ビルレントまたは野生型フラビウイルス感染によって引き起こされる感染疾患を受ける宿主において、保護反応を誘発するために必要な免疫原の総量であることは、当業者によって理解される。用いられる用量の回数および容量は、変更することができ、年齢、体重、性別、種、投与されるワクチンのタイプ、投与様式、被験者の全身状態等と共に、当業者によって認識される他の重要な要因のようなパラメータに基づいて医師によって決定される。

【0073】

TUは、被験者に経口、非経口（例えば、静脈内）、筋肉内注射、腹腔内注射、経皮、体外、鼻腔内、局所等によって投与してもよい。輸送はまた、挿管によって呼吸器系（例えば、肺）の如何なる領域にも直接行うことができる。必要なTUの正確な量は、被験者の種、年齢、体重、および全身状態、用いるワクチンの免疫原性、被験者が免疫されるフラビウイルスの株または種に応じて、被験者ごとに变化するであろう。このように、本発明のあらゆる態様に関して正確な量を明記することは可能ではない。しかし、当業者は、本明細書の教示に示される単に日常的な実験を用いて、適当な量を決定することができる。

30

【0074】

本発明のワクチンの非経口投与は、必要であれば、一般的に注射を特徴とする。注射剤は、液体溶液もしくは懸濁液、注射前に液体にされる溶液もしくは懸濁液に適した固体、または乳剤のいずれかとして通常の形で調製することができる。非経口投与のためのより最近改訂されたアプローチは、一定用量が維持される遅延型放出または徐放系を用いることを含む。例えば、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第3,610,795号を参照のこと。

40

【0075】

固体組成物に関して、通常为非毒性固体担体には、例えば、薬学等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム等が含まれる。液体の薬学的に投与可能な組成物は、例えば本明細書に記載の活性化合物と選択的な薬学的アジュバントとを、例えば、水、生理食塩液、デキストロース水溶液、グリセロール、エタノール等のような賦形剤に溶解、分散等して、それによって溶液または懸濁液を形成することによって調製すること

50

ができる。望ましければ、投与される薬学的組成物はまた、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤等、例えば、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、酢酸ナトリウムトリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミン等のような非毒性の補助物質を少量含んでもよい。そのような投与剤形を調製する実際の方法は、当業者に既知または明らかであり、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Martin, E.W.編、最新版、Mack Publishing Co., Easton, PA)を参照のこと。

【0076】

一つの態様において、本発明のTUは、TUを被験者に投与した直後に、経皮電気パルスを被験者に適用し、被験者の組織へのインビボ核酸移入のより大きい効率および再現性を提供する、エレクトロトランスファー媒介インビボ遺伝子輸送を用いることによって被験者に投与することができる(Mirら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 4262~4267 (1999))

10

【0077】

本発明のワクチンを被験者に投与することによって被験者を免疫することを記述する本発明の方法において、免疫の効率は、被験者の免疫状態をモニターするために当技術分野で周知の臨床プロトコールに従ってモニターすることができる。

【0078】

ワクチン接種組成物の有効量は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与する量であると、当業者によって容易に決定される。そのような決定を行うために、当業者は、ワクチンが投与された被験者の血液中に存在するフラビウイルスprM/MおよびE特異的抗体および/またはフラビウイルスprM/MおよびE特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導能を評価することができる。同様に、実験的被験者を免疫するために用いられる抗原性組成物に対応する生きたフラビウイルスをチャレンジすることによって、実験的被験者に付与される保護免疫のレベルを決定することができる。そのようなチャレンジは当業者に周知である。

20

【0079】

一般的に、WNV、JEV、YFV、デングウイルス、SLEV、または本発明に従う他のフラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫するために、そしてそのような方法において用いられるTUは全体的な大きさが異なることを認識して、約0.1 µg/kg体重~約50 µg/kg体重の用量範囲を用いることができる。

30

【0080】

意外にも、DNAである本発明のTUは、筋肉内注射、またはエレクトロトランスファーによってTUの1回有効量のみを投与した後でも、約100%の有効性レベルで保護免疫を付与することが判明した。これは、1回またはそれ以上の追加ワクチン接種を必要とし、ほぼ100%の有効性の保護免疫を付与しない可能性がある通常のワクチン(上記のように)を用いて行った多くの免疫法とは対照的である。

【0081】

さらに意外にも、保護免疫は、ワクチン接種した雌性被験者から被験者の子孫に保護免疫を伝搬する可能性があることが判明した。本発明のTU DNAを用いて母親にワクチン接種した後、新生仔マウスの有意な比率がウイルスチャレンジに対して保護されることが示された。理論に拘束されたくはないが、受動免疫は、母親の乳汁中に様々な病原体に対して特異的な中和抗体が存在することにより、新生仔哺乳類に付与される可能性があることが知られている。新生仔において認められたJEVに対する保護免疫は、このようにしてそれらに伝搬された可能性がある。

40

【0082】

本発明のもう一つの態様において、TUは、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と、第二のフラビウイルスの免疫原性フラビウイルス抗原とをコードする。このように、一つの態様において、例えば、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列を、第二のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列に置換すると、これによって、宿主における新生ポリペプチドの適切な折り畳み、宿主における適切なプロセッシング、および

50

／またはプロセシングされた蛋白質の適切な折り畳みが起こる。

【0083】

本発明のもう一つの態様において、TUは、抗原が一つまたは一つ以上のフラビウウイルスからの配列を含む、免疫原性フラビウウイルス抗原をコードしてもよい。シグナル配列は、改善されたシグナルペプチドとなりうる。シグナル配列の改善、またはより最適なシグナル配列の選択は、実施例18およびそこで引用された参考文献において教示された原理および技術を適用することによって行うことができ、それらの参考文献のそれぞれは、所望の特性および機能を有するシグナル配列の選択、同定、および設計に関連した明白な教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる。一般的に、これらの所望の特性および機能は高いシグナル配列確率を含むと考えられる。

10

【0084】

本発明のもう一つの態様において、一つ以上のフラビウウイルスからの免疫原性フラビウウイルス抗原をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUが、単一の組成物に含まれる。このように、一つの態様において、例えば、TUは、一つ以上のフラビウウイルスからの蛋白質にプロセシングされる新生ポリペプチドまたは複数のポリペプチドをコードしうる。好ましくは、プロセシングされた蛋白質は、蛋白質に対する免疫応答を誘発するサブウイルス粒子を形成する。サブウイルス粒子は、同じフラビウウイルス、フラビウウイルスの組み合わせ、またはキメラフラビウウイルス蛋白質の配列に由来する、プロセシングされた蛋白質から形成することができる。一つ以上のフラビウウイルスからの免疫原性フラビウウイルス抗原をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUを含む複合ワクチンは、地域で流行しているか、またはそうでなければ遭遇する可能性があるフラビウウイルスからの蛋白質を含めることによって特定の地理的地域において用いるために作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯アジアのためのワクチンは、DEN、WN、およびJEウイルスワクチンの四つの血清型からの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうる。アフリカおよびラテンアメリカのための同様に有用なワクチンはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルス、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスからの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうるであろう。

20

【0085】

もう一つの態様において、TUは、第一のフラビウウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と一つ以上のフラビウウイルスからのアミノ酸配列を含む免疫原性キメラフラビウウイルス抗原とをコードする。このシグナル配列は、日本脳炎ウイルスシグナル配列となりうる。キメラフラビウウイルス抗原は日本脳炎ウイルス抗原からの配列を含みうる。特定の態様において、キメラ抗原はE蛋白質である。E蛋白質のカルボキシ末端部分は、日本脳炎ウイルスからのE蛋白質となりうる。カルボキシ末端部分は、例えば、キメラE蛋白質の5、10、15、20、25、30、40、50、または75%となりうる。好ましい態様において、TUは、日本脳炎ウイルスの構造蛋白質のシグナル配列、デングウイルスのprM蛋白質、および日本脳炎ウイルスとデングウイルスの双方からの配列を含むキメラE蛋白質をコードする。キメラ蛋白質は、カルボキシ末端部分が日本脳炎ウイルス配列を含むE蛋白質となりうる。TUの例には、配列番号：45および配列番号：47に示す抗原のようなフラビウウイルス抗原の合成を指示することができる配列番号：44および配列番号：46に示される核酸配列が含まれる。

30

40

【0086】

本発明はさらに、蛋白質ワクチンとして用いるための、薬学的に許容される担体中に本発明のポリペプチドを含む、免疫原性組成物を提供する。本発明の転写単位から産生される抗原は、被験者において有効な免疫応答を誘発するために用いることができる。この目的の抗原は、蛋白質の免疫原性断片を含む、フラビウウイルスprM、フラビウウイルスM蛋白質、フラビウウイルスE蛋白質またはその如何なる組み合わせを含みうる。特に好ましい態様は、本明細書に記載のNRAを用いることである。さらに好ましい態様は、一つまたは複数のフラビウウイルスのシグナル配列と、一つまたは複数の異なるフラビウウイルスの構造蛋白質（複数）とを含むキメラ蛋白質である。特に好ましい態様において、抗原のシグナル配列は、日本脳炎ウイルスシグナル配列である。他の好ましい態様において、シグナル配列

50

は改善されたシグナルペプチドである。シグナル配列の改善、またはより最適なシグナル配列の選択は、実施例18およびそこで引用されている参考文献において教示される原理および技術を適用することによって行うことができ、その文献のそれぞれは、所望の特性および機能を有するシグナル配列の選択、同定、および設計にそれぞれ関連する明白な教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる。一般的に、これらの所望の特性および機能は高いシグナル配列確率を含むであろう。

【0087】

他の態様において、本発明の蛋白質ワクチンはさらに適したアジュバントを含む。本明細書において用いられるように、「アジュバント」は、免疫応答の強化剤または増強剤である。「適している」という用語は、ワクチン接種被験者において有害反応を生じることなく免疫応答を増強するために、ワクチン免疫原（すなわち、フラビウイルスprM蛋白質、フラビウイルスM蛋白質、フラビウイルスE蛋白質、またはその如何なる組み合わせ）と併用して用いることができる如何なる物質も含まれることを意味する。特定のアジュバントの有効量は、ワクチン接種被験者の免疫応答に及ぼすアジュバントの増強作用を最適にするために容易に決定できる。好ましい態様において、本発明のワクチンのアジュバント投与は、2%水酸化アルミニウム溶液とその後鉱油を用いる2段階プロセスである。特定の態様において、適したアジュバントは、以下の群から選択することができる：鉱油、植物または魚油と水との乳剤、フロイントの不完全アジュバント、大腸菌J5、硫酸デキストラン、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、バクトアジュバント、カルボボル（Carbopol）（BF Goodrich Company, Cleveland, Ohio）のような特定の合成ポリマー、ポリアミノ酸およびアミノ酸コポリマー、サポニン、カラゲニン、REGRESSIN（Vetrepharm, Athens, GA）、A VRIDINE（N,N-ジオクタデシル-N',N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）-プロパンジアミン）、O-アセチル基散在長鎖多分散 β （1,4）結合マンナンポリマー（例えば、ACEMANNAN）、マイコバクテリウム種の非病原性株に由来する徐蛋白された高度精製細胞壁抽出物（例えば、EQUIMUNE、Vetrepharm Research Inc., Athens, GA）、モノオレイン酸マンニット、パラフィン油およびムラミルジペプチド。

【0088】

もう一つの局面において、本発明は、被験者における有効な免疫応答を誘発するために、本発明の蛋白質ワクチンの免疫原性量によって被験者を免疫する方法を提供する。免疫は、経口、非経口、鼻腔内、気管内、筋肉内、乳腺内、皮下、静脈内および/または皮内に行うことができる。フラビウイルスprM蛋白質、フラビウイルスM蛋白質および/またはフラビウイルスE蛋白質を含むワクチンは、注射、吸入、摂取、または注入によって投与することができる。1回量を投与することができ、および/またはワクチン調製物の反復用量、すなわち「追加免疫」を、最初の免疫応答を増強するために定期的に投与するか、または最後の用量以降長期間の後投与することができる。ワクチン接種の間隔は、被験者の年齢および状態に応じて変化しうる。

【0089】

「免疫原性量」という用語は、ワクチン接種被験者において免疫応答を誘導するために十分であって、それらに曝露された際に、野生型またはビルレントフラビウイルス感染によって引き起こされた疾患に対して被験者を保護するか、またはワクチン接種被験者に対するフラビウイルス感染症の作用を減弱する、治療的もしくは商業的に有益な作用を有する免疫原、またはその一部の量を意味する。

【0090】

本発明はさらに、本発明の抗原による免疫に反応して産生された抗体を提供する。本発明の抗体には、無傷の免疫グロブリン分子、キメラ免疫グロブリン分子、「ヒト化抗体」、またはFabもしくは $F(ab')_2$ 断片となりうるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれうる。そのような抗体および抗体断片は、当技術分野で周知の技術によって産生することができ、それらには、参照として本明細書に組み入れられる、HarlowおよびLane（「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）ならびにKohlerら（Nature 256: 495~97, 1975）ならびに米国特

10

20

30

40

50

許第5,545,806号、第5,569,825号、および第5,625,126号に記載されたものが含まれる。抗体は如何なるアイソタイプIgG、IgA、IgD、IgE、およびIgMの抗体となりうる。

【0091】

本発明は、連結したV_HおよびV_Lドメインを含み、抗体の本来のイデオタイプのコンフォメーションおよび特異的結合活性を保持する、一本鎖抗体(ScFv)が含まれうる。そのような一本鎖抗体は当技術分野で周知であり、標準的な方法によって産生することができる(例えば、Alvarezら、Hum. Gene Ther. 8: 229~242(1997))。

【0092】

抗体は、一つまたは複数のフラビウイルスのprM、M、および/またはE抗原の免疫原性アミノ酸配列と、異なるフラビウイルス(例えば、JEV)のシグナル配列とをコードする核酸配列から合成した、本発明の抗原に対して作製することができる。これらのキメラ構築物を用いて合成された免疫原性ペプチドは、アミノ酸配列における免疫原性領域を同定するために、当技術分野で周知の方法を用いることによって容易に同定することができ、本発明の抗体を産生するために用いられる。

【0093】

抗原/抗体複合体を形成することができる状態、ならびに抗原/抗体複合体の形成を検出するためのアッセイ法、および検出された蛋白質の定量は、当技術分野で標準である。そのようなアッセイ法には、当業者に周知である、ウェスタンブロッティング、免疫沈殿、免疫蛍光、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)、免疫磁気アッセイ、ELISA、ELISPOT(Co 20 liganら編、1995、Current Protocols in Immunology、Wiley、New York)、凝集アッセイ、フローキュレーションアッセイ、細胞パニング等が含まれうるが、これらに限定されない。

【0094】

本明細書において用いられるように、「結合する」という用語は、抗原に対する抗体の十分に特徴が調べられた結合、ならびに抗原とその他の非ランダム会合を意味する。本明細書に記載の「特異的に結合する」は、この場合、本発明の抗原である明記されたもの以外の、如何なる抗原とも実質的に交叉反応しない抗体、または他のリガンドを記述する。

【0095】

本発明の抗体またはリガンドは、基質に結合させる、または検出可能な部分と共役させる、または結合させて共役させることができる。本発明に関して企図される検出可能な部分には、免疫蛍光部分(例えば、フルオレセイン、ローダミン)、放射活性部分(例えば、³²P、¹²⁵I、³⁵S)、酵素部分(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、金コロイド部分、およびビオチン部分が含まれるがこれらに限定されない。そのような共役技法は当技術分野で標準である(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY(1989) ; Yangら、Nature 382: 319~324(1996))。

【0096】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体を形成することができる条件下で、試料を本発明のフラビウイルス抗原に接触させる段階; および複合体の形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗体を検出する段階を含む、試料におけるフラビウイルス抗体を検出する方法を提供する。

【0097】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体を形成することができる条件で、試料を本発明の抗体に接触させる段階; および複合体の形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗原を検出する段階を含む、試料中のフラビウイルス抗原を検出する方法を提供する。

【0098】

試料中のフラビウイルス抗原を検出する方法は、例えば、被験者からの液体または組織試料を本発明の抗体に接触させ、抗原に対する抗体の結合を検出することによって行うことができる。抗原は、無傷のフラビウイルスピリオン上であるか、抗原を発現するフラビウ 50

ウイルス感染細胞の表面上に示されるフラビウイルスコード蛋白質であるか、または抗原断片であることが企図される。この方法の液体試料は、脳脊髄液、血液、胆汁、血漿、血清、唾液、および尿のような、抗原を含むか、または抗原を含む細胞を含む、如何なる生体液も含みうる。可能性のある他の体液試料には、喀痰、粘液等が含まれる。

【0099】

試料中のフラビウイルス抗体を検出する方法は、例えば、被験者からの液体または組織試料を本発明の抗原に接触させる段階、および抗体に対する抗原の結合を検出する段階、によって行うことができる。この方法の液体試料は、脳脊髄液、血液、胆汁、血漿、血清、唾液、および尿のような、抗体を含む如何なる生体液も含みうる。他の可能性のある体液試料には、喀痰、粘液等が含まれる。

10

【0100】

免疫蛍光アッセイ (IFA)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、および免疫ブロット法のような酵素免疫アッセイ法は、本発明の方法に従うフラビウイルス抗体の検出を行うために容易に適合させることができる。抗体を検出するために有効なELISA法は、例えば、以下となりうる：(1) 抗原を基質に結合させる；(2) 結合した抗原を、抗体を含む液体または組織試料に接触させる；(3) 結合した抗体と反応する検出可能な部分に結合した二次抗体に、上記を接触させる (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素またはアルカリホスファターゼ酵素)；(4) 酵素の基質に上記を接触させる；(5) 着色試薬に上記を接触させる；および(6) 色の変化または発色を観察/測定する。

【0101】

フラビウイルス抗体を検出するために有効となりうるもう一つの免疫技術は、競合的阻害アッセイ法において、フラビウイルス抗原に特異的に反応する抗体を検出するために、モノクローナル抗体 (Mab) を用いる。簡単に説明すると、試料を、基質 (例えば、ELISA 96ウェルプレート) に結合した本発明の抗原に接触させる。標識した (例えば、酵素結合、蛍光、放射活性等) モノクローナル抗体を、既に形成された抗原抗体複合体に接触させて、モノクローナル抗体結合量を測定する。モノクローナル抗体結合の阻害量は、対照 (抗体なし) と比較して測定し、試料中の抗体の検出および測定を可能にする。モノクローナル抗体阻害の程度は、フラビウイルスの特定の変種または株に対するモノクローナル抗体結合特異性に基づいて、特定のフラビウイルス変種または株を検出するために非常に特異的なアッセイとなりうる。Mabはまた、例えば、標準的な方法に従って、免疫蛍光アッセイ法 (IFA) によって、細胞におけるフラビウイルス抗原を直接検出するために用いることができる。

20

30

【0102】

さらなる例として、微小凝集試験を用いて、試料中のフラビウイルス抗体の有無を検出することができる。簡単に説明すると、ラテックスビーズ、赤血球、または他の凝集可能な粒子を本発明の抗原によってコーティングして、抗原と特異的に反応する試料中の抗体が、抗原とクロスリンクして、凝集を引き起こすように、試料と混合する。凝集した抗原抗体複合体は、裸眼で目に見えるか、または分光光度計によって測定可能な沈殿物を形成する。上記の試験の改変において、本発明の抗体を、凝集可能な粒子に結合させて、それによって試料中の抗原を検出することができる。

40

【0103】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体が形成されうる条件で、被験者からの試料を本発明の抗原に接触させる段階；および抗原/抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階を含む、被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する方法を提供する。

【0104】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体が形成されうる条件で、被験者からの試料を本発明の抗体に接触させる段階；および抗原/抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階を含む、被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する方法を提供する。

50

【0105】

本明細書において教示した診断法において、本発明の抗原は、基質に結合させて、血液、血清、尿、または唾液のような液体試料に接触させることができる。この試料は、患者から直接採取することができる、または部分的に精製された形で得ることができる。このようにして、抗原に対して特異的な抗体（一次抗体）は、結合した抗原と特異的に反応するであろう。その後、検出可能な部分に結合した、またはそれによって標識した二次抗体を加えて、一次抗体の検出を増強することができる。一般的に、抗原の異なるエピトープと特異的に反応する、またはリガンドもしくは反応した抗体と非特異的に反応する、二次抗体または他のリガンドは、一次抗体上の多数の部位と反応できるか否かに関して選択されるであろう。このように、例えば、二次抗体のいくつかの分子は、それぞれの一次抗体と反応し、それによって一次抗体をより検出可能にすることができる。

10

【0106】

検出可能な部分によって、沈殿物もしくは色の変化の肉眼による検出、顕微鏡による視覚的検出、または分光光度計による自動検出、放射測定等が可能となる。検出可能な部分の例には、フルオレセインおよびローダミン（蛍光顕微鏡に関して）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（光学または電子顕微鏡および生化学的検出に関して）、ビオチン-ストレプトアビジン（光学または電子顕微鏡に関して）、およびアルカリホスファターゼ（色の変化による生化学的検出）が含まれる。

【0107】

本発明の特定の態様を下記の実施例に記述する。これらの実施例は、本明細書に開示される本発明の範囲を制限すると解釈されない。

20

【0108】

実施例

本発明の核酸TU分子の調製および発現に関連して分子生物学および組み換え型DNA技術を利用する一般的な方法は、例えば、「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）、および「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、Fritsch and Maniatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989に記載される。

【0109】

実施例1：JEV prMおよびE抗原をコードする転写単位を含む組み換え型プラスミドの調製

30

。ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、マウス脳から増殖させたJEV株SA14ウイルスシード150 μ lから抽出した。シリカ膜上に吸着させたRNAをヌクレアーゼ不含水80 μ l中で溶出して、JEV prMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Nitayaphanら（Virology 177：541～552（1990））の研究から得られた。ゲノムヌクレオチド領域389～2478位を含む単一のcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位KpnIおよびXbaI、コンセンサスコザックリボソーム結合配列、ならびに翻訳開始部位を、アンプリマー（amplimer）14DV389（ヌクレオチド配列、配列番号：1；アミノ酸配列、配列番号：2）によってcDNAの5'末端で作成（engineer）した。インフレーム翻訳終了コドンの後にNotI制限部位を、アンプリマーc14DV2453（配列番号：3）によってcDNAの3'末端に導入した（図2）。Titan RT-PCRキット（Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN）を用いて1試験管RT-PCRを行った。ウイルスRNA 10 μ lを14DV389（50 μ M）およびc14DV2453（50 μ M）各1 μ l、ならびにヌクレアーゼ不含水18 μ lと混合して、混合物を85 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後、4 $^{\circ}$ Cに冷却した。反応ミックス[5 $\times$ 緩衝液20 μ l、dNTP混合物2 μ l（各10 mM）、ジチオスレイトール（0.1 mM）5 μ l、RNasin（商標）（40 U/ μ l、ペーリンガーマンハイム社）0.5 μ l、ポリメラーゼ混合物2 μ l、およびヌクレアーゼ不含水45.5 μ l]75 μ lを加えて、RT-PCRを以下のように行った：1サイクル（50 $^{\circ}$ Cで30分、94 $^{\circ}$ Cで3分、50 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで2.5分）、9サイクル（94 $^{\circ}$ Cで30秒、50 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで2.5分）、20サイクル（最初のサイクルは94 $^{\circ}$ Cで30秒、50 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで2.5分、その後1サイクルごと

40

50

に5秒ずつ増加)、および68℃で15分間の最終伸長。RT-PCR産物は、QIAquick(商標)PCR精製キット(Qiagen)によって精製して、50 µlの1 mMトリス塩酸、pH 7.5によって溶出した。

【0110】

全てのベクター構築物および分析は、標準的な技術を用いて行った(Sambrookら、1989)。KpnIおよびNotIヌクレアーゼによって消化したRT-PCR増幅cDNAを、真核細胞発現プラスミドベクター(pCDNA3、Invitrogen、Carlsbad、CA)のKpnI-NotI部位に挿入した。電気穿孔コンピテント大腸菌XL1-Blue細胞(Stratagene、La Jolla、CA)を、電気穿孔(ジーンパルサー(Gene Pulser、商標)、Bio-Rad、Hercules、CA)によって形質転換して、100 µg/mlカルベニシリン(Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO)を含むLB寒天プレート上に播種した。クローンを採取して、100 µg/mlカルベニシリンを含むLBブロス3 mlに接種した。QIAprep(商標)スピンミニプレップキット(Qiagen)を用いて、14時間培養物からプラスミドDNAを抽出した。自動DNAシーケンシングは、推奨された通りに(Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA)行った。cDNAの双方の鎖をシーケンシングしたところ、当初のSA14株の配列と同一であることが示された(Nitayaphanら、1990)。

【0111】

f1 ori、SV40 ori、ネオマイシン抵抗性遺伝子、およびSV40ポリ(A)要素を含むヌクレオチド(nt)1289~nt 3455位のプラスミドpCDNA3(Invitrogen、Carlsbad、CA)の断片を、PvuII消化によって欠失した後、ライゲーションしてpCBampプラスミドを作製した。pCBampのNcoI/KpnI部位にキメライントロン挿入を含むベクターpCIBampは、NcoIおよびKpnIによる消化によってpCI(プロメガ社、マディソン、ウィスコンシン州)からイントロン配列を切除することによって構築した。得られた566-bp断片を、NcoI-KpnIによって消化することによってpCBampにクローニングし、その289-bp断片を置換した。図3は、プラスミドpCDNA3、pCBamp、およびpCIBampの間の関係を表す。

【0112】

JEV prMおよびE蛋白質をコードする転写単位を含むプラスミドは、これらのプラスミドから調製した。pCDNA3ベクターに由来する組み換え型プラスミドpCDJE2-7(ヌクレオチド配列、配列番号:10;アミノ酸配列、配列番号:11)においてJEV prMおよびEコード領域を含むcDNA断片を、NotIおよびKpnIまたはXbaIによる消化によって切断して、pCBamp、pCIBamp、pCEP4(Invitrogen、Carlsbad、CA)、もしくはpREP4(Invitrogen、Carlsbad、CA)のKpnI-NotI部位、またはpRc/RSV(Invitrogen、Carlsbad、CA)発現ベクターのSpeI-NotI部位にクローニングして、それぞれ、pCBJE1-14(ヌクレオチド配列、配列番号:17;アミノ酸配列、配列番号:18)、pCIBJES14、pCEJE、pREFE、およびpRCJEを作製した。各プラスミドのクローンからのcDNAの双方の鎖をシーケンシングして、正確なヌクレオチド配列を有する組み換え型クローンを同定した。哺乳類細胞のインビトロ形質転換またはマウス免疫実験に用いるプラスミドDNAは、EndoFree(商標)プラスミドマキシキット(Qiagen)を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

【0113】

実施例2:間接的免疫蛍光抗体アッセイ法を用いた、様々な組み換え型プラスミドによって発現されたJEV prMおよびE蛋白質の評価

様々な組み換え型発現プラスミドによるJEV特異的遺伝子産物の発現を、COS-1、COS-7、およびSV-T2(ATCC、ロックビル、メリーランド州;それぞれ、1650-CRL、1651-CRL、および163.1-CCL)の一過性にトランスフェクトした細胞株において、間接的免疫蛍光抗体アッセイ(IFA)によって評価した。SV-T2細胞株は、予備的な結果から、JEV抗原陽性であった細胞が形質転換したSV-T2細胞の1~2%に過ぎないことが示されたことから、以降の試験から除外した。形質転換を行うために、細胞を150 cm²培養フラスコにおいて75%コンフルエンスまで増殖させ、トリプシン処理を行って、4%の燐酸緩衝生理食塩液に最終細胞数5×10⁶個/mlとなるように再懸濁させた。150 V、960 µF、および100 Ω抵抗に設定したBioRadジーンパルス(商標)(Bio-Rad)を用いて、プラスミドDNA 10 µgを細胞浮

遊液300 μ lに電気穿孔した。電気穿孔の5分後、細胞を新鮮な培地25 mlによって希釈して、75 cm^2 フラスコに播種した。形質転換の48時間後、培地を細胞から除去して、細胞にトリプシン処理を行い、3%正常ヤギ血清を含むPBS 5 mlに再懸濁させた。少量10 μ lをスライドガラス上にスポットし、風乾させ、アセトン中で-20℃で20分間固定した。IFAは、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンG (Sigma Chemical Co.) およびJEV HIAFを用いて、アセトン固定プラスミド形質転換細胞について行った。

【0114】

JEV prMおよびE蛋白質発現に及ぼす様々なプロモーター、およびポリ(A)要素の影響を調べるために、COS-1およびCOS-7細胞株を、等量のpCDJE2-7 (配列番号: 10)、pCEJE、pREJE、またはpRJEプラスミドDNAによって一過性に形質転換した。JEV抗原は、四つ全ての組み換え型プラスミドによって形質転換された双方の細胞株において発現され、このように、CMVまたはRSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーターおよびBGHまたはSV40ポリ(A)要素が機能的に活性であることを確認した。しかし、IFA陽性細胞数およびIFA強度によってそれぞれ決定した形質転換細胞の割合および発現されたJEV抗原のレベルは、プラスミドが異なれば大きく異なった (表1)。pCDJE2-7 (配列番号: 10)、pCBE1-14 (配列番号: 17) およびpCIBJES14によって形質転換されたCOS-1細胞の有意に高い割合が、JEV抗原を発現し、発現された蛋白質レベルは、JEV感染細胞と同等であった。一方、pCEJE、pREJE、またはpRJEベクターをトランスフェクションした細胞は、抗原発現細胞の割合が低いのみならず、蛍光強度も低く、抗原の発現が弱いことを示している。

【0115】

pCDJE2-7 (配列番号: 10) によるJEV蛋白質の発現の増強がSV40がコードする真核細胞複製開始点によって影響を受けるか否かを確認するために、pCDJE2-7からf1 ori、SV40 ori、ネオマイシン抵抗性遺伝子、およびSV40ポリ(a)要素を含む2166 bp断片を欠失したプラスミドpCBE1-14 (配列番号: 17) を構築した。次に、キメライントロンをpCBE1-14に挿入して、pCIBJES14を作製した。pCIBJES14プラスミドを用いて、JEV蛋白質の発現がイントロン配列によって増強されるか否かを決定した。形質転換の後、pCBE1-14およびpCIBJES14ベクターの双方を有する細胞は、pCDJE2-7の場合に認められたものと類似のJEV抗原レベルを発現した (表1)。この結果は、組み換え型ベクターによるJEV prMおよびE抗原の発現が、転写調節要素に限って影響を受けることを示している。真核細胞の複製開始点もイントロン配列も、用いた細胞においてJEV抗原の発現を増強しなかった。CMVプロモーターおよびBGHポリ(A) (図3) を含むベクターをさらなる分析のために選択した。

【0116】

実施例3. JEV特異的遺伝子産物を構成的に発現する、インビトロで形質転換した安定な細胞株の選択

COS-1細胞を、先の実施例に記載した電気穿孔によってpCDJE2-7 DNA 10 μ gによって形質転換した。非選択的な培養培地において24時間インキュベートした後、細胞をネオマイシン (0.5 mg/ml、シグマケミカル社) によって処置した。2~3週間で目に見えるネオマイシン抵抗性コロニーを、ネオマイシン含有培地において限界希釈法によってクローニングした。ベクターがコードするJEV遺伝子産物の発現は、JEV HIAFを用いたIFAによって最初にスクリーニングした。JEV-IFA陽性クローン (JE-4B) 1個、および陰性クローン (JE-5A) 1個をさらなる分析のために選択して、200 μ g/mlネオマイシンを含む培地において維持した。

【0117】

JE-4Bクローンによって発現されたJEV E蛋白質の真偽は、JEV E特異的マウスモノクローナル抗体 (Mab) のパネルを用いた、IFAによるエピトープマッピングによって証明した (Kimura-Kurodaら、J. Virol. 45: 124~132 (1983); Kimura-Kurodaら、J. Gen. Virol. 67: 2663~2672 (1986); Zhangら、J. Med. Virol. 29: 133~138 (1989); およびRohrigら、Virol. 128: 118~126 (1983))。JEV HIAFおよび正常マウス血清をそれぞれ、陽性および陰性抗体対照として用いた。四つのJEV-特異的、六つのフラビウイルス亜群特異的、および二つのフラビウイルス群反応性Mabが、4BクローンまたはJEV感染COS-1細胞

10

20

30

40

50

に対して同様に反応した（表2）。

【0118】

実施例4. JE-4B COS-1細胞株によって分泌されたサブウイルス粒子の抗原特性および免疫学的検出

a. サブウイルス粒子の調製。 JE-4B COS-1細胞は、200 μ g/mlネオマイシンを含む培地において増殖および維持した。培養培地は通常通り採取して4 で保存して、週2回新鮮な培地に交換して、細胞を7日～10日ごとに1:5に分割して継代した。培養培地をSorvall F16/250ローターにおいて4 、10,000 rpmで30分間遠心することによって透明にし、Sorvall TH641ローターにおいて5%ショ糖クッション（w/w、10 mMトリス塩酸、pH 7.5、100 mM NaCl（TN緩衝液）によって調製）の中を4 、39,000 rpmでさらに4時間遠心した。サブウイルス粒子を含む沈降物をTN緩衝液に再懸濁させて、4 で保存した。または、7%もしくは10%PEG-8000（w/v）を透明にした培養培地に加えた。混合物を4 で少なくとも2時間攪拌して、沈殿した粒子を10,000 rpmで30分間遠心することによって回収した。沈殿物をTN緩衝液に再懸濁させて、4 で保存した。サブウイルス粒子を、5%～25%連続ショ糖勾配のTN溶液において4 、38,000 rpmで90分間の速度ゾーン遠心によって、沈降した調整物およびPEG沈殿した調製物の双方から精製した。1 ml分画を勾配の上部から回収して、抗原捕獲ELISA（下記参照）によって調べ、陽性分画を25%～50%ショ糖勾配のTN溶液にローディングした。これを、4 、35,000 rpmでの平衡密度遠心において一晩遠心した。平衡勾配からの0.9 ml分画を底から回収した。それらを抗原捕獲ELISAによって調べ、pH 6.6でのヘムアグルチニン（HA）活性に関して評価した。各分画の100 μ lのアリコート10 20の重量を正確に測定して、その密度を測定した。ELISA陽性分画をプールして、4 、39,000 rpmで3～4時間遠心して沈降させ、沈降物をTN緩衝液に再懸濁させた。沈降させた試料に関して抗原捕獲ELISAおよびHA力価を測定した。JEV感染COS-1細胞上清にも同様に、先に詳細に記述したように類似の精製プロトコルを行い、勾配分析のための陽性対照として用いた。JEピリオンも同様に、感染後5日～6日の感染C6/36細胞から、グリセロール/酒石酸塩平衡勾配における沈降によって精製した。

【0119】

b. サブウイルス粒子のウェスタンブロット。 サブウイルス粒子の勾配精製試料を電気泳動試料緩衝液と共に混合して、Laemmli（Nature 277: 680～685（1970））によって記述されるように、10%または12.5%ドデシル硫酸ナトリウム含有ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）の中を泳動させた。蛋白質をニトロセルロースメンブレンに転写して、ポリクローナルJEV HIAF、フラビウイルス交叉反応性抗E Mab 4G2抗体（Henchalら、Amer. J. Trop. Med. Hyg. 31: 830～836（1982））またはマウス抗prMペプチド過免疫血清（JM01）によって免疫化学的に検出した。図4は、JEV感染C6/36およびJE-4B COS-1細胞によって産生されたMおよびE蛋白質の比較を示す。E蛋白質に対する何らかの非特異的反応性を、正常マウス腹水およびJm01抗ペプチド血清において認めた。大きさがMおよびEと同一である蛋白質がサブウイルス粒子において分泌され、それぞれ、E特異的Mab 4G2およびprM特異的JM01抗血清によって検出することができた。 30

【0120】

c. 培養培地におけるJEVサブウイルス粒子の密度勾配検出。 ELISAのために、抗原捕獲抗体（4G2）をpH 9.6の0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液によって希釈して、これを用いて4で一晩インキュベートすることによって96ウェルマイクロタイタープレート（Immulon II、Dynatech、Chantilly、VA）をコーティングした。3%正常ヤギ血清のPBS溶液によってブロッキングした後、連続2倍希釈試料を4G2でコートされたプレートに加えて、37 で1.5時間インキュベートした。捕獲した抗原を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合6B6C-1 Magによって検出して、37 で1時間インキュベートした。次に、固相上の酵素活性をTMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）-ELISA（Life Technologies、Grand Island、NY）によって検出した。 40

【0121】

JE-4B細胞の15 $\times$ 150 cm² フラスコからの細胞培養培地約500 mlを、細胞を播種した4日後 50

に回収した。PEG沈殿サブウイルス粒子をpH 7.5のTN緩衝液2 mlに再懸濁させて、この再懸濁させた沈降物0.7 mlのアリコートに5%～25%ショ糖勾配にローディングした。サブウイルス粒子を破壊するトライトンX-100を、最終濃度が0.1%となるように別の0.7 mlアリコートに加えて、これを0.1%トライトンX-100を含むTN緩衝液中で調製した5%～25%ショ糖勾配にローディングした。トライトンX-100を含む勾配の上部から約2.5 cmのところに明確な不透明なバンドを認めたが、界面活性剤を含まない勾配には認めなかった。各勾配の上から下までの分画(1 ml)を回収した(図5)。それぞれの回収した分画を抗原捕獲ELISAによって分析した。抗原は分画4～6において検出され、サブウイルス粒子の比較的速やかな沈降特徴を示している。トライトンX-100によってJE-4B培養培地からのPEG沈殿物の処置を行うと、ELISA反応性材料の位置が勾配の上部にシフトした。このように、トライトンX-100による処置によって、沈降の遅い分子のみが生成される。類似の知見は、Konishiら(Virol. 188: 714～720(1992))によっても報告された。これらの結果は、prM/MおよびEを含む急速に沈降するサブウイルス粒子を、界面活性剤処置によって破壊できることを示している。

10

【0122】

ヘムアグルチニン(HA)活性は、ClarkeおよびCasals(Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561～573(1958))の方法によってpH範囲6.1～7.0において決定した。JE-4B細胞によって分泌されたサブウイルス粒子およびJEV感染COS-1細胞によって産生されたビリオン粒子は、最適pHが6.6であると決定された類似のHAプロフィールを有した。

【0123】

実施例5. 本発明のpCDJE2-7核酸ワクチンおよび市販のJEVワクチンによってワクチン接種したマウスにおける免疫応答の比較

20

3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群5匹に、左四頭筋および右四頭筋にpCDJE2-7プラスミド100 μgのdH₂O溶液100 μlを筋肉内注射するか、またはヒトに投与する用量の5分の1であるJE-VAX用量(製造は、大阪大学微生物病研究会、および販売は、Connaught Laboratories、Swiftwater、PA)を皮下投与した。無関係な蛋白質をコードして発現するプラスミドpCDNA3/CAT(インビトロジェン社)を陰性ワクチン接種対照として用いた。pCDJE2-7ワクチン接種マウス1群を除き、動物は全て、さらなる用量のプラスミドまたはJE-VAXによって3週間後に追加免疫した。接種後3週、6週、9週、23週、40週、および60週間目にマウスの眼窩後洞から採血した。JEV抗体力価は、精製JEVに対する酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)によって、またはプラーク減少中和試験(PRNT)(Roehrigら、Virol. 171: 49～60(1989); およびHuntおよびCalisher、Amer. J. Trop. Hyg. 28: 740～749(1979))によって決定した。

30

【0124】

pCDJE2-7核酸ワクチンおよびJE-VAXは、三つ全ての群のマウスにおいて、最初のワクチン接種の3週間以内に100%血清転換を示した(表3)。JEV ELISAおよびPRNT抗体力価は、免疫後6週目および9週目にそれぞれ最高レベルに達した。DNAワクチン1用量を接種したマウスは、2用量を接種したマウスと類似の抗体反応を示した。DNAワクチン接種群では、同等のELISA抗体力価が、その後実験を終了した60週まで維持された。しかし、JE-VAX群のマウスでは、接種後60週でJEV抗体陽性であったのは4匹中1匹に過ぎなかった。pCDNA3/CAT対照群は、如何なる測定可能なJEV抗体も生じなかった。これらの結果は、JEV-特異的核酸ワクチンの1回接種が、市販のFDA承認JE-VAXワクチンより、マウスにおけるJEV抗体の維持において有効であることを示している。

40

【0125】

実施例6. 異なる齢でのワクチンの有効性に関する、本発明の様々な核酸ワクチン構築物と市販のJEVワクチンとの比較

類似のレベルのJEV蛋白質が、pCDJE2-7、pCBE1-14、またはpCIBJES14によって形質転換したCOS-1細胞によって発現された。これらの核酸構築物によるJEV抗体誘導を、ワクチン接種時に二つの異なる齢で、JE-VAX市販ワクチンと比較した。1群10匹の3日齢(性別混合)または3週齢(雌性)ICR非近交系マウスに、プラスミドDNA 50 μgもしくは100 μgを筋

50

肉内にワクチン接種するか、またはヒトに投与する用量の10分の1または5分の1であるJE VAX用量を皮下にワクチン接種した。血清標本を免疫後3週間および7週間で採取して、精製JEVを抗原として用いたELISAによって1600倍希釈で試験した。結果を表4に示す。

【0126】

プラスミドpCBE1-14は、最も高い程度の血清変換、すなわち、1600倍以上の抗体力価を示し、双方の齢のワクチン接種で80%~100%に達した。pCDJE2-7またはpCIBJES14の投与は、3日齢のマウスにワクチンを接種した場合には7週目までに中程度の血清変換を示したが(それぞれ60%)、ワクチン接種後3週目に測定した場合にはより弱い血清変換を示した(それぞれ、40%および10%)。しかし、これらのプラスミドを3週齢で投与すると、ワクチン接種の3週後および7週後の双方で血清変換90%または100%が得られた。対照的に、市販のワクチン、JE-VAXは、3日齢で投与した場合に血清変換を示さず、3週齢で投与した場合には100%の血清変換を示した。このように、JEV prMおよびEに対する核酸TUは、市販のワクチンの非常に高い用量より、良好な程度の血清変換を示し、若い動物およびより成熟した動物の双方において予想外に高い血清変換を示した。

10

【0127】

実施例7. 本発明の核酸ワクチンによって与えられる保護免疫

実施例6からの3日齢ワクチン接種群に、ワクチン接種後7週目にマウス適合JEV株SA14 50,000 pfu/100 μ lを腹腔内注射によってチャレンジして、3週間観察した。様々な核酸TU含有ワクチン構築物を接種した群では100%の保護が21日間得られた(表5)。対照的に、JE-VAXワクチン接種マウスの60%、ならびにpCDNA3/CATワクチン接種陰性対照の70%が、ウイルスチャレンジから21日まで生き残ることができなかった。これらの結果は、本発明の核酸TUは、ワクチン接種マウスに対して予想外に有効な保護を与えることを示している。これは、ヒト用の初期幼少期ワクチンとして本発明の核酸ワクチンを用いる可能性を示唆している。対照的に、現在用いられている不活化ヒトワクチンJE-VAXは、若い動物において有効ではないように思われる。

20

【0128】

実施例8. 母体の抗体力価と相関する新生仔マウスの受動的保護

3週齢の雌性ICRマウスに、pCDJE2-7プラスミドDNAを100 μ g/100 μ lの1用量もしくは2日間あけて2用量、またはヒトに投与する用量の5分の1であるJE VAX 2用量をワクチン接種した。陰性対照群には、pCDNA-3/CATプラスミド100 μ g/100 μ lの2用量を投与した。母体抗体による受動的保護は、第一のワクチン接種後9週目または第二のワクチン接種後6週目に、実験の雌性マウスを非免疫雄性マウスと交配させることによって得られた仔において評価した。生後3日~15日の間の仔を、マウス適合SA14ウイルス5,000 pfu/100 μ lの腹腔内投与によってチャレンジして、3週間毎日観察した(表6)。生存率は、母体の中和抗体力価と相関した。PRNT 1:80の母親によって哺乳された仔の100%がウイルス感染から生き残ったのに対し、対照母親からの仔はいずれも生き残らなかった(表6)。PRNT力価がそれぞれ、1:20および1:40である母親によって哺乳されたより週齢の大きい仔では、45%および75%の部分的保護を認めた。生存率はまた、仔が免疫母親によって哺乳された期間にも相関した。まさに示しているように、13日~15日齢の仔は高い生存率を示した。しかし、3~4日齢の仔は、母親のPRNT力価が1:20、または1:40である場合にはウイルスチャレンジから生き残れなかった。このように、母親の抗体は、子孫に部分的ないし完全な保護免疫を提供する。さらに、ELISAによって、チャレンジ後の仔の97%(29/30)の血清中にJEV抗体が検出された。

30

40

【0129】

マウスにプラスミドDNA 100 μ g用量を1回もしくは2回筋肉内接種するか、またはJE VAXワクチンのヒト用量の5分の1を2回皮下接種した。非免疫雄性マウスとの交配の前に、PRNT試験のためにワクチン接種後9週目に血清を採取した。

【0130】

実施例9. WNV prMおよびE抗原をコードする転写単位を含む、組み換え型プラスミドの調製

50

ゲノムRNAを、QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen、Santa Clarita、CA) を用いて、1999年にニューヨークでの大流行から単離した株であるNY 99-6480株に感染させたVero細胞培養培地150 μ lから抽出した。抽出したRNAを溶出させて、ヌクレアーゼ不含有水80 μ lに浮遊させて、WNV prMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Lanciottiら (Science 286: 2333~2337 (1999)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位BsmBIおよびKasIを、アンプリマーWN466 (ヌクレオチド配列、配列番号: 12) を用いてcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドン、アンプリマーcWN2444 (配列番号: 13) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

10

【0131】

上記の二つのアンプリマー (配列番号: 12および配列番号: 13) を用いて産生された二本鎖アンプリコンを、KasIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの998 bp (nt-1470~2468) 断片を作製し、これをpCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、中間プラスミドpCBINTを形成した。pCBJESSは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、転写制御要素および操作されたJEシグナル配列要素を含んだ (Changら、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000))。JEシグナル配列要素はJEシグナル配列 (配列番号: 14) を含む。

【0132】

20

次に、cDNAアンプリコンをBsmBIおよびKasI酵素によって消化して、残っている1003 bp断片 (ヌクレオチド466~1470) をpCBINTのKasI部位に挿入してpCBWN (核酸配列、配列番号: 15; アミノ酸配列、配列番号: 16) を形成した。ABIプリズム377シーケンサー (アプライドバイオシステムズ/パーキンエルマー、フォルターシティ、カリフォルニア州) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドがLanciottiら (Science 286: 2333~2337 (1999)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【0133】

哺乳類細胞のインビトロ形質転換、またはマウス免疫実験において用いるためのプラスミドDNAは、実施例1に記載するように陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

30

【0134】

実施例10. pCBWNによって発現されたWNV prMおよびE蛋白質の免疫化学特徴付けと評価 pCBWNプラスミドによってコードされたWNV特異的遺伝子産物を、COS-1細胞において発現させた。Changら (J. Virol. 74: 4244~4252 (2000)) に従って細胞を電気穿孔して、pCBWNプラスミドによって形質転換した。電気穿孔した細胞を75 cm^2 培養フラスコ、または滅菌カバーガラス1枚/ウェルを含む12ウェル組織培養皿に播種した。フラスコおよび12ウェルプレートは全て、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベータで維持した。電気穿孔の40時間後、接着細胞を含むカバーガラスをウェルから取り出して、PBSによって簡単に洗浄して、室温でアセトンによって2分間固定し、空気乾燥させた。

【0135】

40

蛋白質発現は、実施例2に記載するように間接的免疫蛍光抗体アッセイ (IFA) を用いて検出した。フラビウイルスE蛋白質特異的モノクローナル抗体 (Mab) 4G2、WNVマウス過免疫腹水 (HIAF) および正常マウス血清 (NMS) の、PBSによる200倍希釈液を一次抗体として用いて、蛋白質発現を検出した (Henchalら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 31: 830~836 (1982))。

【0136】

組織培養培地を電気穿孔後40および80時間で回収した。抗原捕獲 (Ag捕獲) ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の培養培地に分泌されたWNウイルス抗原を検出した。Mab 4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合Mab 6B6C-1をそれぞれ用いて、WNウイルス抗原を捕獲し、捕獲された抗原を検出した (Changら、J. Virol. 74: 4244~4252 (2

50

000) ; Henschelら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 : 830 ~ 836 (1983) ; Roehrigら、Virology 128 : 118 ~ 126 (1983)) 。

【 0 1 3 7 】

培地中のWNウイルス抗原は、10% ポリエチレングリコール (PEG) -8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物をTNE緩衝液 (50 mMトリス、100 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.5) に再懸濁させて、遠心によって透明にし、4 で保存した。または、沈殿物を凍結乾燥緩衝液 (0.1 M TRIZMAおよび0.4% ウシ血清アルブミンのホウ酸塩生理食塩液緩衝液、pH 9.0) に再懸濁させて、凍結乾燥して4 で保存した。凍結乾燥調製物を、MAC-および間接的IgG ELISAにおいて評価するための抗原として用いた。

【 0 1 3 8 】

一過性に形質転換したCOS-1細胞において、IFAによってWNウイルス特異的蛋白質を検出した。これらの細胞において発現されたE、prMおよびM蛋白質は、培養培地に分泌された。PEG沈殿によって濃縮されたWNウイルス抗原を、7.0% エタノールによって抽出して、残っているPEGを除去した (Aizawaら、Appl. Environ. Micro. 39 : 54 ~ 57 (1980)) 。エタノール抽出抗原および勾配精製WNビリオンを、Excel Plus電気泳動装置 (Invitrogen、Carlsbad、CA) においてNuPAGE、4% ~ 12% 勾配ピストリスゲルにおいて分析して、その後Excel Plusプロットユニット (インビトロジェン社) を用いてニトロセルロースメンブレンにエレクトロブロッティングを行った。一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって産生されたWNウイルス特異的蛋白質は、陰性血清対照としてNMSを用いたウェスタンブロット分析において、WNウイルス特異的マウスH1AFまたはフラビウイルスE蛋白質反応性Mab 4G2によって検出された。蛋白質は、WNウイルスに感染したほ乳期マウス脳 (SMB) に由来する、対応する勾配精製ビリオンE、prMおよびM蛋白質と類似の反応性および同一の分子量を示した。

【 0 1 3 9 】

診断的ELISAに関する抗原としてのNRAの分析において、組織培養液40 mlから回収した抗原を提示する、1バイアルの凍結乾燥NRAを蒸留水1.0 ml中で再構成し、β-プロピオラクトン不活化ショ糖-アセトン抽出物として凍結乾燥されて提供される、再構成されたWNウイルス感染ほ乳期マウス脳 (SMB) 抗原と比較した (Clarkeら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 7 : 561 ~ 573 (1958)) 。全ての組み換え型蛋白質、prM、M、およびEは、勾配精製ビリオンE、prM、およびM蛋白質と類似の反応性を示した。

【 0 1 4 0 】

暗号化した (coded) ヒト標本を、発達段階での同じ試験における抗原と共に試験した。用いたMAC-およびIgG ELISAプロトコールは、公表された方法と同一であった (Johnsonら、J. Clin. Microbiol. 38 : 1827 ~ 1831 (2000) ; Martinら、J. Clin. Microbiol. 38 : 1823 ~ 1826 (2000)) 。ヒト血清標本は、1999年の大流行の際にWNウイルス確認試験のためにDVBIDに送付した標本からなる、本発明者らの施設の血清バンクから入手した。これらの試験において、スクリーニングMAC-およびIgG ELISAを標本の400倍希釈液について行った。陽性 / 陰性 (P/N) OD比2 ~ 3を生じる標本を擬陽性で見なした。疑われる血清標本は、ELISAエンドポイント滴定およびプラーク減少中和試験 (PRNT) の双方によって陽性であることを確認した。P/N OD比3.0以上を示す全ての標本は、さらなる確認試験を行わずに陽性であると見なした。

【 0 1 4 1 】

フラビウイルス群反応性抗E Mab、4G2、および6B6C-1を用いるAg-捕獲ELISAを用いて、pCBWN形質転換COS-1細胞の培養液に分泌されたNRAを検出した。抗原は、形質転換後1日目に培地において検出することができ、さらに濃縮していない培養液中の最高ELISA力価 (1 : 32 ~ 1 : 64) を、2日 ~ 4日の間に認めた。NRAは、PEG沈殿によって濃縮し、凍結乾燥緩衝液に再懸濁させ、保存のために凍結乾燥した。診断試験の開発のために、1バイアルの凍結乾燥NRAを蒸留水1.0 mlによって再構成して、WNウイルス陽性および陰性基準ヒト血清 (Johnsonら、J. Clin. Microbiol. 38 : 1827 ~ 1831 (2000) ; Martinら、J. Clin. Microbiol. 38 : 1823 ~ 1826 (2000)) を用いてMAC-または間接的IgG ELISAにおいて滴定した

10

20

30

40

50

。NRAの320倍および160倍希釈液はそれぞれ、MAC-およびIgG ELISAにおいて用いるための最適な濃度であることが判明した。これらの希釈液は、MAC-およびIgG試験に関してそれぞれ、P/N OD₄₅₀比が4.19および4.54となった。NY-6480およびEg101株によって産生されたWNウイルスSMB抗原はそれぞれ、MAC-ELISAに関して320倍および640倍希釈で用い、IgG ELISAに関して120倍および320倍で用いた。陰性対照抗原、正常COS-1細胞の培養培地のPEG沈殿物、および正常SMB抗原は、それぞれのNRAおよびSMB抗原に関する場合と同じ希釈で用いた。400倍希釈したヒト血清標本を、ウイルス特異的および陰性対照抗原について、1試料あたり3個ずつ同時に試験した。有効な陽性試験結果を得るためには、ウイルス抗原(P)と反応した試験血清のOD₄₅₀は、陰性対照抗原(N)と反応した同じ血清の対応する吸光度値より少なくとも2倍大きくなければならなかった。

10

【0142】

NRAおよびNY-06480、Eg101、およびSLEウイルスSMBの反応性を、暗号化ヒト血清標本21個を用いてMAC-およびIgG ELISAによって比較した。標本21個のうち、19個は、三つ全ての抗原に対して類似の結果を示した(陰性8例、および擬陽性または陽性11例)。標本18個も同様に、SLE SMB抗原を用いて個別に試験した。Eg-101-SMB陽性標本13個中3個のみがSLE MAC-ELISAにおいて陽性であった(表1)。WN抗原陰性標本はいずれもSLE MAC-ELISAによって陽性ではなかった。この結果は、抗WNウイルスIgMが他のフラビウイルスと有意に交叉反応せず(Tardeira, J. Clin. Microbiol. 38: 2232~2239 (1940))、NRAまたはSMB抗原を試験に用いるか否かにかかわらず、急性のWNウイルス感染症を診断するために特異的であるというこれまでの知見を確認した。全ての標本を同様に、間接的IgG ELISAによって同時に試験した。標本21個中10個は三つの抗原のいずれを用いても陽性であった。

20

【0143】

いずれも同じ患者から、疾患発症後4日目および44日目に採取したの二つの異なる血清標本(7および9)は、NRAおよびSMB NY抗原に関してIgM陰性であり、初回の試験においてEg-101 SMB抗原を用いるとIgM陽性であった。これらの二つの一致しない標本をさらに調べるために、この患者から6個の連続して採取した標本をエンドポイントMAC-およびIgG ELISAによって再試験した。MAC-ELISAにおいて3日~15日の間に示された32倍以上の連続した増加は、用いた全ての抗原について証明することができた。疾患発症後9日目に採取した脳脊髄液も同様に、この患者が実際に試料を採取する直前にWNに感染したことを確認した。脳脊髄液は、IgM P/Nの読みがそれぞれ、Eg-101-およびSLE-SMB抗原に対して13.71および2.04であった。31日目および44日目の標本は、NY-SMB抗原を用いて陰性(<1:400)であったが、NRAおよびEg101-SMBを用いると陽性であった。試験に用いた三つ全ての抗原について同等のIgG力価を認めた。

30

【0144】

実施例11. pCBWNをワクチン接種した動物における免疫応答の評価

3週齢の雌性ICRマウス1群10匹を試験に用いた。マウスにpCBWNまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド(pEGFP) DNA(Clontech, San Francisco, CA)の1回量を筋肉内注射した。pCBWNプラスミドDNAは、EndoFreeプラスミドギガキット(Qiagen)によってXL-1 blue細胞から精製して、pH 7.5のPBSに濃度1.0 μg/μlとなるように再懸濁させた。pEGFP 100 μgを投与したマウスを非ワクチン接種対照として用いた。マウスに100 μlの容量中100 μg、10 μg、1.0 μg、または0.1 μgの用量でpCBWNプラスミドを注射した。pCBWN 10 μg、1.0 μg、または0.1 μgを投与した群にEMC-830方形波電気穿孔装置(Genetronics, San Diego, CA)を用いて、エレクトロトランスファー媒介インビボ遺伝子輸送プロトコールによってワクチン接種した。エレクトロトランスファープロトコールは、Mirra(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4262~4267 (1999))の方法に基づいた。DNA注射の直後、脚のそれぞれの側に4.5 mm~5.5 mm離して配置した2本のステンレス鋼プレート電極によって、経皮電気パルスを適用した。脚の皮膚との電氣的接触は、PBSによって脚を完全に湿らせることによって確実にした。パルス間の間隔200 msecで、持続25 msecの40ボルト/mmのパルス4回2組を適用した。電極の極性は、エレクトロトランスファーの効率を増強するために、パルスの組の間で逆転させた。

40

50

【0145】

マウスを注射後3週間ごとに採血した。WNウイルス特異的抗体反応は、Ag捕獲ELISAおよびブランク減少中和試験（PRNT）によって評価した。個々の血清をIgG-ELISAによって調べ、各群マウス10匹のプールした血清をPRNTによってアッセイした。pCBWNをワクチン接種した全てのマウスは、ワクチン接種後3週間で640倍～1280倍の範囲のIgG ELISA力価を示した。3週および6週で採取したプールされた血清は、80倍のNt抗体力価を有した。pEGFP対照マウスからの血清標本はいずれも、WNウイルスに対して如何なるELISAまたはNt力価も示さなかった。

【0146】

pCBWNの1回筋肉内ワクチン接種が、マウスをWN感染症から保護しうるか否かを決定するために、マウスに腹腔内注射するか、またはウイルス感染イエカ（*Culex mosquitoes*）に刺されることによってNY-6480ウイルスをチャレンジした。マウスの群の半数に、NY99-6480ウイルスのLD₅₀の1,000倍（1,025 PFU/100 μl）をワクチン接種後6週目に腹腔内チャレンジした。残りのマウスはそれぞれ、チャレンジ実験の7日前にNY99-6480ウイルスを感染させたコガタアカイエカ（*Culex tritaeniorhynchus mosquitoes*）3匹に刺された。蚊は十分に充血するまでマウスの血を吸わせた。マウスは、チャレンジ後3週間毎日2回観察した。

【0147】

WNウイルスDNAを免疫した全てのマウスが、ウイルスチャレンジ後も健康であったが、対照マウスは全て、ウイルスチャレンジの4～6日にCNS感染症の症状を発症し、腹腔内または感染性の蚊のチャレンジ後、平均で6.9および7.4日で死亡したことから、Nt抗体の存在は、保護免疫と相関することは明白であった。ワクチン接種群において、ウイルスチャレンジ（免疫後9週間）後3週目に採取したプールされた血清は、Nt抗体力価640倍または320倍を示した。プールしたワクチン接種マウス血清は、ウェスタンブロット分析においてE蛋白質のみと反応した。

【0148】

1群10匹のマウスを、エレクトロトランスファーを用いることによって、動物あたりpCBWN 10.0～0.1 μgによって免疫した。pCBWNを投与した群は全て、ウイルスチャレンジから完全に保護された。免疫後6週目で、エレクトロトランスファーを行ったマウスの群は全て、エレクトロトランスファーを行わずに通常の筋肉内注射によってpCBWN 100 μgを投与した動物より、4倍弱異なるNt力価を示した。有効な免疫の証拠となるこれらの結果はいずれも、エレクトロトランスファープロトコルが本発明のDNAワクチンの免疫原性および保護有効性を増強することを示唆している（Mirら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 4262～4267（1999））に記載されるとおりに実施した場合）。

【0149】

本研究において用いた、様々な年齢の混合繁殖雌ウマおよび去勢ウマは、ELISAおよびPRNTによって、WNウイルスおよびSLEウイルス抗体陰性であることが示された。ウマ4頭にpCBWNプラスミド1回量（1,000 μg/1,000 μl、PBS、pH 7.5）を筋肉内注射した。血清標本はウイルスチャレンジの前に2日毎に38日間採取して、WNウイルス特異的抗体反応をMAC-、またはIgG-ELISAおよびPRNTによって評価した。

【0150】

ウイルスチャレンジの2日前、ウマ12頭（ワクチン接種4頭および対照8頭）を、コロラド州立大学の生物安全性レベル（BSL）-3封じ込め施設に移した。非ワクチン接種対照ウマ8頭は、ウマにおけるWN誘発発病およびウマが増幅宿主として作用することができるか否かを調べるように設計された試験のサブセットであった。ウマはそれぞれ、ウマのチャレンジの12日前にNY99-6425またはBC787ウイルスによって感染させたヒトスジシマカ（*Aedes albopictus*）14匹または15匹に刺された。蚊に10分間ウマの血を吸わせた。ウマを疾患の兆候に関して1日2回調べた。体温を記録し、血清標本を0日（感染日）～10日まで毎日2回、その後14日まで1日1回採取した。脈拍および呼吸数はチャレンジ後毎日記録した。採取した血清試料は、ウイルス血症の検出のためにブランク滴定によって、ならびに抗体反応

10

20

30

40

50

に関してMAC-、またはIgG ELISAおよびPRNTによって調べた。

【0151】

如何なるワクチン接種ウマにも全身または局所反応を認めなかった。個々のウマ血清をPRNTによって調べた。ワクチン接種したウマは、14日～31日の間に5倍以上またはそれに等しいNt抗体を産生した。37日目（蚊のチャレンジの2日前）でのワクチン接種したウマ、#5、#6、#7、および#8のエンドポイント力価はそれぞれ、40倍、5倍、20倍、および20倍であった。pCBWNプラスミドをワクチン接種したウマは、ウイルスチャレンジ後も健康であった。いずれのウマも、1日～14日の間、検出可能なウイルス血症または発熱を示さなかった。非ワクチン接種対照ウマは全て、感染した蚊に刺された後WNウイルスに感染した。非ワクチン接種ウマ8頭中7頭は、ウイルス血症を発症し、これはウイルスチャレンジ後最初の6日間に出現した。ウイルス血症のウマは、ウイルスチャレンジ後7日目～9日目の間にNt抗体を産生した。疾患の臨床兆候を示した全試験からの唯一のウマはウマ#11であり、感染後8日を初めとして発熱し、神経学的兆候を示した。このウマは24時間以内に重度の臨床疾患に進行し、9日目に安楽死させた。0日、2日、4日、または6日間ウイルス血症を示した代表的な4頭のウマ、#9、#10、#14および#15を選択して、本実施例において例として用いた。ウイルス力価は、われわれのアッセイにおいて検出可能な最低レベルである、血清の $10^{1.0}$ PFU/ml（ウマ#10）から血清の $10^{2.4}$ /ml（ウマ#9）の範囲に及んだ。ウマ#14は、試験期間中に検出可能なウイルス血症を発症しなかった。しかし、このウマは、12日後検出されたNt抗体によって示されたように、ウイルスに感染していた。

10

20

【0152】

既往のNt抗体反応は、実験の間Nt力価が徐々に増加したことによって示されるように、ワクチン接種ウマにおいて認められなかった。蚊のチャレンジ前のワクチン接種ウマに既に存在したNt抗体は、最初のウイルス感染および複製を抑制することができた。ウイルスが複製しなければ、感染した蚊によって提供されたチャレンジウイルス抗原は、ワクチン接種したウマにおいて既往の免疫応答を刺激するための十分な抗原量を含まない可能性がある。ワクチン接種したウマは全て、ウイルスチャレンジ後14日目で安楽死させた。WNウイルス感染症を示す肉眼的病理および組織病理学病変は認めなかった。

【0153】

実施例12．黄熱病ウイルス（YFV）またはセントルイス脳炎ウイルス（SLEV）prMおよびE蛋白質のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製
pCDJE2-7組み換え型プラスミドの構築と類似の戦略を用いて、YFVおよびSLEV組み換え型プラスミドを調製した。ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita, CA）を用いて、YFV株TRI-788379またはSLEV株78V-6507ウイルスシード150μlから抽出した。ウイルスRNAは、YFVまたはSLEV prMおよびE遺伝子コード領域を増幅するための鋳型として用いた。プライマーYFDV389（ヌクレオチド配列、配列番号：4；アミノ酸配列、配列番号：5）、cYFDV2452（配列番号：6）、SLEDV410（ヌクレオチド配列、配列番号：7；アミノ酸配列、配列番号：8）、およびcSLEDV2449（配列番号：9）を用いて、JEVおよびWNV組み換え型プラスミドの調製のために、上記のように対応する組み換え型核酸を作製した。KpnIおよびNotI酵素によって消化したRT-PCR増幅cDNAを、真核細胞発現プラスミドベクターpCDNA3（Invitrogen）のKpnI-NotI部位に挿入した。cDNAの双方の鎖をシーケンシングして、YFV株TRI-788379またはSLEV株78V-6507からの配列に対する同一性を確認した。YFVまたはSLEVのprMおよびEコード領域のヌクレオチド配列をそれぞれ含む、組み換え型プラスミドpCDYF2およびpCDSLE4-3は、EndoFree（商標）プラスミドマキシキット（Qiagen）を用いて精製し、インビトロ形質転換またはマウス免疫に用いた。

30

40

【0154】

YFVまたはSLEV特異的抗原はそれぞれ、pCDYF2またはpCDSLE4-3によって形質転換したCOS-1細胞において発現させた。発現された蛋白質レベルは、YFVまたはSLEV感染COS-1細胞対照と類似であった。JEVモデルにおけるように、ウイルス抗原の遺伝子を有するベクターによって形質転換したCOS-1細胞株が得られ、これはYFVまたはSLEV抗原性蛋白質を構成的に発現する。YFVまたはSLEV E特異的Mabのパネルを用いたIFAによるエピトープマッピング

50

グは、真正のE蛋白質が、pCDYF2-またはpCDSLE4-3形質転換COS-1細胞によって発現されたことを示した。予備試験は、pCDSLE4-3プラスミド100 μ g/100 μ lの脱イオン水溶液の1回量を筋肉内接種後、3週齢の雌性ICRマウスの100%が血清転換したことを示した。

【0155】

実施例13. JEVシグナル配列と共に、セントルイス脳炎ウイルスprMおよびE抗原のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、セントルイス脳炎ウイルスのMSI-7株に感染させた、Vero細胞培養培地150 μ lからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80 μ lに懸濁させ、セントルイス脳炎ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Trentら (Virology 156: 293~304 (1987)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片は、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位AfeIを、アンプリマーSLE463 (配列番号: 30) を用いることによってcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcSLE2447 (配列番号: 31) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

10

【0156】

上記の二つのプライマー (配列番号: 30および配列番号: 31) を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの2004断片 (463~2466 nt) を作製し、pCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBSLE (ヌクレオチド配列、配列番号: 21; アミノ酸配列、配列番号: 22) を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素、および操作された改変JEシグナル配列要素 (配列番号: 27) を含んだ。JEシグナル配列要素は、当初のpCBJESSプラスミドにおける-4 (CysからGly) および-2 (GlyからSer) 位で改変JEシグナル配列を含む。

20

【0157】

ABIプリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、Trentら (Virology 156: 293~304 (1987)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

30

【0158】

実施例14. JEVシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルス (YFV) prMおよびE蛋白質のコード配列を含む組み換え型プラスミドの調製

QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、黄熱病ウイルスの17D-213株に感染させたVero細胞培養培地150 μ lからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80 μ lに懸濁させ、黄熱病ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、dos Santosら (Virus Research 35: 35~41 (1995)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位AfeIは、アンプリマーYF482 (配列番号: 28) を用いてcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。後にNotI制限部位が続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcYF2433 (配列番号: 29) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

40

【0159】

上記の二つのアンプリマー (配列番号: 28および配列番号: 29) を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの1971断片 (482~2452 nt) を作製し、これをpCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBYF (ヌクレオチド配列、配列番号: 23; アミノ酸配列、配列番号: 24) を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素および操作されたJEシグナル配列要素 (配列番号: 27) を含ん

50

だ。JEシグナル配列要素は、pCBJESSプラスミドにおけるJESSの - 4 (CysからGly) および - 2 (GlyからSer) 位で改変JEシグナル配列を含む。

【0160】

ABIプリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、dos Santosら (Virus Research 35: 35~41 (1995)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【0161】

実施例15. JEVシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスprMおよびE抗原のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

10

QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、ポワッサンウイルスのLB株に感染させたVero細胞培養培地150μlから、ゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80μlに懸濁させ、ポワッサンウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、MandIら (Virology 194: 173~184 (1993)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位AfeIは、アンプリマーPOW454 (配列番号: 25) を用いてcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドン、アンプリマーcPOW2417 (配列番号: 26) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

20

【0162】

上記の二つのアンプリマー (配列番号: 25および配列番号: 26) を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの1983断片 (454~2436 nt) を作製し、これをpCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBPOW (ヌクレオチド配列、配列番号: 19; アミノ酸配列、配列番号: 20) を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素および操作されたJEシグナル配列要素 (配列番号: 27) を含んだ。JEシグナル配列要素は、pCBJESSプラスミドにおけるJESSの - 4位 (CysからGly) および - 2 (GlyからSer) 位で改変JEシグナル配列を含む。

【0163】

30

ABIプリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、MandIら (Virology 194: 173~184 (1993)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【0164】

実施例16. デング血清型2型構造蛋白質のコード配列を含むプラスミドの調製

他のフラビウイルスに関して行ったような技法 (実施例1、9、および12~15を参照のこと) に従って、デング血清型2型抗原の核酸TUを含むベクターを調製する。実施例に従って、ベクターを構築するために用いられるアンプリマーは、正常なデングウイルスシグナル配列を操作するために選択してもよく、または改変された日本脳炎ウイルスシグナル配列のような、他のフラビウイルスからのシグナル配列を操作するために選択してもよい。

40

【0165】

prMからEまでのデング血清型2型遺伝子領域を含むプラスミドを構築する。デング血清型2型prMおよびE遺伝子 (Deubelら、Virology 155: 365~377 (1986); Gruenbergら、J. Gen. Virol. 69, 1301~1398 (1988); Hahnら、Virology 162: 167~180 (1988)) をpCDNA3のようなプラスミドにライゲーションした後、切除して、発現させるためにpCBamp、pCEP4、pREP4、またはpRc/RSVのようなベクター (Invitrogen, Carlsbad, CAから供給) にクローニングする。必要であれば、cDNA配列においてコードされるデング血清型2型ウイルス特異的配列を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような技法を用いて増幅してもよい。または、ウイルスRNAが遺伝子領域源である場合、RT-PCR技法によってDNA配列を増幅し

50

てもよい。5'末端で開始コドンおよび3'末端で停止コドンを含むDNA断片を、サイトメガロウイルス (CMV) 前初期 (IE) 遺伝子プロモーター、開始コドン、およびターミネーターがデング血清型2型ウイルス配列に機能的に結合するように、適当な制限ヌクレアーゼ特異的部位で発現ベクターにクローニングする。

【0166】

実施例17. デング血清型2型DNAワクチンを用いたマウスのワクチン接種

実施例16において調製した、prMからEまでの遺伝子領域をコードするデング血清型2型核酸TUワクチンを、注射用水または緩衝生理食塩液のような適した薬学的担体に懸濁させ、離乳期のマウス群に筋肉内注射する。対照群には、デング血清型2型特異的遺伝子を欠損する同等のプラスミド調製物を注射する。デング血清型2型特異的抗体および/またはデング血清型2型特異的免疫系細胞障害細胞の産生を、その後一定の間隔で、例えば毎週の間隔で評価する。核酸TUワクチンを投与した約2ヶ月~4ヶ月後、マウスにデング血清型2型ウイルスをチャレンジする。ウイルス血症のレベルは、2日ごとなどのその後の適当な間隔で評価する。母体の抗体による受動的保護は、実施例8に示すように評価する。

10

【0167】

実施例18. 改善されたシグナルペプチドの設計および構築

シグナルペプチドは、挿入された蛋白質の転移および方向、したがってprMおよびE蛋白質の位相学 (topology) を左右しうる。真核細胞のシグナルペプチドの最も一般的な特徴は、h-領域と呼ばれる疎水性アミノ酸の枝8個~12個からなる (von Heijne, 「Signal sequences. The limits of variation」、J. Mol. Biol. 184: 99~105 (1985))。n-領域として知られる開始メチオニンとh-領域との間の領域は、通常、アミノ酸1個~5個を有し、通常、陽性荷電アミノ酸を有する。h-領域と切断部位との間はc-領域であり、これは3個~7個の極性アミノ酸、しかしほとんどが非荷電のアミノ酸残基からなる。ウイルスポリ蛋白質合成の際、CおよびprM蛋白質の接合部での、潜在型から切断可能なコンフォメーションへのシグナラーゼ切断部位の調節は、ウイルスプロテアーゼ複合体NS2B/NS3によってC蛋白質が予め除去されていることに依存する (Lobigs, 「Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6218~6222 (1993))。このように、prMおよびE蛋白質を発現プラスミドのみによって発現させる場合、ウイルスシグナル配列の有効性を検討することが重要である。

20

30

【0168】

様々なプラスミド構築物におけるシグナルペプチドの差は、少なくとも部分的に、蛋白質転移、切断部位提示、および正確な位相学の差、したがってprMおよびE分泌ならびにVLP形成を説明することができる。これらの属性の調節または最適化は、所望の特徴を付与する特性を有するシグナル配列を選択するか、または用いることによって改善することができる。これは、例えば、真核細胞について訓練された隠れたMarkovモデル (HMM) を用いた、機械学習コンピュータプログラムを用いることによって行うことができる (Henrik Nielsenら, 「Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model」、第6回分子生物学のためのインテリジェントシステムに関する国際学会 (ISMB 6) 抄録、AAAI Press、Menlo Park、California、122~130頁 (1998) ; Nielsenら, 「Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals」、Protein Engineering 12: 3~9 (1999) ; Nielsenら, 「A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites」、Int. J. Neural Sys. 8: 581~599 (1997) ; 「From sequence to sorting: Prediction of signal peptides」、Henrik Nielsen、Ph.D.論文、ストックホルム大学生化学部で保護 (1999年5月25日) ; そのそれぞれが、特に、コンピュータによるアルゴリズムを用いた、シグナル配列の最適化に関連する教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる)。

40

【0169】

用いられるプログラムのタイプの例は、2002年4月3日現在、<http://www.cbs.dtu.dk/serv>

50

ices/SignalP-2.0/において認められる。参照および組み入れられた参考文献に記載されるHMMを適用して、異なるプラスミド構築物における、prMシグナルペプチド配列のシグナルペプチド確率を計算した(表7)。シグナルP-HMM検索は、全ての構築物におけるシグナルペプチダーゼ切断部位を正確に予測した。しかし、切断の確率(0.164~1.000の範囲)およびシグナルペプチド確率(0.165~1.00の範囲)にかなりの差を認めた(表7)。これは、切断部位とシグナルペプチド確率が同様に、構築物のn-領域における陽性荷電アミノ酸、h-領域における疎水性アミノ酸の長さ、およびc-領域におけるアミノ酸組成によっても影響を受けることが知られていることから、意外ではない(Changら、「Flavivirus DNA vaccines: current status and potential」、Annals of NY Acad. Sci. 951: 272~285(2001); Sakaguchiら、「Functions of Signal and Signal-Anchor Sequences are Determined by the Balance Between the Hydrophobic Segment and the N-Terminal Charge」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 16~19(1992))。

10

【0170】

それぞれがJEウイルスの異なる株に由来する、三つのJEウイルスプラスミド構築物は、異なるワクチン能を示した(Linら、「DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice」、J. Virol. 72: 191~200(1998); Konishiら、「Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes」、J. Virol. 72: 4925~4930(1998); Changら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252(2000))。これらの構築物におけるシグナルペプチド配列は、荷電アミノ酸を含んでも含まなくてもよいn-領域の長さが異なる(表7)。陽性荷電アミノ酸を含むn-領域は、細胞質側に短いループを形成し、これによってh-領域(膜貫通ヘリックス)はテール方向に挿入されて、シグナラーゼ切断部位を露出する。本発明者らの研究において、prM/MおよびE蛋白質を含む分泌されたVLPは、pCDJE2-7形質転換細胞株、JE4B、またはpCBJE1-14一過性形質転換COS-1細胞の培養培地から精製することができた。勾配精製VLPおよびビリオンは、同一の免疫学的および生化学的特性を有する。フラビウイルス形態形成の顕著な特徴である、prMから成熟M蛋白質へのプロセッシング効率もまた、VLPとビリオン粒子との間で類似である。このように、pCDJE2-7およびpCBJE1-14によって発現されたprMおよびE蛋白質は、ビリオンprMおよびEと類似の方向に、I型膜貫通蛋白質として発現される(Changら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252(2000))。対照的に、pcDNA3JEMEのprM蛋白質は、そのn-領域に陽性荷電アミノ酸が存在しないために、膜貫通h-領域が頭部方向に挿入されたII型膜蛋白質として発現される(Konishiら、「Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes」、J. Virol. 72: 4925~4930(1998))。特に、発現されたprMおよびEの正確な位相学を有する発現された蛋白質と、効率的な蛋白質合成とを組み合わせると、VLP形成および分泌を増強することができ、したがってDNAワクチンの免疫原性を促進する(Changら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252(2000))。

20

30

40

【0171】

先に記述したように、コンピューターに基づく計算を用いることは、発現プラスミドの設計を最適にするために適用されている。特に、シグナルP-HMMプログラムの予想される検出力を適用して、WNウイルス発現プラスミドを設計した(表2)(Davisら、「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75: 4040~4047(2001))。pCBWNプラス

50

ミドは、WNウイルスprM-E遺伝子配列が後に続く短縮型のJEウイルスシグナルペプチドからなる。この構築物のワクチン能は、pCBWN DNAの1回筋肉内注射が保護免疫を誘導したのみならず、マウスおよびウマにおけるWNウイルス感染症を予防したことから十分に証明された。

【0172】

先に考察したように、かつ実施例13～15において証明したように、抗原コード領域と同じウイルスからのウイルスコードシグナル配列が、必ずしも利用できる最適なシグナルペプチドである必要はない。さらに、非改変シグナル配列が必ずしも最適である必要はない。例えば、pCBE1-14プラスミドにおいてコードされるシグナルペプチドは、シグナル配列の確率によって測定すると、n-領域を短縮することによって、c-領域配列を変化させることによって、または双方の改変の組み合わせによって改善することができる（図6）。例示のため、JEウイルスシグナルペプチドの短縮型は、本明細書に記載され、かつ教示のために参照として本明細書に組み入れられる、WNウイルスprMおよびE遺伝子の発現のために用いられている（Davisら、「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75: 4040～4047（2001））。1回筋肉内接種による用量設定試験により、pCBWNは、マウスにおける免疫原性がpCBE1-14より少なくとも2倍～4倍強いことが示された。

10

【0173】

実施例19．多価ワクチン

多数のフラビウイルスに対して免疫するように設計された、多価および/または複合ワクチンも同様に作製することができる。多価ワクチンの調製において、YF、異なる血清型のDEN、JE、WN、SLE、およびTBE（RSSEおよびCEE）ウイルス、またはフラビウイルスの他の任意の組み合わせのような、関係する病原体に関連した要素を含む一価ワクチン成分を調製する。他の実施例および本明細書において記述したDNA構築物の設計および作製は、記述通りに実施する。適当なワクチンの組み合わせは、多数の病原体に対して保護する多価または複合ワクチンを提供するように作製されうる。本発明者らのグループの予備的なデータは、pCBE1-14およびpCBWN DNAの複合ワクチンの筋肉内注射によって、マウスにおいてJEウイルス、およびWNウイルス特異的Nt抗体が誘導されることを証明した（表8）。それぞれの一価の成分は、たとえ同一の転写および翻訳調節物質を用いて構築しても、好ましくは、そのワクチン能を確実にするために類似のモデル系において試験すべきである。その後、複合ワクチンカクテルを処方することができる。これらのワクチンカクテルは、特定の地理的地域に対して特異的に作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯アジアのためのワクチンカクテルは、DENの四つの血清型、WN、およびJEウイルスワクチンを含むべきである。アフリカおよび南アメリカのための同様に有用なワクチンカクテルはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルスワクチン、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスワクチンを含むべきである。

20

30

【0174】

実施例20．組み換え型デング2型ウイルスの調製と試験

a．実施例の要約。 デング2型ウイルス（DEN-2）の前膜（prM）およびエンベロープ（E）蛋白質をコードする一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドには、配列番号：43によって記述される蛋白質をコードする真正のDEN-2prM-E構築物（pCBD2-14-6）（配列番号：42）、配列番号：45によって記述される蛋白質をコードする90% DEN-2 E-10% 日本脳炎（JE）ウイルスエキメラ構築物（pCB9D2-1J-4-3）（配列番号：44）、および配列番号：47によって記述される蛋白質をコードする80% DEN-2 E-20% JE Eキメラ構築物（pCB8D2-2J-2-9-1）（配列番号：46）が含まれた。モノクローナル抗体（MAb）反応性は、三つ全てのプラスミドが、ドメイン1、2、および3の抗体のパネルと反応するE蛋白質エピトープを発現することを示した。しかし、pCB8D2-2J-2-9-1構築物（配列番号：46）のみが高レベルのprM（成熟prM）およびEを、プラスミド形質転換COS-1細胞の培地に分泌した。pCBD2-14-6プラスミド（配列番号：42）によって形質転換されたCOS-1細胞、およびpCB9D2-

40

50

4-3プラスミド（配列番号：44）によって形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたprMおよびE蛋白質の主要な部分は、膜に結合したままであった。DEN-2のE蛋白質をコードする配列の20%を対応するJE E蛋白質配列をコードする配列に置換しても、MAb反応性に影響を及ぼさなかった。

【0175】

試験において、選択したプラスミドをマウスの群に0週目および3週目に2回筋肉内注射して、特異的中和抗体およびELISA抗体を測定することによって免疫応答を評価した。サブウイルス粒子（SVPs）を形成することができる分泌型prMおよびEを発現するプラスミドは、抗体反応の刺激において他の構築物より優れていた。pCB8D2-2J-2-9-1免疫マウスの血清標本9例中7例において、40倍～1000倍超に及ぶ90%中和力価を認めた。

10

【0176】

b. DEN-2ウイルスの重要性とワクチン。 デング（DEN）熱は、亜熱帯および熱帯地域に発生する急性感染症である。これはヒトの最も重要なフラビウイルス疾患の一つである。先に述べたように、デングウイルスには異なる四つのDEN血清型（DEN-1、DEN-2、DEN-3、およびDEN-4）が存在する。これらのいずれかに感染すると、通常、無症候性であるか、またはデング熱（DF）として知られる自己限定性の発熱疾患を生じる。しかし、少ない割合の症例において、デングウイルス感染症の結果、はるかにより重篤な疾患で生命に危険があるデング出血熱またはデングショック症候群（DHF/DSS）が起こる。このように、あまり関心を集めない比較的軽度のDF症例は世界中で年間約1億例であるが、入院を必要とするDHF/DSS症例は年間で推定50万例が報告されている。この疾患に対して保護するために、DENが風土病であり、かつ流行している地域の子供、および免疫がない大人に投与するために、四つ全ての血清型に対して有効な安全かつ有効なDENワクチンが必要である。

20

【0177】

安全なワクチンは、ビルレントウイルスによる重篤な感染症の起こりうるリスクを最小限にしなければならない。そのようなビルレントウイルスは、遺伝子復帰変異または弱毒化ワクチンウイルスに由来する、何らかのタイプのワクチンの組み換えによって生じうる。そのような発生は、ポリオウイルス撲滅キャンペーンにおいて実際に起こった（Guillotら、「Natural Genetic Exchanges between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans」、J. Virol. 74: 8434～8443（2000）；Liuら「Molecular Evolution of a Type 1 Wild-Vaccine Poliovirus Recombinant during Widespread Circulation in China」、J. Virol. 74: 11153～11161（2000））。さらに、黄熱病のアメリカ株TRINID79Aのゲノムシーケンシングを行ったところ、この株と弱毒化黄熱病ワクチンウイルスFNVの間に高度の類似性があることが証明されている（Changら、「Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus」、J. Virol. 69: 5773～5780（1995）；Pisanoら、「Complete nucleotide sequence and phylogeny of an American strain of yellow fever virus, TRINID79A」、Arch. Virol. 144: 1837～1843（1999））。それ自身結論的ではないが、類似性は、TRINID79AがFNVワクチンウイルスに由来することを強く示唆する。

30

【0178】

DNAに基づくワクチンを用いることは、フラビウイルスワクチンを開発するための新規かつ有望な免疫アプローチである（本明細書において記述するように、Changら、「Flavivirus DNA vaccines: current status and potential」、Ann. NY Acad. Sci. 951: 272～285（2001）、およびその中に引用されている参考文献）。本実施例において、多くのDEN-2ワクチンを作製し、DEN-2構築物を筋肉内に免疫した後のマウスにおける免疫応答は、prM/MおよびE分泌の効率と相関した。有意な量のprM/MおよびE抗原を分泌する一つの構築物は、プラスミドワクチン接種マウスにおいて高い力価の中和抗体を刺激できることが示された。

40

【0179】

c. 材料および方法

i. 細胞培養およびウイルス株。 COS-1細胞（ATCC、Manassas、VA；1650-CRL）を、10%

50

熱不活化ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT)、1 mMピルビン酸ナトリウム、1 mM非必須アミノ酸、30 ml/L 7.5% NaHCO₃、100単位/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル最小基本培地 (DME M、GIBCO、Grand Island, NY) において5% CO₂、37 °Cで増殖させた。VeroおよびC6/36細胞を、COS-1細胞に関して用いた条件と同じ条件で増殖させた。DEN-2ウイルス、株16681を、cDNAクローニング、IgG ELISA、およびブランク減少中和試験 (PRNT) のために用いた。ウイルスは、C6/36細胞培養において増殖させた。免疫学的または生化学的研究のために用いられるウイルスは、7% ポリエチレングリコール (PEG-8000; Fisher Scientific、Fair Lawn, NJ) による沈殿の後、30% グリセロール-45% 酒石酸カリウム勾配中で超遠心することによって精製した (Obijeskiら、「Segmented genome and nucleocapsid of L a Crosse virus」、J. Virol. 20: 664~675 (1976))。

10

【0180】

ii. プラスミドの構築。ゲノムRNAは、QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen、Santa Clarita, CA) を用いて、DEN-2 16681株を感染させたC6/36細胞培養培地150 μlから抽出した。抽出したRNAをジエチルピロカーボネート処置水 (DEPC、Sigma、ST. Louis, MO) 80 μlに再懸濁させてから、DEN-2ウイルスprMおよびE抗原を逆転写酵素-PCR (RT-PCR) によって増幅するための鋳型として用いた。公表された配列に基づいてプライマー配列 (表9) を設計した (Gadkariら、「Critical evaluation of Kyasanur Forest disease virus neutralizing antibodies found in bats (a preliminary report)」、Indian J. Med. Res. 64: 64~67 (1976); Kinneyら、「Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PD K-53」、Virology 230: 300~308 (1997))。制限酵素KasIの認識および切断部位をcDNAアンプリコンの5'末端に組み入れた。NotI制限部位が後に続くインフレーム終了コドンにcDNAアンプリコンの3'末端に導入した。DEN-2ウイルスcDNAアンプリコンをKasIおよびNotI酵素によって消化した後、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、100% DEN-2 Eプラスミド、pCBD2-14-6 (配列番号: 42) を作製した。

20

【0181】

90% および80% DEN-2 Eプラスミドを構築するために、100% DEN-2プラスミド、pCBD2-14-6 (配列番号: 42) およびJEプラスミド、pCBE1-14 (配列番号: 17) をPCR鋳型として用いて、それぞれ、DEN-2およびJE DNA配列を増幅した。DEN-2およびJE遺伝子断片を得るために増幅反応において用いた、プライマーの組を表9に記載する。T7およびSP6プライミング部位は、当初のpCDNA-3プラスミド (Invitrogen、Carlsbad, CA) に由来するpCBampプラスミドにおいて認められ、望ましければ、または必要に応じて利用することができる。90% DEN-2-10% JE E蛋白質遺伝子のPCR増幅DNA断片をBstX1制限エンドヌクレアーゼによって消化し、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、プラスミド、pCB9D2-1J-4-3 (配列番号: 44) を得た。80% DEN-2-20% JE E遺伝子のPCR増幅DNA断片を、BsmBIによって消化し、T4 DNAリガーゼによってライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、pCB8D2-2J-2-9-1 (配列番号: 46) を得た。三つのプラスミド構築物の略図を図7に示す。90% DEN-2-10% JE Eおよび80% DEN-2-20% JE E蛋白質接合領域を、それぞれ表9に示す。

30

40

【0182】

ABIプリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City, CA) において、製造元の推奨する技法に従って、自動DNAシーケンシングを行った。正確なprMおよびE配列を有する組み換え型プラスミドを、配列分析を用いて同定した。

【0183】

iii. 電気穿孔によるCOS-1細胞におけるDEN-2組み換え型抗原の一過性の発現。COS-1細胞は、実施例の他の部分、およびChangら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000) に記載したプロトコルを用いて

50

、各DEN-2プラスミドまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド対照 (pEGFP、Clonetech、San Francisco、CA) について個々に電気穿孔した。電気穿孔した細胞を75 cm²培養フラスコに播種して、37℃、5%CO₂において維持した。電気穿孔の6時間後、増殖培地を2%ウシ胎児血清を含む維持培地に交換した。組織培養培地および細胞は、抗原特徴付けのために電気穿孔後個々に48時間で回収した。

【0184】

iv. DEN-2 E特異的モノクローナル抗体を用いたエピトープマッピング。電気穿孔の48時間後、接着細胞をトリプシン処理して、5%ヤギ血清を含むPBSに再懸濁させて、12ウェルスポットスライド上にスポットして、風乾させた。スポットスライドに接着した細胞をアセトンによって-20℃で10分間固定した後、風乾させた。E-蛋白質特異的モノクローナル抗体 (MAb) を用いて、既に記述されているように間接的免疫蛍光抗体アッセイ (IFA) によって蛋白質発現を検出した (表10: Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000)))。

10

【0185】

v. 組み換え型DEN-2ウイルス抗原の特徴付け。組織培養培地を電気穿孔の48時間後に回収した。抗原捕獲 (Ag-捕獲) ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の、培養培地に分泌されたDEN-2ウイルス抗原を検出した。MAb 4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合MAb 6B6C-1を用いて、それぞれ、DENウイルス抗原を捕獲して、捕獲した抗原を検出した (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000) ; Huntら、「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」、J. Virol. Methods. 97: 133~149 (2001)))。

20

【0186】

電気穿孔の48時間後、各プラスミドに関して形質転換した細胞をトリプシン処理し、5×10⁶個を含むアリコートとしてPBSに再懸濁させた。これらの細胞試料は、Mem-PER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット (Pierce、Rockford、IL) を用いて、製造元の提案するプロトコールに従って、膜蛋白質抽出に関して処理した。疎水性および親水性蛋白質の双方を単離した。この技法は、疎水相において認められた膜貫通蛋白質を濃縮するために開発された。疎水性および親水性分画はいずれも、DEN-2組み換え型抗原に関して抗原-捕獲ELISAによって分析した。

30

【0187】

培地中の組み換え型抗原は、10% ポリエチレングリコール (PEG) -8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物は、TNE緩衝液 (50 mM トリス、100 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.5) に、当初の容量の100分の1となるように再懸濁し、遠心によって透明にし、4℃で保存した。PEG沈殿によって濃縮し、TNE緩衝液に再懸濁させた組み換え型抗原を、4.0% エタノールによって抽出し、残留PEGを除去した (Huntら、「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」、J. Virol. Methods. 97: 133~149 (2001)))。エタノール抽出した抗原、形質転換細胞からの疎水性膜蛋白質、および勾配精製DEN-2ビリオンを、Excel Plus電気泳動装置 (商標) (Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA) においてNuPAGE、4~12% ビストリス勾配ゲルにおいて分析した後、Excel Plusプロットユニット (Invitrogen Corp.) を用いてニトロセルロースメンブレン上にエレクトロブロッティングを行った。DEN-2ウイルス特異的蛋白質は、DEN-2ウイルス特異的MAb 1A6A-8 (E特異的) および1A2A-1 (カプシド特異的)、ならびにDEN-2 prMに対して特異的なウサギ血清、およびDEN-2 M蛋白質のアミノ酸1~34位からなるペプチドに対して特異的なマウス血清を用いて、ウェスタンブロットによって検出し、正常マウス腹水を陰性対照として用いた (Murrayら、「Processing of the dengue virus type 2 proteins prM a

40

50

nd C-prM」、J. Gen. Virol. 74 (Pt 2) : 175 ~ 182 (1993) ; Roehrigら、「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology 246 : 317 ~ 328 (1998))。

【 0 1 8 8 】

vi. マウスのワクチン接種。 3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群10匹を試験に用いた。0週目および3週目に容量100 μ l /マウスで用量100 μ gのpCBD2-14-6、pCB9D2-1J-4-3、pCB8D2-2J-2-9-1またはpEGFPをマウスに筋肉内注射した。プラスミドDNAは、EndoFreeプラスミドギガキット (商標) (Qiagen) を用いてXL-1 blue細胞から精製して、1.0 μ g / μ lの濃度でpH 7.5のPBSに再懸濁させた。pEGFP 100 μ gを投与したマウスをプラスミドワクチン接種対照として用いた。マウスを注射後3週間毎に採血して、DEN-2ウイルス特異的抗体反応を間接的ELISAおよびPRNTを用いて評価した。 10

【 0 1 8 9 】

vii. 血清学試験。 ワクチン接種前および接種後の血清標本を、ELISAによって精製DEN-2ビリオンに対する抗体結合能に関して、PRNTによって中和 (Nt) 抗体に関して、およびウェスタンブロッティングによって精製DEN-2ウイルス蛋白質を認識する抗体に関して調べた。PRNTは、DEN-2 (16681株) およびJE (Nakayama株) ウイルスを用いて、既に記述されているようにVero細胞に関して行った (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000))。エンドポイントは、90% ブラーク減少レベルで決定した (Huntら、「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」、J. Virol. Methods. 97 : 133 ~ 149 (2001))。 20

【 0 1 9 0 】

d. 結果

i. DEN-2ウイルス組み換え型抗原の一過性の発現。 DEN-2ウイルスのprMおよびE遺伝子の発現、またはDEN-2およびJEウイルス配列の組み合わせ (80% DEN-20% JEまたは90% DEN-10% JE) からのキメラE遺伝子の発現は、三つの組み換え型DEN-2 DNAプラスミドのそれぞれを、COS-1細胞に個別に形質転換することによって得た。基本のプラスミド設計は、プラスミド形質転換細胞が発現され、真正のウイルス蛋白質が細胞培養液に分泌される、JEウイルスおよびWNウイルスの組み換え型プラスミドによるこれまでの研究結果に基づいた (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000) ; Davisら、「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75 : 4040 ~ 4047 (2001))。DEN-2組み換え型蛋白質の一過性の発現は当初、細胞培養上清の抗原捕獲ELISA、およびアセトン固定形質転換COS-1細胞のIFAによって評価した (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000))。最適な抗原発現点は、電気穿孔の48時間後であると決定された。 30

【 0 1 9 1 】

ii. 一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたE蛋白質のエピトープマッピング。 組み換え型プラスミドのそれぞれによって発現されたDEN-2蛋白質を、DEN-2ウイルスに対して既知の反応性を有するマウスMABのパネルを用いてIFAによって評価した (表10 : Henchalら、「Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 : 162 ~ 169 (1985) ; Roehrigら、「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology 246 : 317 ~ 328 (1998))。MABパネルに 40 50

は、prMおよびC蛋白質と同様にフラビウイルスのE蛋白質の三つの抗原性ドメインのそれぞれと反応する抗体が含まれた (Mandlら、「Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model」、J. Virol. 63: 564~571 (1989); Reyら、「The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2.5 Å resolution」、Nature 375: 291~298 (1995))。フラビウイルス抗原性ドメイン2および3に対して特異的なMAbは、DEN-2ウイルスおよび三つのプラスミド発現蛋白質のそれぞれに対して、ほぼ同一の定量的反応性を示した。ドメイン-1特異的MAbの一つ、1B4C-2もまた、発現された全ての蛋白質と類似の反応性パターンを示した。しかし、二つのドメイン1特異的MAb、2B3A-1および9A4D-1は、エンドポイント滴定によって示されるように、プラスミドpCBD2-14-6およびpCB9D2-1J-4-3によって発現されたE蛋白質との反応性がかなり低かった (括弧内の値、表10)。エンドポイント力価の比較から、100% DEN-2 Eおよび90% DEN-2 E-10% JE Eを含む構築物において、エピトープC3およびC4の発現が明白に少ないことが判明した。prMに対して特異的なMAb 2H2は、三つ全てのプラスミドによって発現された抗原と同じ反応性を示した。抗-C MAb 1A2A-1は、DEN-2ウイルスと良好に反応し、prMおよびEを含むがCは含まないプラスミド発現ウイルス蛋白質と低いレベルの非特異的反応性を示した。

10

【0192】

iii. 三つのDEN-2組み換え型プラスミドのそれぞれによって産生された、分泌蛋白質および膜結合型蛋白質の比較。それぞれの組み換え型DEN-2プラスミドに関して、形質転換後48時間のCOS-1細胞から類似の量の細胞培養液を回収した。培養液に認められた分泌型組み換え型抗原を、PEG沈殿によって100倍濃縮した後、エタノール抽出によって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるその後の分析を妨害するPEGを除去した。各プラスミドによって発現された分泌型抗原の相対量は、PEG沈殿およびエタノール抽出細胞培養液調製物の双方の、Ag捕獲ELISA分析によって決定した (表11)。分泌型抗原は、80% DEN-2 Eおよび20% JE E遺伝子を含むpCB8D2-2J-2-9-1 (配列番号: 34) にトランスフェクトさせた細胞に限って検出された。100% DEN-2 Eまたは90% DEN-2 E-10% JE E遺伝子のいずれかを含む組み換え型プラスミドは、発現された蛋白質を濃縮する努力にもかかわらず、ELISAによって検出可能な抗原を培養液に産生しなかった。

20

【0193】

ウェスタンブロット分析も同様に用いて、DEN-2組み換え型プラスミドのそれぞれによる分泌型抗原の産生を評価した。比較目的のために、PEG-沈殿、エタノール抽出細胞培養上清の同等の容量を、NuPAGE勾配ゲルで泳動し、ニトロセルロースにエレクトロブロットし、全てのDEN-2構造蛋白質と反応することができるMAbまたはポリクローナル抗血清を用いて分析した (図8A)。ウェスタンブロット分析は、DEN-2特異的蛋白質が二つのプラスミド、すなわちpCB8D2-2J-2-9-1およびpCB9D2-1J-4-3 (それぞれ、配列番号: 46および44) からの培養液において検出されたことから、組み換え型抗原の検出に関してAg-捕獲ELISAより大きい感度を示した。プラスミドpCB8D2-2J-2-9-1 (配列番号: 46) はE、prM、およびM蛋白質からなることが示されている分泌型抗原の最大量を発現した。pCB9D2-1J-4-3 (配列番号: 44) によって産生された分泌型抗原は比較的少なく、pCBD2-14-6 (配列番号: 42) 調製物に関しては、かすかに検出可能なレベルが認められたに過ぎず、これは、特に、対照pEGFPに対するE-特異的MAb、1A6A-8の非特異的反応性を考慮に入れても、発現されたE蛋白質が比較的少ないように思われた (図8A、14-6およびGFPに関してレーンa、b)。

30

40

【0194】

E、prMおよびMは、その細胞内合成を通して膜会合蛋白質であることから、三つの組み換え型DEN-2プラスミドによるこれらの蛋白質の発現について、何らかの評価を行う場合には、プラスミド形質転換細胞からの細胞膜調製物の評価を含まなければならない。Mem-PEER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット (Pierce) を用いて、組み換え型プラスミドのそれぞれによって形質転換された細胞の同等数から、膜貫通蛋白質を単離した。疎水性蛋白質を、相分離によって親水性蛋白質から分離した。Ag-捕獲ELISAによる予備的な分析によって、親水性蛋白質分画が非反応性であることが示された; しかし、組み換え型DEN-2プラスミ

50

ドのそれぞれによって形質転換したCOS-1細胞からの疎水性蛋白質分画は、ELISA試験において類似の力価を有した(表11)。これらの結果は、三つ全てのプラスミドによってコードされた組み換え型抗原が、形質転換後に発現されたものの、発現された組み換え型抗原は同じレベルで必ずしも全て分泌されないことを示した。

【0195】

疎水性蛋白質分画に関するAg-捕獲の結果の確認は、ウェスタンブロットによって行った(図8B)。プラスミド形質転換細胞のそれぞれからの疎水性蛋白質分画の同等の容量を、バンドおよびレーンの歪みを減少させるために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関する製造元の推奨に従って希釈した。E-、prM-、C-、およびM-特異的MABまたはポリクローナル抗血清による免疫ブロット法により、三つ全てのDEN-2プラスミドが、EおよびprMからなる組み換え型抗原の類似量の産生を誘導したことが証明された。M蛋白質はprMからプロセッシングされなかったためか、またはそのレベルが低すぎて検出できなかったために、検出されなかった。バンドの歪みを減少させる努力にもかかわらず、疎水性蛋白質試料における高レベルの界面活性剤のために、そのような高濃度の界面活性剤を含まない試料と比較すると、EおよびprMはわずかに異常に移動した(図8Aおよび8BにおいてEおよびprMの移動を比較)。

【0196】

iv. 三つの異なるDEN-2組み換え型DNAプラスミドをワクチン接種したマウスにおける免疫応答の比較。3週齢のICRマウスをpCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)、pCB9D2-1J-4-3(配列番号:44)、pCBD2-14-6(配列番号:42)またはpEGFP 100μgによる筋肉内注射によって0週目および3週目に免疫した。マウスを初回免疫後3週、6週、および9週目に採血した。個々の血清、およびプールした血清を、ワクチン接種後3週および6週で100倍および400倍希釈液のスクリーニング、およびワクチン接種後9週におけるエンドポイント滴定を用いて、間接的ELISAによって調べた。9週の血清も同様に、DEN-2およびJEウイルスによるPRNTによって調べた。ELISAの結果は、1回免疫後(3週目の血清)、pCB8D2-2J-2-9-1を投与した全てのマウスが血清変換したのに対し、pCB9D2-1J-4-3では50%、およびpCBD2-14-6ワクチン接種マウスでは20%がDEN-2ウイルスと反応したに過ぎなかったことを示した(表12)。ワクチン接種後の9週までに、pCB8D2-2J-2-9-1またはpCBD2-1J-4-3のいずれかをワクチン接種したマウスは全て、抗DEN-2 ELISA反応性を示した;しかし、幾何平均力価は、有意に異なった(それぞれ、力価20,000倍対708倍)。100倍を超える抗DEN-2 ELISA力価を示したのは、pCBD2-14-6免疫マウスの40%に過ぎなかった。精製DEN-2ウイルスに対する、pCB8D2-2J-2-9-1免疫マウスからのプールした9週の血清のウェスタンブロットは、免疫優性反応がE糖蛋白質に対してであったことを示した。prMおよびMに対するわずかな反応性も同様に検出された。

【0197】

より重要なことに、三つのDEN-2プラスミドのワクチン能の評価に関して、90%ブランク減少エンドポイントに基づいて、pCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)によって免疫したマウス9匹中7匹においてウイルス中和抗体の誘導を認めた(表10)。しかし、50%中和エンドポイントを用いる場合、血清9例中9例全てがPRNT力価³ 40倍を有する。90%中和力価は、中和活性を有する血清7例に関して40倍から1000倍超の範囲であった。pCB9D2-1J-4-3を免疫したマウスはいずれも、中和抗体を産生せず、pCBD2-14-6ワクチン接種マウスからの血清10例中1例のみがウイルスを中和したが、力価は8倍に過ぎなかった。

【0198】

二つの組み換え型プラスミド、すなわち、pCB9D2-1J-4-3(配列番号:44)およびpCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)がJEウイルスE遺伝子配列を含むため、全ての血清を、JEウイルス中和活性の存在に関しても評価した。しかし、そのような活性は、如何なる免疫群のマウスに関しても90%中和エンドポイントでは検出されなかった。対照プラスミドpEGFPを免疫したマウスがDEN-2またはJEウイルスのいずれにに対しても反応性を示さなかったことは意外ではなかった。

【0199】

e. 考察

JEおよびWNワクチンに関して初期に用いた同じ段階を最初に用いて、真正DEN-2 prMおよびE遺伝子領域からなる組み換え型DEN-2プラスミド、pCBD2-14-6 (配列番号: 42) を構築した。MAbのパネルを用いて、IFAにより、このプラスミドによって形質転換したCOS-1細胞によって発現された、DEN-2蛋白質の抗原性マッピングを行ったところ、prMおよびE蛋白質が適合性の蛍光強度を示し、ウイルス感染細胞と類似のMAb反応性を有することが示された (表10)。しかし、真正DEN-2 prMおよびE領域をコードするプラスミドによって形質転換したこれらのCOS-1細胞は、検出可能なDEN-2抗原を培養液に分泌することができなかった (抗原捕獲ELISAによって測定した場合)。さらに、真正DEN-2 prMおよびE領域をコードするプラスミドを用いてワクチン接種を行っても、筋肉内に免疫したマウスにおいて抗DEN-2ウイルス中和抗体を刺激することができなかった (表13)。興味深いことに、pCBD2-14-6による細胞の形質転換によって、穴の開いた球状の蛍光染色が得られ、これはDEN-2のE蛋白質のC-末端が、蛋白質の膜保持シグナルに関与する可能性があることを示唆している。このIFA染色パターンは、JEまたはWN構築物形質転換細胞のいずれにおいても認められなかった (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000); Davisら、(「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75: 4040~4047 (2001))。したがって、本出願の教示に従ってなされた知見に照らして、DEN-2のC-末端の10%または20%を、それぞれJEウイルスE蛋白質の対応する領域に置換して、DNA配列の適当な操作を行った二つのさらなるプラスミド、pCB9D2-1J-4-3 (配列番号: 44) およびpCB8D2-2J-2-9-1 (配列番号: 46) を作製した。ワクチン接種マウスにおける検出可能な抗DEN-2 ELISA抗体を刺激するための、異なる構築物の相対的な有効性を表13に示す。

10

20

30

40

50

【0200】

これらの結果は、prMとEとの間の相互作用が、粒子の集合および分泌のプロセスに影響を及ぼしうるというモデルと一致する。このモデルに関する支持は、ダニが媒介する脳炎ウイルスの研究において認められ、これは、prMとEの外部ドメインとの相互作用が、prM-EのprM媒介細胞内輸送に関係し、このようにしてウイルス様粒子が分泌されることを推定的に示唆している (Allisonら、(「Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E」、J. Virol. 73: 5605~5612 (1999))。

【0201】

本実施例において、DEN-2 E蛋白質のC-末端部分を、TBE H1^{pred} からTM2に対応するJE E蛋白質に置換すると、DEN-2 prM蛋白質およびキメラE蛋白質が分泌された。しかし、対照的に、TBEにおいてTM1およびTM2を置換しても、抗原分泌にごく軽微な改善を生じたに過ぎなかった。pCBD2-14-6およびpCB9D2-4-3プラスミドによって形質転換したCOS-1によって発現された、prMおよびE蛋白質の主要な部分は、膜に結合したままであった (表13)。これらの結果は、同定されていない膜保持配列がDEN-2 E蛋白質のC-末端幹領域に存在することを示した。このC-末端幹領域をJEウイルスからの配列に置換すると、この保持配列は除去されるか、または無効となる。

【0202】

prM蛋白質は、prM-E成熟の際のE蛋白質の適切なコンフォメーションおよび分泌を維持するために必須であることは、他の研究者によっても主張されている (Aberleら、(「A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms」、J. Immunol. 163: 6756~6761 (1999); Allisonら、(「Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form」、J. Virol. 69: 5816~5820 (1995))。さらに、E蛋白質の外部ドメインがprMと相互作用することも証明されて

いる。この相互作用は、マリーバレー脳炎ウイルスにおけるEのアミノ酸残基200～327位内のアミノ酸配列が関係することが推定されている（Guirakhooら、「The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein」、Virology 191: 921～931（1992））。

【0203】

適切なprMとEとの相互作用、およびE蛋白質の構造の完全性が保持されることは、少なくともそれらが免疫反応性にとって必要である限り、三つ全てのDEN-2構築物によって発現された蛋白質において維持される可能性がある。さらに、pCB8D2-2J-2-9-1におけるC-末端の20%のEの置換によって、真正DEN-2 Eのアミノ酸395個を維持する蛋白質が得られた。そのような如何なる改変も、EおよびprM-E相互作用に対する影響はほとんどなく、キメラE蛋白質の抗原性特徴に対する影響もほとんどないと予想される。DEN-2 EのC-末端領域をJE幹アンカー配列に置換しても、MAbの反応性に対して影響を及ぼさなかったことから（表10）、そのように置換されたDEN-2配列の保持は、DEN-2特異的免疫学的反応を得るためにごく選択的となりうる。

10

【0204】

これまで、ダニ媒介脳炎ウイルスprM、およびE蛋白質の分泌型サブウイルス粒子をコードするプラスミド構築物は、抗体反応の程度および機能性に関して、ならびにウイルスチャレンジに対する反応に関して、分泌されるC-末端切断型可溶性E二量体、分泌されない完全長のE、または効率よく分泌されない切断型Eをコードする他の構築物より優れていることが示されている（Aberleら、「A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms」、J. Immunol. 163: 6756～6761（1999））。しかし、本明細書において、本発明者らは、DEN-2 DNAのワクチン能がprM/MおよびEの分泌と相関することを証明した（表13）。分泌されたprMおよびEの形態学および物理的特徴は本研究において証明しなかった。しかし、pCB8D2-2J-2-9-1構築物によって分泌されたprMおよびEは、ウイルス様粒子を形成する可能性がある。粒子表面上に多数の保護抗原が提示されることは、この構築物のワクチン能を改善すると考えられている。

20

【0205】

DEN-2 ウイルスDNAの開発に関するこれまでの試みは、成否が多様であった（Kochelら、「Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice」、Vaccine 15: 547～552（1997）；Konishiら、「A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice」、Vaccine 18: 1133～1139（2000））。有効性のレベルを改善するために、異なる戦略が用いられている。例えば、ワクチン処方における、pUC19プラスミド、マウスGM-CSFを発現するプラスミドを含む、免疫刺激CpGモチーフの同時免疫、またはEのC-末端のアミノ酸43個を、ライソゾーム会合膜保持配列に置換することによって、DEN-2ワクチンに対する抗体反応が改善し、これらが用いられている（Porterら、「Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses」、Arch. Virol. 143: 997～1003（1998）；Raviprakashら、「Synergistic Neutralizing Antibody Response to a Dengue Virus Type 2 DNA Vaccine by Incorporation of Lysosome-Associated Membrane Protein Sequences and Use of Plasmid Expressing GM-CSF」、Virology 290: 74～82（2001））。非メチル化CpGモチーフは、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、およびリンパ球を直接活性化して、サイトカインおよびケモカインを分泌させ、Th1サイトカインによって媒介される免疫応答の発達を支持する（Mandersら、「Immunology of DNA vaccines: CpG motifs and antigen presentation」、Inflamm. Res. 49: 199～205（2000））。しかし、CpGを含めると、宿主のサイトカインプロファイルを偏らせて、それによって、Th-1媒介臓器特異的自己免疫障害の発症、および免疫恒常性の妨害の双方に關与する可能性がある（Smithら、「The regulation of DNA vaccines」、Curr. Opin. B

30

40

50

iotech. 12 : 299 ~ 303 (2001)) 。同様に、サイトカインの過剰レベルは、特定のTヘルパー細胞の反応を増加させるものの、免疫応答における他の作用物質の反応を減少または遮断して、それによって全身性の免疫抑制または慢性炎症が起こりうるという証拠がマウスにおいて認められている (Robertsonら、「Assuring the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines」、Mol. Biotechnol. 17 : 143 ~ 149 (2001)) 。相応して、フラビウイルスDNA免疫の安全性および有効性は、転写および翻訳を増強するような発現プラスミドの操作によって、ならびに正しいポリ蛋白質のプロセッシングおよび集合を促進する、分泌型prMおよびE蛋白質のターゲティングによって利益を得ることができるであろう (Changら、「Flavivirus DNA vaccines : current status and potential」、Ann. NY Acad. Sci. 951 : 272 ~ 285 (2001)) 。今後の改善は、抗原提示細胞または筋肉細胞によるDNA取り込みの増強に向けることができる (Rodriguezら、「Enhancing DNA immunization」、Virology 268 : 233 ~ 238 (2000)) 。

10

【 0 2 0 6 】

(表 1)

移入された二つの細胞株における、様々な組み換え型プラスミドによるJE prMおよびE蛋白質の一過性の発現。

ベクター						組み換え型 プラスミド	IFA強度／ 抗原陽性細胞の割合*	
	プロモーター	イントロン	ポリ(A)	ORI			COS-1	COS-7
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40		pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	なし	BGH	なし		pCBE1-14	3+/45	nd
pCIBamp	CMV	あり	BGH	なし		pC1BES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	なし	SV40	OriP		pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	なし	SV40	OriP		pREJE	1+/3	1+/2
pRe/RSV	RSV	なし	BGH	SV40		pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40		pCDNA3/CAT	-	-

* 様々な細胞株をpCDNA3/CAT（陰性対照）、pCDJE2-7、pCBE1-14、pC1BES14、pCEJE、pREJE、またはpRCJEによって形質転換した。細胞を48時間後にトリプシン処理して、JEウイルス特異的HIAFによる間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって調べた。データは、IFA陽性細胞の強度（尺度1+～4+）および割合として表記する。pCDNA3/CAT形質転換細胞を陰性対照として用いた。

【0207】

（表2）

JEウイルス反応抗体によるCOS-1細胞のpCDJE2-7によって安定に形質転換したクローン（J

10

20

30

40

50

E-4B) によって発現された蛋白質の特徴付け

Mabまたは 抗血清	Mabの生物活性		細胞の免疫蛍光強度	
	特異性	生物機能	JEV感染	4B
Mab:				
MC3	JEV特異的		2+	2+
2F2	JEV特異的	HI, N	4+	4+
112	JEV特異的		4+	4+
503	JEV特異的	N	4+	3+
109	亜群	HI	2+	1+
N.04	亜群	HI, N	3+	4+
201	亜群		1+	1+
203	亜群		4+	3+
204	亜群		2+	2+
301	亜群	HI	2+	2+
504	フラビウイルス		4+	4+
6B6C-1	フラビウイルス		2+	2+
3B4C-4	VEE		-	-
H1AF:				
抗-JEV			4+	3+
抗-WEE			-	-
PBS			-	-

10

20

30

【 0 2 0 8 】

(表 3)

pCDJE2-7またはJE-VEXワクチンによって免疫したマウスにおける免疫応答の持続

	ELISA 力価 (log ₁₀)						PRNT _{90%} 力価		
	3週間	6週間	9週間	23週間	40週間	60週間*	3週間	6週間	9週間
1x pCDJE2-7	2.6-3.2	3.8-5.0	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.4, 2.4, 3.8, 4.4	<20	20	40-160
2x pCDJE2-7	2.6-3.8	4.4	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.6, 3.8, 3.8	<20	20-40	40-160
2x JE-VAX	2.6-3.8	4.4-5.0	3.8-5.6	>3.2	>3.2	<2, <2, 4.4	<20	20-40	20-160
2x pCDNA3/CAT	<2	<2	<2	ND	ND	<2	<20	<20	<20

10

20

30

40

マウスに100 μg/用量のプラスミドDNA、またはJE-VAXワクチンのヒト用量の1/5を1回もしくは2回接種した。2回目の免疫を行う前に、試験のために血清を採取した。

*個々の血清力価。

【 0 2 0 9 】

(表 4)

様々なJEVワクチンによるワクチン接種後のマウスにおける、年齢依存的 % 血清陽性率

	3日齢		3週齢	
	3週間 PV	7週間 PV	3週間 PV	7週間 PV
JE-VAX	0	0	100	100
pCDNA3/CAT	0	0	0	0
pCDJE2-7	40	60	90	90
pC1BJES14	10	60	80	100
pCBE1-14	80	100	100	100

10

【 0 2 1 0 】

(表 5)

様々なJEVワクチンによる3日齢でのワクチン接種後、8週齢マウスにおけるJEVチャレンジからの保護

ワクチン	チャレンジ前 JEV血清変換	チャレンジ後の日の生存率 (%)				
		6	7	8	9	21
JE-VAX	0	100	100	60	40	40
pCDNA3/CAT	0	100	80	30	30	30
pCDJE2-7	60	100	100	100	100	100
pC1BJES14	60	100	100	100	100	100
pCBE1-14	100	100	100	100	100	100

20

【 0 2 1 1 】

(表 6)

JEV核酸ワクチン接種雌性マウスからの母体抗体が、致死性JEV脳炎から仔を保護することができるか否かに関する評価

ワクチン接種母親		JEVチャレンジした仔		
ワクチン	PRNT _{90%}	チャレンジ 日齢 (日)	生存数 ¹	ELISA ²
1 x pCDJE2-7	40	4	0/11	
2 x pCDJE2-7	80	4	12/12	12/12
2 x JE-VAX	20	3	0/16	
2 x pCDNA-3/CAT	<10	5	0/14	
1 x pCDJE2-7	20	15	5/11	5/5
2 x pCDJE2-7	40	14	8/12	7/8
2 x JE-VAX	80	13	5/5	5/5
2 x pCDNA-3/CAT	<10	14	0/14	

30

40

マウスにプラスミドDNA 100 μg用量を1回もしくは2回筋肉内に接種するか、またはJE-VAXワクチンのヒト用量の1/5量を2回皮下接種した。非免疫雄性マウスと交配させる前に、PRNT試験のためにワクチン接種後9週目に血清を採取した。

1: 生存数 / 各同腹子の総数

2: JEV ELISA抗体陽性動物数 (力価 400倍) / 生存数; 血清は、チャレンジ後12週目に試験のために採取した。

【 0 2 1 2 】

50

(表7)

フラビウイルスDNAワクチン構築物におけるシグナルペプチドの特徴とワクチン能

プラズミド	シグナルペプチド配列 prM蛋白質の前のシグナルペプチド配列	シグナルペプチド確率 ^a			免疫プロトコール ／保護
		SP	AP	C部位	
pSLE1	?LDTINRRPSKKRGGRSLGLAALIGLASS/LQLLSTYQG (配列番号:32)	0.702	0.292	0.352	im x 2/部分的
pJME	MMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGGK (配列番号:33)	0.998	0.000	0.778	im x 2/部分的
pCJME	MNEGSIIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGGK (配列番号:34)	0.985	0.012	0.785	im x 2/100%
pCJIE1-14	MGRKQNKRGGNEGSIIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGGK (配列番号:35)	0.791	0.199	0.623	im x 1/100%
pcDNA3prM-E	MSKKRGGSETSVLMVIFMLIGFAAA/LKLSNFQGGK (配列番号:36)	0.721	0.277	0.622	im x 4/部分的
pCBWN	MGKRKSAGSIIMWLASLAVVIACAGA/VTLNMFQGGK (配列番号:37)	0.976	0.024	0.526	gg x 2-4/100%
p1012D2ME	MNVLRGFRKEIGRMNLNRRRRTAGMIIMLIPVMA/FHLTTRNGE (配列番号:38)	0.165	0.778	0.164	im x 1/100%
SV-PE	MVGLQKRGKRSSATDWMWLLVITLLGMTLA/ATVRKERGD (配列番号:39)	0.943	0.056	0.899	id x 2/なし
pWRG7077-RSSE	MGWLLVVVLLGVTLA/ATVRKERGD (配列番号:40)	1.000	0.000	0.912	im or gg x 2/100%
pWRG7077-CEE	MSWLLVITLLGMTIA/ATVRKERGD (配列番号:41)	0.999	0.000	0.821	gg x 2/100%

^a シグナルP HMMプログラムを適用して、シグナルペプチド (SP)、アンカーペプチド (AP)、およびシグナラーゼ切断部位 (C部位) の確率を計算した。一文字アミノ酸コードを使用し、荷電アミノ酸は、下線と太字の文字で強調した。SPとprMの間のシグナラーゼ切断部位を「/」で示す。DNAワクチンは、筋肉内 (im)、皮内 (id)、または遺伝子ガ

10

20

30

40

50

ン (gg) 法によって接種した。

【 0 2 1 3 】

(表 8)

WNおよびJEウイルスの複合DNAワクチンの異なる用量によって免疫したマウスにおける中和抗体 (Nt) 反応

プラスミドあたりの用量 (μg)	pCBWN + pCBJE1-14				pCB対照
	100 + 100	40 + 40	20 + 20	10 + 10	100
Ntを有するマウスの割合：					
WNウイルス/JEウイルス：	100 / 100	100 / 70	70 / 0	60 / 0	0 / 0
PRNT ₉₀ 力価の範囲：					
WNウイルス：	1:320 - 1:80	1:80 - 1:20	1:80 - <1:10	1:20 - <1:10	<1:10
JEウイルス：	1:40 - 1:10	1:10 - <1:10	<1:10	<1:10	<1:10

10

3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群10匹に、表記の複合プラスミドの用量を1回筋肉内注射した。免疫後12週目に採取した血清標本を、プラーク減少中和試験 (PRNT) によってアッセイした。JEおよびWNウイルスに対するエンドポイント力価はそれぞれ、JEウイルス (SA-14株) および西ナイルウイルス (NY-6480株) を用いて、90% プラーク減少に基づいて計算した。

20

【 0 2 1 4 】

(表 9)

DEN-2ウイルスprM E発現プラスミドを構築するために用いられるオリゴヌクレオチド、およびキメラDEN-2およびJE Eの接合領域を示す。

100% DEN-2 prM-E:D2KasI-438^a 5' TGTGCAGGGCGCCTTCCATTTAACACACGTAACG (配列番号:48)CD2NotI-2402 5' TCGAGCGGGCCGCTCAACTAATTAGGCCTGCACCATGACTC (配列番号:49)**90% DEN-2 E & 10% JE E:**

T7 5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:50)

CD2BstXI-2244 5' ATAGATTGCTCCAAACACTTGGTTGG (配列番号:51)

JE-2281 5' ACTCCATAGGAAAAGCCGTTCCACC (配列番号:52)

CSP6 5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG (配列番号:53)

DEN-2↔↔JE**90-10 接合部 : Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr (配列番号:55)****CTC CAC CAA GTG TTT GGT GGT GCC TTC AGA ACA (配列番号:54)****80% DEN-2 E & 20% JE E:**

T7 5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:56)

CD2BsmBI-2097 5' GAATTCGTCTCACTTCCTTTCTTAAACCAGTTGAGCTTC (配列番号:57)JEBsmBI-2175 5' GGAATTCGTCTCGGAAGCACGCTGGGCAAGG (配列番号:58)

CSP6 5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG 3' (配列番号:59)

DEN-2↔↔JE**80-20 接合部 : Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala (配列番号:61)****AAC TGG TTT AAG AAA GGA AGC ACG CTG GGC GCC (配列番号:60)**^a オリゴヌクレオチドにおいてコードされる制限酵素部位は、太字、斜体、および下線で強調した。

【 0 2 1 5 】

(表 1 0)

間接蛍光抗体アッセイ法 (IFA) によって決定した、組み換え型DEN-2プラスミドによって発現されたDEN-2 E糖蛋白質エピトープの特徴付け

10

20

30

抗体	対照 ^a				Mab (エピトープ) ^b
	抗原ドメイン ^c	PRNT ^d	DEN-2 正常細胞	プラスミド構築物 ^a	
			感染細胞	pCB9D2-1J-4-3	pCB8D2-2J-2-9-1
4G2 (A1)	2	+/-	4+	4+	4+
4E5 (A2)	2	はい	3+	3-4+	2-3+
1B7 (A5)	2	はい	3-4+	4+	2-3+
1B4C-2(C1)	1	いいえ	3-4+ (8000)	2-3+ (4000)	2-3+ (8000)
2B3A-1 (C3)	1	いいえ	3-4+ (≥3200)	3+ (100)	2-3+ (≥3200)
9A4D-1 (C4)	1	いいえ	3-4+	2-3+ (400)	3+ (≥12800)
3H5 (B2)	3	はい	4+	4+	4+
10A4D-2 (B3)	3	はい	2-3+	3-4+	2-3+
1A1D-2 (B4)	3	はい	4+	4+	3-4+
9D12-6		はい	2-4+	2-3+	3-4+
2H2	prM	いいえ	4+	4+	3-4+
1A2A-1	カプシド	いいえ	2-3+	1+	1-2+

10

20

30

^a IFA基質は、DEN-2 16681に感染した、非感染対照、およびDEN-2組み換え型プラスミドによって形質転換したアセトン固定COS-1細胞であった。

40

^b モノクローナル抗体は、DEN-2 16681ウイルスに対する反応性に基づいて規定の最適な希釈で用いた。いくつかのMabに関しては、括弧内に示すエンドポイント力価を報告し、他のMabに関しては、1+~4+の尺度に基づいて定性的な値のみを報告し、3~4+を陽性とし、2+は不明確、そして1+は陰性を見なす。

^c TBEウイルスのE-糖蛋白質に基づく抗原性ドメイン (Mandlら、「Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model」、J. Virol. 63: 564~571 (1989); Reyら、「The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 resolution」、Nature 375: 291~298 (1995))。

^d 50% 中和エンドポイントが報告された4G2および9D12-6を除き、90% ブラーク減少エン

50

ドポイントを用いた、腹水の100倍希釈でのブランク減少中和活性（Henchalら、「Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:162～169（1985）；Roehrigら、「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology 246:317～328（1998））。

【0216】

（表11）

抗原捕獲ELISAによる、分泌型および膜結合型DEN-2組み換え型蛋白質の検出

プラスミド	試料のタイプ	エンドポイントELISA力価	
pCBD2-14-6	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	10
pCBD2-14-6	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:20	
pCBD2-14-6	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:160	
pCB9D2-1J-4-3	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	
pCB9D2-1J-4-3	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:20	
pCB9D2-1J-4-3	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:80	20
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG沈殿培養液 ^a	1:640	
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	1:80	
pCB8D2-2J-2-9-1	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:80	
pEGFP	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	
pEGFP	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:10	30
pEGFP	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	<1:10	

^a プラスミド形質転換細胞からの培養上清を、10%ポリエチレングリコールによって沈殿させ、最初の容積の100分の1に再懸濁させた。

^b PEG沈殿培養上清を4%エタノールによって抽出してPEGを除去し、ペレットを抽出した容量の1/5に再懸濁させた。

^c 疎水性膜分画は、材料と方法に記載のように調製した。

【0217】

（表12）

ICRマウスにおける三つのDEN-2組み換え型プラスミドの免疫原性

プラスミド DNA ^b	マウス#	DEN-2ウイルスに対するELISA					DEN-2ウイルス に対するPRNT ^a	JEウイルス に対するPRNT ^a
		ワクチン接種後3週間でスクリーニング ^c		ワクチン接種後6週間でスクリーニング ^c		ワクチン接種後9週間でのエンドポイント力価		
		1:100	1:400	1:100	1:400			
pCB8D2-2J-2-9-1	プール, 1,2,4-10	ND ^d	ND	+	+	64,000	ND	ND
	1	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
	2	+	+	+	+	32,000	>1000	<2
	4	+	+	+	+	16,000	200	<2
	5	+	+	+	+	4,000	<10	<2
	6	+	+	+	+	16,000	200	<2
	7	+	-	+	+	64,000	100	<2
	8	+	-	+	+	8,000	40	<2
	9	+	+	+	+	6,400	<2	<4
	10	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
pCB9D2-1J-4-3	プール, 1-10	ND	ND	+	+	1,000	ND	<2 ^e
	1	-	-	+	-	400	<10	ND
	2	+	-	+	+	200	<10	ND
	3	+	+	+	+	4,000	<2	≤4
	4	+	-	+	-	200	<10	ND
	5	-	-	+	+	400	<10	ND
	6	+	+	+	+	4,000	<2	2
	7	-	+/-	-	-	100	<10	ND
	8	-	-	-	-	200	<10	ND
	9	+	-	+	-	4,000	<2	<2
10	-	-	+	+	4,000	<2	<2	
pCBD2-14-6	プール, 1-10	ND	ND	+	-	200	<2 ^f	<2 ^g
	1	-	-	-	-	400	<10	ND
	2,3,6-9	-	-	-	-	<100	ND	ND
	4	+	+	+	+	1,000	<2	<2
	5	-	-	+	-	2,000	8	<2
	10	+	-	-	-	<100	ND	ND
pEGFP	プール, 1-10	-	ND	-	ND	<100	<2	<2

^a PRNT、ブランク減少中和試験、90%中和エンドポイント。

^b マウスを0週目および3週目にプラスミドDNA 100 μgによって筋肉内に免疫した。

^c ELISAスクリーニングは、100倍および400倍希釈した血清を用いた。

^d ND、行っていない。

^e プール、1、2、4、5、7、8。

^f プール、2、3、6～10。

^g プール、1～3、6～10。

【 0 2 1 8 】

(表 1 3)

三つのDEN-2組み換え型プラスミドの特徴の要約。

10

20

30

40

プラスミド	IFA ^a		Ag捕獲ELISA力価		DEN-2に関するELISA力価 ^b		DEN-2 PRNT ^c
	+/-	球状 / 拡散	分泌型抗原	疎水性膜蛋白質調製物	100倍以上の血清の数	プールした血清の力価	10倍以上の血清の数
pCB8D2-2J-2-9-1	+	拡散	1:640	1:80	9/9	1:64000	7/9 ^d
pCB9D2-1J-4-3	+	球状	<1:10	1:80	10/10	1:1000	0/10
pCBD2-14-6	+	球状	<1:10	1:160	3/10	1:200	0/10

10

^a 間接蛍光抗体アッセイ (IFA) 染色の特徴、+または-、および拡散または球状パターン

^b 組み換え型プラスミドによって免疫したマウスからの血清の、抗DEN-2 ELISA力価。血清は、ワクチン接種後9週目に採取した (0週目および3週目)。プールした血清試料のエンドポイントELISA力価を含む、力価が100倍以上のマウスの数 / マウスの総数を示す。

^c ブラック減少中和力価 (PRNT、90%減少) が10倍以上であるマウスの数 / マウスの総数。血清はワクチン接種後9週目に採取した。

^d 中和抗体を有するマウス7匹中、マウス3匹は、PRNT力価が1000倍以上であり、3匹は、100倍以上1000倍未満、そして1匹は力価40倍であった。

20

【図面の簡単な説明】

【0219】

【図1】フラビウイルスポリ蛋白質プロセシングの略図である。中央の水平方向の部分には、ウイルスゲノムの略図を示す。線は、5'および3'非翻訳領域を示し、四角で囲った部分には、構造蛋白質 (左と上) および非構造蛋白質 (右と下) のオープンリーディングフレームを表す。宿主シグナラーゼによる切断は、E蛋白質C-末端で翻訳と同時に起こり、構造領域と非構造領域とを分離する。サブチラーゼ様細胞酵素であるフリンがprMの切断に関与する可能性がある。ウイルスポリ蛋白質の潜在的な膜貫通ドメインを、影をつけた部分で示す。

【図2】prM-E蛋白質コード領域を発現させる転写単位を構築するために (下)、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) において用いたJEVゲノム (上) およびオリゴヌクレオチドのDNA配列のマップである。ウイルスポリ蛋白質の、潜在的な膜貫通ドメインを、影をつけた部分で示す。

30

【図3】プラスミドベクター、pCDNA3、pCBamp、およびpCIBampの略図と、それらの関係を示す。これらのプラスミドには、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター / エンハンサー要素、BGHp(A) (ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルおよび転写終了配列)、アンピシリン抵抗性遺伝子、ならびに大腸菌において選択および維持するためのColE1複製開始点が含まれる。pCBampを作製するために、大腸菌細胞における一本鎖救出のためのf1複製開始点、SV40複製開始点 (SV40 ORI)、ネオマイシン抵抗性コード領域およびSV40p(A)配列を、pCDNA3から欠失した。プラスミドpCIBampを作製するために、pCBampのNco I-KpnI部位にイントロン配列を挿入した。

40

【図4】JE-4B COS-1培養液からのショ糖勾配精製サブウイルス粒子のSDS-PAGE免疫プロット分析を示す (4B、各対の右のレーン)。JEV感染C6/36細胞培養物からの密度勾配精製JEピリオンを陽性対照として用いた (JEV、各対の左のレーン)。JE HIAF (過免疫腹水) ; 4G2、抗Eモノクローナル抗体 ; JM01、抗-Mモノクローナル抗体 ; NMAF (正常マウス腹水) 。

【図5】トライトンX-100処置を行うか、または行わないJE-4B細胞培養培地のPEG沈殿物から調製した、E抗原の速度ゾーンショ糖密度勾配分析におけるプロフィールを示す。

【図6】シグナルP-HMMプログラムによって予想される、pCBJE1-14 (pCBJE) のシグナルペプチド確率を示す (A)。シグナルペプチド確率は、-4および-2位 (C-4GおよびG-2S

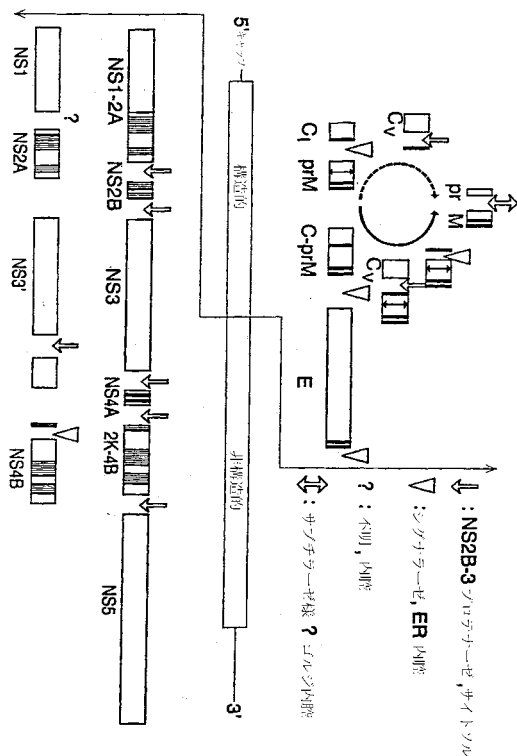
50

）でc-領域配列を変化させることによって（パネルB、JE-LSS-M）、n-領域を短縮することによって（パネルC、JE-SS-ORI）、または双方の改変の組み合わせによって（パネルD、JE-SS-M）改善される。

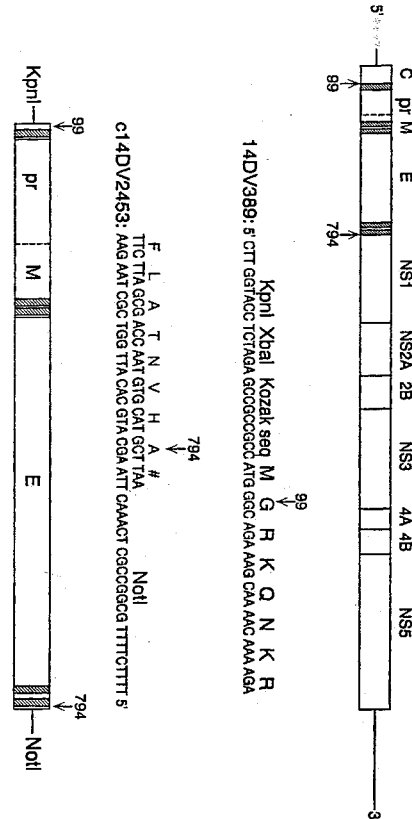
【図7】プラスミドベクターpCBD2-14-16（100% DEN-2E）、pCBD2-1J-4-3（90% DEN-2E；10% JEV E）、およびpCB8D2-2J-2-9-1（80% DEN-2E；20% JEV E）の略図を示す。これらのプラスミドはヒトサイトメガロウイルス（CMV）初期遺伝子プロモーター；JEウイルスシグナル配列；DEN-2ウイルスprMおよびE遺伝子領域（それぞれ、アミノ末端100%、90%、または80%）；JEウイルスE遺伝子領域（それぞれ、なし、10%または20%）；およびウシ成長ホルモンポリAシグナル（BGH）を含む。

【図8】ウェスタンブロットによる、分泌型および膜結合型組み換え型蛋白質の比較を示す。（A）DEN-2プラスミドpCB8D2-2J-2-9-1、pCB9D2-1J-4-3、pCBD2-14-16、および対照プラスミドpEGFPに関する、培養液のPEG-沈殿およびエタノール抽出後の分泌型組み換え型抗原の分析。レーン1（V）、ゴールドブロット（Gold Blot）（Owl Separation System s, Portsmouth, NH）によって染色した精製DEN-2ウイルス。それぞれのプラスミドからの分泌型組み換え型抗原の、a、抗エンベロープ（E）特異的Mab 1A6A-8；b、MAB 1A6A-8、抗カプシド（C）特異的Mab1A2A-1、DEN-2ウイルス前膜（prM）蛋白質に対して特異的な抗血清反応性の混合物；およびc、正常マウス腹水、に対する反応性。（B）組み換え型プラスミド形質転換細胞の、疎水性膜蛋白質の分析。レーン1（V）、ゴールドブロットによって染色した精製DEN-2ウイルス；レーン2（V）、精製DEN-2ウイルスと、Mab 1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質 20
に対する抗血清の混合物との反応性。それぞれのプラスミド形質転換細胞株から単離された疎水性膜蛋白質の、a、Mab1A6A-8；b、Mab 1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質に対する抗血清の混合物；ならびにc、正常マウス腹水、に対する反応性。

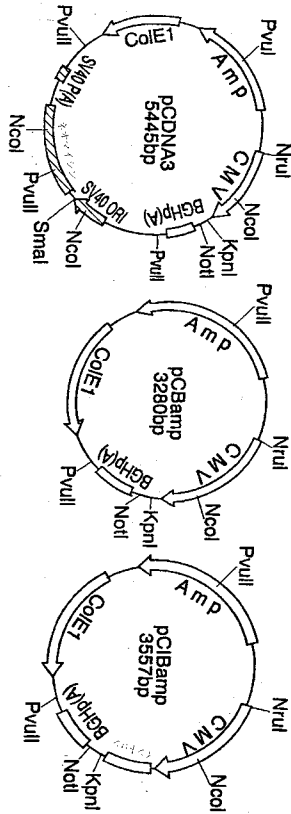
【図1】



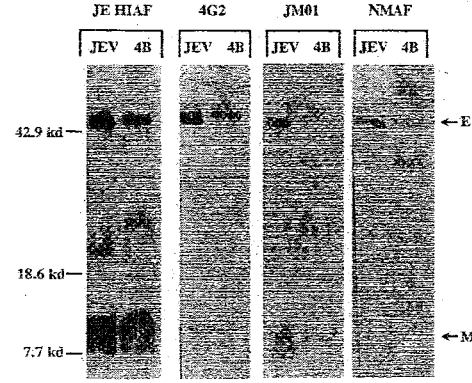
【図2】



【図 3】

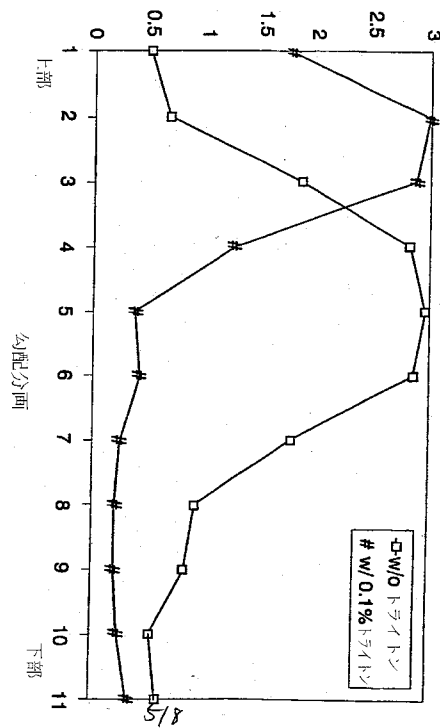


【図 4】

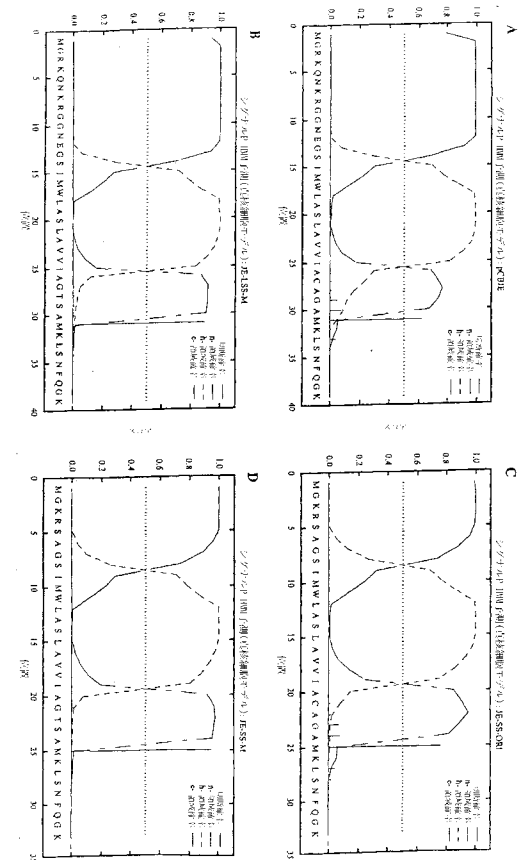


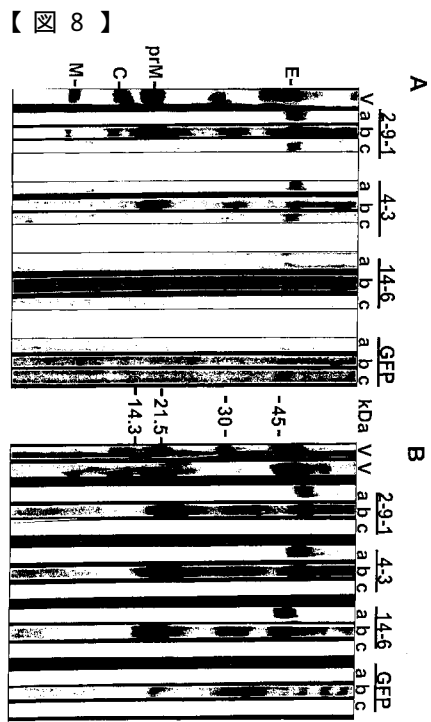
【図 5】

非希釈勾配試料の OD450

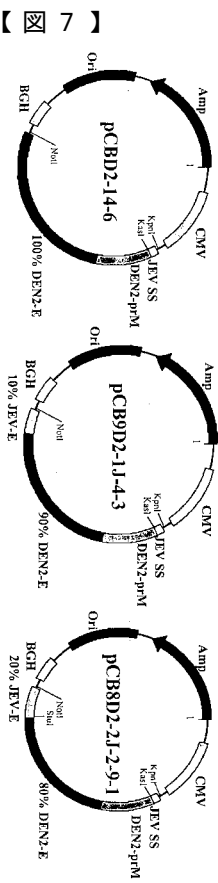


【図 6】





【 8 】



【 7 】

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/081754 A1(51) International Patent Classification: C12Q 1/70,
G01N 33/53, C12P 21/06, C07K 16/00, C07H 21/04,
A61K 39/12J. [US/US]: 4237 Beaver Creek Drive, Fort Collins, CO
80522 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/10764

(74) Agent: MILLER, Mary, L.; Needle & Rosenberg, P.C.,
127 Peachtree Street, N.E., Suite 1200, Atlanta, GA 30303-
1811 (US).

(22) International Filing Date: 4 April 2002 (04.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/826,115 4 April 2001 (04.04.2001) US(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 09/826,115 (CIP)
Filed on 4 April 2001 (04.04.2001)(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(71) Applicant (for all designated States except US): THE
GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA, as represented by the secretary, DEPART-
MENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES,
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PRE-
VENTION [US/US]; Technology Transfer Office, 1600
Clifton Road, N.E., MS 15-67, Atlanta, GA 30333 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): CHANG, Gwong-Jen,

WO 02/081754 A1

(54) Title: NUCLEIC ACID VACCINES FOR PREVENTION OF FLAVIVIRUS INFECTION

(57) Abstract: The present invention encompasses isolated nucleic acids containing transcriptional units which encode a signal sequence of one flavivirus and an immunogenic flavivirus antigen of a second flavivirus or of a chimeric immunogenic flavivirus antigen comprising sequence from more than one flavivirus. The invention further encompasses a nucleic acid and protein vaccine and the use of the vaccine to immunize a subject against flavivirus infection. The invention also provides antigens encoded by nucleic acids of the invention, antibodies elicited in response to the antigens and use of the antigens and/or antibodies in detecting flavivirus or diagnosing flavivirus infection.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

**NUCLEIC ACID VACCINES FOR PREVENTION
OF FLAVIVIRUS INFECTION**

This application is a continuation-in-part of, and claims the benefit of, U.S. application Serial No. 09/826,115, filed April 4, 2001, which status is pending and
5 which is continuation-in-part of, and claims the benefit of U.S. application Serial No. 09/701,536, filed November 29, 2000, which status is pending and which is a national stage application of international application Serial No. PCT/US99/12298, filed June 3, 1999 from, and which claims the benefit of, U.S. provisional application Serial No. 60/087,908, filed June 4, 1998, which applications are hereby incorporated herein in
10 their entirety by reference.

Field of the Invention

This invention relates to novel vaccines, diagnostics and methods of using both in the treatment and prevention of the diseases caused by flaviviruses. In particular,
15 the vaccines are recombinant nucleic acids which contain genes for structural proteins of flaviviruses, such as Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV) or related flaviviruses. These vaccines serve as a transcriptional unit for the biosynthesis of the virus protein antigens when administered *in vivo*. The diagnostics are compositions containing antigens produced from the recombinant nucleic acids that can
20 be used to detect flavivirus infection.

Background of the Invention

Flaviviruses are members of the genus *Flavivirus*, which is classified within the family Flaviviridae. The flaviviruses are largely pathogenic to humans and other mammals. Flaviviruses that inflict disease upon humans and animals include Alfuy,
25 Apoi, Aroa, Bagaza, Banzi, Batu Cave, Bouboui, Bukalasa bat, Bussuquara, Cacipacore, Carey Island, Cowbone Ridge, Dakar bat, Dengue (serotypes 1, 2, 3 and 4), Edge Hill, Entebbe bat, Gadgets Gully, Iguape, Ilheus, Israel turkey

WO 02/081754

PCT/US02/10764

- meningoencephalitis, Japanese encephalitis, Jugra, Jutiapa, Kadam, Karshi, Kedougou, Kokobera, Koutango, Kunjin, Kyasanur Forest disease, Langat, Mcaban, Modoc, Montana myotis leukoencephalitis, Murray Valley encephalitis, Naranjal, Negishi, Ntaya, Omsk hemorrhagic fever, Phnom Penh bat, Potiskum, Powassan, Rio Bravo,
- 5 Rocio, Royal Farm, Russian spring summer encephalitis, Saboya, Sal Vieja, San Perlita, Saumarez Reef, Sepik, Sokuluk, Spondweni, St. Louis encephalitis, Stratford, Tick-borne encephalitis - central European subtype, Tick-borne encephalitis - far eastern subtype, Tembusu, THCAr, Tyulenyi, Uganda S, Usutu, West Nile, Yaounde, Yellow fever, Yokose, Ziki, Cell fusing agent and other related flaviviruses, as listed in
- 10 Kuno et al. (*J. Virol.* 72: 73-83 (1998)).

- The flaviviruses contain the following three structural proteins: prM/M, the premembrane and membrane protein; E, the envelope protein; and C, the capsid protein. (Monath, in *Virology* (Fields, ed.), Raven Press, New York, 1990, pp. 763-814; Heinz and Roehrig, in *Immunochimistry of Viruses II: The Basis for*
- 15 *Serodiagnosis and Vaccines* (van Regenmortel and Neurath, eds.), Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 289-305). M has a molecular weight (MW) of about 7-8 kilodaltons (kDa) and E has a MW of about 55-60 kDa. M is synthesized as a larger precursor termed prM. The pr portion of prM is removed when prM is processed to form M protein in mature virions. M and E are located in the membrane of the
- 20 flavivirus particle, and so have long been considered to constitute important immunogenic components of the viruses.

- The flaviviruses are RNA viruses comprising single stranded RNA having a length, among the various species, of about 10 kilobases (kb). The C protein, with a MW of 12-14 kDa, complexes with the RNA to form a nucleocapsid complex. Several
- 25 nonstructural proteins are also encoded by the RNA genome which are termed NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. The genome is translated within the host cell as a polyprotein, then processed co- or post-translationally into the individual gene products by viral- or host-specific proteases (Figure 1).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The nucleotide sequences of the genomes of several flaviviruses are known, as summarized in U. S. Patent No. 5,494,671. That for JEV is provided by Sumiyoshi et al. (*Virology* 161: 497-510 (1987)) and Hashimoto et al. (*Virus Genes* 1: 305-317 (1988)). The nucleotide sequences of the virulent strain SA-14 of JEV and the
5 attenuated strain SA-14-14-2, used as a vaccine in the People's Republic of China, are compared in the work of Nitayaphan et al. (*Virology* 177: 541-552 (1990)).

Nucleotide sequences encoding the structural proteins of other flavivirus species are also known. In many cases, the sequences for the complete genomes have been reported. The sequences available include dengue serotype 1 virus, dengue serotype 2
10 virus (Deubel et al., *Virology* 155: 365-377 (1986); Gruenberg et al., *J. Gen. Virol.* 69: 1391-1398 (1988); Hahn et al. *Virology* 162: 167-180 (1988)), dengue serotype 3 virus (Osatomi et al., *Virus Genes* 2: 99-108 (1988)), dengue serotype 4 virus (Mackow et al., *Virology* 159: 217-228 (1987), Zhao et al., *Virology* 155: 77-88 (1986)), West Nile virus (Lanciotti et al., *Science* 286: 2331-2333 (1999)), Powassan virus (Mandl et al.,
15 *Virology* 194: 173-184 (1993)) and yellow fever virus (YFV) (Rice et al., *Science* 229: 726-733 (1985)).

Many flaviviruses, including St. Louis encephalitis virus (SLEV), WNV and JEV, are transmitted to humans and other host animals by mosquitoes. They therefore occur over widespread areas and their transmission is not easily interrupted or
20 prevented.

West Nile fever is a mosquito-borne flaviviral infection that is transmitted to vertebrates primarily by various species of *Culex* mosquitoes. Like other members of the Japanese encephalitis (JE) antigenic complex of flaviviruses, including JE, SLE and Murray Valley encephalitis (MVE) viruses, WNV is maintained in a natural cycle
25 between arthropod vectors and birds. The virus was first isolated from a febrile human in the West Nile district of Uganda in 1937 (Smithburn et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 471-492 (1940)). It was soon recognized as one of the most widely distributed flaviviruses, with its geographic range including Africa, the Middle East, Western Asia, Europe and Australia (Hubalek et al., *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643-50 (1999)). Clinically,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

West Nile fever in humans is a self-limited acute febrile illness accompanied by headache, myalgia, polyarthropathy, rash and lymphadenopathy (Monath and Tsai, in Clinical Virology, (Richman, Whitley and Hayden eds.), Churchill-Livingstone, New York, 1997, pp. 1133-1186). Acute hepatitis or pancreatitis has been reported on
5 occasion and cases of WNV infection in elderly patients are sometimes complicated by encephalitis or meningitis (Asnis et al., *Clin. Infect. Dis.* 30: 413-418 (2000)). Thus, infection by WNV is a serious health concern in many regions of the world.

The geographical spread of the disease, particularly the introduction of WNV into the U.S. in 1999, has greatly increased awareness of the human and animal health
10 concerns of this disease. Between late August and early September 1999, New York City and surrounding areas experienced an outbreak of viral encephalitis, with 62 confirmed cases, resulting in seven deaths. Concurrent with this outbreak, local health officials observed increased mortality among birds (especially crows) and horses. The outbreak was subsequently shown to be caused by WNV, based on monoclonal
15 antibody (Mab) mapping and detection of genomic sequences in human, avian and mosquito specimens (Anderson et al., *Science* 286: 2331-2333 (1999); Jia et al., *Lancet* 354: 1971-1972 (1999); Lanciotti et al., *Science* 286: 2333-2337 (1999)). Virus activity detected during the ensuing winter months indicated that the virus had established itself in North America (*Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49: 178-179 (2000); Asnis et al., *Clin.*
20 *Infect. Dis.* 30: 413-418 (2000); Garmendia et al., *J. Clin. Micro.* 38: 3110-3111 (2000)). Surveillance data reported from the northeastern and mid-Atlantic states during the year 2000 confirmed an intensified epizootic/epidemic transmission and a geographic expansion of the virus with documentation of numerous cases of infection in birds, mosquitoes and horses, as well as cases in humans (*Morb. Mortal. Wkly. Rep.*
25 49: 820-822 (2000)).

Currently, no human or veterinary vaccine is available to prevent WNV infection and mosquito control is the only practical strategy to combat the spread of the disease.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Japanese encephalitis virus (JEV) infects adults and children and there is a high mortality rate among infants, children and the elderly in areas of tropical and subtropical Asia (Tsai et al., in Vaccines (Plotkin, ed.) W.B. Saunders, Philadelphia, Pa, 1999, pp. 672-710). Among survivors, there are serious neurological consequences, related to the symptoms of encephalitis, that persist after infection. In more developed countries of this region, such as Japan, the Republic of China (Taiwan) and Korea, JEV has been largely controlled by use of a vaccine of inactivated JEV. Nevertheless, it is still prevalent in other countries of the region.

Vaccines available for use against JEV infection include live virus inactivated by such methods as formalin treatment, as well as attenuated virus (Tsai et al., in Vaccines (Plotkin, ed.) W.B. Saunders, Philadelphia, Pa, 1994, pp. 671-713). Whole virus vaccines, although effective, do have certain problems and/or disadvantages. The viruses are cultivated in mouse brain or in cell culture using mammalian cells as the host. Such culture methods are cumbersome and expensive. Furthermore, there is the attendant risk of incorporating antigens from the host cells, i.e., the brain or other host, into the final vaccine product, potentially leading to unintended and undesired allergic responses in the vaccine recipients. There is also the risk of inadvertent infection among workers involved in vaccine production. Finally, there is the risk that the virus may not be fully or completely inactivated or attenuated and thus, the vaccine may actually cause disease.

Dengue fever and dengue hemorrhagic fever (DF/DHF) are caused by dengue virus, which is also a mosquito-borne flavivirus. There are four antigenically related, but distinct, dengue virus serotypes, (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4), all of which can cause DF/DHF. Symptoms of DF, the mild form of dengue-related disease, include fever, rash, severe headache and joint pain. Mortality among those subjects suffering from DF is low; however, among those subjects suffering from DHF, mortality can be as high as 5%. From available evidence, more than 3 million cases of DHF and 58,000 deaths have been attributed to DHF over the past 40 years, making DHF a major emerging disease (Halstead, in Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (Gubler and Kuno, eds.) CAB International, New York, NY, (1997) pp 23-44). Nevertheless,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

despite decades of effort, safe and effective vaccines to protect against dengue virus infection are not yet available.

Yellow fever is prevalent in tropical regions of South America and sub-Saharan Africa and is transmitted by mosquitos. Infection leads to fever, chills, severe headache
5 and other pains, anorexia, nausea and vomiting, with the emergence of jaundice. A live virus vaccine, 17D, grown in infected chicken embryos, is considered safe and effective. Nevertheless, there remains a need for a vaccine that is stable under adverse conditions, such as are commonly encountered in the tropical regions of Africa and the Americas where the vaccine is most needed.

10 A recombinant flavivirus which is a chimera between two flaviviruses is disclosed in PCT publication WO 93/06214. The chimera is a construct fusing non-structural proteins from one "type," or serotype, of dengue virus or a flavivirus, with structural proteins from a different "type," or serotype, of dengue virus or other flavivirus.

15 Several recombinant subunit and viral vaccines have been devised in recent years. U.S. Patent No. 4,810,492 describes the production of the E glycoprotein of JEV for use as the antigen in a vaccine. The corresponding DNA is cloned into an expression system in order to express the antigen protein in a suitable host cell such as *E. coli*, yeast, or a higher organism cell culture. U. S. Patent No. 5,229,293 discloses
20 recombinant baculovirus harboring the gene for JEV E protein. The virus is used to infect insect cells in culture such that the E protein is produced and recovered for use as a vaccine.

U.S. Patent No. 5,021,347 discloses a recombinant vaccinia virus genome into which the gene for JEV E protein has been incorporated. The live recombinant
25 vaccinia virus is used as the vaccine to immunize against JEV. Recombinant vaccinia viruses and baculoviruses in which the viruses incorporate a gene for a C-terminal truncation of the E protein of dengue serotype 2, dengue serotype 4 and JEV are disclosed in U.S. Patent 5,494,671. U.S. Patent 5,514,375 discloses various

WO 02/081754

PCT/US02/10764

recombinant vaccinia viruses which express portions of the JEV open reading frame extending from prM to NS2B. These pox viruses induced formation of extracellular particles that contain the processed M protein and the E protein. Two recombinant viruses encoding these JEV proteins produced high titers of neutralizing and
5 hemagglutinin-inhibiting antibodies, and protective immunity, in mice. The extent of these effects was greater after two immunization treatments than after only one. Recombinant vaccinia virus containing genes for the prM/M and E proteins of JEV conferred protective immunity when administered to mice (Konishi et al., *Virology* 180: 401-410 (1991)). HeLa cells infected with recombinant vaccinia virus bearing genes
10 for prM and E from JEV were shown to produce subviral particles (Konishi et al., *Virology* 188: 714-720 (1992)). Dmitriev et al. reported immunization of mice with a recombinant vaccinia virus encoding structural and certain nonstructural proteins from tick-borne encephalitis virus (*J. Biotechnology* 44: 97-103 (1996)).

Recombinant virus vectors have also been prepared to serve as virus vaccines
15 for dengue fever. Zhao et al. (*J. Virol.* 61: 4019-4022 (1987)) prepared recombinant vaccinia virus bearing structural proteins and NS1 from dengue serotype 4 and achieved expression after infecting mammalian cells with the recombinant virus. Similar expression was obtained using recombinant baculovirus to infect target insect cells (Zhang et al., *J. Virol.* 62: 3027-3031(1988)). Bray et al. (*J. Virol.* 63: 2853-2856
20 (1989)) also reported a recombinant vaccinia dengue vaccine based on the E protein gene that confers protective immunity to mice against dengue encephalitis when challenged. Falgout et al. (*J. Virol* 63: 1852-1860 (1989)) and Falgout et al. (*J. Virol.* 64: 4356-4363 (1990)) reported similar results. Zhang et al. (*J. Virol* 62: 3027-3031 (1988)) showed that recombinant baculovirus encoding dengue E and NS1 proteins
25 likewise protected mice against dengue encephalitis when challenged. Other combinations in which structural and nonstructural genes were incorporated into recombinant virus vaccines failed to produce significant immunity (Bray et al., *J. Virol.* 63: 2853-2856 (1989)). Also, monkeys failed to develop fully protective immunity to dengue virus challenge when immunized with recombinant baculovirus expressing the
30 E protein (Lai et al. (1990) pp. 119-124 in F. Brown, R. M. Chancok, H. S. Ginsberg

WO 02/081754

PCT/US02/10764

and R. Lerner (eds.) Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Immunization using recombinant DNA preparations has been reported for SLEV and dengue-2 virus, using weanling mice as the model (Phillipotts et al., *Arch. Virol.* 141: 743-749 (1996); Kochel et al., *Vaccine* 15: 547-552 (1997)). Plasmid DNA encoding the prM and E genes of SLEV provided partial protection against SLEV challenge with a single or double dose of DNA immunization. In these experiments, control mice exhibited about 25% survival and no protective antibody was detected in the DNA-immunized mice (Phillipotts et al., *Arch. Virol.* 141: 743-749 (1996)). In mice that received three intradermal injections of recombinant dengue-2 plasmid DNA containing prM, 100% developed anti-dengue-2 neutralizing antibodies and 92% of those receiving the corresponding E gene likewise developed neutralizing antibodies (Kochel et al., *Vaccine* 15: 547-552 (1997)). Challenge experiments using a two-dose schedule, however, failed to protect mice against lethal dengue-2 virus challenge.

The vaccines developed to date for immunizing against infection by JEV, SLEV, dengue virus and other flaviviruses have a number of disadvantages and problems attending their use. Inactivated vaccine is costly and inconvenient to prepare. In addition, any such vaccine entails the risk of allergic reaction originating from proteins of the host cell used in preparing the virus. Furthermore, such vaccines present considerable risk to the workers employed in their production. Candidate attenuated JEV vaccines are undergoing clinical trials, but as of 1996 have not found wide acceptance outside of the People's Republic of China (Hennessy et al., *Lancet* 347: 1583-1586 (1996)).

Recombinant vaccines based on the use of only certain proteins of flaviviruses, such as JEV, produced by biosynthetic expression in cell culture with subsequent purification or treatment of antigens, do not induce high antibody titers. Also, like the whole virus preparations, these vaccines carry the risk of adverse allergic reaction to antigens from the host or to the vector. Vaccine development against dengue virus and

WO 02/081754

PCT/US02/10764

WNV is less advanced and such virus-based or recombinant protein-based vaccines face problems similar to those alluded to above.

There is therefore a need for vaccines or improved vaccines directed against flaviviruses such as yellow fever virus, dengue virus, JEV, SLEV and WNV which are inexpensive to prepare, present little risk to workers involved in their manufacture, carry minimal risk of adverse immunological reactions due to impurities or adventitious immunogenic components and are highly effective in eliciting neutralizing antibodies and protective immunity. There is furthermore a need for a vaccine against JEV, WNV and related flaviviruses that minimizes the number of immunizing doses required.

10

Many of the shortcomings of the current art as described in detail for the production of vaccines also apply to the production of antigens and antibodies to be used for the production of immunodiagnosics. Particularly, the concurrent risks and costs involved in the production of antigens from viruses and the failure of most currently available recombinantly expressed antigens to elicit effective immune responses are paralleled in the field of immunodiagnosics by the same risks, high costs and a corresponding lack of sensitivity. Thus, because of the high costs, risk of accidental infection with live virus and the lower than desired levels of sensitivity of the previously available tests, there exists a need for rapid, simple and highly sensitive diagnostic tests for detecting flavivirus infection and/or contamination.

20

The present invention meets these needs by providing highly immunogenic recombinant antigens for use in diagnostic assays for the detection of antibodies to selected flaviviruses. The present invention further provides for the use of recombinant antigens derived from flaviviruses, flavivirus genes or mimetics thereof in immunodiagnostic assays for the detection of antibodies to flavivirus proteins.

25

Summary of the Invention

The present invention provides a nucleic acid molecule which contains a transcriptional unit (TU) for an immunogenic flavivirus antigen. The TU directs a host

WO 02/081754

PCT/US02/10764

cell, after being incorporated within the cell, to synthesize the antigen. In an important aspect of the invention, the flavivirus can be yellow fever virus (YFV), dengue serotype 1 virus (DEN-1), dengue serotype 2 virus (DEN-2), dengue serotype 3 virus (DEN-3), dengue serotype 4 virus (DEN-4), St. Louis encephalitis virus (SLEV), Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV), Powassan virus or any other flavivirus. In important embodiments of the present invention, the antigen can be the flavivirus prM/M protein, the E protein, or both. In important embodiments of the present invention, the antigen can be a chimeric flavivirus protein. In particular, when the TU includes both the prM/M and E proteins, the host cell secretes subviral particles containing the prM/M and E antigens. In a further important aspect of the invention, the nucleic acid is a DNA molecule. In additional significant embodiments, the nucleic acid TU includes a control sequence disposed appropriately such that it operably controls the expression of the prM/M and E antigens and this control sequence can be the cytomegalovirus immediate early promoter. In an additional embodiment, the nucleotide sequence of the TU is engineered to optimize eukaryotic translation by minimizing large hairpin structures in the 5'-end untranslated region of an mRNA produced by the TU and/or the inclusion of a Kozak consensus sequence at the translational start site of an mRNA produced by the TU. In an additional embodiment, the transcriptional unit also includes a poly-A terminator.

20 The present invention further provides a host cell comprising a nucleic acid molecule which includes a transcriptional unit for an immunogenic flavivirus antigen that directs the host cell to synthesize the immunogenic antigen. The flavivirus may be YFV, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, SLEV, JEV, WNV, Powassan virus or other flavivirus. In important embodiments, the antigen may be the prM/M protein, the E protein, or both the prM/M and the E proteins. In the latter case, the cell secretes subviral particles containing the prM/M and E antigens.

30 Additionally, the invention provides a composition for vaccinating a subject against a flavivirus containing a nucleic acid molecule that includes a transcriptional unit for an immunogenic flaviviral antigen. The transcriptional unit directs a cell within the body of the subject, after being incorporated therein, to synthesize the

WO 02/081754

PCT/US02/10764

immunogenic antigen. The composition further includes a pharmaceutically acceptable carrier. In significant embodiments, the flavivirus may be YFV, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, SLEV, JEV, WNV, Powassan virus or other flavivirus. Furthermore, the antigen may be the prM/M protein, the E protein, or both the prM/M and the E proteins.

5 In the latter instance, the cell secretes subviral particles comprising the flavivirus prM/M and E antigens. These subviral particles are also referred to as noninfectious recombinant antigen (NRA). In important embodiments, the nucleic acid molecule is a DNA molecule. In further significant embodiments, the transcriptional unit additionally contains a control sequence disposed appropriately such that it operably

10 controls the synthesis of the prM/M and E antigens when the nucleic acid is introduced into the cell of the subject. This control sequence can be the cytomegalovirus immediate early promoter. In a still further embodiment, the transcriptional unit can also include a poly-A terminator.

15 The compositions provided by the present invention for vaccinating a subject against a flavivirus can include a nucleic acid molecule, or molecules, that include transcriptional units for more than one immunogenic flaviviral antigen. The more than one immunogenic flaviviral antigen can be from different flavivirus species, strains or isolates in any combination. In significant embodiments, the flaviviruses included can

20 be two or more, three or more, four or more, five or more, or seven or more flaviviruses. Examples of such flaviviruses include, but are not limited to YFV, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, SLEV, JEV, WNV, Powassan virus or other flaviviruses. Combination vaccines can be formulated to confer immunity to flavivirus disease common to particular geographical regions. In a particular embodiment directed

25 toward tropical and subtropical Asia, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, WN, and JE viruses can be selected. In a particular embodiment directed to Africa, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, WN and YF can be selected. In a particular embodiment directed to Latin America, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, Rocio and YF viruses can be selected.

The invention provides still further a method of immunizing a subject against

30 infection by a flavivirus. The method involves administering to the subject an effective amount of a vaccinating composition that contains a nucleic acid molecule which

WO 02/081754

PCT/US02/10764

includes a transcriptional unit for an immunogenic flavivirus antigen. The transcriptional unit directs a cell within the body of the subject, after being taken up by the cell, to synthesize the immunogenic antigen. The composition additionally includes a pharmaceutically acceptable carrier. In significant embodiments of the method, the
5 flavivirus may be YFV, DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, SLEV, JEV, WNV, Powassan virus or other flavivirus. In yet other important aspects of the method, the antigen may be the prM/M protein, the E protein, or both the prM/M and the E proteins. When the antigen is both the prM/M and the E proteins, the cell within the body of the subject, after incorporating the nucleic acid within it, secretes subviral particles
10 comprising the flaviviral prM/M and E antigens. Additionally, in significant embodiments of the method, the vaccinating composition is administered to the subject in a single dose, via a parenteral route. In yet a further aspect of the method, the nucleic acid is a DNA molecule. In yet additional embodiments of the method, the transcriptional unit further includes a control sequence disposed appropriately such that
15 it operably controls the synthesis of the prM/M and E antigens and in a significant aspect of this embodiment, the control sequence is the cytomegalovirus immediate early promoter. Furthermore, the transcriptional unit may include a poly-A terminator.

These aspects and embodiments of the invention are the basis for its distinct attributes and advantages. Being a nucleic acid construct involving only portions of the
20 flavivirus genome rather than the sequence encompassing the complete genome, the nucleic acid TU-containing vaccine is completely nonviable. It therefore poses no danger of infection by the flavivirus to those involved in its manufacture or to subjects receiving the vaccine. The nucleic acid vaccine is easy to prepare and easy to administer and is stable in storage prior to use. Unexpectedly it has been found that the
25 nucleic acid vaccine of the invention is essentially 100% successful in conferring protective immunity in mammals after administering only a single dose. A further unexpected result is that the nucleic acid TU is able to engender immunity to a flavivirus in a female mammal which can be transmitted to its progeny through the milk. Without wishing to be limited by theory, the inventor believes that a possible
30 mechanism for the success of the nucleic acid in conferring protective immunity is that a host cell harboring the nucleic acid, such as the cell of a subject to whom the vaccine

WO 02/081754

PCT/US02/10764

is administered, produces subviral particles containing the flaviviral prM/M and E antigens. These particles mimic the immunogenic attributes of native flavivirus virions.

The present invention also provides noninfectious antigenic polypeptides,
5 antigenic polypeptide fragments and NRA comprising the prM/M and/or E proteins of flaviviruses, wherein the transmembrane signal sequence is derived from a first flavivirus and the M and/or E proteins are derived from a second flavivirus. Further, the prM/M protein can comprise amino acid sequences from both the first and the second flaviviruses. Further, the E protein can comprise amino acid sequences from
10 both the first and second flaviviruses. "Chimeric" as used herein means any protein or nucleic acid comprising sequence from more than one flavivirus. As used herein, "non-virulent" means the antigen or vaccine of this invention is incapable of causing disease. More particularly, the recombinant protein antigens are free of contaminating genomic material from flaviviruses that is necessary for flavivirus infection, replication and
15 pathogenesis.

The polypeptides of the present invention can comprise the amino acid sequences defined herein, or that are known in the art, of the prM, M and/or E proteins of selected flaviviruses. The nucleic acids of this invention can comprise nucleotide sequence that encodes the prM, M and/or E proteins of selected flaviviruses.

20 The antigens of the present invention can be unconjugated, or they can be conjugated to a carrier molecule that facilitates placement of the antigen on a solid phase. A carrier molecule is one to which antigens can be conjugated and which will not react with antibodies in human serum. An example of such a carrier is bovine serum albumin (BSA).

25 The antigens of the present invention can also be recombinant proteins obtained by expressing nucleic acids encoding the antigen in an expression system capable of producing the antigen.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The amino acid sequences of the present antigens can contain an immunoreactive portion of the prM, M and/or E antigen. These antigens may further be attached to sequences designed to provide for some additional property, such as to remove/add amino acids capable of disulfide bonding to increase the reactivity of an epitope by providing a more rigid secondary structure, to increase its bio-longevity or to alter its cytotoxicity or to prevent infection. In any case, the antigen must possess immunoreactivity and/or immunogenicity.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic representation of flaviviral polyprotein processing. The central horizontal region provides a schematic representation of the viral genome. The lines denote the 5' and 3' non-translated regions and the boxed regions represent the open reading frame for structural (left and top) and non-structural (right and bottom) proteins. Cleavage by host cell signalase occurs simultaneously with translation at the E protein C-terminus, separating structural and non-structural regions. A subtilase-like cellular enzyme, furin, may be responsible for prM cleavage. Potential transmembrane domains of viral polyprotein are indicated by shaded areas.

Figure 2 is a map of the JEV genome (top) and the DNA sequence of oligonucleotides used in a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (center) to construct the transcription unit for the expression of prM-E protein coding regions (bottom). Potential transmembrane domains of viral polyprotein are indicated by shaded areas.

Figure 3 shows a schematic representation of the plasmid vectors, pCDNA3, pCBamp, and pCIBamp, and the relationship between them. These plasmids include the CMV (cytomegalovirus) promoter/enhancer element, BGHp(A) (bovine growth hormone polyadenylation signal and transcription termination sequence), ampicillin resistance gene and ColE1 origin of replication for selection and maintenance in *E. coli*. The f1 origin of replication for single-stranded rescue in *E. coli* cells, SV40 origin of replication (SV40 ORI), neomycin resistance coding region and SV40p(A) sequences

WO 02/081754

PCT/US02/10764

were deleted from pCDNA3 to generate pCBamp. An intron sequence was inserted in the NcoI-KpnI site of pCBamp to generate plasmid pCIBamp.

Figure 4 shows SDS-PAGE-immunoblot analyses of the sucrose gradient purified subviral particles from JE-4B COS-1 culture fluid (4B, right lane of each pair).

- 5 The density gradient purified JE virion from JEV infected C6/36 cell culture was used as a positive control (JEV, left lane of each pair). JE HIAF (hyperimmune ascitic fluid); 4G2, anti-E monoclonal antibody; JM01, anti-M monoclonal antibody; NMAF (normal mouse ascitic fluid).

- 10 Figure 5 shows a profile of the E antigen in a rate zonal sucrose gradient analysis prepared from the PEG precipitate of JE-4B cell culture medium with or without Triton X-100 treatment.

- Figure 6 shows signal peptide probability of the pCBJE1-14 (pCBJE) predicted by the SignalP-HMM program (A). The signal peptide probability is improved by altering the c-region sequence at -4 and -2 positions (C-4G and G-2S) (panel B, JE-15 LSS-M), by shortening the n-region (panel C, JE-SS-ORD), or by a combination of both modifications (panel D, JE-SS-M).

- Figure 7 shows schematic representations of plasmid vectors pCBD2-14-16 (100% DEN-2 E), pCBD2-1J-4-3 (90% DEN-2 E : 10% JEV E), and pCB8D2-2J-2-9-1 (80% DEN-2 E : 20% JEV E). These plasmids include the human cytomegalovirus (CMV) early gene promoter; JE virus signal sequence; DEN-2 virus prM and E gene region (amino terminal 100%, 90%, or 80%, respectively); JE virus E gene region (none, 10% or 20%, respectively); and bovine growth hormone poly A signal (BGH).

- Figure 8 shows a comparison of secreted and membrane-bound recombinant protein by western blot. (A) Analysis of secreted recombinant antigen following PEG-25 precipitation and ethanol extraction of culture fluid for DEN-2 plasmids pCB8D2-2J-2-9-1, pCB9D2-1J-4-3, pCBD2-14-16, and control plasmid pEGFP. Lane 1(V), purified DEN-2 virus stained by Gold Blot (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Reactivity of secreted, recombinant antigen from each plasmid with **a**, anti-envelope (E) specific Mab 1A6A-8; **b**, a mixture of MAB 1A6A-8, anti-capsid (C) specific Mab 1A2A-1, anti-serum specific for DEN-2 virus premembrane (prM) protein; and **c**, normal mouse ascites. (B) Analysis of recombinant plasmid-transformed cell

5 hydrophobic membrane proteins. Lane 1 (V), purified DEN-2 virus stained by Gold Blot; lane 2 (V), reactivity of purified DEN-2 virus with a mixture of Mab 1A6A-8, Mab 1A2A-1, anti-serum specific for DEN-2 virus M protein, and anti-serum for DEN-2 virus prM protein. Reactivity of isolated hydrophobic membrane proteins from each plasmid-transformed cell line with **a**, Mab 1A6A-8; **b**, a mixture of Mab 1A6A-8, Mab

10 1A2A-1, anti-serum specific for DEN-2 virus M protein, and anti-serum for DEN-2 virus prM protein; and **c**, normal mouse ascites.

Detailed Description of the Invention

The invention encompasses nucleic acid transcriptional units which encode flaviviral antigenic proteins, such as the prM/M and E protein antigens. The nucleic

15 acids function to express the prM/M and E protein antigens when the nucleic acid is taken up by an appropriate cell, especially when the cell is the cell of a subject. The invention also encompasses a vaccine whose active agent is the nucleic acid transcriptional unit (TU). The invention further encompasses cells containing a TU. The invention in addition encompasses a method of immunizing a subject against

20 flaviviral infection by administering to the subject an effective amount of a vaccine containing the nucleic acid TU molecules.

The invention provides an isolated nucleic acid comprising a transcriptional unit encoding a signal sequence of a structural protein of a first flavivirus and an immunogenic flavivirus antigen of a second flavivirus, wherein the transcriptional unit

25 directs the synthesis of the antigen. The invention further encompasses the use of the nucleic acid transcriptional unit (TU) to generate flaviviral antigens and the flaviviral antigens produced by the nucleic acid TU. The flaviviral antigens encompassed by the present invention include chimeric flavivirus antigens incorporating amino acid

WO 02/081754

PCT/US02/10764

sequence from a first flavivirus and at least one further flavivirus. The invention still further encompasses the use of the flaviviral antigens encoded by the TU of the invention to produce flavivirus-specific antibodies and to detect the presence of flavivirus-specific antibodies.

5 In one embodiment, the isolated nucleic acid of this invention can comprise a transcriptional unit encoding a Japanese encephalitis virus signal sequence.

In another embodiment, the transcriptional unit of this invention can encode an immunogenic flavivirus antigen which can be from one or more of the following flaviviruses: yellow fever virus, dengue serotype 1 virus, dengue serotype 2 virus,
10 dengue serotype 3 virus, dengue serotype 4 virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and West Nile virus.

In another embodiment, the transcriptional unit of this invention can encode an immunogenic chimeric flavivirus antigen which can include sequence from more than one of the following flaviviruses: yellow fever virus, dengue serotype 1 virus, dengue
15 serotype 2 virus, dengue serotype 3 virus, dengue serotype 4 virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and West Nile virus.

In a particular embodiment, the nucleic acid of this invention can encode a signal sequence of Japanese encephalitis virus and an M protein and an E protein of West Nile virus, SLEV, YFV and/or Powassan virus. The nucleic acid can also encode
20 an immunogenic antigen which can be an M protein of a flavivirus, an E protein of a flavivirus, both an M protein and an E protein of a flavivirus, a portion of an M protein of a flavivirus, a portion of an E protein of a flavivirus and/or both a portion of an M protein of a flavivirus and a portion of an E protein of a flavivirus. In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid encodes both the M protein and the E protein of
25 the flavivirus. Further, the nucleic acid of the invention can be DNA and can comprise nucleotide sequence SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23 or SEQ ID NO: 42.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

In another particular embodiment, the nucleic acid of this invention can encode a signal sequence of Japanese encephalitis virus, an M protein of a second virus and a chimeric E protein formed by from substitution of a portion of the nucleic acid encoding the second virus' E protein with nucleic acid encoding the corresponding portion of the JEV E protein. Alternatively, the portion of sequence corresponding to the deleted portion of the second virus' E protein can be substituted by other sequence selected from a third virus or it can be a non-viral sequence. The second protein can be West Nile virus, SLEV, YFV, Powassan and/or a serotype of Dengue virus. Chimeric E proteins can include those where the carboxy terminal portion can be from one flavivirus and the remainder of the chimeric E protein is from another flavivirus. The carboxy terminal portion can be, for example, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, or 75% of the chimeric E protein. The nucleic acid of the invention can be DNA and can comprise the protein-encoding sequence from nucleotide sequence SEQ ID NO:44 or SEQ ID NO:46. The nucleic acid of the invention can comprise nucleotide sequence SEQ ID NO:44 or SEQ ID NO:46.

The transcriptional unit of this invention can also comprise a control sequence disposed appropriately so that it operably controls the synthesis of the antigen. The control sequence can be, for example, the cytomegalovirus immediate early promoter. The nucleic acid of this invention can also comprise a Kozak consensus sequence located at a translational start site for a polypeptide comprising the antigen encoded by the transcriptional unit. The transcriptional unit of this invention can also comprise a poly-A terminator.

The present invention further provides a cell comprising the nucleic acid of this invention.

Also provided is a composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and nucleic acid or cell or antigen of this invention. The present invention additionally provides a method of immunizing a subject against infection by a flavivirus, comprising administering to the subject an effective amount of a composition of this invention. In a particular embodiment, the composition used to

WO 02/081754

PCT/US02/10764

immunize a subject directs the synthesis of both the M protein and the E protein of a flavivirus and a cell within the body of the subject, after incorporating the nucleic acid within it, secretes subviral particles comprising the M protein and the E protein.

Alternatively, the composition can comprise an M protein and/or E protein of a

- 5 flavivirus or subviral particles comprising the M protein and E protein. In the methods of this invention, the immunizing composition can be administered to the subject in a single dose and can be administered via a parenteral route.

This invention further provides the antigens produced from the isolated nucleic acids of this invention. As an example, the antigen from the second flavivirus encoded

- 10 by the nucleotide sequence of TU can be the M protein which can be, for example, from West Nile virus. The antigen can also be protein from dengue virus, St. Louis encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and/or yellow fever virus. In a further embodiment, the antigen comprises a prM/M protein comprising the transmembrane signal sequence from a first flavivirus and further amino acid sequence
- 15 comprising the remainder of the prM/M protein from a second flavivirus, which can be from SLEV, JEV, YFV, WNV and/or Powassan virus. The transmembrane signal sequence from a first flavivirus can be an improved or modified signal sequence wherein the signal sequence imparts desired characteristics such as a high signal sequence probability. Accomplishing these goals by design or selection can be with the
- 20 use of machine-learning computer programs including, but not limited to, those using a hidden Markov model.

The antigen encoded by the nucleotide sequence of the TU can be West Nile virus antigen, dengue virus antigen, St. Louis encephalitis virus antigen, Japanese encephalitis virus antigen, Powassan virus antigen and/or yellow fever virus antigen.

- 25 The antigen encoded by the nucleotide sequence of the TU can also be the E protein, which can be the E protein from West Nile virus, dengue virus, St. Louis encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and/or yellow fever virus. The antigen encoded can also be a chimeric E protein comprising amino acid sequence selected from more than one flavivirus.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Additionally, the antigen encoded by the nucleotide sequence of the TU can be the M protein and the E protein, which can be from West Nile virus, dengue virus, St. Louis encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and/or yellow fever virus.

5 As used herein, "M protein" or "prM protein" or "prM/M protein" means a flavivirus M protein or flavivirus prM protein. Examples include, but are not limited to, prM proteins comprising amino acid sequence from one or more flavivirus prM proteins, M proteins comprising no additional amino acid sequence and proteins
10 comprising additional amino acid sequences which are processed *in vitro* or *in vivo* to generate the mature M protein.

As used herein, "nucleic acid transcriptional unit" or "nucleic acid transcriptional unit molecule" means a nucleic acid encoding one or more specified proteins. The TU has biological activity such that, after having been introduced into a suitable cell, the nucleic acid induces the synthesis of one or more specified gene
15 products encoded by the nucleic acid. The gene product(s) is(are) other biological macromolecules, such as proteins, not chemically related to the TU. The nucleic acid TU induces the cell to employ its cellular components to produce the specific gene product or products encoded by the nucleic acid of the TU. Although any nucleic acid may serve as a TU, in a preferred embodiment, the TU is the DNA of a plasmid or
20 similar vector, wherein the plasmid or vector comprises coding sequences of marker genes or other sequence constructions that facilitate use of the TU for experimentation and biosynthesis.

As used herein, a "control sequence" is a regulatory nucleotide sequence
25 incorporated within a TU which interacts with appropriate cellular components of the cell and leads to enhanced or activated biosynthesis of the gene products encoded by the TU. Thus a suitable control sequence is one with which the components of the cell have the capability to interact, resulting in synthesis of the gene product. When operably disposed in a nucleic acid with respect to a specified coding sequence, a

WO 02/081754

PCT/US02/10764

control sequence effectively controls expression of the specified nucleic acid to produce the gene product.

As used herein, a "promoter" is a nucleotide sequence in a TU which serves as a control sequence.

5 As used herein, a "Kozak sequence" or "Kozak consensus sequence" is a nucleotide sequence at the translational start site which optimizes translation of eukaryotic mRNAs (Kozak, *Mol. Cell. Biology* 9: 5134-5142 (1989)).

As used herein, a "terminator" is an extended nucleotide sequence which acts to induce polyadenylation at the 3' end of a mature mRNA. A terminator sequence is
10 found after, or downstream from, a particular coding sequence.

As used herein, a "cell" is a prokaryotic or eukaryotic cell comprising a TU coding for one or more gene products, or into which such a TU has been introduced. Thus, a cell harbors a foreign or heterologous substance, the TU, which is not naturally or endogenously found in the cell as a component. A suitable cell is one which has the
15 capability for the biosynthesis of the gene products as a consequence of the introduction of the TU. In particular, a suitable cell is one which responds to a control sequence and to a terminator sequence, if any, that may be included within the TU. In important embodiments of the present invention, the cell is a mammalian cell. In particularly important embodiments of this invention, the cell is a naturally occurring cell in the
20 body of a human or nonhuman subject to whom (which) the TU has been administered as a component of a vaccine. Alternatively, in analytical, or diagnostic applications, including preparation of antigen for use as a vaccine or in immunodiagnostic assays, or for demonstrative purposes, the cell may be a human or nonhuman cell cultured *in vitro*.

25 As used herein, a "vaccine" or a "composition for vaccinating a subject" specific for a particular pathogen means a preparation, which, when administered to a subject, leads to an immunogenic response in a subject. As used herein, an "immunogenic"

WO 02/081754

PCT/US02/10764

response is one that confers upon the subject protective immunity against the pathogen. Without wishing to be bound by theory, it is believed that an immunogenic response may arise from the generation of neutralizing antibodies (i.e., a humoral immune response) or from cytotoxic cells of the immune system (i.e., a cellular immune response) or both. As used herein, an "immunogenic antigen" is an antigen which induces an immunogenic response when it is introduced into a subject, or when it is synthesized within the cells of a host or a subject. As used herein, an "effective amount" of a vaccine or vaccinating composition is an amount which, when administered to a subject, is sufficient to confer protective immunity upon the subject.

Historically, a vaccine has been understood to contain as an active principle one or more specific molecular components or structures which comprise the pathogen, especially its surface. Such structures may include surface components such as proteins, complex carbohydrates, and/or complex lipids which commonly are found in pathogenic organisms.

As used herein, however, it is to be stressed that the terms "vaccine" or "composition for vaccinating a subject" extend the conventional meaning summarized in the preceding paragraph. As used herein, these terms also relate to the TU of the instant invention or to compositions containing the TU. The TU induces the biosynthesis of one or more specified gene products encoded by the TU within the cells of the subject, wherein the gene products are specified antigens of a pathogen. The biosynthetic antigens then serve as an immunogen. As already noted, the TU, and hence the vaccine, may be any nucleic acid that encodes the specified immunogenic antigens. In a preferred embodiment of this invention, the TU of the vaccine is DNA. The TU can include a plasmid or vector incorporating additional genes or particular sequences for the convenience of the skilled worker in the fields of molecular biology, cell biology and viral immunology (See Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York 1987 (updated quarterly), which are incorporated herein by reference).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The TU molecules of the instant invention comprise nucleic acids, or derivatives of nucleic acids, having nucleotide sequences that encode specific gene products related to antigens of flaviviruses such as, but not limited to, WNV, JEV, dengue virus, yellow fever virus and SLEV. Although any nucleic acid may serve as a
5 TU, in an important embodiment, the TU is DNA. Alternatively, the nucleic acids may be RNA molecules. They may also be any one of several derivatives of DNA or RNA having a backbone of phosphodiester bonds that have been chemically modified to increase the stability of the TU as a pharmaceutical agent. Modifications so envisioned include, but are not limited to, phosphorothioate derivatives or phosphonate derivatives.
10 These and other examples of derivatives are well known to persons skilled in the field of nucleic acid chemistry.

The genome of JEV has been characterized and sequenced (Figures 1 and 2). The M structural protein is expressed as a portion of the polyprotein which includes a pre-M sequence (pr). This pr sequence, immediately amino terminal to the M protein
15 sequence, prevents conformational problems in the processing of the polyprotein. In particular, the presence of the pr sequence is important in preventing misfolding of the E protein. Thus, the presence of prM allows for assembly of JEV particles. Once the virion or particle is formed, the pr sequence can be cleaved from the prM protein to yield mature virus particles containing M proteins, although cleavage of the prM
20 protein to yield M protein is not necessary to produce infectious particles. The prM sequences from many different, related flaviviruses are cleaved to but a low extent, but the flaviviruses themselves are nonetheless, infectious. Examples of such related flaviviruses with similar genomic structures and functions include, but are not limited to WNV, YFV, dengue virus and SLEV.

25 In one embodiment, the TU encoding flaviviral M and E proteins in the instant invention is DNA. In accord with the discussion in the preceding paragraph, this DNA comprises a nucleotide sequence which encodes the M protein, comprising the pre-M sequence, and a nucleotide sequence encoding the E protein. In this way, the intended gene products are enabled to form subviral particles within the cell. The pre-M

WO 02/081754

PCT/US02/10764

sequence can then be cleaved in a fashion analogous to that which occurs with respect to replete virions.

In order to function effectively *in vivo* as a vaccine, it is advantageous to include within the TU a control sequence that has the effect of enhancing or promoting the transcription of the nucleotide sequences encoding the antigens. Use of such promoters is well known to those of skill in the fields of molecular biology, cell biology and viral immunology (See Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York 1987 (updated quarterly)). When the TU is used as a vaccine in a mammalian host, the promoter to be employed is preferably one which operates effectively in mammalian cells. Such a promoter is disposed with respect to the coding sequences from which transcription is to be promoted, at a position at which it may operably promote such transcription. In a significant embodiment of the instant invention, this promoter is the cytomegalovirus early promoter. In addition, in a further preferred embodiment of the invention, the coding sequences are followed, in the TU nucleic acid, by a terminator sequence (Sambrook et al.). Particular embodiments of the invention relate to both prokaryotic and eukaryotic cells. Many promoter sequences are known that are useful in either prokaryotic or eukaryotic cells. (See Sambrook et al.)

The nucleic acids of the invention may further include DNA sequences known to those of skill in the art to act as immunostimulatory elements. Examples of such elements include, but are not limited to, certain CpG motifs in bacterial DNA (Sato et al., *Science* 273: 352-354 (1996); Klinman et al., *Vaccine* 17: 19-25 (1998)).

Preparation of the TU of the invention is readily accomplished by methods well known to workers of skill in the field of molecular biology. Procedures involved are set forth, for example, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York 1987 (updated quarterly). The flaviviral RNA molecule may be

WO 02/081754

PCT/US02/10764

isolated from a sample of live virus by methods widely known among virologists familiar with flaviviruses, for example, and with other groups of viruses as well. Methods used with JEV are summarized in Kuno et al. (*J. Virol.* 72: 73-83 (1998)). The RNA is used as a template for the synthesis of cDNA using reverse transcriptase.

- 5 From the cDNA, a fragment containing the pre-M through E coding region (Figure 2) is obtained by digestion with restriction nucleases known to cleave the cDNA appropriately to provide such fragments. Examples of restriction digestion of JEV are provided in Nitayaphan et al. (1990) and Konishi et al. (1991). Incorporation of promoters, such as the cytomegalovirus promoter, sequences to promote efficient
- 10 translation, such as the Kozak sequence, and of the polyadenylation signal, is likewise well known to skilled practitioners in molecular biology and recombinant DNA engineering (Kozak, *Mol. Cell. Biology* 9: 5134-5142 (1989); Azevedo et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 147-153 (1999)). When a nucleic acid comprising a TU containing the desired coding sequences and control sequences is prepared, it may be obtained in
- 15 larger quantities by methods that amplify nucleic acids. Such methods are widely known to workers skilled in molecular biology and recombinant DNA engineering. Examples of these methods include incorporation of the nucleic acid into a plasmid for replication by culturing in a cell such as a prokaryotic cell and harvesting the plasmid after completing the culture, as well as amplification of the nucleic acid by methods
- 20 such as PCR and other amplification protocols, as are well known in the art. These examples are not intended to limit the ways in which the nucleic acid containing the TU may be obtained.

The TU-containing nucleic acid molecules of the instant invention may be introduced into appropriate cells in many ways well known to skilled workers in the

25 fields of molecular biology and viral immunology. By way of example, these include, but are not limited to, incorporation into a plasmid or similar nucleic acid vector which is taken up by the cells, or encapsulation within vesicular lipid structures such as liposomes, especially liposomes comprising cationic lipids, or adsorption to particles that are incorporated into the cell by endocytosis.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

In general, a cell of this invention is a prokaryotic or eukaryotic cell comprising a TU, or into which a TU has been introduced. The TU of the present invention induces the intracellular biosynthesis of the encoded prM/M and E antigens. A suitable cell is one which has the capability for the biosynthesis of the gene products as a consequence of the introduction of the nucleic acid. In particular embodiments of the invention, a suitable cell is one which responds to a control sequence and to a terminator sequence, if any, which may be included within the TU. In order to respond in this fashion, such a cell contains within it components which interact with a control sequence and with a terminator and act to carry out the respective promoting and terminating functions. When the cell is cultured *in vitro*, it may be a prokaryote, a single-cell eukaryote or a multicellular eukaryote cell. In particular embodiments of the present invention, the cell is a mammalian cell. In these cases, the synthesized prM/M and E protein gene products are available for use in analytical, or diagnostic applications, including preparation of antigen for use as a vaccine or in immunodiagnostic assays, or for demonstrative purposes.

In some circumstances, such as when the cell is a cultured mammalian cell, the prM/M and E antigens are secreted in the form of subviral particles. These are aggregates of prM/M and E proteins resembling live virus in surface ultrastructural morphology and immunogenic properties. Since the TU of the invention does not include the remainder of the flaviviral genome, however, there is no capsid incorporated, and most importantly, no infectious viral RNA.

In another important embodiment of this invention, the cell is a natural cellular component of the subject to whom the TU has been administered as a vaccine. The TU, when administered to the subject, is taken up by the cells of the subject. The subject's cells have the capability of responding to any promoter sequences, and terminator, if present. In any case, the TU induces the subject's cells to synthesize flaviviral prM/M and E gene products. Without wishing to be constrained by theoretical considerations, it is believed that the subject's cells produce subviral particles *in vivo* consisting of the prM/M and E antigens, just as has been found to occur with cultured mammalian cells *in vitro*. Such subviral particles, it is believed,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

then serve as the *in vivo* immunogen, stimulating the immune system of the subject to generate immunological responses which confer protective immunity on the subject. Again without wishing to be limited by theory, the resulting protective immunity may arise via either humoral or cellular immunity, i.e., via either an MHC class II- or class I-
5 restricted mechanism, respectively, or by both mechanisms.

According to the invention, subjects are immunized against infection by flaviviruses, such as JEV, YFV, dengue virus, SLEV, WNV or other flaviviruses by administering to them an effective amount of a TU comprising nucleic acid which encodes the prM and/or E antigens. The nucleic acid, after being incorporated into the
10 cells of the subject, leads to the synthesis of the flaviviral prM/M and/or E antigens.

In order to administer the TU to the subject, it is incorporated into a composition which comprises a pharmaceutically acceptable carrier. The term "pharmaceutically acceptable" means a material that is not biologically or otherwise undesirable, i.e., the material may be administered to a subject along with the
15 immunogenic material (i.e., recombinant flavivirus protein antigens or portions thereof) without causing any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the other components of the vaccine in which it is contained. Examples of pharmaceutically acceptable carriers, or components thereof, include water, physiological saline and common physiological buffers (for further examples, see
20 Arnon, R. (Ed.) Synthetic Vaccines I: pp. 83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987).

It is understood by those skilled in the art that the critical value in describing a vaccination dose is the total amount of immunogen needed to elicit a protective
25 response in a host which is subject to infectious disease caused by virulent or wild-type flavivirus infection. The number and volume of doses used can be varied and are determined by the practitioner based on such parameters as, age, weight, gender, species, type of vaccine to be administered, mode of administration, overall condition of the subject, et cetera, as well as other important factors recognized by those of skill
30 in the art.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The TU may be administered to a subject orally, parenterally (e.g., intravenously), by intramuscular injection, by intraperitoneal injection, transdermally, extracorporeally, intranasally, topically or the like. Delivery can also be directly to any area of the respiratory system (e.g., lungs) via intubation. The exact amount of the TU required will vary from subject to subject, depending on the species, age, weight and general condition of the subject, the immunogenicity of the vaccine used, the strain or species of flavivirus against which the subject is being immunized, the mode of administration and the like. Thus, it is not possible to specify an exact amount for every embodiment of the present invention. However, an appropriate amount can be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation given the teachings herein and what is available in the art.

Parenteral administration of the vaccine of the present invention, if used, is generally characterized by injection. Injectables can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions, solid forms suitable for solution or suspension in liquid prior to injection, or as emulsions. A more recently revised approach for parenteral administration involves use of a slow release or sustained release system such that a constant dosage is maintained. See, e.g., U.S. Patent No. 3,610,795, which is incorporated by reference herein.

For solid compositions, conventional nontoxic solid carriers include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talc, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. Liquid pharmaceutically administrable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc. an active compound as described herein and optional pharmaceutical adjuvants in an excipient, such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol, and the like, to thereby form a solution or suspension. If desired, the pharmaceutical composition to be administered may also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents and the like, for example, sodium acetate, sorbitan monolaurate, triethanolamine sodium acetate, triethanolamine oleate, etc. Actual methods of preparing such dosage forms are known, or will be apparent, to those skilled in this art;

WO 02/081754

PCT/US02/10764

for example, see Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W. (ed.), latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA).

In one embodiment, the TU of this invention can be administered to the subject by the use of electrotransfer mediated *in vivo* gene delivery, wherein immediately following administration of the TU to the subject, transcutaneous electric pulses are applied to the subject, providing greater efficiency and reproducibility of *in vivo* nucleic acid transfer to tissue in the subject (Mir et al., *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 96: 4262-4267 (1999)).

In the methods of the present invention which describe the immunization of a subject by administering a vaccine of this invention to a subject, the efficacy of the immunization can be monitored according the clinical protocols well known in the art for monitoring the immune status of a subject.

An effective amount of a vaccinating composition is readily determined by those of skill in the art to be an amount which, when administered to a subject, confers protective immunity upon the subject. In order to undertake such a determination, the skilled artisan can assess the ability to induce flaviviral prM/M- and E-specific antibodies and/or flaviviral prM/M- and E-specific cytotoxic T lymphocytes present in the blood of a subject to whom the vaccine has been administered. One can also determine the level of protective immunity conferred upon an experimental subject by challenge with live flavivirus corresponding to the antigenic composition used to immunize the experimental subject. Such challenge experiments are well known to those of skill in the art.

In general, in order to immunize a subject against infection by WNV, JEV, YFV, dengue virus, SLEV, or other flaviviruses according to the present invention, and recognizing that the TUs employed in such methods may have differing overall sizes, doses ranging from about 0.1 $\mu\text{g/kg}$ body weight to about 50 $\mu\text{g/kg}$ body weight can be used.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

It has unexpectedly been found that a TU of the present invention which is a DNA confers protective immunity at a level of effectiveness approximating 100% after administration of only a single effective dose of the TU by i.m. injection or by electrotransfer. This is in contrast to many immunization methods carried out using
5 conventional vaccines (as described above), which require one or more booster vaccinations and which may not confer protective immunity to an effectiveness near 100%.

It has further been found unexpectedly that protective immunity may be transmitted from a vaccinated female subject to the offspring of the subject. A
10 significant proportion of neonatal mice was shown to be protected against viral challenge after the mothers were vaccinated using the TU DNA of the invention. Without wishing to be limited by theory, it is known that passive immunity may be conferred on neonatal mammals due to the presence in maternal milk of neutralizing antibodies specific for various pathogens. It is possible that the protective immunity
15 against JEV found within the neonates was transmitted to them in this way.

In another embodiment of the invention, the TU encodes a signal sequence of a structural protein of a first flavivirus and an immunogenic flavivirus antigen of a second flavivirus. Thus, in one embodiment, for example, the signal sequence of structural protein of a first flavivirus is replaced by a signal sequence of structural
20 protein of a second flavivirus, which results in proper folding of the nascent polypeptide, proper processing in a host, and/or proper folding of the processed protein.

In another embodiment of the invention, the TU may encode an immunogenic flavivirus antigen wherein the antigen comprises sequence from one or more than one flavivirus. The signal sequence can be an improved signal peptide. Improvement of
25 signal sequences, or selection of more optimal signal sequences, can be accomplished by application of the principles and techniques taught in Example 18 and references cited therein, each of which are incorporated herein by reference for the express teachings in each related to the selection, identification and design of signal sequences

WO 02/081754

PCT/US02/10764

with desired properties and functions. Generally, these desired properties and functions will include a high signal sequence probability.

In another embodiment of the invention, more than one TU or a TU encoding an immunogenic flavivirus antigen from more than one flavivirus are included in a single composition. Thus, in one embodiment, for example, a TU can encode a nascent polypeptide or polypeptides that are processed into proteins from more than one flavivirus. Preferably, the processed proteins form subviral particles that elicit an immunological response against the proteins. The subviral particles can be formed from processed proteins derived from the sequence of the same flavivirus, a combination of flaviviruses, or chimeric flavivirus proteins. Combination vaccines, comprising more than one TU or a TU encoding an immunogenic flavivirus antigen from more than one flavivirus can be tailored for use in particular geographical regions by inclusion of proteins from flaviviruses endemic to the region or otherwise likely to be encountered. For example, a vaccine for tropical and subtropical Asia can include TU(s) that encode proteins from the four serotypes of DEN, WN and JE virus vaccines. Similarly useful vaccines for Africa and Latin America could include TU(s) that encode proteins from the four serotypes of DEN, WN and YF viruses and the four serotypes of DEN, Rocio and YF viruses, respectively.

In another embodiment, the TU encodes a signal sequence of a structural protein of a first flavivirus and an immunogenic chimeric flavivirus antigen that includes amino acid sequence from more than one flavivirus. The signal sequence can be a Japanese encephalitis virus signal sequence. The chimeric flavivirus antigen can include sequence from a Japanese encephalitis virus antigen. In certain embodiments, the chimeric antigen is an E protein. The carboxy terminal portion of the E protein can be E protein sequence from the Japanese encephalitis virus. The carboxy terminal portion can be, for example, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 or 75% of the chimeric E protein. In a preferred embodiment, the TU encodes a signal sequence of a structural protein of Japanese encephalitis virus, a prM protein of a Dengue virus and a chimeric E protein containing sequence from both the Japanese encephalitis virus and the Dengue virus. The chimeric protein can be an E protein wherein the carboxy terminal portion

WO 02/081754

PCT/US02/10764

comprises Japanese encephalitis virus sequence. Examples of TUs include nucleic acid sequences shown in SEQ ID NO:44 and SEQ ID NO:46 that can direct the synthesis of flavivirus antigens such as those shown in SEQ ID NO:45 and SEQ ID NO:47.

5 The present invention further provides immunogenic compositions comprising the polypeptides of this invention in a pharmaceutical acceptable carrier for use as a protein vaccine. Antigens produced from the transcriptional units of the present invention can be used to elicit effective immune responses in a subject. Antigens for this purpose can comprise flavivirus prM protein, flavivirus M protein, flavivirus E
10 protein or any combination thereof, including immunogenic fragments of the proteins. A particularly preferred embodiment is the use of the NRA described herein. A further preferred embodiment is a chimeric protein comprising the signal sequence of one flavivirus and the structural protein(s) of one or more different flaviviruses. In a particularly preferred embodiment, the signal sequence of the antigen is the Japanese
15 encephalitis virus signal sequence. In other preferred embodiments, the signal sequence is an improved signal peptide. Improvement of signal sequences, or selection of more optimal signal sequences, can be accomplished by application of the principles and techniques taught in Example 18 and references cited therein each of which are incorporated herein by reference for the express teachings in each related to
20 the selection, identification and design of signal sequences with desired properties and function. Generally, these desired properties and function will include a high signal sequence probability.

In other embodiments, the protein vaccine of this invention further comprises a suitable adjuvant. As used herein, an "adjuvant" is a potentiator or enhancer of the
25 immune response. The term "suitable" is meant to include any substance which can be used in combination with the vaccine immunogen (i.e., flavivirus prM protein, flavivirus M protein, flavivirus E protein, or any combination thereof) to augment the immune response, without producing adverse reactions in the vaccinated subject. Effective amounts of a specific adjuvant may be readily determined so as to optimize
30 the potentiation effect of the adjuvant on the immune response of a vaccinated subject. In a preferred embodiment, adjuvanting of the vaccines of this invention is a 2 - stage

WO 02/081754

PCT/US02/10764

process, utilizing first a 2% aluminum hydroxide solution and then a mineral oil. In specific embodiments, suitable adjuvants can be chosen from the following group: mineral, vegetable or fish oil with water emulsions, incomplete Freund's adjuvant, *E. coli* J5, dextran sulfate, iron oxide, sodium alginate, Bacto-Adjuvant, certain synthetic
 5 polymers such as Carbopol (BF Goodrich Company, Cleveland, Ohio), poly-amino acids and co-polymers of amino acids, saponin, carrageenan, REGRESSIN (Vetrepharm, Athens, GA), AVRIDINE (N, N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine), long chain polydispersed β (1,4) linked mannan polymers interspersed with O-acetylated groups (e.g. ACEMANNAN), deproteinized highly
 10 purified cell wall extracts derived from non-pathogenic strain of *Mycobacterium* species (e.g. EQUIMUNE, Vetrepharm Research Inc., Athens GA), Mannite monooleate, paraffin oil and muramyl dipeptide.

In another aspect, this invention provides a method for immunizing subjects
 15 with immunogenic amounts of the protein vaccine of the invention to elicit an effective immune response in the subject. Immunization can be carried out orally, parenterally, intranasally, intratracheally, intramuscularly, intramammarily, subcutaneously, intravenously and/or intradermally. The vaccine containing the flavivirus prM protein, flavivirus M protein and/or the flavivirus E protein can be administered by injection, by
 20 inhalation, by ingestion, or by infusion. A single dose can be given and/or repeated doses of the vaccine preparations, i.e. "boosters," can be administered at periodic time intervals to enhance the initial immune response or after a long period of time since the last dose. The time interval between vaccinations can vary, depending on the age and condition of the subject.

25 The term "immunogenic amount" means an amount of an immunogen, or a portion thereof, which is sufficient to induce an immune response in a vaccinated subject and which protects the subject against disease caused by wild-type or virulent flavivirus infections upon exposure thereto or which has a therapeutic or commercially beneficial effect that lessens the effect of flavivirus infection on the vaccinated subject.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The invention further provides an antibody produced in response to immunization by the antigen of this invention. The antibodies of the present invention can include polyclonal and monoclonal antibodies which can be intact immunoglobulin molecules, chimeric immunoglobulin molecules, "humanized antibodies," or Fab or F(ab')₂ fragments. Such antibodies and antibody fragments can be produced by techniques well known in the art which include those described in Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) and Kohler et al. (*Nature* 256:495-97, 1975) and U.S. Patents 5,545,806, 5,569,825 and 5,625,126, incorporated herein by reference. The antibodies can be of any isotype IgG, IgA, IgD, IgE and IgM.

The present invention can also include single chain antibodies (ScFv), comprising linked V_H and V_L domains and which retain the conformation and specific binding activity of the native idiotype of the antibody. Such single chain antibodies are well known in the art and can be produced by standard methods. (see, e.g., Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* 8: 229-242 (1997)).

Antibodies can be produced against the antigens of this invention which are synthesized from nucleic acid sequences encoding immunogenic amino acid sequences of the prM, M and/or E antigens of one or more flaviviruses and the signal sequence of a different flavivirus (e.g., JEV). Immunogenic peptides synthesized from the use of these chimeric constructs can easily be identified by use of methods well known in the art for identifying immunogenic regions in an amino acid sequence and used to produce the antibodies of this invention.

Conditions whereby an antigen/antibody complex can form, as well as assays for the detection of the formation of an antigen/antibody complex and quantitation of the detected protein, are standard in the art. Such assays can include, but are not limited to, Western blotting, immunoprecipitation, immunofluorescence, immunocytochemistry, immunohistochemistry, fluorescence activated cell sorting (FACS), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), immunomagnetic assays, ELISA, ELISPOT (Coligan et al., eds. 1995. Current Protocols in Immunology. Wiley, New

WO 02/081754

PCT/US02/10764

York.), agglutination assays, flocculation assays, cell panning, etc., as are well known to the artisan.

As used herein, the term "bind" means the well characterized binding of antibody to antigen as well as other nonrandom association with an antigen.

- 5 "Specifically bind" as used herein describes an antibody or other ligand that does not cross react substantially with any antigen other than the one specified, which in this case, is an antigen of this invention.

The antibody or ligand of this invention can be bound to a substrate (e.g., beads, tubes, slides, plates, nitrocellulose sheets, etc.) or conjugated with a detectable moiety or both bound and conjugated. The detectable moieties contemplated for the present invention can include, but are not limited to, an immunofluorescent moiety (e.g., fluorescein, rhodamine), a radioactive moiety (e.g., ³²P, ¹²⁵I, ³⁵S), an enzyme moiety (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase), a colloidal gold moiety and a biotin moiety. Such conjugation techniques are standard in the art (for example, 10 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989); Yang et al., *Nature* 382: 319-324 (1996)). 15

The present invention further provides a method of detecting flavivirus antibody in a sample, comprising contacting the sample with the flavivirus antigen of the present invention, under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and 20 detecting formation of the complex, thereby detecting flavivirus antibody in the sample.

The present invention further provides a method of detecting flavivirus antigen in a sample, comprising contacting the sample with an antibody of this invention under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and detecting formation of the complex, thereby detecting flavivirus antigen in the sample.

- 25 The method of detecting flavivirus antigen in a sample can be performed, for example, by contacting a fluid or tissue sample from a subject with an antibody of this invention and detecting binding of the antibody to the antigen. It is contemplated that

WO 02/081754

PCT/US02/10764

the antigen will be on an intact flavivirus virion, will be a flavivirus-encoded protein displayed on the surface of a flavivirus-infected cell expressing the antigen, or will be a fragment of the antigen. A fluid sample of this method can comprise any biological fluid which could contain the antigen or a cell containing the antigen, such as

5 cerebrospinal fluid, blood, bile, plasma, serum, saliva and urine. Other possible examples of body fluids include sputum, mucus and the like.

The method of detecting flavivirus antibody in a sample can be performed, for example, by contacting a fluid or tissue sample from a subject with an antigen of this invention and detecting the binding of the antigen to the antibody. A fluid sample of

10 this method can comprise any biological fluid which could contain the antibody, such as cerebrospinal fluid, blood, bile, plasma, serum, saliva and urine. Other possible examples of body fluids include sputum, mucus and the like.

Enzyme immunoassays such as immunofluorescence assays (IFA), enzyme

15 linked immunosorbent assays (ELISA) and immunoblotting can be readily adapted to accomplish the detection of flavivirus antibodies according to the methods of this invention. An ELISA method effective for the detection of the antibodies can, for example, be as follows: (1) bind the antigen to a substrate; (2) contact the bound antigen with a fluid or tissue sample containing the antibody; (3) contact the above with

20 a secondary antibody bound to a detectable moiety which is reactive with the bound antibody (e.g., horseradish peroxidase enzyme or alkaline phosphatase enzyme); (4) contact the above with the substrate for the enzyme; (5) contact the above with a color reagent; and (6) observe/measure color change or development.

Another immunologic technique that can be useful in the detection of flavivirus

25 antibodies uses monoclonal antibodies (MAbs) for detection of antibodies specifically reactive with flavivirus antigens in a competitive inhibition assay. Briefly, sample is contacted with an antigen of this invention which is bound to a substrate (e.g., an ELISA 96-well plate). Excess sample is thoroughly washed away. A labeled (e.g., enzyme-linked, fluorescent, radioactive, etc.) monoclonal antibody is then contacted

30 with any previously formed antigen-antibody complexes and the amount of monoclonal

WO 02/081754

PCT/US02/10764

antibody binding is measured. The amount of inhibition of monoclonal antibody binding is measured relative to a control (no antibody), allowing for detection and measurement of antibody in the sample. The degree of monoclonal antibody inhibition can be a very specific assay for detecting a particular flavivirus variety or strain, when
5 based on monoclonal antibody binding specificity for a particular variety or strain of flavivirus. MAbs can also be used for direct detection of flavivirus antigens in cells by, for example, immunofluorescence assay (IFA) according to standard methods.

As a further example, a micro-agglutination test can be used to detect the presence of flavivirus antibodies in a sample. Briefly, latex beads, red blood cells or
10 other agglutinable particles are coated with the antigen of this invention and mixed with a sample, such that antibodies in the sample that are specifically reactive with the antigen crosslink with the antigen, causing agglutination. The agglutinated antigen-antibody complexes form a precipitate, visible with the naked eye or measurable by spectrophotometer. In a modification of the above test, antibodies of this invention can
15 be bound to the agglutinable particles and antigen in the sample thereby detected.

The present invention further provides a method of diagnosing a flavivirus infection in a subject, comprising contacting a sample from the subject with the antigen of this invention under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and detecting antigen/antibody complex formation, thereby diagnosing a flavivirus infection
20 in a subject.

The present invention further provides a method of diagnosing a flavivirus infection in a subject, comprising contacting a sample from the subject with the antibody of this invention under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and detecting antigen/antibody complex formation, thereby diagnosing a
25 flavivirus infection in a subject.

In the diagnostic methods taught herein, the antigen of this invention can be bound to a substrate and contacted with a fluid sample such as blood, serum, urine or saliva. This sample can be taken directly from the patient or in a partially purified

WO 02/081754

PCT/US02/10764

form. In this manner, antibodies specific for the antigen (the primary antibody) will specifically react with the bound antigen. Thereafter, a secondary antibody bound to, or labeled with, a detectable moiety can be added to enhance the detection of the primary antibody. Generally, the secondary antibody or other ligand, which is reactive, either
5 specifically with a different epitope of the antigen or nonspecifically with the ligand or reacted antibody, will be selected for its ability to react with multiple sites on the primary antibody. Thus, for example, several molecules of the secondary antibody can react with each primary antibody, making the primary antibody more detectable.

The detectable moiety allows for visual detection of a precipitate or a color
10 change, visual detection by microscopy, or automated detection by spectrometry, radiometric measurement or the like. Examples of detectable moieties include fluorescein and rhodamine (for fluorescence microscopy), horseradish peroxidase (for either light or electron microscopy and biochemical detection), biotin-streptavidin (for light or electron microscopy) and alkaline phosphatase (for biochemical detection by
15 color change).

Particular embodiments of the present invention are set forth in the examples which follow. These examples are not intended to limit the scope of the invention as disclosed in this specification.

Examples

20 General methods utilizing molecular biology and recombinant DNA techniques related to preparing and expressing the nucleic acid TU molecules of the invention are set forth in, for example, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York 1987 (updated quarterly), and Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor
25 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Example 1. Preparation of recombinant plasmids containing the transcriptional unit encoding JEV prM and E antigens. Genomic RNA was extracted from 150 μ L of JEV strain SA 14 virus seed grown from mouse brain using a QIAamp™ Viral RNA

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). RNA, adsorbed on a silica membrane, was eluted in 80 μ L of nuclease-free water, and used as a template for the amplification of JEV prM and E gene coding sequences. Primer sequences were obtained from the work of Nitayaphan et al. (*Virology* 177: 541-552 (1990)). A single cDNA fragment containing the genomic nucleotide region 389-2478 was amplified by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Restriction sites KpnI and XbaI, the consensus Kozak ribosomal binding sequence, and the translation initiation site were engineered at the 5' terminus of the cDNA by ampimer 14DV389 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:1; amino acid sequence, SEQ ID NO:2). An in-frame translation termination codon, followed by a NotI restriction site, was introduced at the 3' terminus of the cDNA by ampimer c14DV2453 (SEQ ID NO:3) (Figure 2). One-tube RT-PCR was performed using a Titan RT-PCR Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). 10 μ L of viral RNA was mixed with 1 μ L each of 14DV389 (50 μ M) and c14DV2453 (50 μ M) and 18 μ L of nuclease-free water and the mixture was heated at 85°C for 5 min and then cooled to 4°C. 75 μ L of reaction mix [20 μ L 5x buffer, 2 μ L of dNTP mixture (10 mM each), 5 μ L of dithiothreitol (0.1 mM), 0.5 μ L of RNasin™ (40 U/ μ L, 10
Boehringer Mannheim), 2 μ L of polymerase mixture, and 45.5 μ L of nuclease-free water] was added and RT-PCR performed as follows: 1 cycle (50°C for 30 min, 94°C for 3 min, 50°C for 30 s, 68°C for 2.5 min), 9 cycles (94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 68°C for 2.5 min), 20 cycles (94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 68°C for 2.5 min in the first cycle, with an increment of 5 s per cycle thereafter), and a final extension at 68°C for 15 min. The RT-PCR product was purified by a QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen) and eluted with 50 μ L of 1 mM Tris-HCl, pH 7.5.

All vector constructions and analyses were carried out by using standard techniques (Sambrook et al., 1989). RT-PCR amplified cDNA, digested with KpnI and NotI nucleases, was inserted into the KpnI-NotI site of eukaryotic expression plasmid vector (pCDNA3, Invitrogen, Carlsbad, CA). Electroporation-competent *Escherichia coli* XL1-Blue cells (Stratagene, La Jolla, CA) were transformed by electroporation (Gene Pulser™, Bio-Rad, Hercules, CA) and plated onto LB agar plates containing 100 μ g/mL carbenicillin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Clones were picked and inoculated into 3 mL LB broth containing 100 μ g/mL carbenicillin. Plasmid DNA was

WO 02/081754

PCT/US02/10764

extracted from a 14 h culture using a QIAprep™ Spin Miniprep Kit (Qiagen). Automated DNA sequencing was performed as recommended (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA). Both strands of the cDNA were sequenced and shown to be identical to the sequence for the original SA14 strain (Nitayaphan et al., 1990).

The fragment of plasmid pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) from nucleotide (nt) 1289 to nt 3455, containing f1 ori, SV40 ori, the neomycin resistance gene, and SV40 poly(A) elements was deleted by PvuII digestion and then ligated to generate the pCBamp plasmid. The vector pCIBamp, containing a chimeric intron insertion at the NcoI/KpnI site of the pCBamp was constructed by excising the intron sequence from pCI (Promega, Madison, WI) by digestion with NcoI and KpnI. The resulting 566-bp fragment was cloned into pCBamp by digesting with NcoI-KpnI to replace its 289-bp fragment. Figure 3 presents the relationships between the plasmids pCDA3, pCBamp, and pCIBamp.

Plasmids containing the transcriptional unit encoding JEV prM and E proteins were prepared from these plasmids. The cDNA fragment containing the JEV prM and E coding regions in the recombinant plasmid pCDJE2-7 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:10; amino acid sequence, SEQ ID NO:11), derived from the pCDNA3 vector, was excised by digestion with NotI and KpnI or XbaI and cloned into the KpnI-NotI site of pCBamp, pCIBamp, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), or pREP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), or into the SpeI-NotI site of pRc/RSV (Invitrogen, Carlsbad, CA) expression vector to create pCBJE1-14 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:17; amino acid sequence, SEQ ID NO:18), pCIBJES14, pCEJE, pREFE, and pRCJE, respectively. Both strands of the cDNA from clones of each plasmid were sequenced and recombinant clones with the correct nucleotide sequence were identified. Plasmid DNA for use in the in vitro transformation of mammalian cells or mouse immunization experiments was purified by anion exchange chromatography using an EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Example 2. Evaluation of JEV prM and E proteins expressed by various recombinant plasmids using an indirect immunofluorescent antibody assay.

The expression of JEV specific gene products by the various recombinant expression plasmids was evaluated in transiently transfected cell lines of COS-1, COS-7 and SV-T2 (ATCC, Rockville MD; 1650-CRL, 1651-CRL, and 163.1-CCL, respectively) by indirect immunofluorescent antibody assay (IFA). The SV-T2 cell line was excluded from further testing since a preliminary result showed only 1-2% of transformed SV-T2 cells were JEV antigen positive. For transformation, cells were grown to 75% confluence in 150 cm² culture flasks, trypsinized, and resuspended at 4°C in phosphate buffered saline (PBS) to a final cell count 5 x 10⁶ per mL. 10 µg of plasmid DNA was electroporated into 300 µL of cell suspension using a BioRad Gene Pulse™ (Bio-Rad) set at 150 V, 960 µF and 100 Ω resistance. Five minutes after electroporation, cells were diluted with 25 mL fresh medium and seeded into a 75 cm² flask. 48 h after transformation the medium was removed from the cells, and the cells were trypsinized and resuspended in 5 mL PBS with 3% normal goat serum. 10 µL aliquots were spotted onto slides, air dried and fixed with acetone at -20°C for 20 min. IFA was performed with acetone-fixed plasmid-transformed cells using fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Sigma Chemical Co.) and JEV HIAF.

To determine the influence of various promoter and poly(A) elements on the JEV prM and E protein expression, COS-1 and COS-7 cell lines were transiently transformed by an equal amount of pCDJE2-7 (SEQ ID NO:10), pCEJE, pREJE, or pRCJE plasmid DNA. JEV antigens were expressed in both cell lines transformed by all four recombinant plasmids, thus confirming that the CMV or RSV (roux sarcoma virus) promoter and BGH or SV40 poly(A) elements were functionally active. However, the percentage of transformed cells and the level of JEV antigens expressed, as determined by the number of IFA positive cells and IFA intensity, respectively, differed greatly among the various plasmids (Table 1). A significantly high percentage of COS-1 cells transformed by pCDJE2-7 (SEQ ID NO:10), pCBE1-14 (SEQ ID NO:17) and pCIBJES14 expressed the JEV antigens, and the level of the expressed proteins was compatible with JEV-infected cells. Cells transfected with pCEJE,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

pREJE, or pRCJE vectors, on the other hand, had a low percentage of antigen-expressing cells, as well as a low intensity of fluorescence, indicating weak expression of the antigens.

In order to ascertain whether the enhanced expression of JEV proteins by pCDJE2-7 (SEQ ID NO:10) was influenced by the SV40-encoded eukaryotic origin of replication, the plasmid pCBE1-14 (SEQ ID NO:17) was constructed so that a 2166-bp fragment, containing f1 ori, SV40 ori, the neomycin resistance gene and SV40 poly(a) elements from pCDJE2-7, was deleted. A chimeric intron was then inserted into pCBE1-14 to generate pCIBJES14. The pCIBJES14 plasmid was used to determine if the expression of JEV proteins could be enhanced by the intron sequence. Following transformation, cells harboring both pCBE1-14 and pCIBJES14 vectors expressed a level of JEV antigens similar to that observed with pCDJE2-7 (Table 1). This result indicates that expression of JEV prM and E antigens by recombinant vectors is influenced only by the transcriptional regulatory elements. Neither the eukaryotic origin of replication nor the intron sequence enhanced JEV antigen expression in the cells used. Vectors containing the CMV promoter and BGH poly(A) (Figure 3) were selected for further analysis.

Example 3. Selection of an in vitro transformed, stable cell line constitutively expressing JEV specific gene products. COS-1 cells were transformed with 10 μ g of pCDJE2-7 DNA by electroporation as described in the previous example. After a 24 hr incubation in non-selective culture medium, cells were treated with neomycin (0.5 mg/mL, Sigma Chemical Co.). Neomycin-resistant colonies, which became visible after 2-3 weeks, were cloned by limited dilution in neomycin-containing medium. Expression of vector-encoded JEV gene products was initially screened by IFA using JEV HIAF. One JEV-IFA positive clone (JE-4B) and one negative clone (JE-5A) were selected for further analysis and maintained in medium containing 200 μ g/mL neomycin.

Authenticity of the JEV E protein expressed by the JE-4B clone was demonstrated by epitope mapping by IFA using a panel of JEV E-specific murine

WO 02/081754

PCT/US02/10764

monoclonal antibodies (Mab) (Kimura-Kuroda et al., *J. Virol.* 45: 124-132 (1983); Kimura-Kuroda et al., *J. Gen. Virol.* 67: 2663-2672 (1986); Zhang et al., *J. Med. Virol.* 29: 133-138 (1989); and Roehrig et al., *Virol.* 128: 118-126 (1983)). JEV HIAF and normal mouse serum were used as positive and negative antibody controls, respectively.

- 5 Four JEV-specific, six flavivirus-subgroup specific, and two flavivirus-group reactive Mabs reacted similarly with the 4B clone or JEV-infected COS-1 cells (Table 2).

Example 4. Antigenic properties and immunological detection of subviral particles secreted by the JE-4B COS-1 cell line.

- a. Preparation of subviral particles. JE-4B COS-1 cells were grown and
- 10 maintained in medium containing 200 μ g/mL of neomycin. The cultured medium was routinely harvested and stored at 4°C, and replenished twice weekly, and the cells were split 1:5 every 7-10 days. Culture medium was clarified by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min in a Sorvall F16/250 rotor at 4°C, and centrifuged further for 4 hr at 39,000 rpm in a Sorvall TH641 rotor at 4°C through a 5% sucrose cushion (w/w,
- 15 prepared with 10 mM Tris HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl (TN buffer)). The pellet containing subviral particles was resuspended in TN buffer and stored at 4°C. Alternatively, 7% or 10% PEG-8000 (w/v) was added to the clarified culture medium. The mixture was stirred at 4°C for at least 2 hr, and the precipitated particles were collected by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min. The precipitate was resuspended
- 20 in TN buffer and stored at 4°C. The subviral particles were purified from both pelleted and PEG-precipitated preparations by rate zonal centrifugation in a 5-25% continuous sucrose gradient in TN at 38,000 rpm at 4°C for 90 min. 1-mL fractions were collected from the top of the gradient, tested by antigen capture ELISA (see below), and the positive fractions loaded onto a 25-50% sucrose gradient in TN. This was centrifuged
- 25 overnight in an equilibrium density centrifugation at 35,000 rpm at 4°C. 0.9-mL fractions from the equilibrium gradients were collected from the bottom. They were tested by antigen-capture ELISA and assessed for hemagglutination (HA) activity at pH 6.6. An aliquot of 100 μ L of each fraction was weighed precisely to determine its density. The ELISA-positive fractions were pooled and pelleted at 39,000 rpm at 4°C
- 30 for 3-4 hr and the pellet resuspended in TN buffer. Antigen-capture ELISA and HA

WO 02/081754

PCT/US02/10764

titers were determined on the pelleted samples. JEV-infected COS-1 cell supernatant was also subjected to similar purification protocols as detailed above and used as a positive control for the gradient analysis. JE virions were also purified from infected C6/36 cells 5-6 days postinfection by sedimentation in a glycerol/tartrate equilibrium gradient.

b. Western blots of subviral particles. Gradient-purified samples of the subviral particles were mixed with electrophoresis sample buffer and run on 10 or 12.5% sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels (SDS-PAGE) as described by Laemmli (*Nature* 277: 680-685 (1970)). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and immunochemically detected with polyclonal JEV HIAF, flavivirus cross-reactive anti-E Mab 4G2 (Henchal et al., *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 830-836 (1982)), or mouse anti-prM peptide hyperimmune serum (JM01). Figure 4 shows a comparison of the M and E proteins produced by JEV infected C6/36 and JE-4B COS-1 cells. Some nonspecific reactivity to E protein was observed in the normal mouse ascitic fluid and JM01 anti-peptide serum. Proteins identical in size to M and E were secreted in the subviral particles and could be detected by E-specific Mab 4G2 and prM-specific JM01 antiserum, respectively.

c. Density gradient detection of JEV subviral particles in culture medium. For ELISA, antigen-capture antibody (4G2) was diluted in 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.6, and used to coat 96-well microtiter plates (Immulon II, Dynatech, Chantilly, VA) by overnight incubation at 4° C. After blocking with 3% normal goat serum in PBS, two-fold serially-diluted samples were added to the 4G2-coated plate and incubated 1.5 hours at 37°C. Captured antigen was detected by horseradish peroxidase-conjugated 6B6C-1 Mag, and incubated for 1 hour at 37°C. The enzyme activity on the solid phase was then detected with TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-ELISA (Life Technologies, Grand Island, NY).

Approximately 500 mL of cell culture medium from 15 X 150 cm² flasks of JE-4B cells was collected four days after cells were seeded. PEG-precipitated subviral particles were resuspended in 2 mL of TN buffer, pH 7.5; a 0.7 mL aliquot of this

WO 02/081754

PCT/US02/10764

resuspended pellet was loaded onto a 5-25% sucrose gradient. Triton X-100, which disrupts subviral particles, was added to another 0.7 mL aliquot to a final concentration of 0.1% and this was loaded onto a 5-25% sucrose gradient prepared in TN buffer containing 0.1% Triton X-100. A definite opaque band was observed approximately 5 2.5 cm from the top of the gradient containing Triton X-100, but not in the gradient without detergent. Fractions (1 mL) were collected from top to bottom for each gradient (Figure 5). Each collected fraction was analyzed by antigen capture ELISA. Antigen was detected in fractions 4-6, indicating relatively rapid sedimentation characteristic of subviral particles. Treatment of the PEG precipitate from JE-4B 10 culture medium with Triton X-100 shifted the position of ELISA-reactive material to the top of the gradient. Thus treatment with Triton X-100 produces only slow-sedimenting molecules. A similar finding was reported by Konishi et al. (*Virol.* 188: 714-720 (1992)). These results show that rapidly sedimenting subviral particles containing prM/M and E could be disrupted by detergent treatment.

15 Hemagglutination (HA) activity was determined in the pH range from 6.1 to 7.0 by the method of Clarke and Casals (*Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573 (1958)). The subviral particle secreted by JE-4B cells and the virion particle produced by JEV infected COS-1 cells had a similar HA profile with the optimum pH determined to be 20 6.6.

Example 5. Comparison of the immune response in mice vaccinated with pCDJE2-7 nucleic acid vaccine of the invention and commercial JEV vaccine. Groups of five 3-week-old female, ICR outbred mice were injected intramuscularly in the left and right quadriceps with 100 μ g of pCDJE2-7 plasmid in 100 μ L of dH₂O or were 25 given doses of JE-VAX (manufactured by the Research Foundation for Microbial Disease of Osaka University and distributed by Connaught Laboratories, Swiftwater, PA.) subcutaneously that are one-fifth the dose given to humans. The plasmid pCDNA3/CAT (Invitrogen), which encodes and expresses an unrelated protein, was used as the negative vaccination control. Except for one group of pCDJE2-7- 30 vaccinated mice, all animals were boosted 3 weeks later with an additional dose of plasmid or JE-VAX. Mice were bled from the retroorbital sinus at 3, 6, 9, 23, 40 and

WO 02/081754

PCT/US02/10764

60 weeks after inoculation. JEV antibody titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against purified JEV or by plaque reduction neutralization tests (PRNT) (Roehrig et al., *Virology* 171: 49-60 (1989); and Hunt and Calisher, *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 740-749 (1979)).

5 The pCDJE2-7 nucleic acid vaccine and JE-VAX provided 100% seroconversion within three weeks after the first vaccination in all three groups of mice (Table 3). The JEV ELISA and PRNT antibody titers reached the highest level at week 6 and week 9, respectively, after immunization. Mice receiving 1 dose of DNA vaccine had similar antibody responses as those receiving 2 doses. Comparable ELISA
10 antibody titers were maintained in DNA-vaccinated groups up to 60 weeks, after which the experiment was terminated. However, only one of four mice in the JE-VAX group was JEV antibody positive at 60 weeks post-inoculation. The pCDNA3/CAT control group did not have any measurable JEV antibody. These results demonstrate that a single dose of JEV-specific nucleic acid vaccine is more effective in maintaining JEV
15 antibody in mice than the commercial, FDA-approved JE-VAX vaccine.

Example 6. Comparison of various nucleic acid vaccine constructs of the invention and commercial JEV vaccine for effectiveness of vaccination at different ages. A similar level of JEV protein was expressed by COS-1 cells transformed by either pCDJE2-7, pCBJE1-14, or pCIBJES14. JEV antibody induction by these nucleic
20 acid constructs was compared to JE-VAX commercial vaccine at two different ages at vaccination. Three-day (mixed sex) or 3-week-old (female) ICR outbred mice, 10 per group, were vaccinated intramuscularly with 50 or 100 μ g of plasmid DNA, or subcutaneously with doses of JE-VAX that are one-tenth or one-fifth the dose given to humans. Serum specimens were collected at 3 and 7 weeks after immunization and
25 tested at a 1:1600 dilution by ELISA using purified JEV as an antigen. Results are shown in Table 4.

Plasmid pCBJE1-14 provided the highest extent of seroconversion, i.e., antibody titer greater than 1:1600, achieving 80-100% at both ages of vaccination. Administration of pCDJE2-7 or pCIBJES14 provided moderate seroconversion by 7

WO 02/081754

PCT/US02/10764

weeks when 3-day old mice were vaccinated (60% for each), but weaker seroconversion (40% and 10%, respectively) when measured 3 weeks after vaccination. When these plasmids were administered at the age of 3 weeks, however, seroconversions of 90% or 100% were attained at both 3 weeks and 7 weeks after

5 vaccination. In contrast, the commercial vaccine, JE-VAX, conferred no seroconversion when administered at 3 days of age, and 100% when given at 3 weeks of age. Thus the nucleic acid TU's for JEV prM and E provided an extent of seroconversion better than a very high dose of the commercial vaccine, and unexpectedly high seroconversion in both young and more mature animals.

10 Example 7. Protective immunity conferred by the nucleic acid vaccine of the invention. Three-day old vaccinated groups from Example 6 were challenged 7 weeks after vaccination by intraperitoneal injection of 50,000 pfu/100 μ L of the mouse-adapted JEV strain SA14 and observed for 3 weeks. 100% protection was achieved in groups that received various nucleic acid TU-containing vaccine constructs for up to 21

15 days (Table 5). In contrast, 60% of the JE-VAX-vaccinated mice, as well as 70% of the pCDNA3/CAT-vaccinated negative controls, did not survive virus challenge by 21 days. These results indicate that the nucleic acid TU's of the invention confer unexpectedly effective protection on vaccinated mice. This suggests the possibility of employing the nucleic acid vaccine of the invention as an early childhood vaccine for

20 humans. In contrast, JE-VAX, the inactivated human vaccine currently used, does not appear to be effective in young animals.

Example 8. Passive protection of neonatal mice correlated with the maternal antibody titer. Female ICR mice at the age of 3 weeks were vaccinated with either one dose or two doses spaced two days apart of pCDJE2-7 plasmid DNA, at 100 μ g/100

25 μ L, or with two doses of JE-VAX that were one-fifth the dose given to humans. The negative control group received two doses of 100 μ g/100 μ L of pCDNA-3/CAT plasmid. Passive protection by maternal antibody was evaluated in pups resulting from matings of experimental females with non-immunized male mice that occurred nine weeks following the first vaccination or 6 weeks following the second vaccination.

30 Pups were challenged between 3-15 days after birth by intraperitoneal administration of

WO 02/081754

PCT/US02/10764

5,000 pfu/100 μ L of mouse-adapted SA14 virus and observed daily for 3 weeks (Table 6). The survival rates correlated with the maternal neutralizing antibody titers. 100% of pups nursed by mothers with a PRNT of 1:80 survived viral infection, whereas none of the pups from the control mother survived (Table 6). Partial protection of 45% and 75% was observed in older pups that were nursed by mothers with a PRNT titer of 1:20 and 1:40, respectively. The survival rates also correlated with the length of time that pups were nursed by the immune mother. As just indicated, 13-15 day old pups had high survival rates. None of the 3-4 day old pups, however, survived virus challenge when the mother had a PRNT titer of 1:20 or 1:40. Thus maternal antibody provides partial to complete protective immunity to the offspring. In addition, JEV antibody was detected by ELISA in the sera of 97% (29/30) of the post-challenge pups.

Mice were inoculated intramuscularly with 1 or 2, 100 μ g doses of plasmid DNA, or subcutaneously with two, 1/5 human doses of JE-VAX vaccine. Sera were collected 9 weeks post-vaccination for PRNT testing prior to mating with non-immune male.

Example 9. Preparation of recombinant plasmids containing the transcriptional unit encoding WNV prM and E antigens. Genomic RNA was extracted from 150 μ L of Vero cell culture medium infected with NY 99-6480 strain, an strain isolated from the outbreak in New York 1999, using the QIAamp TM Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Extracted RNA was eluted and suspended in 80 μ L of nuclease-free water, and used as a template for the amplification of WNV prM and E gene coding sequences. Primer sequences were obtained from the work of Lanciotti et al. (*Science* 286: 2333-2337 (1999)). A cDNA fragment containing the genomic nucleotide region was amplified by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Restriction sites BsmBI and KsaI were engineered at the 5' terminus of the cDNA by using amplimer WN466 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:12). An in-frame translation termination codon, followed by a NotI restriction site was introduced at the 3' terminus of the cDNA by using amplimer cWN2444 (SEQ ID NO:13). The RT-PCR product was purified by a QIAquick TM PCR Purification Kit (Qiagen).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The double-stranded amplicon produced by use of the two amplimers above (SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13) was digested with *KasI* and *NotI* enzymes to generate a 998 bp (nt-1470 to 2468) fragment of DNA was inserted into the *KasI* and *NotI* sites of a pCBJESS vector to form an intermediate plasmid, pCBINT. The

5 pCBJESS was derived from the pCBamp plasmid, that contained the cytomegalovirus early gene promoter and translational control element and an engineered JE signal sequence element (Chang et al., *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)). The JE signal sequence element comprises the JE signal sequence (SEQ ID NO:14).

The cDNA amplicon was subsequently digested with *BsmBI* and *KasI* enzymes

10 and the remaining 1003 bp fragment (nt-466 to 1470) was inserted in to the *KasI* site of pCBINT to form pCBWN (nucleic acid sequence, SEQ ID NO:15; amino acid sequence, SEQ ID NO:16). Automated DNA sequencing using an ABI prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) was used to confirm that the recombinant plasmid had a correct prM and E sequence as defined by Lanciotti

15 et al. (*Science* 286: 2333-2337 (1999)).

Plasmid DNA for use in the in vitro transformation of mammalian cells or mouse immunization experiments was purified by anion exchange chromatography as described in Example 1.

Example 10. Immunochemical characterization and evaluation of WNV prM

20 and E proteins expressed by pCBWN. WNV specific gene products encoded by the pCBWN plasmid were expressed in COS-1 cells. Cells were electroporated and transformed with pCBWN plasmid according to Chang et al. (*J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)). Electroporated cells were seeded onto 75 cm² culture flasks or a 12-well tissue culture dish containing one sterile coverslip/well. All flasks and 12-well plates were

25 kept at 37°C, 5% CO₂ incubator. Forty hours following electroporation, coverslips containing adherent cells were removed from the wells, washed briefly with PBS, fixed with acetone for 2 minutes at room temperature, and allowed to air dry.

Protein expression was detected using indirect immunofluorescence antibody

WO 02/081754

PCT/US02/10764

assay (IFA), as described in Example 2. Flavivirus E-protein specific monoclonal antibody (Mab) 4G2, WNV mouse hyperimmune ascitic fluid (HIAF) and normal mouse serum (NMS) at 1:200 dilution in PBS were used as the primary antibody to detect protein expression (Henchal et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 830-836 (1982)).

- 5 Tissue culture medium was harvested 40 and 80 hours following electroporation. Antigen-capture (Ag-capture) ELISA was used to detect secreted WN virus antigen in the culture medium of transiently transformed COS-1 cells. The Mab 4G2 and horseradish peroxidase-conjugated Mab 6B6C-1 were used to capture the WN virus antigens and detect captured antigen, respectively (Chang et al., *J. Virol.* 74: 4244-4452 (2000); Henchal et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 830-836 (1983); Roehrig et al., *Virology* 128: 118-126 (1983)).

- 15 WN virus antigen in the medium was concentrated by precipitation with 10 % polyethylene glycol (PEG)-8000. The precipitant was resuspended in TNE buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5), clarified by centrifugation, and stored at 4°C. Alternatively, the precipitant was resuspended in a lyophilization buffer (0.1 M TRIZMA and 0.4% bovine serum albumin in borate saline buffer, pH 9.0), lyophilized and stored at 4°C. Lyophilized preparations were used as antigen for the evaluation in MAC- and indirect IgG ELISAs.

- 20 WN virus-specific protein was detected by IFA on the transiently transformed COS-1 cells. E, prM and M proteins expressed in these cells were secreted into the culture medium. WN virus antigen concentrated by PEG precipitation was extracted with 7.0 % ethanol to remove residual PEG (Aizawa et al., *Appl. Environ. Micro.* 39: 54-57 (1980)). Ethanol extracted antigens and gradient-purified WN virions were analyzed on a NuPAGE, 4-12% gradient Bis-Tris Gel in a Excel Plus Electrophoresis Apparatus (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes using a Excel Plus Blot Unit (Invitrogen Corp.). WN virus-specific proteins produced by the transiently transformed COS-1 cells were detected by WN virus specific mouse HIAF or flavivirus E protein reactive Mab 4G2 in a Western blot analysis, using NMS as a negative serum control. The proteins displayed similar

WO 02/081754

PCT/US02/10764

reactivity and identical molecular weights to the corresponding gradient purified virion E, prM and M protein derived from WN virus infected suckling mouse brain (SMB).

In analysis of the NRA as an antigen for diagnostic ELISA, one vial of lyophilized NRA, representing antigen harvested from 40 ml of tissue culture fluid, was reconstituted in 1.0 ml of distilled water and compared with the reconstituted WN virus infected suckling mouse brain (SMB) antigen provided as lyophilized as β -propiolactone-inactivated sucrose-acetone extracts (Clarke et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573 (1958)). All recombinant proteins, prM, M and E, had a similar reactivity to that of the gradient-purified virion E, prM and M proteins.

Coded human specimens were tested concurrently with antigens in the same test at the developmental stage. The MAC- and IgG ELISA protocols employed were identical to the published methods (Johnson et al., *J. Clin. Microbiol.* 38: 1827-1831 (2000); Martin et al., *J. Clin. Microbiol.* 38: 1823-1826. (2000)). Human serum specimens were obtained from the serum bank in our facility, which consists of specimens sent to the DVBID for WN virus confirmation testing during the 1999 outbreak. In these tests, a screening MAC- and IgG ELISA were performed on a 1:400 specimen dilution. Specimens yielding positive/negative (P/N) OD ratios between 2 and 3 were considered suspect positives. Suspect serum specimens were subject to confirmation as positives by both ELISA end-point titration and plaque-reduction neutralization test (PRNT). All specimens yielding P/N OD ratios greater than 3.0 were considered positives without further confirmatory testing.

An Ag-capture ELISA employing flavivirus-group reactive, anti-E Mab, 4G2 and 6B6C-1, was used to detect NRA secreted into culture fluid of pCBWN transformed COS-1 cells. The antigen could be detected in the medium one day following transformation; and the maximum ELISA titer (1:32-1:64) in the culture fluid without further concentration was observed between day two and day four. NRA was concentrated by PEG precipitation, resuspended in a lyophilization buffer, and lyophilized for preservation. For diagnostic test development, one vial of lyophilized NRA was reconstituted with 1.0 ml distilled water and titrated in the MAC- or indirect

WO 02/081754

PCT/US02/10764

IgG ELISA using WN virus positive and negative reference human sera (Johnson et al., *J. Clin. Microbiol.* 38: 1827-1831 (2000); Martin et al., *J. Clin. Microbiol.* 38: 1823-1826 (2000)). Dilutions 1:320 and 1:160 of the NRA were found to be the optimal concentrations for use in MAC- and IgG ELISA, respectively. These dilutions resulted in a P/N OD₄₅₀ ratio of 4.19 and 4.54, respectively, for MAC- and IgG test. The WN virus SMB antigens produced by NY-6480 and Eg101 strains were used at 1:320 and 1:640 dilution for MAC-ELISA, and 1:120 and 1:320 for IgG ELISA, respectively. The negative control antigens, PEG precipitates of the culture medium of normal COS-1 cells and normal SMB antigen, were used at the same dilutions as for the respective NRA and SMB antigen. Human serum specimens, diluted at 1:400, were tested concurrently in triplicate with virus-specific and negative control antigens. For the positive test result to be valid, the OD₄₅₀ for the test serum reacted with viral antigen (P) had to be at least two-fold greater than the corresponding optical density value of the same serum reacted with negative control antigen (N).

The reactivity of NRA and NY-06480, Eg101 and SLE virus SMBs were compared by the MAC- and IgG ELISAs using 21 coded human serum specimens. Of the 21 specimens, 19 had similar results on all three antigens (8 negatives and 11 suspect positives or positives). Eighteen specimens were also tested separately using SLE SMB antigen. Only three of 13 Eg-101-SMB positive specimens were positive in the SLE MAC-ELISA (Table 1). None of WN antigen negative specimens was positive by SLE MAC-ELISA. This result confirmed a previous observation that anti-WN virus IgM did not cross-react significantly with other flaviviruses (Tardei et al., *J. Clin. Microbiol.* 38: 2232-2239 (1940)) and was specific to diagnose acute WN virus infection regardless of whether NRA or SMB antigen was used in the test. All of the specimens were also tested concurrently by indirect IgG ELISA. Ten of 21 specimens were positive using any of the three antigens.

The two discrepant serum specimens (7 and 9) both from the same patient, collected on day 4 and 44 after onset of disease, respectively, were IgM-negative with NRA and SMB NY antigen and IgM-positive using Eg-101 SMB antigen in the initial test. To investigate these two discordant specimens further, six sequentially collected

WO 02/081754

PCT/US02/10764

specimens from this patient were retested by end-point MAC- and IgG ELISAs. A greater than 32-fold serial increase shown in the MAC-ELISA titer between day-3 and day-15 could be demonstrated with all antigens used. Cerebrospinal fluid collected on day-9 after onset of disease also confirmed that this patient indeed was infected by WN
 5 shortly prior to taking the sample. The cerebrospinal fluid had IgM P/N reading of 13.71 and 2.04 against Eg-101- and SLE-SMB antigens, respectively. Day-31 and day-44 specimens were negative (<1:400) by using NY-SMB antigen but positive by using NRA and Eg101-SMB. Compatible IgG titers were observed with all three antigens used in the test.

10 Example 11. Evaluation of the immune response in animals vaccinated with pCBWN. Groups of ten, three-wk-old female ICR mice were used in the study. Mice were injected intramuscularly (i.m.) with a single dose of pCBWN or a green fluorescent protein expressing plasmid (pEGFP) DNA (Clontech, San Francisco, CA.). The pCBWN plasmid DNA was purified from XL-1 blue cells with EndoFree Plasmid
 15 Giga Kits (Qiagen) and resuspended in PBS, pH 7.5, at a concentration of 1.0 µg/µl. Mice that received 100 µg of pEGFP were used as unvaccinated controls. Mice were injected with the pCBWN plasmid at a dose of 100, 10, 1.0, or 0.1 µg in a volume of 100 µl. Groups that received 10, 1.0, or 0.1 µg of pCBWN were vaccinated by the electrotransfer mediated *in vivo* gene delivery protocol using the EMC-830 square wave
 20 electroporator (Genetronics Inc. San Diego, CA.). The electrotransfer protocol was based on the method of Mir et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4262-4267 (1999)). Immediately following DNA injection, transcutaneous electric pulses were applied by two stainless steel plate electrodes, placed 4.5-5.5 mm apart, at each side of the leg. Electrical contact with the leg skin was ensured by completely wetting the leg with
 25 PBS. Two sets of four pulses of 40 volts/mm of 25 msec duration with a 200 msec interval between pulses were applied. The polarity of the electrode was reversed between the set of pulses to enhance electrotransfer efficiency.

Mice were bled every 3 wks following injection. The WN virus specific antibody response was evaluated by Ag-capture ELISA and plaque reduction
 30 neutralization test (PRNT). Individual sera were tested by IgG-ELISA, and pooled sera

WO 02/081754

PCT/US02/10764

from 10 mice of each group were assayed by PRNT. All the mice vaccinated with pCBWN had IgG ELISA titers ranging from 1:640 to 1:1280 three wks after vaccination. The pooled sera collected at three and six wks had a Nt antibody titer of 1:80. None of the serum specimens from pEGFP control mice displayed any ELISA or

5 Nt titer to WN virus.

To determine if the single i.m. vaccination of pCBWN could protect mice from WN virus infection, mice were challenged with NY-6480 virus either by intraperitoneal injection or by exposure to the bite of virus-infected *Culex* mosquitoes. Half of the mouse groups were challenged intraperitoneally (ip) at 6 wks post vaccination with

10 1,000 LD₅₀ (1,025 PFU/100 μ l) of NY99-6480 virus. The remaining mice were each exposed to the bites of three *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes that has been infected with NY99-6480 virus 7 days prior to the challenge experiment. Mosquitoes were allowed to feed on mice until they were fully engorged. Mice were observed twice daily for three wks after challenge.

15 It was evident that the presence of Nt antibodies correlated with protective immunity, since all mice immunized with WN virus DNA remained healthy after virus challenge while all control mice developed symptoms of CNS infection 4-6 days following virus challenge and died on an average of 6.9 and 7.4 days after intraperitoneal or infective mosquito challenge, respectively. In the vaccinated group,

20 the pooled sera collected three wks after virus challenge (9-wk post immunization) had Nt antibody titers of 1:640 or 1:320. Pooled vaccinated mouse sera reacted only with E protein in the Western blot analysis.

Groups of ten mice were immunized with 10.0 to 0.1 μ g of pCBWN per animal

25 by use of electrotransfer. All groups that received pCBWN were completely protected from virus challenge. At 6 wks after immunization all groups of electrotransfer mice had Nt titer less than four-fold different than animals receiving 100 μ g of pCBWN by conventional i.m. injection without electrotransfer. Both these results evidencing effective immunization suggest that the electrotransfer protocol enhances the

30 immunogenicity and protective efficacy of the DNA vaccine of the invention (when

WO 02/081754

PCT/US02/10764

carried out as described in (Mir et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 4262-4267.(1999)).

Mixed-bred mares and geldings of various ages used in this study were shown to be WN virus and SLE virus antibody-negative by ELISA and PRNT. Four horses were injected i.m. with a single dose (1,000 µg/1,000 µl in PBS, pH 7.5) of pCBWN plasmid. Serum specimens were collected every other day for 38 days prior to virus challenge, and the WN virus specific antibody response was evaluated by MAC- or IgG ELISA and PRNT.

Two days prior to virus challenge, 12 horses (4 vaccinated and 8 control) were relocated into a bio-safety level (BSL)-3 containment building at the Colorado State University. The eight unvaccinated control horses were the subset of a study that was designed to investigate WN virus induced pathogenesis in horses and the potential of horses to serve as amplifying hosts. Horses were each challenged by the bite of 14 or 15 *Aedes albopictus* mosquitoes that had been infected by NY99-6425 or BC787 virus 12 days prior to horse challenge. Mosquitoes were allowed to feed on horses for a period of 10 min. Horses were examined for signs of disease twice daily. Body temperature was recorded, and serum specimens collected twice daily from days 0 (day of infection) to 10, then once daily through day 14. Pulse and respiration were recorded daily after challenge. The collected serum samples were tested by plaque titration for detection of viremia, and by MAC- or IgG ELISA and PRNT for antibody response.

No systemic or local reaction was observed in any vaccinated horse. Individual horse sera were tested by PRNT. Vaccinated horses developed Nt antibody greater than or equal to 1:5 between days 14 and 31. End point titers for vaccinated horses, #5, #6, #7, and #8, on day-37 (two days prior to mosquito challenge) were 1:40, 1:5, 1:20, and 1:20, respectively. Horses vaccinated with the pCBWN plasmid remained healthy after virus challenge. None of them developed a detectible viremia or fever from days 1 to 14. All unvaccinated control horses became infected with WN virus after exposure to infected mosquito bites. Seven of the eight unvaccinated horses developed viremia that appeared during the first 6 days after virus challenge. Viremic horses developed Nt

WO 02/081754

PCT/US02/10764

antibody between day-7 and day-9 after virus challenge. The only horse from the entire study to display clinical signs of disease was horse #11, which became febrile and showed neurologic signs beginning 8 days after infection. This horse progressed to severe clinical disease within 24 hours and was euthanized on day 9. Four representing
 5 horses, #9, 10, 14 and 15, presenting viremia for 0, 2, 4, or 6 days, were selected and used as examples in this example. Virus titers ranged from $10^{1.0}$ PFU/ml of serum (in horse #10), the lowest level detectable in our assay, to $10^{2.4}$ /ml (in horse #9). Horse #14 did not develop a detectable viremia during the test period. However, this horse was infected by the virus, as evidenced by Nt antibody detected after day 12.

10 Anamnestic Nt antibody response was not observed in vaccinated horses as evidenced by the gradual increase in Nt titer during the experiment. Pre-existing Nt antibody in the vaccinated horse prior to mosquito challenge could suppress initial virus infection and replication. Without virus replication, the challenge virus antigen provided by infected mosquitoes may not contain a sufficient antigen mass to stimulate
 15 anamnestic immune response in the vaccinated horse. All vaccinated horses were euthanized at 14 days after virus challenge. Gross pathological and histopathological lesions indicative of WN viral infection were not observed.

Example 12. Preparation of recombinant plasmids containing coding sequences for yellow fever virus (YFV) or St. Louis encephalitis virus (SLEV) prM and E

20 proteins. A strategy similar to constructing the pCDJE2-7 recombinant plasmid was used to prepare YFV and SLEV recombinant plasmids. Genomic RNA was extracted from 150 μ L of YFV strain TRI-788379 or SLE strain 78V-6507 virus seeds using QIAampTM Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA.). The viral RNA was used as a template for amplification of YFV or SLEV prM and E gene coding regions. Primers
 25 YFDV389 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:4; amino acid sequence, SEQ ID NO:5), cYFDV2452 (SEQ ID NO:6), SLEDV410 (nucleotide sequence, SEQ ID NO:7; amino acid sequence, SEQ ID NO:8) and cSLEDV2449 (SEQ ID NO:9) were used to generate the corresponding recombinant nucleic acids as described above for the preparation of the JEV and WNV recombinant plasmids. RT-PCR amplified cDNA, digested with
 30 KpnI and NotI enzymes, was inserted into the KpnI-NotI site of a eukaryotic expression

WO 02/081754

PCT/US02/10764

plasmid vector, pCDNA3 (Invitrogen). Both strands of the cDNA were sequenced and verified for identity to sequences from YFV strain TRI-788379 or SLEV strain 78V-6507. Recombinant plasmids pCDYF2 and pCDSLE4-3, which contained the nucleotide sequences of the prM and E coding regions for YFV or SLEV, respectively, were purified using an EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen), and used for *in vitro* transformation or mouse immunization.

YFV or SLEV specific antigens were expressed in COS-1 cells transformed by pCDYF2 or pCDSLE4-3, respectively. The level of expressed proteins was similar to a YFV- or SLEV-infected COS-1 cell control. As in the JEV model, COS-1 cell lines transformed by vectors bearing genes for the viral antigens were obtained which constitutively express YFV or SLEV antigenic proteins. Epitope mapping by IFA using a panel of YFV or SLEV E-specific Mabs indicated that the authentic E protein was expressed by the pCDYF2- or pCDSLE4-3-transformed COS-1 cells. A preliminary study indicated that 100% of three week-old female, ICR mice seroconverted after intramuscular inoculation with a single dose of 100 µg/100 µL of pCDSLE4-3 plasmid in deionized water.

Example 13. Preparation of recombinant plasmids containing coding sequences for St. Louis encephalitis virus prM and E antigens with JEV signal sequence.

Genomic RNA was extracted from 150 µL of Vero cell culture medium infected with MSI-7 strain of St. Louis encephalitis virus using the QIAamp™ Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Extracted RNA was eluted and suspended in 80 µl of nuclease-free water, and used as a template for the amplification of St. Louis encephalitis virus prM and E gene coding sequences. Primer sequences were obtained from the work of Trent et al. (*Virology* 156: 293-304 (1987)). A cDNA fragment containing the genomic nucleotide region was amplified by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Restriction site AfeI was engineered at the 5' terminus of the cDNA by using amplimer SLE463 (SEQ ID NO:30). An in-frame translation termination codon, followed by a NotI restriction site was introduced at the 3' terminus of the cDNA by using amplimer cSLE2447 (SEQ ID NO:31). The RT-PCR product was purified by a QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

The double-stranded amplicon, produced by use of the two amplimers above (SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:31), was digested with AfeI and NotI enzymes to generate a 2004 fragment of DNA (463 to 2466nt), and inserted into the AfeI and NotI sites of a pCBJESS-M vector to form pCBSLE (nucleotide sequence, SEQ ID NO:21; amino acid sequence, SEQ ID NO:22). The pCBJESS-M was derived from the pCBamp plasmid, that contained the cytomegalovirus early gene promoter and translational control element and an engineered, modified JE signal sequence element (SEQ ID NO:27). The JE signal sequence element comprises the modified JE signal sequence at -4 (Cys to Gly) and -2 (Gly to Ser) position in the original pCBJESS plasmid.

Automated DNA sequencing using an ABI prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) was used to confirm that the recombinant plasmid had a correct prM and E sequence as defined by Trent et al. (*Virology* 156: 293-304 (1987)).

Example 14. Preparation of recombinant plasmids containing coding sequences for yellow fever virus (YFV) prM and E proteins with JEV signal sequence. Genomic RNA was extracted from 150 μ L of Vero cell culture medium infected with 17D-213 strain of yellow fever virus using the QIAampTM Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Extracted RNA was eluted and suspended in 80 μ L of nuclease-free water, and used as a template for the amplification of yellow fever virus prM and E gene coding sequences. Primer sequences were obtained from the work of dos Santos et al. (*Virus Research* 35: 35-41 (1995)). A cDNA fragment containing the genomic nucleotide region was amplified by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Restriction site AfeI was engineered at the 5' terminus of the cDNA by using amplimer YF482 (SEQ ID NO:28). An in-frame translation termination codon, followed by a NotI restriction site was introduced at the 3' terminus of the cDNA by using amplimer cYF2433 (SEQ ID NO:29). The RT-PCR product was purified by a QIAquickTM PCR Purification Kit (Qiagen).

The double-stranded amplicon, produced by use of the two amplimers above

WO 02/081754

PCT/US02/10764

(SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:29), was digested with AfeI and NotI enzymes to generate a 1971 fragment of DNA (482 to 2452nt), and inserted into the AfeI and NotI sites of a pCBJESS-M vector to form pCBYF (nucleotide sequence, SEQ ID NO:23; amino acid sequence, SEQ ID NO:24). The pCBJESS-M was derived from the

5 pCBamp plasmid, that contained the cytomegalovirus early gene promoter and translational control element and an engineered JE signal sequence element (SEQ ID NO:27). The JE signal sequence element comprises the modified JE signal sequence at -4 (Cys to Gly) and -2 (Gly to Ser) position of JESS in the pCBJESS plasmid.

Automated DNA sequencing using an ABI prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) was used to confirm that the recombinant

10 plasmid had a correct prM and E sequence as defined by dos Santos et al. (*Virus Research* 35: 35-41 (1995)).

Example 15. Preparation of recombinant plasmids containing coding sequences for Powassan virus prM and E antigens with JEV signal sequence. Genomic RNA was

15 extracted from 150 μ L of Vero cell culture medium infected with LB strain of Powassan virus using the QIAampTM Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Extracted RNA was eluted and suspended in 80 μ L of nuclease-free water, and used as a template for the amplification of Powassan virus prM and E gene coding sequences. Primer sequences were obtained from the work of Mandl et al. (*Virology* 194: 173-184

20 (1993)). A cDNA fragment containing the genomic nucleotide region was amplified by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Restriction site AfeI was engineered at the 5' terminus of the cDNA by using ampimer POW454 (SEQ ID NO:25). An in-frame translation termination codon, followed by a NotI restriction site was introduced at the 3' terminus of the cDNA by using ampimer cPOW2417 (SEQ ID

25 NO:26). The RT-PCR product was purified by a QIAquickTM PCR Purification Kit (Qiagen).

The double-stranded amplicon, produced by use of the two ampimers above (SEQ ID NO:25 and SEQ ID NO:26), was digested with AfeI and NotI enzymes to generate a 1983 bp fragment of DNA (454 to 2436nt), and inserted into the AfeI and

WO 02/081754

PCT/US02/10764

NotI sites of a pCBJESS-M vector to form pCBPOW (nucleotide sequence, SEQ ID NO:19; amino acid sequence, SEQ ID NO:20). The pCBJESS-M was derived from the pCBamp plasmid, that contained the cytomegalovirus early gene promoter and translational control element and an engineered JE signal sequence element (SEQ ID NO:27). The JE signal sequence element comprises the modified JE signal sequence at -4 (Cys to Gly) and -2 (Gly to Ser) position of JESS in the pCBJESS plasmid.

Automated DNA sequencing using an ABI prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) was used to confirm that the recombinant plasmid had a correct prM and E sequence as defined by Mandl et al. (*Virology* 194:173-184, (1993)).

Example 16. Preparation of plasmids containing coding sequences for dengue serotype 2 structural proteins. Procedures such as those carried out for other flaviviruses (see Examples 1, 9 and 12-15) are to be followed to prepare vectors including nucleic acid TU's for dengue serotype 2 antigens. According to the examples, the amplimers used for construction of the vectors may be chosen to engineer the normal dengue virus signal sequence or they may be chosen so as to engineer a signal sequence from another flavivirus, such as a modified Japanese encephalitis virus signal sequence.

A plasmid containing the dengue serotype 2 gene region from prM to E is to be constructed. The dengue serotype 2 prM and E genes (Deubel et al., *Virology* 155:365-377 (1986); Gruenberg et al., *J. Gen. Virol.* 69: 1301-1398 (1988); Hahn et al., *Virology* 162:167-180 (1988)) are to be ligated into a plasmid such as pCDNA3, and then excised and cloned into vectors such as pCBamp, pCEP4, pREP4, or pRc/RSV (supplied by Invitrogen, Carlsbad, CA) to enable expression. If necessary, a dengue serotype 2 virus-specific sequence encoded in a cDNA sequence may be amplified using a procedure such as the polymerase chain reaction (PCR). Alternatively, if the viral RNA is the source of the gene region, a DNA sequence may be amplified by a RT-PCR procedure. A DNA fragment including an initiation codon at the 5' end, and a termination codon at the 3' end is to be cloned into an expression vector at an

WO 02/081754

PCT/US02/10764

appropriate restriction nuclease-specific site, in such a way that the cytomegalovirus (CMV) immediate early (IE) promoter, an initiation codon, and a terminator, are operably linked to the dengue serotype 2 virus sequence.

Example 17. Vaccination of mice using a dengue serotype 2 DNA vaccine. The dengue serotype 2 nucleic TU vaccine encoding the gene region from prM to E prepared in Example 16 is to be suspended in a suitable pharmaceutical carrier, such as water for injection or buffered physiological saline, and injected intramuscularly into groups of weanling mice. Control groups receive a comparable plasmid preparation lacking the dengue serotype 2 specific genes. The generation of dengue serotype 2-specific antibodies, and/or of dengue serotype 2-specific immune system cytotoxic cells, is to be assessed at fixed intervals thereafter, for example at weekly intervals. At about two to four months after administration of the nucleic acid TU vaccine, mice are to be challenged with dengue serotype 2 virus. Levels of viremia are to be assessed at appropriate intervals thereafter, such as every second day. Passive protection by maternal antibody is to be assessed as indicated in Example 8.

Example 18. Design and construction of Improved Signal Peptides. Signal peptides can determine the translocation and orientation of inserted protein, hence, the topology of prM and E proteins. The most common feature of signal peptides of eukaryotes consists of an 8 to 12 stretch of hydrophobic amino acids called the h-region (von Heijne, "Signal sequences. The limits of variation" *J. Mol. Biol.* 184: 99-105 (1985)). The region between the initiator Met and the h-region, which is known as the n-region, usually has one to five amino acids, and normally carries positively charged amino acids. Between the h-region and the cleavage site is the c-region, which consists of three to seven polar but mostly uncharged amino acid residues. During viral polyprotein synthesis, modulation of the signalase cleavage site from a cryptic to cleavable conformation at the junction of C and prM proteins depends on prior removal of the C protein by the viral protease complex, NS2B/NS3 (Lobigs, "Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 6218-6222 (1993)). Thus,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

it is critical to consider the effectiveness of the viral signal sequence when prM and E proteins are to be expressed alone by an expression plasmid.

Signal peptide differences in various plasmid constructs can account, at least in part, for the difference in protein translocation, cleavage site presentation and correct topology, thus, prM and E secretion and VLP formation. The modulation or optimization of these attributes can be improved by selection or use of signal sequences with properties that impart the desired characteristics. This can be accomplished by use of machine-learning computer programs using, for example, a hidden Markov model (HMM) trained on eukaryotes (see Henrik Nielsen et al., "Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model," In Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122--130 (1998); Nielsen et al., "Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals," *Protein Engineering* 12: 3-9 (1999); Nielsen et al., "A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites," *Int. J. Neural Sys.* 8: 581-599 (1997); "From sequence to sorting: Prediction of signal peptides," Henrik Nielsen, Ph.D. thesis. Defended at Department of Biochemistry, Stockholm University, Sweden (May 25 1999); each of which is incorporated herein by reference, particularly for the teaching related to the optimization of signal sequences using computer-enabled algorithms).

An example of the type of program used is that found at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/> as of April 3, 2002. The HMM described in the referred to and incorporated references was applied to calculate the signal peptide probability of the prM signal peptide sequences in different plasmid constructs (Table 7). SignalP-HMM searches correctly predicted the signal peptidase cleavage sites in all constructs. However, considerable differences in cleavage probability (ranging between 0.164 and 1.000) and in signal peptide probability (ranging between 0.165 to 1.00) were observed (Table 7). This is not surprising, as the cleavage site and signal peptide probability are known to also be influenced by the positively charged amino acids in the n-region, the length of the hydrophobic amino acid in the h-region and

WO 02/081754

PCT/US02/10764

amino acid composition in the c-region in the constructs (Chang et al., "Flavivirus DNA vaccines: current status and potential," *Annals of NY Acad. Sci.* 951: 272-285 (2001); Sakaguchi et al., "Functions of Signal and Signal-Anchor Sequences are Determined by the Balance Between the Hydrophobic Segment and the N-Terminal Charge," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 16-19 (1992)).

Three JE virus plasmid constructs, each derived from different strain of JE virus, showed different vaccine potentials (Lin et al., "DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice," *J. Virol.* 72: 191-200 (1998); Konishi et al., "Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes," *J. Virol.* 72: 4925-4930 (1998); Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)). The signal peptide sequences in these constructs are different in the length of n-region which may or may not contain charged amino acids (Table 7). The n-region containing positively charged amino acids forms a short loop in the cytoplasmic side that causes the h-region (transmembrane helix) to be inserted in a tail orientation, exposing the signalase cleavage site. In our study, secreted VLPs containing prM/M and E proteins could be purified from culture medium of the pCDJE2-7 transformed cell line, JE4B, or pCBJE1-14 transiently transformed COS-1 cells. The gradient-purified VLPs and virions have identical immunological and biochemical properties. Processing efficiency from prM to mature M protein, the hallmark of flavivirus morphogenesis, is also similar between VLPs and virion particles. Thus, prM and E proteins expressed by pCDJE2-7 and pCBJE1-14 can be expressed as type I transmembrane proteins in the orientation similar to that of virion prM and E (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)). In contrast, the prM protein of pcDNA3JEME could be expressed as a type II membrane protein with its transmembrane h-region inserted in a head orientation because of the absence of positively charged amino acids in its n-region (Konishi et al., "Induction of protective immunity against Japanese encephalitis

WO 02/081754

PCT/US02/10764

in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes," *J. Virol.* 72: 4925-4930 (1998)). Efficient protein synthesis in combination with the expressed protein having the correct topology, particularly of the expressed prM and E, can enhance VLP formation and secretion, and thus promote the immunogenicity of the DNA vaccine (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)).

The use of computer-based computations, as described above, has been applied to optimize the design of expression plasmid. In particular, the predictive power of the SignalP-HMM program was applied to design the WN virus expression plasmid (Table 2) (Davis et al., "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays," *J. Virol.* 75: 4040-4047 (2001)). The pCBWN plasmid consists of a short version of JE virus signal peptide followed by WN virus prM-E gene sequence. Vaccine potential of this construct was amply demonstrated, as a single i.m. injection of pCBWN DNA not only induced a protective immunity but also prevented WN virus infection in mice and horses.

As discussed earlier, and as demonstrated in Examples 13-15, virus-encoded signal sequence from the same virus as the antigen-coding regions is not necessarily the optimal signal peptide available. Further, non-modified signal sequence is not necessarily optimal. For example, the signal peptide encoded in the pCBJE1-14 plasmid can be improved, as measured by the signal sequence probability by shortening n-region, by altering c-region sequence, or by the combination of both modifications (Figure 6). By way of illustration, a shortened version of JE virus signal peptide has been used for the expression of WN virus prM and E genes as described herein and in papers incorporated herein by reference for the teaching (Davis et al., "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays," *J. Virol.* 75: 4040-4047 (2001)). Dose titration studies

WO 02/081754

PCT/US02/10764

by single i.m. inoculation indicated that the pCBWN was at least 2-4 fold more immunogenic than pCBJE1-14 in mice.

- Example 19. Multivalent vaccines. Multivalent and/or combination vaccines designed to immunize against multiple flaviviruses can also be produced. In
- 5 preparation of a multivalent vaccine, monovalent vaccine components are prepared that include elements related to pathogens of interest, such as YF, different serotypes of DEN, JE, WN, SLE and TBE (RSSE and CEE) viruses or any other combination of flaviviruses. Design and production of DNA constructs as described in the other
- 10 examples and in the specification are carried out as described. Combinations of appropriate vaccines can be made to provide multivalent or combination vaccines protective against multiple pathogens. Preliminary data from our group has demonstrated that i.m. injection of the combined pCBJE1-14 and pCBWN DNA
- 15 vaccines induced JE virus- and WN virus-specific Nt antibodies in mice (Table 8). Each monovalent component, even if constructed using identical transcriptional and translational regulators, should preferably be tested in an analogous model system to ensure its vaccine potential. A combination vaccine cocktail can then be formulated. These vaccine cocktails can be tailored specifically for particular geographic regions. For example, a vaccine cocktail for tropical and subtropical Asia should include four serotypes of DEN, WN and JE virus vaccines. Similarly useful vaccine cocktails for
- 20 Africa and Latin America should include four serotypes of DEN, WN and YF virus vaccines and four serotypes of DEN, Rocio and YF virus vaccines, respectively.

Example 20. Preparation and testing of recombinant Dengue virus type 2 vaccines.

- a. Summary of example. A series of plasmids that encode the premembrane (prM) and envelope (E) proteins of the dengue virus type 2 (DEN-2) were constructed.
- 25 These plasmids included an authentic DEN-2 prM-E construct (pCBD2-14-6)(SEQ ID NO:42) encoding the protein described by SEQ ID NO:43, a 90% DEN-2 E-10% Japanese encephalitis (JE) virus E chimeric construct (pCB9D2-1J-4-3)(SEQ ID NO:44) that encodes the protein described by SEQ ID NO:45 and an 80% DEN-2 E-20% JE E chimeric construct (pCB8D2-2J-2-9-1)(SEQ ID NO:46) that encodes the

WO 02/081754

PCT/US02/10764

protein described by SEQ ID NO:47. Monoclonal antibody (MAb) reactivity indicated that all three plasmids expressed E protein epitopes that reacted with a panel of domain 1, 2 and 3 antibodies. However, only the pCB8D2-2J-2-9-1 construct (SEQ ID NO:46) secreted high levels of prM, M (matured prM) and E into the media of the plasmid-transformed COS-1 cells. The major portion of the prM and E protein expressed by COS-1 cells transformed with pCBD2-14-6 plasmid (SEQ ID NO:42) and by COS-1 cells transformed with pCB9D2-4-3 plasmid (SEQ ID NO:44) remained membrane-bound. Replacement of 20% of the sequence encoding the E protein of DEN-2 E with sequence encoding the corresponding JE E protein sequence had no effect on MAbs reactivity.

In testing, groups of mice received two intramuscular immunization of selected plasmids at 0 and 3-wks, and the immune response was evaluated by determining specific neutralizing and ELISA antibody. The plasmid expressing secreted prM and E, which can form subviral-particles (SVPs), was superior to other constructs in stimulating an antibody response. Ninety percent neutralization titers ranging from 1:40 to >1:1000 were observed from the 7 of 9 serum specimens of pCB8D2-2J-2-9-1 immunized mice.

b. Importance of DEN-2 virus and vaccines. Dengue (DEN) fever is an acute infection that occurs in subtropical and tropical areas. It is one of the most important flaviviral diseases of humans. As noted earlier, there are four distinct DEN serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4) of dengue virus. Infection with any of these is usually either asymptomatic or only causes a self-limited febrile illness known as dengue fever (DF). However, in a small percentage of cases, dengue virus infection results in a much more serious disease, life-threatening dengue hemorrhage fever or dengue shock syndrome (DHF/DSS). Thus, while there are approximately 100 million cases of the relatively mild DF world-wide annually which are of limited concern, there are also an estimated 500,000 hospitalized DHF/DSS cases reported annually. To protect against this disease, a safe and effective DEN vaccine effective against all four serotypes is required for administration to children and non-immune adults in the DEN endemic and epidemic regions.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Safe vaccines must minimize the potential risk of serious infection by virulent viruses. Such virulent viruses can arise by gene reversion or recombination of some types of vaccines derived from attenuated vaccine viruses. Such occurrences did arise in the poliovirus eradication campaign (Guillot et al., "Natural Genetic Exchanges
5 between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans," *J. Virol.* 74: 8434-8443 (2000); Liu et al., "Molecular Evolution of a Type 1 Wild-Vaccine Poliovirus Recombinant during Widespread Circulation in China," *J. Virol.* 74: 11153-11161 (2000)). Further, genomic sequencing of an American strain of yellow fever virus, TRINID79A, demonstrates that there is extensive similarity between this strain and the
10 attenuated yellow fever vaccine virus, FNV (Chang et al., "Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus," *J. Virol.* 69: 5773-5780 (1995); Pisano et al., "Complete nucleotide sequence and phylogeny of an American strain of yellow fever virus, TRINID79A," *Arch. Virol.* 144: 1837-1843 (1999)). While not conclusive in and of itself, the similarity strongly
15 suggests that TRINID 79A is derived from the FNV vaccine virus.

The use of DNA-based vaccines is a novel and promising immunization approach for the development of flavivirus vaccines (as described herein, in Chang et al., "Flavivirus DNA vaccines: current status and potential," *Ann. NY Acad. Sci.* 951: 272-285 (2001), and in references cited therein). In this example, a number of DEN-2
20 vaccines were produced and the immune response in mice after i.m. immunization of DEN-2 constructs were correlated with the efficiency of prM/M and E secretion. One construct that led to the secretion of significant amounts of prM/M and E antigens was shown to be capable of stimulating high titers of neutralizing antibodies in plasmid-vaccinated mice.

25 c. Materials and methods.

i. Cell culture and virus strains. COS-1 cells (ATCC, Manassas, VA; 1650-CRL) were grown at 37°C with 5 % CO₂ in Dulbecco's modified Eagle minimal essential medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT), 1mM
30 sodium pyruvate, 1mM non-essential amino acids, 30 ml/liter 7.5% NaHCO₃, 100 units/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin. Vero and C6/36 cells were grown under the same conditions used for COS-1 cells. DEN-2 virus, strain-16681,

WO 02/081754

PCT/US02/10764

was used for cDNA cloning, IgG ELISA and the plaque reduction neutralization test (PRNT). Virus was propagated in the C6/36 cell culture. Virus used for immunological or biochemical studies was purified by precipitation with 7% polyethylene glycol (PEG-8000; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) followed by ultracentrifugation on 30% glycerol-45% potassium-tartrate gradients (Obijeski et al., "Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus," *J. Virol.* 20:664-675 (1976)).

ii. **Plasmid construction.** Genomic RNA was extracted from 150 µl of C6/36 cell culture medium infected with DEN-2 16681 strain using the QIAamp™ Viral RNA Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Extracted RNA was resuspended in 80 µl of diethyl pyrocarbonate-treated water (DEPC, Sigma, ST. Louis, MO) and then used as a template in reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) amplification of DEN-2 virus prM and E genes. Primer sequences (Table 9) were designed based on published sequences (Gadkari et al., "Critical evaluation of Kyasanur Forest disease virus neutralizing antibodies found in bats (a preliminary report)," *Indian J. Med. Res.* 64: 64-67 (1976); Kinney et al., "Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53," *Virology* 230: 300-308 (1997)). The recognition and cleavage site for restriction enzyme *KasI* was incorporated at the 5' terminus of the cDNA amplicon. An in-frame termination codon, followed by a *NotI* restriction site, was introduced at the 3' terminus of the cDNA amplicon. The DEN-2 virus cDNA amplicon was digested with *KasI* and *NotI* enzymes, and was then inserted into the *KasI* and *NotI* sites of a pCBJESS vector to form the 100% DEN-2 E plasmid, pCBD2-14-6 (SEQ ID NO:42).

To construct the 90% and 80% DEN-2 E plasmids, the 100% DEN-2 plasmid, pCBD2-14-6 (SEQ ID NO:42), and the JE plasmid, pCBJE1-14 (SEQ ID NO:17), were used as the PCR templates to amplify DEN-2 and JE DNA sequence, respectively. Sets of primers used in amplification reactions to obtain the DEN-2 and JE gene fragments are listed in Table 9. T7 and SP6 priming sites are found in the pCBamp plasmid, derived from original pCDNA-3 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA), and can be utilized as desired or as required. PCR amplified DNA fragments for the 90% DEN-2-

WO 02/081754

PCT/US02/10764

10% JE E protein gene were digested with BstXI restriction endonuclease, ligated using T4 DNA ligase, digested with KsaI and NotI enzyme, and inserted into the KsaI and NotI sites of the pCBJESS vector to obtain the plasmid, pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NO:44). PCR amplified DNA fragments for the 80% DEN-2-20% JE E gene were

5 digested with BsmBI, ligated with T4 DNA ligase, digested with KsaI and NotI enzyme, and inserted into the KsaI and NotI sites of the pCBJESS vector to obtain the plasmid, pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46). Schematic representations of the three plasmid constructs are shown in Figure 7. The 90% DEN-2-10% JE E and the 80% DEN-2-20% JE E protein junction regions, respectively, are shown in Table 9.

10 Automated DNA sequencing was performed on an ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) according to the manufacture's recommended procedures. Recombinant plasmids with the correct prM and E sequences were identified using sequence analysis.

iii. Transient expression of DEN-2 recombinant antigen in COS-1 cells by

15 electroporation. COS-1 cells were electroporated separately with each DEN-2 plasmid or green fluorescent protein expression plasmid control (pEGFP, Clontech, San Francisco, CA) using the protocol described elsewhere in the examples and in Chang et al., ("A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)).

20 Electroporated cells were seeded onto 75 cm² culture flasks, and kept at 37°C and 5% CO₂. Six hours following electroporation the growth media were replaced with a maintenance media containing 2% fetal bovine serum. Tissue culture medium and cells were harvested separately 48 hours following electroporation for antigen characterization.

25 iv. Epitope mapping using DEN-2 E-specific monoclonal antibodies. Forty-eight hours following electroporation, adherent cells were trypsinized, resuspended in PBS containing 5% goat serum, spotted on a 12 well spot-slide and air dried. Cells adhered to the spot-slide were fixed with acetone for 10 minutes at -20°C and allowed to air dry. E-protein specific monoclonal antibodies (MAb) were used to detect protein

WO 02/081754

PCT/US02/10764

expression by the indirect immunofluorescence antibody assay (IFA), as described previously (Table 10; Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)).

- 5 v. Characterization of the recombinant DEN-2 virus antigen. Tissue culture medium was harvested 48 hours following electroporation. Antigen-capture (Ag-capture) ELISA was used to detect secreted DEN-2 virus antigen in the culture medium of transiently transformed COS-1 cells. The MAb 4G2 and horseradish peroxidase-conjugated MAb 6B6C-1 were used to capture the DEN virus antigens and detect
10 captured antigen, respectively (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000); Hunt et al., "A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen," *J. Virol. Methods.* 97:
15 133-149 (2001)).

- Forty-eight hours following electroporation, transformed cells for each plasmid were trypsinized and resuspended in PBS as aliquots containing 5×10^6 cells. These cell samples were processed for membrane protein extraction using the Mem-PER mammalian membrane protein extraction reagent kit (Pierce, Rockford, IL) following
20 the manufacturer's suggested protocol. Both hydrophobic and hydrophilic proteins are isolated. This procedure was developed for enrichment of integral membrane protein found in the hydrophobic phase. Both hydrophobic and hydrophilic fractions were analyzed by Ag-capture ELISA for DEN-2 recombinant antigen.

- Recombinant antigen in the medium was concentrated by precipitation with
25 10% polyethylene glycol (PEG)-8000. The precipitant was resuspended in TNE buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5) to 1/100th of the original volume, clarified by centrifugation, and stored at 4° C. Recombinant antigen concentrated by PEG precipitation and resuspended in TNE buffer was extracted with 4.0 % ethanol to remove residual PEG (Hunt et al., "A recombinant particulate antigen of Japanese

WO 02/081754

PCT/US02/10764

encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen," *J. Virol. Methods*. 97: 133-149 (2001)). Ethanol-extracted antigens, hydrophobic membrane proteins from the transformed cells and gradient-purified DEN-2 virions were analyzed on a NuPAGE, 4-12% Bis-Tris gradient gel in an Excel Plus Electrophoresis Apparatus™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes using a Excel Plus Blot Unit (Invitrogen Corp.). DEN-2 virus-specific protein was detected by western blot using DEN-2 virus specific MAbs 1A6A-8 (E specific) and 1A2A-1 (capsid specific), as well as rabbit antiserum specific for DEN-2 prM and mouse serum specific for a peptide composed of amino acid 1-34 of the DEN-2 M protein, and normal mouse ascitic fluid was used as negative control (Murray et al., "Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM," *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 2): 175-182 (1993); Roehrig et al., "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica," *Virology* 246: 317-328 (1998)).

vi. Mouse vaccination. Groups of ten, three-wk-old female ICR out-bred mice were used in the study. Mice were i.m. injected with pCBD2-14-6, pCB9D2-1J-4-3, pCB8D2-2J-2-9-1 or pEGFP on week-0 and week-3 at a dose of 100 µg in a volume of 100 µl per mouse. The plasmid DNA was purified from XL-1 blue cells with EndoFree Plasmid Giga Kits™ (Qiagen) and resuspended in PBS, pH 7.5, at a concentration of 1.0 µg/µl. Mice that received 100 µg of pEGFP were used as plasmid-vaccinated controls. Mice were bled every 3 wks following injection, and the DEN-2 virus specific antibody response was evaluated by use of indirect ELISA and PRNT.

vii. Serological tests. Pre- and post-vaccination serum specimens were tested for antibody binding ability to purified DEN-2 virion by ELISA, for neutralizing (Nt) antibody by PRNT, and for antibodies that recognize purified DEN-2 virus proteins by Western blotting. PRNT was performed with Vero cells, as previously described (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)), using DEN-2 (strain-16681) and JE (strain-Nakayama) virus. Endpoints

WO 02/081754

PCT/US02/10764

were determined at a 90% plaque-reduction level (Hunt et al., "A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen," *J. Virol. Methods* 97: 133-149 (2001)).

5 d. Results.

i. Transient expression of DEN-2 virus recombinant antigen. Expression of the prM and E genes of DEN-2 virus or a chimeric E gene from a combination of DEN-2 and JE virus sequences (80% DEN-20% JE or 90% DEN-10% JE) was accomplished by separate transformations of each of the three recombinant DEN-2 DNA plasmids
10 into COS-1 cells. The basic plasmid design was based on results from previous studies with JE virus and WN virus recombinant plasmids in which plasmid-transformed cells expressed, and secreted authentic viral proteins into the cell culture fluid (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000);
15 Davis et al., "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays," *J. Virol.* 75: 4040-4047 (2001)). Transient expression of DEN-2 recombinant proteins was initially assessed by Ag-capture ELISA of cell culture supernatants and by IFA of acetone-fixed, transformed
20 COS-1 cells (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000)). The point of optimum antigen expression was determined to be 48 hours following electroporation.

ii. Epitope mapping of the E protein expressed by transiently-transformed
25 COS-1 cells. The DEN-2 protein expressed by each of the recombinant plasmids was evaluated by IFA using a panel of murine MAbs with known reactivity to DEN-2 virus (Table 10; Henchal et al., "Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies," *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 162-169 (1985); Roehrig et al., "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of
30 the dengue 2 virus, Jamaica," *Virology* 246: 317-328 (1998)). The MAb panel included

WO 02/081754

PCT/US02/10764

antibodies reactive with each of the three antigenic domains of the E protein of flaviviruses as well as prM and C proteins. (Mandl et al., "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model," *J. Virol.* 63: 564-571 (1989); Rey et al., "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution," *Nature* 375: 291-298 (1995)). The MAbs specific for flavivirus antigenic Domains 2 and 3 showed nearly identical qualitative reactivity with DEN-2 virus and each of the three plasmid-expressed proteins. One of the Domain 1-specific MAbs, 1B4C-2, also showed a similar reactivity pattern with all expressed proteins. However, two of the Domain 1-specific MAbs, 2B3A-1 and 9A4D-1, were much less reactive with E protein expressed by plasmids pCBD2-14-6 and pCB9D2-1J-4-3 as shown by endpoint titration (values in parentheses, Table 10). Comparison of the endpoint titers revealed the apparent poor expression of epitopes C3 and C4 in constructs containing 100% DEN-2 E and 90% DEN-2 E-10% JE E. MAb 2H2, specific for prM, had the same reactivity with antigen expressed by all three plasmids. Anti-C MAb 1A2A-1 reacted well with DEN-2 virus and had low level, non-specific reactivity with the plasmid-expressed viral proteins, which included prM and E, but not C.

iii. Comparison of secreted protein and membrane-bound protein produced by each of the three DEN-2 recombinant plasmids. Similar amounts of cell culture fluid were harvested from COS-1 cells 48 hours post-transformation for each recombinant DEN-2 plasmid. Secreted recombinant antigen found in the culture fluid was concentrated 100-fold by PEG precipitation, followed by ethanol extraction to remove PEG which interfered with subsequent analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. The relative amount of secreted antigen expressed by each plasmid was determined by Ag-capture ELISA analysis of both PEG-precipitated and ethanol-extracted cell culture fluid preparations (Table 11). Secreted antigen was detected only from cells transfected with pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:34), which contained 80% DEN-2 E and 20% JE E genes. The recombinant plasmids containing either 100% DEN-2 E or 90% DEN-2 E-10% JE E genes produced no ELISA-detectable antigen in the culture fluid, despite efforts to concentrate expressed protein.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Western blot analysis was also used to evaluate the production of secreted antigen by each of the DEN-2 recombinant plasmids. For comparison purposes, equivalent volumes of PEG-precipitated, ethanol-extracted cell culture supernatant were run on NuPAGE gradient gels, electroblotted to nitrocellulose, and analyzed using MAbs or polyclonal antisera capable of reacting with all DEN-2 structural proteins (Figure 8A). Western blot analysis showed greater sensitivity in detecting recombinant antigen than Ag-capture ELISA since DEN-2-specific proteins were detected in the culture fluid from two of the plasmids, pCB8D2-2J-2-9-1 and pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NOS:46 and 44, respectively). Plasmid pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46) expressed the greatest amount of secreted antigen which was shown to be composed of E, prM, and M proteins. Relatively less secreted antigen was produced by pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NO:44) and barely detectable levels were found for the pCBD2-14-6 (SEQ ID NO:42) preparation, which appeared to contain relatively less expressed E protein, especially if the non-specific reactivity of the E-specific MAb, 1A6A-8, on the control pEGFP was taken into consideration (Figure 8A, lanes a, b for 14-6 and GFP).

Since E, prM, and M are membrane-associated proteins throughout their intracellular synthesis, any assessment of the expression of these proteins by the three recombinant DEN-2 plasmids should include an evaluation of cell membrane preparations from plasmid-transformed cells. The Mem-PER Mammalian Membrane Protein Extraction Reagent kit (Pierce) was used to isolate the integral membrane proteins from equivalent numbers of cells transformed by each of the recombinant plasmids. Hydrophobic proteins were separated from hydrophilic proteins by phase partitioning. Preliminary analysis by Ag-capture ELISA indicated that the hydrophilic protein fraction was non-reactive; however, the hydrophobic protein fractions from COS-1 cells transformed with each of the recombinant DEN-2 plasmids had similar titers in ELISA tests (Table 11). These results indicated that recombinant antigen encoded by all three plasmids was expressed following transformation, but that the recombinant antigens expressed were not all secreted at the same level.

Confirmation of the Ag-capture results for the hydrophobic protein fractions was accomplished by western blot (Figure 8B). Equivalent volumes of hydrophobic

WO 02/081754

PCT/US02/10764

protein fractions from each of the plasmid-transformed cells were diluted according to the manufacturer's recommendations for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in order to reduce band and lane distortion. Immunoblotting with E-, prM-, C-, and M-specific MAbs or polyclonal antisera demonstrated that all three recombinant DEN-2 plasmids induced the production of similar amounts of recombinant antigen composed of E and prM. No M protein was detected, either because it was not processed from prM or because the levels were too low to be detected. Despite efforts to reduce band distortion, high levels of detergent in the hydrophobic protein samples apparently caused E and prM to run in a slightly aberrant manner (slower migration) compared to samples without such high concentrations of detergents (compare E and prM migration in Figure 8A and 8B).

iv. Comparison of the immune response in mice vaccinated with three different DEN-2 recombinant DNA plasmids. Three-week old ICR mice were immunized by i.m. injection with 100 µg of pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46), pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NO:44), pCBD2-14-6 (SEQ ID NO:42), or pEGFP on weeks 0 and 3. Mice were bled 3, 6, and 9 weeks after the primary immunization. Individual and pooled sera were tested by indirect ELISA, using screening dilutions of 1:100 and 1:400 at 3 and 6 weeks post-vaccination and endpoint titrations at 9 weeks post-vaccination. Nine-week sera were also tested by PRNT with both DEN-2 and JE viruses. The ELISA results showed that after one immunization (3-week sera), all mice given pCB8D2-2J-2-9-1 had seroconverted, whereas only 50% of pCB9D2-1J-4-3 and 20% of pCBD2-14-6-vaccinated mice reacted with DEN-2 virus (Table 12). By 9 weeks post-vaccination, all mice vaccinated with either pCB8D2-2J-2-9-1 or pCBD2-1J-4-3 demonstrated anti-DEN-2 ELISA reactivity; however, the geometric mean titers differed significantly (titers of 1:20,000 versus 1:708, respectively). Only 40% of pCBD2-14-6-immunized mice had anti-DEN-2 ELISA titers greater than 1:100. A western blot of pooled 9-week sera from pCB8D2-2J-2-9-1-immunized mice on purified DEN-2 virus showed that the immunodominant response was to the E glycoprotein. Slight reactivity to prM and M were also detected. More significantly, in terms of evaluating the vaccine potential of the three DEN-2 plasmids, the induction of virus-neutralizing antibody in 7 of 9 mice immunized

WO 02/081754

PCT/US02/10764

with pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46) was observed based on a 90% plaque-reduction endpoint (Table 10). However, if a 50% neutralization endpoint is used, then all 9 of 9 sera have PRNT titers of $\geq 1:40$. Ninety percent neutralization titers ranged from 1:40 to $>1:1000$ for the 7 sera with neutralizing activity. None of the mice immunized with pCB9D2-1J-4-3 produced neutralizing antibody, and only 1 of 10 sera from pCBD2-14-6-vaccinated mice neutralized virus, but at a titer of only 1:8.

Since two of the recombinant plasmids, namely pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NO:44) and pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46) contained JE virus E-gene sequences, all sera were also evaluated for the presence of JE virus neutralizing activity. However, no such activity was detected at the 90% neutralization endpoint for mice in any of the immunization groups. Not surprisingly, mice immunized with the control plasmid pEGFP exhibited no reactivity to either DEN-2 or JE viruses.

e. Discussion. The same steps used earlier for the JE and WN vaccines was initially used to construct a recombinant DEN-2 plasmid, pCBD2-14-6 (SEQ ID NO:42), consisting of the authentic DEN-2 prM and E gene region. Antigenic mapping of DEN-2 proteins expressed by COS-1 cells transformed by this plasmid, using a panel of MAb by IFA, indicated the prM and E protein had a compatible fluorescent intensity and a similar MAb reactivity as virus infected cells (Table 10). However, these COS-1 cells transformed by the plasmid encoding an authentic DEN-2 prM and E region failed to secrete detectable DEN-2 antigen into the culture fluid (as measured by antigen-capture ELISA). In addition, vaccination using the plasmid encoding an authentic DEN-2 prM and E region failed to stimulate anti-DEN-2 virus neutralizing antibody in i.m. immunized-mice (Table 13). Interestingly, transformation of cells by pCBD2-14-6 resulted in a punctuated-globular fluorescent staining that suggested that the C-terminus of the E protein of DEN-2 may contribute to that protein's membrane retention signal. This IFA staining pattern was not observed in either the JE or WN construct-transformed cells (Chang et al., "A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice," *J. Virol.* 74: 4244-4252 (2000); Davis et al., "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and

WO 02/081754

PCT/US02/10764

expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays," *J. Virol.* 75: 4040-4047 (2001)). Therefore, in light of the observation made in accordance with the teachings of the present application, two additional plasmids, pCB9D2-1J-4-3 (SEQ ID NO:44) and pCB8D2-2J-2-9-1 (SEQ ID NO:46), in which appropriate manipulation of the DNA sequence was made for 10 % or 20 % of C-terminal E of DEN-2 to be replaced with the corresponding region of JE virus E protein, respectively. Relative effectiveness of the different constructs in stimulating detectable anti-DEN-2 ELISA antibody in vaccinated mice is shown in Table 13.

These results are consistent with the model that interactions between prM and E can influence the processes of particle assembly and secretion. Support for this model can be found in a study of tick-borne encephalitis virus that putatively suggests that interactions between prM and the ectodomain of E are involved in prM-mediated intracellular transport of prM-E, thus, secretion of virus-like particle (Allison et al., "Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E," *J. Virol.* 73: 5605-5612 (1999)).

In the present example, replacing a C-terminal portion of DEN-2 E protein with JE E protein, corresponding to TBE H1^{prod} to TM2, resulted in DEN-2 prM protein and chimeric E protein secretion. However, in contrast, replacement of TM1 and TM2, in TBE, caused only a minor improvement in antigen secretion. The major portion of the prM and E protein expressed by either COS-1 transformed pCBD2-14-6 and pCB9D2-4-3 plasmid remained membrane-bound (Table 13). These results indicated that an unidentified membrane retention sequence is located in the C-terminal stem region of DEN-2 E protein. Substitution of this C-terminal stem region with sequence from the JE virus removes or renders ineffective this retention sequence.

It has been asserted by others that the prM protein is essential for maintaining proper conformation and secretion of E protein during prM-E maturation (Aberle et al., "A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms," *J. Immunol.* 163:

WO 02/081754

PCT/US02/10764

6756-6761 (1999), Allison et al., "Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form," *J. Virol.* 69:5816-5820 (1995)). Further, it has also been demonstrated that the ectodomain of the E protein interacts with prM. This interaction has been estimated to involve amino acid sequence within amino acid residues 200-327 of E in the Murray Valley encephalitis virus (Guirakhoo et al., "The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein," *Virology* 191: 921-931 (1992)).

Proper prM and E interactions and retained integrity of the E protein's structure are likely maintained in the protein expressed by all three DEN-2 constructs, at least insofar as they are required for immunoreactivity. Furthermore, the replacement of the C-terminus 20 % E in the pCB8D2-2J-2-9-1 resulted in a protein that maintained 395 amino acids of authentic DEN-2 E. Any such modification is expected to have minimal influence on E and prM-E interactions and their influence on the antigenic nature of the chimeric E protein. As replacing the C-terminus region of DEN-2 E with JE stem-anchor sequence had no effect on MAbs reactivity (Table 10), retention of the DEN-2 sequence so replaced can only be optional in attaining a DEN-2 specific immunological response.

Previously, it has been shown that a plasmid construct encoding a secreted subviral particle of tick-borne encephalitis virus prM and E protein was superior, in terms of the extent and functionality of the antibody response and in terms of response to virus challenge, to other constructs that encoded C-terminally truncated soluble E-dimer that was secreted, full-length E that was not secreted, or a truncated E that was not efficiently secreted (Aberle et al., "A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms," *J. Immunol.* 163: 6756-6761 (1999)). However, here we have demonstrated that the vaccine potency of DEN-2 DNA is correlated with the secretion of prM/M and E (Table 13). The morphology and physical character of secreted prM and E were not demonstrated in this study. However, the prM and E, secreted by the pCB8D2-2J-2-9-1 construct, does likely form a viral-like particle. It is believed that

WO 02/081754

PCT/US02/10764

the presentation of multiple protective antigens on the particle surface improves vaccine potency of this construct.

Previous attempts for the development of DEN-2 virus DNA vaccine has resulted in varying degrees of success (Kochel et al., "Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice," *Vaccine* 15: 547-552 (1997); Konishi et al., "A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice," *Vaccine* 18: 1133-1139 (2000)). To improve the level of effectiveness, differing strategies have been adopted. For example, coimmunization of the immuno-stimulatory CpG motif containing pUC19 plasmid, plasmid expressing murine GM-CSF in the vaccine regimen, or replacing C-terminus 43 amino acid of E with lysosome-associated membrane retention sequence improved the antibody response to the DEN-2 vaccine has been used (Porter et al., "Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses," *Arch. Virol.* 143: 997-1003 (1998); Raviprakash et al., "Synergistic Neutralizing Antibody Response to a Dengue Virus Type 2 DNA Vaccine by Incorporation of Lysosome-Associated Membrane Protein Sequences and Use of Plasmid Expressing GM-CSF," *Virology* 290: 74-82 (2001)). Unmethylated CpG motifs directly activates macrophages, natural killer cells and lymphocytes to secrete cytokines and chemokines, and supports the development of immune responses mediated by Th1 cytokines (Manders et al., "Immunology of DNA vaccines: CpG motifs and antigen presentation," *Inflamm. Res.* 49: 199-205 (2000)). However, inclusion of the CpG might bias the host's cytokine profile and thereby contribute to the both the development of Th-1-mediated organ-specific autoimmune disorders and interfere with immune homeostasis (Smith et al., "The regulation of DNA vaccines," *Curr. Opin. Biotech.* 12: 299-303 (2001)). There is also evidence in mice that excess levels of cytokine, although increasing the response of certain T-helper cells, can decrease or shutdown the response of other actors in the immune response, leading to generalized immunosuppression or chronic inflammation (Robertson et al., "Assuring the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines," *Mol. Biotechnol.* 17: 143-149 (2001)). Correspondingly, the safety and efficacy of flavivirus DNA immunization

WO 02/081754

PCT/US02/10764

could be benefited by manipulation of an expression plasmid to enhance transcription and translation and targeting prM and E proteins for secretion that promote correct polyprotein processing and assembly (Chang et al., "Flavivirus DNA vaccines: current status and potential," *Ann. NY Acad. Sci.* 951: 272-285 (2001)). Future improvements
5 could be focused on enhancing DNA uptake by antigen presenting cells or by muscle cells (Rodriguez et al., "Enhancing DNA immunization," *Virology* 268: 233-238 (2000)).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 1. Transient expression of JE prM and E proteins by various recombinant plasmids in two transfected cell lines.

Vector						Recombinant Plasmid	IFA intensity/percentage of antigen-positive cells*	
	Promoter	Intron	Poly (A)	ORI			COS-1	COS-7
pCDNA3	CMV	No	BGH	SV40		pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	No	BGH	No		pCBJE1-14	3+/45	nd
pCIBamp	CMV	Yes	BGH	No		pCIBES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	No	SV40	Orig		pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	No	SV40	Orig		pREJE	1+/3	1+/2
pRG/RSV	RSV	No	BGH	SV40		pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	No	BGH	SV40		pCDNA3/CAT	-	-

*Various cell lines were transfected with pCDNA3/CAT (negative control), pCDJE2-7, pCBJE1-14, pCIBES14, pCEJE, pREJE, or pRCJE. Cells are trypsinized 48 hours later and tested by an indirect immunofluorescent antibody assay (IFA) with JE virus-specific H1A1F. Data are presented as the intensity (scale of 1+ to 4+) and the percentage of IFA positive cells. The pCDNA3/CAT transfected cells were used as the negative control.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 2. Characterization of proteins expressed by a pCDJE2-7 stably transformed clone (JE-4B) of COS-1 cells with JE virus-reactive antibodies.

Mab or antiserum	Biological Activity of Mab		Immunofluorescent intensity of cells	
	Specificity	Biological Function	JEV infected	4B
Mab:				
MC3	JEV Specific		2+	2+
2F2	JEV Specific	HI, N	4+	4+
112	JEV Specific		4+	4+
503	JEV Specific	N	4+	3+
109	Subgroup	HI	2+	1+
N.04	Subgroup	HI, N	3+	4+
201	Subgroup		1+	1+
203	Subgroup		4+	3+
204	Subgroup		2+	2+
301	Subgroup	HI	2+	2+
504	Flavivirus		4+	4+
6B6C-1	Flavivirus		2+	2+
3B4C-4	VEE		-	-
H1AF:				
Anti-JEV			4+	3+
Anti-WEE			-	-
PBS			-	-

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 3. Persistence of the immune response in mice immunized with pCDJE2-7 or JE-VEX vaccine.

	ELISA Titer (log ₁₀)						PRNT ₅₀ Titer		
	3 wks	6 wks	9 wks	23 wks	40 wks	60 wks*	3 wks	6 wks	9 wks
1x pCDJE2-7	2.6-3.2	3.8-5.0	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.4, 2.4, 3.8, 4.4	<20	20	40-160
2x pCDJE2-7	2.6-3.8	4.4	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.6, 3.8, 3.8	<20	20-40	40-160
2x JE-VAX	2.6-3.8	4.4-5.0	3.8-5.6	>3.2	>3.2	<2, <2, 4.4	<20	20-40	20-160
pCDNA3/CAT	<2	<2	<2	ND	ND	<2	<20	<20	<20

Mice were inoculated with 1 or 2, 100 µg/dose plasmid DNA, or 1/5 human dose of JE-VAX vaccine. Sera were collected for testing prior to the second immunization.
* Individual serum titers.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 4. The age-dependent percent seropositive rate in mice following vaccination with various JEV vaccines.

	3-day old		3-week old	
	3 weeks PV	7 weeks PV	3 weeks PV	7 weeks PV
JE-VAX	0	0	100	100
pCDNA3/CAT	0	0	0	0
pCDJE2-7	40	60	90	90
pC1BJES14	10	60	80	100
pCBJE1-14	80	100	100	100

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 5. Protection from JEV challenge in 8 week old mice following vaccination at 3 days old with various JEV vaccines.

Vaccine	Pre-challenge JEV seroconversion	Days post-challenge survival rate (%)				
		6	7	8	9	21
JE-VAX	0	100	100	60	40	40
pCDNA3/CAT	0	100	80	30	30	30
pCDJE2-7	60	100	100	100	100	100
pC1BJES14	60	100	100	100	100	100
pCBEI-14	100	100	100	100	100	100

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 6. Evaluation of the ability of maternal antibody from JEV-nucleic acid-vaccinated female mice to protect their pups from fatal JEV encephalitis.

Vaccinated mother		JEV challenged pups		
Vaccine	PRNT _{50%}	Challenge age (days)	No. survival ¹	ELISA ²
1 x pCDJE2-7	40	4	0/11	
2 x pCDJE2-7	80	4	12/12	12/12
2 x JE-VAX	20	3	0/16	
2 x pCDNA-3/CAT	<10	5	0/14	
1 x pCDJE2-7	20	15	5/11	5/5
2 x pCDJE2-7	40	14	8/12	7/8
2 x JE-VAX	80	13	5/5	5/5
2 x pCDNA-3/CAT	<10	14	0/14	

Mice were inoculated intramuscularly with 1 or 2, 100 µg dose of plasmid DNA, or subcutaneously with two, 1/5 human dose of JE-VAX vaccine. Sera were collected 9 weeks post-vaccination for PRNT testing prior to mating with non-immune male.

¹: No Survivors/total for each litter.

²: Number of JEV ELISA-antibody-positive animals (titer ≥ 1:400)/No. of survivors; sera were collected for testing 12 weeks after challenge.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 7. Characteristic of the signal peptides and their vaccine of potentials among flavivirus DNA vaccine constructs

Plasmid	Signal peptide sequence preceding pM protein	Signal peptide probability ^a		Immunization protocol/protection
		SP	C site	
pSLE1	? <u>LD</u> TINRPS <u>K</u> RGGT <u>RS</u> LLGLAALIGLASS/LQLSTVQG (SEQ ID NO: 32)	0.702	0.292	im x 2/Partial
pJME	MWLASLAVVIACAGA/ <u>M</u> KLSNFOG <u>K</u> (SEQ ID NO: 33)	0.998	0.000	im x 2/Partial
pCJEME	MN <u>EG</u> STIMWLASLAVVIACAGA/ <u>M</u> KLSNFOG <u>K</u> (SEQ ID NO: 34)	0.985	0.012	im x 2/100%
pCBIE1-14	MGB <u>K</u> ON <u>ER</u> GG <u>EG</u> STIMWLASLAVVIACAGA/ <u>M</u> KLSNFOG <u>K</u> (SEQ ID NO: 35)	0.791	0.199	im x 1/100%
pDNA3pM-E	MS <u>K</u> RGGS <u>SE</u> TSVLAVIIFWLLIGPAAA/ <u>L</u> KLSNFOG <u>K</u> (SEQ ID NO: 36)	0.721	0.277	im x 4 / Partial
pCBWN	M <u>G</u> ERSAGSIMWLASLAVVIACAGA/VTL <u>S</u> NFOG <u>K</u> (SEQ ID NO: 37)	0.976	0.024	gg x 2-4/100%
p1012D2ME	MNV <u>L</u> RG <u>FR</u> KE <u>IG</u> RLMILN <u>RR</u> RTAGMIIMLPTVMA/ <u>F</u> LT <u>TR</u> NG <u>E</u> (SEQ ID NO: 38)	0.165	0.778	im x 1/100%
SV-PE	MVGL <u>Q</u> K <u>ER</u> GSATDAMSWLLVITLLGMTLA/ATV <u>R</u> ERGD (SEQ ID NO: 39)	0.943	0.056	id x 2/None
pWRG7077-RSSE	MGWLLVVVVLGYTLA/ATV <u>R</u> ERGD (SEQ ID NO: 40)	1.000	0.000	im or gg x 2/100%
pWRG7077-CUE	MSWLLVITLLGMTLA/ATV <u>R</u> ERGD (SEQ ID NO: 41)	0.999	0.000	gg x 2/100%

^a The SignalP HMM program was applied to calculate signal peptide (SP), anchor peptide (AP) and signalase cleavage site (C site) probabilities.

Single amino acid codes were used, and charged amino acids were highlighted by underline-bold letters. The signalase cleavage site separating SP and pM is indicated by "/". DNA vaccines were inoculated by intramuscular (im), intradermal (id), or gene gun (gg) method.

88

Dose per plasmid (μ g)	pCBWN + pCBT1-14			pCB Control
	100 + 100	40 + 40	20 +20	10 +10
Percentage of mice with Nt :				
WN virus/JE virus:	100 / 100	100 / 70	70 / 0	60 / 0
Range of PRNT ₅₀ titer:				
WN virus:	1:320 - 1:80	1:80 - 1:20	1:80 - <1:10	1:20 - <1:10
JE virus:	1:40 - 1:10	1:10 - <1:10	<1:10	<1:10

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 9. Oligonucleotides used to construct DEN-2 virus prM-E expression plasmids, and the junction region of chimeric DEN-2 and JE E indicated.

100% DEN-2 prM-E:	
D2KasI-438 ^a	5' TGTGCA <u>GGCGCC</u> TTCCATTTAACACACGTAACG (SEQ ID NO:48)
CD2NotI-2402	5' TCGAG <u>CGGCGCGC</u> TCAACTAATTAGGCTGCACCATGACTC (SEQ ID NO:49)
90% DEN-2 E & 10% JE E:	
T7	5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:50)
CD2BstXI-2244	5' ATAGATTGCT <u>CCA</u> AACT <u>TGG</u> TGG (SEQ ID NO:51)
JE-2281	5' ACTCCATAGGAAAAGCCGTTACCC (SEQ ID NO:52)
CSP6	5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG (SEQ ID NO:53)
DEN-2  JE 90-10 Junction: Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr (SEQ ID NO:55) CTC CAC CAA GTG TTT GGT GGT GCC TTC AGA ACA (SEQ ID NO:54)	
80% DEN-2 E & 20% JE E:	
T7	5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:56)
CD2BsmBI-2097	5' GAATT <u>CGTCTC</u> ACTTCCTTTCTTAAACCAAGTTGAGCTTC (SEQ ID NO:57)
JEBsmBI-2175	5' GGAATT <u>CGTCTC</u> GGAAGCACGCTGGGCAAGG (SEQ ID NO:58)
CSP6	5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG 3' (SEQ ID NO:59)
DEN-2  JE 80-20 Junction: Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala (SEQ ID NO:61) AAC TGG TTT AAG AAA GGA AGC ACG CTG GGC GCC (SEQ ID NO:60)	

^a Restriction enzyme sites encoded in oligonucleotides were highlighted by the bold, italic and underline.

Table 10. Characterization of DEN-2 E glycoprotein epitopes expressed by the recombinant DEN-2 plasmids as determined by the indirect fluorescent antibody assay (IFA).

MAbs (Epitope) ^b	Antibody	Controls ^a		Plasmid construct ^a				
		Antigenic Domain ^c	PRNT ^d	DEN-2	Normal	pCBSD2-14-6	pCBSD2-14-3	pCBSD2-21-2-9-1
infected cells								
4G2 (A1)	2		+/−	4+	-	4+	4+	4+
4E5 (A2)	2		Yes	3+	-	3-4+	3-4+	2-3+
1B7 (A5)	2		Yes	3-4+	-	4+	4+	2-3+
1B4C-2(C1)	1		No	3-4+ (8000)	-	2-3+ (4000)	2-3+ (4000)	2-3+ (8000)
2B3A-1 (C3)	1		No	3-4+ (≥3200)	-	3+ (100)	2+ (100)	2-3+ (≥3200)
9A4D-1 (C4)	1		No	3-4+	-	2-3+ (400)	1-3+ (400)	3+ (≥12800)
3H5 (B2)	3		Yes	4+	-	4+	4+	4+
10A4D-2 (B3)	3		Yes	2-3+	-	3-4+	3-4+	2-3+
1A1D-2 (B4)	3		Yes	4+	-	3-4+	4+	3-4+
9D12-6			Yes	2-4+		2-3+	2-3+	3-4+
2H2	pM		No	4+	-	4+	3-4+	3-4+
1A2A-1	CapSid		No	2-3+	-	1+	2+	1-2+

WO 02/081754

PCT/US02/10764

^aIFA substrates were acetone-fixed COS-1 cells, either infected with DEN-2 16681, uninfected controls, or transformed with a DEN-2 recombinant plasmid.

^bMonoclonal antibodies were used at a predetermined optimum dilution based on reactivity with DEN-2 16681 virus. For some MAbs, endpoint titers, shown in parentheses, are reported and for others, only qualitative values are reported based on a scale from 1+ to 4+, with 3-4+ considered positive, 2+ equivocal, and 1+ negative.

^cAntigenic domains based on the E-glycoprotein of TBE virus (Mandl et al., "Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model," *J. Virol.* 63: 564-571 (1989); Rey et al., "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution," *Nature* 375: 291-298 (1995)).

^dPlaque-reduction neutralization activity at a 1:100 dilution of ascitic fluid, using a 90% plaque-reduction endpoint, except for 4G2 and 9D12-6, for which a 50% neutralization endpoint is reported (Henchal et al., "Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies," *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 162-169 (1985); Roehrig et al., "Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica," *Virology* 246: 317-328 (1998)).

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 11. Detection of secreted and membrane-bound DEN-2 recombinant protein by antigen-capture ELISA.

Plasmid	Sample type	Endpoint ELISA titer
pCBD2-14-6	PEG-precipitated culture fluid ^a	<1:10
pCBD2-14-6	PEG-precipitated, ethanol-extracted culture fluid ^b	<1:20
pCBD2-14-6	Hydrophobic membrane protein preparation ^c	1:160
pCB9D2-1J-4-3	PEG-precipitated culture fluid ^a	<1:10
pCB9D2-1J-4-3	PEG-precipitated, ethanol-extracted culture fluid ^b	<1:20
pCB9D2-1J-4-3	Hydrophobic membrane protein preparation ^c	1:80
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG-precipitated culture fluid ^a	1:640
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG-precipitated, ethanol-extracted culture fluid ^b	1:80
pCB8D2-2J-2-9-1	Hydrophobic membrane protein preparation ^c	1:80
pEGFP	PEG-precipitated culture fluid ^a	<1:10
pEGFP	PEG-precipitated, ethanol-extracted culture fluid ^b	<1:10
pEGFP	Hydrophobic membrane protein preparation ^c	<1:10

^aCulture supernatant from plasmid-transformed cells was precipitated with 10% polyethylene glycol (PEG) and resuspended in 1/100th of original volume.

^bPEG-precipitated culture supernatant was extracted with 4% ethanol to remove PEG and the pellet was resuspended in 1/5 of the volume extracted.

^cHydrophobic membrane fractions were prepared as described in Materials and Methods.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 12. Immunogenicity of three DEN-2 recombinant plasmids in ICR mice.

Plasmid DNA ^a	Mouse #	ELISA on DEN-2 virus					PRNT on DEN-2 virus ^b Endpoint titer 9 wks, p.v.	PRNT on JE virus ^c Endpoint titer 9 wks, p.v.
		Screen 3 wks, p.v. ^c		Screen 6 wks, p.v. ^c		Endpoint titer 9 wks, p.v.		
		1:100	1:400	1:100	1:400			
pCIBD2-2/-2-9-1	Pool 1,2,4-10	ND ^d	ND	+	+	64,000	ND	ND
	1	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
	2	+	+	+	+	32,000	>1000	<2
	4	+	+	+	+	16,000	200	<2
	5	+	+	+	+	4,000	<10	<2
	6	+	+	+	+	16,000	200	<2
	7	+	-	+	+	64,000	100	<2
	8	+	-	+	+	8,000	40	<2
	9	+	+	+	+	6,400	<2	<4
	10	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
pCIBD2-1/-4-3	Pool 1-10	ND	ND	+	+	1,000	ND	<2 ^e
	1	-	-	+	-	400	<10	ND
	2	+	-	+	+	200	<10	ND
	3	+	+	+	+	4,000	<2	<4
	4	+	-	+	-	200	<10	ND
	5	-	-	+	+	400	<10	ND
	6	+	+	+	+	4,000	<2	2
	7	-	4+	+	-	100	<10	ND
	8	-	-	+	-	200	<10	ND
	9	+	-	+	-	4,000	<2	<2
	10	-	-	+	+	4,000	<2	<2
pCIBD2-14-5	Pool 1-10	ND	ND	+	-	200	<2 ^e	<2 ^e
	1	-	-	-	-	400	<10	ND
	2,3,6-9	-	-	-	-	<100	ND	ND
	4	+	+	+	+	1,000	<2	<2
	5	-	-	+	-	2,000	8	<2
	10	+	-	-	-	<100	ND	ND
pEGFP	Pool 1-10	-	ND	-	ND	<100	<2	<2

WO 02/081754

PCT/US02/10764

^aPRNT, plaque-reduction neutralization test, 90% neutralization endpoint.

^bMice were immunized intramuscularly with 100 μ g plasmid DNA on weeks 0 and 3.

^cELISA screens used sera diluted 1:100 and 1:400.

^dND, not done.

^ePool, 1,2,4,5,7,8.

^fPool, 2,3,6-10.

^gPool, 1-3,6-10.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Table 13. Summary of the characteristics of three DEN-2 recombinant plasmids.

Plasmid	IFA ^a		Ag-capture ELISA titer		ELISA titer on DEN-2 ^b		DEN-2 PRNT ^c
	+/-	Globular/Diffuse	Secreted antigen	Hydrophobic membrane protein prep	No. sera ≥ 1:100	Pooled sera titer	No. sera ≥ 1:10
pCB8D2-2J-2-9-1	+	Diffuse	1:640	1:80	9/9	1:64000	7/9 ^d
pCB9D2-1J-4-3	+	Globular	<1:10	1:80	10/10	1:1000	0/10
pCBD2-14-6	+	Globular	<1:10	1:160	3/10	1:200	0/10

^aIndirect fluorescent antibody assay (IFA) staining characteristics, + or -, and diffuse or globular pattern.

^bAnti-DEN-2 ELISA titer of sera from mice immunized with the recombinant plasmids.

Sera were collected 9 weeks post-vaccination (weeks 0 and 3). Number of mice with titer of ≥ 1:100/ total number of mice is shown, including the endpoint ELISA titer of the pooled serum sample.

^cNumber of mice with plaque-reduction neutralization titers (PRNT, 90% reduction) ≥ 1:10/ total number of mice. Sera were collected 9 weeks post-vaccination.

^dOf the 7 mice with neutralizing antibody, 3 mice had PRNT titers of >1:1000, 3 had titers of ≥1:100<1:1000, and one had a titer of 1:40.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

What is claimed is:

1. An isolated nucleic acid comprising a transcriptional unit encoding a signal sequence of a structural protein of a first flavivirus and an immunogenic flavivirus antigen of a second flavivirus, wherein the transcriptional unit directs the synthesis of the antigen.
2. The nucleic acid of claim 1, wherein the signal sequence is a Japanese encephalitis virus signal sequence.
3. The nucleic acid of claim 1, wherein the immunogenic flavivirus antigen is of a flavivirus selected from the group consisting of yellow fever virus, dengue serotype 1 virus, dengue serotype 2 virus, dengue serotype 3 virus, dengue serotype 4 virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and West Nile virus.
4. The nucleic acid of claim 1, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus and an M protein and an E protein of West Nile virus.
5. The nucleic acid of claim 1, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus and an M protein and an E protein of yellow fever virus.
6. The nucleic acid of claim 1, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus and an M protein and an E protein of St. Louis encephalitis virus.
7. The nucleic acid of claim 1, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus and an M protein and an E protein of Powassan virus.
8. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is selected from the group

WO 02/081754

PCT/US02/10764

consisting of an M protein of a flavivirus, an E protein of a flavivirus, both an M protein and an E protein of a flavivirus, a portion of an M protein of a flavivirus, a portion of an E protein of a flavivirus and both a portion of an M protein of a flavivirus and a portion of an E protein of a flavivirus or any combination thereof.

9. The nucleic acid of claim 8, wherein the antigen is both the M protein and the E protein of a flavivirus.

10. The nucleic acid of claim 1, wherein the nucleic acid is DNA.

11. The nucleic acid of claim 10, comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21 and SEQ ID NO:23.

12. The nucleic acid of claim 1, wherein the transcriptional unit comprises a control sequence disposed appropriately such that it operably controls the synthesis of the antigen.

13. The nucleic acid of claim 12, wherein the control sequence is the cytomegalovirus immediate early promoter.

14. The nucleic acid of claim 1, comprising a Kozak consensus sequence located at a translational start site for a polypeptide comprising the antigen encoded by the TU.

15. The nucleic acid of claim 1 wherein the transcriptional unit comprises a poly-A terminator.

16. A cell comprising the nucleic acid of claim 1.

17. A composition comprising the nucleic acid of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

18. A method of immunizing a subject against infection by a flavivirus, comprising administering to the subject an effective amount of the composition of claim 17.

19. The method of claim 18, wherein the flavivirus antigen is of a flavivirus selected from the group consisting of yellow fever virus, dengue serotype 1 virus, dengue serotype 2 virus, dengue serotype 3 virus, dengue serotype 4 virus, Japanese encephalitis virus, Powassan virus and West Nile virus.

20. The method of claim 18, wherein the antigen is selected from the group consisting of an M protein of a flavivirus, an E protein of a flavivirus, both an M protein and an E protein of a flavivirus, a portion of an M protein of a flavivirus, a portion of an E protein of a flavivirus and both a portion of an M protein of a flavivirus and a portion of an E protein of a flavivirus or any combination thereof.

21. The method of claim 20, wherein the antigen is both the M protein and the E protein of a flavivirus, and wherein a cell within the body of the subject, after incorporating the nucleic acid within it, secretes subviral particles comprising the M protein and the E protein.

22. The method of claim 18, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus, and an M protein and an E protein of West Nile virus.

23. The method of claim 18, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus, and an M protein and an E protein of yellow fever virus.

24. The method of claim 18, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus, and an M protein and an E protein of St. Louis encephalitis virus.

WO 02/081754

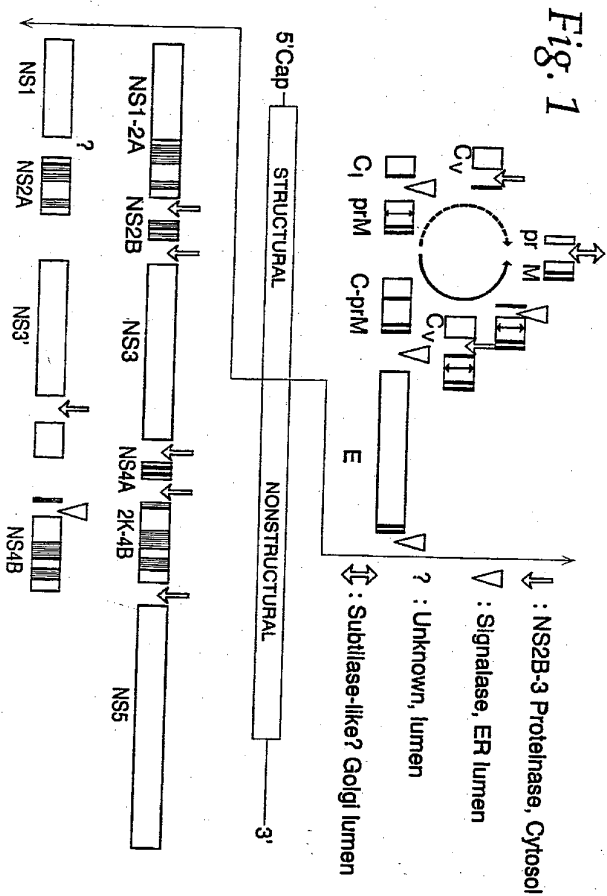
PCT/US02/10764

25. The method of claim 18, wherein the transcriptional unit encodes a signal sequence of Japanese encephalitis virus, and an M protein and an E protein of Powassan virus.
26. The method of claim 18, comprising administering the composition to the subject in a single dose.
27. The method of claim 18, wherein the composition is administered via a parenteral route.
28. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is a St. Louis encephalitis virus antigen.
29. The method of claim 18, wherein the antigen is a St. Louis encephalitis virus antigen.
30. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is a Japanese encephalitis virus antigen.
31. The method of claim 18, wherein the antigen is a Japanese encephalitis virus antigen.
32. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is a yellow fever virus antigen.
33. The method of claim 18, wherein the antigen is a yellow fever virus antigen.
34. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is a dengue virus antigen.
35. The method of claim 18, wherein the antigen is a dengue virus antigen.
36. The nucleic acid of claim 1, wherein the antigen is a West Nile virus antigen.

WO 02/081754

PCT/US02/10764

37. The method of claim 18, wherein the antigen is a West Nile virus antigen.
38. An antigen produced from the nucleic acid of claim 1.
39. A method of detecting a flavivirus antibody in a sample, comprising:
(a) contacting the sample with the antigen of claim 38 under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and
(b) detecting antigen/antibody complex formation, thereby detecting a flavivirus antibody in the sample.
40. An antibody produced in response to immunization by the antigen of claim 38.
41. A method of detecting a flavivirus antigen in a sample, comprising:
(a) contacting the sample with the antibody of claim 40 under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and
(b) detecting antigen/antibody complex formation, thereby detecting a flavivirus antigen in a sample.
42. A method of diagnosing a flavivirus infection in a subject, comprising:
(a) contacting a sample from the subject with the antigen of claim 38 under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and
(b) detecting antigen/antibody complex formation, thereby diagnosing a flavivirus infection in a subject.
43. A method of diagnosing a flavivirus infection in a subject, comprising:
(a) contacting a sample from the subject with the antibody of claim 40 under conditions whereby an antigen/antibody complex can form; and
(b) detecting antigen/antibody complex formation, thereby diagnosing a flavivirus infection in a subject.



WO 02/081754

2/8

PCT/US02/10764

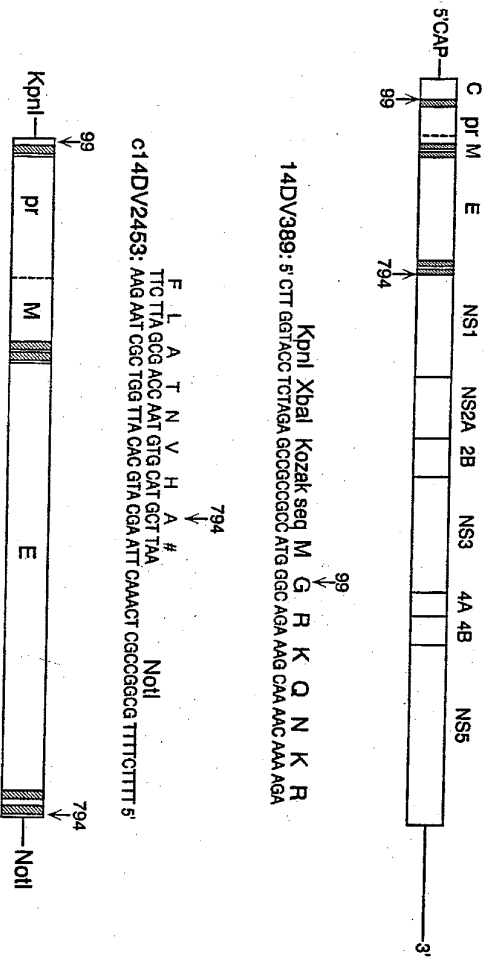


Fig. 2

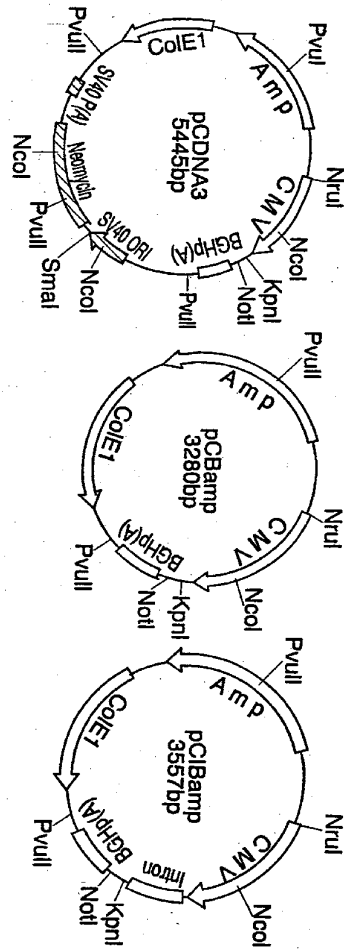
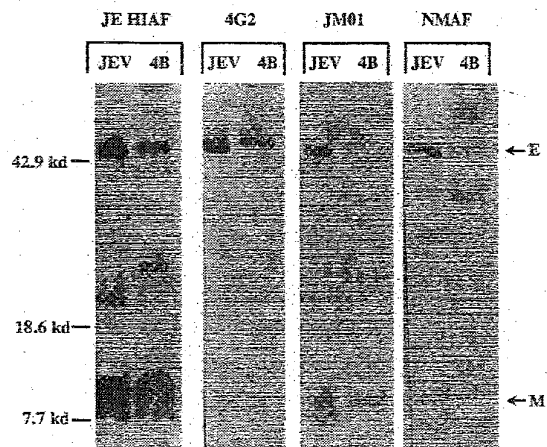


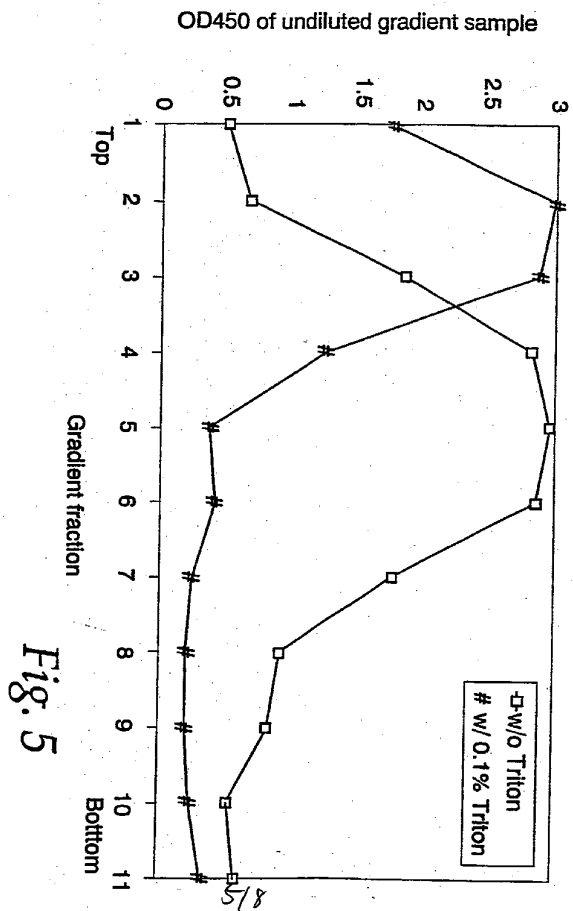
Fig. 3

WO 02/081754

4/8

PCT/US02/10764

**Fig. 4**



WO 02/081754

PCT/US02/10764

6/8

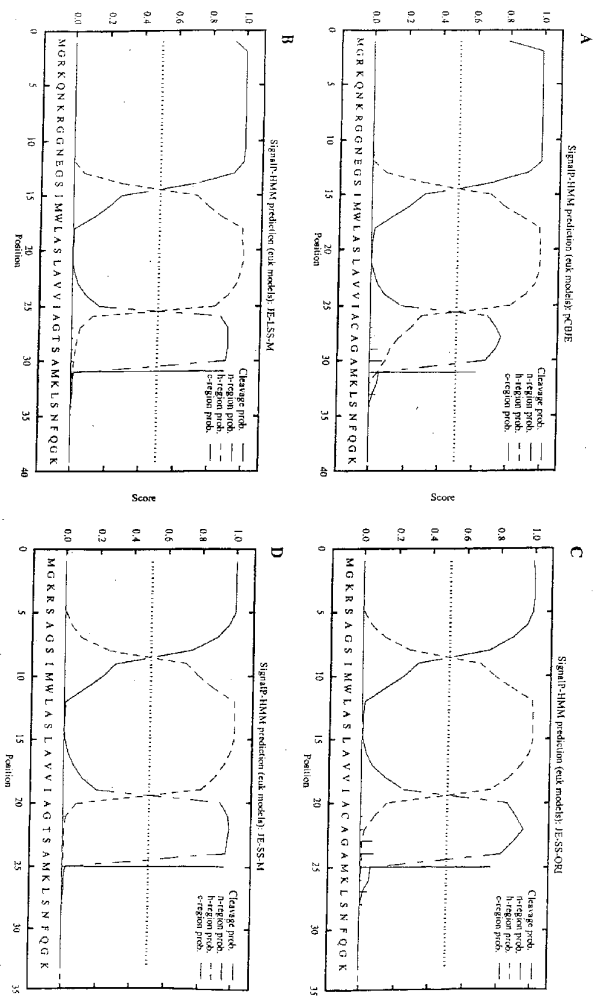


FIG. 6

WO 02/081754

PCT/US02/10764

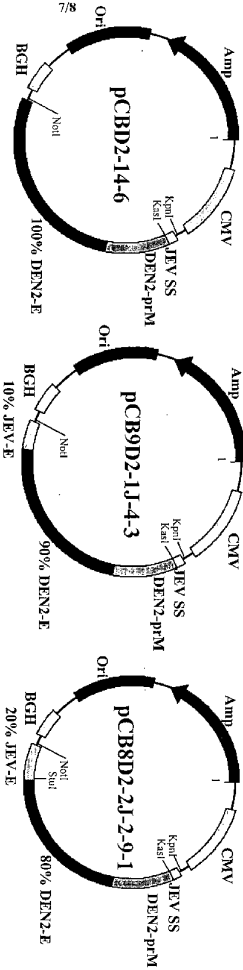


FIG. 7

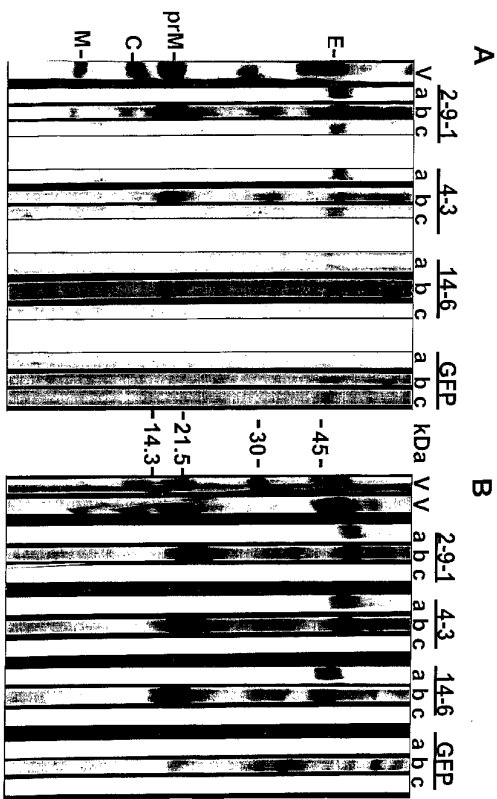


FIG. 8

WO 02/081754

PCT/US02/10764

SEQUENCE LISTING

<110> The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services, c/o Centers for Disease Control and Prevention

Chang, Gwong-Jen J

<120> Nucleic Acid Vaccines for Prevention of Flavivirus Infection

<130> 14114.0332P2

<150> 09/826,115

<151> 2001-04-04

<150> 09/701,536

<151> 2000-11-29

<150> PCT/US99/12298

<151> 1999-06-03

<150> 60/087,908

<151> 1998-06-04

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS

<222> (25)...(48)

<221> misc_feature

<222> 1-48

<223> Amplimer 14DV389

<400> 1

cttggtacct ctagagccgc cgcc atg ggc aga aag caa aac aaa aga 48
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<400> 2
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg
1 5

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-50
<223> Amplimer c14DV2453

<400> 3
tttttttttg cggcgcgtca aacttaagca tgcacattgg tcgctaagaa 50

<210> 4
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (25)...(48)

<221> misc_feature
<222> (1)...(48)
<223> Amplimer YFDV389

<400> 4
cttggtacct cttagagccgc cgcc atg cgt tcc cat gat gtt ctg act 48
Met Arg Ser His Asp Val Leu Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 5
Met Arg Ser His Asp Val Leu Thr
1 5

<210> 6
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-41
<223> Amplimer cYFDV2452

<400> 6
ttttcttttg cggccgctca cgcaccaact cctagagaaa c 41

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (25)...(54)

<221> misc_feature
<222> 1-54
<223> Amplimer SLEDV410

<400> 7
cttggtacct ctagagcgcg cgcc atg tct aaa aaa aga gga ggg acc aga 51
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 8
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1 5

<210> 9
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-38
<223> Amplimer cSLEDV2449

<400> 9
ttttcttttg cggccgctta ggcctgcaag ctggttgc 38

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

<210> 10
<211> 7500
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (916)...(3009)

<221> misc_feature
<222> 1-7500
<223> pCDJB 2-7

<400> 10
gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtagactct cagtacaatc tgcctgatg    60
cgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gactagtgcg    120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcacg aagaatctgc    180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt    240
gattattgac tagttattaa tagtaataaa ttacggggtc attagtccat agcccatata    300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgacgc cccaacgacc    360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccataa gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taatggccc gcttggcatt    540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca    600
tcgtattac catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcgggttg    660
actcacgggg atttccaagt ccccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcaac    720
aaatcaacg gacttttcca aaatgtcgta acaactcgcg cccattgacg caaatggggg    780
gtaggcgtgt acggtggggg gtctatataa gcagagctct ctggctaacg agagaaccca    840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatcaga ctactatag ggagacccaa gcttgggtacc    900
gagctcgccg ccgcc atg gcc aga aag caa aac aaa aga gga gga aat gaa    951
          Met Gly Arg Lys  Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu
                1             5             10

ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gcg    999
Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala
          15             20             25

gga gcc atg aag ttg tcg aat ttc cag ggg aag ctt ttg atg acc atc    1047
Gly Ala Met Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile
          30             35             40

aac aac acg gac att gca gac gtt atc gtg att ccc acc tca aaa gga    1095
Asn Asn Thr Asp Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly
          45             50             55

gag aac aga tgc tgg gtc cgg gca atc gac gtc ggc tac atg tgt gag    1143
Glu Asn Arg Cys Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu
          60             65             70             75

gac act atc acg tac gaa tgt cct aag ctt acc atg ggc aat gat cca    1191
Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro
          80             85             90

gag gat gtg gat tgc tgg tgt gac aac caa gaa gtc tac gtc caa tat    1239
Glu Asp Val Asp Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr
          95             100             105

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gga cgg tgc acg cgg acc agg cat tcc aag cga agc agg aga tcc gtg Gly Arg Cys Thr Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val 110 115 120	1287
tgg gtc caa aca cat ggg gag agt tca cta gtg aat aaa aaa gag gct Ser Val Gln Thr His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala 125 130 135 140	1335
tgg ctg gat tca acg aaa gcc aca cga tat ctc atg aaa act gag aac Trp Leu Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn 145 150 155	1383
tgg atc ata agg aat cct gcc tat gct ttc ctg gcg gcg gta ctt gcc Trp Ile Ile Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly 160 165 170	1431
tgg atg ctt gcc agt aac aac ggt caa cgc gtg gta ttt acc atc ctc Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu 175 180 185	1479
ctg ctg ttg gtc gct ccg gct tac agt ttt aat tgt ctg gga atg gcc Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly 190 195 200	1527
aat cgt gac ttc ata gaa gga gcc agt gga gcc act tgg gtg gac ttg Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu 205 210 215 220	1575
gtg ctg gaa gga gat agc tgc ttg aca atc atg gca aac gac aaa cca Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro 225 230 235	1623
aca ttg gac gtc cgc atg att aac atc gaa gct agc caa ctt gct gag Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu 240 245 250	1671
gtc aga agt tac tgc tat cat gct tca gtc act gac atc tcg acg gtg Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val 255 260 265	1719
gct cgg tgc ccc acg act gga gaa gcc cac aac gag aag cga gct gat Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp 270 275 280	1767
agt agc tat gtg tgc aaa caa gcc ttc act gac cgt ggg tgg gcc aac Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn 285 290 295 300	1815
gga tgt gga ctt ttc ggg aag gga agc att gac aca tgt gca aaa ttc Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe 305 310 315	1863
tcc tgc acc agt aaa gcg att ggg aga aca atc cag cca gaa aac atc Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile 320 325 330	1911
aaa tac gaa gtt gcc att ttt gtg cat gga acc acc act tcg gaa aac Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn 335 340 345	1959

WO 02/081754

PCT/US02/10764

cat ggg aat tat tca gcg caa gtt ggg gcg tcc cag gcg gca aag ttt His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe 350 355 360	2007
aca gta aca ccc aat gct cct tcg ata acc ctc aaa ctt ggt gac tac Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr 365 370 375	2055
gga gaa gtc aca ctg gac tgt gag cca agg agt gga ctg aac act gaa Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu 385 390 395	2103
gcg ttt tac gtc atg acc gtg ggg tca aag tca ttt ctg gtc cat agg Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg 400 405 410	2151
gag tgg ttt cat gac ctc gct ctc ccc tgg acg tcc cct tcg agc aca Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr 415 420 425	2199
gcg tgg aga aac aga gaa ctc ctc atg gaa ttt gaa gag gcg cac gcc Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala 430 435 440	2247
aca aaa cag tcc gtt gtt gct ctt ggg tca cag gaa gga ggc ctc cat Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His 445 450 455 460	2295
cag gcg ttg gca gga gcc atc gtg gtg gag tac tca agc tca gtg aag Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys 465 470 475	2343
tta aca tca ggc cac ctg aaa tgt agg ctg aaa atg gac aaa ctg gct Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala 480 485 490	2391
ctg aaa ggc aca acc tat ggc atg tgt aca gaa aaa ttc tcg ttc gcg Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala 495 500 505	2439
aaa aat ccg gcg gac act ggt cac gga aca gtt gtc att gaa ctc tcc Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser 510 515 520	2487
tac tct ggg agt gat gcc ccc tgc aaa att ccg att gct tcc gtt gcg Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala 525 530 535 540	2535
agc ctc aat gac atg acc ccc gtt ggg cgg ctg gtg aca gtg aac ccc Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro 545 550 555	2583
ttc gtc gcg act tcc agt gcc agc tca aag gtg ctg gtc gag atg gaa Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu 560 565 570	2631
ccc ccc ttc gga gac tcc tac atc gta gtt gga agg gga gac aag cag Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln 575 580 585	2679

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

atc aac cac cat tgg cac aaa gct gga agc acg ctg ggc aag gcc ttt 2727
Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe
590 595 600

tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca ggc ttg ggc gac aca 2775
Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr
605 610 615

gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata gga aaa 2823
Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys
625 630 635

gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt ggg gga 2871
Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
640 645 650

atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc tgg atg 2919
Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met
655 660 665

ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta gcc aca 2967
Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
670 675 680

ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct taa 3009
Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala *
685 690 695

ttagtttgag cggcgcctcg agcatgcato tagaggggccc tattctatag tgcacccaa 3059
atgctagagc tcgctgatca gctcgcactg tgcctctatg ttgccagcca tctgttgttt
3129
gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccttgg aaggagccac tcccaactgc ctctctaat
3189
aaaatgagga aattgcacg cattgctga gtagtgta tctctctctg ggggggggg 3249
tgggpcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg
3309
tgggctctat gcttctctag gggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccag 3369
cgccctgtag cggcgacatta agcgcgggg gtgtgtgtgt tacgcgcagc gtgacgccta
3429
caactgcagc cgccttagcg ccgcctctct togtttctct ccttctctct ctgcgcacgt
3489
tcgcgggctt tcccgtctaa gctctaaatc ggggcacccc tttaggggtc cgatttagtg
3549
ctttacggca cctgcacccc aaaaaacttg attagggtga tgggtcacgt agtgggcat
3609
cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac
3669
tctgtttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatttataag
3729
ggattttggg gatttcggcc tattggttaa aanaatgagct gatttaacaa aaatttaacg
3789
cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggttgga aagtcocccag gctcccccag
3849
caggcagaag tatgcaaaagc atgcactctca attagtcagc aaccagggtg ggaagtcctc
3909
caggctcccc agcaggcaga agtatgcata gcatgcactc caatttagta gcaacctag
3969
tcccgcctct aactgcgcc atccgcgcc taactgcgcc cagttgcgcc catctcgc
4029
cccatggctg actaattttt ttattttatg cagaagccga ggcgcctct cctctgagc
4089
tattccagaa gtatgtagga ggttttttg gaggctcagg cttttgaaa aagtcocccg
4149
gagcttgtat atccattttc ggatctgato aagagacagg atgaggatcg ttctgcata
4209
tgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggt
4269
atgactgggc acaacagaca atcggtgct ctgatgcgc cgtgttcgg ctgtcagcgc
4329
aggggcgcgc ggttcttttt gtaagacgc acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg
4389
acgaggcagc gggctatcg tggctggcca cgacggcggt tcttgcgca gctgtgctcg
4449
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgcatttgg cgaagtgcg gggcaggatc
4509
tctgtcaco tcaacttgct cctgcgcaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc
4569
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattgcacca ccaagcgaaa catcgcatcg
4629
agcgagcacg tactcgatg gaagccggtc ttgtogata ggaatgatcg gaagaagagc
4689
atcaggggct cgcgcagcgc gaactgttgc ccaggtctaa ggcgcgcagc cccgacggcg
4749
aggtctcgt cgtgacccat ggcgatgct gctgcgcga tctatgtgt gaaatggc
4809
gctttcttg atctatgac tgggcggg cggcgctat caggacatag
4869
cgttgctac cgtgatatt gctgaagac ttggcggga atgggctgac cgttctctc
4929
tgctttacgg tatcgccgct ccgatttgc agcgcacgc ctctatcgc cttcttgag
4989

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 5049
atcacgagat ttcgattcca cgcgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 5109
cggggagccc ggctggatga tcttcagcgg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 5169
ccccaaattg ttatttgtag ctataaatgg ttacaaataa agcaatagca tcaaaaattt 5229
caaaaaataa gcattttttt cactgcattc tagttgtggg ttgicccaaac tcaataatgt 5289
atctatacat gtcgtatcac cgtgcacctc tagctagagg ttggcgtaat catggtcata 5349
gtgtgttctt gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaataaac gaggcggaag 5409
cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt agtgagctaa ctacattaa ttgcgttcg 5469
ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca 5529
acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgtcttcc gcttcctcgc tcactgactc 5589
gctgcgctcg gtctgttcgg tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaaag cggtaatacg 5649
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 5709
ggccagggaac cgtaaaaagg cgcggttgct ggcgtttttc cataggctcc gcccccctga 5769
agacgatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggca aaccggacag gactataaag 5829
ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cccgtccgct 5889
taaccgagac ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgt ggcgtttctc aatgctcag 5949
cgttaggtat ctcagttcgg ttaggttcgt tgcgtccaa cttgggtgtg tgcacgaacc 6009
ccccgttcag cccgacccgt ggccttctc cgttaactat cgtcttgagt caaacccggt 6069
aagacacgac ttatgcgcac tggcagcagc cactgttaac aggtattgca gacagagta 6129
tgtaggcgtt gctacagagt tcttgaaagt gggcctaac tatcggtaca ctagaaggac 6189
agttatttgt atctgcgctc tgcgtgaagg agttaccttc ggaataaagg ttggtagctc 6249
ttgatccggc aaacaaccca cgcgttgtag cgtgtgtttt ttgttttga agcagcagat 6309
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcttttgatc ttctctacgg ggtctgacgc 6369
tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat ttgtgtcatg agattatcaa aaaggatctt 6429
cacttagatc cttttaattt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatagta 6489
aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagttaggca cctatctcag cgaatctgtc 6549
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttgag ataactcaga taaggaggag 6609
ctaccatctt ggccccagtg ctgcaatgat acccgagagc ccacgtcac cggctccaga 6669
tttatcagca ataaaccagc cagccgggaag ggcggagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 6729
atccgcctcc atccagctca ttaattgttg cgggaaagct agagtaagta gttgcagct 6789
taatatgttg cgcacagttg ttgcatttgc tacaggcctc gtggtgtcac gctcgtcgll 6849
tggtatggct tcatcagct cgggttcoca agatcaagg cgaattacat gatccccat 6909
gtgtgcgaaa aaagcggtta gctccttcgg tctcctgact gttgtcagaa gtaagtggc 6969
cgcagtggtta cactcatggt ttatggcagc actgcataat tctcttactg caatgcatc 7029
cgtaaagtgc ttttctgtga ctggttgatg ctaaccgaag tcattctgag aatagtgtat 7089
ggcgcgacgc agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag 7149
aactttaaaa gtgctcatca ttggaatacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt 7209
accgctgttg agatccagtt cgaatgaacc cactcgtgca ccaactgat cttcagcctc 7269
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcataatg ccgcaaaaaa 7329
gggaataaag gcgacacgga aatgttgat atctactcct ttctttttc aatattattg 7389
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata ttgnaatga tttagaaaaa 7449
taacaaaata ggggttcgcg gcacatttcc ccgaaaagtg ccactctgag t 7500

```

<210> 11

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<223> pCDNF 2-7

<400> 11

```

Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu Gly Ser Ile Met
1      5      10      15
Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met Lys
20     25     30
Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile Asn Asn Thr Asp
35     40     45

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly Glu Asn Arg Cys
50      55      60
Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu Asp Thr Ile Thr
65      70      75      80
Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro Glu Asp Val Asp
85      90      95
Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr Gly Arg Cys Thr
100     105     110
Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val Ser Val Gln Thr
115     120     125
His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala Trp Leu Asp Ser
130     135     140
Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn Trp Ile Ile Arg
145     150     155     160
Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly Trp Met Leu Gly
165     170     175
Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu Leu Leu Val
180     185     190
Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe
195     200     205
Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly
210     215     220
Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val
225     230     235     240
Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr
245     250     255
Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro
260     265     270
Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val
275     280     285
Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu
290     295     300
Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser
305     310     315     320
Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val
325     330     335
Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr
340     345     350
Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro
355     360     365
Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr
370     375     380
Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val
385     390     395     400
Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His
405     410     415
Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn
420     425     430
Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser
435     440     445
Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala
450     455     460
Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly
465     470     475     480
His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr
485     490     495
Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala
500     505     510
Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser
515     520     525

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp
 530 535 540
 Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr
 545 550 555 560
 Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly
 565 570 575
 Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His
 580 585 590
 Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu
 595 600 605
 Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
 610 615 620
 Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln
 625 630 635 640
 Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile
 645 650 655
 Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala
 660 665 670
 Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu
 675 680 685
 Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 690 695

<210> 12
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1-46
 <223> WN 466

<400> 12
 cttggtaccc gtctcggcgc cgtgaccctc tcgaacttcc agggca 46

<210> 13
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1-43
 <223> CWN2444

<400> 13
 agaggcactt gcaogtgcgg acttccgcgc gcgaaaaaga aaa 43

<210> 14
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<223> JE Signal

<400> 14
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1             5             10             15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala
 20

<210> 15
<211> 5308
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (911)...(2987)

<221> misc_feature
<222> (1)...(5308)
<223> pCBMN

<400> 15
gacggatcgg gagatctccc gatcccccctat ggtgcactct cagtacaatc tgcctctgatg    50
ccgcatagttc Aagccagtat ctgctccctg ctctgtgtgtt ggaggtcgtc gactagctga    120
cagcacaatat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcag aagaatctgc    180
ttaagggttag cgttttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt    240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata    300
tggagtctccg cgttacataa cttaacgtta atggcccgcc tggctgacgg cccaacgacc    360
ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaaata gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggag tatttaccgtt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt    540
atgccacgta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca    600
tcgctattac catggtgatg cgggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcgtttt    660
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac    720
caaaatcaac gggactttcc aaatgtcgt aacaactccg ccccatggac gcaaatgggc    780
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct    840
actgcttact ggcttatcga anttaatacg actcactata gggagaccca agcttgggtac    900
cgccgccgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc ggg    949
          Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala
          1             5             10

agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc gtg acc ctc tcg aac    997
Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn
 15             20             25

ttc cag ggc aag gtg atg atg acg gta aat gct act gac gtc aca gat    1045
Phe Gln Gly Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp
 30             35             40             45

gtc atc acg att cca aca gct gct gga aag aac cta tgc att gtc aga    1093
Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg
 50             55             60

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gca atg gat gtg gga tac atg tgc gat gat act atc act tat gaa tgc Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys 65 70 75	1141
cca gtg ctg tgg gct ggt aat gat cca gaa gac atc gac tgt tgg tgc Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys 80 85 90	1189
aca aag tca gca gtc tac gtc agg tat gga aga tgc acc aag aca cgc Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg 95 100 105	1237
cac tca aga cgc agt cgg agg tca ctg aca gtg cag aca cac gga gaa His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu 110 115 120 125	1285
agc act cta ggc aac aag aag ggg gct tgg atg gac agc acc aag gcc Ser Thr Leu Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala 130 135 140	1333
aca agg tat ttg gta aaa aca gaa tca tgg atc ttg agg aac cct gga Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly 145 150 155	1381
tat gcc ctg gtg gca gcc gtc att ggt tgg atg ctt ggg agc aac acc Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr 160 165 170	1429
atg cag aga gtt gtg ttt gtc gtg cta ttg ctt ttg gtg gcc cca gct Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala 175 180 185	1477
tac agc ttc aac tgc ctt gga atg agc aac aga gac ttc ttg gaa gga Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly 190 195 200 205	1525
gtg tct gga gca aca tgg gtg gat ttg gtt ctc gaa ggc gac agc tgc Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys 210 215 220	1573
gtg act atc atg tct aag gac aag cct acc atc gat gtg aag atg atg Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met 225 230 235	1621
aat atg gag ggc gcc aac ctg gca gag gtc cgc agt tat tgc tat ttg Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu 240 245 250	1669
gct acc gtc agc gat ctc tcc acc aaa gct ggc tgc ccg acc atg gga Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly 255 260 265	1717
gaa gct cac aat gac aaa cgt gct gac cca gct ttt gtg tgc aga caa Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln 270 275 280 285	1765
gga gtg gtg gac agg ggc tgg ggc aac ggc tgc gga cta ttt ggc aaa Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys 290 295 300	1813

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gga agc att gac aca tgc gcc aaa ttt gcc tgc tct acc aag gca ata Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile 305 310 315	1861
gga aga acc atc ttg aaa gag aat atc aag tac gaa gtg gcc att ttt Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe 320 325 330	1909
gtc cat gga cca act act gtg gag tcg cac gga aac tac tcc aca cag Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln 335 340 345	1957
gtt gga gcc act cag gca ggg aga ttc agc atc act cct gcg gcg cct Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro 350 355 360 365	2005
tca tac aca cta aag ctt gga gaa tat gga gag gtg aca gtg gac tgt Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys 370 375 380	2053
gaa cca cgg tca ggg att gac acc aat gca tac tac gtg atg act gtt Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val 385 390 395	2101
gga aca aag acg ttc ttg gtc cat cgt gag tgg ttc atg gac ctc aac Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn 400 405 410	2149
ctc cct tgg agc agt gct gga agt act gtg tgg agg aac aga gag acg Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr 415 420 425	2197
tta atg gag ttt gag gaa cca cac gcc acg aag cag tct gtg ata gca Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala 430 435 440 445	2245
ttg ggc tca caa gag gga gct ctg cat caa gct ttg gct gga gcc att Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile 450 455 460	2293
cct gtg gaa ttt tca agc aac act gtc aag ttg acg tcg ggt cat ttg Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu 465 470 475	2341
aag tgt aga gtg aag atg gaa aaa ttg cag ttg aag gga aca acc tat Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr 480 485 490	2389
ggc gtc tgt tca aag gct ttc aag ttt ctt ggg act ccc gcg gac aca Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr 495 500 505	2437
ggt cac ggc act gtg gtg ttg gaa ttg cag tac act ggc acg gat gga Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly 510 515 520 525	2485
cct tgc aaa gtt cct atc tcg tca gtg gct tca ttg aac gac cta acg Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr 530 535 540	2533

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

cca gtg ggc aga ttg gtc act gtc aac cct ttt gtt tca gtg gcc acg      2581
Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr
      545                      550                      555

gcc aac gct aag gtc ctg att gaa ttg gaa cca ccc ttt gga gac tca      2629
Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser
      560                      565                      570

tac ata gtg gtg ggc aga gga gaa caa cag atc aat cac cat tgg cac      2677
Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His
      575                      580                      585

aag tct gga agc agc att ggc aaa gcc ttt aca acc acc ctc aaa gga      2725
Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly
      590                      595                      600                      605

gcg cag aga cta gcc gct cta gga gac aca gct tgg gac ttt gga tca      2773
Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser
      610                      615                      620

gtt gga ggg gtg ttc acc tca gtt ggg aag gct gtc cat caa gtg ttc      2821
Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe
      625                      630                      635

gga gga gca ttc cgc tca ctg ttc gga ggc atg tcc tgg ata acg caa      2869
Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln
      640                      645                      650

gga ttg ctg ggg gct ctc ctg ttg tgg atg ggc atc aat gct cgt gat      2917
Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp
      655                      660                      665

agg tcc ata gct ctc acg ttt ctc gca gtt gga gga gtt ctg ctc ttc      2965
Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe
      670                      675                      680                      685

ctc tcc gtg aac gtg cac gcc t gaaggcgcc gctcagcat gcctctagag      3017
Leu Ser Val Asn Val His Ala
      690

ggccctatcc tatagtgtca cctaaatgct agagctcgct gatcagcctc gactgtgctt      3077
tctagtgtgc agcctctgtt tgtttgcccc tcccccgctc cttccttgac cctggaaggt
      3137
gccactccca ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg catcgcatig tctgagttagg      3197
tgtcattcta ttctgggggg tgggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac
      3257
aatagcaggc atgtggggga tgggggtgggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccacg
      3317
tgcattaatg aatcgggcaa cgcgcgggga gaggcggttt gctattggg cgtctctcgg
      3377
cttctcgtct cactgactcg ctgcgctcgg tegtctgggt ggggcgagcg gtatcagctc
      3437
actcaaaagg ggtaatacyg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt
      3497
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttctgt cgttttttcc
      3557
ataggctcgg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgagc ctcaagtctg aggtggcgaa
      3617
accgcacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc
      3677
ctgttccgac cctgcgcttt accggatacc tgtccgcttt tctcctctcg ggaagcgtgg
      3737
cgctttctca tagctcagcg tgtaggtatc ttagttcggg gtaggctggt cgtcccaagc
      3797
tgggctgtgt gaacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggttaactatc
      3857
gtcttgagtc caaccgggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca
      3917
ggatttagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact
      3977
acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgggtctt gctgaagcca gttaccttgg
      4037
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca acaaaacac cgtctgttagc ggtggtttt
      4097
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct
      4157
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcagc ttaagggaatt ttggtcatga
      4217
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa
      4277

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

tctaaagat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 4337
ctactcagc gatctgtcta ttctgttcac coatagttgc ctgaactccc gtcgtgtaga 4397
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtyc tgcattgata ccgagagacc 4457
cagctcacc ggtccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccgggaag ccgagagcca 4517
gaagtgttc tgcacttta tccgctcca tccagrtat taattgtgc cgggaagcta 4577
gagtaagtag ttgcacagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgcattgtct acaggaatcg 4637
tgggttcacg ctctgtgttt ggtatggcct cattcagctc cggttcccaa cgaacaggc 4697
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcoggt cctcagatcg 4757
ttgtcagaag taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 4817
ctcttaactgt catgccatcc gtaagatgct ttctgtgtac tgggtgagta ccaaccaagt 4877
cattctgaga atagtgtatg cggcgacrga gttgtctttg ccggcgctca atacgggata 4937
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 4997
gaaaactctc aaggatctta ccgtgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac 5057
ccaactgac ttacagatct ttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa 5117
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatatct 5177
tctttttca atattattga agcatttata agggttatg tctcatgagc ggatacatat 5237
tggatgtat ttagaanaat anacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc 5297
cacttgacgt c 5308

```

<210> 16

<211> 692

<212> FRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<223> pCBMN

<400> 16

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1      5      10      15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly
20     25     30
Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr
35     40     45
Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp
50     55     60
Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu
65     70     75     80
Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser
85     90     95
Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg
100    105    110
Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu
115    120    125
Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr
130    135    140
Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu
145    150    155    160
Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg
165    170    175
Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe
180    185    190
Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly
195    200    205
Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile
210    215    220
Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu
225    230    235    240

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val
 245 250 255
 Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His
 260 265 270
 Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val
 275 280 285
 Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile
 290 295 300
 Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly
 325 330 335
 Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala
 340 345 350
 Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg
 370 375 380
 Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp
 405 410 415
 Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu
 420 425 430
 Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser
 435 440 445
 Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu
 450 455 460
 Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Val Lys Met Glu Lys Leu Glu Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys
 485 490 495
 Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly
 500 505 510
 Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys
 515 520 525
 Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly
 530 535 540
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
 545 550 555 560
 Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 565 570 575
 Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly
 580 585 590
 Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg
 595 600 605
 Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 610 615 620
 Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
 625 630 635 640
 Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu
 645 650 655
 Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile
 660 665 670
 Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val
 675 680 685
 Asn Val His Ala
 690

<210> 17
 <211> 5334

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (916)...(3007)

<221> misc_feature
<222> (1)...(5334)
<223> pCBJE 1-14

<400> 17
gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtgcactct cagtacaatc tgcctctgatg    60
cgcacatagtt aagccagtat ctgctccctg ctctgctgtt ggaggtcgt gagtagtgg    120
cagcacaatt ttaagctaac acaaggcaag gcttgaccca caattgcatg aagaatctgc    180
ttaggggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt    240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata    300
tggagtcccg cgttacataa cttaacgtaa atggcccgcc tggctgacgc cccaacgacc    360
cccgcccatl gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taantggccc gcttgacatt    540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca    600
tcgctattac catggtgatg cgggttttgc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg    660
actcacgggg atttccnagt ctcccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc    720
aaaatcaacg ggaactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggggc    780
gtaggcgtgt acggtggggg gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagAACCCA    840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctacatlag ggaagcccaa gcttggtacc    900
tctagagccg ccgcc atg ggc aga aag caa aac aaa aga gga gga aat gaa    951
          Met Gly Arg Lys   Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu
              1             5             10

ggc tca atc atg tgg etc gcg agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gcg    999
Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala
          15             20             25

gga gcc atg aag ttg tgg aat ttc cag ggg aag ctt ttg atg acc atc    1047
Gly Ala Met Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile
          30             35             40

aac aac acg gac att gca gac gtt atc gtg att ccc acc tca aaa gga    1095
Asn Asn Thr Asp Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly
          45             50             55

gag aac aga tgc tgg gtc cgg gca atc gac gtc ggc tac atg tgt gag    1143
Glu Asn Arg Cys Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu
          65             70             75

gac act atc acg tac gaa tgt cct aag ctt acc atg ggc aat gat cca    1191
Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro
          80             85             90

gag gat gtg gat tgc tgg tgt gac aac caa gaa gtc tac gtc caa tat    1239
Glu Asp Val Asp Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr
          95             100             105

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gga cgg tgc acg cgg acc agg cat tcc aag cga agc agg aga tcc gtg Gly Arg Cys Thr Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val 110 115 120	1287
tcg gtc caa aca cat ggg gag agt tca cta gtg aat aaa aaa gag gct Ser Val Gln Thr His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala 125 130 135 140	1335
tgg ctg gat tca acg aaa gcc aca cga tat ctc atg aaa act gag aac Trp Leu Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn 145 150 155	1383
tgg atc ata agg aat cct gcc tat gct ttc ctg gcg gcg gta ctt ggc Trp Ile Ile Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly 160 165 170	1431
tgg atg ctt gcc agt aac aac ggt caa cgc gtg gta ttt acc atc ctc Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu 175 180 185	1479
ctg ctg ttg gtc gct cgg gct tac agt ttt aat tgt ctg gga atg ggc Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly 190 195 200	1527
aat cgt gac ttc ata gaa gga gcc agt gga gcc act tgg gtg gac ttg Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu 205 210 215 220	1575
gtg ctg gaa gga gat agc tgc ttg aca atc atg gca aac gac aaa cca Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro 225 230 235	1623
aca ttg gac gtc cgc atg att aac atc gaa gct agc caa ctt gct gag Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu 240 245 250	1671
gtc aga agt tac tgc tat cat gct tca gtc act gac atc tcg acg gtg Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val 255 260 265	1719
gct cgg tgc ccc acg act gga gaa gcc cac aac gag aag cga gct gat Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp 270 275 280	1767
agt agc tat gtg tgc aaa caa gcc ttc act gac cgt ggg tgg ggc aac Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn 285 290 295 300	1815
gga tgt gga ctt ttc ggg aag gga agc att gac aca tgt gca aaa ttc Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe 305 310 315	1863
tcc tgc acc agt aaa gcg att ggg aga aca atc cag coa gaa aac atc Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile 320 325 330	1911
aaa tac gaa gtt ggc att ttt gtg cat gga acc acc act tcg gaa aac Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn 335 340 345	1959

WO 02/081754

PCT/US02/10764

cat ggg aat tat tca gcg caa gtt ggg gcg tcc cag gcg gca aag ttt His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe 350 355 360	2007
aca gta aca ccc aat gct cct tcg ata acc ctc aaa ctt ggt gac tac Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr 365 370 375	2055
gga gaa gtc aca ctg gac tgt gag cca agg agt gga ctg aac act gaa Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu 385 390 395	2103
gcg ttt tac gtc atg acc gtg ggg tca aag tca ttt ctg gtc cat agg Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg 400 405 410	2151
gag tgg ttt cat gac ctc gct ctc ccc tgg acg tcc cct tcg agc aca Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr 415 420 425	2199
gcg tgg aga aac aga gaa ctc ctc atg gaa ttt gaa gag gcg cac gcc Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala 430 435 440	2247
aca aaa cag tcc gtt gtt gct ctt ggg tca cag gaa gga ggc ctc cat Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His 445 450 455 460	2295
cag gcg ttg gca gga gcc atc gtg gtg gag tac tca agc tca gtg aag Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys 465 470 475	2343
tta aca tca ggc cac ctg aaa tgt agg ctg aaa atg gac aaa ctg gct Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala 480 485 490	2391
ctg aaa ggc aca acc tat ggc atg tgt aca gaa aaa ttc tcg ttc gcg Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala 495 500 505	2439
aaa aat ccg gcg gac act ggt cac gga aca gtt gtc att gaa ctc tcc Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser 510 515 520	2487
tac tct ggg agt gat ggc ccc tgc aaa att ccg att gct tcc gtt gcg Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala 525 530 535 540	2535
agc ctc aat gac atg acc ccc gtt ggg cgg ctg gtg aca gtg aac ccc Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro 545 550 555	2583
ttc gtc gcg act tcc agt gcc agc tca aag gtg ctg gtc gag atg gaa Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu 560 565 570	2631
ccc ccc ttc gga gac tcc tac atc gta gtt gga agg gga gac aag cag Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln 575 580 585	2679

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

atc aac cac cat tgg cac aaa gct gga agc acg ctg ggc aag gcc ttt 2727
Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe
590 595 600

tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca gcg ttg ggc gac aca 2775
Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr
605 610 615

gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata gga aaa 2823
Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys
625 630 635

gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt ggg gga 2871
Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
640 645 650

atg tct tgg atc aca csa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc tgg atg 2919
Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met
655 660 665

ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta gcc aca 2967
Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
670 675 680

ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct t aattagtttg 3017
Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
685 690 695

agcggccgct cagcagatgca tctagagggc cctattctat agtgtcacct aaatgctaga 3077
gctgctgat cagctcgac tgtgcttct agttgcacgc catctgttgt ttgcccctcc 3137
ccctgtcctt ccttgacccct ggaaggtgco actccacactg tccctcccta ataaatgag 3197
gaaattgcat cgcattgtct gactagtggt cattctatcc tggggggtcg ggtggggcag 3257
gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggtctt 3317
atgctttctg aggcggaaaag aaccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3377
gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgtctggctg 3437
ttcgctgcgc gcgagcgcta tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaa 3497
cagggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3557
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgcagcag catcacaaaa 3617
atcgacgtcc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggant ataaagatac caggcgtttc 3677
ccctgggaag ctccctcgctg cgtctcctgt ttccgacctt gcggttacc ggatacctgt 3737
ccgcttttat cctctgggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca 3797
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gtccagcccg 3857
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa ccggttaaga cagacttat 3917
cgcacatggc agcagccact ggtaacagga tttagcagag gaggatgta ggcggtgtcta 3977
cagagttctt gagggtgttg ctaaacatcg gctacactag aagaaacgta ttgttatct 4037
ggcctctgct gaagcagttt accctcgga aagagagttg tagctcttga tccggcaaac 4097
aaacccacgc tggtagcggc ggtttttttg tttagcaaga gcagattacg cgcagaaaaa 4157
aaggatctca aagaatctct ttgatctttt ctacggygtc tgacgctcag tggaaacgaaa 4217
actcagctta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaaa gatcttcacc tagatccttt 4277
taaatataaa atgaattttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaac ttgtctgaca 4337
gttaaccaatg cttaatcagt gaggcaacct tctcagcgat ctgtctatatt cgtctatcca 4397
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggaagggtta ccatctggcc 4457
ccagtcctgc aatgataccg cgagaccacac gctcaccggc tccagattta tcaagcaata 4517
accagccagc cggaaaggcc gagcgacaga gtggtcctgc aactttatcc gctccatcc 4577
agtcattaaa ttgttcgccc gaagctagag taagtgttcc gccagttaat agtttgccca 4637
acgttgctgc cattgctaca ggcacgtggg tgtcacgctc gtggtttggt atggttcat 4697
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgata ccccatgttg tgcataaaag 4757
cggtagcttc cttcggtcct cgaatcgctg tcaagagtaa gttggcgca gtgttacac 4817
tcagtgttat ggaagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4877
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatcgcg cgaaccgagtt 4937
gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgcaca tagcagaact ttaaaagtgc 4997

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

tcacattgg aaaaagttct tgggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 5057
ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 5117
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaatgcccgc aaaaaagggg ataagggcga 5177
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 5237
gttatgtctc catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 5297
ttccggcac atttcccgga aaagtgcac ctgaagt 5334

```

<210> 18

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<223> pCBJE 1-14

<400> 18

```

Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu Gly Ser Ile Met
1      5      10      15
Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met Lys
20     25     30
Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile Asn Asn Thr Asp
35     40     45
Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly Glu Asn Arg Cys
50     55     60
Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu Asp Thr Ile Thr
65     70     75
Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro Glu Asp Val Asp
80     85     90
Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr Gly Arg Cys Thr
95     100    105
Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val Ser Val Gln Thr
110    115    120
His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala Trp Leu Asp Ser
125    130    135
Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn Trp Ile Ile Arg
140    145    150
Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly Trp Met Leu Gly
155    160    165
Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu Leu Leu Val
170    175    180
Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe
185    190    195
Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly
200    205    210
Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val
215    220    225
Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr
230    235    240
Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro
245    250    255
Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val
260    265    270
Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu
275    280    285
Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser
290    295    300
305    310    315
Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val
320    325    330

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr
340 345 350
Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro
355 360 365
Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr
370 375 380
Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val
385 390 395 400
Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His
405 410 415
Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn
420 425 430
Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser
435 440 445
Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala
450 455 460
Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly
465 470 475 480
His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr
485 490 495
Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala
500 505 510
Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser
515 520 525
Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp
530 535 540
Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr
545 550 555 560
Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly
565 570 575
Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His
580 585 590
Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu
595 600 605
Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
610 615 620
Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln
625 630 635 640
Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile
645 650 655
Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala
660 665 670
Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu
675 680 685
Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
690 695

<210> 19
<211> 5283
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (910)...(2965)

<400> 19
gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg 60

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgacgga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag cgtttttgcy ctgcttcgcy atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaataaa ctacgggggc attagttcat agccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttaaggtaa atggccggcc tgggtgacgc cccaacgacc 360
cccgccatt gaagtcata atgaagtatg ttcccatagt aacgccataa gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca ctggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gccctggcatt 540
atgcccaagta catgacctta tgggaatttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacaataa tggcggtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctcaccccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggaclttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg 780
gtaggcggtg acggtggggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaataga ctcactatag ggagacccaa gcttgggtacc 900
gccgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc 951
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
1 5 10

ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct acc acc atc cac cgg gac 999
Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Thr Thr Ile His Arg Asp
15 20 25 30

agg gaa gga tac atg gtt atg cgg gcc agt gga agg gac gct gca agc 1047
Arg Glu Gly Tyr Met Val Met Arg Ala Ser Gly Arg Asp Ala Ala Ser
35 40 45

cag gtc agg gta caa aac gga acg tgc gtc atc ctg gca aca gac atg 1095
Gln Val Arg Val Gln Asn Gly Thr Cys Val Ile Leu Ala Thr Asp Met
50 55 60

gga gag tgg tgt gaa gat tca atc acc tac tct tgc gtc acg att gac 1143
Gly Glu Trp Cys Glu Asp Ser Ile Thr Tyr Ser Cys Val Thr Ile Asp
65 70 75

cag gag gaa gaa ccc gtt gac gtg gac tgc ttc tgc cga ggt gtt gat 1191
Gln Glu Glu Glu Pro Val Asp Val Asp Cys Phe Cys Arg Gly Val Asp
80 85 90

agg gtt aag tta gag tat gga cgc tgt gga agg caa gct gga tct agg 1239
Arg Val Lys Leu Glu Tyr Gly Arg Cys Gly Arg Gln Ala Gly Ser Arg
95 100 105 110

ggg aaa agg tct gtg gtc att cca aca cat gca caa aaa gac atg gtc 1287
Gly Lys Arg Ser Val Val Ile Pro Thr His Ala Gln Lys Asp Met Val
115 120 125

ggg cga ggt cat gca tgg ctt aaa ggt gac aat att cga gat cat gtc 1335
Gly Arg Gly His Ala Trp Leu Lys Gly Asp Asn Ile Arg Asp His Val
130 135 140

acc cga gtc gag ggc tgg atg tgg aag aac aag ctt cta act gcc gcc 1383
Thr Arg Val Glu Gly Trp Met Trp Lys Asn Lys Leu Leu Thr Ala Ala
145 150 155

att gtg gcc ttg gct tgg ctc atg gtt gat agt tgg atg gcc aga gtc 1431
Ile Val Ala Leu Ala Trp Leu Met Val Asp Ser Trp Met Ala Arg Val
160 165 170

act gtc atc ctc ttg ggc ttg agt cta ggg cca gtg tac gcc acg agg 1479
Thr Val Ile Leu Leu Ala Leu Ser Leu Gly Pro Val Tyr Ala Thr Arg
175 180 185 190

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

tgc acg cat ctt gag aac aga gat ttt gtg aca gga act caa ggg acc Cys Thr His Leu Glu Asn Arg Asp Phe Val Thr Gly Thr Gln Gly Thr	1527
195 200 205	
acc aga gtg tcc cta gtt ttg gaa ctt gga ggc tgc gtg acc atc aca Thr Arg Val Ser Leu Val Leu Glu Leu Gly Gly Cys Val Thr Ile Thr	1575
210 215 220	
gct gag ggc aag cca tcc att gat gta tgg ctc gaa gac att ttt cag Ala Glu Gly Lys Pro Ser Ile Asp Val Trp Leu Glu Asp Ile Phe Gln	1623
225 230 235	
gaa agc ccg gct gaa acc aga gaa tac tgc ctg cac gcc aaa ttg acc Glu Ser Pro Ala Glu Thr Arg Glu Tyr Cys Leu His Ala Lys Leu Thr	1671
240 245 250	
aac aca aaa gtg gag gct cgc tgt cca acc act gga ccg gcg aca ctt Asn Thr Lys Val Glu Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Pro Ala Thr Leu	1719
255 260 265	
ccg gag gag cat cag gct aat atg gtg tgc aag aga gac caa agc gac Pro Glu Glu His Gln Ala Asn Met Val Cys Lys Arg Asp Gln Ser Asp	1767
275 280 285	
cgt gga tgg gga aac cac tgc ggg ttt ttt ggg aag ggc agt ata gtg Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Phe Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val	1815
290 295 300	
gct tgt gca aag ttt gaa tgc gag gaa gca aaa aaa gct gtg ggc cac Ala Cys Ala Lys Phe Glu Cys Glu Glu Ala Lys Lys Ala Val Gly His	1863
305 310 315	
gtc tat gac tcc aca aag atc acg tat gtt gtc aag gtt gag ccc cac Val Tyr Asp Ser Thr Lys Ile Thr Tyr Val Val Lys Val Glu Pro His	1911
320 325 330	
aca ggg gat tac ttg gct gca aat gag acc aat tca aac agg aaa tca Thr Gly Asp Tyr Leu Ala Ala Asn Glu Thr Asn Ser Asn Arg Lys Ser	1959
335 340 345 350	
gca cag ttt acg gtg gca tcc gag aaa gtg atc ctg ccg ctc ggc gac Ala Gln Phe Thr Val Ala Ser Glu Lys Val Ile Leu Arg Leu Gly Asp	2007
355 360 365	
tat gga gat gtg tgg ctg acg tgt aaa gtg gca agt ggg att gat gtc Tyr Gly Asp Val Ser Leu Thr Cys Lys Val Ala Ser Gly Ile Asp Val	2055
370 375 380	
gcc caa act gtg gtg atg tca ctc gac agc agc aag gac cac ctg cct Ala Gln Thr Val Val Met Ser Leu Asp Ser Ser Lys Asp His Leu Pro	2103
385 390 395	
tct gca tgg caa gtg cac cgt gac tgg ttt gag gac ttg gcg ctg ccc Ser Ala Trp Gln Val His Arg Asp Trp Phe Glu Asp Leu Ala Leu Pro	2151
400 405 410	
tgg aaa cac aag gac aac caa gat tgg aac agt gtg gag aaa ctt gtg Trp Lys His Lys Asp Asn Gln Asp Trp Asn Ser Val Glu Lys Leu Val	2199
415 420 425 430	

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gaa ttt gga cca cca cat gct gtg aaa atg gat gtt ttc aat ctg ggg Glu Phe Gly Pro Pro His Ala Val Lys Met Asp Val Phe Asn Leu Gly 435 440 445	2247
gac cag acg gct gtg ctg ctc aaa tca ctg gca gga gtt ccg ctg gcc Asp Gln Thr Ala Val Leu Leu Lys Ser Leu Ala Gly Val Pro Leu Ala 450 455 460	2295
agt gtg gag gcc cag aaa tac cac ctg aaa agc gcc cat gtt act tgt Ser Val Glu Gly Gln Lys Tyr His Leu Lys Ser Gly His Val Thr Cys 465 470 475	2343
gat gtg gga ctg gaa aag ctg aaa ctg aaa gcc aca acc tac tcc atg Asp Val Gly Leu Glu Lys Leu Lys Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Ser Met 480 485 490	2391
tgt gac aaa gca aag ttc aaa tgg aag aga gtt cct gtg gac agc gcc Cys Asp Lys Ala Lys Phe Lys Trp Lys Arg Val Pro Val Asp Ser Gly 495 500 505	2439
cat gac aca gta gtc atg gag gta tca tac aca gga agc gac aag cca His Asp Thr Val Val Met Glu Val Ser Tyr Thr Gly Ser Asp Lys Pro 515 520 525	2487
tgt cgg atc ccg gtg cgg gct gtg gca cat ggt gtc cca gcg gtt aat Cys Arg Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Val Pro Ala Val Asn 530 535 540	2535
gta gcc atg ctc ata acc ccc aat cca acc att gaa aca aat ggt gcc Val Ala Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile Glu Thr Asn Gly Gly 545 550 555	2583
gga ttc ata gaa atg cag ctg cca cca ggg gat aac atc atc tat gtg Gly Phe Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val 560 565 570	2631
gga gac ctt agc cag cag tgg ttt cag aaa gcc agt acc att ggt aga Gly Asp Leu Ser Gln Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Thr Ile Gly Arg 575 580 585	2679
atg ttt gaa aaa acc cgc agg gga ttg gaa agg ctc tct gtg gtt gga Met Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gly Leu Glu Arg Leu Ser Val Val Gly 595 600 605	2727
gaa cat gca tgg gac ttt gcc tca gta gcc ggg gta ctg tct tct gtg Glu His Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Leu Ser Ser Val 610 615 620	2775
ggg aag gca atc cac acg gtg ctg ggg gga got ttc aac acc ctt ttt Gly Lys Ala Ile His Thr Val Leu Gly Gly Ala Phe Asn Thr Leu Phe 625 630 635	2823
ggg ggg gtt gga ttc atc cct aag atg ctg ctg ggg gtt gct ctg gtc Gly Gly Val Gly Phe Ile Pro Lys Met Leu Leu Gly Val Ala Leu Val 640 645 650	2871
tgg ttg gga cta aat gcc agg aat cca acg atg tcc atg acg ttt ctt Trp Leu Gly Leu Asn Ala Arg Asn Pro Thr Met Ser Met Thr Phe Leu 655 660 665	2919

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

gct gtg ggg gct ttg aca ctg atg atg aca atg gga gtt ggg gca t      2965
Ala Val Gly Ala Leu Thr Leu Met Met Thr Met Gly Val Gly Ala
      675              680              685

gagcggcgcg tcagagcatgc atctagaggg cccattctota tagtgtcacc taaatgctag 3025
agctcgctga tcagcctega ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttggcccttc 3085
cccggtgect tccttgaccg tgggaaggtgc cactccactg gtcctttcct aataaaatga 3145
ggaaattgca tcgcatgtgc tgagttagtg tcattctatt ctgggggggtg ggtgggggca 3205
ggacagcaag ggggaggatt ggggaagacaa tagcaggcat gctgggggtg cgtggggctc 3265
tatggcttct gagcggaana gaacagctgc attaatgaat cggccaacgc cggggggagag 3325
gcgggtttgc tattgggggc tcttcgcttc cctcgctcac tgactcgtg cgtcgtgtcg 3385
ttcggtctgc gcgagcggtt tcagctcact caaaggcggt aatcgggtta tccacagat 3445
caggggataa cgcaggaag aacatgtgag caaaggcca gcaaaagucc aggaacgta 3505
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggtccggccc cctgacgag catcacaaaa 3565
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgcaggactg ataaagatac caggcggttc 3625
cccttggaag ctccctgtg cgtctctctg ttcggacctg gccgttacc ggatacctgt 3685
ccgcttctct cctctcggga agcgtagggc ttctcaatg cccagctgtg aggtatctca 3745
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 3805
accgctggcg cttaaccggt aactatctgc ttgagtcaca cccgttaaga caagacttat 3865
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttacagagag gaggtatgta ggcggtgcta 3925
cagagtttct gaagtgtgtg cctaactacg gctacactag aaggacagta ttgtgtatct 3985
gcgtctctgt gaagccagtt accctcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 4045
aaacccacgc tggtagcggt ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4105
aaggatctca agaagatctt ttgatctttt ctacgggggc tgacgtcag tggaaacgaaa 4165
actcacgtta agggattttg gtcatcgat tatcaaaaaa gatcttcacc tagatccttt 4225
taaatataaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaat tggctctgaca 4285
gttaaccaatg cttaactcgt gaggcacctt tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca 4345
tagttgcctg actcccccgc gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccactctggc 4405
ccagtgtctc aatgatacgg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaalaa 4465
accagctcag cgggaagggtc gagcgagaaa gtagctctgc aactttatcc gctcctatcc 4525
agttctatca ttgtgtccgg gaagctcaag taagtgtctc gccagttaat agtttgcgna 4585
accgttgtgc cattgttana ggcatactgg tctcacgctc gtcgttttgt atggtctcat 4645
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaaag 4705
cgtttagctc ctctcgtctt ccatgcttg ttcaagtaaa gttggccgca gtgttatcac 4765
tcattggtat gccagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4825
ctgtgactcg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatccgg cgaacgagtt 4885
gctcttgcgc gccgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 4945
tcactcatgg aaaacgttct tggggcgaaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 5005
cagttctgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 5065
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaaatccgc aaaaaaggga ataaggcgna 5125
cagggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 5185
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaasaataaa caaatagggg 5245
ttccgcgcac atttcccga aaagtgcac ctgaagtc 5283

```

<210> 20

<211> 681

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 20

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1      5      10      15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Val Thr Leu Val Arg Lys Asn Arg
20     25     30
Trp Leu Leu Leu Asn Val Thr Ser Glu Asp Leu Gly Lys Thr Phe Ser
35     40     45

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys Tyr Trp
 50 55 60
 Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro Arg Glu
 65 70 75 80
 Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn Val Arg
 85 90 95
 Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Ser Arg
 100 105 110
 Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys Thr Arg
 115 120 125
 Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu Gln Lys
 130 135 140
 Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val Val Ile
 165 170 175
 Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His Cys Ile
 180 185 190
 Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly Thr Trp
 195 200 205
 Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met Ala Pro
 210 215 220
 Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile Asp Arg
 225 230 235 240
 Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr His Val
 245 250 255
 Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu Ala Glu
 260 265 270
 Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp Arg Gly
 275 280 285
 Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys
 290 295 300
 Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val Asp Gln
 305 310 315 320
 Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly Ala Lys
 325 330 335
 Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp Ala Leu
 340 345 350
 Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala Thr Leu
 355 360 365
 Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ala
 370 375 380
 Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala Gln Asp
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg Glu Met
 405 410 415
 His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile Arg Val
 420 425 430
 Leu Ala Leu Gly Asn Gln Glu Gly Ser Leu Lys Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr Lys Leu
 450 455 460
 His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe Val Lys
 485 490 495
 Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val Lys Val
 500 505 510
 Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp Asp Leu
 515 520 525

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala
530          535          540
Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro Phe Gly
545          550          555          560
Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr Tyr Gln
565          570          575
Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln Thr Met
580          585          590
Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
595          600          605
Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile His Thr
610          615          620
Val Phe Gly Ser Ala Phe Gln Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn Trp Ile
625          630          635          640
Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile Asn Thr
645          650          655
Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val Ile Met
660          665          670
Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
675          680

<210> 21
<211> 5304
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (910)...(2986)

<400> 21
gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggctgaactct cagtacaatc tgetctgatg    60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtatgctg    120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag ctttgaccca caattgcata agaactctgc    180
ttagggttag gcgtttttgc ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt    240
gattattgac tagttattaa tagtaataa ttacgggggc attagttcat agcccatata    300
tggagtccg cgttacataa cttaacgtaa atggcccgcc tggctgacgc cccaacgacc    360
ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca ctggccagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtaacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt    540
atgccagata catgacctta tgggacttcc ctacttggga gtacatctac gtattagtaa    600
tcgtatttac atgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg    660
actcaggggg atttccaaat ctccacccca ttgacgtcaa tgggagrttg ttttggcacc    720
aaatcaacgc ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggggg    780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagacacca    840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaatatag ggagacccaa gcttggatcc    900
gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctg gcg agc    951
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
1          5          10

ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct ttg cag tta tca acc tat    999
Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Leu Gln Leu Ser Thr Tyr
15          20          25          30

cag ggg aaa gtg tta atg tca atc aac aag act gac gct caa agc gcc    1047
Gln Gly Lys Val Leu Met Ser Ile Asn Lys Thr Asp Ala Gln Ser Ala
35          40          45

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

ata aac att cct agt gcc aac gga gca aac act tgc att gtg egg gct Ile Asn Ile Pro Ser Ala Asn Gly Ala Asn Thr Cys Ile Val Arg Ala 50 55 60	1095
cta gat gtg ggg gtc atg tgc aaa gat gac atc aca tac ctg tgc cca Leu Asp Val Gly Val Met Cys Lys Asp Asp Ile Thr Tyr Leu Cys Pro 65 70 75	1143
gtg ctt tca gcg gga aat gat ccc gag gac att gac tgt tgg tgt gac Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asp 80 85 90	1191
gtc gaa gag gtg tgg gtg cac tac gcc aga tgc acg cgc atg gga cat Val Glu Glu Val Trp Val His Tyr Gly Arg Cys Thr Arg Met Gly His 95 100 105 110	1239
tgg agg cgt agc cga cgg tca atc tct gtg cag cat cat gga gat tcc Ser Arg Arg Ser Arg Ser Ile Ser Val Gln His His Gly Asp Ser 115 120 125	1287
aca ctg gca aca aag aac acg cca tgg ttg gac acc gtg aaa acc acc Thr Leu Ala Thr Lys Asn Thr Pro Trp Leu Asp Thr Val Lys Thr Thr 130 135 140	1335
aaa tac ttg aca aaa gta gaa aac tgg gtt ttg cgc aat cct gga tat Lys Tyr Leu Thr Lys Val Glu Asn Trp Val Leu Arg Asn Pro Gly Tyr 145 150 155	1383
gcc cta gtt gcg ctg gcg att gga tgg atg ctc ggt agc aac aac aca Ala Leu Val Ala Leu Ala Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Thr 160 165 170	1431
cag aga gtg gtt ttt gtg atc atg ctg atg ctg att gct ccg gca tac Gln Arg Val Val Phe Val Ile Met Leu Met Leu Ile Ala Pro Ala Tyr 175 180 185 190	1479
agc ttc aac tgt ctg gga aca tca aac agg gac ttt gtc gag gga gcc Ser Phe Asn Cys Leu Gly Thr Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Ala 195 200 205	1527
agt ggg gca aca tgg att gac ttg gta ctt gaa ggg gga agc tgt gtc Ser Gly Ala Thr Trp Ile Asp Leu Val Leu Glu Gly Gly Ser Cys Val 210 215 220	1575
aca gtg atg gca cca gag aaa cca aca ctg gac ttc aaa gtg atg aag Thr Val Met Ala Pro Glu Lys Pro Thr Leu Asp Phe Lys Val Met Lys 225 230 235	1623
atg gag gct acc gag tta gcc act gtg cgt gag tat tgt tac gaa gca Met Glu Ala Thr Glu Leu Ala Thr Val Arg Glu Tyr Cys Tyr Glu Ala 240 245 250	1671
acc ttg gac acg ctg tca aca gtg gca agg tgc ccc aca aca gga gaa Thr Leu Asp Thr Leu Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu 255 260 265 270	1719
gct cac aac acc aaa agg agt gac cca aca ttt gtc tgc aaa aga gat Ala His Asn Thr Lys Arg Ser Asp Pro Thr Phe Val Cys Lys Arg Asp 275 280 285	1767

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gtt gtg gac cgc gga tgg ggt aac gga tgt ggt ctg ttt gga aaa ggg Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly 290 295 300	1815
agc att gac aca tgc gct aag ttc aca tgc aaa aac aag gca aca ggg Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Lys Asn Lys Ala Thr Gly 305 310 315	1863
aag acg atc ttg aga gaa aac atc aag tat gag gtt gca atc ttt gtg Lys Thr Ile Leu Arg Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val 320 325 330	1911
cat ggt tca acg gac tct acg tca cat ggc aat tac tct gag cag att His Gly Ser Thr Asp Ser Thr Ser His Gly Asn Tyr Ser Glu Gln Ile 335 340 345 350	1959
gga aaa aac caa gcg gct aga ttc acc ata agc ccg caa gca ccg tcc Gly Lys Asn Gln Ala Ala Arg Phe Thr Ile Ser Pro Gln Ala Pro Ser 355 360 365	2007
ttt acg gcc aac atg gcc gag tat gga aca gtt acc att gat tgt gaa Phe Thr Ala Asn Met Gly Glu Tyr Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys Glu 370 375 380	2055
gca aga tca gga atc aac acg gag gat tat tat gtt ttc act gtc aag Ala Arg Ser Gly Ile Asn Thr Glu Asp Tyr Tyr Val Phe Thr Val Lys 385 390 395	2103
gag aag tca tgg cta gtg aac agg gac tgg ttt cac gac ttg aac ctt Glu Lys Ser Trp Leu Val Asn Arg Asp Trp Phe His Asp Leu Asn Leu 400 405 410	2151
cca tgg acg agc cct gcc aca act gat tgg cgc aac aga gaa aca ctg Pro Trp Thr Ser Pro Ala Thr Thr Asp Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu 415 420 425 430	2199
gtg gaa ttt gag gaa ccg cat gcc acc aag caa act gta gta gcc cta Val Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Thr Val Val Ala Leu 435 440 445	2247
gga tgc caa gaa ggt gcc ctg cac aca gca ttg gct gga gcc att cca Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro 450 455 460	2295
gcc act gtt agc agc tca acc cta acc ttg caa tca ggg cat ttg aaa Ala Thr Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Leu Gln Ser Gly His Leu Lys 465 470 475	2343
tgc aga gct aag ctt gac aag gtc aaa atc aag gga acg aca tat gcc Cys Arg Ala Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Thr Thr Tyr Gly 480 485 490	2391
atg tgt gac tct gcc ttc acc ttc agc aag aac cca act gac aca ggg Met Cys Asp Ser Ala Phe Thr Phe Ser Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly 495 500 505 510	2439
cac ggg aca gtg att gtg gaa ctg cag tat act gga agc aac gga ccc His Gly Thr Val Ile Val Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Pro 515 520 525	2487

WO 02/081754

PCT/US02/10764

tgc cga gtt ccc atc tcc gtg act gca aac ctc atg gat tfg aca cgg Cys Arg Val Pro Ile Ser Val Thr Ala Asn Leu Met Asp Leu Thr Pro 530 535 540	2535
ggt gga aga ttg gtc acg gtc aat ccc ttt ata agc aca ggg gga gcg Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala 545 550 555	2583
aac aac aag gtc atg atc gaa gtt gaa cca ccc ttt ggc gat tct tac Asn Asn Lys Val Met Ile Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr 560 565 570	2631
atc gtc gtc gga aga ggc acc acc cag att aac tac cac tgg cac aaa Ile Val Val Gly Arg Gly Thr Thr Gln Ile Asn Tyr His Trp His Lys 575 580 585 590	2679
gag gga agc agc att ggg aag gct ttg ggc acc aca tgg aaa gga gcc Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Leu Ala Thr Thr Trp Lys Gly Ala 595 600 605	2727
caa cgg cta gcc gtc tta ggg gac aca ggc tgg gac ttt gga tct att Gln Arg Leu Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile 610 615 620	2775
gga gga gtt ttc aat tca att ggc aaa gct gtc cac caa gtt ttc gga Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly 625 630 635	2823
gga ggc ttc agg act ctg ttc ggg gga atg tcc tgg atc aca cag ggg Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly 640 645 650	2871
cta ctt gga gct ctt ctc ctg tgg atg ggg ttg cag gcc cgc gac agg Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Leu Gln Ala Arg Asp Arg 655 660 665 670	2919
agc atc tgg ctg act cta ctg gct gtc gga ggg att ctc atc ttt ctg Ser Ile Ser Leu Thr Leu Leu Ala Val Gly Gly Ile Leu Ile Phe Leu 675 680 685	2967
gca acc agc gtg caa gcc t gagcggccgc tcgagcatgc atctagaggg Ala Thr Ser Val Gln Ala 690	3016
ccctattcta tagtgtacc taaatgctag agctcgcgtga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccattctgttg tttgccttc ccccggtcct tcttgaccc tggaggtgac 3136	
ccctcccatc gtcttttctt aataaaatga gaaaattgca tcgcatgttc tgagttaggtg 3196	
tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggaacagcaag ggggaggatt ggaagacaa 3256	
tagcaggcat gctggggatg cgggtggctc tatggcttct gaggggaaa gaacagctgc 3316	
attaatgaat cggccaacgc gggggagag ggggtttgct tattgggggc tcttcgctt 3376	
ctcgcctcac tgactcgctg cgcctggctg ttccgctgct ggcagcgcta tcagctcact 3436	
caaaaggcgt aatacgttta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 3496	
caaaaggcca gcaaaaggcc aggaacgcta aaaaaggccg gttgctggcg tttttccata 3556	
ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcagcgtc aagtcagagg tggcgaaacc 3616	
cgacaggact ataaagatac cagggttttc cccctggaag ctccctcgtg cgcctctctg 3676	
ttccgacctt gcgcttacc ggatacctgt ccgcttttct ccttcaggga agcgtggcgc 3736	
tttctcaatg ctcaagctgt aggtatctca gtccgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg 3796	
gctgtgtgca cgaacccccc gttcaagccc accgtgggc cttatccggt aactatcgtc 3856	
ttgagtcocaa cccggttaaga caccacttat cgcactgggc agcagccact ggttaacagga 3916	
ttagcagagc gaggtatgta ggcgtgtcta cagatttctt gaagtgggtg cctaactaag 3976	
gctacacatg aaggacagta ttgtgtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 4036	

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccacccg tggtagcggg ggtttttttg 4096
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 4156
ctacgggggtc tgacgctccag tggaaacaaa actcacgtta agggattttg gtcacgagat 4216
tatcaaaaaag gctcttccac tagatccctt taaactaaaa atgaagtttt aatcaaatct 4276
aaagtataata tgggttaact tggctcgaca gttaacaaatg cttaactagt gaggaactta 4336
tctcagcgat ctgtctattt cgttcaatcca tagttgcctg actcccccgc gttagataaa 4396
ctacgataacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac 4456
gctcacccgc tccagattta tcaacnaata accnccacgc cggaagggcc gagcgccaga 4516
gtgtctctgc aactttatcc gctcccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag 4576
taagtacttc gccagttaat agtttgccga acgttgcttg cattgttaca ggcacgtgg 4636
tgtcacgctc gtctgttggt atggttctat tcaagtcagg ttcccaacga tcaaggcgag 4696
ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cgtttagctc ctccggtcct ccgacgtttg 4756
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 4816
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtaacta accaagtcac 4876
cttgagaata gtgtatcgcc gcacacgagt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 4936
cggcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgtttc tcggggcgaa 4996
aaactctaaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttccgat gtaacccact cgtgcaccca 5056
actgactcttc agcatctctt actttaccca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 5116
aaaatgcgcg aaaaaaggga ataaggcgca cagggaatg ttgaatactc atactcttc 5176
tttttcaata ttatgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 5236
aatgtatttta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccga aaagtgcac 5296
ctgacgtc 5304

```

<210> 22

<211> 692

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 22

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1      5      10      15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Leu Gln Leu Ser Thr Tyr Gln Gly
20     25     30
Lys Val Leu Met Ser Ile Asn Lys Thr Asp Ala Gln Ser Ala Ile Asn
35     40     45
Ile Pro Ser Ala Asn Gly Ala Asn Thr Cys Ile Val Arg Ala Leu Asp
50     55     60
Val Gly Val Met Cys Lys Asp Asp Ile Thr Tyr Leu Cys Pro Val Leu
65     70     75     80
Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asp Val Glu
85     90     95
Glu Val Trp Val His Tyr Gly Arg Cys Thr Arg Met Gly His Ser Arg
100    105    110
Arg Ser Arg Arg Ser Ile Ser Val Gln His His Gly Asp Ser Thr Leu
115    120    125
Ala Thr Lys Asn Thr Pro Trp Leu Asp Thr Val Lys Thr Thr Lys Tyr
130    135    140
Leu Thr Lys Val Glu Asn Trp Val Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu
145    150    155    160
Val Ala Leu Ala Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Thr Gln Arg
165    170    175
Val Val Phe Val Ile Met Leu Met Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Phe
180    185    190
Asn Cys Leu Gly Thr Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Ala Ser Gly
195    200    205
Ala Thr Trp Ile Asp Leu Val Leu Glu Gly Gly Ser Cys Val Thr Val
210    215    220

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Met Ala Pro Glu Lys Pro Thr Leu Asp Phe Lys Val Met Lys Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Thr Glu Leu Ala Thr Val Arg Glu Tyr Cys Tyr Glu Ala Thr Leu
 245 250 255
 Asp Thr Leu Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His
 260 265 270
 Asn Thr Lys Arg Ser Asp Pro Thr Phe Val Cys Lys Arg Asp Val Val
 275 280 285
 Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile
 290 295 300
 Asp Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Lys Asn Lys Ala Thr Gly Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Arg Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly
 325 330 335
 Ser Thr Asp Ser Thr Ser His Gly Asn Tyr Ser Glu Gln Ile Gly Lys
 340 345 350
 Asn Gln Ala Ala Arg Phe Thr Ile Ser Pro Gln Ala Pro Ser Phe Thr
 355 360 365
 Ala Asn Met Gly Glu Tyr Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys Glu Ala Arg
 370 375 380
 Ser Gly Ile Asn Thr Glu Asp Tyr Tyr Val Phe Thr Val Lys Glu Lys
 385 390 395 400
 Ser Trp Leu Val Asn Arg Asp Trp Phe His Asp Leu Asn Leu Pro Trp
 405 410 415
 Thr Ser Pro Ala Thr Thr Asp Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Val Glu
 420 425 430
 Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Thr Val Val Ala Leu Gly Ser
 435 440 445
 Gln Glu Gly Ala Leu His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Ala Thr
 450 455 460
 Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Leu Gln Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Ala Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys
 485 490 495
 Asp Ser Ala Phe Thr Phe Ser Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly
 500 505 510
 Thr Val Ile Val Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Pro Cys Arg
 515 520 525
 Val Pro Ile Ser Val Thr Ala Asn Leu Met Asp Leu Thr Pro Val Gly
 530 535 540
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala Asn Asn
 545 550 555 560
 Lys Val Met Ile Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 565 570 575
 Val Gly Arg Gly Thr Thr Gln Ile Asn Tyr His Trp His Lys Glu Gly
 580 585 590
 Ser Ser Ile Gly Lys Ala Leu Ala Thr Thr Trp Lys Gly Ala Gln Arg
 595 600 605
 Leu Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
 610 615 620
 Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
 625 630 635 640
 Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu
 645 650 655
 Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Leu Gln Ala Arg Asp Arg Ser Ile
 660 665 670
 Ser Leu Thr Leu Leu Ala Val Gly Gly Ile Leu Ile Phe Leu Ala Thr
 675 680 685
 Ser Val Gln Ala
 690

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

<210> 23
<211> 5271
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (910)...(2953)

<400> 23
gacggatcgg gagatctccc gatcccccatt ggtcgactct cagtacaatc tgcctctgatg    60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gaggtagtgcg    120
cgagcaaaat ttaagcttaca acagaggcag gcttgaccga caattgcatt aagaatctgc    180
ttagggttag gcgtttttgcy ctgcttcgcy atglacgggc cagatatagc cytlgacatt    240
gattattgac tagttattca tagtaattca ttacggggtc attagttcat agcccatata    300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgacgg cccaacganc    360
cccgcccatc gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt aacgccaaata gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcaca cttggcagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt    540
atgccagcta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca    600
tcgctattac catggtgatg cggtttttgc agtacatcaa tggggctgga tagcgggttg    660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tggggagtgt ttttggcacc    720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag    780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaaat agagaaccca    840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatcaga ctcaatatag ggagacccaa gcttgggtacc    900
gccgcggcc atg gcc aag agg tcc gcc gcc tca atc atg tgg ctc gcg agc    951
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
      1             5             10

ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct gtg acc ttg gtg cgg aaa    999
Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Val Thr Leu Val Arg Lys
      15             20             25             30

aac aga tgg ttg ctc cta aat gtg aca tct gag gac ctc ggg aaa aca    1047
Asn Arg Trp Leu Leu Leu Asn Val Thr Ser Glu Asp Leu Gly Lys Thr
      35             40             45

ttc tct gtg ggc aca ggc aac tgc aca aca aac att ttg gaa gcc aag    1095
Phe Ser Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys
      50             55             60

tac tgg tgc cca gac tca atg gaa tac aac tgt ccc aat ctc agt cca    1143
Tyr Trp Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro
      65             70             75

aga gag gag cca gat gac att gat tgc tgg tgc tat ggg gtg gaa aac    1191
Arg Glu Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn
      80             85             90

gtt aga gtc gca tat ggt aag tgt gac tca gca gcc agg tct agg agg    1239
Val Arg Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg
      95             100             105             110

tca aga agg gcc att gac ttg cct acg cat gaa aac cat ggt ttg aag    1287
Ser Arg Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys
      115             120             125

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

acc cgg caa gaa aaa tgg atg act gga aga atg ggt gaa agg caa ctc Thr Arg Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu 130 135 140	1335
caa aag att gag aga tgg ttc gtg agg aac ccc ttt ttt gca gtg acg Gln Lys Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr 145 150 155	1383
gct ctg acc att gcc tac ctt gtg gga agc aac atg acg caa cga gtc Ala Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val 160 165 170	1431
gtg att gcc cta ctg gtc ttg gct gtt ggt cgg gcc tac tca gct cac Val Ile Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His 175 180 185 190	1479
tgc att gga att act gac agg gat ttc att gag ggg gtg cat gga gga Cys Ile Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly 195 200 205	1527
act tgg gtt tca gct acc ctg gag caa gac aag tgt gtc act gtt atg Thr Trp Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met 210 215 220	1575
gcc cct gac aag cct tca ttg gac atc tca cta gag aca gta gcc att Ala Pro Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile 225 230 235	1623
gat aga cct gct gag gtg agg aaa gtg tgt tac aat gca gtt ctc act Asp Arg Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr 240 245 250	1671
cat gtg aag att aat gac aag tgc ccc agc act gga gag gcc cac cta His Val Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu 255 260 265 270	1719
gct gaa gag aac gaa ggg gac aat gcg tgc aag cgc act tat tct gat Ala Glu Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp 275 280 285	1767
aga ggc tgg gcc aat ggc tgt ggc cta ttt ggg aaa ggg agc att gtg Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val 290 295 300	1815
gca tgc gcc aaa ttc act tgt gcc aaa tcc atg agt ttg ttt gag gtt Ala Cys Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val 305 310 315	1863
gat cag acc aaa att cag tat gtc atc aga gca caa ttg cat gta ggg Asp Gln Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly 320 325 330	1911
gcc aag cag gaa aat tgg act acc gac att aag act ctc aag ttt gat Ala Lys Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp 335 340 345 350	1959
gcc ctg tca ggc tcc cag gaa gtc gag ttc att ggg tat gga aaa gct Ala Leu Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala 355 360 365	2007

WO 02/081754

PCT/US02/10764

aca ctg gaa tgc cag gtg caa act gcg gtg gac ttt ggt aac agt tac Thr Leu Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr 370 375 380	2055
atc gct gag atg gaa aca gag agc tgg ata gtg gac aga cag tgg gcc Ile Ala Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala 385 390 395	2103
cag gac ttg acc ctg cca tgg cag agt gga agt gcc ggg gtg tgg aga Gln Asp Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg 400 405 410	2151
gag atg cat cat ctt gtc gaa ttt gaa cct ccg cat gcc gcc act atc Glu Met His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile 415 420 425 430	2199
aga gta ctg gcc ctg gga aac cag gaa gcc tcc ttg aaa aca gct ctt Arg Val Leu Ala Leu Gly Asn Gln Glu Gly Ser Leu Lys Thr Ala Leu 435 440 445	2247
act gcc gca atg agg gtt aca aag gac aca aat gac aac aac ctt tac Thr Gly Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr 450 455 460	2295
aaa cta cat ggt gga cat gtt tct tgc aga gtg aaa ttg tca gct ttg Lys Leu His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu 465 470 475	2343
aca ctc aag ggg aca tcc tac aaa ata tgc act gac aaa atg ttt ttt Thr Leu Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe 480 485 490	2391
gtc aag aac cca act gac act gcc cat gcc act gtt gtg atg cag gtg Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val 495 500 505 510	2439
aaa gtg tca aaa gga gcc ccc tgc agg att cca gtg ata gta gct gat Lys Val Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp 515 520 525	2487
gat ctt aca gcg gca atc aat aaa ggc att ttg gtt aca gtt aac ccc Asp Leu Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro 530 535 540	2535
atc gcc tca acc aat gat gat gaa gtg ctg att gag gtg aac cca cct Ile Ala Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro 545 550 555	2583
ttt gga gac agc tac att atc gtt ggg aga gga gat tca cgt ctc act Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr 560 565 570	2631
tac cag tgg cac aaa gag gga agc tca ata gga aag ttg ttc act cag Tyr Gln Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln 575 580 585 590	2679
acc atg aaa ggc gty gaa cgc ctg gcc gtc atg gga gac acc gcc tgg Thr Met Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp 595 600 605	2727

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

gat ttc agc tcc gct gga ggg ttc ttc act tgg gtt ggg aaa gga att 2775
Asp Phe Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile
610 615 620

cat acg gtg ttt ggc tct gcc ttt cag ggg cta ttt ggc ggc ttg aac 2823
His Thr Val Phe Gly Ser Ala Phe Gin Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn
625 630 635

tgg ata aca aag gtc atc atg ggg gcg gta ctt ata tgg gtt ggc atc 2871
Trp Ile Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile
640 645 650

aac aca aga aac atg aca atg tcc atg agc atg atc ttg gta gga gtg 2919
Asn Thr Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val
655 660 665 670

atc atg atg ttt ttg tct cta gga gtt ggg ggc t gagcgccgc 2963
Ile Met Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
675 680

tcgagcagc atctagaggg cccattctta tagtgccacc taaatgctag agctcgctga 3023
tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccgctcct 3083
cccttgacc tcgaaggtgc cactcccaact gtcccttctc aataaaatga ggaattgca 3143
tcgcatgttc tgagttagtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtgggga ggcagcnaag 3203
ggggaggatt ggaagacaaa tagcagccat gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct 3263
gaggcggaaa gaacagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg 3323
tatggggcgc tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgtcggtcg ttcggtcgcg 3383
gcgagcggtc tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa 3443
cgacggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc 3503
gttcgtaggg ttcttcacata ggtcccgccc cctgacagag catcacaaaa atcgacgctc 3563
aagtcagagg tggcggaacc cgacagact ataaagatac caggcggttc ccccggaag 3623
ctccctcggt agctctcttg ttccgacctc gcgccttaac ggatacctgt ccgcttctct 3683
cccttcggga agcgtggcgc ttctcctaat ctoncgtgt aggtatctca gtccggtgta 3743
ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gtccagcccg accgctgcgc 3803
cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cagcacttat cgcactggcg 3863
agcagccact ggtaacagga ttacagagag gaggatgta ggcggtgcta cagagttctt 3923
gaagtgtgtg cctaactacg gctacactag aaggacagta ttctgtatct gcgctctgct 3983
gaagccagtt accctcgaaa aaagagtttg tagctcttta tccggcaaac aaaccacgcg 4043
tggtagcgtt ggtttttttt ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggacttca 4103
agaagatcct ttgatctttt ctacgggttc tgacgttcag tggaaacaaa actcacgtta 4163
agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 4223
atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagttaact tggctcgaca gttaccaatg 4283
cttaatcagt gaggcaacta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg 4343
actcccgctc gtgtagataa ctacagatag ggaaggctta ccatctggcc ccagtgctgc 4403
aatgataccg cggagcccac gctcacccgc tccagattta tcagcaataa accagccagc 4463
cggaaggcgc gaggcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gccctcatcc agtctattaa 4523
tgttgcggcg gaagctagag taagtgttcc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 4583
cattgtctaca ggcacgtggt tgtcacgctc gtcgttttgt atggcttcat tcagctccgg 4643
ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgato cccatgtgtg tgcaaaaaag cggttagctc 4703
cttcgggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgttat 4763
ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 4823
tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatcgcg gcacgcagtt gctcttgccc 4883
ggcgtcaata cgggataata ccgcgcaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 4943
aaaaagtctc tcggggcgaa aactctcaag gatcttaacc ctgttgagat ccagttcgat 5003
gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt acttcaacca gcgtttctgg 5063
gtgagcaaaa acagggaagg aaaaatgcgc aaaaaaggga ataaggcgca cagggaaatg 5123
ttgaatactc atactcttc ttcttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5183
catgagcgga taatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac 5243
atttcccga aaagtgcac ctgacgtc 5271

```

<210> 24

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<211> 681

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 24

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1           5           10           15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Val Thr Leu Val Arg Lys Asn Arg
 20           25           30
Trp Leu Leu Leu Asn Val Thr Ser Glu Asp Leu Gly Lys Thr Phe Ser
 35           40           45
Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys Tyr Trp
 50           55           60
Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro Arg Glu
 65           70           75           80
Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn Val Arg
 85           90           95
Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Ser Arg
100           105           110
Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys Thr Arg
115           120           125
Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu Gln Lys
130           135           140
Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr Ala Leu
145           150           155           160
Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val Val Ile
165           170           175
Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His Cys Ile
180           185           190
Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly Thr Trp
195           200           205
Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met Ala Pro
210           215           220
Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile Asp Arg
225           230           235           240
Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr His Val
245           250           255
Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu Ala Glu
260           265           270
Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp Arg Gly
275           280           285
Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys
290           295           300
Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val Asp Gln
305           310           315           320
Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly Ala Lys
325           330           335
Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp Ala Leu
340           345           350
Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala Thr Leu
355           360           365
Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ala
370           375           380
Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala Gln Asp
385           390           395           400
Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg Glu Met
405           410           415

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile Arg Val
 420 425 430
 Leu Ala Leu Gly Asn Gln Glu Gly Ser Leu Lys Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr Lys Leu
 450 455 460
 His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe Val Lys
 485 490 495
 Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val Lys Val
 500 505 510
 Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp Asp Leu
 515 520 525
 Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala
 530 535 540
 Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro Phe Gly
 545 550 555 560
 Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr Tyr Gln
 565 570 575
 Trp His Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln Thr Met
 580 585 590
 Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
 595 600 605
 Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile His Thr
 610 615 620
 Val Phe Gly Ser Ala Phe Gln Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn Trp Ile
 625 630 635 640
 Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile Asn Thr
 645 650 655
 Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val Ile Met
 660 665 670
 Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
 675 680

<210> 25

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature

<222> 1-35

<223> POW 454

<400> 25

aaaagaataaa gcgctaccac catccacgg gacag

35

<210> 26

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<222> 1-41
<223> CPOW 2417

<400> 26
actgttacc tcaaccccggt actgcgcggc gaaaaagaaa a 41

<210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<223> Modified JE Signal

<400> 27
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1 5 10 15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala
20

<210> 28
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-36
<223> YF 482

<400> 28
aaaagaaaaa gcgctgtgac cttggtgcgg aaaaac 36

<210> 29
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-41
<223> CYF 2433

<400> 29
acagagatcc tcaaccccggt actgcgcggc gaaaaagaaa a 41

<210> 30
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-41
<223> SLE 463

<400> 30
aaagagaaaa gcgctttgca gttatcaacc tatcagggga a          41

<210> 31
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-40
<223> CSLE 2477

<400> 31
accgttggtc gcacgttcgg actgcgcggc gaaaaagaaa          40

<210> 32
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 32
Leu Asp Thr Ile Asn Arg Arg Pro Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1           5           10           15
Ser Leu Leu Gly Leu Ala Ala Leu Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Gln
20           25           30
Leu Leu Ser Thr Tyr Gln Gly
35

<210> 33
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 33
Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met
1           5           10           15
Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys
20

<210> 34
<211> 30
<212> PRT

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 34

Met	Asn	Glu	Gly	Ser	Ile	Met	Trp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ile
1				5				10					15		
Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Lys	Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	Gly	Lys		
			20				25						30		

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 35

Met	Gly	Arg	Lys	Gln	Asn	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn	Glu	Gly	Ser	Ile	Met
1				5				10					15		
Trp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Lys
				20				25					30		
Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	Gly	Lys									
						35									

<210> 36

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 36

Met	Ser	Lys	Lys	Arg	Gly	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser	Val	Leu	Met	Val	Ile
1				5				10					15		
Phe	Met	Leu	Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Asn	Phe	Gln
				20				25					30		
Gly	Lys														

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 37

Met	Gly	Lys	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ile	Met	Trp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala
1				5				10					15		
Val	Val	Ile	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	Gly
				20				25					30		
Lys															

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<210> 38
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 38
Met Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn
1 5 10 15
Ile Leu Asn Arg Arg Arg Thr Ala Gly Met Ile Ile Met Leu Ile
20 25 30
Pro Thr Val Met Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly Glu
35 40 45

<210> 39
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 39
Met Val Gly Leu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Ser Ala Thr Asp Trp
1 5 10 15
Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Ala
20 25 30
Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
35 40

<210> 40
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 40
Met Gly Trp Leu Leu Val Val Val Leu Leu Gly Val Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15
Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
20

<210> 41
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 41

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Ile Ala Ala
 1           5           10           15
Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
                20

<210> 42
<211> 5292
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct

<221> CDS
<222> (910)...(2964)

<400> 42
gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcaactct cagtacaate tgetctgaig    60
cgcatagtt aagccagtat ctgctccctg ctltgtgttt ggaggtoct gactagtggg    120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc    180
ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt    240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagtcat agcccatata    300
tggagtccg cgttacataa cttaacggtaa atggcccgcc tggctgacgc cccaacgacc    360
cccgcccat gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccata gggactttcc    420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt    480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taatggccc gcttggcatt    540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca    600
tcgtattac catggtgatg cgggttttgc agtaacatca tgggcgtgga tagcggtttg    660
actcacgggg atttccaagt cttcacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc    720
aaatcaacg ggaattttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggggc    780
gtaggcgtgt acggtggggg gtctatataa gcaagagctct ctggtaact agagaaccca    840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatcaga ctactatag ggagacccaa gcttggtaac    900
gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc gcc tca atc atg tgg ctc gcg agc    951
      Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
        1           5           10

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca gcc gcc ttc cat tta acc aca cgt    999
Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
 15           20           25           30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt    1047
Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
 35           40           45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat gcc gtg aac atg tgt acc ctc atg gcc    1095
Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
 50           55           60

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc    1143
Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
 65           70           75

ctt ctc agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct    1191
Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser
 80           85           90

acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat    1239
Thr Ser Thr Thr Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His
 95           100           105           110

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctc gtt cca cat gtg gga atg gga Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly 115 120 125	1287
ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys 130 135 140	1335
cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca gcc ttc acc His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr 145 150 155	1383
atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln 160 165 170	1431
aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr 175 180 185 190	1479
atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser 195 200 205	1527
gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat gga agc tgt gtg acg Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr 210 215 220	1575
acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr 225 230 235	1623
gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys 240 245 250	1671
cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro 255 260 265 270	1719
agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met 275 280 285	1767
gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga gcc Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly 290 295 300	1815
att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys 305 310 315	1863
gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His 320 325 330	1911
tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat gcc aag Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys 335 340 345 350	1959

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gaa atc aaa ata acn cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr 355 360 365	2007
ggg tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp 370 375 380	2055
ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val 385 390 395	2103
cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala 400 405 410	2151
gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe 415 420 425 430	2199
aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln 435 440 445	2247
gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met 450 455 460	2295
tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg 465 470 475	2343
atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly 480 485 490	2391
aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile 495 500 505 510	2439
gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac gcc tct cca tgc aag atc cct Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro 515 520 525	2487
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile 530 535 540	2535
aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu 545 550 555	2583
gca gaa cct cca ttc gga gac agc tac atc atc ata gga gta gag ccg Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro 560 565 570	2631
gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agt tct atc ggc caa Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln 575 580 585 590	2679

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

atg ttt gag aca aca atg agg ggg gcg aag aga atg gcc att tta ggt 2727
Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly
595 600 605

gac aca gcc tgg gat ttt gga tcc ttg gga gga gtg ttt aca tct ata 2775
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile
610 615 620

gga aag gct ctc cac caa gtc ttt gga gca atc tat gga gct gcc ttc 2823
Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe
625 630 635

agt ggg gtt tca tgg act atg aaa atc ctc ata gga gtc att atc aca 2871
Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr
640 645 650

tgg ata gga atg aat tca cgc agc acc tca ctg tct gtg aca cta gta 2919
Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val
655 660 665 670

ttg gtg gga att gtg aca ctg tat ttg gga gtc atg gtg cag gcc 2964
Leu Val Gly Ile Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala
675 680 685

taattagtgg agcggcgcgt cgagcatgca tctagagggc cctattctat agtgcacct 3024
aaatgctaga gctcgtgat cagcctcgac tctgctctct agttgccagc catctgttgt 3084
ttgccctctc cccgtgcctt ccttgacctt ggaagggtgc actccactg tcttttctta 3144
ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagttagtgt cattctattc tgggggggtg 3204
ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctgggggatgc 3264
ggtgggctct atggtttctg aggcggaag aaccagctgc attaatgaat cggccacgcg 3324
ggggggagaa cggcttgcg tattggggcg tcttcgggtt cctcgtcac tgaactcgtg 3384
cgctcggcgg ttcggctgg ggcagcggtt tccagctcact caaaggcggt aatcagggtta 3444
tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc 3504
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggtccgcgcc cctgaacag 3564
catcacaaaa atcgacgtc aagtccagag tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 3624
caggcggttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctcctg ttccgacct gccgttacc 3684
ggatacctgt ccgcctttct ccttcgggga agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt 3744
aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctg gctgtgtgca cgaaccccc 3804
gttcagcccg accgctggcg cttatccggt aactatcgtc ttgagtccta cccgtaaga 3864
cacgacttat cgcactggcg agcagccact ggtaacagga tttagcagcg gaggtatga 3924
ggcgggtgta cagagttctt gaagtgttgg cctaactacg gctacactag aagaacagta 3984
tttgggtatc gcgtctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga 4044
tcgggcaaac aaaccacgcg tggtagcggt ggttttttgg ttgtcaagca gcagattacg 4104
cgagaaaaaa aaggatctca agaagatctt ttgatctttt ctacgggggc tgacgtcag 4164
tggaagaaaa actcaagta agggattctt gtcagagat tatcaaaaag gatcttacc 4224
tagatctttt taattaaaa atgaagtttt aaatcaact aaagtatata tgaataaact 4284
tggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggccacta tctcagcat ctgtctatt 4344
cgttcatcca tagttgcctg actcccgctc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta 4404
ccatctggcc ccagtgtcgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta 4464
tcagcaataa accagccagc cgggaaggcc gaggcgagaa gtggtcctgc aactttatc 4524
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtatttc gccagttat 4584
agtttgocga acgttggtgc cattgttaca ggcactgtgg tgtcagcttc gtcgtttgtt 4644
atggttccat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg 4704
tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgacgttgg tcagaagtaa gttggcgca 4764
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta 4824
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaala gtgtatcgg 4884
cgaccgagtt gctcttgccc gggtcaala cgggataata ctcggccaca tgcagaaact 4944
tcaaaagtgc tcatcatgg aaacgttct cggggcgaa aactctcag gatcttacc 5004
ctgttagat ccagttcgat gtaacccact cgtgaccca actgatcttc agcatcttt 5064
actttcaccg cgttttctg gtgagcaaaa scaggagggc aaatgcgcg aaaaaaggga 5124
ataaggcgca caggaaatg ttgaatactc atactcttc tttttcaata ttattgaagc 5184

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa 5244
 caaatagggg ttccgcgcac atttcccccga aaagtgcac ctgacgtc 5292

<210> 43

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 43

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
 20 25 30
 Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
 35 40 45
 Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
 50 55 60
 Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
 100 105 110
 Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
 115 120 125
 Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
 130 135 140
 Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
 165 170 175
 Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
 180 185 190
 Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
 195 200 205
 Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
 210 215 220
 Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
 245 250 255
 Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
 260 265 270
 Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
 275 280 285
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val
 290 295 300
 Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe
 580 585 590
 Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr
 595 600 605
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys
 610 615 620
 Ala Leu His Gln Val Phe Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe Ser Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr Trp Ile
 645 650 655
 Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val Leu Val
 660 665 670
 Gly Ile Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala
 675 680 685

<210> 44

<211> 5293

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS

<222> (910)...(2964)

<400> 44

gacggatcgg gagatctccc gatcccccatt ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtoget gtagtagtgcg	120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatalacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttatcaa tagtaataca ttacgggggtc attagttcat agccatata	300
cgaggtccg cgttacataa cttaaggtaa atggcccgcc tgggtgacg ccacacgacc	360
ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tattacgggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atentatgcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taastggccc gcttggcatt	540

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

atgccagta catgacctta tgggacttct ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgtatttac catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcgggttg 660
actcaggggg atttccaagt cccaccccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggaactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg 780
gtaggcgtgt acggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaaet agagaaacca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaca gcttggtacc 900
gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctg ggc agc 951
      1      5      10
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc ttc cat tta acc aca cgt 999
Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
      15      20      25      30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt 1047
Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
      35      40      45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat ggc gtg aac atg tgt acc ctg atg gcc 1095
Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
      50      55      60

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc 1143
Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
      65      70      75

ctt ctg agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct 1191
Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser
      80      85      90

acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat 1239
Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His
      95      100      105      110

aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctg gtt cca cat gtg gga atg gga 1287
Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly
      115      120      125

ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa 1335
Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys
      130      135      140

cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca ggc ttc acc 1383
His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr
      145      150      155

atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa 1431
Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln
      160      165      170

aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca 1479
Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr
      175      180      185      190

atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca 1527
Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
      195      200      205

gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat gga agc tgt gtg acg 1575
Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
      210      215      220

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca 1623
Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
225 230 235

gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag 1671
Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys
240 245 250

cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc 1719
Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
255 260 265 270

agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg 1767
Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met
275 280 285

gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga ggc 1815
Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
290 295 300

att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa 1863
Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys
305 310 315

gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac 1911
Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His
320 325 330

tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat ggc aag 1959
Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys
335 340 345 350

gaa atc aaa ata aca cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca 2007
Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr
355 360 365

ggt tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac 2055
Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
370 375 380

ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg 2103
Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val
385 390 395

cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg 2151
His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala
400 405 410

gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc 2199
Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe
415 420 425 430

aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa 2247
Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln
435 440 445

gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg 2295
Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met
450 455 460

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg 465 470 475	2343
atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly 480 485 490	2391
aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile 495 500 505 510	2439
gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgc aag atc cct Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro 515 520 525	2487
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile 530 535 540	2535
aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu 545 550 555	2583
gca gaa cct cca ttc gga gac agc cac atc atc ata gga gta gag ccg Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser His Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro 560 565 570	2631
gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agt tct atc ggc caa Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln 575 580 585	2679
atg ttt gag aca aca atg agg ggg gcg aag aga atg gcc att tta ggt Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly 595 600 605	2727
gac aca gcc tgg gat ttt gga tcc ttg gga gga gtg ttt aca tct ata Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile 610 615 620	2775
gga aag gct ctc cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe 625 630 635	2823
ggg gga atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu 640 645 650	2871
tgg atg ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu 655 660 665 670	2919
gcc aca ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala 675 680 685	2964
taattagttt gggcgccgcg tcgagcatgc atctagaggg cctatttcta tagtgtcacc taaatgctag agcgcgtgga tcagcctcga ctgtgctctc tagttgcacg coactgtgtg tttgcccttc ccccggtgct tccttgaccg tggaaaggtc cactccact gtctttctct aataaaatga ggaattgca tcgcattgtc tgagttagtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggga gaacagcaag ggggaggatt gggaaagcaa tagcaggcat gctggggatg	3024 3084 3144 3204 3264

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

cggtagggctc tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg cattaatgaa tcggccaacg 3324
cgcgggggaga ggcggtttgc gtattgggcyg ctcttcgcgt tcttcgctca ctgactcgct 3384
gcgctcggtc gttcggttgc ggcgagcggg atcagctcac tcaagggcgg taatacgggt 3444
atccacagaa tcaaggggata acgcaggaaa gaacatgaga gcaaaaggcc agcaaaaggg 3504
caggaaacgt aaaaaggcgc cgttgctggc gttttccat aggtccggcc ccccgagcga 3564
gcattcacaaa aatcgacgct caagtccagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 3624
ccaggcggtt ccccttgaaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgcgcgttac 3684
cggatcacctg tccgcttttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcagctg 3744
taggtatctc agttcggtgt aggtcggttg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 3804
cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag 3864
acacgactta tgcgactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt 3924
aggcgggtct acagagttct tgaagtggtg gcctaacact ggctacacta gaagaacagt 3984
atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaagagtttg gtactcttg 4044
atccggcaaa caaacaccgc ctgtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac 4104
gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt totacggggt ctgacgtcca 4164
gtggaacgaa aactcacgtt aagggttttt ggtcatyaga ttatcaaaaa ggatcttcac 4224
ctagatcctt tcaatttcaa aatgaagttt taaatcaatc taaagatcat atgagtaaac 4284
ttggtctgac agttaccatg gtttaactag tggggacact attctcagga tctgtctatt 4344
tcgtttatcc atagttgctt gactcccggt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 4404
accatctggc cccagtgtcg caatgatacc cggagaccca cgtccaccgg ctccagattt 4464
atcagcaata aaccagccag ccggaaggcg cagcgccaga agtggctctg caactttatc 4524
cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgcaggttaa 4584
tagtttgccg aacgttggtt ccattgttac aggcactcgt gtgtcacgtt cgtcgttttg 4644
tatggtctca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt 4704
gtgcaaaaaa cgggttaact ccttcggctc tccgactcgt gtcagaagta agttggccgc 4764
agtggtatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgcactccgt 4824
aagatgtctt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagta ttctgagaat agtgtatgog 4884
gcgaccgagt tgcctctggc cggcgtaact acgggataat accgcggcac atagcagaac 4944
tttaaaagtg ctcactatg gaaaacgttc ttccggggcg aaactctcaa ggatcttacc 5004
gctgttgaga tccagttcga tgaacccac tctgtcacc aaactctctt cagactcttt 5064
tactttcac agcgtttctg ggtgagcaaa aacagggaag caaaatgccg caaaaaggg 5124
aataaaggcg acacggaat gttgaatac catactcttc ctttttcaat attattgaag 5184
catttatcag ggttaltgto tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 5244
acaaataggg gttccggcga catttcccg aaaaagtcca cctgacgtc 5293

```

<210> 45

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 45

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1           5           10          15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
20          25          30
Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
35          40          45
Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
50          55          60
Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
65          70          75
Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
80          85          90
Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
100         105         110
Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
115         120         125

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
 130 135 140
 Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
 165 170 175
 Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
 180 185 190
 Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
 195 200 205
 Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
 210 215 220
 Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
 245 250 255
 Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
 260 265 270
 Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
 275 280 285
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val
 290 295 300
 Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380
 Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser His Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe
 580 585 590
 Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr
 595 600 605

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys
610 615 620
Ala Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
625 630 635 640
Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met
645 650 655
Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
660 665 670
Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
675 680 685

<210> 46
<211> 5293
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (910)...(2954)

<400> 46
gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggctgactct cagtacaatc tgcctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gactagtgcg 120
cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgacgga caattgcatt aagaatctgc 180
ttagggttag cgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cyttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgacgg ccacaagacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatag aaagccaata ggaactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgcccaagta catgacctta tgggacttcc ctacttgcca gtacatctac gtattagtc 600
tcgtatttac catggtgatg cgtttttggc agtacatcaa tggcggtgga tagcgggttg 660
actcacgggg atttccaagt cccaccccca ttgacgtcaa tggcggttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggaactttca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatggcg 780
gtagcgctgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggcttaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatcaga ctcaatatag ggagacccaa gcttggtacc 900
gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc gcc tca atc atg tgg ctc ggc agc 951
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
1 5 10

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca gcc gcc ttc cat tta acc aca cgt 999
Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
15 20 25 30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt 1047
Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
35 40 45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat gcc gtg aac atg tgt acc ctc atg gcc 1095
Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
50 55 60

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc 1143
Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
65 70 75

WO 02/081754

PCT/US02/10764

ctt ctc agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser 80 85 90	1191
acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His 95 100 105 110	1239
aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctc gtt cca cat gtg gga atg gga Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly 115 120 125	1287
ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys 130 135 140	1335
cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca ggc ttc acc His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr 145 150 155	1383
atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln 160 165 170	1431
aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr 175 180 185 190	1479
atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser 195 200 205	1527
gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat ggg agc tgt gtg acg Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr 210 215 220	1575
acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr 225 230 235	1623
gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys 240 245 250	1671
cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro 255 260 265 270	1719
agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met 275 280 285	1767
gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga gcc Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly 290 295 300	1815
att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys 305 310 315	1863

WO 02/081754

PCT/US02/10764

gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His 320 325 330	1911
tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat ggc aag Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys 335 340 345 350	1959
gaa atc aaa ata aca cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr 355 360 365	2007
ggg tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp 370 375 380	2055
ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val 385 390 395	2103
cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala 400 405 410	2151
gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe 415 420 425 430	2199
aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln 435 440 445	2247
gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met 450 455 460	2295
tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg 465 470 475	2343
atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly 480 485 490	2391
aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile 495 500 505 510	2439
gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgc aag atc cct Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro 515 520 525	2487
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile 530 535 540	2535
aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu 545 550 555	2583

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

gca gaa cct cca ttc gga gac agc tac atc atc ata gga gta gag ccg 2631
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
560 565 570

gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agc acg ctg ggc aag 2679
Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys
575 580 585

gcc ttt tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca gcg ttg ggc 2727
Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly
595 600 605

gac aca gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata 2775
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile
610 615 620

gga aaa gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt 2823
Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe
625 630 635

ggg gga atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc 2871
Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu
640 645 650

tgg atg ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta 2919
Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu
655 660 665 670

gcc aca ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct 2964
Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
675 680 685

taattagttt gagcggtcgc tcgagcatgc atctagaggg ccctattcta tagtgtcacc 3024
taaagcttag agctcgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtt 3084
tttgcccttc ccccgctgct tccttgaccc tggaaaggtgc cactccact gtccttccct 3144
aataaaatga ggaattgca tcgcatigtc tgaataggtg tcattctatt ctggggggtg 3204
gggtggggca ggaacgcaag ggggaggatt ggaagacaa tagcaggcat gctgggggatg 3264
cggtgggttc tatgcttct gagcggtgaa gaaccagctg cattaatgaa tcggccaacg 3324
cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct 3384
gcgctcgctc gttcggtctg ggcgagcggt atcagctcac tcaaaaggcg taatacgttt 3444
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 3504
caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggtctcgcc cccctgacga 3564
gcacacaaaa aatcgagctc caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 3624
ccaggcgttt cccctggaaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaacc tgcgcctaac 3684
cggataactg tcgctcttc tccttcggg aagcgtggcg ctthctcaat gctcacgtg 3744
tagtatactc agttcggtgt aggtgttctg ctccaaagct ggctgtgtgc acgaaccacc 3804
cgttcagccc gaaccctgag ccttatccgg taactatcgt cttagctcca acccggttaag 3864
acacgactta tcgcaactgg cagcagccac tggtaacagg atlagcagag cgaggtatgt 3924
aggcggtgct acnagtttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 3984
atttgggtatc tgcgtcttgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg tagctcttg 4044
atccggcaaa caaacaccgc ctgttagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac 4104
gcgcagaaaa aaagatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgtca 4164
gtggaacgaa aactcagttt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcc 4224
ctagatcttt taaattaaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 4284
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcaact atctcagcga tctgtctatt 4344
tcgttcaccc atagttgctt gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 4404
accatctggc ccagtgctgt caatgatacc gcgagaccca gctccaccgg ctccagattt 4464
atcagcaata aacagcagag ccggaagggc cgagcgcaag agtggtctcg caactttatc 4524
cgctccatcc cagttatcta attgttgcg ggaagctaga gtaagtgttt cgcagtttaa 4584
tagtttgcgc aacgttgttt ccatgtctac aggcacgtgt gtgtcacgct cgtgttttgg 4644
tatggtctca ttcaggtccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt 4704

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

```

gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgacgtt gtcagaagta agttggccgc 4764
agtgttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgcacccgt 4824
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagta cttcgagaat agtgtatgcy 4884
gcgacccgagtgctcttgcc cggggtcaat accggataat accggccac ataggagaac 4944
tttaaaagtg ctcctcattg gaaaacgttc ttgggggcga aaactctcaa ggtctctaac 5004
gctgttgaga tccagtttga tgaacccac tctgtgcacc aactgatctt cagcatcttt 5064
tactttcacc agcgttttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccc caaaaanagg 5124
aataagggcg acacgggaat gtggaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 5184
catttatcag ggttatgttc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 5244
acaaataggg gttccgcgca catttcccg aaaagtgcga cctgacgtc 5293

```

<210> 47

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 47

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1      5      10      15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
20     25     30
Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
35     40     45
Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
50     55     60
Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
65     70     75     80
Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
85     90     95
Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
100    105    110
Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
115    120    125
Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
130    135    140
Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
145    150    155    160
Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
165    170    175
Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
180    185    190
Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
195    200    205
Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
210    215    220
Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
225    230    235    240
Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
245    250    255
Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
260    265    270
Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
275    280    285
Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ile Val
290    295    300
Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
305    310    315    320

```

WO 02/081754

PCT/US02/10764

Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380
 Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe
 580 585 590
 Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr
 595 600 605
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys
 610 615 620
 Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
 625 630 635 640
 Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met
 645 650 655
 Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
 660 665 670
 Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 675 680 685

<210> 48
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 48
 tgtgcaggcg ccttcatttt aaccacacgt aacg

34

<210> 49
 <211> 40

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 49
tcgagcggcc gctcaactaa ttaggcctgc accatgactc 40

<210> 50
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 50
cttatcgaaa ttaatacgac toactatagg 30

<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 51
atagattgct ccaaacactt gytgg 25

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 52
actccatagg aaaagccgtt cacc 24

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 53
gcgagctcta gcatttaggt gacactatag 30

<210> 54
<211> 33
<212> DNA

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 54
ctccaccaag tgtttggtgg tgccttcaga aca 33

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 55
Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr
1 5 10

<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 56
cttatcgaaa ttaatacgac tcaactatagg 30

<210> 57
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 57
gaattcgtct cacttccttt cttaaaccag ttgagettc 39

<210> 58
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 58
ggaattcgtc tcggaagcac gctgggcaag g 31

<210> 59
<211> 30
<212> DNA

WO 02/081754

PCT/US02/10764

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 59
gcgagctcta gcatttaggt gacactatag 30

<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 60
aactgggtta agaaaggaag cacgctgggc gcc 33

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 61
Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala
1 5 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/10764
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 435/5, 7.1, 69.1, 530/387.1; 424/218.1; 536/23.72 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 7.1, 69.1, 530/387.1; 424/218.1; 536/23.72 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, WPIDS, USPATFUL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,494,671 A (LAI, C., et al.) 27 February 1996, see entire document.	1-43
Y	US 6,074,865 A (KELLY, E. P. and A. D. KING) 13 June 2000, see entire document.	1-43
Y	US 6,165,477 A (IVY, J., et al.) 26 December 2000, see entire document.	1-43
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *B* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *G* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
18 JUNE 2002	18 JUL 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 505-3250	Authorized officer J. S. PARKIN Telephone No. (703) 808-1234	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/10764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C12Q 1/70; G01N 33/53; C12P 21/06; C07K 16/00; C07H 21/04; A61K 39/12

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/10	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 チャン グウォン - ジェン ジェイ .
アメリカ合衆国 コロラド州 フォート コリンズ ビーバー クリーク ドライブ 4 2 3 7
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA04 CA11 DA02 DA06 EA04 GA14
4B065 AA26X AA91X AA95Y AB01 BA03 CA24 CA44 CA46
4C085 AA03 BA62 CC08 EE01 GG01
4H045 AA11 BA10 CA01 DA86 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004532023A5	公开(公告)日	2008-01-10
申请号	JP2002579516	申请日	2002-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府 美國政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	チャングウォンジェンジェイ		
发明人	チャン グウォン-ジェン ジエイ.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/12 A61P31/14 C07K14/18 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53 G01N33/569 C12N5/10		
CPC分类号	A61K39/12 A61K48/00 A61K2039/53 A61K2039/70 C07K14/005 C07K16/1081 C07K2319/02 C12N2770/24022 C12N2770/24122 C12N2770/24134 C12Q1/701 G01N33/56983 G01N2333/18 Y02A50/386 Y02A50/388 Y02A50/39 Y02A50/394 Y02A50/53 Y02A50/60		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/12 A61P31/14 C07K14/18 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.N G01N33/569.L C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA14 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA62 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/826115 2001-04-04 US		
其他公开文献	JP4448281B2 JP2004532023A		

摘要(译)

本发明包括编码嵌合免疫原性黄病毒抗原的转录单元，其包含一种黄病毒信号序列和第二种黄病毒免疫原性黄病毒抗原，或来自多种黄病毒的序列。，包括分离的核酸。本发明还包括核酸和蛋白质疫苗，以及该疫苗用于免疫受试者抵抗黄病毒感染的用途。本发明还提供了由本发明的核酸编码的抗原，响应于抗原引发的抗体，以及抗原和/或抗体在检测黄病毒或黄病毒感染诊断中的用途。