

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-141234

(P2017-141234A)

(43) 公開日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00 1 7 1	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-38534 (P2017-38534)	(71) 出願人	591015142 ユナイテッド・バイオメディカル・インコーポレーテッド UNITED BIOMEDICAL INCORPORATED アメリカ合衆国、ニューヨーク 11788、ホーボージ、デービッツ・ドライブ 25
(22) 出願日	平成29年3月1日(2017.3.1)	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(62) 分割の表示	特願2014-550269 (P2014-550269)の分割	(74) 代理人	100103447 弁理士 井波 実
原出願日	平成23年12月30日(2011.12.30)	(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プタ生殖器呼吸器症候群 (P R R S) の有効な制御のための合成ペプチドベースのマーカークワチン及び診断システム

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 プタ生殖器呼吸器症候群 (P R R S) に対するペプチドベースのマーカークワチン、並びに P R R S の予防方法及び免疫診断方法の提供。

【解決手段】 P R R S V G P 2、G P 3、G P 4、又は G P 5 タンパク質の B エピトープに由来するペプチドの混合物を有し；それぞれのペプチドは個々に、それぞれのペプチドの免疫原性を増強するために人工 T ヘルパーエピトープに個々に結合された、B 細胞 P R R S V 中和 / レセプター結合エピトープを有し；これに P R R S V G P 4、G P 5、M 及びヌクレオカプシドタンパク質に由来する T ヘルパーエピトープを提示するペプチドの混合物を補充して、細胞性免疫を付与することができる、P R R S ワクチン組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有する、ブタ生殖器呼吸器症候群（PRRS）ワクチン組成物であって、該ペプチド抗原が、

a) 配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、及びこれらの任意の組合せ；

b) (a) のホモログ；及び

c) (a) 又は (b) の任意の組合せ

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、PRRS ワクチン組成物。

【請求項 2】

前記ペプチド抗原が、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 3】

前記ペプチド抗原が、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 4】

前記ペプチド抗原が、配列番号 11 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 5】

前記ペプチド抗原が、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 6】

前記ペプチド抗原が、1～5 個のアミノ酸を付加するか又は欠失させることによって変更される、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 7】

前記ペプチド抗原のアミノ末端又はカルボキシル末端に共有結合した T ヘルパーエピトープをさらに有する、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 8】

前記 T ヘルパーエピトープが配列番号 35 である、請求項 7 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 9】

前記 T ヘルパーエピトープが、- リジン残基を有するスペーサーを介してペプチド抗原に共有結合する、請求項 7 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 10】

前記スペーサーが配列番号 36 である、請求項 9 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 11】

前記抗原ペプチドに結合されていない T ヘルパーエピトープをさらに有し、該 T ヘルパーエピトープが配列番号 47～90 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 12】

前記ペプチド抗原の総量が約 10 μg～約 1 mg である、請求項 1 のいずれかに記載の PRRS ワクチン。

【請求項 13】

前記送達ビヒクル及びアジュバントが、モンタニド (Montanide) ISA 50V、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレエート、及び CpG オリゴヌクレオチドからなる群から選択される、請求項 1 に記載の PRRS ワクチン。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のワクチンを投与する工程を有する、PRRS 感染に対して子ブタを防御する方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

- a) ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバント、
- b) 配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号31、及びそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド抗原、及び
- c) 配列番号80～90及びそれらの組合せからなる群から選択されるPRRSV Thペプチド、を有する、PRRSワクチン組成物。

【請求項16】

- a) ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバント、
- b) 配列番号42、配列番号44、配列番号45、配列番号46、及びそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド抗原、及び
- c) 配列番号80～90及びそれらの組合せからなる群から選択されるPRRSV Thペプチド、を有する、PRRSワクチン組成物。

10

【請求項17】

- a) 配列番号1及び配列番号2の混合物を固体支持体に付着させる工程、
- b) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、該ペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、前記抗体を含むブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及び
- c) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程、を有する、PRRS感染を診断する方法。

【請求項18】

- 抗PRRSV抗体の存在をテストするためのELISAイムノアッセイであって、
- a) 配列番号7及び配列番号8の混合物を固体支持体に付着させる工程、
 - b) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、該ペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、前記抗体を有するブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及び
 - c) 前記支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程
- を有する、上記ELISAイムノアッセイ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ブタ生殖器呼吸器症候群（PRRS）に対するペプチドベースのマーカーワクチンならびにブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）のモニタリング及び制御のための一組の免疫診断テストに関する。

30

【背景技術】

【0002】

ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）は、成熟雌ブタ及び若雌ブタにおける重度の繁殖障害の原因として1980年代後半に発見され、ブタ産業における最も重要な病原体の1つである。成熟雌ブタ及び若雌ブタが感染することにより、後期流産、早期分娩及び病弱な子ブタの出産を引き起こし得る一方、感染雄ブタは、精子の質の低下及び精液中のウイルス排出を示す。

【0003】

また、PRRSVは、幼若ブタのブタ呼吸器病候群に関与することも見出され、ウイルス及び細菌の二次感染を伴って呼吸障害を引き起こす。このウイルスは、限られたインピボでの細胞指向性を示し、肺胞マクロファージが主要な標的細胞である。

40

【0004】

PRRSVは、アルテリウイルス科ニドウイルス目に属する、エンベロープを有する一本鎖RNAウイルスであり（1）、約15kbの長さで、9つのオープンリーディングフレーム（ORF）からなる。ピリオンは、ウイルスRNAと結合したヌクレオカプシドタンパク質（オープンリーディングフレーム7、ORF7によってコードされる）で構成されるヌクレオカプシドコアからなる。ヌクレオカプシドは脂質エンベロープに囲まれ、そのエンベロープ中に6つの構造タンパク質：糖タンパク質GP2（ORF2a）、GP3（ORF3）、GP4（ORF4）及びGP5（ORF5）、ならびに非グリコシル化タンパク質M（ORF6）及びE（ORF2b）が埋め込まれている。GP5及びMは、エ

50

ンベローブ内で最も豊富なタンパク質であると考えられる一方、その他のエンベローブタンパク質の存在量はより少ない。ゲノムの5'末端に位置するORF 1a及びORF 1bは、非構造タンパク質をコードする。

【0005】

他の多くのRNAウイルスと同様に、PRRSVは高い遺伝的変異性を示し、病原性の変異、免疫系との相互作用、及びウイルスタンパク質の抗原特性に反映される。遺伝子型間に高い変異性は存在するが、ウイルス株は通常、ORF 5及び/又はORF 7配列に基づき、欧州(EU)及び北米(NA)遺伝子型に分類される。

【0006】

PRRSVは、宿主の防御免疫を回避し得る多数の特性を獲得している。これらの特性は、感染から1~2週間後にウイルス特異的抗体が遅れて産生されることであり；このような抗体は、初代ブタ肺胞マクロファージ(PAM)におけるインビトロでのウイルス複製を減少させることができず；本当に必要なウイルス中和抗体は、感染からおよそ3~4週間後に低レベルで出現するため、急性期のウイルス血症に影響を及ぼすには遅すぎる(1、2)。

10

【0007】

この弱いウイルス中和抗体反応にもかかわらず、感染の開始時にこのようなウイルス中和抗体が十分量存在すれば、肺におけるウイルス複製、ウイルス血症及びウイルスの経胎盤伝播に対しての防御を提供でき、PRRSV特異的中和抗体が、防御免疫に一部貢献できることを示している(2、3)。

20

【0008】

PRRSウイルス血症は、感染ブタの血中において中和抗体と一緒に見つかり、このことから、体液性免疫反応のみではしっかりとした防御を付与しなかったことが示される。細胞性免疫(CMI)は、PRRSVの排除に重要な役割を果たすことが示されている(4)。リンパ球芽球化及び適応サイトカイン産生(例えば、インターフェロン；IFN-)によって判定されるように、感染ブタにおけるCMI応答の進行は遅れることが見出され、末梢血単核球(PBMC)のインビトロの再現応答(recall response)では、感染後およそ4~8週目に検出可能になり、これは中和抗体の発生と関連していた(5~7)。IFN-は、動物における様々な細胞変性ウイルス感染に対する細胞性免疫反応に重要な役割を果たす。PRRSV感染したブタにおいて、IFN-mRNAは、リンパ節、肺及び末梢血単核球で検出された(7)。

30

【0009】

ウイルス中和抗体を誘導するB細胞エピトープ及びIFN-を誘発するT細胞エピトープを提示する抗原性領域を、PRRSV構造プロテオーム全体にわたって探索することは、獣医ウイルス免疫学において、過去20年間にわたって最もやりがいのあるトピックの1つである。世界的なPRRSV研究団体によって蓄積された成果として、このようなエピトープマッピング結果を示す代表的な論文を、本明細書に参考として提供する(8~10)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0010】

改変生ワクチン(MLV)及び不活化PRRSVウイルス溶解物ワクチンが市販されているにもかかわらず、PRRSV関連疾患の制御は、依然として問題をはらんでいる。1つの主要な問題は、PRRSVワクチンが、同種の攻撃に対しては有効であるが、異種の攻撃に対しては有効でないという点についての有効性である。また、MLVについての安全性の問題が本分野で報告されている。改変生ワクチンは、妊娠成熟雌ブタ、若雌ブタにおける使用に適さず、及びワクチン接種により精液中にワクチンウイルスの排出を引き起こす場合があるので雄ブタにおける使用に適さない。改変生ウイルスワクチンは、ワクチン接種動物中で存続できる。ワクチン未接種動物への感染、及びその後のワクチン-ウイルス誘導疾患が報告されている。なお、感染ブタとワクチン接種ブタとを識別でき、それ

50

により PRRSV 感染の追跡管理及び制御が容易になる、マーカーワクチンの開発が緊急に必要とされている。

【0011】

要約すると、防御抗体及び細胞性免疫反応を誘導可能な、異なる機能性 B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープを有する免疫原性 PRRSV ペプチドを設計すること、ならびにブタにおける PRRSV 株の交差防御を可能にするこれらのデザイナーペプチドを有するワクチン製剤を設計することが、依然として緊急に必要とされている。これらの合理的に設計され且つ分子的に特徴付けられた免疫原性ペプチドの利用可能性と共に、感染ブタ由来の抗体によって認識され得る抗原性ペプチドを同定する必要性もあり、且つこれらのデザイナーペプチドを用いて、感染動物とワクチン接種動物とを血清学的に識別するための一組の診断テスト（したがって、診断システム）を開発し、PRRSV 感染の有効な制御を可能にする必要性もある。最終的に、このようなペプチドベースのマーカーワクチンの低価格製造及び品質管理のための手段、ならびに PRRS 疾患を効果的にモニタリング及び制御するための広い用途の診断システムを開発することが必要である。

【0012】

参考文献

1. Gorbalenya, A, et al. 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117:17-37.
2. Lopez, OJ, et al. 2007. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol* 14:269-75.
3. Lopez, OJ, and Osorio FA. 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 102:155-63.
4. Mateu, E., Diaz, I, 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet. J.* 177 (3), 345- 351.
5. Bassaganya-Riera, J, et al. 2004. Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+ T cells. *Viral Immunol.* 17 : 25-37.
6. Bautista, E.M, and Molitor, T.W. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10: 83-94.
7. Lopez Fuertes, L, et al. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 64 : 33-42.
8. Vanhee, M, et al. 2011. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine.* 29:4794-4804.
9. Wang, YX, et al 2011. Identification of immunodominant T-cell epitopes in membrane protein of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research* doi: 10.1016.
10. Diaz, I, et al. 2009. In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-1 (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27: 5603-5611.
11. Wang, CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens including immunogenic LHRH peptides. US 6,025,468.
12. Wang, CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens. US 6,713,301.
13. Wang, CY, Finstad, Connie L., Walfield, Alan M., Sia Charles, Sokoll, Kenneth K., et. al. Site Specific UB1Th Amyloid- Vaccine for Immunotherapy of Alzheimer's Disease. *Vaccine*, 2007: 25: 3041-3052.

10

20

30

40

50

14. Wang, CY, Walfield, Alan M. Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications. (Review Article) *Vaccine* 2005; 23:2049-2056.
15. Hseuh, PR, Kao CL, Lee CN, Chen LK, Ho MS, Sia C, Fang XD, Lynn S, et al and Wang, CY. Highly Specific SARS Antibody Test for Serosurveillance. *Emerg. Infect. Diseases* 2004, 10:1558-1562.
16. Finstad, CL, Wang, CY, et al. Synthetic luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) vaccine for effective androgen deprivation and its application to prostate cancer immunotherapy. *Vaccine* 2004; 22:1300-1313.
17. Wang, CY, et al. Synthetic IgE peptide vaccine for immunotherapy for allergy. *Vaccine* 2003, 21:1580-1590.
18. Wang, CY, et al. Synthetic AIDS vaccine by targeting HIV receptor. *Vaccine* 2002, 21: 89-97.
19. Wang, CY, et al. Effective Synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*. 2002, 20:2603-2610.
20. Wang, CY, et al. Synthetic Peptide-based Vaccine and Diagnostic System for Effective Control of FMD. *Biologicals* 2001, 29: 221-228.
21. Fuerst, TR, Niles EG, Studier FW, and Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:8122-8126.
22. Chen, C-M, Liu H-T, Tu C-F. Effects of PCV2 infection in a transgenic SPF pig farm in Taiwan. 13th AAAP Anim. Sci. Congr. September 22-26, 2008 Hanoi, Vietnam. *Proceedings*, p. 420.
23. Das, PB, et al. The Minor Envelope Glycoproteins GP2a and GP4 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interact with the Receptor CD163. 2010. *J. Virol.* 84:1731-1740.
24. Harlow, E, and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Chapter 14 Immunoassays, pp 555-612. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1988.

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

発明の簡単な説明

本開示は、ブタ生殖器呼吸器症候群（PRRS）に対するペプチドベースのマーカーワクチンならびにブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRSV）の予防、モニタリング及び制御のための一組の免疫診断テストに関する。

【 0 0 1 4 】

構造的 PRRSV プロテオーム全体にわたる抗原性領域に関する科学的情報を利用できるにもかかわらず、研究団体が数十年も努力しても、感染性因子に対する成功したペプチドベースのワクチンを全く開発できないために、大部分の病原体について合成ペプチドワクチンはこの先生産されそうもないという意見がある。本発明者は、第一世代の生物学的ワクチンから多くを学び、ここでは選択的な PRRSV の B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープを含む合理的設計アプローチにより、所望のウイルス株に対する合成ペプチドベースの PRRSV ワクチンならびに疾患のモニタリング及び制御のためのコンパニオン診断テストの検証及び開発が可能ならずである。B 細胞中和エピトープはほとんどが立体構造であり、それらの B 細胞エピトープ関連ペプチド免疫原を設計する場合にはそれを考慮しなければならないと認識することが重要である。関連する B 抗原性エピトープの同定及び設計には、標的分子の構造とその機能との間の関係を理解することが必要になる。免疫原設計に供する標的分子の構造及び機能の理解におけるこのような学問分野を、本発明者は「機能的抗原学（functional antigenic）」と呼ぶ。また、免疫反応は複雑かつ多面的である。疑似種集団として存在する、急速に進化する RNA ウイルスに対するワクチンは、宿主免疫系を回避するウイルス変異体が出現するリスクを最小限にするために、できる限り多くの異なる防御免疫メカニズムを刺激することを常に目標とすべきである。

【0015】

成功した合成ペプチドベースのワクチンは、適応免疫及び先天免疫を含む免疫系の適切な要素を刺激する成分を有するであろう。エピトープベースのペプチドワクチンの開発における別の主要な障害は、一部に、これらのエピトープを提示する短鎖ペプチドが非免疫原性であるという性質に起因している。また、病原体の遺伝的変異及び宿主の遺伝的変異から生じる広範な交差防御のためのワクチンの普遍性が可能になるように、幅広いレパートリーのBエピトープ及びTエピトープを含むことが必要である。さまざまな疾患に対する合成ペプチドベースのワクチン及び診断テストの膨大な努力及び実験検証により、本発明者は、所望の免疫原性の増強に適したT細胞エピトープを補充した、インビボ及びインビトロの血清学的及び機能的な研究のための抗体を誘発する天然標的分子上の抗原部位に擬態したペプチド免疫原の合理的な設計に重点を置いている。これにより、臨床的及び商業的応用のためのそれぞれの標的疾患における最適化抗原、免疫原、及びワクチン製剤につながっている(11~20)。

10

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の種々の態様によるワクチン製剤は、PRRSV GP2、GP3、GP4、又はGP5タンパク質に由来するペプチドの混合物を含み；それぞれのペプチドは個々にB細胞PRRSV中和/レセプター結合エピトープを有し、該エピトープは個々に、各ペプチドの免疫原性を増強するために、人工Tヘルパーエピトープに結合し；ペプチドの混合物にPRRSV GP4、GP5、M及びヌクレオカプシドタンパク質に由来するTヘルパーエピトープを提示するペプチドの混合物を補充して、細胞性免疫を付与することができる。このようなウイルスペプチド組成物は、ワクチン製剤として許容可能な送達系に調製され、PRRSV負荷時にPRRSV抗体を持たないブタに感染からの交差防御を与えることができる。

20

【0017】

本発明の種々の態様による診断システムは一組の診断テストを含み、あるテストは、PRRSV感染動物から最適抗体認識のために、PRRSV ORF7をコードする2つの重複する抗原ペプチドをELISAイムノアッセイ形式で提供し、且つその他のテストは、PRRSVペプチドワクチン免疫化動物から最適抗体認識のために、GP2、GP3、GP4及びGP5由来ワクチン標的ペプチドを、ELISAイムノアッセイ形式で提供する。これらの診断テストを組合せて、感染動物とワクチン接種動物との識別(DIVA)、ひいては疾患の効果的なモニタリング及び制御のための診断システムを構成する。

30

【0018】

PRRSV感染からブタを防御するこのようなワクチンの製造方法、及びDIVAのための一組の免疫診断テストの製造方法、ひいては疾患の効果的な制御を可能にする方法にも関する。

【0019】

本発明のペプチド又はペプチド組成物は、天然のウイルスとの交差反応性により、PRRSV負荷時に感染からPRRSV抗体を持たない子ブタを交差防御するためのマーカーワクチンの開発、及び感染動物とワクチン接種動物とを識別するための一組のペプチドベースのELISAの開発のために、標的種における膨大な血清学的検証のプロセスによって設計され、かつ最適化される。

40

【0020】

本開示はPRRSVワクチンに関し、詳細には、PRRSV GP2、GP3、GP4又はGP5タンパク質のBエピトープに由来するペプチド及びペプチド組成物を有するPRRSVワクチンに関し、各ペプチドは任意にTヘルパーエピトープと結合してもよく、PRRSVとの交差反応性を有する高力価の抗体を含めた液性免疫を免疫化宿主に誘導するように、ペプチドの免疫原性を増強してもよい。

【0021】

本ペプチド又はペプチド組成物は、細胞性免疫反応を開始するために、ワクチン製剤中

50

に PRRSV GP4、GP5、M 及びヌクレオカプシドタンパク質の T 細胞エピトープを提示する追加のペプチドをさらに補充される。

【0022】

本発明の種々の態様が提供される。ある一組の態様として、感染動物由来のヌクレオカプシド (NC) タンパク質に対する抗体の検出用抗原として有効なペプチド及びペプチド組成物に関する。第 2 の一組の態様として、ワクチン接種動物由来の GP2、GP3、GP4 及び GP5 エピトープを標的とするマーカーワクチンに対する抗体の検出用に有効なペプチド及びペプチド組成物に関する。これらの診断テストは DIVA の診断システムを構成し、ひいては疾患の効果的な制御を構成する。

【0023】

PRRSV タンパク質の B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープの両方に由来する、ペプチド (類)、そのホモログ及びアナログに関する、他の一組の態様がある。このような PRRSV ペプチドは、優先的にはあるが任意に、それらの個々の免疫原性を増強するために人工コンビナトリアル T ヘルパーエピトープに結合してもよい。

【0024】

また、他の一組の態様において、PRRSV 感染に対してブタを防御するために、天然の PRRSV タンパク質抗原と交差反応性を示す抗体反応及び細胞性免疫反応の両方を一緒に誘発するように、PRRSV B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープ由来のペプチド免疫原に由来するペプチド及びペプチド組成物を有する、ワクチン製剤に関する。

【0025】

このような設計されたペプチドの各々は、産業上の利用のためにミリグラムからキログラムのスケールで化学合成することができ、かつ品質管理することができる。

ワクチン製剤に通常含まれる送達ビヒクル及び他の成分もまた、本発明の種々の態様によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】図 A は、コトランスフェクトされた HTK 細胞株細胞の細胞質内の PRRSV GP5 タンパク質に対する抗体を、本発明の態様による免疫蛍光法により検出するメカニズムを示す図である。図 1 B は、図 1 A に記載のメカニズムによって実施される免疫蛍光アッセイ (IFA) である。細胞質内の GP5 に結合した PRRSV GP5 タンパク質に対する抗体を有するコトランスフェクトされた HTK 細胞株細胞が検出される。

【図 2 A】PRRSV MD001 株 (受託番号 AF121131) のヌクレオカプシド (NC) タンパク質上の抗原部位の局在及び感染動物における NC タンパク質に対する抗体を検出するための UBI PRRSV NC ELISA に用いる抗原ペプチド (配列番号 1) の同定。

【図 2 B】PRRSV MD001 株 (受託番号 AF121131) のヌクレオカプシド (NC) タンパク質上の抗原部位の局在及び感染動物における NC タンパク質に対する抗体を検出するための UBI PRRSV NC ELISA に用いる抗原ペプチド (配列番号 2) の同定。

【図 3】PRRSV 株 MD001 (配列番号 3)、JXA1 (配列番号 4)、NA (配列番号 5) 及び EU (配列番号 6) 由来の相同ヌクレオカプシドタンパク質配列のアライメント。

【図 4】マーカーワクチン設計に適した PRRSV JXA1 株 (受託番号 AY2G2352) の PRRSV ORF2 ~ ORF7 タンパク質における選択された B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープの局在。

【図 5】UBI PRRSV NC_{NA} ELISA でテストされた異なる起源由来のブタ血清の血清反応性。

【図 6 A】UBI の診断システム (即ち、PRRSV 感染ブタを検出するためのテスト、ならびに GP2、GP3、及び GP4 タンパク質由来のデザイナーペプチド免疫原を含むワクチン製剤を接種された動物を検出するためのテスト) によって検出及び識別されるよ

10

20

30

40

50

うに、PRRSV感染ブタにおける標的ペプチド免疫原に対する特異的な高力価抗体を誘発するUBI PRRSVマーカーワクチン製剤。

【図6B】UBIの診断システム（即ち、PRRSV感染ブタを検出するためのテスト、ならびにGP3、GP4、及びGP5タンパク質由来のデザイナーペプチド免疫原を含むワクチン製剤を接種された動物を検出するためのテスト）によって検出及び識別されるように、PRRSV感染ブタにおける標的ペプチド免疫原に対する特異的な高力価抗体を誘発するUBI PRRSVマーカーワクチン製剤。

【図7】図7Aは、PRRSウイルス負荷後の病理組織学的病変を示す写真。間質性肺炎を発症したコントロール群の動物は、肺にリンパ球細胞による肺胞壁の肥厚が現れた。

図7Bは、PRRSウイルス負荷後の病理組織学的病変を示す写真。UBI PRRSV GP5ペプチドワクチン製剤によって免疫化された動物。肺は正常な肺胞壁を維持する。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

ペプチド抗原は、免疫反応を検出することができ、あるペプチド抗原は、免疫反応を刺激することもできる。多くのペプチド抗原は、免疫反応の高感度かつ特異的な検出に用いられ得るが、ほとんどの場合、それら自体では免疫原として作用しない。ペプチド免疫原は、免疫反応の刺激及びそれらの検出に用いることができる、特殊な分類のペプチド抗原である。本発明のある態様によれば、PRRSVワクチン中のペプチド抗原は、防御免疫反応の発生を刺激するように共に作用するB細胞（B）エピトープ及びTヘルパー細胞（Th）エピトープの両方を有するペプチド免疫原であり、PRRSV感染に対する免疫反応を検出することができる別の組のペプチド抗原も存在する。

【0028】

B細胞エピトープの同定のある方法は、多様な長さ、典型的には、20～60残基又はこれ以上の長さ、のネステッドペプチド（nested peptide）であり且つ重複するペプチドの組を利用する。これらのより長いペプチドは、面倒な一連の独立した固相ペプチド合成によって合成される。その後、得られたネステッドペプチドでありかつ重複するペプチドの組を、抗体結合研究に用いることにより、非連続の立体構造B細胞エピトープを含む免疫優性決定基を最もうまく提示するペプチドを同定することができる。本発明の1つの態様は、2つの重複するPRRSV ORF7がコードするヌクレオカプシドペプチドを提供し、その一方は70アミノ酸配列（配列番号1、図2Aにも示す）を有し、他方は73アミノ酸配列（配列番号2、図2Bにも示す）を有し、かつ各々が独自に、最適な抗体認識のためのB細胞エピトープのクラスターを有している。これらの抗原ペプチドは、経験的に同定され、PRRSV感染子ブタ由来の血清サンプル及びELISAイムノアッセイ形式を用いて最適化された。ペプチド抗原を含む抗体捕捉相に適合できる任意のイムノアッセイ形式（例えば、ELISA）を用いることにより、PRRSV感染ブタ由来の血液、血清、又は血漿サンプル中のPRRSVヌクレオカプシドタンパク質の特定のフラグメントに結合する抗体を検出し、かつ定量することができる。

【0029】

ある特定の態様において、完全長PRRSVヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸残基2～71に対応する、約70アミノ酸の最適化PRRSV抗原ペプチド（配列番号1）、及び完全長PRRSVヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸残基51～123に対応する、約73アミノ酸の別の最適化PRRSV抗原ペプチド（配列番号2）が同定された。これらの2つのペプチドを混合物中に等比で混合して、感染ブタにおけるELISAによるPRRSVに対する抗体の検出に最適な抗体捕捉相を構成した。これらの2つの高抗原性ペプチドは共に、免疫優性B細胞エピトープのクラスターを有することが見出され、PRRSV陽性血清パネルに対して最も顕著で一貫した抗原性を有した。PRRSVヌクレオカプシドペプチド（例えば、配列番号1及び2）を含む診断テストキットの製造及び使用は、本発明の種々の例示的態様の範囲内である。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明の PRRSV 抗原ペプチドの特定の態様は、さらに配列番号 1 及び 2 の免疫学的に機能的なホモログであると定義され、これらは、PRRSV の突然変異株及び変異株由来の対応する配列及び立体構造要素を有する。相同 PRRSV 抗原ペプチドは、起源となる変異体 PRRSV 北米株のヌクレオカプシドタンパク質の 2 ~ 71 位及び 51 ~ 123 位とほぼ相関するアミノ酸残基を有する。このようなホモログは、ClustalW (Julie D. Thompson, Toby Gibson of European Molecular Biology Laboratory, Germany and Desmond Higgins of European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK. Algorithmicにより作成) などの配列アラインメントプログラムによって容易に実証される。図 3 は、PRRSV MD001 Taiwan / 99Y / AF121131 (配列番号 3)、JXA1 Beijing / 06Y / EF112445 (配列番号 4)、NA / NJ - a / 04Y / AY37282 (配列番号 5)、EU / Lena / 08Y / EU90969 1 (配列番号 6) の多様な株から得た 4 つの抗原配列の ClustalW によるアラインメントを示す。図 3 にアラインメントされたヌクレオカプシドホモログの起源となる PRRSV 株は、欧州株のウイルスを含む。表 1 はまた、起源となる PRRSV 株である EU (欧州株 / 08V204 / Belgium / EU / GU737266) を用いて、抗原ペプチド配列番号 1 及び配列番号 2 (北米株 / MD001 / TW / AAC98536) のホモログ (配列番号 7 及び配列番号 8) を例示する。ある態様において、配列番号 1 に対するホモログ (配列番号 7) は、EU 株由来の PRRSV NC タンパク質のアミノ酸約 2 位 ~ アミノ酸約 72 位のアミノ酸配列を有する。別の態様において、ホモログ (配列番号 8) は、EU 株由来の PRRSV NC タンパク質のアミノ酸約 52 位 ~ アミノ酸約 128 位のアミノ酸配列を有する。これらの 2 つの相同ペプチドも同様に、混合物中に等比で混合して、感染ブタにおける ELISA による PRRSV (好ましくは欧州株) に対する抗体の検出に最適な抗体捕捉相を構成できる。

10

20

30

40

50

【0031】

本発明のホモログはさらに、配列番号 1 及び配列番号 2 と少なくとも 50% の同一性を有すると定義される。ある態様において、変異株ホモログ (配列番号 7) は、配列番号 1 と約 50% の同一性を有する。別の態様において、変異株ホモログ (配列番号 8) は、配列番号 2 と約 64% の同一性を有する。

【0032】

感染動物の血清サンプル由来の抗体を検出するのに有用な、PRRSV NC タンパク質から同定される抗原ペプチドに加えて、中和及び / 又はレセプター結合機能部位に対応する、PRRSV GP2、GP3、GP4 及び GP5 タンパク質上に存在する抗原領域がある。種々のペプチド免疫原は、標的ペプチドベースの ELISA によってそれぞれの免疫原性を評価するために、そしてさらに重要なことには、本発明の態様による免疫蛍光アッセイ (IFA) によって天然の PRRSV タンパク質に対する誘発抗体の交差反応性のために、これらのエピトープ領域の周辺で設計された。また、PRRSV GP4、GP5、M 及び NC タンパク質上に存在する、十分に実証された免疫優性 T 細胞エピトープがある。これらの T ヘルパー部位由来のペプチドは、ブタにおけるリンパ球増殖応答を引き起こし、動物における様々な細胞変性ウイルス感染に対する細胞性免疫反応に重要な役割を果たす、IFN- を含むサイトカイン産生をもたらす。

【0033】

図 4 に示すような態様は、PRRSV JXA1 (受託番号 AY2G2352) の配列に基づく PRRSV ORF2 ~ ORF7 がコードする (GP2、GP3、GP4、GP5、M、及び N) タンパク質における、本発明の選択された B 細胞エピトープ及び T 細胞エピトープの分布及び位置を説明する。

【0034】

本発明の別の態様は、4 つの最適化されかつ選択された PRRSV B 細胞エピトープクラスターペプチドの配列、即ち GP5.3 (V21 - E65) (配列番号 9)、GP2B (V111 - L136) (配列番号 10)、GP3B (C57 - C75) (配列番号 11)、及び GP4B (C52 - C69) (配列番号 12) を提供する。これらの B 細胞工

ピトーブクラスターは、中和特性及びレセプター結合特性を有する部位の周辺に位置する。

【0035】

本発明の他の態様は、これらの4つのPRRSV B細胞エピトーブクラスターペプチドの免疫学的に機能的なアナログを提供する。表3は、起源となる株であるMD001、JXA1、NA及びEUを用いて、相同GP5（配列番号13～15）、GP2（配列番号17～19）、GP3（配列番号21～23）、及びGP4（配列番号25～27）由来のB細胞エピトーブクラスターペプチド配列のアラインメントを示す。B細胞エピトーブクラスターペプチドの各々のコンセンサス配列（配列番号16、配列番号20、配列番号24、配列番号28）も示され、可変位置に割り当てられたアミノ酸は、それらの位置に最も頻繁に適用されるアミノ酸である。

10

【0036】

B細胞エピトーブクラスターペプチドの免疫学的に機能的なアナログは、本来の抗原ペプチドと実質的に同じ免疫学的性質を保持する、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12及びホモログの変異体を含む。例えば、配列番号9の機能的なアナログ又はホモログである変異体は、1つのアミノ酸位置における保存的置換；総電荷の変化；別の部分への共有結合；あるいは小さい付加、挿入、欠失もしくは保存的置換及び/又はそれらの任意の組合せを有することができる。したがって、PRRSV GP5.3 B細胞エピトープ（V21-E65）抗原ペプチド（例えば、配列番号9）に結合する抗体は、そのPRRSV GP5.3 B細胞エピトープ抗原ペプチドの免疫学的に機能的なアナログにも実質的に類似の効力で結合することになるであろう。ある態様において、機能的なアナログは、配列番号9又はホモログに対して少なくとも40%の同一性を有する。別の態様において、機能的なアナログは、配列番号11又はホモログに対して少なくとも56%の同一性を有する。さらに別の態様において、機能的なアナログは、配列番号12又はホモログに対して少なくとも72%の同一性を有する。さらに別の態様において、機能的なアナログは、配列番号10又はホモログに対して少なくとも80%の同一性を有する。なお別の態様において、機能的なアナログは、配列番号12又はホモログに対して少なくとも94%の同一性を有する。

20

【0037】

ある態様において、表3に示すように、PRRSV GP5.3 B細胞エピトーブクラスターペプチド（V21-E65）の免疫学的に機能的なアナログは、保存的置換によるか、及び挿入又は欠失によって、改変されているPRRSV GP5.3 B細胞エピトーブクラスターペプチドのバージョンを包含する。この態様において、免疫学的に機能的なアナログは、配列番号9からか又は配列番号9のホモログから、保存的な置換によって改変することができる。

30

【0038】

保存的置換は、1つのアミノ酸残基が、類似の化学的性質を有する別のアミノ酸残基に置き換えられる場合の置換である。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられ；極性中性アミノ酸として、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが挙げられ；正電荷（塩基性）アミノ酸として、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられ；負電荷（酸性）アミノ酸として、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。

40

【0039】

別の態様において、表3及び表4に示すように、免疫学的に機能的なアナログは、N末端、C末端へのアミノ酸付加によって、及び/又はペプチドの中間部への挿入によって改変することができる。本発明の種々の態様において、付加は、ペプチドのN末端又はC末端への付加である。付加は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11アミノ酸残基の付加とすることができる（配列番号9及び30）。このような付加は、PRRSVタンパク質に存在せず、かつPRRSV B細胞エピトーブクラスターペプチドの免疫原

50

性を変更しない、アミノ酸配列を構成してもよい。PRRSV Bエピトープクラスターペプチドに存在しない付加として、小さい荷電配列（例えば、リジン?リジン?リジン）、分岐鎖構造の形成が可能なアミノ酸（例えば、N?リジン）又は環化構造の形成が可能なアミノ酸（例えば、システイン）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のある態様において、PRRSVに存在しないアミノ酸配列の付加は、5アミノ酸以下の付加である。アミノ酸の付加は、古典的又は非古典的なアミノ酸のいずれか、もしくはそれらの混合物とすることができる。

【0040】

別の特定の態様において、免疫学的に機能的なアナログは、ペプチドのN末端、C末端、及び/又は中間部に対するアミノ酸欠失によって改変することができる。種々の態様において、欠失は、ペプチドのN末端又はC末端に対する欠失である。欠失は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11アミノ酸残基の欠失とすることができる。表4に示すような特定の態様において、アミノ酸配列の欠失は、9アミノ酸以下の欠失である（配列番号33及び34）。

10

【0041】

別の態様において、表7に示すように、PRRSV Bエピトープクラスターペプチドの免疫学的に機能的なアナログは、電荷の変更によって改変されているPRRSV Bエピトープクラスター抗原ペプチドを包含する。このような電荷の変更は、アミノ酸の置換、付加、もしくは欠失、又は荷電分子の共有結合の結果であってもよい。電荷の変更により、そのペプチドが、未改変のペプチドと比較してより塩基性に、より酸性に、又はより中性になるという結果を生じてもよい。ある特定の態様において、そのペプチドは、1~5個のリジン残基をN末端又はC末端に付加することによってより塩基性となる。より特定の態様において、そのペプチドは、3個のリジン残基をN末端に付加することによってより塩基性となる。

20

【0042】

限定されない例として、本発明のペプチドの免疫学的に機能的なアナログは、末端のアミノ酸に付加された1~約5個の追加のアミノ酸（古典的及び非古典的）を有することができる。例えば、電荷を変更するために、配列Lys-Lys-Lysを、このPRRSV B細胞エピトープクラスターペプチドのアミノ末端に付加することができる。

【0043】

上記ペプチドは、Merrifield固相合成法及びそのプロセスに対する無数の利用可能な改良法などの標準的な手法を用いて容易に合成することができる。上記ペプチドは、組換えDNA技術を用いて作製することもできる。このように、PRRSV B細胞エピトープクラスター抗原ペプチド及びPRRSV B細胞エピトープクラスター抗原ペプチドの免疫学的に機能的なアナログをコードする核酸分子、ならびにその補体（complements）は、本発明の種々の例示的な態様に包含される。PRRSV B細胞エピトープクラスター抗原ペプチド及び免疫学的に機能的なアナログをコードする核酸分子を含むベクター、特に発現ベクターもまた、本発明の種々の例示的な態様に包含される。それらのベクターを含有する宿主細胞も、本発明の種々の例示的な態様に包含される。

30

【0044】

本発明の種々の例示的な態様はまた、PRRSV抗原ペプチド及びPRRSV B細胞抗原ペプチドの免疫学的に機能的なアナログを産生する方法も包含する。例えば、その方法は、PRRSV抗原ペプチド及び/又はPRRSV抗原ペプチドの免疫学的に機能的なアナログをコードする核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、そのPRRSVペプチド及び/又はPRRSVペプチドの免疫学的に機能的なアナログが発現されるような条件下でインキュベートする工程を有することができる。

40

【0045】

本発明のある態様により、固相合成によって産生されるペプチド組成物が提供される。この態様は、感染細胞の溶解物又は分泌物に由来する、管理されかつ十分に定義された免疫原を使用することができる。この態様の化学的プロセスによって産生される抗原の質は

50

、管理されかつ定義されるので、結果として、抗原性、免疫原性及び収率の再現性を保証することができる。また、生体有害材料がペプチド抗原の製造に用いられないので、リスクを低下させ、費用のかかる生物学的封じ込めの必要性がなくなる。部位特異的免疫原は、高モル濃度の選択されたエピトープを提示するので、P R R S V 抗原ペプチド組成物を用いたワクチンの安全性及び免疫有効性の両方が保証される。

【0046】

ある態様において、本発明のペプチドは合成される。定義されたP R R S V 抗原合成ペプチドを用いることにより、子ブタにおける抗体検出及び診断のための抗原として用いられる場合、偽陽性の結果が最小限になる。公知のB細胞エピトープ及びThエピトープを有する定義された合成ペプチドを免疫原として用いることにより、ワクチンの免疫原性成分として用いられる場合、P R R S V に感染したか又は組換えウイルスに感染した宿主細胞由来の、ならびに組換えタンパク質発現系由来の、P R R S ウイルス及び/又は組換えタンパク質と同時に精製される可能性がある抗原性材料の存在によって引き起こされる、望ましくない非P R R S V 特異的免疫反応が排除される。例えば、ブタ由来の血清は、宿主細胞に対する、又は組換え*Escherichia coli*、酵母もしくはバキュロウイルスに対する抗体を有する可能性があり、それらは後に、生物学的に得られた抗原に基づく診断テストに用いられる抗原性材料と交差反応性となり、これらの外来性の免疫原を成分として含むワクチンによって生じるこのような免疫反応は、防御的ではない。対照的に、本発明のP R R S V ペプチドワクチンを接種されたブタは、宿主細胞又は発現ベクター由来のタンパク質、例えば、生物学的に誘導されたP R R S V 抗原と同時に精製される組換え*Escherichia coli*、酵母又はバキュロウイルス由来のタンパク質に対する不都合な抗体及び他の免疫反応がない、焦点を絞った免疫反応を生じるであろう。

10

20

【0047】

合成ペプチドのこの態様はまた、産生中に生じる不純物による干渉も最小限にする。長い合成の場合、カップリング効率の厳密な制御にもかかわらず、アミノ酸の挿入、欠失、置換、及び早期終結を含む、伸長サイクル中の事象に起因してペプチドアナログも生成され、そのため、標的とするペプチド合成物とともに複数のペプチドアナログが生成する。それにもかかわらず、このようなペプチドアナログは、免疫診断用の固相抗原としてか又はワクチン接種用の免疫原としてのいずれかで、免疫学的用途に用いられる場合、抗原性及び免疫原性に寄与するものとしてペプチド調製物においてなおも適している。

30

【0048】

合成ペプチドの免疫学的用途における25年間の経験において、本発明者らは、意図した免疫学的活性の保持を可能にする構造的変異性の範囲が、低分子薬物による特定の薬物活性、又は生物学的に誘導される薬物と同時に生成される高分子に見られる所望の活性及び望ましくない毒性の保持を可能にする構造的変異性の範囲よりもはるかに融通が利くものであることを見出した。これは、意図的に設計されたか、又は意図したペプチドと類似のクロマトグラフィー特性及び免疫学的特性を有する欠失配列副産物の混合物として合成プロセスの誤りによって不可避免的に生成されたかのいずれかのペプチドアナログが、所望のペプチドの精製された調製物と同程度に有効であることが多い理由である。これらのペプチドを使用して最終生成物の再現性及び有効性を保証するように、製造プロセス及び生成物評価プロセスの両方をモニタリングする識別力のあるQC手順が開発される限り、設計されたアナログ及び意図しないアナログ混合物は、有効である。

40

【0049】

本発明の他の態様において、内在性P R R S V Thペプチド及びそれらのホモログ(配列番号47~79)をワクチン組成物中に含めることができる。Thペプチドが存在することにより、P R R S V ペプチドワクチンの免疫原性を改善することができる。P R R S V Bエピトープに由来する免疫原性ペプチド(上述のホモログ及びアナログを包含する)は、内在性P R R S V Thエピトープと混合することができる。

【0050】

本発明の他の態様において、内在性P R R S V Thペプチドはコンビナトリアル配列

50

として提示されることができ、そこで、アミノ酸残基の組合せは、PRRSV Thペプチドに対するホモログの配列に基づいて、フレームワーク内の特定の位置に表される。コンビナトリアルペプチドの集合体は、合成プロセス中、特定の位置に、1つの特定のアミノ酸の代わりに設計された保護アミノ酸の混合物を付加することによって、1つの合成プロセスで合成することができる。このようなコンビナトリアルPRRSV Thペプチド集合体により、多様な遺伝的背景の動物に対する広範なThヘルパーエpitep適用範囲が可能になる。PRRSV Thペプチドの代表的なコンビナトリアル配列を、PRRSV Thエpitepの各々について、表6の配列番号47~79に由来するように、表7の配列番号80~90に示す。

【0051】

ある態様において、JXA1配列に基づいて配列番号47、51、55、59、61、63、67、70、74、76と記載され(表6にも示す)、かつPRRSV Bペプチド免疫原に結合していない、ORF4、ORF5、ORF6及びORF7由来の免疫優性PRRSV Thエpitepのクラスターを有するThペプチドを用いてPRRSV Bエpitepペプチド免疫原の免疫原性を補い、実施例5に記載するように、ペプチドベースのPRRSVワクチン製剤の免疫原性を増強することができる。Bエpitepペプチド免疫原に共有結合することなく、配列番号47、51、55、59、61、63、67、70、74、76を遊離ペプチドとして含むことにより、それらのワクチン製剤の免疫原性を改善することができる。実施例10に記載されるような別の態様において、Bエpitepペプチド免疫原に共有結合することなく、群2について配列番号47、51、55、59、61、63、67、70、74、76を、ならびに群1、群3、及び群4について配列番号80~90を遊離ペプチドとして含むことにより、それらのワクチン製剤の免疫原性を改善することができる。

【0052】

別の態様において、PRRSVペプチド(上述のホモログ及びアナログを含む)は、スペーサーを介して又はスペーサーを介さずに、Thエpitepを含むことが知られている配列を含むペプチドに共有結合することができる。この態様により、Thエpitepに共有結合していない同等の免疫原よりも増強された免疫原性を提供することができる。ある特定の態様において、Thエpitepを含むペプチドは、PRRSVペプチドのN末端(配列番号38)及び/又はC末端(配列番号39)に共有結合する。別の特定の態様において、スペーサーは、配列Lys-Lys-Lys-NLys(配列番号36)、又は単一アミノ酸NLysを有し、表5にも示す(それぞれ、配列番号43及び42)。ある態様において、Thエpitepを含むペプチドは、PRRSVペプチドのアミノ末端に共有結合する。ある特定の態様において、Thエpitepを含む表5に示すようなペプチド(配列番号40)は、Lys-Lys-Lys-NLysスペーサー(配列番号36)を介してアミノ末端に結合した人工コンビナトリアルThペプチド配列番号35(表5に示す)であり、配列番号40として示す。

【0053】

本発明の種々の態様は、PRRSVに対してブタを防御するためのワクチン組成物に関する。例示的な態様において、ワクチンは、免疫原性ペプチド抗原又はペプチド免疫原組成物及び許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有する。種々の態様において、PRRSVワクチン組成物は、ペプチド抗原又はペプチド抗原組成物及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有し、そのペプチド抗原は、

a) PRRSV B細胞エpitepクラスターペプチド抗原GP5.3(V21-E65)(配列番号9)、GP2B(V111-L136)(配列番号10)、GP3B(C57-C75)(配列番号11)及びGP4B(C52-C69)(配列番号12)のいずれか1つ;

b) (a)のホモログ;

c) (a)又は(b)の抗原的にかつ免疫学的に機能的なアナログ;

d) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換、アミノ酸付加、及び/又はアミノ酸欠失を

10

20

30

40

50

有する、(a)、(b)、又は(c)；ならびに

e) (a) ~ (d) の任意の組合せ

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0054】

PRRSVワクチンの態様において、ペプチド抗原の電荷は、1~5個のアミノ酸を付加するか又は欠失させることによって変更される。PRRSVワクチンの別の態様において、抗原的にかつ免疫学的に機能的なホモログ又はアナログは、GP2、GP3、GP4及びGP5に由来する、PRRSV B細胞エピトープクラスターペプチド抗原GP5.3 (V21-E65) (配列番号9)、GP2B (V111-L136) (配列番号10)、GP3B (C57-C75) (配列番号11) 及びGP4B (C52-C69) (配列番号12) のいずれか1つに由来するアミノ酸配列の抗原と少なくとも50%の同一性を有する。ある特定の態様において、ペプチド抗原は、配列番号9、10、11、12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

10

【0055】

PRRSVワクチンの別の態様において、ペプチド抗原は、該ペプチド抗原のN末端又はC末端に共有結合したTヘルパーエピトープをさらに有する。ある特定の態様において、Tヘルパーエピトープは、ペプチド抗原のアミノ末端に共有結合する。別の特定の態様において、Tヘルパーエピトープは、少なくとも1つのアミノ酸を有するスペーサーを介して、ペプチド抗原に共有結合する。ある特定の態様において、Tヘルパーエピトープは配列番号35である。さらに別の特定の態様において、スペーサーはLys-Lys-Lys-NLys (配列番号36) である。さらに別の特定の態様において、スペーサーはNLysである。ある特定の態様において、ペプチド抗原は、配列番号42、43、44、45又は46である。

20

【0056】

種々の例示的な態様において、任意の量の免疫原性ペプチド抗原を用いて、動物における免疫反応を誘発することができる。ある特定の態様において、ペプチド抗原の量は、約0.1µg~約100mgである。別の特定の態様において、ペプチド抗原の量は、約1µg~約10mgである。さらに別の態様において、ペプチド抗原の量は、約10µg~約1mgである。

【0057】

PRRSVワクチン組成物の種々の態様において、この組成物は、配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、及び76の11個のPRRSVTヘルパーエピトープペプチドの等モル混合物をさらに有する。ある特定の態様において、配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、及び76の等モル混合物の量は、約0.1µg~約1mgである。より特定の態様において、配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、及び76の等モル混合物の量は、約1µg~約100µgである。

30

【0058】

種々の例示的な態様において、任意のタイプ又は任意の量の送達ビヒクル又はアジュバントを用いることができる。ある特定の態様において、送達ビヒクル及びアジュバントは、モンタニド (Montanide) (商標) ISA 50V (油中水型エマルジョンを生成するための、植物油及びオレイン酸マンニド (mannide oleate) からなる油性ワクチンアジュバント組成物)、Tween (登録商標) 80 (ポリソルベート80又はポリオキシエチレン(20)モノオレイン酸ソルビタンとしても公知)、CpGオリゴヌクレオチド、及び/又はそれらの任意の組合せである。

40

【0059】

ある特定の態様において、PRRSVワクチン組成物は、配列番号33のペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有し、ペプチド抗原の量は約10µg~約1mgである

【0060】

50

本発明の別の態様は、PRRSV母性由来抗体(MDA)陽性であるか又は陽性でない子ブタをPRRSV感染に対して防御する方法に関し、この方法は、上述の例示的な態様のいずれかに包含されるワクチンを投与する工程を有する。

【0061】

本開示に従って調製した配列番号1及び配列番号2の2つのPRRSV NCペプチドの混合物を用いて、このペプチドをイムノアッセイの捕捉相に、例えばELISAテストキットの固相免疫吸着剤に、抗原的有効量で使用するにより、PRRSV抗体を検出することもできる。本発明のある態様によると、任意の適合性のイムノアッセイ形式を、対象のペプチドと共に用いることができる。このような形式は、当業者に周知であり、多くの標準的な免疫学マニュアル及びテキストに記載されている。例えばHarlowら、1988(24)を参照のこと。これらには、他の周知のイムノアッセイ形式の中でも、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素イムノドットアッセイ、凝集アッセイ、抗体-ペプチド-抗体サンドイッチアッセイ、ペプチド-抗体-ペプチドサンドイッチアッセイが含まれる。ある態様において、イムノアッセイは、2つのPRRSV NC抗原ペプチド(配列番号1及び配列番号2)を含むペプチド組成物でコーティングされた固相を用いるELISAである。

10

【0062】

本発明のある態様によると、このペプチドにより、成熟雌ブタ及び若雌ブタ、成熟雄ブタ及び去勢ブタ、ならびに子ブタ由来の血清を、PRRSV感染についてスクリーニングELISAによってテストすることができ、ワクチン接種前の子ブタ由来の血清を、母体由来の抗PRRSV抗体のレベルについて評価することができ、かつ、PRRSV抗原ペプチドを用いたワクチンに対する、ワクチン接種を受けた子ブタにおける免疫反応のレベルを測定することができる。

20

【0063】

ある特定の態様において、ELISAイムノアッセイを用いて、ブタの血液、血清又は血漿サンプルを、抗PRRSV抗体の存在についてテストすることができ、このイムノアッセイは、

i. 2つのPRRSV NCペプチド(配列番号1及び配列番号2)の混合物を固体支持体に付着する工程、

ii. 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、そのペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、抗体を含むブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及び

iii. 前記固体支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程、
を有する。

30

【0064】

別の特定の態様において、ELISAイムノアッセイを用いて、ブタの血液、血清又は血漿サンプルを、抗PRRSV抗体の存在についてテストすることができ、このアッセイは、

i. 2つのPRRSV NCペプチド(配列番号7及び配列番号8)の混合物を、欧州株配列に由来する配列番号1及び配列番号2のホモログとして、固体支持体に付着する工程、

ii. 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、そのペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、抗体を含むブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及び

iii. 前記固体支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程、
を有する。

40

【0065】

対象のELISAキットの例示使用において、テストすべきブタ血清サンプルを、サンプル希釈剤で希釈した後、1つ以上の上述のPRRSVペプチドと、ある期間、存在する場合には任意の抗体が、ペプチド感作固相に結合する条件下で接触させる。未結合の材料

50

を除去した後（例えば、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄することによって）、二次複合体を、ブタ特異的 I g G に対する標識抗体又は標識プロテイン A、標識プロテイン G、もしくは標識プロテイン A / G と接触させる。これらの抗体又はプロテイン A、G もしくは A / G は、この二次複合体に結合して三次複合体を形成し、これらの二次抗体又はプロテイン A もしくは G もしくは A / G がレポーター分子で標識されているので、その三次複合体は、検出手段に供されると検出される。レポーター分子は、酵素、放射性同位体、フルオロフォア、生物発光分子、化学発光分子、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンなどとする事ができる。E L I S A の場合、レポーター分子は、好ましくは酵素である。

【 0 0 6 6 】

本発明の特定の態様として、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

(1) ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有する、ブタ生殖器呼吸器症候群 (P R R S) ワクチン組成物であって、該ペプチド抗原が、 a) 配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、及びこれらの任意の組合せ； b) (a) のホモログ；及び c) (a) 又は (b) の任意の組合せ；からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、P R R S ワクチン組成物。

(2) ペプチド抗原が配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(3) ペプチド抗原が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(4) ペプチド抗原が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(5) ペプチド抗原が配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(6) ペプチド抗原が、1 ~ 5 個のアミノ酸を付加するか又は欠失させることによって変更される、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(7) ペプチド抗原のアミノ末端又はカルボキシル末端に共有結合した T ヘルパーエpiteope をさらに有する、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(8) T ヘルパーエpiteope が配列番号 3 5 である、(7) に記載の P R R S ワクチン。

(9) T ヘルパーエpiteope が、- リジン残基を有するスペーサーを介してペプチド抗原に共有結合する、(7) に記載の P R R S ワクチン。

(1 0) スペーサーが配列番号 3 6 である、(9) に記載の P R R S ワクチン。

(1 1) 抗原ペプチドに結合されていない T ヘルパーエpiteope をさらに有し、該 T ヘルパーエpiteope が配列番号 4 7 ~ 9 0 からなる群から選択される、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(1 2) ペプチド抗原の総量が約 1 0 μ g ~ 約 1 m g である、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(1 3) 送達ビヒクル及びアジュバントが、モンタニド (Montanide) I S A 5 0 V、ポリオキシエチレン (2 0) ソルビタンモノオレエート、及び C p G オリゴヌクレオチドからなる群から選択される、(1) に記載の P R R S ワクチン。

(1 4) (1) に記載のワクチンを投与する工程を有する、P R R S 感染に対して子ブタを防御する方法。

(1 5) a) ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバント、b) 配列番号 1 0、1 1、1 2、3 1、及びそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド抗原、及び c) 配列番号 8 0 ~ 9 0 及びそれらの組合せからなる群から選択される P R R S V T h ペプチド、を有する、P R R S ワクチン組成物。

(1 6) a) ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバント、b) 配列番号 4 2、4 4、4 5、4 6、及びそれらの組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチド抗原、及び c) 配列番号 8 0 ~ 9 0 及びそれらの組合せか

10

20

30

40

50

らなる群から選択される P R R S V T h ペプチド、を有する、P R R S ワクチン組成物。

(17) a) 配列番号1及び配列番号2の混合物を固体支持体に付着させる工程、b) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、該ペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、抗体を含むブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及びc) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程、を有する、P R R S 感染を診断する方法。

(18) a) 配列番号7及び配列番号8の混合物を固体支持体に付着させる工程、b) 前記固体支持体に付着した前記ペプチドを、該ペプチドに抗体が結合するのを促す条件下で、抗体を含むブタの血液、血清又は血漿サンプルに曝露する工程、及びc) 前記支持体に付着した前記ペプチドに結合した抗体の存在を検出する工程、を有する、抗 P R R S V 抗体の存在をテストするための E L I S A イムノアッセイ。

【0067】

以下の実施例は、本発明を説明するために役立つものであり、本発明の範囲を限定するために用いられるべきでない。

【実施例1】

【0068】

P R R S V で コトランスフェクトされた H T K 細胞を用いた免疫蛍光アッセイ (I F A) による標的 P R R S V B 細胞エピトープクラスターペプチド抗原と天然 P R R S V タンパク質抗原との間の交差反応性についての免疫血清力価の評価のための血清学的アッセイ

【0069】

P R R S V サブユニットタンパク質、G P 3、G P 4 及び G P 5、に対する抗体は、組換えワクシニアウイルス r V V T 7 (T 7 ポリメラーゼ組換えワクシニアウイルス) と T 7 プロモーターの下流に P R R S V o r f 3、o r f 4 及び o r f 5 をそれぞれコードするプラスミドでコトランスフェクトされた H T K 細胞を用いる免疫蛍光法によって検出することができる。この方法は、哺乳類細胞において、その本来のウイルス複製と共に高忠実度でこれらの P R R S V タンパク質の一過性の発現をもたらす。P R R S V G P 3、G P 4 及び G P 5 が膜貫通ドメイン及び側鎖修飾からなるので、最良の P R R S V タンパク質構造は、デノボでしか生成できない。各々の P R R S V サブユニットタンパク質、G P 2、G P 3、G P 4 又は G P 5、をデノボ合成し、コトランスフェクトされた H T K 細胞を、P R R S V に対する特異的抗体の存在についての免疫アッセイにおける評価用免疫血清によって細胞内染色を行うための標的細胞として用いた。この免疫蛍光アッセイシステムにより、高い特異性及び感度で天然 P R R S V 抗原に対する抗体の検出に最良の条件が可能になる。

【0070】

図1Aに図示するメカニズムに従って、H T K 細胞株細胞を、T 7 ポリメラーゼ組換えワクシニアウイルス (r V V T 7) に感染させ (2 1)、リポフェクトアミン (lipofect amine) (商標) (Invitrogen) によって P R R S V - o r f 3、o r f 4 及び o r f 5 プラスミドでコトランスフェクトした (2 2)。詳細には、T 7 ポリメラーゼプロモーターによって媒介される天然の P R R S V タンパク質の発現のための p R R S V プラスミドの構築を、以下のとおり行った：完全長の p R R S V 遺伝子 (台湾 P R R S V M D 0 0 1 株 (受託番号 A F 0 3 5 4 0 9) 由来) を、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって増幅し、p C R 2 . 1 T o p o (登録商標) プラスミドベクター (Invitrogen) にクローニングした。p R R S V プラスミドの発現能力を、P R R S V 株 M D 0 0 1 由来の o r f 3、o r f 4 及び o r f 5 に対する完全なヌクレオチド配列を示す配列決定によって確認した。

【0071】

H T K 細胞を、96 ウェルプレートにおいて集密度 (confluency) 80 % になるまで増殖させ、r V V T 7 に感染させ (2 2)、次いで、リポフェクトアミン (商標) (Invitrogen) によって p R R S V o r f 3、o r f 4 及び o r f 5 プラスミドで個々にコト

10

20

30

40

50

ランスフェクトした。コトランスフェクションの24時間後、細胞を80%アセトンで固定し、このプレートを免疫蛍光アッセイ (I F A) による P R R S V タンパク質に対する抗体の検出のために - 8 0 で保存した。

【 0 0 7 2 】

図 1 A の図は、T7ポリメラーゼ組換えワクシニアウイルス (T 7 / v a c) に感染させ (2 1)、リポフェクトアミン (商標) (Invitrogen) によって p C R - o r f 5 プラスミドでコトランスフェクトされた H T K 細胞株細胞を示す。組換え G P 5 タンパク質は、翻訳後に細胞質に輸送される (2 2)。抗 G P 5 抗体は、本発明のある態様によれば、トランスフェクトされた H T K 宿主細胞の細胞質に結合し、標識二次抗体の免疫蛍光法によって検出される。この方法により、原核生物 T 7 プロモーターを介した完全長 P R R S V G P 5 タンパク質の H T K 細胞における一過性の真核生物発現によって、真正 P R R S V G P 5 タンパク質に対する抗体が高い特異性で検出される。p C R - 完全長 P R R S V ゲノムでの類似のトランスフェクションも、原核生物 T 7 プロモーターを介した完全長 P R R S V ゲノムの H T K 細胞における一過性の真核生物発現による P R R S V G P 2、G P 3、G P 4、M 及び N タンパク質の高い特異性での検出に用いることができる。

10

【 0 0 7 3 】

免疫蛍光アッセイ (I F A) による P R R S V 抗体の力価測定

初めに血清サンプルを P B S で 1 0 倍希釈し、次に 2 倍の段階希釈を行った。各テストランのために、P R R S V 感染 S P F ブタ由来の陽性コントロール血清及び未感染 S P F ブタ由来の陰性コントロール血清の両方を含めて、p R R S V o r f - 7 プラスミドによる P R R S V ヌクレオカプシドタンパク質の発現を検証した。1 : 1 0 よりも高い希釈度で細胞質に局在した蛍光シグナルを生じる血清サンプル (図 1 B に示す) を、> 1 0 の I F A 力価を有するとスコア化した ; これらの力価から、P R R S V に感染した動物が示された。ワクチン接種の結果として「標的ペプチド」特異的抗体を含む、動物ワクチン由来の血清について、特異的標的タンパク質又は完全 P R R S V ゲノムに対するそれらの抗体の交差反応性を、対応する標的天然 P R R S V タンパク質 (例えば、G P 2、3、4 又は 5) を用いた免疫蛍光アッセイ (I F A) によって評価することができる。自然感染したブタから、又は P R R S V ペプチドベースのワクチンを接種したブタから採取した血清サンプルのすべてのテストを、コード下で行った。

20

【 実施例 2 】

30

【 0 0 7 4 】

P R R S V の中和 / レセプター結合部位を提示するデザイナーペプチドの免疫原性評価のための P R R S V B 細胞エピトープクラスターペプチド抗原ベースの E L I S A

9 6 ウェルプレートのウェルを、特記しない限り 1 0 m M N a H C O ₃ 緩衝液 (p H 9 . 5) 中の特記しない限り 2 μ g / m L での個々の標的ペプチド 1 0 0 μ L を用いて、3 7 で 1 時間、個々にコーティングした。

【 0 0 7 5 】

ペプチドでコーティングしたウェルを、3 重量 % ゼラチンの P B S 溶液 2 5 0 μ L と共に 3 7 で 1 時間インキュベートして、非特異的タンパク質結合部位をブロックした後、0 . 0 5 容量 % T W E E N (登録商標) 2 0 を含む P B S で 3 回洗浄し、乾燥させた。P R R S V 抗体について I F A で陽性のブタ血清及び陰性コントロール血清を、特記しない限り、2 0 容量 % 正常ヤギ血清、1 重量 % ゼラチン及び 0 . 0 5 容量 % T W E E N (登録商標) 2 0 を含む P B S で 1 : 2 0 に希釈した。この希釈した検体 1 0 0 μ L を各ウェルに添加し、3 7 で 6 0 分間反応させた。

40

【 0 0 7 6 】

次に、ウェルを 0 . 0 5 容量 % T W E E N (登録商標) 2 0 の P B S 溶液で 6 回洗浄して、未結合抗体を除去した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ブタ I g G を標識トレーサーとして用いて、陽性ウェル中で形成された抗体 / ペプチド抗原複合体に結合させた。0 . 0 5 容量 % T W E E N (登録商標) 2 0 を含む 1 容量 % 正常ヤギ血清の P B S 溶液中の予め力価測定した最適希釈度のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ブタ I g G 1 0 0 μ

50

Lを各ウェルに添加して、37 でさらに30分間インキュベートした。0.05容量% TWEEN（登録商標）20のPBS溶液でウェルを6回洗浄して未結合抗体を除去し、クエン酸ナトリウム緩衝液中に0.04重量% 3', 3', 5', 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）及び0.12容量%過酸化水素を含む100 μ Lの基質混合物とさらに15分間反応させた。この基質混合物を用いて、有色生成物を形成させることによりペルオキシダーゼ標識を検出した。1.0M H₂SO₄を100 μ L添加することにより反応を停止し、450nmでの吸光度（A₄₅₀）を測定した。

【0077】

動物血清中のPRRSV抗体を検出する目的に従って、血清希釈を行った。すなわち（a）潜在的な自然感染を識別するために、1:20の希釈度を用い、A₄₅₀測定値を記録し、カットオフ計算用の固有の内在性の陰性コントロールを用いた；又は（b）ペプチドベースのPRRSVワクチン製剤を接種したブタの抗体価を測定するために、1:10~1:10,000の10倍段階希釈の血清をテストし、テストした血清の力価（Log₁₀として表される）をA₄₅₀の線形回帰分析によって算出した。

【実施例3】

【0078】

感染動物とワクチン接種動物を識別するための診断用途に最適なPRRSV抗原ペプチドの同定

PRRSV分離体JXA1、LV、EU、NAの既に公開された配列由来、及び台湾株MD001由来のPRRSVのゲノム配列を用いて、オープンリーディングフレームからタンパク質配列を推定し、ORF2、3、4、5、6及び7がコードするタンパク質配列から得られたデータを用いて、PRRSV感染した動物由来の血清中の抗体を検出するためのB細胞エピトプクラスター抗原ペプチド、及びマーカーワクチン製剤を投与した動物において誘発される特異的抗体を検出するためにマーカーワクチン製剤に用いられる機能的中和/レセプター結合部位を提示する抗原ペプチドをデザインした。

【0079】

本発明者らは、生物情報学の情報及び古典的な免疫化実験を用いて、診断用途及びワクチン用途に最適なB及びT細胞エピトプクラスター化ペプチドを同定するためにスクリーニングされるペプチドの数を限定する戦略を用いた。

感染動物とワクチン接種動物の識別のために緊急に必要とされるツール（「DIVA」システムと呼ばれる）の開発は、マーカーワクチン設計プロセスを補完するものである。

【0080】

ブタにおいてPRRSV感染中に生成される大部分の抗体は、PRRSV ORF7がコードするヌクレオカプシドタンパク質（NC）タンパク質（これに対する主要な抗原決定基が同じ大陸由来の株間で比較的良好に保存されている）に対して特異的であるので、このNCタンパク質を、ウイルス特異的抗体の検出ならびに感染及び疾患の診断に適した候補として標的化した。抗体捕捉のために合成ペプチドベースの抗原を用いる利点としては、偽陽性を引き起こす、PRRSVとは無関係の細胞成分が存在しないことに起因する特異性の改善、及びエピトプクラスターペプチドの固有の性質に起因する感受性の改善が挙げられることがよく知られている。

【0081】

公知のPRRSV感染を有する動物由来の陽性血清を用いて、抗体検出に役立つ可能性のある強力かつ一貫した抗原性のための重複するPRRSV ORF7がコードするNCペプチドをスクリーニングした。陰性血清は、正常なブタ及びPRRSV感染のないことが知られているSPFブタから採取した。北米MD001株のNCタンパク質のエピトプマッピングに関するデータを、図2に要約した。デザイナーペプチドを、2 μ g/mLにて1ウェル当たり0.1mLでプレートコーティングに用いた間接的ELISAを行った。MD001 NCタンパク質由来の配列を徐々に長くした2つの系列（a~e）のペプチドを合成した。4171系列のペプチド（図2Aに示す）は、残基71で始まるC末端で合成し、4172系列のペプチド（図2Bに示す）は、残基123で始まるC末端で

10

20

30

40

50

合成した。これらのペプチドを個々にプレートコーティングに用い、12個の確証されたPRRSV陰性血清のパネルと共に3つのプールされたPRRSV陽性血清で、各ペプチドに対する感受性及び特異性についてテストした。

【0082】

図2Aに示すように、ペプチド4171eのN末端に位置する配列「PNNNGKQQKKK」（配列番号91）を有する11merの抗原エピトープでテストしたこの4171系列由来のペプチドの中で、ペプチド4171e（配列番号1）が最も抗原性が高いことが分かった。

【0083】

図2Bに示すように、N末端に位置する配列「EKPHFPLATEDDVRHHFT」（配列番号92）を有する18merの抗原エピトープでテストしたこの4172系列由来のペプチドの中で、ペプチド4172e（配列番号2）が最も抗原性が高いことが分かった。

10

【0084】

18merの抗原エピトープ「EKPHFPLATEDDVRHHFT」（配列番号92）は、ペプチド4171a～d内で提示した場合、抗原性はなかった。しかし、この18merのペプチドエピトープは、それ自体を完全長4171e分子（配列番号1）内で提示して、配列番号1上の11merの抗原エピトープ「PNNNGKQQKKK」と組み合わせると、大きな立体構造エピトープを形成する。さらに、70mer及び73merの2つのペプチド（それぞれ、配列番号1及び2）の予想外の免疫優性抗原性は、長い連続エピトープ及び非連続エピトープの列を提示する、NCタンパク質上の大きな露出面を提示する長鎖ペプチドと一致する。

20

【0085】

抗原ペプチド4171e（配列番号1）及び4172e（配列番号2）を2：1の混合比で、3µg/mLにて1ウェル当たり0.1mLでプレートコーティングに用い、これはPRRSV北米株に対する抗体の捕捉/検出のためのUBI PRRSV NC ELISAの一部を成した。

【0086】

種々のPRRSV株（MD001、JXA1、NA及びEU）由来の相同NCタンパク質配列を、図3に示すようにアラインメントした。親MD001配列と比較して、起源となるEU配列にはアミノ酸残基の重大な置換、挿入及び欠失があるにもかかわらず、起源となる欧州株のPRRSVヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸配列に基づく表1に示すような置換ペプチドホモログ（配列番号3及び配列番号4）は、PRRSV欧州株に対する抗体の捕捉/検出のためのUBI PRRSV NC EU ELISAにおいて抗原として同様に用いられる。

30

【0087】

IFAテストによって抗PRRSV NCタンパク質の反応性について予め特徴付けられた30個の血清のパネルを陽性血清パネルとして用いて、UBI PRRSV NC ELISAの感受性及び特異性をさらに検証した。表2に示すように、UBI PRRSV NC ELISAは、IFAによる検出限界が約1：16希釈であった場合、NCタンパク質についてIFAテストとだいたい同レベルの感受性を有する。UBI PRRSV NC ELISAテストを補助的な血清学ツールとして用いて、他の実施例に記載されるように、野外サンプルを評価し、感染動物とワクチン接種動物を識別し、PRRSVマーカーペプチドベースのワクチンを評価した。

40

【実施例4】

【0088】

PRRSVマーカーワクチンに用いる抗原ペプチドを同定するための血清学的検証用ペプチドの設計及び合成

約10～約70アミノ酸長の配列を有するPRRSV GP2、GP3、GP4、GP5、M及びNCタンパク質由来のPRRSV B細胞及びT細胞の両方のエピトープクラ

50

スター部位を提示する、幅広いレパートリーのPRRSV抗原ペプチドを設計した。いくつかのペプチドについて、適切な部位でアミノ酸置換を行うことにより、対応する天然タンパク質との交差反応を最大にするように局所構造維持に制約を与える環状ペプチドの形成が可能になった。他の抗原ペプチドについて、それらの各々の免疫原性を高めるために、人工コンビナトリアルThペプチド（例えば、UBITh3、配列番号15）と結合させた。すべてのペプチドを、ペプチド合成の反復サイクル、ワクチン形成、動物免疫化、及び血清学的テストを含む、大きな労力を要しかつ時間的制約のある「血清学的検証」プロセスに供し、各診断及びワクチンのための本発明者らの最初の適用を受けた標的動物における、さらなるテストのための候補ペプチドを得た。

【0089】

免疫原性テストに用いられるすべてのペプチドを、Fmoc化学を用いて、Applied Biosystems Peptide Synthesizer Models 430A, 431及び433を用いて合成した。N末端のFmoc保護及び三官能性アミノ酸の側鎖保護基を用いて、固相支持体上での独立した合成によって、各ペプチドを作製した。完成したペプチドを固体支持体から切り離し、90%トリフルオロ酢酸によって側鎖保護基を除去した。合成ペプチド調製物を、正確な組成についてマトリックス支援レーザー脱離飛行時間型(MALDITOF)質量分析によって、且つ合成プロファイル及び濃度を含む内容について逆相HPLCによって、特徴付けした。長い合成の場合、カップリング効率の厳密な制御にもかかわらず、伸長サイクル中の事象(アミノ酸の挿入、欠失、置換、及び早期終結を含む)に起因してペプチドアナログも生成されたため、標的とするペプチドとともに複数のペプチドアナログが生成した。それにもかかわらず、このようなペプチドアナログは、免疫診断用の抗体捕捉抗原として、又はワクチン接種用の免疫原としてのいずれかで免疫学的用途に用いられる場合、抗原性及び免疫原性に寄与するものとしてペプチド調製物においてなおも適していた。これらのペプチドを使用して最終生成物の再現性及び有効性を保証するように、製造プロセス及び生成物評価プロセスの両方をモニタリングする識別力のあるQC手順が開発される限り、意図的に設計したか又は合成プロセスの間に副産物の混合物として生成したこのようなペプチドアナログは、典型的には、所望のペプチドの精製調製物と同程度に有効であることが多い。

【0090】

図4は、後のワクチン製剤用途に用いるために本発明者らの最初の調査及び検証を経た、PRRSV2~ORF7がコードするタンパク質(GP2、GP3、GP4、GP5、M及びNCタンパク質)上における選択されたB細胞エピトープ及びT細胞エピトープの分布/局在を示す。B細胞エピトープクラスターペプチド免疫原の設計目標は、中和抗体を誘導することができるか、又は標的細胞に結合するPRRSVレセプターに関連する、選択された機能部位を模倣する抗原ペプチドを作り出すことである。特異的なGP5 B細胞エピトープクラスターペプチドを、単一のPRRSV株配列に基づくか、又はいくつかのPRRSV株配列に由来する場合は、広範なウイルス適用範囲のためのコンビナトリアル配列として、天然のPRRSV GP5タンパク質抗原に対するそれらの相対的な免疫原性及び交差反応性をテストするために、表4に示すようにレセプター結合/中和部位の周辺の4つのアミノ酸フレームGP5.1、5.2、5.3及び5.4(配列番号9~14)にわたって設計した。

【0091】

GP2 Bエピトープ(V111-L136)、GP3 Bエピトープ(C57-C75)及びGP4 Bエピトープ(C52-C69)の呼称で、PRRSV JXA1配列に基づき構造タンパク質GP2~GP4由来の中和部位の周辺で設計された、さらなるB細胞クラスター抗原ペプチドを、表3に示す。GP2 B(V111-L136)は直鎖ペプチド(配列番号6)として提示され、一方、GP3 Bエピトープ(C57-C75)及びGP4 Bエピトープ(C52-C69)は環状ペプチド(配列番号7及び8)として提示されることにより、立体構造維持のための局所的制約が可能になる。これらの抗原ペプチドはまた、これらのペプチド抗原の長さが短い性質に起因する免疫原性を増強す

10

20

30

40

50

るために、表 5 に示すように G P 5 . 1 及び G P 5 . 2 フレームについて C 末端で (配列番号 2 9 及び 3 0)、又は N 末端で (配列番号 3 9 ~ 4 6) のいずれかで、人工コンビナトリアル T h ペプチド (配列番号 1 5) に個々に結合した。これらの B 細胞エピトープクラスターペプチド免疫原をワクチン製剤に組み込み、十分に設計されたプロトコルに従ってモルモット又はブタを免疫化し、広範な血清学的評価のために免疫血清を適時に採取した。これらの免疫血清を、それぞれの標的ペプチド抗原に対する抗体力価についてそれぞれの標的ペプチド抗原ベースの E L I S A でテストすることにより、免疫原性についてテストした。

【 0 0 9 2 】

免疫蛍光アッセイ (I F A) による P R R S V 天然タンパク質抗原に対する交差反応の検出は、実施例 1 に記述したように行った。これは、設計したペプチド免疫原が最終的なワクチン製剤での使用に適していることを評価するためのものである。ペプチド免疫原として認められたこれらのペプチド抗原について、表 3 に示すような起源となる P R R S V 株 (例えば、 M D 0 0 1、 J X A 1、 N A 及び E U 株) 由来の配列、又はコンセンサス (c o n s) 配列、あるいはそれらに由来する、配列番号 3 2、3 3 及び 3 4 として表 4 に示すようなコンビナトリアル配列を有するペプチドホモログを、異なる株の P R R S V との広範な交差反応性のために免疫化宿主において抗体を誘発できるペプチド免疫原としてさらに設計した。

【 0 0 9 3 】

T 細胞エピトープクラスターペプチド免疫原の設計は、はるかに簡単である。免疫化宿主における細胞性免疫反応の幅を広げるために、P R R S V で免疫化された後にウイルス負荷されたブタから得られた末梢血単核球 (P B M C) の培養において I F N - 応答を誘導する能力に基づいて十分に特徴付けされた免疫優性 T 細胞エピトープを、ワクチン製剤に組み込むために選択した。G P 4、G P 5、M 及び N C タンパク質由来の、P R R S V J X A 1 株に基づく T 細胞エピトープクラスターペプチドの配列、ならびに種々の P R R S V 株 (M D 0 0 1、N A 及び E U) の相同 P R R S V T ヘルパーエピトープ配列のアラインメントを、配列番号 4 7 ~ 7 9 として表 6 に示す。これらのやや疎水性のペプチド抗原の溶解性を改善するために、それらに対する個々の T ヘルパーペプチドの N 末端に 3 つのリジン残基 (K K K) を付加して、ペプチド免疫原として作用するようにした。全ての同定された T h ペプチド免疫原 (配列番号 4 7 ~ 7 9) を、P R R S V B 細胞

【 0 0 9 4 】

T 細胞エピトープ適用範囲を動物の多様な遺伝的背景にわたってさらに広げるために、特異的エピトープのコンビナトリアルペプチド (4 つの相同 T エピトープ配列に基づく) を、各々の T 細胞エピトープについて調製する。同様に、表 7 に示すように、3 つのリジン残基 (K K K) を、それぞれのコンビトリアル T エピトープクラスターペプチド免疫原 (配列番号 8 0 ~ 9 0) の N 末端に付加した。これらの T エピトープクラスターコンビトリアルペプチド免疫原のプール (プール 2) を、P R R S V B 細胞クラスターペプチド免疫原の免疫原性をさらに増強するためのワクチン製剤中の補充として、かつそれら自体で細胞性免疫のための P R R S V T 細胞ペプチド免疫原として用いた。

【 実施例 5 】

【 0 0 9 5 】

免疫原性及び天然 P R R S V タンパク質との交差反応性を評価するための、G P 5、G P 2、G P 3 及び G P 4 タンパク質由来の P R R S V B エピトープクラスターペプチド抗原を含むワクチン製剤を用いたモルモット又はブタの免疫化

外部ドメインは、細胞外空間 (細胞の外側の空間) へと伸びる膜タンパク質のドメインである。外部ドメインは、通常、標的細胞表面との接触を開始し、感染の間、細胞への付

10

20

30

40

50

着及び細胞内への侵入の原因となる、ウイルスタンパク質の部分である。中和抗体はウイルスとその細胞レセプターとの相互作用を阻止するので、ウイルス侵入関連ドメインは、中和抗体の誘導にとって重要である。したがって、次世代の有効なPRRSVワクチンを開発する場合、PRRSVのウイルス侵入関連ドメインの機能性を評価することが重要である。マクロファージ特異的レクチンであるシアロアドヘシン(CD163)は、マクロファージ上の極めて重要なウイルスレセプターである。可溶性のシアロアドヘシンを用いて、PRRSVのGP5及びMの複合体のジスルフィド結合ヘテロダイマーが、シアロアドヘシンに対するリガンドであることを見出した。このリガンド-レセプター相互作用は、シアロアドヘシンのレクチン活性、及びGP5糖タンパク質上のシアル酸に依存する。したがって、PRRSV GP5タンパク質の外部ドメイン及びGP5の免疫原性に対するMの影響を調査して、ウイルスM/GP5と宿主細胞レセプターシアロアドヘシンとの間の相互作用を阻止する免疫を誘導する目的で、PRRSVマーカーワクチン製剤に用いるのに最適なGP5ペプチド免疫原を同定した。

10

【0096】

PRRSV GP5タンパク質の外部ドメインのレセプター結合/中和部位の周辺で45個を超えるペプチド抗原を設計し、免疫原性評価のために4つのアミノ酸配列フレームに分類した。

【0097】

第1のフレームは、PRRSV株MD001の配列に基づいて、GP5外部ドメインのC末端残基「E」(グルタミン酸)で始まり、GP5タンパク質のシグナル配列中に5つの追加のアミノ酸残基を含んで、外部ドメインのN末端まで伸長することにより、GP5.1 MD001(A26-E65)ペプチド抗原(配列番号29)として表4に示すような40merのペプチド抗原を作製した。この設計は、必要であれば、GP5ペプチド抗原の中心部のCys残基がMペプチドの外部ドメインとジスルフィド結合を形成することができる。

20

【0098】

第2のドメインは、GP5.1 MD001(A26-E65)ペプチド抗原のシグナル配列中への別の5つのアミノ酸残基による、N末端での伸長で得られた、45merのペプチドGP5.2 MD001(V21-E65)(配列番号30)であり、C24とC48の間の分子内ジスルフィド結合により、GP5の外部ドメインの局所立体構造の維持が可能になった。この設計により、Mタンパク質の非存在下で、GP5の外部ドメインの大部分に対する特異的抗体の誘導が可能になった。

30

【0099】

第3のフレームは、外部ドメインの11merのGP5 HV2領域を除外したことを別として、第2フレームペプチド抗原GP5.2 MD001(V21-E65)をモデルにして、34merのペプチド抗原GP5.3(V21-D54)(配列番号9)を得た。この設計により、GP5の外部ドメインの高度に保存された中心領域のB細胞認識が可能になる。

【0100】

第4のフレーム(GP5.4)は、GP5タンパク質の外部ドメインの中央に位置するループ構造を対象とし、PRRSV株MD001配列に基づく25merの環状ペプチドGP5.4(C24-C48)になった。株間の変異に適応させるために、北米型のJXA1/MD001及びJXA1/NJ-aのPRRSV株配列に従って第3及び第4アミノ酸フレームのペプチド抗原をモデルにしたコンビナトリアルペプチドを、GP5.3 JXA1/MD001(V21-D54)(配列番号32)、GP5.3 NJ-a/JXA1/NJ-a(V21-D54)(配列番号33)及びGP5.4 NJ-a/JXA1/MD001(C24-C48)(配列番号34)として設計した。GP5外部ドメインペプチド免疫原性に対するMタンパク質の外部ドメインの影響を評価するために、MD001配列に基づいて以下の配列:「MGSSLD~~D~~RCHDSTAPQKVL~~L~~AFSITY」(配列番号93)を有する26merの外部ドメインペプチドを、評価用に設計した(

40

50

M 1 - Y 2 6)。

【 0 1 0 1 】

P R R S V の構造は、ウイルスRNA と結合したヌクレオカプシドタンパク質からなる。この核タンパク質は、脂質エンベロープに囲まれ、そのエンベロープ中に以下の6つの構造タンパク質が埋め込まれている：G P 2、G P 3、G P 4、G P 5 ならびに非グリコシル化タンパク質M 及びE (O R F 2 b)。G P 5 及びM は、エンベロープ内で最も豊富なタンパク質であり、その他のエンベロープタンパク質の存在量はより少ない。G P 5 は、P R R S V 防御免疫のための主要な標的であり続けてきたが、P R R S V の変異性、ならびにG P 2 及びG P 3 も臨床学的及びウイルス学的防御にいくらか関わっている一方、G P 2、G P 3 及びG P 4 由来の抗原ペプチドに結合する実証されたポリクローナル抗体もP R R S V に対する中和活性を示すという最新の知見を考慮して、G P 2、G P 3 及びG P 4 由来の選択された抗原ペプチドも、P R R S V ワクチン製剤中に組み込むために設計し、スクリーニングし、同定した。具体的には、表3に示すような抗原ペプチドG P 2 B エピトープ (V 1 1 1 - L 1 3 6) (配列番号 1 0)、G P 3 B エピトープ (C 5 7 - C 7 5) (配列番号 1 1)、G P 4 B エピトープ (C 5 2 - C 6 9) (配列番号 1 2) を、免疫原性及び交差反応性評価のために、P R R S V J X A 1 株配列に基づき設計した。種々のP R R S V 株の相同G P 5、G P 2、G P 4 及びG P 4 由来のB エピトープ配列も、ペプチド抗原設計の参照のために例として表3にリスト化する。

10

【 0 1 0 2 】

G P 5、G P 2、G P 3、及びG P 4 由来のこれらのB エピトープクラスターペプチド抗原はまた、表5に示すように、G P 5 . 1 及びG P 5 . 2 フレームについてC 末端 (配列番号 3 7 及び 3 8) 又はN 末端 (配列番号 3 9 ~ 4 6) でのいずれかで、人工コンピナトリアルTh ペプチド (配列番号 3 5) に個々に結合し、それらの長さが短い性質を克服してこれらのペプチド抗原の免疫原性を増強させた。

20

【 0 1 0 3 】

ワクチン製剤

本発明のペプチドベースP R R S V ワクチンの例示される使用において、アミノ末端又はカルボキシル末端でL y s - L y s - L y s - N L y s (配列番号 3 6) 又は N L y s スペーサーを介して、人工コンピナトリアルTh 配列U B I T h (登録商標) 3 (配列番号 3 5) などの外来性のTh エピトープに結合するか又は結合しない、表3 ~ 7 に配列番号 9 ~ 9 0 としてリスト化されるようなレセプター結合 / 中和部位又はT ヘルパーエピトープクラスター部位を有する免疫原ペプチドとして含むワクチン製剤を、市販の油性ワクチン送達ビヒクルであるモンタニド (Montanide) ISA 50V2 を用いて供給業者の推奨手順に基づいて、油中水型エマルジョンに製剤化した。オレイン酸マンニド (mannide oil eate) の油性アジュバント組成物であるモンタニド (Montanide) (登録商標) ISA 50V2 (S e p p i c、パリ、フランス) 及びブタワクチンに通常用いられるミネラルオイルを、等容量の水相ペプチドP B S 溶液で乳化した。ペプチド免疫原を、特定のプロトコル (例えば、エマルジョン中のペプチド比及び総ペプチド濃度) に従って、約 2 5 ~ 7 5 μ g / m L でそれぞれのエマルジョンに製剤化した。これらのエマルジョンベースのワクチン製剤を、他に特記しない限り、1 部位当たり 0 . 2 5 m L ~ 0 . 5 m L でモルモットに、又は1 部位当たり 1 m L で子ブタに筋肉注射した。

30

40

【 0 1 0 4 】

デザイナーペプチドワクチン製剤でのモルモット及び子ブタの免疫化

モルモットにおいて行った免疫原性研究について、成熟した無感作の雄及び雌Duncan-H artleyモルモット (体重 3 0 0 ~ 3 5 0 g) を、1 群当たり 3 匹で用いた。2 回用量として 0 w p i 及び 3 w p i に筋肉内 (I M) に特定のワクチン製剤を投与して動物を免疫化した。これらのワクチン製剤は、免疫化の前に約 3 0 分間室温に放置し、約 1 0 ~ 1 5 秒間攪拌しなければならない。初回免疫化後 0 週目、3 週目及び 5 週目 (w p i) に、血清サンプル用に血液を採取した。ペプチド免疫原及びワクチン製剤の免疫原性評価のために、実施例 1 及び 2 に記載されるように、直接結合力価について標的ペプチドベースのE L

50

I S A によって、ならびに交差反応性力価について P R R S V によりコトランスフェクトされた細胞ベースの I F A によって、これらのサンプルをテストした。

【 0 1 0 5 】

特定病原体不在 (S P F) 農場由来の約 4 週齢の子ブタを、免疫原性研究のために耳標を付け、研究プロトコルに従ってグループ化した (子ブタ 3 ~ 5 頭 / 群) 。これらの群を、0 週目及び 4 週目に筋肉内にワクチン製剤を投与して免疫化した。1 つの研究において、以前に P R R S V 感染があった通常の農場由来の子ブタを用いて、感染ブタと本発明のマーカ-ワクチン製剤をワクチン接種したブタとを区別するために、診断 E L I S A テストの組合せを用いることにより、抗 P R R S V 抗体の存在下でのデザイナー P R R S V ペプチド抗原の別個の免疫原性を評価し、P R R S V マーカ-ワクチン製剤に対するこれらのブタの応答を測定した。

10

【 0 1 0 6 】

初回免疫時、3 ~ 4 週目の第 1 回追加免疫時、及び 5 ~ 6 週目の追加免疫から 2 週間後に血液サンプルを採取し、血清サンプルを調製し、実施例 1 及び 2 に詳述するように免疫原性及び交差反応性の評価のための複数の血清学的テストに供した。

【 0 1 0 7 】

P R R S V G P 5 タンパク質外部ドメイン配列から設計したペプチド免疫原の最適化及びランク付け

調製した多数の G P 5 外部ドメインペプチド免疫原の中から 9 個をエマルジョン製剤に製剤化して、初回及び追加免疫の免疫化スケジュール後のそれらの相対的な免疫原性を、図示及びランク付けした。表 8 から分かるように、P R R S V M D 0 0 1 配列に基づくペプチド免疫原 4 0 2 0 K c (配列番号 3 8) は、標的ペプチド E L I S A (> 1 l o g 1 0) 及び I F A 力価の両方に基づいて、ペプチド免疫原 4 0 2 0 K b (配列番号 3 7) よりも免疫原性が高い。したがって、アミノ酸配列フレーム 2 (G P 5 . 2) 設計は、フレーム 1 (G P 5 . 1) よりも優れている。ペプチド免疫原 4 0 2 0 K c を、実施例 6 に詳述するように、P R R S V M D 0 0 1 による P R R S V 負荷研究の大部分に用いた。表 8 に示すように、P R R S V M D 0 0 1 由来の配列を有するフレーム 3 (G P 5 . 3) で設計されたペプチド免疫原 4 0 4 8 K b (配列番号 3 9) は、ペプチド 4 0 2 0 K c とほぼ同じ免疫原性を有することが見出されたが、その I F A 力価は、ペプチド免疫原 4 0 2 0 K c の I F A 力価よりも高かった。ペプチド免疫原 4 0 4 8 K b と比較した場合に、E L I S A 及び I F A の両方によって実証されるような類似の免疫原性が、第 3 フレーム (G P 5 . 3) に基づいて設計された別のペプチド免疫原 4 0 5 0 K b (配列番号 4 0) で見出された。したがって、フレーム 3 は、G P 5 B 細胞エピトープクラスター抗原提示のためのより有利な設計フレームとみなされた。

20

30

【 0 1 0 8 】

ウイルス株の適用範囲を広げるために、本発明者らは、アミノ酸配列フレーム 3 に基づいて、例えばペプチド免疫原 4 0 5 2 K b (配列番号 4 1) 及びペプチド 4 1 2 4 K b (配列番号 4 2) のような、いくつかの関連するコンビナトリアルペプチド抗原の設計に進み、単一配列 G P 5 ペプチド 4 0 4 8 a (配列番号 9) 及び 4 0 5 0 a (配列番号 3 1) と比較した場合の抗体反応性の幅についてテストした。M D 0 0 1 及び J X A 1 由来の G P 5 . 3 フレーム配列との二重反応性が、ペプチド 4 0 5 2 K b (配列番号 4 1) を用いた免疫化により得られた免疫血清について見出されたことから、M D 0 0 1 及び J X A 1 の両方の適用範囲の幅が実証された。G P 5 . 3 ペプチド抗原 4 1 2 4 a (配列番号 3 0) 及び 4 1 2 4 K b (配列番号 4 2) を、ペプチド免疫原のコンビナトリアル性をさらに拡大するために設計し、それらの各々の免疫原性について比較した。表 8 に示すように、E L I S A 及び I F A の両方によって示されるような免疫原性の著しい増強が、ペプチド抗原 4 1 2 4 a と比較した場合にペプチド 4 1 2 4 K b で見出され、ペプチド抗原 4 1 2 4 a に結合した場合の人工コンビナトリアル T h ペプチド (配列番号 3 5) の免疫原性増強効果がわかった。G P 5 のループ構造を維持するように N 末端及び C 末端の両方でアミノ酸を減らすことにより、ペプチド抗原 4 0 9 4 a (配列番号 3 5) 及びそのより高い

40

50

免疫原性型のペプチド抗原 4094Kb (配列番号 43) の設計を得た。両方のペプチド抗原が、このような配列トリミングの後に、低下した免疫原性を示したので、人工的に構築したループ構造 (C24 - C48) は、GP5 外部ドメインの重大な意味を持つ部分を残しており、それにより増強される免疫原性は、ペプチド抗原 4124a 及び 4124Kb の構造中に N 末端及び C 末端の両方から伸長することによって、最適に組み込まれることができる。

【0109】

すべての評価において、人工コンビナトリアル Th ペプチド (配列番号 35) の、ペプチド抗原 4020b 及び 4020c の場合に見られるような C 末端への付着 (結果として、4020Kb 及び 4020Kc が生じる)、又は 4124a のような N 末端への付着 (結果として、4124Kb が生じる) はすべて、各々のペプチド抗原が、より優れたペプチド免疫原になることを促進した。ペプチド 4094 及び 4124 系列のペプチド抗原を、実施例 7 に記載されるように PRRSV JXA1 株による PRRSV GP5 ベースの負荷研究を追跡するために、エマルションワクチン製剤に調製した。ペプチド免疫原 4124Kb は、エマルションの単回投与にもかかわらず、高病原性 PRRSV JXA1 株による感染からの無感作子ブタの完全な (20頭 / 20頭 = 100%) 防御の成功が実証された (群 5) 一方、ペプチド免疫原 4094 系列は、2 回用量の免疫化の後に最適以下の防御 (4頭 / 5頭 = 80%) をもたらした。

10

【0110】

GP5 B エピトープクラスターペプチド抗原の免疫原性への PRRSV 外部ドメイン M ペプチドの効果

20

GP5 及び M は、PRRSV エンベロープ内で最も豊富なタンパク質であり、これらの 2 つのタンパク質は、それらの外部ドメイン中にジスルフィド結合ヘテロダイマーを形成して、マクロファージの細胞表面上のシアロアドヘシンレセプター (CD163) に対するリガンドとして作用する。完全長 M 外部ドメインペプチド抗原 (26mer の長さ) を調製し、1:1 及び 1:10 の比で完全長 GP5 外部ドメインペプチド免疫原 4020Kb 又は 4020Kc と混合して、GP5 外部ドメインペプチド抗原 4020Kb 及び 4020Kc の両方の免疫原性に対するこの外部ドメイン M ペプチドの影響を評価した。

【0111】

表 9 に示すように、26mer の外部ドメイン M ペプチドは、GP5 ペプチド免疫原 4020Kb 及び 4020Kc と等比で混合した場合、驚くほどの免疫原性であることが見出され、GP5 ペプチド免疫原 4020Kb 及び 4020Kc に対する M の相対免疫原性は、ペプチドベースの ELISA によって測定されるように、それぞれ約 1000 倍及び 100 倍にランク付けされた (群 1 及び群 2 の比較; 群 3、群 4 及び群 5 の比較)。GP5 ペプチド免疫原 4020Kc に対する IFA 力価はまた、用量依存的に著しく抑制された (群 3、群 4 及び群 5 の比較)。リガンド - レセプター相互作用は、マクロファージ上のシアロアドヘシンのレクチン活性及び GP5 糖タンパク質上のシアル酸に依存するので、PRRSV エンベロープ中のこの主要タンパク質に結合するための抗体の誘発を可能にする、GP5 の免疫原性を保存することが重要である。したがって、M ペプチドは、エンベロープ上での GP5 との共有結合が示唆され、リガンドとしての GP5 / M 複合体の一部であるにもかかわらず、B 細胞エピトープクラスターペプチド抗原ベースの構成成分における本発明者らの追跡 PRRSV ワクチン設計において除外された。

30

40

【0112】

PRRSV GP5 B 細胞エピトープクラスターペプチド抗原の IFA 力価に対する様々な用量の PRRSV Th プールの効果

最適以下の免疫原性を有する GP5 外部ドメインの中央ループ構造を提示する GP5 ペプチド抗原 4094a (C24 - C48) を、子ブタにおける本研究に用いて、B 細胞エピトープクラスターペプチド抗原の免疫原性に対する様々な用量の PRRSV Th ペプチドの効果进行调查した。PRRSV Th エピトープクラスターペプチドの等比での混合物を、5%、10%、20% ~ 50% で 4094a ペプチド抗原 (配列番号 31) にさら

50

に補充した。B細胞エピトープクラスター抗原ペプチド及びT細胞エピトープクラスターペプチド抗原の両方を含むワクチン製剤を、30 µg/mLの最適以下用量での初回及び追加免疫プロトコルを含む標準免疫化プロトコルによって子ブタに投与して、ペプチド抗原4094aの免疫原性に対するこのようなPRRSV Thペプチドの効果をモニタリングした(群1~群4)。ELISAによって測定される免疫原性は、これらのモニタリングした群についてそれほど変化しなかったが、IFA力価により、天然PRRSV GP5タンパク質に対するこれらの子ブタにおいて誘発された抗ペプチド抗体の交差反応性の用量依存的な改善が実証された。比較のために、コンビナトリアルThエピトープを4094a(配列番号31)(群5)に共有結合させて含む、GP5 B細胞エピトープクラスターペプチド免疫原4094Kb(配列番号43)が、ペプチド抗原4094a単独と比較して改善された免疫原性を有することも示した。これらの短いPRRSV Thペプチド(配列番号47~79)は、免疫化宿主を刺激後にPRRSVに曝露すると再現応答(recall response)によってPRRSVに対する細胞性免疫を開始することが知られているが、B細胞エピトープクラスターペプチド抗原に共有結合しなかった。改善されたIFA力価によって示される抗体反応性の質の改善により、このようなT細胞性免疫反応の利点が示唆された。PRRSVへの曝露時にPRRSVに対するサイトカイン産生を含む広範な細胞性免疫を開始するために、これらの厳選されたPRRSV Thペプチドを、すべての追跡負荷研究において、20%(重量/重量)でPRRSV B細胞エピトープクラスターペプチド免疫原と共にワクチン製剤中に含めた。

10

20

30

40

50

【0113】

中和活性を有する抗原部位周辺の高い免疫原性を示すGP2、GP3及びGP4 B細胞クラスターペプチドの同定及び設計

GP2、GP3及びGP4タンパク質由来の抗原ペプチドに結合するポリクローナル抗体も、PRRSVに対する中和活性を示し、これらのPRRSVエンベロープの微量タンパク質も、PRRSVに対する臨床学的及びウイルス学的防御にいくらか関わっているという最新の知見を考慮して、表3に示すような特異的抗原ペプチドGP2 Bエピトープ(V111-L136)(配列番号6)、GP3 Bエピトープ(C57-C75)(配列番号11)、GP4 Bエピトープ(C52-C69)(配列番号12)を、免疫原性及び交差反応性評価のために、PRRSV JXA1株配列に基づき設計し、候補ペプチド抗原として同定した。これらのBエピトープクラスターペプチド抗原を、そのN末端で人工コンビナトリアルThペプチド(配列番号35)に個々に結合し、モルモットにおける免疫原性評価のためのGP2、3、及び4 B細胞エピトープクラスター抗原ペプチド(配列番号44~46)とした。

【0114】

人工コンビナトリアルTh配列に結合されているか又は結合されていない、中和活性を有する抗原部位の周辺で特異的に設計されたGP2、GP3及びGP4 B細胞クラスターペプチドを個々に含むワクチン製剤を、それらの各々の免疫原性の評価のために、モルモットにおいてテストした。設計した多数のペプチド免疫原の中で、それらのN末端で人工コンビナトリアルThペプチドに結合した3つのペプチド(配列番号44、45、及び46)は、表11に示すように、30 µg用量での単回投与でも、驚くほど高い免疫原性を示した。したがって、これらの高い免疫原性を示すペプチドは、PRRSVワクチンのための最終製剤に組み込むための傑出した候補である。

【0115】

モルモットにおける複合GP2、GP3、GP4及びGP5エピトープクラスターペプチド免疫原についての免疫原性評価

PRRSV GP2、3、4及び5タンパク質由来のB細胞エピトープクラスターペプチド抗原の各々について設計を改良した後、初回刺激については総ペプチド濃度30 µg/mLで、及び追跡追加免疫については3wpiに15 µg/mLで、標準エマルジョンベースワクチン製剤中に等比で混合したこれらのペプチドの組合せを、他のペプチド抗原と混合した(admixed)場合には個々のペプチド抗原の免疫原性についてテストし、且つ

混合物中の1つ以上の抗原の免疫原性のいかなる意図されない抑制も評価及び回避するために、ペプチド抗原混合物の全体の免疫原性も評価した。この評価を行って、GP5/Mペプチド抗原混合物に対するMペプチドによる負の影響を回避した。

【0116】

表12に示すように、GP4 Bエピトープクラスターペプチド抗原(配列番号46)を、GP3/4組合せ製剤としてGP3 Bエピトープクラスターペプチド抗原(配列番号45)と、ならびに、GP3/4/5組合せ製剤としてGP3(配列番号45)及びGP5(配列番号42)と、又は、GP2/3/4組合せ製剤としてGP2(配列番号44)及びGP3(配列番号45)と混合した場合、標的ペプチドベースのELISAによって判断したGP4ペプチド抗原の免疫原性は、GP3標的ペプチドと混合した場合には強いままであったが、3種のペプチド抗原混合物中にある場合には、著しく弱まった。GP2及びGP3エピトープクラスターペプチド抗原の免疫原性は、GP4ペプチド抗原と比較して、単一のペプチド抗原と同じ免疫原性を維持した。したがって、GP2及びGP3エピトープクラスターペプチド抗原は、免疫反応適用範囲の幅を広げるために、任意のPRRSVペプチド抗原混合物にさらに確実に用いることができる。GP2、GP3及びGP4が、ウイルスエンベロープ上の微量成分であるという事実にかかわらず、対応する天然PRRSVタンパク質抗原との交差反応性を示す妥当なIFA力価が、GP5抗原ペプチドの非存在下でペプチド抗原混合物によって得られた(例えば、群1、2及び4)。

10

【実施例6】

【0117】

PRRSV Thエピトープクラスターペプチド抗原を補充したGP5由来のペプチドベースのPRRSVワクチンは、PRRSV MD001株による負荷から子ブタを防御した

20

PRRSV感染からのブタの防御において、PRRSV GP5 B細胞エピトープクラスターペプチド抗原の有効性を証明するために、3つの連続した免疫化及び負荷研究が台湾動物技術研究所(ATIT)によって行われた。PRRSV GP5 Bエピトープクラスターペプチド抗原によって生成されたワクチン製剤を客観的に評価するために、すべての製剤をコード化した。ブタコレラ、仮性狂犬病、萎縮性鼻炎、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ、口蹄疫、ブタ赤痢、疥癬、及びアクチノバチルス・ブルニューモニアを含めた病原体がないことを保証するために、SPFブタを定期的にモニタリングした。PRRSV 1001S、1002S及び1003S研究のすべての群で、GP5 Bエピトープクラスターペプチド免疫原4020Kc(配列番号38)及び4052Kb(配列番号41)を使用し、いくつかの製剤パラメータにわずかな変動があった。これらの製剤は、4020Kc抗原ペプチドとして群1及び2で、ならびに4052Kb抗原ペプチド由来ワクチン製剤として群3及び4で等価であるとみなされた。プールされた等比のPRRSV Thエピトープペプチド混合物(JXA1配列に基づく配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、76)を10重量%でそれぞれのワクチン製剤に補充して、細胞性免疫を付与することによって、PRRSV GP5ペプチド抗原の免疫原性をさらに増強した。

30

【0118】

トランスジェニックSPF農場を汚染しないために、これらの研究を2つの場所で行った。すなわち、免疫化の部分のみを、これらの免疫化/負荷研究への参加のために4週齢のSPFブタを提供したトランスジェニックSPF農場で行った。この農場はATITによって運営され、台湾北部のHsian Shan、Hsin Chuの隔離された区域にある。4週間の初回及び追加免疫の免疫化プロトコルの完了後、これらのSPFブタを、負荷研究のために台湾南部にある十分に管理された別の農場に移動した。PRRSVの米国株は台湾に蔓延しているので、2つの米国株MD-001及びAMERVAC-PRRSVを、これらの負荷研究に採用した。ウイルス負荷後、IFA及びウイルス血症テストのために、血清サンプルを採取した。最終的に、これらの動物を安楽死させ、肉眼検査及び病理学検査に供した。SPF子ブタは、1群当たり5頭で、研究設計に基づいてグループ化した。表13に

40

50

示すように、血液サンプルを採取した。採取した全ての血清サンプルを PRRSV-ORF5 IFA テスト (rVV-PRRS ORF5 発現法による) によってテストした。

【0119】

注射後の臨床的観察

各々のワクチン投与前及び後の全ての子ブタを、局所の (反応源性及びアレルギー反応を含む) 反応及び全身性の (呼吸困難、食欲、下痢、咳、CNS/SS、及びアレルギー反応を含む) 反応についての臨床的観察に供した。研究の間、局所反応源性に関連した腫脹が時折見出されたが、わずか3~4日間しか持続せず、それ以上の差は観察されずに正常な状態に戻った。研究対象の全ての動物について、全身性の有害反応は観察されなかった。

【0120】

ウイルス負荷後の臨床的観察

全ての免疫化ブタは、ウイルス負荷を受けた後のモニタリングの期間中、PRRSに特有の臨床徴候を示さなかった。

【0121】

免疫化及び負荷後のIFA検出及び肺病変

PRRSVに対する特異的抗体は、免疫化後に生成し、表14に示すように、4及び6wpi (免疫化後の週数) にIFAによって検出されたように、高力価に達した。表14に示すように、コントロール群の動物はいずれも、負荷ウイルスストックで表される場合にPRRSV GP5タンパク質の免疫原性が弱いという性質に大部分起因して、PRRSV負荷研究の後でもPRRSV GP5タンパク質に対する抗体を誘発しなかった。ワクチン接種群は、ウイルス負荷後2wpc (負荷後の週数) に、高いIFA力価を維持した。PRRSV GP5 Bエピトープクラスターペプチド抗原ワクチン製剤 (群1及び2について4020KCならびに群3及び4について4052Kb) で免疫化した20頭の子ブタのうち18頭は、1つの病変も検出されることなく、完全に防御された (防御率90%)。群3及び4の子ブタのうち2頭には、軽微な病変が検出された。対照的に、図7A及び7Bに示すように、80% (4頭/5頭) のブタには、間質性肺炎の重度の病変が認められた。ATITのPRRSV研究室で行われた広範な負荷テストに基づいて、PRRSV GP5タンパク質のより高いIFA力価は、PRRSV負荷に対する完全防御とよく相関した。

【0122】

ウイルス血症検出

PRRSVウイルス量検出のためにPR-PCR法を用いたところ、全てのワクチン接種ブタにおいて、検出可能なウイルス量は認められなかった。これは、肺における防御有効性の結果と一致している。これらの2つのウイルス株は、感染後に重篤な症状を引き起こさないが、20頭中18頭のワクチン接種ブタにおいて、ウイルス血症が認められず、かつ病理学的結果がまったく認められなかったことから、PRRSV GP5ベースのワクチン製剤によって付与される防御有効性の証明概念が実証された。

【実施例7】

【0123】

PRRSV Thエピトープクラスターペプチド抗原を補充したGP5由来のペプチドベースのPRRSVワクチンは、単回の免疫化スケジュールならびに初回及び追加免疫の免疫化スケジュールの両方の後で、高病原性PRRSV (NVDC-JXA1株) による負荷から子ブタを防御した

【0124】

中国PRRSV JXA1負荷モデルの背景：

2006年、中国において、当初は知られていなかった、PRRSの症状を伴ういわゆる「高熱」病の未曾有の大規模流行があり、これは10を超える省 (自治都市又は自治区) に蔓延して、2,000,000頭を超えるブタに発症し、約400,000頭の致死例を出した。典型的なPRRSとは異なり、多数の成熟雌ブタも「高熱」病に感染した。

10

20

30

40

50

この非定型 PRRS の大流行は、当初、神経症状（例えば、震え）、高熱（40～42）、紅斑性白化皮疹などを示すブタコレラ様疾患として同定された。免疫学的分析と共に行われた剖検により、複数の臓器が高病原性 PRRSV に感染していることが明確に示され、重度の病理学的変化が観察された。「Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark」における Kegong Tian ら（2007 PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0000526）による協力で、ブタ感染モデルが中国において確立され、12頭の SPF ブタ（1群当たり4頭の子ブタ）の負荷のために、異なる起源を有する3つの代表的な PRRSV 分離体（JXA1、HEB1、及び HUB2）を用いて、分離 PRRSV の高病原性を再現した。

10

【0125】

各群において、2頭の子ブタに静脈内注射し、両方とも6～8日以内に死亡したことから、テストした PRRSV 株の高い病原性が暗示された。同様に、各群の他の2頭の子ブタに鼻腔内接種すると、それらは3～6日以内に「高熱」病の顕著な徴候（例えば、高熱、血斑、点状出血、震え、及びランピング（lamping）など）を示し、両方とも注射後10日目に死亡した。その後、ウイルス分離体を感染ブタからうまく回収し、PCR 検出及び EM によって確認した。剖検を行って、免疫学的効果及び病理学的病変を評価した。ほぼ同じ病理学的変化（肺、心臓、脳、腎臓、肝臓などにおいて）が、「高熱」流行中に屠殺されたブタにおいて観察されたので、中国における「高熱」病の2006年の大流行は、ブタ集団における高病原性 PRRSV 感染によって引き起こされたことが確認された。PRRSV 単離体の1つである JXA1 は現在、中華人民共和国（PRC）ガイドラインの通り、子ブタにおける PRRSV ワクチンの防御有効性を検証するための標準化負荷研究における標準ウイルスとして用いられている。

20

【0126】

PRC 政府 ワクチン 製品 ガイドライン による 妥当な PRRSV 負荷 及び ワクチン の 有効性 の 定義

4週齢の子ブタを、ペプチドベースの PRRSV ワクチン製剤で1回又は2回、2週間の間隔でワクチン接種した一方、1群はワクチン未接種コントロールとして保持した。それらの全ての子ブタを、PRRSV NVDC - JXA1 高抗原性ウイルス 3 mL（10⁵ TCID₅₀を含む）を用いて耳の後ろに筋肉注射で負荷した。体温を21日間毎日観察した。この負荷研究は、5頭中5頭の動物が負荷時に発熱を伴う病気になり、かつ5頭中少なくとも2頭の動物が死亡する場合に、妥当とみなす。ワクチンが防御的であるとみなされるためには、免疫化したブタの5頭中少なくとも4頭が健康を維持していることが必要である。

30

【0127】

南京の動物衛生ワクチン社（Animal Health Vaccine company）と共同で UBI により行われた負荷研究、PRC 2011年概要報告：

上述のように PRC の農業部刊行のガイドラインに従って、合計35頭のブタを血清陰性についてスクリーニングし、そのうち30頭をこの負荷研究のために選択した。詳細な動物の選択、ランダム化、グループ化、免疫化及び負荷研究、温度観察及び記録、ならびに死亡数を以下に記載する。

40

【0128】

中国江蘇省無錫市の農場由来の28日齢の健康な子ブタを選択した。南京のワクチン効力/ウイルス負荷テストセンターに本拠地を置く動物衛生ワクチン社で治験を行った。PRRS 抗体テストキット（LSI社、フランス）、ロット番号2-VERPRA-001, Exp. 2012-01及び PRRS 抗原テストキット：PRRS RT-PCR インビトロ診断キット（NSP2 1594-1680変異体株）を用いて、PRRSV 不在の動物を選択した。PRRS 病原性株（NVCD - JXA1）は、ストックの10倍希釈物を作製して負荷テストに用い、動物1頭当たり3 mLで動物に投与した。

【0129】

50

農場由来の合計35頭の健康な子ブタを、スクリーニングのために選択し、30頭を本研究に登録した。選択された全ての子ブタは、血清中のPRRSV抗原及び抗体について陰性との結果が出た。登録された全ての子ブタを、1群当たり5頭で、群1～6の6群に無作為に割り当てた。ブタの頸筋の脇にある耳の真後ろに位置する部位に、筋肉内注射を行った。免疫化投与量及び群を表15にリスト化する(客観的になるためにコード下で行った)。

【0130】

群1は、PRRSV内在性Tヘルパーエピトープペプチド(JXA1配列に基づく配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、76)の等比のプールを20重量%で補充した、PRRSV GP5ペプチド(GP5 Bエピトープクラスターペプチド抗原4094系列、配列番号43)に基づくワクチンで免疫化した。

10

【0131】

群2～5については、PRRSV GP5ペプチド(GP5 Bエピトープクラスターペプチド抗原4124、配列番号42)を免疫原として用いた。ワクチン製剤中の最終ペプチド濃度は、30µg/mLであった。この製剤はまた、PRRSV内在性Tヘルパーエピトープペプチド(JXA1配列に基づく配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、76)が等比で混合されたプールを、群2、3、及び4についてそれぞれ10重量%(すなわち、27.5µgのB:2.5µgのTのプール)、20重量%(すなわち、25µgのB:5µgのTのプール)及び50重量%(すなわち、20µgのB:10µgのTのプール)で、PRRSV Bエピトープ免疫原(配列番号42)に補充して含んだ。群5の動物は、単回投与しか受けなかったことを除いて、群4と同じワクチン製剤を受けた。

20

【0132】

群6は、いずれのペプチドでの免疫化も受けなかった、陰性コントロール群であった。

【0133】

本研究に最初に登録された30頭全ての子ブタについての抗体スクリーニング結果を、表16に示す。免疫化前にRT-PCRによりPRRSV抗原についてテストしたブタ由来の全てのサンプルの結果から、30頭中30頭が陰性であることがわかった一方、テストキットの陽性コントロールは185塩基対の増幅バンドが認められたことから、このテストシステムの有効性を確認した。無作為化後の全ての動物番号を表17に示す。PRRSV抗体のOD値の結果を、初回免疫化後0日目及び28日目について表18に示す。PRRSV JXA1負荷後の体温及び死亡数を、表19に示される温度()で観察した。

30

【0134】

要約すると、表19に示すように、コントロール群(群6)の全ての子ブタが、ウイルス負荷後の最初の数日中に病気になり、表20に示すように、2頭が死亡した(5頭中2頭=死亡率40%)。この負荷研究下でワクチン接種を受けなかったコントロール群の結果は、PRCの農業部によって制定された負荷研究の妥当性判断基準及びガイドラインに適合した。コントロール群と対照的に、群1の動物は、80%の生存率(5頭中4頭)及びわずか20%の死亡率で防御された。なお、群2～5の全ての動物(20頭中20頭)が防御され、したがって100%の防御がもたらされた。

40

【0135】

1つの主要な研究としてGP5 Bエピトープクラスターペプチド抗原ベースのワクチン製剤を受けた25頭全ての動物を合わせると(すなわち、群1～5)、25頭中24頭の動物が、わずか4%の死亡率で高病原性PRRSVウイルス株JXA1による負荷を生き残った。この結果は、負荷を受けて数日中に40%のブタが死亡し、5頭全ての子ブタが病気になった後に100%の死亡率をもたらしたコントロール群と比較すると、驚くべきことである。

【実施例8】

【0136】

50

PRRSVに対する広く防御的な抗体を誘発するための多成分PRRSVペプチドワクチン

PRRSVは、主要な糖タンパク質であるGP5と、3つの他の微量な糖タンパク質、すなわち、GP2a、GP3、及びGP4を、ビリオンエンベロープ上に含み、これらの全てが感染性ビリオンの生成に必要である。GP4とGP5タンパク質との間に強い相互作用が存在することが見出されたが、他の微量なエンベロープ糖タンパク質（GP2及びGP3）とGP5との間の弱い相互作用も検出されており、その結果、多タンパク質複合体の形成を生じる。全体として、GP4タンパク質は、糖タンパク質間の相互作用を媒介するために重要であり、感受性宿主細胞へのウイルス侵入のためにCD163との相互作用を媒介する原因となるGP5に加えて、GP2aと共に、ウイルス付着タンパク質としての役割を果たすという結論に達した。

10

【0137】

PRRSVの変異性が高いために、広く有効なPRRSVワクチンの開発には、複数のウイルス株の防御が必要である。PRRSVマーカーワクチン成分の基礎として、内在性PRRSV Thペプチド（プール1について、JXA1配列に基づく配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、76、及びプール2について、配列番号80～90）のプールを補充した、既に防御有効性が実証された4つのGP5ベースのPRRSVワクチン製剤（配列番号38のGP5 Bエピトープペプチド抗原4020Kc、配列番号41のペプチド抗原4052Kb、配列番号43の4094Kb及び配列番号42の4124Kb）を用い、多タンパク質レセプター複合体でポリクローナル抗体を誘発するために、このペプチド混合物中に、実証された機能的中和/レセプター結合部位を提示する抗原ペプチドを組み込むことにより、ウイルス適用範囲の広い強力な多成分PRRSVワクチンの開発を可能にすることが非常に望ましい。

20

【0138】

PRRSVに対する著しい中和特性を示すGP2、GP3、及びGP4抗原ペプチド結合抗体を用いて（8）、これらの選択領域の周辺でペプチド抗原を設計し、実施例5に示すように各々のタンパク質から最も強力なペプチド免疫原をスクリーニングした。これらのペプチド免疫原を、ウイルス株の広範な適用範囲を目的とする多成分PRRSVペプチドワクチンとして、様々なワクチン製剤に組み込んだ。精巧な分析ツールであるLC/MS/MSツール及び十分に管理されたGMPペプチド製造プロセスが利用できるので、地域利用（例えば、北米 対 欧州）のためにカスタマイズされた再現性のあるワクチン製剤を合理的に開発できる。

30

【実施例9】

【0139】

PRRSV感染動物、ワクチン接種されたPRRSV不在動物、又はワクチン接種されたPRRSV感染動物を同定するためのUBI DIVAシステム及びエピトープベースのマーカーワクチンの適用

実施例1に示すように、プレートコーティングのための混合物としてPRRSVヌクレオカプシドタンパク質由来の2つの抗原ペプチド（4171e、配列番号1及び4172e、配列番号2）を組合せた後、PRRSV感染動物を検出するためのトレーサーとしてタンパク質-HRPコンジュゲートを用いることにより、UBI PRRSV NC ELISAテストキットを確立した。このテストを、効果的なPRRSVマーカーペプチドワクチンの免疫原性をモニタリングするためにカスタマイズされた標的ペプチドベースのELISAと併用して、感染動物とワクチン接種動物の識別のためのPRRSV DIVAシステムを形成することができる。

40

【0140】

図5に示すように、PRRSVワクチン免疫原性研究に入る前にPRRSV陰性であることが事前のスクリーニングにより分かっている、正常な子ブタ（n = 109）由来の血清は、UBI PRRSV NC ELISAテストで高い特異性（109 - 1 / 109 = 99%）を示した。この群の次に、天然PRRSV GP5タンパク質に対する交差反

50

応性を有し、標的ペプチドベースのELISAによって示されるようにGP5に対する高力価の抗体を含むことが分かっている (Log_{10} 力価 ≥ 3)、PRRSV GP5 マーカーワクチン製剤を受けたブタ ($n = 45$) 由来の血清は、PRRSV NC ELISA テストによって陰性とスコア化され、このテストの特異性がさらに実証された。中央に示される3つの血清群についてのELISA測定値は、感染動物由来の純種のIFA陽性血清のものである。これらのサンプルは、IFA力価と並行して増加するELISA OD 450 nm測定値を示した。右端の血清は、PRRSV感染を有することが分かっている米国の農場から採取したサンプル ($n = 100$) であった。UBI PRRSV NC ELISAで $> 56\%$ の血清陽性率が見出され、この農場におけるPRRSV感染の高い有病率を示している。

10

【0141】

UBI PRRSV NC ELISA及びUBI PRRSV Bエピトープマーカーワクチン標的ペプチドベースのELISAを併用して、PRRSV感染を有することが分かっている台湾の農場においてPRRSVマーカーワクチン製剤の免疫原性をモニタリングしたところ、いくつかの洞察に満ちた情報が観察された。

【0142】

第一に、図6A及び6Bに示すように、PRRSVワクチン免疫原性研究に登録された全てのブタは、PRRSV NS ELISAで、カットオフ値よりもずっと高いs/c比を示し、陽性であることが分かった。このような感染はグレーの背景で強調表示した図に示され、テストした全ての動物が感染していた。第二に、これらの子ブタには高レベルのPRRSV NC反応性抗体(大部分は母性由来(MDA))が存在するにもかかわらず、全てのペプチドベースのPRRSVワクチン製剤が、それぞれの標的ペプチドベースのELISAによって検出されたように著しい免疫原性を実証した。図6A及び6Bに示すように、全ての動物を、初回免疫化後0週間、4週間及び6週間を通して受けたワクチン製剤中に含まれる成分ペプチド抗原に対するそのペプチド特異的抗体力価について、モニタリングした。その各々が初回ならびに0及び4週目の追加免疫スケジュールでの1回用量当たり、合計 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ でこれらのペプチド抗原を含むワクチン製剤(GP2 + GP3、GP3、GP3 + GP4、GP4、又はGP5ペプチド抗原)の中で、独立した高い免疫原性は、ほとんど全てのPRRSV GP2及びGP3中和部位由来のペプチドワクチン製剤と関連し、「GP5ペプチド単独」ワクチン製剤と関連していることが見出され、GP4中和部位由来のペプチド抗原は、他のPRRSV(GP3)ペプチド抗原と組合せると、免疫原性が若干損なわれた。

20

30

【0143】

中和抗体を誘発するために、GP2、GP3、GP4及びGP5タンパク質由来の中和及びレセプター結合部位の周辺で設計されたPRRSV Bエピトープクラスターペプチド免疫原を組み込み、細胞性免疫を促進するために内在性PRRSV Tヘルパーペプチドの混合物を補充した、コンビナトリアルペプチドベースのPRRSVワクチンが、PRRSV MD001及びJXA1株(共に北米型の株)による負荷研究のために計画されている。

40

【実施例10】

【0144】

S PF農場におけるPRRSV感染の根絶のためのUBIのPRRSVペプチドベースのマーカーワクチン及びその診断DIVAシステムの採用

マーカーワクチン製剤に用いられるPRRSV Bエピトープクラスターペプチド抗原は、PRRSVヌクレオカプシドタンパク質由来の抗原ペプチドを含まない一方、感染ブタは通常、この主要な構造タンパク質に対する早期抗体を発現しているので、感染動物とワクチン接種動物を識別するための診断システム、従って診断DIVAシステムに、PRRSV NC ELISA及びPRRSV Bエピトープマーカーワクチン標的ペプチドベースのELISAを組み込むことは論理的である。

50

【0145】

UBIのPRRSVペプチドベースのマーカーククチンは、PRRSVタンパク質上の中和及びレセプター結合部位に対する高力価のIFA陽性交差反応性抗体を誘発することができる。このようなマーカーククチン製剤は、MLV又はウイルス溶解物ベースのPRRSVワクチンよりも効果的に、PRRSV感染を予防することができる。なぜなら、これらのタンパク質の免疫原性が、現行の生物学的ワクチンフォーマットで提示される場合に非常に弱いという性質のせいである。

【0146】

UBIの診断DIVAシステムとそのPRRSVマーカーククチンの併用は、PRRSV感染による長期的問題を克服するために、以下の戦略に基づいて台湾のSPF農場で実行される。このSPF農場は、全ての病原体に対する厳密なモニタリング記録を継続しており、PRRSV感染のみを有する。この農場は、その現在のPRRSV感染を、従来の生物学的ワクチンでは、重大なバイオセキュリティリスクを負うことなく排除できない。UBIのPRRSVペプチドベースのマーカーククチンを用いると、ワクチンの化学的性質に起因するこのようないかなるバイオセキュリティリスクも示さない。

10

【0147】

PRRSV感染したSPF農場におけるPRRSV根絶のための戦略

この農場は、少なくとも2年間、UBIのPRRSVペプチドベースのマーカーククチンを用いたワクチン接種プログラムを継続する。農場内の全てのブタを、0週間、4週間及び8週間、免疫化スケジュールを用いてワクチン接種し、少なくとも6ヶ月間モニタリングする。NC及びマーカーククチン標的ペプチドに対する血清抗体力価を、PRRSVウイルス血症レベルと共に、PRRSV NC ELISA、IFA及び定量的PCR(qPCR)を含めたアッセイによってモニタリングする。ワクチン接種プログラム開始6ヶ月後、ワクチン接種を受けた母親から生まれた子ブタはワクチン接種を受けずに、これらの子ブタにおける感染率についてUBI PRRSV NCによって1~3ヶ月間モニタリングする。全ての子ブタがUBI PRRSV NC ELISAでの陰性反応性を示せば、この農場は、PRRSV感染に対して制御下にあるとみなすことができる。この農場はその後、先にPRRSV感染していた全てのブタを退去させる。このような退去までは、農場内の全てのブタは、PRRSVペプチドベースのマーカーククチンで継続的にワクチン接種する。

20

【0148】

この農場は、PRRSVに対するブタの免疫を増強するために、PRRSVペプチドベースのマーカーククチンを用いて全てのブタのワクチン接種を継続する。

30

【0149】

新たに導入した子ブタ及び成熟雌ブタが、PRRSV NC ELISAでの血清陰性反応性に基づきPRRSV不在であることが見出された場合、この農場はPRRSV不在であることを宣言することができ、従って、PRRSV根絶プログラムの成功を宣言することができる。

【0150】

モニタリングに用いる指標

UBIのPRRSV NC ELISA及びPRRSVマーカーククチン標的ペプチドベースのELISA、したがってDIVAは、この農場の全ての動物由来の血清を、反応性一貫性についてモニタリングするのに用いることができる。PRRSV NC ELISAから導き出される陽性率(%)及び平均OD値は、ワクチン接種及びモニタリングの期間中記録される。

40

【0151】

PRRSV NCタンパク質に対する移行抗体を有する場合がある(したがって、PRRSV NC ELISAで陽性を示す)1ヶ月齢未満の子ブタは、時間と共に減少する。環境中に循環しているPRRSVが存在しない、すなわち、新たな感染がない場合、これらの子ブタもまたPRRSV不在になる。その農場は、PRRSV感染した成熟雌ブタを急いで退去させる。PRRSVマーカーククチンで処置することにより、先に

50

感染していた成熟雌ブタから環境へのPRRSVの放出についての残余リスクはさらに低下し、したがって、農場全体がPRRSV不在状態に到達することが可能になる。表21は、このようなテストのためのサンプルサイズ必要量を、1頭のPRRSV陽性ブタを検出する確率について、95%の信頼度で設定する。

【0152】

DIVA及び多成分PRRSVペプチド免疫原ベースのワクチン製剤を用いたパイロットPRRSV排除研究

DIVAによる血清学的手段によってモニタリングされる、パイロットPRRSV排除研究は、通常のPRRSV感染農場において、多成分PRRSVペプチド免疫原を含む油中水型(I SA 50)エマルジョンベースのワクチン製剤を用いることによって行われ、このような多成分PRRSVペプチド免疫原ベースのワクチン製剤を受けた動物による、PRRSV NC抗体陰性化の潜在力を評価した。

10

【0153】

より具体的には、PRRSV NC ELISAによって陽性と出た4週齢の合計15頭の子ブタを、本研究のために5つの実験群に分類した。これらの子ブタを、0週間、4週間、8週間、免疫化及び採血(bleeding)スケジュールに基づいて免疫化し、初回免疫化の日から13週間モニタリングした。GP5(配列番号42)、GP2(配列番号44)、GP3(配列番号45)及びGP4(配列番号46)由来のPRRSV Bペプチド免疫原を、種々の組合せ(例えば、群1及び2についてはGP5、GP2、GP3、及びGP4;群3についてはGP5、GP3及びGP4;群4についてはGP3及びGP4)で、等比で、PRRSV Bペプチド免疫原について1回用量当たり合計25µg/mLで混合した。これらの製剤には、群2についてはPRRSV Thペプチド(同じく等比で混合した、配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、及び76)を、群1、3及び4についてはPRRSV Thコンビナトリアルペプチド(配列番号80~90)を、20重量%(すなわち、1回用量当たり5µg/mL)でさらに補充した。PRRSV感染を特定するために、NCに対する血清抗体反応性をPRRSV NC ELISAによってモニタリングする一方、種々のワクチン製剤によってもたらされる免疫原性について、PRRSVマーカーペプチドワクチンBエピトープ成分に対する血清抗体力価を、対応するPRRSV GP2、GP3、GP4及びGP5ペプチドベースのELISAによってモニタリングした。群5の動物は、PRRSVペプチドベースのワクチン製剤を受けず、陰性コントロール群としての役割を果たした。

20

30

【0154】

群1~4の全てのブタが、それぞれのマーカーワクチン標的PRRSV B GP2、GP3、GP4及びGP5ペプチドに対する抗体を発現したことが、それぞれのPRRSVペプチドベースのELISAによって検出され、特異的抗体力価は、初回免疫化から4週目の第2回免疫化の後に3Log₁₀よりも高く、モニタリングされた13週間の間ずっと高いままであった。しかし、PRRSV NCタンパク質に対する抗体反応性は、表22に示すように、初回免疫化後およそ6~8週目で最大反応性まで増大した後、初回免疫化後10週目までにベースライン付近まで低下し、モニタリング期間中の初回免疫化後13週目でベースラインのままであった。

40

【0155】

対照的に、PRRSVペプチドベースの免疫原を含むワクチン製剤を受けていない、群5の動物由来の血清は全て、PRRSV NCタンパク質に対する高い反応性を維持した。PRRSV NCタンパク質に対する抗体は、感染ブタに存在することが知られているので、多成分PRRSVペプチド免疫原ベースのワクチン製剤でワクチン接種されたブタにおける、PRRSV NCに対するこのような陰性化の驚くべき知見により、これらの多成分PRRSVペプチドベースのワクチン製剤の有効性がさらに確認された。したがって、DIVAの適用及びこれらの多成分PRRSVペプチド免疫原ベースのワクチン製剤は、広い用途を有し、PRRSV感染のモニタリング、予防、排除及び根絶のための緊急の必要性を満たす。

50

表 1

感染ブタにおける抗体の検出のための
PRRSVヌクレオカプシドタンパク質(N AおよびE U株) 由来の抗原ペプチド

ペプチド コード	配列 番号	ペプチド配列
4171e	1	ヌクレオカプシドタンパク質(北米株/MD001/TW/AAC98536)由来のPRRSVペプチドP2-E71 PNNNGKQQKKKGGQPVNQLCQMLGKILIAQQSQSRVKGGRKKNKKKPKPHFPLATEDDDVRRHHFTPSE
4172e	2	ヌクレオカプシドタンパク質(北米株/MD001/TW/AAC98536)由来のPRRSVペプチドE51-A123 EKPFFPLATEDDDVRRHHFTPSEKQLCLSSIQTAFAFNQAGTCILSDSGRISYTVFFSLPHTHTVRLIRVTAPPSA
4173e	7	ヌクレオカプシドタンパク質(欧州株/08V204/Belgium/EU/GU737266)由来のPRRSVペプチドA2-E72 AGNRNSQKKKNPAPMGNDQPVNQLCQLLGAMKSRQPRGGQAKRKRKPKPHFFLAEDDDVRRHHLTQTE
4174e	8	ヌクレオカプシドタンパク質(欧州株/08V204/Belgium/EU/GU737266)のPRRSVペプチドP51-N128 PEKPHFPLAAEDDDVRRHHLTQTERSLCLQSIQTAFAFNQAGVASLSSGKVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQDAN

10
20
30
40

【表 2】

表2

純種のPRRSV血清サンプルによるPRRSV NC ELISAの血清学的検証

ブタ識別番号	PRRSV IFA 力価	UBI PRRSV N ELISA A450
146	16	0.747
159	32	3.385
160	32	0.299
184	32	2.962
185	32	3.132
229	16	0.273
261	16	0.741
211	32	2.659
213	32	3.755
246	32	1.603
242	128	3.968
248	128	3.497
249	128	4.000
250	128	3.912
254	128	1.841
130	128	1.067
134	128	3.532
135	128	3.246
136	128	1.526
138	128	0.699
289	1024	3.717
290	1024	3.870
291	1024	2.605
292	1024	3.738
293	1024	3.803
294	1024	3.923
295	1024	3.901
296	1024	3.898
297	1024	2.963
298	1024	4.000
陰性 01	<10	0.172
陰性 02	<10	0.151
陰性 03	<10	0.214
陰性 04	<10	0.095
陰性 05	<10	0.096
陰性 06	<10	0.111
陰性 07	<10	0.131
陰性 08	<10	0.137
陰性 09	<10	0.132
陰性 10	<10	0.199
陰性 11	<10	0.142
陰性 12	<10	0.211

3種類のプールされた、および30種類の個別の、PRRSV IFA 陽性 (IFA 力価 >1:16) ブタ血清、ならびに12種類のPRRSV IFA 陰性 (力価 < 1:10) ブタ血清を含むパネルを、PRRSV N [p4171e+4172e]ペプチドベースのELISAの血清学的検証のために用いた。血清は、ELISA テストのために1:21に希釈した。

【 0 1 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3
 種々の PRRSV 株の相同 GP5、GP2、GP3 および GP4 由来の
 B エピトープ配列のアラインメント

GP5.3 B エピトープ: (V21-E65)

MD001	VPFCLAAALVSAN--GNSSSHSqliYnLTLcELNGTD	(配列番号9)	
JXA1	VPFYLAVLVNAS--NNNSSHIqliYnLTLcELNGTD	(配列番号13)	
NA	VPFcFAVLNAS--NDSSSHLqliYnLTLcELNGTD	(配列番号14)	
EU	FSLCIGLSWSFADGNNGNSSTyQYIYnLTlICELNGTT	(配列番号15)	10
Cons	VPFCLAVLVSASDGNNSSHIqliYnLTLcELNGTD	(配列番号16)	

GP2 B エピトープ: (V111-L136)

JXA1	VSRMYRIMEKAGQAawkQvVSEATL	(配列番号10)	
MD001	VSRMYRIMEKAGQAawkQvVNEATL	(配列番号17)	
NA	VSRMYRIMEKAGQAawkQvVSEATL	(配列番号18)	
EU	VSRRIYQTMehSGQAawkQvVSEATL	(配列番号19)	
Cons	VSRMYRIMEKAGQAawkQvVSEATL	(配列番号20)	

GP3 B エピトープ: (C57-C75)

JXA1	CPTRQAAAEIlePGKsFWC	(配列番号11)	20
MD001	CLTRQAAAQLYePSRSLWC	(配列番号21)	
NA	CLTRQAATEIYePGRSLWC	(配列番号22)	
EU	CLTSQAaKQRlePGRNMWC	(配列番号23)	
Cons	CLTRQAAAEIlePGRSLWC	(配列番号24)	

GP4 B エピトープ: (C52-C69)

JXA1	CLRHGDSSSPTIRKSSQC	(配列番号12)	
MD001	CLRHGNPSSEAIRKIPQC	(配列番号25)	
NA	CLRHRDSASEAIRKIPQC	(配列番号26)	
EU	CLRPYRTNTTQgKvPSQC	(配列番号27)	
Cons	CLRPGDSSSEAIRKISQC	(配列番号28)	30

【 0 1 5 9 】

表 4

4つの配列フレーム (GP5.1~GP5.4) に基づくB細胞エピトープの最適化に用いられる
PRRSV GP5外部ドメイン由来のペプチド

配列 番号	UBI PRRSVエピトープの記述	コンピナトリアルペプチド配列	
29.	GP5.1 MD001 (A26-E65)	AALVSANGNSSSHSQLIYNLTLCELNGTDWLAKKFDWAVE	
30.	GP5.2 MD001 (V21-E65)	VPFCLAALVSANGNSSSHSQLIYNLTLCELNGTDWLAKKFDWAVE	
9.	GP5.3 MD001 (V21-D54)	VPFCLAALVSANGNSSYSQLIYNLTLCELNGTD	
31.	GP5.3 JXA1 (V21-D54)	VPFCLAALVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD	
32.	GP5.3 JXA1/MD001 (V21-D54)	VPFCLAALVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD A S NG S YS	
33.	GP5.3 JXA1/NJ-a (V21-D54)	VPFCLAALVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD F A AS NGDS YL S	
34.	GP5.4 NJ-a/JXA/MD001 (C24-C48)	CFAALANASNDSSHLQLIYNLTLC L V VS NGNN YI S	10
			20
			30
			40

表 5

各ペプチドの免疫原性を増強させるために、スペーサを介して人工コンピナトリアルThペプチド(UBITh3)に結合した、PRRSV GP5、GP2、GP3及びGP4タンパク質由来のB細胞エピトープクラースタペプチド

人工コンピナトリアルThペプチド(配列番号 35):

ISISEIKGVIVHKKIETILF
T RT TR

スペーサ配列 (配列番号36):

KKK-εK

ペプチド 配列
コード 番号

ペプチド配列

p4020kb (GP5.1)	37	AALVSANGNSSHSQLIYNLTLCELNGTDWLAKKFDWAVE-εK-KKK-ISISEIKGVIVHKKIETILF T RT TR
p4020kb (GP5.2)	38	VPFCLAALVSANGNSSHSQLIYNLTLCELNGTDWLAKKFDWAVE-εK-KKK-ISISEIKGVIVHKKIETILF T RT TR
p4048kb (GP5.3)	39	ISISEIKGVIVHKKIETILF-KKK-εK-VPFCLAALVSANGNSSYSQLIYNLTLCELNGTD T RT TR
p4050kb (GP5.3)	40	ISISEIKGVIVHKKIETILF-KKK-εK-VPFCLAVLVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD T RT TR
p4052kb (GP5.3)	41	ISISEIKGVIVHKKIETILF-KKK-εK-VPFCLAVLVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD T RT TR
p4124kb (GP5.3)	42	ISISEIKGVIVHKKIETILF-KKK-εK-VPFCLAVLVNASNNSSHIQLIYNLTLCELNGTD T RT TR
p4094kb	43	ISISEIKGVIVHKKIETILF-KKK-εK-CFAALANASNDSSHLQLIYNLTLC L V VS NGNN YI S
p4148kb (GP2B)	44	ISISEIKGVIVHKKIETILF-εK-CPLLISSYFWPFCLASQSPVGMWSYA T RT TR
p4151kb (GP3B)	45	ISISEIKGVIVHKKIETILF-εK-CPTRQAAAEEIIEPGKSFWC T RT TR
p4152kb (GP4B)	46	ISISEIKGVIVHKKIETILF-εK-CLRHGDSSSP T IRKSSQC T RT TR

10

20

30

40

表 6
種々のPRRSV株のGP4、GP5、M及びNCタンパク質由来の
相同PRRSV Tヘルパー-エピトープ配列のアラインメント

GP4 T1 エピトープ (F7-I15)		
JXA1	FLLVGFKCF	(配列番号47)
MD001	FLLVGFKCL	(配列番号48)
NA	FLVVGFKCL	(配列番号49)
EU	FLLAGAQHL	(配列番号50)
GP4 T2 エピトープ (C170-I178)		
JXA1	CLFAILLAI	(配列番号51)
MD001	CLFAILLAI	(配列番号51)
NA	CLFAILLAI	(配列番号51)
EU	CLFAILLAI	(配列番号51)
GP5 T1 エピトープ (L117-C131)		
JXA1	LAALICFVIRLAKNC	(配列番号52)
MD001	LAALICFVIRLAKNC	(配列番号52)
NA	LAALTCFVIRFAKNC	(配列番号53)
EU	FAAFVCFAIRATKNC	(配列番号54)
GP5 T2 エピトープ (K149-K163)		
JXA1	KGRLYRWRSPVIVEK	(配列番号55)
MD001	KGRIYRWRSPVIEK	(配列番号56)
NA	KGRLYRWRSPVIEK	(配列番号57)
EU	RGRlHRWKSPIVIEK	(配列番号58)
GP6 T1 エピトープ (C9-S23)		
JXA1	CNDSTAPQKVLIAFS	(配列番号59)
MD001	CHDSTAPQKVLIAFS	(配列番号59)
NA	CHDSTAPQKVLIAFS	(配列番号59)
EU	CHDPTAAQKLVIAFS	(配列番号60)
GP6 T2 エピトープ (A33-I47)		
JXA1	ALKVSRGRLLGLLHL	(配列番号61)
MD001	ALKVSRGRLLGLLHL	(配列番号61)
NA	ALKVSRGRLLGLLHL	(配列番号61)
EU	ALKVSRGRLLGLLHI	(配列番号62)
GP6 T3 エピトープ (F57-V71)		
JXA1	FGYMTFVHFESTNRV	(配列番号63)
MD001	FGYMTFTHFQSTNRV	(配列番号64)
NA	FGYMTFAHFQSTNKV	(配列番号65)
EU	FGYMTYVHFESTNRV	(配列番号66)
GP6 T4 エピトープ (R93-K107)		
JXA1	KFITSRCRLLCLGRK	(配列番号67)
MD001	RFITSRCRLLCLGRK	(配列番号68)
NA	KFITSRCRLLCLGRK	(配列番号67)
EU	KFVTSRCRLLCCLGRR	(配列番号69)
GP7 T1 エピトープ (G40-L57)		
JXA1	GPGKKNRKNPEKPHFPL	(配列番号70)
MD001	GPGRKNKKNPEKPHFPL	(配列番号71)
NA	GPGKKNKKNPEKPHFPL	(配列番号72)
EU	PRGGQAKKRKPEKPHFPL	(配列番号73)
GP7 T2 エピトープ (V63-E71)		
JXA1	VRHHFTPSE	(配列番号74)
MD001	VRHHFTPSE	(配列番号74)
NA	VRHHFTPSE	(配列番号74)
EU	VRHHLTQTE	(配列番号75)
GP7 T3 エピトープ (S105-A123)		
JXA1	SLPTQHTVRLIRATASPASA	(配列番号76)
MD001	SLPTHHTVRLIRVTAPPASA	(配列番号77)
NA	SLPTHHTVRLIRVTASPASA	(配列番号78)
EU	MLPVAHTVRLIRVTSTSSA	(配列番号79)

【表 7】

表 7

PRRSV GP4、GP5、M及びNCタンパク質由来のTヘルパーエпитープクラスターペプチド

配列 番号	UBI PRRSV Thエпитープの記述	コンビナトリアルペプチド配列
80	GP4 Th1 MD001 (F7-L15)	KKK-FLLVGFKCL IV R I
81	GP4 Th2 MD001 (C170-I178)	KKK-CLFAILLAI I L II L
82	GP5 Th1 JAX1 (L117-C131)	KKK-LAALICFVIRLAKNC I IL KI R
83	GP5 Th2 MD001 (K149-K163)	KKK-KGRIYRWRSPVIEK R KL K K LL R
84	M Th1 Cons. JXA1 (C9-S23)	KKK-CNDSTAPQKVLAFS H F I Y E
85	M Th2 Cons. JXA1 (A33-L47)	KKK-ALKVSRGRLGLLHL
86	M Th3 Cons. JXA1 (F57-V71)	KKK-FGYMTFVHFESTNRV CA LQ K T N F M
87	M Th4 Cons. JXA1 (K93-K107)	KKK-KFITSRCRLCLLGRK R R
88	NC Th1 MD001/Lena (G40-L57)	KKK-GPGRKNKKKNPEKPHFPL P GQA K
89	NC Th2 Eu/Lena (V63-E71)	KKK-VRHHFTPSE L GT
90	NC Th3 MD001/Lena (S105-A123)	KKK-SLPTHHTVRLIRVTAPPSA N V ST A

10

20

【 0 1 6 3 】

【表 8】

表8 PRRSV GP5タンパク質由来のペプチド免疫原の最適化

群	免疫原の説明	動物番号	0 wpi			5 wpi		
			GP5.1ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4020b (配列番号29)	IFA 力価	GP5.1ペプチドELISA ELISA Log10力価 4020b	IFA 力価	GP5.1ペプチドELISA ELISA Log10力価 4020b	
群1	ペプチド 4020Kb=ペプチド免疫原 4020b (MDOO1)-KKK-eK-UBITh3 配列番号37 および PRRSV Th プール 1	D1-1	0.095	<10	3.100	<50		
		G1-2	0.103	<10	3.561	<50		
		G1-3	0.090	<10	2.882	<50		
群2	免疫原の説明	動物番号	0 wpi			5 wpi		
			GP5.2ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4020c (配列番号30)	IFA 力価	GP5.2ペプチドELISA ELISA Log10力価 4020c	IFA 力価	GP5.2ペプチドELISA ELISA Log10力価 4020c	
		G51	0.097	<10	4.764	<50		
		G52	0.101	<10	4.561	50		
		G53	0.096	<10	3.753	50		
群3	免疫原の説明	動物番号	0 wpi			5 wpi		
			GP5.3ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4048a (配列番号9)	IFA 力価	GP5.3ペプチドELISA ELISA Log10力価 4048a	IFA 力価	GP5.3ペプチドELISA ELISA Log10力価 4048a	
		7	0.079	<10	4.571	50		
		8	0.071	<10	4.299	100		
		9	0.099	<10	3.151	100		
群4	免疫原の説明	動物番号	0 wpi			5 wpi		
			GP5.3ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4050a (配列番号31)	IFA 力価	GP5.3ペプチドELISA ELISA Log10力価 4050a	IFA 力価	GP5.3ペプチドELISA ELISA Log10力価 4050a	
		16	0.071	<10	4.571	50		
		17	0.070	<10	4.299	100		
		18	0.099	<10	3.151	100		

【 0 1 6 4 】

【表9】

表8(続き)
PRRSV GP5タンパク質由来のペプチド免疫源の最適化

群	免疫原の説明	動物番号	0 wpi			5 wpi			IFA力価
			GP5.3ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100	4048a	4050a	GP5.3ペプチドELISA 4048a	ELISA Log10力価 4050a	IFA力価	
群5	ペプチド4052Kb=ペプチド免疫原 UBITh3-eK-KKK-4052a (Consensies JXAI/MDOO1) 配列番号41 および PRRSV Th プール 1	25	0.055	0.061		2.888	2.351	50	
		26	0.103	0.068		4.695	4.080	100	
		27	0.051	0.055		4.376	3.620	100	
群6	免疫原の説明 ペプチド4124a (JXAI/MDOO1/NJ-a) 配列番号33 および PRRSV Th プール 1	動物番号	0 wpi			5 wpi			IFA力価
		3908	GP5.3ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100	4124a (配列番号33)		GP5.3ペプチドELISA 4124a		IFA力価	
		3909	0.056			4.647		80	
		3910	0.057			3.324			
群7	免疫原の説明 ペプチド4124Kb=ペプチド免疫原 UBITh3-eK-KKK-4124a (JXAI/MDOO1/NJ-a) 配列番号42 および PRRSV Th プール 1	動物番号	0 wpi			5 wpi			IFA力価
		3912	GP5.3ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100	4124a		GP5.3ペプチドELISA 4124a		IFA力価	
		3913	0.052			4.132		320	
		3914	0.051			4.362			
群8	免疫原の説明 ペプチド4094a (JXAI/MDOO1/NJ-a) 配列番号34 および PRRSV Th プール 1	動物番号	0 wpi			5 wpi			IFA力価
		302	GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100	4094a		GP5.4ペプチドELISA 4094a		IFA力価	
		315	0.145			2.548		80	
		330	0.121			2.919			
			0.212			2.695			

【 0 1 6 5 】

【表 1 0】

表8(続き)
PRRSV GP5タンパク質由来のペプチド免疫源の最適化

群9	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi			5 wpi		
			GP5.4ペプチド	ELISA	IFA 力価	GP5.4ペプチド	ELISA	IFA 力価
			A ₄₅₀ @1:100	4094a		4094a		
	ペプチド 4094Kb=ペプチド 免疫原 UBITH3-eK-KKK-4094a (JXAI/MD001/NJ-a) 配列番号43 および PRRSV Th プール 1	310	0.070		3.868			
321		0.058	<10	3.735		200		
331		0.063		3.450				

* ペプチド免疫原4020Kc、4052Kb、4024Kb、4094Kaおよび4094Kbを、それぞれの実施例に記載されるように、AMERVA C-PRRS、PRRS MD001およびPRRS JXA1株に対する種々の負荷研究に用いた。

【 表 1 1 】

表9 GP5 B/Eピトーブクラスベプチド抗原の免疫原性に対するPRRSV外部ドメインMベプチドの効果

群1 G.P.	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi			6 wpi			IFA 力価
			GP5.1/Mベプチド/ELISA A ₄₅₀ @1:100	4020b	M	GP5.1/Mベプチド/ELISA ELISA Log10力価	4020b	M	
群2 G.P.	4020Kb (配列番号37)	4473	0.046	0.071		3.755	0.000		NA
		4474	0.054	0.075		4.027	0.000		
		4475	0.069	0.080		4.746	0.000		
群3 子ブタ	1:1 比で 4020Kb (配列番号37)+M (配列番号93)	4464	0.071	0.087		3.267	7.891		NA
		4465	0.056	0.062		0.000	4.815		
		4466	0.053	0.075		1.728	6.672		
群4 子ブタ	4020Kc (配列番号38)	動物 番号	GP5.2/Mベプチド/ELISA A ₄₅₀ @1:100	4020c	M	GP5.2/Mベプチド/ELISA ELISA Log10力価	4020c	M	IFA 力価
		F-1	0.146	0.270		3.831	1.051		100
		F-2	0.294	0.280		5.023	1.964		100
	F-3	0.111	0.196		4.754	1.032		200	
群4 子ブタ	1:1 比で 4020Kc (配列番号38)+M (配列番号93)	動物 番号	GP5.2/Mベプチド/ELISA A ₄₅₀ @1:100	4020c	M	GP5.2/Mベプチド/ELISA ELISA Log10力価	4020c	M	IFA 力価
		A-1	0.254	0.331		3.817	5.480		<50
		A-2	0.298	0.333		4.584	5.699		<50
	A-3	0.290	0.314		3.486	6.027		<50	

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

【表 1 2】

表9 (続き)
GP5 Bエプítőープククラスペプチド抗原の免疫原性に対するPRRSV外部ドメインMペプチドの効果

群5 子ブタ	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi			6 wpi		
			GP5.2/MペプチドELISA		IFA カ価	GP5.2/MペプチドELISA		IFA カ価
			A ₄₅₀ @1:100	M		ELISA Log10カ価	M	
	4020Kc (配列番号38)+M (配列番号93) 10:1 比で	E-1	0.250	0.069	4.115	2.282	<50	
E-2		0.168	0.366	5.020	5.020	100		
E-3		0.280	0.304	3.109	3.109	50		

【 表 1 3 】

表10 子ブタにおけるPRRSV B細胞エピトープククラスターペプチド抗原4094aのIFA力価に対する様々な用量のPRRSV Thグループ1の効果

群1	免疫原の説明	動物番号	0 wpi		6 wpi		
			GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4094a	IFA 力価	GP5.4ペプチドELISA ELISA Log10力価 4094a	IFA 力価	
群1	4094a (Gnp34)+5% PRRSV Thグループ1*	B124	0.020	<10	3.845	50	
		O23	0.010	<10	3.250	50	
		O24	0.020	<10	2.950	100	
群2	免疫原の説明	動物番号	0 wpi		6 wpi		
			GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4094a	IFA 力価	GP5.4ペプチドELISA ELISA Log10力価 4094a	IFA 力価	
		B125	0.040	<10	3.207	100	
群2	4094a+10% PRRSV Thグループ1	B113	0.040	<10	3.032	100	
		B112	0.050	<10	3.397	50	
		動物番号	0 wpi		6 wpi		
群3	免疫原の説明		GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4094a	IFA 力価	GP5.4ペプチドELISA ELISA Log10力価 4094a	IFA 力価	
		B115	0.005	<10	3.924	100	
		B116	0.030	<10	2.888	50	
群3	4094a+20% PRRSV Thグループ1	O207	0.010	<10	2.777	200	
		動物番号	0 wpi		6 wpi		
			GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4094a	IFA 力価	GP5.4ペプチドELISA ELISA Log10力価 4094a	IFA 力価	
群4	免疫原の説明	B118	0.010	<10	3.236	200	
		B119	0.040	<10	3.369	200	
		B120	0.020	<10	2.005	200	

【 0 1 6 9 】

【表 1 4】

表10(続き)
子ブタにおけるPRRSV B細胞エプitarクラスタ-ペプチド抗原4094aのIFA力価に対する様々な用量のPRRSV Thプール1の効果

群5	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi		6 wpi	
			GP5.4ペプチドELISA A ₄₅₀ @1:100 4094a	IFA 力価	GP5.4ペプチドELISA ELISA Log10力価 4094a	IFA 力価
	ペプチド 4094Kb (配列番号43) =UBITh3-εK-KKK-4094a (JXAI/MDOO1/NJ-a)	310	0.010		3.868	200
		321	0.070		3.735	200
		331	0.010		3.450	200

* PRRSV Thプール1 (等比で、配列番号47、51、52、55、59、61、63、67、70、74、76)

【表 15】

表11
 単回投与後のモルモットにおけるGP2, GP3 および GP4 B細胞クラスターペプチド抗原の免疫原性

群	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi		3 wpi			
			配列番号10 A ₄₅₀ @1:100	IFA 力価	配列番号10 ELISA Log10力価	IFA 力価		
群1	GP2 B エピトープ (V1111-L136) 配列番号 10	4955	0.048	<10	0.000	<10		
		4956	0.049		0.000			
		4957	0.054		0.000			
群2	免疫原の説明 UBITh-εK-GP2 B エピトープ (V1111-L136) 配列番号 44	動物 番号	0 wpi	IFA 力価	3 wpi	IFA 力価		
		4958	配列番号10 A ₄₅₀ @1:100	<10	配列番号10 ELISA Log10力価	<10		
		4959	0.059		2.945	80		
群3	免疫原の説明 GP3 B エピトープ (C57-C75) 配列番号 11	4960	0.056	<10	4.350	<10		
		動物 番号	0 wpi		IFA 力価		3 wpi	IFA 力価
		4969	配列番号11 A ₄₅₀ @1:100		<10		配列番号11 ELISA Log10力価	<10
群4	免疫原の説明 UBITh-εK-GP3 B エピトープ (C57-C75) 配列番号 45	4970	0.048	<10	0.000	<10		
		4971	0.047		0.000			
		動物 番号	0 wpi		IFA 力価		3 wpi	IFA 力価
群4	免疫原の説明 UBITh-εK-GP3 B エピトープ (C57-C75) 配列番号 45	4962	0.044	<10	0.000	<10		
		4963	0.059		4.222			
		4964	0.056		3.888			
群4	免疫原の説明 UBITh-εK-GP3 B エピトープ (C57-C75) 配列番号 45	動物 番号	0 wpi	IFA 力価	3 wpi	IFA 力価		
		4964	配列番号11 A ₄₅₀ @1:100	<10	配列番号11 ELISA Log10力価	<10		
		4964	0.052		4.285	80		

表111(続き)
 単回投与後のモルモットにおけるGP2, GP3 および GP4 B細胞クラスターペプチド抗原の免疫原性

群	免疫原の説明	動物 番号	0 wpi		3 wpi	
			配列番号12 A ₄₅₀ @1:100	IFA カ価	配列番号12 ELISA Log10カ価	IFA カ価
群5	GP4 B エピトープ (C52-C69) 配列番号 12	4972	0.046	<10	0.000	<10
		4973	0.046		0.000	
		4974	0.044		0.000	
群6	免疫原の説明 UBITH-εK-GP4 B エピトープ (C52-C69) 配列番号 46	動物 番号	0 wpi	IFA カ価	3 wpi	IFA カ価
			配列番号12 A ₄₅₀ @1:100		配列番号12 ELISA Log10カ価	
		4966	0.053	<10	4.561	80
		4967	0.053		4.830	
4968	0.056	4.695				

【表 17】

表12

標的ペプチドベースのELISA及びIFAによる、モルモットにおける PRRSV GP5.3, GP2, GP3及びGP4 抗原ペプチドについての免疫原性評価

群番号	免疫原の説明	動物番号	0 wpi				5 wpi				
			PRRSV ペプチド ELISA				PRRSV ペプチド ELISA				
			A ₄₅₀ @1:100				ELISA Log10 力価				
GP2 (配列番号10)	GP3 (配列番号11)	GP4 (配列番号12)	GP5.3 (配列番号33)	IFA 力価	GP2	GP3	GP4	GP5.3	IFA 力価		
1	PRRSV GP4 ペプチド免疫原 (配列番号 46)	4926	0.047	0.048	0.048	0.049	<1	<1	4.598	<1	80
			0.047	0.050	0.050	0.050	<10	<1	<1	3.791	<1
2	PRRSV GP3/4 ペプチド免疫原 (配列番号 45 および 46)	4916	0.050	0.048	0.051	0.053	<10	<1	4.585	4.656	160
			0.049	0.049	0.049	0.051	<10	<1	5.087	4.811	<1
3	PRRSV GP3/4/5 ペプチド免疫原 (配列番号 45, 46 および 42)	4910	0.005	0.047	0.047	0.049	<10	<1	3.661	2.349	160
			0.046	0.048	0.048	0.050	<10	<1	4.741	3.662	4.276
4	PRRSV GP2/3/4 ペプチド免疫原 (配列番号 44, 45 および 46)	4922	0.047	0.049	0.048	0.052	<10	<1	4.207	4.289	160
			0.052	0.050	0.053	0.052	<10	4.181	4.787	3.556	<1

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

【表 1 8】

表 1 3
動物研究スケジュール

業務	実行時期 (WPI) (初回免疫化後の週数)	
グループ化, 耳標付け, 血液採取 ワクチン投与: 筋肉内注射をブタの頸筋の脇にある耳の真後ろに位置する部位に行った。	W0	10
血液採取 追加免疫	W4	
血液採取	W6	20
動物を負荷現場に移動	W7	
10用量のAMERVAC [®] -PRRS (10 ^{6,8} TCID ₅₀ /頭) または PRRS MD-001 (10 ⁵ TCID ₅₀ /頭)の鼻腔内投与による負荷研究	W7	30
血液採取	W9, 負荷研究の終了	

【 0 1 7 4 】

【表 19】

表 14
PRRSV 負荷研究結果の要約

群番号	頭数 / 群	負荷 回数	4 wpi での IFA 力価	6 wpi での IFA 力価	2 wpc での IFA 力価 ⁽²⁾	2 wpc での肺 病変スコア ⁽³⁾
1 ⁽¹⁾	5	2	50	100		0
			<50	100		0
			50	100		0
			100	200		0
			100	100		0
2 ⁽¹⁾	5	2	50	50	50	0
			<50	50	50	0
			<50	<50	50	0
			50	50	50	0
			100	50	50	0
3 ⁽¹⁾	5	2	<50		<50	1
			50		50	0
			<50		<50	0
			50		100	0
			50		100	0
4 ⁽¹⁾	5	2	50		100	0
			<50		<50	1
			100		200	0
			50		50	0
			200		200	0
Control ⁽¹⁾	5	0	<50		<50	3
			<50		<50	3
			<50		<50	0
			<50		<50	3
			<50		<50	3

(1) 群 1 (PRRS-10-01S)、群 2 (PRRS-10-02S)、群 3 及び群 4 (PRRS-10-03S)、並びにコントロール 群 (PRRS-10-02S) のデータ。

(2) AMERVAC-PRRS 株負荷：群 1；MD-001 株負荷：群 2、群 3 及び群 4。

(3) 病変スコア：0, 病変無し；1, 軽微な病変；2, 軽度の病変；3, 重度の病変。

【0175】

10

20

30

40

【表 2 0】

表 15

動物群および 投与量

群	ワクチン製剤	頭数/群	ワクチンの 用量	接種の回数
1	製剤 1	5	1ml	2
2	製剤 2	5	1ml	2
3	製剤 3	5	1ml	2
4	製剤 4	5	1ml	2
5	製剤 5	5	1ml	1
6	製剤 6	5	0	0

10

注：コントロール群 6 については非免疫化；群 5 については 0 w p i のみでの免疫化；
群 1 ～ 4 については 0 w p i および 2 w p i での 2 回の免疫化。免疫化のための
全ての投与 製剤は同じである（1 mL）。

20

1.2.4 免疫原性：ウイルス負荷前の 4 w p i（28 日目）で PRRS 抗原をテスト。

1.2.5 ウイルス負荷：4 w p i（28 日目）後に PRRS 病原性株（NVCD-JXA1）を使用。

1.2.6 体温測定：ウイルス接種後 21 日目から各日。

【0 1 7 6】

【表 2 1】

表 16

免疫化前の PRRSV ELISA OD_{450nm} の結果

					Pos	Neg
0.264	0.122	0.094	0.160	0.200	Con	Con
0.249	0.210	0.087	0.245	0.193	2.182	0.233
0.241	0.262	0.094	0.164	0.174	2.179	0.302
0.292	0.222	0.141	0.191			
0.225	0.112	0.195	0.205			
0.350	0.095	0.226	0.202			
0.213	0.137	0.219	0.188			

注：上記の値は、PRRSV ELISA で動物サンプルをテストして得られた平均OD値である。陽性コントロール及び陰性コントロールは共に、ELISA キットによって提供されたものである。アッセイキットによると、陽性値及び陰性値は、「陽性平均値」／「陰性平均値」＝S／N＞4. 0であれば妥当とみなされる。

テストの結果から、全てのサンプルが、免疫化前に PRRS 抗体について陰性 (OD) であることがわかった。

【0 1 7 7】

【表 2 2】

表 17

動物番号および群

群 1	群 2	群 3	群 4	群 5	群 6
7	16	2	4	1	13
14	17	8	5	10	20
50	21	51	9	12	25
27	54	55	11	15	26
30	28	57	32	49	31

【0 1 7 8】

【表 2 3】

表 18

PRRS 抗体反応性 (OD) の結果

免疫化後 4 週目

Pig No.	1	2	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14
2wpi	0.574	0.862	0.736	0.562	0.479	0.457	0.347	0.305	0.611	0.487	0.816	1.911
4wpi	0.926	0.557	0.595	0.476	1.377	2.377	0.564	0.670	2.187	0.129	0.530	0.515
Pig No.	15	16	17	20	21	25	26	27	28	30	31	32
2wpi	0.686	0.68	1.101	0.482	0.172	0.367	0.307	0.286	0.549	0.345	0.306	0.667
4wpi	0.549	0.876	0.243	0.584	0.334	0.284	0.575	0.684	0.338	0.364	0.306	0.328
Pig No.	49	50	51	54	55	57						
2wpi	1.254	0.309	0.960	0.522	2.361	0.462						
4wpi	1.736	0.602	3.094	0.542	1.198	1.310						
Pos	2.764	2.740										
Con	0.283	0.253										

10

20

注: OD >0.4995 は陽性としてスコア化される。

【 0 1 7 9 】

【表 2 4】

表19
負荷後の体温観察および死亡数 (X)

GP	Temp C° Pig No.	04 -03	04 -04	04 -05	04 -06	04 -07	04 -08	04 -09	04 -10	04 -11	04 -12	04 -13	04 -14	04 -15	04 -16	04 -17	04 -18	04 -19	04 -20	04 -21	04 -22	04 -23	04 -24	
1	7	39.8	39.4	39.9	40.3	40.5	41.2	41.6	41.5	41.3	41.2	40.2	40.3	40.2	40.2	40.2	40.5	39.7	39.5	39.3	39.6	39.5	39.6	39.6
	14	40.6	40.3	41.2	41.2	41.0	40.6	40.6	41.1	41.2	41.0	40.8	40.8	40.7	40.5	40.2	40.2	40.2	40.7	40.4	x			
	50	39.8	40.3	40.7	41.2	40.0	40.4	41.2	40.8	41.2	41.3	40.8	40.0	40.6	39.9	39.8	40.2	40.5	39.2	39.5	39.9	39.8	39.5	39.4
	27	39.2	39.8	40.0	40.0	40.0	40.7	40.6	41.0	41.5	41.3	40.5	40.7	40.6	40.3	40.7	40.2	40.3	39.6	39.9	39.9	39.8	39.6	39.6
	30	39.0	40.2	41.0	41.5	40.0	40.8	40.7	40.9	41.0	41.0	40.2	40.0	40.0	40.3	41.0	40.6	40.6	40.3	39.4	39.4	39.8	39.7	39.4
2	16	39.9	39.3	41.2	41.3	40.5	41.5	41.4	41.0	41.6	41.8	40.7	40.6	40.5	40.2	39.8	39.8	39.6	39.8	39.4	39.4	39.2	39.6	39.5
	17	40.3	40.0	40.5	41.3	40.4	41.2	40.8	41.0	41.2	41.7	41.0	40.6	41.1	39.8	40.5	39.0	39.4	39.2	39.2	39.5	39.2	39.2	39.3
	21	38.8	40.7	40.8	39.5	39.7	39.9	39.8	40.0	40.9	41.2	40.0	39.8	39.3	39.3	39.5	39.7	39.2	40.5	39.9	40.1	39.9	39.9	39.7
	54	39.6	40.3	41.1	41.6	39.7	40.7	41.2	41.0	41.0	41.0	40.5	40.2	40.7	40.2	39.8	39.5	39.7	39.2	39.7	39.8	39.7	39.8	39.6
	28	39.9	40.2	40.6	40.3	40.0	41.0	41.2	40.8	41.2	40.7	40.3	40.4	40.7	40.3	40.2	40.2	40.2	40.2	40.0	40.0	40.0	39.9	39.9
3	2	39.1	39.5	40.1	40.0	40.3	40.6	40.7	41.3	41.1	41.0	41.0	40.5	40.3	40.9	40.8	40.5	39.9	39.8	39.7	39.5	39.5	39.2	39.5
	8	39.5	39.5	40.0	40.2	40.5	40.3	40.6	40.7	41.0	40.5	40.0	40.8	40.6	40.0	40.2	40.4	40.6	39.7	39.7	39.7	39.5	39.3	39.5
	51	40.3	40.6	41.5	40.8	41.0	40.7	41.7	41.0	40.2	40.8	40.5	40.8	40.7	40.4	40.4	39.9	40.7	40.4	39.7	39.7	39.2	39.2	39.4
	55	39.4	40.3	41.2	40.1	39.8	41.2	41.0	41.0	40.9	41.2	40.7	40.2	40.7	40.2	40.6	40.5	40.5	40.4	40.1	40.2	40.0	40.2	39.9
	57	39.2	40.0	39.7	39.9	40.2	40.3	40.2	40.5	41.0	41.1	40.3	40.5	40.4	40.3	40.2	39.9	40.2	40.5	40.1	40.0	40.0	40.2	40.1
4	4	39.5	39.4	39.8	40.6	41.2	41.2	40.9	40.8	41.6	40.8	40.6	40.4	39.9	40.2	40.1	41.2	40.5	40.1	39.9	39.8	39.7	39.8	39.8
	5	40.5	40.0	40.7	41.0	40.5	41.3	40.6	40.7	41.0	40.8	40.4	40.7	40.3	40.0	40.0	40.7	40.0	39.6	39.4	39.2	39.3	39.3	39.5
	9	39.0	41.5	41.0	41.0	40.8	40.5	40.3	41.0	41.0	40.8	40.6	40.0	39.5	39.0	39.4	40.2	39.5	39.6	39.4	39.2	39.4	39.4	39.2
	11	39.0	40.1	40.0	39.9	40.2	39.8	40.3	40.5	40.8	41.0	40.6	40.3	40.0	40.3	39.7	39.5	40.2	39.2	39.3	39.3	39.5	39.2	39.5
	32	40.0	40.3	40.4	40.5	41.2	40.5	40.4	41.5	41.5	41.3	41.0	41.0	39.8	40.0	40.5	40.4	39.6	39.5	39.4	39.6	39.4	39.6	39.7
5	1	39.0	40.0	40.2	40.3	40.4	40.8	40.8	41.6	42.0	41.5	40.6	41.0	40.7	39.7	40.0	39.7	39.5	39.2	39.3	39.7	39.6	39.4	39.4
	10	39.6	39.8	39.8	40.1	40.8	40.7	40.3	41.2	41.0	41.0	40.8	40.7	40.5	40.3	39.9	40.6	40.3	39.8	39.6	39.4	39.3	39.2	39.2
	12	39.8	40.4	41.5	41.3	41.3	41.3	41.0	41.2	40.8	41.0	40.8	40.5	39.9	40.4	40.7	40.6	39.7	39.7	39.9	39.5	39.3	39.3	39.2
	15	39.8	40.2	41.2	41.3	40.5	40.8	40.3	41.0	41.5	41.0	42.0	40.6	41.2	39.8	40.2	39.7	39.5	39.7	39.6	39.9	39.8	39.8	39.6
	49	39.5	40.4	40.3	40.2	40.3	40.3	40.8	40.7	40.9	41.0	40.5	40.3	39.8	39.8	39.8	40.2	39.8	39.3	39.4	39.5	39.3	39.3	39.4
6	13	39.7	40.0	41.0	41.5	41.0	40.6	40.7	41.3	41.4	41.3	40.8	41.2	41.3	40.7	41.2	40.7	41.2	40.5	40.3	40.2	40.0	39.8	39.8
	20	39.5	40.7	41.2	40.2	40.1	40.0	40.7	41.2	41.8	42.0	41.3	40.8	40.7	40.4	40.2	39.8	39.5	39.2	39.1	39.0	40.2	40.0	40.0
	25	39.9	40.3	40.0	40.2	39.9	40.8	40.2	41.2	x														
	26	39.4	39.7	40.3	40.3	39.9	40.3	40.3	40.5	41.0	41.3	41.1	40.5	40.5	40.2	40.2	40.2	39.8	39.5	39.3	39.3	39.6	39.7	39.4
	31	39.4	39.7	41.0	40.5	41.2	41.3	41.5	41.3	40.9	x													

【 0 1 8 0 】

【表 2 5】

表 20

PRRSウイルス負荷テストの結果

群番号	頭数	死亡数	死亡率
1	5	1	20%
2	5	0	0%
3	5	0	0%
4	5	0	0%
5	5	0	0%
6	5	2	40%

群1～5を合わせると、25頭中24頭のブタが、4%の死亡率でPRRSV JAX1負荷を生き残った。コントロール群6において、5頭中2頭のブタが、40%の死亡率で負荷研究の初期に死亡した。コントロール群6において、全ての動物が病気になり、すなわち、100%の疾病率であった。本負荷研究は、PRC農業部ガイドラインに基づいて妥当とみなされた。

【0181】

【表 2 6】

表 21

	サンプルサイズ	必要量
	群れの中のPRRS有病率	
農場で飼育されるブタの頭数	10%	5%
<100	25	45
200	27	51
300	28	54
400	28	55
500	28	56
1000	29	57
≥5000	29	59

1. 農場は、標準業務手順（SOP）に従って運営され、成熟雌ブタおよび通常のブタは、血液採取のために2つの群に分けられる。

2. 無作為抽出法は、確率計算に基づく。

【0182】

10

20

30

40

50

【表 27】

表 22

PRRSVペプチド免疫原ベースのワクチン製剤を用いた免疫化(0、4、8wpi)による子ブタにおけるPRRSV感染の排除

群	動物 識別番号	O.D 450値/ カットオフ値(C.O=0.15)					
		0 wpi	4 wpi	6 wpi	8 wpi	10 wpi	13 wpi
		採血	採血	採血	採血	採血	採血
1	317	2.93	4.92	6.51	3.07	0.23	0.38
	312	5.75	1.05	3.49	4.42	0.12	-0.03
	309	2.73	2.65	3.35	1.53	-0.1	0.08
2	331	1.89	6.91	10.57	8.75	2.38	0.81
	336	7.79	1.29	0.72	0.04	-0.05	-0.08
	341	1.77	1.79	7.04	2.31	-0.04	-0.08
3	339	2.53	3.18	6.42	3.81	0.39	0.09
	343	3.28	5.91	12.2	3.84	0.78	0.55
	345	3.92	6.52	9.76	7.19	0.58	0.35
4	340	2.02	4.18	10.78	4.39	-0.01	0.62
	342	2.44	3.93	6.26	8.21	0.13	0.16
	344	2.27	5.55	10.29	7.63	0.74	0.16
5	306	15.49	12.74	10.12	13.54	9.34	15.45
	314	7.81	5.3	10.64	15.93	16.56	18.38
	322	2.23	2.39	10.45	10.38	17.2	11.93

4週齢の子ブタを、初回免疫化後0、4および8週目に、3回免疫化した。
 If S/C.O. ≥ 1 , サンプルはPRRSV抗体について陽性であると分類される。
 If S/C.O. < 1 , サンプルはPRRSV抗体について陰性であると分類される。
 S: サンプルのO. D 4 5 0 値 C.O.: カットオフ値

10

20

30

【 図 1 】

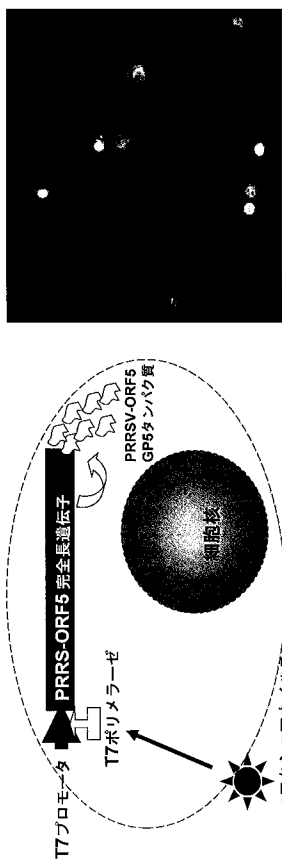
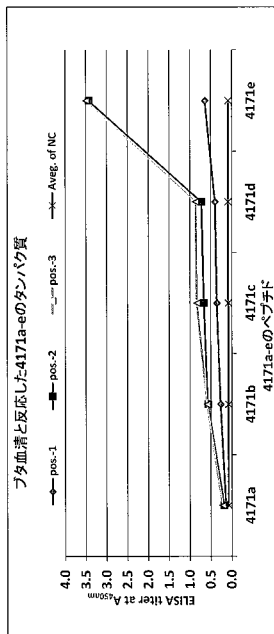


図 1B

図 1A

【 図 2 A 】

図 2A



	4171-a	4171-b	4171-c	4171-d	4171-e
pos-1	0.143	0.269	0.354	0.397	0.639
pos-2	0.182	0.570	0.687	0.723	3.427
pos-3	0.217	0.591	0.834	0.862	3.495
Aveg. of NC	0.077	0.083	0.086	0.095	0.087

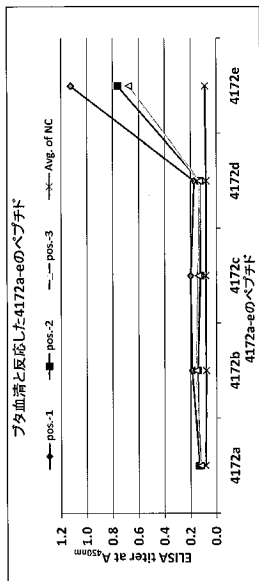
経路ブタの ELISA

(4171a) (配列番号94)	KPHFFLATEDDVRRHFFPSE	(-)
(4171b) (配列番号95)	IAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPFLATEDDVRRHFFPSE	(-)
(4171c) (配列番号96)	COMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPFLATEDDVRRHFFPSE	(-)
(4171d) (配列番号97)	KDGQGFVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPFLATEDDVRRHFFPSE	(-)
(4171e) (配列番号1)	PNNNGKQKQKKKGGQGFVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPFLATEDDVRRHFFPSE	(+)

抗原領域

【 図 2 B 】

図 2B



	4172a	4172b	4172c	4172d	4172e
pos-1	0.128	0.187	0.199	0.173	1.126
pos-2	0.134	0.145	0.143	0.127	0.762
pos-3	0.122	0.155	0.139	0.131	0.679
Aveg. of NC	0.084	0.078	0.082	0.079	0.088

経路ブタの ELISA

(4172a) (配列番号98)	VRLIRVTAPPSA	(-)
(4172b) (配列番号99)	CILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIRVTAPPSA	(-)
(4172c) (配列番号100)	QTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIRVTAPPSA	(-)
(4172d) (配列番号101)	PSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIRVTAPPSA	(-)
(4172e) (配列番号2)	EKEHEFLATEDDVRRHFFPSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIRVTAPPSA	(+)

抗原領域

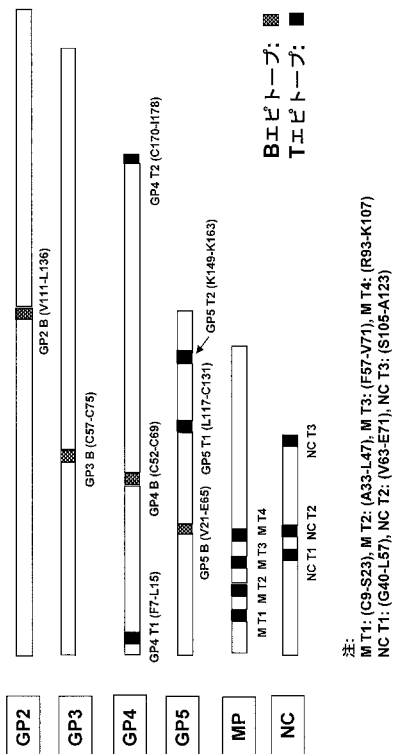
【 図 3 】

図 3

MD001	MENNGKQKQK---GDGQPVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPSE	56
JXA1	MENNGKQKQK---GNGQPVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPSE	56
NA	MENNGKQKQK---GDGQPVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPSE	56
EU	MAGRNRSQKKNPAPMGNDQPVNLQCOMLGLKIIAQSSQSVKGFGRKKNKPKPKFPSE	57
MD001	LAIEDVRRHFFPSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIR	116
JXA1	LAIEDVRRHFFPSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIR	116
NA	LAIEDVRRHFFPSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIR	116
EU	LAIEDVRRHFFPSEBQLCISSIQTAFNQAGTCILSDSGRISYTFEFLPHTHHVRLIR	117
MD001	VTAPPSA-----123 (配列番号3)	
JXA1	AVTAPPSA-----123 (配列番号4)	
NA	VTAPPSA-----123 (配列番号5)	
EU	VTSTASQDAN-----128 (配列番号6)	

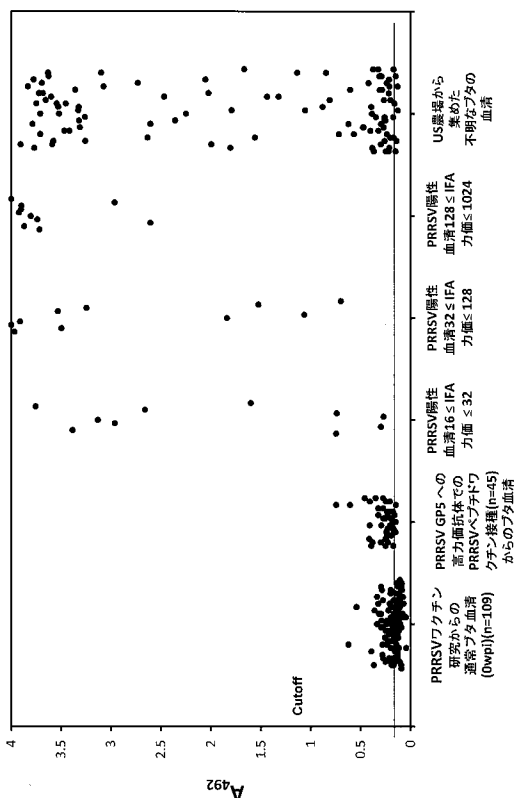
【 図 4 】

図 4



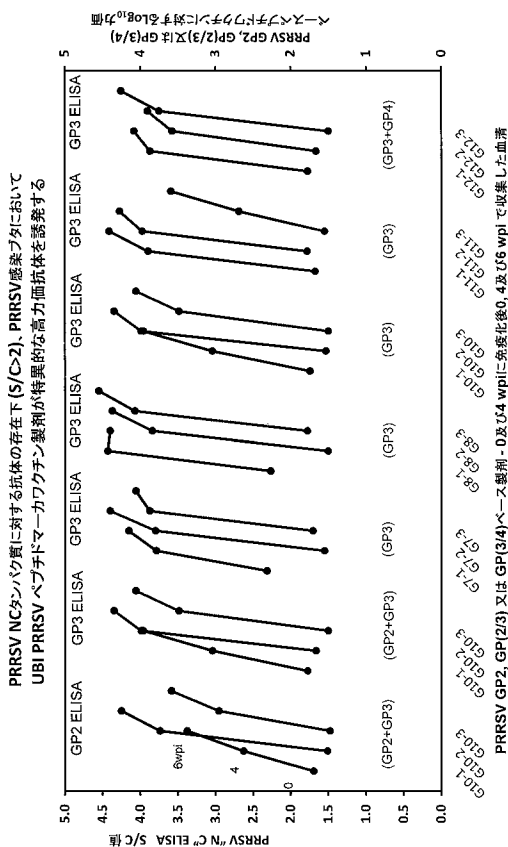
【 図 5 】

図 5



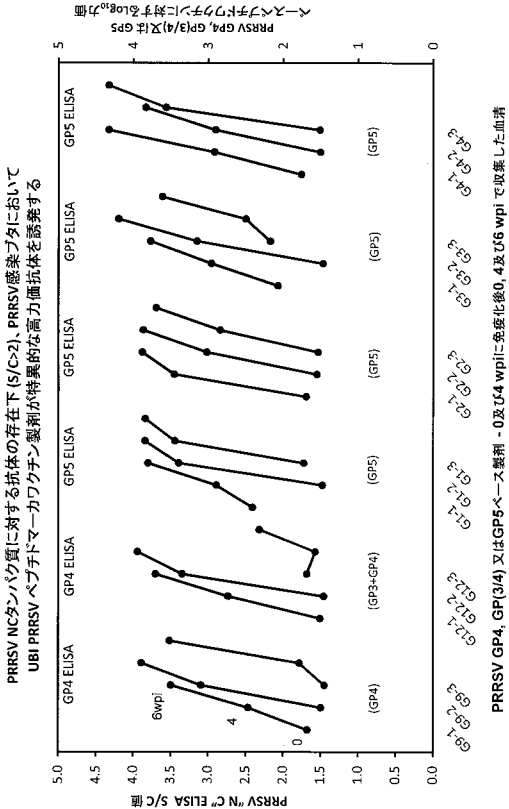
【 図 6 A 】

図 6A

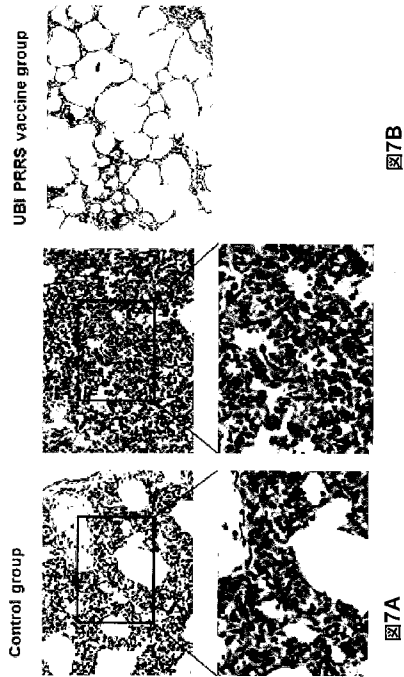


【 図 6 B 】

図 6B



【 図 7 】



【 配列表 】

2017141234000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成29年3月31日 (2017.3.31)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ペプチド抗原及び獣医学的に許容可能な送達ビヒクル又はアジュバントを有する、ブタ生殖器呼吸器症候群 (P R R S) ワクチン組成物であって、該ペプチド抗原が、

a) 配列番号 3 0 で表される G P 5 . 2 B 細胞エピトープクラスターアミノ酸配列であるか ;

b) 前記 a) G P 5 . 2 B 細胞エピトープクラスターアミノ酸配列に、スペーサーを伴うか又は伴わずに、共有結合した T ヘルパーエピトープであるか ; 又は

c) 前記 a) 又は前記 b) の任意の組合せである ;

上記 P R R S ワクチン組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/543 5 4 5 A
C 0 7 K	14/08	(2006.01)	C 0 7 K	14/08
C 0 7 K	16/10	(2006.01)	C 0 7 K	16/10
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00

(74)代理人 100180873

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ワン、チャン、イ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 1 7 2 4、コールド スプリング ハーバー、4 7 スネーク
ヒル ロード

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA08 BA51 BA99 CC21 CC32 EE01 EE03 EE06 FF11
FF14
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA40 DA76 DA86 EA31
EA53 FA71 FA74

专利名称(译)	基于合成肽的标记疫苗和有效控制猪生殖器官呼吸综合征 (PRRS) 的诊断系统		
公开(公告)号	JP2017141234A	公开(公告)日	2017-08-17
申请号	JP2017038534	申请日	2017-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	美国联合生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	联合生物医学公司		
[标]发明人	ワンチャンイ		
发明人	ワン、チャン、イ		
IPC分类号	A61K39/00 A61K39/12 A61K39/39 A61P31/14 A61P15/00 A61P11/00 G01N33/53 G01N33/543 C07K14/08 C07K16/10 C07K19/00		
FI分类号	A61K39/00.ZNA.A A61K39/12 A61K39/39 A61P31/14 A61P15/00.171 A61P11/00 G01N33/53.N G01N33/543.545.A C07K14/08 C07K16/10 C07K19/00 A61K39/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/BA51 4C085/BA99 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF11 4C085/FF14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	伊奈美稔 田村 庆政		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2017-141234 (2017-141234A)
	(43) 公開日 平成29年8月17日 (2017.8.17)		
需要解决的问题：提供针对猪生殖器官呼吸综合征 (PRRS) 的基于肽的标记疫苗，以及预防PRRS的方法和免疫诊断方法。该肽具有衍生自PRRSV GP2，GP3，GP4或GP5蛋白的B表位的肽的混合物；每个肽单独携带B细胞PRRSV中和/受体结合表位，分别与人工T辅助表位结合以增强相应肽的免疫原性；对该PRRSV一种PRRS疫苗组合物，其能够补充肽的混合物，所述肽的混合物呈递来自GP4，GP5，M和核衣壳蛋白的T辅助表位以赋予细胞免疫。	(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
	A 6 1 K 39/00 (2006.01) A 6 1 K 39/12 (2006.01) A 6 1 K 39/39 (2006.01) A 6 1 P 31/14 (2006.01) A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 A 6 1 K 39/12 A 6 1 K 39/39 A 6 1 P 31/14 A 6 1 P 15/00	Z N A A 4 C 0 8 5 4 H 0 4 5
	(21) 出願番号 (22) 出願日 (62) 分割の表示 原出願日	特願2017-38534 (P2017-38534) 平成29年3月1日 (2017.3.1) 特願2014-550269 (P2014-550269) の分割 平成23年12月30日 (2011.12.30)	(71) 出願人 591015142 ユナイテッド・バイオメディカル・インコーポレーテッド UNITED BIOMEDICAL INCORPORATED アメリカ合衆国、ニューヨーク 11178 8、ホーボーン、デュービッシュ・ドライブ 25 (74) 代理人 100094640 弁理士 梶野 昭男 (74) 代理人 100103447 弁理士 井坂 実 (74) 代理人 100111730 弁理士 伊藤 武泰
		審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 65 頁) 最終頁に続く	最終頁に続く
	(54) 【発明の名称】	ブタ生殖器官呼吸器症候群 (P R R S) の有効な制御のための合成ペプチドベースのマーカーワクチン及び診断システム	