

(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2010-259445

(P2010-259445A)

(43) 公開日 平成22年11月18日(2010.11.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	4 C O 8 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-167518 (P2010-167518)
 (22) 出願日 平成22年7月26日 (2010.7.26)
 (62) 分割の表示 特願2000-553594 (P2000-553594) の分割
 原出願日 平成11年5月26日 (1999.5.26)
 (31) 優先権主張番号 98110356.7
 (32) 優先日 平成10年6月5日 (1998.6.5)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504225895
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ
 ディカ ゲゼルシャフト ミット ベシュ
 レンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
 ハイム ビンガー シュトラーセ 1 7 3
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 弱毒化ペスチウイルス

(57) 【要約】

【課題】現場からの病因ペスチウイルスから区別し得る免疫の誘導について高い効力を有する生の弱毒化ワクチンとしての使用のための特異的に弱毒化され、かつ検出可能に標識されたペスチウイルスの提供。

【解決手段】糖タンパク質 E^{R N S} にある RNase 活性が不活性化されているペスチウイルスを含む生ワクチン。

【選択図】 図 1

1 Met Glu Leu Asn His Phe Glu Leu Leu Tyr Lys Thr Ser Lys Gln Lys Pro Val Gly 19
 20 Val Glu Glu Pro Val Tyr Asp Thr Ala Gly Arg Pro Leu Phe Gly Asn Pro Ser Glu Val
 40 His Pro Gln Ser Thr Leu Lys Leu Pro His Asp Arg Gly Arg Gly Asp Ile Arg Thr Thr
 60 Leu Arg Asp Leu Pro Arg Lys Gly Asp Cys Arg Ser Gly Asn His Leu Gly Pro Val Ser
 80 Gly Ile Tyr Ile Lys Pro Gly Pro Val Tyr Tyr Gln Asp Tyr Thr Gly Pro Val Tyr His
 100 Arg Ala Pro Leu Glu Phe Phe Asp Glu Ala Gln Phe Cys Glu Val Thr Lys Arg Ile Gly
 120 Arg Val Thr Gly Ser Asp Gly Lys Leu Tyr His Ile Tyr Val Cys Val Asp Gly Cys Ile
 140 Leu Leu Lys Leu Ala Lys Arg Gly Thr Pro Arg Thr Leu Lys Trp Ile Arg Asn Phe Thr
 160 Asn Cys Pro Leu Trp Val Thr Ser Cys Ser Asp Asp Gly Ala Ser Gly Ser Lys Asp Lys
 180 Lys Pro Asp Arg Met Asn Lys Gly Lys Leu Lys Ile Ala Pro Arg Glu His Glu Lys Asp
 200 Ser Lys Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Glu Gly Val Lys Tyr Gln Ile Lys
 220 Lys Lys Gly Lys Val Lys Gly Lys Asn Thr Gln Asp Gly Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys
 240 Pro Pro Glu Ser Arg Lys Lys Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Val Ile Thr Ile
 260 Leu Leu Tyr Gln Pro Val Ala Ala Glu Asn Ile Thr Gln Trp Asn Leu Ser Asp Asn Gly
 280 Thr Asn Gly Ile Gln Arg Ala Met Tyr Leu Arg Gly Val Asn Arg Ser Leu His Gly Ile
 300 Trp Pro Glu Lys Ile Cys Lys Glu Val Pro Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Glu Leu Lys
 320 Glu Ile Arg Gly Met Met Asp Ala Ser Glu Arg Thr Asn Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln
 340 Arg His Glu Trp Asn Lys His Gly Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Asp Pro Trp Ile Gln
 360 Leu Met Asn Arg Thr Gln Thr Asn Leu Thr Glu Gly Pro Pro Asp Lys Glu Cys Ala Val
 380 Thr Cys Arg Tyr Asp Lys Asn Thr Asp Val Asn Val Val Thr Gln Ala Arg Asn Arg Pro
 400 Thr Thr Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly Lys Asn Phe Ser Phe Ala Gly Thr Val Ile Glu
 420 Gly Pro Cys Asn Phe Asn Val Ser Val Glu Asp Ile Leu Tyr Gly Asp His Glu Cys Gly
 440 Ser Leu Leu Gln Asp Thr Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Met Thr Asn Thr Ile Glu Asn
 460 Ala Arg Gln Gly Ala Ala Arg Val Thr Ser Trp Leu Gly Arg Gln Leu Ser Thr Ala Gly
 480 Lys Lys Leu Glu Arg Arg Ser Lys Thr Trp Phe Gly Ala Tyr Ala Leu 495

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

糖タンパク質^{ERNS}にあるRNaseが不活性化されているペスチウイルスを含むことを特徴とする生ワクチン。

【請求項 2】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第1項記載のワクチン。

【請求項 3】

前記欠失及び/又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸に位置される請求の範囲第2項記載のワクチン。 10

【請求項 4】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第1項~第3項のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項 5】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第1項~第4項のいずれか一項記載のワクチン。 20

【請求項 6】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第1項~第5項のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項 7】

糖タンパク質^{ERNS}にあるRNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されており、但し、前記糖タンパク質の位置297及び/又は346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸がリシンではないことを条件とすることを特徴とするペスチウイルス。 30

【請求項 8】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸に位置される欠失及び/又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第7項記載のペスチウイルス。

【請求項 9】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第7項又は第8項記載のペスチウイルス。 40

【請求項 10】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第7項~第9項のいずれか一項記載のペスチウイルス。

【請求項 11】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第7項~第10項のいずれか一項記載のBVDVペ 50

スチウイルス。

【請求項 1 2】

糖タンパク質^{ERNS}をコードする核酸であって、前記糖タンパク質にあるRNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び / 又は突然変異により不活性化されており、但し、前記糖タンパク質の位置297及び / 又は346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸がリシンではないことを条件とすることを特徴とする核酸。

【請求項 1 3】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置295-307及び / 又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される欠失及び / 又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第12項記載の核酸。

10

【請求項 1 4】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている請求の範囲第12項又は第13項記載の核酸。

【請求項 1 5】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第12項～第14項のいずれか一項記載の核酸。

20

【請求項 1 6】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求の範囲第12項～第15項のいずれか一項記載のBVDV核酸。

【請求項 1 7】

ヌクレオチドワクチン及び / 又はベクターワクチンを調製するための請求の範囲第12項～第16項のいずれか一項記載の核酸の使用。

【請求項 1 8】

請求の範囲第1項～第6項のいずれか一項記載のワクチン、及び / 又は請求の範囲第7項～第11項のいずれか一項記載のペスチウイルス、及び / 又は請求の範囲第12項～第16項のいずれか一項記載のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする医薬組成物。

30

【請求項 1 9】

糖タンパク質^{ERNS}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とするペスチウイルスの弱毒化方法。

【請求項 2 0】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び / 又は突然変異により不活性化する請求の範囲第19項記載の方法。

【請求項 2 1】

前記欠失及び / 又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び / 又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される請求の範囲第19項又は第20項記載の方法。

40

【請求項 2 2】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化する請求の範囲第19項～第21項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 3】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化する請求の範囲第19項～第22項のいずれか一項記載の核酸。

50

- 【請求項 2 4】
糖タンパク質^{E^{RNS}}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に弱毒化されたワクチンの生産方法。
- 【請求項 2 5】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び／又は突然変異により不活性化する請求の範囲第 2 4 項記載の方法。
- 【請求項 2 6】
前記欠失及び／又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び／又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される請求の範囲第 2 4 項又は第 2 5 項記載の方法。 10
- 【請求項 2 7】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化する請求の範囲第 2 4 項～第 2 6 項のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 2 8】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化する請求の範囲第 2 4 項～第 2 7 項のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 2 9】
糖タンパク質^{E^{RNS}}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とするペスチウイルスを 20
検出可能に標識する方法。
- 【請求項 3 0】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び／又は突然変異により不活性化する請求の範囲第 2 9 項記載の方法。
- 【請求項 3 1】
前記欠失及び／又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び／又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される請求の範囲第 2 9 項又は第 3 0 項記載の方法。
- 【請求項 3 2】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について 30
図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化する請求の範囲第 2 9 項～第 3 1 項のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 3 3】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化する請求の範囲第 2 9 項～第 3 2 項のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 3 4】
請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれか一項記載のワクチン又は請求の範囲第 1 8 項記載の医薬組成物をペスチウイルス感染症の予防又は治療を要する動物に適用することを特徴とする動物のペスチウイルス感染症の予防方法及び治療方法。 40
- 【請求項 3 5】
糖タンパク質^{E^{RNS}}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法。
- 【請求項 3 6】
前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び／又は突然変異により不活性化する請求の範囲第 3 5 項記載の方法。
- 【請求項 3 7】
前記欠失及び／又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び／又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図 1 に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される請求の範囲第 3 5 項又は第 3 6 項記載の方法。 50

【請求項 3 8】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化する請求の範囲第35項～第37項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 9】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化する請求の範囲第36項～第38項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 0】

糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法。

10

【請求項 4 1】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化する請求の範囲第40項記載の方法。

【請求項 4 2】

前記欠失及び/又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される請求の範囲第40項又は第41項記載の方法。

【請求項 4 3】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化する請求の範囲第40項～第42項のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 4 4】

前記RNase活性を前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化する請求の範囲第40項～第43項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 5】

動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療のための請求の範囲第1項～第6項のいずれか一項記載のワクチンの使用。

【請求項 4 6】

動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療のための請求の範囲第18項記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 4 7】

ワクチン又は医薬組成物の調製のための請求の範囲第7項～第11項のいずれか一項記載のペスチウイルス及び/又は請求の範囲第12項～第16項のいずれか一項記載のヌクレオチド配列の使用。

【請求項 4 8】

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、
 (2) 前記サンプル中のペスチウイルスのヌクレオチド配列を同定する工程、
 (3) ワクチン中に存在する E^{RNS} ヌクレオチド配列の欠失及び/又は突然変異をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記欠失及び/又は突然変異の不在を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付ける工程
 を含むことを特徴とする、特異的に弱毒化されたペスチウイルス（前記の特異的に弱毒化されたペスチウイルスは請求の範囲第19項～第23項のいずれか一項記載の方法により弱毒化されている）でワクチン注射された動物からペスチウイルス感染動物を区別する方法。

40

【請求項 4 9】

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

50

(2) 前記サンプル中に存在する E^{RNS} 糖タンパク質へのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合により弱毒化ペスチウイルスの修飾 E^{RNS} 糖タンパク質を同定する工程（前記糖タンパク質は請求の範囲第19項～第23項のいずれか一項記載の方法により修飾され、それにより前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が未修飾 E^{RNS} 糖タンパク質に結合しない）、

(4) 前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記動物及び/又は前記サンプル中のペスチウイルス物質の存在がそうしないと証明される条件下で前記動物のペスチウイルス感染への抗体結合の不在を相関関係付ける工程

を含む請求の範囲第48項記載の方法。

10

【請求項50】

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

(2) 前記サンプル中に存在する E^{RNS} 糖タンパク質へのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合によりペスチウイルスの未修飾 E^{RNS} 糖タンパク質を同定する工程（前記糖タンパク質は請求の範囲第19項～第23項のいずれか一項記載の方法により修飾されておらず、それにより前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が修飾 E^{RNS} 糖タンパク質に結合しない）、

(3) 前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付け、前記動物及び/又は前記サンプル中のペスチウイルス物質の存在がそうしないと証明される条件下でワクチン注射された動物への抗体結合の不在を相関関係付ける工程

20

を含む請求の範囲第49項記載の方法。

【請求項51】

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

(2) 前記サンプル中の糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在又は存在を測定する工程、

(3) 糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記活性の存在を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付ける工程

を含む請求の範囲第48項記載の方法。

30

【請求項52】

(1) ポリクローナル抗体のサンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

(2) 未修飾糖タンパク質 E^{RNS} 又は本発明に従って修飾された糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の特異的結合を同定する工程、

(3) 未修飾糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の結合をペスチウイルス感染症と相関関係付け、本発明に従って修飾された糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の結合をワクチン注射された動物と相関関係付ける工程

を含む請求の範囲第48項記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるリボヌクレアーゼ活性（RNase活性）を不活性化することによるペスチウイルスの弱毒化方法に関する。また、本発明は本発明に従って弱毒化されたペスチウイルス、このようなペスチウイルスを調製するための核酸、本発明の弱毒化ペスチウイルスを含むワクチン及び医薬組成物に関する。更に、本発明は本発明の弱毒化ウイルスと病原ウイルスとを区別する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ペスチウイルスは世界中の多くの国で経済的に重要な動物の疾患の原因物質である。現

50

在知られているウイルス分離物はフラビウイルス科中の一つの属と一緒に形成する三つの異なる種にグルーピングされていた。

I ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)はウシにウシウイルス性下痢(BVD)及び粘膜病(MD)を引き起こす(Baker, 1987; Moennig及びPlagemann, 1992; Thielら, 1996)。

II 以前には豚コレラウイルスと称された古典的ブタ熱病ウイルス(CSFV)は古典的ブタ熱病(CSF)又は豚コレラ(HC)の原因である(Moennig及びPlagemann, 1992; Thielら, 1996)。

III ボーダー病ウイルス(BDV)は典型的にはヒツジに見られ、ボーダー病(BD)を引き起こす。ウシのMDと同様の症候がまたBDVによる子ヒツジの子宮内感染後に生じることが記載されていた(Moennig及びPlagemann, 1992; Thielら, 1996)。

ペスチウイルスの別の分類がBecherら(1995)その他により提示されている。

10

【0003】

ペスチウイルスは5'キャップ配列及び3' poly(A)配列の両方を欠いている陽極性の一本鎖RNAゲノムを有する小さいエンベロープウイルスである。ウイルスゲノムは細胞プロテアーゼ及びウイルスプロテアーゼを伴う同時翻訳プロセッシング及び後翻訳プロセッシングにより最終開裂産物を生じる約4000アミノ酸のポリタンパク質をコードする。ウイルスタンパク質は順位NH₂-N^{P10}-C-E^{RNS}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOHでポリタンパク質中に配置されている(Rice, 1996)。プロテインC並びに糖タンパク質E^{RNS}、E1及びE2がペスチウイルスのウイルス粒子の構成成分に相当し(Thielら, 1991)、E2及び少ない程度でE^{RNS}が抗体中和の標的であることがわかった(Donisら, 1988; Patonら, 1992; van Rijnら, 1993; Weilandら, 1990, 1992)。E^{RNS}は膜アンカーを欠いており、感染細胞からかなりの量で分泌される。このタンパク質はRNase活性を示すことが報告されていた(Hulstら, 1994; Schneiderら, 1993; Windischら, 1996)。ウイルス生活環に関するこの酵素活性の機能は現在知られていない。CSFVワクチン株の場合、部位誘導突然変異誘発によるRNaseの実験的分解は野生型ウイルスと同等の細胞培養中の増殖特性を有する細胞変性ウイルスをもたらすと報告されていた(Hulstら, 1998)。その酵素活性はペスチウイルスE^{RNS}と植物起源及び菌類起源の異なる既知のRNaseとの間に保存されたアミノ酸の二つのストレッチの存在に依存する。これらの保存配列の両方がヒスチジン残基を含む(Schneiderら, 1993)。CSFVワクチン株のE^{RNS}タンパク質中のリシンに対するこれらの残基の夫々の交換がRNase活性の分解をもたらした(Hulstら, 1998)。CSFVワクチン株のゲノムへのこれらの突然変異の導入はウイルス生存度又は増殖性に影響しなかったが、わずかに細胞変性の表現型を示すウイルスをもたらした(Hulstら, 1998)。

20

30

【0004】

弱毒化もしくは死滅されたウイルス又は異種発現系中で発現されたウイルスタンパク質を含むワクチンがCSFV及びBVDVについて生成され、現在使用されている。ライフワクチンとして使用されるこれらのウイルスの弱毒化の構造上の基礎は知られていない。これはワクチン注射後の逆突然変異又は組換えにより予測できない復帰突然変異体のリスクをもたらす。一方、免疫の誘導中の不活化ワクチン又は異種発現されたウイルスタンパク質(サブユニットワクチン)の効力はかなり低い。

一般に、弱毒化の基礎としての特定の突然変異を含む生ワクチンはワクチンの現在の世代の欠点を回避することを可能にするであろう。ペスチウイルス中の弱毒化突然変異に潜在的な標的は現在利用できない。

40

前記弱毒化突然変異の更なる利点はそれらを弱毒化ペスチウイルスに特有な標識として使用し、それらを現場からのペスチウイルスから区別することを可能にするそれらの分子上の特異性にある。

ペスチウイルス感染症の有効かつ安全並びに検出可能な予防及び治療の重要性のために、免疫の誘導についての高い可能性並びに病因ペスチウイルスから区別し得る弱毒化の特定の基礎を有する生の特異的に弱毒化されたワクチンに対する強い要望がある。

それ故、本発明の基礎となる技術上の問題は、この方法の結果として、現場からの病因ペスチウイルスから区別し得る免疫の誘導について高い効力を有する生の特異的に弱毒化されたワクチンとしての使用のための特異的に弱毒化され、かつ検出可能に標識されたペスチウイルスを

50

提供することである。

【発明の概要】

【0005】

上記の技術上の問題の解決はこの記載及び特許請求の範囲に特定された実施態様により達成される。

驚くことに、ペスチウイルスが糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不活性化により特異的に弱毒化し得ることがわかった。

弱毒化ペスチウイルスは高い免疫原性の生ワクチンを与える。

それ故、一局面において、本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNaseが不活性化されているペスチウイルスを含むことを特徴とする生ワクチンを提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】CSFVのアルフォート株により発現された最初の495アミノ酸。配列表はCSFVのアルフォート株により発現された最初の495アミノ酸を示す(Meyersら, 1989)。前記株の糖タンパク質 E^{RNS} の一つのモノマーはRumenapfら(1993)により記載されたアミノ酸268-494に相当する。植物及び菌類のRNase (Schneiderら, 1993)に相同性を示す領域に相当する残基295-307及び338-357が下線を施されている。

【図2】試験感染後の動物の直腸温度曲線。毎日の直腸温度を感染後の2日目から18日目まで記録した。直腸温度曲線がプラスミドpA/CSFVから誘導されたウイルスV(pA/CSFV)(連続線)又はプラスミドpA/C-346-dから誘導されたウイルスV(pA/C-346-d)(点線)で感染されたグループの夫々の動物について詳細に示される。

20

【図3】抗原投与感染後の動物の直腸温度曲線。毎日の直腸温度を抗原投与ウイルス感染後の1-21日目に記録した。致死用量のCSFV抗原投与株エストラップで抗原投与された動物は明細書に詳述されたように69日前に突然変異体C-346-d〔V(pA/C-346-d)〕で感染されていた。直腸温度曲線がCSFV抗原投与株エストラップから 2×10^5 TCID₅₀で抗原投与されたグループの夫々の動物について詳しく示される。

【図4】試験感染後の動物の直腸温度曲線。毎日の直腸温度を感染後の0-18日目に記録した。直腸温度曲線がC-346-d〔V(pA/C-346-d)〕(点線)又は回復されたウイルスC-346-d/RS〔V(pA/C-346-dRS)〕(連続線)で感染された二つのグループの夫々の動物について詳細に示される。

30

【図5】抗原投与感染動物実験#2後の直腸温度。毎日の直腸温度を抗原投与ウイルス感染後の1-10日目に記録した。致死用量(2×10^5 TCID₅₀)のCSFV抗原投与株エストラップで抗原投与された動物は37日前に突然変異体C-346-dで感染されていた。

【図6】実施例6に記載の二重突然変異体で治療された動物の直腸温度。毎日の直腸温度が突然変異体V(pA/C-297-L/346-L)による抗原投与ウイルス感染の前後に記録された。

【図7】実施例8に記載のRT-PCRによるC-346-dとヒスチジンコドン346の欠失を含まないCSFVの識別。a)プライマー対OI H-3/OI E^mPStopは実施例8に詳しく記載されたようにコドン346の欠失を含むRNA(C-346-d)から誘導されたバンドを特異的に増幅することを可能にする。対照的に、前記欠失を含まないRNAは前記プライマー対と相互作用しない(C-WT、C-346-L、C-346-K)。b)及びc)その他の二つのプライマー組み合わせ(OI H+2及びOI H+3)はコドン346の欠失を含まないRNAから誘導されたバンドを増幅する(OI H+2及びOI H+3)。346欠失突然変異体C-346-dから誘導されたRNAが鑄型として使用される場合、バンドを観察することができない。

40

【発明を実施するための形態】

【0007】

本明細書に使用される“ワクチン”という用語は動物に免疫応答を誘導する少なくとも一種の免疫活性成分とおそらく前記活性成分の免疫活性を増進する必ずしも必要ではない一種以上の付加的な成分とを含む医薬組成物を表す。ワクチンは医薬組成物に典型的な異なる成分を更に含んでもよい。ワクチンの免疫活性成分は完全生生物をその初期の形態で、又は所謂修飾生ワクチン(MLV)中の弱毒化生物もしくは所謂死滅ワクチン(KV)中の適当

50

な方法により不活性化された生物として含んでもよい。別の形態において、ワクチンの免疫活性成分は前記生物の適当な要素（サブユニットワクチン）を含んでもよく、それによりこれらの要素が全生物もしくはこのような生物の増殖培養物の分解及びその後の所望の一つ以上の構造を生じる精製工程により、又は細菌、昆虫、哺乳類もしくはその他の種（これらに限定されない）のような好適な系の適当な操作により誘導される合成方法＋その後の分離操作及び精製操作により、或いは好適な医薬組成物を使用する遺伝子物質の直接のとり込みによるワクチンを必要とする動物中の前記合成方法の誘導（ポリヌクレオチドワクチン注射）により生成される。ワクチンは上記の要素の一種を含んでもよく、又は一種より多い要素を同時に含んでもよい。

【0008】

免疫応答を増進するための付加的な成分はワクチンに添加される、例えば、水酸化アルミニウム、鉱油もしくはその他の油又は補助的分子のようなアジュバントと普通称される成分又はインターフェロン、インターロイキンもしくは成長因子（これらに限定されない）のようなこのような付加的な成分による夫々の誘導後に生体により生成される成分である。

“医薬組成物”は本質的には抗生物質又は駆虫薬（これらに限定されない）のような、それが投与される生物又はその表面に生きている生物の生理学的機能、例えば、免疫機能を変更することができる一種以上の成分、並びにプロセッシング形質、滅菌、安定性、腸内経路もしくは非経口経路、例えば、経口経路、鼻内経路、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、経皮経路もしくはその他の経路により組成物を投与することのしやすさ、投与後の

トレランス、徐放性（これらに限定されない）のような或る種のその他の目的を達成するためにそれに添加されるその他の成分からなる。

本発明のワクチンは先に特定されたワクチンを表し、一種の免疫活性成分がペスチウイルス又はペスチウイルス起源のものである。

“生ワクチン”という用語は生物、特に、生ウイルス活性成分を含むワクチンを表す。本明細書に使用される“ペスチウイルス”という用語はフラビウイルス科中のBVDV、CSFV及びBDVと同じ属に属すること及び糖タンパク質 E^{RNS} のそれらの発現を特徴とする、全てのペスチウイルスを表す。勿論、前記用語はまたBecherら(1995)により特性決定された全てのペスチウイルス又は糖タンパク質 E^{RNS} を発現するその他のペスチウイルスを表す。本明細書に使用される“RNase活性”はRNAを加水分解する糖タンパク質 E^{RNS} の能力を表す

。用語糖タンパク質E0は刊行物中に糖タンパク質 E^{RNS} と同義でしばしば使用されることが注目されるべきである。

“前記糖タンパク質にあるRNase活性の不活性化”という用語は前記糖タンパク質 E^{RNS} の未修飾野生型と較べて修飾糖タンパク質 E^{RNS} がRNAを加水分解することができないこと又は低下されたその能力を表す。

糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不活性化は本明細書及びHulstら(1998)により実証されるような前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により達成し得る。それ故、好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されている生ワクチンに関する。

【0009】

糖タンパク質 E^{RNS} は約97kDのジスルフィド結合されたホモダイマーを形成することが示され、夫々のモノマーはRumenapfら(1993)により記載されたCSFVポリタンパク質のアミノ酸268-494に相当する227アミノ酸からなる。CSFVのアルフォート(Alfort)株により発現された最初の495アミノ酸が参考の目的のみのために図1に示される。CSFVのアルフォート株のゲノム配列は受理番号J04358としてGenBank/EMBLデータライブラリー中で入手し得る。また、BVDV株CP7に関するアミノ酸配列はGenBank/EMBLデータライブラリー（受理番号U63479）中でアクセスし得る。アミノ酸の二つの領域は糖タンパク質 E^{RNS} 中だけでなく、或る種の植物及び菌類のRNase活性タンパク質中で高度に保存される（Schneiderら、1993

10

20

30

40

50

)。これらの二つの領域がRNase酵素活性に特に重要である。第一領域はCSFVのアルフォート株について図1により例示されるように位置295-307のアミノ酸の領域からなり、また第二領域は前記ウイルスポリタンパク質の位置338-357のアミノ酸からなる（CSFV株アルフォートの公表された演繹アミノ酸配列(Meyersら, 1989)に従うナンバリング)。上記RNase活性に特に重要なアミノ酸はCSFVのアルフォート株について特定された正確な位置に何ら限定されないが、その位置又はBVDV、BDV及び一般のペスチウイルスに見られるその他の株中のその位置に相当する位置にある好ましいアミノ酸を指摘するために単に例示様式で使用される。何とならば、それらが高度に保存されるからである。CSFVアルフォート株以外のペスチウイルスについて、好ましいアミノ酸の位置のナンバリングはしばしば異なるが、ペスチウイルスの分子生物学の分野の専門家は前記糖タンパク質の高度に保存されたアミノ酸に対するそれらの位置によりこれらの好ましいアミノ酸を容易に同定するであろう。一つの特別な非限定例において、CSFVアルフォートの位置346はBVDV株cp7の位置349と同じである。

10

【0010】

結果として、本発明は更に好ましい実施態様において本発明のワクチンに関するものであり、前記不活性化欠失及び/又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸に位置される。

非常に好ましい実施態様において、本発明は前記糖タンパク質の位置346のアミノ酸の欠失又は突然変異による前記RNaseの不活性化が特に有益な生ワクチンをもたらすことを開示する。それ故、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置）のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている本発明のワクチンに関する。

20

【0011】

本発明はウイルスポリタンパク質の位置346のヒスチジン（CSFVアルフォート/ツビンゲン(Tubingen)の公表された配列(Meyersら, 1989)に従うナンバリング)（これはE^{RNS} RNaseの保存された推定活性部位残基の一つに相当する）が欠失される場合にペスチウイルスが生存可能であり、RNase活性のないE^{RNS}タンパク質をコードすることを実証する。また、BVDペスチウイルスのE^{RNS}中の夫々のヒスチジン（位置349、BVDV CP7 GenBank/EMBLデータライブラリーの配列（受理番号U63479）に従ってナンバリングされた）の欠失はE^{RNS}糖タンパク質がRNase活性を失った生存可能なウイルスをもたらすことが本発明について実証された。一つのアミノ酸を別のものに変える点突然変異とは対照的に、欠失突然変異体は一般に復帰突然変異体よりも極めて安定である。この欠失を含むE^{RNS}を発現する病原CSFVアルフォート/ツビンゲンの突然変異体によるブタの感染はCSFV感染症の発熱又はその他の典型的な臨床症候をもたらさなかったが、一方、野生型ウイルスによる感染は発熱、下痢、拒食症、アパシー、B細胞の枯渇及び中枢神経障害を生じた。これらのブタが瀕死段階で殺され、接種14日後に皮膚及び内臓中にひどい出血を示した。その突然変異体で感染されたブタは感染3日、5日、7日、10日、14日後に試験してウイルス血症を示さなかったし、またB細胞枯渇を示さなかったが、一方、CSFVが野生型ウイルスを接種されたブタ由来の血液サンプルから容易に分離された。欠失突然変異体は中和抗体の誘導により示されるように動物中で明らかに複製した（実施例3、表3cを参照のこと）。突然変異体ウイルスに対する免疫応答はアルフォート株に異種であるCSFV株エイストラップ(Eystrup) (Konig, 1994)による高度に病原性の感染の2x10⁵ TCID₅₀による致死抗原投与を克服させるのに十分であった。更に、試験動物は抗原投与感染後に発熱、下痢、出血、B細胞枯渇又は拒食症のようなCSFV感染に典型的な臨床症候を示さなかった。このデータは欠失突然変異体によるブタの感染が厳しい抗原投与に対する保護に十分な免疫応答を誘導することを実証する。

30

40

【0012】

それ故、最も好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の

50

株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている本発明のワクチンに関する。

更に別の最も好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている本発明のBVDVワクチンに関する。

別の局面において、本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されており、但し、前記糖タンパク質の位置297及び/又は346(CSFVについて図1に記載された)のアミノ酸がリシンではないことを条件とする、弱毒化ペスチウイルスに関する。前記糖タンパク質の位置297及び/又は346のアミノ酸がリシンである組換えペスチウイルスがHulstらにより1998年に記載されていた。これらの特別なペスチウイルスはブタ腎臓細胞中で細胞変性効果を示した。今まで、 E^{RNS} 酵素活性の不活性化による驚くべき、かつ革新的な弱毒化の特徴が全く知られていなかった。

【0013】

ワクチンについて上記された理由のために好ましい実施態様において、本発明はまた前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸に位置される欠失及び/又は突然変異により不活性化されているペスチウイルスに関する。

ワクチンについて上記された理由のために更に好ましい実施態様において、本発明はまた前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている本発明のペスチウイルスに関する。

ワクチンについて上記された理由のために最も好ましい実施態様において、本発明はまた前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されているペスチウイルスに関する。

更に別の最も好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されているBVDVペスチウイルスに関する。

【0014】

本発明の弱毒化ペスチウイルス及びワクチンの活性成分は糖タンパク質 E^{RNS} 中の突然変異体アミノ酸配列の発現をもたらす核酸修飾組換え技術により容易に調製し得る。それ故、本発明の更なる局面は前記糖タンパク質にあるRNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されており、但し、前記糖タンパク質の位置297及び/又は346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された)のアミノ酸がリシンではないことを条件とする、糖タンパク質 E^{RNS} をコードする核酸に関する。

好ましい実施態様において、本発明は、上記された理由のために、前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸に位置される欠失及び/又は突然変異により不活性化されている、本発明の核酸に関する。

更に好ましい実施態様において、本発明は、ワクチンについて上記された理由のために、前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている、本発明の核酸に関する。

最も好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれ

10

20

30

40

50

に相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている、本発明の核酸に関する。

更に別の最も好ましい実施態様において、本発明は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている、本発明のBVDV核酸に関する。

【0015】

ヌクレオチド、例えば、DNA又はRNAはまたDNAワクチン、RNAワクチン及び/又はベクターワクチンを調製するのに有益である。これらのワクチンでは、ヌクレオチドが動物に直接適用され、又は初期のウイルス以外のベクターにより間接的に適用される。ヌクレオチドワクチン及びベクターワクチンは現在の技術水準から公知であり、更に詳述するまでもないであろう。

更なる局面において、本発明はヌクレオチドワクチン及び/又はベクターワクチンを調製するための本発明の核酸の使用に関する。

本発明のワクチン、弱毒化ペスチウイルス、及び/又は核酸は医薬組成物の調製に特に有益である。

従って、本発明の更なる局面は本発明のワクチン、及び/又は本発明のペスチウイルス、及び/又は本発明のヌクレオチド配列を含む医薬組成物に関する。例示目的のためにのみ示される、このような医薬組成物の一つの非限定例は以下のようにして調製し得る。感染細胞培養物の細胞培養上澄みが安定剤(例えば、スペルミジン及び/又はBSA(ウシ血清アルブミン))と混合され、続いて混合物が凍結乾燥され、又はその他の方法により脱水される。ワクチン注射の前に、前記混合物がその後水溶液(例えば、食塩水、PBS(食塩加リン酸緩衝液))又は非水性溶液(例えば、油エマルション、アルミニウムをベースとするアジュバント)中で再度水和される。

【0016】

本発明の付加的な局面はペスチウイルスの弱毒化方法に関する。本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性を不活性化することを特徴とするペスチウイルスの特異かつ予期しない弱毒化方法を提供する。

特異的に弱毒化されたペスチウイルスはワクチンの調製に特に有益である。それ故、更なる付加的な局面において、本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に弱毒化されたペスチウイルスワクチンの生産方法に関する。

糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不活性化はペスチウイルスを検出可能に標識するための驚くべき、かつ新規な方法を提供する。更なる局面において、本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性を不活性化することを特徴とするペスチウイルスを検出可能に標識する方法を提供する。本発明のペスチウイルスの糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不在の特徴はこれらのペスチウイルスを検出可能に標識することを可能にする。体液中のペスチウイルス感染細胞から分泌された標識され、又は標識されていないペスチウイルス又は E^{RNS} は分離及びこのような酵素活性のアッセイ後に糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在又は存在により明らかに区別し得る。

【0017】

欠失及び/又は突然変異により糖タンパク質 E^{RNS} にあるそれらのRNase活性を不活性化されたペスチウイルスについて、幾つかのその他の技術が使用し得る。このようなペスチウイルスはこのような欠失及び/又は突然変異から生じる構造上の結果のために容易に検出し得る。例えば、変化された糖タンパク質 E^{RNS} の核酸配列の配列の相違が実施例8に示されるように核酸配列決定技術又はPCR技術(ポリメラーゼ連鎖反応)により検出できる。変化されたタンパク質配列は変化しなかったタンパク質を認識しない特異性モノクローナル抗体により検出し得る。その逆に、変化され、それにより構造標識されたタンパク質を変化しなかった糖タンパク質 E^{RNS} を認識する特異性モノクローナル抗体への結合の不在により検出することがまた可能であるが、但し、ペスチウイルスの存在がそれ以外に証明し得ることを条件とする。また、勿論、標識ウイルス中のRNase活性を終わらせる欠失及

び / 又は突然変異は未標識ペスチウイルス感染症から生じる応答と較べた場合に動物で異なる免疫応答を生じるであろう。

【0018】

ペスチウイルスの弱毒化方法、特異的に弱毒化されたペスチウイルスワクチンの生産方法及び本発明のペスチウイルスを検出可能に標識する方法について言及する全ての局面に好ましい実施態様は前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び / 又は突然変異により不活性化する糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

ペスチウイルスの弱毒化方法、特異的に弱毒化されたペスチウイルスワクチンの生産方法及び本発明のペスチウイルスを検出可能に標識する方法について言及する全ての局面に更に好ましい実施態様は前記欠失及び / 又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び / 又は位置338-357 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置) のアミノ酸に位置される糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

10

ペスチウイルスの弱毒化方法、特異的に弱毒化されたペスチウイルスワクチンの生産方法及び本発明のペスチウイルスを検出可能に標識する方法について言及する全ての局面に非常に好ましい実施態様は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置) のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化される糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

20

【0019】

ペスチウイルスの弱毒化方法、特異的に弱毒化されたペスチウイルスワクチンの生産方法及び本発明のペスチウイルスを検出可能に標識する方法について言及する全ての局面に最も好ましい実施態様は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置) のヒスチジン残基の欠失により不活性化される糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

本発明は動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療に特に有益であるワクチン及び / 又はその他の医薬組成物を提供する。それ故、本発明の更なる局面は本発明のワクチン又は本発明の別の医薬組成物をこのような予防又は治療を要する動物に適用することを特徴とする動物のペスチウイルス感染症の予防方法及び治療方法に関する。

30

更なる局面において、本発明は糖タンパク質^{E^{RNS}}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法を提供する。

一つの局面において、本発明は糖タンパク質^{E^{RNS}}にあるRNase活性を不活性化することを特徴とする特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法を提供する。

【0020】

特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法、本発明の特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法について言及する全ての局面に好ましい実施態様は前記RNase活性を前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び / 又は突然変異により不活性化する糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

40

特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法、本発明の特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法について言及する全ての局面に更に好ましい実施態様は前記欠失及び / 又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び / 又は位置338-357 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置) のアミノ酸に位置される糖タンパク質^{E^{RNS}}の不活性化に関するこれらの方法である。

【0021】

特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法、本発明の特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法について言及する全ての局面に非常に好ましい実施態様は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346 (例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置) のアミノ酸の欠失又は突然変異によ

50

り不活性化される糖タンパク質 E^{RNS} の不活性化に関するこれらの方法である。

特異的に弱毒化されたペスチウイルスの調製方法、本発明の特異的に標識されたペスチウイルスの調製方法について言及する全ての局面に最も好ましい実施態様は前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346（例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置）のヒスチジン残基の欠失により不活性化される糖タンパク質 E^{RNS} の不活性化に関するこれらの方法である。

【0022】

本発明のワクチン又はその他の医薬組成物は動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療に特に有益である。

それ故、一つの局面において、本発明は動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療のための本発明のワクチンの使用に関する。更なる局面において、本発明は動物のペスチウイルス感染症の予防及び治療のための本発明の医薬組成物の使用に関する。

本発明のペスチウイルス及び/又は核酸は医薬組成物又はワクチンの有益な活性成分である。それ故、本発明は更なる局面においてワクチン又は医薬組成物の調製のための本発明のペスチウイルス及び/又は本発明の核酸の使用に関する。

【0023】

上記のように、糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不活性化はペスチウイルスを標識するための驚くべき、かつ新規な方法を提供する。

従って、本発明の一つの局面は本発明の検出可能に標識されたペスチウイルスを未標識かつおそらく病因のペスチウイルスから区別する方法に関する。このような方法は動物中の標識ペスチウイルスの効力を追跡するのに特に有益である。ワクチン治療された動物はこのような動物のサンプルを得、前記標識についてアッセイした後に標識陽性を与えるであろう。未標識動物及び特にペスチウイルス陽性を与える未標識動物が直ちに分離され、隔離され、又は屠殺されてその他の動物への病的感染の広がりの切迫した危険性を取り去ることができる。

【0024】

本発明は糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性を不活性化することを特徴とするペスチウイルスを検出可能に標識する方法を提供する。本発明のペスチウイルスの糖タンパク質 E^{RNS} にあるRNase活性の不在のこの特徴はこれらのペスチウイルスを検出可能に標識することを今可能にする。その結果として、標識ペスチウイルス及び未標識ペスチウイルスが分離及びこのような酵素活性のアッセイ後に糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在又は存在により明らかに区別し得る。関係するペスチウイルス又はその物質を含むサンプルを得た後のこの酵素活性の存在又は不在の測定は、例えば、実施例2又はHulstら(1994)に記載されたような通常の方法に従って行い得る。

それ故、好ましい実施態様において、本発明は

- (1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、
 - (2) 前記サンプル中の糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在又は存在を測定する工程、
 - (3) 糖タンパク質 E^{RNS} のRNase活性の不在をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記活性の存在を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付ける工程
- を含むことを特徴とするペスチウイルス感染動物を本発明に従って特異的に弱毒化されたペスチウイルスでワクチン注射された動物から区別する方法に関する。

【0025】

本発明は欠失及び/又は突然変異により糖タンパク質 E^{RNS} にあるそれらのRNase活性を不活性化されたペスチウイルスを提供する。このようなペスチウイルスはこのような欠失及び/又は突然変異により生じる構造上の結果のために容易に検出される。変化された糖タンパク質 E^{RNS} をコードする E^{RNS} 遺伝子の配列の相違が配列決定技術又はPCR技術により検出できる。その結果として、本発明は好ましい実施態様において

- (1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

(2) 前記サンプル中のペスチウイルスゲノム又はタンパク質のヌクレオチド配列を同定する工程、

(3) ワクチン中に存在する E^{RNS} ヌクレオチド配列の欠失及び/又は突然変異をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記欠失及び/又は突然変異の不在を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付ける工程

を含むことを特徴とする、本発明の特異的に弱毒化されたペスチウイルスでワクチン注射された動物からペスチウイルス感染動物を区別する方法を提供する。

【0026】

更に、本発明のペスチウイルスの糖タンパク質 E^{RNS} の変化されたタンパク質配列から生じる構造変化が未変化タンパク質を認識しない特異性モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体により検出し得る。

10

それ故、更なる実施態様において、本発明は

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

(2) 前記サンプル中に存在する E^{RNS} 糖タンパク質へのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合により弱毒化ペスチウイルスの修飾 E^{RNS} 糖タンパク質を同定する工程（前記糖タンパク質は本発明の方法により修飾され、それにより前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が未修飾 E^{RNS} 糖タンパク質に結合しない）、

(3) 前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合をワクチン注射された動物と相関関係付け、前記動物及び/又は前記サンプル中のペスチウイルス物質の存在がそうしないと証明される条件下で前記動物のペスチウイルス感染への抗体結合の不在を相関関係付ける工程

20

を含むことを特徴とするペスチウイルス感染動物を本発明の弱毒化ペスチウイルスでワクチン注射された動物から区別する方法に関する。

【0027】

逆に、ペスチウイルスの存在がそうしないと証明される場合に未変化糖タンパク質 E^{RNS} のみを認識する特異性モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体への結合の不在により変化され、それにより構造上標識されたタンパク質を検出することがまた可能である。好ましい実施態様において、本発明は

(1) サンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、

30

(2) 前記サンプル中に存在する E^{RNS} 糖タンパク質へのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合によりペスチウイルスの未修飾 E^{RNS} 糖タンパク質を同定する工程（前記糖タンパク質は本発明の方法により修飾されておらず、それにより前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が修飾 E^{RNS} 糖タンパク質に結合しない）、

(3) 前記モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の特異的結合を前記動物のペスチウイルス感染症と相関関係付け、前記動物及び/又は前記サンプル中のペスチウイルス物質の存在がそうしないと証明される条件下でワクチン注射された動物への抗体結合の不在を相関関係付ける工程

を含むことを特徴とするペスチウイルス感染動物を本発明の弱毒化ペスチウイルスでワクチン注射された動物から区別する方法に関する。

40

【0028】

勿論、構造の修飾及び本発明の標識ウイルス中のRNase活性の不在は未標識ペスチウイルス感染症から生じる応答と較べた場合に動物の異なる免疫応答を生じるであろう。本発明のペスチウイルスは細胞だけでなく体液の異なり、かつ特有の免疫応答を誘発し、これは未修飾かつおそらく病的の免疫応答とは異なる。例えば、本発明の糖タンパク質 E^{RNS} は未修飾糖タンパク質から生じるポリクローナル抗体と較べた場合にそれらの結合特異性を異にするポリクローナル抗体を生じるであろう。結合特異性のこの相違はペスチウイルス現場感染動物から本発明からのペスチウイルスでワクチン注射された動物を区別するための標識を与える。感染動物及びワクチン注射された動物を差別する目的のために野生型工

50

ピトープ又はそのエピトープのマーカー欠失突然変異に結合する特異性ポリクローナル抗体について血清をスクリーニングするための試験が、例えば、仮性狂犬病感染ブタ及びワクチン注射されたブタについて記載されていた (Kitら, 1991)。

【0029】

好ましい実施態様において、本発明は

- (1) ポリクローナル抗体のサンプルをペスチウイルス感染症の疑いのある関係する動物又はワクチン注射された動物から得る工程、
- (2) 未修飾糖タンパク質 E^{RNS} 又は本発明に従って修飾された糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の特異的結合を同定する工程、
- (3) 未修飾糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の結合をペスチウイルス感染症と相関関係付け、本発明に従って修飾された糖タンパク質 E^{RNS} への前記ポリクローナル抗体の結合をワクチン注射された動物と相関関係付ける工程を含むことを特徴とするペスチウイルス感染動物を本発明の弱毒化ペスチウイルスでワクチン注射された動物から区別する方法に関する。

10

【0030】

(実施例)

実施例1 RNase陰性ペスチウイルス突然変異体の生成

完全長cDNAクローンpA/CSFV (Meyersら, 1996a)又はpA/BVDV (Meyersら, 1996b) (これらから感染性cRNAが*in vitro*転写により得られる)で開始して、サブクローンを生成した。CSFVについて、pA/CSFVのXhoI/SspI断片をpブラスクリプトSK+にクローン化し、XhoI及びSmaIで切断した。BVDVについて、pA/BVDVからのXhoI/BglII断片をプラスミドpCITE-2Cにクローン化し、同酵素で切断した。E. coli CJ 236細胞 (バイオラド)及びVCMS一本鎖ファージ (ストラタゲン)を使用して、一本鎖プラスミドDNAをKunkel (Kunkelら, 1987)の方法に従ってこれらの構築物から生成した。“ファージミド*in vitro*突然変異誘発キット” (バイオラド)を使用して、一本鎖DNAを二本鎖に変換した。所望のペスチウイルス突然変異体を生成するためのプライマーとして使用された合成オリゴヌクレオチドの幾つかを例示様式で以下にリストする。

20

【0031】

C-297-L: AGGAGCTTACTTGGGATCTG
 C-346-L: GGAACAACTTGGATGGTGT
 C-297-K: ACAGGAGCTTAAAAGGGATCTGGC
 C-346-K: ATGGAACAAAAAGGGATGGTGTA
 C-346-d: GAATGGAACAAAGGATGGTGTAAC
 B-346-d: CATGAATGGAACAAAGGTTGGTGCAACTGG

30

【0032】

二本鎖プラスミドDNAをE. coli XL1-ブルー細胞 (ストラタゲン)の形質転換に使用した。プラスミドを宿している細菌コロニーをアンピシリン選択により分離した。プラスミドDNAを調製し、T7ポリメラーゼ配列決定キット (ファーマシア)を使用してヌクレオチド配列決定により更に分析した。所望の突然変異を含み、第二部位変化を含まないプラスミドを完全長cDNAクローンの構築に使用した。CSFVの場合、突然変異誘発プラスミドからのXhoI/NdeI断片をプラスミド578 (pA/CSFVからのXhoI/BglII断片を含むpCITE 2A)から誘導されたNdeI/BglII断片と一緒にXhoI及びBglIIで切断されたpA/CSFVに挿入した。BVDV CP7突然変異体を得るために、その欠失を含むXhoI/BglII断片をpA/BVDV/Ins-から分離されたBglII/NcoI断片と一緒にXhoI及びNcoIで切断されたpA/BVDVに挿入した。構築物pA/BVDV/Ins-から、cRNAを転写し、これが好適な細胞中でトランスフェクション後に非細胞変性BVDVを生じる (Meyersら, 1996b)。異なる完全長クローンを増幅し、プラスミドを分離した。所望の突然変異の存在がDNA配列決定により判明された。SrfI (CSFV完全長クローン)又はSmaI (BVDV完全長クローン)で線状にした後、cRNAを既に記載されたようにして転写した (Meyersら, 1996ab)。RNAをゲル濾過及びフェノール/クロロホルム抽出により精製し、ブタ腎臓 (PK15)細胞又はウシ腎臓 (MDBKクローンB2)細胞の形質転換に使用した (夫

40

50

々、CSFV構築物又はBVDV構築物)。トランスフェクションをウイルス特異性抗血清による免疫蛍光により分析した。所望の突然変異体が回収できた場合(免疫蛍光陽性)、ウイルスをトランスフェクション実験に使用したのと同じ細胞系による継代により増幅した。CSFV突然変異体の更なる分析は1工程増殖曲線の測定及びウイルス特異性cDNAプローブによるノーザンブロットによるウイルスRNAの特性決定並びに逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)及びウイルスゲノム中の所望の突然変異の存在を確かめるためのPCR断片のその後の配列決定を含んでいた。全ての場合に、所望の突然変異の存在が判明された。回収したウイルスの全てが同等に良く増殖し、野生型配列を示すプラスミドから生じるウイルスと同様の量のRNAを生成した。

【0033】

BVDV突然変異体の生存度を夫々のcRNAのトランスフェクション及びその3日後の細胞のスプリッティングにより示した。細胞の一部を直径3.5cmの皿に接種し、その後その日にアセトン/メタノールで固定し、BVDV特異性モノクローナル抗体(Weilandら, 1989)の混合物による免疫蛍光により分析した。全ての細胞が陽性とわかり、一方、非感染性RNAでトランスフェクトされた細胞の対照はシグナルを示さなかった。夫々のcRNAでトランスフェクトされた細胞の一部から、抽出物を凍結及び解凍の1サイクルにより生成した。新しい細胞をこの細胞抽出物で感染させ、感染3日後にBVDV特異性免疫蛍光によりBVDV陽性であると判明した。

表1は示されたウイルス突然変異体によりコードされるRNaseの推定活性部位に相当するE^{RNS}の保存配列に導入された異なる変化を要約する。

【0034】

10

20

【表 1】

表1

名称	RNase モチーフ中の配列	RNase 活性	突然変異体の生存度
pA/CSFV	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	+	+
C-297-L	...SLLGIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	+
C-346-L	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNKLGWCNW..	-	+
C-297-L/346-L	...SLLGIWPEKIC... ..RHEWNKLGWCNW..	-	+
C-297-K	...SLKGIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	+
C-346-K	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNKKGWCNW..	-	+
C-297-d	...SL_GIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-346-d	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNK_GWCNW..	-	+
C-296/7/8-d	...S ___ IWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-345/6/7-d	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWN ___ WCNW..	-	-
C-345/6-d	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWN __GWCNW..	-	-
C-346/7-d	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNK _ _WCNW..	-	-
C-342-d	...SLHGIWPEKIC... ..RH_WNKHGWCNW..	-	-
C-342/6-d	...SLHGIWPEKIC... ..RH_WNK _GWCNW..	-	-
C-301-d	...SLHGIW_EKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-295-S/G	...GLHGIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	+
C-300-W/G	...SLHGIGPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	+
C-302-E/A	...SLHGIWPAKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-305-C/G	...SLHGIWPEKIG... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-300-W/G-302-E/A	...SLHGIGPAKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	-	-
C-340-R/G	...SLHGIWPEKIC... ..GHEWNKHGWCNW..	-	-
C-343-W/G	...SLHGIWPEKIC... ..RHEGKNKHGWCNW..	-	-
C-345-K/A	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNAHGWCNW..	-	-
C-297-K/346-K	...SLKGIWPEKIC... ..RHEWNKKGWCNW..	-	+
C-297-K/346-L	...SLKGIWPEKIC... ..RHEWNKKGWCNW..	-	+
pABVDV	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNKHGWCNW..	+	+
B-346-d	...SLHGIWPEKIC... ..RHEWNK_GWCNW..	-	+

【0035】

表1の脚注：RNase活性に関する試験を一時的アッセイで行った。BHK21細胞をワクチンウイルスvTF7-3 (Fuerstら, 1986)で感染し、次いで夫々のcDNA構築物(プラスミドDNA 5 µg、供給業者(キアゲン)により推奨されるようにスーパーフェクトを使用するトランスフェクション)でトランスフェクトした。CO₂インキュベーター中の37 °Cで10時間のインキュベーション後に、トランスフェクトされた細胞を溶解し、以下に記載されるようなRNase活性の測定のために処理した。生存度を以下に記載されるようにして測定した。

【0036】

実施例2 E^{RNS}のRNase活性に関する異なる突然変異の効果

E^{RNS}のRNase活性に関する異なる突然変異の効果を試験するために、適当な細胞を突然変異体ウイルスで感染させた。CSFVについて、感染を0.01の感染多重度(m.o.i.)で行った。野生型ウイルスによる感染が陽性対照として利用でき、一方、非感染細胞を陰性対照として使用した。感染48時間後に、細胞を食塩加リン酸緩衝液で2回洗浄し、溶解緩衝液(20 mM トリス/HCl; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2mg/mlのウシ血清アルブミン; 1%トリトンX100; 0.1%デオキシコール酸; 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム)0.4ml中で溶解した。溶解産物を1.5mlの反応管に入れ、音波処理し(プランソンソニファイアーB12、120ワット)

ト、カップホルン水浴中で20秒)、遠心分離(5分間、14,000rpm、エッペンドルフ遠心分離機、4)により透明にし、上澄みを超遠心分離(ベックマン卓上超遠心分離機、TL A45ローター中で4で45,000rpmで60分間)にかけた。RNase活性の測定をRNaseアッセイ緩衝液(40 mM トリス-アセテート(pH 6.5)、0.5 mM EDTA、5 mM ジチオスレイトール(DTT))中に第二遠心分離工程の上澄み5又は50 µl及びポリ(rU)(ファーマシア)80 µgを含む合計200 µlの容積で行った。37で1時間の反応混合物のインキュベーション後に、200 µlの1.2Mの過塩素酸、20 mM LaSO₄を添加した。氷の上の15分のインキュベーション後に、混合物をエッペンドルフ遠心分離機中で4で14,000rpmで15分間遠心分離した。上澄みに、3倍容積の水を添加し、ウルトラスペック3000スペクトロフォトメーター(ファーマシア)を使用して光学密度を260nmで測定することにより混合物のアリコート进行分析した。全ての場合に、突然変異が完全に停止されたRNase活性をE^{ms}遺伝子に導入した(表1)。

10

【0037】

BVDV突然変異体について、回収ウイルスの継代を使用しないRNAトランスフェクション後に得られた物質でRNase活性を試験した。適当なRNAでトランスフェクトされた細胞をトランスフェクション72時間後にスプリットし、二つの皿に接種した。24時間後に、一つの皿から、細胞抽出物を調製し、上記のようにRNase活性について分析した。感染を証明するために、第二の皿の細胞をBVDV特異性モノクローナル抗体(Weilandら, 1989)で免疫蛍光により分析し、100%陽性とわかった。トランスフェクションをpA/BVDV/Ins-またpA/B-346-d、CSFVアルフォートゲノム中のコドン346に均等のコドンの欠失を含む以外はpA/BVDV/Ins-に均等のプラスミドから転写されたRNAを用いて行った。トランスフェクトされなかったMDBK細胞が陰性対照として利用できた。

20

【0038】

【表2】

表2A 異なるウイルスのRNase活性の測定

	アルフォート	C-WT	C-297-L	C-346-L	C-346-d	C-346-d/Rs	対照
OD ₂₆₀	2.4	2.3	1.1	1.1	1.1	2.3	1.1

	アルフォート	C-WT	C-297-L	C-346-L	C-297-K	C-346-K	C-297-L/346-L
OD ₂₆₀	2.09	2.16	0.715	0.77	0.79	0.766	0.77
		C-297-K/346-L		C-297-K/346-K		C-346-d	対照
OD ₂₆₀		0.725		0.835		0.8	0.84

30

【0039】

表2Aの説明:

PK15細胞を0.01のm.o.i.(感染多重度)で示されたウイルスで感染させ、CO₂インキュベーター中で37で48時間インキュベートし、次いで溶解し、RNase試験にかけた。異なる細胞抽出物とのインキュベーションから生じる酸可溶性RNAを260nmで光学密度を測定することにより定量した。RNase活性の観察された相違はサンプル中のE^{RNS}タンパク質の異なる量のためではなかった。何とならば、同様の値が放射性標識、免疫沈澱及びホスホリメジャーによる放射能の分析によるE^{RNS}の定量後に得られたからである。更に、通常の量のわずかに1/10へのアッセイ中のE^{ms}濃度の低下は得られるOD値をかなり変化せず、選ばれた条件ではアッセイがE^{ms}で飽和されることを示した。

40

CSFV株アルフォート;全てのその他のウイルスをプラスミドからinvitro転写されたRNAから回収した:例えば、C-WTをpA/CSFVから;C-297-LをpA/C-297-Lから回収した;以下、同様。C-346-d/RsウイルスをpA/C-346-d/Rs(pA/CSFVから誘導された均等断片に対する夫々のcDNA断片の交換によりpA/C-346-d中の突然変異の反転により生成した)から回収した。対照:感染されなかったPK15細胞の抽出物。

50

【 0 0 4 0 】

【 表 3 】

表 2B

	B-WT	B-346-d	対照
OD ₂₃₀	2.5	1.1	1.1

【 0 0 4 1 】

表 2B の説明

MDBK細胞を *in vitro* 転写RNAで感染させ、トランスフェクション72時間後にスプリットし、24時間後にRNase活性について分析した。細胞の感染が明細書に記載された免疫蛍光分析により判明された。

B-WT : pA/BVDV/Ins- から回収されたウイルス ; B-346-d : pA/B-346-d から回収されたウイルス ; 対照 : 感染されなかったMDBK細胞からの抽出物。

【 0 0 4 2 】

実施例 3 RNase不活性化後のCSFVの細胞変性

RNase活性の分解がそれらの天然宿主中のペスチウイルスの細胞変性に影響するか否かを試験するために、動物実験を突然変異体V(pA/C-346-d) (表中のC346-d)で行った。突然変異を含まないCSFV完全長クローンから回収されたウイルス(V(pA/CSFV))が陽性対照として利用できた(表中のC-WT)。夫々の突然変異体について、3匹の子ブタ(品種:ゲルマン・ランドレース;体重約25kg)を使用した。感染用量は動物当たり 1×10^5 TCID₅₀であった。接種物の2/3を鼻内投与し(1/3を夫々の鼻孔に)、1/3を筋肉内に投与した。二つのグループを別々の分離ユニット中に収容した。血液を感染前及び3日、5日、7日、10日、12日及び14日に動物から2回採取した。加えて、体温を毎日記録した(図2)。野生型ウイルスで感染された動物は発熱、運動失調、拒食症、下痢、中枢神経障害、皮膚中の出血のような古典的なブタ熱病の典型的な症候を示した(表3a)。ウイルスを3日目(動物#68)及び5日目、7日目、10日目、14日目(動物#68、#78、#121)に血液から回収することができた(表3b)。動物を感染後14日目に瀕死段階で殺した。この時点では、ウイルス中和抗体を検出することができなかった。対照的に、突然変異体で感染された動物は臨床症候を発生しなかった(表3a)。体温は全実験期間にわたって正常に留まり(図2)、動物は食事をとることを停止しなかった。いずれの時点でも、ウイルスを血液から回収することができなかった。それにもかかわらず、動物は明らかに感染されており、ウイルスがおそらく複製した。何とならば、全ての動物が中和抗体を発生したからである(表3c)。

【 0 0 4 3 】

【 表 4 】

表 3a : 試験感染後の臨床症候

動物実験 1									
動物 No.:	下記のもので感染した	臨床症候							
		発熱	下痢	CNS 障害	拒食症	皮膚中の出血	アバシー	安楽死の日 に瀕死	検死時に臓器 中に出血
#68	C-WT	+	+	+	+	+	+	+	+
#78	C-WT	+	+	+	+	+	+	+	+
#121	C-WT	+	+	+	+	+	+	+	+
#70	C-346-d	-	-	-	-	-	-	-	n.a.
#72	C-346-d	-	-	-	-	-	-	-	n.a.
#74	C-346-d	-	-	-	-	-	-	-	n.a.

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

表3aの説明

二つのグループ（夫々のグループを別々に収容した）中の6匹の子ブタ（ゲルマン・ランドレース；体重約25kg）をその研究に入れた。3匹の動物をCSFV-WT（ $1 \cdot 10^5$ TCID₅₀）で感染させ、3匹の動物をC-346-d（ $1 \cdot 10^5$ TCID₅₀）で感染させた。直腸温度及び臨床症候を記録し、表に詳しく要約した。n.a.：検死を行わなかった。

【 0 0 4 5 】

【表5】

表3b：試験感染後の血液細胞ウイルス血症

動物実験 1						
動物番号	下記のもので感染した	感染後の下記の日におけるウイルス血症				
		3	5	7	10	14
#68	C-WT	+	+	+	+	+
#78	C-WT	-	+	+	+	+
#121	C-WT	-	+	+	+	+
#70	C-346-d	-	-	-	-	-
#72	C-346-d	-	-	-	-	-
#74	C-346-d	-	-	-	-	-

10

20

【 0 0 4 6 】

表3bの説明

血液細胞ウイルス血症をPK15細胞と一緒に血液の同時培養により検出した。37℃で72時間のインキュベーション後に、細胞をPBSで洗浄し、氷冷アセトン/メタノールで固定し、糖タンパク質E2に特異性のモノクローナル抗体(mAb A18、Weilandら, 1990)による免疫蛍光により感染について分析した。

【 0 0 4 7 】

【表6】

表3c：CSFV 特異性血清中和力価の発生

日数 p.i.	-3	0	17	25	69	76	79	87
ブタ #70	-	-	1:18	1:162	1:162	1:162	1:486	1:1458
ブタ #72	-	-	1:18	1:54	1:486	1:1458	1:1458	1:4374
ブタ #74	-	-	1:6	1:54	1:162	1:162	1:486	1:1458

30

【 0 0 4 8 】

表3cの説明

動物実験中の異なる時点で測定されたウイルス突然変異体C-346-dで感染されたブタの抗体力価：

希釈した血清50 µlを30 TCID₅₀のウイルス（CSFVアルフォート/ツピンゲン）を含む培地50 µlと混合した。37℃で90分間のインキュベーション後に、細胞100 µl（ $1.5 \cdot 10^4$ 細胞）を添加し、混合物を96ウェルプレートに接種した。72時間後に、細胞を氷冷アセトン/メタノールで固定し、糖タンパク質E2に特異性のモノクローナル抗体(mAb A18、Weilandら, 1990)による免疫蛍光により感染について分析した。感染後の69日目に、動物に $2 \cdot 10^5$ TCID₅₀のCSFV株エイストラップを抗原投与した。表は投入ウイルスの完全中和をもたらす最高血清希釈を示す。

40

【 0 0 4 9 】

50

実施例4 RNase陰性ウイルスによる感染による保護免疫の誘導

突然変異体ウイルスによる感染が保護免疫をもたらしたか否かを分析するために、抗原投与実験をCSFV突然変異体による感染の約9週後に高度に細胞変性の異種CSFV株(株Eイストラップ、ベリングから得られた)を使用して行った。2x10⁵ TCID₅₀のウイルスを感染に使用した。この量のウイルスは幾つかの先行実験(Konig, 1994)で致死性疾患を誘導するのに十分であることがわかった。しかしながら、CSFV RNase突然変異体で既に感染された動物は抗原投与感染後に症候を示さなかった。発熱(図3)又はウイルス血症のいずれもが検出できなかったが、中和抗体の増加が増殖性感染及び抗原投与ウイルスの複製を示した。

【0050】

10

実施例5 弱毒化原理の確認

突然変異体ウイルスの観察された弱毒化が実際にポリタンパク質の位置346のヒスチジンの欠失のためであり、同定されなかった第二部位突然変異の結果ではないことを示すために、野生型配列を野生型配列を示すpA/CSFVの相当する断片に対する完全長クローンpA/C-346-dの1.6kb XhoI/NdeI断片の交換により回復した。pA/C-346-dから切除された断片を突然変異についてヌクレオチド配列決定により分析した。ポリタンパク質のヒスチジン346をコードするトリプレットの欠失を除いて、野生型配列に対する相違が見られなかった。救済された突然変異体を含むcDNA構築物から、野生型ウイルスと同等に良く増殖し、均等のRNase活性を示すウイルスV(pA/C-346-d/Rs)を回収することができた(表2A)。

【0051】

20

第二動物実験では、救済されたウイルスをブタの感染に使用した。対照として、欠失突然変異体を使用した。再度、3匹の動物からなる二つのグループを使用した。動物が第一実験の動物よりも若かったので(ゲルマン・ランドレース、約20kg)、5x10⁴ TCID₅₀のウイルスを今回感染に使用した。再度、突然変異体で感染された動物は臨床症候を示さなかった(表5、図4)。1匹の動物のみが1日目に発熱した。それにもかかわらず、これらの動物は中和抗体を発生し、致死性CSFV抗原投与に対し保護された。再度、抗原投与を2x10⁵ TCID₅₀の抗原投与株Eイストラップによる感染により行った。動物は抗原投与後に臨床症候を示さず、体温が正常に留まった(図5)。欠失突然変異体で感染されたブタとは対照的に、救済された野生型ウイルスで接種された動物は致死性の古典的なブタ熱病を発生した。1匹の動物が感染の11日後に殺され、別の2匹がその3日後に殺された。全ての動物が古典的なブタ熱病の典型的な症候、即ち、発熱、下痢、拒食症、及び腎臓を含む異なる臓器中の出血のような病的兆候を示した。

30

【0052】

【表7】

表5a: 試験感染後の臨床症候

動物実験2										
動物番号	下記のもので感染した	臨床症候								
		発熱	下痢	CNS 障害	拒食症	皮膚中に出血	アパーチア	安楽死の日に瀕死	検死時の臓器中に出血	
#43	C-346-d	+	*	-	-	-	-	-	-	n.a.
#47	C-346-d	-	-	-	-	-	-	-	-	n.a.
#87	C-346-d	-	-	-	-	-	-	-	-	n.a.
#27	C-346-d/RS	+	+	+	+	-	+	+	+	+
#28	C-346-d/RS	+	+	+	+	-	+	+	+	+
#30	C-346-d/RS	+	+	+	+	-	+	+	+	+

* 1日目のみに発熱

40

【0053】

表5aの説明

二つのグループ(夫々のグループが分離条件下で別々に収容された)中の6匹の子ブタ

50

(ゲルマン・ランドレース；体重約20kg)をその研究に入れた。3匹の動物を突然変異体C-346-d ($5 \cdot 10^4$ TCID₅₀)で感染させ、3匹の動物をC-346-d/Rs ($5 \cdot 10^4$ TCID₅₀)で感染させた。C-346-d/RsはE^{RNS}遺伝子の野生型配列を回復することにより突然変異体C-346-dから誘導された。直腸温度及び症候を記録し、要約した。n.a.：検死を行わなかった。

【0054】

【表8】

表5b ウイルス血症中に感染動物から回収したウイルスによる診断RNase試験

	アル フォ ート	動物#3 C-297-K	動物 #5 C-297-K	動物#27 C-346-d/Rs	動物#28 C-346-d/Rs	動物#30 C-346-d/Rs	対照
OD ₂₆₀	1.84	0.60	0.56	1.84	1.93	1.94	0.49

10

【0055】

感染の5日後の動物3及び5並びに感染の7日後の動物実験#2(実施例5に記載された)の動物27、28及び30の血液から回収したウイルスを組織培養で増殖させ、滴定し、上記のようにRNase活性について試験した。感染されなかったPK15細胞及び野生型CSFV(アルフォート)で感染された細胞(対照)が対照として利用できた。動物3及び5は突然変異体C-297-Kで感染され、一方、動物27、28及び30は表に示されたように突然変異体C-346-d/Rsで感染された。

20

【0056】

実施例6 E^{RNS}内の二重突然変異の効果

夫々のウイルスがその天然宿主中で複製する能力及び細胞変性に関するE^{RNS}内の二重突然変異の効果を試験するために、動物実験を突然変異体V(pA/C-297-L/346-L)で行った。突然変異を含まないCSFV完全長クローンから回収されたウイルス(V(pA/CSFV)が陽性対照として利用できた。夫々の突然変異体について、3匹の子ブタ(品種：ゲルマン・ランドレース；体重約25kg)を使用した。感染用量は動物当たり 1×10^5 TCID₅₀であった。接種物の2/3を鼻内に投与し(1/3を夫々の鼻孔に)、1/3を筋肉内に投与した。血液を感染前(0日目)及び5日目、8日目、12日目及び20日目に動物から採取した。加えて、体温を毎日記録した(図6)。二重突然変異体で感染された動物は臨床症候を発生せず、動物は食事をとることを停止しなかった。動物はおそらく右後脚の外傷により生じた細菌感染症のために8日目の動物45/1を除いて全実験期間にわたって発熱を示さなかった(動物45/2及び45/3)。10日目の抗生物質によるこの動物の治療後に、体温が1日以内に正常値に戻った(図6)。全ての動物について、ウイルスを5日目に血液から回収し、ウイルス血症がその後の時点で検出されなかった(表6a)。全ての動物が中和抗体を発生した(表6a)。動物45/1について、中和力価を約4.5ヶ月p.i.で再度測定し、1:4374であることがわかった。こうして、二重突然変異体による感染は長く持続している免疫記憶をもたらした。

30

【0057】

【表9】

40

表6a ウイルス血症に関する試験

日数 p.i.	5	8	12
ブタ 45/I	+	-	-
ブタ 45/II	+	-	-
ブタ 45/III	+	-	-

【0058】

50

【表 1 0】

表 6b 中和力価

動物	0日目	20日目 p.i.
45/1	-	1:128
45/2	-	1:256
45/3	-	1:256

【 0 0 5 9】

10

実施例 7 BVDVウイルス“B-346-d”の免疫原性及び弱毒化原理

pA/B-346-dから回収されたBVDVウイルス、“B-346-d”の弱毒化原理並びに免疫原性を調べるためにそれをpA/BVDV/Ins-から回収された“B-WT”ウイルスと比較することにより調べるようにこの実験を設計した。ウイルス“B-346-d”は勿論初期のBVDV位置349で突然変異されるが、図1のCSFVアルフォート位置346に対する位置を示すために“B-346”と称される。

生後3-6ヶ月のBVDV血清反応陰性動物の三つのグループを選んだ。グループ1及び2は夫々5匹の動物を含み、一方、グループ3は3匹の動物を含んだ。グループ1及び2の動物を経路当り5mlの容積の 2×10^6 TCID₅₀のB-346-d(グループ1)又はB-WT(グループ2)の投与により感染させた。動物を筋肉内(殿筋)、鼻内そして皮下(肩甲骨の上)で感染させた。感染後の14日の期間にわたって、両方のグループのウイルス血症を血液細胞ウイルス血症及び鼻スワブ中のウイルス放出のようなパラメーターにより監視した。加えて、直腸温度、白血球カウント及び全般の健康パラメーターのような臨床パラメーターを監視した。

20

【 0 0 6 0】

抗原異種かつ毒性のBVDV分離物(#13)による感染に対する保護免疫をB-346-dによるグループ1の動物の感染77日後の抗原投与感染により調べた。グループ3の動物は抗原投与対照として利用でき、毒性BVDV分離物によるグループ1の動物についての操作に従って感染された。BVDVウイルス(#13)は異なる抗原性グループ(型II)に属し、一方、B-346-dウイルスはPellerin, C.ら, 1994により記載された分類に従って抗原性グループ(型I)に属する。グループ1及び3の動物は経路当り5mlの容積で 2×10^6 TCID₅₀のBVDV分離物(#13)の投与により感染された。動物を筋肉内(殿筋)、鼻内そして皮下(肩甲骨の上)で感染させた。感染後の14日の期間にわたって、両方のグループのウイルス血症を血液細胞ウイルス血症及び鼻スワブ中のウイルス放出のようなパラメーターにより監視した。加えて、直腸温度、白血球カウント及び全般の健康パラメーターのような臨床パラメーターを監視した。

30

B-346-dによる感染後に、動物はBVDV感染症の典型的な臨床症候、例えば、直腸温度上昇(表7a)、又は呼吸器の臨床症候(示されていない)を示さなかった。

【 0 0 6 1】

減少した血液細胞ウイルス血症(表7b)及び鼻スワブ中のウイルス放出(表7c)はB-WTと較べてB-346-dの弱毒化を明らかに示した。

40

毒性BVDV分離物#13はグループ3の動物で数日の期間にわたる直腸温度上昇(表7d)、強い白血球減少(表7e)、延長された血液細胞ウイルス血症(表7f)及び鼻スワブ液中のウイルス放出(表7g)のようなBVDV感染症の典型的な症候で強いウイルス血症を誘発した。対照的に、B-346-dによる感染によりワクチン注射されたグループ1の動物は毒性BVDV分離物#13による抗原投与感染後にBVDV感染症に典型的な臨床症候を殆ど示さなかった。感染後に直腸温度の有意な上昇がなかった(表7d)。観察された白血球減少は大きさ及び期間に関して非常に限界に近かった(表7e)。BVDVが血液から分離できず(表7f)、唯一の動物について鼻スワブ滲出液中のウイルス放出が検出できた(表7g)。

それ故、B-346-dによる感染は異種BVDV分離物による抗原投与感染後に臨床症候、ウイ

50

ルス放出及び血液細胞ウイルス血症を明らかに減少する強い免疫を誘発する。

【 0 0 6 2 】

【表 1 1】

表 7a : グループ 1 (B-346-d) 及び 2 (B-WT) の平均直腸温度

研究の日:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
グループ 1	38,8	39,1	39,0	38,7	38,8	38,7	38,7	38,5	38,7	38,5	38,5	38,5	38,4	38,9	38,7
グループ 2	38,8	39,0	38,9	38,6	38,6	38,7	38,6	38,4	39,1	38,4	38,7	38,6	38,7	38,6	38,6

10

【 0 0 6 3 】

グループ 1 の動物を 0 日目に 6×10^6 TCID₅₀ の B-346-d で感染させ、一方、グループ 2 の動物を 6×10^6 TCID₅₀ の B-WT で感染させた。

【 0 0 6 4 】

【表 1 2】

表 7b : グループ 1 及び 2 の血液細胞ウイルス血症

グループ	動物	鼻放出を記録した最初の日	鼻放出を記録した最後の日	鼻放出の記録した期間 (日数)	グループの平均期間 (日数)
1	1	6	6	1	1,4
	2	4	6	2	
	3	5	5	1	
	4	-	-	0	
	5	6	9	3	
2	6	4	8	5	4,4
	7	4	7	4	
	8	4	7	4	
	9	4	7	4	
	10	4	8	5	

20

30

【 0 0 6 5 】

EDTA 血液を B-346-d 及び B-WT による夫々の感染 10 日後まで毎日サンプリングした。血液 0.2ml をヘパリン (凝固を防止するために 1 単位/ml) を含む培地とともにウシ睾丸 (Cte) 細胞の 3 種の培養液の夫々に添加した。一夜のインキュベーション後に、接種物 / 培地をヘパリンを含まない新しい培地と交換した。4-6 日のインキュベーション後に、BVDV 細胞を BVDV に特異性のポリクローナル血清による免疫蛍光により検出した。

40

陰性培養物を凍結し、続いて解凍した。その 0.2ml を Cte 細胞で第二継代で継代して BVDV の不在を確かめた。

【 0 0 6 6 】

【表 1 3】

表 7c: 鼻液中のウイルス放出

グループ	動物	鼻放出を記録した最初の日	鼻放出を記録した最後の日	滲出物中にウイルスを検出した日数	グループ当りにウイルスを検出した平均日数
1	1	4	8	4	2,6
	2	6	6	1	
	3	4	4	1	
	4	5	7	3	
	5	3	6	4	
2	6	6	8	3	3,6
	7	5	7	3	
	8	5	8	4	
	9	5	6	2	
	10	3	9	6	

10

20

【0067】

鼻滲出液を遠心分離(1000g)してグロステプリ及び汚染物を除去した。上澄み液を除去し、0.2mlを3種の細胞培養物の夫々に接種した。一夜のインキュベーション後に、接種物/培地を新しい培地2mlと交換した。4-6日のインキュベーション後に、BVDV感染細胞をBVDVに特異性のポリクローナル血清による免疫蛍光により検出した。

【0068】

【表 1 4】

表 7d: グループ1及び3の平均直腸温度

研究の日:	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14
グループ 1	38,4	38,6	38,5	38,5	38,6	38,4	38,4	38,4	38,3	38,4	38,4	38,4	38,4	38,4	38,5
グループ 3	38,8	39,1	38,8	39,1	39,4	39,7	40,2	40,2	40,4	41,3	40,2	40,1	40,2	40,8	40,4

30

【0069】

直腸温度を抗原投与感染の16日後まで記録した。グループ1及び3の動物を 6×10^6 TCID₅₀の毒性BVDV分離物#13により感染させた。

【0070】

【表 1 5】

表 7e: 平均白血球カウント

研究の日:	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14
グループ 1	11,9	11,9	11,3	10,8	9,2	8,2	8,9	9,9	11,2	11,6	11,6	10,6	10,8	10,8	9,4
グループ 3	11,7	15,8	13,8	11,1	7,7	9,8	7,4	6,8	7,5	8,7	7,0	8,1	6,2	6,4	6,2

40

【0071】

50

EDTA血液細胞サンプルを両方のグループの夫々の動物から抗原投与後の2日目から14日目まで毎日採取した。シスメックス・ミクロ・セル・カウンターF800を使用して、EDTA血液サンプル中の白血球のカウントを測定した。

【0072】

【表16】

表7f: 血液サンプルから分離したBVDV

グループ	動物	血液中にウイルスを検出した最初の日	血液中にウイルスを検出した最後の日	血液中のウイルスの記録した期間(日数)	平均期間(日数)
1	1	-	-	0	0
	2	-	-	0	
	3	-	-	0	
	4	-	-	0	
	5	-	-	0	
3	11	3	10	8	9,7
	12	3	14	12	
	13	3	9	9	

10

20

【0073】

EDTA血液を抗原投与後の10日目まで毎日サンプリングした。血液0.2mlをヘパリン(凝固を防止するために1単位/ml)を含む培地とともにウシ鞏丸(Cte)細胞の3種の培養液の夫々に添加した。一夜のインキュベーション後に、接種物/培地をヘパリンを含まない新しい培地と交換した。4-6日のインキュベーション後に、BVDV感染細胞をBVDVに特異性のポリクローナル血清による免疫蛍光により検出した。

陰性培養物を凍結し、続いて解凍した。その0.2mlをCte細胞で第二継代で継代してBVDVの不在を確かめた。

【0074】

【表17】

表7g: 鼻液中のウイルス放出

グループ	動物	鼻放出を記録した最初の日	鼻放出を記録した最後の日	鼻放出の記録した期間(日数)	平均期間(グループ当りの日数)
1	1	3	4	2	0,8
	2	-	-	0	
	3	-	-	0	
	4	-	-	0	
	5	4	5	2	
3	11	3	14	12	10
	12	3	14	12	
	13	3	8	6	

40

【0075】

鼻滲出液を遠心分離(1000g)してグロステブリ及び汚染物を除去した。上澄み液を除去し、その0.2mlを3種の細胞培養物の夫々に接種した。一夜のインキュベーション後に、接種物/培地を新しい培地2mlと交換した。4-6日のインキュベーション後に、BVDV感染細

50

胞をBVDVに特異性のポリクローナル血清による免疫蛍光により検出した。

【 0 0 7 6 】

実施例 8 RT-PCRによるC-346-dとヒスチジンコドン346の欠失を含まないCSFVの識別

CSFV糖タンパク質E^{NS}中の保存RNaseモチーフをコードするRNA配列が高度に保存される。全ての既知のCSFV配列の中で、ヌクレオチド交換がCSFVアルフォート株の公表された配列 (Meyersら, 1987) の残基1387-1416に相当する領域で見られなかった。こうして、ゲノムのこの保存領域から誘導されたオリゴヌクレオチドプライマーを全てのCSFV分離物の検出のためにRT-PCRアッセイに使用することができる (図7を参照のこと)。従って、ヒスチジン346をコードするトリプレット (ヌクレオチド1399-1401) の不在を適当に設計したプライマーによるRT-PCRアッセイにより検出することができた。保存領域をカバーする異なるオリゴヌクレオチド (ヒスチジンコドンを含み、又は含まない) を合成した。これらのオリゴヌクレオチドを下流プライマーとしてのオリゴヌクレオチドE^{NS}-StopとともにRT-PCR反応に上流プライマーとして利用できた。夫々C-346-d、C-WT、C-346-L又はC-346-Kで感染された組織培養細胞から精製されたRNAを鋳型として使用した。熱変性RNA (30pモルの逆プライマーの存在下で水1.5 µl中で92 で2分間、氷の上で5分間) 2 µgの逆転写を8 µlのRTミックス (125 mM トリス/HCl pH8.3、182.5 mM KCl、7.5 mM MgCl₂、25 mM ジスレイトール、1.25 mMの夫々のdATP、dTTP、dCTP、dGTP)、15UのRNAガード (ファーマシア、フライブルグ、ドイツ) 及び50Uのスーパースク립ト (ライフ・テクノロジー/BRL、エッゲンシュタイン、ドイツ) の添加後に45分間にわたって37 で行った。逆転写を終了した後、管を氷の上に置き、30 µlのPCRミックス (8.3 mM トリス/HCl、pH8.3; 33.3 mM KCl; 2.2 mM MgCl₂; 0.42 mMの夫々のdATP、dTTP、dCTP、dGTP; 0.17% トリトンX100; 0.03% ウシ血清アルブミン; 5UのTaqポリメラーゼ (アプリゲン、ハイデルブルグ、ドイツ) 及び16.7% DMSO) を添加した。プライマーOI H+3を使用した場合、増幅のための反応ミックスはDMSOを含まなかった。増幅を36サイクル (30秒94 ; 30秒57 ; 45秒74) で行った。増幅反応液1 µlを1% アガロースゲルに装填し、増幅産物を電気泳動により分離し、臭化エチジウムで染色した。図7に示されるように、プライマー対OI H-3/OI E^{NS}Stopはコドン346の欠失を含むRNAから誘導されたバンドを特異的に増幅することを可能にし、一方、その他の二つのプライマー組み合わせでは、コドン346を含む産物が増幅され、このコドンの欠失を含むRNAが鋳型として使用された場合、バンドが観察されなかった。

10

20

30

【 0 0 7 7 】

RT-PCR用のプライマー

上流:

OI H-3: TGGAACAAAGGATGGTGT

OI H+2: TGGAACAAACATGGATGG

OI H+3: GAATGGAACAAACATGGA

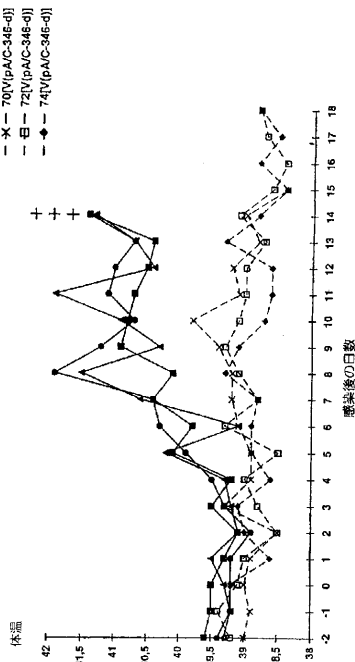
下流:

OI E^{NS}Stop: GGAATTCTCAGGCATAGGCACCAAACCAGG

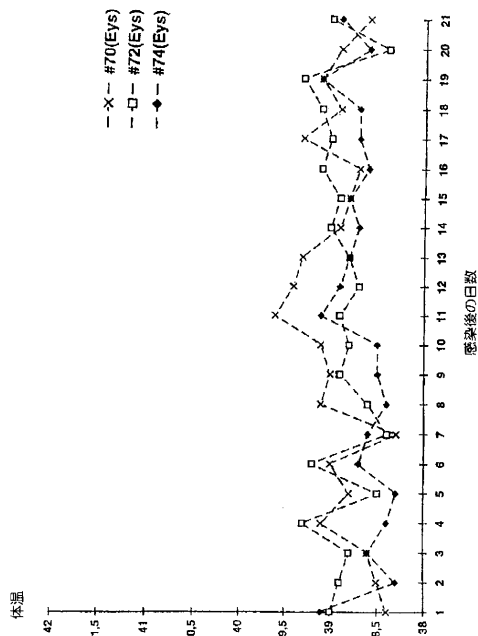
【 図 1 】

1 Met Glu Leu Asn His Phe Glu Leu Leu Tyr Lys Thr Ser Lys Gln Lys Pro Val Gly 19
 20 Val Glu Glu Pro Val Tyr Asp Thr Ala Gly Arg Pro Leu Phe Gly Asn Pro Ser Glu Val
 40 His Pro Gln Ser Thr Leu Lys Leu Pro His Asp Arg Gly Arg Gly Asp Ile Arg Thr Thr
 60 Leu Arg Asp Leu Pro Arg Lys Gly Asp Cys Arg Ser Gly Asn His Leu Gly Pro Val Ser
 80 Gly Ile Tyr Ile Lys Pro Gly Pro Val Tyr Tyr Gln Asp Tyr Thr Gly Pro Val Tyr His
 100 Arg Ala Pro Leu Glu Phe Phe Asp Glu Ala Gln Phe Cys Glu Val Thr Lys Arg Ile Gly
 120 Arg Val Thr Gly Ser Asp Gly Lys Leu Tyr His Ile Tyr Val Cys Val Asp Gly Cys Ile
 140 Leu Leu Lys Leu Ala Lys Arg Gly Thr Pro Arg Thr Leu Lys Trp Ile Arg Asn Phe Thr
 160 Asn Cys Pro Leu Trp Val Thr Ser Cys Ser Asp Asp Gly Ala Ser Gly Ser Lys Asp Lys
 180 Lys Pro Asp Arg Met Asn Lys Gly Lys Leu Lys Ile Ala Pro Arg Glu His Glu Lys Asp
 200 Ser Lys Thr Lys Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Glu Gly Val Lys Tyr Gln Ile Lys
 220 Lys Lys Gly Lys Val Lys Gly Lys Asn Thr Gln Asp Gly Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys
 240 Pro Pro Glu Ser Arg Lys Lys Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Val Ile Thr Ile
 260 Leu Leu Tyr Gln Pro Val Ala Ala Glu Asn Ile Thr Gln Trp Asn Leu Ser Asp Asn Gly
 280 Thr Asn Gly Ile Gln Arg Ala Met Tyr Leu Arg Gly Val Asn Arg Ser Leu His Gly Ile
 300 Trp Pro Glu Lys Ile Cys Lys Gly Val Pro Thr His Leu Ala Thr Asp Thr Glu Leu Lys
 320 Glu Ile Arg Gly Met Met Asp Ala Ser Glu Arg Thr Asn Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln
 340 Arg His Glu Trp Asn Lys His Gly Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Asp Pro Trp Ile Gln
 360 Leu Met Asn Arg Thr Gln Thr Asn Leu Thr Glu Gly Pro Pro Asp Lys Glu Cys Ala Val
 380 Thr Cys Arg Tyr Asp Lys Asn Thr Asp Val Asn Val Val Thr Gln Ala Arg Asn Arg Pro
 400 Thr Thr Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly Lys Asn Phe Ser Phe Ala Gly Thr Val Ile Glu
 420 Gly Pro Cys Asn Phe Asn Val Ser Val Glu Asp Ile Leu Tyr Gly Asp His Glu Cys Gly
 440 Ser Leu Leu Gln Asp Thr Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Met Thr Asn Thr Ile Glu Asn
 460 Ala Arg Gln Gly Ala Ala Arg Val Thr Ser Trp Leu Gly Arg Gln Leu Ser Thr Ala Gly
 480 Lys Lys Leu Glu Arg Arg Ser Lys Thr Trp Phe Gly Ala Tyr Ala Leu 495

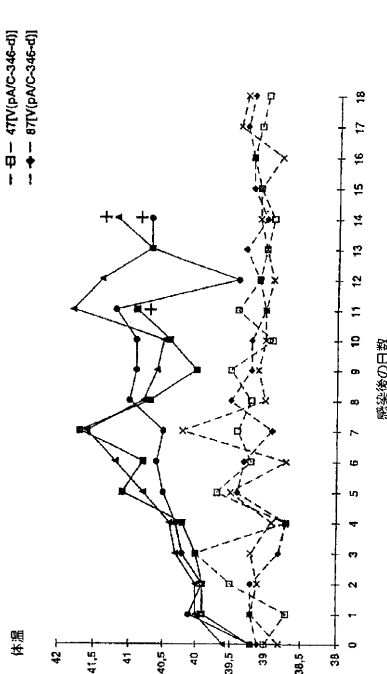
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2010259445000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月24日(2010.8.24)

【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】

糖タンパク質^{ERNS}にあるRNase活性が不活性化されているペスチウイルスを含むことを特徴とする生ワクチン。

【請求項2】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の少なくとも一つのアミノ酸の欠失及び/又は突然変異により不活性化されている請求項1記載のワクチン。

【請求項3】

前記欠失及び/又は突然変異が前記糖タンパク質の位置295-307及び/又は位置338-357(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸に位置される請求項2記載のワクチン。

【請求項4】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のアミノ酸の欠失又は突然変異により不活性化されている請求項1~3のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項5】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他の株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている請求項1~4のいずれか一項記載のワクチン。

【請求項6】

前記RNase活性が前記糖タンパク質の位置346(例示様式でCSFVアルフォート株について図1に記載された位置又はその他のBVDV株中のそれに相当する位置)のヒスチジン残基の欠失により不活性化されている、BVDVペスチウイルスを含む請求項1~5のいずれか一項記載のワクチン。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/44	(2006.01)	C 1 2 Q	1/44
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/12
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
				V

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 マイヤーズ グレゴール

ドイツ連邦共和国 デー 7 2 1 4 1 ウォルドルフヘルスラッハ アルプストラーセ 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 DA02
 DA06 EA02 EA03 EA04 FA02 FA07 GA11 GA18 GA19 GA25
 HA08 HA09 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ10 QQ32 QQ52 QR08 QR35 QR42
 QR56 QR57 QR62 QR63 QR66 QR77 QR79 QR82 QS03 QS12
 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02 QX07
 4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 BA01 BA14 BA24 CA45
 4C085 AA03 BA51 DD01 EE01

专利名称(译)	衰弱的瘟病毒		
公开(公告)号	JP2010259445A	公开(公告)日	2010-11-18
申请号	JP2010167518	申请日	2010-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	マイヤーズグレゴール		
发明人	マイヤーズ グレゴール		
IPC分类号	C12N15/09 C12N7/04 C12Q1/68 C12Q1/70 C12Q1/04 C12Q1/44 A61K39/12 G01N33/53 A61K35/13 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/12 C07K14/18 C12N7/00 C12N9/10 C12N9/22 C12N15/40 C12N15/55 C12Q1/00		
CPC分类号	A61K35/13 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 A61K2039/51 A61K2039/5254 A61K2039/53 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/20 A61P37/04 C07K14/005 C12N7/00 C12N9/22 C12N2770/24322 C12N2770/24361		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N7/04 C12Q1/68.A C12Q1/70 C12Q1/04 C12Q1/44 A61K39/12 G01N33/53.V C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/40 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/GA25 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ32 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA14 4B065/BA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/DD01 4C085/EE01		
代理人(译)	中村稔 小川伸男 西岛隆义		
优先权	1998110356 1998-06-05 EP		
其他公开文献	JP5247770B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性减毒和可检测标记的瘟病毒，用作减毒活疫苗，具有高效诱导免疫力，可与现场病原瘟病毒区分开来。包含瘟病毒的活疫苗，其中糖蛋白E RNS 中的RNase活性被灭活。点域1

