

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-527799

(P2014-527799A)

(43) 公表日 平成26年10月23日(2014.10.23)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|----------------------|----------------|------------|
| C12N 7/04 (2006.01) | C12N 7/04 | 4B024 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 A | 4B065 |
| C12N 15/00 (2006.01) | C12N 15/00 ZNA | 4C085 |
| C12N 5/10 (2006.01) | C12N 5/00 1O2 | |
| C12N 7/00 (2006.01) | C12N 7/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-527339 (P2014-527339)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月24日 (2012. 8. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月16日 (2014. 4. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/052368
 (87) 国際公開番号 W02013/032942
 (87) 国際公開日 平成25年3月7日 (2013. 3. 7)
 (31) 優先権主張番号 61/527, 935
 (32) 優先日 平成23年8月26日 (2011. 8. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508293944
 ダブリュエーアルエフーウィスコンシン
 アラムナイ リサーチ ファウンデーション
 アメリカ合衆国, ウィスコンシン 537
 07-7365, マディソン, ポスト オ
 フィス ボックス 7365
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型PB2遺伝子セグメントを有する弱毒化生ワクチンとしてのインフルエンザウイルス

(57) 【要約】

本発明は、例えば多価ワクチンを生成するのに有用な、PB2ノックアウトウイルスである生体含有可能な組換えインフルエンザウイルス、該ウイルスの作製方法、および使用方法を提供する。

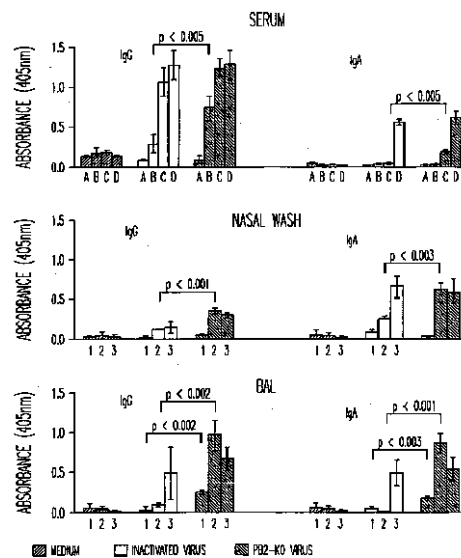


FIGURE 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) P A ウイルス遺伝子セグメント、P B 1 ウイルス遺伝子セグメント、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント、H A ウイルス遺伝子セグメント、N A ウイルス遺伝子セグメント、N P ウイルス遺伝子セグメント、M (M 1 および M 2) ウイルス遺伝子セグメント、ならびに N S (N S 1 および N S 2) ウイルス遺伝子セグメント、を含む 8 の異なる遺伝子セグメント、
 i i) P A ウイルス遺伝子セグメント、P B 1 ウイルス遺伝子セグメント、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント、H A ウイルス遺伝子セグメント、N A (N A および N B) ウイルス遺伝子セグメント、N P ウイルス遺伝子セグメント、M (M 1 および B M 2) ウイルス遺伝子セグメント、ならびに N S (N S 1 および N S 2) ウイルス遺伝子セグメント、を含む 8 の異なる遺伝子セグメント、または
 i i i) P A ウイルス遺伝子セグメント、P B 1 ウイルス遺伝子セグメント、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント、H E F ウイルス遺伝子セグメント、N P ウイルス遺伝子セグメント、M (M 1 および C M 2) ウイルス遺伝子セグメント、ならびに N S (N S 1 および N S 2) ウイルス遺伝子セグメント、を含む 7 の異なる遺伝子セグメント、を含む単離された弱毒化インフルエンザウイルスであって；

該変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメントは、異種ヌクレオチド配列にフランキングする 3 ' または 5 ' コードおよび非コード組み込み配列を含む 5 ' および 3 ' 組み込み配列を含み、機能的 P B 2 をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まない、単離された弱毒化インフルエンザウイルス。

【請求項 2】

前記異種ヌクレオチド配列はレポーター遺伝子配列を含む、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 3】

前記異種ヌクレオチド配列は抗原の配列を含む、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 4】

前記抗原が糖タンパク質である、請求項 3 に記載のウイルス。

【請求項 5】

M 1 および M 2 の M ウイルス遺伝子セグメントを有する、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 6】

N B および N A の N A ウイルス遺伝子セグメントを有する、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 7】

H E F 遺伝子セグメントを有する、請求項 1 に記載のウイルス。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のウイルスを有効量含むワクチン。

【請求項 9】

前記組換えウイルスは、A 型インフルエンザウイルス H A の H A 遺伝子セグメントを含む、請求項 8 に記載のワクチン。

【請求項 10】

H 1、H 2、H 3、H 5、H 7 または H 9 H A を含む、請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 11】

前記組換えウイルスにおける H A は H A 開裂部位で修飾される、請求項 10 に記載のワクチン。

【請求項 12】

異なるインフルエンザウイルスを更に含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 13】

2 の異なるインフルエンザウイルスを更に含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

脊椎動物を請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のワクチンに接触させることを含む脊椎動物を免疫する方法。

【請求項 15】

前記脊椎動物は鳥類である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記脊椎動物は哺乳類である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記脊椎動物はヒトである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

ベクターを安定して宿主細胞ゲノムに取り込むインフルエンザウイルス PB2 を発現するベクターを含む宿主細胞。

【請求項 19】

vRNA 生産用の転写カセット及び mRNA 生産用の転写カセットを含む 1 以上のベクターを更に含む、請求項 18 に記載の宿主細胞であって、

該 vRNA 生産用の転写カセットは、PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PB1 DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、PolI 転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルス PB2 DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス HA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NP DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、および PolI 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス M DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された PolI プロモーターを含む転写カセット、であり、

変異型 PB2 DNA は、異種ヌクレオチド配列にフランキングしている 3' または 5' コードおよび非コード組み込み配列を含む 5' および 3' 組み込み配列を含み、機能的 PB2 をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まず；並びに

該 mRNA 生産用の転写カセットは、PolII 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PA の DNA コード領域に対し作用可能に連結された PolII プロモーターを含む転写カセット、PolII 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PB1 の DNA コード領域に対し作用可能に連結された PolII プロモーターを含む転写カセット、および PolII 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NP の DNA コード領域に対し作用可能に連結された PolII プロモーターを含む転写カセット、であり、

該宿主細胞は、野生型 PB2 遺伝子セグメントの vRNA を生産する PB2 コード配列に対応する配列を含まない、請求項 18 に記載の宿主細胞。

【請求項 20】

293 細胞、293 T 細胞、DF-1 細胞、A549 細胞、ベロ細胞、または MDCK 細胞である、請求項 18 又は 19 に記載の宿主細胞。

【請求項 21】

宿主細胞を、vRNA 生産用の転写カセット及び mRNA 生産用の転写カセットを含む 1 以上のベクターに接触させること、並びに

10

20

30

40

50

該宿主細胞から生体含有可能な (biologically contained) ウイルスを単離することを含む、

生体含有可能な 8 セグメントの A または B 型インフルエンザウイルスを調製する方法であって、

該 vRNA 生産用の転写カセットは、Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PB1 DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、Pol I 転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルス PB2 DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス HA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NA DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NP DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、および Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス M DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、および Pol I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NS (NS1 および NS2) DNA に対し、vRNA を生産する方向で作用可能に連結された Pol I プロモーターを含む転写カセット、であり、

該変異型 PB2 DNA は、異種ヌクレオチド配列にフランキングしている 3' または 5' コードおよび非コード組み込み配列を含む 5' および 3' 組み込み配列を含み、機能的 PB2 をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まず；並びに

該 mRNA 生産用の転写カセットは、Pol II 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PA の DNA コード領域に対し作用可能に連結された Pol II プロモーターを含む転写カセット、Pol II 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PB1 の DNA コード領域に対し作用可能に連結された Pol II プロモーターを含む転写カセット、および Pol II 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス NP の DNA コード領域に対し作用可能に連結された Pol II プロモーターを含む転写カセット、であり、

該宿主細胞のゲノムは、Pol II 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス PB2 の DNA コード領域に対し作用可能に連結された Pol II プロモーターを含む転写カセット、と共に安定して増幅し、そして、

該宿主細胞は、野生型 PB2 遺伝子セグメントの vRNA を生産する PB2 コード配列に対応する配列を含まない、

生体含有可能な 8 セグメントの A または B 型インフルエンザウイルスを調製する方法。

【請求項 22】

前記細胞を、その他のベクターより先に PB2 の mRNA 生産用のベクターに接触させる、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

各転写カセットがプラスミドベクター上にある、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

1 以上の転写カセットが 1 以上のプラスミドベクター上にある、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

1 のプラスミドベクターが、PA、PB1、HA、NP、NA、M1、NS1 および / または NS2 並びに変異型 PB2 cDNA の vRNA 生産用の転写カセットを有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

1のプラスミドベクターが1の前記mRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターがその他の前記mRNA生産用の転写カセットを有する、請求項24または25に記載の方法。

【請求項27】

3のmRNA生産用プラスミドベクターを有し、それぞれのmRNA生産用プラスミドベクターが1の前記mRNA生産用の転写カセットを有する、請求項24または25に記載の方法。

【請求項28】

1のプラスミドベクターが6の前記vRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターがその他の前記vRNA生産用の転写カセットを有する、請求項24に記載の方法。

10

【請求項29】

1のプラスミドベクターが1の前記mRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターがその他のmRNA生産用の転写カセットを有する、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

3のmRNA生産用のプラスミドベクターを有する、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

1のプラスミドが3の前記mRNA生産用の転写カセットを有する、請求項25、26、又は29のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項32】

前記異種ヌクレオチド配列はマーカーまたは選択可能な遺伝子配列である、請求項21に記載の方法

【請求項33】

前記生体含有可能なウイルスが6:2再集合体である、請求項21に記載の方法。

【請求項34】

前記HAはA型HAである、請求項21に記載の方法。

【請求項35】

HAが、H1、H2、H3、H5、H7、またはH9 HAである、請求項34に記載の方法。

30

【請求項36】

前記HA cDNAは、非病原性の開裂部位をコードする、請求項21に記載の方法。

【請求項37】

前記HAおよびNAは、同一のウイルス単離物由来である、請求項21又は33に記載の方法。

【請求項38】

前記HAはB型HAである、請求項21に記載の方法。

【請求項39】

脊椎動物の生理学的サンプルにおいて、選択インフルエンザウイルス株に対する中和抗体を検出する方法であって、下記：

40

a) 該サンプル、該選択インフルエンザウイルス株のHAおよび/またはNAを発現する請求項2又は3のウイルス、およびインフルエンザウイルス感染に感受性のある細胞を接触させること；並びに

b) 該細胞中におけるレポーターまたは抗原の存在または量を検出することを含み、ここで、該サンプル中において該レポーターまたは抗原が存在しないこと、あるいは対照サンプルと比較して該レポーターまたは抗原の量が少ないことが、脊椎動物が該インフルエンザウイルス株に感染したという指標になる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

関連出願の相互参照

本出願は、2011年8月26日に出願された米国特許出願第61/527、935号の出願日の利益を主張し、その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の権利に関する声明

本発明は、米国政府の支援を受け、米国国立衛生研究所により授与されたAI047446を用いてなされた。米国政府は本発明についての一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

インフルエンザウイルスは、毎年世界中にエピデミックを、時にはパンデミックを引き起こす。A型インフルエンザウイルスは、毎年、接触伝染性の呼吸器疾患、軽度から重度の発熱、そして、時として死に至るといった特徴を有するエピデミックを引き起こす(Pallesen & Shaw, 2007)。保健システムと世界経済に対する大きな負担を回避すべく、この命を奪いかねないウイルスを予防しコントロールすることに焦点を当てたワクチンおよび治療用抗ウイルスの研究が認可されている。鋭意研究の結果、インフルエンザ感染に対する治療的介入の発見に至ったが、しかしながら、ウイルスのポリメラーゼはエラーが発生しやすいので、ヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)インフルエンザウイルスタンパク質は抗原連続変異または遺伝的浮動として知られる点突然変異を受けやすい(Linら、2004)。抗原連続変異または遺伝的浮動により、ウイルスは宿主の免疫応答から逃れることができ、あるいは、ある種の薬物に対し耐性になる結果になる(Mossら、2010)。ワクチンの接種は、インフルエンザ関連の罹患および死亡を予防する最も有効な手段の一つである。

10

20

【0004】

現在利用可能な治療的および予防的介入として、2つのタイプのワクチン(すなわち、不活化および生ワクチン)、並びに2つのクラスの抗ウイルス剤(すなわち、アマンタジンおよびリマントジン等のM2イオンチャネル遮断薬、並びに、オセルタミビルおよびザナミビル等のノイラミニダーゼ(NA)阻害剤)がある(Daviesら、1964; Hayden, 2001)。それにもかかわらず、季節性インフルエンザは、公衆衛生学的に最も強力な影響の一をもたらす伝染性疾患である。さらに、2009年から2010年のインフルエンザシーズン中には、新型のA型インフルエンザウイルス株である2009H1N1のパンデミックウイルスが出現して世界中に広がり、これにより、40年ぶりにインフルエンザパンデミックとなり、地球規模で保健および経済に相当な影響を与えた(<http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm>)。米国だけで、274000人の入院および12470人の死亡を含む推定6100万のH1N1の症例が報告された(<http://www.cdc.gov/flu/about/season/index.htm>)。

30

【0005】

若年者、高齢者、または免疫不全者は、免疫系が未発達または低下しているため、特にインフルエンザなどの感染症に感染しやすい。日本で実施されたいくつかの研究により、学齢期の子供たちの間でインフルエンザワクチンの接種率が高いと、インフルエンザ感染を防ぎ、地域社会における感染が減少し、高齢者の発症および死亡も減少することが示唆された; 2001年の研究において、年間約37000~49000人の死亡が予防されたが、学童のワクチン接種を中止したときは超過死亡率が上昇したと報告されている(Reichertら、2001)。

40

【0006】

現在利用可能な不活化インフルエンザワクチンは、特に幼児や高齢者において、持続期間が短くまた有効性も限られている。不活化ワクチンは、細胞介在性の免疫を効果的に惹起できないため、一般に、弱毒化生ワクチンよりも免疫原性が低い、したがってあまり有効ではなく、そして、この弱毒化生ワクチンは、アメリカのような限られた数の国でしか使用が承認されていない。弱毒化生ウイルスの経鼻投与が小児にとって不活化ワクチンよ

50

りも優れていると考えられており、これは弱毒化生ウイルスが長期間持続する効力と関連して強力な粘膜免疫ならびに体液性および細胞性の免疫応答を誘発するためである（Coxら、2004）。しかし、弱毒化生ワクチンは現在、2歳から49歳までの慢性的な病状がなく、妊娠中でも免疫低下でもない者にしか許可されていない。認可済み弱毒化生インフルエンザウイルスは、安全でかつ、復帰変異ウイルスの出現といった潜在的なリスクについて安定していると考えられているにもかかわらずである。

【0007】

また、不活化ワクチンは、孵化卵においてウイルス増殖をするので、非経口的な投与により副作用又はアナフィラキシー反応と結びつくこともあり、また、これらのワクチンにおける卵タンパクの傾向として、感受性の高い宿主において過敏反応が生じてアレルギーを誘発することもある。卵ベースのワクチンの増殖が成功する前提条件として、孵化鶏卵に適した変異体を選択することがあるが、この基準に従うと、もはや循環ウイルスの抗原性と一致しない場合がある。さらに困難なことに、鳥インフルエンザパンデミックの爆発的な襲来を予測すると、鶏の在庫が枯渇する可能性が考えられ、よってワクチンの大量生産が危うくなる可能性がある。

10

【0008】

弱毒化生インフルエンザワクチン（LAI V）は、もともとインフルエンザA型株（A/Ann Arbor/6/60H2N2）及びB型株（B/Ann Arbor/1/66）を低温馴化したものであり、特定の病原体をもたない初代ニワトリ腎細胞中で低温において連続的に継代したものである（Maassabら、1968）。このプロセスの間に、ウイルスは、マスター供与体ウイルス（MDV）の内部タンパク質遺伝子セグメント（すなわち、「内部」非グリコシル化タンパク質をコードする遺伝子）中に、低温馴化（ca）、温度感受性（ts）、および弱毒化（att）という表現型を生ずるような複数の変異を獲得する。MDVは、LAI V遺伝子の主骨格であり、毎年、現在のインフルエンザウイルスのものからヘマグルチニン（HA）およびノイラミニダーゼ（NA）遺伝子について更新されて、年ごとの三価製剤が製造される。よって、これら3種のインフルエンザウイルス株はそれぞれ、ca、ts、att MDV由来の6つの内部遺伝子セグメント、並びに世界保健機関（WHO）及び米国公衆衛生局で毎年選択される野生型インフルエンザウイルス由来の（HAおよびNAタンパク質をコードする）2つの遺伝子セグメント、を含む6：2遺伝子再集合体ウイルスである。

20

30

【0009】

いくつかの遺伝子における複数の遺伝子座がLAI Vワクチンウイルスのca、ts、およびattの表現型を制御するので、LAI Vが復帰してこれらの表現型を失うとはとても考えにくい（Kemblerら、2003；Murphyら、2002）。インフルエンザウイルスの複製中、ヌクレオチドの位置あたり組み込みエラーが $10^{-4} \sim 10^{-5}$ というエラー率の場合で、各MDVの弱毒化の表現型は少なくとも5つの点突然変異が関与するという事実（Murphyら、2002；Smithら、1987）を考慮すると、5つの弱毒化の遺伝子座で突然変異が生じ野生型インフルエンザに戻るLAI Vワクチンウイルスの確率は、少なくとも 10^{20} 複製サイクルのうち1つであろう。ワクチン接種を受けた幼児から回収された135のワクチン株の研究では、復帰の痕跡は見られなかった（Vesikariら、2006）。

40

【0010】

最初の経鼻投与LIAVは、2003年に米国で使用が承認され、FluMist（登録商標）[インフルエンザウイルス生ワクチン、経鼻用]として米国で販売された。LAI Vワクチンウイルスは、もともとは古典的に再集合を利用して製造されていたが、2008年、その工程は逆遺伝学技術に移行した。その内の遺伝子再集合体ウイルスは、細胞培養における逆遺伝学技術を用いて調製される。これは、インフルエンザ遺伝子を含むDNAプラスミドからインフルエンザウイルスを生成することができる技術である。三種のワクチン株を一緒に調合して単用量噴霧器入りのLAI V三価ワクチンを製造する。経鼻用LIAVは現在、2歳から49歳までの者への使用について米国で承認されている。

50

【0011】

弱毒化生ウイルスは、体液性および細胞性の免疫応答を誘発できるので、不活化ワクチンよりも優れており、ひいては、乳児や幼児をより良く防御できると考えられている（Coxら、2004）。特に、弱毒化生ワクチンを経鼻投与すると、長期間持続する防御的効力と関連して強力な粘膜免疫および細胞性応答を誘発する（Coxら、2004）。弱毒化生インフルエンザウイルスは、主に鼻咽頭粘膜の繊毛上皮細胞で複製し、（粘膜免疫グロブリンIgA、血清IgG抗体、および細胞性免疫を経由して）免疫応答を誘発するが、LAIVウイルスは、それより下方の気道および肺におけるような高温ではあまり増殖しない（Murphyら、2002；Gruberら、2002）。加えて、従来の卵ベースのワクチンの増殖システムに代わり、細胞ベースのもの（例えば、逆遺伝学を利用したウイルスの生成後にウイルスを増幅するのに用いられる細胞）を代替することによるいくつかの利点がある。細胞ベースのワクチン研究は、卵ベースのワクチン研究に比べより経済的に実現可能であり、より迅速で、そして労働密度がより少ないという点で、大きな利点を示し、また、労働密度が少ないので、その製造力をパンデミックの際には需要に合わせて容易にスケールアップできる。また、組換えDNAに基づく技術によりウイルスを遺伝子操作すると、その病原性を安全化しながらウイルスの遺伝的寄生力の開発が可能になる。ウイルスを、複製不能および非病原性にすることができ、または受容宿主に外来遺伝子を導入し発現する操作ができる。

10

【発明の概要】

【0012】

本発明は、多価ワクチンを製造するのに有用で、並びに、病原性および復帰についての安全上の懸念を満たす生体含有可能な（biologically contained）組換えインフルエンザウイルスであって、該ウイルスは、任意で、外来遺伝子を安定的に発現してもよく、よって効果的に追跡可能で、そしてその複製が容易に評価可能な生体含有可能な組換えインフルエンザウイルスを提供する。以下に開示されているように、そのPB2ウイルスRNA（vRNA）のコード領域内に、例えば、GFP遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子といった蛍光タンパク質遺伝子等のレポーター遺伝子を有するPB2-ノックアウト（PB2-KO）インフルエンザウイルスを生成した。ここで、このウイルスの複製はPB2タンパク質を安定的に発現する細胞系に限定される。このレポーター遺伝子をコードするPB2 vRNAは、PB2を発現する細胞中での複製中に安定して子孫ウイルス中に取り込まれ、レポーター遺伝子がウイルス感染細胞中で発現し、この際、組換えPB2 vRNAおよびPB2タンパク質mRNA間での組み換えを示す証拠は見られなかった。さらに、異なるウイルス株のHAおよびNA遺伝子が容易にPB2-KOウイルスに収容された。細胞変性作用を観察するのではなく、ウイルス感染の指標としてレポーター遺伝子発現を用いることにより、インフルエンザウイルスに対する中和抗体をスクリーニングするための改良アッセイを、このPB2-KOウイルスを用いて確立した。これらの結果により、PB2-KOウイルスは、基礎および応用インフルエンザウイルス学の研究用に貴重なツールとなる可能性があること、並びに、例えば、PA-KOウイルス又はPB1-KOウイルスといった他のポリメラーゼ遺伝子ノックアウトウイルスにも適用可能であることが示唆される。

20

30

40

【0013】

一の実施形態では、本発明は、ウイルスRNAポリメラーゼサブユニットの一つであってウイルス複製に欠かせないタンパク質であるPB2をコードする配列に対応するコンテイングの核酸配列を含まないウイルス遺伝子セグメント（変異型PB2ウイルス遺伝子セグメント）を有し、単離された感染性生体含有可能なインフルエンザウイルスを提供する。細胞培養内にこのようなウイルスを調製するために、トランスにPB2を発現する細胞株を採用し、野生型PB2ウイルス遺伝子セグメント用ではなく、インフルエンザウイルスvRNA生産用のベクターと組み合わせ、一の実施形態では、インフルエンザウイルスmRNAタンパク質生産用のベクターと組み合わせる。得られるウイルスは、トランスにPB2を発現しない細胞、または、ヘルパーウイルスに未感染の細胞に感染しても、PB2を

50

発現することができないので「生体含有可能な」ウイルスになる。しかし、トランスにPB2を発現する細胞から生産されるビリオンは、PB2を含む。このような変異型PB2ウイルス遺伝子セグメントを有する、感染性生体含有可能インフルエンザウイルスを、トランスでPB2を発現する複数の細胞系、例えば、PB2発現293ヒト胚腎臓(293)、ヒト肺腺癌上皮(A549)、または2、6-結合シアル酸転移酵素を過剰発現するメイディン・ダービーイヌ腎臓(MDCk)細胞(AX4細胞)等、において生成した結果、少なくとも 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 もしくは 10^8 PFU/mLまたはそれ以上の高いウイルス力価が得られた。

【0014】

ワクチン接種は、インフルエンザ感染に対する予防のための主要な手段である。本明細書に開示されるように、PB2-KOウイルスは、正常な未感染細胞(トランスでPB2を発現しない細胞)ではなく、PB2を発現する細胞において高力価($>10^8$ PFU/mL)で複製し、異種インフルエンザウイルスのHAおよびNA遺伝子を収容し、子孫PB2-KOビリオン内に連続的継代を通じ維持されるレポーター遺伝子を安定的に取り込み、そしてマウスで弱毒化されたので、ワクチンとしての可能性が示唆される。その抗原発現能およびそのワクチンとしての候補性をマウスモデルにおいて検査した。1用量のみのPB2-KO(GFP)ウイルスで免疫化したマウスの血清、鼻洗浄液、および気管支肺胞洗浄液のサンプルにおいて、不活化インフルエンザワクチンに比べ有意に高いレベルのIgGおよびIgA抗体が誘導された。様々な致死量のPR8を試みたところ、すべてのPB2-KOウイルス処理マウスが生存した。トランスでPB2を発現する細胞中で生産されたウイルスは、その後宿主細胞(例えば、それでは自身ではPB2を発現せずもしくは含まない、または野生型PB2 vRNAを含まない宿主細胞)に感染すると、少量のPB2タンパク質を搬送するので、限定的なウイルス複製がインビボで起こる。これにより、限られた量(例えば、1ラウンド程度)の複製は起こるが、主要な感染過程を経た複製(例えば、約1000超のウイルス力価の増幅)は起こらない。インビボでのKOウイルスの複製は限定的なので、従来の不活化インフルエンザワクチンによって誘導されるよりも強力な免疫応答が可能になる。これらの免疫マウスが、免疫蛍光による測定によると、レポーターに対する抗体を生産することは注目し、これにより、PB2-KOウイルスは、多価ワクチンとしての可能性を有することが示唆される。PB2-KOは、対照と比較して同等かそれ以上の安全性および有効性を示すので、インフルエンザウイルス感染対策として有望である。

【0015】

一の実施形態では、本発明は、PAウイルス遺伝子セグメント、PB1ウイルス遺伝子セグメント、変異型PB2ウイルス遺伝子セグメント、HAウイルス遺伝子セグメント、NAウイルス遺伝子セグメント、NPウイルス遺伝子セグメント、M(M1およびM2)ウイルス遺伝子セグメント、ならびにNS(NS1およびNS2)ウイルス遺伝子セグメント、を含む8の遺伝子セグメントを含み、単離された感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルスを提供する。別の実施形態では、本発明は、PAウイルス遺伝子セグメント、PB1ウイルス遺伝子セグメント、変異型PB2ウイルス遺伝子セグメント、HAウイルス遺伝子セグメント、NA(NAおよびNB)ウイルス遺伝子セグメント、NPウイルス遺伝子セグメント、M(M1およびBM2)ウイルス遺伝子セグメント、ならびにNS(NS1およびNS2)ウイルス遺伝子セグメントを含む8の遺伝子セグメントを含み、単離された感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルスを提供する。一の実施形態では、上記感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルスは、M1およびM2のMウイルス遺伝子セグメントを有する。一の実施形態では、上記感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルスは、NBおよびNAのNAウイルス遺伝子セグメントを有する。一の実施形態では、上記感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルスは、HEF遺伝子セグメントを有する。

【0016】

さらに別の実施形態では、本発明は、PAウイルス遺伝子セグメント、PB1ウイルス

10

20

30

40

50

遺伝子セグメント、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント、N P ウイルス遺伝子セグメント、M ウイルス遺伝子セグメント、N S (N S 1 および N S 2) ウイルス遺伝子セグメント、ならびに H E F ウイルス遺伝子セグメントを含み、単離された感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルス遺伝子セグメントを提供する。一の実施形態では、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメントは、任意で異種ヌクレオチド配列にランキングしてもよい 5' および / または 3' P B 2 ウイルス非コードおよびコード組み込み配列を含み、機能的 P B 2 をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まない。変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント中の P B 2 オープンリーディングフレームは、例えば、形質移入または感染後に容易に検出可能なもの、例えば、G F P 遺伝子もしくはウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子といったルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子、または病原体からの抗原をコードする遺伝子等の異種ヌクレオチド配列により置換または破壊されてもよい。一の実施形態では、P B 2 コード領域は変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント中に、1 以上のヌクレオチドの挿入または削除、または 1 以上のアミノ酸置換または停止コドンをもたらすもの、あるいはそれらの任意の組み合わせであって非機能的 P B 2 コード配列となるような変異を含んでいてもよい。一の実施形態では、異種ヌクレオチド配列は、例えば、約 1 0 0 ~ 約 4 5 0 0 又は約 5 0 0 ~ 約 4 0 0 0 ヌクレオチドといった、約 3 0 ~ 約 5 0 0 0 の間の長さである。

10

【0017】

本発明の感染性生体含有可能ウイルスは、従って、宿主において免疫応答を誘導するインフルエンザワクチンとして使用してもよく、この際、感染または弱毒化から完全感染性形質となる遺伝的復帰に伴う症状のリスクがない。本発明の感染性生体含有可能ウイルスは、生ウイルスであるため、化学的に不活化されたウイルスよりも良好に免疫応答を誘発することができ、そして、さらに本発明のウイルスは、生体含有可能になっているため、しばしば弱毒化生ワクチンに伴い問題となる疾患の症状が出にくい。そして、複製不能なウイルス様粒子 (V L P) の使用とは対照的に、本発明の K O ウイルスは、ウイルスに対する宿主の免疫応答を増強するアジュバントである R N A を含有する。本発明の P B 2 - K O インフルエンザウイルスについて得られる特性は驚くべきものである。というのは、類似のウイルスである M 2 の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠く M 2 欠損ウイルス (W a t a n a b e ら、J . V i r o l . 8 3 : 5 9 4 4 (2 0 0 9) 参照) は、トランスで M 2 が供されないと、例えば、 $10^2 \sim 10^3$ P F U / m L という低い力価にしか増殖せず、よって複製欠陥であるが生体含有可能になってはいないからである。

20

30

【0018】

一の実施形態では、本発明は、P A ウイルス遺伝子セグメント、P B 1 ウイルス遺伝子セグメント、H A ウイルス遺伝子セグメント、N A ウイルス遺伝子セグメント、N P ウイルス遺伝子セグメント、M ウイルス遺伝子セグメント、ならびに N S 1 および N S 2 ウイルス遺伝子セグメント、を含む 7 つの遺伝子セグメントを含み、単離された感染性生体含有可能組換えインフルエンザウイルス、すなわち、P B 2 ウイルス遺伝子セグメントを欠くウイルス、を提供する。

【0019】

一の実施形態では、変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメントを有する 8 セグメントの P B 2 - K O インフルエンザウイルスとしては、該変異型 P B 2 ウイルス遺伝子セグメント中に、P B 2 コード配列の削除、P B 2 コード配列の削除および異種ヌクレオチド配列の挿入、又は P B 2 コード配列を破壊する異種ヌクレオチド配列の挿入を有する。このウイルスは、P B 2 がトランスで供されるとインビトロで複製し、対応する野生型インフルエンザウイルスと比べ、実質的に同一かまたは多くとも 10^1 0 0 または 10^0 0 0 倍低い力価となるが、しかし、P B 2 がトランスで供給されないとインビボ又はインビトロで弱毒化する。一の実施形態では、P B 2 コード配列の削除には、1 以上の P B 2 のコンティグ又はコンティグでないヌクレオチドを含んでもよく、また、例えば、7 5 9 のアミノ酸をコードする領域等の全コード領域の削除を含んでもよい。一の実施形態では、削除には、P B 2 コード領域の少なくとも 1 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5

40

50

%、90%、93%、95%、および最大99%、又は、10から99の間の任意の整数であるパーセント数値を含むが、全PB2コード領域は含まない。一の実施形態では、PB2コード配列の削除には、例えば、3'または5'非コードPB2配列にコンティグする配列等の、非コードPB2組み込み配列のみを有する組換えウイルス遺伝子セグメントと比較して、得られるウイルス遺伝子セグメントをビリオン中へ取り込まれるのがより増強される5'または3'コード配列の削除は含まない。

【0020】

一の実施形態では、該変異型PB2遺伝子セグメントは、例えば、フレームシフトをもたらす機能的PB2の発現を不能にするような1以上のヌクレオチドの挿入を含んでもよい。一の実施形態では、挿入には、非コードPB2組み込み配列のみを有する組換え遺伝子セグメントと比較して、当該遺伝子セグメントをビリオン中へ取り込まれるのがより増強される5'または3'コード配列の変更は含まない。

10

【0021】

一の実施形態では、変異型PB2ウイルス遺伝子セグメントは、対応する野生型PB2タンパク質と比較して少なくとも1のアミノ酸の置換をもたらす少なくとも1の変異を含んでもよく、例えば、開始コドン削除または置換する変異、該コード領域中に1以上の終止コドンを導入する変異等の、感染後のウイルス遺伝子セグメントから機能的PB2が発現できないようなものが挙げられる。一の実施形態では、該開始コドンの削除または置換、あるいは該PB2のリーディングフレーム中への1以上の終止コドンの導入には、非コードPB2組み込み配列のみを有する組換え遺伝子セグメントと比較して、当該遺伝子セグメントをビリオン中へ取り込まれるのがより増強される5'または3'コード配列の変更は含まない。

20

【0022】

本発明の一の実施形態では、異種ヌクレオチド配列は、検出可能な表現型を付与する可能性のある異種タンパク質（糖タンパク質、または細胞質、核、もしくはミトコンドリア特異的タンパク質等の非インフルエンザウイルスタンパク質、あるいは微生物病原体由来の抗原といった任意の抗原タンパク質）をコードしてもよい。一の実施形態では、異種ヌクレオチド配列は、PB2コード配列の欠損部、例えば5'または3'PB2コード組み込み配列に対応するものと融合してもよく、任意でキメラタンパクを生成するものであってもよい。一の実施形態では、異種ヌクレオチド配列を、ウイルス遺伝子セグメントのコード領域内の組み込み配列を破壊しないように、ウイルス遺伝子セグメントのコード領域に対応するセグメント中の配列に置換するかまたは導入してもよい。例えば、異種ヌクレオチド配列は、非コード配列に隣接する5'および/または3'PB2コード領域から約3~約400ヌクレオチドにフランキングしてもよい。一の実施形態では、3'PB2組み込み配列は、PB2コード領域のN末端および/またはC末端から3~400ヌクレオチド、3~300ヌクレオチド、3~100ヌクレオチド、3~50ヌクレオチド、又は3~400ヌクレオチドの間の任意の整数、に対応する。一の実施形態では、宿主細胞が該生体含有可能PB2-KOウイルスに感染した後、削除されたPB2タンパク質の残り残基のN末端および/またはC末端が融合した異種タンパク質が生成される。

30

【0023】

変異型PB2遺伝子セグメントのvRNA生産用ベクターは、PA vRNA、PB1 vRNA、NP vRNA、HA vRNA、NA vRNA、M vRNA、およびNS（NS1および/またはNS2）vRNAのvRNA生産用のベクター、並びに、1以上のPA、PB1、PB2およびNPのmRNA（タンパク質）生産用のベクター又はPA、PB1、PB2、およびNPのうち最大3つのmRNA生産用のベクター、と共に細胞中に導入され、ここで、この細胞は、安定して残りのウイルスタンパクを発現し、そして任意に、HA、NA、M、例えば、M1およびM2、NS1および/またはNS2を発現する。変異型PB2遺伝子セグメントのvRNAは、対応する野生型PB2 vRNAと比べ、少なくとも1%、5%、10%、もしくは30%、または少なくとも50%、の効率で、ビリオンに取り込んでもよい。

40

50

【 0 0 2 4 】

一の実施形態では、本発明のインフルエンザウイルスは、全身性免疫および感染の主要な進入口における粘膜免疫の両方を誘発する。よって、本発明は、本発明の生体含有可能組換えウイルスを含む弱毒化生ワクチン又は免疫原性組成物、並びに、それぞれ鳥類もしくはヒトといった哺乳類等の脊椎動物を免疫するため、又は、脊椎動物における免疫応答を誘発するための該ワクチン又は免疫原性組成物の使用方法を提供する。一の実施形態では、該組成物又はワクチンは、経鼻投与用に調合される。一の実施形態では、ワクチン中の生体含有可能組換えウイルスは、A型インフルエンザウイルスHA、例えば、H1、H2、H3、H5、H7、またはH9 HAのHA遺伝子セグメントを含む。一の実施形態では、ワクチン中の生体含有可能組換えウイルスにおけるHAは、HA開裂部位で修飾される。一の実施形態では、ワクチンは、本発明の生体含有可能組換えウイルスとは異なる少なくとも1のインフルエンザウイルス株を含み、例えば、ワクチンは2または3の異なるインフルエンザウイルスを含む。

10

【 0 0 2 5 】

本発明は、vRNA生産用の転写カセット及びmRNA生産用の転写カセットを含む1以上のベクターを有する感染性で生体含有可能な8セグメントのA型インフルエンザウイルスを調製するための、複数のベクターを提供する。vRNA生産用の転写カセットは、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPB1 DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルスPB2 DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスHA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNP DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスM DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、およびゲノムウイルスRNAを生産する方向で、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNS (NS1およびNS2) DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセットである。変異型PB2 DNAは、異種ヌクレオチド配列にフランキングする5'および3'組み込み配列を含み、機能的PB2をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まない。mRNA生産用の転写カセットは、PolII転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPAのDNAコード領

20

30

40

50

域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、P o l I I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス P B 1 の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、および P o l I I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス N P の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、そして任意で、P o l I I 転写終結配列に連結された 1 以上のインフルエンザウイルス P B 2、H A、N A、N S 1、N S 2、M 1 および / または M 2 の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、である。また、これらのベクターを有する組成物、およびこれらのベクターを採用する方法も更に提供する。

【 0 0 2 6 】

また、本発明は、v R N A 生産用の転写カセット及び m R N A 生産用の転写カセットを含む 1 以上のベクターを有し、感染性で生体含有可能な 8 セグメントの B 型インフルエンザウイルスを調製するための、複数のベクターも提供する。v R N A 生産用の転写カセットは、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス P A D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス P B 1 D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルス P B 2 D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス H A D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス N A および N B D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス N P D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様 v R N A 末端、例えば、P o l I 転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス M D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された v R N A 生産用のプロモーター、例えば、P o l I プロモーター、を含む転写カセット、および P o l I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス N S (N S 1 および N S 2) D N A に対し、ゲノムウイルス R N A を生産する方向で作用可能に連結された P o l I プロモーターを含む転写カセット、である。変異型 P B 2 D N A は、任意で異種ヌクレオチド配列にフランキングしてもよい 5 ' および 3 ' 組み込み配列、を含み、機能的 P B 2 をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まない。m R N A 生産用の転写カセットは、P o l I I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス P A の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、P o l I I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス P B 1 の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、および P o l I I 転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルス N P の D N A コード領域に対し作用可能に連結された P o l I I プロモーターを含む転写カセット、そして任意で、P o l I I 転写終結配列に連結された 1 以上のインフルエンザ

10

20

30

40

50

ウイルスPB2、HA、NA、NS1、NS2、M1および/またはBM2のDNAコード領域に対し作用可能に連結されたPolIプロモーターを含む転写カセット、である。また、これらのベクターを有する組成物、およびこれらのベクターを採用する方法も更に提供する。

【0027】

一の実施形態では、vRNAベクター中のプロモーターは、ヒトRNA PolIプロモーター等のRNAポリメラーゼI (PolI)プロモーター、RNAポリメラーゼII (PolII)プロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、SP6プロモーター、T7プロモーター、又はT3プロモーターを含むが、これらに限定されない。一の実施形態では、1以上のvRNAベクターは、インフルエンザウイルス配列の5'側にPolIIプロモーターおよびリボザイム配列を含み、そして、該インフルエンザウイルス配列の3'側に同一または異なるリボザイム配列を含む。一の実施形態では、変異型PB2遺伝子セグメントは、ベクター中にあり、ヒトRNA PolIプロモーターといったRNA PolIプロモーター、RNA PolIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、SP6プロモーター、T7プロモーター、又はT3プロモーター、を含むが、これらに限定されないプロモーターに対し作用可能に連結される。一の実施形態では、vRNAベクターは、PolI転写終結配列、PolII転写終結配列、またはPolIII転写終結配列を含むが、これらに限定されない転写終結配列、あるいは、1以上のリボザイムを含む。

10

【0028】

本発明の複数のベクターは、物理的に連結されていてもよく、あるいは、各ベクターが個々のプラスミドまたは他の、例えば線状の、核酸送達ビヒクル上に存在していてもよい。一の実施形態では、各vRNA生産ベクターが別々のプラスミド上にある。一の実施形態では、各mRNA生産ベクターが別々のプラスミド上にある。一の実施形態では、1以上のvRNA生産用のベクターが同じプラスミド上にある（例えば、その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる公開された米国特許出願第2006/0166321号参照）。一の実施形態では、1以上のmRNA生産用のベクターが同じプラスミド上にある（例えば、米国特許出願第2006/0166321号参照）。一の実施形態では、この方法で採用されるvRNAベクターが、1のプラスミド、または2もしくは3の異なるプラスミド上にある。一の実施形態では、この方法において採用されるPA、PB1、およびNP、ならびに任意でPB2のmRNAベクターが、1のプラスミド、または2もしくは3の異なるプラスミド上にある。

20

30

【0029】

また、ベクター発現PB2、例えば、PB2~PR8または他のマスターワクチン株を含む宿主細胞も提供する。一の実施形態では、PB2は、配列番号3でコードされるPB2に対し、少なくとも90%、95%、98%、99%または100%の同一性を有する。一の実施形態では、例えばエピソームとして安定的に細胞内で維持されるベクター、又はレンチウイルス若しくはレトロウイルスベクター等の染色体に組み込まれるベクター、といったウイルスベクターで、宿主細胞が形質導入される。一の実施形態では、宿主細胞は更に、一過性vRNA生産用の転写カセットおよび一過性mRNA生産用の転写カセットを含む1以上のベクターを含む。vRNA生産用の転写カセットは、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPB1 DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルスPB2 DNAに対し、ゲノ

40

50

ムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスHA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNA DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、インフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNP DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセット、およびインフルエンザウイルス様vRNA末端、例えば、PolI転写終結配列、が得られるような転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNS(NS1およびNS2)DNAに対し、ゲノムウイルスRNAを生産する方向で作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーター、例えば、PolIプロモーター、を含む転写カセットである。変異型PB2 DNAは、任意で異種ヌクレオチド配列にフランキングしてもよい5'および3'組み込み配列を含み、機能的PB2をコードする配列に対応するコンティグの配列を含まない。mRNA生産用の転写カセットは、PolI転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPAのDNAコード領域に対し作用可能に連結されたPolIプロモーターを含む転写カセット、PolI転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPB1のDNAコード領域に対し作用可能に連結されたPolIプロモーターを含む転写カセット、およびPolI転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNPのDNAコード領域に対し作用可能に連結されたPolIプロモーターを含む転写カセットである。宿主細胞は、野生型PB2ウイルス遺伝子セグメントのvRNA生産用のPB2コード配列に対応する配列を含まない。

【0030】

また、本発明は、例えば、本発明の宿主細胞を用いて、インフルエンザウイルスを調製する方法を提供する。この方法は、細胞を、感染性インフルエンザウイルスを生成するのに有効な量で、例えば逐次的にまたは同時に本発明の複数のベクターに接触させることを含む。また、本発明は、複数のベクターに接触させた細胞からウイルスを分離することを含む。よって、本発明はさらに、単離されたウイルス及び本発明のウイルスに接触した宿主細胞を提供する。別の実施形態では、本発明は、細胞を1以上のベクターに接触させることを含む、vRNAまたはタンパク質生産ベクターのいずれか一方を、該vRNAまたはタンパク質生産ベクター以外の他のベクターより先に接触させることを含む。

【0031】

一の実施形態では、本発明は、変異型PB2ウイルス遺伝子セグメントを含む組換えインフルエンザウイルスを調製する方法を提供する。この方法は、組換えウイルスを得るために、宿主細胞を、変異型PB2遺伝子セグメント配列を含むベクターを含む複数のインフルエンザベクターに接触させることを含む。例えば、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPA DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスPB1 DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結された変異型インフルエンザウイルスPB2 DNAに対し、転写終結配列、作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスHA DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用の

プロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNP DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNA DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスM DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、および転写終結配列に連結されたインフルエンザウイルスNS (NS1およびNS2) DNAに対し作用可能に連結されたvRNA生産用のプロモーターを含むベクター、を含むvRNA生産用のベクターに、宿主細胞を接触させ；ここで、変異型PB2 DNAはゲノムvRNAを生産する方向にあり、任意で異種ヌクレオチド配列にフランキングしてもよい5'および3'組み込み配列を含み、機能的PB2用の配列に対応するコンティグの配列を含まず；インフルエンザウイルスPAをコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、インフルエンザウイルスPB1をコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、インフルエンザウイルスNPをコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、を含むmRNA生産用のベクターに、宿主細胞を接触させ；ここで、該細胞は、vRNA生産用のPB2コード配列に対応する配列には接触させない。任意で、宿主細胞を、インフルエンザウイルスHAをコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、インフルエンザウイルスNAをコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、インフルエンザウイルスM1をコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、M2タンパク質、例えば、変異型M2タンパク質、をコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクター、およびインフルエンザウイルスNS1および/またはNS2をコードするDNAセグメントに対し作用可能に連結されたプロモーターを含むベクターに、接触させる。一の実施形態では、M1およびM2 mRNA並びに/又はNS1およびNS2 mRNAについて別々のベクターを設けて用いる。

【0032】

本発明の生体含有可能組換えインフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、各転写カセットが、プラスミドベクター上にある。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、1以上の転写カセットが、1以上のプラスミドベクター上にある、例えば、1のプラスミドベクターが、PA、PB1、HA、NP、NA、M1、NS1および/またはNS2並びに変異型PB2 cDNAのvRNA生産用の転写カセット、を有する。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、1のプラスミドベクターが、1の上記mRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターが、その他の上記mRNA生産用の転写カセットを有する。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、3のmRNA生産用のプラスミドベクターを用い、それぞれが1の上記mRNA生産用の転写カセットを有する。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、1のプラスミドベクターが、6の上記vRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターが、その他の上記vRNA生産用の転写カセットを有する。例えば、1のプラスミドベクターが、1の上記mRNA生産用の転写カセットを有し、他の1のプラスミドベクターが、その他の上記mRNA生産用の転写カセットを有する。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、3のmRNA生産用のプラスミドベクターを用いる。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、1のプラスミドが3のmRNA生産用の転写カセットを有する。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、上記HA cDNAは、非病原性の開裂部位をコードする。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、上記HAおよびNAは、同一のウイルス単離物由来である。本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスを調製する方法の一の実施形態では、上記HAは、B型HAであ

10

20

30

40

50

る。

【0033】

vRNA中のプロモーターもしくは転写終結配列またはウイルスタンパク質発現ベクターは、プロモーターまたは他の任意のベクターに対し同一でも異なってもよい。一の実施形態では、インフルエンザvRNAを発現するベクター又はプラスミドは、プロモーターを含み、このプロモーターは、少なくとも1の特別な宿主細胞、例えば、鳥類またはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、又はヒト細胞を含む霊長類細胞などの哺乳類の宿主細胞、あるいは複数の宿主で発現するのに適している。一の実施形態では、各PolI含有ベクターのPolIプロモーターは同一である。一の実施形態では、上記PolIプロモーターは、ヒトPolIプロモーターである。一の実施形態では、各PolII含有ベクターのPolIIプロモーターは同一である。一の実施形態では、上記PolII含有ベクターの2又はそれ以上のPolIIプロモーターは同一であるが全部のPolII含有ベクターのPolIIプロモーターは同一ではない。一の実施形態では、各PolII含有ベクターのPolIIプロモーターは異なる。

10

【0034】

別の実施形態では、この方法は、宿主細胞を、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスPA DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター（双方向のカセット）、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスPB1 DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それが変異型インフルエンザウイルスPB2 DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスHA DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスNP DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスNA DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、PolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスM DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクター、およびPolIIプロモーターがPolI転写終結配列に連結し、それがインフルエンザウイルスNS1および/またはNS2 DNAに連結し、それがPolIプロモーターに連結し、それがPolII転写終結配列に連結しているベクターに接触させることを含む。宿主細胞は、例えば、ニワトリベータ-アクチンプロモーター由来のものといったPB2タンパク質を発現するPB2 DNAを含む。野生型PB2のvRNA源がないので、複製不能なウイルスが得られる。

20

30

【0035】

一の実施形態では、双方向のカセット中のvRNA生産用のプロモーターとして、ヒトRNA PolIプロモーター等のRNAポリメラーゼI (PolI)プロモーター、RNAポリメラーゼII (PolII)プロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、SP6プロモーター、T7プロモーター、又はT3プロモーター等が挙げられるが、これらに限定されない。一の実施形態では、1以上のvRNAベクターは、インフルエンザウイルス配列の5'側にPolIIプロモーターおよびリボザイム配列を含み、並びに、該インフルエンザウイルス配列の3'側に同一または異なるリボザイム配列を含む。一の実施形態では、変異型PB2遺伝子セグメントは、ベクター内にあり、かつヒトRNA PolIプロモーターといったRNA PolIプロモーター、RNA PolIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、SP6プロモーター、T7プロ

40

50

モーター、又はT3プロモータ等が挙げられるが、これらに限定されないプロモーターに対し作用可能に連結される。一の実施形態では、vRNAベクターは、PolI転写終結配列、PolII転写終結配列、またはPolIII転写終結配列等が挙げられるが、これらに限定されない転写終結配列、あるいは、1以上のリボザイムを含む。本発明の範囲内のリボザイムとしては、テトラヒメナリボザイム、RNase P、ハンマーヘッドリボザイム、ヘアピンリボザイム、肝炎リボザイム、並びに合成リボザイムが挙げられるが、これらに限定されない。一の実施形態では、少なくとも1のvRNA用のベクターでは、RNAポリメラーゼIIプロモーターがリボザイム配列に連結し、それがウイルスコード配列に連結し、それが別のリボザイム配列に連結し、それが任意でRNAポリメラーゼII転写終結配列に連結している。一の実施形態では、少なくとも2、例えば、3、4、5、6、7または8のvRNA生産用のベクターでは、RNAポリメラーゼIIプロモーター、第1リボザイム配列を含み、これがウイルスコード配列を含むウイルス配列に対応する配列の5'側にあり、これが第2リボザイム配列の5'側にあり、さらにこれが転写終結配列の5'側にある。各vRNAベクターにおける各RNAポリメラーゼIIプロモーターは、他の任意のvRNAベクターにおけるRNAポリメラーゼIIプロモーターと同一であっても異なってもよい。同様に、各vRNAベクターにおける各リボザイム配列は、他の任意のvRNAベクターにおけるリボザイム配列と同一であっても異なってもよい。一の実施形態では、単一のベクターにおけるリボザイム配列は同一ではない。

10

【0036】

20

また、本発明の複数のベクター、組成物、および宿主細胞は、異種配列を含む他のvRNA生産もしくはタンパク質生産用のベクターを含んでもよい。例えば、異種配列には、癌関連抗原または、細菌、非インフルエンザウイルス、真菌、もしくは他の病原体等の病原体に対する免疫原といった目的の治療的または予防的遺伝子の配列がある。例えば、目的の遺伝子またはcDNAを含むベクターまたはプラスミドを、インフルエンザウイルス遺伝子用のベクター又はプラスミドの代わりに用いてもよく、あるいは全インフルエンザウイルス遺伝子用のベクターまたはプラスミドに追加してもよい。よって、本発明の別の実施形態は、上述の組成物又は複数のベクターを含み、ここで該ベクターの1つは、任意で5'インフルエンザウイルスコード配列またはその一部を含んでもよい5'インフルエンザウイルス配列が所望のcDNAといった所望の核酸配列に連結し、これが任意で3'インフルエンザウイルスコード配列またはその一部を含んでもよい3'インフルエンザウイルス配列に連結するもので置換されている、又はこれを追加的に含む。一の実施形態では、cDNAなどの所望の核酸配列は、アンチセンス(アンチゲノム)方向にある。このようなベクターを上述の他のベクターと共にインフルエンザウイルス複製を許容する宿主細胞へ導入すると、該ベクターの異種配列に対応するvRNAを含む組換えウイルスが得られる。

30

【0037】

一の実施形態では、本発明の組換えウイルスは、A型インフルエンザウイルス由来の1以上の遺伝子を含む。別の実施形態では、本発明の組換えウイルスは、B型インフルエンザHA遺伝子などのB型インフルエンザウイルス由来の1以上の遺伝子を含んでもよい。さらに別の実施形態では、本発明の組換えウイルスは、C型インフルエンザウイルス由来の1以上の遺伝子を含んでもよい。NAのvRNAの産生用のDNAは、例えば、任意のN1~N9、キメラNA配列、または非天然NA配列等のいかなるNA由来であってよく、そして、HAのvRNAの産生用のDNAは、例えば、任意のH1~H16、キメラHA配列、または非天然HA配列等のいかなるHA由来であってよい。一の実施形態では、vRNAの産生用のDNAは、B型またはC型インフルエンザウイルスのためのものであってよい。一の実施形態では、他の弱毒化変異がベクターに導入されていてもよく、例えば、HA開裂部位における変異であってこれが開裂されなくなるようなものを導入してもよい。NAおよびHAのvRNAの生産用のDNAは異なる株または単離物由来(6:1:1再集合体)であってよく、同一株または単離物由来(6:2再集合体)であって

40

50

よく、NAは内部遺伝子と同一株または単離物由来（7：1再集合体）、あるいは内部遺伝子の1であってもよく、NAおよびHAは、同一株または単離物由来（5：3再集合体）であってもよい。

【0038】

本発明の範囲における再集合体用の内部遺伝子を提供できるウイルスとしては、ペロ細胞では、例えば、力価が少なくとも 10^6 PFU/mL、 10^7 PFU/mLまたは 10^8 PFU/mLといった少なくとも約 10^5 PFU/mLである高い力価；孵化卵では、例えば、力価が少なくとも 10^8 EID₅₀/mL、 10^9 EID₅₀/mLまたは 10^{10} EID₅₀/mLといった少なくとも約 10^7 EID₅₀/mLである高い力価；AX5細胞等のMDCCKでは、例えば、力価が少なくとも 10^8 PFU/mLといった少なくとも約 10^7 PFU/mLである高い力価；あるいはこれらの宿主細胞の2またはそれ以上において高い力価を有するウイルスが挙げられる。一の実施形態では、PB1 vRNA、変異型PB2 vRNA、PA vRNA、NP vRNA、M（M1および/もしくはM2またはM1および/もしくはBM2）vRNA、ならびに/あるいはNS（NS1および/またはNS2）vRNAのvRNA生産用のDNAは、AX4細胞、ペロ細胞、またはPER.C6（登録商標）細胞、および、任意で、孵化卵、といった培養哺乳動物細胞中で高力価に複製するインフルエンザウイルス、および/または、例えば、ヒトに重大な疾患を引き起こさないようなワクチンウイルス由来の配列を有していてもよい。

10

【0039】

例えば、他のPR8単離物またはワクチンウイルス由来の内部遺伝子を有する再集合体を、本発明の組換え再集合体ウイルスに採用できる。特に、PR8（UW）PB1、PB2、PA、NP、およびM（「5」）並びにPR8（Cam）NS（「1」）を有する5：1：2再集合体；PR8（UW）NA、PB1、PB2、PA、NP、およびM（「6」）並びにPR8（Cam）NS（「1」）遺伝子セグメントを有する6：1：1再集合体；および、PR8（UW）PB1、PB2、PA、NP、M、NA、およびNS（「7」）遺伝子セグメントを有する7：1再集合体を採用できる。

20

【0040】

一の実施形態では、PB1、PB2、PA、NP、M、およびNSの内部遺伝子のDNAは、配列番号1～6又は10～15の1によってコードされる対応ポリペプチドと実質的に同じ活性を有するタンパク質をコードする。本明細書で用いる場合、「実質的に同じ活性」とは、それぞれ、対応する完全長ポリペプチドの約0.1%、1%、10%、30%、50%、90%、例えば、最大100%またはそれ以上の活性、もしくは約80%、90%またはそれ以上の検出可能なタンパク質レベルを含む。一の実施形態では、核酸は、例えば、配列番号1～6または10～15の1によりコードされるポリペプチドと同一なコンティグのアミノ酸配列と、少なくとも80%、例えば、90%、92%、95%、97%または99%（80および99の間のいかなる整数も含む）の割合で実質的に同じポリペプチドをコードする配列を含む。一の実施形態では、単離および/または精製された核酸分子は、例えば、配列番号1～6または33～38の1と同一なコンティグの核酸配列と、少なくとも50%、例えば、60%、70%、80%または90%（50および100の間のいかなる整数も含む）の割合で実質的に同じヌクレオチド配列を含み、並びに一の実施形態では、単離および/または精製された核酸分子は、例えば、配列番号1～6または10～15の1によりコードされるポリペプチドに同一なコンティグのアミノ酸配列と、少なくとも80%、例えば、90%、92%、95%、97%または99%（80～99のいずれの整数も含む）の割合で実質的に同じポリペプチドをコードする。一の実施形態では、インフルエンザウイルスポリペプチドは、1以上の、例えば2、5、10、15、20又はそれ以上の保存的アミノ酸置換、例えば、配列番号1～6または10～15の1によりコードされるポリペプチドに対し最大10%または20%の残基の保存的置換を有する。保存的アミノ酸置換とは、類似の側鎖を有する残基が互いに変換することをいう。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸群は、セリ

30

40

50

ンおよびトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸群は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸群は、リジン、アルギニンおよびヒスチジンであり；そして、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群はシステインおよびメチオニンである。一の実施形態では、保存的アミノ酸置換群は：バリン - ロイシン - イソロイシン；フェニルアラニン - チロシン；リジン - アルギニン；アラニン - バリン；グルタミン酸 アスパラギン酸；およびアスパラギン - グルタミンである。一の実施形態では、インフルエンザウイルスポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 または 10 ~ 15 の 1 によりコードされるポリペプチドに対し 1 以上の、例えば 2、3 又は 4 の、非保存的アミノ酸置換を有する。

【0041】

ヘルパーウイルスの感染を必要としない本明細書に記載のウイルスを生産する方法は、ウイルスの突然変異誘発の研究、並びにワクチン（例えば、AIDS、インフルエンザ、B型肝炎、C型肝炎、ライノウイルス、フィロウイルス、マラリア、ヘルペス、および手足口病用）および遺伝子治療ベクター（例えば、癌、AIDS、アデノシンデアミナーゼ、筋ジストロフィー、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、および中枢神経系腫瘍用）の製造に有用である。よって、医学的治療（例えば、ワクチンまたは遺伝子治療用）において使用するためのウイルスが提供される。

【0042】

この方法は、宿主生物、例えば、哺乳類に、有効量の本発明のインフルエンザウイルスを投与することを含み、例えば、生または不活化ウイルス調製物を、任意で、アジュバントおよび/または担体と組み合わせて、そのウイルスまたは抗原的に密接に関連するウイルスにより哺乳類などの動物の感染症を予防または改善するのに有効な量で投与することなどがある。一の実施形態ではウイルスを筋肉内投与するが、別の実施形態ではウイルスを経鼻投与する。いくつかの投与プロトコルでは、すべての用量を筋肉内または経鼻投与してもよいが、他のプロトコルでは、筋肉内および経鼻投与を組み合わせる。一の実施形態では、2 ~ 3 の用量を投与する。ワクチンは、異種ヌクレオチド配列を本発明のインフルエンザウイルスのウイルス遺伝子セグメントに導入する結果として多価になってもよい。ワクチンは、更に、例えば、組換えインフルエンザウイルス、他の病原体、追加の生物剤又は微生物成分を含むインフルエンザウイルスの他の単離物を含有してもよく、例えば、多価ワクチンを形成してもよい。一の実施形態では、例えば不活化インフルエンザウイルスを含有する経鼻ワクチン接種、および粘膜アジュバントにより、鼻咽頭でのウイルス特異的 I g A および中和抗体、加えて、血清 I g G を誘導し得る。

【0043】

本発明のインフルエンザウイルスは、例えば、アマンタジン、リマンタジン、および/またはノイラミニダーゼ阻害剤といった他の抗ウイルス剤と共に用いてもよく、また、例えば、投与前、投与時、および/または投与後にそれらの抗ウイルス剤と組み合わせて別々に投与してもよい。

【0044】

一の実施形態では、本発明のインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスおよび少なくとも一つの他の病原体、例えばウイルス性もしくは細菌性病原体、用のワクチンベクターであってもよく、または、インフルエンザウイルス以外の病原体用のワクチンベクターであってもよい。病原体としては、これらに限定されないが、HIV等のレンチウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、CMVまたはHSV等のヘルペスウイルス、口蹄疫ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒトライノウイルス、呼吸器合胞体ウイルスおよび1型ヒトパラインフルエンザウイルス等のパラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、ニパウイルス、ハンタウイルス、日本脳炎ウイルス、ロタウイルス、デング熱ウイルス、西ナイルウイルス、肺炎球菌、結核菌、百日咳菌、またはインフルエンザ菌などが挙げられる。例えば、本発明の生体含有可能インフルエンザウイルスは、麻疹ウイルスのHタンパク質、風疹ウイルスのウイルスエンペロー

10

20

30

40

50

ブタンパク質 E 1、流行性耳下腺炎ウイルスの H N タンパク質、ヒトライノウイルスの R V キャプシドタンパク質 V P 1、呼吸器合胞体ウイルスの G タンパク質、コロナウイルスの S タンパク質、ニパウイルスの G または F タンパク質、ハンタウイルスの G タンパク質、日本脳炎ウイルスの E タンパク質、ロタウイルスの V P 6、デング熱ウイルスの E タンパク質、西ナイルウイルスの E タンパク質、肺炎球菌の P s p A、結核菌由来の H S P 6 5、百日咳菌の I R P 1 ~ 3、ヘム利用タンパク質、保護表面抗原 D 1 5、ヘム結合タンパク質 A、またはインフルエンザ菌の外膜タンパク質 P 1、P 2、P 5 もしくは P 6 の配列を含んでもよい。

【 0 0 4 5 】

さらに、脊椎動物の生理学的サンプルにおいて、選択インフルエンザウイルス株に対する中和抗体を検出する方法を提供する。この方法は、サンプル、選択株の H A および / または N A を発現する本発明の組換えウイルス、およびインフルエンザウイルス感染に感受性のある細胞を接触させることを含む。細胞中におけるレポーターまたは抗原の存在またはその量を検出し、ここで、サンプル中においてレポーターまたは抗原が存在しないこと、あるいは対照サンプルと比較してレポーターまたは抗原の量が少ないことが、脊椎動物がインフルエンザウイルス株に感染したという指標になる。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 6 】

【 図 1 】 変異型 P B 2 v R N A の模式図およびそれらのビリオン形成およびビリオン取り込みの効率。V L P 数および変異型 P B 2 v R N A のビリオンの取り込み効率は、W S N H A および G F P を発現する細胞数を基準として用いることにより決定した。全ての変異体を、負のセンス方向で示す。各変異体は、G F P リーディングフレーム（緑色のバー）； 3 ' および 5 ' 非コード領域の各 2 7 および 3 4 ヌクレオチド（灰色のバー）；並びに様々な長さのコード領域（黒色のバー）を含む。点線は、P B 2 コード領域中の削除された配列を表す。P B 2 (-) はこの v R N A を欠く（すなわち、7 の v R N A セグメントのみを使用して V L P が生成された）ことを示す。

20

【 0 0 4 7 】

【 図 2 - 1 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 1 および 2 ）。

【 図 2 - 2 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 2 および 3 ）。

【 図 2 - 3 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 3 ~ 5 ）。

30

【 図 2 - 4 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 5 ~ 7 ）。

【 図 2 - 5 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 7、8、および 1 0 ）。

【 図 2 - 6 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 1 0 および 1 1 ）。

【 図 2 - 7 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 1 1 ~ 1 3 ）。

【 図 2 - 8 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 1 3 ~ 1 5 ）。

【 図 2 - 9 】 例示としてのワクチンウイルスの内部遺伝子配列（配列番号 1 5 ）。

【 0 0 4 8 】

【 図 3 】 P R 8 / P B 2 - G F P ウイルスの特性評価。A) 野生型 P B 2 および P B 2 (1 2 0) G F P (1 2 0) v R N A の模式図。P B 2 (1 2 0) G F P (1 2 0) v R N A は 3 ' 非コード領域、P B 2 v R N A のコード配列の 1 2 0 ヌクレオチド、G F P 遺伝子、並びに P B 2 v R N A の 3 ' コードおよび 5 ' 非コード領域の 1 2 0 ヌクレオチドを有する。P B 2 v R N A 非コード領域およびコード領域を、それぞれ灰色と赤色のバーで表す。G F P 遺伝子を、緑色のバーで表す。B) A X 4 / P B 2 細胞（A X 4 細胞は M D C K 細胞由来）における P B 2 遺伝子発現。R N A を、野生型 A X 4 および A X 4 / P B 2 細胞の両者から抽出した。R T - P C R をオリゴ（d T）プライマーを用いて実施し、続いて、P B 2（上のパネル）又はイヌ - アクチン（下のパネル）に特異的なプライマーを用いて c D N A 合成および P C R を行った。C) A X 4 / P B 2 細胞における P B 2 タンパク質発現。細胞を、抗 P B 2 抗体 1 8 / 1（H a t t a ら、2 0 0 0）（左

40

50

のパネル)及びHoechst 33342(右のパネル)と反応させた。スケールバー、50 μm 。D)72時間にわたりモニターしたPR8/PB2-GFPの成長速度。野生型AX4細胞(上のパネル)およびAX4/PB2細胞(下のパネル)を、0.001のMOIで、野生型PR8(赤)またはPR8/PB2-GFP(緑)ウイルスに感染させた。図に示す各時点で採取した上清についてAX4/PB2細胞における感染性ウイルスをブラクアッセイでアッセイした。

【0049】

【図4】PB2-KOウイルスにおける様々なHA遺伝子の収容。PB2-KOウイルス感染細胞におけるHA発現。AX4/PB2細胞を、PR8/PB2-GFP、WSN/PB2-GFP、CA04/PB2-GFP、またはVN1203/PB2-GFPに感染させた。感染から16時間後、細胞をWSN、CA04、又はVN1203 HAタンパク質に特異的なモノクローナル抗体で染色した。HAおよびGFPの発現を蛍光顕微鏡を用いて調べた。

10

【0050】

【図5】PB2-456 KOウイルスにおける様々なレポーター遺伝子の収容。A)PB2-KOウイルス感染細胞におけるルシフェラーゼ活性。野生型AX4およびAX4/PB2細胞を、図に示す各MOIで、PR8/PB2-Fluc(上のグラフ)およびPR8/PB2-Rluc(下のグラフ)に感染させた。感染から8時間後、細胞におけるFlucおよびRluc活性をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステムを用いて測定した。ウイルス感染細胞の結果は、非感染細胞のもの(「0」で表す)と比較し、P値を学生t検定を用いて計算した。*、 $P < 0.05$ 。RLU、相対発光単位。B)PB2-KOウイルス感染細胞におけるGFP強度。AX4/PB2細胞を図に示す各MOIで、PR8/PB2-GFPに感染させた。感染から8時間後、GFP強度を無限M1000マイクロプレートリーダーを用いて測定した。ウイルス感染細胞の結果は、非感染細胞のもの(「0」で表す)と比較し、P値を学生t検定を用いて計算した。*、 $P < 0.05$ 。RFU、相対発光単位。

20

【0051】

【図6】PB2-KOウイルスに基づく微量中和アッセイ。AX4/PB2細胞を、あらかじめ3連ウェル中に連続希釈したフェレット血清と混合した100PFUのCA04/PB2-Rlucに感染させた。細胞中のRluc活性を、感染から24時間後に、レニラルシフェラーゼアッセイシステムを用いて測定した。ウイルス感染細胞の結果は、血清処理をしていないウイルスに感染させた細胞のもの(「血清(-)」で表す)と比較し、P値を学生t検定を用いて計算した。*、 $P < 0.05$ 。RLU、相対発光単位。

30

【0052】

【図7】マウスのチャレンジ後の体重変化。図示の材料で1回(A)、2回(B)、又は3回(C)免疫したマウスを、 MLD_{50} の0.5倍(i)又は5倍(ii)のPR8ウイルスでチャレンジした。数値は、平均の体重変化 \pm SDとして表す($n=3$)。

【0053】

【図8】免疫マウスにおけるウイルス特異的抗体応答。精製PR8ウイルスを抗原として用い、培地、ホルマリンで不活化したウイルス、またはPB2-KOウイルスで免疫したモックマウスの血清、鼻洗浄液、およびBAL液(それぞれ上部、中央部、下部)におけるIgGおよびIgA抗体の力価を分析した。血清(上部パネル)は、異なる時点、すなわち、ワクチン接種前(バーA)、2回目のワクチン接種前(バーB)、3回目のワクチン接種前(バーC)、およびチャレンジ前(バーD)に得た。鼻洗浄液およびBAL液(それぞれ、中央および下部のパネル)は、ワクチン接種を1回(バー1)、ワクチン接種を2回(バー2)、又はワクチン接種を3回(バー3)行ったマウスのチャレンジ1日前に得た。数値は、平均吸光度 \pm 標準偏差(SD)として表す($n=3$)。不活化ウイルス及びPB2-KOウイルスで免疫したマウスから得たサンプル間において、統計的有意性が示された。

40

50

【0054】

【図9】チャレンジ後の免疫マウスの肺および鼻甲介（NT）におけるウイルス力価。x軸上の数字は、ワクチン接種の回数を示す。群当たり3匹のBAL液B/cマウスを、図に示す各PR8ウイルスの用量（マウス当たり50 μ l）で経鼻感染させ、感染から3および6日後に屠殺しウイルス力価を測定した。バーは、それぞれのマウスの各器官におけるウイルス力価を示す。バーが無い箇所は、器官当たりのウイルス力価が5PFU/mLの検出限界未満であったことを示す。

【0055】

【図10】PB2-KOウイルスで免疫したマウスの血清における抗GFP抗体の検出。一過性にGFPを発現するコンフルエントな293細胞を、培地（A）、ホルマリンで不活化したウイルス（B）、またはPB2-KOウイルス（C）を接種したマウスから得られた血清（1/20希釈）、あるいは、市販の抗GFP抗体（D）で処理した。DNAは、Hoechst 33342で染色した（第1列）。GFPは、GFP発現用のプラスミドで形質移入した細胞を表す（第2列）。GFP抗体は、サンプル中のGFP抗体の存在を表す（第3列）。これら3枚の画像を統合した（第4列）。スケールバー、20 μ m。

10

【0056】

【図11】肺炎球菌（*S. pneumoniae*）のpspA配列を有するPB2-KOウイルスを細胞に感染した後の異種抗原発現の検出。抗インフルエンザウイルス抗体および抗PspA抗体を用いて、PB2-KO-GFP又はPB2-KO-PspA感染細胞におけるインフルエンザウイルス及びPspAタンパク質の発現を検出した。

20

【0057】

【図12】PB2を発現しない細胞および安定的にPB2を発現する細胞におけるPB2-KO-PspAの成長速度。

【0058】

【図13】PB2-KO-PspAまたはPB2-KO-GFPで3回免疫したマウスの血清、BAL液、および鼻洗浄液中のインフルエンザ抗原特異的IgGおよびIgA。

【0059】

【図14】PB2-KO-PspAで3回免疫したマウス血清中のPspA特異的IgG。

30

【0060】

【図15】PB2-KO-PspAで3回免疫したマウスのBAL液および鼻洗浄液中のPspA特異的IgGおよびIgA。

【0061】

【図16】PB2-KO-PspAで3回免疫し、10LD₅₀または100LD₅₀のインフルエンザウイルスをチャレンジしたマウスについてチャレンジ後の生存率。

【0062】

【図17】PB2-KO-PspAで3回免疫し、10LD₅₀または100LD₅₀のインフルエンザウイルスをチャレンジしたマウスについてチャレンジ後3日目の気道におけるウイルス複製。

40

【0063】

【図18】PB2-KO-PspAまたはPB2-KO-GFPで3回免疫し、マウス当たり10²CFUの*S. pneumoniae*（EF3030）をチャレンジしたマウスの鼻洗浄液における肺炎球菌数。

【0064】

【図19】PB2-KO-PspAで3回免疫し、マウス当たり2 \times 10⁷CFUのpneumococcus WU2（致死株）をチャレンジしたマウスについてのチャレンジ後の生存率。

【発明を実施するための形態】

【0065】

50

定義

本明細書中で用いる場合、「感染性生体含有可能」ウイルスとは、ウイルスが正常細胞において子孫を産生することができない、又はインビトロまたはインビボにおいて大量の複製ができない、例えば、トランスで安定的に供給されるヘルパーウイルスまたはウイルスタンパク質の非存在下で約 $10^2 \sim 10^3$ PFU/mL 未満の力価であるものを意味する。

【0066】

本明細書中で用いる場合、「複製欠損」ウイルスとは、ウイルスがインビトロまたはインビボにおいて一定の限度で複製可能である、例えば、トランスで供給されるヘルパーウイルスまたはウイルスタンパク質の非存在下で少なくとも約 $10^2 \sim 10^3$ PFU/mL の力価であるものを意味する。

10

【0067】

本明細書中で用いる場合、用語「単離」とは、例えばベクターまたはプラスミドなどの核酸分子、ペプチドまたはポリペプチド（タンパク質）、あるいは本発明のウイルスを、インビボの物質と関連しないように、又は、インビトロの物質から実質的に精製するようにインビトロで調製および/または単離することを指す。単離ウイルス調製物は、一般に、インビトロでの培養および増殖、ならびに/または卵における継代により得られ、そして実質的に他の感染因子を含まないものである。

【0068】

本明細書中で用いる場合、「実質的に精製」とは、対象の種が優勢な種であること、例えば、モルベースで、組成物において他の個々の種よりも多く存在すること意味し、好ましくは組成物中に存在する種のうちの少なくとも約 80% であり、そして、任意で、95%、98%、99% 以上といった 90% 以上であってもよい。

20

【0069】

本明細書中で用いる場合、「実質的に含まない」とは、ある特定の感染因子について、その因子に標準的な検出方法を用いて検出できるレベルに満たないことを意味する。

【0070】

「組換え」ウイルスとは、インビトロで操作されたものであり、例えば組換え DNA 技術を用いて、ウイルスゲノムの変化をもたらすようなものである。再集合体ウイルスは、組換えまたは非組換え技術により調製可能である。

30

【0071】

本明細書中で用いる場合、用語「組換え核酸」または「組換え DNA 配列もしくはセグメント」とは、供給源に由来し又は供給源から単離され、その後インビトロで化学的に改変し得る核酸、例えば、DNA で、その配列が天然に存在しないようなもの、又は天然ゲノム中での位置とは異なる位置付を有するような天然配列に対応するものを指す。供給源に「由来する」DNA の一例としては、有用な断片として同定された後、本質的に純粋な態様で化学的に合成される DNA 配列がある。供給源から「単離された」DNA の一例としては、有用な DNA 配列があり、本発明で用いるために遺伝子工学的方法によりさらに操作、例えば増幅ができるよう、例えば制限エンドヌクレアーゼの使用といった化学的手段により上記供給源から切断または取り出したものである。

40

【0072】

本明細書中で用いる場合、「異種ヌクレオチド配列」とは、親インフルエンザウイルス以外に由来するものをいい、例えば、レポーター遺伝子、他のウイルスもしくは細菌などの他の生物由来の遺伝子、または、例えば、完全長のインフルエンザウイルス遺伝子セグメントのサブセットおよび欠損 PB2 コード配列に融合したような非天然型の配列等のインフルエンザウイルス由来だがの天然のインフルエンザウイルスゲノムの模倣ではない配列がある。

【0073】

本明細書中で用いる場合、「異種」インフルエンザウイルス遺伝子または遺伝子セグメントは、例えば、再集合体等の組み換えインフルエンザウイルスにおける主要な他のイン

50

フルエンザウイルス遺伝子または遺伝子セグメントとは異なるインフルエンザウイルスから由来したものである。

【0074】

用語「単離ポリペプチド」、「単離ペプチド」、または「単離タンパク質」は、cDNA若しくは組換えRNA又はそれらの組み合わせ（合成由来のものを含む）によりコードされるポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質を含む。

【0075】

本明細書中で用いる場合、用語「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」とは、組換えDNA分子から発現したタンパク質分子を指す。逆に、本明細書中で用いる場合、用語「天然タンパク質」とは、天然に存在する供給源（すなわち、組換え体でないもの）から単離されたタンパク質を指す。分子生物学的技術を用いて、そのタンパク質の天然形態と比べて同一の特性を有するようなタンパク質の組換え形態を作製してもよい。

【0076】

比較用の配列のアラインメントの方法は当技術分野で周知である。よって、任意の2つの配列間の同一性の割合は、数学的アルゴリズムを用いて決定できる。

【0077】

コンピューターを用いてこれらの数学的アルゴリズムを実行して配列を比較することで配列の同一性を決定することができる。これらのプログラムを用いたアラインメントは、デフォルトパラメータを使用して実施できる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センターを通して公的に入手可能である（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）。このアルゴリズムには、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインした場合に、いくつかの正の値の閾値スコアTに一致する又は満たすようなクエリ配列における長さWの短いワードを同定することによる、ハイスコア配列ペア（HSP）を第1に同定することを含んでもよい。Tは、近傍ワードスコア閾値と呼ばれる。これらの初期の近傍ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索開始の種として作用する。次いで、該ワードのヒットを、累積アライメントスコアが増加され得る限り各配列に沿って双方向に拡張する。累積スコアは、ヌクレオチド配列にパラメータM（マッチする残基ペアとしての報酬スコア；常に > 0 ）及びN（マッチしない残基としてのペナルティスコア；常に > 0 ）を使用して計算する。アミノ酸配列については、スコアマトリクスを使用して該累積スコアを計算する。各方向におけるワードヒットの拡張は、該累積アライメントスコアが、その得られた最大値から数量X単位で減少するとき、該累積スコアが、1又は複数の負のスコアである残基アライメントが蓄積することでゼロ又はそれ以下となる時、あるいは、各配列の末端に至ったとき、に停止する。

【0078】

配列同一性の割合を計算することに加え、該BLASTアルゴリズムを実施して2つの配列間の類似性についての統計分析を実施してもよい。該BLASTアルゴリズムによる類似性の測定値の一つとしては、最小合計確率（ $P(N)$ ）があり、これは2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列が偶然マッチする確率を示すものである。例えば、もし参照核酸配列と検査核酸配列との比較における該最小合計確率が、約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、該検査核酸配列は該参照配列と類似すると考えられる。

【0079】

（ヌクレオチド配列の場合）BLASTNプログラムに、デフォルトとして、ワード長（W）11、期待値（E）10、カットオフ100、 $M = 5$ 、 $N = -4$ を用いて両鎖の比較をしてもよい。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムに、デフォルトとして、ワード長3、期待値（E）10、およびBLOSUM62スコアリングマトリクスを用いてもよい（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照）。また、アラインメントは、人の目視によって実施してもよい。

【0080】

10

20

30

40

50

配列を比較する場合、典型的には、1の配列が参照配列として機能し、検査配列と比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、検査配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要なら部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する検査配列の配列同一性の割合を計算する。

【0081】

インフルエンザウイルス

ウイルスのライフサイクルには、一般に、細胞表面受容体への結合、細胞へのウイルス核酸の侵入及び脱殻、それに続く細胞内でのウイルス遺伝子の複製が含まれる。ウイルスタンパク質および遺伝子の新しいコピーが合成されると、これらの構成要素が集合して子孫ウイルス粒子となり、細胞から出る (RoizmanおよびPalese、1996参照)。異なるウイルスタンパク質が、これらの各ステップにおいて様々な役割を果たす。

【0082】

A型インフルエンザウイルスは、エンベロープに包まれ、8つのRNAセグメントを持ち、核タンパク質(NP)と共にキャプシド化されたマイナス鎖ウイルスである(LambおよびKrug、1996参照)。この8つの一本鎖マイナスセンスウイルスRNA(vRNA)は、合計10から11のタンパク質をコードする。インフルエンザウイルスのライフサイクルは、宿主細胞の表面にあるシアル酸含有受容体へヘマグルチニン(HA)が結合することにより開始し、続いて受容体媒介性エンドサイトーシスが起る。後期エンドソーム中のpHが低くなるとHAの立体配座の転換が起こり、それによりHA2サブユニットのN末端が曝露する(いわゆる融合ペプチド)。融合ペプチドは、ウイルスおよびエンドソーム膜の融合を開始し、マトリックスタンパク質(M1)およびRNP複合体が細胞質中に放出される。RNPは、vRNAをキャプシド化する核タンパク質(NP)ならびにPA、PB1およびPB2タンパク質により形成されるウイルスポリメラーゼ複合体からなる。RNPは核中に輸送され、ここで転写および複製が起こる。RNAポリメラーゼ複合体は、3つの異なる反応を触媒する：5'キャップおよび3'ポリA構造を有するmRNAの合成、全長相補的RNA(cRNA)の合成、ならびに鋳型としてcDNAを用いたゲノムvRNAの合成、である。新たに合成されたvRNA、NP、およびポリメラーゼタンパク質は次に、RNPに集合し、核から輸出され、そして形質膜に輸送され、ここで子孫ウイルス粒子の出芽が起こる。ノイラミニダーゼ(NA)タンパク質は、感染後期に、シアルオリゴ糖からシアル酸を除去するという重要な役割を演じ、これにより新しく集合したビリオンを細胞表面から放出し、ウイルス粒子の自己凝集を防止する。ウイルス集合体はタンパク質-タンパク質およびタンパク質-vRNA相互作用に関与しているが、しかしこれらの相互作用の性質はほとんど未知である。

【0083】

B型およびC型インフルエンザウイルスはA型インフルエンザウイルスと構造的および機能的に類似するが、いくつかの差異が存在する。例えばB型インフルエンザウイルスのMセグメントは、2種類のタンパク質M1及びBM2をタンデム・シストロンの終結-再開スキームを介してコードしており、そしてNAセグメントは、2シストロン(bicistronic)のmRNAよりNA及びNBタンパク質をコードしている。7のvRNAセグメントを有するC型インフルエンザウイルスは、スプライシング転写産物に依存してM1タンパク質を産生し、スプライシングされていないmRNA産物はタンパク質分解により切断されてCM2タンパク質を産生する。加えて、C型インフルエンザウイルスは、個々のHA及びNAタンパク質ではなくHAエステラーゼ(HEF)をコードする。

【0084】

A型インフルエンザウイルスのウイルス膜にまたがるのは、3種のタンパク質：ヘマグルチニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)、およびM2である。HAおよびNAの細胞外ドメイン(外部ドメイン)は、非常に可変であるが、M2の細胞外ドメインは、インフルエンザA型ウイルス間で本質的に不変である。イオンチャネル活性を有するM2タンパク質(Pintoら、1992)は、宿主細胞への侵入およびウイルスRNAの脱殻の

間のウイルスのライフサイクルの初期状態で機能すると考えられている (Martin および Helenius、1991; Helenius、1992; Sugrueら、1990 参照)。一旦ビリオンがエンドサイトーシスを受けると、ビリオン関連 M2 イオンチャンネルであるホモ四量体のヘリックス束を通してプロトンがエンドソームからビリオンの内部へと流入できるようになるため、酸に不安定な M1 タンパク質 - リボ核タンパク質複合体 (RNP) の相互作用を妨げ、よって細胞質への RNP の放出が促進されると考えられている (Helenius、1992 参照)。加えて、HA が細胞内で開裂するいくつかのインフルエンザ株 (例えば A / f o w l p l a g u e s / R o s t o c k / 3 4) では、M2 イオンチャンネルがトランス・ゴルジ網の pH を上昇させることでトランス・ゴルジ網の内部が低 pH 条件になるために HA の構造変化が抑制されると考えられている (Hayら、1985; Ohuchiら、1994; Takeuchi および Lamb、1994)。

10

【0085】

本発明に使用できる細胞系

インフルエンザウイルスの効率的な複製に寄与する任意の細胞、例えば、293T または PER.C6 (登録商標) 細胞等のヒト、若しくはイヌ、ウシ、ウマ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ミンクの MvLu1 細胞等のげっ歯類、若しくは CHO 細胞等のハムスター、Vero 細胞等の非ヒト霊長類、若しくは MDCK 細胞等の非霊長高等脊椎動物細胞、及び AX4 細胞等のこれらの変異細胞を含む任意の鳥類または哺乳類細胞がインフルエンザウイルスを単離および / または増殖させるのに使用できる。単離ウイルスは、再集合体ウイルスを調製するのに使用できる。一の実施形態では、ワクチン生産のための宿主細胞は、哺乳動物または鳥類の連続細胞系または細胞株である。最終生成物の純度についての適切な検査を含めることができるよう、使用する細胞を完全に特性評価してもよい。細胞の特性評価に使用できるデータとして、(a) その起源、由来、及び系統に関する情報; (b) その成長および形態学的特徴に関する情報; (c) 外来性物質についての検査結果; (d) 他の細胞系から当該細胞を明らかに識別できるようにするための、生化学的、免疫学的、及び細胞遺伝学的パターンといった明確な特徴; 並びに、(e) 腫瘍原性についての検査結果などが挙げられる。一の実施形態では、使用する宿主細胞の継代レベルまたは集団倍加はなるべく低い。

20

【0086】

一の実施形態では、これらの細胞は、WHO 承認済みまたは承認可能な連続細胞系である。このような細胞系を承認するための要件としては、動物、卵および細胞培養を検査することに加え、系統、増殖特性、免疫学的マーカー、ウイルス感受性、腫瘍形成能および貯蔵条件のうち少なくとも 1 つに関する特性評価を行うことが挙げられる。このような特性評価は、細胞が検出可能な外因性物質を含有しないことを確認するために用いられる。いくつかの国では、核学的評価も必要な場合がある。加えて、腫瘍形成能を、ワクチン製造のために用いるものと同じの継代レベルにある細胞について検査する。ウイルスは、ワクチン製造の前に、一貫性のある結果を出すことが示されている方法によって精製してもよい (例えば World Health Organization、1982 参照)。

30

40

【0087】

宿主細胞により産生されるウイルスは、ワクチンまたは遺伝子治療用として調合する前に高純度に精製してもよい。一般的に、精製過程で、細胞 DNA、その他の細胞構成成分、および外因性物質などが広範に除去される。DNA を広範に分解するかまたは変性する手法を用いてもよい。

インフルエンザワクチン

【0088】

本発明のワクチンとしては、本発明の単離組換インフルエンザウイルスが挙げられ、及び任意で、その他の単離インフルエンザウイルス等の 1 以上のその他の単離ウイルス、あるいは、1 以上の単離インフルエンザウイルスまたは 1 以上のその他病原体に対する 1 以

50

上の免疫原性タンパク質または糖タンパク質、例えば、1以上の細菌、非インフルエンザウイルス、酵母または真菌由来の免疫原性タンパク質、あるいは、1以上の本発明の単離インフルエンザウイルスの免疫原性タンパク質を含む1以上のウイルスタンパク質（例えば、DNAワクチン）をコードする単離核酸を含んでもよい。一の実施形態では、本発明のインフルエンザウイルスは、インフルエンザウイルスまたはその他の病原体に対するワクチンベクターであってもよい。

【0089】

完全ビリオンワクチンは、限外濾過により濃縮し、その後ゾーン遠心分離またはクロマトグラフィーにより精製してもよい。多価ワクチンに含まれるウイルス等の本発明のウイルス以外のウイルスは、例えば、ホルマリンまたは - プロピオラクトンを用いた精製の前または後に不活化してもよい。

10

【0090】

サブユニットワクチンは、精製糖タンパク質を含む。このようなワクチンは次のように調製してもよい：洗剤を用いた処理により断片化したウイルス懸濁液を用いて、例えば超遠心分離により、表面抗原を精製する。したがってサブユニットワクチンは、主としてHAタンパク質を、そしてNAも含有する。用いられる洗剤は、例えば臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムといった陽イオン性洗剤、(Bachmeyer, 1975)、デオキシコール酸アンモニウムといった陰イオン性洗剤、(Laver & Webster, 1976; Websterら, 1977)、または例えばTriton X100の名称で市販されているもののような非イオン性洗剤であってもよい。ヘマグルチニンを、プロ

20

【0091】

スプリットワクチンは、脂質を溶解する溶剤で処理したビリオンを含む。スプリットワクチンは、次のように調製してもよい：上記のようにして得られた（不活化されたまたは不活化されていない）精製ウイルスの水性懸濁液を、攪拌しながら、例えばエチルエーテルまたはクロロホルムといった洗剤と会合する脂質溶媒により処理する。ウイルスエンベロープ脂質が溶解する結果、ウイルス粒子が断片化される。主にヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼからなり、それらの元の脂質環境が取り除かれたスプリットワクチン、

30

【0092】

不活化ワクチン

不活化インフルエンザウイルスワクチンは、既知の方法、例えば、これらに限定されないが、ホルマリンまたは - プロピオラクトン処理により、複製ウイルスを不活化することにより得られる。本発明に用いられ得る不活化ワクチンの型として、全ウイルス(WV)ワクチンまたはサブビリオン(SV)(スプリット)ワクチンが挙げられる。WVワクチンは、無傷の不活化ウイルスを含有し、一方、SVワクチンは、脂質含有ウイルスエンベロープを可溶化し、その後、残留ウイルスを化学的に不活化する洗剤で破壊した精製ウ

40

【0093】

加えて、用いられ得るワクチンとしては、表面抗原またはサブユニットワクチンと呼ばれる単離HAおよびNA表面タンパク質を含有するものが挙げられる。

【0094】

弱毒化生ウイルスワクチン

例えば、本発明の組換えウイルスを含む弱毒化生インフルエンザウイルスワクチンも、インフルエンザウイルス感染の予防または治療に用いることができる。弱毒化は、既知の方法に従って、弱毒化供与体ウイルスから複製単離物または再集合ウイルスに弱毒化遺伝子に移入することにより、単一の工程で達成できる。A型インフルエンザウイルスに対す

50

る耐性は、まず、H A および / または N A 糖タンパク質に対する免疫応答が発達することで仲介されるため、これらの表面抗原をコードする遺伝子は再集合ウイルスまたは臨床単離物由来のものである。弱毒化遺伝子は、弱毒化された親に由来する。このアプローチでは、弱毒化を付与する遺伝子は、一般に、H A および N A 糖タンパク質をコードしない。

【 0 0 9 5 】

インフルエンザウイルスを再現可能に弱毒化できるウイルス（供与体インフルエンザウイルス）が利用可能である、例えば、寒冷順応（c a）供与体ウイルスを、弱毒化ワクチン製造用に使用できる。弱毒化再集合体生ウイルスワクチンは、c a 供与体ウイルスを有毒複製ウイルスと交配することにより生成できる。次に、弱毒化 c a 供与体ウイルスの表面抗原を保有するウイルスの複製を阻害する適切な抗血清の存在下で、再集合体の子孫を、25（有毒ウイルスの複製に限定）において選択する。使用可能な再集合体は：（a）感染性がある、（b）血清反応陰性の非成体哺乳動物および免疫学的に感作された成体の哺乳類に対しても弱毒である、（c）免疫原性を有する、そして（d）遺伝的に安定なものである。c a 再集合体の免疫原性は、それらの複製レベルに平行する。したがって新規の野生型ウイルスが c a 供与体ウイルスの6つの移入可能遺伝子を獲得すると、これらのウイルスは再現可能に弱毒化され、感受性のある哺乳類成体および非成体の双方へのワクチン接種に使用できる。

【 0 0 9 6 】

他の弱毒化突然変異も、これら突然変異体遺伝子を保有する感染性ウイルスが生き残れるような部位特異的突然変異によりインフルエンザウイルス遺伝子中に導入することができる。弱毒化突然変異は、コード領域に加えゲノムの非コード領域にも導入することができる。このような弱毒化突然変異は、H A または N A 以外の遺伝子、例えば M 2 遺伝子中に導入することもできる。したがって、部位特異的突然変異により導入された弱毒化突然変異を保有する新規の供与体ウイルスが生成され、そしてこのような新規の供与体ウイルスは、c a 供与体ウイルスに関して上記されたものと同様の方法で、弱毒化再集合体生ワクチンの候補を製造するのに用いることができる。同様に、その他の既知で適切な弱毒化供与体株は、インフルエンザウイルスと再集合でき、哺乳類のワクチン接種用に適した弱毒化ワクチンを得ることができる。

【 0 0 9 7 】

一の実施形態では、このような弱毒化ウイルスは、元の臨床単離物のものと実質的に同様の抗原決定基をコードするウイルス由来の遺伝子を保持する。これは、弱毒化ワクチンの目的が、ウイルスの元の臨床単離物と実質的に同一の抗原性を提供しつつ、同時に、ワクチンを接種をされた哺乳類において重篤な病態を起こす最小要因となる程度の感染性を引き起さないことだからである。

【 0 0 9 8 】

したがって多価ワクチン中のこれらのウイルスを、動物、例えば哺乳類における免疫応答を誘導するためのワクチンとして、既知の方法に従い弱毒化または不活化し調合および投与することができる。このような弱毒化または不活化ワクチンが臨床単離物またはそれに由来する高増殖株のものと類似の抗原性を有する否かを確認するための方法は、当該技術分野で周知である。このような既知の方法として、供与体ウイルスの抗原決定基を発現するウイルスを排除するための抗血清または抗体の使用；化学的選択（例えばアマンタジンまたはリマンチジンによる）；H A および N A の活性化および阻害；ならびに抗原決定基をコードする供与体遺伝子（例えば H A または N A 遺伝子）が弱毒化ウイルス中に存在しないことを確認するための核酸スクリーニング（例えばプローブハイブリダイゼーションまたは P C R）が挙げられる。

【 0 0 9 9 】

医薬組成物

例えば経鼻、非経口、又は経口投与などの接種に適した本発明の医薬組成物として、例えば、1以上の弱毒化または不活化インフルエンザウイルス等の1以上のインフルエンザウイルス単離物、それらのサブユニット、それらの単離タンパク質、および / または1以

10

20

30

40

50

上のそれらのタンパク質をコードする単離核酸を含み、さらに任意で滅菌した水性または非水性溶液、懸濁液、および乳濁液を含む。この組成物は、さらに、当該技術分野で既知の助剤または賦形剤を含むこともできる。本発明の組成物は一般に、個別用量（単位用量）の形態で提供される。

【0100】

従来のワクチンは、一般に、組成物中において約0.1~200 μ g、例えば、30~100 μ gの各株由来のHAを含有する。本発明のワクチン組成物の主要成分を構成するワクチンは、単種のインフルエンザウイルスからなれるものであってもよく、または、例えば1以上の再集合体を含む少なくとも2または3種のインフルエンザウイルスの組み合わせであってもよい。

10

【0101】

非経口投与用の調製物としては、滅菌された水性もしくは非水性の溶液、懸濁液、および/または乳液が挙げられ、これらは当該技術分野で既知の助剤または賦形剤を含んでもよい。非水性の溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油といった植物油、およびオレイン酸エチルといった注射可能な有機エステルがある。担体または閉鎖包帯を、皮膚浸透性を増大し抗原吸収を増強するために用いてもよい。経口投与用の液体剤形は、一般に、液体剤形を含むリポソーム溶液を含んでもよい。リポソームを懸濁するための適切な形態としては、当該技術分野で一般的に用いられる不活性希釈剤、例えば精製水を含有する乳液、懸濁液、溶液、シロップ、およびエリキシルが挙げられる。このような組成物は、不活性希釈剤のほかに、アジュバント、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、または甘味剤、風味剤、若しくは香料等を含んでもよい。

20

【0102】

本発明の組成物を個体への投与に用いるとき、さらに、塩、緩衝剤、アジュバントまたは該組成物の効力の向上に望ましい他の物質を含むことができる。ワクチンのために、特定の免疫応答を増大できる物質であるアジュバントを用いることができる。通常は、アジュバントおよび組成物を混合してから免疫系へ提示するか、あるいは免疫感作を受ける生物の同一の部位に別々に提示する。

【0103】

少なくとも2種のインフルエンザウイルス株、例えばその内2~200株または任意の範囲もしくは数値内の複製のインフルエンザウイルスを混合することにより、ワクチンが異種性となる。ワクチンは、当該技術分野で既知の技法を用いてインフルエンザウイルス単一株のバリエーションにしてもよい。

30

【0104】

本発明の医薬組成物は、さらにまたは付加的に、例えば遺伝子治療、免疫抑制剤、抗炎症剤、または免疫増強剤の用途、およびワクチン用に、少なくとも1つの化学療法化合物を含んでもよく、化学療法剤としては、ガンマグロブリン、アマンタジン、グアニジン、ヒドロキシベンズイミダゾール、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、腫瘍壊死因子 α -アルファ、チオセミカルバルゾン、メチサゾン、リファムピン、リバビリン、ピリミジン類似体、プリン類似体、フォスカルネット、ホスホノ酢酸、アシクロビル、ジデオキシヌクレオシド、プロテアーゼ阻害剤またはガンシクロビルが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0105】

また、この組成物は、可変で少量の内毒素無含有のホルムアルデヒド、ならびに安全かつ該組成物を投与する生物体中で望ましくない作用に關与しないと判明した防腐剤を含有することもできる。

【0106】

医薬目的

組成物の投与（またはそれから生じる抗血清）は、「予防」または「治療」目的のいずれかであってもよい。予防目的の場合、ワクチンである本発明の組成物は、病原体感染による症状または臨床的兆候が顕在化する前に投与する。組成物を予防的に投与すると、そ

50

の後の感染を防止または弱めるのに役立つ。予防目的の場合、本発明の遺伝子治療組成物は、病気のある種の症状または臨床的兆候が顕在化する前に投与する。組成物を予防的に投与すると、疾患に関連した1以上の症状または臨床的兆候を防止または弱めるのに役立つ。

【0107】

治療目的の場合、ウイルスワクチンは、実際の感染による症状または臨床的兆候を検出してから投与する。組成物を治療的に投与すると、実際の感染を弱めるのに役立つ。治療目的の場合、遺伝子治療組成物は、疾患による症状または臨床的兆候を検出してから投与する。当該化合物を治療的に投与すると、その疾患による症状または臨床的兆候を弱めるのに役立つ。

10

【0108】

したがって、本発明のワクチン組成物は、(予期される感染を防止もしくは弱めるため) 感染のが起こる前に投与してよい、または実際の感染が起こった後に投与してよい。同様に、遺伝子治療用途として、この組成物を、病気もしくは疾患の症状または臨床的兆候が顕在化する前、あるいは、1または複数の症候を検出した後に投与してもよい。

【0109】

ある組成物について、それを投与してもレシピエントの哺乳類が耐えうる場合、「薬理的に許容可能」であるといわれる。このような物質について、その投与量が生理学的に有意である場合、「治療的有効量」で投与されると言われる。本発明の組成物について、その存在による結果としてレシピエント患者の生理機能に検出可能な変化がある場合、例えば、感染性インフルエンザウイルスの少なくとも1つの株に対する一次的または二次的な体液性または細胞性免疫応答のうち少なくとも1つを増強するような場合、生理学的に有意である。

20

【0110】

供される「防御」が絶対的である必要はない、すなわち、インフルエンザ感染は、哺乳類の集団または組と比較して、統計学的に有意な改善があるなら、全体的に防止または根絶される必要はない。防御については、インフルエンザウイルス感染の症状もしくは臨床的兆候の発現の重症度または速度を緩和するものに限定してもよい。

【0111】

製剤投与

本発明の組成物は、受動免疫法または能動免疫法のいずれかにより、1以上の病原体、例えば、1以上のインフルエンザウイルス株に耐性を付与するものであってもよい。能動免疫法では、弱毒化生ワクチン組成物を宿主(例えば哺乳類) に予防的に投与し、宿主が投与に対して免疫応答することにより感染および/または疾患から防御する。受動免疫法では、誘発された抗血清を回収し、少なくとも1のインフルエンザウイルス株により感染したと疑われるレシピエントに投与する。本発明の遺伝子治療組成物は、予防的または治療的レベルの所望の遺伝子産物を能動免疫法により産生してもよい。

30

【0112】

一の実施形態では、ワクチンは、(胎盤を通じてまたは母親の乳汁中に抗体を受動的に混入することにより) 雌および胎児の両者または新生児を防御するための免疫応答形成を引き起こすのに十分な時間および量があるという条件の下、(妊娠もしくは分娩時またはその前の) 哺乳類の雌に投与される。

40

【0113】

したがって、本発明は、例えば病原体の少なくとも1つの株による感染などの病気または疾患を防止または弱めるための方法を包含する。本明細書中で用いる場合、ワクチンを投与すると、疾患の臨床的兆候または状態が全体的または部分的に弱まり(即ち抑制)、あるいはその疾患に対し個体に全体的または部分的な免疫が生ずるような場合、ワクチンは疾患を防止または弱めると言う。本明細書中で用いる場合、遺伝子治療組成物を投与すると、疾患の臨床的兆候または状態が全体的または部分的に弱まり(即ち抑制)、あるいはその疾患に対し個体に全体的または部分的な免疫が生ずるような場合、遺伝子治療組成

50

物は疾患を防止または弱めると言う。

【0114】

弱毒化した1のウイルスおよび1以上の他の単離ウイルス、それらの1以上の単離ウイルスタンパク質、それらの1以上のウイルスタンパク質をコードする1以上の単離核酸分子、あるいはこれらの組み合わせ、を含む本発明の少なくとも1つのインフルエンザウイルスを有する組成物は、意図した目的を達成するような任意の手段により投与できる。

【0115】

例えば、このような組成物の投与は、種々の非経口経路、例えば皮下、静脈内、皮膚内、筋肉内、腹腔内、経鼻、経口または皮膚経路によるものであってもよい。非経口投与は、ポラス注入又は時間をかけた緩やかな灌流によって達成できる。

10

【0116】

インフルエンザウイルスに関連する病変を予防し、抑制し、または治療するための典型的レジメンは、本明細書中に記載されるような有効量のワクチン組成物の投与、単一治療としての投与、あるいは1週間～約24ヶ月以内、あるいはその中の任意の範囲または数値を含む期間にわたる強化または追加投与としての反復投与を包含する。

【0117】

本発明によれば、組成物の「有効量」は、所望の生物学的作用を達成するのに十分な量のことである。有効投与量は、レシピエントの種、年齢、性別、健康状態および体重、もしあれば、併用療法の種類、治療の頻度、ならびに望まれる効果の性質に依存すると理解される。以下に示す有効用量の範囲は、本発明を限定して用量の範囲を示すという意図ではない。

20

【0118】

哺乳類成体生物等の動物用の弱毒化生ウイルスワクチンまたは死滅ウイルスワクチンの投与量は、例えば $10^3 \sim 10^{12}$ 等の約 $10^2 \sim 10^{15}$ のプラーク形成単位(PFU)/kg、またはその中の任意の範囲もしくは数値であってもよい。不活化ワクチンの用量は、HAタンパク質なら、例えば、約 $15 \mu\text{g}$ といった $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 等の約 $0.1 \sim 1000$ の範囲内であってもよい。しかしながら投与量は、出発点として既存のワクチンを用いて慣用法により決定する場合、安全且つ有効な量であるべきである。

【0119】

複製ウイルスワクチンの各用量での免疫反応性HAの投与量は、適量、例えば、約 $15 \mu\text{g}$ といった $30 \sim 100 \mu\text{g}$ またはその中の任意の範囲もしくは数値、あるいは政府機関もしくは認識専門機関が推奨する量になるよう標準化してもよい。また、NAの量も標準化することができるが、この糖タンパク質は精製および貯蔵中に不安定になるおそれがある。

30

【0120】

複製ウイルスワクチンの各用量での免疫反応性HAの投与量は、適量、例えば、 $1 \sim 50 \mu\text{g}$ またはその中の任意の範囲もしくは数値、あるいは米国公衆衛生局(PHS)が推奨する量、通常、3歳以上の小児用には構成成分あたり $15 \mu\text{g}$ 、そして3歳未満の小児用には構成成分あたり $7.5 \mu\text{g}$ になるよう標準化することができる。また、NAの量も標準化することができるが、しかし、この糖タンパク質はプロセッサ精製および貯蔵中に不安定になるおそれがある(Kendallら、1980; Kerrら、1975)。各 0.5ml 用量のワクチンにつき、約 $1 \sim 500$ 億のウイルス粒子、好ましくは 100 億の粒子を含有してもよい。

40

【実施例】

【0121】

以下の非限定的な実施例により、本発明をさらに説明する。

実施例 1

PB2 組み込み配列

A型インフルエンザウイルスの最も欠損しているRNAセグメントは、それぞれの遺伝子セグメントの5'および3'末端に対応する150～300ヌクレオチドを保有する(

50

Duhautら、1998；Jenningsら、1983；Nobleら、1995；およびOdagiriら、1990）。このことより、これらの300～600ヌクレオチドが効率的なゲノムパッケージングに必要な構造的特徴を有している可能性が示唆される。PB2、PB1、およびPA vRNAにおけるvRNAビリオンの取り込みおよびビリオンの形成に重要な領域を同定するために、GFP遺伝子が、非コード領域および両末端に由来するコード領域の一部にフランキングされているプラスミド[PB2(300)GFP(300)、PB1(300)GFP(300)、およびPA(120)GFP(120)]を作製した。このようなプラスミドを、PB2、PB1、PA、およびNPタンパク質の発現プラスミド(vRNAの転写および複製に最小限の構成要素)と共に293T細胞へ形質移入したところ、細胞においてGFPの発現がみられる結果となった。このことより、キメラvRNAが、細胞性RNAポリメラーゼIによって合成され、発現プラスミドによって生産されたウイルスタンパク質によりmRNAに転写されたことが示唆される。

【0122】

vRNAビリオンの取り込み効率を計算するには、検査vRNAを含むビリオンの数をVLPの合計数と比較する必要がある。VLPの総数は、細胞をVLPで接種した後、所定のインフルエンザウイルスからの保護を発現する細胞の数をカウントすることによって決定できた。この方法により決定された感染性VLPの数がマーカーとして選択されるウイルス遺伝子産物により大きな影響を受けなかったことを確認するために、我々は、HAまたはNPのいずれかを発現する細胞の数を決定した。PB2、PB1およびPA vRNAの取り込み効率を検査するので、機能性ポリメラーゼタンパク質を供するヘルパーウイルスが必要であった。(WSNウイルス由来の)検査VLPから発現したHAおよびNPタンパク質と、ヘルパーPR8ウイルスから発現したものとを区別するために、我々はWSN HAおよびNPタンパク質を認識するがPR8ウイルスの対応物は認識しない抗生物質を使用した。

【0123】

生成したVLPの数の評価が可能な系を確立するために、293T細胞を、(PB2、PB1、またはPAセグメント由来の)検査vRNAの転写用プラスミド、残りのvRNA生産用の7のプラスミド、およびウイルスタンパク質(すなわち、PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、およびNS2)発現用の10の発現プラスミドで形質移入した。48時間後、形質移入細胞に由来するVLPを含有する上清を、PR8ヘルパーウイルスと混合し、MDC細胞に感染させた。感染から12時間後に、HAまたはNPタンパク質のいずれかを発現した細胞の数を決定した。3つ全てのvRNAについて、HAとNP発現細胞数の差は3倍未満であった、例えば、PB2(300)GFP(300)検査vRNAでは、240800のHA発現細胞に対し353200のNP発現細胞が検出された。したがって、その後の実験では、HA発現細胞の数を、感染性ビリオン形成の効率の指標として用いた。検査vRNAの取り込み効率は、よって、(検査vRNAのマーカーとしての)GFP発現細胞の数を(ビリオンの数のマーカーとしての)HA発現細胞の数およびGFP発現細胞の数の和で割ることによって計算した。

【0124】

PB2 vRNAのコード領域中の配列は、感染性ビリオンの形成およびvRNAビリオンの取り込みに影響する。ビリオン形成および/またはvRNAビリオン取り込みのために重要なPB2 vRNAにおける配列を明らかにするために、PB2 vRNAの非コード領域に加え、GFPを発現し、両末端由来のPB2コード領域の一部を含むPB2 vRNA生産用の一連のプラスミドを作製した(図1)。VLP数および検査vRNAの取り込み効率は、上述のように決定した。

【0125】

PB2 vRNAの5'および3'コード領域に対応する300ヌクレオチドを含むPB2(300)GFP(300)については、mL当たり約 2.8×10^6 のVLPが検出された。vRNAの3'末端におけるコード配列(3'コード領域と呼ぶ)を段階的に

10

20

30

40

50

削除しても、VLP生産効率にはほんのわずかな影響しか示さず、3'末端の全コード配列を欠くPB2(0)GFP(120)でもmL当たり約 1×10^6 VLPの生産があった。しかし、vRNAの5'末端におけるコード配列(5'コード領域と呼ぶ)を削除すると[PB2(120)GFP(0)]、VLP生産がPB2(300)GFP(300)の98%も減少し、PB2 vRNA無しの場合[PB2(-)]に匹敵するほどのVLP数であった。この結果により、PB2 vRNAの5'コード領域中の配列が感染性ビリオンの効率的な生成に重要であることが示唆される。さらなる分析により、この作用には、5'コード領域の30ヌクレオチドが[PB2(120)GFP(0)およびPB2(120)GFP(30)のVLP数に比較すると]重要であることが明らかになった。

10

【0126】

vRNAビリオンの取り込みの効率に関し、54.7%のVLPがPB2(300)GFP(300)検査vRNAを保有しており、これは、両端の300末端ヌクレオチドが存在すればビリオンの取り込みに十分であることを示している。野生型セグメントでみられるような取り込み効率を達成するには、おそらく内部PB2コード配列が必要であろう。30又はこれ以上のヌクレオチドを保持したまま、PB2 vRNAの3'コード領域中のヌクレオチドを段階的に削除しても、VLP生産効率にはほんのわずかな影響しか見られなかったが、しかし、これら残りの30ヌクレオチドを削除すると、ビリオンの取り込み効率がPB2(0)GFP(120)については29.5%減少した。これは、この領域がビリオンへPB2 vRNAの効率的な取り込みに重要であることを示している。5'コード領域における配列は、3'コード領域における機能的パッケージング配列を欠くPB2 vRNAによるビリオン取り込みに寄与しており、これはPB2(0)GFP(0)検査vRNAが取り込み不可であることにより示される。

20

【0127】

対照的に、5'コード領域のみを削除しても、取り込み効率に影響を及ぼさない。これはPB2(120)GFP(0)における75.7%という取り込み率によりわかる。よって、この検査vRNAを使用すると、非常に少数の感染性VLPを生産しながら効率的に検査vRNAをこれらの粒子中に取り込めた。この知見は、PB2 vRNAの中の配列が、生物学的に異なる2つのプロセスに関与していることを示唆している：つまり、効率的な感染性ビリオンの形成(5'コード領域に存在する機能)および粒子中への効率的なvRNAの取り込み(主として3'コード領域に存在する機能)である。

30

【0128】

パッケージング効率の差が、293T細胞における検査vRNAの転写レベルの差を反映している可能性がある。この可能性を除外するために、プラスミドで形質移入した293T細胞におけるPB2(0)GFP(0)およびPB2(120)GFP(120)のレベルを、リアルタイムPCRを用いて調べた。PB2(0)GFP(0)vRNAの量は、PB2(120)GFP(120)の52%であったが、この差がVLP生成における99%の減少およびvRNAのビリオン取込み抑止の原因になると説明できる可能性は低い。

40

【0129】

PB2 vRNAは、効率的な感染性ビリオンを生成にとってPB1またはPA vRNAよりも重要である。このように、PB2 vRNAが他のvRNAビリオンの効率的な取り込みのために重要である一方、他のセグメントが欠落してもある程度耐えうるといふ階層が存在している可能性がある。

【0130】

PB2 vRNAを欠くとVLP生産が約30倍減少する結果となり、一方、他のvRNAセグメントを欠いても1.4~5.1倍しか減少しないという結果となった。これらの結果は、他のvRNAセグメントの取り込みにおける個々のvRNAの重要性に関しvRNAセグメント間において階層があるというさらなる証拠となった。

【0131】

50

実施例 2

複製不能なインフルエンザウイルスで外来遺伝子が安定的に発現すると、遺伝子操作ウイルスを効果的に追跡できる。ウイルス学の分野で幅広く応用できる生体含有可能外来遺伝子発現ウイルスを目的として、PB2タンパク質、ウイルス複製に必須な三量体ウイルスRNA依存性のRNAポリメラーゼの一部を形成するインフルエンザウイルスポリメラーゼサブユニットを選択した。PB2ウイルスRNA (vRNA) の3'および5'末端の部分コード配列は、vRNAの階層において他のvRNAよりも、効率的な感染性ピリオン生成における重要な役割を与えるものである(実施例1およびMuramotoら、2006)。この知見により、PB2 vRNAのコードおよび非コード配列にフランキングされたレポーター遺伝子を有するPB2ノックアウト(PB2-KO)インフルエンザウイルスが、安定して、レポーター遺伝子を発現しつつPB2発現細胞のみにおいて複製することが示される。

10

【0132】

安定的にPB2タンパク質を発現する細胞株を確立し、これを使用してGFP遺伝子を有するPB2-KOウイルスの特性評価をおこなった。また、PB2-KOウイルスに收容される種々のウイルス株由来のHAおよびNA遺伝子並びに他のレポーター遺伝子の能力についても調べた。さらに、このPB2-KOウイルスを、2009年のパンデミックウイルスに対する中和抗体をスクリーニングするためのプラットフォームとして用いた。

【0133】

方法

20

細胞

293Tヒト胚腎臓細胞(シミアンウイルス40T抗原遺伝子を挿入した293株の派生株(Dubridgeら、1987))を、10%ウシ胎児(Invitrogen)含有ダルベッコ改変イーグル培地(Lonza)内で保持した。メイディン・ダービーイヌ腎臓(MDCK)細胞を、5%新生仔ウシ血清(NCS; Sigma, St. Louis, MO)含有最小必須培地(MEM; Invitrogen)内で保持した。MDCK細胞由来でかつヒト2,6-シアル酸転移酵素のcDNAで形質移入したAX4細胞(Hatakeyamaら、2005)を、5%NCS/MEM+ピューロマイシン(2µg/mL)内で保持した。レトロウイルスベクターで形質導入することにより確立したAX4/PB2細胞(PB2タンパク質を安定して発現するA/PuertoRico/8/34由来のAX4細胞(H1N1, PR8)(結果の欄を参照)を、5%NCS/MEM+ピューロマイシン(2µg/mL)+ブラストサイジン(10µg/mL)内で保持した。全ての細胞を、37°C、5%CO₂で保持した。

30

【0134】

逆遺伝学的手法およびウイルス増殖

ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターおよびマウスRNAポリメラーゼIターミネーターとの間にPR8ウイルス遺伝子のcDNAを含有するプラスミド(PolIプラスミドと呼ぶ)及び、真核生物タンパク質発現プラスミド(NP、PA、PB1、およびPB2)を用い、Neumannら(1999)に記載のようなニワトリ-アクチンプロモーター(Niwaら、1991)の制御下で逆遺伝学的手法を行った。簡潔に言うと、野生型PR8ウイルスを、あらかじめ作製した8のPR8由来野生型構築物(Horimotoら、2007)を用いて遺伝子操作し、一方、PB2-KO変異体を、pPolIPB2(120)GFP(120)(図3A)(Muramotoら、2006)および残りの7つのセグメントのPolIプラスミドから構成した。このpPolIPB2(120)GFP(120)プラスミドは、A/WSN/33(H1N1, WSN)由来3'PB2非コード領域、vRNAの3'末端のPB2コード配列に対応する120ヌクレオチド、それに続いて、GFPコード配列、vRNAの5'末端のPB2コード配列に対応する120ヌクレオチド、そして最後に、5'PB2非コード領域、を含む(Muramotoら、2006)。同様に、pPolIPB2(120)Fluc(120)およびpPolIPB2(120)Rluc(120)を構築し、それぞれ、ホタルルシフェラー

40

50

ゼ (Fluc) またはウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) 遺伝子を有する PB2-KO ウイルスを作製した。8 の PolI プラスミドおよびタンパク質発現プラスミドを、形質移入試薬 TransIT-293 (Mirus) と混合し室温で 15 分間インキュベートして、Opti-MEM1 (Invitrogen) で培養した 10^6 の 293T 細胞に加えた。形質移入から 48 時間後、野生型 PR8 または PB2-KO ウイルスを含む上清を採取し、それぞれ、10 日齢の孵化鶏卵または AX4 / PB2 細胞内で増殖させた。また、野生型 CA04 も、Yamada ら (2010) に記載のような逆遺伝学的手法を用いて生成し、MDC K 細胞内で増殖させた。これらの増殖ウイルスを、MDC K 細胞におけるブランクアッセイを用いて滴定しウイルスのブランク形成単位 (PFU) を決定した。

10

【0135】

PB2 タンパク質の免疫蛍光染色

35 mm のガラスボトムディッシュ (旭テクノグラス社) に播種したコンフルエントな AX4 および AX4 / PB2 細胞を、4% パラホルムアルデヒド (和光純薬株式会社) を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で固定し、0.1% Triton X-100 で透過処理した。細胞を抗 PB2 抗体クローン 18/1 (Hattara, 2000) と共にインキュベートし、さらに Alexa Fluor 594-標識抗マウス二次抗体 (Invitrogen) と共に Hoechst 33342 (Invitrogen) 内でインキュベートした。サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META; Carl Zeiss) 下で観察した。

20

【0136】

逆転写 PCR (RT-PCR)

AX4 / PB2 細胞における PB2 mRNA を検出するために、全 RNA を RNeasy RNA 抽出キット (Qiagen Sciences) を用いて抽出した。ウイルス RNA を、QIAmp ウイルス RNA ミニキット (Qiagen Sciences) を用いてビリオンから単離した。逆転写および cDNA 合成を、オリゴ (dT) プライマーおよび SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて行った。RT マイナスサンプルを陰性対照として調製した。合成された cDNA を、Phusion PCR ポリメラーゼ (Finnzymes) および PB2 特異的プライマーを用いた PCR により増幅した。プライマー配列は次の通りである: フォワードプライマー、ATGGAAAGAAATAAAGA ACTACGA (配列番号 9)、及びリバースプライマー GCCACAATTATTGCTTCGGC (配列番号 16)。

30

【0137】

成長速度およびウイルス力価測定

ウイルスの増殖率を決定するために、コンフルエントな AX4 または AX4 / PB2 細胞の 3 連ウェルを 0.001 の感染多重度 (MOI) で感染させた。ウイルス吸着の 1 時間後に、細胞を 0.3% BSA 含有する MEM 中で洗浄し、L-(トシルアミド-2-フェニル)エチルクロロメチルケトン (TPCK) で処理したトリプシン ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を含有する MEM で重層した。上清を 3 日間 12 時間ごとに回収し、AX4 / PB2 細胞におけるブランクアッセイで感染性ウイルスについてアッセイした。

40

【0138】

免疫染色

GFP レポーター遺伝子の PB2-KO ウイルス内への取り込みの安定性を評価するために、AX4 / PB2 細胞を様々な PB2-KO ウイルス希釈液に感染させた (希釈なし ~ 10^{-10})。細胞変性効果 (CPE) が観察された 2 番目 ~ 最後のウェルより上清を採取し、その後の感染用に希釈した。ウイルス継代 5 ラウンドからの上清について、標準的なウイルスブランクアッセイを行った。形成されたブランク数を計数した後、寒天を除去し、ブランクを含むウェルを 100% メタノールで 30 分間固定した。その後ウェルを PBS で洗浄し、モノクローナル抗 GFP 抗体 (clone GFP-20; Sigma-Aldrich) と共に 1 時間室温でインキュベートした。免疫組織化学的染色を、Ve

50

ctastain Elite ABCキットの説明書 (Vector Laboratories) に従い、ビオチン化抗マウス抗体を用いて行った。GFP陽性ブランクを、Sigma Fast 3, 3' - ジアミノベンジジン錠剤 (Sigma) を用いて可視化し、GFP陽性ブランクの数を、各ウェルに形成されたブランク総数に対する割合として計算した。

【0139】

HAタンパク質の免疫蛍光染色

PR8、WSN、A/California/04/09 (CA04)、またはA/Vietnam/1203/04 (VN1203) 由来のHAおよびNA vRNAを保有しGFPをコードするPB2-KOウイルスを、上述したような逆遺伝学的手法を用いて生成し、AX4/PB2細胞内で増殖させた。VN1203 HA開裂部位における複数の塩基性アミノ酸残基を、非病原性型の開裂配列で置換した。コンフルエントなAX4/PB2細胞を、0.2~1のMOIでこれらのウイルスに感染させた。感染から16時間後に、細胞をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100で透過処理した。次いで、細胞を、抗WSN HA抗体 (WS 3-54)、抗CA04 HA抗体 (IT-096; eENZ YME)、および抗H5 HA抗体 (VN04-10; Rockland Immunochemicals Inc.) と共にインキュベートし;その後さらにAlexa Fluor 594 標識抗マウス二次抗体とともにインキュベートした。サンプルを蛍光顕微鏡下で観察した。

【0140】

ルシフェラーゼアッセイ

FlucまたはRluc遺伝子をコードするPB2-KOウイルスに感染した細胞を、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用い、その説明書に従い、感染から8時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。FlucおよびRluc活性を、Infinite M1000 (Tecan) プレートリーダーを用いて測定した。

【0141】

微量中和アッセイ

血清は、 10^6 PFUの野生型CA04に感染後3週間の2匹のフェレットおよび2匹の非感染フェレットから回収した。受容体破壊酵素 (デンカ生研株式会社) の2倍希釈系列で処理したフェレットの血清を、100 PFUの野生型CA04またはCA04由来のHAおよびNA vRNAを有しRlucをコードするPB2-KOウイルス (CA04/PB2-Rluc) に混合した。37°Cで1時間インキュベートした後、野生型AX4またはAX4/PB2細胞は、3連ウェル中でそれぞれ野生型ウイルス血清混合物またはPB2-KOウイルス血清混合物を接種し、野生型ウイルスまたはPB2-KOウイルスについてそれぞれ3日間または24時間インキュベートした。フェレット血清の中和活性を、野生型ウイルスまたはPB2-KOウイルスのそれぞれについて、顕微鏡で観察したCPE又はウミシイタケルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を用いて測定したRluc活性に基づき決定した。

【0142】

結果

PR8/PB2-GFPウイルスの特性評価

安定的にPB2タンパク質を発現する細胞系を確立するために、野生型MDC K細胞と比較して臨床的インフルエンザ単離物をより良好に複製できるメイディン・ダービーヌ腎臓 (MDC K) 細胞由来でかつヒト2, 6 - シアル酸転移酵素を過剰発現するAX4細胞 (Hatakeyamaら、2005) を、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1、PR8) PB2タンパク質のcDNA、続いて脳心筋炎ウイルス由来の内部リボソーム侵入部位配列、およびプラストサイジン耐性遺伝子を有するレトロウイルスベクターで形質導入した。プラストサイジン耐性細胞クローンをAX4/PB2と命名した。AX4/PB2細胞におけるPB2タンパク質のmRNAの発現を確認するために、全R

10

20

30

40

50

NAをAX4/PB2および野生型AX4細胞から抽出し、PB2特異的プライマーを用いたRT-PCRを行った。AX4/PB2細胞ではPB2 mRNAが検出されたが、野生型AX4細胞では検出されなかった(図3B)。さらにAX4/PB2細胞におけるPB2タンパク質の発現を検証するために、AX4/PB2細胞の免疫蛍光染色をPB2特異的モノクローナル抗体を用いて行った。AX4/PB2細胞およびいくつかのPB2タンパク質発現プラスミドで形質移入されたAX4細胞(陽性対照として使用)では蛍光シグナルが検出されたが、野生型AX4細胞ではシグナルが検出されなかった(図3C)。これらの結果により、AX4/PB2細胞がPB2タンパク質を安定的に発現していることが示される。

【0143】

PB2発現細胞がPB2-KOウイルス複製をサポートしているのか否かを調べるために、PR8/PB2-GFPと呼ばれる、PB2(120)GFP(120)vRNAを有するPR8ベースのPB2-KOウイルス(図3A)を作製し(表1)、AX4/PB2および野生型AX4細胞に感染させた(図3D)。野生型AX4細胞では感染性ウイルスが検出されなかったが、AX4/PB2細胞では野生型PR8に匹敵するPR8/PB2-GFPウイルスの複製がみられた(図3D)。これらの結果により、PB2-KOウイルスの複製はPB2を発現する細胞に限定的であることが示される。

【0144】

【表 1】

| ウイルス | 由来 | | | その他の遺伝子 |
|----------------|---------------------|--------|--------------------|---------|
| | HA遺伝子 | NA遺伝子 | PB2遺伝子 | |
| 野生型PR8 | PR8* | PR8 | PR8 | |
| PR8/PB2-GFP | PR8 | PR8 | PB2(120)GFP(120)† | |
| PR8ΔPB2 | PR8 | PR8 | — [†] | |
| WSN/PB2-GFP | WSN [†] | WSN | PB2(120)GFP(120) | |
| CA04/PB2-GFP | CA04* | CA04 | PB2(120)GFP(120) | PR8 |
| VN1203/PB2-GFP | VN1203 [§] | VN1203 | PB2(120)GFP(120) | |
| PR8/PB2-Rluc | PR8 | PR8 | PB2(120)Rluc(120)† | |
| PR8/PB2-Fluc | PR8 | PR8 | PB2(120)Fluc(120)† | |
| CA04/PB2-Rluc | CA04 | CA04 | PB2(120)Rluc(120) | |

* PR8 : A/Puerto Rico/8/34(H1N1)

† WSN : A/WSN/33(H1N1)

‡ CA04 : A/California/04/09(H1N1)

§ VN1203 : A/Vietnam/1203/04(H5N1)

HA開裂部位(RERRKRR↓G)中の複数の塩基性アミノ酸残基を、非病原性型の開裂配列(RETR↓G)で置換した。

†† PB2(120)GFP(120)、PB2(120)Rluc(120)、およびPB2(120)Fluc(120)。GFP、ホタルルシフェラーゼ、およびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が、それぞれPB2遺伝子の3' および5' 非コード配列ならびに3' および5' コード配列の120塩基にフランキングされている。

††† —、該当せず

10

20

30

40

【 0 1 4 5 】

PB2-KOウイルスにおけるレポーター遺伝子の安定性を、AX4/PB2細胞におけるPR8/PB2-GFPウイルスの連続継代により確認した。形成された総ブランク

50

に対する GFP 発現 プラークを計算し、GFP レポーター 遺伝子を発現する プラーク 形成 ウイルスの割合を決定したところ (表 2)、5 継代にわたり、80% ~ 90% の プラーク 形成 ウイルスが GFP を発現した。PB2 - KO ウイルスは、AX4 / PB2 細胞で 5 連続 継代した 後であっても、野生型 細胞において プラークを形成 できなかった。このこと により、PB2 - KO ウイルスは、PB2 - GFP vRNA および 細胞により発現された PB2 mRNA 間での 組み換えによる複製 可能な遺伝子型への 復帰が起こりにくい ことが示唆される。7 つの vRNA セグメントを有する PB2 遺伝子欠損 ウイルス (PR8 PB2、表 1) を救出する 試みを行ったが、PR8 PB2 形質移入後の 上清を接種した AX4 / PB2 または野生型 AX4 細胞において、細胞 変性効果 (CPE) および NP タンパク質発現の いずれも見られなかつ た (データは図示せず)。これらの結果により、感 染性ピリオンの効率的な 生成には、PB2 vRNA が重要であること (Muramoto ら、2006) が強調される。

【0146】

【表 2】

PB2-KO ウイルスの遺伝的安定性

| | 次の各継代中のウイルス由来の GFP 陽性 プラーク* の割合 | | | | |
|------|---------------------------------|------|------|------|------|
| | 継代 1 | 継代 2 | 継代 3 | 継代 4 | 継代 5 |
| 実験 1 | 100% | 90% | 90% | 100% | 80% |
| 実験 2 | 100% | 100% | 90% | 100% | 90% |
| 実験 3 | 100% | 90% | 90% | 100% | 90% |

【0147】

* それぞれのウイルス上清について、コンフルエントな AX4 / PB2 細胞中で標準的な ウイルスプラークアッセイを行った。ウェル当たり 10 プラークをマークして、その後、 抗 GFP 抗体を用いた免疫検出アッセイを行い GFP を発現する ウイルスプラークを検出 した。全プラーク中で茶色に染色された プラークの割合を示す。3 つの独立した実験 (実 験 1 ~ 3) の結果を示す。

【0148】

PB2 - KO ウイルスにおける異なる HA および NA 遺伝子の機能的発現

A 型インフルエンザピリオンの 2 つの表面糖タンパク質、赤血球凝集素 (HA) およ びノイラミニダーゼ (NA) が主要な防御抗原である (Wright ら、2007)。特 に、HA は細胞接着を仲介するので、HA に対する抗体がウイルス中和に重要である。P R8 ウイルスベースの PB2 - KO ウイルスの関連糖タンパク質が、他のウイルス株由来 ものに置換可能か否かについて検査した。この目的のために、PR8 HA および NA vRNA を実験 H1N1 株 A / WSN / 33 (WSN / PB2 - GFP)、2009 パン デミック (H1N1) 株 A / California / 04 / 2009 (CA04 / PB2 - GFP)、又は高病原性 H5N1 株 A / Vietnam / 1203 / 2004 (VN1 203 / PB2 - GFP) 由来のものに置換して GFP をコードする PB2 - KO ウィ ルスを作製した (表 1)。AX4 / PB2 細胞を、これらのウイルスに感染させ、種々の抗 HA モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光アッセイを行った。GFP 陽性のウイルス感染 細胞において、ウイルス株特異的 HA の発現を検出した (図 4)。対応する NA vRNA がピリオンに取り込まれたことを配列決定により確認した (データは図示せず)。これ らの結果により、他のインフルエンザウイルスの HA および NA 遺伝子もまた PB2 - K O ウィルス内に収容することができ、従って、ウイルス感染細胞において発現できるこ とが示される。

【0149】

PB2 - KO ウィルスにおける代替レポーター 遺伝子の発現

ルシフェラーゼレポーター 遺伝子の活性は、容易に定量可能であり、従って、それを P

10

20

30

40

50

B2-KOウイルスに組み込めばルシフェラーゼ活性に基づくウイルス複製の測定が可能
 ならずである。この可能性を調べるために、PB2 vRNAの中のホタル (PR8/PB2-Fluc)
) またはウミシイタケ (PR8/PB2-Rluc) ルシフェラーゼ遺伝子のいずれかを有するPB2-KO
 ウイルスを生成した (表1)。AX4/PB2および野生型AX4細胞を、種々な感染多重度 (MOI)
 でこれらのウイルスに感染させ、感染から8時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。
 ウイルスに感染したAX4/PB2細胞では、FlucおよびRluc活性が用量依存的に検出され、
 それぞれ0.1および0.001のMOIでのウイルス感染だと、有意なFlucとのRluc活性の検出に
 適切であった (図5A)。対照的に、ウイルス感染細胞において有意なGFPの強度を検出
 するには、1以上のMOIでPR8/PB2-GFPを感染させる必要があった (図5B) 10
 。これらの結果により、Fluc及びRluc遺伝子がPB2-KOウイルス内に収容可能で、
 そしてGFP遺伝子の場合よりもより定量的なウイルス複製の指標となることが示
 される。PR8/PB2-FlucおよびPR8/PB2-Rlucに感染した野生型AX4細胞もまた、
 それぞれ、検出可能なFlucおよびRluc活性を示し、それぞれPR8/PB2-Flucでは1
 を上回るMOI、PR8/PB2-Rlucでは0.01のMOIであったが、両レポーター遺伝子の
 活性はAX4/PB2細胞において検出されたものに比べて10分の1より低かった (図5A)。
 PB2タンパク質は、野生型AX4細胞にトランスで供されないため、これらのレポーター
 遺伝子が発現する場合は、導入ウイルス由来のウイルスリボ核タンパク質 (すなわち
 PB2、PB1、PA、及びNP) が、野生型AX4細胞において有意に高いレベルでPB2-
 KOウイルスのPB2 vRNAの転写を仲介していることが示唆される。 20

【0150】

PB2-KOウイルスに基づく微量中和

レポーター遺伝子を発現する生体含有可能インフルエンザウイルスは、プレートリー
 ーアッセイによって成長を定量できるので、従来のウイルス複製評価システムの一部を
 代替できる可能性がある。抗血清の中和活性は、典型的には、従来の微量中和アッセイ
 を用いて決定される (Itohら、2009; Kobasaraら、2004)。これは、酵素結合免疫吸
 着アッセイを用いた検出によるウイルス感染誘発性CPE又はウイルス抗原の有無に基
 づいて中和抗体の検出を可能にするものである。PB2-KOウイルスを使用して 30
 2009パンデミックウイルスに対する中和抗体を検出するために、Rluc遺伝子をコード
 するPB2 vRNAおよびA/California/04/2009由来のHAおよびNA vRNAを有するPB2-
 KOウイルスを生成した (CA04/PB2-Rluc)。CA04/PB2-Rluc (100PFU) をCA04に感
 染したフェレットから回収した抗血清の連続希釈液と混合し、37で1時間インキュベ
 ートした。非感染フェレットからの血清をネガティブコントロールとした。ウイルス血
 清混合物をAX4/PB2細胞に接種した。感染から24時間後、細胞内のRluc活性をウ
 ミシイタケルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を用いて測定した。検出感
 度を比較するために、CPEに基づく従来の微量中和アッセイを使用して、野生型CA04
 および野生型AX4細胞を用いて同一の抗血清についての中和活性を検査した。PB2-
 KOウイルスに基づくアッセイでは、1:1280および1:640倍に希釈したフェレットの
 血清がウイルス感染細胞内のRluc活性の有意な減少を引き起こした (図6)。対照
 的に、従来の微量中和アッセイにおいて決定された同一のフェレット血清の中和力価
 は、160及び80であった (データは図示せず)。これらの結果により、PB2-KOウ
 イルスおよびPB2発現細胞の組み合わせにより、従来の微量中和アッセイよりも感
 度が高い中和抗体の検出方法が提供できることが示される。 40

【0151】

考察

ここで、PB2-KOインフルエンザウイルスは、野生型細胞において複製不能である
 が、PB2タンパク質発現細胞においては複数の複製サイクルを行い得ることが示され
 ている (図3D)。加えて、PB2 vRNAパッケージングシグナルによりフランキング 50

されたレポーター遺伝子は、安定して子孫ウイルス中に維持され（表1）、ウイルス感染細胞において発現された（図4および5）。また、異なるウイルス株由来のHAおよびNA遺伝子もPB2-KOウイルスに収容されたことを確認した（図4）。これらの結果は、PB2-KOウイルスは、インフルエンザウイルス学の分野において幅広く使用できる可能性があることを示している。

【0152】

実用的な応用例として、PB2-KOウイルスに基づく微量中和アッセイを開発し2009年パンデミックウイルスに対する中和抗体を検出するのに使用した（図6）。このPB2-KOウイルスに基づくアッセイは、中和抗体の検出という点で従来の微量中和アッセイよりも高感度であることが判明した。スクリーニングのプラットフォームとして複製不能PB2-KOウイルスを使用すると（図3Cおよび3D）、H5N1および1918株といった通常BSL3施設やバイオセーフティーレベル2下の封じ込めをして取り扱わなくてはならない高病原性ウイルスに対する中和抗体の検出が可能になる。ただし、生物学上の安全性を保つ追加手段（例えば、HA開裂部位のアミノ酸配列の改変等）は必要であろう。Kongら（2006）は、先に、インフルエンザHA偽型レンチウイルスに基づく中和抗体スクリーニングシステムを開発したが、これもバイオセーフティーレベル3の物質に対する中和抗体の検出を可能にするものである。しかしながら、これらのレンチウイルスは、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを発現しないので、これはHAと共に中和抗体を誘導する可能性がある（Nayakら、2010）。従って、PB2-KOウイルスに基づくアッセイは、より正確に中和抗体の力価を反映すべきである。また、レポーター遺伝子をコードするインフルエンザvRNAを安定的に発現する細胞でも中和抗体の高感度検出が可能であることが示されたが（Hossainら、2010；Liraら、2009）、これらの組換え細胞に基づくアッセイには感染性ウイルスが必要である。

【0153】

PB2-KOウイルスについてその他の可能性のある応用例としては、新型インフルエンザワクチンとしての使用があり、我々はこれを次の理由で実現可能であると考えている。第一に、PB2-KOウイルスはAX4/PB2細胞系において高い力価（ $> 10^8$ PFU/mL）になる（図3D）ことがある。第二に、HAおよびNAタンパク質を発現することができるという事実（図4）により、PB2-KOウイルスは、所望の抗原をコードするようにカスタマイズ可能だと示されていることがある。第三に、PB2-KOウイルス感染細胞（図5A）で起こるvRNAの転写により、二本鎖RNAを生産することで細胞の先天性免疫を刺激できるということがある。そして、第四に、PB2 vRNAに挿入された外来遺伝子が安定的に維持されるので（表2）、追加的な抗原の担体として機能し、安全な多価ワクチンとしてPB2-KOの操作ができる可能性があることがある。

【0154】

今日までに、特定のウイルスタンパク質を欠くいくつかの組換えインフルエンザウイルスは、欠損タンパク質がトランスで提供されれば細胞培養において野生型ウイルスと同等に複製することが示されている。M2を欠くインフルエンザウイルスは、M2を発現する細胞内で効率的に複製し、弱毒化生ワクチンとしての可能性があることを示した（Watanabeら、2009）。そのM2対応物を超えるPB2-KOウイルスの明確な利点として、PB2-KOウイルスは、正常細胞で複製不能なので、つまり安全だということがある。また、M2タンパク質コード領域内にコードされる外来遺伝子が、子孫ウイルスに取り込まれウイルス感染細胞内で発現できるか否かは未だ不明なことがある。

【0155】

Martinez-Sobridoら（2010）は、HA vRNAのパッケージングシグナルにフランキングされたGFP遺伝子を有するインフルエンザウイルスを用いて中和抗体の迅速な検出のために改良されたスクリーニングアッセイを開発した。このHA-KOウイルスはHAタンパク質を発現した細胞のみで複数の複製サイクルを行ったが、このHA-KOウイルスにおけるレポーター遺伝子の安定性は該研究では検査されなかつ

10

20

30

40

50

た。実際、7のvRNAセグメントを有するHA vRNA欠損ウイルスは、PB2 vRNAを欠損するPR8APB2ウイルスとは対照的に(上記参照)、HAを発現するMDCK細胞において複数の複製ラウンドを行ったので(データは図示せず)、このことより、HA-KOウイルスにおけるレポーター遺伝子をコードするHA vRNAはHA発現細胞における複製の間に簡単に消失する可能性が示唆される。また、自己のNA vRNA中にGFP遺伝子を有する複製可能ウイルスも、中和抗体を検出するのに使用される(Rimmelzwaanら、2011)。トランスで細菌性シアリダーゼがあると、このNA-KOウイルスの複製における制限が改善され妥当なウイルス力価の回復が可能であったが、しかしながら、NA-KOウイルスのレポーター遺伝子の安定性は不明なままである。

10

【0156】

より最近では、GFP遺伝子を有する複製可能インフルエンザウイルスは、組換えNS(Manicassamyら、2010)またはNA(Liら、2010)遺伝子を用いて生成されている。これらのウイルスは研究ツールとしての可能性を有するが、それらには複製能があるので生物学的安全性の問題があるが、一方PB2-KOウイルスではその心配がない。まとめて言うと、本研究で生産したPB2-KOウイルスは安定的に外来遺伝子を発現するが複製不能であるという事実により、PB2-KOウイルスが信頼性と生物学的安全性の面で理想的である。

【0157】

結論として、ウイルスPB2遺伝子をレポーター遺伝子に置換することにより、外来遺伝子を発現する生体含有可能インフルエンザウイルスを作製した。ウイルスの複製は、トランスでPB2タンパク質を発現する細胞に限られていた。レポーター遺伝子は、安定的にPB2発現細胞中での複製の間に子孫ウイルスに継承された。種々のHA、NA、およびレポーター遺伝子を、PB2-KOウイルス内に収容した。そのため、このウイルスは、インフルエンザウイルスの基礎及び応用研究のための多数の用途において有望であることが示される。

20

【0158】

実施例3

インフルエンザウイルスのPB2タンパク質は、三量体ウイルスRNA依存性のRNAポリメラーゼサブユニットの必須成分である。PB2は、宿主の抗ウイルス免疫経路の調節、従って、毒性に関与し、そして他の個々のvRNAセグメントの取り込みにおいて主要な役割を果たしている(Muramotoら、2006)。実施例2では、PB2ウイルスRNA(vRNA)のコード領域内に緑色蛍光タンパク質(GFP)などのレポーター遺伝子を有するPB2-ノックアウト(PB2-KO)インフルエンザウイルスを説明する。PB2-KOウイルスの複製は、安定してPB2タンパク質を発現する細胞系のみ限定され、そこでは 10^8 PFU/mL超の高い力価となる。また、レポーター遺伝子をコードするPB2 vRNAは複製の間に、安定的に子孫ビリオンに取り込まれ、連続的継代を通じ維持された。また、任意のインフルエンザウイルスのHAおよびNA vRNAをPB2-KOウイルスに収容でき、ウイルス感染細胞内で発現できた。したがって、主なインフルエンザ抗原であるHAおよびNAの所望の組み合わせをコードするようにPB2-KOウイルスを仕立てることができ、よって、PB2-KOウイルスを、多価ワクチンプラットフォームとして使用できることが示唆される。ここで、我々は、マウスを免疫化し、マウスにおける抗体応答および防御効力を調べることにより、PB2-KOウイルスのワクチンとしての可能性を調べた。

30

40

【0159】

材料と方法細胞

293および293T(シミアンウイルス40T抗原遺伝子を挿入した293株の派生株(Dubridgeら、1987))ヒト胚腎臓細胞を、10%ウシ胎児(Invitrogen、Carlsbad、CA)含有ダルベッコ改変イーグル培地(Lonza、

50

Basel, Switzerland) 内で保持した。メイディン・ダービーイヌ腎臓 (MDCK) 細胞を、5% 新生仔ウシ血清 (NCS) (Sigma, St. Louis, MO) 含有最小必須培地 (MEM) (Invitrogen) 内で保持した。インフルエンザウイルスに対するヒト型レセプターの発現が増強された MDCK 細胞由来株であり、ヒト - 2, 6 - シアル酸転移酵素を発現するプラスミドで安定的に形質移入することにより作製した AX4 細胞 (Hatakeyama ら、2005) を、ピューロマイシン (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 含有 5% NCS-MEM 内で保持した。レトロウイルスベクターで形質導入することにより確立した AX4/PB2 細胞 (A/Puerto Rico/8/34 由来で PB2 タンパク質を安定的に発現する AX4 細胞 [H1N1, PR8]) (Ozawa ら、2011) を、ピューロマイシン (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびブラストサイジン (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含有する 5% NCS-MEM 内で保持した。全ての細胞を、37°C、5% CO₂ の加湿インキュベーター内で保持した。

【0160】

プラスミドによる逆遺伝学的手法

前述の通り (Neumann ら、1999)、本研究において使用した野生型 PR8 および PB2-KO ウイルスを、逆遺伝学的手法を用いて操作した。ウイルス RNA (vRNA) を発現するために、プラスミドは、ヒト RNA ポリメラーゼ I プロモーターおよびマウス RNA ポリメラーゼ I ターミネーターの間に PR8 遺伝子のクローン cDNA を含む (PolI プラスミドと呼ぶ)。PB2 セグメントコードする PolI プラスミドを置換し、A/WSN/33 (H1N1) 由来 3' PB2 非コード領域、vRNA の 3' 末端の PB2 コード配列に対応する 120 ヌクレオチド、それに続いて、GFP コード配列、vRNA の 5' 末端の PB2 コード配列に対応する 120 ヌクレオチド、そして最後に、5' PB2 非コード領域、を含むプラスミド [pPolIPB2 (120) GFP (120)] を構築した (Muramoto ら、2006)。PB2-KO ウイルスを作製するために、TransIT293 形質移入試薬 (Mirus, Madison, WI) を用いて、その説明書に従い、pPolIPB2 (120) GFP (120) および残りの 7 PolI プラスミドを、A/WSN/33 由来の PB2、PB1、PA、および NP の真核生物タンパク質発現プラスミドと共に、293T 細胞へ同時形質移入した。形質移入から 48 時間後、PR8 または PB2-KO ウイルスを含む上清を採取し、それぞれ、10 日齢の孵化鶏卵または AX4/PB2 細胞内に接種した。両ウイルスを、AX4/PB2 細胞におけるブランクアッセイを用いて滴定した。

【0161】

ホルマリン不活化ウイルスの調製

卵で増殖させた PR8 ウイルスを濃縮し、感染尿膜液を用いた 10% ~ 50% ショ糖密度勾配による超遠心分離で精製し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に再懸濁した。精製 PR8 ウイルスにホルマリン (最終濃度 0.1%) を加え、4°C で 1 週間不活化させた。ウイルスの不活化は、MDCK 細胞で 2 回ウイルスを継代し、細胞変性効果またはその欠如を調べることによって確認した。

【0162】

PB2-KO ウイルスによるマウスの感染実験

マウスにおける PB2-KO ウイルスの安全性を検査するために、6 匹の 4 週齢の雌 BALB/c マウスに 1 匹当たり 10⁶ PFU のウイルスを経鼻接種した。感染マウスの体重および生存率を接種後 14 日間毎日モニターした。また、接種後 1 日目、3 日目、および 6 日目に、接種マウスから肺および鼻甲介を採取、均質化し、ブランクアッセイを行いウイルスの存在を検出した。

【0163】

免疫および防御についての検査

8、6、又は 4 週齢の雌 BALB/c マウス (各群 3 匹のマウス) をイソフルランで麻酔し、50 μl の培地 (0.3% ウシ血清アルブミン分画 V を含む MEM)、ホルマリンで不活化した PR8 (64 ヘマグルチニン単位、10⁶ PFU の PB2-KO ウイルスに

10

20

30

40

50

相当)、またはPB2-KOウイルス(10^6 PFU)を、2週間に1回、2回、または3回の間隔で、それぞれ経鼻接種した。最後の接種から3週間後、マウスに対し50%マウス致死量(MLD₅₀)の0.5又は5倍のPR8ウイルスで経鼻的にチャレンジした。感染後3日目および6日目に、マウス(各群3匹のマウス)の肺および鼻甲介を採取し、Tissue Lyser II(Qiagen, Valencia, CA)を用いて1mlのPBS中で均質化し、低速遠心分離(4で10分間、5,000rpm)により清澄化した。ホモジネート中のウイルス力価はAX4/PB2細胞を用いたブランクアッセイにより決定した。残りのチャレンジ後のマウス(各群3匹のマウス)の体重と生存率を14日間毎日モニターした。

【0164】

ウイルス特異的抗体の検出

マウス(各群3匹のマウス)の血清を、それぞれの接種前は下顎静脈出血より、そしてチャレンジ1日前は大腿動脈より得た。また、鼻洗浄および気管支肺胞洗浄(BAL)液のサンプルもチャレンジ1日前に頸椎脱臼により屠殺したマウスから(各群3匹のマウス)得た。切開部を設け、気管にカニューレを挿入した。肺は、シリンジを用いて1mlのPBSで灌流した。洗浄液を回収し、マイクロチューブに入れ氷上で保存した。鼻洗浄液は、400 μ lのPBSを鼻腔に通過させることにより回収した。血清、鼻洗浄液、およびBAL液サンプル中のIgGおよびIgA抗体を、先述の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)(Kidaら、1982)を用いて検出した。各ウェルを0.5%Triton X-100および0.6M KClを含有する0.05M Tris-HCl(pH7.8)で破碎した精製PR8で覆った。検査サンプルを載せたウイルス被覆プレートをインキュベーションした後、サンプル中のIgAおよびIgG抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を結合したヤギ抗マウスIgAまたはIgG抗体を用いて検出した。また、免疫マウスの血清における中和抗体の力価を先述のように(Iwatsuki-Horimotoら、2011)評価した。簡潔に言うと、ウイルス(50%組織培養感染量[TCID₅₀])の100倍)をレセプター破壊酵素で処理した血清の2倍連続希釈液とともに33で30分間インキュベートし、その混合物を96ウェルマイクロプレートに載せたコンフルエントなMDC K細胞に添加して中和活性を決定した。

【0165】

GFPに対する抗体検出のためのIFA

35mmのガラスボトムディッシュ(旭テクノグラス社)中で増殖させた293細胞をGFP発現プラスミドで形質移入し、免疫蛍光アッセイ(IFA)前48時間インキュベートした。細胞を、4%パラホルムアルデヒド(和光純薬株式会社)を含むPBS中で15分間固定し、0.1%Triton X-100で5分間透過処理した。これらを、培地、ホルマリンで不活化したPR8、またはPB2-KOウイルスウイルスで免疫したモックマウスから採取した血清の20倍希釈液と共に1時間インキュベートした。抗GFP抗体(clone GFP-20, Sigma-Aldrich)で処理した細胞を、陽性対照として用いた。その後、全細胞を、Alexa Fluor 594標識ヤギ抗マウス二次抗体(Invitrogen)およびHoechst 33342(Invitrogen)と共に更に1時間インキュベートしそれぞれGFP抗体および核染色の検出用とした。サンプルは、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510META; Carl Zeiss, Jena, Germany)で観察した。

【0166】

結果

マウスにおけるPB2-KOウイルスの特性評価

PB2-KOウイルスはAX4細胞において複製不能であったが、AX4/PB2細胞におけるPR8と同様の高い力価が得られた。PB2-KOウイルスがインフルエンザウイルスとして機能できるか否かを判断するために、その安全性のプロファイルを、PB2

10

20

30

40

50

- K Oウイルスを経鼻接種したマウス (1 匹当たり 5 0 μ L 中 1 0⁶ P F U) の体重を 2 週間モニターして評価した。マウスは安定した成長に伴い着実に体重増加し、P B 2 - K Oウイルス感染による影響は見られなかった (データは図示せず) 。接種後 1 日目、3 日目、および 6 日目に得た肺および鼻甲介を、均質化し A X 4 / P B 2 細胞中でのブランクアッセイを行って、マウスにおける P B 2 - K Oウイルスの増殖を評価した。P B 2 - K Oウイルスに感染したマウスの器官ではブランクは検出されなかったが、1 0⁶ P F U の P R 8 ウイルスに感染したマウスの肺組織では高いウイルス力価 (1 0⁸ P F U / g) がみられた。これらの結果は、マウスで P B 2 - K Oウイルスが増殖しなかったこと、および複製能力のあるウイルスへの復帰が起こらなかったことを示している。

【 0 1 6 7 】

P B 2 - K Oウイルスを接種したマウスにおけるウイルス特異的抗体応答

P B 2 - K Oウイルスにより誘発される抗体応答のレベルを、2 週間に 1 回、2 回、または 3 回の間隔で P B 2 - K Oウイルスを経鼻接種したマウスにおいて調べた。比較として、培地または 1 0⁶ P F U の P B 2 - K Oウイルス相当量のホルマリン不活化 P R 8 ウイルスで免疫したモックマウスも用いた。血清を様々な時点で回収し、経時的に様々なレベルの抗体の存在を決定した。また、最後の接種から 3 週間後に血清、鼻洗浄液、および B A L 液サンプル中の P R 8 に対する I g G および I g A 抗体のレベルを、E L I S A を用いて調べた (図 8) 。培地を接種したマウスでは、どのサンプルにおいても I g G および I g A 応答のいずれも感知可能ではなかった。対照的に、ホルマリン不活化 P R 8 および P B 2 - K Oウイルスで免疫したマウスは、血清 I g G および I g A レベルの時間依存的な増加を示した。3 回の免疫後、同レベルの抗体が、不活化ウイルス及び P B 2 - K Oウイルスで免疫したマウスの両者において検出された。興味深いことに、マウスを 1 回または 2 回免疫したときは、P B 2 - K Oウイルスで免疫したマウスにおいて、ホルマリン不活化ウイルスで免疫したマウスよりもそれぞれ有意に高い血清 I g G または I g A 力価がみられた (図 8、上のパネル) 。P B 2 - K Oウイルスを 2 回接種したマウスの鼻洗浄液および 1 回または 2 回接種したマウスの B A L 液では、I g G および I g A レベルがホルマリン不活化ウイルスを接種したマウスよりも有意に高かった (図 8、それぞれ、中央および下のパネル) 。従って、このマウスモデルにおいて P B 2 - K Oウイルスは効率的に I g G および I g A 抗体応答を誘発した。培地で免疫したモックマウスから得られた血清は中和抗体を有さず、一方、P B 2 - K O処理マウスから得られた血清は 1 : 1 6 の中和抗体力価を有していた。これは、不活化ウイルスで処理したマウスから得られた血清よりも約 2 倍高いものであった (データは図示せず) 。中和活性は、どの鼻洗浄サンプル又は B A L 液でも検出されなかった (データは図示せず) 。

【 0 1 6 8 】

P B 2 - K Oウイルスのワクチン有効性

P B 2 - K Oウイルスのワクチン有効性を評価するために、マウスに対し M L D₅₀ の 0 . 5 または 5 倍の P R 8 ウイルスでチャレンジした。前者のチャレンジの用量は、自然界での感染を模倣したもので、自然界では通常、個体は比較的低いウイルス量 (確実に致死量ではない) で感染する。

【 0 1 6 9 】

(i) チャレンジ後の体重変化および免疫マウスの生存率

P B 2 - K Oウイルスのワクチン有効性を評価するために、P R 8 ウイルスでのチャレンジ後に P B 2 - K Oウイルスで免疫したマウスの体重変化及び生存率を調べた。培地で免疫し、M L D₅₀ の 0 . 5 倍の P R 8 でチャレンジしたモックマウスは、かなり体重が減少したが実質的に回復した (図 7、左のパネル) 。一方、培地で免疫し、M L D₅₀ の 5 倍の P R 8 でチャレンジしたマウスはすべて、かなり体重が減少し、感染後約 1 週間で死亡した (図 2、右のパネル) 。ホルマリン不活化又は P B 2 - K Oウイルスで 1 回免疫したマウスは、各チャレンジの服用後に体重が減少した (1 5 %) (図 7 A) 。ホルマリン不活化ウイルスで 1 回免疫した 3 匹のマウスのうち 1 匹は M L D₅₀ の 5 倍の P R 8 ウイルスでチャレンジした感染後 8 日目に死亡したのに対し、P B 2 - K Oウイルスで 1 回免疫し

10

20

30

40

50

たマウスは100%が生存していたことは注目に値する(データは図示せず)。不活化およびPB2-KOウイルスで2回および3回免疫したマウスは全て生存しており体重減少もほとんどなかった(図7BおよびC)。

【0170】

(ii) 肺および鼻甲介におけるウイルス複製

PB2-KOウイルスで免疫したマウスの肺および鼻甲介におけるウイルス複製を評価するために、両器官をPR8ウイルスでのチャレンジ後3日および6日目に採取した。図9はこれらの器官におけるウイルス複製の程度を示す。PR8ウイルスは、すべてのモック免疫マウスの肺および鼻甲介で高力価に複製した。PB2-KOワクチンの効力は1回免疫したマウスにおけるホルマリン不活化ワクチンのものと同様であったものの、2回または3回のワクチン接種を受けたマウスでは、PB2-KOワクチンはホルマリン不活化ワクチンよりも有効であり、PB2-KOワクチンで免疫したマウスでの双方の器官におけるウイルス力価はホルマリン不活化ワクチンで免疫したものに比べかなり低かった。まとめると、これらの結果は、PB2-KOウイルスがホルマリン不活化ウイルスよりもインフルエンザワクチンとしてより良好な効力を有することを示している。

10

【0171】

PB2-KOウイルスを接種したマウスにおけるGFPに対する抗体の検出

最後に、PB2-KOウイルスが、GFPに対する抗体を誘導し得るか否かを判断した、なぜなら、ここで使用されるPB2-KOウイルスがそのPB2コード領域にGFP遺伝子を有しているからであり、GFPがPB2-KOウイルス感染培養細胞中で発現したからである(データは図示せず)。PB2-KOウイルスを接種したマウスの血清中に抗GFP抗体が検出されたことは、インフルエンザウイルスベースの多価ワクチンの開発のためのプラットフォームとしてこの系が可能性があることを示唆している。よって、チャレンジから3日目後にマウスから血清を採取しIFAで検査した。GFPはモック免疫マウス由来の血清または不活化ワクチンで免疫したマウス由来の血清では検出されなかったが(図10)、PB2-KOウイルスで免疫したマウス由来の血清では、市販の抗GFP抗体(ポジティブコントロールとして)と同様にGFP発現が検出された。これらの結果は、GFPに対する抗体がPB2-KOウイルスで免疫したマウスにおいて誘導されたことを示しており、多価ワクチンとしてPB2-KOウイルスを応用できることを示唆している。

20

30

【0172】

考察

ここで、複製不能PB2-KOウイルスがウイルス特異的防御抗体応答を誘発し、また、このウイルスはそのPB2セグメントのコード領域においてコードされるレポータータンパク質に対する抗体も誘導することが示された。特に、PB2-KOワクチンは、H1N1 PR8ウイルスの致死量投与からマウスを防御するので、A型インフルエンザ感染に対するこのワクチンの可能性が示唆される。PB2-KOウイルスを接種したマウスの血清中においてGFPに対する抗体が検出できたので、レポーター遺伝子、このケースではGFP、を別の病原体の抗原領域に置き換えると、組換えウイルスを接種したマウスが二次病原体に対する抗体を発現することが示唆され; 翻って、多価ワクチンとしての可能性が示唆される。従って、PB2コード領域を別の病原体の抗原部分に置き換えれば、複製不能PB2-KOウイルスを、インフルエンザワクチンのプラットフォームとしてのみでなく、多価ワクチンとして役立てることができる。

40

【0173】

遺伝子ノックアウトウイルスを含む不活化および弱毒化生ワクチンは致命的なインフルエンザ感染に対しマウスを成功裏に免疫することが報告されている。貫通および細胞質尾部ドメインを欠くM2-KOウイルスはM2を発現する細胞内で効率的に複製し、弱毒化生ワクチンとしての可能性が示されている(Watanabeら、2009)。また、HA-KOも、構成的にHAタンパク質を発現する細胞において複数回の複製サイクルを行うことが示された(Martinez-Sobridoら、2010)。しかしながら、

50

防御的効果を発揮するには高い力価で十分なHAタンパク質を生じるような大量のウイルスが必要であると思われる。レポーター遺伝子の安定的な取り込みおよび維持についてはM2-KOでもHA-KO系でも研究されていない。先に、複製不能ウイルス様粒子(VLP)は、マウスモデルにおいて効率的に粘膜および全身性の免疫応答を誘発することが実証された。NS2を欠くVLPは、様々な致死量のインフルエンザウイルスに対しマウスを保護する(Watanabeら、2002)。しかし、構成的にNS2を発現する細胞系が存在しないと、防御的効果を誘発するのに十分なVLPの効率的な生産ができない。

【0174】

上述のM2-KO、HA-KO、および/またはVLPとは対照的に、PB2-KOウイルスは、PB2を発現した細胞系で調製でき、高い力価を生じ、安定的に取り込まれ、そしてウイルス複製の間にGFP遺伝子を維持することができた(Ozawaら、2011)。これらのデータは、明らかに、この系が効率的なワクチン製造のために使用できることを立証している。

10

【0175】

ワクチンとしてのウイルスの利用可能性を検討する際、安全性が最も重要となる。細胞ベースのワクチンは欧州で認可されているものの、現在、弱毒化生インフルエンザワクチンおよび不活化インフルエンザワクチンの大部分のいずれも孵化鶏卵で増殖している。卵ベースのワクチン増殖を成功させる前提条件として、実施時孵化鶏卵に適した変異体を選択しなくてはならないので、ワクチン中のウイルスは抗原性の点において循環ウイルスとわずかに異なる場合がある(Fulviniら、2011; Hardyら、1995; Robertson、1993)。アレルギーを誘発するこれらのワクチンにおける卵タンパク質の傾向として、卵中で生産された不活化ワクチンを非経口的に投与すると、副作用又はアナフィラキシー反応に結びつく個体もある(Halperinら、2002)。他の問題として、病原性の高い鳥インフルエンザパンデミックの発生の際には、鶏の在庫が枯渇する可能性が考えられ、よってワクチンの大量生産が危うくなる可能性がある(Hampson、2008)。

20

【0176】

対照的に、従来卵ベースのワクチンの増殖に代わり細胞ベースのものを代替することによるいくつかの利点がある。製造力を需要に合わせて容易にスケールアップできることがある。また、卵で増殖させたウイルスとは異なり、細胞内で増殖させたウイルスの抗原性は、動物およびヒトのものに適合するということがある(Katzら、1990; Robertsonら、1991)。

30

【0177】

PB2を安定的に発現する細胞系が確立され、PB2-KOウイルスは当該細胞系において効率的(すなわち、野生型ウイルスに匹敵するレベル)に複製した(Ozawaら、2011)。トランスでPB2を発現しない細胞において、複製不能PB2-KOウイルスは、複製のサイクルを1回しか行わないので、感染性粒子の形成にはつながらない。従ってPB2-KOウイルスは、感染性ウイルスの複製を許容せずに防御抗体応答を誘導する。そのため、細胞ベースのPB2-KOワクチンでは、ワクチン製剤および送達における様々な障害が除かれる。

40

【0178】

さらに、PB2遺伝子をノックアウトすると、複製サイクルを複数回行ったとしても、PR8インフルエンザウイルスは、組換えPB2-vRNAおよびPB2タンパク質mRNA間の組換えを示すことなく、複製ができなくなってしまう。

【0179】

ホルマリンで不活化したワクチンで免疫応答を誘発することによりPR8ウイルスの致死量を用いたチャレンジからマウスを効果的に防御できた(図7~9)。しかしながら、生存率および体重減少の点ではホルマリン不活化ワクチンおよびPB2-KOワクチンで免疫したマウスは同様であったにもかかわらず(図7)、ホルマリン不活化ワクチンで免

50

疫したマウスの肺および鼻甲介のウイルス力価は、PB2-KOワクチンで免疫したマウスのものよりも高かった(図9)。この知見は、おそらく、免疫応答のレベルの違いを反映しているものと考えられる(図8)。細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答については本研究で検討されなかったが、不活化抗原はCTL応答を誘導しないと考えられるので、CTL応答は、ホルマリン不活化ウイルスではなくPB2-KOウイルスによって活性化されたとするのが妥当である。

【0180】

定義では、多価(multi-valentまたはpoly-valent)ワクチンとは、複数の感染因子または単一の因子における複数の異なる抗原決定基に対する免疫応答を誘発するように設計されたワクチンを指す。他のレポーター遺伝子ならびに異なるウイルス株のHAおよびNA遺伝子をPB2-KOウイルス中に収容できるという事実に基づき、多価ワクチンの設計および製造が実現可能になる。その結果、PB2-KOワクチンが、いくつかの異なる抗原性のインフルエンザ株、あるいはインフルエンザおよび/または他の病原体の亜型に対して防御できると考えられる。付与される利点としては、ワクチンの粘膜送達が可能になり、針を用いてワクチンを皮下注射する必要が排除されること等がある。

10

【0181】

結論として、PB2-KOウイルスは、有効な免疫応答を誘発し、そのPB2セグメント中にコードされたレポーター遺伝子産物に対する抗体を誘導し、容易に増殖し、安全にワクチンとして投与できるので、PB2-KOウイルスは、信頼でき安全で、かつ効果的なワクチン候補となる。

20

【0182】

実施例 4

肺炎球菌は、インフルエンザウイルス感染に続く以下の二次的な細菌感染症を引き起こす呼吸器系の病原体で、高齢者の死亡率の上昇に関連する。呼吸器合胞体ウイルスおよび1型ヒトパラインフルエンザウイルス等のパラインフルエンザウイルスは、乳児に重度の症状を引き起こす呼吸器病原体である。パラインフルエンザウイルスのために利用可能なワクチンは現在存在しない。PB2セグメントのコード領域中にコードされたレポーター遺伝子産物(この場合GFP)に対する抗体が、真正のPB2の代わりに誘発されたため(図10)、PB2-KOウイルスが多価ワクチンとして利用できるだろう。PB2セグメント中のコード領域内に病原体の主要な抗原も同様にコードされている場合は、PB2-KOウイルスは、インフルエンザウイルスタンパク質に対する免疫応答と同様に抗原に対する免疫応答も誘導できるので、それにより、乳幼児や高齢者をこれらの深刻な呼吸器疾患から守ることができる。

30

【0183】

図11に、PB2-KO-PspAを有する細胞における肺炎球菌のPspAの発現およびインフルエンザウイルス抗原の発現、ならびにPB2-KO-GFPを有する細胞におけるインフルエンザウイルス抗原の発現を示す。PB2-KO-PspAはトランスでPB2を発現する細胞中では、野生型インフルエンザウイルスと同様の成長速度であるが、トランスにPB2を発現しない細胞においては成長することができない(図12)。

40

【0184】

PB2-KO-PspAまたはPB2-KO-GFPに感染したマウスは、血清、BAL液、および鼻洗浄液中にインフルエンザ特異的IgGおよびIgAを有していた(図13)。PB2-KO-PspAに感染したマウスは肺炎球菌特異的IgGを、血清中(図14)、BAL液および鼻洗浄液中(図15)に有していたが、PB2-KO-GFPで感染したマウスは有していなかった。

【0185】

PB2-KO-PspAで3回免疫したマウスは、インフルエンザウイルスによるチャレンジ(図16)および肺炎球菌によるチャレンジ(図19)を生き延びた。対照および免疫化マウスにおいては、チャレンジ後3日目に鼻甲介および肺でインフルエンザウイル

50

スを検出できた(図17)。チャレンジ後、PB2-KO-PspAでは細菌量が減少したが、PB2-KO-GFPや免疫化マウスではこのような減少は見られなかった。

【化1】

References

- Cox et al., Scand. J. Immunol., 59:1 (2004).
Davies et al., Science, 144:862 (1964).
DuBridge et al., Mol. Cell Biol., 7:379 (1987).
Duhaut et al., Virology, 248:241 (1998).
Gruber, Vaccine, 20:566 (2002).
Fiore et al., MMWR Recommend. Rep., 59:1 (2010).
Fulvini et al., PLoS One, 6:e20823 (2011)
Halperin et al., Vaccine, 20:1240 (2002).

【化 2】

- Hampson, Ann. Acad. Med. Singapore, **37**:510 (2008).
- Hardy et al., Virology, **211**:302 (1995).
- Hatakeyuma et al., J. Clin. Microbiol., **43**:4139 (2005).
- Hatta et al., Arch. Virol., **145**:1947 (2000).
- Hayden, Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **356**:1877 (2001).
- Hoffmann et al., J. Virol., **79**:11014 (2005).
- Horimoto et al., Virology, **366**:23 (2007).
- Hossain et al., J. Clin. Microbiol., **48**:2515 (2010). 10
- Itoh et al., Nature, **460**:1021 (2009).
- Iwatsuki-Horimoto et al., Clin. Vaccine Immunol., **18**:860 (2011).
- Jennings et al., Cell, **34**:619 (1983).
- Katz et al., J. Virol., **64**:1808 (1990).
- Kemble et al., Vaccine, **21**:1789 (2003).
- Kida et al., Virology, **122**:38 (1982).
- Kobasa et al., Nature, **431**:703 (2004).
- Kong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103**:15987 (2006). 20
- Li et al., J. Virol., **84**:12075 (2010).
- Li et al., Viruses, **3**:241 (2009).
- Lin et al., Virus Res., **103**:47 (2004).
- Maassab, Nature, **219**:645 (1968).
- Manicassamy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**:11531 (2010).
- Martinez-Sobrido et al., J. Virol., **84**:2157 (2010).
- Moss et al., J. Antimicrob. Chemother., **65**:1086 (2010).
- Muramoto et al., J. Virol., **80**:2318 (2006).
- Murphy et al., Viral Immunol., **15**:295 (2002). 30
- Nayak et al., J. Virol., **84**:2408 (2010).
- Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**:9345 (1999).
- Niwa et al., Gene, **108**:193 (1991).
- Noble et al., Virology, **210**:9 (1995).
- Odagiri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:5988 (1990).
- Ozawa et al., J. Gen. Virol., **92**:2879 (2011).
- Palese et al., J. Clin. Invest., **110**:9 (2002).
- Palese et al., In Fields virology, 5th edn, pp. 1647-1689 (2007), Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers. 40
- Reichert et al, N. Engl. J. Mol., **344**:889 (2001).
- Rimmelzwaan et al., Vaccine, **29**:3424 (2011).
- Robertson, Rev. Med. Virol., **3**:97 (1993).
- Robertson et al., J. Gen. Virol., **72**:2671 (1991).
- Smith et al., J. Gen. Virol., **68**:2729 (1987).
- Vesikari et al., Pediatr. Infect. Dis. J., **25**:590 (2006).
- Watanabe et al., J. Virol., **76**:767 (2002).
- Watanabe et al., J. Virol., **83**:5947 (2009).

【化3】

Wright et al., In Fields virology, 5th edn, pp. 1691-1740 (2007). Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley, Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers.

Yamada et al., PLoS Pathog., 6:e1001034 (2010).

【0186】

全ての刊行物、特許および特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。前述の明細書において、本発明は特定の好ましい実施形態に関して記載し、多くの詳細について例示目的で説明したが、本発明は追加の実施形態も可能であり、その詳細のいくつかは、本明細書本発明の基本原則から逸脱することなく、相当な種々の変更を加えることができることは当業者にとって明らかであろう。

10

【図1】

| PB2変異型vRNAs | VLP数 (/ml) | GFP vRNAを有するVLP数 (/ml) | ピリオンの取り込み効率 |
|------------------|------------|------------------------|-------------|
| PB2(300)GFP(300) | 2,799,200 | 1,532,400 | 54.7% |
| PB2(120)GFP(120) | 1,080,800 | 753,600 | 69.7% |
| PB2(60)GFP(120) | 1,676,800 | 960,000 | 57.3% |
| PB2(30)GFP(120) | 1,807,200 | 839,200 | 46.4% |
| PB2(0)GFP(120) | 1,093,600 | 322,400 | 29.5% |
| PB2(120)GFP(60) | 1,756,800 | 1,132,800 | 64.5% |
| PB2(120)GFP(30) | 1,068,000 | 549,600 | 51.5% |
| PB2(120)GFP(0) | 56,000 | 42,400 | 75.7% |
| PB2(0)GFP(0) | 28,000 | 0 | 0.0% |
| PB2(-) | 無し | 19,600 | .. |

FIGURE 1

【図2 - 1】

FIGURE 2

配列番号: 1

```

agcgaagca ggtactgat caaaatgaa gattttgtc gacaatgct caatccgat 60
attgtcagc ttgggaaaa aacaatgaa gaagtatgg aggacctgaa atcgaagca 120
aacaatttg cagcaatag cactcaattg gaagtatgct tcatgtattc agattttcac 180
ttcatcaatg agcaaggcga gtcaataatc gtagaacttg gtgatccaaa tgcctctttg 240
aagccaggt ttgaataat cagaggaga gatcgcaaaa tggcctggac agtagtaaac 300
agtatttga acactacag gcttgagaaa ccaaatgttc taccagattt gtatgattac 360
aaggagaata gattcatcga aattggagta acaaggagag aagtccaact atactatctg 420
gaaaaggcca ataaaattaa atctgagaaa acacacatcc acattttctc gttcaactggg 480
gaagaatgg ccacaaaggc agactacact ctcgatgaag aaagcagggc taggatcaaa 540
accagactat tcaccataag caagaatag gccagcagag gcctctggga ttccotttctg 600
cagtcggaga gaggagaaga gacaattgaa gaaaggtttg aaatcacagg aacaatgcgc 660
aagcttgcgc accaaagtct ccgcgcgaac ttctccagcc ttgaaaattt tagagcctat 720
gtggatgga tcaaacggaa cggctacatt gaggccaagc tgtctcaaat gtccaaagaa 780
gtaaatgcta gaattgaacc ttttttgaaa acaacaccac gacctcttag acttcogaat 840
gggctccct gttctcagcg gtccaaattc ctgctgaggg atgcctaaa actaagcatt 900
ggggcccaa gtcctgaagg agagggaata ccctctatgg atgpaatcaa atgatgaga 960
acattcttg gatggaagg acccaatggt gttaaacacc acgaaaagg aataaatcca 1020
aattatcttc tgtcatgga gcaagtactg gcagaactcg aggaacttga gaatgaggag 1080
aaaattccaa agactaaaaa tatgaagaaa caactgcagc taaagtggcg acttggtgag 1140
aacatggcac cagaaaaggt agactttgac gactgtaaa atgtaggtga ttgagacca 1200
tatgatagt atgaaccaga attgaggtcg ctctgcaagt ggattcagaa tgagtttaac 1260
aaggcatgg aactgacaga ttcaagctgg atagagctcg atgagatgg agaagatgtg 1320
gccccaattg aacacattgc aagcatgaga aggaattatt tcaactcaga ggtgtctcac 1380
tgcagagcca cagaatacat aatgaaggga gtgtacatca atactgctt gcttaatgca 1440
tcttgtcag caatggatga ttccaatta attccaatga taagcaagt tagaactaag 1500
gaggaaggc gaaagaccaa ctltgatggt ttcatcatta aagggaagtc ccaactaagg 1560
aatgacacg acgtgtaaa ctltgtgagc atggagtttt ctctcaactga ccaaaagctt 1620
gaaccacata aatgggagaa gtlactgtgt cttagatag gagatattgt tataagaagt 1680
gccataggcc aggtttcaag gcccatgttc ttgtatgta gaacaaatgg aacctcaaaa 1740
attaaatga aatggggaat ggagatgagg cgttgcctcc tccagctact tcaacaaatt 1800
gagagtatga ttgaagctga gtctctgtc aaagagaag acatgacaaa agagttcttt 1860
gagaacaaat cagaacatg gcccatgga gactgcccc aaggagtga ggaagttccc 1920
attgggaag tctgaaggac ttattagca aagtcggtat tcaacagctt gtatgactct 1980
ccacaactag aaggttttc agctgaatca agaaaactgc ttcttatctg tcaagctctt 2040
agggcaaac ttgaacctgg gaccttgat ctgggggggc tatatgaagc aattgaggag 2100
tgcttgatta atgacctgg ggttttgctt aatgctcttt ggttcaactc ctctcttaca 2160
cagpatgga gtlagttgtg gcagtgctac tatttgetat ccaatactgc caaaaagta 2220
ctttgtctt act

```

配列番号: 2

```

agcgaagca ggtactgat caaaatgaa gattttgtc gacaatgct caatccgat 60
ccagcacaat atgctataag cacaatttcc ctttatactg gagacctctc ttacagccat 120
gggacagaaa caggtatcac catggtact gttaacagga cacatcagta ctacgaaaaa 180
ggaggatgga caacaaacac cgaactgga gccaccgaac tcaaccgat tgatgggcca 240
ctgcagaagg acaatgaacc aagtggttat gcccaaacag atltggtatt ggagcggatg 300
gctttctctg aggaatccca tcttggtatt ttgaaaaaac cgtgtaatga aacgatggag 360
gttghtcagc aaaaacagat agacaagctg acacaagccc gacagaccta tgcctggact 420
ctcaaaagaa acaaacctgc tgaacacaga ttggccaaca caatagaagt gttcagatca 480
aatggcctca cggccaatga gttctggaag ctcaatgact tccctaaagga tgaatggag 540
tcnaatgaca agnagaat gggatccca acatcttttc agagaagag acggttga 600
gacaataga ctatgaaat gaaacacag agacaatgg gtaaaaagaa gccaggtttg 660
aacaagaaga gttatctaat tagagcttg accctgaaca naatgacaaa agatpctgag 720
agggggaag taacaggag acaaatgca cccccagga tgcaaatag ggggtttgta 780

```

【図 2 - 2】

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tactttgttg | agcactcgc | aagagytata | tgtgagaac | ttgacaact | agggttgcca | 840 |
| gttggaggca | atgagaaga | agcaaatgtg | gcaaatgtg | taaggaagt | gatgaccaat | 900 |
| tctcagaca | cegaacttc | tttccacct | gcaagagata | aacccaagt | gagogaana | 960 |
| caagatctc | ggatgtttt | ggccatgat | acataatga | ccagaatca | gcccgaatgg | 1020 |
| ttcagaact | ttctaatgt | ttgtccaat | atgtttcca | acaaatgcg | gagactggga | 1080 |
| aaagggata | tggttggag | caagagtata | aaacttaga | ctcaaatacc | tpcagaatg | 1140 |
| ctcggagca | tcgatttga | atatttcaat | gattccaaa | gaaagagat | tgcaaaaatc | 1200 |
| cgacgcctc | taatagagg | gactgcgca | ttgaacctt | gatgatgat | gggatgttc | 1260 |
| aatatgtta | gcactatgt | aggctctcc | atctcgacc | ttggacaaa | ggatgacoc | 1320 |
| aaagctact | actgtggga | tggtttcoa | ctctctgac | atittgtct | gatttgtae | 1380 |
| gcaccnaat | atagaagat | toagccgca | gtocagagg | tttatcgac | cttgaagta | 1440 |
| cttggatac | atatagaca | gaaaactgt | taataaaca | gaaagatga | atltgaatt | 1500 |
| acaagtctt | tctatcgtt | tggttttgt | gccaattca | gcatggagt | tcccagttt | 1560 |
| gggtgtctg | ggatcaocga | gtcaggggc | atgatattg | gagttactg | catcaaaaac | 1620 |
| aatatgata | acaatgatc | ttgtccagca | aaagctcaa | tgcccttca | gttttcaat | 1680 |
| aaagattca | ggtagacgt | ccgatccat | ataggtgca | cacaataca | aacccgaaga | 1740 |
| tcaattgaa | taaaagaa | gtggggaca | accctgtca | agctggact | gctggtctc | 1800 |
| caagggacc | caaatata | caacttaga | aatctccaca | ttctcgaat | ctgcctaaaa | 1860 |
| tgggattga | tgattggga | ttaccgggg | cgttttatca | accacttga | ccatttttc | 1920 |
| ggcataaag | aatgtgaat | aatgacata | gcagttaga | tgccagaca | tggtccagcc | 1980 |
| aaaaaatgt | agtagatgc | ttgtccaaca | acacactgt | ggatcccaa | agaaatcga | 2040 |
| tccattctg | atacaagta | aaagagatg | cttgaggat | aaacaatga | ccaaaggtg | 2100 |
| cttcattct | ttgaaaaat | cttcccagc | atgatattg | gaagccctg | gggatattc | 2160 |
| agtagtggt | aggctatgt | ttccagcgt | cgaaatgat | caaggatga | tcttcaatc | 2220 |
| ggtagataa | agaaagaga | gtccactgag | gtaatcaga | tcgtttcca | catctgaag | 2280 |
| ctcagacgc | aaaaatagt | aatttagct | gtctctcat | aaaaatgcc | tgtttctac | 2340 |

配列番号: 3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| agcgaagca | ggccaatt | atccaatg | gaaagaata | agaactacg | aaatcaatg | 60 |
| tcgacgttc | gcaccgga | gtaactca | aaacaaca | tgacocat | ggcatcaatc | 120 |
| aaagattca | actcagag | acagggag | accacagc | ttagatgaa | atggatgatg | 180 |
| gcaatgaat | atccaatg | agcgaagc | aggtaacg | aaatgtct | tgagagaat | 240 |
| gagcaagac | aaacttatg | gagtaaac | gatacggc | gctgatgga | 300 | |
| tcaactctg | ctgtgcatg | gtggaatag | aatggacca | taacaatac | agttcaatt | 360 |
| ccaaaatct | acaaaacta | tttgaaga | taaaagagc | aacctttgc | 420 | |
| ccgttccat | ttgaaacca | agtcaaaata | cgctggagag | ttgacatata | ctctgtcat | 480 |
| gcagatctc | gtcccaagca | ggcacaggat | gtaatcagg | aaagtgttt | ctctcaagaa | 540 |
| gtggggaca | ggatactac | atccagatg | caactaacg | taaccaga | gaagaaaga | 600 |
| gaaactcag | attgcaaat | ttctccatt | acatgttga | gagagaactg | 660 | |
| gtccgcaaaa | cgagattct | ccagctggc | gggtgaaaca | gcagtgtga | catgaaagt | 720 |
| ttgcattga | ctcaagagc | acagatgata | ctccaggag | ggaagcag | 780 | |
| aatgatgat | ttgatcaag | cttattatg | ctctcagga | acatagtga | aaagatgca | 840 |
| gtatcagag | atccactag | atctttatg | gaagtgtgc | acagacaca | gattgtgta | 900 |
| attagagtg | tagactctc | tagccagac | ccacagaag | agcaacctg | ggatatatg | 960 |
| aaagctgaa | tgaggactg | aatgatctc | tccttcaat | ttgtggat | caactaaag | 1020 |
| agacacaagc | gatcatcag | caagagag | gagagagc | ttctccaaa | 1080 | |
| ttgaaagat | gagtgatga | gggatgaa | gagttcaca | tggttggag | aaagacaaca | 1140 |
| gcacactca | gaaaagca | caagagatg | atctcagta | tagtgatgg | gagagacag | 1200 |
| caagtccag | ccgaagca | aatgtggc | atgattat | cacaagaga | ttgatgata | 1260 |
| aaagcagta | gagtgatct | gaatttgc | atacagatt | gaactatg | 1320 | |
| catcaactt | taagacatt | tcgaagag | ggaaagtc | ttttcaaaa | ttggggagt | 1380 |
| gaacattgc | acaatgtag | ccgaatgat | gggatattg | ccacatgac | 1440 | |

【図 2 - 4】

| | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------|
| acagattgt | gactcccag | atcggctca | taggcaaat | gtgacaaca | ccaatcaact | 540 |
| aatcagact | gagacagaa | tggttttag | ccgactaca | gctaaggta | tgagcaaat | 600 |
| ggctgagct | agtgagcag | gcagcagag | accacagc | gctagacaa | tgagcaaat | 660 |
| ggcgaagct | atgagaaga | ttggggact | tcctactgc | agtgctgct | tgaaaaatga | 720 |
| tctcttgaa | aatltgca | ccatcaaga | acgaatggg | gtcagatgc | aacggttca | 780 |
| gtgatctct | caactatgc | gcaaatca | ttgggatct | gcaactgca | ttgtgattc | 840 |
| ttttgcaat | tttttcaaa | tgctttacc | gtcctttaa | atacggactg | aaagggagc | 900 |
| cttccagca | agagtgcca | aagttctga | gggaagaata | tcgaaagaa | accagagctc | 960 |
| ctgtggatg | tgacgatgt | tgatttgcg | gcaatagag | ggagtaaaa | actaccctgt | 1020 |

配列番号: 7

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| agcaaaagca | ggggaaaata | aaacaacca | aaatgaagc | aaactactg | gtctctgtat | 60 |
| gtgcaactg | agctgcagat | gcagacaca | atgtatag | ctaccatgc | aaacattca | 120 |
| ccgacactg | tgacacagta | ctcagaaga | atgtgcagat | gaaacactg | gttaacctg | 180 |
| ttcgaagct | ccacaacgca | aaactatga | gattaaaag | aatgccccca | ctacaattg | 240 |
| ggaaatgaa | catcgcgcca | tgctcttgg | gaaactcga | atgcgacca | ctgcttccag | 300 |
| tgagattctg | gtctcaact | gtgagaaac | caaaccttga | gaatgaaata | tggttaacga | 360 |
| gagatttca | ccaaagaa | aaagttaga | acactgtga | caactgtga | tacttccga | 420 |
| gattcgaat | atlttccaa | gaaagttag | ggcccacaa | caacaaaac | ggagtaacg | 480 |
| cgactctc | ccatggagg | aaaagcatt | tttcaagaa | tttgcatag | gtcagcaga | 540 |
| agggggctc | atcccaaa | ctcaaaaat | cttatgtga | caaaaaggg | aaagagctc | 600 |
| tttgtatgt | gggtattca | cggccacta | acacagaa | atctatcga | 660 | |
| atgaaatgc | ttatgtctc | gtatgactg | caaatataa | caggagatt | accocgaaa | 720 |
| tagcagaag | accacaagt | agagatcag | gaactatac | gaactatac | tgaccctgc | 780 |
| taaaaccgc | agacacaata | atatttggag | caaatggaa | tcataagca | ccaatgatg | 840 |
| ctttcgcct | gagtagagc | tttggctcg | ctcatcgc | ctcaaacgca | ccaatgatg | 900 |
| agttgaaac | gaagtgtca | aacccccctg | gagctataa | cagcagctc | ctttaccaga | 960 |
| atatacaccc | agtcaacta | ggagagtcg | caaatatgc | caggagctc | aaatgagga | 1020 |
| tcggttaacg | actaaagaa | atccgctca | ttcaatcag | aggtctatt | ggagcaattg | 1080 |
| ccggtttat | tgaaagggca | tgactggaa | tgaatagtg | atggtatgt | tactatcat | 1140 |
| agatgaaca | gggatcggc | ttatcagcg | caaaaaag | gccattaac | gccattaac | 1200 |
| ggattacaa | caaggtgac | actgttatc | agaaatgaa | actcaactc | acagctgtg | 1260 |
| gtaaaagt | caacaata | gaaataagg | tgaaaatt | aaataaaaa | aatgtgatg | 1320 |
| gatttctgga | catcttggca | tataatgcag | aattgtgat | tctactgaa | aatgaaagca | 1380 |
| ctctgagtt | ccatgacta | aatgtgaag | actctatga | gaaagtaaa | agccaataa | 1440 |

【図 2 - 3】

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------|
| gagattctca | tgagaggag | gagaaatcag | aaaatgggt | tagatagta | ctccagcag | 1500 |
| gagaggatg | tggtgagat | tgaccgttt | ttgagaact | gggacacag | aggaatgta | 1560 |
| ctactgtctc | ccggaggag | gaagtgaaca | caggagaac | aaactaacg | aaataactg | 1620 |
| tcactgtcca | tgatgtgga | gattaatgt | ctcgaatcg | tggttggca | tacctataa | 1680 |
| ttgatctca | gaaactggga | aaactgttaa | attcagttg | cccagaacc | tacaatgta | 1740 |
| tcacaataa | tggaattga | accattcag | tctttagac | ctaagctca | tagagpcaa | 1800 |
| tacagtggt | ttgaaagaa | tctgttcaa | caatggagc | atctagctg | gacatttga | 1860 |
| accgcagca | taaaaaact | tcttccctc | cgcccgctc | cccaagaa | agatgaatg | 1920 |
| cagttctctc | tactactgt | gaatgtgag | ggatcagga | tgagaaact | tgtaagggc | 1980 |
| aattctctg | tattcaact | taacaagcc | acgaagacc | tcaacttct | cgaaaggat | 2040 |
| gctggcaat | taactgaag | ccocatgaa | ggcagatg | gagtgagct | cgctgtctg | 2100 |
| aggggatcc | tcattctgg | caagaagac | agagatgat | ggccagact | agcatcaat | 2160 |
| gaactgagca | acccttgcga | aggaagagc | gcatatgtc | taattggca | agggagcgt | 2220 |
| gtgttgtaa | tgaaacggaa | acgggactc | acataacta | ctgcaacga | gacagocag | 2280 |
| aaaagaatc | ggatggcat | caattagtgt | cgaaatgtt | aaaaacacc | ttgtttctac | 2340 |

配列番号: 4

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------|
| agcaaaagca | gggtagata | tcactcactg | agtgacatca | aaatcagc | gtctcaagc | 60 |
| accaaaagc | ctcgcagaca | gatggagct | gatggagac | ggcagaatg | cactgaaatc | 120 |
| agcactctc | ccggaaagc | gattgttga | atttggagat | tctacatca | aatgtgacc | 180 |
| gaactcaac | tcagtatga | tgaggagcg | ttgatcnaa | acagctaac | aatgagaga | 240 |
| atgtgctct | ctgttttga | cgaaagaga | ataaataac | ttccagagc | 300 | |
| gggaagact | ctaagaaac | tgaggagct | atatacaga | gagtaaacg | aaagtgtgt | 360 |
| agagaaactc | ctctttatg | caagaagaa | ataaggocga | tgtggccca | agctaaata | 420 |
| ggtagagct | caacgctgt | tctgactca | atgatgatc | ggactcaaa | tttgaatga | 480 |
| gcaactatc | agaggaacag | agctcttgt | cgaccggga | tgagttcca | gatgtgctc | 540 |
| ctgatcaag | gttcaactc | ccctaggag | tctggagcg | caggtgctg | agtcaaaaga | 600 |
| tttggagaa | tggtgatga | attgtcaga | atgatcaac | gtgggatca | tgatcggaac | 660 |
| ctcaaaagga | aatltcaac | tgctgcaca | aaagcaata | tgagtaact | gtgcaactt | 720 |
| cggaacccc | ggatgctga | gttcagag | ctcactttt | tgacaagct | tgcaactata | 780 |
| cgccagctg | agcatttga | aaagggaga | tactctgat | tcagatgaa | ccctttcaga | 840 |
| ctgctcaaa | acagcaagt | gtacagcta | atcagacca | atgaaactc | agcacaagc | 900 |
| agtcactgt | tggtgatgc | atgcactc | agcttctag | aaagtcaag | agttctaacg | 960 |
| tctatcaag | ggacgaagt | gctcccaag | ggagacttt | ccactagag | agttcaaat | 1020 |
| gcttccaa | aaaatattg | gactatgga | caagctac | ttcagtag | aaagcagatc | 1140 |
| tgcccatca | ggaccagaa | tgaggagaa | accactaac | atgttgcac | tgccggccaa | 1200 |
| atcagatca | accctacgt | ctcagtagc | agaaatctc | cggttgca | acaacactt | 1260 |
| atggagact | tcaatggaa | tacagaggg | agaaactct | acatggagg | cgaaatcag | 1320 |
| agagatggt | aaagtgcag | accagaagt | gtgtctctc | atggggctg | aaattctgaa | 1380 |
| ctctggagc | aaaagcgac | ggcccagct | gtgctcttc | ttgatcatg | tgaaagagga | 1440 |
| ttctattct | tcggagaca | tgcaagagg | tgcactaat | aaaagaaat | accctgtgt | 1500 |

配列番号: 5

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-----------|-----------|------------|-----|
| agcaaaagca | ggttagatatt | gaaagatgag | tcttcaacc | gaggtcgaa | cgtagctact | 60 |
| ctctatcat | ccgtcagcc | ccctcaagc | cgagatcga | caagcttct | aaagtctct | 120 |
| tgagagagc | aaacccatc | ttgagttct | catgaaatg | ctaaagaca | gaccaactc | 180 |
| ctcactctg | actaaaggg | tttagatt | ttgtctcag | ctcagctgc | ccagtggcg | 240 |
| agagctcag | ctgtagcct | ttgtccaaa | tgccctaat | gggaacagc | atccaaata | 300 |
| catgagaca | gcaatgaac | tgtagagaa | gctcaagag | gagatacct | tcaatgggg | 360 |
| caaaagaa | tcaactcag | attctgctg | tgcaattgc | agttgtatg | gctccatata | 420 |
| caaacagat | ggggctgta | ccaactgag | ctgtttg | ctggtatg | aaactctga | 480 |

配列番号: 8

| | | | | | | |
|------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|------|
| agcaaaagca | ggggtttaa | atgaatcaa | atcagaaa | aaataccat | ggatcaact | 60 |
| gtctgtagt | ggagcaact | agccatatt | tgcaatagg | gaaataact | tcaatagga | 120 |
| taagcaatc | aatcaaaat | ggagtcaaa | accactactg | aaatgaca | caaaactca | 180 |
| ttactataa | aaatgacc | tggttaaag | acacacttc | agttatgta | accgcaatt | 240 |
| catctcttt | tccactcgt | gggtgggca | tatacagca | agcaaatca | ataagaatt | 300 |
| gttccaaag | agagctttt | gtcataaag | agcccttat | tctatgtc | cacttggat | 360 |
| gcaagactt | ttcttgacc | caagtgctc | tactgaatg | caagcatca | agtgagact | 420 |
| ttaaagagc | aaagcctat | agggcctaa | ttagctgcc | ttctcgtga | ccctcgctc | 480 |
| gtaacactc | aaagttgaa | tcggtgtct | gtcagcaag | tgcatctg | gagggatg | 540 |
| gctggctca | aatcggaa | tcaagttca | ataatggag | agtgctgta | ttaaaatca | 600 |
| acggcatat | aactgaaac | ataaaaagt | ggagagaaga | aatatgag | acaacagag | 660 |
| ctgaatgtc | ctgtgaaat | ggttctatg | ttaactata | actgatgag | ccagatgatg | 720 |
| gggtggctc | gtcaaaaat | ttcaagatg | aaaagggaa | ggttcaata | tcaatagct | 780 |
| tgaatgacc | taattctca | tataggaat | gtctcttca | ccctgatac | ggaaagatg | 840 |
| ttgtgtgtg | ccagacact | tgcaatggt | cgaaaccgc | atggtgtct | ttcagataa | 900 |
| actcgtgta | tcaaatgga | tacatctga | gtgggtttt | cgtagcaac | ccgctccgc | 960 |
| aaagtgaac | agggcactg | ggtccagtg | atgtagag | agcaaacgg | gtaagagct | 1020 |
| ttcatatag | gtatgtaat | ggttttga | taggaagac | caaaagctc | agttccagc | 1080 |
| atgggttga | gatgatttg | gattcactg | gatgacaga | gactgatag | aaagtctg | 1140 |
| tgaggcaag | gttgtggca | atgactgat | ggtcagga | tagcggaa | ttcgtcaac | 1200 |
| atcctgagc | gacagggca | gactgatga | ggccgtgct | ctgggtgaa | taactcaag | 1260 |
| gacgactaa | agaaaatac | atctgacta | gtcgcagca | catctcttt | ttggggctg | 1320 |
| atagtatc | tgatagtg | tctggccag | acggtgctga | gttgcactc | agacttgaca | 1380 |
| agtagctct | tcaaaaact | cctgtttct | act | | 1413 | |

配列番号: 10

| | | | | | | |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----|
| agcaaaagca | ggctcaatt | attcaatg | gaaagaata | aaagcaatg | aaatctaatg | 60 |
| tcaagactc | ggcccggca | gatactca | aaaacagc | tgaccatct | ggccaatat | 120 |
| aaagatata | catcagga | acaggaaga | aacccagac | ttagatgaa | taagatgatg | 180 |
| gcaatgaa | atccaatg | agcagcaag | aggtaacg | aaatgctc | tgagaaatg | 240 |
| gagcaagac | aaacttatg | gagtaaaat | aatgatg | gactcagcc | agttgatgta | 300 |
| tcaactctg | cttgactag | gtggaatag | aatggacca | tgcaaatca | agttcaatt | 360 |
| ccaaaactc | acaaaacta | tttgaaga | gtcgaagc | taagcaatg | aaactttgc | 420 |
| ctgctccat | ttgaaacca | agtcaaaa | ctcgtcgag | ttgacataa | ctctgtcat | 480 |
| gcagatctc | gtgcaagga | ggcacaagt | gtaactatc | aaattgttt | ttcctcaag | 540 |
| gtggagcga | ggatactac | atcgaatg | caactaaga | taaccaaga | gaagaaaga | 600 |
| gaaactcag | attgcaaat | ttctcttgg | atggttga | acatgttga | gagagaactg | 660 |
| gtccgcaaaa | cgagttctc | ccagtgctc | ggtagagca | gcagctgta | caatggagc | 720 |
| tgtatttga | ctcaagagc | atctggaga | caagctgta | ctccagagc | gaaagtgaag | 780 |
| aatgatgat | ttgataaac | cttgattat | | | | |

【図 2 - 6】

```

cagtcgattg ccgaagcaat aattgtggcc atgtgatatt cacaagagga ttgtatgata 1260
aaagcagttg gaggtagctt gaattttgct aatagggcga atcagcgact gaatcctatg 1320
catcaacttt taagaacttc tcaagaagat gcgaaagtgc tttttcaaaa ttggggagtt 1380
gaacctatcg acaatgtgat gggaaatgat gggatattgc ccgacatgac tcccaagcatc 1440
gagatgtcaa tggagggagt ggaatcagc aaaaatgggt tagatgagta ctccaaagcag 1500
gagagggtag tggtagagct tgaacggfct tggaggtca gggagagctc agaaatgtg 1560
ctactgtctc cggaggaggt cagtgaacac cagggacagc agaaactgac aataacttac 1620
tcactgcoa tgatgggga ctgtaatggt cctgaaatcg ttgtgctca tacactcoa 1680
tggatcatca gaaactggga aactgttaaa atcagttggt cccagaaccc tacaatgcta 1740
tacaataaaa tggaaattga accatttcag tctttagtag ctaaggccat tagagggcaa 1800
tacagtgggt ttgtaaaact tctgttccaa caaatgaggg atgtgcttgg gacattttag 1860
accgcaacga taataaaac tttcccttc cgcagccgct caccaaagca aagtagaatg 1920
cagttctcct cactttcgtt gaatgtgagg ggatcagaaa tgaagaatct tgaagaaggg 1980
aatttctctg tattcaacta caacaagggc agcaagagac tcaacgtttc cggaaagvat 2040
gctgcacttc taaccgaaga cccagatgaa ggcagacgtg gattggagtc cgtctgtctg 2100
agggatctcc tcaattctgg caaagaagac agcaagatag gggccagcatt aagcatcaat 2160
gacctgagca accttgcgaa aggagagaag gcaaatgtgc taattgggca agygagcgtg 2220
gtgttggtaa tgaacagcaa accggagctc agcaacttta ctgacagcca gaacggagcc 2280
aaaagaactt ggatggccat caattaggtt cgaatagttt aaaaacgacc ttgtttctac 2340

```

配列番号: 11

```

agcgaagaa ggaacaaacct ttgaatggat gtaaatccga ccttactctt cttaaaaagtg 60
ccagcacaaa atgctataag cacaacttcc cttataaccg gagaccctcc ttacagccat 120
gggacagaaa caggatcacac catggtactc gtcaacagga cacatcagta ctcagaaaaag 180
ggaagatgga caacaacaaac caacaactga ccaaccogat tgaatgggcca 240
ctgccaagaa acaatgaacc aagtgttatt gcccaaacag atgtgtgatt ggaagcaatg 300
gcttctctg aggaatccca tctctgtatt ttgaaaaact cgtgtattga accgatgga 360
gttgttcagc aaacacagct agacaagctg acacaagggc gacagaccta tgaatggact 420
ttaaataaga accagcctgc tgaacaagca ttggccaaca caatgaaagt gttcaagctc 480
aattgcccct cggccaatga gtcaggaagc ctctagactc tcttataagg tgaatggag 540
tcaatgaaa aagaagaat gggatgaca actcaatttc agagaaagag accgggtgag 600
gacaaataga ctgagaagaa ggaacaacag agaaatag tcaaaagga acagagattg 660
aaocaaaggg ctgtactaat tagcgctatt accctgaaca caatgccaaa agatgctgag 720
agaggaagtc taaaagggg agcaatgca accccaagga tgcaaaatag ggggttgtg 780
tactttgttg agaacctggc aaggagata tggtagaact ttgacaactc aggtttgcc 840
gttggagaca atgagaagga acaaatgttg tcaagaaagt taaggaaagt gatgaccaat 900
tctcagagca cccaactctt tttccacttc actcgagata acaccaaatg gaacgaaat 960
cagaactctc gggatgtttt tctccagatc acatataga ccagaatcca gccgaatgg 1020
tcagaagtg tttcaagat ttgctcaata atgttctcaa acaaaatgac gacactggga 1080
aaagggata tgtttgagc caagatgat aaacttagaa ctcaaatacc tgcagaatgt 1140
ctagaagca ttgatttga atatttcaac gatccaaca gaagaagat tgaaaaaatc 1200
cgaccctctc taalagaggg gactgatac ttgagccctg gaatgatgat gggcatgttc 1260
aatatgttaa gactatatt agcgctctcc actcagatc ttggcaaaa gactaaccc 1320
aaagactact actgtggga ttgtcttcaa tctctgaag attttgcctc gatgtgaa 1380
gcccactatc atgaaaggg atgacccgca gtcagcaggt tttactcaac ctttaagcta 1440
cttggaaaca atatgagcta gaaaaagttc tacataaaca gaacaggtac atttgaact 1500
acaagtittt tctatcgta ttggattgtt gccaattca gcatggagct tcccaagtt 1560
ggggtctctg ggatcaagca tgcagcggac atgagtattg gacttactgt catcaaaaac 1620
aatatgata acaatgact ttgtccaagc acagctcaaa tggcccttca gttgttoac 1680
aaagattaca ggtacatca ccgatgccat accgttcca cacaaaata acccccga 1740
tcaattgaaa taagaacct gttggagaca agagtgaca aagctgactc gctgttctcc 1800
gacggagggc caaatttata caaactatga aatccocaa tctctgaag ctgctcaaaa 1860
tgggaattga tggaggggg ogtttatgca cccaactgaa cccatttgc 1920

```

【図 2 - 8】

```

gaaactaaac tcaagtatta tggagggcgg ttgatccaaa acagcttaac aatagagaga 240
atggtgtcct ctgcttltga cgaaaaagga aataaatacc tggaaagaaca tcccagttcg 300
gggaaagatc ctaagaaaac tggagacctc atatacagaa gagtaaacgg aaagtggatg 360
agaaactcga tctttatgca caagaagaa ataaagcgaa tctgggcca agtaataat 420
ggtgagactg caacggctgg tctgactcac atgatgatc ggcattccaa ttgaaatgt 480
gcaacttatc agagggcaag gctcttgggt ogacccggaa tggatccnag gatgtgctc 540
ctgatgcaag gttcaactct ccttagaggg tctgagcccg caggtgctgc agtcaaaaga 600
gttggaaaca tggtagatga atttgtcaag atgatcaaac ctggggatca tctcggaa 660
ttctgagggg gtgagatgg acgaaaaaca agaattgctt atgaaagaat gtgcaacatt 720
ctcaagggga aatttcaaac tgcctgcaaca aaagcaatga tggatcaagt gagagagagc 780
cggaaaccag ggaatgctga gttcgaagat ctcaactttc tagcacggtc tgcactcata 840
ttgagaggtt cggttgtcca caagtctcgc ctgctgctc gttgtatgg acctgcocta 900
gcaagtgggt scgaatttga aagagagggg tactctctag tgggaataga ccccttcaag 960
ctgctcaaa acagccaatg gtacagccta atcagaccas atgagatcc agcacacaag 1020
agtcaactgg tggagatgg atgcccattc gcgcgacttg aagatcaag agtaattggc 1080
ttcaaaaag gaaagagggt gttccaagc atgaaagctt ccaactagag agttcaaat 1140
gcttcaactg aaatatgga taactatgaa taaagtacac tgaactgag aagcaagttac 1200
tgggcatata ggaccagaag tggagaaaac accaatcaac agagggatcc tgcgggcaa 1260
atcagcatac aactcagtt ctcaatcaag aaaaactctc cttttgacag acaaacctgt 1320
atggcagcat tcaactggga tacagagggg agaaactctg acatgagagc cgaactcata 1380
aggatgatgg aaagtcaag accagaagat gtgtctttcc agggcgggg agtcttoga 1440
ctctggagcg aaaagggcag gagcccagtc gttcctctc ttgacatgag taatgaagga 1500
tcttattctc tggagacaaa tgcagagggg taogacaatt aaagaaaaat acccttgttt 1560
ctact 1565

```

配列番号: 14

```

agcaaaagca ggtagatatt gaaagatgag tcttctaacc gaggtgaaa cgtactgtct 60
ctctatcact ccgtcaggcc cctccaagc ccagatgcca cagagacttg aagatgtctt 120
ttcaggggag acaacagatc ttgggtttct ctggaatgg ctaaaagaga ccaactctct 180
gtcaactctg atgaaggggt gtttagatt ttgtgtcaag ctcaactgctc cagtgagcg 240
aggactgagc cgtagactgt ttgtccaaaa tgccttaaat gggaaagggg atccaaata 300
catggacaaa gcagttaaac tttatagaaa gctcaagagg gagataaac tcaatggggc 360
caaaagaact tcaactcagtt attctgtctg tgcacttggc agttgtatgg gctcadata 420
caacagagatg ggggctgtga ccaactgaat ggcatttggc ctggtatgtg caacctgtga 480
acagatgctg gactcccagc atcggttcca tagcacaatg gtagacaaca ccaaccact 540
aatcagacat gagaaacgaa tggtttttag cagcaactaca ctaagggcta tggagcaaat 600
ggctggatcg agtgagcaag cagcagaggg ctggagaggtt gctagtcaag ctaggcaaat 660
ggtgcaagcg atgagaacca ttgggactca tctagactcc agtgcgtgct tgaaaaatga 720
tctcttgaaa aatttgcagg cctatcaaaa acogaatggg gtagagatg caacggttcaa 780
gtgactctct cgtattggc gcaaatatca ttgggactct ccaacttata ttgggtatg 840
ttgactgctt ttttttcaaa tgcacttccc ctgctcttca atcagacttg aaagggggc 900
ctctcaagga agagggca agtctatgga ggaagata tgaagagaa cagcaagaa 960
ctgtggggc tgaagatggt cattttgcga gcatagagct ggaataaaa actacttgt 1020
rtctact 1027

```

配列番号: 15

```

agcaaaagca ggtgacaaa gacataatg atocaaacac tgtgtcaagc tttcaggtag 60
atgtcttctc ttggatgtgc cgcacaagag ttgcagacca agaactaggt gatgcccact 120
tctttagctg gcttgcgca gatcagaat cctaaagagg aagggcagc actctgtctc 180
tggactatga gacagccaca cgtgctggaa acagacatgt ggaagcagtt ctgaaagag 240
aatccgatga ggcacttaaa atgaccatgg cctctgtacc tgcgtcgtt tactaaacc 300
acatgactct gaggaaatg tcaagggaaat ggtccatgct ataccaaac cagaagatgg 360
cagggcctct ttgatcaga atggaaccagc cgaactatga taaaactct atactgaaag 420
cgaactcagc tgtgatttt gaccggctgg agactctaat atgtcaagc gctttccagc 480
aagagggagc aattgttgc gaaattccac catctgcttc tottccagga catactgct 540

```

【図 2 - 7】

```

agccataaag aaattgaatc aatgaaact gcagtgatga tggcagcaac tggttccagcc 1980
aaaaacatgg agtatgatgc tttgtcaaca acacactctt ggtccccca aaaaaataga 2040
tccactttga atcaagatca aagagagata cttgaaatga acaaatgta ccaaggtgc 2100
tgcatttat ttgaaaaat ctccccacc agttcaacc agtaaccag cggatattcc 2160
agtatggtgg aggotgatgt tccagagacc cgaatgatg cagagatga tttcgaatc 2220
ggaagataaa aaaaaagaa ttcaactgag atcaatgaag tctgtttcac caatgaaagc 2280
ctcagagcgg aaaaatagtg aatttagctt gctctctag aaaaaatgct ttgtttctac 2340

```

配列番号: 12

```

agcgaagaa ggtactgatt caaaaatgaa gatattgtgc gacaatgctt caatccagtg 60
atgtgcagc ttgcggaaaa acaaatgaaa gattatgggg aggacctgaa aatcgaace 120
aacaatttg cagaatagc cactcaactg gggatgtgct tcaatgtatc agatttccc 180
ttcaactaag agcaagggca gtcactaatc gtgaaacttg gttatccaa tgcacttttg 240
agtatttga cactcaagc ggtcagaaa galcgcaca ttgocggacc agtagtaaac 300
aaggaaaaa gattcatga aattggagta caaaggagag aagttccact atactatct 420
gaaaagata ataaaaata atctgaaaa acacactcc accattttcc ttcaactggg 480
gaaagaaat ccacaagggc cgtactacat ctgtagag agagcagggc taggatcaaa 540
accagctat taccataag acaagaaat gccagcagag gctctggga tctctctgt 600
cagtcagaga gaggagaaga gacaattgaa gaaagtttg aatcacagc acaactgccc 660
aagcttccgc accaaagct cccgcgcaac ttctccagc ttgaaaatt tagagctat 720
gtgtagggt tcgaaccgaa cggctacat gagggcaagc tctctcaat gtcocaaaga 780
gtaaatgcta gaattgaac tttttgaaa acaaacacc gacccttag acttccgat 840
gggctctcct gttctcagc gttcaaatlc ctgctgatg atcgocaa atgaaactaa 900
gagggcccaa gctatgaag agagagaata ccgctatg atgaaactaa atgaactttg 960
acattcttg gatggaaaga acccaatgtt gtaaaacc atgaaaggg aataaactga 1020
sattatctc tgcctgaa gaaagtact gcagaactg agacattgc gaatgagga 1080
aaaatccaa agactaaaa tatgaaaaa acaagtttc taagctggc acttggttg 1140
aatcagcaca cagaaaaggt agactttgac gactgcaagc atgtatgga tttgaaagc 1200
tatgatagtg atgaocaga attgagctg cttgcaagt ggatccaga tgaatcaac 1260
aaggaatgg aactgacaga tcaacgtcg atagagctg atgactatgg agaatgtg 1320
gttccaatg aacacattg aagcatgaa agaatatt tccatcaga ggtgtctac 1380
ttcagagcca cagaatcac aatgaaaggg gttgacata atactgctt acttaatgca 1440
tttgtgagc caatgagta tttccaaata atcccaagc taagcagtg tagaactaa 1500
gagggagggc gaaagccaa cttgtatgt ttcatataa aaggaagatc ccaactaaag 1560
aatgacaccy acgtggtaaa ctttltgagc atggggtt ctctcaactg ccaagactc 1620
gaaacacaa aatgggaaa gtaactgt ctgagatg gatgatgct tcaagaagt 1680
atcaactgg aggttcaag gccatgct ttgatgtgc gaaabaact agccataaa 1740
atlaaatga aatggggat ggaatgagc cgttgtctc tccactgct tcaaaaact 1800
gagatgtga tgaagctga gctctctc aagagaag acatgacca agatgcttt 1860
gagaacaaat cagaacatg gccatttga gacttccca aagagtgga gaaagtctc 1920
atltggaaag tctcagagc tttatagca aagtctgat tcaacagct gtagtctc 1980
ccaacatag aagatttcc agtgaatca atgaaactg ttctatctc tcaagctct 2040
agggcaact tggacctgg gactttgat ctgtggggcg tatatgagc aatgagag 2100
tgcctaaata atgatccct gttttgctt aatgctctt ggttcaact ctctctca 2160
catgattga gttatgtg gcaagtctac ttttgcata ccaactgctc caaaaaagta 2220
cctgttct act 2233

```

配列番号: 13

```

agcaaaagca ggttagataa tcaactcagc agtgacatca aatcactggc gtcocaaagc 60
accaaacggt cttacgaca atgagactc gatggaaac gccagaatgc cactgaaatc 120
agagcatccg tggaaaaat gattggtgga atrgagcat tctacatca aatgtgaca 180

```

【図 2 - 9】

```

aggatgtcaa aaatgcagtt ggagtctca tcggaggact tgaatgaaat gataaacag 600
ttcagatctc tgaacctca cagagatctc cttggagaag cagtaatgag aatggagag 660
ctccactcct tccaaaacc aaacgagaaa tggcgggaac aataggtca gaagttyaa 720
gaaataagat gtttgatga agaatgaga ccaaacact agttaacga gaatgttt 780
gagcaataa cattaatga agcctaacat ctatgctg agtggagca agagataaga 840
actttctat ttcagcttac ttaataataa aaaaacacct ttgtttact 890

```

【 図 4 】

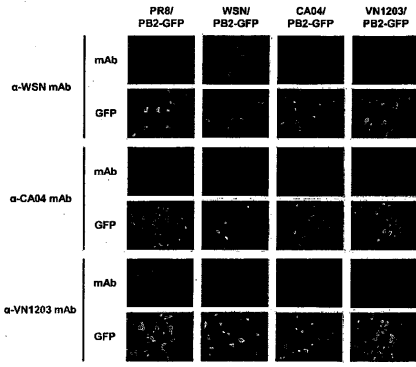


FIGURE 4

【 図 5 】

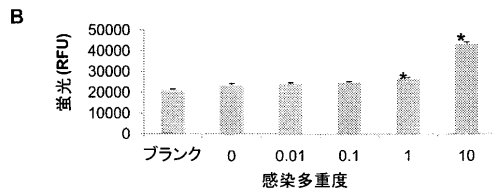
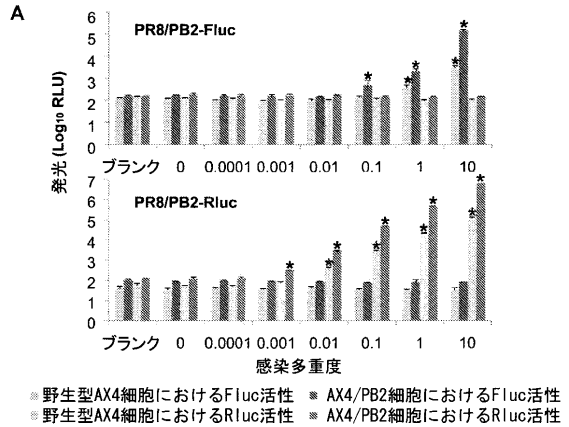


FIGURE 5

【 図 6 】

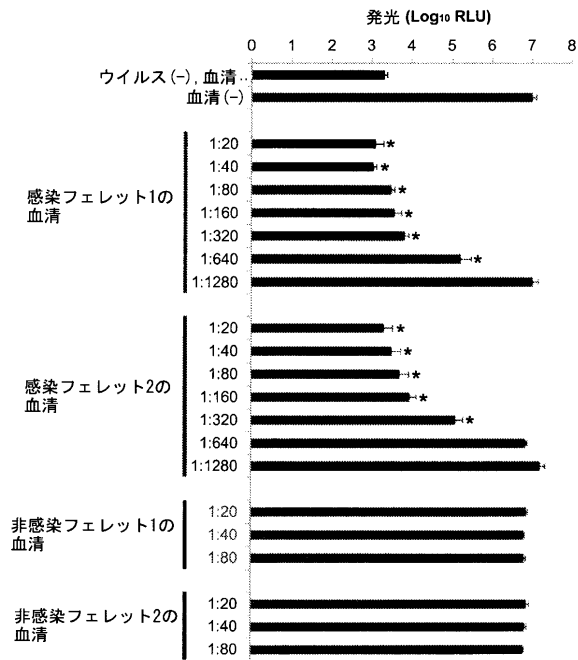


FIGURE 6

【 図 7 】

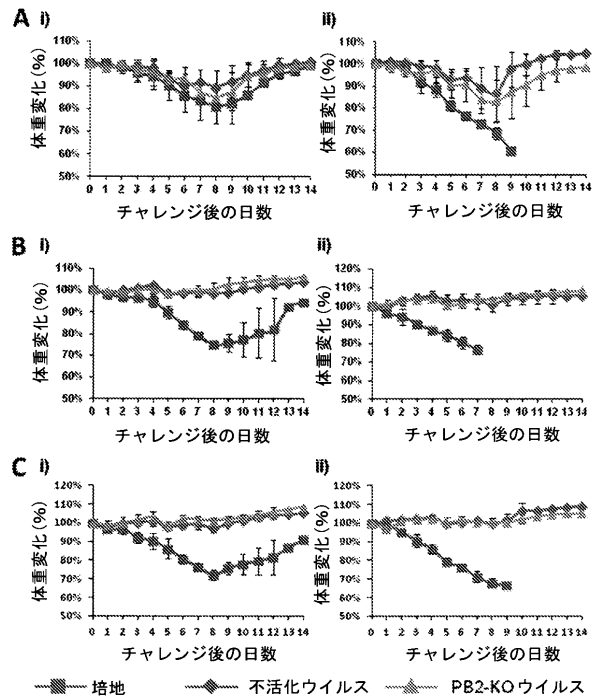


Figure 7

【 図 8 】

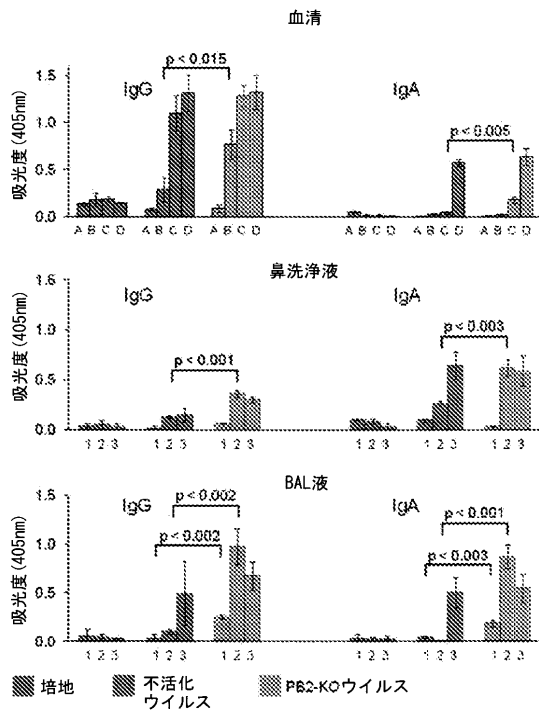


Figure 8

【 図 9 】

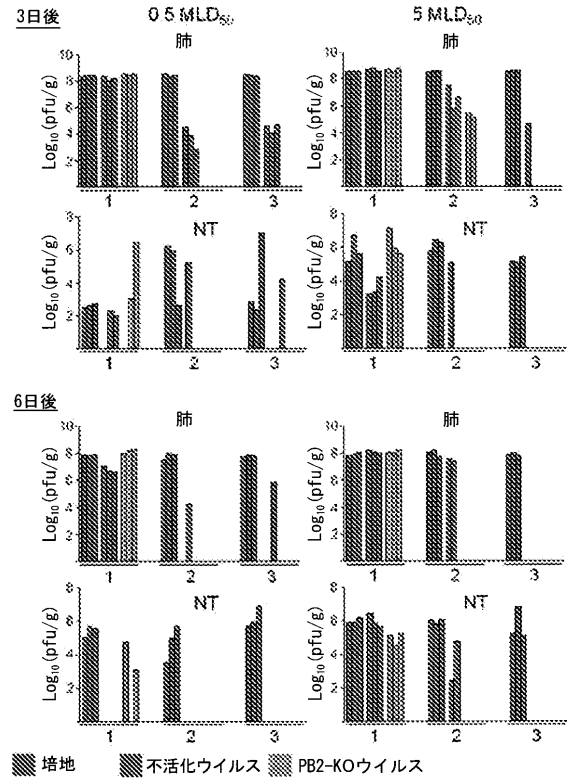


Figure 9

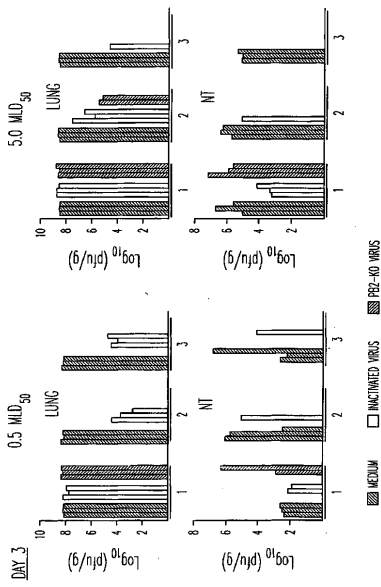


FIGURE 9A

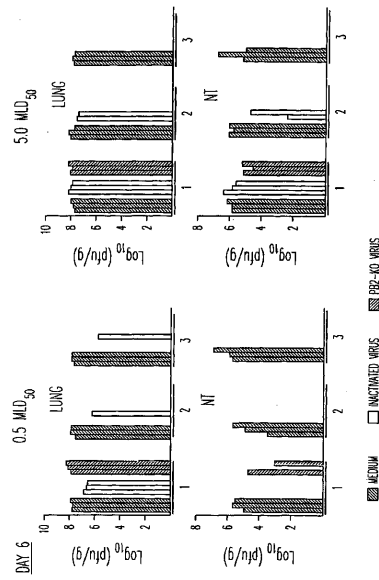
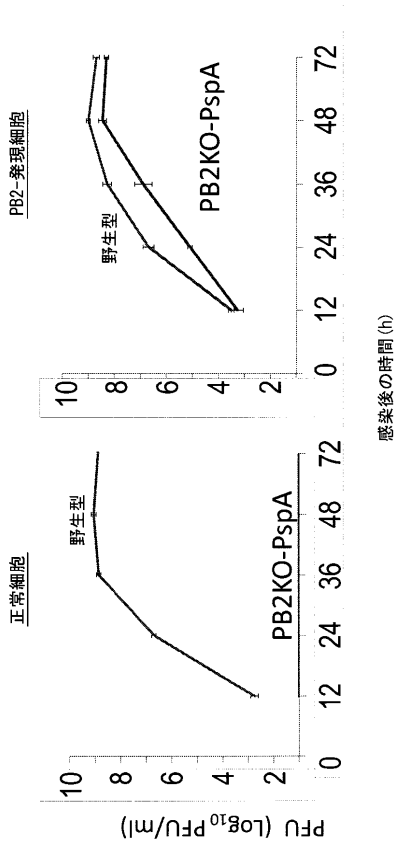


FIGURE 9B

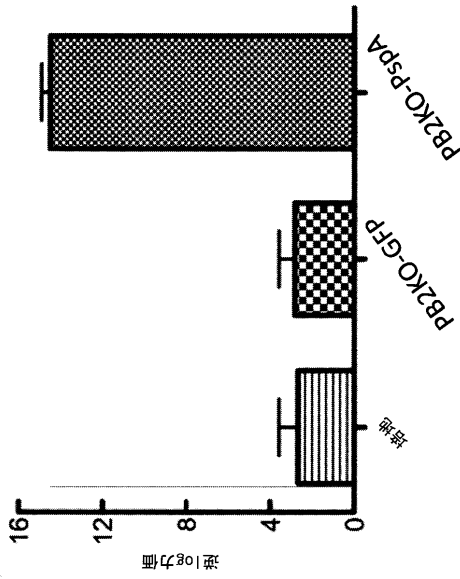
【 図 1 2 】

Fig 12. PB2KO-PspAウイルスの成長速度



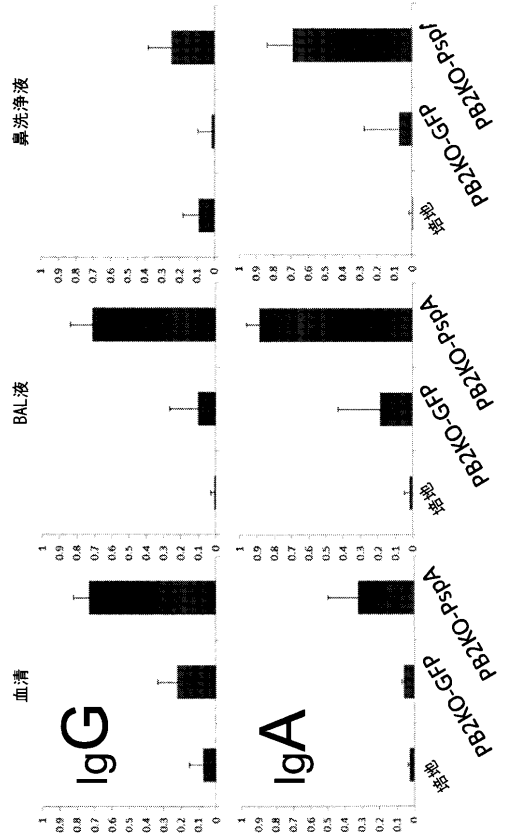
【 図 1 4 】

Fig 14. 肺炎球菌特異的抗体血清中のIgG



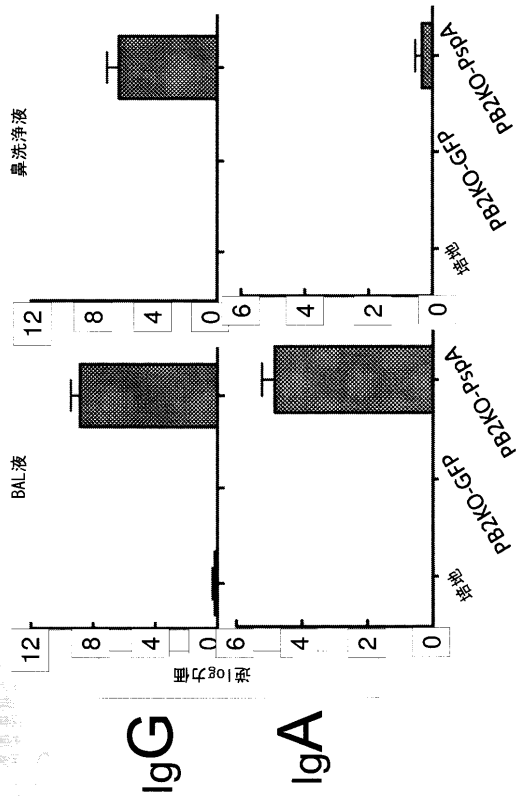
【 図 1 3 】

Fig 13. インフルエンザ特異的抗体

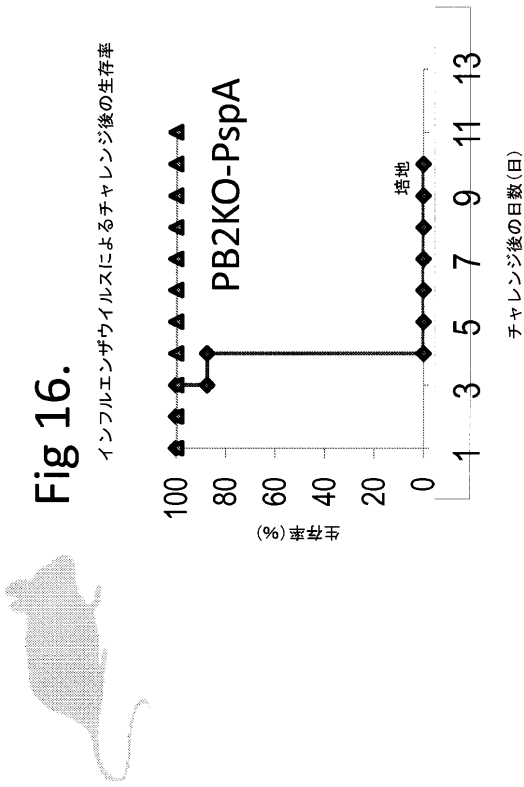


【 図 1 5 】

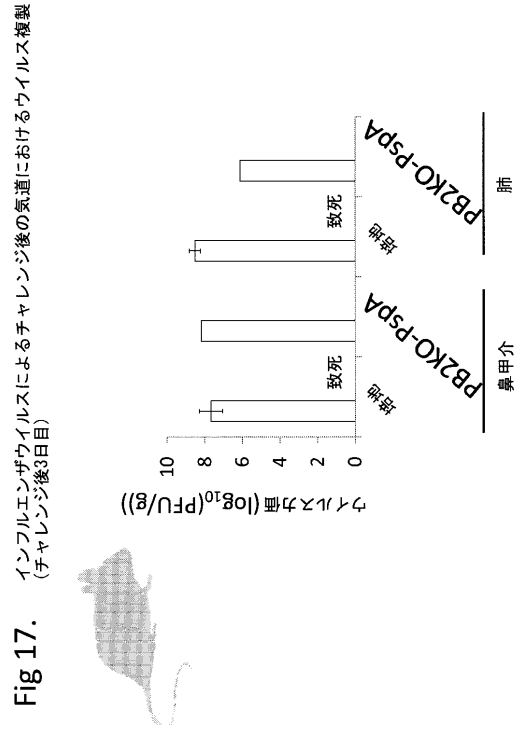
Fig 15. 肺炎球菌特異的抗体(気道)



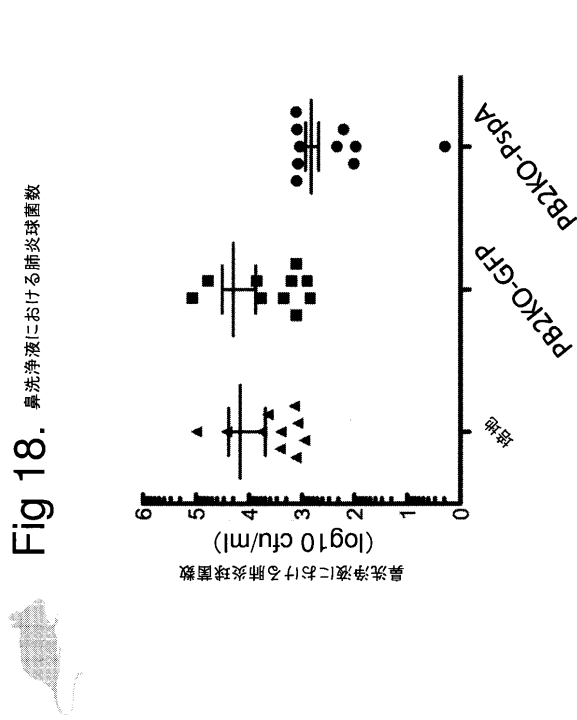
【 図 1 6 】



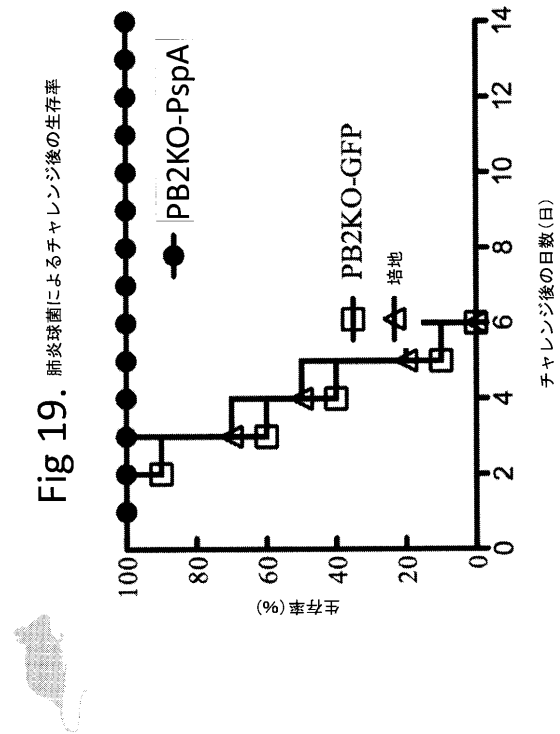
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【図3】

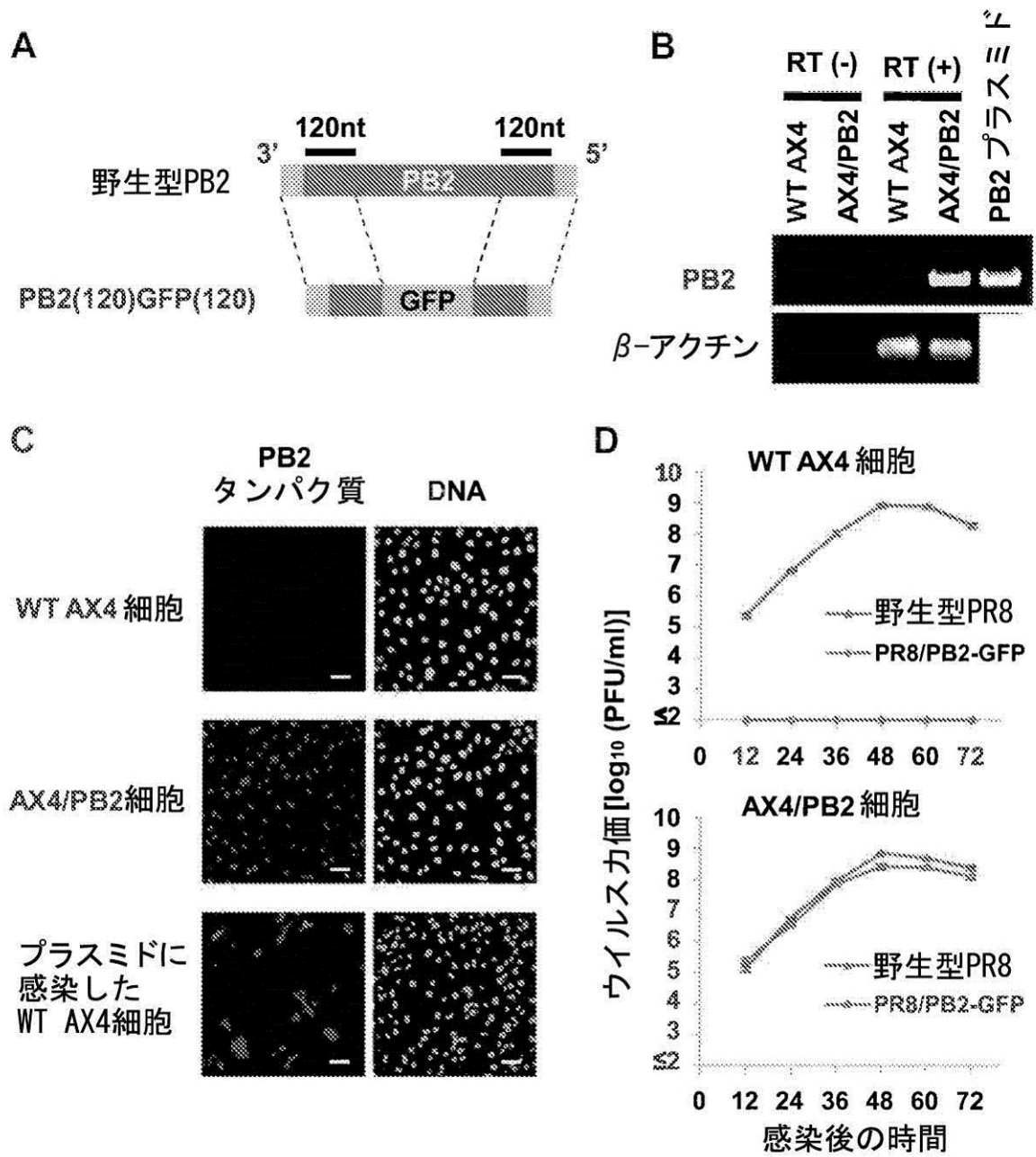


FIGURE 3

【 図 1 0 】

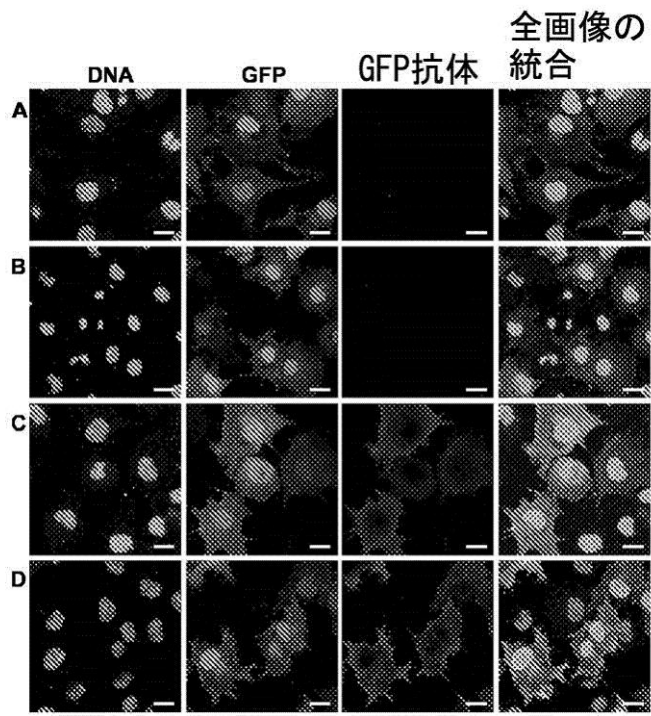
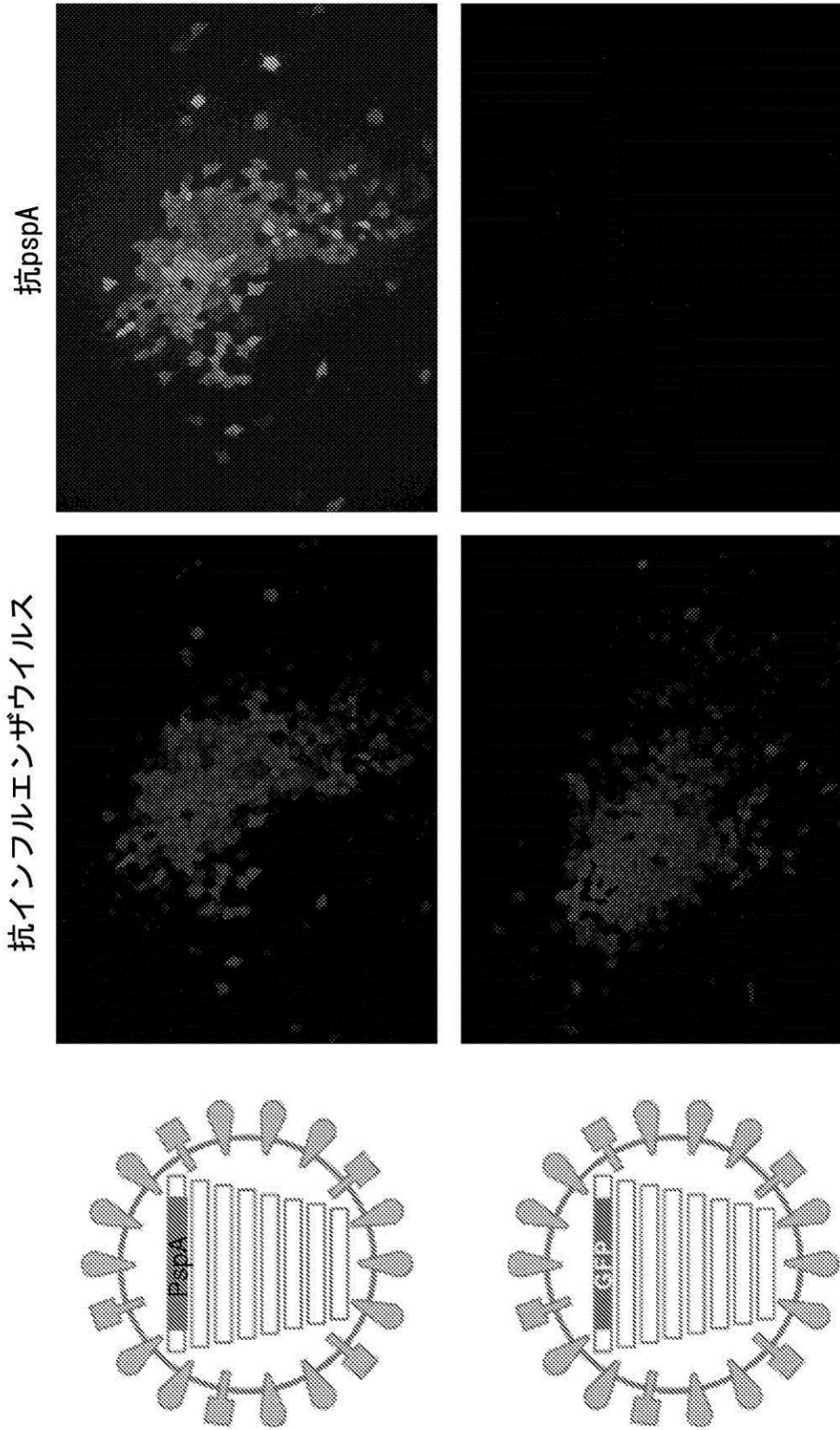


Figure 10

【 図 1 1 】

Fig 11. 肺炎球菌のpspAを発現するPB2KOウイルス



【 配 列 表 】
[2014527799000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/052368

| | |
|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | |
| INV. A61K39/145 C12N7/00 G01N33/569 ADD. | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | |
| B. FIELDS SEARCHED | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N G01N | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages |
| | Relevant to claim No. |
| A | <p>WATANABE SHINJI ET AL: "Influenza A Virus Lacking M2 Protein as a Live Attenuated Vaccine", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 83, no. 11, June 2009 (2009-06), pages 5947-5950, XP002687007, ISSN: 0022-538X page 5947, left-hand column, last paragraph - page 5948, right-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p> |
| | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 13 November 2012 | 03/12/2012 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Sitch, David |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2012/052368 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X,P | OZAWA MAKOTO ET AL: "Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 92, no. Part 12, December 2011 (2011-12), pages 2879-2888, XP002687008, ISSN: 0022-1317 the whole document ----- | 1-39 |
| X,P | VICTOR SYLVIA T ET AL: "A Replication-Incompetent PB2-Knockout Influenza A Virus Vaccine Vector", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 86, no. 8, April 2012 (2012-04), pages 4123-4128, XP002687009, the whole document ----- | 1-39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/052368

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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 K 39/145 (2006.01) | A 6 1 K 39/145 | |
| A 6 1 P 31/16 (2006.01) | A 6 1 P 31/16 | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | N |
| G 0 1 N 33/569 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |
| | G 0 1 N 33/569 | L |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72) 発明者 河岡 義裕

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 6 2, ミドルトン, エアポート ロード 8 7 2 2

(72) 発明者 ガブリーレ ノイマン

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 7, マディソン, ランドルフ ドライブ 2 3 4, アパートメント 3 1 6

(72) 発明者 小澤 真

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 0 5, マディソン, シェボイガン アベニュー 5 0 0 2, アpartment 1 5 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 CA20 EA04 FA02 GA11 HA01 HA08

4B065 AA90X AA91X AA93X AA95X AB01 AC20 BA02 BA14 CA45

4C085 AA03 AA04 AA38 BA55 CC08 DD62 EE01 EE03 EE06 FF24

GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 流感病毒作为具有突变PB2基因区段的减毒活疫苗 | | |
| 公开(公告)号 | JP2014527799A | 公开(公告)日 | 2014-10-23 |
| 申请号 | JP2014527339 | 申请日 | 2012-08-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 威斯康星校友研究基金会 | | |
| 申请(专利权)人(译) | AW代理伯爵的F - 威斯康星校友研究基金会 | | |
| [标]发明人 | 河岡義裕 ガブリーレノイマン 小澤真 | | |
| 发明人 | 河岡 義裕 ガブリーレ ノイマン 小澤 真 | | |
| IPC分类号 | C12N7/04 C12N15/09 C12N15/00 C12N5/10 C12N7/00 A61K39/145 A61P31/16 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 | | |
| CPC分类号 | A61K39/092 A61K39/12 A61K39/145 A61K2039/5252 A61K2039/5254 A61K2039/5256 A61K2039/543 A61K2039/70 A61P31/16 C12N7/00 C12N2760/16121 C12N2760/16134 C12N2760/16143 C12N2760/16171 G01N33/56983 G01N2333/11 A61K35/76 C12N2760/16151 | | |
| FI分类号 | C12N7/04 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C12N5/00.102 C12N7/00 A61K39/145 A61P31/16 G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/569.L | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA08 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA14 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/AA38 4C085/BA55 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 | | |
| 代理人(译) | 青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎 | | |
| 优先权 | 61/527935 2011-08-26 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了重组生物学上含有的流感病毒，它是PB2敲除病毒，例如可用于产生多价疫苗的病毒，以及制备和使用该病毒的方法。

| ウイルス | 由来 | | | その他の遺伝子 |
|----------------|---------------------|--------|---------------------------------|---------|
| | HA遺伝子 | NA遺伝子 | PB2遺伝子 | |
| 野生型PR8 | PR8 ¹ | PR8 | PR8 | |
| PR8/PB2-GFP | PR8 | PR8 | PB2(120)GFP(120) ¹¹ | |
| PR8/PB2 | PR8 | PR8 | - ¹ | |
| WSN/PB2-GFP | WSN ¹ | WSN | PB2(120)GFP(120) | |
| CA04/PB2-GFP | CA04 ¹ | CA04 | PB2(120)GFP(120) | PR8 |
| VN1203/PB2-GFP | VN1203 ¹ | VN1203 | PB2(120)GFP(120) | |
| PR8/PB2-Rluc | PR8 | PR8 | PB2(120)Rluc(120) ¹¹ | |
| PR8/PB2-Fluc | PR8 | PR8 | PB2(120)Fluc(120) ¹¹ | |
| CA04/PB2-Rluc | CA04 | CA04 | PB2(120)Rluc(120) | |

¹PR8: A/Puerto Rico/8/34(H1N1)

¹¹WSN: A/WSN/33(H1N1)

¹CA04: A/California/04/09(H1N1)

¹VN1203: A/Vietnam/1203/04(H5N1)

HA: 膜タンパク質 (RRRRKR)IG中の膜のタンパク質ミニドメイン、膜タンパク質の膜タンパク質 (RETR)IGに置換した。

¹¹PB2(120)GFP(120)、PB2(120)Rluc(120)、およびPB2(120)Fluc(120) GFP、
 タルシフェラーゼ、およびシグナルペプチド遺伝子が、それぞれPB2遺伝子の3' および5' 末端に
 および3' および5' コード別の120塩基にアミノ酸が挿入されている。

¹ - 該当せず