(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-17185
(P2010-17185A)
(43)公開日　平成22年1月28日(2010.1.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C085
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	A	4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　（全 65 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-192598 (P2009-192598)
(22)出願日　平成21年8月21日 (2009.8.21)
(62)分割の表示　特願2002-579516 (P2002-579516)の分割
原出願日　平成14年4月4日 (2002.4.4)
(31)優先権主張番号　09/826,115
(32)優先日　平成13年4月4日 (2001.4.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500554265
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８５２－３８０４，　ロックビル，　エグゼクティブ　ブールバード　６０１１，　スイート　３２５，　オフィス　オブ　テクノロジー　トランスファー，　ナショナル　インスティチューツ　オブ　ヘルス
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】フラビウイルス感染症の予防のための核酸ワクチン

(57)【要約】
【課題】フラビウイルスによって引き起こされる疾患の治療および予防の双方において用いられる新規ワクチン、診断薬および方法を提供すること。
【解決手段】本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位（TU）を含む核酸分子を提供する。TUは、細胞内に取り込まれた後、宿主細胞に抗原を合成するように指示する。本発明の重要な局面において、フラビウイルスは、黄熱病ウイルス（YFV）、デング血清型1型ウイルス（DEN-1）、デング血清型2型ウイルス（DEN-2）、デング血清型3型ウイルス（DEN-3）、デング血清型4型ウイルス（DEN-4）、セントルイス脳炎ウイルス（SLEV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、西ナイルウイルス（WNV）、ポワッサンウイルスまたは他の如何なるフラビウイルスとなりうる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本明細書に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、1998年6月4日に提出された米国特許仮出願第60/087,908号からの、かつその恩典を主張する、1999年6月3日に提出された国際出願第PCT/US99/12298号の国内段階出願であり、かつ現状は係属中である、2000年11月29日に提出された米国特許出願第09/701,536号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、かつ現状は係属中である、2001年4月4日に提出された米国特許出願第09/826,115号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、これらの出願はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。
【０００２】
発明の分野
本発明は、フラビウイルスによって引き起こされる疾患の治療および予防の双方において用いられる新規ワクチン、診断薬および方法に関する。特に、ワクチンは、日本脳炎ウイルス（JEV）、西ナイルウイルス（WNV）、または関連フラビウイルスのようなフラビウイルスの構造蛋白質の遺伝子を含む組み換え型核酸である。これらのワクチンは、インビボで投与した場合にウイルス蛋白質抗原を生合成するための転写単位として作用する。診断薬は、フラビウイルス感染症を検出するために用いることができる組み換え型核酸から作製した抗原を含む組成物である。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
フラビウイルスは、フラビウイルス科に分類されるフラビウイルス属のメンバーである。フラビウイルスは、ヒトおよび他の哺乳類に対して主として病原性である。ヒトおよび動物に疾患を引き起こすフラビウイルスには、アルフュイ（Alfuy）、アポイ（Apoi）、アロア（Aroa）、バガザ（Bagaza）、バンジ（Banzi）、バツ洞（BatuCave）、ブブイ（Bouboui）、ブカラサコウモリ（Bukalasa bat）、ブスクアラ（Bussuquara）、カシパコア（Cacipacore）、カーリー島（CareyIsland）、カウボーンリッジ（Cowbone Ridge）、ダカールコウモリ（Dakar bat）、デング（Dengue）（血清型1、2、3および4）、エッジヒル（EdgeHill）、エンテベコウモリ（Entebbe bat）、ガジェッツガリー（Gadgets Gully）、イグアペ（Iguape）、イルヘウス（Ilheus）、イスラエル七面鳥髄膜脳炎（Israeltur key meningoencephalitis）、日本脳炎（Japanese encephalitis）、ジュグラ（Jugra）、ジュチアパ（Jutiapa）、カダム（Kadam）、Karshi（カーシ）、ケドーゴー（Kedougou）、ココベラ（Kokobera）、コウタンゴ（Koutango）、クンジン（Kunjin）、キャサヌール森林病（KyasanurForest disease）、ランガト（Langat）、メアバン（Meaban）、モドック（Modoc）、モンタナ筋炎白質脳炎（Montana myotisleukoencephalitis）、マリーバレー脳炎（Murray Valley encephalitis）、ナランジャル（Naranjal）、ネギシ（Negishi）、ウンタヤ（Ntaya）、オムスク出血熱（Omskhemorrhagic fever）、プノンペンコウモリ（Phnom Penh bat）、ポチスクム（Potiskum）、ポワッサン（Powassan）、リオブラボー（RioBravo）、ロシオ（Rocio）、ロイヤルファーム（Royal Farm）、ロシア春夏脳炎（Russian spring summerencephalitis）、サボヤ（Saboya）、サルビエジャ（Sal Vieja）、サンパーリタ（San Perlita）、サウマレツリーフ（SaumarezReef）、セピク（Sepik）、ソクルク（Skuluk）、スポンドウェニ（Spondweni）、セントルイス脳炎（St. Louisencephalitis）、ストラトフォード（Stratford）、ダニ媒介脳炎-中欧サブタイプ（Tick-borne encephalitis -Central European subtype）、ダニ媒介脳炎-極東サブタイプ（Tick-borne encephalitis - far easternsubtype）、テンブス（Tembusu）、THCAr、チュレニイ（Tyuleniy）、ウガンダS（Uganda S）、ウスツ（Usutu）、西ナイル（WestNile）、ヤウンデ（Yaounde）、黄熱病（Yellow fever）、ヨコセ（Yokose）、ジキ（Ziki）、

細胞融合物質およびKunoら（J.Virol. 72：73～83（1998））に記載される他の関連フラビウイルスが含まれる。

【０００４】

フラビウイルスは、以下の三つの構造蛋白質を含む：prM/M、前膜および膜蛋白質；E、エンベロープ蛋白質；およびC、カプシド蛋白質。（非特許文献１；非特許文献２）。Mは分子量（MW）約7～8キロダルトン（kDa）であり、Eの分子量は約50kDa～60kDaである。MはprMと呼ばれるより大きい前駆体として合成される。prMのpr部分は、prMが成熟ビリオンにおいてM蛋白質を形成するように処理される際に除去される。MおよびEは、フラビウイルス粒子の膜に存在し、そのため、長い間ウイルスの重要な免疫原性成分を構成すると考えられてきた。

【０００５】

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

【０００６】

特許文献１に要約されているように、いくつかのフラビウイルスのゲノムのヌクレオチド配列が既知である。JEVのヌクレオチド配列は、非特許文献３および非特許文献４によって提供されている。JEVのビルレント株SA-14および中華人民共和国においてワクチンとして用いられている弱毒株SA-14-14-2のヌクレオチド配列は、非特許文献５の研究において比較されている。

【０００７】

他のフラビウイルス種の構造蛋白質をコードするヌクレオチド配列も既知である。多くの場合、完全なゲノムの配列が報告されている。利用できる配列には、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス（非特許文献６；非特許文献７；非特許文献８）、デング血清型3型ウイルス（非特許文献９）、デング血清型4型ウイルス（非特許文献１０；非特許文献１１）、西ナイルウイルス（非特許文献１２）、ポワッサンウイルス（非特許文献１３）、および黄熱病ウイルス（YFV）（非特許文献１４）が含まれる。

【０００８】

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

【０００９】

西ナイル熱は、主に様々な種のイエカ（Culex mosquitoes）によって脊椎動物に伝幡される、蚊媒介性フラビウイルス感染症である。JE、SLE、およびマリーバレー脳炎（MVE）ウイルスを含むフラビウイルスの日本脳炎（JE）抗原性複合体の他のメンバーと同様に、WNVは、節足動物ベクターとトリの間の天然のサイクルにおいて維持される。このウイルスは1937年にウガンダの西ナイル地区で発熱した人から初めて単離された（非特許文献１５）。まもなく、これは最も広く分布するフラビウイルスの一つであると認識され、その地理的範囲は、アフリカ、中東、西アジア、ヨーロッパおよびオーストラリアに及ぶ（非特許文献１６）。臨床的には、ヒトにおける西ナイル熱は、頭痛、筋肉痛、多発性関節症、発疹およびリンパ節症を伴う自己限定性の急性発熱性疾患である（非特許文献１７）。急性肝炎または膵炎が時に報告されており、高齢患者におけるWNV感染症の症例は、時に脳炎または髄膜炎を併発する（非特許文献１８）。このように、WNVによる感染症は、世界の多くの地域において健康に関する重篤な懸念である。

【００１０】

疾患の地理的伝幡、特にWNVが1999年にアメリカ合衆国に入ったことは、この疾患のヒ

トおよび動物の健康への懸念に対する関心を大きく増加させた。1999年の8月の終わりから9月の初めにかけて、ニューヨーク市およびその周辺地域において、ウイルス脳炎が大発生して、確認症例は62例、死亡7例を認めた。この大流行と同時に、地域の保健担当者は、トリ（特にカラス）およびウマにおける死亡率の増加を認めた。大流行はその後、モノクローナル抗体（Mab）マッピングおよびヒト、トリ、および蚊の標本におけるゲノム配列の検出に基づき、WNVによって引き起こされたことが示された（非特許文献１９；非特許文献２０；非特許文献２１）。続く冬の月の間に検出されたウイルス活性は、ウイルスが北米で確立したことを示した（非特許文献２２；非特許文献１８；非特許文献２３）。2000年の間に北東部および大西洋中部の州から報告された調査データから、強まった家畜流行性／流行性伝幡およびウイルスの地理的拡大が確認され、ヒトのみならずトリ、蚊およびウマにおける多数の感染例が報告された（非特許文献２４）。

【００１１】

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

【００１２】

日本脳炎ウイルス（JEV）は、成人および子供に感染し、熱帯および亜熱帯アジア地域では、幼児、子供、および高齢者における死亡率は高い（非特許文献２５）。生存者において、感染後も持続する脳炎の症状に関連した重篤な神経学的結末が起こる。日本、台湾、および韓国のようなこの地域のより先進国では、JEVは、不活化JEVのワクチンを用いることによってほぼ制御されている。それにもかかわらず、この地域の他の国ではなおも流行している。

【００１３】

JEV感染症に対して用いるために利用できるワクチンには、ホルマリン処置のような方法によって不活化した生きたウイルスと共に、弱毒化ウイルスが含まれる（非特許文献２６）。全ウイルスワクチンは有効であるが、特定の問題および／または短所を有する。ウイルスは、マウス脳において、または宿主として哺乳類細胞を用いる細胞培養において培養する。そのような培養法は、厄介で費用がかさむ。さらに、宿主細胞、すなわち脳または他の宿主からの抗原を最終的なワクチン産物に組み入れることに付随したリスクがあり、おそらくワクチンレシピエントにおいて意図しない、かつ望ましくないアレルギー反応を引き起こす。同様に、ワクチン産生に従事する労働者における偶発的な感染症のリスクも存在する。最後に、ウイルスが十分にまたは完全に不活化または弱毒化されていない可能性があり、このようなワクチンが実際に疾患を引き起こす可能性があるというリスクがある。

【００１４】

デング熱およびデング出血熱（DF/DHF）は、同様に蚊が媒介するフラビウイルスであるデングウイルスによって引き起こされる。四つの抗原的に関連した、しかし異なるデングウイルス血清型（DEN-1、DEN-2、DEN-3およびDEN-4）が存在し、その全てがDF/DHFを引き起こしうる。デング関連疾患の軽症型であるDFの症状には、発熱、発疹、重度の頭痛および関節痛が含まれる。DFを有する被験者の死亡率は低い；しかし、DHFを有する被験者では死亡率は5％もの高さとなりうる。利用可能な証拠から、過去40年間にDHFの300万以上の症例および58,000例以上の死亡例の原因がDHFであり、DHFは主な新たな疾患となっている（非特許文献２７）。それにもかかわらず、何十年もの努力にもかかわらず、デングウイルス感染症に対して保護する安全かつ有効なワクチンはなおも利用できない。

【００１５】

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

【００１６】
二つのフラビウイルスのキメラである組み換え型フラビウイルスは、特許文献２に開示されている。キメラは、デングウイルスまたはフラビウイルスの一つの「タイプ」または血清型からの非構造蛋白質を、デングウイルスまたは他のフラビウイルスの異なる「タイプ」または血清型からの構造蛋白質と融合した構築物である。
【００１７】
近年、いくつかの組み換え型サブユニットおよびウイルスワクチンが考案されている。特許文献３は、ワクチンにおける抗原として用いるためのJEVのE糖蛋白質の産生について記述している。大腸菌、酵母、または高等生物の細胞培養物のような適した宿主細胞において抗原蛋白質を発現させるために、対応するDNAを発現系にクローニングする。特許文献４は、JEV E蛋白質の遺伝子を有する組み換え型とバキュロウイルスを開示する。E蛋白質が産生され、ワクチンとして用いるために回収されるように、ウイルスを用いて培養昆虫細胞に感染させる。
【００１８】
特許文献５は、JEV E蛋白質の遺伝子が組み入れられる組み換え型ワクシニアウイルスゲノムを開示する。生きた組み換え型ワクシニアウイルスは、JEVに対して免疫するためのワクチンとして用いる。ウイルスがデング血清型2型、デング血清型4型およびJEVのE蛋白質のC-末端切断型の遺伝子を組み入れる組み換え型ワクシニアウイルスおよびバキュロウイルスは、特許文献１に開示される。特許文献６は、prMからNS2Bに及ぶJEVオープンリーディングフレームの一部を発現する様々な組み換え型ワクシニアウイルスを開示する。これらのポックスウイルスは、プロセシングされたM蛋白質およびE蛋白質を含む細胞外粒子の形成を誘導した。これらのJEV蛋白質をコードする二つの組み換え型ウイルスは、高い力価の中和およびヘムアグルチニン阻害抗体を産生し、マウスにおいて保護免疫を生じた。これらの効果の程度は、1回限りの免疫後より2回免疫処置後のほうが大きかった。JEVのprM/MおよびE蛋白質の遺伝子を含む組み換え型ワクシニアウイルスは、マウスに投与すると保護免疫を付与した（非特許文献２８）。JEVからのprMおよびEの遺伝子を有する組み換え型ワクシニアウイルスに感染させたHeLa細胞は、サブウイルス粒子を産生することが示された（非特許文献２９）。Dmitrievらは、ダニ媒介脳炎ウイルスの構造蛋白質および特定の非構造蛋白質をコードする組み換え型ワクシニアウイルスによるマウスの免疫を報告した（非特許文献３０）。
【００１９】
組み換え型ウイルスベクターも同様に、デング熱のウイルスワクチンとして役立てるために調製されている。Zhaoら（非特許文献３１）は、デング血清型4型からの構造蛋白質およびNS1を有する組み換え型ワクシニアウイルスを調製して、哺乳類細胞を組み換え型ウイルスに感染させた後発現を得た。類似の発現は、標的昆虫細胞に感染させるために組み換え型バキュロウイルスを用いて得られた（非特許文献３２）。Brayら（非特許文献３３）も同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対する保護免疫をマウスに付与する、E蛋白質遺伝子に基づく組み換え型ワクシニアデングワクチンを報告した。Falgoutら（非特許文献３４）およびFalgoutら（非特許文献３５）は、類似の結果を報告した。Zhangら（非特許文献３２）は、デングEおよびNS1蛋白質をコードする組み換え型バキュロウイルスが同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対してマウスを保護することを示した。構造遺伝子と非構造遺伝子とを組み換え型ウイルスワクチンに組み入れた他の組み合わせは、有意な免疫を生じることができなかった（非特許文献３３）。同様に、サルは、E蛋白質を発現する組み換え型バキュロウイルスによって免疫した場合に、デングウイルスチャレンジに対して十分な保護免疫を産生できなかった（非特許文献３６）。
【００２０】
組み換え型DNA調製物を用いた免疫は、モデルとして離乳したばかりのマウスを用いて、SLEVおよびデング-2ウイルスに関して報告されている（非特許文献３７；非特許文献３８）。SLEVのprMおよびE遺伝子をコードするプラスミドDNAは、DNA免疫の1回用量または2回用量によるSLEVチャレンジに対して部分的保護を提供した。これらの実験において、対

照マウスは約25％の生存を示し、DNA免疫マウスには保護抗体は検出されなかった（非特許文献３７）。prMを含む組み換え型デング-2プラスミドDNAの皮内注射を3回行ったマウスでは、100％が抗デング-2中和抗体を産生し、対応するE遺伝子を投与したマウスの92％が同様に中和抗体を産生した（非特許文献３８）。しかし、2用量スケジュールを用いたチャレンジ実験は、致死的デング-2ウイルスチャレンジに対してマウスを保護することができなかった。

【００２１】

JEV、SLEV、デングウイルス、および他のフラビウイルスによる感染症に対して免疫するために今日開発されたワクチンは、その使用に伴って多くの短所および問題を有する。不活化ワクチンは費用が高く、調製が不便である。さらに、そのような如何なるワクチンもウイルスを調製するために用いられる宿主細胞の蛋白質に由来するアレルギー反応のリスクを伴う。さらに、そのようなワクチンは、その製造のために雇用される労働者に対してかなりのリスクを呈する。候補弱毒化JEVワクチンは、現在臨床試験中であるが、1996年現在、中華人民共和国外では広く受け入れられていない（非特許文献３９）。

【００２２】

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

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２３】

【特許文献１】米国特許第５，４９４，６７１号明細書
【特許文献２】国際出願公開第９３／０６２１４号パンフレット
【特許文献３】米国特許第４，８１０，４９２号明細書
【特許文献４】米国特許第５，２２９，２９３号明細書
【特許文献５】米国特許第５，０２１，３４７号明細書
【特許文献６】米国特許第５，５１４，３７５号明細書

【非特許文献】

【００２４】

【非特許文献１】Ｍｏｎａｔｈ、「Ｖｉｒｏｌｏｇｙ」（Ｆｉｅｌｄｓ編）、Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９０、７６３～８１４頁
【非特許文献２】ＨｅｉｎｚおよびＲｏｅｈｒｉｇ、「Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｖｉｒｕｓｅｓ ＩＩ：Ｔｈｅ Ｂａｓｉｓ ｆｏｒ Ｓｅｒｏｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」（ｖａｎ ＲｅｇｅｎｍｏｒｔｅｌおよびＮｅｕｒａｔｈ編）、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、１９９０、２８９～３０５頁
【非特許文献３】Ｓｕｍｉｙｏｓｈｉら（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６１：４９７～５１０（１９８７））
【非特許文献４】Ｈａｓｈｉｍｏｔｏら（Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ １：３０５～３１７（１９８８））
【非特許文献５】Ｎｉｔａｙａｐｈａｎら（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７７：５４１～５５２（１９９０））
【非特許文献６】Ｄｅｕｂｅｌら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １５５：３６５～３７７（１９８６）
【非特許文献７】Ｇｒｕｅｎｂｅｒｇら、Ｊ． Ｇｅｎ． Ｖｉｒｏｌ． ６９：１３９１～１３９８（１９８８）
【非特許文献８】Ｈａｈｎら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６２：１６７～１８０（１９８８）

【非特許文献９】Ｏｓａｔｏｍｉら、Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ ２：９９～１０８（１９８８）
【非特許文献１０】Ｍａｃｋｏｗら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １５９：２１７～２２８（１９８７）
【非特許文献１１】Ｚｈａｏら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １５５：７７～８８（１９８６）
【非特許文献１２】Ｌａｎｃｉｏｔｔｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８６：２３３１～２３３３（１９９９）
【非特許文献１３】Ｍａｎｄｌら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９４：１７３～１８４（１９９３）
【非特許文献１４】Ｒｉｃｅら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：７２６～７３３（１９８５）
【非特許文献１５】Ｓｍｉｔｈｂｕｒｎら、Ａｍ． Ｊ． Ｔｒｏｐ． Ｍｅｄ． Ｈｙｇ． ２０：４７１～４９２（１９４０）
【非特許文献１６】Ｈｕｂａｌｅｋら、Ｅｍｅｒｇ． Ｉｎｆｅｃｔ． Ｄｉｓ． ５：６４３～５０（１９９９）
【非特許文献１７】ＭｏｎａｔｈおよびＴｓａｉ、「Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ」、（Ｒｉｃｈｍａｎ， ＷｈｉｔｌｅｙおよびＨａｙｄｅｎ編）、Ｃｈｕｒｃｈｉｌｌ－Ｌｉｖｉｎｇｔｏｎｅ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１１３３～１１８６頁
【非特許文献１８】Ａｓｎｉｓら、Ｃｌｉｎ． Ｉｎｆｅｃｔ． Ｄｉｓ． ３０：４１３～４１８（２０００）
【非特許文献１９】Ａｎｄｅｒｓｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８６：２３３１～２３３３（１９９９）
【非特許文献２０】Ｊｉａら、Ｌａｎｃｅｔ ３５４：１９７１～１９７２（１９９９）
【非特許文献２１】Ｌａｎｃｉｏｔｔｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８６：２３３３～２３３７（１９９９）
【非特許文献２２】Ｍｏｒｂ Ｍｏｒｔａｌ． Ｗｋｌｙ． Ｒｅｐ． ４９：１７８～１７９（２０００）
【非特許文献２３】Ｇａｒｍｅｎｄｉａら、Ｊ． Ｃｌｉｎ． Ｍｉｃｒｏ． ３８：３１１０～３１１１（２０００）
【非特許文献２４】Ｍｏｒｂ． Ｍｏｒｔａｌ． Ｗｋｌｙ． Ｒｅｐ． ４９：８２０～８２２（２０００）
【非特許文献２５】Ｔｓａｉら、「Ｖａｃｃｉｎｅｓ」（Ｐｌｏｔｋｉｎ編）、Ｗ．Ｂ． Ｓａｕｎｄｅｒｓ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、Ｐａ、１９９９年、６７２～７１０頁
【非特許文献２６】Ｔｓａｉら、「Ｖａｃｃｉｎｅｓ」、（Ｐｌｏｔｋｉｎ編）、Ｗ．Ｂ． Ｓａｕｎｄｅｒｓ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、Ｐａ、１９９４年、６７１～７１３頁
【非特許文献２７】Ｈａｌｓｔｅａｄ、「Ｄｅｎｇｕｅ ａｎｄ Ｄｅｎｇｕｅ Ｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｆｅｖｅｒ」、（ＧｕｂｌｅｒおよびＫｕｎｏ編）、ＣＡＢ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ、（１９９７）、２３～４４頁
【非特許文献２８】Ｋｏｎｉｓｈｉら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １８０：４０１～４１０（１９９１）
【非特許文献２９】Ｋｏｎｉｓｈｉら、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １８８：７１４～７２０（１９９２）
【非特許文献３０】Ｄｍｉｔｒｉｅｖら、Ｊ． Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ４４：９７～１０３（１９９６）
【非特許文献３１】Ｚｈａｏら、Ｊ． Ｖｉｒｏｌ． ６１：４０１９～４０２２（１９８７）
【非特許文献３２】Ｚｈａｎｇら、Ｊ． Ｖｉｒｏｌ． ６２：３０２７～３０３１（１９８８）
【非特許文献３３】Ｂｒａｙら、Ｊ． Ｖｉｒｏｌ． ６３：２８５３～２８５６（１９８９）

【非特許文献３４】Ｆａｌｇｏｕｔら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．　６３：１８５２～１８６０（１９８９）
【非特許文献３５】Ｆａｌｇｏｕｔら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．　６４：４３５６～４３６３（１９９０）
【非特許文献３６】Ｌａｉら、（１９９０）、１１９～１２４頁、Ｆ．　Ｂｒｏｗｎ，Ｒ．Ｍ．　Ｃｈａｎｃｏｃｋ，　Ｈ．Ｓ．ＧｉｎｓｂｅｒｇおよびＲ．　Ｌｅｒｎｅｒ（編）「Ｖａｃｃｉｎｅｓ　９０：Ｍｏｄｅｒｎ　ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ　ｔｏ　ｎｅｗ　ｖａｃｃｉｎｅｓ　ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ　ｏｆ　ＡＩＤＳ」、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ
【非特許文献３７】Ｐｈｉｌｌｐｏｔｔｓら、Ａｒｃｈ．　Ｖｉｒｏｌ．　１４１：７４３～７４９（１９９６）
【非特許文献３８】Ｋｏｃｈｅｌら、Ｖａｃｃｉｎｅ　１５：５４７～５５２（１９９７）
【非特許文献３９】Ｈｅｎｎｅｓｓｙら、Ｌａｎｃｅｔ　３４７：１５８３～１５８６（１９９６）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２５】
したがって、調製が安価で、その製造にかかわる労働者に対するリスクが少なく、不純物または外因性の免疫原性成分による有害な免疫反応のリスクが最小限であり、しかも中和抗体および保護免疫を誘発するために非常に有効である、黄熱病ウイルス、デングウイルス、JEV、SLEV、およびWNVのようなフラビウイルスに対して向けられるワクチンまたは改善されたワクチンが必要である。さらに、必要な免疫量を最小限にするJEV、WNV、および関連フラビウイルスに対するワクチンが必要である。
【００２６】
ワクチンの製造に関して詳細に記述したように現状技術の短所の多くはまた、免疫診断薬の製造のために用いられる抗原および抗体の製造にも当てはまる。特に、ウイルスからの抗原の製造に伴って発生するリスクおよび費用、ならびに現在利用できるほとんどの組み換え型発現抗原が、有効な免疫反応を誘発できないことは、免疫診断薬の分野における、同様のリスク、高い費用および対応する感度の欠如と同等である。このように、高い費用、生きたウイルスの偶発的感染のリスク、およびこれまでに利用可能な試験の感度の所望より低いレベルのために、フラビウイルス感染症および／または混入を検出するための迅速、単純、および高感度の診断試験が必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【００２７】
本発明は、選択したフラビウイルスに対する抗体を検出するための診断アッセイ法において用いられる、非常に免疫原性の高い組み換え型抗原を提供することによってこれらの需要を満たす。本発明はさらに、フラビウイルス蛋白質に対する抗体を検出するための免疫診断アッセイ法において、フラビウイルス、フラビウイルス遺伝子、またはその模倣体に由来する組み換え型抗原を用いることを提供する。
【００２８】
発明の概要
本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位（TU）を含む核酸分子を提供する。TUは、細胞内に取り込まれた後、宿主細胞に抗原を合成するように指示する。本発明の重要な局面において、フラビウイルスは、黄熱病ウイルス（YFV）、デング血清型1型ウイルス（DEN-1）、デング血清型2型ウイルス（DEN-2）、デング血清型3型ウイルス（DEN-3）、デング血清型4型ウイルス（DEN-4）、セントルイス脳炎ウイルス（SLEV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、西ナイルウイルス（WNV）、ポワッサンウイルスまたは他の如何なるフラビウイルスとなりうる。本発明の重要な態様において、抗原はフラビウイルスprM/M蛋白

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

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

本発明は、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法をなおさらに提供する。方法は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含むワクチン

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

【００３３】

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

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

本発明の抗原は非結合となりうる、または固相上での抗原の配置を促進する担体分子に結合させることができる。担体分子は、抗原をそれに結合させることができ、ヒトの血清において抗体と反応しない分子である。そのような担体の例は、ウシ血清アルブミン（BSA）である。

【００３７】

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

【００３８】
本発明の抗原のアミノ酸配列は、prM、M、および／またはE抗原の免疫反応性部分を含みうる。これらの抗原はさらに、より堅固な二次構造を提供することによってエピトープの反応性を増加させるためにジスルフィド結合することができるアミノ酸を除去および／または付加するため、その生体内寿命を増加させるため、その細胞障害性を変化させるため、または感染症を予防するためなどの、いくつかのさらなる特性を提供するように設計された配列に結合してもよい。いずれにせよ、抗原は免疫反応性および／または免疫原性を有しなければならない。
本発明の好ましい実施形態によれば、以下の核酸などが提供される：
（項目１）
第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列、および第二のフラビウイルスの免疫原性フラビウイルス抗原をコードする転写単位を含み、ここで転写単位は抗原の合成を指示する、単離された核酸。
（項目２）
シグナル配列が日本脳炎ウイルスのシグナル配列である、項目1記載の核酸。
（項目３）
免疫原性フラビウイルス抗原が、黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルスからなる群より選択されるフラビウイルスの抗原である、項目1記載の核酸。
（項目４）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質とをコードする、項目1記載の核酸。
（項目５）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目1記載の核酸。
（項目６）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにセントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目1記載の核酸。
（項目７）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目1記載の核酸。
（項目８）
抗原が、フラビウイルスのM蛋白質、フラビウイルスのE蛋白質、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウイルスのM蛋白質の一部、フラビウイルスのE蛋白質の一部、ならびにフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方、またはその任意の組み合わせからなる群より選択される、項目1記載の核酸。
（項目９）
抗原が、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方である、項目8記載の核酸。
（項目１０）
核酸がDNAである、項目1記載の核酸。
（項目１１）
配列番号：15、配列番号：19、配列番号：21、および配列番号：23からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、項目10記載の核酸。
（項目１２）
転写単位が、抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含む、項目1記載の核酸。
（項目１３）
制御配列がサイトメガロウイルス前初期プロモーターである、項目12記載の核酸。
（項目１４）

TUによってコードされる抗原を含むポリペプチドの翻訳開始部位に存在するコザックコンセンサス配列を含む、項目1記載の核酸。
（項目１５）
転写単位が、ポリ-Aターミネーターを含む、項目1記載の核酸。
（項目１６）
項目1記載の核酸を含む細胞。
（項目１７）
項目1記載の核酸および薬学的に許容される担体を含む組成物。
（項目１８）
項目17記載の組成物の有効量を被験者に投与する段階を含む、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法。
（項目１９）
フラビウイルス抗原が、黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルスからなる群より選択されるフラビウイルスの抗原である、項目18記載の方法。
（項目２０）
抗原がフラビウイルスのM蛋白質、フラビウイルスのE蛋白質、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウイルスのM蛋白質の一部、フラビウイルスのE蛋白質の一部、ならびにフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方、またはその任意の組み合わせからなる群より選択される、項目18記載の方法。
（項目２１）
抗原がフラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方であって、被験者の体内の細胞が、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質およびE蛋白質を含むサブウイルス粒子を分泌する、項目20記載の方法。
（項目２２）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目18記載の方法。
（項目２３）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目18記載の方法。
（項目２４）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにセントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目18記載の方法。
（項目２５）
転写単位が、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、項目18記載の方法。
（項目２６）
被験者に組成物の1回量を投与する段階を含む、項目18記載の方法。
（項目２７）
組成物が非経口経路によって投与される、項目18記載の方法。
（項目２８）
抗原がセントルイス脳炎ウイルス抗原である、項目1記載の核酸。
（項目２９）
抗原がセントルイス脳炎ウイルス抗原である、項目18記載の方法。
（項目３０）
抗原が日本脳炎ウイルス抗原である、項目1記載の核酸。
（項目３１）
抗原が日本脳炎ウイルス抗原である、項目18記載の方法。
（項目３２）

抗原が黄熱病ウイルス抗原である、項目1記載の核酸。
（項目３３）
抗原が黄熱病ウイルス抗原である、項目18記載の方法。
（項目３４）
抗原がデングウイルス抗原である、項目1記載の核酸。
（項目３５）
抗原がデングウイルス抗原である、項目18記載の方法。
（項目３６）
抗原が西ナイルウイルス抗原である、項目1記載の核酸。
（項目３７）
抗原が西ナイルウイルス抗原である、項目18記載の方法。
（項目３８）
項目1記載の核酸から産生された抗原。
（項目３９）
以下を含む、試料におけるフラビウイルス抗体を検出する方法：
（a）抗原／抗体複合体が形成されうる条件下で、項目38記載の抗原に試料を接触させる段階；および
（b）抗原／抗体複合体形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗体を検出する段階。
（項目４０）
項目38記載の抗原による免疫化に反応して産生された抗体。
（項目４１）
以下を含む、試料におけるフラビウイルス抗原を検出する方法：
（a）抗原／抗体複合体が形成しうる条件下で、項目40記載の抗体に試料を接触させる段階；および
（b）抗原／抗体複合体形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗原を検出する段階。
（項目４２）
以下を含む、被験者におけるフラビウイルス感染を診断する方法：
（a）抗原／抗体複合体が形成されうる条件下で、項目38記載の抗原に被験者からの試料を接触させる段階；および
（b）抗原／抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染を診断する段階。
（項目４３）
以下を含む、被験者におけるフラビウイルス感染を診断する方法：
（a）抗原／抗体複合体が形成されうる条件下で、項目40記載の抗体に被験者からの試料を接触させる段階；および
（b）抗原／抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

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

【図２】prM-E蛋白質コード領域を発現させる転写単位を構築するために（下）、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）において用いたJEVゲノム（上）およびオリゴヌク

レオチドのDNA配列のマップである。ウイルスポリ蛋白質の、潜在的な膜貫通ドメインを、影をつけた部分で示す。
【図３】プラスミドベクター、pCDNA3、pCBamp、およびpCIBampの略図と、それらの関係を示す。これらのプラスミドには、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター／エンハンサー要素、BGHp(A)（ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルおよび転写終了配列）、アンピシリン抵抗性遺伝子、ならびに大腸菌において選択および維持するためのColE1複製開始点が含まれる。pCBampを作製するために、大腸菌細胞における一本鎖救出のためのf1複製開始点、SV40複製開始点（SV40ORI）、ネオマイシン抵抗性コード領域およびSV40p(A)配列を、pCDNA3から欠失した。プラスミドpCIBampを作製するために、pCBampのNcoI-KpnI部位にイントロン配列を挿入した。
【図４】JE-4B COS-1培養液からのショ糖勾配精製サブウイルス粒子のSDS-PAGE免疫ブロット分析を示す（4B、各対の右のレーン）。JEV感染C6/36細胞培養物からの密度勾配精製JEビリオンを陽性対照として用いた（JEV、各対の左のレーン）。JEHIAF（過免疫腹水）；4G2、抗Eモノクローナル抗体；JM01、抗-Mモノクローナル抗体；NMAF（正常マウス腹水）。
【図５】トライトンX-100処置を行うか、または行わないJE-4B細胞培養培地のPEG沈殿物から調製した、E抗原の速度ゾーンショ糖密度勾配分析におけるプロフィールを示す。
【図６】シグナルP-HMMプログラムによって予想される、pCBJE1-14（pCBJE）のシグナルペプチド確率を示す（A）。シグナルペプチド確率は、－4および－2位（C-4GおよびG-2S）でc-領域配列を変化させることによって（パネルB、JE-LSS-M）、n-領域を短縮することによって（パネルC、JE-SS-ORI）、または双方の改変の組み合わせによって（パネルD、JE-SS-M）改善される。
【図７】プラスミドベクターpCBD2-14-16（100％DEN-2E）、pCBD2-1J-4-3（90％DEN-2E；10％JEV E）、およびpCB8D2-2J-2-9-1（80％DEN-2E；20％JEVE）の略図を示す。これらのプラスミドはヒトサイトメガロウイルス（CMV）初期遺伝子プロモーター；JEウイルスシグナル配列；DEN-2ウイルスprMおよびE遺伝子領域（それぞれ、アミノ末端100％、90％、または80％）；JEウイルスE遺伝子領域（それぞれ、なし、10％または20％）；およびウシ成長ホルモンポリAシグナル（BGH）を含む。
【図８】ウェスタンブロットによる、分泌型および膜結合型組み換え型蛋白質の比較を示す。（A）DEN-2プラスミドpCB8D2-2J-2-9-1、pCB9D2-1J-4-3、pCBD2-14-16、および対照プラスミドpEGFPに関する、培養液のPEG-沈殿およびエタノール抽出後の分泌型組み換え型抗原の分析。レーン1（V）、ゴールドブロット（GoldBlot）（Owl Separation Systems、Portsmouth、NH）によって染色した精製DEN-2ウイルス。それぞれのプラスミドからの分泌型組み換え型抗原の、a、抗エンベロープ（E）特異的Mab1A6A-8；b、MAB 1A6A-8、抗カプシド（C）特異的Mab1A2A-1、DEN-2ウイルス前膜（prM）蛋白質に対して特異的な抗血清反応性の混合物；およびc、正常マウス腹水、に対する反応性。（B）組み換え型プラスミド形質転換細胞の、疎水性膜蛋白質の分析。レーン1（V）、ゴールドブロットによって染色した精製DEN-2ウイルス；レーン2（V）、精製DEN-2ウイルスと、Mab1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質に対する抗血清の混合物との反応性。それぞれのプラスミド形質転換細胞株から単離された疎水性膜蛋白質の、a、Mab1A6A-8；b、Mab1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質に対する抗血清の混合物；ならびにc、正常マウス腹水、に対する反応性。
【発明を実施するための形態】
【００４０】
発明の詳細な説明
本発明は、prM/MおよびE蛋白質抗原のようなフラビウイルス抗原性蛋白質をコードする核酸転写単位を含む。核酸は、特に細胞が被験者の細胞である場合、核酸が適当な細胞に取り込まれると、prM/MおよびE蛋白質抗原を発現するように機能する。本発明はまた、その活性物質が核酸転写単位（TU）であるワクチンを含む。本発明はさらに、TUを含む細胞

を含む。本発明はさらに、核酸TU分子を含むワクチンの有効量を被験者に投与することによって、フラビウイルス感染症に対して被験者を免疫する方法を含む。

【００４１】

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

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

特定の態様において、本発明の核酸は、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルス、SLEV、YFV、および／またはポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードしうる。核酸はまた、フラビウイルスのM蛋白質、フラビウイルスのE蛋白質、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウイルスのM蛋白質の一部、フラビウイルスのE蛋白質の一部、ならびに／またはフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方となりうる。好ましい態様において、単離された核酸は、フラビウイルスのM蛋白質とE蛋白質の双方をコードする。さらに、本発明の核酸は、DNAであってよく、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、または配列番号：42のヌクレオチド配列を含みうる。

【００４６】

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

【００４７】
本発明の転写単位はまた、それが抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含みうる。制御配列は、例えば、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。本発明の核酸はまた、転写単位によってコードされる抗原を含むポリペプチドに関する翻訳開始部位に存在する、コザックコンセンサス配列を含みうる。本発明の転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含みうる。
【００４８】
本発明はさらに、本発明の核酸を含む細胞を提供する。
【００４９】
同様に、薬学的に許容される担体と、本発明の核酸、細胞、または抗原とを含む組成物が提供される。本発明はさらに、本発明の組成物の有効量を被験者に投与することを含む、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法を提供する。特定の態様において、被験者を免疫するために用いられる組成物は、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方の合成を指示し、被験者の体内の細胞は、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。または、組成物は、フラビウイルスのM蛋白質および／またはE蛋白質、またはM蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を含みうる。本発明の方法において、免疫組成物は、1回用量を被験者に投与することができ、かつ非経口経路によって投与することができる。
【００５０】
本発明はさらに、本発明の単離された核酸から産生された抗原を提供する。例として、TUのヌクレオチド配列によってコードされた第二のフラビウイルスからの抗原は、例えば西ナイルウイルスに由来しうるM蛋白質となりうる。抗原はまた、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび／または黄熱病ウイルスに由来する蛋白質となりうる。さらなる態様において、抗原は、第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列と、SLEV、JEV、YFV、WNVおよび／またはポワッサンウイルスに由来しうる、第二のフラビウイルスからのprM/M蛋白質の残りを含む、さらなるアミノ酸配列とを含む。第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列は、高いシグナル配列確率のような所望の特徴を付与する、改善または改変されたシグナル配列となりうる。設計または選択によってこれらの目標を達成することは、隠れたマルコフモデルを用いるプログラムを含むがこれらに限定されない、機械学習コンピュータープログラムを用いて行うことができる。
【００５１】
TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス抗原、デングウイルス抗原、セントルイス脳炎ウイルス抗原、日本脳炎ウイルス抗原、ポワッサンウイルス抗原および／または黄熱病ウイルス抗原となりうる。
【００５２】
TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、E蛋白質であってもよく、それは西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび／または黄熱病ウイルスに由来するE蛋白質となりうる。コードされる抗原はまた、一つ以上のフラビウイルスから選択されたアミノ酸配列を含む、キメラE蛋白質となりうる。
【００５３】
さらに、TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび／または黄熱病ウイルスに由来しうるM蛋白質およびE蛋白質となりうる。
【００５４】
本明細書において用いられるように、「M蛋白質」、「prM蛋白質」、または「prM/M蛋白質」とは、フラビウイルスM蛋白質またはフラビウイルスprM蛋白質を意味する。例には、一つまたは複数のフラビウイルスprM蛋白質からのアミノ酸配列を含むprM蛋白質、さらなるアミノ酸配列を含まないM蛋白質、およびインビトロまたはインビボで成熟M蛋白質を

産生するようにプロセシングされる、さらなるアミノ酸配列を含む蛋白質が含まれるが、これらに限定されない。

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

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

【００６０】

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

【００６１】

本明細書において用いられるように、特定の病原体に対して特異的な「ワクチン」または「被験者にワクチン接種するための組成物」は、被験者に投与した場合に、被験者において免疫応答を誘導する調製物を意味する。本明細書において用いられるように、「免疫原性」反応は、病原体に対する保護免疫を被験者に付与する反応である。理論に拘束されたくはないが、免疫原性反応は、中和抗体の産生によって（すなわち、液性免疫応答）、免疫系の細胞障害細胞によって（すなわち、細胞性免疫応答）、またはその双方によって

起こってもよいと考えられる。本明細書において用いられるように、「免疫原性抗原」は、被験者に導入した場合に、または宿主もしくは被験者の細胞内で合成された場合に、免疫原性反応を誘導する抗原である。本明細書において用いられるように、ワクチンまたはワクチン組成物の「有効量」は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与するために十分である量である。歴史的に、ワクチンは、活性成分として、病原体、特にその表面を含む、一つまたは複数の特異的分子成分または構造を含むと理解されてきた。そのような構造には、病原性生物において一般的に認められる蛋白質、複合糖質、および／または複合脂質のような表面成分が含まれてもよい。

【００６２】

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

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

一つの態様において、本発明におけるフラビウイルスMおよびE蛋白質をコードするTUはDNAである。先行段落における考察に従って、このDNAは、プレM配列を含むM蛋白質をコードするヌクレオチド配列と、E蛋白質をコードするヌクレオチド配列とを含む。このよう

にして、意図される遺伝子産物は、細胞内でサブウイルス粒子を形成させることができる。次に、プレM配列は、充満したビリオンに関して起こる方法と類似の方法で切断することができる。

【００６６】

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

【００６７】

本発明の核酸は、さらに、免疫刺激要素として作用することが当業者に既知であるDNAを含んでもよい。そのような要素の例には、細菌DNAにおける特定のCpGモチーフが含まれるがこれらに限定されない（Satoら、Science273：352～354（1996）；Klinmanら、Vaccine 17：19～25（1998））。

【００６８】

本発明のTUの調製は、分子生物学の分野の当業者に周知の方法によって容易に行われる。含まれる技法は、例えば、「Molecular Cloning：ALaboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring HarborLaboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989；および「Current Protocols in MolecularBiology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）に記載されている。フラビウイルスRNA分子は、例えば、フラビウイルスおよび他のグループのウイルスも同様に熟知しているウイルス学者に広く知られている方法によって生きたウイルスの試料から単離してもよい。JEVについて用いられる方法は、Kunoら（J.Virol. 72：73～83（1998））において要約されている。RNAは、逆転写酵素を用いたcDNAの合成のための鋳型として用いられる。cDNAから、プレMからEコード領域までを含む断片（図2）を提供するために適切にcDNAを切断することが知られている、制限ヌクレアーゼによる消化によって、そのような断片が得られる。JEVの制限消化の例は、Nitayaphanら（1990）およびKonishiら（1991）に提供される。サイトメガロウイルスプロモーターのようなプロモーター、コザック配列のような有効な翻訳を促進する配列、およびポリアデニル化シグナルの配列を組み入れることも同様に、分子生物学および組み換え型DNA操作の当業者に周知である（Kozak、Mol.Cell Biology 9：5134～5142（1989）；Azevedoら、Braz. J. Med. Biol. Res. 32：147～153（1999））。所望のコード配列および制御配列を含むTUを含む核酸を調製する場合、これは核酸を増幅する方法によってより大量に得てもよい。そのような方法は、分子生物学および組み換えDNA操作の当業者に広く既知である。これらの方法の例には、当技術分野で周知であるように、原核細胞のような細胞において培養することによって複製するためにプラスミドに核酸を組み入れること、および培養終了後にプラスミドを回収することと共に、PCRおよび他の増幅プロトコールのような方法による核酸の増幅が含まれる。これらの例は、TUを含む核酸が得られる方法に限定されないと解釈される。

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

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

【００７２】

本発明のもう一つの重要な態様において、細胞は、TUがワクチンとして投与されている被験者の天然の細胞成分である。被験者に投与した場合、TUは、被験者の細胞に取り込まれる。被験者の細胞は、如何なるプロモーター配列、および存在すればターミネーターにも反応することができる。いずれにせよ、TUは、フラビウイルスprM/MおよびE遺伝子産物を合成するように被験者の細胞を誘導する。理論的検討に拘束されたくはないが、被験者の細胞は、インビトロでの培養哺乳類細胞について起こることが判明しているように、prM/MおよびE抗原からなるサブウイルス粒子をインビボで産生すると考えられている。そのようなサブウイルス粒子は、インビボ免疫原として作用して、被験者の免疫系を刺激して、被験者に保護免疫を付与する免疫応答を生じると考えられている。この場合も、理論に拘束されたくはないが、得られた保護免疫は液性または細胞性免疫のいずれかによって、すなわちそれぞれ、MHCクラスIIもしくはクラスI拘束メカニズムのいずれかによって、または双方のメカニズムによって生じる可能性がある。

【００７３】

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

【００７４】

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

編）、「Synthetic Vaccines I」：83～92頁、CRC Press、Boca Raton、Florida、1987を参照のこと）。

【００７５】

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

【００７６】

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

【００７７】

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

【００７８】

固体組成物に関して、通常の非毒性固体担体には、例えば、薬学等級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム等が含まれる。液体の薬学的に投与可能な組成物は、例えば本明細書に記載の活性化合物と選択的な薬学的アジュバントとを、例えば、水、生理食塩液、デキストロース水溶液、グリセロール、エタノール等のような賦形剤に溶解、分散等して、それによって溶液または懸濁液を形成することによって調製することができる。望ましければ、投与される薬学的組成物はまた、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤等、例えば、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、酢酸ナトリウムトリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミン等のような非毒性の補助物質を少量含んでもよい。そのような投与剤形を調製する実際の方法は、当業者に既知または明らかであり、例えば、「Remington'sPharmaceutical Sciences」（Martin, E.W.編、最新版、Mack Publishing Co.、Easton、PA）を参照のこと。

【００７９】

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

【００８０】

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

【００８１】

ワクチン接種組成物の有効量は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与する量であると、当業者によって容易に決定される。そのような決定を行うために、当業者

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

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

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

【００８６】

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

【００８７】

本発明のもう一つの態様において、一つ以上のフラビウイルスからの免疫原性フラビウイルス抗原をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUが、単一の組成物に含まれる。このように、一つの態様において、例えば、TUは、一つ以上のフラビウイルスからの蛋白質にプロセシングされる新生ポリペプチドまたは複数のポリペプチドをコードしうる。好ましくは、プロセシングされた蛋白質は、蛋白質に対する免疫応答を誘発するサブウイルス粒子を形成する。サブウイルス粒子は、同じフラビウイルス、フラビウイルスの組み合わせ、またはキメラフラビウイルス蛋白質の配列に由来する、プロセシングされた蛋白質から形成することができる。一つ以上のフラビウイルスからの免疫原性フラビウイルス抗原

をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUを含む複合ワクチンは、地域で流行しているか、またはそうでなければ遭遇する可能性があるフラビウイルスからの蛋白質を含めることによって特定の地理的地域において用いるために作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯アジアのためのワクチンは、DEN、WN、およびJEウイルスワクチンの四つの血清型からの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうる。アフリカおよびラテンアメリカのための同様に有用なワクチンはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルス、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスからの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうるであろう。

【００８８】

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

【００８９】

本発明はさらに、蛋白質ワクチンとして用いるための、薬学的に許容される担体中に本発明のポリペプチドを含む、免疫原性組成物を提供する。本発明の転写単位から産生される抗原は、被験者において有効な免疫応答を誘発するために用いることができる。この目的の抗原は、蛋白質の免疫原性断片を含む、フラビウイルスprM、フラビウイルスM蛋白質、フラビウイルスE蛋白質またはその如何なる組み合わせを含みうる。特に好ましい態様は、本明細書に記載のNRAを用いることである。さらに好ましい態様は、一つまたは複数のフラビウイルスのシグナル配列と、一つまたは複数のの異なるフラビウイルスの構造蛋白質（複数）とを含むキメラ蛋白質である。特に好ましい態様において、抗原のシグナル配列は、日本脳炎ウイルスシグナル配列である。他の好ましい態様において、シグナル配列は改善されたシグナルペプチドである。シグナル配列の改善、またはより最適なシグナル配列の選択は、実施例18およびそこで引用されている参考文献において教示される原理および技術を適用することによって行うことができ、その文献のそれぞれは、所望の特性および機能を有するシグナル配列の選択、同定、および設計にそれぞれ関連する明白な教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる。一般的に、これらの所望の特性および機能は高いシグナル配列確率を含むであろう。

【００９０】

他の態様において、本発明の蛋白質ワクチンはさらに適したアジュバントを含む。本明細書において用いられるように、「アジュバント」は、免疫応答の強化剤または増強剤である。「適している」という用語は、ワクチン接種被験者において有害反応を生じることなく免疫応答を増強するために、ワクチン免疫原（すなわち、フラビウイルスprM蛋白質、フラビウイルスM蛋白質、フラビウイルスE蛋白質、またはその如何なる組み合わせ）と併用して用いることができる如何なる物質も含まれることを意味する。特定のアジュバントの有効量は、ワクチン接種被験者の免疫応答に及ぼすアジュバントの増強作用を最適にするために容易に決定できる。好ましい態様において、本発明のワクチンのアジュバント投与は、2％水酸化アルミニウム溶液とその後鉱油を用いる2段階プロセスである。特定の態様において、適したアジュバントは、以下の群から選択することができる：鉱油、植物または魚油と水との乳剤、フロイントの不完全アジュバント、大腸菌J5、硫酸デキストラン、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、バクトアジュバント、カルボポル（Carbopol）（BF

Goodrich Company、Cleveland、Ohio）のような特定の合成ポリマー、ポリアミノ酸およびアミノ酸コポリマー、サポニン、カラゲニン、REGRESSIN（Vetrepharm、Athens、GA）、AVRIDINE（N,N-ジオクタデシル-N',N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-プロパンジアミン）、O-アセチル基散在長鎖多分散β(1,4)結合マンナンポリマー（例えば、ACEMANNAN）、マイコバクテリウム種の非病原性株に由来する徐蛋白された高度精製細胞壁抽出物（例えば、EQUIMUNE、VetrepharmResearch Inc.、Athens、GA）、モノオレイン酸マンニット、パラフィン油およびムラミルジペプチド。

【００９１】

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

【００９２】

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

【００９３】

本発明はさらに、本発明の抗原による免疫に反応して産生された抗体を提供する。本発明の抗体には、無傷の免疫グロブリン分子、キメラ免疫グロブリン分子、「ヒト化抗体」、またはFabもしくは$F(ab')_2$断片となりうるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれうる。そのような抗体および抗体断片は、当技術分野で周知の技術によって産生することができ、それらには、参照として本明細書に組み入れられる、HarlowおよびLane（「Antibodies：ALaboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989）ならびにKohlerら（Nature256：495～97、1975）ならびに米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、および第5,625,126号に記載されたものが含まれる。抗体は如何なるアイソタイプIgG、IgA、IgD、IgE、およびIgMの抗体となりうる。

【００９４】

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

【００９５】

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

【００９６】

抗原／抗体複合体を形成することができる状態、ならびに抗原／抗体複合体の形成を検出するためのアッセイ法、および検出された蛋白質の定量は、当技術分野で標準である。そのようなアッセイ法には、当業者に周知である、ウェスタンブロッティング、免疫沈殿、免疫蛍光、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、蛍光

インサイチューハイブリダイゼーション（FISH）、免疫磁気アッセイ、ELISA、ELISPOT（Coliganら編、1995、CurrentProtocols in Immunology、Wiley、New York）、凝集アッセイ、フロキュレーションアッセイ、細胞パニング等が含まれうるが、これらに限定されない。

【００９７】

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

【００９８】

本発明の抗体またはリガンドは、基質に結合させる、または検出可能な部分と共役させる、または結合させて共役させることができる。本発明に関して企図される検出可能な部分には、免疫蛍光部分（例えば、フルオレセイン、ローダミン）、放射活性部分（例えば、^{32}P、^{125}I、^{35}S）、酵素部分（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、金コロイド部分、およびビオチン部分が含まれるがこれらに限定されない。そのような共役技法は当技術分野で標準である（例えば、HarlowおよびLane、Antibodies：ALaboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY（1989）；Yangら、Nature382：319～324（1996））。

【００９９】

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

【０１００】

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

【０１０１】

試料中のフラビウイルス抗原を検出する方法は、例えば、被験者からの液体または組織試料を本発明の抗体に接触させ、抗原に対する抗体の結合を検出することによって行うことができる。抗原は、無傷のフラビウイルスビリオン上であるか、抗原を発現するフラビウイルス感染細胞の表面上に示されるフラビウイルスコード蛋白質であるか、または抗原断片であることが企図される。この方法の液体試料は、脳脊髄液、血液、胆汁、血漿、血清、唾液、および尿のような、抗原を含むか、または抗原を含む細胞を含む、如何なる生体液も含みうる。可能性がある他の体液試料には、喀痰、粘液等が含まれる。

【０１０２】

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

【０１０３】

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

を接触させる；および（6）色の変化または発色を観察／測定する。

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

【０１０８】

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

【０１０９】

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

【０１１０】
本発明の特定の態様を下記の実施例に記述する。これらの実施例は、本明細書に開示される本発明の範囲を制限すると解釈されない。
【実施例】
【０１１１】
実施例
本発明の核酸TU分子の調製および発現に関連して分子生物学および組み換え型DNA技術を利用する一般的方法は、例えば、「Current Protocols inMolecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）、および「MolecularCloning：A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、Fritsch and Maniatis、Cold SpringHarbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989に記載される。
【０１１２】
実施例1：JEV prMおよびE抗原をコードする転写単位を含む組み換え型プラスミドの調製。
ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、マウス脳から増殖させたJEV株SA14ウイルスシード150μlから抽出した。シリカ膜上に吸着させたRNAをヌクレアーゼ不含水80μl中で溶出して、JEVprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Nitayaphanら（Virology 177：541～552（1990））の研究から得られた。ゲノムヌクレオチド領域389～2478位を含む単一のcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位KpnIおよびXbaI、コンセンサスコザックリボソーム結合配列、ならびに翻訳開始部位を、アンプリマー（amplimer）14DV389（ヌクレオチド配列、配列番号：1；アミノ酸配列、配列番号：2）によってcDNAの5'末端で作成（engineer）した。インフレーム翻訳終了コドンの後にNotI制限部位を、アンプリマーc14DV2453（配列番号：3）によってcDNAの3'末端に導入した（図2）。TitanRT-PCRキット（Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN）を用いて1試験管RT-PCRを行った。ウイルスRNA 10μlを14DV389（50μM）およびc14DV2453（50μM）各1μl、ならびにヌクレアーゼ不含水18μlと混合して、混合物を85℃で5分間加熱した後、4℃に冷却した。反応ミックス[5×緩衝液20μl、dNTP混合物2μl（各10mM）、ジチオスレイトール（0.1 mM）5μl、RNasin（商標）（40 U/μl、ベーリンガーマンハイム社）0.5μl、ポリメラーゼ混合物2μl、およびヌクレアーゼ不含水45.5μl]75μlを加えて、RT-PCRを以下のように行った：1サイクル（50℃で30分、94℃で3分、50℃で30秒、68℃で2.5分）、9サイクル（94℃で30秒、50℃で30秒、68℃で2.5分）、20サイクル（最初のサイクルは94℃で30秒、50℃で30秒、68℃で2.5分、その後1サイクルごとに5秒ずつ増加）、および68℃で15分間の最終伸長。RT-PCR産物は、QIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製して、50μlの1mMトリス塩酸、pH 7.5によって溶出した。
【０１１３】
全てのベクター構築物および分析は、標準的な技術を用いて行った（Sambrookら、1989）。KpnIおよびNotIヌクレアーゼによって消化したRT-PCR増幅cDNAを、真核細胞発現プラスミドベクター（pCDNA3、Invitrogen、Carlsbad、CA）のKpnI-NotI部位に挿入した。電気穿孔コンピテント大腸菌XL1-Blue細胞（Stratagene、LaJolla、CA）を、電気穿孔（ジーンパルサー（Gene Pulser、商標）、Bio-Rad、Hercules、CA）によって形質転換して、100μg/mlカルベニシリン（SigmaChemical Co.、St. Louis、MO）を含むLB寒天プレート上に播種した。クローンを採取して、100μg/mlカルベニシリンを含むLBブロス3mlに接種した。QIAprep（商標）スピンミニプレップキット（Qiagen）を用いて、14時間培養物からプラスミドDNAを抽出した。自動DNAシークエンシングは、推奨された通りに（AppliedBiosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA）行った。cDNAの双方の鎖をシークエンシングしたところ、当初のSA14株の配列と同一であることが示された（Nitayaphanら、1990）。
【０１１４】

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

【０１１５】

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

【０１１６】

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

様々な組み換え型発現プラスミドによるJEV特異的遺伝子産物の発現を、COS-1、COS-7、およびSV-T2（ATCC、ロックビル、メリーランド州；それぞれ、1650-CRL、1651-CRL、および163.1-CCL）の一過性にトランスフェクトした細胞株において、間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって評価した。SV-T2細胞株は、予備的な結果から、JEV抗原陽性であった細胞が形質転換したSV-T2細胞の1～2％に過ぎないことが示されたことから、以降の試験から除外した。形質転換を行うために、細胞を150cm^{2}培養フラスコにおいて75％コンフルエンスまで増殖させ、トリプシン処理を行って、4℃の燐酸緩衝生理食塩液に最終細胞数5×10^{6}個/mlとなるように再懸濁させた。150V、960μF、および100Ω抵抗に設定したBioRadジーンパルス（商標）（Bio-Rad）を用いて、プラスミドDNA 10μgを細胞浮遊液300μlに電気穿孔した。電気穿孔の5分後、細胞を新鮮な培地25mlによって希釈して、75 cm^{2}フラスコに播種した。形質転換の48時間後、培地を細胞から除去して、細胞にトリプシン処理を行い、3％正常ヤギ血清を含むPBS5 mlに再懸濁させた。少量10μlをスライドガラス上にスポットし、風乾させ、アセトン中で－20℃で20分間固定した。IFAは、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンG（SigmaChemical Co.）およびJEV HIAFを用いて、アセトン固定プラスミド形質転換細胞について行った。

【０１１７】

JEV prMおよびE蛋白質発現に及ぼす様々なプロモーター、およびポリ(A)要素の影響を調べるために、COS-1およびCOS-7細胞株を、等量のpCDJE2-7（配列番号：10）、pCEJE、pREJE、またはpRJEプラスミドDNAによって一過性に形質転換した。JEV抗原は、四つ全ての組み換え型プラスミドによって形質転換された双方の細胞株において発現され、このように、CMVまたはRSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーターおよびBGHまたはSV40ポリ(A)要素が機能的に活性であることを確認した。しかし、IFA陽性細胞数およびIFA強度によってそれぞれ決定した形質転換細胞の割合および発現されたJEV抗原のレベルは、プラスミドが異なれば大きく異なった（表1）。pCDJE2-7（配列番号：10）、pCBJE1-14（配列番号：17）およびpCIBJES14によって形質転換されたCOS-1細胞の有意に高い割合が、JEV抗原を発現し、発現された蛋白質レベルは、JEV感染細胞と同等であった。一方、pCEJE、pREJE、

またはpRCJEベクターをトランスフェクションした細胞は、抗原発現細胞の割合が低いのみならず、蛍光強度も低く、抗原の発現が弱いことを示している。

【０１１８】

pCDJE2-7（配列番号：10）によるJEV蛋白質の発現の増強がSV40がコードする真核細胞複製開始点によって影響を受けるか否かを確認するために、pCDJE2-7からf1ori、SV40 ori、ネオマイシン抵抗性遺伝子、およびSV40ポリ(a)要素を含む2166 bp断片を欠失したプラスミドpCBJE1-14（配列番号：17）を構築した。次に、キメライントロンをpCBJE1-14に挿入して、pCIBJES14を作製した。pCIBJES14プラスミドを用いて、JEV蛋白質の発現がイントロン配列によって増強されうるか否かを決定した。形質転換の後、pCBJE1-14およびpCIBJES14ベクターの双方を有する細胞は、pCDJE2-7の場合に認められたものと類似のJEV抗原レベルを発現した（表1）。この結果は、組み換え型ベクターによるJEVprMおよびE抗原の発現が、転写調節要素に限って影響を受けることを示している。真核細胞の複製開始点もイントロン配列も、用いた細胞においてJEV抗原の発現を増強しなかった。CMVプロモーターおよびBHGポリ(A)（図3）を含むベクターをさらなる分析のために選択した。

【０１１９】

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

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

【０１２０】

JE-4Bクローンによって発現されたJEV E蛋白質の真偽は、JEV E特異的マウスモノクローナル抗体（Mab）のパネルを用いた、IFAによるエピトープマッピングによって証明した（Kimura-Kurodaら、J.Virol．45：124～132（1983）；Kimura-Kurodaら、J．Gen．Virol．67：2663～2672（1986）；Zhangら、J.Med．Virol．29：133～138（1989）；およびRoehrigら、Virol．128：118～126（1983））。JEV HIAFおよび正常マウス血清をそれぞれ、陽性および陰性抗体対照として用いた。四つのJEV-特異的、六つのフラビウイルス亜群特異的、および二つのフラビウイルス群反応性Mabが、4BクローンまたはJEV感染COS-1細胞に対して同様に反応した（表2）。

【０１２１】

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

a．サブウイルス粒子の調製。　JE-4B COS-1細胞は、200μg/mlネオマイシンを含む培地において増殖および維持した。培養培地は通常通り採取して4℃で保存して、週2回新鮮な培地に交換して、細胞を7日～10日ごとに1：5に分割して継代した。培養培地をSorvall F16/250ローターにおいて4℃、10,000 rpmで30分間遠心することによって透明にし、Sorvall TH641ローターにおいて5％ショ糖クッション（w/w、10mMトリス塩酸、pH 7.5、100 mM NaCl（TN緩衝液）によって調製）の中を4℃、39,000 rpmでさらに4時間遠心した。サブウイルス粒子を含む沈降物をTN緩衝液に再懸濁させて、4℃で保存した。または、7％もしくは10％PEG-8000（w/v）を透明にした培養培地に加えた。混合物を4℃で少なくとも2時間攪拌して、沈殿した粒子を10,000rpmで30分間遠心することによって回収した。沈殿物をTN緩衝液に再懸濁させて、4℃で保存した。サブウイルス粒子を、5％～25％連続ショ糖勾配のTN溶液において4℃、38,000rpmで90分間の速度ゾーン遠心によって、沈降した調整物およびPEG沈殿した調製物の双方から精製した。1 ml分画を勾配の上部から回収して、抗原捕獲ELISA（下記参照）によって調べ、陽性分画を25％～50％ショ糖勾配のTN溶液に

ローディングした。これを、4℃、35,000rpmでの平衡密度遠心において一晩遠心した。平衡勾配からの0.9 ml分画を底から回収した。それらを抗原捕獲ELISAによって調べ、pH 6.6でのヘムアグルチニン（HA）活性に関して評価した。各分画の100μlのアリコートの重量を正確に測定して、その密度を測定した。ELISA陽性分画をプールして、4℃、39,000rpmで3～4時間遠心して沈降させ、沈降物をTN緩衝液に再懸濁させた。沈降させた試料に関して抗原捕獲ELISAおよびHA力価を測定した。JEV感染COS-1細胞上清にも同様に、先に詳細に記述したように類似の精製プロトコールを行い、勾配分析のための陽性対照として用いた。JEビリオンも同様に、感染後5日～6日の感染C6/36細胞から、グリセロール／酒石酸塩平衡勾配における沈降によって精製した。

【０１２２】

b. サブウイルス粒子のウェスタンブロット。 サブウイルス粒子の勾配精製試料を電気泳動試料緩衝液と共に混合して、Laemmli（Nature 277：680～685（1970））によって記述されるように、10％または12.5％ドデシル硫酸ナトリウム含有ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）の中を泳動させた。蛋白質をニトロセルロースメンブレンに転写して、ポリクローナルJEVHIAF、フラビウイルス交叉反応性抗E Mab 4G2抗体（Henchalら、Amer. J. Trop. Med. Hyg. 31：830～836（1982））またはマウス抗prMペプチド過免疫血清（JM01）によって免疫化学的に検出した。図4は、JEV感染C6/36およびJE-4BCOS-1細胞によって産生されたMおよびE蛋白質の比較を示す。E蛋白質に対する何らかの非特異的反応性を、正常マウス腹水およびJmo1抗ペプチド血清において認めた。大きさがMおよびEと同一である蛋白質がサブウイルス粒子において分泌され、それぞれ、E特異的Mab4G2およびprM特異的JM01抗血清によって検出することができた。

【０１２３】

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

【０１２４】

JE-4B細胞の15×150 cm^2フラスコからの細胞培養培地約500 mlを、細胞を播種した4日後に回収した。PEG沈殿サブウイルス粒子をpH7.5のTN緩衝液2 mlに再懸濁させて、この再懸濁させた沈降物0.7 mlのアリコートを5％～25％ショ糖勾配にローディングした。サブウイルス粒子を破壊するトライトンX-100を、最終濃度が0.1％となるように別の0.7mlアリコートに加えて、これを0.1％トライトンX-100を含むTN緩衝液中で調製した5％～25％ショ糖勾配にローディングした。トライトンX-100を含む勾配の上部から約2.5cmのところに明確な不透明なバンドを認めたが、界面活性剤を含まない勾配には認めなかった。各勾配の上から下までの分画（1 ml）を回収した（図5）。それぞれの回収した分画を抗原捕獲ELISAによって分析した。抗原は分画4～6において検出され、サブウイルス粒子の比較的速やかな沈降特徴を示している。トライトンX-100によってJE-4B培養培地からのPEG沈殿物の処置を行うと、ELISA反応性材料の位置が勾配の上部にシフトした。このように、トライトンX-100による処置によって、沈降の遅い分子のみが生成される。類似の知見は、Konishiら（Virol.188：714～720（1992））によっても報告された。これらの結果は、prM/MおよびEを含む急速に沈降するサブウイルス粒子を、界面活性剤処置によって破壊できることを示している。

【０１２５】

ヘムアグルチニン（HA）活性は、ClarkeおよびCasals（Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7：561～573（1958））の方法によってpH範囲6.1～7.0において決定した。JE-4B細胞によっ

て分泌されたサブウイルス粒子およびJEV感染COS-1細胞によって産生されたビリオン粒子は、最適なpHが6.6であると決定された類似のHAプロフィールを有した。

【０１２６】

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

3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群5匹に、左四頭筋および右四頭筋にpCDJE2-7プラスミド100μgのdH_2O溶液100μlを筋肉内注射するか、またはヒトに投与する用量の5分の1であるJE-VAX用量（製造は、大阪大学微生物病研究会、および販売は、ConnaughtLaboratories、Swiftwater、PA）を皮下投与した。無関係な蛋白質をコードして発現するプラスミドpCDNA3/CAT（インビトロジェン社）を陰性ワクチン接種対照として用いた。pCDJE2-7ワクチン接種マウス1群を除き、動物は全て、さらなる用量のプラスミドまたはJE-VAXによって3週間後に追加免疫した。接種後3週、6週、9週、23週、40週、および60週間目にマウスの眼窩後洞から採血した。JEV抗体力価は、精製JEVに対する酵素結合免疫吸着アッセイ法（ELISA）によって、またはプラーク減少中和試験（PRNT）（Roehrigら、Virol,171：49～60（1989）；およびHuntおよびCalisher、Amer．J．Trop．Hyg．28：740～749（1979））によって決定した。

【０１２７】

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

【０１２８】

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

類似のレベルのJEV蛋白質が、pCDJE2-7、pCBJE1-14、またはpCIBJES14によって形質転換したCOS-1細胞によって発現された。これらの核酸構築物によるJEV抗体誘導を、ワクチン接種時に二つの異なる齢で、JE-VAX市販ワクチンと比較した。1群10匹の3日齢（性別混合）または3週齢（雌性）ICR非近交系マウスに、プラスミドDNA50μgもしくは100μgを筋肉内にワクチン接種するか、またはヒトに投与する用量の10分の1または5分の1であるJEVAX用量を皮下にワクチン接種した。血清標本を免疫後3週間および7週間で採取して、精製JEVを抗原として用いたELISAによって1600倍希釈で試験した。結果を表4に示す。

【０１２９】

プラスミドpCBJE1-14は、最も高い程度の血清変換、すなわち、1600倍以上の抗体力価を示し、双方の齢のワクチン接種で80％～100％に達した。pCDJE2-7またはpCIBJES14の投与は、3日齢のマウスにワクチンを接種した場合には7週目までに中程度の血清変換を示したが（それぞれ60％）、ワクチン接種後3週目に測定した場合にはより弱い血清変換を示した（それぞれ、40％および10％）。しかし、これらのプラスミドを3週齢で投与すると、ワクチン接種の3週後および7週後の双方で血清変換90％または100％が得られた。対照的に、市販のワクチン、JE-VAXは、3日齢で投与した場合に血清変換を示さず、3週齢で投与した場合には100％の血清変換を示した。このように、JEVprMおよびEに対する核酸TUは、市販のワクチンの非常に高い用量より、良好な程度の血清変換を示し、若い動物およびより成熟した動物の双方において予想外に高い血清変換を示した。

【０１３０】

実施例7．本発明の核酸ワクチンによって与えられる保護免疫

実施例6からの3日齢ワクチン接種群に、ワクチン接種後7週目にマウス適合JEV株SA14 5

0,000 pfu/100μlを腹腔内注射によってチャレンジして、3週間観察した。様々な核酸TU含有ワクチン構築物を接種した群では100％の保護が21日間得られた（表5）。対照的に、JE-VAXワクチン接種マウスの60％、ならびにpCDNA3/CATワクチン接種陰性対照の70％が、ウイルスチャレンジから21日まで生き残ることができなかった。これらの結果は、本発明の核酸TUは、ワクチン接種マウスに対して予想外に有効な保護を与えることを示している。これは、ヒト用の初期幼少期ワクチンとして本発明の核酸ワクチンを用いる可能性を示唆している。対照的に、現在用いられている不活化ヒトワクチンJE-VAXは、若い動物において有効ではないように思われる。

【０１３１】

実施例8．母体の抗体力価と相関する新生仔マウスの受動的保護

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

【０１３２】

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

【０１３３】

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

ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、1999年にニューヨークでの大流行から単離した株であるNY99-6480株に感染させたVero細胞培養培地150μlから抽出した。抽出したRNAを溶出させて、ヌクレアーゼ不含水80μlに浮遊させて、WNV prMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Lanciottiら（Science286：2333～2337（1999））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位BsmBIおよびKasIを、アンプリマーWN466（ヌクレオチド配列、配列番号：12）を用いてcDNAの5'末端に作成（engineer）した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcWN2444（配列番号：13）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

【０１３４】

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

んだ（Changら、J.Virol．74：4244～4252（2000））。JEシグナル配列要素はJEシグナル配列（配列番号：14）を含む。

【０１３５】

次に、cDNAアンプリコンをBsmBIおよびKasI酵素によって消化して、残っている1003 bp断片（ヌクレオチド466～1470）をpCBINTのKasI部位に挿入してpCBWN（核酸配列、配列番号：15；アミノ酸配列、配列番号：16）を形成した。ABIプリズム377シークエンサー（アプライドバイオシステムズ／パーキンエルマー、フォルターシティ、カリフォルニア州）を用いた自動DNAシークエンシングを用いて、組み換え型プラスミドがLanciottiら（Science286：2333～2337（1999））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【０１３６】

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

【０１３７】

実施例10．pCBWNによって発現されたWNV prMおよびE蛋白質の免疫化学特徴付けと評価

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

【０１３８】

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

【０１３９】

組織培養培地を電気穿孔後40および80時間で回収した。抗原捕獲（Ag捕獲）ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の培養培地に分泌されたWNウイルス抗原を検出した。Mab4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合Mab 6B6C-1をそれぞれ用いて、WNウイルス抗原を捕獲し、捕獲された抗原を検出した（Changら、J.Virol．74：4244～4252（2000）；Henchalら、Am．J．Trop．Med．Hyg．31：830～836（1983）；Roehrigら、Virology128：118～126（1983））。

【０１４０】

培地中のWNウイルス抗原は、10％ポリエチレングリコール（PEG）-8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物をTNE緩衝液（50 mMトリス、100 mMNaCl、10 mM EDTA、pH 7.5）に再懸濁させて、遠心によって透明にし、4℃で保存した。または、沈殿物を凍結乾燥緩衝液（0.1 M TRIZMAおよび0.4％ウシ血清アルブミンのホウ酸塩生理食塩液緩衝液、pH9.0）に再懸濁させて、凍結乾燥して4℃で保存した。凍結乾燥調製物を、MAC-および間接的IgG ELISAにおいて評価するための抗原として用いた。

【０１４１】

一過性に形質転換したCOS-1細胞において、IFAによってWNウイルス特異的蛋白質を検出した。これらの細胞において発現されたE、prMおよびM蛋白質は、培養培地に分泌された。PEG沈殿によって濃縮されたWNウイルス抗原を、7.0％エタノールによって抽出して、残っているPEGを除去した（Aizawaら、Appl.Enviro．Micro．39：54～57（1980））。エタノール抽出抗原および勾配精製WNビリオンを、Excel Plus電気泳動装置（Invitrogen、Carlsbad、CA）においてNuPAGE、4％～12％勾配ビストリスゲルにおいて分析して、その後E

xcelPlusブロットユニット（インビトロジェン社）を用いてニトロセルロースメンブレンにエレクトロブロッティングを行った。一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって産生されたWNウイルス特異的蛋白質は、陰性血清対照としてNMSを用いたウェスタンブロット分析において、WNウイルス特異的マウスHIAFまたはフラビウイルスE蛋白質反応性Mab4G2によって検出された。蛋白質は、WNウイルスに感染したほ乳期マウス脳（SMB）に由来する、対応する勾配精製ビリオンE、prMおよびM蛋白質と類似の反応性および同一の分子量を示した。

【０１４２】

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

【０１４３】

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

【０１４４】

フラビウイルス群反応性抗E Mab、4G2、および6B6C-1を用いるAg-捕獲ELISAを用いて、pCBWN形質転換COS-1細胞の培養液に分泌されたNRAを検出した。抗原は、形質転換後1日目に培地において検出することができ、さらに濃縮していない培養液中の最高ELISA力価（1：32～1：64）を、2日～4日の間に認めた。NRAは、PEG沈殿によって濃縮し、凍結乾燥緩衝液に再懸濁させ、保存のために凍結乾燥した。診断試験の開発のために、1バイアルの凍結乾燥NRAを蒸留水1.0mlによって再構成して、WNウイルス陽性および陰性基準ヒト血清（Johnsonら、J. Clin. Microbiol. 38：1827～1831（2000）；Martinら、J.Clin. Microbiol. 38：1823～1826（2000））を用いてMAC-または間接的IgG ELISAにおいて滴定した。NRAの320倍および160倍希釈液はそれぞれ、MAC-およびIgGELISAにおいて用いるための最適な濃度であることが判明した。これらの希釈液は、MAC-およびIgG試験に関してそれぞれ、P/N OD_{450}比が4.19および4.54となった。NY-6480およびEg101株によって産生されたWNウイルスSMB抗原はそれぞれ、MAC-ELISAに関して320倍および640倍希釈で用い、IgGELISAに関して120倍および320倍で用いた。陰性対照抗原、正常COS-1細胞の培養培地のPEG沈殿物、および正常SMB抗原は、それぞれのNRAおよびSMB抗原に関する場合と同じ希釈で用いた。400倍希釈したヒト血清標本を、ウイルス特異的および陰性対照抗原について、1試料あたり3個ずつ同時に試験した。有効な陽性試験結果を得るためには、ウイルス抗原（P）と反応した試験血清のOD_{450}は、陰性対照抗原（N）と反応した同じ血清の対応する吸光度値より少なくとも2倍大きくなければならなかった。

【０１４５】

NRAおよびNY-06480、Eg101、およびSLEウイルスSMBの反応性を、暗号化ヒト血清標本21個を用いてMAC-およびIgG ELISAによって比較した。標本21個のうち、19個は、三つ全ての抗原に対して類似の結果を示した（陰性8例、および擬陽性または陽性11例）。標本18個も同様に、SLESMB抗原を用いて個別に試験した。Eg-101-SMB陽性標本13個中3個のみがSLE MAC-ELISAにおいて陽性であった（表1）。WN抗原陰性標本はいずれもSLEMAC-ELISAに

よって陽性ではなかった。この結果は、抗WNウイルスIgMが他のフラビウイルスと有意に交叉反応せず（Tardeiら、J. Clin.Microbiol. 38：2232～2239（1940））、NRAまたはSMB抗原を試験に用いるか否かにかかわらず、急性のWNウイルス感染症を診断するために特異的であるというこれまでの知見を確認した。全ての標本を同様に、間接的IgGELISAによって同時に試験した。標本21個中10個は三つの抗原のいずれを用いても陽性であった。

【０１４６】

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

【０１４７】

実施例11. pCBWNをワクチン接種した動物における免疫応答の評価

3週齢の雌性ICRマウス1群10匹を試験に用いた。マウスにpCBWNまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド（pEGFP）DNA（Clonetech、SanFrancisco、CA）の1回量を筋肉内注射した。pCBWNプラスミドDNAは、EndoFreeプラスミドギガキット（Qiagen）によってXL-1blue細胞から精製して、pH 7.5のPBSに濃度1.0μg/μlとなるように再懸濁させた。pEGFP 100μgを投与したマウスを非ワクチン接種対照として用いた。マウスに100μlの容量中100μg、10μg、1.0μg、または0.1μgの用量でpCBWNプラスミドを注射した。pCBWN10μg、1.0μg、または0.1μgを投与した群にEMC-830方形波電気穿孔装置（Genetronics、San Diego、CA）を用いて、エレクトロトランスファー媒介インビボ遺伝子輸送プロトコールによってワクチン接種した。エレクトロトランスファープロトコールは、Mirら（Proc.Natl. Acad. Sci. USA 96：4262～4267（1999））の方法に基づいた。DNA注射の直後、脚のそれぞれの側に4.5mm～5.5 mm離して配置した2本のステンレス鋼プレート電極によって、経皮電気パルスを適用した。脚の皮膚との電気的接触は、PBSによって脚を完全に湿らせることによって確実にした。パルス間の間隔200msecで、持続25 msecの40ボルト/mmのパルス4回2組を適用した。電極の極性は、エレクトロトランスファーの効率を増強するために、パルスの組の間で逆転させた。

【０１４８】

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

【０１４９】

pCBWNの1回筋肉内ワクチン接種が、マウスをWN感染症から保護しうるか否かを決定するために、マウスに腹腔内注射するか、またはウイルス感染イエカ（Culexmosquitoes）に刺されることによってNY-6480ウイルスをチャレンジした。マウスの群の半数に、NY99-6480ウイルスの LD_{50} の1,000倍（1,025PFU/100μl）をワクチン接種後6週目に腹腔内チャレンジした。残りのマウスはそれぞれ、チャレンジ実験の7日前にNY99-6480ウイルスを感染させたコガタアカイエカ（Culextritaeniorhynchus mosquitoes）3匹に刺された。蚊は十分に充血するまでマウスの血を吸わせた。マウスは、チャレンジ後3週間毎日2回観察した

。

【０１５０】

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

【０１５１】

1群10匹のマウスを、エレクトロトランスファーを用いることによって、動物あたりpCBWN 10.0～0.1μgによって免疫した。pCBWNを投与した群は全て、ウイルスチャレンジから完全に保護された。免疫後6週目で、エレクトロトランスファーを行ったマウスの群は全て、エレクトロトランスファーを行わずに通常の筋肉内注射によってpCBWN100μgを投与した動物より、4倍弱異なるNt力価を示した。有効な免疫の証拠となるこれらの結果はいずれも、エレクトロトランスファープロトコールが本発明のDNAワクチンの免疫原性および保護有効性を増強することを示唆している（Mirら、Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 96：4262～4267（1999））に記載されるとおりに実施した場合）。

【０１５２】

本研究において用いた、様々な年齢の混合繁殖雌ウマおよび去勢ウマは、ELISAおよびPRNTによって、WNウイルスおよびSLEウイルス抗体陰性であることが示された。ウマ4頭にpCBWNプラスミド1回量（1,000μg/1,000μl、PBS、pH7.5）を筋肉内注射した。血清標本はウイルスチャレンジの前に2日毎に38日間採取して、WNウイルス特異的抗体反応をMAC-、またはIgG-ELISAおよびPRNTによって評価した。

【０１５３】

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

【０１５４】

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

ある、血清の$10^{1.0}$PFU/ml（ウマ#10）から血清の$10^{2.4}$/ml（ウマ#9）の範囲に及んだ。ウマ#14は、試験期間中に検出可能なウイルス血症を発症しなかった。しかし、このウマは、12日後検出されたNt抗体によって示されたように、ウイルスに感染していた。

【０１５５】

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

【０１５６】

実施例12．黄熱病ウイルス（YFV）またはセントルイス脳炎ウイルス（SLEV）prMおよびE蛋白質のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

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

【０１５７】

YFVまたはSLEV特異的抗原はそれぞれ、pCDYF2またはpCDSLE4-3によって形質転換したCOS-1細胞において発現させた。発現された蛋白質レベルは、YFVまたはSLEV感染COS-1細胞対照と類似であった。JEVモデルにおけるように、ウイルス抗原の遺伝子を有するベクターによって形質転換したCOS-1細胞株が得られ、これはYFVまたはSLEV抗原性蛋白質を構成的に発現する。YFVまたはSLEVE特異的Mabのパネルを用いたIFAによるエピトープマッピングは、真正のE蛋白質が、pCDYF2-またはpCDSLE4-3形質転換COS-1細胞によって発現されたことを示した。予備試験は、pCDSLE4-3プラスミド100μg/100μlの脱イオン水溶液の1回量を筋肉内接種後、3週齢の雌性ICRマウスの100％が血清転換したことを示した。

【０１５８】

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

QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、セントルイス脳炎ウイルスのMSI-7株に感染させた、Vero細胞培養培地150μlからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80μlに懸濁させ、セントルイス脳炎ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Trentら（Virology156：293～304（1987））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片は、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位AfeIを、アンプリマーSLE463（配列番号：30）を用いることによってcDNAの5'末端に作成（engineer）した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcSLE2447（配列番号：31）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

【０１５９】
上記の二つのプライマー（配列番号：30および配列番号：31）を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの2004断片（463～2466nt）を作製し、pCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBSLE（ヌクレオチド配列、配列番号：21；アミノ酸配列、配列番号：22）を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素、および操作された改変JEシグナル配列要素（配列番号：27）を含んだ。JEシグナル配列要素は、当初のpCBJESSプラスミドにおける－4（CysからGly）および－2（GlyからSer）位で改変JEシグナル配列を含む。

【０１６０】
ABIプリズム377シークエンサー（Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA）を用いた自動DNAシークエンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、Trentら（Virology156：293～304（1987））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【０１６１】
実施例14．JEVシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルス（YFV）prMおよびE蛋白質のコード配列を含む組み換え型プラスミドの調製
QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、黄熱病ウイルスの17D-213株に感染させたVero細胞培養培地150μlからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80μlに懸濁させ、黄熱病ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、dosSantosら（Virus Research 35：35～41（1995））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位AfeIは、アンプリマーYF482（配列番号：28）を用いてcDNAの5'末端に作成（engineer）した。後にNotI制限部位が続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcYF2433（配列番号：29）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

【０１６２】
上記の二つのアンプリマー（配列番号：28および配列番号：29）を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの1971断片（482～2452nt）を作製し、これをpCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBYF（ヌクレオチド配列、配列番号：23；アミノ酸配列、配列番号：24）を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素および操作されたJEシグナル配列要素（配列番号：27）を含んだ。JEシグナル配列要素は、pCBJESSプラスミドにおけるJESSの－4（CysからGly）および－2（GlyからSer）位で改変JEシグナル配列を含む。

【０１６３】
ABIプリズム377シークエンサー（Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA）を用いた自動DNAシークエンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、dosSantosら（Virus Research 35：35～41（1995））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【０１６４】
実施例15．JEVシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスprMおよびE抗原のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製
QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、ポワッサンウイルスのLB株に感染させたVero細胞培養培地150μlから、ゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80μlに懸濁させ、ポワッサンウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Mandlら（Virology194：173～184（1993））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位AfeI

は、アンプリマーPOW454（配列番号：25）を用いてcDNAの5'末端に作成（engineer）した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドンを、アンプリマーcPOW2417（配列番号：26）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

【０１６５】

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

【０１６６】

ABIプリズム377シークエンサー（Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA）を用いた自動DNAシークエンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、Mandlら（Virology194：173～184（1993））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【０１６７】

実施例16．デング血清型2型構造蛋白質のコード配列を含むプラスミドの調製

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

【０１６８】

prMからEまでのデング血清型2型遺伝子領域を含むプラスミドを構築する。デング血清型2型prMおよびE遺伝子（Deubelら、Virology 155：365～377（1986）；Gruenbergら、J. Gen. Virol. 69、1301～1398（1988）；Hahnら、Virology 162：167～180（1988））をpCDNA3のようなプラスミドにライゲーションした後、切除して、発現させるためにpCBamp、pCEP4、pREP4、またはpRc/RSVのようなベクター（Invitrogen、Carlsbad、CAから供給）にクローニングする。必要であれば、cDNA配列においてコードされるデング血清型2型ウイルス特異的配列を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような技法を用いて増幅してもよい。または、ウイルスRNAが遺伝子領域源である場合、RT-PCR技法によってDNA配列を増幅してもよい。5'末端で開始コドンおよび3'末端で停止コドンを含むDNA断片を、サイトメガロウイルス（CMV）前初期（IE）遺伝子プロモーター、開始コドン、およびターミネーターがデング血清型2型ウイルス配列に機能的に結合するように、適当な制限ヌクレアーゼ特異的部位で発現ベクターにクローニングする。

【０１６９】

実施例17．デング血清型2型DNAワクチンを用いたマウスのワクチン接種

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

【０１７０】

実施例18．改善されたシグナルペプチドの設計および構築

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

【０１７１】

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

【０１７２】

用いられるプログラムのタイプの例は、2002年4月3日現在、http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/において認められる。参照および組み入れられた参考文献に記載されるHMMを適用して、異なるプラスミド構築物における、prMシグナルペプチド配列のシグナルペプチド確率を計算した（表7）。シグナルP-HMM検索は、全ての構築物におけるシグナルペプチダーゼ切断部位を正確に予測した。しかし、切断の確率（0.164～1.000の範囲）およびシグナルペプチド確率（0.165～1.00の範囲）にかなりの差を認めた（表7）。これは、切断部位とシグナルペプチド確率が同様に、構築物のn-領域における陽性荷電アミノ酸、h-領域における疎水性アミノ酸の長さ、およびc-領域におけるアミノ酸組成によっても影響を受けることが知られていることから、意外ではない（Changら、「FlavivirusDNA vaccines：current status and potential」、Annals of NY Acad. Sci. 951：272～285（2001）；Sakaguchiら、「Functionsof Signal and Signal-Anchor Sequences are Determined by the Balance Between theHydrophobic Segment and the N-Terminal Charge」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：16～19（1992））。

【０１７３】

それぞれがJEウイルスの異なる株に由来する、三つのJEウイルスプラスミド構築物は、異なるワクチン能を示した（Linら、「DNA immunizationwith Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protectiveimmunity in mice」、J. Virol. 72

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

【０１７４】

先に記述したように、コンピューターに基づく計算を用いることは、発現プラスミドの設計を最適にするために適用されている。特に、シグナルP-HMMプログラムの予想される検出力を適用して、WNウイルス発現プラスミドを設計した（表2）（Davisら、「WestNile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from viruschallenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that canbe used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75：4040～4047（2001））。pCBWNプラスミドは、WNウイルスprM-E遺伝子配列が後に続く短縮型のJEウイルスシグナルペプチドからなる。この構築物のワクチン能は、pCBWNDNAの1回筋肉内注射が保護免疫を誘導したのみならず、マウスおよびウマにおけるWNウイルス感染症を予防したことから十分に証明された。

【０１７５】

先に考察したように、かつ実施例13～15において証明したように、抗原コード領域と同じウイルスからのウイルスコードシグナル配列が、必ずしも利用できる最適なシグナルペプチドである必要はない。さらに、非改変シグナル配列が必ずしも最適である必要はない。例えば、pCBJE1-14プラスミドにおいてコードされるシグナルペプチドは、シグナル配列の確率によって測定すると、n-領域を短縮することによって、c-領域配列を変化させることによって、または双方の改変の組み合わせによって改善することができる（図6）。例示のため、JEウイルスシグナルペプチドの短縮型は、本明細書に記載され、かつ教示のために参照として本明細書に組み入れられる、WNウイルスprMおよびE遺伝子の発現のために用いられている（Davisら、「WestNile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from viruschallenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that canbe used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 7

5：4040～4047（2001））。1回筋肉内接種による用量設定試験により、pCBWNは、マウスにおける免疫原性がpCBJE1-14より少なくとも2倍～4倍強いことが示された。

【０１７６】

実施例19．多価ワクチン

多数のフラビウイルスに対して免疫するように設計された、多価および／または複合ワクチンも同様に作製することができる。多価ワクチンの調製において、YF、異なる血清型のDEN、JE、WN、SLE、およびTBE（RSSEおよびCEE）ウイルス、またはフラビウイルスの他の任意の組み合わせのような、関係する病原体に関連した要素を含む一価ワクチン成分を調製する。他の実施例および本明細書において記述したDNA構築物の設計および作製は、記述通りに実施する。適当なワクチンの組み合わせは、多数の病原体に対して保護する多価または複合ワクチンを提供するように作製されうる。本発明者らのグループの予備的なデータは、pCBJE1-14およびpCBWNDNAの複合ワクチンの筋肉内注射によって、マウスにおいてJEウイルス、およびWNウイルス特異的Nt抗体が誘導されることを証明した（表8）。それぞれの一価の成分は、たとえ同一の転写および翻訳調節物質を用いて構築しても、好ましくは、そのワクチン能を確実にするために類似のモデル系において試験すべきである。その後、複合ワクチンカクテルを処方することができる。これらのワクチンカクテルは、特定の地理的地域に対して特異的に作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯アジアのためのワクチンカクテルは、DENの四つの血清型、WN、およびJEウイルスワクチンを含むべきである。アフリカおよび南アメリカのための同様に有用なワクチンカクテルはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルスワクチン、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスワクチンを含むべきである。

【０１７７】

実施例20．組み換え型デング2型ウイルスの調製と試験

a．実施例の要約。　デング2型ウイルス（DEN-2）の前膜（prM）およびエンベロープ（E）蛋白質をコードする一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドには、配列番号：43によって記述される蛋白質をコードする真正のDEN-2prM-E構築物（pCBD2-14-6）（配列番号：42）、配列番号：45によって記述される蛋白質をコードする90％DEN-2E-10％日本脳炎（JE）ウイルスEキメラ構築物（pCB9D2-1J-4-3）（配列番号：44）、および配列番号：47によって記述される蛋白質をコードする80％DEN-2E-20％JE Eキメラ構築物（pCB8D2-2J-2-9-1）（配列番号：46）が含まれた。モノクローナル抗体（MAb）反応性は、三つ全てのプラスミドが、ドメイン1、2、および3の抗体のパネルと反応するE蛋白質エピトープを発現することを示した。しかし、pCB8D2-2J-2-9-1構築物（配列番号：46）のみが高レベルのprM（成熟prM）およびEを、プラスミド形質転換COS-1細胞の培地に分泌した。pCBD2-14-6プラスミド（配列番号：42）によって形質転換されたCOS-1細胞、およびpCB9D2-4-3プラスミド（配列番号：44）によって形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたprMおよびE蛋白質の主要な部分は、膜に結合したままであった。DEN-2のE蛋白質をコードする配列の20％を対応するJEE蛋白質配列をコードする配列に置換しても、MAb反応性に影響を及ぼさなかった。

【０１７８】

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

【０１７９】

b．DEN-2ウイルスの重要性とワクチン。　デング（DEN）熱は、亜熱帯および熱帯地域に発生する急性感染症である。これはヒトの最も重要なフラビウイルス疾患の一つである。先に述べたように、デングウイルスには異なる四つのDEN血清型（DEN-1、DEN-2、DEN-3、およびDEN-4）が存在する。これらのいずれかに感染すると、通常、無症候性であるか、またはデング熱（DF）として知られる自己限定性の発熱疾患を生じる。しかし、少ない

割合の症例において、デングウイルス感染症の結果、はるかにより重篤な疾患で生命に危険があるデング出血熱またはデングショック症候群（DHF/DSS）が起こる。このように、あまり関心を集めない比較的軽度のDF症例は世界中で年間約1億例であるが、入院を必要とするDHF/DSS症例は年間で推定50万例が報告されている。この疾患に対して保護するために、DENが風土病であり、かつ流行している地域の子供、および免疫がない大人に投与するために、四つ全ての血清型に対して有効な安全かつ有効なDENワクチンが必要である。

【０１８０】

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

【０１８１】

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

【０１８２】

c．材料および方法

i．細胞培養およびウイルス株。 COS-1細胞（ATCC、Manassas、VA；1650-CRL）を、10％熱不活化ウシ胎児血清（FBS、HycloneLaboratories Inc.、Logan、UT）、1 mMピルビン酸ナトリウム、1 mM非必須アミノ酸、30 ml/L 7.5％$NaHCO_3$、100単位/mlペニシリン、および100μg/mlストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル最小基本培地（DMEM、GIBCO、GrandIsland、NY）において5％CO_2、37℃で増殖させた。VeroおよびC6/36細胞を、COS-1細胞に関して用いた条件と同じ条件で増殖させた。DEN-2ウイルス、株16681を、cDNAクローニング、IgGELISA、およびプラーク減少中和試験（PRNT）のために用いた。ウイルスは、C6/36細胞培養において増殖させた。免疫学的または生化学的研究のために用いられるウイルスは、7％ポリエチレングリコール（PEG-8000；FisherScientific、Fair Lawn、NJ）による沈殿の後、30％グリセロール-45％酒石酸カリウム勾配中で超遠心することによって精製した（Obijeskiら、「Segmentedgenome and nucleocapsid of La Crosse virus」、J. Virol. 20：664～675（1976））。

【０１８３】

ii．プラスミドの構築。 ゲノムRNAは、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、DEN-216681株を感染させたC6/36細胞培養培地150μlから抽出した。抽出したRNAをジエチルピロカーボネート処置水（DEPC、Sigma、ST.Louis、MO

）80μlに再懸濁させてから、DEN-2ウイルスprMおよびE抗原を逆転写酵素-PCR（RT-PCR）によって増幅するための鋳型として用いた。公表された配列に基づいてプライマー配列（表9）を設計した（Gadkariら、「Criticalevaluation of Kyasanur Forest disease virus neutralizing antibodies found inbats（a preliminary report）」、Indian J. Med. Res. 64：64～67（1976）；Kinneyら、「Constructionof infectious cDNA clones for dengue 2 virus：strain 16681 and its attenuatedvaccine derivative, strain PDK-53」、Virology 230：300～308（1997））。制限酵素KasIの認識および切断部位をcDNAアンプリコンの5'末端に組み入れた。NotI制限部位が後に続くインフレーム終了コドンをcDNAアンプリコンの3'末端に導入した。DEN-2ウイルスcDNAアンプリコンをKasIおよびNotI酵素によって消化した後、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、100％DEN-2Eプラスミド、pCBD2-14-6（配列番号：42）を作製した。

【０１８４】

90％および80％DEN-2 Eプラスミドを構築するために、100％DEN-2プラスミド、pCBD2-14-6（配列番号：42）およびJEプラスミド、pCBJE1-14（配列番号：17）をPCR鋳型として用いて、それぞれ、DEN-2およびJEDNA配列を増幅した。DEN-2およびJE遺伝子断片を得るために増幅反応において用いた、プライマーの組を表9に記載する。T7およびSP6プライミング部位は、当初のpCDNA-3プラスミド（Invitrogen、Carlsbad、CA）に由来するpCBampプラスミドにおいて認められ、望ましければ、または必要に応じて利用することができる。90％DEN-2-10％JEE蛋白質遺伝子のPCR増幅DNA断片をBxtX1制限エンドヌクレアーゼによって消化し、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、プラスミド、pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）を得た。80％DEN-2-20％JEE遺伝子のPCR増幅DNA断片を、BsmBIによって消化し、T4 DNAリガーゼによってライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、pCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）を得た。三つのプラスミド構築物の略図を図7に示す。90％DEN-2-10％JEEおよび80％DEN-2-20％JE E蛋白質接合領域を、それぞれ表9に示す。

【０１８５】

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

【０１８６】

iii. 電気穿孔によるCOS-1細胞におけるDEN-2組み換え型抗原の一過性の発現。COS-1細胞は、実施例の他の部分、およびChangら、（「Asingle intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protectiveimmunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74：4244～4252（2000））に記載したプロトコールを用いて、各DEN-2プラスミドまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド対照（pEGFP、Clonetech、San Francisco、CA）について個々に電気穿孔した。電気穿孔した細胞を75 cm^2培養フラスコに播種して、37℃、5％CO_2において維持した。電気穿孔の6時間後、増殖培地を2％ウシ胎児血清を含む維持培地に交換した。組織培養培地および細胞は、抗原特徴付けのために電気穿孔後個々に48時間で回収した。

【０１８７】

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

【０１８８】

v．組み換え型DEN-2ウイルス抗原の特徴付け。　組織培養培地を電気穿孔の48時間後に回収した。抗原捕獲（Ag-捕獲）ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の、培養培地に分泌されたDEN-2ウイルス抗原を検出した。MAb4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合MAb 6B6C-1を用いて、それぞれ、DENウイルス抗原を捕獲して、捕獲した抗原を検出した（Changら、（「Asingle intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protectiveimmunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74：4244～4252（2000）；Huntら、「Arecombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced instably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunitimmunogen」、J. Virol. Methods. 97：133～149（2001））。

【０１８９】

電気穿孔の48時間後、各プラスミドに関して形質転換した細胞をトリプシン処理し、5×10^6個を含むアリコートとしてPBSに再懸濁させた。これらの細胞試料は、Mem-PER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット（Pierce、Rockford、IL）を用いて、製造元の提案するプロトコールに従って、膜蛋白質抽出に関して処理した。疎水性および親水性蛋白質の双方を単離した。この技法は、疎水相において認められた膜貫通蛋白質を濃縮するために開発された。疎水性および親水性分画はいずれも、DEN-2組み換え型抗原に関して抗原-捕獲ELISAによって分析した。

【０１９０】

培地中の組み換え型抗原は、10％ポリエチレングリコール（PEG）-8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物は、TNE緩衝液（50 mMトリス、100 mMNaCl、10 mM EDTA、pH 7.5）に、当初の容量の100分の1となるように再懸濁し、遠心によって透明にし、4℃で保存した。PEG沈殿によって濃縮し、TNE緩衝液に再懸濁させた組み換え型抗原を、4.0％エタノールによって抽出し、残留PEGを除去した（Huntら、「Arecombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced instably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunitimmunogen」、J. Virol. Methods. 97：133～149（2001））。エタノール抽出した抗原、形質転換細胞からの疎水性膜蛋白質、および勾配精製DEN-2ビリオンを、ExcelPlus電気泳動装置（商標）（Invitrogen Corp.、Carlsbad、CA）においてNuPAGE、4～12％ビストリス勾配ゲルにおいて分析した後、ExcelPlusブロットユニット（Invitrogen Corp.）を用いてニトロセルロースメンブレン上にエレクトロブロッティングを行った。DEN-2ウイルス特異的蛋白質は、DEN-2ウイルス特異的MAb1A6A-8（E特異的）および1A2A-1（カプシド特異的）、ならびにDEN-2 prMに対して特異的なウサギ血清、およびDEN-2 M蛋白質のアミノ酸1～34位からなるペプチドに対して特異的なマウス血清を用いて、ウェスタンブロットによって検出し、正常マウス腹水を陰性対照として用いた（Murrayら、「Processingof the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM」、J. Gen. Virol. 74（Pt 2）：175～182（1993）；Roehrigら、「Monoclonalantibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology246：317～328（1998））。

【０１９１】

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

【０１９２】

vii．血清学試験。　ワクチン接種前および接種後の血清標本を、ELISAによって精製DEN-2ビリオンに対する抗体結合能に関して、PRNTによって中和（Nt）抗体に関して、およびウェスタンブロッティングによって精製DEN-2ウイルス蛋白質を認識する抗体に関して

調べた。PRNTは、DEN-2（16681株）およびJE（Nakayama株）ウイルスを用いて、既に記述されているようにVero細胞に関して行った（Changら、（「Asingle intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protectiveimmunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74：4244～4252（2000））。エンドポイントは、90%プラーク減少レベルで決定した（Huntら、「Arecombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced instably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunitimmunogen」、J. Virol. Methods. 97：133～149（2001））。

【０１９３】

d. 結果

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

【０１９４】

ii. 一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたE蛋白質のエピトープマッピング。 組み換え型プラスミドのそれぞれによって発現されたDEN-2蛋白質を、DEN-2ウイルスに対して既知の反応性を有するマウスMAbのパネルを用いてIFAによって評価した（表10：Henchalら、「Epitopicanalysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions usingmonoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34：162～169（1985）；Roehrigら、「Monoclonalantibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology246：317～328（1998））。MAbパネルには、prMおよびC蛋白質と同様にフラビウイルスのE蛋白質の三つの抗原性ドメインのそれぞれと反応する抗体が含まれた（Mandlら、「Antigenicstructure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, usingtick-borne encephalitis virus as a model」、J. Virol. 63：564～571（1989）；Reyら、「Theenvelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Åresolution」、Nature375：291～298（1995））。フラビウイルス抗原性ドメイン2および3に対して特異的なMAbは、DEN-2ウイルスおよび三つのプラスミド発現蛋白質のそれぞれに対して、ほぼ同一の定量的反応性を示した。ドメイン-1特異的MAbの一つ、1B4C-2もまた、発現された全ての蛋白質と類似の反応性パターンを示した。しかし、二つのドメイン1特異的MAb、2B3A-1および9A4D-1は、エンドポイント滴定によって示されるように、プラスミドpCBD2-14-6およびpCB9D2-1J-4-3によって発現されたE蛋白質との反応性がかなり低かった（括弧内の値、表10）。エンドポイント力価の比較から、100%DEN-2Eおよび90%DEN-2 E-10%JE Eを含む構築物において、エピトープC3およびC4の発現が明白に少ないことが判明した。prMに対して特異的なMAb2H2は、三つ全てのプラスミドによって発現された抗原と同じ反応性を示した。抗-C MAb 1A2A-1は、DEN-2ウイルスと良好に反応し、prMおよびEを含むがCは含まないプラスミド発現ウ

イルス蛋白質と低いレベルの非特異的反応性を示した。

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

E、prMおよびMは、その細胞内合成を通して膜会合蛋白質であることから、三つの組み換え型DEN-2プラスミドによるこれらの蛋白質の発現について、何らかの評価を行う場合には、プラスミド形質転換細胞からの細胞膜調製物の評価を含まなければならない。Mem-PER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット（Pierce）を用いて、組み換え型プラスミドのそれぞれによって形質転換された細胞の同等数から、膜貫通蛋白質を単離した。疎水性蛋白質を、相分離によって親水性蛋白質から分離した。Ag-捕獲ELISAによる予備的な分析によって、親水性蛋白質分画が非反応性であることが示された；しかし、組み換え型DEN-2プラスミドのそれぞれによって形質転換したCOS-1細胞からの疎水性蛋白質分画は、ELISA試験において類似の力価を有した（表11）。これらの結果は、三つ全てのプラスミドによってコードされた組み換え型抗原が、形質転換後に発現されたものの、発現された組み換え型抗原は同じレベルで必ずしも全て分泌されないことを示した。

【０１９８】

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

試料と比較すると、EおよびprMはわずかに異常に移動した（図8Aおよび8BにおいてEおよびprMの移動を比較）。

【０１９９】

ｉｖ．三つの異なるDEN-2組み換え型DNAプラスミドをワクチン接種したマウスにおける免疫応答の比較。　3週齢のICRマウスをpCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）、pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）、pCBD2-14-6（配列番号：42）またはpEGFP100μgによる筋肉内注射によって0週目および3週目に免疫した。マウスを初回免疫後3週、6週、および9週目に採血した。個々の血清、およびプールした血清を、ワクチン接種後3週および6週で100倍および400倍希釈液のスクリーニング、およびワクチン接種後9週におけるエンドポイント滴定を用いて、間接的ELISAによって調べた。9週の血清も同様に、DEN-2およびJEウイルスによるPRNTによって調べた。ELISAの結果は、1回免疫後（3週目の血清）、pCB8D2-2J-2-9-1を投与した全てのマウスが血清変換したのに対し、pCB9D2-1J-4-3では50％、およびpCBD2-14-6ワクチン接種マウスでは20％がDEN-2ウイルスと反応したに過ぎなかったことを示した（表12）。ワクチン接種後の9週までに、pCB8D2-2J-2-9-1またはpCBD2-1J-4-3のいずれかをワクチン接種したマウスは全て、抗DEN-2ELISA反応性を示した；しかし、幾何平均力価は、有意に異なった（それぞれ、力価20,000倍対708倍）。100倍を超える抗DEN-2 ELISA力価を示したのは、pCBD2-14-6免疫マウスの40％に過ぎなかった。精製DEN-2ウイルスに対する、pCB8D2-2J-2-9-1免疫マウスからのプールした9週の血清のウェスタンブロットは、免疫優性反応がE糖蛋白質に対してであったことを示した。prMおよびMに対するわずかな反応性も同様に検出された。

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

ｅ．考察

JEおよびWNワクチンに関して初期に用いた同じ段階を最初に用いて、真正DEN-2 prMおよびE遺伝子領域からなる組み換え型DEN-2プラスミド、pCBD2-14-6（配列番号：42）を構築した。MAbのパネルを用いて、IFAにより、このプラスミドによって形質転換したCOS-1細胞によって発現された、DEN-2蛋白質の抗原性マッピングを行ったところ、prMおよびE蛋白質が適合性の蛍光強度を示し、ウイルス感染細胞と類似のMAb反応性を有することが示された（表10）。しかし、真正DEN-2prMおよびE領域をコードするプラスミドによって形質転換したこれらのCOS-1細胞は、検出可能なDEN-2抗原を培養液に分泌することができなかった（抗原捕獲ELISAによって測定した場合）。さらに、真正のDEN-2prMおよびE領域をコードするプラスミドを用いてワクチン接種を行っても、筋肉内に免疫したマウスにおいて抗DEN-2ウイルス中和抗体を刺激することができなかった（表13）。興味深いことに、pCBD2-14-6による細胞の形質転換によって、穴の開いた球状の蛍光染色が得られ、これはDEN-2のE蛋白質のC-末端が、蛋白質の膜保持シグナルに関与する可能性があることを示唆している。このIFA染色パターンは、JEまたはWN構築物形質転換細胞のいずれにおいて

も認められなかった（Changら、（「Asingle intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protectiveimmunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74：4244～4252（2000）；Davisら、「WestNile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from viruschallenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that canbe used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75：4040～4047（2001））。したがって、本出願の教示に従ってなされた知見に照らして、DEN-2のC-末端の10％または20％を、それぞれJEウイルスE蛋白質の対応する領域に置換して、DNA配列の適当な操作を行った二つのさらなるプラスミド、pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）およびpCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）を作製した。ワクチン接種マウスにおける検出可能な抗DEN-2ELISA抗体を刺激するための、異なる構築物の相対的な有効性を表13に示す。

【０２０３】

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

【０２０４】

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

【０２０５】

prM蛋白質は、prM-E成熟の際のE蛋白質の適切なコンフォメーションおよび分泌を維持するために必須であることは、他の研究者によっても主張されている（Aberleら、「ADNA immunization model study with constructs expressing the tick-borneencephalitis virus envelope protein E in different physical forms」、J. Immunol.163：6756～6761（1999）；Allisonら、「Synthesis and secretion of recombinant tick-borneencephalitis virus protein E in soluble and particulate form」、J. Virol. 69：5816～5820（1995））。さらに、E蛋白質の外部ドメインがprMと相互作用することも証明されている。この相互作用は、マリーバレー脳炎ウイルスにおけるEのアミノ酸残基200～327位内のアミノ酸配列が関係することが推定されている（Guirakhooら、「TheMurray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virusparticles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of Eglycoprotein」、Virology 191：921～931（1992））。

【０２０６】

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

めにごく選択的となりうる。

【０２０７】

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

【０２０８】

DEN-2 ウイルスDNAの開発に関するこれまでの試みは、成否が多様であった（Kochelら、「Inoculation of plasmidsexpressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice」、Vaccine15：547～552（1997）；Konishiら、「A DNA vaccine expressing dengue type 2 viruspremembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cellsin mice」、Vaccine 18：1133～1139（2000））。有効性のレベルを改善するために、異なる戦略が用いられている。例えば、ワクチン処方における、pUC19プラスミド、マウスGM-CSFを発現するプラスミドを含む、免疫刺激CpGモチーフの同時免疫、またはEのC-末端のアミノ酸43個を、ライソゾーム会合膜保持配列に置換することによって、DEN-2ワクチンに対する抗体反応が改善し、これらが用いられている（Porterら、「Protectiveefficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpGimmuno-stimulatory motifs on antibody responses」、Arch. Virol. 143：997～1003（1998）；Raviprakashら、「SynergisticNeutralizing Antibody Response to a Dengue Virus Type 2 DNA Vaccine byIncorporation of Lysosome-Associated Membrane Protein Sequences and Use ofPlasmid Expressing GM-CSF」、Virology 290：74～82（2001））。非メチル化CpGモチーフは、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、およびリンパ球を直接活性化して、サイトカインおよびケモカインを分泌させ、Th1サイトカインによって媒介される免疫応答の発達を支持する（Mandersら、「Immunologyof DNA vaccines：CpG motifs and antigen presentation」、Inflamm. Res. 49：199～205（2000））。しかし、CpGを含めると、宿主のサイトカインプロフィールを偏らせて、それによって、Th-1媒介臓器特異的自己免疫障害の発症、および免疫恒常性の妨害の双方に関与する可能性がある（Smithら、「Theregulation of DNA vaccines」、Curr. Opin. Biotech. 12：299～303（2001））。同様に、サイトカインの過剰レベルは、特定のTヘルパー細胞の反応を増加させるものの、免疫応答における他の作用物質の反応を減少または遮断して、それによって全身性の免疫抑制または慢性炎症が起こりうるという証拠がマウスにおいて認められている（Robertsonら、「Assuringthe quality, safety, and efficacy of DNA vaccines」、Mol. Biotechnol. 17：143～149（2001））。相応して、フラビウイルスDNA免疫の安全性および有効性は、転写および翻訳を増強するような発現プラスミドの操作によって、ならびに正しいポリ蛋白質のプロセシングおよび集合を促進する、分泌型prMおよびE蛋白質のターゲティングによって利益を得ることができるであろう（Changら、「FlavivirusDNA vaccines：current status and potential」、Ann. NY Acad. Sci. 951：272～285（2001））。今後の改善は、抗原提示細胞または筋肉細胞によるDNA取り込みの増強に向けることができる（Rodriguezら、「EnhancingDNA immunization」、Virology 268：233～238（2000））。

【０２０９】

（表１）

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

ベクター					組み換え型プラスミド	IFA強度／抗原陽性細胞の割合*	
	プロモーター	イントロン	ポリ(A)	ORI		COS-1	COS-7
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	なし	BGH	なし	pCBJE1-14	3+/45	nd
pC1Bamp	CMV	あり	BGH	なし	pC1BJES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	なし	SV40	OriP	pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	なし	SV40	OriP	pREJE	1+/3	1+/2
pRe/RSV	RSV	なし	BGH	SV40	pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDNA3/CAT	-	-

* 様々な細胞株をpCDNA3/CAT（陰性対照）、pCDJE2-7、pCBJE1-14、pC1BJES14、pCEJE、pREJE、またはpRCJEによって形質転換した。細胞を48時間後にトリプシン処理して、JEウイルス特異的HIAFによる間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって調べた。データは、IFA陽性細胞の強度（尺度1+～4+）および割合として表記する。pCDNA3/CAT形質転換細胞を陰性対照として用いた。

【０２１０】

（表２）
JEウイルス反応抗体によるCOS-1細胞のpCDJE2-7によって安定に形質転換したクローン（JE-4B）によって発現された蛋白質の特徴付け

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

【０２１１】
（表３）
pCDJE2-7またはJE-VEXワクチンによって免疫したマウスにおける免疫応答の持続

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

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

【０２１２】

（表４）

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

	3日齢		3週齢	
	3週間 PV	7週間 PV	3週間 PV	7週間 PV
JE-VAX	0	0	100	100
pCDNA3/CAT	0	0	0	0
pCDJE2-7	40	60	90	90
pC1BJES14	10	60	80	100
pCBJE1-14	80	100	100	100

【０２１３】

（表５）

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

ワクチン	チャレンジ前 JEV血清変換	チャレンジ後の日の生存率 (%)				
		6	7	8	9	21
JE-VAX	0	100	100	60	40	40
pCDNA3/CAT	0	100	80	30	30	30
pCDJE2-7	60	100	100	100	100	100
pC1BJES14	60	100	100	100	100	100
pCBJE1-14	100	100	100	100	100	100

【０２１４】

（表６）

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

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

マウスにプラスミドDNA 100μg用量を1回もしくは2回筋肉内に接種するか、またはJE-VAX

ワクチンのヒト用量の1/5量を2回皮下接種した。非免疫雄性マウスと交配させる前に、PRNT試験のためにワクチン接種後9週目に血清を採取した。

1：生存数／各同腹子の総数
2：JEV ELISA抗体陽性動物数（力価≧400倍）／生存数；血清は、チャレンジ後12週目に試験のために採取した。
【０２１５】
（表７）
フラビウイルスDNAワクチン構築物におけるシグナルペプチドの特徴とワクチン能

プラスミド	prM蛋白質の前のシグナルペプチド配列	シグナルペプチド確率[a] SP	AP	C部位	免疫プロトコール／保護
pSLE1	?LDTINRRPSKKRGGTRSLLGLAALIGLASS/LQLLSTYQG(配列番号:32)	0.702	0.292	0.352	im x 2/部分的
pJME	MWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK(配列番号:33)	0.998	0.000	0.778	im x 2/部分的
pCJEME	MNEGSIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK(配列番号:34)	0.985	0.012	0.785	im x 2/100%
pCBJE1-14	MGRKQNKRGGNEGSIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK(配列番号:35)	0.791	0.199	0.623	im x 1/100%
pcDNA3prM-E	MSKKRGGSETSVLMVIFMLIGFAAA/LKLSNFQGK(配列番号:36)	0.721	0.277	0.622	im x 4 / 部分的 gg x 2-4/100%
pCBWN	MGKRSAGSIMWLASLAVVIACAGA/VTLSNFQGK(配列番号:37)	0.976	0.024	0.526	im x 1/100%
p1012D2ME	MNVLRGFRKEIGRMLNILNRRRRTAGMIIMLIPTVMA/FHLTTRNGE(配列番号:38)	0.165	0.778	0.164	id x 2/なし
SV-PE	MVGLQKRGKRRSATDWMSWLLVITLLGMTLA/ATVRKERGD(配列番号:39)	0.943	0.056	0.899	im or gg x 2/100%
pWRG7077-RSSE	MGWLLVVVLLGVTLA/ATVRKERGD(配列番号:40)	1.000	0.000	0.912	gg x 2/100%
pWRG7077-CEE	MSWLLVITLLGMTIA/ATVRKERGD(配列番号:41)	0.999	0.000	0.821	gg x 2/100%

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

【０２１６】

（表８）
WNおよびJEウイルスの複合DNAワクチンの異なる用量によって免疫したマウスにおける中和抗体（Nt）反応

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

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

【０２１７】
（表９）
DEN-2ウイルスprM E発現プラスミドを構築するために用いられるオリゴヌクレオチド、およびキメラDEN-2およびJE Eの接合領域を示す。

100% DEN-2 prM-E:	
D2KasI-438[a]	5' TGTGCA***GGCGCC***TTCCATTTAACCACACGTAACG (配列番号:48)
CD2NotI-2402	5' TCGA***GCGGCCGC***TCAACTAATTAGGCCTGCACCATGACTC (配列番号:49)
90% DEN-2 E & 10% JE E:	
T7	5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:50)
CD2BstXI-2244	5' ATAGATTGCT***CCA***AA***C***ACT***TGG***TGG (配列番号:51)
JE-2281	5' ACTCCATAGGAAAAGCCGTTCACC (配列番号:52)
CSP6	5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG (配列番号:53)

DEN-2← →JE

90-10接合部 : Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr (配列番号:55)
CTC CAC CAA GTG TTT GGT GGT GCC TTC AGA ACA (配列番号:54)

80% DEN-2 E & 20% JE E:	
T7	5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:56)
CD2BsmBI-2097	5' GAATT***CGTCTC***ACTTCCTTTCTTAAACCAGTTGAGCTTC (配列番号:57)
JEBsmBI-2175	5' GGAATT***CGTCTC***GGAAGCACGCTGGGCAAGG (配列番号:58)
CSP6	5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG 3' (配列番号:59)

DEN-2← →JE

80-20接合部 : Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala (配列番号:61)
AAC TGG TTT AAG AAA GGA AGC ACG CTG GGC GCC (配列番号:60)

[a] オリゴヌクレオチドにおいてコードされる制限酵素部位は、太字、斜体、および下線で強調した。

【０２１８】

（表１０）

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

抗体				対照[a]		プラスミド構築物[a]		
MAb (エピトープ)[b]	抗原ドメイン[c]	PRNT[d]	DEN-2 感染細胞	正常細胞	pCBD2-14-6	pCB9D2-1J-4-3	pCB8D2-2J-2-9-1	
4G2 (A1)	2	+/−	4+	-	4+	4+	4+	
4E5 (A2)	2	はい	3+	-	3-4+	3-4+	2-3+	
1B7 (A5)	2	はい	3-4+	-	4+	4+	2-3+	
1B4C-2(C1)	1	いいえ	3-4+ (8000)	-	2-3+ (4000)	2-3+ (4000)	2-3+ (8000)	
2B3A-1 (C3)	1	いいえ	3-4+ (≥3200)	-	3+ (100)	2+ (100)	2-3+ (≥3200)	
9A4D-1 (C4)	1	いいえ	3-4+	-	2-3+ (400)	1-3+ (400)	3+ (≥12800)	
3H5 (B2)	3	はい	4+	-	4+	4+	4+	
10A4D-2 (B3)	3	はい	2-3+	-	3-4+	3-4+	2-3+	
1A1D-2 (B4)	3	はい	4+	-	3-4+	4+	3-4+	
9D12-6		はい	2-4+		2-3+	2-3+	3-4+	
2H2	prM	いいえ	4+	-	4+	3-4+	3-4+	
1A2A-1	カプシド	いいえ	2-3+	-	1+	2+	1-2+	

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

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

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

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

ドポイントを用いた、腹水の100倍希釈でのプラーク減少中和活性（Henchalら、「Epitopicanalysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions usingmonoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34：162～169（1985）；Roehrigら、「Monoclonalantibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology246：317～328（1998））。

【０２１９】

（表１１）

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

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

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

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

[c] 疎水性膜分画は、材料と方法に記載のように調製した。

【０２２０】

（表１２）

ICRマウスにおける三つのDEN-2組み換え型プラスミドの免疫原性

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

[a] PRNT、プラーク減少中和試験、90％中和エンドポイント。
[b] マウスを0週目および3週目にプラスミドDNA 100μgによって筋肉内に免疫した。
[c] ELISAスクリーニングは、100倍および400倍希釈した血清を用いた。
[d] ND、行っていない。
[e] プール、1、2、4、5、7、8。
[f] プール、2、3、6～10。
[g] プール、1～3、6～10。

【０２２１】
（表１３）
三つのDEN-2組み換え型プラスミドの特徴の要約。

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

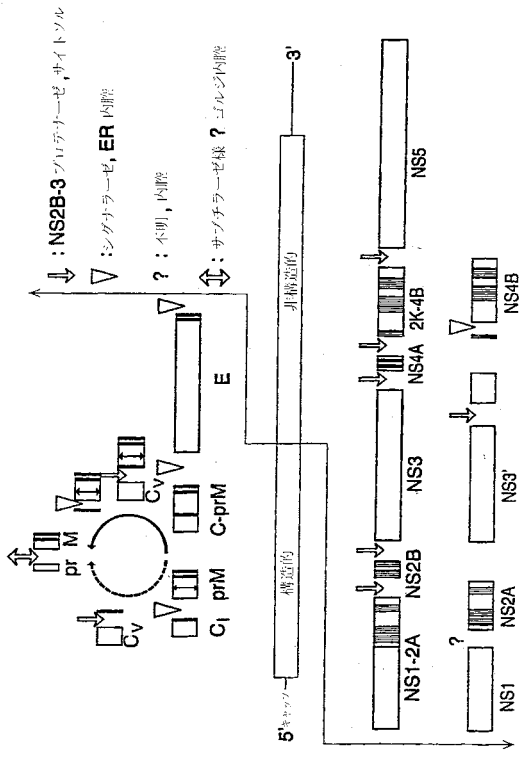
[a] 間接蛍光抗体アッセイ（IFA）染色の特徴、+または-、および拡散または球状パターン。

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

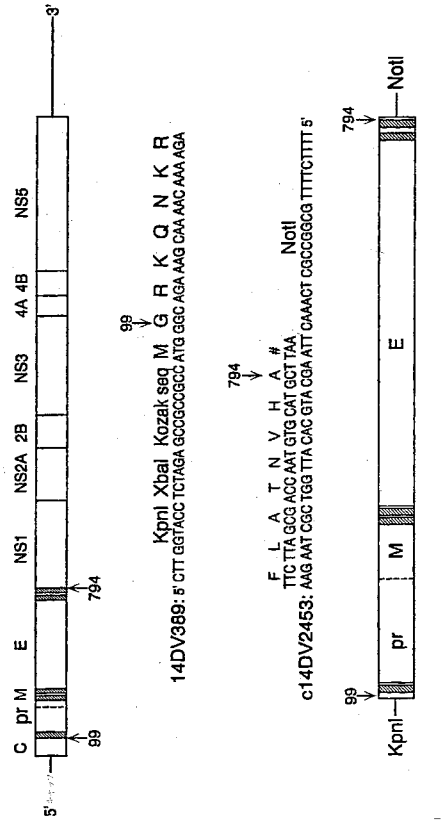
[c] プラーク減少中和力価（PRNT、90％減少）が10倍以上であるマウスの数／マウスの総数。血清はワクチン接種後9週目に採取した。

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

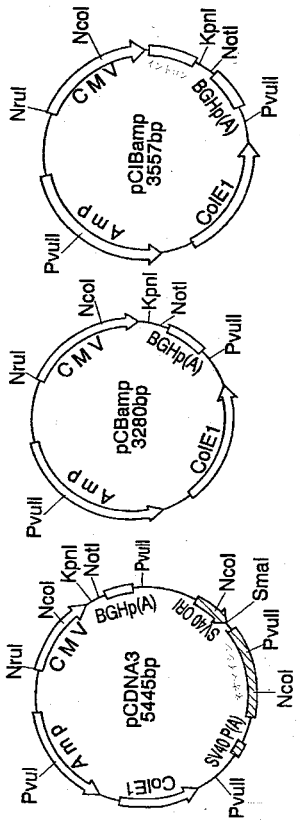
【図１】



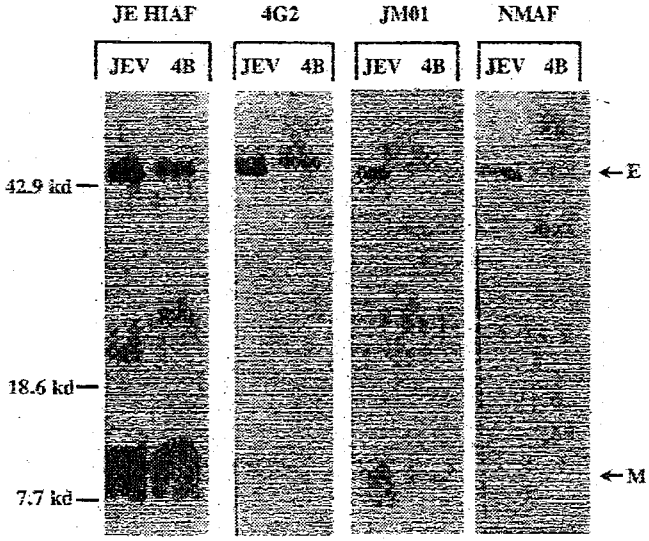
【図２】



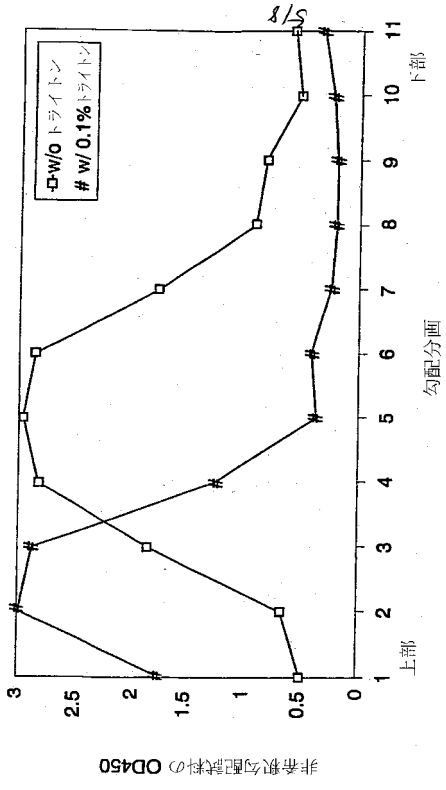
【図３】


pCIBamp
3557bp
pCBamp
3280bp
pCDNA3
5445bp
CMV
BGHp(A)
SV40 ori
SV40 P(A)
ColE1
Amp
NruI
NcoI
KpnI
NotI
PvuII
SmaI

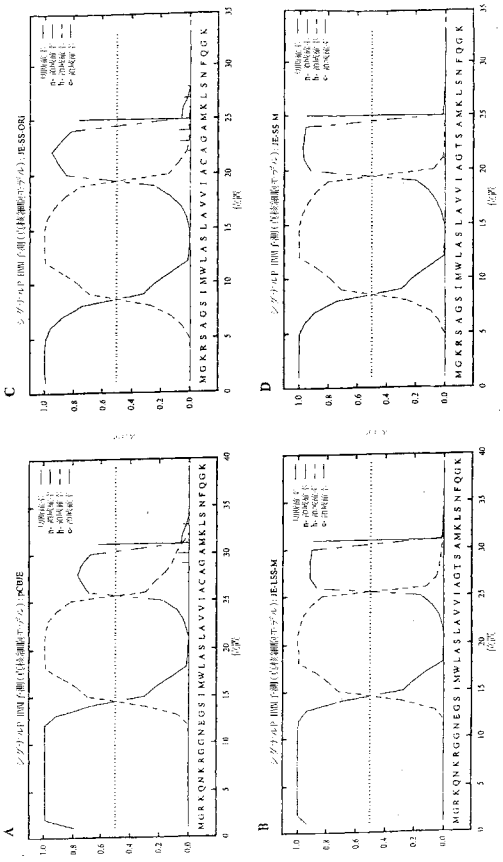
【図４】


JE HIAF
4G2
JM01
NMAF
JEV 4B
42.9 kd
18.6 kd
7.7 kd
E
M

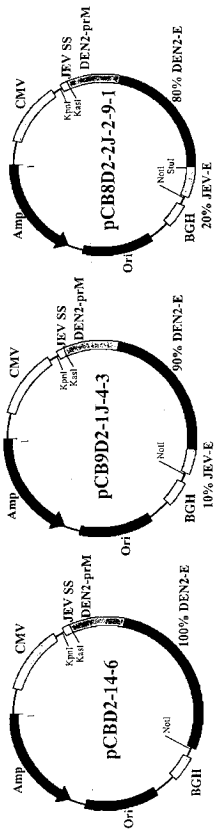
【図５】


w/o トライトン
w/ 0.1% トライトン
上部
下部
均面分画
非希釈勾配試料の OD450

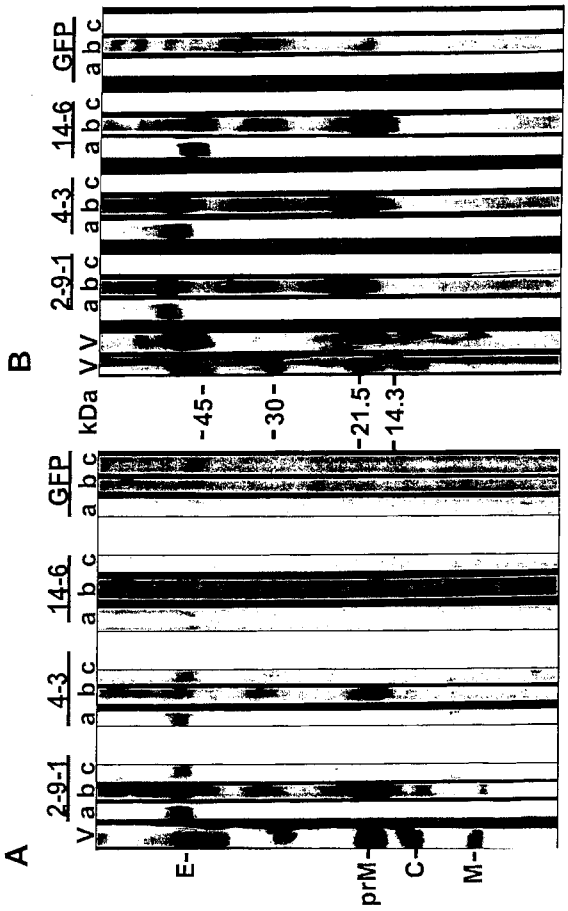
【図６】


A
B
C
D

【図７】



【図８】



【配列表】

2010017185000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*16/10*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/10		
Ｃ０７Ｋ	*14/18*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/18		
Ａ６１Ｋ	*39/21*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/21		
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ａ６１Ｐ	*37/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ｇ０１Ｎ	*33/569*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｌ	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	

(72)発明者　グウォンージェン　ジェイ．　チャン
アメリカ合衆国　コロラド州　フォート　コリンズ　ビーバー　クリーク　ドライブ　４２３７

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA32 BA51 CA11 DA02 EA04 FA02 GA11 HA01 HA14
4B065 AA90X AA92Y AA95Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA45 CA46
4C084 AA13 NA14 ZB09 ZB33
4C085 BA61 BB11 CC08 CC21 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA40 DA76 DA86 EA22 EA53
FA74

专利名称(译)	用于预防黄病毒感染的核酸疫苗		
公开(公告)号	JP2010017185A	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2009192598	申请日	2009-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	グウォンジェンジェイチャン		
发明人	グウォン-ジェン ジェイ. チャン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/10 C07K14/18 A61K39/21 A61K48/00 A61P31/14 A61P37/04 G01N33/569 G01N33/53 A61K31/711 A61K39/00 A61K39/12 C12N15/40 C12Q1/70		
CPC分类号	A61K39/12 A61K48/00 A61K2039/53 A61K2039/70 A61P31/12 A61P31/14 A61P37/04 C07K14/005 C07K16/1081 C07K2319/02 C12N2770/24022 C12N2770/24122 C12N2770/24134 C12Q1/701 G01N33/56983 G01N2333/18 Y02A50/386 Y02A50/388 Y02A50/39 Y02A50/394 Y02A50/53 Y02A50/60		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/10 C07K14/18 A61K39/21 A61K48/00 A61P31/14 A61P37/04 G01N33/569.L G01N33/53.N A61K35/76 A61K39/12 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B065/AA90X 4B065/AA92Y 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB33 4C085/BA61 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA53 4H045/FA74 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA55 4C087/NA14 4C087/ZB33		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	09/826115 2001-04-04 US		
其他公开文献	JP5236597B2 JP2010017185A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新型疫苗，诊断剂和用于治疗和预防由黄病毒引起的疾病的方法。 解决方案：本发明提供了包含免疫原性黄病毒抗原的转录单位（TU）的核酸分子。 TU指导宿主细胞在被摄入细胞后合成抗原。在本发明的一个重要方面，黄病毒是黄热病病毒（YFV），登革热血清型1病毒（DEN-1），登革热血清型2病毒（DEN-2），登革热血清型3病毒。 DEN-3），登革热血清型4病毒（DEN-4），圣路易斯脑炎病毒（SLEV），流行性乙型脑炎病毒（JEV），西尼罗河病毒（WNV），Poissan病毒或任何其他黄病毒。 【选择图】无

ベクター					組み換え型プラスミド	IP1強度/抗原陽性細胞の割合*	
	プロモーター	イントロン	ポリ(A)	ORI		CDS-1	CDS-7
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	なし	BGH	なし	pCBJE1-14	3+/45	nd
pC1Bamp	CMV	あり	BGH	なし	pC1BJES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	なし	SV40	OriP	pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	なし	SV40	OriP	pREJE	1+/3	1+/2
pReRSV	RSV	なし	BGH	SV40	pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDNA3/CAT	.	.