

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-508863

(P2008-508863A)

(43) 公表日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-517517 (P2007-517517)
 (86) (22) 出願日 平成17年5月16日 (2005.5.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月13日 (2006.11.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2005/001753
 (87) 国際公開番号 W02005/111221
 (87) 国際公開日 平成17年11月24日 (2005.11.24)
 (31) 優先権主張番号 0405366
 (32) 優先日 平成16年5月17日 (2004.5.17)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 501474748
 インスティティ・パスツール
 INSTITUT PASTEUR
 フランス、エフ-75724 パリ セデ
 ックス 15、リュ デュ ドクトール
 ル 28
 28, rue du Docteur R
 oux, F-75724 Paris C
 edex 15 FRANCE

(71) 出願人 502205846
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィク
 フランス国 エフ-75016 パリ リ
 ュ ミシエル-アンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラビウイルス科ウイルスタンパク質発現のための組換えレンチウイルスベクター、及びワクチンとしてのそれらの使用

(57) 【要約】

フラビウイルス科のウイルスの少なくとも1つのタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含む組換えレンチウイルスベクターの、感受性の種におけるフラビウイルス科ウイルス感染の予防及び/又は治療を意図する医薬組成物を製造するための使用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フラビウイルス科のウイルスの少なくとも1つのタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含む組換えレンチウイルスベクターの、感受性の種におけるフラビウイルス科ウイルス感染の予防及び/又は治療を意図する免疫原性組成物を製造するための使用。

【請求項 2】

前記組換えレンチウイルスベクターが、三重らせんタイプであることを特徴とする請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記組換えレンチウイルスベクターが、プロモータ及びアクチベータがU3領域から欠失された3' LTRを含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の使用。

【請求項 4】

前記組換えレンチウイルスベクターが、別のウイルスの少なくとも1つのエンベロープタンパク質を用いて偽型にされたことを特徴とする請求項1～3のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 5】

前記エンベロープタンパク質が、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質Gである請求項4に記載の使用。

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチド断片が、フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つの構造タンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードすることを特徴とする請求項1～5のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 7】

前記構造タンパク質が、膜タンパク質又はエンベロープタンパク質であることを特徴とする請求項6に記載の使用。

【請求項 8】

前記ポリヌクレオチド断片が、フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つの非構造タンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードすることを特徴とする請求項1～5のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 9】

前記ポリヌクレオチド断片が、フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つの構造タンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドと、同じフラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つの非構造タンパク質又は該非構造タンパク質の少なくとも8アミノ酸の断片との両方をコードすることを特徴とする請求項1～8のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 10】

前記免疫原性ペプチドが、種々のフラビウイルス科ウイルスの免疫原性断片の組み合わせ、及び/又は同じフラビウイルス科ウイルスの異なる血清型免疫原性断片の組み合わせからなることを特徴とする請求項1～9のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 11】

前記フラビウイルス科ウイルスが、西ナイルウイルス、デングウイルス、黄熱ウイルス及びC型肝炎ウイルスからなる群より選択されることを特徴とする請求項1～10のいずれか1つに記載の使用。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチド断片が、

- 西ナイルウイルス若しくはデングウイルスのEタンパク質と、任意にprM若しくはMタンパク質及び/又はCタンパク質及び/又は非構造タンパク質とをコードするcDNA、並びに前記タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドの1又は複数コードするcDNA

10

20

30

40

50

- C型肝炎ウイルスのE1若しくはE2タンパク質又はE1/E2ヘテロダイマー、及び/又は0、+1若しくは+2リーディングフレームによるCタンパク質、及び/又はNS3タンパク質をコードするcDNA、並びに前記タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドの1又は複数をコードするcDNA、

- それぞれがデングウイルスの4つのタイプの1つに相当するデングウイルスのEタンパク質の1又は複数の異なるドメインIII (位置295~394)をコードするcDNA

からなる群より選択されることを特徴とする請求項1~11のいずれか1つに記載の使用。

【請求項13】

前記cDNAが、その配列が添付の配列表の配列番号1~4により表される4つのドメインIIIをコードすることを特徴とする請求項12に記載の使用。

10

【請求項14】

+1又は+2リーディングフレームによるCタンパク質をコードする前記cDNAが、配列番号5~14の配列からなる群より選択されることを特徴とする請求項12に記載の使用。

【請求項15】

前記ポリヌクレオチドが、M23027、M19197、M93130、M14931、M12294、AF481864、M18370、X03700、U27495、M73835、M31182、M31768、J04358、M62321、D90208及びM58335からなる群より選択されるNCBIデータベースのアクセッション番号に相当するフラビウイルス科ウイルスのコーディング配列の断片であることを特徴とする請求項1~12のいずれか1つに記載の使用。

【請求項16】

請求項6で規定されるような少なくとも1つの構造タンパク質又は該タンパク質の断片と、任意に非構造タンパク質又は該タンパク質の断片とをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1~6及び8~15のいずれか1つで規定される組換えレンチウイルスベクター。

20

【請求項17】

三重らせんタイプであることを特徴とする請求項16に記載の組み換えベクター。

【請求項18】

- 西ナイルウイルス若しくはデングウイルスの少なくとも1つのEタンパク質と、任意にprM若しくはMタンパク質及び/又はCタンパク質及び/又は非構造タンパク質とをコードするcDNA、並びに前記タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドの1又は複数をコードするcDNA、

30

- C型肝炎ウイルスのE1若しくはE2タンパク質又はE1/E2ヘテロダイマー、及び/又は0、+1若しくは+2リーディングフレームによるCタンパク質と、任意に、NS3タンパク質とをコードするcDNA、並びに前記タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドの1又は複数をコードするcDNA、並びに

- それぞれがデングウイルスの4つのタイプの1つに相当するデングウイルスのEタンパク質のドメインIII (位置295~394)又はいくつかの異なるドメインIIIをコードするcDNAからなる群より選択されるcDNAを含むことを特徴とする請求項16又は17に記載の組換えレンチウイルスベクター。

【請求項19】

+1又は+2リーディングフレームによるCタンパク質をコードする前記cDNAが、配列番号5~14の配列からなる群より選択されることを特徴とする請求項18に記載の組換えレンチウイルスベクター。

40

【請求項20】

前記cDNAが、その配列が配列番号1~4で表される4つのドメインIIIをコードすることを特徴とする請求項18に記載の組換えレンチウイルスベクター。

【請求項21】

デングウイルス又は西ナイルウイルスのEタンパク質とprMタンパク質とをコードするcDNAを含むことを特徴とする請求項18に記載の組換えレンチウイルスベクター。

【請求項22】

西ナイルウイルスのIS-98-ST1株のEタンパク質の分泌型をコードするcDNAを含み、2003

50

年8月27日に25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15のCollection Nationale de Cultures de Microorganismes [National Collection of Cultures of Microorganisms] に番号I-3076で寄託された微生物に含まれる請求項18に記載の組換えレンチウイルスベクター。

【請求項23】

前記ポリヌクレオチド断片が、CMVプロモータの制御下にあることを特徴とする請求項16~22のいずれか1つに記載の組換えレンチウイルスベクター。

【請求項24】

請求項1~23のいずれか1つで規定される少なくとも1つの組換えレンチウイルスベクターを含むことを特徴とする免疫原性組成物。

10

【請求項25】

医薬的に許容される媒体と、任意に担体物質とを含むことを特徴とする請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

前記組換えレンチウイルスベクターが、三重らせんタイプのものであることを特徴とする請求項24又は25に記載の組成物。

【請求項27】

別のウイルスのエンベロープタンパク質を用いて偽型にされた前記組換えレンチウイルスベクターのウイルス粒子を含むことを特徴とする請求項24~26のいずれか1つに記載の組成物。

20

【請求項28】

前記エンベロープタンパク質が、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質Gであることを特徴とする請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

三重らせんタイプの前記レンチウイルスベクターの組換えゲノムに相当する単離された核酸分子を含み、該核酸分子が(i) 包膜、逆転写及び組込みのための調節配列と、レンチウイルス起源のセントラルイニシエーション及びターミネーションのためのシス作用配列と、任意にRevタンパク質のための調節配列、及び(ii) 請求項1及び6~15のいずれか1つで規定するフラビウイルス科ウイルスタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含むことを特徴とする請求項26に記載の組成物。

30

【請求項30】

請求項1~23のいずれか1つで規定される組換えレンチウイルスベクターで改変された好ましくは真核細胞である細胞。

【請求項31】

次の工程：

a) 請求項30に記載の改変された細胞を、前記組換えレンチウイルスベクターによりコードされるフラビウイルス科ウイルスの1又は複数のウイルスタンパク質及び/又は該タンパク質の1又は複数の免疫原性断片の発現を可能にする条件下で培養し、そして

b) 前記タンパク質、タンパク質断片又はウイルス擬似粒子を、a)の培養上清又は細胞から分離する

40

を少なくとも含むことを特徴とする、フラビウイルス科のウイルスタンパク質及び/又は該タンパク質の免疫原性断片あるいはウイルス擬似粒子を製造する方法。

【請求項32】

- 請求項30に記載の改変真核細胞、特にフラビウイルス科ウイルスの非構造タンパク質、例えばNS3又はNS5をコードするcDNAを含むベクターで改変された真核細胞を、試験すべきライブラリの種々の化合物と接触させ、

- 前記タンパク質の活性を、前記化合物の存在下又は非存在下で測定し、そして

- 前記活性を変更できる化合物を選択する

ことを含むことを特徴とする、抗ウイルス化合物をスクリーニングする方法。

50

【請求項 3 3】

前記真核細胞が、樹状細胞、神経細胞及び肝細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項 3 4】

感受性の種の個体からの生物学的流体試料を用い、次の工程：

- a) 前記生物学的試料を、請求項30で規定される少なくとも1つのフラビウイルス科ウイルス抗原を発現する改変真核細胞と接触させ、そして
 - b) (a)で形成された抗原 - 抗体複合体を明らかにする
- を少なくとも含むことを特徴とする、フラビウイルス科ウイルスでの感染を診断する方法。

10

【請求項 3 5】

a)の前記改変真核細胞が、透過性にされることを特徴とする請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

感受性の種の個体からの生物学的流体試料を用い、次の工程：

- a) 前記生物学的試料を、請求項7、9～12、15～18及び21～23のいずれか1つで規定される少なくとも1つの膜タンパク質及び/又はエンベロープタンパク質を発現するレンチウイルスベクターで改変された細胞の培養上清から得られるウイルス擬似粒子と接触させ、そして
 - b) (a)で形成された抗原 - 抗体複合体を明らかにする
- を少なくとも含むことを特徴とする、フラビウイルス科ウイルスでの感染を診断する方法。

20

【請求項 3 7】

請求項30に記載の改変細胞を少なくとも含むことを特徴とする、請求項31～36のいずれか1つに記載の方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フラビウイルス科ウイルス(Flaviviridae)のタンパク質の発現用の組換えレンチウイルスベクター、及び感受性の種(宿主又は保有体)におけるフラビウイルス科のウイルスでの感染の予防及び/又は治療を意図するワクチンとしてのその使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

フラビウイルス科は、3つの属に分けられる：フラビウイルス属(Flavivirus)、ペスチウイルス属(Pestivirus)及びヘパシウイルス属(Hepacivirus)又はC型肝炎ウイルスである。フラビウイルス科は、フラビウイルス科ウイルスにより誘導される多数のヒト及び獣医学的疾患の両方により、主要なヒト及び獣医学的衛生問題を表す。具体的には、例えば、フラビウイルス属には70を超える種が存在するが、これらの少なくとも50%はヒト又は獣医学的疾患の原因である。

【0003】

フラビウイルス科ウイルスは小さいエンベロープに包まれたウイルスである。そのゲノムは、フラビウイルス科に依存して9.5 kb～12.5 kbの正の極性の一本鎖RNA分子であり、その5'及び3'端の2つの短い非コーディング領域で挟まれた単一のオープンリーディングフレームを含む。このオープンリーディングフレームは、ポリタンパク質に翻訳され、これがそのN-末端部分において構造タンパク質の前駆体であり、C-末端部分において非構造(NS)タンパク質の前駆体である。

40

【0004】

より具体的には、

- フラビウイルス属について、ゲノムは約10～12キロベースの正の極性の一本鎖RNA分子である。ゲノムRNAは、カプシドタンパク質Cのいくつかのコピーと組み合わさってヌクレオカプシドを形成する。これは、エンベロープタンパク質E及び膜タンパク質Mが固定され

50

ている小胞体(ER)膜に由来する脂質二重層からなるウイルスエンベロープにより囲まれる。フラビウイルス属のゲノムRNAは、その5'及び3'端で2つの短い非コーディング領域で挟まれた約10500ヌクレオチドの単一のオープンリーディングフレームを含む。このゲノムは、約3400アミノ酸のポリタンパク質に翻訳され、これはそのN-末端部分において3つの構造タンパク質、C、prM (Mの細胞内前駆体)及びEの前駆体であり、そのC-末端部分において少なくとも5つの非構造(NS)タンパク質NS1~NS5の前駆体である。よって、次の構造：C-prM/M-E-NS1-NS2A/2B-NS3-NS4A/4B-NS5が観察される。

【0005】

- ペスチウイルス属について、ゲノムRNAは12キロベースより長く、約3900アミノ酸のポリタンパク質に翻訳される単一のオープンリーディングフレームを含み、該ポリタンパク質は、11~13のペスチウイルスタンパク質の前駆体であり、このうち4つが構造タンパク質である。次の構造：N^{prM}-C^{emS}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A/4B-NS5A/5Bが観察される。

10

【0006】

- ヘパシウイルス属について、ゲノムRNAは約9.5キロベースを含み、約3000アミノ酸のポリタンパク質に翻訳される単一のオープンリーディングフレームを含み、該ポリタンパク質は、そのN-末端部分において3つの構造タンパク質、C、E1及びE2の前駆体であり、そのC-末端部分において少なくとも7つの非構造(NS)タンパク質NS1~NS5の前駆体である。次の構造：C-E1-E2-NS1-NS2-NS3-NS4A/4B-NS5A/5Bが観察される。

【0007】

多くの深刻なヒト及び動物の病理は、この科のウイルスにより誘導される。感染性ウイルスに応じて観察される種々の症状は、一般的に発熱(周期又は非周期)、出血性の熱、下痢、脳炎、肝炎又は敗血症性ショックである。より詳細には、問題の種々のウイルスは、以下のとおりである。

20

- フラビウイルス属：フラビウイルス属の大多数は、カ(イエカ属(*Culex*)、ヤブカ属(*Aedes*)、ハマダラカ属(*Anopheles*)又はマンソニア属(*Mansonia*))又はダニ類(ticks)により脊椎動物宿主に伝染する。(i) カにより伝染するウイルス：デングウイルス(タイプ1~4)、黄熱ウイルス(YFV)、日本脳炎ウイルス(JEV)、西ナイルウイルス(WNV)、マリーバレー脳炎ウイルス(MVEV)、セントルイス脳炎ウイルス(SLEV)、及び(ii) ダニ類により伝染するウイルス：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)、キャサヌール森林病、オムスク出血性熱ウイルス及び跳躍病ウイルス。

30

【0008】

- ペスチウイルス属：ボーダー病(border disease)ウイルス(BDV)、ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)、及び古典ブタ熱ウイルス(CSFV)又はブタコレラウイルス。
- ヘパシウイルス属：C型肝炎ウイルス及びG型肝炎ウイルス。

【0009】

渡り鳥はこれらのウイルスのいくつか、特に西ナイルウイルスの保有体であり得、このウイルスは種の境界をウマ及びヒトにおいて越えることも注目されている。

【0010】

いくつかのワクチンストラテジが今日までに提案されており(Gould EA: Flavivirus Infections in Humans, Encyclopaedia of Life Sciences, 2001; Pugazhev KVら, Internat. J. Parasitol., 2003, 33, 567~582; Putnak Rら, Advances in Virus Research 2003, 61, 445~468; Smith DB, Hepatitis C virus, Encyclopaedia of Life Sciences, 2001)、次のことに関係する。

40

- 弱毒化生ウイルス又は不活化ウイルスを含むワクチン(Pugachev KVら, 2003, 上記; Gould EA, 2001, 上記; Brinton MA, Annu. Rev. Microbiol., 2002, 56, 371~402; Hamers C.ら, Vet. Rec., 2003, 153, 8, 236~240; Kovacs F.ら, Vet. Microbiol., 2003, 96, 2, 117~131);

- ウイルスサブユニットを含むワクチン;

- 1又は複数のウイルス由来抗原を含むワクチン(Wang Tら, J. Immunol., 2001, 167, 5273~5277);

50

- キメラウイルスを含むワクチン(Pugachev KVら, 2003, 上記); 又は

【0011】

- DNAワクチン(Putnak Rら, 2003, 上記; Turell MJら, *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9, 9, 1077~1081; Davis BSら, *J. Virol.*, 2001, 4040~4047; Pan CHら, *J. Virol.*, 2001, 75, 23, 11457~11463); これらのワクチンは、種々のベクターを用いる。特に、上記のPutnak Rら, 2003は、最適発現のためには、最も適切な調節要素が選択されるべきであり(プロモータ及びエンハンサー)、一般的に、少なくともフラビウイルス属については、CMVプロモータ(例えばプラスミドpcDNA3, Invitrogen)又はRSVプロモータを含みかつprM及びE遺伝子と、任意に、少なくとも1つの非構造タンパク質を同時発現するプラスミドを用いることが推奨されることを記載している。

10

【0012】

例えばWNVをとると、北半球、特に米国でのその出現は、かなり最近であり、西ナイルウイルスと闘うために現在提案されている種々のワクチンストラテジは次のとおりである。

- ホルモンで不活化された、マウスの脳で産生された日本脳炎ウイルス(JE-VAX (登録商標)、Aventis-Pasteur; Monathら, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 2001, 1, 37~50)。西ナイルウイルス感染に対してヒト又はウマを保護できる交差防御(cross protection)の存在は証明されておらず、議論の余地がある(Monath, *AM; Trop. Med. Hyg.*, 2002, 66, 113~114)。さらに、マウスでの研究は、交差免疫性が、西ナイル感染の間に脳の炎症を誘導し得ることを示している。

20

【0013】

- ホルモン不活化西ナイルウイルス(国際出願WO 03/061555)。ウマの免疫化のために提案されたこのワクチンは、いずれの病原性の影響がなく、ウマにおける西ナイルウイルスに対して効果的であることが見出されている。しかし、体液性応答の大きさが低いことから、数回の注射に続いて毎年のブースター注射が必要である。

【0014】

- 黄熱ウイルスの弱毒化株に由来するキメラウイルス(17D株; ChimeriVax (商標)-WN)。より具体的には、ChimeriVax (商標)-西ナイルキメラウイルスは、弱毒化ウイルスYV 17D中に、WNV株New York 1999のprM-Eカセットを含む(国際出願WO 03/059384及びPletnev AGら, *PNAS*, 2002, 99, 5, 3036~3041; Monath TPら, *Curr. Drug Targets Disord.*, 2001, 1, 1, 37~50)。西ナイルウイルスのprM及びE遺伝子は、黄熱ウイルス又はデングウイルスに挿入され、よってこれがベクターとしての役割を果たす。ヌクレオカプシドタンパク質及び非構造タンパク質をコードする遺伝子、及び17D又はDEN4株からの非翻訳末端領域を、組換えキメラウイルスの複製に用いる。キメラウイルスは17D又はDEN4ウイルスのような宿主において複製するが、西ナイルウイルスに対して特異的に免疫にする(Monathら, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 上記)。キメラウイルスを用いる感染は、免疫応答の種々の経路を刺激する。さらに、キメラウイルス粒子は、重複する(redundant)中和エピトープを有する完全Eタンパク質を含む。よって、宿主におけるキメラウイルスの複製は、ウイルスの早期の伝播を防ぐ中和抗体の高い力価を誘導し、細胞傷害性T免疫性が感染細胞に継続しているウイルスを排除する。ワクチン後応答よりも迅速で強力な感染後記憶応答も、西ナイルウイルス感染に対する防御に貢献する。17D株での予めの免疫化はキメラウイルスでの感染を阻害しないが、逆に、このことは特異的抗体の産生を増大させることが示されている。マウス及び非ヒト霊長類において、ChimeriVax (商標)-JEキメラワクチンが、17D株よりも神経毒性が低いことも示されている。さらに、キメラウイルスのゲノムは、インビボ及び細胞培養での継代を繰り返しても安定である。ChimeriVax (商標)-WNキメラウイルスは、65年以上前にヒトの免疫化のために開発されかつ数億人の個体において用いられているので、ヒトにおいて無害であり有効であることが証明されているワクチン株に由来する(Monathら, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 上記)。しかし、キメラ弱毒化生ウイルスの使用は、安全性の問題を提起する。異なる種間での非同源性組換えは、天然に発生する組換えフラビウイルスにより証明されるように、可能であ

30

40

50

る(Seligman SJ及びGould EA, Lancet, 2004, 363, 2073~2075)。

【0015】

- 裸の(naked) DNA (Davisら, J. Virol., 2001, 75: 4040~4047; Turellら, Emerg. Infect. Diseases, 2003, 9, 1077~1081、及び国際出願WO 03/061555)。用いられる裸のDNAベクターは、サイトメガロウイルスの初期プロモーターと、日本脳炎ウイルス由来のシグナルペプチドをコードする配列と、西ナイルウイルスのprM及びEタンパク質をコードする配列とを含むベクター-pCBWNである。このプラスミドの単純な筋肉内注射は、マウス及びウマにおいて西ナイル感染に対する防御免疫を誘導することが示されている。

【0016】

- 組換えタンパク質E (Wangら, J. Immunol., 2001, 167, 5273~5277); 大腸菌(*E. coli*)において融合タンパク質の形で発現され、アフィニティークロマトグラフィーにより精製された完全Eタンパク質又はC-末端領域(残基E1~E409)が欠失されたEタンパク質は、マウスにおいて、Eタンパク質に対して指向された中和抗体の産生を誘導する。C-末端領域が欠失された可溶性Eタンパク質は、マウスにおいて完全防御を誘導するが、完全Eタンパク質を用いると部分防御しか観察されない。

10

【0017】

現在提案されているワクチンのほとんどが全体的に有効であるが、にもかかわらず、特にフラビウイルス科についてのDNAワクチンの分野における新規な予防的方法に対する必要性がある。特に、ヒトの医学及び獣医学におけるこれらのウイルスにより誘導される疾患の予防、及び保有体におけるこれらのウイルスの根絶の両方において有用なベクターに対する真の必要性が存在する。

20

【0018】

実際に、例えばヘパシウイルス属、特にC型肝炎の場合、C型肝炎に罹患した患者の防御を目的とした試験は、HCVウイルスタンパク質を発現するのにワクシニアウイルスを用いると失敗する。ここで、このウイルスは、その防御的有効性が減少した短くされたウイルスタンパク質をもたらすスプライシングを引き起こす(Dumonceaux J.ら, J. Virol., 2003, 77, 24, 13418~13424)。

さらに、ほとんど注射を必要とせず(多くて1回又は2回)、特に、その後続く免疫化プログラムを設定するのが困難な国においてその使用が促進されるようなワクチンに対する必要性がある。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

驚くべきことに、本発明者らは、フラビウイルス科のウイルスの少なくとも1の免疫原性タンパク質の発現のための組換えレンチウイルスベクターが、免疫にされた個体(ヒト又は動物)において、特に該個体をこのウイルスでの感染に対して防御できる強い免疫応答を誘導することを可能にすることを示した。

該組換えレンチウイルスベクターは、高い用量の西ナイルウイルスの攻撃に対して非常に早期で、長期持続性で、完全に防御性の免疫応答を誘導することが可能であった。

40

【0020】

本発明者らは、レンチウイルスベクターが、病原体に対する体液性防御応答を誘導するための効果的な手段であることの最初の証拠を示す。このことは、中和体液性応答が免疫系の一つの活性化武器であるフラビウイルス科のウイルスのような病原体に対するワクチン接種手段としてのレンチウイルスベクターの適用可能性を広げる。

【課題を解決するための手段】

【0021】

よって、本発明の主題は、フラビウイルス科のウイルスの少なくとも1つのタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含む組換えレンチウイルスベクターの、感受性の種(sensitive species)におけるフラビウイルス科ウイルス感染の予防及び/又は治療を意図する免疫原性組成物を製

50

造するための使用である。

【0022】

このようなベクターは、いくつかの利点を有しており、上記で開示した必要性のために特に適する。

- これは、増大された免疫原性を有する。結果として、感受性の種における単回投与の後に有効である。このベクターの有効性は、(i) 特に皮下注射されたときに、抗原提示細胞又はAPC、例えば樹状細胞へのその親和性に、(ii) これらのベクターが有する興味対象の配列の細胞ゲノムへの安定な組み込みに(このことは、インピボ、特に樹状細胞での抗原の長期持続発現を可能にする)、及び(iii) 樹状細胞依存性免疫応答を刺激するその能力にすぐに関係する。よって、パルスされた樹状細胞を用いて通常得られるものよりも長い樹状細胞での抗原の発現の持続期間は、ベクターの繰り返しの投与をなくす(do away with)ことを有利に可能にする。

10

【0023】

- これは、非複製型である。結果として、これは、感受性の種においてほとんど又は全く病原性を有さず、かつ感染能力を有さない。すなわち、環境中の伝播の危険性を有さない。

- これは、非腫瘍形成性である。これは、いずれの腫瘍形成性作用を引き起こさずに、宿主細胞のゲノムへの興味対象の配列の安定な組み込みをもたらす。

【0024】

- これは、特に、他のウイルスからのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス(VSV)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)のウイルス、例えば狂犬病ウイルス及びエボラウイルスの糖タンパク質Gを用いて偽型を産生することができるという事実により、種の限定を示さず、かつ細胞親和性が広がられている。結果として、これは、いずれの感受性の種において予防的及び/又は治療的免疫化のために有効である。

20

- これは、アジュバントの使用をなくすことを可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

定義

- ポリヌクレオチド断片：「ポリヌクレオチド断片又はポリヌクレオチド」の用語は、少なくとも24塩基又は塩基対、好ましくは24~5000塩基又は塩基対のDNA又はRNA断片、特にcDNA又はcDNA断片を意味することを意図する。

30

- 免疫原性断片：フラビウイルス科ウイルスでの感染に対して感受性の種において特異的体液性及び/又は細胞性応答の誘導が可能なペプチド断片。

【0026】

- フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つのタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片：フラビウイルス科ウイルスの1又は複数の構造タンパク質若しくは非構造タンパク質及び/又は1又は複数の免疫原性断片をコードする上記で規定するポリヌクレオチド。フラビウイルス科ウイルスポリタンパク質のオープンリーディングフレーム(ORF)及び該ORFに含まれる種々のフラビウイルス科ウイルスタンパク質のコーディング配列は、当業者に公知であり、データベース、特にNCBIのもの(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)又は関係する研究、例えばVirus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses (F. A. Murphyら, Archives of Virology Supplement 10, 1995, Springer Verlag, Vienna, New York)において入手可能である。本発明は、いずれのフラビウイルス科ウイルスのコーディング配列及び該コーディング配列の1又は複数のヌクレオチドの変異(挿入、欠失、置換)、又は1若しくは2のヌクレオチドのオープンリーディングフレーム内でのシフト(ORF + 1又はORF + 2)により派生する変異形(但し、該変異は、上記のタンパク質又は上記の断片の抗原性及び/又は免疫原性の特性を実質的に変更しない)のコーディング配列を包含する。本発明は、改変されたヌクレオチド断片が、高ストリンジェントな条件下で、それらから派生した改変ポリヌクレオチド

40

50

と特異的にハイブリダイズする能力を保持するという条件で、ヌクレオチドの変異(挿入、欠失、置換)により上記から派生する変異形ポリヌクレオチドを特に包含する。

【0027】

- 高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件：本発明の目的のために、「高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」の表現は、相補的ポリヌクレオチドの間の特異的及び選択的なハイブリダイゼーションを維持することを可能にするように選択される温度及びイオン強度の条件を意味することを意図する。説明のために、上記のポリヌクレオチドを規定する目的のための高ストリンジェントな条件は、有利には次のようである：DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーションは、2工程で行われる：(1) $5 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ は $0.15 \text{ M NaCl} + 0.015 \text{ M}$ クエン酸ナトリウムの溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、 $10 \times$ デンハルト(Denhardt's)、5%硫酸デキストラン及び1%サケ精子DNAを含有するリン酸緩衝液(20 mM、pH 7.5)中に42℃で3時間のプレハイブリダイゼーション；(2) 42℃で20時間のハイブリダイゼーション、続いて $2 \times \text{SSC} + 2\%$ SDS中に20℃で20分間の2回の洗浄、及び $0.1 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS中に20℃で20分間の1回の洗浄。最後の洗浄は、 $0.1 \times \text{SSC} + 0.1\%$ SDS中に60℃で30分間行う。

10

【0028】

- 感受性の種：「フラビウイルス科ウイルスでの感染に感受性の種」の表現は、フラビウイルス科ウイルスにより誘導される病理を発生することができる宿主種、例えばヒト又は非ヒト哺乳動物と、症状を発生することなくウイルスの伝播の原因となる保有体種、例えば特に鳥類又は爬虫類(クロコダイル)との両方を意味することを意図する。

20

【0029】

- 組換えレンチウイルスベクター：「組換えレンチウイルスベクター」の用語は、特にプラスミド(ベクタープラスミド)に含まれるレンチウイルスベクターの組換えゲノムに対応する単離された核酸分子と、適切な細胞形で産生され、任意に他のウイルスからのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病ウイルス及びエボラウイルスの糖タンパク質Gを用いて偽型にされる、該組換えゲノムを含む組換えレンチウイルス粒子(ベクター粒子)との両方を意味することを意図する。

【0030】

本発明によると、上記のレンチウイルスベクターは、HIV (ヒト免疫不全ウイルス)、例えばHIV-1又はHIV-2、CAEV (ヤギ関節炎脳炎ウイルス)、EIAV (ウマ伝染性貧血ウイルス)、VMV (ビスナ/マエディウイルス)、SIV (サル免疫不全ウイルス)又はFIV (ネコ免疫不全ウイルス)に由来するものからなる群より選択される。本発明は、少なくとも2つの異なるレンチウイルスに由来するキメラレンチウイルスをも包含する。レンチウイルスベクターの選択は、特に、感受性の種に依存する。例えば、HIV由来のベクターは、ヒトの免疫化に有利に用いられる。

30

【0031】

レンチウイルスベクターは、当業者に公知である。これらは、(i) 翻訳及び発現のための調節シグナルの制御下に置かれた興味対象の配列(本発明の場合、フラビウイルス科ウイルスのコーディング配列)と、(ii) 包膜、逆転写及びウイルス組み込みのために必要かつ十分なレンチウイルス起源の調節配列、及び任意に、Revタンパク質のための調節配列(RRE又はrev結合要素(rev responsive element))とを含む組換えヌクレオチド配列(組換えレンチウイルスゲノム)からなる。Poznansky ら(J. Virol., 1991, 65, 532~536)及びNa Idiniら(Science, 1996, 272, 263~267)により記載されるHIV、又はPoeschlaら(Nature Medicine, 1998, 4, 354~357)により記載されるFIVに由来するレンチウイルスベクター、及び国際出願WO 99/32646及びWO 98/17815に記載されるような上記のものに由来する最小ベクター(minimal vectors)を特に挙げることができる。

40

【0032】

本発明によると、上記のレンチウイルスベクターは、上記で規定されるコーディング配列を、適切な細胞系で発現できるベクターである。上記のベクターは、その制御下に上記で規定するコーディング配列が挿入される、転写のための適切な調節要素(プロモータ、

50

エンハンサー、コザック(Kozak)コンセンサス配列、ポリアデニル化シグナルなど)を含む発現カセットを含む。上記の興味対象のコーディング配列は、上記のフラビウイルス科ウイルスのポリタンパク質において上記のコーディング配列の前にあるORFに特に由来する細胞輸送のために必要とされるシグナル、例えば小胞体への転置のためのシグナルを含む。例えば、フラビウイルス属の場合、上記のコーディング配列がEタンパク質又は該タンパク質の断片のものであるときに、上記のシグナル配列は、Mタンパク質前駆体(prM)に有利に由来する。有利には、上記の発現カセットは、サイトメガロウイルス(CMV)初期プロモータのような強力な遍在プロモータ、又はエンハンサーを有さないプロモータ、例えば伸長因子1 (EF1)又はホスホグリセレート(PGK)プロモータを含む。

【0033】

さらに、上記のベクターは、ヘルペスタイプ1チミジンキナーゼ(HSV 1-TK)のような自殺遺伝子を含むことができ、適切な薬剤、例えばHSV 1-TKの場合にアシクロビルを用いる処理により、形質導入された細胞を排除することができる。

【0034】

本発明は、単純発現ベクター、及び同じプロモータ又は発現ベクターの同じ領域若しくは異なる領域に位置する異なるプロモータからいくつかのコーディング配列の同時発現を可能にする複数発現ベクターを包含する。

【0035】

上記の使用の有利な実施形態によると、上記の組換えレンチウイルスベクターは、三重らせんタイプである。

三重らせんのベクターは、特に、Zennouら, Cell, 2000, 101, 173~185並びにWO 99/55892、WO 01/27304及びWO 01/27300に記載される。

三重らせんベクターは、ウイルス逆転写の間に三重らせん(又はDNA三量体)を形成できるDNA領域を含むことを特徴とする。この三重らせんDNA領域は、セントラルイニシエーションのためのシス作用領域(cis-active region)又はポリプリン配列(polypurine tract)(cPPT)と、ターミネーションのためのシス作用領域(CTS)とからなり、これらの領域は、その合成がレンチウイルスゲノムの中央に存在するPTT領域により開始される+鎖の転写を開始すること、及びその合成がレトロウイルスLTRの上流の3' PPT部位で開始される+鎖の転写を中断することを可能にする。レトロウイルスベクター中のこの三重らせんDNA領域の存在は、ベクターの核の移入速度を刺激することにより、有糸核分裂細胞又は非有糸核分裂細胞の遺伝子の形質導入を明らかに改善する。

【0036】

上記の使用の別の有利な実施形態によると、上記の組換えレンチウイルスベクターは、プロモータ及びアクチベータがU3領域から欠失された3' LTRを含む。この欠失は、さらなる安全性の特徴を与える。

【0037】

上記の使用の別の有利な実施形態によると、上記の組換えレンチウイルスベクターは、別のウイルスの少なくとも1つのエンベロープタンパク質、好ましくは水疱性口内炎ウイルス(VSV)糖タンパク質Gで偽型にされる(pseudotyped)。該VSV糖タンパク質Gは、危険な状態のいずれの脊椎動物種：ヒト又はウマ、家禽(fowl)及び家畜(zoo animal)を含む、において、特に抗原提示細胞、例えば樹状細胞を形質導入できる高い力価のベクター粒子を得ること及び広い細胞親和性を有するベクター粒子を産生することを有利に可能にする。

【0038】

本発明によると、上記のフラビウイルス科ウイルスは、上記のようにフラビウイルス属、ペスチウイルス属又はヘパシウイルス属から選択される。

上記の使用の別の有利な実施形態によると、上記のフラビウイルス科ウイルスは、西ナイルウイルス、デングウイルス、黄熱ウイルス及びC型肝炎ウイルスからなる群より選択される。

【0039】

本発明によると、フラビウイルス科ウイルスの上記のポリヌクレオチド、特にcDNA又は

10

20

30

40

50

cDNA断片は、(i) 1又は複数の異なる構造タンパク質(C、prM、M、E、E1、E2)及び/又は(ii) 1又は複数の異なる非構造(NS)タンパク質、及び/又は(iii) 該タンパク質の1又は複数の異なる免疫原性断片をコードし、該タンパク質又はそれらの断片は、同じフラビウイルス科ウイルス(一価ワクチン)あるいは、多価ワクチンを製造するために、種々のフラビウイルス科ウイルス及び/又は同じフラビウイルス科ウイルスの異なる血清型若しくは異なるタイプのいずれかに由来する。

上記のcDNAは、1又は2のヌクレオチドのオープンリーディングフレームにおけるシフト(リボソームフレームシフト)により、フラビウイルス科ウイルスのコーディング配列に由来することもできる。このようなcDNAは、特にC型肝炎ウイルスのCタンパク質について当業者に公知である(Xuら, EMBO, 2001, 20, 3840~3848; Rousselら, J. Gen. Virol., 2003, 84, 1751~1759; Vassilakiら, J. Biol. Chem., 2003, 278, 40503~40513; 国際出願WO 99/63941)。

10

【0040】

上記の使用の別の有利な実施形態によると、上記のポリヌクレオチドは、表1に列挙するNCBIデータベースのアクセッション番号に相当するフラビウイルス科ウイルスのコーディング配列の断片である。

【0041】

【表 1】

表 1: フラビウイルス科ウイルスのコーディング配列

フラビウイルス科	NCBI アクセション番号	配列説明
フラビウイルス属	M23027	デングウイルスタイプ 1 のポリタンパク質の 5' cDNA 配列
フラビウイルス属	M19197	デングウイルスタイプ 2 のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M93130	デングウイルスタイプ 3 のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M14931	デングウイルスタイプ 4 のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M12294	西ナイルウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	AF481864	西ナイルウイルスの IS-98-ST1 株のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M18370	日本脳炎ウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	X03700	黄熱ウイルスのポリタンパク質の cDNA (ワクチン接種株 17D)
フラビウイルス属	U27495	ダニ媒介脳炎ウイルス複合体 (TBE 複合体) の Neudoerfl ウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M73835	Langat ウイルス (TBE 複合体) の構造タンパク質の cDNA
ペスチウイルス属	M31182	BVD ウイルスのゲノムに等価な DNA
ペスチウイルス属	M31768	CSF ウイルス (ブタコレラウイルス) の Brescia 株のゲノムに等価な DNA
ペスチウイルス属	J04358	CSF ウイルス (ブタコレラウイルス) の Alfort 株のゲノムに等価な DNA
ヘパシウイルス属	M62321	C 型肝炎ウイルスタイプ 1 (HCV-1) のポリタンパク質の cDNA
ヘパシウイルス属	D90208	C 型肝炎ウイルスのポリタンパク質の cDNA
ヘパシウイルス属	M58335	C 型肝炎ウイルスのポリタンパク質の完全 cDNA

【 0 0 4 2 】

種々のフラビウイルス科ウイルスタンパク質のコーディング配列の位置は、表1に列挙するアクセション番号に相当する配列中に示され、これらはフラビウイルス科ウイルスゲノムのポリタンパク質のcDNA又はDNA等価物に相当する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

上記の使用の別の有利な実施形態によると、上記のポリヌクレオチド断片は：

- a) 西ナイルウイルス又はデングウイルスのEタンパク質と、任意にprM若しくはMタンパク質及び/又はCタンパク質及び/又は非構造タンパク質とをコードするcDNA、並びに上記のタンパク質の少なくとも8アミノ酸の1又は複数の免疫原性ペプチドをコードするcDNA、
 b) C型肝炎ウイルスのE1若しくはE2タンパク質若しくはE1/E2ヘテロダイマー、及び/又は0、+1若しくは+2リーディングフレームによるCタンパク質、及び/又はNS3タンパク質をコードするcDNA、並びに上記のタンパク質の少なくとも8アミノ酸の1又は複数の免疫原性ペプチドをコードするcDNA、並びに
 c) 4つのタイプのデングウイルス(タイプ1~4又はDEN-1~DEN-4)のうちの1つにそれぞれ相当するデングウイルスのEタンパク質の1又は複数の異なるドメインIII(位置295~394)をコードするcDNA、好ましくはその配列が添付の配列表の配列番号1~4で表される4つのドメインIII(DEN-1~DEN-4)をコードするcDNA

から選択される。

【 0 0 4 4 】

上記の使用の有利な規定によると、+1又は+2リーディングフレームによるCタンパク質をコードする上記のcDNAは、配列番号5~14の配列からなる群より選択される。

【 0 0 4 5 】

本発明によると、上記の膜タンパク質(prM若しくはM)及び/又はエンベロープタンパク質(E、E1、E2)は、細胞表面の細胞質膜に位置する膜型、又は分泌型、すなわち細胞から細胞外媒質へ移出された形のいずれかで、上記で規定される組換えレンチウイルスベクターにより発現される。

【 0 0 4 6 】

さらに、フラビウイルス属prM及びEタンパク質が、組み換えベクターにより形質導入された(インビトロ又はインビボで)細胞で同時に発現される場合、これらは、細胞外媒質へ分泌されるウイルス擬似粒子(pseudoparticles)(又はウイルス様粒子;VLP)として集合する。このような粒子は、特に免疫原性であり、中和抗体の産生を誘導する。

上記の膜形をコードするcDNAは、その5'端に転写開始コドン(ATG)を含む、成熟タンパク質をコードする配列とそれに先立って小胞体での移動のためのシグナルペプチドをコードする配列とを含む。フラビウイルス属の場合、上記のシグナル配列は、有利にはMタンパク質前駆体(prM)に由来する。上記の分泌形をコードするcDNAは、膜固定(anchoring)領域が欠失された短縮された成熟タンパク質と、それに先立って上記で規定するシグナルペプチドとをコードする配列を含む。

【 0 0 4 7 】

例えば西ナイルウイルスの場合：

- 成熟Eタンパク質は、Genbank配列AAL87234を参照にするポリタンパク質配列の位置291~791に相当する。対応するヌクレオチド配列は、Genbank配列AF481864を参照にする西ナイルウイルスのゲノムの配列において位置967~2469に位置する；
- 膜固定領域が欠失された短縮された成熟Eタンパク質は、Genbank配列AAL87234を参照にする西ナイルウイルスのポリタンパク質の配列の位置291~732に特に相当する。対応するヌクレオチド配列は、Genbank配列AF481864を参照にする西ナイルウイルスゲノムの配列の位置967~2292に位置する；
- Mタンパク質前駆体由来の内部シグナルペプチドは、Genbank配列AAL87234を参照にするポリタンパク質の配列の位置275~290に相当する。対応するヌクレオチド配列は、Genbank配列AF481864を参照にする西ナイルウイルスゲノムの配列の位置919~966に位置する。

【 0 0 4 8 】

よって、西ナイルウイルスのEタンパク質の膜型、Eタンパク質の分泌型並びにPrM及びEタンパク質のをコードするcDNAは、それぞれ、上記で規定する上記のウイルスのゲノム配列の位置919~2469、919~2292及び399~2469に相当する。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

本発明の主題は、フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つの構造タンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含む組換えレンチウイルスベクターでもある。さらに、このようなベクターの使用の関係において上述したように、上記のベクターは、1又は複数の非構造タンパク質及び/又は該タンパク質の1又は複数の免疫原性断片をコードするcDNAをも有利に含む。上記のポリヌクレオチド断片は、上記の配列から特に選択される。有利には、上記の組換えレンチウイルスベクターは、三重らせんタイプのベクターである。さらに、上記の組換えレンチウイルスベクターは、U3領域からプロモータ及びアクチベータが欠失された3' LTRを有利に含むことができる。これは、別のウイルスの少なくとも1つのエンベロープタンパク質、好ましくは水疱性口内炎ウイルス(VSV)糖タンパク質Gで偽型にされたベクターである。

10

【0050】

上記のベクターの有利な実施形態によると、これは、西ナイルウイルス又はデングウイルスの少なくとも1つのEタンパク質と、任意にprM若しくはMタンパク質及び/又はCタンパク質及び/又は非構造タンパク質をコードするcDNA、又は上記のタンパク質の少なくとも8アミノ酸の1又は複数の免疫原性ペプチドをコードするcDNAを含む。

【0051】

上記のベクターの別の有利な実施形態によると、これは、C型肝炎ウイルスのE1若しくはE2タンパク質若しくはE1/E2ヘテロダイマー、及び/又は0、+1若しくは+2リーディングフレームによるCタンパク質と、任意にNS3タンパク質をコードするcDNA、又は上記のタンパク質の少なくとも8アミノ酸の1又は複数の免疫原性ペプチドをコードするcDNAを含む。

20

上記のベクターの有利な規定によると、+1又は+2リーディングフレームによるCタンパク質をコードする上記のcDNAは、配列番号5~14の配列からなる群より選択される。

【0052】

上記のベクターの別の有利な実施形態によると、これは、デングウイルスの4つのタイプ(タイプ1~4又はDEN-1~DEN-4)の1つにそれぞれ相当するデングウイルスのEタンパク質のドメインIII(位置295~394)又はいくつかの異なるドメインIIIをコードするcDNAを含み、好ましくは、これは、添付の配列表の配列番号1~4により表される配列の4つのドメインIII(DEN-1~DEN-4)をコードするcDNAを含む。

30

【0053】

上記のベクターの別の有利な実施形態によると、これは、西ナイルウイルスIS-98-ST1株のEタンパク質の分泌形をコードするcDNAを含む、pTRIP U3.CMV-sE(WNV)とよばれるベクタープラスミドであり、該ベクターは、2003年8月27日に25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15のCollection Nationale de Cultures de Microorganismes [National Collection of Cultures of Microorganisms]に番号I-3076で寄託された微生物中に含まれる。

【0054】

本発明は、上記で規定されるベクタープラスミド、及び該ベクター粒子に由来するベクター粒子、特に、別のウイルスの少なくとも1つのエンベロープタンパク質、例えば特に水疱性口内炎ウイルス(VSV)糖タンパク質Gで偽型にされたベクター粒子をも包含する。

40

【0055】

上記で規定される組換えレンチウイルスベクターは、それら自体で公知である標準的なプロトコル、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc., Library of Congress, USA)に記載されるものに従う従来の方法により作製される。

より詳細には、ポリヌクレオチド断片は、フラビウイルス科ウイルスのゲノムRNA若しくはmRNA、又は上記に由来するcDNA若しくはDNA断片からなるマトリックスの増幅によるか、フラビウイルス科のウイルスのゲノムに特異的なプライマを用いるPCR又はRT-PCRによるか、又は制限酵素を用いるフラビウイルス科cDNAの消化によるか、又は完全又は部分

50

的な化学合成によるかのいずれかで得ることができる。

このようにして得られるポリヌクレオチド断片は、レンチウイルスベクターゲノムを含むベクタープラスミドにクローニングして、組換えベクタープラスミドを作製する。

【0056】

組換えレンチウイルスベクターの粒子(ベクター粒子)は、上記で規定する組換えベクタープラスミドと、トランスに構造タンパク質及びウイルス粒子の酵素を提供する包膜プラスミドと、任意に、偽型にされた粒子の産生のためにウイルス、例えばVSVのエンベロープ糖タンパク質を発現するためのプラスミドとを用いる細胞の同時トランスフェクションにより作製される。

【0057】

本発明の主題は、上記で規定される少なくとも1つの組み換えベクターを含むことを特徴とする免疫原性組成物でもある。

上記の組成物の有利な実施形態によると、これは、医薬的に許容される媒体(vehicle)と、任意に担体物質とを含む。

上記の医薬的に許容される媒体及び担体物質は、従来用いられるものである。

上記の担体物質は、単層リポソーム、多層リポソーム、サポニンミセル又は糖若しくは金含有の性質の固体マイクロスフェアからなる群より有利に選択される。

【0058】

上記の組成物の別の有利な実施形態によると、これは、好ましくは別のウイルスのエンベロープタンパク質、好ましくは水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質Gで偽型にされた上記の組換えレンチウイルスベクターの粒子(ベクター粒子)を含む。

上記の組成物の別の有利な実施形態によると、これは、上記で規定する三重らせんタイプの組換えレンチウイルスベクターを含む。

【0059】

上記の組成物の有利な規定によると、これは、三重らせんタイプの上記の組換えレンチウイルスベクターの組換えゲノムに対応する単離された核酸分子を含み、該核酸分子は：(i) 包膜、逆転写及び組込みのための調節配列と、レンチウイルス起源のセントラルイニシエーション(又はポリプリン配列；cPPT)及びセントラルターミネーション(CTS)のためのシス作用配列と、任意に、Revタンパク質(RRE又はRev結合要素)のための調節配列、及び(ii) 上記で規定するフラビウイルス科ウイルスタンパク質又は該タンパク質の少なくとも8アミノ酸の免疫原性ペプチドをコードするポリヌクレオチド断片を含む。

【0060】

本発明によると、三重らせんタイプの上記のベクターは、その制御下に上記で規定するコーディング配列が挿入される、転写のための適切な調節要素(プロモーター、エンハンサー、コザックコンセンサス配列、ポリアデニル化シグナルなど)を含む発現カセットを含み、興味対象の該コーディング配列は、任意に、上記で規定する細胞輸送に要求されるシグナルを含む。

【0061】

本発明による免疫原性又はワクチン組成物は、上記で規定する感受性の種(ヒト若しくは非ヒト哺乳動物宿主、又は保有体(鳥類、爬虫類))において、全身(経口、筋肉内、皮下、腹腔内又は静脈内)、局所(鼻腔内、その他の粘膜経路)、又はこれらの経路の組み合わせにより投与できる。

好ましくは、これらは、抗原提示細胞、例えば樹状細胞を標的としてこれらの細胞における抗原の延長された発現を得るために、皮下投与される。

【0062】

あるいは、本発明の免疫原性又はワクチン組成物は、宿主種の自己細胞、特に抗原提示細胞、例えば樹状細胞を改変するのに用いられる。改変された細胞は、次いで、宿主に再投与される。このような使用は、ヒト又は非ヒト宿主哺乳動物におけるフラビウイルス科ウイルスでの感染の治療のために特に有利である。

ベクターの投与量は、投与経路により、及び治療される種(ヒト又は動物)の性質および

10

20

30

40

50

体重により変動する。

【0063】

本発明の主題は、上記で規定される組み換えベクターで改変された細胞でもある。好ましくは、上記の細胞は、上記の組み換えベクターで安定に改変された真核細胞である。フラビウイルス科ウイルスの少なくとも1つのタンパク質又は少なくとも1つの抗原性ペプチドを安定に発現するこのような細胞は：

- 上記の組換えレンチウイルスベクターの粒子(ベクター粒子)の産生のため、
 - フラビウイルス科ウイルスのエンベロープタンパク質及び/又は膜タンパク質、特にフラビウイルス属prM及びEタンパク質に由来する、フラビウイルス科の組換えウイルスタンパク質、該タンパク質の免疫原性断片及びフラビウイルス科のもののタイプのウイルス擬似粒子(VLP、又はウイルス様粒子)の産生のため；該擬似粒子は、感染した個体の生物学的流体中に存在する特異的免疫グロブリンの免疫捕捉によるフラビウイルス科ウイルス感染の診断用の試薬として有利に用いられる、
 - 抗ウイルス化合物のスクリーニングのため、及び
 - 診断試薬として
- 有用である。

【0064】

本発明によると、フラビウイルス科のウイルスタンパク質及び/又は該タンパク質の免疫原性断片又はウイルス擬似粒子は、次の工程：

- a) 上記で規定する改変細胞を、上記の組換えレンチウイルスベクターによりコードされるフラビウイルス科の1又は複数のウイルスタンパク質及び/又は該タンパク質の1又は複数の免疫原性断片の発現を可能にする条件下で培養し、そして
 - b) a)における培養上清又は細胞から、いずれの適切な手段により、上記のタンパク質、タンパク質断片又は擬似粒子を分離する
- により作製することが可能である。

【0065】

この方法によると、ウイルスタンパク質又は断片の精製は、公知の技術、例えば：

- ・アフィニティクロマトグラフィー：ポリヒスチジンテイルをコードするヌクレオチド配列のようなタグをベクターに導入し、タンパク質をニッケルゲル(アガロースなど)のカラムを用いて精製する；
 - ・イムノアフィニティクロマトグラフィー：興味対象のウイルス配列を、C-末端又はN-末端で、エピトープ配列をタンパク質から後で分離するために酵素、例えばトロンピンによる切断のための部位を含むペプチドエピトープをコードするヌクレオチド配列に融合させる。有用なエピトープは、例えば、C9エピトープ(TETSQVAPA) (Mirzabekov T.ら, J. Biol. Chem., 1999, 274, 28745~28750)又はmycエピトープである。発現されたタンパク質は、上記のエピトープに特異的な抗体(C9エピトープに対して1D14、mycエピトープに対して9^E10)が結合したアフィニティカラム上で精製され、興味対象のタンパク質は、トロンピンを用いる切断により分離される；
 - ・沈殿剤、例えばポリエチレングリコールを用いる沈殿、次いでタンパク質をペレットで回収するための遠心分離
- により、上記で規定される組み換えベクターを用いて改変した細胞の培養上清又は溶解物から行うことができる。

【0066】

この方法によると、フラビウイルスのもののタイプの粒子の精製は、公知の技術、例えば：

- ・沈殿剤、例えばポリエチレングリコールを用いる沈殿、次いで擬似粒子をペレットで回収するための遠心分離
 - ・特にスクロース勾配での連続又は不連続勾配遠心
- により、上記で規定される組み換えベクターを用いて改変した細胞の培養上清から行われる。

10

20

30

40

50

【0067】

本発明の主題は、

- 上記で規定する組み換えベクター、特にフラビウイルス科ウイルスの非構造タンパク質、例えばNS3 (ヘリカーゼ又はプロテアーゼ)又はNS5 (ポリメラーゼ)をコードするcDNAを用いて改変した真核細胞を、試験すべきライブラリの種々の化合物と接触させ、そして
- いずれの適切な手段により、上記の化合物の存在下又は非存在下に、上記のタンパク質の活性(ヘリカーゼ、プロテアーゼ、ポリメラーゼ)を測定し、そして
- 上記の活性を変更(活性化又は阻害)できる化合物を選択することを特徴とする、抗ウイルス化合物をスクリーニングする方法でもある。

【0068】

この活性は、当業者に知られた従来の方法、例えば特にBorowskiら, *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49, 597~614; Steffensら, *J. Gen. Virol.*, 1999, 80, 2583~2590; Ryanら, *J. Gen. Virol.*, 1998, 79, 947~959; Bretnerら, *Antivir. Chem. Chemother.*, 2004, 15, 35~42に記載されるものにより評価される。

好ましくは、スクリーニングは、特定の標的組織、特に樹状細胞、神経細胞又は肝細胞に対して行われる。

【0069】

本発明の主題は、感受性の種の個体からの生物学的流体試料を用いてフラビウイルス科ウイルスでの感染を診断する方法であり、少なくとも以下の工程：

- a) 上記の生物学的試料を、上記で規定する少なくとも1つのフラビウイルス科ウイルス抗原(C、E、E1、E2、prM、M、NS (特にNS1))を発現する、任意に透過性にされた改変真核細胞と接触させ、
 - b) いずれの適切な手段により、例えばEIA、ELISA若しくはRIA又は免疫蛍光により、(a)で形成された抗原-抗体複合体を明らかにする
- を含むことを特徴とする方法でもある。

【0070】

本発明の主題は、感受性の種の個体からの生物学的流体試料を用いてフラビウイルス科ウイルスでの感染を診断する方法であり、少なくとも以下の工程：

- a) 上記の生物学的試料を上記で規定する少なくとも1つの膜タンパク質及び/又はエンベロプタンパク質を発現するレンチウイルスベクターを用いて改変された細胞の培養上清から得られるウイルス擬似粒子と接触させ、そして
 - b) いずれの適切な手段により、例えばEIA、ELISA若しくはRIA又は免疫蛍光により、(a)で形成された抗原-抗体複合体を明らかにする
- を含むことを特徴とする方法でもある。

【0071】

本発明の主題は、上記で規定される改変細胞を少なくとも含むことを特徴とする、上記で規定される方法を行うためのキットでもある。

【0072】

本発明の主題は、上記で規定される組み換えベクターの、好ましくは皮下での単回投与を含むことを特徴とする、フラビウイルス科ウイルスに対する免疫化方法でもある。

【0073】

上記の規定の他に、本発明は、本発明による組換えベクターの製造及び該ベクターの免疫化のための使用、並びにタンパク質の産生のための誘導される改変細胞の実施例及び添付の図面に言及する以下の記載から明らかになるその他の規定をも含む。図面において：

- 図1は、西ナイルウイルスの短縮Eタンパク質(E 1~411) (配列番号17)をコードするcDNA (配列番号16)を含む、配列番号15の配列に相当するベクタープラスミドpTRIP U3CMV-sE(WNV)の模式図である。

- 図2は、1 µgのTRIP U3CMV-sE(WNV)ベクター粒子の単回腹腔内注射で免疫されたマウスからの血清のELISA及び中和アッセイによる分析を示す。

【0074】

10

20

30

40

50

- 図3は、西ナイルウイルスで感染させたVERO細胞の溶解物の、1 μ gのTRIP U3CMV-sE(WNV)ベクター粒子で免疫にされたマウスの血清との免疫沈降を、コントロール血清との比較で表す。

レーン1~10：西ナイルウイルスで感染させたVERO細胞の溶解物を、次の血清を用いて沈降させた：

- レーン1： TRIP U3CMV-GFPベクターで免疫後D14での血清、
- レーン2： TRIP U3CMV-GFPベクターで免疫後D23での血清、
- レーン3： ポリクローナル抗西ナイルウイルス (IS-98-ST1株) 腹水、
- レーン4： 非免疫血清、
- レーン5： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで免疫後D14での血清、 10
- レーン6： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで免疫後D23での血清、
- レーン7： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで14日間免疫されたマウスからの、攻撃後D22での血清 (IS-98-ST1株を10 LD₅₀)、
- レーン8： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで14日間免疫されたマウスからの、攻撃後D30での血清 (IS-98-ST1株を10 LD₅₀)、
- レーン9： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで30日間免疫されたマウスからの、攻撃後D22での血清 (IS-98-ST1株を100 LD₅₀)、
- レーン10： リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスで免疫されたマウスからの血清。

【0075】

レーン11及び12：非感染VERO細胞の溶解物を、次の血清を用いて沈降させた： 20

- レーン11： ポリクローナル抗西ナイルウイルス (IS-98-ST1株) 腹水
- レーン12： TRIP U3CMV-sE(WNV)ベクターで30日間免疫されたマウスからの、攻撃後D22での血清 (IS-98-ST1株を100 LD₅₀)。

【0076】

- 図4は、腹腔内免疫され、次いで免疫後2週間で10 LD₅₀のIS-98-ST1株によるか(A)、又は免疫後4週間で100 LD₅₀のIS-98-ST1株によるか(B)のいずれかで同じ経路により攻撃されたマウスの生存曲線を表す。 : DPBSを接種されたコントロールマウス。 : 1 μ gのTRIP U3CMV-EGFPベクター粒子で免疫されたコントロールマウス。 : 1 μ gのTRIP U3CMV-sE(WNV)ベクター粒子で免疫されたマウス。

【0077】

- 図5は、西ナイルウイルスのprM及びEタンパク質を発現する組換えレンチウイルスベクターで形質導入された真核細胞の上清からのウイルス擬似粒子の精製を示す。 30

- 図6は、TRIP U3.CMV-sE(WNV)ワクチン接種された129マウスからの血清中の抗WNV-sE抗体の検出を説明する。WNV感染ペロ細胞からの放射性標識された細胞溶解物を、レンチウイルスベクターをワクチン接種した129マウスからのプールした免疫血清と免疫沈降させた。(A) WNV攻撃前の血清。(B) 攻撃後の血清。HMAF = 高度免疫マウス腹水(Hyperimmune Mouse Ascitic Fluid)。コントロール血清 = 非免疫血清。MVに対する抗血清 = 麻疹ウイルスに対する抗血清。TRIP/WNsE = TRIP U3.CMVsE(WNV)。TRIP/GFP = TRIP U3.CMV-GFP。

【0078】

- 図7は、組換えレンチウイルスベクター形質導入効率に対する加熱処理の効果のフローサイトメトリによる分析を示す。293T細胞を、70 で10分間熱不活化した(加熱TRIP/GFP)か、又は不活化しなかった(TRIP/GFP) TRIP U3.CMV-GFPベクターとインキュベートした。非感染293T細胞(模擬)をコントロールとして用いた。48時間で、GFP蛍光強度を測定した。GFP陽性細胞のパーセンテージを示す。 40

【0079】

実施例1：TRIP U3.CMV-sE(WNV)組換えベクターの作製

1) pTRIP U3.CMV-sE(WNV)ベクタープラスミドの構築

ポリタンパク質(出願FR 01 04599及びGenbank AAL87234)の位置291~732のアミノ酸に相当する、西ナイルウイルスIS-98-ST1株(出願FR 01 04599及びGenbank AF481864)のゲノ 50

ム的位置967~2292のヌクレオチド配列を示すcDNAを、下線部にBsiW部位を含むセンスプライマ: 5'-TATCGTACGATGAGAGTTGTGTTTTGTCGTGCTA-3' (配列番号18)と、下線部にBssH II部位を含むアンチセンスプライマ: 5'-ATAGCGCGCTTAGACAGCCCTTCCCAACTGA-3' (配列番号19)とを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。添付の配列表の配列番号16の配列に相当するこのcDNAの境界は、5'位でBsiW I部位、及び3'位でBssH II部位となる。配列番号16の配列は、5'から3'に連続して: ATG、Mタンパク質前駆体由来のシグナルペプチド(prM 151~166)をコードする配列、及び膜固定領域が欠失された短縮Eタンパク質(E1~441)をコードする配列を含む。これは、細胞外媒質へ分泌されるEタンパク質(sEタンパク質)をコードする。prMタンパク質由来のシグナルペプチドは、小胞体におけるEタンパク質の移動及び分泌小胞中での細胞質膜へのその輸送(ここでこれは細胞外媒質に放出される)のために用いられる。

【0080】

レンチウイルスベクタープラスミドpTRIP U3.CMV EGFP (出願WO 01/27302)は、EGFP遺伝子を切り出すように消化され、次いで、直鎖状にされたプラスミドをBsiW I及びBssH II部位を含むリンカーとライゲーションして、pTRIP U3.CMV-BsiW I-BssH IIとよばれるプラスミドを得た。上記で得られたcDNAの、sEタンパク質構築物を含む1.4 kbのBsiW I-BssH II断片を、プラスミドpTRIP U3.CMV-BsiW I-BssH IIの同じ部位にクローニングして、pTRIP U3.CMV-sE (WNV)又はpTRIP U3.CMV-sE (WNV)とよばれる組換えレンチウイルスベクタープラスミドを得た(図1及び配列番号15)。pTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクタープラスミドで形質転換した大腸菌(*E. coli*)を、25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15のCollection Nationale de Cultures de Microorganismes [National Collection of Cultures of Microorganisms]に、2003年8月27日に、番号I-3076の下で寄託した。

【0081】

pTRIP U3.CMV-sE (WNV)組換えベクタープラスミドの適合性を、酵素制限及びsEタンパク質構築物に相当する挿入断片を配列決定することにより確かめた。

1.4 kbのBsiW I-BssH II挿入断片の配列は、添付の配列表の配列番号16のヌクレオチド配列に相当する。これは、添付の配列表の配列番号17のアミノ酸配列に相当する、sEとよばれる分泌されるEタンパク質をコードする。

【0082】

2) 水疱性口内炎ウイルスエンベローブ糖タンパク質(VSV-G)で偽型にされたTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターのウイルス粒子の作製

ヒト繊維芽293T細胞(ATCC)を、10%胎児ウシ血清(FCS)を補ったダルベッコ変法イーグル培地(DMEM) Glutamax (GIBCO)中に増殖させる。TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子ともよばれる、水疱性口内炎ウイルスエンベローブ糖タンパク質(VSV-G)で偽型にされたTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターのウイルス粒子は、Zennouら, Cell., 2000, 101, 173~185に説明されるように、293T細胞系統を、上記で規定するpTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクタープラスミドと、トランスに構造タンパク質とウイルス粒子の酵素とを提供する包膜プラスミド(pCMV R8.2: Naldiniら, Science, 1996, 272, 263~267; pCMV R8.91又はp8.7: Zuffereyら, Nat. Biotechnol., 1997, 15, 871~877)と、VSVウイルスエンベローブ糖タンパク質の発現用プラスミド(pHCMV-G: Yeeら, P.N.A.S., 1994, 91, 9564~9568)とでリン酸カルシウム同時トランスフェクションすることにより作製される。

【0083】

3) 組換えTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターによる、WNVのE糖タンパク質の分泌型(WNV-sE)の発現

レンチウイルスベクターを形質導入された293T細胞におけるWNV-sEの発現を、間接的免疫蛍光により調べた。簡単に、8チャンバのGlass-Labteks (NUNC)で培養したヒト293T細胞を、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターを用いて形質導入した。48時間後に、細胞をPBS中の3%パラホルムアルデヒド(PFA)で20分間固定し、PBS中の0.1% Triton X-100で4分間透過性にした。細胞を、PBS中の1:100期尺の抗WNV HMAFと1時間インキュベートした。PBS中の0.2% BSAでブロッキングした後、細胞をPBS 0.2% BSA中の1:500希釈のCy3-複合化抗マ

10

20

30

40

50

ウスIgG抗体 (AMERSHAM PHARMACIA) とさらにインキュベートした。細胞核をDAPIを用いて視覚化した。スライドを、Zeiss Axioplan顕微鏡をApoTomeシステムとともに用いて、調べた。

形質導入の48時間後に、細胞の多くの (high) 画分が免疫染色された。免疫染色パターンは、WNV-sEが分泌経路を通して移動したことを示唆する。

【 0 0 8 4 】

4) 組換えTRIP U3.CMV-sE (WNV) ベクターの力価測定 (titration)

4.1) 材料及び方法

a) ELISAによるp24抗原力価測定

濃縮したベクター粒子のp24抗原含量の定量を、市販のHIV-1 p24 ELISAキット (PERKIN ELMER LIFESCIENCES) を用いて行った。

【 0 0 8 5 】

b) 定量的PCR

プライマとプローブを、PROLIGOにより合成した。レンチウイルスベクター中のU5-R配列の検出のために、用いたプライマ及びプローブ (Brussel A及びSonigo P, J. Virol., 2003, 77, 10119~10124) は、次のとおりである (配列番号20~27) :

- プローブ (3'フルオレセイン (PITC) 又はリン酸化 (P))

LTR-FL : 5' -CACAAACAGACGGGCACACACTACTTGA-FITC-3'

LTR-LC : 5' -RED640-CACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGC-P-3'

- プライマ

AA55M : 5' -GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA-3'

M667 : 5' -GGCTAACTAGGGAACCCACTG-3'。

【 0 0 8 6 】

CD3の検出のためのプライマ及びプローブの配列は、次のとおりであった :

- プローブ

CD3-P1 : 5' -GGCTGAAGGTTAGGGATACCAATATTCCTGTCTC-FITC-3' ,

CD3-P2 : 5' RED705-CTAGTGATGGGCTCTTCCCTTGAGCCCTTC-P-3'

- プライマ

CD3-in-F : 5' -GGCTATCATTCTTCTTCAAGGTA-3'

CD3-in-R : 5' -CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3'。

【 0 0 8 7 】

約 $3 \cdot 10^6$ レンチウイルスベクターを形質導入した293T細胞からのゲノムDNAを、形質導入の48時間後に、QIAamp (登録商標) DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて単離した。リアルタイムPCR分析のために、5 μ LのDNAを、1 \times Jumpstart (商標) Taq ReadyMix (商標) (SIGMA)、1.9mM MgCl₂、1.5 μ Mのフォワード及びリバースプライマ (AA55M/M667又はCD3-in-F/CD3-in-R)、200nMのプローブ (LTR-FL/LTR-LC又はCD3-P1/CD3-P2) 及び1.5単位のTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen) からなる15 μ LのPCRマスターミックスと混合した。増幅は、95 $^{\circ}$ で3分間を1サイクル、及び95 $^{\circ}$ で5秒、55 $^{\circ}$ で15秒及び72 $^{\circ}$ で10秒の40サイクルを用いて行った。ベクターストックのプラスミド汚染の可能性を考慮に入れて、加熱不活化した (70 $^{\circ}$ で10分間) ベクターで形質導入した293T細胞からのDNAを、常に平行して試験した。ネガティブコントロールとして、形質導入していない細胞からのゲノムDNA 5 μ Lを用いた。各DNA試料を二重で試験し、平均値を報告する。関連する配列U5-R及びCD3を含む既知の濃度のプラスミドpTripCD3の10倍連続希釈を、DNA試料と平行して増幅させて標準曲線を作製した。

【 0 0 8 8 】

細胞当たりのベクターコピーの全体数を、同じゲノムDNA試料についてのCD3分子のコピー数により定量化されるように、U5-Rコピーの数を293T細胞の数に対して標準化し、加熱不活化ベクターを形質導入した細胞について得られたコピー数を減ずることにより、算出した。

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

50

4.2) 結果

この研究に用いたベクターストックの物理的粒子の数を、市販で入手可能なELISAアッセイをp24 HIV-1カプシドタンパク質に対して用いることにより、まず評価した。測定された濃度は、マイクロリットル当たり58 ngのp24であった。

【0090】

ベクターストックの実際の力価を、定量PCRアッセイを用いて、標的細胞へのベクターDNAの移入に基づいて算出した。ベクター特異的配列(U5)及び細胞遺伝子座(CD3)の両方の定量は、細胞当たり平均的なDNAベクターコピー数を示す。このことは、ベクター粒子の規定された濃度を用いた形質導入の後の、ベクター調製物の力価の計算を可能にする。この研究において用いたTRIP U3.CMV-sEベクターストックは、ヒト293T細胞を、ml当たり 5.2×10^7 形質導入単位(TU)で滴定した。言い換えると、このTRIP U3.CMV-sEベクター調製物からのp24抗原1 ngが、900個のヒト293T細胞を形質導入できる。

単純化のために、以下の部分では、用いたベクター粒子の量をp24抗原のngで表す。

【0091】

実施例2：BALB/cマウスでのTRIP U3.CMV-sEベクターの免疫原性能力の分析

1) 材料及び方法

1.1) 免疫化/ワクチン接種プロトコル

6週齢のBALB/cマウス(6匹のマウスの2群；Janvier繁殖コロニー)に、実施例1のようにして作製した1 µgのTRIP U3.CMV-sEベクター粒子を含有する0.1 mlのダルベッコのPBS (DPBS)を腹腔内接種した。動物には、単回ワクチン注射を与えた。

コントロール群には、同じ条件下で、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターと同様の方法で作製した1 µgのTRIP U3.CMV-GFPベクター粒子(3匹のマウスの2群)、又はDPBS緩衝液のみ(3匹のマウスの2群)のいずれかを接種した。

【0092】

マウスの血清を、ワクチン注射の14日(D₁₄)及び23日(D₂₃)後に採取し、抗体応答の測定の前に56 °Cで30分間加熱不活化した。

【0093】

1.2) 西ナイルウイルス株、精製及び力価

用いた西ナイルウイルス株は、IS-98-ST1株であり、出願FR 01 04599に記載される。これは、ヤブカ属の力の細胞(AP61系統)で産生され、Despresら, *Virology*, 1993, 196, 209 ~ 219に記載されるプロトコルにより精製される。より詳細には、AP61細胞に、0.4の感染多重度で、西ナイルウイルスのIS-98-ST1株を感染させる。感染の3日後に、培養上清に存在するウイルス粒子をPEG 6000 (7%)を用いて沈殿させ、次いで、不連続の30 ~ 60%スクロース勾配及び10 ~ 50%の直線スクロース勾配で精製する。このようにして得られるピリオンを、スクロース(30%)中に - 80 °C で保存する。

【0094】

西ナイルウイルスは、上記のDespresらにより記載されるプロトコルに従って、AP61細胞でのフォーカス免疫アッセイ(FIA)により力価測定され、感染力価はフォーカス形成単位(FFU_{AP61}/ml)として表す。

精製されたウイルス調製物の感染力価は、約 10^{10} FFU_{AP61}/mlである。

【0095】

1.3) 抗WNV高度免疫腹水

抗WNV高度免疫マウス腹水(HMAF)を、成体のマウスをWNVのIS-98-ST1株で反復免疫化し、続いて肉腫180を接種することにより得た。マウスポリクローナル抗WNV抗体を、成体のWNV耐性BALB/c-MBT類似遺伝子系マウスを 10^3 FFUのIS-98-ST1で以前に記載されたようにして(Mashimoら, *PNAS*, 2002, 99, 11311 ~ 11316)免疫することにより得た。WNV-免疫血清は、初回抗原刺激の1ヵ月後に回収した。

【0096】

1.4) ELISA

抗E全抗体力価を、Mashimoら, *PNAS*, 2002, 99, 11311 ~ 11316に記載されるプロトコル

10

20

30

40

50

に従って、段落1.2に記載されるようにしてスクロース勾配で精製したWN IS-98-ST1ピリオンを抗原として用いるELISAにより測定する(96ウェルマイクロプレート当たり 10^6 FFU_{AP61})。1:4000希釈でのペルオキシダーゼ複合化抗マウス免疫グロブリン(H+L) (JACKSON IMMUNO RESEARCH)、1:20000でのペルオキシダーゼ複合化抗マウスIgM (μ 鎖特異的) (SIGMA)、又は1:20000希釈でのペルオキシダーゼ複合化抗マウスIgG (μ 鎖特異的) (Sigma)を二次抗体として用いた。力価は、上記で規定するように、コントロールマウスからの血清の光学密度(OD)の少なくとも2倍のOD値に相当する血清の最終希釈により決定する。抗E IgG及びIgM抗体も、すでに記載されたアイソタイプ特異的ELISAを用いて測定する(Despres Pら, J. Infect. Dis., 2005, 191, 207~214)。

【0097】

1.5) 免疫沈降(RIPアッセイ)

実験プロトコルは、Despresら(J. Virol., 1995, 69, 7345~7348)に記載されるとおりである。より詳細には、VERO細胞を、西ナイルウイルスのIS-98-ST1株を5 FFU_{AP61}/細胞の感染多重度で用いて感染させる。感染の20時間後に、細胞タンパク質をTran³⁵Slabel (ICN; 100 μ Ci/ml)で3時間標識する。冷PBSで3回洗浄後、細胞を、25 μ g/mlのアプロチニン(SIGMA)を補ったRIPA緩衝液(50 mM Tris-Cl, pH 8.0、150 mM NaCl、10 mM EDTA、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、1% Triton X-100)中に+4 で10分間溶解させる。細胞溶解物を、+4 で10000 rpm、5分間の遠心分離により澄清にする。溶解物を、プロテインAセファロースの存在下に1:100の最終希釈で、試験すべき血清とインキュベートする。次いで、免疫沈降物を、非還元条件下のSDS-15% PAGEゲルで分析し、オートラジオグラフィで明らかにする。

【0098】

1.6) 中和試験

西ナイルウイルスのIS-98-ST1株についての、免疫されたマウスからの血清の中和活性を、VERO細胞(ATCC)でのウイルス複製フォーカスにおける減少により測定した。より詳細には、56 で30分間不活化した血清の連続希釈(0.1 ml)を、西ナイルウイルスのIS-98-ST1株の接種物(0.1 ml 中に100 FFU_{AP61})の存在下でインキュベートする。VERO細胞(12ウェルプレートのウェル当たり 1.5×10^5 細胞)を、次いで、混合物を用いて37 で2時間感染させ、ウイルス複製フォーカスを、感染後2日で計数する。TNR90 (ウイルス複製フォーカスにおける90%減少による中和試験(Test for Neutralization by 90% Reduction in viral replication Foci))とよばれる血清の中和抗体力価を、各ウェルに接種した100 FFUのウイルスの少なくとも90を中和する血清の最終希釈により決定する。

【0099】

2) 結果

2.1) 免疫された動物からの血清の西ナイルウイルスについての反応性のELISAによる分析

西ナイルウイルスのEタンパク質に対して指向された抗体の産生を、精製西ナイルウイルスを抗原として用いて、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の注射後14及び23日で採取したマウス血清について行うELISAアッセイにより確かめた。

【0100】

図2に示す結果は、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子で免疫されたマウスからの血清の特異的抗体の力価が、ワクチン注射の14日及び23日後にそれぞれ1/10000及び1/20000であることを示す。

【0101】

2.2) 免疫された動物からの血清の特異性の免疫沈降による分析

TRIP U3.CMV-sEベクターで免疫された動物からの血清の特異性を、免疫沈降により確かめた。TRIP U3.CMV-sEベクターで免疫された動物からの血清は、西ナイルウイルスのエンペロプタンパク質Eと反応する。反応性は、ワクチン注射後D₁₄よりもD₂₃でより強い(図3)。

【0102】

2.3) 免疫された動物からの血清の西ナイルウイルスについての中和活性の分析

10

20

30

40

50

TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の単回注射で免疫されたマウスからの血清の西ナイルウイルスについての中和活性を、VERO細胞でのウイルス複製フォーカス(TNRF90)における減少を測定することにより実験的に確かめた。ワクチン注射後D₁₄及びD₂₃での力価は、それぞれ10及び20である(図2)。

【0103】

実施例3: BALB/cマウスにおけるTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターの防御能力の分析

マウスをTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子で免疫した後に産生される抗Eタンパク質抗体の防御的役割を、WNV関連脳炎のマウスモデルにおいて試験した(Deubelら, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2001, 951, 195~206; Mashimoら, 2002, 上記; 国際出願WO 02/081511; Ceccaldiら, FEMS Microbiol. Lett., 2004, 233, 1~6)。つまり、マウスを、西ナイルウイルスの高度に神経侵襲性及び神経毒性のIS-98-ST1株10 LD₅₀ (マウスの50%において致死性である用量)又は100 LD₅₀の腹腔内接種により攻撃した。

10

【0104】

より詳細には、2つの攻撃プロトコルを用いた。(i) 実施例2に記載のようにして免疫した6匹のマウスの第一群は、ワクチン注射の15日後(D15)に10 LD₅₀のIS-98-ST1株を受けた。(ii) 実施例2に記載のようにして免疫した6匹のマウスの第二群は、ワクチン接種の30日後(D30)に100 LD₅₀のIS-98-ST1株を受けた。攻撃ウイルスは、0.2%のウシ血清アルブミン(Sigma)を補ったDPBS (pH 7.5)で希釈する。1 LD₅₀は10 FFU_{AP61}/mlに相当する。

【0105】

マウスの第一群の生存曲線(図4A)は、DPBS又はTRIP U3.CMV-EGFPベクターを接種した全てのコントロールマウスが、ウイルス攻撃用量の接種の後13日で死亡することを示す。一方、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターで免疫した6匹のマウスは、致死用量に耐性であり、罹患を示さない。

20

攻撃の22日後に、耐性マウスは、ELISAにより抗西ナイルウイルス抗体力価(1.7±0.1、希釈1:10⁴)を有し、これは攻撃前に得られたものよりも大きい。攻撃されたマウスからの血清は、西ナイルウイルスのEタンパク質と強く反応し(図3)、中和抗体は、攻撃の1ヵ月後に100の力価を有する。

【0106】

マウスの第二群についての生存曲線(図4B)は、DPBS又はTRIP U3.CMV-EGFPベクターを接種した全てのコントロールマウス(DPBS)は、ウイルス攻撃用量の接種後9日以内に死亡することを示す。一方、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターで免疫された6匹のマウスは、致死用量に耐性であり、罹患を示さない。マウスの第一群と同様に、攻撃されたマウスからの血清は、西ナイルウイルスのEタンパク質と強く反応し(図3)、中和抗体は、攻撃の1ヵ月後に100の力価を有する。

30

さらに、攻撃されたマウスからの抗体の反応性が、西ナイルウイルスの非構造タンパク質について存在しないことは(図3)、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクターにより誘導される防御免疫が攻撃ウイルスでの感染を防ぐのに充分であることを示唆する。

【0107】

結果は、成体マウスへの少量のTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の単回投与は、免疫化の2週間後に中和抗体の産生を誘導し、末梢接種された西ナイルウイルスでの致死攻撃に対して防御免疫を与えることを示す。

40

【0108】

実施例4: TRIP U3.CMV-prM-E (WNV)組換えベクターを用いるウイルス擬似粒子の作製

1) TRIP U3.CMV-prM-E (WNV)ベクターの作製

ゲノム配列(出願FR 01 04599及びGenbank AF481864)の位置399~2469に相当する、西ナイルウイルスのIS-98-ST1株のprM及びEタンパク質をコードするcDNAを含む、三重らせんタイプの組換えHIVベクターを、実施例1に記載のようにして構築した。TRIP U3.CMV-prM-E (WNV)組換えベクターで形質導入された安定系統を、実施例1に記載のようにして得た。

【0109】

50

2) ウイルス擬似粒子又はVLPの作製

TRIP U3.CMV-prM-E (WNV)ベクターで形質導入された細胞の培養上清を回収し、静かに攪拌しながら4 で4~5時間、PEG 6000 (Fluka, 7% W/V)を用いて沈殿させる。得られた沈殿物を、9000 rpmで4 で30分間遠心分離し、VLPを含有するペレットを4 mlのTNE (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA)中に採取し、不連続のスクロース勾配(1 × TNE中に20%~60%スクロース)で析出させる。勾配を39000 rpmで2時間遠心分離し、20~60%界面で乳白色のバンドを回収し、直線勾配(1 × TNE 中に11~55%スクロース)で析出させ、35000 rpmで16時間遠心分離する。勾配画分を回収し(0.5 mlの11の画分)、抗WNV免疫血清(1:20)を用いるELISA、SDS-PAGEゲル電気泳動及びクマーシーブルー染色、並びに抗WNV免疫血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析する。図5に示すELISAの結果は、勾配の6~10の画分に精製VLPが存在することを示す。

10

【0110】

実施例5: 129マウスでのTRIP U3.CMV-sEベクターの免疫原性能力及び防御能力の分析

1) 材料及び方法

1.1) 免疫化/ワクチン接種プロトコル

6~8週齢の129マウス(6匹のマウスの6群)を、実施例1に記載のようにして調製し、0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)を補った0.1 mlのダルベッコのPBS (DPBS; pH 7.5)で希釈した種々の用量のTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子で腹腔内(i.p.)接種した。

動物は、単回ワクチン注射を受けた。

【0111】

20

コントロール群には、同じ条件下で、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子と同様の方法で作製されたTRIP U3.CMV-GFPベクター粒子の500 ngのp24抗原等価物(6匹のマウスの1群)、又はDPBS緩衝液のみ(6匹のマウスの1群)を接種した。

【0112】

マウスを、免疫後6、13、20又は27日(D₆、D₁₃、D₂₀、D₂₇)に眼窩周囲で採血し、プールした血清を56 で30分間加熱不活化した後に、実施例2に記載のようにして抗WNV全抗体、IgG及びIgM、並びにインビトロ中和活性を測定した。

WNV攻撃を、実施例2のようにして作製された神経毒性WNV IS-98-ST1株のi.p.接種により行った。続いて、動物を、免疫後7又は14日でWNV IS-98-ST1株の1000 LD₅₀ (i.p. LD₅₀ =10 FFU)を用いてi.p.攻撃した。攻撃したマウスを、21日目まで、罹患又は死亡の徴候について監視した。

30

【0113】

1.2) フローサイトメトリアッセイ

25 cm²フラスコで培養した293T細胞を、70 で10分間加熱不活化したか、又は処理していない(ポジティブコントロール)かのいずれのTRIP U3.CMV-GFPベクター粒子で形質導入した。48時間後に、細胞をはがし、洗浄し、2% PFAで固定した。GFP蛍光強度をFACSスキャンにより測定し、CellQuestソフトウェアで分析した。

【0114】

2) 結果

個体間の免疫応答の変動を考慮に入れるために、BALB/cマウスよりも類似遺伝子系でない129マウスを、WNV-sEを発現するレンチウイルスベクターにより誘導される体液性免疫応答を評価するために選択した。

40

2.1) TRIP U3.CMV-sEベクター粒子の腹腔内注射に続く、強い抗体応答

500 ngのp24抗原に等価なTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の単回用量で免疫された129成体マウスにおいて、WNVに対する全抗体は、低濃度ではあるが、免疫後6日の早さで検出可能であった。比べると、TRIP U3.CMV-GFPで免疫したマウスの血清中に抗WNV抗体は検出されなかった。この時点で予測されたように、体液性応答はIgM抗体に対応し、IgG抗体に対応しなかった。全抗体応答は、第13日に10倍に増加してプラトーに達し、時間がたっても維持された。これらのより後の時点(第13、20、27日)において、IgM抗体は消滅して、IgGに置換された(表2)。

50

【 0 1 1 5 】

【 表 2 】

表 2. TRIPΔU3.CMV-sE (WNV) の接種に対するマウスの抗体応答

免疫化ベクター ^a 、 採血の日	WNV 抗体力価 ^b	WNV IgM 抗体力価 ^b	WNV IgG 抗体力価 ^b	抗 WNV FRNT90 ^c
TRIPΔU3.CMV -GFP 第 27 日	<100	<100	<100	<10
TRIPΔU3.CMV -sE (WNV) 第 06 日	3 000	300	<100	10
第 13 日	30 000	<100	1 000	10
第 20 日	30 000	<100	1 000	10
第 27 日	30 000	<100	1 000	20

- a. 成体 129 マウスの群は、500 ng の p24 抗原に相当する量のレンチウイルスベクター粒子を i.p. 接種された。
- b. プールされた加熱不活化血清についての ELISA により測定された。
- c. FRNT: フォーカス低減中和試験: WNV の FFU 数を少なくとも 90% 減少させる最も高い血清希釈

【 0 1 1 6 】

これらの抗体は、RIPアッセイにより示されるように、IS-98-ST1を感染させたペロ細胞溶解物からのWNV E-糖タンパク質と反応性であった(図6A)。フォーカス低減中和試験(Focus Reduction Neutralization Test ; FRNT)は、TRIP U3.CMV-sE (WNV)で免疫したマウスからの血清が、免疫後6日の早さで検出可能なレベルのWNV中和抗体を含有していたことを示した(表2)。これらのデータはともに、早期の特異的な抗WNV抗体免疫応答が、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子で免疫されたマウスで開始されることを示す。

【 0 1 1 7 】

2.2) 高用量のWNV攻撃に対するTRIP U3.CMV-sE (WNV)ワクチン接種によりマウスに付与される早期の防御

500 ngのp24抗原に等価なTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の単回用量で免疫したマウスは、免疫後7日の早さで高ウイルス攻撃に対して完全に防御された。なぜなら、この群において罹患又は死亡が観察されなかったからである(表3)。

【 0 1 1 8 】

【表3】

表3: WNV 感染に対する TRIPΔU3.CMV-sE (WNV) による迅速な防御

免疫ベクター ^a 、 攻撃の日	防御 ^b (生存数/感染数)	攻撃後 WNV 抗体力価 ^c
DPBS 第7日 第14日	0/2 0/2	ND ND
TRIPΔU3.CMV-GFP 第7日 第14日	0/2 0/2	ND ND
TRIPΔU3.CMV-sE (WNV) 第7日 第14日	6/6 6/6	200 000 300 000

a. 成体 129 マウスの群は、500 ng の p24 抗原に相当するレンチウイルスベクター粒子の単回用量又は DPBS を i.p. 接種された。

b. 攻撃の日に、マウスは WNV IS-98-ST1 株の 1,000 i.p. LD₅₀ を i.p. 接種された。生存は、21 日間記録した。

c. プールされた加熱不活化血清についての ELISA により測定された。

ND: 測定せず

【0119】

ウイルス攻撃において用いられる感染性ウイルス用量は、力にかまれることにより伝染され得る最大限のウイルス接種物に相当するように選択した。この用量は、10000 インピトロFFU に相当すると見積もられ (Despres ら, J. Infect. Dis., 2005, 191, 207 ~ 214; M ashimo ら, 2002, 上記)、それ自体は、腹腔内経路による 1000 インピトロ LD₅₀ に相当する

【0120】

コントロールベクター TRIP U3.CMV-GFP 又は DPBS で免疫された全てのマウスは、攻撃の 11 日以内に全て死亡した (表3)。興味深いことに、WNV に対する全抗体は、攻撃後に 10 倍に増加し、このことは、効果的な二次応答が、TRIP U3.CMV-sE (WNV) で免疫されたマウスで開始されたことを示唆する (表3)。等しい結果が、BALB/c マウスで得られた。これらの結果は、TRIP U3.CMV-sE (WNV) ワクチン接種が、高い WNV 攻撃に対して非常に速い完全防御免疫応答を付与することを示す。このことは、感受性の種の防御が緊急事態である大発生の関係において、かなり重要であり得る。

【0121】

2.3) レンチウイルスベクターワクチンにより与えられる免疫性は、排除性である (sterilizing)

攻撃により、ワクチン接種された動物において、WNV の第一の感染 (primo-infection) が起こるか否か、すなわち、惹起された免疫応答が、排除性防御免疫を与えるかを調べるために、WNV 攻撃の前及び 21 日後に回収された、免疫されたマウスからのプールした血清について RIP アッセイを行った。500 ng の p24 抗原に等価な TRIP U3.CMV-sE (WNV) ベクター粒子の単回用量で免疫後 13、20 及び 27 日目に得られた血清は、WNV の E タンパク質と反応した。しかし、免疫後第 6 日から得られた血清はこのタンパク質と反応しなかった (図 6A)。RIP アッセイは IgM の検出ができないので、このことは、p.i. 第 6 日では WNV に対する IgM 抗体のみが存在し、IgG 抗体は存在しないことを示す ELISA の結果と一致する。TRIP U3.CMV-G

10

20

30

40

50

FPで免疫されたマウスからの血清は、WNV Eタンパク質と反応しなかった。

【 0 1 2 2 】

興味深いことに、WNV E以外のいずれのウイルスタンパク質に対する抗体も、TRIP U3.CMV-sE (WNV) ワクチン接種されたマウスからの攻撃後の血清から検出されなかった(図6B)。WNV非構造タンパク質に対する抗体が存在しないことは、全てのTRIP U3.CMV-sE (WNV) ワクチン接種されたマウスにおいてウイルス複製が起こらなかったことを強く示唆する。よって、TRIP U3.CMV-sE (WNV)のワクチン接種は、マウスに完全排除性免疫性を与える。

【 0 1 2 3 】

このことは、ワクチンを鳥の免疫化に用いる場合に重要な利点を表す。実際に、ウマ、ヒト及びその他の哺乳動物はWNV感染の終端の宿主であると考えられているが、鳥類は、増幅宿主であることが知られており、流行の維持に關与する(Dauphinら, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2004, 27, 343~355)。

【 0 1 2 4 】

2.4) TRIP U3.CMV-sE (WNV)の単回免疫化により与えられる防御は、長期持続する。

TRIP U3.CMV-sE (WNV)レンチウイルスベクターベースのワクチンの単回免疫化がWNVに対する長期間の防御免疫を惹起する能力があるかを決定するために、免疫化129マウスからのプールした血清を、TRIP U3.CMV-sE (WNV)ワクチンの注射から3ヵ月後にELISA及びFRNTにより試験した。

【 0 1 2 5 】

500 ngのp24抗原に等価なTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子の単回用量で免疫したマウスでの抗体レベルは、注射後3ヶ月でも著しく高く(1:30000)、中和抗体は持続していた(表4)。

【 0 1 2 6 】

【表 4】

表 4: WNV 感染に対する TRIP/sE_{WNV} による長期防御

免疫化ベクター ^a	WNV 抗体力価 ^b (攻撃前)	抗 WNV FRNT90 ^c (攻撃前)	防御 ^d 生存数/ 感染数	WNV 抗体力価 ^b (攻撃後)	抗 WNV FRNT90 ^c (攻撃後)
TRIPΔU3. CMV-GFP	<100	<10	0/3	ND	ND
TRIPΔU3. CMV-sE (WNV)	30 000	20	13/13	500 000	400

a) 500 ng の p24 抗原への ng。

b) プールした熱不活化血清についての ELISA により測定された。

c) FRNT: フォーカス低減中和試験: WNV の FFU 数を少なくとも 90%減少させる最も高い血清希釈。

d) マウスは、免疫化の 3 ヶ月後に 1000 LD₅₀ の WNV IS-98-ST1 株を i.p.接種された。生存を 21 日間記録した。

【 0 1 2 7 】

TRIP U3.CMV-sE (WNV)で免疫され、その後、1000 LD₅₀用量のIS-98-ST1 WNVでi.p.攻撃されたマウスでは、罹患も死亡も観察されなかったが、コントロールマウスは全て死亡した(表4)。抗体全力価及び中和抗体は攻撃後に増大し、このことは有効な二次応答が、TRIP U3.CMV-sE (WNV)で3ヶ月前に免疫されたマウスで開始されたことを示唆する(表4)。このことは、WNV-sEをコードするレンチウイルスベクターでの単回免疫化が、マウスにお

いて長期持続する防御免疫を提供するのに充分であることを示す。

【0128】

2.5) TRIP U3.CMV-sE (WNV)の単回の微小用量は、完全で迅速な防御を付与するのに充分である。

完全防御免疫を達成するのに必要なベクターの最小用量を算出するために、129マウスのいくつかの群を、減少する用量のTRIP U3.CMV-sE (WNV)又はコントロールとして500 ng用量のTRIP U3.CMV-GFPベクター粒子でi.p.免疫した。7日後に、全てのマウスを1000 LD₅₀ IS-98-ST1で攻撃した。予想されたように、コントロールベクターを与えられた全てのマウスは、攻撃の11~13日の間に死亡した。結果は、マウスの完全防御に必要とされるTRIP U3.CMV-sE (WNV)の最小用量は、50 ngのp24抗原に等価なベクター粒子の量であることを示した(表5)。

10

【0129】

【表5】

表5: WNV感染に対するTRIP/sE_{WNV}による用量依存性防御

免疫化ベクター ^a , 用量(p24のng)	防御 ^b 生存数/感染数	攻撃後 WNV抗体力価 ^c
TRIPΔU3.CMV-GFP 500	0/6	ND
熱不活化 TRIPΔU3.CMV-sE (WNV) ^d 50	0/6	ND
TRIPΔU3.CMV-sE (WNV) 500	6/6	200 000
150	6/6	300 000
50	12/12	300 000
15	5/6	300 000
5	2/5	200 000
1.5	11/12	ND

20

30

a) 成体129マウスの群に、レンチウイルスベクター粒子の単回用量をi.p.接種した。

b) マウスに、初回抗原刺激の1週間後に、1,000 i.p. LD₅₀のWNV IS-98-ST1株をi.p.接種した。生存を21日間記録した。

c) プールした熱不活化血清のELISAによる測定。

d) レンチウイルスベクター粒子を、70°Cで10分間熱不活化した。

40

【0130】

より低い用量は、部分的防御しか付与せず、よって、50%防御用量は、6.2 ngのp24抗原に等価なベクター粒子と計算された。これらの用量 - 防御実験は、ワクチン接種の7日後という早期の攻撃及び高いウイルス攻撃(1000 LD₅₀)という最も厳しい攻撃条件で行ったことに注目すべきである。第7日と15日との間に全抗体濃度が10倍に増加したことにより、あと1週間後に算出していたならば、50%防御用量は6.2 ngより低かったであろう。50 ngのp24に等しいTRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子を与えられたマウスからの免疫血清は、検出可能な抗WNV抗体を有さなかった。このような少量のTRIP U3.CMV-sEが初回免疫攻撃の1週間後に完全防御を付与すると仮定すると、レンチウイルスベクターベースのワ

50

クチンは、WNVに対する先天性免疫を開始するシグナルを発生しているに違いないと予測されるだろう。

【0131】

さらに、完全防御免疫に必要とされる用量は、用いられるモデルのために、低く見積もられている可能性があることに注目することが重要である。実際に、マウス細胞は、ヒト細胞を含む他の哺乳動物細胞に比べて、レンチウイルスベクター形質導入に対する許容性が低いことが示されている(Gianniniら, Hepatology, 2003, 38, 114~122; Nguyenら, Mol. Ther., 2002, 6, 199~209)。鳥類の細胞は、マウス細胞よりも形質導入に対してよりよい許容性を示し、少量のレンチウイルスベクターワクチン用量が家禽類で有効であろうと予測することが可能である

10

【0132】

得られた防御が、WNV-sE抗原の実際にベクターに媒介された発現に特異的によるものであり、残存WNV-sEタンパク質又はベクターストックに混在するベクタープラスミドDNAによるものではないことを確実にするために、マウスを熱不活化(70℃で10分間) TRIP U3.CMV-sE (WNV)ベクター粒子で免疫し、形質導入を廃止する処理を行った(図7)。WNV攻撃の後に、熱不活化TRIP U3.CMV-sE (WNV)を注射された全てのマウスは死亡した(表5)。よって、遊離の裸のDNAが防御において役割を演じてはいないようである。

【0133】

さらに、ベクター粒子を偽型にするために用いられるVSV-Gエンベロープの遍在する親和性のために、レンチウイルスベクターワクチンは、危険性のあるヒト及びウマ、家禽類及び家畜のような動物を含むいずれの脊椎動物種において、改変することなく用いることが理論的にできる。

20

これらの結果は、微小用量のベクター粒子は、マウスにおいて迅速で完全な防御免疫を達成するのに充分であることを証明する。このことは、この候補のワクチンの費用対効果を興味のあることに大きくし、家禽の飼育場(stock)及びウマの飼育農場における集団ワクチン接種のためのプロトコル(例えばエアロソルを介して)の設定を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0134】

【図1】西ナイルウイルスの短縮Eタンパク質(E 1~411) (配列番号17)をコードするcDNA (配列番号16)を含む、配列番号15の配列に相当するベクタープラスミドpTRIP U3CMV-sE (WNV)の模式図である。

30

【図2】1µgのTRIP U3CMV-sE(WNV)ベクター粒子の単回腹腔内注射で免疫されたマウスからの血清のELISA及び中和アッセイによる分析を示す。

【図3】西ナイルウイルスで感染させたVERO細胞の溶解物の、1µgのTRIP U3CMV-sE(WNV)ベクター粒子で免疫にされたマウスの血清との免疫沈降を、コントロール血清との比較で表す。

【図4】腹腔内免疫され、次いで免疫後2週間で10 LD₅₀のIS-98-ST1株によるか(A)、又は免疫後4週間で100 LD₅₀のIS-98-ST1株によるか(B)のいずれかで同じ経路により攻撃されたマウスの生存曲線を表す。

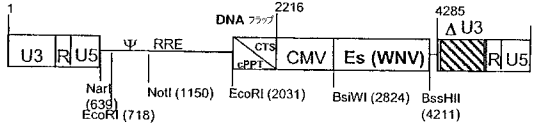
【図5】西ナイルウイルスのprM及びEタンパク質を発現する組換えレンチウイルスベクターで形質導入された真核細胞の上清からのウイルス擬似粒子の精製を示す。

40

【図6】TRIP U3.CMV-sE(WNV)ワクチン接種された129マウスからの血清中の抗WNV-sE抗体の検出を説明する。

【図7】組換えレンチウイルスベクター形質導入効率に対する加熱処理の効果のフローサイトメトリによる分析を示す。

【 図 1 】

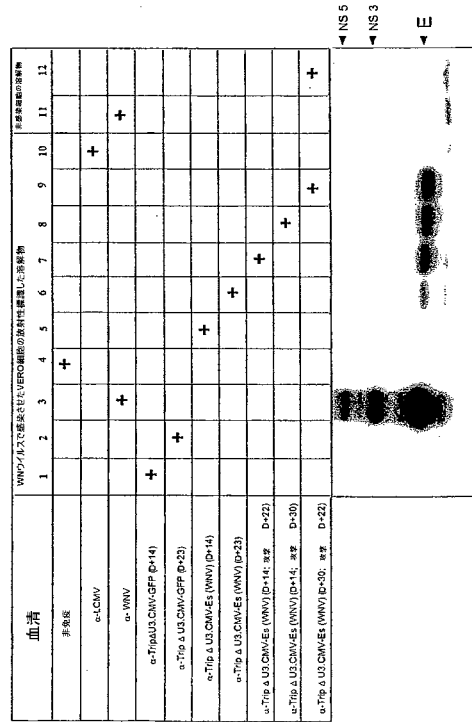


【 図 2 】

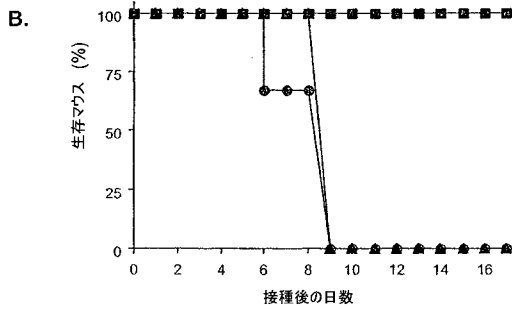
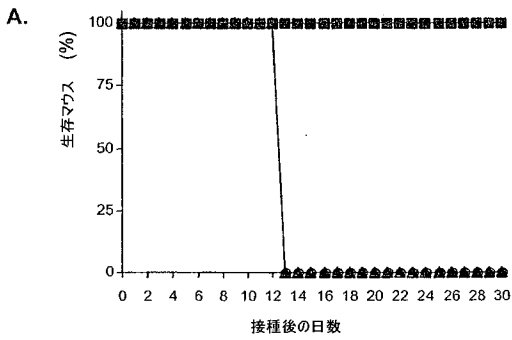
ベクター	抗-WNV ¹ 抗体力価	TNRF ₉₀ ²
TRIPAU3.CMV-GFP		
D + 14 ³	< 100	< 10
D + 23 ⁴	< 100	< 10
TRIPAU3.CMV-Es (WNV)		
D + 14 ³	10 000	10
D + 23 ⁴	20 000	20

- 1 抗原として精製 WNV ウイルスを用いる ELISA アッセイ
- 2 WNV ウイルスの感染性フォーカスの90%を中和する抗体の力価
- 3 免疫後14日で採取した血清
- 4 免疫後23日で採取した血清

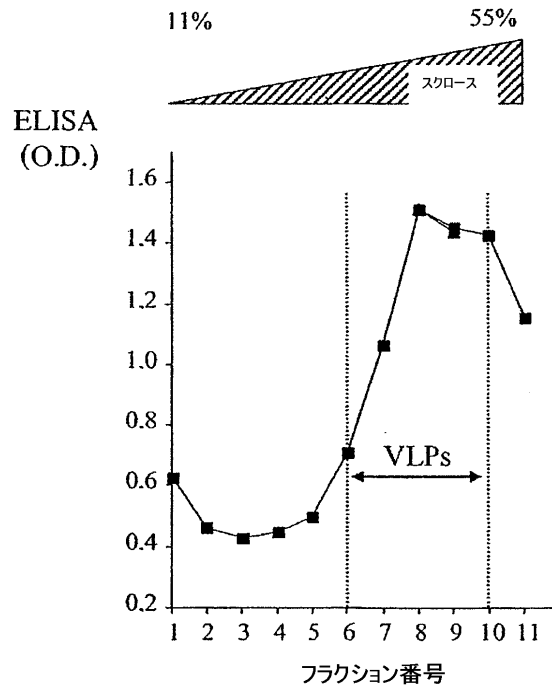
【 図 3 】



【 図 4 】

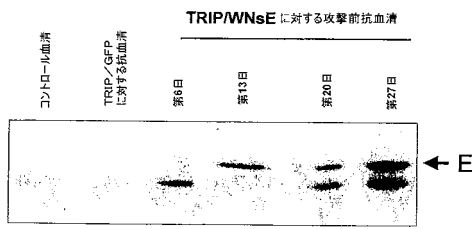


【 図 5 】

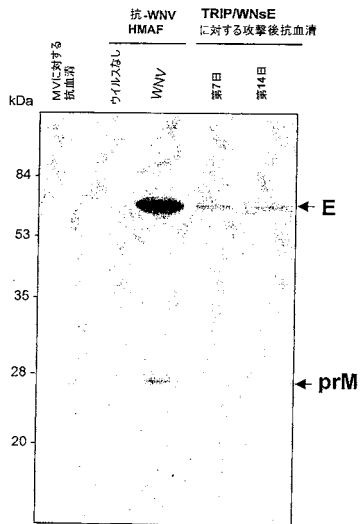


【 図 6 】

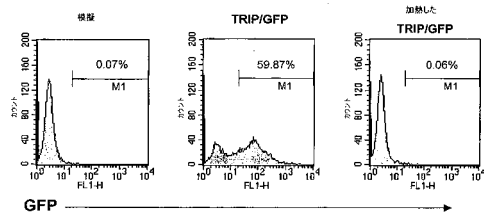
A.



B.



【 図 7 】



【 配列表 】

[2008508863000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB2005/001753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/867 C07K14/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/104611 A1 (DUBENSKY THOMAS W ET AL) 5 June 2003 (2003-06-05) paragraph '0105! ----- -/--	1,3-12, 14-16, 18,19, 23-25, 30-37
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 21 July 2005		Date of mailing of the international search report 08/08/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Didelon, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IB2005/001753

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTOSCH B ET AL: "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 197, no. 5, 3 March 2003 (2003-03-03), pages 633-642, XP002267934 ISSN: 0022-1007 abstract figure 1b	1,3-12, 14-16, 18, 23-25, 30-37
Y	EP 1 092 779 A (CT NAT DE ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 18 April 2001 (2001-04-18) the whole document en particulier revendications 27,29	1-37
Y	FR 2 777 909 A (PASTEUR INSTITUT) 29 October 1999 (1999-10-29) the whole document	1-37
Y	WO 99/55892 A (CHARNEAU PIERRE ; FIRAT HUESEYIN (FR); PASTEUR INSTITUT (FR); ZENNOU V) 4 November 1999 (1999-11-04) the whole document	1-37
Y	WO 00/75665 A (FLAMAND MARIE ; ALCON SOPHIE (FR); DEUBEL VINCENT (FR); DESPRES PHILIP) 14 December 2000 (2000-12-14) examples	1-37
Y	COLOMBAGE G ET AL: "DNA-Based and Alphavirus-Vectored Immunisation with PrM and E Proteins Elicits Long-Lived and Protective Immunity against the Flavivirus, Murray Valley Encephalitis Virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 250, no. 1, 10 October 1998 (1998-10-10), pages 151-163, XP004445627 ISSN: 0042-6822 abstract	1-37
P,X	CA 2 456 873 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ; PASTEUR INSTITUT (FR)) 26 August 2004 (2004-08-26) the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2005/001753

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003104611 A1	05-06-2003	US 2002048805 A1	25-04-2002
		AU 2329599 A	02-08-1999
		CA 2318575 A1	22-07-1999
		EP 1045921 A2	25-10-2000
		WO 9936511 A2	22-07-1999
		US 2002068354 A1	06-06-2002
EP 1092779 A	18-04-2001	EP 1092779 A1	18-04-2001
		AU 1143501 A	23-04-2001
		CA 2387182 A1	19-04-2001
		CN 1379820 A	13-11-2002
		WO 0127300 A1	19-04-2001
		EP 1222300 A1	17-07-2002
		JP 2003511080 T	25-03-2003
		US 2004081636 A1	29-04-2004
FR 2777909 A	29-10-1999	FR 2777909 A1	29-10-1999
		AU 3427299 A	16-11-1999
		CA 2326719 A1	04-11-1999
		EP 1071804 A1	31-01-2001
		WO 9955892 A1	04-11-1999
		JP 2002512804 T	08-05-2002
US 6682907 B1	27-01-2004	US 6682907 B1	27-01-2004
		FR 2777909 A1	29-10-1999
		AU 3427299 A	16-11-1999
		CA 2326719 A1	04-11-1999
		EP 1071804 A1	31-01-2001
		WO 9955892 A1	04-11-1999
JP 2002512804 T	08-05-2002	JP 2002512804 T	08-05-2002
		US 6682907 B1	27-01-2004
		FR 2777909 A1	29-10-1999
		AU 3427299 A	16-11-1999
		CA 2326719 A1	04-11-1999
		EP 1071804 A1	31-01-2001
WO 0075665 A	14-12-2000	FR 2794864 A1	15-12-2000
		FR 2794865 A1	15-12-2000
		AT 274701 T	15-09-2004
		AU 776844 B2	23-09-2004
		AU 6447400 A	28-12-2000
		BR 0011369 A	12-08-2003
		CN 1360678 A	24-07-2002
		DE 60013287 D1	30-09-2004
		EP 1190257 A1	27-03-2002
		ES 2226894 T3	01-04-2005
		WO 0075665 A1	14-12-2000
		HK 1045729 A1	18-03-2005
		JP 2003501661 T	14-01-2003
		MX PA01012662 A	19-03-2004
US 6870032 B1	22-03-2005		
ZA 200109993 A	23-08-2002		
CA 2456873 A	26-08-2004	CA 2420092 A1	26-08-2004
		CA 2432738 A1	26-08-2004
		CA 2456873 A1	26-08-2004
		WO 2004076619 A2	10-09-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2005/001753

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

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	4 C 0 8 5
A 6 1 K	35/76 (2006.01)	A 6 1 K	35/76	4 C 0 8 7
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569 Z	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z	

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

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 デスプレ, フィリップ

フランス、エフ - 9 2 2 5 0 ラ ガレンヌ - コロンブ、ブラス ド ラ リベルテ 1 8

(72)発明者 シャーニュー, ピエール

フランス、エフ - 7 5 0 0 5 パリ、ピス リュ デ エコール 6

(72)発明者 タンギー, フレデリク

フランス、エフ - 9 3 2 6 0 レ リラス、リュ ギャルド シャッセ 6 0

(72)発明者 フレンキエル, マリー - パスカル

フランス、エフ - 9 2 3 0 0 ラパロワ、リュ シャプタル 1 5

Fターム(参考) 2G045 CB30 DA12 DA13 DA36 FB02 FB03 FB04

4B024 AA01 BA32 BA33 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11 HA03 HA17

4B063 QA06 QA18 QQ07 QQ08 QQ09 QQ13 QQ79 QR76 QR77 QR78

QR79 QR80 QS36

4B064 AG32 CA05 CA10 CA11 CA12 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA57X AA87X AA95X AA95Y AA96Y AA97X AA97Y AB01 AC14 BA02

CA24 CA45 CA46

4C084 AA13 NA14 ZB332

4C085 AA03 BA51 BA87 CC08 DD62 EE01

4C087 AA01 BC83 NA14 ZB33

专利名称(译)	用于黄病毒科病毒蛋白表达的重组慢病毒载体及其作为疫苗的用途		
公开(公告)号	JP2008508863A	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2007517517	申请日	2005-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	仪器蒂蒂巴斯德 中心法国国家Shiantifiku		
[标]发明人	デスプレフィリップ シャーニューピエール タンギーフレデリク フレンキエルマリーパスカル		
发明人	デスプレ,フィリップ シャーニュー,ピエール タンギー,フレデリク フレンキエル,マリー-パスカル		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 A61K39/12 A61K35/76 A61P31/12 A61K48/00 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 A61K39/00 A61P31/14 C07K14/18 C12N15/40 C12N15/86 C12N15/867 C12Q1/70		
CPC分类号	A61K2039/53 A61P31/12 A61P31/14 C07K14/005 C12N15/86 C12N2740/16043 C12N2770/24134 Y02A50/386 Y02A50/388 Y02A50/394		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.A A61K39/12 A61K35/76 A61P31/12 A61K48/00 G01N33/569.Z G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/CB30 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 4B024 /AA01 4B024/BA32 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA17 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ07 4B063/QQ08 4B063/QQ09 4B063 /QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR76 4B063/QR77 4B063/QR78 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS36 4B064/AG32 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AA96Y 4B065 /AA97X 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/BA87 4C085/CC08 4C085 /DD62 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB33		
优先权	2004005366 2004-05-17 FR		
其他公开文献	JP2008508863A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含编码至少一个蛋白的至少8个氨基酸的免疫原性肽或黄病毒科的病毒的蛋白质，预防黄病毒科病毒感染的一个敏感的物种的多核苷酸片段的重组慢病毒载体和/或药物组合物的制造中的使用旨在用于治疗。技术领域

フラビウイルス科	NCBI アクセション番号	配列説明
フラビウイルス属	M23027	デングウイルスタイプ1のポリタンパク質の5' cDNA 配列
フラビウイルス属	M19197	デングウイルスタイプ2のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M93130	デングウイルスタイプ3のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M14931	デングウイルスタイプ4のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M12294	西ナイルウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	AF481864	西ナイルウイルスの IS-98-ST1 株のゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M18370	日本脳炎ウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	X03700	黄熱ウイルスのポリタンパク質の cDNA (ワタチン接種株 17D)
フラビウイルス属	U27495	ダニ媒介脳炎ウイルス複合体 (TBE 複合体) の Neudoerfl ウイルスのゲノムに等価な DNA
フラビウイルス属	M73835	Langat ウイルス (TBE 複合体) の構造タンパク質の cDNA
ベスチウイルス属	M31182	BVD ウイルスのゲノムに等価な DNA
ベスチウイルス属	M31768	CSF ウイルス (ブタコレラウイルス) の Brescia 株のゲノムに等価な DNA
ベスチウイルス属	J04358	CSF ウイルス (ブタコレラウイルス) の Alfort 株のゲノムに等価な DNA
ヘパシウイルス属	M62321	C 型肝炎ウイルスタイプ1 (HCV-1) のポリタンパク質の cDNA
ヘパシウイルス属	D90208	C 型肝炎ウイルスのポリタンパク質の cDNA
ヘパシウイルス属	M58335	C 型肝炎ウイルスのポリタンパク質の完全 cDNA