

(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2016-509832
(P2016-509832A)

(43) 公表日 平成28年4月4日(2016.4.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 7/01 (2006.01)	C12N 7/01	4B065
C07K 16/08 (2006.01)	C07K 16/08	4C085
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 有 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2015-558122 (P2015-558122)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月13日 (2014. 2. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月7日 (2015. 8. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/016165
 (87) 国際公開番号 WO2014/127084
 (87) 国際公開日 平成26年8月21日 (2014. 8. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/765, 204
 (32) 優先日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/800, 413
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

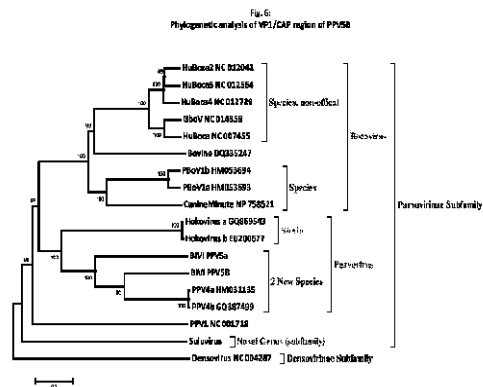
(71) 出願人 503345374
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ
 ディカ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 64506
 -2002 セント ジョセフ ノース
 ベルト ハイウェイ 2621
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プタパルボウイルス5B型、使用方法およびワクチン

(57) 【要約】

本発明は、特に家畜ブタに感染する新規プタパルボウイルス5B型 (PPV5B) の製造および使用に関連する新規ヌクレオチド配列、タンパク質配列、免疫原性組成物、ワクチンおよび方法を提供する。本組成物および方法は、前記新規ウイルスによる感染の検出、野生および家畜の動物および集団におけるウイルス配列の遺伝的変化のモニタリングならびに前記ウイルスによる感染から動物を保護するための新規ワクチンの製造および使用を提供する。前記新規ウイルスによる感染の検出、野生および家畜の動物および集団におけるウイルス配列の遺伝的変化のモニタリングならびに前記ウイルスによる感染から動物を保護するための新規ワクチンの製造および使用を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 配列番号1の核酸配列を有するポリヌクレオチド；
- b) 配列番号3または配列番号4のポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチド；
- c) 配列番号2、配列番号3または配列番号4のポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチドをコードする、配列番号1と少なくとも80%同一な核酸配列を有するポリヌクレオチド；
- d) 配列番号4をコードする少なくとも30連続ヌクレオチド配列を含む、配列番号1の核酸配列のフラグメントであるポリヌクレオチド、または
- e) 配列番号1の少なくとも30連続ヌクレオチド配列を含み、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列の免疫学的に有効な活性をコードする、配列番号1の核酸配列のフラグメント、であるポリヌクレオチド、を含む単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 2】

- a) 配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチド；
- b) 配列番号3または配列番号4と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有し、配列番号3または配列番号4によってコードされるポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチド；
- c) 配列番号3または配列番号4の少なくとも13連続アミノ酸を含む、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列のフラグメントであるポリペプチド；
- d) 配列番号3または配列番号4の少なくとも13連続アミノ酸を含み免疫学的に有効な活性を有する、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列のフラグメントであるポリペプチド；または
- e) 配列番号1のヌクレオチド2161-2860または配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列に含まれる少なくとも39ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質フラグメントであるポリペプチドを含む、単離されたポリペプチド。

20

【請求項 3】

- a) 配列番号1の核酸配列、または
- b) 配列番号3または配列番号4のポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチドをコードする、配列番号1と少なくとも80%同一な核酸配列、を含む、単離されたプタバルウイルス5B型(PPV5B)。

30

【請求項 4】

PPV5Bの弱毒非病原性型を含む、請求項3に記載のPPV5B。

【請求項 5】

請求項3に記載のPPV5Bの死滅型または弱毒型を含む、病原性PPV5Bによる感染を治療または予防するためのワクチン。

【請求項 6】

請求項3に記載のPPV5Bの死滅型または弱毒型のサブユニットを含む、病原性PPV5Bによる感染を治療または予防するためのワクチン。

40

【請求項 7】

サブユニットが配列番号4のカプシドタンパク質である、請求項6に記載のワクチン。

【請求項 8】

サブユニットが配列番号4のポリペプチドの免疫学的に有効なフラグメントである、請求項6に記載のワクチン。

【請求項 9】

請求項2に記載のポリペプチドの免疫学的有効量および薬学的もしくは獣医学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む免疫原性調製物。

【請求項 10】

50

哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項3に記載のPPV5Bの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項11】

哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項2に記載のポリペプチドの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項12】

哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項5に記載のワクチンの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項13】

哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項6に記載のワクチンの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

10

【請求項14】

哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項7に記載のワクチンの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項15】

哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する感染防御免疫を提供する、請求項10に記載の方法。

【請求項16】

哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する感染防御免疫を提供する、請求項11に記載の方法。

20

【請求項17】

哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する感染防御免疫を提供する、請求項12に記載の方法。

【請求項18】

哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する感染防御免疫を提供する、請求項13に記載の方法。

【請求項19】

哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する感染防御免疫を提供する、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

配列番号1の配列を有するブタパルボウイルス5B型ポリヌクレオチドによってコードされるPPV5Bポリペプチドに結合する単離された抗体であって、前記ポリペプチドが配列番号2、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を有し、異なるパルボウイルスによってコードされるポリペプチドに結合しない前記抗体。

30

【請求項21】

a) 請求項20に記載の抗体と生体試料とを接触させること、
b) 前記抗体とPPV5Bポリペプチドとの複合体の形成を検出すること、
を含み、
前記複合体が存在することが前記生体試料中にPPV5Bが存在することを示す、生体試料中のPPV5Bの存在を確認する方法。

40

【請求項22】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むベクターまたはプラスミド。

【請求項23】

請求項22に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項24】

請求項20に記載の抗体を発現するハイブリドーマ。

【請求項25】

生体試料中のPPV5Bの存在を確認するための診断キットであって、

a) 請求項20に記載の抗体、および

b) 前記抗体とPPV5Bポリペプチドとの複合体の形成を検出するための試薬、

50

を含む前記キット。

【請求項 26】

- a) PPV5B感染に関連する少なくとも1つの疾患に対して動物に免疫性を与えるのに有効な少なくとも1つの免疫原性PPV5Bペプチド；
- b) 少なくとも1つの担体またはアジュバント分子；
- c) 免疫原性組成物を収容するための容器；
- d) 1組の印刷した使用説明書；および
- e) 動物に免疫原性組成物を投与することができるディスペンサー、を含む、免疫原性キット。

【請求項 27】

少なくとも1つの他のブタ病原性ウイルスまたは細菌による感染に関連する疾患を引き起こす前記ウイルスまたは細菌に対して前記動物に免疫性を与えるのに有効な少なくとも1つの免疫原性タンパク質をさらに含む、請求項26に記載の免疫原性キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本願は、37 C.F.R. 1.821-1.825に従って配列表を含む。本願に付随する配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2013年3月21日に作成された前記ASCIIコピーは10-0153-WO-1-SEQ.txtという名称が付され、サイズは34,495バイトである。

【0002】

技術分野

本発明は、動物の健康の分野に属し、ワクチン接種のための弱毒株を含む新規ブタパルボウイルス株、製造方法および前記新規パルボウイルス株から得られたワクチンを用いる治療法に関する。

【背景技術】

【0003】

パルボウイルスはさまざまな動物種に感染する。パルボウイルスの一部は重篤な臨床疾患の原因となるが、これらのウイルスの大部分は軽度または無症状の感染を引き起こすに過ぎない。これらのウイルスはパルボウイルス科に属し、2つの亜科：デンソウイルス亜科(Densovirinae)(このメンバーは昆虫に感染する)およびパルボウイルス亜科(Parvovirinae)(このメンバーは脊椎動物に感染する)を形成する。後者の亜科には、現在、5つの属：ディペンドウイルス属(Dependovirus)、エリスロウイルス属(Erythrovirus)、アムドウイルス属(Amdovirus)、ボカウイルス属(Bocavirus)およびパルボウイルス属(Parvovirus)が含まれる(1)。

パルボウイルスピリオンはエンベロープを持たず、おおよそ5~6キロベース(kb)の一本鎖線状DNAゲノムを持つ。このゲノムは、非構造タンパク質およびカプシドタンパク質をコードする2つの主要なオープンリーディングフレーム(ORF)からなる。最近記述されたボカウイルスは、2つの主要なORFの間に第3のORFを持つ(1)。

【0004】

パルボウイルス属の古典的なブタパルボウイルス(PPV1)株は世界中に広く分布し、ブタ、特に、ワクチン接種プロトコルが正しく守られていないかまたは免疫抑制因子によってワクチンの有効性が低下しているブタ集団の繁殖障害の原因となっている。過去10年で、ブタにおいていくつかの新規パルボウイルスが発見された。これらには、ブタパルボウイルス2型(PPV2)(2)および関連ウイルス(3)が含まれる。ブタおよびウシのパルボウイルスの新規グループ、すなわちホコウイルス(PHoV、BHoV)が香港で確認されたが(4)、これらのウイルスはヒトPARV4および5に遺伝的に類似していることが見出された。これらのウイルスは、最初は香港にちなんでホコウイルスと名付けられたが、PHoVの新規分類としてPPV3が提案された(5)。PPV4はウシパルボウイルス2型に最も高い類似性を示すが、コードする容量およびゲノム構造はボカウイルスのものと類似している。なぜなら、PPV4は、ORF1

10

20

30

40

50

とORF2の間に位置する、ポカウイルスと同様な追加のORF3をコードしているからである。しかしながら、PPV4によってコードされる推定上のORF3タンパク質は、ポカウイルスのものとは極めて異なっている(5)。

新規ウイルスの出現に関してブタをモニタリングし、新規ウイルスのワクチン、治療方法および検出方法を開発することが継続的に求められている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、特に家畜ブタに感染する新規パルボウイルス株の製造および使用に関する新規ヌクレオチド配列、タンパク質配列、免疫原性組成物、ワクチンおよび方法を提供する。これらの株は、臨床的に罹患した家畜ブタからの組織試料において、既知のブタパルボウイルス種および株との配列相同性に基づいて同定された新規ブタパルボウイルスに関連する。この新規ウイルスは、ブタパルボウイルス5B型すなわちPPV5Bと命名された。

本発明の組成物および方法は、前記新規ウイルスによる感染の検出、野生および家畜の動物および集団におけるウイルス配列の遺伝的変化のモニタリングならびに前記ウイルスによる感染から動物を保護するための新規ワクチンの製造および使用を提供する。

本発明の免疫原性組成物およびワクチンは、配列番号1またはその免疫原性フラグメントの核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含み、場合により、より強い免疫原性応答を誘導するためのアジュバントを含む。

本発明の例示的な組成物は、配列番号2、配列番号3、配列番号4またはPPV5Bに特異的な抗体に対して免疫反応性であるそれらのフラグメントのポリペプチド配列のいずれかを含む。本発明の好ましいポリペプチドは配列番号4の配列を含む。好ましくは、これらのポリペプチドまたはそれらのフラグメントは、PPV5Bに特異的な抗体に対して免疫反応性である。

他の側面において、本発明は、1以上のポリペプチド、抗体構築物または抗体複合体をコードする核酸配列を提供する。これらのポリペプチドをコードする遺伝子配列は、配列番号1の配列、特に配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列(カプシドタンパク質)に少なくとも95%、90%、85%、またはさらには80%相同なおよび/または同一な核酸配列、または、PPV5Bに特異的な抗体に対して免疫反応性であるポリペプチドをコードする配列番号1のフラグメントに少なくとも95%、90%、85%、またはさらには80%相同なおよび/または同一な核酸配列を含む。本発明の例示的な核酸配列は、PPV5Bに特異的な抗体に対して免疫反応性であるポリペプチドをコードする、配列番号1のヌクレオチド935-2024、配列番号1のヌクレオチド2161-2860および配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列のいずれか、ならびにそれらのフラグメント、を含む。好ましくは、該核酸配列または遺伝子は、PPV5Bに特異的な抗体に対して免疫反応性であるポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列または遺伝子である。

【0006】

さらに、本明細書において、本発明のポリペプチドは、限定するものではないが、

- i) 配列番号2、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- ii) i)のポリペプチドに少なくとも80%相同なおよび/または同一なポリペプチド；
- iii) i)および/またはii)のポリペプチドのフラグメント；
- iv) 配列番号3または配列番号4の配列に含まれる少なくとも13、好ましくは15、より好ましくは17、よりさらに好ましくは20連続アミノ酸を含むiii)またはiv)のフラグメント；
- v) 配列番号1のヌクレオチド935-2024、配列番号1のヌクレオチド2161-2860または配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- vi) vi)のポリヌクレオチドに少なくとも80%相同なまたは同一なポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；
- vii) 配列番号1のヌクレオチド2161-2860または配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列に含まれる少なくとも39、好ましくは45、より好ましくは51、よりさらに好ましくは60連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質フラグメント

を含むポリペプチドを含む。

【0007】

本明細書に記載の少なくとも1以上のPPV5Bポリペプチドを含む本発明の免疫原性組成物は、さらに、生理学的に許容されるビヒクル、例えば薬学的もしくは獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせを含むことができる。

本明細書で提供されるPPV5Bポリペプチドのいずれかまたは本明細書で提供されるこれらのPPV5Bポリペプチドの1以上を含む任意の免疫原性組成物は、医薬として、好ましくはワクチンまたは免疫原性組成物として用いることができ、最も好ましくは、PPV5B感染に対する被験者の予防または治療のために用いることができる。

特に好ましいPPV5Bポリペプチドは、PPV5Bに特異的な免疫応答を誘導する免疫原性エpiteopeを有するものを含む。好ましいPPVBポリペプチドは、関連PPV1において表面抗原であることが予測されているアミノ酸配列(Simpson et al. JMB 315, 2002)を有し、限定するものではないが、配列番号4の残基289、375-381および431-443を含むものを含む。

本明細書で用いられる組成物に、生理学的に許容される公知の注射用滅菌溶液を組み込むことができることは、当業者には明らかであろう。非経口注射剤または輸液用に調製済み(ready-to-use)溶液を調製するために、水性等張溶液、例えば生理食塩水または血漿タンパク質溶液が容易に入手できる。さらに、本発明の免疫原性組成物およびワクチン組成物は、獣医学的に許容される担体、希釈剤、等張剤、安定剤またはアジュバントを含むことができる。

【0008】

本発明の方法は、限定するものではないが、被験者においてPPV5B感染に対して免疫応答を引き起こす方法であって、本明細書に規定する1以上のPPV5Bポリペプチドを含む免疫原性組成物を被験者に投与する工程を含む前記方法を含む。好ましくは、免疫応答は、PPV5Bの2以上の血清型または株に対して引き起こされる。本発明の組成物は、PPV5B感染の治療あるいは予防のために使用することができる。好ましくは、このような免疫応答は、1以上のPPV5B血清型による感染に関連するかあるいはそれによって引き起こされる1以上の臨床徴候の罹患率または重症度を低下させる。

本明細書において、適切な被験者および本発明の組成物を投与することが必要な被験者は、ウイルス、微生物、寄生体、原生動物、細菌または真菌による感染、疾患または状態の予防または治療のいずれかを必要とする動物を含む。本発明の組成物または方法の使用によって免疫応答が刺激される動物は、ブタ、ウシ、家禽(例えばニワトリ、カモ、ガチョウまたはシチメンチョウ)ヤギおよびヒツジなどの家畜類ならびにマウス、ウサギ、イヌ、ネコおよびウマなどの家畜を含む。好ましい動物は、ブタ、ネズミ、ウマ、ウサギおよびウシを含む。最も好ましくは、免疫応答はブタにおいて刺激される。

本発明はまた、PPV5B感染に関連するかあるいはそれによって引き起こされる1以上の臨床徴候の罹患率または重症度を低下させる方法であって、本明細書で提供される免疫原性組成物が投与されていない被験者に対して、PPV5B感染の臨床徴候の罹患率または重症度を、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、よりさらに好ましくは少なくとも30%、よりさらに好ましくは少なくとも50%、よりさらに好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも100%低下させるような、本明細書で提供される1以上のPPV5Bペプチドおよび好ましくは担体分子を含む本発明の免疫原性組成物を投与する工程を含む前記方法を提供する。このような臨床徴候は、PPV5Bの単独感染から生じるウイルス血症および免疫抑制を含む。このような臨床徴候は、神経徴候(うつ病、運動失調、嗜眠)、下痢、呼吸困難、身体状態喪失、関節の腫脹(跛行および横臥を生じる)、平均での1日当たりの体重増加の減少、死亡率および、他の微生物、例えばマイコプラズマ・ヒオリニス(Mycoplasma hyorhinis)による共感染によって生じる多漿膜炎を含む得る。

【0009】

さらなる側面によれば、本発明はまた、PPV5B感染を予防するための方法であって、前記PPV5B感染が、配列番号1のヌクレオチド配列に100%の配列同一性を有するPPV5B；配列番号1のヌクレオチド配列に少なくとも95%の配列同一性を有するPPV5B；配列番号1のヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列に少なくとも90%の配列同一性を有するPPV5B；または配列番号1のヌクレオチド配列に少なくとも85%の配列同一性を有するPPV5Bによって引き起こされ得る前記方法であって、本明細書によって提供される1以上のPPV5Bポリペプチド、すなわち配列番号3および/または配列番号4のポリペプチド配列またはそのフラグメントに対して、それぞれ100%、少なくとも95%、少なくとも90%および/または少なくとも85%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチド、または、配列番号3および/または配列番号4の配列に含まれる少なくとも12、好ましくは15、より好ましくは17、よりさらに好ましくは20連続アミノ酸を含む本明細書で提供される1以上のPPV5Bペプチド、を含む本発明の免疫原性組成物を投与する工程を含む前記方法に関する。

本発明はまた、本明細書で提供される免疫原性組成物のいずれかを製造する方法であって、本明細書で提供される1以上のPPV5Bペプチドと担体分子とを、好ましくは1以上のPPV5Bペプチドと担体分子とを共有結合させるか、またはお互いに抱合体（コンジュゲート）を形成する様に混合することを含む前記方法を提供する。このようなコンジュゲートは、多価または一価であることができる。多価組成物またはワクチンは、複数のPPV5Bペプチドと担体分子とのイムノコンジュゲーション(imuno-conjugation)を含む。他の側面において、本発明は、1以上のPPV5Bペプチドを製造する方法であって、宿主細胞、好ましくはE.コリ(E. coli)などの原核細胞を、本明細書で提供されるPPV5Bペプチドのいずれかをコードする核酸分子で形質転換することを含む前記方法を提供する。あるいはまた、宿主細胞は、動物細胞、昆虫細胞、原生生物細胞、植物細胞または真菌細胞などの真核細胞であることができる。好ましくは、真核細胞は、CHO、BHKもしくはCOSなどの哺乳動物細胞、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)などの真菌細胞またはSf9などの昆虫細胞である。本発明の核酸のパキユロウイルス発現もまた好ましい。

【0010】

本発明の他の側面は、PPV5Bの少なくとも1つの遺伝的変種、より好ましくはPPV5Bの2以上の遺伝的変種に対する免疫応答を誘導する1以上のPPV5Bペプチドを産生する方法を提供する。本方法は、本明細書に開示された1以上のPPV5Bペプチドをコードし発現する形質転換発現ベクターを培養することを含む。発現されたタンパク質は、発現微生物に保持されるか、または培地に分泌される。発現は、PPV5Bに対する免疫応答を誘導することができるPPV5Bペプチドを産生するのに十分な条件下で行われる。PPV5Bペプチドが免疫応答を誘導するPPV5B血清型は、限定するものではないが、少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91または90%一致する配列を含む。

本発明の組成物を製造する方法は、さらに、1以上のPPV5Bペプチドの複合体および担体分子と、生理学的に許容されるビヒクル、例えば薬学的もしくは獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせとを混合することを含むことができる。ビヒクル、アジュバントまたは組み合わせの選択は、特に、送達経路、個人的な好みおよび動物種によって決定されることは、当業者には明らかであろう。

他の側面において、本発明は、被験者のPPV5B感染を診断する方法を提供する。本方法は、1以上のPPV5Bペプチドを提供すること；被験者から得られた試料と前記1以上のPPV5Bペプチドとを接触させること；前記1以上のPPV5Bペプチドに結合することができる抗体がこの試料において検出される場合に、前記被験者がPPV5B感染を起こしていると同定すること、を含む。

他の点において、本発明は、被験者が以前にPPV5B感染に暴露され、PPV5Bに対する免疫応答を発現することができることを確かめる方法を提供する。本方法は、1以上のPPV5Bペプチドを提供すること；被験者から得られた試料と前記1以上のPPV5Bペプチドとを接触させること；前記1以上のPPV5Bペプチドに結合することができる抗体がこの試料において検出される場合に、前記被験者がPPV5B感染を起こしていたと同定すること、を含む。

【0011】

本発明はまた、1以上のPPV5Bペプチドを、好ましくは担体分子と共に含む免疫原性組成物；前記免疫原性組成物を収容するための容器；1組の印刷した使用説明書；および動物に前記免疫原性組成物を投与することができるディスペンサーを含むキットを提供する。場

10

20

30

40

50

合により、1以上のPPV5Bペプチドおよび担体分子は、コンジュゲートとしてパッケージングすることもできるし、別々の化合物としてパッケージングすることもできる。別々に供給される場合は、1以上のPPV5Bペプチドと担体分子とを複合体化する手段および適切な使用説明書もまた供給される。

本発明はまた、動物にワクチン接種するためのキットであって、1組の印刷した使用説明書；1以上のPPV5Bペプチドを含む、本明細書で提供される免疫原性組成物を動物に投与することができるディスペンサーを含む前記キットにおいて、PPV5Bペプチドの少なくとも1つが、PPV5B感染に関連する少なくとも1つの疾患に対して動物に効果的に免疫性を与える前記キットを提供する。好ましくは、1以上のPPV5Bペプチドは、本明細書で提供されるものから選択される。本発明のキットは、さらに、獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせを含むことができる。

本発明のキットにおけるディスペンサーは、その内容物を液滴として分注することができる。キットに含まれる本明細書記載のPPV5Bペプチドを含む免疫原性組成物は、動物において鼻腔内、経口、皮内または筋肉内投与されるとき、PPV5B感染の少なくとも1つの臨床徴候の重症度を低下させることができる。好ましくは、臨床徴候の重症度は、未処置の感染動物と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、よりさらに好ましい少なくとも30%、よりさらに好ましくは少なくとも50%、よりさらに好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも100%低下する。

【0012】

PPV5Bによって引き起こされる感染の治療または予防のための方法もまた開示される。本方法は、被験者に本発明の免疫原性組成物の有効量を投与することを含み、ここで前記治療または予防は、PPV5B感染の徴候を減少させること、PPV5B感染の臨床徴候の重症度または罹患率を低下させること、PPV5B感染による被験者の死亡率を低下させることおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

本発明の組成物は、さらに、獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせを含む。このような組成物は、ワクチンとして使用することができ、1以上の追加の弱毒ワクチン、不活化ワクチンまたはそれらの組み合わせを含むことができる。このようなワクチンは、ブタパルボウイルス1型、2型、3型、4型、5A型、5B型、他のブタパルボウイルス種、他のブタ病原性ウイルスおよび細菌ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される、少なくとも1つの疾患に関連するウイルスに対して防御免疫学的応答を誘発する。PPV5Bに対するワクチンと組み合わせて共投与することができる他の種類のワクチンは、限定するものではないが、ブタサーコウイルス2型(例えばIngelvac(登録商標) CircoFLEX、Ingelvac(登録商標) CircoFLEX-MycoFLEX)、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス(例えばIngelvac(登録商標) PRRS ATP、Ingelvac(登録商標) PRRSV MLV)、ブタパルボウイルス(例えばReproCyc(登録商標) PRRSV-PLE)、マイコプラズマ(Mycoplasma)(例えばIngelvac(登録商標) MycoFLEX)などを含む。

本明細書で用いられる組成物に、生理学的に許容される公知の注射可能な滅菌溶液を組み込むことができることは、当業者には明らかであろう。非経口注射または輸液用に調製済み(ready-to-use)溶液を調製するためには、水性等張溶液、例えば生理食塩水または血漿タンパク質溶液が容易に入手できる。さらに、本発明の免疫原性組成物およびワクチン組成物は、薬学的もしくは獣医学的に許容される担体、希釈剤、等張剤、安定剤またはアジュバントを含むことができる。

【0013】

本発明の方法はまた、本発明の組成物と獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせとを混合することを含むことができる。担体、アジュバントまたは組み合わせの選択は、特に、送達経路、個人的な好みおよび動物種によって決定されることは、当業者には明らかであろう。

本発明はまた、動物への組成物の投与による、動物における進行中のPPV5B感染の重症度を低下させる方法を提供する。該組成物は、許容される獣医用担体と組み合わせて、弱毒化ウイルス培養物または1以上のPPV5Bペプチドを含むことができる。

好ましい投与経路は、鼻腔内、経口(例えば飲料水での)、皮内および筋肉内を含む。筋肉内投与(最も好ましくは単一用量)が好ましい。本発明の組成物はまた、2以上の用量で投与することもでき、他の投与経路で投与することもできることは、当業者には明らかであろう。例えば、このような他の経路は、皮下、皮内、静脈内、血管内、動脈内、腹腔内、髄腔内、気管内、皮内、心臓内、乳腺葉内、脊髄内、肺内または腔内を含む。所望の治療期間および有効性に応じて、本発明に記載の組成物は、1回または数回、あるいは断続的に、例えば数日間、数週間または数ヶ月間1日単位で、異なる用量で投与することもできる。

【0014】

本発明はまた、動物にワクチン接種するためのキットであって、1組の印刷した使用説明書;動物にワクチンを投与することができるディスペンサー;および、PPV5B、他のパルボウイルス株、他の病原体および/またはそれらの組み合わせに関連する少なくとも1つの疾患に対して動物に効果的に免疫性を与える細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞培養物を含むがこれに限定されない細胞培養物からの少なくとも1つの単離物を含む前記キットを提供する。本発明のキットは、さらに、獣医学的に許容される担体、アジュバントまたはそれらの組み合わせを含むことができる。

本発明のキットにおけるディスペンサーは、その内容物を液滴として分注することができ、キットに含まれる単離物は、動物に鼻腔内、経口、皮内または筋肉内で投与されるとき、PPV5B感染の少なくとも1つの臨床徴候の重症度を低下させることができる。いくつかのキットでは、この単離物は、PPV5B感染の少なくとも1つの臨床徴候の重症度を低下させることもできる。好ましくは、臨床徴候の重症度は、未処置の感染動物と比較して少なくとも10%低下される。

【0015】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、この詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、この詳細な説明から本発明の精神および範囲内での種々の変更および改変が当業者に明らかとなるため、例示として与えられるに過ぎないことが理解されるべきである、

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の側面をさらに明らかにするために含まれる。本明細書に提示した特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせるこれらの図面の1以上を参照することにより本発明をよりよく理解することができる。本出願は少なくとも1つのカラー図面を含む。カラー図面(単数または複数)付きの本特許出願公開の複写は請求及び必要な手数料を支払うことで庁から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1-1】PPV5Bの核酸配列(配列番号1)を示す図である。

【図1-2】図1-1つづき

【図2】PPV5Bレプリカーゼのタンパク質配列(配列番号2)を示す図である。

【図3】PPV5Bオープンリーディングフレーム(ORF)タンパク質のタンパク質配列(配列番号3)を示す図である。

【図4】PPV5Bカプシドタンパク質のタンパク質配列(配列番号4)を示す図である

【図5】PPV5Bカプシドタンパク質および多数の他のウイルス配列のタンパク質配列の対比較アミノ酸同一性比較を示す図である。ウイルス配列の参考文献を表1に列挙する。

【図6】表1に列挙した他のウイルスのVP1およびカプシドタンパク質と比較した、PPV5BのVP1/CAP領域の系統発生解析を示す図である。

【図7】PPV4の最も近い関連タンパク質(GenBankアクセッション番号AFM73881(配列番号5))に対するPPV5Bカプシドタンパク質(配列番号4の残基184-851)の同一性(53%(367/690)の配列同一性)を示す図である。

【図8】PPV4の最も近い関連タンパク質(GenBankアクセッション番号ADF59557(配列番号1))に対するPPV5Bレプリカーゼタンパク質(配列番号2の残基1-594)の同一性(87%(517/597)の配列同一性)を示す図である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

表 1

配列	GenBank ID	論文誌情報	著者
[1] Bovine	DQ_335247	J. Virol. 81 (21), 12080-12085 (2007)	Qiu,J., Cheng,F., Johnson,F.B. and Pintel,D

[2] CanineMinute	NP_758521	Virology 302 (2), 219–223 (2002)	Schwartz,D., Green,B., Carmichael,L.E. and Parrish,C.R.	
[3] GboV	NC_014358	PLoS ONE 5 (7), E11948 (2010)	Kapoor,A., Mehta,N., Esper,F., Poljsak–Prijatelj,M., Quan,P.L., Qaisar,N., Delwart,E. and Lipkin,W.I	
[4] PBoV1a	HM_053693	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. and Duan,Z.J	
[5] PBoV1b	HM_053694	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. and Duan,Z.J	10
[6] HuBoca	NC_007455	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (36), 12891–12896 (2005)	Allander,T., Tammi,M.T., Eriksson,M., Bjerkner,A., Tiveljung–Lindell,A. and Andersson,B.	
[7] HuBoca2	NC_012042	J. Infect. Dis. 199 (2), 196–200 (2009)	Kapoor,A., Slikas,E., Simmonds,P., Chieochansin,T., Naeem,A., Shaukat,S., Alam,M.M., Sharif,S., Angez,M., Zaidi,S. and Delwart,E.	
[8] HuBoca3	NC_012564	PLoS Pathog. 5 (4), E1000391 (2009)	Arthur,J.L., Higgins,G.D., Davidson,G.P., Givney,R.C. and Ratcliff,R.M.	20
[9] HuBoca4	NC_012729	J. Infect. Dis. 201 (11), 1633–1643 (2010)	Kapoor,A., Simmonds,P., Slikas,E., Li,L., Bodhidatta,L., Sethabutr,O., Triki,H., Bahri,O., Oderinde,B.S., Baba,M.M., Bukbuk,D.N., Besser,J., Bartkus,J. and Delwart,E.	
[10] Dengovirus	NC_004287	DIRECT SUBMISSION TO GENBANK	Nonaka,K., Chiba,T., Nakahara,S., Kajjura,Z. and Nakagaki,M.	
[11] Hokovirus_a	GQ_869543	Virol. J. 7, 171 (2010)	Adlhoch,C., Kaiser,M., Ellerbrok,H. and Pauli,G.	30
[12] Hokovirus_b	EU_200677	J. Gen. Virol. 89 (PT 8), 1840–1848 (2008)	Lau,S.K., Woo,P.C., Tse,H., Fu,C.T., Au,W.K., Chen,X.C., Tsoi,H.W., Tsang,T.H., Chan,J.S., Tsang,D.N., Li,K.S., Tse,C.W., Ng,T.K., Tsang,O.T., Zheng,B.J., Tam,S., Chan,K.H., Zhou,B. and Yuen,K.Y.	
[13] PPV4a	HM_031135	Virol. J. 7 (1), 333 (2010)	Huang,L., Zhai,S.L., Cheung,A.K., Zhang,H.B., Long,J.X. and Yuan,S.S	
[14] PPV4b	GQ_387499	Arch. Virol. 155 (5), 801–806 (2010)	Cheung,A.K., Wu,G., Wang,D., Bayles,D.O., Lager,K.M. and Vincent,A.L.	40
[15] PPV5B				
[16] PPV1	NC_001718	Virology 197 (1), 86–98 (1993)	Bergeron,J., Menezes,J. and Tijssen,P.	

本発明は、本明細書に開示された新規ブタパルボウイルス5B型およびそのバリエーションに関連する核酸およびそのフラグメント、ポリペプチドおよびその免疫学的に有効なフラグメント、ワクチン、免疫学的に有効な製剤、抗体、診断アッセイおよびキットならびに前記組成物および製剤の製造方法および使用方法を提供する。

特記しない限り、本発明の実施には分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、タンパク

10

20

30

40

50

質化学および免疫学の慣用法を用いるが、これらは当該分野の技術の範囲内である。このような技術は文献で十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)のシリーズ; Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)を参照のこと。

本発明を詳細に説明する前に、本発明は、特定のDNA、ポリペプチド配列またはプロセスパラメータに限定されるものではなく、もちろんこれらは変化しうるものであることが理解されるべきである。本明細書で用いられる用語法は、本発明の特定の実施形態を説明するためのものにすぎず、限定することを意味するものではないこともまた理解されなければならない。本明細書および添付の特許請求の範囲においては、文脈によって明確に否定されない限り複数指示対象を含むことに注意しなければならない。従って、例えば“抗原”は2以上の抗原の混合物を含み、“賦形剤”は2以上の賦形剤の混合物を含むことなどを意味する。

【0018】

A. 定義

特記しない限り、本明細書で用いられるすべての学術用語は、出願時点での、本発明が属する当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。用語の意味および範囲は明確でなければならない。しかしながら、任意の潜在的な多義性の事象において、本明細書で提供される定義は、任意の辞書または別段の定義に優先する。さらにまた、文脈上別段の必要がなければ、単数用語は複数であることを含むこととし、複数用語は、単数であることを含むこととする。本明細書においては、別途記載のない限り、“または(or)”の使用は、“および/または”を意味する。さらにまた、用語“含んでいる(including)”ならびに“含む(includes)”および“含まれる(included)”などの他の語形の使用は限定するものではない。本明細書で言及したすべての特許および公報は、参照により本願に組み込まれる。

“疾患に対する防御”、“防御免疫”、“機能免疫”および同様な句は、疾患または感染に暴露された非免疫被験者で予想されるよりも有害作用が少ない、本発明の1以上の治療用組成物またはそれらの組み合わせの投与によって生じる疾患または状態に対する応答を意味する。すなわち、感染の有害作用の重症度は、ワクチン接種された被験者においてより低い。ワクチン接種された被験者において、感染は減少され、遅延され、そして場合により完全に予防されることができる。本明細書においては、感染の完全な予防を意味する場合は、そのことが具体的に述べられる。完全な予防と記載されていない場合、その用語は部分予防を含む。

【0019】

本明細書においては、“臨床徴候の罹患率および/または重症度の低下”または“臨床症状の減少”は、限定するものではないが、ある群における感染した被験者数の減少、感染の臨床徴候を示す被験者数の減少もしくは低下または、野生型感染と比較して1以上の被験者に存在する任意の臨床徴候の重症度の低下を意味する。例えば、それは、任意の病原体負荷、病原体排出の減少、病原体伝播の減少または、PPV5B感染を示す任意の臨床徴候の減少を指す。好ましくは、これらの臨床徴候は、本発明の治療用組成物が投与される1以上の被験者において、本組成物が投与されず感染する被験者と比較して少なくとも10%減少される。より好ましくは、臨床徴候は、本発明の組成物が投与される被験者において、少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、よりさら

に好ましくは少なくとも50%減少される。

本明細書においては、用語“ 防御の増強 ”は、限定するものではないが、被験者のワクチン接種群における、被験者のワクチン非接種対照群に対する、感染性病原体、好ましくはPPV5Bによる感染に関連する1以上の臨床症状の有意な減少を意味する。用語“ 臨床症状の有意な減少 ”は、限定するものではないが、感染性病原体のチャレンジ後に、被験者のワクチン接種群における少なくとも1つの臨床症状の罹患率が、ワクチン非接種対照群よりも、少なくとも10%、好ましくは20%、より好ましくは30%、よりさらに好ましくは50%、よりさらに好ましくは70%低いことを意味する。

“ 長期持続性防御 ”は、少なくとも3週間、より好ましくは少なくとも3ヶ月間、よりさらに好ましくは少なくとも6ヶ月間持続する “ 有効性の改善 ” を指すものとする。家畜の場合は、動物が食肉として市場で売られる平均年齢までその長期持続性防御が持続することが最も好ましい。

【 0 0 2 0 】

“ 免疫原性組成物または免疫学的組成物 ”とは、宿主において、その組成物に対する細胞性または抗体性免疫応答での免疫応答を誘導する少なくとも1つのPPV5Bタンパク質もしくはポリペプチドまたはそれらの免疫原性部分を含む組成物または物質のことを言う。本発明の好ましい実施形態において、免疫原性組成物は免疫応答を誘導する。より好ましくは、免疫原性組成物は、PPV5B感染の臨床徴候の1以上に対して感染防御免疫を与える。

本明細書において、“ 免疫原性 ” PPV5Bポリペプチドまたは “ 抗原 ”とは、本明細書に記載されるように免疫応答を誘発するポリペプチドまたはタンパク質を指す。“ 免疫原性 ” PPV5Bタンパク質またはポリペプチドは、本明細書において同定されたコード配列のいずれかの完全長配列またはそのアナログもしくは免疫原性フラグメントを含む。用語 “ 免疫原性フラグメント ” または “ 免疫原性部分 ”とは、1以上のエピトープを含み、それによって本明細書に記載の免疫応答を誘発するPPV5Bタンパク質のアミノ酸配列のフラグメントまたは短縮型および/もしくは置換型のことをいう。一般に、このような短縮型および/もしくは置換型またはフラグメントは、完全長タンパク質、例えばカプシドタンパク質からの少なくとも13連続アミノ酸を含むかまたはコードする。より好ましくは、短縮型もしくは置換型またはフラグメントは、完全長タンパク質、例えばカプシドタンパク質からの少なくとも15、より好ましくは少なくとも17、よりさらに好ましくは少なくとも20、よりさらに好ましくは30連続アミノ酸を含む。

【 0 0 2 1 】

用語 “ エピトープ ”とは、免疫系、特に抗体、B細胞またはT細胞によって認識される物（例えばタンパク質またはポリペプチド）のセグメントまたはフラグメントを意味する。本発明において、エピトープは、一般に、ウイルスタンパク質のポリペプチド配列のフラグメント(単数または複数)である。

このようなフラグメントは、当該分野で公知の任意の数のエピトープマッピング技術を用いて同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey を参照のこと。例えば、線状エピトープは、例えば、固体担体上にタンパク質分子の一部に対応する多数のペプチドを同時に合成し、ペプチドが担体上に接着している間にペプチドと抗体を反応させることによって決定することができる。このような技術は当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号;Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; and Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715 に記載されている。同様に、コンホメーションエピトープは、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴によってアミノ酸の空間的コンホメーションを決定することによって容易に同定される。例えば、前出のエピトープマッピングプロトコル(Epitope Mapping Protocols)を参照のこと。合成抗原、例えば、ポリエピトープ、隣接エピトープおよび、他の組換えによってまたは合成的に誘導された抗原もまた定義に含まれる。例えば、Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408

10

20

30

40

50

;およびGardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998 を参照のこと(これらの教示および内容は、すべて参照により本願に組み込まれる)。

【0022】

”免疫応答”または”免疫学的応答”は、限定するものではないが、対象とする組成物またはワクチンに対する細胞性および/または抗体性免疫応答の発生を意味する。通例、免疫応答または免疫学的応答は、限定するものではないが、以下の効果の1以上を含む:対象とする組成物またはワクチンに含まれる抗原(単数または複数)に特異的に指向性を示す抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞および/または細胞傷害性T細胞の産生または活性化。好ましくは、宿主は、新規感染に対する耐性が増強されるように、および/または疾患の臨床的重症度が低下されるような治療または防御免疫学的(記憶)応答のいずれかを示す。このような防御は、症状数の減少、症状の重症度または、病原体の感染と関連する症状の1以上の欠如、ウイルス血症の開始の遅延、ウイルス持続感染の減少、全ウイルス量の減少および/またはウイルス排出の減少で証明される。

本明細書においては、”特異的免疫反応性”とは、PPV5B感染に特徴的な抗原は認識するが、厳密なチャレンジ対照に特徴的な抗原には反応しない免疫反応性タンパク質またはポリペプチドのことをいう。潜在的PPV5B免疫反応性タンパク質または他のポリペプチドの特異性を決定するために、種々のイムノアッセイ(ELISA、IFA、ウエスタンブロット)を用いて、遺伝的に類似したウイルスを含む動物血清に対してタンパク質を試験する。これらのタンパク質はまた、発現方法(パキユロウイルス、Sf9細胞など)に関連するタンパク質を含む物質に対する種々のイムノアッセイにおいて試験される。

【0023】

本明細書において、”薬学的または獣医学的に許容される担体”または”賦形剤”は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、アジュバント、安定化剤、希釈剤、防腐薬、抗菌剤および抗真菌薬、等張剤、吸着遅延剤などを含む。いくつかの好ましい実施形態、特に凍結乾燥免疫原性組成物を含む実施形態において、本発明に使用する安定化剤は、凍結乾燥またはフリーズドライのための安定剤を含む。

いくつかの実施形態において、本発明の免疫原性組成物はアジュバントを含む。本明細書において、”アジュバント”は、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム、サポニン、例えばQuil A、QS-21(Cambridge Biotech社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)、GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals社、バーミンガム、アラバマ州)、油中水型乳剤、水中油型乳剤、水中油中水型乳剤を含むことができる。乳剤は、特に、軽質流動パラフィン油(欧州薬局方タイプ);イソプレノイド油、例えばスクアランまたはスクアレン;アルケン、特にイソプテンまたはデセンのオリゴマー化によって得られるオイル;直鎖アルキル基を含む酸またはアルコールのエステル、より具体的には植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコールジ(カプリラート/カブラート)、グリセリルトリ(カプリラート/カブラート)またはプロピレングリコールジオレアート;分枝鎖脂肪酸またはアルコールのエステル、特にイソステアリン酸エステルに基づくことができる。これらのオイルは、乳剤を形成させるために、乳化剤と組み合わせて用いられる。乳化剤は、好ましくは非イオン性界面活性剤であり、特にソルビタン、マンニド(例えばアンヒドロマンニトールオレアート)、グリコール、ポリグリセロール、プロピレングリコールとオレイン酸、イソステアリン酸、リシノール酸またはヒドロキシステアリン酸とのエステル(これらは場合によりエトキシ化されている)ならびにポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレン共重合体ブロック、特にプルロニック製品、特にL121である。Hunter et al., The Theory and Practical Application of Adjuvants (Ed.Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp51-94 (1995)およびTodd et al., Vaccine 15:564-570 (1997) を参照のこと。例示的なアジュバントは、”Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach”(M. Powell and M. Newman編), Plenum Press, 1995 の147ページに記載されているSPT乳剤および同書の183ページに記載されている乳剤MF59である。

【0024】

10

20

30

40

50

アジュバントのさらなる例は、アクリル酸またはメタクリル酸のポリマーおよび、無水マレイン酸とアルケニル誘導体の共重合体から選択される化合物である。好都合なアジュバント化合物は、特に糖またはポリアルコールのポリアルケニルエーテルで架橋されたアクリル酸またはメタクリル酸のポリマーである。これらの化合物は、カルボマー (Phameur opa Vol. 8, No. 2, June 1996) という用語で知られている。当業者は、少なくとも3、好ましくは8以下のヒドロキシル基を有し、その少なくとも3つのヒドロキシルの水素原子が、少なくとも2炭素原子を有する不飽和脂肪族ラジカルによって置換されているポリヒドロキシル化合物で架橋されたアクリルポリマーを記載している米国特許第2,909,462号を指摘することもできる。好ましいラジカルは、2~4炭素原子を含むラジカルであり、例えばビニル、アリルおよび他のエチレン性不飽和基である。不飽和ラジカルは、それ自身、他の置換基、例えばメチルを含むことができる。カルボボル (Carbopol); (BF Goodrich社、オハイオ州、米国) の名称で販売されている製品は特に適切である。カルボボルは、アリルスクロースまたはアリルペンタエリスリトールで架橋されている。それらの中では、カルボボル974P、934Pおよび971Pを挙げることができる。カルボボル971Pの使用が最も好ましい。無水マレイン酸とアルケニル誘導体との共重合体の中では、無水マレイン酸とエチレンとの共重合体である共重合体EMA (Monsanto社) がある。これらのポリマーは水への溶出によって酸溶液を生じるため、免疫原性組成物、免疫学的組成物またはワクチン組成物自身が組み込まれるアジュバント溶液を提供するために、この溶液は好ましくは生理学的なpHに中和される。

10

さらなる適切なアジュバントは、限定するものではないが、とりわけ、リビアジュバントシステム (Ribi社)、ブロック共重合体 (CytRx社、アトランタ、ジョージア州)、SAF-M (Chiron社、エメリービル、カリフォルニア州)、モノホスホリル脂質A、アブリジン脂質-アミンアジュバント、E. コリ (E. coli) 由来 (組換え他) の熱不安定性エンテロトキシン、コレラ毒素、IMS 1314もしくはムラミルジペプチドまたは天然に存在するサイトカイン、組換えサイトカインまたはそれらのアナログまたは内因性サイトカイン放出の刺激薬を含む。

20

【0025】

アジュバントは、1用量当たり約100 μg ~ 約10mgの量で、好ましくは1用量当たり約100 μg ~ 約10mgの量で、より好ましくは1用量当たり約500 μg ~ 約5mgの量で、よりさらに好ましくは1用量当たり約750 μg ~ 約2.5mgの量で、最も好ましくは1用量当たり約1mgの量で加えることができることが期待される。あるいは、アジュバントは、最終製品の容量パーセントで、約0.01 ~ 50%の濃度で、好ましくは約2% ~ 30%の濃度で、より好ましくは約5% ~ 25%の濃度で、よりさらに好ましくは約7% ~ 22%の濃度で、最も好ましくは10% ~ 20%の濃度であることができる。

30

”希釈剤”は、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールなどを含むことができる。等張剤は、特に、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトールおよびラクトースを含むことができる。安定剤は、特に、アルブミンおよびエチレンジアミン四酢酸のアルカリ塩を含む。

【0026】

”単離された”とは、その天然状態から”人間の手によって”変えられたことを意味する。すなわち、それが天然に存在する場合、それはその元の環境から変えられたかまたはそこから除去されたことあるいはその両方を意味する。例えば、生体中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは”単離された”ポリヌクレオチドまたはポリペプチドではないが、その天然状態から共存する物質を分離した同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書で用いられる用語では”単離された”ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。

40

”安全性”とは、生ウイルスベースワクチンのビルレンスへの復帰可能性、臨床的に重要な副作用、例えば持続性全身疾患またはワクチン投与部位における許容できない炎症を含むがこれらに限定されない、ワクチン接種後のワクチン接種動物における有害な結果が存在しないことを言う。

50

本明細書において、用語「ワクチン接種」もしくは「ワクチン接種する」またはそれらの異形は、限定するものではないが、動物に投与された場合に、PPV5Bに対する動物の免疫応答を誘発する、または誘発することができる本発明の免疫原性組成物の投与を含むプロセスを意味する。

本発明との関係において、「死亡率」とは、PPV5B感染および/またはPPV5B感染によって増強された他の微生物との共感染によって引き起こされる死のことをいい、その感染が重篤なため苦痛を予防し人道的な死を与えるために動物を安楽死させる場合を含む。

【0027】

「弱毒化」は、病原体の病原性を低下させることを意味する。本発明において、「弱毒化」は「非病原性の(avirulent)」と同義である。本発明において、弱毒化ウイルスは、病原性が低下され、それによってPPV5B感染の臨床徴候を引き起こさずに標的哺乳動物において免疫応答を誘導することができるウイルスであるが、それはまた、非弱毒PPV5Bに感染し、弱毒化ウイルスを投与されていない動物の「対照群」と比較して、弱毒化PPV5Bに感染した動物の臨床徴候の罹患率または重症度が低下されていることを意味することもできる。ここでは、用語「低下する/低下される」は、上記で定義した対照群と比較しての少なくとも10%、好ましくは25%、よりさらに好ましくは50%、よりさらに好ましくは60%、よりさらに好ましくは70%、よりさらに好ましくは80%、よりさらに好ましくは90%、最も好ましくは100%の低下を意味する。従って、弱毒非病原性PPV5B株は、改変生PPV5Bウイルスを含む免疫原性組成物に組み込むのに適した株である。

「死滅」または「不活化」は、PPV5Bウイルスを殺すおよび/または別な方法で複製できないようにする物理薬剤または化学薬剤で処理することを意味する。PPV5Bは、慣用法、例えば、加熱、放射線または紫外線の存在下でのソラレンなどによって死滅させることができる。PPV5Bは、慣用法、例えば、限定するものではないが、パイナリーエチレンイミン(BEI)、 β -プロピオラクトン、ホルマリン、グルタルアルデヒドおよび/またはドデシル硫酸ナトリウムの1以上を含む1以上の化学不活化剤を用いる化学的不活化によって不活化することができる。これらの毒性株を弱毒化する方法および不活化ウイルス調製物を製造する方法は当該技術分野で公知であり、例えば米国特許第4,567,042号および第4,567,043号に記載されている。従って、本発明のワクチン組成物に使用するためのPPV5Bからの抗原は、特に、改変および/または弱毒生ウイルス調製物または死滅もしくは不活化ウイルス調製物である全ウイルスの形態であることができる。

【0028】

本明細書において、「抗体」は、抗PPV5B抗体、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ブタ抗体ならびに、本発明のPPV5Bポリペプチドを特異的に認識するCDR配列を含む化合物を含むCDR移植抗体を含む。用語「に特異的な」とは、本発明の抗体の可変領域が、もっぱらPPV5Bポリペプチドを認識してそれに結合し(すなわち、ポリペプチドのファミリーにおいて見出される配列同一性、相同性または類似性にもかかわらず、関連ポリペプチドからただ1つのPPV5Bポリペプチドを区別することができる)、抗体の可変領域の外部の配列、特に抗体分子の定常領域における配列との相互作用によって、他のタンパク質(例えば、S.アウレウス(S.aureus)のプロテインAまたはELISA技術における他の抗体)と相互作用することが(場合により)可能なことを示す。本発明の抗体の結合特異性を決定するためのスクリーニングアッセイは公知であり、当該技術分野でルーチンに実施される。このようなアッセイの総合的な議論に関しては、Harlow et al. (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6* を参照のこと。フラグメントが由来する本発明のPPV5Bポリペプチドに(上記で定義された通り)優先的かつ第1に特異的であるという条件で、本発明のPPV5Bポリペプチドのフラグメントを認識および結合する抗体もまた考えられる。明確にするために、「抗体」とは、特異抗原への免疫応答の結果としてその抗原に結合することができる免疫グロブリン分子のことをいう。免疫グロブリンは、「定常」領域および「可変」領域を有する「軽」および「重」ポリペプチド鎖から構成される血清タンパク質であり、定常領域の組成に基づいて複数のクラス(例え

10

20

30

40

50

ばIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM)に分類される。抗体は、例えばas、Fv、Fab'、F(ab')₂および一本鎖をも含む種々の形態で存在することができ、1以上の抗体の一本鎖ポリペプチド配列の全部または一部を含む合成ポリペプチドを含む。

【0029】

本明細書においては、“有効用量”は、限定するものではないが、抗原が投与される動物において臨床症状の減少を引き起こす免疫応答を誘発するかまたはそれを誘発することができる抗原の量を意味する。

本明細書において、用語“有効量”は、組成物との関係において、動物の疾患の罹患率を減少させるかまたは感染の重症度を低下させる免疫応答を誘導することができる免疫原性組成物の量を意味する。特に、1用量または等価物当たりのプラーク形成単位(PFU)数によって測定される弱毒生ウイルス調製物の有効量は、50%組織培養感染量(TCID₅₀)、すなわち接種した感受性細胞培養物の50%において病理学的変化を生じる病原体の量によってモニターされる。死滅ワクチンまたは抗原性サブユニットに関しては、有効量は、相対抗原量(RAC)、すなわち有効量当たりの抗原の組み入れレベルのことをいう。あるいは、治療剤との関係において、用語“有効量”は、疾患または障害の進行を予防し、疾患または障害の軽減を引き起こし、疾患もしくは障害またはそれらの1以上の症状の重症度または持続期間を低減または改善し、疾患または障害の進行を予防し、疾患または障害の退縮を引き起こし、疾患または障害に関連する1以上の症状の再発、発生、開始または進行を予防するかまたは他の治療もしくは治療薬の予防もしくは治療を促進または改善するのに十分な治療剤の量のことを言う。

【0030】

当該技術分野で公知の“配列同一性”とは、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列、すなわち参照配列とその参照配列と比較される所定の配列との間の関係のことをいう。配列同一性は、最も高い配列類似度が生じるように配列を最適にアラインメントした後に参照配列と所定の配列とを比較することによって決定されるが、これは、必要に応じてギャップを挿入し、このような配列の文字列間でマッチングさせることによって決定される。このようなアラインメントにおいて、配列同一性は位置毎に確認される。例えば、特定の位置においてヌクレオチドまたはアミノ酸残基が同一である場合、その位置における配列は“同一”である。次いで、このような位置の一致の総数を参照配列におけるヌクレオチドまたは残基の総数で割ることによって%配列同一性を得る。配列同一性は、Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991);およびCarillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)に記載されている方法を含むがこれらに限定されない公知の方法によって容易に算出することができる(これらの教示は参照により本願に組み込まれる)。配列同一性を決定するための好ましい方法は、検査される配列間でマッチングが最大になるように設計される。配列同一性を決定する方法は、所定の配列間で配列同一性を決定するための公表されているコンピュータプログラムに体系化されている。このようなプログラムの例には、限定するものではないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTNおよびBLASTX(Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)が含まれる。BLASTXプログラムはNCBI及び他のソースから公表されている(BLAST Manual, S. Altschul et al. NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894; S.F. Altschul et al. J Molec Biol 1990, 215:403-410(これらの教示は参照により本願に組み込まれる))。これらのプログラムは、所定の配列と参照配列との間の最高レベルの配列同一性を得るために、デフォルトギャップ重みを用いて配列を最適にアラインメントする。例として、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば85

10

20

30

40

50

%、好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%の”配列同一性”を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、所定のポリヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチド当たり15まで、好ましくは10まで、よりさらに好ましくは5までの点突然変異を含むことができるという条件下で、所定のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であるものとする。すなわち、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも85%、好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%の同一性を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにおいては、参照配列におけるヌクレオチドの15%まで、好ましくは10%、よりさらに好ましくは5%が欠失しているかもしくは他のヌクレオチドによって置換されていることもできるし、参照配列における全ヌクレオチドの15%まで、好ましくは10%、よりさらに好ましくは5%のヌクレオチド数が参照配列に挿入されていることもできる。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置に存在することもできるし、これらの末端位置の間の任意の位置に、参照配列中のヌクレオチド中に個々に分散してまたは参照配列内に1以上の連続するグループで存在することができる。同様に、参照アミノ酸配列に対して少なくとも、例えば、85%、好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%の配列同一性を有する所定のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、所定のポリペプチド配列が、参照アミノ酸配列の各100アミノ酸当たり、15まで、好ましくは10まで、よりさらに好ましくは5つまでのアミノ酸改変を含むことができるという条件下で、ポリペプチドの所定のアミノ酸配列と同一であるものとする。参照アミノ酸配列と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%の配列同一性を有する或るポリペプチドを得るために、参照配列中のアミノ酸残基の15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までが欠失若しくは別のヌクレオチドで置換されるか、又は参照配列中のアミノ酸残基総数の15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までの数のアミノ酸が参照配列中に挿入される。すなわち、参照アミノ酸配列に対して少なくとも85%、好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%の配列同一性を有する所定のポリペプチド配列を得るために、参照配列におけるアミノ酸残基の15%まで、好ましくは10%まで、よりさらに好ましくは5%までが、欠失しているかもしくは他のアミノ酸によって置換されていることもできるし、参照配列における全アミノ酸の15%まで、好ましくは10%、よりさらに好ましくは5%のアミノ酸数が参照配列に挿入されていることもできる。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ末端またはカルボキシ末端位置に存在することもできるし、これらの末端位置の間の任意の位置に、参照配列中のアミノ酸中に個々に分散してまたは参照配列内に1以上の連続するグループで存在することができる。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって相異なる。しかしながら、保存的置換は、配列同一性を決定する場合にはマッチングに含まれない。

【0031】

本明細書において、”配列相同性”とは、2つの配列の関連性を決定する方法のことをいう。配列相同性を決定するために、2以上の配列が最適にアラインメントされ、必要に応じてギャップが挿入される。しかしながら、”配列同一性”と対照的に、配列相同性を決定する場合、保存的アミノ酸置換もまたマッチングとして数えられる。言い換えると、参照配列と95%の配列相同性を有するポリペプチドを得るためには、参照配列におけるアミノ酸残基の85%、好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%がマッチングするか、または他のアミノ酸による保存的置換を含まなければならない、または、保存的置換を含まない、参照配列における全アミノ酸残基の15%まで、好ましくは10%まで、よりさらに好ましくは5%までのアミノ酸数が参照配列に挿入されることができる。好ましくは、相同配列は、相同なアミノ酸をコードする、少なくとも50ヌクレオチド、よりさらに好ましくは100ヌクレオチド、よりさらに好ましくは250ヌクレオチド、よりさらに好ましくは500ヌクレオチドのストレッチを含む。

”保存的置換”とは、サイズ、疎水性などを含む類似した特徴または特性を有することによって、全体の機能が顕著には変化しないような、他のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換のことをいう。これはまた、保存的アミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換も意味することができる。

【 0 0 3 2 】

B. 担体分子

本発明のPPV5Bタンパク質またはペプチドとコンジュゲートさせるかまたは共有結合させることができる担体分子は、好ましくは前述の担体分子である。動物用の好ましい担体はウシ血清アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニンである。好ましくは、担体タンパク質自体が免疫原である。

本発明のPPV5Bタンパク質またはペプチドは、当業者に公知の任意の便利な方法によって担体に共有結合させることができる。Schneerson et al, J. Experimental Medicine, 152, 361-376 (1980) に記載されているアジピン酸ジヒドラジドなどの対称リンカーまたは、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate as described by Fattom et al, Infection and Immunity, 56, 2292-2298 (1988) に記載されているN-スクシンイミジル3-(2-ピリジリジチオ)プロピオネートなどのヘテロ二官能性リンカーの使用は本発明の範囲内であるが、任意のリンカーの使用を避け、代わりに本発明のPPV5Bペプチドを直接的に担体分子にカップリングさせることが好ましい。このようなカップリングは、Landi et al J. Immunology, 127, 1011-1019 (1981) に記載されている還元的アミノ化によって達成することができる。

10

【 0 0 3 3 】

平均分子量によって定義される免疫原性組成物のサイズは一定ではなく、選択されたPPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)および、PPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)の担体へのカップリング法によって左右される。従って、それは1,000ダルトン(10^3)程度であることもできるし、 10^6 ダルトンを超えることもできる。還元的アミノ化カップリング法による場合、PPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)の分子量は、通例、5,000~500,000以上の範囲内である。例えば、配列番号4のカプシドタンパク質に関しては、分子量はおおよそ101,000ダルトンであると予測され、これは60単量体タンパク質で構成されるウイルス様粒子(VLP)を形成すると予測される。

20

担体分子、すなわちペプチド、誘導体およびそのアナログならびに、本発明のPPV5Bタンパク質またはペプチドに特異的に結合するペプチドミメティックは、限定するものではないが、固相合成または溶液合成(Nakanishi et al., 1993, Gene 137:51-56; Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 15:2149-2154; Neurath, H. et al., Eds., The Proteins, Vol II, 3d Ed., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976)(参照によってその全体が本願に組み込まれる))を含む当該技術分野で公知の種々の方法によって製造することができる。

30

本発明のPPV5Bタンパク質もしくはペプチドまたは本発明の抗体もしくはその結合部分は、医薬担体または獣医担体を含む希釈剤による溶液または懸濁液による注射剤で投与することができる。

【 0 0 3 4 】

このような分子の安全性と有効性は、Center for Veterinary Biologics (CVB)によって記載され規制されている細胞培養物または実験動物における標準的方法によって決定される。このような分子の毒性および治療効果は、例えばLD₅₀(集団の50%致死用量)を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的薬学的方法によって決定することができる。

40

本発明のワクチンは多価または一価であることができる。多価ワクチンは、複数のPPV5Bタンパク質またはペプチドと担体分子のイムノコンジュゲーションによって製造される。

一側面において、PPV5Bタンパク質またはペプチド組成物は、好ましくは免疫増強剤および生理学的に許容されるビヒクルと共に免疫原性コンジュゲートの有効免疫量を含む。本文脈では、“免疫増強剤”は、特異抗原と組み合わせたの特定の増強効果であれ、単に免疫応答の1以上のエレメントの活性に対する独立した効果であれ、免疫系の活性を増強する能力を有する任意の化合物または組成物を含むこととする。免疫増強化合物は、限定

50

するものではないが、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウム；界面活性剤、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール；ポリアニオン；ペプチド；オイルエマルジョン；アラムおよびMDPを含む。これらの物質を利用する方法は当該技術分野で公知であり、所定のワクチンのための刺激薬の最適量を決定することは、当業者の能力の範囲内である。所定の製剤に2以上の免疫増強剤を用いることができる。免疫原は、リボソームに組み込むこともできるし、ワクチン製剤に使用するための多糖および/または他のポリマーにコンジュゲートさせることもできる。

本組成物は、必要に応じて、活性成分を含む1以上の単位用量を含むことができるパックまたはディスペンサー装置で提供することができる。該パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはホイルを含むことができる。該パックまたはディスペンサー装置は、投与、好ましくは哺乳動物、特にブタへの投与のための使用説明書を添えることができる。

【0035】

C. アジュバント

本明細書で提供される1以上のPPV5Bタンパク質またはペプチドを含む免疫原性組成物の免疫原性をさらに増強させるために、1以上のアジュバントを含むこともできる。

アジュバントは、前述の技術または当該技術分野で公知の技術のいずれかで精製されることができる。好ましい精製技術は、W. Clark Still et al, J. Organic Chemistry, 43, 2923-2925 (1978)に記載されているシリカゲルクロマトグラフィーであり、特に"フラッシュ"(迅速)クロマトグラフ技術である。しかしながら、HPLCを含む他のクロマトグラフ法をアジュバントの精製に用いることができる。アジュバントを精製するために結晶化を用いることもできる。ある場合には、合成によって分析グレードの製品が直接に得られるので精製は必要ではない。

本発明のワクチン組成物は、アジュバント添加組成物(adjuvanted composition)を製造するための公知の技術に従って適切な滅菌条件下でPPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)とアジュバントとを物理的に混合することによって製造される。PPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)とアジュバントとの複合体形成は、長鎖アルキル化合物アジュバント上に存在する正電荷に静電的に誘引されるコンジュゲート上の負の正味電荷の存在によって促進される。

【0036】

D. 生理学的に許容されるビヒクル

本発明のワクチン組成物は、他の医薬ポリペプチド組成物に用いる技術と同様な技術を用いて製剤化することができる。従って、アジュバントおよびPPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)(好ましくは担体分子にコンジュゲートされたおよび/またはアジュバントと混合された)は、凍結乾燥形で保存し、投与前に生理学的に許容されるビヒクルで再構成させて懸濁液を調製することができる。あるいはまた、アジュバントおよびコンジュゲートは、ビヒクル中で保存することもできる。好ましいビヒクルは滅菌溶液であり、特に、滅菌緩衝液、例えばリン酸緩衝化生理食塩水である。免疫原性組成物の免疫学的有効性が改善される、ビヒクル中でアジュバントとコンジュゲートを混合する任意の方法が適切である。

本発明のワクチンの単一用量の体積は変えることができるが、一般に、従来のワクチンで一般に用いられる範囲内である。単一用量の体積は、上記のコンジュゲートおよびアジュバントの濃度で、好ましくは約0.1ml~約3ml、好ましくは約0.2ml~約1.5ml、より好ましくは約1.0mlである。

本発明のワクチン組成物は、任意の便利な手段で投与することができる。

【0037】

E. 処方物

PPV5Bの1以上の血清型に対する予防接種のために、担体分子に結合されたPPV5Bタンパク質(単数または複数)またはペプチド(単数または複数)を含む免疫原性コンジュゲートをワクチンとして用いることができる。生理学的に許容されるビヒクル中に免疫原性コンジ

10

20

30

40

50

ュゲートを含むワクチンは、PPV5Bによる感染の治療または予防のために、動物、好ましくはブタに免疫性を与える方法に有用である。

免疫原性コンジュゲートを用いる予防接種によって本発明の免疫原性コンジュゲートに対して生じた抗体は、PPV5Bの感染を治療または予防するための受動免疫療法および抗イディオタイプ抗体の生成に用いることができる。

本組成物が投与される被験者は、好ましくは、限定するものではないが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、家禽(例えばニワトリ)、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラットを含む動物であり、最も好ましくはブタである。

本発明の製剤は、1以上の免疫原性組成物の有効免疫量またはそれに対する抗体および生理学的に許容されるピヒクルを含む。ワクチンは、1以上の免疫原性組成物の有効免疫量および生理学的に許容されるピヒクルを含む。この製剤は、投与方法に適したものでなければならない。

10

本免疫原性組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝化剤を含むこともできる。免疫原性組成物は、液体溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、ピル、カプセル、持続放出製剤または粉末であることができる。経口製剤は、標準的な担体、例えば医薬品グレードのマニトール、ラクトース、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、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含むことができる。

【0038】

F. 有効量

本明細書に記載の化合物は、PPV5B関連疾患を治療するために、治療的有效量で被験者に投与することができる。この用量は、ワクチンが投与される宿主ばかりでなく、その宿主の要素、例えばサイズ、体重および年齢にも左右される。

20

処方物に用いられる本発明の免疫原性コンジュゲートまたは抗体の正確な量は、投与経路および被験者の性質(例えば種、年齢、サイズ、疾患の病期/レベル)によって決まり、標準的な臨床技術に従って、医師の判断および各被験者の環境に従って決定されなければならない。有効免疫量は、被験者のPPV5B感染を治療または予防するのに十分な量である。有効量は、動物モデル試験系から導かれる用量反応曲線から外挿することもでき、0.1mg/kgから20mg/kgまで、好ましくは1mg/kgから10mg/kgまで様々であることができる。

組成物の免疫原性は、当該技術分野で公知の任意のイムノアッセイの使用により組成物での予防接種後に被験者の免疫応答をモニタリングすることによって決定することができる。液性(抗体)応答および/または細胞媒介免疫の生成は、免疫応答の徴候で確かめることができる。対象は、動物、例えばブタ、マウス、ハムスター、イヌ、ネコ、ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジならびに家禽(例えばニワトリ、カモ、ガチョウおよびシチメンチョウ)を含むことができる。

30

【0039】

対象の免疫応答は、種々のアプローチ、例えば、公知の技術、例えば、酵素免疫抗体法(ELISA)、イムノプロット、免疫沈降などによりアッセイされる、得られた免疫血清の免疫原性コンジュゲートに対する反応性;または病原体による感染からの免疫宿主の防御および/または、感染病原体レベルをアッセイするための当該技術分野で公知の任意の方法、例えば定量PCR、ウイルス単離もしくは当該技術分野で公知の他の技術によって測定される、免疫宿主における病原体による感染の症状の減少によって分析することができる。感染病原体レベルは、免疫グロブリンが指向される抗原のレベルを測定することによっても測定することができる。感染病原体レベルの低下または感染の症状の改善は、組成物が有効であることを示す。

40

動物におけるin vivoでの使用の前に、所望の治療または予防効果に関して本発明の治療薬をin vitroで試験することができる。例えば、特定の治療剤が必要であるかどうかを決定するために使用することができるin vitroアッセイは、細胞株からの適切な細胞または、特定の疾患または障害を有する被験者から培養された細胞に治療剤が暴露されるかまたは他の方法で投与され、その治療剤の前記細胞に対する効果が観察されるin vitro細胞培養アッセイを含む。

50

あるいは、治療剤は、感染病原体による感染に感受性が高いが感染病原体に感染していない(対象または培養細胞株のいずれかから培養された)細胞にその治療剤を接触させ、感染病原体にこの細胞を暴露し、次いで、その治療剤に接触された細胞の感染率がその治療剤に接触されなかった細胞の感染率よりも低いかどうかを測定することによってアッセイされることができる。感染病原体による細胞の感染は、当該技術分野で公知の任意の方法によってアッセイされることができる。

【0040】

さらに、治療の前、最中または後に、適切な時間間隔で、動物モデル対象において抗体が指向される分子のレベルを測定することによって治療剤をアッセイすることができる。該分子の量の変化の有り無しは、対象に対する治療剤の効果によって見出し、関連づけることができる。該分子のレベルは、当該技術分野で公知の任意の方法によって測定することができる。

10

本発明の方法および組成物を用いる、PPV5Bに対する動物のワクチン接種後に、当該技術分野で公知の任意の結合アッセイを用いて、得られた抗体と特定の分子との結合を評価することができる。これらのアッセイは、特定の抗原に対する、より高い親和性または特異性を示す抗体を選択するために行うこともできる。

【0041】

G. 検出および診断法

天然PPV5B、弱毒化ウイルス、本発明のタンパク質またはペプチドの使用から得られる抗体またはその結合部分は、試料中のPPV5Bの存在を検出するのに有用である。この検出法は、天然PPV5B、弱毒化ウイルス、本発明のタンパク質またはペプチドに対して作られた単離された抗体またはその結合部分を提供する工程、前記単離された抗体またはその結合部分に、PPV5Bウイルスをある量含むことが疑われる試料を加える工程、および、PPV5Bウイルスに結合した前記単離された抗体またはその結合部分を含む複合体の存在を検出する工程を含む。

20

本発明の抗体またはその結合部分は、試料中のPPV5Bタンパク質またはペプチドの存在を検出するのにも有用である。この検出法は、天然PPV5B、弱毒化ウイルス、タンパク質またはペプチドに対して作られた単離された抗体またはその結合部分を提供する工程、前記単離された抗体またはその結合部分にPPV5Bタンパク質またはペプチドのある量を含むことが疑われる試料を加える工程、および、PPV5Bタンパク質またはペプチドに結合している前記単離された抗体またはその結合部分を含む複合体の存在を検出する工程を含む。

30

結合ペアのメンバーの1つである特定の分子に結合する免疫グロブリン、特に抗体(およびその機能的に活性なフラグメント)は、本明細書に記載されるように、診断および予測に用いることができる。種々の実施形態において、本発明は、結合ペアのメンバーの1つの測定法および臨床応用におけるこのような測定法の使用を提供する。本発明における免疫グロブリンは、例えば生体試料中の抗原の検出に用いることができ、それによって、対象は、その免疫グロブリンが結合する分子の異常なレベルおよび/またはこのような分子の異常形の存在に関して試験されることができる。"異常なレベル"とは、疾患を有さない対象またはその身体の一部からの類似した試料中に存在するレベルかまたはそれに存在する代表的な標準レベルに対して増加または減少していることを意味する。本発明の抗体はまた、診断または予測技術に使用するためのキット中に試薬として含まれることもできる。

40

【0042】

一側面において、PPV5Bの天然もしくは弱毒化ウイルス、タンパク質またはペプチドに免疫特異的に結合する本発明の抗体は、PPV5B感染の診断、予測またはスクリーニングに用いることができる。

他の側面において、本発明は、対象において対象由来の試料に対する抗体の免疫特異的結合レベルを測定することを含む、PPV5B感染の存在またはこれに対する免疫を診断またはスクリーニングする方法であって、前記抗体がPPV5Bタンパク質またはペプチドに免疫特異的に結合し、感染病原体を有さない対象からの類似した試料における前記免疫特異的

50

結合レベルに対する前記免疫特異的結合レベルの増加がPPV5Bの存在を示す前記方法を提供する。

PPV5Bペプチドまたはそのアンタゴニストの存在を検出するための適切なアッセイの例は、限定するものではないが、ELISA、ラジオイムノアッセイ、ゲル内拡散沈降反応アッセイ、免疫拡散法アッセイ、凝集アッセイ、蛍光性イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイまたは免疫電気泳動アッセイを含む。

特定の分子のイムノアッセイは、一般的には、検出可能に標識した抗体の存在下で、試料、例えば生体液、組織抽出物、新たに採取した細胞または培養細胞溶解物をインキュベートし、当該技術分野で公知のいくつかの技術のいずれかによって結合抗体を検出することを含む。

当業者は、ルーチン試験を用いることによって各測定のための適切かつ最適のアッセイ条件を決定することができるであろう。

本発明のさらなる側面は、PPV5Bの検出または測定のための診断キットに関する。1以上の容器に抗PPV5B抗体および、場合によりこの抗体に対する標識された結合パートナーを含む診断用途のためのキットが提供される。あるいは、抗PPV5B抗体を(検出可能なマーカー、例えば化学発光、酵素、蛍光性または放射性部分で)標識することもできる。従って、本発明は、抗PPV5B抗体および対照免疫グロブリンを含む診断キットを提供する。特定の実施形態において、容器の前述の化合物の1つは検出可能に標識されていることができる。キットは、場合により、標準品または対照として使用するために、キットの抗体によって認識されるPPV5Bウイルス、タンパク質またはペプチドの所定量を容器内にさらに含むことができる。

【0043】

H. 対象への投与

【0044】

投与経路は、限定するものではないが鼻腔内、経口(例えば飲料水で)、皮内および筋肉内を含む。筋肉内投与が特に好ましい。本発明の組成物は、1または2以上の用量で投与することもできるし、他の投与経路で投与することもできることは、当業者には明らかであろう。例えば、このような他の経路は、皮下、皮内、静脈内、血管内、動脈内、腹腔内、髄腔内、気管内、心臓内、乳腺葉内、脊髄内、肺内および腔内を含む。治療の所望の持続期間および有効性に依じて、本発明の組成物は、1回または数回、また断続的に、例えば毎日、数日間、数週間または数か月間、種々の用量で投与することができる。

本発明の好ましい実施形態を明らかにするために以下の実施例が含まれる。以下の実施例に開示された技術は、本発明の実施が十分に機能するように本発明者によって見出された技術を表し、従ってその実施のための好ましい方法を構成するとみなすことができることは、当業者には明らかであろう。しかしながら、本開示を考慮すれば、開示された特定の実施形態において多くの変更が可能であり、なお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様な結果が得られることは、当業者には明らかであろう。

本願は、“Porcine Parvovirus 5A, Methods of Use and Vaccine”と題して2012年12月17日に提出された出願(米国出願番号第61/738,110号)に関連する(参照により、その内容の全体が本願に組み込まれる)。

【0045】

実施例

材料および方法

材料源: 異常な集団発生の調査から入手した3頭のブタからの組織ホモジネート。この飼育場での臨床歴は、休息時に見られ移動時に悪化する全身の筋振戦を有する200ポンドのブタに関するものであった。獣医臨床検査室における大規模な試験を行ったが、ウイルス病原体(顕微鏡的病変に基づく)が示唆されたものの、病原体X(非豚コレラウイルス関連ペスチウイルス)の同定には至らなかった。その後、これらの動物におけるCNS徴候の基礎原因の決定を助けるために、本発明者らに試料が提供された。

DNAおよびタンパク質解析: 感染ブタからの試料のDNA解析は、454 Life Sciences社(ブ

10

20

30

40

50

ランフォード、コネティカット州)製のハイスループット配列決定("454技術")を用いて Operon社(ハンツヴィル、アラバマ州)が行った。核酸を保護しているウイルス粒子のヌクレアーゼ処理によってウイルス配列を試料から富化し、次いで抽出、ランダム増幅およびハイスループット配列決定を行った。これらは、一般に、Victoria et. al PLoS pathogen 2008 Sep 26;4(9):e1000163 の記載に従って行った。

得られた配列は、初めに、BLASTx分析によって、パルボウイルス科ファミリーの異なるメンバーであることが特徴づけられた。Sequencherソフトウェアを用いて配列をアセンブルし、これらのDNA解析結果とターゲットシーケンシング(targeted sequencing)を組み合わせ、配列番号1のDNA配列を得た。これは、PPV5Bと名付けられた、このウイルスの推定上の完全コード配列である。Sequencherソフトウェアを用いるDNA配列のさらなる解析によって、ウイルスレプリカーゼ(配列番号2)、オープンリーディングフレーム"ORF3"(配列番号3)およびウイルスカプシドタンパク質(配列番号4)を含む、他のパルボウイルス種で見出されるコード領域に対応する3つの推定上のコード領域が同定された。

10

【実施例1】

【0046】

新規ウイルスの同定

異なる状態からの2頭の非血縁ブタの肺ホモジネート試料において、454技術(ウイルスメタゲノミクス)によってDNA配列が同定された。BLASTnおよびBLASTx解析によって、ブタパルボウイルス4型に対してレプリカーゼ遺伝子(REP)の保存された領域において最大67%のヌクレオチドが一致するという最も近い一致が明らかになったが、そのカプシド(CAP)コード領域は、ヌクレオチドレベルでは識別できるマッチングが認められなかった。タンパク質レベルでは、推定上のレプリカーゼタンパク質は、~60%のアミノ酸同一性を示し、カプシドタンパク質は、~50%の同一性を示した。このウイルスは、新種としてブタパルボウイルス5B型(PPV5B)と命名された。このカプシドコード配列に基づいて特異的プライマーを開発した。組織および病理学的/臨床的特徴が類似したホモジネートのPCRベースのスクリーニングによって、試料の~16%においてこの病原体の存在が明らかとなった。スクリーニングされた組織に関連する臨床徴候およびウイルス学データに基づいて、他のいくつかのウイルス病原体および臨床病理学/組織病理学との間で統計的に有意な関連が見られた。

20

【実施例2】

【0047】

新規パルボウイルスとしてのPPV5Bの同定および系統樹解析

複数の既知ウイルス種の推定上のレプリカーゼ(REP)およびカプシド(VP1/CAP)タンパク質の両方の対比較アミノ酸同一性を図5に示す。最も近い種であるPPV4に対するPPV5BのREPおよびCAPの両方の配列同一性(それぞれ~90%/65%)は、新種としてのPPV5Bの名称を支持している。

30

系統発生解析(図6)は、CAPタンパク質の保存された領域に基づいて、このウイルスがパルボウイルス科パルボウイルス属に属する新種であることを明らかにしている。保存されたREPタンパク質配列を用いても同様な結果が得られる(図示せず)。

【実施例3】

【0048】

疾患の原因病原体としてのPPV5Bの確認

ウイルスを増幅させ、新規パルボウイルスとPRRSVとの共感染が臨床呼吸徴候の増加をもたらすかどうかを決定する試みにおいて、PPV5B感染CDCDブタからの脳ホモジネートを用いて、帝王切開で作出し、初乳を摂取していない(cesarean-derived colostrum-deprived)(CDCD)動物に接種した。この研究において、新規パルボウイルスを含む組織ホモジネートを接種した群において、予想外の高い死亡率(20~22%)が認められ、カプシドコード領域を標的とするPPV5B特異的PCRを用いたとき、血清中に高力価のPPV5Bが同定された。次いで、臨床徴候を再現するために、この研究における動物1頭からの組織を用いてCDCDブタにチャレンジした。この研究において、感染動物の大部分で高力価のウイルス血症を

40

50

伴う全身性感染が認められた。PPV5Bを含む接種物を投与した群においては、高い死亡率(20%)、跛行、1日当たりの平均体重増加の低下、発熱ならびに肉眼的および顕微鏡的病変が認められた。

【実施例4】

【0049】

PPV5Bの培養、単離、および精製

滅菌した乳鉢および乳棒を用いてPCR陽性組織(例えば脾臓、脳、肺、腸など)の小切片をすり砕く。HEPES緩衝液および抗生物質を含む5~10mlの改変EMEMにすり砕いた組織を再懸濁し、清澄化して大きな組織の塊を除去する。上清を採取し、順次種々のフィルターを通過させて、細菌を含むより大きな粒子の大部分を除去する。さらに、PCR陽性動物から

10

の便試料懸濁液および血清もまた、ウイルス単離のために順次濾過によって処理する。濾液の希釈液をトリプシンで処理するか未処理のままにし、特定の温度で6ウェルプレート中で樹立細胞培養物および初代細胞培養物に吸着させる。接種物を吸引し、新しい維持培地2mlで置き換える。次いで、このプレートを33~37℃、5%CO₂雰囲気中でインキュベートし、モック(単純培地)接種した対照と比較して、細胞変性効果、例えば細胞円形化、細胞-細胞融合、脱落、細胞クラスタリングなどに関して毎日観察する。PCRによってウイルス増殖/単離に関して潜在的陽性ウェルをスクリーニングする。

ウイルスの単離に有用である樹立細胞株には、特に、ST(ブタ精巣)、SK6(ブタ腎臓)、BHK-21(新生仔ハムスター腎臓)、VIDO R1(胎児ブタ網膜)、PK-15NADC(ブタ腎臓)、PK/WRL(ブタ腎臓)、HRT-180(ヒト大腸腺癌)、Hep2(ヒト上皮)、Vero(アフリカミドリザル腎臓)およびRK-13(ウサギ腎臓)が含まれた。

20

本プロセスに有用な初代細胞培養物には、特に、乳児期ブタ肺、腎臓、精巣、気管および腸培養物が含まれる。

ウイルスが単離されたので、このウイルスを複数ラウンドのブランク精製または限界希釈で精製し、大量に増幅し、動物実験のための保存株を作成する。

【実施例5】

【0050】

不活化ウイルスおよびワクチンの調製

2~15mMのBEIの存在下、より好ましくは約10mMのBEIの存在下、約35~39℃で不活化が行われる。不活化は、少なくとも24時間、最大24~72時間行われる。次いで、溶液中の不活化剤を中和する薬剤の相当量、例えばチオ硫酸ナトリウムの相当量が添加される。不活化ウイルス調製物は、当該技術分野で公知の方法に従って、例えばPreuss, T., et al., Comparison of Two Different Methods for Inactivation of Viruses in Serum, CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, (1997), 504-508 またはBahnmann, H.G., Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine, VACCINE, (1990), 299-303 の開示に従って調製される。不活化ウイルスが調製されれば、その材料は、最終ワクチン製剤のための担体調製物と混合される。

30

【実施例6】

【0051】

弱毒化ウイルスおよびワクチンの調製

弱毒化ウイルス調製物は、当該技術分野で公知の方法に従って調製され、例えばVaccine Protocols, 2nd edition; Robinson, Husdon, Cranage, eds, Humana Press 2003 の開示に従って調製される。例えば、"野生型ウイルスは、組織培養/動物宿主において、ビルレンスの消失と免疫原性の保持の間で許容されるバランスに到達するまで多数回継代接種される..."

40

弱毒化ウイルスは、複数ラウンドのブランク精製または限界希釈によって精製される。培養材料の特異性を決定するために、PCRアッセイ、ディープシーケンシングまたは免疫蛍光法アッセイが用いられる。

精製された弱毒化ウイルス調製物と担体調製物を混合することによって弱毒化ウイルス

50

ワクチンが調製される。

【実施例7】

【0052】

カプシドタンパク質を含むサブユニットワクチンの調製

配列番号4のカプシドタンパク質は、種々のタンパク質発現系においてクローン化された配列番号4またはそのフラグメントの発現によって調製された。

バキュロウイルス発現：配列番号4のPPV5Bカプシドタンパク質は、一般に、Kost et al. (6), 2012 に開示された方法に従ってバキュロウイルス発現系で発現された。該タンパク質は、最初の精製時に不溶性フラクション内に少量見出された。収率および溶解性を増加させる方法は、限定するものではないが、代替緩衝液条件(例えば尿素またはグアニジン塩酸塩)、代替結合および精製条件(例えばコバルトもしくはニッケルアフィニティカラム、アニオンもしくは陽イオン交換カラム)または代替発現条件(例えば温度、時間、代替細胞株)の使用を含む。

10

【0053】

細菌発現：配列番号4のPPV5Bカプシドタンパク質は、一般に、EMD Chemicals Inc. Nova gen User Protocol TB184 に開示された方法に従って細菌発現系で発現された。この方法には、生成されたタンパク質の精製を容易にするために、細菌ベクター(EMD Chemicals Inc., 2011 (7))に含まれる固有のHisタグの添加を含めた。細菌によって発現されたHisタグ付きカプシドタンパク質は、一般に、GE Healthcare, 2012 (8) に開示された方法に従って精製され、得られた生成物は、実施例8の記載に従って、PPV5B特異的抗体を生成させるために用いた。

20

弱毒化サブユニットワクチンは、精製されたカプシドタンパク質調製物と担体調製物とを混合することによって調製した。

【実施例8】

【0054】

PPV5Bに特異的に結合する抗体の調製

PPV5Bに特異的に結合する抗体は、PPV5Bウイルスの抗原性調製物またはカプシド(配列番号4)タンパク質もしくはそのフラグメントのサブユニットタンパク質調製物でウサギを免疫することにより調製される。PPV5B抗原に結合するポリクローナル抗体に関して、接種したウサギの血清試料がスクリーニングされる。抗原に対する抗体を産生することが決定された、接種したマウスからの脾臓を骨髓腫細胞と融合させハイブリドーマを作成する。次いで、PPV5B抗原への結合に関してハイブリドーマをスクリーニングする。

30

ポリクローナル抗体：カスタム抗体作製サービス(Rockland Antibodies and Assays社；ギルバートビル、ペンシルベニア州)において、2頭のニュージーランド白ウサギに免疫性を与えるために、実施例7に従って製造した、細菌により発現したHisタグ付きカプシドタンパク質を用いた。D0、D7、D14およびD28において、抗原およそ100 µg/ウサギでウサギを免疫した。D0およびD7の接種に関しては動物の皮内に接種し、D14およびD28の接種に関しては皮下に投与した。最初の接種には完全フロイントアジュバントを用い、その後の接種には不完全フロイントアジュバントを用いた。免疫化の前および免疫化38日および45日後に、両方のウサギから血清試料を採取した。

40

Rockland Antibodies and Assays社が、抗PPV5B特異性に関してポリクローナル抗体調製物をスクリーニングした。免疫蛍光アッセイ(IFA)、ウェスタンブロットおよび酵素免疫測定法(ELISA)によって、精製されたまたは部分精製されたPPV5Bタンパク質に対する結合特異性を有する抗体が製造された。各アッセイの特異性のパラメータは次のとおりである：ウェスタンブロット特異性は予測される79.0kDaサイズのタンパク質の検出によって測定し、IFA特異性は非感染細胞との比較によって測定し、ELISA特異性は、関連性のないタンパク質を用いコーティングプレートによって測定した。

【0055】

モノクローナル抗体：カスタム抗体作製サービス(Rockland Antibodies and Assays社；ギルバートビル、ペンシルベニア州)において、実施例7に従って調製したHisタグ付きバ

50

キウウイルス発現カプシドタンパク質をBalb/cマウスにおけるモノクローナル抗体作成のために用いる。カスタム抗体産生施設によって設計された標準プロトコルに従って種々のPPV5B抗原性調製物でマウスを免疫する。接種後の免疫応答は、カスタム抗体産生施設によってモニターされ、ハイブリドーマの作成のために抗体候補が選択される。モノクローナル抗体を作成するための標準プロトコルは当該技術分野で公知であり、例えば、Gabriele et al. (9), p.117-135 の開示に従って作成される。

Gabriele et al. (9), p.117-135で開示されている標準プロトコルに従って、PPV5B抗原に対する抗体を産生することが決定された接種したマウスから採取した脾臓細胞と増殖期までハイブリドーマ培地中で培養したB細胞腫瘍細胞を混合することによってハイブリドーマを作成する。ハイブリドーマの融合および培養後、PPV5B抗原に対する結合に関してハイブリドーマをスクリーニングし、抗PPV5Bを産生するハイブリドーマを選択する。Gabriele et al. (9), p.209-232 に開示されている標準プロトコルに従って、ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体をアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製する。

PPV5Bに特異的な高親和性抗体が同定され、それらが結合するエピトープの決定、他の関連ウイルス種に対するその抗体の特異性を含めてさらに特性決定され、当業者に公知の免疫学上の技術、例えばELISA、ウエスタンブロット分析およびエピトープマッピング(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey)を用いて、PPV5Bウイルス抗原(単数または複数)に対して高い特異性を有する適切な高親和性抗体が選択される。

【実施例 9】

【0056】

PPV5Bの診断アッセイ

ELISAアッセイ:実施例8に従って調製した抗体を、ELISA法を用いる生体試料中のPPV5Bの測定に用いる。このアッセイは次のとおりに行う。

配列番号4のカプシドタンパク質から選択したコーティング抗原をコーティング緩衝液(0.05M炭酸-重炭酸緩衝液;pH9.6)に希釈し、最終濃度0.25ng/ μ lを得る。プレート(High protein binding 96-well ELISA plates Phenixカタログ番号MPG-655061)を、50 μ l/wウェルのコーティング抗原でコーティングする。プレートをシールし、37 °Cで1時間または4時間で終夜インキュベートする。コーティング溶液を除去し、プレートを200 μ l/ウェルのPBST(1X PBS+0.05%ツイーン20)で3回洗浄する。プレートを300 μ l/ウェルのブロッキング溶液(脱脂粉乳0.5%w/v / PBS)でコーティングし、シールし、37 °Cで1時間インキュベートする。ブロッキング溶液を除去し、プレートを200 μ l/ウェルのPBSTで3回洗浄する。試料をブロッキング溶液で1:100に希釈し、プレートに100 μ l/ウェルの血清試料を加える。プレートをシールし、37 °Cで1時間インキュベートする。血清試料を除去し、プレートを200 μ l/ウェルのPBSTで3回洗浄する。二次抗体(HRP標識ヤギ抗ブタIgG(H+L);Jackson Immuno-Research 114-035-003)をブロッキング溶液で1:10,000に希釈し、100 μ l/ウェルでプレートをコーティングするために用いる。プレートをシールし、37 °Cで1時間インキュベートする。二次抗体を除去し、プレートを200 μ l/ウェルのPBSTで3回洗浄する。プレートを50 μ l/ウェルのTMB(3,5,3',5'-テトラメチルベンジジン;KPLカタログ番号53-00-01)でコーティングする。プレートを室温、暗所でおおよそ10分間インキュベートする。プレートを50 μ l/ウェルの停止液(2M H₂SO₄;KPLカタログ番号50-85-04)でコーティングする。吸光度を450nmで読む。

【0057】

PCRアッセイ:PPV5BのためのゲルベースPCRおよびqPCRアッセイを最適化した。これらのアッセイは次のとおりに行う: qPCRアッセイに関しては、各反応物は以下の試薬を加えることによって調製される: 2X SsoFast probe supermix (BioRad社、カタログ番号172-5233)10 μ l/反応物、DPC処理水5 μ l/反応物、濃度6 μ Mのフォワードプライマー(ACC AGA GA A CAG GCG ACA T:配列番号6)1 μ l/反応物、濃度6 μ Mのリバースプライマー(AAA CAC CTG ATG GGA CCA TAA T:配列番号7)1 μ l/反応物、濃度4 μ Mのプローブ(6-FAM/ACT CAA CAG CC

A GGA CCG AGA ACA CAG GAA/BHQ_1:配列番号8)1 μ l/反応物および抽出されたDNA2 μ l/反応物。反応は、T100サーマルサイクラー(Bio-Rad社)で、1サイクルを95 °Cで2分間行い、次いで40サイクルを以下の2つの温度：95 °Cで5秒間、続いて60 °Cで5秒間行う。CFX96光イメージングシステム(Bio-Rad社)を用いてデータを読む。ゲルベースアッセイに関しては、以下の試薬を加えることによって各反応物を調製する：2X AmpliTaq Gold Mastermix(Applied Biosystems社、カタログ番号4302758)12.5 μ l/反応物、DPC処理水8.0 μ l/反応物、濃度10 μ Mのフォワードプライマー(CCA GAT TTA CAT TTT GAG CAG CTA ACA CAG TAC:配列番号9)1.25 μ l/反応物、濃度10 μ Mのリバースプライマー(GGA TAT AAG CCC AAA TCT GAG ACT CTA G:配列番号10)1.25 μ l/反応物および抽出されたDNA2 μ l/反応物。反応は、T100サーマルサイクラー(Bio-Rad社)で、1サイクルを95 °Cで5分間行い、次いで40サイクルを以下の温度：95 °Cで30秒間、60 °Cで30秒間、72 °Cで45秒間、次いで72 °Cで10分間最後の伸長反応を行う。

10

【実施例10】

【0058】

ブタにおけるPPV5Bワクチンの有効性の評価

少なくとも1つのPPV5Bタンパク質またはポリペプチド(原型PPV5Bワクチン)を含むもののブタにおける有効性を評価するために、3群に無作為化した5週齢の帝王切開で作出し、初乳を摂取していない(CDCD)動物を用いて無作為化試験(表2参照)を行う。試験日0(D0)およびD14において、組成物またはプラセボ(リン酸緩衝化生理食塩水;PBS)を用いて動物にワクチン接種する。PPV5Bを含むことが知られている材料でD28に動物にチャレンジする。臨床観察、直腸温、体重測定および採血をモニターする。D56において、肉眼的病変を評価するために動物を剖検する。ワクチン接種された動物とワクチン接種されていない動物の間でパーセント死亡率、ウイルス血症(力価および持続期間)、セロコンバージョン(力価および持続期間)ならびに臨床徴候を統計的に比較することによってPPV5Bワクチンの有効性を決定する。

20

【0059】

表2

群番号	群	N	部屋	ワクチン接種	チャレンジ
1	PPV5B-Vx	10	1および2	PPV5B原型	する
2	PBS-Vx	10	1および2	PBS	する
3	厳密な対照	5	3	なし	しない

30

【0060】

本明細書において開示および請求されているすべての組成物および方法は、過度の実験を要することなく本開示を考慮して製造し実施することができる。好ましい実施形態を参照して本発明の組成物および方法について説明してきたが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の組成物および方法ならびにその方法の工程または工程の順序に変更が可能であることは当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的に関連する特定の薬剤は、本明細書に記載の薬剤と置き換えても同一または同様な結果が得られるであろうことは明らかであろう。当業者には明らかでないすべてのこのような類似した代替物および改変は、以下の特許請求の範囲で定義される本発明の精神、範囲および概念の範囲内であるとみなされる。

40

【0061】

参考文献

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- (1) Cságola A, et al., Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. Arch Virol. Jun; 157(6):1003-10 (2012).
- (2) Hijikata M, et al., Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. Jpn J Infect Dis 54:244-245 (2001).
- (3) Wang F, et al., Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. Virus Genes 41:305-308 (2010).
- (4) Lau SK, et al., Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. J Gen Virol 89:1840-1848 (2008).
- (5) Cheung AK, et al., Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. Arch Virol 155(5):801-806 (2010).
- (6) Kost et al., Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors, Trends in Biotechnology, 20, 173-180, Apr. 2002. cited by other .
- (7) EMD Chemicals Inc. 2011. Xa/LIC Kits, User Protocol TB184.
- (8) GE Healthcare. Recombinant Protein Purification Handbook. 18-1142-75.
- (9) Gabriele et al. (eds.), Antibody Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2012, vol. 901, chapter 7.

10

20

【 図 1 - 1 】

FIG. 1: PPV5BのDNA配列

PPV5B_Reference: 935..2024
 遺伝子 /label=" 予想されるレプリカーゼ"
 2161..2860
 遺伝子 /label=" 未知の機能の予測される遺伝子/ORF"
 2861..5014
 遺伝子 /label=" 予想されるカプシド"
 配列:

```

GCTTCAAGTCTAATTAATTCGATATTTATGCAAAAGGGAAGTTAACCTGATTGGTCAAGTTTTT
GGCGGGAAGCAATTTGATGGACGGCACTCAAGTCCTAAITTTGCAATGACGTGGACCAATCAGA
ATTGAGTACATATATATAGGAGGCCAAAAGAGGAAGTTTGTCAATTTGCGTTTTGGAGACCA
TCGCGAGCAGAAGTCCGTCGTTTTGCGGCTGATTTGAAGATGGAAACCTACTGGACAGGATTT
CGAGACTTTTTCTGATGTTTTAAANAATACCTGGTGTTTATGAAGGACGCTATATTTTTGAAAGT
CCGTTTTCTACACAGAGCTTTAAGAAATGGCCGTGATATATTTCAAAATGAAAANAATAATGAAAA
CTGTGAGTCTGGCGGGCCGCTGGCGGCGCCGCGGATGAAATTGACAGTAATCTAGTACCGGCTG
TTAGACAAGGGGAGGCTCTATTTAGAGAGCTTCAAAAAGAACTTAGAAAATCCTGTAGATTAGGA
GTAGATCTGGCTTTTTCATGCAATTTGGAAAGAGTTGACTCAAAAGGTGGCTTACATTTGCAATG
GTGTGTCTGTGTCGCGTGGTCCCGCGAGAGTTTTAACATATTTCAAAAATACAGAAAATAA
AAGTTTTCAATTAATACCTTTGCTGTGAGGGACTTACTTTTTTGTCCACACAAAATAAACAC
GGACGCTGGAAGAAGCAGATGAGAGGTTTTATTAATATTTGCTTAAAAAATCAGCACTGAA
AGATGCTTTATGCAATGGACTACAAATGGAGGTACAAATAGGTGAGGCTGTTTTAAATACAGAAA
AAGAAAAGAACTATGATAATATGACAGAACTCCAGCACTTATGAAAGATTTATCTGCTCCATG
TACAAATGTGCCACTGGGAAAAGATGCTTAGACTTTGACAGTGGTGGTGGACAAATATTTG
TCTGATGATGAGAGTGGGAGGAAAGATGCTTAAGCTTATCACTCATTTCTGACCAACAGCTG
GAGGATATGSCAATAAGCAATGCTTTGAGATTCGCTCAGCAAAAATTAACAAAAGAAAATCACTA
GGGTAACTTAAATGGATTTTAAAACATGATGCTTTAAGAGCTTTCCACAAAGTGCATGGA
GTGCTCATTCGATCATAACAGAAATACATTTAGATTTTTCGAGTAAACATATGATCCTTAAAATTG
CTGAGTTATAAGTGTTCACCTGGAGCATGAAACAAACGGGAAAAGAACTGTGATGTTTTAC
GGTCTGCTAACACAGGAAAACAAATATTGCAACAGCAACTTTCAGTAAACCTGAAATCATGAATTG
CAATGTTAAGTGCAGCAATCCAAATTTTCCTTTTCAAGATATTGAGGAGCTCAAGTGGTGGT
GGGAGAAAGGGAATGACAGGAGCATGTTGAGAGCTGCAAAAAGCTTTGCTGGGGGAACTGCT
TTGCCATCGACCCAAATGATGCACTGTTGAGTCAACAGTCCACCGCTTATATATACATC
GAATGTGGACATGACCTGTGTTCAAGAAGGAGTTTTGTAAGCTTTGAACCAACAGCCGTTAG
AGCCAGGATGATAAAATTTTCATTTAACCTGACACTACTGGAACTTTGGTCTGATTAACAATG
GAGAAAGTGAATCTTTTTTCGCGATGGGTGCAAACTTTTCAGTAAACCTGAAATCATGAATTG
CCAAATTTTCAAAAGAGGAGCTTCGACAGTCCGCGCACTAGTTCCTCTGGAGAAATTTCCCTCAC
CAAGAGAGTGCATATAAAAACAGACAGCCACTCTATTTGAGAGCTGAACAGATGAAAGAAAGAA
ACACCAGACTCTGATGATTTGTTTGAAGAACCAAGTCAAAAAGAAAGAAAGACAGAGAGAGCC
TGCAAAACAGCACCTCTCCGGGCTTAGAGAAATTTAGATGACAACCTTTGAACCTGTTCCAGGTA
AGAAATTTGCAATTTATCAATTTTAAATGTTCAAAAACAAATAGAGCAAACTGGTGTATGTCGAT
ATTCTTACAGATACCCAGAGCACTGATATTTGACGTGGTCTTACGAGAGACACAGAGAGGAG
CGAATGGAGGACAACTGACCTTTACTGGTATTTCAAAAATCTCCCGCGGTTTTAGAGGAGT
TACAAATCCCAATTTGGTGTGATTTTTGCTTCCGAGAAATAGCTGATTTTAAATTTGGTGGT
ATATTAATATTAAGTTCGAGAGCAAGAAAGATTTAGTATGAGCAATCTCACAGGTTTTTA
CTTAAATGGCCGGTGCACAGGAAAAGAAACCGAGTTAAGAACTTTTACCAAGCTGCGTTTTCC

```

【 図 1 - 2 】

FIG. 1 (続):

```

ATATATGAAAGTACCITGIGAGACCAGACAACATTTGAATGGATTTAAAATCCATGAGATGCTACATA
ATTATGATAGCAAAATAACRCCGACAGCACTGAGAATGATTTACTTGCAGTATCACTGCTGAC
TTGATCAGAGAGATCATCCATCCAGTCCACGGCGGAGAAATGGGTTTTGCGTAAAGAAAACAGA
AGCTTTTGTACTGATTTGGAAGAAGCCGTGGATGAGAAGATCCCTGATACAGAGAAAACCAAC
CTACTGATAAAAACAAAATATACAGAAAGAGGGGAAATTTGGTAAAGAAAGAAAGAGGTTGAT
ACCTTACTGCTCAAAATGAGGAACATCAACCATAAGAAATATATAGAACACGACTCAAGCGAAGA
ACNACCAGAAAGAGTGGTCCACGAGAACGAAAGACTAGAGACAAATTTGAGACATCAAC
ATGGAGCGGAGAAAGCAAAACCGGAACCGGTATCAACTGGCCAGGACATCGCTACACAGGTCCT
GAAATCCACTCCCTCAGCGACTCCTCCGAATGAAATGATCTCTCTGTCGGAACATGATAT
CAGCTACAAAATAATTTCTGATATGGTCACTGGCCATACATTTGGGCCCATATATGATAAAA
AAATGCAAGAGATATAGAGAGATAGTAAAAAAGGTTTTGAGATTAGAAAGTAACTTTTAGT
AACCTTATATCAGCTTTATGCAAGCAAAAATCAAGATTAGAGCCCGGATATATGAAATTTTAA
ACAATTTTACCCCGGAAAGTATGCTTACTAAGAACTCTGATAGAAAATTTTACAAAACCTT
TGCCATTTGATCTCCACAGACATCCTTACAGGTGCATCTCTCCCTCGAACTCTGACTTGGST
GGCGAGACTGGGAATGAAAGAGCCTCCAGCAAAAAGAAAGATGACAGAGACAGATGTGACAG
CACCACAAGTGGCAAAACATTGGACACCAATATGAGGATTTCAAAATGGCGGAGGGGTGGGG
GGGAGGGAACCACTAAAAGTTCTTGGATTTGGGGGGGCTTCTTACTGATACGACGGTTACT
ACTTATGTTACTAGAAAGTGTGTGCTTAGCTTTCTGCTTTTCGGATTAAGTACTGACCCAGAGCGGG
GGATCATATACCTAGCTTTGTTGCTGTACTCCAATGGTACTATATGATCTTAAACATCTATCAG
CTCATTTCTCTCCCTCTGCTTGGCAAAACGCTTTTAGAAGAGATATGATGCTTTTAAACCTTAAA
TTGGAAGTTAAAATTAAGAGATAGTTGTTAAAGATGTTAAATAATGACAGGGAAAACAACTGCTG
TGACACAGTTTCTGCAATGCCATGGCTGAGTGTGTTTGGAGGATACACATACGAGCTGCT
CATATGTTTGGGAGGGGAGCAGCTAACAGTGGCTGGTCACTCCAGGACAAACTTATGAACTT
CCAAAATCTGCTATGAACTGTGGGAAAACCCGATAGGAGATGTGGTCACTGTATGATGGTTT
CAAAAAGGCCACTTAGACATGCTTTTGGTTCAGCAACACAGAACTGAGTTTATTTAG
AGACAGACACTTACCATCTTACACAGGCAATGAAATCTTCAAACCTATGACTTTCCAGAT
TTACATTTGAGCAGCTAACACAGTACATGTTGGGAGCGCGAGAGACTTGACATCCCAATGAAAG
TCAAAAGAAACAGGTTATGAAAACAAACCTACAGAAAACAAAGATCAATGTTTGGTATCAGAG
CTCAGGTTTACCTGTTTCCCTGGATTTGCTCACTCTAACAGACTTGTATGTTTTTCAAGGA
GGAAGTAAAAGAGCGGGATTTATCCATTTGTTGGGCTGGGACAGAGACAGGCGACATRCCA
CTACTTATGATACACTCTGCTGGTGTGAAAGAGATATTTACAAATTTACAATAGTATGCTTA
AAAGAGAACTCAACAGCAGGACCGAGAAACAGGAAACCAAGTAAAACACCTGATGGGAC
ATAATTTAACCACTAACAGTTTAGCGTATGGACAGCTGCTGAAAACATTTGATAACATACCAG
TGATCAAAAGCGCTTTTCGGGTTTACAGGTTACAGGCTTGTGCTGCTGACAGAGAGGGTATA
GCACACTGGAAATGCTTCTCATATAAGGGAGATATTTAGCAAAAACACCCAAAATATTAGAA
AAAGATCAGCAAGAAATCACATTTCAAACCTTTGAAGGTTGCTGACGAAAACCTTCGGTAA
TTAGAGTCTCAGATTTGGGCTTATATCCCTAACACTGATAACAAACTGATGCTGGGAGCCGCC
CTTATCTATATGGGGAATGAAAATCCTCCACTATGTTTTTTTGAAGTTACTCCCTCACTG
GGACCCCTGAAAATCCACGCTGTTCTGGAAGCAACCTTCAAAAAGTTCTGAAATCAGTACTG
CCAAITTTTACTGGAATATACTGTAACATGGGCTGTGTGAGGCGGAAAGAAACATCTCCGAGT
GGAACCTTATCCCGGGGTCACAAITCCAACCTTATAACCAACTCTGTGATCATCTTGAACAA
AATGGTTTTATAAATGCCAGAACTGTTTGGACAGCAAGCAACCTGTAGAGCCGGAAGATA
ATAAAAATAAATTTGAGAAAATAAAGACTTACTCTCTTTTTTTTGAATTTGAAAGCGCCAGG
CCTCTCCGCGTCCGCCCTGACGTCACTCCGCTTCCGGCTCAAAGGGGGGGTCAAAGGTCAAA
GGTCTTCACTGCTATCCGCTTCCGGGTCAAGCC

```

【 図 2 】

Fig. 2: PPV5Bレプリカーゼタンパク質配列

METWYIGICRLFPDVLKIPGVEYGRIFVFPVSTRDFMKWPFDFQNEKNNECESGAAPAAAPRDEISNL
VAVRQGEALFRELQKELRKSRLGVDPIFMQLERVDKGGGLHLHWCVSUSAGTDRDVLTIKPKTEKVK
SLYYFVGVGLSFFVPHKNGKAWKSDDEGFIYNYLLKLLPKLECLYAWTIGGTIGEACLNTEKRLKLD
NRQDPVIEELSAPMYKCATGEKMLDIDVQWLDNINCSERWEGKALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIA
OQKLLKESLGLTMDFMKMDLRAFQSDMECSDFHNRHIIHYIFAANNYPKIAAIVIMPHWMSKQIGKRN
CVWFYGPATTGKTNIAQAICHSSANYGNVNNNPNFPDQIVGAQVGVWEEGKMTGDMVEAAKALLGGA
LRIDRCKMQSVEVNSPFIITSNVDMTVQEGSFSVFEHQPLLEDKMIKFSNLTLPNGFLITTEVKS
FFRMGAKLSVKPEIMNQCIFKRGFASIRHLVPLGEIPPPKEMHKRQPLVLAEPDEBQETPDVLDHWF
EP5QRKKTEDPANTTPPAAYENLDDNFEPVPGKNFAP IIF

【 図 3 】

Fig. 3: PPV5B ORF3

MSFSGYKSLPPGLEEVTFPFVWDLARIADFNINWCGYNNIKCPKPAEKVFSIQSTQVLLKWPGAQKKE
NRVKNTEAAPPYMKVPRPDIEMIKIHEMLNDRQITPQTENDLAAITADPDQRITIHPIVIGEKW
VEGKTEAFAADLEEADEEDPTEKQPTDKTQSNKKKEIGEKKEEDTLTNSNEHHQSRKLEHDS
EQQPEAGHREKLEDNIEDIK

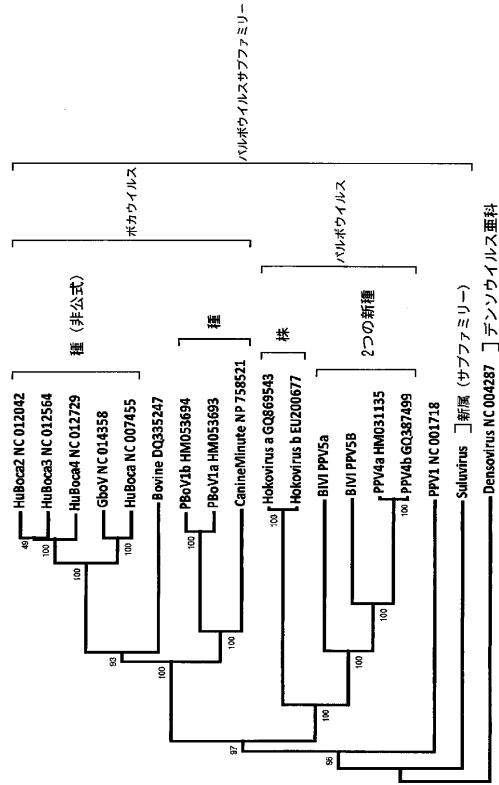
【 図 4 】

Fig. 4: PPV5Bカプシドタンパク質配列

MLHNYDRQITPQTTENDLAAITADFDQREI IHPVIGEKWVFGKKEAFATDLEEADEEDPTEKQPT
DKTQSNKKKEIGEKKEEDTLTNSNEHHQSRKLEHDSSEOEPEAGHREKLEDNIEDIKHGAEDQ
TGTGNNPCHRYTGPCNPLPHGAPRNEIDL SAAKHDIRYQYSRYGHPVYINAPYIDKMQDIDREIVK
GLLEGLKLLGNLISALWQAKYRLGAFIYEILKTLIPPKSMTKESVKEKHLKPLLPIDDPQTS:LPGASPP
TPDLGGTGMNEEPPAKRRMTEDRCDSITRCEITLDTQYEDSKMAGGGGGGQPKSWSIGCGAFFDITVT
YGTTRCVLSSFFPHNYCTTESGDHIFSLVVCYFHWYDNLNLSAHFSPSAWQTLLEBYDAFKPLKLEVKI
KEIVKDVNNMTGKQCCDITVSDNAMAAVLFCEDTHYELVFPVVLGGGLTVFVGHLPQQTYELPKYCYRTV
GHSEMWSFVDSKRAHLDMPFVQPTQNTTEFFILENHRSTILHTGNEFFQTYDFDLHFEQLTQYMWDAAR
LONPMKGQRIVQMKNKPTENKQDMFGIRASSYLVPVWIVNSLNRPAFLOGGRKLDGDYSIVGPTREQAT
YHYFNDTPVVEVDIYKFTTSMLKREIQQPGRTQETVTKTPDGTITITNSLAVGQVPEINIDNIPSDHK
AAFVGTGYRLAVAEQRGYTPGMPSHIREILLTKPKLEKQDQETFPNFEGSVSEKTSANLESQIWAY
IPNTDNKHCNCTPPLSIWGMENPPMVFRLRLLPGLPPEKSSCSGSKPKFLNQYCFLEIYTVWAV
RRKKHTFRWNPMPGVITPTYNNDPVYLLDQNGFYKLPETVWIAQRVRARR

【 図 6 】

Fig. 6: PPV5BのVP1/CAP領域の系統発生解析



【 図 5 】

Fig. 5

Table with 16 columns representing sequence positions [1] to [16]. Each cell contains a percentage value representing sequence identity. The values range from approximately 47.2% to 99.5%. The table is titled '対比較アミノ酸同一性比較' (Pairwise amino acid identity comparison) and includes a legend for '下部=配列A / 上部=配列B' (Lower=Sequence A / Upper=Sequence B).

【 図 7 】

FIG. 7.

PPV5B Capsid全Genbank配列のBLASTp結果。最も近いマッチング：フタバルボウイルス4型PPV4 (Genbankアクセッション番号AFM73881)
配列同一性：53% (367/690)
配列相同性：68% (468/690)

BLASTp results table showing sequence alignments between PPV5B and PPV4. Columns include accession numbers (e.g., PPV5B_50, PPV4_3), query coordinates, subject coordinates, and alignment scores. The table shows high sequence identity between the two viruses, particularly in the capsid region.

【 図 8 】

FIG. 8:

PPV5B REP遺伝子対全Genbank配列のBLAST結果。
最も近いマッチング：フタバネボウイルス4型PPV4 (Genbankアクセッション番号ADF59557)
配列同一性：87% (517/597)
配列相同性：93% (555/597)

Table with 3 columns: Query/Sbjct ID, Sequence, and Position. It shows BLAST search results for PPV5B REP gene against Genbank sequences, including alignment details and scores.

【 配列表 】

2016509832000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年9月7日 (2015.9.7)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

- a) 配列番号1の核酸配列を有するポリヌクレオチド；
b) 配列番号3または配列番号4のポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチド；
c) 配列番号2、配列番号3または配列番号4のポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチドをコードする、配列番号1と少なくとも80%同一な核酸配列を有するポリヌクレオチド；
d) 配列番号4をコードする少なくとも30連続ヌクレオチド配列を含む、配列番号1の核酸配列のフラグメントであるポリヌクレオチド、または
e) 配列番号1の少なくとも30連続ヌクレオチド配列を含み、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列の免疫学的に有効な活性をコードする、配列番号1の核酸配列のフラグメント、であるポリヌクレオチド、を含むポリヌクレオチド。

【 請求項 2 】

- a) 配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- b) 配列番号3または配列番号4と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を有し、配列番号3または配列番号4によってコードされるポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチド；
- c) 配列番号3または配列番号4の少なくとも13連続アミノ酸を含む、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列のフラグメントであるポリペプチド；
- d) 配列番号3または配列番号4の少なくとも13連続アミノ酸を含み免疫学的に有効な活性を有する、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列のフラグメントであるポリペプチド；または
- e) 配列番号1のヌクレオチド2161-2860または配列番号1のヌクレオチド2861-5014の配列に含まれる少なくとも39ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質フラグメントであるポリペプチドを含む、ポリペプチド。

【請求項3】

- a) 配列番号1の核酸配列、または
- b) 配列番号3または配列番号4のポリペプチドの生物学的または免疫学的に有効な活性を有するポリペプチドをコードする、配列番号1と少なくとも80%同一な核酸配列、を含む、ブタパルボウイルス5B型(PPV5B)。

【請求項4】

PPV5Bの弱毒非病原性型を含む、請求項3に記載のPPV5B。

【請求項5】

請求項3に記載のPPV5Bの死滅型または弱毒型を含む、病原性PPV5Bによる感染を治療または予防するためのワクチン。

【請求項6】

請求項3に記載のPPV5Bの死滅型または弱毒型のサブユニットを含む、病原性PPV5Bによる感染を治療または予防するためのワクチン。

【請求項7】

サブユニットが配列番号4のカプシドタンパク質である、請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】

サブユニットが配列番号4のポリペプチドの免疫学的に有効なフラグメントである、請求項6に記載のワクチン。

【請求項9】

請求項2に記載のポリペプチドの免疫学的有効量を含む免疫原性調製物。

【請求項10】

非ヒト哺乳動物において免疫応答を引き起こす方法であって、請求項3に記載のPPV5B、請求項2に記載のポリペプチド、または請求項5～7のいずれか1項記載のワクチンの免疫学的有効量を投与することを含む前記方法。

【請求項11】

非ヒト哺乳動物がブタであり、免疫応答が、PPV5B感染によって引き起こされる疾患に対する防御免疫を提供する、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

配列番号1の配列を有するブタパルボウイルス5B型ポリヌクレオチドによってコードされるPPV5Bポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、前記ポリペプチドが配列番号2、配列番号3または配列番号4のアミノ酸配列を有し、異なるパルボウイルスによってコードされるポリペプチドに結合しない前記抗体。

【請求項13】

- a) 請求項12に記載の抗体と生体試料とを接触させること、
- b) 前記抗体とPPV5Bポリペプチドとの複合体の形成を検出すること、を含む、
前記複合体が存在することが前記生体試料中にPPV5Bが存在することを示す、生体試料中のPPV5Bの存在を確認する方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターまたはプラスミド。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 に記載の抗体を発現するハイブリドーマ。

【請求項 1 7】

生体試料中のPPV5Bの存在を確認するための診断キットであって、

- a) 請求項 1 2 に記載の抗体、および
- b) 前記抗体とPPV5Bポリペプチドとの複合体の形成を検出するための試薬、を含む前記キット。

【請求項 1 8】

- a) PPV5B感染に関連する少なくとも1つの疾患に対して動物に免疫性を与えるのに有効な少なくとも1つの免疫原性PPV5Bペプチド；
- b) 少なくとも1つの担体またはアジュバント分子；
- c) 免疫原性組成物を収容するための容器；
- d) 1組の印刷した使用説明書；および
- e) 動物に免疫原性組成物を投与することができるディスペンサー、を含む、免疫原性キット。

【請求項 1 9】

少なくとも1つの他のブタ病原性ウイルスまたは細菌による感染に関連する疾患を引き起こす前記ウイルスまたは細菌に対して動物に免疫性を与えるのに有効な少なくとも1つの免疫原性タンパク質をさらに含む、請求項 1 8 に記載の免疫原性キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/016165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/015	C12N7/00	A61K39/23 C07K16/08 G01M33/569
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>9 January 2013 (2013-01-09), "SubName: Full=Capsid;", XP002725408, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:K4K2G7 Database accession no. K4K2G7 sequence</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 June 2014		Date of mailing of the international search report 24/06/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sitch, David

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/016165

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>9 January 2013 (2013-01-09), "SubName: Full=Replicase;", XP002725409, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:K4K4H5 Database accession no. K4K4H5 sequence</p>	1-27
X	<p>-----</p> <p>DATABASE EMBL [Online]</p> <p>23 October 2012 (2012-10-23), "Porcine parvovirus 5 isolate MI216, complete genome.", XP002725410, retrieved from EBI accession no. EM STD:JX896318 Database accession no. JX896318 sequence</p>	1-27
A	<p>-----</p> <p>A. JOZWIK ET AL: "Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 90, no. 10, 17 June 2009 (2009-06-17) , pages 2437-2441, XP55104196, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.012054-0 page 2437 abstract</p> <p>-----</p>	1

1

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/12 (2006.01)	C 1 2 N 5/12	
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/23 (2006.01)	A 6 1 K 39/23	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

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

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 イヤー アルン ヴィ

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ジョーダン ダイアナ エム マーフィー

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 パターソン アビー レイ

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ルーフ マイケル ビー

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ヴォーン エリック マーティン

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ヴィクトリア ジョセフ ギルバート

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロ

ード 900 ピーオーボックス 368 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
ポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ヴィセック カリー アン

アメリカ合衆国 コネチカット州 06877-0368 リッジフィールド リッジバリー ロ
ード 900 ピーオーボックス 368 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コー
ポレイション ヴイピー アイピー リーガル内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA02
GA01 GA11 HA08
4B065 AA95X AA95Y AB01 AB02 AC14 BA02 BA08 BA14 CA24 CA45
4C085 AA03 BA75 BB11 CC08 EE01
4H045 AA11 AA30 BA09 CA01 CA40 DA75 DA86 EA20 EA53 FA74

专利名称(译)	5B型猪细小病毒，使用方法和疫苗		
公开(公告)号	JP2016509832A	公开(公告)日	2016-04-04
申请号	JP2015558122	申请日	2014-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草公司		
[标]发明人	イヤーアルンヴィ ジョーダンダイアナエムマーフィー パターソンアビーレイ ルーフマイケルビー ヴォーンエリックマーティン ヴィクトリアジョセフギルバート ヴィセックカリーアン		
发明人	イヤー アルン ヴィ ジョーダン ダイアナ エム マーフィー パターソン アビー レイ ルーフ マイケル ビー ヴォーン エリック マーティン ヴィクトリア ジョセフ ギルバート ヴィセック カリー アン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N7/01 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/12 C07K14/015 A61K39/00 A61K39/23 A61P37/04 A61P31/12 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/005 C12N7/00 C12N2750/14021 C12N2750/14022 C12N2750/14034 G01N33/56983 A61K39/23 A61K2039/53 C12N2750/14321 C12N2750/14322 C12N2750/14334 G01N2333/015 G01N2469/10 A61P31/12 A61P31/20 A61P37/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N7/01 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/12 C07K14/015 A61K39/00.H A61K39/23 A61P37/04 A61P31/12 G01N33/569.L G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA14 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA75 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	61/765204 2013-02-15 US 13/800413 2013-03-13 US		
其他公开文献	JP6215965B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与特异性感染家猪的新型5B型猪细小病毒 (PPV5B) 的生产和使用有关的新核苷酸序列, 蛋白质序列, 免疫原性组合物, 疫苗和方法。所述组合物和方法提供了对所述新型病毒的感染的检测, 对野生和家畜和种群中病毒序列的遗传改变的监测, 以及新型疫苗的生产和使用, 以保护动物免受所述病毒的感染。提供。本发明提供了对所述新型病毒感染的检测, 对野生和家养动物及种群中病毒序列的遗传改变的监测以及用于保护动物免受所述病毒感染的新型疫苗的生产和使用。

(21) 出願番号	特願2015-558122 (P2015-558122)	(71) 出願人	503345374
(86) (22) 出願日	平成26年2月13日 (2014. 2. 13)		ベーリンガー インゲルハイム、フェトメ
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月7日 (2015. 8. 7)		ディカ インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/016165		アメリカ合衆国 ミズーリ州 64506
(87) 国際公開番号	W02014/127084		-2002 セント ジョセフ ノース
(87) 国際公開日	平成26年8月21日 (2014. 8. 21)		ベルト ハイウェイ 2621
(31) 優先権主張番号	61/765, 204	(74) 代理人	100092093
(32) 優先日	平成25年2月15日 (2013. 2. 15)		弁理士 辻居 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	13/800, 413		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く