

(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2016-518126

(P2016-518126A)

(43) 公表日 平成28年6月23日(2016.6.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/175 (2006.01)	C O 7 K 14/175	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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-509132 (P2016-509132)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月18日 (2014. 4. 18)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年12月11日 (2015. 12. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/034684
 (87) 国際公開番号 W02014/172661
 (87) 国際公開日 平成26年10月23日 (2014. 10. 23)
 (31) 優先権主張番号 61/816, 634
 (32) 優先日 平成25年4月26日 (2013. 4. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/814, 181
 (32) 優先日 平成25年4月19日 (2013. 4. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ローンスターウイルス

(57) 【要約】

本開示は、ユニークなフレボウイルスであるローンスターウイルスの単離、同定および配列決定に関する。ローンスターウイルスの核酸分子、タンパク質および抗体が、開示される。ローンスターウイルスを検出、診断および処置するための方法もまた開示される。配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームと少なくとも90%同一の核酸配列を含む、単離された核酸分子。(a)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームと少なくとも90%同一のヌクレオチド配列；(b)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列のオープンリーディングフレーム；または(c)配列番号4~7として示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、cDNA。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のオープンリーディングフレームと少なくとも 90% 同一の核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 として示されている核酸配列のオープンリーディングフレームを含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 として示されている核酸配列を含む、請求項 6 に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 4】

前記核酸が、配列番号 4 ~ 7 として示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

(a) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のオープンリーディングフレームと少なくとも 90% 同一のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 として示されている核酸配列のオープンリーディングフレーム；または

(c) 配列番号 4 ~ 7 として示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列

20

を含む、cDNA。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つとして示されているアミノ酸配列と少なくとも 80% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つとして示されているアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 9】

異種プロモーターに作動可能に連結された、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子を含む、組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 もしくは 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 10 に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 12】

12 ~ 40 ヌクレオチド長の単離されたオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドは、高ストリンジェンシー条件下において、配列番号 1、配列番号 2 もしくは配列番号 3 またはそれらの相補体のうちの 1 つに特異的にハイブリダイズする、単離されたオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドが、フルオロフォア、クエンチャーまたはその両方を含む、請求項 12 に記載の単離されたオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

(a) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

50

(b) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または

(c) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つとして示されているアミノ酸配列に特異的に結合する、請求項 14 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 16】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、標識されている、請求項 14 または請求項 15 に記載の抗原結合フラグメントの抗体。

【請求項 17】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、キメラである、請求項 14 または請求項 15 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 18】

生物学的サンプル中のローンスタールウイルスポリペプチドを検出するための方法であって、該方法は、

20

(a)

(i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントと該生物学的サンプルとを接触させる工程；

30

および

(b) 該生物学的サンプルへの該抗体または抗原結合フラグメントの結合を検出する工程であって、該生物学的サンプルへの該抗体または抗原結合フラグメントの結合は、該生物学的サンプル中の該ローンスタールウイルスまたは該ローンスタールウイルスポリペプチドの存在を示す、工程

を含む、方法。

【請求項 19】

生物学的サンプル中のローンスタールウイルス特異的抗体を検出するための方法であって、該方法は、

40

(a)

(i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドと該生物学的サンプルとを接触させる工程；

(b) 該生物学的サンプルへの該ポリペプチドの結合を検出する工程であって、該生物学

50

的サンプルへの該ポリペプチドの結合は、生物学的サンプル中の該ロースターウイルス特異的抗体の存在を示す、工程を含む、方法。

【請求項 20】

配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つとして示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドと前記生物学的サンプルとを接触させる工程を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

生物学的サンプル中のロースターウイルス核酸分子を検出するための方法であって、該方法は、

(a) 12 ~ 40 ヌクレオチド長の単離されたオリゴヌクレオチドと該生物学的サンプルとを接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、高ストリンジェンシー条件下において、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つに特異的にハイブリダイズする、工程；および

(b) 該生物学的サンプルと該プローブとのハイブリダイゼーションを検出する工程であって、該生物学的サンプルと該プローブとのハイブリダイゼーションは、該生物学的サンプル中の該ロースターウイルス核酸分子の存在を示す、工程を含む、方法。

【請求項 22】

前記生物学的サンプルが、

(a) 該生物学的サンプルから RNA を単離する工程；

(b) 該 RNA を逆転写して、cDNA を生成する工程；および

(c) 請求項 6 に記載の単離された核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用して該 cDNA を増幅し、それにより、核酸増幅産物を生成する工程を含む方法によって得られる核酸増幅産物である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ロースターウイルスに感染した被験体を同定するための方法であって、該方法は、

(a) 該被験体から得られた生物学的サンプルから RNA を単離する工程；

(b) 該 RNA を逆転写して、cDNA を生成する工程；

(c) その相補体の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用して該 cDNA を増幅する工程；および

(d) 工程 (i i i) からの増幅産物を検出する工程であって、該増幅産物の検出は、該被験体を該ロースターウイルスに感染していると同定する、工程を含む、方法。

【請求項 24】

前記増幅産物を検出する工程は、該増幅産物をプローブにハイブリダイズさせる工程を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記プローブが、フルオロフォア、クエンチャーまたはその両方を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

キットであって、

a)

i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のオープンリーディングフレームと少なくとも 90 % 同一の核酸配列；

i i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 として示されている核酸配列のオープンリーディングフレーム；

(i i i) 配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 として示されている核酸配列；または

(i v) 配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つをコードする cDNA を含む単離された核酸分子；

10

20

30

40

50

b) 高度にストリンジェントな条件下において、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 またはそれらの相補体として示されているヌクレオチド配列にハイブリダイズするプライマー、

c)

(i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(iii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；もしくは

(iv) その免疫原性フラグメント

を含む、単離されたポリペプチド

または d) c) のポリペプチドに特異的に結合する抗体；および

e) 該キットを使用するための指示

のうちの少なくとも 1 つを含む容器を含む、キット。

【請求項 27】

前記ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメント、および被験体由来のサンプル中のローンスターウイルスに特異的に結合する抗体の存在を検出するための指示を含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

前記抗体、および被験体由来のサンプル中の LSV ポリペプチドの存在を検出するための指示を含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 29】

請求項 11 に記載の宿主細胞をインビトロで培養する工程を含む、タンパク質を発現させる方法。

【請求項 30】

抗体を作製する方法であって、該方法は、

(a)

(i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(iii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；もしくは

(iv) 該ポリペプチドの免疫原性フラグメント

を含むポリペプチド；

または (i) ~ (iv) のポリペプチドをコードする核酸

で哺乳動物を免疫する工程；および

(b)

(i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 90% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列と少なくとも 95% 同一の核酸配列のオープンリーディングフレームに

10

20

30

40

50

よってコードされるアミノ酸配列；または

(i i i) 配列番号 1、その相補体、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体を単離し；
それにより、該抗体を作製する工程を含む、方法。

【請求項 3 1】

前記抗体が、配列番号 4 ~ 7 のうちの 1 つとして示されているアミノ酸配列に特異的に結合する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

S 分節、M 分節および L 分節を含む、単離されたフレボウイルスであって、ここで：

(i) 該 S 分節のヌクレオチド配列は、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 同一であるか；
(i i) 該 M 分節のヌクレオチド配列は、配列番号 2 と少なくとも 8 0 % 同一であるか；
(i i i) 該 L 分節のヌクレオチド配列は、配列番号 3 と少なくとも 8 0 % 同一であるか；または
(i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである、
単離されたフレボウイルス。

【請求項 3 3】

(i) 前記 S 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一であるか；
(i i) 前記 M 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 2 と少なくとも 9 0 % 同一であるか；
(i i i) 前記 L 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 3 と少なくとも 9 0 % 同一であるか；または
(i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである、
請求項 3 2 に記載の単離されたフレボウイルス。

【請求項 3 4】

(i) 前記 S 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 1 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；
(i i) 前記 M 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 2 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；
(i i i) 前記 L 分節のヌクレオチド配列が、配列番号 3 と少なくとも 9 5 % 同一であるか；または
(i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである、
請求項 3 2 に記載の単離されたフレボウイルス。

【請求項 3 5】

(i) 前記 S 分節が、配列番号 1 として示されている核酸配列を含むか；
(i i) 前記 M 分節が、配列番号 2 として示されている核酸配列を含むか；
(i i i) 前記 L 分節が、配列番号 3 として示されている核酸配列を含むか；または
(i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである、
請求項 3 2 に記載の単離されたフレボウイルス。

【請求項 3 6】

(i) 前記 S 分節が、配列番号 1 として示されている核酸配列からなるか；
(i i) 前記 M 分節が、配列番号 2 として示されている核酸配列からなるか；
(i i i) 前記 L 分節が、配列番号 3 として示されている核酸配列からなるか；または
(i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである、
請求項 3 2 に記載の単離されたフレボウイルス。

【請求項 3 7】

請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードするフレボウイルス。

【請求項 3 8】

前記フレボウイルスが、弱毒化されている、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載のフレボウイルス。

10

20

30

40

50

【請求項 39】

有効量の請求項 38 に記載のフレボウイルス、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリペプチド、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の単離された核酸または請求項 10 に記載のベクターおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む、免疫原性組成物。

【請求項 40】

被験体においてロンスターウイルスに対する免疫応答を誘発する方法であって、該方法は、治療有効量の請求項 39 に記載の免疫原性組成物を該被験体に投与し、それにより、該ロンスターウイルスに対する該免疫応答を誘発する工程を含む、方法。

【請求項 41】

前記被験体が、前記ロンスターウイルスに感染している、請求項 40 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記被験体が、健常である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

弱毒化されたフレボウイルスを前記被験体に投与する工程を含む、請求項 40 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2013年4月26日に提出した米国出願第61/816,634号および2013年4月19日に提出した米国出願第61/814,181号の利益を主張する。これらの出願の両方は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

20

【0002】

分野

本開示は、ユニークなフレボウイルスのロンスターウイルス(Lone Star Virus)の単離、同定および配列決定、ならびに検出および治療におけるロンスターウイルス(LSV)の核酸分子、タンパク質および抗体の使用に関する。

【0003】

政府支援の陳述

本発明は、National Institutes of Health (NIH) が授与した助成金番号R56-AI089532およびR01-HL105704、National Research Fund for Tick-borne Diseasesからの研究助成金、ならびにCenter for Disease Controlからの資金により、政府支援を得てなされたものである。政府は、本発明において一定の権利を有する。

30

【背景技術】

【0004】

背景

ブニヤウイルス科は、植物、節足動物および脊椎動物をはじめとした幅広い宿主に感染する350を超える種を含む、ウイルスの最も大きな科である(Walter and Barr (2011) J Gen Virol 92:2467-2484)。このブニヤウイルス科のウイルスは、広範囲の植物、昆虫および動物宿主に感染する。ブニヤウイルス科は、5つの属：ナイロウイルス属、ブニヤウイルス属、ハンタウイルス属、フレボウイルス属およびトスポウイルス属からなっている(Guerra (2012) Adv Exp Med Biol 726:245-266)。それらのゲノムは、3つの一本鎖マイナスセンスRNA分節：RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)であるLタンパク質をコードするラージ(L)；糖タンパク質GnおよびGcをコードするミディアム(M)；ならびにヌクレオカプシドタンパク質(N)およびあるサブセットのウイルスにおいてアンピセンス非構造タンパク質(NSs)をコードするスモール(S)からなる。

40

【0005】

50

最近になって、中国における重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) および米国における Heartland ウイルスを含む、ダニ媒介と推定されている新たに出現したブンヤウイルス (bunyavirus) は、ヒト急性発熱疾患に関連して発見された。ヒトに対して病原性であるブンヤウイルスは、呼吸器疾患および出血性疾患にも関連する。これらのブンヤウイルスには、アジア、欧州およびアフリカにおいて最大 30% の致死率を有するダニ媒介性の急性出血性疾患であるクリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルス (Ergonul, (2012) *Curr Opin Virol* 2: 215 - 220) および腎症候群を伴う肺炎または出血熱に関連する世界中の一連のげっ歯類媒介性疾患であるハンタウイルス (Jonssonら (2010) *Clin Microbiol Rev* 23: 412 - 441) が含まれる。

10

【0006】

2011年に、重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) と命名された、フレボウイルス属の新しいブンヤウイルスが、中国における重症の熱病の大流行の原因であると報告された (Xuら (2011), *PLoS Pathog* 7: e1002369; Yuら (2011) *N Engl J Med* 364: 1523 - 1532; Zhangら (2012) *Clin Infect Dis* 54: 527 - 533)。2008年~2010年の間に、中国東部のおよそ500人の患者 (主に、湖北省および河南省の農村部の丘陵地における農業者) が、SFTSV 感染症と診断された。SFTSV が原因の疾患は、発熱、食欲不振、疲労ならびに血小板および白血球の数の減少によって特徴づけられた (Zhangら、2012, 前出)。SFTS 疾患の臨床症候は、ヒト顆粒球性アナプラズマ症において見られる臨床症候と類似しているため、当初、病原因子は、*Anaplasma phagocytophilum* であると考えられていた。新規フレボウイルスが、SFTS の原因として同定され (Xuら、2011, 前出; Yuら、2011, 前出)、さらなる知見から、カタダニである *Haemaphysalis longicornis* が SFTSV のベクターとして関係があるとされた (Zhangら、2012, 前出)。Heartland ウイルス (HRTV) は、LSV とは異なるダニ媒介性フレボウイルスであり、ミズーリの重症の熱病の2つのヒト症例に関連し、これも報告された (McMullanら (2012) *N Engl J Med* 367: 834 - 841)。Bhanja ウイルス (BHAV) および Palma ウイルス (PALV) の株もまた、完全に配列決定され、ダニ媒介性フレボウイルスの新規クレードを構成することが見出された (Dilcherら (2012) *Virus Genes* 45: 311 - 315; Matsunoら (2013), *J Virol*.)。BHAV 群のウイルスの病原性の範囲は、まだ完全には定義されていないが、Bhanja ウイルスは、研究室での症例と天然に感染した症例の両方において中枢神経系が関与する熱病に関連していた (例えば、Calisher and Goodpasture (1975) *Am J Trop Med Hyg* 24: 1040 - 1042; Pundara (1980) *Zentralblatt für Bakteriologie*: 297 - 301; Vesjenjak - Hirjanら (1980) *First natural clinical human Bhanja virus infection. Zentralblatt für Bakteriologie*: 297 - 301 を参照のこと。

20

30

40

【0007】

フレボウイルス感染の検出および処置のために使用され得る作用物質が、依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Ergonul, (2012) *Curr Opin Virol* 2: 215 - 220

【非特許文献2】Jonssonら (2010) *Clin Microbiol Rev* 23: 412 - 441

50

【非特許文献3】Xuら(2011), PLoS Pathog 7:e1002369

【非特許文献4】Yuら(2011) N Engl J Med 364:1523-1532

【非特許文献5】Zhangら(2012) Clin Infect Dis 54:527-533

【非特許文献6】McMullanら(2012) N Engl J Med 367:834-841

【非特許文献7】Dilcherら(2012) Virus Genes 45:311-315

【非特許文献8】Calisher and Goodpasture(1975) Am J Trop Med Hyg 24:1040-1042

【非特許文献9】Pundaら(1980) Zentralblatt fur Bakteriologie:297-301

【非特許文献10】Vesenjok-Hirjanら(1980) First natural clinical human Bhanja virus infection. Zentralblatt fur Bakteriologie:297-301

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

要旨

これまで同定されていなかったフレボウイルスの単離および同定が、本明細書中に開示される。特に、一つ星ダニ(lone star tick)であるAmblyomma americanum由来のフレボウイルス分離株が開示される。このローンスターウイルス(LSV)に対するゲノム配列ならびにそのウイルスによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列が、さらに開示される。

【0010】

いくつかの実施形態において、S分節、M分節およびL分節を含む単離されたフレボウイルスが、開示され、ここで、(a)そのS分節のヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも80%同一であるか；(b)そのM分節のヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも80%同一であるか；(c)そのL分節のヌクレオチド配列は、配列番号3と少なくとも80%同一であるか；または(d)(a)、(b)および(c)のすべてである。上記フレボウイルスは、弱毒化され得る。

【0011】

いくつかの実施形態において、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームと少なくとも90%同一の核酸配列を含む単離された核酸分子が、開示される。その単離された核酸分子は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列のオープンリーディングフレームを含み得る。単離された核酸分子は、cDNAであり得る。これらの核酸分子に特異的であるオリゴヌクレオチド(例えば、プライマーおよびプローブ)が、開示される。これらの核酸分子によってコードされるポリペプチドもまた開示される。これらのポリペプチドには、配列番号4~7として示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0012】

さらなる実施形態において、本明細書中に開示されるLSVまたはそのLSVによってコードされるポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが、開示される。

【0013】

生物学的サンプル中のLSV、LSVポリペプチド、LSV核酸分子またはLSV特異的抗体を検出するための方法もまた開示される。本開示は、LSVに感染した被験体を同

10

20

30

40

50

定するための方法をさらに提供する。したがって、LSV感染を検出するための抗体、オリゴヌクレオチドおよびポリペプチドの使用が、本開示によって提供される。

【0014】

組換えLSV、LSV核酸およびLSVポリペプチドを含む免疫原性組成物が、開示される。LSVに対して免疫応答を誘発するためのこれらの免疫原性組成物の使用が、本開示によって提供される。したがって、抗体の産生からの方法が、提供される。本明細書中に開示される組成物は、被験体（例えば、健常な被験体またはLSVに感染した被験体）においてLSVに対する免疫応答を誘導するために使用され得る。

【0015】

本発明の前述のおよび他の目的、特徴および利点は、添付の図面を参照して進められる以下の詳細な説明からより明らかになる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ヒト(HeLa)およびサル(Vero)細胞培養物におけるローンスターウイルスによる細胞変性効果の発生の経時変化。接種の24、48、72、96および120時間後(hpi)におけるCPEが、示されている。120hpiにおける非感染コントロールも示されている。

【図2A】図2A~2D。偏りのないディープシーケンシング(unbiased deep sequencing)によるLSVゲノムの同定およびアセンブリ。(A)高速計算パイプライン(rapid computational pipeline)を使用し、SNAPヌクレオチドアラインメント(薄い灰色)またはRAPSearchアミノ酸アラインメント(濃い灰色)によってブニヤウイルスと同定されたリードを、アセンブルされたLSVゲノムにマッピングした。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。(B)PRICEアセンブラ(各15サイクルが3回)および(A)から同定されたLSVシード(seed)配列(「S」)を使用したときの、LSVゲノムのデノボアセンブリ。(C)LSVのゲノム構造。四角は、線によって示されている非コード領域に隣接した、RdRp、G、NおよびNSタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF)を表している。コードの方向が、矢印で示されている。(D)最終的にアセンブルされたゲノムに対する、LSVから得られた実際のディープシーケンシングリードのマッピング。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。省略形: kb, キロベース; bp, 塩基対。

20

30

【図2B】図2A~2D。偏りのないディープシーケンシング(unbiased deep sequencing)によるLSVゲノムの同定およびアセンブリ。(A)高速計算パイプライン(rapid computational pipeline)を使用し、SNAPヌクレオチドアラインメント(薄い灰色)またはRAPSearchアミノ酸アラインメント(濃い灰色)によってブニヤウイルスと同定されたリードを、アセンブルされたLSVゲノムにマッピングした。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。(B)PRICEアセンブラ(各15サイクルが3回)および(A)から同定されたLSVシード(seed)配列(「S」)を使用したときの、LSVゲノムのデノボアセンブリ。(C)LSVのゲノム構造。四角は、線によって示されている非コード領域に隣接した、RdRp、G、NおよびNSタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF)を表している。コードの方向が、矢印で示されている。(D)最終的にアセンブルされたゲノムに対する、LSVから得られた実際のディープシーケンシングリードのマッピング。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。省略形: kb, キロベース; bp, 塩基対。

40

【図2C】図2A~2D。偏りのないディープシーケンシング(unbiased deep

50

ep sequencing)によるLSVゲノムの同定およびアセンブリ。(A)高速計算パイプライン(rapid computational pipeline)を使用し、SNAPヌクレオチドアラインメント(薄い灰色)またはRAPSearchアミノ酸アラインメント(濃い灰色)によってブニヤウイルスと同定されたリードを、アセンブルされたLSVゲノムにマッピングした。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。(B)PRICEアセンブラ(各15サイクルが3回)および(A)から同定されたLSVシード(seed)配列(「S」)を使用したときの、LSVゲノムのデノボアセンブリ。(C)LSVのゲノム構造。四角は、線によって示されている非コード領域に隣接した、RdRp、G、NおよびNSsタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF)を表している。コードの方向が、矢印で示されている。(D)最終的にアセンブルされたゲノムに対する、LSVから得られた実際のディープシーケンシングリードのマッピング。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。省略形: kb, キロベース; bp, 塩基対。

10

【図2D】図2A~2D。偏りのないディープシーケンシング(unbiased deep sequencing)によるLSVゲノムの同定およびアセンブリ。(A)高速計算パイプライン(rapid computational pipeline)を使用し、SNAPヌクレオチドアラインメント(薄い灰色)またはRAPSearchアミノ酸アラインメント(濃い灰色)によってブニヤウイルスと同定されたリードを、アセンブルされたLSVゲノムにマッピングした。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。(B)PRICEアセンブラ(各15サイクルが3回)および(A)から同定されたLSVシード(seed)配列(「S」)を使用したときの、LSVゲノムのデノボアセンブリ。(C)LSVのゲノム構造。四角は、線によって示されている非コード領域に隣接した、RdRp、G、NおよびNSsタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム(ORF)を表している。コードの方向が、矢印で示されている。(D)最終的にアセンブルされたゲノムに対する、LSVから得られた実際のディープシーケンシングリードのマッピング。ゲノムに沿った各位置(x軸)において達成されたカバレッジ(y軸)が、対数目盛でプロットされている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。省略形: kb, キロベース; bp, 塩基対。

20

30

【図3A】図3A~3B。代表的なフレボウイルスおよびGouleakoウイルスに由来する配列に対する4つのLSVタンパク質配列のアミノ酸の系統学的解析。RdRp、糖タンパク質およびNタンパク質について、Gouleakoウイルスは、フレボウイルスに対するアウトグループとして含まれている(tan)。フレボウイルスに最も近縁であると知られているブニヤウイルスであるGouleakoウイルスは、ブニヤウイルス科の提案された新しい属のメンバーである(Marklewitzら(2011)JVirology 85: 9227-9234)。公知のダニ媒介性フレボウイルスのUkunieni、BhanjaおよびSFTSクレードもまた、色分けされて示されている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。

40

【図3B】図3A~3B。代表的なフレボウイルスおよびGouleakoウイルスに由来する配列に対する4つのLSVタンパク質配列のアミノ酸の系統学的解析。RdRp、糖タンパク質およびNタンパク質について、Gouleakoウイルスは、フレボウイルスに対するアウトグループとして含まれている(tan)。フレボウイルスに最も近縁であると知られているブニヤウイルスであるGouleakoウイルスは、ブニヤウイルス科の提案された新しい属のメンバーである(Marklewitzら(2011)JVirology 85: 9227-9234)。公知のダニ媒介性フレボウイルスのUkunieni、BhanjaおよびSFTSクレードもまた、色分けされて示されている。GENBANK(登録商標)アクセッション番号は、本文中に報告されている。

【図4】他の代表的なブニヤウイルスに対するLSVのアミノ酸ペアワイズ同一性。4つ

50

の L S V タンパク質 (R d R p、G、N および N S s) に対するアミノ酸同一性が示されている。50塩基対 (b p) のスライディングウィンドウを使用した。G E N B A N K (登録商標) アクセション番号は、本文中に報告されている。

【発明を実施するための形態】

【0017】

配列表

添付の配列表に列挙された核酸配列およびアミノ酸配列は、37C.F.R.1.822に定義されているように、ヌクレオチド塩基に対しては標準的な省略形文字およびアミノ酸に対しては3文字コードを使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖だけが示されているが、相補体は、表示されている鎖を任意に参照することにより含まれていると理解される。配列表は、2013年3月12日に作成された226KBのASCIIテキストファイルとして提出されている(これは参照により本明細書中に援用される)。添付の配列表において：

10

【0018】

配列番号1は、L S V の S 分節のヌクレオチド配列である。

【0019】

配列番号2は、L S V の M 分節のヌクレオチド配列である。

【0020】

配列番号3は、L S V の L 分節のヌクレオチド配列である。

【0021】

配列番号4は、ヌクレオカプシドタンパク質 (N p、S 分節) のアミノ酸配列である。

20

【0022】

配列番号5は、非構造タンパク質 (N S s、S 分節) のアミノ酸配列である。

【0023】

配列番号6は、糖タンパク質前駆体 (M 分節) のアミノ酸配列である。

【0024】

配列番号7は、R d R P (L 分節) のアミノ酸配列である。

【0025】

核酸配列およびアミノ酸配列は、G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 N C _ 0 2 1 2 4 2 . 1 , 2 0 1 3 年 5 月 2 1 日 ; G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 K C 5 8 9 0 0 5 . 1、G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 2 0 1 3 年 5 月 1 8 日 ; G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 N C _ 0 2 1 2 4 4 . 1 , 2 0 1 3 年 5 月 2 1 日、G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 N C _ 0 2 1 2 4 3 . 1 , 2 0 1 3 年 5 月 2 1 日 ; G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 K C 5 8 9 0 0 7 . 1 , 2 0 1 3 年 5 月 1 8 日 ; および G E N B A N K (登録商標) アクセション番号 K C 5 8 9 0 0 6 . 1 , 2 0 1 3 年 5 月 1 8 日 に開示されている(これらの全体はすべて、参照により本明細書中に援用される)。

30

【0026】

詳細な説明

フレボウイルス属 (ブニヤウイルス科) のメンバーである L S V が、本明細書中に開示される。特に、L、M および S 分節の配列を含む L S V の完全なヌクレオチド配列、ならびに非構造タンパク質 (N S s) および糖タンパク質 (G)、ヌクレオカプシド (N) および R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ (R d R p) タンパク質を含むこのウイルスによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列が、本明細書中に開示される。L S V ポリペプチドに特異的に結合する抗体が、開示される。いくつかの実施形態において、L S V 核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド (プライマーおよびプローブを含む) および L S V によってコードされるタンパク質に特異的に結合する抗体が、提供される。フレボウイルスの核抗体、タンパク質、プローブ、プライマーおよび核酸分子を使用する診断アッセイおよび検出アッセイもまた開示される。組換えフレボウイルス (例えば、レポーター分子をコードするおよび / または弱毒化変異を含む組換え L S V) が、さらに提

40

50

供される。LSVに対する免疫応答を誘発するための方法もまた開示される。

【0027】

用語

別段述べられない限り、技術用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Oxford University Pressによって出版されたBenjamin Lewin, Genes V, 1994 (ISBN0-19-854287-9); Blackwell Science Ltd.によって出版されたKendrewら(eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN0-632-02182-9); およびVCH Publishers, Inc.によって出版されたRobert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN1-56081-569-8)に見出され得る。本開示の様々な実施形態の概説を容易にするために、具体的な用語の以下の説明が提供される:

10

20

30

40

50

【0028】

アジュバント: 抗原に対する免疫応答を非特異的に増強する物質またはビヒクル。アジュバントには、抗原が吸着される無機物(ミョウバン、水酸化アルミニウムまたはリン酸塩)の懸濁物; または抗原溶液が鉱油に乳化された油中水型エマルジョン(例えば、フロイント不完全アジュバント)、時折、抗原性をさらに高めるために、死滅したマイコプラズマを含めたもの(フロイント完全アジュバント)が含まれ得る。免疫賦活性オリゴヌクレオチド(例えば、CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド)もまた、アジュバントとして使用され得る(例えば、米国特許第6,194,388号; 同第6,207,646号; 同第6,214,806号; 同第6,218,371号; 同第6,239,116号; 同第6,339,068号; 同第6,406,705号; および同第6,429,199号を参照のこと)。アジュバントには、共刺激分子などの生物学的分子も含まれる。例示的な生物学的アジュバントとしては、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40Lおよび4-1BBLが挙げられる。

【0029】

投与する: 被験体に組成物を与えるか、適用するか、または被験体と組成物とを接触させること。投与は、いくつかの経路(例えば、局所的、経口、鼻腔内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内および髄腔内)のうちの一つによって達成され得る。組成物は、治療的または予防的に投与され得る。予防的投与は、ある感染症に特徴的な症候が顕れる前に行われ得る。

【0030】

アンビセンス: プラスセンス部分とマイナスセンス部分の両方を有するゲノムまたはゲノム分節のことを指す。例えば、フレボウイルスのS分節は、マイナスセンスにおいて核タンパク質(NP)をコードし、プラスセンスにおいて非構造タンパク質(NSs)をコードする、アンビセンスである。

【0031】

動物: 例えば、哺乳動物および鳥類を含むカテゴリーである、生存している多細胞脊椎動物。

【0032】

抗体: 抗原のエピトープを特異的に認識して結合する、少なくとも軽鎖免疫グロブリン可変領域または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンド。抗体は、重鎖および軽鎖から構成され、それらの各々は、可変重鎖(V_H)領域および可変軽鎖(V_L)領域と呼ばれる可変領域を有する。 V_H 領域および V_L 領域は、一体となって、抗体によって認識される抗原への結合に参与する。

【0033】

抗体には、インタクトな免疫グロブリン、ならびに当該分野で周知の抗体のバリエーション

および構成部分（例えば、F a bフラグメント、F a b'フラグメント、F (a b) ' ₂フラグメント、一本鎖F vタンパク質（「s c F v」）およびジスルフィド安定化F vタンパク質（「d s F v」））が含まれる。s c F vタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域とがリンカーによって結合されている融合タンパク質である一方で、d s F vでは、それらの鎖は、それらの鎖の会合を安定化するジスルフィド結合を導入するように変異されている。この用語には、遺伝的に操作された形態（例えば、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体））も含まれる。Pierce Catalog and Handbook, 1994 - 1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照のこと。

【0034】

概して、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。軽鎖には、2つのタイプ、ラムダ（ λ ）およびカッパー（ κ ）がある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス（またはアイソタイプ）が存在する：I g M、I g D、I g G、I g AおよびI g E。

【0035】

重鎖および軽鎖の各々は、定常領域および可変領域を含む（これらの領域は、「ドメイン」としても知られる）。「V_H」または「VH」に対する言及は、F v、s c F v、d s F vまたはF a bの可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖の可変領域のことを指している。「V_L」または「VL」に対する言及は、F v、s c F v、d s F vまたはF a bの可変領域を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域のことを指している。

【0036】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単クローンによってまたは単一抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって、例えば、ミエローマ細胞と免疫脾臓細胞との融合物からハイブリッド抗体形成細胞を作製することによって、産生される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が含まれる。

【0037】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種に由来するフレームワーク残基、すなわち定常ドメインを有し、マウス抗体などの別の種に由来するC D R（一般に抗原結合を付与する）を含む。

【0038】

「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラットまたは合成）免疫グロブリン由来の1つまたはそれを超える相補性決定領域（C D R）を含む免疫グロブリンである。ヒト化抗体は、ヒト定常ドメインおよび非ヒト抗体由来の可変ドメインも含み得る。C D Rを提供している非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供しているヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。いくつかの実施形態において、おそらくC D Rを除く、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分が、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、C D Rを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作によって構築され得る（例えば、米国特許第5, 585, 089号を参照のこと）。

【0039】

「ヒト」抗体（「完全ヒト」抗体とも呼ばれる）は、ヒトフレームワーク領域およびヒト免疫グロブリン由来の全C D Rを含む抗体である。1つの例において、フレームワークおよびC D Rは、同じ起源であるヒト重鎖アミノ酸配列および/またはヒト軽鎖アミノ酸配列に由来する。しかしながら、1つのヒト抗体に由来するフレームワークが、異なるヒト抗体に由来するC D Rを含むように操作され得る。ヒト免疫グロブリンのすべての部分

が、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。

【0040】

抗原：動物において抗体の産生またはT細胞応答を刺激し得る、化合物、組成物または物質（動物に注射されるかまたは吸収される組成物を含む）。抗原は、特異的な液性免疫または細胞性免疫の生成物と反応する。

【0041】

アンチゲノム（Anti-genomic）：本明細書中で使用されるとき、「アンチゲノム」とは、ウイルスゲノムに対して逆の配向のフレボウイルスのゲノム分節のことを指す。例えば、フレボウイルスは、マイナスセンスRNAウイルスである。したがって、「アンチゲノム」とは、プラスセンス配向（またはウイルス相補的センス）のことを指す一方で、「ゲノム（genomic）」とは、遺伝子セグメントのマイナスセンス配向のことを指す。

10

【0042】

弱毒化されている：生きているウイルスの文脈において、細胞もしくは被験体に感染する能力および/または疾患をもたらす能力が、野生型ウイルスと比べて低下している（例えば、排除されている）場合、そのウイルスは、弱毒化されている。概して、弱毒化ウイルスは、免疫適格性被験体への投与後に免疫応答を誘発する少なくともいくらかの能力を保持している。場合によっては、弱毒化ウイルスは、いかなる感染の徴候または症候も引き起こさずに防御免疫応答を誘発することができる。いくつかの実施形態において、弱毒化ウイルスが被験体において疾患を引き起こす能力は、野生型ウイルスと比べて、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%または少なくとも約90%低下している。したがって、「弱毒化変異」は、ウイルスゲノムにおける変異および/または弱毒化ウイルスをもたらすコードされるポリペプチドにおける変異である。

20

【0043】

結合または安定した結合：十分量のオリゴヌクレオチドが、塩基対を形成するか、またはその標的核酸にハイブリダイズされることにより、その結合の検出が可能になる場合、そのオリゴヌクレオチドは、標的核酸に結合するか、または安定に結合する。結合は、標的：オリゴヌクレオチド複合体の物理的特性または機能特性によって検出され得る。標的とオリゴヌクレオチドとの結合は、機能的または物理的結合アッセイの両方を含む、当業者に公知の任意の手順によって検出され得る。結合は、結合が生合成プロセス（例えば、遺伝子の発現、DNAの複製、転写、翻訳など）の際に観察可能な効果を有するかどうかを決定することによって機能的に検出され得る。

30

【0044】

DNAまたはRNAの相補体の結合を検出する物理的方法は、当該分野で周知であり、それらの方法には、DNase Iまたはケミカルフットプリント法、ゲルシフトアッセイおよび親和性切断アッセイ、ノーザンブロッティング、ドットブロッティングならびに光吸収検出の手順などの方法が含まれる。例えば、非常に単純であり、信頼できることから広く使用されている方法は、温度をゆっくり上昇させたときの、オリゴヌクレオチド（またはアナログ）および標的核酸を含む溶液の220~300nmにおける光吸収の変化を観察することを含む。オリゴヌクレオチドまたはアナログは、その標的に結合されている場合、そのオリゴヌクレオチド（またはアナログ）および標的が解離するかまたは融解する特徴的な温度において、吸収が急増する。

40

【0045】

オリゴマーとその標的核酸との結合は、しばしば、そのオリゴマーの50%がその標的から融解される温度（ T_m ）によって特徴付けられる。より高い（ T_m ）は、より低い（ T_m ）を有する複合体と比べて、より強いまたはより安定した複合体を意味する。

【0046】

生物学的サンプル：被験体（例えば、ヒトまたは動物被験体）から得られたサンプル。例示的な生物学的サンプルとしては、体液、細胞および/または組織サンプルが挙げられ

50

る。本明細書中のいくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、体液サンプルである。体液サンプルとしては、血清、血液、血漿、尿、便、唾液、脳脊髄液（CSF）または他の体液が挙げられるが、これらに限定されない。生物学的サンプルとは、細胞または組織サンプル（例えば、生検サンプル、組織切片または単離された白血球）のことも指し得る。

【0047】

接触させる：直接的な物理的会合での配置；これには、固体と液体の両方の形態が含まれる。「接触させる」は、「曝露される」と交換可能に使用されることが多い。場合によっては、「接触させる」には、トランスフェクトすること、例えば、核酸分子を細胞にトランスフェクトすることが含まれる。他の例では、「接触させる」とは、分子（例えば、抗体）を生物学的サンプルとインキュベートすることを指す。

10

【0048】

検出する：ウイルスまたはウイルス粒子（ウイルスペプチドを含む）が、細胞内、細胞上および/または細胞もしくはウイルスが接触している培地中に存在することを、任意の方法を用いて決定すること。それらの方法は、以下に限定されないが、細胞変性効果の観察、ウイルスタンパク質の検出（例えば、免疫蛍光測定法、ELISAまたはウエスタンブロットハイブリダイゼーションによるもの）、ウイルス核酸配列の検出（例えば、PCR、RT-PCR、サザンブロットおよびノーザンブロットによるもの）、核酸ハイブリダイゼーション、核酸アレイなどによって例証される。

【0049】

発現ベクター：所望のタンパク質をコードするための核酸配列が挿入され得るかまたは導入され得る、プラスミド、ウイルスまたは当該分野で公知の別の媒体。

20

【0050】

フルオロフォア：特定の波長の光への曝露によって励起されたとき、例えば、異なる波長の光（すなわち、蛍光（fluoresces））を発する、化学的化合物。本明細書中のいくつかの実施形態において、プローブは、そのプローブの5'末端などにおいて、フルオロフォアで標識される。リアルタイムPCRアッセイのために使用されるプローブは、概して、フルオロフォアおよびクエンチャーを含む。TaqManTM PCRなどのリアルタイムPCRアッセイとともに使用するのに適したフルオロフォアとしては、6-カルボキシフルオレセイン（FAM）、テトラクロロフルオレセイン（TET）、テトラメチルローダミン（TMR）、ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、JOE、ROX、CAL FLUORTM、PULSARTM、QUASARTM、TEXAS REDTM、CYTM3およびCYTM5が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0051】

異種：異種配列は、通常は（すなわち、野生型配列においては）、第2の配列に隣接して見出されない配列である。1つの実施形態において、その配列は、第2の配列と異なる遺伝子供給源（例えば、異なるウイルスまたは生物）に由来する。

【0052】

宿主細胞：外来性の核酸構築物または発現ベクターによる、形質転換、トランスフェクション、形質導入、結合体化などの影響を受けやすい細胞。宿主細胞は、哺乳動物、植物、細菌、酵母、真菌、昆虫、動物などに由来し得る。宿主細胞は、ヒトまたは非ヒト霊長類に由来し得る。

40

【0053】

ハイブリダイゼーション：オリゴヌクレオチドおよびそれらのアナログは、相補的な塩基間のワトソン-クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合を含む、水素結合によってハイブリダイズする。一般に、核酸は、ピリミジン（シトシン（C）、ウラシル（U）およびチミン（T））またはプリン（アデニン（A）およびグアニン（G））である窒素塩基からなる。これらの窒素塩基は、ピリミジンとプリンとの間で水素結合を形成し、そのピリミジンとプリンとの結合は、「塩基対形成」と称される。より詳細には、Aは、TまたはUと水素結合し、Gは、Cと水素結合する。「相補的」とは、2

50

つの異なる核酸配列間または同じ核酸配列の2つの異なる領域間で生じる塩基対形成のことを指す。

【0054】

「特異的にハイブリダイズ可能な」および「特異的に相補的な」は、安定した特異的結合が、オリゴヌクレオチド（またはそのアナログ）とDNA標的またはRNA標的との間に生じるのに十分な程度の相補性を示す用語である。オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログは、特異的にハイブリダイズ可能であるようにその標的配列と100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドまたはアナログと標的DNA分子または標的RNA分子との結合が、標的DNAまたは標的RNAの正常な機能を干渉するとき、および特異的結合が望まれる条件下、例えば、インビボのアッセイまたは系の場合、生理学的条件下において、オリゴヌクレオチドまたはアナログと非標的配列との非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在するとき、そのオリゴヌクレオチドまたはアナログは、特異的にハイブリダイズ可能である。そのような結合は、特異的なハイブリダイゼーションと称される。

10

【0055】

特定の程度のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、好まれるハイブリダイゼーション方法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変動する。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度（特に、 Na^+ および / または Mg^{++} 濃度）は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するが、洗浄回数もまた、ストリンジェンシーに影響する。特定の程度のストリンジェンシーを達成するために必要とされるハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら(ed.)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapter 9および11;ならびにAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999に論じられている。

20

【0056】

本開示の目的で、「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーション分子と標的配列との間に25%未満のミスマッチが存在する場合にだけ、ハイブリダイゼーションが生じる条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は、より正確な定義のために、特定のストリンジェンシーレベルに分けられ得る。したがって、本明細書中で使用されるとき、「中等度の(moderate)ストリンジェンシー」条件は、25%超の配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり;「中間の(medium)ストリンジェンシー」の条件は、15%超の配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり、「高ストリンジェンシー」の条件は、10%超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。「非常に高いストリンジェンシー」の条件は、6%超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。

30

【0057】

「特異的なハイブリダイゼーション」とは、特定のヌクレオチド配列が複合体混合物（例えば、全細胞DNAまたはRNA）中に存在するとき、その配列だけにまたは実質的にその配列だけに分子が結合すること、二重鎖形成することまたはハイブリダイズすることを指す。特異的なハイブリダイゼーションは、様々なストリンジェンシーの条件下でも生じ得る。特定の程度のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション方法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変動する。以下は、例示的なハイブリダイゼーション条件のセットであって、限定するものではない:

40

非常に高いストリンジェンシー（少なくとも90%の同一性を共有する配列を検出する）
ハイブリダイゼーション：16時間にわたる65の5×SSC

50

2回洗浄：各15分間にわたる室温(RT)の2×SSC

2回洗浄：各20分間にわたる65の0.5×SSC

高ストリンジェンシー(少なくとも80%の同一性を共有する配列を検出する)

ハイブリダイゼーション：16~20時間にわたる65~70の5×~6×SSC

2回洗浄：各5~20分間にわたるRTの2×SSC

2回洗浄：各30分間にわたる55~70の1×SSC

低ストリンジェンシー(少なくとも60%の同一性を共有する配列を検出する)

ハイブリダイゼーション：16~20時間にわたるRTから55の6×SSC

少なくとも2回洗浄：各20~30分間にわたるRTから55の2×~3×SSC

【0058】

免疫応答：抗原などの刺激に対する免疫系の細胞(例えば、B細胞、T細胞、マクロファージまたは多形核球(polymorphonucleocyte))の応答。免疫応答は、例えば、インターフェロンまたはサイトカインを分泌する上皮細胞を含む、宿主防御応答に關与する身体の任意の細胞を含み得る。免疫応答としては、自然免疫反応または炎症が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用されるとき、防御免疫応答とは、感染から被験体を防御する(感染を防ぐかまたは感染に關連する疾患の発生を防ぐ)免疫応答のことを指す。

【0059】

免疫原：適切な条件下において、免疫応答(例えば、動物における、例えば、LSVに対する、抗体の産生またはT細胞応答)を刺激することができる、化合物、組成物または物質。免疫原には、動物へと注射されるまたは吸収される組成物が含まれる。本明細書中で使用されるとき、「免疫原性組成物」は、免疫原を含む組成物である。

【0060】

免疫する：ワクチン接種などによって、被験体を感染症から防御すること。

【0061】

単離された：「単離された」生物学的構成要素(例えば、核酸、タンパク質またはウイルス)は、他の生物学的構成要素(例えば、細胞残屑または他のタンパク質もしくは核酸)から実質的に分離されているか、または精製されている。「単離された」生物学的構成要素には、標準的な精製方法によって精製された構成要素が含まれる。この用語は、組換え核酸、タンパク質またはウイルス、ならびに化学的に合成された核酸またはペプチドも包含する。単離された組成物は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%純粋であり得る。

【0062】

標識：その有無またはレベルが直接または間接的にモニター可能である、検出可能な部分またはその任意の原子、分子もしくは一部。種々の検出可能な部分は、当業者に周知であり、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電氣的、光学的または化学的な手段によって検出可能な任意の材料であり得る。そのような検出可能な標識としては、磁気ビーズ、蛍光色素、放射標識、酵素および比色標識(例えば、コロイド金または色ガラスまたはプラスチックビーズ)が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0063】

哺乳動物：この用語は、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「被験体」は、ヒト被験体と動物被験体の両方を含む。

【0064】

核酸：一本鎖または二本鎖の形態における、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよびそれらのポリマー。この用語には、一本鎖ヌクレオチドの相補体およびcDNAが含まれる。別段示されない限り、特定の核酸配列は、その保存的に改変されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)および相補的な配列、ならびに明示的に示された配列も暗に包含する。詳細には、縮重コドン置換は、1つまたはそれを超える選択された(またはすべての)コドンの3番目の位置が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作製することによって、達成され得る(Batzerら、Nuclei

10

20

30

40

50

c Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと交換可能に使用される。

【0065】

特定のヌクレオチド配列は、その名称が示唆するように、遺伝子の選択的スプライシングの産物である「スプライスバリエント」を包含し得る。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（代替の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするように、スプライシングされ得る。スプライスバリエント生成の機構は、様々であるが、エキソンの選択的スプライシングを含む。読み越し転写によって同じ核酸から得られる代替のポリペプチドもまた、この定義に包含される。組換え型のスプライス産物を含むスプライシング反応の任意の産物が、この定義に含まれる。ポリヌクレオチドは、一般に、100ヌクレオチド塩基長を超える配列を含む直鎖状のヌクレオチド配列である。

10

【0066】

オリゴヌクレオチド：短い核酸ポリマー。オリゴヌクレオチドは、一般に、100ヌクレオチド長未満である。本明細書中のいくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、8~100、10~50、12~40、16~30または18~24ヌクレオチド長である。特定の例において、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長である。

20

【0067】

作動可能に連結された：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的関係にある状態で配置されているとき、その第1の核酸配列は、その第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターが、コード配列の転写または発現に影響する場合、そのプロモーターは、そのコード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は、2つのタンパク質コード領域をつなぐ必要がある場合、同じリーディングフレーム内で連続している。

【0068】

ORF（オープンリーディングフレーム）：いかなる終止コドンも含まない、アミノ酸をコードする一続きのヌクレオチドトリプレット（コドン）。これらの配列は、通常、ペプチドに翻訳可能である。

30

【0069】

薬学的に許容され得るキャリア：本開示において有用な薬学的に許容され得るキャリア（ビヒクル）は、従来のものである。E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)には、1つまたはそれを超える治療的な化合物または分子（例えば、1つまたはそれを超える組換えフレボウイルス）および追加の医薬品の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

40

【0070】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、薬学的および生理的に許容され得る流体（例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロス、グリセロールなど）をビヒクルとして含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセルの形態）の場合、従来は無毒性の固体キャリアには、例えば、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与される薬学的組成物は、少量の無毒性の補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート）を含み得る。

50

【 0 0 7 1 】

フレボウイルス：ブニヤウイルス科の5つの属のうちの1つ。フレボウイルスは、正二十面体の対称性を有する、エンベロープを持った球状のウイルスである。フレボウイルスのゲノムは、3つの一本鎖RNAゲノム分節、すなわち、スモール(S)、ミディアム(M)およびラージ(L)からなる。MおよびL分節は、マイナスセンスRNA鎖である一方、S分節は、アンビセンスRNAである。S分節は、プラスセンス配向において非構造タンパク質(NSs)をコードし、マイナスセンス配向において核タンパク質(NP)をコードする。M分節は、宿主のプロテアーゼによって2つの構造ドメインであるGnおよびGcに切断される糖タンパク質前駆体をコードする。L分節は、mRNAおよび複製中間体をそれぞれ生成する1次および2次転写においてRNA依存性RNAポリメラーゼとして機能するLタンパク質をコードする。フレボウイルスは、世界中に分布しており、スナバエ、蚊およびダニをはじめとした多種多様の節足動物によって伝染する。いくつかのフレボウイルスは、ヒトの疾患に関連づけられており、場合によっては熱病、発熱、肝炎、髄膜炎、脳炎または出血症候群を引き起こす。LSVは、フレボウイルスである。

10

【 0 0 7 2 】

ポリペプチド：モノマーが、アミド結合によって互いにつながったアミノ酸残基であるポリマー。そのアミノ酸が、アルファ-アミノ酸であるとき、L-光学異性体またはD-光学異性体のいずれかが使用され得る。本明細書中で使用される用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、任意のアミノ酸配列を包含すると意図されており、糖タンパク質などの改変された配列を含むと意図されている。用語「ポリペプチド」は、天然に存在するタンパク質、ならびに組換え的にまたは合成的に生成されたタンパク質を網羅すると具体的に意図されている。用語「残基」または「アミノ酸残基」は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに組み込まれているアミノ酸への言及を含む。

20

【 0 0 7 3 】

保存的アミノ酸置換は、それが行われたとき、元のタンパク質の特性を最も少なく干渉する、つまり、そのタンパク質の構造および特に機能が保存され、そのような置換によって有意に変化しない、置換である。保存的置換の例を下記に示す。

【 0 0 7 4 】

【表2】

30

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

40

【 0 0 7 5 】

50

保存的置換は、一般に、(a)置換の領域内のポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたは、らせんの立体構造としての構造、(b)標的部位におけるその分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさを維持する。

【0076】

タンパク質の特性に最も大きな変化をもたらすと一般に予想される置換は、例えば、(a)親水性残基、例えば、セリルまたはトレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルの代わりに用いられる(か、またはそれらによって置換される)；(b)システインまたはプロリンが、他の任意の残基の代わりに用いられる(か、またはそれらによって置換される)；(c)電気陽性側鎖、例えば、リジル、アルギニルまたはヒスタジルを有する残基が、電気陰性残基、例えば、グルタミンまたはアスパルチルの代わりに用いられる(か、またはそれらによって置換される)；または(d)かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有しない残基、例えば、グリシンの代わりに用いられる(か、またはそれらによって置換される)、非保存的な変更である。

10

【0077】

疾患を予防する、処置するまたは回復させる：疾患を「予防する」とは、疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置する」とは、疾患または病理学的な状態が発症し始めた後にその徴候または症候を回復させる治療的介入のことを指す。「回復させる」とは、疾患の徴候または症候の数または重症度の減少のことを指す。

【0078】

プローブおよびプライマー：プローブは、検出可能な標識または他のレポーター分子に結合した単離された核酸分子を含む。典型的な標識としては、放射性同位体、酵素基質、補助因子、リガンド、化学発光剤または蛍光剤、ハプテンおよび酵素が挙げられる。標識するための方法および様々な目的にとって適切な標識を選択する際のガイダンスは、例えば、Sambrookら(ed.)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989およびAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999に論じられている。

20

30

【0079】

プライマーは、例えば、連続した相補的なヌクレオチドまたは増幅される配列にハイブリダイズする、短い核酸分子、例えば、10またはそれを超えるヌクレオチド長のDNAオリゴヌクレオチドである。より長いDNAオリゴヌクレオチドは、約12、15、18、20、25、30もしくは50またはそれを超えるヌクレオチド長であり得る。プライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによって、相補的な標的DNA鎖にアニーリングされて、プライマーと標的DNA鎖との間でハイブリッドを形成し、次いで、そのプライマーが、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長され得る。プライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または当該分野で公知の他の核酸増幅方法による、核酸配列の増幅のために使用され得る。増幅の他の例としては、米国特許第5,744,311号に開示されているような鎖置換増幅；米国特許第6,033,881号に開示されているような無転写等温増幅；WO90/01069に開示されているような修復連鎖反応増幅；リガーゼ連鎖反応増幅；5,427,930に開示されているようなギャップフィリングリガーゼ連鎖反応増幅；および米国特許第6,025,134号に開示されているようなNASBAT^MRNA無転写増幅が挙げられる。

40

【0080】

核酸プローブおよびプライマーを調製するためおよび使用するための方法は、例えば、Sambrookら(ed.)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Har

50

bor, NY, 1989; Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999; および Innisら、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990に記載されている。増幅プライマー対は、例えば、Primer (Version 0.5, (著作権) 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)などの、その目的のために意図されたコンピュータプログラムを使用することによって、既知配列から導き出され得る。

【0081】

クエンチャー：近接しているとき、フルオロフォアからの励起エネルギーを吸収する物質。TAQMANTM PCRなどのリアルタイムPCRアッセイのために使用されるプローブは、概して、フルオロフォアおよびクエンチャーを含む。リアルタイムPCRアッセイとともに使用するのに適したクエンチャーとしては、ZENTM、IOWA BLACKTM FQ、テトラメチルローダミン (TAMRA)、ブラックホールクエンチャー (BHQ) 1、BHQ 2、BHQ 3 および 4 - (4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、プローブは、2種のクエンチャーを含む。

【0082】

組換え体：組換え核酸、タンパク質またはウイルスは、天然に存在しない配列を有するものであるか、または2つの別途分断された配列セグメントの人工的な組み合わせによって作製された配列を有するものである。この人工的な組み合わせは、化学合成、またはより一般的には、単離された核酸セグメントの人工的な操作、例えば、遺伝子操作法によって達成されることが多い。いくつかの例では、組換えフレボウイルスは、NSsなどのウイルス病原性因子に1つまたはそれを超える欠失を含む。他の例では、組換えウイルスは、レポーター遺伝子などの異種遺伝子を含む。

【0083】

レポーター遺伝子：レポーター遺伝子は、目的の別の遺伝子または核酸配列（例えば、プロモーター配列）に作動可能に連結された遺伝子である。レポーター遺伝子は、目的の別の遺伝子または核酸が、細胞において発現されているかまたは細胞において活性化されているかを決定するために使用される。レポーター遺伝子は、概して、蛍光などの容易に識別可能な特色または酵素などの容易にアッセイされる生成物を有する。レポーター遺伝子は、宿主細胞または組織に抗生物質耐性も付与し得る。レポーター遺伝子としては、例えば、標識（例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP または eGFP) または他の蛍光遺伝子、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼ) が挙げられる。

【0084】

配列同一性：アミノ酸配列間または核酸配列間の類似性は、配列同一性と別途称される、それらの配列間の類似性に関して表現される。配列同一性は、パーセンテージ同一性（または類似性または相同性）に関してしばしば測定され；そのパーセンテージが高いほど、それらの2つの配列は、より類似している。所与の遺伝子またはタンパク質のホモログまたはバリエーションは、標準的な方法を用いてアラインメントされたとき、比較的高い程度の配列同一性を有する。

【0085】

比較のために配列をアラインメントする方法は、当該分野で周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73: 237-244, 1

10

20

30

40

50

988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989; Corpet, Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988; および Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988. Altschul, Nature Genet. 6:119-129, 1994に記載されている。

【0086】

NCBI ベーシックローカルアラインメントサーチツール (BLASTTM) (Altschul, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) は、配列解析プログラム blastp、blastn、blastx、tblastn および tblastx と関連して使用するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) を含むいくつかの供給源から入手可能であり、インターネット上で利用可能である。

10

【0087】

本明細書中のいくつかの実施形態において、配列番号 1 ~ 10 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、提供される。

【0088】

被験体：ヒトと非ヒト哺乳動物の両方を含むカテゴリーである、生存している多細胞脊椎動物。

20

【0089】

治療有効量：指定の作用物質で処置されている被験体において所望の効果を達成するのに十分なその作用物質の量。例えば、これは、被験体において免疫応答を誘発するためにおよび/またはフレボウイルスによる感染を予防するために有用な組換えフレボウイルス (例えば、ローンスターウイルス) の量であり得る。理想的には、本開示の文脈において、組換えフレボウイルスの治療有効量は、被験体において実質的な細胞傷害作用を引き起こさずに、その被験体においてフレボウイルスによって引き起こされる感染に対する抵抗性を高める、その感染を予防する、回復させるおよび/または処置するのに十分な量である。被験体において感染に対する抵抗性を高めるため、その感染を予防するため、回復させるためおよび/または処置するために有用な組換えフレボウイルスの有効量は、例えば、処置されている被験体、治療的な組成物の投与様式および他の因子に依存する。

30

【0090】

ワクチン：感染症または他のタイプの疾患の予防、回復または処置のために投与される、免疫応答を刺激することができる免疫原性材料の調製物。その免疫原性材料には、弱毒化された微生物または死滅した微生物 (例えば、弱毒化ウイルス)、抗原性タンパク質、抗原性ペプチド、または抗原性タンパク質もしくは抗原性ペプチドをコードする DNA が含まれ得る。ワクチンは、予防的 (防止的) な応答と治療的な応答の両方を誘発し得る。投与方法は、ワクチンに応じて異なるが、接種、経口摂取、吸入または他の投与形態を含み得る。接種は、非経口 (例えば、静脈内、皮下または筋肉内) を含むいくつかの経路のうちの一つによって送達され得る。ワクチンは、免疫応答をブーストするためにアジュバントとともに投与され得る。

40

【0091】

ベクター：宿主細胞に導入され、それにより、形質転換された宿主細胞をもたらす、核酸分子。ベクターは、それが宿主細胞において複製できるようにする核酸配列 (例えば、複製起点 (DNA 合成の開始に参与する DNA 配列)) を含み得る。ベクターは、1 つまたはそれを超える選択可能マーカー遺伝子および当該分野で公知の他の遺伝的エレメントも含み得る。

【0092】

別段説明されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、

50

本開示が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含む。同様に、単語「または」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、「および」を含むと意図されている。ゆえに、「AまたはBを含む」は、AまたはB、またはAおよびBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドに対して与えられる、すべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズおよびすべての分子量または分子質量の値が、近似値であって、説明のために提供されているものであることがさらに理解されるべきである。本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価の方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、好適な方法および材料が、下記に記載される。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参照により援用される。すべてのGENBANK（登録商標）アクセッション番号が、2013年4月19日にデータベースに見られるものとして、参照により本明細書中に援用される。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が、支配するものとする。さらに、材料、方法および実施例は、単に例証であって、限定であると意図されていない。

10

20

30

40

50

【0093】

III. いくつかの実施形態の概要

ローンスターウイルス(LSV)と呼ばれる、フレボウイルス属(ブニヤウイルス科)の新しいメンバーの発見が、本明細書中に開示される。いくつかの実施形態において、本明細書中に開示されるフレボウイルスによる感染は、最近のダニ咬傷に関連する。

【0094】

特に、LSVの3つすべてのゲノム分節の完全なヌクレオチド配列、ならびにNP、GP、NSsおよびポリメラーゼ(L)タンパク質を含む、各分離株によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列が、本明細書中に提供される。抗体、例えば、モノクローナル抗体、その抗原結合フラグメントおよびそのキメラ型(例えば、ヒト化抗体)も提供される。LSV核酸配列と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(例えば、プライマーおよびプローブ)およびコードされたタンパク質に特異的な抗体が、さらに提供される。LSV核酸分子、タンパク質、プローブ、プライマーおよび抗体を使用する診断アッセイおよび検出アッセイも、提供される。さらに、組換えフレボウイルス(例えば、レポーター分子をコードするおよび/または弱毒化変異を含む組換えウイルス)、および被験体において免疫応答を誘発するためのそれらの使用が、提供される。

【0095】

ローンスターウイルスの核酸分子およびポリペプチド

ローンスターウイルス(LSV)分離株のS分節、M分節またはL分節とそれぞれ少なくとも80%同一のS分節、M分節およびL分節などの核酸分子が、本明細書中に開示される。いくつかの実施形態において、S分節のヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。他の実施形態において、M分節のヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。さらなる実施形態において、L分節のヌクレオチド配列は、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。

【0096】

いくつかの非限定的な例において、S分節のヌクレオチド配列は、配列番号1を含むかもしくはそれからなるか；M分節のヌクレオチド配列は、配列番号2を含むかもしくはそれからなるか；L分節のヌクレオチド配列は、配列番号3を含むかもしくはそれからなるか；またはそれらの任意の組み合わせを含むかもしくはそれからなる。特定の非限定的な例において、S分節は、配列番号1を含むかまたはそれからなり、M分節は、配列番号2

を含むかまたはそれからなり、L分節は、配列番号3を含むかまたはそれからなる。

【0097】

さらなる実施形態において、配列番号1、配列番号2；もしくは配列番号3またはその相補体と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の核酸分子が、提供される。さらなる実施形態において、配列番号1、配列番号2；または配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の核酸分子が、提供される。配列番号1、2および/または3を含むかまたはそれらからなる核酸分子もまた提供される。これらの核酸分子のいずれもが、RNAまたはcDNAであり得る。

10

【0098】

さらなる実施形態において、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つのオープンリーディングフレームと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一の核酸配列を含む核酸分子が、提供される。いくつかの例において、その核酸分子は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列のオープンリーディングフレームを含むかまたはそれからなる。具体的な例において、その核酸分子は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号4~7のうちの1つまたは複数をコードする核酸分子を含むかまたはそれからなる単離された核酸分子が、提供される。これらの核酸分子のいずれもが、RNAまたはcDNAであり得る。

20

【0099】

LSV核酸分子のオープンリーディングフレームによってコードされる単離されたポリペプチドが、さらに提供される。いくつかの実施形態において、LSVによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチドと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。特定の例では、LSVポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号4~7のうちの1つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。他の例では、LSVポリペプチドは、配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。他の例では、LSVポリペプチドは、配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列の中に多くとも1、2、3、4または5つの保守的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。

30

【0100】

本明細書中に開示される核酸分子または本明細書中に開示されるタンパク質およびペプチドをコードする核酸分子のいずれかを含むベクターが、本開示によって提供され、細胞を形質転換するために使用され得る。そのベクターは、任意の好適なベクター（例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクター）であり得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、プロモーター、複製起点および/または選択可能マーカを含む。そのベクターは、レポーターもコードし得る。いくつかの例では、ベクターの核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結される。例示的なプロモーターとしては、ウイルスプロモーター（例えば、サイトメガロウイルス前初期遺伝子プロモーター（「CMV」）、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（「tk」）、SV40初期転写単位、ポリオーマ、レトロウイルス、パピローマウイルス、B型肝炎ウイルスならびにヒトおよびサル免疫不全ウイルス）が挙げられる。他のプロモーターは、免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、T細胞レセプター、HLA DQ および DQ、 γ -インターフェロン、インターロ

40

50

イキン - 2、インターロイキン - 2 レセプター、MHC クラス II、HLA - DR、
 - アクチン、筋肉クレアチンキナーゼ、プレアルブミン (トランスサイレチン)、エラス
 ターゼ I、メタロチオネイン、コラゲナーゼ、アルブミン、フェトプロテイン、
 - グロ
 ビン、c - fos、c - HA - ras、インスリン、神経細胞接着分子 (NCAM)、
 1 - 抗トリプシン、H2B (TH2B) ヒストン、I 型コラーゲン、グルコース制御タン
 パク質 (GRP94 および GRP78)、ラット成長ホルモン、ヒト血清アミロイド A (SAA)、
 トロポニン I (TNI)、血小板由来成長因子およびジストロフィンを含む哺乳
 動物遺伝子、樹状細胞特異的プロモーター、例えば、CD11c、マクロファージ特異
 的プロモーター、例えば、CD68、ランゲルハンス細胞特異的プロモーター、例えば、
 ランゲリン (Langerin)、ならびにケラチノサイトならびに皮膚および肺の上皮
 細胞に特異的なプロモーターから単離される。

10

【0101】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導性である。誘導性プロモーターは
 、インデューサー物質の存在下を除いては不活性であるかまたは低活性を示すプロモーター
 である。誘導性プロモーターの例としては、MT - II、MMTV、コラゲナーゼ、ス
 トロメラシリン、SV40、マウスMX遺伝子、
 - 2 - マクログロブリン、MHC クラ
 スI 遺伝子 h - 2 kb、HSP70、プロリフェリン (proliferin)、腫瘍壊
 死因子または甲状腺刺激ホルモン遺伝子プロモーターが挙げられるが、これらに限定され
 ない。他の実施形態において、プロモーターは、宿主細胞に導入されると、追加の因子の
 非存在下でも高レベルの転写をもたらす構成的プロモーターである。必要に応じて、転写
 調節配列には、最小プロモーターだけで観察される転写を超えて転写を増加させる1つま
 たはそれを超える転写因子に対する結合認識部位である1つまたはそれを超えるエンハン
 サーエレメントが含まれる。

20

【0102】

適切な終結および遺伝子転写物のポリアデニル化をもたらすためにポリアデニル化シグ
 ナルを含めることが望ましい場合がある。例示的なポリアデニル化シグナルは、ウシ成長
 ホルモン、SV40 および単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子から単離され
 ている。これらのまたは他のポリアデニル化シグナルのいずれもが、本明細書中に記載さ
 れるアデノウイルスベクターの状況において使用できる。

【0103】

ベクターは、例えば、ウイルスベクターであり得る。ポリオーマ、SV40 (Madz
 akら、1992, J. Gen. Virol., 73: 1533-1536)、アデノウイル
 ス (Berkner, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 39-6; Berlinera、1988, Bio
 Technique s, 6: 616-629; Gorzigliara、1992, J. Virol., 66:
 4407-4412; Quantinら、1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 2581-2584; Rosenfeldら、1992, Cell,
 68: 143-155; Wilkinsonら、1992, Nucl. Acids Res., 20: 2233-2239; Stratford - Perricaudetら、1
 990, Hum. Gene Ther., 1: 241-256)、ワクシニアウイルス (Mackettら、1992, Biotechnology, 24: 495-499)、
 アデノ随伴ウイルス (Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 91-123; Onら、1990, Gene, 89:
 279-282)、HSV および EBV を含むヘルペスウイルス (Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 67
 - 90; Johnsonら、1992, J. Virol., 66: 2952-2965; Finkら、1992, Hum. Gene Ther. 3: 11-19; Breakfieldら、1987, Mol. Neurobiol., 1: 337-371; Fresse
 ら、1990, Biochem. Pharmacol., 40: 2189-2199)、
 シンドビスウイルス (H. Herweijerら、1995, Human Gene T

30

40

50

herapy 6:1161-1167; 米国特許第5,091,309号および同第5,2217,879号)、アルファウイルス(S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22; I. Frolovら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377) ならびに鳥類起源(Brandyopadhyayら、1984, Mol. Cell Biol., 4:749-754; Petropoulosら、1992, J. Virol., 66:3391-3397)、マウス起源(Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:1-24; Millerら、1985, Mol. Cell Biol., 5:431-437; Sorgeら、1984, Mol. Cell Biol., 4:1730-1737; Mannら、1985, J. Virol., 54:401-407) およびヒト起源(Pageら、1990, J. Virol., 64:5370-5276; Buchschalcherら、1992, J. Virol., 66:2731-2739) のレトロウイルスを含むいくつかのウイルスベクターが、構築されている。バキュロウイルス(Autographa californica多核多角体病ウイルス; AcMNPV)ベクターもまた当該分野で公知であり、商業的供給源(例えば、PharMingen, San Diego, Calif.; Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.; Stratagene, La Jolla, Calif.)から入手され得る。

【0104】

これらのベクターを含む宿主細胞も提供される。その宿主細胞は、真核細胞または原核細胞であり得る。好適な宿主細胞の非限定的な例としては、細菌、古細菌、昆虫、真菌(例えば、酵母)、植物および動物細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト)が挙げられる。有用な例示的な細胞としては、大腸菌、枯草菌、Saccharomyces cerevisiae、Salmonella typhimurium、SF9細胞、C129細胞、293細胞、Neurosporaならびに不死化された哺乳動物骨髄系およびリンパ系細胞株が挙げられる。培養中の哺乳動物細胞を増やすための技法は、周知である(Jakoby and Pastan(eds), 1979, Cell Culture Methods in Enzymology, volume 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, N.Y.を参照のこと)。通常使用される哺乳動物宿主細胞株の例は、VEROおよびHeLa細胞、CHO細胞ならびにWI38、BHKおよびCOS細胞株であるが、より高い発現、望ましいグリコシル化パターンまたは他の特徴を提供するようにデザインされた細胞などの細胞株を使用してもよい。酵母細胞を形質転換するための技法(例えば、ポリエチレングリコール形質転換、プロトプラスト形質転換および遺伝子銃)もまた、当該分野で公知である(Gietz and Woods Methods in Enzymology 350:87-96, 2002を参照のこと)。

【0105】

組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来技法によって行われ得る。宿主が、原核生物(例えば、大腸菌であるがこれに限定されない)である場合、DNAの取り込みが可能なコンピテントセルは、当該分野で周知の手順を用いて、指数関数的な増殖相の後に回収され、続いてCaCl₂法によって処理された細胞から調製され得る。あるいは、MgCl₂またはRbClが、使用され得る。形質転換は、所望であれば、宿主細胞のプロトプラストを形成させた後に、またはエレクトロポレーションによっても行われ得る。宿主が、真核生物であるとき、リン酸カルシウム共沈殿のようなDNAのトランスフェクション法、従来機械的手順(例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソームに包まれたプラスミドまたはウイルスベクターの挿入)を使用できる。

【0106】

組換えタンパク質が、宿主細胞などから精製されるとき、いくつかの手順を使用できる。例えば、確立された分子接着特性を有するタンパク質が、そのタンパク質に可逆的に融

10

20

30

40

50

合され得る。適切なりガンドまたは基質を用いて、特異的なタンパク質が、精製カラムに選択的に吸着され、次いで、比較的純粋な形態でカラムから遊離され得る。次いで、融合されたタンパク質は、酵素活性によって除去される。最後に、タンパク質は、イムノアフィニティーカラムを使用して精製され得る。組換えタンパク質は、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞を含む任意の好適な供給源から精製され得る。

【0107】

組換えタンパク質は、形質転換された細菌によって大量に、概してプロモーター誘導後に、プラスミドなどの組換え核酸から発現され得、精製され得るが、発現は、構成的であり得る。IPTGによるプロモーター誘導は、誘導性プロモーターシステムの1つの例である。細菌は、当該分野において標準的な手順に従って生育される。新鮮なまたは凍結された細菌細胞が、タンパク質の単離のために使用される。

10

【0108】

細菌において発現されたタンパク質は、不溶性凝集物（「封入体」）を形成し得る。いくつかのプロトコルが、タンパク質封入体の精製に適している。例えば、封入体の精製は、概して、細菌細胞の破壊、例えば、50 mM TRIS / HCL pH 7.5、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.1 mM ATPおよび1 mM PMSFの緩衝液中でのインキュベーションによる封入体の抽出、分離および/または精製を含む。細胞懸濁物は、フレンチプレスに2~3回通して溶解され得るか、Polytron (Brinkman Instruments)などのホモジナイザー (homogenizer) を使用してホモジナイズされ得るか、または氷上で超音波処理され得る。細菌を溶解する代替の方法は、当業者に明らかである（例えば、Sambrookら、前出；Ausubelら、前出を参照のこと）。

20

【0109】

必要であれば、封入体は、可溶化され、溶解された細胞懸濁物は、概して、遠心分離されて、望まれない不溶物が除去される。封入体を形成していたタンパク質は、適合性の緩衝液での希釈または透析によって再生され得る。好適な溶媒としては、尿素（約4 M ~ 約8 M）、ホルムアミド（少なくとも約80%、体積/体積基準）および塩酸グアニジン（約4 M ~ 約8 M）が挙げられるが、これらに限定されない。凝集物を形成するタンパク質を可溶化することができるいくつかの溶媒、例えば、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、70%ギ酸は、免疫原性および/または活性の欠如を伴うそれらのタンパク質の不可逆的な変性の可能性に起因して、この手順における使用に不適切である。塩酸グアニジンおよび類似の作用物質は、変性剤であるが、この変性は、不可逆的でなく、その変性剤が除去される（例えば、透析によって）かまたは希釈されると、再生が生じ得、免疫学的におよび/または生物学的に活性なタンパク質の再形成が可能になる。他の好適な緩衝液は、当業者に公知である。ヒトタンパク質は、標準的な分離技法、例えば、Ni-NTAアガロース樹脂を用いる技法によって、他の細菌タンパク質から分離される。

30

【0110】

あるいは、細菌ペリプラズムから組換えタンパク質を精製することが可能である。細菌を溶解した後、その細菌のペリプラズム画分が、当業者に公知の他の方法に加えて、冷浸透圧ショックによって単離され得る。ペリプラズムから組換えタンパク質を単離するために、細菌細胞を遠心分離して、ペレットを形成させる。そのペレットを、20%スクロースを含む緩衝液に再懸濁する。それらの細胞を溶解するために、細菌を遠心分離して、ペレットを氷冷5 mM MgSO₄に再懸濁し、氷浴内でおよそ10分間維持する。その細胞懸濁物を遠心分離し、上清をデカントして、保存する。上清中に存在する組換えタンパク質は、当業者に周知の標準的な分離技法によって宿主タンパク質から分離され得る。

40

【0111】

タンパク質を精製するための標準的なタンパク質分離技法として、可溶性分画が使用され得る。最初の工程として、特に、そのタンパク質混合物が、複合的である場合、最初の塩分画が、望まれない宿主細胞タンパク質（または細胞培養液に由来するタンパク質）の多くを目的の組換えタンパク質から分離し得る。好ましい塩は、硫酸アンモニウムである

50

。硫酸アンモニウムは、タンパク質混合物中の水の量を効率的に減少させることによって、タンパク質を沈殿させる。次いで、タンパク質は、その溶解度に基づいて、沈殿する。タンパク質が疎水性であるほど、より低い硫酸アンモニウム濃度で沈殿する可能性が高くなる。典型的なプロトコルは、得られる硫酸アンモニウム濃度が20～30%になるように、飽和硫酸アンモニウムをタンパク質溶液に加えることを含む。この濃度は、最も疎水性のタンパク質を沈殿させる。次いで、その沈殿物を廃棄し（目的のタンパク質が疎水性でない場合）、硫酸アンモニウムを、目的のタンパク質を沈殿させると知られている濃度まで上清に加える。次いで、その沈殿物を緩衝液に溶解し、必要であれば、透析またはダイアフィルトレーションによって、過剰な塩を除去する。タンパク質の溶解度に依存する他の方法（例えば、冷エタノール沈殿）が、当業者に周知であり、それを使用することにより、複雑なタンパク質混合物を分画することができる。

10

【0112】

タンパク質の分子量を用いて、異なるポアサイズの膜（例えば、Amicon膜またはMillipore膜）での限外濾過を使用して、より大きいおよびより小さいサイズのタンパク質からそのタンパク質を単離することができる。第1の工程として、タンパク質混合物を、目的のタンパク質の分子量より小さい分子量のカットオフを有するポアサイズの膜で限外濾過する。次いで、限外濾過の濃縮水（retentate）を、目的のタンパク質の分子量より大きい分子カットオフを有する膜に対して限外濾過する。その組換えタンパク質は、その膜を通過して濾液に入る。次いで、濾液を、下記に記載されるようにクロマトグラフィー処理し得る。

20

【0113】

タンパク質はまた、カラムクロマトグラフィーを使用して、該タンパク質のサイズ、正味の表面電荷、疎水性およびリガンドまたは基質に対する親和性に基づいて他のタンパク質から分離され得る。さらに、タンパク質に対する抗体が、カラムマトリックスに結合体化され得、そのタンパク質が、免疫精製され得る。これらの方法のすべてが、当該分野で周知である。クロマトグラフィー法は、任意のスケールで、多くの異なる製造者（例えば、Pharmacia Biotech）からの機器を使用して行われ得ることは、当業者には明らかである。

【0114】

LSV核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドもまた提供される。オリゴヌクレオチドは、一般に、100ヌクレオチド長未満である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、80未満、60未満、40未満または30未満のヌクレオチド長である。他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、8～100、10～50、12～40、16～30または18～24ヌクレオチド長である。特定の例において、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長である。1つの非限定的な例において、オリゴヌクレオチドは、12～40ヌクレオチド長である。別の非限定的な例において、オリゴヌクレオチドは、18～24ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1、2または3の連続したヌクレオチドと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1、2または3の相補体の連続したヌクレオチドと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。いくつかの例では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号1、2または3のヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。さらなる例では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号1、2または3の相補体のヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。

30

40

【0115】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、フルオロフォアを含む。数多く

50

のフルオロフォアが、当該分野で公知であり、適切なフルオロフォアは、オリゴヌクレオチドの意図される用途に基づいて当業者によって選択され得る。1つの例として、T A Q M A N^{T M} P C RなどのリアルタイムP C Rアッセイの場合、例示的なフルオロフォアとしては、F A M、T E T、T M R、H E X、J O E、R O X、C A L F L U O R^{T M}、P U L S A R^{T M}、Q U A S A R^{T M}、T E X A S R E D^{T M}、C Y^{T M} 3およびC Y^{T M} 5が挙げられるが、これらに限定されない。

【0116】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、クエンチャーを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチドは、1種より多いクエンチャー（例えば、2種のクエンチャー）を含む。好適なクエンチャー（または風数のクエンチャー）は、オリゴヌクレオチドの意図される目的に応じて当業者によって選択され得る。1つの例として、T A Q M A N^{T M} P C RなどのリアルタイムP C Rアッセイの場合、例示的なクエンチャーとしては、Z E N^{T M}、I O W A B L A C K^{T M} F Q、T A M R A、B H Q 1、B H Q 2、B H Q 3およびD A B C Y L^{T M}が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、オリゴヌクレオチドは、2種のクエンチャーを含む。

10

【0117】

1つの非限定的な例において、オリゴヌクレオチド（例えば、そのオリゴヌクレオチドがプローブとして使用され得るとき）は、フルオロフォアおよびクエンチャーを含む。別の非限定的な例において、オリゴヌクレオチドは、フルオロフォアおよび2種のクエンチャーを含む。オリゴヌクレオチドは、プローブまたはプライマーであり得る。

20

【0118】

フレボウイルス

ローンスターウイルスが、本明細書中に開示される。いくつかの実施形態において、L S Vのゲノムは、配列番号1と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するS分節；配列番号2と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するM分節；または配列番号3と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するL分節を含む。他の実施形態において、組換えL S Vのゲノムは、配列番号1と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するS分節；配列番号2と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するM分節；および配列番号3と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するL分節を含む。他の非限定的な例では、それぞれ、(a) S分節のヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であり；(b) M分節のヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であり；(c) L分節のヌクレオチド配列は、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。

30

40

【0119】

具体的な非限定的な例において、組換えローンスターウイルスのゲノムは、配列番号1と少なくとも80%同一のS分節、配列番号2と少なくとも80%同一のM分節および配列番号3と少なくとも80%同一のL分節を含む。別の具体的な非限定的な例において、

50

組換えローンスターウイルスのゲノムは、配列番号1と少なくとも90%同一のS分節、配列番号2と少なくとも90%同一のM分節および配列番号3と少なくとも90%同一のL分節を含む。さらなる具体的な非限定的な例において、組換えローンスターウイルスのゲノムは、配列番号1と少なくとも95%同一のS分節、配列番号2と少なくとも95%同一のM分節および配列番号3と少なくとも95%同一のL分節を含む。

【0120】

いくつかの実施形態において、LSVのゲノムは、配列番号1を含むヌクレオチド配列を有するS分節、配列番号2を含む核酸配列を含むM分節および配列番号3を含む核酸配列を含むL分節を含み得る。さらなる実施形態において、LSVのゲノムは、配列番号1からなるヌクレオチド配列を有するS分節、配列番号2からなる核酸配列を含むM分節および配列番号3からなる核酸配列を含むL分節を含み得る。

10

【0121】

いくつかの例では、組換えLSVは、NSsのオープンリーディングフレーム(ORF)の欠失などの欠失を含む。特定の例において、欠失したORFは、レポーター遺伝子(例えば、蛍光タンパク質をコードする遺伝子または抗生物質耐性遺伝子)で置き換えられる。

【0122】

いくつかの例では、組換えLSVは、少なくとも1つの弱毒化変異を含む。その弱毒化変異は、ウイルスの感染力またはウイルスによって誘導される疾患の減少をもたらす任意の挿入、欠失または置換であり得る。その弱毒化変異は、遺伝子セグメントおよび/またはウイルスタンパク質のいずれかにおけるものであり得る。いくつかの例では、弱毒化変異は、NSsなどの病原性タンパク質の変化または欠失をもたらす。

20

【0123】

組換えLSVは、例えば、逆遺伝学系を使用して、作製され得る。フレボウイルスに対する逆遺伝学系は、当該分野で公知であり、PCT公開番号WO2009/082647および米国特許第8,084,248号に記載されている。

【0124】

抗LSV抗体

LSV分離株および/または本明細書中に開示されるLSVポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが、本明細書中に提供される。いくつかの実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体である。他の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。

30

【0125】

いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、フレボウイルスピリオン、詳細には、LSVピリオンのエピトープに特異的に結合し、ゆえに、ウイルス粒子を検出し得る。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、LSVポリペプチドの線状エピトープもしくは立体構造エピトープまたはその両方に特異的に結合する。

【0126】

いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、LSVのNSs、NP、GPまたはLタンパク質に特異的に結合する。特定の例において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号4~7のうちの1つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のポリペプチドに特異的に結合する。他の特定の例において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号4~7のうちの1つを含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する。抗体は、配列番号4~7のうちの1つの抗原性フラグメントに特異的に結合し得る。

40

【0127】

いくつかの実施形態において、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab)'₂、scFvまたはdsFvである。いくつかの実施形態において、抗体は、マウス

50

、ラットまたはウサギ抗体である。他の実施形態において、抗体は、ヒト化抗体または完全ヒト抗体である。他の実施形態において、抗体は、キメラ抗体である。

【0128】

抗体、例えば、組換え抗体、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の調製のために、当該分野で公知の多くの技法が使用され得る（例えば、Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozborら、*Immunology Today* 4:72 (1983); *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)の中のColeら、pp.77-96; Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); および Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed. 1986)を参照のこと)。

10

【0129】

ポリクローナル抗体を作製する方法は、当業者に公知である。いくつかの実施形態において、フロイントアジュバントなどの標準的なアジュバントおよび標準的な免疫プロトコルを使用して、近交系のマウス系統（例えば、BALB/Cマウス）またはウサギをタンパク質で免疫する。試験採血を行い、ベータサブユニットに対する反応性の力価を測定することによって、その免疫原調製物に対する動物の免疫応答をモニターする。免疫原に対して適切に高い力価の抗体が得られたら、その動物から血液を回収し、抗血清を調製する。所望であれば、その抗血清のさらなる分画により、当該タンパク質に反応性の抗体についての富化が行われ得る（Harlow & Lane, 前出を参照のこと）。

20

【0130】

モノクローナル抗体は、当業者によく知られた様々な技法によって得ることができる。簡潔には、所望の抗原で免疫された動物由来の脾臓細胞を、通常、ミエローマ細胞との融合によって、不死化する（Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976)を参照のこと）。不死化の代替の方法としては、エプスタイン・バーウイルス、オンコジーンもしくはレトロウイルスによる形質転換または当該分野で周知の他の方法が挙げられる。単一の不死化細胞から生じたコロニーが、抗原に対して所望の特異性および親和性の抗体の産生についてスクリーニングされ、脊椎動物宿主の腹腔腔への注射を含む様々な技法によって、そのような細胞が産生するモノクローナル抗体の収量が高められ得る。あるいは、Huseら、*Science* 246:1275-1281 (1989)に概説されている一般的なプロトコルに従って、ヒトB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、モノクローナル抗体またはその結合フラグメントをコードするDNA配列を単離することもできる。

30

【0131】

ファージディスプレイ技術を使用することにより、選択された抗原に特異的に結合する抗体およびヘテロマーのFabフラグメントを同定することができる（例えば、McCaffertyら、*Nature* 348:552-554 (1990); Marksら、*Biotechnology* 10:779-783 (1992)を参照のこと）。抗体は、二重特異性、すなわち、2つの異なる抗原を認識することができるようにもされ得る（例えば、WO93/08829、Traunekerら、*EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); および Sureshら、*Methods in Enzymology* 121:210 (1986)を参照のこと）。抗体は、ヘテロコンジュゲート、例えば、2つの共有結合的につながれた抗体または免疫毒素でもあり得る（例えば、米国特許第4,676,980号、WO91/00360; WO92/200373; およびEP03089を参照のこと）。

40

【0132】

モノクローナル抗体およびポリクローナル血清が、回収され、イムノアッセイ、例えば、固体支持体上に固定化された免疫原を用いる固相イムノアッセイにおいて、免疫原タン

50

パク質に対して力価測定される。概して、 10^4 またはそれを超える力価を有するポリクローナル抗血清が選択され、競合的結合イムノアッセイを使用して、非LSVタンパク質および非LSV核酸に対する交差反応性について試験される。特異的なポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体は、一般的には、少なくとも約 0.1 mM の K_d 、より一般的には、少なくとも約 $1\ \mu\text{M}$ の K_d 、例えば、少なくとも約 $0.1\ \mu\text{M}$ またはそれより良好な K_d 、例えば、 $0.01\ \mu\text{M}$ またはそれより良好な K_d で結合する。特定のLSVタンパク質だけに特異的な抗体は、他の交差反応性タンパク質を取り去ることによっても、作製され得る。この様式では、好まれるタンパク質だけに結合する抗体を得ることができる。

【0133】

キメラもまた提供され、ここで、(a) 定常領域またはその一部は、抗原結合部位(可変領域)が、異なるクラス、エフェクター機能および/もしくは種または変更されたクラス、エフェクター機能および/もしくは種の定常領域あるいはキメラ抗体に新しい特性を付与する全く異なる分子、例えば、酵素、トキシン、ホルモン、成長因子、薬物などに連結されるように、変更されているか、置き換えられているか、または交換されているか；または(b) 可変領域またはその一部は、異なる抗原特異性または変更された抗原特異性を有する可変領域によって変更されているか、置き換えられているか、または交換されている。具体的な非限定的な例において、抗体は、LSVタンパク質に特異的に結合する1つの抗体由来の相補性決定領域(CDR)、および異なる抗体由来の少なくとも1つのフレームワーク領域を含むキメラ抗体であり得る。

【0134】

ヒト化抗体または霊長類化(primatized)抗体が、使用され得る。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその抗体に導入された1つまたはそれを超えるアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、概して移入可変ドメインから選取られた、移入残基と称されることが多い。非ヒト抗体をヒト化するためまたは霊長類化するための方法は、当該分野で周知である。ヒト化は、げっ歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることによる、Winterおよび共同研究者の方法に従って基本的に行われ得る(例えば、Jonesら、Nature 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature 332:323-327(1988); Verhoeyenら、Science 239:1534-1536(1988)およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照のこと)。したがって、そのようなヒト化抗体は、キメラ抗体(米国特許第4,816,567号)であり、ここで、実質的にインタクトでないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、概して、いくつかのCDR残基またはすべてのCDR残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体などの非ヒト抗体における類似の部位からの残基によって置換された、ヒト抗体である。ヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域が使用されているがCDRは非ヒト抗体由来である抗体でもあり得る。

【0135】

通常、上記抗体および抗原結合フラグメントは、LSVに特異的に結合する。これらのLSV特異的抗体は、例えば、生物学的サンプル中のLSVまたはLSVポリペプチドを検出するためのアッセイにおいて使用され得る。例示的な免疫検出アッセイとしては、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ(RIA)および免疫組織化学(IHC)アッセイが挙げられる。そのようなアッセイを行う方法は、当該分野で周知であり、下記で簡潔に開示される。

【0136】

フレボウイルスを検出するための方法

本明細書中に開示されるLSVの単離および配列決定は、生物学的サンプル中のLSVを検出するためおよび/または被験体におけるLSV感染を診断するために使用され得る一連のアッセイの開発を可能にした。

10

20

30

40

50

【0137】

検出アッセイおよび診断アッセイのいくつかの実施形態において、その方法は、被験体から生物学的サンプルを得る工程をさらに含む。いくつかの例では、サンプルは、被験体から直接得られ、上に記載されたアッセイのうちの一つにおいて使用される。他の例では、サンプルは、被験体から生物学的サンプルを直接取り出さずに、間接的に得られる。サンプルが間接的に得られるいくつかの場合では、そのサンプルは、例えば、臨床医または検査室の職員から得られる。

【0138】

いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、細胞または組織サンプル（例えば、生検サンプル、骨髄吸引物または単離された細胞）である。他の実施形態において、生物学的サンプルは、体液サンプルである。いくつかの例では、体液サンプルは、血清、血液、血漿、尿、便、唾液または脳脊髄液を含む。

10

【0139】

LSV特異的抗体を使用して生物学的サンプル中のLSVまたはLSVポリペプチドを検出するための方法が、本明細書中に提供される。いくつかの実施形態において、その方法は、生物学的サンプルをLSV特異的抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；およびその生物学的サンプルへのその抗体または抗原結合フラグメントの結合を検出する工程を含む。生物学的サンプルへの抗体または抗原結合フラグメントの結合は、生物学的サンプル中のLSVまたはLSVポリペプチドの存在を示す。

【0140】

検出方法のいくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、LSVのNSs、NP、GPまたはLタンパク質に特異的に結合する。特定の例において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1、2または3のオープンリーディングフレームと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のポリペプチドに特異的に結合する。他の実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号4～7のうちの一つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のポリペプチドに特異的に結合する。他の特定の例において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号4～7のうちの一つを含むかまたはそれからなるアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する。

20

30

【0141】

本明細書中に開示されるLSVポリペプチドを使用して生物学的サンプル中のLSV特異的抗体を検出するための方法もまた提供される。いくつかの実施形態において、その方法は、生物学的サンプルをLSV特異的ポリペプチドと接触させる工程；およびその生物学的サンプルへのそのポリペプチドの結合を検出する工程を含む。生物学的サンプルへのポリペプチドの結合は、生物学的サンプル中のLSV特異的抗体の存在を示す。

【0142】

検出方法のいくつかの実施形態において、LSVポリペプチドは、NSs、NP、GPまたはLタンパク質である。特定の例において、フレボウイルスポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号4～7のうちの一つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。他の例において、フレボウイルスポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号4～7のうちの一つを含むかまたはそれからなる。その方法は、目的の被験体由来の生物学的サンプル中のこれらのタンパク質の一つまたはそれを超えるタンパク質を検出する。

40

【0143】

抗体へのポリペプチドの結合に基づく検出アッセイは、当該分野で周知であり、それらとしては、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、蛍光励起細胞分取（FACS）、ラジオイムノアッセイおよび免疫組織化学が挙げられる。当業者に周知であるように、場

50

合によっては、検出アッセイは、抗原抗体複合体を、検出試薬（例えば、標識された2次抗体（例えば、抗アイソタイプ抗体、例えば、抗IgG抗体））またはサンドイッチELISAの場合は第1の抗体と同じ抗原を認識し、検出のために標識された第2の抗体と接触させる工程をさらに含む。2次抗体はまた、磁気選別を可能にするために磁気ビーズに結合体化され得る。他の場合では、1次抗体が、直接標識される。直接標識された抗体は、FACSなどの種々の検出アッセイのために使用され得る。

【0144】

非競合的イムノアッセイは、抗原が直接検出されるアッセイであって、場合によっては抗原の量が直接測定されるアッセイである。酵素媒介性のイムノアッセイ（例えば、免疫蛍光測定法（IFA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫プロット法（ウエスタン）および捕捉アッセイ）は、LSVタンパク質の非競合的検出を達成するように容易に適合され得る。

10

【0145】

LSVの検出に有効なELISA法は、例えば、以下のとおりであり得る：（1）抗体または抗原を基材に結合させ；（2）結合したレセプターを、ウイルス、ウイルス抗原またはウイルスに対する抗体を含む体液または組織サンプルと接触させ；（3）上記のものを、検出可能な部分（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素またはアルカリホスファターゼ酵素）に結合した抗体と接触させ；（4）上記のものを、当該酵素に対する基質と接触させ；（5）上記のものを呈色試薬と接触させ；（6）色の変化を観察する。上記方法は、サンプル中の抗LSV抗体または特異的なLSVポリペプチドならびにウイルスの存在を検出するように容易に改変され得る。

20

【0146】

ウエスタンプロット（イムノプロット）解析を使用することにより、サンプル中のLSVの存在を検出することおよび定量することができる。その技法は、通常、分子量に基づくゲル電気泳動によるサンプルタンパク質を分離する工程、分離されたタンパク質を好適な固体支持体（例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルターまたは誘導体化ナイロンフィルター）に移す工程、およびそのサンプルをLSVポリペプチドに特異的に結合する抗体とともにインキュベートする工程を含む。抗LSVポリペプチド抗体は、固体支持体上の抗原に特異的に結合する。これらの抗体は、直接標識され得るか、あるいは、その後、その抗LSV抗体に特異的に結合する標識された抗体（例えば、標識されたヒッジ抗マウス抗体）を使用して検出され得る。

30

【0147】

他のアッセイ形式には、特異的な分子（例えば、抗体）に結合し、被包された試薬またはマーカーを放出するようにデザインされたリポソームを使用するリポソームイムノアッセイ（LIA）が含まれる。次いで、放出された化学物質は、標準的な技法に従って検出される（Monroeら、Amer. Cl M. Prod. Rev. 5: 34-41（1986）を参照のこと）。

【0148】

本明細書中に開示されるLSV核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプローブおよび/またはプライマーを使用して生物学的サンプル中のLSV核酸分子を検出するための方法が、さらに提供される。いくつかの実施形態において、その方法は、LSV核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブと生物学的サンプルとを接触させる工程；および生物学的サンプルとプローブとのハイブリダイゼーションを検出する工程を含む。高ストリンジェンシーまたは非常に高いストリンジェンシー条件などにおける、プローブと生物学的サンプルとのハイブリダイゼーションは、生物学的サンプル中のLSV核酸分子の存在を示す。

40

【0149】

いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、生物学的サンプルからRNAを単離する工程；そのRNAを逆転写して、cDNAを生成する工程；およびLSV核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用してそのcDNAを増幅し、それによ

50

り、核酸増幅産物を生成する工程を含む方法によって得られる核酸増幅産物である。

【0150】

本明細書中に開示されるLSV核酸分子（例えば、S、MまたはL LSV核酸分子）と特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用してLSVに感染した被験体を同定するための方法もまた提供される。いくつかの実施形態において、その方法は、被験体から得られた生物学的サンプルからRNAを単離する工程；そのRNAを逆転写して、cDNAを生成する工程；LSV核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用してそのcDNAを増幅する工程；および増幅産物を検出する工程を含む。その増幅産物の検出は、被験体をLSVに感染していると同定する。

【0151】

核酸に基づく検出方法のいくつかの実施形態において、LSV核酸分子のヌクレオチド配列は、配列番号1、2または3あるいはその一部と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%同一であり、例えば、限定なしにオープンリーディングフレームが検出される。いくつかの例では、配列番号1、2もしくは3またはその一部を含むかまたはそれからなるフレボウイルス核酸分子のヌクレオチド配列が、検出される。いくつかの実施形態において、配列番号4～7の1つまたは複数をコードする核酸が、検出される。

【0152】

核酸に基づく検出方法のいくつかの実施形態において、核酸増幅のためにプライマー対が使用される。いくつかの実施形態において、増幅産物を検出する工程は、その増幅産物をプローブにハイブリダイズする工程を含む。いくつかの実施形態において、そのプローブは、フルオロフォア、クエンチャーまたはその両方を含む。1つの非限定的な例において、プローブは、フルオロフォアおよび2種のクエンチャーを含む。

【0153】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用してサンプル中の特異的な核酸分子を検出する方法は、当該分野で周知である。いくつかの実施形態において、PCR検出法は、TAQMANTMPCRなどのリアルタイムPCR法である。TAQMANTMPCRアッセイは、概して、自己クエンチングプローブを使用し、場合によっては、フルオロフォアおよび2種のクエンチャーを含む。プローブが2種のクエンチャーを含むいくつかの場合において、第1のクエンチャーは、プローブの3'末端に配置され、第2のクエンチャーは、リンカーを使用することなどによってオリゴヌクレオチドに挿入される。フルオロフォアは、概して、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端に配置される。各PCRサイクルのアニーリング相の間に、プライマーと二重にクエンチされるプローブの両方が、そのDNAの相補的な区画に結合する。伸長相の間に、新しいDNA鎖の重合が、プライマーから開始される。いったんポリメラーゼが、結合したプローブに達すると、その5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性により、プローブが分解され、それにより、フルオロフォアからクエンチャーが物理的に分離する。結果として、蛍光を測定することができ、その蛍光は、PCR産物の指数関数的な増加とともにリアルタイムで増加する。

【0154】

PCRの場合、低ストリンジェンシー増幅では、約36の温度が典型的であるが、アニーリング温度は、プライマーの長さに応じて、約32～48で変動し得る。高ストリンジェンシーPCR増幅の場合、約62の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーのアニーリング温度は、プライマーの長さおよび特異性に応じて、約50～約65の範囲であり得る。高ストリンジェンシー増幅と低ストリンジェンシー増幅の両方に対する典型的なサイクル条件は、30秒～2分間の90～95の変性相、30秒～2分間続くアニーリング相および1～2分間の約72の伸長相を含む。低および高ストリンジェンシー増幅反応に対するプロトコルおよびガイドラインは、提供されている（例えば、Innisら（1990）PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, In

10

20

30

40

50

c . N . Y .) において)。

【0155】

LSVポリヌクレオチドに対するプローブは、ハイブリダイゼーションによるユニークなウイルス配列の検出を可能にする長さのものであるかまたはそのような検出を可能にする配列を有する。約6～8ヌクレオチドが、有用であり得るが、それより長い配列、例えば、約10～12ヌクレオチド(例えば、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは約20ヌクレオチドまたはそれを超えるヌクレオチド)の配列もより有効であり得る。いくつかの実施形態において、これらの配列は、ウイルス分離株の間で異質性を欠く領域に由来する。

【0156】

PCRに基づかない配列特異的DNA増幅技法もまた、LSV配列を検出するために本発明とともに使用され得る。そのような技法の例としては、INVADER(登録商標)アッセイ(例えば、Kwiatkowskiら、Mol Diagn December 1999, 4:353-64および米国特許第5,846,717号を参照のこと)が挙げられるが、これに限定されない。

【0157】

他の実施形態において、本明細書中に記載される任意のポリヌクレオチドを含むアレイなどの固形基材が、提供される。それらのポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を使用してアレイ上に固定化される。アレイは、1つまたはそれを超える異なるポリヌクレオチドを有し得る。

【0158】

プローブ(またはサンプル核酸)は、検出のためにアレイ上に提供され得る。アレイは、例えば、ポリヌクレオチドプローブを、基材(例えば、ガラス、ニトロセルロースなど)の上に2次元マトリックスでまたは整列させてスポットすることによって、作製され得る。それらのプローブは、共有結合または疎水性相互作用などの非特異的相互作用のいずれかによって、その基材に結合され得る。ポリヌクレオチドのサンプルは、検出可能に標識され(例えば、放射性標識または蛍光標識を使用して)、次いで、プローブにハイブリダイズされ得る。プローブポリヌクレオチドに結合された標識されたサンプルポリヌクレオチドを含む二本鎖ポリヌクレオチドは、サンプルの未結合部分が洗い流されたら、検出され得る。アレイを構築するための技法およびこれらのアレイを使用する方法は、公開欧州出願番号EP799897;公開PCT出願番号WO97/29212;公開PCT出願番号WO97/27317;公開欧州出願番号EP785280;公開PCT出願番号WO97/02357;米国特許第5,593,839号;米国特許第5,578,832号;公開欧州出願番号EP728520;米国特許第5,599,695号;公開欧州出願番号EP721016;米国特許第5,556,752号;WO95/22058;および米国特許第5,631,734号に記載されている。例えば、各標的領域に対するプローブならびにコントロール(ポジティブとネガティブの両方)が単一のアレイ上に提供され得るように、単一のサンプルが、2つまたはそれを超える核酸標的領域の存在について解析されるべきである場合、アレイが特に有用である。したがって、アレイは、迅速かつ好都合な解析を容易にする。

【0159】

免疫原性組成物およびその使用

本明細書中に開示される任意のLSVポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび組換えウイルスが、免疫応答を誘発するため(例えば、LSVによる感染からの防御を提供するため)に免疫原性組成物において使用され得る。したがって、本明細書中に開示される組成物は、予防的または治療的に使用され得る。それらの組成物は、健常な被験体またはLSVに感染した被験体において免疫応答をもたらすために使用され得る。免疫原性組成物は、必要に応じてアジュバントを含む。

【0160】

いくつかの実施形態において、本明細書中に開示されるようなLSVポリペプチドまた

10

20

30

40

50

はその免疫原性フラグメントおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む免疫原性組成物が、提供される。その免疫原性組成物は、アジュバントをさらに含み得る。いくつかの例では、その免疫原性組成物は、LSV NSs、NP、GPまたはLタンパク質を含む。特定の例において、フレボウイルスポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレーム(open reading from)と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。他の特定の例において、フレボウイルスポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームを含むかまたはそれからなる。なおも他の例において、そのポリペプチドは、配列番号1、その相補体、配列番号(SEQ DI NO:)2または配列番号3のオープンリーディングフレームの免疫原性フラグメントを含む。他の例において、その免疫原性組成物は、配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列を含むかまたはそれからなるポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0161】

本明細書中に記載されるような組換えLSVおよび薬学的に許容され得るキャリアを含む免疫原性組成物も、提供される。そのLSVは、弱毒化され得る。

【0162】

いくつかの実施形態において、組換えLSVは、配列番号1と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するS分節；配列番号2と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するM分節；および配列番号3と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のヌクレオチド配列を有するL分節を含む。

【0163】

ホールウイルス(Whole virus)ワクチン(弱毒化された生のもの、または複製能力のないものまたは死滅させたもの)またはサブユニットワクチン(例えば、構造LSVタンパク質もしくは非構造LSVタンパク質またはその免疫原性フラグメント)は、被験体において免疫応答を誘発することによって、それぞれLSV感染症を処置するためまたは予防するために使用され得る。あるいは、薬学的組成物は、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)がそれぞれLSVポリペプチドを発現するようにLSVポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞を含み得る。

【0164】

治療有効量の組換えLSV、LSVポリペプチドもしくはLSVポリペプチドをコードする核酸分子または本明細書中に開示されるような免疫原性組成物を被験体に投与することによって、その被験体においてLSVに対する免疫応答を誘発する方法が、さらに提供される。いくつかの実施形態において、被験体には、LSVによる感染を防ぐために、組換えLSV、LSVポリペプチドまたは免疫原性組成物が予防的に投与される。他の場合、組換えLSV、LSVポリペプチド、LSVポリペプチドをコードする核酸分子または免疫原性組成物は、LSV感染症に対する処置として投与される。

【0165】

治療有効量の組換えLSV、LSVポリペプチド、LSVポリペプチドをコードする核酸分子または本明細書中に開示されるような免疫原性組成物を被験体に投与することによって、LSV感染症などのフレボウイルス感染に対してその被験体を免疫する方法もまた提供される。

【0166】

LSVのゲノム、構造タンパク質もしくは非構造タンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸ワクチンが、免疫応答を誘発して、それぞれLSV感染症を処置するかま

たは予防するために使用され得る。数多くの遺伝子送達技法（例えば、Rolland（1998）Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198およびその中で引用された参考文献に記載されたもの）が、当該分野で周知である。適切な核酸発現系は、患者における発現のために必要なDNA配列（例えば、好適なプロモーターおよび終結シグナル）を含む。好ましい実施形態において、そのDNAは、ウイルス発現系（例えば、ワクシニア、ポックスウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルス）を使用して導入され得、それは、複製能力のない非病原性（欠陥）ウイルスの使用を含み得る。好適な系は、例えば、Fisher-Hochら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexnerら（1989）Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexnerら（1990）Vaccine 8:17-21; 米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、同第4,777,127号および同第5,017,487号; PCT公開番号WO89/01973; 英国公開番号2,200,651; 欧州公開番号0,345,242; PCT公開番号WO91/02805; Berkner（1988）Biotechniques 6:616-627; Rosenfeldら（1991）Science 252:431-434; Kollsら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219; Kass-Eislerら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502; Guzmanら（1993）Circulation 88:2838-2848; および Guzmanら（1993）Cir. Res. 73:1202-1207に開示されている。DNAをそのような発現系に組み込むための技法は、当業者に周知である。そのDNAは、例えば、Ulmerら（1993）Science 259:1745-1749に記載され、Cohen（1993）Science 259:1691-1692に概説されているような、「裸」でもあり得る。裸のDNAの取り込みは、そのDNAを、細胞に効率的に輸送される生分解性ビーズ上にコーティングすることによって高められ得る。ワクチンが、ポリヌクレオチドとポリペプチドの両方の構成要素を含み得ることは、明らかである。そのようなワクチンは、増強された免疫応答をもたらし得る。

【0167】

ワクチン調製物は、例えば、Powell and Newman, eds., Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach), Plenum Press (NY, 1995) に広く記載されている。ワクチンは、抗体免疫および/または細胞性免疫（例えば、CTLまたはCD4+T細胞から生じるもの）を生成するようにデザインされ得る。

【0168】

非特異的な免疫応答増強物質（immune response enhancer）は、外来性抗原に対する免疫応答を増強する任意の物質であり得る。非特異的な免疫応答増強物質の例としては、アジュバント、生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリ乳酸ガラクトイド（polylactic galactide））およびリポソーム（その中に化合物が取り込まれている；例えば、米国特許第4,235,877号を参照のこと）が挙げられる。ほとんどのアジュバントは、抗原を迅速な異化から保護するようにデザインされた物質（例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油）および免疫応答の刺激物質（例えば、リポドA、Bordetella pertussisまたはMycobacterium tuberculosis由来のタンパク質）を含む。好適なアジュバントは、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント（Difco Laboratories, Detroit, MI）; Merck Adjuvant 65（Merck and Company, Inc., Rahway, NJ）; AS-2（SmithKline Beecham）; アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウム）; カルシウム、鉄または亜鉛の塩; アシル化チロシンの不溶性懸濁物; アシル化糖; カチオン性にまたはアニオン性に誘導体化された

10

20

30

40

50

(cationically or anionically derivatized) 多糖類；ポリホスファゼン；生分解性マイクロスフェア；モノホスホリルリピドAおよびクイル(quil)Aとして、商業的に入手可能である。サイトカイン(例えば、GM-CSFまたはインターロイキン-2、-7もしくは-12)もまた、アジュバントとして使用され得る。これらは、免疫応答の誘導において有用である。

【0169】

薬学的組成物およびワクチンは、生物学的に活性または不活性であり得る、他の化合物も含み得る。例えば、他の抗原の1つまたはそれを超える免疫原性部分が、組成物中またはワクチン中に、融合ポリペプチドに組み込まれた状態でまたは別個の化合物として、存在し得る。ポリペプチドは、例えば、米国特許第4,372,945号および同第4,474,757号の中で記載されているように、他の高分子に結合体化され得るが、結合体化される必要はない。薬学的組成物およびワクチンは、一般に、予防目的および治療目的で使用され得る。

10

【0170】

経口投与に適した製剤は、(a)液体溶液(例えば、希釈剤(例えば、水、食塩水またはPEG400)に懸濁された有効量のパッケージされた核酸)；(b)カプセル、サシェまたは錠剤(各々、所定の量の活性成分を液体、固体、顆粒またはゼラチンとして含む)；(c)適切な液体における懸濁物；および(d)好適なエマルジョンからなり得る。錠剤の形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および他の賦形剤、着色料、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味料、色素、崩壊剤ならびに薬学的に適合性のキャリアのうちの1つまたは複数を含み得る。舐剤の形態は、フレーバー、例えば、スクロースの中に活性成分を含み得、ならびにトローチ剤は、活性成分に加えて当該分野で公知のキャリアを含む不活性な基剤(例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアエマルジョン、ゲルなど)の中に活性成分を含む。

20

【0171】

エアロゾル製剤(すなわち、それらは「霧状に」され得る)は、吸入を介して投与される。エアロゾル製剤は、加圧された許容され得る噴霧剤(例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など)の中に入れられ得る。

30

【0172】

非経口投与、例えば、関節内(関節の中)、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内および皮下経路による非経口投与に適した製剤は、水性および非水性の滅菌された等張性注射溶液(これは、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、およびその製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る)ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および保存剤を含み得る水性および非水性の滅菌された懸濁物を含む。組成物は、例えば、静脈内注入によって、吸入によって、非経口的に、経口的に、局所的に、皮内に、腹腔内に、静脈内に、膀胱内に、直腸にまたは髄腔内に、投与され得る。それらの製剤は、単位用量または複数回用量が密封された容器(例えば、アンプルおよびバイアル)で提供され得る。薬学的に許容され得るキャリアは、投与される特定の組成物(例えば、核酸、タンパク質、調節性化合物または形質導入された細胞)によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、ある程度決定される。したがって、本発明の薬学的組成物の多種多様の好適な製剤が存在する(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照のこと)。

40

【0173】

そのような組成物は、緩衝液(例えば、中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸(例えば、グリシン)、酸化防止剤、静菌剤、キレート剤(例えば、EDTAまたはグルタチオン)、アジュバント(例えば、水

50

酸化アルミニウム)、製剤をレシピエントの血液と等張性、低張性もしくはやや高張性にする溶質、懸濁化剤、増粘剤および/または保存剤も含み得る。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化され得る。また、化合物は、周知の技術を用いてリボソーム内に被包され得る。

【0174】

注射溶液および注射懸濁物は、先に記載された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製され得る。エキソピボ治療のための、核酸によって形質導入された細胞もまた、静脈内または非経口的に投与され得る。

【0175】

被験体に投与される用量は、経時的に被験体において有益な治療的応答をもたらすのに十分であるべきである。その用量は、使用される特定のベクターの有効性および被験体の状態、ならびに処置される被験体の体重または表面積によって決定される。用量のサイズは、特定のベクターの投与に伴う任意の有害な副作用の存在、性質および程度、または特定の患者における形質導入された細胞型によっても決定される。

10

【0176】

投与に向けて、本発明の化合物および形質導入された細胞は、阻害剤のLD-50、ベクターまたは形質導入された細胞型、ならびに患者の大きさ(mass)および全般的な健康状態に適用されたときの、阻害剤、ベクターまたは細胞型の様々な濃度における副作用によって決定された速度で投与され得る。投与は、単回用量または分割用量によって達成され得る。

20

【0177】

薬学的組成物およびワクチン組成物は、単位用量または複数回用量の容器(例えば、密閉されたアンプルまたはバイアル)で提供され得る。そのような容器は、好ましくは、使用するまでその製剤の無菌性を守るために密封されている。一般に、製剤は、油性または水性ビヒクル中の懸濁物、溶液またはエマルジョンとして保存され得る。あるいは、ワクチン組成物または薬学的組成物は、使用する直前に、滅菌された液体キャリアを加えることだけが必要なフリーズドライされた状態で保存され得る。

【0178】

LSVの修飾物質についてのアッセイ

LSVの調節は、細胞に基づくモデルを含む種々のインビトロおよびインビボアッセイを使用して評価され得る。そのようなアッセイは、LSVの阻害剤および活性化剤について試験するために使用され得る。LSVの修飾物質は、好まれる組換えタンパク質または天然に存在するタンパク質のいずれかを使用して試験される。調節としては、感染、複製、レセプター結合、細胞侵入、粒子形成などの調節が挙げられ得るが、これらに限定されない。

30

【0179】

LSVポリペプチドの調節、または組換えLSVもしくは天然に存在するLSVを発現する細胞の調節の測定は、本明細書中に記載されるように、インビトロ、インビボおよびエキソピボの種々のアッセイを使用して行われ得る。活性、例えば、酵素活性、細胞表面マーカーの発現、ウイルスの複製および増殖に影響する、好適な物理的变化、化学的变化または表現型の変化は、本発明のポリペプチドに対する試験化合物の影響を評価するために使用され得る。機能的な影響が、インタクトな細胞または動物を用いて決定されるとき、種々の影響も測定され得る。

40

【0180】

LSV調節活性を有する化合物を同定するアッセイが、インビトロにおいて行われ得る。そのようなアッセイは、完全長LSVポリペプチドもしくはそのバリエーションまたはその変異体またはそのフラグメントを使用し得る。精製された組換えタンパク質または精製された天然に存在するタンパク質が、本発明のインビトロ方法において使用され得る。その組換えタンパク質または天然に存在するタンパク質は、細胞溶解産物または細胞膜の一部であり得る。下記に開示されるように、結合アッセイは、固体の状態または可溶性であり

50

得る。好ましくは、そのタンパク質または膜は、共有結合的または非共有結合的のいずれかで、固体支持体に結合される。しばしば、本発明のインビトロアッセイは、非競合的または競合的のいずれかの、基質結合アッセイもしくはリガンド結合アッセイまたは親和性アッセイである。他のインビトロアッセイは、当該タンパク質に対する分光学的特性（例えば、蛍光、吸光度、屈折率）、流体力的特性（例えば、形状）、クロマトグラフィー特性または溶解特性の変化の測定を含む。

【0181】

タンパク質またはそのフラグメントを潜在的な修飾物質と接触させ、好適な時間量にわたってインキュベートするハイスループット結合アッセイが、行われ得る。1つの実施形態において、その潜在的な修飾物質が、固体支持体に結合され、タンパク質が、加えられる。別の実施形態では、タンパク質が、固体支持体に結合される。有機小分子、ペプチド、抗体などをはじめとした多種多様の修飾物質が、下記に記載されるように使用され得る。LSV修飾物質の結合を同定するための多種多様のアッセイ（標識されたタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフト、イムノアッセイ、酵素アッセイなどを含む）が使用され得る。場合によっては、候補の修飾物質の結合は、公知のリガンドまたは基質の結合の干渉が、潜在的な修飾物質の存在下において測定される、競合結合アッセイを使用することによって決定される。修飾物質、公知のリガンドまたは基質のいずれかが、まず結合され；次いで、競合物質が、加えられる。タンパク質を洗浄した後、潜在的な修飾物質または公知のリガンドもしくは基質のいずれかの結合の干渉が、決定される。しばしば、潜在的な修飾物質または公知のリガンドもしくは基質のいずれかが、標識される。

10

20

【0182】

LSVが細胞において発現され、機能的変化、物理的变化、化学的变化および表現型の変化（例えば、空胞の形成）がウイルス修飾物質を同定するためにアッセイされる、細胞に基づくアッセイが、使用され得る。任意の好適な機能的影響は、当該分野で周知のウイルス阻害アッセイに加えて、本明細書中に記載されるように測定され得る。LSVは、天然に存在するかまたは組換えである。また、LSVのフラグメントまたはキメラタンパク質が、細胞に基づくアッセイにおいて使用され得る。さらに、触媒部位が必要とする必須の残基における点変異体が、これらのアッセイにおいて使用され得る。

30

【0183】

1つの実施形態において、ハイスループットスクリーニング法は、多数の潜在的な治療的化合物（潜在的な修飾物質またはリガンド化合物）を含むコンビナトリアル有機小分子ライブラリーまたはコンビナトリアルペプチドライブラリーを提供することを含む。次いで、そのような「コンビナトリアル化学ライブラリー」または「リガンドライブラリー」は、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー（特定の化学種またはサブクラス）を同定するために本明細書中に記載されるような1つまたは複数のアッセイにおいてスクリーニングされる。このようにして同定された化合物は、従来の「リード化合物」として働き得るか、またはそれら自体が潜在的なもしくは実際の治療薬として使用され得る。

【0184】

コンビナトリアル化学ライブラリーは、試薬などのいくつかの化学的「基本要素」を組み合わせることによって、化学合成または生物学的合成のいずれかによって作製された多様な化学的化合物の集合である。例えば、ポリペプチドライブラリーなどの直鎖状コンビナトリアル化学ライブラリーは、所与の化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数）について、可能性のあるあらゆる方法で化学的基本要素のセット（アミノ酸）を組み合わせることによって形成される。数百万の化学的化合物が、化学的基本要素のそのようなコンビナトリアル混合によって合成され得る。

40

【0185】

コンビナトリアル化学ライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者に周知である。そのようなコンビナトリアル化学ライブラリーとしては、ペプチドライブラリー（例えば、米国特許第5,010,175号、Furka, Int. J. Pept. Prot

50

. Res. 37: 487-493 (1991) および Houghtonら、Nature 354: 84-88 (1991) を参照のこと) が挙げられるが、これに限定されない。化学多様性ライブラリーを作製するための他の化学もまた、使用され得る。そのような化学としては、ペプチド (例えば、PCT 公開番号 WO91/19735)、コードされるペプチド (例えば、PCT 公開番号 WO93/20242)、ランダムなバイオオリゴマー (例えば、PCT 公開番号 WO92/00091)、ベンゾジアゼピン (例えば、米国特許第 5,288,514 号)、ダイバーソマー (diversomers) (例えば、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド) (Hobbsら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993))、ビニル性のポリペプチド (Hagiharaら、J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992))、グルコース足場を有する非ペプチドの (nonpeptidal) ペプチド模倣物 (Hirschmannら、J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992))、小化合物ライブラリーの類似の有機合成物 (Chenら、I Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994))、オリゴカルバメート (Choら、Science 261: 1303 (1993)) および / またはペプチジルホスホネート (Campbellら、I Org. Chem. 59: 658 (1994))、核酸ライブラリー (Ausubel, Berger and Sambrook, すべて前出を参照のこと)、ペプチド核酸ライブラリー (例えば、米国特許第 5,539,083 号を参照のこと)、抗体ライブラリー (例えば、Vaughnら、Nature Biotechnology, 14(3): 309-314 (1996) を参照のこと)、炭水化物ライブラリー (例えば、Liangら、Science, 274: 1520-1522 (1996) および米国特許第 5,593,853 号を参照のこと)、有機小分子ライブラリー (例えば、ベンゾジアゼピン、Baum C&EN, Jan 18, page 33 (1993); イソプレノイド、米国特許第 5,569,588 号; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第 5,549,974 号; ピロリジン、米国特許第 5,525,735 号および同第 5,519,134 号; モルホリノ化合物、米国特許第 5,506,337 号; ベンゾジアゼピン、5,288,514 などを参照のこと) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0186】

コンビナトリアルライブラリーを調製するためのデバイスは、商業的に入手可能である (例えば、357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA を参照のこと)。さらに、数多くのコンビナトリアルライブラリーは、それら自体が商業的に入手可能である (例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD などを参照のこと)。

【0187】

LSV、または LSV タンパク質を発現する細胞もしくは組織を使用してアッセイする固体状態または可溶性のハイスループットが、使用され得る。固相に基づくインビトロアッセイは、ハイスループットの形式で使用され得、ここで、LSV は、固相に結合されている。本明細書中に記載されるアッセイのいずれか 1 つが、ハイスループットスクリーニングに対して適合され得る。

【0188】

可溶性または固体状態のいずれかのハイスループットアッセイでは、1 日で最大数千個の異なる修飾物質またはリガンドをスクリーニングすることが可能である。この方法は、LSV をインビトロで調査するため、または LSV を含む細胞に基づくかもしくは膜に基づくアッセイのために使用され得る。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルが、選

扱われた潜在的な修飾物質に対して別個のアッセイを実行するために使用され得るか、または濃度もしくはインキュベーション時間の影響が観察されるべきである場合、5～10ウェルごとに1つの修飾物質が試験され得る。したがって、1枚の標準的なマイクロタイタープレートは、約100（例えば、96）個の修飾物質をアッセイできる。1536ウェルプレートが使用される場合、1枚のプレートは、約100～約1500個の異なる化合物を容易にアッセイできる。1日に多くのプレートをアッセイすることが可能であり；最大約6,000、20,000、50,000個、または100,000個を超える異なる化合物に対するアッセイスクリーニングが、本発明の統合システムを使用すると可能である。

【0189】

固体状態の反応の場合、目的のタンパク質もしくはそのフラグメント、例えば、細胞外ドメイン、または目的のタンパク質もしくはそのフラグメントを融合タンパク質の一部として含む細胞もしくは膜が、共有結合または非共有結合によって、固体状態の構成要素に直接または間接的に結合され得る。共有結合性または非共有結合性の結合に対するタグは、種々の構成要素のいずれかであり得る。一般に、タグに結合する分子（タグ結合物質）が、固体支持体に固定され、タグ化された目的の分子は、タグとタグ結合物質との相互作用によって固体支持体に結合される。

【0190】

いくつかのタグおよびタグ結合物質が、文献に十分に記載されている公知の分子相互作用に基づいて、使用され得る。例えば、タグが、天然の結合物質、例えば、ビオチン、プロテインAまたはプロテインGを有する場合、それは、適切なタグ結合物質（アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、免疫グロブリンのFc領域など）とともに使用され得る。ビオチンなどの天然の結合物質を有する分子に対する抗体は、広く入手可能な適切なタグ結合物質でもある（SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis MOを参照のこと）。

【0191】

同様に、任意のハプテン化合物または抗原性化合物が、タグ/タグ結合物質対を形成するために、適切な抗体と組み合わせて使用され得る。数千の特異的抗体が、商業的に入手可能であり、多くのさらなる抗体が、文献に記載されている。例えば、1つの通常の設定では、タグは、第1の抗体であり、タグ結合物質は、第1の抗体を認識する第2の抗体である。抗体-抗原相互作用に加えて、レセプター-リガンド相互作用は、タグとタグ結合物質との対としても適切である。例えば、細胞膜レセプターのアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、細胞レセプター-リガンド相互作用、例えば、トランスフェリン、ckit、ウイルスレセプターリガンド、サイトカインレセプター、ケモカインレセプター、インターロイキンレセプター、免疫グロブリンレセプターおよび抗体、カドヘリン（cadherin）ファミリー、インテグリンファミリー、セレクトインファミリーなど（例えば、Pigott & Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)を参照のこと）。同様に、トキシンおよび毒液、ウイルスエピトープ、ホルモン（例えば、オピエート類、ステロイドなど）、細胞内レセプター（例えば、それは、ステロイド、甲状腺ホルモン、レチノイドおよびビタミンDを含む様々な小リガンドの作用を媒介する；ペプチド）、薬物、レクチン、糖、核酸（直鎖状と環状の両方のポリマー配置）、オリゴ糖、タンパク質、リン脂質および抗体がすべて、様々な細胞レセプターと相互作用し得る。

【0192】

合成ポリマー（例えば、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリ尿素、ポリアミド、ポリエチレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミドおよびポリアセテート）もまた、適切なタグまたはタグ結合物質を形成し得る。他の多くのタグ/タグ結合物質対もまた、本開示を再検討すると当業者に明らかであるような本明細書中に記載されるアッセイシステムにおいて有用である。

【0193】

ペプチド、ポリエーテルなどのような通常のリンカーもまた、タグとして働き得、それには、約5～200アミノ酸のポリgly配列などのポリペプチド配列が含まれる。そのような柔軟なリンカーは、当業者に公知である。例えば、ポリエチレングリコールリンカーは、Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabamaから入手可能である。これらのリンカーは、必要に応じて、アミド結合、スルフィドリル結合またはヘテロ官能性結合を有する。

【0194】

タグ結合物質は、現在利用可能な種々の方法のいずれかを使用して固体基材に固定される。固体基材は、通常、その基材の全部もしくは一部を、タグ結合物質の構成部分と反応性であるその表面に化学基を固定する化学的試薬に曝露することによって、誘導体化されるかまたは官能化される。例えば、より長い鎖部分への結合に適した基としては、アミン、ヒドロキシル、チオールおよびカルボキシル基が挙げられる。ガラス表面などの種々の表面を官能化するために、アミノアルキルシランおよびヒドロキシルアルキルシランが、使用され得る。そのような固相バイオポリマーアレイの構築は、文献（例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154 (1963)（例えばペプチドの、固相合成を説明している）；Geysenら、J. Immun. Meth. 102: 259 - 274 (1987)（ピン上での固相の構成要素の合成を説明している）；Frank & Doring, Tetrahedron 44: 60316040 (1988)（セルロースディスク上での様々なペプチド配列の合成を説明している）；Fodorら、Science, 251: 767 - 777 (1991)；Sheldonら、Clinical Chemistry 39(4): 718 - 719 (1993)；およびKozalら、Nature Medicine 2(7): 753759 (1996)（すべて、固体基材に固定されたバイオポリマーのアレイを説明している））において十分に説明されている。タグ結合物質を基材に固定するための非化学的アプローチとしては、加熱、UV照射による架橋などのような他の通常の方法が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0195】

LSVの修飾物質として試験される化合物は、任意の有機小分子、または生物学的実体（例えば、タンパク質、例えば、抗体もしくはペプチド、糖、核酸、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリボザイムもしくはsiRNA、または脂質）であり得る。あるいは、修飾物質は、LSVの遺伝的に変更されたバージョンであり得る。概して、試験化合物は、有機小分子、ペプチド、環状ペプチド、siRNA、アンチセンス分子、リボザイムおよび脂質である。

【0196】

本質的に任意の化学的化合物が、本発明のアッセイにおいて潜在的な修飾物質またはリガンドとして使用され得るが、ほとんどの場合、水性または有機（特に、DMSOに基づく）溶液に溶解され得る化合物が、使用される。それらのアッセイは、アッセイ工程を自動化し、任意の好都合な供給源からの化合物をアッセイに提供することによって大きな化学ライブラリーをスクリーニングするようにデザインされ、それらは、概して並行して行われる（例えば、ロボットアッセイでのマイクロタイタープレートにおけるマイクロタイター形式で）。Sigma (St. Louis, MO)、Aldrich (St. Louis, MO)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Fluka Chemika-Biochemika Analytika (Buchs Switzerland) などをはじめとした、化学的化合物の多くの供給業者が存在することが認識される。

【0197】

キット

例えば、イムノアッセイ（例えば、ELISAおよび「サンドイッチ」タイプイムノアッセイ）、ならびに核酸アッセイ、例えば、PCRアッセイをはじめとした、種々の診断アッセイにおいて使用するための1つまたはそれを超える診断試薬を含む、診断試薬および診断キットが、提供される。関連する実施形態において、そのアッセイは、フロースル

ー形式またはストリップテスト形式で行われ、ここで、結合物質が、ニトロセルロースなどの膜上に固定化されている。

【0198】

キットは、LSV核酸配列に特異的な1つまたはそれを超えるプローブまたはプライマーを含み得る。キットは、1つまたはそれを超える抗体（例えば、LSVポリペプチドに特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体）を含み得る。キットは、1つまたはそれを超えるLSVポリペプチドも含み得る。キットは、1つまたはそれを超えるLSVポリヌクレオチド（例えば、cDNA）を含み得る。

【0199】

いくつかの実施形態において、そのようなキットは、少なくとも第1のペプチドまたは本発明の第1の抗体もしくは抗原結合フラグメント、その機能的フラグメントまたはそのカクテルまたは第1の核酸分子およびシグナルを生成するための手段を含み得る。キットの構成要素は、固体支持体に予め結合され得るか、またはキットを使用するとき固体支持体の表面に適用され得る。シグナル生成手段は、本発明の抗体もしくは核酸と予め会合され得るか、または使用する前に、1つまたはそれを超える構成要素、例えば、緩衝剤、核酸、抗体-酵素結合体、酵素基質などとの組み合わせを必要とし得る。

【0200】

キットは、さらなる試薬、例えば、固相表面への非特異的結合を減少させるためのブロッキング試薬、洗浄試薬、酵素基質、酵素なども含み得る。固相表面は、マイクロタイタープレート、マイクロスフェアまたは核酸、タンパク質、ペプチドもしくはポリペプチドを固定化するのに適した他の材料の形態であり得る。化学発光生成物もしくは色素形成生成物の形成または化学発光基質もしくは色素形成基質の還元を触媒する酵素は、シグナル生成手段の構成要素の1つである。そのような酵素は、当該分野で周知である。放射標識、色素生産性標識、蛍光発生性（fluorigenic）標識もしくは他のタイプの検出可能な標識または検出手段が、キット内に含まれる場合、その標識物質は、診断的組成物もしくは治療的組成物自体と同じ容器に提供され得るか、あるいは、代わりに第2の組成物が入れられ適切に等分され得る第2の異なる容器手段に入れられ得る。あるいは、検出試薬および標識は、単一の容器手段において調製され得、ほとんどの場合、キットは、概して、商業的販売ならびに/または好都合な包装および送達のために厳重に閉じ込められた状態でバイアル（複数可）を含めるための手段も含む。

【0201】

キットは、開示された抗体、核酸またはポリペプチドを保管するための1つまたはそれを超える容器、ならびに容器上のまたは容器に関連づけられたラベルまたは添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器などが挙げられる。これらの容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。その容器は、診断および/または処置に有効な組成物を保持している。いくつかの実施形態において、その容器は、滅菌されたアクセスポートを有し得る（例えば、その容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する、静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。そのラベルまたは添付文書は、内容物が、特定の状態を処置するためまたは検出/診断のために使用されることを示す。

【0202】

いくつかの実施形態において、キットは、LSVポリペプチド、核酸または抗体を使用する手段を開示している添付文書などの指示材料を含み得る。その指示材料は、書面、電子的形態（例えば、コンピュータディスクまたはコンパクトディスク）であり得るか、または視覚的なもの（例えば、ビデオファイル）であり得る。指示は、詳細な方法が得られる場所に関する情報（例えば、インターネットリンクの開示またはウェブサイトに対する言及）を含み得る。キットは、キットがデザインされた特定の用途を容易にするさらなる構成要素も含み得る。したがって、例えば、キットは、標識を検出するための手段（例えば、酵素標識の場合の酵素基質、蛍光標識を検出するフィルターセット、2次抗体などの適切な2次標識など）をさらに含み得る。キットは、緩衝剤および特定の方法を実施す

10

20

30

40

50

るために日常的に使用される他の試薬をさらに含み得る。

【0203】

例示的な実施形態

いくつかの実施形態では、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレームと少なくとも90%同一の核酸配列を含むかまたはそれらなる、単離された核酸分子が開示される。単離された核酸分子は、配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列のオープンリーディングフレームを含んでもよく、またはそれらからなってもよい。単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列を含んでもよく、またはそれらからなってもよい。単離された核酸分子は、配列番号4~7として示されている核酸配列を含むポリペプチドをコードしてもよい。核酸分子は、cDNAであり得る。これらの核酸は、プロモーターに作動可能に連結され得、かつ/またはベクター内に含まれ得る。さらなる実施形態において、これらの核酸分子のいずれかによってコードされる単離されたポリペプチドが、開示される。それらの核酸分子およびベクターは、宿主細胞内で発現され得る。宿主細胞をインビトロで培養することによってタンパク質を発現させる方法もまた開示される。配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含んでもよいかまたはそれらからなってもよい、あるいは配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列を含んでもよいかまたはそれらからなってもよい、単離されたポリペプチドもまた開示される。

10

【0204】

プローブおよびプライマーもまた開示される。いくつかの実施形態では、12~40ヌクレオチド長の単離されたオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドは、高ストリンジェンシー条件下において、配列番号1、配列番号2もしくは配列番号3またはそれらの相補体のうちの1つに特異的にハイブリダイズする、単離されたオリゴヌクレオチドが提供される。前記オリゴヌクレオチドは、フルオロフォア、クエンチャーまたはその両方を含んでもよい。

20

【0205】

さらなる実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(a)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(b)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または(c)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列、に特異的に結合する。配列番号4~7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列に特異的に結合する、抗体または抗原結合フラグメントもまた提供される。特定の非限定的な例では、前記抗体または抗原結合フラグメントは、標識されてもよい。他の非限定的な例では、前記抗体または抗原結合フラグメントは、キメラである。

30

40

【0206】

さらなる実施形態では、生物学的サンプル中のローンスターウイルスポリペプチドを検出するための方法が開示される。前記方法は、(i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または(iii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列、に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体

50

またはその抗原結合フラグメントと該生物学的サンプルとを接触させる工程を含む。前記方法はまた、該生物学的サンプルへの該抗体または抗原結合フラグメントの結合を検出する工程であって、該生物学的サンプルへの該抗体または抗原結合フラグメントの結合は、該生物学的サンプル中の該ローンスタールウイルスまたは該ローンスタールウイルスポリペプチドの存在を示す、工程を含む。

【0207】

いくつかの実施形態では、生物学的サンプル中のローンスタールウイルス特異的抗体を検出するための方法が開示される。前記方法は、(a)(i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの一つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの一つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または(iii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの一つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチドと該生物学的サンプルとを接触させる工程を含む。前記方法はまた、該生物学的サンプルへの該ポリペプチドの結合を検出する工程であって、該生物学的サンプルへの該ポリペプチドの結合は、生物学的サンプル中の該ローンスタールウイルス特異的抗体の存在を示す、工程を含む。いくつかの非限定的な例では、前記方法は、配列番号4~7のうちの一つとして示されているアミノ酸配列を含むポリペプチドと前記生物学的サンプルとを接触させる工程を含む。

10

20

【0208】

さらなる実施形態では、生物学的サンプル中のローンスタールウイルス核酸分子を検出するための方法が開示される。前記方法は、(a)12~40ヌクレオチド長の単離されたオリゴヌクレオチドと該生物学的サンプルとを接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチドは、高ストリンジェンシー条件下において、配列番号1、配列番号2または配列番号3のうちの一つに特異的にハイブリダイズする、工程；および(b)該生物学的サンプルと該プローブとのハイブリダイゼーションを検出する工程であって、該生物学的サンプルと該プローブとのハイブリダイゼーションは、該生物学的サンプル中の該ローンスタールウイルス核酸分子の存在を示す、工程を含む。いくつかの実施形態では、前記生物学的サンプルが、(i)該生物学的サンプルからRNAを単離する工程；(ii)該RNAを逆転写して、cDNAを生成する工程；および(iii)請求項6に記載の単離された核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用して該cDNAを増幅し、それにより、核酸増幅産物を生成する工程を含む方法によって得られる核酸増幅産物である。

30

【0209】

さらなる実施形態では、ローンスタールウイルスに感染した被験体を同定するための方法であって、該方法は、(a)該被験体から得られた生物学的サンプルからRNAを単離する工程；(b)該RNAを逆転写して、cDNAを生成する工程；(c)本明細書に開示される核酸分子に特異的にハイブリダイズするプライマー対を使用して該cDNAを増幅する工程；および(d)工程(c)からの増幅産物を検出する工程であって、該増幅産物の検出は、該被験体を該ローンスタールウイルスに感染していると同定する、工程を含む、方法が提供される。前記増幅産物は、該増幅産物をプローブにハイブリダイズさせることによって検出され得る。前記プローブは、フルオロフォア、クエンチャーまたはその両方を含んでもよい。

40

【0210】

他の実施形態において、キットが開示される。そのキットは、a)単離された核酸分子；b)高度にストリンジェントな条件下において、配列番号1、配列番号2、配列番号3もしくはそれらの相補体として示されているヌクレオチド配列にハイブリダイズするプライマー；c)単離されたポリペプチド；またはd)抗体のうちの一つを含む容器を含む。そのキットは、使用するための指示を含む。前記単離された核酸分子は、i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のオープンリーディングフレー

50

ムと少なくとも90%同一の核酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列のオープンリーディングフレーム；(iii)配列番号1、配列番号2または配列番号3として示されている核酸配列；または(iv)配列番号4～7のうちの1つをコードするcDNA、を含み得る。前記単離されたポリペプチドは、(i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(iii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；あるいは(iv)それらの免疫原性フラグメントを含み得る。前記抗体は、前記ポリペプチドに特異的に結合し得る。

10

【0211】

さらに他の実施形態では、抗体を作製するための方法が開示される。前記方法は、を含む。(a)ポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードする核酸で哺乳動物を免疫する工程、および前記抗体を単離する工程を含む。前記ポリペプチドは、(i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(iii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；もしくは(iv)該ポリペプチドの免疫原性フラグメント、を含むかまたはそれからなる。前記抗体は、(i)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも90%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；(ii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列と少なくとも95%同一の核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列；または(iii)配列番号1、その相補体、配列番号2または配列番号3のうちの1つとして示されている核酸配列のオープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列、に特異的に結合する。いくつかの例では、前記抗体は、配列番号4～7のうちの1つとして示されているアミノ酸配列に特異的に結合する。

20

30

【0212】

さらなる実施形態では、S分節、M分節およびL分節を含む、単離されたフレボウイルスであって、ここで：(i)該S分節のヌクレオチド配列は、配列番号1と少なくとも80%同一であるか；(ii)該M分節のヌクレオチド配列は、配列番号2と少なくとも80%同一であるか；(iii)該L分節のヌクレオチド配列は、配列番号3と少なくとも80%同一であるか；または(iv)(i)、(ii)および(iii)のすべてである、単離されたフレボウイルスが開示される。いくつかの例では、(i)前記S分節のヌクレオチド配列が、配列番号1と少なくとも90%同一であるか；(ii)前記M分節のヌクレオチド配列が、配列番号2と少なくとも90%同一であるか；(iii)前記L分節のヌクレオチド配列が、配列番号3と少なくとも90%同一であるか；または(iv)(i)、(ii)および(iii)のすべてである。他の例では、(i)前記S分節のヌクレオチド配列が、配列番号1と少なくとも95%同一であるか；(ii)前記M分節のヌクレオチド配列が、配列番号2と少なくとも95%同一であるか；(iii)前記L分節のヌクレオチド配列が、配列番号3と少なくとも95%同一であるか；または(iv)(i)、(ii)および(iii)のすべてである。なお他の例では、(i)前記S分節が、配列番号1として示されている核酸配列を含むか；(ii)前記M分節が、配列番号2

40

50

として示されている核酸配列を含むか；(i i i) 前記 L 分節が、配列番号 3 として示されている核酸配列を含むか；または (i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである。さらなる例では、(i) 前記 S 分節が、配列番号 1 として示されている核酸配列からなるか；(i i) 前記 M 分節が、配列番号 2 として示されている核酸配列からなるか；(i i i) 前記 L 分節が、配列番号 3 として示されている核酸配列からなるか；または (i v) (i)、(i i) および (i i i) のすべてである。前記フレボウイルスは、本明細書に記載のポリペプチドをコードし得る。前記フレボウイルスは、弱毒化されていてもよい。

【 0 2 1 3 】

さらなる実施形態において、免疫原性組成物が、開示される。その組成物は、有効量の、上に記載されたようなフレボウイルス、単離されたポリペプチド、単離された核酸およびベクターのうちの一つまたは複数を含み得る。その免疫原性組成物は、薬学的に許容され得るキャリアを含み得る。その免疫原性組成物は、被験体においてローンスターウイルスに対する免疫応答を誘発するために使用され得る。その被験体は、ローンスターウイルスに感染している場合がある。その被験体は、健常であり得る。具体的な非限定的な例において、被験体に、弱毒化されたフレボウイルスが投与される。

10

【 0 2 1 4 】

以下の実施例は、ある特定の特徴および / または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例は、記載される特定の特徴または実施形態に本開示を限定すると見なされるべきでない。

20

【 実施例 】

【 0 2 1 5 】

ローンスターダニ *Amblyomma americanum* から初めて単離された未分類のブニヤウイルスであるローンスターウイルス (L S V) の成長の特色およびゲノムを特徴付けた。ローンスターウイルス (L S V) は、ヒト (H e L a) 細胞とサル (V e r o) 細胞の両方に感染できた。細胞変性効果が、両方の細胞株において 7 2 時間以内に見られた；空胞形成が、感染 V e r o 細胞において観察されたが、H e L a 細胞では観察されなかった。偏りのないディープシーケンシング、およびウイルス発見のための組織内で開発された高速計算パイプラインを使用する解析によって、ウイルス培養上清を調べたところ、最終的に L S V はフレボウイルスと同定された。全ゲノムのデノボアセンブリから、L S V が、高度に分岐しており、他の任意のブニヤウイルスと < 6 1 % の全アミノ酸同一性しか共有しないことが明らかになった。この配列多様性にもかかわらず、L S V は、系統学的解析によって、S F S T V / H R T V と最も密接な関係がある B h a n j a 群ウイルスのメンバーを含む十分に裏付けされたクレードの一部であることが見出された。L S V のゲノムシーケンシングは、*A . americanum* (その地理的範囲が拡大していることおよび疾患ベクターとしての適格性を考えると、ますます重要なダニである) によるアルボウイルス伝染のリスクを測定する診断ツールを開発することにおける不可欠な第 1 段階である。この研究は、潜在的な臨床上および公衆衛生上の意義のあるウイルスを迅速に同定し、そのゲノムを配列決定することにおけるディープシーケンシング解析の検出力を強調するものでもある。

30

40

【 0 2 1 6 】

実施例 1

材料および方法

【 0 2 1 7 】

ローンスターウイルス株 T M A 1 3 8 1 の分離株を入手した (C e n t e r s f o r D i s e a s e C o n t r o l a n d P r e v e n t i o n (C D C) , F o r t C o l l i n s , C O) 。 L S V を使用した実験は、バイオセーフティーレベル - 2 (B S L - 2) の施設で行った。

【 0 2 1 8 】

L S V の哺乳マウス脳継代数 5 の調製物を、2 % F B S (A t l a s B i o l o g i

50

cals, Fort Collins, CO)が補充されたDMEM培地(Invitrogen, NY)中で培養されているHeLa細胞およびVero細胞のT25フラスコに接種した。感染効率は、1.3 pfu/細胞だった。細胞変性効果(CPE)を、7日間にわたって24時間間隔でモニターした。プラークアッセイを使用して、ウイルス力価を接種の72時間後(hpi)に決定した。簡潔には、細胞上清を10倍希釈し、100 µlを、0.5%アガロース二重オーバーレイを使用して、6ウェルプレート内のVero細胞単層上に接種した。第2のオーバーレイに加えたニュートラルレッドによって、それらの細胞を可視化した。

【0219】

LSVに感染したVero細胞培養物を、2つの異なるプロトコルを使用して、抽出した(一方は、ウイルス粒子からRNAを精製するものであり(「ウイルス精製プロトコル」)、他方は、全RNAを抽出するものである)。まず、130 µLのウイルス培養上清を、Turbo DNase、Baseline Zero DNase、BenzonaseおよびRNase A(Roche, South San Francisco, CA)で処理し、次いで、QIAAMP ULTRASENS(登録商標)ウイルスキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて抽出した。ヌクレアーゼ前処理なしの第2のRNA抽出を、400 µLの上清に対して、TRIzol(登録商標)試薬(Life Technologies, Foster City, CA)を使用して行った。各抽出は、製造者のプロトコルに従って行われた。

【0220】

ILLUMINA(登録商標)シーケンシング用のLSV cDNAライブラリーを、SCRIPTSEQTMバージョン2キットを製造者のプロトコル(Epicentre, Madison, WI)に従って用いて調製した。投入物は、第1の抽出からの30 ngのRNAおよび第2の抽出からの80 ngからなった。RNAをcDNAに逆転写し、アダプターをそのcDNA末端にライゲートし、次いで、そのcDNAを、17サイクルのPCRによって増幅した。AMPURETM XPビーズ(Beckman Coulter Genomics, Brea, CA)を使用して、プライマーダイマーおよびアダプターダイマーならびにより大きなPCRフラグメント(>600 bp)を、増幅されたcDNAライブラリーから除去した。ライブラリーのサイズ分布および濃度を、それぞれAgilent Bioanalyzer 2100装置(Agilent, Santa Clara, CA)において高感度DNAキットおよびKAPAライブラリー定量キット(Kapa Biosystems, Woburn, MA)を使用して、決定した。ILLUMINA(登録商標)MISEQ(登録商標)配列分析装置(Illumina, Hayward, CA)における150 bpペアエンドシーケンシングのために、およそ10 pmolのライブラリーを使用した。

【0221】

ディープシーケンシングデータのコンピュータ分析のすべてを、512 GB RAMを備える64-コア1U Quad AMD OPTERONTM 6200コンピュータサーバーにおいて、Ubuntu 12.04 LTSオペレーティングシステムを使用して、行った。まず、未加工のディープシーケンシングリードを、プライマーを切り取り、フィルタリングにかけて低品質および低複雑度の配列を排除し、残りのすべての<50 bp長の配列を除去することによって、「前処理」した(Delwart EL(2007) Rev Med Virol 17:115-131; Kong Y(2011) Genomics 98:152-153; Morgulis A,ら(2006) J Comput Biol 13:1028-1040)。次いで、前処理されたリードを、ヌクレオチドデータベースおよびタンパク質データベースに対するアラインメントのためにそれぞれSNAP(Zaharia M,ら(2011) arXiv 1111.5572 v1)およびRAPSearch(Ye Y,ら(2011) BMC Bioinformatics 12:159)アライナーを組み込んでいる高速計算パイプラインを使用して解析した(Naccacheら、投稿準備中)。そのパイプラインの形式は、200

10

20

30

40

50

9年のパンデミックインフルエンザA (Greningerら(2010) PLoS One 5:e13381)およびアフリカの新規出血熱ウイルス(Grardら(2012) PLoS Pathog 8:e1002924)を検出するために以前使用された、計算サブトラクション(computational subtraction)アプローチに基づいた。簡潔には、GENBANK(登録商標)におけるヒト(hg19)および細菌のデータベースに対するヌクレオチドアラインメントを、宿主に対応する配列を除外するために高ストリンジェンシーカットオフ(SNAPの場合、編集距離d12)で行い、ウイルスGENBANK(登録商標)データベースに対するタンパク質アラインメントを、低ストリンジェンシーカットオフ(SNAPの場合、編集距離d28およびRAPSearchの場合、 10^{-1})で行うことにより、ウイルス配列を同定した。これらの最初のアラインメントについて、SNAPおよびRAPSearchの利点は、BLASTn/BLASTxなどの既存のアルゴリズムと比べて匹敵する精度を維持しつつ、計算速度が $10 \sim 1,000$ 倍高いことだった(Zahariaら(2011) arXiv 1111.5572v1; Yeら(2011) BMC Bioinformatics 12:159; Altschul SF,ら(1990) J Mol Biol 215:403-410)。続いて、候補ウイルス配列を、 1×10^{-8} というE値カットオフを使用して、同定されたウイルスの属または種に対する直接的なBLASTnアラインメントによって、真であると確認した。前処理、ヒト/細菌/ウイルスデータベースに対するSNAPヌクレオチドアラインメント、およびウイルスタンパク質データベースに対するRAPSearchアミノ酸アラインメントに対するおおよその計算時間は、それぞれ5分、10分および135分だった(合計時間2時間)。

【0222】

ディープシーケンシングリードを計算パイプラインにかけた後、リードのサブセットの解析により、LSVが高度に分岐のブニヤウイルスと同定された(表1)。同定されたブニヤウイルスリードのカバレッジは、ゲノムアセンブリにとって十分でなかった(3xカバレッジ深度において、L、MおよびS分節の、6,341中4,188、3,313中820および1,867中652、または66.0%、24.8%および34.9%)(図2)。したがって、配列「シード」を、推定的なL、MおよびS分節の各々から選択し、前処理されたデータセット全体を使用した反復デノボコンティグアセンブリ(iterative de novo contig assembly)を、PRICEアセンブラーを使用して行った(およそ6時間の合計時間)(Earlら(2011) Genome Res 21:2224-2241; Ruby JG, DeRisi JL(2013) 2012年1月にアクセスした(succeeded) derisilab.ucsf.eduのウェブサイトにおいて利用可能)。次いで、大きなコンティグの計算仕上げ(Computational finishing)を、Geneiousソフトウェアv6.0(Kearseら(2012) Bioinformatics 28:1647-1649)を使用して、手作業で行った。たった7xカバレッジでアセンブルされたLSVのL分節の3'末端の配列(図2D)を、RACE(rapid amplification of cDNA ends)-PCR(Elbeainoら(2009) J Gen Virol 90:1281-1288)を使用して確認した。

【0223】

4つのブニヤウイルスタンパク質: RdRp(L分節)、糖タンパク質(M分節)、Nタンパク質(S分節)およびNSsタンパク質(S分節)について系統学的解析を行った。まず、GENBANK(登録商標)における入手可能なほぼすべてのフレボウイルス配列由来およびGouleakoウイルス由来の対応するタンパク質に対する各LSVタンパク質の複数の配列アラインメント(Marklewitzら(2011) J Virol 85:9227-9234)を、E-INS-Iアルゴリズムとともにデフォルトの設定でMAFFT(v6.0)(Katoohら(2005) Nucleic Acids Res 33:511-518)を使用して作製した。新規ブニヤウイルス属のメンバーであり、フレボウイルスに最も近縁であると知られているGouleakoウイルス(

10

20

30

40

50

Marklewitzら(2011) *J Virol* 85:9227-9234)を、RdRp、糖タンパク質およびNタンパク質ツリーに対するアウトグループとして選択した。10,000回のブートストラッピング反復の後の系統樹およびブートストラップ信頼度を、Jukes-Cantorモデルおよび25%というサポート閾値(support threshold)における近隣結合法を使用してGeneiousにおいて明らかにした(図3)。次いで、ツリー型トポロジーを、MrBayes V3.2ソフトウェアを用いる交互最尤ベイズ的アプローチを使用して確かめた(20,000サンプルツリー、ツリーの25%をバーンイン(burn-in)として捨てた)(Ronquistら(2012) *Syst Biol* 61:539-542)。近隣結合法または最尤法を使用したときの全体的なツリー型トポロジーは、同じだった。

10

【0224】

Geneious(Kearseら(2012) *Bioinformatics* 28:1647-1649)におけるスライディングウィンドウのペアワイズアラインメントによって、LSVの推定アミノ酸配列を比較した。具体的には、FFT-NS-Ix1000アルゴリズムとともにデフォルトの設定でMAFFT(v6.0)(Katohら(2005) *Nucleic Acids Res* 33:511-518)を使用して、Bhanjaウイルス株IG690、Heartlandウイルス、中国からの3つのSFTSフレボウイルス分離株(SFTS BX-2010、SFTSウイルスHB29およびSFTSウイルスHN6)、Ukuniemiウイルス、リフトバレー熱ウイルス株SharqiyaおよびCCHFウイルスとLSVをアラインメントし、50アミノ酸のスライディングウィンドウを使用して各ウイルス分節にわたってペアワイズ同一性をプロットした。4つのブニヤウイルスタンパク質配列を互いに連結し、Geneiousにおいてペアワイズアラインメントを行うことによって、全体的なアミノ酸のペアワイズ類似性を決定した。

20

【0225】

図3および4に対して使用されているGENBANK(登録商標)アクセッション番号は、以下のとおりである：RdRp(L分節)：Agua cateウイルス(NC_015451)、Armeroウイルス(HQ661805)、Bhanjaウイルス株ibAr2709(JX961616)、Bhanjaウイルス株IG690(JX961619)、Bhanjaウイルス株M3811(JQ956376)、Bhanjaウイルス株R-1819(JX961622)、Candiruウイルス(NC_015374)、CCHFウイルス(NC_005301)、EgAN1825-61ウイルス(HM566159)、Gouleakoウイルス(HQ541738)、Heartlandウイルス(JX005847)、Massiliaウイルス(EU725771)、Palmaウイルス株PoTi4.92(JX961628)、Palmaウイルス株M3443(JQ956379)、Precarious pointウイルス(HM566181)、リフトバレー熱株Sharqiya(NC_014397)、リフトバレー熱ウイルス株Smithburn(DQ375430)、Saloboウイルス(HM627185)、Tosacanaウイルス(NC_006319)、サシチョウバエ熱シチメンチョウウイルス(NC_015412)、SFTSウイルスBX-2010(JF682773)、SFTSウイルスHB29(NC_018136)、SFTSウイルスHN6(HQ141595)、Ukuniemiウイルス(UUKLRNAP)、Zaliv Terpeniyaウイルス(HMX66191)；糖タンパク質(M分節)：Agua cateウイルス(NC_015450)、Armeroウイルス(HQ661806)、Bhanjaウイルス株ibAr2709(JX961616)、Bhanjaウイルス株IG690(JX961620)、Bhanjaウイルス株M3811(JQ956377)、Bhanjaウイルス株R-1819(JX961620)、Candiruウイルス(NC_015373)、EgAN1825-61ウイルス(HM566158)、CCHFウイルス(NC_005300)、Gouleakoウイルス(HQ541737)、Heartlandウイルス(JX005845)、Massiliaウ

30

40

50

イルス (EU725772)、Palmaウイルス株PoTi4.92 (JX961629)、Palmaウイルス株M3443 (JQ956380)、Precarious pointウイルス (HM566179)、リフトバレー熱株Sharqiya (NC__014396)、リフトバレー熱ウイルス株Smithburn (DQ80193)、Saloboウイルス (HM627183)、Tosacanaウイルス (NC__006320)、サシチョウバエ熱シチメンチョウウイルス (NC__015411)、SFTSウイルスBX-2010 (JF682774)、SFTSウイルスHB29 (NC__018138)、SFTSウイルスHN6 (HQ141596)、Uukuniemiウイルス (UUKGPM)、Zaliv Terpeniyaウイルス (HMX66193); N (S分節): Aguacateウイルス (NC__015452)、Armeroウイルス (HQ661807)、Bhanjaウイルス株ibAr2709 (JX961618)、Bhanjaウイルス株IG690 (JX961621)、Bhanjaウイルス株M3811 (JQ956378)、Bhanjaウイルス株R-1819 (JX961624)、Candiruウイルス (NC__015375)、CCHFウイルス (NC__005302)、EgAN1825-61ウイルス (HM566160)、Gouleakoウイルス (HQ541736)、Heartlandウイルス (JX005843)、Massiliaウイルス (EU725773)、Palmaウイルス株PoTi4.92 (JX961630)、Palmaウイルス株M3443 (JQ956381)、Precarious pointウイルス (HM566180)、リフトバレー熱株Sharqiya (NC__014396)、リフトバレー熱ウイルス株Smithburn (DQ80157)、Saloboウイルス (HM627184)、Tosacanaウイルス (NC__006318)、サシチョウバエ熱シチメンチョウウイルス (NC__015413)、SFTSウイルスBX-2010 (JF682775)、SFTSウイルスHB29 (NC__018137)、SFTSウイルスHN6 (HQ141597)、Uukuniemiウイルス (UUKNNSA)、Zaliv Terpeniyaウイルス (HMX66192); NSs (S分節): Aguacateウイルス (NC__015452)、Armeroウイルス (HQ661807)、Bhanjaウイルス株ibAr2709 (JX961618)、Bhanjaウイルス株IG690 (JX961621)、Bhanjaウイルス株M3811 (JQ956378)、Bhanjaウイルス株R-1819 (JX961624)、Candiruウイルス (NC__015375)、EgAN1825-61ウイルス (HM566160)、Heartlandウイルス (JX005843)、Massiliaウイルス (EU725773)、Palmaウイルス株PoTi4.92 (JX961630)、Palmaウイルス株M3443 (JQ956381)、Precarious pointウイルス (HM566180)、リフトバレー熱株Sharqiya (NC__014396)、リフトバレー熱ウイルス株Smithburn (DQ80157)、Saloboウイルス (HM627184)、Tosacanaウイルス (NC__006318)、サシチョウバエ熱シチメンチョウウイルス (NC__015413)、SFTSウイルスBX-2010 (JF682775)、SFTSウイルスHB29 (NC__018137)、SFTSウイルスHN6 (HQ141597)、Uukuniemiウイルス (UUKNNSA)、Zaliv Terpeniyaウイルス (HMX66192)。上に列挙されたすべてのGENBANK (登録商標) アクセッション番号が、2013年4月19日に入手可能だったものとして参照により本明細書中に援用される。

【0226】

上記核酸配列およびアミノ酸配列は、GENBANK (登録商標) アクセッション番号NC__021242.1, 2013年5月21日; GENBANK (登録商標) アクセッション番号KC589005.1、GENBANK (登録商標) アクセッション番号2013年5月18日; GENBANK (登録商標) アクセッション番号NC__021244.1、2013年5月21日、GENBANK (登録商標) アクセッション番号NC__021243.1, 2013年5月21日; GENBANK (登録商標) アクセッション番

号KC589007.1, 2013年5月18日; およびGENBANK(登録商標)アクセッション番号KC589006.1, 2013年5月18日(これらの全体はすべて、参照により本明細書中に援用される)に開示されている。

【0227】

実施例2

細胞効果

【0228】

ローンスターウイルス(LSV)は、接種の72時間後(hpi)に、非ヒト霊長類(Ver0)細胞型とヒト(HeLa)細胞型の両方において、細胞変性効果(CPE)を誘導した(図1)。細胞シートの完全に近い剥離(clearing)が、96hpiにおいて、感染HeLa細胞において観察されたが、Ver0細胞では観察されなかった。接種されたVer0細胞は、72hpiに空胞を発生し始め、CPEが進むにつれてますますその存在量が増えた。空胞は、接種されたHeLa細胞では観察されなかった。72hpiにHeLaおよびVer0細胞培養においてもたらされた、1ミリリットルあたりのプラーク形成単位(PFU)としての感染性LSVの力価は、それぞれ 1.9×10^6 PFU/mlおよび 1.2×10^6 PFU/mlだった。

10

【0229】

実施例3

シーケンシング

【0230】

次いで、偏りのない次世代シーケンシングまたは「ディープシーケンシング」を使用して、LSV培養上清を解析し、ウイルスゲノムをアセンブルした。抽出前にヌクレアーゼを使用する標準的なウイルス精製プロトコルにより、非常に低い濃度のRNA(5ng/ μ L未満)がもたらされたので、この材料を、cDNAディープシーケンシングライブラリー調製のためのヌクレアーゼ処理なしの第2の抽出からのRNAとともにプールした。未加工のディープシーケンシングリードの最終カウントは、合計15,134,328個の配列(7,567,164個の150bpペアエンドシーケンス)だった。ディープシーケンシングデータから病原体を同定するために組織内で開発された高速計算パイプラインを使用して、そのデータセットを、512GB RAMを備えた単一の64-コアコンピュータサーバーを用いて、2時間以内にウイルスについて包括的に解析した。第1に、NGSリードを、順次、前処理し、参照ヒトデータベースとアラインメントし、参照細菌データベースとアラインメントしたところ、そのデータセット内の未加工の配列のそれぞれ50.3%(n=7,606,235)、15.5%(n=2,345,988)および1.9%(n=293,410)が除去された。次いで、元のデータセットの32.3%を構成する残りの4,888,695個の配列を、参照ウイルスヌクレオチドデータベースおよび参照ウイルスタンパク質データベースとアラインメントすることにより、ウイルスに対応するリードを同定した(表1)。検出されたウイルスのうち、大多数が、細胞培養物、試薬および実験室環境中の公知の夾雑物だった(表1)。

20

30

【0231】

【表 1】

表1. ウイルス配列にマッチするディープシーケンシングリード

ウイルス	ウイルス科	SNAP によるウイルスリード数*	RAPSearchによるウイルスリード数*	RAPSearch + SNAPによるウイルスリード数(%)*	推定供給源
サル内在性レトロウイルス	レトロウイルス科	1,217	1,502	2,008 (5%)	Vero 細胞内在性レトロウイルス
トリ骨髄芽球症ウイルス	レトロウイルス科	608	833	936 (2.3%)	ScriptSeq キット内の逆転写酵素の既知のウイルス夾雑物
フレボウイルス (LSV)	ブニヤウイルス科	90	37,292	37,322 (92.2%)	LSV の培養物
ウシウイルス性下痢症ウイルス	フラビウイルス科	93	139	148 (0.37%)	ウイルスの培養において使用されるウシ胎仔血清の夾雑物
環境 DNA ウイルス	様々な科*	4	73	75 (0.19%)	環境および/または試薬の汚染
合計 (%)		2,012	39,839	40,489 (ウイルスリードの 100%、全リードの 0.27%)	

10

20

【0232】

* ウイルスリードは、SNAP (Zaharia M, ら (2011) arXiv 1111.5572v1) および RAPSearch (Yeら (2011) BMC Bioinformatics 12:159) アライナーを使用して、それぞれウイルスのヌクレオチドデータベースおよびアミノ酸データベースとの比較によって同定された。ウイルスヒットは、 1×10^{-8} の E 値カットオフを使用し、LSV または GENBANK (登録商標) における最も近縁のウイルス属もしくは種との BLASTn アラインメントによって真であると確認された。合計 15,134,328 個のリードのうち、40,489 個のリード (0.27%) が、SNAP および/または RAPSearch によってウイルスとして同定された。これらの 40,489 個のウイルスヒットのうち、37,322 個 (92.2%) が、LSV に対応した。そのデータセット内の LSV リードの実際数は、142,941 個 (全リードの 0.94%) であり; ゆえに、LSV リードの実際の数のたった 26.1% (142,941 個中 37,322 個) しか検出されなかった。

30

40

【0233】

唯一の例外は、ブニヤウイルス科のフレボウイルスのリードであり、それは、ウイルスディープシーケンシングヒットの 92.2% を構成した。そのフレボウイルスリードは、3 つすべての分節に相当し、高度に分岐しており、GENBANK (登録商標) における他の任意のブニヤウイルス配列と < 50% の同一性しか共有しなかった。アラインメント可能なリードが、ゲノムのカバレッジ全体の 50% 未満にしか相当しなかったので (図 2A)、続いて、推定的な L、M および S 分節の各々に対する同定されたリードに対応する単一の「シード」を使用して、15 サイクルのデノボアセンブリを 3 回行うことによって、LSV 全ゲノムを回収した (図 2B)。その後、前処理されたディープシーケンシングリードを LSV 全ゲノムに高ストリンジェンシーでマッピングすることにより、実際の力

50

バレッジが平均 1, 112 × に達することが示された [範囲 7 ~ 4, 939 ×] (図 2 C)。そのマッピングから、計算パイプラインが、ディープシーケンシングデータに実際に存在する LSVリードの総数の 26.1% (37, 322 / 142, 941) しか検出しなかったことも明らかになった (表 1)。

【 0 2 3 4 】

他のブニヤウイルスにおけるように、LSVのゲノムは、3つのマイナスセンスRNA分節 (L (配列番号 3)、M (配列番号 2) および S (配列番号 1)) からなる (図 2 B)。これらの分節は、RdRp、G、N および NSs タンパク質に対するコード配列を含むことが見出された。LSVのL、MおよびS分節のサイズは、2, 085 アミノ酸 (aa) のLタンパク質、1, 084 aaのGタンパク質、247 aaのNタンパク質および 316 aaのNSsタンパク質をコードする、それぞれ 6, 341、3, 313 および 1, 876 nt である。系統学的解析により、LSVは、フレボウイルス属のメンバーであり、最近配列決定された Bhanja ウイルスおよび Palma ウイルスを含む十分に裏付けされたクレードの一部であることが見出された (図 3, 「 Bhanja 」) (Dilcher ら (2012) Virus Genes 45 : 311 - 315 ; Matsunori ら (2013) J Virol .)。このクレードは、SFTSV および HRTV を含むダニ媒介性フレボウイルスの SFTS 群 (図 3, 「 SFTS 」) (Xu B, ら (2011) PLoS Pathog 7 : e1002369 ; Yu XJ, ら (2011) N Engl J Med 364 : 1523 - 1532 ; Zhang YZ, ら (2012) Clin Infect Dis 54 : 527 - 533 .)、ならびにメンバーの中でも Zaliv Terpeniya、Ukuniemi、EgAN1825 - 61 および Precarious point ウイルスを含む Ukuniemi 群 (図 3, 「 Ukuniemi 」) (Palacios ら (2013) J Virol .) と異なるが、それは、Ukuniemi 群よりも SFTS と系統学的に密接な関係がある。

【 0 2 3 5 】

LSVのL、MおよびS分節の末端は、ブニヤウイルス科のフレボウイルスに共通の、保存された「5 - ACACAAAG」および「CUUUGUGU - 3」逆位シグネチャ配列を保持するが、S分節の5'末端は

【 化 1 】

「5'-ACACAGAG」

配列を含むという注目すべき例外がある。この末端のシグネチャ配列の絶対的保存からの逸脱は、SFTSV ウイルス、Heartland ウイルス、Bhanja ウイルスおよび Palma ウイルスを含む他のダニ媒介性フレボウイルスにおいても見られる (Dilcher ら (2012) Virus Genes 45 : 311 - 315)。ペアワイズ同一性のプロットから、LSVが、高度に多岐にわたり、他の代表的なブニヤウイルスと 61% の全アミノ酸同一性であることが明らかになった (図 4)。LSVに最も近縁のものは、Bhanja ウイルスおよび Palma ウイルスであり、4つのブニヤウイルスタンパク質にわたって 39 ~ 70% のアミノ酸同一性であり (図 4)、次の最も近い近縁者は、SFTSV ウイルスおよび Heartland ウイルスであり、18 ~ 43% のアミノ酸同一性しか共有しない。

【 0 2 3 6 】

ヒトにとって病原性であるフレボウイルスは、蚊、スナバエおよびダニによって伝染され得る (Yu ら (2011) N Engl J Med 364 : 1523 - 1532)。A. americanum ダニは、野生動物宿主ならびにヒトの広い組合せを常食としているので、人獣共通感染症のベクターとして適している。そのダニは、ロッキー山紅斑熱 (Rickettsia rickettsia)、ヒト単球性エーリキア症 (Ehrlichia chaffeensis) および野兎病 (Francisella tularensis) の病原体にとってのベクターであり、病因物質がまだ同定されていない (Goddard and Varela - Stokes (2009) Vet Par

10

20

30

40

50

asitol 160:1-12) 南部ダニ媒介性発疹疾病 (Southern Tick-borne Rash Illness) (STAR I) にも関連している。A. americanum の地理的範囲は、米国東部において北へ広がっており、ヒトを咬む性質を有するので (Paddock and Yabsley (2007) Curr Top Microbiol Immunol 315:289-324)、疾患のベクターとしてのその潜在的な役割は、ますます重要である。しかしながら、A. americanum がウイルスを有する能力は、十分に理解されていない。したがって、LSV のシーケンシングは、A. americanum によるアルボウイルス感染のリスクを決定することにおける不可欠な第 1 段階である。

【0237】

本明細書中に提示される結果は、LSV が、Uukuniemi クレードよりも SFTS のメンバーとより高い系統学的類似性を共有する、ダニ媒介性フレボウイルスの Bhanja クレードのメンバーであることを示す (図 3) (Matsuno ら (2013) J Virol.) (図 3 および 4)。高い配列分岐 (sequence divergence) にもかかわらず、血清学的な交差反応性が、3 つすべてのクレードのメンバー間で最近観察された (Matsuno ら (2013) J Virol.; Palacios G, ら (2013) J Virol.)。このことは、SFTS、Bhanja および Uukuniemi クレードのメンバーが、ダニ媒介性フレボウイルスのより大きな単一の血清群の一部を構成することを示唆する。SFTS および Bhanja クレード内のフレボウイルスは、ヒトにおいて病原性であることが知られているので (Xu ら (2011) PLoS Pathog 7:e1002369; Yu ら (2011) N Engl J Med 364:1523-1532; Zhang ら (2012) Clin Infect Dis 54:527-533; Calisher and Goodpasture (1975) Am J Trop Med Hyg 24:1040-1042; Punda V ら (1980) Zentralblatt fur Bakteriologie:297-301; Vesenjajak-Hirjan J, ら (1980) Zentralblatt fur Bakteriologie:297-301)、LSV は、ヒトのダニ媒介性疾病に関連し得る。

【0238】

ヒト (HeLa) 細胞とサル (Vero) 細胞の両方が、LSV による感染をサポートすることが見出されたことから、LSV は、インビボにおいてヒトおよび他の非ヒト霊長類に感染できると示唆される。しかしながら、CPE は、72 hpi から始まって、HeLa 細胞と Vero 細胞の両方において観察されたが、CPE の出現および進行は、2 つの LSV 接種細胞株の間で異なった。特に、空胞は、Vero 細胞だけで観察された。同様に、感染性のウイルス粒子をおそらく含む細胞空胞が、Vero 細胞において効率的に成長する SFSTV および Heartland ウイルスでも観察された (Yu ら (2011) N Engl J Med 364:1523-1532; McMullan ら (2012) N Engl J Med 367:834-841)。

【0239】

病原体を同定し、次いでそれらのゲノムをデノボで迅速にアセンブルすることは、新規エマージングウイルスに見出される配列などの広範囲に分岐の配列にとって難易度が高い。GENBANK (登録商標) などの大きな配列データベースに関連ゲノムが欠落しているときは、リードを参照配列に対してマッピングする / アラインメントする日常的なアルゴリズムでは不十分である。これらの困難に対処するために、ディープシーケンシングのメタゲノムデータセットからのウイルス病原体の迅速な同定およびデノボゲノムアセンブリのための計算パイプラインを開発した。前処理し、宿主バックグラウンドおよび / または実験室汚染に対応する配列を除去した後、このパイプラインは、効率的かつ高度に並列処理可能なアルゴリズムを使用して、ヌクレオチドアラインメントとアミノ酸アラインメントの両方を参照データベースに組み込むことにより、数時間のうちに公知のウイルスと新規のウイルスの両方を包括的に同定する。アミノ酸によるフレボウイルスリードの数の

10

20

30

40

50

約 4 1 4 X の検出によって示されるように、ヌクレオチドアラインメントではなくタンパク質のアラインメントが、L S V などの高度に分岐のウイルスを検出するために不可欠である (3 7 , 2 9 2 対 9 0 , 表 1) 。実際に、低ストリンジェンシーのアミノ酸アラインメントを使用したときでさえ、上記計算パイプラインは、他のブニヤウイルスと比べて L S V の配列分岐が高いことに起因して、ディープシーケンシングデータセット (表 1) に実際に存在する L S V リードの総数の 2 6 . 1 % を同定することしかできなかった (図 4) 。したがって、ゲノムアセンブリの場合、下流の「シードに基づく」デノボアセンブリパッケージ (例えば、P R I C E (登録商標)) は、密接な関係がある参照配列 (図 2 A) の非存在下においてウイルス全ゲノムを回収するために有用である (E a r l a n d B r a d n a m ら (2 0 1 1) G e n o m e R e s 2 1 : 2 2 2 4 - 2 2 4 1 . ; R u b y a n d D e R i s i (2 0 1 3) , 2 0 1 2 年 1 月 に ア ク セ ス し た d e r i s i l a b . u c s f . e d u の ウ ェ ブ サ イ ト か ら イ ン タ ー ネ ッ ト 上 で 利 用 可 能)) 。

10

【 0 2 4 0 】

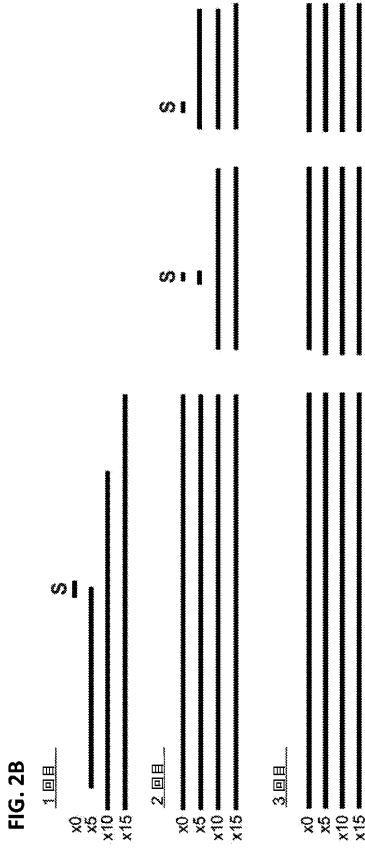
新しい感染症の出現率は、上昇し続けている。ベクター媒介性疾患は、過去 1 0 年間の新興感染症の事象のほぼ 3 0 % を占めた (J o n e s ら (2 0 0 8) N a t u r e 4 5 1 : 9 9 0 - 9 9 3) 。サーベイランスまたは大流行の調査のために新興のベクター媒介病原体を迅速に同定する能力は、これらの新しい疾患を理解することおよび取り扱うことの重要な構成部分である。A . a m e r i c a n u m ダニの中の高度に分岐のフレボウイルスの迅速な同定およびデノボ配列アセンブリのための、ディープシーケンシングに基づくアプローチを開発した。

20

【 0 2 4 1 】

開示された発明の原理が適用され得る多くの可能性のある実施形態に鑑みて、例証された実施形態は、本発明の好ましい例であるだけであって、本発明の範囲を限定すると見なされるべきでないとして認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。ゆえに、本発明者らは、本発明者らの発明が、これらの特許請求の範囲の範囲および精神に入るすべてのものであると主張する。

【 図 2 B 】



【 図 2 D 】

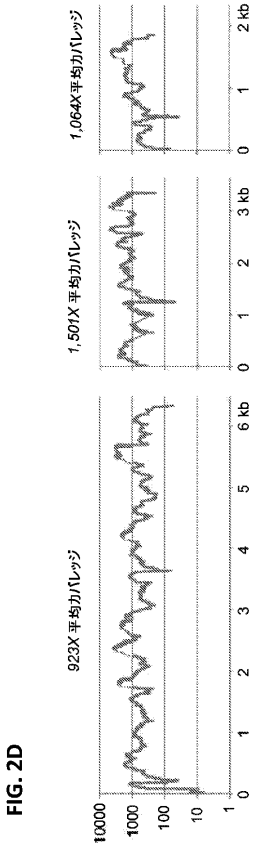


FIG. 2D

【 図 2 C 】

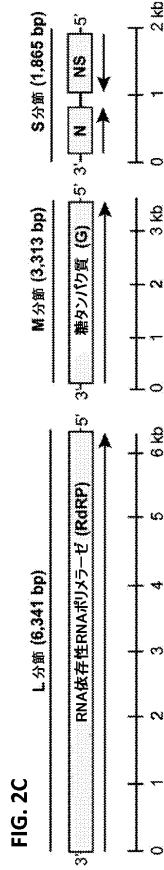


FIG. 2C

【 図 1 】

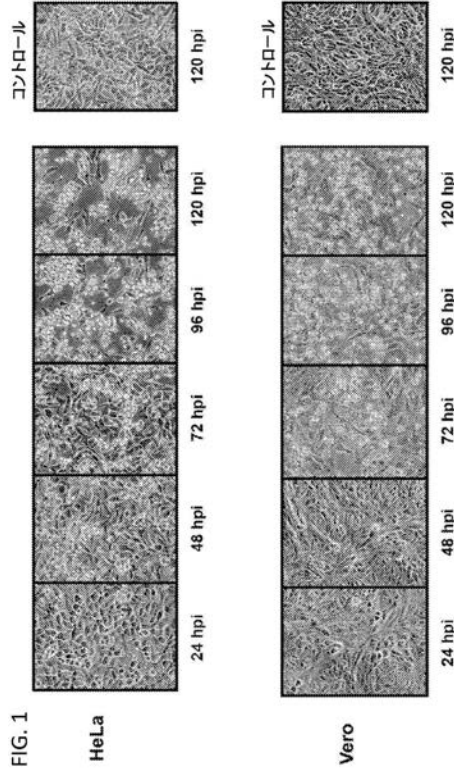


FIG. 1

【 図 2 A 】

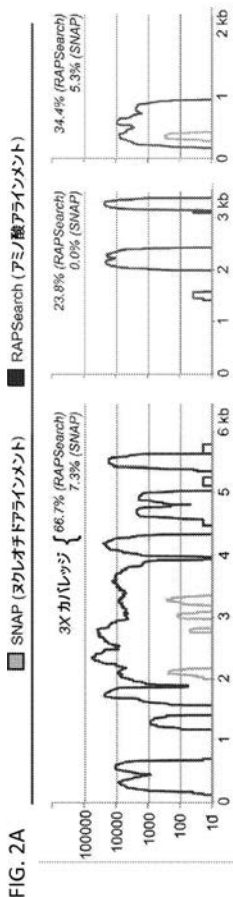


FIG. 2A

【 図 3 B 】

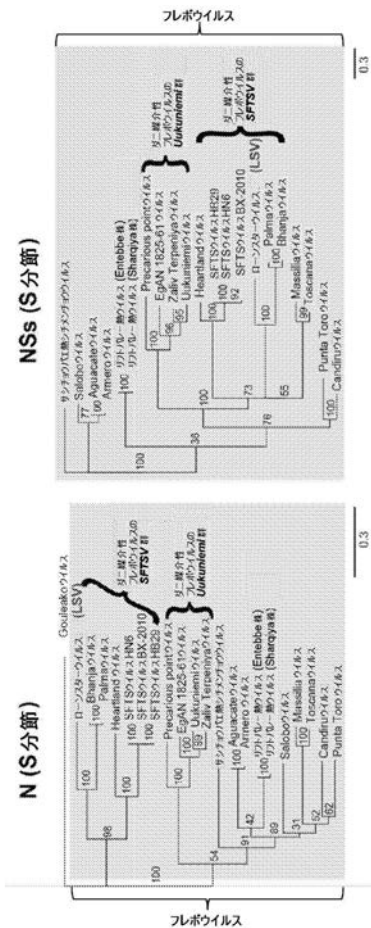


FIG. 3B

【 図 3 A 】

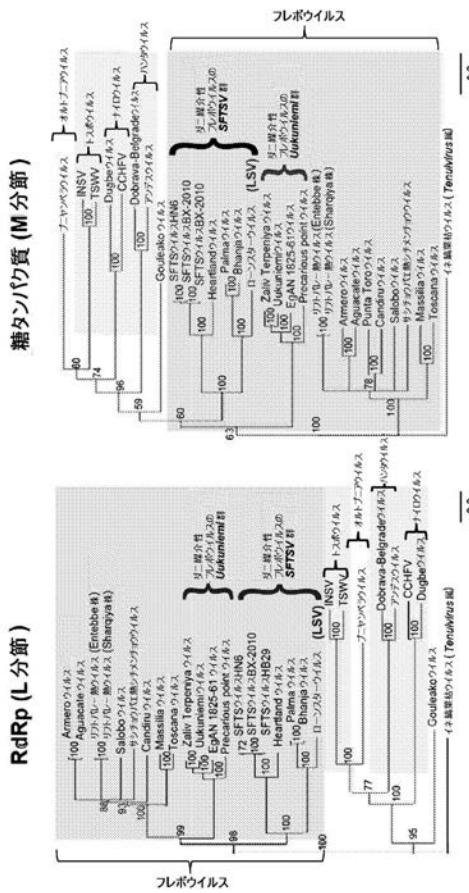


FIG. 3A

【 図 4 】

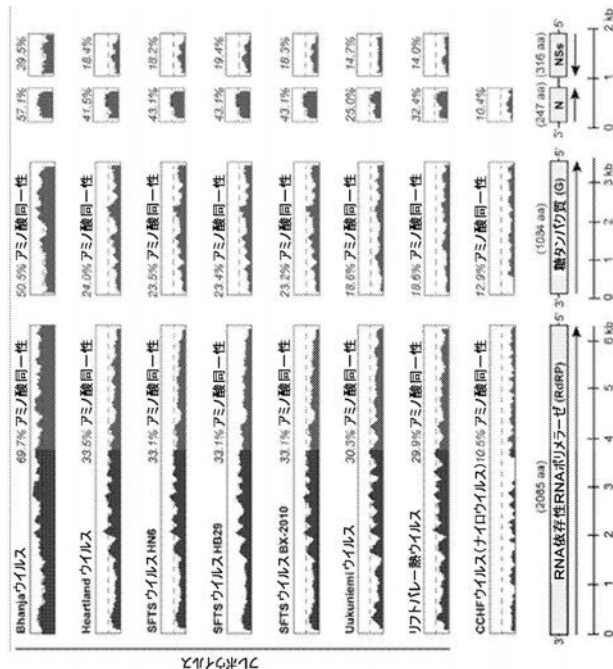


FIG. 4

【配列表】

2016518126000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/034684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N7/00 C07K14/175 C07K16/10 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, MEDLINE, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"No. 239, Lone Star (LS): Strain: TMA 1381", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, [Online] vol. 19, no. 6 Suppl, 1 November 1970 (1970-11-01), pages 1151-1152, XP008170866, ISSN: 0002-9637 Retrieved from the Internet: URL: http://www.ajtmh.org/content/19/6_Part_2/1151.full.pdf+html The whole document ----- -/--	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" 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 "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 August 2014	29/08/2014	
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	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/034684

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOKERNOT R H ET AL: "Arbovirus Studies in the Ohio-Mississippi Basin, 1964-1967: VII. Lone Star Virus, a Hitherto Unknown Agent Isolated from the Tick <i>Amblyomma americanum</i> (Linn.)", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, [Online] vol. 18, no. 5, 1 September 1969 (1969-09-01), pages 789-795, XP008170867, ISSN: 0002-9637 Retrieved from the Internet: URL: http://www.ajtmh.org/content/18/5/789.full.pdf+html > the whole document	1-43
X	US 2003/104410 A1 (MITTMANN MICHAEL P [US]) 5 June 2003 (2003-06-05) sequence 43752	12,13
X	DATABASE Geneseq [Online] 13 October 2003 (2003-10-13), "Human microarray DNA oligonucleotide SEQ ID NO 43752.", XP002728034, retrieved from EBI accession no. GSN:ACI43761 Database accession no. ACI43761 sequence	12,13
X	WO 2004/048511 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD [IL]; BENTWICH ITZHAK [IL]) 10 June 2004 (2004-06-10) sequence 20345	12,13
X	DATABASE Geneseq [Online] 28 December 2007 (2007-12-28), "Viral regulatory miRNA SEQ ID NO 20345.", XP002728035, retrieved from EBI accession no. GSN:AJH68023 Database accession no. AJH68023 sequence	12,13
X	US 2006/051770 A1 (MAKEEV TANYA [US]) 9 March 2006 (2006-03-09) sequence 57249	12,13
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/034684

(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 Geneseq [Online]</p> <p>4 October 2007 (2007-10-04), "Saccharomyces cerevisiae derived probe, SEQ ID NO: 57249.", XP002728036, retrieved from EBI accession no. GSN:AEV10634 Database accession no. AEV10634 sequence</p>	12,13
X,P	<p>-----</p> <p>SWEI ANDREA ET AL: "The Genome Sequence of Lone Star Virus, a Highly Divergent Bunyavirus Found in the Amblyomma americanum Tick", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 29 April 2013 (2013-04-29), XP002728033, the whole document</p> <p>-----</p>	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/034684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003104410	A1	05-06-2003	NONE
WO 2004048511	A2	10-06-2004	NONE
		AU 2003302409	A1 18-06-2004
		EP 1576145	A2 21-09-2005
		US 7759478	B1 20-07-2010
		US 8207316	B1 26-06-2012
		US 2004219515	A1 04-11-2004
		US 2007031823	A1 08-02-2007
		US 2007042381	A1 22-02-2007
		US 2008188428	A1 07-08-2008
		WO 2004048511	A2 10-06-2004
US 2006051770	A1	09-03-2006	NONE

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	5/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K	16/10	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N	7/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	L
	G 0 1 N	33/53	N
	G 0 1 N	33/53	M

(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

(71) 出願人 515122756

ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンテッド
バイ ザ セクレタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン
サービシズ

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA
AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

アメリカ合衆国 30341 ジョージア州 アトランタ ブフォード ハイウェイ 4770
メールストップ ケイ - 79

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 チウ, チャールズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サンフランシスコ, ベリー ストリート 1
85, ボックス 0134

(72) 発明者 スウェイ, アンドレア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94132, サンフランシスコ, ホロウェイ アベニュー
1600

(72) 発明者 ジョンソン, バーバラ ジェイ. ビー.

アメリカ合衆国 コロラド 80521, フォート コリンズ, ランパート ロード 315
6

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA14 BA51 CA04 CA09 CA20 DA02 DA05 DA12 EA04

FA02 GA11 HA03

4B063 QA01 QA18 QQ10 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02

4B064 AG27 CA19 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA95Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
CA45
4C085 AA13 AA14 AA16 BA65 BB11 CC08 DD62 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 DA76 DA86 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	孤星病毒		
公开(公告)号	JP2016518126A	公开(公告)日	2016-06-23
申请号	JP2016509132	申请日	2014-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会 健康和人类Sabishizu部的复制禅特德遮阳秘书长对美国的美国政府 美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会 美利坚合众国为复制禅泰德的健康与人类Sabishizu部秘书政府		
[标]发明人	チウチャールズ スウェイアンドレア ジョンソンバーバラジェイビー		
发明人	チウ, チャールズ スウェイ, アンドレア ジョンソン, バーバラ ジェイ.ビー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/175 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/10 C12Q1/68 C12P21/08 C12N7/04 A61K39/395 A61P31/14 A61P37/04 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	C12N7/00 A61K39/12 A61K2039/5254 C07K14/005 C07K16/10 C07K2317/24 C12N2760/12221 C12N2760/12234 C12N2760/12251 C12Q1/701 G01N33/56983 G01N2333/175 G01N2469/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/175 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/10 C12Q1/68.A C12P21/08 C12N7/04 A61K39/395.D A61K39/395.S A61P31/14 A61P37/04 G01N33/569.L G01N33/53. N G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063 /QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065 /CA44 4B065/CA45 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BA65 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045 /DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/816634 2013-04-26 US 61/814181 2013-04-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及独特的黄病毒孤星病毒的分离, 鉴定和测序。公开了孤星病毒核酸分子, 蛋白质和抗体。还公开了用于检测, 诊断和治疗孤星病毒的方法。一种分离的核酸分子, 其包含与SEQ ID NO: 1的开放阅读框至少90%相同的核酸序列, 其互补序列, SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3。(a) SEQ ID NO: 1, 其互补序列, 与SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3的开放阅读框至少90%相同的核苷酸序列; (b) 如SEQ ID NO: 1, 其互补序列, SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 3编码包含所示核酸序列的开放阅读框的多肽的核酸序列;或(c) 如SEQ ID NO: 4-7所示的氨基酸序列 含有cDNA。

(21) 出願番号	特願2016-509132 (P2016-509132)	(71) 出願人	506115514
(86) (22) 出願日	平成26年4月18日 (2014. 4. 18)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月11日 (2015. 12. 11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/034684		
(87) 国際公開番号	W02014/172661		
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014. 10. 23)		
(31) 優先権主張番号	61/816, 634		
(32) 優先日	平成25年4月26日 (2013. 4. 26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/814, 181		
(32) 優先日	平成25年4月19日 (2013. 4. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く