



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ORF 1 a またはその機能的部分をコードする核酸を含むアルテリウイルスであって、前記核酸が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において、nsp2TFのTFドメインの翻訳の低減および/または前記核酸から翻訳される1以上の下流産物の翻訳の変更をもたらす少なくとも1つの突然変異を含む、アルテリウイルス。

## 【請求項 2】

前記突然変異が、nsp2タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに干渉する、請求項1に記載のアルテリウイルス。

10

## 【請求項 3】

前記突然変異の少なくとも1つがフレームシフト部位GGU(U/C)U(U/C)Uおよび/または保存されているCCCANCUCCモチーフ内にある、請求項1または請求項2に記載のアルテリウイルス。

## 【請求項 4】

前記突然変異の少なくとも1つが、nsp1タンパク質をコードする核酸配列内にあり、かつ、マイナス2リボソームフレームシフトの低減をもたらす、請求項1～3のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

## 【請求項 5】

nsp2TF機能が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において低減される、かつ/または欠失となる、アルテリウイルス。

20

## 【請求項 6】

ORF 1 a またはその機能的部分をコードする核酸を含み、前記アルテリウイルスのnsp2TFアミノ酸配列が変更されるか、末端切断されるかまたは不在である、請求項5に記載のアルテリウイルス。

## 【請求項 7】

nsp2TFのTFドメインのアミノ酸配列が改変され、前記改変されたアミノ酸配列が場合により、野生型アルテリウイルスには存在せず、免疫原性があるエピトープを提供し、かつ、ORF 1 a のリーディングフレームが損なわれていない、請求項5または請求項6に記載のアルテリウイルス。

30

## 【請求項 8】

請求項1～7のいずれか一項に記載の自律複製アルテリウイルス。

## 【請求項 9】

前記アルテリウイルスがPRRSV 1型PRRSV(欧州遺伝子型)、II型PRRSV(北米遺伝子型)、またはそれらの組合せである、請求項1～8のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

## 【請求項 10】

前記アルテリウイルスが乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(LDV)またはサル出血熱ウイルス(SHFV)である、請求項1～8のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

40

## 【請求項 11】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアルテリウイルスをコードするRNA、DNA、またはcDNA。

## 【請求項 12】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアルテリウイルス、または請求項11に記載のRNAもしくはDNA、またはそれらの組合せと薬学上許容される担体または希釈剤を含む、ワクチンまたは免疫原性組成物。

## 【請求項 13】

pL1a(配列番号1)、pLnsp2-8(配列番号2)、pLnsp1-2(配列

50

番号3)、pLns p1 - 2 (配列番号4)、pLns p1 cc - 2 (配列番号5)、pLns p2 (配列番号6)、pLns p1 - 3 (配列番号7)、pLns p1 - 3 (配列番号8)、pLns p2 - 3 (配列番号9)、pLns p2 - 3 - IFC (配列番号10)、pLns p1 (配列番号11)、pL1a - IFC (配列番号12)、pL1a - KO1 (配列番号13)、pL1a - KO2 (配列番号15)、pL1a - SS (配列番号17)、pL1a - CC1 (配列番号18)、pL1a - CC2 (配列番号20)、pSD01 - 08 - IFC (配列番号22)、pSD01 - KO1 (配列番号25)、pSD01 KO2 (配列番号26)、pSD01 - 08 - KO1 (配列番号92)、pSD01 - 08 - KO2 (配列番号93)、pSD01 - 08 - KO3 (配列番号94)、pSD95 - 21 - KO1 (配列番号95)、pSD95 - 21 - KO2 (配列番号96)、およびpSD95 - 21 - KO3 (配列番号97)を含む、請求項12に記載のワクチンまたは免疫原性組成物。

10

【請求項14】

前記組成物がアジュバント、賦形剤、またはそれらの組合せをさらに含む、請求項12または請求項13に記載のワクチンまたは免疫原性組成物。

【請求項15】

動物においてアルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、動物に有効量の請求項12～14のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項16】

アルテリウイルスns p2TFタンパク質の全長または部分的TFドメインを含む、単離されたまたは組換え型のタンパク質。

20

【請求項17】

アルテリウイルスns p2TFタンパク質、請求項16に記載のタンパク質、または配列番号63、64もしくは65で示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、のTFドメインと特異的に結合する、単離されたまたは組換え型の抗体。

【請求項18】

野生型アルテリウイルスに感染した、および/または非改変型アルテリウイルス株を接種された被験体を、請求項12～14のいずれか一項に記載のワクチンを接種された被験体から識別するための方法であって、

30

a) 前記被験体からサンプルを準備すること；

b) 前記サンプルにおいて、TF ORFの5'末端に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに影響を及ぼす突然変異の有無またはTF ORFコード領域に対する改変を定性的に、または定量的に、または定性的かつ定量的に判定すること；および/または

c) 前記サンプルにおいて、前記ワクチンに特異的な免疫原性エピトープに対する抗体の存在を判定すること；および/または

d) 前記サンプルにおいて、前記野生型または非改変型アルテリウイルスにより発現されるが前記ワクチンには存在しないエピトープに対する抗体の存在を判定すること

を含む、方法。

40

【請求項19】

生体サンプルにおけるアルテリウイルスのタイピングのための方法であって、

a) ns p2タンパク質のコード領域に位置するマイナス2フレームシフト部位の存在および/または配列を判定すること；および/または

b) 前記アルテリウイルスにおけるns p2TFコード領域の存在および/または配列を判定すること

を含む、方法。

【請求項20】

あるタンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結されたアルテリウイルスのマイナス2フレームシフト部位を含む核酸であって、前記タンパク質がアルテリウイルスタン

50

パク質でなく、前記核酸が前記マイナス2フレームシフト部位の5'側にリボソーム翻訳開始コドンをさらに含む、核酸。

【請求項21】

前記アルテリウウイルスのマイナス2フレームシフト部位が配列GGU(U/C)U(U/C)Uおよび/またはCCCANCUCCを含む、請求項20に記載の核酸。

【請求項22】

- a) 配列番号35の核酸配列；
- b) 配列番号45、36、または76のうち1以上のアミノ酸をコードする核酸；
- c) 高ストリンジェンシー条件下で(a)または(b)とハイブリダイズする核酸配列

；  
d) (a)、(b)、または(c)のいずれかの機能的フラグメントを含む、請求項20または請求項21に記載の核酸。

【請求項23】

請求項20～22のいずれか一項に記載の核酸を含む発現系であって、前記発現系がnsp1またはその機能的部分をさらに含む、発現系。

【請求項24】

ある薬剤が、nsp2タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるリボソームフレームシフトに干渉し得るかどうかを判定するための方法であって

a) 前記部位においてフレームシフトを許容する翻訳系に、前記部位と作動可能に連結された遺伝子マーカーまたはリポーターをコードする核酸を提供すること；

b) 前記翻訳系を前記薬剤と接触させること；

c) 工程b)の系と薬剤を前記核酸の翻訳を可能とするようにインキュベートすること；および

d) 前記核酸によりコードされている翻訳産物の有無を判定することを含む、方法。

【請求項25】

前記翻訳系がアルテリウウイルスnsp1タンパク質もしくはその機能的部分を含み、かつ/または細胞である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記薬剤がアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA、マイクロRNA、核酸類似体、ペプチド、小分子もしくは化学化合物、またはそれらの組合せからなる群から選択される、請求項24または請求項25に記載の方法。

【請求項27】

アルテリウウイルスにおけるマイナス2フレームシフトに干渉し得る有効量の薬剤と、場合により薬学上許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項28】

アルテリウウイルスに感染した動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の請求項27に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項29】

異種プロモーターと作動可能に連結されたアルテリウウイルスnsp2TFタンパク質をコードする核酸を含む発現カセット。

【請求項30】

請求項29に記載の発現カセットを含む細胞。

【請求項31】

前記発現カセットが前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項30に記載の細胞。

【請求項32】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアルテリウウイルス、または請求項11に記載のcDNAをさらに含む、請求項30または請求項31に記載の細胞。

【請求項33】

10

20

30

40

50

請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の細胞を含むアルテリウイルスパッケージング細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、発現が *ns p 2* コード領域内に位置する部位におけるマイナス 2 リボソームフレームシフトに依存する新規なアルテリウイルスタンパク質 (*ns p 2 TF*) の発見および特性決定を提供する。

配列表の組み入れ

本出願は添付した配列表を含み、参照によりその全内容を本明細書に組み入れる。

10

【背景技術】

【0002】

ブタ繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、世界的な、豚の経済的に最も重大な疾患である。PRRS は、雌ブタでの後期生殖障害および新生ブタでの重症肺炎を特徴とする。PRRS の病原体 PRRS ウイルス (PRRSV) は、小型で、エンベロープを持ち、一本鎖のプラス鎖 RNA ゲノムを含有するウイルスである。PRRSV は、ニドウイルス目 (Nidovirales) のアルテリウイルス科 (Arteriviridae) のメンバーである。アルテリウイルス科には、ウマ動脈炎ウイルス (EAV)、乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス (LDV)、およびサル出血熱ウイルス (SHFV) が含まれる。

【0003】

20

PRRSV は、2つの主要な遺伝子型、すなわち、I 型 (欧州遺伝子型とも呼ばれる) および II 型 (北米遺伝子型とも呼ばれる) に分類できる。最近中国および他のアジア諸国に出現している高病原性変異株 (HP-PRRSV) は、II 型遺伝子型のウイルスに起源する。

【0004】

PRRSV ゲノムは、約 15 kb の長さで、少なくとも 10 のオープンリーディングフレームを含む。ゲノムの 3' 末端は、4つの膜結合性糖タンパク質 (GP2a、GP3、GP4 および GP5; *sg mRNA 2 ~ 5* から発現される)、3つの非グリコシル化膜タンパク質 (E、ORF5a および M; *sg mRNA 2、5 および 6* から発現される) およびヌクレオキャプシドタンパク質 (N; *sg mRNA 7* から発現される) をコードしている (de Boon et al., 1991; Meulenberg et al., 1993, 1995; Snijder et al., 1999; Wu et al., 2001, 2005; Firth et al., 2011; Johnson et al., 2011)。

30

【0005】

ゲノムの 5' 近位に位置する PRRSV レプリカーゼ遺伝子 ORF1a および ORF1b は、ウイルスゲノムの 75% 近くを占める。ORF1a および ORF1b は、2つの長いレプリカーゼポリタンパク質 pp1a および pp1ab をコードし、これらはタンパク質分解プロセッシングを受けて (少なくとも) 14 の非構造タンパク質 (*ns p*) 産物となる (Ziebuhr et al., 2000; Fang and Snijder, 2010)。これらのうち、*ns p 2* は最大の切断産物であり、*ns p 1 / 2* 部位に向けた上流 *ns p 1* の自己タンパク質分解活性と、パピイン様プロテアーゼ PLP2 による *ns p 2 / 3* 部位の切断とによって放出され、*ns p 2* の N 末端ドメインが残る (Snijder et al., 1995)。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】 de Boon et al., 1991

【非特許文献 2】 Meulenberg et al., 1993

【非特許文献 3】 Meulenberg et al., 1995

【非特許文献 4】 Snijder et al., 1999

【非特許文献 5】 Wu et al., 2001

【非特許文献 6】 Wu et al., 2005

50

- 【非特許文献 7】Firth et al., 2011  
 【非特許文献 8】Johnson et al., 2011  
 【非特許文献 9】Ziebuhr et al., 2000  
 【非特許文献 10】Fang and Snijder, 2010  
 【非特許文献 11】Snijder et al., 1995

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現在ところ、PRRSV感染に対抗する、またはPRRSV感染を予防するための効果的な処置またはワクチンはない。PRRSの影響は、米国の養豚産業だけで毎年およそ6億ドルの損失であり、世界ではこの額の数倍である。動物の苦痛、ならびにPRRSの防除にかかる生産者への経済的損失を軽減するために、基本的知識、抗ウイルス戦略、およびツールが必要とされる。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

出願者らは、アルテリウイルスPRRSV、LDVおよびSHFVにおけるC末端から3番目のnsp2付近をコードするレプリカーゼORF1a領域とオーバーラップする保存されているオープンリーディングフレーム(TFORF)を発見し、特性決定した。出願者らはまた、そのユニークなC末端ドメイン(TFドメイン)がTFORFによりコードされている新規なアルテリウイルスタンパク質nsp2TFも同定した。さらに、

20

【0009】

本発明は、ORF1aまたはその機能的部分をコードする核酸を含むアルテリウイルスであって、前記核酸が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において、nsp2TFの翻訳の低減および/または前記核酸から翻訳される1以上の下流産物の翻訳の変更をもたらす少なくとも1つの突然変異を含むアルテリウイルスを提供する。本発明のアルテリウイルスは、場合により、nsp2タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに干渉する突然変異を含む。本発明のアルテリウイルスは、場合により、フレームシフト部位GGU(U/C)U(U/C)Uおよび/または保存されているCCCANCUCCモチーフ内に少なくとも1つの突然変異を含む。本発明のアルテリウイルスは、場合により、nsp1タンパク質をコードする核酸配列内に、マイナス2リボソームフレームシフトの低減をもたらす1以上の突然変異を含む。

30

【0010】

本発明はさらに、nsp2TF機能が、アルテリウイルスの野生型に比べて、本発明のアルテリウイルスが感染した細胞において低減される、かつ/または欠失となるアルテリウイルスを提供する。前述のアルテリウイルスは、場合により、ORF1aまたはその機能的部分をコードする核酸を含み、ここで、コードされているnsp2TFアミノ酸配列のTFドメインは変更されているか、末端切断されているかまたは不在である。本発明のアルテリウイルスは、場合により、TFドメインの改変されたアミノ酸配列を含み、前記アミノ酸は翻訳され、場合により、野生型アルテリウイルスには存在しないが、ORF1aを損なわないタンパク質またはエピトープを提供する。本発明により提供されるアルテリウイルスのいくつかは自律的に複製することができる。本発明のアルテリウイルスのいずれかは、PRRSVであってよく、限定されるものではないが、1型(欧州遺伝子型)PRRSV、2型(北米遺伝子型)PRRSV、アジア変異株、またはそれらの組合せ、または乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(LDV)またはサル出血熱ウイルス(SHFV)が含まれる。本発明はまた、本明細書で提供されるアルテリウイルスのいずれかをコ

40

50

ードするRNAまたはcDNAベクターを提供する。

【0011】

また、本発明により、本発明のアルテリウイルスのいずれか、上記のcDNA、またはそれらの組合せと、場合により、薬学上許容される担体または希釈剤を含むワクチンまたは免疫原性組成物も提供される。また、アジュバント、賦形剤、またはそれらの組合せをさらに含む本発明のワクチンまたは免疫原性組成物も提供される。本発明は、被験体においてアルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、前記被験体に有効量の本発明の組成物を投与することを含む方法を提供する。被験体は、限定されるものではないが、哺乳類、ヒト、およびブタを含む動物であり得る。

【0012】

本発明は、全長または部分的アルテリウイルスTFドメインタンパク質を含む、好ましくは、配列番号36、45および46~67、91、および76~91のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含むか、または配列番号36、45および46~67、91、および76~91のいずれか1つと少なくとも70%同一なアミノ酸配列を含む、単離されたまたは組換え型のタンパク質を提供する。

【0013】

本発明は、TFドメインを含む、好ましくは、配列番号61で示されるアミノ酸配列を含むか、またはその中のエピトープを認識する、それと少なくとも70%同一なアミノ酸配列、配列番号63、64、および65を含む、単離されたまたは組換え型のタンパク質を提供する。さらに、本発明は、アルテリウイルスnsp2TFタンパク質または本発明のタンパク質のTFドメインと特異的に結合することができる単離されたまたは組換え型の抗体を提供する。

【0014】

生体サンプルにおいてアルテリウイルスに対する抗体の存在を検出する方法が本発明により提供され、前記方法は、生体サンプルをある量のTFドメインタンパク質抗原またはその一部と接触させること；TFドメイン抗原と抗体の間の複合体の有無を、検出系を用いて検出すること；およびTFドメイン抗原と抗体の間の複合体の有無を判定することを含み、複合体の存在がアルテリウイルスに対する免疫応答を示す。

【0015】

本発明により提供される別法は、生体サンプルがアルテリウイルスに対する抗体を含むかどうかを判定するための方法であり、前記方法は、生体サンプル中のTFドメイン特異的抗体の存在を検出することを含む。

【0016】

本発明は、野生型アルテリウイルスに感染した、および/または非改変型アルテリウイルス株を接種された被験体を、本発明のワクチンを接種された被験体から識別するための方法を提供し、前記方法は、前記試験対象からサンプルを準備すること；前記サンプルにおいて、TFORFの5'末端に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに影響を及ぼす突然変異の有無、またはTFドメインコード領域に対する改変を定性的、定量的、または定性的かつ定量的に判定すること；および/または前記サンプルにおいて、前記ワクチンに特異的な免疫原性エピトープに対する抗体の存在を判定すること；および/または前記サンプルにおいて、前記野生型または非改変型アルテリウイルスにより発現されるが前記ワクチンには存在しないエピトープに対する抗体の存在を判定することを含む。

【0017】

さらに、生体サンプルにおいてアルテリウイルスをタイピングする方法が提供され、前記方法は、nsp2タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位の存在および/または配列を判定すること；および/または前記アルテリウイルスにおけるTFドメインコード領域の存在および/または配列を判定することを含む。本発明はまた、あるタンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結されたアルテリウイルスのマイナス2フレームシフト部位を含む核酸を提供し、前記タンパク質はアルテリウ

10

20

30

40

50

イルスタンパク質でなく、前記核酸は好ましくは、前記マイナス2フレームシフト部位の5'側にリボソーム翻訳開始コドンを含み、本発明の核酸内のアルテリウイウイルスのマイナス2フレームシフト部位は、配列GGU(U/C)U(U/C)Uおよび/または下流CCCANCUCC配列を含み得る。加えて、本発明は、本発明の核酸の1つを含む発現系を提供し、前記発現系は場合により、nsp1 またはその機能的部分をさらに含む。

**【0018】**

本発明は、ある薬剤が、nTF ORFの5'末端に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるリボソームフレームシフトに干渉し得るかどうかを判定するための方法を提供し、前記方法は、前記部位においてフレームシフトを許容する翻訳系に、前記部位と作動可能に連結された遺伝子マーカーまたはリポーターをコードする核酸を提供すること；前記翻訳系を前記薬剤と接触させること；前記翻訳系と薬剤混合物を前記核酸の翻訳を可能とするようにインキュベートすること；および前記核酸によりコードされている翻訳産物の有無を判定することを含む。翻訳産物は完全翻訳産物であり得るか、または部分的翻訳産物であり得る。上記で提供される本発明の方法の翻訳系は、アルテリウイウイルスnsp1 タンパク質またはその機能的部分を含み得るか、かつ/または細胞である。上記で提供される本発明の方法の薬剤は、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA、マイクロRNA、核酸類似体、ペプチド、化学化合物、もしくは小分子、またはそれらの組合せからなる群から選択され得る。

10

**【0019】**

本発明はまた、アルテリウイウイルスにおけるマイナス2フレームシフトに干渉し得る有効量の薬剤と、場合により薬学上許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、アルテリウイウイルスに感染した動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

20

**【0020】**

本発明は、加えて、異種プロモーターと作動可能に連結されたアルテリウイウイルスnsp2TFタンパク質をコードする核酸を含む発現カセットを提供する。本発明は、本発明の発現カセットを含む細胞を提供する。本発明の細胞は、場合により、細胞の染色体に組み込まれる発現カセットを含む。本発明の細胞はいずれも、本発明により提供されるいずれかのアルテリウイウイルスまたは本発明のcDNAをさらに含み得る。本発明は、本発明の細胞を含むアルテリウイウイルスパッケージング細胞株を提供する。本発明はまた、本発明の細胞を含むnsp2TFを発現する安定な細胞株を提供する。さらに、本発明により提供される細胞株の細胞は、異種プロモーターからnsp2TFを発現する。

30

**【0021】**

本発明は、本明細書に記載の診断方法のためのキットを提供する。本発明は、単離されたnsp2TFタンパク質、ならびにTFドメインの免疫原性エピトープを含有するタンパク質およびペプチド、またはこのようなタンパク質またはペプチドをコードする任意のリボ核酸を提供する。本発明はさらに、本明細書に記載のタンパク質およびペプチドの免疫原性組成物を生産するための方法を提供する。エピトープは好ましくは1~500アミノ酸長の間、または好ましくは1~10アミノ酸長の間、または好ましくは10~15アミノ酸長の間、または好ましくは15~20アミノ酸長の間、または好ましくは20~25アミノ酸長の間、または好ましくは20~50アミノ酸長の間、または好ましくは50~75アミノ酸長の間、または好ましくは75~150アミノ酸長の間、または好ましくは150~250アミノ酸長の間、または好ましくは250~350アミノ酸長の間、または好ましくは350~500アミノ酸長の間、またはそれより長い。エピトープは好ましくは、150~275アミノ酸長の間、または好ましくは155~250アミノ酸長の間、または160~240アミノ酸長の間であり得る。

40

**【0022】**

出願者らは、効率的なPRRSVマイナス2フレームシフトが少なくとも2つのRNA配列(実際のフレームシフト部位および保存されている下流CCCANCUCC配列)と

50

n s p 1 の存在に依存することを見出した。出願者らは、予期しないことに、マイナス2フレームシフト(frameshifiting)および/またはn s p 2 T Fの発現を部分的または完全に妨げる突然変異はP R R S V複製を障害し、より小さなブランクの表現型をもたらすことを見出した。本明細書では、より低い感染性子孫力価を伴う増殖障害表現型とブランクサイズの縮小を示す、L D V、S H F V、およびP R R S ウイルスを含む新規なアルテリウイルスが提供される。また、本明細書では、n s p 3 - 1 2発現の効果的なアップレギュレーションを可能とし、ウイルスR N A合成を調節するための効果的なツールを提供する、L D V、S H F V、およびP R R S Vを含むアルテリウイルスの新規なノックアウト変異株が提供される。

【0023】

本発明は、O R F 1 a内に1以上の突然変異または突然変異の組合せを含むアルテリウイルスを提供し、アルテリウイルスにおいてマイナス2フレームシフトのレベルおよびn s p 2 T Fタンパク質の発現レベルが変更される。本発明はさらに、O R F 1 a内に1つの突然変異または突然変異の組合せを含むアルテリウイルスを提供し、n s p 2 T Fタンパク質が変更される。本発明の一実施形態によれば、前記アルテリウイルスにおける突然変異は、未成熟終止コドンをもたらす欠失または置換を含んでよく、またはT Fコード領域内に1以上の(one of more)終止コドンの挿入を含んでよく、その結果、n s p 2 T Fタンパク質の末端切断がもたらされる。また、本発明によれば、O R F 1 aの突然変異は、T Fドメインおよび/またはフレームシフト部位のコード領域内に存在してもよい。

【0024】

本発明のアルテリウイルスにおける突然変異は、n s p 1 タンパク質をコードする核酸配列内に欠失および/または突然変異を含み得る。本発明は、O R F 1 aに1以上の突然変異を含むアルテリウイルスを提供し、アルテリウイルスにおけるn s p 2 T Fタンパク質の発現レベルが低減される。本発明はまた、O R F 1 aに、n s p 2 T FのT Fドメインの変更、末端切断、または不在をもたらす1以上の突然変異を含むアルテリウイルスを提供する。

【0025】

本発明のアルテリウイルスは、限定されるものではないが、P R R S Vを含み、限定されるものではないが、1型(欧州遺伝子型)P R R S Vおよび2型(北米遺伝子型)P R R S V、アジア変異株、またはそれらの組合せを含む、いずれのアルテリウイルスであってもよい。本発明のアルテリウイルスは、限定されるものではないが、乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(L D V)またはサル出血熱ウイルス(S H F V)を含む、いずれのアルテリウイルスであってもよい。本発明のアルテリウイルスは、限定されるものではないが、T Fドメインまたはn s p 2 T Fアミノ酸配列内の特定の配列を変更または欠失させる突然変異を含む、遺伝子マーカーを含み得る。

【0026】

本発明は、1以上の本発明のアルテリウイルスと薬学上許容される担体および/または希釈剤とを含むワクチンおよび/または免疫原性組成物を提供する。本発明は、アルテリウイルス感染に感受性のある動物において、アルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法を提供し、前記方法は、1以上の本発明のワクチンまたは免疫原性組成物を含む組成物の有効量の投与を含み、その動物において前記免疫応答が誘導される。前記ワクチン組成物および免疫原性組成物は、限定されるものではないが、哺乳類、ヒト、およびブタを含むいずれの動物においても使用可能である。

【0027】

本発明は、アルテリウイルスにおいてマイナス2フレームシフト機構を阻害する有効量の阻害剤と薬学上許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。阻害剤は、アンチセンスD N A、アンチセンスR N A、s i R N AおよびマイクロR N A、核酸類似体、ペプチド、および小分子、化学組成物、またはそれらの組合せからなる群から選択され得る。核酸類似体は、ロックド核酸、モルフィリノ(morphilino)オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸、または当業者に公知の他の類似体の群から選択され得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 8 】

本発明は、アルテリウイルスに感染した動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の1以上の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

## 【 0 0 2 9 】

本発明はさらに、アルテリウイルス由来の1以上のフレームシフトシグナルおよび1以上の目的遺伝子をコードする1以上の核酸分子を核酸構築物に挿入することを含む、1以上の対象遺伝子の発現を制御するための発現系を提供する。本発明の発現系はさらに、核酸構築物への1以上のフレームシフト刺激因子の挿入を提供し、ここで、フレームシフトシグナルは、G\_\_G U U\_\_U U U、G\_\_G U C\_\_U C U、G\_\_A U U\_\_U U U、G\_\_G U U\_\_U U C、C C C A N C U C C、またはそれらの組合せである。

10

## 【 0 0 3 0 】

本発明は、n s p 2 T FのT Fドメインまたはその機能的部分をコードするアルテリウイルス核酸は、ウイルスゲノム内で完全にまたは部分的に不活性化されている、ワクチンまたは遺伝子発現系に使用するためのアルテリウイルスノックアウト変異株を提供する。

## 【 0 0 3 1 】

本発明は、生体サンプルにおいてアルテリウイルスに対する抗体の存在を検出する*in vitro*法を提供し、この場合、生体サンプルを抗原としての、一定量のn s p 2 T FのT Fドメインまたはその一部と接触させ、およびT Fドメイン抗原と抗体の間の複合体の有無を検出するための検出系を使用する、この場合、T Fドメイン抗原と抗体の間の複合体は、その生体サンプルが前記抗原に対する抗体を含有する場合にのみ生じ、複合体の存在がアルテリウイルスに対する免疫応答を示す。

20

## 【 0 0 3 2 】

本発明は、配列番号1~26、35~36、45、46~67、68~75、および76~97を提供する。本発明は、構築物p L 1 a (配列番号1)、p L n s p 2 - 8 (配列番号2)、p L n s p 1 - 2 (配列番号3)、p L n s p 1 - 2 (配列番号4)、p L n s p 1 - c c - 2 (配列番号5)、p L n s p 2 (配列番号6)、p L n s p 1 - 3 (配列番号7)、p L n s p 1 - 3 (配列番号8)、p L n s p 2 - 3 (配列番号9)、p L n s p 2 - 3 - I F C (配列番号10)、p L n s p 1 (配列番号11)、p L 1 a - I F C (配列番号12)、p L 1 a - K O 1 (配列番号13)、p L 1 a - K O 2 (配列番号15)、p L 1 a - S S (配列番号17)、p L 1 a - C C 1 (配列番号18)、p L 1 a - C C 2 (配列番号20)、p S D 0 1 - 0 8 - I F C (配列番号22)、p S D 0 1 - K O 1 (配列番号25)、p S D 0 1 - K O 2 (配列番号26)、p S D 0 1 - 0 8 - K O 1 (配列番号92)、p S D 0 1 - 0 8 - K O 2 (配列番号93)、p S D 0 1 - 0 8 - K O 3 (配列番号94)、p S D 9 5 - 2 1 - K O 1 (配列番号95)、p S D 9 5 - 2 1 - K O 2 (配列番号96)、およびp S D 9 5 - 2 1 - K O 3 (配列番号97)、それらと少なくとも70%同一な配列、あるいは本発明の方法、発現系および組成物(限定されるものではないが、ワクチンおよび免疫原性組成物を含む)のいずれかにおける、全体としての、または部分的な、またはその任意の組合せもしくはフラグメントでのそれらの使用(or their use in whole, in part, in or in any combination or fragment thereof)を提供する。

30

40

## 【 0 0 3 3 】

下記の図面は本明細書の一部を成し、特定の実施形態または本発明の種々の態様をさらに説明するために含まれる。いくつかの場合では、本発明の実施形態は、本明細書に提供される詳細な説明と組み合わせて添付の図面を参照することにより最も良く理解できる。これらの説明および添付の図面は本発明の特定の具体例または特定の態様を強調していることがある。しかしながら、当業者ならば、この例または態様の部分は、本発明の他の例または態様と組み合わせて使用可能であることを理解するであろう。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 3 4 】

【 図 1 】アルテリウイルスのゲノム構成および発現機構。(A)約15kb PRRSV

50

ゲノムのマップ。2つの長い5'近位レプリカーゼORFは非構造ポリタンパク質をコードし、少なくとも8つのより短い3'ORFは構造タンパク質をコードする。3'ORFは、3'コターミナルサブゲノムmRNAのネスティッドセットから翻訳され、そのうち2つは2シストロン性である。ORF1aとORF1bはゲノムRNAから翻訳され、ORF1bの翻訳は、ORF1aの末端における+1プログラムリボソームフレームシフト(PRF)に依存し、pp1a bレプリカーゼポリタンパク質を生じる。新たに記載されるTF ORFは、マイナス2リーディングフレーム内のORF1aの中央領域とオーバーラップし、マイナス2PRFを介してアクセスされる。nsp2/nsp2TF内のドメインは、PLP2(パバイン様プロテアーゼ)、HVR(超可変領域)、TM/TM(推定TMドメイン)、およびC(Cysリッチドメイン)として注釈される。nsp2関連産物の予測サイズは、CBI RefSeq NC\_001961および本研究で使用する単離株SD01-08(GenBank#DQ489311)に関して示される。(B)PRRSV ORF1aのバイオインフォマティクス解析。パネル1および2は、25コドンスライディングウインドウを用いて、212のPRRSV配列のアラインメントにおけるORF1a-フレーム同義部位の保存を示す。パネル2は、同義部位における中立進化のヌルモデル下で予想される数に対する、観察された置換数の比を示し、パネル1は対応するp値を示す。全TF ORFを合計すると、対応するp値は $5.7 \times 10^{-6.5}$ である。アラインメントにおける特定の配列の座標上に保存統計値をマッピングするために、選択された参照配列(viz. NC\_001961)においてギャップを含むアラインメントカラムは全て除去した(オリジナルアラインメントはTF ORF自体内ではギャップを含まないことに注意)。パネル3~5は、アラインした212の全ての配列における可能性のある3つのリーディングフレーム内の終止コドン(三角)、およびアラインメントギャップ(四角)の位置を示す。TF領域内のプラス1リーディングフレームにおいて終止コドンの欠損が保存されていることに留意されたい。(C)3つのSHFV配列のアラインメントにおける終止コドンの位置。垂直の線は、G\_\_GU(U/C)\_\_U(U/C)Uモチーフの位置を示す。この部位のすぐ後に続く220のコドンのプラス+1リーディングフレームにおいて終止コドンの欠損が保存されていることに留意されたい。

【図2A】フレームシフト部位付近のヌクレオチド配列。(A)代表的なアルテリウイルス由来の配列(Genbank受託番号:NC\_001639-LDV(配列番号27);NC\_001961-遺伝子型II NCBI PRRSV Ref Seq(配列番号28);JX258843-遺伝子型II PRRSV単離株SD23983(配列番号29);DQ489311-遺伝子型I PRRSV単離株SD01-08(配列番号30);NC\_003092-SHFV(配列番号31);HQ845737-8-SHFV krc1株(配列番号32)およびkrc2株(配列番号33)。提案されるフレームシフト部位(SD01-08およびSD23983で確定)を強調し、SHFV単離株krc1-2におけるヌクレオチドパリエーションを示す。保存性の高い下流CCCANCUCCモチーフを強調している。スペースはORF1aのコドンを区切る。マイナス2フレームTF ORFの長さを右に示す。

【図2B】(B)TFの発現および機能を検討するために用いた突然変異体の概要。非WTヌクレオチドを強調している。WT;IFC-インフレーム対照;KO1-ノックアウト1(TF内に未成熟終止コドン);KO2-ノックアウト2(未成熟終止コドンおよびフレームシフトカセットの破壊);SS-シフト部位突然変異体;CC1およびCC2-CCCANCUCCモチーフの破壊。

【図2C】(C)TFの発現および機能を検討するために用いた突然変異体の概要。

【図2D】(D)TFの発現および機能を検討するために用いた突然変異体の概要。

【図3A】PRRSV感染細胞におけるnsp2TF発現の免疫沈降およびウエスタンブロット分析。MARC-145細胞に欧州遺伝子型(EU)PRRSV単離株SD01-08(図AおよびB)または北米遺伝子型(NA)PRRSV単離株SD23983(C)を感染させた。感染細胞またはmock感染細胞の溶解液をnsp2特異的mAbで免

疫沈降 (IP) させた。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、クーマシブルーで染色した (A)。特異的ウイルスタンパク質の発現をウエスタンブロット (WB) により分析した (B および C)。各パネルの下に示されているように各膜を特異的 mAb または pAb でプローピングした。分子量マーカーおよび (推定) PRRSV タンパク質の位置を示す。

【図 3 B】 PRRSV 感染細胞における nsp2 TF 発現の免疫沈降およびウエスタンブロット分析。MARC-145 細胞に欧州遺伝子型 (EU) PRRSV 単離株 SD01-08 (図 A および B) または北米遺伝子型 (NA) PRRSV 単離株 SD23983 (C) を感染させた。感染細胞または mock 感染細胞の溶解液を nsp2 特異的 mAb で免疫沈降 (IP) させた。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、クーマシブルーで染色した (A)。特異的ウイルスタンパク質の発現をウエスタンブロット (WB) により分析した (B および C)。各パネルの下に示されているように各膜を特異的 mAb または pAb でプローピングした。分子量マーカーおよび (推定) PRRSV タンパク質の位置を示す。

10

【図 3 C】 PRRSV 感染細胞における nsp2 TF 発現の免疫沈降およびウエスタンブロット分析。MARC-145 細胞に欧州遺伝子型 (EU) PRRSV 単離株 SD01-08 (図 A および B) または北米遺伝子型 (NA) PRRSV 単離株 SD23983 (C) を感染させた。感染細胞または mock 感染細胞の溶解液を nsp2 特異的 mAb で免疫沈降 (IP) させた。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、クーマシブルーで染色した (A)。特異的ウイルスタンパク質の発現をウエスタンブロット (WB) により分析した (B および C)。各パネルの下に示されているように各膜を特異的 mAb または pAb でプローピングした。分子量マーカーおよび (推定) PRRSV タンパク質の位置を示す。

20

【図 4】 免疫蛍光顕微鏡による PRRSV 感染細胞における nsp2 TF タンパク質発現の検出、nsp2 および nsp2 TF が PRRSV 感染細胞の細胞内の種々の場所にターゲットされることも示す。MARC-145 細胞に PRRSV SD01-08 を感染させ、18 hpi において固定した。細胞を nsp2 TF 特異的ウサギ抗血清 (A) と PRRSV nsp2 を認識する mAb (B) で二重染色した。DyLight 549 標識ヤギ抗ウサギ IgG (A、蛍光) および FITC コンジュゲートヤギ抗マウス抗体 (B、蛍光) を二次抗体として用いた。細胞核は DAPI で染まった (C、青色蛍光)。D: A、B および C のマージ像。検体は Zeiss LSM510 共焦顕微鏡で画像化した。各画像では核を通る 0.8 μm 切片を示す。

30

【図 5 A】 遺伝子型 I PRRSV 単離株 SD01-08 に感染した細胞から精製された nsp2 TF の質量分析。(図 5 A) 3 つのリーディングフレームの全てにおける概念的アミノ酸翻訳によるシフト部位 G\_\_GUU\_\_UUU 近傍のヌクレオチド配列。マイナス 2 フレームシフトの産物を灰色で示す (配列番号 68、69)。これらのアミノ酸をカバーする 3 つのトリプシンペプチド (配列番号 70、71、72) を質量分析により検出した。シフト部位にわたる下線のペプチド (配列番号 83) は、-2 フレームシフトには適合するが、+1 フレームシフトには適合しない。定型の P 部位および A 部位 tRNA は、フレームシフトの前後で予想されたコドン: アンチコドン二重鎖を示す (本文も参照)。真核生物では、GUU は、アンチコドン 5' - IAC - 3' (I = イノシン) を持つパリン tRNA により読み取られると予想されるが、アンチコドン 5' - ncm<sup>5</sup>UAC - 3' (ncm<sup>5</sup>U = 5 - カルバモイルメチルウリジン) を有するパリン tRNA により読み取られることもあり得る。パリンのアンチコドンは、模式的に 3' - CA\* - 5' で示される。

40

【図 5 B】 (図 5 B) nsp2 TF の完全アミノ酸配列 (配列番号 45)。質量分析により同定されたペプチドは灰色で示す (配列番号 46 ~ 60、および 66)。マイナス 2 リーディングフレームによりコードされる C 末端 169 aa (配列番号 61) を強調し、一方、N 末端 713 aa (配列番号 62) は nsp2 と共有される。(順に mAb 36-19、58-64 および pAb - TF により認識されるエピトープを下線で示す (それぞれ

50

配列番号 63、64、および 65)。黒い下線は、突然変異体 KO1 の未成熟終止コドンの位置を示す(図 2B)。

【図 5C】(図 5C)ゲル切片から同定されたフレームシフトペプチド LMTWVFLK (上)および合成ペプチド(下)のタンデム質量スペクトル。

【図 6A】遺伝子型 I I PRRSV SD23983 株に感染した細胞から精製された nsp2TF の質量分析。(A) PRRSV 感染または mock 感染 MARC-145 細胞溶解液を nsp2 特異的 mAb 140-68 で免疫沈降させた。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、クーマシーブルーで染色した。分子量マーカーおよび(推定) PRRSV タンパク質の位置を示す。

【図 6B】(B) nsp2TF の完全アミノ酸配列(配列番号 76)。質量分析により同定されたペプチドを灰色で示す(配列番号 77~90)。フレームシフト部位にわたるペプチドを強調している(配列番号 91)。

【図 7A】p2 関連産物および nsp2TF 突然変異体の放射性免疫沈降分析。新たに合成されるタンパク質を 35S で代謝標識し、細胞溶解液を mAb 58-46 または pAb-TF 免疫沈降させた。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。SDS-PAGE の際に用いた分子量マーカーおよび nsp2 関連産物の位置を各パネルの横に示す。(A) PRRSV 感染 MARC-145 細胞を用いたパルスチェイス実験。タンパク質合成を 1 時間標識し、パネルの上に示されているような種々の時間追跡した。レーン C0h は、nsp2、nsp2TF、および nsp2N の量に基づいてフレームシフト効率を評価するために用い、マイナス 2 および 20

【図 7B】(B) 組換えワクシニアウイルス/T7 ポリメラーゼ系における ORF1a 発現の分析。RK-13 細胞を mock トランスフェクト、または pL1a プラスミド DNA でトランスフェクトした。タンパク質合成を 30 分間標識し、最大 2 時間追跡した。

【図 7C】(C) 組換えワクシニアウイルス/T7 RNA ポリメラーゼ発現系における nsp2TF 突然変異体の分析。各突然変異体を、全長 ORF1a ポリタンパク質を発現する pL1a 骨格を用いて構築した。RK-13 細胞をパネルの上に示されているような各構築物のプラスミド DNA でトランスフェクトした。矢印は突然変異体 KO1 由来の C 末端切断型 nsp2TF 産物を示す。

【図 8A】nsp1 が PRRSV における効率的マイナス 2 フレームシフトに必要とされることを明らかにする、組換えワクシニアウイルス/T7 RNA ポリメラーゼ発現系を用いた N 末端または C 末端 ORF1a 末端切断の分析。RK-13 細胞を mock トランスフェクト、または各パネルの上に示されているような pL-nsp 構築物でトランスフェクトした。代謝標識後、発現産物を示されているような特異的抗体で免疫沈降させた。Ab mAb 58-46 および pAb nsp2-3 は、nsp2 と nsp2TF の両方を認識し、pAb-TF は nsp2TF を認識する。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。nsp2 および nsp2TF の位置を各パネルの左側に示す。99kDa: 99kDa マーカータンパク質を発現する対照構築物。pL nsp2-3-IFC: nsp2TF のみを発現するインフレーム 30

【図 8B】nsp1 が PRRSV における効率的マイナス 2 フレームシフトに必要とされることを明らかにする、組換えワクシニアウイルス/T7 RNA ポリメラーゼ発現系を用いた N 末端または C 末端 ORF1a 末端切断の分析。RK-13 細胞を mock トランスフェクト、または各パネルの上に示されているような pL-nsp 構築物でトランスフェクトした。代謝標識後、発現産物を示されているような特異的抗体で免疫沈降させた。Ab mAb 58-46 および pAb nsp2-3 は、nsp2 と nsp2TF の両方を認識し、pAb-TF は nsp2TF を認識する。免疫沈降タンパク質を SDS-PAGE により分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。nsp2 および nsp2TF の位置を各パネルの左側に示す。99kDa: 99kDa マーカータンパク質を発現する対照構築物。pL nsp2-3-IFC: nsp2TF のみを発現するインフレーム 40

50

対照構築物。

【図9A】(A) *ns p 1* コード領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列アラインメント(上の配列:野生型ヌクレオチド;野生型の下の配列:*p L ns p 1 cc - 2*の変異型ヌクレオチド;下のヌクレオチド:アミノ酸)配列番号34、35、36。

【図9B】(B-C)トランス*ns p 1* 発現によるリボソームフレームシフトの刺激。RK-13細胞を、個々の*ns p 1* および*ns p 2* (B、*p L ns p 2 / 1*)または*ns p 1 - 2*融合タンパク質(C、*p L ns p 1 - 2*および*p L ns p 1 cc - 2*)を発現するプラスミドDNAで共トランスフェクトした。プラスミド*p L ns p 1 cc - 2*は、ほとんど全てのコドンが同義突然変異された(ただし、希少なコドンは避けて)合成*ns p 1* コード配列を含む。WT *ns p 2* (*p L ns p 2*)および*ns p 2 T F* (*p L 1 a - I F C*)を発現するプラスミドを対照として含んだ。細胞溶解液を、mAb 36-19を用いて免疫沈降させ、タンパク質発現をウエスタンブロット法により分析した。膜を、パネルの横に示されているような*ns p 1*、*ns p 2*および/または*ns p 2 T F*(図では「TF」とも呼ばれる)に対するAbでプロービングした。ローディング対照としての $\alpha$ -チューブリンの発現を検出するためには抗 $\alpha$ -チューブリン抗体を用いた。

【図9C】(B-C)トランス*ns p 1* 発現によるリボソームフレームシフトの刺激。RK-13細胞を、個々の*ns p 1* および*ns p 2* (B、*p L ns p 2 / 1*)または*ns p 1 - 2*融合タンパク質(C、*p L ns p 1 - 2*および*p L ns p 1 cc - 2*)を発現するプラスミドDNAで共トランスフェクトした。プラスミド*p L ns p 1 cc - 2*は、ほとんど全てのコドンが同義突然変異された(ただし、希少なコドンは避けて)合成*ns p 1* コード配列を含む。WT *ns p 2* (*p L ns p 2*)および*ns p 2 T F* (*p L 1 a - I F C*)を発現するプラスミドを対照として含んだ。細胞溶解液を、mAb 36-19を用いて免疫沈降させ、タンパク質発現をウエスタンブロット法により分析した。膜を、パネルの横に示されているような*ns p 1*、*ns p 2*および/または*ns p 2 T F*(図では「TF」とも呼ばれる)に対するAbでプロービングした。ローディング対照としての $\alpha$ -チューブリンの発現を検出するためには抗 $\alpha$ -チューブリン抗体を用いた。

【図10】*ns p 1* の表面接近性予測および配列アラインメント。(A) Emini表面接近性予測;灰色の四角で強調したピークは最高の表面接近値を示した。(B)代表的なI型およびII型PRRSV株由来の*ns p 1* のアミノ酸配列アラインメント。アラインメントの上に示されたPRRSV *ns p 1* の二次構造要素は、II型PRRSV XH-GD株の結晶構造(Xue et al., 2010)に基づく。保存性の高いモチーフGKYLQRR LQは、四角で強調している。上のアミノ酸の数は、XH-GD株の*ns p 1* 配列内の残基の位置を表す。図に示される配列はGenBankからのものであった:GU737264(07V063)、GU067771(Amer vac PRRS)、GU047344(BJEU06-1)、AY366525(Euro PPRSV)、EU076704(HKEU16)、FJ349261(KNU-07)、M96262(LV;レリスタッドウイルス)、GU047345(NMEU09-1)、DQ489311(SD01-08)、GQ461593(SHE)、EU624117(XH-GD)、EU708726(JX143)、AY424271(JA142)、DQ988080(Inge l vac ATP)、AF325691(NVSL)、AF494042(P129)、EF536003(VR2332)、EF488739(MN184)、AF066183.4(Resp PRRS MLV)、KC469618(SD95-21)、EF112445(JXA1)、AY032626(CH-1a)、EU807840(CH-1R)、DQ779791(Prime Pac)、AF176348(PA8)、AF184212(SP)。配列番号64~150)。

【図11】組換えワクシニアウイルス/T7 RNAポリメラーゼ発現系を用いた*ns p 1* GKYLQRR LQモチーフにおける突然変異の分析。HEK 293T細胞( $2 \times 10^6$ )に組換えワクシニアウイルスを感染させた後、1 h p iにおいて、mockト

10

20

30

40

50

ランスフェクト、または1型PRRSV(EU)または2型PRRSV(NA)由来のnsp1-2(またはその突然変異体)を発現するプラスミドDNAでランスフェクトした。24時間のインキュベーション後に、タンパク質をmAb58-46で免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分析した。サイズマーカーおよびnsp2関連産物を各パネルの横に示す。

【図12A】PRRSV nsp1におけるRNA結合部位の予測。1型PRRSV SD01-08または2型PRRSV SD95-21のnsp1アミノ酸配列を、BindN software worldwide web bioinfo.ggc.org/bindnを用いて分析した。テキストラインの下の「+」の記号は、予測されるRNA結合アミノ酸を表し、「-」の記号は非結合アミノ酸を表す。このラインの下の数字は信頼水準をレベル0(最低)からレベル9(最高)までで表す。GKYLQRR LQモチーフは、配列の上のバーで強調している。右上のパネルはnsp1の結晶構造を示し、GKYLQRR LQモチーフはタンパク質表面に露出されていることに留意されたい。配列番号151および152。

10

【図12B】PRRSV nsp1におけるRNA結合部位の予測。1型PRRSV SD01-08または2型PRRSV SD95-21のnsp1アミノ酸配列を、BindN software worldwide web bioinfo.ggc.org/bindnを用いて分析した。テキストラインの下の「+」の記号は、予測されるRNA結合アミノ酸を表し、「-」の記号は非結合アミノ酸を表す。このラインの下の数字は信頼水準をレベル0(最低)からレベル9(最高)までで表す。GKYLQRR LQモチーフは、配列の上のバーで強調している。右上のパネルはnsp1の結晶構造を示し、GKYLQRR LQモチーフはタンパク質表面に露出されていることに留意されたい。配列番号151および152。

20

【図13】PRRSV、LDVおよびSHFV由来のnsp1のアミノ酸配列アラインメント。図はENDscriptプログラムにより作成された。アラインメントの上に示されているPRRSV nsp1の二次構造要素は、II型PRRSV XH-GD株の結晶構造(Xue et al., 2010)に基づく。図に示される配列はUniProtから得たものである。保存されているモチーフGKYLQRR LQ(配列番号158)を強調している。略号: hyd - ハイドロパシー; acc - 結晶学的接触; a - タンパク質と2つのGLC分子の間の接触、ならびに結晶学接触。配列番号148~157。

【図14A】WT PRRSVおよびnsp2TFノックアウト突然変異体の増殖特性の比較。(A~B)。1型PRRSV(A)および2型PRRSV(B)由来のnsp2TFノックアウトウイルスおよびWTウイルスのブランク形態。コンフルエントMARC-145細胞単層にWTウイルスまたは組換えウイルスの10倍連続希釈液を感染させた。感染2時間後、細胞培養上清を取り出し、寒天で覆った。ブランクは、37で5日(1型ウイルス)または3日(2型ウイルス)のインキュベーション後に検出され、0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

30

【図14B】WT PRRSVおよびnsp2TFノックアウト突然変異体の増殖特性の比較。(A~B)。1型PRRSV(A)および2型PRRSV(B)由来のnsp2TFノックアウトウイルスおよびWTウイルスのブランク形態。コンフルエントMARC-145細胞単層にWTウイルスまたは組換えウイルスの10倍連続希釈液を感染させた。感染2時間後、細胞培養上清を取り出し、寒天で覆った。ブランクは、37で5日(1型ウイルス)または3日(2型ウイルス)のインキュベーション後に検出され、0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

40

【図14C】(C-D)。1型PRRSV(C)および2型PRRSV(D)由来のWTウイルスと比較したnsp2TFノックアウトウイルスの増殖速度。MARC-145細胞に各ウイルスをMOI0.1で感染させ、生産されたウイルスの量を12、24、36、48、60、および72hpiにおいて、MARC-145細胞における蛍光フォーカスアッセイにより決定した。示されている結果は3反復からの平均値であり、ウイルス力価を蛍光フォーカス単位/ミリリットル(FFU/ml)の数値として表した。

【図14D】(C-D)。1型PRRSV(C)および2型PRRSV(D)由来のWTウイルスと比較したnsp2TFノックアウトウイルスの増殖速度。MARC-145細胞

50

胞に各ウイルスをMOI 0.1で感染させ、生産されたウイルスの量を12、24、36、48、60、および72 hpiにおいて、MARC-145細胞における蛍光フォーカスアッセイにより決定した。示されている結果は3反復からの平均値であり、ウイルス力価を蛍光フォーカス単位/ミリリットル(FFU/ml)の数値として表した。

【図15A】PRRSVのdeISGylation能に及ぼすnsp2TFノックアウト突然変異の影響。MARC-145細胞に0.1 MOIの野生型PRRSVまたはnsp2TFノックアウト突然変異体を感染させた。Mock感染細胞を対照として含めた。感染後24時間において、細胞を1,000 U/mlのIFN- $\gamma$ で刺激した。(A)刺激後12時間において、細胞を採取し、免疫プロット法により分析した。遊離型および結合型のISG15を抗ISG15ポリクローナル抗血清により検出した。nsp1の発現の検出には、MAb 123-128を用いた。-チューブリン(ローディング対照)の発現の検出には、抗-チューブリン抗体を用いた。

【図15B】(B)35Sで1時間代謝標識した後、nsp2関連産物をmAb 140-68で免疫沈降させた。沈降したタンパク質をSDS/PAGEにより分析し、オートラジオグラフィーにより検出した。

【図16】PRRSVの脱ユビキチン化能に及ぼすnsp2TFノックアウト突然変異の影響。HEK-293T細胞に、HAタグを有するユビキチンを発現するプラスミドおよび野生型PRRSVまたはnsp2TFノックアウト突然変異体の全長cDNAクローンを共トランスフェクトした。細胞をトランスフェクション36時間後に溶解させ、抗HAMAbを用いたウエスタンプロット法により分析した。nsp1の発現の検出には、MAb 123-128を用いた。-チューブリン(ローディング対照)の発現の検出には、抗-チューブリン抗体を用いた。

【図17A】野生型PRRSVで抗原チャレンジを行った非免疫ブタおよび免疫ブタからのウイルス量および肉眼的肺所見の比較。黒い垂直の点線で示される28 dpvにおいて、ブタに抗原チャレンジを行った。(A)リアルタイムRT-PCRにより定量したLogウイルス量(RNAコピー数/ml)。

【図17B】(B)抗原チャレンジ後13日における、非ワクチン接種ブタ群と接種ブタ群の間の肉眼的肺病変スコアの比較。肺病変スコアは、各肺葉の肺炎パーセントの評価を全肺としての合算したものに基づいて割り当てた。データ点は、肉眼的肺病変スコアの平均パーセンテージとして表した。

【図18A】nsp2TFノックアウト突然変異体または野生型ウイルスを接種したブタからの活性化PBMCにおける免疫マーカー遺伝子発現の比較。PBMCは7 dpvにおいて採取し、培養系にて、突然変異体ウイルス、親ウイルスまたは培地で刺激した。刺激後24時間で細胞培養上清を採取した。サイトカインタンパク質IFN- $\alpha$ (A)またはIL-8(B)の発現は、Luminesx蛍光マイクロスフェアイムノアッセイにより決定した。各データ点は5パラメーターロジスティック回帰曲線を用いて補間し、ブタ陰性対照群と比較して平均蛍光単位(n=3)の変化倍率として表示した。

【図18B】nsp2TFノックアウト突然変異体または野生型ウイルスを接種したブタからの活性化PBMCにおける免疫マーカー遺伝子発現の比較。PBMCは7 dpvにおいて採取し、培養系にて、突然変異体ウイルス、親ウイルスまたは培地で刺激した。刺激後24時間で細胞培養上清を採取した。サイトカインタンパク質IFN- $\alpha$ (A)またはIL-8(B)の発現は、Luminesx蛍光マイクロスフェアイムノアッセイにより決定した。各データ点は5パラメーターロジスティック回帰曲線を用いて補間し、ブタ陰性対照群と比較して平均蛍光単位(n=3)の変化倍率として表示した。

【図19A】nsp2TFノックアウト突然変異体または野生型ウイルスを接種したブタにおける抗体応答。(A)IDEXX Herd Check(登録商標)PRRSV ELISA 3XRキットによって測定したPRRSV特異的血清抗体。0.4より大きいS/P比を陽性とし見した。

【図19B】(B)蛍光フォーカス中和アッセイによって決定された血清中和抗体応答。結果はウイルス感染の90%減と解釈され、中和抗体力価を平均値(n=5)として示し

10

20

30

40

50

、log<sub>2</sub>スケール上に表した。野生型ウイルスをウイルス中和アッセイに用いた。

【発明を実施するための形態】

【0035】

定義

本明細書で使用する場合、列挙される用語は以下の意味を有する。本明細書で使用される他の用語および句は全て、当業者が理解しているそれらの通常の意味を有する。このような通常の意味は、Hawley's Condensed Chemical Dictionary 第14版, R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001などの専門辞書を参照することにより得ることができる。

【0036】

本明細書において「ある実施形態」、「一実施形態」などという場合には、記載の実施形態が特定の態様、特徴、構造、部分、または特徴を含み得るが、全ての実施形態がその態様、特徴、構造、部分、または特徴を必ず含むわけではないことを示す。さらに、このような句は、必ずというわけではないが、本明細書の他の部分に言及される同じ実施形態も指し得る。さらに、特定の態様、特徴、構造、部分、または特徴がある実施形態と関連付けて記載される場合、明記の有無にかかわらず、このような態様、特徴、構造、部分、または特徴を他の実施形態に振り向けるまたは関連付けることは当業者の知識の範囲内である。

【0037】

単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうではないことを明示しない限り、複数の指示対象を含む。特許請求の範囲は、任意選択の要素を排除するように起案されている場合があることにさらに留意されたい。従って、この記述は、クレーム要素の列挙または「否定的な限定(negative limitation)」の使用に関して、「唯一」、「のみ」などの排他的技術用語の使用に対する先行記載として機能することを意図する。

【0038】

用語「および/または」は、この用語が関連するそれらの項目のいずれか1つ、それらの項目の任意の組合せ、またはそれらの項目の全てを意味する。「1以上の」という句は、当業者には、特にその用法の文脈で読めば容易に理解される。

【0039】

用語「約」は、明示されている値の例えば、±5%、±10%、±20%、または±25%の変動を指し得る。例えば、「約50」パーセントは、いくつかの実施形態では、45~55パーセントの変動を含み得る。整数の範囲に関して、用語「約」とは、その範囲の各末端において列挙されている整数より1または2大きい、および/または小さい整数を含み得る。本明細書において特に断りのない限り、用語「約」は、個々の成分、組成物、または具体例の機能性に関して等価な、列挙範囲に近接する値、例えば、重量パーセントを含むものとする。

【0040】

当業者により理解されているように、成分、分子量などの特性、反応条件などの量を表現するものを含め、全ての数字は近似値であり、全ての場合において、任意選択で用語「約」により修飾され得ると理解される。これらの値は、本明細書の記述の教示を用いて当業者が得ようとする所望の特性に応じて可変である。また、それらの個々の試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる変動を内包すると理解される。

【0041】

当業者により理解されているように、あらゆる目的で、特に、書面による説明を提供するという点で、本明細書に列挙される全ての範囲はまた、あらゆる可能性のある部分範囲およびその部分範囲の組合せ、ならびにその範囲を構成する個々の値、特に整数値を包含する。列挙される範囲は、その範囲内の各具体的な値、整数、小数、または属性を含む。列挙される範囲はいずれも、同じ範囲が少なくとも等分、3分の1、4分の1、5分の1または10分の1に分割されることを十分に記載または可能とすると容易に認識することができる。限定されない例として、本明細書に記載の各範囲は、下方の3分の1、中間の

10

20

30

40

50

3分の1、上方の3分の1に容易に分割され得る。

【0042】

これもまた当業者により理解されているように、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」、「を超える」、「以上」などのような言葉は全て、列挙されている数値を含み、このような用語は、上述のように次に部分範囲に分割され得る範囲を意味する。同様に、本明細書に列挙されている全ての比も、より広い比内に入る全ての部分比を含む。

【0043】

また、当業者ならば、構成要素がマーカッシュ群などの共通の様式で群に分けられる場合、本発明は、全体として挙げられている群全体だけでなく、その群の各構成要素を個々に、また、主要な群の可能性のある全ての部分群を包含すると容易に理解するであろう。加えて、あらゆる目的で、本発明は、主要な群だけでなく、その群の構成要素の1以上を欠いたその主要な群も包含する。従って、本発明は、列挙される群の構成要素のいずれか1以上の明確な排除を想定する。よって、条件は開示されるカテゴリーまたは具体例のいずれにも当てはまり、それにより、列挙される要素、種、または具体例のいずれか1以上は、例えば、明確な否定的な限定で使用されるように、このようなカテゴリーまたは具体例から排除され得る。

【0044】

用語「接触させる」は、細胞レベルまたは分子レベルを含め、触れ合わせる、接触を持たせる、または直接または密接に近接させる、例えば、溶液中、反応混合物中、*in vitro*、または*in vivo*で、例えば、生理学的反応、化学反応、または物理的变化を達成する行為を意味する。

【0045】

「有効量」は、疾病、障害、および/または病態を治療するため、または免疫性の付与もしくは疾病発症の予防などの列挙されている効果を達成するために有効な量を意味する。例えば、有効な量は、治療される病態または症状の進行または重篤度を軽減するために有効な量であり得る。

【0046】

治療上有効な量の決定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らせば、十分に当業者の能力の範囲内である。用語「有効な量」は、例えば、宿主において、疾病もしくは障害を治療もしくは予防するため、または疾病または障害の症状を治療するために有効な、本明細書に記載の化合物の量、または本明細書に記載の化合物の組合せもしくは組成物の量を含むものとする。よって、「有効な量」は一般に、所望の効果を提供する量を意味する。

【0047】

用語「処置(treating, treat, and treatment)」は、(i) 疾病、病的もしくは医学的状态の発症を防ぐこと(例えば、予防); (ii) 疾病、病的もしくは健康状態/医学的状态を阻害すること、もしくはその発生を阻止すること; (iii) 疾病、病的もしくは医学的状态を軽減すること; および/または(iv) 疾病、病的もしくは医学的状态に関連する症状を減じることを含む。よって、用語「処置(treat, treatment, and treating)」は予防に及び、処置される病態または症状の進行または重篤度の予防(prevent, prevention, preventing)、低減、停止または逆転を含む。従って、用語「処置」は、必要に応じて医学的、獣医学的、治療的、および/または予防的投与を含む。

【0048】

用語「阻害(inhibit, inhibiting, and inhibition)」は、疾病、感染、病態、または細胞群の増殖または進行の緩徐化、停止、または逆転を意味する。阻害は、例えば、処置または接触の不在下で起こる増殖または進行に比べて、約20%、40%、60%、80%、90%、95%、または99%より大きいものであり得る。

【0049】

用語「ワクチン」は本明細書で使用する場合、病原体に対する宿主の免疫を刺激する組

10

20

30

40

50

成物を意味する。宿主の免疫応答は、サイトカインの産生などの抗体（体液性免疫応答）、ならびに生得免疫応答および細胞媒介性免疫応答を含む。従って、ワクチンは、被験体を疾病から防御すること、または被験体における疾病の影響を和らげることができる。ワクチンは、有針注射（限定されるものではないが、筋肉内、皮内、または皮下注射を含む）を介して、経口で、またはエアゾールにより（限定されるものではないが、鼻腔内送達）、または当業者に公知の他の手段によって投与することができる。

【0050】

ワクチンは、限定されるものではないが、弱毒生ウイルス（MLV）ワクチン、死滅ワクチン、トキソイドワクチン、コンジュゲートワクチン、DNAまたはRNAワクチン、マーカーワクチン、組換え細菌またはウイルスベクターワクチン、およびサブユニットワクチンを含む、概して1～20またはそれを超える抗原を含有し得る、いくつかのワクチン種の1つであり得る。

10

【0051】

弱毒ワクチン、または改変型の生ウイルスワクチンは、その疾病の重篤な影響を生じない免疫応答を生起するために、化学的もしくは物理的プロセスによって、または遺伝子改変によって、生ウイルスが弱められているワクチンである。不活化ワクチン、または死滅ワクチンは、物理的または化学的プロセスによって死滅させたウイルスまたは細菌から作製されるワクチンである。これらの死滅させた生物は 疾病を引き起こすことはできない。

【0052】

「免疫」とは、本明細書で使用する場合、人または動物がある疾病から防護されるようになるプロセスを意味する。この用語は、ワクチン接種または接種と互換的に使用される場合が多い。

20

【0053】

「混合ワクチン」は、単一用量中に投与する2種類以上のワクチンを含むワクチンである。

【0054】

本明細書で使用する場合、用語「抗原」は、免疫応答を惹起もしくは誘導もしくは刺激し、かつ/またはB細胞および/もしくはT細胞と特異的に反応することができる物質を意味する。加えて、本明細書で使用する場合、抗原は、細胞、細菌、もしくはウイルス粒子、もしくはそれらの一部、または免疫原性合成タンパク質、組換えタンパク質もしくは天然タンパク質もしくはペプチド、もしくはそれらの一部であり得る。抗原は、ウイルスもしくは細菌起源であり得るか、または生物系にとって外来の因子である物質であり得る。抗原は、免疫原と呼ばれる場合もある。抗原はまた、ウイルスコートの成分、またはウイルスタンパク質の完全型もしくは部分型、またはウイルス遺伝物質であってもよく、この場合、実際のウイルスが疾病の病原体である。

30

【0055】

本明細書で使用する場合、用語「弱毒する」は、限定されるものではないが、阻害する、弱める、低下させる、障害する、軽減する、および減じる、を含むと定義される。

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「アジュバント」は、限定されるものではないが、ワクチンに対する被験体の免疫応答を増強するためにワクチン組成物に添加される物質（例えば、アルミニウム塩）を含むと定義される。

40

【0057】

本明細書で使用する場合、「免疫原性」とは、抗原を含め、免疫応答を誘導する物質の能力を意味する。

【0058】

用語「動物」は、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、1)セルロース壁を持たない細胞を持つこと、2)クロロフィルおよび光合成能を欠くこと、3)より複雑な食物材料、例えば、タンパク質を必要とすること、4)より大きな複雑度に組織化

50

されていること、および5)自発的運動および刺激に対する刺激に対する迅速運動応答の能力を持つことで植物とは一般に異なる、多細胞生物、および単細胞生物を含む、動物界のメンバーを含む、生物界のいずれのものも意味する。動物という用語はまた、本明細書で使用する場合、哺乳類(Mammalia)の大区分、または亜界、およびそれらの下の主要な綱のいずれかを意味し、限定されるものではないが、哺乳類(Mammalia or mammals)、例えば、鳥類(Aves or birds)、爬虫類(Reptilia)、両生類(Amphibia)、魚類(Pisces or fishes)、嚢嚢類(Marsipobranchiata)(有頭類(Craniota))；および薄心類(Leptocardia)(無頭類(Acrania))；被嚢類(Tunicata)、例えば、サルバ類(Thaliacea)、およびホヤ類(Ascidioideaまたはascidians)；有関節類(Articulata)またはクモヒトデ類(Annulosa)、例えば、昆虫類(Insecta)、多足類(Myriapoda)、マラカボダ(Malacapoda)、蛛形類(Arachnida)、ウミグモ類(Pycnogonida)、節口類(Merostomata)、甲殻類(Crustacea)(節足動物門(Arthropoda))；および環形動物門(Annelida)、ヤモリ類(Gephyrea)(アナルトロボダ(Arthropoda))；蠕虫類(Helminthes)または蠕虫形動物(vermes)、例えば、輪形動物門(Rotifera)、毛顎動物門(Chaetognatha)、線形動物(Nematoidea)、鉤頭動物門(Acanthocephala)、紐虫類(Nemertina)、渦虫類(Turbellaria)、吸虫類(Trematoda)、条虫類(Cestoidea)、中世動物(Mesozoa)；擬軟体動物(Molluscoidea)、例えば、腕足動物門(Brachiopoda)および苔虫類(Bryozoa)；軟体動物門(Mollusca)、例えば、頭足類(Cephalopoda)、腹足類(Gastropoda)、翼足類(Pteropoda)、掘足類(Scaphopoda)、ラメリブランキアタ(Lamellibranchiata)または無頭類(Acephala)；棘皮動物門(Echinodermata)、例えば、海鼠類(Holothuroidea)、海胆類(Echinoidea)、海星類(Asterioidea)、蛇尾類(Ophiuroidea)、および海百合類(Crinoidea)；腔虫動物(Coelenterata)、例えば、花虫類(Anthozoa)またはポリプ類(polyps)、有櫛動物門(Ctenophora)、およびヒドロ虫類(Hydrozoa)または鉢虫類(Acalephs)；スポンジオゾア(Spongiozoa)または海綿動物門(Porifera)、例えば、海綿動物(sponges)；原生動物門(Protozoa)、例えば、滴虫類(Infusoria)および根足虫類(Rhizopoda)が含まれる。動物という用語は、本明細書で使用する場合、以下の限定されない例をさらに意味する：ヒト、霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ラム、ブタ、去勢ブタ、家禽類、ウマ、雌ウマ、ラバ、雄ロバ、雌ロバ、雄仔ウマ、仔ウシ、2歳馬、非去勢牛、去勢牛、ヒツジ、ヤギ、ラム、パイソン、パッファロー、ラム、仔ヤギ、仔ブタ、雌ニワトリ、ヒヨコ、シチメンチョウ、カモ、ガチョウ、ダチョウ、他の鳥類または家禽類、ウサギ、野ウサギ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット、他の齧歯類、魚類および他の水生生物種、および両生類。用語「動物」は本明細書で使用する場合、加えてトランスジェニック動物も意味する。

10

20

30

40

50

## 【0059】

哺乳類は、本明細書で使用する場合、霊長類、ヒト、齧歯類、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ヤギ、ウシなどを含む。

## 【0060】

用語「ウイルス」は、本明細書で使用する場合、宿主細胞外では複製または再生できない超顕微鏡的感染性因子を意味する。ウイルスは非細胞性である。タンパク質コートおよび場合によりメンブランシェルに囲まれたDNAまたはRNAのコアからなる。

## 【0061】

「RNAウイルス」という句は、本明細書で使用する場合、一般に、RNAをその遺伝物質として含有するウイルスを意味する。メッセンジャーRNA(mRNA)は、タンパク質合成に関する遺伝子コード情報を運ぶRNA分子である。RNAウイルスは、それらのRNAのセンスまたは極性に従って、ネガティブセンスRNAウイルス、ポジティブセンスRNAウイルス、および二本鎖RNAウイルスにさらに分類することができる。ポジティブセンスウイルスRNAはmRNAと類似し、従って、ウイルス感染時に宿主細胞によってすぐに翻訳され得る。

## 【0062】

このようなウイルスは、それらのRNAを複製するためにRNA依存性RNAポリメラーゼを必要とするが、動物細胞は適切な酵素を有するとは思われない。従って、このタイ

ブの動物RNAウイルスは、RNA依存性RNAポリメラーゼをコードする必要がある。

【0063】

本明細書で使用する場合、用語「エピトープ」は、動物において抗原活性または免疫原活性を有するポリペプチドまたはタンパク質の部位またはフラグメントを意味する。免疫原活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を惹起するポリペプチドまたはタンパク質の部位またはフラグメントである。抗原活性を有するエピトープは、当業者に周知のいずれかの方法、例えば、イムノアッセイによって判定した場合に、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチドまたはタンパク質の部位またはフラグメントである。

【0064】

本明細書で使用する場合、用語「フラグメント」は、タンパク質性因子に関して、あるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも2つの連続するアミノ酸残基、少なくとも5つの連続するアミノ酸残基、少なくとも10の連続するアミノ酸残基、少なくとも15の連続するアミノ酸残基、少なくとも20の連続するアミノ酸残基、少なくとも25の連続するアミノ酸残基、少なくとも40の連続するアミノ酸残基、少なくとも50の連続するアミノ酸残基、少なくとも60の連続するアミノ酸残基(amino residues)、少なくとも70の連続するアミノ酸残基、少なくとも80の連続するアミノ酸残基、少なくとも90の連続するアミノ酸残基、少なくとも100の連続するアミノ酸残基、少なくとも125の連続するアミノ酸残基、少なくとも150の連続するアミノ酸残基、少なくとも175の連続するアミノ酸残基、少なくとも200の連続するアミノ酸残基、少なくとも250の連続するアミノ酸残基、少なくとも300の連続するアミノ酸残基、少なくとも300の連続するアミノ酸残基、少なくとも500の連続するアミノ酸残基、少なくとも750の連続するアミノ酸残基、少なくとも1000の連続するアミノ酸残基、または6～75の間の連続するアミノ酸残基、25～150の間の連続するアミノ酸残基、または25～300の間の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

10

20

【0065】

本明細書で使用する場合、用語「フラグメント」は、核酸に関して、あるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列の少なくとも2つの連続するヌクレオチド、少なくとも5つの連続するヌクレオチド、少なくとも10の連続するヌクレオチド、少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、少なくとも25の連続するヌクレオチド、少なくとも30の連続するヌクレオチド、少なくとも35の連続するヌクレオチド、少なくとも40の連続するヌクレオチド、少なくとも50の連続するヌクレオチド、少なくとも60の連続するヌクレオチド、少なくとも70の連続するヌクレオチド、少なくとも80の連続するヌクレオチド、少なくとも90の連続するヌクレオチド、少なくとも100の連続するヌクレオチド、少なくとも125の連続するヌクレオチド、少なくとも150の連続するヌクレオチド、少なくとも175の連続するヌクレオチド、少なくとも200の連続するヌクレオチド、少なくとも250の連続するヌクレオチド、少なくとも300の連続するヌクレオチド、少なくとも350の連続するヌクレオチド、少なくとも380の連続するヌクレオチド、または8～75の間の連続するヌクレオチド、25～150の間の連続するヌクレオチド、または25～300の間の連続するヌクレオチドの核酸配列を含む核酸を意味する。

30

40

【0066】

本明細書で使用する場合、用語「感染」は、細胞または被験体におけるウイルスによる侵害およびウイルスの存在を意味する。一実施形態では、感染は、活動的感染、すなわち、細胞または被験体においてウイルスが複製している感染である。このような感染は、ウイルスが最初に感染した細胞、組織、および/または器官から他の細胞、組織、および/または器官へのウイルスの核酸を特徴とする。感染はまた潜在感染、すなわち、ウイルスが複製していない感染であってもよい。一実施形態では、感染は、細胞もしくは被験体におけるウイルスの存在から生じる、またはウイルスによる細胞もしくは被験体の侵害による病的状態を意味する。

50

## 【0067】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、ウイルスに関して、単一の親ウイルスに由来するウイルスを意味する。ウイルスは、限定されるものではないが、ブランク精製および限界希釈に基づくものを含む、当業者に公知の常法を用いて単離することができる。

## 【0068】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、タンパク質性因子または核酸以外の化合物に関して、化学的に合成される場合に、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない化合物を意味する。「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という句は、化学前駆体または他の化学物質が約30%、25%、20%、10%、5%、または1%（乾重）未満である化合物の調製物を含む。特定の実施形態では、化合物は、他の種々の化合物を約60%、好ましくは、65%、70%、75%、80%、85%、90%または99%不含である。別の特定の実施形態では、本明細書で開示される化合物が単離される。

10

## 【0069】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、タンパク質性因子（例えば、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド）に関して、それが由来する細胞もしくは組織源からの細胞材料もしくは夾雑タンパク質を実質的に含まない、または化学的に合成される場合には、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まないタンパク質性因子を意味する。

## 【0070】

「細胞材料を実質的に含まない」という句は、タンパク質性因子が、それが単離されたまたは組換えにより生産された細胞の細胞成分から分離されている、タンパク質性因子の調製物を含む。従って、細胞材料を実質的に含まないタンパク質性因子は、夾雑タンパク質（例えば、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド）が約30%、25%、20%、15%、10%、または5%（乾重）未満であるタンパク質性因子の調製物を含む。タンパク質性因子が組換えにより生産される場合、それはまた、好ましくは培養培地も実質的に含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%、15%、10%、または5%未満に相当する。タンパク質性因子が化学合成により生産される場合には、それは好ましくは化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、それはタンパク質性因子の合成に関与する化学前駆体または他の化学物質から分離される。従って、タンパク質性因子のこのような調製物は、化学前駆体または目的のタンパク質性因子以外の化合物が約30%、20%、10%、5%（乾重）未満である。特定の実施形態では、本明細書に開示されるタンパク質性因子が単離される。

20

30

## 【0071】

本明細書で使用する場合、用語「小分子」および類似の用語は、限定されるものではないが、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、分子量が約10,000グラム/モル未満の他の有機および無機化合物（すなわち、ヘテロ有機金属および有機金属化合物）、分子量が約5,000グラム/モル未満の有機または無機化合物、分子量が約1,000グラム/モル未満の有機または無機化合物、分子量が約500グラム/モル未満の有機または無機化合物、分子量が約100グラム/モル未満の有機または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステル、および他の任意の薬学上許容される形態を含む。このような化合物の塩、エステル、および他の薬学上許容される形態も包含される。

40

## 【0072】

本明細書で使用する場合、用語「1つの療法」および「複数の療法」は、病態（例えば、ウイルス感染またはそれに関連する病態もしくは症状、またはその病態に関連する特定の抗原に対する免疫応答を誘導するために弱毒ウイルスがベクターとして使用できる病態）の予防、治療、管理、および/または改善において使用することができる任意のプロトコール、方法、組成物、製剤、および/または薬剤を意味し得る。特定の実施形態では、用語「1つの療法」および「複数の療法」は、当業者に公知の、病態（例えば、ウイルス

50

感染またはそれに関連する病態もしくは症状、またはその病態に関連する特定の抗原に対する免疫応答を誘導するために弱毒ウイルスがベクターとして使用できる病態)の治療、管理、予防、および/または改善において有用な生物学的療法、補助療法、および/または他の療法を意味する。一実施形態では、療法は、弱毒ウイルスまたは不活化ウイルス突然変異体である。

本明細書で使用する場合、「野生型ウイルス」という句は、流行性、自然循環性、および疾病の典型的な大発生をもたらすウイルスのタイプを意味する。

【0073】

本明細書で使用する場合、「検出系」という句は、タンパク質の存在を判定するための当技術分野で承認されているアッセイ、プロトコルまたは方法を意味する。本発明の方法に適用可能な検出系としては、限定されるものではないが、蛍光、酵素、放射性および磁気を含むイムノアッセイ；吸光度アッセイ；比色定量アッセイ；顕微鏡；タンパク質免疫染色；免疫沈降；免疫電気泳動；免疫プロット法；ウエスタンプロット法；および分光光度法が含まれる。

10

【0074】

突然変異は、当業者に公知の遺伝子工学技術を用いて本発明のウイルスに挿入することができる。

【0075】

本明細書で使用する場合、「TF ORF」は、トランスフレームオープンリーディングフレームを意味する。

20

【0076】

本明細書で使用する場合、nsp2は、pp1aおよびpp1bのタンパク質分解切断により生じる少なくとも13の機能的非構造タンパク質(nsp)のうちの一つである非構造タンパク質2を意味する。pp1aおよびpp1bは、アルテリウイルスの大きなレプリカーゼ前駆体タンパク質であり、ゲノムmRNA鋳型から合成される。

【0077】

本明細書で使用する場合、nsp2TFは、本明細書に記載のマイナス2フレームシフト機構により生産されるトランスフレームタンパク質を意味する。Nsp2TFは、EAVを除く全てのアルテリウイルスによりコードされている。

【0078】

本明細書で使用する場合、「マイナス2フレームシフト」および「プラス1/マイナス2フレームシフト」という句は互換的に使用することができる。

30

【0079】

本明細書で使用する場合、「ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス」または「PRRSV」は、疾病PRRS、PEARS、SIRS、MSDおよび/またはPIP(用語「PIP」は今般避けられているようである)を引き起こす、PRRSVのアイオワ株、米国で発見された他のPRRSV株(例えば、VR2332)、カナダで発見されたPRRSV株(例えば、IAF-exp91)、欧州で発見されたPRRSV株(例えば、レリスタッドウイルス、PRRSV-10)、およびすでに出現している可能性のある、また、将来出現するであろうこれらのウイルスの近縁の変異株を含むウイルスを意味する。

40

【0080】

非罹患ブタは、ブタ繁殖・呼吸障害感染性因子に曝されたことがない、またはPRRSVなどのブタ繁殖・呼吸障害感染性因子に曝されたが、疾病の症状を示していないブタである。罹患ブタは、PRRSの症状を示すか、またはPRRSVが単離できたブタである。

【0081】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用する場合、任意の長さのポリリボヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドのいずれか、または混合ポリリボ-ポリデオキシリボヌクレオチドの、プリン含有およびピリミジン含有ポリマーを意味する。これには、一本鎖および二本鎖分子、すなわち、cDNA、mRNA、DNA-D

50

NA、DNA-RNAおよびRNA-RNAハイブリッド、ならびにアミノ酸骨格に塩基をコンジュゲートさせることによって形成される「タンパク質核酸」(PNA)が含まれる。これにはまた、改変塩基を含有する核酸も含まれる。

【0082】

「ベクター」は、宿主細胞に核酸を導入するための任意の手段である。ベクターは、付加されたセグメントの複製を達成するように別のDNAセグメントを付加することができるレプリコンであり得る。「レプリコン」は、*in vivo*においてDNA複製の自律的単位として機能する、すなわち、その固有の制御下で複製が可能である任意の遺伝要素(例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルス)である。用語「ベクター」には、*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*において核酸を細胞に導入するための、ウイルス手段および非ウイルス手段の両方が含まれる。ウイルスベクターとしては、アルファウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ボックス、バキュロウイルス、ワクシニア、単純ヘルペス、エプスタイン-バーおよびアデノウイルスベクターが含まれる。非ウイルスベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミド、リボソーム、荷電脂質(サイトフェクチン)、DNA-タンパク質複合体、および生体高分子が含まれる。核酸に加え、ベクターはまた、1以上の調節領域、および/または核酸導入結果(どの組織に導入されたか、発現の持続期間など)の選択、測定およびモニタリングに有用な選択マーカーを含み得る。

10

【0083】

「カセット」は、ベクターの特定の制限部位に挿入され得るDNAのセグメントを意味する。DNAのセグメントは目的のポリペプチドをコードし、このカセットおよび制限部位は、転写および翻訳のために適切なリーディングフレーム内にカセットを挿入することを保証するように設計されている。

20

【0084】

外因性または異種DNAが細胞内に導入された場合に、その細胞はそのようなDNAにより「トランスフェクト」されたという。

【0085】

トランスフェクトされたDNAが表現型の変化をもたらす場合に、その細胞は外因性または異種DNAにより「形質転換」されたという。この形質転換DNAは、細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込まれ(共有結合され)得る。

30

【0086】

「核酸分子」は、一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかの、リボヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジンもしくはシチジン;「RNA分子」)またはデオキシリボヌクレオシド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、もしくはデオキシシチジン;「DNA分子」)、またはその任意のホスホエステル類似体、例えば、ホスホロチオエートおよびチオエステルのリン酸エステルポリマー形態を意味する。二本鎖DNA-DNA、DNA-RNAおよびRNA-RNAヘリックスが存在し得る。核酸分子、および特に、DNAまたはRNA分子という用語は、分子の一次構造および二次構造を意味するに過ぎず、それをいずれの特定の三次形態にも限定されない。従って、この用語には、とりわけ、線状または環状DNA分子で見られる二本鎖DNA(例えば、制限断片)、プラスミド、および染色体が含まれる。特定の二本鎖DNA分子の構造の述べる上で、本明細書では、配列は、DNAの非転写鎖(すなわち、mRNAと相同な配列を有する鎖)に沿った配列のみを5'から3'の方向に示すという慣例に従って記載され得る。「組換えDNA分子」は、分子生物学的操作を受けたDNA分子である。

40

【0087】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」は一般に、8つを超えるアミノ酸を有するペプチドおよびタンパク質を意味する。

【0088】

「保存的改変変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、保存的改変変異体は、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードす

50

る核酸を、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列を意味する。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が、ある任意のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGは全てアミノ酸のアルギニンをコードしている。従って、コドンがアルギニンを指定している全ての位置において、そのコドンは、コードされているポリペプチドを変更することなく、記載の対応するコドンのいずれかに変更することができる。このような核酸バリエーションは、「保存的改変バリエーション」の一種である「サイレント置換」または「サイレントバリエーション」である。ポリペプチドをコードする本明細書に記載の全てのポリヌクレオチド配列が、特に断りのない限り、可能性のある全てのサイレントバリエーションも表す。従って、サイレント置換は、アミノ酸をコードする全ての核酸配列の黙示的特徴である。当業者ならば、核酸内の各コドン（通常、メチオニンの唯一のコドンであるAUGを除く）は、標準的な技術によって、改変して機能的に同一な分子を作出することができることを認識するであろう。いくつかの実施形態では、PADをコードするヌクレオチド配列は、好ましくは、酵素を生産するために使用される特定の宿主細胞（例えば、酵母、哺乳類、植物、真菌など）における発現に関して最適化される。

10

20

30

40

50

#### 【0089】

アミノ酸配列については、当業者ならば、コードされている配列内の単一のアミノ酸または小パーセンテージのアミノ酸を変更、付加または削除する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加は、その変更があるアミノ酸の化学的に類似のアミノ酸での置換をもたらす場合、「保存的改変変異体」（本明細書では「変異体」と呼ぶ）であることを認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸を示す保存的置換の表は当技術分野で周知である。例えば、Davis et al., "Basic Methods in Molecular Biology" Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994)参照。このような保存的改変変異体は付加的なものであり、本発明の多型変異体、種間同族体、および対立遺伝子を排除しない。

#### 【0090】

以下の8つの群はそれぞれ互いに保存的置換となるアミノ酸を含む：1)アラニン(A)、グリシン(G)；2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4)アルギニン(R)、リシン(K)；5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7)セリン(S)、トレオニン(T)；および8)システイン(C)、メチオニン(M)（例えば、Creighton, 1984, Proteins参照）。

#### 【0091】

用語「同一」または「同一性」パーセントは、2以上の核酸またはポリペプチド配列に関して、BLASTまたはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを下記のデフォルトパラメーターとともに用いて、または手作業によるアラインメントと目視検査により評価した場合に同じである、または指定のパーセンテージの、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチド（すなわち、比較ウィンドウまたは示された領域にわたって最大の一致をみるように比較およびアラインされた場合に、指定の領域（例えば、PRRSVのnsp2TFタンパク質のエピトープ）にわたって約70%の同一性、好ましくは、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い同一性）を有する2以上の配列または部分配列を意味する。そして、このような配列は「実質的に同一」であると言われる。この定義はまた、検定配列の相補物(compliment)を意味する。この定義はまた、置換を有する配列だけでなく、欠失および/または付加を有する配列も含む。下記のように、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを考慮することができる。好ましくは、同一性は、前記2以上の核酸またはポリペプチド配列の少なくとも約25アミノ酸またはヌクレオチド長の領域、またはより好ましくは50~100アミノ酸またはヌクレオチド長の領域、またはより好ましくは全長にわたって存在する。

## 【 0 0 9 2 】

配列比較では、一般に、ある配列が参照配列として機能し、これと検定配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、検定配列と参照配列をコンピューターに入力し、部分配列座標を指定し、必要に応じて、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。デフォルトプログラムパラメーターを使用することができ、または別のパラメーターを指定することもできる。その後、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメーターに基づいて参照配列に対する検定配列の配列同一性パーセントを計算する。

## 【 0 0 9 3 】

「比較ウィンドウ」は、本明細書で使用する場合、20～600、通常には約50～約200、より通常には約100～約150からなる群から選択される連続する位置の数のいずれか1つのセグメントに対する参照を含み、その中で、ある配列を、2つの配列が最適にアラインされた後に同数の連続する位置の参照配列と比較することができる。比較のための配列アラインメントの方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, 1991, Adv. Appi. Math. 2:482のローカルホモロジーアルゴリズム、Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443のホモロジーアラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピューター実行 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. の G A P、B E S T F I T、F A S T A、および T F A S T A)、または手作業によるアラインメントと目視検査 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995補遺)参照) によって行うことができる。

## 【 0 0 9 4 】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するために好適なアルゴリズムの別の例として B L A S T および B L A S T 2 . 0 アルゴリズムがあり、それぞれ Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 および Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410 に記載されている。B L A S T 解析を実行するソフトウェアは、the National Center for Biotechnology Information world wide web at [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/) で公開されている。このアルゴリズムは、第一に、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインする際の、正の値をとる閾値スコア T にマッチするまたはそれを満足する、検索配列中の長さ W のショートワードを同定することによりハイスコア配列対 (H S P) を同定することを含む。T は、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., 前掲)。これらの最初の隣接ワードヒットが、それらを含むより長い H S P を見つける検索を開始するためのシードとして機能する。これらのワードヒットは、累積アラインメントスコアが増え得る限り、各配列に沿った両方向へ延びる。累積スコアは、ヌクレオチド配列に関しては、パラメーター M (マッチ残基対のリワードスコア; 常に > 0) および N (ミスマッチ残基のペナルティスコア; 常に < 0) を用いて計算される。アミノ酸配列では、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを計算する。各方向におけるワードヒットの延長は、累積アラインメントスコアがその最大到達値から量 X だけ下がった時; 1 以上の負のスコアをとる残基アラインメントの蓄積のために、累積スコアがゼロ以下になった時; またはいずれかの配列の末端に達した時に停止される。B L A S T アルゴリズムパラメーター W、T、および X は、アラインメントの感度と速度を決定する。B L A S T N プログラム (ヌクレオチド配列用) では、デフォルトとして、ワードレングス (W) 11、期待値 (E) 10 (an expectation (E) or 10)、M = 5、N = - 4 および両鎖比較を使用する。アミノ酸配列の場合には、B L A S T P プログラムは、デフォルトとして、ワードレングス 3、および期待値 (E) 10、および B L O S U M 6 2 スコアリングマトリックス (Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10915参照)、アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = - 4、および両鎖比較を使用する。

## 【 0 0 9 5 】

B L A S T アルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計解析も実行する (例えば、Karlin & Altschul, 1993, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787参照)。B L

A S Tアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小和確率 ( $P(N)$ ) であり、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間のマッチが偶然生じる確率が表示される。例えば、検定核酸と参照核酸の比較における最小和確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満であれば、その核酸は参照配列と類似すると見なされる。

#### 【0096】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であると示されることは、下記のように、第1の核酸によりコードされているポリペプチドが、第2の核酸によりコードされているポリペプチドに対して生じた抗体と免疫学的に交差反応性があるということである。従って、あるポリペプチドは一般に、例えば、その2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合は、第2のポリペプチドと実質的に同一である。もう一つ、2つの核酸配列が実質的に同一であると示されることは、下記のように、その2つの分子またはそれらの相補物がストリンジェント条件下で互いにハイブリダイズするということである。さらにもう一つ、2つの核酸配列が実質的に同一であると示されることは、その配列を増幅するために同じプライマーを使用できるということである。

10

#### 【0097】

「抗原決定基」は、特に断りのない限り、特定の動物または種において免疫応答を惹起することができる分子である。抗原決定基は、タンパク質性分子、すなわち、ポリアミノ酸配列、ポリペプチド、フラグメント、誘導體または変異体を含み、これらは他の部分、例えば、グリカンなどの糖鎖部分、および/または脂質部分を含んでよい。

20

#### 【0098】

本発明の抗原決定基はまた、本発明の2TFに応答して産生される抗体または抗血清、例えば、配列番号63、64、および65ヘテロ二量体、またはそれと少なくとも70%同一の配列を含むエピトープに対する抗体と交差反応し、ブタなどの特定の動物において免疫応答を惹起することができる、他のウイルス、PRRSV株または科に由来する中和エピトープ抗原決定基を含め、異種であってもよい。

#### 【0099】

「生体サンプル」という句は、一般に(commonly)抗体またはウイルス粒子を含有する哺乳類(例えば、ブタ、ウサギ、ウマ)の流体または組織を意味する。このような成分は当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液、呼吸器、腸管または泌尿生殖路の分泌物、涙、唾液、乳汁、白血球細胞、および骨髄腫が含まれる。

30

#### 【0100】

本明細書で使用する場合、抗体は、当技術分野内で認識されているものと一致する用語として定義され、抗体は、抗原チャレンジに応答して哺乳類生物が生産する多サブユニットタンパク質である。本発明の抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびに限定されるものではないが、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>、およびFvフラグメントを含む、このような抗体のフラグメントが含まれる。

#### 【0101】

本明細書で使用する場合、用語「特異的」または「特異性」またはその文法上の変形は、抗原決定基に結合する抗体に関して、抗原決定基に対する抗体の結合強度を意味する。抗原と抗原決定基結合タンパク質の解離に関する平衡定数(KD)は、抗原決定基と抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との間の結合強度の尺度であり、低いKD値が、抗原決定基と抗体の間の強い結合強度を示す。もう一つ、親和性も親和性定数(KA)(すなわち1/KD)として表すことができる。一般に、抗体は、それらの抗原決定基と解離定数(KD)  $10^{?5} \sim 10^{?12}$  モル/リットル以下、好ましくは  $10^{?7} \sim 10^{?12}$  モル/リットル以下、より好ましくは  $10^{?8} \sim 10^{?12}$  モル/リットル(すなわち、会合定数(KA)  $10^5 \sim 10^{12}$  リットル/モル以上、好ましくは  $10^7 \sim 10^{12}$  リットル/モル以上、より好ましくは  $10^8 \sim 10^{12}$  リットル/モル)で結合する。 $10^{-4}$  モル/リットルより大きいKD値は一般に、非特異的結合を示すと見なされる。好ましくは、

40

50

本発明の抗体は、所望の抗原決定基と500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満、例えば、500 pM未満の親和性で結合する。抗原決定基に対する抗体の特異的結合は、例えば、スキャッチャード解析法および/または競合的結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)およびサンドイッチ競合アッセイ、および当技術分野で公知のそれらの種々の変法を含む、それ自体公知の好適な任意の様式で測定することができる。

【0102】

本明細書で使用する場合、用語「不活化」とは、もはや複製および/または増殖できない感染性生物体を含有するワクチンを意味する。

【0103】

本明細書で使用する場合、用語「PRRSV」は、本明細書で使用する場合、アルテリウイルス科内のアルテリウイルス属のPRRSV種に属す全てのウイルスを意味する。

【0104】

用語「防御する」、「防御」、「感染防御免疫」または「防御免疫応答」は、本明細書で使用する場合、宿主ブタが本発明のワクチンまたはポリペプチドに対して能動的免疫応答を惹起し、その結果、その後そのウイルスまたは有毒ウイルスの攻撃に曝された際にそのブタが感染に対抗できるようになることを意味するものとする。従って、防御免疫応答は、その後の宿主ブタ間でのウイルス暴露による罹患率および死亡率を低減する。当業者ならば、商業的養豚現場において、防御免疫応答の生成は、接種済みのブタの少数になお罹患および死亡が見られるなど、獣群全体に対するワクチン接種の効果を評価することによって査定され得ることが理解できるであろう。さらに、防御はまた、防御されていない同等のブタにおける、その単離株によって一般に引き起こされる変化または症状に比べた場合(すなわち、適当な対照に比べた場合)の、任意の肉眼的または組織病理学的変化(例えば、肺の病変)および/またはPRRS疾患の症状の重篤度の軽減を含む。従って、防御免疫応答は、限定されるものではないが、体重減少、体重増加の低下、嗜眠、呼吸困難、「激しい鼓動(thumping)」(努力呼気)、発熱、被毛の荒れ、くしゃみ、咳、眼の浮腫、結膜炎、肉眼的病変、顕微鏡的肺病変、心筋炎、リンパ節炎、脳炎および鼻炎を含むPRRSの臨床徴候または症状の、対照ブタに比べての軽減を含め、PRRSVの症状を軽減する。

【0105】

本明細書で使用する場合、用語「生ウイルス」は、適当な被験体に感染する能力を保持するウイルスを意味する(不活化(死滅)またはサブユニットワクチンと対照的)。

【0106】

本明細書で使用する場合、「免疫原的に有効な量」は、PRRSV感染、疾患、障害、または病態の症状を軽減する、消失させる、治療する、予防するまたは管理する上で有効な量を意味する。

【0107】

アルテリウイルス

ニドウイルス目は現在のところコロナウイルス科、ロニウイルス科(Roniviridae)、およびアルテリウイルス科を含む(de Groot et al., 2012; Gorbalenya et al., 2006)。アルテリウイルス科はウマ動脈炎ウイルス(EAV)、ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)、乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(LDV)、およびサル出血熱ウイルス(SHFV)を含み、これらのうちEAVおよびPRRSVは、経済的に重要な獣医学的病原体である(Snijder and Meulenberg, 1998; Snijder and Spaan, 2007)。ニドウイルスは、RNA依存性RNAポリメラーゼおよびヘリカーゼを含む、複製複合体のサブユニットの合成を指示する、プラス極性の、一本鎖、ポリシストロン性RNAゲノムを用いている。数種のコロナウイルス、例えば、SARSコロナウイルスはヒトに感染することに留意されたい。

【0108】

アルテリウイルスは、プラス極性の一本鎖RNAゲノムを含有する、小型でエンペロー

10

20

30

40

50

ブを有するウイルスである (den Boon et al., 1991; Meulenberg et al., 1993)。アルテリウイルスのゲノムはおよそ 13 ~ 16 kb である。アルテリウイルス感染の結果は、無症候性、持続性、または急性感染、ならびに流産性または致死性出血熱を含み、幅広い。

#### 【0109】

ブタ繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) は、世界中で経済的に重要なブタの疾患である。PRRS は、雌ブタでの後期生殖障害および新生ブタでの重症肺炎を特徴とする。PRRS の病原体は、本明細書では PRRSV (ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス) と呼ばれる小型で、エンベロープを持つウイルスである。PRRSV は、一本鎖のプラス鎖 RNA ゲノムを含有する。

#### 【0110】

#### プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム構成および遺伝子発現

ウイルスは、リボソーム、およびそれらのタンパク質合成のための翻訳機構の他の成分を宿主細胞に完全に依存している。真核生物では、翻訳開始は mRNA の 5' 末端依存性のスキャンに依存するところが大きく、その際、開始因子を伴う複合体中の小リボソームサブユニットがまず 5' キャップ構造に結合し、それが最初の好適な開始コドンに出くわすまで 5' から 3' の方向にスキャンし、その地点から翻訳が始まる (Jackson 2010)。結局のところ、細胞の mRNA の大多数は本質的にモノシストロン性であるが、極めて短い ORF の翻訳の後には効率的な再開が起こり得る。

#### 【0111】

真核生物では、細胞の翻訳機構は、本質的に、mRNA の 5' に最も近い長いオープンリーディングフレーム (ORF) だけを読み取るという事実は、自らの複製サイクルを全うするために複数の酵素タンパク質および構造タンパク質を発現しなければならない非分節型 RNA ウイルスに大きな制約を課す。この制約を克服する戦略には、機能的モノシストロン性サブゲノム mRNA の生産、後にウイルスによりコードされるプロテアーゼおよび/または宿主にコードされるプロテアーゼによって切断される前駆体ポリタンパク質の生産、およびポリシストロン性 mRNA からさらなる ORF が翻訳され得る非カノニカル翻訳機構 (内部リボソーム侵入、読み漏らし、リボソームフレームシフト、および終止コドン読み過ぎしなど (Firth & Brierley, 2012)) が含まれる。非カノニカル翻訳機構は、プラス鎖 RNA ウイルスに、限定された数の転写産物から複数のタンパク質を発現し、遺伝子発現を調節し、それ以外の点でも、自らの特殊な必要のために宿主細胞の翻訳機構を操作することを可能とする。これらの機構は、ゲノム構成、翻訳、ポリタンパク質前駆体の翻訳後プロセッシングおよびさらなるサブゲノム mRNA の合成のレベルで作動し得る。

#### 【0112】

現在知られている最大ゲノムを有する RNA ウイルスを含むニドウイルス目のメンバーは、これらの戦略 (ポリタンパク質の発現、複数のサブゲノム RNA の合成、リボソームフレームシフト、および読み漏らしを含む; 図 1A) の多くを利用して、これまでに記載されている最も複雑な RNA ウイルス複製サイクルの 1 つを構成している (Perlman et al., 2009; Masters, 2006; Fang & Snijder, 2010; Gorbalenya et al., 2006)。

#### 【0113】

アルテリウイルスのレプリカーゼ遺伝子は、2 つの長いオープンリーディングフレーム (ORF)、ORF 1a と ORF 1b からなり、ゲノムの 5' 近位の 4 分の 3 を占める。ORF 1a および ORF 1b は、2 つの大きなレプリカーゼ前駆体ポリタンパク質、pp1a とおよびトランスフレーム融合物 pp1ab をコードし、後者の発現は、短い ORF 1a / ORF 1b オーバーラップ領域におけるマイナス 1 リボソームフレームシフトに依存している (den Boon et al., 1991)。このマイナス 1 リボソームフレームシフト機構は、ニドウイルス目の全てのメンバー間で保存されている。

#### 【0114】

ゲノム mRNA 鋳型から合成された後、pp1a および pp1ab は、4 つ (PRRSV / LDV) または 3 つ (EAV) の、ORF 1a によりコードされるプロテイナーゼドメインによって指示される複雑なタンパク質分解カスケードによって機能的非構造タンバ

10

20

30

40

50

ク質 ( n s p ) へとプロセシングされる (Ziebuhr et al., 2000; Fang and Snijder, 2010)。 p p 1 a および p p 1 a b のタンパク質分解による切断は、 n s p 1 ~ n s p 1 2 として知られる少なくとも 1 3 の機能的非構造タンパク質 ( n s p ) を生じ、 n s p 1 領域と n s p 7 領域の両者は内部切断されてそれぞれ n s p 1 / n s p 1 ( P R R S V / L D V ) および n s p 7 / n s p 7 を生じる (Ziebuhr et al., 2000; Fang and Snijder, 2010)。

#### 【 0 1 1 5 】

アルテリウイルスゲノムの 3 ' 近位の領域は、ウイルス構造タンパク質をコードする少なくとも 8 つの遺伝子を含み、これらの遺伝子はサブゲノム m R N A の 5 ' および 3 ' コターミナルネスセットから翻訳される (Pasternak et al., 2006 に総説)。最も小さい m R N A を除き、サブゲノム m R N A は構造的にはポリシストロン性であるが、一般に、5 ' 近位の O R F のみが翻訳される。知られている例外は m R N A 2 および 5 であり、これらは両方とも 2 シストロン性である。

10

#### 【 0 1 1 6 】

##### リボソームフレームシフト

ニドウイルス目の全ての現メンバー (Brierley et al., 1989; den Boon et al., 1991) を含む様々なウイルスのゲノムは、一定の割合の翻訳中のリボソームをマイナス 1 n t へシフトさせ、代替リーディングフレームで翻訳を続けさせる配列を保有している (Brierley et al., 2010; Miller & Giedroc, 2010)。機能的に重要である場合、このプロセスは、マイナス 1 プログラムリボソームフレームシフト (マイナス 1 P R F ) と呼ばれる。

20

#### 【 0 1 1 7 】

真核生物のマイナス 1 フレームシフト部位は一般に、コンセンサスモチーフ X \_ X X Y \_ Y Y Z (ここで、X X X は通常、任意の 3 つの同一のヌクレオチド (特定の例外が見つかるが) を表し、Y Y Y は厳密に A A A または U U U を表し、Z は A、C または U を表し、下線はゼロフレームコドンを分離している) に適合する「スリッピー (slippery)」ヘプタヌクレオチドからなる (Brierley et al., 1992)。この後には一般に、シフト部位の 5 ~ 9 n t 下流から始まる、シュードノット (pseudoknot) またはステム - ループなどの安定な R N A 二次構造を含む刺激エレメントが続く (Brierley et al., 2010; Miller & Giedroc, 2010)。

30

#### 【 0 1 1 8 】

これに対して、マイナス 2 P R F は、一見してはるかに稀であり、出願者らの発見まで、潜在的シフト部位または刺激エレメントについてはほとんど知られていなかった。出願者らの発見の前には、真核生物系におけるマイナス 2 フレームシフトの機能的な天然利用の例は、あったとしても極めてわずかであった。多様な動物および真菌において、細胞遺伝子のアンチザイムの発現は、プラス 1 フレームシフトに関わる (Ivanov & Atkins, 2009)。しかしながら、哺乳類のアンチザイムを酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) で人工的に発現させると、マイナス 2 フレームシフトを介して全長アンチザイム産物が発現される (Matsufuji et al., 1996)。ここで、刺激エレメントは、シフト部位に 3 ' 隣接する終止コドン ( U G C \_ U C C \_ u g a ) と 3 ' 近位 R N A シュードノット構造を含む。マイナス 2 フレームシフト翻訳は C S P D を読み、フレームシフトは、A 部位がエンブティである G C \_ U C C での P 部位のスリッピーを主として含むと思われる。

40

#### 【 0 1 1 9 】

原核生物系では、ファージ M u における g p G T テールアセンブリタンパク質の発現に比較的非効率的な (約 2 . 2 %) マイナス 2 フレームシフトが使用されているが、フレームシフトを介して g p G T を発現する d s D N A ファージの大多数は、代わりにマイナス 1 フレームシフトを利用すると思われる (Xu et al., 2004)。

#### 【 0 1 2 0 】

配列解析は、腔トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) ウイルス 1 ( T V V 1 ; Su & Tai, 1996; Goodman et al., 2011 ) における G a g - P o l の発現においては C C \_ C U

50

U\_\_UUUに対するマイナス2フレームシフトが利用されているということを強く示唆する。しかしながら、他のトティウイルス(totivirids)については、TVV1におけるフレームシフトは、ビリオンのGag-Pol:Gag比が極端に低い(例えば、1~2%; Dinman et al., 1991; Liu et al., 1998)ことから、比較的非効率的であると思われ、これは本明細書に記載されるPRRSV マイナス2PRFに関する研究で見られたはるかに高い効率とは著しく対照的である(図7)。

#### 【0121】

出願者らの発見までに、マイナス2PRFの効率的な天然利用は従前に記載されたことはなかった。出願者らは、ブタの経済的に最も重要な病原体の1つであるPRRSVが、この機構を使用してnsp2関連トランスフレームタンパク質nsp2TFを生産することを実証した。バイオインフォマティクス解析は、ORF1aの関連領域が実質的により小さく、劇的に発散しているEAVを顕著な例外として、このようなnsp2TF産物が全てのアルテリウイルスによりコードされていることを強く示唆する。

10

#### 【0122】

出願者らは、nsp2特異的およびnsp2TF特異的Abを用いた複数の独立したイムノアッセイにおいて、ウイルス感染細胞におけるnsp2TFの効率的発現を実験的に確認した。出願者らはまた、感染細胞から精製されたタンパク質の質量分析によって、nsp2TFの発現ならびにフレームシフトの正確な部位および方向を確認した。出願者らは、WTウイルスと2つおよび9つのヌクレオチド置換(ORF1aに関しては全て同義)で異なる2つのnsp2TFノックアウト突然変異体を発見、同定および特性評価したところ、両方とも障害のある小さなブランクサイズの表現型および感染性子孫力価の低下を示し、これは培養細胞でのウイルス複製におけるnsp2TFの重要な役割の証拠となる。

20

#### 【0123】

典型的なマイナス1フレームシフト部位(X\_\_XXY\_\_YYZ)はP部位とA部位の両方においてウォブル(wobble)位置にのみ mismatchesを含んでコドン:アンチコドンの再対合を可能とするが、出願者らは、これがG\_\_GUU\_\_UUUでのマイナス2フレームシフトに関してはそうではなく、完全な再対合がA部位でのみ維持されることを発見した(図5A)。ヘプタヌクレオチドの前のヌクレオチドは、一般に、種々のアルテリウイルス配列においてGまたはAであり、従って、少しでも二重鎖が生じれば、シフト後のP部位のアンチコドン:コドン二重鎖は、複数の位置に mismatchesを含み得る。しかしながら、このA部位の二重鎖の完全性は翻訳中のリボソームによって厳格に監視されるので(Demehkina et al., 2012)、P部位の二重鎖はそれほど厳格には監視されず、マイナス1フレームシフトの場合であっても、UCC、GGA、GUUおよびGGUを含め、カノニカルなXXXに対するいくつかのパリエーションが許容される(Melian et al., 2010; Firth et al., 2010; den Boon et al., 1991; Loughran et al., 2011)。TVV1における潜在的マイナス2フレームシフト部位(CC\_\_CUU\_\_UUU)およびSHFV単離株HQ845737およびHQ845738における推定マイナス2フレームシフトの部位(G\_\_GUC\_\_UCU)はまた、A部位における完全な再対合のテーマとも一致するが、P部位における再対合の能力は低下した。

30

40

#### 【0124】

ほとんど例外なく、真核生物のマイナス1フレームシフトは、アルテリウイルスおよび全てのニドウイルスで保存されているORF1a/ORF1b 1 PRFに関する詳細に報告されているように(Brierley et al., 1989; den Boon et al., 1991; Brierley et al., 2010)、3'近位のRNA二次構造によって刺激される。このような構造がマイナス2フレームシフトの刺激に十分かつ/または必要であるかどうかは依然として検討対象である。

#### 【0125】

しかしながら、出願者らの結果は、PRRSVおよび他のアルテリウイルスにおけるマイナス2フレームシフトは、代わりに、シフト部位から10ntだけ離れている保存性の

50

高い下流 C C C A N C U C C モチーフを含む一次配列要素によって刺激され得ることを示している。非構造化 3' 配列もまた、酵母におけるプラス 1 フレームシフト (Guarraia et al., 2007) およびセムリキ森林アルファウイルスにおけるマイナス 1 フレームシフト (Chung et al., 2010) の刺激に関連付けられている。

【 0 1 2 6 】

出願者らは、分析において様々な n s p 2 関連タンパク質を観察した。遺伝子型 I I P R R S V 単離株 V R 2 3 3 2 を用いたこれまでの研究でも同様の現象が見られ、このような n s p 2 関連産物は、選択的な N 末端および / または C 末端切断部位の使用に由来するものと思われた (Han et al., 2010)。これらの産物のうち少なくとも 1 つは p 2 T F に相当すると思われるが、他のいくつかは図 7 のパルスチェイス実験で見られた翻訳後修飾に由来すると思われる。

【 0 1 2 7 】

さらに、G \_ G U U \_ U U U モチーフもまた、マイナス 1 フレームシフトの好適なシフト部位であり (Loughran et al., 2011)、潜在的マイナス 1 フレームシフト産物 ( n s p 2 N ) が見られた ( 図 3 および 7 )。大多数の P R R S V 配列 ( 2 0 5 / 2 1 2、単離株 S D 0 1 - 0 8 を含む ) では、このようなフレームシフトはマイナス 1 フレーム終止コードにおいて即時終結をもたらす ( G \_ G U U \_ U U U \_ g a、G \_ G U U \_ U U U \_ a g および G \_ G U U \_ U U U \_ a a は全て、種々の P R R S V 単離株において提示されている )。

【 0 1 2 8 】

n s p 2 N バンドの質量分析により、マイナス 1 フレームシフト産物の推定される C 末端に相当するペプチドが同定されたが、形式的には、このようなペプチドは、この位置での n s p 2 または n s p 2 T F の内部切断に由来する可能性もあった。n s p 2 N バンドのマイナス 1 フレームシフト産物としての同定は、フレームシフト部位が変異を受けている S S 突然変異体の発現時には、このタンパク質が見られなかったという事実によってさらに裏付けられた。様々な n s p 2 関連産物の同一性および翻訳後修飾が研究され続けているが、これまでに蓄積されたデータには、効率的なマイナス 2 P R F が起こることに疑いの余地は無く、同じヌクレオチド配列においてマイナス 1 フレームシフトの場合にはより低いレベルが伴うという可能性がある。

【 0 1 2 9 】

アルテリウイルス p p 1 a レプリカーゼポリタンパク質と p p 1 a b レプリカーゼポリタンパク質の間の合成のバランスは、(別の)リボソームフレームシフトイベントであるマイナス 1 P R F ( 図 1 A ) によって調節され、約 4 : 1 の推定 p p 1 a : p p 1 a b 比をもたらす (den Boon et al., 1991)。今般、種々の非構造タンパク質の発現レベルは、効率的なマイナス 2 P R F およびマイナス 1 P R F による n s p 2 T F および (推定) n s p 2 N の生産によってさらに影響を受け、さらに複雑な一連の比をもたらすことが明らかである。O R F 1 a の 5' 末端の A U G コドンから開始し、n s p 1 / n s p 1 を翻訳するリボソームのうち、約 20% が n s p 2 T F の合成を続け、約 8% が n s p 2 N の合成を続けるが、他の約 72% は n s p 2 ~ n s p 8 を合成し、わずかに約 14% が、ウイルス RNA ポリメラーゼ ( n s p 9 ) およびヘリカーゼ ( n s p 1 0 ) を含む、O R F 1 b によりコードされているタンパク質 n s p 9 ~ n s p 1 2 を翻訳する。

【 0 1 3 0 】

ベータレトロウイルスおよびデルタレトロウイルスもまた、それらの G a g - P r o - P o l ポリタンパク質の発現において 2 つのリボソームフレームシフト (両方ともマイナス 1 P R F ) を使用している (Jacks et al., 1987; Moore et al., 1987)。ベータレトロウイルスおよびデルタレトロウイルスでは、G a g、P r o および P o l は、連続的末端オーバーラップを持つ O R F であり、アルテリウイルスとは対照的に、ポリメラーゼは 2 回フレームシフトしたリボソームにより翻訳される。同様に、他の多くの RNA ウイルスでは、ポリメラーゼ (一般に、その複製複合体の他の特定の成分よりもはるかに少量しか必要とされない) は、終止コードの読み過ぎもしくは比較的無効率的に翻訳される

10

20

30

40

50

ゲノムセグメントなどの様々な機構を介して低レベルで生産されるか、または余分なポリマーゼが、例えば、分解または封入体における隔離によって除去される (Ahluquist, 2006に総説)。

#### 【0131】

PRRSV nsp2は最大のレプリカーゼ切断産物であり、一般に、単離物によって1060~1196アミノ酸からなる。PRRSV nsp2は、nsp1における上流パライン様プロテアーゼ(PLP) (nsp1 / 2部位を標的とする(den Boon et al., 1995))の自己タンパク質分解活性、およびnsp2のN末端ドメインに存在するプロテアーゼであるPLP2によるnsp2 / 3部位の切断(Snijder et al., 1995)によって放出される。Nsp2は、マルチドメイン性かつ多機能性のタンパク質である。

10

#### 【0132】

nsp2 / 3部位の切断に加え、nsp2は、ORF1aによりコードされているポリペプチドのC末端半分のプロセシング中にnsp4セリンプロテアーゼ(SP)の補因子として機能する(Wassenaar et al., 1997)。nsp2のC末端ドメインは未知の機能の保存性の高いCysリッチドメインであるが、nsp2TFはそうではない(Snijder et al., 1994)。さらに、nsp2は、複数回膜貫通(またはTM)タンパク質であると予測され、おそらくウイルス複製複合体のアセンブリの足場となる膜性複製構造体の形成に関連付けられている(Knoops 2012; Pedersen et al., 1999)。

#### 【0133】

これらのウイルス複製における重要な役割の他、最近の研究はnsp2をウイルス病因に関連付けてもいる。具体的には、PLP2ドメインは、脱ユビキチン化活性およびdeISGylation活性を有することが報告されている(Frias-Staheli, et al., 2007; Makarova et al., 2000; van Kasteren, et al., 2011; Sun et al., 2010, 2012)。これらの活性の生物学的重要性は、I型インターフェロン(IFN)の活性化を阻害し、ISG15の抗ウイルス効果に拮抗するPLP2の能力によって証明された。最後に、PRRSV複製に必要性が低いまたは必須でないことが明らかなnsp2の特定の領域は、in vivoにおける宿主免疫応答の調節に役割を果たしていると思われる(Chen et al., 2010; Sun et al., 2012)。

20

#### 【0134】

nsp2TFタンパク質は、このゲノム領域にコードされている(潜在的)機能の複雑性に加わる。nsp2TFタンパク質が重要なタンパク質であるという事実は、4つの遠縁アルテリウイルスのうち3つにおけるその保存性および出願者らの逆遺伝学研究によって確認される。フレームシフトシグナルは、予測されるnsp2TMドメインをコードする領域のすぐ上流に位置する。従って、nsp2およびnsp2TFはPLP2ドメインとnsp2の「超可変領域」を共通に持つが、これら2つのタンパク質は異なるC末端セグメントを有する。nsp2TFのC末端領域はnsp2よりも短い(PRRSV SD01-08では177aa短い)が、nsp2と同様に、複数の予測TM領域を含む。

30

#### 【0135】

nsp2をコードする核酸配列内のマイナス2フレームシフト部位は7つの連続するヌクレオチドによりコードされ、そのうち最初の5つは、nsp2TFコード領域のTFコード部分の最初のアミノ酸をコードするヌクレオチドの前にあり、最後の2つは、nsp2TFコード領域のTFコード部分の最初のアミノ酸のコードの最初の2つのヌクレオチドをコードする。

40

#### 【0136】

出願者らの逆遺伝学分析からの結果は、nsp2TFはウイルスの生存力に不可欠ではないが、最大ウイルス適応にはやはり不可欠であることを示唆する。本明細書で提供される実験において証明されるように、nsp2TF発現がノックアウトされた場合(突然変異体KO2)またはC末端切断型nsp2TFが生産された場合(突然変異体KO1)に、出願者らは、ウイルスが明らかに障害を受け、低力価の感染性子孫およびブランクサイズの減少を特徴とする表現型を示したことを見出した。

50

## 【0137】

出願者らは、TF ORFに終止コドン2つ導入しただけで、フレームシフトイベント自体は本質的に影響を受けていない最小破壊アプローチを用いてKO1突然変異体を設計した(図7C)。従って、KO1は、全長 $nsp2$ と $nsp2$ TF/ $nsp2$ Nフレームシフト産物(1または複数)の間に本来の比率を維持すると思われた。しかしながら、出願者らにより示されるように、このウイルスの操作は障害型の表現型をもたらした。このことは、全長 $nsp2$ TFの発現の必要性を強調している。

## 【0138】

出願者らは、フレームシフトシグナルを完全にロックアウトして $nsp2$ のみを発現するようにKO2突然変異体を設計した。出願者らの実験では、KO2は、最も増殖障害の大きい表現型を示した。出願者らの突然変異体KO2は $nsp2$ TFを発現せず、これでウイルス複製を損なうには十分である(KO1突然変異体により証明される通り)。フレームシフトシグナルをロックアウトはまた、全ての下流 $nsp(nsp3\sim 12)$ の発現をアップレギュレートすると思われ、これは注意深くバランスがとられた個々の $nsp$ の発現レベルを乱す可能性がある。 $pp1a$ および $pp1ab$ の合成レベルは厳格に制御されると思われ、このバランスの乱れは様々な結果を招く。これらの結果としては、 $nsp4$ によるレプリカーゼタンパク質分解性プロセッシングに対する影響(補因子として $nsp2$ も使用)、複製複合体の形成、またはRdRpおよびヘリカーゼ発現のアップレギュレーションが含まれ、これらは全て個々にウイルスRNA合成に直接的または間接的に影響を及ぼす可能性を有する。

10

20

## 【0139】

死滅PRRSウイルス、または改変型生ウイルス(MLV)を用いた数種のワクチンが上市している。現在利用可能なワクチンは一般に、均質な株に対しては効果的であるが、現場での広域のヘテロなPRRSV単離株に対するワクチンの安全性および防御の有効性に関しては問題が残る(Botner et al., 1997; Mengeling, 2005)。実験的PRRSワクチン(DNA、サブユニット、およびペプチドワクチン)(Huang et al., 2009; Kimman et al., 2009; Li et al., 2009; Wang et al., 2009)は、常に十分な感染防御免疫を生じたわけではなく、このようなワクチンが既存のMLVおよび死滅ワクチンよりも効果的であると言えるかどうかは依然として決定すべきことである。従って、現在利用可能なものよりも効果的なワクチンの大きな必要性がある。

30

## 【0140】

現行のワクチンのもう1つの欠点は、ワクチン接種を行ったブタが、自然感染から回復したブタから識別できないということである。遺伝的にマークされたワクチンは、ワクチン接種を行ったブタと自然感染ブタの区別を可能とし、PRRS防除プログラムに有用となる(Fang et al., 2008)。

## 【0141】

出願者らは、PRRSワクチン開発においてその潜在的適用のための $nsp2$ 領域を探索した。出願者らのマイナス2PRFおよび $nsp2$ 領域におけるオーバーラップORFの同定は、PRRSワクチンにおいて使用するための新規なウイルスの合理的設計に重要な結果を持つ。PRRSVゲノムの $nsp2$ コード領域内の核酸配列の操作は、意図しないことに、 $nsp2$ TFおよび全ての下流レプリカーゼサブユニットの完全性および/または発現レベルに影響を及ぼし、これはウイルス複製に衰弱効果を持ち得る。他方、出願者らは、改変型生ウイルスワクチンの設計に関するこのような操作の使用を見出した。実際に、KO1およびKO2などの突然変異体は、改変型生ウイルスワクチンのために使用ならびにさらなる開発が可能である。

40

## 【0142】

$nsp2$ 領域はまた、その高い免疫原性のために診断アッセイの開発のために探索した(Johnson et al., 2007; Brown et al., 2009)。配列解析によれば、 $nsp2$ TFのC末端領域は予測されるB細胞エピトープを含有することが示された(Hopp and Woods, 1983; Larsen et al., 2006)。このことはさらにタンパク質の3'末端に位置する予測B細胞

50

エピトープ C P K G V V T S V G E S V を用いた n s p 2 T F 特異的ウサギ抗血清の生産によって裏付けられる。

【 0 1 4 3 】

出願者らの発見および n s p 2 T F の特性評価は、ウイルスの新規な抗原および / または診断アッセイの開発のための潜在的標的としての n s p 2 T F の使用の基礎を提供する。さらに、K O 1 または K O 2 突然変異体に導入された突然変異、末端切断または欠失は、K O 1 または K O 2 に基づくマーカーワクチンに関する独自マーカー ( 領域 ) 比較診断アッセイを提供する。

【 0 1 4 4 】

疾病管理におけるその適用に加え、特に、効率的かつ誘導性のフレームシフトシグナルはほとんど知られていないことから、フレームシフト機構はそれ自体、バイオテクノロジー開発に重要な適用を持つ。効率的および誘導性のフレームシフトシグナルは、ニシストロン性構築物における 2 番目の遺伝子の効率的制御発現を可能とする。出願者らが発見したところでは、T F 発現は、シフト部位の下流の R N A 配列モチーフ ( C C C A N C U C C ) の存在、n s p 1 コード配列、およびシフト部位の下流の保存されている R N A 配列に依存する。フレームシフトは、トランスで発現される n s p 1 により刺激することができ、従って、n s p 1 ( C C C A N C U C C モチーフとともに)、またはその一部は、目的遺伝子の発現を活性化および不活性化するための分子スイッチとして使用することができる。

10

【 0 1 4 5 】

出願者らは、アルテリウイルスゲノムに存在するさらなるコード配列を発見および同定し、そのタンパク質産物 n s p 2 T F は P R R S V 複製に役割を果たす。n s p 2 T F タンパク質自体およびその発現機構 ( マイナス 2 P R F ) は、バイオテクノロジー開発および疾病管理において重要な適用を持つ。

20

【 0 1 4 6 】

出願者らは新規なアルテリウイルスタンパク質を同定し、マイナス 2 フレームシフトが真核生物系における遺伝子発現機構として機能的に利用されることを実証した。

【 0 1 4 7 】

出願者らのデータは、アルテリウイルスレプリカーゼタンパク質の発現が 2 つの異なるリボソームフレームシフトイベントのよって影響を受け、その結果、3 つの領域 n s p 1 / 2、n s p 3 ~ 8 および n s p 9 ~ 1 2 が異なるレベルで全て発現されることを明らかにする。

30

【 0 1 4 8 】

出願者らは、P R R S ウイルスの O R F 1 a の n s p 2 コード部分の翻訳の際に起こる新規なリボソームフレームシフトイベントを発見した。このフレームシフトイベントは O R F 1 a の中央領域で起こり、保存されている代替 O R F を関与させる。出願者らは、P R R S V の両遺伝子型 ( 1 型および I I 型 )、L D V および S H F V を含むほとんどのアルテリウイルスにおいて、n s p 2 の推定膜貫通ドメイン ( 本明細書では「T M」と呼ばれる ) をコードする O R F 1 a の一部をコードし、それとオーバーラップする、保存されている代替 O R F ( T F と呼ばれる ) を発見し、特性評価した。

40

【 0 1 4 9 】

出願者らは、この保存されている代替 O R F ( T F ) が O R F 1 a に対してマイナス 2 リーディングフレームにあり、マイナス 2 P R F を介して n s p 2 の N 末端半分とのトランスフレーム融合物 ( n s p 2 T F ) として翻訳されることを発見した。出願者らは、保存されている G \_ G U U \_ U U U モチーフで起こるマイナス 2 P R F が 2 0 % 程度の効率でそれを行うことを示す。

【 0 1 5 0 】

結果として生じるトランスフレームタンパク質 ( n s p 2 T F と呼ばれる ) が出願者らによって同定され、その発現が P R R S V 感染細胞においてマイナス 2 P R F を介して起こることが n s p 2 T F 特異的抗体を用いて確認された。T F ドメインは、n s p 2 の T

50

F O R Fによりコードされているユニークな169aaのC末端領域とN末端65~72% (具体的な株による)の融合物からなる。結果として、nsp2とnsp2TFのN末端セグメントは同一であるが、nsp2に比べてnsp2TFは著しく短く、ユニークなC末端ドメインを含んでいる。

【0151】

P R R S V nspの質量分析からの出願者らのデータからさらに、nsp2TFの発現、ならびにフレームシフトの部位および方向が確認される。フレームシフト部位G\_\_GUU\_\_UUUおよび保存性の高い下流CCCAxCUCCモチーフの部位特異的突然変異誘発を用いた出願者らの実験は、両方の要素が効率的フレームシフトに必要とされることを証明する。出願者らはさらに、nsp1領域も効率的フレームシフトに必要とされ、フレームシフトがnsp1の共発現によってトランスで活性化され得ることを証明するデータを提供する。

10

【0152】

出願者らは、nsp2TFの発現を部分的または完全に妨げる突然変異がP R R S V複製を損ない、より小型のブランク表現型(50分の1~100分の1のウイルス力価)をもたらすことを発見した。TFリーディングフレームへシフトするリボソームは全て、レプリカーゼ遺伝子の下流部分(nsp3~nsp12をコードする)を翻訳しないので、マイナス2PRFを下流ORF1a/ORF1bマイナス1PRFと組み合わせると、nsp1~2、nsp3~8、およびnsp9~12をコードする3つのレプリカーゼ遺伝子領域がそれぞれ有意に異なるレベルで翻訳される発現スキームが得られる。従って、出願者らにより発見されたマイナス2PRFは、アルテリウイルス複製複合体の種々の成分の発現レベルを微調整する上で重要な役割を果たす。

20

【0153】

本明細書で提供されるように、本発明は、ORF1aまたはその機能的部分をコードする核酸を含むアルテリウイルスであって、前記核酸が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において、nsp2TFの翻訳の低減および/または前記核酸から翻訳される1以上の下流産物の翻訳の変更をもたらす少なくとも1つの突然変異を含む、アルテリウイルスを提供する。

【0154】

本発明の一実施形態では、アルテリウイルスは場合により、nsp2をコードする領域内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに干渉する1以上の突然変異を含む。nsp2タンパク質をコードする核酸配列内のマイナス2フレームシフト部位は、7つの連続するヌクレオチドからなり、そのうち最初の5つは、nsp2TFコード領域のTFコード部分の最初のアミノ酸をコードするヌクレオチドの前にあり、最後の2つは、TF ORFによりコードされている最初のアミノ酸のコードの最初の2つのヌクレオチドからなる。

30

【0155】

別の実施形態では、本発明のアルテリウイルスは、場合により、フレームシフト部位GU(U/C)U(U/C)Uおよび/または保存されているCCCANCUCCモチーフ内に少なくとも1つの突然変異を含む。本発明のアルテリウイルスは、場合により、nsp1タンパク質コード領域をコードする核酸配列内に、例えば、保存されているGKYLQRR L Qモチーフ内に、マイナス2PRFの低減をもたらす1以上の突然変異を含む。前記1以上の突然変異は、好ましくは、1型P R R S Vのnsp1におけるK130および/またはR134残基(2型P R R S Vのnsp1におけるK124および/またはR128に相当する)を含む。前記1以上の突然変異は、好ましくは、1型P R R S VのK130Aおよび/またはR134A、およびII型P R R S VのK124Aおよび/またはR128Aを含む。

40

【0156】

本発明はさらに、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、本発明のアルテリウイルスが感染した細胞において、nsp2TF機能が低減される、および/または欠失となるア

50

ルテリウイルスを提供する。前述の本発明のアルテリウイルスは、場合により、n s p 2 T F アミノ酸配列が変更されているか、末端切断されているか、または不在である、O R F 1 a またはその機能的部分をコードする核酸を含む。本発明のアルテリウイルスは、場合により、T F ドメインの改変アミノ酸配列をコードし、ここで、前記アミノ酸配列は翻訳され、場合により、野生型アルテリウイルスには存在しないが、O R F 1 a のリーディングフレームを損なわないエピトープを提供する。T F ドメインのアミノ酸配列は、好ましくは、配列番号 6 8 および 6 9 またはそれらと少なくとも 7 0 % 同一の配列を含む。

【 0 1 5 7 】

一実施形態において、本発明のアルテリウイルスは、成果が得られるマーカーワクチンを開発するため、またはある被験体が遺伝子マーカーを含有するワクチンを投与されたかどうかを判定するために使用することができる。別の実施形態では、本発明により提供されるアルテリウイルスのいくつかは、自律的に複製可能である。本発明のアルテリウイルスは、限定されるものではないが、1 型（欧州遺伝子型）P R R S V、I I 型（北米遺伝子型）P R R S V、例えば、アジア高病原性変異体（H P P R R S V）、またはそれらの組合せ、または乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス（L D V）またはサル出血熱ウイルス（S H F V）を含む、P R R S V であり得る。

10

【 0 1 5 8 】

加えて、本発明の一実施形態は、本明細書で提供されるアルテリウイルスのいずれかをコードする R N A または c D N A を提供する。本明細書では、本発明のアルテリウイルス、上記の c D N A、またはそれらの組合せのいずれかと、場合により薬学上許容される担体または希釈剤とを含むワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。また、本発明の一実施形態では、場合によりアジュバント、賦形剤、またはそれらの組合せを含むワクチンまたは免疫原性組成物も提供される。

20

【 0 1 5 9 】

別の実施形態では、本発明は、被験体においてアルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、被験体に有効量の本発明の組成物を投与することを含む方法を提供する。被験体は動物であり得る。

【 0 1 6 0 】

本発明は、全長または部分的アルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質を含む、好ましくは、配列番号 3 6、4 5、および 7 6 で示されるアミノ酸配列および部分配列 4 6 ~ 6 7 および 7 7 ~ 9 1 またはそれらと少なくとも 7 0 % 同一の配列を含む、単離されたまたは組換え型のタンパク質を提供する。前記タンパク質は好ましくは、別のタンパク質と融合され、かつ/またはタグを付加され、例えば、当業者に知られているような、M y c タグ（例えば、N - I L K K A T A Y I L - C、N - E Q K L I S E E D L - C）、H A タグ（例えば、N - Y P Y D V P - C）、H i s タグ（例えば、6 x H i s）、F L A G タグ（例えば、N - D Y K D D D D K - C）、G S T タグおよび/またはビオチンタグを有する。

30

【 0 1 6 1 】

さらに、本発明の一実施形態では、単離されたまたは組換え型の抗体が提供され、この抗体はアルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質または本発明のタンパク質と特異的に結合することができる。前記抗体は好ましくは、アルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質、または配列番号 6 3、6 4 もしくは 6 5 で示される、またはそれらと少なくとも 7 0 % 同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の、T F ドメインと結合する。

40

【 0 1 6 2 】

本発明の一実施形態により、生体サンプルにおいてアルテリウイルスに対する抗体の存在を検出する方法であって、生体サンプルを一定量の n s p 2 T F 抗原またはその一部と接触させること；n s p 2 T F 抗原と抗体の間の複合体の有無を、検出系を用いて検出すること；および n s p 2 T F 抗原と抗体の間の複合体の有無を判定することを含み、複合体の存在がアルテリウイルスに対する免疫応答を示す方法が提供される。

【 0 1 6 3 】

50

本発明の別の実施形態は、生体サンプルがアルテリウイルスに対する抗体を含むかどうかを判定するための方法を提供し、前記方法は、生体サンプル中の n s p 2 T F 特異的抗体の存在を検出することを含む。

【0164】

本発明はまた、野生型アルテリウイルスに感染した、および/または非改変型アルテリウイルス株を接種された被験体を、本発明のワクチンを接種された被験体から識別するための方法を提供し、前記方法は、前記試験対象からサンプルを準備すること；前記サンプルにおいて、n s p 2 T F をコードする核酸配列の 5' 側に位置するマイナス 2 フレームシフト部位におけるマイナス 2 リボソームフレームシフトに影響を及ぼす突然変異の有無、または n s p 2 T F をコードする核酸配列に対する改変を定性的、または定量的、または定性的かつ定量的に判定すること；および/または前記サンプルにおいて、前記ワクチンに特異的な免疫原性エピトープに対する抗体の存在を判定すること；および/または前記サンプルにおいて、前記野生型または非改変型アルテリウイルスにより発現されるが前記ワクチンには存在しないエピトープに対する抗体の存在を判定することを含む。

10

【0165】

さらに、本発明の一実施形態は、生体サンプルにおいてアルテリウイルスをタイピングする方法を提供し、前記方法は、n s p 2 タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス 2 フレームシフト部位の存在および/または配列を判定すること；および/または前記アルテリウイルスにおける n s p 2 T F コード領域の存在および/または配列を判定することを含む。

20

【0166】

本発明の別の実施形態は、あるタンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結されたアルテリウイルスのマイナス 2 フレームシフト部位を含む核酸であり、前記タンパク質はアルテリウイルスタンパク質でなく、前記核酸は好ましくは、前記マイナス 2 フレームシフト部位の 5' 側にリボソーム翻訳開始コドンを含み得る。本発明の核酸内のアルテリウイルスのマイナス 2 フレームシフト部位は、配列 G G U ( U / C ) U ( U / C ) U および/または C C C A N C U C C を含み得る。加えて、本発明は、本発明の核酸の 1 つを含む発現系を提供し、前記発現系は場合により、n s p 1 またはその機能的部分をさらに含む。

30

【0167】

本発明の一実施形態は、ある薬剤が、n s p 2 タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス 2 フレームシフト部位におけるリボソームフレームシフトに干渉し得るかどうかを判定するための方法を提供し、前記方法は、前記部位においてフレームシフトを許容する翻訳系に、前記部位と作動可能に連結された遺伝子マーカーまたはリポーターをコードする核酸を提供すること；前記翻訳系を前記薬剤と接触させること；前記翻訳系と薬剤混合物を前記核酸の翻訳を可能とするようにインキュベートすること；および前記核酸によりコードされている部分的翻訳産物の有無を判定することを含む。

40

【0168】

本発明の一実施形態では、上記で提供される本発明の方法の翻訳系は、アルテリウイルス n s p 1 タンパク質またはその機能的部分を含み得るか、かつ/または細胞である。上記で提供される本発明の方法の薬剤は、アンチセンス DNA、アンチセンス RNA、s i RNA、マイクロ RNA、核酸類似体、ペプチド、または化学化合物からなる群から選択され得る。

【0169】

いくつかの実施形態では、本発明は、アルテリウイルスにおけるマイナス 2 フレームシフトに干渉し得る有効量の薬剤と、場合により薬学上許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、アルテリウイルスに感染した動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

50

【0170】

加えて、本発明の一実施形態は、異種プロモーターと作動可能に連結されたアルテリウイルス *ns p 2 TF* タンパク質をコードする核酸を含む発現カセットを提供する。本発明はさらに、本発明の発現カセットを含む細胞を提供する。本発明の細胞は、場合により、細胞の染色体に組み込まれる発現カセットを含む。本発明の細胞はいずれも、本発明により提供されるいずれかのアルテリウイルスまたは本発明の *cDNA* をさらに含み得る。本発明はまた、本発明の細胞を含むアルテリウイルスパッケージング細胞株を提供する。本発明はまた、本発明の細胞を含む *ns p 2 TF* を発現する安定な細胞株を提供する。さらに、本発明により提供される細胞株の細胞は、異種プロモーターから *ns p 2 TF* を発現する。本発明はまた、本発明のいずれかの方法のためのキットを提供する。

【0171】

本発明の一実施形態は、アルテリウイルスに対する免疫応答を誘導または惹起し得る免疫原性組成物を提供する。本発明の組成物は、本明細書の配列表に示される配列のうち1以上を含む、また構築物 *pL1a*、*pLns p 2 - 8*、*pLns p 1 - 2*、*pLns p 1 - 2*、*pLns p 1 cc - 2*、*pLns p 2*、*pLns p 1 - 3*、*pLns p 1 - 3*、*pLns p 2 - 3*、*pLns p 2 - 3 - IFC*、*pLns p 1*、*pL1a - IFC*、*pL1a - KO1*、*pL1a - KO2*、*pL1a - SS*、*pL1a - CC1*、*pL1a - CC2*、*pSD01 - 08 - IFC*、*pSD01 08 - KO1*、*pSD01 08 - KO2*、および *pLns p 1 cc - 2*、またはそれらの任意の一部、フラグメントまたは組合せのうち1以上を含むベクターと薬理的に許容される担体とを含み得る。

【0172】

本発明の一実施形態は、アルテリウイルス（それぞれ *LDV*、*SHFV*、または *PRRSV*）感染に感受性のある動物において、*LDV*、*SHFV*、および *PRRSV* を含むアルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法であって、前記動物に有効量の組成物および薬学上許容される担体を投与し、前記組成物が前記動物において免疫応答の誘導を引き起こす方法を提供する。

【0173】

本発明の一実施形態は、オープンリーディングフレーム *ORF 1a* に1以上の突然変異を含むアルテリウイルスを提供し、前記突然変異は、アルテリウイルスにおける *ns p 2 TF* 生産が変更される、低減される、または全体的に消失するようなものである。

【0174】

本発明の一実施形態は、ブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（*PRRSV*）に対する免疫応答を検出、同定または定量する *in vitro* 法であって、生体サンプルを *PRRSV* に由来する非構造タンパク質 2 トランスフレームタンパク質（*ns p 2 TF*）抗原と接触させること（ここで、生体サンプル中の抗体は *ns p 2 TF* 抗原と結合する）、*ns p 2 TF* 抗原と抗体の間の複合体の有無を検出するための検出系を導入すること、および *ns p 2 TF* 抗原と抗体の間の複合体の有無を定量的、または定性的、または定量的かつ定性的に判定することを含み、複合体の存在が *PRRSV* に対する免疫応答を示す方法を提供する。

【0175】

本明細書に記載の化合物または組成物の、限定されるものではないが、*PRRSV* を含むアルテリウイルスにより引き起こされる疾患を治療または予防する能力は、当技術分野で周知のアッセイを用いて決定することができる。例えば、ワクチン接種プロトコルの計画、評価、データ解析分析、および免疫応答の定量を、本発明の化合物の、アルテリウイルスにより引き起こされる疾患を治療または予防する能力を決定するために使用することができる。

【0176】

さらに、化合物または組成物の、限定されるものではないが *PRRSV* を含むアルテリウイルスにより引き起こされる疾患を治療または予防する能力は、当業者に公知かつ理解されている試験を用いて決定することができる。例えば、本発明の組成物および方法とともに使用するための好適なアッセイとしては、限定されるものではないが、抗体に基づく

10

20

30

40

50

アッセイ、核酸に基づくアッセイ、例えば蛍光マイクロスフェアタイムノアッセイ、およびリアルタイムRT-PCRなどの核酸に基づく種々のアッセイが含まれる。

【0177】

本発明はさらに、ORF1aに1以上の突然変異を含むアルテリウイルスを提供し、ここで、アルテリウイルスで発現されるnsp2TFタンパク質は、変更されるか、末端切断されるかまたは不在となる。本発明によれば、アルテリウイルスにおける突然変異は、TFコード領域の5'末端におけるマイナス2フレームシフトに干渉する1以上の突然変異、および/または169コドンTFコード領域における突然変異を含む。TFコード領域における突然変異は、TFコード領域における1以上の(one of more)終止コドンの挿入、置換、欠失、またはそれらの組合せを含み得る。本発明のアルテリウイルスはさらに

10

【0178】

本発明のアルテリウイルスは、限定されるものではないが、PRRSV、例えば、限定されるものではないが、1型PRRSV(欧州遺伝子型)、2型PRRSV(北米遺伝子型)、両遺伝子型の任意の変異体、遺伝子型内/遺伝子型間の組換えおよび/またはそれらの組合せ、または乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(LDV)、またはサル出血熱ウイルス(SHFV)を含む、いずれのアルテリウイルスであってもよい。

【0179】

本発明のアルテリウイルスはまた、遺伝子マーカーの導入を含み得る。

20

【0180】

本発明は、1以上の本発明のアルテリウイルスと薬学上許容される担体とを含むワクチン組成物を提供する。本発明はまた、1以上の本発明のアルテリウイルスと薬学上許容される担体とを含む免疫原性組成物を提供する。本発明は、アルテリウイルス感染に感受性のある動物においてアルテリウイルスに対する免疫応答を誘導する方法を提供し、前記方法は、1以上の本発明の免疫原性組成物を含む組成物の有効量の投与を含み、その動物において前記免疫応答が誘導される。前記ワクチン組成物および免疫原性組成物は、限定されるものではないが、哺乳類、ヒト、およびブタを含むいずれの動物においても使用可能である。

30

【0181】

本発明は、有効量の阻害的核酸または核酸類似体(前記核酸または核酸類似体はアルテリウイルスにおいてマイナス2PRF機構を阻害する)と薬学上許容される担体および/または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は場合により、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、adマイクロRNA(ad microRNA)、ロックド核酸、ペプチド核酸、モルフィリノ(morphilino)オリゴヌクレオチド、または他の小分子、またはそれらの組合せからなる群から阻害的核酸を含み得る。

【0182】

本発明は、アルテリウイルスに感染した動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の1以上の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

40

【0183】

本発明はさらに、1以上の外因性遺伝子の発現を制御するための発現系であって、核酸構築物にアルテリウイルス由来の1以上のフレームシフトシグナルと、1以上の外因性遺伝子をコードする1以上の核酸分子とを挿入することを含む発現系を提供する。本発明の発現系はさらに、核酸構築物への1以上のフレームシフトシグナルの挿入(前記フレームシフトシグナルは、G\_\_GUU\_\_UUU、G\_\_GUC\_\_UCU、G\_\_AUU\_\_UUU、G\_\_GUU\_\_UUC、CCCANCUCC、またはそれらの組合せである)を、nsp1の共発現とともに、または伴わずに提供する。

【0184】

本発明は、nsp2TFまたはその機能的部分をコードするアルテリウイルス核酸がウ

50

イルスゲノムにおいて部分的に不活化されている、ワクチンおよび遺伝子発現系において使用するためのアルテリウイルスノックアウト突然変異体を提供する。本発明はまた、nsp2TFまたはその機能的部分をコードするアルテリウイルス核酸がウイルスゲノム内で完全に不活化されている、アルテリウイルスノックアウト突然変異体を提供する。

【0185】

本発明は、生体サンプルにおいてアルテリウイルスに対する抗体の存在を検出する *in vitro* 法を提供し、この場合、生体サンプルを、アルテリウイルスに由来する一定量の非構造タンパク質2トランスフレームタンパク質 (nsp2TF) と接触させ、およびnsp2TF抗原と抗体の間の複合体の有無を検出するための検出系を使用する、この場合、nsp2TF抗原と抗体の間の複合体は、その生体サンプルが前記抗原に対する抗体を含有する場合にのみ生じ、複合体の存在がアルテリウイルスに対する免疫応答を示す。

10

【0186】

本発明は、フレームシフト部位、nsp2TFの保存されている下流配列、およびnsp2TF ORF全体を含む、nsp2TF関連核酸の有無を判定する *in vitro* 法を提供し、前記の判定は定量的、定性的、または定量的かつ定性的である。

【0187】

本発明は、nsp2TFタンパク質が発現され、かつ/または変更されるワクチン構築物を提供する。本発明はさらに、nsp2TFタンパク質発現が完全にまたは部分的にノックアウトされるワクチン構築物を提供する。本発明はまた、nsp2TFタンパク質および全ての下流非構造タンパク質の発現レベルが変更される、例えば、限定されるものではないが、nsp2TFタンパク質の発現レベルが低減、増大、または増強される、ワクチン構築物を提供する。本発明はさらに、nsp2TFタンパク質それ自体が実質的にまたは部分的にまたは微妙に変更または増強されるワクチン構築物を提供する。本明細書で提供されるような本発明のワクチン構築物は、いずれのアルテリウイルス種においても、またいずれのアルテリウイルス種に対しても使用可能である。

20

【0188】

本発明は、nsp2TFの発現が完全にもしくは部分的にノックアウトされるか、またはnsp2TFおよび全ての下流非構造タンパク質の発現が変更される、限定されるものではないが、組換えアルテリウイルスを含む、組換えウイルスのワクチンとしての使用を提供する。本発明は、nsp2TFが突然変異されるか、末端切断されるか、またはそうでなければ変更される、限定されるものではないが、組換えアルテリウイルスを含む、組換えウイルスのワクチンとしての使用を提供する。

30

【0189】

本発明は、レプリカーゼ発現の全体的調節が混乱、障害または中断されるようにフレームシフト効率が増変される、限定されるものではないが、組換えアルテリウイルスを含む、組換えウイルスのワクチンとしての使用を提供する。本明細書で提供されるような本発明の組換えウイルスは、任意のウイルス種であり得る。本明細書で提供されるような本発明の組換えウイルスは、限定されるものではないが、乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス (LDV)、任意のサル出血熱ウイルス (SHFV)、または任意のPRRSウイルス種 (例えば、限定されるものではないが、1型 (欧州遺伝子型) PRRSVおよびII型 (北米遺伝子型) PRRSV、アジア変異株またはそれらの組合せを含む、任意のアルテリウイルス種であり得る。

40

【0190】

本発明は、単離、精製された、nsp2TFタンパク質、ならびにTFドメインの免疫原性エピトープを含有するタンパク質および/またはペプチド、またはnsp2TFタンパク質もしくはTFドメインをコードする、リボ核酸を含む任意の核酸を提供する。

【0191】

また、単離、精製された、nsp2TFタンパク質、ならびにTFドメインの免疫原性エピトープを含有するタンパク質および/またはペプチド、またはnsp2TFタンパク

50

質もしくはTFドメインをコードする、リボ核酸を含む任意の核酸、またはそれらの組合せを含む免疫原性組成物を生産するための方法も本発明により提供される。本発明は、動物の免疫系に応答を惹起するための細胞内もしくは細胞外タンパク質としての、またはビリオンタンパク質としてのnsp2TFの使用を提供し、ここで、動物は、限定されるものではないが、ヒトおよびブタを含む。本発明によれば、免疫応答は、限定されるものではないが、適応免疫応答、獲得免疫応答、体液性免疫応答、細胞媒介性免疫応答、生得免疫応答、受動免疫応答、または能動免疫応答であり得る。

【0192】

本発明は、nsp2TFタンパク質の細胞局在が変更され、その結果、nsp2TFタンパク質の脱ユビキチン化機能が障害され、nsp2TFタンパク質の脱ユビキチン化活性が低減または阻害されるようにTFドメインを改変するための方法を提供する。本発明に関して、TFドメインの改変は突然変異に小化合物の使用、ペプチドの使用、または当技術分野で承認されている他のタンパク質ドメイン改変方法によって行うことができる。

10

【0193】

本発明は、限定されるものではないが、遺伝子マーカー（限定されるものではないがTFコード領域またはnsp2TFアミノ酸配列内の特定の配列を変更または削除する突然変異を含む）を含有するワクチン組成物に関する診断アッセイを含む診断検査におけるnsp2TFの使用を提供する。

【0194】

本発明は、抗体に基づくアッセイのためのnsp2TFタンパク質またはTFドメインの使用を提供する。本発明はさらに、核酸に基づくアッセイのためのTFコード領域および/またはフレームシフト配列の使用を提供する。

20

【0195】

本発明は、限定されるものではないが、タンパク質または他の分子の発現用の発現カセットを含む、バイオテクノロジー適用におけるアルテリウイルス由来のマイナス2PRF誘導核酸配列の使用を提供する。さらに、限定されるものではないが、外来または非天然または異種タンパク質またはそれらの組合せを含む、目的タンパク質の発現を、選択された構築物において1以上のアルテリウイルス由来マイナス2PRF誘導核酸配列を用いて誘導する方法も提供される。本発明において使用するためのアルテリウイルス由来マイナス2PRF誘導核酸配列は、場合により、nsp1を発現するものを含む、本発明は、遺伝子発現系におけるマイナス2フレームシフト機構の刺激因子および/または誘導因子としての、アルテリウイルス種由来のG\_\_GUU\_\_UUUモチーフ、G\_\_GUC\_\_UCUモチーフ、CCCANUCUCモチーフ、およびまたはnsp1タンパク質、またはそれらの組合せの使用を提供する。G\_\_GUU\_\_UUUモチーフ、G\_\_GUC\_\_UCUモチーフ、CCCANUCUCモチーフ、および/またはnsp1タンパク質、またはそれらの組合せは、限定されるものではないが、任意のアルテリウイルス種（現在知られている全てのアルテリウイルス種を含む）を含む、マイナス2PRF機構を有する任意のウイルス種、ならびに後に同定される、マイナス2PRF機構を有する任意のウイルスに由来し得る。本発明は、任意のウイルス、または任意の生物系においてnsp1媒介性のフレームシフトを変調、阻害、または変更するための化合物を同定するための方法を提供する。

30

40

【0196】

以下の実施例は上記の発明を例示することを意図し、その範囲を狭めるように解釈されるべきでない。当業者は、これらの実施例が、本発明が実施され得る他の多くの方法を示唆することを容易に認識するであろう。本発明の範囲内にありつつ、多くの変形および改変が行えたと理解されるべきである。

【実施例】

【0197】

実施例1．PRRSV由来のORF1a領域のコンピューター解析

GenBankで現在入手可能な212のPRRSV単離株のORF1a配列を抽出し

50

、翻訳し、アラインし、逆翻訳してヌクレオチド配列アラインメントを得た。pp1a内に一般に50～55% aaの同一性を有する欧州（EU；遺伝子型I）および北米（NA；遺伝子型II）単離株を含めた。次に、アラインメントを、従前に記載されているように(Firth et al., 2011b)、ORF1a同義部位における保存性に関して解析した。

【0198】

方法：

GenBank配列NC\_001961（PRRSV-NA）、NC\_001639（LDV）、NC\_003092（SHFV）およびNC\_002532（EAV）に由来するpp1aペプチド配列にNCBI tblastn(Altschul et al., 1990)を適用することによって、ORF1aコード配列が完全にカバーされるようにGenBankのPRRSV、LDV、SHFVおよびEAVヌクレオチド配列を同定した。

【0199】

個々の218、2、3および32配列を検索した。なお、バイオインフォマティクス解析に用いた配列の受託番号は次の通りである：PRRSV（EU遺伝子型）：M96262、AY366525、AY375474、AY588319、DQ489311、DQ864705、EU076704、FJ349261、GQ461593、GU047344、GU047345、GU067771、GU737264、JF276430、JF276431、JF276432、JF276433、JF276434、JF276435、JF802085。PRRSV（NA遺伝子型）：NC\_001961 = AF046869、AB288356、AF066183、AF159149、AF176348、AF184212、AF303354、AF303355、AF303356、AF303357、AF325691、AF331831、AF494042、AY032626、AY150312、AY150564、AY262352、AY424271、AY457635、AY545985、AY585241、AY612613、DQ056373、DQ176019、DQ176020、DQ176021、DQ217415、DQ459471、DQ473474、DQ779791、DQ988080、EF075945、EF112445、EF112446、EF112447、EF153486、EF484031、EF484033、EF488048、EF488739、EF517962、EF532801、EF532802、EF532803、EF532804、EF532805、EF532806、EF532807、EF532808、EF532809、EF532810、EF532811、EF532812、EF532813、EF532814、EF532815、EF532816、EF532817、EF532818、EF532819、EF535999、EF536000、EF536001、EF536002、EF536003、EF635006、EF641008、EU097706、EU097707、EU106888、EU109502、EU109503、EU144079、EU187484、EU200961、EU200962、EU236259、EU262603、EU360128、EU360129、EU360130、EU624117、EU678352、EU708726、EU807840、EU825723、EU825724、EU860248、EU860249、EU864231、EU864232、EU864233、EU880431、EU880432、EU880433、EU880434、EU880435、EU880436、EU880437、EU880438、EU880439、EU880440、EU880441、EU880442、EU880443、EU939312、FJ175687、FJ175688、FJ175689、FJ393456、FJ393457、FJ393458、FJ393459、FJ394029、FJ536165、FJ548851、FJ548852、FJ548853、FJ548854、FJ548855、FJ797690、FJ889129、FJ895329、FJ899592、GQ330474、GQ351601、GQ359108、GQ374441、GQ374442、GQ475526、GQ499193、GQ499194、GQ499195、GQ499196、GQ857656、GU143913、GU168567、GU168568、

10

20

30

40

50

GU168569、GU169411、GU232735、GU232736、GU232737、GU232738、GU269541、GU454850、GU461292、HM011104、HM016158、HM016159、HM189676、HM214913、HM214914、HM214915、HM853673、HQ233604、HQ233605、HQ315835、HQ315836、HQ315837、HQ401282、HQ416720、HQ699067、HQ843178、HQ843179、HQ843180、HQ843181、JF268672、JF268673、JF268674、JF268675、JF268676、JF268677、JF268678、JF268679、JF268680、JF268681、JF268682、JF268683、JF268684、JF748717、JF748718、JF796180、JF800911、JN256115、JN387271、JN387272、JN387273、JN387274、JN626287、JN662424、U87392。LDV:NC\_\_001639=U15146、L13298。SHFV:NC\_\_003092=AF180391、HQ845737、HQ845738。EAV:NC\_\_002532=X53459、AY349167、AY349168、DQ846750、EU252113、EU252114、EU586273、EU586274、EU586275、GQ903794、GQ903795、GQ903796、GQ903797、GQ903798、GQ903799、GQ903800、GQ903801、GQ903802、GQ903803、GQ903804、GQ903805、GQ903806、GQ903807、GQ903808、GQ903809、GQ903810、GQ903811、JN211316、JN211317、JN211318、JN211319、JN211320。

#### 【0200】

6つのORF1a欠損PRRSV配列はその後の解析から除いた。EMBOSS and Clustal (Rice et al., 2000; Larkin et al., 2007)を用い、各グループ内で、ポリタンパク質をコードする配列を抽出し、翻訳し、アラインし、逆翻訳してヌクレオチド配列アラインメントを作成した。同義部位の保存性を従前に記載されているように(Firth et al., 2011b)に計算した。

#### 【0201】

結果：

この解析により、nsp2をコードする配列の3'末端に向かう169コドンにわたる領域における同義部位保存において、著しく高い統計的に有意な( $p < 10^{-64}$ )上昇が明らかになった(図1)。この領域内の平均同義置換率は、ORF1a平均の47%と低かった。同義部位保存におけるこのようなピークは一般に、コードまたは非コードのいずれであっても、機能的に重要なオーバーラップ要素の指標となる。

#### 【0202】

この場合、212配列の全てにおいて、ORF1aに対するマイナス1およびプラス2リーディングフレームにおける終止コドンの位置を調べると、保存性の高い領域に厳密に相当する領域において、プラス1リーディングフレームに終止コドンがほとんど全く無いことが明らかになった(図1B)。このことはORF1a同義部位の高い保存性に関する可能な説明として、プラス1リーディングフレームにおけるオーバーラップコード配列を示唆する。ORF1aの5'末端付近に見られた高い同義部位保存は、おそらく、複製および/またはサブゲノムRNA合成に關与する高次のRNA構造などの、機能的に重要な非コード要素に相当すると思われる(van den Born et al., 2004; Lu et al., 2011)。

#### 【0203】

他のアルテリウイルス種のゲノムを調べると、ORF1aの相当領域とオーバーラップするプラス1フレームORFの証拠がさらに明らかになった。現在のところ、3つのSHFV配列が利用可能である(Lauck et al., 2011)。pp1a内の対をなすaaの同一性はわずか35~37%であるので、これらの配列は同義部位保存解析にとっては発散し過ぎている。しかしながら、このような発散配列にあって、プラス1フレームにおける220

~ 226 コドンの ORF の存在の保存は、それ自体、統計的に有意である (図 1 C ;  $p < 10^{-10}$ )。

#### 【0204】

3つの発散性の高い SHFV 配列における長い TF ORF の存在の保存 (図 1 C) の統計的有意性は、ORF 1a フレームコドンカラムを TF ORF 領域内でランダムにシャッフリングし、+1 フレームにおいてどれくらいの割合のシャッフリングがオープンリーディングフレームを保存するか計算することによって評価した。この手順は、ORF 1a フレームアミノ酸使用頻度、コドン使用頻度、またはヌクレオチドバイアスによる、ランダムな長いプラス1フレーム ORF に対する正または負のいずれのバイアスも制御し、系統発生的な非独立性についても制御する。実際に、プラス1フレーム ORF を保存する無作為化の割合は小さすぎて直接評価できなかった (4000 の無作為化で出現は 0) ので、代わりに、ポアソン統計を仮定して、1以上の配列において終止コドンを含むプラス1フレームアラインメントコドンカラムの平均数 (無作為化アラインメント当たり) からこれを見積もった (viz. 24.70)。

10

#### 【0205】

この方法を用いれば、SHFV アラインメントのこの領域に偶然生じる長いプラス1フレーム ORF の p 値は  $1.9 \times 10^{-11}$  である。SHFV に関するこの統計値 ( $1.9 \times 10^{-11}$ ) も PRRSV のメインテキストにおいて見積もった保存統計値 ( $1 \times 10^{-6.4}$ ) も多重検定の補正は行われておらず、すなわち、基本的に、全ゲノム (約 15,000 nt) を保存されている領域および/または約 200 コドンの保存されている ORF に関して検定することが考えられ、また、基本的に、GenBank に提示されている約 1000 の RNA ウイルス種にこのような分析を当てはめて合計約 25,000 の独立した検定を作り出すことができる。従って、SHFV における TF ORF の 5' 末端の位置は先験的に知られているので (それは PRRSV における TF ORF の 5' 末端に位置する)、SHFV の統計値に多重検定に関する補正は実際に必要とされないが、p 値は約 25,000 倍しなければならない (それぞれ  $2.5 \times 10^{-6.0}$  および  $4.8 \times 10^{-7}$  となる)。

20

#### 【0206】

169 コドン ORF はまた、2つの公開されている LDV 配列のうちの1つ (LDV-P) に存在するが、もう一方 (LDV-C) では、ORF は単一の終止コドンによって破壊される。LDV-C 配列におけるシーケンシングエラーの尤度を評価するため、本発明者らはさらなる LDV 単離株の関連領域のシーケンシングを行った (795 nt、TF の最後の 158 コドンを含む; GenBank 受託番号 JX258842)。

30

#### 【0207】

新規な配列は LDV-P および LDV-C の両方からの発散が見られ (局所的に 83 ~ 90% nt の同一性)、LDV-C に存在する TF フレーム終止コドンを含んでいない。注目すべきは、EAV には、対応する ORF の証拠は見られなかった。実際、ゲノムのこの部分では、EAV は他のアルテリウイルスから高い発散を示し、ns p2 領域はサイズが大幅に縮小している。

#### 【0208】

保存されている TF ORF の 5' 末端には、G\_\_GUU\_\_UUU モチーフ (下線は ORF 1a コドンを区切っている) が存在し、これは両 LDV 配列および1つの SHFV 配列で 206 / 212 の PRRSV 配列に存在する (4 / 212 は G\_\_GUU\_\_UUC を有する)。一方、他の2つの SHFV 配列は対応する位置に G\_\_GUC\_\_UCU を有する。重要なことには、種々の PRRSV 単離株において対応する ORF 1a コドンは CAG (Gln)、UGG (Trp)、または CGG (Arg) であるにもかかわらず、1位の「G」は保存されている (図 2 A)。このモチーフは、ORF 1a からオーバーラップ ORF へのマイナス 2 PRF を促進することができる。

40

#### 【0209】

ところが、本発明者らは、(マイナス 1 PRF 部位により) 存在すると予想される 5 ~

50

9の距離に確かな3'RNA二次構造を予測することができなかった。本発明者らは、長い範囲の塩基対合および/または複雑な三次元相互作用を含む構造はコンピューター解析だけに基づいては検出が困難である可能性があることから、このような構造の存在を明確に除外することはできなかった。

#### 【0210】

本発明者らは、G\_\_GUU\_\_UUU配列の下流10ntの距離に保存性の高いCCCCANCUCCモチーフを見出した。このモチーフは、LDV、3つ全てのSHFV配列、および211/212のPRRSV配列に存在する。このような高い保存は、(2つのオーバーラップリーディングフレームでの)アミノ酸制限を反映している可能性があったが、フレームシフト刺激性RNA配列(の一部)を表すとも思われた。

10

#### 【0211】

PRRSVでは、G\_\_GUU\_\_UUU配列におけるマイナス2フレームシフトは、オーバーラップORFによりコードされている169aaと融合したnsp2のN末端65~72%(一般に、単離株によって718~849aa)を含むトランスフレーム融合タンパク質を産生する(図1A)。本発明者らは、ここで、オーバーラップORFをTFと呼び、本発明者らは、予測トランスフレーム融合タンパク質をnsp2TFと呼ぶ。PRRSV、LDVおよびSHFVでは、nsp2TFは、「全長」nsp2よりも14~19%短い。3つ全ての種において、TF ORFはnsp2の予測TMドメインをコードするORF1aの部分とオーバーラップし、種および単離株によって、4以上の潜在的TM領域を含有する選択的TMドメインをコードすると思われる。

20

#### 【0212】

実施例2: PRRSV感染細胞におけるnsp2TFタンパク質発現の免疫検出

予測されるnsp2TFフレームシフト産物がウイルス感染細胞で実際に発現されることを確認するために、遺伝子型IのPRRSウイルスであるPRRSV単離株SD01-08(Fang et al., 2006)の予測されるnsp2TFタンパク質のC末端ペプチド(CPKGVVTSVGE SV)に対してポリクローナル抗体(pAb-TF)を作製した。本発明者らはまた、SD01-08 nsp2のN末端436残基を含有する抗原を用いて従前に作製された(Fang et al., 2006; Li et al., 2012)、数種のnsp2特異的モノクローナル抗体(mAb36-19および58-46)も使用した。予測されるnsp2TFはその714N末端aa(SD01-08中)をnsp2と共有していると思われるので、これらのmAbはnsp2TFも認識すると予想された。

30

#### 【0213】

nsp2TFの発現は、免疫沈降(IP)およびウエスタンブロット解析により分析した。MARC-145細胞にPRRSV単離株SD01-08を感染させ、48hpiにおいて細胞溶解液を採取した。PRRSVタンパク質を、まず、mAb36-19を用いて免疫沈降物させ、SDS-PAGEにより分離した。同様の解析を遺伝子型II PRRSVである単離株SD23983についても、この単離株のnsp2N末端ドメインに特異的なmAb(140-68および140-43)を用いて行った。ウイルス感染細胞におけるnsp2TFの細胞内局在を、免疫蛍光顕微鏡を用いて調べた。

40

#### 【0214】

方法:

ウイルスおよび細胞: BHK-21、RK-13およびMARC-145細胞を、10%ウシ胎仔血清を含有する改変イーグル培地(MEM、Invitrogen、CA)で培養した。細胞を37、5%CO<sub>2</sub>で維持した。本研究では、I型PRRSV単離株(欧州遺伝子型)であるSD01-08(GenBank受託番号DQ489311; Fang et al., 2006)、およびII型PRRSV単離株(北米遺伝子型)であるSD23983(GenBank受託番号JX258843)を用いた。T7 RNAポリメラーゼを産生するワクシニアウイルス組換え体vTF7-3(Fuerst et al., 1986)を、RK-13細胞内で増殖させた。

50

#### 【0215】

抗体：モノクローナル抗体 mAb 36 - 19、mAb 58 - 46、mAb 140 - 68 および mAb 148 - 43 は、従前に記載されている通りに (Fang et al., 2006; Li et al., 2012)、本発明者らの研究室で作製した。これらの抗体は、nsp2 および nsp2 TF の両方の N 末端領域を認識する。mAb 36 - 19 および 58 - 46 は、マウスを SD01 - 08 のペプチド (pp1a の aa386 ~ 821) 免疫することにより産生され、一方、mAb 140 - 68 および 148 - 43 は、マウスを SD23983 のペプチド (pp1a の aa435 ~ 514) で免疫することにより産生された。ポリクローナル抗体 pAb - TF は、合成ペプチド CPKGVVTSVGE SV (nsp2 TF の C 末端 13 aa) を用いて GenScript により作製された。ウサギをこれらのペプチドで免疫し、抗体をウサギ免疫血清からアフィニティー精製した。

10

## 【0216】

免疫沈降および SDS - PAGE : PRRSV 感染 MARC - 145 細胞の全細胞溶解液を、RIPA バッファー [TNE バッファー (100 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 8.0、10 mM トリス - HCl、pH 7.5) 中、0.5% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム、1% SDS および 1% (v/w) NP - 40] に懸濁させた。非特異的バックグラウンドを低くするために、細胞溶解液を、PRRSV 特異的抗体を含有しないウサギの免疫前血清またはマウス腹水であらかじめ清澄化した。このあらかじめ清澄化した細胞溶解液に、プロテイン A - セファロース CL - 4B ビーズ (Pharmacia Biotech) と nsp2 特異的 mAb を加えた。

## 【0217】

一晚 4 にてロッカープラットフォーム上でインキュベートした後、上清を除去し、プロテイン A - セファロースビーズ / 抗体 / 抗原免疫複合体を RIPA バッファー (10 mM トリス - HCl、150 mM NaCl、1% NP - 40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム) で 3 回、および脱イオン H<sub>2</sub>O で 3 回洗浄した。次に、サンプルを 100 μl の 2 × Laemmli サンプルバッファー中、96 で 5 分間煮沸し、6% SDS - ポリアクリルアミドゲル (SDS - PAGE) での電気泳動によりタンパク質を分離した。

20

## 【0218】

ウエスタンブロット : SDS - PAGE により分離したタンパク質を、20% メタノールを含む トリス - グリシンバッファー中で 1 時間、電気転写によりニトロセルロース膜 (Protran) に転写した。転写後、4 で一晚、PBST (0.05% Tween 20 中、1 × PBS) および 5% 脱脂粉乳を用いて膜をブロッキングした。次に、この膜を一次 nsp2 特異的抗体および / または nsp2 TF 特異的抗体とともに (1 : 1000 希釈の mAb および 1 : 250 希釈の pAb - TF) 室温で 1 時間インキュベートした。PBST で洗浄した後、IR 色素 680 結合ヤギ抗ウサギ抗体および / または IR 色素 800 CW 結合ヤギ抗マウス抗体 (LI - COR Biosciences、NE) を加え、膜を室温でさらに 2 時間インキュベートした。プロットの可視化は、デジタルイメージングシステム (Odyssey 赤外線イメージングシステム ; LI - COR Biosciences、リンカン、NE) を用い、適当な励起波長下で行った。

30

## 【0219】

免疫蛍光顕微鏡 : nsp2 および TF の細胞内発現の検出のために、MARC - 145 細胞に PRRSV を、2% ウマ血清を含有する MEM 中、MOI 0.1 で感染させた。感染後 18 時間で、1 × PBS (pH 7.4) 中 4% パラホルムアルデヒド中で細胞を固定した。1 × PBS 中、0.1% トリトン X - 100 および 1% BSA で室温にて 15 分間透過処理を施した後、細胞を一次抗体 mAb 36 - 19 (1 : 1000 希釈) またはウサギ抗血清 Prot 00A (1 : 100 希釈) とともに 37 で 1 時間インキュベートした。1 × PBS で 3 回洗浄した後、FITC 結合ヤギ抗マウス抗体 (1 : 100 希釈 ; ICN Biomedicals)、または DyLight 549 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) (1 : 1000 希釈 ; KPL) を二次抗体として加え、37 で 1 時間インキュベートした。DAPI (4', 6' - ジアミノ - 2 - フェニルインドール 2 HCl) による核染色は、製造者 (Molecular Probes) よって推奨されてい

40

50

る通りに行った。細胞は、対物レンズ63倍を備えたZeiss LSM510共焦点蛍光顕微鏡を用いて画像化した。画像は、NIH Image/JおよびAdobe Photoshop 6.0ソフトウェアを用いて処理した。

【0220】

結果：

クーマシーブリリアントブルー染色により、100～150kDaの間にサイズの明らかな4つの高分子量タンパク質バンドが検出され、小さい方の2つの産物は明らかに存在量が少ない。さらに、低分子量の様々な産物が見られた(図3A)。

【0221】

高分子量バンドがnsp2関連産物に相当することを確認するために、nsp2N末端ドメインに特異的なmAb58-46、およびnsp2TF特異的pAb-TFを用いてウエスタンブロット解析を行った。4つの高分子量産物は全て、mAb58-46によって特異的に認識され(図3B)、それらがN末端配列を共通に持つはずであることを示したが、第2のタンパク質(標識nsp2TF)のみがpAb-TFによって認識された。第3のタンパク質(標識nsp2TF')は、pAb-TFを用いたウエスタンブロットでは検出されなかった。この産物はpAb-TFを用いたIPでは検出された(図7参照)ことから、これはこのタンパク質の存在量が低く、かつ/または抗体に対する親和性が低い結果であり得る。このタンパク質は、nsp2TFの改変形態であり得る。4つのうち最も小さい産物(標識nsp2N)は、同じ保存されているG\_\_GUU\_\_UUUモチーフにおけるマイナス1フレームシフトに由来する可能性がある。このようなフレームシフトは、このシフト部位に隣接するマイナス1/プラス2フレーム終止コドンが存在する(図6)ことから、即時終結をもたらすと思われる。

【0222】

単離株SD23983では、100～150kDaのサイズ範囲の複数の産物が検出された(図3C)。利用可能なpAb-TF(SD01-08TF産物に対して作製)は、これらのバンドのいずれとも交差反応しなかったが、この抗体を作製するために用いた13aaのペプチドが遺伝子型IIのウイルスでは保存されていないために、このことは驚くことではなかった。

【0223】

ウイルス感染細胞におけるnsp2TFの発現を、免疫蛍光顕微鏡を用いてさらに確認した。図4に示されるように、nsp2TFタンパク質はpAb-TFによって特異的に検出され、PRRSV感染細胞の核周囲領域に鮮明なフォーカスとして分布する。pAb-TFがnsp2TFを特異的に認識していたことを確認するために、細胞をnsp2特異的mAb36-19で二重標識した。ウイルス感染細胞の同じクラスターが両方の抗体によって検出された。しかしながら、感染細胞のnsp2特異的mAbおよびpAb-TFによる免疫蛍光標識は、nsp2mAbがよく知られているアルテリウイルス複製構造を標識し、pAb-TFは別のコンパートメントを染色するというように、オーバーラップしない標識パターンをもたらし、このことはnsp2とnsp2TFが異なる細胞コンパートメントに局在することを示唆している。

【0224】

実施例3：nsp2TF発現の質量分析的確認

バイオインフォマティクス解析は、フレームシフトの部位(G\_\_GUU\_\_UUU)および方向(マイナス2)を示唆したことから、これらの予測を確認するためにタンパク質配列解析を行った。上記に示されるように、PRRSVSD01-08感染およびmock感染MARC-145細胞溶解液を抗nsp2mAb36-19で免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、クーマシーブリリアントブルーで染色した(図3A)。推定nsp2TFバンドを含有するゲル切片を切り出し、トリプシンで消化し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC/MS/MS)により分析した。

【0225】

方法：

10

20

30

40

50

質量分析：n s p 2 T F タンパク質をウイルス感染細胞溶解液から、特異的抗体を用いて免疫沈降させた。ゲル電気泳動後、タンパク質をイソプロパノール固定液（25%イソプロパノール/10%酢酸 [v/v]）中で30分間固定し、その後、クーマシーブリリアントブルー-G-250（Bio-Rad；10%酢酸中0.006% [w/v]）クーマシーブリリアントブルー-G-250）で30分～1時間染色した。G-250染色ゲルを、青色のタンパク質バンドを伴った鮮明なバックグラウンドが現れるまで10%酢酸で脱染した。

#### 【0226】

対応するn s p 2 T F タンパク質バンドをゲルから切り出し、そのゲル切片を50%アセトニトリルで2回洗浄した。次に、このゲル切片をDTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化し、ProteinExpert DP消化ロボット（Bruker、ブレーメン、ドイツ）を用いてトリプシン（Worthington Chemical Corporation）で消化した。このトリプシン消化ペプチドをゲルから抽出して凍結乾燥させた。ペプチドを95/3/0.1 v/v/v 水/アセトニトリル/ギ酸に溶かした後、従前に記載されている通りに（Meiring et al, 2002）、a1100 HPLCシステム（Agilent Technologies）を用いたオンラインナノHPLC MS/MSにより分析した。カラムは全て自家充填した。ペプチドを15mmカラム（100μm ID；ReproSil-Pur C18-AQ、3μm、Dr. Maisch GmbH）上に10μl/分で捕捉し、50nL/分にて、20分で0.1%ギ酸中、0%から30%アセトニトリルへの勾配で、200mmカラム（50μm ID；ReproSil-Pur C18-AQ、3μm）へと溶出させた。このナノカラムの末端はチップ（ID約5μm）へと吸い出され、そこから溶出液が、MSとMS/MS取得を自動的に切り替えるデータ依存モードで作動する7テスラのLTQ-FT Ultra質量分析計（Thermo Electron）へとスプレーされた。

#### 【0227】

FT-ICRにて、ターゲット値3,000,000で分解能25,000として、フルスキャンMSスペクトルを取得した。ターゲット累積値50,000で分解能50,000として、FT-ICRの選択されたイオンモニタリングスキャンにより正確な質量測定を行うために、最も強い2つのイオンを単離した。選択されたイオンを、ターゲット値10,000で衝突誘起解離を使用するリニアイオントラップにてフラグメント化した。生データを、BioWorksバージョン3.2を用いてピークリストに変換した。BioWorksに提供されているPerlスクリプトであるdta閾値を用い、個々のデータファイルの全てを、1つのMascot Generic File（MGF）に変換した。ペプチドは、Mascotバージョン2.2.04（Matrix Science）を用い、以下の設定：消化酵素としてトリプシン、フィックスド・モディフィケーション（fixed modification）としてシステインのカルバミドメチル、バリアブル・モディフィケーション（variable modification）としておよびチオニンの酸化、ペプチド質量許容差2ppmおよびMS/MS許容差0.8Daで同定した。

#### 【0228】

結果：

n s p 2 およびn s p 2 T F が共通に持つN末端ドメイン由来の多くのペプチドの他、170aaのTF領域に特異的な4つのペプチドが同定された。これらのペプチドの1つLMTWVFLKはフレームシフト部位自体にわたっており、その配列はマイナス2PRFと完全に一致する（GUU\_\_UUUをVFと読み取った後；図5A～B）が、1アミノ酸短いシフト部位ペプチド（予測配列LMTWVFK）を生成すると思われる+1PRFとは一致しない。

#### 【0229】

フレームシフトペプチドの正確な同一性を確認するために、合成型のペプチドを作製し、同じLC/MS/MS分析を行った。この合成ペプチドのタンデム質量スペクトルは、ゲル切片で同定されたペプチドのスペクトルと同一であり、n s p 2 T F が実際にG\_\_G

UU\_\_UUUモチーフにおけるマイナス2PRFを介して翻訳されることが確認された(図5C)。この分析をPRRSV遺伝子型II単離株SD23983についても繰り返したところ、異なる配列(QVFLTSSPISLFS SHAFSTR)を有するマイナス2フレームシフトトリプシン処理ペプチドが予測された。この配列をSDS-PAGEゲルから切り出した推定nsp2TFバンド(図6)の質量分析で同定した。

#### 【0230】

実施例4：フレームシフト効率の評価

nsp2およびnsp2TFのフレームシフト効率およびターンオーバーをパルスチェイス標識実で調べた。MARC-145細胞にSD01-08ウイルスを感染させた。1時間、<sup>35</sup>S標識アミノ酸でパルス標識した後、組み込まれた標識を種々の期間(最大24時間)追跡し、タンパク質をnsp2-およびnsp2TF特異的抗体で免疫沈降させた。

#### 【0231】

方法：

放射性標識および放射性免疫沈降(RIP)分析：感染細胞におけるnsp2TF発現を分析するために、MARC-145細胞にPRRSV SD01-08をm.o.i. 0.1で23.5時間、2%FCSを含有するDMEM中で感染させた。細胞をPBSで洗浄した後、メチオニンおよびシステイン不含培地(Gibco)で30分間飢餓状態とした。24hpiにおいて、1ml当たり500μCi [<sup>35</sup>S]メチオニン/システイン(5:2)混合物(Perkin-Elmer)を含有するメチオニンおよびシステイン不含培地を用い、1時間パルスでタンパク質を標識した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、2mM(両方とも)の非標識メチオニンおよびシステインおよび2%FCSを含有するDMEM中、種々の追跡期間で(最大24時間)インキュベートした。

#### 【0232】

ORF1a発現を分析するために、従前に記載したように(Fuerst et al., 1986; Snijder et al., 1994)組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系を用い、プラスミドDNAをRK-13細胞で一時的に発現させた。トランスフェクション4時間後に、細胞をPBSで洗浄した後、メチオニンおよびシステイン不含培地で30分間飢餓状態とした。新たに合成されたタンパク質を、1ml当たり500μCiの [<sup>35</sup>S]メチオニン/システイン(5:2)混合物を用い、30分のパルスで標識した。細胞を2時間までの種々の追跡期間インキュベートした。細胞を溶解させ、上記のAbを用いて従前に記載したように(Li et al., 2012)RIP分析を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ホスフォイメージャースクリーンをゲルに曝した後、Typhoon Variable Mode Imager(GE Healthcare)を用いてスキャンした。画像解析およびバンド強度の定量は、ImageQuant TLソフトウェア(GE Healthcare)を用いて行った。

#### 【0233】

結果：

図7Aに示されるように、この分析は、見かけの分子量がnsp2およびnsp2TFの分子量よりも約10kDa小さい、2つのより小さい産物(nsp2'およびnsp2TF')として表示)の存在を明らかにした。追跡中のその消失は、nsp2'がnsp2の直接的な前駆体であることを示唆し、その若干のサイズ増およびゲル中でのよりヘテロな移動(より後の時点のC0hと比較)のよって見て取れるように、それ自体も、追跡期間中にさらなる改変を受けると思われた。nsp2TF'の潜在的前駆体状態は、この産物の量が追跡中で多少とも不安定であり、その間にnsp2TFおよびnsp2TF'の両バンドはダブレットに変換されとも思われたことから、ほとんど明らかにならなかった。タンパク質のターンオーバーについては、追跡期間中、nsp2TFの量がnsp2の量よりもはるかに急速に低下した。これは、推定マイナス1フレームシフト産物であるnsp2Nに関していっそうより顕著であったが(上記、図3参照)、これは本明細書に記載される種々のnsp2形態の最小の安定性であると思われる。C0hサンプルにおけ

10

20

30

40

50

る顕著な95 kDa産物を含め、いくつかのより小さなnsp2特異的産物が見られた。

【0234】

フレームシフト効率の最も正確な評価を得るために、本発明者らは、パルス標識直後のnsp2+nsp2'、nsp2TF+nsp2TF'、およびnsp2Nバンドへの組み込みを測定し(レーンC0h)、これらの数値を種々のタンパク質のメチオニンおよびシステイン含量に関して補正した。これらの測定値は、それぞれおよそ20%および8%のマイナス2および推定マイナス1フレームシフト効率を示唆した。見られた種々の産物の安定性と組み合わせると、これらの効率は一般的にウエスタンプロットデータ(図3)と一致すると思われる、nsp2TFおよびnsp2Nでは、従って、これらの産物の比較的速いターンオーバーのためにフレームシフト効率は過小評価されていると思われる。

10

【0235】

フレームシフトイベントを研究するためのもう1つの系として、本発明者らは、RK-13細胞におけるPRRSV ORF1aの一時的発現を用いた。T7プロモーター由来の全長ORF1a発現ベクター(pL1a)を構築し、nsp2、nsp2TF、およびnsp2Nの合成を、組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系(Fuerst et al., 1986)でモニタリングした。トランスフェクト細胞で合成されたタンパク質を30分放射性標識した後、種々の産物の運命を最大2時間モニタリングした(図7B)(なお、この最大時間はワクシニアウイルスにより誘導される細胞病理を考慮したものである)。nsp2'を除き、図7Aに記載された産物は全て同定できたが、存在量、外観、および安定性には明らかな違いがあった。例えば、追跡期間後期のnsp2の極端な不均質性、nsp2TF'のはるかに速いターンオーバー、および95 kDaの未同定のnsp2特異的産物のほぼ完全な欠如が注目される。

20

【0236】

これらのデータは、PRRSV ORF1a配列の翻訳は、感染細胞で見られるフレームシフトイベントを再現するに十分であることを明らかに示す。それでもやはり、感染MARC-145細胞での実験(図7A)と比較すると、異なる細胞株、PRRSV複製の欠如、およびワクシニアウイルス感染の結果はそれぞれ、この発現系におけるフレームシフト効率および種々のnsp2関連産物の運命に影響を及ぼした可能性がある。

【0237】

実施例5：フレームシフトに及ぼすG\_\_GUU\_\_UUUおよびCCCAxCUCCモチーフの影響

30

CCCANCUCCモチーフ(上記、図2A参照)がG\_\_GUU\_\_UUU部位におけるフレームシフトの刺激に役割を果たすかどうかを検討するために、本発明者らは、CCCANCUCCモチーフが破壊された2つの突然変異体(CC1およびCC2;図2B)を作出した。

【0238】

CC1突然変異はnsp2フレームでは同義であり、一方、CC2突然変異はより徹底的にこのモチーフを破壊するが、nsp2に関しては同義でない置換を含む。対照として、さらに2つの突然変異体を構築した(SSおよびIFC;図2B)。SS突然変異体は、このシフト部位に2つの突然変異を含み(G\_\_GUU\_\_UUUがG\_\_GUA\_\_UUCに変異)、従って、nsp2のみを発現すると思われる。

40

【0239】

フレームシフト産物がゲルを移動する位置をマークするために、シフト部位を同義的に変異させ、余分な2ntを挿入してnsp2TFリーディングフレーム(G\_\_GUU\_\_UUUがG\_\_GUG\_\_UUC\_\_UUに変異)を強制発現するようにしたインフレーム対照であるIFCを構築した。この突然変異体はnsp2TFのみを作り出すと思われる。突然変異体pL1a発現構築物を作成し、組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系で、野生型(WT)対照とともに発現させた。

【0240】

方法：

50

全長または部分的ORF1aの発現のためのプラスミド：発現プラスミドpL1aを作出するために、EAV pL1aのプラスミド(Snijder et al., 1994)を用いた。まず、EAV ORF1a配列をPRRSV ORF1a (PRRSV SD01-08ゲノムのaa 1~2379)に置換した。この構築物は、PRRSV配列の上流に、T7プロモーターと1コピーの脳筋炎ウイルス内部リボソーム侵入部位を含む。T7ターミネーター配列は、PRRSV配列の下流に挿入された。PRRSV ORF1aは、クローニングおよび部位特異的突然変異誘発を助けるために改変した。内部NcoI制限酵素部位を不活性化するために、C<sub>1878</sub>からG、A<sub>4449</sub>からTおよびC<sub>6000</sub>からGへの翻訳サイレント突然変異セットを導入した。翻訳開始コドンを含むNcoI制限部位(CCATGG)は、PRRSV ORF1a特異的残基をコードする配列の上流に作出した。

10

## 【0241】

PRRSV pL1a骨格を用い、ORF1aN末端切断型またはC末端切断型(表1)を、5'末端および3'末端でNcoIおよびNotI制限酵素部位に隣接するプライマー対を用い、対応する領域のRT-PCR増幅により構築した。PCR産物をNcoIおよびNotI制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化したpL1aプラスミドに連結した。

## 【0242】

部位特異的突然変異誘発：個々の核点突然変異を発現ベクターpL1aまたはPRRSV全長cDNAクローンプラスミドpSD01-08(Fang et al., 2006)のnsp2領域に導入した。合成遺伝子によって作製されたKO2およびnsp1 cc-2突然変異体を除き、全ての突然変異を部位特異的突然変異誘発により導入した。簡単に述べれば、シャトルプラスミドpTOPO-ESを、ゲノム配列(SD01-08ゲノムのnt3365~6990)をPCR(登録商標)-Blunt II-TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen)にクローニングすることにより作出した。次に、特異的突然変異をQuick-Change部位特異的PCR突然変異誘発キット(Stratagene)によってpTOPO-ESに導入した。DNAシーケンシングによる確認の後、特異的突然変異を有するフラグメントを制限酵素EcoRVおよびSgrAIで消化し、同じ制限酵素で消化したpSD01-08またはpL1aプラスミド骨格に連結した。

20

30

## 【0243】

一時的タンパク質発現および放射性免疫沈降(RIP)分析：プラスミドDNAを、組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系(Fuerst et al., 1986)を用いてRK-13細胞で一時的に発現させた。ワクシニアウイルス感染後5~8時間で、トランスフェクト細胞で合成されたタンパク質を、メチオニン不含培地と100μCiの[<sup>35</sup>S]-メチオニン/mlを用いて標識した。細胞を溶解させ、RIP分析を従前に記載した通りに行った(Snijder et al., 1994)。RIPは、TFタンパク質に特異的なウサギ抗血清またはnsp2とTFタンパク質の両方を認識する抗体を用いて行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ホスフォイメージャースクリーンをゲルに曝した後、Typhoon Variable Mode Imager(GE Healthcare)を用いてスキャンした。画像解析およびバンド強度の定量は、ImageQuant TLソフトウェア(GE Healthcare)を用いて行った。

40

## 【0244】

結果：

図7Cに示されるように、WT pL1aはnsp2とnsp2TFの両方を産生し、後者のタンパク質の発現はpAb-TFを用いたIPにより確認した。予想されたように、このIFC突然変異体は、pAb-TFおよびmAb58-46の両方によって検出した場合に、nsp2TFのみを産生した。CCCANCUCCモチーフが破壊されているCC1およびCC2突然変異体はnsp2を産生したが、nsp2TFは検出されなかった。興味深いことに、シフト部位突然変異体SSは、なお少量の(ただし、大幅に減少し

50

ている)のマイナス2フレームシフトを許容した。これらの結果は、WT効率でのリボソームフレームシフトにはG\_\_GUU\_\_UUUシフト部位と下流CCCANCCUCCモチーフの両方が必要とされることを示す。

#### 【0245】

実施例6：効率的フレームシフトにはNsp1 発現が必要とされる

マイナス2PRFに必要な配列をさらに検討した。T7プロモーターを有する末端切断型ORF1a発現構築物のパネルを作製し(表1)、nsp2およびnsp2TFの発現を組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系(Fuerst et al., 1986)で試験した。トランスフェクト細胞で合成されたタンパク質を放射性標識した後、nsp2TFおよびnsp2の発現を、pAb-TF(nsp2TFを認識する)またはmAb58-64およびpAb-nsp2-3(nsp2とnsp2TFの両方を認識する)を用いた放射性免疫沈降(RIP)により分析した。フレームシフト刺激がnsp1タンパク質またはその基礎にあるRNA配列を必要とするかどうかをさらに調べるために、本発明者らは、フレームシフトがnsp1発現によりトランスで誘導され得るかどうかを調べた。

#### 【0246】

方法：

全長または部分的ORF1aの発現のためのプラスミド：PRRSV pL1a骨格を用い、ORF1aの5'末端または3'末端切断(表1)を、それらの5'末端および3'末端でNcoIおよびNotI制限酵素部位に隣接するプライマー対を用い、対応する領域のRT-PCR増幅により構築した。PCR産物をNcoIおよびNotI制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化したspL1aプラスミドに連結した。プラスミドpLnsp1cc-2は、コードされるnsp1アミノ酸配列は完全にそのままに維持しつつ、nsp1コード領域のほとんど全てのコドンと同義的に変異させることによって構築した(図9A)。改変したnsp1コード配列(nsp1cc)を合成遺伝子として合成し、nsp2コード領域と再び融合し、構築物pLnsp1cc-2を作出した。

#### 【0247】

一時的タンパク質発現および放射性免疫沈降(RIP)分析：組換えワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系(Fuerst et al., 1986)を用い、プラスミドDNAをRK-13細胞で一時的に発現させた。ワクシニアウイルス感染後5~8時間で、トランスフェクト細胞で合成されたタンパク質を、メチオニン不含培地と100μCiの[<sup>35</sup>S]-メチオニン/mlを用いて標識した。細胞を溶解させ、RIP分析を従前に記載した通りに行った(Snijder et al., 1994)。RIPは、nsp2TFタンパク質に特異的なpAb-TFまたはnsp2とnsp2TFの両方を認識するmAbを用いて行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEにより分離した。ホスフォイメージャースクリーンをゲルに曝した後、Typhoon Variable Mode Imager(GE Healthcare)を用いてスキャンした。画像解析およびバンド強度の定量は、ImageQuant TLソフトウェア(GE Healthcare)を用いて行った。

#### 【0248】

結果：

図8Aに示されるように、nsp2およびnsp2TFは両方とも、全長ORF1a構築物をトランスフェクトした細胞由来の溶解液で検出されたが、nsp2TFは構築物pLnsp2-8およびpLnsp2-3をトランスフェクトした細胞由来の溶解液でほとんど検出されず、このことは、PRFに必要な要素がORF1aのnsp1コード領域内にあること示唆する。N末端またはC末端に末端切断を有するnsp1~3タンパク質を発現する構築物の別のセットを作製した。RIP結果は、nsp1コード領域および/またはnsp3コード領域を欠く構築物がpL1aと同量のnsp2TFを発現し続けたことを示した。これに対して、nsp1コード領域を欠く構築物はnsp2を産生したが、有意な量のnsp2TFは検出されなかった(図8B)。このことは、nsp2コード領域内の約2.5kb下流にあるG\_\_GUU\_\_UUUモチーフにおける効率的リボソームフレームシフトにnsp1またはnsp1をコードするRNA配列が必要とされる

ことを示す。

【0249】

図9Bに示されるように、nsp2TFは、nsp2を発現するもの(pLnsp2)とnsp1を発現するもの(pLnsp1)の別のプラスミドを共トランスフェクトした細胞でも検出された。これは、nsp2TF発現のnsp1刺激がトランスで働き得ることを示す。この効果がnsp1コードRNA配列ではなくnsp1タンパク質によって媒介されたものかどうかを調べるために、ほとんど全てのコドンが同義的に変異された(ただし、稀なコドンは避ける)、劇的に変更されたnsp1コード配列を合成し、nsp2コード配列と再び融合して構築物pLnsp1cc-2を作出したが、この構築物は、普遍のnsp1タンパク質配列を発現するが、その基礎にあるnsp1コードRNA配列は、マイナス2PRFに關与する可能性のある任意の機能上重要な一次または二次RNA構造要素を破壊すると予想される程度に劇的に変更されたものである(図9A)。pLnsp1cc-2の発現をワクシニアウイルス/T7ポリメラーゼ発現系で試験した。比較のため、WT構築物pLnsp1-2およびインフレーム対照pL1a-IFC(nsp1-nsp2TFのみを発現する;下記参照)を分析に含めた。ウエスタンブロット解析は、nsp2TFがpLnsp1cc-2をトランスフェクトした細胞で効率的に発現されたことを示し(図9C)、このことは、フレームシフト刺激がnsp1タンパク質を必要とするが、その基礎にあるRNA配列は必要としないことを強く示唆する。

10

【0250】

20

【表 1】

表 I : 構築物の一覧

構築物	TF 発現	注釈	配列番号
pL1a	有	ワクシニア/T7 系における WT ORF1a の発現	配列番号 1
pLnsp2-8	無	ワクシニア/T7 系における nsp2~nsp8 の発現	配列番号 3
pLnsp1-2	有	ワクシニア/T7 系における nsp1 $\alpha$ ~nsp2 の発現	配列番号 4
pLnsp1 $\beta$ -2	有	ワクシニア/T7 系における nsp1 $\beta$ ~nsp2 の発現	配列番号 5
pLnsp1 $\beta$ cc-2	有	ワクシニア/T7 系における合成 nsp1 $\beta$ ~nsp2 の発現; nsp1 $\beta$ の全てのコドンが同義的に突然変異	配列番号 6
pLnsp2	無	ワクシニア/T7 系における nsp2 の発現	配列番号 9
pLnsp1-3	有	ワクシニア/T7 系における nsp1 $\alpha$ ~nsp3 の発現	配列番号 10
pLnsp1 $\beta$ -3	有	ワクシニア/T7 系における nsp1 $\beta$ ~nsp3 の発現	配列番号 11
pLnsp2-3	無	ワクシニア/T7 系における nsp2~nsp3 の発現	配列番号 12
pLnsp2-3-IFC	有	インフレーム対照; ワクシニア/T7 系における nsp2TF のみの発現	配列番号 13
pLnsp1 $\beta$	無	ワクシニア/T7 系における nsp1 $\beta$ の発現	配列番号 15
pL1a-IFC	有	インフレーム対照; ワクシニア/T7 系における nsp2TF のみの発現	配列番号 16

10

20

30

【 0 2 5 1 】

pL1a-K01	無	TF ノックアウト突然変異体 1; TF 内の未成熟終止コドン; ワクシニア/T7 系におけるより小さいTF の生成	配列番号 17
pL1a-K02	無	TF ノックアウト突然変異体 2; 未成熟終止コドンおよびフレームシフトカセットの破壊	配列番号 19
pL1a-SS	無	フレームシフト部位突然変異体; ワクシニア/T7 系における nsp2 のみの発現	配列番号 21
pL1a-CC1	無	CCCAxCUC モチーフの破壊; ワクシニア/T7 系における nsp2 のみの発現	配列番号 23
pL1a-CC2	無	CCCAxCUCC モチーフの破壊; ワクシニア/T7 系における nsp2 のみの発現	配列番号 25
pSD01-08-IFC	有	インフレーム対照; 生存ウイルスは生成されない	配列番号 27
pSD01 08-K01	無	TF ノックアウト突然変異体 1; 生存ウイルスは生成されない	配列番号 31
pSD01 08-K02	無	TF ノックアウト突然変異体 2; 生存ウイルスは生成されない	配列番号 32

10

20

## 【 0 2 5 2 】

実施例 7 : N s p 1 内の保存性の高い G K Y L Q R R L Q モチーフはマイナス 2 P R F のトランスアクチベーターとしてのその機能のために重要である

本発明者らは、さらに、n s p 1 内の、そのトランスアクチベーター機能のために重要である潜在的ドメインをマッピングした。部位特異的 n s p 1 突然変異体のパネルを構築した (表 2)。それらはタンパク質表面接近性予測 (Emini et al., 1985)、親水性分析 (Hopp & Woods, 1981) および n s p 1 の結晶構造 (Xue et al., 2010) に基づいて設計された。タンパク質表面に露出していると予測された保存されている親水性アミノ酸を突然変異誘発の標的とした (図 10 A)。二重突然変異を有する種々の n s p 1 - 2 突然変異体 (表 2) を、まず、ワクシニア/T7 ポリメラーゼ発現系を用いて調べた。G K Y L Q R R L Q モチーフ内の潜在的 R N A 結合残基をバイオインフォマティクス解析に基づいて予測した。

30

## 【 0 2 5 3 】

【表 2】

構築物	突然変異	WT コドン	突然変異体コドン	ウイルス株
E41A/E43A	E-41→A	GAG	GCG	1 型
	E-43→A	GAA	GCA	
E68A/E71A	E-68→A	GAG	GCG	1 型
	E-71→A	GAG	GCG	
K130A/R134A	K-130→A	AAG	GCG	1 型
	R-134→A	CGC	GCC	
K124A/R128A	K-124→A	AAG	GCG	2 型
	R-128→A	CGG	GCG	
C96S	C-96→A	TGC	AGC	1 型

10

## 【 0 2 5 4 】

## 方法：

1 型 PRRSV 由来の nsp1 - 2 コード領域 (SD01 - 08 ゲノムの 763 ~ 4559 nt) および 2 型 PRRSV 由来の nsp1 - 2 コード領域 (SD95 - 21 ゲノムの 731 ~ 4927 nt) を、それぞれ PRRSV SD01 - 08 (EU) および SD95 - 21 (NA) のゲノム RNA から RT-PCR 増幅した。nsp1 - 2 領域の PCR 産物を pL1a プラスミド (Snijder et al., 1994) にクローニングし、pL-EU-nsp1 - 2 および pL-NA-nsp1 - 2 と呼称した。特異的突然変異を、Quick Change (商標) 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) を製造者の説明書に従って用いる部位特異的突然変異誘発によって導入した。組換えワクシニアウイルス/T7 ポリメラーゼ発現系 (Fuerst et al., 1986) を用い、プラスミド DNA を RK-13 細胞で一時的に発現させた。トランスフェクト細胞で合成されたタンパク質を免疫沈降およびウエスタンブロット解析により検出した。

20

## 【 0 2 5 5 】

nsp2 TF 発現に干渉する K130A および R134A 突然変異を、Quick Change (商標) 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) を用いて、p3xFLAG-nsp1 の nsp1 領域に導入した。nsp1 内の潜在的 RNA 結合残基を、BindN program world wide web bioinfo.ggc.org/bindn を用いて検索した。

30

## 【 0 2 5 6 】

## 結果：

図 11 に示されるように、WT nsp1 - 2 (1 型 PRRSV) は nsp2、nsp2 TF および nsp2 N を産生した。E41A/E43A および E68A/E71A 突然変異は、これらの nsp2 関連タンパク質の発現に影響を及ぼさなかった。これに対し、nsp2 TF および nsp2 N は、K130A/R134A 突然変異体を発現する細胞では検出されなかった。1 型 PRRSV の nsp1 の K130 および R134 残基は、2 型 PRRSV の nsp1 では K124 および R128 に相当する。本発明者らは、2 型 PRRSV 株 SD95 - 21 由来の nsp1 - 2 を用いてこの実験を繰り返した。結果は、1 型ウイルスで得られたものと一致した。WT nsp1 - 2 の発現は対応するフレームシフト産物を生成したが、K124A/R128A 突然変異体を発現する細胞では、nsp2 TF は全く検出されず、nsp2 N は低いレベルが検出されたに過ぎなかった。

40

## 【 0 2 5 7 】

2 型 PRRSV 由来の nsp1 の公開されている結晶構造 (Xue et al., 2010) に基づけば、K124 および R128 残基はタンパク質表面に露出している可能性がある (図 1

50

2)。本発明者らは、さらに、この領域における潜在的な機能モチーフを検索したところ、結果は、これらの2つの残基が、nsp1の他の領域と比べて最高の親水性値を有するモチーフGKYLQRR L Q (Kolaskar & Tongaonkar, 1990)上に位置することを示した(図10A)。GenBankで利用可能な212のPRRSV単離株由来のnsp1配列のアミノ酸配列アラインメントから、GKYLQRR L Qモチーフが、1型および2型の両ウイルスを含め、利用可能な全てのPRRSV株の間でよく保存されていることが明らかになった(図10B)。さらに興味深いことに、アルテリウイルスの種々の種間のnsp1のアミノ酸配列アラインメントから、このGKYLQRR L QモチーフはLDVおよびSHFVでもよく保存されていることが示された(図13)。4つの遠縁アルテリウイルスのうち3つにおけるその保存は、nsp1の機能におけるGKYLQRR L Qモチーフの重要な役割を示唆する(4つ目のアルテリウイルスEAVはnsp2TFを発現しないことに留意されたい)。次に、本発明者らは、nsp1においてRNA結合残基を予測するためにBindNプログラムを用いた。この結果は、GKYLQRR L Qモチーフが5つ(1型ウイルス)または4つ(2型ウイルス)の予測されるRNA結合残基を含むことを示した(図12)。

10

#### 【0258】

実施例8：細胞培養におけるPRRSV複製に及ぼすnsp2TF発現不活性化の影響

nsp2TF発現および/またはある割合のリボソームのORF1aからの迂回がウイルス複製に適切であるかどうかを検討するために、nsp2TF発現を部分的にまたは完全にノックアウトするように3つの突然変異体を構築した(KO1、KO2およびKO3; 図2Bおよび2C)。KO1突然変異体は、170コドンのTF ORFのコドン101と103に2つの終止コドンが挿入されたために末端切断型nsp2TFタンパク質を産生する。結果として、この末端切断型nsp2TFはC末端pAb-TFエピトープを欠く。KO2突然変異体は、TF ORFへの終止コドンの導入の他、フレームシフト部位および下流CCCANCUCCモチーフを破壊する9つの突然変異を含む。この突然変異体は、フレームシフトシグナルを完全にノックアウトすることを意図し、nsp2のみを発現すると予想される。KO1およびKO2は、WTウイルスと、それぞれ2および9ヌクレオチドの置換で異なり、それらにはnsp2アミノ酸配列に影響を及ぼすものはない。KO3は、nsp1突然変異K130A/R134A(1型PRRSV)またはK124A/R128A(2型PRRSV)を含む。

20

30

#### 【0259】

まず、1型PRRSVからのこれらの突然変異体をORF1a発現系で試験し、予想されたタンパク質の合成を確認した。次に、これらの突然変異をさらに、1型(SD01-08)および2型(SD95-21)ウイルスの全長cDNAクローンに導入した。

#### 【0260】

方法：

部位特異的突然変異誘発：個々の各点突然変異を、発現ベクターpL1aの1型PRRSV nsp2領域、またはPRRSV全長cDNAクローンプラスミドpCMV-SD01-08(1型PRRSV、Fang et al., 2006)およびpCMV-SD95-21(2型PRRSV、GenBank KC469618)に導入した。遺伝子合成によって作出されたKO2を除き、全ての突然変異は部位特異的突然変異誘発により導入した。簡単に述べれば、シャトルプラスミドpTOPO-ESを、pCR(登録商標)-Blunt II-TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen)にゲノム配列をクローニングすることにより作出した。次に、特異的突然変異をQuick-Change部位特異的PCR突然変異誘発キット(Stratagene)によってpTOPO-ESに導入した。DNAシーケンシングによる確認の後に、特異的突然変異を有するフラグメントを制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化した対応するプラスミド骨格に連結した。

40

#### 【0261】

組換えウイルスのレスキュー：FuGENE HD試薬(Roche, CA)を用い、製造者の説明書に従って、全長PRRSV cDNAまたはその突然変異体を有するプラ

50

スミドを用いてBHK-21細胞をトランスフェクトした。このウイルスをレスキューするため、トランスフェクション後24～48時間に得た細胞培養上清をMARC-145細胞で継代した。感染性ウイルスのレスキューは、感染後48～72時間でIFAによって確認した。TF/nsp2領域に導入された突然変異の安定性をモニタリングするために、組換えウイルスをMARC-145細胞で連続20回継代した。20代目の組換えウイルスに感染させた細胞から、QiaAmpウイルスRNAキット(Qiagen、MD)を用いてRNAを抽出した。突然変異を含むゲノム領域をRT-PCRにより増幅し、アイオワ州立大学DNAシーケンシング施設(Ames、IA)で配列決定を行った。

#### 【0262】

増殖速度およびブランクアッセイ：増殖速度は、MARC-145細胞に2代目のWTウイルス、KO1、KO2またはKO3突然変異体をMOI 0.1で感染させることによって調べた。感染後(hpi)12、24、36、48、60、および72時間で感染細胞から上清を回収し、従前に記載したように(Sun et al., 2012)蛍光フォーカスアッセイによってウイルス力価を測定した。ウイルス力価は、蛍光フォーカス単位/ml(FFU/ml)の数値として表した。突然変異体および親ウイルスのブランク形態をブランクアッセイにより比較した。6ウェルプレート内のコンフルエント細胞単層を親ウイルスまたは突然変異体ウイルスの10倍連続希釈液で感染させた。感染後2時間で、培地を除去し、2%寒天(SeaPlaque Agrose、Lonza、ロックランド、ME)を重層した。37℃で4日のインキュベーションの後、細胞を0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

#### 【0263】

##### 結果：

まず、1型PRRSVの突然変異体をORF1a発現系で試験し、予想されるタンパク質の合成を確認した。実際に、TF ORFに未成熟終止コドンを含む突然変異体KO1のフレームシフト産物はpAb-TFを用いて検出できず、これはC末端エプトープ領域の末端切断によって説明される。しかしながら、mAb58-64によるIPでは、nsp2TFおよびnsp2TF'の末端切断型の合成(図7C、矢印)および全長nsp2とフレームシフト産物の間で同等の比が明らかになった。他方、KO2に導入された突然変異はフレームシフトを消失させることが分かったと同時に、はるかに多量の全nsp2が産生された(図7C)。図11に示すように(実施例8)、nsp1領域に導入されたK130A/R134A(1型ウイルス)またはK124A/R128A(2型ウイルス)もまたフレームシフトを消失させた。

#### 【0264】

次に、KO1、KO2およびKO3突然変異を両遺伝子型のPRRSV全長cDNA感染性クローンに導入し、生存組換えウイルスが得られ得るかどうかを判定した。図14に示されるように、生存組換えウイルスのパネルを作製したが、全ての突然変異体がWTウイルスよりも明らかに小さいブランクを生じた。増殖速度分析は、全ての突然変異体の複製がMARC-145細胞において障害されたことを一貫して示し、これらの突然変異体のピーク力価は、WTウイルスのピーク力価の100分の1～50分の1であった。

#### 【0265】

実施例9. PRRSVの脱ユビキチン化およびdeISGylation能に及ぼすnsp2TF発現不活性化の影響

図4に示されるように、PRRSV感染細胞において、nsp2TFは、全長nsp2とは異なる細胞の場所、おそらくは、nsp2が位置し、また、ウイルスRNA合成が関与する改変されたER膜ではなく、細胞外経路に向けられることが分かった。この結果は、nsp2およびnsp2TFはウイルス複製および/または免疫回避において異なる機能を持ち得ることを示唆する。nsp2およびnsp2TFタンパク質は共通のN末端PLP2ドメインを有する。PLP2ドメインをトランスフェクト細胞で単独で発現させた場合、PLP2は細胞の生得免疫応答との拮抗に関与する脱ユビキチン化(de-Ub)およびde-ISGylation機能を有すると判定された(Sun et al., 2010, 2012;

10

20

30

40

50

van Kasteren et al., 2012, 2013)。本発明者らは、ユビキチン化アッセイおよび I S G y l a t i o n アッセイを行って、K O 1、K O 2 および K O 3 組換えウイルスの d e - U b および d e - I S G y l a t i o n 能を W T ウイルスと比較した。

【0266】

方法：

I S G 1 5 コンジュゲーション ( I S G y l a t i o n ) アッセイ：M A R C - 1 4 5 細胞に P R R S V S D - 9 5 - 2 1 W T または n s p 2 T F ノックアウト突然変異体 K O 1、K O 2、または K O 3 を感染させた。感染後 2 4 時間で、細胞を I F N - で刺激した。刺激後 1 2 時間で、この細胞単層を、ウエスタンブロット解析向けに、L a e m m l i サンプルバッファーに溶解させた。I S G 1 5 発現の検出のために、ニトロセルロース膜を m A b F - 9 またはウサギポリクローナル抗体 H - 1 5 0 (両方とも S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y、サンタクルス、C A) でプロービングした。m A b M 2 ( S i g m a、セントルイス、M O) を用いて、F l a g タグを有するタンパク質の発現を検出した。

10

【0267】

ユビキチン化アッセイ：B H K - 2 1 細胞に H A タグを有するユビキチンを発現する p c D N A 3 . 1 - H A - U b 0 . 5 μ g および 2 型 P R R S V S D - 9 5 - 2 1 の全長 c D N A クローンを含む p C M V - S D 9 5 - 2 1 2 μ g をトランスフェクトした。トランスフェクションは、F u G E N E H D 試薬 ( R o c h e ) を製造者の説明書に従って用いて行った。トランスフェクション後 2 4 時間で、細胞をウエスタンブロット解析のために採取した。m A b H A - 7 ( S i g m a、セントルイス、M O) を用いて、H A タグを有するタンパク質の発現を検出した。P R R S V n s p 1 の発現は従前に記載したような m A b 2 2 - 2 8 ( L i e t a l . , 2 0 1 2 ) によって検出し、- チューブリン発現を検出するために m A b H 3 ( L a m b d a B i o t e c h、セントルイス、M O) を用いた。

20

【0268】

結果：

I S G y l a t i o n アッセイの結果を図 1 5 に示す。W T ウイルスに感染した細胞では、I S G y l a t e d タンパク質のレベルに明らかな低下が見られ、これは W T ウイルスが細胞タンパク質の I S G y l a t i o n を打ち消す能力を有することを示す ( 図 1 5 A )。これに対して、3 つの突然変異体 K O 1、K O 2 および K O 3 は全て、n s p 2 T F 発現のノックアウトが n s p 2 の発現レベルに影響を及ぼさなかった場合であって、I S G y l a t i o n に干渉するそれらの能力をほとんど喪失していた ( 図 1 5 B )。次に、本発明者らは、これらの n s p 2 T F ノックアウト突然変異体の d e - U b 能を試験した。B H K - 2 1 細胞に、H A タグを有するユビキチンを発現するプラスミドと W T P R R S V またはその突然変異体の全長 c D N A を含むプラスミドを共トランスフェクトした。エンティプラスミドベクターを対照として用いた。図 1 6 に示されるように、W T P R R S V はユビキチンコンジュゲートタンパク質の発現レベルの低下を招いたが、n s p 2 T F ノックアウト突然変異体は、細胞タンパク質のユビキチン化に干渉する能力の障害を示した。これらのデータを考え合わせると、細胞タンパク質の I S G y l a t i o n およびユビキチン化プロセスに干渉するためには n s p 2 T F が重要であることが示唆される。

30

40

【0269】

実施例 10 . プタチャレンジモデルにおける n s p 2 T F ノックアウト突然変異体の i n v i v o 特性評価

2 つの組換えウイルス v S D 9 5 - 2 1 - K O 1 および v S D 9 5 - 2 1 - K O 2 をナーサリープタモデルにおいて試験した。n s p 2 T F 欠損突然変異体によって誘導された防御を、プタに相同ウイルス S D 9 5 - 2 1 で抗原チャレンジを行うことにより評価した。この実験計画を表 3 に示す。感染防御免疫の程度は、肺病変スコアの測定、ならびにウイルス血症、ウイルス中和抗体、生得免疫および細胞性免疫のサイトカイン応答のレベル

50

に基づいて評価した。

【0270】

【表3】

表3 動物試験計画 (\*dpi:免疫後日数)

群*	ワクチン構築物 (0 dpv)	チャレンジウイルス (28 dpv)	血液サンプルの採取(dpv)
1 (n = 5)	Mock	Mock	0、7、14、21、28、31、35、41
2 (n = 8)	Mock	SD 95-21	0、7、14、21、28、31、35、41
3 (n = 8)	野生型	SD 95-21	0、7、14、21、28、31、35、41
4 (n = 8)	K01	SD 95-21	0、7、14、21、28、31、35、41
5 (n = 8)	K02	SD 95-21	0、7、14、21、28、31、35、41

\*群2~5のブタからの3個体は10 dpvにおいて急性感染の際の肉眼的病状を評価するために安楽死させた。

【0271】

方法：

動物 / チャレンジ群：動物およびチャレンジ群は表3に示されるように割り付けた。突然変異体またはWTウイルス(2 ml、 $1 \times 10^6$  FFU/ml)を用いてブタを免疫した。細胞培養培地を陰性対照として用いた。ワクチン接種後(dpv)10日目に、各群3個体のブタを急性感染後の肉眼的病状の評価のために安楽死させた。残りのブタ(n = 5)は、28 dpvにおいて、SD 95-21ウイルス(2 ml、 $1 \times 10^7$  FFU/ml)で抗原チャレンジを行い、41 dpvにおいてブタを安楽死させた。血液サンプルを定期的に採取した(表3)。剖検の際に肉眼的肺病変を評価した。

【0272】

ウイルス量の定量：ウイルスRNAの検出およびウイルス量の決定のために、血清および組織サンプルを、PCRおよびウイルス力価測定を用いて調べた。

【0273】

体液性免疫、生得免疫および細胞性免疫の測定：ワクチン候補によって誘導された生得免疫および細胞性免疫を測定するために、PBMCを単離し、死滅させたチャレンジウイルス抗原PHA(陽性対照)、または細胞培養培地(陰性対照)で刺激した。本発明者らの従前の刊行物(Invitrogen; Lawson et al., 2010, 2012)に記載のとおりブタサイトカインFMAを用い、PBMC培養上清および血清サンプルを、生得免疫応答および細胞性免疫応答に関して分析した。体液性抗体応答は、本発明者らが従前に記載したように(Fang et al., 2006, 2008; Lawson et al., 2012)、IDEXX Herd Check(登録商標)PRRS 3XR ELISAおよびウイルス中和アッセイを用いて評価した。

【0274】

Nsp2TFノックアウト突然変異体ブタにおいて弱毒化された

これらのnsp2エプトプ欠失突然変異体がin vivoで複製したかどうかを判定するために、7~28 dpvにおいて採取した血清サンプルを、MARC-145細胞におけるウイルス単離のために用いた。3、7および14 dpvにおいて採取された群3~5のブタの血清サンプルからウイルスが回収されたが、このことは、ブタにおける突然変異体ウイルスの活発な複製を示している。さらに、ウイルス血症の量をリアルタイムqRT-PCRによって定量した(図17A)。2種類のnsp2TFノックアウト突然変異体感染ブタは、7 dpvにおいて、野生型ウイルスに感染したブタよりも有意に低いウイルス量を持っていた。3、14および28 dpvにおいて、ウイルス量の平均値は、個々のブタの変動が大きいため有意差はなかったが、平均ウイルス量は、突然変異体感染ブタの全てで野生型ウイルスに感染したブタに比べて一貫して低かった。急性感染中の肺病変を評価するために、10 dpvにおいて、群2~5のそれぞれから3個体のブタを安

10

20

30

40

50

楽死させた。突然変異体ウイルス感染ブタに肉眼的肺病変は無く、野生型ウイルス感染ブタでは軽度の病変（2～6%）が見られた。

【0275】

N s p 2 T F ノックアウト突然変異体はブタにおいて P R R S V チャレンジに対する防御を誘導した

これらの n s p 2 T F 突然変異体が P R R S V チャレンジに対する防御を誘導することができるかどうかを調べるために、28 d p v において、群 2～5 のブタに親ウイルス S D 9 5 - 2 1 で抗原チャレンジを行った。群 2 の対照ブタに比べ、W T または n s p 2 T F ノックアウト突然変異体を接種したブタでは、抗原チャレンジ後（d p c）3 および 7 日において、ウイルス量が有意に低下していたが、K O 1 または K O 2 突然変異体に感染したブタのウイルス量は、W T 感染ブタのウイルス量の約 10 分の 1 であった（図 17 A）。剖検（13 d p c）時に、肺病状を評価した。群 2 のブタ（W T ウイルスで抗原チャレンジを行った陰性対照ブタ）では、明らかな肉眼的肺病変が顕著であり、肺表面の 36～63% を侵していた。これに対し、群 3～5 のブタは、肉眼的肺病変が軽減されていた。K O 1 または K O 2 接種ブタでの肉眼的肺病変は W T 接種ブタの約 4 分の 1～3 分の 1 であった（図 17 B）。予想されたように、陰性対照の群 1 のブタでは、顕著な肺病変は見られなかった。

【0276】

n s p 2 T F は生得免疫応答との拮抗に関与することが知られている P L P 2 ドメインを含んでいるので、本発明者らはさらに、n s p 2 T F 発現の変更が宿主免疫応答に対して、本発明者らが図 17 で認めたような防御レベルに寄与するような効果を持っていたかどうかを判定した。まず、本発明者らは、3、7、14、21、28、30、35 および 41 d p v において、対照またはウイルス感染ブタの全血由来の末梢血単核細胞（P B M C）における、選択された生得免疫遺伝子および細胞性免疫遺伝子の一時的発現をモニタリングした。生得免疫の免疫マーカー：I L - 1、I L - 8、I F N -、T N F -、I L - 12；T h 1 免疫の免疫マーカー：I F N -；T h 2 免疫の免疫マーカー：I L - 4；および制御性 T 細胞応答の免疫マーカー：I L - 10 を含む標的サイトカインのタンパク質発現レベルを測定するために、ブタサイトカイン F M I A を行った。F M I A の結果は、P B M C に関して予測されるような弱い再刺激応答を示した。しかしながら、ワクチン接種後 7 日において、K O 1 および K O 2 突然変異体感染ブタ由来の P B M C は、W T ウイルス感染ブタ由来の P B M C とは異なるサイトカイン発現パターンを生じ、I F N - および I L - 8 発現レベルの顕著な増加を伴っていた（図 18）。

【0277】

体液性免疫応答もまた評価した。I D E X X E L I S A により測定したところ、14 d p v までに、W T、K O 1 および K O 2 群の全てのブタが血清転換を起こしていた（図 19 A）。この結果は、これらのブタ群のウイルス量レベルとよく相関している。さらにウイルス中和（V N）抗体レベルの測定は、V N 抗体応答は、最初に K O 1 突然変異体感染ブタにおいて 21 d p v に検出されたことを示した。28 d p v では、K O 1 群の 2 個体のブタおよび K O 2 群および W T 群のそれぞれ 1 個体のブタが検出可能な V N 応答を生じた。チャレンジ後（35 d p v）、全てのワクチン接種ブタが V N 応答を生じ、K O 2 突然変異体感染群のブタの平均 V N 力価は、他の群の平均 V N 力価よりも高かった。41 d p v では、K O 1 突然変異体感染群のブタの平均 V N 力価は、種々のブタ群の中で最高であった。しかしながら、この群間の差異は、個々のブタの変動が大きく、各群のブタの個体数が限定されていたために統計的に有意ではなかった（図 19 B）。

【0278】

実施例 11：オーバーラップ n s p 2 タンパク質のアミノ酸配列を変更しない n s p 2 T F タンパク質の末端切断

遺伝コードの縮重のために、n s p 2 タンパク質のアミノ酸配列を変化させずに、n s p 2 T F タンパク質の C 末端部分に終止コドンを導入することができる。このような末端切断型の n s p 2 T F は、全長天然 n s p 2 T F タンパク質とは異なる生物特性を持つ可

10

20

30

40

50

能性があり、従って、ワクチンおよび診断薬の設計に有用であり得る。

【0279】

下記は、オーバーラップ n s p 2 リーディングフレームのアミノ酸配列を変更せずに n s p 2 T F に終止コドンを作り出す、マイナス 2 フレームシフト部位から下流の n s p 2 T F コード領域の部分の一塩基変異の非網羅的一覧である。この例の参照 P R R S 株は、P C T 出願 W O 2 0 1 2 / 0 6 3 2 1 2 A 1 において配列番号 6 として見出すことができる北米 ( 2 型 ) P 1 2 9 - P K C 1 2 - F L 5 2 回継代株である。以下に引用されるヌクレオチド番号は、このウイルスの 1 5 , 4 5 0 n t のゲノム配列に相当する。これらの突然変異は、n s p 2 タンパク質の長さまたはアミノ酸配列を変更せずに n s p 2 T F タンパク質の未成熟末端 ( C 末端切断 ) を生じる。このタイプの突然変異は単独で使用可能である。このタイプの突然変異はまた、完全な末端切断を確保し、ウイルス複製の際の復帰突然変異による全長 n s p 2 T F タンパク質の復帰の確率を大幅に引き上げるために、組み合わせて、または 2 以上を使用してもよい。

1 . n t 3 8 7 8 の C から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( A C C T C G T C T から A C C T A G T C T )

2 . n t 4 0 2 2 の G から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T C T T G G G T G から T C T T A G G T G )

3 . n t 4 0 7 9 の G から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( G G C T G G C T T から G G C T A G C T T )

4 . n t 4 0 9 1 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( C T G T T G G C C から C T G T A G G C C )

5 . n t 4 1 2 1 の C から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( C A G T C G G C A から C A G T A G G C A )

6 . n t 4 1 8 4 の C から G への変異は、n s p 2 T F において T G A 終止コドンを作り出す ( T T C T C A A A C から T T C T G A A A C )

7 . n t 4 2 1 1 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( G C C T T G T T G から G C C T A G T T G )

8 . n t 4 2 1 4 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T T G T T G T G G から T T G T A G T G G )

9 . n t 4 2 1 7 の G から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T T G T G G G C C から T T G T A G G C C )

1 0 . n t 4 2 2 6 の C から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( C C G T C G G T C から C C G T A G G T C )

1 1 . n t 4 2 3 2 の C から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( G T C T C G G T C から G T C T A G G T C )

1 2 . n t 4 2 3 8 の T から A への変異は、n s p 2 T F において A G 終止コドンを作り出す ( G T C T T G C C A から G T C T A G C C A )

1 3 . n t 4 2 4 7 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T T C T T G G C A から T T C T A G G C A )

1 4 . n t 4 2 5 9 の G から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T A C T G G G C G から T A C T A G G C G )

1 5 . n t 4 2 9 2 の T から G への変異は、n s p 2 T F において T G A 終止コドンを作り出す ( T G C T T A G G C から T G C T G A G G C )

1 6 . n t 4 2 9 8 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( G G C T T G G C A から G G C T A G G C A )

1 7 . n t 4 3 0 4 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( G C A T T G T T G から G C A T A G T T G )

1 8 . n t 4 3 0 7 の T から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作り出す ( T T G T T G C A G から T T G T A G C A G )

1 9 . n t 4 3 2 2 の G から A への変異は、n s p 2 T F において T A G 終止コドンを作

10

20

30

40

50

り出す (TCTTGGCTG から TCTTAGCTG)

【0280】

nsp2におけるマイナス2フレームシフトイベントの効率の低減は、P129 - PKC12 - FL52回継代株において、実施例5に記載されているようにフレームシフト部位の保存されているGGUUUUモチーフまたはフレームシフト部位の下流の保存されているCCCANCCUCCモチーフを変異させることによって達成することができる。P129 - PKC12 - FL52回継代株におけるこれらのモチーフの配列は、北米PRRS株SD23983およびSD95 - 21に関して図2Aに示されるものと同じである(それぞれGGUUUUおよびCCCAUCC)。同様に、nsp2におけるマイナス2フレームシフトは、P129 - PKC12 - FL52回継代株において、実施例8に記載され、図11に示されているように、nsp1において保存されているGKYLQRRLQモチーフを変異させることによって阻害することができる。このアミノ酸配列は、P129 - PKC12 - FL52回継代株においては完全に保存されている。

10

【0281】

実施例12：弱毒中国高病原性PRRSウイルスにおけるオーバーラップnsp2タンパク質のアミノ酸配列を変更しないnsp2TFタンパク質の末端切断

遺伝コードの縮重のために、nsp2タンパク質のアミノ酸配列を変化させずに、nsp2TFタンパク質のC末端部分に終止コドンを導入することができる。このような末端切断型のnsp2TFは、全長天然nsp2TFタンパク質とは異なる生物特性を持つ可能性があり、従って、ワクチンおよび診断薬の設計に有用であり得る。

20

【0282】

下記は、オーバーラップnsp2リーディングフレームのアミノ酸配列を変更せずにnsp2TFに終止コドンを作り出す、マイナス2フレームシフト部位から下流のnsp2TFコード領域の部分の一塩基変異の非網羅的一覧である。この例の参照PRRS株は、米国特許出願US2012/0189655において配列番号1として見出すことができる中国「高病原性」(遺伝子型2型)TJM-F92株(92回継代)である。以下に引用されるヌクレオチド番号は、このウイルスの14,966ntのゲノム配列に相当する。これらの突然変異は、nsp2タンパク質の長さまたはアミノ酸配列を変更せずにnsp2TFタンパク質の未成熟末端(C末端切断)を生じる。このタイプの突然変異は単独で使用可能である。このタイプの突然変異はまた、完全な末端切断を確保し、ウイルス複製の際の復帰突然変異による全長nsp2TFタンパク質の復帰の確率を大幅に引き下げるために、組み合わせ、または2以上を使用してもよい。

30

20. nt3444のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GCCTCGTTTからGCCTAGTT)

21. nt3619のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTGA終止コドンを作り出す(TGTGCGAATからTGTGAGAAT)

22. nt3645のGからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GGTTGGCTTからGGTTAGCTT)

23. nt3657のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(CTGTTGGTCからCTGTAGGTC)

40

24. nt3687のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(CAGTCGGCAからCAGTAGGCA)

25. nt3750のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAA終止コドンを作り出す(TTCTCAAACからTTCTAAAAC)

26. nt3777のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GCCTTGTTGからGCCTAGTTG)

27. nt3780のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TTGTTGTGGからTTGTAGTGG)

28. nt3783のGからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TTGTGGGCCからTTGTAGGCC)

50

29. nt 3792のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(CCGTCGGTCからCCGTAGGTC)

30. nt 3798のCからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GTCTCGGCCからGTCTAGGCC)

31. nt 3804のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GCCTTGCCAからGCCTAGCCA)

32. nt 3813のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TTCTTGGCAからTTCTAGGCA)

33. nt 3825のGからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TACTGGGCGからTACTAGGCG)

34. nt 3858のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAA終止コドンを作り出す(TGCTTAGGCからTGCTAAGGC)

35. nt 3864のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GGCTTGGCAからGGCTAGGCA)

36. nt 3870のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(GCATTGTTGからGCATAGTTG)

37. nt 3873のTからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TTGTTGCAGからTTGTAGCA)

38. nt 3888のGからAへの変異は、nsp2TFにおいてTAG終止コドンを作り出す(TCTTGGCTGからTCTAGCTG)

【0283】

nsp2におけるマイナス2フレームシフトイベントの効率の低減は、TJM-F92株(92回継代)において、実施例5に記載されているようにフレームシフト部位の保存されているGGUUUUモチーフまたはフレームシフト部位の下流の保存されているCCANCUCCモチーフを変異させることによって達成することができる。TJM-F92株(92回継代)におけるこれらのモチーフの配列は、北米PRRS株SD23983およびSD95-21に関して図2Aに示されるものと同じである(それぞれGGUUUUおよびCCCAUCC)。同様に、nsp2におけるマイナス2フレームシフトは、TJM-F92株(92回継代)において、実施例8に記載され、図11に示されているように、nsp1において保存されているGKYLQRR LQモチーフを変異させることによって阻害することができる。このアミノ酸配列は、TJM-F92株(92回継代)においては完全に保存されている。

【0284】

参考文献

10

20

30

1. Ahlquist P (2006) Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 4(5):371-382.
2. Brierley I, Gilbert RJC, & Pennell S (2010) Pseudoknot-Dependent Programmed—1 Ribosomal Frameshifting: Structures, Mechanisms and Models. Recoding: expansion of decoding rules enriches gene expression:149-174.
3. Brierley I, Jenner AJ, & Inglis SC (1992) Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol* 227(2):463-479. 10
4. Brown E, *et al.* (2009) Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. (Translated from eng) *Clin Vaccine Immunol* 16(5):628-635.
5. Cavanagh D (1997) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142(3):629-633. 20
6. Chen Z, *et al.* (2010) Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response. *J Gen Virol* 91(Pt 4):1047-1057.
7. Chung BY, Firth AE, & Atkins JF (2010) Frameshifting in alphaviruses: a diversity of 3' stimulatory structures. *J Mol Biol* 397(2):448-456.
8. Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, & Thiel HJ (1993) Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193(1):329-339. 30
9. de Groot RJ., Cowley JA, Enjuanes L, Faaberg, KS, Perlman S, Rottier PJ, Snijder EJ, Ziebuhr J, Gorbalenya AE. 2012. Order Nidovirales, p. 785-795. In A. King, M. Adams, E. Carstens, and E. J. Lefkowitz (eds.), *Virus Taxonomy, the 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
10. de Lima M, *et al.* (2008) Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine* 26(29-30):3594-3600. 40

11. Demeshkina N, Jenner L, Westhof E, Yusupov M, Yusupova G (2012) A new understanding of the decoding principle on the ribosome. *Nature* doi10.1038/nature10913 [Epub ahead of print] PMID: 22437501.
12. den Boon JA, *et al.* (1991) Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J Virol* 65(6):2910-2920.
13. Dinman JD, Icho T, & Wickner RB (1991) A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(1):174-178. 10
14. Du Z, Fenn S, Tjhen R, & James TL (2008) Structure of a construct of a human poly(C)-binding protein containing the first and second KH domains reveals insights into its regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 283(42):28757-28766.
15. Fang Y, *et al.* (2008) Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. *J Gen Virol* 89(Pt 12):3086-3096. 20
16. Fang Y, *et al.* (2004) Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res* 100(2):229-235.
17. Fang Y, *et al.* (2006) A full-length cDNA infectious clone of North American type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: expression of green fluorescent protein in the Nsp2 region. *J Virol* 80(23):11447-11455.
18. Fang Y & Snijder EJ (2010) The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* 154(1-2):61-76. 30
19. Farabaugh PJ (2010) Programmed Frameshifting in Budding Yeast. Recoding: expansion of decoding rules enriches gene expression:221-247.
20. Firth AE, Blitvich BJ, Wills NM, Miller CL, & Atkins JF (2010) Evidence for ribosomal frameshifting and a novel overlapping gene in the genomes of insect-specific flaviviruses. *Virology* 399(1):153-166.
21. Firth AE, Wills NM, Gesteland RF, & Atkins JF (2011) Stimulation of stop codon read through: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Res* 39(15):6679-6691. 40
22. Firth AE, Brierley I (2012) Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol*

- (in press).
23. Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, & Moss B (1986) Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21):8122-8126.
  24. Goodman RP, *et al.* (2011) Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four *Trichomonasvirus* species (Family Totiviridae). *J Virol* 85(9):4258-4270.
  25. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, & Snijder EJ (2006) Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117(1):17-37. 10
  26. Guarraia C, Norris L, Raman A, & Farabaugh PJ (2007) Saturation mutagenesis of a +1 programmed frameshift-inducing mRNA sequence derived from a yeast retrotransposon. *RNA* 13(11):1940-1947.
  27. Han J, Rutherford MS, & Faaberg KS (2010) Proteolytic products of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 replicase protein. *J Virol* 84(19):10102-10112.
  28. Hopp TP, Woods KR (1983): A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol Immunol* 20(4):483-489. 20
  29. Ivanov IP & Atkins JF (2007) Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation. *Nucleic Acids Res* 35(6):1842-1858.
  30. Jacks T, Townsley K, Varmus HE, & Majors J (1987) Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polyproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12):4298-4302. 30
  31. Jackson RJ, Hellen CU, & Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2):113-127.
  32. Johnson CR, Yu W, & Murtaugh MP (2007) Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 88(Pt 4):1184-1195.
  33. Kim DY, *et al.* (2009) Insertion and deletion in a non-essential region of the nonstructural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity. *Virus Genes* 38(1):118- 40

- 128.
34. Kollmus H, Hentze MW, & Hauser H (1996) Regulated ribosomal frameshifting by an RNA-protein interaction. *RNA* 2(4):316-323.
  35. Larkin MA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
  36. Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006): Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2:2. 10
  37. Lauck M, et al. (2011) Novel, divergent simian hemorrhagic fever viruses in a wild Ugandan red colobus monkey discovered using direct pyrosequencing. *PLoS One* 6(4):e19056.
  38. Li Y, Tas A, Snijder EJ, & Fang Y (2012) Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus ORF1a-Encoded Nonstructural Proteins in Virus-Infected Cells. *J Gen Virol*. In press.
  39. Liu HW, Chu YD, & Tai JH (1998) Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Arch Virol* 143(5):963-970. 20
  40. Loughran G, Firth AE, & Atkins JF (2011) Ribosomal frameshifting into an overlapping gene in the 2B-encoding region of the cardiovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(46):E1111-1119.
  41. Loughran G, Firth AE, & Atkins JF (2011) Ribosomal frameshifting into an overlapping gene in the 2B-encoding region of the cardiovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(46):E1111-1119.
  42. Lu J, et al. (2011) A 5'-proximal stem-loop structure of 5' untranslated region of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genome is key for virus replication. *Virology* 438:172. 30
  43. Masters PS. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 66:193-292.
  44. Matsufuji S, Matsufuji T, Wills NM, Gesteland RF, & Atkins JF (1996) Reading two bases twice: mammalian antizyme frameshifting in yeast. *EMBO J* 15(6):1360-1370.
  45. Meiring H, Van der Heeft E, Ten Hove G, & De Jong A (2002) Nanoscale LC-MS (n): technical design and applications to peptide and protein analysis. *Journal of separation science* 25(9):557-568. 40

46. Melian EB, *et al.* (2010) NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *J Virol* 84(3):1641-1647.
47. Meulenberg JJM, *et al.* (1993) Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192(1):62-72.
48. Miller WA & Giedroc DP (2010) Ribosomal frameshifting in decoding plant viral RNAs. Recoding: expansion of decoding rules enriches gene expression:193-220. 10
49. Moore R, Dixon M, Smith R, Peters G, & Dickson C (1987) Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J Virol* 61(2):480-490.
50. Ogle JM, *et al.* (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292(5518):897-902.
51. Oleksiewicz M, Bøtner A, Toft P, Normann P, & Storgaard T (2001) Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. 20  
*Journal of Virology* 75(7):3277-3290.
52. Perlman S, Netland J. 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Jun;7(6):439-50.
53. Rice P, Longden I, & Bleasby A (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16(6):276-277.
54. Snijder EJ & Meulenberg JJM (1998) The molecular biology of arteriviruses. 30  
*Journal of general virology* 79(5):961-980.
55. Snijder EJ, Spaan WJM. 2007. Arteriviruses, p. 1337-1355. In D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
56. Snijder EJ, Wassenaar A, & Spaan W (1994) Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *Journal of virology* 68(9):5755-5764.
57. Snijder EJ, Wassenaar ALM, Spaan WJM, & Gorbalenya AE (1995) The Arterivirus Nsp2 Protease. *Journal of Biological Chemistry* 270(28):16671-16676. 40
58. Su HM & Tai JH (1996) Genomic organization and sequence conservation in type I

- Trichomonas vaginalis viruses. *Virology* 222(2):470-473.
59. Van Den Born E, Gultyaev AP, & Snijder EJ (2004) Secondary structure and function of the 5'-proximal region of the equine arteritis virus RNA genome. *RNA* 10(3):424-437.
60. Xu J, Hendrix RW, & Duda RL (2004) Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes. *Mol Cell* 16(1):11-21.
61. Ziebuhr J, Snijder EJ, & Gorbalenya AE (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *Journal of General virology* 81(4):853-879.

10

## 【 0 2 8 9 】

公開米国特許出願第 2 0 1 0 / 0 1 3 6 0 4 7 号は参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる。

## 【 0 2 9 0 】

具体例を開示されている実施形態および実施例に関して以上に記載したが、このような具体例は例示に過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。下記の特許請求の範囲で定義されるようなそのより広い態様において、本発明から逸脱することなく、当技術分野の通常の技術に従って変更および修飾を行うことができる。

20

## 【 0 2 9 1 】

全ての刊行物、特許、および特許文献は、個々に参照により組み入れられるかのように、参照により本明細書に組み入れられる。本発明を種々の具体的かつ好ましい実施形態および技術に関して記載してきた。しかしながら、本発明の趣旨および範囲内にありながら多くの変形および修飾をなし得ると理解されるべきである。

## 配列の説明

配列番号 1	pL1a	
配列番号 2	pLnsp2-8	
配列番号 3	pLnsp1-2	10
配列番号 4	pLnsp1 $\beta$ -2	
配列番号 5	pLnsp1 $\beta$ cc-2	
配列番号 6	pLnsp2	20
配列番号 7	pLnsp1-3	
配列番号 8	pLnsp1 $\beta$ -3	
配列番号 9	pLnsp2-3	
配列番号 10	pLnsp2-3-IFC	30
配列番号 11	pLnsp1 $\beta$	
配列番号 12	pL1a-IFC	
配列番号 13	pL1a-K01	40
配列番号 14	TTAGCTCTAGAG	
配列番号 15	pL1a-K02	

配列番号 16

TGGGTATTCGAAGTTTATAGTCATTGCCAGCTTTTATACTGACACTT

配列番号 17

pL1a-SS

配列番号 18

pL1a-CC1

10

配列番号 19

TTTATAGTCATTGCC

配列番号 20

pL1a-CC2

配列番号 21

GTTTACAGAAATATGGCAGCTTTT

20

配列番号 22

pSD-IFC

配列番号 23

ATATTGGCGCGCCtaatacgactcactatagg

配列番号 24

GGCGCGCCtaatacgactcactatagg

配列番号 25

pSD-K01

30

配列番号 26

pSD-K02

配列番号 27

NC\_001639 - LDV (図. 2A より)

配列番号 28

NC\_001961 PRRSV Ref. seq (図. 2A より)

40

配列番号 29

Genotype II PRRSV isolate SC23983 (図. 2A より)

配列番号 30

DQ489311- isolate SD01-08 (図. 2A より)

配列番号 31	NC_003092 -SHFV(図. 2A より)	
配列番号 32	HQ845737-8 -SHFV strain krc1(図. 2A より)	
配列番号 33	HQ845737-8 -SHFV strain krc2(図. 2A より)	
配列番号 34	(WILD TYPE FROM 図 9 A)	10
配列番号 35	(pLnspl $\beta$ cc - 2 の変異型ヌクレオチド, 図. 9A より)	
配列番号 36	(アミノ酸, 図. 9A より)	
配列番号 37	PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08, 図. 2B より	20
配列番号 38	PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08 IFC, 図. 2B より	
配列番号 39	PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08: K01 TF コドン 100	
配列番号 40	図. 2B より PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08: K02	30
配列番号 41	図. 2B より, PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08: SS	
配列番号 42	図. 2B より, PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08: CC1	
配列番号 43	図. 2B より, PRRSV-EU/DQ489311/SD01-08: CC2	40
配列番号 44	野生型 2b	
配列番号 45	図. 5B より, nsp2TF のアミノ酸配列	

配列番号 46	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 47	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 48	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 49	図. 5B より, nsp2TF の部分	10
配列番号 50	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 51	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 52	図. 5B より, nsp2TF の部分	20
配列番号 53	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 54	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 55	図. 5B より, nsp2TF の部分	30
配列番号 56	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 57	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 58	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 59	図. 5B より, nsp2TF の部分	40
配列番号 60	図. 5B より, nsp2TF の部分	

配列番号 61	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 62	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 63	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 64	図. 5B より, nsp2TF の部分	10
配列番号 65	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 66	図. 5B より, nsp2TF の部分	
配列番号 67	図. 5B より, nsp2TF の部分	20
配列番号 68	図. 5A より	
配列番号 69	図. 5A より	
配列番号 70	図. 5A より	30
配列番号 71	図. 5A より	
配列番号 72	図. 5A より	
配列番号 73	図. 5A より	
配列番号 74	図. 5A より	40
配列番号 75	図. 5A より	
配列番号 76	図. 6B より	

配列番号 77	図. 6B より	
配列番号 78	図. 6B より	
配列番号 79	図. 6B より	
配列番号 80	図. 6B より	10
配列番号 81	図. 6B より	
配列番号 82	図. 6B より	
配列番号 83	図. 6B より	20
配列番号 84	図. 6B より	
配列番号 85	図. 6B より	
配列番号 86	図. 6B より	
配列番号 87	図. 6B より	30
配列番号 88	図. 6B より	
配列番号 89	図. 6B より	
配列番号 90	図. 6B より	40
配列番号 91	図. 6B より	

配列番号 92	PSD01-08-K01	
配列番号 93	PSD-08-K02	
配列番号 94	PSDp1-08-K03	
配列番号 95	PSD95-28-K01	10
配列番号 96	PSD95-28-K02	
配列番号 97	PSD95-28-K03	
配列番号 98	図. 2C より, WT	20
配列番号 99	図. 2C より, IFC	
配列番号 100	図. 2C より, M1	
配列番号 101	図. 2C より, CC	
配列番号 102	図. 2C より, K02	30
配列番号 103	図. 2C より, WT 4067	
配列番号 104	図. 2C より, K01 4067	
配列番号 105	図. 2D より, HQ845737	40
配列番号 106	図. 2D より, HQ845738	
配列番号 107	図. 2D より, NC_003092	

配列番号 108	図. 2D より, JX473849	
配列番号 109	図. 2D より, JX473848	
配列番号 110	図. 2D より, JX473850	
配列番号 111	図. 2D より, JX473847	10
配列番号 112	XH-GD, 図. 10B より	
配列番号 113	JX143, 図. 10B より	
配列番号 114	JXA1, 図. 10B より	20
配列番号 115	JA142, 図. 10B より	
配列番号 116	Ingelvac, 図. 10B より	
配列番号 117	NVSL, 図. 10B より	
配列番号 118	CH-1a, 図. 10B より	30
配列番号 119	CH-1R, 図. 10B より	
配列番号 120	P129, 図. 10B より	
配列番号 121	RespPRRS, 図. 10B より	40
配列番号 122	SD-95-21, 図. 10B より	

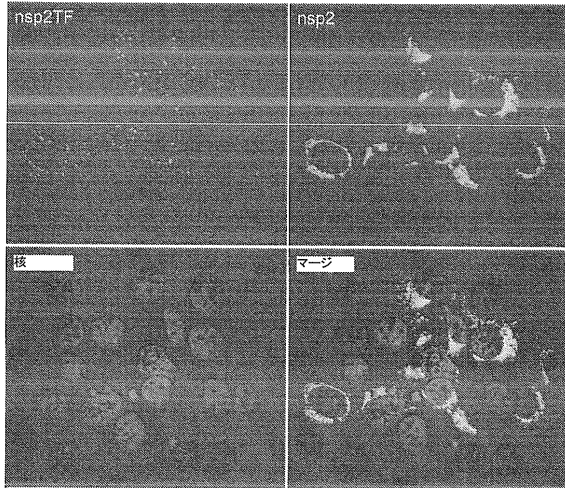
配列番号 123	PA8, 図. 10B より	
配列番号 124	VR2332, 図. 10B より	
配列番号 125	Prime, 図. 10B より	
配列番号 126	SP, 図. 10B より	10
配列番号 127	MN184, 図. 10B より	
配列番号 128	Amervac, 図. 10B より	
配列番号 129	SHE, 図. 10B より	20
配列番号 130	LV, 図. 10B より	
配列番号 131	SD01-08, 図. 10B より	
配列番号 132	EuroPRRSV, 図. 10B より	
配列番号 133	NMEU09-1, 図. 10B より	30
配列番号 134	07V063, 図. 10B より	
配列番号 135	BJEU06-1, 図. 10B より	
配列番号 136	HKEU16, 図. 10B より	40
配列番号 137	KNU-07, 図. 10B より	
配列番号 138	AA 95-21, 図. 12A より	

配列番号 139	Aa 01-08, 図. 12B より	
配列番号 140	RPOa_LDVC, 図. 13 より	
配列番号 141	RPOA_LDVP, 図. 13 より	
配列番号 142	RPOA_PRRSL, 図. 13 より	10
配列番号 143	RPOA_PRRSS, 図. 13 より	
配列番号 144	3MTV_A, 図. 13 より	
配列番号 145	RPOA_PRRSB, 図. 13 より	20
配列番号 146	RPOA_PRRSR, 図. 13 より	
配列番号 147	RPOA_PRRS1, 図. 13 より	
配列番号 148	RPOA_SHFV, 図. 13 より	30
配列番号 149	保存モチーフ, 図. 13 より	

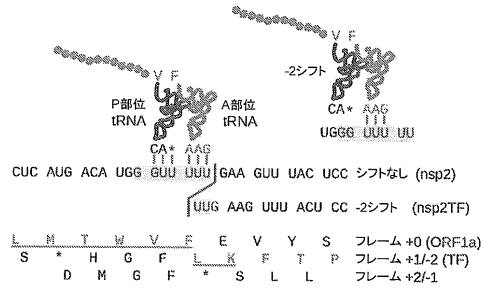




【 図 4 】



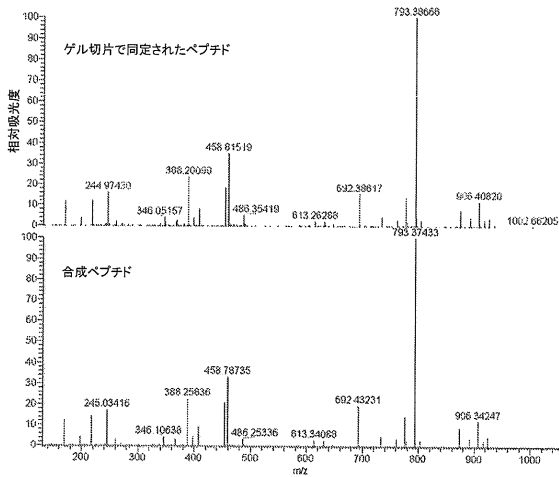
【 図 5 A 】



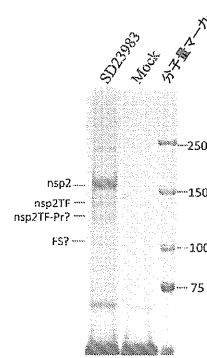
【 図 5 B 】

AAGKRARAKR ATKSGKDSAL APKIAPPVPT CGITTYSPPT DSCSGHHVLA  
 AIVNRMINGD FTSPLPQYNR PEDDWDSDYD LAQAIQCLQL PATVVRNRAC  
 PNAKYLKILN GVHWEVEVRS GHAPRSLRSR CVVGVSECGD VAPPYFADGL  
 PKRALEALAS AYRLPKDCVS SGIADFLADP PQQFHTLDK NLTSPSPERS  
 QFSLYKILL EYVFKCGAT EGAFYVAVER MLKDCPSPEQ AMALLAKIKV  
 PSSHAPSVSL DECFPAGVPA DFEPAFQERP QSPGAVALC SPDAKQFEY  
 ASSEAGSEGH KAVHAVPLAE GPNNQOVVV AGEQLLGGC GLAIGSAQSS  
 SDSKRENMHN SREDEPLDLS HPAPAAATTL VGEQTPDNP6 SDASALPIAV  
 RGFVPTGPII RHVEHCGTES GDSSSPLDLS FAQILDQDLP LSLAMPVKA  
 TADSPGNVWG RCEPVFLKPR KAFSDSDSAL QFSELSESSS YTEFQTKDT  
 LVADAPVDLT TSNEALSVD PSEFVELRRP RNSAQAALYDR GSPLEAFHAK  
 IKNRVYEQL QACEPGRAT PATREHLAKN HBRVDHKTNR CTSQFQAGRI  
 LSLKFLPDH IQDTPPPVPK KHRASDSAGL KQLVARNDKN LSYTPPKSA  
 GLVLDQTVPP PTDIQEDAT PSDGLSHAD FSSRVTSWS HGLNLSGTR  
 LABSAGRLN TVVFLNTPF SLLVNSRSG RGALMLQIG CLQVLFYLLS  
 CSVLTQYED AFPHYVSSLV LCGVFWVFL VLGWLLLYFY SRLHPTQSVL  
 LVTTRRMVM LSFVLLSSAN FQNLCAALWL APOVSYVSSL ASYSVGHVIS  
 GMLSYVYACL QIWPFLFMW CRKGVVTSVG EKV

【 図 5 C 】



【 図 6 A 】



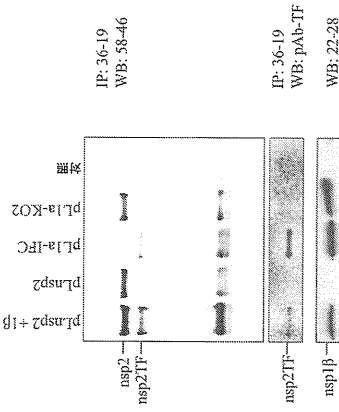
【 図 6 B 】

1 AGRPARKARN SRTTAVAGRA SSARSIQDAR KHEAADANKV EHLKRYSEPA  
 51 EKMCDWEGIS ALANNWNRK FKTTLEERVV PPDNATDED LVNMQILRL  
 101 EALDSDNCR ASKIVYANL GRHWVIVFP GQSPFLPLE CVGCGCEHIG  
 151 GLTDPDAVEV FGFDAALNH AETVHLISS HIALALRHS GDCRSESEV  
 201 TETVTSQDF ARHGKSHFD QVRLKRIEL QGVTSDDCCS QNKRVNTEE  
 251 EVRACIDEMV RQATSELEC RLRLKRRPR VQTSFDWQV VLPVGAATO  
 301 TTELQVHQC DALFVVEQC SLENNVPLT AFDLANNYR AQGQVRRR:  
 351 RLAVLSKLE GVYSEYGLM PNTGPRPPL EQLDLEKQ MEDDLKLAN  
 401 AQTISEMNAV AVEQVLRKH VKNYPRVTP PEPKQDQK TSKAKLLER  
 451 KVEEARRKV GTNCGSPISL GDNIPSRKED LAVGSPYDPP TPEEPATSE  
 501 EKVVSVEKQ IFRPVPSEI DALIPARGA VSRVPTLSE DEVPARRK  
 551 FQSKDLSSA AVTPPYQDP LLSASSQIE FAPSLAPQ SECVIGKQK  
 601 EAFEALSETG DMQDIXPAS VSSSSLSV RYRBYNSAQ AIJDLGGCQ  
 651 CHLQEVKHC LQINREKCA EKLDDVATQE HESRWRVDE MTRKNSFAY  
 701 QAFRTLDGRH KPLFHLLET PPFYFCEPVX MPSPAPSVG ARSDLTIGV  
 751 ATEDVRLLE KIKWGMTH QGLAFSEDK PVDDQLAKP RISSGSPDES  
 801 TSAPPTTSGS AGSFTELPSS DGADADGGP FRTIKRKAEG LSKLSRQVF  
 851 LFSGFSISLQ SBRESTRAVY LRVIGVQLL LIYCASPYAT VIQHLVLLP  
 901 WVCLELGA SRYVLAQW LMLVCSLQ FTQSALLVSL IRQSVETSFL  
 951 LLSFNLGT FALHWAPV SVLPPLAGYV AGVAVGTEC LGLALLQVTS  
 1002 KLEMTETKA GVKSAGELV



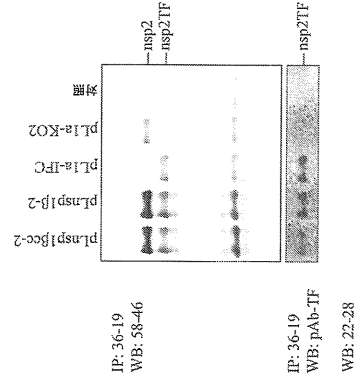
【 図 9 B 】

nsp1βはin vitroでマイナスイオンシフトを制御する



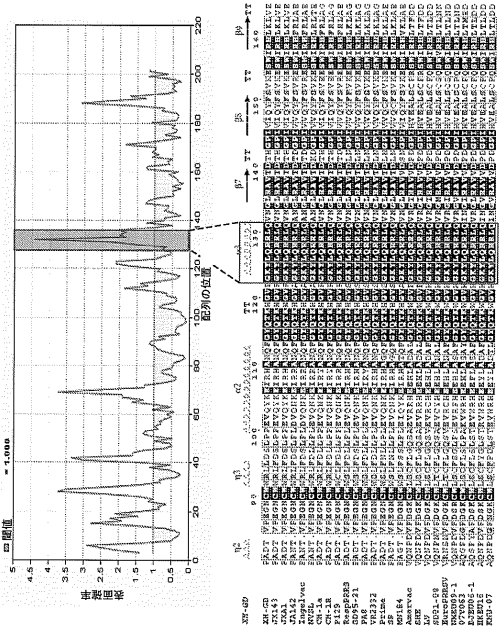
【 図 9 C 】

nsp1βはin vitroでマイナスイオンシフトを制御する



【 図 1 0 】

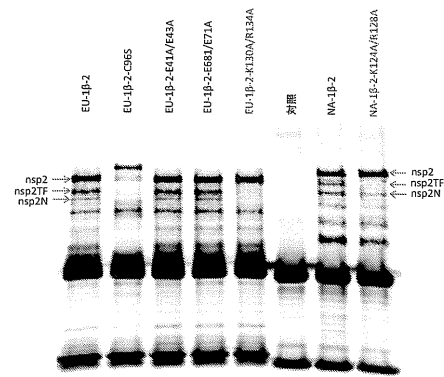
GKYLQRRRLQモチーフは型および型遺伝子型の間で保存性が高い



【 図 1 1 】

ワクシニア発現系を用いたGKYLQRRRLQモチーフに導入された突然変異の検定

I型PRRSV nsp1βのK130A/R134Aは II型PRRSV nsp1βのK124A/R128Aに相当する

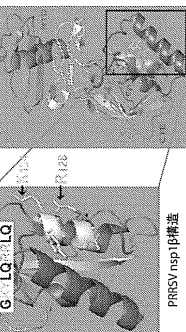


10A

10B

【 図 1 2 A 】

### BindN RNA結合残基の予測



概要  
 長さ配列: 95-21  
 配列長の入力: 205 アミノ酸  
 予測結合部位: 20 残基  
 ユーザー定義の特異性: 90.00%  
 推定感度: 37.81%

全体像  
 配列: A T V D I G H A V Y V A E R K I S M A R G S G V E V E R A V P S G L L A L I A N R L R R E F F H H Y D M S R F  
 信頼水準: 8 9 9 3 7 9 9 6 9 9 9 8 3 7 7 2 1 7 6 7 4 2 7 3 3 2 3 7 1 8 6 7 6 4 7 5 9 1 7 5 3 3 1 5 8 1 1 4 4 3 4 4 3 8 5 6 1 6  
 配列: A T A F A R C G V A M V E R G H C P A D T V F E G H C W S L F D S L E L Y Q N N E I R H A N Q V Y Q T F S R S  
 信頼水準: 7 6 2 7 4 4 3 2 4 1 3 8 5 3 7 4 2 5 3 4 8 5 2 6 3 5 7 3 7 5 6 5 9 9 8 4 8 7 6 2 7 3 2 2 7 7 2 2 2 2 8 6 1 1 7 7 1  
 配列: Y S G K Y L Q R R L Q P N G L S R V T D N G S P I Y Q V F V R E S P I R H K L A S E P S G S G F E D L L R I E V E  
 信頼水準: 2 7 2 8 7 3 1 7 7 2 2 2 4 5 8 7 6 2 6 8 4 7 6 9 8 6 6 5 6 9 2 6 4 3 3 1 1 9 3 6 3 4 3 3 1 8 2 5 6 6 6 6 6 6 8 9 7 2  
 配列: F W S F L A N D K E K I F R F G S H W K G  
 信頼水準: 2 2 1 1 1 9 4 2 7 6 1 6 5 6 5 3 2 1 3 1 5

\*\*\* 予測: 結合残基は「+」と赤で表示、非結合残基は「-」と緑で表示  
 \*\*\* 信頼水準: レベル0(最低)からレベル4(最高)まで

【 図 1 2 B 】

### BindN RNA結合残基の予測



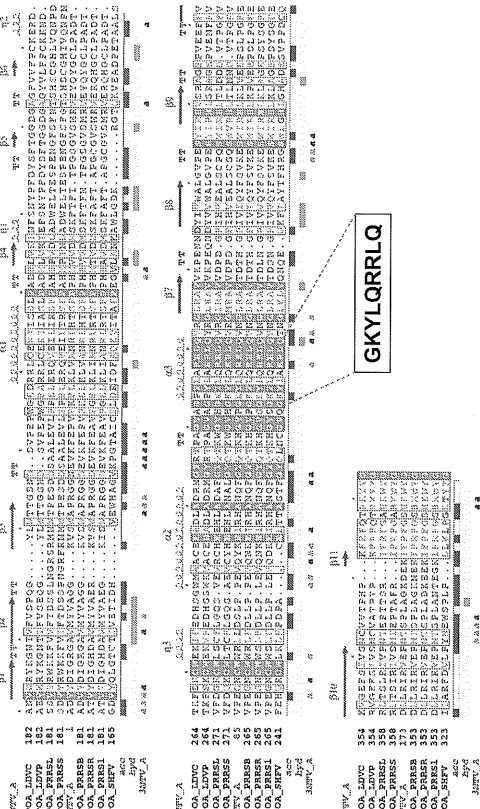
概要  
 長さ配列: 01-08  
 配列長の入力: 205 アミノ酸  
 予測結合部位: 14 残基  
 ユーザー定義の特異性: 90.00%  
 推定感度: 37.81%

全体像  
 配列: S D V Y M K R F V I F D S S F S G R F R M G W P E S D S A L E V L F P E L E R G V E I L R G F P A H H P I N  
 信頼水準: 2 2 5 2 1 5 2 2 7 9 8 7 5 5 1 1 7 1 8 5 7 5 7 3 4 5 5 4 6 4 2 7 7 7 9 7 6 4 5 7 1 4 5 9 6 6 5 1 4 4 5 6 3 5 8 9 4  
 配列: L A D H E L E S E S E I N S E R S E R S H S G H I T O N P V F E S K S K M L T F L G S S S F C Y H E H L A N L A G  
 信頼水準: 3 9 7 7 6 3 3 4 4 5 5 2 4 4 1 4 2 1 2 1 5 5 3 7 8 4 7 8 5 7 5 5 8 5 8 4 9 8 9 7 3 4 6 3 6 5 3 8 9 8 7 8 6 3 7 4 5  
 配列: V Q E S P S V H G V Y L Q R R L Q V R G N G A V V D P D S F I H V F A L S G S G S W R F R L N D T W F E V E L T  
 信頼水準: 1 1 1 4 3 3 4 1 4 7 6 9 8 8 8 3 1 1 7 4 5 7 7 6 5 9 4 8 6 6 2 6 2 1 2 3 3 1 3 8 4 8 2 4 7 7 1 3 7 3 2 8 6 2  
 配列: S I R I V N G E F T F P I P R F E G A H W K S  
 信頼水準: 2 6 1 5 6 2 2 3 4 3 1 6 1 6 1 8 7 6 5 1 6 3 2 4 2 8

\*\*\* 予測: 結合残基は「+」と赤で表示、非結合残基は「-」と緑で表示  
 \*\*\* 信頼水準: レベル0(最低)からレベル4(最高)まで

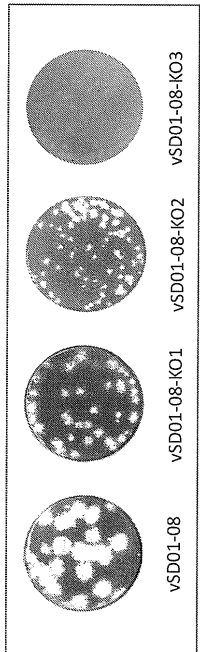
【 図 1 3 】

### GKYLQRRLQモチーフはアルチウイルス(atenuviruses)(PRRSV, LDVおよびSHFV)において保存性が高い

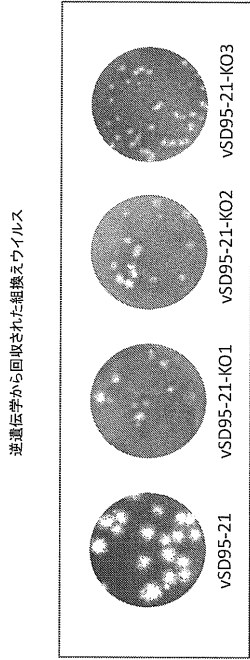


【 図 1 4 A 】

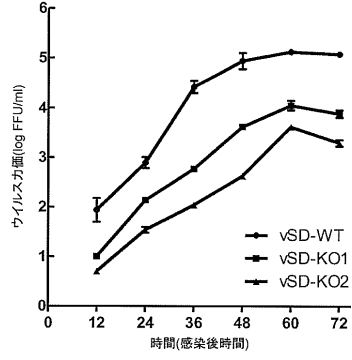
### 逆遺伝子から回収された結核ウイルス



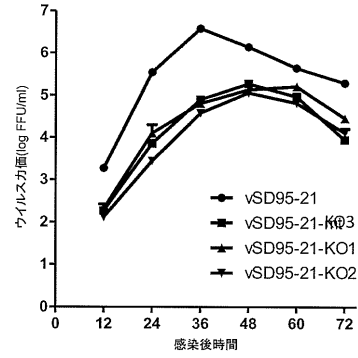
【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】

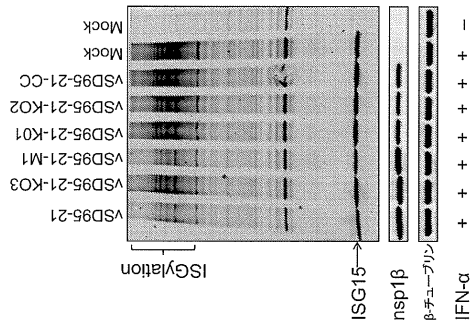


【 図 1 4 D 】



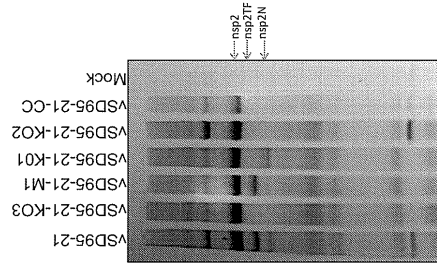
【 図 1 5 A 】

nsp2IFノックアウト突然変異体はPRRSVのdeISGylation能を低下させた。



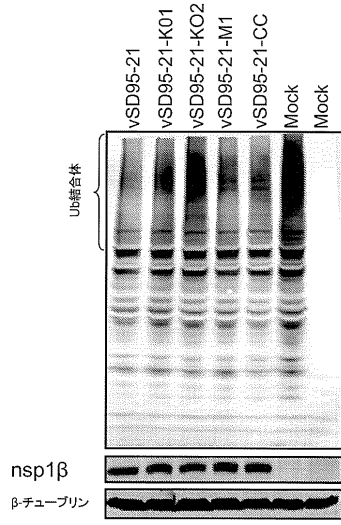
【 図 1 5 B 】

nsp2IFノックアウト突然変異体はPRRSVのdeISGylation能を低下させた。



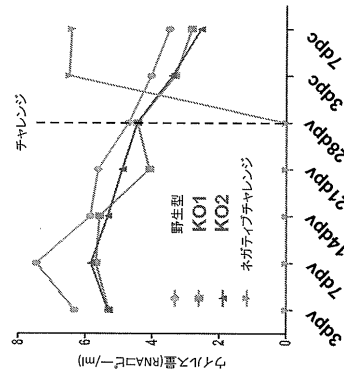
【 図 1 6 】

nsp2TFノックアウト突然変異体はPRRSVのde-Ub能を低下させた



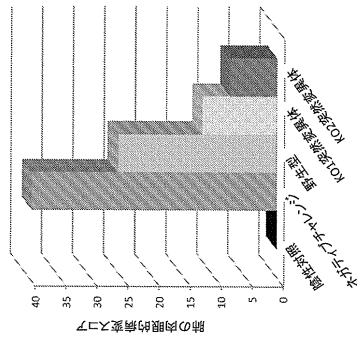
【 図 1 7 A 】

nsp2TFノックアウト突然変異体はPRRSVチャレンジに対するブタの防御を誘導した



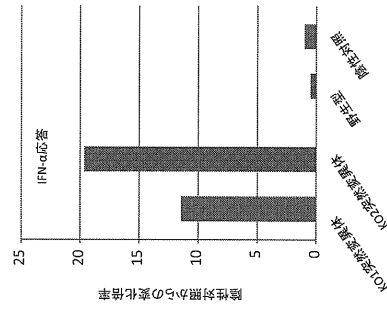
【 図 1 7 B 】

nsp2TFノックアウト突然変異体はPRRSVチャレンジに対するブタの防御を誘導した



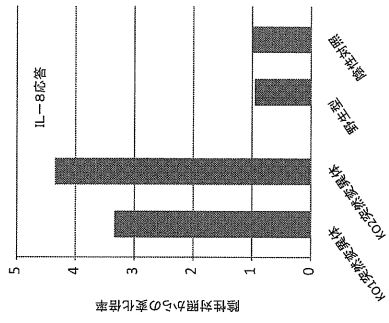
【 図 1 8 A 】

nsp2TF突然変異体感染ブタにおけるIFN-αおよびIL-8発現のアップレギュレーション



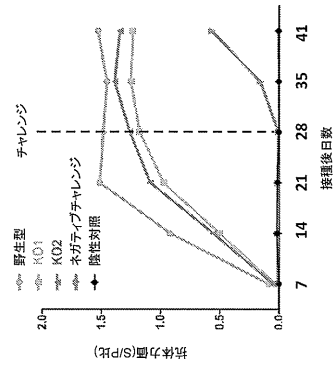
【 図 1 8 B 】

nsp2TF突然変異体感染ブタにおけるIFN-α5およびIL-8発現のアップレギュレーション



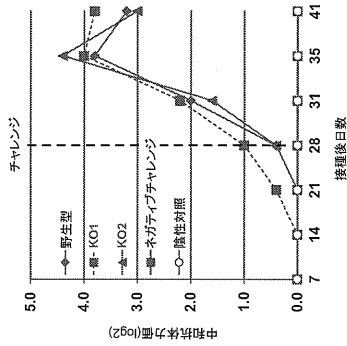
【 図 1 9 A 】

KO1突然変異体は初期中和抗体応答を誘導した



【 図 1 9 B 】

KO1突然変異体は初期中和抗体応答を誘導した



## 【配列表】

2015533474000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年4月28日(2015.4.28)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ORF1a またはその機能的部分をコードする核酸を含むアルテリウイルスであって、前記核酸が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において、nsp2TFのTFドメインの翻訳の低減および/または前記核酸から翻訳される1以上の下流産物の翻訳の変更をもたらす少なくとも1つの突然変異を含む、アルテリウイルス。

【請求項2】

前記突然変異が、nsp2タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるマイナス2リボソームフレームシフトに干渉する、請求項1に記載のアルテリウイルス。

【請求項3】

前記突然変異の少なくとも1つがフレームシフト部位GGU(U/C)U(U/C)Uおよび/または保存されているCCCANCUCCモチーフ内にある、請求項1または請求項2に記載のアルテリウイルス。

【請求項4】

前記突然変異の少なくとも1つが、nsp1タンパク質をコードする核酸配列内にあり、かつ、マイナス2リボソームフレームシフトの低減をもたらす、請求項1～3のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

【請求項5】

nsp2TF機能が、前記アルテリウイルスの野生型に比べて、前記アルテリウイルスが感染した細胞において低減される、かつ/または欠失となる、アルテリウイルス。

【請求項6】

ORF1a またはその機能的部分をコードする核酸を含み、前記アルテリウイルスのnsp2TFアミノ酸配列が変更されるか、末端切断されるかまたは不在である、請求項5に記載のアルテリウイルス。

【請求項7】

nsp2TFのTFドメインのアミノ酸配列が改変され、前記改変されたアミノ酸配列が場合により、野生型アルテリウイルスには存在せず、免疫原性があるエピトープを提供し、かつ、ORF1aのリーディングフレームが損なわれていない、請求項5または請求項6に記載のアルテリウイルス。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項に記載の自律複製アルテリウイルス。

【請求項9】

前記アルテリウイルスがPRRSV 1型PRRSV(欧州遺伝子型)、II型PRRSV(北米遺伝子型)、またはそれらの組合せである、請求項1～8のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

【請求項10】

前記アルテリウイルスが乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス(LDV)またはサル出血熱ウイルス(SHFV)である、請求項1～8のいずれか一項に記載のアルテリウイルス。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のアルテリウイルスをコードする RNA、DNA、または cDNA。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のアルテリウイルス、または請求項 11 に記載の RNA もしくは DNA、またはそれらの組合せと薬学上許容される担体または希釈剤とを含む、ワクチンまたは免疫原性組成物。

## 【請求項 13】

pL1a (配列番号 1)、pLns p 2 - 8 (配列番号 2)、pLns p 1 - 2 (配列番号 3)、pLns p 1 - 2 (配列番号 4)、pLns p 1 - cc - 2 (配列番号 5)、pLns p 2 (配列番号 6)、pLns p 1 - 3 (配列番号 7)、pLns p 1 - 3 (配列番号 8)、pLns p 2 - 3 (配列番号 9)、pLns p 2 - 3 - IFC (配列番号 10)、pLns p 1 (配列番号 11)、pL1a - IFC (配列番号 12)、pL1a - KO1 (配列番号 13)、pL1a - KO2 (配列番号 15)、pL1a - SS (配列番号 17)、pL1a - CC1 (配列番号 18)、pL1a - CC2 (配列番号 20)、pSD01 - 08 - IFC (配列番号 22)、pSD01 - KO1 (配列番号 25)、pSD01 - KO2 (配列番号 26)、pSD01 - 08 - KO1 (配列番号 92)、pSD01 - 08 - KO2 (配列番号 93)、pSD01 - 08 - KO3 (配列番号 94)、pSD95 - 21 - KO1 (配列番号 95)、pSD95 - 21 - KO2 (配列番号 96)、および pSD95 - 21 - KO3 (配列番号 97) を含む、請求項 12 に記載のワクチンまたは免疫原性組成物。

## 【請求項 14】

前記組成物がアジュバント、賦形剤、またはそれらの組合せをさらに含む、請求項 12 または請求項 13 に記載のワクチンまたは免疫原性組成物。

## 【請求項 15】

アルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質の全長または部分的 T F ドメインを含む、単離されたまたは組換え型のタンパク質。

## 【請求項 16】

アルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質、請求項 15 に記載のタンパク質、または配列番号 63、64 もしくは 65 で示されるアミノ酸配列もしくはそれと少なくとも 70% 同一のアミノ酸配列を有するタンパク質、の T F ドメインと特異的に結合する、単離されたまたは組換え型の抗体。

## 【請求項 17】

野生型アルテリウイルスに感染した、および / または非改変型アルテリウイルス株を接種された被験体を、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載のワクチンを接種された被験体から識別するための方法であって、

a) 前記被験体からサンプルを準備すること；

b) 前記サンプルにおいて、T F O R F の 5' 末端に位置するマイナス 2 フレームシフト部位におけるマイナス 2 リボソームフレームシフトに影響を及ぼす突然変異の有無または T F O R F コード領域に対する改変を定性的に、または定量的に、または定性的かつ定量的に判定すること；および / または

c) 前記サンプルにおいて、前記ワクチンに特異的な免疫原性エピトープに対する抗体の存在を判定すること；および / または

d) 前記サンプルにおいて、前記野生型または非改変型アルテリウイルスにより発現されるが前記ワクチンには存在しないエピトープに対する抗体の存在を判定することを含む、方法。

## 【請求項 18】

生体サンプルにおけるアルテリウイルスのタイピングのための方法であって、

a) n s p 2 タンパク質のコード領域に位置するマイナス 2 フレームシフト部位の存在および / または配列を判定すること；および / または

b) 前記アルテリウイルスにおける n s p 2 T F コード領域の存在および/または配列を判定することを含む、方法。

【請求項 19】

あるタンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結されたアルテリウイルスのマイナス2フレームシフト部位を含む核酸であって、前記タンパク質がアルテリウイルスタンパク質でなく、前記核酸が前記マイナス2フレームシフト部位の5'側にリボソーム翻訳開始コドンを含み、核酸。

【請求項 20】

前記アルテリウイルスのマイナス2フレームシフト部位が配列 G G U ( U / C ) U ( U / C ) U および/または C C C A N C U C C を含む、請求項 19 に記載の核酸。

【請求項 21】

a) 配列番号 35 の核酸配列；  
b) 配列番号 45、36、または 76 のうち 1 以上のアミノ酸をコードする核酸；  
c) 高ストリンジェンシー条件下で ( a ) または ( b ) とハイブリダイズする核酸配列；  
d) ( a )、( b )、または ( c ) のいずれかの機能的フラグメントを含む、請求項 19 または請求項 20 に記載の核酸。

【請求項 22】

請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の核酸を含む発現系であって、前記発現系が n s p 1 またはその機能的部分をさらに含む、発現系。

【請求項 23】

ある薬剤が、n s p 2 タンパク質をコードする核酸配列内に位置するマイナス2フレームシフト部位におけるリボソームフレームシフトに干渉し得るかどうかを判定するための方法であって

a) 前記部位においてフレームシフトを許容する翻訳系に、前記部位と作動可能に連結された遺伝子マーカーまたはリポーターをコードする核酸を提供すること；  
b) 前記翻訳系を前記薬剤と接触させること；  
c) 工程 b) の系と薬剤を前記核酸の翻訳を可能とするようにインキュベートすること；および  
d) 前記核酸によりコードされている翻訳産物の有無を判定することを含む、方法。

【請求項 24】

前記翻訳系がアルテリウイルス n s p 1 タンパク質もしくはその機能的部分を含み、かつ/または細胞である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記薬剤がアンチセンス DNA、アンチセンス RNA、s i R N A、マイクロ RNA、核酸類似体、ペプチド、小分子もしくは化学化合物、またはそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 23 または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

アルテリウイルスにおけるマイナス2フレームシフトに干渉し得る有効量の薬剤と、場合により薬学上許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 27】

異種プロモーターと作動可能に連結されたアルテリウイルス n s p 2 T F タンパク質をコードする核酸を含む発現カセット。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の発現カセットを含む細胞。

【請求項 29】

前記発現カセットが前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のアルテリウイルス、または請求項 11 に記載の cDNA をさらに含む、請求項 28 または請求項 29 に記載の細胞。

【請求項 31】

請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の細胞を含むアルテリウイルスパッケージング細胞株。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2015533474000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/051041
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K39/12 C07K14/005 C12N7/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. HAN ET AL: "Identification of Nonessential Regions of the nsp2 Replicase Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain VR-2332 for Replication in Cell Culture", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 81, no. 18, 15 September 2007 (2007-09-15), pages 9878-9890, XP055091114, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00562-07	1,2,4-9, 11,16
Y	the whole document ----- -/--	12,14,15
<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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  3 December 2013		Date of mailing of the international search report  09/04/2014
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  Wimmer, Georg

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2013/051041**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-19, 29-33

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 051041

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-19, 29-33

Arterivirus comprising nucleic acid encoding ORF1a or functional part thereof, wherein said nucleic acid comprises at least one mutation resulting in reduced translation of nsp2TF; a protein comprising a full-length or partial TF domain of an arterivirus nsp2TF protein; as well as corresponding methods related to the detection of nsp2TF protein.

---

2. claims: 20-23

A nucleic acid comprising an arterivirus -2 frameshift site in operable linkage with a nucleic acid sequence that codes for a protein, wherein said protein is not an arterivirus protein, said nucleic acid further comprising a ribosomal translation start codon 5' of said -2 frameshift site.

---

3. claims: 24-28

A method for determining whether an agent is capable of interfering with ribosomal frameshifting at the -2 frameshift site located in the nucleic acid sequence that encodes said protein.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/051041
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GREBENNIKOVA T V ET AL: "Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 321, no. 2, 10 April 2004 (2004-04-10), pages 383-390, XP004499218, ISSN: 0042-6822, DOI: 10.1016/J.VIROL.2004.01.001	1,2, 4-11,16
Y	the whole document	12,14,15
X	YUFENG LI ET AL: "Genetic analysis of two porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with different virulence isolated in China", ARCHIVES OF VIROLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE VIROLOGY DIVISION OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 153, no. 10, 22 September 2008 (2008-09-22), pages 1877-1884, XP019660398, ISSN: 1432-8798, DOI: 10.1007/S00705-008-0207-6	1,2, 4-10,16
Y	the whole document	12,14,15
X	WO 2012/063212 A1 (PFIZER [US]; WELCH SIAO-KUN WAN [US]; CALVERT JAY GREGORY [US]) 18 May 2012 (2012-05-18)	1,2, 4-12, 14-16
Y	the whole document	12,14,15
X	FANG YING ET AL: "A FULL-LENGTH CDNA INFECTIOUS CLONE OF NORTH AMERICAN TYPE 1 PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS: EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN IN THE NSP2 REGION", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 80, no. 23, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 11447-11455, XP009077448, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01032-06	17
A	XU Z ET AL: "synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 14, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 3840-3848, XP002246932, ISSN: 0261-4189, DOI: 10.1093/EMBOJ/20.14.3840	1-19, 29-33
	the whole document	

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/051041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012063212 A1	18-05-2012	AR 083839 A1	27-03-2013
		AU 2011327760 A1	23-05-2013
		CA 2817486 A1	18-05-2012
		CN 103517715 A	15-01-2014
		EP 2637688 A1	18-09-2013
		JP 2014500721 A	16-01-2014
		KR 20130084692 A	25-07-2013
		TW 201249864 A	16-12-2012
		US 2014072589 A1	13-03-2014
		WO 2012063212 A1	18-05-2012

---

## 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 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(71) 出願人 510114583

アカデミシュ ジーケンハウス ライデン

オランダ国 エンエル - 2 3 3 3 ゼットアー ライデン、アルビヌスドレーフ 2

(71) 出願人 591197426

ユニバーシティ・カレッジ・コーク

UNIVERSITY COLLEGE CORK

アイルランド国コーク, カレッジ・ロード (番地なし)

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74) 代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74) 代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74) 代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72) 発明者 ファン, イン

アメリカ合衆国 5 7 5 0 1 サウスダコタ州, ピア, スイート 2 0 0, イースト キャピトル  
アベニュー 3 0 6, サウス ダコタ ボード オブ リージェンツ

(72) 発明者 スナイデル, エリック ジョン

オランダ国 2 3 3 3 ゼットアー ライデン, アルビヌスドレーフ 2, アカデミシュ ジー  
ケンハウス ライデン

(72) 発明者 ファース, アンドリュウ イー.

イギリス国 シービー2 1 ティーエヌ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, トリニティ レー  
ン, ジ オールド スクールズ, ケンブリッジ エンタープライズ リミテッド

- (72)発明者 アトキンス, ジョン エフ.  
 アイルランド国 カウンティ コーク, コーク, カレッジ ロード, ユニバーシティ カレッジ  
 コーク
- (72)発明者 トレファース, エマ エリザベス  
 オランダ国 2333 ゼットエー ライデン, アルピーヌストレーフ 2, アカデミシュ ジー  
 ケンハウス ライデン
- (72)発明者 タス, アリ  
 オランダ国 2333 ゼットエー ライデン, アルピーヌストレーフ 2, アカデミシュ ジー  
 ケンハウス ライデン
- (72)発明者 リー, ヤンファ  
 アメリカ合衆国 57501 サウスダコタ州, ピア, スイート 200, イースト キャピトル  
 アベニュー 306, サウス ダコタ ボード オブ リージェンツ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 DA02 GA11  
 4B063 QA01 QQ02 QQ42 QQ79 QR32 QR35 QR48  
 4B064 AG32 CA10 CA19 CC24 DA01  
 4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA45  
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA592 ZB332  
 4C085 AA03 BA51 BB11 BB23 CC31 EE01 GG01  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76 DA86 EA31 FA74

专利名称(译)	新型Artemis病毒蛋白及其表达机制		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015533474A</a>	公开(公告)日	2015-11-26
申请号	JP2015523246	申请日	2013-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	南达科他州评议委员会 剑桥企业有限公司 学院什鲁斯伯里啧啧肯家莱顿 愛爾蘭國立科克大學科克學院		
申请(专利权)人(译)	评议南达科他州局 剑桥企业有限公司 学院什鲁斯伯里啧啧肯家莱顿 科克大学		
[标]发明人	ファンイン スナイデルエリックジョン ファースアンドリュウイー アトキンスジョンエフ トレファースエマエリザベス タスアリ リーヤンファ		
发明人	ファン,イン スナイデル,エリック ジョン ファース,アンドリュウ イー. アトキンス,ジョン エフ. トレファース,エマ エリザベス タス,アリ リー,ヤンファ		
IPC分类号	C12N7/00 C12N15/09 C07K14/08 C12N7/04 C07K16/10 C12Q1/68 C12P21/02 A61K39/00 A61K39/12 A61K45/00 A61P31/12 A61P11/00 A61K48/00 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/5254 A61K2039/552 A61P11/00 C07K14/005 C12N7/00 C12N2770/10011 C12N2770/10022 C12N2770/10034 C12N2770/10062 G16B20/00 C07K16/10		
FI分类号	C12N7/00.ZNA C12N15/00.A C07K14/08 C12N7/04 C07K16/10 C12Q1/68.A C12P21/02.C A61K39/00. H A61K39/12 A61K45/00 A61P31/12 A61P11/00 A61K48/00 G01N33/53.N G01N33/569.L		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063 /QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084 /ZB332 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC31 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045 /FA74		
代理人(译)	荒井英一 Nobuto 滤纸冲		
优先权	61/741425 2012-07-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本発明提供了新型动脉病毒蛋白 ( nsp2TF ) の发现和表征，其表达依赖于位于nsp2编码区中的位点的-2核糖体移码。nsp2TF的独特TF结构域的编码区与编码动脉炎 ( 包括PRRSV，LDV和SHFV ) 中的nsp2的跨膜区的ORF1a的部分重叠。影响nsp2TF表达的突变损害PRRSV复制并导致较小的斑块表型。本文提供了显示nsp2TF的降低的翻译和/或一种或多种下游产物，其中nsp2TF功能减少和/或缺失的动脉病毒和包含所述动脉炎病毒的疫苗的改变的翻译的动脉炎病毒。本文还提供了诊断方法，鉴定抑制-2移码的化合物的方法和使用-2移码的真核系统的基因表达工具。

(21) 出願番号	特願2015-523246 (P2015-523246)	(71) 出願人	515015241
(86) (22) 出願日	平成25年7月18日 (2013. 7. 18)		サウス ダコタ ボード オブ リージェ ンツ
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月10日 (2015. 3. 10)		アメリカ合衆国 57501 サウスダコ タ州, ビア, スイート 200, イースト キャピトル アベニュー 306
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/051041	(71) 出願人	501484851
(87) 国際公開番号	WO2014/015116		ケンブリッジ・エンタープライズ・リミテ ッド CAMBRIDGE ENTERPRIS E LIMITED
(87) 国際公開日	平成26年1月23日 (2014. 1. 23)		英国シービー2・1ティエヌ、ケンブリッ ジジャー、ケンブリッジ、トリニティ・レ イン、ジ・オールド・スクールズ
(31) 優先権主張番号	61/741, 425		
(32) 優先日	平成24年7月18日 (2012. 7. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く