

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6649255号  
(P6649255)

(45) 発行日 令和2年2月19日(2020.2.19)

(24) 登録日 令和2年1月20日(2020.1.20)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/235 (2006.01)	A 6 1 K 39/235 Z N A
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 47/14 (2006.01)	A 6 1 K 47/14
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44

請求項の数 25 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-535460 (P2016-535460)  
 (86) (22) 出願日 平成26年8月19日 (2014.8.19)  
 (65) 公表番号 特表2016-534110 (P2016-534110A)  
 (43) 公表日 平成28年11月4日 (2016.11.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/067654  
 (87) 国際公開番号 W02015/024932  
 (87) 国際公開日 平成27年2月26日 (2015.2.26)  
 審査請求日 平成29年6月22日 (2017.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 13180849.5  
 (32) 優先日 平成25年8月19日 (2013.8.19)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 507364333  
 フェテリネールメディツィニシュ ウニベルジテート ウィーン  
 オーストリア国, アー 1 2 1 0 ウィーン, フェテリネールブラッツ 1  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリアデノウイルスワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鳥類における肝炎心膜水腫症候群 (HHS) の予防において使用するための、トリアデノウイルスC (FAdV-C) のファイバー-2タンパク質を含むワクチンであって、サブユニットワクチンである、前記ワクチン。

【請求項 2】

前記鳥類は、家禽である、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記鳥類は、ブロイラーである、請求項 1 又は 2 に記載のワクチン。

【請求項 4】

補助剤を更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 5】

前記補助剤は、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム、百日咳菌、サポニン、ムラミルジペプチド、エチレンビニルアセテート共重合体、油、植物油または鉱油、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 4 に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記FAdV-Cのファイバー-2タンパク質は、









鳥類におけるHHSを予防するための方法であって、  
前記方法は、家禽に、トリアデノウイルス血清型C (FAdV-C) のファイバー2タンパク質を含むワクチンを投与することを含み、

ここで、前記ワクチンはサブユニットワクチンである、前記方法。

【請求項16】

前記鳥類は、家禽である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記鳥類は、ブロイラーである、請求項15又は16に記載の方法。

【請求項18】

前記ワクチンは、親の群れに投与される、請求項15～17のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項19】

固体表面に固定されたFAdV-Cのファイバー2タンパク質またはその免疫原性断片を含む、抗ファイバー2抗体を検出するためのキット。

【請求項20】

前記固定されたFAdV-Cのファイバー2タンパク質または前記固定されたその免疫原性断片に対する抗体の結合を検出するための手段を更に含む、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

前記検出するための手段は、鳥類の抗体に特異的な抗体である、請求項20に記載のキット。 20

【請求項22】

前記検出するための手段は、抗ニワトリIgG抗体または抗七面鳥IgG抗体である、請求項20又は21に記載のキット。

【請求項23】

前記抗ニワトリIgG抗体または抗七面鳥IgG抗体は、標識された抗体である、請求項22に記載のキット。

【請求項24】

前記標識された抗体は、色素、蛍光、発光、または放射性標識で標識された抗体である、請求項23に記載のキット。

【請求項25】 30

FAdV-Cのファイバー2タンパク質を含む、請求項19～24のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝炎心膜水腫症候群 (hepatitis-hydropericardium syndrome : HHS) を予防するための方法および組成物 (製剤) に関する。

【背景技術】

【0002】

HHSは、主にブロイラーの群れで発症する鶏の感染症で、死亡率が高く深刻な経済的損失をもたらす。1987年にパキスタンからこの疾病についての最初の報告があり、その後、主にアジア諸国や中南米における大流行 (outbreaks) が記録されている。当初、トリアデノウイルスに加え未知の物質の関与が仮定されたが、後に特定の病原体フリーのトリにおいて病原性トリアデノウイルス (FAdV) 種C株の経口感染後に疾病が再現されるという説に修正された。 40

【0003】

トリアデノウイルスは、アデノウイルス科アピアデノウイルス属のメンバーである。5つの種 (FAdV-A～FAdV-E) および12個の血清型 (FAdV-1～8aおよび8b～11) が交差中和試験により同定されており、現在まで認識されている。

【0004】 50

アデノウイルスは、直径が70～90nmのエンベロープを持たない粒子であり、二本鎖DNAゲノムを有する。

【0005】

アデノウイルスの主要な構造タンパク質はヘキソンとペントンであり、これらは、252個のサブユニット（カプソマー）からなる正二十面体のカプシドを構成する。ヘキソンは面を形成し、ペントンは正二十面体の頂点を覆っている。ペントンベースは、アンテナ状のファイバータンパク質を固定し、このファイバータンパク質の遠位ヘッドドメイン（ノブと呼ばれる）は、受容体結合部位を有しているため、ウイルスを宿主細胞へ結合するのを開始するのに不可欠である。

【0006】

FAdVカプシドは、2個のファイバータンパク質が各ペントンベースと結合するという形態学的な特性を有する。一方、哺乳類のアデノウイルスは、一つの頂点につき唯一つのファイバータンパク質を有するという特徴を有する。二重ファイバーの存在は全てのFAdVに共通するが、2個のファイバーの配列および長さが異なり、それぞれ別個の遺伝子によってコードされるというのがFAdV-1（FAdV-A）の特徴である（Hess et al., J. Mol. Biol. 252 (1995), 379-385）。FAdV-C分離株における2個のファイバーをそれぞれコードする遺伝子が異なるということが新たに発見され、遺伝子が異なるということが、同じ長さのファイバータンパク質を有する全てのFAdV種の中でもFAdV-Cのメンバーに特有な特徴であることが近年実証された（Marek et al., Vet. Microbiol. 156 (2012), 411-417）。

【0007】

受容体結合ドメインとしてのノブの特徴解析により、ファイバー分子が、組織親和性及び病原性の違いといったアデノウイルスの感染特性に関連する重要な因子であることが確立された。しかし、FAdVに存在する二重ファイバーの個々の機能に関すること、特に宿主細胞受容体との相互作用の点で未だ多くの疑問が残っている。

【0008】

主要な表面露出カプシド構造として、ファイバーおよびヘキソンが、アデノウイルスおよびキャリアにおける亜群や型特異性によるエピトープの抗原性の重要なメディエーターである。また、ヘキソンおよびファイバーに特異的な抗体が、アデノウイルスに対する哺乳動物の液性応答における中和活性に主に寄与することが示されている。近年、in vitroの試験で、産卵低下症候群ウイルス（EDSV（DAdV-A = DAdV-1））の組換えヘキソンおよびファイバータンパク質によって抗体の中和能が異なることが実証された。

【0009】

かかる抗原性のため、アデノウイルスカプシドの構造が、エピトープベースのワクチンの設計に可能性のある候補として提案されている。

【0010】

HHSに対する戦略は、感染の防止および弱毒化トリアデノウイルスワクチン（W003/039593）や不活化ワクチンの提供に集中しており、これらのワクチンは感染肝臓ホモジネート由来のもの（Anjum et al. 1990）または初代細胞で増殖させたウイルス由来のもの（Alvarado et al. 2007）である。しかし、FAdVは普遍的に発生するので、このような従来ワクチンの適用およびそのワクチン接種の有効性の検証は、接種と感染の間で区別が付きにくいいため使用が限定的である。ペントンベースに基づくHHSに対するサブユニットワクチン（大腸菌で発現）が近年示唆された（Shah et al., Vaccine 30 (2012); 7153-7156）。しかし、他のトリアデノウイルスも遍在するので、免疫化の成功度を示す指標として抗体を検出することは通常困難である。

【0011】

US 2011/165224 A1に、防御免疫を誘導する特定の血清型のFAdV分離株（isolated FAdV strains）が開示されている。これらの組成物は、全（生または死滅）ウイルスを含み、サブユニットワクチンまたは単離FAdVタンパク質（isolated FAdV proteins）は含まない。Griffin et al. (J. Gen. Virol. 92 (2011); 1260-1272) は、FAdV-4のコーディング能および転写産物の分析を開示している。「タンパク質をコードすることが予測される」

10

20

30

40

50

(しかし、発現することは示されていない) FAdV-4ファイバー2(ショートファイバー)がおそらく受容体に結合し、FAdV-4の組織親和性を決定する可能性がありこのことが、「おそらく病原性FAdV-4の感染に関連するユニークな臨床的特徴につながるのではないかと記載されているがこの記載は疑わしい。上記著者らは、トリFAdV-1およびヒト腸溶性血清型HAdV - 40とHAdV-41 (=HADV-F)のいずれも、2個のファイバー遺伝子を含むという点は正しく指摘している。しかし、重要な違いがある。つまり、すべてのトリAdVの中でもFAdV-1は、1個のペントンベースごとに常に2個のファイバーと一緒にアセンブルされているのに対し、HAdV - F内ではたった1個のファイバーしかない。また、HAdV - Fピリオンでは異なる量の2個のファイバーがアセンブルされるもののこれらのmRNAレベルは同じである(Song et al., Virology 432 (2012), 336-342)。これは、これらの両者のファイバーがアセンブルされたピリオンにおいて異なる機能を有することを示す(このことは、受容体の研究で確認された)。また、Tan et al. (J. Gen. Virol. 82 (2001), 1465-1472)は、ファイバー2が、ウイルスアセンブリおよび未知の細胞受容体との相互作用に参与していることを示している。FAdV-1は、他のすべてのFAdVとは対照的に、完全に異なる長さの2個のファイバーを含むので、かかる結果を他の血清型に当てはめることはできない。

10

#### 【0012】

Marek et al. (Vet. Microbiol. 156 (2012); 411-417)は、ほぼ同じ長さの2個のファイバー遺伝子がFAdV-Cに存在する一方、他の血清型はただ1つのファイバー遺伝子しか有さないという事実を開示している。「FAdVのファイバーがFAdVの感染性や病原性に重要な役割を果たしている(1996年に実証)」と述べられているが、この記載事項は、Marek et al.によってFAdV-Cに関する限り「純粋に推論的」とであると認定された。更に、ファイバータンパク質が感染性や病原性に参与する可能性があるからといって、組換えタンパク質をワクチンとして適用できることが成功すると自動的に示すものではない。

20

#### 【0013】

Fingerut et al. (Vaccine 21 (2003); 2761-2766)は、アデノウイルス産卵低下症候群に対し、そのファイバータンパク質の一部を使用したサブユニットワクチンを開示している。

#### 【0014】

本発明の目的は、鳥類、特に家禽におけるHHSの効率的な予防のための安全かつ特異的なワクチンを提供することである。本ワクチンは、製造が容易で費用効率が良く、工業ベースでの管理に適しているはずである。ワクチンを用いる免疫の成功度は、検出容易で確認可能なはずである。

30

#### 【0015】

従って、本発明は、鳥類、好ましくは家禽、特にブロイラーにおける肝炎心膜水腫症候群(HHS)の予防において使用するための、トリアデノウイルスC(FAdV-C)のファイバー2タンパク質またはその免疫原性断片を含むワクチンを開示する。

#### 【0016】

本発明は、FAdV-Cのファイバー2タンパク質が、鳥類、特にニワトリを、HHSから完全に保護する効果的なサブユニットワクチンであるという教示を提供する。FAdV-Cのファイバー1タンパク質、並びに、ヘキソン由来のサブユニットワクチン(ヘキソンループ1)では保護効果を示さなかったため、この知見は卓越するものである。単離されたサブユニット、すなわち単離された単一タンパク質またはタンパク質断片を備える本ワクチンは、本質的に、生、弱毒化、または死滅ウイルス(ウイルス全体)ベースのワクチンとは異なることは明らかである。従って、本発明は、全く新規かつ、FAdVのファイバーおよびヘキソン由来タンパク質についての当該分野における本教示に鑑みて、HHS、IBH、およびGEの予防を管理するためのトリへのワクチン接種に驚くほど効果的な戦略を提供する。

40

#### 【0017】

本発明では、FAdV-Cのファイバー2タンパク質を使用できる。本発明の実施例では、基準株であるKR5株由来のファイバー2タンパク質を、基準(UniProtエントリH8WQW9)とし

50

て使用したが、FAdV-Cのファイバー2タンパク質の他の配列、例えば、基準株ON1 (GU1884 28 = NC\_\_015323) またはCFA20 (AF160185) または他の任意のFAdV-Cのフィールド分離株、例えば、分離株 (isolates) IV37、K99-97、K388-95、K88-95、K31、Peru53、Peru54、c344、K1013、AG234、C2B、09-584、09-8846、09-2602、922-1、Da60、K1013QTおよびINT 4 (Marek et al., Vet. Microbiol. 156 (2012), 411-417に開示されている) 由来の配列で、UniProtエントリH8WG65、H8WG69、H8WG72、H8WG77、H8WG70、H8WG73、H8WG66、H8WG76、H8WG60、H8WG61、H8WG62、H8WG75、H8WG67、H8WG78、H8WG63、H8WG68、H8WG64、H8WG74、H8WG71、H8WQZ7、H8WQZ2、H8WQW9、Q0GH78、055281、およびF2VJ15に対応する配列も使用し得る。

【0018】

用語「ファイバー2タンパク質」は、当該技術分野において一般に認められている。全てのファイバータンパク質、特に、ファイバー2タンパク質のサブグループは、特異的かつ保存されたアミノ酸モチーフを有する特徴的な構造をもたらす特徴的なアミノ酸配列によって統一されている。

【0019】

FAdV-Cのファイバー2タンパク質の全体を使用する代わりに、ファイバー2タンパク質の免疫原性断片のみを、本発明に係るワクチンとして使用できる。免疫原性断片は、天然に存在するFAdV-C分離株のファイバー2タンパク質由来の任意のポリペプチドであり得る。これらの断片は、7個のアミノ酸残基の最小長、好ましくは8個のアミノ酸残基の最小長、特に9個のアミノ酸残基の最小長を有する。かかる最小長を有すれば、十分なMHC結合がもたらされる。適切なモチーフは、実験的にまたはコンピューターによる予測を通じて確認できる (例えば、Wallny et al., PNAS 103(2006), 1434-1439; Huo et al., PLoS ONE 7 (2012): e39344. doi:10.1371参照)。従って、免疫原性断片の好ましい長さは、7~100個のアミノ酸、好ましくは8~50個のアミノ酸、より好ましくは8~20個のアミノ酸、特に8~16個のアミノ酸である。例えば、本発明に係る免疫原性断片は、B4、B12、B15、およびB19ハプロタイプに属するニワトリMHCクラスI分子のペプチド結合モチーフベースのオクタペプチドまたはノナペプチド (Wallny et al., 2006; Huo et al., 2012) を含み得る。これらのモチーフは以下の通りである: B4: x - (DまたはE) - x - x - (DまたはE) - x - x - E; B12: x - x - x - x - (VまたはI) - x - x - Vおよびx - x - x - x - (VまたはI) - x - x - x (V); B15: (KまたはR) - R - x - x - x - x - Yおよび(Kまたは) - R - x - x - x - xx - x - Y; B19: x - R - x - x - x - x - x - (Y、P、L、F) およびx - R - x - x - x - x - x - x - (Y、P、L、F)。

【0020】

ファイバー2タンパク質は、テールドメイン (アミノ酸1~65)、シャフトドメイン (アミノ酸66~276)、およびヘッドドメイン (アミノ酸277~479) を有する。ここで、概して、本明細書における全てのアミノ酸配列の番号は、KR5基準株のファイバー2タンパク質 (UniProt H8WQW9; Marek et al., 2012) に対応する。本発明の好ましい免疫原性断片は、以下のモチーフ: 400~450、好ましくは410~440、より好ましくは420~440; 70~95、好ましくは75~93、特に75~90; 20~70、好ましくは25~65、特に45~65および25~47; 200~225、265~290、350~385、460~480、165~190、320~350および290~320 (番号は、KR5のファイバー2のアミノ酸番号に対応) を含む。

【0021】

免疫原性断片の例として、以下のファイバー2タンパク質 (ここでも、KR5のファイバー2のアミノ酸番号基準で、図5のアライメントに対応する) のアミノ酸配列を1つまたは複数含む断片が挙げられる。

【0022】

最も好ましい (番号は、KR5のファイバー2のアミノ酸番号に対応):

23 ~ 37  
24 ~ 38  
22 ~ 36

10

20

30

40

50

25	~	39	
21	~	35	
424	~	438	
254	~	268	
423	~	437	
424	~	438	
421	~	435	
422	~	436	
423	~	437	
424	~	438	10
425	~	439	
426	~	440	
427	~	441	
423	~	437	
253	~	267	
425	~	439	
254	~	268	
78	~	92	
424	~	438	
424	~	438	20
79	~	93	
77	~	91	
423	~	437	
26	~	40	
403	~	417	
404	~	418	
405	~	419	
406	~	420	
407	~	421	
408	~	422	30
409	~	423	
69	~	83	
255	~	269	
20	~	34	
325	~	339	
355	~	369	
425	~	439	
423	~	437	
45	~	59	
46	~	60	40
47	~	61	
48	~	62	
49	~	63	
50	~	64	
51	~	65	
326	~	340	
255	~	269	
326	~	340	

非常に好ましい（番号は、KR5のファイバー2のアミノ酸番号に対応）：

50

424	~	438	
26	~	40	
27	~	41	
28	~	42	
29	~	43	
30	~	44	
31	~	45	
32	~	46	
75	~	89	
76	~	90	10
77	~	91	
78	~	92	
79	~	93	
80	~	94	
81	~	95	
354	~	368	
283	~	297	
425	~	439	
422	~	436	
325	~	339	20
282	~	296	
422	~	436	
253	~	267	
423	~	437	
322	~	336	
323	~	337	
324	~	338	
325	~	339	
326	~	340	
327	~	341	30
328	~	342	
70	~	84	
425	~	439	
423	~	437	
424	~	438	
204	~	218	
205	~	219	
206	~	220	
207	~	221	
208	~	222	40
209	~	223	
210	~	224	
267	~	281	
268	~	282	
269	~	283	
270	~	284	
271	~	285	
272	~	286	
273	~	287	
353	~	367	50

354	~	368	
355	~	369	
356	~	370	
357	~	371	
358	~	372	
359	~	373	
69	~	83	
76	~	90	
425	~	439	
327	~	341	10
68	~	82	
252	~	266	
309	~	323	
442	~	456	
256	~	270	
426	~	440	
68	~	82	
69	~	83	
70	~	84	
71	~	85	20
72	~	86	
73	~	87	
74	~	88	
464	~	478	
465	~	479	
310	~	324	
80	~	94	
443	~	457	
426	~	440	
324	~	338	30
167	~	181	
168	~	182	
169	~	183	
170	~	184	
171	~	185	
172	~	186	
173	~	187	
356	~	370	
70	~	84	
353	~	367	40
192	~	206	
54	~	68	
55	~	69	
322	~	336	
323	~	337	
324	~	338	
325	~	339	
326	~	340	
422	~	436	
422	~	436	50

327	~	341	
56	~	70	
294	~	308	
295	~	309	
296	~	310	
297	~	311	
298	~	312	
299	~	313	
300	~	314	
355	~	369	10
325	~	339	
191	~	205	
355	~	369	
71	~	85	
441	~	455	
421	~	435	
256	~	270	
79	~	93	
308	~	322	
283	~	297	20
71	~	85	
425	~	439	
426	~	440	
77	~	91	
422	~	436	
68	~	82	
426	~	440	
282	~	296	
426	~	440	
356	~	370	30
281	~	295	
284	~	298	
78	~	92	
310	~	324	
311	~	325	
53	~	67	
183	~	197	
313	~	327	
314	~	328	
315	~	329	40
316	~	330	
317	~	331	
318	~	332	
319	~	333	
52	~	66	
252	~	266	
183	~	197	
297	~	311	
422	~	436	
328	~	342	50

59	~	73	
60	~	74	
61	~	75	
62	~	76	
63	~	77	
64	~	78	
65	~	79	
463	~	477	
184	~	198	
254	~	268	10
309	~	323	
207	~	221	
43	~	57	
324	~	338	
52	~	66	
53	~	67	
54	~	68	
55	~	69	
56	~	70	
57	~	71	20
58	~	72	
185	~	199	
323	~	337	
444	~	458	
324	~	338	
356	~	370	
78	~	92	
206	~	220	
364	~	378	
376	~	390	30
377	~	391	
378	~	392	
379	~	393	
380	~	394	
381	~	395	
382	~	396	
71	~	85	
192	~	206	
378	~	392	
421	~	435	40
192	~	206	
297	~	311	
182	~	196	
183	~	197	
184	~	198	
185	~	199	
186	~	200	
187	~	201	
188	~	202	
76	~	90	50

194	~	208	
77	~	91	
326	~	340	
193	~	207	
79	~	93	
282	~	296	
69	~	83	
184	~	198	
298	~	312	
23	~	37	10
70	~	84	
379	~	393	
283	~	297	
296	~	310	
283	~	297	

好ましい（番号は、KR5のファイバー2のアミノ酸番号に対応）：

424	~	438	
354	~	368	
27	~	41	20
426	~	440	
255	~	269	
282	~	296	
357	~	371	
193	~	207	
261	~	275	
307	~	321	
352	~	366	
354	~	368	
75	~	89	30
261	~	275	
295	~	309	
44	~	58	
207	~	221	
169	~	183	
253	~	267	
311	~	325	
292	~	306	
185	~	199	
464	~	478	40
465	~	479	
283	~	297	
423	~	437	
206	~	220	
42	~	56	
287	~	301	
288	~	302	
289	~	303	
290	~	304	
291	~	305	50

292	~	306	
293	~	307	
357	~	371	
280	~	294	
281	~	295	
282	~	296	
283	~	297	
284	~	298	
285	~	299	
286	~	300	10
284	~	298	
440	~	454	
261	~	275	
310	~	324	
251	~	265	
363	~	377	
207	~	221	
24	~	38	
319	~	333	
282	~	296	20
182	~	196	
260	~	274	
22	~	36	
293	~	307	
428	~	442	
429	~	443	
296	~	310	
168	~	182	
260	~	274	
318	~	332	30
78	~	92	
309	~	323	
79	~	93	
191	~	205	
192	~	206	
193	~	207	
194	~	208	
195	~	209	
196	~	210	
197	~	211	40
282	~	296	
28	~	42	
317	~	331	
245	~	259	
206	~	220	
67	~	81	
127	~	141	
186	~	200	
465	~	479	
310	~	324	50

257	~	271	
421	~	435	
323	~	337	
208	~	222	
378	~	392	
72	~	86	
93	~	107	
207	~	221	
320	~	334	
86	~	100	10
458	~	472	
459	~	473	
460	~	474	
461	~	475	
462	~	476	
281	~	295	
280	~	294	
281	~	295	
77	~	91	
205	~	219	20
308	~	322	
193	~	207	
204	~	218	
261	~	275	
260	~	274	
170	~	184	
377	~	391	
282	~	296	
167	~	181	
190	~	204	30
310	~	324	
189	~	203	
190	~	204	
309	~	323	
284	~	298	
76	~	90	
355	~	369	
425	~	439	
421	~	435	
206	~	220	40
283	~	297	
80	~	94	
308	~	322	
312	~	326	
91	~	105	
92	~	106	
93	~	107	
94	~	108	
95	~	109	
96	~	110	50

97	~	111	
69	~	83	
424	~	438	
169	~	183	
165	~	179	
166	~	180	
101	~	115	
102	~	116	
103	~	117	
104	~	118	10
105	~	119	
106	~	120	
107	~	121	
191	~	205	
298	~	312	
259	~	273	
423	~	437	
309	~	323	
205	~	219	
261	~	275	20
357	~	371	
256	~	270	
291	~	305	
295	~	309	
327	~	341	
294	~	308	
170	~	184	
283	~	297	
347	~	361	
421	~	435	30
208	~	222	
281	~	295	
191	~	205	
244	~	258	
464	~	478	
57	~	71	
58	~	72	
425	~	439	
348	~	362	
349	~	363	40
350	~	364	
351	~	365	
352	~	366	
284	~	298	
379	~	393	
311	~	325	
327	~	341	
260	~	274	
182	~	196	
445	~	459	50

262	~	276	
422	~	436	
55	~	69	
450	~	464	
451	~	465	
452	~	466	
453	~	467	
454	~	468	
455	~	469	
456	~	470	10
310	~	324	
70	~	84	
208	~	222	
353	~	367	
205	~	219	
328	~	342	
258	~	272	
328	~	342	
203	~	217	
322	~	336	20
128	~	142	
262	~	276	
85	~	99	
55	~	69	
452	~	466	
75	~	89	
422	~	436	
77	~	91	
353	~	367	
321	~	335	30
28	~	42	
78	~	92	
262	~	276	
453	~	467	
123	~	137	
124	~	138	
125	~	139	
126	~	140	
127	~	141	
128	~	142	40
129	~	143	
265	~	279	
266	~	280	
320	~	334	
321	~	335	
366	~	380	
367	~	381	
368	~	382	
369	~	383	
370	~	384	50

371	~	385	
372	~	386	
284	~	298	
322	~	336	
246	~	260	
260	~	274	
443	~	457	
307	~	321	
81	~	95	
29	~	43	10
94	~	108	
311	~	325	
284	~	298	
421	~	435	
80	~	94	
72	~	86	
202	~	216	
79	~	93	
323	~	337	
281	~	295	20
312	~	326	
87	~	101	
28	~	42	
281	~	295	
285	~	299	
465	~	479	
356	~	370	
194	~	208	
309	~	323	
306	~	320	30
252	~	266	
306	~	320	
443	~	457	
405	~	419	
54	~	68	
41	~	55	
204	~	218	
24	~	38	
380	~	394	
251	~	265	40
208	~	222	
348	~	362	
157	~	171	
158	~	172	
159	~	173	
160	~	174	
161	~	175	
162	~	176	
163	~	177	
355	~	369	50

204	~	218	
421	~	435	
406	~	420	
118	~	132	
71	~	85	
294	~	308	
346	~	360	
426	~	440	
280	~	294	
45	~	59	10
290	~	304	
297	~	311	
320	~	334	
119	~	133	
20	~	34	
21	~	35	
22	~	36	
23	~	37	
24	~	38	
25	~	39	20
404	~	418	
442	~	456	
289	~	303	
281	~	295	
170	~	184	
258	~	272	
259	~	273	
260	~	274	
261	~	275	
262	~	276	30
263	~	277	
264	~	278	
442	~	456	
443	~	457	
444	~	458	
445	~	459	
446	~	460	
447	~	461	
448	~	462	
347	~	361	40
186	~	200	
68	~	82	
403	~	417	
213	~	227	
25	~	39	
27	~	41	
259	~	273	
27	~	41	
169	~	183	
407	~	421	50

321	~	335	
365	~	379	
442	~	456	
299	~	313	
227	~	241	
308	~	322	
309	~	323	
310	~	324	
311	~	325	
312	~	326	10
377	~	391	
72	~	86	
29	~	43	
348	~	362	
307	~	321	
345	~	359	
346	~	360	
347	~	361	
361	~	375	
362	~	376	20
363	~	377	
364	~	378	
365	~	379	
169	~	183	
311	~	325	
168	~	182	
262	~	276	
376	~	390	
21	~	35	
311	~	325	30
170	~	184	
294	~	308	
54	~	68	
29	~	43	
298	~	312	
364	~	378	
290	~	304	
259	~	273	
205	~	219	
92	~	106	40
280	~	294	
28	~	42	
33	~	47	
34	~	48	
35	~	49	
36	~	50	
37	~	51	
38	~	52	
205	~	219	
80	~	94	50

39	~	53	
40	~	54	
245	~	259	
262	~	276	
426	~	440	
69	~	83	
280	~	294	
312	~	326	
464	~	478	
319	~	333	10
354	~	368	
187	~	201	
322	~	336	
325	~	339	
308	~	322	
67	~	81	
308	~	322	
444	~	458	
254	~	268	
195	~	209	20
126	~	140	
189	~	203	
93	~	107	
295	~	309	
192	~	206	
194	~	208	
227	~	241	
71	~	85	
70	~	84	
23	~	37	30
316	~	330	
1	~	15	
206	~	220	
293	~	307	
56	~	70	
1	~	15	
243	~	257	
369	~	383	
325	~	339	
225	~	239	40
226	~	240	
227	~	241	
228	~	242	
229	~	243	
230	~	244	
231	~	245	
76	~	90	
349	~	363	
378	~	392	
451	~	465	50

296	~	310	
69	~	83	
356	~	370	
228	~	242	
76	~	90	
71	~	85	
117	~	131	
70	~	84	
346	~	360	
310	~	324	10
25	~	39	
29	~	43	
465	~	479	
292	~	306	
345	~	359	
164	~	178	
137	~	151	
263	~	277	
209	~	223	
305	~	319	20
171	~	185	
136	~	150	
280	~	294	
66	~	80	
67	~	81	
181	~	195	
358	~	372	
284	~	298	
295	~	309	
325	~	339	30
129	~	143	
94	~	108	
307	~	321	
291	~	305	
251	~	265	
252	~	266	
253	~	267	
254	~	268	
255	~	269	
256	~	270	40
257	~	271	
288	~	302	
285	~	299	
254	~	268	
228	~	242	
257	~	271	
319	~	333	
440	~	454	

## 【 0 0 2 3 】

本発明に係るワクチンは、好ましくは、UniProtエントリH8WG65、H8WG69、H8WG72、H8W 50

G77、H8WG70、H8WG73、H8WG66、H8WG76、H8WG60、H8WG61、H8WG62、H8WG75、H8WG67、H8WG78、H8WG63、H8WG68、H8WG64、H8WG74、H8WG71、H8WQZ7、H8WQZ2、H8WQW9、Q0GH78、O55281、およびF2VJ15の配列、並びに図5および表3に記載のタンパク質配列、特にH8WQW9、またはそれらの免疫原性断片；あるいは、それらと少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、特に少なくとも95%のアミノ酸同一性を有する免疫原性のある配列、またはそれらの免疫原性断片から選択されるFAAdV-Cのファイバー-2タンパク質を含む(Clustal Omegaプログラムによるアラインメントに基づく；同一性は、同一アミノ酸をアミノ酸の総数で割った比率に100を乗じた値(%)によって算出する(配列が同じ長さでない短い配列の場合))。例えば、29、31、36、91、93、114、115、213、219、232、235、279、291、294、295、299、300、302~307、319、324、329、343、338、343~346、372、378、380、391、393、400、403、405、406、411、413、421、427、433、435、439、453、459、476、または478の位置(KR5配列H8WQW9に対応)にあるアミノ酸残基は変更可能である(UniProt配列H8WG65、H8WG69、H8WG72、H8WG77、H8WG70、H8WG73、H8WG66、H8WG76、H8WG60、H8WG61、H8WG62、H8WG75、H8WG67、H8WG78、H8WG63、H8WG68、H8WG64、H8WG74、H8WG71、H8WQZ7、H8WQZ2、H8WQW9、Q0GH78、O55281、およびF2VJ15の単離物により証明されているように)；または、例えば、N末端(例えば、21位まで)、123~139、250~272、364、もしくはC末端(例えば、464~479位)の配列を欠失させることができる(上記UniProt配列により証明されているように)。ここで、アラインメントは、UniProtアラインメントソフトウェアによる(Clustal Omegaプログラム)。更に、天然アミノ酸の変異、欠失、および挿入物について、図5に例示する。これらは表3の配列から誘導可能である。

#### 【0024】

好ましくは、本発明に係るワクチンは、補助剤、好ましくは、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、サポニン、ムラミルジペプチド、エチレンビニルアセテート共重合体、油、植物油または鉱油、特に、ピーナッツ油またはシリコンオイル、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される補助剤を更に含む。

#### 【0025】

補助剤は、免疫原に対する免疫応答を増強する物質である。補助剤として、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、サポニン、例えば、クイルA、油中水型エマルジョン、水中油型エマルジョン、水中油中水エマルジョンが挙げられる。エマルジョンは、特に、軽質流動パラフィン油(欧州薬局方型)；スクワランやスクアレンなどのイソプレノイド油；アルケン、特にイソプテンまたはデセンのオリゴマー化から生じる油；直鎖アルキル基を含む酸またはアルコールのエステル、より具体的には植物油、オレイン酸エチル、プロピレングリコールジ(カプリル酸/カプリン酸)グリセリル、トリ(カプリル酸/カプリン酸)、またはプロピレングリコールジオレート；分枝脂肪酸またはアルコールのエステル、特にイソステアリン酸エステルのベースであり得る。油は、乳化剤を組み合わせることでエマルジョンを形成するように使用してもよい。乳化剤は、好ましくは、非イオン性界面活性剤、特に、ソルビタンの、マンニド(例えば無水マンニトールオレイン酸)の、グリセロールの、ポリグリセロールの、プロピレングリコールの、およびオレイン酸、イソステアリン酸、リシノール酸またはヒドロキシステアリン酸(これらは場合によりエトキシ化される)のエステル、ならびにポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマーブロック、特にプルロニック(登録商標)製品、特にL121である。例えば、補助剤を含むワクチンは以下のように調製される：50~90v/vの免疫原を含む水性相を、1~10%w/vの無水マンニトールオレイン酸、1~10%w/vの11E0でエトキシ化されたオレイン酸(エチレンオキサイド)、および5~40%v/vの軽質流動パラフィン油(欧州薬局方型)中で、乳化ターボミキサーを用いて乳化する。エマルジョンを調製するための代替的な方法として、1~10%w/vのスクアラン、1~10%w/vのプルロニック(登録商標)L121、0.05~1%w/vのオレイン酸のエステル、および20E0でエトキシ化された無水ソルビトールの混合物と、50~95%v/vの免疫原を含む水性相を、高圧ホモジナイザーに通すことによって乳化することも挙げられる。合成ポリマー(例えば、生分解性マイクロスフェア等の免

疫原をカプセル化するマイクロスフェアを製造するために使用されている、例えば、乳酸およびグリコール酸のホモおよびコポリマー)と共に調合することも可能である。補助剤のさらなる例は、アクリル酸又はメタクリル酸のポリマーおよび無水マレイン酸とアルケニル誘導体のコポリマーから選択される化合物である。有利な補助剤化合物は、特に糖またはポリアルコールのポリアルケニルエーテルで架橋されたアクリル酸またはメタクリル酸のポリマーである。これらの化合物は、カルボマーという用語で知られており、例えば、少なくとも3個、好ましくは8個以下のヒドロキシル基(少なくとも3個のヒドロキシル基の水素原子は、少なくとも2個の炭素原子を有する不飽和脂肪族基によって置換されている)を有するポリヒドロキシル化合物で架橋されたアクリル系ポリマーが挙げられる。好ましい基は、2~4個の炭素原子を含むもの、例えばビニル、アリル、および他のエチレン性不飽和基である。不飽和基は、それ自体にメチルのような他の置換基を含んでもよい。Carbopol(登録商標)の名称で販売されている製品(BF Goodrich, Ohio, USA)は、特に適切である。それらはアリルスクロースまたはアリルペンタエリスリトールで架橋されている。とりわけ、Carbopol(登録商標)974P、934P、および971Pを挙げることができる。無水マレイン酸およびアルケニル誘導体のコポリマーの中では、無水マレイン酸およびエチレンのコポリマーであるコポリマー-EMA(R)(Monsanto)で、直鎖状または架橋されたもの、例えばジビニルエーテルで架橋されたもの、が好ましい。水中でこれらのポリマーを溶解させると酸性溶液になるので、免疫原性を有する組成物、免疫学的組成物、またはワクチンの組成物自体と組み合わせるための補助剤溶液とするために、好ましくは生理的pHに中和する。その後、ポリマーのカルボキシル基の一部がCOO<sup>-</sup>形態になる。

10

20

**【0026】**

好ましくは、本発明に係る補助剤の溶液は、蒸留水中、好ましくは塩化ナトリウムの存在下で調製され、酸性pHである溶液とする。このストック溶液を、(所望の最終濃度を獲得するための)所望の量または実質的な量のNaCl荷電水、好ましくは生理食塩水(NaCl 9g/l)に添加することによって希釈して、一度にまたはいくつかの部分に分けて、同時またはその後に、好ましくはNaOHを用いて中和(pH7.3~7.4)する。生理学的pHを有するこの溶液はそのままワクチンと混合するのに使用され、特に、凍結乾燥形態、液体形態、または凍結形態で保存できるようにする。本開示および当該技術分野の知識から、当業者は、必要に応じ、過度の実験を行うことなく、本発明に係る免疫学的組成物、免疫原性を有する組成物、またはワクチンの組成物に使用するための適切な補助剤およびその量を選択できる。

30

**【0027】**

従って、好ましくは、本発明に係るワクチンは、医薬的に許容される希釈剤および/または担体、好ましくは、注射用水、生理食塩水、組織培養培地、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、特にオリーブオイル、およびオレイン酸エチルなどの有機エステルからなる群より選択される医薬的に許容される希釈剤および/または担体を含む。

**【0028】**

FAdV-Cのファイバー2タンパク質は、任意の適切な発現系によって生成できる。好ましくは、生成は、真核生物発現系で行われる。特に好ましい発現系は、バキュロウイルス発現系、大腸菌発現系、またはピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)発現系である。しかし、実質的に任意の適切な発現系またはベクターを使用して、本発明にかかるワクチンを生成できる。例示として、前記適切な発現またはベクター系は、それぞれの例の具体的な状況やニーズに応じて、プラスミド、バクミド、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、バクテリオファージP1ベースの人工染色体(PAC)、コスミド、またはウイルスから選択することができる。それらは、更に、細菌または酵母内で増幅することができるように、例えば、細菌または酵母の異種の複製起点を有してもよく、目的の1つまたは複数の遺伝子とは異なるトランスフェクト細胞を選択するのに使用可能なマーカーを有してもよい。これらの発現系またはベクターは、当業者に公知の従来の方法によって得ることができる。

40

50

## 【0029】

本発明に係るワクチンは、工業的な量で製造でき、動物に対する個々のワクチンの用量は、他のワクチンにも適用される範囲内でありうる。好ましくは、FAdV-Cのファイバー2タンパク質またはその免疫原性断片は、ワクチン中に0.1 µg/ml ~ 10mg/ml、好ましくは1 µg/ml ~ 1mg/ml、特に10 ~ 100 µg/mlの量で含有される。

## 【0030】

好ましい形態では、本発明に係るワクチンは、0.1 µg ~ 10mg、好ましくは1 µg ~ 1mg、特に10 ~ 100 µgの量のFAdV-Cのファイバー2タンパク質その免疫原性断片；および、医薬的に許容される担体および/または希釈剤および/または補助剤、から成る (consisting of)。

10

## 【0031】

本発明に係るワクチンは、好ましくは、商業的なワクチン製品として提供する場合は特に、医薬的に許容されるビヒクルを含む。適切なビヒクルは、水性および非水性の両方であり得る。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。

## 【0032】

本発明では、鳥類におけるHHSを防止するための効率的な方法を提供する。従って、本発明は、家禽、特に、親の群に、FAdV-Cのファイバー2タンパク質またはその免疫原性断片を含むワクチンを投与することを含む、鳥類、好ましくは家禽、特に親の群れにおけるHHSを予防するための方法の別の態様に関する。本ワクチンは、間に合う適切な時点で有効な量で鳥類に投与される。典型的な投与方法は、静脈内、皮下、筋肉内、経口、胚内 (in ovo) またはクローン内 (intraocular) 投与である。好ましくは、ニワトリにおけるワクチン接種は、生後17 ~ 19週、特に18週に行う。

20

## 【0033】

本発明の具体的な利点は、特にブロイラーでは、親の群れにワクチン接種すれば、子孫に対しても十分な保護をもたらす、ワクチン接種した動物の子孫に、例えば、少なくとも30日、好ましくは少なくとも40日、特に少なくとも60日間、十分な保護をもたらすセーフガードとなる。よって、本発明は、親をワクチン接種することでブロイラーに十分な保護を与える点で有利である。したがって、ブロイラーの保護は、家禽、特にニワトリ、において親動物を免疫化することによって達成される。

30

## 【0034】

別の態様では、本発明は、固体表面に固定されたFAdV-Cのファイバー2タンパク質またはその免疫原性断片を含むキットも提供する。好ましくは、本キットは、試料、特に動物の血液試料における、抗ファイバー2抗体 (本発明の定義の範囲内で) を検出するための血清学的キットである。本キットは、ワクチン接種した親において特異的な抗ファイバー2抗体を検出することによりワクチン接種の成功度を検出する本発明に特に適している。本発明を確立する過程で、ワクチン接種した動物における抗ファイバー2抗体の特異的な検出は、市販のFAdV検査キット、特にFAdV-ELISA法、または通常血清中和検査 (SNT) によっては困難あるいは不可能であることが発見された。ファイバー2に特異的な検査 (例えば、Fib-2 ELISA等) でのみ検出可能であることが観察された。これは、本発明に係るワクチン接種によって誘発された抗体の型特異性 (type specificity) および非中和能力 (non-neutralizing capacity) によるものであった。それにもかかわらず、本発明のワクチンにより十分な (さらにより顕著な) 保護をもたらされる。

40

## 【0035】

これは、保護が与えられているかどうかを確立するための特定の検査および検査システム (FAdV-Cのファイバー2タンパク質に対する特異的な抗体の存在を決定することによる) を提供する必要があったことを示す。この必要性は、本発明に係るキットにより提供される、つまり、(偽陰性の結果が生じる可能性がある) 市販のFAdV-ELISAやSNTとは対照的に、ワクチン接種の成功度を正確かつ高い信頼性で確認することができる。また、FAdV

50

-Cのファイバー2タンパク質は、個々のウイルスに非常に特異的であるため、本発明のキットは、FAdVウイルスの感染を検出するための手段も提供する。また、本発明に係るキットは、抗体保護が、ワクチン接種した動物の子孫にまで存在するか否か、あるいは子孫が能動免疫を示すか否かを決定するのにも適している。

【0036】

好ましくは、本発明に係るキットは、固定されたFAdV-Cのファイバー2タンパク質または固定されたその免疫原性断片に対する抗体、好ましくは鳥類の抗体に特異的な抗体、特に抗ニワトリIgG抗体または抗七面鳥IgG抗体、の結合を検出するための手段を更に含む。もちろん、ファイバー2タンパク質と、ワクチン接種した鳥類由来の抗体間の結合事象に対するいかなる適切な検出（捕捉）手段も本キットに適する。しかし、ワクチン接種したトリの（血液）試料中の検出対象である抗ファイバー2抗体に結合可能な適切な（二次）抗体または（二次）抗体断片が特に好ましい。

10

【0037】

固定されたファイバー2タンパク質への結合事象を検出する標識物質を含む固相試験キットを提供することが特に好ましい。従って、結合事象の検出物質、特に抗ニワトリIgG抗体または抗七面鳥IgG抗体は、標識された物質、特に標識された抗体である。例えば、当該物質（抗体／抗体断片）は、色素、蛍光、発光、または放射性標識で標識される。

【0038】

適切な標識は、したがって、例えば、抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能な蛍光化合物、同位体化合物、化学発光化合物、量子ドット標識、ビオチン、酵素、電子密度試薬、およびハプテンまたはタンパク質である。種々の検出手段としては、分光的、光化学的、放射化学的、生化学的、免疫学的、または化学的手段が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0039】

標識は、化学性、ペプチド性、または核酸分子性であってもよいがこれらに限定されない。他の検出可能な標識としては、<sup>32</sup>Pなどの放射性同位体、蛍光色素などの発光マーカー、光学または電子密度マーカーなど、または例えば、FLAGエピトープまたはHAエピトープなどのエピトープタグ、ビオチン、アビジン、および西洋ワサビペルオキシダーゼやガラクトシダーゼなどの酵素タグが挙げられる。標識は合成中または合成後にペプチドに結合させてもよい。当業者に公知の多くの異なる標識および標識方法がある。本発明において使用可能な標識の種類例として、酵素、放射性同位元素、蛍光化合物、コロイド金属、化学発光化合物、および生物発光化合物が挙げられる。当業者は、本明細書に記載の物質（抗体／抗体断片）に対する他の適切な標識を知っているであろうし、または日常的な実験を用いて確認できるであろう。さらに、本発明のペプチドへのこれらの標識の連結または結合は、当業者に一般的な標準技術を用いて行うことができる。

30

【0040】

本発明をさらに、以下の実施例および図面によって説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0041】

40

【図1】図1は、病原性FAdVAG234株感染後のI群（Fib-1によるワクチン接種）、II群（Fib-2によるワクチン接種）、III群（Hex L1によるワクチン接種）、IV群（陽性対照）、およびV群（陰性対照）のトリの生存率を示す。

【0042】

【図2】図2は、チャレンジ後（d.p.c.）3日目に死亡した陽性対照IV群のトリにおける、麦わら色に変色した流体で満たされた肝臓および心膜における斑状の壊死によって明示される病理学的な病変を示す。

【0043】

【図3】図3は、以下の(a)～(c)により検出された抗体検査の結果を示す。(a)市販のFAdV群1のELISAによる測定結果（各群から得た最大10個の検査血清の平均OD値を、試料対

50

陽性 (sample to positive:S/P) 比として示す。21日目 (チャレンジ前) に測定を開始)。(b) 血清中和試験 (SNT) の結果 (各群から得た最大10個の検査血清の平均力価を、 $\log_2$ として示す。21日目に測定を開始。力価 3である場合に陰性とした)。(c) 組換えFib-2タンパク質を用いるカスタムメイドのELISAによる測定結果 (Fib-2によるワクチン接種トリならびに陽性および陰性対照トリから得た血清の平均OD値として示す。7日目に開始)。

#### 【0044】

【図4】図4は、生後21日目に採取したニワトリ血清とともにインキュベートした精製組換えKR5タンパク質のイムノプロット (昆虫細胞粉末で前吸収し、1:2000に希釈) を示す。A: Fib-1でワクチン接種したトリから得た血清をインキュベートした精製Fib-1 (レーン1、2、および3)。B: Fib-2でワクチン接種したトリから得た血清をインキュベートした精製Fib-2 (レーン1、2、および3)。C: Hex L1でワクチン接種したトリから得た血清をインキュベートした精製Hex L1 (レーン1、2、および3)。D: 陽性対照群のトリ (非感染昆虫細胞材料の精製物をワクチン接種したトリ) から得た血清をインキュベートした精製Hex L1 (レーン1)、精製Fib-1 (レーン2)、精製Fib-2 (レーン3)。E: 陰性対照群のトリ (ワクチン接種しないトリ) から得た血清をインキュベートした精製Hex L1 (レーン1)、精製Fib-1 (レーン2)、精製Fib-2 (レーン3)。51kDa (Fib-1)、56kDa (Fib-2)、および36kDa (Hex L1) と推定したサイズの分子量に移動したバンドとして血清抗体によりタンパク質を検出。

#### 【0045】

【図5】図5は、本発明に係るファイバータンパク質 (FAdV-CのFib-2) のアライメントを示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0046】

#### 【実施例】

#### 【0047】

本発明の実施例では、FAdV-C基準株 (KR5) のファイバー1、ファイバー2、およびヘキソンのループ-1領域を組換え的にパキキュロウイルス系で発現させた。ワクチン接種試験では、これらのカプシドの成分のニワトリにおける防御免疫を誘導する効果について、病原性FAdVを有するトリにチャレンジすることによって評価した。したがって、これは、検査対象であるFAdVカプシドタンパク質の感染プロセスにおける機能的な意義を更に解明し、そしてHHSを制御するためのサブユニットワクチン候補としての使用可能性を調べる目的で、*in vivo*実験において両方のファイバータンパク質を個々に使用する初めての研究である。

#### 【0048】

##### 1. 材料と方法

##### 1.1. ウイルス増殖およびDNA抽出

FAdV-C (= FAdV-4) 基準KR5株およびチャレンジウイルスAG234を、Schat and Sellers, A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, (2008), 195 - 203に記載のプロトコルに従って、初代ニワトリ胚肝 (CEL) 細胞で増殖させた。ウイルス力価は、Reed and Muenchの方法 (Am. J. Hyg. 27 (1938), 493-497) に従ってエンドポイント滴定によって決定した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen社、ヒルデン、ドイツ) を用いて細胞培養上清からDNAを抽出した。

#### 【0049】

##### 1.2. クローニングおよび初期タンパク質の発現

プライマーは、完全ゲノムKR5配列 (GenBank登録番号HE608152) に基づいて設計し、pFastBac移入ベクター (Invitrogen社、ウィーン、オーストリア) にクローニングするための5'末端制限部位を持たせた (表1)。ファイバー1およびファイバー2に対する全コード領域 (それぞれ30438~31739および31723~33162位の塩基) およびヘキソンのループ-1領域 (20481~21366位の塩基) を、校正DNAポリメラーゼ (Invitrogen社、ウィーン、オー

ストリア)を用いてFAdV-C基準KR5株より増幅した。pCR4Blunt - TOP0ベクター (Invitrogen社)に中間クローニングしBamHI / StuI (Fib-1)、StuI / XbaI (Fib-2)、およびNcoI / XhoI (Hex L1)を用いて切断した後、断片を切断したpFastBacベクターにそれぞれの制限部位で連結した。配列決定によってpFastBacに各生成物が正確に挿入されたことを決定した後、構築物をコンピテント大腸菌DH10Bac細胞 (Invitrogen社、ウィーン、オーストリア)に形質転換した。組換えバキュロウイルスDNAを、S.N.A.P.Miniprepキット (Invitrogen社、ウィーン、オーストリア)を用いて形質転換コロニーから単離した。目的の遺伝子は、業者のプロトコルに従って、Spodoptera frugiperda Sf9細胞 (Invitrogen社、ウィーン、オーストリア)内でHisタグ融合タンパク質として発現させた。

【 0 0 5 0 】

10

### 1.3. 組換えタンパク質の同定

組換えタンパク質の発現を確認し発現条件を最適化するために、感染Sf9単層培養物から、異なる時点(感染後24、48、72、96時間)において採取した細胞溶解物の可溶性画分および膜結合画分のSDS-PAGEを行った。組換えタンパク質は、抗ポリヒスチジン抗体 (Sigma-Aldrich社、ウィーン、オーストリア)を用いたイムノブロットによって同定した。非感染Sf9細胞を同じ方法で処理して陰性対照とした。

【 0 0 5 1 】

### 1.4. 組換えタンパク質の発現および精製

発現させるために、Sf9懸濁培養物(50ml)を3のMOIで増幅組換えバキュロウイルスに感染させた。接種から72時間後に振盪インキュベーター内の培養物を回収し、3500rpmで5分間の遠心分離によって濃縮した。得られた細胞ペレットは、溶解緩衝液(20mMのリン酸ナトリウム、0.5MのNaCl、20~40mMのイミダゾール、0.2mg/mlのリゾチーム、20µg/mlのDNase、1mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのPMSF、およびプロテイナーゼ阻害剤を含有する)中で再懸濁し超音波処理することによって破碎し、その後氷上で1時間インキュベーションした。粗細胞溶解物を4で20分間、14000rpmで遠心分離して得られた清澄化した上清を、アフィニティークロマトグラフィーカラム(His GraviTrap、GEヘルスケア社、フライブルク、ドイツ)で精製した。ペレット画分における不溶性物質として現れるヘキソンLIタンパク質を、8Mの尿素を含むリン酸緩衝液で可溶化した。0.45µmでろ過した試料を、8Mの尿素を含むリン酸緩衝液で平衡化したカラムに搭載し、カラムに、尿素の濃度を減少させる段階的な洗浄を施して、タンパク質を溶出した。その後、各精製画分からの試料をSDS-PAGEおよびイムノブロットングにより目的のタンパク質の存在について分析した。

20

30

【 0 0 5 2 】

インビボ投与の前に、Slide-A-Lyzer 7K透析カセット(Thermo Scientific社、ウィーン、オーストリア)内で緩衝液交換を施して組換えタンパク質を滅菌PBS(Gibco/Invitrogen社、ウィーン、オーストリア)に移した。タンパク質Hex L1は、Amicon Ultra-15サイズ排除スピンカラム(Millipore、ウィーン、オーストリア)を用いてさらに処理して、溶出した昆虫細胞タンパク質を除去し標的タンパク質を濃縮した。

【 0 0 5 3 】

タンパク質濃度は、Bradford assay(Thermo Scientific社、ウィーン、オーストリア)によって決定した。

40

【 0 0 5 4 】

### 1.5. 動物実験

合計112羽のSPF(特定病原体を含まない:specific pathogen-free)のニワトリ(VALO Lohmann Tierzucht社、クックスハーフェン、ドイツ)を5つの群に分け、アイソレーターユニット(Montair Andersen bv、HM 1500、セーフエヌム、オランダ)内で別個に飼育した。各動物は、生後1日目に50µlの下記組み換えタンパク質を含む溶液を500µl注射することにより筋肉内投与した:I群(n=26)にはファイバー1(Fib-1);II群(n=28)にはファイバー2(Fib-2);III群(n=26)には、ヘキソンループ-1(Hex L1)(GERBU Adjuvant LQ #3000(GERBU Biotechnik社、ハイデルベルク、ドイツ;賦形剤および乳化剤を含む脂質粒子の滅菌水性懸濁液)を1:1で含む混合物として)。

50

## 【 0 0 5 5 】

同様に、IV群 (n=23) のトリには、非感染昆虫細胞由来の精製透析材料を注射して陽性対照とした。V群 (n=9) のトリには、500 µl の滅菌PBSを注射して陰性対照とした。

## 【 0 0 5 6 】

生後21日目に、I~IV群の動物に、 $10^7$ 個の50%組織感染量 ( $10^7$  50% tissue culture infective dose) (TCID<sub>50</sub>) / mlの病原性FAdV-CウイルスAG234を200 µl筋肉内投与してチャレンジした。陰性対照群のトリは、同量の滅菌PBSを筋肉内投与した。

## 【 0 0 5 7 】

チャレンジに際し、トリの臨床的な症状を毎日モニターした。死亡したまたは研究過程で安楽死させなければならなかった全ての動物に剖検を実施した。定期的にウイルスの排出を検出するために、抗体を検出するための血液 (7、11、14、21、28、35および42日目に収集)、排泄腔スワブ (21、28および35日目に収集)、または大腸組織 (42日目に収集) の試料を定期的に採取した。

10

## 【 0 0 5 8 】

残りのトリは全て生後42日目の実験終了時に屠殺した。

## 【 0 0 5 9 】

試験および実験に使用したトリに行う全ての手順は、機関の倫理委員会によって検討および承認されオーストリア政府のライセンスを受けた (ライセンス番号BMWF-68.205 / 019 6-11 / 3b / 2012)。

## 【 0 0 6 0 】

## 1.6. 抗体応答

市販のFAdVの酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

市販のFAdV I群抗体検査キット (FAdV I Group I Antibody Test Kit) をBioChek (Reeuwijk, オランダ) から入手し、チャレンジ前 (21日目) およびチャレンジ後 (28、35、および42日目)、各群の血清中の抗体レベルを検査した。

20

## 【 0 0 6 1 】

## 血清中和試験 (SNT)

検査血清は、56 °Cで30分間不活化した。CEL細胞は、14日齢のニワトリ胚から調製し、 $1 \times 10^6$ 細胞 / mlの密度で96ウェルプレート (Sarstedt社、ウィーナーノイドルフ、オーストリア) に播種した。アッセイは、100 TCID<sub>50</sub> / 100 µl KR5を用いて一定ウイルス希釈血清法 (constant virus diluted serum method) に従って実施した。プレートは、5%CO<sub>2</sub> において37 °Cで接種し、5日後CPEについて調べた。

30

## 【 0 0 6 2 】

## Fib-2 ELISA

チェッカーボード滴定により最適なウイルスおよび血清希釈率を予め決定した後、96ウェルのELISAプレート (Nunc Medisorb社、ロスキレ、デンマーク) に、コーティング緩衝液 (0.015M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.035M NaHCO<sub>3</sub>、pH8.4) で希釈して最終濃度を0.05 µg / mlにした組換えアフィニティ精製Fib-2タンパク質を、ウェル当たり100 µlでコーティングした。24時間後プレートを洗浄し、ブロッキングバッファ (Starting Block T20 PBS、Thermo Scientific社) で1:100に希釈した100 µlの検査血清を、各ウェルに添加して1時間置いた。洗浄工程の後、PBS-0.05% v / v Tween 20 (Calbiochem社、ダルムシュタット、ドイツ) で1:5000に希釈した100 µlのヤギ抗ニワトリIgG - HRP (Southern Biotechnology社、バーミンガム、米国) を各ウェルに添加して1時間インキュベートした。更なる洗浄工程の後、100 µlのTMB (テトラメチルベンジジン) 基質 (Calbiochem社、ダルムシュタット、ドイツ) を各ウェルに添加し、プレートを暗所で15分間インキュベートした。反応は、ウェル当たり100 µlの0.5M硫酸を添加することで停止させ、各ウェルの光学密度 (OD) をELISAリーダー (Sunrise - Basic Tecan社、グレーディヒ、オーストリア) を用いて波長450nmで測定した。

40

## 【 0 0 6 3 】

各プレートには、陽性および陰性対照も含ませた。血清は全て二重に検査し、ODは二重

50

検査の平均値とした。仮のカットオフ値は、陰性対照群の血清試料から決定した全OD値の算術平均 + 3倍標準偏差とした。

#### 【 0 0 6 4 】

##### 1.7. ウェスタンブロット分析

精製組換えFib-1、Fib-2、およびHex L1タンパク質は、4%SDSおよび10%メルカプトエタノールを含む試料緩衝液に添加して5分間煮沸し、BioTrace PVDF転写膜 (Pall社、ウィーン、オーストリア) 上に載せ、12%SDS-PAGEの電気泳動で分離した。3% (w/v) のスキムミルクを用いて3時間ブロッキングした後、膜をストリップに切断し、検査血清 (1% Sf9細胞粉末を前吸収させ、1:2000に希釈) 中で別々に1時間インキュベートした。PBS-0.05% Tween 20で数回洗浄した後、膜ストリップを、1:2500に希釈したウサギ抗ニワトリ IgG - HRPコンジュゲート (Sigma-Aldrich社、ウィーン、オーストリア) と共に1時間インキュベートし、数回洗浄し、Clarity Western ECL基質 (Bio-Rad Laboratories社、ウィーン、オーストリア) と共にインキュベートした。可視化は12秒間露光してX線フィルム (Super RX社、富士、日本) で行った。

10

#### 【 0 0 6 5 】

##### 1.8. 排泄腔スワブおよび大腸試料のリアルタイム (rt) PCR

チャレンジウイルスの排出を、チャレンジ後 (p.c.) 7日目および14日目の排泄腔スワブ、および研究の終了時 (p.c.21日目) に大腸から採取した各群5羽の組織試料より、市販のシステム (Qiagen社、ヒルデン、ドイツ) を用いてDNA抽出した後、52K遺伝子に基づくrt PCRアッセイ (Gunes et al., J. Virol. Meth. 183 (2012), 147-153) を使用して検査した。

20

#### 【 0 0 6 6 】

##### 2. 結果

##### 2.1. タンパク質の発現

組換えバキュロウイルスを接種後、48~96時間以内に、Sf9細胞培養物に特徴的な形態学的変化が示された。組換えタンパク質は、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって、51kDa (Fib-1)、56kDa (Fib-2)、および35kDa (Hex L1) の分子量と推定される位置に移動したバンドとして検出された。ピークの発現は接種後約72時間であった。更に、発現解析により、Fib-1およびFib-2の大きな画分が上清中に可溶性タンパク質として表され、一方、Hex L1タンパク質は主にペレット内で見られることが示された。

30

#### 【 0 0 6 7 】

##### 2.2. 病原性FAdVに対する組換えタンパク質の保護

チャレンジ後、個々の群間における臨床徴候の重症度と死亡率に明確な違いが見られた (図1)。群間の死亡率の差は、カイ二乗分析 ( $\chi^2 = 46$ ;  $p < 0.01$ ) によって非常に有意であることが判明し、またその有意差は、Fib-2ワクチン接種群と他の全てのチャレンジ群間の死亡率の1対1比較 (ボンフェローニ補正カイ二乗検定) によっても示された。

#### 【 0 0 6 8 】

死亡の発生はp.c.3日目に記録され、これは死亡率の全体的なピークと一致した。トリの死亡はp.c.5日目まで見られ、それ以降、動物の死亡はなかった。病原性ウイルス感染後、IV群 (陽性対照) のトリは、羽の逆立ちとうずくまりによって明示される重度の臨床的うつ症状を示し、23羽のうち18羽 (78%) が死亡した。対照的に、II群 (Fib-2のワクチン接種) のトリは、明白な臨床症状を示さず、p.c.3日目に28羽のうちたった1羽のみが死亡した以外、チャレンジ後の死亡は記録されなかった。I群 (Fib-1のワクチン接種) のトリは、一部で臨床症状を示し、26羽のうち10羽の動物が死亡し、全体で38%の死亡率という結果であった。III群 (Hex L1のワクチン接種) では、臨床的な影響の重症度は、陽性対照群と同等であり、26羽のうち9羽 (73%) の動物が死亡した。剖検により、死亡した動物および実験中に安楽死させなければならなかった動物全ての心臓と肝臓に重篤な病変が発見された。心臓における麦わら色の流体および肝臓における斑状の壊死という特徴的な所見が見られた (図2)。

40

#### 【 0 0 6 9 】

50

臨床的な影響があった群で生存した動物は、生後26日目までに完全に回復した。これ以上の病変は生後42日目の実験終了時に生存している動物のいずれにも記録されなかった。V群（陰性対照）では、実験のいかなる時点でも臨床的な症状が観察されず、試験の終了時においても病理学的な病変が見られなかった。

【0070】

### 2.3. 抗体の検出

市販のFAdV ELISAおよびSNT

21日目のチャレンジ前には、いずれの群でも市販のELISAおよびSNTにより抗体は検出されなかった（図3aおよび3b）。チャレンジ後、市販のELISAおよびSNTのいずれを用いてもI~IV群のトリの抗体レベルが増加したことが確認された。市販のELISAによる測定では、ワクチン接種群では抗体はチャレンジ後7日目までは増加しその後は徐々に減少し、一方、陽性対照群では抗体レベルは実験の終了まで継続的な増加を示した。チャレンジ後の中和抗体の発生はI~IV群で継続的に増加し、非ワクチン接種トリで最高の力価が得られた。陰性対照動物では、実験中のいずれの検査時点においても抗体は検出されなかった。

【0071】

Fib-2 ELISA

チャレンジ前後のFib-2に対する特異的抗体応答を調べるために、組換え精製タンパク質を使用するカスタムメイドのELISAを開発した。7日目にFib-2ワクチン接種トリの測定を開始し、11日目に決定カットオフを超える平均OD値の上昇がELISAで最初に検出され、チャレンジ後7日目（7d.p.c）にピークに達した（図3b）。実験の終了まで、平均Fib-2抗体レベルはほんのわずかに減少した。注目すべきは、チャレンジで生存しなかったトリの抗体応答はわずか0.21であり、他の全てのトリと有意に異なっていた。

【0072】

陽性対照群のトリを検査したところ、21日目においてFib-2抗体に陰性であった。しかし、生存したトリはチャレンジ後強力な抗Fib-2応答を発現し、実験の終わりまでにはワクチン接種トリのレベルに達した。

【0073】

チャレンジ前後に、陰性対照群から得た血清を検査したところ、Fib-2 ELISAに陰性であり（図3c）、これはFib-1およびHex L1のワクチン接種群から得た血清でも同様であった。

【0074】

### 2.4. ウェスタンブロット

組換えタンパク質の投与後21日目にI~III群のそれぞれの3羽のトリから得た血清を用いたイムノブロットにより、Fib-1、Fib-2、およびHex L1それぞれに対する抗体の存在が確認された（図4）。陽性および陰性対照群の1羽ずつから得た血清をイムノブロットで検査したところ、精製組換えタンパク質のそれぞれに対する抗体は検出されなかった。

【0075】

### 2.5. ウイルス排出

陰性対照動物から採取したいずれの試料でもウイルス排泄は検出されなかった（表2）。チャレンジ後7日目（7d.p.c）には、I~IV群の全ての検査したトリでウイルス排泄が見られた。タンパク質ワクチンを接種した群と陽性対照群との間でウイルス負荷の明らかな差異はなかった。実験の終了まで脱落（Shedding）を評価したところ、殆どのトリは糞便中のウイルス排出が陽性であるという記録が得られた。I~IV群のそれぞれにおいて陽性であった感染トリの半分では、研究の終了時に大腸が陽性であった。

【0076】

## 3. 考察

ヒトアデノウイルスは、ワクチンおよび遺伝子治療ベクターとして使用するために分子レベルでよく研究されているが、FAdVと宿主間の相互作用や関与する分子についての現在の理解度は未だ限定的である。カプソメアおよび宿主細胞間の相互作用が、宿主の免疫形成における重要な因子として確立されているので、アデノウイルスカプシドタンパク質は

10

20

30

40

50

、サブユニットワクチンの開発に興味深い候補である。HHSの予防に関し、E.coliで発現されるペントンベースが、サブユニット抗原の候補として近年提唱された。本研究では、FAdV-Cにおける2個の異なるファイバーをコードする遺伝子についての新規な知見を利用することで、FAdV-C由来のファイバーサブユニットによる免疫化の効果について初めて検査した。また、ヘキソソループ-1の免疫原性を有する表面露出構造も検査した。

【0077】

バキュロウイルス発現系は、例えば、アデノウイルスタンパク質の翻訳後修飾の可能性に関する証拠に基づいて選択した。

【0078】

病原性AG234株でチャレンジすると、ワクチン接種したニワトリにおける保護の程度が組換えFAdV capsidタンパク質によって異なることが観察された。Hex L1特異的抗体はチャレンジ前に検出されたが、このタンパク質は、我々の研究ではサブユニット抗原として効果的であるとは証明できなかった。これに対し、Fib-2に対する免疫応答は疾患の臨床的な症状を防ぐのに非常に効果的であった。これは、おそらく宿主の細胞受容体への接着を媒介することによって、感染の初期段階でFib-2タンパク質が重要な役割を果たすということを示している可能性がある。遍在するコクサッキーウイルスアデノウイルス受容体(CAR)へのファイバーの結合を介した細胞接着は、ヒトアデノウイルスではよく知られているメカニズムである。しかし、CARとファイバーの相互作用についての教示は、主に *in vitro* 試験から導かれるものであり、宿主細胞へのアデノウイルスの侵入に対する一次受容体としてのCARの役割は疑問視されている。この文脈において、哺乳類ではなく鳥類に特異的な一次受容体への結合では、CELOのショートファイバーを介して細胞と結合することが示唆された。以前の系統学的データによると、FAdV-C Fib-2は、CELOのショートファイバー遺伝子および他のFAdV種で見られる単一のショートファイバー遺伝子に対しFib-1よりも関連性が高いことが示されている。FAdV-C Fib-2に対する非常に有効な免疫応答についての実際の知見と共に、これらの情報に基づくと、Fib-2は、宿主細胞依存性の感染経路の誘導についての主要なリガンドとして作用している可能性がある。

【0079】

ワクチン接種後のFib-2に対して誘発された抗体が、1羽の例外を除き検出されたことにより、保護と相関することが示唆される。これは、チャレンジ前に抗体を検出できなかった市販のELISAとは対照的である。明らかに、市販のELISA試験システムでは、ファイバー抗原の型特異性のため、誘発された抗体の結合互換性がないという結果になった。SNTから得られた結果は、Fib-2に対する抗体は中和能を有していないことを示唆しており、これは、単離ウイルス成分として投与される場合、ファイバーによって誘発される血清中和活性が弱いまたは欠くという以前に報告された観察事項と一致する。

【0080】

チャレンジウイルスがI~IV群の排出腔スワブで同様に検出されたので、臨床的な疾患から保護されたトリであっても、ワクチン接種はウイルス排出および脱落を妨げないことを実証している。この発見は、弱毒生FAdVワクチンによって臨床的に完全に保護されたトリであってもチャレンジウイルスの排泄があることを報告する以前の研究(Schonewille et al., Avian Dis. 54 (2010), 905-910)により裏づけされる。

【0081】

要約すると、現在用いられている不活性化ワクチンは限界に直面していることに加え、HHSの原因物質としてFAdV-Cの病原性株が同定されたことにより、次世代免疫戦略の開発につながる。本発明で提示された所見は、効果的かつ安全なサブユニットワクチンの開発のために組換えFib-2タンパク質が非常に有効であることを示している。

【0082】

10

20

30

40

【表 1】

プライマー名	配列 (5' -3')	位置	目的
KR5-b Fib-1 f	5' -GGATCCATGTCGGCCCTAATCG-3'	30438 - 30453 <sup>a</sup>	KR5株のファイバー1遺伝子の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
KR5-b Fib-1 r	5' -AGGCCTTTAGGGCTCGGAGC-3'	31725 - 31739 <sup>a</sup>	KR5株のファイバー1遺伝子の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
KR5-b Fib-2 f	5' -AGGCCTATGCTCGGAGCCCTA-3'	31723 - 31738 <sup>a</sup>	KR5株のファイバー2遺伝子の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
KR5-b Fib-2 r	5' -TCTAGATTACGGGACGGAGGCTG-3'	33146 - 33162 <sup>a</sup>	KR5株のファイバー2遺伝子の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
FAV f	5' -AATTCATGGACAAGTTCAGGCGAGGGTCGT-3'	20481 - 20502 <sup>a</sup>	KR5株のヘキシソルルーブ-1遺伝子領域の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
FAV r	5' -TAACTCGAGCTAGTGTGTCGGGGACATCAT-3'	21347 - 21366 <sup>a</sup>	KR5株のヘキシソルルーブ-1遺伝子領域の増幅およびpFastBacベクターへのクローニング
52K-fw	5' -ATGGCKCAGATGGCYAAGG-3'	13075 - 13093 <sup>b</sup>	rt-PCRにおける52k遺伝子の増幅
52K-rv	5' -AGGCCCTGGGTCAAACCGA-3'	13250 - 13232 <sup>b</sup>	rt-PCRにおける52k遺伝子の増幅

a位置は、完全ゲノムKR5配列 (HE608152) についてのものである。

b位置は、完全ゲノムO/ELO配列 (U46933) についてのものである。

表 1：使用したプライマー

【 0 0 8 3 】

表 2 は、各群につき5羽のトリから得た排出腔スワブ試料 (21、28、および35日目に収集) および大腸組織 (42日目に収集) におけるウイルス排泄の検出をリアルタイムPCRにより示す。結果は、陽性試料数 / 検査した試料数として示す。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

【表 2】

実験日	I群 (Fib-1)	II群 (Fib-2)	III群 (Hex L1)	IV群 (陽性対照)	V群 (陰性対照)
21	-	-	-	-	-
28	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5
35	3/5	4/5	4/5	4/5	0/5
42	1/5	3/5	5/5	1/5	0/5

10

## 【0085】

表 3 は、本発明に使用可能なファイバータンパク質の例のリストを示す。

## 【0086】

【表 3 - 1】

トリアデノウイルス4 分離株 (isolate) Punjab 1 ファイバー遺伝子、完全cds 1,386bp 線状DNA DQ864436.1 GI : 112735223	
トリアデノウイルス4 分離株Punjab 2 ファイバー遺伝子、完全cds 1,386bp 線状DNA DQ864434.1 GI : 112735219	
トリアデノウイルス4 ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,482bp 線状DNA AY340863.1 GI : 33359662	10
トリアデノウイルス10 ショートファイバータンパク質遺伝子、完全cds 1,496bp 線状DNA AF007579.1 GI : 2674070	
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Yeaju ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709232.1 GI : 318040046	
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Gunwi ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709231.1 GI : 318040044	
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Andong ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709230.1 GI : 318040042	20
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Changnyeong ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709229.1 GI : 318040040	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株0TE 1,197bp 線状DNA FN557186.1 GI : 315455213	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株08-5769 1,197bp 線状DNA FN557185.1 GI : 315455211	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株08-3622 1,197bp 線状DNA FN557184.1 GI : 315455209	30
トリアデノウイルス4 分離株Bareilly ファイバータンパク質遺伝子、完全cds 1,437bp 線状DNA FJ949088.1 GI : 238683632	
トリアデノウイルスC pVIII遺伝子、U-exon遺伝子、ファイバー1遺伝子、ファイバー2遺伝子および ORF22、分離株C2B 4,345bp 線状DNA HE608154.1 GI : 381214073	
トリアデノウイルスC pVIII遺伝子、U-exon遺伝子、ファイバー1遺伝子、ファイバー2遺伝子および ORF22、分離株AG234株 4,321bp 線状DNA HE608153.1 GI : 381214067	40
トリアデノウイルスC 完全ゲノム、分離株KR5 45,810bp 線状DNA HE608152.1 GI : 381214017	

【表 3 - 2】

トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株K388-95 1,395bp 線状DNA FR872927.1 GI : 381214013	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株09/8846 1,440bp 線状DNA FR872926.1 GI : 381214011	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株09/584 1,440bp 線状DNA FR872925.1 GI : 381214009	10
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株09/2602 1,329bp 線状DNA FR872924.1 GI : 381213952	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株K99-97 1,340bp 線状DNA FR872923.1 GI : 381213950	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株Peru54 1,421bp 線状DNA FR872922.1 GI : 381213948	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー2遺伝子、分離株Peru53 1,416bp 線状DNA FR872921.1 GI : 381213946	20
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株K1013 1,184bp 線状DNA FR872898.1 GI : 381213900	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株922/1 1,311bp 線状DNA FR872897.1 GI : 381213898	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株C2B 1,302bp 線状DNA FR872896.1 GI : 381213896	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株Da60 1,302bp 線状DNA FR872895.1 GI : 381213894	30
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株KR5 1,302bp 線状DNA FR872894.1 GI : 381213892	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株INT4 (QT-細胞 継体 AG234) 1,188bp 線状DNA FR872893.1 GI : 381213890	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離AG234株 1,302bp 線状DNA FR872892.1 GI : 381213888	
トリアデノウイルスC 部分ファイバー1遺伝子、分離株K31 1,181bp 線状DNA FR872891.1 GI : 381213886	40

## 【表 3 - 3】

トリアデノウイルス4 分離株Kr-Yeaju ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709232.1 GI:318040046	
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Gunwi ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709231.1 GI:318040044	
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Andong ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709230.1 GI:318040042	10
トリアデノウイルス4 分離株Kr-Changnyeong ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,425bp 線状DNA HQ709229.1 GI:318040040	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株0TE 1,197bp 線状DNA FN557186.1 GI:315455213	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株08-5769 1,197bp 線状DNA FN557185.1 GI:315455211	
トリアデノウイルスのショートファイバータンパク質の部分sf遺伝子、分離株08-3622 1,197bp 線状DNA FN557184.1 GI:315455209	20
トリアデノウイルス4 分離株Bareilly ファイバータンパク質遺伝子、完全cds 1,437bp 線状DNA FJ949088.1 GI:238683632	
トリアデノウイルス4 ショートファイバー遺伝子、完全cds 1,482bp 線状DNA AY340863.1 GI:33359662	
トリアデノウイルス4 分離株Punjab 1 ファイバー遺伝子、完全cds 1,386bp 線状DNA DQ864436.1 GI:112735223	
トリアデノウイルス4 分離株Punjab 2 ファイバー遺伝子、完全cds 1,386bp 線状DNA DQ864434.1 GI:112735219	30
トリアデノウイルス10 ショートファイバータンパク質遺伝子、完全cds 1,496bp 線状DNA AF007579.1 GI:2674070	

## 【0087】

配列のそれぞれに、配列の性質、FAdV種/血清型、配列長、GenBank受託番号およびバージョンを示した。

## 【0088】

表4は、アピアデノウイルス属の種のリストを示す。

40

【表4】

ファルコンアデノウイルスA		
ファルコンアデノウイルス1	[AY683541]	(FaAdV-1)
トリアデノウイルスA		
トリアデノウイルス1 (CELO)	[U46933 = __ AC_000014]	(FAdV-1)
トリアデノウイルスB		
トリアデノウイルス5 (340)	[AF508952]	(FAdV-5)
トリアデノウイルスC		
トリアデノウイルス4 (ON1)	[GU188428=NC_015323]	(FAdV-4)
トリアデノウイルス10 (CFA20)	[AF160185]	(FAdV-10)
トリアデノウイルスD		
トリアデノウイルス2 (P7-A)	[AF339915]	(FAdV-2)
トリアデノウイルス3 (75)	[AF508949]	(FAdV-3)
トリアデノウイルス9 (A2-A)	[AF083975=AC_000013]	(FAdV-9)
トリアデノウイルス11 (380)	[AF339925]	(FAdV-11)
トリアデノウイルスE		
トリアデノウイルス6 (CR119)	[AF508954]	(FAdV-6)
トリアデノウイルス7 (YR36)	[AF508955]	(FAdV-7)
トリアデノウイルス8a (CFA40)	[AF155911]	(FAdV-8a)
トリアデノウイルス8b (764)	[AF508958]	(FAdV-8b)
ガチョウアデノウイルス		
ガチョウアデノウイルス1 (GoAdV-1)		

10

20

【0089】

種名は、イタリック体で示す。型と分離株( )の名前はローマ字で示す。配列受託番号 [ ] およびそれらにつけられた略語( )も記載する。

【図1】

【図2】

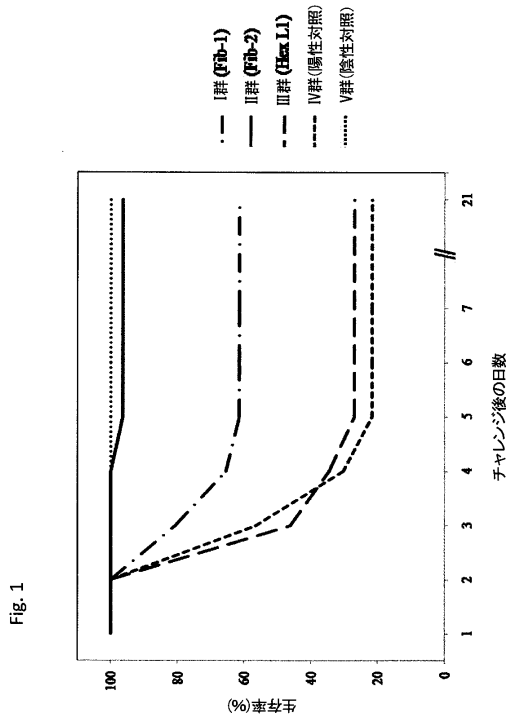


Fig. 2





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/20	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 ミヒヤエル ヘス

オーストリア国, アー - 3 4 0 0 クロスターノイブルク, ヨーゼフシュタイク 7 1

(72)発明者 アンナ シャヒナー

オーストリア国, アー - 1 2 1 0 ウィーン, フェテリネールブラッツ 1

(72)発明者 アナ マレク

オーストリア国, アー - 1 0 6 0 ウィーン, マクダレーネンシュトラッセ 8 / 1 2

(72)発明者 バルバラ ヤスクルスカ

オーストリア国, アー - 1 2 1 0 ウィーン, フェテリネールブラッツ 1

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 1 / 0 1 6 5 2 2 4 ( U S , A 1 )

特表2 0 1 6 - 5 2 8 2 7 0 ( J P , A )

Journal of General Virology , 2 0 1 1 年 , Vol.92 , p.1260-1272

Vaccine , 2 0 0 3 年 , Vol.21 , p.2761-2766

Journal of General Virology , 2 0 0 7 年 , Vol.88 , p.2407-2416

Vet Microbiol , 2 0 1 2 年 , Vol.156 , No.3-4 , p.411-417

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	禽腺病毒疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP6649255B2</a>	公开(公告)日	2020-02-19
申请号	JP2016535460	申请日	2014-08-19
申请(专利权)人(译)	铁特丽尼赫鲁媒体梓尼什Uniberujiteto维也纳		
当前申请(专利权)人(译)	铁特丽尼赫鲁媒体梓尼什Uniberujiteto维也纳		
[标]发明人	ミヒヤエルヘス アンナシャヒナー アナマレク バルバラヤスクルスカ		
发明人	ミヒヤエルヘス アンナ シャヒナー アナ マレク バルバラ ヤスクルスカ		
IPC分类号	A61K39/235 A61K39/39 A61K47/10 A61K47/14 A61K47/44 A61P1/16 A61P31/20 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/505 A61K2039/552 A61K2039/55555 A61K2039/55566 A61P1/16 C12N2710 /10234 A61K39/235 A61K2039/545 A61K2039/55505 A61K2039/55588 C12N7/00 C12N2710/10222 G01N33/6854 G01N2333/075 G01N2800/26 G01N2800/52		
FI分类号	A61K39/235.ZNA A61K39/39 A61K47/10 A61K47/14 A61K47/44 A61P1/16 A61P31/20 G01N33/53.D		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛 胜		
优先权	2013180849 2013-08-19 EP		
其他公开文献	JP2016534110A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

公开了一种疫苗，其包含禽腺病毒C的纤维2蛋白 ( FAdV-C ) 或其免疫原性片段，用于预防禽类，特别是家禽，特别是肉鸡中的肝炎-水囊病综合症 ( HHS ) 。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6649255号 (P6649255)
(45) 発行日 令和2年2月19日 (2020.2.19)	(24) 登録日 令和2年1月20日 (2020.1.20)	
(51) Int. Cl. F 1 A 6 1 K 39/235 (2006.01) A 6 1 K 39/39 (2006.01) A 6 1 K 47/10 (2006.01) A 6 1 K 47/14 (2006.01) A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 39/235 Z N A A 6 1 K 39/39 A 6 1 K 47/10 A 6 1 K 47/14 A 6 1 K 47/44	
請求項の数 25 (全 43 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-535460 (P2016-535460)	(73) 特許権者 507364333 フェテリネールメディアツィニシュ ウニベ ルジテート ウィーン オーストリア国、アー ー 1 2 1 0 ウィー ン、フェテリネールプラッツ 1	
(66) (22) 出願日 平成26年8月19日 (2014.8.19)	(74) 代理人 10009759 弁理士 青木 篤	
(65) 公表番号 特表2016-534110 (P2016-534110A)	(74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬	
(43) 公表日 平成28年11月4日 (2016.11.4)	(74) 代理人 100087871 弁理士 福本 慎	
(84) 国際出願番号 PCT/EP2014/057654	(74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 晋次	
(87) 国際公開日 W02015/024932	(74) 代理人 100117019 弁理士 渡辺 陽一	
(86) 優先権主張番号 13180849.5		
(31) 優先日 平成25年8月19日 (2013.8.19)		
(32) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関		

(54) 【発明の名称】 トリアノウイルスワクチン

最終頁に続く