

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3780256号
(P3780256)

(45) 発行日 平成18年5月31日(2006.5.31)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/01 (2006.01)	C O 7 K 14/01
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 L
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2002-526914 (P2002-526914)	(73) 特許権者	394010986
(86) (22) 出願日	平成13年9月14日(2001.9.14)		アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(65) 公表番号	特表2004-508818 (P2004-508818A)		オランダ国、6824・ベー・エム・アー
(43) 公表日	平成16年3月25日(2004.3.25)		ネム、フェルペルウエビ・76
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010679	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02002/022664		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成14年3月21日(2002.3.21)	(72) 発明者	ピラーク、ジュステイヌス・マリア
審査請求日	平成14年11月29日(2002.11.29)		オランダ国、エヌ・エル-3911・メー
(31) 優先権主張番号	00203186.2		スター・レーネン、ニーバー・ペーネンダ
(32) 優先日	平成12年9月15日(2000.9.15)		ールスウエビ・214
(33) 優先権主張国	欧州特許庁(EP)	(72) 発明者	バン・ヒュールテン、マリア・コーネリア
前置審査			・ウイヘルミーナ
			オランダ国、エヌ・エル-6701・デー
			・ペー・ワーゲニンゲン、サルバーダブレ
			イン・10
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小エビ白斑病症候群 (White Spot Syndrome) ウイルスの抗原性蛋白質及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

W S S V に対して甲殻類を免疫するのに適した W S S V の抗原性蛋白質であって、配列番号 4 又は配列番号 5 に示すアミノ酸配列あるいは前記配列に対して 1 個もしくは数個のアミノ酸の置換、挿入、付加または欠失を有するアミノ酸配列からなることを特徴とする前記抗原性蛋白質。

【請求項2】

配列番号 4 又は配列番号 5 に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 1 に記載の抗原性蛋白質。

【請求項3】

請求項 1 又は 2 に記載の抗原性蛋白質をコードする核酸。

【請求項4】

前記核酸が配列番号 3 に示すヌクレオチド配列からなることを特徴とする、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項5】

請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質に対して惹起される抗体。

【請求項6】

配列番号 3 に示すヌクレオチド配列あるいは該配列に対して 1 個もしくは数個のヌクレオチドの置換、挿入、付加または欠失を有するヌクレオチド配列又は前記ヌクレオチド配列のいずれかに相補性であるヌクレオチド配列からなる核酸、若しくは配列番号 3 に示す

核酸を特異的に増幅できる20個以上のヌクレオチドの長さを持つその断片を含むことを特徴とする、WSSVの検出のための診断キット。

【請求項7】

請求項5に記載の抗体を含むことを特徴とする、WSSVの検出のための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、白斑病症候群(White Spot Syndrome)ウイルスから誘導される抗原性蛋白質、ワクチンにおけるこれらの蛋白質の使用、これらの蛋白質に基づくワクチン、当該蛋白質に対する抗体、ワクチンにおけるこれらの抗体の使用、それらをコードする核酸配列及び甲殻類における白斑病症候群の予防及び/又は治療のためのワクチンの製造における当該蛋白質の使用、ベクターワクチン及び診断キットに関する。

10

【0002】

白斑病症候群ウイルス(WSSV)は世界中で小エビ(shrimp)における主要なウイルス性疾患である。かかるウイルスは甲殻類において広い宿主対象を有しており(Flegel, 1997)、分離体の間で遺伝的変異はほとんど存在しない(Lora, 1999)。電子顕微鏡(EM)検査は、ビリオンがエンベロープに包まれており、長さ約275nm、幅120nmの杆状から弾丸形の外観で、一方の端に尾状付属器を持つことを示した。エンベロープを喪失したヌクレオカプシドは、網目の陰影のある外観を持ち、約300nm×70nmの大きさである(Wongteerasupayaら、1995)。このビリオンの形態、その核局在及び形態発生は、昆虫におけるバキュロウイルスを想起させる(Durandら、1997)。もともと、WSSVはバキュロウイルス科(Baculoviridae)ファミリーの割り当てられない(unassigned)成員として分類されており(Franckira、1991)、それ故このウイルスは、Systemic Ectodermal Mesodermal Baculovirus(SEMBV)又はWhite Spot Baculovirus(WSBV)と称されてきた。現在WSSVは、分子情報が欠如していることからもはやこのファミリーとしては認められない(Murphyら、1995)。二本鎖ウイルスDNAは、制限エンドヌクレアーゼ分析から推論して200kbをはるかに越える大きさを持つ(Yangら、1997)。

20

【0003】

養殖小エビにおけるWSSVの発生は小エビの大量の死亡を引き起こす。この疾病は、小エビの甲、付属器及び小皮上の白い斑点と肝臓の赤みがあった変色を特徴とする。感染した小エビは嗜眠の徴候を示し、食餌摂取が急速に低下して、3-5日以内にRほらの小エビは死亡する。WSSVの発生は小エビ養殖産業における重大な損失を導き、それ故WSSV感染に対して防護することができるワクチンが強く求められている。かかるワクチンにおいて使用することができる主要WSSV蛋白質の同定と特性指摘は、そのようなワクチンを開発するための手段を提供するであろう。

30

【0004】

クマシーブリリアントブルー染色SDS-PAGEゲルでの移動度から推定した分子量により、それぞれ蛋白質VP13(13kDa)とVP19(19kDa)をコードする2つの遺伝子が単離され、vp19及びvp13として同定された。VP19はエンベロープ蛋白質であり、一方VP13はヌクレオカプシド蛋白質である。vp19のオープンリーディングフレーム(ORF)は配列番号1に示すように366個のヌクレオチドを含み、合わせて121個のアミノ酸から成る演繹アミノ酸配列を示す(配列番号2として別途に表示する)。遺伝子vp13のオープンリーディングフレームは、配列番号3に示すように少なくとも186個のヌクレオチドを含む。このORFは、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むヌクレオカプシド蛋白質VP13をコードする。蛋白質VP13の2つの変異体が認められており、1つは配列番号4に示すアミノ酸配列を持ち、より長い変異体は配列番号5に示すアミノ酸配列を持つ。

40

【0005】

50

本発明は、WSSVによる感染に対して甲殻類を防護するための組換えワクチンを作製する手段を提供する。同定され、特性付けられたWSSVのエンベロープ蛋白質VP19及びヌクレオカプシド蛋白質VP13は、WSSVによる感染に対して甲殻類を防護するためのサブユニットワクチンの製造における使用に適することが認められた。本発明のヌクレオチド配列のクローニングと特性指摘は、組換えテクノロジー手法を用いたWSSVのこれらの蛋白質の生産を提供する。この方法では、他のWSSV蛋白質を実質的に含まないWSSV蛋白質が入手できる。単離したWSSV蛋白質は、WSSV感染に対して甲殻類を防護するためのサブユニットワクチンを製造するために使用できる。

【0006】

本発明の蛋白質はマーカーワクチンにおいて特に有用である。そのようなワクチンは、例えばVP13及び/又は19だけを含みうる。 10

【0007】

代替的に、WSSVの蛋白質をコードするヌクレオチド配列は、WSSVによる感染に対して甲殻類を防護するためのベクターワクチンを製造するために使用できる。

【0008】

本発明のヌクレオチド配列はさらに、診断目的、例えば圃場においてWSSVの存在を検出するために使用できる。

【0009】

さらに、本発明のWSSV蛋白質はWSSV特異的抗体を産生するために使用できる。これらの抗体は、甲殻類の受動免疫のためのWSSVワクチンを生産するために使用できる。抗体はまた、甲殻類における又は圃場におけるWSSVの検出のような診断目的にも使用できる。 20

【0010】

従って本発明の最初の実施形態は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列と少なくとも70%相同であるアミノ酸配列を持つ、WSSVに対して甲殻類を免疫するのに適したWSSVの抗原性蛋白質及びかかる抗原性蛋白質の免疫原性断片を提供する。

【0011】

好ましい形態では、実施形態は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の配列相同性を持つWSSV蛋白質及びそのような蛋白質の免疫原性断片に関する。 30

【0012】

98%、さらには100%の相同性レベルがさらに一層好ましい。

【0013】

蛋白相同性のレベルは、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を用いて、サブプログラム：「BLASTP」を選択することによって決定ことができ、このプログラムはwww.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.htmlで検索できる。

【0014】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)である。使用するマトリックス：「blosum62」。使用するパラメータはデフォルトパラメータ：オープンギャップ：11。エクステンションギャップ：1。ギャップx__ドロップオフ：50である。 40

【0015】

ここに含まれる特定蛋白質について、個々のWSSV株の間で天然の変異が存在しうるとは明白であろう。これらの変異は、全体配列中でのアミノ酸の相違、若しくは当該配列におけるアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位又は付加によって明らかにされうる。生物学的及び免疫学的活性を基本的に変化させないアミノ酸置換は、例えばNeurathらに 50

より「蛋白質 (The Proteins)」Academic Press New York (1979) の中で述べられている。関連アミノ酸の間でのアミノ酸置換又は進化の過程でしばしば起こる置換は、中でも特に、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val である (Dayhof, M. D., 蛋白質配列と構造のアトラス (Atlas of protein sequence and structure)、Nat. Biomed. Res. Found. Washington D. C., 1978, 第5巻、補遺3参照)。他のアミノ酸置換は、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val 及び Ala/Glu を含む。この情報に基づき、Lipman と Pearson は、迅速で感受性の高い蛋白質比較 (Science, 227, 1435-1441, 1985) と、相同蛋白質間の機能的類似性を決定するための方法を開発した。本発明の例示的实施形態のそのようなアミノ酸置換ならびに欠失及び/又は挿入を持つ変異体は、生じる蛋白質がその抗原性又は免疫原性に本質的に影響を受けていないかぎり、本発明の範囲内である。

10

【0016】

これは、本発明に従った WSSV 蛋白質が、種々の圃場分離株から単離したとき、同じ免疫特性を持つ同じ蛋白質のままでありながら、なぜ約 70% の相同性レベルを持ちうるかという理由を説明する。

【0017】

WSSV による感染に対して又は少なくとも感染の臨床症状発現に対して免疫応答を誘導することができる蛋白質を依然として提供する、本発明に従ったある種の蛋白質のアミノ酸配列におけるそれらの変異は、「当該蛋白質の抗原性又は免疫原性に本質的に影響を及ぼさない」とみなされる。

20

【0018】

蛋白質を、例えばワクチン接種のため又は抗体を惹起するために使用するとき、蛋白質全体を使用する必要はない。それ自体で又は例えば KLH のような担体と結合して、その蛋白質に対する免疫応答を誘導することができる当該蛋白質の断片、いわゆる免疫原性断片を使用することも可能である。「免疫原性断片」とは、脊椎動物宿主において免疫応答を誘導するその能力をまだ保持している完全長蛋白質の断片と理解され、すなわち B 又は T 細胞エピトープを含む。脊椎動物宿主において惹起される抗体は、小エビにおけるワクチン接種の受動手段として非常に適する。現在、抗原性断片 (抗原決定基) をコードする DNA 断片を容易に同定するために様々な手法が使用できる。Geysen ら (特許願 WO 84/03564 号、特許願 WO 86/06487 号、米国特許第 4,833,092 号、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3998-4002 (1984); J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987)) が述べた方法、いわゆる PEPSCAN 法は、蛋白質の免疫学的に重要な領域であるエピトープの検出のための、実施しやすく、迅速で広く確立された方法である。かかる方法は世界中で使用されており、それ自体当業者には周知である。この (経験的) 方法は B 細胞エピトープの検出に特に適する。また、何らかの蛋白質をコードする遺伝子の配列が与えられれば、コンピュータアルゴリズムが、現在既知のエピトープとそれらの配列及び/又は構造上の一貫に基づいて特定蛋白質断片を免疫学的に重要なエピトープとして選定することができる。これらの領域の決定は、Hopp と Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78:38248-3828 (1981)) に従った疎水性判定基準と、Chou と Fasman (Advances in Enzymology 47:45-148 (1987)) 及び米国特許第 4,554,101 号) に従った二次構造局面の組合せに基づく。T 細胞エピトープは同様に、Berzofsky の両親媒性判定基準 (Science 235, 1059-1062 (1987)) 及び米国特許願 NTIS US 07/005,885 号) を用いてコンピュータにより配列から予測できる。要約された概要が次の参考文献に認められる：一般原理に関しては、Shan Lu: Tibtech 9:238-242

30

40

50

(1991)、マラリアエピトープに関しては、Goodら：Science 235：1059-1062(1987)、総説については、Lu：Vaccine 10：3-7(1992)、HIVエピトープについては、Berzowsky：The FASEB Journal 5：2412-2418(1991)。

【0019】

本発明のもう1つの実施形態は、上述したような本発明に従った蛋白質又は免疫原性断片と反応性の抗体を製薬上許容される担体と共に含む、WSSV感染に対して小エビを防護することができるワクチンに関する。

【0020】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、上述したような本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片を製薬上許容される担体と共に含む、WSSV感染に対して小エビを防護することができるワクチンに関する。

【0021】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、本発明に従った抗原性蛋白質をコードする核酸配列又はその免疫原性断片に関する。

【0022】

より好ましくは本発明のこの実施形態は、配列番号2、4又は5に示すようなアミノ酸配列を含む抗原性蛋白質をコードする核酸配列又はその免疫原性断片に関する。

【0023】

好ましくは、核酸配列は配列番号1又は3に示すような配列を持つか又は含む。それぞれのヌクレオチド配列は、推定アミノ酸配列の最初のM残基をコードするATGコドンから始まり、C末端アミノ酸残基をコードするコドンまでに及ぶ。本発明のために、配列番号1又は配列番号3に示す配列と配列相同性を持つ核酸配列も本発明の範囲内であることは明白であろう。本発明のために、配列相同性は少なくとも70%、好ましくは75%、より好ましくは80%、さらに一層好ましくは85%であるとみなされる。配列番号1又は3に示す配列と少なくとも90%、より好ましくは95%の配列相同性を持つ核酸配列が極めて好ましい。

【0024】

98%、さらには100%の相同性がさらに一層好ましい。

【0025】

本発明のために、配列相同性は、対象とするヌクレオチド配列を配列番号1又は3に示す配列の対応する部分と比較することによって決定される。本発明のために、パーセンテージ配列相同性は、比較される配列間での同一ヌクレオチドのパーセンテージと定義される。

【0026】

ヌクレオチド相同性のレベルは、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を用いて、サブプログラム：「BLASTN」を選択することによって決定することができる。このプログラムはwww.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.htmlで検索できる。

【0027】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174：247-250(1999)である。使用するマトリックス：「blosum62」。使用するパラメータはデフォルトパラメータである：適合についてのリワード：+1。不適合についてのペナルティー：-2。オープンギャップ：5。エクステンションギャップ：2。ギャップx_ドロップオフ：50。

【0028】

本発明に従った配列相同性を持つ核酸配列は、常套的クローニング及びハイブリダイゼーション手法を用いて緊密に関連するWSSV株から配列番号1又は3に示す配列の1つ又はこの配列の断片で容易に単離することができる。このためには、ストリンジェント条件

10

20

30

40

50

下、好ましくは高いストリンジェント条件下でハイブリダイゼーションを実施する。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、65の温度で1×SSC、0.1%SDSの洗浄条件と理解される；高いストリンジェント条件は、SSC濃度を0.3×SSC近くまで低下させた洗浄条件を指す。特定情報は、誤って同定された根拠を排除する必要が生じるほど狭義に解釈すべきではない。ここで開示する特定配列は、他の菌株から相同ヌクレオチド配列を単離するために容易に使用できる。

【0029】

配列番号1又は3に示す配列の1つと配列相同性を持つ核酸配列は、配列番号2、4又は5に示すアミノ酸配列の1つと比較して変異を含むアミノ酸配列を持つ蛋白質をコードするが、但しかかる変異は当該蛋白質の抗原性又は免疫原性に本質的に影響を及ぼさない。

10

【0030】

本発明に従ったWSSV蛋白質は、標準的な生化学的分離及び精製法を通して入手することができ、若しくは一般的組換えテクノロジーによって調製することができる。本発明に従ったヌクレオチド配列は、実質的に他のWSSV蛋白質を含まないWSSV蛋白質の組換え産生のために使用するのに特に適する。ヌクレオチド配列を、当該蛋白質を発現することができる適当な発現ベクターに組み込み、かかる発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換して、適当な培地中で宿主細胞を培養する。発現された蛋白質を細胞又は培地から分離し、精製することができる。適当な発現ベクターは、中でも特に、複製と発現のために必要な制御領域を含むプラスミド、コスミド、ウイルス及びYAC(酵母人工染色体)である。発現ベクターは宿主細胞上で発現することができる。適当な宿主細胞は、例えば細菌、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳類細胞である。そのような発現手法は当該技術において周知である(Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: a Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989; KingとPossee, 1992)。

20

【0031】

さらに、本発明に従った核酸配列は、WSSV感染に対して甲殻類にワクチン接種するためのベクターワクチンを製造するために使用できる。ベクターワクチンは、生弱毒化細菌又はウイルスが、その遺伝物質内に挿入された1つ又はそれ以上の異種ヌクレオチド配列を含むように修飾されているワクチンと理解される。これらのいわゆるベクター細菌又はウイルスは、挿入されたヌクレオチドによってコードされる異種蛋白質を同時発現することができる。それ故第四の局面では、本発明は、生弱毒化細菌又はウイルスと製薬上許容される担体を含み、かかる細菌又はウイルスがその遺伝物質内に本発明のヌクレオチド配列の1つ又はそれ以上を含むように修飾されている、甲殻類における白斑病症候群の予防又は治療において使用するためのベクターワクチンを提供する。そのようなLRCに感染した小エビは、担体の免疫原に対してのみならず、遺伝子コードがLRCに付加的にクローニングされている蛋白質の免疫原性部分に対しても免疫応答を生じる。

30

【0032】

細菌LRCの例として、当該技術において既知の*Vibrio anguillarum*のような細菌が好都合に使用できる(Singer, J. T.ら、「海洋バイオテクノロジーにおける新しい開発(New Developments in Marine Biotechnology)」、p. 303-306, Le GalとHalvorsen編集、Plenum Press, New York, 1998)。

40

【0033】

また、LRCウイルスは核酸配列を標的細胞内に運搬する手段としても使用しうる。この役割に適したウイルスは、例えばYellow Headウイルス及びGill関連ウイルスであり、これらはどちらもコロナウイルス科のファミリーに属する(例えば、ウイルスについてはSpann, K. M.ら、Dis. Aquat. Org. 42: 221-225(2000)、及びCowley, J. A.ら、Dis. Aquat. Org. 36: 153-157(1999)、又は生組換え担体コロナウイルスについてはEnjua

50

nes, L.ら、ESVV議事録、p. 28 - 31, Brescia, Italia, 2000年8月27 - 30日参照)。

【0034】

当該技術において周知の生体内相同的組換えの手法を使用して、宿主動物において本発明に従った挿入核酸配列の発現を誘導することができる選択した細菌又はウイルスのゲノム内に組換え核酸配列を導入することができる。

【0035】

ワクチン接種の代替的で効率的な方法は、関連抗原をコードするDNAによる直接ワクチン接種である。蛋白質をコードするDNAの直接ワクチン接種は多くの異なる蛋白質について成功を収めてきた。(例えばDonnellyら、The Immunologist 2: 20 - 26 (1993)で検討されている)。このワクチン接種の方法は、WSVに対する小エビのワクチン接種にとって魅力的である。それ故、本発明のさらにもう1つの実施形態は、製薬上許容される担体と、本発明に従った蛋白質をコードする核酸配列又はその免疫原性断片、若しくはそのような核酸配列を含むDNA断片、例えばプラスミドを含有するワクチンに関する。

10

【0036】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、ワクチンにおいて使用するための本発明に従った蛋白質に関する。

【0037】

本発明のさらにもう1つの実施形態は、WSV感染に対抗するためのワクチンの製造のための、本発明に従った蛋白質の使用に関する。

20

【0038】

本発明に従ったワクチンは、例えば*P. monodon*、*P. vannamei*、*P. chinensis*、*P. merguensis*、又は*Metapeaeus spp.*のようなPenaeidaeファミリーからの成員を含むがこれらに限定されない小エビ(shrimps)、例えば*Macrobrachium spp.*又は*Palaemon spp.*のようなPalaemonidaeファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないクルマエビ・テナガエビ類(prawns)、例えば*Calinectes spp.*、*Palinurus spp.*、*Panuliris spp.*又は*Homarus spp.*のようなPalinuridae及びNephropidaeファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないウミザリガニ(lobsters)、*Astacus spp.*、*Procambarus spp.*及び*Oronectes spp.*を例とするAstacidaeファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないザリガニ・イセエビ類(crayfish)、そして*Cancer spp.*、*Callinectes spp.*、*Carcinus spp.*及び*Portunus spp.*を例とするCancridae及びPortuidaeファミリーからの成員を含むがこれらに限定されないカニ(crab)などの甲殻類を防護するために使用できる。

30

【0039】

本発明に従ったワクチンは、当業者に周知であり、例えば「レミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」、第18版、A. R. Gennaroら編集、72章、p. 1389 - 1404, Philadelphia College of Pharmacy and Scienceに述べられている手法に従って調製することができる。

40

【0040】

本発明に従ったワクチンは、本発明に従った有効量の1つ又はそれ以上の蛋白質、ベクター細菌又はウイルス、及び製薬上許容される担体を含む。ここで使用する「有効」の語は、甲殻類において防護応答を誘導するのに十分な量と定義される。ベクター又は蛋白質の量は、ベクター又は蛋白質の種類、投与経路、投与時間、ワクチン接種する種ならびに年齢、全身状態、温度及び食事に依存するであろう。

【0041】

50

一般に、動物当たり0.01から1000 μ g蛋白質の投与量、好ましくは動物当たり0.5から500 μ g、より好ましくは1から100 μ g蛋白質の投与量可以使用。ウイルスベクターワクチンの場合には、一般に動物当たり10³から10⁸pfu(プラーク形成単位)の投与量が非常に効率的に使用できる。細菌ベクターワクチンは、10³から10⁸細菌の用量で非常に効率的に投与することができる。

【0042】

DNAワクチン接種については、動物当たり0.1から10 μ gDNAのDNA量が非常に有用な用量である。

【0043】

本発明に従ったワクチンにおける使用に適した製薬上許容される担体は、例えば滅菌水、食塩水、アルカリ金属リン酸塩(例えばPBS)、アルコール、ポリオール等のような水性緩衝液のように、無菌であり、生理的に適合性である。さらに、本発明に従ったワクチンは、アジュバント、安定剤、抗酸化剤、防腐剤その他のような他の添加物を含みうる。適当なアジュバントは、アルミニウム塩又はゲル、カルボマー、非イオン性ブロック共重合体、トコフェロール、モノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド、油性乳剤、グルカン、サイトカイン、Quil Aのようなサポニン等を含むがこれらに限定されない。加えるアジュバントの量はアジュバント自体の性質に依存する。

10

【0044】

本発明に従ったワクチンにおける使用のための適当な安定剤は、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストリン、及びグルコース、アルブミン又はカゼインのような蛋白質、ならびにアルカリリン酸塩のような緩衝剤を含むがこれらに限定されない。適当な防腐剤は、中でも特に、チメロサル及びmerthiolateを含む。

20

【0045】

本発明に従ったワクチンは、注射、液浸、浸漬、噴霧又はエアロゾルによって、又は経口的に投与することができる。好ましくはワクチンは、特に商業的水産養殖場の場合、液浸によって又は経口的に甲殻類に投与する。

【0046】

経口投与については、好ましくはワクチンを経口投与のための適当な担体、すなわちセルロース、食餌、又は β -セルロース又は植物又は動物由来の様々な油のような代謝性物質と混合する。本発明に従ったワクチンの経口送達のための特に好ましい食餌担体は、ワクチンを被包することができる生体飼料生物である。これを得るための非常に適切な方法は、例えば本発明に従った蛋白質が発現されている昆虫細胞を生体飼料生物に給餌することである。適切な生体飼料生物は、プランクトン様の非選択性濾過摂食体(non-selective filter feeder)、好ましくはRotifera、Artemia等の成員を含むがこれらに限定されない。brine shrimp Artemia sp.が極めて好ましい。

30

【0047】

本発明に従った蛋白質は、当業者に使用可能な一般的手法を用いた抗体産生のために使用できる。好ましくは蛋白質を使用して特異的モノクローナル抗体を産生する。本発明に従った抗体は標準的手法に従って調製することができる。動物、例えばマウスを蛋白質で免疫するための手順及び蛋白質特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択のための手順は当該技術において周知である(例えばCliganら(編集)、「免疫学における現在のプロトコル(Current protocols in Immunology)」、1992; KohlerとMilstein, Nature 256, p. 495-497, 1975; Steenbakkersら, Mol. Biol. Rep. 19, p. 125-134, 1994参照)。得られた抗体は、圃場でWSSVを検出するため又は甲殻類におけるWSSVの存在を検出するための診断において使用しうる。本発明に従ったヌクレオチド配列はまた、診断における使用にも適する。当該配列又はその断片は、例えば圃場で又は甲殻類におけるWSSVの存在を検出するためのPCRテクノロジーにおいて使用できる。

40

50

【0048】

WSSVの検出のための診断試験は、例えば検査する動物から分離したDNAの特異的プローブとの反応に基づくか、若しくは本発明に従ったコード配列に基づくPCR試験又はそれらのコード配列に相補的な核酸配列に基づくPCR試験である。本発明に従ったWSSV蛋白質に特異的な核酸分子が動物中に存在する場合、これらは、例えば特異的PCRプライマーに特異的に結合し、その後PCR反応において増幅される。次にDNAゲル電気泳動においてPCR反応産物を容易に検出することができる。PCR反応は当該技術において周知である(下記の参考文献参照)。核酸分子は、検査する動物の肝臓から最も容易に分離することができる。標準的なPCRテキストが、本発明に従った蛋白質に特異的な核酸分子を持つ選択的PCR反応のためのプライマーの長さを決定する方法を教示する。少なくとも12個のヌクレオチドから成るヌクレオチド配列を持つプライマーがしばしば使用されるが、15個以上、より好ましくは18個のヌクレオチドのプライマーがいくぶんより選択的である。特に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個のヌクレオチドの長さを持つプライマーが非常に一般的に適用できる。PCR手法は、(Dieffenbach & Drexler, PCR primers, a laboratory manual, ISBN 0-87969-447-5 (1995))において広汎に記述されている。

10

【0049】

当該核酸分子又はその部分が、配列番号1又は3に示すような核酸配列又は配列番号1又は3に示すような核酸配列に相補的な核酸配列と少なくとも70%の相同性を持つ、本発明に従ったWSSV蛋白質をコードする核酸分子、又は少なくとも12個、好ましくは15個、より好ましくは18個、さらに一層好ましくは、好ましい順に20、22、25、30、35又は40個のヌクレオチドの長さを持つそれらの核酸分子の部分も、それ故、本発明の一部である。そのような核酸分子は、例えば本発明に従った蛋白質をコードする核酸の量を高めるためにPCR反応におけるプライマーとして使用することができる。これは、例えば上述したような組織におけるWSSVの検出のための診断ツールとして使用するための特異的ヌクレオチド配列の速やかな増幅を可能にする。

20

【0050】

もう1つの核酸ベースの試験は、放射能又は着色標識した蛋白質特異的cDNA断片との古典的ハイブリダイゼーションに基づく。PCR反応とハイブリダイゼーション反応のいずれもが当該技術において周知であり、中でも特に、Maniatis/Sambrook (Sambrook, J.ら、「分子クローニング:実験室マニュアル(Molecular Cloning: a laboratory manual)」, ISBN 0-87969-309-6)に記述されている。

30

【0051】

それ故、本発明のもう1つの実施形態は、試験が、配列番号1又は3に示すような核酸配列又はその核酸配列に相補的なヌクレオチド配列と少なくとも70%相同である核酸配列、若しくは少なくとも12個、好ましくは15個、より好ましくは18個のヌクレオチドの長さを持つその断片を含む、WSSVの検出のための診断キットに関する。

【0052】

WSSV蛋白質の抗原性物質の検出に基づく、そしてそれ故WSSV感染の検出に適する診断試験は、例えば同時に標準サンドイッチELISA試験でありうる。そのような試験の一例では、ELISAプレートのウェルの壁を本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片に対する抗体で被覆する。試験する物質とのインキュベーション後、標識抗WSSV抗体をウェルに加える。その後呈色反応によってWSSVからの抗原性物質の存在を明らかにする。

40

【0053】

それ故、本発明のさらにもう1つの実施形態は、当該試験が本発明に従った蛋白質又はその免疫原性断片に対する抗体を含むことを特徴とする、WSSVの検出のための診断試験に関する。

50

【0054】

そこで、もう1つの局面では、本発明は、本発明に従った1つ又はそれ以上のヌクレオチド配列又は抗体を含む診断キットを提供する。

【0055】

本発明に従った蛋白質に対して惹起される抗体は、さらに、甲殻類の受動免疫のための抗体ワクチンを製造するために使用できる。それ故、さらなる局面では、本発明は、配列番号2、配列番号4又は配列番号5に示すようなアミノ酸配列を含む蛋白質に対して惹起される抗体を含む、WSSVに対する受動免疫のためのワクチンを提供する。そのようなワクチンは、上述したような標準的手法を用いて調製することができる。好ましくは、抗体が魚類飼料 (fish food) のような食用担体と混合されている、抗体の経口投与のためのワクチンを調製する。より好ましくは、鶏卵において調製される抗体 (IgY抗体) からワクチンを調製する。

10

【0056】

本発明に従った抗体の大規模生産のための方法も当該技術において既知である。そのような方法は、ファージディスプレイのための線状ファージにおける、本発明に従った蛋白質をコードする遺伝情報 (の断片) のクローニングに基づく。そのような手法は、中でも特に、「抗体エンジニアリングページ (Antibody Engineering Page)」において「線状ファージディスプレイ」として <http://axim11.imt.unimarburg.de/~rek/aepphage.html> に述べられており、また Cortese, R. ら (1994) により Trends Biotechnol. 12: 262 - 267 において、Clackson, T. & Wells, J. A. (1994) により Trends Biotechnol. 12: 173 - 183 において、Marks, J. D. ら (1992) により J. Biol. Chem. 267: 16007 - 16010 において、Winter, G. ら (1994) により Annu. Rev. Immunol. 12: 433 - 455 において、そして Little, M. ら (1994) により Biotechnol. Adv. 12: 539 - 555 において、総説論文として記述されている。ファージはその後、camelid 重鎖抗体を発現する camelid 発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される。(Muyldermans, D. と Lauwereys, M., Journ. Molec. Recogn. 12: 131 - 140 (1999) 及び Grahroudi, M. A. ら, FEBS Letters 414: 512 - 526 (1997))。所望する抗体を発現するライブラリーからの細胞を複製し、その後抗体の大規模発現のために使用することができる。

20

30

【0057】

(実施例)

実施例 1

WSSV 蛋白質 VP19 による *Penaeus monodon* のワクチン接種

ウイルス株の産生

ザリガニ・イセエビ類の *Procambarus clarkii* において精製 WSSV の筋肉内注射により WSSV ウイルス株を産生した。ブラックタイガーエビ *P. monodon* において 90 から 100% の死亡率をもたらす希釈を調べるため、体重約 1 グラムの動物を用いて生体内ウイルス滴定を実施した。NaCl 330 mM 中 1×10^5 から 5×10^{11} 倍までの段階でウイルス株を希釈し、各々の希釈について $10 \mu\text{l}$ を 10 匹のエビに筋肉内注射した。NaCl 330 mM を注射したエビを感染の陰性対照として使用した。陰性対照として使用したすべてのエビ (示していない) 及び 5×10^{11} ウイルス希釈を投与したエビは生存したが、それより低いウイルス希釈を摂取したすべての群においてウイルス感染による死亡が発生した。 1×10^5 から 1×10^7 のウイルス希釈の投与は、20 日の期間中にほぼ 100% の死亡率をもたらした。 1×10^8 と 5×10^9 のウイルス希釈を使用したときには死亡の遅延が認められた。 1×10^8 希釈は 90% の最終的死亡率をもたらしたが、死亡期間は遅延し、40 日の期間にわたった。 1×10^7 、 1×10^8 、及び 5×10^9 希釈に関して実験を反復し、基本的に同じ結果を得た。

40

50

1×10^8 希釈をその後の実験のためのウイルス用量として選択した。この条件が、死亡率の低下という見地から中和に対する至適応答をもたらすと予想されたからである。

【0058】

昆虫細胞におけるWSSV蛋白質VP19及びVP13の発現

バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞においてVP19及びVP13 ORFを発現した。Bac-to-Bacシステム(GIBCO BRL)を使用して、昆虫細胞においてバキュロウイルスポリヒドロキシプロモーターから推定上のWSSVビリオン蛋白質VP19及びVP13を発現する組換えバキュロウイルス(AcMNPV)を生成した。p10プロモーターからグリーン蛍光蛋白質(GFP)を発現する組換えウイルスを、またバキュロウイルスポリヒドロキシプロモーターから各々のWSSV蛋白質を発現する組換えウイルスを生成した。

10

【0059】

Sf21昆虫細胞を5の感染多重度(MOI)でAcMNPV-VP19及びAcMNPV-VP13に感染させ、感染後72時間目に採集した。感染Sf21細胞の抽出物を15%SDS-PAGEゲル中で分析した(図1)。VP13(図1、レーン5、ここではVP15と表示している)については明瞭な発現産物が認められ、これはWSSVビリオンにおけるその真正対(図1、レーン2)と同じ電気泳動移動度を持つ。VP19(図1、レーン3)については、(明瞭度はより低い、明らかに目に見える)発現産物が認められた。それ故、精製WSSVに対して惹起したポリクローナル抗血清を使用してウェスタン分析を実施した。この分析は、VP19が予想された位置(図1、レーン4)で発現されたこと、それ故vp19 ORFがWSSVビリオン蛋白質をコードすることを示した。

20

【0060】

ワクチン接種と攻撃誘発

表1に示す計画に従って実験を設定した。4つの実験群を使用した：陰性対照と陽性対照の2つの対照群、VP19を摂取する1つの群及びGFPを摂取する1つの群。GFP群では、エビは、VP19を除いて、VP19群に与えられたのと同じ混合物を摂取した。

【0061】

【表1】

表1. ワクチン接種実験における群の設定

30

群番号	群の名称	ワクチン接種	ブースター	攻撃誘発	エビの数
1	陰性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	300mM NaCl	10
2	陽性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	WSSV	10
3	VP19	VP19	VP19	WSSV	10
4	GFP	GFP	GFP	WSSV	10

【0062】

すべての群にそれぞれの溶液20 μ lを注射した。VP19群とGFP群に関しては、ワクチン接種とブースターの両方について総量15 μ gの蛋白質を投与した。蛋白質溶液ならびにウイルス対照の希釈のために、NaCl 330mM溶液を使用した。GFPはグリーン蛍光蛋白質(Green Fluorescent Protein)である。GFP群では、エビは、VP19を除いて、VP19群に与えられたのと同じ混合物を摂取した。

40

ワクチン接種から5日後に、エビにブースター注射を行い、その2日後にWSSVの注射を行った。

【0063】

攻撃誘発後、エビを1週間モニターし、ELISAアッセイと電子顕微鏡検査によって死亡したエビをWSSVの存在に関して検査した。陰性対照である1群においては、WSSV

50

Vのために死亡したエビはなかった。2群のエビは、1日半後からWSSV感染による死亡が始まり、5日後に死亡率が100%に達した。ワクチン接種群3の最初の動物が1日半後に死亡したが、2群に比べてその後の死亡はより緩慢であった。3群は攻撃誘発から6日後に100%の死亡率に達し、陽性対照と比べて死亡率の明らかな遅延を示す。これは、WSSV蛋白質VP19によるP. monodonエビのワクチン接種が、WSSVによる攻撃誘発後のエビの生存率に明確な作用を及ぼすことを明らかにしている。

【0064】

(参考文献)

【0065】

【表2】

Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., and Bonami, J. R. (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases Aquat. Organisms* 29, 205-211.

Flegel, T. W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 433-442.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., and Brown, F. (1991). "Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Springer-Verlag, New York.

Lo, C. F., Hsu, H. C., Tsai, M. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Kou, G. H., and Lightner, D. V. (1999). Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Diseases Aquat. Organisms.*

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. (1995). "Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.". Virus Taxonomy Springer-Verlag, New York.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory Manual." 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Wonteerapayaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamom, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnukul, B., and Flegel, T. W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases Aquat. Organisms* 21, 69-77.

Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z., and Xu, X. (1997). A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. *J. Virol. Meth.* 67, 1-4.

【図面の簡単な説明】

【図1】 レーン1: LMWマーカー (Amersham pharmacia biotech)、2: 精製WSSVのSDS-PAGEゲル、3: 過剰発現VP19のSDS-PAGEゲル、4: 過剰発現VP19の抗WSSVによるウエスタンブロット、5: 過剰発現VP13 (ここではVP15と表示している)のSDS-PAGEゲル。

【図2】 この図は、WSSVによる攻撃誘発後のエビの死亡率へのワクチン接種の影響のレベルを示す: - * - = VP19ワクチン、- - = 陰性対照、- - = 陽性対照、-

10

20

30

40

50

- = G F P 对照。

【 図 1 】

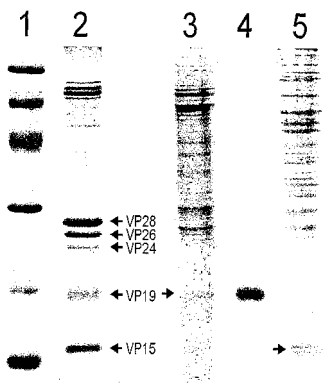


Figure 1

【 図 2 】

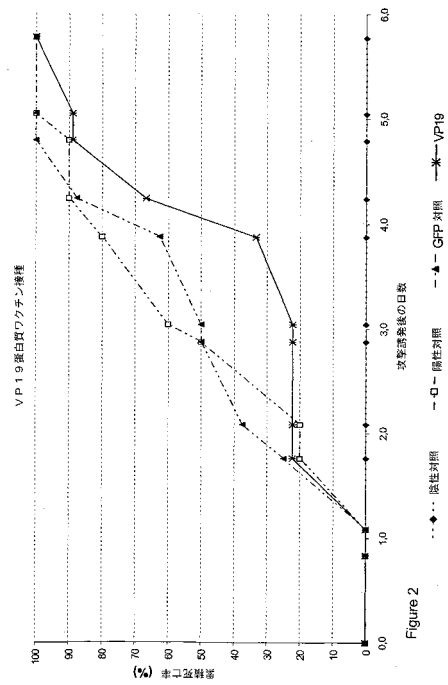


Figure 2

フロントページの続き

審査官 森井 隆信

- (56)参考文献 特表2003-506338(JP,A)
Arch Virol., 2000年 2月, 145(2), 263-74
Virology., 2000年 1月, 266(2), 227-36
J. Gen. Virol., 2002年 1月, 83, 257-265

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09 ZNA
C07K 14/01
C07K 16/08
G01N 33/569
C12Q 1/68
JICSTファイル(JOIS)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed

专利名称(译)	虾白斑病综合征 (WhiteSpot Syndrome) 病毒的抗原蛋白及其应用		
公开(公告)号	JP3780256B2	公开(公告)日	2006-05-31
申请号	JP2002526914	申请日	2001-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
当前申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	ビラークジュステイヌスマリア バンヒュールテンマリアコーネリアウシルヘルミーナ		
发明人	ビラーク,ジュステイヌス・マリア バン・ヒュールテン,マリア・コーネリア・ウシルヘルミーナ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/01 C07K16/08 G01N33/569 C12Q1/68 G01N33/53 A61K35/76 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61P17/00 C12N15/34 C12N15/86 C12Q1/70		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/523 A61K2039/5254 A61P17/00 A61P31/20 C07K14/005 C12N2710/18022 Y10S424/817		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K14/01 C07K16/08 G01N33/569.L C12Q1/68.A		
优先权	2000203186 2000-09-15 EP		
其他公开文献	JP2004508818A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及衍生自白斑综合症病毒的抗原蛋白，其估计大小为19kDa (VP19) 或13kDa (VP13)，这些蛋白质在疫苗中的用途和基于这些蛋白质的疫苗。此外，本发明涉及针对这些蛋白质的抗体，以及抗体在疫苗中的用途，编码这些蛋白质的核酸序列及其在疫苗中的用途。此外，本发明涉及所述蛋白质在制备用于预防和/或治疗甲壳类白斑综合症的疫苗中的用途，载体疫苗和包含所述核酸或抗体的诊断试剂盒。

群番号	群の名称	ワクチン接種	ブースター	攻撃誘発	エピソードの数
1	陰性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	300mM NaCl	10
2	陽性対照	300mM NaCl	300mM NaCl	WSSV	10
3	VP19	VP19	VP19	WSSV	10
4	GFP	GFP	GFP	WSSV	10