

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5215561号  
(P5215561)

(45) 発行日 平成25年6月19日(2013.6.19)

(24) 登録日 平成25年3月8日(2013.3.8)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C 1 2 N 7/00 (2006.01)** C 1 2 N 7/00

請求項の数 15 (全 46 頁)

|               |                               |           |                                                                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2006-533439 (P2006-533439)  | (73) 特許権者 | 506097988                                                            |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年5月27日 (2004.5.27)        |           | ウィスコンシン アルムニ リサーチ フ<br>アンデーション                                       |
| (65) 公表番号     | 特表2007-518395 (P2007-518395A) |           | アメリカ合衆国, ウィスコンシン 537<br>26, マディソン, ウォルナット ストリ<br>ート 614, サーティーンズ フロア |
| (43) 公表日      | 平成19年7月12日 (2007.7.12)        | (74) 代理人  | 100099759                                                            |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2004/016680             |           | 弁理士 青木 篤                                                             |
| (87) 国際公開番号   | W02004/112831                 | (74) 代理人  | 100077517                                                            |
| (87) 国際公開日    | 平成16年12月29日 (2004.12.29)      |           | 弁理士 石田 敬                                                             |
| 審査請求日         | 平成19年4月5日 (2007.4.5)          | (74) 代理人  | 100087871                                                            |
| (31) 優先権主張番号  | 60/473,798                    |           | 弁理士 福本 積                                                             |
| (32) 優先日      | 平成15年5月28日 (2003.5.28)        | (74) 代理人  | 100087413                                                            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 古賀 哲次                                                            |
| 前置審査          |                               |           |                                                                      |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン及び遺伝子治療のための高力価組換えインフルエンザ・ウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数のインフルエンザ・ウイルス・ベクターを含む高力価再集合株組換えインフルエンザ・ウイルス生産のための組成物であって、該組成物は、以下の：

a) vRNA生産用ベクターであって、転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスPA cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスPB1 cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスPB2 cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスHA cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスNP cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスNA cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；及び転写終結配列に連結されたインフルエンザ・ウイルスNS cDNAに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクターを含むもの、ここで、前記PB1のためのcDNAは配列番号2によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、前記PB2のためのcDNAは配列番号3によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、前記PAのためのcDNAは配列番号1によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、

10

20

前記NPのためのcDNAは配列番号4によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、前記MのためのcDNAは配列番号5によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、前記NSのためのcDNAは配列番号6によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含み、前記NAのためのcDNAは配列番号8によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含まず、そして前記HAのためのcDNAは配列番号7によりコードされるポリペプチドをコードする配列を含まず；並びに

b) mRNA生産用ベクターであって、インフルエンザ・ウイルスPAをコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；インフルエンザ・ウイルスPB1をコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；インフルエンザ・ウイルスPB2をコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；及びインフルエンザ・ウイルスNPをコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクターを含むもの、

を含み、ここで、前記vRNA生産用ベクター内の配列は、再集合株インフルエンザ・ウイルスのための配列である、前記組成物。

【請求項2】

前記HAのためのcDNAはH5 HAである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記b)のベクターが、インフルエンザ・ウイルスHAをコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；インフルエンザ・ウイルスNAをコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；インフルエンザ・ウイルスM1をコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；インフルエンザ・ウイルスM2をコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクター；又はインフルエンザ・ウイルスNS2をコードするDNAセグメントに作用可能な状態で連結されたプロモーターを含むベクターをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記RNAポリメラーゼIプロモーターが、ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターである、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記b)のベクターの全てが、RNAポリメラーゼIIプロモーターを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記a)の各ベクターが、別個のプラスミド上に存在する、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

前記b)の各ベクターが、別個のプラスミド上に存在する、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

前記b)のベクターのそれぞれが、RNA転写終結配列をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

転写終結配列に連結された3'インフルエンザ・ウイルス非コーディング配列を含む3'インフルエンザ・ウイルス配列に連結された着目のcDNAに連結された5'インフルエンザ・ウイルス非コーディング配列を含む5'インフルエンザ・ウイルス配列に連結されたプロモーターを含むベクターをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

前記着目のcDNAがセンス配向で存在する、請求項8に記載の組成物。

【請求項11】

前記着目のcDNAがアンチセンス配向で存在する、請求項8に記載の組成物。

【請求項12】

前記着目のcDNAが、病原体の免疫原性ポリペプチド又はペプチド、あるいは治療用

10

20

30

40

50

ポリペプチド又はペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記 P B 1、P B 2、P A、N P、M、及び N S のための c D N A が、配列番号 1 ~ 6 をもつ、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記 H 5 H A のための c D N A が、非病原性解裂部位をもつ突然変異体 H 5 である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記 P B 1、P B 2、P A、N P、M、及び N S のための c D N A が、配列番号 1 ~ 6 のいずれか又はその相補鎖に少なくとも 9 0 % のヌクレオチド配列同一性をもつ、請求項 1 に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の引照

本出願は、米国特許出願第 60/473,798 (2003年5月28日提出) (この記載内容は、参照により本明細書中で援用される) の出願日の 35 U.S.C. § 119(e) 下での利益を主張する。

政府権利の陳述

本発明は、アメリカ合衆国政府からの補助金を用いてなされた (国立アレルギーおよび感染性疾患研究所・公衆衛生総局からの補助金 AI-47446)。アメリカ合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

ネガティブ・センス RNA ウイルスは、一般的ヒト病原体、例えば呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ・ウイルス、麻疹ウイルスおよびエボラウイルス、ならびに家禽および畜産産業に及ぼす大きな経済的影響を有する動物ウイルス (例えばニューカッスル病ウイルスおよび牛痘ウイルス) を含む 7 つの科 (ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、フィロウイルス科、ボルナウイルス科、オルソミクソウイルス科、ブニヤウイルス科およびアレナウイルス科) に分類される。はじめの 4 つの科は非セグメント化ゲノムにより特性化され、一方、後者 3 つはそれぞれ 6 ~ 8、3 または 2 つのネガティブ・センス RNA セグメントから成るゲノムを有する。ネガティブ・センス RNA ウイルスの共通の特徴は、それらの RNA ゲノムの負極性である；即ちウイルス RNA (v RNA) は mRNA と相補的であり、したがってそれ自体感染性でない。ウイルス転写および複製を開始するために、v RNA は、ウイルスポリメラーゼ複合体および核タンパク質により、それぞれプラスセンス mRNA または c RNA に転写されなければならない；A 型インフルエンザウイルスに関しては、ウイルスポリメラーゼ複合体は 3 つのポリメラーゼタンパク質 P B 2、P B 1 および P A で構成される。ウイルス複製中、c RNA は新しい v RNA 分子の合成のための鋳型として役立つ。全てのネガティブ鎖 RNA ウイルスに関して、v RNA および c RNA の 5' および 3' 末端の両方の非コード領域は、ウイルスゲノムの転写および複製に重要である。細胞またはウイルス mRNA 転写体と違って、c RNA および v RNA はともに、5' 末端にキャップ形成されず、あるいはまさに 3' 末端でポリアデニル化されない。

30

40

【0 0 0 3】

多数のウイルスタンパク質の基本的機能は、生化学的におよび/またはウイルス感染の状況で解明されてきた。しかしながら逆遺伝学系は、それらのウイルス複製および病原性に関して、ならびに生弱毒化ウイルスワクチンに関して、ネガティブ鎖セグメント化および非セグメント化 RNA ウイルスについてのわれわれの知識を劇的に増大した。逆遺伝学は、当該用語が分子ウイルス学で用いられる場合、クローン化 c D N A 由来のゲノムを保

50

有するウイルスの生成と定義される（再検討のためには、Neumann et al., 2002参照）。

【0004】

ネガティブ鎖RNAウイルスのウイルス複製を開始するためには、vRNA（単数または複数）またはcRNA（単数または複数）は、ポリメラーゼ複合体および核タンパク質と同時に発現されなければならない。狂犬病ウイルスは、クローン化cDNAから完全に生成された最初の非セグメント化ネガティブ・センスRNAであった：Schneil等（1994）は、全長cRNAをコードするcDNA構築物、ならびにL、PおよびNタンパク質に関するタンパク質発現構築物（全てT7 RNAポリメラーゼプロモーターの制御下にある）の同時トランスフェクションにより、組換え狂犬病を生成した。T7ポリメラーゼを提供する組換えワクシニアウイルスによる感染は、感染性狂犬病ウイルスの生成を生じた。このT7ポリメラーゼ系では、T7 RNAポリメラーゼの制御下の全長cRNAの一次転写は、非キャップcRNA転写体を生じた。しかしながら、T7 RNAポリメラーゼのための最適開始配列を構成する3つのグアニジンヌクレオチドは、5'末端に結合された。増殖感染サイクルに不可欠であるcRNA転写体の確証的3'末端を作成するために、肝炎デルタリボザイム（HDVRz）配列が、cRNA転写体の3'末端での的確な自己触媒的切断のために用いられた。

10

【0005】

Schneil等（1994）による初期の報告以来、同様の技法を用いる逆遺伝学系は、多数の非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルスの生成をもたらした（Conzelmann, 1996; Conzelmann, 1998; Conzelmann et al., 1996; Marriott et al., 1999; Munoz et al., 2000; Nagai, 1999; Neumann et al., 2002; Roberts et al., 1998; Rose, 1996）。初めての救済手法は、安定的トランスフェクト化細胞株（Radecke et al., 1996）からの、またはタンパク質発現プラスミド（Lawson et al., 1995）からのT7 RNAポリメラーゼの発現を、あるいは救済効率を増大するための熱ショック手法（Parks et al., 1999）を包含した。T7ポリメラーゼ系を基礎にして、BridgenとElliott（1996）は、クローン化cDNAからブンヤムウエラBunyamweraウイルス（ブンヤウイルス科）を作製し、T7ポリメラーゼ系によりセグメント化ネガティブ・センスRNAウイルスを人工的に生成することの実現可能性を実証した。

20

【0006】

1999年に、完全にクローン化cDNAからのセグメント化A型インフルエンザ・ウイルスの生成のための細胞RNAポリメラーゼIを基礎にして、プラスミドベースの逆遺伝学技法が創造された（Fodor et al., 1999; Neumann and Kawaoka, 1999）。核小体酵素であるRNAポリメラーゼIは、インフルエンザ・ウイルスRNAと同様に5'キャップまたは3'ポリA構造を含有しないリボソームRNAを合成する。RNAポリメラーゼIプロモーターおよびターミネーター配列が隣接するインフルエンザ・ウイルスcDNAを含有する構築物のRNAポリメラーゼI転写は、インフルエンザvRNA合成を生じた（Fodor et al., 1999; Neumann and Kawaoka, 1999; Neumann and Kawaoka, 2001; Pekosz et al., 1999）。当該系は非常に効率的で、トランスフェクション後48時間に $10^8$ 個より多い感染性ウイルス粒子/プラスミドトランスフェクト化細胞の上清1 mlを産生した。

30

したがって必要とされるのは、完全にクローン化cDNAからのセグメント化ネイティブ鎖RNAウイルス、例えばオルソミクソウイルス、例えばA型インフルエンザウイルスを調製するための改良型方法である。

40

【発明の開示】

【0007】

発明の要約

本発明は、高力価、例えば、 $10^9$  / ml より高い力価、例えば、 $10^{10}$  / ml より高い、インフルエンザ・ウイルスのタンパク質をコードする単離及び/又は精製核酸分子（ポリヌクレオチド）、又はその部分、又は当該核酸分子の相補体を提供する。一実施態様では、当該単離及び/又は精製核酸分子は、HA、NA、PB1、PB2、PA、NP、M、又はNS、又は配列番号1～8の内の1つによりコードされる対応のポリペプチド

50

と実質的に同じ活性を有するその部分をコードする。本明細書中に使用するとき、「実質的に同じ活性」とは、対応の全長ポリペプチドの、約0.1%、1%、10%、30%、50%、90%、例えば、100%までの又はそれを超える活性、又は約80%、90%又はそれを超える検出可能なタンパク質レベルである、それぞれ、活性又はタンパク質レベルを含む。一実施態様では、前記単離及び/又は精製核酸分子は、配列番号1~8のいずれか1によりコードされるポリペプチドと実質的に同じ、例えば、少なくとも80%、例えば、90%、92%、95%、97%又は99%のそれに対する連続アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。一実施態様では、前記単離及び/又は精製核酸分子は、配列番号1~8のいずれか1と実質的に同じ、例えば、少なくとも50%、例えば、60%、70%、80%又は90%又はそれを超える、それに対する連続核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列、又はその相補体を含み、そして一実施態様では、配列番号1~8のいずれか1によりコードされるポリペプチドに、少なくとも80%、例えば、90%、92%、95%、97%又は99%の連続アミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードする。一実施態様では、前記単離及び/又は精製核酸分子は、配列番号1~8のいずれか1によりコードされるポリペプチドに対し、残基の、1以上の、例えば、2、5、10、15、20又はそれを超える、保存的アミノ酸置換、例えば、10%又は20%までの保存的置換をもつポリペプチドをコードする。「保存的アミノ酸置換」とは、類似の側鎖をもつ残基の交換可能性をいう。例えば、脂肪族側鎖をもつアミノ酸群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びソロイシンであり；脂肪族-水酸基側鎖をもつアミノ酸群は、セリンとトレオニンであり；アミド含有側鎖をもつアミノ酸群は、アスパラギンとグルタミンであり；芳香族側鎖をもつアミノ酸群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり；塩基性側鎖をもつアミノ酸群は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンであり；そして硫黄含有側鎖をもつアミノ酸群は、システインとメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は：バリン-ロイシン-イソロイシン；フェニルアラニン-チロシン；リジン-アルギニン；アラニン-バリン；グルタミン-アスパラギン；及びアスパラギン-グルタミンである。

#### 【0008】

他の実施態様では、本発明の単離及び/又は精製核酸分子又はその相補体は、低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー又はストリンジェント条件下、配列番号1~8のいずれか1のもの、又はその相補体にハイブリダイズする。例えば、以下の条件を使用する：7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、50、そして50で2X SSC、0.1% SDS中での洗浄(低ストリンジェンシー)、より望ましくは、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、50、そして50で1X SSC、0.1% SDS中での洗浄(中ストリンジェンシー)、さらにより望ましくは、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、50、そして50で0.5X SSC、0.1% SDS中での洗浄(ストリンジェント条件)、好ましくは、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、50、そして50で0.1X SSC、0.1% SDS中での洗浄(より高いストリンジェント条件)、より好ましくは、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA、50、そして65で0.1X SSC、0.1% SDS中での洗浄(ひじょうに高いストリンジェント条件)。一実施態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1~8のいずれか1と実質的に同じ、例えば、少なくとも50%、例えば、60%、70%、80%又は90%又はそれを超える、それに対する連続核酸配列同一性を有するポリペプチドをコードし、そして好ましくは、配列番号1~8のいずれか1によりコードされる対応の全長ポリペプチドと実質的に同じである。

#### 【0009】

本発明の核酸分子は、インフルエンザ・タンパク質を発現するために、例えば、他のインフルエンザ・ウイルス遺伝子を含む他のウイルス遺伝子とのキメラ遺伝子を作製するために、及び/又は組換えウイルスを作製するために、使用しうる。したがって、本発明は

10

20

30

40

50

、単離ポリペプチド、組換えウイルス、及び本発明の核酸分子又は組換えウイルスと接触される宿主細胞をも提供する。

【0010】

本発明は、以下の単離及び/又は精製ベクターの内の少なくとも1をも提供する：転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB1 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB2 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスHA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNP cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNS cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター、ここで、少なくとも1つのベクターは、HA、NA、PB1、PB2、PA、NP、M、NS、又は配列番号1～8のいずれか1によりコードされる対応のポリペプチドと実質的に同じ活性をもつその部分、をコードする配列、例えば配列番号1～8のいずれか1によりコードされるポリペプチドに少なくとも80%のアミノ酸同一性をもつポリペプチドをコードする配列を、含む。場合により、転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクターの代わりに、2つのベクター、例えば、転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM1 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター、及び転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM2 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクターが、使用されうる。

【0011】

本発明は、インフルエンザ・ウイルス・タンパク質を発現するか若しくはコードする、又は天然であるか組換えvRNAであるかを問わず、インフルエンザvRNAを発現するか又はコードする、単離及び精製ベクター又はプラスミドを提供する。好ましくは、ベクターは、インフルエンザcDNA、例えばA型（例えば任意のA型インフルエンザ遺伝子、例えば15HAまたは9NA亜型のいずれか）、BまたはC型インフルエンザDNAを含む（Chapters 45 and 46 of *Fields Virology* (Fields et al. (eds.)), Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, PA(1996)参照）（これらの記載内容は、参照により本明細書中で援用される）。ただし、任意の生物の遺伝子（単数または複数）が本発明のベクター又は方法に用いられ得ると予見される。cDNAは、プロモーターに対してセンスまたはアンチセンス配向であり得る。したがって、本発明のベクターは、インフルエンザ・ウイルス・タンパク質（センス）またはvRNA（アンチセンス）をコードし得る。任意の適切なプロモーターまたは転写終結配列を用いて、タンパク質、例えばウイルス・タンパク質、非ウイルス性病原体のタンパク質若しくはペプチド、または治療用タンパク質若しくはペプチドを発現し得る。

【0012】

本発明は、本発明の複数のインフルエンザ・ウイルス・ベクターを含む組成物を提供する。本発明の一実施形態では、組成物は：a) 転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB1 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB2 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスHA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNP cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結される

インフルエンザ・ウイルスNA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；及び転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNS cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクターから選択される少なくとも2つのベクター、ここで、少なくとも1つのベクターが、転写終結配列に連結された本発明の核酸分子に操作可能的に連結されたプロモーターを含み；並びにb)インフルエンザ・ウイルスPAをコードするベクター；インフルエンザ・ウイルスPB1をコードするベクター；インフルエンザ・ウイルスPB2をコードするベクター；及びインフルエンザ・ウイルスNPをコードするベクターからから選択される少なくとも2つのベクターを、含む。任意に、b)のベクターは、NP、NS、M、例えばM1およびM2、HAまたはNAをコードする1つまたは複数のベクターを含む。好ましくは、ウイルス・タンパク質をコードするベクターは、転写終結配列をさらに含む。

10

## 【0013】

別の実施形態では、組成物は：a)転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB1 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスPB2 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスHA cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNP cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNAおよびNB cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスM cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスNS cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクター；および転写終結配列に連結されるインフルエンザ・ウイルスBM2 cDNAに操作可能的に連結されるプロモーターを含むベクターから選択される少なくとも2つのベクター、ここで、少なくとも1つのベクターが、転写終結配列に連結された本発明の核酸配列に操作可能的に連結されたプロモーターを含み；並びにb)インフルエンザ・ウイルスPAをコードするベクター；インフルエンザ・ウイルスPB1をコードするベクター；インフルエンザ・ウイルスPB2をコードするベクター；及びインフルエンザ・ウイルスNPをコードするベクターからから選択される少なくとも2つのベクターを含む。任意に、b)のベクターは、NP、NS、M、HAまたはNAをコードする1つまたは複数のベクターを含む。好ましくは、ウイルス・タンパク質をコードするベクターは、転写終結配列をさらに含む。

20

30

## 【0014】

本発明の組成物は、着目の遺伝子又はオープン・リーディング・フレーム、例えば、ワクチンとして有用な免疫原性ペプチド又はタンパク質をコードする外来遺伝子をも含む。したがって、本発明の他の態様は、上記ベクターの内の1つが、転写終結配列に連結された、3'インフルエンザ・ウイルス・コーディング配列又はその部分の場合により含む3'インフルエンザ・ウイルス配列に連結された、所望の核酸配列、例えば、所望のcDNAに連結された、5'インフルエンザ・ウイルス・コーディング配列又はその部分の場合により含む5'インフルエンザ・ウイルス配列に連結されたプロモーターを含むベクターで、置き換えられ、又はそれをさらに含むような上記の本発明の組成物を含む。好ましくは、上記所望の核酸配列、例えば、cDNAは、アンチセンスは移行にある。インフルエンザ・ウイルス複製を許容する宿主細胞への上記組成物の導入は、当該ベクターの配列に相当するvRNAを含む組換えウイルスをもたらす。vRNA製造のためのこのようなベクター内のプロモーターは、RNAポリメラーゼIプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、T7プロモーター、及びT3プロモーターであることができ、そして場合により、当該ベクターは、転写終結配列

40

50

、例えば、RNAポリメラーゼI転写終結配列、RNAポリメラーゼII転写配列、RNAポリメラーゼIII転写配列、又はリボザイムを含む。一実施態様では、所望の核酸配列を含むベクターは、着目のcDNAを含む。着目のcDNAは、vRNAかタンパク質製造のためのベクターであるかを問わず、免疫原性エピトープ、例えば、癌治療又はワクチンにおいて有用なエピトープ、又は遺伝子治療において有用なペプチド又はポリペプチドをコードすることができる。ウイルスを製造するとき、着目の遺伝子又はcDNAを含むベクター又はプラスミドは、インフルエンザ・ウイルス遺伝子のためのベクター又はプラスミドを置き換わり、又は全てのインフルエンザ・ウイルス遺伝子のためのベクター又はプラスミドに追加して、存在しうる。

【0015】

本発明の複数のベクターは、物理的に連結され、又は各ベクターは、個々のプラスミド又は他の、例えば、線形の、核酸デリバリー・ビヒクル上に存在することができる。

【0016】

vRNA又はウイルス・タンパク質発現ベクター内のプロモーター又は転写終結配列は、当該プロモーター又はいずれかの他のベクターに対して同一又は相違することができる。好ましくは、インフルエンザvRNAを発現するベクター又はプラスミドは、少なくとも1の特定の宿主細胞、例えば、トリ又は哺乳動物宿主細胞、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、又はヒト細胞を含む霊長類細胞内での発現、又は好ましくは2以上の宿主内での発現のために好適なプロモーターを含む。

【0017】

一実施形態では、vRNA産生のための1以上のベクターは、RNAポリメラーゼIプロモーター、例えば、ヒトRNAポリメラーゼIプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、T7プロモーターおよびT3プロモーターを非制限的に含むプロモーターを含む。vRNAベクターのための好ましい転写終結配列は、非制限的に、RNAポリメラーゼI転写終結配列、RNAポリメラーゼII転写終結配列、RNAポリメラーゼIII転写終結配列またはリボザイムを含む。本発明の範囲内におけるリボザイムは、非制限的に、テトラヒメナ・リボザイム、RNase P、ハンマーヘッド・リボザイム、ヘアピン・リボザイム、肝炎リボザイム、並びに合成リボザイムを含む。

【0018】

一実施形態では、vRNA産生のための少なくとも1つのベクターは、場合によりRNAポリメラーゼII転写終結配列に連結された、他のリボザイム配列に連結されたウイルス・コーディング配列に連結されたりリボザイム配列に連結されたRNAポリメラーゼIIプロモーターを含む。一実施形態では、vRNA産生のための少なくとも2つの、好ましくはそれ以上の、例えば3、4、5、6、7または8つのベクターは、RNAポリメラーゼIIプロモーター、一次リボザイム配列（これは、転写終結配列に対して5'である二次リボザイム配列に対して5'であるウイルスコード配列を含むウイルス配列に対応する配列に対して5'である）を含む。各vRNAベクター中の各RNAポリメラーゼIIプロモーターは、任意のその他のvRNAベクター中のRNAポリメラーゼIIプロモーターと同一であるかまたは異なり得る。同様に、各vRNAベクター中の各リボザイム配列は、任意のその他のvRNAベクター中のリボザイム配列と同一であるかまたは異なり得る。一実施形態では、単一ベクター中のリボザイム配列は同一ではない。

【0019】

本発明は、インフルエンザ・ウイルスの製造方法も提供する。本方法は、本発明の複数のベクターと細胞を、例えば逐次的にまたは同時に、例えば感染性インフルエンザ・ウイルスを産生するのに有効な量で本発明の組成物を用いて、接触させることを包含する。本発明は、組成物と接触させられた細胞からウイルスを単離することも包含する。したがって本発明はさらに、単離ウイルス、ならびに本発明の組成物またはウイルスと接触された宿主細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は、他のベクター（vRNAまたはタンパク質産生ベクター）の前に、1つまたは複数のベクター（vRNAまたはタンパク質産

10

20

30

40

50



生ベクター)と細胞を接触させることを包含する。

【0020】

本発明の方法は、例えばウイルスゲノム中への弱毒性突然変異の導入により、インフルエンザ・ウイルスの容易な操作を可能にする。さらに、インフルエンザ・ウイルスは強力な体液性および細胞性免疫を誘導するため、本発明は、特に逐次的に用いられて遺伝子療法のための反復使用を可能にするウイルスの天然変異体の利用可能性にかんがみて、ワクチンベクターとしてこれらのウイルスを大いに強化する。

【0021】

ヘルパーウイルス感染を必要としない本明細書中に記載したウイルスの製造方法は、ウイルス突然変異誘発研究において、そしてワクチン(例えばAIDS、インフルエンザ、B型肝炎、C型肝炎、ライノウイルス、フィロウイルス、マラリア、ヘルペスならびに手足口病のための)、ならびに遺伝子療法ベクター(例えば癌、AIDS、アデノシンデアミナーゼ、筋ジストロフィー、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損および中枢神経系腫瘍のための)の製造において有用である。したがって医学療法(例えばワクチンまたは遺伝子療法)に用いるためのウイルスが提供される。

10

【0022】

本発明は、病原体、例えば細菌、ウイルスまたは寄生生物、あるいは悪性腫瘍に対して個体を免疫感作するための方法も提供する。本方法は、個体を免疫監査するのに有効な量の少なくとも1つの本発明の単離ウイルスを、任意にアジュバントと組合せて、個体に投与することを包含する。ウイルスは、病原体によりコードされるポリペプチドまたは腫瘍特異的ポリペプチドを含むvRNAを含む。

20

【0023】

内因性タンパク質の量の低減または欠如により特性化される適応症または疾患を有する哺乳類における内因性タンパク質の発現を増強または増大するための方法も提供される。本方法は、哺乳類における内因性タンパク質の量を増強または増大するのに有効な量の本発明の単離ウイルスを哺乳類に投与することを包含する。好ましくは哺乳類はヒトである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の詳細な説明

30

定義

本明細書中で用いる場合、「単離されたおよび/または精製された」という用語は、それがin vivo物質に関連しない、あるいは実質的にin vitro物質から精製されるような本発明のベクター、プラスミドまたはウイルスのin vitro調製、単離および/または精製を指す。単離ウイルス調製物は一般にin vitro培養および増殖により得られ、そして他の感染性作因を実質的に含有しない。

【0025】

本明細書中で用いる場合、「実質的に含有しない」とは、その作因に関して、標準検出方法を用いた特定の感染性作因に関する検出レベルより低いことを意味する。

【0026】

「組換え体」ウイルスは、ウイルスゲノムに変更を導入するために、例えば組換えDNA技術を用いてin vitroで操作されたものである。

40

【0027】

本明細書中で用いる場合、「組換え核酸」または「組換えDNA配列またはセグメント」という用語は、その配列が天然に存在しないか、あるいはネイティブゲノム中にそれらが位置するように位置されない天然配列に対応するよう、供給源から得られるかまたは単離され、その後、in vitroで化学的に変更され得る核酸、例えばDNAを指す。供給源から「得られる」DNAの一例は、有用な断片として同定されるDNA配列であり、これはその後、本質的に純粋形態で化学的に合成される。供給源から「単離される」このようなDNAの一例は、それが、遺伝子工学処理の方法により、本発明で用いるためにさらに操

50

作され、例えば増幅され得るよう、化学的手段により、例えば制限エンドヌクレアーゼの使用により、上記供給源から切断されるかまたは除去される有用なDNA配列である。

【0028】

#### インフルエンザ・ウイルス複製

A型インフルエンザウイルスは、10個のタンパク質の全体をコードする8つの一本鎖ネガティブ・センスウイルスRNA (vRNA) のゲノムを保有する。インフルエンザ・ウイルス生活環は、宿主細胞の表面のシアル酸含有受容体へのヘマグルチニン (HA) の結合と、その後の受容体媒介性エンドサイトーシスにより開始する。後期エンドソーム中の低pHがHAの立体配座シフトを誘発し、それによりHA2サブユニット (いわゆる融合ペプチド) のN末端を曝露する。融合ペプチドは、ウイルスおよびエンドソーム膜の融合を開始し、そしてマトリックスタンパク質 (M1) およびRNP複合体が細胞質中に放出される。RNPは、vRNAをキャプシド形成する核タンパク質 (NP) ならびにPA、PB1およびPB2タンパク質により形成されるウイルスポリメラーゼ複合体からなる。RNPは核中に輸送され、ここで転写および複製が起こる。RNAポリメラーゼ複合体は、3つの異なる反応を触媒する：5'キャップおよび3'ポリA構造を有するmRNAの合成、全長相補的RNA (cRNA) の合成、ならびに鋳型としてcDNAを用いたゲノムvRNAの合成。新規に合成されたvRNA、NPおよびポリメラーゼタンパク質は次に、RNPに集合され、核から輸出され、そして形質膜に輸送され、ここで子孫ウイルス粒子の出芽が起こる。ノイラミニダーゼ (NA) タンパク質は、シアルルオリゴ糖からシアル酸を除去し、したがって細胞表面から新規集合ビリオンを放出して、ウイルス粒子の自己凝集を防止することにより、感染において後期に重要な役割を演じる。ウイルス集合体はタンパク質-タンパク質およびタンパク質-vRNA相互作用を包含するが、しかしこれらの相互作用の性質はほとんど未知である。

【0029】

BおよびC型インフルエンザ・ウイルスはA型インフルエンザウイルスと構造的および機能的に類似するが、しかしいくつかの差異が存在する。例えばB型インフルエンザウイルスは、イオンチャンネル活性を有するM2タンパク質を有さない。同様にC型インフルエンザ・ウイルスは、イオンチャンネル活性を有するM2タンパク質を有さない。しかしながらCM1タンパク質はこの活性を有すると思われる。イオンチャンネルタンパク質の活性は、当該技術分野で周知の方法により測定され得る (例えばHolsinger et al. (1994) およびWO 01/79273参照)。

【0030】

#### 本発明に用いられ得る細胞株およびインフルエンザ・ウイルス

本発明によれば、インフルエンザ・ウイルスの効率の複製を支持する任意の細胞、例えばインフルエンザウイルスの受容体である1つまたは複数のシアル酸のレベル低減または減少を発現する突然変異体細胞が本発明で用いられ得る。本方法により得られるウイルスは、再集合株ウイルスに作製され得る。

【0031】

好ましくは細胞は、WHO認証または認証可能連続細胞株である。このような細胞株を認証するための要件としては、系統、増殖特性、免疫学的マーカー、ウイルス感受性、腫瘍形成能および貯蔵条件のうちの少なくとも1つに関する、ならびに動物、卵および細胞培養を試験することによる特性化が挙げられる。このような特性化は、細胞が検出可能な外因性作用物質を含有しないことを確認するために用いられる。いくつかの国では、核学も必要とされ得る。さらに腫瘍形成能は、好ましくは、ワクチン製造のために用いられるものと同一継代レベルである細胞で試験される。ウイルスは好ましくは、ワクチン製造のために不活性化または弱毒化される前に、一貫した結果を生じることが示された方法により精製される (例えばWorld Health Organization, 1982参照)。

【0032】

最終生成物の純度に関する適切な試験が含まれ得るよう、用いられるべき細胞株の完全特性化を確立することが好ましい。本発明に用いられるべき細胞の特性化のために用いら

れ得るデータとしては、(a)その起源、誘導および継代歴に関する情報；(b)その増殖および形態学的特質に関する情報；(c)外因性作用物質の試験の結果；(d)細胞を他の細胞株の間で明らかに認識させる生化学的、免疫学的および細胞遺伝学的パターンといった特徴の識別；ならびに(e)腫瘍形成能に関する試験の結果が挙げられる。用いられる宿主細胞の継代レベル、または集団倍加は、できるだけ低いのが好ましい。

【0033】

細胞中で産生されるウイルスは、ワクチンまたは遺伝子療法処方前に高度に精製されるのが好ましい。一般に精製手法は、細胞DNA、その他の細胞構成成分および外因性作用物質の広範な除去を生じる。DNAを広範に分解するかまたは変性する手法も用いられる(例えばMizrahi, 1990参照)。

10

【0034】

ワクチン

本発明のワクチンは、免疫原性タンパク質、例えば任意の病原体の糖タンパク質、例えば1つまたは複数の細菌、ウイルス、酵母または真菌からの免疫原性タンパク質を含み得る。したがって一実施形態では、本発明のインフルエンザ・ウイルスは、インフルエンザ・ウイルスまたはその他のウイルス性病原体、例えばレンチウイルス、例えばHIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、例えばCMVまたはHSV、あるいは手足口病ウイルス(これらに限定されない)のためのワクチンベクターであり得る。

【0035】

完全ビリオンワクチンは限外濾過により濃縮され、次にゾーン遠心分離により、またはクロマトグラフィーにより精製される。それは、例えばホルマリンまたは - プロピオラクトンを用いて、精製の前または後に不活性化される。

20

【0036】

サブユニット・ワクチンは、精製糖タンパク質を含む。このようなワクチンは、以下のように調製され得る：洗剤を用いた処理により断片化されたウイルス懸濁液を用いて、例えば超遠心分離により、表面抗原が精製される。したがってサブユニット・ワクチンは、主としてHAタンパク質を、そしてNAも含有する。用いられる洗剤は、例えば陽イオン性洗剤、例えば臭化ヘキサデシル・トリメチル・アンモニウム(Bachmeyer, 1975)、陰イオン性洗剤、例えばデオキシコール酸アンモニウム(Laver & Webster, 1976; Webster et al., 1977)、または非イオン性洗剤、例えばトリトンX100の名称で市販されているものであり得る。ヘマグルチニンも、プロテアーゼ、例えばプロメリンでビリオンを処理後に単離され、次に、Grand and Skehel (1972)により記載されたような方法により精製され得る。

30

【0037】

スプリット・ワクチンは、脂質を溶解する作用物質による処理に付されたビリオンを含む。スプリット・ワクチンは、以下のように調製され得る：(不活性化された場合またはされない場合)上記のようにして得られた精製ウイルスの水性懸濁液は、洗剤と会合される脂質溶媒、例えばエチルエーテルまたはクロロホルムにより、攪拌下で、処理される。ウイルスエンベロープ脂質の溶解は、ウイルス粒子の断片化を生じる。主にヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼからなるスプリット・ワクチンを含有し、除去されたそれらの元の脂質環境ならびにコアまたはその分解産物を伴う水性相が回復される。次に、これがすでに実行されていない場合、残留感染性粒子が不活性化される。

40

【0038】

不活性化ワクチン。本発明の不活性化インフルエンザ・ウイルス・ワクチンは、既知の方法、例えばホルマリンまたは - プロピオラクトン処理(これらに限定されない)を用いて、本発明の複製ウイルスを不活性化することにより提供される。本発明に用いられる不活性化ワクチン型は、全ウイルス(WV)ワクチンまたはサブビリオン(SV)(スプリット)ワクチンを包含し得る。WVワクチンは、無傷の不活性化ウイルスを含有し、一方、SVワクチンは、脂質含有ウイルスエンベロープを可溶化し、その後、残留ウイル

50

スを化学的に不活性化する洗剤で崩壊された精製ウイルスを含有する。

【 0 0 3 9 】

さらに、用いられ得るワクチンとしては、表面抗原またはサブユニット・ワクチンと呼ばれる単離 H A および N A 表面タンパク質を含有するものが挙げられる。概して、S V および表面抗原（即ち精製 H A または N A ）ワクチンに対する応答は類似する。流行病ウイルスに免疫学的に関連する N A 抗原および非関連 H A を含有する実験的不活性化 W V ワクチンは、慣用的ワクチンより低有効性であると思われる（Ogra et al., 1977）。両関連表面抗原を含有する不活性化ワクチンが好ましい。

【 0 0 4 0 】

生弱毒化ウイルスワクチン。生弱毒化インフルエンザ・ウイルス・ワクチンも、既知の方法過程に従って、インフルエンザ・ウイルス感染を予防または治療するために用いられ得る。弱毒化は好ましくは、既知の方法に従って、複製単離物または再集合ウイルスに弱毒化供与体から弱毒化遺伝子に移入することにより、単一段階で達成される（例えばMurphy, 1993参照）。A型インフルエンザ・ウイルスに対する耐性は、H A および N A 糖タンパク質に対する免疫応答の発現により媒介されるため、これらの表面抗原をコードする遺伝子は再集合ウイルスまたは高増殖臨床単離株から得られなければならない。弱毒化遺伝子は、弱毒化親に由来する。このアプローチでは、弱毒化を付与する遺伝子は、好ましくは H A および N A 糖タンパク質をコードしない。別の情況では、これらの遺伝子は、臨床ウイルス単離株の表面抗原を保有する再集合株に移入され得ない。

【 0 0 4 1 】

多数の供与体ウイルスは、インフルエンザ・ウイルスを再現可能的に弱毒化するそれらの能力に関して評価された。非限定例として、A / A n n A r b o r ( A A ) / 6 / 6 0 ( H 2 N 2 ) 寒冷順応 ( c a ) 供与体ウイルスは、弱毒化ワクチン製造のために用いられ得る（例えばEdwards, 1994; Murphy, 1993参照）。さらに生弱毒化再集合株ウイルスワクチンは、c a 供与体ウイルスを本発明の有毒複製ウイルスと交配することにより生成され得る。次に、弱毒化 A / A A / 6 / 6 0 ( H 2 N 2 ) c a 供与体ウイルスの表面抗原を保有するウイルスの複製を抑制する H 2 N 2 抗血清の存在下で、再集合株子孫が 25 で（有毒ウイルスの複製に限定的）選択される。

【 0 0 4 2 】

大型シリーズの H 1 N 1 および H 3 N 2 再集合株がヒトにおいて評価され、申し分なく：（ a ）感染性、（ b ）血清陰性小児および免疫学的に感作された成人に対して弱毒化され、（ c ）免疫原性、ならびに（ d ）遺伝子安定性であることが判明した。c a 再集合株の免疫原性は、それらの複製レベルと平行する。したがって新規の野生型ウイルスによる c a 供与体ウイルスの 6 つの移入可能遺伝子の獲得は、感染しやすい成人および小児にワクチン接種するのに用いるために、これらのウイルスを再現可能的に弱毒化した。

【 0 0 4 3 】

その他の弱毒性突然変異は、これらの突然変異体遺伝子を保有する感染性ウイルスを救済するための部位特異的突然変異誘発によりインフルエンザ・ウイルス遺伝子中に導入され得る。弱毒性突然変異は、ゲノムの非コード領域に、ならびにコード領域に導入され得る。このような弱毒性突然変異は、H A または N A 以外の遺伝子、例えば P B 2 ポリメラーゼ遺伝子中にも導入され得る（Subbarao et al., 1993）。したがって部位特異的突然変異誘発により導入された弱毒性突然変異を保有する新規の供与体ウイルスも生成され、そしてこのような新規の供与体ウイルスは、A / A A / 6 / 6 0 c a 供与体ウイルスに関して上記されたものと同様の方法で、生弱毒化再集合株 H 1 N 1 および H 3 N 2 ワクチン候補の低減に用いられ得る。同様に、その他の既知のならびに適切な弱毒化供与体株は、本発明のインフルエンザ・ウイルスと再集合されて、哺乳類のワクチン接種に用いるのに適した弱毒化ワクチンを生成し得る（Enami et al., 1990; Muster et al., 1991; Subbarao et al., 1993）。

【 0 0 4 4 】

このような弱毒化ウイルスは、元の臨床単離株のものと実質的に同様の抗原決定基をコ

10

20

30

40

50

ードするウイルスからの遺伝子を保持するのが好ましい。これは、弱毒化ワクチンの目的が、ワクチン接種哺乳類における重篤な病原性状態を誘導する最小変化をワクチンが引き起こす程度に感染性を同時に欠きながら、ウイルスの元の臨床単離株と実質的に同一の抗原性を提供することであるためである。

#### 【 0 0 4 5 】

したがってウイルスは、動物、例えば哺乳類における免疫応答を誘導するためのワクチンとして、既知の方法に従って、弱毒化されるかまたは不活性化され、処方され、そして投与され得る。このような弱毒化または不活性化ワクチンが臨床的単離株またはそれに由来する高増殖株のものと類似の抗原性を保持したか否かを確定するための方法が、当該技術分野で周知である。このような既知の方法としては、供与体ウイルスの抗原決定基を発現するウイルスを排除するための抗血清または抗体の使用；化学的選択（例えばアマンタジンまたはリマンチジン）；H AおよびN A抗体活性および抑制；ならびに抗原決定基をコードする供与体遺伝子（例えばH AまたはN A遺伝子）が弱毒化ウイルス中に存在しないことを確認するためのD N Aスクリーニング（例えばプローブハイブリダイゼーションまたはP C R）が挙げられる（例えばRobertson et al., 1988; Kilbourne, 1969; Aymard-Henry et al., 1985; Robertson et al., 1992参照）。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 医薬（製剤）組成物

接種に、あるいは非経口または経口投与に適した本発明の製剤組成物は、弱毒化または不活性化インフルエンザ・ウイルスを含み、任意に滅菌水性または非水性溶液、懸濁液および乳濁液をさらに含む。組成物は、当該技術分野で既知のような助剤または賦形剤をさらに含む得る（例えばBerkow et al., 1987; Goodman et al., 1990; Avery's Drug Treatment, 1987; Osol, 1980; Katzung, 1992参照）。本発明の組成物は一般に、個々の用量（単位用量）の形態で存在する。

#### 【 0 0 4 7 】

慣用的ワクチンは、一般にそれらの組成物中に入り込む株の各々からの約0.1~200  $\mu$ g、好ましくは10~15  $\mu$ gのヘマグルチニンを含む。本発明のワクチン組成物の主要構成成分を構成するワクチンは、A、BまたはC型のウイルス、あるいはそれらの任意の組合せ、例えば3つの型のうちの少なくとも2つ、異なる亜型のうちの少なくとも2つ、同一型のうちの少なくとも2つ、同一亜型のうちの少なくとも2つ、あるいは異なる単離株（単数または複数）または再集合株（単数または複数）を含む得る。ヒトA型インフルエンザ・ウイルスとしては、H 1 N 1、H 2 N 2 およびH 3 N 2 亜型が挙げられる。

#### 【 0 0 4 8 】

非経口投与のための調製物としては、当該技術分野で既知の助剤または賦形剤を含む得る滅菌水性または非水性溶液、懸濁液および/または乳濁液が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、ならびに注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。担体または閉鎖包帯は、皮膚浸透性を増大し、抗原吸収を増強するために用いられ得る。経口投与のための液体剤形は一般に、液体剤形を含むリポソーム溶液を含む。リポソームを懸濁するための適切な形態としては、当該技術分野で一般的に用いられる不活性希釈剤、例えば精製水を含む得る乳濁液、懸濁液、溶液、シロップおよびエリキシルが挙げられる。不活性希釈剤のほかに、このような組成物は、アジュバント、湿潤剤、乳化剤および沈殿防止剤、あるいは甘味剤、風味剤または香料も包含し得る（例えばBerkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery's, 1987; Osol, 1980; およびKatzung, 1992参照）。

#### 【 0 0 4 9 】

本発明の組成物が個体への投与のために用いられる場合、それはさらに、塩、緩衝剤、アジュバントまたは組成物の効力を改善するために望ましいその他の物質を含む得る。ワクチンのために、アジュバント、即ち特定の免疫応答を増大し得る物質が用いられ得る。普通は、アジュバントおよび組成物は、免疫系への提示前に混合され、あるいは別個に、しかし免疫感作されている生物体の同一部位に提示される。ワクチン組成物に用いるのに

適した物質の例は、Osol (1980)に提示されている。

【0050】

ワクチンの不均質性は、その中の2~50株または任意の範囲または値のような少なくとも2つのインフルエンザ・ウイルス株に関する複製インフルエンザ・ウイルスを混合することにより提供され得る。現代の抗原性組成物を有するA型またはB型インフルエンザ・ウイルス株が好ましい。本発明によれば、ワクチンは、当該技術分野で既知の技法を用いて、インフルエンザ・ウイルスの単一株における変異のために提供され得る。

【0051】

本発明の製剤組成物は、さらにまたは付加的に、例えば遺伝子療法、免疫抑制剤、抗炎症剤または免疫増強剤のための、ならびにワクチンのための少なくとも1つの化学療法化合物を含み、化学療法剤としては、ガンマグロブリン、アマンタジン、グアニジン、ヒドロキシベンズイミダゾール、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子-アルファ、チオセミカルバルゾン、メチサゾン、リファンプン、リバピリン、ピリミジン類似体、プリン類似体、フォスカルネット、ホスホノ酢酸、アシクロビル、ジデオキシヌクレオシド、プロテアーゼ阻害剤またはガンシクロビルが挙げられるが、これらに限定されない(例えばKatzung (1992)ならびにその中のそれぞれ798-800および680-681ページに引用された参考文献参照)。

【0052】

組成物は、可変量のしかし少量の内毒素無含有ホルムアルデヒド、そして安全で且つ組成物が投与される生物体中での望ましくない作用に関与しないことが判明した防腐剤も含有し得る。

【0053】

医薬(薬学的)目的

組成物(またはそれが引き出す抗血清)の投与は、「予防的」または「治療的」目的のためであり得る。予防的に提供される場合、ワクチンである本発明の組成物は、病原体感染の任意の症候が症状発現するようになる前に提供される。組成物の予防的投与は、任意のその後の感染を防止するかまたは弱毒化するために役立つ。予防的に提供される場合、本発明の遺伝子療法組成物は、疾患の任意の症候が症状発現するようになる前に提供される。組成物の予防的投与は、疾患に関連した1つまたは複数の症候を防止するかまたは弱毒化するために役立つ。

【0054】

治療的に提供される場合、弱毒化または不活性化ウイルスワクチンは、実際の感染の症候の検出時に提供される。化合物(単数または複数)の治療的投与は、任意の実際の感染を弱毒化するのに役立つ(例えばBerkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987; およびKatzung, 1992参照)。治療的に提供される場合、遺伝子療法組成物は、疾患の症候または適応症の検出時に提供される。化合物(単数または複数)の治療的投与は、その疾患の症候または適応症を弱毒化するのに役立つ。

【0055】

したがって、本発明の弱毒化または不活性化ワクチン組成物は、感染の開始前に(予測される感染を防止するかまたは弱毒化するために)、あるいは実際の感染の開始後に提供され得る。同様に、遺伝子療法に関しては、組成物は、障害または疾患の任意の症候が症状発現される前に、あるいは1つまたは複数の症候が検出された後に提供され得る。

【0056】

組成物は、その投与がレシピエント患者により耐容され得る場合、「薬理的に許容可能」であるといわれる。このような作用物質は、投与される量が生理学的に十分である場合、「治療的有效量」で投与されると言われる。本発明の組成物は、その存在がレシピエント患者の生理学における検出可能な変化を生じる、例えば感染製インフルエンザ・ウイルスの少なくとも1つの株に対する少なくとも1つの一次または二次体液性または細胞性免疫応答を増強する場合、生理学的に十分である。

【0057】

提供される「防御」が絶対というわけではない、即ちインフルエンザ感染は、患者の対照集団または組と比較して、統計学的に有意の改善が存在する場合、全体的に防止されるかまたは根絶される必要はない。防御は、インフルエンザ・ウイルス感染の症候の開始の重症度または急速度を緩和するよう制限され得る。

【0058】

#### 製剤投与

本発明の組成物は、受動免疫法または能動免疫法により、1つまたは複数の病原体、例えば、1つまたは複数のインフルエンザ・ウイルス株に耐性を付与し得る。能動免疫法では、不活性化または弱毒化生ワクチン組成物が宿主（例えば哺乳類）に予防的に投与され、そして投与に対する宿主の免疫応答が感染および/または疾患に対して防御する。受動免疫法に関しては、引き指された抗血清が回収され、そして少なくとも1つのインフルエンザ・ウイルス株により引き起こされる感染を有することが疑われるレシピエントに投与される。本発明の遺伝子療法（治療）組成物は、能動免疫法により、予防的または治療的レベルの所望の遺伝子産物を産生し得る。

【0059】

一実施形態では、ワクチンは、雌および胎児または新生児とともに防御するのに役立つ免疫応答の生成を引き起こす（胎盤を通してまたは母親の乳汁中に抗体を受動混入することによる）のに十分な時間および量の条件下で、哺乳類雌に（妊娠または分娩時またはその前に）提供される。

【0060】

したがって、本発明は、障害または疾患、例えば病原体のうちの少なくとも1つの株による感染を防止するかまたは弱毒化するための方法を包含する。本明細書中で用いる場合、ワクチンは、その投与が疾患の症候または状態の全体的または部分的弱毒化（即ち抑制）を、あるいは疾患に対する個体の全体的または部分的免疫を生じる場合、疾患を防止または弱毒化すると言われる。本明細書中で用いる場合、遺伝子療法組成物は、その投与が疾患の症候または状態の全体的または部分的弱毒化（即ち抑制）を、あるいは疾患に対する個体の全体的または部分的免疫を生じる場合、疾患を防止または弱毒化すると言われる。

【0061】

本発明の少なくとも1つの不活性化または弱毒化インフルエンザ・ウイルス、あるいはその組成物は、上記のような製剤組成物を用いて、意図された目的を達成する任意の手段により投与され得る。

【0062】

例えば、このような組成物の投与は、種々の非経口経路、例えば皮下、静脈内、皮膚内、筋肉内、腹腔内、鼻内、蛍光または皮膚経路によるものであり得る。本発明の製剤組成物を用いる好ましい方式は、筋肉内または皮下適用によるものである（例えばBerkow et al., 1992; Goodman et al., 1990; Avery, 1987; およびKatzung, 1992参照）。

【0063】

インフルエンザ・ウイルス関連病態を予防し、抑制または治療するための典型的レジメンは、単一治療として投与されるか、あるいは1週間～約24ヶ月、あるいはその中の任意の範囲または数値までの期間に亘って、強化または追加投与量として反復される本明細書中に記載されるような有効量のワクチン組成物の投与を包含する。

【0064】

本発明によれば、組成物の「有効量」は、所望の生物学的作用を達成するのに十分である量である。有効投与量は、レシピエントの年齢、性別、健康状態および体重、もしあれば、共存的治療の種類、治療の頻度、ならびに望まれる作用の性質によっている、と理解される。以下に提示される有効用量の範囲は、本発明を限定するものではなく、好ましい用量範囲を表す。しかしながら最も好ましい投与量は、当業者に理解され、確定されるように、個々の被験者に適応される（例えばBerkow et al., 1992; Avery's, 1987; Katzung, 1992参照）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 5 】

哺乳類（例えばヒト）または鳥類成体生物体のための弱毒化ウイルスワクチンの投与量は、約 $10^3 \sim 10^7$ プラーク形成単位（PFU）/kg、またはその中の任意の範囲または値からであり得る。不活性化ワクチンの用量は、約0.1～200  $\mu\text{g}$ の範囲、例えば50  $\mu\text{g}$ のヘマグルチニンタンパク質であり得る。しかしながら投与量は、出発点として先在ワクチンを用いて慣用的方法により確定した場合に、安全且つ有効な量であるべきである。

## 【 0 0 6 6 】

複製ウイルスワクチンの各用量での免疫反応性HAの投与量は、適量の、例えば1～50  $\mu\text{g}$ 、またはその中の任意の範囲または値、あるいは米国公衆衛生局（PHS）により推奨される量（通常は3歳児以上の年長小児用：15  $\mu\text{g}$ /構成成分；3歳未満の小児用：7.5  $\mu\text{g}$ /構成成分）を含有するよう標準化され得る。しかしながらNAの量も標準化され、この糖タンパク質はプロセッサ精製および貯蔵中是不安定であり得る（Kendal et al., 1980）。各々0.5 ml用量のワクチンは、好ましくは約1～500億個のウイルス粒子、好ましくは100億個の粒子を含有する。

## 【実施例】

## 【 0 0 6 7 】

以下の実施例により、本発明をさらに説明する。

実施例 1材料および方法

細胞およびウイルス。293Tヒト胚腎細胞およびマディン・ダービーイヌ腎細胞（MDCK）を、それぞれ10%ウシ胎仔血清を補足したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）中、および5%ウシ新生仔血清を含有する変法イーグル培地（MEM）中に保持した。全ての細胞を、37℃で5%CO<sub>2</sub>中に保持した。インフルエンザ・ウイルスA/WSN/33（H1N1）およびA/PR/8/34（H1N1）を、10日齢卵中で増殖させた。

## 【 0 0 6 8 】

プラスミドの構築。RNAポリメラーゼI構築物を生成するために、A/WSN/33またはA/PR/8/34ウイルスRNA由来のクローン化cDNAを、RNAポリメラーゼIのプロモーターおよびターミネーター配列間に導入した。要するに、BsmBIで消化されたBsmBIを含有するプライマーを用いたPCRにより、クローン化cDNAを増幅し、そしてBsmBI部位により分離されるヒトRNAポリメラーゼIプロモーターおよびマウスRNAポリメラーゼIターミネーターを含有するpHH21ベクターのBsmBI部位中にクローン化した（図2）。A/WSN/33株のPB2、PB1、PA、HA、NP、NA、MおよびNS遺伝子を、以下のプラスミドの使用によりPCR増幅した：それぞれpSCWPB2、pGW-PB1およびpSCWPA（全てDr. Debi Nayak at the University of California Los Angelesから得られる）、ならびにpWH17、pWNP152、pT3WNA15（Castrucci et al., 1998）、kPT3WMおよびpWNS1。鋳型としてpcDNA774（PB1）（Perez et al., 1998）を用いて、インフルエンザウイルスA/PR/8派34ウイルスのPB1遺伝子を増幅した。プライマーの配列に関しては図6を参照されたい。遺伝子が望ましくない突然変異を含有しないことを保証するためには、PCR由来断片は、メーカーに推奨されたプロトコールに従ってオートシーケンサー（Applied Biosystems Inc., CA, USA）を用いた配列であった。A/WSN/33ウイルスのHA、NP、NAおよびM1遺伝子をコードするcDNAを記載された（Huddlestone et al., 1982）とおりにクローン化して、真核生物発現ベクターpCAGGS/MCS（ニワトリアクチンプロモーターにより制御）（Niwa et al., 1991）中にサブクローニングして、それぞれpEWSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0-14、pCAGGS-WNA15およびpCAGGS-WSN-M1-2/1を生じた。PCRによりA/PR/8/34ウイルスからのM2およびNS2遺伝子を増幅し、pCAGGS/MCS中にクローン化して、pEP24cおよびpCA-NS2を産生した。最後に、pcDNA774（PB1）、pcDNA762（PB2）およびpcDNA787（PA）を用いて、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下でPB2、PB



1 および P A タンパク質を発現した (Perez et al., 1998)。

【 0 0 6 9 】

感染性インフルエンザ粒子の生成。メーカーの使用説明書に従って、トランスIT L T - 1 (Panvera, Madison, Wisconsin) の使用により、異なる量で最大17のプラスミドを用いて、293T細胞 ( $1 \times 10^6$ ) をトランスフェクトした。要するに、DNAおよびトランスフェクション試薬を混合し (2  $\mu$ lトランスIT - LT - 1 / DNA1  $\mu$ g)、室温で45分間インキュベートし、細胞に付加した。6時間後、DNAトランスフェクション試薬混合物を、0.3%ウシ血清アルブミンおよび0.01%ウシ胎仔血清を含有するオプチ - M E M (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) に入れ換えた。トランスフェクション後異なる時間に、ウイルスを上清から収穫し、MDC K細胞に関して滴定した。ヘルパーウイルスはこの手法に必要なとされなかったため、回収されたトランスフェクト体ウイルスを、ブランク精製を伴わずに分析した。

10

【 0 0 7 0 】

ウイルスを産生するプラスミドトランスフェクト化細胞のパーセンテージの確定。トランスフェクション後24時間に、293T細胞を、単一細胞中に0.02% EDTAとともに分散した。次に細胞懸濁液を10倍に希釈し、24ウェルプレート中のMDC K細胞の集密的細胞単層に移した。血球凝集検定により、ウイルスを検出した。

【 0 0 7 1 】

免疫染色検定。インフルエンザウイルス感染後9時間目に、細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水 (P B S) で2回洗浄し、室温で20分間、3.7%パラホルムアルデヒド (P B S 中) で固定した。次にそれらを0.1%トリトン X - 100で処理し、Neumann等 (1997) が記載したように加工処理した。

20

【 0 0 7 2 】

結果

ウイルスRNAセグメント、3つのポリメラーゼサブユニットおよびNPタンパク質のプラスミド駆動発現による感染性ウイルスの生成。精製ビリオンから抽出されたRNPの混合物を用いた細胞のトランスフェクションは感染性インフルエンザ粒子を生じるが、しかしこの戦略は、8つの異なるin vitro生成RNPとともに用いられる場合、効率的であるとは思われない。完全にcDNAから感染性インフルエンザ・ウイルスを産生するために、8つのウイルスRNPをin vivoで生成した。したがって、ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターおよびマウスRNAポリメラーゼIターミネーターに隣接されたA / W S N / 33ウイルスの全長ウイルスRNAに関するcDNAを含有するプラスミドを調製した。原則として、真核生物細胞中へのこれら8つのプラスミドのトランスフェクションは、8つのインフルエンザvRNA全ての合成を生じるべきである。タンパク質発現プラスミドの同時トランスフェクションにより生成されるPB2、PB1、PAおよびNPタンパク質は次に、機能性vRNP中にvRNAを集合させ、これらは複製され、転写されて、最終的に感染性インフルエンザ・ウイルスを生成する (図3)。 $1 \times 10^6$ 個の293T細胞をタンパク質発現プラスミド (pcDNA762 (PB2) 1  $\mu$ g、pcDNA774 (PB1) 1  $\mu$ g、pcDNA787 (PA) 0.1  $\mu$ g、およびpCAGGS - WSN - NP0 / 141  $\mu$ g)、ならびに以下のRNAポリメラーゼIプラスミドの各々1  $\mu$ g (pPol I - WSN - PB2、pPol I - WSN - PB1、pPol I - WSN - PA、pPol I - WSN - HA、pPol I - WSN - NP、pPol I - WSN - NA、pPol I - WSN - MおよびpPol I - WSN - NS) でトランスフェクトした。低減量のpcDNA787 (PA) を用いることの決定は、過去の観察 (Mena et al., 1996)、ならびにウイルス様粒子 (VLP) の生成に関する最適条件に関するデータ (示されていない) を基礎にした。293T細胞のトランスフェクション後24時間目に、 $7 \times 10^3$  pfuのウイルス/mlが上清中に見出された (実験1、表1) が、これは、完全にプラスミドからA型インフルエンザ・ウイルスを産生する逆遺伝子学の能力を初めて実証した。

30

40

【 0 0 7 3 】

【表1】

表1. クローニングされたcDNAからインフルエンザ・ウイルスを作製するために使用されるプラスミド・セット\*

|                       |         | 実験                |                   |                   |                   |   |   |   |   |
|-----------------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|---|---|---|
| RNAポリメラーゼI<br>プラスミド:† |         | 1                 | 2                 | 3                 | 4                 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|                       | PB1     | +                 | +                 | -                 | -                 | - | - | - | - |
|                       | PR8-PB1 | -                 | -                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | PB2     | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | PA      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | HA      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | NP      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | NA      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | M       | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | NS      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | + |
| タンパク質発現<br>プラスミド:     |         |                   |                   |                   |                   |   |   |   |   |
|                       | PB1     | +                 | +                 | +                 | +                 | + |   | + | + |
|                       | PB2     | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | - | + |
|                       | PA      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | - | + |
|                       | NP      | +                 | +                 | +                 | +                 | + | + | + | - |
|                       | HA      | -                 | +                 | -                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | NA      | -                 | +                 | -                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | M1      | -                 | +                 | -                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | M2      | -                 | +                 | -                 | +                 | + | + | + | + |
|                       | NS2     | -                 | +                 | -                 | +                 | + | + | + | + |
| ウイルスカ価<br>(pfu/ml)    |         | 7×10 <sup>3</sup> | 7×10 <sup>3</sup> | 1×10 <sup>3</sup> | 3×10 <sup>4</sup> | 0 | 0 | 0 | 0 |

\* 293T細胞を示されたプラスミドでトランスフェクトさせた。24時間（実験1と2）又は48時間（実験3-8）後、上清中のウイルスカ価をMDCK細胞において測定した。

†特にことわらない限り、プラスミドをA/WSN/33ウイルスのRNAsを表すcDNAsを用いて構築した。

## 【0074】

全てのウイルス構造タンパク質の同時発現を伴うインフルエンザ・ウイルス産生の効率。ウイルスNPおよびポリメラーゼタンパク質の発現はインフルエンザ・ウイルスのプラスミド駆動性生成のために十分であるが、しかし効率は改善され得る可能性もあった。過去の研究では、全てのインフルエンザ・ウイルス構造タンパク質（PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2およびNS2）の発現は、レポーター・クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子をコードする人工vRNAを含有するVLPを生じた（Mena et al., 1996）。したがってウイルスRNA複製および転写に必要なとされるものだけの代わりにの構造タンパク質の全相補体の利用可能性は、ウイルス産生の効率を改善し得る。この目的のために、293T細胞を最適量のウイルスタンパク質発現プラスミド：pcDNA762（PB2）およびpcDNA774（PB1）1 μg；pcDNA787（PA）0.1 μg；pPolI-WSN-HA、pCAGGS-WSN-NP0/14およびpCAGGS-WNA15 1 μg；pCAGGS-WSN-M1-2/1

2  $\mu\text{g}$ ; pCA-NS2 0.3  $\mu\text{g}$ ; ならびに pEP24c(M2) 0.03  $\mu\text{g}$  (VLP 産生により判定; 未発表データ) を、各 RNA ポリメラーゼ I プラスミド 1  $\mu\text{g}$  と一緒に用いて、トランスフェクトした (実験 2、表 1)。同一組の RNA ポリメラーゼ I プラスミド (PB1 遺伝子を除く: これは再集合株ウイルスを生成しようとして努力して pPolI-PR/8/34-PB1 に置換された) を、PA、PB1、PB2 および NP のみを発現するプラスミド (実験 3、表 1) あるいは全てのインフルエンザ構造タンパク質を発現するプラスミド (実験 4、表 1) と一緒に用いて、第二組の細胞をトランスフェクトした。WSN ウイルスの産生は、トランスフェクション後 24 時間 (実験 1 および 2、表 1) でまたは 36 時間 (データは示されていない) で感知可能程度に異ならなかった。しかしながら、全てのインフルエンザ・ウイルス構造タンパク質が提供された場合、PR/8/34-PB1 による 10 倍より大きいウイルス産生増大が見出された (実験 3 および 4、表 1)。PA、PB1、PB2 または NP タンパク質の発現のためのプラスミドのうちの 1 つを欠くネガティブ対照は、いかなるウイルスも産生しなかった (実験 5 ~ 8、表 1)。したがって、生成されるウイルスによって、A 型インフルエンザ・ウイルス構造タンパク質の発現は、逆遺伝学方法の効率を容易に評価可能程度に改善した。

【0075】

次に、A/PR/8/34-PB1 遺伝子を有するウイルスを生成するために用いられるプラスミド組を用いて、細胞のトランスフェクション後のウイルス産生の動態を確定した。3 つの実験のうち 2 つにおいて、トランスフェクション後 24 時間に、最初にウイルスを検出した。その時間に測定された力価  $> 10^3$  pfu/ml は、トランスフェクション後 48 時間では  $> 10^6$  pfu/ml に増大した (表 2)。ウイルスを産生しているプラスミドトランスフェクト化細胞のパーセンテージを概算するために、トランスフェクションの 24 時間後に EDTA (0.02%) で 293T 細胞を処理して、細胞を分散し、次に限定希釈試験を実施した。この実験では、この時点での培養上清中に遊離ウイルスは見出されなかった。結果は、 $10^{3.3}$  細胞中の 1 つが感染性ウイルス粒子を生成中である、ということを示した。

【0076】

【表 2】

表 2. 293T 細胞内へのプラスミド・トランスフェクション後のウイルス生産の動態\*

| プラスミド・トランスフェクション後の時間 | 培養上清中のウイルス力価 (pfu/ml) |                   |                 |
|----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------|
|                      | 実験                    |                   |                 |
|                      | 1                     | 2                 | 2               |
| 6                    | 0                     | ND                | ND              |
| 12                   | 0                     | ND                | 0               |
| 18                   | 0                     | ND                | 0               |
| 24                   | 0                     | $2 \times 10^3$   | $6 \times 10^3$ |
| 30                   | ND                    | $5 \times 10^4$   | $9 \times 10^4$ |
| 36                   | $6 \times 10^2$       | $> 1 \times 10^5$ | $7 \times 10^5$ |
| 42                   | ND                    | $> 1 \times 10^6$ | $5 \times 10^6$ |
| 48                   | $8 \times 10^4$       | $> 1 \times 10^6$ | $1 \times 10^7$ |

\* 293T 細胞を、A/PR/8/34 ウイルスに由来する、PB1 遺伝子を除き A/WSN/33 ウイルス遺伝子をコードする 8 つの RNA ポリメラーゼ I プラスミドを用いて、及び本明細書中に記載する 9 つのタンパク質発現プラスミドを用いて感染させた。異なる時機において、我々は、MDCK 細胞における上清中のウイルスを滴定した。ND=実施せず。

【0077】

NA タンパク質中の FLAG エピトープを含有するインフルエンザ・ウイルスの回収。

新規の逆遺伝学系がA型インフルエンザ・ウイルスのゲノム中への突然変異の導入を可能にすることを立証するために、NAタンパク質中のFLAGエピトープを含有するウイルス(Castrucci et al., 1992)を生成した。NAタンパク質およびタンパク質頭部の底のFLAGエピトープの両方をコードするcDNAを含有するRNAポリメラーゼIプラスミド(pPolI-WSN-NA/FL79)を、必要なRNAポリメラーゼIおよびタンパク質発現プラスミドと一緒に用いて、293T細胞をトランスフェクトした。回収ウイルス(PR8-WSN-FL79)が実際にNA-FLAGタンパク質を発現しないことを確認するために、PR8-WSN-FL79またはA/WSN/33野生型ウイルスに感染させた細胞の免疫染色検定を実施した。FLAGエピトープに対するモノクローナル抗体はPR8-WSN-FL79に感染した細胞を検出したが、しかし野生型ウイルスに感染したものを検出しなかった。PR8-WSN-FL79ウイルスの回収は、非タグ化野生型ウイルスに関する場合と同様に効率的であった(データは示されていない)。これらの結果は、新規の逆遺伝学系がA型インフルエンザウイルスゲノム中への突然変異の導入を可能にする、ということを示す。

#### 【0078】

PA遺伝子中に突然変異を含有する感染性インフルエンザ・ウイルスの生成。 PA遺伝子中に突然変異を保有するウイルスを産生するために、2つのサイレント突然変異を導入して、制限エンドヌクレアーゼに関する新規の認識配列を作製した(mRNAの位置486にBsp1201および位置1284にPvuII)。従来は、信頼できる選択系の欠如のため、逆遺伝学によりこの遺伝子を修飾することはできなかった。トランスフェクト体ウイルスPA-T846CおよびPA-A1284を回収した。2連続限定希釈により、回収トランスフェクト体ウイルスを生物学的にクローン化した。回収ウイルスが実際にPA遺伝子中の突然変異を有するトランスフェクト体であることを立証するために、逆転写酵素-PCRにより、PA遺伝子に関するcDNAを得た。PA-T846CおよびPA-A1284Cウイルスは、新規導入制限部位の存在により実証されるように、PA遺伝子内に予期された突然変異を有した。同一ウイルス試料のPCRおよび逆転写段階を有さないプライマーは、いかなる生成物も産生できなかった(データは示されていない)が、このことは、PA cDNAが、ウイルスを生成するために用いられるプラスミドの代わりにvRNAに事実上由来することを示す。これらの結果は、ヘルパーウイルスの使用を伴わずに突然変異化遺伝子を有するウイルスが産生され、回収され得る方法を例証する。

#### 【0079】

##### 考察

本明細書中に記載した逆遺伝学系は、完全にクローン化cDNAからA型インフルエンザウイルスを効率的に産生するのを可能にする。BridgenとElliott(1996)も、逆遺伝学を用いて、ブンヤムウエラウイルス(ブンヤウイルス科)を生成しているが、しかしそれは、ネガティブ・センスRNAの3つのセグメントのみを含有し、そしてその産生効率は低く、 $10^2$  pfu/ $10^7$ 細胞であった。ウイルス収率は実験間で異なったが、しかし8つのセグメントを含有するインフルエンザウイルスに関して、一貫して $>10^3$  pfu/ $10^6$ 細胞を得た。本明細書中に上記した逆遺伝学系の高効率に関しては、いくつかの解釈がある。in vitroでRNPを産生する(Luytjes et al., 1989)代わりに、RNAポリメラーゼIを用いたvRNAの細胞内合成により、そしてウイルスポリメラーゼタンパク質およびNPのプラスミド駆動性発現により、RNPをin vivoで生成した。さらにまた、プラスミドで容易にトランスフェクトされる293T細胞の使用(Goto et al., 1997)は、細胞の大集団がウイルス産生のために必要なプラスミドの全てを受容することを保証した。さらに、増殖中の細胞中で最も豊富に発現される酵素の1つであるRNAポリメラーゼIにより産生される多数の転写体は、当該系の全体的効率に寄与すると思われた。これらの特徴は、vRNAのキャプシド形成、核中のRNPの生成、ならびに新規のウイルスが集合され、放出される細胞膜へのこれらの複合体の輸出のための、それ相当に多数のvRNA転写体および適量のウイルスタンパク質をもたらした。

## 【 0 0 8 0 】

従来確立された逆遺伝学系 (Enami et al., 1990; Neumann et al., 1994; Lyutjes et al., 1989; Pleschka et al., 1996) は、ヘルパーウイルス感染を必要とし、したがって少数のトランスフェクト体を膨大な数のヘルパーウイルスから回収させる選択方法を必要とする。このような戦略は、以下の c D N A 由来遺伝子のうちの1つを保有するインフルエンザウイルスを生成するために用いられてきた: P B 2 (Subbarao et al., 1993)、H A (Enami et al., 1991; Horimoto et al., 1994)、N P (Li et al., 1995)、N A (Enami et al., 1990)、M (Castrucci et al., 1995; Yasuda et al., 1994) および N S (Enami et al., 1991)。選択方法のほとんどが、H A および N A 遺伝子に適用可能なものを除いて、増殖温度、宿主範囲制限または薬剤感受性によっており、したがって 10  
 遺伝子産物の機能性分析のための逆遺伝学の有用性を制限する。信頼できる抗体駆動性選択計が利用可能である H A および N A 遺伝子に関する場合でも、顕著な増殖欠陥を有するウイルスを産生することは難しい。これに対して、本明細書中に記載した逆遺伝学系は、ヘルパーウイルスを必要とせず、任意の遺伝子セグメント中に突然変異を有する、あるいはいくつかの増殖欠陥を有するトランスフェクト体の生成を可能にする。この利点は、図 5 で実証されている (突然変異化 P A 遺伝子を用いたトランスフェクト体ウイルスの回収)。A 型インフルエンザウイルスゲノム中に任意の実行可能な突然変異を導入するための技法を有するならば、多数の積年の問題、例えばウイルスゲノムの非翻訳領域における調節配列の性質、ウイルスタンパク質の構造 - 機能関係、ならびに宿主範囲制限およびウイルス病原性の分子基礎を処理することができる。 20

## 【 0 0 8 1 】

不活性化インフルエンザワクチンが利用可能であるが、しかしそれらの効力は、一部は、局所的 I g A および細胞傷害性 T 細胞応答を引き出すそれらの限定能力のため、最適以下である。目下進行中の寒冷順応生インフルエンザワクチンの臨床試験は、インフルエンザ症候を引き起こさないがしかし依然として防御免疫を誘導するよう、このようなワクチンが最適に弱毒化される、ということを示唆する (Keitel & Piedra, 1998 で再検討)。しかしながら、予備的結果は、これらの生ウイルスワクチンが最良の不活性化ワクチン (Keitel & Piedra, 1998 中にレビューされる) より有意に有効であるというわけではなく、さらなる改善の余地を残している、ということを示す。可能性の1つは、上記の逆遺伝学系を用いて寒冷順応ワクチンを修飾することである。あるいは内部タンパク質をコード 30  
 する遺伝子中に多数の弱毒性突然変異を有する「マスター」A 型インフルエンザ株を産生するために逆遺伝学を用いることにより、ゼロから出発し得る。本明細書中に記載した逆遺伝学系の最も興味をそそる用途は、新規の H A または N A 亜型インフルエンザ・ウイルスを含めた汎発性流行が疑われる場合の弱毒化生ウイルスワクチンの迅速生産に見出され得る。

## 【 0 0 8 2 】

この新規の逆遺伝学系は、ワクチンベクターとしてのインフルエンザ・ウイルスの使用を増強すると思われる。ウイルスは、インフルエンザウイルスタンパク質のほかに、外因性タンパク質または免疫原性エピトープを発現するよう工学処理され得る。例えば第九番目のセグメントとして外因性タンパク質を有するウイルスを生成し (Enami et al., 1991) 40  
 )、そしてそれらを生ワクチンとして用い得る。インフルエンザ・ウイルスは強力な細胞媒介性および体液性免疫応答を刺激するだけでなく、それらは広範な一連のピリオン表面 H A および N A タンパク質 (例えば15の H A および9つの N A 亜型ならびにそれらの流行病性変異体) ももたらして、同一標的集団の反復免疫感作をも可能にする。

## 【 0 0 8 3 】

ウイルス構造タンパク質およびワクシニア - T 7 ポリメラーゼ系を有する v R N A を発現することにより、レポーター遺伝子をコードする人工 v R N A を保有するインフルエンザ V L P が産生されている (Mena et al., 1996)。逆遺伝学を用いて、目下、v R N A 転写および複製に必要とされるタンパク質をコードする v R N A (即ち P A、P B 1、P B 2 および N P) ならびに当該タンパク質をコードする v R N A を含有す V L P を生成し 50

得る。このようなVLPは、有用な遺伝子送達ビヒクルであり得る。ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子のそれらの欠如は、感染性ウイルスがVLP-遺伝子療法後には産生されないことを保障する、ということは重要である。インフルエンザウイルスゲノムが宿主染色体中に組み込まれないため、VLP系は、細胞の短期間形質導入（例えば癌治療のため）のみを要する状況において遺伝子療法に適している。アデノウイルスベクター（Kovesdi et al., 1997）と対比して、インフルエンザVLPはHAおよびNA変異体の両方を含有して、標的集団の反復治療を可能にする。

【0084】

オルソミクソウイルス科は、A、BおよびC型インフルエンザ・ウイルス、ならびに近年分類されたトゴウイルスを含む。本明細書中に記載したクローン化cDNAから完全に感染性A型インフルエンザ・ウイルスを生成するための戦略は、任意のオルソミクソウイルスに、そしておそらくはその他のセグメント化ネイティブ・センスRNAウイルス（例えばブニヤウイルス科、アレナウイルス科）にも同様に当てはまる。技術的制限なしにウイルスゲノムを操作する能力は、ウイルス生活環およびそれらの調節、ウイルスタンパク質の機能およびウイルス病原性の分子メカニズムの研究のための深い含蓄を有する。

【0085】

#### 実施例 2

インフルエンザA/Puerto Rico/8/34のための逆遺伝学系を開発するために、製造者のプロトコールに従って、RNeasy Mini kit (Qiagen)を用いて、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)、Madison高増殖変種(PR8HG)の尿膜液からウイルスRNAを抽出した。cDNAを、MMLV-R Tase(Promega)とUni12プライマーを用いて合成した。このcDNAを以下を用いて、PCRにより一晩増幅した：

【0086】

10

20

## 【表 3】

## プライマー・セット

PB1: Ba PB1-1 と PB1-1735R (前断片)、及び PB1-903 と Ba-PB1-2341R (後断片)

Ba-PB1-1 CACACACGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGCA (SEQ ID NO:9)

173PB1-1735R GGGTTTGTATTTGTGTGTCACC (SEQ ID NO:10)

233PB1-903 CCAGGACACTGAAATTTCTTTCAC (SEQ ID NO:11)

Ba-PB1-2341R

CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGCATTT (SEQ ID NO:12)

10

PB2: Ba PB2-1 と B2 1260R (前断片)、及び WSN PB2 seq-2 と Ba-PB2-2341R (後断片)

Ba-PB2-1 CACACAGGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTC (SEQ ID NO:13)

B2 1260R CACACACGTCTCCATCATAAATCCTCTTG (SEQ ID NO:14)

20

WSN PB2 seq-2 CTCCTCTGATGGTGGCATAAC (SEQ ID NO:15)

Ba-PB2-2341R

CACACAGGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT (SEQ ID NO:16)

PA:

Bm-PA-1 CACACACGTCTCCGGGAGCGAAAGCAGGTAC (SEQ ID NO:17)

Bm-PA-2233R

CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTA CTT (SEQ ID NO:18)

30

HA:

Bm-HA-1: CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO:19)

Bm-NS-890R:

CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID NO:20)

NP:

Bm-NP-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTA (SEQ ID NO:21)

40

【 0 0 8 7 】

## 【表 4】

|     |                                                                          |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------|----|
|     | Bm-NP-1565R<br>CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT (SEQ ID<br>NO:22)  |    |
| NA: | Ba-NA-1: CACACAGGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ<br>ID NO:23)               |    |
|     | Ba-NA-1413R:<br>CACACAGGTCTGGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT (SEQ<br>ID NO:24) | 10 |
| M:  | Bm-M-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGTAG (SEQ<br>ID NO:25)                 |    |
|     | Bm-M-1027R<br>CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT (SEQ ID<br>NO:26)   |    |
| NS: | Bm-NS-1 CACACACGTCTCCGGGAGCAAAAGCAGGGTG (SEQ<br>ID NO:27)                | 20 |
|     | Bm-NS-890R<br>CACACACGTCTCCTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT (SEQ ID<br>NO:28)    |    |

## 【 0 0 8 8 】

DNAポリメラーゼ：pfu ネーティブDNAポリメラーゼ(Stratagene)。

上記PCR産物を、ゲル電気泳動により分離し、そしてゲル抽出キット(Qiagen)を用いてアガロース・ゲルから抽出した。抽出した遺伝子をTakaraライゲーション・キットver. II(Takara)を用いてpT7Blueプラント・ベクター(Novagen)内にライゲートした。5時間後、ライゲートされた遺伝子を、JM109(PB2, M, 及びNS遺伝子)又はDH5alpha(PA, PB1, 及びNP)内に遺伝子移入した。各遺伝子について6つのコロニーを、8時間TB中で培養した。プラスミドを、細菌コロニーから抽出し、そして遺伝子当り4つのコロニーを配列決定した。

## 【 0 0 8 9 】

PTBlue内のPA、NP、M、及びNS遺伝子を、Bsm BI酵素(New England Biolabs)により切り出した。PB1遺伝子を、Bsa I (New England Biolabs)により切り出した。切り出した遺伝子を、ヒトRNAポリメラーゼIプロモーターとマウスRNAポリメラーゼIターミネーターであってBsm BIで消化されたものを含むpPolIRベクターで一晩ライゲートした。PT7Blue内のPB2遺伝子の前断片を、Bsr GI (New England Biolabs)とBam HI (Roche)により切り出し、そして後断片を、Bsr GI (New England Biolabs)とSpe I (Roche)により切り出した。切り出した断片を混合し、そしてBsa Iで消化した。6時間後、消化された断片を、PCR増幅キット(Qiagen)を用いて精製し、そしてpPolIRベクターのBsm BI部位間に一晩ライゲートした。

## 【 0 0 9 0 】

ライゲートされたPB1、PA、NP、M、及びNS-pPolIR遺伝子を、一晩、JM109 (M及びNS遺伝子)又はDH5alpha(PB1、PA、及びNP遺伝子)を形質転換するために使用した。形質転換された細菌のコロニーを、LB中で一晩培養した。ライゲートされたPB2-pPolIRを、一晩JM109を形質転換するために使用した。



## 【 0 0 9 1 】

プラスミドを、細菌培養液から抽出し、そして遺伝子挿入物を酵素消化により確認した。PB2-PoIIIRにいり軽質転換された細菌のコロニーを。8時間LB中で培養した。次いで、プラスミドを、抽出し、そして遺伝子挿入を酵素消化により確認した。pPoII構築物の全てを、不所望の突然変異が含んでいないことを保証するために、配列決定した。

## 【 0 0 9 2 】

PR8HGにためのpPoIIIR構築物を、A/WSN/33(WSN)-HA及びNA、A/Hong Kong/483/97(HK)-HA avir及びNA、又はA/Kawasaki/01(Kawasaki)-HA及びNA PoII構築物、及びポリメラーゼ・タンパク質及びA/WSN/33にNPのための4タンパク質-発現構築物により、293Tヒト胚性腎細胞内にトランスフェクトした。トランスフェクトされた293T細胞からの上清を、(10<sup>-7</sup>まで薄めずに)逐次希釈し、そして9日齢の有胚ニワトリ卵の尿膜腔内に感染させた。感染した卵の尿膜液を収穫し、そしてそれらのウイルス力価をHAアッセイにより試験した(表3)。

## 【 0 0 9 3 】

## 【表5】

表3

| 以下のHA及びNA<br>遺伝子とともに<br>PR8遺伝子を有<br>するウイルス | 以下に希釈された293T上清により接種された卵からの尿膜液のHA力価<br>(HAU/ml) |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                            | 未希釈                                            | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |
| WSN-HA NA                                  | <1                                             | <1               | 200              | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               |
| HK-HAavir NA                               | 100                                            | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               |
| Kawasaki-HA NA                             | <1                                             | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               | <1               |

## 【 0 0 9 4 】

HA陽性サンプル(10<sup>-2</sup>におけるWSN-HA NAをもつウイルス、及び非希釈HK-HAavir NAをもつウイルス)を、10<sup>-2</sup>から10<sup>-8</sup>まで逐次希釈し、そして100μlの各希釈液を、有胚ニワトリ卵内に感染させた。感染した卵の尿膜液を収穫し、そしてそれらのウイルス力価をHAアッセイにより試験した(表4)。プラスミドから調製したA/Puerto Rico/8/34(H1N1)の50%卵感染投与量(EID<sub>50</sub>)は、10<sup>10.33</sup>/mlであり、そしてHA力価は1:3200であった。

## 【 0 0 9 5 】

A/Hong Kong/213/2003(H5N1)からのHA及びNA遺伝子、並びにPR8HGからのA型インフルエンザ・ウイルス遺伝子の残余を有する組換えウイルスを調製した。組換えウイルスの力価は10<sup>10.67</sup>EID<sub>50</sub>/mlであり、そしてHA力価は1:1600であった。

## 【 0 0 9 6 】

【表 6】

表 4

| 以下のHA及びNA<br>遺伝子とともに<br>PR8遺伝子を有<br>するウイルス | 各希釈におけるHA力価 (HAU/ml) |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                            | 10-2                 | 10-3 | 10-4 | 10-5 | 10-6 | 10-7 | 10-8 |
| WSN-HA NA                                  | 160                  | 40   | 40   | 320  | 40   | 640  | <1   |
| HK-HAavir NA                               | 400                  | 800  | 400  | 400  | 400  | 800  | <1   |

10

【 0 0 9 7 】

P R 8 遺伝子の配列 :

【 0 0 9 8 】

【表 7】

20

PA

AGCGAAAGCA GGTACTGATC CAAAATGGAA GATTTTGTGC  
 GACAATGCTT  
 CAATCCGATG ATTGTCGAGC TTGCGGAAAA AACAAATGAAA  
 GAGTATGGGG  
 AGGACCTGAA AATCGAAACA AACAAATTTG CAGCAATATG  
 CACTCACTTG  
 GAAGTATGCT TCATGTATTC AGATTTTCAC TTCATCAATG  
 AGCAAGGCGA  
 GTC AATAATC GTAGAACTTG GTGATCCAAA TGC ACTTTTG  
 AAGCACAGAT  
 TTGAAATAAT CGAGGGAAGA GATCGCACAA TGGCCTGGAC  
 AGTAGTAAAC  
 AGTATTTGCA AACTACAGG GGCTGAGAAA CCAAAGTTTC  
 TACCAGATTT  
 GTATGATTAC AAGGAGAATA GATTCATCGA AATTGGAGTA  
 ACAAGGAGAG  
 AAGTTCACAT AACTATCTG GAAAAGGCCA ATAAAATTAA  
 ATCTGAGAAA  
 ACACACATCC ACATTTTCTC GTTCACTGGG GAAGAAATGG  
 CCACAAAGGC  
 AGACTACACT CTCGATGAAG AAAGCAGGGC TAGGATCAAA  
 ACCAGACTAT  
 TCACCATAAG ACAAGAAATG GCCAGCAGAG GCCTCTGGGA  
 TTCCTTTCGT

30

40

【 0 0 9 9 】

【表 8】

CAGTCCGAGA GAGGAGAAGA GACAATTGAA GAAAGGTTTG  
 AAATCACAGG  
 AACAAATGCGC AAGCTTGCCG ACCAAAGTCT CCCGCCGAAC  
 TTCTCCAGCC  
 TTGAAAATTT TAGAGCCTAT GTGGATGGAT TCGAACCGAA  
 CGGCTACATT  
 GAGGGCAAGC TGTCTCAAAT GTCCAAAGAA GTAAATGCTA  
 GAATTGAACC  
 TTTTTTGAAA ACAACACCAC GACCACTTAG ACTTCCGAAT  
 GGGCCTCCCT 10  
 GTTCTCAGCG GTCCAAATTC CTGCTGATGG ATGCCTTAAA  
 ATTAAGCATT  
 GAGGACCCAA GTCATGAAGG AGAGGGAATA CCGCTATATG  
 ATGCAATCAA  
 ATGCATGAGA ACATTCTTTG GATGGAAGGA ACCCAATGTT  
 GTTAAACCAC  
 ACGAAAAGGG AATAAATCCA AATTATCTTC TGTCATGGAA  
 GCAAGTACTG  
 GCAGAAGTGC AGGACATTGA GAATGAGGAG AAAATTCCAA  
 AGACTAAAAA  
 TATGAAGAAA ACAAGTCAGC TAAAGTGGGC ACTTGGTGAG  
 AACATGGCAC 20  
 CAGAAAAGGT AGACTTTGAC GACTGTAAAG ATGTAGGTGA  
 TTTGAAGCAA  
 TATGATAGTG ATGAACCAGA ATTGAGGTCG CTTGCAAGTT  
 GGATTCAGAA  
 TGAGTTTAAC AAGGCATGCG AACTGACAGA TTCAAGCTGG  
 ATAGAGCTCG  
 ATGAGATTGG AGAAGATGTG GCTCCAATTG AACACATTGC  
 AAGCATGAGA  
 AGGAATTATT TCACATCAGA GGTGTCTCAC TGCAGAGCCA  
 CAGAATACAT  
 AATGAAGGGA GTGTACATCA ATACTGCCTT GCTTAATGCA  
 TCTTGTGCAG  
 CAATGGATGA TTTCCAATTA ATTCCAATGA TAAGCAAGTG  
 TAGAACTAAG 30  
 GAGGGAAGGC GAAAGACCAA CTTGTATGGT TTCATCATAA  
 AAGGAAGATC  
 CCACTTAAGG AATGACACCG ACGTGGTAAA CTTTGTGAGC  
 ATGGAGTTTT  
 CTCTCACTGA CCCAAGACTT GAACCACATA AATGGGAGAA  
 GTACTGTGTT  
 CTTGAGATAG GAGATATGCT TATAAGAAGT GCCATAGGCC  
 AGGTTTCAAG  
 GCCCATGTTT TGTATGTGA GAACAAATGG AACCTCAAAA  
 ATTAAAATGA  
 AATGGGGAAT GGAGATGAGG CGTTGCCTCC TCCAGTCACT  
 TCAACAAATT 40  
 GAGAGTATGA TTGAAGCTGA GTCCTCTGTC AAAGAGAAAAG  
 ACATGACCAA

【 0 1 0 0 】

【表 9】

AGAGTTCTTT GAGAACAAAT CAGAAACATG GCCCATTGGA  
GAGTCCCCCA  
AAGGAGTGGG GGAAAGTTCC ATTGGGAAGG TCTGCAGGAC  
TTTATTAGCA  
AAGTCGGTAT TCAACAGCTT GTATGCATCT CCACAACCTAG  
AAGGATTTTC  
AGCTGAATCA AGAAAACCTGC TTCTTATCGT TCAGGCTCTT  
AGGGACAACC  
TGGAACCTGG GACCTTTGAT CTTGGGGGGC TATATGAAGC  
AATTGAGGAG  
TGCCTGATTA ATGATCCCTG GGTTTTGCTT AATGCTTCTT  
GGTTCAACTC  
CTTCCTTACA CATGCATTGA GTTAGTTGTG GCAGTGCTAC  
TATTTGCTAT  
CCATACTGTC CAAAAAAGTA CCTTGTTTCT ACT  
(SEQ ID NO:1)

10

【 0 1 0 1 】

20

【表 1 0】

**PB1**

AGCGAAAGCA GGCAAACCAT TTGAATGGAT GTCAATCCGA  
 CCTTACTTTT CTTAAAAGTG CCAGCACAAA ATGCTATAAG  
 CACAACTTTC  
 CCTTATACTG GAGACCCTCC TTACAGCCAT GGGACAGGAA  
 CAGGATACAC  
 CATGGATACT GTCAACAGGA CACATCAGTA CTCAGAAAAG  
 GGAAGATGGA  
 CAACAAACAC CGAAACTGGA GCACCGCAAC TCAACCCGAT  
 TGATGGGCCA  
 CTGCCAGAAG ACAATGAACC AAGTGGTTAT GCCCAAACAG  
 ATTGTGTATT  
 GGAGGCGATG GCTTTCCTTG AGGAATCCCA TCCTGGTATT  
 TTTGAAAAC  
 CGTGTATTGA AACGATGGAG GTTGTTTCAGC AAACACGAGT  
 AGACAAGCTG  
 ACACAAGGCC GACAGACCTA TGACTGGACT CTAAATAGAA  
 ACCAACCTGC  
 TGCAACAGCA TTGGCCAACA CAATAGAAGT GTTCAGATCA  
 AATGGCCTCA  
 CGGCCAATGA GTCTGGAAGG CTCATAGACT TCCTTAAGGA  
 TGTAATGGAG  
 TCAATGAACA AAGAAGAAAT GGGGATCACA ACTCATTTTC  
 AGAGAAAGAG  
 ACGGGTGAGA GACAATATGA CTAAGAAAAT GATAACACAG  
 AGAACAATGG  
 GTAAAAAGAA GCAGAGATTG AACAAAAGGA GTTATCTAAT  
 TAGAGCATTG  
 ACCCTGAACA CAATGACCAA AGATGCTGAG AGAGGGAAGC  
 TAAAACGGAG  
 AGCAATGCA ACCCCAGGGA TGCAAATAAG GGGGTTTGTA  
 TACTTTGTTG

10

20

30

【 0 1 0 2】

【表 1 1】

AGACACTGGC AAGGAGTATA TGTGAGAAAC TTGAACAATC  
 AGGGTTGCCA  
 GTTGGAGGCA ATGAGAAGAA AGCAAAGTTG GCAAATGTTG  
 TAAGGAAGAT  
 GATGACCAAT TCTCAGGACA CCGAACTTTC TTTCACCATC  
 ACTGGAGATA  
 ACACCAAATG GAACGAAAAT CAGAATCCTC GGATGTTTTT  
 GGCCATGATC  
 ACATATATGA CCAGAAATCA GCCCGAATGG TTCAGAAATG  
 TTCTAAGTAT 10  
 TGCTCCAATA ATGTTCTCAA ACAAATGGC GAGACTGGGA  
 AAAGGGTATA  
 TGTTTGAGAG CAAGAGTATG AACTTAGAA CTCAAATACC  
 TGCAGAAATG  
 CTAGCAAGCA TCGATTTGAA ATATTTCAAT GATTCAACAA  
 GAAAGAAGAT  
 TGAAAAAATC CGACCGCTCT TAATAGAGGG GACTGCATCA  
 TTGAGCCCTG  
 GAATGATGAT GGGCATGTTT AATATGTTAA GCACTGTATT  
 AGGCGTCTCC  
 ATCCTGAATC TTGGACAAA GAGATACACC AAGACTACTT  
 ACTGGTGGGA 20  
 TGGTCTTCAA TCCTCTGACG ATTTTGCTCT GATTGTGAAT  
 GCACCCAATC  
 ATGAAGGGAT TCAAGCCGGA GTCGACAGGT TTTATCGAAC  
 CTGTAAGCTA  
 CTTGGAATCA ATATGAGCAA GAAAAAGTCT TACATAAACA  
 GAACAGGTAC  
 ATTTGAATTC ACAAGTTTTT TCTATCGTTA TGGGTTTGT  
 GCCAATTTCA  
 GCATGGAGCT TCCCAGTTTT GGGGTGTCTG GGATCAACGA  
 GTCAGCGGAC  
 ATGAGTATTG GAGTTACTGT CATCAAAAAC AATATGATAA  
 ACAATGATCT  
 TGGTCCAGCA ACAGCTCAA TGGCCCTTCA GTTGTTTCATC  
 AAAGATTACA 30  
 GGTACACGTA CCGATGCCAT ATAGGTGACA CACAAATACA  
 AACCCGAAGA  
 TCATTTGAAA TAAAGAACT GTGGGAGCAA ACCCGTTCCA  
 AAGCTGGACT  
 GCTGGTCTCC GACGGAGGCC CAAATTTATA CAACATTAGA  
 AATCTCCACA  
 TTCCTGAAGT CTGCCTAAAA TGGGAATTGA TGGATGAGGA  
 TTACCAGGGG  
 CGTTTATGCA ACCCACTGAA CCCATTTGTC AGCCATAAAG  
 AAATGAATC  
 AATGAACAAT GCAGTGATGA TGCCAGCACA TGGTCCAGCC  
 AAAACATGG 40  
 AGTATGATGC TGTTGCAACA ACACACTCCT GGATCCCCAA  
 AAGAAATCGA

【 0 1 0 3 】

【表 1 2】

TCCATCTTGA ATACAAGTCA AAGAGGAGTA CTTGAGGATG  
AACAAATGTA  
CCAAAGGTGC TGCAATTTAT TTGAAAAATT CTTCCCAGC  
AGTTCATACA  
GAAGACCAGT CGGGATATCC AGTATGGTGG AGGCTATGGT  
TTCCAGAGCC  
CGAATTGATG CACGGATTGA TTTCGAATCT GGAAGGATAA  
AGAAAGAAGA  
GTTCACTGAG ATCATGAAGA TCTGTTCCAC CATTGAAGAG  
CTCAGACGGC  
AAAAATAGTG AATTTAGCTT GTCCTTCATG AAAAAATGCC  
TTGTTTCTAC  
T  
(SEQ ID NO:2)

10

【 0 1 0 4 】

【表 1 3】

**PB2**

AGCGAAAGCA GGTCAATTAT ATTCAATATG GAAAGAATAA  
 AAGAACTACG  
 AAATCTAATG TCGCAGTCTC GCACCCGCGA GATACTCACA  
 AAAACCACCG  
 TGGACCATAT GGCCATAATC AAGAAGTACA CATCAGGAAG  
 ACAGGAGAAG  
 AACCCAGCAC TTAGGATGAA ATGGATGATG GCAATGAAAT  
 ATCCAATTAC  
 AGCAGACAAG AGGATAACGG AAATGATTCC TGAGAGAAAT  
 GAGCAAGGAC  
 AAAC TTTATG GAGTAAAATG AATGATGCCG GATCAGACCG  
 AGTGATGGTA  
 TCACCTCTGG CTGTGACATG GTGGAATAGG AATGGACCAA  
 TAACAAATAC  
 AGTTCATTAT CCAAAAATCT ACAA AACTTA TTTTGAAAGA  
 GTCGAAAGGC  
 TAAAGCATGG AACCTTTGGC CCTGTCCATT TTAGAAACCA  
 AGTCAAAATA  
 CGTCGGAGAG TTGACATAAA TCCTGGTCAT GCAGATCTCA  
 GTGCCAAGGA  
 GGCACAGGAT GTAATCATGG AAGTTGTTTT CCCTAACGAA  
 GTGGGAGCCA  
 GGATACTAAC ATCGGAATCG CAACTAACGA TAACCAAAGA  
 GAAGAAAGAA  
 GAACTCCAGG ATTGCAAAT TTCTCCTTTG ATGGTTGCAT  
 ACATGTTGGA  
 GAGAGAACTG GTCCGCAAAA CGAGATTCCT CCCAGTGGCT  
 GGTGGAACAA  
 GCAGTGTGTA CATTGAAGTG TTGCATTTGA CTCAAGGAAC  
 ATGCTGGGAA  
 CAGATGTATA CTCCAGGAGG GGAAGTGAGG AATGATGATG  
 TTGATCAAAG

10

20

30

【 0 1 0 5 】



【表 1 4】

CTTGATTATT GCTGCTAGGA ACATAGTGAG AAGAGCTGCA  
 GTATCAGCAG  
 ATCCACTAGC ATCTTTATTG GAGATGTGCC ACAGCACACA  
 GATTGGTGGA  
 ATTAGGATGG TAGACATCCT TAGGCAGAAC CCAACAGAAG  
 AGCAAGCCGT  
 GGATATATGC AAGGCTGCAA TGGGACTGAG AATTAGCTCA  
 TCCTTCAGTT  
 TTGGTGGATT CACATTTAAG AGAACAAGCG GATCATCAGT  
 CAAGAGAGAG 10  
 GAAGAGGTGC TTACGGGCAA TCTCAAACA TTGAAGATAA  
 GAGTGCATGA  
 GGGATATGAA GAGTTCACAA TGGTTGGGAG AAGAGCAACA  
 GCCATACTCA  
 GAAAAGCAAC CAGGAGATTG ATTCAGCTGA TAGTGAGTGG  
 GAGAGACGAA  
 CAGTCGATTG CCGAAGCAAT AATTGTGGCC ATGGTATTTT  
 CACAAGAGGA  
 TTGTATGATA AAAGCAGTCA GAGGTGATCT GAATTTTCGTC  
 AATAGGGCGA  
 ATCAACGATT GAATCCTATG CATCAACTTT TAAGACATTT  
 TCAGAAGGAT 20  
 GCGAAAGTGC TTTTCAAAA TTGGGGAGTT GAACCTATCG  
 ACAATGTGAT  
 GGGAAATGATT GGGATATTGC CCGACATGAC TCCAAGCATC  
 GAGATGTCAA  
 TGAGAGGAGT GAGAATCAGC AAAATGGGTG TAGATGAGTA  
 CTCCAGCACG  
 GAGAGGGTAG TGGTGAGCAT TGACCGTTTT TTGAGAATCC  
 GGGACCAACG  
 AGGAAATGTA CTA CTACTGTCTC CCGAGGAGGT CAGTGAAACA  
 CAGGGAACAG  
 AGAAACTGAC AATAACTTAC TCATCGTCAA TGATGTGGGA  
 GATTAATGGT  
 CCTGAATCAG TGTTGGTCAA TACCTATCAA TGGATCATCA 30  
 GAAACTGGGA  
 AACTGTAAA ATTCAGTGGT CCCAGAACCC TACAATGCTA  
 TACAATAAAA  
 TGGAATTTGA ACCATTTTCAG TCTTTAGTAC CTAAGGCCAT  
 TAGAGGCCAA  
 TACAGTGGGT TTGTAAGAAC TCTGTTCCAA CAAATGAGGG  
 ATGIGCTTGG  
 GACATTTGAT ACCGCACAGA TAATAAAACT TCTTCCCTTC  
 GCAGCCGCTC  
 CACCAAAGCA AAGTAGAATG CAGTTCTCCT CATTTACTGT  
 GAATGTGAGG  
 GGATCAGGAA TGAGAATACT TGTAAGGGGC AATTCTCCTG 40  
 TATTCAACTA  
 TAACAAGGCC ACGAAGAGAC TCACAGTTCT CGGAAAGGAT  
 GCTGGCACTT

【 0 1 0 6 】

【表 1 5】

TAAGTGAAGA CCCAGATGAA GGCACAGCTG GAGTGGAGTC  
CGCTGTTCTG  
AGGGGATTCC TCATTCTGGG CAAAGAAGAC AAGAGATATG  
GGCCAGCACT  
AAGCATCAAT GAACTGAGCA ACCTTGCGAA AGGAGAGAAG  
GCTAATGTGC  
TAATTGGGCA AGGAGACGTG GTGTTGGTAA TGAAACGGAA  
ACGGGACTCT  
AGCATACTTA CTGACAGCCA GACAGCGACC AAAAGAATTC  
GGATGGCCAT  
CAATTAGTGT CGAATAGTTT AAAAACGACC TTGTTTCTAC T  
(SEQ ID NO:3)

10

【 0 1 0 7】

【表 16】

NP

AGCAAAGCA GGGTAGATAA TCACTCACTG AGTGACATCA  
 AAATCATGGC GTCTCAAGGC ACCAAACGAT CTTACGAACA  
 GATGGAGACT  
 GATGGAGAAC GCCAGAATGC CACTGAAATC AGAGCATCCG  
 TCGGAAAAAT  
 GATTGGTGGA ATTGGACGAT TCTACATCCA AATGTGCACC  
 GAACTCAAAC  
 TCAGTGATTA TGAGGGACGG TTGATCCAAA ACAGCTTAAC  
 AATAGAGAGA  
 ATGGTGCTCT CTGCTTTTGA CGAAAGGAGA AATAAATACC  
 TTGAAGAACA  
 TCCAGTGCG GGGAAAGATC CTAAGAAAAC TGGAGGACCT  
 ATATACAGGA  
 GAGTAAACGG AAAGTGGATG AGAGAACTCA TCCTTTATGA  
 CAAAGAAGAA  
 ATAAGGCGAA TCTGGCGCCA AGCTAATAAT GGTGACGATG  
 CAACGGCTGG  
 TCTGACTCAC ATGATGATCT GGCATTCCAA TTTGAATGAT  
 GCAACTTATC  
 AGAGGACAAG AGCTCTTGT CGCACCGGAA TGGATCCCAG  
 GATGTGCTCT  
 CTGATGCAAG GTTCAACTCT CCCTAGGAGG TCTGGAGCCG  
 CAGGTGCTGC  
 AGTCAAAGGA GTTGAACAA TGGTGATGGA ATTGGTCAGA  
 ATGATCAAAC  
 GTGGGATCAA TGATCGGAAC TTCTGGAGGG GTGAGAATGG  
 ACGAAAAACA  
 AGAATTGCTT ATGAAAGAAT GTGCAACATT CTCAAAGGGA  
 AATTTCAAAC  
 TGCTGCACAA AAAGCAATGA TGGATCAAGT GAGAGAGAGC  
 CGGAACCCAG  
 GGAATGCTGA GTTCGAAGAT CTCACTTTTC TAGCACGGTC  
 TGCACTCATA  
 TTGAGAGGGT CGGTTGCTCA CAAGTCCTGC CTGCCTGCCT  
 GTGTGTATGG

10

20

30

【0108】

【表 1 7】

ACCTGCCGTA GCCAGTGGGT ACGACTTTGA AAGGGAGGGA  
TACTCTCTAG  
TCGGAATAGA CCCTTTCAGA CTGCTTCAAA ACAGCCAAGT  
GTACAGCCTA  
ATCAGACCAA ATGAGAATCC AGCACACAAG AGTCAACTGG  
TGTGGATGGC  
ATGCCATTCT GCCGCATTTG AAGATCTAAG AGTATTAAGC  
TTCATCAAAG  
GGACGAAGGT GCTCCAAGA GGAAGCTTT CCACTAGAGG  
AGTTCAAATT  
GCTTCCAATG AAAATATGGA GACTATGGAA TCAAGTACAC  
TTGAACTGAG  
AAGCAGGTAC TGGGCCATAA GGACCAGAAG TGGAGGAAAC  
ACCAATCAAC  
AGAGGGCATC TCGGGCCAA ATCAGCATAAC AACCTACGTT  
CTCAGTACAG  
AGAAATCTCC CTTTTGACAG AACAACCATT ATGGCAGCAT  
TCAATGGGAA  
TACAGAGGGG AGAACATCTG ACATGAGGAC CGAAATCATA  
AGGATGATGG  
AAAGTGCAAG ACCAGAAGAT GTGTCTTTCC AGGGGCGGGG  
AGTCTTCGAG  
CTCTCGGACG AAAAGGCAGC GAGCCCGATC GTGCCTTCCT  
TTGACATGAG  
TAATGAAGGA TCTTATTCT TCGGAGACAA TGCAGAGGAG  
TACGACAATT  
AAAGAAAAAT ACCCTTGTTT CTA  
(SEQ ID NO:4)

10

20

【 0 1 0 9】

30

【表 1 8】

M

AGCAAAGCA GGTAGATATT GAAAGATGAG TCTTCTAACC  
 GAGGTCGAAA  
 CGTACGTACT CTCTATCATC CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC  
 CGAGATCGCA  
 CAGAGACTTG AAGATGTCTT TGCAGGGAAG AACACCGATC  
 TTGAGGTTCT  
 CATGGAATGG CTAAAGACAA GACCAATCCT GTCACCTCTG  
 ACTAAGGGGA  
 TTTTAGGATT TGTGTTACG CTCACCGTGC CCAGTGAGCG  
 AGGACTGCAG  
 CGTAGACGCT TTGTCCAAAA TGCCCTTAAT GGAACGGGG  
 ATCCAAATAA  
 CATGGACAAA GCAGTTAAAC TGTATAGGAA GCTCAAGAGG  
 GAGATAACAT  
 TCCATGGGGC CAAAGAAATC TCACTCAGTT ATTCTGCTGG  
 TGCACTTGCC  
 AGTTGTATGG GCCTCATATA CAACAGGATG GGGGCTGTGA  
 CCACTGAAGT  
 GGCATTTGGC CTGGTATGTG CAACCTGTGA ACAGATTGCT  
 GACTCCCAGC

10

20

【 0 1 1 0】

【表 1 9】

ATCGGTCTCA TAGGCAAATG GTGACAACAA CCAATCCACT  
 AATCAGACAT  
 GAGAACAGAA TGGTTTTAGC CAGCACTACA GCTAAGGCTA  
 TGGAGCAAAT  
 GGCTGGATCG AGTGAGCAAG CAGCAGAGGC CATGGAGGTT  
 GCTAGTCAGG  
 CTAGACAAAT GGTGCAAGCG ATGAGAACCA TTGGGACTCA  
 TCCTAGCTCC  
 AGTGCTGGTC TGAAAAATGA TCTTCTTGAA AATTTGCAGG  
 CCTATCAGAA  
 ACGAATGGGG GTGCAGATGC AACGGTTCAA GTGATCCTCT  
 CACTATTGCC  
 GCAAATATCA TTGGGATCTT GCACTTGACA TTGTGGATTG  
 TTGATCGTCT  
 TTTTTTCAA TGCATTTACC GTCGCTTTAA ATACGGACTG  
 AAAGGAGGGC  
 CTTCTACGGA AGGAGTGCCA AAGTCTATGA GGAAGAATA  
 TCGAAAGGAA  
 CAGCAGAGTG CTGTGGATGC TGACGATGGT CATTTTGTCA  
 GCATAGAGCT  
 GGAGTAAAAA ACTACCTTGT TTCTACT  
 (SEQ ID NO:5)

30

40

【 0 1 1 1】

【表 2 0】

NS

AGCAAAAGCA GGGTGACAAA AACATAATGG ATCCAAACAC  
 TGTGTCAAGC  
 TTTCAGGTAG ATTGCTTTCT TTGGCATGTC CGCAAACGAG  
 TTGCAGACCA  
 AGAACTAGGC GATGCCCAT TCCTTGATCG GCTTCGCCGA  
 GATCAGAAAT  
 CCCTAAGAGG AAGGGGCAGT ACTCTCGGTC TGGACATCAA  
 GACAGCCACA  
 CGTGCTGGAA AGCAGATAGT GGAGCGGATT CTGAAAGAAG  
 AATCCGATGA  
 GGCACCTAAA ATGACCATGG CCTCTGTACC TGCCTCGCGT  
 TACCTAACTG  
 ACATGACTCT TGAGGAAATG TCAAGGGACT GGTCCATGCT  
 CATACCAAG  
 CAGAAAGTGG CAGGCCCTCT TTGTATCAGA ATGGACCAGG  
 CGATCATGGA  
 TAAGAACATC AACTGAAAG CGAACTTCAG TGTGATTTTT  
 GACCGGCTGG  
 AGACTCTAAT ATTGCTAAGG GCTTTCACCG AAGAGGGAGC  
 AATTGTTGGC  
 GAAATTCAC CATTGCCTTC TCTTCCAGGA CATACTGCTG  
 AGGATGTCAA  
 AAATGCAGTT GGAGTCCTCA TCGGAGGACT TGAATGGAAT  
 GATAACACAG  
 TTCGAGTCTC TGAAACTCTA CAGAGATTCG CTTGGAGAAG  
 CAGTAATGAG

10

20

【 0 1 1 2】

【表 2 1】

AATGGGAGAC CTCCACTCAC TCCAAAACAG AAACGAGAAA  
 TGGCGGGAAC  
 AATTAGGTCA GAAGTTTGAA GAAATAAGAT GGTTGATTGA  
 AGAAGTGAGA  
 CACAACTGA AGATAACAGA GAATAGTTTT GAGCAAATAA  
 CATTATGCA  
 AGCCTTACAT CTATTGCTTG AAGTGGAGCA AGAGATAAGA  
 ACTTTCTCGT  
 TTCAGCTTAT TTAGTACTAA AAAACACCCT TGTTTCTACT  
 (SEQ ID NO:6)

40

【 0 1 1 3】

【表 2 2】

HA

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAAACAACCAAAATGAAGGCAAACCT  
 ACTGGTCCTGTTATGTGCACTTGCAGCTGCAGAT  
 GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAAATTC AACCGACAC  
 TGTTGACACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGT  
 GACACACTCTGTTAACCTGCTCGAAGACAGCCACAACGGAAAACCTAT  
 GTAGATTA AAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGG  
 GGAAATGTAACATCGCCGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGAC  
 CCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCCTACATT  
 GTAGAAACACCAAACTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTT  
 CATCGACTATGAGGAGCTGAGGGAGCAATTGAG  
 CTCAGTGTTCATTCGAAAGATTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCT  
 CATGGCCCAACCACAACACAAACGGAGTAACGG  
 CAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTTTACAGAAATTTGCTA  
 TGGCTGACGGAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAG  
 CTGAAAAATTCTTATGTGAACAAAAAGGGAAAGAAGTCCTTGTACT  
 GTGGGGTATTCATCACCCGCTAACAGTAAGGA  
 ACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGA  
 CTTCAAATTATAACAGGAGATTTACCCCGGAAA  
 TAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTA  
 TFACTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATA  
 ATATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCACCAATGTATGCTTTCGC  
 ACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCAC  
 CTCAAACGCATCAATGCATGAGTGTAACACGAAGTGCAAAACACCCC  
 TGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGA  
 ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAATACGTCAGGAGT  
 GCCAAATTGAGGATGGTTACAGGACTAAGGAAC  
 ATTCCGTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTT  
 ATTGAAGGGGGATGGACTGGAATGATAGATGG  
 ATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGGGATCAGGCTATGCAG  
 CGGATCAAAAAGCACACAAAATGCCATTAACG  
 GGATTACAAACAAGGTGAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAA  
 TTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTC AACAAATTA  
 GAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTTCT  
 GGACATTTGGACATATAATGCAGAATTGTTAGT  
 TCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGA  
 AGAATCTGTATGAGAAAAGTAAAAAGCCAATTA  
 AGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGTTTTGAGTTCTACCAC  
 AAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGTAAGA

10

20

30

【 0 1 1 4】

【表 2 3】

AATGGGACTTATGATTATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAA  
 CAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAATTGGAATC  
 AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTC  
 ACTGGTGCTTTTGGTCTCCCTGGGGGCAATCA  
 GTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT  
 GAGATTAGAATTCAGAGATATGAGGAAAAAC  
 ACCCTTGTTTCTACT (SEQ ID NO:7)

40

【 0 1 1 5】

50

【表 2 4】

NA

AGCAAAAGCAGGGGTTTAAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC  
 CATTGGATCAATCTGTCTGGTAGTCGGACTAATT  
 AGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCA  
 TTCAATTCAAACCTGGAAGTCAAACCATACTGG  
 AATATGCAACCAAACATCATTACCTATAAAAATAGCACCTGGGTAA  
 AGGACACAACCTCAGTGATATTAACCGGCAATT  
 CATCTCTTTGTCCCATCCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAAT  
 AGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTT  
 GTCATAAGAGAGCCCTTTATTTTCATGTTCTCACTTGAATGCAGGACC  
 TTTTTICTGACCCAAGGTGCCTTACTGAATGA  
 CAAGCATTCAAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCT  
 TAATGAGCTGCCCTGTCGGTGAAGCTCCGTCCC  
 CGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGGTCAGCAAGTGCATGTC  
 ATGATGGCATGGGCTGGCTAACAAATCGGAATT  
 TCAGGTCCAGATAATGGAGCAGTGGCTGTATTTAAAATACAACGGCAT  
 AATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAA  
 AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAAATGGTTTCAT  
 GTTTTACTATAATGACTGATGGCCCGAGTGATG  
 GGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACT  
 AAATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCAC  
 TATGAGGAATGTTCTGTTACCCTGATACCGGCAAAGTGATGTGTGT  
 GTGCAGAGACAATTGGCATGGTTCGAACCGGCC  
 ATGGGTGTCTTTTCGATCAAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCT  
 GCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAACCCCGTCCC  
 AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGTATGTTGATGGAGCAAAC  
 GGAGTAAAGGGATTTTCATATAGGTATGGTAAT  
 GGTGTTTGGATAGGAAGGACCAAAAGTCACAGTCCAGACATGGGTT  
 TGAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGA  
 GACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAAGATGTTGTGGCAATGACTG  
 ATTGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAAC  
 ATCCTGAGCTGACAGGGCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTT  
 GAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAAACA  
 ATCTGGACTAGTGCAGCAGCATTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTGAT  
 ACTGTAGATTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGA  
 GTTGCCATTGAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACTCCTTGTTT  
 CTAAT (SEQ ID NO:8)

10

20

30

## 【0116】

インフルエンザ・ウイルスA/Hong Kong/213/2003(H5N1, HK213)は、ニワトリ内で全身  
 で複製し、致死感染を引き起こす。さらに、このウイルスは、ニワトリの胚に対して致  
 死性である。したがって、その表面タンパク質は、最近広まっている病原性トリ・インフ  
 ルエンザ・ウイルスに密接に関連するけれども、HK213は、ワクチン株としては使用  
 できない。なぜなら、有胚ニワトリ卵内でそれを増殖させる試みは、低品質の羊膜液の生  
 産をもたらすからである。さらに、ワクチン製造におけるこの高く有害なウイルスの使用  
 は、ワクチン製造従事者にとって安全でない。マスター・ウイルス株としてA/PR/8/34を  
 使用することの実行可能性を試験するために、(多数の塩基性アミノ酸を含有する)HK  
 213のヘマグルチニン(HA)遺伝子の開裂部位を、毒性から無毒性表現型に(RER  
 R R K K R (配列番号9)から-T E T Rまで)突然変異させた。突然変異したHA遺伝  
 子を含むウイルスは、ニワトリにおいて非致死性の、局所的感染を作り出した。さらに、  
 突然変異したウイルスは、ニワトリの胚に対して非致死性であった。したがって、有胚卵

40

50



内での突然変異したウイルスの増殖は、高品質の尿膜液をもたらし、そしてこの弱毒型において、当該ウイルスはワクチン製造にとって安全である。

【 0 1 1 7 】

ノイラミニダーゼ ( N A ) 及び H K 2 1 3 からの突然変異 H A 遺伝子、並びに高力価 A / P R / 8 / 3 4 ( H 1 N 1 , H G - P R 8 ) ウイルス ( 実施例 2 ) からの残余遺伝子の全てを含む組換えウイルスであって、卵内で他の A / P R / 8 / 3 4 P R 8 株よりも 1 0 倍良好に増殖する (  $10^{1.0}$  E I D  $_{50}$  / m l ; H A 力価 : 1 : 8 , 0 0 0 ) ものを、有胚ニワトリ卵内で生成した。最近広まっている病原性トリ・インフルエンザ・ウイルスに関連する表面タンパク質を発現するこの組換えウイルスは、有胚ニワトリ卵内で高力価に増殖した ( 図 4 ) 。したがって、H G - P R 8 の H A 及び N A 遺伝子を、インフルエンザ・ウイルスの最近広まっている株の

10

【 0 1 1 8 】

参考文献

【表 2 5】

Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical

Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD (1987).

20

Aymard-Henry et al., Virology: A Practical Approach, Oxford IRL Press, Oxford, 119-150 (1985).

Bachmeyer, Intervirology, 5:260 (1975).

【 0 1 1 9 】

## 【表 2 6】

- Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck & Co., Rahway, NJ (1992).
- Bridgen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93:15400 (1996).
- Castrucci et al., J. Virol., 66:4647 (1992).
- Castrucci et al., J. Virol., 69:2725 (1995).
- Conzelmann et al., J. Gen. Virol., 77:381 (1996).
- Conzelmann et al., Trends Microbiol., 4:386 (1996). 10
- Conzelmann, Annu. Rev. Genet., 32:123 (1998).
- Cozelmann et al., J. Virol., 68:713 (1994).
- Edwards, J. Infect. Dis., 169: 68 (1994).
- Enami et al., J. Virol., 65:2711 (1991).
- Enami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:3802 (1990).
- Enami et al., Virology, 185:291 (1991).
- Fodor et al., J. Virol., 73:9679 (1999).
- Goto et al., Virology, 238:265 (1997). 20
- Grand and Skehel, Nature, New Biology, 238:145 (1972).
- Hatta et al., Science, 293:1840 (2001).
- Horimoto et al., J. Virol., 68:3120 (1994).
- Huddleston et al., Nucl. Acids Res., 10:1029 (1982).
- Keitel et al., in Textbook of Influenza, eds. Nickolson, K. G., Webster, R. G., and Hay, A. (Blackwell, Oxford), pp. 373-390 (1998).
- Kendal et al., Infect. Immunity, 29:966 (1980).
- Kilbourne, Bull. M2 World Health Org., 41: 653 (1969).
- Kovesdi et al., J. Curr. Opin. Biotechnol., 8:583 (1997). 30
- Laver & Webster, Virology, 69:511 (1976).
- Lawson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92:4477 (1995).
- Li et al., Virus Res., 37:153 (1995).
- Luytjes et al., Cell, 59:1107 (1989).
- Marriott et al., Adv. Virus Res., 53:321 (1999).
- Mena et al., J. Virol., 70:5016 (1996).
- Mizrahi, (ed.), Viral Vaccines, Wiley-Liss, New York, 39-67 (1990).
- Murphy, Infect. Dis. Clin. Pract., 2: 174 (1993). 40
- Muster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5177 (1991).
- Munoz et al., Antiviral Res., 46:91 (2000).

## 【表 27】

- Nagai et al., Microbiol. Immunol., 43:613 (1999).
- Nagai, Rev. Med. Virol., 9:83 (1999).
- Neumann et al., Adv. Virus Res., 53:265 (1999).
- Neumann et al., J. Gen. Virol., 83:2635 (2002).
- Neumann et al., J. Virol., 71:9690 (1997).
- Neumann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96:9345 (1999). 10
- Neumann et al., Virology, 202:477 (1994).
- Neumann et al., Virology, 287:243 (2001).
- Niwa et al., Gene, 108:193 (1991).
- Ogra et al., J. Infect. Dis., 134: 499 (1977).
- Osol (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 1324-1341 (1980).
- Parks et al., J. Virol., 73:3560 (1999).
- Pekosz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96:8804 (1999). 20
- Perez et al., Virology, 249:52 (1998).
- Pleschka et al., J. Virol., 70:4188 (1996).
- Radecke et al., EMBO J., 14:5773 (1995).
- Roberts et al., Virology, 247:1 (1998).
- Robertson et al., Biologicals, 20:213 (1992).
- Robertson et al., Giornale di Igiene e Medicina Preventiva, 29:4 (1988).
- Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93:14998 (1996).
- Schnell et al., EMBO J., 13:4195 (1994). 30
- Subbarao et al., J. Virol., 67:7223 (1993).
- World Health Organization TSR No. 673 (1982).

## 【0121】

出版物、特許および特許出願は全て、参照により本明細書中で援用される。上記の明細書中で、そのある種の好ましい実施形態に関連して本発明を説明し、多数の詳細を例示の目的のために記述してきたが、本発明がさらなる実施形態を受け入れ可能であり、そして本明細書中に記載した詳細のあるものは、本発明の基本原理を逸脱しない限りかなり変更され得る、ということは当業者には明らかである。 40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0122】

【図1】図1. 確立された逆遺伝学系の模式図である。RNPトランスフェクション法(A)では、*in vitro*合成vRNAを用いて精製NPおよびポリマーゼタンパク質をRNPに集合させる。細胞をRNPでトランスフェクトし、その後ヘルパーウイルス感染させる。RNAポリマーゼI法(B)では、RNAポリマーゼIプロモーター、救済されるべきvRNAをコードするcDNA、およびRNAポリマーゼIターミネーターを含有するプラスミドを細胞中にトランスフェクトする。RNAポリマーゼIによる細胞内転写は、合成vRNAを産生し、これはヘルパーウイルスによる感染時に子孫ウイルス 50

粒子中に包装される。両方法を用いて、ヘルパーウイルス集団から、トランスファクタント・ウイルス（即ちクローン化 cDNA 由来の RNA を含有するもの）を選択する。

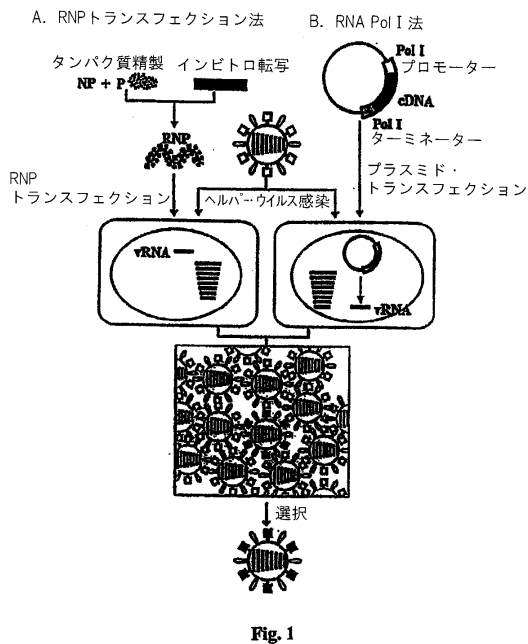
【図2】図2. RNAポリメラーゼI構築物の生成の模式図。インフルエンザウイルス由来の cDNA を PCR により増幅し、BsmBI で消化し、そして pHH21 ベクターの BsmBI 部位中にクローン化した (E. Hoffmann, Ph.D. thesis, Justus, Liebig-University, Giessen, Germany) が、これは、ヒト RNA ポリメラーゼ I プロモーター (P) およびマウス RNA ポリメラーゼ I ターミネーター (T) を含有する。ターミネーター配列の上流のチミジンヌクレオチド (\*T) は、インフルエンザウイルス RNA の 3' 末端を表す。A 型インフルエンザウイルス配列は、太字で示されている (配列番号 29 ~ 40)。

10

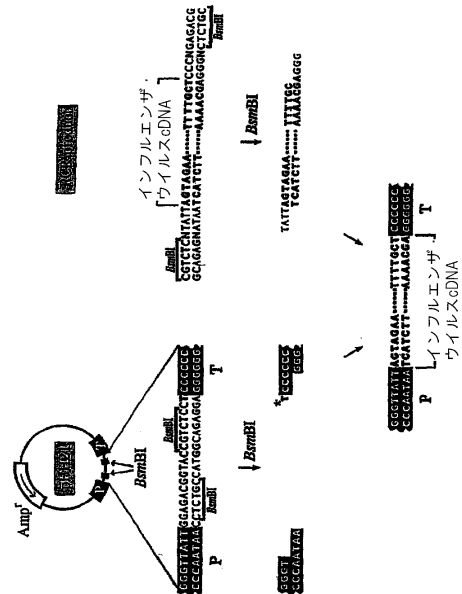
【図3】図3. セグメント化ネガティブ・センス RNA ウイルスを生成するための提唱された逆遺伝学法。RNAポリメラーゼIプロモーター、8つのウイルスRNAセグメントの各々に関する cDNA、および RNAポリメラーゼIターミネーターを含有するプラスミドを、タンパク質発現プラスミドと一緒に、細胞中にトランスフェクトする。感染性ウイルスは PA、PB1、PB2 および NP を発現するプラスミドを用いて精製し得るが、しかし残りの構造タンパク質 (大括弧内に示される) 全ての発現は、生成されるウイルスによってウイルス産生の効率を増大する。

【図4】図4. 各種インフルエンザ・ウイルスの力価。

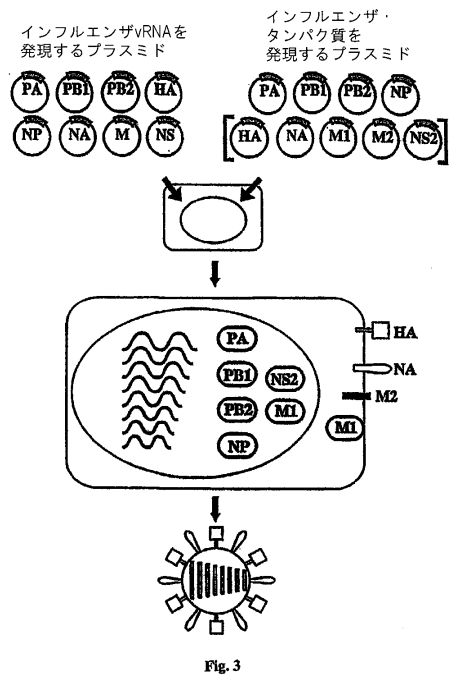
【図1】



【図2】

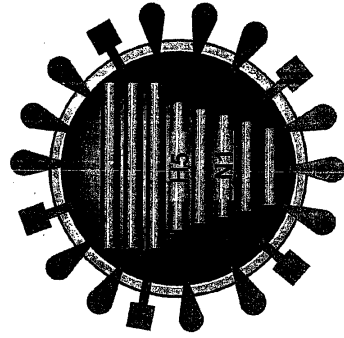


【 図 3 】



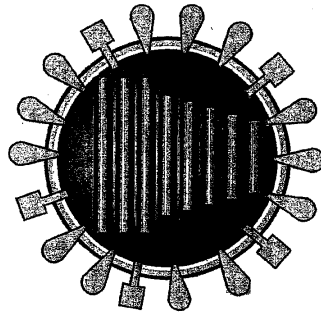
【 図 4 】

H5N1-PR8



10<sup>10</sup>ED<sub>50</sub>/ml  
HA力価：1：3,200

A/PR/8/34 (H1N1)



10<sup>10</sup>ED<sub>50</sub>/ml  
HA力価：1：8,000

【 配 列 表 】

[0005215561000001.app](#)

[0005215561000002.xml](#)

## フロントページの続き

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 河岡 義裕

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 5 6 2 , ミドルトン, エアポート ロード 8 7 2 2

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第00/060050 (WO, A1)

国際公開第1999/028445 (WO, A1)

Vaccine, 2002年, Vol.20, p.3165-3170

Virology, 2003年 1月, Vol.305, p.192-200

Journal of Virology, 2000年, Vol.71, No.1, p.547-551

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2002年, Vol.99, No.17, p.11411-11416

Phil.Trans.R.Soc.Lond.B, 2001年, Vol.356, p.1965-1973

Rev.Med.Virol., 2002年, Vol.12, p.13-30

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12N 7/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq