

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-514197

(P2024-514197A)

(43)公表日 令和6年3月28日(2024.3.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-563191(P2023-563191)	(71)出願人	515230154
(86)(22)出願日	令和4年4月15日(2022.4.15)		ゾエティス・サービシーズ・エルエルシ
(85)翻訳文提出日	令和5年12月7日(2023.12.7)		ー
(86)国際出願番号	PCT/US2022/024941		アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7
(87)国際公開番号	WO2022/221612		0 5 4 , パーシパニー , シルバン・ウ
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)		エイ 1 0
(31)優先権主張番号	202110412008.9	(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和3年4月16日(2021.4.16)		弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100196508
			弁理士 松尾 淳一
		(74)代理人	100135415
			弁理士 中濱 明子
		(72)発明者	リウ, キャオラン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 仮性狂犬病ウイルスワクチン

(57)【要約】

本開示は、弱毒化ブタヘルペスウイルス1（仮性狂犬病ウイルス）であって、そのTK、gI、及びgE遺伝子が、親野外株に対して修飾されており、その結果得られたウイルスが、ブタ動物を毒性の仮性狂犬病ウイルスによる攻撃から保護する生ワクチンとしての使用に安全かつ有効である、弱毒化ブタヘルペスウイルス1（仮性狂犬病ウイルス）を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

弱毒化ブタヘルペスウイルス 1 (仮性狂犬病ウイルス) であって、その T K、g I、及び g E 遺伝子が、親野外株に対して修飾されており、その結果得られたウイルスが、ブタ動物を毒性の仮性狂犬病ウイルスによる攻撃から保護する生ワクチンとしての使用に安全かつ有効であり、前記親株が、株 F S 1 8 (配列番号 1)、株 J S 2 0 1 2 (配列番号 2)、株 T J (GenBank アクセッション番号 K J 7 8 9 1 8 2)、株 H e N 1 (GenBank アクセッション番号 K P 0 9 8 5 3 4)、株 H L J 8 (GenBank アクセッション番号 K T 8 2 4 7 7 1)、株 H N 1 2 0 1 (GenBank アクセッション番号 K P 7 2 2 0 2 2)、及び配列番号 1 又は配列番号 2 と少なくとも 8 5 % 同一であるヌクレオチド配列からコードされる任意の株からなる群から選択される、弱毒化ブタヘルペスウイルス 1 (仮性狂犬病ウイルス)。

10

## 【請求項 2】

U S 1、U S 2、及び U S 9 遺伝子のうちの 1 つ以上の弱毒化修飾を更に含むが、ただし、U S 2 及び U S 9 遺伝子のうちの少なくとも 1 つが修飾されていないことを条件とする、請求項 1 に記載のウイルス。

## 【請求項 3】

U S 1、U S 2、及び U S 9 遺伝子が、非修飾である、請求項 1 に記載のウイルス。

## 【請求項 4】

前記弱毒化遺伝子修飾が、完全若しくは部分的な欠失、フレームシフト変異、ヌクレオチド交換、又は挿入を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のウイルス。

20

## 【請求項 5】

前記 F S 1 8 株 (配列番号 1 によってコードされる) 又は前記 J S 2 0 1 2 株 (配列番号 2 によってコードされる) に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のウイルス。

## 【請求項 6】

配列番号 3、又はそれと少なくとも 8 5 % 同一である配列によってコードされており、前記配列が、

- a) U L 2 3 遺伝子ヌクレオチド 4 8 0 ~ 8 4 6 の欠失 (分離株 M 1 7 0 7)、又は
- b) U L 2 3 遺伝子ヌクレオチド 5 2 6 ~ 6 0 7 の欠失 (分離株 M 1 7 0 5)、又は
- c) U L 2 3 遺伝子ヌクレオチド 2 8 0 ~ 7 2 3 の欠失 (分離株 M 1 7 0 8)、又は
- d) U L 2 3 遺伝子ヌクレオチド 3 6 4 ~ 6 1 5 の欠失 (分離株 M 1 7 1 0)、又は
- e) 「a」、「b」、「c」、若しくは「d」の欠失のうちのいずれかを含む U L 2 3 遺伝子における欠失、を含む、請求項 1 に記載のウイルス。

30

## 【請求項 7】

前記 g E、U S 9、及び U S 2 遺伝子が、完全に欠失し、前記 g I 及び T K 遺伝子が、少なくとも部分的に欠失し、U S 1 遺伝子の 1 つ以上のコピーが、少なくとも部分的に欠失している、請求項 2 に記載のウイルス。

## 【請求項 8】

弱毒化ブタヘルペスウイルス I (仮性狂犬病ウイルス) であって、前記ウイルスが、株 F S 1 8 (配列番号 1)、株 J S 2 0 1 2 (配列番号 2)、株 T J (GenBank アクセッション番号 K J 7 8 9 1 8 2)、株 H e N 1 (GenBank アクセッション番号 K P 0 9 8 5 3 4)、株 H L J 8 (GenBank アクセッション番号 K T 8 2 4 7 7 1)、若しくは株 H N 1 2 0 1 (GenBank アクセッション番号 K P 7 2 2 0 2 2)、又は配列番号 1 若しくは配列番号 2 と少なくとも 8 5 % 同一であるヌクレオチド配列からコードされる任意の株に由来し、前記弱毒化物が、DNA 配列からコードされており、前記 DNA 配列が、以下の欠失：

40

g E 遺伝子については、O R F のヌクレオチドの全てが欠失し、

g I 遺伝子については、1 1 0 1 ヌクレオチド O R F の少なくともヌクレオチド 2 6 9 ~ 1 1 0 1 が欠失し、

50



t t c g g c g c g t a c a a g g c g c c c g a g c t c t g c g a c c g g c  
g c g g g c g c c c g c t c g a g g t g c a c g c g t g g g c g a t g g a  
c g c g c t c g t g g c c a a g c t g c t g c c g c t g c g c g t c t c  
c a c c g t c g a c c t g g g g c c c t c g c c ( 配列番号 6 )、又は前記配列  
が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 2 1】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 J S 2 0 1 2ヌクレオチド 5 2 6  
~ 6 0 7 ( c g c c t g c t c a c g g c c c t g c g c a a c g t c t a c g c c a t  
g c t g g t c a a c a c g t c g c g c t a c c t g a g c t c g g g g c g c c g c  
t g g c g、配列番号 7 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより大きな  
配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

10

【請求項 2 2】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 J S 2 0 1 2ヌクレオチド 2 8 0  
~ 7 2 3 ( g g g c c c g c g g t c g a g g g c c c g c c c g a g a t g a c g g t  
c g t c t t t g a c c g c c a c c c g g t g g c c g c g a c g g t g t g c t t c  
c c g c t g g c g c g c t t c a t c g t c g g g g a c a t c a g c g c g g c g g  
c c t t c g t g g g c c t g g c g g c c a c g c t g c c c g g g g a g c c c c c  
c g g c g g c a a c c t g g t g g t g g c c t c g c t g g a c c c g g a c g a g  
c a c c t g c g g c g c c t g c g c g c c c g c g c g c g c c g g g g a g c  
a c g t g g a c g c g c g c c t g c t c a c g g c c c t g c g c a a c g t c t a  
c g c c a t g c t g g t c a a c a c g t c g c g c t a c c t g a g c t c g g g g  
c g c c g c t g g c g c g a c g a c t g g g g g c g c g c g c c g c g c t t c g  
a c c a g a c c g t g c g c g a c t g c c t c g c g c t c a a c g a g c t c t g  
c c g c c c g c g c g a c g a c c c c g a g c t c c a g g a c a c c c t c t t c  
g g c g c g t a c、配列番号 8 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のよ  
り大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

20

【請求項 2 3】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 J S 2 0 1 2ヌクレオチド 3 6 4  
~ 6 1 5 ( c g c t t c a t c g t c g g g g a c a t c a g c g c g g c g g c c t t  
c g t g g g c c t g g c g g c c a c g c t g c c c g g g g a g c c c c c c g g c  
g g c a a c c t g g t g g t g g c c t c g c t g g a c c c g g a c g a g c a c c  
t g c g g c g c c t g c g c g c c c g c g c g c g c c g g g g a g c a c g t  
g g a c g c g c g c c t g c t c a c g g c c c t g c g c a a c g t c t a c g c c  
a t g c t g g t c a a c a c g t c g c g c t a c c t g a g c t c g g g g c g c c  
g c t g g c g c g a c g a c t g g、配列番号 9 )、又は前記配列が含まれる前記 T K  
遺伝子の任意のより大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

30

【請求項 2 4】

前記 U S - 1 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列番号 4 に類似する F S 1  
8 からの配列、又は前記配列が含まれる前記 U S - 1 遺伝子の任意のより大きな配列であ  
る、請求項 2 に記載のウイルス。

40

【請求項 2 5】

前記 U S - 1 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列番号 5 に類似する F S 1  
8 からの配列、又は前記配列が含まれる前記 U S - 1 遺伝子の任意のより大きな配列であ  
る、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 2 6】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 F S 1 8 / M 1 7 0 7ヌクレオチ  
ド 4 8 0 ~ 8 4 6 ( 配列番号 6 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより  
大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 2 7】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 F S 1 8 / M 1 7 0 5ヌクレオチ

50

ド 5 2 6 ~ 6 0 7 ( 配列番号 7 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 2 8】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 F S 1 8 / M 1 7 0 8 ヌクレオチド 2 8 0 ~ 7 2 3 ( 配列番号 8 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 2 9】

T K 遺伝子のヌクレオチド配列における欠失が、配列 F S 1 8 / M 1 7 1 0 ヌクレオチド 3 6 4 ~ 6 1 5 ( 配列番号 9 )、又は前記配列が含まれる前記 T K 遺伝子の任意のより大きな配列である、請求項 2 に記載のウイルス。

10

【請求項 3 0】

請求項 1 又は 2 に記載のウイルスをコードする、分離された D N A ポリヌクレオチド分子。

【請求項 3 1】

宿主細胞を直接トランスフェクトすることができるプラスミドであって、請求項 3 0 に記載の D N A ポリヌクレオチド分子と、前記コード配列の転写を可能にすることができるプロモーターと、を含む、プラスミド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

本発明は、概して、仮性狂犬病ウイルスに対するワクチンの分野におけるものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

仮性狂犬病ウイルス ( P R V ) は、世界中の多くの種の動物を感染させる疾患である。P R V 感染症は、感染性延髄麻痺、オーエスキー病、及びマッド・イッチ ( m a d i t c h ) と様々に呼ばれている。P R V 感染の臨床的徴候としては、中絶、子豚の高い死亡率、並びに子豚及び成熟豚の咳、くしゃみ、発熱、便秘、うつ病、発作、運動失調、旋回、及び過剰な唾液分泌が挙げられる。1 ヶ月齢未満の子豚の死亡率は 1 0 0 % に近いが、1 か月齢 ~ 6 か月齢の豚においては 1 0 % 未満である。妊娠中のブタは、それらの胎児を再吸収するか、又はミイラ化した、死産した、若しくは弱った子豚を産む場合がある。ウシでは、症状としては、激しい痒み、続いて神経学的徴候、及び死が挙げられる。イヌでは、症状としては、激しい痒み、顎及び咽頭の麻痺、遠吠え、並びに死などの症状が挙げられる。任意の感染した第二宿主は、一般に、2 ~ 3 日しか生きられない。搔痒又は痒みは、ウイルスが搔痒の部位に見出されたことがないため、幻肢感覚とみなされる。

30

【0 0 0 3】

感染症は、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ラット、及びミンクなどの重要な家畜におけるものが知られている。宿主の範囲は非常に広く、ほとんどの哺乳動物、及び実験的には少なくとも多くの種類の鳥類が挙げられる ( 宿主の詳細なリストについては、D . P . G u s t a f s o n , " P s e u d o r a b i e s " , D i s e a s e s o f S w i n e , 5 t h e d . , A . D . L e m a n e t a l . , e d s . , ( 1 9 8 1 ) を参照のこと)。しかしながら、成熟ブタ及び場合によりラットは、この疾患によって死滅することはなく、したがって担体である。しかしながら、他の種については、この疾患は、致命的である。

40

【0 0 0 4】

ブタの集団は、特に P R V に感染しやすい。成熟ブタはめったに症状を示さないが、又は疾患から死ぬことはないが、子豚は感染すると急性的に病にかかり、通常、特定の臨床的徴候なしに 2 4 ~ 4 8 時間で死亡することが多い ( T . C . J o n e s a n d R . D . H u n t , V e t e r i n a r y P a t h o l o g y , 5 t h e d . , L e a & F e b i g e r ( 1 9 8 3 ) ) 。

【0 0 0 5】

50

PRVは、ヘルペスウイルスである。PRVゲノムは、2つの特異領域（UL及びUS）によって特徴付けられ、US領域は、内部反復配列及び末端反復配列（それぞれ、IRS及びTRS）に隣接する。PRVゲノム全体の配列及び遺伝子配置は知られており、実験データによって十分に裏付けられた、可能性のある転写機構のマップが確立されている。逆位反復部間の組換えは、反対の向き（US領域）を有するゲノムの2つの可能な異性体を生成することができる。70の異なる遺伝子の機能が特定されている。PRVの一般の生物学及びその作用機序については、Pomeranz et al, Microbiol. And Mol. Biol. Reviews 205, Sept., 462-500を参照のこと。

#### 【0006】

PRVワクチンは種々の技法によって生成されており、ヨーロッパの流行地域では15年超にわたってワクチン接種が実践されている。ワクチン接種によって損失は減少しているが、ワクチン接種により、環境内でウイルスが維持されている。毒性のウイルスに曝露されるワクチン接種された動物は、感染を生き延び、次いでより毒性が高いウイルスを排出する場合がある。したがって、ワクチン接種された動物は、再発し得る潜在的な感染症を抱えている場合がある。（上記のD. P. Gustafsonを参照のこと）。

#### 【0007】

PRVに対する弱毒化生ワクチン及び不活性化ワクチンは、米国で市販されており、USDAによって承認されている（C. E. Aronson, ed., Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, (1983)を参照のこと）。

#### 【0008】

PRVに対する弱毒化生ワクチン及び不活性化ワクチンは、米国で市販されており、USDAによって承認されている（C. E. Aronson, ed., Veterinary Pharmaceuticals & Biologicals, (1983)を参照のこと）。それにもかかわらず、新規のPRVワクチン、及び特に、安全かつ有効である弱毒化生ワクチンの必要性が依然としてある。

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

一態様では、本発明は、弱毒化ブタヘルペスウイルス1（仮性狂犬病ウイルス）であって、そのTK、gI、及びgE遺伝子が、親野外株に対して修飾されており、その結果得られたウイルスが、ブタ動物を毒性の仮性狂犬病ウイルスによる攻撃から保護する生ワクチンとしての使用に安全かつ有効であり、上記親株が、株FS18（配列番号1）、株JS2012（配列番号2）、株TJ（GenBankアクセッション番号KJ789182）、株HeN1（GenBankアクセッション番号KP098534）、株HLJ8（GenBankアクセッション番号KT824771）、株HN1201（GenBankアクセッション番号KP722022）、及び配列番号1又は配列番号2と少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列からコードされる任意の株からなる群から選択される、弱毒化ブタヘルペスウイルス1（仮性狂犬病ウイルス）を提供する。ある特定の実施形態では、ウイルスは、US1、US2、及びUS9遺伝子のうちの1つ以上の弱毒化修飾を更に含むが、ただし、US2及びUS9遺伝子のうちの少なくとも1つが修飾されていないことを条件とする。

#### 【0010】

ある特定の実施形態では、ウイルスは、配列番号3、又はそれと少なくとも85%同一である配列によってコードされており、この配列が、a) UL23遺伝子ヌクレオチド480~846の欠失（分離株M1707）、又はb) UL23遺伝子ヌクレオチド526~607の欠失（分離株M1705）、又はc) UL23遺伝子ヌクレオチド280~723の欠失（分離株M1708）、又はd) UL23遺伝子ヌクレオチド364~615の欠失（分離株M1710）、又はe) 「a」、「b」、「c」、若しくは「d」の欠失のうちのいずれかを含むUL23遺伝子における欠失、を含む。

10

20

30

40

50

## 【0011】

別の態様では、本発明は、弱毒化ブタヘルペスウイルスI（仮性狂犬病ウイルス）であって、ウイルスが、株FS18（配列番号1）、株JS2012（配列番号2）、株TJ（GenBankアクセッション番号KJ789182）、株Hen1（GenBankアクセッション番号KP098534）、株HLJ8（GenBankアクセッション番号KT824771）、若しくは株HN1201（GenBankアクセッション番号KP722022）、又は配列番号1若しくは配列番号2と少なくとも85%同一であるヌクレオチド配列からコードされる任意の株に由来し、上記弱毒化物が、DNA配列からコードされており、このDNA配列が、以下の欠失：gE遺伝子については、ORFのヌクレオチドの全てが欠失し、gI遺伝子については、1101ヌクレオチドORFの少なくともヌクレオチド269～1101が欠失し、TK遺伝子については、963ヌクレオチドORFから、526～607位、480～846位、280～723位、及び364～615位からなるヌクレオチド配列から欠失が選択される、を含む、弱毒化ブタヘルペスウイルスI（仮性狂犬病ウイルス）を提供する。

10

## 【0012】

ある特定の実施形態では、ウイルスは、US2遺伝子の完全な欠失、US9遺伝子の完全な欠失、並びにUS1遺伝子の1260ヌクレオチドORFの少なくともヌクレオチド909～1034及び/又は少なくともヌクレオチド301～315の欠失を更に含む。他の実施形態では、US1、US2、及びUS9遺伝子は、修飾されていない。ある特定の実施形態では、ウイルスは、配列番号3（M1707）又はそれと少なくとも85%同一の配列によってコードされている。

20

## 【0013】

第3の態様では、本発明は、本発明の第1及び/又は第2の態様の任意の実施形態によるウイルスをコードする分離されたDNAポリヌクレオチド分子を提供する。

## 【0014】

第4の態様では、本発明は、宿主細胞を直接トランスフェクトすることができるプラスミドであって、本発明の第3の態様によるDNAポリヌクレオチド分子と、上記コード配列の転写を可能にすることができるプロモーターと、を含む、プラスミドを提供する。

## 【0015】

本発明の第5の態様では、本発明の第1又は第2の態様の実施形態のうちのいずれかによるウイルスを含むワクチンが提供される。

30

## 【0016】

第6の態様では、本発明は、ブタ動物を仮性狂犬病感染から保護する方法であって、本発明の第5の態様の実施形態のうちのいずれかによるワクチンを上記ブタ動物に投与することを含む、方法を提供する。ある特定の実施形態では、ワクチンの各用量は、ウイルスの $10^4 \cdot 5$ 及び $10^9$ TCID<sub>50</sub>、好ましくは、約 $10^7$ TCID<sub>50</sub>を含む。好ましくは、ウイルスは、配列番号3によってコードされる分離株M1707である。異なる実施形態では、上記ブタ動物は、雄豚、雌豚、未經産豚、又は子豚である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0017】

本明細書には、以下の定義及び導入事項が適用可能である。

40

## 【0018】

文脈が別途明確に指示しない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」は、複数の指示語を含む。同様に、文脈が別途明確に指示しない限り、「又は」という単語は、「及び」を含むことが意図される。「又は」という単語は、特定のリストの任意の1つのメンバーを意味し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含む。

## 【0019】

「アジュバント」という用語は、ワクチンの有効性を強化する化合物を指し、免疫剤を含む製剤に添加され得る。アジュバントは、単回用量のみのワクチンの投与後でさえ、強化された免疫応答を提供する。アジュバントとしては、例えば、ムラミルジペプチド、ピ

50

リジン、水酸化アルミニウム、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド ( D D A )、油、水中油型エマルジョン、サポニン、サイトカイン、及び当該技術分野で知られている他の物質が挙げられ得る。好適なアジュバントの例は、米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 1 3 8 1 7 A 1 号に記載されている。「アジュバント化物 ( A d j u v a n t e d )」は、アジュバントを組み込むか、又はアジュバントと組み合わせられる組成物を指す。

【 0 0 2 0 】

「抗体」は、F a b 又は他の免疫グロブリン発現ライブラリの生成物を含む、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、キメラ及び一本鎖抗体、並びに F a b 断片を指す。抗体に関して、「免疫学的に特異的な」という用語は、目的のタンパク質の 1 つ以上のエピトープに結合するが、抗原性生体分子の混合集団を含有する試料中の他の分子を実質的に認識及び結合しない抗体を指す。

10

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用される「弱毒化された」P R V は、感受性宿主において感染及び / 又は複製することができるが、感染しやすい宿主に対して非病原性であるか、又はより低い病原性である P R V を指す。例えば、弱毒化ウイルスは、関連する野外で分離された株と比較して、観察可能 / 検出可能な臨床的病態、若しくはより少ない臨床的病態、若しくはより少ない重篤な臨床的病態を引き起こさないか、又はウイルス複製効率及び / 又は感染力の低下を示し得る。P R V 感染症の臨床的病態としては、子豚及び成熟豚の咳、くしゃみ、発熱、便秘、うつ病、発作、運動失調、前回、及び過剰な唾液分泌が挙げられ得るが、これらに限定されない。

20

【 0 0 2 2 】

「エピトープ」は、宿主に投与されると、体液型 ( B 細胞 ) 及び / 又は細胞型 ( T 細胞 ) の免疫応答を惹起することができるという意味で、免疫学的に活性である抗原性決定基である。これらは、抗原性である分子上の特定の化学基又はペプチド配列である。抗体は、ポリペプチド上の特定の抗原性エピトープに特異的に結合する。動物では、ほとんどの抗原は、いくつか、又は更には多くの抗原性決定基を同時に提示するであろう。そのようなポリペプチドはまた、免疫原性ポリペプチドとして認定することができ、エピトープは、更に記載されるように特定することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の目的のために、第 2 のポリヌクレオチド分子 ( R N A 又は D N A のいずれか ) のヌクレオチド配列は、第 2 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列が遺伝コードの縮重に基づいて第 1 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列と同じポリアミノ酸をコードする場合、又は第 2 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列が第 1 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列によってコードされるポリアミノ酸と十分に類似するポリアミノ酸をコードするとき、第 1 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列と「同一」である。一般に、第 2 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列は、第 2 のポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列が B L A S T N アルゴリズム ( U n i t e d S t a t e s N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h の N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n 、 別 途 N C B I と し て 知 ら れ て い る ( B e t h e s d a , M d . , U S A ) ) に 基 づ い て 第 1 の ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 分 子 の ヌ ク レ オ チ ド 配 列 に 対 し て 少 な く と も 約 8 5 % の ヌ ク レ オ チ ド 配 列 同 一 性 を 有 す る 場 合 、 第 1 の ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 分 子 の ヌ ク レ オ チ ド 配 列 と 同 一 で あ る 。 本 発 明 の 実 践 に よ る 計 算 の た め の 特 定 の 例 で は 、 B L A S T P 2 . 2 . 6 [ T a t u s o v a T A a n d T L M a d d e n , “ B L A S T 2 s e q u e n c e s - - a n e w t o o l f o r c o m p a r i n g p r o t e i n a n d n u c l e o t i d e s e q u e n c e s . ” ( 1 9 9 9 ) F E M S M i c r o b i o l L e t t . 1 7 4 : 2 4 7 - 2 5 0 . ] が 参 照 さ れ る 。 簡 潔 に 言 え ば 、 1 0 の ギ ャ ッ プ オ ー プ ニ ン グ ペ ナ ル テ ィ 、 0 . 1 の ギ ャ ッ プ エ ク ス テ ン シ ョ ン ペ ナ ル テ ィ 、 並 び に H e n i k o f f 及 び H e n i k o f f の 「 b l o s u m 6 2 」 ス コ ア リ ン グ マ ト リ ッ ク ス を 使 用 し て

30

40

50

、2つのアミノ酸配列を整列させて、アライメントスコアを最適化する (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 325 89:10915-10919, 1992)。次いで、同一性パーセントは、以下のように計算される：完全一致の総数×100/2つの配列を整列させるためにより長い配列の長さ+より長い配列に導入されたギャップの数で除算する。

【0024】

「分離された」という用語は、細胞、ペプチド、又は核酸がその自生環境から離れていることを示すために使用される。分離されたペプチド及び核酸は、実質的に純粋であり得る、すなわち、それらが天然に結合し得る他の物質を本質的に含まない。

【0025】

「機能的タンパク質を欠く」という語句は、修飾遺伝子によってコードされるタンパク質の量及び/又は活性が、非修飾遺伝子によってコードされるタンパク質と比較して少なくとも95%減少することを意味する。ある特定の態様では、修飾遺伝子によってコードされるタンパク質の量及び/又は活性は、少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は少なくとも99.5%、又は少なくとも99.9%減少する。ある特定の態様では、修飾遺伝子によってコードされるタンパク質の量及び/又は活性は、完全に排除される。

【0026】

「薬学的に許容される担体」は、ワクチンの生成及び投与のために当該技術分野で使用される任意の従来の薬学的に許容される担体、ビヒクル、又は賦形剤を意味する。薬学的に許容される担体は、典型的には、非毒性、不活性、固体、又は液体の担体である。

【0027】

「ブタ (porcine)」及び「ブタ (swine)」という用語は、本明細書で互換的に使用され、例えば豚などのイノシシ科のメンバーである任意の動物を指す。

【0028】

本明細書で使用される「感染しやすい」宿主は、PEDVによって感染させることができる細胞又は動物を指す。感染しやすい動物に導入すると、弱毒化されたPEDVはまた、PEDV又はその抗原に対する免疫学的応答を誘発することができ、それによって、PEDV感染に対する動物の免疫をもたらす。

【0029】

「ワクチン」という用語は、感染の影響を予防又は軽減するために、疾患に対する免疫を生成するために使用される抗原性調製物を指す。ワクチンは、典型的には、免疫原に対するワクチン接種された対象の免疫応答を強化するのに有効なアジュバントと一緒に、免疫学的有効量の免疫原の組み合わせを使用して調製される。

【0030】

ワクチン製剤は、「治療有効量」の活性配合成分、つまり、組成物が投与される対象における免疫保護応答の誘発を生じさせることができる量を含有するであろう。PEDV疾患の処置及び予防において、例えば、「治療有効量」は、好ましくは、新たな感染に対するワクチン接種された対象の耐性を強化する、及び/又は疾患の臨床的重症度を低減する量である。そのような保護は、PRVに感染した対象によって通常表される症状の低減若しくは消失、より速い回復時間、及び/又は減少したウイルス粒子数のいずれかによって実証されるであろう。ワクチンは、PRVに対する予防的措置として、感染前に投与することができる。代替的に、ワクチンは、対象がすでに疾患に罹患した後に投与され得る。PRVへの曝露後に与えられるワクチンは、疾患を緩和することができ、自然感染自体よりも優れた免疫応答を引き起こし得る。

【0031】

本開示は、ワクチンに使用された場合に安全かつ有効であり、毒性のPRV株による攻撃から豚を保護するPRVの弱毒化株を提供する。ある特定の態様では、PRVの弱毒化株は、親野外株に対するチミジンキナーゼ (TK)、糖タンパク質I (gI)、及び糖タンパク質E (gE) 遺伝子における修飾を含む。

10

20

30

40

50

## 【0032】

好適な親株としては、FS18（配列番号1）、株JS2012（配列番号2）、株TJ（GenBankアクセッション番号KJ789182）、株HeN1（GenBankアクセッション番号KP098534）、株HLJ8（GenBankアクセッション番号KT824771）、株HN1201（GenBankアクセッション番号KP722022）が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な株は、全長配列番号1又は配列番号2と少なくとも85%同一（すなわち、少なくとも86%同一、少なくとも87%同一、少なくとも88%同一、少なくとも89%同一、少なくとも90%同一、少なくとも91%同一、少なくとも92%同一、少なくとも93%同一、少なくとも94%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.2%同一、少なくとも99.4%同一、少なくとも99.6%同一、少なくとも99.8%同一、少なくとも99.9%同一）であるヌクレオチド配列によってコードされる株である。

10

## 【0033】

ある特定の態様では、親株は、前の段落に記述されているように、配列番号1又は2と少なくとも85%同一であり、また、異なる塩基の少なくとも半分（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%）は、類似のアミノ酸をコードするコドン、すなわち、保存的アミノ酸置換をもたらす。そのようなある特定の保存的アミノ酸置換は、一般に、全体的なタンパク質機能を不活性化しないことが認識されている：例えば、正に帯電したアミノ酸（及び、逆もまた同様）については、リジン、アルギニン、及びヒスチジン；負に帯電したアミノ酸（及び、逆もまた同様）については、アスパラギン酸及びグルタミン酸、並びに中性に帯電したアミノ酸のある特定の群（及び、全ての場合において、逆もまた同様）については、（1）アラニン及びセリン、（2）アスパラギン、グルタミン、及びヒスチジン、（3）システイン及びセリン、（4）グリシン及びプロリン、（5）イソロイシン、ロイシン、及びバリン、（6）メチオニン、ロイシン、及びイソロイシン、（7）フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、及びチロシン、（8）セリン及びスレオニン、（9）トリプトファン及びチロシン、（10）並びに例えば、チロシン、チルプトファン、及びフェニルアラニン。アミノ酸は、物理的特性、並びに二次及び三次タンパク質構造への寄与に従って分類することができる。したがって、保存的置換は、類似の特性を有する別のアミノ酸に対する1つのアミノ酸の置換として当該技術分野で認識され、例示的な保存的置換は、1997年3月13日に公開されたWO97/09433、10頁（1996年9月6日に出願されたPCT/GB96/02197）に見出され得る。代替的に、保存的アミノ酸は、Lehninger, (Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY: NY (1975), pp. 71 - 77)に記載されているようにグループ化され得る。タンパク質配列は、Vector NTI Advance 11.5及びCLUSTAL 2.1の両方の多重配列アラインメントを使用して整列させることができる。本明細書で使用される場合、特定のアミノ酸又はヌクレオチド配列の列挙は、核酸配列に関する全てのサイレント変異、及びアミノ酸配列に関する任意の及び全ての保存的に修飾された変異体を含むものとする。

20

30

40

## 【0034】

仮性狂犬病ウイルスのgI、gE、及びTKタンパク質の配列並びに機能が知られている。チミジンキナーゼは、UL23遺伝子によってコードされ、ヌクレオチド合成に関与する。糖タンパク質I及びEは、それぞれ、US7及びUS8遺伝子によってコードされるウイルス粒子タンパク質である。Pomeranzらは、gI及びgEが互いに複合体化されることを開示している。本開示の目的のために、遺伝子UL23、US7、及びUS8は、それぞれ、「TK遺伝子」、「gI遺伝子」、及び「gE遺伝子」と称され得る。

## 【0035】

50

ある特定の実施形態では、PRVの弱毒化株は、US1、US2、及びUS9遺伝子のうちの1つ以上（すなわち、1つ、2つ、又は3つ全て）の修飾体を更に含む。これらの遺伝子は、RSp40/ICP22、11K、及び28Kタンパク質をそれぞれコードする。ある特定の実施形態では、US2及びUS9遺伝子のうちの少なくとも1つは、修飾されていない。したがって、例えば、ウイルスは、未修飾US2、修飾US9、及び修飾又は未修飾US1を含み得る。代替的に、ウイルスは、未修飾US9、修飾US2、及び修飾又は未修飾US1を含み得る。

【0036】

ある特定の他の実施形態では、本発明のPRVの弱毒化株では、US1、US2、及びUS9遺伝子は、修飾されていない。

10

【0037】

Pomeranzらは、US1がRSp40/ICP22タンパク質をコードすることを開示している。RSp40/ICP22タンパク質は、PRVにおける機能が現在知られていないタンパク質であるが、Pomeranzは、そのHSV-1ホモログが遺伝子発現の調節因子として作用することを開示している。US2は、ウイルスのテグメントに存在するタンパク質をコードする。US9は、軸索におけるタンパク質選別に関与し、II型テイルアンカー型膜タンパク質として機能するエンベロープタンパク質をコードする。

【0038】

TK、gI、gEタンパク質をコードする遺伝子における修飾、並びにUS1、US2、及びUS9遺伝子における任意の修飾は、これらの遺伝子によって発現される機能性タンパク質を欠くウイルスをもたらす。

20

【0039】

例えば、ある特定の態様では、機能性gEタンパク質を欠く本発明のウイルスは、多数の手段によって調製することができる。例えば、gEタンパク質をコードするORFの近位部分に終止コドンを導入してもよい。異なる実施形態では、終止コドンは、N末端10アミノ酸以下、例えば、9、8、7、6、5、4、3、又は2N末端アミノ酸の後に導入され得る。他の実施形態では、転写スタート部位は、転写が開始されないように変更され得る。更に他の実施形態では、gEタンパク質をコードするORF中のヌクレオチドの全てが欠失している。

30

【0040】

本発明のウイルスはまた、機能性gIタンパク質を欠いている。ある特定の実施形態では、少なくともヌクレオチド269~1101は、gIタンパク質をコードする1101-ヌクレオチド-ORFから欠失している。ある特定の実施形態では、欠失は、ヌクレオチド269の上流、例えば、ヌクレオチド250、200、150、100、50、又は更には更に上流で始まる。ある特定の実施形態では、全ての1101ヌクレオチドが欠失している。ある特定の実施形態では、終止コドンは、フレームシフト変異を導入することなく、269位又はその上流に導入される。

【0041】

本発明のウイルスはまた、TKタンパク質をコードする修飾US23遺伝子を有する。UL23遺伝子は、963-ヌクレオチド-長ORFを有する。ある特定の態様では、この963-ヌクレオチド-長ORFは、この963-ヌクレオチド-長ORFのヌクレオチド526~607、480~846、280~723、及び364~615によって定義される配列から選択される少なくとも1つ（又は少なくとも2つ、又は少なくとも3つ、又は4つ全て）のサブ配列を欠く。当然、より長い欠失、例えば、4つ全てのサブ配列を組み込む280~846位によって定義される欠失、又は2つのサブ配列を含む300~650位によって定義される欠失なども存在し得る。代替的に、ORFの963ヌクレオチドの全てが欠失し得る。代替的に、終止コドンは、526の上流の位置、又は364位の上流、又は480位の上流、又は280位の上流などに（フレームシフトを引き起こすことなく）導入され得る。転写開始部位の変異は、ある特定の態様においても可能であ

40

50

る。

【0042】

US1、US2、及びUS9遺伝子のうちのいずれか1つに対する任意選択の修飾は、好ましくは、得られたウイルスを、修飾遺伝子によってコードされるタンパク質を欠くようにする。好適な変異としては、遺伝子欠失、挿入、置換などが挙げられる。上述のように、フレームシフト変異が導入され得、したがって、非修飾遺伝子によってコードされるタンパク質と最小限の類似性を有するタンパク質を生成する。フレーム内変異は、遺伝子の近位部分（例えば、N末端20、15、10、5、3アミノ酸内）への終止コドンの導入、又は対応するORFが転写されないための転写開始部位の変異を含み得る。

【0043】

ある特定の態様では、本発明の弱毒化ウイルスは、配列番号1又は2と少なくとも85%同一であり、以下の修飾を有するゲノムを有する：

a) gIタンパク質をコードする少なくとも90%（少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%）のORF；

b) gEタンパク質をコードする少なくとも90%（少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%）のORF；

c) TKタンパク質をコードするORFは、この963-ヌクレオチド-長ORFの526~607位、480~846位、280~723位、及び364~615位にあるヌクレオチドによって定義されるサブ配列のうちの少なくとも1つ（すなわち、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は4つ全て）を欠いている。

【0044】

ある特定の他の態様では、修飾生ウイルスは、配列番号3又はそれと少なくとも85%同一である配列によってコードされるが、ただし、ウイルスをコードする配列がUL23遺伝子（TKをコードする）、US7遺伝子（gIをコードする）、US8遺伝子（gEをコードする）に対する修飾を含むことを条件とする。本発明のこの態様によるいくつかの修飾ライフウイルスは、非修飾US1、US2、及びUS9遺伝子を含み得る。本発明のこの態様によるいくつかの他の修飾生ウイルスは、上述のように、US1、US2、及びUS9遺伝子に対する任意選択の修飾体、例えば、修飾US2、未修飾US9、及び修飾若しくは未修飾US1、又は修飾US9、未修飾US2、及び修飾若しくは未修飾US1を更に含む。他の態様では、これらの遺伝子（US1、US2、US9）の3つ全てが修飾されている

【0045】

得られたウイルスが、これらの遺伝子によってコードされる機能性タンパク質を欠くと言われるような遺伝子を修飾する方法は、よく知られている。これらの方法としては、完全又は部分的な欠失、フレームシフト変異、ヌクレオチド交換、又は挿入が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、1つは、遺伝子又は転写開始部位を調節するプロモーターを修飾することができる。代替的に（又は追加的に）、1つは、コード配列に未成熟終止コドンをもたらす変異を挿入することができる。他の好適な方法は、当業者の専門知識内にある。

【0046】

上述の修飾は、標的の突然変異誘発及び相同組換えが挙げられるが、これらに限定されない、多数の方法によってウイルスのゲノムに導入することができる。

【0047】

この技法の第1のステップは、PrVゲノムDNAとの組換えのための組換えDNA分子の構築を含む。そのような組換えDNA分子は、任意の好適なプラスミド、コスミド、又はファージに由来し得、プラスミドが最も好ましく、上記で定義されるようなPrVゲノムの部分のDNAを含有するPrV DNAの断片を含む。上記で定義されるPrVゲノムの部分のDNA配列は、好ましくは、ウイルスPrVゲノムとのインビボ相同組換え

10

20

30

40

50

が起ることを可能にするように、適切な長さ、例えば50～3000bpであるべきPrV核酸配列に隣接する。

【0048】

このようにして得られた組換えDNA分子は、変異をPrVゲノムに導入するのに好適である。

【0049】

次に、細胞、例えば、ブタ腎臓細胞又はVERO細胞は、上述のような組換えDNA分子の存在下でPrV DNAでトランスフェクトされるか、又は野生型PrVで感染させることができ、それによって組換えDNA分子内の配列とPrVゲノム内の対応する配列との間で組換えが起こる。

10

【0050】

組換えはまた、プラスミド配列を含まない適切な隣接PrV配列に隣接する変異配列を含む核酸配列で細胞を共トランスフェクトすることによって誘発することができる。その後、組換えウイルス子孫は、細胞培養で生成され、例えば、遺伝子型的又は表現型的に選択することができる。別の可能性は、変異が局在化された核酸配列がコードしていたポリペプチドの非存在の検出である。同じように、挿入された異種核酸配列によってコードされたポリペプチドの存在を検出することができる。組換えウイルスはまた、ネオマイシン、ゲンタマイシン、又はミコフェノール酸などの化合物に対する耐性に基づいて確実に選択され得る。

【0051】

選択された組換えPrVは、細胞培養において大規模に培養することができ、この後に、組換えPrV含有物質又は上記PrVによって発現される異種ポリペプチドを収集することができる。

20

【0052】

組換えDNA技法に対して代替的又は追加的に、クローン濃縮及びクローン選択と組み合わせた細胞培養継代を使用して、本発明のウイルスを調製してもよい。例えば、遺伝子、例えば、gI又はgEのうちの1つに欠失を有するクローンは、更なる増殖のために選択されてもよく、TK天然遺伝子欠失変異体がウイルス複製欠損からもたらされ得ることが知られている。

【0053】

好適な細胞株としては、ブタ精巣細胞株ST、ブタ腎臓細胞株PK-15又はMRS-2、ウサギ腎臓細胞株RK、アフリカミドリザル腎臓細胞株Ver o、サル胚腎臓上皮細胞株Marc-145、ウシ腎臓細胞株MDBK、ウシ精巣細胞株BT、ニワトリ胚線維芽細胞(CEF)、及びペビーハムスター腎臓細胞株BHK-21が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、好適な細胞株は、Ver o(ATCC CCL-81)である。

30

【0054】

本発明のワクチンの免疫学的有効量は、ウイルス感染に対する保護を必要とする豚に投与される。豚に接種する免疫学的有効量又は免疫原性量は、ルーチン試験によって容易に決定又は容易に滴定することができる。有効量は、PRVウイルスに曝露された豚を保護するために、ワクチンに対する十分な免疫学的応答が達成される量である。好ましくは、豚は、ウイルス性疾患の有害な生理学的症状又は影響のうちの1つから全てが有意に低減、軽減、又は完全に予防される程度まで保護される。

40

【0055】

本発明のワクチンは、標準的な緩衝液、安定剤、希釈剤、防腐剤、及び/又は可溶化剤などの動物用の許容される担体を含むように、許容された慣習に従って製剤化することができ、徐放を促進するように製剤化することもできる。希釈剤としては、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールなどが挙げられる。等張性のための添加剤としては、とりわけ、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、及びラクトースが挙げられる。安定剤としては、とりわけ、アルブミンが挙げられる。修

50

飾生ワクチンを製剤化する際に特に有用であるものを含む、他の好適なワクチンビヒクル及び添加剤は、当業者に知られているか、又は明らかであろう。例えば、参考により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing を参照のこと。

#### 【0056】

本発明のワクチンは、非アジュバント化物であり得る。代替的に、本発明のワクチンは、とりわけ、例えば、アジュバント又はサイトカインなどの1つ以上の追加の免疫調節成分を更に含み得る。本発明のワクチンに使用することができるアジュバントの非限定的な例としては、RIBIアジュバント系(Ribi Inc., Hamilton, Mont.), ミョウバン、水酸化アルミニウムゲルなどの鉱物ゲル、水中油型エマルション、例えばフロイントの完全及び不完全アジュバントなどの油中水型エマルション、ブロックコポリマー(CytRx, Atlanta Ga.), QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M(Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN(登録商標)アジュバント、サポニン、Quil A又は他のサポニン画分、モノホスホリル脂質A、イオン性多糖類、及びAvridine脂質-アミンアジュバントが挙げられる。本発明のワクチンに有用な水中油型エマルションの非限定的な例としては、修飾SEAM62及びSEAM1/2製剤が挙げられる。修飾SEAM62は、5%(v/v)スクワレン(Sigma)、1%(v/v)SPAN(登録商標)85洗剤(ICI界面活性剤)、0.7%(v/v)TWEEN(登録商標)80洗剤(ICI界面活性剤)、2.5%(v/v)エタノール、200µg/mlのQuil A、100µg/mlのコレステロール、及び0.5%(v/v)レシチンを含有する水中油型エマルションである。修飾SEAM1/2は、5%(v/v)スクワレン、1%(v/v)SPAN(登録商標)85洗剤、0.7%(v/v)Tween80洗剤、2.5%(v/v)エタノール、100µg/mlのQuil A、及び50µg/mlのコレステロールを含む水中油型エマルションである。ワクチンに含まれ得る他の免疫調節剤としては、例えば、1つ以上のインターロイキン、インターフェロン、又は他の知られているサイトカインが挙げられる。

#### 【0057】

追加のアジュバント系は、Tヘルパー及びB細胞エピトープの両方の組み合わせを可能にし、WO2006/084319、WO2004/014957、及びWO2004/014956に記載されるものなどの追加的に脂質化され得る1つ以上の種類の共有結合T-Bエピトープ連結構造をもたらす。

#### 【0058】

本発明の好ましい実施形態では、ORFI PEDVタンパク質、又は他のPEDVタンパク質若しくはその断片は、以下で論じられるように、5% AMPHIGEN(登録商標)で製剤化される。

#### 【0059】

##### アジュバント成分

本発明のワクチン組成物は、アジュバントを含んでもよく、又は含まなくてもよい。具体的には、経口感染性ウイルスに基づくように、本発明の修飾生ワクチンは、無菌担体とともに、アジュバントを含まずに使用され得る。経口投与に使用され得るアジュバントとしては、CT様免疫調節剤(rmLT、CT-B、すなわち、E.coliの組換え変異型熱不安定毒素、コレラ毒素-Bサブユニット)に基づくもの、又はポリマー及びアルギン酸塩、若しくはキトサンなどの粘膜付着剤とのカプセル化を介するもの、又はリポソームを介するものが挙げられる。ワクチン放出を通じた最小保護用量での好ましいアジュバント化物又は非アジュバント化物ワクチン用量は、用量当たり約 $10 \sim 10^6 \log_{10} TCID_{50}$ のウイルス、又はそれ以上を提供し得る。「TCID<sub>50</sub>」は、「組織培養感染用量」を指し、接種された細胞培養物の所与のバッチの50%に感染するために必要なウイルスのその希釈として定義される。本明細書全体を通して利用される Spearman-Kärber法を含む、TCID<sub>50</sub>を計算するために様々な方法が使用され

得る。Spearman-Kärber法の記載については、B. W. Mahy & H. O. Kangro, *Virology Methods Manual*, p. 25 - 46 (1996)を参照のこと。存在する場合、アジュバントは、より一般的に、非経口投与が選択される場合、エマルションとして提供され得るが、開始力価を0.710g(80%低減)を超えて低下させてはならない。

#### 【0060】

一例では、アジュバント成分は、軽鉱物油中のレシチン、及びまた水酸化アルミニウム成分の組み合わせから提供される。AMPHIGEN(登録商標)(代表的なレシチン/鉱物油成分として)の組成及び配合に関する詳細は次のとおりである。

#### 【0061】

好ましいアジュバント化合物は、約5%(v/v)のREHYDRAGEL(登録商標)(水酸化アルミニウムゲル)及び「20%AMPHIGEN(登録商標)を約25%最終物(v/v)に更に含む緩衝溶液中の2ML用量として提供され得る。AMPHIGEN(登録商標)は、一般に、米国特許第5,084,269号に記載され、軽油中に溶解された脱油レシチン(好ましくは、大豆)を提供し、軽油は、次いで、水中油型エマルションとして、抗原の水溶液又は懸濁液中に分散される。Amphigenは、米国特許第6,814,971号(その第8~9欄を参照のこと)のプロトコルに従って改善されて、本発明の最終的なアジュバント化ワクチン組成物で使用するためのいわゆる「20%Amphigen」成分を提供する。したがって、10%レシチン及び90%キャリアオイル(DRAKEOL(登録商標)、Penreco, Karns City, Pa.)のストック混合物は、0.63%リン酸緩衝生理食塩水溶液で1:4で希釈され、それによって、レシチン及びDRAKEOL(登録商標)成分をそれぞれ2%及び18%(すなわち、それらの元の濃度の20%)まで低減する。Tween80及びSpan80界面活性剤は、この組成物に添加され、代表的かつ好ましい最終量は、5.6%(v/v)のTWEEN(登録商標)80及び2.4%(v/v)のSPAN(登録商標)80であり、生理食塩水及びDRAKEOL(登録商標)成分の混合物が最終的に所望の界面活性剤濃度をもたらすように、SPAN(登録商標)は、最初にストックDRAKEOL(登録商標)成分に提供され、TWEEN(登録商標)は、最初に緩衝生理食塩水成分から提供される。DRAKEOL(登録商標)/レシチン及び生理食塩水溶液の混合物は、In-Line Slim Emulsifier装置、モデル405(Charles Ross and Son, Hauppauge, N.Y., USA)を使用して実現することができる。

#### 【0062】

ワクチン組成物はまた、追加のアジュバント成分(Reheis, N.J., USA、及びChemTrade Logistics, USAから入手可能)として、REHYDRAGEL(登録商標)LV(ストック材料中の約2%水酸化アルミニウム含有量)を含む。0.63%のPBSを使用して更に希釈すると、最終ワクチン組成物は、2ML用量当たり以下の組成量、5%(v/v)REHYDRAGEL(登録商標)LV、25%(v/v)の「20%Amphigen」、すなわち、更に4倍に希釈される)、及び0.01%(w/v)のメルチオレートを含む。

#### 【0063】

当該技術分野で理解されるように、成分の添加の順序は、同等の最終ワクチン組成物を提供するために変動させることができる。例えば、緩衝液中のウイルスの適切な希釈物を調製することができる。次いで、実際の最終生成物中に所望の5%(v/v)濃度のREHYDRAGEL(登録商標)LVを可能にするために、ブレンドしながら、適切な量のREHYDRAGEL(登録商標)LV(約2%の水酸化アルミニウム含有量)ストック溶液を添加することができる。調製した後、この中間ストック材料を、適切な量の「20%Amphigen」ストック(一般に上述したように、すでに必要量のTween80及びSpan80を含む)と組み合わせ、25%(v/v)の「20%Amphigen」を有する最終生成物を再び達成する。最終的に、適切な量の10%メルチオレ-

10

20

30

40

50

トを添加することができる。

【0064】

本発明のワクチン接種組成物は、抗原の総用量が、好ましくは、上記の抗原用量と比較して100倍（上又は下）、及び最も好ましくは10倍以下（上又は下）変動し得るように、配合成分の全てにおける変動を可能にする。同様に、界面活性剤濃度（TWEEN（登録商標）又はSPAN（登録商標）にかかわらず）は、互いに独立して、最大10倍まで変動させてもよく、又はそれらは、当該技術分野でよく理解されているように、適切な濃度の類似の材料によって置き換えられて、完全に欠失させてもよい。

【0065】

最終生成物中のREHYDRAGEL（登録商標）濃度は、まず、他の多くの製造業者（すなわち、ALHYDROGEL（登録商標）、Brenntag；Denmark）から入手可能な同等の材料を使用することによって、又はCG、HPA、又はHSなどのREHYDRAGEL（登録商標）製品ラインにおいて追加の変形形態を使用することによって変動させることができる。LVを例として使用して、その最終的に有用な濃度は、0%～20%を含み、2～12%がより好ましく、4～8%が最も好ましく、同様に、AMPHIGEN（登録商標）の最終濃度（「20% Amphigen」の%で表される）は、好ましくは25%であるが、この量は5～50%、好ましくは20～30%で変動させることができ、最も好ましくは約24～26%であり得る。

【0066】

本発明の実践によれば、本発明のアジュバント製剤で使用される油は、好ましくは鉱物油である。本明細書で使用される場合、「鉱物油」という用語は、蒸留技法を介してワセリンから得られる液体炭化水素の混合物を指す。この用語は、「液状パラフィン」、「液体ワセリン」、及び「白色鉱物油」と同義である。この用語はまた、「軽鉱物油」、すなわち、ワセリンの蒸留によって同様に得られるが、白色鉱物油よりもわずかに低い比重を有する油を含むことが意図される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1990, pages 788 and 1323)を参照のこと。鉱物油は、様々な商業的供給源、例えば、J. T. Baker (Phillipsburg, Pa.)、USB Corporation (Cleveland, Ohio)から得ることができる。好ましい鉱物油は、DRAKEOL（登録商標）の名前で市販されている軽鉱物油である。

【0067】

本発明の免疫原性及びワクチン組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態の薬学的に許容される担体、賦形剤、及び/又は安定剤を更に含むことができる（例えば、Remington: The Science and practice of Pharmacy, 2005, Lippincott Williams）を参照のこと。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、投薬量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（水銀（o-カルボキシフェニル）チオ）エチルナトリウム塩（THIOMERSAL（登録商標））、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾールなどの）；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、若しくはデキストランを含む単糖、二糖、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；並びに/又はポリエチレングリコール（PEG）、TWEEN（登録商標）、若しくはPLURONICS（

10

20

30

40

50

登録商標)などの非イオン性界面活性剤を含む。

【0068】

本発明のワクチンは、任意選択で、本発明のウイルス、感染性DNA分子、プラスミド、又はウイルスベクターの徐放のために製剤化され得る。そのような徐放製剤の例としては、例えば、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲンなどの、生体適合性ポリマーの複合体と組み合わせたウイルス、感染性DNA分子、プラスミド、又はウイルスベクターが挙げられる。薬物送達ビヒクルにおける分解性ポリマーの構造、選択、及び使用は、いくつかの刊行物で概説されており、A. Domb et al., 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3: 279-292を含む(参照により本明細書に組み込まれる)。薬学的製剤におけるポリマーの選択及び使用に関する追加のガイダンスは、当該技術分野で知られているテキスト、例えば、更に参照により本明細書に組み込まれるM. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems": *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 45, M. Dekker, NYに見出すことができる。代替的に、又は追加的に、ウイルス、プラスミド、又はウイルスベクターは、投与及び効力を改善するためにマイクロカプセル化することができる。マイクロカプセル化抗原のための方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、米国特許第3,137,631号、米国特許第3,959,457号、米国特許第4,205,060号、米国特許第4,606,940号、米国特許第4,744,933号、米国特許第5,132,117号、及び国際特許公開第95/28227号に記載される技法を含み、これらの全てが参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

リポソームを使用して、ウイルス、プラスミド、ウイルスタンパク質、又はウイルスベクターの徐放を提供することもできる。リポソーム製剤を作製及び使用する方法に関する詳細は、とりわけ、米国特許第4,016,100号、米国特許第4,452,747号、米国特許第4,921,706号、米国特許第4,927,637号、米国特許第4,944,948号、米国特許第5,008,050号、及び米国特許第5,009,956号に見出すことができ、これらの全てが参照により本明細書に組み込まれる。

【0070】

上述のワクチンのうちのいずれかの有効量は、低用量のウイルス、ウイルスタンパク質、プラスミド、又はウイルスベクターから開始し、次いで、効果を監視しながら投薬量を増加させる、従来手段によって決定することができる。有効量は、ワクチンの単回投与後、又はワクチンの複数回投与後に得ることができる。動物当たりの最適用量を決定するときに、知られている要因を考慮することができる。これらは、動物の種、サイズ、年齢、及び一般状態、動物における他の薬物の存在などを含む。実際の投薬量は、好ましくは、他の動物研究からの結果を考慮した後に選ばれる。

【0071】

適切な免疫応答が達成されたかどうかを検出する1つの方法は、ワクチン接種後の動物におけるセロコンバージョン及び抗体力価を決定することである。もしあれば、ワクチン接種のタイミング及びブースターの数は、好ましくは、全ての関連する要因の分析に基づいて、医師又は獣医によって決定され、これらのうちのいくつかは、上述されている。

【0072】

ブタのワクチン接種に関連する本発明の好ましい例では、動物に対する最適な年齢目標は、約1~21日であり、これは、豚肺炎マイコプラズマ又は豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスに対してなどの他のスケジュール化されたワクチン接種にも対応し得る。追加的に、繁殖雌豚のための好ましいワクチン接種スケジュールには、同様の用量が含まれ、毎年の再接種スケジュールが含まれる。

【0073】

## 投薬

好ましい臨床的適応は、繁殖雌豚及び未経産豚の両方の分娩前の処置、制御、及び予防、続いて子豚のワクチン接種のためのものである。代表的な例（雌豚及び未経産豚の両方に適用可能）では、単回用量のワクチンが使用されるが、当然、必要に応じて2回用量のワクチン接種レジメンも想定される。

## 【0074】

用量の実際の体積は、ワクチンがどのように製剤化されるかの関数であり、実際に投薬する量は、動物のサイズも考慮して、0.05~5MLの範囲である。単回用量ワクチン接種も適切である。ワクチン中の仮性狂犬病ウイルスの量は、用量当たり $10^4 \cdot 5$  TCID<sub>50</sub>~ $10^8$  TCID<sub>50</sub>、好ましくは用量当たり $10^5$ ~ $10^7$  TCID<sub>50</sub>、より好ましくは用量当たり $10^{5.5}$ ~ $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>である。

10

## 【0075】

好ましくは、単回投与のみが保護を付与するのに十分である。しかしながら、2回用量レジメンが必要な場合、ブースター用量は、任意のその後の分娩の2~4週間前に与えることができる。筋肉内ワクチン接種（全ての用量）が好ましいが、用量のうちの1つ以上が皮下的に与えられ得る。経口投与も好ましい。ワクチン接種はまた、計画的又は自然感染によって実現されるように、投与済みの動物、及び未投与の動物においても有効であり得る。

## 【0076】

更なる好ましい例では、雌豚又は未経産豚は、分娩の5週間前次いで分娩2週間前に、筋肉内又は経口でワクチン接種される。本発明のプロトコルはまた、すでに血清反応陽性の雌豚及び未経産豚、並びにまた子豚及び雄豚の処置に適用可能である。ブースターワクチンも与えることができ、これらは異なる投与経路を介してもよい。任意のその後の分娩の前に母豚に再ワクチン接種することが好ましいが、それにもかかわらず、本発明のワクチン組成物は、母豚が以前の分娩と関連してのみワクチン接種された場合でも、依然として、抗体の継続的な受動的伝達を介して子豚に保護を提供することができる。

20

## 【0077】

次いで、子豚は、生後1日目に早くもワクチン接種することができることに留意されたい。例えば、子豚は、3週齢のブースター用量の有無にかかわらず、特に、親雌豚が、繁殖前にワクチン接種されているが、分娩前にワクチン接種されなかった場合、1日目にワクチン接種することができる。子豚ワクチン接種はまた、親雌豚が自然感染又は計画的感染のいずれかに起因して以前に投与済みではなかった場合に有効であり得る。母親が以前にウイルスに曝露されていないか、又は分娩前にワクチン接種されていないかのいずれかのとき、子豚のワクチン接種も有効であり得る。

30

## 【0078】

他の態様では、ワクチンは、約6日齢以上、又は約14日齢以上、又は約21日齢以上、又は約28日齢以上、又は約35日齢以上、又は約42日齢以上である子豚に投与され得る。

## 【0079】

イノシシ（典型的には、繁殖目的で飼育されている）は、6か月ごとに1回ワクチン接種される必要がある。用量の変動は、当該技術分野の実践内で望ましい。本発明のワクチンは、妊娠した動物（全3期）及び新生児ブタで使用するのに安全であることに留意されたい。本発明のワクチンは、再び新生児ブタを含む最も敏感な動物でさえも許容される安全性のレベル（すなわち、死亡率なし、一過性の軽度の臨床的徴候又は新生児ブタに正常な徴候のみ）に弱毒化される。当然、PRV流行及び持続性低レベルPRV発生の両方からブタの群れを保護する観点から、持続的な雌豚ワクチン接種のプログラムは非常に重要なものである。PRV MLVで免疫化された雌豚又は未経産豚は、PRV関連疾患及び死亡から子豚を保護するPRV特異的IgAを含む、子豚への免疫を受動的に受動的伝達することが理解されるであろう。追加的に、一般に、PRV MLVで免疫化された豚は、量及び/若しくは持続時間が減少するか、又はそれらの糞便中へのPRVの排出から保

40

50

護され、更に、PRV MLVで免疫化された豚は、PRVの死亡、生殖、神経、及び呼吸器の病態が挙げられるが、これらに限定されない、PRVの臨床的病態から保護され、更に、PRV MLVは、PEDV伝送サイクルを停止又は制御するのに役立つであろう。

【0080】

また、本発明のワクチンでワクチン接種された動物は、21日以下などの任意の大幅な殺の保留なしに、ヒトの消費にも直ちに安全であることに留意されたい。

【0081】

治療的に提供されるとき、ワクチンは、実際の感染の徴候の検出時に有効量で提供される。組成物は、その投与がレシピエントによって許容され得る場合、「薬理学的に許容される」と言われる。そのような組成物は、投与される量が生理学的に有意である場合、「治療又は予防有効量」で投与されると言われる。

10

【0082】

本明細書に記載されるような薬学的組成物を使用して、意図される目的を達成する任意の手段によって、本発明の少なくとも1つのワクチン又は免疫原性組成物を投与することができる。例えば、そのような組成物の投与経路は、非経口、経口、口鼻、鼻腔内、気管内、局所、皮下、筋肉内、経皮、皮内、腹腔内、眼内、及び静脈内投与によるものであり得る。本発明の一実施形態では、組成物は、筋肉内で投与される。非経口投与は、ポラス注入によるもの、又は経時的に、漸進的な灌流によるものであり得る。注射器、点滴器、無針注入デバイス、パッチなどを含む任意の好適なデバイスを使用して、組成物を投与してもよい。使用のために選択される経路及びデバイスは、アジュバント、抗原、及び対象の組成に依存し、そのようなものは、当業者によく知られている。経口又は代替的に皮下である投与が好ましい。経口投与は、直接、水を介した、又は飼料（固体又は液体飼料）を介したものであり得る。液体形態で提供されるとき、ワクチンは、再構成して凍結乾燥されるか、あるいは飼料に直接添加するか（混ぜ込むか、又は上からかける）、又は別の方法で水若しくは液体飼料に添加するためのペーストとして提供され得る。

20

【0083】

診断キット

本発明はまた、診断キットを提供する。このキットは、PRVウイルスの野外株に自然に感染したブタ動物と、本明細書に記載されるPRVワクチンのうちのいずれかでワクチン接種されたブタ動物とを区別するために有益であり得る。キットはまた、PRVウイルスの野外株に潜在的に感染した動物が、臨床症状の存在に先行して検出され、群れから除外されるか、又は投与済み動物若しくはワクチン接種された動物から隔離されたままにすることができるため、有益なものであり得る。

30

【0084】

キットは、特定のPRVウイルスの特定の成分に対する抗体の存在についてブタ動物からの試料を分析するための試薬を含む。本発明の診断キットは、成分として、野外株に存在するが目的のワクチンには存在しない又は逆もまた同様の本発明の変異体PRV株からのペプチド (peptide) 又はペプチド (peptides) を含むことができ、そのような好適なペプチドドメインの選択は、広範なアミノ酸配列決定によって可能になる。そのようなペプチドは、名前を挙げると、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ、「サンドイッチ」アッセイ、沈降反応、ゲル拡散免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイ、及び免疫電気泳動アッセイが挙げられるが、これらに限定されない、当該技術分野で知られている任意のイムノアッセイシステムで使用され得るが、いくつかの米国特許第4,629,783号及びその中で引用される特許もまた、好適なアッセイを記載している。

40

【0085】

例えば、キットは、非修飾のTK、gE、及び/又はgIタンパク質に存在し、任意選択で修飾US1、US2、及び/又はUS9遺伝子の生成物に存在し、修飾遺伝子の発現生成物には非存在である免疫原性ペプチドを含有し得る。PRVに感染している疑いのある動物の試料との接触時に、ペプチドがこれらのタンパク質のうちの1つに対して抗体を

50

結合する場合、これは、動物が感染していることを示している。結合の非存在は、動物が感染していないが、本発明のワクチンでワクチン接種されている可能性があることを示す。

#### 【0086】

キットはまた、PRVの弱毒化株及び野生型株の両方に存在するペプチドを含有し得る。そのようなペプチドの好適な非限定的な例としては、UL53、UL49.5、UL27、UL34遺伝子によってコードされたエンベロープタンパク質が挙げられる。PRVに感染している疑いのある動物の試料との接触時に、ペプチドがこれらのタンパク質のうちの1つに対して抗体を結合する場合、これは、動物が感染しているか、又はワクチン接種されていることを示している。結合の非存在は、動物が感染していないか、又はワクチン接種されていないことを示す。

10

#### 【0087】

以下の実施例は、上記の発明を例示することを意図しており、その範囲を狭めるものとして解釈されるべきではない。当業者であれば、実施例が、本発明を実践することができる多くの他の方法を示唆することを容易に認識するであろう。本発明の範囲内に留まりながら、数多く変形形態及び修正形態が行われ得ることを理解すべきである。

#### 【0088】

##### 実施例1

PRV抗原及び抗体の両方について陰性の子豚を、各群において7頭の子豚を有する群に割り当てた。子豚には、市販試料、及び水への自由なアクセスが提供された。

20

#### 【0089】

株M1707（配列番号3を含み、TKをコードするUL23遺伝子のヌクレオチド480～846が欠失している）を、MEM、ゼラチン、NZアミン、グルタミン、スクロース、デキストラン40、ラクトース、ソルビトール、及びペニシリン-ストレプトマイシンで製剤化した。

#### 【0090】

豚の第2の群に、株Bartha K61をワクチン接種した。豚の第3の群に、DMEMをワクチン接種した。ワクチン接種方法は、頸部への筋肉内注射であった。処置群に対する接種体積は、全て子豚当たり1mLであった。接種後、豚の直腸温度を測定することを含む臨床的観察を毎日実施した。

30

#### 【0091】

データは、F35ラボ製品レベルの株M1707が3～4週齢の子豚（7頭の豚を処置）及び7週齢の目標年齢の子豚（14頭の豚を処置）において $>10^6$ で安全であることを示した。3つの異なるバッチのラボ製品による<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/豚処置。対照ブタを含む全てのブタの体温は正常であり、14日間の観察期間内に臨床的徴候を示さなかった。

#### 【0092】

##### 実施例2

PRV抗原及び抗体の両方について陰性の子豚を、各群において7頭の子豚を有する群に割り当てた。子豚には、市販試料、及び水への自由なアクセスが提供された。

#### 【0093】

PRV株M1707の3つのロット（ロットA、ロットB、及びロットC）を調製した。ウイルスを、MEM、ゼラチン、NZアミン、グルタミン、スクロース、デキストラン40、ラクトース、ソルビトール、及びペニシリン-ストレプトマイシンで製剤化した。

40

#### 【0094】

0日目に、用量当たり $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>の量のロットのうちの1つの製剤を筋肉内注入して、豚を処置した。対照群を、DMEMのみで処置した。接種後、豚の直腸温度を毎日測定した。臨床症状の観察では、全ての豚が正常な体温、良好な食欲、正常な精神状態、呼吸器及び消化器の症状なし、並びに21日間の観察期間内に神経学的症状なし、ということが見出された。3つのワクチン接種群及び対照群を、21日目に、株FS21PF1115、2mL（ $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>）で鼻腔内攻撃した。

50

## 【 0 0 9 5 】

保護を、症状の重症度（又は非存在）によって決定した。3つの対照群では、20頭の豚のうち19頭（ロットA及びBの各々において7頭のうち7頭、ロットCにおいて7頭のうち6頭）が保護された。対照群では、7頭の豚のうち保護されたのは0頭であった。

## 【 0 0 9 6 】

## 実施例 3

PRV 抗原及び抗体の両方について陰性の子豚を、各群において5頭の子豚を有する群に割り当てた。子豚には、市販試料、及び水への自由なアクセスが提供された。

## 【 0 0 9 7 】

PRV 株 1707 を、MEM、ゼラチン、NZアミン、グルタミン、スクロース、デキストラン40、ラクトース、ソルビトール、及びペニシリン - ストレプトマイシンで製剤化した。各ワクチン接種されたブタは、用量当たり  $10^5 \cdot 0$  TCID<sub>50</sub> の抗原を受け取った。対照群を、DMEMで処置した。製剤を筋肉内注入によって投与した。ワクチン接種群及び対照群の両方に、ワクチン接種の6か月後、株 FS21PF1115、2 mL ( $10^6 \cdot 0$  TCID<sub>50</sub>) で鼻腔内攻撃した。

10

## 【 0 0 9 8 】

免疫の持続時間を、症状の重症度（又は非存在）によって決定した。ワクチン接種群の5頭のうち5頭の豚が保護的力価を示し、対照群のいずれも保護的力価を示さなかった。

## 【 配列表 】

[2024514197000001.app](#)

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2022/024941

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	C12N7/00	C12N15/86 A61K39/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TONG WU ET AL: "A live, attenuated pseudorabies virus strain JS-2012 deleted for gE/gI protects against both classical and emerging strains", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, [Online] vol. 130, 2 March 2016 (2016-03-02), pages 110-117, XP029526205, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.03.002 abstract; figures 1-6; tables 1, 2	1-31
X	US 2016/279232 A1 (TIAN KEGONG [CN] ET AL) 29 September 2016 (2016-09-29) abstract; claims 1-4, 8-13,16, 17; figures 1-5; examples 1-12; tables 1-8	1-31
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 July 2022	23/09/2022	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Schulz, Regine	

10

20

30

40

1

50

International application No.

PCT/US2022/024941

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/US2022/024941**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

10

2.  Claims Nos.: **1-31 (partially)**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210**

3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

20

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

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

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

30

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:  
**1-31 (partially)**

40

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2022/024941
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108 251 382 A (PULIKE BIOLOGICAL ENG INC) 6 July 2018 (2018-07-06) abstract; examples 1-3; tables 1-5; compounds HN1202-R1 paragraph [[0041]] paragraph [[0059]] -----	1-31
T	FREULING C M ET AL: "Vaccines against pseudorabies virus (PrV)", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, [Online] vol. 206, 18 November 2016 (2016-11-18), pages 3-9, XP085115665, ISSN: 0378-1135, DOI: 10.1016/J.VETMIC.2016.11.019 abstract; figure 1; table 1 page 4, paragraph 4 - page 7 -----	
X	CN 105 018 436 A (PU LIKE BIO ENG CO LTD) 4 November 2015 (2015-11-04) abstract; figures 1-7; examples 1-8; tables 1 -5; sequences SEQ ID NOS: 1, 5 -----	1-31
T	KLUPP BARBARA G. ET AL: "Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome", JOURNAL OF VIROLOGY, [Online] vol. 78, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 424-440, XP055932734, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.1.424-440.2004 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC303424/pdf/1683.pdf> abstract; figures 1, 2; tables 3, 4, 6 -----	

10

20

30

40

1

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

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/US2022/024941**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>US 2016279232 A1</b>	<b>29-09-2016</b>	<b>CN 104250640 A</b>	<b>31-12-2014</b>
		<b>CN 104862286 A</b>	<b>26-08-2015</b>
		<b>DK 3012322 T3</b>	<b>07-10-2019</b>
		<b>EP 3012322 A1</b>	<b>27-04-2016</b>
		<b>JP 6368725 B2</b>	<b>01-08-2018</b>
		<b>JP 2016531545 A</b>	<b>13-10-2016</b>
		<b>TW 201612316 A</b>	<b>01-04-2016</b>
		<b>US 2016279232 A1</b>	<b>29-09-2016</b>
		<b>US 2016281065 A1</b>	<b>29-09-2016</b>
		<b>US 2016317650 A1</b>	<b>03-11-2016</b>
		<b>WO 2016026264 A1</b>	<b>25-02-2016</b>
-----			
<b>CN 108251382 A</b>	<b>06-07-2018</b>	<b>NONE</b>	
-----			
<b>CN 105018436 A</b>	<b>04-11-2015</b>	<b>NONE</b>	
-----			

10

20

30

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

10

1. claims: 1-31 (partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain FS18 (SEQ ID NO: 1). . . ' as well as related products and uses thereof;

2. claims: 1-31 (partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain JS2012 (SEQ ID NO: 2). . . ' as well as related products and uses thereof;

20

3. claims: 1-4, 6-31 (all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain TJ (GenBank accession KJ789182)' as well as related products and uses thereof;

30

4. claims: 1-4, 6-31 (all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain HeN1 (GenBank accession KP098534). . . ' as well as related products and uses thereof;

40

5. claims: 1-4, 6-31 (all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain HLJ8 (GenBank accession KT824771). . .' as well as related products and uses thereof;

10

---

6. claims: 1-4, 6-31(all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . strain HN1201 (GenBank accession KP722022). . .' as well as related products and uses thereof;

20

---

7. claims: 1-4, 6-31(all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . any strain that is encoded from a nucleotide sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 1' as well as related products and uses thereof;

30

---

8. claims: 1-4, 6-31(all partially)

attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus, and wherein said parent strain is . . . any strain that is encoded from a nucleotide sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 2' as well as related products and uses thereof;

40

---

50

International Application No. PCT/US2022 /024941

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

10

Claims Nos.: 1-31(partially)

Present claim 1 relates to an extremely large number of possible compounds/products, i.e. 'attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus. . . ' as the parent strain might be selected from any one of ' . . . the group consisting of: strain FS18 (SEQ ID NO: 1); strain JS2012 (SEQ ID NO: 2); strain TJ (GenBank accession KJ789182); strain HeN1 (GenBank accession KP098534); strain HLJ8 (GenBank accession KT824771); strain HN1201 (GenBank accession KP722022), and any strain that is encoded from a nucleotide sequence that is at least 85% identical to SEQ ID: NO: 1 or SEQ ID NO: 2'.

20

The present wording of said

claim therefore covers:

- analogous attenuated variants derived from different PRV strains;
- attenuated variants involving (further) selections in US1, US2 and/or US9;
- specific deletions in TK, gE, and/or gI.

The exact breadth of the claim's scope referring to ' . . . any strain that is encoded from a nucleotide sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2' is not clear.

Support and disclosure in the sense of Art. 6 PCT and Art. 5 PCT on the other hand is to be found for only a very small proportion of the compounds/products claimed, i.e. ' . . . strain M1707 (comprising SEQ ID NO: 3, . . . wherein nucleotides 480 - 846 of the UL23 gene encoding TK are deleted) was formulated with MEM, gelatin, NZ amine, glutamine, sucrose, Dextran 40, lactose, sorbitol, and penicillin-streptomycin. . . ' and used for the immunisation of pigs, followed by challenge with strain FS21PF1115 (cf. application: Example 1 - 3, p. 22, [0088] - [0098]).

30

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 1 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 1 - 31 was restricted to those claimed compounds/products, 'attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain, such that the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent Pseudorabies virus. . . ' which appear to be supported (cf. application: Example 1 - 3, p. 22, [0088] - [0098]) and to the broad concept of an compound/product 'attenuated suid herpesvirus 1 (a Pseudorabies virus) wherein the TK, gI and gE genes thereof are modified relative to a parent field strain' having the desired property or effect, i.e. ' . . . the resultant virus is safe and effective for use as a live vaccine that protects swine animals from challenge with a virulent

40

50

International Application No. PCT/US2022 /024941

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Pseudorabies virus. . .'.  
.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 K 39/245 (2006.01)  
C 1 2 N 15/38 (2006.01)

## F I

A 6 1 K 39/245  
C 1 2 N 15/38

## テーマコード (参考)

Z N A

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J  
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N  
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,  
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ペキン,チャンピン・ディストリクト,ズイージーシー・ライフ・  
サイエンス・パーク,ライフ・パーク・ロード 8,ピーケイユーケア・インダストリアル・パー  
ク・ビルディング 1 4, 4 / エフ,ケア・オブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

## (72)発明者

ファン,ジンアン

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7,カラマズー,ポージェー・ストリート 3 3 3,ケア・オ  
ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

## (72)発明者

コン,イーボ

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 7,カラマズー,ポージェー・ストリート 3 3 3,ケア・オ  
ブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

## (72)発明者

スン,ドン

中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ペキン,チャンピン・ディストリクト,ズイージーシー・ライフ・  
サイエンス・パーク,ライフ・パーク・ロード 8,ピーケイユーケア・インダストリアル・パー  
ク・ビルディング 1 4, 4 / エフ,ケア・オブ・ゾエティス・サービシーズ・エルエルシー

## F ターム (参考)

4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 BA01 CA45  
4C085 AA03 BA78 CC08 DD01 EE01