

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-533513

(P2005-533513A)

(43) 公表日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/155	A 6 1 K 39/155		4 B O 5 0
A 6 1 K 39/215	A 6 1 K 39/215		4 B O 6 3
A 6 1 K 39/235	A 6 1 K 39/235		4 B O 6 4
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/245		4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 74 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-523905 (P2004-523905)	(71) 出願人	505033743
(86) (22) 出願日	平成15年7月1日(2003.7.1)		ザ ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月24日(2005.3.24)		イギリス, ロンドン エヌダブリュ1
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/002832		Oティーユー, ロイヤル カレッジ ス
(87) 国際公開番号	W02004/011651		トリート, ユニヴァーシティ オブ ロ
(87) 国際公開日	平成16年2月5日(2004.2.5)		ンドン
(31) 優先権主張番号	0217434.0	(74) 代理人	100090033
(32) 優先日	平成14年7月27日(2002.7.27)		弁理士 荒船 博司
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100093045
			弁理士 荒船 良男
		(72) 発明者	ブラウンリー, ジョン
			イギリス, ハーツ エーエル9 7ティ
			ーエー, ハートフィールド, ノース
			ミムス, ホークスヘッド レーン, ロ
			イヤル ヴェテリネリ カレッジ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌ呼吸器コロナウイルス (C R C V) のスパイクタンパク、ポリメラーゼ及び血球凝集素/エステラーゼ

(57) 【要約】

イヌ伝染性呼吸器疾患に罹患したイヌの気道に存在するイヌ呼吸器コロナウイルス (C R C V) であって、イヌ腸性コロナウイルスとは低い程度の相同性であるが、ウシコロナウイルスのすべての系統 (例えばQuebec及びLY 138) 及びヒトコロナウイルス0C43系統と高い相同性を持つもの。C R C Vのスパイク、ポリメラーゼ及び血球凝集素/エステラーゼのcDNA及びタンパクの部分配列は図1から4、13及び14に示される。

```

ctcagatgaa tttgeaatat gctattagtg ctaagaatag agcccgcaact gttgtgggtg 60
tttccatctact tngtactatg actggcagaa cgtttcatca aaaatggttg aaaagtatag 120
cagctaacag tgggttctct gttgttatag gcaccactaa attttatggc ggtgggtg 180
atatgttaag tegccttatt aaagatggtg acaatcctgt acctatgggt tgggattatc 240
ctaagtgtga 250
    
```

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

コロナウイルスのスパイク(S)タンパクまたはその断片であって、図4に示されるアミノ酸配列のCRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に示すイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)特異的なアミノ酸の少なくとも1を有する、コロナウイルスのスパイク(S)タンパクまたはその断片。

**【請求項 2】**

図4に示すアミノ酸配列を有するコロナウイルスのSタンパク、またはその変体であって図4に示す配列と少なくとも97%のアミノ酸相同性を持つ変体。

**【請求項 3】**

コロナウイルスのポリメラーゼ(pol)タンパクまたはその断片であって、BCVのpolタンパクと少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を有し、BCVゲノム(アクセス番号SWALL:Q91A29)の4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有する、コロナウイルスのポリメラーゼ(pol)タンパクまたはその断片。

**【請求項 4】**

図2に示すアミノ酸配列を有する、コロナウイルスのpolタンパク。

**【請求項 5】**

コロナウイルスの血球凝集素/エステラーゼ(HE)タンパクまたはその断片であって、BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持ち、BCVのHEタンパク(GenBankアクセス番号AF058942)の235番のF、242番のN、253番のLのうちの1以上を有する、コロナウイルスの血球凝集素/エステラーゼ(HE)タンパクまたはその断片。

**【請求項 6】**

図14に示すアミノ酸配列を有するコロナウイルスのHEタンパク。

**【請求項 7】**

請求項1から6のいずれかに記載のタンパクをコードするポリヌクレオチド、またはその相補物。

**【請求項 8】**

図3に示す核酸配列を有する、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 9】**

図1に示す核酸配列を有する、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 10】**

図13に示す核酸配列を有する、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

**【請求項 11】**

請求項7から10の何れかに記載のポリヌクレオチドを有するベクター。

**【請求項 12】**

請求項11に記載のベクターを有する宿主細胞。

**【請求項 13】**

請求項11に記載のベクターによりコードされるタンパクを得る方法であって、請求項12に記載の宿主細胞を培養することと、前記宿主細胞で前記タンパクを発現させることと、前記タンパクを精製すること、を有する方法。

**【請求項 14】**

請求項13に記載の方法によって得ることのできるタンパク。

**【請求項 15】**

前記ベクターは前記ポリヌクレオチドに作用するように結合された真核生物のプロモーターを有する発現ベクターであり、前記宿主細胞は真核生物の宿主細胞である、請求項12に記載の宿主細胞。

**【請求項 16】**

請求項7または8に記載のポリヌクレオチドによりコードされるグリコシル化Sタンパクを得る方法であって、前記方法は請求項15の宿主細胞を培養すること、前記宿主細胞

10

20

30

40

50

において前記タンパクを発現させることと、前記タンパクを精製すること、を有する方法。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法によって得ることのできるグリコシル化 S タンパク。

【請求項 18】

抗 C R C V 抗体を作製する方法であって、( i ) 動物において請求項 1、2、14 及び 17 のいずれかに記載の S タンパクに対する免疫応答を起こさせて、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製すること、または ( i i ) 請求項 1、2、14 及び 17 のいずれかに記載の S タンパクを用いて抗体ディスプレイライブラリから抗体を選択すること、を有する方法。

10

【請求項 19】

前記抗体のアフィニティーが B C V の S タンパクよりも C R C V の S タンパクに対して強いかどうかを判別することをさらに有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

C R C V の S タンパクに対するアフィニティーが B C V の S タンパクに対するアフィニティーよりも強い、請求項 18 または 19 に記載の方法により得ることのできる抗 C R C V 抗体。

【請求項 21】

抗 C R C V 抗体を作製する方法であって、( i ) 動物において請求項 5 または 6 に記載の H E タンパクに対する免疫応答を起こさせて、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製すること、または ( i i ) 請求項 5 または 6 に記載の H E タンパクを用いて抗体ディスプレイライブラリから抗体を選択すること、を有する方法。

20

【請求項 22】

前記抗体のアフィニティーが B C V の H E タンパクよりも C R C V の H E タンパクに対して強いかどうかを判別することをさらに有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

C R C V の H E タンパクに対するアフィニティーが B C V の H E タンパクに対するアフィニティーよりも強い、請求項 21 または 22 に記載の方法により得ることのできる抗 C R C V 抗体。

【請求項 24】

イヌが C R C V に曝されたかどうかを判別する方法であって、

( a ) 前記イヌから好適な試料を得ることと、

( b ) 前記試料中の C R C V または抗 C R C V 抗体を特定すること、

を有する方法。

30

【請求項 25】

前記抗 C R C V 抗体は C R C V、B C V、ヒトコロナウイルス ( H C V ) または赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルスの抗原を用いて検出される、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 26】

前記好適な試料は血清、唾液、気管洗液及び細気管支洗液などの抗体を含有する試料であり、抗 C R C V 抗体の特定することは B C V の S タンパク ( AF058942 )、H C V の S タンパク ( L14643 )、または C R C V の S タンパク ( 図 4 ) と少なくとも 75 % のアミノ酸相同性を持つ S タンパクもしくはその断片を持つコロナウイルスに選択的に結合する抗体を特定することを有する、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

抗 C R C V 抗体を特定することは B C V の H E タンパク ( AF058942 )、H C V の H E タンパク ( M76373 )、または C R C V の H E タンパク ( 図 14 ) と少なくとも 90 % のアミノ酸相同性を持つ H E タンパクもしくはその断片を持つコロナウイルスに選択的に結合する抗体を特定することを有する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

50

前記好適な試料は抗体を含有する試料であり、抗CRCV抗体を特定することは請求項1、2、11及び14のいずれかに記載のSタンパクまたは請求項5もしくは6に記載のHEタンパクに選択的に結合する抗体を特定することを有する、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

前記好適な試料は、肺洗液、気管洗液、扁桃腺の綿棒採取標本またはイヌの気道から得た生検もしくは死後の試料である、請求項24に記載の方法。

【請求項30】

CRCVを特定することはCRCVの核酸構成物を特定することを有する、請求項29に記載の方法。

10

【請求項31】

CRCVの核酸構成物を特定することは前記BCVゲノム(AF058942)と非常にストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを特定することを有する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

CRCVを特定することは請求項7から10のいずれかに規定されるポリヌクレオチドを特定することを有する、請求項30または31に記載の方法。

【請求項33】

CRCVを特定することはCRCVのタンパク構成物を特定することを有する、請求項29に記載の方法。

20

【請求項34】

CRCVのタンパク構成物を特定することは請求項1、2、5、6、11及び14のいずれかに記載のタンパクを特定することを有する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

CRCVのタンパク構成物を特定することはCRCVと反応する抗体を用いることを有する、請求項33または34に記載の方法。

【請求項36】

前記CRCVに反応する抗体は抗BCV抗体、抗HCV抗体、または請求項20または23に記載の抗CRCV抗体である、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

抗CRCVのS抗体を検出するための免疫吸着検定法であって、  
請求項1、2、14及び17のいずれかに記載されるSタンパクまたは抗原性のあるその断片でコートされた固相であって、前記固相に曝された試料中の抗CRCVのS抗体は前記タンパクに結合する固相と、

30

前記固相に結合した前記抗CRCV抗体と結合する検出可能な標識複合体、  
を有する検定法。

【請求項38】

抗CRCVのHE抗体を検出するための免疫吸着法であって、  
請求項5または6に記載されるHEタンパクまたは抗原性のあるその断片でコートされた固相であって、前記固相に曝された試料中の抗CRCVのHE抗体は前記タンパクに結合する固相と、

40

前記固相に結合した前記抗CRCV抗体と結合する検出可能な標識複合体  
を有する検定法。

【請求項39】

前記固相はマイクロタイターウェルである、請求項37または38に記載の免疫吸着検定法。

【請求項40】

前記複合体は抗イヌ抗体を有する、請求項37または38に記載の免疫吸着検定法。

【請求項41】

前記複合体は酵素を有する、請求項37から40のいずれかに記載の免疫吸着検定法。

50

## 【請求項 4 2】

前記酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼである、請求項 4 1 に記載の免疫吸着検定法。

## 【請求項 4 3】

前記酵素の基質をさらに有する、請求項 4 1 または 4 2 に記載の免疫吸着検定法。

## 【請求項 4 4】

請求項 1、2、14 及び 17 のいずれかに記載の S タンパクまたは抗原性のあるその断片を付着させた、液体試料から抗 C R C V の S 抗体を捉えるための固体基質であって、前記固体基質に曝された試料中の抗 C R C V の S 抗体は前記 S タンパクに結合する、固体基質。

10

## 【請求項 4 5】

請求項 5 または 6 に記載の H E タンパクまたは抗原性のあるその断片を付着させた、液体試料から抗 C R C V の H E 抗体を捉えるための固体基質であって、前記固体基質に曝された試料中の抗 C R C V の H E 抗体は前記 H E タンパクに結合する、固体基質。

## 【請求項 4 6】

前記固体基質はマイクロタイターウェルである、請求項 4 4 または 4 5 に記載の固体基質。

## 【請求項 4 7】

イヌに免疫するためのワクチン構成物であって、B C V の S タンパクと少なくとも 7 5 % のアミノ酸相同性を有する S タンパクを持つコロナウイルス、または B C V タンパクと少なくとも 7 5 % のアミノ酸相同性を有するコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または前記コロナウイルスタンパクをコードする核酸もしくは免疫原性のあるその断片を有する、ワクチン構成物。

20

## 【請求項 4 8】

前記コロナウイルスタンパクは B C V、H C V、H E V もしくは C R C V タンパク、またはその改変物である、請求項 4 7 に記載のワクチン構成物。

## 【請求項 4 9】

前記コロナウイルスタンパクは S タンパクである、請求項 4 7 または 4 8 に記載のワクチン構成物。

## 【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載のワクチン構成物であって、請求項 1、2、14 または 17 のいずれかに記載の S タンパク、または B C V の S タンパク、または H C V の S タンパク、または H E V の S タンパク、または免疫原性のあるその断片を有する、ワクチン構成物。

30

## 【請求項 5 1】

前記コロナウイルスタンパクは血球凝集素 - エステラーゼタンパク ( H E ) または膜内在タンパク ( M ) である、請求項 4 7 または 4 8 に記載のワクチン構成物。

## 【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載のワクチン構成物であって、前記 H E タンパクは請求項 5 または 6 に規定される H E タンパク、B C V の H E タンパク、H C V の H E タンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である、ワクチン構成物。

40

## 【請求項 5 3】

前記ウイルスは B C V、H C V、H E V 及び C R C V、またはそれらの改変物から選択される、請求項 4 7 に記載のワクチン構成物。

## 【請求項 5 4】

医薬として使用可能なアジュバントをさらに有する、請求項 4 7 から 5 3 のいずれかに記載のワクチン構成物。

## 【請求項 5 5】

請求項 4 7 から 5 5 のいずれかに記載のワクチン構成物であって、

( a ) イヌにおいてイヌパラインフルエンザウイルス ( C P I V ) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

50

(b) イヌにおいてイヌアデノウイルス 2 型 (C A V - 2) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

(c) イヌにおいてイヌヘルペスウイルス (C H V) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

(d) イヌにおいて *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) に対する免疫応答を起こすことのできる試薬、

のいずれか 1 以上をさらに有するワクチン構成物。

【請求項 56】

イヌにおける C R C V に対す免疫応答を刺激するための薬剤の調製における使用であって、(i) C R C V の S タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を有する S タンパクを持つコロナウイルス、または (ii) B C V の S タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を有する S タンパクを持つコロナウイルス、または (iii) C R C V の H E タンパクと少なくとも 90% のアミノ酸相同性を有する H E タンパクを持つコロナウイルス、または (iv) B C V の H E タンパクと少なくとも 90% のアミノ酸相同性を有する H E タンパクを持つコロナウイルス、または (v) C R C V タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または (vi) B C V タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または (vii) 前記コロナウイルスタンパクをコードする核酸もしくは免疫原性のあるその断片、の使用。

10

【請求項 57】

イヌにおける呼吸器疾患の予防のための薬剤の調製における使用であって、(i) C R C V の S タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を有する S タンパクを持つコロナウイルス、または (ii) B C V の S タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を有する S タンパクを持つコロナウイルス、または (iii) C R C V の H E タンパクと少なくとも 90% のアミノ酸相同性を有する H E タンパクを持つコロナウイルス、または (iv) B C V の H E タンパクと少なくとも 90% のアミノ酸相同性を有する H E タンパクを持つコロナウイルス、または (v) C R C V タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または (vi) B C V タンパクと少なくとも 75% のアミノ酸相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、の使用。

20

30

【請求項 58】

前記コロナウイルスタンパクは B C V、H C V、H E V もしくは C R C V タンパク、またはそれらの改変物である、請求項 56 または 57 に記載の使用。

【請求項 59】

前記コロナウイルスタンパクは S タンパクである、請求項 56 から 58 のいずれかに記載の使用。

【請求項 60】

前記 S タンパクは請求項 1、2、14 及び 17 のいずれかに記載の S タンパク、B C V の S タンパク、H C V の S タンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である、請求項 59 に記載の使用。

40

【請求項 61】

前記コロナウイルスタンパクは H E または M である、請求項 56 から 58 のいずれかに記載の使用。

【請求項 62】

前記 H E タンパクは請求項 5 または 6 に記載の H E タンパク、B C V の H E タンパク、H C V の H E タンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である、請求項 61 に記載の使用。

【請求項 63】

前記ウイルスは B C V、H C V、H E V 及び C R C V またはそれらの改変物から選択さ

50

れる、請求項 5 6 に記載の使用。

【請求項 6 4】

医薬としての使用のための、請求項 1、2、14 及び 17 のいずれかに記載の S タンパク。

【請求項 6 5】

医薬としての使用のための、請求項 5 または 6 に記載の H E タンパク。

【請求項 6 6】

C R C V に対してイヌを免疫する方法であって、前記イヌに請求項 4 7 から 5 4 に記載のいずれかに記載のワクチン構成物を投与することを有する、方法。

【請求項 6 7】

イヌの間での C R C V の蔓延と戦う方法であって、イヌが C R C V に感染しているかどうかを請求項 2 4 から 3 6 のいずれかに記載の方法によって判別することと、前記イヌが C R C V に感染しているのであれば前記イヌを隔離することを有する方法。

【請求項 6 8】

イヌの間での C R C V の蔓延と戦う方法であって、イヌが C R C V に感染しているかどうかを請求項 2 4 から 3 6 のいずれかに記載の方法によって判別することと、前記イヌが C R C V に感染しているのであれば前記イヌと接していた、接している、または接しているかもしれない他のイヌに予防接種すること、を有する方法。

【請求項 6 9】

イヌにおいてイヌ伝染性呼吸器疾患 ( C I R D ) を予防することができる試験ワクチンを特定するための方法であって、

( a ) 請求項 2 4 から 3 6 のいずれかに記載の方法によってイヌが C R C V に曝されたかどうか判別することと、

( b ) 前記イヌが C R C V に曝されていなかったのであれば前記イヌに前記テストワクチンを投与することと、

( c ) 前記イヌに C R C V を接種することと、

( d ) 前記イヌが C I R D を発症するかどうかを判別すること、

を有し、前記工程 ( d ) において C I R D が確認されないことによって前記テストワクチンが C I R D を予防することができることを示唆される、方法。

【請求項 7 0】

請求項 6 9 に記載の方法により特定されるワクチン。

【請求項 7 1】

挿入部分が C R C V の S の c D N A の一部分を含むプラスミドを含有する Spike D-1 C R C V 系統の大腸菌であって、2002 年 7 月 25 日にザロイヤルヴェテリネリカレッジにより N C I M B に寄託されたアクセス番号 N C I M B 4 1 1 4 6 の大腸菌。

【請求項 7 2】

2002 年 7 月 25 日にザロイヤルヴェテリネリカレッジにより N C I M B に寄託されたアクセス番号 N C I M B 4 1 1 4 6 である Spike D-1 C R C V 系統の大腸菌に含まれるプラスミド。

【請求項 7 3】

請求項 3 7 から 4 3 のいずれかに記載の免疫吸着検定法のためのキットであって、固相と、固相をコーティングするための C R C V、C R C V 様の S タンパク及び / または C R C V、C R C V 様の H E タンパクと、検出可能な標識複合体とを有するキット。

【請求項 7 4】

前記固相はマイクロタイタープレートを有する、請求項 7 3 に記載のキット。

【請求項 7 5】

前記検出可能な標識複合体は抗イヌ抗体を有する、請求項 7 3 または 7 4 に記載のキット。

【請求項 7 6】

前記検出可能な標識複合体は酵素を有する、請求項 7 3 または 7 4 に記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 77】

前記酵素に対する基質をさらに有する請求項 76 に記載のキット。

## 【請求項 78】

抗 C R C V の S タンパク抗体及び / または抗 C R C V の H E タンパク抗体を含有するポジティブコントロール試料をさらに有する、請求項 73 から 77 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 79】

イヌを C R C V に対して受動的に免疫する方法であって、C R C V と反応する抗体を前記イヌに投与することを有する方法。

## 【請求項 80】

前記 C R C V と反応する抗体は抗 B C V 抗体、抗 H C V 抗体、または抗 C R C V 抗体を有する、請求項 79 に記載の方法。

## 【請求項 81】

前記 C R C V と反応する抗体は抗 S タンパク抗体または抗 H E タンパク抗体を有する、請求項 79 または 80 に記載の方法。

## 【請求項 82】

前記 C R C V と反応する抗体は請求項 20 から 23 の何れかに記載の抗 C R C V 抗体を有する、請求項 79 から 81 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 83】

イヌを C R C V に対して受動的に免疫する薬剤の調製における、C R C V と反応する抗体の使用。

## 【請求項 84】

前記 C R C V と反応する抗体は抗 B C V 抗体、抗 H C V 抗体、または抗 C R C V 抗体である、請求項 83 に記載の使用。

## 【請求項 85】

前記 C R C V と反応する抗体は抗 S タンパク抗体または抗 H E タンパク抗体である、請求項 83 または 84 に記載の使用。

## 【請求項 86】

前記 C R C V と反応する抗体は請求項 20 から 23 のいずれかに記載の抗 C R C V 抗体を有する、請求項 83 から 85 のいずれかに記載の使用。

## 【請求項 87】

C I R D の診断方法であって、請求項 24 から 36 のいずれかに規定される方法によってイヌが C R C V に曝されたかどうかを判別することを有する、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は生物材料に関し、特にイヌ感染性呼吸器疾患のイヌが持つイヌ呼吸器コロナウイルスに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

イヌ感染性呼吸器疾患 (C I R D) は、救助施設 (re-homing center) や宿泊所または訓練施設などの過密な状況で飼育されるイヌによく見られる高い伝染性を有する病気である。多くのイヌは弱い咳のみを呈し短期間で回復するが、中には重い気管支炎に発展する場合もある (Appel and Binn, 1987)。

## 【0003】

C I R D の病因は多岐にわたると考えられており、数種のウイルスやバクテリアが含まれる。感染性のある、C I R D の原因となる主な病原体としては、イヌパラインフルエンザウイルス (C P I V) (Binn et al., 1967)、イヌアデノウイルス 2 型 (C A V - 2) (Ditchfield et al., 1962)、及びバクテリアの Bordetella bronchiseptica (Bemis et al., 1977, Keil et al., 1998) が考えられている。また、イヌヘルペスウイルス、

10

20

30

40

50

ヒトレオウイルス及びマイコプラズマ類がCIRDの症状を示すイヌから単離されている (Karpas et al., 1968, Lou and Wenner 1963, Randolph et al., 1993)。ストレス等のその他の要素もまた重要となるかもしれない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

CIRDが致命的となることは希であるが、CIRDにより相当な治療費用がかかるだけでなく、イヌが救助施設から家に帰るのが遅くなったり、訓練施設でのスケジュールが乱れたりする。

【0005】

この病気に関する病原体のいくつか、すなわちCPIV及びCAV-2並びにBordetella bronchisepticaについては、ワクチンが利用可能である。しかしながら、こうしたワクチンの利用にもかかわらず、CIRDは依然として世界規模で飼育施設において流行している。これは、おそらくワクチンがCIRDに含まれるすべての病原体に対する予防作用をもたらすものではないためと考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

我々は、特有な呼吸器疾患の経歴がある大規模なイヌ飼育施設において新規なコロナウイルスを発見し、イヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)と命名した。そして、このウイルスがCIRDに関連することを示した。

【0007】

コロナウイルス科のファミリーのいくつかは、ヒト、ウシ、ブタ及び家禽の呼吸器疾患の原因となることが知られている (Makela et al., 1998, Pensaert et al., 1986, Ignjatovic and Sapats 2000)。例えば、ウシ呼吸器コロナウイルスは多因性の呼吸器疾患であるウシの輸送熱に関連している (Storz et al., 2000)。

【0008】

しかしながら、コロナウイルスはCIRDの病因の一因として疑われていなかった。実際、たったひとつの例外を除いて、イヌコロナウイルスは腸性ウイルスであり、主に若いイヌにおける急性の下痢の原因であると報告されている (例えばTennant et al., 1993)。大規模なイヌ呼吸器疾患に関連するウイルスの研究において、Binnら(1979)は一匹のイヌの肺からイヌコロナウイルスをしたが、そのイヌはSV5及びイヌアデノウイルス2型にも感染しており、イヌコロナウイルスの他に2種のウイルスを伴っていた。

【0009】

イギリスでは、神経、腸性、肝臓及び呼吸器等の疾患の原因となる種々の病原体に対する30~40のイヌワクチンが市販されている。これらのワクチンのほとんどは、ジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパルボウイルス、イヌパラインフルエンザウイルス、並びにLeptospira canicola及びL. icterohaemorrhagiaeなどの微生物試薬を含有している。これらのワクチンのいずれもイヌコロナウイルスを含有していない。

【0010】

イヌ呼吸器疾患に用いられるイヌワクチンは、“ケンネルコフ”用のワクチンとして市販されている(下記参照)。そうしたワクチンはすべて“ケンネルコフ”に関連するバクテリアであるBordetella bronchisepticumを含有している。

【0011】

Coyne M.J. 及び May S.W., (1995)は、著書"Considerations in using a canine coronavirus vaccine" (published as a Pfizer Technical Bulletin on the Internet at <http://www.pfizer.com/ah/vet/tref/trbull/ccv.html>)の中で、イヌコロナウイルス単体あるいはイヌコロナウイルスとその他に対するワクチンとして市販される20種以上のワクチンを列挙している。これらのワクチンはそれぞれイヌ腸性疾患に対するものであり、イヌコロナウイルスが呼吸器疾患に関連する可能性を示唆するものは無い。

【0012】

10

20

30

40

50

Millerらによるファイザー社のUS Patents Nos. 6,057,436 and 6,372,224には、腸性コロナウイルスのスパイク遺伝子と、胃腸性炎のワクチンとしての使用などのその使用について記載されている。これら2つの特許のいずれもイヌコロナウイルスがCIRDに関連する可能性を示唆していない。

#### 【0013】

コロナウイルス科のファミリーは直径80～160nmの被膜ウイルスで、直鎖状プラス鎖RNAゲノムを含む。コロナウイルスの構造タンパクは、スパイク糖タンパク(S)、膜糖タンパク(M)、及びヌクレオカプシドタンパク(N)である。血球凝集素/エステラーゼ糖タンパク(HE)は2属のコロナウイルスの表面でのみ発見されている(例えばウシコロナウイルス及びネズミ肝炎ウイルス)(Spaan et al, 1988)。コロナウイルス類の詳細な構造については、the chapter by Cavanagh et al entitled "Coronaviridae" p407-411, in "Virus Taxonomy, 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", pub. Springer-Verlag Wein, New York, Eds. Murphy et alに記載されており、これは参照により組み入れられる。

10

#### 【0014】

本発明のイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)は、伝染性の呼吸器疾患をもつイヌの呼吸器系に存在するコロナウイルスとして特徴としてもよい。さらにCRCVの特徴として、我々はCRCVポリメラーゼ(pol)cDNAの250残基の塩基配列を決定した(図1及びSEQ ID No. 1)。これはpolタンパクにおける83の部分アミノ酸配列に相当する(図2及びSEQ ID No. 2)。また、我々はCRCVスパイク(S)cDNAの4092残基の塩基配列をクローニング及び決定した(図3及びSEQ ID No. 3)。これは1363のアミノ酸に相当する(図4及びSEQ ID No. 4)。また、我々はCRCV血球凝集素/エステラーゼ(HE)遺伝子の497残基の塩基配列を決定した(図13及びSEQ ID No. 21)。これは165のアミノ酸に相当する(図14及びSEQ ID No. 22)。我々はCRCVが腸性性のイヌコロナウイルス(CCV)と驚くべき低い相同性を持ち、一方でウシコロナウイルス(LY138またはQuebec系統)及びヒトコロナウイルス(OC43系統)と予期せぬ高い相同性を持つことを突き止めた。

20

#### 【0015】

CRCVスパイクcDNAの一部を挿入したpT7Blue2プラスミド(Novagen)を含むXL1-Blue大腸性菌(ストラタジーン)である"Spiked-1CRCV"の培養菌は、寄託番号NCIMB41146としてブダペスト条約に基づき2002年7月25日にNCIMB社に寄託されている。NCIMB41146の寄託者はザロイヤルヴェテリネリカレッジ(Royal College Street, London NW1 0TU, UK)である。NCIMB社の住所は23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB24 3RY, UK.である。

30

#### 【0016】

CRCV pol 遺伝子と他のウイルスの対応する部分との比較に基づいて、CRCVと11の公知のコロナウイルスとの系統発生上の関係を決定した(図5)。ウシコロナウイルス(BCV)、ヒトコロナウイルス(HCV)OC43系統及び血球凝集を起こさせる脳脊髄炎ウイルス(HEV)が最もCRCVと相関していたが、一方で腸性CCVはCRCVと遠く関係しているにすぎないことが分かった。

40

#### 【0017】

図6及び7に示すように、配列が決定されたpolcDNAの250残基及び対応する83のアミノ酸について、CRCVは腸性CCV(1-71系統)pol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124986)の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ68、5%及び75.9%の相同性しかもたない。

#### 【0018】

配列が決定されたCRCVのS遺伝子の4092ヌクレオチド残基及び対応する1363のアミノ酸について、CRCVは腸性CCV(1-71系統)S遺伝子の同一の領域に

50

対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ45%及び21.2%の相同性しかもたない(図8)。

【0019】

腸性CCVはII属のコロナウイルスではないため、HE遺伝子を持たない。従ってCRCVのこの遺伝子の腸性CCVに対する配列相同性を決定することは不可能である。

【0020】

以下の場合を除き、2のヌクレオチドまたは2のアミノ酸配列間の相同性%はFASTA version 3.4 (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". Methods Enzymol.;183:63-98)を用いて決定した。FASTAの設定はGap open penaltyを-16及びGap extension penaltyを-4とした。

10

【0021】

CRCVと腸性CCVのスパイク配列の相同性%はGCG version 1.0 (Genetics Computer Group, (1991), Program Manual for the GCG Package, Version 7, April 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)を用いて決定した。使用したGCGのパラメータは以下の通りである。DNAについてGap creation penalty 50、及びgap extension penalty 3、並びにタンパク質についてGap creation penalty 8、及びGap extension penalty 2。

【0022】

配列解析はClustal Xにより行った(Thompson et al., 1997)。

【0023】

対照的に、polcDNAの250残基の配列について、CRCVはBCVのQuebec系統のpol遺伝子(Genbankアクセス番号AF220295)と98.8%の配列相同性、BCVのLY138系統のpol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124985)と98.4%の相同性、及びHCV 0C43のpol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124989)と98.4%の配列相同性を持っていた。

20

【0024】

CRCV polタンパクの83のアミノ酸配列とBCV、HCV及びHEV polタンパクとの間には、1のアミノ酸の違いしか無く、CRCVにおいて、BCVゲノム(アクセス番号SWALL:Q91A29)における4975番に対応する部位がD(Asp)ではなくE(Glu)であった。従って、CRCV polタンパクは、この領域においてBCV、HCV及びHEV polタンパクと99%相同する。

30

【0025】

ここではIUPAC-IUB生化学命名委員会の1字及び3字のアミノ酸コードを用いる。

【0026】

HE遺伝子の決定された497ヌクレオチド残基及び対応する165のアミノ酸において、CRCVはBCVのLY138系統(Genbankアクセス番号AF058942)の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ98.994%及び98.2%の配列相同性を持っていた。CRCVは、ヒト腸性コロナウイルス(HECV)のHE遺伝子(Genbankアクセス番号L07747)と98.189%(ヌクレオチド)及び98.2%(アミノ酸);HCV 0C43のHE遺伝子(Genbankアクセス番号M76373)と97.4%(ヌクレオチド)及び95.2%(アミノ酸);及びHEV(Genbankアクセス番号AF481863)と92.0%(ヌクレオチド)及び93.9%(アミノ酸)の配列相同性をそれぞれ持っていた。

40

【0027】

図16及び表3に示すように、CRCVのHEタンパクの165のアミノ酸において、CRCVのHEタンパクとBCV、HECV、HCV及びHEVのSタンパクとの間の3のアミノ酸配列の違いは、BCV、HECV、HCV 0C43及びHEV HE遺伝子の235、242及び253番に対応する部位において、それぞれにL(Leu)対しF(Phen)、T(Thr)対しN(Asn)、及びV(Val)対しL(Leu)であっ

50

た。従って235番のF、242番のN及び253番のLがCRCVのHEタンパク特異的なアミノ酸とすることができる。

【0028】

CRCVのS遺伝子の決定された4092ヌクレオチド残基及び対応する1363のアミノ酸において、CRCVはBCVのLY138系統(Genbankアクセス番号AF058942)の同一の領域に対してヌクレオチド及びアミノ酸レベルでそれぞれ97.3%及び96%の配列相同性を持っていた。図9及び10に示すように、CRCVはOC43系統のHCV(Genbankアクセス番号Z32768)と96.9%(ヌクレオチド)及び95.2%(アミノ酸)、及びHEV(Genbankアクセス番号AF481863(cDNA))及びAAM77000(タンパク)と83.8%(ヌクレオチド)及び80.4%(アミノ酸)の配列相同性をそれぞれ持っていた。

10

【0029】

CRCVのSタンパクにおける1363のアミノ酸について、CRCVのSタンパクとBCV、HCV、及びHEV Sタンパクのそれぞれとの間で異なるアミノ酸を以下の表1に列挙する。従って、表1に列挙されるアミノ酸がCRCVのSタンパク特異的なアミノ酸であると言える。アミノ酸はCRCVタンパクの最初のM残基を始点として、図4に示されるような番号が付されている。

【表 1】

表1：BCV、HCV及びHEVのSタンパクには存在しない、CRCVのSタンパクに特異的な39のアミノ酸のリスト

位置	アミノ酸
103	V
118	V
166	D
171	M
179	K
192	P
210	S
235	H
267	F
388	F
407	M
436	S
440	I
447	I
501	F
525	Y
528	N
540	L
582	K
608	G

位置	アミノ酸
692	G
695	S
757	W
758	G
763	Q
769	T
786	P
792	H
818	R
827	P
828	V
887	F
933	D
977	F
1011	T
1018	S
1063	K
1256	L
1257	M

10

20

30

40

【0030】

本発明の第1の側面は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、表4に

50

示すアミノ酸配列のC R C VのSタンパクと少なくとも75%の配列相同性を有し、少なくとも103番のV、118番のV、166番のD、171番のM、179番のK、192番のP、210番のS、235番のH、267番のF、388番のF、407番のM、436番のS、440番のI、447番のI、501番のF、525番のY、528番のN、540番のL、582番のK、608番のG、692番のG、695番のS、757番のW、758番のG、763番のQ、769番のT、786番のP、792番のH、818番のR、827番のP、828番のV、887番のF、933番のD、977番のF、1011番のT、1018番のS、1063番のK、1256番のL、及び1257番のMのうち少なくとも1を有するものである。アミノ酸は、表4 (SEQ ID No. 4) に示されるようにC R C VのSタンパクの最初のMを始点として番号が付されている。

10

#### 【0031】

当然ながら、C R C VのSタンパクの部分ヌクレオチド配列は、D-1 C R C V系統の大腸性菌に含まれるプラスミドの挿入配列をシークエンスすることにより、当業者であれば容易に決定することができる。この大腸性菌は、寄託番号NCIMB41146としてブダペスト条約に基づき2002年7月25日にNCIMB社に寄託されている。さらにこのDNAは、ハイブリダイゼーションプローブまたはプローブ設計の基礎として、イヌにおけるC R C V核酸の単離に用いることができる。

#### 【0032】

念のためではあるが、本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、表4に示すアミノ酸配列のC R C VのSタンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも75%の配列相同性を有し、少なくとも表1に列挙する位置のC R C VのSタンパクに特異的なアミノ酸のうち少なくとも1を有するものである。

20

#### 【0033】

“タンパク”には糖タンパクの意味も含まれる。糖タンパクのアミノ酸配列は、糖タンパクのポリペプチド主鎖の配列であり、そこに付随する糖の型、数、配列及び位置とは無関係である。

#### 【0034】

典型的には、本発明は単離されたタンパクまたは組み換えタンパクを含み、C R C V構成部分として存在する改変されていないC R C Vタンパクを含まない。

30

#### 【0035】

本発明はコロナウイルスのSタンパク及びその断片であって、C R C VのSタンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも76%のアミノ酸配列相同性を有し、またはC R C VのSタンパクと少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に列挙する位置において少なくとも1のC R C VのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

40

#### 【0036】

また、本発明は、コロナウイルスのSタンパク及びその断片であって、C R C VのSタンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に列挙する位置に置いて少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少な

50

くとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、または少なくとも38のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

【0037】

好ましくは、コロナウイルスSタンパクまたはその断片は、表1に列挙する位置においてCRCVのSタンパクに特異的な39のアミノ酸残基のすべてを有する。

【0038】

従って、本発明はBCV、HCVもしくはHEVのSタンパクまたはその断片であって、表1に列挙する位置の内すくなくとも1の位置においてCRCVのSタンパクに近づくよう改変されているものを包含する。

10

【0039】

好ましくは、本発明のコロナウイルスSタンパクは図4(SEQ ID No. 4)に示す配列または前記配列と少なくとも97%の相同性を持つその変体を有するまたはのみからなるCRCVのSタンパクである。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸配列相同性を有する。

20

【0040】

従って、本発明のコロナウイルスSタンパクの変体は図4(SEQ ID No. 4)に示す配列を有するまたはのみからなるが、図4に示す配列と1から40個のアミノ酸の違いがある。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と40未満のアミノ酸の違いを有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも35、少なくとも30、少なくとも25、少なくとも20、少なくとも15、または少なくとも10、9、8、7、6、5、4、3、もしくは2のアミノ酸の違いを有し、または1のアミノ酸の違いを有する。

【0041】

また、本発明は図4(SEQ ID No. 4)に示す配列の断片であり、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するCRCVのSタンパクの断片を包含する。

30

【0042】

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパク(SEQ ID No. 14、Genbankアクセス番号AF058942)と少なくとも75%のアミノ酸配列相同性を有し、少なくとも103番のV、118番のV、166番のD、171番のM、179番のK、192番のP、210番のS、235番のH、267番のF、388番のF、407番のM、436番のS、440番のI、447番のI、501番のF、525番のY、528番のN、540番のL、582番のK、608番のG、692番のG、695番のS、757番のW、758番のG、763番のQ、769番のT、786番のP、792番のH、818番のR、827番のP、828番のV、887番のF、933番のD、977番のF、1011番のT、1018番のS、1063番のK、1256番のL、及び1257番のMのうち少なくとも1を有するものを包含する。

40

【0043】

念のためではあるが、本発明はLY138系統のBCVのSタンパク(SEQ ID No. 14)と少なくとも75%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するコロナウイルスのSタンパクまたはその断片を包含する。

【0044】

50

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパクと少なくとも76%のアミノ酸配列相同性、または少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するものを包含する。

**【0045】**

本発明は、コロナウイルスのSタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのSタンパク(SEQ ID No. 14)と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸配列相同性を有し、表1に示す位置において少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、

10

20

**【0046】**

好ましくは、前記コロナウイルスのSタンパクまたはその断片は表1に示す位置における39のすべてのCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸残基を有する。

**【0047】**

本発明の第2の側面は、コロナウイルスのpolタンパクまたはその断片であって、BCVのpolタンパク(SEQ ID No. 5)と少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を有し、BCVゲノム(アクセス番号SWALL: Q91A29)の4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものである。

30

**【0048】**

本発明は、コロナウイルスpolタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列相同性、またはLY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、BCVゲノム(アクセス番号SWALL: Q91A29)の4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものを包含する。

**【0049】**

好ましくは、前記コロナウイルスのpolタンパクまたはその断片は、図2に示すアミノ酸配列を有するまたはのみからなるCRCV polタンパクまたはその断片である。

40

**【0050】**

従って、本発明はBCV、HCVまたはHEVのpolタンパクまたはその断片であって、BCVゲノムの4975番に相当するアミノ酸がCRCVのpolタンパクに近づきよう改変されているものを包含する。

**【0051】**

また、本発明は図2(SEQ ID No. 2)に示す配列の断片を有するCRCVのpolタンパクの断片であり、BCVゲノムの4975番に相当する位置にアミノ酸Eを有するものを包含する。

**【0052】**

本発明の第3の側面は、コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片であって、LY13

50

8系統のBCVのpolタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLの少なくとも1を有するものである。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM(1番となる)を始点として番号が付されている。

【0053】

本発明は、コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片であって、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列相同性、またはLY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLの少なくとも1を有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM(1番となる)を始点として番号が付されている。

10

【0054】

本発明は、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸配列相同性、またはLY138系統のBCVのpolタンパクと少なくとも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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLのうちの2を有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM(1番となる)を始点として番号が付されている。

【0055】

本発明は、LY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも91%のアミノ酸配列相同性、またはLY138系統のBCVのHEタンパクと少なくとも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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLのうちの3個すべてを有する。アミノ酸はBCVのHEタンパクの最初のM(1番となる)を始点として番号が付されている。

20

【0056】

好ましくは、前記コロナウイルスのHEタンパクまたはその断片は、図14(SEQ ID No. 22)に示すアミノ酸配列を有するまたはのみからなるCRCVのHEタンパクまたはその断片である。

30

【0057】

従って、本発明はBCV、HCVもしくはHEVのHEタンパクまたはその断片であり、235番、242番または253番に相当するアミノ酸の1以上がCRCVのHEタンパクに近づくよう改変されているものを包含する。

【0058】

また、本発明は図14(SEQ ID No. 22)に示す配列の断片を有するCRCVのHEタンパクの断片であり、235番のL、242番のNまたは253番のLの1以上を有する。これらのアミノ酸の番号は、LY138系統のBCVのHEタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と対応し、残基の番号1はLY138系統のBCVのHEタンパクの最初のMを始点とする。

40

【0059】

ここでは、上記本発明の第1、第2及び第3の側面のコロナウイルスのS、pol及びHEタンパクを“CRCV”または“CRCV様”タンパクとする。

【0060】

“CRCVのSタンパク”とは、図4(SEQ ID No. 4)に示す天然のCRCVのSのアミノ酸配列、または表1に示す位置において少なくとも1のCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するその断片の配列を有する、Sタンパクまたはその断片である。

【0061】

“CRCVのpolタンパク”とは、図2(SEQ ID No. 2)に示す天然のC

50

R C Vの p o lのアミノ酸配列またはB C Vゲノムの4 9 7 5番に相当する位置にアミノ酸Eを有するその断片の配列を有する、p o lタンパクまたはその断片である。

【0062】

“C R C VのH Eタンパク”とは、図14 (S E Q I D N o . 2 2)に示す天然のC R C VのH Eタンパクのアミノ酸配列または2 3 5番のF、2 4 2番のN及び2 5 3番のLの少なくとも1を有するその断片の配列を有する、H Eタンパクまたはその断片である。これらのアミノ酸番号はLY138系統のB C VのH Eタンパク (Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)と対応しており、LY138系統のB C VのH Eタンパクの最初のMを1番の残基としている。

【0063】

“C R C V様Sタンパク”とは、天然のC R C VのSアミノ酸配列 (図4及びS E Q I D N o . 4)と同一のアミノ酸配列ではないが、C R C VまたはLY138系統のB C VのSタンパクに対応する領域と少なくとも7 5 %の配列相同性を持ち、表1に示す位置において少なくとも1のC R C VのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するSタンパクまたはその断片である。

【0064】

また、“C R C V様Sタンパク”には、天然のC R C VのSアミノ酸配列 (図4及びS E Q I D N o . 4)と同一のアミノ酸配列ではないが、表4に示す配列と少なくとも9 7 %の相同性を有する表4に示す配列の変体を有するあるいはのみからなるSタンパクも含まれる。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも9 8 %または少なくとも9 9 %のアミノ酸配列相同性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも9 9 . 1 %、少なくとも9 9 . 2 %、少なくとも9 9 . 3 %、少なくとも9 9 . 4 %、少なくとも9 9 . 5 %、少なくとも9 9 . 6 %、少なくとも9 9 . 7 %、少なくとも9 9 . 8 %、または少なくとも9 9 . 9 %のアミノ酸配列相同性を有する。

【0065】

“C R C V様p o lタンパク”とは、天然のC R C Vのp o lアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列ではないが、C R C VまたはLY138系統のB C Vのp o lタンパクの対応する領域と少なくとも9 0 %の配列相同性を持ち、B C Vゲノムの4 9 7 5番に対応する位置にEを有するp o lタンパクまたはその断片である。

【0066】

“C R C V様H Eタンパク”とは、天然のC R C VのH Eアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列ではないが、LY138系統のB C VのH Eタンパクの対応する領域と少なくとも9 0 %の配列相同性を持ち、2 3 5番のF、2 4 2番のN及び2 5 3番のLのうちの1以上を有するH Eタンパクまたはその断片である。これらの3のアミノ酸の番号はLY138系統のB C VのH Eタンパク (Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)において、LY138系統のB C VのH Eタンパクの最初のMを1番の残基とするアミノ酸番号に対応する。

【0067】

好ましくは、C R C VもしくはC R C V様タンパク、またはその断片は、少なくともアミノ酸1 0個の長さである。より好ましくは、C R C VもしくはC R C V様タンパク、またはその断片は、少なくとも2 0、少なくとも3 0、少なくとも4 0、少なくとも5 0、少なくとも1 0 0、少なくとも2 0 0、少なくとも3 0 0、少なくとも4 0 0、少なくとも5 0 0、少なくとも6 0 0、少なくとも7 0 0、少なくとも8 0 0、少なくとも9 0 0、少なくとも1 0 0 0、少なくとも1 1 0 0、または少なくとも1 2 0 0個のアミノ酸の長さである。

【0068】

好ましくは、C R C VもしくはC R C V様タンパク、またはその断片は、アミノ酸1 3 0 0個未満の長さである。より好ましくは、C R C VもしくはC R C V様タンパク、またはその断片は、約1 2 0 0未満、約1 1 0 0未満、約1 0 0 0未満、約9 0 0未満、約8 0 0未満、約7 0 0未満、約6 0 0未満、約5 0 0未満、約4 0 0未満、約3 0 0未満、約2 0 0未満、約1 0 0未満または約5 0未満のアミノ酸の長さである。

10

20

30

40

50

## 【0069】

CRCVタンパクはCRCVから単離されてもよく、または例えば単離したタンパクの部分分解などのタンパク化学的な方法を用いて作製されてもよく（末端分解でも内分解でも良い）、または新たに合成されるものでもよい。あるいは、CRCV様タンパクだけでなくCRCVタンパクは、組み換えDNA技術により作製されてもよい。核酸のクローニング、取り扱い、修飾及び発現、並びに発現したタンパクの精製に好適は公知であり、例えば参照により組み込まれるSambrook et al (2001) "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 3<sup>rd</sup> edition, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USAに記載されている。

## 【0070】

CRCVまたはCRCV様タンパクのより短い断片、即ちペプチドは、一般的な方法によって合成して良い。ペプチドはLu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433及びそこでの参照において記載される固相ペプチド合成のFmocポリアミド法により合成して良い。N-アミノ類は、9-フルオロレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)類により一時的に保護される。この塩不安定な保護基は20%ピペリジンのN,N-ジメチルホルムアミド溶液の作用により反復的に開裂する。側鎖の官能性は、そのブチルエーテル(セリン、トレオニン及びチロシンの場合)、ブチルエステル(グルタミン酸及びアスパラギン酸の場合)、ブチロキシカルボニル誘導体(リシン及びヒスチジンの場合)、トリチル誘導体(システインの場合)、及び4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルフォニル誘導体(アルギニンの場合)として保護してもよい。ここで、グルタミンまたはアスパラギンがC末端基である場合、4,4'-ジメトキシベンズヒドリル基が側鎖アミノ官能性を保護するのに用いられる。固相支持体は、ジメチルアクリルアミド(主鎖モノマー)、ビスアクロイルエチレンジアミン(架橋剤)及びアクリロイルサルコジンメチルエステル(機能化剤)の3種のモノマーから構成されるポリジメチル-アクリルアミドポリマーを素材とする。ペプチド-樹脂間の開裂可能な結合剤としては、酸に不安定な4-ヒドロキシメチル-フェノキシ酢酸誘導体を用いられる。すべてのアミノ酸誘導体は、あらかじめ作られた対称形の無水物誘導体として添加される。但し、アスパラギン及びグルタミンは逆N,N-ジシクロヘキシル-カルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを介したカップリング法を用いて添加される。すべてのカップリング及び保護解除反応はニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸もしくはisotintest法により測定される。合成が完了すると、50%スカベンジャー混合物を含む95%トリフルオロ酢酸で処理してペプチドを樹脂支持体より開裂させ、同時に側鎖保護基を取り除く。スカベンジャーは一般にはエタンジオール、フェノール、アニソール及び水が使われるが、合成されたペプチドを構成するアミノ酸に従って正確に選択される。減圧蒸発によりトリフルオロ酢酸を除去したのち、ジエチルエーテルと共に粉碎して粗ペプチドを得る。使用したあらゆるスカベンジャーは水相の凍結乾燥による簡便な抽出処理により取り除かれ、粗ペプチドはスカベンジャーフリーとなる。ペプチド合成のための試薬は、カルピオケム-ノバピオケム社(イギリス)、ノッティングナム NG7 2QJ、イギリスにより市販されている。精製は限外クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及び(主に)逆相高性能液体クロマトグラフィーなどの単独使用もしくは組み合わせにより行われる。ペプチドの分析は薄層クロマトグラフィー、逆相高性能液体クロマトグラフィー、酸加水分解によるアミノ酸分析、及び高速原子衝突(FAB)質量分析法により行ってよい。

## 【0071】

本発明の第4の側面はポリヌクレオチドであって、本発明の第1、第2及び第3の側面によるCRCVまたはCRCV様のS、polまたはHEタンパクをコードするポリヌクレオチドまたはその相補ポリヌクレオチドである。

## 【0072】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは本発明の第1の側面のCRCVのSタンパクをコードするポリヌクレオチドまたはその相補ポリヌクレオチドである。

## 【0073】

10

20

30

40

50

より好ましくは、C R C VのSタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図3 ( S E Q I D N o . 3 ) に記載の配列を有するあるいはのみからなる。

【0074】

当然ながら、図3 ( S E Q I D N o . 3 ) に示す配列は3531番にYを含み、これはCもしくはTを表す。どちらの場合も、対応するアミノ酸はI l eである。従って、本発明は図3に示す配列を有するあるいはのみからなるC R C VのSタンパクをコードするポリヌクレオチドであり、3531番にCを有するものを包含する。また、本発明は図3に示す配列を有するあるいはのみからなるC R C VのSタンパクをコードするポリヌクレオチドであり、3531番にTを有するものも包含する。

【0075】

また本発明は、図3 ( S E Q I D N o . 3 ) に示す配列の断片を有し、表1に示す位置において少なくとも1のC R C VのSタンパクに特異的なアミノ酸を有するタンパクをコードするC R C VのSのポリヌクレオチドも包含する。

【0076】

好ましくは、p o lタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図1 ( S E Q I D N o . 1 ) に示す配列またはその相補的配列を有するもしくはのみからなる。

【0077】

また、本発明はB C Vゲノムの4975番に相当する位置にEを有するタンパクをコードする図1 ( S E Q I D N o . 1 ) に示す配列の断片を有するC R C Vポリヌクレオチドまたはその相補ヌクレオチドを包含する。

【0078】

好ましくは、H Eタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図13 ( S E Q I D N o . 21 ) に示す配列またはその相補配列を有するまたはのみからなる。

【0079】

また、本発明は235番のF、242番のNまたは253番のLの1以上を有するタンパクをコードする図13 ( S E Q I D N o . 21 ) に示す配列の断片を有するC R C VのH Eのポリヌクレオチドを包含する。これらの3のアミノ酸の番号はLY138系統のB C VのH Eタンパク ( Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2 ) において、LY138系統のB C VのH Eタンパクの最初のMを1番の残基とするアミノ酸番号に対応する。

【0080】

上記のポリヌクレオチドをここでは本発明のC R C VまたはC R C V様ポリヌクレオチドとする。

【0081】

“ C R C V様ポリヌクレオチド ” とは、図1、3及び13 ( S E Q I D N o . 1、3及び21 ) に列挙するような天然のC R C V c D N A配列のすべてまたはその断片を有さないが、上記のC R C VもしくはC R C V様のS p o lまたはH Eタンパクをコードするヌクレオチド、またはその相補的なヌクレオチドである。

【0082】

C R C Vはプラス鎖R N Aウイルスである。本発明のポリヌクレオチドはD N AまたはR N Aであってよい。R N Aはプラス鎖またはマイナス鎖R N Aであってよい。D N Aは一本鎖または二本鎖D N Aであってよい。

【0083】

C R C Vなどのプラス鎖R N Aウイルスからc D N Aをクローニングし配列を決定するための好適な方法は公知であり、例えば本願に参照により取り込まれるSambrook et al 2001に記載されている。

【0084】

本発明のC R C VまたはC R C V様ポリヌクレオチドはどのような大きさであってもよい。しかしながら、プローブ用または増幅用など特定の目的に対しては、核酸は3000塩基対 ( 核酸が2本鎖の場合 ) または塩基 ( 核酸が一本鎖の場合 ) より少ないことが好ましく、より好ましくは1000より少ない、さらには10から100、さらに好ましくは

10

20

30

40

50

15から30である。以下により詳細に記載するが、1本鎖DNAオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用またはポリメラーゼ連鎖反応におけるプライマーとしての使用に好適であり、特に好ましい。

【0085】

オリゴヌクレオチドとしては、CRCVのS、polまたはHEポリヌクレオチドを特異的に増幅またはこれらと特異的にハイブリダイズするが、BCV、HCVまたは腸性CCVのS、polまたはHEポリヌクレオチドとは作用しないものが特に好ましい。当業者であれば、図6、8、9、及び15のヌクレオチド配列の比較を参照することで好適なオリゴヌクレオチドを決定することができる。

【0086】

当然ながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドは、たとえ非常にストリンジентな状況下であっても、CRCVに加えてHCV、BCV及びHEV由来のRNAまたはDNAのいずれの核酸ともハイブリダイズしてもよい。しかしながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCV由来の核酸とであれば、HCV、BCVまたはHEV由来の核酸よりもよりストリンジентな状況下でもハイブリダイズすることが好ましい。これは実験的に、あるいはオリゴヌクレオチド配列とCRCV、HCV、BCVまたはHEV配列のそれぞれとの比較により決定することができるが、これらは当業者によりよく知られている(Sambrook et al 2001)。

【0087】

また、当然ながらCRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCVに加えて腸性CCV由来のRNAまたはDNAのいずれの核酸ともハイブリダイズしてもよい。しかしながら、CRCVまたはCRCV様オリゴヌクレオチドはCRCV由来の核酸とであれば、CCV由来の核酸よりもよりストリンジентな状況下でもハイブリダイズすることが好ましい。これは実験的に、あるいはオリゴヌクレオチドの配列とそれぞれの配列との比較により決定することができるが、これらは当業者によりよく知られている(Sambrook et al 2001)。好ましくは、オリゴヌクレオチドはどのようなストリンジентな状況下でも腸性CCV由来の核酸とはハイブリダイズしないことが好ましい(下記参照)。

【0088】

簡便のためとして、CRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはさらに検出可能な標識を有する。

【0089】

“検出可能な標識”には、公知の方法により核酸分子に容易に取り込ませることができる<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>Pまたは<sup>35</sup>Sなどのあらゆる簡便な放射性標識が含まれる。また、核酸分子に容易に取り込ませることができるあらゆる簡便な蛍光または化学ルミネッセンス標識も含まれる。さらに、“検出可能な標識”には、他の部分の結合することで検出できる一部分(ストレプトアビジンと結合することで検出できるビオチンなど)や、酵素などの一部分で無色の化合物を色の付いた化合物に転化する能力、またはその逆の能力を持つことから検出できるもの(例えばアルカリホスファターゼは、無色のo-リン酸ニトロフェニルを色の付いたo-ニトロフェノールに転化することができる)も含まれる。簡便のためとして、核酸プローブは固定されたアレイの特定の位置を占めるものであってよく、核酸がプローブにハイブリダイズしたかどうかをアレイにおけるハイブリダイゼーションの位置を参照することによって決定することができる。

【0090】

[<sup>32</sup>P]dCTPによる標識は、アマシャムのRediprime random primer labelling kitを用いて行ってよい。

【0091】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Saiki et al (1988) Science 239, 487-491)に好適に用いられるプライマーが好ましい。好適なPCRプライマーとしては以下の特性を持つものであってよい。

【0092】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドの5'末端の配列が増幅される標的の配列と適合する必要が無いことはよく知られている。

【0093】

通常PCRプライマーは特に3'末端において互いに2塩基以上の相互に相補的な構造を持たない。そうした場合、“プライマーダイマー”と呼ばれる副産物の形成が促進されるためである。2のプライマーの3'末端がハイブリダイズした場合、それらは“primed template”複合体を形成し、プライマーの伸長により“プライマーダイマー”と呼ばれる短い複製産物となる。

【0094】

プライマーにおいては分子内二次構造を避けるべきである。対称PCRとしては、40 - 60%のG + C含量で、1種の塩基が長く連続していないものが双方のプライマーに推奨される。DNAプローブハイブリダイゼーションの研究と古典的な解離温度の算出を組み合わせると、所定のプライマーは特定の温度でアニールすべきであり72の伸長温度ではプライマー/テンプレートハイブリッドが解離してしまう、といったことがしばしば予想される。実際、ハイブリッドはPCRにおいて単純な $T_m$ 計算により一般的に予想されるものよりも有効である。

【0095】

最適なアニール温度は経験的に決定してよく、予想よりも高くても良い。Taq DNAポリメラーゼは37~55の領域では活性を持っているので、プライマーの伸長はアニールステップの間に起こり、ハイブリッドは安定化される。プライマーの濃度は従来の(対称)PCRと同じであり、典型的には0.1~1 $\mu$ Mの範囲である。

【0096】

偏在的に発現している遺伝子に相補的なプライマーなど用いてコントロールの増幅反応を行えばより好ましい。コントロールの産物とCRCVまたはCRCV様産物が異なるサイズとなり、例えばこれら2の産物は例えばアガロースゲル電気泳動での移動度など、検出手段により区別することができるなどの有益性がある。しかしながら、2の産物は例えば共に100から1000塩基長または100から600塩基長など、同様なサイズであることが望ましいかもしれない。これにより例えばゲル電気泳動による産物の同時分析に役立つかもしれない。また、例えば反応中の異なる段階における産物の相対的な生成速度といった点から見て、コントロールとCRCVまたはCRCV様の増幅反応が同様な性能特性を持つことを意味するかもしれない。

【0097】

ポリメラーゼ連鎖反応、QBレプリカーゼ及びリガーゼ連鎖反応を含む本発明の方法では、あらゆる核酸増幅プロトコルを用いることができる。また、3SRとも呼ばれるNASBA (nucleic acid sequence based amplification:核酸配列を基礎とする増幅法)はCompton (1991) Nature 350, 91-92 及び AIDS (1993), Vol 7 (Suppl 2)に記載されるようにして、S108またはSDA (strand displacement amplification)はWalker et al (1992) Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696に記載されるようにして用いることができる。ポリメラーゼ連鎖反応は、その平易さから特に好ましい。

【0098】

本発明の好適な核酸の組がPCRに用いられる場合、その産物はゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色によって検出するのが簡便である。その他、プローブとして増幅したDNAとハイブリダイズできる標識したオリゴヌクレオチドを用いることも便利である。PCRにより増幅を行った場合、オリゴヌクレオチドプローブは2のプライマーにより定まるインタープライマー配列とハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは10から50塩基長であり、より好ましくは15から30塩基長である。オリゴヌクレオチドプローブは増幅されたDNAより長くてもよく、1のまたは両方のプライマーを含んでいてもよい。しかしこの場合、ハイブリダイズの条件として、プローブはプライマー単体とはハイブリダイズせず、プローブとハイブリダイズできるインタープライマー配列を含む増幅産物のみとハイブリダイズすべきである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 9 】

プローブは例えば<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P及び<sup>35</sup>Sなどの放射活性ヌクレオチドにより標識してもよく、または蛍光色素により標識しても良い。オリゴヌクレオチドプローブを蛍光で標識した場合、増幅されたDNA産物は溶液中で検出される(例えばBalaguer et al (1991) "Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent" Anal. Biochem. 195, 105-110及びDilesare et al (1993) "A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation" BioTechniques 15, 152-157参照)。

## 【 0 1 0 0 】

また、PCR産物は、蛍光体 - 消光剤の組み合わせを有するプローブを用いる、プローブを固体の支持体に固着させる、ビオチンタグを有するプローブを用いる、または捕獲プローブ及び検出プローブの組み合わせを用いて検出することによっても検出することができる。

## 【 0 1 0 1 】

蛍光体 - 消光剤の組み合わせはPCR反応の量的な測定(例えばRT-PCR)に特に好適である。好適なプローブを用いた蛍光偏光もまた、PCR産物の検出に用いても良い。

## 【 0 1 0 2 】

また、本発明は、第4の側面のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドを有するベクターを包含する。

## 【 0 1 0 3 】

原核生物ベクターのプラスミドとしては、Biorad研究所(リッチモンド、CA、アメリカ)より市販されるpUC18、pUC19、pBR322及びpBR329; ファルマシア(ピスカタウェイ、NJ、アメリカ)より市販されるpTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540及びpRIT5; ストラタジーンクローニングシステム(ラホーラ、CA 92307、アメリカ)より市販されるpBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A及びpNH46Aが典型的である。

## 【 0 1 0 4 】

哺乳類細胞ベクターのプラスミドとしては、ファルマシア(ピスカタウェイ、NJ、アメリカ)より市販されるpSVLが典型的である。このベクターはクローニングされた遺伝子の発現にSV40後期プロモーターを用い、COS-1細胞のようなT抗原産生細胞において最も強い発現が見られる。誘導哺乳類発現ベクターの例としては、同様にファルマシア(ピスカタウェイ、NJ、アメリカ)より市販されるpMSGがある。このベクターは、マウス乳がんウイルスの長い末端反復の糖質コルチコイド誘導性のプロモーターをクローニングされる遺伝子の発現に用いる。

## 【 0 1 0 5 】

酵母プラスミドのベクターとしては、一般にストラタジーンクローニングシステム(ラホーラ、CA 92307、アメリカ)より市販されるpRS403-406及びpRS413-416が有用である。pRS403、pRS404、pRS405及びpRS406プラスミドは酵母Integratingプラスミド(YIps)であり、酵母に選択可能なマーカーであるHIS3、TRP1、LEU2及びURA3を取り込ませる。pRS413-416プラスミドは酵母動原体プラスミド(YCps)である。

## 【 0 1 0 6 】

一般的に、本発明のCRCV及びCRCV様ポリヌクレオチドは、プラスミドなどの発現ベクターに適当な向きと正しい読み枠で挿入される。所望のホストに認識される適切な転写及び翻訳調節を行う制御ヌクレオチド配列をベクターへの挿入に先立って結合させても良い。ただし、このような制御は一般的には発現ベクターにおいて行うことができる。従って本発明のポリヌクレオチドの挿入は、適切なプロモーターに効果的に結合するものであって良い。真核生物のプロモーターとしては、CMV immediate earlyプロモーター、HCVチミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期SV40プロモーター及びレトロウイルスのLTRsのプロモーターが挙げられる。当業者であれば、他の好適なプロモ

ターも知りうるであろう。発現の構築としては、望ましくは転写初期化及び終止のためのサイトも含み、転写される領域には、翻訳のためのリボゾーム結合サイトを含む (Hastings et al, International Patent No. WO 98/16643)。

【0107】

コード配列、及び例えば適切な転写及び翻訳制御部を含む発現ベクターの構築には当業者に公知の方法を用いることができる。そのような方法のひとつが、ホモポリマー末端を介した連結である。ポリ d A (またはポリ d C) ホモポリマー末端は DNA 断片の露出した 3' - OH 基に付加され、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによりクローニングされる。次にその断片は、線状プラスミドベクターの末端に結合されたポリ d T (またはポリ d G) 末端とアニールすることができる。アニールで残された隙間は DNA ポリメラーゼ及び DNA リガーゼにより結合される自由末端により埋めることができる。

【0108】

他の方法としては、付着端を介した結合が挙げられる。適合する付着端は、好適な制限酵素の作用により DNA 断片及びベクター上で作製することができる。こうした末端は相補的な塩基の対合において即座にアニールし、残ったニックは DNA リガーゼの作用により閉じられる。

【0109】

その他の方法では、リンカーまたはアダプターと呼ばれる合成分子を用いる。平滑末端を持つ DNA 断片は、3' 突出末端を除去し、陥凹末端 3' 末端を挿入するバクテリオファージ T4 DNA ポリメラーゼまたは大腸性菌 DNA ポリメラーゼ I により作製することができる。認識配列を含む平滑末端の 2 本鎖 DNA の断片である合成リンカーは T4 DNA リガーゼにより平滑末端の DNA 断片と結合することができる。続いてそれらは適切な制限酵素により切断されて付着端を形成し、適切な末端の発現ベクターと結合する。アダプターもまた結合に用いる 1 の平滑末端を含む化学的に合成された DNA であるが、あらかじめ形成された付着端も持つ。

【0110】

各種の制限エンドヌクレアーゼサイトを含む合成リンカーが、International Biotechnologies社、New Haven、CN、USAなど様々な企業等から市販されている。

【0111】

本発明のポリヌクレオチドを修飾するのに望ましい方法のひとつが、Saiki et al (1988) Science 239, 487-491に開示されるポリメラーゼ連鎖反応を用いる方法である。この方法では、酵素反応で増幅される DNA は、2 の特定のオリゴヌクレオチドプライマーと隣接し、このプライマー自身は増幅された DNA に取り込まれる。この特定のプライマーは、制限エンドヌクレアーゼ認識サイトを含んでいても良く、公知の方法で発現ベクターにクローニングするのに用いられる。

【0112】

また、本発明は CRCV または CRCV 様ポリヌクレオチドを有するベクターにより形質転換された宿主細胞を包含する。宿主細胞は真核生物と原核生物のいずれであってもよい。ベクター中の CRCV または CRCV 様ポリヌクレオチドが糖タンパクとして発現する場合、前記宿主細胞は真核生物の宿主細胞であり、好ましくは哺乳類の宿主細胞である。

【0113】

原核生物の宿主細胞としては微生物細胞が好ましく、典型的には大腸性菌の系統である。例としては、Bethesda Research Laboratories社、Bethesda、MD、USAより市販される DH5 系統、American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville、MD、USA (No ATCC 31343)より市販される RR1 などである。好ましい真核生物の宿主細胞としては、酵母及び哺乳類の細胞が挙げられ、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト線維芽細胞系などの脊椎動物の細胞が挙げられる。酵母の宿主細胞としては、ストラタジーンクローニングシステム (ラホーラ、CA 92307、アメリカ)より市販される YPH499、YPH500 及び YPH501 が挙げられる。好ましい哺乳類の宿主細胞としては、ATCCより CCL61として市販

されるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ATCCよりCRL 1658として市販されるNIHスイスマウス胚細胞のNIH/3T3、及びATCCよりCRL1650として市販されるサル腎臓由来COS-1細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞としては、バキュロウイルス発現ベクターによりトランスフェクションすることができるSf9細胞である。

【0114】

ベクターによる適切な宿主細胞の形質転換は、公知の方法により行うことができるが、典型的には用いるベクターの種類に依存する。原核生物の宿主細胞の形質転換に関しては、例えばCohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 and Sambrook et al (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。酵母細胞の形質転換については、Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。Beggs (1978) Nature 275, 104-109の方法もまた、有用である。脊椎動物の細胞については、その導入に有用な試薬、例えばリン酸カルシウム及びDEAEデキストランまたはリポソーム製剤などが、ストラタジーンクローニングシステムまたはLife Technologies社 (Gaithersburg, MD 20877, USA) より市販されている。

10

【0115】

エレクトロポレーションもまた細胞の形質転換に有用であり、酵母細胞、微生物細胞及び脊椎動物細胞の形質転換において公知である。

【0116】

例えば、参照により組み込まれるLuchansky et al (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646に記載される方法により種々の微生物を形質転換してもよい。2.5 × PEB溶液に懸濁させたDNA-細胞混合物に25 µFDで6250 V/cmのエレクトロポレーションを行うと、最大数の形質転換体が常に回収される。

20

【0117】

エレクトロポレーションによる酵母の形質転換の方法はBecker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182に記載される。

【0118】

DNAを動物または植物の細胞に導入するには物理的な方法を用いてもよい。DNAでコーティングした金またはタングステンの粒子を細胞に打ち込む方法がある。

【0119】

首尾良く形質転換された細胞、即ちCRCVまたはCRCV様DNA構築物を含んだ細胞、は公知の方法により識別される。例えば、選別方法のひとつとしては、発現ベクターに形質転換細胞において選別可能な特徴をコードするDNA配列 (マーカー) を組み込む方法がある。

30

これらのマーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素のG418、または真核生物の細胞培養においてはネオマイシン耐性、大腸性菌及びその他の微生物の培養においてはテトラサイクリン、カネマイシン及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。その他にも、選別可能な特徴を与える遺伝子を他のベクターに入れて、目的とする宿主細胞を協同的に形質転換するのに用いることもできる。

【0120】

マーカー遺伝子は形質転換体を特定するのに用いられるが、どの細胞が組み換えDNA分子を含み、自己結合ベクター分子を含むのかを決定できるものが望ましい。これは、DNA断片の挿入により分子上に存在する遺伝子のひとつが完全性を失うようなクローニングベクターを用いることによって得られる。従って、形質転換体はそうした遺伝子の機能の欠損に基づいて特定することができる。

40

【0121】

他にも、首尾良く形質転換された細胞を特定する方法として、本発明の発現構築物を導入した結果としてCRCVまたはCRCV様のS、p o lまたはHEタンパクを産生している細胞を培養する方法がある。細胞を回収して溶解し、DNA成分を分析して目的のDNAの存在をSouthern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 or Berent et al (1985) Biotech

50

3, 208などに記載される方法で確認することができる。他にも、後述するような抗体を用いて上清における目的のタンパクの存在を検出することもできる。

【0122】

組み換えDNAの存在を直接的にアッセイする方法に加えて、組み換えDNAが直接タンパクを発現するのであれば、形質転換が成功したかどうかは公知の免疫的な方法によって確認することができる。例えば、発現ベクターによる形質転換が成功した細胞は適当な抗原性を示すタンパクを産生する。形質転換が疑われる細胞の試料を回収して、適切な抗体を用いてタンパクをアッセイを行う。

【0123】

従って、形質転換された宿主細胞自体に加えて、本発明にはそれらの細胞の培養物も意図されている。好ましくは、栄養培地中のモノクローナルな（系統的に単一の）培養物またはモノクローナルな培養物から派生する培養物である。

【0124】

典型的には上記のベクターに挿入された組み換えCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドにより形質転換された宿主細胞は、続いてここに開示される技術を参考に公知の技術により適当な条件で十分な時間培養され、CRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるCRCVまたはCRCV様タンパクが発現させて回収する。

【0125】

CRCVまたはCRCV様タンパクは組み換え細胞培養物より公知の方法により回収及び生成される。公知の方法としては、硫酸またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸セルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、水酸アパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーが挙げられる。最も好ましいのは、高性能液体クロマトグラフィー“HPLC”を用いた精製である。

【0126】

例えば、バキュロウイルス系の発現において、CRCVスパイク遺伝子をコードする組み換えDNAはpMelBac (Invitrogen)などの好適な移転ベクターにクローニングしても良い。バキュロウイルスDNA（例えばBac-N-Blue/Invitrogen）と共に導入することで、スパイクタンパクをコードする組み換えバキュロウイルスとなる。好適な昆虫細胞系（例えばSf9、Sf21、High Five/Invitrogen）に適切な感染効率で感染させると、組み換えスパイクタンパクが発現する。タンパクの発現は、適当な試薬（例えば回復期のイヌ血清またはその他のウイルス特異的な抗体）を用いてウエスタンブロッティングまたはELISAにより確認することができる。

【0127】

従って本発明は、本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるCRCVまたはCRCV様タンパクを得る方法を包含する。前記方法は、典型的にはベクターであるCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドを有する宿主細胞の培養することと、タンパク質を前記宿主細胞内で発現させることと、前記タンパク質を精製することを有する。本発明はさらに、この方法により得られるタンパク質を包含する。

【0128】

従って本発明は、典型的にはSタンパクであり、本発明のCRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドによりコードされるグリコシル化CRCVまたはCRCV様タンパクも包含する。前記方法は、典型的にはベクターであるCRCVまたはCRCV用のポリヌクレオチドを有する真核生物、より好ましくは哺乳類の宿主細胞の培養と、宿主細胞中のタンパクの発現と、前記グリコシル化タンパクの精製を有する。本発明はさらに、この方法によって得られるグリコシル化タンパクを包含する。

【0129】

第5の側面としての本発明は、抗CRCV抗体の作製方法であり、前記方法は動物において上記本発明の第1の側面のCRCVまたはCRCV様Sタンパクに対する免疫反応を起こさせることと、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製することを含

10

20

30

40

50

む。前記方法は、その他に本発明の第1の側面に記載のCRCVまたはCRCV様Sタンパクを用いて抗体発現ライブラリから抗体を選択することを有していても良い。

【0130】

モノクローナル抗体を作製する方法及び技術は当業者に公知であり、例えば参照として組み込まれる*Monoclonal Antibodies: A manual of techniques*", H Zola (CRC Press, 1988) and in *"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications"*, J G R Hurrell (CRC Press, 1982)に開示される方法がある。

【0131】

また本発明は、さらに任意でこのようにして得られた抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーがBCVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、及び好ましくは前記抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーがHCV及びHEVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、を有する。抗体の抗原に対する相対的なアフィニティーを決定する方法は公知である。

10

【0132】

また本発明は、本発明の第5の側面の方法により得られる、CRCVのSタンパクに対するアフィニティーがBCVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高い抗CRCV抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のCRCVのSタンパクに対するアフィニティーは、さらにHCV及びHEVのSタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

【0133】

また本発明は抗CRCV抗体の作製方法を包含し、前記方法は動物において上記本発明の第3の側面のCRCVまたはCRCV様のHEタンパクに対する免疫応答反応を起こさせることと、前記動物または前記動物由来の不死細胞から抗体を調製することを含む。前記方法は、その他に本発明の第3の側面に記載のCRCVまたはCRCV様HEタンパクを用いて抗体発現ライブラリから抗体を選択することを有していても良い。

20

【0134】

また本発明は、さらに任意でこのようにして得られた抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがBCVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、及び好ましくは前記抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがHCV及びHEVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高いかどうかを決定すること、を有する。抗体の抗原に対する相対的なアフィニティーを決定する方法は公知である。

30

【0135】

また本発明は、本発明の第5の側面の方法により得られる、CRCVのHEタンパクに対するアフィニティーがBCVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高い抗CRCV抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のCRCVのHEタンパクに対するアフィニティーは、さらにHCV及びHEVのHEタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

【0136】

好ましくは前記抗体はモノクローナル抗体である。しかしながら、本発明は単一特異的な抗CRCV抗体を包含する。前記抗体は、後述する抗体断片であって良い。

40

【0137】

前記モノクローナルまたは単一特異性の抗体は、Neuberger et al (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799)において論じられるようなキメラ抗体であってよい。前記モノクローナル抗体または単一特異的な抗体は“イヌ化された”抗体であってよく、例えばマウス抗体のCDR領域をイヌ抗体の骨格に挿入して作られる。

【0138】

また本発明は、抗CRCV抗体の断片を包含する。抗体の可変H(V<sub>H</sub>)及び可変L(V<sub>L</sub>)ドメインは、抗原認識に関係しており、この事実はプロテアーゼによる消化実験により最初に認められた。これはさらにげっ歯目の抗体の“ヒト化”により確認された。げっ歯目由来の可変領域をヒト由来の不変領域と融合させて作られた抗体は、母体となった

50

げっ歯目抗体の抗原特異性を保持している (Morrisonら (1984) Proc. Acac. Sci. USA 81, 685 1-6855)。

【0139】

この抗原特異性は可変領域により付与されるものであり、不変領域からは独立していることが、1以上の可変領域のすべてを含む抗体断片をバクテリアで発現させた実験によって知られている。

【0140】

これらの分子にはF a b様の分子 (Better et al (1988) Science 240, 1041)、F v分子 (Skerra et al (1988) Science 240, )、V HとV Lの組となるドメインが柔軟なオリゴペプチドを介して結合している一本鎖F v (S c F v)分子 (Bird et al (1988) Science 242, 423及びHuston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879)及び孤立したVドメインを含む単一ドメイン抗体 (d A b s) (Ward et al (1989) Nature 341, 544)を含まれる。抗体断片の合成に関する技術の一般的概要については、Winter & Milstein (1991) Nature 349 293-299に記載されている。

10

【0141】

“S c F V分子”とは、V HとV Lの組となるドメインが柔軟なオリゴペプチドを介して結合した分子を意味する。

【0142】

完全体の抗体に対して抗体断片の優位性は数倍にもなる。より小さなサイズの断片は例えば固体組織への浸透性などの薬理学的な特性を改善するかもしれない。また、補体結合などの抗体全体の効果または影響は取り除かれる。F a b、F v、S c F vおよびd A b抗体断片はすべて大腸性菌により発現及び分泌させることができるので、容易に大量生産することができる。

20

【0143】

完全体の抗体、及びF (a b')<sub>2</sub>断片は“2価”である。“2価”とは、抗体及びF (a b')<sub>2</sub>断片が2の抗原結合部位を持つことを意味する。対照的に、F a b、F v、S c F v及びd A b断片は1価であり、1の抗原結合部位を持つ。

【0144】

第6の側面としての本発明は、イヌがC R C Vに曝されたかどうかを決定する方法である。前記方法は、イヌから好適な試料を得ることと、前記試料中のC R C Vまたは抗C R C V抗体を特定すること、を有する。前記方法はイヌがC I R Dに感染しているかどうかを診断する補助としても良い。

30

【0145】

本発明は、イヌから得た試料において、そのイヌが過去にC R C Vに曝された経歴を検出する方法を包含し、前記方法はイヌから好適な試料を得ることと、前記試料中に抗C R C V抗体を特定することを、有する。

【0146】

好ましい実施例のひとつとして、前記好適な試料は血清、唾液、気管洗液または細気管支洗液などのあらゆる抗体含有試料であって良い。

【0147】

好ましくは、抗C R C V抗体はB C V、H C V、H E VまたはC R C V抗原を用いて検出され、より好ましくはB C VまたはC R C V抗原を用いて検出される。

40

【0148】

より好ましくは、試料における抗C R C V抗体の特定は、C R C VのSタンパクのアミノ酸配列 (図4及びSEQ ID No. 4)と少なくとも75%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパク、B C VのSタンパク (Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)のアミノ酸配列と少なくとも75%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパク、H C VのSタンパク (Genbankアクセス番号L 1 4 6 4 3)、B C VのSタンパク (Genbankアクセス番号A F 0 5 8 9 4 2)と少なくとも75%の相同性をもつSタンパクを有するコロナウイルスまたはその断片、またはC R C VのSタンパクと少なくとも75%の相同性を持

50

つSタンパクを含むコロナウイルスもしくはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【0149】

より好ましくは、BCVのSタンパクのアミノ酸配列と少なくとも75%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、BCVのSタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)のアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパク、またはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0150】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、BCVのSタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と選択的に結合する抗体を特定することを有する。 10

【0151】

より好ましくは、CRCVのSタンパクのアミノ酸配列と少なくとも75%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、CRCVのSタンパクのアミノ酸配列(図4及びSEQ ID No. 4)と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の相同性をもつアミノ酸配列のSタンパク、またはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0152】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、本発明の第1の側面のCRCVまたはCRCV様のSタンパクと選択的に結合する抗体を特定することを有する。 20

【0153】

最も好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定すること、とは、図4(SEQ ID No. 4)に示すCRCVのSタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【0154】

同様に、試料における抗CRCV抗体を特定する、とは、CRCVのHEタンパクの部分アミノ酸配列(図14及びSEQ ID No. 22)と少なくとも90%の相同性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと、BCVのHEタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)の部分アミノ酸配列またはHECVのHEタンパク(Genbankアクセス番号L07747)と少なくとも90%の相同性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと、BCVのHEタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と少なくとも90%の相同性を持つSタンパクを含むコロナウイルスと、もしくはその断片と、またはCRCVのHEタンパクと少なくとも90%の相同性を持つHEタンパクを含むコロナウイルスまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有していても良い。 30

【0155】

より好ましくは、BCVのHEタンパクのアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を持つアミノ酸配列のHEタンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、BCVのHEタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)のアミノ酸配列と少なくとも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%の相同性を持つアミノ酸配列のHEタンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。 40

【0156】

より好ましくは、試料における抗CRCV抗体の特定とは、BCVのHEタンパク(Genbankアクセス番号AF058942)と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【0157】

さらにより好ましくは、CRCVのHEタンパクのアミノ酸配列と少なくとも90%の 50

相同性を持つアミノ酸配列の H E タンパクと選択的に結合する抗体を特定する、とは、C R C V の H E タンパク ( 図 1 3 ) の部分アミノ酸配列と少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % の相同性を持つアミノ酸配列の H E タンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定すること、を有する。

【 0 1 5 8 】

さらにより好ましくは、試料における抗 C R C V 抗体を特定することが、本発明の第 3 の側面に規定される C R C V または C R C V 様の H E タンパクに選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【 0 1 5 9 】

最も好ましくは、試料における抗 C R C V 抗体を特定することが、図 1 4 ( S E Q I D N o . 2 2 ) に示す部分アミノ酸配列の C R C V の H E タンパクまたはその断片と選択的に結合する抗体を特定することを有する。

【 0 1 6 0 】

本発明は、イヌから得た試料において C R C V を検出する方法を包含し、前記方法はイヌから好適な試料を得ることと、前記試料中に C R C V を特定することを、有する。

【 0 1 6 1 】

当然ながら、異なる C R C V の単離物の間にはある程度の自然発生した配列の変化があつてよい。従つて本発明は、C R C V 単離物であり、その S、p o l、及び H E の遺伝子及びタンパクの配列が図 1 から 4、1 3 及び 1 4 に示す配列からある程度変化した C R C V 単離物を特定することを包含する。しかしながら、当然そうした C R C V の変体単離物の検出には、図 1 から 4、1 3 及び 1 4 に示す配列を特徴とする単離物の検出と同じ方法が用いられる。

【 0 1 6 2 】

好ましい実施例では、肺洗液、気管洗液、扁桃腺の綿棒採取標本またはイヌの気管から得た生検もしくは死後の試料が好適な試料である。

【 0 1 6 3 】

本実施例において、C R C V の特定は、好ましくは C R C V の核酸構成物を特定することを有する。

【 0 1 6 4 】

これは、典型的には、例えば実施例 1 に記載されるように R N A を試料から抽出して c D N A を得ることにより行われる。次いで、例えば高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション、特異的な増幅、及び核酸のシークエンスを使った、当業者によく知られる方法 ( S a m b r o o k e t a l ( 2 0 0 1 ) s u p r a ) を用いて C R C V の核酸構成物を c D N A において特定する。

【 0 1 6 5 】

好ましくは、C R C V を特定することが、LY138系統のゲノム ( G e n b a n k アクセス番号 A F 0 5 8 9 4 2 ) やその一部分などの B C V ゲノムと高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを特定することを有する。

【 0 1 6 6 】

また好ましくは、C R C V の特定は、C R C V の S、p o l または H E ポリヌクレオチド ( 図 1、3 及び 1 3 ) やその一部分と高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを特定することを有する。

【 0 1 6 7 】

“ 高度にストリンジェントな条件でハイブリダイズする ” とは、ハイブリダイズするポリヌクレオチド及び核酸が、非常にストリンジェントな条件下でもハイブリダイズするのに十分な塩基配列の類似性を持っていることを意味する。本技術分野で周知であるように、核酸のハイブリダイズの厳密性は、ハイブリダイズする核酸の長さ、ハイブリダイズする配列の相同性などや、温度、イオン強度、配列の C G または A T 含有量などの要素によって決まる。

10

20

30

40

50

## 【0168】

CRCVのcDNA分子と高い厳密性でハイブリダイズする核酸としては、CRCVのcDNAの少なくとも一部分において>90%の配列相同性、このましくは>95%、>96%、>97%、>98%、より好ましくは>99%の配列相同性を持つ核酸が挙げられる。

## 【0169】

選択的なハイブリダイゼーションとなる高度にストリンジェントなハイブリダイズの条件は、典型例が公知であり、例えば参照として組み込まれるSambrook et al 2001 (supra)に記載の条件がある。

## 【0170】

以下は、核酸がナイロンメンブレン上に固定され、プローブ核酸が500塩基以上の場合の典型的なハイブリダイズ溶液の例である。

6 x SSC (クエン酸ナトリウム食塩水)  
0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)  
100 µg/mlの変性、断片化サケ精子DNA

## 【0171】

ハイブリダイゼーションは68°Cで行う。核酸が固定されているナイロンメンブレンは68°Cの0.1 x SSCで一度洗浄しても良い。

## 【0172】

20 x SSCは、以下のように調製しても良い。800 mlのH<sub>2</sub>Oに175.3 gのNaClと88.2 gのクエン酸ナトリウムを溶解する。10 Nの水酸化ナトリウムの液滴でpHを7.0に調整する。H<sub>2</sub>Oで体積を1リットルに調整する。一定分量に分注する。オートクレーブにより滅菌する。

## 【0173】

以下は、核酸がナイロンメンブレン上に固定され、プローブ核酸が15から50塩基の場合の典型的なハイブリダイズ溶液の例である。

3.0 M塩化トリメチルアンモニウム (TMACl)  
0.01 Mリン酸ナトリウム (pH 6.8)  
1 mM EDTA (pH 7.6)  
0.5% SDS  
100 µg/mlの変性、断片化サケ精子DNA  
0.1%脱脂粉乳

## 【0174】

ハイブリダイズに最適な温度としては、所定の鎖長に対するT<sub>i</sub>より5°C低い温度が通常選択される。T<sub>i</sub>とは、プローブとその標的となる配列との間に形成されたハイブリッドの不可逆な解離温度である。Jacobs et al (1988) Nucl. Acids Res. 16, 4637では、T<sub>i</sub>の算定について議論されている。3 MのTMAClにおける17量体のハイブリダイズ温度としては、48 - 50°Cが推奨される。19量体では55 - 57°C、20量体では58 - 66°Cである。

## 【0175】

好ましくは、CRCVを特定することが、BCVゲノム (Genbankアクセス番号AF058942)の一部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチドを用いることを有する。

## 【0176】

より好ましくは、CRCVを特定することが、CRCVのSポリヌクレオチド (図3)の一部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチド、またはCRCVのp o lヌクレオチド (図1)の一部分と少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチド、またはCRCVのHEポリヌクレオチド (図13)と少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を持つポリヌクレオチドを用いることを有する。

10

20

30

40

50

## 【0177】

より好ましくは、CRCVを特定することは、上記の本発明の第4の側面で規定されるCRCVポリヌクレオチドを特定することを有する。

## 【0178】

最も好ましくは、CRCVを特定することが、図1、図3もしくは図13に示される配列、またはそれらの断片を有する、またはのみからなるCRCVポリヌクレオチドを特定することを有する。

## 【0179】

他の好ましい実施例としては、CRCVを特定することが、CRCVのタンパク構成物を特定することを有する。

## 【0180】

好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することが、上記本発明の第1、第2または第3の側面に規定されるCRCVタンパクを特定することを有する。

## 【0181】

最も好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することが、図2、図4もしくは図14に示されるアミノ酸配列、またはそれらの断片を有する、またはのみからなるCRCVタンパクを特定すること有する。

## 【0182】

生物試料におけるCRCVのタンパク構成物のアッセイはあらゆる公知の方法により行うことができる。生物試料におけるCRCVタンパクレベルでのアッセイには、抗体を用いる技術が好適である。

## 【0183】

好ましくは、CRCVのタンパク構成物を特定することは、CRCVに反応する抗体を用いることを有する。

## 【0184】

より好ましくは、CRCVに反応する抗体とは、本発明の第5の側面の方法により得られた、または得ることのできる抗BCV抗体、抗HCV抗体、抗HEV抗体、または抗CRCV抗体である。

## 【0185】

例えば、CRCVのタンパク発現は、古典的な免疫組織学的方法により研究することができる。この方法において、一次抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）により特異的な認識が行われるが、二次の検出系には蛍光、抗体、またはその他の複合二次抗体を利用することができる。結果として、病理学的な検査を目的とした組織切片の免疫組織学的な染色が得られる。またウエスタンブロットまたはドット/スロットアッセイのために、組織を例えば尿素または中性界面活性などで抽出し、CRCVタンパクを遊離させることができる（Jalkanen, M., et al, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)）。この方法は陽イオン性の固相を用いるものであるが、単離したCRCVタンパクを基準として用いることでCRCVタンパクを定量することができる。この方法は体液試料にも適用することができる。

## 【0186】

その他のCRCVタンパクの発現を検出するのに有用な抗体を用いた方法としては、酵素結合抗体吸着検定法（ELISA）及び放射免疫検定法（RIA）などの免疫学的検定法が挙げられる。例えば、CRCVに反応するモノクローナル抗体は、免疫吸着剤、及びCRCVタンパクを検出、定量する酵素標識プローブのどちらとしても用いることができる。試料中に存在するCRCVタンパクの量は、標準試料に存在する量を参照すればコンピューターアルゴリズムによる直線回帰を用いて計算することができる。腫瘍の抗原を検出するためなどのELISAが、Iacobelli et al, Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988)に記載されている。その他のELISA法としては、2の異なる特異モノクローナル抗体を体液中のCRCVタンパクを検出するのに用いることができる。この方法では、抗体のひとつは免疫吸着剤として用いられ、他の抗体は酵素標識したプロ

10

20

30

40

50

ープとして用いられる。

【0187】

上記の方法は“1段階”または“2段階”の方法として行って良い。“1段階”の方法には、CRCVタンパクを固定した抗体に接触させることと、洗浄せずにそのまま標識した抗体に混合物に接触させることが含まれる。“2段階”の方法には、標識した抗体に混合物を接触させる前の洗浄することが含まれる。その他の従来の方法も適宜採用して良い。一般的には、アッセイ系の一構成要素を支持体上に固定して、そうして系の他の構成要素をその構成要素と接触させ、試料から除去できるようにすることが望ましい。

【0188】

好適な酵素標識としては、例えば基質と反応して水素ペルオキシダーゼの産出を触媒するオキシダーゼ類が挙げられる。グルコースオキシダーゼは、その安定性と基質（グルコース）が容易に入手できることから特に好ましい。オキシダーゼ標識の活性は、酵素標識された抗体と基質の反応により形成された水素ペルオキシダーゼの濃度を測定することによりアッセイしても良い。酵素の他にも、他の好適な標識としては、ヨウ素（<sup>125</sup>I、<sup>121</sup>I）、炭素（<sup>14</sup>C）、硫黄（<sup>35</sup>S）、トリチウム（<sup>3</sup>H）、インジウム（<sup>111</sup>In）及びテクネチウム（<sup>99m</sup>Tc）などの放射性同位体、フルオレセイン、ローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンなどが挙げられる。

10

【0189】

第7の側面としての本発明は、抗CRCVのSまたはHE抗体を検出するための抗体吸着法である。この方法は、本発明の第1もしくは第3の側面に規定されるか第4の側面方法に用いて得られるCRCVもしくはCRCV様のSもしくはHEタンパク、またはCRCVもしくはCRCV様のS及びHEタンパクの両方、あるいは抗原性のあるそれらの断片でコーティングされた固相を有し、当該固相に曝された試料中の抗CRCVのSまたはHE抗体はタンパクに結合し、検出可能な標識複合体は固相に結合した抗CRCV抗体に結合する。

20

【0190】

固相をコーティングするCRCVまたはCRCV様のSタンパクの抗原性の断片が、抗CRCVのS抗体と結合するのに十分な大きさで、少なくとも1の表1に示すCRCVのSタンパクに特異的なアミノ酸を有することが好ましい。

【0191】

また、固相をコーティングするCRCVまたはCRCV様のHEタンパクの抗原性の断片が、抗CRCVのHE抗体と結合するのに十分な大きさで、上記で規定されるCRCVのHEタンパクに特異的な3のアミノ酸の少なくとも1を有することが好ましい。

30

【0192】

好ましくは、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、少なくとも10のアミノ酸長である。より好ましくは、CRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、または少なくとも400のアミノ酸長である。CRCV、CRCV用のSタンパクは少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、または少なくとも1000のアミノ酸長である。

40

【0193】

好ましくは、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は1200未満のアミノ酸長である。より好ましくは、CRCV、CRCV様のSタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、1100未満、1000未満、900未満、800未満、700未満、600未満、または500未満のアミノ酸長である。CRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片は、400未満、300未満、200未満、100未満、または50未満のアミノ酸長であってよい。

50

## 【0194】

好ましくは、固相はマイクロタイターウェルである。

## 【0195】

また、好ましくは複合体は抗イヌ抗体を有する。

## 【0196】

好ましくは複合体は例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼである酵素を有する。また、好ましくは免疫吸着法は酵素の基質も有する。

## 【0197】

好適な免疫吸着法及びELISA法の詳細は上述のとおりである。

## 【0198】

本発明には免疫吸着法の構成物を含むようなキットも含まれる。キットには、マイクロタイタープレートなどの固相、固相をコーティングするCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパクまたはその両方、及び固相に結合した抗CRCV抗体に結合する検出可能な抗イヌ抗体などの標識複合物が含まれていても良い。検出可能な標識複合物が酵素の場合、キットには当該酵素の基質も含まれる。またキットには、本発明の第5の側面において記載されるような抗CRCVのSまたはHEタンパク抗体を含有するポジティブコントロール試料、及びネガティブコントロール試料が含まれていても良い。

10

## 【0199】

従って本発明には、抗CRCVのSまたはHE抗体またはその両方を補足するためであって、本発明の第1もしくは第3の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSもしくはHEタンパク、または抗原性のあるそれらの断片が固着された固体基質が含まれ、当該固相に曝された試料中の抗CRCVのSまたはHE抗体はSまたはHEタンパクに結合する。

20

## 【0200】

典型的には、タンパクは抗原の安定性により4 から37 で一晩マイクロタイタープレート上にコーティングされる。結合しなかったタンパクをリン酸緩衝生理食塩水やトリス緩衝生理食塩水などの緩衝液で洗浄する。血清またはその他の試料を、典型的には37 で1～数時間プレート上でインキュベートする。結合しなかった材料を洗浄し、プレートを酵素標識した(例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ)抗体(例えば血清試料に対しては抗イヌIgG、IgMまたは肺洗液に対しては抗イヌIgA)で37 で1～数時間インキュベートする。結合しなかった抗体を洗浄し、プレートをOPDなどの基質で10分インキュベートし、光学的な濃度を光度計で測定する。

30

## 【0201】

好ましくは、固体基質はマイクロタイターウェルである。

## 【0202】

本発明としての第8の側面は、イヌの予防接種用のワクチン構成物であって、(i)CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii)BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii)CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv)BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v)CRCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi)BCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii)前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片をコードする核酸、を有する。

40

## 【0203】

好ましくは、ワクチンはイヌ用として作られ、供される。

## 【0204】

ワクチンがコロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片を有する場合、前記

50

タンパクはBCVまたはCRCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つ。

【0205】

好ましくは、コロナウイルスタンパクはBCV、HCV、HECもしくはCRCVタンパク、またはそれらの改変物である。

【0206】

改変物としては、典型的にはワクチンの抗原性を改善するようなアミノ酸置換が挙げられる。BCV、HCV及びHEVタンパクは、よりCRCVに近くなるよう改変しても良い。例えば、BCV、HCVまたはHEVのスパイクタンパクは図10において比較されるまたは表1に示される相違部分がCRCVのアミノ酸となるように改変されていても良い。さらに、または代わりとして、BCV、HCVまたはHEVのHEタンパクは上記の3のCRCV特異的な残基がCRCVのアミノ酸となるように改変されていても良い。

10

【0207】

1以上のアミノ酸残基が化学的に修飾されたタンパクは、そのタンパクの機能、すなわち生体内において特異抗体を産生させること、が実施的に変化せずに保持されているのであれば、用いても良い。合成タンパクは、合成前または合成後に適宜修飾されていることが好ましい。そのような修飾としては、酸または塩基（特に生理学的に許容できる有機または無機の酸または塩基）との塩の形成、末端カルボキシ基のエステルまたはアミドの形成、及びN-t-ブトキシカルボニルなどのアミノ酸保護基の付加などが挙げられる。そのような修飾は、生体内での代謝からポリペプチドを保護するものであって良い。

20

【0208】

前記タンパクは単一コピーまたはタンデム反復などの複数体として存在してよい。タンデムや複数の反復は、それ自体が十分に抗原性であり、キャリア使用しなくても良いかもしれない。タンパクは、N末端とC末端が互いに結合して環状となっていたり、抗原性が増したりジスルフィド結合が形成できるように末端に1以上のCys残基が付加されていれば有利である。タンパクがキャリアと共有結合（好ましくはポリペプチド）していれば、本発明のタンパクが環状に形成されるような配列が好ましい。

【0209】

現在の免疫学的理論によれば、あらゆる免疫原形成において、キャリアには免疫系を刺激したり刺激を増幅したりするキャリアの機能が存在するはずである。T細胞エピトープが組み込まれた（または抗原と共にT細胞エピトープをつくる）キャリアが最も良いと考えられている。ペプチドは、例えば架橋により、血清アルブミン、ミオグロビン、微生物変性毒素及びキーホールリンペットヘモシアニンといったキャリアと結合している。免疫応答におけるT細胞ヘルプを含む最近開発されたキャリアには、B型肝炎コア抗原（ヌクレオカプシド抗原とも呼ばれる）、Thr-Ala-Ser-Gly-Val-Ala-Glu-Thr-Thr-Asn-Cys (SEQ ID NO. 52)などのT細胞推定エピトープ、ベータガラクトシダーゼ、及びインターロイキン-1のペプチド163-171が含まれる。後者の物質は、キャリアもしくはアジュバント、またはその両方として様々に解釈されて良い。もしくは、同一のまたは異なる種類の本発明のタンパクを数コピー分互いに架橋したものであって良い。この場合、独立したキャリアは存在しないが、架橋によってキャリアの機能を果たされる。好適な架橋剤としては、シグマやピアスのカタログに記載されるようなものが挙げられ、例えばグルタルアルデヒド、カルボジイミド、コハク酸イミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩であり、後者の試薬はC末端のシステイン残基（あれば）の-SH基を利用する。

30

40

【0210】

タンパクが好適な塩基配列を好適な宿主において発現させることにより調製する場合、キャリアとして作用するペプチド配列との融合体として発現させるのが有利である。Kabi genの“Ecosec”システムがそのような取り合わせの例である。

【0211】

ワクチンのコロナウイルスの構成物が他の抗原と結合して二重の効果を奏するものであ

50

っても良い。

【0212】

好ましくは、ワクチン構成物におけるコロナウイルスタンパクはSタンパクである。より好ましくは前記Sタンパクは、上記本発明の第1の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSタンパク、BCVのSタンパク、HCVのSタンパク、HEVのSタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である。

【0213】

最も好ましくは、ワクチン構成物は図4に示すアミノ酸配列を含むまたはのみからなるCRCVのSタンパク、または図4に示すアミノ酸配列と少なくとも97%の同一性を持ち、免疫原性のあるその断片を含む。好ましくは、前記変体は図4に記載の配列と少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸相同性を持つ。より好ましくは、前記変体は図4に記載の配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸相同性を持つ。

10

【0214】

さらに、またはもしくは、前記ワクチン構成物は、血球凝集素 - エステラーゼタンパク (HE)、膜内在タンパク (M)、または小膜タンパク (E) (Lai MMC & Cavanagh D, (1997) "The molecular biology of coronaviruses" Adv. Vir. Res, 48: 1-100) を有していても良い。

20

【0215】

実施例のひとつとして、HE、EまたはMタンパクはBCV、HCVまたはHEVタンパクである。他の実施例として、HE、EまたはMタンパクはCRCVタンパクである。

【0216】

好ましくは、前記HEタンパクは上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片である。

【0217】

より好ましくは、前記ワクチン構成物は図14に示す部分アミノ酸配列を有する、もしくはのみからなるCRCVのHEタンパク、または免疫原性のあるその断片で図14に示す配列と少なくとも97%の相同性を持つものを含む。好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸相同性を持つ。より好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸相同性を持つ。

30

【0218】

ワクチンがコロナウイルスを有する場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを有する。より好ましくは、前記コロナウイルスは、CRCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを有する。

40

【0219】

さらに、またはもしくは、ワクチンがコロナウイルスを含む場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのHEタンパクと、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つ。より好ましくは、前記コロナウイルスはCRCVのHEタンパクと少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを有する。

【0220】

その他の好ましい実施例では、ワクチン構成物はBCV、HCV、HEV及びCRCV

50

、またはその改変物を有する。

【0221】

イヌウイルスに対して効果のあるイヌワクチンは非イヌウイルス由来であることが好ましい。例えば、US Patent No. 5,750,112 (Gillが発明しSolvay Animal Health社に譲渡、)は、不活化したネコ科腸性コロナウイルスを含むイヌ腸性コロナウイルスに対するワクチンを開示している。US 5,750,112の開示内容は本願に参照により組み込まれる。

【0222】

好ましい実施例のひとつとして、前記ウイルスは不活化したウイルスである。ワクチンとしての使用するためのウイルスの不活化の方法は周知である。好適な方法としては、例えばベータプロピオラクトン(BPL)などを使用する化学的な方法が挙げられる。好適な不活化したウシコロナウイルスのワクチンは、不活化したBCVを含んでもよく、例えば"Rotovect Corona" (シェーリングブラウ、<http://www.ukvet.co.uk/rotovect/scour.htm>)、"Lactovac" (Hoechst Roussel Vet社、(Veterinary Formulary 5th Edition of the Veterinary Data Sheet Compendium)、"First Defense" (Immuncell社、アメリカ); "Scour Bos 4" (Grand Laboraotries) 及び"Scour Guard 3K" (ファイザー)が挙げられる。

10

【0223】

その他の実施例として、前記ウイルスは弱毒化したウイルスである。ワクチンとしての使用するためのウイルスの弱毒化の方法は周知である。

【0224】

好ましくは、ワクチン構成物は医薬として可能なアジュバントも有する。

20

【0225】

好ましくは、ワクチンが核酸を含む場合、ワクチンとして用いられるコロナウイルスタンパクや免疫原性のあるその断片をコードする核酸は、CRCV、CRCV様のSポリヌクレオチド、またはCRCV、CRCV様のHEポリヌクレオチド、またはCRCV、CRCV様のS及びHEポリヌクレオチドの両方である。より好ましくは、前記核酸は図3もしくは図13に記載の塩基配列、またはその断片を有する、またはのみからなる。

【0226】

ワクチンとしての使用のため、CRCVまたはCRCV様のSまたはHE核酸は、様々な複製(例えば組み換えアデノウイルスワクチン)または非複製(DNAワクチン)ベクターにより運ばれるものであってよい。

30

【0227】

好ましい実施例としては、ワクチンはHEタンパクなどの他の免疫原性のコロナウイルスの他にも組み換えCRCV、CRCV様のSタンパクを含んでいて良い。

【0228】

上述したように、数種のウイルス及び細菌がイヌの呼吸器疾患に関わっていることが知られており、イヌパラインフルエンザウイルス(CPIV)、イヌアデノウイルス2型(CAV-2)、イヌヘルペスウイルス(CHV)及びBordetella bronchiseptica(B. bronchiseptica)が知られている。

【0229】

その他の好ましい実施例として、ワクチンにはイヌパラインフルエンザウイルス、イヌアデノウイルス2型、Bordetella bronchiseptica(B. bronchiseptica)、イヌヘルペスウイルス、ヒトレオウイルス及びマイコプラズマ類、または免疫原性のあるこれら由来のタンパクの他にも、組み換えCRV、CRCV様のSまたはHEタンパクを含んでいても良い。従って、ワクチンは免疫応答、例えばCPIV、CAV-2、B.bronchiseptica及びCHVなどの呼吸器疾患に関係する病原体と同様にCRCVに対する抗体の産生を起こさせることのできる試薬を含むものであって良い。

40

【0230】

実施例として、ワクチン構成物はCRCV、CRCV様のSまたはHEタンパクなどのCRCVに対する抗体の産生を刺激することのできる試薬を含むことに加えて、以下のい

50

ずれか1以上をさらに有するものであって良い。

- (a) イヌにおいてC P I Vに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。
- (b) イヌにおいてC A V - 2に対する免疫応答を起こすことのできる試薬。
- (c) イヌにおいてC H Vに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。
- (d) イヌにおいてB. bronchisepticaに対する免疫応答を起こすことのできる試薬。

【0231】

従って、ワクチン構成物はこれらの追加試薬(a)、(b)、(c)及び(d)のいずれか2、3または4種すべてを適宜有することができる。

【0232】

典型的には、イヌにおいてC P I Vに対する免疫応答を起こすことのできる試薬は、不活化、弱毒化したC P I V、免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

10

【0233】

典型的には、イヌにおいてC A V - 2に対する免疫応答を起こすことのできる試薬は、不活化、弱毒化したC A V - 2、免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

【0234】

イヌアデノウイルス1型は感染性肝炎を引き起こし、イヌアデノウイルス2型は呼吸器疾患を引き起こす。C A V - 1はC A V - 2に対して相互に交差防御されることが示されている。従って、イヌにおいてC A V - 2に対して免疫応答を起こす試薬は、C A V - 1またはC A V - 2のどちらか、または免疫原性のあるその断片を含んでも良い。以下に示すワクチンはEURICAN DHPPiを除いてC A V - 2を含んでおり、使用されるウイルス型を特定しない。

20

【0235】

イヌにおいてC P I V及びC A V - 2に対して免疫応答を起こすのに好適な試薬は、当業者に公知である。例えば、以下のイヌワクチンがイギリスにおいて認可されている。

【0236】

Fort Dodge Animal HealthのKAVAK DA<sub>2</sub>PiP69は、組織培養より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパラインフルエンザ2型、及びイヌパルボウイルスの弱毒系統を含む、生凍結乾燥ワクチンである。

30

【0237】

Fort Dodge Animal HealthのKAVAKパラインフルエンザは、同一の樹立細胞株を培養して得たイヌパラインフルエンザ2型の弱毒系統由来の生凍結乾燥ワクチンである。

【0238】

Intervet UK社のNOBIVAK DHPPiは、組織培養下細胞株より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む、弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

【0239】

Intervet UK社のNOBIVAC KCは、Bordetella bronchiseptica系統B-C2及びイヌパラインフルエンザウイルス系統Cornellを含む改変された生ワクチンである(これは鼻腔内ワクチンである)。管理許可番号Vm06376/4026。

40

【0240】

Merial Animal Health社のEURICAN DHPPiは、イヌジステンパー、イヌ感染性肺炎、イヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルス2型に対する複合生凍結乾燥ワクチンである。

【0241】

ファイザー社のVANGUARD7は、樹立細胞株で増殖させた弱毒化した生のイヌジステンパーウイルス(Snyder Hill系統)、アデノウイルス(CAV-2 Manhatta系統)、パラインフルエンザウイルス(NL-CPI-5系統)、イヌパルボウイルス(NL-35-D)、並びにLeptospira canicola及びLeptospira icterohaemorrhagiaeの不活化培養物を含む。

50

## 【0242】

シェーリングブラウ Animal HealthのQUANTUM DOG7は、イヌジステンパー、アデノウイルス2型、パラボウイルス、パラインフルエンザウイルス2型のワクチン(生)及び不活化した*Leptospira canicola*及び*Leptospira icterohaemorrhagiae*のワクチンを含む。

## 【0243】

Virbac社のCANIGEN DHPPiは、組織培養した細胞株より得たイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス(CAV2)、イヌパラボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

## 【0244】

Virbac社のCANIGEN Ppiは、細胞株を組織培養して得られたイヌパルボウイルス及びイヌパラインフルエンザウイルスを含む弱毒化生凍結乾燥ワクチンである。

10

## 【0245】

典型的には、イヌにおいてCHVに対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は、不活化、弱毒化したCHV、または免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

## 【0246】

イヌにおいてCHVに対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は当業者に公知である。例えば、MerialのEURICAN Herpes205は、イヌヘルペスウイルスに対する精製サブユニットワクチンであり、妊娠したメスの能動免疫に用いられて、子犬が生後1日目からイヌヘルペスウイルスに感染することで死んだり、臨床的な症状や傷害を示したりするのを防ぐものである。しかし、成犬の呼吸器疾患に対しての免疫には許可されていない。

20

## 【0247】

典型的には、イヌにおける*B. bronchiseptica*に対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は、不活化、弱毒化した*B. bronchiseptica*、または免疫原性のあるその断片、または前記免疫原性のある部分をコードする核酸を有する。

## 【0248】

イヌにおいて*B. bronchiseptica*に対する免疫応答を起こさせることのできる試薬は当業者に公知である。例えば、以下のイヌワクチンが使用許可されている。

## 【0249】

ファイザー Animal HealthのCOUGHGUARD-B(登録商標)(U.S.Vet.Lic.No.:189)は、*B. bronchiseptica*の不活化した培養物を含む。これは、*B. bronchiseptica*により引き起こされる病気、特にケンネルコフの予防として健康なイヌの免疫に用いられる。COUGHGUARD-B(登録商標)は、*B. bronchiseptica*の不活化された抗原性の高い系統から調製され、イヌに投薬する際に無毒化される。*B. bronchiseptica*の免疫原特性を完全なまま残す製造方法が報告されている。

30

## 【0250】

ファイザー Animal HealthのVANGUARD(登録商標)5/B(U.S.Vet.Lic.No.:189)は、イヌの樹立細胞株で増殖させたイヌジステンパーウイルス(CDV)、CAV-2、CPIV及びイヌパラボウイルス(CPV)の弱毒系統を含む。CPV抗原はイヌ細胞株の低い継代(low passage)によって弱毒化されるが、移行抗体に勝ることのできる免疫原特性を持つ継代レベルとする。ワクチンは凍結乾燥され不活性ガスで充填された状態で包装される。不活化した*B. bronchiseptica*の全培養物を含む細菌ワクチンの構成物であり、希釈液として供される。VANGUARD(登録商標)5/Bの*B. bronchiseptica*成分は、不活化された免疫原性の高い系統をイヌに投薬する際に無毒化して調製される。

40

## 【0251】

ファイザー Animal HealthのNASAGUARD-B(商標)(U.S. Vet. Lic. No.: 112)は、*B. bronchiseptica*の無毒性の生培養物からなる。

## 【0252】

IntervetのPROGARD(登録商標)-KCは、弱毒イヌパラインフルエンザウイルス及び*B. bronchiseptica*の無毒性の生培養物を含む鼻腔投与型の改変生ワクチンである。PROGARD(

50

登録商標) -KCは、最溶解用の滅菌希釈液と共に乾燥粉末の状態で供される。PROGARD(登録商標) -KCは、イヌパラインフルエンザウイルス及び*B. bronchiseptica*によるイヌの感染性気管支炎(“ケンネルコフ”)の予防として、健康な感染しやすい子イヌおよびイヌの免疫に用いられる。

【0253】

IntervetのPROGARD(登録商標) -KC PLUSは、*B. bronchiseptica*の無毒系統、弱毒イヌアデノウイルス2型及びパラインフルエンザウイルスを含み、鼻腔投与用である。PROGARD(登録商標) -KC Plusを投与すると、気管において即応性の局所的な免疫が活性化し、臨床的症状を予防するだけでなく、初期の感染が抑制される。局所的な免疫に加えて、鼻腔投与から3週間以内に全身の免疫も活性化する。PROGARD(登録商標) -KC Plusの少量(0.4ml)で1回の鼻孔投与であるため、特に少ない血統や若い子犬に対して、容易に予防接種することができる。PROGARD(登録商標) -KC Plusは、最溶解用の滅菌希釈液と共に乾燥粉末の状態で供される。PROGARD(登録商標) -KC Plusは、イヌアデノウイルス2型、パラインフルエンザウイルス及び*B. bronchiseptica*によるイヌ感染性気管支炎(“ケンネルコフ”)の予防として、健康なイヌ及び3週齢以上子犬の免疫に用いられる。

10

【0254】

IntervetのIntraclは、*B. bronchiseptica*のS55系統を含む凍結乾燥した改変生ワクチンであり、鼻孔投与用である。製品許可番号はPL0201/4011である。

【0255】

上記のNovivackCもまた、*B. bronchiseptica*を含んでいる。

20

【0256】

予防接種は特に犬舎に入れる前のイヌ、または繁殖施設のイヌの予防接種として特に有用であるが、それだけに限られるものではない。

【0257】

組み換えタンパクからなるワクチンの典型的な投与量は5~10µgである。不活化ウイルスからなるワクチンの典型的な投与量は1~10mgである。

【0258】

第9の側面としての本発明は、イヌのCRCVに対する免疫応答を刺激するための薬剤の調製における、(i)CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii)BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii)CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv)BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v)CRCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi)BCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii)前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片をコードする核酸、の使用である。

30

【0259】

本発明は、イヌにおける呼吸器疾患、典型的にはCIRDの予防のための薬剤の調製における、(i)CRCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(ii)BCVのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを持つコロナウイルス、または(iii)CRCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(iv)BCVのHEタンパクと少なくとも90%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを持つコロナウイルス、または(v)CRCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vi)BCVタンパクと少なくとも75%の相同性を持つコロナウイルスタンパクもしくは免疫原性のあるその断片、または(vii)前記コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のある

40

50

その断片をコードする核酸、の使用である。

【0260】

コロナウイルスタンパクまたは免疫原性のあるその断片が薬剤の調製に用いられる場合、前記タンパクはBCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つ。好ましくは、前記タンパクはCRCVタンパクの対応する部分と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つ。

【0261】

好ましくは、薬剤の調製に使用されるコロナウイルスタンパクは上述の第8の側面におけるBCV、HCV、HEVもしくはCRCVタンパク、またはその改変物である。

10

【0262】

より好ましくは、薬剤の調製に用いられるコロナウイルスタンパクはSタンパクである。また好ましくは、前記Sタンパクは、上記本発明の第1の側面に規定されるか第4の側面の方法を用いて得られるCRCV、CRCV様のSタンパク、BCVのSタンパク、HCVのSタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片を有する。

【0263】

最も好ましくは、薬剤の調製に用いられるコロナウイルスタンパクは、図4に示すアミノ酸配列、または図4に示すアミノ酸配列と少なくとも97%の同一性を持ち、免疫原性のあるその断片を有するまたはのみからなる。好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有する。より好ましくは、前記変体は図4に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸配列相同性を有する。

20

【0264】

さらに、またはもしくは、薬剤の調製に使用される前記コロナウイルスタンパクはHE、E、MまたはNコロナウイルスタンパクを有していても良い。実施例のひとつとして、HE、M、またはNタンパクはBCV、HCVまたはHEVタンパクである。他の実施例として、HE、E、M、またはNタンパクはCRCVタンパクである。

【0265】

典型的には、前記HEタンパクは上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパク、BCVのHEタンパク、HCVのHEタンパク、または免疫原性のあるそれらの断片を有する。

30

【0266】

好ましくは、薬剤の調製に用いられるHEタンパクは、図14に示す部分アミノ酸配列、または免疫原性のあるその断片で図14に示す配列と少なくとも98%の相同性を持つものを有する、またはのみからなる。好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも98%または少なくとも99%のアミノ酸配列相同性を有する。より好ましくは、前記変体は図14に示す配列と少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%のアミノ酸相同性を持つ。

40

【0267】

コロナウイルスを薬剤の調製に用いる場合、好ましくはコロナウイルスはBCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つ。より好ましくは、前記コロナウイルスは、CRCVのSタンパクと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つSタンパクを有していてもよい。

【0268】

さらに、またはもしくは、コロナウイルスはBCVのHEタンパクと少なくとも90%

50

、または少なくとも95%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを有していても良い。より好ましくは、前記コロナウイルスはCRCVのHEタンパクと少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸相同性を持つHEタンパクを有する。

【0269】

第10の側面としての本発明は、本発明の第1の側面に規定されるか、第4の側面の方法により得られるCRCVまたはCRCV様のSタンパクで、薬として使用されるものである。典型的には、前記Sタンパクは家畜用医薬として使用される。

【0270】

本発明は、薬として使用される、上記本発明の第3の実施例で定義されるか、第4の側面の方法によって得られるCRCV、CRCV様のHEタンパクを包含する。典型的には、前記HEタンパクは家畜用医薬として使用される。

10

【0271】

第11の側面としての本発明は、CRCVの予防としてイヌに免疫する方法であって、本発明の第9の側面のワクチン構成物をイヌに投与することを有する。

【0272】

典型的には、前記ワクチンは、筋肉、皮下または鼻腔道に投与される。

【0273】

その他の実施例として、CRCVと反応する抗体を投与することで、イヌにCRCVに対する免疫性を受動的に持たせることもできる。CRCVと反応する抗体は抗BCV抗体、抗HCV抗体であって良いが、好ましくは抗CRCV抗体である。好ましくは、CRCVと反応する抗体は抗Sタンパク抗体、抗HEタンパク抗体である。最も好ましくは、CRCVと反応する抗体は、本発明の第5の側面に記載される抗CRCVのSまたはHEタンパク抗体である。

20

【0274】

第12の側面としての本発明は、イヌの間におけるCRCVの蔓延と戦う方法であり、上記本発明の第6の側面に記載される方法、または上記本発明の第7の側面に記載される免疫吸着法または固体基質を用いることによってイヌがCRCVに感染しているかどうかを判断すること、及びイヌがCRCVに感染しているのであればそのイヌを隔離すること、を有する。

30

【0275】

イヌを“隔離する”とは、そのイヌを他のすべてのイヌから引き離れた状態にすることを意味を含む。また、そのイヌをCRCVに対する予防接種をしていない他のすべてのイヌから引き離れた状態にするという意味も含んでおり、これは上述するように実施することができる。そのイヌをCRCVに感染していない他のすべてのイヌから引き離れた状態にするという意味も含んでおり、感染については上記のように判断することができる。

【0276】

第13の側面としての本発明は、イヌの間におけるCRCVの蔓延と戦う方法であり、上記本発明の第6の側面に記載される方法、または上記本発明の第7の側面に記載される免疫吸着法または固体基質を用いることによってイヌがCRCVに感染しているかどうかを判断すること、及びイヌがCRCVに感染しているのであれば、そのイヌと接していた、接している、または接しているかもしれない他のイヌに予防接種すること、を有する。

40

【0277】

第14の側面としての本発明は、イヌにおけるイヌ感染性呼吸器疾患(CIRD)の発生を予防したり減少させたりすることのできるテストワクチンを検定する方法である。前記方法は、(a)典型的には上記本発明の第6の側面の方法、または上記本発明の第7の側面の免疫吸着法が固体基質を用いることによって、イヌがCRCVに曝されていたかどうかを決定することと、(b)イヌがCRCVに曝されていなかったのであれば、テストワクチンをイヌに投与することと、(c)イヌにCRCVを接種することと、(d)イヌがCIRDを発症したかどうかを判断すること、を有する。(d)段階においてCIRD

50

が確認されなければ、テストワクチンがCIRDを予防することができることが示される。

【0278】

典型的には、この方法は一揃いのイヌに対して実施される。

【0279】

好ましくは、前記方法は、(b)段階においてテストワクチンを投与されないコントロールのイヌを一揃い使用することを含む。テストワクチンを投与したイヌの組におけるCIRDの発症が、コントロールの組よりも有意に低ければ、テストワクチンがCIRDの発症を予防または減少させることができることが示される。

【0280】

本発明は、この方法により検定されるワクチンを含む。

【0281】

本願で引用される文献は、すべてここに参照により完全に取り込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0282】

以下、本発明を以下の図及び実施例を参照しながら詳細に説明する。

【実施例1】

【0283】

イヌ伝染性呼吸器疾患に関わる新規なコロナウイルスの検出

【0284】

概要

イヌ伝染性呼吸器疾患(CIRD)の原因についての調査を大規模なイヌの救助施設(re-homing kennel)にて行った。罹患したイヌの気管から採取した組織試料について、ポリメラーゼ遺伝子の保存プライマー(conserved primer)によるRT-PCR法を用いて試験した。4つの陽性試料について配列解析したところ新規なコロナウイルスの存在が示され、それらはウシ及びヒトコロナウイルス(OC43系統)の両方について、そのポリメラーゼとスパイクタンパクが高い類似性を示したが、一方でイヌ腸性コロナウイルスの対応する遺伝子とは低い類似性しか持たなかった。このイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)は、32/119の気管試料及び20/119の肺試料よりRT-PCRにより検出されたが、軽い臨床的症状を示すイヌが最も高い罹患率で検出された。犬舎に入った日にCRCVに対する抗体が存在していた場合、呼吸器疾患を発症する危険が減少することが血清学的な分析により示された。

【0285】

試料と方法

【0286】

研究個体群

本研究では、地域的な呼吸器疾患が発生した経歴のある、大手のイヌ救助施設(re-homing kennel)を調査した。すべてのイヌについて、犬舎に入る際にKAVAK DA<sub>2</sub>PiP69(Fort Dodge)(ジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパラインフルエンザウイルス及びイヌパラボウイルスに対する弱毒生ワクチン)を予防接種した。また、レプトスピラ症死菌ワクチンも用いた(Fort Dodge)。各イヌの健康状態について、獣医学臨床医により1日に2度評価して呼吸器の症状を以下のように評定した。1:呼吸器の症状無し、2:弱い咳、3:咳と鼻水、4:咳と鼻水と食欲不振、5:気管支肺炎。イヌの全身的健康状態、は以下のように評定した。1:健康、2:健康でない、3:非常に健康でない。イヌの年齢、血統及び性別を記録した。

【0287】

119匹のイヌに対して、全身の死体解剖を行った。組織試料は、使用に供するまで-70で保存した。

【0288】

111匹のイヌについて、イヌ救助施設に入った日に血清試料を採取した。81匹のイ

10

20

30

40

50

ヌについては入舎後7日、及び111匹のイヌについては入舎後21日の追跡試料の血清を入手することができた。

【0289】

最初の血清採取から最後の採取までの21日間において、111匹のイヌのうち30匹が健康であったが、81匹のイヌが呼吸器疾患を発症した。

【0290】

他の場所で飼育されていた35匹のイヌの血清を、Royal Veterinary Collegeの診療施設から得た。これらの血清は、種々の理由から生化学的な調査に供されたものである。これらの血清のうちの5つは、呼吸器疾患の経歴のない18月齢のビーグル犬より得たものである。血清は常法に基づき-20で保存した。

10

【0291】

RNAの抽出とRT-PCR

RNAはTriReagent(シグマ)を用いて119匹のイヌの気管及び肺組織から抽出した。約25-50mgのホモジナイズした試料を用い、取扱説明書の推奨にならってRNAを抽出した。

【0292】

cDNAの合成は、Random Hexamers(ロシュ)及びImpromII逆転写酵素(Promega)を用いて行った。

【0293】

コロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子は高度に保存されていることが知られており、このウイルスファミリーの系統解析に用いられている(Stephensen et al., 1999)。コロナウイルスの検出のため、Stephensen et al. (1999)に記載されるポリメラーゼ遺伝子に対する2Bp及び4Bmプライマーの改変物を用いた(Conscoro5: 5'-ACT-CAR-ATG-AAT-TTG-AAA-TAT-GC (SEQ ID NO. 31)、及びConscoro6: 5'-TCA-CAC-TTA-GGA-TAR-TCC-CA (SEQ ID NO. 32))。

20

【0294】

PCRは、終濃度が2.5mMのMgCl<sub>2</sub>と0.5μMのプライマーを含む所定の反応バッファー中でTaqポリメラーゼ(Promega)を用いて行った。Conscoro5及びConscoro6プライマーを用いたPCRでは、以下の温度制御とした。95 5分の変性後、95 1分、37 1分でアニール、及び72 1分で伸長のサイクルを10回行った。続いて、アニール温度45で10サイクル、アニール温度50で10サイクル、及びアニール温度53で10サイクル行い、最後の伸長を72で10分行った。

30

【0295】

PCR産品の20μl画分を1.5%アガロースゲルで分析し、電気泳動の後ナイロンメンブレン(ロシュ)上にプロットした。ナイロンメンブレンはPCR産品に特異的なオリゴヌクレオチドプローブと37で一晩ハイブリダイズさせた(Probe Conscoro: AAG-TT-TAT-GGY-GGY-TGG-GA (SEQ ID NO. 33))。ジゴキシゲニン-dUTPを伴う3'A-末端のプローブを用い、抗ジゴキシゲニン複合体及びCSPD化学蛍光基質(ロシュ)を用いて検出した。

【0296】

スパイク遺伝子に特異的なプライマー配列は、ウシコロナウイルスLY-138系統(AF058942)及びヒトコロナウイルスOC43系統のスパイク領域の配列(L14643)由来のものである。

40

【0297】

PCRはSpike1及びSpike2プライマーを用いて行い、続いてSpike3及びSpike4プライマー並びに2μlの最初の増幅産物を用いてネステッドPCRを行った。

【0298】

括弧書きの数字は、ウシコロナウイルスゲノムにおけるヌクレオチドの位置を示す。

Spike1: 5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT (25291-25314)

Spike2: 5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG (25912-25890)

50

Spike3: 5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-CTG (25320-25339)

Spike4: 5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG (25762-25742)

【0299】

オリゴヌクレオチドのSpike1はSEQ ID No. 34、Spike2はSEQ ID No. 35、Spike3はSEQ ID No. 36、Spike4はSEQ ID No. 37である。

【0300】

温度制御は、95 5分の変性後、95 1分、55 1分でアニール、及び72 40秒で伸長のサイクルを35回行った。72 10分で最後の伸長を行った。ネステッドPCRにより442bpの断片を産した。

【0301】

PCR産物はpGEM-T-easyベクター(Promega)にクローニングされ、Cy5標識プライマーを用いたThermo sequenase 蛍光標識プライマーサイクルシークエンスキット及び7-deaza-dGTP(アマシャムファルマシア)を用いてシークエンスした。

【0302】

系統解析

ポリメラーゼ遺伝子由来の250bpのcDNA配列と、11のコロナウイルスの対応する配列との配列解析は、Clustal Xを用いて行った(Thompson et al., 1997)。

【0303】

公知のコロナウイルスとの系統学的な関係は、Phylip 3.6 package(Felsenstein, 1989)を用いて解析した(Felsenstein, 1989)。配列はSeqbootプログラムを用いてブートストラップ解析を行った。得られたデータはDNAParsプログラムを用いた最節約法に供し、またコンセンサスツリーはConsenseを用いて算出した。こうして得られた系統図をTreeviewプログラムを用いて描画した(Page, 1996)。

【0304】

ELISA

ウシコロナウイルス、イヌ腸性コロナウイルス(CECV)のELISA抗原(ウイルスに感染した細胞培養物から調製したもの。Churchill Applied Biosciences, Huntingdon, UKより購入)を推奨される濃度にてPBSに再懸濁させ、96穴プレート(ファルコン)で37 で一晩インキュベートした。

【0305】

プレートをPBSで洗浄し、5%スキムミルクを含むPBSで30分ブロッキングした。血清はブロッキングバッファーで1:100に希釈し、プレートで1時間インキュベートした。PBS/0.05%Tween20(シグマ)で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗イヌIgGコンジュゲート(Sigma)(PBS/0.05%Tween20で1:5000希釈)を加えて1時間した。プレート発色基質(OPD、シグマ)で10分インキュベートし、2MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて反応を停止させた。492nmにおける吸収をELISA分光計で決定した。

【0306】

ウイルス培養

イヌ成犬の肺線維芽細胞(継代3から7)、MDCK及びA72細胞においてウイルスの単離を行った(ウイルスの単離は初代細胞、またはMDCKなどの細胞株、またはA72(イヌ)、MDBK(ウシ)、HRT-18(ヒト直腸性腫瘍細胞株)及びVeroc(アフリカミドリザル)を用いて行われるのが好ましい)。肺線維芽細胞は20%ウシ胎児血清(FCS)を含むMEMで培養し、MDCK及びA72細胞は5%FCSを含むMEMで培養する。気管組織試料(おおよそ25mg)はメスでホモジナイズし、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)、アンフォテリシンB(2.5µg/ml)及びトリプシン(1µg/ml)を含む1mlのMEM中で強く攪拌する。試料を13000rpmで10分間遠心分離し、上清を細胞培養物の接種に用いた

10

20

30

40

50

。37 30分経過後、上清を除去し、維持培地を培養物に加える。培養物を細胞変性の効果がない状態で3代継代する。次いで、RNAを細胞から抽出し、CRCVの存在を検出するためのRT-PCRを行う。

【0307】

統計分析

データはカイ二乗検定またはフィッシャーの直接確率検定により分析し、p値が0.05未満であれば統計的に有意とした。

【0308】

結果

【0309】

10

コロナウイルスRNAポリメラーゼ遺伝子に対するコンセンサプライマーを用いたPCR

Conscoro5及びConscoro6プライマーを用い、40の気管試料から得たcDNAをRT-PCRにより分析した。

【0310】

PCR及びそれに続くハイブリダイゼーションにより、これらのうち7の試料が陽性であることが判明した(17.5%)。

【0311】

PCR産物をクローニング及び配列決定し(図1及び図2)、配列データをFASTA検索プログラムを用いて利用可能なウイルスの配列と比較した(Pearson, 1990)。

20

【0312】

4のイヌ気管試料から得たコロナウイルスcDNAポリメラーゼ配列を他のコロナウイルス配列と比較した結果、それらはQuebec及びLY138系統のBCVの配列(GenBankアクセス番号はそれぞれAF220295及びAF058942)及びヒトコロナウイルスOC43系統(GenBankアクセス番号AF124989)の配列と最も似ていることが明らかとなった。解析した250bpの配列の相同性は、BCV Quebecとは98.8%、BCV LY138及びHCV pol遺伝子とは98.4%であったが、一方でCCV 1-71系統のpol遺伝子とは68.53%にすぎなかった(図6及び図7)。

【0313】

この新規な配列と11のコロナウイルスの対応する配列との配列比較、及び最節約法を用いた解析により得られたコンセンサツリーを図5に示す。気管試料(T101)より得られたcDNA配列は、ウシコロナウイルス、ヒトコロナウイルス-OC43、及び赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルスと共通する分岐に位置することがわかった。

30

【0314】

このウイルスをイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)と呼ぶ。

【0315】

スパイク遺伝子に対するプライマーを用いたPCR

CRCVのRNA配列を更に解析するために、ウシコロナウイルスLY138系統(AF058942)及びヒトコロナウイルスOC43系統(L14643)とのRNAの配列比較をClustal Xを用いて行った(Thompson et al., 1997)。コンセンサ領域に基づいてネステッドプライマーのセットSpike 1-2及びSpike3-4の選択した(図11)。119の気管及び肺試料からネステッドプライマーを用いて得られたcDNAに対してPCR分析を行った。

40

【0316】

ネステッドPCRにより、総計で32の気管試料(26.9%)及び20の肺試料(16.8%)が陽性であることがわかった。8匹のイヌについては、気管及び肺の両方においてPCR結果が陽性であった。

【0317】

6匹の異なるイヌの組織から得たPCR産物の配列分析により、これらのcDNAからこれらが同一のDNA配列であることが示された(図3及び4)。FASTAプログラムを用いて公知のコロナウイルスのスパイク配列と比較したところ、ウシコロナウイルスと

50

は 98.1% の相同性、ヒトコロナウイルス OC43 系統とは 97.8% の相同性があることが明らかとなった (図 9 及び図 10)。

【0318】

HE 遺伝子に対するプライマーを用いた PCR

ウシコロナウイルス及び他のグループ II のコロナウイルスは、さらに構造タンパクである血球凝集素/エステラーゼ (HE) を含有している。CRCV が BCV と高い相同性を示したことから、我々は CRCV における HE 遺伝子の存在について分析した。

【0319】

BCV 及び OC43 系統 HCV の HE 遺伝子配列の配列比較を HE1 及び HE2 プライマーの設計に用いた (表 2)。S 遺伝子に対するプライマーを用いた RT-PCR により陽性と確認された 4 の気管試料を HE 遺伝子に対するプライマーセットを用いた RT-PCR により試験した。アガロースゲル電気泳動の結果、4 の試料のすべてが予想されたサイズの PCR バンドを示した (図 17)。

【表 2】

表 2: BCV (GenBank アクセス番号 No.M84486) 及び HCV OC43 (GenBank アクセス番号 No.M76373) の配列解析より設計したプライマー

名称	配列	BCV の HE 遺伝上の位置
HE 1	5'-TAT-CGC-AGC-CTT-ACT-TTT-GT	418-437
HE 2	5'-ACC-GCC-GTC-ATG-TTA-TCA-G	914-896

【0320】

HE1 プライマーは SEQ ID No. 38 であり、HE2 プライマーは SEQ ID No. 39 である。HE1 及び HE2 プライマーを用いた CRCV の PCR 産物の配列を図 13 に (SEQ ID No. 21)、その予想されるアミノ酸配列を図 14 (SEQ ID No. 22) に示す。これらのヌクレオチド及びアミノ酸配列と、他のコロナウイルスの対応する断片との比較を図 15 及び図 16 に示す。表 3 に示すように 3 のアミノ酸配列が CRCV に特有であった。

【表 3】

表 3: CRCV の HE 遺伝子独自のアミノ酸

CRCV の アミノ酸	BCV/HECV/HCV/HEV のアミノ酸	BCV/HECV/HCV/HEV での位置	PCR 産物 HE1-HE2 での位置
F (Phe)	L (Leu)	235	96
N (Asn)	T (Thr)	242	103
L (Leu)	V (Val)	253	114

【0321】

BCV、HECV、HCV、及び HEV におけるアミノ酸の位置については、BCV 及

び0C43系統のHCVのHEタンパク(それぞれGenBankアクセス番号M84486及びM76373)の最初のM(これを1番とする)から番号を付した。

【0322】

PCR陽性の試料と呼吸器症状の関連

スパイク遺伝子に対するプライマーを用いて、119匹のイヌから得た気管及び肺試料をCRCVに対するRT-PCRにより分析した。このうち、42匹のイヌは呼吸器症状が無く(1度)、18匹のイヌは軽症の呼吸器症状を示し(2度)、46匹は中程度の(3度)そして13匹は重症の呼吸器症状(4度及び5度)を示した。4度と5度については、本グループでは症例が少ないため併合した。

【0323】

表4は異なる程度の呼吸器疾患を持つイヌにおけるコロナウイルスに対するPCRの結果を示したものである。特に、表4はコロナウイルスのSタンパクに対するネステッドPCRを用いた、異なる呼吸器症状(無しからひどいものまで)を持つ119匹のイヌの気管及び肺試料から得られたRT-PCRの結果を試料総数に対する陽性試料の数とその割合(カッコ内)と共に示したものである。

【表4】

表4： 気管及び肺試料のRT-PCR結果

呼吸器の症状	気管 陽性試料	肺 陽性試料	気管及び肺 陽性試料
無し	11/42 (26.2%)	8/42 (19.1%)	2/42
軽症	10/18 (55.6%)	4/18 (22.2%)	4/18
通常	9/46 (19.6%)	8/46 (17.4%)	2/46
重症	2/13 (15.4%)	0/13	0/13

【0324】

CRCVの血清によるアッセイ法の確立

CRCVのスパイクcDNAとウシコロナウイルスのスパイク領域との相同性から、BCVに対するELISA抗原をCRCVの血清による分析に用いた。

【0325】

調査した犬舎にて飼育されたことが無く、伝染性の呼吸器疾患に罹患した経歴のない5匹のイヌの血清を試験した。OD値は-0.013から0.39であり、平均値は0.154であった。また、様々な理由から動物病院に来た30匹のイヌの血清について、コロナウイルスの抗体に対する試験を行った。そのうち、20の試料は<0.4(-0.46から0.396)のOD値を示し、10の試料は>1.0のOD値(1.012から1.949)を示した。OD値が0.6以上の試料は、実質上陽性と考えられる。

【0326】

呼吸器疾患を持つ及び持たないイヌのCRCVに対する免疫応答の比較

調査した犬舎の111匹のイヌの血清の組について、BCV抗原ELISAを行った。

このうち、81匹のイヌは21日間期間中に呼吸器疾患の症状を示しており、30匹は健康であった。

【0327】

呼吸器疾患のイヌのグループについて、犬舎に来た日において17匹はCRCVに対する抗体が陽性であり、64匹は陰性であった。

【0328】

1日目にBCVに対する抗体が検出されなかった64匹のイヌについて、21日目には63匹が陽性であった。63匹中7日目の試料が利用可能な46匹のすべてにおいて、7日目の結果は陰性であった。従って、63匹のイヌが試験期間中に血清変換を起こし、陰性のままだったのはたった1匹だった。

10

【0329】

健康なままだった31匹のイヌの内、17匹のイヌは犬舎に来た日においてCRCVに対する抗体を持っていた。1日目に陰性だった13匹のイヌは、7日目においてもすべて陰性であったが、21日目までに血清変換を起こした。

【0330】

従って、犬舎に到着した日にCRCVに対する抗体が陽性だった34のイヌのうち、17匹が呼吸器疾患に罹患したが(50%)、一方で到着時に陰性だった77のイヌは試験期間中に64匹(83.1%)が呼吸器疾患の症状を示した(図12)。

【0331】

従って、犬舎に来た日にCRCVに対する抗体を持たないイヌは呼吸器疾患に罹患する可能性が高かった( $p < 0.001$ )。

20

【0332】

犬舎に来た日に陰性だった77匹のイヌのうちたった1匹が21日の試験期間において陰性のままであり、76匹は血清転換を起こした。

【0333】

イヌ腸性コロナウイルス(CECV)抗原を用いた血清学

CRCVがイヌ腸性コロナウイルスと血清学的な交差反応を起こすかどうかを調べるために、イヌコロナウイルス抗原を用いたELISAアッセイを行った。BCV抗原を用いてCRCVに対する抗体の試験を行った27匹のイヌの血清を選出した。

【0334】

そして、8匹のイヌが犬舎に来た日にCECVに対する抗体を持っており、そのうちの4匹はCRCVに対する抗体も持っていた。19匹のイヌは1日目にはCECVに対して陰性であり、そのうち17匹はCRCVに対しても陰性であった。この19匹のイヌのうち、5匹は21日の試験期間中にCECVに対する血清変換を起こし、17匹はCRCVに対する血清変換を起こした。

30

【0335】

このグループにおける呼吸器疾患の罹患率を分析した結果、1日目にCECVに対する抗体が陽性であった8匹のうち6匹(75%)が呼吸器疾患に罹患した。1日目にCECVに対する抗体が検出されなかった19匹のイヌのグループについては、15匹が呼吸器疾患の症状を示した(78.9%)( $p = 0.594$ )。

40

【0336】

ウイルスの単離

RT-PCRによりCRCVのRNAが陽性と確認されたイヌの気管組織試料を、イヌ成熟線維芽細胞及びMDCK細胞の培養細胞に植え付ける。いくつかの試料については、A72細胞においてウイルスの単離も行う。培養物は3世代の継代において細胞病理学的な徴候を示さない。数回の継代後、培養組織からRNAを抽出し、PT-PCRによりCRCVのRNAの有無を試験した。

【0337】

考察

【0338】

50

本研究は、犬舎に飼育される呼吸器疾患を持つイヌにおける新規なコロナウイルスであるCRCVについて報告するものである。

【0339】

コロナウイルスはヒト、ネコ、ブタ、家禽類の呼吸器疾患を引き起こすことが報告されているが、イヌの気管における存在及びイヌの伝染性呼吸器疾患(CIRD)との関係は確認されていなかった。

【0340】

CIRDが流行しており、CIRDに対して推奨されるワクチンの使用によっても流行を抑制することができなかった犬舎のイヌについて調査した。これらのイヌの気管から採取した試料を、コロナウイルスの保存ポリメラーゼ遺伝子に対するRT-PCRプライマーを用いて試験した(Stephensen et al., 1999)。

10

【0341】

まず、7の気管試料が陽性であることがわかった。RT-PCR産物の配列を決定し、すべての利用可能なコロナウイルスポリメラーゼ遺伝子の配列と比較した。この解析により、イヌ試料から得たcDNA配列が、ウシコロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子(98.8%)及びヒトコロナウイルスのOC43系統(98.4%)と最も高い相同性を持つが、腸性イヌコロナウイルスのポリメラーゼ遺伝子とは低い相同性しか持たない(1-71系統、68.53%)ことが明らかとなった。

【0342】

11のコロナウイルスのポリメラーゼ配列を用いて、系統学的な解析を行った。イヌの気管から検出したコロナウイルス(CRCV)は、第2グループに属する3のウイルス(BCV、OC43系統のHCV、及びHEV)と同じ分岐に位置していた。しかしながら、グループ1のコロナウイルスである、イヌ腸性コロナウイルスは、遠く関係しているにすぎなかった。

20

【0343】

従って、イヌ呼吸器コロナウイルスは新規なイヌのウイルスであり、共に呼吸器疾患の原因となることで知られるBCV及びHCV-OC43と密接に関係するウイルスである。

【0344】

より多くの配列情報を得るため、またより変化しやすい遺伝子を用いて他のコロナウイルスとの関係を決定するために、スパイク遺伝子の一部を解析した。CRCVはBCV及びHCV-OC43と最も類似していることが示されたことから、これらのスパイク遺伝子の配列をネステッドプライマーのセットを設計するのに用いた。より感度の良いアッセイが達成されるように、ネステッドプライマーが選択された。

30

【0345】

このRT-PCRの産物のシーケンスにより、CRCVがBCV及びHCV-OC43と高い相同性を持つことが確認された。

【0346】

BCVとCRCVのスパイクcDNAは高い相同性を持つことから、BCV抗原に基づくELISAを用いてCRCVに対する抗体の有無を分析した。ELISAの結果により、調査個体群におけるBCVに類似するウイルスの存在が確認された。

40

【0347】

犬舎に来た時は30%だった抗体の保有率は、21日後には99%となった。

【0348】

興味深いことに、また予期しなかったことに、血清の分析から犬舎に来た日にCRCVに対する抗体を持っていたイヌは抗体を持たなかったイヌに比べて呼吸器疾患に罹患する確率が低かった( $p < 0.001$ )。従って、今回の個体群CRCVに対する抗体の存在によって、において呼吸器疾患に対する防護的な効果があった。

【0349】

犬舎に来た日に陰性だったイヌのほとんどが3週間の間CRCVに対する血清変換を起こしたことから、このウイルスが非常に伝染性であることが示唆される。イヌ腸性コロ

50

ナウイルス (C E C V) に対する抗原の血清としての使用により、21日目における C E C V に対する抗体の保有率はがずっと低いことが示された。従って、B C V - E L I S A の結果はイヌ腸性コロナウイルスへの感染を反映しておらず、これら2種の抗原間での交差反応は低いことが示された。

【0350】

C R C V に対する血清抗体は、飼い犬や救助施設に来たイヌなどを含む様々なイヌのうちの30%に見られた。従って、C R C V の存在は調査した犬舎に限ったものではなく、ウイルスはイヌ全体に定着しているようである。

【0351】

P C R によって、気管組織及び肺組織に検出されたことから、C R C V は上気道及び下気道に感染しているようであった。犬舎の個体群において、C R C V - R N A はあらゆる程度の呼吸器疾患を持つイヌの27.3%で検出され、安楽死の時点では一見すると健康であるイヌの26.2%で検出された。

【0352】

C R C V - R N A は軽症の咳をするイヌの気管から最も高い割合で発見された(55%)。229-E系統のヒトコロナウイルスを用いた研究により、コロナウイルスは気管上皮の破壊及び繊毛の運動異常を引き起こすことが知られている(Chilvers et al., 2001)。理論に束縛されないのであれば、C R C V の感染は同様な効果を持ち、ウイルスはC I R D の病因のうちの初期段階において重要な役割を持つことを我々は確信している。C R C V が気管上皮を傷つけ、繊毛の運動を妨げることで、他のウイルスや病原菌の侵入が容易になる。したがって、C R C V の感染自体は軽症の呼吸器症状しか引き起こさないが、他の病原体と共同して重症な呼吸器疾患を引き起こすのであろう。

【0353】

*Bordetella bronchiseptica*、イヌアデノウイルス2型及びイヌパラインフルエンザがC I R D の主要な原因であると決定されたため、1970年代以降C I R D の病因については詳細に調査されていなかった。しかしながら、すべてのイヌにC P I V、C A V - 2及びジステンパーウイルスに対する予防接種を行い、大多数のイヌが21日以内にワクチンに应答したことが示されたにもかかわらず、この予防接種は今回の犬舎における病気の抑制を手助けするものとはならなかった(データ示さず)。

【0354】

この研究より、C I R D には新規なイヌ呼吸器コロナウイルスが関係していることが示された。従って、C I R D の病因を再評価し、新規な微生物や以前はこの病気に関係しないとされた微生物の役割を立証しなければならないであろう。

【0355】

参考文献

【0356】

Appel, M., and Binn L.N. (1987) Canine infectious tracheobronchitis, Short review: kennel cough. In "Virus infections of carnivores" (M. Appel Ed.), 1st Edition, pp201-211 Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

Bemis, D.A., Carmichael, L.E., and Appel, M.J. (1977). Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* 67, 282-93.

Binn, L.N., Alford, J. P., Marchwicki, R. H., Keefe, T.J., Beattie, R. J., and Wall, H.G. (1979). Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. *Lab Anim Sci.* 29, 48-52

Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., and Murnane, T. (1967). Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 126, 140-5

Chilvers, M. A., McKean, M., Rutman, A., Myint, B. S., Silverman, M., and O'Callaghan, C. (2001). The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory

10

20

30

40

50

ry epithelium. *Eur Respir J.* 18, 965-70.

【 0 3 5 7 】

Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("kennel cough"). *Can. Vet. Jour.* 3, 238-247

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2c). *Cladistics* 5, 164-166

Ignjatovic, J., and Sapats, S. (2000). Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech.* 19, 493-508.

Karpas, A., King, N.W., Garcia, F.G., Calvo, F., and Cross, R.E. (1968). Canine tracheobronchitis: Isolation and characterization of the agent with experimental reproduction of the disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 127, 45-52. 10

Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15, 200-7.

Lou, T.Y., and Wenner, H.A. (1963). Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type1: pathogenicity of the strain for other animals. *Am.J.Hyg.* 77, 293-304.

Makela, M.J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimaki, M., Blomqvist, S., Hyyppia, T., Arstila, P. (1998). Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 36, 539-42. 20

Page, R.D.M. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358

Pearson WR. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98.

Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q.* 1986 Jul;8(3):257-61.

Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1993 Mar;54(3):387-91. 30

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol.* 1988 Dec;69 ( Pt 12):2939-52.

Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 1999 Apr;60(2):181-9.

Storz J, Purdy CW, Lin X, Burrell M, Truax RE, Briggs RE, Frank GH, Loan RW Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med Assoc.* 2000 May 15;216(10):1599-604. 40

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec.* 1993 Jan 2;132(1):7-11.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

【 実 施 例 2 】

【 0 3 5 8 】

C R C V スパイクのクローニング及び発現

C R C V のスパイク遺伝子は表 5 に示すプライマー及び以下のクローニング法を用いて 50

クローニングした。これらは図18に図示される。

【0359】

1. スパイク遺伝子を4の重複断片で増幅した。
2. PCR産物であるSp5-Sp2(B)は重複部分におけるPvuIIサイトを用いてSp1-Sp8(C)に結合させた。
3. この断片を制限サイトNcoI及びBstXIを用いてpT7blue2ベクター (Novagen) にクローニングした。
4. PCR断片SpFXho-Sp6(A)を、重複部分のBstXI及びSpF-Xhoプライマーに取り込ませたXhoIサイトを用いてBCに結合させた。
5. 断片ABCを制限サイトXhoI及びNcoIを用いてバキュロウイルス輸送ベクターpMelBac B (Invitrogen)に移送した。 10
6. PCR断片Sp7-SpR-HisTag-Eco(D)を、重複部分のNcoI及びプライマーSpR-Eco-HisTagに取り込まれたEcoRIの制限サイトを用いてABCに結合させ、pMelBacB中の完全なスパイク遺伝子(Spike MelBac)を得た。これには、発現タンパクのC末端にHisTag (6xHis)が含まれる。
7. 哺乳類における発現のため、完全遺伝子をpMelBacBのBamHIサイト及びABCDの末端のEcoRIサイトを用いてpSecTagA (Invitrogen)に移送してプラスミドSpikeSecTagとした。

【0360】

組み換えバキュロウイルスの構築

Bac-N-BlueバキュロウイルスDNA (Invitrogen)及びSpike MelBacを用いてSf9細胞に同時導入を行った。得られたバキュロウイルス (AcSpCRCV 1-11) には、組み換え部位の上流及び下流に位置するプライマー (Invitrogen) を用いたPCRにより、全長が挿入されていることが示された。 20

【0361】

哺乳動物細胞における発現

Spike SecTagプラスミドは、リポフェクタミン (Invitrogen) を用いてBHK-21細胞に導入した。ELISA (Churchillより得たBCV抗原) によってCRCVに対する抗体が陽性であることが示されたイヌの血清試料及びChurchillより得たBCVに対するポジティブコントロール血清 (トリ抗BCV) を用いて、スパイクタンパクの発現を分析した。 30  
導入が行われた細胞はイヌまたはトリ血清及びFITC標識複合体 (FITC抗イヌIgGまたはFITC抗トリIgG) を用いた免疫蛍光アッセイにおいてポジティブな標識を示す。

【表 5】

表 5 : ウシコロナウイルス (GenBank アクセス番号 No. AF058942) 及びヒトコロナウイルス  
 OC43 (GenBank アクセス番号 No. L14643) のスパイク遺伝子の配列比較より設計されたプライマー

名称	配列	SEQ ID NO:	BCVスパイク遺伝子 における位置
Sp 1	5'-CTT-ATA-AGT-GCC-CCC-AAA-CTA-AAT	40	1637-1660
Sp 2	5'-CCT-ACT-GTG-AGA-TCA-CAT-GTT-TG	41	2258-2236
Sp 3	5'-GTT-GGC-ATA-GGT-GAG-CAC-TG	42	1666-1686
Sp 4	5'-GCA-ATG-CTG-GTT-CGG-AAG-AG	43	2107-2088
Sp 5	5'-AAC-GGT-TAC-ACT-GTT-CAG-CC	44	931-950
Sp 6	5'-CAA-GTA-AAT-GAG-TCT-GCC-TG	45	1121-1102
Sp 7	5'-GGC-TGC-CAC-CTC-TGC-TAG-TC	46	2919-2938
Sp 8	5'-ATT-GTT-AAA-TGC-ATT-AGC-AAT-AAG-C	47	3069-3045
SpF	5'-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	48	4-29
SpR	5'-GTC-GTC-ATG-TGA-WGT-TTT-RAT-TAC	49	4089-4066
SpF- <i>Xho</i> I	5'-AGC-TCG-AGC-TTT-TTG-ATA-CTT-TTA-ATT-TCC-TTA-CC	50	
SpR His- <i>Eco</i> RI	5'-TTG-AAT-TCT-TAA-TGA-TGA-TGA-TGA-TGG-TCG-TCA- TGT-GAW-GTT-TTR-ATT-AC	51	

SpF-*Xho*I は *Xho*I サイト (太字) を含む。SpR-His-*Eco*RI は 6xHisTag (二重下線)、  
 終止コドン (下線)、及び *Eco*RI サイトを含む。

10

20

30

40

50

## 【0362】

【図1】CRCVポリメラーゼ(pol)cDNAの部分ヌクレオチド配列(250残基)(SEQ ID No. 1)。

【図2】図1の塩基配列由来のCRCVのpolタンパクの部分アミノ酸配列(83残基)(SEQ ID No. 2)。

【図3】CRCVのスパイク(S)cDNAの塩基配列(4092残基)(SEQ ID No. 3) 3531番目のYはCもしくはTの何れかである。

【図4】図3の塩基配列由来のCRCVのSタンパクのアミノ酸配列(1363残基)(SEQ ID No. 4)。

【図5】12種のコロナウイルスにおけるポリメラーゼ遺伝子の250塩基領域についてのcDNA配列のコンセンサスツリー。イヌ呼吸器コロナウイルスから得られた配列をT101で示す。数字は100種のデータセットを解析して得られたブートストラップ値を示す。BCV:ウシコロナウイルス、CCV:イヌコロナウイルス、FIPV:ネコ伝染性腹膜炎ウイルス、HEV:ブタ赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、IBV:伝染性気管支炎ウイルス、MHV:マウス肝炎ウイルス、OC43:ヒトコロナウイルスOC43系統、SDAV:シアロ腺炎ウイルス、TCV:七面鳥コロナウイルス、TGEV:伝染性胃腸性炎ウイルス、229E:ヒトコロナウイルス、229E系統、T101:イヌ呼吸器コロナウイルス(気管試料T101のPCR産物)。

【図6】CRCV(サンプルT101 SEQ ID No. 1)、BCV(SEQ ID No. 5)、HCVのOC43系統(SEQ ID No. 6)、HEV(SEQ ID No. 7)およびCCV(腸性CCV SEQ ID No. 8)のpolのcDNAの250塩基部分配列におけるCLUSTAL X(1.8)多重配列解析。

【図7】CRCV(protCRCVpol(SEQ ID No. 2)のpolタンパクと、HCV(protHCVpoly、SEQ ID No. 9)、HEV(protHEVpolyにSEQ ID No. 10)、BCV(protBCVpolyにSEQ ID No. 11)およびCECV(腸性CCV、protCECVpol、SEQ ID No. 12)のpolタンパクとにおける83塩基部分配列のCLUSTAL X(1.8)多重配列解析。

【図8】CRCVスパイクcDNA(CRCVspike、SEQ ID No. 3)と腸性CCVスパイクcDNA(CECVspike、SEQ ID No. 13)の塩基配列におけるCLUSTAL X(1.8)多重配列解析。

【図9】CRCVのスパイクcDNA(CRCVspike、SEQ ID No. 3)配列と、BCV(BCVspike、SEQ ID No. 14)、HCV(HCVspike、SEQ ID No. 15)及びHEV(HEVspike、SEQ ID No. 16)スパイクcDNA配列とにおける4092塩基のCLUSTAL X(1.8)多重配列解析CRCVの3531番目のYは、CまたはTのいずれかである。

【図10】CRCVのスパイクタンパク(CRCVspikepr、SEQ ID No. 4)とBCV(BCVspikepro、SEQ ID No. 17)、HCV(HCVspikepro、SEQ ID No. 18)、HEV(HEVspikepro、SEQ ID No. 19)及び腸性CCV(CECVspikepr、SEQ ID No. 20)のスパイクタンパクとにおける1363アミノ酸のCLUSTAL X(1.8)多重配列解析。

【図11】入れ子状態の組となったプライマー(Spike1及び2(SEQ ID Nos. 34及び35)とそれに続くSpike3及び4(SEQ ID Nos. 36及び37))を使ったRT-PCR。BCV:ウシコロナウイルスのポジティブコントロール試料、A72:コロナウイルスに感染していないA72細胞;H<sub>2</sub>O:DNAを含まないPCR混合物;T5-T21:研究対称の犬の気管試料。アガロースゲル電気泳動により、ポジティブコントロール並びに試料T12及びT21のPCR産物の推定サイズは442bpであることが示された。

【図12】2のイヌのグループにおける呼吸器疾患の罹患率の比較。グループ1のイヌは

犬舎に入る日において呼吸器コロナウイルスに対して血清抗体が陽性であり、グループ2は陰性であった。グラフはグループ2と比較したグループ1においてイヌが呼吸器疾患を発症した割合を示すものである。nは、各グループのイヌの総数である。

【図13】CRCV血球凝集素/エステラーゼ(HE)遺伝子の部分ヌクレオチド配列(497残基)(SEQ ID No. 21)。配列はBCVのHE遺伝子(Genbank M84486)とHCV 0C43(Genbankアクセス番号M76373)のヌクレオチド418から914に対応する。

【図14】図13のヌクレオチド配列由来のCRCVのHEタンパク(SEQ ID No. 22)の部分アミノ酸配列(165残基)。配列ははBCVのHE遺伝子(Genbank M84486)とHCV 0C43(Genbankアクセス番号M76373)のヌクレオチド140から304に対応する。

【図15】CRCV(イヌ呼吸器コロナウイルス、SEQ ID No. 21)の血球凝集素/エステラーゼ(HE)遺伝子と、BCV(ウシコロナウイルスLY138系統、(SEQ ID No. 23、Genbankアクセス番号AF058942より取得)、0C43(ヒトコロナウイルス0C43系統、SEQ ID No. 24、Genbankアクセス番号M76373より取得)、HECV(ヒト腸性コロナウイルス、SEQ ID No. 25、Genbankアクセス番号L07747より取得)、及びHEV(赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、SEQ ID No. 26、Genbankアクセス番号AF481863より取得)の血球凝集素/エステラーゼ(HE)遺伝子との497ヌクレオチド部分配列のCLUSTAL X(1.8)多重配列解析

【図16】CRCV(イヌ呼吸器コロナウイルス、SEQ ID No. 22)のHEタンパクと、BCV(ウシコロナウイルスLY138系統、SEQ ID No. 27、Genbankアクセス番号AF058942より取得)、0C43(ヒトコロナウイルス0C43系統、SEQ ID No. 28、Genbankアクセス番号M76373より取得)、HECV(ヒト腸性コロナウイルス、SEQ ID No. 29、Genbankアクセス番号L07747より取得)、及びHEV(赤血球凝集性脳脊髄炎ウイルス、SEQ ID No. 30、Genbankアクセス番号AF481863より取得)のHEタンパクとの165アミノ酸部分配列のCLUSTAL X(1.8)多重配列解析 CRCV特異的な3のアミノ酸であるF、N、及びLを太字及び下線で示す。

【図17】BCV及びHCV(0C43系統)のHE遺伝子を対称とするコンセンサスプライマーHE1(SEQ ID No. 38)及びHE2(SEQ ID No. 39)を用いたRT-PCRアガロースゲル電気泳動により推測されるPCR産物のサイズはBCVポジティブコントロール及び研究対象のイヌのうちの4つの気管試料(T90、T91、T101及びT105)については497bp示したが、コロナウイルス陰性のA72細胞またはDNAを含まないPCR混合物(H<sub>2</sub>O)は示さなかった。1kbとは分子サイズ標準を示す(プロメガ)。

【図18】CRCVスパイクタンパクのクローニングの方策。

10

20

30

【 図 1 】

FIGURE 1

```

ctcagatgaa ttgaaatg gctattagtg ctaagaatag agcccgccact gttgctggtg 60
tttccatct tagtactatg actgacagaa tggttcatca aaaaagtgtg aaagatagag 120
cagctacagc tgggtttctc gttggtatag gcaaccactaa attttatggc ggcgtgggatg 180
atatgttacg togcctttat aaagatggtg acaatcctgt actttaggtt tgggattatc
ctaagtgtga 250

```

【 図 2 】

FIGURE 2

```

QMNLKAYISA KWRARTVAGV SILSTNTGRM FHKQKLSKIA ATRGVFVVIG TTXFYGGNDD 60
MLRRLEKDVDE NPFVLMGWDYF KCE 84

```

【 図 3 】

FIGURE 3 (Page 1 of 2)

```

atgttttga tacttttaa ttccatcca atggctttg ctgtatagg agattaaag 60
tgtactacgg ttccatcaa tgaattgac accggtgctc ctctatagg cncgtatgt 120
gtcagatga ctaatgggtt aggtactact tatgttttag atcogtggta ttaataact 180
acattgttgc taaatgggta ttactactc tcaagttcca catatogtaa tatgcnctg 240
aaggaactt tactattgag ccaactatgg tttaaacacc cattcttctc tgaatttat 300
gagtggttt ttgctaaggt aaaaataacc aaggttatta aagatgggtg agtgtatagt 360
gagtttctcg ctataactat aggtagtact ttgtaataa catcotatag tgggtatga 420
caaccnosta ctactaattt agataataa ttcaaggtc tcttagagat ctctgttgc 480
cagtatacta tgtgagatta cccactatag atgtgctac ctaactggg taataaacgc 540
atagaactat ggcattggga tacaggtgtt gttccctgtt tatataagcg taatttoca 600
tatagtgta atgctgatta ttgtattcc catttttacc aagaagtggtg tacttttat 660
gcatattta cagacaatgg tgtgttact agtttctgt ttcatgta tttaggcaag 720
gtgctttcac atattatagt catgcccgtt acttgaata gtgctatag lttagaatac 780
tgggttacac ctctcactt taacaatat ttactgctt tcaatcaga tgggttatt 840
ttatagctg ttgattgaa gagtgtatt atgagtgaga taaagtgtaa aacatctat 900
ataggacct ctactgggt ttatgatta aocgtttaca ctgttcagc aattgcagat 960
gtttaccgac gtatacctaa tcttccogt tgaatatab aggtgtgct taatgataag 1020
tcgtgctct ctocattaaa ttgggaactg aagaccttt caaatgtaa tttaaatag 1080
agcagcctga tgccttttat ccaggtgac tcttactct gtaataat tgaatgctc 1140
aagatatacg gtatgtgtt ttccagata actatagata agtttctat cccaatggt 1200
aggaagtg acctacaat gggcaattg ggcatttgc agtctttta ctatagaatt 1260
gatactactg ctacaagttg tcaatttat taataatc ctgctatga tgttctatt 1320
agcagttta atctctat ttgaatag agtttctgt ttacagaaca atctgtttt 1380
aagctcaac ctgtaggtg ttactctat catgatgtg ttatgcaca acattgttt 1440
aaagctcca caaattctg tcoygtaaa ttgaatggg ctttctgtg agttagtgt 1500
ttgttatag atgctggtta taataatag ggtatggca cttctctcg agtactaat 1560
tattactct gtaataagc taacaatgt gatgtttg gcaatccaga cctatttta 1620
tctaatcta caggtcctta taagtcccc caaactaat acttagtgg catagtgag 1680
cactgtctg gctctgat taagaatgt tatgtggg gcaatcctg tactgcca 1740
ccaaagcat ttttgggtg gctgtggc tctgttacc aagggatag gtaataat 1800
ttgtcaat ttatttga tgggttaat agtgtacta ctgttctac tggattaca 1860
aaatcaaca cagacaata tcttgggtt tgtgtaat atgacttta tggattaca 1920
ggccaagta ttttggta ggttaatgc acttattata atagttgca gcaacttta 1980
tatgattca atgtaact ctatgtttt aggtactat taacaacag aacttttat 2040
atctagtt gctatagcg tctgttca ggggtcttc actcaact tccgaacca 2100
gactgcat tccgaat taatgcaat tcaatttta atactact tccagcag 2160
ctgcaacta ttaactatt tgaatgat cttgtgtg ttgcaatg tgaatag 2220

```

【 図 3 】

FIGURE 3 (Page 2 of 2)

```

actctagtt ctgttcaac atgtgctc acagtagga tgggttctg ggggattac 2280
tctccacaaa gacgaagtg tagaagatt acaactggtt atcggttac taattttgag 2340
ccatttactg ttaatccagc aaatgatag ttaccocbc taggtggtt gbatgaaett 2400
caaatcctt cagattttac tatagtaat atgagggagt ttaticaaac aagatctctc 2460
aaagttaata tttattgctc tttttttgc tgyggatgt atgcagcatg taactacagc 2520
ttgttgaal atggttagtt ttgtgcaat ataaatgcta tactccaga agtaaatgaa 2580
ctactgaca ctacacagtt gcaatagct aatagttta tgaatggtt cactcttagc 2640
actaagctta aagatgctt taatttcaat gtagatgac taacttttc cctgttata 2700
ggtgttttag gaagcgaatg taataagtt tcaatgtag ctgctataga gatttactt 2760
ttttcaaa taagttaat tgaatggtt ttgtgtgtt cttaataaa ttgctatgga 2820
ggtccgaaa ttaggacct catttggg caaagtata atgctatcaa agtgttgcct 2880
caactgctc cagaataca gtagcagga taacttttg ctgcaactt tgotagctg 2940
ttctcctt ggtcagcagc agcagccta ccaatttat taaatttca gtagctatt 3000
aaggtatg tgttaccat gtagtctga actcaaatc aaaaactat ttcatatgca 3060
tttaacaatg cactgtagc tattcagga ggttttgg ctaccactt tggattagt 3120
aaaattcaag ctgttgttaa tgcgaatgt gaagcttta atacttat gcaacaactc 3180
tcaataaat ttgtgtctat aagctctt ctcaagaaa tctactctag actttagct 3240
ctgaagcgc aagctcagat agcacgact atcaatggc gctctacgc tcttaatgct 3300
tatgtttctc sacagcttag ttttttcca ctatgaaat ttatgtcagc acaagctatg 3360
gagaagttta atgtagtgt caaaagcaca tcaactgga taattttg tggtaatgt 3420
aatcatata tatcattagt gcaatgct ccaatggtt tgtatttat ccaatttagc 3480
tatgtccta ctaagtatg cactgcaag gtagtcccg gctctgcat ygcagtgat 3540
agaggtatag ctctaaagc tggttattt gtaatgaa ataacactg gatgtact 3600
ggtagtggtt atactaac ccgcaacta actgaaata atggtgtgt tatgactacc 3660
tgtctgta actataca agcaccgat gtaatgctga acatttca ccccaactc 3720
cctgattta aggaagatt ggcactatg tttaaaacc aaactaat ggcaccgat 3780
ttgtcactg atataaaa ttttactt ttgcaactac aagatgaaat gaatagttta 3840
caggaagcaa taatggttt aactatagc taatcaact caaagcat tggatcat 3900
gaatattatg taatggcc tggatgta tggctttta ttggcttgc tggctagct 3960
atgctgtt tactattct ccatagctg tgaacagat gttgactag ttgtttaa 4020
aaatcggtg tgtttgta tttattact ggcactcag agttagta caaaactca 4080
catgactact aa 4092

```

【 図 4 】

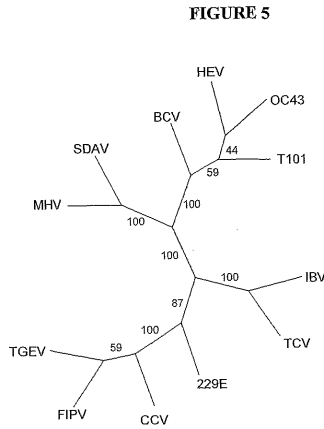
FIGURE 4

```

MELILLISLP MAFVIGDLK CTVSINDV TGAFISTDV VDWINGLGY YLKVLYLNT 60
TLNLNGYPT SGTYSRML KSTLLSLM FKFFLSDFI DGVPKVRMT KVINDGVYS 120
EFAITIGST FVNTSYVVV QPHNLNKK LOGLEISVC QYTMCDYPT MCFNLGNKR 180
IELWHDVGV VCLYKRFET YDWNADLYS HFYQSGTFY AYFTDGVVT KEFPHYLG 240
VLSHYVMEI TCNSRMELEY WYFLTFXQY LLAFLQGVY FNAVCKSDT MEFKCKTLS 300
IAFTGVYEL NGYVQPIAD WYRFLPEED CNIEANLNDK SVPELNNER KYFNCNENM 360
SSIMFIQAD SFTCNIDAA KIVMCFESI TIDKFIPIG RKVLDQNGE GYLGSFNRY 420
DTPATSCQL YNLPASNVI SRFNSINR RGFTEQSVF KPOQVGVTD HDVYIQRFC 480
KAPTFCPCF INGLSLVGG RPIDYKNS GIGCFAGIN YLCTNANQC DCLCTPDL 540
SKSTGPKCF QYKYLWIGE RCGSLAKSD YCGSNCTQC PKAFIWSVD SCLOGRNI 600
FANFLWGVN SGTICSTLQ KSWDILLO CVNYLXGIT QGQIFVYNA YYNSNQNL 660
YDNGMLYGF RYLWRFEM IRSCISGRV AFPHNSSEF ALLFRNKN YFNNPLRSQ 720
LQFINYFDSY LGCVNADNS TSSVQTCDL TVGSGVWDY STQRSRRTI TGTFRWFE 780
PFTVNPVNS LHFVGLYEI QIPSEFTGN MEEFIQTRP KVIIDCFVY GDIYACKSQ 840
LVEYGFCDN INALLTEVNE LLDITLQVA NSLWNGVLS YKLGDVFN VDDINFSVL 900
GLGSRCKV SRSATDILL FSKVLSQV FVDYNNCTG GAIRDILCV QSYNGKFLP 960
PLLSNQISG YPLAATFSL FPFWSAAGV FFLNVQYRI NGIGYMDVL TQNGKISNA 1020
FNNALDIQI FGDATNSALV KIQAVVANA EALNNLQQL SKKFGAISAS LQELSLRA 1080
LEAQIDRL INGRALNA YVSQLSDST LVKFSAAQAM RKNVCKKSG SSRINFCNG 1140
NHIIQLQNA FYGLYIFES YPFTYKAK VSPGLCIAD RGAPEKSGY VVNNFMTF 1200
GSGYYPFPI TGNVVVMSV CAVNYKAPD VMLNISTPL PDKFELDQV FKNCTMADP 1260
LSLDYINVTI LDLDQNNRL QBAIKVLSN YINKLDIGY EYVYKRWVY NLIIGLAGVA 1320
MLVLIFFIC CTGCTSCFK KCGCCDDVT GHQLVIRTS HSD 1363

```

【 図 5 】



【 図 6 】

**FIGURE 6**

```

T101 CTGAGTGAATTTGAAATATGCTATTAGTCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
BCV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
OC43 CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
HEV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
CCV CTCGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTCTAAGAATAGAGCCCGCACTGTTGCTGGTG
*****

T101 TTTCATACCTAGTACTAGTACTGGCAGAAATGTTTCATCANAATGTTGAAAAGTATAG
BCV TTTCATACCTAGTACTAGTACTGGCAGAAATGTTTCATCANAATGTTGAAAAGTATAG
OC43 TTTCATACCTAGTACTAGTACTGGCAGAAATGTTTCATCANAATGTTGAAAAGTATAG
HEV TTTCATACCTAGTACTAGTACTGGCAGAAATGTTTCATCANAATGTTGAAAAGTATAG
CCV TTTCATACCTAGTACTAGTACTGGCAGAAATGTTTCATCANAATGTTGAAAAGTATAG
**** *

T101 CAGCTACACGCTGGTGTCTCTGTTGTTATAGCACCACCTAAATTTTATGGCGCTGGGATG
BCV CAGCTACACGCTGGTGTCTCTGTTGTTATAGCACCACCTAAATTTTATGGCGCTGGGATG
OC43 CAGCTACACGCTGGTGTCTCTGTTGTTATAGCACCACCTAAATTTTATGGCGCTGGGATG
HEV CAGCTACACGCTGGTGTCTCTGTTGTTATAGCACCACCTAAATTTTATGGCGCTGGGATG
CCV CAGCTACACGCTGGTGTCTCTGTTGTTATAGCACCACCTAAATTTTATGGCGCTGGGATG
* * *

T101 ATATGTTACGTCGCTTATTAAGATGTTGACAAATCCGTCCTTATGGTATGGATTATC
BCV ATATGTTACGTCGCTTATTAAGATGTTGACAAATCCGTCCTTATGGTATGGATTATC
OC43 ATATGTTACGTCGCTTATTAAGATGTTGACAAATCCGTCCTTATGGTATGGATTATC
HEV ATATGTTACGTCGCTTATTAAGATGTTGACAAATCCGTCCTTATGGTATGGATTATC
CCV ACATGCTTAAAAATTTAAGCGTATGTTGATAATGTTGTTGATGGATGGGACTATC
* * *

T101 CTAAGTGTGA
BCV CTAAGTGTGA
OC43 CTAAGTGTGA
HEV CAAAGTGTGA
CCV CTAAGTGTGA
*****

```

【 図 8 】

FIGURE 8 (Page 1 of 9)

```

CRCVspike -----ATGTTTTGGTACTTTTA-----ATTTCCTTACCAATG
CECVspike ATGATTTGCTGCTACTTGCATTTTATTTGTTTATGTTTCATACCACACTGGTTCGAGTACG
*****

CRCVspike GCTTTTCTGCTG--TATAGGAGATTAAAGGTACTACGGTTTC-CATCAATGAATGTGACA
CECVspike TCAAATATGATTTAGTACAAATGAA--CGTACACCAATTAGATGSCAAATGAABACCTCA
* * *

CRCVspike CCGGTG-CICCTTCTATFAGCAGTGTGTTGCGATGTTACTAATGTTTATGACTTAT
CECVspike TTAGAGACTTTTGTTCABAACCT--TAAAGAAAGGAACTGTAGTGTGGTGGTTAC
* * *

CRCVspike TATGTTTATGA---TCGCTG--TATTTAAATACTACA---TTGTTGCTTAAATGCTTA
CECVspike TACCCTACAGAGTTTGGTATACTGTTCTAGAACGACCAACTACTGCTCA--TGAGTA
* * *

CRCVspike TTATCCTACTTCAGTCTACATATCGPAMPATGCA--CTGAGGGAACTTACTATTGA
CECVspike TTTCAGTATATACAGCGATTCTATTTTGATATGAGAGCCATGAGAAATAGTACTGGTAA
* * *

CRCVspike -GCACACTATG--TTAAACCACTTCTCTCTGATTTATGATGGTGTTTTGTCTAA
CECVspike TGCAGTGGTAAACCTTTATATTTCTATGTTCTAGTGGTGGCTGTTAGTCTCATCATATA
*****

CRCVspike GGTAAARATACCAAGTATTAAGATGCGTGTAGTGTATAG--TGAGTTCCTGCTAT
CECVspike CATATCTTATAGAGATGATGTCGACACAPAGCCACTTTAABACACCGATTAATGTGCTAT
* * *

CRCVspike AACTATAGTACTGTTTGG--TA-AATACCTCTATAGTGTGAGTACACCACTATC
CECVspike AACTATAGTACTGTTTGG--TA-AATACCTCTATAGTGTGAGTACACCACTATC
*****

CRCVspike -TACFATTTAGATPATAAATACAGGCTCTCTACAGATCTCTGTTGCGATATFACTA
CECVspike GTACGGTATGACAGAAAATTCCTT-TCCTGTCTATCCACCGGACATGGAACAAA
* * *

```

【 図 8 】

FIGURE 8 (Page 2 of 9)

```

CRCVspike -TGTGGATTACCCGATA-CGATGTGTC-ATCCAACTGGGT-ATAAACC--CATAG
CECVspike ATTTATGGTCTTGAATGAAATGATGAAATTTGTTACAGCGTACATAGTGTCTCTTAT
* * *

CRCVspike AACTATGGCAGTGGGTACAGGTTGTTCCCTGTT-TATATAGCATAATTCACATAT
CECVspike AATGGAACATCAATATATTTGTTTACAAATGACCGTCTCTGTAGTGTCTCARGC
* * *

CRCVspike GATGTGA-ATGCTGATTTTGTATTCOCATTTTTATCAAGAGGTGGTACTTT--TTA
CECVspike ACTGCCACATGSCAACACAGTGC--TGCATAGCTTACCAAGGTTTCTACTCAGCTTA
* * *

CRCVspike TGCATATTTACAGACACTGGTGTGTACPAAGTGTCTGTTGATGTTTAT--TTEGCA
CECVspike TTACAGATTAATAACCACTAGTCTTA--AATCCTAATGAAATGTAAGATATAGAA
* * *

CRCVspike CCGTGCCTT--CACATATTA-TGTCATGCCCTGACTTGTATATAGTCTAAGTACTTA
CECVspike TATTGCACTGGTACGCCACTACTCTTTTGCACCAGTGGAGAGTTACTACTGAT
* * *

CRCVspike GAATAGTGGGTTA---CACCTCTCCTTTTAAACAATATTTACTGCTTTCAATCAAG
CECVspike GGATTTAGTTTAAACAATGGTGTGTTGCTTACAAACACCCACTTTTGTATAGTGGCAGA
* * *

CRCVspike ATGGTGTATTTTAAAGTGTGTTGATGTAAGATGATTTTATGATGAGATTAAGTGT-
CECVspike TTTGAAACAATCAACCATATATGATTAATGCTTTGAGGCACTTCTAGTTTGGTGT
* * *

CRCVspike --AABACACTATATAGACCACTACTGCTGTTTATGAAATTAACGGTTACTACTGTC
CECVspike GCAGCACAAGAAATTTGTTTGAAGTGCACACTTTAGCCAAATTAAGTGTGTTTATA
* * *

CRCVspike AGCA-ATGCGAGTGTACCAGGATACCAATCTCCCG--ATFGTAATATAGAGG
CECVspike AATAACACAGTATGCTATTAATGATCACTTATTTACTGCAAGTATGATCTGCG
* * *

```



【 8 】

FIGURE 8 (Page 7 of 9)

```

CRCVspike TATTTCTAATGATTTACCAATGCCCCCTGATGCTATT-----CAGSAAAGGTT--
CECVspike CTFGGCTAATGCTTTACCCAGCTATTGGTACATTACACAGGCATTGGTAAAGTTAA
* * * * *
CRCVspike TGAATGCTA-----CAATTCCTGCT-----TAGCTAARAT
CECVspike TGAATGCTATACATCAACATCACAGGCTCTTGCACCTGTTGCTAAGCATTGGCRAAAGT
*****
CRCVspike TCAGCTGTTGTTAATGCAAAATGCTGAGCTCTTARTACTATTGCAACACTCTCTAA
CECVspike GCAGAGTGTGTTAACACAAGGGCAGCTTTAAGCCACTAACAGTACACACTGCAAAA
****
CRCVspike TAAATTTGGTCTAATGCTCTTACAGAAATTCATCTAGACTTGAATGCTCTTGA
CECVspike TAGCTCCAGCCTATTACTAGTCTATTAGTGCATTTAATATAGGCTTGAATGACTGAG
** *
CRCVspike AGCCCAAGCTCAGATGACAGACTTATCAATGGGGCTTACCCTCTAATGCTTATGT
CECVspike TGTCTATGACAGATGATAGGCTGATACAGTACAGCTTAAATGCAATTTGT
* * * * *
CRCVspike TTCTCAACAGCTTATGATTTACACTAGTAAATTTAGTGCAGCACAAGCTATGGAAA
CECVspike ATCTCAGACTCTPACCCAGACAACCGAGCTTAGGGCTAGTAGACACTTSCCAAGACAA
*****
CRCVspike GGTAAATGAACTGTCBAAGGCCAATCATCTAGGATAAATTTTGGTAAATGTAATCA
CECVspike GGTAAATGAACTGTTTACTCTCACTCTCAGSATTTGGATTTTGGTAAATGTAATCA
*****
CRCVspike TATTAATATAGTATGAGCAGAAATGCTCATAATGGTTTGTATTTATCCACTTA-CCTATG
CECVspike TTTGTTTTCAGCTGCAAAATGACAGCAAAATGGCAATGTTTTCACACAGTGTAT-
* * * * *
CRCVspike TCCCTACTAAGTATGCTGCTGGAAGTTAGTCCGGCTCTGTCATYCAAGTATGAGAG
CECVspike TACCACAGCTTATGAACTGTAAAGCTTGGTCCAGTATTTGCTTCCAGATGGCAGTC
* * * * *

```

【 8 】

FIGURE 8 (Page 8 of 9)

```

CRCVspike GTA-----TAGCTCCTAAGAGTGGTTATT----TGT-----AATCTAATATACA
CECVspike GCACCTTTGCACTTGTGCTTAAAGATGTCAGTGCAGTGTGTCGTAATCTAGATGACA
* * * * *
CRCVspike CTGGATGTTCTACTGCTAGTGGTTATTACTACCTGACCTATAACTGGAATAATGTGG
CECVspike AGTCTTATTTGACTCCAGACTATGATGACGCTAGAGCTGCACTAGTCTGATTTTG
* * * * *
CRCVspike TTGTTATGATCTCTGCTGCTTACTATACTAAGCAGCCGGATGTAATGCTGACACTTT
CECVspike TTCAGATTGAGGGGTCGACGCTGTTGTTGCAATGCACTGTAATGCTGCTGCTAGTA
* * * * *
CRCVspike CACACCCACCTCCCTGATTTAAGGAG-----AGTGGTCAATGTTTAAAAAC
CECVspike TTATACCTGACTATATGACATTAACAGACTGTCAGACATTAATGAAACTACAGAC
* * * * *
CRCVspike CAACACTAATGAGCCACCAAGATTGTCATGATATATATATATATGATCTGAGCCTA
CECVspike CAAAC-TGGACTGACTGATTAATGACATTAACACTTTTAAAGCAGCTATTTAAATCTG
*****
CRCVspike CAAGATGAATGAATAGTACAGG--AGGCCAATAAGTT---TTAATCATAGC---
CECVspike ACTGCTGAATGATGACTTAGAATTTAGTGCAGAAAGCTACATAACCCACAGTAGAG
* * * * *
CRCVspike -----TACAT-----CAATCTCAAGGACATTTGGTACA
CECVspike CTGCCCCATCTATTGACATAATTAACATTAATGATCAATGATGCAATCTGAAATGGCTCAATAGA
*****
CRCVspike TATGAATATTAATGAAATGGCTTGTATGATGCTTTAATTTGGCTGCTGGCGTA
CECVspike ATTGAACCTATGATGAATGGCTTGTATGCTGCTGCTACTAATAGGC-TTAGATGATAG
* * * * *
CRCVspike GCTATGCTGTT-TTACTATCTTCAATGCTGTTGACAGATG---TGGGACTATGTG
CECVspike GTTTTGCATACCGCTATTGCTATTTGCTGTTGACAGAGTTCCTGCTGATGCAATAGG
* * * * *

```

【 8 】

FIGURE 8 (Page 9 of 9)

```

CRCVspike TTTTAAAGTATCGGCTGGTGTGTTGATGATTAATCTGGACA--TCAGGAGTATGATATC
CECVspike TTGTTTGGAAATGTTGTCATCTATTGCTAGTAAAGCAAAATTAATTAATGCAAGCC
* * * * *
CRCVspike AA-----AACTGCATGACACTAA-----
CECVspike AATTAAGAAATGCTGCTCCACTAA-----
* * * * *

```

【 9 】

FIGURE 9 (Page 1 of 12)

```

BCVspike ATGTTTTGATACTTTAAITTCCTACCAAGGCTCTGCTGTATAG
HCVspike -----ATGTTTTGATACTTTAAITTCCTACCAAGGCTCTGCTGTATAG
CRCVspike -----ACTTTTTGATACTTTAAITTCCTACCAAGGCTCTGCTGTATAG
HEVspike -----ATGTTTTGATACTTTAAITTCCTACCAAGGCTCTGCTGTATAG
*****
BCVspike GAGATTTAAGTGTACTACGGTTCCATTAAATGATGCTGACACCGGTTCCCTCTGTTA
HCVspike GAGATTTAAGTGTACTACGGTTCCATTAAATGATGCTGACACCGGTTCCCTCTGTTA
CRCVspike GAGATTTAAGTGTACTACGGTTCCATTAAATGATGCTGACACCGGTTCCCTCTGTTA
HEVspike GGGATTTAAGTGTAACTACTCATCAATTAAGCCTTGACACTGCTGCTCATCTATTA
* * * * *
BCVspike GCACGTACTGCTGATGTTACTAATGGTTTAGTACTTATATGTTTAGATCGTGTGT
HCVspike GCACGTACTGCTGATGTTACTAATGGTTTAGTACTTATATGTTTAGATCGTGTGT
CRCVspike GCACGTACTGCTGATGTTACTAATGGTTTAGTACTTATATGTTTAGATCGTGTGT
HEVspike GCTCTGAAGTTGATGTCACATAGGTTTGGGACTTCTATGTTTAGATCGTGTCT
* * * * *
BCVspike ATTTAAATFACACTGTTGCTTAAATGGTTACTACCTACTCAGGTTCTACATATCGTA
HCVspike ATTTAAATFACACTGTTGCTTAAATGGTTACTACCTACTCAGGTTCTACATATCGTA
CRCVspike ATTTAAATFACACTGTTGCTTAAATGGTTACTACCTACTCAGGTTCTACATATCGTA
HEVspike ATTTAAATFACACTGTTGCTTAAATGGTTACTACCTACTCAGGTTCTACATATCGTA
*****
BCVspike ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACACACTATGGTTTAAACACCTTTCTTT
HCVspike ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACACACTATGGTTTAAACACCTTTCTTT
CRCVspike ATATGGCACTGAGGGAACCTTACTATTGACACACTATGGTTTAAACACCTTTCTTT
HEVspike ATGCGCTCTGAGGGAACCTGATATTGAGGACCTTGTGTTTAAAGCCCTTTTAT
* * * * *
BCVspike CTGATTTTATATGGTATTTTGGTAAAGTCAAAATACCAAGGTTATTAATAATGGTG
HCVspike CTGATTTTATATGGTATTTTGGTAAAGTCAAAATACCAAGGTTATTAATAATGGTG
CRCVspike CTGATTTTATATGGTATTTTGGTAAAGTCAAAATACCAAGGTTATTAATAATGGTG
HEVspike CACTTTTATATGGTATTTTGGTAAAGTCAAAATACCAAGGTTATTAATAATGGTG
* * * * *

```





【 9 】

FIGURE 9 (Page 10 of 12)

```

BCVspike    GACTTGTGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGCGCTTACCG
HCVspike    GACTTGTGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGCGCTTACCG
CRVspike    GACTTGTGCTCTTGAAGCGCAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGCGCTTACCG
HEVspike    GGCTCGATGCTCTTGAAGCGTAAAGCTCAGATAGACAGACTTATTAATGGCGCTCAGCG
* * * * *

BCVspike    CTCCTAATGCTTATGTTCTCAGACGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
HCVspike    CTCCTAATGCTTATGTTCTCAGACGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
CRVspike    CTCCTAATGCTTATGTTCTCAGACGCTTAGTGATTCTACACTAGTAAATTTAGTGCAG
HEVspike    *****

BCVspike    CAGAGCTATGAGAGGTTAATGAATGTCGCAAGCCCAATCATCTAGGATAAATTTT
HCVspike    CACAGGCTATGAGAGGTTAATGAATGTCGCAAGCCCAATCATCTAGGATAAATTTT
CRVspike    CACAGGCTATGAGAGGTTAATGAATGTCGCAAGCCCAATCATCTAGGATAAATTTT
HEVspike    CACAGGCTATGAGAGGTTAATGAATGTCGCAAGCCCAATCATCTAGGATAAATTTT
*****

BCVspike    GTGCTAATGCTTATGCTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
HCVspike    GTGCTAATGCTTATGCTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CRVspike    GTGCTAATGCTTATGCTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
HEVspike    GTGCTAATGCTTATGCTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
*****

BCVspike    TOCACTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATG
HCVspike    TOCACTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATG
CRVspike    TOCACTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATG
HEVspike    TOCACTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATGCTTATG
*****

BCVspike    TTGCTGCTATAGAGGTTAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATPACACTT
HCVspike    TTGCTGCTATAGAGGTTAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATPACACTT
CRVspike    TTGCTGCTATAGAGGTTAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATPACACTT
HEVspike    TTGCTGCTATAGAGGTTAGCCCTTAGAGTGGTATTTGTTAATGTAATPACACTT
*****

```

【 9 】

FIGURE 9 (Page 11 of 12)

```

BCVspike    GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCCGAAACCTATAACGAAATATGTTGGT
HCVspike    GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCCGAAACCTATAACGAAATATGTTGGT
CRVspike    GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCCGAAACCTATAACGAAATATGTTGGT
HEVspike    GGATGTTCACTGGTAGTGGTTATTACTACCCGAAACCTATAACGAAATATGTTGGT
*****

BCVspike    TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTAACCTAAGACCCGAGTAAATGCTGAACATTCRA
HCVspike    TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTAACCTAAGACCCGAGTAAATGCTGAACATTCRA
CRVspike    TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTAACCTAAGACCCGAGTAAATGCTGAACATTCRA
HEVspike    TTATGAGTACCTGTGCTGTTAATTAACCTAAGACCCGAGTAAATGCTGAACATTCRA
*****

BCVspike    CACCCACCTCCCTGATTTAAGGAGAGTGGATCAATGGTTTAAACCAACACATCAG
HCVspike    CACCCACCTCCCTGATTTAAGGAGAGTGGATCAATGGTTTAAACCAACACATCAG
CRVspike    CACCCACCTCCCTGATTTAAGGAGAGTGGATCAATGGTTTAAACCAACACATCAG
HEVspike    CACCCACCTCCCTGATTTAAGGAGAGTGGATCAATGGTTTAAACCAACACATCAG
*****

BCVspike    TGCCACGAGTTTGTCACTTATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
HCVspike    TGCCACGAGTTTGTCACTTATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CRVspike    TGCCACGAGTTTGTCACTTATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
HEVspike    TGCCACGAGTTTGTCACTTATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
*****

BCVspike    TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGTACATCAATCTCAAGGCA
HCVspike    TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGTACATCAATCTCAAGGCA
CRVspike    TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGTACATCAATCTCAAGGCA
HEVspike    TGAATAGGTTACAGGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGTACATCAATCTCAAGGCA
*****

BCVspike    TTGCTACATATGATATTAAGTAAATGGCCCTGGTATGATGGCTTTAATGGCCCTG
HCVspike    TTGCTACATATGATATTAAGTAAATGGCCCTGGTATGATGGCTTTAATGGCCCTG
CRVspike    TTGCTACATATGATATTAAGTAAATGGCCCTGGTATGATGGCTTTAATGGCCCTG
HEVspike    TTGCTACATATGATATTAAGTAAATGGCCCTGGTATGATGGCTTTAATGGCCCTG
*****

```

【 9 】

FIGURE 9 (Page 12 of 12)

```

BCVspike    CTGGCTAGCTATGCTTGTACTATCTTCAATGCTGTTGACAGGATGGGACFA
HCVspike    CTGGCTAGCTATGCTTGTACTATCTTCAATGCTGTTGACAGGATGGGACFA
CRVspike    CTGGCTAGCTATGCTTGTACTATCTTCAATGCTGTTGACAGGATGGGACFA
HEVspike    CTGGCTAGCTATGCTTGTACTATCTTCAATGCTGTTGACAGGATGGGACFA
*****

BCVspike    GTTGTITTAAGAAATGCGGTTGTTGATGATTAATAC-----
HCVspike    GTTGTITTAAGAAATGCGGTTGTTGATGATTAATACAGCCAGG-----
CRVspike    GTTGTITTAAGAAATGCGGTTGTTGATGATTAATACAGCCAGG-----
HEVspike    GTTGTITTAAGAAATGCGGTTGTTGATGATTAATACAGCCAGGTTGTA
*****

BCVspike    -----
HCVspike    -----
CRVspike    -----
HEVspike    TCRAACCTCAGATGAGGATTAATTCCT

```

【 10 】

FIGURE 10 (Page 1 of 5)

```

BCVspikepro  ---MFLILLISLFWALAVIGDLKCTVSIINDVDTGVSVDVTVNGLGTYVLDLV
HCVspikepro  ---MFLILLISLFWALAVIGDLKCTVSIINDVDTGVSVDVTVNGLGTYVLDLV
CRVspikepro  ---MFLILLISLFWALAVIGDLKCTVSIINDVDTGVSVDVTVNGLGTYVLDLV
HEVspikepro  ---MFLILLISLFWALAVIGDLKCTVSIINDVDTGVSVDVTVNGLGTYVLDLV
CECspikepro  MEVLVTCILLCSYFASSTSNDRQVNVTLQDGNELIRDLELQNFKEKRGTVVGG--
: ***: .: .: * : : : * : : : .: .: .: ** * .

BCVspikepro  YLNTLLLLNGYPTSGSTRNMLKGLLSTLWFKPFLSDPFDNGIFAKVKNTRKIVKNG
HCVspikepro  YLNTLLLLNGYPTSGSTRNMLKGLLSTLWFKPFLSDPFDNGIFAKVKNTRKIVKNG
CRVspikepro  YLNTLLLLNGYPTSGSTRNMLKGLLSTLWFKPFLSDPFDNGIFAKVKNTRKIVKNG
HEVspikepro  YLNTLLLLNGYPTSGSTRNMLKGLLSTLWFKPFLSDPFDNGIFAKVKNTRKIVKNG
CECspikepro  YYPEVWYKSRATATAYEYFSNIHAFYFDMELMNSTGNARKKPLLEHVHGSVEVS--
* * * * * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

BCVspikepro  VMYSEFPATIGSTFVNTSYVSVVQPHNTLNLKGLLEISVQYTMCEYPHITCENL
HCVspikepro  VMYSEFPATIGSTFVNTSYVSVVQPHNTLNLKGLLEISVQYTMCEYPHITCENL
CRVspikepro  VMYSEFPATIGSTFVNTSYVSVVQPHNTLNLKGLLEISVQYTMCEYPHITCENL
HEVspikepro  VMYSEFPATIGSTFVNTSYVSVVQPHNTLNLKGLLEISVQYTMCEYPHITCENL
CECspikepro  ILYISYRDDVQHRFLKGLVCTESRNIQYNSFTSSQWNSICTGNDKIPESVIEPTDN
: * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

BCVspikepro  GNRIBLHNDTGVVSCLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDGVVT
HCVspikepro  GNRIBLHNDTGVVSCLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDGVVT
CRVspikepro  GNRIBLHNDTGVVSCLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDGVVT
HEVspikepro  GNRIBLHNDTGVVSCLYKRNFTYDWN-----ADLYLHFYQEGGTFYAYFTDGVVT
CECspikepro  GTKIYGLEWDEPVTATYISGRSYNWNINNNFNWVTLYSRSSTATQHSAAVYQGSVN
* : * * * . : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

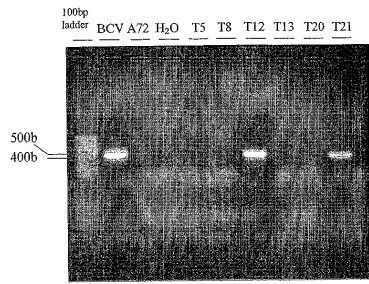
BCVspikepro  KFLFNVLGTVLSHYYVME-----LTCNSAMTLEYVWVPLFKQYLLAFNQGQVIF
HCVspikepro  KFLFNVLGTVLSHYYVME-----LTCNSAMTLEYVWVPLFKQYLLAFNQGQVIF
CRVspikepro  KFLFNVLGTVLSHYYVME-----LTCNSAMTLEYVWVPLFKQYLLAFNQGQVIF
HEVspikepro  KFLFNVLGTVLSHYYVME-----LTCNSAMTLEYVWVPLFKQYLLAFNQGQVIF
CECspikepro  FTYKLNNTNGLKTYLCEDEYECTGYATNIFAPTVGGYIPDGFSEFNHFLINSSTFVS
: : : . * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```



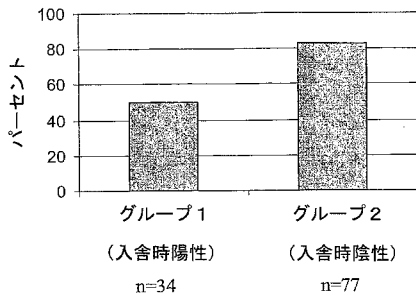
【 図 1 1 】

FIGURE 11



【 図 1 2 】

図 12



【 図 1 5 】

FIGURE 15 (Page 1 of 2)

```

CRCV  TATCGCAGCCCTACITTTTGTAAATGACACATATGTTTATAATGGCTCGCACATCTCA
BCV   TATCGCAGCCCTACITTTTGTAAATGACACATATGTTTATAATGGCTCGCACATCTCA
OC43  TATCGCAGCCCTACITTTTGTAAATGACACATATGTTTATAATGGCTCGCACATCTCA
HECV  TATCGCAGCCCTACITTTTGTAAATGACACATATGTTTATAATGGCTCGCACATCTCA
HEV   TATCGCAGCCCTACITTTTGTAAATGACACATATGTTTATAATGGCTCGCACATCTCA
*****

CRCV  GCCTTTGTAAATCTGTAGTTAGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCGGAGAGCT
BCV   GCCTTTGTAAATCTGTAGTTAGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCGGAGAGCT
OC43  GCCTTTGTAAATCTGTAGTTAGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCGGAGAGCT
HECV  GCCTTTGTAAATCTGTAGTTAGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCGGAGAGCT
HEV   GCCTTTGTAAATCTGTAGTTAGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCGGAGAGCT
*****

CRCV  AATTTGGGGATTATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTAATTTGTCAGGTTGTCAGGAG
BCV   AATTTGGGGATTATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTAATTTGTCAGGTTGTCAGGAG
OC43  AATTTGGGGATTATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTAATTTGTCAGGTTGTCAGGAG
HECV  AATTTGGGGATTATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTAATTTGTCAGGTTGTCAGGAG
HEV   AATTTGGGGATTATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTAATTTGTCAGGTTGTCAGGAG
*****

CRCV  TATATGACACACTTTGATTTTAAAGCAGCTGTTTTCGAAATACAAAGTATATGAT
BCV   TATATGACACACTTTGATTTTAAAGCAGCTGTTTTCGAAATACAAAGTATATGAT
OC43  TATATGACACACTTTGATTTTAAAGCAGCTGTTTTCGAAATACAAAGTATATGAT
HECV  TATATGACACACTTTGATTTTAAAGCAGCTGTTTTCGAAATACAAAGTATATGAT
HEV   TATATGACACACTTTGATTTTAAAGCAGCTGTTTTCGAAATACAAAGTATATGAT
*****

CRCV  GATAGTCATATATTTTAAATGACACACTGTTTAAATGCTCAATTCCTACTGAA
BCV   GATAGTCATATATTTTAAATGACACACTGTTTAAATGCTCAATTCCTACTGAA
OC43  GATAGTCATATATTTTAAATGACACACTGTTTAAATGCTCAATTCCTACTGAA
HECV  GATAGTCATATATTTTAAATGACACACTGTTTAAATGCTCAATTCCTACTGAA
HEV   GATAGTCATATATTTTAAATGACACACTGTTTAAATGCTCAATTCCTACTGAA
*****

CRCV  ACCATTACACCTGTTTGAATTTAAATGCTCAATTTACTTTTACCCCTGCGTAATAT
BCV   ACCATTACACCTGTTTGAATTTAAATGCTCAATTTACTTTTACCCCTGCGTAATAT
OC43  ACCATTACACCTGTTTGAATTTAAATGCTCAATTTACTTTTACCCCTGCGTAATAT
HECV  ACCATTACACCTGTTTGAATTTAAATGCTCAATTTACTTTTACCCCTGCGTAATAT
HEV   ACCATTACACCTGTTTGAATTTAAATGCTCAATTTACTTTTACCCCTGCGTAATAT
*****

CRCV  TTAGCCATTTCAATGACCTATTGTTAACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAATAG
BCV   TTAGCCATTTCAATGACCTATTGTTAACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAATAG
OC43  TTAGCCATTTCAATGACCTATTGTTAACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAATAG
HECV  TTAGCCATTTCAATGACCTATTGTTAACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAATAG
HEV   TTAGCCATTTCAATGACCTATTGTTAACTGTTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAATAG
*****

```

FIGURE 13

```

TATCGCAGCC TTAGCTTTGT TAAATGACCA TACGTTTATA AAGGCTCGC ACAAATCTACA 60
GCTCTTTGTA AATCGCTAG TTAGCTTCT AATACCCCTG CATATATAGC TCCTGAGCT 120
AATTTGGGG AATATATTA TAAAGTTGAA CCGTATTCT ATTGTCAGG TTCTGACGAG 180
TATATGCTAC CACTTTCTAT TTTTACCGC AAGTTTTCT CGAATACAA GTATATAGAT 240
GATAGTCAAT AATATTTAA TAAAGACACT GGTGTTATT ATGGTTCAA TTCTACTGAA 300
ACCATTACA CTGATTTGAA TTTTAAATCT CATATTTAC TTTTACCCCT TGGERTAT 360
TTAGCCATTT CAATGAGCT AATGTTACT GTCTCPGCA AAGCAATCGC TCTTATAAG 420
CSTAGGATT TTAGCTCTT ACAGTTGTT GACTGCGCT GGAACAATG CAGCAGCT 480
GATAACATGA CCGCGG

```

【 図 1 4 】

FIGURE 14

```

YRSLTFVNVF YVYNSAQST ALCKSGSLV NNFAYIAREA NFGDYKYKVE ADFYLSGDE 60
YIVPLCIFNG KFLSNTRYD DSQYFNKDT GVIYGNSTE TINTGFENH HYLLPSGNY 120
LAISNELLIT VPKAICLNK RKDFTFVQV DSRWNNARQS DNMTA 165

```

```

CRCV  CGTAAGGATTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGCAGTCT
BCV   CGTAAGGATTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGCAGTCT
OC43  CGTAAGGATTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGCAGTCT
HECV  CGTAAGGATTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGCAGTCT
HEV   CGTAAGGATTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGGTGGAACAATGCCAGCAGTCT
*****

```

```

CRCV  GATAACATGACGGCGGT
BCV   GATAACATGACGGCGGT
OC43  GATAACATGACGGCGGT
HECV  GATAACATGACGGCGGT
HEV   GATAACATGACGGCGGT
*****

```

【 図 1 6 】

FIGURE 16

```

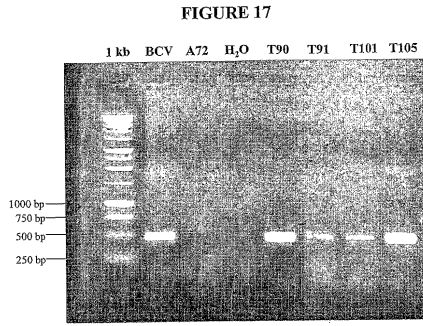
CRCV  YRSLTFVNVFVYNSAQSTALCKSGSLV LNNFAYIAREANFGDYKYKVEADFYLSGDE
BCV   YRSLTFVNVFVYNSAQSTALCKSGSLV LNNFAYIAREANFGDYKYKVEADFYLSGDE
OC43  YRSLTFVNVFVYNSAQSTALCKSGSLV LNNFAYIAREANFGDYKYKVEADFYLSGDE
HECV  YRSLTFVNVFVYNSAQSTALCKSGSLV LNNFAYIAREANFGDYKYKVEADFYLSGDE
HEV   YRSLTFVNVFVYNSAQSTALCKSGSLV LNNFAYIAREANFGDYKYKVEADFYLSGDE
*****

CRCV  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDSDQYFNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLVLPSGNY
BCV   YIVPLCIFNGKFLSNTRYDSDQYFNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLVLPSGNY
OC43  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDSDQYFNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLVLPSGNY
HECV  YIVPLCIFNGKFLSNTRYDSDQYFNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLVLPSGNY
HEV   YIVPLCIFNGKFLSNTRYDSDQYFNKDTGVIYGNSTETITGDFNCHYLVLPSGNY
*****

CRCV  LAISNELLITVPKAICLNKRDFTFVQVDSRWNNARQSDNMTA
BCV   LAISNELLITVPKAICLNKRDFTFVQVDSRWNNARQSDNMTA
OC43  LAISNELLITVPKAICLNKRDFTFVQVDSRWNNARQSDNMTA
HECV  LAISNELLITVPKAICLNKRDFTFVQVDSRWNNARQSDNMTA
HEV   LAISNELLITVPKAICLNKRDFTFVQVDSRWNNARQSDNMTA
*****

```

【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

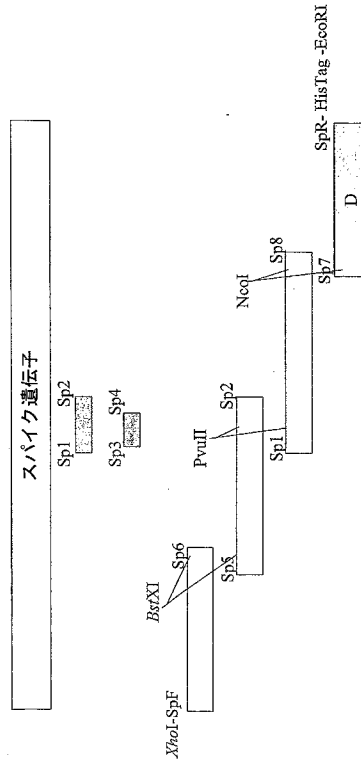


図 1 8

【 配 列 表 】

[2005533513000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/JP 03/02832
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/50 C07K14/165 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEPHENSEN, C.B., CASEBOLT, D.B., GANGOPADHYAY, N.N., : "Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 60, no. 2, April 1999 (1999-04), pages 181-189, XP002242737 ISSN: 0168-1702 cited in the application the whole document ----- -/--	1-10, 24, 30, 31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  20 October 2003	Date of mailing of the international search report  27/10/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Chambonnet, F.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/GB	03/02832

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"STUDIES OF RESPIRATORY DISEASE IN RANDOM SOURCE LABORATORY DOGS VIRAL INFECTIONS IN UNCONDITIONED DOGS" BINN L N---; ALFORD J P; MARCHWICKI R H; KEEFE T J; BEATTIE R J; WALL H G, vol. 29, no. 1, 1979, pages 48-52, XP0008023128 cited in the application the whole document	
A	WO 93 23423 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP ; JONES ELAINE V (US); KLEPFER SHARON (US); MI) 25 November 1993 (1993-11-25) the whole document	1-87
X	US 5 672 350 A (BABIUK LORNE A ET AL) 30 September 1997 (1997-09-30) the whole document	47-54
A	WO 99 25838 A (CONTRERAS ANAPATRICIA ; BROWN THOMAS P (US); UNIV GEORGIA (US); VILLEG) 27 May 1999 (1999-05-27) claims 8-12	1
A	US 6 057 436 A (KLEPFER SHARON ET AL) 2 May 2000 (2000-05-02) the whole document	1
A	EP 0 510 773 A (AKZO NV) 28 October 1992 (1992-10-28) the whole document	1
X	US 5 916 570 A (KAPIL SANJAY) 29 June 1999 (1999-06-29) the whole document	47-54
A	HASOKSUZ M ET AL: "ANTIGENIC VARIATION AMONG BOVINE ENTERIC CORONAVIRUSES (BECV) AND BOVINE RESPIRATORY CORONAVIRUSES (BRCV) DETECTED USING MONOCLONAL ANTIBODIES" ARCHIVES OF VIROLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 144, no. 12, 1999, pages 2441-2447, XP001005398 ISSN: 0304-8608 the whole document	18-46
P,X	ERLES KERSTIN ET AL: "Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease." VIROLOGY, vol. 310, no. 2, 5 June 2003 (2003-06-05), pages 216-223, XP002257085 ISSN: 0042-6822 the whole document	1-7

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel  
national application No.  
PCT/GB 03/02832**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 03 02832

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

Continuation of Box I.1

Although claims 66 to 69 and 79 to 82 are directed to a method of treatment of the animal body, the search could be carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 24 to 36, claims 67 to 69 and 87 are directed to a diagnostic method comprising steps practised on the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

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 Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No  
PCT/GB 03/02832

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9323423	A	25-11-1993	AT 225805 T	15-10-2002
			AU 670092 B2	04-07-1996
			AU 4251593 A	13-12-1993
			CA 2135200 A1	25-11-1993
			DE 69332375 D1	14-11-2002
			DE 69332375 T2	13-02-2003
			DK 640098 T3	28-10-2002
			EP 0640098 A1	01-03-1995
			ES 2182827 T3	16-03-2003
			JP 3245169 B2	07-01-2002
			JP 7508421 T	21-09-1995
			PT 640098 T	31-01-2003
			WO 9323423 A1	25-11-1993
			US 6057436 A	02-05-2000
			US 6372224 B1	16-04-2002
US 2002127245 A1	12-09-2002			
US 5672350	A	30-09-1997	CA 2065365 A1	23-02-1991
			WO 9102752 A1	07-03-1991
			DE 69013512 D1	24-11-1994
			DE 69013512 T2	23-02-1995
			EP 0489033 A1	10-06-1992
			US 5369026 A	29-11-1994
WO 9925838	A	27-05-1999	AU 1408499 A	07-06-1999
			WO 9925838 A1	27-05-1999
US 6057436	A	02-05-2000	US 2002127245 A1	12-09-2002
			AT 225805 T	15-10-2002
			AU 670092 B2	04-07-1996
			AU 4251593 A	13-12-1993
			CA 2135200 A1	25-11-1993
			DE 69332375 D1	14-11-2002
			DE 69332375 T2	13-02-2003
			DK 640098 T3	28-10-2002
			EP 0640098 A1	01-03-1995
			ES 2182827 T3	16-03-2003
			JP 3245169 B2	07-01-2002
			JP 7508421 T	21-09-1995
			PT 640098 T	31-01-2003
			WO 9323423 A1	25-11-1993
			US 6372224 B1	16-04-2002
			AU 666298 B2	08-02-1996
			AU 9128691 A	11-06-1992
			CA 2096010 A1	17-05-1992
			EP 0557455 A1	01-09-1993
			IE 913948 A1	20-05-1992
			JP 6502768 T	31-03-1994
			JP 2003093078 A	02-04-2003
			KR 204258 B1	15-06-1999
NZ 240558 A	25-11-1994			
WO 9208487 A1	29-05-1992			
US 6280974 B1	28-08-2001			
US 2002115064 A1	22-08-2002			
ZA 9108988 A	30-12-1992			
EP 0510773	A	28-10-1992	AU 645417 B2	13-01-1994
			AU 1513192 A	29-10-1992

Form PCT/GBA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interns Application No  
PCT/GB 03/02832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0510773 A		CA 2066940 A1	26-10-1992
		EP 0510773 A1	28-10-1992
		JP 3420258 B2	23-06-2003
		JP 5260976 A	12-10-1993
		NZ 242471 A	26-05-1993
		US 5661006 A	26-08-1997
US 5916570 A	29-06-1999	AU 705186 B2	20-05-1999
		AU 6383296 A	09-01-1997
		CA 2224309 A1	27-12-1996
		EP 0833903 A1	08-04-1998
		WO 9641874 A1	27-12-1996

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 1/22	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 K 14/165	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 16/10	C 0 7 K 14/165	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/12	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 9/16	C 1 2 N 9/16	Z
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## WINDOWS

(72)発明者 チョーカー, ヴィクトリア, ジェーン

イギリス, ハーツ エーエル9 7ティーエー, ハートフィールド, ノース ミムス, ホークスヘッド レーン, ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ

(72)発明者 エルレス, ケルスティン

イギリス, ハーツ エーエル9 7ティーエー, ハートフィールド, ノース ミムス, ホークスヘッド レーン, ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA14 BA10 BA11 BA32 BA51 CA04 CA05 CA06  
CA09 CA11 DA02 EA02 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18  
GA19 GA23 GA27 HA03 HA08 HA09 HA12 HA14  
4B050 CC01 CC03 DD01 LL01 LL03  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ10 QQ22 QQ42 QQ52 QQ79 QR02  
QR32 QR35 QR42 QR48 QR55 QR57 QR66 QR82 QS10 QS12

	QS16	QS25	QS34	QS36	QX02	QX07				
4B064	AG27	AG32	CA10	CA19	CA20	CC24	CE12	DA04	DA13	DA15
4B065	AA26X	AA90X	AA95Y	AB01	AC14	BA02	BA24	CA24	CA29	CA31
	CA45	CA46								
4C085	AA03	AA04	BA57	BA71	BA77	BA78	BB11	CC08	EE01	EE03
	EE06									
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA53	CA01	DA50	DA76	DA86
	DA89	EA31	EA50	EA53	EA61	FA72	FA74	GA26		

专利名称(译)	犬呼吸道冠状病毒 (CRCV) , 聚合酶和血凝素/酯酶的刺突蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005533513A</a>	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2004523905	申请日	2003-07-01
申请(专利权)人(译)	英国皇家学院Veterineri		
[标]发明人	ブラウンリージョン チョーカーヴィクトリアジェーン エルレスケルスティン		
发明人	ブラウンリー, ジョン チョーカー, ヴィクトリア, ジェーン エルレス, ケルスティン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/155 A61K39/215 A61K39/235 A61K39/245 A61P11/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/20 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/22 C07K14/165 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N9/16 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/50 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/28 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/525 A61P11/00 C07K14/005 C12N2710/14143 C12N2770/20022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/155 A61K39/215 A61K39/235 A61K39/245 A61P11/00 A61P31/12 A61P31/12.171 A61P31/14 A61P31/20 A61P37/04 A61P43/00.121 C07K1/22 C07K14/165 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12N9/16.Z C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/28 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.D G01N33/569.L C12N15/00.C C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA14 4B024/BA10 4B024/BA11 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/GA23 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA04 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA29 4B065/CA31 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA57 4C085/BA71 4C085/BA77 4C085/BA78 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA01 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA53 4H045/EA61 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2002017434 2002-07-27 GB		
其他公开文献	JP4644486B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种犬呼吸道冠状病毒 (CRCV) 存在于犬传染性呼吸道疾病呼吸道的呼吸道中, 与犬肠道冠状病毒的同源性较低, 但不是所有的牛冠状病毒株 (例如魁北克和LY 138) 和与人类冠状病毒OC43菌株高度同源的那些。CRCV峰值, 聚合酶和血凝素/酯酶cDNA和蛋白质的部分序列示于图1至4,13和14中。

gaa ttgaaatat gctattagt ccaagaatag agccgcact gctgctggtg 60  
act tagtactctg octggcagaa tgttccatca aaaatgcttg aaaagtatag 120  
acg tgggttctt gttgttarag gcaaccctaa attttatggc ggcctgggatg 180  
acg tgccttatt aaagtgtg acctccctgt octtatgggt tgggattatc 240  
tga 250