

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4644486号  
(P4644486)

(45) 発行日 平成23年3月2日(2011.3.2)

(24) 登録日 平成22年12月10日(2010.12.10)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	14/165	(2006.01)	C O 7 K	14/165
C O 7 K	16/10	(2006.01)	C O 7 K	16/10
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 53 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-523905 (P2004-523905)  
 (86) (22) 出願日 平成15年7月1日(2003.7.1)  
 (65) 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)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/002832  
 (87) 国際公開番号 W02004/011651  
 (87) 国際公開日 平成16年2月5日(2004.2.5)  
 審査請求日 平成18年5月10日(2006.5.10)  
 (31) 優先権主張番号 0217434.0  
 (32) 優先日 平成14年7月27日(2002.7.27)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

微生物の受託番号 NC1MB 41146

(73) 特許権者 505033743  
 ザ ロイヤル ヴェテリネリ カレッジ  
 イギリス, ロンドン エヌダブリュ1  
 Oティーユー, ロイヤル カレッジ ス  
 トリート, ユニヴァーシティ オブ ロ  
 ンドン  
 (74) 復代理人 100127052  
 弁理士 福岡 睦  
 (74) 代理人 100090033  
 弁理士 荒船 博司  
 (74) 代理人 100093045  
 弁理士 荒船 良男

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原性若しくは免疫原性のあるコロナウイルススパイク(S)タンパクであって、配列番号4に示されるアミノ酸配列のイヌ呼吸器コロナウイルス(CRCV)のSタンパクと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するコロナウイルスSタンパク、又は、少なくとも200個の長さのアミノ酸である、前記コロナウイルスSタンパクの抗原性若しくは免疫原性のある断片であって、前記コロナウイルスSタンパク又は前記断片は表1に示すCRCV特異的アミノ酸の少なくとも4を有する、コロナウイルスSタンパク又はその断片。

【請求項2】

配列番号4に示すアミノ酸配列を有するコロナウイルスSタンパク、又は前記コロナウイルスSタンパクの抗原性若しくは免疫原性のある変体であって配列番号4に示す配列と少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を持つ変体。

【請求項3】

配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有する、請求項1又は2に記載のコロナウイルスのSタンパク。

【請求項4】

配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも99%の同一性を有する、請求項1又は2に記載のコロナウイルスのSタンパク。

【請求項5】

10

20

請求項 1 から 4 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、又は該ポリヌクレオチドの相補物。

【請求項 6】

配列番号 3 に示す核酸配列を有する、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチドを有するベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを有する宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 7 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 8 に記載の宿主細胞を培養する工程と、前記宿主細胞で前記タンパクを発現させる工程と、前記タンパクを精製する工程と、を有する方法。

10

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法によって得ることができるタンパク。

【請求項 11】

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 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 5 又は 6 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 11 の宿主細胞を培養する工程と、前記宿主細胞において前記タンパクを発現させる工程と、前記タンパクを精製する工程と、を有する方法。

20

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法によって得ることができるグリコシル化 S タンパク。

【請求項 14】

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 又は 2 に記載の S タンパクに対する免疫応答を起こさせて、前記動物又は前記動物由来の不死細胞から抗体を調製する工程、又は ( i i ) 請求項 1 ~ 4 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工程を有する方法。

30

【請求項 15】

前記抗体のアフィニティーがウシコロナウィルス ( B C V ) の S タンパクに対してよりも 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工程をさらに有する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

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工程と、

( b ) 前記試料中の C R C V 又は抗 C R C V 抗体を特定する工程と、

を有し、

前記 C R C V を特定する工程は、請求項 5 又は 6 に記載のポリヌクレオチドを特定する工程、又は請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のコロナウィルス S タンパクを特定する工程を含み、

40

前記抗 C R C V 抗体を特定する工程は、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のコロナウィルス S タンパクに選択的に結合する抗体を特定する工程を含む方法。

【請求項 17】

前記抗 C R C V 抗体は、C R C V、B C V 又はヒトコロナウィルス ( H C V ) の抗原を用いて検出される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

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又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 16 に記載の方法。

50

## 【請求項 19】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のコロナウイルス S タンパクを特定する工程は C R C V と反応する抗体を用いる工程を有する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記 C R C V に反応する抗体は、抗 B C V 抗体、抗 H C V 抗体、又は請求項 15 に記載の方法によって調製された抗 C R C V 抗体である、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

抗 C R C V の S タンパク抗体を検出するための免疫吸着検定デバイスであって、  
請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク又は抗原性 S タンパク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 C R C V の S タンパク抗体は前記 S タンパク又は前記 S タンパク断片に結合可能である固相と、  
前記固相に結合した前記抗 C R C V の S タンパク抗体と結合可能であって、抗イヌ抗体を含む、検出可能な標識複合体と、を含むデバイス。

10

## 【請求項 22】

前記固相はマイクロタイターウェルである、請求項 21 に記載の免疫吸着検定デバイス。

## 【請求項 23】

前記複合体は酵素を有する、請求項 21 又は 22 に記載の免疫吸着検定デバイス。

## 【請求項 24】

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 23 に記載の免疫吸着検定デバイス。

20

## 【請求項 25】

前記酵素の基質をさらに有する、請求項 23 又は 24 に記載の免疫吸着検定デバイス。

## 【請求項 26】

請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク又は抗原性 S タンパク断片を付着させた、液体試料から抗 C R C V の S タンパク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 タンパク抗体は前記 S タンパクに結合する、固体基質。

## 【請求項 27】

前記固体基質はマイクロタイターウェルである、請求項 26 に記載の固体基質。

30

## 【請求項 28】

イヌに免疫するためのワクチン構成物であって、  
配列番号 4 のアミノ酸配列の C R C V の S タンパクと少なくとも 97% のアミノ酸配列同一性を有する免疫原性のある S タンパクを持つコロナウイルス、又は、  
配列番号 4 のアミノ酸配列の C R C V の S タンパクと少なくとも 97% のアミノ酸配列同一性を有する免疫原性のあるコロナウイルス S タンパク、又は少なくとも 200 個の長さのアミノ酸配列を有し、表 1 に示す C R C V 特異的アミノ酸の少なくとも 4 を有する、前記コロナウイルス S タンパクの免疫原性のある断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは前記断片をコードする核酸を有する、ワクチン構成物。

## 【請求項 29】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 98% の同一性を有する、請求項 28 に記載のワクチン構成物。

40

## 【請求項 30】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 99% の同一性を有する、請求項 29 に記載のワクチン構成物。

## 【請求項 31】

請求項 28 に記載のワクチン構成物であって、請求項 1、2、10 及び 13 のいずれかに記載の S タンパク、又は少なくとも 200 個の長さのアミノ酸配列を有し、表 1 に示す C R C V 特異的アミノ酸の少なくとも 4 を有する、前記 S タンパクの免疫原性のある断片を有する、ワクチン構成物。

50

## 【請求項 3 2】

請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のワクチン構成物であって、前記コロナウイルス S タンパクは単離されたタンパク又は組み換えタンパクである、ワクチン構成物。

## 【請求項 3 3】

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 2 8 から 3 2 のいずれかに記載のワクチン構成物。

## 【請求項 3 4】

請求項 2 8 から 3 3 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、

( 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 3 5】

イヌにおける C R C V 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使用であって、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の S タンパクを持つコロナウイルスの使用、又は請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の免疫原性のあるコロナウイルス S タンパクもしくは S タンパク断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは前記断片をコードする核酸の使用。

## 【請求項 3 6】

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、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の S タンパクを持つコロナウイルスの使用、又は請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の免疫原性のあるコロナウイルス S タンパクもしくは S タンパク断片、又は前記コロナウイルス S タンパクもしくは前記断片をコードする核酸の使用。

## 【請求項 3 7】

前記コロナウイルス S タンパクは、C R C V の S タンパクである、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

## 【請求項 3 8】

前記コロナウイルス S タンパクは、配列番号 4 に示すアミノ酸配列の前記 C R C V タンパクと少なくとも 9 5 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

## 【請求項 3 9】

前記 S タンパクは請求項 9 又は 1 2 の方法によって調製された、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

## 【請求項 4 0】

前記コロナウイルスは不活化又は弱毒化されている、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の使用。

## 【請求項 4 1】

医薬としての使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のコロナウイルス S タンパク。

## 【請求項 4 2】

単離されたタンパク又は組み換えタンパクである、請求項 4 1 に記載の使用のためのコロナウイルス S タンパク。

## 【請求項 4 3】

イヌの間での C R C V の蔓延と闘う方法であって、イヌが C R C V に感染しているかどうかを請求項 1 6 から 2 0 のいずれかに記載の方法によって判別する工程と、前記イヌが

10

20

30

40

50

CRCVに感染しているのであれば前記イヌを隔離する工程と、を有する方法。

【請求項44】

イヌの間でのCRCVの蔓延と闘う方法であって、イヌがCRCVに感染しているかどうかを請求項16から20のいずれかに記載の方法によって判別する工程と、前記イヌがCRCV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、又は接しているかもしれない他のイヌに予防接種する工程と、を有する方法。

【請求項45】

挿入部分がCRCVのSのcDNAの一部を含むプラスミドを含有するSpike D 1 CRCV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NCIMBに寄託されたアクセス番号NCIMB41146の大腸菌。

10

【請求項46】

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NCIMBに寄託されたアクセス番号NCIMB41146であるSpike D 1 CRCV系統の大腸菌に含まれるプラスミド。

【請求項47】

請求項21から25のいずれかに記載の免疫吸着検定デバイス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請求項1、2、10及び13のいずれかに記載のコロナウイルスSタンパクと、抗イヌ抗体を有する検出可能な標識複合体と、を有するキット。

【請求項48】

前記固相はマイクロタイタープレートを有する、請求項47に記載のキット。

20

【請求項49】

前記検出可能な標識複合体は酵素をさらに有する、請求項47又は48に記載のキット。

【請求項50】

前記酵素に対する基質をさらに有する請求項49に記載のキット。

【請求項51】

抗CRCVのS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47から50のいずれかに記載のキット。

【請求項52】

イヌをCRCVに対して受動的に免疫する薬剤の調製における、請求項14又は15に記載の方法によって調製された抗体の使用。

30

【請求項53】

CIRDの診断方法であって、請求項16から20のいずれかに規定される方法によってイヌがCRCVに曝されたかどうかを判別する工程を有する方法。

【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。

40

【背景技術】

【0002】

イヌ感染性呼吸器疾患(CIRD)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】

CIRD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、CIRD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(CPIV)(Binn et al., 1967)、イヌアデノウイルス2型(CAV-2

50

) (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、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

50

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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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。

【 0 0 1 4 】

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。

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

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%の同一性しかもたない。

【 0 0 1 8 】

10

20

30

40

50

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%の同一性しかもたない(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に対する配列同一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同一性%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。

【0021】

CRCVと腸性CCVのスパイク配列の同一性%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%の配列同一性、BCVのLY138系統のpol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124985)と98.4%の同一性、及びHCV OC43のpol遺伝子(Genbankアクセス番号AF124989)と98.4%の配列同一性を持っていた。

【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。

【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%の配列同一性を持っていた。CRCVは、ヒト腸性コロナウイルス(HCEV)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 OC43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)の配列同一性をそれぞれ持っていた。

【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、HCEV、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、HCEV、HCV OC43及びHEV HE遺伝子の2

10

20

30

40

50

35、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 (Phe)、T (Thr) に対しN (Asn)、及びV (Val) に対しL (Leu) であった。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%の配列同一性を持っていた。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) の配列同一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： BCoV、HCoV及びHEVのSタンパクには存在しない、CRCoV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に示すアミノ酸配列のCRCoVのSタンパクと少なくとも75%の配列同一性を有し、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、19

50

2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CRCV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。

【0031】

当然ながら、CRCVのSタンパクの部分ヌクレオチド配列は、D-1CRCV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ケ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としてブダベスト条約に基づき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CRCV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CRCVのSタンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも75%の配列同一性を有し、少なくとも表1に列挙する位置のCRCV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。

【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、CRCV構成部分として存在する改変されていないCRCVタンパクを含まない。

【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、CRCVのSタンパク (SEQ ID No. 4) と少なくとも76%のアミノ酸配列同一性を有し、またはCRCV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%のアミノ酸配列同一性を有し、表1に列挙する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。

【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、CRCV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%のアミノ酸配列同一性を有し、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

10

20

30

40

50

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。

【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%の同一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%のアミノ酸配列同一性を有する。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%のアミノ酸配列同一性を有する。

【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。

【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%のアミノ酸配列同一性を有し、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。

【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%のアミノ酸配列同一性を有し、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】

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%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも77%、少な

10

20

30

40

50

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%のアミノ酸配列同一性を有し、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%のアミノ酸配列同一性を有し、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、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。

【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%のアミノ酸配列同一性を有し、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。

【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%のアミノ酸配列同一性、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%のアミノ酸配列同一性を有し、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。

【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9475番に相当するアミノ酸がCRCVのpolタンパクに近づく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、LY138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%のアミノ酸配列同一性を有し、235番のF、242番のN、及び253番のLの

10

20

30

40

50

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%のアミノ酸配列同一性、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%のアミノ酸配列同一性を有し、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%のアミノ酸配列同一性、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%のアミノ酸配列同一性を有し、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%のアミノ酸配列同一性、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%、

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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【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CRCVのpolのアミノ酸配列またはBCVゲノムの4975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、polタンパクまたはその断片である。

50

## 【 0 0 6 2 】

“ C R C V の H E タンパク ” とは、図 1 4 ( 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。

## 【 0 0 6 3 】

“ 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 同一性 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。

10

## 【 0 0 6 4 】

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 同一性 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 同一性 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 同一性 を有する。

20

## 【 0 0 6 5 】

“ 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 同一性 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。

## 【 0 0 6 6 】

“ 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 同一性 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。

30

## 【 0 0 6 7 】

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。

40

## 【 0 0 6 8 】

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。

## 【 0 0 6 9 】

C R C V タンパクは C R C V 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

50

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、C R C V様タンパクだけでなくC R C V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】

C R C VまたはC R C V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isotinテスト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)、ノッティンガム 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C R C VまたはC R C V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C R C V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】

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(SEQ ID No. 3)に記載の配列を有するあるいはのみからなる。

10

20

30

40

50

## 【0074】

当然ながら、図3 (SEQ ID No. 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Ile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CRCV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CRCV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 (SEQ ID No. 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CRCV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CRCVのSのポリヌクレオチドも包含する。

10

## 【0076】

好ましくは、polタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図1 (SEQ ID No. 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BCV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 (SEQ ID No. 1) に示す配列の断片を有するCRCV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、HEタンパクをコードする前記ポリヌクレオチドは図13 (SEQ ID No. 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。

20

## 【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 (SEQ ID No. 21) に示す配列の断片を有するCRCVのHE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BCVのHEタンパク (Genbankアクセス番号AF058942) において、LY138系統のBCVのHE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CRCVまたはCRCV様ポリヌクレオチドとする。

30

## 【0081】

“CRCV様ポリヌクレオチド” とは、図1、3及び13 (SEQ ID No. 1、3及び21) に列挙するような天然のCRCV cDNA配列のすべてまたはその断片を有さないが、上記のCRCVもしくはCRCV様のSpolまたはHE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】

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

## 【0083】

CRCVなどのプラス鎖RNAウイルスからcDNA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。

40

## 【0084】

本発明のCRCVまたはCRCV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

50

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 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ または $^{35}\text{S}$ 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、酵素など的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】

[ $^{32}\text{P}$ ]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】

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。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 3 】

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。

## 【 0 0 9 4 】

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。

## 【 0 0 9 5 】

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。

## 【 0 0 9 6 】

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。

## 【 0 0 9 7 】

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。

## 【 0 0 9 8 】

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。

## 【 0 0 9 9 】

プローブは例えば $^3\text{H}$  P、 $^{32}\text{P}$  P及び $^{35}\text{S}$  Sなどの放射活性ヌクレオチドにより標識し

10

20

30

40

50

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)。

#### 【0100】

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。

10

#### 【0101】

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。

#### 【0102】

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。

#### 【0103】

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。

20

#### 【0104】

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。

30

#### 【0105】

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。

#### 【0106】

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、他の好適なプロモー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(Hastin

40

50

gs 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dA(またはポリdC)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dT(またはポリdG)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T4DNA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T4DNA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、CA92307、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CRL1658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

10

20

30

40

50

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ボソーム製剤などが、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 x 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. 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。

50

## 【 0 1 2 2 】

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。

## 【 0 1 2 3 】

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。

10

## 【 0 1 2 4 】

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。

## 【 0 1 2 5 】

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。

20

## 【 0 1 2 6 】

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トティングまたはELISAにより確認することができる。

30

## 【 0 1 2 7 】

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。

## 【 0 1 2 8 】

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。

40

## 【 0 1 2 9 】

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。

50

## 【 0 1 3 0 】

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。

## 【 0 1 3 1 】

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C R C VのSタンパクに対するアフィニティーがH C V及びH E V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

## 【 0 1 3 2 】

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、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高い抗C R C V抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のC R C VのSタンパクに対するアフィニティーは、さらにH C V及びH E VのSタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

## 【 0 1 3 3 】

また本発明は抗C R C V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C R C VまたはC R C V様のH E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C R C VまたはC R C V様H E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

## 【 0 1 3 4 】

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C R C VのH Eタンパクに対するアフィニティーがH C V及びH E VのH E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

## 【 0 1 3 5 】

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、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高い抗C R C V抗体を包含する。好ましくは、前記抗体のC R C VのH Eタンパクに対するアフィニティーは、さらにH C V及びH E VのH Eタンパクに対するアフィニティーよりも高い。

## 【 0 1 3 6 】

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C R C V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。

## 【 0 1 3 7 】

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C D R領域をイヌ抗体の骨格に挿入して作られる。

40

## 【 0 1 3 8 】

また本発明は、抗C R C V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)。

50

## 【 0 1 3 9 】

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。

## 【 0 1 4 0 】

これらの分子にはF a b様の分子(Better et al(1988)Science240、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

## 【 0 1 4 1 】

“ 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。

## 【 0 1 4 2 】

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

20

## 【 0 1 4 3 】

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。

## 【 0 1 4 4 】

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

## 【 0 1 4 5 】

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。

## 【 0 1 4 6 】

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。

## 【 0 1 4 7 】

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

## 【 0 1 4 8 】

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S E Q I D N o . 4 ) と少なくとも75%の同一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%の同一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%の同一性をもつ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%の同一性を持つ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。

50

## 【 0 1 4 9 】

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%の同一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%の同一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。

## 【 0 1 5 0 】

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

## 【 0 1 5 1 】

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%の同一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%の同一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。

## 【 0 1 5 2 】

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

## 【 0 1 5 3 】

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。

## 【 0 1 5 4 】

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%の同一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%の同一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%の同一性を持つ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%の同一性を持つ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

## 【 0 1 5 5 】

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%の同一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%の同一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

## 【 0 1 5 6 】

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。

## 【 0 1 5 7 】

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%の同一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、CRCVのHEタンパク(図13)の部分アミノ酸配列と少なくとも91%、少なくとも9

50

2%、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%の同一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。

【0158】

さらにより好ましくは、試料における抗CRCV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CRCVまたはCRCV様の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。

【0159】

最も好ましくは、試料における抗CRCV抗体を特定することが、図14(SEQ ID No. 22)に示す部分アミノ酸配列のCRCV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。

10

【0160】

本発明は、イヌから得た試料においてCRCV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CRCVを特定することを、有する。

【0161】

当然ながら、異なるCRCV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ってよい。従って本発明は、CRCV単離物であり、そのS、pol、及びHEの遺伝子及びタンパクの配列が図1から4、13及び14に示す配列からある程度変化したCRCV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CRCVの変体単離物の検出には、図1から4、13及び14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。

20

【0162】

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。

【0163】

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

【0164】

これは、典型的には、例えば実施例1に記載されるようにRNAを試料から抽出してcDNA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、及び核酸のシーケンスを使った、当業者によく知られる方法(Sambrook et al (2001) supra)を用いてCRCVの核酸構成物をcDNAにおいて特定する。

30

【0165】

好ましくは、CRCVを特定することが、LY138系統のゲノム(Genbankアクセス番号AF058942)やその一部分などのBCV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。

【0166】

また好ましくは、CRCVの特定は、CRCVのS、polまたはHEポリヌクレオチド(図1、3及び13)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。

40

【0167】

“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同一性などや、温度、イオン強度、配列のCGまたはAT含有量などの要素によって決まる。

【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

50

cDNAの少なくとも一部分において > 90%の配列同一性、このましくは > 95%、> 96%、> 97%、> 98%、より好ましくは > 99%の配列同一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 × 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 × SSCで一度洗浄しても良い。

【0172】

20 × 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。

【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

10

20

30

40

50

C R C V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、C R C V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C R C V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、C R C Vを特定することが、C R C V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、C R C V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C R C Vタンパクを特定することを有する。

10

【0181】

最も好ましくは、C R C V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C R C Vタンパクを特定すること有する。

【0182】

生物試料におけるC R C V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C R C V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、C R C Vのタンパク構成物を特定することは、C R C Vに反応する抗体を用いることを有する。

20

【0184】

より好ましくは、C R C V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B C V抗体、抗H C V抗体、抗H E V抗体、または抗C R C V抗体である。

【0185】

例えば、C R C V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、C R C V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C R C Vタンパクを基準として用いることでC R C V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。

30

【0186】

その他のC R C V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（E L I S A）及び放射免疫検定法（R I A）などの免疫学的検定法が挙げられる。例えば、C R C Vに反応するモノクローナル抗体は、免疫吸着剤、及びC R C V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C R C V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E L I S A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E L I S A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C R C V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ーブとして用いられる。

40

【0187】

50

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、C R C V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。

【 0 1 8 8 】

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>112</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。

【 0 1 8 9 】

第7の側面としての本発明は、抗C R C VのSまたはH E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C R C VもしくはC R C V様のSもしくはH Eタンパク、またはC R C VもしくはC R C V様のS及びH E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C R C VのSまたはH E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C R C V抗体に結合する。

【 0 1 9 0 】

固相をコーティングするC R C VまたはC R C V様のSタンパクの抗原性の断片が、抗C R C V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C R C V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。

【 0 1 9 1 】

また、固相をコーティングするC R C VまたはC R C V様のH Eタンパクの抗原性の断片が、抗C R C VのH E抗体と結合するのに十分な大きさで、上記で規定されるC R C VのH E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。

【 0 1 9 2 】

好ましくは、固相をコーティングするC R C V、C R C V様のSもしくはH E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、C R C V、C R C V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。C R C V、C R C V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。

【 0 1 9 3 】

好ましくは、固相をコーティングするC R C V、C R C V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、C R C V、C R C V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。C R C V、C R C V様のSもしくはH E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。

【 0 1 9 4 】

好ましくは、固相はマイクロタイターウェルである。

## 【 0 1 9 5 】

また、好ましくは複合体は抗イヌ抗体を有する。

## 【 0 1 9 6 】

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。

## 【 0 1 9 7 】

好適な免疫吸着法及びE L I S A法の詳細は上述のとおりである。

## 【 0 1 9 8 】

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C R C V、C R C V様のSもしくはH Eタンパクまたはその両方、及び固相に結合した抗C R C V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C R C VのSまたは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、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

## 【 0 1 9 9 】

従って本発明には、抗C R C VのSまたはH E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C R C V、C R C V様のSもしくはH E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C R C VのSまたはH E抗体はSまたはH Eタンパクに結合する。

20

## 【 0 2 0 0 】

典型的には、タンパクは抗原の安定性により4 から37 で一晚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I g G、I g Mまたは肺洗液に対しては抗イヌI g A)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O P D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

## 【 0 2 0 1 】

好ましくは、固体基質はマイクロタイターウェルである。

## 【 0 2 0 2 】

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) C R C VのSタンパクと少なくとも75%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%の同一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%の同一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

## 【 0 2 0 3 】

好ましくは、ワクチンはイヌ用として作られ、供される。

## 【 0 2 0 4 】

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、前記タンパクはB C VまたはC R C V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%のアミノ酸同一性を持つ。

50

## 【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-ε-プ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。

## 【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。

20

## 【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っても良い。

## 【0212】

50

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%のアミノ酸同一性を持つ。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%のアミノ酸同一性を持つ。

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。

【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。

20

【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%の同一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%のアミノ酸同一性を持つ。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%のアミノ酸同一性を持つ。

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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ。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%のアミノ酸同一性を持つ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、またはその改変物を有する。

【0221】

50

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"Rotovec Corona" (シェーリングプラウ、<http://www.ukvet.co.uk/rotovec/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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【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CRCV、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CPIV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CAV-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CHV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CPIV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CPIV、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CAV-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CAV-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。CAV-1はCAV-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CAV-2に対して免疫応答を起こす試薬は、CAV-1またはCAV-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CAV-2を含んでおり、使用されるウイルス型を

20

【0235】

イヌにおいてCPIV及びCAV-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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【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(SnyderHI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。

【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

50

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。

【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。

【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。

【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。

【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(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

10

20

30

40

50

染性気管気管支炎（“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作られる。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Intrac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。

【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。

20

【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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%の同一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%の同一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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%のアミノ酸同一性を持つ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%の同一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%の同一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。

40

【0260】

50

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%のアミノ酸同一性を持つ。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%のアミノ酸同一性を持つ。

【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。

【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。

10

【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%のアミノ酸配列同一性を有する。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%、

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%の同一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%のアミノ酸配列同一性を有する。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%のアミノ酸同一性を持つ。

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%のアミノ酸同一性を持つ。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%のアミノ酸同一性を持つ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%、または少なくとも95%のアミノ酸同一性を持つ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

50

くとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のアミノ酸同一性を持つ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。

【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。

30

【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か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。

50

## 【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。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 8 9 】

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。

## 【 0 2 9 0 】

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。

## 【 0 2 9 1 】

R N A の抽出と R T - P C R

R N A 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 - 50 mg 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 R N A を抽出した。

## 【 0 2 9 2 】

c D N A 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。

## 【 0 2 9 3 】

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 2 B p 及び 4 B m 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))。

## 【 0 2 9 4 】

P C R は、終濃度が 2.5 mM の M g C l<sub>2</sub> と 0.5 μ M のプライマーを含む所定の反応バッファー中で T a q 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 P C R 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。

## 【 0 2 9 5 】

P C R 産品の 20 μ l 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 P C R 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 - d U T P 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 C S P D 化学蛍光基質 (ロシュ) を用いて検出した。

## 【 0 2 9 6 】

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 L Y - 138 系統 (A F058942) 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。

## 【 0 2 9 7 】

P C R 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 2 μ l の最初の増幅産物を用いてネステッド P C R を行った。

## 【 0 2 9 8 】

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)

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

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

10

20

30

40

50

## 【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。

10

## 【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)。

20

## 【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。

30

## 【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。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

40

50

出するための R T - P C R を行う。

【 0 3 0 7 】

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 . 0 5 未満であれば統計的に有意とした。

【 0 3 0 8 】

結果

【 0 3 0 9 】

コロナウイルス R N A ポリメラーゼ遺伝子に対するコンセンサスプライマーを用いた P C R

Conscoro5 及び Conscoro6 プライマーを用い、40 の気管試料から得た c D N A を R T - P C R により分析した。

【 0 3 1 0 】

P C R 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 ( 1 7 . 5 % ) 。

【 0 3 1 1 】

P C R 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 F A S T A 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) 。

【 0 3 1 2 】

4 のイヌ気管試料から得たコロナウイルス c D N A 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 B C V の配列 ( GenBank アクセス番号はそれぞれ A F 2 2 0 2 9 5 及び A F 0 5 8 9 4 2 ) 及びヒトコロナウイルス OC43 系統 (GenBank アクセス番号 A F 1 2 4 9 8 9 ) の配列と最も似ていることが明らかとなった。解析した 2 5 0 b p の配列の同一性は、B C V Quebec とは 9 8 . 8 % 、B C V LY138 及び H C V p o l 遺伝子とは 9 8 . 4 % であったが、一方で C C V 1-71 系統の p o l 遺伝子とは 6 8 . 5 3 % にすぎなかった ( 図 6 及び図 7 ) 。

【 0 3 1 3 】

この新規な配列と 1 1 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スツリーを図 5 に示す。気管試料 ( T 1 0 1 ) より得られた c D N A 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。

【 0 3 1 4 】

このウイルスをイヌ呼吸器コロナウイルス ( C R C V ) と呼ぶ。

【 0 3 1 5 】

スパイク遺伝子に対するプライマーを用いた P C R

C R C V の R N A 配列を更に解析するために、ウシコロナウイルス LY138 系統 ( AF05894 2 ) 及びヒトコロナウイルス OC43 系統 ( L14643 ) との R N A の配列比較を Clustal X を用いて行った (Thompson et al., 1997) 。コンセンサス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 Spike 3-4 の選択した ( 図 1 1 ) 。1 1 9 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 c D N A に対して P C R 分析を行った。

【 0 3 1 6 】

ネステッド P C R により、総計で 3 2 の気管試料 ( 2 6 . 9 % ) 及び 2 0 の肺試料 ( 1 6 . 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 P C R 結果が陽性であった。

【 0 3 1 7 】

6 匹の異なるイヌの組織から得た P C R 産物の配列分析により、これらの c D N A からこれらが同一の D N A 配列であることが示された ( 図 3 及び 4 ) 。F A S T A 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は 9 8 . 1 % の同一性、ヒトコロナウイルス OC43 系統とは 9 7 . 8 % の同一性があることが明らかとなった ( 図 9 及び図 1 0 ) 。

10

20

30

40

50

## 【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 I I 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ノエステラーゼ (HE) を含有している。CRCV が BCV と高い同一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】

HE 1 プライマーは SEQ ID No. 38 であり、HE 2 プライマーは SEQ ID No. 39 である。HE 1 及び HE 2 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 HE 1-HE 2 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 OC43 系統の HCV の HE タンパク (それぞれ GenBank アクセス番号 M 8 4 4 8 6 及び M 7 6 3 7 3) 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。

【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。

10

【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( $p < 0.001$ )。

【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。

20

【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%)( $p = 0.594$ )。

【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。

40

【0337】

考察

【0338】

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

50

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（CIR D）との関係は確認されていなかった。

【0340】

CIR Dが流行しており、CIR D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)。

【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%）と最も高い同一性を持つが、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同一性しか持たない（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。

【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。

【0345】

このRT-PCRの産物のシーケンスにより、CRCVがBCV及びHCV-OC43と高い同一性を持つことが確認された。

【0346】

BCVとCRCVのスパイクcDNAは高い同一性を持つことから、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。

【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週間間に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。イヌ腸性コロナウイルス（CECV）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CECV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、BCV-ELISA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

10

20

30

40

50

差反応は低いことが示された。

【0350】

CRCV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、CRCV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】

PCRによって、気管組織及び肺組織に検出されたことから、CRCV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、CRCV-RNA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。

10

【0352】

CRCV-RNA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、CRCVの感染は同様な効果を持ち、ウイルスはCIRD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。CRCV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、CRCV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CIRDの主要な原因であると決定されたため、1970年代以降CIRD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CPIV、CAV-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)。

20

【0354】

この研究より、CIRD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、CIRD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。

30

【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

40

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

【0357】

Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Association of a ca

50

nine 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.

Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15, 200-7. 10

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., Hyypia, T., Arstila, P. (1998). Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 36, 539-42.

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. 20

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.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol.* 1988 Dec;69 ( Pt 12):2939-52. 30

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 cytocidal 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.

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec.* 1993 Jan 2;132(1):7-11. 40

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】

### 【0358】

CRCVスパイクのクローニング及び発現

CRCV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pMelBacB (Invitrogen) に移送した。

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-His Tag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。

#### 【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。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。

10

20

30



【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)。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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 OC43(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 OC43(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)、OC43(ヒトコロナウイルスOC43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)、OC43(ヒトコロナウイルスOC43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(OC43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

【 1 】

FIGURE 1

ctcagatgaa ttgaaatata gctattagtg ctaagaatag agocccgact gttgctgggtg 60
tttccatact tagtactatg actggcagaa tggttccata aaaaagcttg aaaaagatag 120
cagctacacg tgggttctcc gttgctatag gcaccataaa ttttatggc ggcctgggatg 180
atatgttagc tgcctctatt aagaatggtg acaactcctg acttatgggtg tgggattacc 240
ctaagtgtga 250

【 2 】

FIGURE 2

QNNLKYAISA KNRARTVAGV SILSTMTRM FHKKCLKSIA ATRGVFVVG TTKFVGGWDD 60
MLRLIKDVE NPFVLMGWDP KCE 84

【 3 】

FIGURE 3 (Page 1 of 2)

arcttttga taactttaa ttccctacca atggctttg ctgttatag agattaaag 60
tgtactacgy ttccctacca tgaatgac acocggctcc ctctctatag cctgtagtt 120
gtcagatgta ctaactggtt aggtactatt tatgttttag atogtggta tttaaatct 180
acattgttc taaatggtta ttactctact tcaagttcta calatogtaa tatgcaecg 240
aagggaactt tactatttag cacctatagg ttaaacacc cattctcttc tggatttact 300
taggtgttt ttgctaaggt aaaaaatcc aaggtatta aagatgggtg aggtatagt 360
gattttctcg ctataactat aggtatgact ttgttaata catctatag tgggttagta 420
caaccaata ctaactaatt agataataa ttacaaggtc tcttagagat ctctgtttgc 480
cagtatacta tggctgatta cccacatag atgtgtaac ctaactcggg taataaacgc 540
atagaactat ggcattgga tacaggtgtt gttccctgtt tatataagcg taatttccca 600
tatgatgta atgtgatta ttgtattcc catttttacc aagaaglyg tactttttat 660
gcatattita cacacactgy tggtttact aagttctgt tcaatgtaa tttagcaag 720
gtgctttcac atattatgt catgcccctg actgttaata tggctatgac tttagaatac 780
tgggtttcac ctctcacttt taacaataat ttaactcgtt tcaatcaaga tgggtttatt 840
ttaatgctg ttgatgtaa gagtatttt atgagttaga ttaagttaa acaactatct 900
atagaccat ctactggtt ttatgatta accgtttaca ctgtctgac aatgcaatg 960
gtttcccgac gtatacctaa tctcccgat tgaataatag agcttgggt taatgataag 1020
tcggtcctt ctocattaaa ttgggaactg aagactcttt caaattgtaa ttttaaatg 1080
agcagctgta tgccttttat ccaggtgac tctttactt gtaataatag tgaatgctg 1140
aagatatacg gtatgtttt tttagcata actatagata agtttctat acccaatgt 1200
agggaggtg acctcaaat ggcactttg gctatttgc agtcttttaa ctatagaatt 1260
gatactactg ctacaagtg tcaatgtat tataatttac ctgtagtaa tgtttctatt 1320
agcaggtta atcctctat ttggaatag agatttgggt ttacagaaca atctgtttt 1380
aagctcaac ctgtaggtt ttttactgat atgatgttg ttatgcaac acatgtttt 1440
aagctccca caaattctg tccgtgtaan ttgaatgggt ctgtgtgtg aggtaggtt 1500
ttggtatag atgtggtta taaaatag gttaggca ctgtctcgc aggtactaat 1560
tatttaactt gttataatg taacaatgt gattgtttg gcaatcaga ccaatttta 1620
tctaatacta caggcctta taagtcccc caaactaat acttagttg cataggtgag 1680
cactgtctg gttctgat taaagtgtat tattgtgag gcaatcctg taactgcaa 1740
ccaaaagcat ttttgggtg gctctggag tctgtttac aagggaatag gtagaatat 1800
ttgttaatt ttattttgca tgggttaat agtgtacta ctgtctcsc tggtttaca 1860
aaatcaaca cagacataat tctgtgtt ttgttaatt atgacttta tggattaca 1920
ggccaagta tttttgtga ggttaatgc acttataa atagttgca gaaacttta 1980
tatgatcta atgtaact ctatgtttt aggactact taacaacag aactttatg 2040
atgtagttg gctataggg tctgtttca cgggcttcc actcaactc ttccgaacca 2100
gattgctat ttoggaat taatgcaat taactttta atactctc ttccagacag 2160
ctgcaacta ttaactatt tgaatgatt ctgtgttg ttgcaatg tgaatagt 2220

FIGURE 3 (Page 2 of 2)

acttctagt ctgtcaca abtgaatc acagtagta gtggtactg gggggattac 2280
tctacacaaa gacgaagtg tgaacgatt accactggt atcggtttac taattttgag 2340
ccaattactg ttaatccagt aeatgtagt ttacacccg tagtgggtt gtagaatt 2400
caataactt cagagttac batagtaat agggagag ttattcaaac aagatctcc 2460
asegttacta tggatttcc tgtttttgct tgggtgatt atgcaagat taatcacag 2520
ttggtgaa atggtattt ttgtaaat ataatgcta tactcacaga agtaaatgaa 2580
ctacttgca ctacacagtt gcaatgagt aatagttaa tgaatgggtg cactctagc 2640
actagctta aagatgctt taattcaat gtatagaca tcaattttc cctgtatta 2700
ggtgtttag gaagcaatg taataaagt tccagtagt ctgctataga ggtattact 2760
tttctaaag taagttacc tgaatggtt ttgtgtatg cttaataaa ttgtactgga 2820
ggtgcogaaa ttaggacct cattttgtg caaagtata atggtatcaa agtgtgct 2880
ccaactgctt cagaanaat gatcagtgga tacactttg ctgcaactt tgcagctg 2940
ttctcctct ggtcagcag agcagcgtta ccaattttat taatgttca gtatgatt 3000
aatggtattg gtttaccat ggtgtgcta actcaaatc aagaacttat ttctaatgca 3060
tttaacaaag cctgtgatg tattcaaga ggtgtgtatg ctcaacttc tcttttagt 3120
aaaatcaag ctgtgttaa tgcacatg gaagcttta atacttat gcaacaactc 3180
tctaataat ttgtgctat aagtctct ttacaagaa tctactatg actttagct 3240
ctgaagcag aagctagat agacagact atcaatggc gtctaccgc tcttaatgct 3300
tatgtttcc aacagctag tgaattcaca ctgataaat ttatgcaag caaagctatg 3360
gagaagttta atgattgtg caaagcaca tcaatcagga taatttttg tggtaatgt 3420
aatcatatta tatcattagt cagatagct ccaatgggt ttattttat ccaacttagc 3480
tatgctccta ctaagtagt cactgcaag gttatcccg gttctgcat ygcaggtgat 3540
agaggtatg ctcaatag ttgtatttt gttatgtaa ataacactg gatgtcaat 3600
ggtatggtt atactacc tgaactata actggaata atgtgttg ttatgatac 3660
tgtctgta actatactaa agcagcgtt gtaatgcta acattcaac acccaactc 3720
cctgattta aggaagatt ggaatcaatg tttaaaaac aacattat ggcacagat 3780
ttgtcactg atataataa tttacattc ttggacctac aagatgaat gaatgggta 3840
caggagcaa taanagttt aatcatagc tacatcaatc caaggacat tggatcat 3900
gaatattatg taanagctg ttgattgta tggcttttaa ttggcttgc tggctgact 3960
atgctgttt tactatct catatgctg ttgcaagatg atgagactg ttgttttag 4020
aaatgctgtg gttgtgtga tgaatctat ggaactcag agttagtaat caaacgta 4080
catgactaa aa 4092

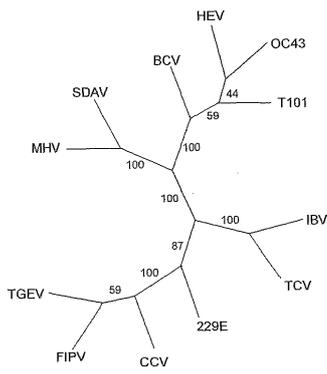
【 4 】

FIGURE 4

MELILLISLP MAFVIGDLK QTVSINDVD TQPSISIDV VDVNGLQTY YLDRVLYMT 60
TLLNLCYPT SGTYSRNMAL KGTLLSLTW KFPFLSDFI DGVEAKVMT KVIKDGVYS 120
EPAITIGST FNTSYSVVV QHNTLNDK LQGLLEISVC QYTMCDYPT MCFNPNKRR 180
IELNMDGV VCLYKRNET YDNDYLDX LFYEGGFFV AFVDCGVV KEIPIVLYGT 240
VLSHYMPL TCSNMELEY HYPLEFKY LLAPNODGV FNAVDCSDF MSKICKTLS 300
IAPSTVYEL NGYVQPIAD VYRIPNEDL CHIEANLNDK SVSPINNER KFSNCFNM 360
SSIMFIQAD SETCNIDAA KIYMCFFSI TIKKATPAG RKVDLQKML GYQSPNYRI 420
DTTASCOLY YNLPASVSI SRFNPSINR RSGTQGVFV KPOVGVVFD HDVYVQCF 480
KAPTFECPK LAGSLCVSG FGDVAGYNS GIGTCPAGM YLTCNANQC DCLCTPDL 540
SKSTGYKCP QTKYLVIGE HCSGLAKSD YCGNPTCG PRAPLGSVD SCLQSDRONI 600
FANFLLGVN SGTCTDQL KSNIDILGV CVNYDLYGT GGFVFEVNA TYNSWGLNL 660
YDNGKLYGF RYVLPNPFM IRSCYGRVS AGHNSNSEP ALLFRNIKX YVENYLSRQ 720
LQPTNYFDSY LCVVNDNS TSSVQTCDL TVSGYWDYV STQRSRRI TTYRNFPE 780
PFTVGVNDS LHPVGLYEI QIPSEFTIGN MEFEIQRSE KVILDCPFEV GDYVACKSQ 840
LVEYGFCDN INAILTEVNE LLDTPQLQVA NSLNGVTLK TKLKDQFNEV VDDINSEVL 900
CGLSECNKV SRSRSEDLL FSKVQLSDV FVDVYNNCTE GAERDLICV QSYNGIKVLP 960
PLSSEQISG YLRAEFASL FPFWSADGY PFYLVQYRI NGIGVMDVL TQKQLSNA 1020
FNNALDICE GFOATNSALV KIQAVVWNA EALNNLQOI SKVFCASIS LQELISRLDA 1080
LEAQAIDL INGRIFALNA YVSQLSDST LVKFSRAQM EKVNEKVSQ SSRNFCGNG 1140
NHILSLVNA FGLFPIHS YPVPYVTKA VSRGLIAG RLIPEKSYV VVNNFMET 1200
GSGYFPEI TGNVVMST CAVNTKAD VMLNISTFM PDFKELDQV ENNSTMAPD 1260
LSDYINVF LQLQSMNL QBAIKVLS YINLADITG EYVKNVWV MLICGLASYA 1320
MLVLFFIQC CTGCTSCFK KCGGCCDDT GHQLVIRTS HDD 1363

【 5 】

FIGURE 5



【 6 】

FIGURE 6

T101 CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGTCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTGTGGTG  
 BCV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGTCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTGTGGTG  
 OC43 CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGTCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTGTGGTG  
 HEV CTCAAATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGTCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTGTGGTG  
 CCV CTCAGATGAATTTGAAATATGCTATTAGTGTCTAAGAAATAGAGCCCGCAGCTGTGTGGTG  
 \* \* \* \* \*

T101 TTCCATACACTAGTACTATGACGGCAGAGTGTTCATCAAAAATGTTGAAAAGTATAG  
 BCV TTCCATACACTAGTACTATGACGGCAGAGTGTTCATCAAAAATGTTGAAAAGTATAG  
 OC43 TTCCATACACTAGTACTATGACGGCAGAGTGTTCATCAAAAATGTTGAAAAGTATAG  
 HEV TTCCATACACTAGTACTATGACGGCAGAGTGTTCATCAAAAATGTTGAAAAGTATAG  
 CCV TTCCATACACTAGTACTATGACGGCAGAGTGTTCATCAAAAATGTTGAAAAGTATAG  
 \* \* \* \* \*

T101 CAGCTACACGCTGGTCTCCCTGTTGTTATAGCCACCCTAAATTTTATGGGGCTGGGATG  
 BCV CAGCTACACGCTGGTCTCCCTGTTGTTATAGCCACCCTAAATTTTATGGGGCTGGGATG  
 OC43 CAGCTACACGCTGGTCTCCCTGTTGTTATAGCCACCCTAAATTTTATGGGGCTGGGATG  
 HEV CAGCTACACGCTGGTCTCCCTGTTGTTATAGCCACCCTAAATTTTATGGGGCTGGGATG  
 CCV CAGCTACACGCTGGTCTCCCTGTTGTTATAGCCACCCTAAATTTTATGGGGCTGGGATG  
 \* \* \* \* \*

T101 ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAACTCCGTAATTTGGTGGGATATAC  
 BCV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAACTCCGTAATTTGGTGGGATATAC  
 OC43 ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAACTCCGTAATTTGGTGGGATATAC  
 HEV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAACTCCGTAATTTGGTGGGATATAC  
 CCV ATATGTTACGCTGGCTTATTAAGATGTTGACAACTCCGTAATTTGGTGGGATATAC  
 \* \* \* \* \*

T101 CTAAGTGTGA  
 BCV CTAAGTGTGA  
 OC43 CTAAGTGTGA  
 HEV CTAAGTGTGA  
 CCV CTAAGTGTGA  
 \* \* \* \* \*

【 7 】

FIGURE 7

protHCVPoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTGRMFHQKLSIAATR  
 protHEVPoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTGRMFHQKLSIAATR  
 protBCVPoly ---MNLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTGRMFHQKLSIAATR  
 protCRCVPol --QMLKYAISAKNRARTVAGVSLSTMTGRMFHQKLSIAATR  
 protCEVPol MTQMLKYAISGKARARTVGGVSLSTMTTRQYHQKHLKLSIAATR  
 \* \* \* \* \*

protHCVPoly GVPVVIQTKEYGGWDDMLRRLIKDVENFVLMGWDYFKC  
 protHEVPoly GVPVVIQTKEYGGWDDMLRRLIKDVENFVLMGWDYFKC  
 protBCVPoly GVPVVIQTKEYGGWDDMLRRLIKDVENFVLMGWDYFKC  
 protCRCVPol GVPVVIQTKEYGGWDDMLRRLIKDVENFVLMGWDYFKC--  
 protCEVPol NATVVIQTKEYGGWDDMLRRLIKDVENFVLMGWDYFKC--  
 \* \* \* \* \*

【 8 】

FIGURE 8 (Page 1 of 9)

-----ATGTTTGGTACTTTA-----ATTCCCTACCAATG  
 ATGATGTCCTGCTACTGCACTTATTGTTGTTGTTCTCCACCACTGCTGCGAGTAGC  
 \* \* \* \* \*

GCITTTGCTG-TTATGGGAGATTAAAGTGTACTACGGTTTC-CATCAATGATGTGACA  
 TCAAAATGATTGTAGCAAGTTAA--CGTACACAAATGATGGCAATGAAACCTCA  
 \* \* \* \* \*

CGGTG-CFCTTCTATTAAGCTGCTGCTGCTGATGTTACTAATGTTAGTACTTAT  
 TTAGAGCTTTTGTTCMAACTT-AAAAGAGAGGAACTGTAGTGTGTGGTGTAC  
 \* \* \* \* \*

TATGTTTAGA---TCGTGG--TATTTAAATCACTA---TTGTTGCTTAATGGTTA  
 TACCCACAGAGGTTGGTAACTGTTTGAACAGCAACTACTGCTCA-TGASTA  
 \* \* \* \* \*

TTATCCTACTCAGGTTCTACTATCGTAATAGGCA-CGAGGAACTTACTATTGA  
 TTTCASTAATATACAGGCTTATTTGATATGAGCCATGGAGAAATAGTACTGTAA  
 \* \* \* \* \*

-GCACACTAGG-TTAAACCCACTTCTTCTGATTTATGATGGTGTGTTTGTCTAA  
 TGCAGCTGGTAAACCTTATTTATTCATGTTTATGCTGAGGCTTATGCTCATATA  
 \* \* \* \* \*

GGTAAAAATACCAAGTTTAAAGTGTGTAAGTATG--TGASTTCTCTGAT  
 CATATCTATAGAGATGATGACACATAGCCACTTTAAACAGGATTAAGTGTGAT  
 \* \* \* \* \*

AACATAGGTAGTACTTTTG--TA-AATACATCTAGTGTGAGTACACACATAC  
 AACTGAAAGTGGCAGACTGACTATACAGTTTACAGTA-GCCAGTGGATCCATAT  
 \* \* \* \* \*

-TACTATTTAGATAAATAAACAAGGCTCTCTAGAGATCTCTGTTGCCAGTATATA  
 GTACGGTAAATGACGAAAATTCCTT-TCCTGTCTATGCCAGCAATGGACAAA  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 8 (Page 2 of 9)

-TGTGGATTACCCACATA-CGATGTGTC-ATCCATACTGGGT-AATAAAGC--CATAG  
 ATTTATGCTGTGGTGGATCGAGATTTGTTACAGCTACATAGTGTGCTTCTTAT  
 \* \* \* \* \*

AACATAGGCAATGGGATACAGGTTGTTCCCTGTT-TATATAAGCGTAAITTCACATAT  
 AATGGAACATCAATATATATGTTTACATATGTCACGCTCTCTATAGTCCGTCACAGC  
 \* \* \* \* \*

GATGTGA-ATGCTGATTTATGATTCOCATTTTATCAGAAGTGTGACTTT---TTA  
 ACTGCCACTGGCAACACAGTCC-TGCACTAGTTTACCAAGTGTGTTTCACTTCACTTA  
 \* \* \* \* \*

TGCATTTTACAGACACTGGTGTGTTACTAAGTTCGTGTTTATGTTAT-TTAGGCA  
 TTACAGTTAAATACACCAATGGTCTAA--AACTATGAAITATGTGAAGATTTAGAA  
 \* \* \* \* \*

CGGTGCTT---CACTATTTA-TGCTAGCCCTGACTGTAATAGTGTAGTACTTTA  
 TATTCACGCTGCTACGCTACACTTCTTCCCAACTGTGGAGGTTACACTGAT  
 \* \* \* \* \*

GAACTGCGGTA---CACTCTCACTTTTAAACATATTTACTGCTTCAATCAAG  
 GCAATTTAGTTTACCAATGTTTGGTTCACAAACGCTCCACTTTGTTAGTGGCAGA  
 \* \* \* \* \*

ATGTTGTTATTTTATGCTGTTGATTTAAGTGTGTTTATAGTGTGATTTAGTGTGAT  
 TTTGTAACAAATCAACATTTATGATTAATGCTTGTGGCCAGTCTCTAGTTTGGTGT  
 \* \* \* \* \*

--AAACACTATCTATAGCACCCTACTGCTGTTATGAAATTAACGGTTCACACTGTT  
 GCGACACAGAAATTTTATGAGTGCAGCTTACGCAATGATGAGTGTGTTTTTA  
 \* \* \* \* \*

AGCCA-ATTGCAATGTTTACCGGCTTACCTAATCTCCCG--ATTGTAATATAGAGG  
 AATACACAGTATGATGCTAATGATTCACCTTAATTTTACGAGATGCAACTGTCG  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 8 (Page 3 of 9)

CTGGCTTAATGATAGT-DSGTGCCTTCCATTAATTTGGGAGTGTAGAGCTTTTCA  
 ATGGGTCTACAGTATTTTACTGAAATACACAGGCTGGTGCATCTCTGATTTCTT--  
 \* \* \* \* \*

AATGTAATTTAATATAGCAGGCTGATGCTTTTATCAGGCTGACTGTTTACTGT  
 -GTATAAGATATAGTGGGAGTCAAGTTTACAGTATGTTGA--AATCCCTTC  
 \* \* \* \* \*

AATATATGATGCTGCTAGATATACGGTATGTTGTTTCA--GCATACATATAGATA  
 GCGCTAAGTATGG-ACCGGTTAT-TGTTATGCTCTATATAGGACACTCTTAAAT  
 \* \* \* \* \*

AGTTGCTA---TACCAATGTTAGGAGTGTACCTCAATGGCAATTTGGGCTAT  
 ATTTGGGCAATATCCCTAGTGTCAAG--AAATGCTATAG-TAAGTGGGCAAT  
 \* \* \* \* \*

TGCAGTCTTTTACTGTAAGATTAATGATCTGCTACAAGTGTGCTATGATTAAT  
 TTTATATATGTTAGATTTCTTTAGCCTTTTCTTATGATTTATATCTTTTAACT  
 \* \* \* \* \*

TACCTGCTAATGTTCTTATAGCAGGTTTAACTCTTATTTGAAATA--GGAGAT  
 TAACCACTGTTAGTGGAGCAATTTGGCAATCTTACACATGTTACTGACAGCAAT  
 \* \* \* \* \*

TGTTTGA-CAGACATCTGTTTTTAAAGCT-CAAGCTAGGCTGTTTACTGATGAT  
 TAGTACAGTTGAAACACAGCAATTAAGAGTGGAGTATGTTAAGACATC-ATTAA  
 \* \* \* \* \*

GATGTTGTTATGCACACATTTGTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGTCG---TGT  
 AACTCAATGTTCTCACTACTGCTAATTTGCAAAATGGCTTTTCTGTTGCTTCA  
 \* \* \* \* \*

AATGAAATGGCTTGTGTGAGTGTGTTTGGTA--TAGATGCTGTATATAA--  
 AGTGAAGTGGCTTGTGATAGAGTGTGTTTACTACCTAGTTCTTATGACATACC  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 8 (Page 4 of 9)

```

CRCVspike  AATAGTGGTATAGGCACTTCTCCAGCTACTAATATATTTACTTGTATATATGCTAAC
CECVspike  AGTGTAAATATAACTATATGATCTTC--GTATGAGCGTAGTGGTTATGGTCRACCCA--
* * * * *
CRCVspike  CAATGTGATTTGTTGCRCTCCAGC--CCTATTTTATCTAAATCTACAGGCGCTTAT-T
CECVspike  TAGCCTCAACACTAAGTATACATCAACACTACCAATGACAGGATATATACCCGGATGTGACT
* * * * *
CRCVspike  AAGTCCCCCAACATAACTATAGTGGCATAAGTGGACACGTCTGTGGTCTTCTGATTT
CECVspike  GTATTCGTCTAACCAAT--CTCAGTATATGTCTCCTCCACTGCAAAAGTCTTTATGG
* * * * *
CRCVspike  AAAAGTGTATTTGTTGAGGCAATCCTTGACTTGCACACCAAAAGCGTTTTGGG--TT
CECVspike  GACAACTTTTAAICAGGATTCACAGATGTTTTATGCCCAGCTGTATATAAACT
* * * * *
CRCVspike  GGTCTGTGAC--TCTGTTFACAGG--GGATAGTGTAAATATTTTGTAA--TTTTAT
CECVspike  GGTACTTCCCTTCTCTGTGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
* * * * *
CRCVspike  TTGCATGGTGT--TAAATGTC--GTACTACTTGTCTACTGATT--TACAAAATC
CECVspike  TTGTCTGAACTCCTACTGCTCCAACTGAAGTTTGTGTTCTGCTGCCCTACAAAGACC
* * * * *
CRCVspike  AAACACACATTAATCTTGGTGTGTAATATGATCTTTATGGTATACAGGCA
CECVspike  AA--TGACAGGTTGTAGAGTTTATATGTAATATAGAGAGAGAGCAACATAGTGG
* * * * *
CRCVspike  AGGTATTTTGTGA--GGTAAAGCAGCTTATATATAGTGGCAGACCTTTTAT
CECVspike  TGTACCGTCTGATTAATAGTGGTCTCAGAGTTGTGAGTGTACACTTAGACTCCTCTAC
* * * * *
CRCVspike  ATGATCTAATG--GTATCTCTATGTTTGGAGACTACTTAAACACAGA--ACTTTT
CECVspike  A--GATTACATATATATGAGTACTGCTGTT--GGTATATAGACAACTTACAGCACA
* * * * *

```

FIGURE 8 (Page 6 of 9)

```

CRCVspike  ACAAATTAATGCTATACTACAG--AAGT-----AAATGACTACTTACACTA
CECVspike  AAATCTATGAGCAAGCGCTTGCANTAGAGTCCAGCCTTGAATATGAGATGATTCACA
* * * * *
CRCVspike  CACAGTTCGAATGACTATAGTATTAATGATGTTGCTACTCTAGCACTAAGCTTAAAG
CECVspike  TGTGTTTGTCTCAGAAATGCGCTTA--AAATGGCATCTGTGAGGCGTCAATAGTACA
* * * * *
CRCVspike  ATGGCTTAAATTCAGATGATGACAT---CAATTT--TTCCCGTATAGTATGTT
CECVspike  GACATTTAGATCTATTTACAAAGATGCGCTTACATAGCTGTTCTGGCTAGAGGT
* * * * *
CRCVspike  TTAGGAGCGAAT-----GTAATTA--AGTTTCCAGTA--GATCTGCTATAGAGAT
CECVspike  CTBAAGACATACTCCGCTCCCAATATAGCAACCTAAGTATCTGCTCTATAGAGAGC
* * * * *
CRCVspike  TTACTTTTCTAAGTAAAGTATGATGATGTTGGTGTGTTGATGC--TTATTAATAT
CECVspike  TTGCTTTTGAATGTTGACTCTGCTGCTAGGTCAGATGATGAGATTAATAAGT
* * * * *
CRCVspike  TGTACTGGAGTCCGAATAGGCACTTCTTTGTGCAAGTATAATGATATCAA
CECVspike  TGTACAGGCTTATGACATAGCTACTGATGTTTGGCAATATACAAATGGCATATG
* * * * *
CRCVspike  GTGTGCTC--CCTCTCTCAGAAATCAGATAGTGTATACCTTTGGCTGCCACTT
CECVspike  GTCTACTCTGTGTGCTAAT--GATGACAGATGACTATGTACACAGCTCTCTTGCAGG
* * * * *
CRCVspike  TGTACTGCTTCTCTCC--TTGGTCAAGCA--GCAGGCTACCATTATTAATATG
CECVspike  TGGTATAGCATAGGCTACTAGTGTGGCGCGCTGCTATACCTTTTGCAGTACAGT
* * * * *
CRCVspike  TCAGTATGCTATTAAGGATTTGGTGTACCATGATGCTAATCAAAATCAAAGCT
CECVspike  TCAGGCTAGCTTAATATGTTGCTCAAACTGATGTTTGAACAAACCGAGCAT
* * * * *

```

FIGURE 8 (Page 5 of 9)

```

CRCVspike  ATGATTCGTAGTGTCTATAGCG--GTCTGTTCAGCGGCTTCA---CTCTACTCTTC
CECVspike  ATACTTAGTGGCTTAGATATATACATCACTACAGTATATATATAGGTTTAAATGCTT
* * * * *
CRCVspike  CGAACAGCGMTG--CTATTTGGAAATTAATGCAATACGTTTAAATTAATCTCTT
CECVspike  AGTGTAGTGTGTCTATTTCTGACACCGMTGATGTAAGGCGCAACAGCGGCTTATTT
* * * * *
CRCVspike  CRG-----ACAGCTGCAACTTATTAATTTGATAGTATCTTGGTTCGTTGTCAA
CECVspike  GATGGGCGCATAGTGGAGC--TATGACTTCCATTAATAGTAACT--GTAGGCTACAC
* * * * *
CRCVspike  TGCAGATAATAGTAC----TCTAGTCTGTTCAACATGTGATCTCAGAGTAGTAT
CECVspike  ATTGGACACACACCAATTTTATTACTACTCTA--TATATAT--ACACAAATAG
* * * * *
CRCVspike  GGTACTGGGGGATTACTCTACACAAAGCAAGT---CGTAGACAGTATACCCTGG
CECVspike  AGA--ACTGCTGGCAGTCAATCCAGCTACAGTATGATGTTGACACTTATCAACTTA
* * * * *
CRCVspike  TT----ATCGGTT----ACTAATTTGAGCCATTTACTGTTAATCCAGTAAATGATG
CECVspike  TTCTACATAGGTTTGTAAATGGTGGCTGCTTTTATTAATTAATTAATTAATTAATTA
* * * * *
CRCVspike  TTTACACCTGTAGTGGTTGTAT--GAAT--TCA--AATCACTCAGAGTTACTATAG
CECVspike  TGGAGATGTT--CAACCAATTAGCACTGGCAATGACAGTACCCCAACTTTACCATAT
* * * * *
CRCVspike  GTATATGAGGAGTATTATCAACCAAGTCTCCTAAGTACTATGATGCTCTCTT
CECVspike  CTGTCAAGTGTAAATGATCAGGTTTACACTACCGGTTGATAGATTTTCTACTAT
* * * * *
CRCVspike  TTGTCTGTGATGATGACAGCATTAATCAGAGTGGTGGAAATGGTATGTTTCTG
CECVspike  ACGTTGTAAATGGTAACTAGATGTAATTAATTTGTAACCAATATGTTCTGACTGTC
* * * * *

```

FIGURE 8 (Page 7 of 9)

```

CRCVspike  TATTTCTAATGCAATTAACATGCGCTTGTAGCTAAT-----CAGSAGGCTT--
CECVspike  CTTGGTAAAGCTTTCACACAGCTATGGTAACTTACACAGCAATTTGGTAGGTTAA
* * * * *
CRCVspike  TGTAGCTA-----CCAACTCTGCT-----TTAGTAAAT
CECVspike  TGTAGCTAATCAACATCAACAGCTCTTCCCACTGCTTGGCTAAGCAATGGCAAGT
* * * * *
CRCVspike  TCAAGCTGTGTTAATGCAATGCTGACCTTAAATAGTATTTGCAACACTCTCAA
CECVspike  GCAAGATGTTGTTAACAACAGGCGAGCTTAAAGCACTTACAGTCACTGCAAAA
* * * * *
CRCVspike  TAAATTTGGCTATAGTCTCTTTACAAGAAATCTATGACTATGCTCTGTA
CECVspike  TAGCTTCAAGCCTATGACTGCTTCTATAGTACATTTAATAGGCTTATGATGACTGAG
* * * * *
CRCVspike  AGCCAGCTCAGTAGCAGCTTATCAATGGGCGCTTACCGCTCTTAATGCTTATGT
CECVspike  TGCTATGCAAGTGTATGAGGCTGATCAGGCTAGCTTACAGCTTAAAGCTTTG
* * * * *
CRCVspike  TTCTCAACAGCTTAGTGTCTACAGTAAATTTAGTCAAGCAAGCTTAGGAGAA
CECVspike  ATCTCAGCTTAAACAGCAGCGGAGGTTAGGCTAGACACTTGCCAAGACAA
* * * * *
CRCVspike  GTTAATGATGCTCAAAAGCCTAATCACTAGCAAAATTTTGGTATGCTAATCA
CECVspike  GTTAATGATGCTTAGGTTAGTCTCAGTCTCAGAGATTTGGATTTGGTATGCTACACA
* * * * *
CRCVspike  TATTATATCTTAGTGCAGATGCTCMAATGTTTGTATTTATCCACTTA--GCTAIG
CECVspike  TTTGTTTCTACTGCAAGTCAAGCAGCAAAATGGCAAGTTTCTTCAACAGTCTAT--
* * * * *
CRCVspike  TCCCTACTAGTATGCTCCTGCAAGGTTAGTCCCGCTGCTGCTGCTGAGTATGAG
CECVspike  TACCAACAGCTTAAATGCTGACAGCTTGGTCAAGTATTTGGTCTCAGATGGCATC
* * * * *

```

FIGURE 8 (Page 8 of 9)

```

CRCVspike  GTA-----TAGCTCTAAGAGTGGTATT----TGT----AATGTAAATAACA
CECVspike  GCACCTTTGAGCTTGTCTGTAAGAGTGTCTAGCTTGCATTTGCTGTACTAGATGACA
* * * * *

CRCVspike  CTGGATGTTTCACTGGTATGTTTACTACTACCTGAACCTTAACTGGAATTAATGTTGG
CECVspike  AGTCTATTGACTCCAGAACTATGTTACAGCTTAGAGCTGCAACTAGTCTGATTTTG
* * * * *

CRCVspike  TTGTTATGATBCCTGTCTGTTAACTAFACTAAGCACCGGATPAATGCTGACATTT
CECVspike  TTCAGATTTGAGGGGTGCGAGCTGTTTCTCAATGCACTGTAATTTGCTTGGCTAGTA
* * * * *

CRCVspike  CABCACCAACCTCCCTGATTTTAGGAG-----AGTTGATCAATGTTTAAAAAC
CECVspike  TTATACCTGACTATGACACTAATTAACAGCTGTTCAAGACATTTAGAAACTACAGAC
* * * * *

CRCVspike  CAACACTTATGCGCCAGAGTTGTCACITGATATATAAATGTTACATTTGAGCCTA
CECVspike  CAAC--TGGACTGTCTGATGATGACATTTTACCGACCTAATTAATCTG
* * * * *

CRCVspike  CAGATGAAATGAAATAGTTACAGG--AGGCAATAAAGTT---TFAATCATAGC----
CECVspike  ACTGCTGAAATGATGACTTAGAATTTAGTCCAGAAAGCTACATAACACCCACBTAGAG
* * * * *

CRCVspike  -----TAGCT---CAATCTCAGGACATTTGATGAC
CECVspike  CTGGCCATTTCTATTGACAAATTAACAAATGACTTAGTCAATCTGATGCTCAATAGA
* * * * *

CRCVspike  TATGAATATATGAAAATGSCCTTGGTATGATGCTTTAATTTGGCTTCTGGCGTA
CECVspike  ATTGAACCTTATGTAATGSCCTTGGTATGATGCTTAAATAGCC--TTAGTAGTAT
* * * * *

CRCVspike  GCTATGCTGTT--TACTATTTCTCATATGCTGTGACAGATC--TGGACTAGTTG
CECVspike  GTTTTCATACCGCTTATGCTATTTGCTGTGTAGTACAGTCTGCTGGGACATAGG
* * * * *

```

FIGURE 8 (Page 9 of 9)

```

CRCVspike  TTTTAAAGAAATGCGTGGTGTGATGATTAATAGGACA--TCAGGAGTATAGTATTC
CECVspike  TTGTTTGGAAATGCTTCTCATTTATTTGATAGAGAAACAAATTTGAAATAGGAAAC
* * * * *

CRCVspike  AA---AACGCTCACAGGACTAA-----
CECVspike  AATGAAAGATGCACTCCACTAAA-----
* * * * *

```

FIGURE 9 (Page 2 of 12)

```

BCVspike  TANTGTATAGTGGTTCCTGCTATAACATAGTACTTCTTAAATACATCCTATA
HCVspike  TANTGTATAGTGGTTCCTGCTATAACATAGTACTTCTTAAATACATCCTATA
CRCVspike  TAGTGTATAGTGGTTCCTGCTATAACATAGTACTTCTTAAATAGTACTATA
HEVspike  TTAGTGTATAGTGGTTCCTGCTATAACATAGTACTTCTTAAATAGTACTATA
* * * * *

BCVspike  GTGTGGTATACAAACACACTACTACCAATTTAGATANTAAATACAGGCTCTTAGAGA
HCVspike  GTGTGGTATACAAACACACTACTACCAATTTAGATANTAAATACAGGCTCTTAGAGA
CRCVspike  GTGTGGTATACAAACACACTACTACTAATTTAGATANTAAATACAGGCTCTTAGAGA
HEVspike  GCGATAGTAGAAGCCATACCTCAATTTAATGGTAAATACAGGTTTTTGCAAA
* * * * *

BCVspike  TCTCTGTTGCCATTAFACTATGTCGAGTACCACATAGGATTTGTCATCCTAATTTGG
HCVspike  TCTCTGTTGCCATTAFACTATGTCGAGTACCACATAGGATTTGTCATCCTAATTTGG
CRCVspike  TCTCTGTTGCCATTAFACTATGTCGAGTACCACATAGGATTTGTCATCCTAATTTGG
HEVspike  TTCTGTTTTCATATATGCTGCTCAATACCCACAGCTATTTGTCATCCTAATTTGG
* * * * *

BCVspike  GPTATGCGCGCATAGAACTATGGCATTTGGGATACAGGTTGTTCTGTTATATAAGC
HCVspike  GPTATGCGCGCATAGAACTATGGCATTTGGGATACAGGTTGTTCTGTTATATAAGC
CRCVspike  GPTATGCGCGCATAGAACTATGGCATTTGGGATACAGGTTGTTCTGTTATATAAGC
HEVspike  GTANTGACCGATAGAAATAGGCACTACAGACAGATGTTGTTCTGTTATATAAGC
* * * * *

BCVspike  GPARTTTACATATGATGATGATGATTTGTTATTTCCATTTTATCAGAGGTTG
HCVspike  GPARTTTACATATGATGATGATGATTTGTTATTTCCATTTTATCAGAGGTTG
CRCVspike  GPARTTTACATATGATGATGATGATTTGTTATTTCCATTTTATCAGAGGTTG
HEVspike  GPARTTTACATATGATGATGATGATTTGTTATTTCCATTTTATCAGAGGTTG
* * * * *

BCVspike  GTACTTTTATGCAATTTTACAGACACGCTGTTGTTACTAAGTTCTGTTAATGTTT
HCVspike  GTACTTTTATGCAATTTTACAGACACGCTGTTGTTACTAAGTTCTGTTAATGTTT
CRCVspike  GTACTTTTATGCAATTTTACAGACACGCTGTTGTTACTAAGTTCTGTTAATGTTT
HEVspike  GCRCITTTTATGCAATTTTACAGACACGCTGTTGTTACTAAGTTCTGTTAATGTTT
* * * * *

```

【 9 】

FIGURE 9 (Page 1 of 12)

```

BCVspike  ATGTTTTGATACTTTTAAITTCCTACCAATGCTTCTGCTGTATAG
HCVspike  -----ATGTTTTGATACTTTTAAITTCCTACCAATGCTTCTGCTGTATAG
CRCVspike  -----ATGTTTTGATACTTTTAAITTCCTACCAATGCTTCTGCTGTATAG
HEVspike  -----ATGTTTTGATACTTTTAAITTCCTACCAATGCTTCTGCTGTATAG
* * * * *

BCVspike  GAGATTTAAAGTACTACGGTTCATTAATGATGTTGACCCGGTGTCTCTGTTA
HCVspike  GAGATTTAAAGTACTACGGTTCATTAATGATGTTGACCCGGTGTCTCTGTTA
CRCVspike  GAGATTTAAAGTACTACGGTTCATTAATGATGTTGACCCGGTGTCTCTGTTA
HEVspike  GGGATTTAAAGTACTACTCATCAATTAATGACGTTGACCTGTGTGCTCATTA
* * * * *

BCVspike  GCACGTACTGTCGATGTTACTAATGTTTACTTATTTAGATGCTGTGT
HCVspike  GCACGTACTGTCGATGTTACTAATGTTTACTTATTTAGATGCTGTGT
CRCVspike  GCACGTACTGTCGATGTTACTAATGTTTACTTATTTAGATGCTGTGT
HEVspike  GCTCTGAGTGTGTGATGCTACTAATGTTTGGGGACTTCTGATTTTATGATGCTGT
* * * * *

BCVspike  ATTTAAATACTAGTGTGTTGCTTAAAGTGTACTACCTACTCTGAGTCTACATATCGTA
HCVspike  ATTTAAATACTAGTGTGTTGCTTAAAGTGTACTACCTACTCTGAGTCTACATATCGTA
CRCVspike  ATTTAAATACTAGTGTGTTGCTTAAAGTGTACTACTCTGAGTCTCTGATATCGTA
HEVspike  ATTTAAATACCAATGTTGCTCAATGTTTATACCAATTTGAGTGTGATTTGTA
* * * * *

BCVspike  ATATGGCACTGAGGGAACCTTTACTATTGACACACTATGTTTAAACACCTTTCTTT
HCVspike  ATATGGCACTGAGGGAACCTTTACTATTGACACACTATGTTTAAACACCTTTCTTT
CRCVspike  ATATGGCACTGAGGGAACCTTTACTATTGACACACTATGTTTAAACACCTTTCTTT
HEVspike  ATGTTGCTCTGAGGGAACCTGATTTATGAGCACTTGTGTTTAAAGCCCTTTTAT
* * * * *

BCVspike  CTGATTTTATTAATGATTTTGTCTGCTGAAATACCAAGTATTAATAAATGGTG
HCVspike  CTGATTTTATTAATGATTTTGTCTGCTGAAATACCAAGTATTAATAAATGGTG
CRCVspike  CTGATTTTATTAATGATTTTGTCTGCTGAAATACCAAGTATTAATAAATGGTG
HEVspike  CACCTTTTATTAATGATTTTGTCTGCTGAAATACCAAGTATTAATAAATGGTG
* * * * *

```

FIGURE 9 (Page 3 of 12)

```

BCVspike  ATTTAGGCACGGTTCCTGCTATTAATGATGATGCTTGTGATTTGATGATGATG
HCVspike  ATTTAGGCACGGTTCCTGCTATTAATGATGATGCTTGTGATTTGATGATGATG
CRCVspike  ATTTAGGCACGGTTCCTGCTATTAATGATGATGCTTGTGATTTGATGATGATG
HEVspike  ATTTAGGCACGTGCTGCTGCTATTAATGATGATGCTTGTGATTTGATGATGATG
* * * * *

BCVspike  CTTTGAATATGGGTTACACCTCTCACTTCAACCAATTTACTGCTTCAATCAAG
HCVspike  CTTTGAATATGGGTTACACCTCTCACTTCAACCAATTTACTGCTTCAATCAAG
CRCVspike  CTTTGAATATGGGTTACACCTCTCACTTCAACCAATTTACTGCTTCAATCAAG
HEVspike  CTTTGAATATGGGTTACACCTCTCACTTCAACCAATTTACTGCTTCAATCAAG
* * * * *

BCVspike  ATGGTGTATTTTAAATGCTGTTGATTTGATAGATGATTTTAAAGTGGATTAAGTGA
HCVspike  ATGGTGTATTTTAAATGCTGTTGATTTGATAGATGATTTTAAAGTGGATTAAGTGA
CRCVspike  ATGGTGTATTTTAAATGCTGTTGATTTGATAGATGATTTTAAAGTGGATTAAGTGA
HEVspike  ATGGTGTATTTTAAATGCTGTTGATTTGATAGATGATTTTAAAGTGGATTAAGTGA
* * * * *

BCVspike  AAACACTATCTATAGCAACCTACTGCTGTTTAAATGATTAACCGTTTACAGTCTCAGC
HCVspike  AAACACTATCTATAGCAACCTACTGCTGTTTAAATGATTAACCGTTTACAGTCTCAGC
CRCVspike  AAACACTATCTATAGCAACCTACTGCTGTTTAAATGATTAACCGTTTACAGTCTCAGC
HEVspike  AAACACTATCTATAGCAACCTACTGCTGTTTAAATGATTAACCGTTTACAGTCTCAGC
* * * * *

BCVspike  CAATTCAGATGTTTACCGAGTATACCTATCTTCCGATTTTAAATAGAGGCTTGGC
HCVspike  CAATTCAGATGTTTACCGAGTATACCTATCTTCCGATTTTAAATAGAGGCTTGGC
CRCVspike  CAATTCAGATGTTTACCGAGTATACCTATCTTCCGATTTTAAATAGAGGCTTGGC
HEVspike  CAATTCAGATGTTTACCGAGTATACCTATCTTCCGATTTTAAATAGAGGCTTGGC
* * * * *

BCVspike  TTAATGATAGTGGTCCCTTCCATTAATTTGGAACCTAAGACCTTTTCAATTTGTA
HCVspike  TTAATGATAGTGGTCCCTTCCATTAATTTGGAACCTAAGACCTTTTCAATTTGTA
CRCVspike  TTAATGATAGTGGTCCCTTCCATTAATTTGGAACCTAAGACCTTTTCAATTTGTA
HEVspike  TTAATGATAGTGGTCCCTTCCATTAATTTGGAACCTAAGACCTTTTCAATTTGTA
* * * * *

```

FIGURE 9 (Page 4 of 12)

```

BCVspike A1TTTAAATAGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGCAGACTCATTTACTGTATAATA
HCVspike ATTTTAAATAGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGCAGACTCATTTACTGTATAATA
CRCVspike ATTTTAAATAGAGCAGCTGATGCTTTTATTCAGCAGCTGATGCTTTACTGTATAATA
HEVspike A1TTTAAACAGGCGAGCTGATGCTTTTATTCAGCAGCTGATGCTTTTGGTGTACAAATA
*****
BCVspike TTGATGCAGCTAAGATATATGGATGCTTTTCCAGCATACCTATAGATAGTTTGCCTA
HCVspike TTGATGCCTAAGATATATGGATGCTTTTCCAGCATACCTATAGATAGTTTGCCTA
CRCVspike TTGATGCCTAAGATATACGATATGCTTTTCCAGCATACCTATAGATAGTTTGCCTA
HEVspike TTGATGCCTCGCTATATGGATGCTTTTGGTAGCACTACTATTGACAGTTTGCCTA
*****
BCVspike TACCAATGCTAGGAGGTTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTGCGACTTTTFA
HCVspike TACCAATGCTAGGAGGTTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTGCGACTTTTFA
CRCVspike TACCAATGCTAGGAGGTTGACCTACAATGGGCAATTTGGGCTATTGCGACTTTTFA
HEVspike TACCAATGCTAGGAGGTTGATCTGCAATGGGTAATCTGGTATTTCANCTTTTFA
*****
BCVspike ACTATAGAAATGATACCTACTGCTACAGTTGTCAGTTGATATAAATTTACTGCTGCTA
HCVspike ACTATAGAAATGATACCTACTGCTACAGTTGTCAGTTGATATAAATTTACTGCTGCTA
CRCVspike ACTATAGAAATGATACCTACTGCTACAGTTGTCAGTTGATATAAATTTACTGCTGCTA
HEVspike ATATATAGAAATGACCTACTGCTACAGTTGTCAGTTGATATAAATTTACTGCTGCGA
*****
BCVspike ATGTTCTCTAGCAGGTTTAACTCTTACTTGGAAAGGAGATTGGTTTACAGAAC
HCVspike ATGTTCTCTAGCAGGTTTAACTCTTACTTGGAAAGGAGATTGGTTTACAGAAC
CRCVspike ATGTTCTCTAGCAGGTTTAACTCTTACTTGGAAAGGAGATTGGTTTACAGAAC
HEVspike ACSTATCTGCACTCAATATAACTTCACTTGGAAAGGAGATTGGTTTATTT---T
*****
BCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACTGTAGGCTTTTACTGATCATGATGTTGTTATGAC
HCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACTGTAGGCTTTTACTGATCATGATGTTGTTATGAC
CRCVspike AATCTGTTTAAAGCCTCAACTGTAGGCTTTTACTGATCATGATGTTGTTATGAC
HEVspike AATCAGATTTGGTCCAG-----AGGC-CTT-----CATGATGCTATATTCAC
*****

```

FIGURE 9 (Page 5 of 12)

```

BCVspike AACATGTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGCTGCTAAATGGATGGGCTTTGGTGG
HCVspike AACATGTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGCTGCTAAATGGATGGGCTTTGGTGG
CRCVspike AACATGTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGCTGCTAAATGGATGGGCTTTGGTGG
HEVspike AGCAATGTTTAAAGCTCCCAAAATTTCTGCTGCTAAATGGATGGGCTTTGGTGG
*****
BCVspike TAGTATGTTGCTGCTGATAGATGCTGCTTATAAAATAGTGGATAGGCATGCTCCG
HCVspike TAGTATGTTGCTGCTGATAGATGCTGCTTATAAAATAGTGGATAGGCATGCTCCG
CRCVspike TAGTATGTTGCTGCTGATAGATGCTGCTTATAAAATAGTGGATAGGCATGCTCCG
HEVspike TAGTATGTTGCTGCTGATAGATGCTGCTTATAAAATAGTGGATAGGCATGCTCCG
*****
BCVspike CAGTACTAATATTTAACTGCTGCTAAATGCTGCCAATGTAATGTTGTCGACTCCAG
HCVspike CAGTACTAATATTTAACTGCTGCTAAATGCTGCCAATGTAATGTTGTCGACTCCAG
CRCVspike CAGTACTAATATTTAACTGCTGCTAAATGCTGCCAATGTAATGTTGTCGACTCCAG
HEVspike CTG---C-AGTAC--A-----AACGCTACTAGTACTGCTGCTGACCCAG
*****
BCVspike ACCCAATACATTAATCTACAGGCTTATAAGTGCCTCCCAAACTAAATATTTAGTGG
HCVspike ACCCAATACATTAATCTACAGGCTTATAAGTGCCTCCCAAACTAAATATTTAGTGG
CRCVspike ACCCAATACATTAATCTACAGGCTTATAAGTGCCTCCCAAACTAAATATTTAGTGG
HEVspike ATCCCTCCCAATATAAGGCTAAATGCTGCACTGCTGCCAATGTAATGTTTCTATAC
*****
BCVspike GCATAGGTGAGCAGCTGCTGGGCTGCTGCTATTAAGATGATTATGTTGAGGATTCCT
HCVspike GCATAGGTGAGCAGCTGCTGGGCTGCTGCTATTAAGATGATTATGTTGAGGATTCCT
CRCVspike GCATAGGTGAGCAGCTGCTGGGCTGCTGCTATTAAGATGATTATGTTGAGGATTCCT
HEVspike AACCAGGTGAGCAGCTGCTGGGCTGCTGCTATTAAGATGATTATGTTGAGGATTCCT
*****
BCVspike GTACTGCCAACCAAGCAATTTGGGTTGCTGCTGCTGCTGTTTACAGGGGATA
HCVspike GTACTGCCAACCAAGCAATTTGGGTTGCTGCTGCTGCTGTTTACAGGGGATA
CRCVspike GTACTGCCAACCAAGCAATTTGGGTTGCTGCTGCTGCTGTTTACAGGGGATA
HEVspike GCACCTGTAACCAAGCAATTTAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGTTTACAGGGGATA
*****

```

FIGURE 9 (Page 6 of 12)

```

BCVspike GGTAAATATCTTTGCTAATTTTAAATTTGCAATGATGTTAAAGTGTACTGTTCTA
HCVspike GGTAAATATTTTGGTAAATTTTAAATTTGCAATGATGTTAAAGTGTACTGTTCTA
CRCVspike GGTAAATATTTTGGTAAATTTTAAATTTGCAATGATGTTAAAGTGTACTGTTCTA
HEVspike GGTAAATATTTTGGTAAATTTTAAATTTGCAATGATGTTAAAGTGTACTGTTCTA
*****
BCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACAAATTTCTTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
HCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACAAATTTCTTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
CRCVspike CTGATTTACAAAATCAACACAGACAAATTTCTTGGTGTGTTGTTAATATGATCTTT
HEVspike CTGATTTACACAGGCTAATACTAATATTTACTGATGATGTTGTTAATATGATCTTT
*****
BCVspike ATGATATACAGGCAAGGATTTTGGTGGGTTAATGCGACTTAAATATAGTTGGC
HCVspike ATGATATACAGGCAAGGATTTTGGTGGGTTAATGCGACTTAAATATAGTTGGC
CRCVspike ATGATATACAGGCAAGGATTTTGGTGGGTTAATGCGACTTAAATATAGTTGGC
HEVspike ATGCGATACAGGCAAGGATTTTGGTGGGTTAATGCGACTTAAATATAGTTGGC
*****
BCVspike AGAACCTTTAATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTAGAGACTACTTAAACAA
HCVspike AGAACCTTTAATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTAGAGACTACTTAAACAA
CRCVspike AGAACCTTTAATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTAGAGACTACTTAAACAA
HEVspike AGAACCTTTAATATGATCTAATGGTAACTCTATGGTTTAGAGACTACTTAAACAA
*****
BCVspike GAACCTTTATGATTCGTATGCTATAGCGGCTGCTGTTTACAGCGGCTTTCACTAAT
HCVspike GAACCTTTATGATTCGTATGCTATAGCGGCTGCTGTTTACAGCGGCTTTCACTAAT
CRCVspike GAACCTTTATGATTCGTATGCTATAGCGGCTGCTGTTTACAGCGGCTTTCACTAAT
HEVspike GAACCTTTCTTATGCTATGCTATAGCGGCTGCTGTTTACAGCGGCTTTCACTAAT
*****
BCVspike CTTCCAGCAGCAATGCTATTTGGAAATATAAATGCAATACGTTTAAATATAC
HCVspike CTTCCAGCAGCAATGCTATTTGGAAATATAAATGCAATACGTTTAAATATAC
CRCVspike CTTCCAGCAGCAATGCTATTTGGAAATATAAATGCAATACGTTTAAATATAC
HEVspike CTTCCAGCAGCTTAAATGCTATTTGGAAATATAAATGCAATACGTTTAAATATAC
*****

```

FIGURE 9 (Page 7 of 12)

```

BCVspike TTTCAGCAGCTGCAACTAATTAATATTTTAAAGTGTACTGTTCTA
HCVspike TTTCAGCAGCTGCAACTAATTAATATTTTAAAGTGTACTGTTCTA
CRCVspike TTTCAGCAGCTGCAACTAATTAATATTTTAAAGTGTACTGTTCTA
HEVspike TTTCAGCAGCTGCAACTAATTAATATTTTAAAGTGTACTGTTCTA
*****
BCVspike CTGATAATGATCTTACTGCTGCTTCAACATGCTGCTCAGACTAGTGTACT
HCVspike CTGATAATGATCTTACTGCTGCTTCAACATGCTGCTCAGACTAGTGTACT
CRCVspike CTGATAATGATCTTACTGCTGCTTCAACATGCTGCTCAGACTAGTGTACT
HEVspike CTGATAATGATCTTACTGCTGCTTCAACATGCTGCTCAGACTAGTGTACT
*****
BCVspike GCTGGATTACTCTACAAAAGCAGGCTGATAGGACTTACCCTGTTATCGGTTTA
HCVspike GCTGGATTACTCTACAAAAGCAGGCTGATAGGACTTACCCTGTTATCGGTTTA
CRCVspike GCTGGATTACTCTACAAAAGCAGGCTGATAGGACTTACCCTGTTATCGGTTTA
HEVspike GCTGGATTACTCTACAAAAGCAGGCTGATAGGACTTACCCTGTTATCGGTTTA
*****
BCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAAATGATGTTTAGAACCTTAGTGGT
HCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAAATGATGTTTAGAACCTTAGTGGT
CRCVspike CTAAATTTGAGCCATTTACTGTTAATTCAGTAAATGATGTTTAGAACCTTAGTGGT
HEVspike CTAAATTTGAGCCATTTGCGCTAATTTGGTAAATGATGTTTAGAACCTTAGTGGT
*****
BCVspike TGTATGAAATCAAACTCAGAGTTTACTATAGTAAATAGGAGGTTTATCAAA
HCVspike TGTATGAAATCAAACTCAGAGTTTACTATAGTAAATAGGAGGTTTATCAAA
CRCVspike TGTATGAAATCAAACTCAGAGTTTACTATAGTAAATAGGAGGTTTATCAAA
HEVspike TGTATGAAATCAAACTCAGAGTTTACTATAGTAAATAGGAGGTTTATCAAA
*****
BCVspike TAGCCTCTCTAAAGTACTAATGATTTCTGCTTTTGTGTTGTTTATGAGCAT
HCVspike TAGCCTCTCTAAAGTACTAATGATTTCTGCTTTTGTGTTGTTTATGAGCAT
CRCVspike TAGCCTCTCTAAAGTACTAATGATTTCTGCTTTTGTGTTGTTTATGAGCAT
HEVspike TAGCCTCTCTAAAGTACTAATGATTTCTGCTTTTGTGTTGTTTATGAGCAT
*****

```

FIGURE 9 (Page 8 of 12)

BCVspike G2AAATCAGATGGTGGATATGGTAGTTCTGTGCAAAATTAATGCTATCTACAG  
 HCVspike G2AAATCAGATGGTGGATATGGTAGTTCTGTGCAAAATTAATGCTATCTACAG  
 CRVspike G2AAATCAGATGGTGGATATGGTAGTTCTGTGCAAAATTAATGCTATCTACAG  
 HEVspike GTAGCAGACGATGACGATGATGGTAGTTCTGTGCAAAATTAATGCTATCTACAG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike AAGTAAATGAACACTTGACACTACACAGTTCGAAAGTACGATAGTAAATGATGGTGG  
 HCVspike AAGTAAATGAACACTTGACACTACACAGTTCGAAAGTACGATAGTAAATGATGGTGG  
 CRVspike AAGTAAATGAACACTTGACACTACACAGTTCGAAAGTACGATAGTAAATGATGGTGG  
 HEVspike AAGTAAATGAACACTTGACACTACACAGTTCGAAAGTACGATAGTAAATGATGGTGG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 HCVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 CRVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 HEVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CCCCTGATAGTGGTGGTAAAGAGCGATGTAATAAAGTTCGAGTAGATCGCTATAG  
 HCVspike CCCCTGATAGTGGTGGTAAAGAGCGATGTAATAAAGTTCGAGTAGATCGCTATAG  
 CRVspike CCCCTGATAGTGGTGGTAAAGAGCGATGTAATAAAGTTCGAGTAGATCGCTATAG  
 HEVspike CCCCTGATAGTGGTGGTAAAGAGCGATGTAATAAAGTTCGAGTAGATCGCTATAG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTATCTGATGCGGTTTTGTGAGGCTTATAATA  
 HCVspike AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTATCTGATGCGGTTTTGTGAGGCTTATAATA  
 CRVspike AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTATCTGATGCGGTTTTGTGAGGCTTATAATA  
 HEVspike AGGATTTACTTTTTCTAAAGTAAAGTATCTGATGCGGTTTTGTGAGGCTTATAATA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike ATTGTACTGAGGTGGCGAAATTAGGACCTCAATTTGTGCAAAAGTATAATGGTATCA  
 HCVspike ATTGTACTGAGGTGGCGAAATTAGGACCTCAATTTGTGCAAAAGTATAATGGTATCA  
 CRVspike ATTGTACTGAGGTGGCGAAATTAGGACCTCAATTTGTGCAAAAGTATAATGGTATCA  
 HEVspike ACTGCACTGAGGTGGCGAAATTAGGACCTCAATTTGTGCAAAAGTATAATGGTATCA  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 9 (Page 9 of 12)

BCVspike AAGTGTTCCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCACCT  
 HCVspike AAGTGTTCCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCACCT  
 CRVspike AAGTGTTCCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCACCT  
 HEVspike AAGTGTTCCTCCACTACTCTCAGAAATCAGATCAGTGGATACACTTTGGCTGCACCT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CTGCTAGTCTGTTCCCTCTTGGTCCAGCAGCAGGCGTACCATTTTAAATGATTC  
 HCVspike CTGCTAGTCTGTTCCCTCTTGGTCCAGCAGCAGGCGTACCATTTTAAATGATTC  
 CRVspike CTGCTAGTCTGTTCCCTCTTGGTCCAGCAGCAGGCGTACCATTTTAAATGATTC  
 HEVspike CTGCTAGTCTGTTCCCTCTTGGTCCAGCAGCAGGCGTACCATTTTAAATGATTC  
 \* \* \* \* \*

BCVspike AGTATCGTAAATGAGGATGGTGTACCATGGATGTTCTAACTCAAAATCAAAAGCTTA  
 HCVspike AGTATCGTAAATGAGGATGGTGTACCATGGATGTTCTAACTCAAAATCAAAAGCTTA  
 CRVspike AGTATCGTAAATGAGGATGGTGTACCATGGATGTTCTAACTCAAAATCAAAAGCTTA  
 HEVspike AGTATCGTAAATGAGGATGGTGTACCATGGATGTTCTAACTCAAAATCAAAAGCTTA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TTGCTAATGCAATTAACAAATGCCCTTGTAGTCTATCAGGAGGTTTGTATGCTACCAAT  
 HCVspike TTGCTAATGCAATTAACAAATGCCCTTGTAGTCTATCAGGAGGTTTGTATGCTACCAAT  
 CRVspike TTGCTAATGCAATTAACAAATGCCCTTGTAGTCTATCAGGAGGTTTGTATGCTACCAAT  
 HEVspike TTGCTAATGCAATTAACAAATGCCCTTGTAGTCTATCAGGAGGTTTGTATGCTACCAAT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CTGCTTTAGTAAATCAAGCTGTGTTAATGCAAAATGCTGAGCTCTTAATCACTTAT  
 HCVspike CTGCTTTAGTAAATCAAGCTGTGTTAATGCAAAATGCTGAGCTCTTAATCACTTAT  
 CRVspike CTGCTTTAGTAAATCAAGCTGTGTTAATGCAAAATGCTGAGCTCTTAATCACTTAT  
 HEVspike CTGCTTTAGTAAATCAAGCTGTGTTAATGCAAAATGCTGAGCTCTTAATCACTTAT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TGCACCACTCTCTAATAGATTTGGTGTATAGTCTCTTCTTACAGAAATTTCTATCTA  
 HCVspike TGCACCACTCTCTAATAGATTTGGTGTATAGTCTCTTCTTACAGAAATTTCTATCTA  
 CRVspike TGCACCACTCTCTAATAGATTTGGTGTATAGTCTCTTCTTACAGAAATTTCTATCTA  
 HEVspike TGCACCACTCTCTAATAGATTTGGTGTATAGTCTCTTCTTACAGAAATTTCTATCTA  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 9 (Page 10 of 12)

BCVspike GACTGTATGCTCTTGAAGCGAAGCTCAGATAGACAGACTTAAATGAGGCGCTTACCG  
 HCVspike GACTGTATGCTCTTGAAGCGAAGCTCAGATAGACAGACTTAAATGAGGCGCTTACCG  
 CRVspike GACTGTATGCTCTTGAAGCGAAGCTCAGATAGACAGACTTAAATGAGGCGCTTACCG  
 HEVspike GACTGTATGCTCTTGAAGCGAAGCTCAGATAGACAGACTTAAATGAGGCGCTTACCG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CTCTTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTACTGATTTACACAGTAAATTTAGTGCAG  
 HCVspike CTCTTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTACTGATTTACACAGTAAATTTAGTGCAG  
 CRVspike CTCTTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTACTGATTTACACAGTAAATTTAGTGCAG  
 HEVspike CTCTTAATGCTTATGTTCTCAACAGCTTACTGATTTACACAGTAAATTTAGTGCAG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CACAGCTATGAGAGGTTAATGAAATGCTCAAAAGCCAAATCATAGGATAAATTTT  
 HCVspike CACAGCTATGAGAGGTTAATGAAATGCTCAAAAGCCAAATCATAGGATAAATTTT  
 CRVspike CACAGCTATGAGAGGTTAATGAAATGCTCAAAAGCCAAATCATAGGATAAATTTT  
 HEVspike CACAGCTATGAGAGGTTAATGAAATGCTCAAAAGCCAAATCATAGGATAAATTTT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike GTGGTAAAGTAAATCATATATATCATAGTGCAGATGCTCCATAGGTTTGTATTTA  
 HCVspike GTGGTAAAGTAAATCATATATATCATAGTGCAGATGCTCCATAGGTTTGTATTTA  
 CRVspike GTGGTAAAGTAAATCATATATATCATAGTGCAGATGCTCCATAGGTTTGTATTTA  
 HEVspike GTGGTAAAGTAAATCATATATATCATAGTGCAGATGCTCCATAGGTTTGTATTTA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 HCVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 CRVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 HEVspike TCACCTTAGCCTAAGCTTAAAGATGGGTTAAATTCAGTGTAGACGACATCAATTTT  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TTGCTGGTAAAGGATTAAGCCCTAAGAGTGGTAAATTTGTTAATGTAATTAACACT  
 HCVspike TTGCTGGTAAAGGATTAAGCCCTAAGAGTGGTAAATTTGTTAATGTAATTAACACT  
 CRVspike TTGCTGGTAAAGGATTAAGCCCTAAGAGTGGTAAATTTGTTAATGTAATTAACACT  
 HEVspike TTGCTGGTAAAGGATTAAGCCCTAAGAGTGGTAAATTTGTTAATGTAATTAACACT  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 9 (Page 11 of 12)

BCVspike GGATGTTCACTGGTACTGTTATTAACCTCAACCTAATGAAATTAATGTTGTG  
 HCVspike GGATGTTCACTGGTACTGTTATTAACCTCAACCTAATGAAATTAATGTTGTG  
 CRVspike GGATGTTCACTGGTACTGTTATTAACCTCAACCTAATGAAATTAATGTTGTG  
 HEVspike GGATGTTCACTGGTACTGTTATTAACCTCAACCTAATGAAATTAATGTTGTG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TTATGAGTACCTGTGCTTAACTAATCAAGCAGGATGAAATGCTGAACTTTCAA  
 HCVspike TTATGAGTACCTGTGCTTAACTAATCAAGCAGGATGAAATGCTGAACTTTCAA  
 CRVspike TTATGAGTACCTGTGCTTAACTAATCAAGCAGGATGAAATGCTGAACTTTCAA  
 HEVspike TTATGAGTACCTGTGCTTAACTAATCAAGCAGGATGAAATGCTGAACTTTCAA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAABCCAAACATCAG  
 HCVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAABCCAAACATCAG  
 CRVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAABCCAAACATCAG  
 HEVspike CACCCAACTCCCTGATTTTAAAGAGAGTGGATCAATGTTTAAABCCAAACATCAG  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TGGCCAGATTTGTCACTGATTAATAAATTTGATATCTTGGACCTCAAGATGAAA  
 HCVspike TGGCCAGATTTGTCACTGATTAATAAATTTGATATCTTGGACCTCAAGATGAAA  
 CRVspike TGGCCAGATTTGTCACTGATTAATAAATTTGATATCTTGGACCTCAAGATGAAA  
 HEVspike TGGCCAGATTTGTCACTGATTAATAAATTTGATATCTTGGACCTCAAGATGAAA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TGAATAGGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAGGACA  
 HCVspike TGAATAGGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAGGACA  
 CRVspike TGAATAGGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAGGACA  
 HEVspike TGAATAGGTTACAGAGGCAATAAAGTTTAAATCAGAGCTACATCAATCTCAGGACA  
 \* \* \* \* \*

BCVspike TTGGTACATATAGATTAATGTAATGAGGCTGTTAATGATAGGCTTTAATGGCTTG  
 HCVspike TTGGTACATATAGATTAATGTAATGAGGCTGTTAATGATAGGCTTTAATGGCTTG  
 CRVspike TTGGTACATATAGATTAATGTAATGAGGCTGTTAATGATAGGCTTTAATGGCTTG  
 HEVspike TTGGTACATATAGATTAATGTAATGAGGCTGTTAATGATAGGCTTTAATGGCTTG  
 \* \* \* \* \*

FIGURE 9 (Page 12 of 12)

```

BCVspike      CTGGGTAGCTATGCTTGTACTATCTCATATGCTGTGTACAGGATGCGGACTA
HCVspike      CTGGGTAGCTATGCTTGTACTATCTCATATGCTGTGTACAGGATGCGGACTA
CRCVspike     CTGGGTAGCTATGCTTGTACTATCTCATATGCTGTGTACAGGATGCGGACTA
HEVspike      CTGGGTAGCTATGCTTGTACTATCTCATATGCTGTGTACAGGATGCGGACTA
*****

BCVspike      GTGTTTTAAGAAATGCGTGGTGTGTGATGATTATAC-----
HCVspike      GTGTTTTAAGAAATGCGTGGTGTGTGATGATTATACGACACAGG-----
CRCVspike     GTGTTTTAAGAAATGCGTGGTGTGTGATGATTATACGACACAGG-----
HEVspike      GTGTTTTAAGAAATGCGTGGTGTGTGATGATTATACGACACAGGAGTTGTTAA
*****

BCVspike      -----
HCVspike      -----
CRCVspike     -----
HEVspike      TCARAACTTCACATGACGATTAATTTCCT

```

【 10 】

FIGURE 10 (Page 1 of 5)

```

BCVspikepro  ----MFLILLISLHMLAVIGDLKCTTVSINDVDGVPVSTDTVDVYVNGLGTYYVLDV
HCVspikepro  ----MFLILLISLPTAFVIGDLKCTTVSINDVDGVPVSTDTVDVYVNGLGTYYVLDV
CRCVspikepr  ----MFLILLISLMAFAVIGDLKCTTVSINDVDGVPVSTDTVDVYVNGLGTYYVLDV
HEVspikepro  ----MFLILLITLSEVAVIGDLKCTTVSINDVDGVPVSTDTVDVYVNGLGTYYVLDV
CECVspikepr  MIVLVITCILLCLSPHTASSTSNWDCRQVWVYQLDQNEILRIDLEQVFKKEGTVVVG--
:  * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  YLMTLLNGYPTSGSTRNMALKGLLLSLTLEWFKPFLSDFINCLPAKVKNTKVIKNG
HCVspikepro  YLMTLLNGYPTSGSTRNMALKGLLLSLTLEWFKPFLSDFINCLPAKVKNTKVIKNG
CRCVspikepr  YLMTLLNGYPTSGSTRNMALKGLLLSLTLEWFKPFLSDFINCLPAKVKNTKVIKNG
HEVspikepro  YLMTLLNGYPTSGSTRNMALKGLLLSLTLEWFKPFLSDFINCLPAKVKNTKVIKNG
CECVspikepr  YYPEVWYVNCSTRTATTAAYEFSMIAHAFIFDMEAMENSTGNAGKPLLHVHVGSEVS--V
* * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  VHYSEFPAITIGSTFVNTSYVVVQPHMTLNDKLGLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
HCVspikepro  VHYSEFPAITIGSTFVNTSYVVVQPHMTLNDKLGLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
CRCVspikepr  VHYSEFPAITIGSTFVNTSYVVVQPHMTLNDKLGLEISVCQYTMCEYPTICHFNL
HEVspikepro  VHYSEFPAITIGSTFVNTSYVVPKPTSFINGLQFLGIVSVCQYTMCEYPTICHFNL
CECVspikepr  IITYSRDDVQHRPLKMLKGLVCTESRNI DYN--SPTSSQWNSICTGNDRKIPFVIFPDN
: : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  GNRRIELNHDTCVSVCLYKRNFTYDWN----ADLYLHFYQEGGTFYAFYFDTGVVT
HCVspikepro  GNRRIELNHDTCVSVCLYKRNFTYDWN----ADLYLHFYQEGGTFYAFYFDTGVVT
CRCVspikepr  GNRRIELNHDTCVSVCLYKRNFTYDWN----ADLYLHFYQEGGTFYAFYFDTGVVT
HEVspikepro  GNRRIELNHDTCVSVCLYKRNFTYDWN----ADLYLHFYQEGGTFYAFYFDTGVVT
CECVspikepr  GTKLYGLEWDEFPVYVIGRSTYMNINWVFNWVILISRSSTATQBSAAVYVQGVSN
* * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  KFLNVLGTVLSHYWMP-----LTCNSAMTLEWVPLTSKQYLLAFNDQGVIF
HCVspikepro  KFLNVLGTVLSHYWMP-----LTCNSAMTLEWVPLTSKQYLLAFNDQGVIF
CRCVspikepr  KFLNVLGTVLSHYWMP-----LTCNSAMTLEWVPLTSKQYLLAFNDQGVIF
HEVspikepro  KFLNVLGTVLSHYWMP-----LTCNSAMTLEWVPLTSKQYLLAFNDQGVIF
CECVspikepr  FTYKLNWVNGLKTVECEYCTGYATNIPAFYVGGYVPGGFSFNWFLTNSSTFVS
: : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

```

FIGURE 10 (Page 2 of 5)

```

BCVspikepro  NAVDCKSDPMEIKCKTSLIAPSTGYELNGYVQPIADVYR--IENLFDCEIEMALNDK
HCVspikepro  NAVDCKSDPMEIKCKTSLIAPSTGYELNGYVQPIADVYR--IENLFDCEIEMALNDK
CRCVspikepr  NAVDCKSDPMEIKCKTSLIAPSTGYELNGYVQPIADVYR--IENLFDCEIEMALNDK
HEVspikepro  NAVDCKSDPMEIKCKTSLIAPSTGYELNGYVQPIADVYR--IENLFDCEIEMALNDK
CECVspikepr  GREVTNQLVWLCMLVPSFVGAAGQECFEGAGQFSQCGVFLNNTVDVIRFNLNFTADVQ
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  SVPSFLNWERKTFSNCFNMSLMSFIQADSFTCN----NIDAAKIYGMCFSSITIDK
HCVspikepro  SVPSFLNWERKTFSNCFNMSLMSFIQADSFTCN----NIDAAKIYGMCFSSITIDK
CRCVspikepr  SVPSFLNWERKTFSNCFNMSLMSFIQADSFTCN----NIDAAKIYGMCFSSITIDK
HEVspikepro  SVPSFLNWERKTFSNCFNMSLMSFIQADSFTCN----NIDAASRLYGMCFSSITIDK
CECVspikepr  SGMGAIVFSLNMTGGCILELSCINDIVSESSFYSYGEIPEFVDTGFRICVILNHTALKY
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  FAIPNGRKVDLQGLNGLYLSFNRYRIDTATSCQLYLNLPASN--VVSIRFNPSTWNRREF
HCVspikepro  FAIPNGRKVDLQGLNGLYLSFNRYRIDTATSCQLYLNLPASN--VVSIRFNPSTWNRREF
CRCVspikepr  FAIPNGRKVDLQGLNGLYLSFNRYRIDTATSCQLYLNLPASN--VVSIRFNPSTWNRREF
HEVspikepro  FAIPNGRKVDLQGLNGLYLSFNRYRIDTATSCQLYLNLPASN--VVSIRFNPSTWNRREF
CECVspikepr  FGTLEFSPKRIASKQGFQYINGYFNFSTFPIDCISFNLTIGSGAFWTAIATSYTALV
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  FTEQSVFKPQVGVFTHDQVYAQCHFKAPNFCPCKLDGSLCVGNGPFI DAGYKNSGIG
HCVspikepro  FTEQSVFKPQVGVFTHDQVYAQCHFKAPNFCPCKLDGSLCVGNGPFI DAGYKNSGIG
CRCVspikepr  FTEQSVFKPQVGVFTHDQVYAQCHFKAPNFCPCKLDGSLCVGNGPFI DAGYKNSGIG
HEVspikepro  FTEQSVFKPQVGVFTHDQVYAQCHFKAPNFCPCKLDGSLCVGNGPFI DAGYKNSGIG
CECVspikepr  QVENTAIKVVYCNSHINNIKSQLTANLQNGFYVASSVEGLVMSVWVLRFSYHSYV
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  TPCAGTYLTC-----NAAQCCLCTPDPIISKSTGPKYKQKYLVI GERCSGLAIKS
HCVspikepro  TPCAGTYLTC-----NAAQCCLCTPDPIISKSTGPKYKQKYLVI GERCSGLAIKS
CRCVspikepr  TPCAGTYLTC-----NAAQCCLCTPDPIISKSTGPKYKQKYLVI GERCSGLAIKS
HEVspikepro  TPCAGTYLTC-----NAAQCCLCTPDPIISKSTGPKYKQKYLVI GERCSGLAIKS
CECVspikepr  NITIDLGMKRSAGG--QPIASTLSNITLFDQNNVDVYICRSNGFSVYVASTCKSSLMON
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

```

FIGURE 10 (Page 3 of 5)

```

BCVspikepro  DYCQGNCTCQPPQAFIAGVSDCLQGRCN--IFANFILLDVSNTCTCDLQKSNFTDII
HCVspikepro  DYCQGNCTCQPPQAFIAGVSDCLQGRCN--IFANFILLDVSNTCTCDLQKSNFTDII
CRCVspikepr  DYCQGNCTCQPPQAFIAGVSDCLQGRCN--IFANFILLDVSNTCTCDLQKSNFTDII
HEVspikepro  DYCQGNCTCQPPQAFIAGVSDCLQGRCN--IFANFILLDVSNTCTCDLQKSNFTDII
CECVspikepr  NENQDCDVLVATAVITKTCGPFSDKANVITFKMLCLNLTGAMCKPVAARATPNE
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  LGVCVNYDLGIGTGGIFVEVNATYNSQNLVYDSNGLYFRDYLTNRTEMRISCSYG
HCVspikepro  LGVCVNYDLGIGTGGIFVEVNATYNSQNLVYDSNGLYFRDYLTNRTEMRISCSYG
CRCVspikepr  LGVCVNYDLGIGTGGIFVEVNATYNSQNLVYDSNGLYFRDYLTNRTEMRISCSYG
HEVspikepro  LGVCVNYDLGIGTGGIFVEVNATYNSQNLVYDSNGLYFRDYLTNRTEMRISCSYG
CECVspikepr  QVRSVLYVYSEGDWVGVFSDNSGLDLSVHLSDCTDYN--IIRGTGVLIRQNTST
* * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  RVSAFVHNSSEFALLFRNICKNYFNNTLSRQLQPLINVEDYLGCVNADNSTSSAVOT
HCVspikepro  RVSAFVHNSSEFALLFRNICKNYFNNTLSRQLQPLINVEDYLGCVNADNSTSSAVOT
CRCVspikepr  RVSAFVHNSSEFALLFRNICKNYFNNTLSRQLQPLINVEDYLGCVNADNSTSSAVOT
HEVspikepro  RVSAFVHNSSEFALLFRNICKNYFNNTLSRQLQPLINVEDYLGCVNADNSTSSAVOT
CECVspikepr  ILSGLHYTSLSGDLGFRVSDGVVYVTPCVDSQAARVLDGAVGAMTSINSELLGLTH
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  CDLTVGSGYCVDYSTRKRSRAITIGRFTNFPPTVNS-----VNSD
HCVspikepro  CDLTVGSGYCVDYSTRKRSRAITIGRFTNFPPTVNS-----VNSD
CRCVspikepr  CDLTVGSGYCVDYSTRKRSRAITIGRFTNFPPTVNS-----VNSD
HEVspikepro  CDLTVGSGYCVDYSTRKRSRAITIGRFTNFPPTVNS-----VNSD
CECVspikepr  WTTTFNYYYSIYHTNERTRGTAIGSDWVDCPEIITYSNIGVCKNGALVFNVTBSGDG
* * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

BCVspikepro  LEPVGGLEYIQIPSEFTIGNMEEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEGSECDN
HCVspikepro  LEPVGGLEYIQIPSEFTIGNMEEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEGSECDN
CRCVspikepr  LEPVGGLEYIQIPSEFTIGNMEEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEGSECDN
HEVspikepro  LEPVGGLEYIQIPSEFTIGNMEEFIQSSPKVTIDCSAFVCGDYAACKSQLVEGSECDN
CECVspikepr  VQFIS--TGNVTPITNFTSYVQVYIQWYTFVSDICSRVFCNGFRNCKLLQVVSACQT
: : : * * * * : : : * * : : : * * : : : * * * :

```

FIGURE 10 (Page 4 of 5)

```

BCVspi kepro      INAILTEVNELEDDTTLQVANSLSMNGVTLSTKLDGKGFNFVDDIN-----FSPVL
HCVspi kepro      INAILTEVNELEDDTTLQVANSLSMNGVTLSTKLDGKGFNFVDDIN-----FSPVL
CRCVspi kepro      INAILTEVNELEDDTTLQVANSLSMNGVTLSTKLDGKGFNFVDDIN-----FSPVL
HEVspi kepro      INAILTEVNELEDDTTLQVANSLSMNGVTLSTKLDGKGFNFVDDIN-----FSSVL
CECVspi kepro      IEDALMASASLEHMEZVSMILFVSENAKLSAFAFNSTHLOPIYKFNWIGGSWLGGLK
*: * . * : . : * . : * : . : * : * . : . : * : . : . :
                                     887

BCVspi kepro      GCLGSDCNKVSRSRAIEDLLFSKVKLSDVG-FVEAYNCTGGAEIRDLICVQSYNGIKVL
HCVspi kepro      GCLGSDCNKVSRSRAIEDLLFSKVKLSDVG-FVEAYNCTGGAEIRDLICVQSYNGIKVL
CRCVspi kepro      GCLGSDCNKVSRSRAIEDLLFSKVKLSDVG-FVDAYNCTGGAEIRDLICVQSYNGIKVL
HEVspi kepro      GCLGSECNKRASRSRAIEDLLFSKVKLSDVG-FVQAYNCTGGAEIRDLICVQSYNGIKVL
CECVspi kepro      DILFPHNSKRRYSRAIEDLLFHKVVTSGIGTVEDEYKRCCTGGYDIALVCAQYNGIMVL
. * . : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     933
                                     977
                                     1011 1028

BCVspi kepro      PELLSENQISGYTLAATASLFFPPSS-AAAGVPEYLANVQYRINGIVTHDVLSONQKLI
HCVspi kepro      PELLSENQISGYTLAATASLFFPPSS-AAAGVPEYLANVQYRINGIVTHDVLSONQKLI
CRCVspi kepro      PELLSENQISGYTLAATASLFFPPSS-AAAGVPEYLANVQYRINGIVTHDVLSONQKLI
HEVspi kepro      PELLSENQISGYTLAATASLFFPPSS-AAAGVPEYLANVQYRINGIVTHDVLSONQKLI
CECVspi kepro      PCVANDDKMTMYTASLAGGALGALGGGVAIFFAVAVQARLNVAALQTVLKNQOILA
* . . : : : * * : . : . : * . : * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1063

BCVspi kepro      NAFNNALDAIQEGFDATN-----SALVKIQAVVNAEAALNLLQQLSNRF
HCVspi kepro      NAFNNALDAIQEGFDATN-----SALVKIQAVVNAEAALNLLQQLSNRF
CRCVspi kepro      NAFNNALDAIQEGFDATN-----SALVKIQAVVNAEAALNLLQQLSNRF
HEVspi kepro      NAFNNALDAIQEGFDATN-----SALVKIQAVVNAEAALNLLQQLSNRF
CECVspi kepro      NAFNNALDAIQEGFDATN-----SALVKIQAVVNAEAALNLLQQLSNRF
* . * . : * * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1063

BCVspi kepro      GAISSSLQELSRDLAERQAQIDRLINGRLTALNAVVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVN
HCVspi kepro      GAISSSLQELSRDLAERQAQIDRLINGRLTALNAVVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVN
CRCVspi kepro      GAISSSLQELSRDLAERQAQIDRLINGRLTALNAVVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVN
HEVspi kepro      GAISSSLQELSRDLAERQAQIDRLINGRLTALNAVVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVN
CECVspi kepro      DAISSSISDIYMRDLAERQAQIDRLINGRLTALNAVVSQQLSDSTLVKFSAAQAMEKVN
* . * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURE 10 (Page 5 of 5)

```

BCVspi kepro      ECVKSQSSSRINFCNGNHIISLVQNAFYGLYFHFVYVPTKYVTAKVSPLGLIAGDRGIA
HCVspi kepro      ECVKSQSSSRINFCNGNHIISLVQNAFYGLYFHFVYVPTKYVTAKVSPLGLIAGDRGIA
CRCVspi kepro      ECVKSQSSSRINFCNGNHIISLVQNAFYGLYFHFVYVPTKYVTAKVSPLGLIAGDRGIA
HEVspi kepro      ECVKSQSSSRINFCNGNHIISLVQNAFYGLYFHFVYVPTKYVTAKVSPLGLIAGDRGIA
CECVspi kepro      ECVKSQSSSRINFCNGNHIISLVQNAFYGLYFHFVYVPTKYVTAKVSPLGLIAGDRGIA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1256
                                     1257

BCVspi kepro      NLPDFKEELQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEN-----RLQE
HCVspi kepro      NLPDFKEELQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEN-----RLQE
CRCVspi kepro      NLPDFKEELQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEN-----RLQE
HEVspi kepro      NLPDFKEELQWFKNQTS--VAPDLSLDYINVTFLDLQDEN-----RLQE
CECVspi kepro      DYIDINQTDILENYRKNATVPELIDIPATYLYQRRASDQVQEGCDLVFNATYIDLFSITP
: * : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1256
                                     1257

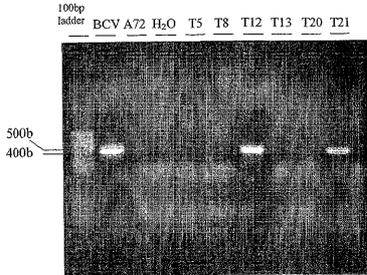
BCVspi kepro      AIKVLNQSYINLADIGTYEYVKNWYVWLLIGLAGVAMLLFFICCCSTGCTSCFKKC
HCVspi kepro      AIKVLNQSYINLADIGTYEYVKNWYVWLLIGLAGVAMLLFFICCCSTGCTSCFKKC
CRCVspi kepro      AIKVLNHSYINLADIGTYEYVKNWYVWLLIGLAGVAMLLFFICCCSTGCTSCFKKC
HEVspi kepro      AIKVLNHSYINLADIGTYEYVKNWYVWLLIGLAGVAMLLFFICCCSTGCTSCFKKC
CECVspi kepro      LIDMHNLLVNLSEMRNRTVYVKNWYVWLLIGLAGVAMLLFFICCCSTGCTSCFKKC
* . : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                     1256
                                     1257

BCVspi kepro      GGCCDDYTGQELVIRKTSDD-----
HCVspi kepro      GGCCDDYTGQELVIRKTSDD-----
CRCVspi kepro      GGCCDDYTGQELVIRKTSDD-----
HEVspi kepro      GGCCDDYTGQELVIRKTSDD-----
CECVspi kepro      GSCHSICSRQFENYEPTEKRVVH-----
* . * . : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

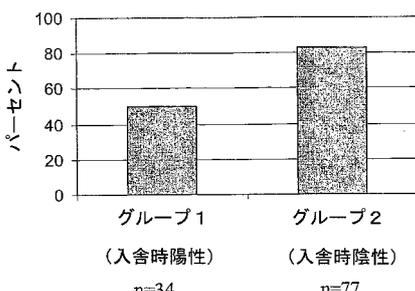
【 図 1 1 】

FIGURE 11



【 図 1 2 】

図 1 2



【 図 1 3 】

FIGURE 13

```

TATCCAGCC TTACTTTTGT TARIQTAGCA TATGTTTATA ATGGCCTGCA CAACATTCACA 60
GCCTTTTGT AATCTGTAG TTAGTCTTCT AATACCCCG CATATATAGC TCCGTAAGCT 120
AATTTTGGG ATATATTATA TTAGGTTGAA GCTGATTTCT ATTGTACAG TTGTGACGAG 180
TATAZGTAC CACTTGTAT TTTTACCGC AGTTTTCT CGAATACAA GTATTAAGAT 240
GATAGCAAT ATATTTTAA TARAQCACT GGTGTATT ATGGTTTCAA TCTACGARA 300
ACCTTACCA CTGTTTTGA TTTTATTGT CATATATAC TTTTACCCG TGGTAATTAT 360
TTGGCATT CAAKAGACT ATTTTAACT GTTCTACGA ANGCAATCG TCTTAATAG 420
CGDAGGATT TTACCCCTG ACAGGTGTT GACTCCGGT GGAACATGC CAGGCAGCT 480
GATAACATGA CCGCCG

```

【 図 1 4 】

FIGURE 14

```

YRSLPFVNP YYNGSAQST ALCKSSGLVL NNPAYIARA NFDXYKVE ADFLSCGDE 60
YIVPLIFNG KFLSNTRYD DSQYFNKDT GVIYGFNSTE TINIGFDENC HYLLEPSGNY 120
LAISNELLT VPKAICLAK RKDFTVQVQ DSRWRNAGS DNMTA 165

```

【 15 】

FIGURE 15 (Page 1 of 2)

```

CRCV TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGACCAATGTTTAAATGGCTCTGCACAATCTACA
BCV TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGACCAATGTTTAAATGGCTCTGCACAATCTACA
OC43 TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGACCAATGTTTAAATGGCTCTGCACAATCTACA
HECV TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGACCAATGTTTAAATGGCTCTGCACAATCTACA
HEV TATCGCAGCCTTACTTTTGTAAATGACCAATGTTTAAATGGCTCTGCACAATCTACA
*****

CRCV GCTCTTTGAAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAGCT
BCV GCTCTTTGAAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAGCT
OC43 GCTCTTTGAAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAGCT
HECV GCTCTTTGAAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAGCT
HEV GCTCTTTGAAATCTGGTAGTTTGTCTTAAATACCCCTGCATATATAGCTCTGTGAGCT
*****

CRCV AATTTGGGGATTAATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTATTTGTCAGGTGTGACGAG
BCV AATTTGGGGATTAATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTATTTGTCAGGTGTGACGAG
OC43 AATTTGGGGATTAATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTATTTGTCAGGTGTGACGAG
HECV AATTTGGGGATTAATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTATTTGTCAGGTGTGACGAG
HEV AATTTGGGGATTAATATATAAGGTTGAAGCTGATTTCTATTTGTCAGGTGTGACGAG
*****

CRCV TATATCGTACCATTGTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCGAATACAAAGTATATGAT
BCV TATATCGTACCATTGTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCGAATACAAAGTATATGAT
OC43 TATATCGTACCATTGTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCGAATACAAAGTATATGAT
HECV TATATCGTACCATTGTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCGAATACAAAGTATATGAT
HEV TATATCGTACCATTGTATTTTAAAGGCAAGTTTGTGCGAATACAAAGTATATGAT
*****

CRCV GATAGTCAATATTAATTAATAAGACACTGGTGTATTTAATGGTCAATTTACTGAA
BCV GATAGTCAATATTAATTAATAAGACACTGGTGTATTTAATGGTCAATTTACTGAA
OC43 GATAGTCAATATTAATTAATAAGACACTGGTGTATTTAATGGTCAATTTACTGAA
HECV GATAGTCAATATTAATTAATAAGACACTGGTGTATTTAATGGTCAATTTACTGAA
HEV GATAGTCAATATTAATTAATAAGACACTGGTGTATTTAATGGTCAATTTACTGAA
*****

CRCV ACCATTACCACTGGTTTGAATTTAATTTGTCATTTACTTTTACCCCTGGAATATAT
BCV ACCATTACCACTGGTTTGAATTTAATTTGTCATTTACTTTTACCCCTGGAATATAT
OC43 ACCATTACCACTGGTTTGAATTTAATTTGTCATTTACTTTTACCCCTGGAATATAT
HECV ACCATTACCACTGGTTTGAATTTAATTTGTCATTTACTTTTACCCCTGGAATATAT
HEV ACCATTACCACTGGTTTGAATTTAATTTGTCATTTACTTTTACCCCTGGAATATAT
*****

CRCV TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
BCV TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
OC43 TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
HECV TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
HEV TTAGCCATTTCAAATGAGCTATTGTTACTGTCTTACGAAAGCAATCTGCTTAAATAG
*****

```

(Page 2 of 2)

```

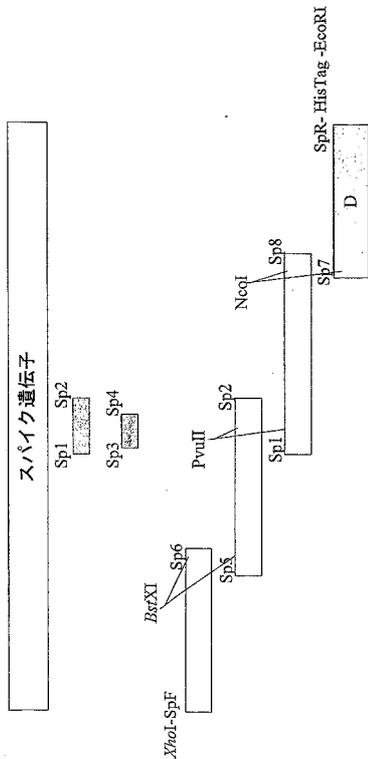
CRCV CGTAAAGATTTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGTGGAAACAATGCCAGGAGTCT
BCV CGTAAAGATTTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGTGGAAACAATGCCAGGAGTCT
OC43 CGTAAAGATTTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGTGGAAACAATGCCAGGAGTCT
HECV CGTAAAGATTTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGTGGAAACAATGCCAGGAGTCT
HEV CGTAAAGATTTTACGCTGTACAGGTTGTTGACTCGCGTGGAAACAATGCCAGGAGTCT
*****

CRCV GATAACATGACGCGGCT
BCV GATAACATGACGCGGCT
OC43 GATAACATGACGCGGCT
HECV GATAACATGACGCGGCT
HEV GATAACATGACGCGGCT
*****

```

【 18 】

図 18



【 16 】

FIGURE 16

```

CRCV YRSLTFVNVVYVYNGSAQTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYKVEADFLSGCDE
BCV YRSLTFVNVVYVYNGSAQTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYKVEADFLSGCDE
OC43 YRSLTFVNVVYVYNGSAQTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYKVEADFLSGCDE
HECV YRSLTFVNVVYVYNGSAQTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYKVEADFLSGCDE
HEV YRSLTFVNVVYVYNGSAQTALCKSGSLVNNPAYIAREANFGDYKVEADFLSGCDE
*****

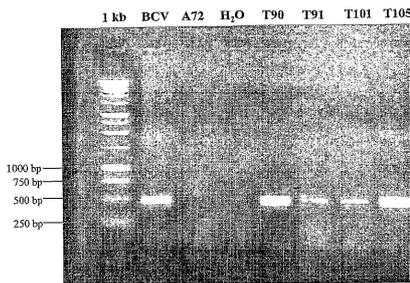
CRCV YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFNKDTGVIYGLNSTETITGDFNCHYLLPSGNY
BCV YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFNKDTGVIYGLNSTETITGDFNCHYLLPSGNY
OC43 YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFNKDTGVIYGLNSTETITGDFNCHYLLPSGNY
HECV YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFNKDTGVIYGLNSTETITGDFNCHYLLPSGNY
HEV YIVPLCIFNGKFLSNKYDDSQYFNKDTGVIYGLNSTETITGDFNCHYLLPSGNY
*****

CRCV LAISNELLLVPTKAIKLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
BCV LAISNELLLVPTKAIKLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
OC43 LAISNELLLVPTKAIKLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HECV LAISNELLLVPTKAIKLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
HEV LAISNELLLVPTKAIKLNKRKDFTPVQVDSRWNNARQSDNMTA
*****

```

【 17 】

FIGURE 17



【配列表】

0004644486000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 Q	1/28 (2006.01)	C 1 2 Q	1/28
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 Q	1/70 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569 L
A 6 1 K	39/215 (2006.01)	A 6 1 K	39/215
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14

- (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
- (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

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 Virology, 1991, Vol.183, p.397-404  
Virology, 1991年, vol.183, p.397-404

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
- C12N 15/00-15/90
  - C07K 14/00-14/825
  - CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
  - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
  - GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
  - UniProt/GeneSeq

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="#">JP4644486B2</a>	公开(公告)日	2011-03-02
申请号	JP2004523905	申请日	2003-07-01
申请(专利权)人(译)	英国皇家学院Veterineri		
当前申请(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	C12N15/09 C07K14/165 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/28 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/215 A61P11/00 A61P31/14 A61K38/00 A61K39 /155 A61K39/235 A61K39/245 A61P31/12 A61P31/20 A61P37/04 A61P43/00 C07K1/22 C12N9/12 C12N9/16 C12N15/02 C12N15/50 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/525 A61P11/00 C07K14/005 C12N2710/14143 C12N2770/20022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/165 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02. C C12Q1/28 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.D G01N33/569.L A61K39/215 A61P11/00 A61P31/14		
优先权	2002017434 2002-07-27 GB		
其他公开文献	JP2005533513A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

犬呼吸道冠状病毒 (CRCV) 存在于患有犬传染性呼吸道疾病的犬的呼吸道中, 与犬肠道冠状病毒的同源性较低, 但所有牛冠状病毒株均存在与 (例如魁北克和LY138) 和人冠状病毒株OC43具有高度同源性的那些。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。

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