

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4866848号  
(P4866848)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A
<b>C O 7 K</b>	<b>7/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 7/08 Z N A
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 M 1/34 F
<b>G O 1 N</b>	<b>33/569</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/569 H
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 N

請求項の数 22 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2007-519193 (P2007-519193)
(86) (22) 出願日	平成17年3月10日 (2005.3.10)
(65) 公表番号	特表2008-509091 (P2008-509091A)
(43) 公表日	平成20年3月27日 (2008.3.27)
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/007860
(87) 国際公開番号	W02006/011920
(87) 国際公開日	平成18年2月2日 (2006.2.2)
審査請求日	平成19年1月24日 (2007.1.24)
(31) 優先権主張番号	60/584,599
(32) 優先日	平成16年6月30日 (2004.6.30)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	300004500 アイデックス ラボラトリーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブルック アイデックス ドライブ ワン
(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(74) 代理人	100106840 弁理士 森田 耕司
(74) 代理人	100105991 弁理士 田中 玲子
(74) 代理人	100114465 弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネコ免疫不全ウイルス (F I V) の E N V タンパク質の V 3 領域に由来するペプチドの使用を含む F I V を検出するための方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドを含む、FIVに自然感染した動物とFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種された動物とを鑑別するためのキット。

【請求項 2】

FIVに自然感染した動物とFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種された動物とを鑑別する方法であって、

動物からの生体サンプルを配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドと接触させ、

サンプル中のFIV抗体が特異的にポリペプチドに結合するか否かを検出し、

サンプル中の抗体がFIVポリペプチドに特異的に結合することによりその動物が自然感染していると判定し、サンプル中の抗体がFIVポリペプチドに特異的に結合しないことを検出することによりその動物がワクチンを接種されているかまたは未感染であると判定する、

ことを含む方法。

【請求項 3】

生体サンプルは過去約12週間以内に死滅物全体FIVワクチンを接種されていない動物から得られたものである、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

ネコが死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあるのか、またはFIVに自然感染しているのかを判定する方法であって、

- (a) ワクチン接種後、死滅物全体FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体がネコから排除されるのに十分な期間が過ぎる前に、ネコが配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドに対する抗体を有するか否かを検出し、
  - (b) ワクチン接種後、死滅物全体FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体がネコから排除されるのに十分な期間が過ぎた後に、ネコがFIVポリペプチドに対する抗体を持っているかを検出し、
  - (c) ステップaで抗体を検出するが、ステップbで検出しないことにより、ネコが成功裏にワクチン接種されていると判定し、そして
  - (d) ステップaおよびステップbで抗体を検出することにより、ネコが自然感染していると判定する、
- ことを含む方法。

10

【請求項5】

ネコがFIVに感染したことがないかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあるのかを判定する方法であって、  
ネコの生体サンプルを分析して、配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドに対する抗体が存在するか否かを検出し、  
そのような抗体がないと判定することにより動物が感染したことがないかまたはワクチンを接種されたことがあると判定する、

20

【請求項6】

ネコが死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあるか否か、またはFIVに自然感染しているか否かを判定する方法であって、  
配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドを含む試験装置を用意し、  
ネコから生体サンプルを採取し、  
サンプルがポリペプチドと接触するように試験装置上に生体サンプルを流し、そして  
試験装置の結果を読み取り、ここで陽性の結果はネコがFIVに自然感染したことがあるかまたは過去12週間以内にワクチンを接種されたことがあることを示し、陰性の結果はネコがFIVに自然感染したことがなくかつ過去12週間以内にワクチンを接種されたことがないことを示す、

30

【請求項7】

自然にFIV感染しているかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあることが疑われる動物から得られた生体サンプル中のFIVポリペプチドの由来を判定する方法であって、  
過去約12週間以内に死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがない動物から生体サンプルを取得し、そして  
動物から得られた生体サンプルを、

- (a) 死滅物全体FIVワクチンに対する動物の抗体反応の重要な要素に特異的に結合する第1のポリペプチド；および
- (b) 配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチド

と接触させ、  
サンプル中の抗体が特異的に一方または両方のポリペプチドに結合するかを検出し、そして  
抗体が特異的に(a)および(b)の両方のペプチドに結合したとき動物が自然感染していると判定し、抗体が(a)のペプチドのみに結合したとき動物がワクチンを接種されたことがあると判定する、

ことを含む方法。

40

50

## 【請求項 8】

第 1 のポリペプチドはFIVp15を含む，請求項7記載の方法。

## 【請求項 9】

第 1 のポリペプチドはFIVp24を含む，請求項7記載の方法。

## 【請求項 10】

FIVに自然感染した動物とFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種された動物とを鑑別するための診断装置であって、

乾燥した多孔質キャリアー；

多孔質キャリアー上に固定化された第 1 の検出試薬であって，前記第 1 の検出試薬はFIVの自然感染または死滅物全体FIVワクチン接種に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するタンパク質を含み，および

多孔質キャリアー上に固定化された第 2 の検出試薬であって，前記第 2 の検出試薬は配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドを含む，を含む診断装置。

10

## 【請求項 11】

第 1 の検出試薬はFIV p15を含む，請求項10記載の診断装置。

## 【請求項 12】

第 1 の検出試薬はFIV p24を含む，請求項10記載の診断装置。

## 【請求項 13】

ネコが死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあるか，FIVに自然感染しているかを判定する方法であって，生体サンプルを請求項10記載の診断装置と接触させ，サンプル中の抗体が第 1 の検出試薬と第 2 の検出試薬の一方または両方と特異的に結合するか否かを検出する，ことを含む方法。

20

## 【請求項 14】

FIVに自然感染した動物とFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種された動物とを鑑別するための診断装置であって、

第 1 の検出試薬が固定化された第 1 の多孔質キャリアーであって，前記第 1 の検出試薬はFIVの自然感染または死滅物全体FIVワクチン接種に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するポリペプチドを含み，

第 2 の検出試薬が固定化された第 2 の多孔質キャリアーであって，前記第 2 の検出試薬は配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドを含む，を含む診断装置。

30

## 【請求項 15】

第 1 の検出試薬はFIV p15を含む，請求項14記載の診断装置。

## 【請求項 16】

第 1 の検出試薬はFIV p24を含む，請求項14記載の診断装置。

## 【請求項 17】

FIVに自然感染したネコとFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種されたネコとを鑑別する方法であって，

配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペプチドを用意し，

過去約12週間以内に死滅物全体FIVワクチンを接種されていないネコから得た生体サンプルをポリペプチドと接触させて，ポリペプチド/抗体複合体を形成し，

そして

ポリペプチド/抗体複合体が存在するかないかを判定し，ここで，複合体が存在することは自然感染を表し，複合体が存在しないことはワクチンを接種されているか未感染のいずれかを表す，

40

ことを含む方法。

## 【請求項 18】

ネコが死滅物全体FIVワクチンを接種されたことがあるかまたはFIVに自然感染したかを判定する方法であって，配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択されるポリペ

50

チドに対するネコの免疫反応を判定することを含む方法。

【請求項 19】

FIVに自然感染したネコとFIVに未感染であるかまたは死滅物全体FIVワクチンを接種されたネコとを鑑別するためのキットの製造におけるFIV envに由来するポリペプチドの使用であって、ポリペプチドは配列番号:1および配列番号:2からなる群から選択される、該使用。

【請求項 20】

該方法がネコがFIVに感染したことがあるか否かを判定することをさらに含む、請求項19記載の使用。

【請求項 21】

ポリペプチドは抗原性断片およびその機能的同等物を含む、請求項1記載のキット。

【請求項 22】

ポリペプチドは前記アミノ酸配列に融合された追加のポリペプチドを含む融合タンパク質の形であるかまたはキャリアタンパク質またはキャリアポリペプチドと結合している、請求項1記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願との相互参照

本出願は、2004年6月30日に出願された米国特許仮出願60/584,599に基づく優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明はネコ免疫不全ウイルスに対する抗体の検出に関するものである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

従来は、ネコTリンパ球レンチウイルスと呼ばれていたネコ免疫不全ウイルス(FIV)は、1986年にカリフォルニア州ペタルマ(Petaluma)の大きな飼いネコ集団から初めて発見された(Pederson et al., Science (1987) 235: 790)。ネコがFIVに感染するとエイズ様症候群を呈する。FIVは形態的および病理学的にヒト免疫不全ウイルス(HIV)と似ているが、抗原性ではHIVと明確に区別される。HIVと同様、ネコが一旦FIVに感染すると。初期感染期(ウイルス血症、発熱、一般的なリンパ節炎)から長期の無症候期を経てCD4リンパ球の減少による極めて難治性の免疫機能障害が出現し、二次感染を併発して遂には死に至る。

【0004】

FIVはレトロウイルス科レンチウイルス亜科に分類される。レトロウイルス科にはヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス、ヒツジのマエディ・ビスナ・ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)が含まれる。FIVのゲノムは他のレンチウイルスと同様に、gag, polおよびenvに対応する3つの長いオープン・リーディング・フレームを有する構造をしている(Talbott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86: 5743; Olmsted et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86: 2448)。gag遺伝子はウイルスの主要な構造要素、env遺伝子はエンペローブの糖タンパク質、pol遺伝子はポリメラーゼ・タンパク質をコードしている。

【0005】

gag遺伝子からは55kDのポリタンパク質が発現し、これはプロセッシングされてp15マトリックス・タンパク質、p24カプシド・タンパク質、p10核カプシド・タンパク質の3つのサブユニットとなる。pol遺伝子は、プロテアーゼ、逆転写酵素、それに機能不明のp14.6タンパク質の3つのタンパク質をコードしている。この遺伝子のプロテアーゼ部分の自動プロセッシングにより、pol領域の3つのタンパク質すべての産生が増加する。さらに、このプ

10

20

30

40

50

ロテアーゼはgag前駆物質のプロセッシングにも重要な働きをする。pol遺伝子はgag-pol融合タンパク質として発現する。エンペローブ遺伝子は160 kDの糖タンパク質gp160として発現する。FIVコア・タンパク質の抗原性は他のレンチウイルスとよく似ている。

#### 【0006】

世界中でいくつかのウイルス株が分離され、ウイルスの構造を決定するためいくつかの独立した研究が実施されてきた。用いられた分離株は米国のペタルマ株 (Talbot et al. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 5743-5747; Philipps et al., J. Virol., 1990, 64, 10, 4605-4613), 日本のTM1株とTM2株 (Miyazawa et al., Arch.Virol., 1989, 108, 59-68), スイスのFIVZ1株とFIVZ2株 (Morikawa et al., Virus Research, 1991, 21, 53-63) である。

10

#### 【0007】

米国のFIV分離株 (ペタルマ株) から得られた3つのプロウイルス・クローン (FIV34TF10, FIV14, 分離PPRの各クローン) のヌクレオチド配列が誌上発表され (Olmsted, et al. 1989; Philipps et al., 1990; Talbot et al., 1989), 2つのスイス株と比較されている (Morikawa et al. 1991)。Morikawaらは、この比較研究により、FIVのenv遺伝子にはいくつかの不変領域と可変領域が存在することを明らかにした。フランス株 (Wo株とMe株) も分離されている (Morailon et al., 1992, Vet. Mic., 31, 41-45)。

#### 【0008】

このウイルスは、最適には、血液中の単核球の中で複製されて増殖し、Tリンパ球、腹水マクロファージ、脳マクロファージ、星状膠細胞に対する指向性がある。他のレトロウイルスで一般的なように、FIVの遺伝子物質はRNAであり、ウイルスRNAからDNAコピーを産生する過程は宿主中でFIVが複製するために必要不可欠なステップである。このステップには侵入したウイルスが宿主に持ち込んだ逆転写酵素が必要である。ウイルスゲノムのDNAが感染宿主細胞の遺伝物質の中に挿入され、ここでウイルスはプロウイルスの形で住み続ける。このプロウイルスは、細胞が分裂するたびに複製され、新しいウイルス粒子を産生することができる。FIVに感染した細胞は死ぬまで感染したままである。

20

#### 【0009】

感染したネコの唾液には相当量のウイルスが存在することから (Yamamoto et al., Am. J. Vet. Res. 1988, 8:1246), このウイルスは通常、主に感染したネコが噛んだ傷からの水平感染で伝染すると考えられる。垂直感染の報告もあるが、これはまれである。

30

#### 【0010】

FIV感染の現在の診断スクリーニング試験では、血清中の抗FIV抗体 (Ab) を検出している。ウイルス検出キットも入手できるが、普及していない。感染動物中の抗FIV抗体の存在を判定する診断試験が多数利用できる。例えば、PetChek (登録商標) FIV抗体試験キットおよびSNAP (登録商標) Combo FeLV Ag/FIV抗体試験キット (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine) は、免疫測定法に基づいたFIV感染の診断試験である。

#### 【0011】

FIV感染が世界中で広がっていることがいくつかの研究により明らかになっていることから、FIV感染の検出は益々重要となっている。この疾患に対処するためにワクチンが開発されていることから、ワクチンの効果を判定すること、またワクチン接種されたネコと自然感染したネコを識別することがさらに重要となってきている。

40

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

##### 発明の概要

1つの観点においては、本発明は新規のFIVポリペプチドに関する。別の観点においては、本発明はFIV envポリペプチドのようなFIVポリペプチドに対するネコの免疫反応を調べることにより、ネコがFIVのワクチン接種を受けたことがあるのか、またはFIVに自然感染しているのかを判定する方法を提供する。

#### 【0013】

50

別の観点においては、本発明は、FIVに自然感染した動物とFIV未感染動物またはFIVワクチン接種された動物を鑑別する方法に関する。本方法は、動物の生体サンプルを、FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素であるFIV抗体が実質的に結合しないポリペプチドと接触させることを含む。そのポリペプチドに実質的に結合するサンプル中のFIV抗体を検出する。検出ステップの陽性結果は自然感染に相応することからその動物は自然感染であると判定され、陰性結果はワクチン接種または未感染に相応することからその動物はワクチン接種または未感染であると判定される。このポリペプチドはFIV envに由来するものであってもよい。

【0014】

さらに別の観点においては、本発明は、ネコがFIVワクチンを接種されたことがあるかまたはFIVに自然感染しているかを判定する方法に関する。この方法は、(a) ワクチン接種後、ワクチンに反応して産生されるある種のFIV抗原に対する特異的抗体が検出されない十分な期間が過ぎる前に、ネコがFIVペプチドに対する抗体を持っているかを検出する、(b) ワクチン接種後、ワクチンに反応して産生されるある種のFIV抗原に対する特異的抗体が検出されない十分な期間が過ぎた後、ネコがFIVポリペプチドに対する抗体を持っているかを検出する、(c) ステップaで抗体を検出するが、ステップbでは検出しないことにより動物がワクチン接種されたと判定する、および(d) ステップaおよびステップbで抗体を検出することにより動物が自然感染したと判定することを含む。

【0015】

本発明はネコがFIVに感染したことがないか、またはFIVワクチンを接種されたことがあるかを判定する方法をも提供する。この方法は、FIV由来のポリペプチドに対する抗体を検出するためネコの生体サンプルを分析すること、そのネコが感染したことがないかまたはワクチンを接種されたことがあるかを判定することを含む。

【0016】

さらに別の観点においては、本発明は、ネコがFIVワクチンを接種されたことがあるのか、あるいはFIVに自然感染したことがあるのかを判定する方法を提供する。本方法は、ポリペプチドを含む試験装置を用意し、ネコから血液サンプルを採取し、血液サンプルを試験装置で測定し、試験装置でのデータを読み取ることを含む。陽性の結果はネコがFIVに自然感染したことがあるかまたはFIVワクチンを接種されたことを示し、陰性の結果はネコがFIVに自然感染したことがなくかつFIVワクチンを接種されたことがないことを示す。

【0017】

さらに本発明は、乾燥した多孔質キャリアー、多孔質キャリアー上に固定化された第1の検出試薬および多孔質キャリアー上に固定化された第2の検出試薬を有する診断装置に関し、ここで、第1の検出試薬は、FIV自然感染またはFIVワクチン接種のいずれかに反応して宿主が産生するFIV抗体を捕捉するタンパク質を含み、および、第2の検出試薬は、FIV自然感染に対して反応して宿主が産生するFIV抗体を捕捉するが、FIVワクチン接種に対して反応して宿主が生成するFIV抗体は実質的に捕捉しないタンパク質を含む。第1の検出試薬はFIV p15抗原またはFIV p24抗原であることができ、第2の検出試薬はFIV envタンパク質であることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

詳細な説明

本明細書に記載される発明を詳細に説明する前に、いくつかの用語の定義を記す。本明細書において用いる場合、単数形の“a”、“an”、および“the”は、文脈が明らかに示しているのではない限り、複数形の関係項も含めるものとする。

【0019】

本明細書において用いる場合、「ポリペプチド」という用語はペプチド結合でつながっているアミノ酸残基の単鎖もしくは2つ以上の鎖の複合体からなる化合物を指す。ペプチド鎖はどのような長さでも良い。タンパク質はポリペプチドであり、これらは同義語とし

10

20

30

40

50

て扱う。本発明の範囲内には、機能上同等のFIVポリペプチドの変異体および断片も含まれる。ポリペプチドはそのポリペプチドに特異的な1つまたは複数の抗体と結合することができる。

【0020】

FIV由来のポリペプチドには、例えばgagおよびenv領域の部分およびそれらのミミトープを含むFIVプロテオームのいかなる領域も含まれる。参照のため本明細書にそのまま全体が組み込まれている米国特許5,648,209, 5,591,572, 6,458,528には、FIVのenvおよびgagタンパク質に由来するFIVポリペプチドが記述されている。envおよびgagタンパク質由来のこれらのペプチドおよびこれに類するペプチドは、本発明の方法に使用するのに適している。適切なenvポリペプチドの例には以下のものがある。

CNRWEWRPDFESEK [配列番号：1]

【0021】

配列番号1は表面エンベロープ・タンパク質(SU)由来の元来のFIV env配列(アミノ酸396~408)であり、ここでは元来のものではないN末端システイン残基とともに示す。

【0022】

「結合特異性」または「特異的結合」とは、第1の分子が第2の分子を実質的に認識することを表し、例えばポリペプチドとそのポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体あるいは抗体の断片(例えば、Fv, 単鎖Fv, Fab', またはF(ab')<sub>2</sub>断片)である。

【0023】

「実質的な結合」または「実質的に結合する」とは、特定の測定条件下における測定混合物中の分子間の特異的な結合あるいは認識の程度をいう。最も広い観点においては、実質的な結合は第1の分子が第2の分子と結合するか、または第2の分子を認識する能力の欠如の程度と、第1の分子が第3の分子と結合するかまたは第3の分子を認識する能力の大きさの差、すなわち分子の相対濃度やインキュベーションの時間と温度などの特定の測定条件下において、特異的な結合を識別する意味ある測定を実施するための十分な差に関係している。別の観点においては、分子の相対濃度やインキュベーションなどの特定の測定条件下において、第1の分子が第2の分子に対して、第3の分子に対して示す反応性の25%以下、好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下の反応性を示す場合、交叉反応という意味において、1つの分子が別の分子と結合するかまたは別の分子を認識する能力が実質的に欠如している。特異的な結合は広く知られている多くの方法、すなわち免疫組織化学法、酵素免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、またはウェスタン・ブロット法で試験することができる。

【0024】

FIVに感染する動物はネコ類であり、飼いネコ、ライオン、トラ、ジャガー、ヒョウ、ピューマ、オセロットなどネコ目のすべての動物が含まれると理解されている。本明細書において用いる場合、「ネコ」、「猫」、「動物」の用語はすべてのネコ類を指す。

【0025】

「生体サンプル」とは唾液、全血、血清、血漿、その他FIV抗体を含んでいると考えられるサンプルなどの、被検動物から得られたサンプルを指す。

【0026】

「FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素である抗体」とは、FIVワクチンの接種により誘導された抗体を指す。この抗体はFIV自然感染の結果誘導される抗体と全く同じか同等のものである。ワクチン接種の成功とは、FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素である抗体が測定可能なレベルまで産生されることである。

【0027】

FIVワクチンは、例えば米国特許6,667,295, 5,833,993, 6,447,993, 6,254,872, 6,544,528, および米国特許公開20040096460に記述されており、それぞれはその全体が参照として本明細書に組み込まれている。米国特許6,447,993および6,254,872は、異なるFIV亜種の細胞フリーウイルス単離物、または異なる亜種からの異なるプロトタイプFIVウイル

10

20

30

40

50

スに感染したいいくつかの細胞株の組み合わせから調製されたワクチンを記述している。米国特許5,833,933は、FIV gagタンパク質およびFIV envタンパク質をコードしているDNA配列を含むワクチンを記述している。これらのワクチンにはその配列を発現するための発現システムが含まれている。利用できるワクチンの1つに、FEL-0-VAX（登録商標）FIV（Fort Dodge Animal Health, Overland Park, Kansas）がある。

【0028】

FIV感染に対してワクチン接種された動物の生体サンプルは、ワクチンに反応して動物が生成した抗体が存在しているため、FIV感染に対する試験で陽性結果を示す可能性がある。1つの観点においては、本発明は、FIVに自然感染した動物と、FIV未感染またはFIVワクチンを接種された動物とを鑑別する方法を提供する。本方法は、動物の生体サンプルを、FIVワクチンに対する動物の抗体反応の重要な要素である抗体に実質的に結合しないFIV由来のポリペプチドと接触させることを含む。

10

【0029】

別の観点においては、本発明は、ネコがFIVに感染したことがなくかつFIVワクチンを接種されたことがないかを判定する方法を含む。ネコの生体サンプルを分析して、FIV envおよび/またはgag由来のポリペプチドに対する抗体を検出する。次にそのような抗体がないことにより、その動物が感染したことがなくかつワクチンを接種されたことがないと判定する。

【0030】

場合によっては、ワクチン接種後の初期段階で、動物はワクチン成分である特定のFIVポリペプチドに対するある種の抗体を、自然感染に対する反応で生成される量に比べて低濃度ながら一時的（一過性）に産生する。この抗体レベルは経時的に先細りとなり、初期段階が過ぎた後このポリペプチドに対する抗体は検出できなくなる。一般的にこの期間は約10～12週間であるが、動物種や個々の動物によって様々である。一過性の抗体はワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない。

20

【0031】

例えば、ワクチンに対する動物のFIV抗体産生はワクチンに依存している。FEL-0-VAX（登録商標）ワクチンを接種してから約2～4週間後、動物は血清学的にp24（gag）に対するFIV抗体が陽性となることが知られている。しかしながら、そのようにワクチンを接種された動物は、envタンパク質がワクチンの成分に含まれているにもかかわらず、envタンパク質の1つまたは複数の領域に対する抗体を恒久的なレベルで産生しない。それとは対照的に、自然感染した動物は、典型的には、FIV gagおよびenvタンパク質の両方に対する抗体を恒久的なレベルで産生する。

30

【0032】

ワクチンを接種された動物と自然感染した動物の間に見られる免疫反応の相違は、動物がワクチンを接種されたのか自然感染したのかを鑑別する手段を提供する。本発明の方法を用いて、FIVに自然感染した動物を、感染したことがないかまたはFIV感染に対するワクチンを接種されている動物から識別することが可能である。したがって、FIV由来のポリペプチドと、ワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体との間の実質的な結合が検出されることは、自然感染を示すことができる。そのような結合の相対的欠如は、ワクチンを接種されたかもしくは感染していないことを示すことができる。さらに、ワクチン接種および/または自然感染に反応して産生されるp15またはp24タンパク質のような抗体と実質的に結合する第2の別の抗体捕捉反応物質を試験系に組み込むことができる。そのように、個々の捕捉反応物質の様々な組み合わせにより、被検動物のワクチン接種状態および/または感染状態を判定する道が開かれる。

40

【0033】

例えば、FIV gagタンパク質のp15およびp24は死滅ウイルス全体によるFIVワクチンの免疫抗原成分である。これらの成分は接種された動物に恒久的な抗体反応を誘導するものと考えられる。他方、ワクチンの中には、免疫学的に意義ある量のFIV envタンパク質を含まないもの、そのタンパク質がウイルス不活性化の過程で変質してしまったもの、さらに

50

はワクチン接種によるこのタンパク質の抗原呈示がこのタンパク質に対して産生された抗体が（もしあったとしても）ある期間内にp15およびp24に対する抗体よりも少なく検出されるように、自然感染における抗原呈示とは異なるものなどがある。このように、ワクチン接種後の初期段階で、動物は一過性にenvタンパク質に結合する抗体を低レベルながら産生するかもしれないが、時間経過と共に抗体産生は減少し、約12週間後には検出されなくなる。この例では、一過性に産生された抗体は、一定期間の後、ワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではなくなる。

【0034】

特定のFIV envポリペプチドに対する検出可能な抗体の産生は、通常ワクチン接種が完了してから約12週間後にはなくなっていることを考えると、本発明の1つの観点においては、過去12週間以内にFIVのワクチンを接種されていない動物から生体サンプルを得る。ワクチン接種状態が不明でありかつ試験が感染を示す（抗体捕捉タンパク質との反応に基づく）場合、12週間後に再試験することが勧められる。

10

【0035】

ワクチンを接種された動物と自然感染した動物の間の免疫反応の相違、例えば特異的抗体のレベルおよび/または抗原抗体結合反応の速度論的パラメータ（例えば、親和性、アビディティ）は、ワクチンを接種された動物と自然感染した動物を鑑別するための測定法のデザインにおいて考慮されるべきである。免疫反応の相違は大きく、ワクチン接種後の初期段階の後でさえ、動物が特定のFIVポリペプチドに対する抗体、および/または自然感染に対する反応で産生された抗体とは結合性が異なる抗体を低値ながら持続的に産生

20

【0036】

本発明の方法は、様々な仕方により最適化が可能であり、当業者はFIV感染またはワクチン接種に対する抗体を有する血清の鑑別を実施する方法に使用される、サンプル希釈、試薬濃度、インキュベーションの温度と時間を同時に調整することができる。例えば、特定のポリペプチドに対する抗体のための免疫測定法において、サンプル希釈およびその他の条件が最適化されている場合、ワクチン接種された動物からのサンプルは1つの特定のFIVポリペプチドに関し陰性の測定結果を与え、感染動物からのサンプルは陽性の測定結果を与えることができる。第2のFIVポリペプチドに関しては、両方のサンプルが陽性結果を与えることができる。

30

【0037】

本発明の1つの観点においては、タンパク質は適切な固形支持体の上に固定化される。生体サンプルをタンパク質と接触させ、サンプル中に抗体が存在する場合には抗FIV抗体はタンパク質に結合する。結合は、酵素、放射性物質、粒子、蛍光標識など適切な方法によって検出することができる。適切な実施形態では、検出試薬は抗FIV抗体（もし存在するならば）を捕捉するのに使用されるものと同じかまたはこれに類似するタンパク質と結合させることができる。

【0038】

別の観点においては、この方法は、ネコがFIVワクチンを接種されたことがあるか、あるいはFIVに自然感染したことがあるかを判定する試験装置に関する。この試験装置を使用する方法は、FIV envタンパク質および別のFIV gagタンパク質を備えている試験装置を用意することを含む。本装置は、装置を生体サンプルと接触させることによりネコの生体サンプルを試験するのに使用することができる。装置の読み取りにおいて、抗体とgagタンパク質の結合の検出（gagタンパク質の陽性結果）は、そのネコがFIVに自然感染したことがあるかまたはFIVのワクチンを接種されたことがあることを示す。同時にenvタンパク質の結果が陽性になるときは、自然感染（または、恐らく一過性のワクチン接種後反応）を意味し、同時にenvタンパク質の結果が陰性になるときは、ワクチン接種を意味する。上述内容を下表に要約する。

40

【0039】

【表1】

	gag タンパク質	env タンパク質
ワクチン未接種または未感染	—	—
ワクチン接種	+	—
最近ワクチン接種した可能性	+	+
感染	+	+
感染およびワクチン接種	+	+

10

## 【0040】

本発明に使用するポリペプチドは、天然のFIVタンパク質の1つおよびこれらのミミトープおよび機能的に同等の変異体に見出される少なくとも6個のアミノ酸、通常は少なくとも9個のアミノ酸、さらに通常は12個以上のアミノ酸を含む。

## 【0041】

「機能上の同等」または「機能的に同等」とは、元来のFIVエンベロープ (env) およびウイルス・コア (gag) のポリペプチド配列に関するか、またはこれに由来するポリペプチドのことを指し、そのアミノ酸配列が1個または複数のアミノ酸の置換、挿入、欠失により修飾されている場合、およびアミノ酸類似物などアミノ酸が化学的に修飾されているが、なお実質的に同等の機能を保持している場合である。機能的に同等の変異体は、自然の生物学的多様性として発生することもあり、または化学合成、部位特定の突然変異、無作為突然変異、アミノ酸の酵素的切断および/または結合などの既知の技術を使って作製することもできる。このように、変異体配列を得るためのアミノ酸配列の修飾は、ポリペプチドの機能が影響されない限り起こり得る。

20

## 【0042】

本発明の範囲内における機能的に同等のFIV変異体は、保存的に置換された配列を含んでいてもよく、すなわち、FIVポリペプチドの1個または複数のアミノ酸残基がFIVポリペプチドの二次元および/または三次元構造を変えないように別の残基で置き換えられていてもよい。そのような置換には、荷電密度、大きさ、構成、親水性/疎水性などの同じような生理化学的特性を持つ残基でアミノ酸を置き換えることが含まれる。例としてのみの目的で挙げれば、そのような置換には1つの脂肪族残基 (Ile, Val, Leu, Ala) を別の脂肪族残基に置き換える、あるいは塩基性残基 (LysとArg)、酸性残基 (GluとAsp)、アミド残基 (GlnとAsn)、ヒドロキシ残基 (SerとTyr)、芳香族残基 (PheとTyr) を互いに置き換えることが含まれる。保存的な変異体は通常、本発明のポリペプチド配列を修飾し、修飾されたポリペプチドの抗原性を、例えば免疫組織化学法、酵素免疫測定法 (ELISA)、放射性免疫測定法 (RIA)、またはウェスタン・ブロット法によって評価することにより同定できる。表現形質的に表立たないアミノ酸変換体の作製に関する詳細は、ポーウィアの論文 (Bowie et al., Science 247:1306-1310, 1990) に見ることができる。

30

## 【0043】

配列番号1の機能上同等物の例を、ペプチドの様々な修飾に関する説明とともに以下に示す。

40

## 【0044】

【表 2】

配列番号：	配列	アミノ酸変化の説明
2	CNRWD <u>W</u> RP <u>D</u> PDFES <u>K</u> K	元来の FIV env 配列(アミノ酸 396~408, N 末端に C 追加, E から D, E から K の置換)

## 【 0 0 4 5 】

その他の変異体も本発明の範囲内で企図されており、そのような変異体には、例えば不特定数の残基のアミノ酸配列の追加ならびに1つまたは複数のアミノ酸の配列内への挿入により得られる、アミノおよび/またはカルボキシル末端の融合が含まれる。例えば、追加されるアミノ酸配列は、別のポリペプチドまたはタンパク質の全体または一部に由来するものであってもよく、またはFIVのエンベローブまたはウイルスのタンパク質の対応する位置に提供されているものであってもよい。より長いペプチドは1つまたは複数のポリペプチド配列の複数のコピーを含んでいてもよい。さらに、複数のコピーのポリペプチドをポリリジンの主骨格のようなポリアミノ酸の主骨格と組み合わせて多抗原ペプチド (MAP) を形成してもよい。

10

## 【 0 0 4 6 】

アミノ酸配列の欠失変異体は、配列から1つまたは複数のアミノ酸残基が除去されている変異体である。挿入変異体は、1つまたは複数のアミノ酸がタンパク質のあらかじめ定められた部位に組み込まれている場合に相当するが、無作為挿入法は結果的な産物の適切なスクリーニングを有するオプションである。いずれの場合も、用いられるこれらおよびその他のFIV変異体は実質的にFIVポリペプチドと同じ抗原性を保持している。その他の変異体も企図されており、例えば、このタンパク質の抗原認識領域以外の領域のアミノ酸が置換されているものがある。FIVの2つ以上のポリペプチド配列を含む融合タンパク質も、その配列が適切な抗原性を提示する限り、本発明の範囲内にある。そのようなポリペプチドは一般的に、FIVの特徴であるエピトープまたはミミトープの少なくとも1つに対応している。特徴とは、エピトープまたはミミトープが、生体サンプル中のFIVに対する抗体の免疫学的検出を妥当な確かさで可能にすることを意味する。通常、エピトープまたはミミトープ、変異体または融合タンパク質は、免疫学的にFIV以外のウイルスから明確に区別されること(すなわち、FIV以外のウイルスを認識する抗体と交叉反応しないこと)が望ましい。

20

30

## 【 0 0 4 7 】

抗原性を発揮する変異体は、配列番号 2に示すように、配列番号 1またはその断片と、例えば1, 2, 3, 4, または5個のアミノ酸残基が異なる。この比較にアライメントが必要なときは、配列を最大相同性に対してアライメントする。欠失, 挿入, 置換, 反復, 逆位, あるいは不一致は相違と考える。相違は非必須の残基での相違または変化, あるいは保存的な置換であることが好ましい。でき上がった変異ポリペプチドが、例えば配列番号 2に示す変化のように抗原的に配列番号 1と実質的に類似している限り、ポリペプチドのどの場所でも変位部位が生じうる(表2参照)。機能的に同等の変異体の例には、50%以上のアミノ酸が相同性を示すものが含まれる。相同性は60%, 70%, あるいは80%より大きいことが好ましい。しかし、そのような変異体は全体的に少ない割合の相同性を示すかもしれないが、相同性の領域が保存されている点でなお本発明の範囲内である。

40

## 【 0 0 4 8 】

場合によっては、特定のキャリアーとの結合を促進するため、あるいはジスルフィド結合が抗原ループを模倣できるようにして抗原性を高めるために、1個または複数のシステイン残基をポリペプチドの末端に付加することができる。さらに、デリバリーベヒクルへの取り込みを容易にし抗原性を増すために、ペプチドに脂肪酸または疎水性尾部を付加す

50

することもできる。

【0049】

検出試薬として使用するFIVポリペプチドは自然のもの、すなわち自然界から分離されたFIVタンパク質全体または断片であってもよく、または合成されたものであってもよい。自然のタンパク質はアフィニティ・クロマトグラフィなど慣用の方法でFIVウイルス全体から分離することができる。既知の技術で、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を使用して適切なアフィニティ・カラムを調製することができる。

【0050】

自然界のFIVタンパク質と免疫学的に交叉反応するタンパク質を化学的に合成することができる。例えば、アミノ酸を連続的に付加して長くしてゆく既知のMerrifield固相合成法により、約100個以下、より一般的には約80個以下、典型的には約50個以下のアミノ酸からなるポリペプチドを合成することができる(Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156)。組み換えタンパク質を使用することもできる。これらのタンパク質は、FIVゲノムの目的部位をコードしている組み換えDNA分子を持った培養細胞中で発現させることにより製造することができる。FIVゲノムの部分はそれ自体自然でも合成でもよいが、自然の遺伝子は分離されたウイルスから慣用の技術により取得することができる。もちろんFIVのゲノムはRNAであり、逆転写酵素を使った慣用の技術により自然のRNAをDNAに転写する必要がある。ポリヌクレオチドも既知の技術で合成することができる。例えば、短い単鎖DNA断片はBeaucageおよびCarruthersによって記載されているフォスフォアミダイト法を用いて製造することができる(Beaucage and Carruthers, 1981, Tett. Letters 22:1859-1862)。二本鎖断片は、相補性の鎖を合成した後それを適当な条件下でともにアニールするか、適当なプライマー配列とDNAポリメラーゼを使って相補性の鎖を加えてゆくことにより作製できる。

【0051】

目的のFIVタンパク質または断片をコードした自然のまたは合成のDNA断片は、生体外(in vitro)で細胞培養に導入でき発現させることができるDNAコンストラクトの中に組み込むことができる。通常、DNAコンストラクトは酵母や細菌のような単細胞内で複製させるのに適したものである。それらを哺乳動物の培養細胞または他の真核細胞のゲノムに導入し一体化させることも企図される。細菌や酵母に導入するために用意されるDNAコンストラクトには、宿主細胞に認識される複製システム、目的のポリペプチド産物をコードしているFIV DNA断片、FIV DNAの5'末端に結合している転写および翻訳の開始制御配列、および断片の3'末端に結合している終末制御配列が含まれる。転写制御配列は宿主細胞によって認識される異種プロモーターを含む。便利なことに、多数の宿主細胞のための多くの適切な発現ベクターが市販されている。

【0052】

本発明の検出方法に有用であるためには、ポリペプチドは実質的に純粋な形、すなわち典型的には純度が約50% w/w以上であって、妨害タンパク質や不純物が実質的に含まれていない形を得る。FIVポリペプチドは少なくとも80% w/wの純度で分離あるいは合成するのが好ましく、少なくとも95% w/wの純度ならさらに好ましい。慣用のタンパク質精製法を使って少なくとも約99% w/wの純度の同種ポリペプチド成分を取得することができる。例えば、上述のイムノアフィニティ・カラムを使用して、以下に示す抗体を用いてタンパク質を精製することができる。

【0053】

本発明の方法は、マイクロプレートや側方流(lateral flow)装置などの使用を含む(ただしこれらに限定されない)、当業者に知られる免疫測定技術を用いて行なうことができる。1つの実施形態では、FIVタンパク質は固形支持体上の特定の位置に固定化される。固形支持体上のタンパク質抗体複合体の検出は、当業者に知られる任意の方法で可能である。例えば、参照のため本明細書にその全体が組み込まれている米国特許5,726,010には、本発明に有用な側方流(lateral flow)装置であるSNAP(登録商標)免疫測定装置(DEXX Laboratories)の例が記載されている。市販されているWITNESS(登録商標) FIV診

10

20

30

40

50

断試験 (Synbiotics Corporation, Lyon, France) のようなコロイド粒子に基づく試験も使用可能である。

【0054】

例えばFIVタンパク質などの1つまたは複数の分析物捕捉試薬を装置あるいは固形支持体上に固定化して、分析物捕捉試薬がサンプル、希釈液および/または洗浄操作により洗い流されないようにする。物理的な吸収(すなわち、化学リンカーを使用せず)または化学的結合(すなわち、化学リンカーを使用して)によって、1つまたは複数の分析物捕捉試薬を表面に付加することができる。化学的結合は特異的結合物質を表面により強く取り付け、表面結合分子の明確な方向と配座を提供することができる。

【0055】

本発明の別の実施形態では、側方流 (lateral flow) 測定法に適切な装置を提供する。例えば、試験サンプルをフローマトリックスの第1の領域(サンプル適用ゾーン)に添加する。試験サンプルは毛細管現象により液体流路に沿って流れてフローマトリックスの第2の領域に運ばれ、ここで標識物質は試験サンプル中の分析物と結合して第1の複合体を形成することができる。第1の複合体は、FIVタンパク質が明確な部位に固定化されているフローマトリックスの3番目の領域に運ばれる。固定化されたタンパク質とサンプル中の抗体を含む第1の複合体との間で第2の複合体が形成される。例えば、金ゾル粒子とFIV抗体に結合しているFIVタンパク質を含む第1の複合体は、第2の固定化FIVタンパク質またはネコの抗体に対する第2抗体と特異的に結合して第2の複合体を形成する。第2の複合体の一部を成す標識物質は直接可視化できる。

【0056】

別の観点においては、本発明は、本発明の装置に適用する前に試験サンプルと混合できる1つまたは複数の標識化特異的結合試薬を含む。この場合、標識化特異的結合試薬を装置の特異的結合試薬パッドに沈着させ乾燥させる必要はない。標識化特異的結合試薬は、例えば試験サンプルに加えるにしても装置にあらかじめ沈着させるにしても、FIVに対する抗体に特異的に結合する標識化FIVタンパク質でありうる。

【0057】

上記の実施形態のいずれもキットとして提供することができる。1つの具体的な例において、そのようなキットは、特異的結合試薬(例えば、非固定化標識化特異的結合試薬および固定化分析物捕捉試薬)および洗浄試薬、ならびに所望の場合または適切な場合には検出試薬および陽性および陰性コントロール試薬を備えた装置を含む。さらに、安定化剤、バッファなどのような他の添加物を含むことができる。種々の試薬の相対量は、測定法の感度を実質的に最適化する溶液中の試薬濃度を提供するため、様々であることができる。特に、試薬は乾燥粉末(通常は凍結乾燥)で提供することができ、溶解してサンプルと混合するための適切な濃度の試薬溶液とする。

【0058】

FIVタンパク質は反応ゾーン(固相)中の固定化分析物捕捉試薬でありうる。標識物質とコンジュゲートさせた第2の分析物捕捉試薬、すなわち第2のFIVタンパク質は、サンプルを装置に適用する前にサンプルに添加してもよく、第2の分析物捕捉試薬を装置に組み込むこともできる。例えば、標識化特異的結合試薬は、サンプル適用ゾーンと固相の間の液体連絡を与える液体流路に沈着させ乾燥させることができる。標識化特異的結合試薬が液体サンプルに接触すると、標識化特異的結合試薬が溶け出す。

【0059】

この装置には、結合していない物質(例えば、未反応の液体サンプルや未結合の特異的結合試薬)を反応ゾーン(固相)から除去する液体試薬を含めることができる。液体試薬は洗浄試薬であって、未結合物質を反応ゾーンから除去することのみに作用してもよく、検出試薬を含み、未結合物質を除去し分析物の検出を促進することの両方に利用することができるものであってもよい。例えば、酵素とコンジュゲートさせた特異的結合試薬の場合、検出試薬は反応ゾーンで酵素抗体コンジュゲートと反応して検出可能な信号を発生する基質を含む。放射性物質、蛍光物質、または吸光分子とコンジュゲートさせた標識化特

10

20

30

40

50

異的結合試薬の場合，検出試薬は単に未結合の標識試薬を洗い流すことによって反応ゾーンでの複合体形成の検出を促進する洗浄液としての役目のみを果たす。

【0060】

装置には2つ以上の液体試薬が存在していてもよく，例えば装置は洗浄試薬として働く液体試薬と検出試薬として働き分析物の検出を促進する液体試薬を含むことができる。

【0061】

液体試薬にはさらに限定された用量の「阻害物質」，すなわち検出可能な最終産物の発生を阻止する物質を含むことが可能である。限定された用量とは，過剰の未結合物質のほとんどまたはすべてが第2の領域から運び出されるまで最終産物の発生を阻止し，その時点で検出可能な最終産物が生成するのに十分な阻害物質の量である。

10

【0062】

以下は例示目的のためだけに提供され，上記の広範な項で記述した本発明の範囲を限定することを意図するものではない。この開示で引用しているすべての参考文献は参照として本明細書に組み入れられている。

【実施例】

【0063】

#### 実施例1

SNAP（登録商標）FeLV Ag/FIV Ab 試験キットでFIVが陰性結果となった8匹のネコに，Fel-0-Vax（登録商標）FIVワクチン（Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge Iowa）でワクチン接種した。このワクチンは多数のFIVウイルス株の死滅物全体から生成されている。製造元の使用方法に従って，ネコに試験0日，14日，および28日にワクチンを接種した。FIV試験で陰性結果が出た2匹のネコにはワクチン接種を行わず，本試験の対照群に含めた。

20

【0064】

ワクチン接種試験の第0日およびそれ以降第12週まで7日ごとに，10匹のネコから血液サンプルを採取し測定時まで冷凍保存した。それに加えて，ウェスタン免疫ブロット確認試験によりFIV Ab陰性または陽性と確認されたFIV陰性ネコおよびFIV自然感染ネコの血液サンプルも同じく試験した。

【0065】

サンプルの測定はSNAP（登録商標）ELISA法により実施した。米国特許5,726,010に記述されているように，SNAP（登録商標）装置技術を使用して，固相にサンプルの逆行クロマトグラフィ・フローと洗浄溶液および酵素基質溶液の自動連続フローを提供した。

30

【0066】

SNAP（登録商標）装置については，FIV gag p24（組み換え）および追加のN末端システインを有するFIV env 696-707 - CELGCNQNQFFCK [配列番号3] - を沈着させて，固相上に単体抗体捕捉スポットを形成した。SNAP（登録商標）装置の固相上に陰性コントロール試薬を沈着させて陰性コントロールスポットを形成し，陽性コントロール試薬を沈着させて陽性コントロールスポットを形成した。gag もしくはenvタンパク質は酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼに化学的にコンジュゲートさせ，バッファ，洗浄剤および動物の血清成分から構成された溶液に入れて用意した。

40

【0067】

血清サンプルをgagもしくはenvタンパク質 - 酵素コンジュゲート溶液と混合して，SNAP（登録商標）装置に適用した。短時間インキュベーションしたのち，装置の作動を開始した。陽性コントロールスポットが発色したことから適正な試験であったことが示された。サンプルスポットの発色が陰性コントロールスポットの発色よりも大きい場合には，サンプル内にFIV抗体が存在していたことを示し，陽性の試験結果として評点した。試験結果は視覚的に判定し，表1に示した。

【0068】

【表3】

表1

動物ID	状態	日	gag Ab 試験結果 (視覚的)	env Ab 試験結果 (視覚的)
NV1	未ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	21	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	28	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	35	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	42	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	49	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	56	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	63	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	70	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	77	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種, 未感染	84	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	21	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	28	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	35	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	42	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	49	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	56	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	63	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	70	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	77	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種, 未感染	84	陰性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陽性
V1	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性
V1	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	21	陰性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	28	陰性	陰性

【表4】

V2	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性
V2	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	21	陰性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	28	陰性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性
V3	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	14	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性
V4	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陽性
V5	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性
V5	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性

10

20

30

40

【表5】

V5	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陽性	
V5	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性	10
V5	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性	
V5	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	14	陰性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陽性	
V7	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陽性	
V7	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性	20
V7	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性	
V7	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	0	陰性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	7	陰性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	14	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	21	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	28	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	35	陽性	陰性	30
V8	ワクチン接種, 未感染	42	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	49	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	56	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	63	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	70	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	77	陽性	陰性	
V8	ワクチン接種, 未感染	84	陽性	陰性	
Inf1	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf2	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf3	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf4	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	40
Inf5	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf6	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf7	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf8	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
Inf9	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	
inf10	未ワクチン接種, 感染	ND	陽性	陽性	

【0071】

実施例2

FIVが陰性と確認された感染ネコおよびFEL-0-VAX（登録商標）FIVワクチンを接種され

50

たネコから採取した血清サンプルに対して、固相上の個々のFIVポリペプチドと抗ネコIgG-ペルオキシダーゼコンジュゲートを用いた間接測定法によりマイクロプレートELISA解析を実施した。env FIVタンパク質に対する抗体は、以下のペプチドを抗原試薬として用いて検出した。

CNRWEWRPDFESEK [配列番号:1]

CNRWDWRPDFESKK [配列番号:2]

【0072】

ポリペプチドは市販の機器を用い製造元の使用説明書に従って合成した。ポリペプチド保存試薬はDMSOに5 mg/ml で溶解して準備した。次にポリペプチドをマイクロプレートウェルにコーティングした(ペプチドを50 mM Tris-HCl pH 7.4に10 ug/mlの濃度で溶解し100 ul/ウェルの割合でコーティング)。次にプレートを2%ツイーン-20/2.5%ショ糖によりブロック/コーティングし、吸湿剤入りマイラーバッグで乾燥させた。

10

【0073】

分析試験については、ネコの血清サンプル(100 ul/well, 50%胎児ウシ血清中で1/1000に希薄)をウェルに加え、プレートを室温で10分間インキュベーションした。インキュベーション後、マイクロプレートをPBS/ツイーン溶液で洗浄した。ヤギ抗(ネコIgG):ペルオキシダーゼ・コンジュゲートをウェルに加えた(100 ul/ウェル, 50%胎児ウシ血清で希釈した抗ネコIgG:ペルオキシダーゼ)。プレートを室温でさらに15分間インキュベーションし、PBS/ツイーンで2回目の洗浄を行なった。ペルオキシダーゼの基質を加え(100 ul/ウェル, テトラメチル・ベンチジン・ペルオキシダーゼ基質)、プレートを室温で10分間3回目のインキュベーションを行なった。フッ酸停止液(50 ul/ウェル)をプレートに添加した。分光光度計(A650 nm)でペルオキシダーゼ活性(発色産物)を判定することによりサンプル抗体結合を測定した。サンプルに対する有意義な実質的抗体結合はA650 nmが0.200より大きいこととした。参照試験としてこれらのサンプルをIDEXX PetChek(登録商標) Anti-FIV抗体試験キットでも測定した。結果を表2に示す。

20

【0074】

【表 6】

表 2

FIV 感染, 未ワクチン接種:			
	配列番号 1	配列番号 2	PetChek (登録商標) Anti-FIV
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	結果
AWL 3979	0.807	0.618	陽性
11734	0.291	0.600	陽性
11738	1.006	1.227	陽性
653	0.236	0.291	陽性
Jack	0.150	0.390	陽性
4384	0.813	0.441	陽性
145B	1.054	0.456	陽性
151F	0.782	0.576	陽性
PETexp	1.682	1.636	陽性
2253-52-3705	0.391	0.212	陽性
Jack	0.229	0.700	陽性
151J NEG	0.460	0.778	陽性
平均値	0.658	0.660	

10

20

FIV 陰性, ワクチン接種:			
	配列番号 1	配列番号 2	PetChek (登録商標)
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	結果
Vx A1 w0	0.039	0.038	陰性
Vx A1 w1	0.050	0.046	陰性
Vx A1 w2	0.055	0.046	陰性
Vx G1 w0	0.039	0.040	陽性
Vx G1 w1	0.051	0.050	陽性
Vx G1 w2	0.058	0.052	陽性
平均値	0.049	0.045	

30

FIV 陰性, 未ワクチン接種:			
	配列番号 1	配列番号 2	PetChek (登録商標)
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	結果
11839	0.043	0.040	陰性
11713	0.039	0.042	陰性
11353	0.038	0.036	陰性
11835	0.041	0.042	陰性
11586	0.036	0.038	陰性
2523-19-259	0.041	0.040	陰性
145	0.034	0.035	陰性
2343	0.046	0.041	陰性
145C NEG	0.037	0.038	陰性
18110-35	0.035	0.036	陰性
平均値	0.039	0.039	

40

## 【 0 0 7 5 】

本明細書において本発明の様々な特異的实施形態を説明したが、本発明はそれらの厳密な実施形態に限られるわけではなく、当業者は本発明の範囲や精神から逸脱することなく

50

それらに様々な変更や修飾を与え得ることが理解されるべきである。

【配列表】

0004866848000001.xml

---

フロントページの続き

(72)発明者 グロート, ランドール, ジーン  
アメリカ合衆国 04032 メイン州 フリーポート, ホルブルック ストリート ナンバー  
イレブン 19

(72)発明者 トネリ, クウェンティン, ジョセフ  
アメリカ合衆国 04103 メイン州 ポートランド, ウェリントン ロード 37

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00577458 (EP, A1)  
特開平02-011524 (JP, A)  
特開平07-159408 (JP, A)  
欧州特許出願公開第00887412 (EP, A1)  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 19  
89年, Vol.86, p.5743-5747

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90  
C07K1/00-19/00  
C12Q1/00-1/68  
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus(JDreamII)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
Pubmed

专利名称(译)	用于检测FIV的方法和装置，包括使用源自猫免疫缺陷病毒（FIV）的ENV蛋白的V3区的肽。		
公开(公告)号	<a href="#">JP4866848B2</a>	公开(公告)日	2012-02-01
申请号	JP2007519193	申请日	2005-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories , Inc.的		
当前申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories , Inc.的		
[标]发明人	グロートランドールジーン トネリクウエンティンジョセフ		
发明人	グロート,ランドール,ジーン トネリ,クウエンティン,ジョセフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/08 C12M1/34 G01N33/569 G01N33/53 C07K14/155		
CPC分类号	A61K39/21 A61K39/12 A61K2039/5252 C07K14/005 C12N2740/15022 C12N2740/15034 G01N33/56983 G01N2333/15 G01N2333/155 G01N2469/20		
FI分类号	C12N15/00.A C07K7/08.ZNA C12M1/34.F G01N33/569.H G01N33/53.N		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
审查员(译)	福泽弘光		
优先权	60/584599 2004-06-30 US		
其他公开文献	JP2008509091A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

用于确定动物中猫免疫缺陷病毒感染或疫苗接种的方法和设备。该方法包括使猫生物样品与各种FIV多肽接触，并测定样品中抗体和多肽的结合。通过测量对动物的FIV env多肽的免疫应答，可以确定动物是否被FIV感染或已经用FIV疫苗接种。提供了一种用于检测FIV抗体的装置。

	gag タンパク質	env タンパク質
ワクチン未接種または未感染	-	-
ワクチン接種	+	-
最近ワクチン接種した可能性	+	+
感染	+	+
感染およびワクチン接種	+	+