(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-65670
(P2012-65670A)
(43)公開日　平成24年4月5日(2012.4.5)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 7/00	(2006.01)	C12N 7/00		4B063
C07K 16/08	(2006.01)	C07K 16/08		4B064
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q 1/04		4B065
A61K 39/12	(2006.01)	A61K 39/12		4C085
A61K 39/39	(2006.01)	A61K 39/39		4H045

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 24 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-268298 (P2011-268298)
(22)出願日　平成23年12月7日 (2011.12.7)
(62)分割の表示　特願2007-531450 (P2007-531450)の分割
原出願日　平成17年9月12日 (2005.9.12)
(31)優先権主張番号　60/609,480
(32)優先日　平成16年9月13日 (2004.9.13)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　11/223,099
(32)優先日　平成17年9月9日 (2005.9.9)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　309040701
ワイス・エルエルシー
アメリカ合衆国　ニュージャージー州Ｏ７９４０．マジソン，フアイブ　ジラルダ　フアームズ
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　チェンチン　ファン
アメリカ合衆国　アイオワ　５０５０１，フォート　ドッジ，　２６ティーエイチ　アベニュー　ノース　１１６９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】出血性ネコカリシウイルス、カリシウイルスワクチンおよびカリシウイルス感染または疾患を予防するための方法

(57)【要約】
【課題】出血性および通常の両方のＦＣＶ株により引き起こされる重篤な感染および疾患に対してネコを防御する広域ウイルスワクチンを提供する。
【解決手段】本発明は、新規の単離精製された出血性ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１に関する。本発明はさらに、新規ＦＣＶ－ＤＤ１株を含む一価および多価のワクチンを含む。さらに本発明は、単独または他の病原体を加えたネコカリシウイルスにより引き起こされる感染に対してネコを防御するかまたは疾患を予防する方法に関し、この方法は、本明細書中に記載の免疫学的有効量の一価および多価のワクチンをネコに対して投与する工程を包含する。また本発明は、ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１またはネコカリシウイルスに対して惹起または産生されたＦＣＶ－ＤＤ１抗原抗体の存在を検出することにより、感受性宿主、無症候性キャリアなどにおいて出血性ネコカリシウイルスを診断または検出するための方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書中に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（米国出願に関連する相互参照）
この非仮出願は、米国特許法第１１９条第（ｅ）項の下で、２００４年、９月１３日に出願された米国仮出願第６０／６０９，４８０号の利益を主張する。この先行出願は、その全体が本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
（連邦政府によって援助された研究または開発に関する陳述）
適用なし
（「配列表」に関する参照）
適用なし
（発明の背景）
（発明の分野）
本発明は、毒性があり、出血生ネコカリシウイルスの新規の単離されて精製された菌株、その菌株から産生されるワクチンおよびネコをカリシウイルス感染または疾患から防御するためのワクチンの使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
（関連技術の詳細）
本明細書中に引用される全ての特許および刊行物は、その全体が本明細書中に参考として援用される。
【０００４】
ネコカリシウイルス（ＦＣＶ）は、しばしば、多くのネコのいる環境（特に、動物病院および少ない程度で動物保護施設）において急性の発症を引き起こす。代表的に、ＦＣＶ感染は、上気道に影響を与え、時折、関節痛および跛行を引き起こすことによるウイルス鼻気管炎（ＦＶＲ）と似ている症状を示す。さらに、感染したネコは、舌の上および口の部分において潰瘍を発症する。鼻腔、硬口蓋および舌の小疱疹および糜爛は、蔓延するように見える。ＦＣＶ疾患の他の症状としては、高熱、脱毛、脚または顔の周りにおける皮膚腫瘍形成および水腫（腫脹）が挙げられる。感染菌株の毒性に依存して、ＦＣＶ感染は、致命的になり得る。感染の主要な方法は、感染の経口経路によるが、ネコはまた、感染したネコの唾液、顔または尿に見出される感染ウイルスの吸入から感染し得る。
【０００５】
ＦＣＶ感染は、飼いネコおよびいくらかの野生のネコ種の両方に影響を与え得る。ＦＶＲおよびＦＣＶは、全てのネコ呼吸器感染のうちのほとんど９０％を含み、これらの２つの疾患を予防するための効果的なワクチンの有効性が、最も重要である。ＦＣＶは、新しい菌株に変異し得る一本鎖のＲＮＡウイルスである（非特許文献１）。６５種以上のネコカリシウイルスが世界中に存在し、これにより、単独に構成されるワクチンを用いるワクチン接種による適切な防御は、ほとんど不完全で困難になっている。ウイルスが変異し得るために、ＦＣＶの一本鎖に基づく一価ウイルスは、他のＦＣＶ株に対して十分に防御し得ない（一般的に、非特許文献２；非特許文献３；非特許文献４；非特許文献５を参照のこと）。
【０００６】
ＦＣＶに関する別の問題は、ウイルスが非常に感染性であり、感染したネコは、感染後、長期間ウイルスをまき散らし続け、回復したネコは、一生、感染性ウイルスのキャリアを保持し得る。無症候性のネコでさえ、他の健康なネコに対して致命的な疾患を伝播し得る。最近の急激な発生は、北カリフォルニアおよびニューイングランドにおいて、特に、

動物保護施設におけるネコの集団に対して致命的であった２つの遺伝的に多様な菌株（それぞれ、ＦＣＶ－ＡｒｉおよびＦＣＶ－Ｄｉｖａと名付けられている）の非常に毒性がある、出血性カリシウイルスが報告されている（非特許文献６；非特許文献７）。

【０００７】

過去に、一価ウイルスワクチンが、種々の抗原（例えば、ネコカリシウイルスＦ９菌株（特許文献１（Ｊ．Ｌ．Ｂｉｔｔｌｅら））、ネコＣｈｌａｍｙｄｉａ ｐｓｉｔｔａｃｉ（特許文献２および特許文献３（Ｈ．Ｊ．Ｃｈｕら））、ネコ白血病ウイルス（特許文献４（Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎら））など）を用いてネコの疾患を防御するために記載され、数種類が製造された。他のカリシウイルス菌株（例えば、ＦＣＶ－Ｍ８およびＦＣＶ－２５５）およびネコ鼻気管炎ウイルスもまた、以前にワクチン用途のために単離され、記載されている（非特許文献８；非特許文献９；非特許文献１０）。さらに、特許文献５（Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎ）は、ＦＣＶ－２２８０株を含むネコカリシウイルスワクチンを記載している。特許文献６（Ｄ．Ｃｏｌａｕら）は、ＦＣＶ－２２８０株のゲノム由来のヌクレオチド配列およびネコカリシウイルス疾患を防御するためのカプシド遺伝子のヌクレオチド配列を用いるワクチンを開示している。特許文献７（Ｇ．Ｐ．Ｗｉｅｓｅｈａｈｎら）は、とりわけ、ネコカリシウイルスを含む不活性化ウイルスワクチンの調製を開示している。特許文献８（Ｌ．Ｓｉｍｐｓｏｎら）は、抗原（例えば、カリシウイルス）と共に改変されたボツリヌス毒素を用いる経口ワクチンを記載している。

【０００８】

より最近では、ＦＣＶ－Ｋａｏｓの株が、同定されて（非特許文献１１）、続いて、ＦＣＶ－Ｋａｏｓ株およびＦＣＶ－Ａｒｉ株の両方が、単離された（特許文献９（２００４年９月１６日に公開されたＨｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ））。単離された毒性があり、全身性のカリシウイルス（ＶＳ－ＦＣＶ）株（ＦＣＶ－Ｋａｏｓ、ＦＣＶ－ＡｒｉおよびＦＣＶ－Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍが挙げられる）は、アミノ酸４４８位におけるリジン（Ｋ）；アミノ酸４５２位におけるグルタミン酸（Ｅ）；アミノ酸５８１位におけるリジン（Ｋ）；およびアミノ酸５８１位におけるアスパラギン酸（Ｄ）からなる群より選択されるアミノ酸残基を含むカプシドタンパク質を含むと記載されている（特許文献１０（２００４年１２月２３日に公開されたＶｉｒｕｌｅｎｔ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ））。

多価ワクチンは、ネコ白血病、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコカリシウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、ネコ後天性免疫不全症ウイルス、狂犬病、ネコ感染性腹膜炎、Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉなどを含む、１種以上の病原体と組み合わせた多くのウイルス抗原（例えば、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｆｅｌｉｓ（以前はＣｈｌａｍｙｄｉａ ｐｓｉｔｔａｃｉとして公知））を含むように調製または記載されている（特許文献１１（Ｈ．Ｊ．Ｃｈｕら））。Ｒｉｃｋａｒｄ単離体ネコ白血病ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、ネコカリシウイルスおよびネコ汎白血球減少症ウイルスの別の混合物は、同様にワクチンとして開示されている（特許文献１２（Ｗ．Ｈ．Ｋｅｌｓｅｙら））。

残念ながら、以前に使用されたネコカリシウイルスの菌株を含む前のワクチンのどれも、出現する出血性ネコカリシウイルス株からネコを防御しない。最近の出血性ネコカリシウイルスの急激な発生において、ネコがカリシウイルスに対するワクチン接種を受けたという事実にもかかわらず、かなり多くが死んだ。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】米国特許第３，９４４，４６９号明細書
【特許文献２】米国特許第５，９７２，３５０号明細書
【特許文献３】米国特許第５，２４２，６８６号明細書
【特許文献４】米国特許第４，２６４，５８７号明細書
【特許文献５】米国特許第４，５２２，８１０号明細書

【特許文献６】米国特許第６，２３１，８６３号明細書
【特許文献７】米国特許第５，１０６，６１９号明細書
【特許文献８】米国特許第６，０５１，２３９号明細書
【特許文献９】米国特許出願第２００４０１８００６４　Ａ１号明細書
【特許文献１０】米国特許出願第２００４０２５９２２５　Ａ１号明細書
【特許文献１１】米国特許第６，００４，５６３号明細書
【特許文献１２】米国特許第５，３７４，４２４号明細書
【非特許文献】
【００１０】
【非特許文献１】Ｊ．Ｎ．Ｂｕｒｒｏｕｇｈｓら、「Ｐｈｙｓｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｆｏｔ ｔｈｅ ｒｅ－ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓｅｓ」、Ｊｏｕｒｎａｌ Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．、１９７４年、第２２巻、ｐ．２８１－２８６
【非特許文献２】Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎら、「Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｆｏｒ ｐｅｒｓｉｓｔｅｎｃｅ ｏｆ ａｃｕｔｅ ａｎｄ ｃｈｒｏｎｉｃ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎｓ ｉｎ ｔｈｅ ｆａｃｅ ｏｆ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ」、Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．、１９９５年１１月、第４７巻（１－２）、ｐ．１４１－１５６
【非特許文献３】Ａ．Ｌａｕｒｉｔｚｅｎら、「Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ ｉｓｏｌａｔｅｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ａｎｄ Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ」、Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．、１９９７年５月、第５６巻（１－２）、ｐ．５５－６３
【非特許文献４】Ｔ．Ｈｏｈｄａｔｓｕら、「Ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ ｆｅａｔｕｒｅ ｏｆ ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌｌｙ ａｖａｉｌａｂｌｅ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ（ＦＣＶ）ｖａｃｃｉｎｅ ｉｍｍｕｎｅ ｓｅｒａ ａｇａｉｎｓｔ ＦＣＶ ｆｉｅｌｄ ｉｓｏｌａｔｅｓ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｓｃｉ．、１９９９年３月、第６１巻（３）、ｐ．２９９－３０１
【非特許文献５】Ａ．Ｄ．Ｒａｄｆｏｒｄら、「Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ ａｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｂａｓｅｄ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｙｐｉｎｇ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｃｉｖｉｒｕｓ ｉｓｏｌａｔｅｓ ｆｒｏｍ ｖａｃｃｉｎｅ ｆａｉｌｕｒｅｓ」、２０００年１月２９日、第１４６巻（５）、ｐ．１１７－１２３
【非特許文献６】Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎら、「Ａｎ ｉｓｏｌａｔｅｄ ｅｐｉｚｏｏｔｉｃ ｏｆ ｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ－ｌｉｋｅ ｆｅｖｅｒ ｉｎ ｃａｔｓ ｃａｕｓｅｄ ｂｙ ａ ｎｏｖｅｌ ａｎｄ ｈｉｇｈｌｙ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｓｔｒａｉｎ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ」、Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．、２０００年５月、第７３巻、ｐ２８１－３００
【非特許文献７】Ｅ．Ｍ．Ｓｃｈｏｒｒ－Ｅｖａｎｓら、「Ａｎ ｅｐｉｚｏｏｔｉｃ ｏｆ ｈｉｇｈｌｙ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ ｄｉｓｅａｓｅ ｉｎ ａ ｈｏｓｐｉｔａｌ ｓｅｔｔｉｎｇ ｉｎ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｆｅｌｉｎｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｓｕｒｇｅｒｙ、２００３年、第５巻、ｐ．２１７－２２６
【非特許文献８】Ｅ．Ｖ．Ｄａｖｉｓら、「Ｓｔｕｄｉｅｓ ｏｎ ｔｈｅ ｓａｆｅｔｙ ａｎｄ ｅｆｆｉｃａｃｖ ｏｆ ａｎ ｉｎｔｒａｎａｓａｌ ｆｅｌｉｎｅ ｒｈｉｎｏｔｒａｃｈｅｉｔｉｓ－ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ ｖａｃｃｉｎｅ」、ＶＭ－ＳＡＣ、１９７６年、第７１巻、ｐ．１４０５－１４１０
【非特許文献９】Ｄ．Ｅ．Ｋａｈｎら、「Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｉｍｍｕｎｉｔｙ ｔｏ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒａｌ ｄｉｓｅａｓｅ」、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．、１９７５年、第１１巻、ｐ．１００３－１００９

【非特許文献１０】Ｄ．Ｅ．Ｋａｈｎ、「Ｆｅｌｉｎｅ ｖｉｒｕｓｅｓ：ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｃａｔ」、Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ、１９７１年、第３２巻、ｐ．５２１－５３１
【非特許文献１１】Ｋ．Ｆ．Ｈｕｒｌｅｙら、「Ａｎ Ｏｕｔｂｒｅａｋ ｏｆ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ ｄｉｓｅａｓｅ」、Ｊ．Ａｍ．Ｖｅｔ．Ｍｅｄ．Ａｓｓｏｃ．、２００４年1月１５日、第２２４巻（２）、ｐ．２４１－２４９

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

従って、非常に毒性がある出血性ネコカリシウイルス感染に対する、効果的で、安全なワクチンを生成するために、獣医学分野において確実な技術的に認識される必要性が存在する。別の技術的に認識される必要性は、出血性ＦＣＶ株および通常のＦＣＶ株の両方によって引き起こされる重篤な感染および疾患に対してネコを防御する広範囲のウイルスワクチンを提供することである。本発明の新規のＦＣＶ株は、急性および慢性ウイルス疾患からネコを防御するために、毒性があり、出血性ＦＣＶの株に対する特異的免疫応答を唯一および有利に誘発することによって、これらの必要性を満たし得る。通常のカリシウイルスと組み合わせて、本発明の新規のＦＣＶ株は、優れたウイルス中和抗体価を達成し得、広範囲の免疫を可能にし得る。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

（発明の要旨）

本発明は、非常に感染性があり、ＦＣＶ－ＤＤ１と命名された新規の出血性ＦＣＶ株に関し、これは、ワクチン株として有用である。本発明のさらなる実施形態は、出血性ネコカリシウイルスによって引き起こされる感染および疾患に対してネコを免疫するためにワクチンを用いる新規の方法に関する。ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１またはネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１抗原に対して惹起または産生される抗体の存在を検出することによって、感受性宿主、無症候性キャリアなどにおいて出血性ネコカリシウイルスを診断または検出するための方法もまた、本発明に包含される。

本発明は例えば、以下の項目を提供する：

（項目１）

単離および精製された出血性ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１。

（項目２）

菌株が、ＡＴＣＣ特許受託番号ＰＴＡ－６２０４またはその菌株由来のウイルスクローンである、項目１に記載のネコカリシウイルス。

（項目３）

免疫学的に有効な量の項目１に記載のネコカリシウイルスを含む、免疫原性組成物。

（項目４）

無毒性で、生理学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤および項目３に記載の免疫原性組成物を含む、ワクチン。

（項目５）

１種以上のさらなるネコカリシウイルスをさらに含む、項目４に記載のワクチン。

（項目６）

前記さらなるネコカリシウイルスが、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０、ＦＣＶ－Ｄｉｖａ、ＦＣＶ－Ｋａｏｓ、ＦＣＶ－Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍ、ＦＣＶ－Ｆ９、ＦＣＶ－Ｆ４、ＦＣＶ－Ｍ８およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目５に記載のワクチン。

（項目７）

前記さらなるネコカリシウイルスが、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０またはＦＣＶ－

２５５とＦＣＶ－２２８０との組み合わせを含む、項目６に記載のワクチン。
（項目８）
前記さらなるネコカリシウイルスが、ＦＣＶ－２５５を含む、項目７に記載のワクチン。
（項目９）
Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓ、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される抗原をさらに含む、項目７に記載のワクチン。
（項目１０）
前記抗原が、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓ、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスの組み合わせを含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１１）
前記抗原が、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓ、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスの組み合わせを含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１２）
前記抗原が、ネコ白血病ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスの組み合わせを含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１３）
アジュバントをさらに含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１４）
前記アジュバントが、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、界面活性剤、ポリアニオン、ポリカチオン、洗浄剤、ペプチド、代謝可能動物油または代謝可能植物油、鉱油、鉱油エマルジョン、免疫調節剤、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー、スチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物とのコポリマー、コリネバクテリウム由来アジュバント、プロピオン酸菌属由来アジュバント、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｂｏｖｉｓ（Ｂａｃｉｌｌｅ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）、インターロイキン、インターフェロン、リポソーム、イスコム（ｉｓｃｏｍ）アジュバント、ミコバクテリア細胞壁抽出物、合成グリコペプチド、アブリジン、脂質Ａ、硫酸デキストラン、ＤＥＡＥ－デキストラン、カルボキシポリメチレン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、アクリルコポリマーエマルジョン、動物ポックスウイルスタンパク質、サブウイルス粒子アジュバント、コレラ毒素、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウムおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１３に記載のワクチン。
（項目１５）
前記アジュバントが、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、スチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物とのコポリマー、鉱油エマルジョンまたはそれらの組み合わせである、項目１４に記載のワクチン。
（項目１６）
前記アジュバントが、サポニン、スクアラン、スクアレンであり、前記洗浄剤、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはそれらの組み合わせである、項目１４に記載のワクチン。
（項目１７）
前記無毒性で、生理学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤が、生理食塩水またはイーグル最小必須培地を含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１８）
防腐剤をさらに含む、項目９に記載のワクチン。
（項目１９）
前記防腐剤が、チメロサール、ネオマイシン、ポリミキシンＢ、アンホテリシンＢ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目１８に記載のワクチン。
（項目２０）

ネコカリシウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目４に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目２１）

ネコカリシウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目５に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目２２）

ネコカリシウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目７に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目２３）

ネコカリシウイルス、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓ、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａおよびそれらの組み合わせによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目９に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目２４）

ネコカリシウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルスおよびＣｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目１０に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目２５）

ネコカリシウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルスおよびＣｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ　ｆｅｌｉｓによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目１１に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法

（項目２６）

ネコカリシウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量の項目１２に記載のワクチンを該ネコに投与する工程を包含する、方法

（項目２７）

項目２０、２１、２２、２３、２４、２５および２６のいずれか１項に記載の方法であって、前記ワクチンが、前記ネコに対して、非経口、経口、鼻腔内、口腔鼻または経皮的に投与される、方法。

（項目２８）

前記ワクチンが、前記ネコに対して、筋肉内、皮下または口腔鼻に投与される、項目２７に記載の方法。

（項目２９）

ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１に対して惹起または産生される、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体。

（項目３０）

ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１に対する抗体の形成を刺激する方法であって、該方法は、免疫学的に有効な量のＦＣＶ－ＤＤ１またはその抗原性サブユニットをネコに投与する工程を包含する、方法。

（項目３１）

感受性宿主において出血性ネコカリシウイルス感染を検出または診断する方法であって、該方法は、該宿主由来の生物学的試料を分析する工程、および生物学的試料においてネコ

カリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１あるいはネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１に対して惹起または産生される抗体の存在を検出する工程を包含する、方法。

（項目３２）

生物学的サンプルにおいてネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１に対する抗体を検出する方法であって、該方法は、該生物学的サンプルと、ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１を含む抗原とを接触させる工程、および抗原－抗体免疫複合体の形成を検出または観測する工程を包含する、方法。

（項目３３）

前記抗原が、完全なウイルスＦＣＶ－ＤＤ１である、項目３２に記載の方法。

（項目３４）

前記抗原が、ＦＣＶ－ＤＤ１の抗原性サブユニットである、項目３２に記載の方法。

（項目３５）

前記抗原－抗体免疫複合体が、酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）によって検出される、項目３２に記載の方法。

（項目３６）

前記抗原－抗体免疫複合体が、ウェスタンブロットによって検出される、項目３２に記載の方法。

（項目３７）

前記抗原－抗体免疫複合体が、フローサイトメトリーによって検出される、項目３２に記載の方法。

（項目３８）

前記抗原－抗体免疫複合体が、ＩＦＡによって検出される、項目３２に記載の方法。

（項目３９）

ＦＣＶ－ＤＤ１抗原に対する抗体を検出するための酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）であって、該酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）は、ＦＣＶ－ＤＤ１および該抗体が該抗原に結合する場合を示す、検出可能な基質でコーティングされた固体支持体を含む、酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）。

（項目４０）

出血性ネコカリシウイルス抗原のキャリアを検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

（ａ）試験サンプルを得る工程；

（ｂ）該試験サンプルとＦＣＶ－ＤＤ１に対する抗体とをインキュベートする工程；

（ｃ）抗体－抗原複合体を形成させる工程；および

（ｄ）該抗体－抗原複合体の存在を検出する工程、

を包含する、方法。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

（発明の詳細な説明）

本発明に従って、新規で、非常に感染性のあるネコカリシウイルス（ＦＣＶ）株およびカリシウイルスによって引き起こされるウイルス感染からネコを防御するための獣医学ワクチンが提供される。より具体的には、本発明は、単離されて精製された出血性ネコカリシウイルス「ＦＣＶ－ＤＤ１」を記載し、ＦＣＶ－ＤＤ１単離体由来のウイルスクローンを含む（ＦＣＶ－ＤＤ１単離体が本明細書中に記載される場合はいつでも、ウイルスクローンが、各場合において親単離体と置き換えられ得ることが、理解される）。ＦＣＶ－ＤＤ１の免疫原性の量を含むワクチンおよびネコカリシウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御する方法または疾患を予防するもまた、開示され、この方法は、防御を必要とするネコに対して、免疫学的に有効な量のワクチンを投与する工程を包含する。ワクチンは、必要に応じて、１種以上のさらなるＦＣＶ単離体（例えば、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０、ＦＣＶ－Ｄｉｖａ、ＦＣＶ－Ｋａｏｓ、ＦＣＶ－Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍ、ＦＣＶ－Ｆ９、ＦＣＶ－Ｆ４、ＦＣＶ－Ｍ８など）を含み得る。望ましくは、ワ

クチンは、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０またはその両方と共にＦＣＶ－ＤＤ１、より好ましくは、ＦＣＶ－ＤＤ１とＦＣＶ－２５５との混合物を含む。

【００１４】

また、ワクチンは必要に応じて、他の抗原または病原体（例えば、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｆｅｌｉｓ（Ｃ．ｆｅｌｉｓ）、ネコ白血病ウイルス（ＦｅＬＶ）、ネコ汎白血球減少症ウイルス（ＦＰＶ）、ネコ鼻気管炎ウイルス（ＦＶＲ）、ネコ免疫不全ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ細菌（例えば、代表的には、ネコひっ掻き病（ｃａｔ ｓｃｒａｔｃｈ ｄｉｓｅａｓｅ））、それらの組み合わせなど）を含み得る。好ましくは、抗原の混合物は、Ｃ．ｆｅｌｉｓ、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスと組み合わせて、またはＣ．ｆｅｌｉｓ、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスと組み合わせてＦＣＶ－ＤＤ１を含む。特に好ましい多価ワクチンは、ネコ白血病ウイルスおよび／またはＣ．ｆｅｌｉｓ、または他のＦＣＶ株の任意の付加とともにＦＣＶ－ＤＤ１、非出血性ネコカリシウイルス（例えば、ＦＣＶ－２５５）、ネコ鼻気管炎ウイルスおよびネコ汎白血球減少症ウイルスを含む。

【００１５】

新規の出血性ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１株の発見に至るまで、ＦＣＶ－Ａｒｉの組織培養サンプルを、Ｓｃｈｏｏｌ ｏｆ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，ＵＣ Ｄａｖｉｓ，ＣａｌｉｆｏｒｎｉａのＤｒ．Ｎｅｉｌｓ Ｐｅｄｅｒｓｅｎから得た（Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎら、「Ａｎ ｉｓｏｌａｔｅｄ ｅｐｉｚｏｏｔｉｃ ｏｆ ｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ－ｌｉｋｅ ｆｅｖｅｒ ｉｎ ｃａｔｓ ｃａｕｓｅｄ ｂｙ ａ ｎｏｖｅｌ ａｎｄ ｈｉｇｈｌｙ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｓｔｒａｉｎ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ」、Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７３：２８１－３００（２０００年５月））。ＦＣＶ－Ａｒｉのサンプルを凍結し、解凍して使用し、組織培養ローラーボトルのコンフルエントなＣｒａｎｄｅｌｌ Ｆｅｌｉｎｅ Ｋｉｄｎｅｙ Ｃｅｌｌ（ＣＲＦＫ）を感染させた（Ｒ．Ａ．Ｃｒａｎｄｅｌｌら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ ｖｉｒａｌ ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｏｆ ａ ｆｅｌｉｎｅ（Ｆｅｌｉｓ ｃａｔｕｓ）ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅ（ＣＲＥＫ）」，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ９：１７６－１８５（１９７３））。後で、ローラーボトルを凍結し、解凍し、培養液を、作業ストックとして等分した。

【００１６】

最初のＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を使用して、Ｄｒ．Ｎｅｉｌｓ Ｐｅｄｅｒｓｅｎから得た材料由来の「作業ストック」が、出血性カリシウイルスを含むことを確認するためにネコに接種した。ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を接種したネコは、ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」が、出血性カリシウイルスを含むことを確認する、極度の臨床徴候（例えば、高熱、水腫、脱水および死）を誘発した。

【００１７】

次いで、ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を、１ｍＬあたり10^5ＴＣＩＤ$_{50}$に希釈し、凍結し、解凍し、０．２μｍで濾過した。濾過したＦＣＶ－Ａｒｉを、ほとんどの毒性カリシウイルス株の後の精製および単離のために使用した。濾過したＦＣＶ－Ａｒｉを、澄まし、連続的に希釈して使用し、２４－ウェル組織培養プレートのコンフルエントをＣＲＦＫ細胞で感染させた。ＣＰＦＫ細胞に対する細胞変性効果（ＣＰＥ）を含む最も高い希釈のウェルを、収集し、凍結し、すぐに解凍し、連続的に希釈して使用し、別の２４－ウェル組織培養プレートのコンフルエントをＣＲＦＫ細胞で感染させた。この手順を、合計で３ラウンドの精製および単離のために２回繰り返した。

【００１８】

このように精製したＦＣＶ－Ａｒｉの一部を、ホルマリンで不活性化して使用し、死滅させた多価ワクチンを混合した。この不活性化ＦＣＶ－Ａｒｉワクチンをネコに注射して、ワクチン接種に対する血清学的応答を測定した。予想外に、ワクチンは、たとえウイル

スに対する抗体が、ＥＬＩＳＡによって確認されるように誘発されたとしても、ウイルス中和抗体価を誘発しなかった。さらに、精製したＦＣＶ－Ａｒｉ（生きている）を使用して、２群のネコに接種した。これらの２群のネコは、出血性カリシウイルス感染の臨床徴候（例えば、高熱、水腫、膿皮症、脱毛など）の特徴を示さなかった。死滅させたワクチンは、中和抗体を誘発しなかったため、ＦＣＶ－Ａｒｉの「作業ストック」から精製した生きている菌株は、制御されたチャレンジ研究において出血性カリシウイルス感染を引き起こさず、ＦＣＶ－Ａｒｉのサンプルの最初の精製から単離したウイルスは、出血性単離体でないことを確認し；さらにこの菌株の作業およびワクチン開発を中止した。次いで、２つまたはおそらくそれ以上のＦＣＶ株を含む元のＦＣＶ－Ａｒｉのウイルスサンプルの少なくとも１つは、最初の精製から得た単離した菌株によって示されるように毒性がないことが推定された。

【００１９】

出血性ネコカリシウイルス感染を引き起こす毒性のある菌株を単離する試みにおいて、ＦＣＶ－Ａｒｉの元の組織培養サンプルを、３ラウンドの精製および単離のために使用した。この課題を達成するために、ＦＣＶ－Ａｒｉサンプルを、元のＦＣＶ－Ａｒｉ（死滅させた）ワクチン接種から得た抗血清とともにインキュベートした。ウイルスを、連続的に希釈して使用し、２４－ウェル組織培養プレートのコンフルエントをＣＲＦＫ細胞で感染させ、ＣＲＦＫ細胞に対する細胞変性効果（ＣＰＥ）を示した最も高い希釈のウェルを、収集した。収集したウイルスクローンを、標準的な血清ウイルス中和アッセイによって評価した。各ウイルスクローンを、最初の精製して死滅させたワクチンから得た抗血清とともに、または生きている「作業ストック」でのチャレンジから得た抗血清とともにインキュベートした。この血清中和アッセイからの結果は、驚くべきことに、元のサンプルにおいて１種以上のカリシウイルスの株が存在することを示し、さらに、最初のラウンドの精製から単離した株は、出血性株ではないことを確認した。選択および処分されなかったウイルスクローンは、最初の精製の望ましくない産物に特異的な抗血清によって中和されたものであった。次のラウンドの精製のために選択したウイルスクローンは、最初の精製の望ましくな産物に対して特異的な抗血清によってまだ中和されていないＤｒ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎから得た元のウイルスに対する抗血清によって中和されたものであった。ＣＰＥを引き起こす最も高い希釈を収集することによるウイルスクローン選択を、合計で３ラウンド繰り返した。得られたウイルス単離体（ＦＣＶ－ＤＤ１と命名した）をネコに接種すると、ネコは、代表的な出血性カリシウイルスの臨床徴候を示した。このプロセスによって、精製および単離したＦＣＶ－ＤＤ１株を、真の出血性ネコカリシウイルス株（以前に獣医学分野において知られていない）であると決定した。

【００２０】

従って、新規の精製および単離されたＦＣＶ－ＤＤ１株、ＦＣＶ－ＤＤ１のワクチンおよびカリシウイルスを使用する方法は、本発明の範囲内に含まれる。接種されたネコは、カリシウイルスによって引き起こされる重篤なウイルス感染および疾患から防御される。この新規の方法は、本発明に従って、免疫学的に有効な量のワクチン（例えば、死滅されたＦＣＶ－ＤＤ１、改変された生きているＦＣＶ－ＤＤ１または弱毒化されたＦＣＶ－ＤＤ１またはそのクローンを含むワクチン）をネコに投与することによって、ウイルス感染に対して防御する必要のあるネコを防御する。ワクチンはさらに、多数のネコ疾患に対してネコの免疫学的防御を促進するために、さらなる抗原（非出血性カリシウイルス株（例えば、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０など）、他の出血性カリシウイルス（例えば、ＦＣＶ－Ｄｉｖａ、ＦＣＶ－Ｋａｏｓ、ＦＣＶ－Ｆ９など）および他の抗原（例えば、ネコウイルス鼻気管炎、ネコ汎白血球減少症ウイルス（ネコジステンパー）、Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｆｅｌｉｓ（Ｃ．ｆｅｌｉｓ）など）が挙げれるが、これらに限定されない）を含み得る。さらなる抗原は、ウイルス感染に対して広範囲の防御を提供するために、生成物と組み合わせて、または別々にネコに同時に与えられ得る。最も好ましくは、混合物は、ＦＣＶ－ＤＤ１、ＦＣＶ－２５５、Ｃ．ｆｅｌｉｓ、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルス、あるいは代替としてＦＣＶ－Ｄ

Ｄ１、ＦＣＶ－２５５、ネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルス、死滅されたウイルス、ならびに必要に応じて、ネコ白血病ウイルスおよび／もしくはＣ．ｆｅｌｉｓまたは他のＦＣＶ株を含む。補完的な様式において、感染または疾患に対するワクチンを含むＦＣＶ－ＤＤ１によって確認される防御の範囲を広げるために、２種以上のＦＣＶ株を含む多価ワクチンを有するこが有用であり、ここで、さらなるＦＣＶ株としては、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２８０、ＦＣＶ－Ｄｉｖａ、ＦＣＶ－Ｋａｏｓ、ＦＣＶ－Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍ、ＦＣＶ－９、ＦＣＶ－Ｆ４、ＦＣＶ－Ｍ８などが挙げられるが、これらに限定されず；そして、特に、少なくとも１種以上の非出血性株（例えば、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０など）を含むことが有益である。特定のＦＣＶ抗原（例えば、ＦＣＶ－Ｆ９）を使用する場合、ウイルスの毒性に適応させるために、改変された生きているワクチンまたは弱毒化されたワクチンを作製することが所望される。ワクチンにおける好ましい抗原の組み合わせは、ＦＶＶ－ＤＤ１を含むさらなるネコカリシウイルスが、少なくともネコ汎白血球減少症ウイルスおよびネコ鼻気管炎ウイルスとともに、ＦＣＶ－２５５、ＦＣＶ－２２８０またはＦＣＶ－２５５とＦＣＶ－２２８０との組み合わせを含むものである。

【００２１】

ワクチンは、例えば、無毒性の生理学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤および他の賦形剤、アジュバントあるいはネコ種に許容される従来の同時処方物と組み合わせて、感染性ウイルス（例えば、不活性化（死滅された）ウイルス、弱毒化されたウイルス、改変された生きているウイルスなど）含む。単離および精製されたＦＣＶ－ＤＤ１株またはそのウイルスクローンは、多価ウイルスとして使用され得、ここで、防御は、交差中和の間の他の血清型によって感染に対する防御を提供するその能力に依存する。同じ血清型を有する反復接種は、代表的に、後の重篤な感染に対する防御を与える。

【００２２】

本発明の新規のワクチンは、任意の特定の型の調製方法に限定されない。ウイルスワクチンとしては、不活性化（死滅された）ワクチン、改変された生きているワクチン、弱毒化されたワクチン、サブユニットワクチン、遺伝子操作されたワクチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのワクチンは、当該分野において公知の標準的な方法によって調製される。毒性のあるＦＣＶ感染および疾患に対してネコに接種するための新規のＦＣＶ－ＤＤ１株を送達するための最も好ましいワクチンは、不活性化（死滅された）ウイルスワクチンまたは改変された生きているウイルスワクチンである。

【００２３】

不活性化ウイルスワクチンを調製するために、例えば、ウイルス増殖が、当該分野に公知または本明細書中に記載される方法によって、行われる。ウイルス不活性化は、当業者に一般的に公知のプロトコルによって達成される。不活性化ウイルスワクチンは、ウイルスを不活性化因子（例えば、ホルマリンまたは疎水性溶媒、酸、βプロピオラクトン、バイナリー（ｂｉｎａｒｙ）エチレンジアミンなど）で処理することによって、調製され得る。ホルマリンは、最も好ましい不活性化因子である。不活性化は、当該分野において公知様式において行われる。例えば、化学的不活性化を達成するために、適切なウイルスサンプルまたはウイルスを含む血清サンプルが、ウイルスを不活性化するために、不活性化因子に依存して、十分に高いまたは低い温度あるいはｐＨにおいて、十分な量または濃度の不活性化因子で、十分な期間、処理される。感染に対して感受性の細胞に感染し得ない場合、ウイルスが不活性化であるとみなされる。

【００２４】

適切なワクチンの調製は、代表的に、改変された生きているワクチンまたは不活性化ワクチンの調製と異なる。サブユニットワクチンの調製の前に、防御またはワクチンの抗原性成分が、確認されなければならない。このような防御または抗原性組成物としては、例えば、ウイルス株の免疫原性タンパク質またはカプシドタンパク質が挙げられる。免疫原性組成物は、当該分野において公知の方法によって同定される。いったん、同定されると、防御またはウイルスの抗原性タンパク質（すなわち、サブユニット）が、続いて、標準

的な手順によって精製され、そして／または標準的な組換えＤＮＡ技術によってクローニングされる（例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ ＨａｒｂｏｒＬａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＭＡ．１９８９を参照のこと）。サブユニットワクチン（例えば、高度に精製されたウイルスのサブユニット）が、完全なウイルスより毒性が少ないために、サブユニットワクチンは、生きているウイルスに基づいた他のワクチンより利点を提供する。

【００２５】

毒性のあるウイルスクローンで、組織培養を適用された、生きている病原性ＦＣＶ由来の弱毒化されたワクチンを調製するために、最初に、当該分野において公知の方法によって弱毒化され、代表的に、細胞培養によって連続的に継代される。病原性クローンの弱毒化はまた、ウイルスゲノムの遺伝子欠失をもたらす、点変異を導入することによってなされ得る。

【００２６】

本発明のワクチンの免疫学的に有効または免疫原性の量は、ウイルス感染に対する防御を必要とするネコ（通常、８週齢またはそれ以上）に投与される。ＦＣＶ感染および疾患に対してネコに接種する免疫学的に有効または免疫原性の量は、獣医学分野における当業者による慣例の試験によって、容易に決定され得るか、または容易に滴定され得る。有効な量は、ワクチンに対して十分な免疫学的応答があり、これにより、毒性のあるネコウイルスに曝露されたネコの防御が達成される。ＦＣＶについての免疫学的応答は、一般に、ウイルス中和抗体価を誘導するワクチンの能力によって示される。好ましくは、ネコは、ある程度まで防御され、ここで、ウイルス疾患状態の有害な生理学的徴候または効果は、顕著に減少、改善または完全に予防される。

【００２７】

ワクチンは、代表的に、単回投与または長期にわたる反復投与において投与される。例えば、投薬範囲は、ワクチンの免疫原性成分の濃度に依存して、約０．２５ｍＬ～約３．５ｍＬ、通常、約０．５ｍＬ～約２．５ｍＬ、好ましくは、約０．８ｍＬ～約１．２ｍＬ、および最も好ましくは、約１．０ｍＬであるが、副作用またはウイルス感染の生理学的症状を生じるのに十分なウイルスベースの抗原の量を含まないべきである。ネコの体重、抗原の濃度および他の代表的な因子に基づいて、最低限の効果的な投薬を見出すために、活性抗原性因子の適切な投薬を決定または滴定するための方法は、当該分野において周知である。最適な免疫化のために、健康なネコは、を用いて、無菌技術を用いて約１ｍｌの用量でワクチン接種され、次いで、第２の１ｍｌの用量は、約２週間～４週間後に与えられる。ワクチンの単回の追加注射を用いる年１回のワクチン再接種は、感染に対する十分な免疫を維持するために有用である。

【００２８】

ワクチンは、便宜的に、鼻腔内、経皮的（すなわち、全身性吸収のために皮膚表面上または皮膚表面に適用される）、非経口的、経口的などで、または組み合わせて（例えば、用量の一部が経口的に与えられ、一部が鼻孔中に与えられる口腔鼻）投与され得る。投与の非経口的経路としては、筋肉内、皮下、皮内（すなわち、注射またはそうでなければ皮膚の下に入れられる）、静脈内などが挙げられるが、これらに限定されない。筋肉内、皮下および口腔鼻の投与経路が、最も好ましい。

【００２９】

液体として投与される場合、本発明のワクチンは、溶剤、シロップ、エリキシル剤、チンキ剤などの従来の形態で調製され得る。このような処方物は、当該分野において公知であり、代表的に、ネコに対する投与のための適切なキャリアまたは溶媒系における抗原および他の添加剤の溶解または分散によって調製される。適切な無毒性の生理学的に受容可能なキャリアまたは溶媒としては、水、生理食塩水、エチレングリコール、グリセロールなどが挙げられるが、これらに限定されない。ワクチンはまた、凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｅｄ）され得るか、そうでなければ、凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｉｅｄ）され

、次いで、使用前に短時間で適切な希釈剤を用いて、無菌的に再構成されるか、または再水和される。適切な希釈剤としては、生理食塩水、イーグル最小必須培地などが挙げられるが、これらに限定されない。代表的な添加剤または同時処方物は、例えば、認定された色素、矯味矯臭剤、甘味料および１種以上の抗菌性防腐剤（例えば、チメロサール（エチルメルクリチオサリシレートナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ ｅｔｈｙｌｍｅｒｃｕｒｉｔｈｉｏｓａｌｉｃｙｌａｔｅ））、ネオマイシン、ポリミキシンＢ、アンホテリシンＢなど）である。このような溶液は、例えば、部分的に加水分解されたゼラチン、ソルビトールまたは細胞培養培地の添加によって、安定化され得、そして、当該分野において公知の試薬（例えば、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、リン酸二水素カリウム、それらの混合物など）を用いる従来の方法によって、緩衝化され得る。

液体処方物はまた、他の標準的な同時処方物と組み合わせた因子を懸濁または乳化する含む懸濁液およびエマルジョンを含み得る。これらのタイプの液体処方物は、従来の方法によって調製され得る。懸濁液は、例えば、コロイドミルを用いて調製され得る。エマルジョンは、例えば、ホモジナイザーを用いて調製され得る。

【００３０】

体液系への注入のために設計される非経口的処方物は、ネコの体液のレベルに相当する適切な等張性およびｐＨ緩衝化を必要とする。等張性は、塩化ナトリウムおよび必要な場合、他の塩で調整されて適切にされ得る。ワクチン接種時に、ウイルスは、生理学的に受容可能なキャリア（例えば、脱イオン水、リン酸緩衝化生理食塩水など）で解凍（凍結されている場合）または再構成（凍結乾燥されている場合）される。適切な溶媒（例えば、プロピレングリコール）は、処方物における成分の溶解度および液体調製物の安定性を増加させるために使用され得る。

【００３１】

本発明のワクチンに使用され得るさらなる処方物としては、デキストロース、従来の酸化防止剤および従来のキレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））が挙げられるが、これらに限定されない。必要に応じて、ワクチン処方物を補い得る他の薬学的に受容可能なアジュバントとしては、以下が挙げられる：界面活性剤、ポリアミン、ポリカチオン、ペプチド、鉱油エマルジョン、免疫調節剤、種々の組み合わせなどが挙げられるが、これらに限定されない。適切なアジュバントのさらなる非限定的なとしては、スクアランまたはスクアレン（または他の動物源の油）；ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンブロックコポリマー（例えば、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）（例えば、ＢＡＳＦ Ａｋｔｉｅｎｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｙ，Ｌｕｄｗｉｇｓｈａｆｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙから市販されているＬ１２１））；サポニン；洗浄剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－８０（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから市販されているポリソルベート８０））；Ｑｕｉｌ Ａ（Ｉｓｃｏｔｅｃ ＡＢ，ＳｗｅｄｅｎおよびＳｕｐｅｒｆｏｓ Ｂｉｏｓｅｃｔｏｒ ａ／ｓ，Ｖｅｄｂａｅｋ，Ｄｅｎｍａｒｋから入手可能なＱｕｉｌｌａｊａ ｓａｐｏｎａｒｉａの精製された形態の商品名）；鉱油（例えば、Ｍａｒｃｏｌ（登録商標）（ＥｘｘｏｎＭｏｂｉｌ，Ｆａｉｒｆａｘ，ＶＡから市販されている、液体飽和炭化水素の精製された混合物））；植物油（例えば、ラッカセイ油）；コリネバクテイルム由来アジュバント（例えば、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）；プロピオニバクテリウム由来アジュバント（例えば、Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｎｅ）；Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ（Ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｎｅｔｔｅ－ＧｕｅｒｉｎまたはＢＣＧ）；インターロイキン（例えば、インターロイキン－２およびインターロイキン１２）；インターフェロン（例えば、γインターフェロン）；組み合わせ（例えば、サポニン－アルブミン水酸化物またはＱｕｌｉ Ａ－アルブミン水酸化物）；リポソーム；イスコム（ｉｓｃｏｍ）アジュバント；ミコバクテリア細胞壁抽出物；合成グリコペプチド（例えば、ムラミルジペプチドまたは他の誘導体）；Ｎ，Ｎ－ジオクタデシル－Ｎ’，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシエチル）－ピロパンジアミン（アビジリン）；脂質Ａ；硫酸デキストラン；ＤＥＡＥ－デキ

ストラン；カルボキシポリメチレン（例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）（Ｂ．Ｆ．Ｇｏｏｄｒｉｃｈ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，Ｏｈｉｏから市販されているポリアクリルポリマー））；無水マレイン酸エチレンまたはエチレン／無水マレイン酸コポリマー（Ｍｏｎｓａｎｔｏ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから市販されている、約７５，０００～１００，０００の推定平均分子量を有する直鎖状のエチレン／無水マレイン酸コポリマーである、ＥＭＡ（登録商標））；アクリルコポリマーエマルジョン（例えば、ＮｅｏＣｒｙｌ（登録商標）Ａ６４０のようなスチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物とのコポリマー（例えば、米国特許第５，０４７，２３８号（Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡから市販されているスチレンと混合されたアクリル酸とメタクリル酸との非結合水溶性アクリル酸コポリマー））；動物ポックスウイルスタンパク質；サブウイルス粒子アジュバント（例えば、オルビウイルス）；コレラ毒素；臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム（Ｋｏｄａｋ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹから市販されている、ＤＤＡ）；またはそれらの混合物。好ましいアジュバントは、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、スチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物とのコポリマー、鉱油エマルジョンまたはそれらの組み合わせを含む。

【００３２】

ＦＣＶ－ＤＤ１抗原を調製して、死滅させたＦＣＶ－ＤＤ１ワクチンを作製する方法の例を示すために、ウイルスを使用して、コンフルエントなＣＲＦＫ細胞を、組織培養ローラーボトルにおいて０．０１のＭＯＩ（代表的には、約０．００１～約１．０の範囲）にて感染させた。９０％～１００％のＣＰＥを観測した場合、ウイルス液を収集した。収集した液体を、４日間、３６℃で０．０４％ホルマリンを用いて不活性化した。残りのホルマリンを、亜硫酸水素ナトリウムの添加によって中和した。次いで、約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖのＦＣＶ－ＤＤ１を含む死滅させたＦＣＶ－ＤＤ１ワクチンを、ホルマリンで不活性化されたＦＣＶ－ＤＤ１単独；死滅させたＦｅＬＶ（約５．０％ｗ／ｖ～約５０％ｗ／ｖの量において）、ＦＰＶ（約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖの量において）、ＦＣＶ－２５５（約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖの量において）、ＦＶＲ（約１．０％ｗ／ｖ～約２０％ｗ／ｖの量において）およびＣ．ｆｅｌｉｓ（約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖの量において）と組み合わせたＦＣＶ－ＤＤ１；ならびにＦＰＶ（約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖの量において）、ＦＣＶ－２５５（約０．５％ｗ／ｖ～約１０％ｗ／ｖの量において）およびＦＶＲ（約１．０％ｗ／ｖ～約２０％ｗ／ｖの量において）と組み合わせたＦＣＶ－ＤＤ１を含むように処方した。ワクチンは、適切に調整されて；そしてイーグル最小必須培地は、混合希釈剤として添加された。ワクチンにおける各抗原の量は、抗原特異的ＥＬＩＳＡ力価試験を用いて決定された。ワクチンは、標準的なワクチン接種チャレンジ試験において出血性ＦＣＶに対する防御免疫を誘発することが見出された。ＦＣＶ－ＤＤ１由来の他のワクチン画分の干渉がないことが、チャレンジ試験または血清学的試験のいずれかによって確認された。ＦＣＶ－ＤＤ１、ＦＶＰ、ＦＣＶ－２５５、ＦＶＲおよびＣ．ｆｅｌｉｓを含む別のワクチン処方物もまた、調製された。

【００３３】

本発明の別の実施形態は、ネコカリシウイルスによって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防する新規の方法を包含し、この方法は、ネコに対して、単離および精製された出血性ネコカリシウイルスＦＣＶ－ＤＤ１を含む本明細書中に記載される免疫学的に有効な量のワクチンを投与する工程を包含する。さらなる方法は、ＦＣＶ－ＤＤ１とともに１種以上の抗原（例えば、ネコ白血病ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａなど）、より好ましくは、ネコ白血病ウイルスおよび／またはＣ．ｆｅｌｉｓ、あるいは他の出血性ＦＣＶ株の最適な付加とともに、１種以上の非出血性ネコカリシウイルス（例えば、ＦＣＶ－２５５）、ネコ鼻気管炎ウイルスおよびネコ汎白血球減少症ウイルスを含む抗原の組み合わせを用いて、他の病原性因子によって引き起こされる感染に対してネコを防御するか、または疾患を予防し、この方法

は、ネコに対して、本明細書中の免疫学的に有効な量の多価ワクチンを投与する工程を包含する。

【００３４】

本発明のさらなる実施形態は、ＦＣＶ－ＤＤ１抗原に対して惹起または産生する抗体に関する。抗体は、当業者に周知であるインビトロまたはインビボでの方法によるいずれかで惹起または産生し得る。例えば、ＦＣＶ－ＤＤ１に対する抗体の形成を刺激するための代表的なインビボでの方法は、ネコに対して、検出可能なウイルス中和抗体価を誘発するのに十分である、免疫学的に有効な量のＦＣＶ－ＤＤ１またはその抗原性サブユニットを直接的に投与する工程を包含する。ＦＣＶ－ＤＤ１抗原に密接に関連する出血性カリシウイルス株の異なるエピトープを認識するために有用なＦＣＶ－ＤＤ１抗原に特異的なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方は、本発明の実施に使用され得る。本発明のさらなる方法は、抗原－抗体相互作用ならびにＦＣＶ－ＤＤ１抗原および抗ＦＣＶ－ＤＤ１抗体の能力に基づき、検出可能な免疫複合体を形成する。このような方法は、感受性宿主において出血性ネコカリシウイルスを検出または診断する方法を包含し、この方法は、宿主由来の生物学的試料を分析する工程および生物学的試料においてＦＣＶ－ＤＤ１またはＦＣＶ－ＤＤ１に対して惹起または産生された抗体の存在を検出する工程を包含し、生物学的サンプルにおいて抗ＦＣＶ－ＤＤ１抗体を検出する方法は、生物学的サンプルとＦＣＶ－ＤＤ１を含む抗原とを接触させる工程およびの抗原－抗体免疫複合体の形成を検出または観測する工程を包含する。これらの方法において使用される抗原は、例えば、完全なウイルスＦＣＶ－ＤＤ１、ＦＣＶ－ＤＤ１の抗原性サブユニット（例えば、免疫原性カプシドタンパク質など）である。

【００３５】

出血性ネコカリシウイルスのキャリアを検出するための本発明のさらなる方法は、ウイルスが非常に感染性であり毒性があるために、保証される。ウイルスをまきちらす病気のネコから健康なネコへ感染が容易に広まり得る病院の環境において、感染性ＦＣＶは、無症候性のネコから他のネコまたは世話人（ｃａｒｅｔａｋｅｒ）へ運搬または感染され得る。従って、出血性ネコカリシウイルスのキャリアを検出する方法は、以下の工程：（ａ）無症候性のネコ（尿、血清、唾液、糞など）または世話人もしくはペットの飼い主（衣服、手、家具などからのネコの毛）、ネコのケージなどから試験サンプルを得る工程；（ｂ）ＦＣＶ－ＤＤ１に対して特異的な抗体とともに試験サンプルをインキュベートする工程；（ｃ）抗体－抗原複合体の形成を可能にする工程；および（ｄ）抗体－抗原複合体の存在を検出する工程を含むことが示される。本発明はさらに、当業者に明白である特異的な抗原－抗体相互作用を使用させる他の類似の方法を企図する。

【００３６】

抗原－抗体免疫複合体は、任意の標準的な免疫学的検定（酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーなどが挙げられるが、これらに限定されない）によって検出され得る。周知のフローサイトメトリー技術は、例えば、デバイス（例えば、粒子上の蛍光色素の量を検出および測定するＢｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳｃａｎ Ｆｌｏｗ Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ）を使用し得る。サンプル細胞または試料は、蛍光色素で標識された抗体で標識され、過剰な非結合の抗体は、洗浄され、次いで、サンプルは、フローサイトメトリーで分析される。蛍光およびレーザー－スキャッター指標の程度が、血球計算器を通過する同じサンプル細胞について観測され、記録される。この様式において、蛍光と光散乱特徴との間の関係を示すカラーヒストグラムの形態で示されたデータによって、サンプル中の結合したＦＣＶ－ＤＤ１の存在が確認される。

【００３７】

血清または他の試験サンプル中のウイルス特異的抗体の検出のための他の標準的なインビトロでの免疫学的アッセイは、直接的または間接的な抗体検出および力価決定の免疫蛍光法によって使用され得る。間接的な免疫蛍光アッセイは、サンプル試料中のＦＣＶをスクリーニングおよび同定するために使用され得る。例えば、試験サンプルは、ＦＣＶ－Ｄ

Ｄ１抗原、ＦＣＶ－ＤＤ１に独特な大部分のカプシドタンパク質とともにフラグメントとともにインキュベートされ、ここで、そのフラグメントは、出血性カリシウイルス単離体などに関連する組換えＤＮＡ技術を用いて発現された合成ペプチドであってもよいか、または短いペプチド鎖であってもよく、次いで、スライドガラス上でコーティングおよび安定化される。抗ＦＣＶ－ＤＤ１抗体は、サンプル中に存在し、安定な抗原－抗体免疫複合体形態である。次いで、結合した抗体は、蛍光に結合した反応物質と反応され、複合体は、蛍光顕微鏡で観察される。抗原部位で明るく色づいた蛍光により、ポジティブ抗体反応が確認される。他の標準的なＥＬＩＳＡまたは免疫クロマトグラフィー（ｉｍｍｕｎｏｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）技術は、容易にアッセイされる酵素に結合した抗体または抗原の検出（例えば、モノクローナル抗体によって認識されるＦＣＶ－ＤＤ１抗原の存在の検出またはＦＣＶ－ＤＤ１抗原を認識する抗体についての試験）における診断目的のために使用され得る。特に、ＥＬＩＳＡは、抗原濃度または抗体濃度のいずれかの有用な測定を供給し得る。あるいは、ＦＣＶ－ＤＤ１抗原は、固体支持体（例えば、マイクロウェルテストストリップのポリスチレン表面）に付着され得る。試験サンプル（例えば、ネコの血清）は、洗浄されて、残りの血清が取り除かれ、次いで、ペルオキシダーゼが結合した酵素が添加される。検出可能な物質（例えば、無色のテトラメチルベンジジン／過酸化水素）もまた、添加されて、酵素によって加水分解される。色素原は、青色に変わる。反応後、酸の付加を停止して、色のついたテトラメチレンベンジジン／過酸化水素は、黄色に変わる。最終的な分析において、色の強度は、サンプル中の抗体－抗原複合体の存在を検出する。

【００３８】

新規のＦＣＶ株は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．８０８によって指定された条件下で寄託され、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（ＡＴＣＣ）、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａ ２０１１０－２２０９，ＵＳＡにおいてブダペスト条約に従って維持されている。具体的には、ＦＣＶ－ＤＤ１サンプルは、２００４年９月９日にＡＴＣＣに寄託され、ＡＴＣＣ特許受託番号ＰＴＡ－６２０４と指定されている。

【００３９】

以下の実施例は、本発明の特定の局面を示す。しかしながら、これらの実施例は、例示のみの目的であり、本発明の条件および範囲であると完全に最終的に支持されないことが、理解されるべきである。本明細書中に使用される全ての科学的および技術的用語は、獣医学および薬学的分野における当業者によって一般的に理解される場合と同様の意味を有することが、理解されるべきである。本発明の目的のために、ＦＣＶ－ＤＤ１株に対する明細書または特許請求の範囲におけるあらゆる言及は、ＦＣＶ－ＤＤ１単離体由来のウイルスクローンを含む。これらのウイルスクローンは、本明細書中に記載されるワクチン、方法などの全ての局面においてＦＣＶ－ＤＤ１と容易に置き換えられ得る。さらに、代表的な反応条件（例えば、温度、反応時間など）は、一般にあまり便利でないが、用いられ得る具体的な範囲の上および下の両方の条件を与えられることが、理解されるべきである。実施例は、室温（約２３℃～約２８℃）および大気圧で行われる。本明細書中に言及される全ての部および割合は、重量を基本にしており、全ての温度は、具体的に反対に示されない限り、摂氏度で表される。

【００４０】

本発明のさらなる理解は、以下の非限定的な実施例から得られ得る。

【実施例】

【００４１】

（実施例１）

（出血性ネコカリシウイルスを単離する失敗した試み）

ＦＣＶ－Ａｒｉの２つの２５ｃｍ^{2}組織培養フラスコ（１：１００および１：１０００と標識した）を、Ｄｒ．Ｎｅｉｌｓ Ｐｅｄｅｒｓｅｎ，Ｓｃｈｏｏｌ ｏｆ Ｖａｔｅ

ｒｉｎａｒｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，ＵＣ Ｄａｖｉｓから得た（Ｎ．Ｃ．Ｐｅｄｅｒｓｏｎら、「Ａｎ ｉｓｏｌａｔｅｄ ｅｐｉｚｏｏｔｉｃ ｏｆ ｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ－ｌｉｋｅ ｆｅｖｅｒ ｉｎ ｃａｔｓ ｃａｕｓｅｄ ｂｙ ａ ｎｏｖｅｌ ａｎｄ ｈｉｇｈｌｙ ｖｉｒｕｌｅｎｔ ｓｔｒａｉｎ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ」，Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７３：２８１－３００（２０００年、５月））。１：１０００の標識をしたＦＣＶ－Ａｒｉのフラスコを、凍結して解凍した。次いで、１ｍＬの培養液を使用して、１つの８５０ｃｍ^{2}組織培養ローラーボトルのコンフルエントなＣｒａｎｄｅｌｌネコ腎臓細胞（Ｆｅｌｉｎｅ Ｋｉｄｎｅｙ Ｃｅｌｌ）（ＣＲＦＫ）を感染させた（Ｒ．Ａ．Ｃｒａｎｄｅｌｌら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ ｖｉｒａｌ ｓｕｓｃｅｐｔｉｂｉｌｉｔｙ ｏｆ ａ ｆｅｌｉｎｅ（Ｆｅｌｉｓ ｃａｔｕｓ）ｒｅｎａｌ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅ（ＣＲＦＫ）」，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ９：１７６－１８５（１９７３））。１６時間後、このローラーボトルを、凍結し、解凍し、作業ストックとして等分した。

【００４２】

最初のＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を使用して、この物質が、出血性カリシウイルスを含むことを確認するためにネコに接種した。ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を接種されたネコは、極度の臨床徴候（例えば、高発熱、水腫、脱水および死）を誘発した。従って、ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」が、出血性カリシウイルスを含むことを確認した。

【００４３】

ＦＣＶ－Ａｒｉ「作業ストック」を、１ｍｌあたり約１０^{5}ＴＣＩＤ$_{50}$の力価に希釈して、０．２μｍで濾過した。濾過したＦＣＶ－Ａｒｉを、ほとんどの有毒なカリシウイルス株の精製／単離のために使用した。濾過したＦＣＶ－Ａｒｉを連続的に希釈して使用し、コンフルエントな２４－ウェル組織培養プレートをＣＲＦＫ細胞で感染させた。ＣＲＦＫ細胞に対して細胞変性効果（ＣＰＥ）を示した最も高い希釈のウェルを回収し、凍結し、すぐに解凍し、連続的に希釈して使用し、別のコンフルエントな２４－ウェル組織培養プレートをＣＲＦＫ細胞で感染させた。全部で３ラウンドの精製および単離のために、この手順を２回繰り返した。

【００４４】

精製したＦＣＶ－Ａｒｉを、ホルマリンで不活性化して使用し、死滅した一価ワクチンと混合した。このＦＣＶ－Ａｒｉ（死滅した）ワクチンをネコに与え、ワクチン接種に対する血清応答を測定した。このワクチンは、ウイルス中和抗体価を誘導しなかったが、ウイルスに対する抗体は、ＥＬＩＳＡによって確認されるように誘導された。

【００４５】

特に、精製されて、死滅させたＦＣＶ－Ａｒｉワクチンを用いる研究には、２０匹のネコを使用し、１群あたり５匹のネコに０．５％ｖ／ｖ、２％ｖ／ｖおよび８％ａｖ／ｖの用量、５匹のコントロール（注射なし）を用いた。１５匹のネコの各々に、３週間離して、２×１ｍｌ用量を首の項部の皮下に与えた。最後のワクチン接種の１週間および２週間後に、ＦＣＶ　ＳＮ価が、代表的に、それらのピークになった時点で、ＦＣＶに対する測定可能な血清中和（ＳＮ）価は、存在しなかった。

【００４６】

再試験および最初の発見を確認するために、４匹以上のネコに、３週間離して、精製されて、死滅したＦＣＶ－Ａｒｉワクチンを含む２×１ｍｌ用量を与えた。最後のワクチン接種から１週間後、測定可能な血清中和抗体価（全て＜２）は、ＦＣＶについての血清中和価が、代表的に、最も高い時点で存在しなかった。

【００４７】

精製したＦＣＶ－Ａｒｉ（生きている）をまた、使用して、２群のネコに接種した。２群のネコは、出血性カリシウイルス注射の臨床徴候（高熱、水腫、膿皮、脱毛など）の特徴を示さなかった。従って、「作業ストック」から精製した株は、出血性カリシウイルス株ではないことを確認した。また、ワクチンは、中和抗体を誘導しなかったため、この株

のさらなる作業および開発を中止した。

【００４８】

（実施例２）

（限界希釈クローニングによるＦＣＶ－ＤＤ１の単離）

元のＦＣＶ－Ａｒｉを、Ｄｒ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎから受け取り、１：１００と標識し、３ラウンドの限界希釈クローニングのために使用して、ＦＣＶ－ＤＤ１を精製して単離した。ＦＣＶ－Ａｒｉの１：１００サンプルを、ＦＣＶ－Ａｒｉの最初の精製／単離から単離されたＦＣＶ株を中和するために元のＦＣＶ－Ａｒｉ（死滅した）ワクチン接種から得た抗血清とともにインキュベートした。ウイルスを連続的に希釈して使用し、２４－ウェル組織培養プレートのコンフルエントをＣＲＦＫ細胞で感染させて、ＣＲＦＫ細胞に対して細胞変性効果（ＣＰＥ）を示した最も高い希釈のウェルを、収集し、凍結し、すぐに解凍した。収集したクローンを、血清中和アッセイによって評価した（限界希釈クローニング法ならびにＦＣＶ株を識別および単離するために使用される血清中和アッセイの概要については、Ｈ．Ｐｏｕｌｅｔら、「Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ａｃｕｔｅ ｏｒａｌ／ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ａｎｄ ｃｈｒｏｎｉｃ ｓｔｏｍａｔｉｔｉｓ／ｇｉｎｇｉｖｉｔｉｓ ｉｓｏｌａｔｅｓ ｏｆ ｆｅｌｉｎｅ ｃａｌｉｃｉｖｉｒｕｓ：ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃｉｔｙ，ａｎｔｉｇｅｎｉｃ ｐｒｏｆｉｌｅ ａｎｄ ｃｒｏｓｓ－ｎｅｕｔｒａｌｉｓａｔｉｏｎ ｓｔｕｄｉｅｓ」，Ａｒｃｈ．Ｖｉｒｏｌ．１４５：２４３－２６１（２０００）を参照のこと）。ＦＣＶ－Ａｒｉの各ウイルスクローンを、最初の精製して死滅させたワクチンから得た抗血清とともに、または生きた「作業ストック」でのチャレンジから得た抗血清とともにインキュベートした。この血清中和アッセイからの結果は、元のサンプルにおいて１種以上のカリシウイルスの菌株が存在することを示した。選択および処分されなかったウイルスクローンを、最初の精製の望ましくない産物に対して特異的な抗血清によって中和した。次の精製のラウンドのために選択したウイルスクローンは、最初の精製の望ましくない産物に対して特異的な抗血清によってまだ中和されていないＤｒ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎから得た元のウイルスサンプルに対する抗血清によって中和したものであった。ＣＰＥを含む最も高い希釈を収集する、このウイルスクローン選択のパターンを、合計で３ラウンド繰り返した。ＦＣＶ－ＤＤ１と命名された生じたクローンを、生物学的研究のために選択した。

【００４９】

具体的には、ＦＣＶ－Ａｒｉサンプルを中和して、限界希釈クローニングによって再精製した。ＦＣＶ－Ａｒｉウイルスを中和するために、ＦＣＶ－Ａｒｉサンプルの元の組織培養を、１×ＭＥＭ（改変されたイーグル培地）において１：２００に希釈した。元のＦＣＶ－Ａｒｉ（死滅させた）ワクチン接種（α－Ａｒｉ血清をワクチン接種する）から得た抗血清を、１×ＭＥＭにおいて１：５０に希釈した。２ｍＬの希釈した抗－Ａｒｉ血清を、２ｍＬの希釈したウイルスに添加した。ウイルス／抗血清混合物を、約１時間３７℃でインキュベートした。

【００５０】

中和したウイルスを用いる試験的ＦＣＶ－Ａｒｉ精製から、２４－ウェルプレート中のＣＰＥが、10^{-2}希釈までポジティブであることを見出した（10^{-2}ウェルは、５０％ＣＯＥであり、10^{-3}は、０％ＣＰＥであった）。この情報に基づいて、ウイルスを希釈して、ＣＲＦＫ細胞のウェルの約５０％のＣＰＥを達成した。これらの希釈を、４倍より高い目標、４倍の目標、および４倍より低い目標で行った。

【００５１】

１つの２４－ウェルプレートを、各希釈のために使用した。全ての２４ウェルを、同じ希釈の複製として使用した。これらのプレートを、４日間、５％CO_2で３７℃にてインキュベートした。２４の複製において５０％ＣＰＥ未満または５０％ＣＰＥとほとんど等しい希釈におけるＣＰＥについてポジティブであったウェルを、収集した。

【００５２】

限界希釈クローニング手順のラウンド＃１について、交差中和分析を、収集したクロー

ンに対して行った。各収集物を、１×ＭＥＭにおいて１：２００および１：１０００に希釈して、２つの複製において、Ｃｈａｌｌｅｎｇｅ　α－Ａｒｉ（生きた「作業ストック」でのチャレンジから得た抗血清）またはＶａｃｃｉｎａｔｅ　α－Ａｒｉ（最初に精製した死滅させたワクチンからの抗血清）のいずれかの希釈液とともに混合した。ウイルス血清混合物を、３７℃で１時間、インキュベートし、次いで、９６－ウェルプレート中のＣＲＦＫ細胞上にプレートした。プレートを、３日間インキュベートして、ＣＰＥを測定した。最初のラウンドの限界希釈クローニングおよび交差中和スクリーニングから得た結果を、以下の表１に示す。

【００５３】

５つの収集したクローン（ＡＢ２、ＢＣ１、ＢＣ４、ＣＢ４およびＤＤ１）を、第１の精製の望ましくない産物に対して特異的な抗血清によってまだ中和されていないＤｒ．Ｐｅｄｅｒｓｅｎから得た元のウイルスサンプルに対する抗血清によって中和した。これらを、ラウンド＃２の精製のために選択した。

【００５４】

ラウンド＃２の限界希釈クローニング手順に関して、２４－ウェルプレート中のＣＰＥを、10^{-5}～10^{-6}までポジティブであることを見出した。これらの希釈を、４倍より高い目標、４倍の目標、４倍より低い目標で行った。１つの２４－ウェルプレートを、各希釈のために使用した。全ての２４ウェルを、同じ希釈の複製として使用した。これらのプレートを、４日間、５％CO_2で３７℃でインキュベートした。２４の複製において５０％未満のＣＰＥを得た希釈のＣＰＥについてポジティブであったウェルを、収集した。

【００５５】

上記の工程を、３ラウンドの限界希釈クローニングのために繰り返した。

【００５６】

【表１】

表１．ＦＣＶ－Ａｒｉ限界希釈交差中和スクリーニング

収集 ID	ウイルス希釈	チャレンジ α-Ari	ワクチン接種 α-Ari
AB2	1:200	>256	<2
AB2	1:1000	>256	<2
BC1	1:200	>256	<2
BC1	1:1000	>256	<2
BC4	1:200	>256	<2
BC4	1:1000	>256	<2
CA4	1:200	>256	<2
CA4	1:1000	>256	<2
CB2	1:200	>256	<2
CB2	1:1000	>256	<2
CB3	1:200	>256	<2
CB3	1:1000	>256	<2
CB4	1:200	>256	<2
CB4	1:1000	>256	<2
CC5	1:200	>256	<2
CC5	1:1000	>256	<2
CD1	1:200	>256	37
CD1	1:1000	>256	<2
DA5	1:200	>256	<2
DA5	1:1000	>256	<2
DB1	1:200	>256	<2
DB1	1:1000	>256	<2
DB5	1:200	>256	<2
DB5	1:1000	>256	<2
DC2	1:200	>256	<2
DC2	1:1000	>256	<2
DD1	1:200	>256	<2
DD1	1:1000	>256	<2
DD2	1:200	>256	<2
DD2	1:1000	>256	<2
DD4	1:200	>256	<2
DD4	1:1000	>256	<2

（実施例３）

（ＦＣＶ－ＤＤＩ株の単離）

１つの収集したクローン、ＤＤ１を、ラウンド＃３から選択して使用し、約０．００３のＭＯＩ（多重度の感染）で８５０ｃｍ^{2}組織培養ローラーボトルのコンフルエントなＣＲＦＫで感染させた。１００％ＣＰＥを観測した場合、ウイルス流体をローラーボトルから収集し、４時間、－５０℃で凍結し、次いで、３７℃のウォーターバス中ですぐに解凍した。ウイルス流体を、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＧＳ－６Ｒ遠心機（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ，ＣＡ）で、２０分間、３０００ｒｐｍで遠心分離し、無細胞上清を、８１×１ｍＬサンプルバイアル中に等分して、－８０℃に保存した。

【００５７】

（実施例４）

（生理学的チャレンジ研究）

実施例３において調製された単離および精製されたＦＣＶ－ＤＤ１株を、ネコに接種した。３匹のネコの１つのチャレンジ群を用い、ここで、各ネコに、鼻孔に０．２５ｍＬお

よび経口で０．５ｍＬで、合計１ｍＬの投与によって、６．３ｌｏｇの毒性のあるＦＣＶ－ＤＤ１を与えた。ネコは、代表的な出血性カリシウイルス臨床徴候を示した。極度の高熱が、１日後に全ての３匹のネコに現れた。水腫（腫脹）は、観察の５日目に開始した。外部および口の両方の潰瘍形成が、観察の６日目に現れた。ネコの３分の２は、観察の６日目に安楽死（血を抜いた）させた。なぜなら、そのネコらは、瀕死であったからである。３匹目のネコは、観察の７日目に体温が低下し、瀕死であった。そして、この研究は終了した。このチャレンジ研究から得た結果は、元のＦＣＶ－Ａｒｉサンプル（ＦＣＶ－ＤＤ１と命名された）から精製および単離されたカリシウイルスの株が、真の出血性ネコカリシウイルス株であることを証明している。

【００５８】

上記において、例示の目的であり、限定されない本発明の特定の実施形態の詳細な説明が提供されている。この開示に基づいて当業者に明白である全ての他の改変、派生および等価物は、特許請求としての本発明の範囲内に含まれることが、理解される。

【００５９】

【表２】

寄託された微生物または他の 生物材料に関する表示 （ＰＣＴ規則１３規則の２）	
A． 下記の表示は明細書中下記の箇所で言及された寄託された微生物または他の生物材料に関する。 16頁，25～29行	
B．寄託物の表示 さらなる寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐	
寄託機関の名称：アメリカン タイプ カルチャー コレクション(ATCC)	
寄託機関の住所（郵便番号および国を含む） アメリカ合衆国　バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブルーバード 10801	
寄託日 2004年9月9日	受託番号 PTA-6204
C．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐	
D．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）	
E．別に添付する表示物（なければ空白のまま）	
下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）	
受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☐ この用紙は国際出願とともに受理された	☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1998年7月;2004年1月再版）

【受託番号】
【００６０】
ネコカリシウイルス：ＦＣＶ－ＤＤ１　　ＰＴＡ－６２０４

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			ＦＩ			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12	１７１	
Ｇ０１Ｎ	*33/569*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｌ	
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ	*33/543*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/543	５４５Ａ	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		

(72)発明者　ジェニファー　ヘス
アメリカ合衆国　アイオワ　５０５０１，　フォート　ドッジ，　ヒドゥン　バレー　レーン　１８８７

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ10 QR48 QR55 QS33 QS39
4B064 AG27 CA20 CC24 DA04 DA15
4B065 AA90 AA95 AB02 AC14 AC20 CA24 CA25 CA45 CA46
4C085 AA03 AA04 AA38 BA51 CC08 EE01 EE03 EE06 FF01 FF02
FF03 FF11 FF13 FF14 FF24
4H045 AA10 AA11 AA30 CA01 CA40 DA76 DA86 EA31 EA53 FA72

【外国語明細書】
2012065670000001.pdf

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012065670A5	公开(公告)日	2013-01-24
申请号	JP2011268298	申请日	2011-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯，LLC		
[标]发明人	チェンチンファン ジェニファーヘス		
发明人	チェンチン ファン ジェニファー ヘス		
IPC分类号	C12N7/00 C07K16/08 C12Q1/04 A61K39/12 A61K39/39 A61P31/12 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/10 A61K39/12 A61K39/125 A61K2039/552 C12N7/00 C12N2770/16034		
FI分类号	C12N7/00 C07K16/08 C12Q1/04 A61K39/12 A61K39/39 A61P31/12.171 G01N33/569.L G01N33/53.N G01N33/543.545.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS39 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA04 4B064/DA15 4B065/AA90 4B065/AA95 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/AA38 4C085/BA51 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF11 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA72		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/609480 2004-09-13 US 11/223099 2005-09-09 US		
其他公开文献	JP2012065670A JP5653337B2		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种广谱病毒疫苗，可以保护猫免受出血性和正常FCV株引起的严重感染和疾病。 本发明涉及一种新颖的分离纯化的出血性猫杯状病毒FCV-DD1。 本发明进一步包括包含新型FCV-DD1菌株的单价和多价疫苗。 本发明进一步涉及保护猫免于单独或与其他病原体组合或由猫病杯状病毒引起的感染或预防疾病的方法，该方法包括本文所述的免疫治疗。 给猫施用有效量的单价和多价疫苗。 此外，本发明通过检测无症状携带者中针对猫杯状病毒FCV-DD1或猫杯状病毒，易感宿主，出血性猫杯状病毒等引发或产生的FCV-DD1抗原抗体的存在。 一种用于诊断或检测的方法。 [选择图]无