

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5926194号
(P5926194)

(45) 発行日 平成28年5月25日 (2016.5.25)

(24) 登録日 平成28年4月28日 (2016.4.28)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	L
請求項の数 17 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-548908 (P2012-548908)
 (86) (22) 出願日 平成23年1月18日 (2011.1.18)
 (65) 公表番号 特表2013-516983 (P2013-516983A)
 (43) 公表日 平成25年5月16日 (2013.5.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2011/050027
 (87) 国際公開番号 W02011/087366
 (87) 国際公開日 平成23年7月21日 (2011.7.21)
 審査請求日 平成25年12月5日 (2013.12.5)
 (31) 優先権主張番号 10151340.6
 (32) 優先日 平成22年1月21日 (2010.1.21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 10151001.4
 (32) 優先日 平成22年1月18日 (2010.1.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 509163824
 ユニベルシテイト ユトレヒト ホールディング ビー. ブイ.
 オランダ国, 3584 シーエム ユトレヒト, イェールラーン 40
 (74) 代理人 100085545
 弁理士 松井 光夫
 (72) 発明者 ロティエール, ペトラス ヨセフス マリー
 オランダ国, 3584 シーエム ユトレヒト, イェールラーン 40, シー/オー
 ユニベルシテイト ユトレヒト ホールディング ビー. ブイ.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F E C V 及び F I P V を区別する為の手段及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) が試料中に存在するかどうかを決定するための方法であって、該試料がネココロナウイルスを含むかどうかを決定すること、そして、もしネココロナウイルスが存在するならば、該ネココロナウイルスのスパイクタンパク質中の配列 ID: No. 8 及び / 又は配列 ID: No. 9 の配列に示されたとおりのアミノ酸位置 1049 に対応する位置でのアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該アミノ酸がロイシンであるならば、FIPV が存在すると決定することを含む、前記方法。

【請求項 2】

位置 1049 での該アミノ酸の正体が、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸の核酸配列を決定することにより決定され、該核酸が配列 ID: No. 6 及び / 又は配列 ID: No. 7 の配列に示されたとおりの位置 3145、3146、及び / 又は 3147 でのヌクレオチド又配列 ID: No. 6 及び / 又は配列 ID: No. 7 の配列は当該位置に対応するヌクレオチドを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

配列 ID: No. 6 及び / 又は配列 ID: No. 7 の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置 3145、3146、及び 3147 を含む領域又は当該位置に対応する領域を含むネココロナウイルス核酸分子の少なくとも一部を、配列 ID: No. 6 及び / 又は配列 ID: No. 7 の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置 3055 に対応する位置とヌクレオチド位置 3669 に対応する位置との間の該核酸配列の少なくとも一部にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのプライマーを

10

20

用いて増幅することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)が試料中に存在するかどうかを決定するための方法であって、該試料がネココロナウイルスを含むかどうかを決定すること、そして、もしネココロナウイルスが存在するならば、該ネココロナウイルスのスパイクタンパク質中の配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりのアミノ酸位置1051に対応する位置でのアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該アミノ酸がアラニンであるならば、FIPVが存在すると決定することを含む、前記方法。

【請求項 5】

該ネココロナウイルスのスパイクタンパク質中の配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりのアミノ酸位置1051に対応する位置でのアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該アミノ酸がアラニンであるならば、FIPVが存在すると決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

位置1051での該アミノ酸の正体が、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸の核酸配列を決定することにより決定され、該核酸が配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの位置3151、3152、及び/又は3153でのヌクレオチド又は当該位置に対応するヌクレオチドを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置3151、3152、及び3153を含む領域若しくは当該ヌクレオチド位置に対応する領域を含むネココロナウイルス核酸分子の少なくとも一部を、配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置3055に対応する位置とヌクレオチド位置3669に対応する位置との間の該核酸配列の少なくとも一部にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのプライマーを用いて増幅することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

該少なくとも 1 つのプライマーが5' -CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3' , 5' -CAATATTA CAATGGCATAATGG-3' , 5' -GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3' 及び 5' -TAATTAAGCCTCGCCTGCACT T-3' に記載されたプライマーから選択された配列を有する、請求項 3 又は 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

配列5' -CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3' と少なくとも 90%の配列同一性を有する配列を含む分離された若しくは組み換えの核酸配列と配列5' -CAATATTACAATGGCATAATGG-3' と少なくとも 90%の配列同一性を有する配列を含む分離された若しくは組み換えの核酸配列とを含むプライマー対であって、該プライマー対が、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列中の領域を特異的に増幅することが可能であり、該領域が、配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145、3146、及び3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153を含む、該プライマー対。

【請求項 10】

配列5' -GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3' と少なくとも 90%の配列同一性を有する配列を含む分離された若しくは組み換えの核酸配列と配列5' -TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3' と少なくとも 90%の配列同一性を有する配列を含む分離された若しくは組み換えの核酸配列とを含むプライマー対であって、該プライマー対が、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列中の領域を特異的に増幅することが可能であり、該領域が、配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145、3146、及び3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153を含む、該プライマー対。

40

【請求項 11】

配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりの位置3145、3146、及び3147

50

でのヌクレオチド若しくは当該位置に対応するヌクレオチドを含むネココロナウイルス核酸の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズすることができる、又は、配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりの位置3151、3152、及び3153でのヌクレオチド若しくは当該位置に対応するヌクレオチドを含むネココロナウイルス核酸の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズすることができる、少なくとも14ヌクレオチド長を有するプローブを用いて、該核酸配列が検出され、該一部が少なくとも14ヌクレオチド長を有する、請求項2～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

配列5'-CCCARRGCCATAGG-3'と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む、14～100ヌクレオチド長を有するプローブであって、RはA又はGであり、該プローブが、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列中の領域と特異的にハイブリダイズすることが可能であり、該領域が、配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置3145、3146、及び3147を含む、該プローブ。

【請求項13】

ネココロナウイルス核酸配列の少なくとも一部をシーケンシングすることをさらに含み、該一部が、配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりのヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147に対応するヌクレオチド又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153に対応するヌクレオチドを含む、請求項2～8又は11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

ネココロナウイルススパイクタンパク質の配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりのアミノ酸位置1049又は1051に対応する位置でのアミノ酸が、FIPVスパイクタンパク質のエピトープに対して特異的に向けられた抗体又はその機能的等価物を用いることにより検出され、該エピトープが、配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でロイシン又はアミノ酸位置1051に対応する位置でアラニンを含む、請求項1、4又は5に記載の方法。

【請求項15】

配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりの、アミノ酸位置1051に対応する位置でアラニンを有するネココロナウイルススパイクタンパク質若しくは少なくとも前記アミノ酸位置に対応する位置のアミノ酸残基を含むその免疫原性部分、又は配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシンを有し及び/又はヌクレオチド位置3151に対応する位置でグアニンを有する、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸、又は配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145に対応する位置でアデニンを有し及びヌクレオチド位置3151に対応する位置でチミンを有する核酸を含むネココロナウイルス、又はそれらの組み合わせを含む免疫原性組成物。

【請求項16】

配列ID:No.8及び/又は配列ID:No.9の配列に示されたとおりの、アミノ酸位置1051に対応する位置でアラニンを有するネココロナウイルススパイクタンパク質若しくは少なくとも前記アミノ酸位置に対応する位置のアミノ酸残基を含むその免疫原性部分、又は配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシンを有し及び/又はヌクレオチド位置3151に対応する位置でグアニンを有する、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸、又は配列ID:No.6及び/又は配列ID:No.7の配列に示されたとおりの、ヌクレオチド位置3145に対応する位置でアデニンを有し及びヌクレオチド位置3151に対応する位置でチミンを有する核酸を含むネココロナウイルス、又はそれらの組み合わせを、ネコ科動物においてネココロナウイルスに対する免疫応答を引き起こす為の免疫原性組成

10

20

30

40

50

物又は予防剤の調製の為に使用する方法。

【請求項 17】

該ネココロナウイルスが、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)である、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は獣医学的診断の分野に関し、より特には、本発明はネココロナウイルス及びその同定の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

ネココロナウイルス (FCoV) は、ネコ、ライオン、トラ、レパード、ジャガー、リンクス、カラカル、チーター、クーガー、及びサーバルを包含するがこれらに限定されない、家畜の及び非家畜のネコ科動物の一般的な病原体である。家畜の複数ネコ環境において、最大で 90% の FCoV 血清陽性が到達される。FCoV は、イヌコロナウイルス (CCoV) 及びブタの伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) の近縁である。2 つの血清タイプの FCoV が存在し、I 及び II、このうち、血清タイプ I が優位であり、FCoV 感染の 80~95% を伴う。II 型 FCoV は、血清型 I の FCoV 及び CCoV に二重に感染した動物における RNA 組み換えから推定上結果し、その間に、CCoV スパイク遺伝子又はその一部が FCoV ゲノムに組み込まれ、これは明らかにまれに発生する事象である。ネコ腸コロナウイルス (FECV) は、血清型 I 及び血清型 II の両方について、FCoV の最も一般的な病原型である。FECV は主に腸に限局しており、経口 - 糞便経路を介して拡がり、及び、非常に伝染性である。FECV 感染は一般に不明白に起こる；しかしながら、ときどき、それは、軽度の腸炎などの症状を引き起こす (Haijema et al., 2007)。

【0003】

1970 年代のネコ伝染性腹膜炎 (FIP) において、ネコにおいて (そのときは) まれであるが重度の疾患が、ネココロナウイルスにより引き起こされると報告され、これがネコ伝染性腹膜炎ウイルスと呼ばれた。FECV と対照的に、FIPV は非常に毒性である (virulent)。FIPV 感染は、肉芽腫性 (ドライ) 又は滲出性 (ウェット) であり、及び、進行性であり且つ通常致死性の疾患である。FIP の症状は、若いネコにおける発育障害、跛行、変動する発熱、食欲不振、及び体重喪失を含み、死を結果する (Pedersen 2009)。適応免疫系の劇的な調節異常が、高ガンマグロブリン血症及びリンパ球及び末梢 T 細胞の枯渇により示されるとおり、FIP の進行に伴う (Haijema et al., 2007)。FECV は腸に限局されるが、FIPV は単球及びマクロファージに感染し及びこれらにおいて複製することができ、複数の臓器が冒されることを伴う全身性疾患を引き起こす。

【0004】

2 つの支配的な理論が、FIPV の起源について存在する。「変異仮説」によると、FIPV は、FECV から、感染したネコ科動物におけるデノボ変異により生じ、非常に毒性の FIPV ウイルスを結果する。FIPV を生じる該変異は同定されていないが、非構造遺伝子 3c、7a、又は 7b 内にあると提案されており (図 1 参照)、これは未知機能を有するタンパク質をコードする (Vennema et al., 1998, Poland et al., 1996, Kennedy et al., 2001, Pedersen 2009)。それ故に、該 3c、7a、又は 7b 遺伝子における変異又はこれら遺伝子における変異の組み合わせが、該ウイルスの生物学的特性を変化させ、該腸コロナウイルスが単球及びマクロファージに感染することを許し、それにより感染を臓器へ拡大させ及び FIP を引き起こすと考えられている (Pedersen 2009) : FECV の FIPV への遷移。該変異仮説は正式に証明されていない。

【0005】

もう一つの理論によると、2 つの異なる株の FECV、毒性株及び無毒性 (avirulent) 株、が天然の集団において広まりそして、該毒性株により冒されたネコ科動物だけが FIP を発病するであろう (Brown et al., 2009)。Brown et al. (2009)、は、ウイルス配

10

20

30

40

50

列を、FIPを患うネコから分離し、及び、FECVに感染したが無症状の（健康な）ネコから分離した。系統発生的分析を用いて、彼らは、異なるウイルス配列が病気のネコ及び健康なネコにおいて存在することを発見した。Dye and Siddell (2007)は、FIPを患うネコの空腸から及び肝臓から分離されたネココロナウイルスのウイルス配列を比較した。該変異理論によるとFECVは腸に局限される一方で、FIPV（これはマクロファージ及び単球に感染することができる）は肝臓に存在する。しかしながら、Dye and Siddellは、100%のヌクレオチド同一性を発見し、すなわち、該変異仮説（それによると該肝臓コロナウイルスが変異した空腸コロナウイルスである）に異議を唱えた。彼らは、FIPを患うネコにおいて、同じ毒性のネココロナウイルス株が肝臓及び空腸の両方に存在することを示唆した。

10

【0006】

以前に、本発明者らは、組織培養に適合された血清タイプIIのコロナウイルスFECV 79-1683及びFIPV 79-1146のスパイクタンパク質における多くの違いを同定した（Rottier et al., 2005）。FIPV79-1146は、該スパイクタンパク質のC末端ドメイン、S2ドメイン、においていくつかの変異を有した。しかしながら、FECV 79-1683及びFIPV 79-1146は、原型的なネココロナウイルスでなく、及びすなわち、多くのネコが感染する血清I型FECV及びFIPVについて代表的なものでない（Pedersen 2009）。第一に、血清II型ネココロナウイルスは、イヌコロナウイルス及びネココロナウイルスのRNA組み換えに由来し、そして、イヌコロナウイルススパイクタンパク質を有する。ネココロナウイルス及びイヌコロナウイルスのスパイクタンパク質は、約45%だけのアミノ酸配列同一性を有する（Motokawa et al., 1996）。第二に、FECV 79-1683及びFIPV 79-1146は、マクロファージ以外の細胞株に組織培養適合されている。FIPVは、単球及びマクロファージにインピボで感染するので、これらの実験室株の指向性は、原型的なネココロナウイルスと異なる。第三に、単球及びマクロファージに感染する血清I型FIPVと異なり、FIPV 79-1146は、全ての一般的な感染経路により、図抜けて毒性である（Pedersen 2009）。第四に、FECV 79-1683は、Pedersenにより彼の最近のレビュー（Pedersen, 2009）において広く議論されているとおり、真のFECVとしての資格を有し得ない。特に、FECV79-1683は、7b遺伝子のほとんどを欠き、これは、FECVの非組織培養適合株に存在する、及び、その3c遺伝子中に有害な変異を有し、それがFIPVに由来したかもしれないことを示唆する。

20

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ネココロナウイルス感染症は一般に、血液中の抗体の存在によって示される。FIPV感染症に対する有効な処置又はワクチンは存在しない。FIPを発症するネコは、滲出性FIPの場合は数日又は数週間以内に、乾燥性の又は肉芽腫性のFIPの場合は数か月以内に死ぬ。FIPV株の温度感受性変異体からなる市販入手可能なワクチンは、多くの免疫付与研究において、その防御的有効性を納得できるように証明していない（McArdle et al., 1995; Fehr et al., 1997）。さらに、今日までに、FECVとFIPVとを区別する診断試験は無い。さらに複雑な要因は、FIPの臨床像が非常に変わりやすく、そしてその結果、該疾患を明白に確立されることは容易になされ得ない。診断はしばしば、既往の、臨床の、及び非特異的な検査値に基づく、推定的なものである。FIPVについての特異的な診断試験が無いので、FIPとオーバーラップする症状を有する他の疾患とを区別することもしばしば可能でない。FIPVについての診断試験及びFIPVに対するワクチンの両方が、FIPの進行性及び消耗性の経過の故に、非常に必要とされている。

40

【0008】

本発明の目的は、FIPVとFECVとを区別する為の手段及び方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

FIPVが、図2Bにおいて示される通り、FECVに関して、スパイクタンパク質においてアミノ酸位置1049で特定の変化を有することを本発明者らは発見した。

50

【 0 0 1 0 】

それ故に、本発明は、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）を同定する為の方法であって、図2Bに示されるとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置での、ネココロナウイルススパイクタンパク質のアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該アミノ酸の決定された正体がメチオニンでないならば、該ネココロナウイルスをFIPVとして同定することを含む前記方法を提供する。本発明のこの方法に従い、もし該アミノ酸の決定された正体がメチオニンであるならば、FECVが同定される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 ネココロナウイルスRNAゲノムの模式図である。5'部分（左）は、オープンリーディングフレーム（ORF）1 a 及び 1 b から得られた複製及び転写機能をコードするプライマーを特定する。その下流において、3'末端に向かって、構造タンパク質S（スパイクタンパク質）、E（エンベロープタンパク質）、M（膜タンパク質）、及びN（ヌクレオキャプシッドタンパク質）についての遺伝子、及び、アクセサリタンパク質3 a、3 b、3 c、7 a、及び7 bについての遺伝子が置かれている。

【 図 2 】 A) ネココロナウイルススパイク遺伝子のヌクレオチド配列（ヌクレオチド1-4407）であり、NC_012955（ネココロナウイルスUU10、完全ゲノム）のヌクレオチド配列において定義されたとおりのネココロナウイルスのヌクレオチド20395-24801に対応し、及び、NC_012952（ネココロナウイルスUU8、完全ゲノム）のヌクレオチド配列において定義されたとおりのネココロナウイルスのヌクレオチド20382-24788に対応する。B) YP_003038574及びYP_003038543のアミノ酸配列において定義されたとおりの、ネココロナウイルススパイクタンパク質のアミノ酸配列。

【 図 3 】 感染したネコの排泄物から得られた6の臨床試料からの増幅されたRNAのアガロースゲル電気泳動を示す図である。レーンMは分子サイズ標準であり、レーン1～6は臨床試料であり、及び、レーン7は陰性対照である。

【 図 4 】 42の健康なネコから分離された排泄物又は血しょう由来FCoV RNAの部分配列、及び、FIPVを確認されたネコの試料から得られた5の部分配列（すなわちQ093501030_326B_4546.scf（白血球由来）、Q093501032_327B_4546.scf（白血球由来）、Q093501036_321S_4546.scf（血清由来）、Q093501038_321A_4546.scf（腹水（ascites）由来）及びQ093501046_K11_019.ab1（白血球由来））のアラインメントを示す図である。B) 54のFIPVを確認されたネコから分離された病変由来FCoV RNAの部分配列のアラインメントを示す図である。C) FIPVを確認されたネコから分離された排泄物由来FCoV RNAの部分配列のアラインメントを示す図である。図4A、B、及びCの右に、分析されたネココロナウイルスのアイデンティティコードが示されている。標的とされたヌクレオチド及び予測されたアミノ酸が矢印により示されている。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

FIPV又はFECVを同定することにより、毒性（FIPV）タイプネココロナウイルス又は無毒性（FECV）タイプネココロナウイルスの同定が意味される。同定は、該ネココロナウイルスのアミノ酸又は核酸の配列の正体を決定することにより実施される。

【 0 0 1 3 】

ネココロナウイルス核酸配列は、ネココロナウイルスの部分であるヌクレオチド、好ましくは(c)DNA又はRNA、又は、例えば逆転写酵素PCR及び/又は増幅を用いることにより、ネココロナウイルスから直接に若しくはプロセッシング後に得られるヌクレオチド、好ましくは(c)DNA又はRNA、の鎖を含む。

【 0 0 1 4 】

ネココロナウイルススパイクタンパク質は、細胞外ドメインを有するネココロナウイルス膜タンパク質である。該スパイクタンパク質は、コロナウイルスの4つの標準的（canonical）構造タンパク質のひとつであり、及び、感染の間の該ウイルスの細胞への付着及び侵入に關与する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

病理学的に確認されたFIPを有するネコの病変からのFIPVが、無症状ネコから得られたFECVと遺伝子的に比較された。FIPの典型的な病変は、種々の内部器官において、主に脾臓、肝臓、肺、腎臓、又は腸間膜リンパ節において示される（化膿性）肉芽腫性（pyo）granulomatous）病変であった。RNAウイルスの高い変異率により、多数の違いが、個々のFECV配列とFIPV配列との間に観察された。しかしながら、47全てのFECVの排泄物又は血しょう分離物において、図2Bに示されたとおりのスパイクタンパク質の位置1049でのアミノ酸がメチオニンである一方で、54のFIPV病変分離物のうち52において、図2Bに示されたとおりの位置1049でのアミノ酸の変化が存在し、その結果、メチオニン以外のこの位置でのアミノ酸を結果した。後に、健康なネコから得られたと分類された5つの配列が、確認されたFIPを有するネコの血液試料から実際に得られたことが発見され（Q093501030_326B_4546.scf、Q093501032_327B_4546.scf、Q093501036_321S_4546.scf、Q093501038_321A_4546.scf、及びQ093501046_K11_019.ab1）、これは図2Bに示されたとおりの位置1049に対応する位置での該アミノ酸の正体が、決定され、及び、健康なネコからのFECV排泄物又は血しょう分離物からの、47の代わりに、42の試料において、メチオニンであると示されたことを意味する。

10

【 0 0 1 6 】

FECVの該スパイクタンパク質の位置1049での該メチオニンをコードする核酸配列は、図2Aにおいて示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147を有するコドンに対応する。図2Aに示されるとおりの位置1049での該FECVスパイクタンパク質における該メチオニンをコードするヌクレオチド配列は、アデニン - チミン - グアニン(a-t-g)であり、これはウイルスのゲノムRNAにおける配列アデニン - ウリジン - グアニン(a-u-g)に相当する。このヌクレオチドコドンにおける少なくとも1つのヌクレオチドのいずれの置換も、メチオニン以外のアミノ酸を、図2Bに示されたとおりの位置1049でのFECVの該スパイクタンパク質において、結果する。本発明に従い、図2A及び2Bにおいてそれぞれ示されたとおりの、ネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及びアミノ酸位置1049での該同定されたヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列は、FIPVとFECVとを区別する為に用いられる。本発明により、初めて、FECVとFIPVとを区別することを可能にするネココロナウイルスの多型（ポリモルフィズム）が、原型の血清タイプIのFECV及びFIPVにおいて同定された。

20

30

【 0 0 1 7 】

本発明者はさらに、該スパイクタンパク質における図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049で、FECVに対して特定の変化を有さないFIPVの小さな割合のかなりの部分が、該スパイクタンパク質において図2Bにおいて示されたとおりのアミノ酸位置1051でFECVに対して特定の変化を有することを発見した。これらの場合、この位置でのセリンが置換されているとみえた。すなわち、アミノ酸位置1051での該特定の変化もまた、FIPVを同定する為のアプローチを提供する。

【 0 0 1 8 】

それ故に、本発明はまた、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）を同定する為の方法であって、図2Bにおいて示されたとおりのアミノ酸位置1051に対応する位置でのネココロナウイルススパイクタンパク質のアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該決定されたアミノ酸の正体がセリンでないならば、該ネココロナウイルスをFIPVと同定することを含む前記方法を提供する。また、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス（FIPV）が試料中に存在するかを決定する為の方法であって、該試料がネココロナウイルスを含むかどうかを決定すること、もしネココロナウイルスが存在するならば、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1051に対応する位置での該ネココロナウイルスのスパイクタンパク質におけるアミノ酸の正体を決定すること、そして、もし該アミノ酸がセリンでないならばFIPVが存在することを決定することを含む前記方法も提供される。

40

【 0 0 1 9 】

50

病理学的に確認されたFIPを有する97のネコのセットにおいて、97のFIPV病変分離物のうち87において、図2Bに示されたとおりの位置1049でのアミノ酸の変化が存在し、この位置でメチオニン以外のアミノ酸を結果する。図2Bに示されたとおりの位置1049でメチオニンが存在する10のFIPV病変分離物のうち5において、図2Bに示されたとおりの位置1051でのアミノ酸の変化が存在し、この位置でセリン以外のアミノ酸を結果した。FECVのスパイクタンパク質の位置1051での該セリンをコードする核酸配列は、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3151、3152、及び3153を含むコドンに対応する。セリンは、ヌクレオチドコドンt/u-c-t/u、t/u-c-c、t/u-c-a、t/u-c-g、c-g-t/u、及びc-g-cによりコードされる。これらのコドン以外のヌクレオチド配列を結果する、このヌクレオチドコドンにおける1以上(1又はそれより多く)のヌクレオチドのいずれかの置換が、FECVのスパイクタンパク質において図2Bに示されたとおりの位置1051でセリン以外のアミノ酸を結果する。本発明に従い、それぞれ図2A及び2Bに示されたとおりの、ネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153及びスパイクタンパク質のアミノ酸位置1051のいずれかでの該同定されたヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列はまた、FIPVとFECVとを区別する為に用いられる。好ましい実施態様において、図2Bに示されたとおりの位置1051に対応するアミノ酸位置でのセリンの変化は、図2Aにおいて示されたとおりのヌクレオチド位置3151に対応する位置での核酸塩基チミンの核酸塩基グアニンによる置換の結果である。

【0020】

一つの実施態様において、ネココロナウィルスのスパイクタンパク質における図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び1051に対応する位置での該アミノ酸の正体が両方とも決定される。両方のこれらのアミノ酸の正体がもし決定されるならば、FIPV及びFECVの区別における高い精度が得られる。一つの実施態様において、図2Bに示されたとおりの位置1049及び1051でのアミノ酸の正体は、一つの試験において決定される。しかしながら、これらアミノ酸の正体を逐次的に決定することも可能である。例えば、最初に、図2Bに示されたとおりの位置1049に対応する位置でのアミノ酸の正体が決定される。もしメチオニンの存在がこの位置で検出されるならば、次に図2Bに示されたとおりの位置1051に対応する位置でのアミノ酸の正体が好ましくは決定される。もしメチオニン以外のアミノ酸の存在がこの位置で検出されるならば、図2Bに示されたとおりの位置1051に対応する位置でのアミノ酸の正体を決定することは省略されうる。しかしながら、この位置でのアミノ酸の正体は、その場合において決定されてもよい。

【0021】

遺伝子アクセス番号NC_012955(ネココロナウィルスUU10、完全ゲノム)において規定されたとおりのヌクレオチド20395-24801及び遺伝子アクセス番号NC_012952(ネココロナウィルスUU8、完全ゲノム)の配列において規定されたとおりのヌクレオチド20382-24788を含むネココロナウィルスのスパイク遺伝子(ヌクレオチド1-4407)の核酸配列が、図2Aに提示される。NC_012955のヌクレオチド20395-24801は、ネココロナウィルススパイクタンパク質(YP_003038574)をコードする。NC_012952のヌクレオチド20382-24788は、ネココロナウィルススパイクタンパク質(YP_003038543)をコードする。すなわち、本明細書を通じて用いられるときに及び図2Aにおいて示されたとおりのスパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド3145、3146、及び3147は、NC_012955の配列において規定されたとおりの完全ゲノムのヌクレオチド23539、23540、及び23541及び/又はNC_012952の配列において定義されたとおりの完全ゲノムのヌクレオチド23526、23527、及び23528に対応する。本明細書を通じて用いられるときの及び図2Aにおいて示されたとおりのスパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド3151、3152、及び3153は、NC_012955の配列において規定されたとおりの完全ゲノムのヌクレオチド23545、23546、及び23547及び/又はNC_012952の配列において定義されたとおりの完全ゲノムのヌクレオチド23532、23533、及び23534に対応する。

【0022】

NC_012955及びNC_012952それぞれの部分翻訳であるYP_003038574及びYP_003038543の配列において定義されたアミノ酸ナンバリングを参照するネココロナウィルススパイクタンパク質のアミノ酸配列が図2Bに提示される。本明細書を通じて用いられるときにアミノ酸位置のナンバリングは、YP_003038574及び/又はYP_003038543において規定されたとおりのアミノ酸位置をいう。

【0023】

当業者は、図2A又は2Bにおいて示されたとおりのヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及びアミノ酸位置1049及びヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153及びアミノ酸位置1051に対応する任意のあるネココロナウィルス配列におけるヌクレオチド位置及びアミノ酸位置を、例えば“Align 2”又は“Bioconductor”などのアラインメントソフトウェアを用いて、同定することができる。

10

【0024】

FIPの症状は、例えば、腹部内の腹水の蓄積（滲出性FIPにおいてだけ）、発育遅延、食欲不振、発熱、体重喪失、及び下痢を含む。本明細書内上記において示されたとおり、同様の症状は、他の疾患を患うネコによっても観察され、FIPの明確な診断をこれまでは不可能にした。今、ネココロナウィルススパイクタンパク質について多型が同定され、これが試料中のFIPVの存在を決定することを許し、ネコ科動物、例えばネコ、がFIPを患っているかどうか決定されうる。現在、FIPについての処置は無く、そして該疾患の経過は進行性且つ消耗性であり、不可避免的に死を結果するので、該動物がFIPVを有すると示された場合に、該ネコを安楽死させることが決定されうる。加えて、該ネコ又はネコ飼育所所有者は、感染のあり得る拡大を防ぐ為及び/又は誘発する条件、例えばストレスなど、を減少させる為の適切な手段をとりうる。しかしながら、FIPVがネコにおいて不在であると示された場合、ネコ伝染性腹膜炎は、該疾患のあり得る原因として排除されうる。それ故に、その場合、該ネコは安楽死されるべきでないが、診断的アプローチが継続されることができ、そして、該どうぶつは、FIPのものに似ている症状を有するあり得る代替りの疾患についての処置を提供されることができ、そのような処置は、例えば、該疾患のあり得るバクテリアの原因に対して作用するさらなる対症療法又は抗生物質の施与でありうる。

20

【0025】

それ故に、本発明により、ネコ伝染性腹膜炎ウィルス（FIPV）が、好ましくはネコ科動物から又はネコ科動物と接触した物質からの、試料中に存在するかどうかを決定する為の方法がさらに提供され、該方法は、該試料がネココロナウィルスを含むかどうかを決定すること、そして、もしネココロナウィルスが存在するならば、該ネココロナウィルスのスパイクタンパク質中における図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又は1051に対応する位置でのアミノ酸の正体を決定すること、そして、もしアミノ酸位置1049での該アミノ酸がメチオニンでないならば及び/又はもしアミノ酸位置1051での該アミノ酸がセリンでないならば、FIPVが存在することを決定することを含む。

30

【0026】

ネコ腸内コロナウィルス、ネコ伝染性腹膜炎ウィルス、ネココロナウィルス（スパイク）タンパク質、又はネココロナウィルス核酸を含む試料は、任意のネコ科動物から直接的に又は間接的に得られる。そのような試料は例えば、任意のネコ科動物組織又は流体又は排せつ産物から得られる。そのような試料が得られるネコ科動物組織、流体、又は排せつ産物は、FIP病変、血液、白血球、血しょう、血清、唾液、腹水、尿、糞便、皮膚、筋肉、リンパ節、及び肝臓を包含するがこれらに限定されない。ネコ科動物から間接的に得られる本発明に従う試料は、ネコ科動物組織、流体、又は排せつ産物を含む任意の材料を含んでよく、例えば土又はネコスナ（cat litter）を含みうる。本発明の好ましい実施態様において、試料は、FIP病変、排泄物、血液、及び/又は腹水から得られる。より好ましい実施態様において、試料は、白血球から得られる。血液試料は、動物から比較的容易に得られ、そして次に、白血球は血液試料から容易に分離される。本発明者らは、図2Bにおいて示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でのアミノ酸の変化がFIP病変試料において検出されたネコから得られた31の白血球試料のうち29において、該アミ

40

50

ノ酸の変化が、該白血球試料においても存在することを発見した。すなわち、アミノ酸の変化の該検出が、ネコ科動物白血球試料において、正確に検出される。

【0027】

ネコ科動物が、ネココロナウイルス感染を患っていると疑われる場合、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸であって、図2Aに示されたとおりのヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153を含むところの前記核酸が、該ネコ科動物からの試料において検出されうる。該ネコ科動物からの試料は、ネココロナウイルス核酸又は分離されたネココロナウイルス核酸を含みうる。任意的に、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153を含むネココロナウイルス核酸は、検出の前に増幅される。本発明に従う試料はさらに、ネココロナウイルス又は、該スパイクタンパク質を包含するがこれに限定されない、ネココロナウイルスタンパク質を含みうる。

【0028】

本発明に従い、図2Bに示されたとおりのネココロナウイルスのアミノ酸位置1049に対応する位置でのメチオニンの存在は、FECVを示し、そして、該位置でのメチオニン以外のいずれかのアミノ酸の存在はFIPVを示す。すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及び/又はバリンの、図2Bに示されたとおりのネココロナウイルスのアミノ酸位置1049に対応する位置での存在は、FIPVを示す。本発明の好ましい実施態様において、メチオニン以外の該アミノ酸はロイシンである。図2Bに示されたとおりのネココロナウイルスのアミノ酸位置1051に対応する位置でのセリン以外のいずれかのアミノ酸の存在は、FIPVを示す。すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及び/又はバリンの図2Bに示されたとおりのネココロナウイルスのアミノ酸位置1051に対応する位置での存在はFIPVを示す。本発明の好ましい実施態様において、セリン以外の該アミノ酸はアラニンである。

【0029】

図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置での核酸塩基アデニン(a)、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3146に対応する位置での核酸塩基チミン(t)、及び、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3147に対応する位置での核酸塩基グアニン(g)の存在がFECVを示し、及び、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置でのアデニン(a)以外のいずれかの核酸塩基、及び/又は、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3146に対応する位置でのチミン(t)以外のいずれかの核酸塩基、及び/又は、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3147に対応する位置でのグアニン(g)以外のいずれかの核酸塩基の存在が、FIPVを示す。すなわち、図2Aにおいて示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置での核酸塩基チミン(t)、及び/又はシトシン(c)、及び/又はグアニン(g)、及び/又は図2Aにおいて示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3146に対応する位置での核酸塩基アデニン(a)、及び/又はシトシン(c)、及び/又はグアニン(g)、及び/又は図2Aにおいて示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3147に対応する位置での核酸塩基アデニン(a)、及び/又はチミン(t)、及び/又はシトシン(c)の存在はFIPVを示す。ネココロナウイルスはRNAウイルスであ

10

20

30

40

50

る。それ故に、ヌクレオチドが本明細書内においてチミンとして同定される場合、当業者
に知られているとおり、ウラシルも該語によって包含される。

【 0 0 3 0 】

それ故に、本発明は、本発明に従う方法を提供し、ここで位置1049での該アミノ酸の正体
が、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸の核酸配列を決定すること
により決定され、該核酸は図 2 Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパ
ク質をコードする遺伝子の位置3145、3146、及び/又は3147でのヌクレオチド又は当該位
置に対応するヌクレオチドを含む。好ましい実施態様において、図 2 Aにおいて示された
とおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置
3145に対応する位置でのシトシン又はチミン又はグアニンがFIPVを示し、及び、図 2 Aに
10 において示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌ
クレオチド位置3145に対応する位置でのアデニンがFECVを示す。本発明はまた、本発明に
従う方法も提供し、ここで位置1051でのアミノ酸の正体が、スパイクタンパク質をコード
するネココロナウイルス核酸の核酸配列を決定することにより決定され、該核酸は、図 2
Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子の位置3
151、3152、及び/又は3153での又は当該位置に対応する位置でのヌクレオチドを含む。

【 0 0 3 1 】

コロナウイルスはRNAウイルスである。ウイルスRNAは、当技術分野で既知の方法により分
離されそして処理されうる。例えば、RNA試料が細胞又は組織から、回収の時に新鮮に調
製されることができ、又はそれらは、試料調製の為に処理されるまで、- 7 0 で保存され
20 20 される試料から調製されうる。代わりに、組織又は細胞試料は、RNAの品質を保存する条件
下で貯蔵されうる。これらの保存条件の例は、例えばホルマリンを用いた固定、RNase阻
害剤、例えばRNAsin(Pharmingen)又はRNasesecure(Ambion)など、水性溶液、例えばRNAlate
r(Assuragen)、Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protecti
on Effect(HOPE)、及びRCL2(Alphelys)など、並びに非水性溶液、例えばUniversal Mol
ecular Fixative(Sakura Finetek USA Inc.)である。RNAは例えば、Chomczynski an
d Sacchi (1987)の方法又はBoom et al. (1990)の方法に従い、又は市販入手可能な
システム(例えばRNeasy total RNA isolation kit、QIAGEN、ドイツ、から、又はHig
h-Pure-RNA-Isolation-Kit(商標)、Roche Diagnostics、バーゼル、スイス、から)に
30 30 従い分離されうる。代わりに、又は追加的に、RNAはcDNAへと逆転写される。逆転写酵素
ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)は例えば、関心のあるRNA配列にハイブリダイズする特
異的プライマー及び逆転写酵素を用いて実施される。さらに、RT-PCRは、ランダムプ
ライマー、例えば該RNAに沿ってランダムにハイブリダイズするランダムヘキサマー又はデ
カマーなど、又はmRNAのポリ(A)テールにハイブリダイズするオリゴd(T)、と逆転写酵素
とを用いて実施されうる。

【 0 0 3 2 】

ネココロナウイルスから直接に又はRT-PCR後に得られるヌクレオチドの増幅は、任意の
核酸増幅方法、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Mullis and Faloona, 1987)など
、を用いて、又は、増幅反応、例えばリガーゼ連鎖反応(LCR; Barany, 1991)、自己持
続配列複製(Self-Sustained Sequence Replication(3SR); Guatelli et al., 1
40 40 990)、Strand Displacement Amplification(SDA; Walker et al., 1992)、Transcr
iptional Amplification System(TAS; Kwoh et al, 1989)、Q-Beta Replicase (L
izardi et al., 1988)、Rolling Circle Amplification (RCA; 米国特許番号第5
,871,921号)、核酸配列ベース増幅(Nucleic Acid Sequence Based Amplification(N
ASBA); Compton, 1991)、Cleavase Fragment Length Polymorphism(米国特許第5,71
9,028号)、Isothermal and Chimeric Primer-initiated Amplification of Nuclei
c Acid(ICAN)、Ramification-extension Amplification Method(RAM; 米国特許第5,7
19,028号及び第5,942,391号)など、又は核酸の増幅の為に他の適切な方法を用いて実施さ
れうる。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

本明細書内において用いられるときに、語「核酸」又は「核酸分子」は、ヌクレオチドの鎖、好ましくはDNA及び/又はRNAを含む。

【0034】

語「プライマー」は、本明細書内において用いられるときに、増幅標的にアニールすることができ、DNAポリメラーゼが付着することを許し、それにより、プライマー伸長産物の合成が誘発される条件下に置かれた場合に、すなわちヌクレオチド及びDNAポリメラーゼなどの重合化の為に剤の存在下且つ適切な温度で、DNA合成の開始点として従事するオリゴヌクレオチドをいう。増幅プライマーは好ましくは、増幅における最大効率の為に一本鎖である。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、重合化の為に剤の存在下において、伸長産物の合成を刺激するのに十分長くなければならない。該プライマーの正確な長さは、温度及びプライマーの組成（A/T及びG/C含量）を含む多くの因子に依存するであろう。プライマー対は、DNA増幅の分野において、例えばPCR増幅において一般に用いられるとおり、一つのフォワードプライマー及び一つのリバースプライマーからなる。

10

【0035】

語「プローブ」は、標的核酸配列分析物又はそのcDNA誘導体における相補的配列を認識しそして水素結合された二本鎖を形成するであろう、一本鎖オリゴヌクレオチド配列をいう。結合の検出を容易にするために、特定のアンプリコン検出プローブは、ラベル部分、例えばフルオロフォア、クロモフォア、酵素、又は放射性標識など、を含み、それにより該プローブの該増幅反応の反応産物への結合をモニタリングすることを容易にする。そのような標識は、当技術分野の当業者によく知られており、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、 α -ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴシキゲニン、 $<35>S$ 、 $<14>C$ 、 $<32>P$ 、及び $<125>I$ を包含する。

20

【0036】

本発明に従うプライマー又はプローブは、核酸配列、好ましくはDNA及び/又はRNAを含む。該核酸配列はまた、他の種類の核酸構造物、例えばDNA/RNAヘリックス、ペプチド核酸（PNA）、及び/又はロックド核酸（LNA）など、を包含する。従って、語「核酸配列」はまた、天然のヌクレオチドと同じ機能を示す非天然のヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド、及び/又は非ヌクレオチドビルディングブロックを含む鎖を包含する。

30

【0037】

ハイブリダイゼーションは当技術分野において知られており、そして、相補的な一本鎖核酸の、好ましくはストリンジェントな条件下での、結合をいう。語「相補的」又は「配列相補性」もまた当技術分野において知られており、そしてベースペアリングにより非共有結合的に結合せらるる2つの核酸ストランドをいう。本明細書内において用いられるときに、「相補的」又は「実質的に相補的」は、2つの核酸配列が少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%の配列相補性を互いに有することを意味する。これは、プライマー及びプローブが、それらの鋳型及び標的核酸にそれぞれ、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするのに十分な相補性を示さなければならないことを意味する。それ故に、該プライマー及びプローブ配列は、該鋳型上の結合領域の正確に相補的な配列を反映する必要は無く、そして、縮重（degenerate）プライマーが用いられうる。例えば、非相補的ヌクレオチド断片が、該プライマーの5'末端に取り付けられてよく、該プライマー配列の残りが該ストランドに相補的である。

40

【0038】

語「ストリンジェントな条件」は、ハイブリッドの安定性に影響するハイブリダイゼーション条件、例えば温度、塩濃度、pH、ホルムアミド濃度、及び同様なものなど、をいう。これらの条件は、プライマー又はプローブのその標的核酸配列への特異的な結合を最大にし及び非特異的な結合を最小にする為に、経験的に最適化される。用いられるとおりの該語は、プローブ又はプライマーが、他の配列へよりも検出可能に大きな程度（例えばバ

50

ックグラウンドの少なくとも2倍)で、その標的配列にハイブリダイズするであろう条件、への言及を含む。ストリンジентな条件は、配列依存的であり、そして、種々の環境において異なるであろう。

【0039】

語「%配列同一性」は、本明細書内において、参照配列における残基と同一である候補アミノ酸配列又は候補核酸配列における残基のパーセンテージであって、該2つの配列を整列化し、そして、もし必要ならば、最大のパーセント同一性を得る為にギャップを導入した後の前記パーセンテージとして定義される。該整列化の為の方法及びコンピュータプログラムは当技術分野でよく知られている。候補配列がこの定義内に入るかどうかを決定する為に用いられ又は適合されうる一つのコンピュータプログラムは、Genentech, Inc.により著作された「Align 2」であり、これは米国著作権局、ワシントン, D.C. 20559におけるユーザー文書に1991年12月10日に提出され、又は、BESTFITプログラムを提供するUWGCG Packageに提出された(Devereux et al., 1984)。

10

【0040】

図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、又は3147及びノ又はヌクレオチド位置3151、3152、又は3153に対応するヌクレオチドを含むネココロナウィルス核酸は、該ネココロナウィルス核酸配列の少なくとも一部にハイブリダイズすることができるプライマーを用いて増幅される。該プライマーは例えば、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3055に対応する位置とヌクレオチド位置3669に対応する位置との間のスパイクタンパク質をコードする該ネココロナウィルス核酸配列にハイブリダイズする。該プライマーは好ましくは、9~50ヌクレオチドの長さ、例えば16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、又は31ヌクレオチドの長さを有する。そのようなプライマーを用いる増幅方法により得られた核酸産物は好ましくは、少なくとも35ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも50ヌクレオチドを含む。

20

【0041】

それ故に、本発明は、本発明に従う方法であって、さらに、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び3147及びノ又はヌクレオチド位置3151、3152、及び3153を含む領域若しくは該位置に対応する領域を含むネココロナウィルス核酸分子の少なくとも一部を、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードするヌクレオチド位置3055に対応する位置とヌクレオチド位置3669に対応する位置との間の該核酸配列の少なくとも一部にハイブリダイズすることができる少なくとも1つのプライマーを用いて増幅することをさらに含む前記方法を提供する。

30

【0042】

本発明に従う方法における使用の為に好ましいプライマー対は、核酸配列

5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3'

40

と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは該核酸配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは該核酸配列と少なくとも90%の配列同一性、最も好ましくは該核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するプライマーと、核酸配列

5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3'

と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは該核酸配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは該核酸配列と少なくとも90%の配列同一性、最も好ましくは該核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するプライマーとを含む。本発明に従う方法における使用の為に好ましい他のプライマー対は、核酸配列

50

5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3'

と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは該核酸配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは該核酸配列と少なくとも90%の配列同一性、最も好ましくは該核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するプライマーと、核酸配列

5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3'

と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは該核酸配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは該核酸配列と少なくとも90%の配列同一性、最も好ましくは該核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するプライマーとを含む。

【0043】

一つの実施態様において、本発明に従うプライマー対は、核酸配列

5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3'

と核酸配列

5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3'

との組み合わせを含み、又は、核酸配列

5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3'

と核酸配列

5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3'

との組み合わせを含む。

【0044】

本発明の一つの実施態様において、上記で示されたプライマー対は、ネステッド(nested)PCR反応において用いられる。ネステッドポリメラーゼ連鎖反応において、2つのプライマー対が、逐次のPCR反応において用いられる。第二のプライマー対は、第一のプライマー対を用いた増幅反応において得られた核酸産物又はその部分を増幅する為に用いられる。それ故に、一つの実施態様において、第一のプライマー対を用いて増幅された、増幅された核酸の少なくとも一部が、さらに第二のプライマー対を用いて増幅される。本発明に従う第一のプライマー対は、例えば、核酸配列

5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3'

と少なくとも70%の配列同一性を有するプライマー及び核酸配列

10

20

30

40

5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3'

と少なくとも70%の配列同一性を有するプライマーとを含み、及び、本発明に従う第二のプライマー対は、例えば、核酸配列

5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG3'-

と少なくとも70%の配列同一性を有するプライマーと核酸配列

10

5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT3'-

と少なくとも70%の配列同一性を有するプライマーを含む。

【0045】

また、本発明により、好ましくはネコ腸コロナウイルス(FECV)又はネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)を同定する為に、及び/又は、ネココロナウイルス感染症を患うと疑われる動物においてFIPV又はネコ伝染性腹膜炎(FIP)の存在を決定する為に、本発明に従うプライマー対を使用する方法が提供される。

20

【0046】

ネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子の位置3145、3146、及び/又は3147でのヌクレオチド及び/又は位置3151、3152、及び/又は3153でのヌクレオチドの正体は、当技術分野において知られている任意の方法により決定されうる。これらの方法は、アレル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)、核酸配列のシーケンシング(例えばタグ-アレイミニシーケンシング[Fan et al., 2000]若しくはパイロシーケンシング[Fakhrai-Rad et al., 2002])、ブロック試薬とのアレル特異的PCR(ASB-PCR、Morlan et al., 2009)、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA, Baron et al., 1996)、マスマスペクトロメトリー(MS、例えばマトリックス支援レーザー脱着/イオン化飛行時間(MALDI-TOF)MS、Crain and McCloskey 1998)、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)、エレクトロニックハイブリダイゼーション、蛍光一本鎖高次構造多型(F-SSCP)分析(Makino et al., 1992)、変性ハイパフォーマンス液体クロマトグラフィー(denaturing high-performance liquid chromatography、DHPLC)、ゲル電気泳動(例えばマイクロプレートアレイ対角ゲル電気泳動[MADGE, Day et al., 1998]及び変性勾配ゲル電気泳動[DGGE, Fischer and Lerman 1980]など)、及びマイクロアレイ分析を包含するがこれらに限定されない。

30

【0047】

アレル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)は、短く且つ特定のRNA又はDNA配列に対して特異的であるフルホロフォア-、クロモフォア-、酵素-、又は放射性-標識されたヌクレオチドプローブである。ASOは例えば、ヌクレオチド変異を有し、そして、この変異を含む核酸配列とハイブリダイズするだけである。図2Aに示されたとおりの位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153でのヌクレオチド又は当該位置に対応するヌクレオチドを含むスパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列の核酸配列は例えば、図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153に対応するヌクレオチドを含む該ネココロナウイルス核酸配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができるプローブを用いて検出される。該プローブは好ましくは、14~100ヌクレオチド長

40

50

、好ましくは14、15、16、17、18、19、20、21、22、又はそれより多くのヌクレオチド長を有する。それ故に、一つの実施態様において、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子の位置3145、3146、及び3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び3153での(又は、に対応する)ヌクレオチドを含むネココロナウィルス核酸配列は、該核酸の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも14のヌクレオチド長を有するプローブを用いて検出される。好ましい実施態様において、プローブは、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシン又はチミンを有するネココロナウィルス核酸に特異的にハイブリダイズすることができる。

【0048】

本発明に従う方法において用いられるプローブは、図2Aに示される通りのヌクレオチド位置3145、3146、及び3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び3153に対応するヌクレオチドを含むスパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸配列に相補的である。コロナウィルスはRNAウィルスであるので、それらは、当業者が知っているであろうとおり、比較的高い割合の変異を有する。それ故に、ネココロナウィルスの配列は、ネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び3153の周囲のいくつかのヌクレオチドにおいて異なりうる。当技術分野の当業者は、例えば核酸置換によって、本発明に従うプローブが特定のネココロナウィルスの核酸配列にハイブリダイズすることができるようにし、及び、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子の位置3145、3146、又は3147及び/又は位置3151、3152、又は3153での(又は、に対応する)ヌクレオチドを検出する為に、該プローブがどのように修正されるかを知っている。

【0049】

本発明に従う方法における使用の為に、図2Aにおいて示されたとおりのヌクレオチド位置3145、3146、及び3147に対応するヌクレオチドを含む好ましいプローブは、RがA又はGである核酸配列5'-CCCARRGCCATAGG-3'と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは該核酸配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは該核酸配列と少なくとも90%の配列同一性、最も好ましくは該核酸配列と少なくとも95%の配列同一性、を有する配列を含む。一つの実施態様において、本発明は、本発明に従う方法を提供し、ここで該プローブは、配列CCCARRGCCATAGGを含む。また、本発明により、好ましくはネコ腸コロナウィルス(FECV)及び/又はネコ伝染性腹膜炎ウィルス(FIPV)を同定する為に、及び/又はネココロナウィルス感染症を患うと疑われる動物においてネコ伝染性腹膜炎(FIP)の存在を決定する為に、本発明に従うプローブを使用する方法が提供される。

【0050】

ネココロナウィルス核酸配列は、当業者に知られているシークエンシング方法により、好ましくは関連核酸の増幅直後に、決定されうる。これらの方法は例えば、蛍光的に標識されたダイデオキシヌクレオチドターミネーターを用いた直接的二本鎖ヌクレオチドシークエンシング(Smith et al., 1986)、タグ-アレイミニシークエンシング、又はパイロシークエンシングを含む。一般に、そのようなシークエンシング方法は、核酸分離手順によるウィルスゲノム核酸の分離、及び、該分離された核酸の核酸配列の、例えばダイデオキシ鎖ターミネーション方法(Sanger et al., 1977)(任意的にRNAのDNAへの逆転写及び/又は標的核酸の増幅により先行される)による決定を含む。

【0051】

一つの実施態様において、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び3153に対応するヌクレオチドを含むネココロナウィルス核酸配列の少なくとも一部がシークエンスされる。

【0052】

オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)は、既知のシングルヌクレオチドポ

10

20

30

40

50

リモルフィズムの検出の為の方法である。該方法は、2つの隣接するオリゴヌクレオチドプローブをDNAリガーゼを用いてライゲーションすることに基づき、一方で、それらが相補的なDNA標的にアニールされる。該プローブのひとつは例えば蛍光標識され且つアレレル特異的である。典型的には、それぞれのアレレルについて一つの、2つの異なって標識されたプローブがある。これらの2つのプローブは、3'末端の最後の塩基での配列においてだけ異なり、すなわちポリモルフィズムの部位で異なる。第二のプローブは、該ポリモルフィズムを有する部位の直下流(3')の標的DNA配列に相補的であり、すなわち両方のアレレルに相補的である一般的なプローブである。このプローブは蛍光標識される必要がない。アレレル識別は、DNAリガーゼの、完全にマッチしたプローブを連結する能力により起こる；キャプチャープローブにおける3'ミスマッチが、ライゲーションを妨げるであろう。本発明の方法において、例えば該プローブの一つが、FECVを示す、図2Aに示されたとおりのヌクレオチド位置3145でのアデニンを有するスパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸配列に特異的にハイブリダイズすることができるおりのオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイが用いられる。すなわち、右のプローブの最初のヌクレオチド又は左のプローブの最後のヌクレオチドがチミンである。第二のプローブは一般的なプローブであり、これは、FECV及びFIPV両方の核酸配列にハイブリダイズすることができ、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子の位置3145の次でスタートし、例えばもし該第二のプローブが右のプローブであるならば位置3146でスタートする。FECVの存在下において、該2つのプローブのライゲーションが可能である一方で、FIPVの存在下において、該2つのプローブのライゲーションは可能でない。本発明の一つの実施態様において、ヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147を含むスパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸配列は、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)を用いて決定される。

【0053】

リアルタイムPCR技術が、ブロッキング試薬が用いられる場合に遺伝子の一つの特異的アレレルを検出する為に用いられうる。この技術は、ブロッキング試薬を用いるアレレル特異的PCRと呼ばれる(ASB-PCR, Morlan et al., 2009)。該PCR反応の間、ブロッキング剤が該反応混合物に添加されて、一つのアレレルの増幅を防ぐ。プライマーの一つ、例えばフォワードプライマー、は変異アレレル特異的プライマーとして設計される。他方のプライマーは一般的なプライマーであり、これは両方のアレレルとハイブリダイズすることができる。ブロッキング剤(これは3'末端での増幅を防ぐためにホスホリル化される)が次に野生型アレレルと特異的に結合するように設計される。該PCR反応の間、該ブロッキング剤は、該変異体特異的プライマーの該野生型アレレルへのハイブリダイゼーションを防ぐ。野生型アレレルだけの存在下において増幅産物は得られない一方で、変異体アレレルだけの存在下において増幅産物が得られる。ASB-PCRにより、例えば、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145でアデニンを有する(及びこれはFECVを示す)ネココロナウィルス核酸配列と、該位置でシトシン又はチミンを有するネココロナウィルス核酸配列(これはFIPVを示す)とを区別することができる。例えば、一般的なリバープライマーと、2つのFIPV核酸特異的プライマーであって、3'末端ヌクレオチドが図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に相補的である前記プライマーとからなるプライマーセットが用いられる。これらのFIPV特異的プライマーの一つが、その3'末端でアデニンを有し、及び、他方のプライマーがその3'末端でグアニンを有し、これが、該プライマーが、ヌクレオチド位置3145でそれぞれチミン又はシトシンを有するスパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸配列にハイブリダイズすることを可能にする。3'末端でチミンを有するブロッキング剤が用いられてよく、これはヌクレオチド位置3145でアデニンとハイブリダイズすることができる。該プライマーセットを用いて、FIPV核酸配列が存在する場合に増幅が起こるのである一方で、FECV核酸だけが存在する場合は増幅は起こらないであろう。本発明の好ましい実施態様において、ヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は31

10

20

30

40

50

53を含むスパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列が、ブロッキング試薬とのアレル特異的PCR(ASB-PCR)を用いて決定される。

【0054】

MALDI-TOF MSを用いて、低量(フェムトモル量)のDNAの検出が達成されうる。2~2000ヌクレオチドの核酸が、MALDI-TOF MSを用いることにより検出されうる。MSは、種々の核酸断片の混合物を、核酸塩基の質量差の故に、いずれのラベルも使用すること無く分析する為に用いられうる。すなわち、ほとんどの場合、核酸断片の分離は、MS測定の前には必要ない。MALDI-TOF MSを用いて、例えば、ヌクレオチド位置3145での、スパイクタンパク質をコードするネココロナウイルス核酸配列のヌクレオチドがアデニンであるか(これはFECVを示す)、若しくは、シトシン又はチミンであるか(これはFIPVを示す)を決定することが可能である。本発明の一つの実施態様において、ネココロナウイルス核酸配列の少なくとも一部の質量であって、該一部が図2Aに示されたとおりのネココロナウイルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145、3146、及び/又は3147及び/又はヌクレオチド位置3151、3152、及び/又は3153に対応するヌクレオチドを含むところの前記質量が決定される。好ましい実施態様において、該核酸配列の質量は、マトリックス支援レーザー脱着/イオン化飛行時間マスペクトロメトリー(MALDI-TOF MS)を用いて決定される。

10

【0055】

図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051でのスパイクタンパク質をコードするネココロナウイルスアミノ酸配列中のアミノ酸の正体は、当技術分野で既知の任意の方法を用いて検出されうる。そのようなアミノ酸は、例えば、抗体又はその機能的等価物、マスペクトロメトリー又はエドマン分解反応を用いて検出されうる。任意的に、コロナウイルスタンパク質は、当技術分野で既知の方法により生成されうる。例えば、コロナウイルスタンパク質は、ゲル電気泳動又はクロマトグラフィー法、例えばアフィニティークロマトグラフィーなど、を用いて精製されうる。

20

【0056】

抗体の機能的等価物は、種類においては該抗体と少なくとも一つの同じ特性を有するが量においては必ずしもそうでない化合物として定義される。該機能的等価物は、該抗体と、必ずしも同じ程度で結合しないけれども、同じ抗原に結合することができる。抗体の機能的等価物は好ましくは、シングルドメイン抗体、一本鎖抗体、ナノボディ、ユニボディ、又は一本鎖可変断片(scFv)を含む。抗体の機能的等価物は例えば、抗体を、得られる化合物の少なくとも一つの特性(好ましくは抗原結合性)が種類においては本質的に同じであるが、量においては必ずしもそうでないように変更することによって作成される。これは、多くの方法において、例えば、アミノ酸残基が一般的に同様な特性(サイズ、疎水性等)を有する他の残基により置換され、その結果全体的な機能性が重度には影響されないところの保存的アミノ酸置換により行われる。

30

【0057】

ネココロナウイルススパイクタンパク質を有するネココロナウイルスの免疫原性部分は、少なくとも一つの特性を、ネココロナウイルススパイクタンパク質を有するネココロナウイルスと、種類においては共有するが、量においては必ずしもそうでない部分として定義される。ネココロナウイルススパイクタンパク質の免疫原性部分は、ネココロナウイルススパイクタンパク質と、種類においては同じであるが量においては必ずしもそうでない少なくとも一つの同じ特性を有する部分として定義される。該免疫原性部分は、ネココロナウイルス、好ましくはネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)、に対する免疫応答を動物において好ましくは引き起こすことができる。

40

【0058】

図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051に対応する、ネココロナウイルススパイクタンパク質アミノ酸配列のアミノ酸は、例えば、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051を有するネココロナウイルススパイクタンパク質のエピトープに対して、特異的に向けられた抗体又は機能的等価物を

50

用いて検出される。図2Bに示されたとおりの該アミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051は、FECVとFIPVとの区別を可能にする。アミノ酸位置1049でのメチオニンは、FECVを示し、一方で、この位置でのメチオニン以外のいずれかのアミノ酸、好ましくはロイシン、はFIPVを示し、及び、アミノ酸位置1051でのセリン以外のいずれかのアミノ酸、好ましくはアラニン、はFIPVを示す。それ故に、本発明は、本発明に従う方法を提供し、ここで図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でのネココロナウィルススパイクタンパク質のアミノ酸が、アミノ酸1049及び/又はアミノ酸1051を含むFIPVスパイクタンパク質のエピトープに対して特異的に向けられた抗体又はその機能的等価物を用いることにより検出される。一つの実施態様において、該エピトープは、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニン以外のアミノ酸を有し、且つ/又は、該エピトープは、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1051に対応する位置でセリン以外のアミノ酸を有する。

10

【0059】

FIPVスパイクタンパク質のエピトープに対して特異的に向けられた抗体又はその機能的等価物であって、そのエピトープが図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049及び/又はアミノ酸位置1051に対応するアミノ酸を有する前記抗体又は等価物は、当技術分野で既知の任意の方法により検出されうる。例えば、該抗体又はその機能的等価物は、フルオロフォア-、クロモフォア-、又は酵素-により標識され、そして、すなわち、例えば蛍光顕微鏡又はスペクトロフォトメトリーにより検出されうる。抗体又は機能的等価物はまた、例えばフルオロフォア-、クロモフォア-、又は酵素-により標識された二次抗体を用いて検出されうる。そのような標識は当技術分野の当業者に周知であり、そして、例えば、フルオレセインイソチシアネート(FITC)、-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、又はジゴキシゲニンを包含する。

20

【0060】

また、本発明により、FIPVスパイクタンパク質のエピトープに対して特異的に向けられた抗体又は機能的等価物であって、該エピトープは、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニン以外のアミノ酸を有する前記抗体又は等価物が提供され、及び、本発明に従う抗体を含む部品及び該抗体を検出する為の手段のキットが提供される。

【0061】

MALDI-TOF MSを用いて、少ない量のアミノ酸配列の検出が達成されうる。MSは、種々のアミノ酸配列の混合物を、いずれの標識の使用無く、アミノ酸配列の質量差異の故に、分析する為に用いられうる。すなわち、ほとんどの場合、アミノ酸配列の分離は、MS測定の前に必要ない。MALDI-TOF MSを用いて、例えば、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049でメチオニンを有するネココロナウィルスアミノ酸配列と、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049でメチオニン以外のアミノ酸を有するネココロナウィルスアミノ酸配列とを区別することが可能である。本発明の一つの実施態様において、ネココロナウィルスアミノ酸配列の少なくとも一部の質量であって、前記一部が図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応するアミノ酸を有する前記質量が、決定される。好ましい実施態様において、該アミノ酸配列の質量は、マトリックス支援レーザー脱着/イオン化飛行時間質量分析(MALDI-TOF MS)を用いて決定される。

30

40

【0062】

FIPVに対するワクチンの開発は、これまでに成功していない。種々のアプローチが、FIPVに対する防御を誘発するワクチンを提供することに失敗してきた。これらのアプローチは、近縁の異種の生きているコロナウィルス、致死未満量の毒性FIPV、低毒性FIPV、及び(組み換え)ネココロナウィルスサブユニット又はタンパク質によるワクチン接種を包含する。これらのアプローチのいくつかは、ある程度の防御を提供したが、結果は一貫しなかった。ときどき、ワクチン接種は、増大した疾病進行及び死亡を結果しさせた。唯一の現在利用可能なワクチンは、FIPVの温度感受性株に基づき、その有効性は疑わしい(McArdle et al., 1995; Fehr et al., 1997)。

50

【 0 0 6 3 】

今、FECVとFIPVとの間の区別を許す、ネココロナウィルスのスパイクタンパク質における多型が同定されたので、FECVを示す該同定された核酸又はアミノ酸を有するネココロナウィルスを有する免疫原性組成物を開発することが可能である。FECVを表す核酸又はアミノ酸を有するネココロナウィルスを有する免疫原的組成物を用いることで、疾病及び/又は死亡のリスクが無い。というのも、該免疫原的組成物は、毒性のFIPV又はその部分を含まないからである。今、FIPVを示す該同定されたアミノ酸を有するネココロナウィルススパイクタンパク質を含む免疫原性組成物を開発することも可能である。FIPVスパイクタンパク質又はその免疫原的部分を含む免疫原性組成物を用いて、FIPVに対するより良い免疫応答が、分離されたウィルスタンパク質だけが用いられるので増大した疾患進行及び/又は死亡のリスク無く、引き起こされうる。

10

【 0 0 6 4 】

それ故に、一つの実施態様において、本発明は、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニン以外のアミノ酸及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリン以外のアミノ酸を有するネココロナウィルススパイクタンパク質又はその免疫原性部分を含む、又は、図2Aに示されたとおりのヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシン又はチミンを有し及び/又はヌクレオチド位置3151に対応する位置でグアニンを有する、スパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸を含む、又は、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置でアデニンを有し及び/又は位置3151に対応する位置でチミンを有する核酸を含むネココロナウィルスを含む、又は、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニンを有し及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリンを有するネココロナウィルススパイクタンパク質又はその免疫原性部分を有するネココロナウィルスを含む、又はそれらの任意の組み合わせを含む、免疫原性組成物を提供する。好ましい実施態様において、本発明に従う免疫原性組成物はワクチンとして用いられる。

20

【 0 0 6 5 】

さらに、ネコ科動物において、ネココロナウィルス、好ましくはネコ伝染性腹膜炎ウィルス(FIPV)、に対する免疫応答を引き起こす為の、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニン以外のアミノ酸及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリン以外のアミノ酸を有するネココロナウィルススパイクタンパク質又はその免疫原性部分、又は、図2Aに示されたとおりのヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシン又はチミンを有し及び/又はヌクレオチド位置3151に対応する位置でグアニンを有する、スパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸、又は、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位置でアデニンを有し及び/又は位置3151に対応する位置でチミンを有する核酸を含むネココロナウィルス、又は、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニンを有し及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリンを有するネココロナウィルススパイクタンパク質又はその免疫原性部分を有するネココロナウィルス、又はそれらの任意の組み合わせが提供される。

30

40

【 0 0 6 6 】

一つの実施態様は、ネコ科動物においてネココロナウィルス、好ましくはネコ伝染性腹膜炎ウィルス(FIPV)、に対する免疫応答を引き起こすための免疫原的組成物又は予防剤を調製する為に、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニン以外のアミノ酸及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリン以外のアミノ酸を有するネココロナウィルススパイクタンパク質又はその免疫原的部分を含む、又は、図2Aに示されたとおりのヌクレオチド位置3145に対応する位置でシトシン又はチミンを有し及び/又はヌクレオチド位置3151に対応する位置でグアニンを有する、スパイクタンパク質をコードするネココロナウィルス核酸を含む、又は、図2Aに示されたとおりのネココロナウィルススパイクタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド位置3145に対応する位

50

置でアデニンを有し及び/又は位置3151に対応する位置でチミンを有する核酸を含むネココロナウイルス、又は、図2Bに示されたとおりのアミノ酸位置1049に対応する位置でメチオニンを有し及び/又はアミノ酸位置1051に対応する位置でセリンを有するネココロナウイルススパイクタンパク質又はその免疫原性部分を含むネココロナウイルス、又はそれらの任意の組み合わせを使用する方法を提供する。

【0067】

本発明はさらに以下の実施例において説明される。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものでないが、本発明を明確にするために従事するだけである。

【0068】

実施例

10

【実施例1】

【0069】

この実施例において、6の臨床試料(排泄物)が分析された。RNAが、該臨床試料から抽出され、RT-PCRが該抽出されたRNAに適用され、そして、産物が、第1のPCR(第1のラン)の後及びネステッドPCR(第2のラン)の後に、アガロースゲル電気泳動により分析された(図3参照)

【0070】

材料及び方法

ネステッドRT-PCRは、標的変異を有するFCoVスパイク遺伝子領域を増幅する為に用いられた。ゲノムRNAが、QIAamp Viral RNA Mini Kit及びQiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc.)を用いて、製造者の指示に従い、6の健康なネコの排泄物から抽出された。cDNA合成が、M-MLVリバーシトランスクリプターゼ(RT)により実施され、そして次に、Taq DNAポリメラーゼによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が行なわれた。全ての酵素は、製造者の指示(Promega Corp., マディソン, WI)に従い用いられた。両方の反応が、特異的なプライマーにより刺激された(表1のプライマーを参照)。プライマーは、アクセス番号NC_012955及びNC_012952を有するFCoVゲノム配列を用いて設計された。増幅は、60秒間の94°、30秒間の50°、及び1分間の72°の30サイクル並びに増幅の終わりで7分間の72°での追加的伸長を用いて実施された。PCR断片が分離され、そして、アガロースゲルから、電気泳動後、Qiagen gel Extractionキット(Qiagen Benelux B.V., Venlo, オランダ)を用いて精製された。シーケンシングは、Base Clear Holding B.V. (ライデン、オランダ)により実施された。

20

30

【0071】

結果

第1のPCR後、601-bp断片が、図3のレーン2において見られるとおり、一つの臨床試料においてだけ得られた。PCRの第二ラウンド後、139-bp断片が、ネステッドプライマーが該第一のランのRT-PCRの産物について適用されたときに、増幅された。今、産物は、レーン2においてだけでなく、レーン3、5、及び6において示される増幅されたRNAについても見られる。

【実施例2】

【0072】

この実施例において、47の健康なネコの排泄物及び血しょう試料、54のFIPが確認されたネコの臨床試料、及び14のFIPが確認されたネコの排泄物試料が分析された。

【0073】

材料及び方法

ゲノムRNA抽出、cDNA合成、増幅、及びシーケンシングは、実施例1の材料及び方法に従い実施された。

【0074】

結果

アミノ酸位置1049でメチオニンをコードする核酸配列が、健康なネコからの全て(47/47)の排泄物若しくは血しょう由来FCoVにおいて検出された(図4A)。後で、図4Aが、確

40

50

認められた F I P を有するネコの試料に由来する 5 つの配列 (Q093501030_326B_4546.scf、Q093501032_327B_4546.scf、Q093501036_321S_4546.scf、Q093501038_321A_4546.scf 及び Q093501046_K11_019.ab1) を有することが発見され、これは、健康なネコからの 42/42 の排泄物若しくは血しょう由来 FCoV において、メチオニンがアミノ酸位置 1049 に存在することを意味した。この配列は、F I P を確認されたネコから増幅された、2/54 の病変由来 R N A (図 4B) 及び 12/14 の排泄物由来 R N A (図 4C) においても観察された。重要なことに、F I P を確認されたネコからの 52/54 (96%) の病変由来 RNA が、位置 3145 で A の C 又は T への変更を有し、メチオニンをロイシンに変更する位置 1049 でのアミノ酸変化をもたらした (図 4 B)。

【実施例 3】

10

【0075】

私たちは、オランダにおいて獣医学者及び所有者を通じて試料及びネコを集めることを継続した。この実施例において、以下の試料が分析された：

- 352 の健康なネコの排泄物試料、
- 89 の健康な又は FIP を疑われていないネコの白血球細胞試料、
- 89 の健康な又は FIP を疑われていないネコの血しょう試料、
- 56 の健康な又は FIP を疑われていないネコの血清試料、
- 97 の FIP を確認されたネコの FIP 病変試料 (腸間膜リンパ節 (LN) 及び / 又は腎臓及び / 又は脾臓及び / 又は網 (omentum) 及び / 又は肺及び / 又は LN 及び / 又は肝臓及び / 又は腹水)、
- 34 の F I P を確認されたネコの白血球試料、
- 34 の FIP を確認されたネコの血しょう試料、及び
- 15 の FIP を確認されたネコの血清試料。

20

【0076】

材料及び方法

ゲノム R N A 抽出、c D N A 合成、増幅、及びシーケンシングは、実施例 1 の材料及び方法に従い実施された。

【0077】

結果

【0078】

30

健康なネコからの試料

排泄物試料の 137/352 (39%) が FCoV 陽性であった。アミノ酸位置 1049 でメチオニン及びアミノ酸位置 1051 でセリンをコードする核酸配列が、健康なネコからの全て (137) の排泄物由来 FCoV において検出された。

【0079】

健康な又は F I P を疑われていないネコからの試料

89 の健康な又は F I P を疑われていないネコからの EDTA 血試料が得られ、そして、白血球 (WBC) 及び血しょうに分離された。56 の健康な又は F I P を疑われていないネコからの血清試料が得られた。

【0080】

40

20/89 の白血球細胞試料、4/89 の血しょう試料、及び 8/56 の血清試料が FCoV 陽性であった。全ての 4 つの血しょう陽性試料はまた W B C 画分においても陽性であり、及び、それぞれの動物において、血しょう中の配列は W B C におけるものと 100% 同一であった。アミノ酸位置 1049 でメチオニン及びアミノ酸位置 1051 でセリンをコードする核酸配列が、FCoV について陽性と試験された全ての試料において検出された。

【0081】

F I P を確認されたネコからの試料

F I P を確認された 97 のネコからの全てが研究された。典型的な F I P 病変を有する 97/97 の臓器 (腸間膜 L N 及び / 又は腎臓及び / 又は脾臓及び / 又は網 (omentum) 及び / 又は肺及び / 又は LN 及び / 又は肝臓及び / 又は腹水) が、FCoV について陽性と試験された。

50

【 0 0 8 2 】

FIPを確認されたネコからの病変由来RNAの87/97(90%)が、メチオニンをロイシンに変更する位置1049でのアミノ酸変化を有した。FIPを確認されたネコからの病変由来RNAの5/97(5%)が、セリンをアラニンに変更する位置1051でのアミノ酸変化を有した。位置1051でアラニンが存在した5つの試料全てにおいて、メチオニンが位置1049に存在した。すなわち、FIPを確認されたネコからの病変由来RNAの97のうち92(95%)が、FIPを示すアミノ酸変化を有した一方で、97のうち5(5%)が、FIPを示すアミノ酸変化を有さなかった。

【 0 0 8 3 】

該97のFIPを確認されたネコの34から、該動物を安楽死させる前に血液が得られた。血液試料が白血球（バフィーコート）及び血しょうに分離された。EDTA血も得られた、15のFIPを確認されたネコからの血清試料が得られた。

10

【 0 0 8 4 】

WBC:

WBC試料の34/34(100%)がFCoV陽性であった。FIPを確認されたネコからのWBC由来RNAの29/34(85%)において、ロイシンが位置1049で存在し、セリンが位置1051で存在した；29全てについて、臓器試料においてロイシンが位置1049で存在した。WBC試料において位置1049でメチオニンを有する5のネコのうち、2がFIP病変を有する臓器においてこの位置にロイシンを有し、他の3はFIPVを示すアミノ酸変化のいずれも有さなかった。すなわち、臓器材料においてロイシンが位置1049で検出されたFIPネコの31/34(90%)から、ロイシンはまた、この位置でWBCにおいて29/31(94%)の症例においても検出された。

20

【 0 0 8 5 】

血しょう:

血しょう試料の14/34(41%)がFCoV陽性であった。FIPを確認されたネコからの11/34(32%)の血しょう由来RNAにおいて、ロイシンが位置1049に存在し及びセリンが位置1051に存在した。血しょうにおいて位置1049でメチオニンを有する3のFCoV陽性ネコのうち、1つがFIP病変を有する臓器のFCoVのRNAにおけるこの位置でロイシンを有し、他の2つがFIPVを示すアミノ酸変化のいずれも有さなかった。すなわち、臓器材料において位置1049でロイシンが検出された31/34(90%)のFIPネコから、ロイシンもまた11/31(35%)の症例において血しょう中に検出された。

30

【 0 0 8 6 】

血清:

4/15(27%)の血清試料がFCoV陽性であった。FIPを確認されたネコからの2/15(13%)の血清由来RNAにおいて、ロイシンが位置1049に存在し及びセリンが位置1051に存在した。これらのネコのうち15/15(100%)が、臓器由来FCoV RNAにおいて、位置1049でロイシンを有した。

【 0 0 8 7 】

【表 1】

表1. FCoVスパイクターゲット領域の増幅の為に用いられたプライマー

プライマー5'-3'	スパイク遺伝子の位置	
CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA	3642-3656	第1回目のランのRT-PCRの為にリバースプライマー
CAATATTACAATGGCATAATGG	3055-3076	第1回目のランのRT-PCRの為にフォワードプライマー
GGCATAATGGTTTTACCTGGTG	3067-3088	第2回目のランのRT-PCRの為にフォワードプライマー
TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT	3188-3206	第2回目のランのRT-PCRの為にリバースプライマー

10

20

【 0 0 8 8 】

参考文献

- Barany, F. (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193.
- Baron H, Fung S, Aydin A, Bähring S, Luft FC, Schuster H. Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat Biotechnol.* 1996 Oct;14(10):1279-82.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503. 10
- Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1445-52.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. 20
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 350:91-92.
- Crain PF, McCloskey JA. Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids [Review]. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9:25-34.
- Day IN, Spanakis E, Palamand D, Weavind GP, O'Dell SD. Microplate-array diagonal-gel electrophoresis (MADGE) and melt-MADGE: tools for molecular-genetic epidemiology. *Trends Biotechnol.* 1998 Jul;16(7):287-90. 30
- Devereux J, Haeberli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95.
- Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *J Feline Med Surg.* 2007 Jun;9(3):202-13. 40

Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat.* 2002 May;19(5):479-85.

Fan, J.B., Chen, X., Halushka, M.K., Berno, A., Huang, X., Ryder, T., Lipshutz, R.J., Lockhart, D.J. and Chakravarti, A. (2000) Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.*, 10, 853–860. 10

Fehr D, Holznagel E, Bolla S, Hauser B, Herrewegh AA, Horzinek MC, Lutz H. Placebo-controlled evaluation of a modified live virus vaccine against feline infectious peritonitis: safety and efficacy under field conditions. *Vaccine.* 1997 Jul;15(10):1101-9.

Fischer SG, Lerman LS. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Aug;77(8):4420-4. 20

Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwok, D.Y., Barringer, K. J., Richman, D.D., Gingeras, T.R. (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a muti-enzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878. 20

Haijema, B. J., P. J. Rottier, and R. J. de Groot. 2007. Feline coronaviruses: a tale of two-faced types, p. 183-203. *In* V. Thiel (ed.), *Coronaviruses. Molecular and cellular biology.* Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. 30

Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P., Kania, S. (2001) Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* 81, 227-234.

Kwok, D.Y., Davis, G.R., Whitefield, K.M., Chappelle, H.L., DiMichele, L. J., Gingeras, T.R. (1989) Transcription-Based Amplification System and Detection of Amplified Human Immunodeficiency Virus Type 1 with a Bead- Based Sandwich Hybridization Format. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 1173- 1177. 40

Lizardi, P.M., Guerra, C.E., Lomeli, H., Tussie-Luna, I., Kramer, F. R. (1988) Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biotechnology* 6, 1197-1202.

Makino R, Yazyu H, Kishimoto Y, Sekiya T, Hayashi K. F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *PCR Methods Appl.* 1992 Aug;2(1):10-3.

McArdle F, Tennant B, Bennett M, Kelly DF, Gaskell CJ, Gaskell RM. Independent evaluation of a modified FIPV vaccine under experimental conditions (University of Liverpool experience). *Feline Pract.* 2005;23:67-71.

Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PLoS One.* 2009;4(2):e4584.

Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol.* 1996;40(6):425-33.

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-350.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *Feline Med Surg.* 2009 Apr;11(4):225-58.

Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec;34(12):3180-4.

Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol.* 2005 Nov;79(22):14122-30.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74;5463-5467.

10

20

30

40

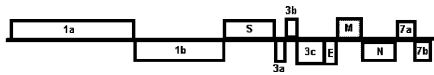
Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5463-5467.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. Virology. 1998 Mar 30;243(1):150-7.

Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., Malinowski, D. P. (1992) Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique Nucleic Acids Res 20:1691-1696.

【 図 1 】

Figure 1



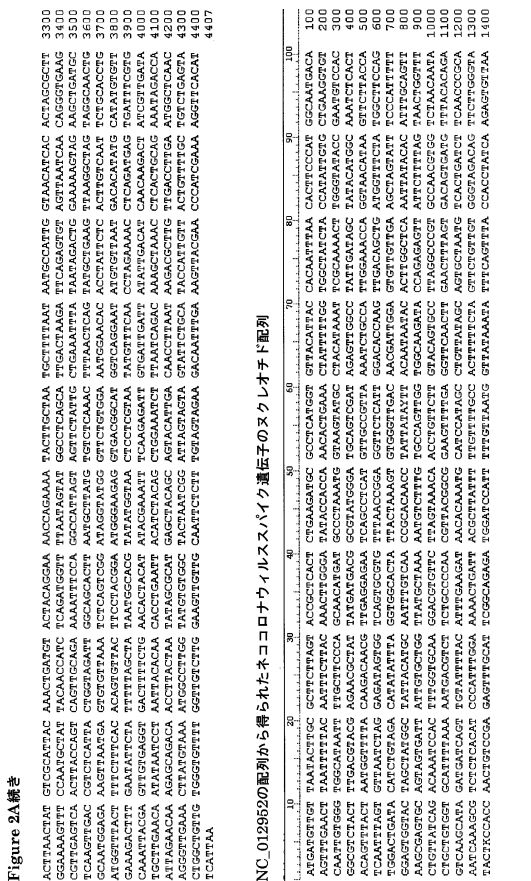
【 図 2 - 1 】

Figure 2A

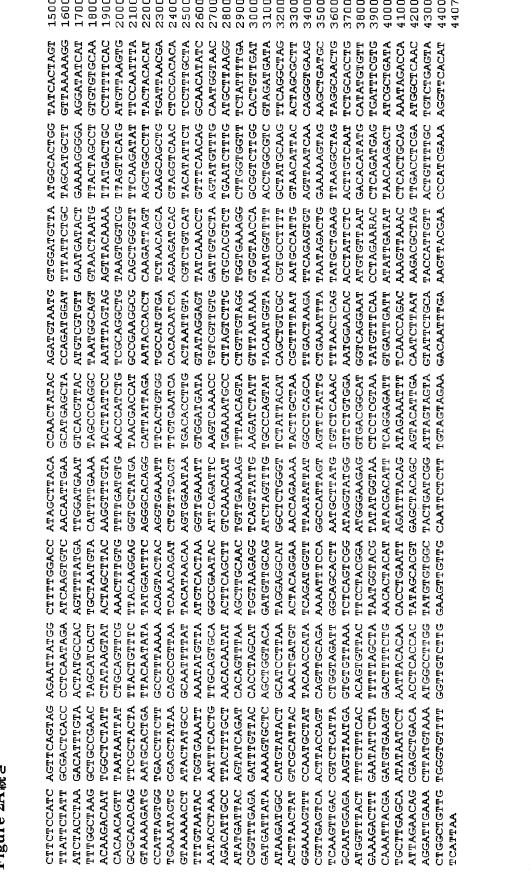
NC_012855の配列から得られたネココロナウイルスバイク遺伝子のヌクレオチド配列

ATGATGTGTG TAAACTTTCG GCTTCTTAGT ACCGCTCACT CTGAGATGCG GCGTCAAGGT GTACATATAC CACAATTTAA CAGTTCGCAI GACAATGCCA 100
AGTTTGAAGT TAAATTTTAC AATCTTTCGA AAACCTGGGA TAFACACCA AACTAGTAAA CTATCTTTGG TGCGTATCTA CCATATTTGT CTGAAGGTGT 200
CAATTTGGGG TGGCADATAT TGGCTTTTCA GCAACAGAT GCGCTAATAG GFAAGTATCG CTACATPAAT TCGCAAAACT TGGGTATACC GAATGTCCAC 300
AGCGTTACT TTGAGTGGAG AGAAGCTTAT TNGATAGAG GCGATATGGA GCGATGCGAT AGAGTGGGCG TATGTGATAK TATACATGCG AATCTCCACT 400
GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 500
TCAATTTAGT GTAACTGAG GAGATAGTGG TGAAGTGGCG TTACACAGCA GCGTCTTCTA GCGACACAG TTESACGCTG TCGTATCTA TCGTCTTCTA 600
TGGACTGATA CACTGTGAGA CAAATATTTA GTTGGCACTA TTACTAAAGT GTGAGTAGAC AACGATTTGA GGTGTGTGGA ASCTAGTAT TCCCATATAT 700
GGAGTGGTGC TASCATATGCG TATTACATGC AATTTGTCAA CCGCACACT TATTATGCTT ACAATATAC TGGTGTGTTCA AATTATACT ATTTACATAT 800
AAGTGAATGC ACCATATGCG ACTGTGTGCG TTAGTGTAG AATGTCTTGG TCCCAATTTG TCGCAAAATA CAGAAAGCT TCTCTTTAG TAACTGGTTT 900
GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 1000
GTCACAGTAA GATGATCAGT TGGATTTTAC CCGATTTTGA AACTGATGAC AACTGATGAC CAGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 1100
ATCTCAAGCG TCTCTTCACAT CCGATTTTGA AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC 1200
TACTGCGCAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC AACTGATGAC 1300
CTTCTTCATC AGTTGAGTAG AGAATATGCG CTTTTGGACC ATAGCTTACA CCAACTATAC AGATGATAG GCGGAGTTA TCGCACTACA ASAGTGTAA 1400
CCGATTTTGA GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 1500
ATCTACATTA GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 1600
TTTGGCTAAG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 1700
ACAGACAAAT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 1800
GCGACAGAT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 1900
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2000
GCGACAGAT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2100
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2200
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2300
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2400
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2500
CAGAACAGT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2600
TFTGTATAC TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2700
AATACCTAAA AATTTTCACTG TTGCAAGTGA GCGCGATGCA ATTCAGATTC AATGCAAAAC GTCGCTGTGG GATTTGCGCA GTTATCAAGT GCAACATATC 2800
ATAGATATAC ACTATATGAT TGGTCTTCTA CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT CTATAAGTAT 2900
CAGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 3000
GATGACTATA AATAGTCTTC TCTTGGCACT CAATGAGCAT GATGATGAG ATCTAGTGTG TCGCCAAAT TACAATGGCA TAAAGTGTTTT ACTTGGTGTI GCGATGTGAC 3100
ATAAGATGCG CAGTATGACT CCTCTCTTTA GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG GCGTCTTCTG 3200

【 図 2 - 2 】



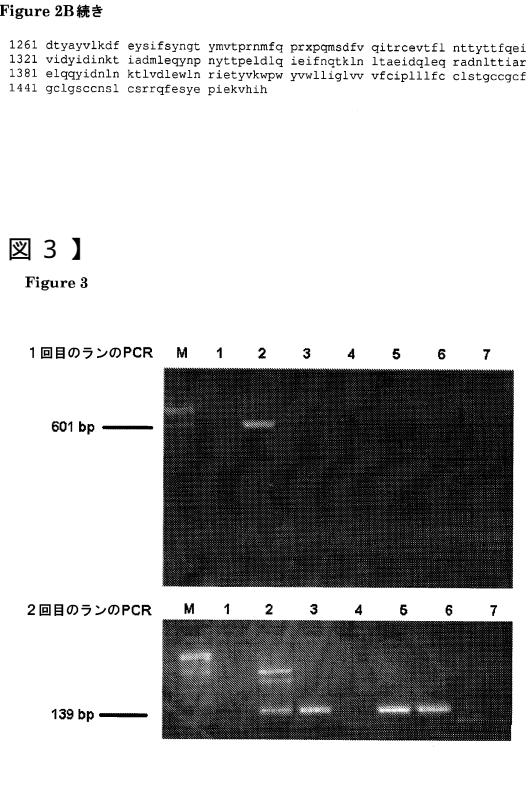
【 図 2 - 3 】



【 図 2 - 4 】



【 図 2 - 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)		A 6 1 K 39/215	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 16/08 (2006.01)		C 0 7 K 16/08	

(72)発明者 チャン, フイ - ウェン
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム コトレヒト, イェールラーン 4 0, シー / オー ユニベルシ
テイト コトレヒト ホールディング ビー . ブイ .

(72)発明者 エグベリンク, ヘルマン エフ .
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム コトレヒト, イェールラーン 4 0, シー / オー ユニベルシ
テイト コトレヒト ホールディング ビー . ブイ .

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特開平 0 7 - 3 2 7 6 8 3 (J P , A)
特表平 0 7 - 5 0 3 6 2 0 (J P , A)
国際公開第 9 5 / 0 0 8 5 7 5 (W O , A 1)
spike protein [Feline coronavirus UU10]. [online]. 2009-JUL-11 uploaded. NCBI Entrez P
rotein, ACCESSION No.ACT10937 (GI:251748030) [Retrieved on 2015-OCT-22]. Retrived from
the internet:<URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/251748030?sat=13&satkey=856304
5](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/251748030?sat=13&satkey=8563045)>

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	用于区分FECV和FIPV的手段和方法		
公开(公告)号	JP5926194B2	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	JP2012548908	申请日	2011-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	乌得勒支大学		
申请(专利权)人(译)	Yuniberushiteito乌得勒支控股蜜蜂.浮标.		
当前申请(专利权)人(译)	Yuniberushiteito乌得勒支控股蜜蜂.浮标.		
[标]发明人	ロティエールペトラスヨセフスマリー チャンファイウエン エグベリンクヘルマンエフ		
发明人	ロティエール,ペトラス ヨセフス マリー チャン,ファイ-ウエン エグベリンク,ヘルマン エフ.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/70 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/215 A61P31/12 A61K31/7088 A61K48/00 A61P37/04 C07K16/08		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/12 A61P37/04 C12Q1/701 C12Q2600/156 C12Q1/04 C12Q1/6876		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/70 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/569.L A61K39/215 A61P31/12.171 A61K31/7088 A61K48/00 A61P37/04 C07K16/08		
代理人(译)	松井光夫		
优先权	2010151340 2010-01-21 EP 2010151001 2010-01-18 EP		
其他公开文献	JP2013516983A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于区分FECV和FIPV的方法和手段，并提供了用于确定样品中是否存在FIPV的方法和手段。此外，用于检测编码刺突蛋白的FIPV特异性核酸序列的引物和探针，用于检测FIPV的抗体和用于引发针对猫冠状病毒的免疫应答的免疫原性组合物，优选FIPV并且提供了使用该方的方法。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2012-548908 (P2012-548908)	(73) 特許権者	509163824
(86) (22) 出願日	平成23年1月18日 (2011.1.18)		ユニベルシテイト ヌトレヒト ホールディング ビー. ブイ.
(65) 公表番号	特表2013-516983 (P2013-516983A)		オランダ国, 3584 シーエム ヌトレヒト, イェールラーン 40
(43) 公表日	平成25年5月16日 (2013.5.16)		
(86) 国際出願番号	PCT/NL2011/050027	(74) 代理人	100085545
(87) 国際公開番号	W02011/087366		弁理士 松井 光夫
(87) 国際公開日	平成23年7月21日 (2011.7.21)	(72) 発明者	ロティエール, ペトラス ヨセフス マリー
審査請求日	平成25年12月5日 (2013.12.5)		ー
(31) 優先権主張番号	10151340.6		オランダ国, 3584 シーエム ヌトレヒト, イェールラーン 40, シー/オー
(32) 優先日	平成22年1月21日 (2010.1.21)		ユニベルシテイト ヌトレヒト ホールディング ビー. ブイ.
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	10151001.4		
(32) 優先日	平成22年1月18日 (2010.1.18)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		