

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-524583

(P2014-524583A)

(43) 公表日 平成26年9月22日(2014.9.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 L	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-526574 (P2014-526574)	(71) 出願人	512261355 ゾエティス・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成24年8月10日 (2012.8.10)		アメリカ合衆国ニュージャージー州079
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月24日 (2014.4.24)		32, フローラム・パーク, キャンパス・
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/054092		ドライブ 100
(87) 国際公開番号	W02013/027149	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成25年2月28日 (2013.2.28)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	61/526,792	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(32) 優先日	平成23年8月24日 (2011.8.24)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107386 弁理士 泉谷 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善されたワクチン診断法

## (57) 【要約】

本発明は、(a) キメラペスチウイルスを投与された動物、および(b) 野生型ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)に感染したか、または慣用的BVDVワクチンで免疫されている動物の間を区別するための改善された診断法およびキットに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV) E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定する方法であって：

a) 動物から血清試料を得て；

b) 前記試料をエダツノレイヨウ (pronghorn) ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質またはその断片とインキュベーションし；

c) 前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

前記試料をエダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質またはその断片とインキュベーションする工程が、前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程の前に行われる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

前記試料をエダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質またはその断片とインキュベーションする工程が、前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程と同時にされる、請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

前記抗体が、BVDV E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質に存在するが、エダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質には存在しない、少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 5】

前記抗体の存在が、該動物が野生型 BVDV に感染しているか、または慣用的 BVDV ワクチンで免疫されているかいずれかであることを示す、請求項 1 または 4 の方法。

## 【請求項 6】

前記抗体の非存在が、該動物が 1) 野生型 BVDV に感染していないか、または 2) 慣用的 BVDV ワクチンで免疫されていないか、あるいはエダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質を発現するキメラペスチウイルスで免疫されていることを示す、請求項 1 または 4 の方法。

## 【請求項 7】

動物が BVDV 感染に感受性である動物である、請求項 1 または 4 の方法。

## 【請求項 8】

動物が、ウシ (bovine)、ヒツジ (ovine)、ヤギ (caprine)、またはブタ (porcine) 種である、請求項 7 の方法。

## 【請求項 9】

動物がウシである、請求項 8 の方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 または 4 の方法を実行するために有用な診断キットであって、前記キットがエダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質には存在しない少なくとも 1 つの BVDV E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> エピトープに対する抗体の存在または非存在の検出を容易にする試薬を含み、前記試薬の 1 つがエダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質またはその断片である、前記キット。

## 【請求項 11】

前記試薬の 1 つが、野生型 BVDV または慣用的 BVDV ワクチンに存在するエピトープであるが、エダツノレイヨウ ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質には存在しない前記エピトープに特異的に結合する抗体である、請求項 10 の診断キット。

## 【請求項 12】

酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA)、側方流動アッセイ、ウェスタンブロッティング、PCR、ラジオイムノアッセイ、固相ラジオイムノアッセイ、電気化学発光アッセイ、イムノブロッティング、免疫沈降、および免疫染色からなる群より選択されるアッセ

10

20

30

40

50

イを実行するための試薬を含む、請求項10の診断キット。

【請求項13】

ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体の非存在を示す試料を、(i)E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>ではないBVDVタンパク質または(ii)E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>ではないBVDVタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在に関してさらに試験する、請求項1~9のいずれか記載の方法。

【請求項14】

前記試料をBVDVタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在に関して試験し、さらに、前記タンパク質がp80およびE2からなる群より選択される、請求項13の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、(a)キメラペスチウイルスを投与された動物、および(b)野生型ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)に感染したかまたは慣用的BVDVワクチンで免疫された動物の間を区別するための、改善された診断法およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDウイルス、またはBVDV)を含むペスチウイルスは、家畜および野生両方の動物のいくつかの種より単離されてきている。BVDVに関して同定された宿主には、バッファロー(buffalo)、レイヨウ(antelope)、トナカイ(reindeer)および多様なシカ(deer)種が含まれ、一方、ユニークなペスチウイルス種がキリン(giraffe)およびエダツノレイヨウ(pronghorn antelope)で同定されてきている。BVDVは、フラビウイルス科の小分子RNAウイルスである。該ウイルスは、ヒツジ(sheep)におけるボーダー病およびブタ(pig)における古典的ブタコレラ(swine fever)の原因病原体である他のペスチウイルスに近縁である。

【0003】

特にウシにおいてBVDVによって引き起こされる疾患は、広く蔓延しており、そして経済的に壊滅的となりうる。ウシにおけるBVDV感染は、繁殖上の問題を生じる可能性もあり、そして流産または未成熟な誕生を引き起こしうる。BVDVは、妊娠したウシの胎盤を横断することが可能であり、そして該ウイルスに対して免疫寛容であり、そして残りの生涯を通じて持続的にウイルス血症である、持続性感染(PI)子ウシの誕生を生じる可能性もある。感染した子ウシはまた、体温上昇、下痢、咳および消化器粘膜の潰瘍によって特徴付けられる「粘膜性疾患」も示しうる。これらの持続性感染動物は、群れの内部でのウイルス播種の供給源および粘膜性疾患のさらなる突発の供給源を提供し、そして腸疾患または肺炎を引き起こす原因となる微生物感染に非常に罹りやすくなる。

【0004】

現在入手可能なBVDVワクチンの中には、化学的に不活性化された野生型ウイルスを含有するもの、または修飾生存(ML)BVDVを含有するものがある。BVDVは、ウシ細胞またはブタ細胞において反復継代することによって、あるいはウイルスに温度感受性表現型を与える化学的誘導性突然変異によって、弱毒化可能である。しかし、存在する不活性化ワクチンおよびMLワクチンは、ワクチン接種された動物および天然に感染した動物の間の区別を可能にしない。

【0005】

野生型ウイルス中に存在しないさらなる抗原決定基を含有するか、または野生型ウイルス中に存在する抗原決定基を欠くかいずれでもよい、「印をつけた」ワクチンは、野外のBVDV感染を管理するための有効なツールとなりうる。米国特許出願2010/0360055(Luoら、本明細書において、その全体が援用される)は、BVDVのE<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質をエダツノレイヨウ・ペスチウイルス由来のE<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質で置き換え

10

20

30

40

50

た、キメラペスチウイルスに基づく、後者のワクチンを記載する。このキメラペスチウイルスは、ATCC（登録商標）にUC25548として寄託され、そしてATCC（登録商標）寄託番号PTA-9939を与えられた。適切な診断アッセイが付随すると、このキメラペスチウイルスの使用によって、野生型BVDVに感染したかまたは慣用的BVDVワクチンで免疫された動物に対して、該キメラペスチウイルスを投与された動物を区別することが可能になる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願2010/0360055

10

【発明の概要】

【0007】

1つの態様において、動物がBVDVに曝露されたかまたは慣用的なBVDVワクチンで免疫されたかどうかを決定するための方法を提供し、ここで、BVDVに感染したかまたは慣用的なBVDVワクチンで免疫された動物は、BVDVに存在する少なくとも1つのE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>エピトープであるが、BVDV由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質をもはや発現せずBVDVにおいてエダツノレイヨウ・ペスチウイルス由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質を発現するキメラペスチウイルスには存在しない、前記エピトープに特異的に結合する抗体を所持する。

【0008】

20

1つの態様において、BVDV E<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって：

a) 動物から血清試料を得て；

b) 前記試料をエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質またはその断片とインキュベーションし；

c) 前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程を含む、前記方法を提供する。

【0009】

別の態様において、動物がBVDVに曝露されたかまたは慣用的なBVDVワクチンで免疫されたかどうかを決定するための診断キットであって、前記キットが、BVDVに存在する少なくとも1つのE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>エピトープであるが、BVDV由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質をもはや発現せずBVDVにおいてエダツノレイヨウ・ペスチウイルス由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質を発現するキメラペスチウイルスには存在しない、前記エピトープに対する抗体を検出することが可能な試薬を含む、前記診断キットを提供する。

30

【0010】

さらなる態様において、BVDVまたは慣用的BVDVワクチンに存在するエピトープであるが、BVDV由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質をもはや発現せずBVDVにおいてエダツノレイヨウ・ペスチウイルス由来のE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質を発現するキメラペスチウイルスには存在しない前記エピトープに結合する抗体の使用を提供する。

【0011】

40

別の態様において、動物が、BVDV E<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体を所持するかどうかを決定するための方法であって：

a) 動物から血清試料を得て；

b) 前記試料をエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質またはその断片とインキュベーションし；

c) 前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程を含む、前記方法を提供する。

【0012】

別の態様において、BVDV E<sup>r</sup><sub>n</sub><sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、前記試料をエダツノレイヨウ・ペスチウイルス

50

E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質またはその断片とインキュベーションする工程が、前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程の前に行われる、前記方法を提供する。

【0013】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、前記試料をエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質またはその断片とインキュベーションする工程が、前記試料中の前記抗体の存在または非存在を検出する工程と同時にされる、前記方法を提供する。

【0014】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、前記抗体が、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に存在する少なくとも1つのエピトープであるが、エダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質には存在しない、前記エピトープに特異的に結合する、前記方法を提供する。

10

【0015】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、前記抗体の存在が、該動物がBVDVに感染しているか、または慣用的BVDVワクチンで免疫されているかいずれかであることを示す、前記方法を提供する。

【0016】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、前記抗体の非存在が：a) 該動物が1) BVDVに感染していないか、または2) 慣用的BVDVワクチンで免疫されていないか；あるいはb) エダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質を発現するキメラペスチウイルスで免疫されていることを示す、前記方法を提供する。

20

【0017】

別の態様において、試料中の、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、血清試料がBVDV感染に感受性である動物から得られる、前記方法を提供する。

【0018】

別の態様において、試料中の、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、血清試料が、ウシ(bovine)、ヒツジ(ovine)、ヤギ(caprine)、またはブタ(porcine)種である動物から得られる、前記方法を提供する。

30

【0019】

別の態様において、試料中で、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための方法であって、血清試料が、ウシである動物から得られる、前記方法を提供する。

【0020】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための診断キットであって、前記キットがエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質には存在しない少なくとも1つのBVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sエピトープに対する抗体の存在または非存在の検出を容易にする試薬を含み、前記試薬の1つがエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質またはその断片である、前記キットを提供する。

40

【0021】

別の態様において、BVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための診断キットであって、前記キットがエダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sub>r</sub><sup>n</sup>Sタンパク質には存在しない少なくとも1つのBVDV E<sub>r</sub><sup>n</sup>Sエピトープに対する抗体の存在または非存在の検出を容易にする試薬を含み、前記試薬の1つが、BVDVまたは慣用的BVDVワクチンに存在するエピトープであるが、エダツノレイ

50

ヨウ・ペスチウイルスE<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質には存在しない前記エピトープに特異的に結合する抗体である、前記キットを提供する。

【0022】

別の態様において、BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体の存在または非存在を決定するための診断キットであって、前記キットが：酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、側方流動アッセイ、ウェスタンブロッティング、PCR、ラジオイムノアッセイ、固相ラジオイムノアッセイ、電気化学発光アッセイ、イムノブロッティング、免疫沈降、および免疫染色からなる群より選択されるアッセイを実行するための試薬を含む、前記キットを提供する。

【0023】

別の態様において、本発明は、動物が、BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質に特異的に結合する抗体を所持するかどうか決定する方法であって、前記抗体が、BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質に存在するエピトープであるが、エダツノレイヨウ・ペスチウイルスE<sup>r</sup>n<sup>s</sup>タンパク質には存在しない前記エピトープに特異的に結合する、前記方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下の定義は、本発明の態様の説明において使用する用語に適用可能である。以下の定義は、本明細書に援用される各個々の参考文献中に含有される、いかなる相反する定義にも優先される。

【0025】

本明細書に別に定義しない限り、本発明と関連して用いられる科学的用語および技術的用語は、一般の当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、背景によって別に必要とされない限り、単数形の用語には複数形が含まれ、そして複数形の用語には単数形が含まれるものとする。

【0026】

「約」または「およそ」は、測定可能な数値変数と関連して用いられた際、変数の示す値を指し、そして示す値の実験誤差内(例えば平均に関する95%信頼区間内)または示す値の10パーセント以内のいずれか大きい方である変数のすべての値を指す。

【0027】

用語「動物」は、本明細書において、限定されるわけではないが、家畜および野生両方のウシ、ヒツジ、ヤギ、およびブタ種を含む、BVDV感染に感受性であるいかなる動物も含まれるよう意味される。

【0028】

用語「(単数の)抗体」または「(複数の)抗体」は、本明細書において、エピトープの認識によって、抗原に結合可能な免疫グロブリン分子を指す。免疫グロブリンは、「定常」領域および「可変」領域を有する「軽鎖」および「重鎖」ポリペプチド鎖で構成される血清タンパク質であり、そして定常領域の組成に基づいて、クラス(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM)に分けられる。所定の抗原に「特異的」である抗体は、抗体の可変領域が、もっぱら特定の抗原を認識し、そして該抗原に結合することを示す。抗体は、ポリクローナル混合物またはモノクローナルであってもよい。抗体は、天然供給源由来または組換え供給源由来の損なわれていない(intact)免疫グロブリンであってもよいし、あるいは損なわれていない免疫グロブリンの免疫反応部分であってもよい。抗体は、例えば、Fv、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>として、ならびに一本鎖を含む、多様な型で存在してもよい。抗体を、限定されるわけではないが抗体断片を含む、抗原結合タンパク質に変換してもよい。

【0029】

用語「抗原」は、本明細書において、被験体への曝露に際して、その抗原に特異的である免疫反応を誘導するであろう、1またはそれより多いエピトープ(直鎖、コンホメーションまたは両方)を含有する分子を指す。用語「抗原」は、弱毒化、不活性化または修飾生存細菌、ウイルス、真菌、寄生虫または他の微生物を指すことも可能である。本明細書

10

20

30

40

50

において、用語「抗原」はまた、抗原が天然に関連している生物全体から分離され、そして別個である、サブユニット抗原を指すことも可能である。用語「抗原」はまた、抗イデオタイプ抗体またはその断片などの抗体、および抗原または抗原決定基（エピトープ）を模倣しうる合成ペプチド・ミモトープを指すことも可能である。用語「抗原」はまた、DNA免疫適用におけるなど、*in vivo*で抗原または抗原決定基を発現するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを指すことも可能である。

【0030】

「緩衝剤」は、別の化学物質の濃度の変化を防止する化学系であり、例えばプロトン・ドナーおよびアクセプター系は、水素イオン濃度（pH）の顕著な変化を防止する緩衝剤として働く。緩衝剤のさらなる例は、弱酸およびその塩（共役塩基）または弱塩基およびその塩（共役酸）の混合物を含有する溶液である。

10

【0031】

用語「BVDV」、「BVDV単離体」または「BVDV株」は、本明細書において、ウイルスゲノム、関連タンパク質、および他の化学的構成要素（脂質など）からなる、限定されるわけではないがI型およびII型を含む、ウシウイルス性下痢ウイルスを指す。多くのI型およびII型ウシウイルス性下痢ウイルスが当業者に知られており、そして例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC（登録商標）；マナサス、VA 20108 USA）を通じて入手可能である。ウシウイルス性下痢ウイルスは、RNAの形のゲノムを有する。クローニングにおいて使用するため、RNAをDNAに逆転写することも可能である。したがって、本明細書において、核酸およびウシウイルス性下痢ウイルス配列への言及は、ウイルスRNA配列およびウイルスRNA配列由来のDNA配列の両方を含む。用語「NADL」は、本明細書において、ATCCにVR-534として寄託されているBVDVの参照株を指す。

20

【0032】

用語「細胞株」または「宿主細胞」は、本明細書において、ウイルスが複製可能であるかまたは維持可能である、原核細胞または真核細胞を意味する。

【0033】

「細胞性免疫反応」または「細胞仲介性免疫反応」は、Tリンパ球または他の白血球あるいは両方によって仲介されるものであり、そしてこれには、サイトカイン、ケモカイン、および活性化T細胞、白血球または両方によって産生される類似の分子の産生が含まれる。

30

【0034】

用語「キメラ性」または「キメラ」は、本明細書において、1より多い前駆体由来の遺伝的または物理的構成要素を含有する微生物、例えばウイルスを意味する。

【0035】

用語「慣用的BVDVワクチン」は、本明細書において、野生型BVDVに基づくワクチンを意味する。ウイルスは弱毒化されるかまたは不活性化されていてもよい。しかし、ウイルスは遺伝子修飾されていない。

【0036】

用語「培養」は、本明細書において、他の種またはタイプの非存在下で増殖している細胞または微生物の集団を意味する。

40

【0037】

用語「DIVA」は、本明細書において、ワクチン接種動物から感染動物を区別することを意味する。

【0038】

「用量」は、被験体に投与されたワクチンまたは免疫原性組成物を指す。「第一の用量」または「プライミング・ワクチン」は、第0日に投与された用量を指す。「第二の用量」または「第三の用量」または「毎年の用量」は、第一の用量に続いて投与されるこうした組成物の量を指し、これは第一の用量と同じワクチンまたは免疫原性組成物であってもまたはなくてもよい。

50

## 【0039】

用語「エピトープ」は、本明細書において、T細胞受容体または特異的抗体に結合し、そして典型的には約3アミノ酸残基～約20アミノ酸残基を含み、そして連続であってもまたは不連続であってもよい、抗原の特異的部位を意味する。

## 【0040】

「断片」は、タンパク質または遺伝子の一部切除 (truncated) 部分を指す。「機能性断片」および「生物学的活性断片」は、全長タンパク質または遺伝子の生物学的特性を保持する断片を指す。「免疫原性に活性である断片」は、免疫反応を誘発する断片を指す。

## 【0041】

用語「異種性」は、本明細書において、異なる種または株に由来することを意味する。

## 【0042】

用語「同種性」は、本明細書において、同じ種または株に由来することを意味する。

## 【0043】

「体液性免疫反応」は、抗体によって少なくとも部分的に仲介されるものを指す。

## 【0044】

被験体における「免疫反応」は、抗原に対する、体液性免疫反応、細胞性免疫反応、または体液性および細胞性免疫反応の発展を指す。免疫原性反応は、診断目的または他の試験に十分である可能性もあるし、あるいは疾患病原体への感染によって引き起こされる、不都合な健康上の影響またはその合併症を含めて、疾患の徴候または症状を防止するのに適切である可能性もある。

## 【0045】

「免疫原性の」または「免疫原性」は、本明細書において、抗原に対して特異的に向けられる免疫反応を誘発する能力を指す。

## 【0046】

用語「免疫原性組成物」は、本明細書において、免疫系によって認識されることが可能であり、単独で、または薬学的に許容されうるキャリアーとともに、動物に投与された際、特異的免疫反応(すなわち免疫原性活性)の生成を生じることが可能な組成物を意味する。

## 【0047】

用語「免疫学的に有効な量」は、本明細書において、動物において免疫原性または免疫学的反応を誘導するのに有効な抗原の量を指す。免疫反応は、限定なしに、細胞性免疫および/または体液性免疫の誘導を含むことも可能である。

## 【0048】

「単離」は、本明細書において、天然に存在する環境から除去されていることを意味する。微生物に言及した際、これは、単独であっても、あるいは異種宿主細胞、または染色体またはベクター(例えばプラスミド、ファージなど)中であってもいずれでもよい。「単離細菌」、「単離嫌気性細菌」、「単離細菌株」、「単離ウイルス」、「単離ウイルス株」等は、細菌またはウイルスが、実質的に他の微生物を含まない、例えば培養中にある、例えば天然に存在する環境から分離されている場合の組成物を指す。「単離」は、任意の特定の定義される物質、例えばポリヌクレオチドまたはポリペプチドを記載するために用いられる際、物質、例えばポリペプチドまたは核酸が通常見出される元来の細胞環境から分離されている物質を指す。本明細書において、したがって、例示のみのため、本発明のポリヌクレオチドで構成される組換え細胞株は、「単離」核酸を利用する。あるいは、特定のタンパク質または特異的免疫原性断片が請求されるか、あるいはワクチンまたは他の組成物として用いられる場合、これらは同定され、分離され、そして天然に存在しうる状態に比較した際、ある程度まで精製されているため、単離されていると見なされるであろう。タンパク質またはその特異的免疫原性断片が、抗原を産生する組換え細菌または真核生物発現ベクター中で産生される場合、単離タンパク質または核酸として存在すると見なされる。例えば、ポリヌクレオチドで構築された組換え細胞株は、「単離」核酸を利用

10

20

30

40

50

する。

【0049】

用語「感染多重度」(MOI)は、本明細書において、細胞あたりの微生物の数の比を指し、これは、所定の感染において、どのくらい多くの接種物が用いられるかを詳述する。

【0050】

用語「病原体」または「病原性微生物」は、本明細書において、宿主動物において、疾患、疾病、または異常な状態を誘導するかまたは引き起こすことが可能な微生物、例えばウイルス、細菌、真菌、原生動物、または蠕虫を意味する。

【0051】

用語「ペスチウイルス」は、本明細書において、フラビウイルス科のペスチウイルス属由来のRNAウイルスを意味する。ペスチウイルス属には、限定されるわけではないが、BVDV(1型および2型)、古典的ブタコレラウイルス(CSFV)、およびボーダー病ウイルス(BDV)、ならびにイノシシ(wild boar)、バウファロー、エランド(eland)、バイソン(bison)、アルパカ(alpaca)、プーズー(pudu)、ボンゴ(bongo)、多様なシカ種、キリン、トナカイ、シャモア(chamois)およびエダツノレイヨウなどの種より単離されるペスチウイルスが含まれる(VilcekおよびNettleton; Vet Microbiol. 116: 1-12(2006))。

【0052】

「薬学的に許容されうる」は、正当な医学的判断の範囲内であり、過度の毒性、刺激、アレルギー反応等を伴わずに、被験体の組織と接触して使用するのに適しており、妥当な利益対リスク比と釣り合い、そして意図される使用に関して有効である物質を指す。

【0053】

用語「防止する」、「防止すること」または「防止」等は、本明細書において、微生物の複製を阻害するか、微生物の伝染を阻害するか、または微生物が宿主において自らを確立することを阻害することを意味する。これらの用語等は、本明細書において、また、感染の1またはそれより多い徴候または症状を阻害するかまたは遮断することも意味する。

【0054】

「防御」、「防御すること」等は、本明細書において、ワクチンまたは他の組成物に関して、ワクチンまたは組成物が、ワクチンまたは組成物中で用いる抗原(単数または複数)が由来する生物によって引き起こされる疾患の症状を防止するかまたは減少させることを意味する。用語「防御」および「防御すること」等はまた、ワクチンまたは組成物が、被験体においてすでに存在する疾患あるいは該疾患の1またはそれより多い症状を療法的に治療するために使用可能であることも意味する。

【0055】

用語「特異的に結合すること」、「特異的に結合する」等は、本明細書において、生理学的条件またはアッセイ条件下で測定可能であり、そして選択性である複合体を形成する、2またはそれより多い分子と定義される。抗体または他の阻害剤は、適切に選択される条件下で、こうした結合が実質的に阻害されない一方、同時に非特異的結合が阻害されるならば、タンパク質に「特異的に結合する」と言われる。特異的結合は、高アフィニティによって特徴付けられ、そして化合物またはタンパク質に関して選択性である。非特異的結合は、通常、低アフィニティを有する。IgG抗体における結合は、例えば、一般的に、少なくとも約 $10^{-7}$  Mまたはそれより高い、例えば少なくとも約 $10^{-8}$  Mまたはそれより高い、あるいは少なくとも約 $10^{-9}$  Mまたはそれより高い、あるいは少なくとも約 $10^{-10}$  Mまたはそれより高い、あるいは少なくとも約 $10^{-11}$  Mまたはそれより高い、あるいは少なくとも約 $10^{-12}$  Mまたはそれより高い、アフィニティによって特徴付けられる。該用語はまた、例えば抗原結合ドメインが多くの抗原によって所持されない特定のエピトープに対して特異的である場合に適用可能であり、こうした場合、抗原結

10

20

30

40

50

合ドメインを所持する抗体は、一般的に、他の抗原に結合しないであろう。

【0056】

用語「療法的有効量」は、本明細書において、投与される被験体において、疾患を治療するために必要な、微生物、またはサブユニット抗原、またはポリペプチド、またはポリヌクレオチド分子、およびその組み合わせ、あるいはワクチンまたは組成物の量を意味する。

【0057】

用語「治療する」、「治療すること」または「治療」等は、本明細書において、微生物による感染を減少させるかまたは排除することを意味する。これらの用語等は、本明細書において、また、微生物の複製を減少させるか、微生物の伝染を減少させるか、または微生物が宿主において自らを確立する能力を減少させることも意味する。これらの用語等は、本明細書において、また、微生物による感染の1またはそれより多い徴候または症状を減少させるか、回復させるか、または除去するか、あるいは微生物による感染からの回復を加速することも意味する。

10

【0058】

用語「ワクチン接種する」および「ワクチン接種すること」等は、本明細書において、動物にワクチンまたは免疫原性組成物を投与することを意味する。

【0059】

用語「ワクチン」および「ワクチン組成物」は、本明細書において、感染を防止するかまたは減少させるか、あるいは感染の1またはそれより多い徴候または症状を防止するかまたは減少させる組成物を意味する。病原体に対するワクチン組成物の防御効果は、通常、被験体において、細胞仲介性免疫反応または体液性免疫反応いずれかの免疫反応、あるいは両方の組み合わせを誘導することによって、達成される。一般的に言って、感染事象の消失または減少、徴候または症状の回復、あるいは感染被験体からの微生物の除去加速は、ワクチン組成物の防御効果を示す。本発明のワクチン組成物は、BVDVによって引き起こされる感染に対する防御効果を提供する。

20

【0060】

用語「獣医学的に許容されうるキャリアー」は、本明細書において、正当な医学的判断の範囲内であり、過度の毒性、刺激、アレルギー反応等を伴わずに、動物の組織と接触して使用するのに適しており、妥当な利益対リスク比と釣り合い、そして意図される使用に関して有効である物質を指す。

30

【0061】

以下の説明を提供して、当業者が本発明を実施するのを補助する。そうではあるが、本説明は、本発明を過度に制限するように解釈されてはならず、これは、本発明の発見の精神または範囲から逸脱することなく、本明細書で論じる態様における修飾および変動が、一般の当業者によって作製可能であるためである。

検出、診断法、キット

本発明は、動物が、感染またはワクチン接種いずれかを通じて、特定のペスチウイルスに曝露されているかどうかを決定する方法を提供する。

【0062】

感染動物およびワクチン接種動物の間の区別を可能にするDIVAワクチンを利用するワクチン接種によって、動物被験体の曝露歴を評価するための手段が提供される。この区別は、限定されるわけではないが、競合性、直接または間接的であってもよい酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、側方流動アッセイ、ウェスタンブロッティング、PCR、ラジオイムノアッセイ、固相ラジオイムノアッセイ(SPIA)、電気化学発光(EL)アッセイ、イムノブロッティング、免疫沈降、および免疫染色を含む、多様な診断法のいずれかを通じて達成可能である。これらの方法および他の方法は、一般の当業者に容易に認識され、そして知られている。

40

【0063】

本明細書記載のキメラペスチウイルスは、ゲノム組成および発現されるタンパク質の両

50

方で、野生型 B V D V 株から区別可能である。こうした区別は、ワクチン接種動物および感染動物の間の区別を可能にする。例えば、特定の実験室試験において、B V D V に関して陽性の試験結果が出た動物が、野生型 B V D V 株を所持するか、または慣用的 B V D V ワクチンで免疫されているか、あるいはキメラペスチウイルスを投与されているかまたは感染していないかに関して、決定することが可能となる。

【0064】

決定を行うため、多様なアッセイを使用してもよい。例えば、感染に関して陽性の試験結果が出た動物から、ウイルスを単離してもよい。核酸に基づくアッセイには、限定されるわけではないが、サザンまたはノーザンブロット分析、PCR、および配列決定が含まれうる。あるいは、タンパク質に基づくアッセイを使用してもよい。タンパク質に基づくアッセイにおいては、感染が疑われる細胞または組織を、B V D V に関して陽性の試験結果が出た動物から単離してもよい。こうした細胞または組織から細胞抽出物を作製して、そしてワクチン中で先に投与されたキメラペスチウイルス、または野生型 B V D V のいずれかの存在を別個に同定可能な、ウイルスタンパク質に対する適切な抗体を用いて、例えばウェスタンブロットに供してもよい。

10

【0065】

多様な技術を用いることによって、動物中で誘導される免疫反応の度合いおよび性質を評価してもよい。例えば、接種動物から血清を収集し、そしてキメラウイルスに特異的な抗体の存在または非存在に関して、試験してもよい。

【0066】

こうした評価を行う際、動物によって生成される抗体が、アッセイにおける試験抗原に対して特異的であり、そして他のペスチウイルス由来の同じ抗原と交差反応しないことが非常に重要である。エダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質を認識し、そして該タンパク質に結合する抗体がまた、野生型 B V D V 上に存在する E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質にも結合することは予期されなかった。しかし、ウシにキメラペスチウイルスを反復投与すると、ときに、野生型 B V D V E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質に対する限定された交差反応性を示す抗体の生成が導かれた。これらの交差反応性抗体は、プレートに結合した野生型 B V D V E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質（すなわち試験抗原）に結合可能であり、以前、野生型 B V D V に感染しているかまたは慣用的 B V D V ワクチンでワクチン接種されていることを示唆する結果、すなわち偽陽性結果を導く。したがって、アッセイの正確性および特異性を改善する必要がある。これは、エダツノレイヨウ E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質の存在下で、動物由来の血清をインキュベーションすることによって達成可能である。タンパク質は、天然、すなわちエダツノレイヨウ・ペスチウイルスより精製されてもよいし、または組換え的に発現されてもよい。エダツノレイヨウ E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> タンパク質の添加は、アッセイプレート（単数または複数）への血清の添加前に行われてもよいし、またはアッセイプレート（単数または複数）に血清を添加すると同時にも行われてもよい。これは E<sup>r</sup> N<sup>s</sup> 交差反応性抗体を除去するのに有効であり、そしてより正確で、そして信頼可能なアッセイを生じる。

20

30

【0067】

本発明のキットは、(1) B V D V 感染動物または慣用的 B V D V ワクチンで免疫された動物、および(2) キメラペスチウイルスを投与された動物の検出およびこれらの間の区別のために有用な、1またはそれより多い試薬を含んでもよい。キットには、全 B V D V、あるいはキメラペスチウイルスに存在しない B V D V ポリペプチド、エピトープまたはポリヌクレオチド配列の存在に関して試料を分析するための試薬が含まれてもよい。あるいは、本発明のキットには、キメラペスチウイルス、あるいは野生型 B V D V に存在しないポリペプチド、エピトープまたはポリヌクレオチド配列の存在に関して試料を分析するための試薬が含まれてもよい。抗体、PCR、ハイブリダイゼーション、および当業者に知られる他の検出法を用いて、ウイルス、ポリペプチド、またはポリヌクレオチド配列の存在を検出してもよい。

40

【0068】

50

本発明の別のキットは、特定のエピトープに対する抗体の検出のための試薬を提供してもよい。エピトープは、キメラペスチウイルスに存在し、そして野生型 BVDV に存在しないか、あるいは野生型 BVDV に存在し、そしてキメラペスチウイルスに存在しないかいずれかである。こうした試薬は、抗体の存在に関して試料を分析するのに有用であり、そして一般の当業者に容易に知られ、そして利用可能である。当業者に知られる標準的検出法を用いて、抗体の存在を決定してもよい。

#### 【0069】

特定の態様において、キットには、該キットが、BVDV 感染動物または BVDV ワクチン接種動物を検出し、そしてキメラペスチウイルスを投与された動物から、これらを区別するために有用であることを示す印刷された使用説明書またはラベルのセットが含まれてもよい。

10

#### 【0070】

##### 抗体（単数、複数）

抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、または組換えのいずれであってもよい。免疫原またはその部分に対して抗体を調製してもよい。例えば、免疫原のアミノ酸配列に基づく合成ペプチド、またはクローニング技術によって組換え的に調製されたもの、あるいは天然遺伝子産物および/またはその一部を単離し、そして免疫原として用いてもよい。免疫原を用いて、当業者に周知の標準的抗体産生技術、例えば、一般的に、Harlow および Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1988)に記載されるものなどによって抗体を産生してもよい。抗体断片もまた、抗体から調製可能であり、そしてこれには、当業者に知られる方法による、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、および Fv が含まれる。

20

#### 【0071】

抗体産生において、当該技術分野に知られる免疫学の標準法によって、望ましい抗体に関するスクリーニングを達成してもよい。一般的に、ELISA およびウェスタンブロットティングはどちらも、使用可能なタイプのイムノアッセイであり、そしてどちらも当業者に周知である。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が、アッセイにおいて使用可能である。BVDV エンタタンパク質に結合するために用いられる抗体を、固体支持体に結合させてもよい。抗体を検出可能部分または標識でコンジュゲート化してもよい。本発明における使用が意図される検出可能部分には、限定されるわけではないが、蛍光、金属、酵素、および放射性マーカーが含まれ、これには限定されるわけではないが、ビオチン、金、フェリチン、アルカリホスファターゼ、b-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、フルオレセイン、ローダミン、トリチウム、<sup>14</sup>C、およびヨード化が含まれる。検出可能部分でコンジュゲート化された抗体は、競合 ELISA アッセイにおけるように、BVDV エンタタンパク質に結合してもよいし、または間接的 ELISA アッセイにおけるように、BVDV エンタタンパク質に結合する、動物由来の抗体に結合してもよい。

30

#### 【0072】

慣用的標識コンジュゲート特異的結合アッセイ技術において、アッセイしようとする液体培地試料を、多様な試薬組成物と組み合わせる。こうした組成物には、標識とともに取り込まれる結合構成要素を含む標識コンジュゲートが含まれる。コンジュゲート中の結合構成要素は、アッセイ下で、あるとすれば、培地中の試薬組成物の他の構成要素およびリガンドとともに参加して、2つの種または型のコンジュゲート、例えば結合種（コンジュゲート複合体）および遊離種を産生する、結合反応系を形成する。結合種において、コンジュゲートの結合構成要素には、対応する結合パートナーが結合する一方、遊離種においては、結合構成要素はそれほど結合しない。分析物の量は、結合コンジュゲート対未結合コンジュゲートの量に比例する。

40

アッセイ発展の一般的な説明

BVDV のエンタタンパク質をエダツノレイヨウ・ペスチウイルス由来のエンタ

50

ンパク質で置き換えたキメラペスチウイルスを投与されているウシは、本明細書記載の本発明の使用を通じて、野生型 BVDV に天然感染したウシまたは慣用的 BVDV ワクチンで免疫されたウシから区別可能である。多様な年齢のウシは、治療されていないか、あるいは各用量の間に約 3 週間あけて、生存もしくは不活性化キメラペスチウイルス、または生存もしくは不活性化 BVDV のいずれかの 3 用量を投与されている。各投与の 2 ~ 3 週間またはそれより後であるが、次の投与の前に、血清試料を収集する。BVDV の野外（野生型）株に感染しているかまたは慣用的 BVDV ワクチンで免疫されているウシに対して、キメラペスチウイルスを投与されたウシまたは治療を受けていないウシを区別するため、示差診断アッセイを通じて、血清試料を試験する。

#### 【0073】

競合 ELISA のため、野生型 BVDV またはキメラペスチウイルス E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質（天然、合成または組換え由来）をアッセイにおける抗原供給源として用いてもよい。野生型 BVDV 上に存在する E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質を試験抗原として用いる場合、標識野生型 BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> 特異的 mAb による結合の欠如は、野生型 BVDV 特異的エピトープに結合する抗体がウシ血清中に存在することを示し、天然（野生型）感染または慣用的 BVDV ワクチンでの免疫を示す。対照的に、キメラペスチウイルスを投与されたウシ由来の血清は、プレートをコーティングする野生型 BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質に結合する抗体を含有しないであろう。したがって、標識野生型 BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> 特異的 mAb は、結合したタンパク質に結合し、そして続いて発色を生じるであろう。

#### 【0074】

上記アッセイにおいて、エダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質を認識し、そして該タンパク質に結合する抗体がまた、野生型 BVDV 上に存在する E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質にも結合することは驚くべきことであった。ウシへのキメラペスチウイルスの反復投与は、ときに、野生型 BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質に対する限定された交差反応性を示す抗体の生成を生じ、これは BVDV での以前の感染または慣用的 BVDV ワクチンでのワクチン接種を示唆する結果につながるため、アッセイの正確性および特異性を改善する必要性が存在した。

#### 【0075】

改善された競合 ELISA のため、血清試料を、アッセイプレートへのウシ血清の添加前にまたは添加と同時にのいずれかで、組換え発現エダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質とインキュベーションする。これは、エダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質に結合可能であるが、また野生型 BVDV E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> タンパク質との交差反応性も発展させている抗体を効果的に除去する。したがって、アッセイにおける発色は、動物が BVDV 曝露に対して無感作であるか、またはキメラペスチウイルスでワクチン接種されていることを示し、一方、発色がなければ、動物が野生型 BVDV に曝露されたか、または慣用的 BVDV ワクチンでワクチン接種されたことが示される。

#### 【0076】

本発明はさらに、いかなる意味でも限定されることなく、以下の実施例によって例示される。

#### 【実施例】

#### 【0077】

##### 実施例 1

BVDV - NADL E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> を発現する組換えバキュロウイルスを構築した。プライマー、オリゴ 250（配列番号 1； 5' - C A C C A T G A A A A T A G T G C C C A A A G A A T C - 3'）およびオリゴ 252（配列番号 2； 5' - T T A A G C G T A T G C T C C A A A C C A C G T C - 3'）を用いて、BVDV - NADL cDNA の全長を含有するプラスミドから、PCR によって、BVDV の C 遺伝子の 3' 部分および全長 E<sup>r</sup>n<sup>s</sup> 遺伝子の遺伝子融合体をコードする DNA 分子を増幅した。製造者の指示にしたがって、PCR 産物を pENTR<sup>TM</sup> / D - TOPO（Invitrogen；カリフォルニア州カールスバッド）内にクローニングし、そして One Shot（登録商標

10

20

30

40

50

コンピテント大腸菌 (*E. coli*) (*Invitrogen*) に形質転換した。組換えプラスミドを抽出し、そして配列決定によって挿入物を確認した。このプラスミドを pENTR-E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> と称した。pENTR-E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> および BaculoDirect<sup>TM</sup> バキュロウイルス発現系 (*Invitrogen*) を用いて、製造者の指示にしたがって、BVDV-NADL E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質を発現する組換えバキュロウイルスを構築した。BVDV-NADL E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質を発現する組換えバキュロウイルスを生成し、ブランク精製し、増大させ、そして 4 および -80 の両方で保存した。BVDV E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> 特異的 MAb 15C5 (*Idexx Laboratories Inc.*; メイン州ウェストブルック) を用いて、免疫蛍光染色およびウェスタンブロットによって、組換えバキュロウイルス中の BVDV-NADL E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質の発現を確認した。

10

## 【0078】

同様の戦略を用いて、エダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質をバキュロウイルス中で発現させた。抗 His (C 末端) MAb (*Invitrogen*) を用いた免疫蛍光染色およびウェスタンブロットによって、エダツノレイヨウ E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質の発現を確認した。

## 【0079】

ELISA 抗原の産生のため、100 ml 懸濁培養中の Sf21 細胞または Sf9 細胞を、0.2 ~ 5 の MOI で、組換えバキュロウイルスストックに感染させた。細胞を 27 で 2 ~ 4 日間インキュベーションした後に採取した。細胞を低速 (約 800 g) で 10 分間遠心分離して、細胞を収集した。天然溶解/結合緩衝液 (pH 8.0 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール、および 1% IGEPAL CA-630) で細胞を溶解した。混合物をピペティングで上下させて、細胞の塊を壊し、そして次いで、-80 で 1 時間凍結させた。融解後、8000 g で 20 分間、4 で遠心分離することによって、混合物を清澄にした。バキュロ-エダツノレイヨウ E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> 溶解物と称される最終上清をアリコットし、そして -80 で保存した。

20

## 【0080】

アッセイを実行する際、炭酸/重炭酸緩衝液 (pH 9.0) 中で 1 μg/ml に希釈した BVDV 1 型 E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> タンパク質に特異的に結合する MAb WB210 (*Veterinary Laboratory Agency*, 英国サリー州) 100 μl / ウェルで、ELISA プレートを 4 で一晚コーティングした。翌日、プレートを PBST 洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20 を含有する PBS) で 3 回洗浄し、そしてブロッキング緩衝液 (PBST に加えて 1% カゼインナトリウム塩) と 37 で 1 時間インキュベーションした。続いて、プレートを PBST で 3 回洗浄し、そして 100 μl のバキュロ-BVDV E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> 溶解物 (PBS 中で 1:1600 に希釈) を各ウェルに添加し、そしてプレートを 37 で 1 時間インキュベーションした。このインキュベーション期間中、60 μl のウシ血清試料を、ブロッキング緩衝液およびあらかじめ決定された濃度のバキュロ-エダツノレイヨウ E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> 溶解物を含有する 60 μl の試料希釈物に添加した。血清・希釈物混合物を、室温で少なくとも 30 分間インキュベーションした。PBST で 3 回洗浄した後、血清・希釈物混合物を ELISA プレートのウェルに移した。各プレート上で、多数のウェルをブランクのままにして、非競合 15C5-HRP 対照として利用した。プレートを 37 で 1 時間インキュベーションした。PBST でさらに 3 回洗浄した後、100 μl MAb 15C5-HRP コンジュゲート (BVDV E<sup>r<sup>n</sup>s</sup> に特異的; ブロッキング緩衝液中で希釈) を各ウェルに 37 で 1 時間添加した。3 回洗浄した後、100 μl の ABTS 基質 (KPL, メリーランド州ガイザーズバーグ) を各ウェルに添加し、そして発色のため、室温で 20 ~ 60 分間インキュベーションした。光学密度 (OD) を 405 / 490 nm の波長で測定した。以下の式:

30

40

$$\text{阻害\%} = (\text{試料 OD}) \div (15C5-HRP \text{ 対照の平均 OD}) \times 100\%$$

によって各血清試料に関するコンジュゲート対照からの OD 阻害の割合を計算する。

## 【0081】

50

治療群あたり6頭のBVDV血清陰性ウシに、不活性化BVDV(NADL株)、キメラペスチウイルスでワクチン接種するか、またはワクチン接種しなかった(NTX)。ワクチン接種は3週間間隔であった。ワクチンを投与する前に、各時点で血清試料を収集した。次いで、上述のアッセイにおいて、試料を試験した。

#### 結果

表1に提示するデータは、実験抗原を投与したウシおよび未処置対照の血清学的反応の比較を提示する。元来の診断アッセイおよび本発明の改善された診断アッセイを用いて、提示するデータを生成した。2用量の不活性化BVDV、または2用量の不活性化キメラペスチウイルスをウシに投与した後、血清試料を収集した。いくつかの既知のBVDV陽性試料および陰性試料に基づき、陽性(「Pos」)、陰性(「Neg」)または不明確(「+/-」)に関するカットオフ値を以下のように定義した：

< 40% = Pos

40% ~ 50% = +/-

> 50% = Neg

表1 .

【0082】

【表1】

動物ID	治療	阻害%	
		元来のアッセイ (未希釈)	改善されたアッセイ (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1352	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1354	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1361	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1355	キメラペスチウイルス	NA	Neg
1357	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1359	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1360	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1366	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1369	キメラペスチウイルス	Pos	Neg

【0083】

表2に提示するデータは、表1に関して上述する実験の続きを示す。ここでは、不活性化BVDVまたは不活性化キメラペスチウイルスのいずれかの第三の用量の投与後に血清試料を収集した。

【 0 0 8 4 】

表 2 .

【 0 0 8 5 】

【 表 2 】

動物 ID	治療	阻害%	
		元来のアッセイ (未希釈)	改善されたアッセイ (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1352	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1354	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1361	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1355	キメラペステウイルス	Pos	Neg
1357	キメラペステウイルス	Pos	Neg
1359	キメラペステウイルス	Pos	Neg
1360	キメラペステウイルス	Neg	Neg
1366	キメラペステウイルス	+/-	Neg
1369	キメラペステウイルス	Pos	Neg

10

20

30

【 0 0 8 6 】

表 3 に提示するデータは、元来の E<sup>r n s</sup> D I V A アッセイおよび改善された E<sup>r n s</sup> D I V A アッセイを用いて生成され、生存弱毒化 B V D V または生存キメラペステウイルスのいずれかの 3 回の用量を投与したウシにおける血清学的反応の比較を示す。

【 0 0 8 7 】

表 3 .

【 0 0 8 8 】

40

【表 3】

動物 ID	治療	阻害%	
		元来のアッセイ (未希釈)	改善されたアッセイ (1:1)
5688	NTX	Neg	Neg
5699	NTX	Neg	Neg
5700	NTX	Neg	Neg
5701	NTX	Neg	Neg
5706	NTX	Neg	Neg
5709	NTX	Neg	Neg
1351	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1352	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1354	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1361	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1363	BVDV (NADL 株)	Pos	Pos
1370	BVDV (NADL 株)	Pos	Neg
1355	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1357	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1359	キメラペスチウイルス	Pos	Neg
1360	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1366	キメラペスチウイルス	Neg	Neg
1369	キメラペスチウイルス	Neg	Neg

10

20

30

## 【0089】

該データは、アッセイプレートに添加する前の、組換え発現されたエダツノレイヨウ・ペスチウイルス E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質をウシ血清とインキュベーションするさらなる工程が、BVDV およびエダツノレイヨウ E<sup>r</sup> n<sup>s</sup> タンパク質の両方に結合可能な交差反応性抗体を除去する際に有効であることを立証する。したがって、キメラペスチウイルスを投与された動物の血清学的状態は、改善された DIVA アッセイでは BVDV 陰性を示し、そして BVDV 陽性（すなわち BVDV 感染または慣用的 BVDV ワクチンでのワクチン接種）を誤って示さない。

## 【0090】

## 実施例 2

実施例 1 記載の DIVA アッセイを、別の BVDV 特異的抗原捕捉アッセイまたは抗体アッセイと並行して組み合わせて、実施例 1 の DIVA アッセイで検出された陰性試料（すなわちキメラペスチウイルスでワクチン接種された動物、または無感作の未感染動物のいずれかが由来のもの）が実際に無感作であるか、またはそうではなく、キメラペスチウイルスでワクチン接種された動物由来であることを決定する。

40

## 【0091】

実施例 1 の DIVA アッセイ由来の陰性試料を、キメラペスチウイルスでワクチン接種されている動物においてさえ存在するであろう、第二の抗原または BVDV に対する抗体の存在に関して試験する。このアッセイにおいて、実施例 1 の DIVA アッセイで BVDV に関して「陰性」と決定された動物由来の試料を、別の BVDV 特異的抗原または抗体

50

の存在または非存在に関してさらに分析する。例えば、実施例 1 の D I V A アッセイを抗原捕捉試験、または別の B V D V 抗原、例えば B V D V E 2 タンパク質に特異的に結合する抗体に関する抗体検出試験と組み合わせる。あるいは、実施例 1 の D I V A アッセイで B V D V に関して「陰性」と決定された動物由来の試料を、B V D V p 8 0 / 1 2 5 (すなわち N S 2 / 3 ) 非構造タンパク質に関して特異的な抗体に関して分析する。こうしたタンパク質の検出に関するアッセイは商業的に入手可能であり、そして記載され、例えば S E R E L I S A (登録商標) B V D V p 8 0 A b M o n o プロッキングキット ( S y n b i o t i c s 社 ; ミズーリ州カンザスシティ ) がある。

【 0 0 9 2 】

別の B V D V 抗原、例えば p 8 0 に特異的に結合する抗体に関するアッセイと、実施例 1 の D I V A アッセイの組み合わせからの例示的な読み取り値は、表 4 に例示するような結果を生じるであろう。

【 0 0 9 3 】

表 4 :

【 0 0 9 4 】

【表 4】

動物状態	示すアッセイによる読み取り値	
	DIVA	p80
無感作 (未感染; ワクチン未接種)	-	-
野生型 BVDV に感染	+	+
野生型 BVDV ワクチンでワクチン接種 (生ワクチンまたは死菌ワクチン)	+	+
開示するキメラペスチウイルスワクチンでワクチン接種 (生ワクチンまたは死菌ワクチン)	-	+

【 0 0 9 5 】

本発明はその特定のバージョンに関連して、かなり詳細に記載されてきているが、他のバージョンも可能である。したがって、付随する請求項の範囲は、本明細書に含有されるバージョンの説明に限定されてはならない。

【配列表】

[2014524583000001.app](#)

10

20

30

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/054092

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/064164 A1 (PFIZER [US]; ANKENBAUER ROBERT GERARD [US]; LUO YUGANG [US]; WELCH SIA) 10 June 2010 (2010-06-10) examples 1,5 ----- -/--	1,2,4-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 December 2012		03/01/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Fleitmann, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/054092

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>YUGANG LUO ET AL: "Construction of chimeric bovine viral diarrhea viruses containing glycoprotein Erns of heterologous pestiviruses and evaluation of the chimeras as potential marker vaccines against BVDV",  VACCINE,  vol. 30, no. 26, 1 June 2012 (2012-06-01),  pages 3843-3848, XP055044173,  ISSN: 0264-410X, DOI:  10.1016/j.vaccine.2012.04.016  page 3845, left-hand column, paragraph 5 -  right-hand column, paragraph 1; figure 3  page 3846, left-hand column, paragraph 1 -  right-hand column, paragraph 1  -----</p>	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/IB2012/054092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010064164 A1	10-06-2010	AR 075484 A1	06-04-2011
		AU 2009323784 A1	10-06-2010
		CA 2744750 A1	10-06-2010
		CN 102239251 A	09-11-2011
		CO 6440541 A2	15-05-2012
		EP 2373785 A1	12-10-2011
		JP 2012510285 A	10-05-2012
		KR 20110091579 A	11-08-2011
		NZ 592979 A	31-08-2012
		TW 201024416 A	01-07-2010
		US 2010136055 A1	03-06-2010
		UY 32274 A	30-06-2010
		WO 2010064164 A1	10-06-2010

-----

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/04

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

(72) 発明者 アンケンバウアー, ロバート・ジー

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 1, カラマズー, ポーテジ・ロード 7 0 0 0, ゾエティス・エルエルシー

(72) 発明者 ネルソン, リン・ディー

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 1, カラマズー, ポーテジ・ロード 7 0 0 0, ゾエティス・エルエルシー

(72) 発明者 オイエン, ナンシー・エル

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 1, カラマズー, ポーテジ・ロード 7 0 0 0, ゾエティス・エルエルシー

(72) 発明者 ウェルチ, シャオ・クン・ダブリュー

アメリカ合衆国ミシガン州 4 9 0 0 1, カラマズー, ポーテジ・ロード 7 0 0 0, ゾエティス・エルエルシー

F ターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48  
QR62 QS02 QS33 QS34 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014524583A5</a>	公开(公告)日	2015-10-01
申请号	JP2014526574	申请日	2012-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	硕腾服务有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Zoetisu LLC		
[标]发明人	アンケンバウアー・ロバート・ジー ネルソン・リン・ディー オイエン・ナンシー・エル ウェルチ・シャオ・クン・ダブリュー		
发明人	アンケンバウアー,ロバート・ジー ネルソン,リン・ディー オイエン,ナンシー・エル ウェルチ,シャオ・クン・ダブリュー		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/68 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N2333/18 G01N2333/183 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/ /QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	61/526792 2011-08-24 US		
其他公开文献	JP6080850B2 JP2014524583A		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种筛选动物的方法，所述动物已被 (a) 给予动物的嵌合瘟病毒和 (b) 感染野生型牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 或用常规BVDV疫苗免疫的动物感染。改进的诊断方法和用于区分的试剂盒。