

(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2019-532667

(P2019-532667A)

(43) 公表日 令和1年11月14日(2019.11.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/45 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/45 Z N A	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-530543 (P2019-530543)  
 (86) (22) 出願日 平成29年8月24日 (2017. 8. 24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月20日 (2019. 2. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/071392  
 (87) 国際公開番号 WO2018/037100  
 (87) 国際公開日 平成30年3月1日 (2018. 3. 1)  
 (31) 優先権主張番号 16185761.0  
 (32) 優先日 平成28年8月25日 (2016. 8. 25)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 505258715  
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ  
 ディカ ゲーエムベーハー  
 Boehringer Ingelhei  
 m Vetmedica GmbH  
 ドイツ国 55216 インゲルハイム  
 アム ライン ビンゲル シュトラーセ  
 173  
 (74) 代理人 100094569  
 弁理士 田中 伸一郎  
 (74) 代理人 100103610  
 弁理士 ▲吉▼田 和彦  
 (74) 代理人 100109070  
 弁理士 須田 洋之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なパラミクソウイルスおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は新規なネコパラミクソウイルスに関する。本発明のパラミクソウイルスは(-)s sRNAウイルスであり、ある特徴では、配列番号:1または配列番号:8に記載の核酸に相補的なゲノムを有する。本発明はさらに、対応する核酸およびポリペプチド、抗体およびワクチンに関する。さらにまた、本発明は、本発明のパラミクソウイルスに関する医療上の使用および診断方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下から成る群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む核酸

- (a) 配列番号:1および配列番号:8から成る群から選択されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号:1または配列番号:8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号:2と少なくとも90%同一、配列番号:3と少なくとも76%同一、配列番号:4と少なくとも92%同一、配列番号:5と少なくとも89%同一、配列番号:6と少なくとも86%同一、または配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および
- (e) (a) から (d) のヌクレオチド配列のいずれかの相補鎖。

10

**【請求項 2】**

以下を含む、請求項1に記載の核酸：

- (i) 配列番号:2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列
- (ii) 配列番号:3と少なくとも76%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、
- (iii) 配列番号:4と少なくとも92%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、
- (iv) 配列番号:5と少なくとも89%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、
- (v) 配列番号:6と少なくとも86%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、および
- (vi) 配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列。

20

30

**【請求項 3】**

パラミクソウイルスをコードする、請求項1または2に記載の核酸。

**【請求項 4】**

パラミクソウイルスが、感染、特に泌尿生殖器系の感染を人間または非人間哺乳動物、好ましくはネコ科の動物、より好ましくはイエネコ (*Felis silvestris catus*) で誘発することができる、請求項3に記載の核酸。

**【請求項 5】**

ゲノムが請求項1 (a) から (d) または請求項2に記載の核酸に対して相補的なりボ核酸を含む、パラミクソウイルス。

40

**【請求項 6】**

アクセッション番号CNCM 1-5123の下に寄託されるか、またはその任意の子孫であり、前記子孫が弱毒化されるかまたは弱毒化されていなくてもよい、パラミクソウイルス。

**【請求項 7】**

パラミクソウイルスが弱毒化されている、請求項5または6に記載のパラミクソウイルス。

**【請求項 8】**

請求項1から4のいずれかの項に記載の核酸を含むベクター。

**【請求項 9】**

請求項8に記載のベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 10】**

50

下記のアミノ酸配列を有するポリペプチド：

- (a) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列；または
- (b) 配列番号:2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、
- (c) 配列番号:3と少なくとも76%同一であるアミノ酸配列、
- (d) 配列番号:4と少なくとも92%同一であるアミノ酸配列、
- (e) 配列番号:5と少なくとも89%同一であるアミノ酸配列、
- (f) 配列番号:6と少なくとも86%同一であるアミノ酸配列、若しくは
- (g) 配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列。

10

【請求項11】

請求項10に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項12】

- (a) 請求項5、6または7のいずれかの項に記載のパラミクソウイルス、
- (b) 請求項1または2のいずれかの項に記載の核酸、
- (c) 請求項10に記載のポリペプチド、
- (d) 請求項11に記載の抗体、
- (e) 異種または自己(ポリ)ペプチドに融合される、請求項10に記載のポリペプチド、および場合によって医薬的に許容できる担体または賦形剤を含む免疫原性組成物であって、好ましくは前記担体が皮内または筋肉内適用に適切であり、場合によって前記ワクチンがさらにアジュバントを含む、前記免疫原性組成物。

20

【請求項13】

- (a) 請求項5、6または7のいずれかの項に記載のパラミクソウイルス、
- (b) 請求項1または2のいずれかの項に記載の核酸、
- (c) 請求項10に記載のポリペプチド、
- (d) 請求項11に記載の抗体、
- (e) 異種または自己(ポリ)ペプチドに融合される、請求項10に記載のポリペプチド、および医薬的に許容できる担体または賦形剤を含むワクチンであって、好ましくは前記担体が皮内または筋肉内適用に適切であり、場合によって前記ワクチンがさらにアジュバントを含む、前記ワクチン。

30

【請求項14】

病原性パラミクソウイルスによる対象動物の感染によって引き起こされる臨床徴候若しくは疾患を軽減または予防する方法で使用されるか、または病原性パラミクソウイルスによる対象動物の感染を治療または予防する方法で使用され、好ましくは前記対象動物がネコ科の動物である、請求項12または13に記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項15】

パラミクソウイルス、好ましくは請求項5または6に記載のパラミクソウイルスによって引き起こされる臨床的疾患に対抗して対象動物、好ましくはネコ科の動物を免疫する方法であって、当該対象動物、好ましくはネコ科の動物に請求項12または13に記載の免疫原性組成物またはワクチンを投与する工程を含み、それによって前記ウイルスがパラミクソウイルス感染の臨床徴候を引き起こすことができないが、パラミクソウイルス、好ましくは請求項5または6に記載のパラミクソウイルスの病原型に対して対象動物、好ましくはネコ科の動物に免疫を付与する免疫応答を誘発することができる、前記方法。

40

【請求項16】

以下を含む、パラミクソウイルス、好ましくは請求項5または6に記載のパラミクソウイルスと密接に関係する疾患に対してネコ科の動物をワクチン免疫するための、および/またはパラミクソウイルスと密接に関係するかまたはパラミクソウイルスによって引き起こされる1つ以上の臨床徴候の発生率若しくは重篤度を対象動物で軽減するためのキット：  
(a) ワクチンを当該対象動物、好ましくはネコ科の動物に投与することができるディスプレイ；および

50

(b) 請求項12または13に記載の免疫原性組成物またはワクチン；および

(c) 場合によって指示冊子。

【請求項17】

以下の工程を含む、請求項5または6に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法：

(i) 請求項1から4のいずれかの項に記載の核酸に特異的な1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブと当該サンプルを接触させる工程、および

(ii) 前記パラミクソウイルスと前記1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブとの間の結合を検出する工程。

【請求項18】

以下の工程を含む、請求項5または6に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法：

(i) 請求項11に記載の抗体と当該サンプルを接触させる工程、および

(ii) 前記パラミクソウイルスと前記抗体との間の結合を検出する工程。

【請求項19】

請求項5または6に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法であって、前記パラミクソウイルスに対する抗体の有無を前記サンプル中に検出する工程を含む、前記方法。

【請求項20】

対象動物、好ましくはネコ科の動物に由来するサンプルについて請求項5または6に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法であって、請求項17から19のいずれか1項に記載のパラミクソウイルスを検出する方法を含み、前記パラミクソウイルスの存在が感染を表示する、前記診断方法。

【請求項21】

対象動物、好ましくはネコ科の動物に由来するサンプルについて請求項5または6に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法であって、請求項17から19のいずれか1項に記載の前記パラミクソウイルスに対する抗体を検出する方法を含み、前記抗体の存在が前記パラミクソウイルスによる感染を表示する、前記診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なネコパラミクソウイルス並びに前記新規なパラミクソウイルスに対するワクチンおよび治療に関する。本発明はさらに、前記パラミクソウイルスの検出および前記パラミクソウイルスによる感染の診断に関する。

【背景技術】

【0002】

パラミクソウイルスはエンベロープを有し、マイナスセンスの一本鎖RNA((-)ssRNA)ウイルスであり、ヒトおよび動物の多くの伝染性疾患と関係している。パラミクソウイルスには2つの亜科、パラミクソビリナエ(Paramyxovirinae)およびプニューモビリナエ(Pneumovirinae)が存在し、パラミクソビリナエ亜科には少なくとも5つの属、すなわち、レスピロウイルス(Respirovirus)、ルブラウイルス(Rubulavirus)、モルビリウイルス(Morbillivirus)、ヘニパウウイルス(Henipavirus)、およびアブラウイルス(Avulavirus)が存在する。パラミクソウイルスの例には、イヌジステンパーウイルス、麻疹ウイルス、牛痘ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルスおよびパラインフルエンザウイルスが含まれる。パラミクソウイルスは、以下の7つのウイルスペプチドをコードする線状ゲノムを有する：ヌクレオキャプシドタンパク質、リントタンパク質、マトリックスタンパク質、融合タンパク質、ヘマグルチニンタンパク質、およびポリメラーゼ。パラミクソウイルスビリオンはエンベロープを有し、およそ150nmの直径の球形、糸状、または多型性であり得る。融合タンパク質および付着タンパク質(ヘマグルチニン、“H”)はビリオン表面でスパイクのように見える。エンベロープ内部のマトリックスタンパク質(“M”)はウイ

10

20

30

40

50

ルスの構造を安定化させる。ヌクレオキャプシドコアは、ゲノムRNA、ヌクレオキャプシドタンパク質(“N”)、リンタンパク質(“P”)およびポリメラーゼタンパク質(“大きなタンパク質(large protein)”)を意味する“L”)で構成される。融合タンパク質(“F”)はエンベロープ表面からトリマーとして突き出され、ウイルスエンベロープと細胞膜との間の融合を誘発することによって細胞侵入を媒介する。

#### 【0003】

パラミクソウイルスは、例えば野生および飼育される動物(ネコ、げっ歯類およびコウモリを含む)だけでなくヒトからも単離された。パラミクソウイルス感染、特にパラミクソビリナエ亜科の感染は、様々な種で示される腎組織傷害による腎疾患と密接に関係している。腎疾患、特に例えば慢性腎疾患(CKD)は、飼い猫(domestic cat)(特に高齢の個体)でもっともありふれた疾患でありかつもっとも一般的な死亡原因である。Lulichら(Lulich et al., Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 1992, 14(2):127-125)は、全飼い猫集団で約1.5%、10歳を超える飼い猫で約7.5%の有病率を報告している。これらの疾患の原因は非常に多様であり得る。多くの事例で、正確な病因を決定できない。他方で、慢性腎疾患は、尿細管および腎間質組織の炎症の結果として最も頻繁に発生することが知られている。これは特発性尿細管間質性腎炎(TIN)と呼ばれる。

当業界ではいくつかのネコパラミクソウイルスが記載されている。US 2013/0230529 A1およびWooら(Woo et al., Proc.Nat.Acad.Sci., 2012, 109(14):5435-5440)には、ホンコンで単離されたネコモルビリウイルス(FmoPV)が記載されており、このウイルスは飼い猫のTINと密接に関係を有する。日本(Sakaguchi et al., 2014, General Virology, 95(7), 1464-1468; Furuya et al., 2014, Archives of virology, 159(2), 371-373)、イタリア(Lorusso et al., 2013, Vet Ital.51(3):235-237)およびUSA(Sharp et al., 2016, Emerging Infectious Diseases 22(4):760)の他の研究グループもまた、ネコの尿サンプルからパラミクソウイルスを検出した。Siegら(Sieg et al., Virus Genes, 2015, 51(2):294-297)は、慢性腎疾患を有する飼い猫でネコパラミクソウイルスの発見を記載している。

しかしながら、これらのパラミクソウイルスは遺伝的に多様であり、関連を有するパラミクソウイルスを同定し前記パラミクソウイルスに対するワクチンおよび治療を提供することが希求される。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

本発明は、ネコパラミクソウイルス2型(FPaV-2)と称される新規なネコパラミクソウイルスを提供する。本発明のパラミクソウイルスは(-)ssRNAウイルスであり、ある特徴では、配列番号:1または配列番号:8に記載の核酸に相補的であるゲノムを有する。これら2つの配列は、本発明者らが単離したFPaV-2の2つの株(‘ゴードン(Gordon)’株(配列番号:1)および‘TV25’株(配列番号:8))のゲノムの相補性DNA配列を表す。配列番号:1および配列番号:8は、(マイナスRNA鎖のウイルスゲノムから転写される)プラスRNA鎖と一致するDNA配列として提供される(すなわち、それらはmRNAのように5'から3'方向でORFを含む)。本発明のパラミクソウイルスのウイルスゲノムは(-)ssRNAゲノムであることは当業者は認識していよう。したがって、ある特徴では、本発明はまた、配列番号:1若しくは配列番号:8に記載の核酸、または配列番号:1若しくは配列番号:8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一である配列に関する。配列番号:1または配列番号:8の核酸配列は、パラミクソウイルスの6つのウイルスポリペプチドのための6つのオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。配列番号:1または配列番号:8の核酸配列上のエレメントの配列は(5'から3'に)、ウイルスゲノムの3'非翻訳領域(UTR)、ヌクレオキャプシドタンパク質(“N”)ORF、リンタンパク質(“P”)ORF、マトリックスタンパク質(“M”)ORF、融合タンパク質(“F”)ORF、ヘマグルチニン(“H”)ORF、RNA依存RNAポリメラーゼ(“大

きいタンパク質”を意味する“L”) ORF、5'UTRである。下記の表1は、配列番号:1および配列番号:8の核酸の構造を記載する。

【0005】

表1: 本発明のパラミクソウイルスのゲノムの概要

ゲノム領域	ヌクレオチドの位置 (配列番号:1の場合)	対応するポリペプチド 配列
3' UTR	1-107	---
ヌクレオキャプシド タンパク質 ORF	108-1667	配列番号:2、 配列番号:9
遺伝子間配列	1668-1780	---
リンタンパク質 ORF	1781-3256	配列番号:3、 配列番号:10
遺伝子間配列	3257-3388	---
マトリックス タンパク質 ORF	3389-4402	配列番号:4、 配列番号:11
遺伝子間配列	4403-4949	---
融合タンパク質 ORF	4950-6581	配列番号:5、 配列番号:12
遺伝子間配列	6582-6958	---
ヘマグルチニン ORF	6959-8746	配列番号:6、 配列番号:13
遺伝子間配列	8747-8887	---
ポリメラーゼ ORF	8888-15496	配列番号:7、 配列番号:14
5' UTR	15497-16047	---

配列番号:2から7は配列番号:1(ゴードン株)のオープンリーディングフレームのポリペプチド配列を表し、配列番号:9から14は配列番号:8(TV25株)のオープンリーディングフレームのポリペプチド配列を表す。

【0006】

したがってある特徴では、本発明は、以下から成る群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む核酸に関する：

(a) 配列番号:1または配列番号:8に記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号:1または配列番号:8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列；

(c) 配列番号:2、配列番号:9(すなわちヌクレオキャプシドタンパク質)、配列番号:3、配列番号:10(すなわちリンタンパク質)、配列番号:4、配列番号:11(すなわちマトリックスタンパク質)、配列番号:5、配列番号:12(すなわち融合タンパク質)、配列番号:6、配列番号:13(すなわちヘマグルチニン)、配列番号:7および配列番号:14(すなわちポリメラーゼ)から成る群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) 下記(i)から(vi)のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列：

(i) 配列番号:2と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%同一、

(ii) 配列番号:3と少なくとも76%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一

10

20

30

40

50

(iii) 配列番号:4と少なくとも92%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%同一、

(iv) 配列番号:5と少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%同一、

(v) 配列番号:6と少なくとも86%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一、および/または

(vi) 配列番号:7と少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%同一、および

(e) (a) から (d) のヌクレオチド配列のいずれかの相補鎖。

10

#### 【0007】

本発明の核酸はネコパラミクソウイルスのゲノムをコードする。ある実施態様では、前記パラミクソウイルスは、感染、特に泌尿生殖器系の感染、より具体的には泌尿器系の感染または腎性疾患（特に慢性腎性疾患）をヒトまたは非ヒト哺乳動物、好ましくはネコ科の動物、イヌ科の動物、げっ歯類またはヒト、もっとも好ましくはイエネコ (*Felis silvestris catus*、時にはまた*Felis catus*とも称される) で誘発することができる。配列番号:2から7は、配列番号:1中の6つのオープンリーディングフレーム (ORF) のポリペプチド遺伝子生成物に関する。配列番号:9から14は、配列番号:8中の6つのオープンリーディングフレーム (ORF) のポリペプチド遺伝子生成物に関する。したがって、項目 (d) (i) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質であり、項目 (d) (ii) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスのリントタンパク質であり、項目 (d) (iii) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスのマトリックスタンパク質であり、項目 (d) (iv) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスの融合タンパク質であり、項目 (d) (v) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスのヘマグルチニンであり、項目 (d) (vi) の核酸によってコードされるポリペプチドはウイルスのポリメラーゼである。

20

好ましくは、本明細書では本発明の核酸は以下を含む：

(i) 配列番号:2と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(ii) 配列番号:3と少なくとも76%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

30

(iii) 配列番号:4と少なくとも92%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(iv) 配列番号:5と少なくとも89%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(v) 配列番号:6と少なくとも86%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、および/または

(vi) 配列番号:7と少なくとも91%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列。

#### 【0008】

40

さらに本発明の部分は以下のアミノ酸配列を有するポリペプチドである：

(a) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13、および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列

(b) 配列番号:2と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(c) 配列番号:3と少なくとも76%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(d) 配列番号:4と少なくとも92%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なく

50

とも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(e) 配列番号:5と少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(f) 配列番号:6と少なくとも86%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、または

(g) 配列番号:7と少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列。

いくつかの実施態様では、当該ポリペプチドは1つ以上の翻訳後修飾（例えばグリコシル化）を含むことができる。

#### 【0009】

本発明はまた、ゲノムが上記に示す本発明の核酸に相補的なりボ核酸を含むネコパラミクソウイルスに関する。特に、本発明は、2016年8月16日にアクセス番号CNCM I-5123で国立微生物培養集積所（Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (NCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France)に寄託されたパラミクソウイルスに関する。この株は、本明細書では‘ゴードン’株と称される。本発明はさらにCNCM I-5123として寄託されたパラミクソウイルスの任意の子孫に関し、前記子孫は弱毒化されていることもされていないこともあり得る。したがって、本発明のパラミクソウイルスは、CNCM I-5123として寄託されたパラミクソウイルス、CNCM I-5123として寄託されたパラミクソウイルスの子孫、CNCM I-5123として寄託されたパラミクソウイルスの弱毒化子孫、およびCNCM I-5123として寄託されたパラミクソウイルスと同じ特徴を有するパラミクソウイルス株から成る群から選択され得る。

#### 【0010】

本発明のパラミクソウイルスは、好ましくは以下のアミノ酸配列を有する1つ以上のポリペプチドを含む：

(a) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13、および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列

(b) 配列番号:2と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(c) 配列番号:3と少なくとも76%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(d) 配列番号:4と少なくとも92%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(e) 配列番号:5と少なくとも89%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、

(f) 配列番号:6と少なくとも86%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列、および/または

(g) 配列番号:7と少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、もっとも好ましくは少なくとも98%同一であるアミノ酸配列。

好ましくは、本発明のパラミクソウイルスは、配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6および配列番号:7のポリペプチド、または配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13および配列番号:14のポリペプチド、または項目(b)から(g)の全てのポリペプチドを含む。

#### 【0011】

本発明にしたがえば、核酸配列またはアミノ酸配列とのつながりで“~と少なくとも%”

10

20

30

40

50

同一”という用語は、2つ以上のアラインメントされた配列の全長（またはその部分と比較される全体）を構成する残基の数と比較して、当該配列の同一の核酸またはアミノ酸の一致（“ヒット”）の数を指す。言い換えれば、アラインメントを用い2つ以上の配列または部分配列について、同じである残基のパーセンテージ（例えば少なくとも84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一）を決定することができ、その場合、（部分）配列は、測定される比較ウィンドウにわたったまたは指定領域にわたって、当業者に公知の配列比較アルゴリズムを用いて最大一致のために比較およびアラインメントされるか、または手動によりアラインメントされて目視により点検される。

複数の配列間で、例えばCLUSTALWコンピュータプログラム（Thompson Nucl.Acids Res. 2 (1994), 4673-4680）またはFASTA（Pearson and Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci., 1988, 85; 2444）に基づくアルゴリズムを用いてパーセント配列同一性を決定する態様は当業界では周知である。しかしながら、FASTAアルゴリズムは典型的には、その計算において内部不一致欠失または配列への付加（すなわちギャップ）を考慮せず、これは手動で修正されて%配列同一性の過大評価は回避され得るが、ただし、配列ギャップをその同一性計算に採用する。さらに当業者が利用できるものは、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムである（Altschul, Nucl.Acids Res., 25 (1977), 3389）。核酸配列のためのBLASTNプログラムは、標準としてワード長（W）11、期待（E）10、M=5、N=4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列のためには、BLASTPプログラムは、標準としてワード長（W）3、期待（E）10を用いる。BLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci., 89 (1989), 10915）は、アラインメント（B）50、期待（E）10、M=5、N=4および両鎖の比較を用いる。これらプログラムの全てを本発明の目的のために用いることができる。しかしながら、好ましくはBLASTプログラムが用いられる。したがって、所定の機能を有し、さらにまた少なくとも84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する全ての核酸分子またはアミノ酸配列が本発明の範囲内に入る（前記配列同一性は、上記に列挙したまたは当業者に利用可能なさらに別のプログラム、好ましくはBLASTプログラムのいずれかを用いて決定される）。

#### 【0012】

ある特徴では、前記パラミクソウイルスは、感染、特に泌尿生殖器系の感染、より具体的には泌尿器系の感染または腎性/腎（renal/kidney）疾患（特に慢性腎性疾患）をヒトまたは非ヒト哺乳動物で、もっとも好ましくは尿細管間質性腎炎（TIN）を対象動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはネコ科の動物、さらに好ましくはイエネコ（*Felis silvestris catus*）で誘発することができる。

しかしながら、本発明のパラミクソウイルスはまた、2016年8月16日にアクセス番号CNCM I-5123で国立微生物培養集積所（Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France）に寄託されたパラミクソウイルスと比較して、免疫原性組成物またはワクチンでの使用のために弱毒化されることがある。

本発明のパラミクソウイルスを弱毒化する方法は当業者には公知である。ウイルスを弱毒化する昔ながらの方法は、例えば、臨床で単離されたウイルスを、鶏卵胚、ニワトリ胎児および/またはニワトリ胎児細胞培養で継続的に継代するか（例えば以下を参照されたい：Buynak et al.(1966), Experimental Biology and Medicine, 123(3), 768-775）、または野生型ウイルスを外来種の細胞株に順化させ連続的に継代して、病毒性および病原性を軽減する工程を含むことができる（例えば以下を参照されたい：Enders et al.(1960), New England Journal of Medicine, 263(4), 153-159）。より最近のアプローチは、例えば、野生型ウイルスのコドンペア偏向を操作することによる病毒性の軽減（Coleman et al.(2008), Science, 320(5884), 1784-1787）、または病毒性および病原性に必要ないくつかのウイルスタンパク質の欠失による臨床単離ウイルス株の遺伝的改変（例えば以下を参照されたい：Xu et al.(2014) Journal of virology, 88(5), 2600-2610）に基づ

く。

したがって、本発明はさらに、本発明に記載の核酸分子（特に配列番号:1若しくは配列番号:8に記載の核酸、または配列番号:1若しくは配列番号:8と少なくとも80%同一の核酸）を弱毒化ネコパラミクソウイルスの作製のために使用することに関し、1つ以上の変異が核酸分子に導入される。結果として、本発明はまた弱毒化ネコパラミクソウイルスの作製方法を提供し、前記方法は、本発明に記載の核酸分子（特に配列番号:1若しくは配列番号:8に記載の核酸、または配列番号:1若しくは配列番号:8と少なくとも80%同一の核酸）に1つ以上の変異を導入する工程を含む。

#### 【0013】

本明細書に記載する“弱毒化”パラミクソウイルスという用語は、特にin vitroおよび/またはin vivoで、より具体的には感受性細胞株および/または宿主において弱毒化されたパラミクソウイルスを指す。本明細書に記載されるように、特に“弱毒化”は病原体（特にパラミクソウイルス）の病毒性の軽減に関し、“病毒性”は病原性の程度であると理解され、“病原性”は、当該病原体が宿主または当該宿主の子で臨床徴候を誘発する能力を指す。本発明のパラミクソウイルスによる感染の可能な臨床徴候は、例えば対象動物における渴きの増加、排尿増加、体重減少、食欲減退、無気力および嘔吐を含む。本発明のパラミクソウイルスによる対象動物の感染と密接に関係する可能な検査所見は、例えばクレアチニンおよび非対称性ジメチルアルギニン（SDMA）のレベル増加を含む。本発明のパラミクソウイルスによる対象動物の感染と密接に関係する可能な組織学的所見は、例えば皮質および髄質癒痕化、尿細管変性、主としてリンパ球、形質細胞、マクロファージおよび顆粒球の浸潤による間質炎症を含む。

本明細書で用いられる“宿主”という用語は、本発明のネコパラミクソウイルスに感染し得る哺乳動物、特に下記に定義される対象動物、好ましくはネコ科の動物、より好ましくは飼い猫を指す。

#### 【0014】

本発明に関して、“対象動物”（例えば、本発明のパラミクソウイルスによる感染に感受性であるか、または本発明のワクチンで治療されるか、または本発明の関係で診断される対象動物）という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、具体的には食肉目（好ましい）、げっ歯目、翼手目および霊長目のメンバー、より好ましくはネコ科、イヌ科、キヌゲネズミ科、ネズミ科またはヒト科のメンバーから成る群から選択される哺乳動物である。好ましくは、対象動物は、ネコ科のメンバー、具体的にはネコ属（前記が本明細書では好ましい）、オオヤマネコ属、ヒョウ属、ウンピョウ属、カラカル属、レオパルドゥス属、ピューマ属、アシノニムス属、ベンガルヤマネコ属およびオトコロブス属のメンバーである。イヌ科には、例えばイヌ属およびキツネ属、例えばハイイロオオカミ（Canis lupus）、好ましくはイエイヌ（Canis lupus familiaris）（飼い犬（domestic dog））が含まれる。しかしながら、本発明はこれらの種、目および科に限定されない。ネコ属には、例えばヤマネコ（Felis silvestris）の種、例えばヨーロッパヤマネコ（Felis silvestris silvestris）（ヨーロッパ山猫）、野猫、好ましくはイエネコ（Felis silvestris catus）（フェリス・カツス（Felis catus）（すなわち飼い猫）としても知られている）、ジャングルキャット（Felis chaus）、クロアシネコ（Felis nigripes）、スナネコ（Felis margarita）およびハイイロネコ（Felis bieti）が含まれる。ヒョウ属には、例えばトラ（Panthera tigris）、ライオン（Panthera leo）、ジャガー（Panthera onca）、レオパード（Panthera pardus）、ユキヒョウ（Panthera uncial）およびライガーが含まれる。他のネコ科には、リンクス・リンクス（Lynx lynx）、リンクス・ルフス（Lynx rufus）、アシノニクス・ジュバツス（Acinonyx jubatus）（チーター）、ピューマ・コンコロール（Puma concolor）（クーガー）、レオパルドゥス・パルダリス（Leopardus pardalis）（オセロット）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。ヒト科の哺乳動物には、ボルネオオランウータン（Pongo pygmaeus）、スマトラオランウータン（Pongo abelii）、ゴリラ・ゴリラ（Gorilla gorilla）、チンパンジー（Pan troglodytes）、ボノボ（Pan paniscus）、およびホモ・サピエンス・サピエンス（Homo sapiens sapiens）（ヒト）

が含まれる。翼手目（コウモリ）には大翼手亜目（オオコウモリ）および小翼手亜目（ココウモリ）が含まれる。哺乳動物はまた、典型的なペット種、例えばモルモット（*Cavia porcellus*）、家兎（*Oryctolagus cuniculus*）、ファンシーマウス（*Mus musculus*）、ファンシーラット（*Rattus norvegicus*）、フェレット（*Mustela putorius furo*）、またはシリアンハムスター（*Mesocricetus auratus*）であり得る。哺乳動物のペットおよび動物園の動物は本明細書で好ましい。哺乳動物は、好ましくはネコ類、イヌ類、げっ歯類、ヒトまたはコウモリ、より好ましくはネコ類（“ネコ科の動物”）、もっとも好ましくは飼い猫である。

#### 【0015】

本発明はさらにまた、本発明に記載の核酸分子を含むDNA構築物を提供し、前記DNA構築物は特にDNAベクター（例えばプラスミド）である。その中に本発明のヌクレオチド分子を挿入することができるDNAベクターまたはプラスミドは当業者には認識されているであろう。本明細書に記載するDNA構築物は、好ましくは単離されたDNA構築物である。本明細書で用いられる、“核酸分子を含む”または“DNA分子を含む”という用語は、特に“核酸分子の配列を含む”または“DNA分子の配列を含む”という用語とそれぞれ同等であると理解される。したがって、本発明はまた、本発明の核酸を含むベクターおよび前記ベクターを含む宿主細胞に関する。

さらにまた、本発明は本明細書に記載するDNA構築物のRNA転写物を提供し、前記RNA転写物は好ましくは単離されたRNA転写物である。本発明はまた、本明細書に記載するDNA構築物をトランスフェクトした細胞を提供し、前記細胞は好ましくは単離された細胞である。したがって、本発明はまた上述の細胞によって生産されるネコパラミクソウイルスを提供し、前記ネコパラミクソウイルスは好ましくは単離されたネコパラミクソウイルスである。さらにまた、本発明は本明細書で述べたRNA転写物をトランスフェクトした細胞を提供し、前記細胞は好ましくは単離された細胞である。したがって、本発明はまた上述の細胞によって生産されるネコパラミクソウイルスを提供し、前記ネコパラミクソウイルスは好ましくは単離されたネコパラミクソウイルスである。その中で本発明のパラミクソウイルスまたは本発明のポリペプチドを生産することができる宿主細胞には、HEK293、HEK293T、Vero、CrFK、LLC-MK2、BHK21、CHO、BSR-T7/5、MA-104およびHELA細胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0016】

本発明はさらにまた、ゲノムが本発明の核酸分子を含む、またはそのゲノムが本発明の核酸分子によってコードされるRNA分子を含むネコパラミクソウイルスを提供し、前記ネコパラミクソウイルスは好ましくは単離されたネコパラミクソウイルスである。別の特徴では、本発明はネコパラミクソウイルスを生産する方法を提供し、前記方法は、本明細書に記載するDNA構築物または本発明の核酸により細胞をトランスフェクトする工程を含む。

本発明に記載のパラミクソウイルスはまた、キメラウイルス（すなわちそのゲノムが異種核酸配列を含む本発明のパラミクソウイルス）であり得る。キメラウイルスは、例えば異種ヌクレオチド配列を含むベクターによってコードされ得る。本発明にしたがえば、キメラウイルスはしたがってウイルスベクターによってコードされることができ、当該ベクターには異種ヌクレオチド配列が、本来のまたは本来ではない配列のために、付加、挿入または置換されてある。キメラウイルスは、例えば、2つ以上のウイルス、例えば2つ以上のパラミクソウイルス株に対して防御する組換えワクチンの作製のために用いることができる。弱毒化および複製欠損ウイルスは生ワクチンによるワクチン免疫に代わって用いることができる。異種配列は、任意の伝染性病原体の抗原または任意の疾患と密接に関係し免疫応答を引き出すことができる抗原をコードすることができる。

#### 【0017】

本発明はさらにまた、本発明のパラミクソウイルスおよび/または本発明のポリペプチドに特異的な抗体に関する。本明細書で用いられる“抗体”という用語は、特段の指示がないかぎり広く用いられ、抗体分子および様々な抗体由来分子の両方を指す。そのような

抗体由来分子は、少なくとも1つの可変領域（重鎖または軽鎖可変領域）とともに、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖と他の分子との間のキメラ融合物などを含む。本発明に記載の機能的免疫グロブリンフラグメントは、Fv、scFv、ジスルフィド結合Fv、Fab、およびF(ab')<sub>2</sub>であり得る。抗体は例えば、IgM、IgD、IgE、IgAまたはIgG（例えばIgG1、IgG2、IgG2b、IgG3若しくはIgG4、または対応する種の対応するIgGサブクラス）であり得る。さらに“抗体”という用語に包含されるものは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（“mAb”）、キメラモノクローナル抗体、ヒト化抗体、遺伝子操作モノクローナル抗体である。例えば、そのような抗体は、非ヒト哺乳動物（例えばマウスまたはウサギ）に本発明の（完全な）パラミクソウイルスまたはその部分（例えば本発明のポリペプチドまたはその抗原フラグメント）を投与し、その後抗体または抗体産生細胞を単離することによって入手できる。また別には、抗体ライブラリーをそのような抗体についてスクリーニングすることもできる。ヒト（またはネコ科の動物若しくはイヌ科の動物若しくは任意の他の所望される種）の抗体、ヒト化（またはイヌ化、ネコ化若しくは任意の他の種）抗体、またはキメラ抗体は当業界で周知である。例えば、ファージディスプレイおよびゼノマウス系技術を用いて、ヒト、ネコ科の動物、イヌ科の動物または他の種をベースとするモノクローナル抗体を作製することができる。上記に記載の方法にしたがって作製または特定した抗体を、本発明のネコパラミクソウイルスの抗原に対する特異性および/または本発明のネコパラミクソウイルスの中和能力について当業界で公知の生物学的アッセイを用いて試験することができる。本明細書で好ましい抗体は、本発明のネコパラミクソウイルスの表面エピトープに対して特異的なもの、特にヘマグルチニンタンパク質（配列番号:6または配列番号:13に記載のポリペプチド）に対する抗体、または融合タンパク質（配列番号:5または配列番号:12に記載のポリペプチド）に対する抗体である。本発明の抗体に関して、“～に特異的”および“特異的結合”という用語は、問題の分子またはそのフラグメントに対して生じた抗体を指す。抗体は、問題の分子または上述のそのフラグメントに対する当該抗体の親和性が、当該問題の分子を含むサンプルに含まれる他の分子に対する親和性よりも少なくとも10倍強い、好ましくは50倍強い、より好ましくは100倍強い、もっとも好ましくは少なくとも1000倍強い場合に特異的であると考えられる。本発明の抗体を用いて、サンプル中の本発明のネコパラミクソウイルスを検出するか、および/または診断の目的のために、例えば治療方法の有効性および/または疾患の進行をモニターすることができる。

#### 【0018】

さらに別の特徴では、本発明は、本発明のパラミクソウイルスに対する免疫原性組成物またはワクチンに関する。前記ワクチンは例えば、

- (a) 本発明に記載のパラミクソウイルス；
- (b) 本発明に記載の核酸；
- (c) 本発明に記載のポリペプチド；または
- (d) 本発明に記載の抗体；

および医薬的に許容できる担体または賦形剤を含むことができ、好ましくは、前記担体は皮内または筋肉内適用に適切であり、場合によって前記ワクチンはさらにまたアジュバントを含む。

前記免疫原組成物は例えば、

- (a) 請求項5、6または7のいずれか1つに記載のパラミクソウイルス；
  - (b) 請求項1または2のいずれか1つに記載の核酸；
  - (c) 請求項10に記載のポリペプチド；
  - (d) 請求項11に記載の抗体；
  - (e) 異種または自己(ポリ)ペプチドに融合された、請求項10に記載のポリペプチド、
- および場合によって医薬的に許容できる担体または賦形剤を含むことができ、好ましくは、前記担体は皮内または筋肉内適用に適切であり、場合によって前記ワクチンはさらにまたアジュバントを含む。

#### 【0019】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる“免疫原性組成物”は、本発明に記載の少なくとも1つのパラミクソウイルス、核酸、ポリペプチド若しくは抗体または前記の免疫原性部分を含む物質の組成物であり、宿主で当該組成物に対する免疫学的応答（細胞性または抗体媒介免疫応答）を惹起する。特定の特徴では、免疫原性組成物は免疫応答を誘発し、より好ましくは、パラミクソウイルス感染の臨床徴候の1つ以上に対して防御免疫を付与する。

本発明の特定の特徴で用いられる“ワクチン”という用語は、動物で免疫学的応答を誘発する少なくとも1つの免疫学的に活性な成分および当該活性成分の免疫学的活性を強化する1つ以上の追加成分を必然的ではないが場合によって含む医薬組成物を指す。ワクチンは、医薬組成物に典型的なさらに別の成分を追加的に含むことができる。区別的手段として、ワクチンの免疫学的に活性な成分は、いわゆる改変生ワクチン（MLV）では完全なウイルス粒子をそれらの本来の形または弱毒化粒子として含み、いわゆる殺滅ワクチン（KV）では適切な方法によって不活化した粒子を含むことができる。別の形態では、ワクチンの免疫学的に活性な成分は生物の適切なエレメントを含むことができ（サブユニットワクチン）、これらのエレメントは、全粒子またはそのような粒子を含む増殖培養を破壊する工程および場合によって所望の構造物を取得するその後の精製工程によって、または例えば細菌、昆虫、哺乳動物若しくは他の種の適切な系の使用による適切な操作を含む合成プロセスおよび場合によってその後の単離および精製工程によって、またはワクチンを必要とする動物での適切な医薬組成物を用いる遺伝材料の直接取り込みによる合成プロセスの誘発（ポリヌクレオチドワクチン免疫）によって生成される。ワクチンは、上記に記載のエレメントの1つまたは同時に2つ以上を含むことができる。本発明の特定の特徴で用いられる“ワクチン”という用語は、抗原性物質を含む獣医的使用のための改変生弱毒化ワクチンを示し、パラミクソウイルス感染、好ましくはネコパラミクソウイルス感染によって惹起される疾患に対して特異的で能動的な免疫を誘発する目的のために投与される。本発明のさらに別の特定の特徴では、ワクチンはとりわけ生ワクチン、生弱毒化ワクチン、不活化ワクチンまたは複合化ワクチンであり得る。

#### 【0020】

様々な物理的および化学的不活化方法が当業界で公知である。“不活化”という用語は、照射を受けたか（紫外線（UV）、X線、電子線またはガンマ照射）、加熱されたか（例えば55 から65 の温度で30分から数時間、例えば56 で3時間）、または不活化、殺滅のために化学的に処理された、以前には病毒性または非病毒性のウイルスを指し、そのようなウイルスはその免疫原性を維持する。ある特徴では、本明細書に開示する不活化パラミクソウイルスは、不活化剤による処理で不活化できる。適切な不活化剤には、ベータ-プロピオラクトン、バイナリまたはベータ-またはアセチル-エチレンイミン、グルタルアルデヒド、オゾン、およびホルマリン（ホルムアルデヒド）が含まれる。

ホルマリンまたはホルムアルデヒドによる不活化のためには、ホルムアルデヒドは典型的には水およびメチルアルコールと混合されてホルマリンを生じる。メチルアルコールの添加は、不活化プロセス時の分解または交差反応を防ぐ。ある実施態様は、ホルムアルデヒドの37%溶液の約0.1%から1%を用いてウイルスを不活化する。ホルマリンの量を調整して、材料が不活化されるが高投薬量による副作用がそれほど強くないことを担保することが重要である。

より詳しく言えば、ウイルスに関して“不活化”という用語は、ウイルスがin vivoおよびin vitroで複製できないことを意味する。例えば、“不活化”という用語は、in vitroで増殖していて、化学的または物理的手段を用いて脱活性化され、したがってもはや複製し得ないウイルスを指すことができる。別の例では、“不活化”という用語は、増殖していて、続いてウイルスの懸濁物、ウイルスのフラグメントまたは構成要素（これらはワクチンの成分として用いることができる）を生じる化学的または物理的手段を用いて脱活性化されたウイルスを指すことができる。本明細書で用いられるように、“不活化”、“殺滅”または“KV”という用語は互換的に用いられる。

“生ワクチン”という用語は、生きていて、特に生きていてウイルスの活性成分を含むワクチンを指す。

10

20

30

40

50

## 【0021】

本明細書に記載される、任意の1つ以上の医薬的に許容できる担体または賦形剤には、任意のかつ全ての溶媒、分散媒体、被覆剤、アジュバント、安定化剤、希釈剤、保存料、抗菌および抗カビ剤、等張剤、吸着遅延剤などが含まれる。いくつかの特徴では、特に凍結乾燥された免疫原性組成物を含む特徴では、安定化剤には凍結乾燥またはフリーズドライに対する安定化剤が含まれる。

好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物は、1用量当たり本明細書に記載の弱毒化パラミクソウイルスの $10^1$ から $10^7$ ウイルス粒子、好ましくは1用量当たり $10^3$ から $10^6$ 粒子、より好ましくは1用量当たり $10^4$ から $10^6$ 粒子量を含む。

別の好ましい特徴では、本発明の免疫原性組成物は、1用量当たり少なくとも約 $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL、好ましくは1用量当たり $10^3$ から $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mLのウイルス力価と同等の本発明に記載のパラミクソウイルス量を含む。

本明細書で用いられる、“ワクチン”および“ワクチン組成物”という用語は互換的に用いられ、特に、当該組成物に暴露された対象動物で防御免疫応答を惹起する組成物を指す。免疫応答には抗体の誘発および/またはT細胞応答の誘発が含まれ得る。

本発明のワクチンはまた、マーカーワクチン（すなわち感染動物とワクチン接種動物との免疫学的弁別または分離を可能にするワクチン）であり得る。例えば、マーカーワクチンは、それに対してワクチン免疫される病原体（すなわち本発明のパラミクソウイルス）に存在する免疫原性抗原を欠き、したがってワクチン免疫でマイナスマーカーを生じることができる。そのようなマーカーワクチンはまた、獣医医療ではDIVAまたはSIVAワクチン（“感染動物とワクチン接種動物の区別/分離（Differentiation/Segregation of infected from vaccinated animals）”）と称され、特に生産用家畜（例えば飼育動物）に有用である。

## 【0022】

通常、“免疫応答”には以下の作用の1つ以上が含まれる（ただしこれらに限定されない）：問題の組成物またはワクチンに含まれる1つの抗原または複数の抗原に特異的に向けられる、抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞、および/または細胞傷害性T細胞の生産または活性化。好ましくは、宿主は治療的または防御的な免疫学的（メモリー）応答を示し、したがって、新たな感染に対する耐性は強化され、および/または疾患の臨床的重篤度は軽減されるであろう。そのような防御は、病原体の感染と密接に係る臨床徴候の数若しくは重篤度の軽減または前記臨床徴候の1つ以上の欠如、ウイルス血症開始の遅延、ウイルス持続の緩和、全体的ウイルス量の低下、および/またはウイルス排出の低下によって示されるであろう。したがって、“免疫応答”は、特に問題の組成物またはワクチンに対する細胞性および/または抗体媒介免疫応答の発達を意味する（ただし前記に限定されない）。

ある特徴では、ワクチンは、本発明のポリペプチドと別のペプチドまたはポリペプチドとの融合タンパク質を含む。融合パートナーは、異種ポリペプチド/ペプチドまたは自己ポリペプチド/ペプチドであり得る。本発明のポリペプチドに融合できる異種ポリペプチドには、カナリヤボックスウイルスのポリペプチド（特にネコのワクチンの場合）、ミクソマウイルスのポリペプチド（特にウサギのワクチンの場合）、またはヘルペスウイルスのポリペプチドが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

## 【0023】

別の特徴では、本発明は、本発明のパラミクソウイルスを対象動物からのサンプル中に検出する方法に関する。本発明に関するサンプルは、生物学的サンプル、特に、対象動物の診断、予後判定または評価の目的のために入手される体液または組織サンプルである。本発明の目的のための“対象動物”にはヒトおよび他の哺乳動物の両方が含まれる。したがって、前記方法はヒトの診断および獣医の適用の両方に応用できる。好ましい試験サンプルには、全血、血漿、尿、唾液、喀痰、吸引物、穿刺物、および粘膜スワブ（拭き取り検体）が含まれる。付け加えれば、いくつかの試験サンプルは、分画または精製手順（例えば全血の血清または血漿成分への分離）の後で分析が容易になることは当業者には理解

10

20

30

40

50

されよう。したがって、本発明の好ましい実施態様では、サンプルは、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、唾液サンプル、吸引サンプル、穿刺サンプル、粘膜スワブおよび尿サンプルまたは上述のサンプルのいずれかの抽出物から成る群から選択される。パラフィン組織切片サンプルもまた用いることができる。好ましくは、サンプルは血液または尿サンプル、もっとも好ましくは血清サンプルまたは血漿サンプルである。適切な場合には、サンプルは本発明での使用前に均質化するかまたは溶媒で抽出して液体サンプルを入手せねばならないことがある。この液体サンプルは溶液または懸濁物であり得る。液体サンプルは、本発明での使用前に1つ以上の前処理に付すことができる。そのような前処理には、希釈、ろ過、遠心分離、濃縮、沈降、沈殿、透析が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前処理はまた、当該溶液への化学物質または生化学物質（例えば酸、塩基、緩衝液、塩、溶媒、反応性染料、洗剤、乳化剤、キレート剤、）の添加を含むことができる。本発明に関して“血漿”は、遠心分離後に得られる抗凝固剤を含む血液の実質的に細胞を含まない上清である。例示的な抗凝固剤には、カルシウムイオン結合化合物、例えばEDTAまたはクエン酸塩、およびトロンピン阻害剤、例えばヘパリン塩またはヒルジンが含まれる。無細胞血漿は、抗凝固剤添加血液（例えばクエン酸塩、EDTAまたはヘパリン添加血液）を2000から3000gで少なくとも15分間遠心分離することによって入手できる

10

20

30

40

50

#### 【0024】

検出は、核酸レベルであるか（すなわちウイルスのゲノムRNAがサンプル中に検出される）、またはウイルスタンパク質レベル（例えば免疫アッセイを利用）であり得る。当業界で公知の任意の免疫アッセイ系をこの目的のために用いることができ、前記系には、競合および非競合アッセイ系（例えば放射能免疫アッセイ技術を用いる）、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、“サンドイッチ”免疫アッセイ、プレシピチン反応、ゲル拡散プレシピチン反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射能測定アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A免疫アッセイおよび免疫電気泳動アッセイが含まれるが、ただしこれらに限定されない。さらにウェスタンブロットアッセイまたはラテラルフロー免疫アッセイもまた用いることができる。ウイルス核酸は、例えば逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）で特異的プライマーおよび/またはプローブを用いて検出できる。例えば、核酸の検出は対象動物の尿サンプルで直接実施することができる。他の核酸系サンプル（例えばNASBA）もまた用いることができる。PCRアッセイは、例えばネステッドPCR、セミネステッドPCRおよび定量的PCRのような様式を含むことができる。

#### 【0025】

特に、本発明は本発明に記載のパラミクソウイルスをサンプルにおいて検出する方法に関し、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 本発明に記載の核酸に対して特異的な1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブと当該サンプルを接触させる工程（すなわち、当該プライマーおよび/またはプローブは好ましくは前記核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする）、および

(ii) パラミクソウイルスと前記1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブとの間の結合を検出する工程。

別の特定の特徴では、本発明はサンプル中の本発明に記載のパラミクソウイルスを検出する方法に関し、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 本発明に記載の抗体と当該サンプルを接触させる工程、および

(ii) パラミクソウイルスと前記抗体との間の結合を検出する工程。

本発明のパラミクソウイルスを検出する方法は、したがってサンプル中のパラミクソウイルスの直接検出に基づくことができる。しかしながら、当該方法はまた、より間接的なアプローチ、すなわちパラミクソウイルスに対する抗体のサンプル中の存在の検出に基づくことができる。パラミクソウイルスに対する抗体の存在は、当該対象動物の免疫系がすでにパラミクソウイルスと接触し、したがって対応する免疫応答が開始したことを示す。この状況では、パラミクソウイルスによる真の感染は、マーカーワクチン（DIVA、上記参照）から欠落した抗原（すなわち本発明のポリペプチドまたはその抗原性フラグメント）

をサンプル中に検出することによって、マーカーワクチンでワクチン免疫された対象動物と区別することができる。

【0026】

したがって、本発明はまた、本発明に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法に関し、前記方法は、前記パラミクソウイルスに対する抗体の前記サンプル中の有無を検出する工程を含む。サンプル中の抗体を検出する適切なアプローチには、上記に記載の免疫アッセイ（例えばELISA、特にサンドイッチELISAおよびラテラルフローアッセイ）が含まれる。したがって、本発明はまた、本発明のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法に関し、前記方法は、パラミクソウイルスの抗原とサンプルを接触させて、前記パラミクソウイルスに対する当該サンプル中の抗体（存在するとして）と前記抗原との結合を検出する工程を含む。前記抗原は好ましくは表面に固定される。前記抗原と結合した抗体は、例えば二次検出抗体（例えば、ネコ科の動物のサンプルの場合には、ネコ免疫グロブリン（Ig）に対する抗体（例えばマウス抗ネコIg抗体））を用いることによって検出することができる。本発明のポリペプチドの例示的な抗原性エピトープは下記の表2に記載される：

ポリペプチド	エピトープ（配列内残基）
ヌクレオキャプシドタンパク質 （配列番号:2、配列番号:9）	13-29、38-46、61-69、92-97、106-115、 147-160、182-192、242-249、399-409、 424-483、496-512
リンタンパク質 （配列番号:3、配列番号:10）	18-30、39-96、106-176、186-202、 208-234、242-249、251-268、270-289、 363-378、396-411、425-430、436-442
融合タンパク質 （配列番号:5、配列番号:12）	210-217、241-245、297-302、394-400、 528-538
ヘマグルチニン （配列番号:6、配列番号:13）	1-11、124-131、140-145、331-336、 391-398、409-414、423-435、477-482、 521-526、536-543

これらのエピトープ（または前記エピトープの1つ以上を含む本発明のポリペプチドのフラグメント）は、例えば本発明のパラミクソウイルスに対する抗体の作製に用いることができる。

【0027】

別の特徴では、本発明は、本発明のパラミクソウイルスによる対象動物の感染を診断する方法に関する。特に、本発明はまた、対象動物（好ましくはネコ科の動物、より好ましくは飼い猫）のサンプルについて本発明に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法に関し、前記方法は上記に記載したパラミクソウイルスの検出方法を含み、前記パラミクソウイルスの存在は感染の指標である。別の特徴では、本発明は、対象動物（好ましくは飼い猫）からのサンプルについて本発明に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法に関し、前記方法は、本発明の前記パラミクソウイルスに対する抗体の検出方法を含み、前記抗体の存在は前記パラミクソウイルスによる感染の指標である。

本発明の検出方法および診断方法に関しては、パラミクソウイルスの融合タンパク質またはヘマグルチニンの検出が好ましい。ある特徴では、ウイルスポリメラーゼが検出されないこと、または少なくともウイルスゲノム（配列番号:1または8）のヌクレオチド残基10055から10560に相当するエピトープまたは領域が検出されないことがまた好ましい。

別の特徴では、本発明は、本発明のパラミクソウイルスの検出のためのキットに関する。ある実施態様では、キットは、本発明のパラミクソウイルスに特異的な1つ以上の抗体を含むことができる。別の実施態様では、キットは、本発明のパラミクソウイルスの検出のためのオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブを含むことができる。

【0028】

10

20

30

40

50

最後に、本発明は、本発明のワクチン、核酸、ポリペプチド、抗体および免疫原性組成物の医療上の使用並びに対象動物でパラミクソウイルスによる感染を治療および/または予防する方法に関する。例えば、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物を用いて、パラミクソウイルスによる感染の臨床徴候、好ましくは泌尿生殖器系の感染（より具体的には泌尿器系の感染）の臨床徴候または腎性/腎疾患、特にヒトまたは非ヒト哺乳動物の慢性腎性疾患、もっとも好ましくは尿細管間質性腎炎（TIN）を軽減することができる。特に、本発明は、パラミクソウイルス、特に本発明のネコパラミクソウイルスによる感染の治療または予防で使用される本発明のワクチンまたは免疫原性組成物に関する。

本発明はさらに本発明のワクチンまたは免疫原性組成物に関し、前記ワクチンまたは免疫原性組成物は、感染、特に泌尿生殖器系の感染（より具体的には泌尿器系の感染）または腎性/腎疾患、特にヒトまたは非ヒト哺乳動物の慢性腎性疾患、もっとも好ましくは哺乳動物（好ましくはネコ科の動物、より好ましくは飼い猫）の尿細管間質性腎炎（TIN）の治療または予防で使用される。

本発明はまた、パラミクソウイルス、特に本発明に記載のネコパラミクソウイルスによる感染を対象動物（好ましくは飼い猫）において治療または予防する方法に関し、前記方法は、ワクチンまたは免疫原性組成物を前記対象動物に投与する工程を含む。

本発明はまた、腎疾患、好ましくは慢性腎疾患、もっとも好ましくは尿細管間質性腎炎（TIN）を対象動物（好ましくはネコ科の動物、より好ましくは飼い猫）で治療または予防する方法に関し、前記方法は、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物を前記対象動物に投与する工程を含む。

好ましい特徴では、本発明のワクチンまたは免疫原性組成物は、本発明のパラミクソウイルスによる感染を対象動物で予防するために用いられる。

#### 【0029】

本発明はさらに本発明のワクチンまたは免疫原性組成物に関し、前記ワクチンまたは免疫原性組成物は、病原性パラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスの感染によって引き起こされる臨床徴候または疾患を対象動物で軽減または予防する方法において使用されるか、または病原性パラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスによる感染を対象動物で治療または予防する方法において使用され、好ましくは前記対象動物はネコ科の動物である。本発明はさらに本発明のワクチンまたは免疫原性組成物に関し、前記ワクチンまたは免疫原性組成物は、対象動物（好ましくはネコ科の動物）をパラミクソウイルス、好ましくは本発明に記載のパラミクソウイルスによる感染から、または病原性パラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスによる感染で引き起こされる臨床徴候または疾患から防御する方法で使用される。

本発明はさらに、パラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスによって対象動物で引き起こされる臨床疾患または臨床徴候に対して、対象動物（好ましくはネコ科の動物）を免疫する方法に関し、前記方法は、当該対象動物（好ましくはネコ科の動物）に本発明に記載の免疫原性組成物またはワクチンを投与する工程を含み、前記ウイルスはパラミクソウイルス感染の臨床徴候を引き起こすことはできないが、当該対象動物（好ましくはネコ科の動物）にパラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスの病原型に対して免疫を付与する免疫応答を誘発することができる。

したがって、本発明はまた、パラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスによって対象動物で引き起こされる臨床疾患に対してまたは臨床徴候に対して、対象動物（好ましくはネコ科の動物）でパラミクソウイルス感染（好ましくは本発明のパラミクソウイルスによる感染）の臨床徴候を防御または軽減する方法に関し、前記方法は、当該対象動物（好ましくはネコ科の動物）に本発明に記載の免疫原性組成物またはワクチンを投与する工程を含み、前記ウイルスはパラミクソウイルス感染の臨床徴候を引き起こすことはできないが、当該対象動物（好ましくはネコ科の動物）にパラミクソウイルス、好ましくは本発明のパラミクソウイルスの病原型に対して免疫を付与する免疫応答を誘発することができる。

本発明はさらに、対象動物（好ましくはネコ科の動物）をパラミクソウイルス、好まし

くは本発明に記載のパラミクソウイルスと密接に関係する疾患に対してワクチン免疫するための、および/または前記と密接に関係するかまたは前記によって引き起こされる1つ以上の臨床徴候の発生率若しくは重篤度を対象動物で軽減するためのキットに関し、前記キットは以下を含む：

- (a) ワクチンを当該対象動物、好ましくはネコ科の動物に投与することができるディスプレイ；および
- (b) 本発明に記載の免疫原性組成物またはワクチン；および
- (c) 場合によって指示冊子。

全引用特許および非特許文書は参照によってその全体が本明細書に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】細胞培養上清のネコパラミクソウイルス (FPaV-2) の検出 FPaV-2 “ゴードン”株の感染後、CrFKおよびLLC-MK2細胞のそれぞれ継代3の細胞培養上清の分析が示される。M：DNAサイズ標準物；1：CrFK細胞の細胞培養上清；2：LLC-MK2細胞の細胞培養上清；3：水；4：陽性コントロール。

【図2】FPaV-2 “ゴードン”単離株を感染させたLLC-MK2細胞の免疫蛍光 DAPIで染色した細胞核。FPaV-2感染細胞は緑色蛍光を示す。拡大：200x；感染後5日で染色。

【図3】ネコ初代腎細胞の単離。拡大：100x、播種後48時間。

【図4】ネコ初代腎細胞のFPaV-2による感染 細胞核はDAPIで染色される。FPaV-2感染細胞は緑色蛍光を示す。拡大：200x；感染後5日で染色。

【図5】FPaV-2感染ネコの抗体の多様性 SDS-PAGEで分離しニトロセルロース膜にプロットした、半精製のFPaV-2まるごとのウェスタンブロット分析。A = FPaV-2陽性ネコ‘TV25’の1:100希釈血清サンプルとともにインキュベーション；B = パラミクソウイルス陰性ネコの1:100希釈サンプルとともにインキュベーション；C = 1:200希釈抗ヌクレオキャプシド抗体とともにインキュベーション。ウイルスタンパク質に対する特異的反応は、標的抗体とのそれらの反応性を基準にして（ヌクレオキャプシドおよびリンタンパク質）、またはそれらの予想される分子量を基準にして（ポリメラーゼおよびヘマグルチニンタンパク質）右下に注釈されている。

【図6】ネコ血清サンプル中のFPaV-2抗体検出用ELISAの開発 ネコ血清サンプルを特異抗体の存在についてFPaV-2-IFAでスクリーニングした。IFAの結果をゴールドスタンダードとしてOD値と比較した。0.5より小さいOD値を有するサンプルをFPaV-2陰性と定義し、一方、0.7より高いOD値を有するサンプルをFPaV-2陽性と定義する。灰色の枠は‘ボーダーライン’サンプルを示し、これはIFAでチェックしてELISAの結果を評価する必要がある。

【図7】FPaV-2の主要免疫標的細胞 FPaV-2 (MOI 0.1) による感染後48時間のPBMCのフローサイトメトリー分析。細胞をT細胞表面マーカー (CD4) およびB細胞表面マーカー (CD2) について、さらにポリクローナルヌクレオキャプシド抗体を用いて細胞内FPaV-2の存在について染色した。AおよびC = 模擬感染PBMC、BおよびD = FPaV-2感染PBMC

【図8】FPaV-2免疫ウサギのウェスタンブロット分析 半精製の全FPaV-2をSDS-PAGEで分離してニトロセルロース膜にプロットした。A = 免疫前のウサギNo.2の血清サンプル (1:100希釈) とともにインキュベーション (前免疫血清)、B = 熱不活化FPaV-2による免疫後2週間のウサギNo.2の血清サンプル (1:100希釈) とともにインキュベーション。ウイルスタンパク質に対する特異的反応は、図5に示した反応性を基準にして右下に注釈されている。免疫前血清とは対照的に、FPaV-2特異的抗体が免疫後5週間で検出された。

【実施例1】

【0031】

FPaV-2の検出

サンプルの収集：

慢性腎疾患を有する雄ネコ (13歳齢) の尿を収集し、氷上で保存した。

RNA単離：

10

20

30

40

50

‘QIAampウイルスRNAミニキット’ (Qiagen, Hilden) を用いて300  $\mu$ Lの尿からRNAを単離し、50  $\mu$ Lの緩衝液AVEに溶出させて-80  $^{\circ}$ Cで保存した。

#### RT-PCR :

RT-PCRは、‘スーパースクリプトIII単工程RT-PCR系白金Taqハイフェデリティー’ (‘SuperScript III One Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity’) (Life Technologies) を用いて単工程で実施する。Tongら (2008) (J Clin Microbiol.46(8):2652-8) の記載にしたがうが、いくつかの小さな変更を加える：9マイクロリットルのRNAを12.5  $\mu$ Lの反応緩衝液 (2倍の各々0.4mMのdNTPおよび2.4mM MgSO<sub>4</sub>)、2  $\mu$ Lの硫酸マグネシウム (5mM)、0.25  $\mu$ Lのプライマー-RES-MOR-HEN-R (100  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ Lのプライマー-RES-MOR-HEN-F1 (100  $\mu$ M)、0.5  $\mu$ LのRNase阻害剤 (40U/  $\mu$ L) (Life Technologies) および0.5  $\mu$ Lの‘スーパースクリプトIII/白金Taqハイフェデリティー酵素ミックス’ (‘SuperScript III/Platinum Taq High Fidelity Enzyme Mix’) と混合する。続いて、サンプルを以下の温度プロフィールにしたがって処理する：60  $^{\circ}$ Cで1分、45  $^{\circ}$ Cで30分および94  $^{\circ}$ Cで2分。この処理の後で、サンプルを以下のように加熱する：94  $^{\circ}$ Cで15秒、48  $^{\circ}$ Cで30秒および68  $^{\circ}$ Cで30秒の45サイクルとともに68  $^{\circ}$ Cで5分の最終伸長工程。PCR生成物は、0.2  $\mu$ g/mLの臭化エチジウムを含むトリス酢酸EDTA緩衝液 (40mMトリス酢酸、1mM EDTA (pH8.3)) 中でのアガロースゲル電気泳動を用いて可視化される。約611bpのサイズを有する特異的PCRフラグメントをゲルから切り出し、‘ゲル/PCR DNAフラグメント抽出キット’ (Geneaid, Taiwan) を用いて精製する。

#### 配列決定 :

配列決定プライマーとしてRES-MOR-HEN-R (10  $\mu$ M) およびRES-MOR-HEN-F1 (10  $\mu$ M) を用いサングーのジデオキシ法を適用することによって、PCRフラグメントを配列決定する。得られたクロマトグラムを‘BioEdit’ソフト (バージョン7.2.4) を用いて編集し、NCBIウェブサイトでの‘ベーシックローカルアラインメント検索ツール’ (‘Basic Local Alignment Search Tool’) によりアラインメントを実施する。

#### 【実施例2】

#### 【0032】

#### FPaV-2の単離

ウイルスの培養のために、75cm<sup>2</sup>の細胞培養フラスコにLLC-MK2およびCrFK細胞を、5%二酸化炭素を含む雰囲気下で (37  $^{\circ}$ C および90%湿度)、5%FBS含有DMEM (ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を含む) に播種する。70 - 80%コンフルエンス時に、細胞を1mLの尿および5mLのDMEM (ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む) の混合物で一晩感染させる (37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> および90%湿度)。

24時間後に、感染培養液を8mLの培養液 (DMEM、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、5%FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシン) に置き換え、表示の条件でさらに6日間培養する。この感染の細胞培養上清をさらに3回継代する。その後、この細胞培養上清の600  $\mu$ Lを、ネコパラミクソウイルスの存在について実施例1に記載したように試験する。図1はそのような実験の結果を示す。

#### 【実施例3】

#### 【0033】

#### FPaV-2の免疫蛍光検出

FPaV-2感染を検出するために、LLC-MK2細胞を実施例2に記載したように感染させ、免疫蛍光技術を用いてFPaV-2特異的抗体で染色する。

この目的のために、付着性細胞を5日間の感染期間後にPBSで洗浄し、続いて80%アセトンで-20  $^{\circ}$ C、10分間固定する。細胞をPBSで2回洗浄し、非特異的結合をPBS中の5%BSAとの37  $^{\circ}$ C 1時間のインキュベーションによってブロックする。その後抗FPaV-2抗体 (ウサギ抗FPaV-2ヌクレオキャプシドポリクロナル抗体) (PBSに1%のBSA中に最終濃度1  $\mu$ g/mL) との37  $^{\circ}$ Cで1時間のインキュベーション工程が続く。細胞をPBSで3回洗浄し、その後で‘ヤギ抗ウサギIgG(H+L) 二次抗体-Alexa Fluor (商標)488複合物’ (Thermo Fisher Scientific) を最終希釈1:1000 (PBSに1%のBSA中) で適用する。37  $^{\circ}$ Cで1時間のインキュ

ベーション時間の後で、細胞を2回PBSで洗浄し、蛍光顕微鏡を用いて細胞をFPaV-2の存在についてスクリーニングする。結果は図2に示される。

【実施例4】

【0034】

FPaV-2の感染スペクトル

FPaV-2のin vitro感受性を分析するために、種々の細胞株を感染させ、続いて実施例3に記載したように免疫蛍光技術を用いて分析する。表3はそのような実験の結果を反映する。

細胞株	組織	種	FPaV-2感染
CrFK	腎臓、上皮	ネコ	陽性
CrFK/CatSLAM	腎臓、上皮、 ネコCD150をトランスフェクト	ネコ	陽性
FE	胚性、上皮および 線維芽細胞	ネコ	陽性
Vero (CCL-81)	腎臓、上皮	ベルベットマンキー	陽性
LLC-MK2	腎臓、上皮	アカゲザル	陽性
BHK-21	腎臓、線維芽細胞	シリアンゴールデン ハムスター	陽性

10

20

表3：FPaV-2感染のin vitroスペクトル

【実施例5】

【0035】

FPaV-2によるネコ初代腎細胞の感染

初代細胞もまたFPaV-2に感受性が否かを究明するために、初代ネコ腎細胞を単離する。この目的のために、安楽死させたネコから腎臓を無菌的状态下で取り出し、直ちに氷上で保存する。続いて、腎皮膜を剥がして皮質を小片に切断し、HBSSで5回洗浄する。これらの組織片を続いてHBSS中の0.1%トリプシンを用い垂直シェーカーで処理する(37℃で20分)。細胞懸濁物を100µmのナイロンフィルターでろ過し、ろ液を400×gで10分間遠心分離する。細胞ペレットを完全腎培養液に再懸濁し、組織フラスコに播種し37℃、5%CO<sub>2</sub>および90%湿度でインキュベートする。完全腎培養液は、DMEMおよびHams-F12培養液の1:1混合物であり、以下が補充されている：‘インスリン-トランスフェリン-セレニウム-エタノールアミン’ (Thermo Fisher Scientific)、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、10%FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシン。図3はそのような実験の典型的な結果を示す。

30

先に記載した初代ネコ腎細胞を実施例2に記載したようにFPaV-2に感染させ、実施例3に記載したようにFPaV-2の存在について染色する。図4はそのような実験の結果を示す。

【実施例6】

【0036】

完全長FPaV-2ゲノムの決定及び分析

FPaV-2細胞培養単離株、ゴードンの全ゲノム配列を得るために、RNAを細胞培養上清から実施例1に記載したように単離する。続いて、実施例1に記載の一工程PCR系およびプライマーウォーキング手法を用いることによって、FPaV-2特異的PCR生成物を作製する。‘ゲル/PCR DNAフラグメント抽出キット’ (Geneaid) を用いてアガロースゲルから増幅生成物を単離し、対応する増幅プライマーを用いサンガーのジデオキシ法によって配列を決定する。各PCRフラグメントについて配列を2回決定する。FmoPV単離株M252A (Woo et al., (2012), Proc.Nat.Acad.Sci.109(14):5435-5440) (アクセッション番号: JQ411016.1) を用いて得られたFPaV-2配列のアラインメントの結果は表4に示されている。

40

50

ゲノム領域	ヌクレオチドの位置 (cRNA)	FmoPV-M252Aに対するヌクレオチド相同性 (nt/nt)	FmoPV M252Aに対するアミノ酸相同性 (aa/aa)
3'非翻訳領域(UTR)	1-107	84.1%(90/107)	適用できない
ヌクレオキャプシドタンパク質	108-1667	81.1%(1266/1560)	89.8%(466/519)
遺伝子間配列	1668-1780	39.8%(45/113)	適用できない
リントタンパク質	1781-3256	80.5%(1188/1476)	75.1%(369/491)
遺伝子間配列	3257-3388	44.7%(59/132)	適用できない
マトリックスタンパク質	3389-4402	83.3%(845/1014)	91.7%(309/337)
遺伝子間配列	4403-4949	48.6%(268/551)	適用できない
融合タンパク質	4950-6581	80.9%(1320/1632)	88.7%(482/543)
遺伝子間配列	6582-6958	56%(211/377)	適用できない
ヘマグルチニンタンパク質	6959-8746	80.5%(1435/1788)	85.9%(511/595)
遺伝子間配列	8747-8887	54.6%(77/141)	適用できない
ポリメラーゼタンパク質	8888-15496	82.5%(5453/6609)	90.9%(2001/2202)
5'非翻訳領域(UTR)	15497-16047	52.4%(289/551)	適用できない
全ゲノム	1-16047	78.2% (12546/16047)	適用できない

10

20

表4: FPaV-2 (ゴードン株) の全ゲノム配列の分析

nt: ヌクレオチド aa: アミノ酸

【実施例7】

【0037】

尿サンプル中のFPaV-2の存在頻度 (prevalence)

飼い猫におけるFPaV-2の存在頻度を明らかにするために、膀胱穿刺術によって尿サンプルを収集し、直ちに -20 で保存し、実施例1に記載したようにFPaV-2 RNAの存在について分析した。結果は表5に示されている。

30

詳細	疾患群	健常群
被検尿数	325	238
臨床的および検査所見	FLUTD、腎炎、無尿、多尿、 尿路結石症、膀胱炎、血尿、 白血球尿、脂肪尿、タンパク尿	尿路疾患の病歴無し
平均年齢	8 (1-19歳)	10 (0.5-21歳)
雄ネコ	72%	61%
RT-PCR陽性	4 (1.2%)	0 (0%)

40

表5: 飼い猫の尿サンプルにおけるFPaV-2の存在頻度

【実施例8】

【0038】

FPaV-2株の不均一性

実施例1に記載した手順を用いて、FPaV-2の第二の株をネコ泌尿器症候群を罹患する雄ネコから単離した。プライマーウォーキング手法およびサンガーのジデオキシDNA配列決定法を用いて、ウイルス単離株 ('TV25' と呼ぶ) を全ゲノム配列決定に付した。結果は

50

表6に要約され、ヌクレオチド配列は配列番号:8に示されている。

ゲノム領域	ヌクレオチドの位置 (cRNA)	‘ゴードン’ と ‘TV25’ とのヌクレオチド類似性 (ヌクレオチド)	‘ゴードン’ と ‘TV25’ との アミノ酸類似性 (アミノ酸)
3'非翻訳領域(UTR)	1-107	100%(107/107)	適用できない
ヌクレオキャプシドタンパク質	108-1667	99.2% (1547/1560)	99.2%(515/519)
遺伝子間配列	1668-1780	98.2%(111/113)	適用できない
リンタンパク質	1781-3256	99.6%(1470/1476)	98.8%(485/491)
遺伝子間配列	3257-3388	98.5%(130/132)	適用できない
マトリックスタンパク質	3389-4402	99.4%(1008/1014)	99.7%(336/337)
遺伝子間配列	4403-4949	98 %(540/551)	適用できない
融合タンパク質	4950-6581	99.4%(1622/1632)	99.4%(540/543)
遺伝子間配列	6582-6958	97.6%(368/377)	適用できない
ヘマグルチニンタンパク質	6959-8746	99.2%(1774/1788)	99.5%(592/595)
遺伝子間配列	8747-8887	97.9%(138/141)	適用できない
ポリメラーゼタンパク質	8888-15496	99.2%(6554/6609)	99.5%(2191/2202)
5'非翻訳領域(UTR)	15497-16047	99.4%(548/551)	適用できない
全ゲノム	1-16047	99.2%(15917/16047)	適用できない

表6：2つのFPaV-2単離株 ‘ゴードン’ および ‘TV25’ の全ゲノム配列の比較

【実施例9】

【0039】

FPaV-2の電子顕微鏡

15mLのFPaV-2細胞培養上清（実施例2に記載）を3000 x gで10分間（4）遠心分離し、続いて0.45 μmの硝酸セルロースフィルターでろ過した。ろ液を20%（w/w）シュクロースクッション上に重層し、100,000 x gで90分間（4）遠心分離した。続いてペレットを100 μLのPBSに懸濁し、ウイルスをフォームバー/炭素被覆300メッシュ銅グリッドに室温で5分間吸収させた。蒸留水による3回の洗浄工程の後で、ウイルス粒子を2%（w/v）酢酸ウラニルで30秒間染色した。透過型電子顕微鏡を用いるこのサンプルの分析は、典型的なパラミクソウイルスの形態学、すなわち100 - 150ナノメートルのサイズを有する多形性でエンベロープを有するウイルス粒子を示した。

【実施例10】

【0040】

FPaV-2感染ネコの抗体多様性

FPaV-2に自然感染したネコの抗体多様性を究明するために、半精製ウイルス粒子（実施例9で提示）を等体積のSDSローディング緩衝液（100mMトリス塩酸（pH6.8）、4%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム、0.2%（w/v）プロモフェノールブルー、20%（v/v）グリセロール、200mM β-メルカプトエタノール）と混合し、95℃で5分間加熱して8%ポリアクリルアミドゲルにローディングした。SDS-PAGE泳動緩衝液（25mMトリス、192mMグリシン、0.1% SDS）中での電気泳動（130V、30分）によってウイルスタンパク質を分離し、その後ニトロセルロース膜にプロットした。

PBS-T（0.05% tween 20）中の5%（w/v）脱脂粉乳を用いて室温で30分間ブロックした後、ブロック緩衝液で1：100に希釈したネコ血清サンプルとともに当該膜を4℃で一晩インキュベートした。膜を3回PBS-Tで洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合 -ネコ-

10

20

30

40

50

IgG抗体（ブロック緩衝液で1：1000に希釈）とともに室温で1時間インキュベートした。3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）をシグナル発生に用いた。図5Aに示すように、FPaV-2感染ネコは、ウイルス構造タンパク質の広域スペクトル（例えばポリメラーゼ-、リン-、ヌクレオキャプシド-およびヘマグルチニン-タンパク質）に対して抗体を生じることができる。ヌクレオキャプシドタンパク質に対して示されたように（図5C）標的抗体とのウイルスタンパク質の反応を基準にしてウイルスタンパク質に対する特異的反応を注釈した。

リンタンパク質は、リン-セリン抗体（QIAGEN N.V.のQ5）を用いて強くリン酸化されていることが証明され、計算分子量は53kDaから約75kDaにシフトした。分子量シフトのこの現象は、他のモルビリウイルス、例えば麻疹ウイルス（リンタンパク質 = 70kDa）およびイヌジステンパーウイルス（リンタンパク質 = 73kDa）でも知られている。ポリメラーゼ-およびヘマグルチニン-タンパク質に対する特異的反応の注釈は、それらのアミノ酸配列から予想される分子量を基準にして行った。

【実施例 1 1】

【0 0 4 1】

#### FPaV-2の血清中和試験の開発

FPaV-2に対する中和抗体を検出するために、血清中和アッセイ（SNT）を確立した。したがって、ネコ血清サンプルは56 で30分処理して補体因子が不活化された。これらの熱不活化血清サンプルの50 µLを、FPaV-2（'ゴードン'単離株）の100蛍光形成単位を含む50 µLのDMEMと混合し、続いて4 で1時間インキュベートした。この混合物を用いて、96ウェル細胞培養プレートのLLC-MK2細胞を37 で2時間感染させた。続いて当該血清/ウイルス混合物を除去し、以下（2%（v/v）熱不活化FBS、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、ペニシリンおよびストレプトマイシン）を含むDMEMと置き換えた。細胞を5日間インキュベートし（37、5%CO<sub>2</sub>および90%湿度）、続いて実施例3に記載したように免疫蛍光染色を実施した。試験血清サンプルの中和力価は、血清インキュベーションがないウイルスコントロールと比較したときウイルス感染性が50%減少する最高の試験血清希釈の逆数と定義される。

【実施例 1 2】

【0 0 4 2】

#### FPaV-2感染ネコの中和抗体のスクリーニング

実施例11に記載したSNTを用いて、FPaV-2自然感染ネコの血清サンプルを中和抗体の存在についてスクリーニングした。これらの実験の結果は表7に示されている。それら結果は、FPaV-2感染は当該ウイルスに対して高力価の中和抗体を誘発できることを明瞭に示している（表7のネコ血清サンプル98450およびTV25のFPaV-2-SNTの結果を参照されたい）。対照的に、イヌジステンパーウイルス感染ネコ（表7のサンプルCDV）およびネコパラミクソウイルス陰性ネコ（表7のサンプルTV36）は中和抗体を示さず、検出された抗体力価がFPaV-2特異的であることが際立つ。

ネコ血清ID	98450	TV25	TV26	CDV
尿のPCRの結果	FPaV2陽性		パラミクソウイルス陰性	
尿ウイルスRNAの存在	>14週間	>18箇月	—	—
IFA	陽性	陽性	陰性	陰性
FPaV-2SNT力価	320	320	<10	<10

表7：FPaV-2血清中和試験の結果

IFA：免疫蛍光アッセイ、CDV：イヌジステンパーウイルス陽性サンプル

【実施例 1 3】

【0 0 4 3】

#### ネコ血清サンプルのFPaV-2抗体のスクリーニングのためのELISAの開発

ジャーマンキャット集団のFPaV-2感染の頻度を明らかにするために、組換え発現ヌクレオキャプシドによるELISA系を確立した。したがって、FPaV-2ヌクレオキャプシド（配列

番号:2)の完全なオープンリーディングフレームを、制限酵素BamHIおよびXhoIを用いて発現ベクター‘pGEX-4T-1’でクローニングした。得られた組換え発現プラスミド(‘pGEX-Gordon-NC’)でケミカルコンピテント大腸菌(E. coli)BL21(DE3)を標準的技術によって形質転換し、100 µg/mLのアンピシリン含有LB-寒天で選別して、‘E. coli-Gordon-NC’ と称される大腸菌クローンを得た。このクローンを1000mLのLB培地(0.2%グルコースおよび100 µLアンピシリンを含む)に接種し、培養が最適密度の $A_{600nm}$ に達するまで37、200rpmで振盪した。当該時点で培養を22 に冷却し、組換えタンパク質の発現をイソプロピル -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)(最終濃度0.1mM)で誘発した。20時間(22 および220rpm)インキュベートした後、培養を3000 x gで20分間(4 )遠心分離し、得られたペレットを音波処理して大腸菌細胞を破壊した。組換えGST-融合タンパク質の精製は、製造業者の記載にしたがいグルタチオンセファロース4B(GE Healthcare Life Science)を用いて実施した。

10

ウェル当たり200ngの生成GST-Gordon-NCタンパク質でNunc MaxiSorp ELISAプレートを一晩4 で被覆し、続いてPBS-T(0.05% tween 20)による洗浄工程を3回実施した。自由なタンパク質結合部位をPBS-T(ブロッキング緩衝液)中の5%(w/v)脱脂粉乳を37 で30分間用いてブロックした。血清サンプルをブロッキング緩衝液で1:100に希釈し、プライムしたELISAプレートで2時間(37 )インキュベートした。PBS-Tによる3回の洗浄工程の後で、ウェルを二次抗体(ブロッキング緩衝液で1:10,000に希釈したヤギ抗ネコIgG(Fc):HRP(Bio-Rad))とともに37 で1時間インキュベートした。3回のPBS-T洗浄サイクルによって未結合抗体を洗い流し、サブストラクト溶液(OPD Substrate Tablets(Thermo Fisher Scientific))を各ウェルに適用し、酵素反応を2.5Mの硫酸によって停止させる前に22 で5分間インキュベートした。吸収を490nmで測定した。このELISA系のカットオフを明らかにするために、実施例3に記載した免疫蛍光試験を利用して、ネコの血清サンプルをFPaV-2特異的の反応についてスクリーニングした。結果は図6に示されている。IFAの結果をゴールドスタンダードとし、OD値と比較した。0.5より小さいOD値を有するサンプルをFPaV-2陰性と定義し、一方、0.7より高いOD値を有するサンプルをFPaV-2陽性と定義する。0.5と0.7の間のOD値を有する‘ボーダーライン’サンプルは、IFAでチェックしてELISAの結果を評価する必要がある。

20

このアプローチを用いて、飼い猫の230血清サンプルのうち13(=5.6%)がFPaV-2陽性であった。この結果は、ジャーマンキャット集団における比較的高い存在頻度を反映している。

30

#### 【実施例14】

#### 【0044】

##### FPaV-2の主要標的細胞

ネコPBMCをFPaV-2にin vitro感染させて、ネコ免疫細胞もまたFPaV-2の標的であるか否かを明らかにした。この目的のために、標準的なフィコール(Ficoll)密度勾配遠心分離を用いて、健康な雄のネコから末梢血単核球(PBMC)を単離した。PBMCをRPMI中の2%(v/v)フィットヘマグルチニン(M型、粗抽出物(Thermo Fisher Scientific))で処理し(37、4時間)、続いて37 で2時間FPaV-2を感染させるか(MOI=0.1)、または模擬感染させた。PBMCをPBSで1回洗浄し、続いて37 で4時間、5%CO<sub>2</sub>および90%湿度でインキュベートした。標準的なフローサイトメトリープロトコルを用い、細胞をCD4およびCD20表面マーカーについて染色した。2%(w/v)パラホルムアルデヒドによる固定工程(4、10分間)の後で、facs緩衝液(PBS(pH7.4)、3%FBS、0.1%アジ化ナトリウム)中の抗FPaV-2ヌクレオキャプシド抗体(実施例2参照)で0.5(w/v)サポニンとともに細胞を22 で30分間細胞内染色した。染色細胞をfacs緩衝液で3回洗浄し、LSRFortessa™(Becton Dickinson)細胞アナライザーを用いて分析した。図7に示すように、ネコCD4陽性T細胞はネコCD20陽性B細胞と同様にFPaV-2の標的細胞である。これらの結果は、FPaV-2の全身性様相が生じる得ることを明瞭に示している。

40

#### 【実施例15】

#### 【0045】

50

### 不活化FPaV-2によるウサギの免疫

この‘実証’実験の目的は、不活化FPaV-2による免疫が中和抗体を誘発するか否か、したがって強力なワクチン候補として機能できるか否かを明らかにすることであった。雄のウサギを以下のワクチン混合物で免疫した：1mLの熱不活化（56℃で3時間）FPaV-2株‘ゴードン’（ $1 \times 10^5$  FFU/mL、実施例2参照）および2mLのアジュバント（92.8% 鉱物油、3.48% Tween80、3.48% Span80、23% リポ多糖類）。陰性コントロール動物には、同体積のアジュバント混合模擬感染（ウイルス無し）細胞培養上清をFPaV-2の代わりに用いた。

免疫を以下のスキームにしたがって実施した：

- 初回免疫：前免疫血清の収集、続いて、ワクチン混合物の1mLを皮下および1mLを筋肉内に接種した。
- 2回目免疫：初回免疫から14日後、ワクチン混合物の1mLを皮下および1mLを筋肉内に接種した。
- 3回目免疫：2回目免疫から7日後、ワクチン混合物の1mLを皮下および1mLを筋肉内に接種した。
- 最終採血（ウサギは死亡）：3回目免疫から14日後。

実施例10に記載した全ウイルス調製物を用いて、最後の血清サンプルをまず初めにウェスタンブロット分析で試験した。この実験は、免疫後5週間で、ポリメラーゼタンパク質、リンタンパク質、ヘマグルチニンタンパク質およびヌクレオキャプシドタンパク質に対する特異的抗体がFPaV-2ワクチン接種動物で検出されることを示した（図8B参照）。観察された反応の特異性はこのウサギの前免疫血清の分析によって確認した。図8Aに示すように、ウイルス特異的抗体は免疫前には存在しなかった。加えて、免疫後血清サンプルの染色パターン（図8B）はFPaV-2自然感染ネコの結果と同一で、提示したウェスタンブロット分析の観察されるバンドのウイルス特異的特性を提供した。したがって、用いたFPaV-2ワクチン免疫処方、広域の抗FPaV-2抗体を動物で誘発できる。

これらの抗体が中和特性を有するか否かを明らかにするために、FPaV-2によるまたは模擬感染細胞培養上清による免疫から5週間後に収集した血清サンプルを用い、（実施例11に記載したように）FPaV-2-SNTを実施した。結果は表8に示されている。

ウサギの番号	1	2
免疫原	模擬感染細胞培養上清	FPaV-2感染（‘ゴードン株’） 熱不活化細胞培養上清
SNTの結果		
血清希釈 (免疫後5週間サンプル)	血清希釈のウイルス中和活性	
1:10	陰性	陽性
1:20	陰性	陽性
1:40	陰性	陽性
1:80	陰性	陽性
1:160	陰性	陽性
1:320	陰性	陰性
1:640	陰性	陰性
1:1280	陰性	陰性
SNT力価	< 10	160

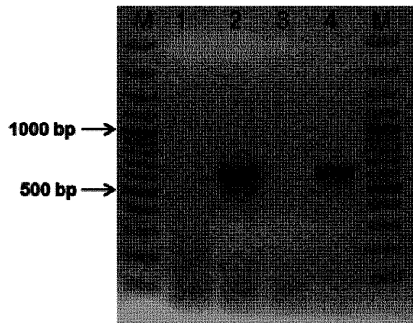
表8：免疫ウサギのFPaV-2-SNTの結果

ウサギを実施例15に記載したように熱不活化FPaV-2株‘ゴードン’で免疫するか（ウサギ2）または陰性コントロールとして細胞培養上清で免疫した（ウサギ1）。免疫から5週間後に、これらウサギの血清サンプルをFPaV-2に対する中和抗体の存在について試験した。表8の“陽性”はウイルスの増殖を意味しない。すなわち、ウイルス中和活性が存在する。ウイルス増殖は実施例3にしたがって免疫蛍光により測定された。

これらの実験は、熱不活化FPaV-2処方が高力価の中和抗体を誘発することができ、それら抗体はウイルス感染を阻害することができることを明瞭に示している。ウサギでの試験であったが、同様なワクチン免疫戦略が他の動物（例えば飼い猫）で有効であろうと推定できる。

【 図 1 】

Figure 1



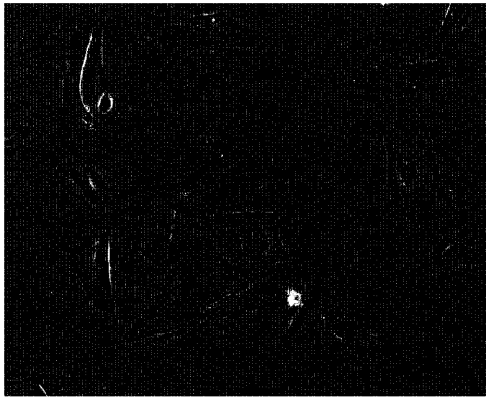
【 図 2 】

Figure 2



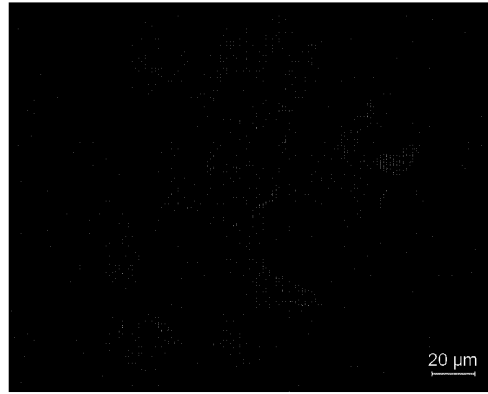
【 図 3 】

Figure 3



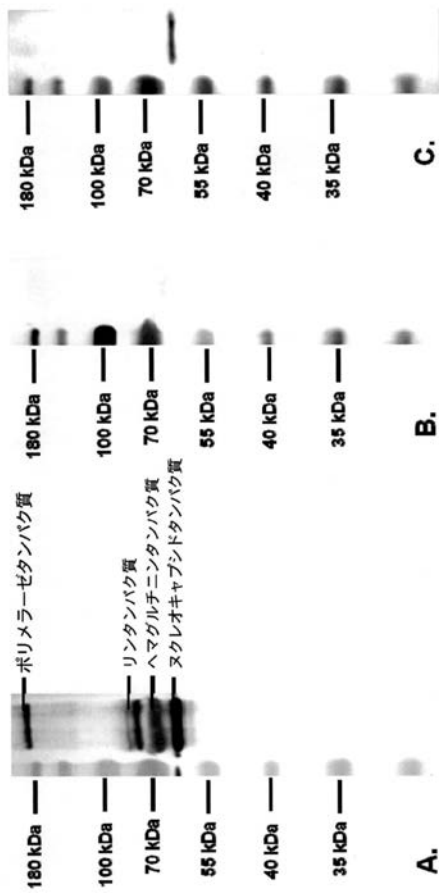
【 図 4 】

Figure 4



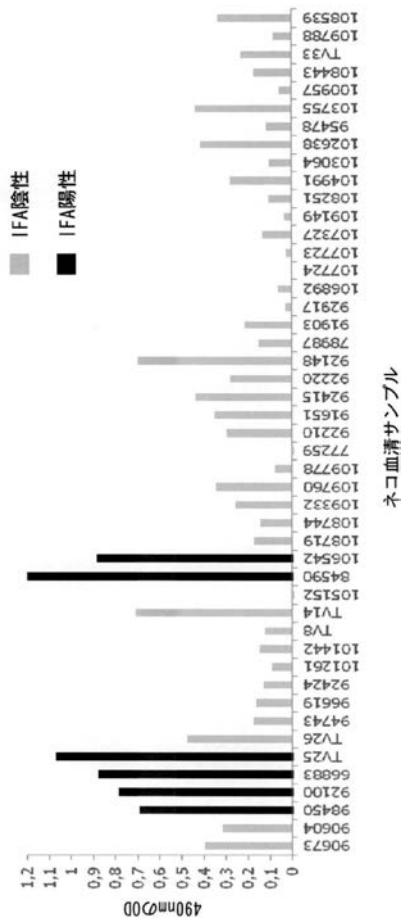
【 図 5 】

Figure 5



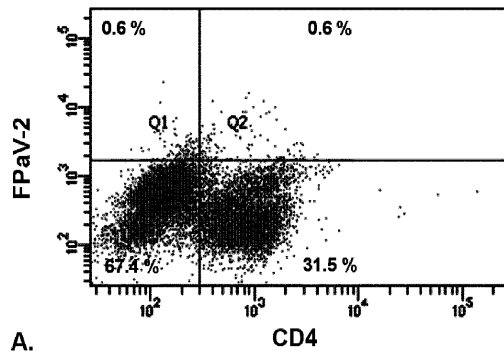
【 図 6 】

Figure 6

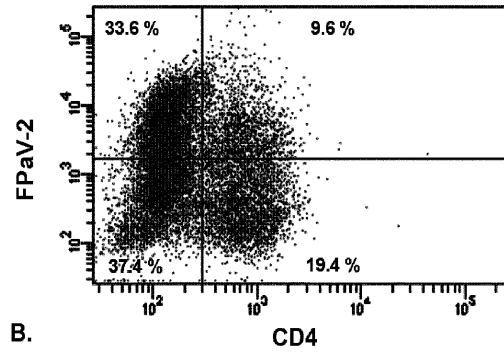


【 図 7 - 1 】

Figure 7



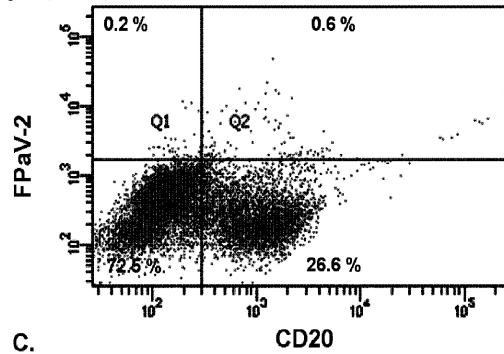
A.



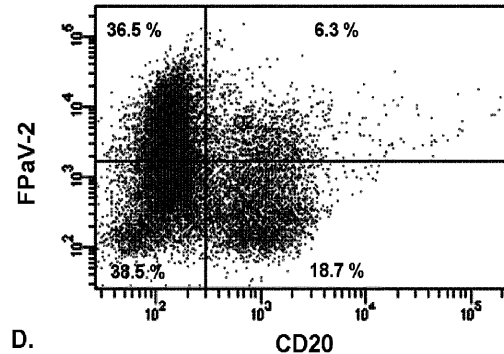
B.

【 図 7 - 2 】

Figure 7 (continued)



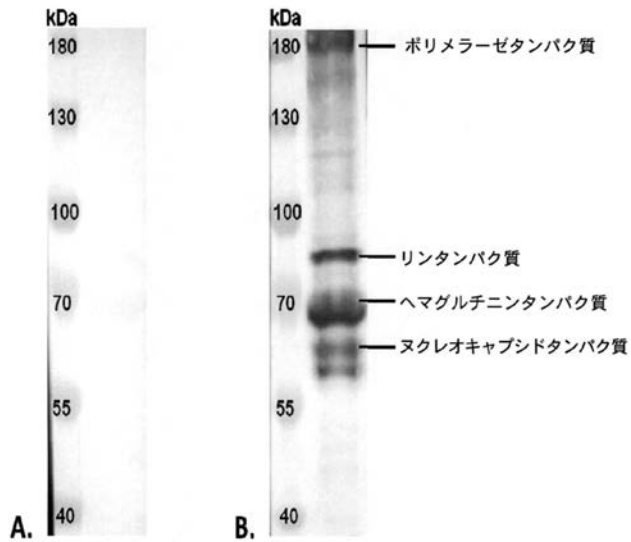
C.



D.

【 図 8 】

Figure 8



## 【配列表】

2019532667000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成31年2月20日(2019.2.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下から成る群から選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む核酸：

(a) 配列番号:1および配列番号:8から成る群から選択されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号:1または配列番号:8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一であるヌクレオチド配列；

(c) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) 配列番号:2と少なくとも90%同一、配列番号:3と少なくとも76%同一、配列番号:4と少なくとも92%同一、配列番号:5と少なくとも89%同一、配列番号:6と少なくとも86%同一、または配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および

(e) (a) から (d) のヌクレオチド配列のいずれかの相補鎖。

【請求項2】

以下を含む、請求項1に記載の核酸：

(i) 配列番号:2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列

(ii) 配列番号:3と少なくとも76%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(iii) 配列番号:4と少なくとも92%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(iv) 配列番号:5と少なくとも89%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、

(v) 配列番号:6と少なくとも86%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列、および

(vi) 配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列。

【請求項3】

パラミクソウイルスをコードする、請求項1または2に記載の核酸。

【請求項4】

パラミクソウイルスが、感染をヒトまたは非ヒト哺乳動物で誘発することができる、請求項3に記載の核酸。

【請求項5】

非ヒト哺乳動物がネコ科の動物である、請求項4記載の核酸。

【請求項6】

ゲノムが請求項1(a) から (d) または請求項2に記載の核酸に対して相補的なりボ核酸を含む、パラミクソウイルス。

【請求項7】

アクセッション番号CNCM 1-5123の下に寄託されるか、またはその任意の子孫であり、前記子孫が弱毒化されるかまたは弱毒化されていなくてもよい、パラミクソウイルス。

【請求項 8】

パラミクソウイルスが弱毒化されている、請求項6または7に記載のパラミクソウイルス。

【請求項 9】

請求項 1 から 5 のいずれかの項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 10】

請求項9に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 11】

下記のアミノ酸配列を有するポリペプチド：

- (a) 配列番号:2、配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7、配列番号:9、配列番号:10、配列番号:11、配列番号:12、配列番号:13および配列番号:14から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列；または
- (b) 配列番号:2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、
- (c) 配列番号:3と少なくとも76%同一であるアミノ酸配列、
- (d) 配列番号:4と少なくとも92%同一であるアミノ酸配列、
- (e) 配列番号:5と少なくとも89%同一であるアミノ酸配列、
- (f) 配列番号:6と少なくとも86%同一であるアミノ酸配列、若しくは
- (g) 配列番号:7と少なくとも91%同一であるアミノ酸配列。

【請求項 12】

請求項11に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 13】

- (a) 請求項6～8のいずれかの項に記載のパラミクソウイルス、
- (b) 請求項 1 または 2 のいずれかの項に記載の核酸、
- (c) 請求項11に記載のポリペプチド、
- (d) 請求項12に記載の抗体、
- (e) 異種または自己(ポリ)ペプチドに融合される、請求項11に記載のポリペプチド、を含む免疫原性組成物。

【請求項 14】

- (a) 請求項6～8のいずれかの項に記載のパラミクソウイルス、
- (b) 請求項 1 または 2 のいずれかの項に記載の核酸、
- (c) 請求項11に記載のポリペプチド、
- (d) 請求項12に記載の抗体、
- (e) 異種または自己(ポリ)ペプチドに融合される、請求項11に記載のポリペプチド、を含むワクチン。

【請求項 15】

病原性パラミクソウイルスによる対象動物の感染によって引き起こされる臨床徴候若しくは疾患を軽減または予防する方法で使用されるか、または病原性パラミクソウイルスによる対象動物の感染を治療または予防する方法で使用される、請求項13または14に記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 16】

パラミクソウイルスによって引き起こされる臨床的疾患に対抗して非ヒト対象動物を免疫する方法であって、当該対象動物に請求項13または14に記載の免疫原性組成物またはワクチンを投与する工程を含み、それによって前記ウイルスがパラミクソウイルス感染の臨床徴候を引き起こすことができないが、パラミクソウイルスの病原型に対して非ヒト対象動物に免疫を付与する免疫応答を誘発することができる、前記方法。

【請求項 17】

非ヒト対象動物がネコ科動物である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

パラミクソウイルスが請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスである、請求項 1 6 または 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

以下を含む、パラミクソウイルスと密接に関係する疾患に対してネコ科の動物をワクチン免疫するための、および/またはパラミクソウイルスと密接に関係するかまたはパラミクソウイルスによって引き起こされる1つ以上の臨床徴候の発生率若しくは重篤度を対象動物で軽減するためのキット：

- (a) ワクチンを当該対象動物に投与することができるディスペンサー；および
- (b) 請求項 1 3 または 1 4 に記載の免疫原性組成物またはワクチン。

【請求項 2 0】

以下の工程を含む、請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法：

- (i) 請求項 1 から 4 のいずれかの項に記載の核酸に特異的な1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブと当該サンプルを接触させる工程、および
- (ii) 前記パラミクソウイルスと前記1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブとの間の結合を検出する工程。

【請求項 2 1】

以下の工程を含む、請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法：

- (i) 請求項 1 2 に記載の抗体と当該サンプルを接触させる工程、および
- (ii) 前記パラミクソウイルスと前記抗体との間の結合を検出する工程。

【請求項 2 2】

請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスをサンプル中に検出する方法であって、前記パラミクソウイルスに対する抗体の有無を前記サンプル中に検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 2 3】

対象動物に由来するサンプルについて請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法であって、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか 1 項に記載のパラミクソウイルスを検出する方法を含み、前記パラミクソウイルスの存在が感染を表示する、前記診断方法。

【請求項 2 4】

対象動物に由来するサンプルについて請求項 6 または 7 に記載のパラミクソウイルスによる感染を診断する方法であって、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の前記パラミクソウイルスに対する抗体を検出する方法を含み、前記抗体の存在が前記パラミクソウイルスによる感染を表示する、前記診断方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/071392
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	C12N7/00 C12N15/45 C07K16/10 A61K39/155	C07K14/115 C12N15/63 C12N5/10
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) C12N C07K A61K		
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, Sequence Search, 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 2013/107290 A1 (GOVERNMENT HONG KONG SPECIAL ADMIN REGIO) 25 July 2013 (2013-07-25) page 23, lines 13-25; claims 3,6,7,9-14,18; figure 4; examples 2,6,7; sequence 3 page 29, paragraph 3 ----- -/--	1,3-5, 7-21
<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  16 October 2017		Date of mailing of the international search report  24/10/2017
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  Brenz Verca, Stefano

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/071392

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. C. Y. WOO ET AL: "Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 14, 3 April 2012 (2012-04-03), pages 5435-5440, XP055078968, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1119972109 FmoPV M252A (EMBL:JQ411016)</p> <p>-----</p>	1,3-5, 10,17, 19-21
X	<p>JP 2015 198654 A (KYORITSU SEIYAKU KK) 12 November 2015 (2015-11-12) paragraphs [0083], [0085]; claims 5-8; examples 1,5; sequence 13</p> <p>-----</p>	1,3-5, 10-16
X	<p>S. SAKAGUCHI ET AL: "Genetic diversity of feline morbilliviruses isolated in Japan", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY., vol. 95, no. Pt 7, 11 April 2014 (2014-04-11), pages 1464-1468, XP055415460, GB ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.065029-0 the whole document</p> <p>-----</p>	1,3-5, 10,11, 17-21
X	<p>MARCACCI MAURILIA ET AL: "Genome characterization of feline morbillivirus from Italy", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 234, 4 May 2016 (2016-05-04), pages 160-163, XP029569230, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2016.05.002 EMBL:KT825132; the whole document</p> <p>-----</p>	1,3-5,10
A	<p>SIEG MICHAEL ET AL: "Discovery of new feline paramyxoviruses in domestic cats with chronic kidney disease", VIRUS GENES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BOSTON, US, vol. 51, no. 2, 12 August 2015 (2015-08-12), pages 294-297, XP035535220, ISSN: 0920-8569, DOI: 10.1007/S11262-015-1232-7 [retrieved on 2015-08-12] the whole document</p> <p>-----</p>	1-21

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/071392

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013107290 A1	25-07-2013	CN 104471064 A EP 2804948 A1 HK 1208495 A1 US 2013230529 A1 WO 2013107290 A1	25-03-2015 26-11-2014 04-03-2016 05-09-2013 25-07-2013
JP 2015198654 A	12-11-2015	NONE	

## 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 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 Q 1/6888 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6888	Z
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. S P A N

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74) 代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74) 代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72) 発明者 ヴァーレンカンブ トマス ダブリュー

ドイツ連邦共和国 0 4 4 1 6 マルククレーベルク ヴィーゼンヴェーク 8

(72) 発明者 ジーク ミハエル

ドイツ連邦共和国 0 6 7 1 2 ツァイツ ツム ヴァーグナー 7 0

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ10 QR55 QR62 QR72 QR79 QS32

4B065 AA95X AA95Y AB01 BA02 CA24 CA45 CA46

4C084 AA02 AA03 BA01 BA02 MA02 NA14 ZB33 ZC61

4C085 AA03 AA13 BA57 EE03

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZB33 ZC61

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA20 MA02 NA14 ZB33 ZC61

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 DA75 EA31 EA53 FA74

专利名称(译)	新型副粘病毒及其使用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019532667A</a>	公开(公告)日	2019-11-14
申请号	JP2019530543	申请日	2017-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草EM为主硬 贝林格尔.英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草有限公司		
发明人	ヴァーレンカンプトマス ダブリュー ジーク ミハエル		
IPC分类号	C12N15/45 C12N15/63 C12N7/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/115 C07K16/10 C12Q1/6888 A61K39/155 A61K35/76 A61K31/7088 A61K38/02 A61K39/395 A61P31/12 A61P31/16 A61P37/04 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61P31/12 A61P31/16 A61P37/04 C12N7/00 C12N2760/18021 C12N2760/18022 C12N2760/18034 A61K39/155 A61K39/39 A61K2039/54 A61K2039/552 C07K14/005 C07K16/1027 G01N33/56983 G01N2333/115		
FI分类号	C12N15/45.ZNA C12N15/63.Z C12N7/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/115 C07K16/10 C12Q1/6888.Z A61K39/155 A61K35/76 A61K31/7088 A61K38/02 A61K39/395.D A61P31 /12.171 A61P31/16 A61P37/04 G01N33/53.D G01N33/569.L		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR79 4B063 /QS32 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB33 4C084 /ZC61 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/BA57 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZB33 4C086/ZC61 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087 /CA20 4C087/MA02 4C087/NA14 4C087/ZB33 4C087/ZC61 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA75 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 须田博之 山崎 一夫 服部博信		
优先权	2016185761 2016-08-25 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及新型猫副粘病毒。本发明的副粘病毒是(-) ssRNA病毒，其在一方面具有与SEQ ID NO : 1或SEQ ID NO : 8所示的核酸互补的基因组。本发明进一步涉及相应的核酸和多肽，抗体和疫苗。此外，本发明涉及本发明副粘病毒的医学用途和诊断方法。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/45 (2006.01)	C 1 2 N 15/45 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 6
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-530543 (P2019-530543)	(71) 出願人	505258715
(86) (22) 出願日	平成29年8月24日 (2017. 8. 24)		ベリンガー インゲルハイム フェトメ
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月20日 (2019. 2. 20)		ディカ ゲームベーパー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/071392		Boehringer Ingelhei
(87) 国際公開番号	W02018/037100		m Vetmedica GmbH
(87) 国際公開日	平成30年3月1日 (2018. 3. 1)		ドイツ国 5 5 2 1 6 インゲルハイム
(31) 優先権主張番号	16185761.0		アム ライン ビンゲル シュトラッセ
(32) 優先日	平成28年8月25日 (2016. 8. 25)		1 7 3
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100094569
			弁理士 田中 伸一郎
		(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100108070
			弁理士 須田 洋之
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なバクテリオファージおよびその使用