

(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2004-531220

(P2004-531220A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

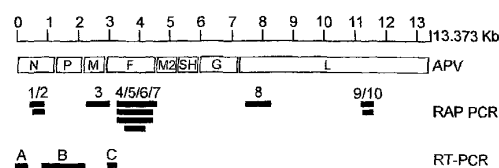
| | | |
|------------------------------------|-----------------|-------------------|
| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 31/7105 | A 6 1 K 31/7105 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 35/64 | A 6 1 K 35/64 | 4 B O 6 5 |
| A 6 1 K 35/74 | A 6 1 K 35/74 | A 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 35/76 | A 6 1 K 35/76 | 4 C O 8 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 245 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-557978 (P2002-557978) | (71) 出願人 | 503257871 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年1月18日 (2002.1.18) | | ヴィロノヴァティブ, ベスローテン ヴェンノートシャップ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年7月17日 (2003.7.17) | | オランダ国 エヌエルー 3 0 6 2 ピーエー |
| (86) 国際出願番号 | PCT/NL2002/000040 | | ー ロッテルダム, ブルゲメスター オウドラーン 5 0 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/057302 | (74) 代理人 | 100091096 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年7月25日 (2002.7.25) | | 弁理士 平木 祐輔 |
| (31) 優先権主張番号 | 01200213.5 | (74) 代理人 | 100118773 |
| (32) 優先日 | 平成13年1月19日 (2001.1.19) | | 弁理士 藤田 節 |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | (74) 代理人 | 100096183 |
| (31) 優先権主張番号 | 01203985.5 | | 弁理士 石井 貞次 |
| (32) 優先日 | 平成13年10月18日 (2001.10.18) | (72) 発明者 | デ ジョン, ジャン, コルネリウス |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | オランダ国 エヌエルー 2 8 0 6 イーエ |
| | | | イチ ホウダ, クルゲルラーン 2 0 5 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 感受性哺乳動物において気道疾患を引き起こすウイルス

(57) 【要約】

本発明はウイルス学分野に関する。本発明は、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれ、系統的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される、単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV)、ならびにその成分を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属し、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される上記ウイルス。

【請求項 2】

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスの核酸配列を決定し、その配列を、最尤系統樹を100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製する系統樹解析で試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM（パリ）にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される上記ウイルス。

【請求項 3】

トリ・ニューモウイルスがAPV C型（APV-C）からなる、請求項 2 に記載のウイルス。

【請求項 4】

前記核酸配列が、前記ウイルスのウイルスタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項 5】

前記オープンリーディングフレームがN、P、MおよびFタンパク質をコードするORFの群から選ばれる、請求項 4 に記載のウイルス。

【請求項 6】

前記オープンリーディングフレームがSHまたはGタンパク質をコードするORFの群から選ばれる、請求項 5 に記載のウイルス。

【請求項 7】

図6に示す配列に系統学的に対応する核酸または機能性断片を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項 8】

CNCM（パスツール研究所、パリ）にI-2614として寄託されているMPV単離体または系統学的にそれに該当するウイルス単離体を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項 9】

気道疾患に罹患しているヒトから単離される、請求項 8 に記載のウイルス。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のウイルスから得られる、単離された核酸もしくは組換え核酸またはそのMPV特異的機能性断片。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の核酸または請求項 11 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の核酸によりコードされる、単離されたタンパク質様分子もしくは組換えタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片を含む抗原。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の抗原に対して特異的な抗体。

【請求項 16】

ウイルス単離体をMPVとして同定する方法であって、そのウイルス単離体またはその成分

10

20

30

40

50

を、請求項 15 に記載の抗体と反応させることを含む上記方法。

【請求項 17】

ウイルス単離体を MPV として同定する方法であって、そのウイルス単離体またはその成分を、請求項 10 に記載の核酸と反応させることを含む上記方法。

【請求項 18】

前記 MPV がヒト MPV を含む、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法により、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれ、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖 RNA ウイルスとして同定されるウイルス単離体

10

【請求項 20】

哺乳動物の MPV 感染をウイルス学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを請求項 10 に記載の核酸または請求項 15 に記載の抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法。

【請求項 21】

哺乳動物の MPV 感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを請求項 13 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片または請求項 14 に記載の抗原と反応させることにより、そのサンプル中の MPV またはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含む上記方法。

20

【請求項 22】

MPV 感染を診断するための診断キットであって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 10 に記載の核酸、請求項 13 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 14 に記載の抗原、および / または請求項 15 に記載の抗体を含む上記キット。

【請求項 23】

医薬組成物を製造するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 10 に記載の核酸、請求項 11 に記載のベクター、請求項 12 に記載の宿主細胞、請求項 13 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 14 に記載の抗原、または請求項 15 に記載の抗体の使用。

30

【請求項 24】

MPV 感染の治療または予防のための医薬組成物を製造するための、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

気道疾患の治療または予防のための医薬組成物を製造するための、請求項 23 または 24 に記載の使用。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 10 に記載の核酸、請求項 11 に記載のベクター、請求項 12 に記載の宿主細胞、請求項 13 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 14 に記載の抗原、または請求項 15 に記載の抗体を含む医薬組成物。

40

【請求項 27】

請求項 26 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、MPV 感染の治療または予防方法。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、気道疾患の治療または予防方法。

【請求項 29】

前記個体がヒトを含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

50

気道疾患の治療に有用な抗ウイルス剤を得る方法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルスを含む細胞培養物または実験動物を樹立し、その培養物または動物を候補の抗ウイルス剤で処理し、そのウイルスまたはその培養物もしくは動物の感染に及ぼすその剤の効果を判定し、目的とする効果を有する抗ウイルス剤を選び出すことを含む上記方法。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載の方法により得られる、抗ウイルス剤。

【請求項 3 2】

医薬組成物を製造するための、請求項 3 1 に記載の抗ウイルス剤の使用。

【請求項 3 3】

気道疾患の治療のための医薬組成物を製造するための、請求項 3 3 に記載の使用。

【請求項 3 4】

MPV感染の治療のための医薬組成物を製造するための、請求項 3 2 または 3 3 に記載の使用。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 に記載の抗ウイルス剤を含む医薬組成物。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、MPV感染の治療または予防方法。

【請求項 3 7】

請求項 3 5 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、気道疾患の治療または予防の方法。

【請求項 3 8】

前記個体がヒトを含む、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

動物のMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その動物のサンプルをトリ・ニューモウイルス (APV) の成分と特異的に反応する核酸もしくは抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体もしくはその成分の存在を判定することを含み、但し、その核酸もしくは抗体がMPVの成分と交差反応性である、上記方法。

【請求項 4 0】

動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その動物のサンプルをAPV単離体もしくはその成分から誘導されるタンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることにより、そのサンプル中のMPVもしくはその成分に対する抗体の存在を判定することを含み、但し、その分子、断片または抗原が、MPVの成分と本質的に相同であるように選ばれる、上記方法。

【請求項 4 1】

鳥類のAPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルを請求項 1 0 に記載の核酸または請求項 1 5 に記載の抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体もしくはその成分の存在を判定することを含み、但し、その核酸もしくは抗体がAPVの成分と交差反応性である、上記方法。

【請求項 4 2】

鳥類のAPV感染を血清学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルを請求項 1 3 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片または請求項 1 4 に記載の抗原と反応させることにより、そのサンプル中のAPVもしくはその成分に特異的な抗体の存在を判定することを含み、但し、その分子、断片または抗原が、本質的にAPVの成分と相同であるように選ばれる、上記方法。

【請求項 4 3】

前記APVがAPV-Cを含む、請求項 3 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

APV特異的抗体を検出するように設計された診断試験の、MPVに対する抗体を検出するため

10

20

30

40

50

の使用。

【請求項 4 5】

前記試験が、酵素免疫アッセイ (EIA) を含む、請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

APV特異的抗体を検出するように設計された診断試験においてサンプルを試験することを含む、サンプル中のMPVに対する抗体の検出方法。

【請求項 4 7】

前記試験が酵素免疫アッセイ (EIA) を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、ウイルス学の分野に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

過去何十年もの間、哺乳動物の疾患、特にヒトにおける気道疾患 (RTI) の幾つかの原因物質が同定されてきた⁷。哺乳動物に罹患するRTIの古典的な原因物質は、ヒト (hRSV) およびウシやヒツジなどの反芻動物 (bRSVおよび/またはoRSV) に見られるニューモウイルス (Pneumovirus) 属に属する呼吸器合胞体ウイルスである。ヒトRSVでは、相互交差中和アッセイ (reciprocal cross neutralization assay)、免疫学的アッセイにおけるGタンパク質の反応性、およびG遺伝子のヌクレオチド配列における違いを用いて、2つのhRSV抗原亜群が定義される。それらの亜群内では、アミノ酸 (aa) 配列は94% (亜群A) または98% (亜群B) の同一性を示すが、亜群間では53%のアミノ酸配列同一性しか見られない。モノクローナル抗体、RT-PCRアッセイおよびRNase保護アッセイによれば、亜群内では更なる変異性が見られる。両者の亜群のウイルスは、世界的に分布しており、1シーズンの間存在できる。感染は、すでに免疫が存在している場合にも起こり、抗原性変異は再感染を起こすのに厳密には必要ではない。例えば、Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1):p.1-15; Collins, P.L., McIntosh, K.およびChanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Fields virology, B.N. Knipe, Howley, P.M.編, 1996, Philadelphia: Lippencott-raven. 1313-1351; Johnson, P.R., ら, The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. 84(16):p.5625-9; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial virus (RSV) of the Genus Pneumovirus, in The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury, 編. 1991, Plenum Press: New York. p.103-153を参照されたい。

20

30

【0 0 0 3】

もう1つの古典的なニューモウイルスは、マウス肺炎ウイルスであり、通常は実験用マウスだけに見られる。しかし、哺乳動物で見られる疾患の中には、依然として既知の病原体が原因であるとするすることができないものがある。

40

【発明の開示】

【0 0 0 4】

本発明は、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のニューモウイルス亜科 (Pneumovirinae) に属し、系統学的にはメタニューモウイルス (Metapneumovirus) 属に該当するものとして同定可能である、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV) を提供する。このウイルスは、そのウイルスの核酸配列を決定し、その配列を系統学的解析 (例えば、最尤系統樹を100のブートストラップおよび3のジャンプを用いて作製する) において試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス (TRTV) としても知られるトリ・ニューモウイルス (APV) の本質的に鳥類性のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM (パリ) にI-2614として寄託され

50

ているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定されうる。この系統学的解析では、比較対照のアウトグループとして非MPVの核酸配列を得ることがしばしば有用であり、非常に有用なアウトグループの単離体は、例えば本明細書の図5に示すように、トリ・ニューモウイルスの血清型C (APV-C) から得ることができる。

【0005】

系統学的解析は、ウイルスをMPVとして同定するための便利な方法を提供するが、本明細書では、そのウイルスまたはそのウイルス由来のウイルスタンパク質もしくは核酸を同定するための、(もっと粗雑ではあるが)おそらくもっと簡単な他の方法も幾つか提供される。経験的に、MPVは、本明細書において配列または寄託により特定した単離体、ウイルスタンパク質または核酸と比較した場合の、同定しようとするウイルス、たんぱく質または核酸の相同性のパーセンテージにより同定することができる。一般に、ウイルス種、特にRNAウイルス種は、そのウイルスのクラスターがそのメンバー間で異質性(heterogeneity)を示す擬似種を構成することが多いことが知られている。したがって、各単離体は、本明細書中で提供される種々の単離体のうちの1つと、多少異なる関係(%)を有する可能性があると予期される。

10

【0006】

寄託ウイルスI-2614と比較しようとする場合に、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス(MPV)であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属し、かつ、そのウイルスのアミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列が、APV-Cと比較して、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体と、Lタンパク質、Mタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質またはFタンパク質について、本明細書に記載されたパーセンテージよりも本質的に高いアミノ酸相同性のパーセンテージを有することを判定することによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定されうる上記ウイルスを提供する。あるいは、同様に、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属する、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス(MPV)が、そのウイルスの核酸配列を決定し、その核酸配列が、APV-Cと比較して、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に対して、本明細書の後記で特定されるLタンパク質、Mタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質またはFタンパク質をコードする核酸について本明細書中で特定されるパーセンテージよりも本質的に高い核酸同一性のパーセンテージを有することを判定することによって系統学的にメタニューモウイルス属に該当すると同定されうるものとして提供される。

20

30

【0007】

ここでもまた、経験的に、MPVは、同定が必要な単離体またはその単離体のウイルスタンパク質もしくは核酸が、単離体00-1または99-1をそれぞれの比較の単離体として両者のそれぞれの群について本明細書中で特定される相同性のパーセンテージの境界に含まれる相同性のパーセンテージを有するならば、本明細書中で同定されるMPVの2つの血清学的群の一方に属する、と考えることができる。しかし、相同性のパーセンテージがそれより小さいか、あるいは更にウイルス単離体を例えばAPV-Cと区別する必要がある場合は、本明細書で特定される系統学的解析を用いることが更に好ましく推奨される。

40

【0008】

ここでもまた、相同性のパーセンテージの決定に他の単離体が選択される場合、上記のパーセンテージは多少変動する可能性があることに留意すべきである。

【0009】

このMPVが提供されると、本発明は、特に哺乳動物における疾患、更にはヒトにおける疾患、特に呼吸系疾患の診断および/または治療に用いられる診断手段および方法ならびに治療手段および方法を提供する。しかし本発明はまた、本質的に哺乳動物性のMPVと本質的に鳥類性のAPV(特にAPV-C)との遺伝学的関連(遠縁ではあるが)に基づき、トリの疾患の診断および治療に用いられる手段および方法も提供する。ウイルス学では、特定のウイルス感染の診断および/または治療は、その感染を引き起こすその特定のウイルスに最

50

も特異的な試薬を用いて実施することが最も推奨される。この場合、これは、上記のMPV感染の診断および/または治療が、MPVに最も特異的な試薬を用いて実施されるのが好ましいことを意味する。しかし、これは、例えばもっと容易に入手可能であり当面の課題に十分に対処するという理由から、それほど特異的ではないが十分に交差反応性である試薬が代わりに用いられる可能性を決して排除するものではない。本明細書では、例えば、APVから誘導される試薬（特にAPV-Cから誘導される試薬）を用いて哺乳動物においてMPV感染のウイルス学的および/または血清学的な診断を行うことが提供され、本明細書の「詳細な説明」では、例えば、哺乳動物におけるMPV感染の十分に信頼できる血清学的診断が、トリにおいてAPV抗体を検出するように特に設計されたELISAを用いることによって達成可能であることが示されている。この目的のための特定の有用な試験としては、（例えば血清または卵黄中の）APV抗体の検出用に設計されたELISA試験であり、その1つの商業的に入手可能なものは、SVANOVA Biotech AB（Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden）により製造されているAPV-Ab SVANOVIR（登録商標）として知られている。逆の状況も該当し、本明細書では、例えば、MPVから誘導される試薬を用いて、哺乳動物におけるAPV感染のウイルス学的および/または血清学的な診断を実施することが提供され、本明細書の「詳細な説明」では、例えば、鳥類におけるAPV感染の十分に信頼できる血清学的診断が、MPV抗体を検出するように設計されたELISAを用いることによって達成可能であることが示されている。抗原および抗体が「鍵と鍵穴（lock-and-key）」関係を有していることを考慮すれば、種々の抗原の検出は、十分な交差反応性を有する適切な抗体を選択することにより達成できる。勿論、そのような交差反応性に基づく場合、種々のウイルスの種々の（糖）タンパク質間に存在するアミノ酸相同性の指標に基づいて試薬（例えば抗原または抗体）を選ぶことが最も良く、その結果最も相同なタンパク質に関連する試薬が、上記の交差反応性に基づく試験で使用するのに最も有用である。

10

20

30

【0010】

核酸検出の場合、種々のウイルスの異種の核酸配列に基づいてプライマーまたはプローブを設計する（すなわち、本質的に哺乳動物性または鳥類性のメタニューモウイルス間の差異を検出するプライマーまたはプローブを設計する）のではなく、高い相同性を示すウイルス特異的核酸配列のストレッチに基づいてプライマーまたはプローブを設計または選択すればよいので、本発明の方法はさらに簡単である。一般に、核酸配列の場合、90%以上の相同性パーセンテージがあれば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いる診断試験においてその試験が依存する交差反応性が十分確保される。

【0011】

本発明は、例えば、動物、特に哺乳動物、更に具体的にはヒトのMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その動物のサンプルを本発明によるMPV特異的核酸または抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法、ならびに哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを本発明によるMPV特異的タンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVまたはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含む上記方法を提供する。また、本発明は、MPV感染を診断するための診断キットであって、本発明によるMPV、MPV特異的核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および/または抗体を含み、さらに好ましくはそのMPV、MPV特異的核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および/または抗体の検出手段をも含む上記キットを提供する。なおこの検出手段としては、例えば、蛍光団などの励起可能な基、または当業界で使用される酵素的検出システム（好適な診断キット様式の例としては、IF、ELISA、中和アッセイ、RT-PCRアッセイが含まれる）が挙げられる。未同定のウイルス成分またはその合成類似体（例えば核酸、タンパク質様分子もしくはその断片など）をMPV特異的なものとして同定できるか否かを判定するためには、その成分の核酸またはアミノ酸の配列を、例えばその核酸またはアミノ酸のストレッチ（好ましくは、（それぞれ）少なくとも10、更に好ましくは少なくとも25、更に好ましくは少なくとも40のヌクレオチドまたはアミノ酸からなるもの）について、例えば本明細書中で提供され

40

50

るような系統学的解析を用いて既知のMPV配列および既知の非MPV配列（APV-Cが好ましく使用される）との配列相同性比較により解析すればよい。そのMPV配列または非MPV配列との関連性の程度に応じて、その成分または合成類似体が同定できる。

【0012】

本発明はまた、哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルをAPV（好ましくは血清型C）から誘導される交差反応性核酸またはそのAPVと反応性である交差反応性抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法、ならびに、哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルをAPVから誘導されるタンパク質様分子またはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のAPVとも反応する交差反応性抗体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法を提供する。更に、本発明は、本来はAPVまたはAPV抗体の検出用に設計された診断キットの、MPV感染を診断するため、特にヒトにおけるMPV感染を検出するための使用を提供する。

10

【0013】

また、本発明は、鳥類におけるAPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルをMPVから誘導される交差反応性核酸またはMPVと反応性である交差反応性抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法、ならびに、鳥類のAPV感染を血清学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルをMPVから誘導されるタンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVとも反応する交差反応性抗体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法を提供する。更に、本発明は、本来はMPVまたはMPV抗体の検出用に設計された診断キットの、APV感染を診断するため、特にニワトリ、アヒルまたは七面鳥などの家禽におけるAPV感染を検出するための使用を提供する。

20

【0014】

上記で述べたように、治療の場合、見出された交差反応性を用いて同様の使用を実施することが可能であるが、これは特に、当面の状況によって、より相同性の高い方法がそれほど簡単ではない場合に実施されうる。MPV感染に対する緊急のワクチン接種のように、待つことができないワクチン接種は、例えば、より相同性の高いMPVワクチンが入手不可能な場合は、APV（好ましくはC型）の単離体から誘導されるワクチン製剤を用いて行うことが可能であり、またその逆に、APV感染に対するワクチン接種をMPVから誘導されるワクチン製剤を用いて行うことも考えられる。また、逆遺伝学的技法により、ワクチンとして有用なキメラAPV-MPVウイルス構築物の作製が可能になり、これはそれぞれの株の各々の単離体を望ましいレベルまで弱毒化する分野とは十分に異なるものである。同様の逆遺伝学的技法により、ワクチン製剤において使用するためのキメラパラミクソウイルス-メタニューモウイルス構築物（例えばRSV-MPVまたはPI3-MPV構築物）を作製することも可能になる。そうした構築物は、気道疾患を撲滅するための混合ワクチンとして特に有用である。

30

【0015】

したがって、本発明は、新規な原因物質、すなわち、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するが、古典的なニューモウイルスとしては同定されず、かつ、メタニューモウイルス属に属する、単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（本明細書中ではMPVとも呼ぶ）、ならびにMPV特異的成分またはその合成類似体を提供する。メタニューモウイルスに類似する哺乳動物性ウイルス、すなわち本質的にそのウイルスの天然の宿主として機能する哺乳動物から単離できるメタニューモウイルス、あるいはその哺乳動物において疾患を引き起こすメタニューモウイルスは、現在のところ、見出されていない。メタニューモウイルスは、天然の宿主または疾患の原因物質によって基本的には家禽に限定されると一般には考えられており、トリ・ニューモウイルスとしても知られている。近年、アヒルのAPV単離体が記載され（FR 2 801 607）、APV感染が天然の宿主として基本的に鳥類に限られることを更に実証している。

40

【0016】

50

本発明は、ニューモウイルス属のものとは異なる遺伝子順序およびアミノ酸配列を有し、且つパラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれるメタニューモウイルス属と近縁であり、その系統学的関連を考慮するとその属に属すると思われる、単離された哺乳動物ニューモウイルス（本明細書中ではMPVとも呼ぶ）を提供する。現在まで、メタニューモウイルスは鳥類からしか単離されていなかったが、本発明により、哺乳動物などの他の動物種においても、関連する（しかし物質的には異なる）ウイルスが同定できることが示される。ここで、本発明者らは、ヒトからのMPVの反復単離を示すが、そのような報告はAPVに関しては存在しない。更に、APVとは違って、MPVは基本的にニワトリや七面鳥において全く、または殆ど複製しないが、カニクイザルにおいては容易に複製する。哺乳動物におけるAPVの複製に関する報告は見られない。更に、MPVに対して生起させた特異的抗血清はMPVを中和するが、APV A、BまたはCに対して生起させた抗血清はそれと同程度にはMPVを中和せず、そして、このように完全な交差反応性が備わっていないことは、MPVが異なるメタニューモウイルスであることのもう1つの証拠となっている。更に、APVとMPVとはほぼ同様の遺伝子順序を有するが、MPVのGおよびSHタンパク質は、それらがアミノ酸レベルでも核酸レベルでも有意な配列相同性を示さない、という点で、APVでの知見とは大きく異なっている。APV単離体とMPV単離体、またはこれらの異なるウイルスに対する抗体同士を区別する診断アッセイは、これらのタンパク質の一方または双方に基づいて有利に開発できる（例えばIF、ELISA、中和アッセイ、RT-PCRアッセイ）。しかし、MPVのより関連するN、P、M、FおよびLタンパク質から得られる配列および/または抗原性情報、ならびにAPVのそれぞれのタンパク質との配列相同性の解析もまた、APVとMPVとを区別するのに用いることができる。例えば、MPVから得られる配列情報の系統学的解析から、MPVおよびAPVが2種の異なるウイルスであることが明らかになった。特に、系統樹は、APVおよびMPVが2種の異なるウイルスの系列であることを示している。また、本発明者らは、MPVがヒト集団において少なくとも50年間にわたって広まってきており、そのために、種間伝播は恐らく少なくとも50年前から起こっていて、ありふれた事象ではないことも示した。MPVのCPEは、tMKまたは他の細胞培養物中でhRSVもしくはhPIV-1により引き起こされるCPEとは実際には区別不能だったので、MPVは現在まで余り注目されていなかったと思われる。tMK（サル腎三次細胞、すなわち細胞培養の第三継代のMK細胞）は、初代または二代培養物と比較してコストが少なくて済むので、好ましく使用される。CPEは、古典的なパラミクソウイルス科の幾つの場合と同様に、合胞体形成し、その後で細胞が急速な内部破壊を示し、続いて細胞が単層から剥離することを特徴とする。細胞は通常（しかしいつもではない）、初期材料から3代継代した後、接種後10～14日でCPEを示し、これはhRSVまたはhPIV-1などの他のウイルスにより起こるCPEよりも幾分遅い。

10

20

30

40

50

【0017】

従来、影響力の大きい疾患原因として、パラミクソウイルスは毎年世界的に多くの動物やヒトの死亡の原因となっている。パラミクソウイルス科はモノネガウイルス目（ネガティブセンス一本鎖RNAウイルス）に含まれる科を形成し、パラミクソウイルス亜科（Paramyxovirinae）とニューモウイルス亜科（Pneumovirinae）とからなる。後者の亜科は現在のところ、分類学上、ニューモウイルス属とメタニューモウイルス属とに分類される¹。ヒト呼吸器合胞体ウイルス（hRSV）は、ニューモウイルス属の典型種であり、世界的に幼年期および初期小児期の下部気道感染の最も重要な単独原因である²。ニューモウイルス属の他のメンバーとしては、ウシおよびヒツジの呼吸器合胞体ウイルスおよびマウス肺炎ウイルス（PVM）が挙げられる。

【0018】

七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）は、鳥類の鼻気管炎、七面鳥の上部気道感染の原因物質であり³、近年になって区分されたメタニューモウイルス属の唯一のメンバーであり、上記で述べたように、これまで哺乳動物の感染と、ましてや疾患とも関係付けられていなかった。APVの血清学的亜群は、G糖タンパク質のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列、およびG糖タンパク質をも認識するモノクローナル抗体を用いた中和試験に基づいて区別できる。亜群A、BおよびDの中で、G糖

タンパク質は、亜群内では98.5%～99.7%のアミノ酸配列同一性を示すが、亜群間ではたった31.2～38%のアミノ酸同一性しか見られない。例えば、Collins, M.S., Gough, R.E.およびAlexander, D.J., Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22:p.469-479; Cook, J.K.A, Jones, B.V., Ellis, M.M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993.22:p.257-273; Bayon-Auboyer, M.H., ら, Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol, 2000.81(Pt 11):p.2723-33; Seal, B.S., Matrix Protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res, 1998.58(1-2):p.45-52; Bayon-Auboyer, M.H., ら, Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Arch Virol, 1999.144(6):p.1091-109; Juhasz, K.およびA.J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J Gen Virol, 1994. 75(Pt 11):p.2873-80を参照されたい。

10

【0019】

APVのもう1つの亜群はW000/20600に提供されており、そこでは、APVのコロラドで得られた単離体を記載しており、それをin vitro血清中和試験を用いて既知のAPVまたはTRTと比較した。まず、コロラドの単離体を、認識されたTRT単離体に対する単一特異的ポリクローナル抗血清に対して試験した。コロラドの単離体は、TRT株のいずれに対する単一特異的抗血清によっても中和されなかった。しかし、それは、亜群A株に対して作った超免疫抗血清によっても中和された。この抗血清は、相同なウイルスを1:400の力価まで、コロラド単離体を1:80の力価まで中和した。次に、上記の方法を用いて、コロラドの単離体をTRTモノクローナル抗体に対して試験した。それぞれの場合において、逆中和の力価は10未満であった。コロラドの単離体に対して生起させた単一特異的抗血清は、両者の亜群のTRT株に対しても試験した。試験したTRT株はいずれも、コロラドの単離体に対する抗血清によっても中和されなかった。

20

【0020】

APVのコロラド株は、TRTウイルスの亜群A株または亜群B株によるチャレンジに対してSPFニワトリを保護しなかった。これらの結果から、コロラドの単離体が、Bayon-Auboyerら(J. Gen. Vir. 81:2723-2733 (2000))によっても示唆されているように、トリ・ニューモウイルスのさらなる血清型の最初の例である可能性があることが示唆される。

30

【0021】

1つの好ましい実施態様において、本発明は、分類学的には(これに関しては未知の哺乳動物の)メタニューモウイルスに該当し、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれるニューモウイルスのものとは異なる遺伝子順序を含む、単離されたMPVを提供する。これら2種の属の分類は、主に、遺伝子の位置に基づいている。メタニューモウイルスには一般に、NS1またはNS2などの非構造タンパク質が欠けており(Randhawaら, J. Virol. 71:9849-9854 (1997)も参照されたい)、遺伝子の順序はニューモウイルスとは異なっている(RSV: '3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'; APV: '3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')^{4,5,6}。本発明により提供されるMPVまたは分類学的にそれに該当するウイルス単離体は、EM分析を行ったところ、パラミクソウイルス様の粒子であることが判明した。この分類と一致して、MPVまたは系統学的もしくは分類学的にそれに該当するウイルス単離体は、クロロホルムによる処理に対して感受性であり、tMK細胞または機能的にそれと同等の細胞において最適に培養され、大部分の細胞培養物において基本的にトリプシン依存性である。更に、典型的なCPEや、最も古典的に用いられる赤血球での赤血球凝集活性がないことから、本発明で提供されるウイルスが、(遠縁ではあるが)RSVなどの古典的なニューモウイルスと関連することが示唆される。多くのパラミクソウイルスは赤血球凝集活性を

40

50

有するが、ニューモウイルスの大部分は有していない¹³。本発明によるMPVは、例えばAhmadianら, J. Gen. Vir. 80:2011-2016(1999)において示されているような多くの他のニューモウイルスが一般的にそうであるように、M2タンパク質をコードする核酸断片の内部に第2の重複するORF (M2-2) も含んでいる。

【0022】

本発明により提供されるような別のウイルス単離体を見出すためには、サンプル（場合によっては罹患している動物またはヒトから得たもの）を、ニューモウイルス亜科のウイルスの存在について試験し、こうして得られたウイルスを、（機能性の）NS1またはNS2をコードする遺伝子の存在について試験するか、あるいは既に上記で既に述べたようにRSVなどのニューモウイルスのものとは異なる遺伝子順序を実証すればよい。更に、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当するウイルス単離体は、ここで提供されるMPV単離体からの核酸を用いる交差ハイブリダイゼーション実験により、あるいはMPV単離体に対して特異的なモノクローナル抗体および/またはMPV単離体から特異的に誘導される抗原および/もしくは免疫原を用いる古典的な交差血清学実験で見出すことができる。

【0023】

新たに単離されたウイルスは、本発明者らのプロトタイプMPV単離体と十分に類似する遺伝子順序および/またはアミノ酸配列を含んでいるならば、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当し、あるいは構造的にMPVと対応し、ニューモウイルス亜科のメタニューモウイルス属と近い関連を示す。MPVと現在既知の同じ科の他のウイルスのいずれか（APVの亜型C）との間での、最大のアミノ酸配列相同性および個々のタンパク質レベルで構造的対応の規定は、図6に示す配列を他のウイルス（特にAPV-C）の配列と比較した場合に推定できるように、マトリックスについては87%、核タンパク質については88%、リン酸化タンパク質については68%、融合タンパク質については81%、ポリメラーゼタンパク質の一部については56~64%である。これらの記載する最大値よりも高い相同性をそれぞれ有する個々のタンパク質またはウイルス単離体全体は、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当しており、構造的に図6に示す配列に該当する核酸配列を含む。ここで、本発明は、寄託されたウイルスに系統学的に該当するウイルスを提供する。他のウイルスと同様に、ここで提供される各種の単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス単離体の間で、ある程度の変異性が見られることに注目すべきである。系統樹において、本発明者らは、L、M、NおよびF遺伝子の一部の比較配列解析に基づいて、ウイルス単離体の少なくとも2つの遺伝的クラスターを同定した。ウイルスの核酸配列またはアミノ酸配列（ウイルス配列）におけるヌクレオチドおよびアミノ酸の違いと、RSVなどの他のニューモウイルスとの類似性に基づく、これらのMPVの遺伝子型はMPVの亜型に該当する。MPV単離体の遺伝的クラスターの各々の中で、ヌクレオチドレベルでの同一性のパーセンテージは、Lについては94~100、Mについては91~100、Nについては90~100、Fについては93~100であり、アミノ酸レベルでの同一性のパーセンテージは、Lについては91~100、Mについては98~100、Nについては96~100、Fについては98~100であることが判った。更なる比較は、図18~28に見ることができる。これまでに同定されたここで提供される単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV単離体）のグループ全体についてのヌクレオチドレベルでの最低の同一性のパーセンテージは、LおよびMについては81であり、Nについては83であり、Fについては82であった。アミノ酸レベルでは、このパーセンテージは、LおよびNについては91であり、Mについては94であり、Fについては95であった。本発明で提供されるMPV単離体または単離されたMPVのF遺伝子のウイルス配列は、例えば、Sealら, Vir. Res. 66:139147(2000)により提供されるAPV-Cの融合遺伝子（F）のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して、それぞれ81%未満のヌクレオチド配列同一性または82%未満のアミノ酸配列同一性を示す。

【0024】

また、本発明で提供されるMPV単離体または単離されたMPVのL遺伝子のウイルス配列は、例えば、Randhawaら, J. Gen. Vir. 77:3047-3051(1996)により提供されるAPV-Aのポリメ

10

20

30

40

50

ラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して、61%未満のヌクレオチド配列同一性または63%未満のアミノ酸配列同一性を示す。

【0025】

世界中のMPV株の配列多様性は、他のウイルスと同様に多少高めである可能性がある。したがって、2つの可能性のある遺伝的クラスターは、9種のウイルス単離体のN、M、FおよびLのORFにおける部分ヌクレオチド配列の分析により同定される。1つのクラスター内で、90～100%のヌクレオチド同一性が見られ、クラスター間では81～88%の同一性が見られた。更なるウイルス単離体について得られた配列情報から、2つの遺伝子型の存在が確認された。クラスターAのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/00/01、およびクラスターBのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/99/01を交差中和アッセイで用いて、それらの遺伝子型が異なる血清型または亜群と関連するか否かを調べた。これらのデータから、単離体I-2614に対してLについては64より、M2については87より、Nについては88より、Pについては68より、Fについては81より、M-1については84より、またはM2-2については58より高いアミノ酸相同性のパーセンテージを示す本質的に哺乳動物性のウイルス単離体は、本発明で提供される単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとして分類できる、と結論づけられる。特に、一般にヌクレオチド配列レベルでは、本発明で提供されるプロトタイプMPV単離体と、LおよびMについては81、Nについては83且つノまたはFについては82、という最低の同一性のパーセンテージを有するウイルス単離体は、本発明で提供されるMPV単離体のグループのメンバーである。アミノ酸レベルでは、これらのパーセンテージは、LおよびNについては91、Mについては94、且つノまたはFについては95である。所与のウイルス単離体についてのアミノ酸配列相同性のパーセンテージが、LおよびNについては90より、Mについては93より、またはFについては94より高い場合、そのウイルス単離体は、図5に示すMPV単離体のグループと同じものである。所与のウイルス単離体についてのアミノ酸配列相同性のパーセンテージが、Lについては94より、Nについては95より、またはMおよびFについては97より高い場合、そのウイルス単離体は、図5に示す遺伝子型クラスターの1つに属すると同定できる。これらの相同性のパーセンテージ（これにより遺伝的クラスターが規定される）が、RSVの対応する遺伝子の遺伝的クラスター間で見られる相同性の程度とほぼ同じであることに注目すべきである。

10

20

【0026】

つまり、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスのゲノムの適当な断片の核酸配列を決定し、それを、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製される系統樹解析で試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM（パリ）にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことにより、系統学的にメタニューモウイルス属に該当すると同定されうる上記ウイルスを提供する。

30

【0027】

そうした系統樹解析にそれぞれ有用な好適な核酸ゲノム断片は、例えば、本明細書の「詳細な説明」において開示されるRAP-PCR断片1～10のいずれかであり、本明細書において図4または5に開示されるような種々の系統樹解析が導かれる。MPVの核タンパク質（N）、リン酸化タンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）および融合タンパク質（F）の遺伝子の系統樹解析を行ったところ、APV血清型C（アメリカ合衆国で主に鳥類で見られるトリ・ニューモウイルス）と、最も高い配列相同性を示すことが判明した。

40

【0028】

1つの好ましい実施形態において、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスのゲノムの適当な断片の核酸配列を決定し、それを、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製され

50

る系統樹解析で試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス (TRTV) としても知られるトリ・ニューモウイルス (APV) のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM (パリ) に I-2614 として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことにより、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するとして同定可能であり、但し、その適当な断片がそのウイルスのウイルスタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む、上記ウイルスを提供する。

【0029】

好適なオープンリーディングフレーム (ORF) は、Nタンパク質をコードする ORF を含む。単離体 I-2614 の Nタンパク質に対して分析した Nタンパク質に少なくとも 91%、好ましくは少なくとも 95% の全体のアミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましい MPV 単離物を含んでいる。図示されているように、MPV のゲノム地図中の第 1 の遺伝子は、394 アミノ酸 (aa) のタンパク質をコードし、他のニューモウイルスの Nタンパク質と広範にわたる相同性を示す。N の ORF の長さは、APV-C の N の ORF の長さと同じであり (表 5)、他のパラミクソウイルスの長さ (Barr ら, 1991) より短い。アミノ酸配列の分析から、APV-C とは最も高い相同性 (88%) を有し、他のパラミクソウイルスとは 7~11% しか有しないことが判明した (表 6)。

10

【0030】

Barr ら (1991) は、モノネガウイルス目 (Mononegavirales) に属するウイルスの間で類似性を示す 3 つの領域: A、B および C を同定した (図 8)。類似性はウイルス科内では最も高いが、これらの領域はウイルス科の間でも高度に保存されている。3 つ全ての領域において、MPV は、APV-C と 97%、APV-B と 89%、APV-A と 92%、RSV および PVM と 66~73% のアミノ酸配列同一性を有することが判明した。アミノ酸残基 160~340 の領域は、メタニューモウイルス間では高度に保存されており、ニューモウイルス亜科に対してはそれより多少低い程度であると思われる (Miyahara ら, 1992; Li ら, 1996; Barr ら, 1991)。これは、MPV がメタニューモウイルスであることと一致しており、この特定の領域は APV C と 99% の類似性を示す。

20

【0031】

系統学的解析において有用なもう 1 つの好適なオープンリーディングフレーム (ORF) は、Pタンパク質をコードする ORF を含む。分析した Pタンパク質と単離体 I-2614 の Pタンパク質との間に少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 85% の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましい MPV 単離体を含んでいる。ゲノム地図中のこの第 2 の ORF は、APV-C の Pタンパク質と 68% のアミノ酸配列相同性を有し、RSV の Pタンパク質とは 22~26% しか有しない 294 アミノ酸のタンパク質をコードする (表 6)。MPV の P 遺伝子は、1 個の実質的な ORF を含み、それに関しては、多くの他のパラミクソウイルス由来の P と同様である (Lamb および Kolakofsky, 1996; Seldmeier ら, 1998 を参照のこと)。APV A および B ならびに PVM とは違って、しかし RSV および APV-C とは同様に、MPV の ORF にシステイン残基が欠けている。Ling (1995) は、全てのニューモウイルス間で高い類似性がある領域 (アミノ酸 185~241) が RNA 合成プロセスまたはヌクレオカプシド複合体の構造的完全性の維持において役割を担っていることを示唆した。この高い類似性の領域は、特に同類置換を考慮に入れる場合、MPV においてもみとめられ (図 9)、APV-C とは 100%、APV-A および B とは 93%、RSV とは約 81% の類似性を示す。MPV の Pタンパク質の C 末端は、APV について記載されているのと同様に (Ling ら, 1995)、グルタミン酸残基に富んでいる。

30

40

【0032】

系統学的解析において有用であるもう 1 つの好適なオープンリーディングフレーム (ORF) は、Mタンパク質をコードする ORF を含む。分析した Mタンパク質と単離体 I-2614 の Mタンパク質との間に少なくとも 94%、好ましくは少なくとも 97% の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましい MPV 単離体を含んでいる。ゲノム地図中のこの第 3 の ORF は、254 アミノ酸のタンパク質をコードし、これは他のニュー

50

モウウイルスのMのORFと同様である。MPVのMのORFは、他のメタニューモウイルスのMのORFと全く同じ大きさであり（表5）、APVのマトリックスタンパク質と高いアミノ酸配列相同性（76～87%）を示し、RSVおよびPVMのものとはそれより低い相同性（37～38%）を示し、他のパラミクソウイルスのものとは10%以下の相同性を示す（表6）。Easton（1997）は、全てのニューモウイルスのマトリックスタンパク質の配列を比較し、残基14～19において保存されたヘキサペプチドを見出した。このヘキサペプチドはMPVにおいても保存されている（図10）。RSV、PVMおよびAPVでは、Mの第1のORF内に、またはそのORFと重複して、小さな二次的なORFが同定されている（bRSVでは52アミノ酸および51アミノ酸、RSVでは75アミノ酸、PVMでは46アミノ酸、APVでは51アミノ酸）（Yuら、1992；Eastonら、1997；Samalら、1991；Satakeら、1984）。本発明者らは、MPVのMのORFの中の2つの小さなORFに注目した。54アミノ酸残基の1つの小さなORFは、第1のMのORF内に見出され、ヌクレオチド2281から始まるものであり、33アミノ酸残基の1つの小さなORFは、第1のMのORFと重複して見出され、ヌクレオチド2893から始まっている（データは示さず）。RSVおよびAPVの第2のORFと同様に、これらの第2のORFと他のニューモウイルスの第2のORFとの間に有意な相同性はなく、明確な開始シグナルまたは停止シグナルがない。更に、APVおよびRSVのこれらの第2のORFに対応するタンパク質の合成についての証拠は報告されていない。

10

【0033】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープンリーディングフレーム（ORF）は、Fタンパク質をコードするORFを含む。分析したFタンパク質と単離体I-2614のFタンパク質との間に少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのFのORFは、MのORFに隣接して位置しており、これはメタニューモウイルス属のメンバーの特徴である。MPVのF遺伝子は539アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-CのFよりもアミノ酸残基2個分だけ長い（表5）。このアミノ酸配列の分析から、APV-Cとは81%、APV-AおよびBとは67%、ニューモウイルスFタンパク質とは33～39%、他のパラミクソウイルスとは僅か10～18%の相同性があることが判明した（表6）。パラミクソウイルスのFタンパク質間で保存されている特徴の1つで、MPVでも見られるものは、システイン残基の分布である（Morrison、1988；Yuら、1991）。メタニューモウイルスは、F1中に12個のシステイン残基（内、7個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている）、そしてF2中に2個（内、1個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている）を有する。MPVのFのORF内に存在する3つの可能性のあるN-結合グリコシル化部位のうち、RSVと共通するものはなく、2つ（66位および389位）はAPVと共通している。MPVの第3のユニークな可能性のあるN結合グリコシル化部位は、206位に位置する（図11）。MPVのFタンパク質については、他のパラミクソウイルスとの配列相同性は低いものの、他のパラミクソウイルス科のメンバーのFタンパク質について記載されているもの（Morrison、1988）と一致する典型的な融合タンパク質の特徴が明らかになった。パラミクソウイルスのメンバーのFタンパク質は、不活性な前駆体（F0）として合成され、それが宿主細胞のプロテアーゼにより切断されて、アミノ末端側のF2サブユニットと大きなカルボキシ末端側のF1サブユニットを生じる。提案されている切断部位（Collinsら、1996）は、パラミクソウイルス科の全てのメンバー間で保存されている。MPVの切断部位は、残基RQSRを含む。2つのアルギニン（R）残基はAPVおよびRSVと共有するが、グルタミン（Q）およびセリン（S）残基は、ヒト・パラインフルエンザウイルス1型、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどの他のパラミクソウイルスと共有していない（データは示さず）。F1のアミノ末端にある疎水性領域は、膜融合ドメインとして機能すると考えられ、パラミクソウイルスおよび麻疹ウイルスの間では高い配列類似性を、ニューモウイルスではそれより低い配列類似性を示す（Morrison、1988）。これらの26の残基（137～163位、図11）は、MPVとAPV-Cとの間では保存されており、このことは、この領域がメタニューモウイルス間で高度に保存されていることと一致する（Naylorら、1998；Sealら、2000）。

20

30

40

【0034】

APVおよび他のパラミクソウイルスのF2サブユニットについて判るように、MPVは、RSVと

50

比較して22個のアミノ酸残基が欠失していることが判明した(107~128位、図11)。更に、RSVおよびAPVでは、シグナルペプチドおよびアンカードメインが亜型内で保存されていることが判り、亜科間では高い多様性を示した(Plowsら, 1995; Naylorら, 1998)。MPVのF2のアミノ末端にあるシグナルペプチド(アミノ酸10~35、図11)は、APV-Cとある程度の配列類似性を示し(26個のアミノ酸残基のうち18個が類似)、他のAPVともRSVともあまり保存されていない。F1のカルボキシ末端にある膜アンカードメインでは、ずっと高い多様性が見られるが、それでもAPV-Cとは多少の相同性が見られる。

【0035】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープンリーディングフレーム(ORF)は、M2タンパク質をコードするORFを含む。分析したM2タンパク質と単離体I-2614のM2タンパク質との間に少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。M2遺伝子は、ニューモウイルス亜科に固有のものであり、全てのニューモウイルスにおいて2つの重複するORFがみついている。第1の主要なORFはM2-1タンパク質に該当し、これはウイルスポリメラーゼのプロセッシビティ(Collinsら, 1995; Collins, 1996)およびその遺伝子間領域のリードスルー(Hardyら, 1998; Fearnら, 1999)を増大させる。MPVのM2-1領域は、F遺伝子に隣接して位置し、187アミノ酸のタンパク質をコードし(表5)、APV-CのM2-1と最も高い(84%)相同性を示すことが判る(表6)。全てのニューモウイルスのM2-1タンパク質を比較したところ、そのタンパク質のアミノ末端側の半分において最も高度に保存されていることが判明し(Collinsら, 1990; Zamoraら, 1992; Ahmadianら, 1999)、このことは、MPVが、そのタンパク質の最初の80個のアミノ酸残基において、APV-Cと100%の類似性を示すという知見と一致している(図12A)。MPVのM2-1タンパク質は、最初の30個のアミノ酸残基の内部に位置する3個のシステイン残基を含み、それらは全てのニューモウイルス間で保存されている。そのような濃度のシステインは、亜鉛結合タンパク質ではよく見られる(Ahmadianら, 1991; Cuestaら, 2000)。

【0036】

ニューモウイルスのM2-1のORFと重複する第2のORF(M2-2)は、位置においては保存されているが、配列は保存されておらず、ウイルスRNAの複製と転写の切り替えの調節に関与すると考えられる(Collinsら, 1985; Elangoら, 1985; Baybuttら, 1987; Collinsら, 1990; Lingら, 1992; Zamoraら, 1992; Alansariら, 1994; Ahmadianら, 1999; Berminghamら, 1999)。MPVでは、M2-2のORFは、M2-1のORF内のヌクレオチド512から始まり(図7)、これはAPV-Cの場合と全く同じ開始位置である。M2-2のORFの長さはAPV-CおよびMPVと同じで、77個のアミノ酸残基からなる(表5)。M2-2のORFの配列比較(図12B)から、MPVとAPV-Cの間では56%のアミノ酸配列相同性があり、MPVとAPV-AおよびBの間では26~27%の配列相同性しかないことが判った(表6)。

【0037】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープンリーディングフレーム(ORF)は、Lタンパク質をコードするORFを含む。分析したLタンパク質と単離体I-2614のLタンパク質との間に少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。他のネガティブ鎖ウイルスと同様に、MPVゲノムのこの最後のORFは、複製および転写複合体のRNA依存性RNAポリメラーゼ成分である。MPVのL遺伝子は、2005アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-Aのタンパク質よりも残基1個分だけ長い(表5)。MPVのLタンパク質は、APV-Aとは64%、RSVとは42~44%、他のパラミクソウイルスとは約13%の相同性を有する(表6)。Pochら(1989; 1990)は、非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルスのLタンパク質内の6つの保存されたドメインを同定し、その中のドメインIIIは、ポリメラーゼの機能に必要不可欠であると考えられる4つのコアポリメラーゼモチーフを含んでいた。これらのモチーフ(A、B、CおよびD)は、MPVのLタンパク質ではよく保存されている。モチーフA、BおよびCでは、MPVは全てのニューモウイルスと100%の類似性を有し、モチーフDでは、MPVはAPVと100%、RSVとは92%の類似性を有する。ドメインIII全体(LのORFのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸625～847)では、MPVは、APVとは83%、RSVとは67～68%、他のパラミクソウイルスとは26～30%の同一性を有する(図15)。ニューモウイルスのLタンパク質は、ポリメラーゼモチーフに加えて、共通ATP結合モチーフK(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀Kに合致する配列を含んでいる(Stec, 1991)。MPVのLのORFは、APVとほぼ同様のモチーフを含んでおり、介在残基の間隔は1個分だけ離れている: K(X)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

【0038】

系統学的解析において有用である、更に好ましい好適なオープンリーディングフレーム(ORF)は、SHタンパク質をコードするORFを含む。分析したSHタンパク質と単離体I-2614のSHタンパク質との間に少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、更に好ましくは少なくとも75%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのM2に隣接して位置するこの遺伝子は、183アミノ酸のタンパク質をコードする(図7)。ヌクレオチド配列およびその推定アミノ酸配列の分析から、他のRNAウイルス遺伝子または遺伝子産物とは明確な相同性はないことが判った。MPVのSHのORFは、現時点で知られている最も長いSHのORFである(表5)。SHのORFのアミノ酸残基の組成は、APV、RSVおよびPVMのものと比較的類似しており、トレオニンおよびセリンの割合(%)が高い(MPV、APV、RSV A、RSV B、bRSVおよびPVMについて、それぞれ22%、18%、19%、20.0%、21%および28%のセリン/トレオニン含量)。MPVのSHのORFは、10個のシステイン残基を含んでいるが、APVのSHは16個のシステイン残基を含んでいる。全てのニューモウイルスは、ほぼ同数の潜在的なN-グリコシル化部位を有する(MPVは2、APVは1、RSVは2、bRSVは3、PVMは4)。

10

20

【0039】

MPVのSHタンパク質ならびにAPVおよびRSVのSHについての疎水性度プロファイルは、ほぼ同様の構造的な特徴があることが判った(図13B)。APVおよびMPVのSHのORFは、親水性のN末端(アミノ酸1～30)、潜在的な膜貫通ドメインとしての役割を果たし得る中央の疎水性ドメイン(アミノ酸30～53)、残基160付近の第2の疎水性ドメイン、および親水性C末端を有する。これに対し、RSVのSHは、APVおよびMPVのORFのC末端側の半分を欠いていると思われる。全てのニューモウイルスのSHタンパク質において、疎水性ドメインは塩基性アミノ酸に隣接しており、これはMPVのSHのORFにおいても見られる(アミノ酸29および54)。

30

【0040】

系統学的解析において有用である、もう1つの更に好ましい好適なオープンリーディングフレーム(ORF)は、Gタンパク質をコードするORFを含む。分析したGタンパク質と単離体I-2614のGタンパク質との間に少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、更に好ましくは少なくとも75%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのGのORFは、SH遺伝子に隣接して位置しており、236アミノ酸のタンパク質をコードする。このORFのすぐ後に、第2の小さなORFが見られ、これは68個のアミノ酸残基(6973～7179位)を潜在的にコードするが、開始コドンが欠けている。別のリーディングフレーム内に存在する194アミノ酸残基の第3の主要なORF(断片4、図7)は、これらのORFの両者と重複しているが、これもまた開始コドンが欠けている(ヌクレオチド6416～7000)。この主要なORFの後ろには、同じリーディングフレーム内に第4のORFが存在し(nt7001～7198)、65個のアミノ酸残基をコードする可能性があるが、これもまた開始コドンが欠けている。最後に、可能性のある97アミノ酸残基のORF(開始コドンが欠けている)が、第3のリーディングフレーム内に見られる(nt6444～6737、図1)。第1のORFとは違って、それ以外のORFは、明確な遺伝子開始配列または遺伝子終結配列を持たない(後記を参照)。236アミノ酸残基のGのORFは、MPVの接着タンパク質の少なくとも一部に該当すると思われるが、更なるコード配列が、何らかのRNA編集事象により別のタンパク質または接着タンパク質の一部として発現されることも除外できない。APVおよびRSVでは、第1のGのORFの後ろに第2のORFが同定できなかったこと、しかしAPVもRSVもGの主たるORF内に第2のORFを有していることに注目すべきである。しかし、これらのORFの発現に関する証拠はなく、異なるウイルスの推定アミノ酸配列間に相同性は

40

50

ない (Lingら, 1992)。MPVのGにおける第2のORFは、他のGタンパク質の特徴を示さず、この別のORFが発現されるか否かについては、更なる調査が必要である。この4つのORF全てを用いたBLAST分析から、ヌクレオチドレベルでもアミノ酸配列レベルでも、他の既知のウイルス遺伝子または遺伝子産物との明確な相同性は示されなかった。このことは、他のGタンパク質についてhRSV AおよびB (53%) (Johnsonら, 1987)ならびにAPV AおよびB (38%) (Juhaszら, 1994)などの低い配列相同性が見られることと一致する。MPVのORFの多くは、長さにおいても配列においてもAPVのものと類似しているが、MPVのGのORFはAPVのGのORFよりもかなり小さい (表5)。アミノ酸配列から、セリンおよびトレオニンの含量が34%であることが判明し、これはRSVでの32%やAPVでの24%よりも高い。また、GのORFは8.5%のプロリン残基も含んでおり、これはRSVでの8%やAPVでの7%よりも高い。APV、RSVおよびMPVのGタンパク質ではプロリン残基が並外れて豊富であることは、ムチン源である糖タンパク質 (タンパク質の三次元構造の主な決定要因) においても見られている (Collinsら, 1983; Wertzら, 1985; Jentoft, 1990)。MPVのGにおける可能性のあるN結合グリコシル化部位の数は、他のニューモウイルスとほぼ同じである (MPVは5つであるが、hRSVは7つ、bRSVは5つ、APVは3~5つ)。

10

【0041】

MPVのGの推定される疎水性度プロフィールは、他のニューモウイルスと同様の特徴を示した。アミノ末端は親水性領域を含み、その後ろに短い疎水性領域 (アミノ酸33~53) および主に親水性のカルボキシ末端と続く (図14B)。この全体的構成は、アンカー型II型膜貫通ドメインと一致し、APVおよびRSVのGタンパク質のこれらの領域に十分に対応する。MPVのGのORFは、RSVやAPV (それぞれ5個および20個) とは違って、1個のシステイン残基しか含まない。

20

【0042】

例えばFrancki, R.I.B., Fauquet, C.M., Kundson, D.L.およびBrown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2:p. 140-144から知られているような古典的な血清学的分析によれば、MPV単離体はまた、本発明で提供される血清型に属するものとして同定可能であり、動物の抗血清 (例えば「詳細な説明」に示されているようにしてフェレットまたはモルモットから得たもの) を用いる定量的中和により決定した場合のその免疫学的特徴に基づいて定められる。そのような血清型は、他のものと交差反応しないか、あるいは両方向において16を超える同種-異種力価比を示す。中和が2種のウイルス間で一方または両方向にある程度の交差反応を示す場合は (8または16の同種-異種力価比)、DNAの実質的な生物物理学的/生化学的相違が存在する場合には、血清型は区別されるものとみなされる。中和が2種のウイルス間で一方または両方向に明らかな程度の交差反応を示す場合は (8未満の同種同士-異種同士の力価比)、検討される単離体の血清型が同一であるとみなされる。上記で述べたように、単離体I-2614 (本明細書中ではMPV単離体00-1としても知られる) などの有用なプロトタイプ単離体が本発明において提供される。

30

【0043】

ウイルスの、本発明で提供される単離された本質的に哺乳動物のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとしての更なる分類は、Gおよび/またはSHタンパク質に対する相同性に基づいて行うことができる。一般に、APV (トリから単離されたもの) とMPV (ヒトから単離されたもの) のN、P、M、F、M2およびLのORFにおける全体アミノ酸配列同一性は64~88%であり、ヌクレオチド配列相同性は、APVゲノムとMPVゲノムの非コード領域間で見られ、ヒト単離体 (MPV) のORFの2つと他のパラミクソウイルスのORFのいずれかとの間には本質的に明確なアミノ酸配列相同性は見られなかった。ウイルスゲノムにおけるこれらのORFのアミノ酸含量、疎水性度プロフィールおよび位置から、それらがGタンパク質およびSHタンパク質の類似体に該当することが示される。APVとMPVとの配列相同性、それらの類似のゲノム構成 (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')、ならびに系統学的解析から、MPVを最初の哺乳動物メタニューモウイルスとして分類する提案の更なる証拠が得られる。したがって、

40

50

新規なMPV単離体は、例えば、ウイルス単離、およびtMKもしくは他の細胞についての特性決定により、RT-PCRおよび/または配列解析とそれに続く系統樹解析により、そしてウイルス中和アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、直接免疫蛍光アッセイ、FAC分析または他の免疫学的技法などの血清学的技法により、同定される。好ましくは、これらの技法は、SHおよび/またはGタンパク質類似体に対するものである。

【0044】

例えば、本発明は、本明細書中において、本発明において提供されるMPVの更なる単離体の同定方法を提供するものであり、その方法は、本質的にMPV非感染の、または特定の病原体を含まないモルモットまたはフェレットに、プロトタイプ単離体I-2614または関連する単離体を接種することを含む（「詳細な説明」では、この動物は鼻腔内接種されるが、筋肉内または皮内接種などの他の方法で接種してもよく、他の実験動物を用いてもよい）。0日目、接種後2週間目および3週間目に、血清をその動物から採取する。その更なる単離体の免疫学的検出では、ウイルス中和（VN）アッセイおよびそれぞれの単離体I-2614に対する間接IFAで測定した場合に特異的に血清転換を起こした動物、ならびにその血清転換を起こした動物からの血清が用いられる。

10

【0045】

一例として、本発明は、ヒトにおいて重篤なRTIを引き起こす可能性のあるパラミクソウイルス科の新規なメンバー、ヒトのメタニューモウイルスまたはメタニューモウイルス様ウイルス（その最終的な分類は、ウイルス分類委員会による討議を待っているところなので、MPVはここでは、例えば分類学的にAPVに相当するものとして記載している）（MPV）の特性決定を提供する。MPVによって引き起こされる疾患の臨床的所見は、咳、筋肉痛、嘔吐、発熱、細気管支炎（broncheolitis）もしくは肺炎、可能性のある結膜炎、またはそれらの組合せなどのhRSVにより引き起こされるものと本質的に類似している。hRSVに感染した小児で見られるように、特に非常に年少の小児は入院が必要になる場合がある。一例として、2001年1月19日付でCNCM（パスツール研究所、パリ）にI-2614として寄託されたMPVまたは系統学的にそれに該当するウイルス単離体が、本発明で提供される。それと共に、本発明は、図6a、6b、6cに記載の核酸配列、または構造的にそれらに該当する核酸配列に系統学的に該当する核酸またはその機能性断片を含むウイルスを提供する。特に、本発明は、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製される系統樹解析でそれを試験した後で、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM（パリ）にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することが見出されることを特徴とするウイルスを提供する。AVP-Cウイルス単離体を、上記の系統樹解析におけるアウトグループとして使用することが特に有用であり、それは本質的に非哺乳動物性のウイルスであるが、最も近縁である。

20

30

【0046】

本発明者らは、この新規なヒト・ウイルスを、複数の知見に基づいて、ヒト・メタニューモウイルスまたはメタニューモウイルス様ウイルス（MPV）と命名することを提案する。EM分析から、パラミクソウイルス様粒子が示された。分類と一致して、MPVは、クロロホルムによる処理に対して感受性であると思われる。MPVはtMK細胞において最適に培養され、トリプシン依存性である。MPVにより引き起こされる臨床的症状、ならびに典型的なCPEおよび赤血球凝集活性がないことから、このウイルスが、hRSVに近縁であることが示唆された。多くのパラミクソウイルスが赤血球凝集活性を有するが、ニューモウイルスの多くはその活性を有していない¹³。

40

【0047】

一例として、本発明は、重篤なRTIに罹患している28人の小児から採取した鼻咽頭吸引物サンプルからの、これまで同定されていなかったパラミクソウイルスを提供する。これらの小児の臨床的症状は、hRSVにより引き起こされるものと非常に類似していた。患者のうち27人が5歳以下の小児であり、その半分以上が1～12ヶ月齢であった。それ以外に18歳の患者

50

がいた。全ての個体は上部RTIに罹患しており、咳、筋肉痛、嘔吐および発熱から気管支炎および重篤な肺炎までにわたる症状を示していた。これらの患者の大部分は1～2週間にわたり入院した。

【0048】

これらの患者からのウイルス単離体は、陰性造影電子顕微鏡でパラミクソウイルスの形態を有していたが、既知のヒトおよび動物のパラミクソウイルスに対する特異的抗血清とは反応しなかった。それらは全て、単離体のうち2つに対して作った血清を用いた間接免疫蛍光アッセイ（IFA）により測定したところ、互いに近縁であった。これらの単離体のうち9種の配列解析を行ったところ、このウイルスがAPVとある程度関連していることが判明した。ウイルス学的データ、配列相同性ならびにゲノム構成に基づいて、本発明者らは、このウイルスがメタニューモウイルス属のメンバーであることを提案する。血清学的調査から、このウイルスは、オランダでの血清陽性率（seroprevalence）は5歳までの年齢のヒトでは100%に達しているので、比較的一般的な病原体であることが示された。更に、血清陽性率は、1958年にヒトから採取した血清では等しく高いことが判り、このことは、このウイルスが、ヒト集団の間で40年以上にもわたって広まっていることを示している。ここで、ウイルス性気道感染の診断アッセイの手段および方法または試験キットならびにワクチンまたは血清または抗体組成物、ならびにMPV感染の治療に有用な抗ウイルス剤の試験またはスクリーニングの方法を開発するための、この提案されたメタニューモウイルス属の新規メンバーの同定が提供される。

10

【0049】

この範囲で、本発明は、とりわけ、本発明によるウイルスから得ることができる単離された核酸もしくは組換え核酸またはそのウイルス特異的な機能性断片を提供する。特に、本発明は、MPVの核酸の同定に適するプライマーおよび/またはプローブを提供する。

20

【0050】

更に、本発明は、本発明による核酸を含むベクターを提供する。まず、MPVのゲノム（の一部）を含むプラスミドベクター、MPVのゲノム（の一部）を含むウイルスベクター（例えば、限定するものではないが、他のパラミクソウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルスなど）、または他のウイルスもしくは他の病原体のゲノム（の一部）を含むMPVなどのベクターが提供される。更に、2つの重要なパラメーターに基づく、組換えネガティブ鎖ウイルスを作製するための様々な逆遺伝学的技法が記載された。まず第1に、そのようなウイルスの作製は、ネガティブセンスウイルスRNA（vRNA）ゲノムまたはその相補的なコピー（cDNA）の部分または完全長コピーの複製に基づく。このvRNAまたはcDNAは、感染ウイルスから単離してもよいし、in-vitro転写により産生させてもよいし、あるいは核酸のトランスフェクションの際に細胞内で産生させてもよい。第2に、組換えネガティブ鎖ウイルスの作製は、機能性ポリメラーゼ複合体に基づく。典型的には、ニューモウイルスのポリメラーゼ複合体は、N、P、L、そして恐らくはM2タンパク質から構成されるが、必ずしもそれらに限定されない。ポリメラーゼ複合体またはその成分は、ウイルス粒子から単離してもよいし、その成分の1種以上を発現している細胞から単離してもよいし、あるいは特定の発現ベクターのトランスフェクションにより産生させてもよい。

30

40

【0051】

MPVの感染性コピーは、上記のvRNA、cRNA、またはこれらのRNAを発現しているベクターが上記のポリメラーゼ複合体により複製される場合に得ることができる^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22}。ミニレプリコン、すなわちMPVゲノムの全部または一部を含む完全長コピーを作製するための逆遺伝学的な系を作製する場合は、例えばAPV（Randhawaら、1997）またはMPV自体から得ることができる3'末端および/または5'末端の核酸配列を使用すればよい。

【0052】

また、本発明は、本発明による核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。MPVのポリメラーゼ成分（多分、N、P、LおよびM2、しかし必ずしもそれらに限定されない）を含んでいるプラスミドまたはウイルスベクターは、適切な細胞型（細菌、昆虫細胞、真核細

50

胞)内でその成分を発現するように原核細胞内で作製される。MPVゲノムの完全長または部分コピーを含むプラスミドまたはウイルスベクターは、ウイルス核酸をin-vitroまたはin-vivoで発現させるために原核細胞内で作製される。後者のベクターは、キメラウイルスまたはキメラウイルスタンパク質の作製のために他のウイルス配列を含んでいてもよいし、複製欠損ウイルスの作製のためにはウイルスゲノムの一部が欠失していてもよいし、弱毒ウイルスの作製のためには突然変異、欠失または挿入を含んでいてもよい。

【0053】

MPVの感染性コピー(野生型、弱毒化型、複製欠損型またはキメラ型)は、上記に記載されている現時点での最新技術によりポリメラーゼ成分の共発現により作製できる。

【0054】

更に、1種以上の完全長または部分MPVタンパク質を一過性または安定に発現する真核細胞が使用できる。そのような細胞は、トランスフェクション(タンパク質または核酸ベクター)、感染(ウイルスベクター)またはトランスダクション(ウイルスベクター)により作製でき、上記で述べた野生型、弱毒化型、複製欠損型またはキメラ型のウイルスを相補するのに有用となり得る。

【0055】

キメラウイルスは、2種以上のウイルスに対して防御する組換えワクチンの作製に特に使用できる^{23, 24, 26}。例えば、RSVの1種以上のタンパク質を発現するMPVウイルスベクターまたはMPVの1種以上のタンパク質を発現するRSVベクターは、双方のウイルス感染に対してそのようなベクターがワクチン接種された個体を保護すると考えられる。PI3または他のパラミクソウイルスについても同様の方法が考えられる。弱毒型または複製欠損型のウイルスは、他のウイルスについて示唆されているように^{25, 26}、生ワクチンによるワクチン接種の目的で使用できる。

【0056】

1つの好ましい実施形態において、本発明は、本発明による核酸によりコードされるタンパク質様分子またはメタニューモウイルス特異的ウイルスタンパク質またはそれらの機能性断片を提供する。有用なタンパク質様分子は、例えば、本発明によるウイルスに由来する遺伝子またはゲノム断片のいずれかから誘導される。ここで提供されるそのような分子またはその抗原性断片は、例えば、診断の方法もしくはキットまたは医薬組成物(例えばサブユニットワクチン)において有用である。特に有用なのは、抗原またはサブユニット免疫原として封入するためのF、SHおよび/もしくはGタンパク質またはそれらの抗原性断片であるが、不活化されているウイルス全体も使用可能である。また、系統学的解析で同定される組換え核酸断片によりコードされるタンパク質様物質も特に有用であり、勿論、系統学的解析において有用なORFの好ましい範囲に含まれるものが好ましく、特にMPV特異的抗体をin-vivo(例えば保護目的または診断用の抗体を提供するため)またはin-vitro(例えばファージ提示法または合成抗体を作製するのに有用な別の方法による)で生起させるためのものである。

【0057】

また、本発明では抗体も提供され、それは、本発明によるタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片を含む抗原と特異的に反応する天然のポリクローナルもしくはモノクローナルもしくは合成(例えば(ファージ)ライブラリー由来の結合性分子の)抗体である。そのような抗体は、ウイルス単離体またはその成分を本発明で提供される抗体と反応させることを含む、ウイルス単離体をMPVとして同定する方法において有用である。これは、例えば、精製または非精製のMPVまたはその一部(タンパク質、ペプチド)を用い、ELISA、RIA、FACSまたは同様の抗原検出アッセイフォーマット(Current Protocols in Immunology)を用いることにより達成可能である。あるいはまた、感染細胞または細胞培養物を用いて、古典的な免疫蛍光法または免疫組織化学法を用いたウイルス抗原の同定を行うことも可能である。

【0058】

ウイルス単離体をMPVとして同定するためのもう1つの方法は、そのウイルス単離体または

10

20

30

40

50

その成分を本発明によるウイルス特異的核酸と反応させることを含んでなり、特に、その哺乳動物のウイルスはヒト・ウイルスを含む。

【0059】

このようにして、本発明は、本発明の方法によって同様にパラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれるメタニューモウイルス属に属するものとして同定されうる分類学的にネガティブセンス一本鎖RNAウイルスに該当する哺乳動物のウイルスとして同定可能なウイルス単離体を提供する。

【0060】

この方法は、哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に診断するための方法、例えば、動物のサンプルを本発明による核酸または抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含んでなる方法において有用である。例は「詳細な説明」に更に示してあり、例えばPCR（または当業界で周知の他の増幅またはハイブリダイゼーション技術）の使用、または免疫蛍光検出（または当業界で公知の他の免疫学的技術）の使用が挙げられる。

10

【0061】

また、本発明は、哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断するための方法であって、その動物のサンプルを本発明によるタンパク質様分子またはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVまたはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含んでなる上記方法を提供する。

【0062】

本発明で提供される方法および手段は、MPV感染を診断するための診断用キットにおいて特に有用であり、これはウイルス学的または血清学的診断によるものである。そのようなキットまたはアッセイは、例えば、本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および/または抗体を含む。また、医薬組成物、例えば特にヒトにおけるMPV感染の治療もしくは予防および/または気道疾患の治療もしくは予防のための医薬組成物を製造するための、本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および/または抗体の使用も提供される。ウイルスの弱毒化は、この目的で開発された確立されている方法により達成でき、限定するものではないが、他の種の関連ウイルスの使用、実験動物および/または組織/細胞培養物による連続継代、分子クローンの部位指定突然変異誘発、および関連ウイルス間での遺伝子または遺伝子断片の交換が挙げられる。

20

30

【0063】

本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および/または抗体を含む医薬組成物は、例えば、本発明による医薬組成物を個体に投与することを含んでなる、MPV感染および/または気道疾患の治療または予防の方法において使用できる。これは、その個体がヒトである場合、とりわけ、そのヒトが5歳以下である場合に最も有用である。何故ならば、そのような幼児および若年の小児は、本発明で提供されるヒトMPVに最も感染しやすいからである。一般に、急性期では、患者は上部呼吸器症状に苦しみ、他の呼吸器疾患および他の疾患に罹患し易くなる。また、下部呼吸器疾患が起こることもあり、更に他の重篤な症状に懸かり易くなる。

40

【0064】

また、本発明は、気道疾患の治療に有用な抗ウイルス剤を得る方法であって、本発明によるウイルスを含む細胞培養物もしくは実験動物を樹立し、その培養物もしくは動物を候補の抗ウイルス剤で処理して、その剤がもつそのウイルスに対する効果、またはその培養物もしくは動物のその感染に及ぼす効果を判定することを含む上記方法を提供する。そのような抗ウイルス剤の一例は、本発明で提供されるMPV中和抗体またはその機能性成分を含むが、他の性質の抗ウイルス剤も同様にして得られる。本発明はまた、医薬組成物の製造、特に気道疾患（とりわけMPV感染により引き起こされる疾患）を治療するための医薬組成物の製造のための、本発明による抗ウイルス剤の使用を提供し、さらには、MPV感染または呼吸器疾患の治療または予防の方法において有用な、本発明による抗ウイルス剤を含

50

む医薬組成物を提供し、但しこの方法はそのような医薬組成物を個体に投与することを含む。

【0065】

「詳細な説明」により本発明を更に説明するが、それらに限定されない。

【0066】

図面の説明

図1Aは、「表1：単離体00-1とニューモウイルス亜科の他のメンバーのアミノ酸配列間で見られる相同性のパーセンテージ」である。パーセンテージ(×100)は、N、P、M、FおよびLにおける2種のRAP-PCR断片(L8およびL9/10)のアミノ酸配列について示してある。この分析で用いたアクセッション番号は「材料および方法」のセクションに記載されている。 10

【0067】

図1Bは、「表2：免疫蛍光アッセイおよびウイルス中和アッセイを用いた、年齢群で分類したヒトにおけるMPVの血清陽性率」である。

【0068】

図2：ウイルス単離体00-1についてRAP-PCRおよびRT-PCRを用いて得られた断片の位置および大きさを含む、APVのゲノムの概略図。断片1～10は、RAP-PCRを用いて得た。断片Aは、RAP-PCR断片1および2中のプライマーと、APVおよびRSVのリーダー配列およびトレイラー配列のアライメントに基づいて設計されたプライマーとを用いて得た⁶。断片Bは、RAP-PCRの断片1および2ならびにRAP-PCRの断片3中に設計されたプライマーを用いて得た。断片Cは、RAP-PCRの断片3ならびにRAP-PCRの断片4、5、6および7中に設計されたプライマーを用いて得た。 20

【0069】

全ての系統樹において、(図3～5の)DNA配列はClustalWソフトウェアパッケージを用いてアラインして、最尤系統樹は、Phylip 3.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを使用し、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した¹⁵。系統樹の作製に用いた先に公表されている配列は、Genbankから次のアクセッション番号で入手可能である：全ORFについて：hRSV：NC001781；bRSV：NC001989；FのORFについて：PVM、D11128；APV-A、D00850；APV-B、Y14292；APV-C、AF187152；NのORFについて：PVM、D10331；APV-A、U39295；APV-B、U39296；APV-C、AF176590；MのORFについて：PVM、U66893；APV-A、X58639；APV-B、U37586；APV-C、AF262571；PのORFについて：PVM、09649；APV-A、U22110；APV-C、AF176591。MPVの9種の異なるウイルス単離体についての系統学的解析は、アウトグループとしてAPV C株を用いて行った。 30

【0070】

図中で用いた略語：hRSV：ヒトRSV；bRSV：ウシRSV；PVM：マウス肺炎ウイルス；APV-A、BおよびC：トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型。

【0071】

図3。ニューモウイルス亜科のメンバーおよびウイルス単離体00-1の間でのN、P、MおよびFのORFの比較。アライメントは、ウイルス単離体00-1の完全なN、P、MおよびFタンパク質ならびにLタンパク質の一部のアミノ酸配列を示す。単離体00-1と他のウイルスとの間で異なるアミノ酸を示し、同一であるアミノ酸はピリオドで表わし、ギャップはダッシュで表わす。数字はそれらタンパク質におけるアミノ酸の位置に該当する。分析に用いたアクセッション番号は、「材料および方法」のセクションに記載されている。APV-A、BまたはC：トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型、b-またはhRSV：ウシまたはヒトの呼吸器合胞体ウイルス、PVM：マウス肺炎ウイルス。L8：L内に位置するRAP-PCRを用いて得られた断片8、L9/10：L内に位置するRAP-PCRを用いて得られた断片9と10との共通配列。Pのアライメントでは、APV-B配列はGenbankから入手できなかった。Lのアライメントでは、bRSV、hRSVおよびAPV-Aの配列だけが入手できた。 40

【0072】

図4：ニューモウイルス属のメンバーおよびウイルス単離体00-1のN、P、MおよびFのORFの 50

系統学的解析。系統学的解析は、次の遺伝子からのウイルス配列について行った：F（パネルA）、N（パネルB）、M（パネルC）およびP（パネルD）。系統樹は、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いた最尤法解析に基づくものである。ヌクレオチドの変化の数を表わすスケールバーを各系統樹について示す。

【0073】

図5：9種の主なMPV単離体とAPV-C（遺伝的に最も近縁である）とのF（パネルA）、N（パネルB）、M（パネルC）およびL（パネルD）のORFの部分の系統学的関係。系統樹は、最尤法解析に基づくものである。ヌクレオチドの変化の数を表わすスケールバーを各系統樹に示す。APV-Cのアクセッション番号：パネルA：D00850；パネルB：U39295；パネルC：X58639；パネルD：U65312。

10

【0074】

図6A：MPV単離体00-1のゲノムの3'末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報。ORFを示す。N：核タンパク質のORF；P：リン酸化タンパク質のORF；M：マトリックスタンパク質のORF；F：融合タンパク質のORF；GE：遺伝子の終点；GS：遺伝子の開始点。

【0075】

図6BおよびC：MPV単離体00-1のポリメラーゼ遺伝子（L）内の断片から得られたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報。断片のL内での位置は、APV-C（アクセッション番号U65312）とのタンパク質相同性に基づくものである。翻訳された断片8（図6B）は、アミノ酸番号8～243に位置し、断片9と10との共通配列（図6C）は、APV-CのLのORFのアミノ酸番号1358～1464に位置する。

20

【0076】

図7：MPV単離体00-1のゲノム地図。開始コドンおよび停止コドンのヌクレオチド位置は、各ORFの下に示してある。LのORFを横切る二重線は、L遺伝子を短く表わしたことを示す。地図の下に3つのリーディングフレームは、第1のG ORF（ヌクレオチド(nt) 6262～6972）、および重複した、可能性のある第2のORFを表わす。

【0077】

図8：MPVと他のニューモウイルスの核タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。Barr（1991）によって同定された保存領域は、枠で囲んで表わし、A、BおよびCと標記した。ニューモウイルス間での保存領域（Li, 1996）は、灰色の影を付けて示す。ギャップはダッシュで示し、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

30

【0078】

図9：MPVのリン酸化タンパク質と他のニューモウイルスのリン酸化タンパク質のアミノ酸配列比較。高度に類似する領域（Ling, 1995）は枠で囲み、グルタミン酸に富む領域は灰色の影を付けてある。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【0079】

図10：MPVのマトリックスタンパク質と他のニューモウイルスのマトリックスタンパク質の推定アミノ酸配列の比較。保存されたヘキサペプチド配列（Easton, 1997）は、灰色の影を付けてある。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

40

【0080】

図11：MPVの融合タンパク質と他のニューモウイルスの融合タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。保存されたシステインは枠で囲んであり、N-結合グリコシル化部位には下線を引いてあり、F0の切断部位には二重下線を引いてあり、融合ペプチド、シグナルペプチドおよび膜アンカードメインは灰色の影をつけてある。ギャップはダッシュで示し、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【0081】

図12：MPVのM2のORFと他のニューモウイルスのM2のORFのアミノ酸配列比較。M2-1のORFのアライメントをパネルAに示し、保存されたアミノ末端（Collins, 1990；Zamora, 1999）は灰色の影をつけてある。3つの保存されたシステイン残基は太字で印字し、#で示してあ

50

る。M2-2のORFのアライメントをパネルBに示す。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【 0 0 8 2 】

図13：MPVのSHのORFのアミノ酸配列解析。(A) MPVのSHのORFのアミノ酸配列であり、セリン残基およびトレオニン残基には灰色の影を付けてあり、システイン残基は太字とし、疎水性領域には二重下線が引いてある。可能性のあるN-結合グリコシル化部位には一本下線が引いてある。数字は、疎水性ドメインに隣接する塩基性アミノ酸の位置を示す。(B) MPV、APV-AおよびhRSV-BのSHタンパク質の疎水性度プロットのアライメント。17のアミノ酸からなるウィンドウで、KyteおよびDoolittle法(1982)を用いた。矢印は、強疎水性のドメインを示す。ORF内の位置はX軸に示す。

10

【 0 0 8 3 】

図14：MPVのGのORFのアミノ酸配列解析。(A) MPVのGのORFのアミノ酸配列であり、セリン残基、トレオニン残基およびプロリン残基には灰色の影を付けてあり、システイン残基は太字とし、疎水性領域には二重下線が引いてある。可能性のあるN-結合グリコシル化部位には一本下線が引いてある。(B) MPV、APV-AおよびhRSV-BのGタンパク質の疎水性度プロットのアライメント。17のアミノ酸からなるウィンドウで、KyteおよびDoolittle法(1982)を用いた。矢印は、強く疎水性の領域を示し、ORF内の位置はX軸に示す。

【 0 0 8 4 】

図15：MPVおよび他のパラミクソウイルスのポリメラーゼ遺伝子の保存されたドメインのアミノ酸配列の比較。ドメインIIIは、ドメインIII内の枠で囲った4つの保存されたポリメラーゼモチーフ(A、B、CおよびD)(Poch 1998, 1999)と共に示す。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。hPIV3：ヒト・パラインフルエンザウイルス3型；SV：センダイウイルス；hPIV-2：ヒト・パラインフルエンザウイルス2型；NDV：ニューカッスル病ウイルス；MV：麻疹ウイルス；nipah：ニパウイルス。

20

【 0 0 8 5 】

図16：MPVおよび選択したパラミクソウイルスのM2-1およびLのORFの系統学的解析。M2-1のORFを、ニューモウイルス属の他のメンバーのM2-1のORFとアライメントし(A)、LのORFを、図15(B)の説明に記載されているニューモウイルス属のメンバーおよび選択された他のパラミクソウイルスのLのORFとアライメントした(B)。系統樹は、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いた最尤法解析により作製した。ヌクレオチド変化の数を表わすスケールバーを各系統樹に示す。系統樹内の番号は、共通系統樹に基づくブートストラップ値を示す。

30

【 0 0 8 6 】

図17：hMPV単離体00-1の非コード配列。(A) ORF間およびゲノム末端の非コード配列をポジティブセンス鎖で示している。左から右へ向かって、記載したORFの停止コドン、続いて非コード配列、記載した後続のORFの遺伝子開始シグナルおよび開始コドンを示している。数字は、hMPV地図における開始コドンおよび停止コドンの最初の位置を示す。公表されている遺伝子終結シグナルと類似性を示す配列には下線を引いてあり、UAAAAAU/A/Cと類似性を示す配列には、配列の上に線を引いて表わす。(B) hMPVのゲノム末端のヌクレオチド配列。hMPVのゲノム末端をAPVのゲノム末端と互いにアライメントした。下線を引いた領域は、RT-PCRアッセイで用いた、APVおよびRSVの3'末端および5'末端に基づくプライマー配列を表わす(Randhawaら, 1997; Minkら, 1991)。太字のイタリック体で示したヌクレオチドは、N遺伝子の遺伝子開始シグナルの一部である。Le：リーダー、Tr：トレイラー。

40

【 0 0 8 7 】

図18：2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較；各種のウイルスタンパク質をコードする核酸についてのDNA類似性マトリックス。

【 0 0 8 8 】

図19：2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較；各種のウイルスタ

50

ンパク質についてのタンパク質類似性マトリックス。

【 0 0 8 9 】

図 20：2種のプロトタイプのhMPV単離体の核タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 0 】

図 21：2種のプロトタイプのhMPV単離体のリン酸化タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 1 】

図 22：2種のプロトタイプのhMPV単離体のマトリックスタンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 2 】

図 23：2種のプロトタイプのhMPV単離体の融合タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 3 】

図 24：2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 4 】

図 25：2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 5 】

図 26：2種のプロトタイプのhMPV単離体の短い疎水性タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 6 】

図 27：2種のプロトタイプのhMPV単離体の接着糖タンパク質のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 7 】

図 28：2種のプロトタイプのhMPV単離体のポリメラーゼタンパク質のN末端のアミノ酸アライメント。

【 0 0 9 8 】

図 29：ned/00/01および / またはned/99/01を接種した12匹のモルモットの咽喉スワブおよび鼻スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。

【 0 0 9 9 】

図 30A：ned/00/01に感染させ、ned/00/01 (GP4、5、6) またはned/99/01 (GP1、3) で再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答。

【 0 1 0 0 】

図 30B：ned/99/01に感染させ、ned/00/01 (GP8、9) またはned/99/01 (GP10、11、12) のいずれかで再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答。

【 0 1 0 1 】

図 31：ned/00/01またはned/99/01に感染させたモルモットから採取した血清についてのned/00/01およびned/99/01 ELISAの特異性。

【 0 1 0 2 】

図 32：3匹の同種感染 (00-1/00-1)、2匹の同種感染 (99-1/99-1)、2匹の異種感染 (99-1/00-1) および2匹の異種感染 (00-1/99-1) させたモルモットのned/00/01およびned/99/01 ELISAに対する平均IgG応答。

【 0 1 0 3 】

図 33：hMPVに感染させたモルモットのAPV抑制の平均パーセンテージ。

【 0 1 0 4 】

図 34：ned/00/01およびned/99/01に感染したモルモットのned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cに対するウイルス中和力価。

【 0 1 0 5 】

図 35：ned/00/01を (2回) 接種したカニクイザルの咽喉スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。

【 0 1 0 6 】

図 36A (上の2枚のパネル)：ned/00/01に (再) 感染させた2匹のカニクイザルのned/00/01に対するIgA、IgMおよびIgG応答。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

図36B(下の2枚のパネル): ned/00/01に感染させた2匹のカニクイザルのAPVに対するIgG応答。

【 0 1 0 8 】

図37: ヒト血清においてIgG抗体を検出するためのhMPV ELISAおよびAPV抑制ELISAの使用の比較。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 1 0 9 】

詳細な説明ウイルス単離および特性決定

1980年から2000年までに、本発明者らは、重篤な呼吸性疾患に罹患している患者から、28種の未同定のウイルス単離体を見出した。これら28種の未同定のウイルス単離体は、tMK細胞ではゆっくり増殖したが、VERO細胞およびA549細胞ではあまり増殖せず、MDCKまたはニワトリ胚形成線維芽細胞では全くまたは殆ど増殖できなかった。これらのウイルス単離体の多くは、tMK細胞で3代継代した後、10日目～14日目にCPEを誘発した。このCPEは、tMKまたは他の細胞培養物においてhRSVまたはhPIVにより誘発されるものとほとんど区別できず、合胞体形成が起こった後で細胞が急速な内部破壊を示し、続いて細胞が単層から剥離することを特徴とする。細胞は通常(時には後に)、ウイルスを初期材料から3代継代した後、接種後10～14日目にCPEを示し、これはhRSVやhPIVなどの他のウイルスにより引き起こされるCPEよりも多少遅い。

10

20

【 0 1 1 0 】

感染tMK細胞の上清を用いてEM分析を行ったところ、13～17nmの短いエンベロープ突起を有する150～600nmのパラミクソウイルス様ウイルス粒子の存在が明らかになった。パラミクソウイルス科などのエンベロープウイルスの生化学的特性と一致して、標準的なクロロホルムまたはエーテルでの処理⁸を行ったところ、tMK細胞ではTCID₅₀が10⁴を超える感染度の低下が起こった。ウイルス感染tMK細胞培養物の上清は、七面鳥、ニワトリおよびモルモットの赤血球では赤血球凝集活性を示さなかった。培養の間、ウイルスの複製は、被験細胞についてトリプシン依存性のようであった。これらのウイルス学的データを組合わせて、新たに同定されたウイルスを分類学的にパラミクソウイルス科の1メンバーとして分類することができた。

30

【 0 1 1 1 】

パラミクソウイルス亜科⁹、hPIV 1～4、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルス、hRSV、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、ツパイウイルスおよびマプエラウイルスに特異的なプライマーセットを用いた逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析のために、未同定のウイルス単離体のうちの15種に感染させたtMK細胞からRNAを単離した。RT-PCRアッセイは、関連する可能性のあるウイルスを検出するために低ストリンジエンシーにて行い、同種のウイルスストックから単離されたRNAを対照として用いた。入手可能な対照はそれぞれのウイルス特異的プライマーと陽性に反応したが、新たに同定されたウイルス単離体はどのプライマーセットとも反応せず、このことは、そのウイルスが被験ウイルスと近縁ではないことを示した。

40

【 0 1 1 2 】

ウイルス感染tMK細胞培養物の上清を2種用いて、モルモットおよびフェレットに鼻腔内接種した。接種の0日目、2週間後および3週間後に、これらの動物から血清を採取した。動物は臨床的症状を示さなかったが、ウイルス中和(VN)アッセイおよび同種ウイルスに対する間接IFAで測定したところ、全てが血清転換を起こしていた。血清は、間接IFAでは上に記載されている既知のパラミクソウイルスおよびPVMのいずれとも反応しなかった。次に、モルモットおよびフェレットの感染前および感染後の血清を用いて、これまで未同定だったウイルス単離体をスクリーニングしたところ、そのうちの28種が、感染後血清を用いた間接IFAにより明らかに陽性を示し、それらが血清学的に近縁であるかまたは同一であることが示唆された。

50

【0113】

RAP PCR

未知のウイルス単離体についての配列情報を得るために、RAP-PCR¹⁰として知られるランダムPCR増幅戦略を用いた。このために、tMK細胞を、ウイルス単離体の1つ（単離体00-1）ならびに対照としてのhPIV-1に感染させた。両者の培養物が同様のCPEレベルを示した後、培養物上清中のウイルスを連続20～60%ショ糖勾配で精製した。勾配画分を、EMによりウイルス様粒子について調べ、約50%のショ糖を含む画分からRNAを単離したところ、その中にヌクレオカプシドが見られた。双方のウイルス画分から単離した等量のRNAをRAP-PCRに用い、その後でサンプルを3%NuSieveアガロースゲル上で並べて泳動した。次に、未同定のウイルスに特異的な20の差示的に現れるバンドをゲルから精製し、プラスミドpCR2.1（Invitrogen）にクローニングし、ベクター特異的プライマーを用いて配列決定した。これらの配列を用い、BLASTソフトウェア（www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/）を用いてGenbankデータベースの配列に対する相同性を検索したところ、20の断片のうち10がAPV/TRTV配列に対して類似性を示した。

【0114】

これら10の断片は、核タンパク質（N；断片1および2）、マトリックスタンパク質（M；断片3）、融合タンパク質（F；断片4、5、6、7）およびポリメラーゼタンパク質（L；断片8、9、10）をコードする遺伝子内に位置していた（図2）。次に、PCRプライマーを設計して、本発明者らのRAP PCR断片ならびに公表されているニューモウイルス亜科のリーダーおよびトレイラー配列⁶に基づいて、ウイルスゲノムの3'末端についての配列情報を完成させた。3つの断片を増幅した。そのうち、断片AはNのオープンリーディングフレーム（ORF）の3'最末端を含み、断片Bはリン酸化タンパク質（P）のORFを含み、断片CはMとFのORFのギャップに近傍であった（図2）。これら3つの断片の配列解析から、ウイルスゲノムの3'最末端にNS1およびNS2のORFが存在せず、FのORFの位置はMのORFのすぐ隣であることが判明した。このゲノム構成は、メタニューモウイルスAPVのゲノム構成と類似しており、これもまた、配列相同性と一致している。N、P、MおよびFのORFの翻訳配列全体が、平均して、ニューモウイルス属のメンバーと30～33%、メタニューモウイルス属のメンバーと66～68%の相同性を示した。SHおよびGのORFでは、これらの属のいずれのメンバーとも、認識できる相同性は見られなかった。Nについて見られるアミノ酸相同性は、hRSVとは約40%、APV-C（遺伝的に最も近縁である）とは88%の相同性を示し、これは例えば図3のアミノ酸配列と他のウイルスのそれぞれのNタンパク質のアミノ酸配列との比較から推定できる。Pのアミノ酸配列は、hRSVとは約25%、APV-Cとは約66～68%の相同性を示し、MはhRSVとは約36～39%、APV-Cとは約87～89%の相同性を示し、FはhRSVとは約40%、APV-Cとは約81%の相同性を示し、M2-1はニューモウイルスとは約34～36%、APV-Cとは約84～86%の相同性を示し、M2-2はニューモウイルスとは約15～17%、APV-Cとは56%の相同性を示し、Lにおいて得られる断片は、平均してニューモウイルスとは44%、APV-Cとは64%の相同性を示した。

【0115】

系統学

未同定のウイルス単離体から得たヌクレオチド配列を用いたBLAST検索から、主にニューモウイルス亜科のメンバーとの相同性が明らかになったが、タンパク質配列に基づく相同性からは、他のパラミクソウイルスともある程度の類似性があることが判った（データは示さず）。新たに同定されたウイルス単離体とニューモウイルス亜科のメンバーとの関係の指標として、これらのウイルスのN、P、MおよびFのORFに基づいて系統樹を構築した。全4つの系統樹において、新たに同定されたウイルス単離体は、APVに最も近縁であった（図4）。記載されているAPVの4種の血清型¹¹から、アメリカ合衆国で主に鳥類において見られるメタニューモウイルスであるAPV血清型Cが、その新たに同定されたウイルスに最も近い類似性を示した。しかし、APV血清型Dでは部分配列情報しか利用できなかったことに注意すべきである。

【0116】

本発明者らの種々の新たに同定されたウイルス単離体の関係を調べるために、8～9種の単離体（Fについて8種、N、MおよびLについて9種）から得られる配列情報に基づいて系統樹を構築した。この目的のために、N、M、FおよびLのORF内の短い断片を増幅するように設計されたプライマーを使用するRT-PCRを用い、続いて直接配列決定した。予め血清学的な意味に関連していることが判っている9種のウイルス単離体（上記を参照）は、遺伝的にも近縁であることが判った。実際に、全9種の単離体は、APVに対してよりも、互いに対しての方が近縁であった。これらの系統樹に用いた配列情報は限られていたが、9種の単離体は2つのグループに分類できると思われ、単離体94-1、99-1および99-2が一方のグループに入り、他の6種の単離体（94-2；93-1；93-2；93-3；93-4；00-1）は他方のグループに入る（図5）。

10

【0117】

血清陽性率

ヒト集団におけるこのウイルスの血清陽性率を調べるために、異なる年齢のカテゴリのヒトからの血清を、未同定のウイルス単離体の1つに感染させたtMK細胞を用いる間接IFAにより試験した。この分析から、6ヶ月～12ヶ月の小児の25%がそのウイルスに対する抗体を有しており、5歳までにほぼ100%の小児が血清陽性となることが判明した。間接IFAにより試験した全部で56の血清サンプルをVNアッセイにより試験した。これらのサンプルの51（91%）において、VNアッセイの結果（力価>8）は間接IFAにより得られた結果（力価>32）と一致した。IFAで陽性と判明した4種のサンプルがVN試験では陰性であり（力価<8）、一方、1種の血清がIFAでは陰性に（力価<32）、VN試験では陽性に（力価16）に反応した（表2）。

20

【0118】

1958年にヒトから採取した72の血清を用いて行ったIFA（年齢は8～99歳）^{12,27}では、100%の血清陽性率が示されており、ヒト集団において40年以上にもわたってこのウイルスが広まってきたことを示している。更に、これらの血清の幾つかをVNアッセイで用いて、IFAデータを確認した（表2）。

【0119】

N、M、PおよびF遺伝子の遺伝学的解析から、MPVが、ニューモウイルス属（平均で30%）と比較して、近年提案されたメタニューモウイルス属に対してより高い配列相同性（平均で63%）を有することが明らかになり、したがって、APV/TRTVと同様であり類似したゲノム構成であることが実証された。RSVのゲノム構成（'3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'）とは違って、メタニューモウイルス（3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）はNS1とNS2の遺伝子を欠失しており、MとLの間の遺伝子の配置が異なっている。本発明者らのウイルス単離体ではM遺伝子とF遺伝子の間にORFが欠けていること、Nの隣にNS1とNS2が欠けていること、そしてAPVとの高いアミノ酸配列相同性を示すことを理由として、ヒトから単離されたMPVを哺乳動物起源、特にヒト起源のメタニューモウイルス属の最初のメンバーとして分類することが提案される。

30

【0120】

系統学的解析から、配列情報が得られた9種のMPV単離体が近縁であることが明らかになった。配列情報は限られていたが、それらは実際に、トリ・メタニューモウイルスのいずれに対してよりも、お互いに対しての方が近縁であった。記載されているAPVの4種の血清型のうち、血清型Cが、N、P、MおよびF遺伝子に基づいて、MPVに最も近縁であった。しかし、血清型Dについて、GenbankからF遺伝子についての部分配列しか入手できず、血清型Bについては、M、NおよびFの配列しか入手できなかったことに注意しなければならない。本発明者らのMPV単離体は、系統樹において2つのクラスターを形成した。hRSVおよびAPVの両者については、異なる遺伝学的および血清学的亜型が記載されている。MPV単離体の2つの遺伝的クラスターが、機能的にも異なる血清学的亜群に該当するか否かは、現在のところ不明である。本発明者らの血清学的調査から、MPVがありふれたヒトの病原体であることが示された。このウイルスが重篤なRTIに罹患している小児の臨床サンプルからたびたび単離されたことは、MPVの臨床的かつ経済的なインパクトが大きいものと思われること

40

50

を示す。ウイルス検出および血清学に基づいた新規な診断アッセイは、このウイルス病原体の罹患率ならびに臨床的および経済的インパクトをより詳細に分析することを可能にする。

【0121】

IFAとVNの結果（5つのサンプル）が僅かに異なるのは、IFAではIgG血清抗体だけが検出されたが、VNアッセイでは抗体のクラスおよびサブクラスの両方が検出されるという事実によるのかもしれないし、あるいはその違いは、両者のアッセイの感度の違いによるのかもしれない。IFAではカットオフ値16が使用され、VNではカットオフ値8が使用される。

【0122】

一方、IFAとVNアッセイとの違いは、この新たに同定されたウイルスの異なる血清型の間で違いがある可能性を示しているのかもしれない。MPVはAPVに最も近縁であると思われるので、このヒトウイルスの起源が鳥類だったことが推測される。1958年のヒトから採取した血清サンプルの分析によれば、MPVが40年以上にわたってヒト集団に広がってきたことが明らかにされ、これは、ゾーノシス（人獣共通感染）仮説事象が1958年よりもずっと以前から起こってきたことを示している。

【0123】

材料および方法

試料の採取

過去何十年にもわたって、本発明者らの研究室は、RTIに罹患している小児から鼻咽頭吸引物を集めてきており、それについてウイルスの存在についてルーチンに試験してきた。全ての鼻咽頭吸引物は、直接免疫蛍光アッセイ（DIF）により、インフルエンザウイルスA型およびB型、hRSVならびにヒト・パラインフルエンザウイルス（hPIV）1～3型に対する蛍光標識抗体を用いて試験した。鼻咽頭吸引物は、VERO細胞、カニクイザル腎三次（tMK）細胞、ヒト肺内皮（HEL）細胞およびイヌ腎（marbin dock kidney; MDCK）細胞を含む各種の細胞系について迅速シェル-バイアル法¹⁴を用いて、ウイルス単離用に処理を行った。二代または三代の継代後に細胞変性効果（CPE）を示し、DIFで陰性であったサンプルを、間接免疫蛍光アッセイ（IFA）により、インフルエンザウイルスA型、B型およびC型、hRSV A型およびB型、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ヒト・パラインフルエンザウイルス（hPIV）1～4型、センダイウイルス、サルウイルス5型、ならびにニューカッスル病ウイルスに対するウイルス特異的抗体を用いて試験した。多くの場合は原因物質を同定できたが、幾つかの試料は試験したこれら全ての被験ウイルスに対して陰性であった。

【0124】

直接免疫蛍光アッセイ（DIF）

RTIに罹患している患者からの鼻咽頭吸引物サンプルを、記載されているようなDIFおよびウイルス単離^{14,15}に用いた。サンプルは-70℃で保存した。簡単に述べると、鼻咽頭吸引物を5mlのダルベッコMEM（BioWhittaker, Walkersville, MD）で希釈し、ボルテックスミキサーで1分間にわたり十分に混合した。次に、懸濁液を840×gで10分間遠心分離した。沈殿物をマルチスボットスライド（Nutacon, Leimuiden, The Netherlands）に広げ、上清はウイルス単離に用いた。乾燥した後、細胞を、アセトン中で室温にて1分間固定した。洗浄した後、スライドを、インフルエンザA型およびB型、hRSVならびにhPIV1～3型（Dako, Glostrup, Denmark）のような市販のFITC標識ウイルス特異的抗血清と共に、37℃で15分間インキュベートした。PBS中で3回、水道水で1回洗浄した後、スライドをグリセロール/PBS溶液（Citifluor, UKC, Canterbury, UK）中に入れ、カバーをした。スライドを、Axioscop蛍光顕微鏡（Carl Zeiss B.V, Weesp, The Netherlands）を用いて分析した。

【0125】

ウイルス単離

ウイルス単離では、tMK細胞（RIVM, Bilthoven, The Netherlands）を、スライドガラス（Costar, Cambridge, UK）が入った24ウェルプレートで、10%ウシ胎仔血清（BioWhittaker, Vervier, Belgium）を補充した下記の培地を用いて培養した。インキュベートする前

に、プレートをPBSで洗浄し、ハンクス塩（ICN, Costa mesa, CA）を含むイーグルMEMを加えた〔そのイーグルMEMの1/2リットルに、0.26gのNaHCO₃、0.025M Hepes（Biowhittaker）、2mM L-グルタミン（Biowhittaker）、100単位のペニシリン、100μgストレプトマイシン（Biowhittaker）、0.5gラクトアルブミン（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）、1.0g D-グルコース（Merck, Amsterdam, The Netherlands）、5.0gペプトン（Oxoid, Haarlem, The Netherlands）および0.02%トリプシン（Life Technologies, Bethesda, MD）を補充した〕。そのプレートに鼻咽頭吸引サンプルの上清を接種し（0.2ml/ウェルで、それぞれ3連ずつ）、続いて840×gで1時間遠心分離した。接種後、プレートを37℃で最大14日間、培地を1週間に一度交換しながらインキュベートし、また、培養物をCPEについて毎日チェックした。14日後、二代目の継代から細胞を掻き集め、14日間インキュベートした。この工程を三継代にわたり繰り返した。スライドガラスを用いて、後記に記載する間接IFAによりウイルスの存在を示した。

10

【0126】

動物の免疫

新たに見出されたウイルスに対するフェレットおよびモルモットに特異的な抗血清を、特定の病原体を保有しない2匹のフェレットおよび2匹のモルモットに実験的に鼻腔内感染させることにより生成させて、それらの動物は別々の加圧グローブボックスに収容した。2～3週間後、全ての動物から心臓穿刺により採血し、それらの血清を参照血清として用いた。その血清は、先に記載されている全てのウイルスについて、後記に記載されている間接IFAにより試験した。

20

【0127】

間接IFAによる抗原の検出

感染tMK細胞を載せたスライドについて、間接IFAを行った。PBSで洗浄した後、スライドを、ウイルス特異的抗血清と共に、37℃で30分間インキュベートした。上記で記載されているように、インフルエンザA型、B型およびC型、hPIV1～3型ならびにhRSVに対するモノクローナル抗体をDIFで用いた。hPIV4型については、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルスのポリクローナル抗体（RIVM）、ならびにフェレットおよびモルモットの参照血清を用いた。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、最初のインキュベーションに用いた血清に対する二次抗体で染色した。ポリクローナル抗血清の二次抗体は、ヤギ-抗-フェレット（KPL, Guilford, UK, 40倍希釈したもの）、マウス-抗-ウサギ（Dako, Glostrup, Denmark, 20倍希釈したもの）、ウサギ-抗-ニワトリ（KPL, 20倍希釈したもの）、およびマウス-抗-モルモット（Dako, 20倍希釈したもの）を用いた。スライドは、DIFについて記載されているようにして処理した。

30

【0128】

間接IFAによるヒトにおける抗体の検出

ウイルス特異的抗体を検出するために、感染tMK細胞をカバーガラス上で冷アセトンで固定し、PBSで洗浄し、1～16倍の希釈度の血清サンプルで染色した。次に、サンプルを、PBS（Dako）中に80倍希釈したFITC標識ウサギ-抗ヒト抗体で染色した。スライドを上記に記載されているようにして処理した。

40

【0129】

MPVのウイルス培養

上記で記載した培地中のサブコンフルエント（sub-confluent）な単層のtMK細胞に、24ウェルプレートで二代または三代継代した後でCPEを示したサンプルの上清を接種した。培養物は毎日CPEについてチェックし、週に一度培地を交換した。CPEは単離体ごとに異なっていたので、全ての培養物を、12～14日目に間接IFAにより新規なウイルス単離体に対するフェレット抗体を用いて試験した。陽性の培養物を3回凍結融解した後、低速遠心分離により上清を清澄化し、アリコートを取り、-70℃で凍結保存した。培養上清中のウイルスの50%組織培養感染量（TCID₅₀）を、記載¹⁶されているようにして測定した。

【0130】

50

ウイルス中和アッセイ

VNアッセイは、ヒトおよび動物の血清の、8倍希釈から出発する連続2倍希釈物を用いて行った。希釈した血清を、TCID₅₀が100のウイルスと共に1時間インキュベートした後、96ウェルプレート内で増殖させたtMK細胞を接種し、その後、プレートを840×gで遠心分離した。3日後および6日後に培地を交換し、接種後8日目にMPVに対するフェレット抗体を用いてIFAを行った。VN力価は、IFAが陰性となり細胞培養物中でCPEが抑制される血清サンプルの最低希釈度として定義した。

【0131】

ウイルスの特性決定

赤血球凝集アッセイおよびクロロホルム感受性試験を記載^{8,14}のようにして行った。EM分析では、ウイルスは、感染細胞培養物の上清から17000×gで4 での微量遠心分離で濃縮した後、ペレットをPBSに再懸濁し、陰性造影EMにより調べた。RAP-PCRのために、ウイルスは、感染tMK細胞上清から、60%ショ糖クッションでの超遠心分離(150000×g、4 2時間)により濃縮した。次に、60%ショ糖境界画分をPBSで希釈し、20~60%の連続ショ糖勾配に上層し、これを275000×gで4 にて16時間遠心分離した。ショ糖勾配画分を、EMおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いて銀染色により、ウイルス様粒子の存在について調べた。ヌクレオカプシドを含むと思われる約50%のショ糖画分をRNA単離およびRAP-PCRに用いた。

【0132】

RNAの単離

RNAは、感染細胞培養物の上清またはショ糖勾配画分から高純度RNA単離キットを用いて製造元(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands)の説明書に従って単離した。

【0133】

RT-PCR

既知のパラミクソウイルスについてのRT-PCRアッセイのためのウイルス特異的オリゴヌクレオチド配列は、追記1に記載されている。ワンステップRT-PCRを、50mM Tris.HCl(pH 8.5)、50mM NaCl、4mM MgCl₂、2mMジチオトレイトール、200μM 各dNTP、10単位の組換えRNAsin(Promega, Leiden, the Netherlands)、10単位のAMV RT(Promega, Leiden, The Netherlands)、5単位のAmplitaq Gold DNAポリメラーゼ(PE Biosystems, Nieuwerker aan de IJssel, The Netherlands)および5μl RNAを含む50μlの反応物中で行った。サイクル条件は、42 45分および95 7分を1回、95 1分、42 2分、72 3分を40回繰り返し、72 10分を1回とした。

【0134】

RAP-PCR

RAP-PCRは、本質的に記載¹⁰のようにして行った。オリゴヌクレオチド配列は、追記2に記載されている。RT反応では、2μlのRNAを、10ng/μlのオリゴヌクレオチド、10mM ジチオトレイトール、500μmの各dNTP、25mM Tris-HCl(pH 8.3)、75mM KClおよび3mM MgCl₂を含む10μlの反応物中で用いた。反応混合物を70 5分間、37 5分間インキュベートした後、200単位のSuperscript RT酵素(Life Technologies)を添加した。37 でのインキュベーションを55分間継続し、72 5分間のインキュベーションにより反応を停止させた。RT混合物を希釈して、8ng/μlのオリゴヌクレオチド、300μmの各dNTP、15mM Tris-HCl(pH 8.3)、65mM KCl、3.0mM MgCl₂および5単位のTaq DNAポリメラーゼ(PE Biosystems)を含む50μlのPCR反応物とした。サイクル条件は、94 5分、40 5分および72 1分を1回、続いて94 1分、56 2分および72 1分を40回繰り返し、72 5分を1回とした。RAP-PCRの後、15μlのRT-PCR産物を3% NuSieveアガロースゲル(FMC BioProducts, Heerhugowaard, The Netherlands)上で並べて泳動した。差示的に現れるMVP特異的断片をゲルからQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen, Leusden, The Netherlands)を用いて精製し、pCR2.1ベクター(Invitrogen, Groningen, The Netherlands)に製造元の説明書に従ってクローニングした。

【0135】

10

20

30

40

50

配列解析

ベクターpCR2.1 (Invitrogen) にクローニングしたRAP-PCR産物を、M13特異的オリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。RT-PCRにより得られたDNA断片を、アガロースゲルからQiaquick Gel Extractionキット (Qiagen, Leusden, The Netherlands) を用いて精製し、PCRに用いたのと同じオリゴヌクレオチドを用いて直接配列決定した。配列解析は、Dyna mic ETターミネーターシーケンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech, Roosenda al, The Netherlands) およびABI373自動DNAシーケンサー (PE Biosystems) を用いて行 った。全ての方法は、製造元の説明書に従って行った。

【0136】

RT-PCRによるMPVのゲノム断片の作製

RAP-PCR断片間のギャップA,BおよびCにまたがるPCR断片 (図2) を作製するために、ウイ ルス単離体00-1から単離したRNAについて、先に記載したようなRT-PCRアッセイを用いた 。次のプライマーを用いた。

【0137】

断片Aについて：リーダー中に設計されたTR1：(5' -AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') お よびNにおいて得られるRAP-PCR断片の3' 末端に設計されたN1 (5' -CTGTGGTCTCTAGTCCCAC TTC-3') 。

【0138】

断片Bについて：Nにおいて得られるRAP-PCR断片の5' 末端に設計されたN2：(5' -CATGCA AGCTTATGGGGC-3') およびMにおいて得られるRAP-PCR断片の3' 末端に設計されたM1：(5' -CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3') 。

【0139】

断片Cについて：Mにおいて得られるRAP-PCR断片の5' 末端に設計されたM2：(5' -GTAGAA CTAGGAGCATATG-3') およびFにおいて得られるRAP-PCR断片の3' 末端に設計されたF1：(5' -TCCCCAATGTAGATACTGCTTC-3') 。

【0140】

断片は、前記で記載したようにして、ゲルから精製し、クローニングし、配列決定した。

【0141】

MPVを診断するためのRT-PCR

9種のMPV単離体のN、M、FおよびLのORFの一部を増幅して配列決定するために、それぞれ につき、プライマーN3 (5' -GCACTCAAGAGATACCCTAG-3') およびN4 (5' -AGACTTTCTGCTTT GCTGCCTG-3') を用いて151ヌクレオチドの断片を増幅し、M3 (5' -CCCTGACAATAACCACTCT G-3') およびM4 (5' -GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3') を用いて252ヌクレオチドの断片を 増幅し、F7 (5' -TGCACTATCTCCTCTTGGGGCTTTG-3') およびF8 (5' -TCAAAGCTGCTTGACACTG GCC-3') を用いて221ヌクレオチドの断片を増幅し、L6 (5' -CATGCCCCACTATAAAAGGTCAG-3') およびL7 (5' -CA CCCCAGTCTTTCTTGAAA-3') を用いて173ヌクレオチドの断片を増幅 した。RT-PCR、ゲル精製および直接配列決定は上記で記載したようにして行った。更に、 用いたプローブは次のとおりとした。

【0142】

Mにおいて用いたプローブ：5' -TGCTTGTACTTCCCAAAG-3'

Nにおいて用いたプローブ：5' -TATTTGAACAAAAAGTGT-3'

Lにおいて用いたプローブ：5' -TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

系統学的解析

全ての系統樹について、ClustalWソフトウェアパッケージを用いてDNA配列をアライメン トし、最尤系統樹は、Phylip3.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを使用し、1 00のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した¹⁵。系統樹の作製に用いた 先に公表されている配列は、Genbankから次のアクセッション番号で入手できる：全ORFに ついて：hRSV：NC001781；bRSV：NC001989；FのORFについて：PVM、D11128；APV-A、D008 50；APV-B、Y14292；APV-C、AF187152；NのORFについて：PVM、D10331；APV-A、U39295； APV-B、U39296；APV-C、AF176590；MのORFについて：PVM、U66893；APV-A、X58639；APV-

10

20

30

40

50

B、U37586；APV-C、AF262571；PのORFについて：PVM、09649；APV-A、U22110；APV-C、AF176591。MPVの9種の異なるウイルス単離体についての系統学的解析は、アウトグループとしてAPV C株を用いて行った。

【0143】

図中で用いた略語：hRSV：ヒトRSV；bRSV：ウシRSV；PVM：マウス肺炎ウイルス；APV-A、BおよびC：トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型。

【0144】

MPVの同定方法の実施例

試料の採取

ウイルス単離体を見出すために、好ましくはヒトなどの哺乳動物、肉食動物（イヌ、ネコ、イタチ（mustellids）、アザラシなど）、ウマ、反芻動物（ウシ、ヒツジ、ヤギなど）、ブタ、ウサギ、トリ（家禽、ダチョウなど）からの鼻咽頭吸引物、咽喉および鼻のスワブ、気管支肺胞洗浄液を調べなければならない。トリの排泄腔スワブおよび糞からも調べることができる。ELISAなどの免疫学的アッセイおよびウイルス中和アッセイのためには、血清を採取しなければならない。

【0145】

採取したウイルス試料は、5mlのダルベッコMEM培地（BioWhittaker, Walkersville, MD）で希釈し、ボルテックスミキサーで1分間にわたり完全に混合した。次に、懸濁液を840×gで10分間遠心分離した。沈殿物は免疫蛍光技法用としてマルチスポットスライド（Nutacon, Leimuiden, The Netherlands）に広げ、上清はウイルス単離に用いた。

【0146】

ウイルス単離

ウイルス単離では、tMK細胞（RIVM, Bilthoven, The Netherlands）を、スライドガラス（Costar, Cambridge, UK）を含む24ウェルプレートで、10%ウシ胎児血清（BioWhittaker, Vervier, Belgium）を補充した下記の培地を用いて培養した。インキュベートする前に、プレートをPBSで洗浄し、0.52g/LのNaHCO₃、0.025M Hepes（BioWhittaker）、2mM L-グルタミン（BioWhittaker）、200単位/Lのペニシリン、200μg/Lのストレプトマイシン（BioWhittaker）、1g/Lのラクトアルブミン（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）、2.0g/LのD-グルコース（Merck, Amsterdam, The Netherlands）、10g/Lのペプトン（Oxoid, Haarlem, The Netherlands）および0.02%トリプシン（Life Technologies, Bethesda, MD）を補充したHanks'塩（ICN, Costa mesa, CA）を有するイーグルMEM（Eagle's MEM）を供給した。プレートに鼻咽頭吸引サンプルの上清を接種し（0.2ml/ウェルで3連ずつ）、続いて840×gで1時間遠心分離した。接種後、プレートを37℃最大14日間インキュベートし、培地を1週間に一度交換し、培養物をCPEについて毎日チェックした。14日後、二代目の継代から細胞を剥がし、更に14日間インキュベートした。この工程を三継代にわたり繰り返した。スライドガラスを用いて、後記に記載する間接IFAによりウイルスの存在を示した。

【0147】

CPEは概して、第三代継代後、単離体によって8～14日目に見られた。CPEは実際には、tMK細胞または他の細胞培養物においてhRSVもしくはhPIVにより引き起こされるものとは区別できなかった。しかし、hRSVは4日目付近を起点としてCPEを誘導する。CPEは、合胞体形成を特徴とし、その後で細胞は急速な内部破壊を示し、続いて細胞が単層から離脱した。幾つかの単離体では、CPEを観察することが難しく、IFAを用いてこれらの培養物中のウイルスの存在を確認した。

【0148】

MPVのウイルス培養

上記で記載した培地中のサブコンフルエントな（sub-confluent）単層のtMK細胞に、24ウェルプレートで二代または三代継代した後でCPEを示したサンプルの上清を接種した。培養物を、CPEについて毎日チェックし、1週間に一度培地を交換した。CPEは単離体ごとに異なっていたので、全ての培養物を、12～14日目に間接IFAにより新規なウイルス単離体に

対するフェレット抗体を用いて試験した。陽性の培養物を3回凍結融解した後、低速遠心分離により上清を清澄化し、アリコートを取り、-70℃で凍結保存した。培養物上清中のウイルスの50%組織培養感染量(TCID50)を、当該分野で用いられる確立された技法¹⁶に従って測定した。

【0149】

ウイルスの特性決定

血液凝集アッセイおよびクロロホルム感受性試験を、十分に確立され記載されている当該分野で用いられる技法¹⁴に従って行った。EM分析では、ウイルスを17000×gで4時間の微量遠心分離で感染細胞培養上清から濃縮した後、ペレットをPBSに再懸濁し、陰性造影EMにより調べた。

10

【0150】

間接IFAによる抗原の検出

採取した被験体は、記載されているようにして処理し、サンプルの沈殿物をマルチスポットスライドに広げた。乾燥した後、細胞をアセトン中で室温で1分間固定した。

【0151】

あるいはまた、ウイルスは、スライドガラスを含む24ウェルスライド内のtMK細胞において培養した。これらのスライドガラスをPBSで洗浄し、アセトン中で室温で1分間固定した。

【0152】

PBSで洗浄した後、スライドを、PBSで1:50~1:100に希釈したポリクローナル抗体と共に、37℃で30分間インキュベートした。本発明者らは、免疫したフェレットおよびモルモットを用いてポリクローナル抗体を得たが、これらの抗体は種々の動物において生起させることができ、ポリクローナル抗体の実施希釈度は各免疫について変えることができる。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、FITC標識ヤギ-抗フェレット抗体(KPL, Guilford, UK, 40倍希釈したもの)と共に、37℃で30分間インキュベートした。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、グリセロール/PBS溶液(Citifluor, UKC, Canterbury, UK)に入れ、覆った。スライドは、Axioscop蛍光顕微鏡(Carl Zeiss B.V., Weesp, the Netherlands)を用いて分析した。

20

【0153】

間接IFAによるヒト、哺乳動物、反芻動物または他の動物における抗体の検出

30

ウイルス特異的抗体を検出するために、MPVを保有する感染tMK細胞をカバーガラス上でアセトンで固定し(上記で記載したとおり)、PBSで洗浄し、希釈度1~16の血清サンプルと共に37℃で30分間インキュベートした。PBSで2回、水道水で1回洗浄した後、スライドを使用する種に対するFITC標識二次抗体(Dako)と共に37℃30分間インキュベートした。スライドは上記で記載したようにして処理した。

【0154】

抗体は蛍光色素で直接標識でき、そうすれば直接免疫蛍光アッセイが行えるだろう。FITCは、任意の蛍光色素で代用できる。

【0155】

動物の免疫

40

新たに見出されたウイルスに対するフェレットおよびモルモットの特異的抗血清は、2匹の特定の病原体を保有しないフェレットおよび2匹のモルモットの実験的鼻腔内感染により作製し、別々の加圧グローブボックスに収容した。2~3週間後、動物から心臓穿刺により採血し、それらの血清を参照血清として用いた。血清は、全ての先に記載されているウイルスについて、後記に記載されているようにして間接IFAにより試験した。特異的抗体調製物の作製には、他の動物種も適しており、他の抗原調製物も使用可能である。

【0156】

ウイルス中和アッセイ(VNアッセイ)

VNアッセイは、ヒトおよび動物の血清の、8倍希釈から出発する連続2倍希釈物を用いて行った。希釈した血清を、TCID50が100のウイルスと共に1時間インキュベートした後、96ウ

50

エルプレート内で増殖させたtMK細胞を接種し、その後、プレートを840×gで遠心分離した。上記で記載したのと同じ培地を使用した。3日後および6日後に培地を交換し、8日目にIFAを行った（上記を参照）。VN力価は、IFAが陰性で細胞培養物中でCPEの抑制が起こる血清サンプルの最低希釈度として定義した。

【0157】

RNAの単離

RNAは、感染細胞培養物の上清またはショ糖勾配画分から高純度RNA単離キットを用いて製造元（Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands）の説明書に従って単離した。RNAは、当該分野で公知の他の手順に従って単離することもできる（Current Protocols in Molecular Biology）。

10

【0158】

RT-PCR

ワンステップRT-PCRを、50mM Tris.HCl(pH 8.5)、50mM NaCl、4mM MgCl₂、2mMジチオトレイトール、200μM各dNTP、10単位の組換えRNasin（Promega, Leiden, the Netherlands）、10単位のAMV RT（Promega, Leiden, The Netherlands）、5単位のAmplitaq Gold DNAポリメラーゼ（PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands）および5μl RNAを含む50μlの反応物中で行った。サイクル条件は、42℃で45分および95℃で7分を1回、95℃で1分、42℃で2分、および72℃で3分を40回繰り返し、72℃で10分を1回とした。

20

【0159】

診断PCRで用いたプライマー：

核タンパク質では、N3（5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG-3'）およびN4（5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'）を用いて151ヌクレオチドの断片を増幅した。マトリックスタンパク質では、M3（5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3'）およびM4（5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3'）を用いて252ヌクレオチドの断片を増幅した。ポリメラーゼタンパク質では、L6（5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3'）およびL7（5'-CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3'）を用いて173ヌクレオチドの断片を増幅した。他のプライマーはMPVの配列に基づいて設計でき、特定の目的には異なる緩衝液およびアッセイ条件が使用できる。

【0160】

配列解析

配列解析は、Dyamic ETターミネーターシーケンシングキット（Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands）およびABI373自動DNAシーケンサー（PE Biosystem）を用いて行った。全ての技法は、製造元の説明書に従って行った。PCR断片は、PCRにおいて使用したのと同じオリゴヌクレオチドを用いて直接配列決定するか、あるいは、断片をゲルからQiaquick Gel Extractionキット（Qiagen, Leusden, The Netherlands）を用いて精製し、pCR2.1ベクター（Invitrogen, Groningen, The Netherlands）に製造元の説明書に従ってクローニングし、次にM13特異的オリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。

30

【0161】

ゲノムの3'末端（NS1/NS2が欠けている）の分析に用いたオリゴヌクレオチド

プライマーTR1（5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3'）は、公表されているhRSVおよびAPVのトレイラーおよびリーダーの配列（Randhawa（1997）により公表）に基づいて設計し、プライマーN1（5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3'）は、Nタンパク質において得られた配列に基づいて設計した。RT-PCRアッセイおよび配列決定は上記に記載されているようにして行った。

40

【0162】

RT-PCRにより、約500塩基対の産物が得られた。これは2種のORFの情報を含むにしては短く、これらの配列を翻訳しても、ORFは明らかにならなかった。

【0163】

ELISAによるヒト、哺乳動物、反芻動物または他の動物における抗体の検出

50

パラミクソウイルス科において、Nタンパク質は最も豊富なタンパク質であり、このタンパク質に対する免疫応答は感染の初期に起こる。これらの理由から、MPVに対する抗体を検出するためのELISAアッセイの開発には、Nタンパク質の組換え供給源が好ましく使用される。抗体検出に適する抗原としては、MPVウイルスに暴露された、またはMPVウイルスに感染した患者のMPV特異的抗体のいずれかと結合するあらゆるMPVタンパク質が含まれる。本発明の好ましい抗原としては、MPVに暴露された患者において主に免疫応答を生じさせるものが挙げられ、したがって、それらは典型的には患者の抗体により最も容易に認識される。特に好ましい抗原としては、MPVのN、FおよびGタンパク質が挙げられる。免疫学的技法において使用される抗原は、未変性の抗原とすることができるか、あるいはそれらの修飾バージョンとすることができる。周知の分子生物学の技法を用いて、MPV抗原のアミノ酸配列を改変して、免疫学的技法において使用可能なその抗原の修飾バージョンを産生することができる。

10

【0164】

遺伝子のクローニング方法、発現ベクターへの、または発現ベクターからの遺伝子の操作方法、および異種宿主における遺伝子によりコードされるタンパク質の発現方法は周知であり、それらの技法を用いて、診断アッセイに使用するための組換え抗原を産生するための発現ベクター、宿主細胞、および宿主内での抗原をコードするクローン化遺伝子の発現を提供することができる。例えば、Molecular cloning, A laboratory manual and Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい。MPV抗原の産生には種々の発現系が使用可能である。例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞においてタンパク質を産生させるのに適する種々の発現ベクターが記載されており、そのいずれもが、暴露された患者において抗MPV抗体を検出するのに適するMPV抗原の産生に使用可能である。

20

【0165】

バキュロウイルス発現系には、必要なタンパク質のプロセッシングを提供するという利点があり、そのために好ましい。この系は、MPV抗原の発現を指令するのにポリヘドリンプロモーターを利用する(Matsuuraら, 1987, J. Gen. Virol. 68:1233-1250)。

【0166】

組換えバキュロウイルスにより産生される抗原は、患者において抗MPV抗体を検出するための種々の免疫学的アッセイに使用できる。組換え抗原が、実際にウイルス特異的抗体を検出するための免疫学的アッセイにおいて天然ウイルスの代わりに使用できることは、十分に確立されている。このアッセイとしては、直接および間接アッセイ、サンドイッチアッセイ、固相アッセイ(特にプレートもしくはビーズを使用するものなど)、ならびに液相アッセイが挙げられる。好適なアッセイとしては、一次および二次抗体を使用するもの、ならびにプロテインAなどの抗体結合試薬を使用するものが挙げられる。更に、本発明では種々の検出方法が使用可能であり、比色、蛍光、リン光、化学発光、発光および放射性の方法が挙げられる。

30

【実施例】

【0167】

実施例1: 組換えNタンパク質を用いる間接抗MPV IgG EIA

40

抗原として組換えNタンパク質(昆虫(Sf9)細胞内で組換えバキュロウイルスを用いて産生したもの)を使用する間接IgG EIAが実施できる。抗原調製物として、Sf9細胞を組換えバキュロウイルスに感染させ、感染後3~7日目に収集する。細胞懸濁液をPBS(pH 7.2)で2回洗浄し、細胞密度を 5.0×10^6 細胞/mlに調整し、3回凍結融解する。大きな細胞デブリを低速遠心分離($500 \times g$ で15分間)によりペレット化し、上清を集め、使用するまで -70°C で保存する。陰性対照抗原として、未感染細胞を同様に処理する。

【0168】

100 μl の凍結融解溶解物を1:50~1:1000の範囲の希釈度で用いて、マイクロタイタープレートにコーティングする。未感染細胞の溶解物を2連ずつウェルに入れ、陰性対照として使う。一夜インキュベートした後、プレートをPBS/0.05% Tweenで2回洗浄する。試験

50

血清をELISA緩衝液（2%正常ヤギ血清および0.5% ウシ血清アルブミンならびに0.1%ミルクを補充したPBS）で1：50～1：200に希釈し、続いてウェルを37℃で1時間インキュベートする。

【0169】

プレートにPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト（または他の種に対するもの）IgGをELISA緩衝液で1：3000～1：5000に希釈し、ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートする。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回、水道水で1回洗浄し、Sigmaから入手したような酵素基質TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）と共に室温で15分間インキュベートし、反応を100μlの2Mリン酸により停止する。比色読取は、自動マイクロタイタープレート読取装置を用いて450nmで測定する。

10

【0170】

実施例2：組換え核タンパク質を用いる捕捉抗MPV IgM EIA

抗原として組換え核タンパク質または任意の他の組換えタンパク質を使用する捕捉IgM EIAは、先にErdmanら（1990）によりJ. Clin. Microb. 29:1466-1471に記載されているアッセイに変更を加えることにより実施できる。

【0171】

アフィニティ精製抗ヒトIgM捕捉抗体（または他の種に対するもの）（例えばDakoから入手したもの）を、マイクロタイタープレートのウェルに、0.1M炭酸緩衝液（pH 9.6）中で250ng / ウェルの濃度で添加する。室温で一夜インキュベートした後、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。ELISA緩衝液で1：200～1：1000に希釈した100μlの試験血清を、3連ずつウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートする。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。

20

【0172】

凍結融解した（組換えウイルスに感染させた）Sf21細胞溶解物を、ELISA緩衝液で1：100～1：500に希釈し、ウェルに添加し、37℃で2時間インキュベートする。未感染細胞溶解物は陰性対照として使用し、2連ずつウェルに入れる。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで3回洗浄し、ELISA緩衝液で最適希釈度にした100μlのMPVに対するポリクローナル抗体と共に37℃で1時間インキュベートする。PBS / 0.05% Tweenで2回洗浄した後、プレートを西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識二次抗体（例えばウサギ抗フェレット）と共にインキュベートし、プレートを37℃で20分間インキュベートする。

30

【0173】

次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで5回洗浄し、酵素基質TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）（例えば「Sigma」から入手したもの）と共に室温で15分間インキュベートし、反応を100μlの2Mリン酸で停止させる。比色読取は、自動マイクロタイタープレート読取装置を用いて450nmで測定する。

【0174】

組換え核タンパク質（または他の組換えタンパク質）およびMPVウイルス全体を用いる捕捉IgM EIAの感度を、臨床的MPVウイルス感染に罹患している患者からの急性期および回復期の血清対を用いて比較する。組換え核タンパク質捕捉EIAの特異性は、健常なヒトおよび他のパラミクソウイルス感染に罹患しているヒトからの血清被験体を試験することにより決定する。

40

【0175】

バキュロウイルス発現により産生された組換えMPV融合タンパク質および糖タンパク質のタンパク質を用いることに関するEIAの可能性

糖タンパク質GおよびFは、MPVビリオンの2種の膜貫通エンベロープ糖タンパク質であり、主要な中和および保護抗原を表す。これらの糖タンパク質をベクターウイルス系（例えばバキュロウイルス系）で発現させると、MPV特異的抗体を検出するためのアッセイで使用する組換え抗原の供給源が得られる。更に、それらを例えば核タンパク質と組み合わせて使用すると、MPVに対する抗体の検出における酵素免疫アッセイの感度がさらに増大する。

【0176】

50

種々の他の免疫学的アッセイ (Current Protocols in Immunology) は、本明細書で記載されているものの代替の方法として使用可能である。

【0177】

ウイルス単離体を見出すためには、好ましくは (限定するものではないが) ヒト、肉食動物 (イヌ、ネコ、アザラシなど)、ウマ、反芻動物 (ウシ、ヒツジ、ヤギなど)、ブタ、ウサギ、トリ (家禽、ダチョウなど) からの鼻咽頭吸引物、咽喉および鼻のスワブ、気管支肺胞洗浄液を調べればよい。トリからは、排泄腔および腸管のスワブならびに糞も調べることができる。全てのサンプルについて、ウイルスを検出するために、血清学 (抗体および抗原の検出など)、ウイルス単離および核酸検出技法を行うことができる。

【0178】

モノクローナル抗体は、マウス (または他の動物) を精製したMPVまたはその部分 (タンパク質、ペプチド) で免疫し、次に確立されたハイブリドーマ技術 (Current Protocols in Immunology) を用いることにより作製できる。あるいはまた、ファージディスプレイ技術もこの目的に使用できる (Current Protocols in Immunology)。同様に、ポリクローナル抗体は、感染しているヒトもしくは動物、または免疫したヒトもしくは動物から得ることができる (Current Protocols in Immunology)。

【0179】

NS1タンパク質およびNS2タンパク質の存在又は不在の検出は、種々の抗体調製物を用いるウエスタンブロッティング、IFA、免疫沈降技法を用いて行うことができる。ウイルス単離体におけるNS1遺伝子およびNS2遺伝子またはそれらの相同体の存在または不在の検出は、既知のNS1および / またはNS2遺伝子に基づいて設計されたプライマーセットを使用するPCRならびに種々の核酸ハイブリダイゼーション技法を用いて行うことができる。

【0180】

NS1遺伝子およびNS2遺伝子がウイルスゲノムの3'末端に存在するか否かを判定するために、ゲノムのこの3'末端に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことができる。本発明者らの場合、本発明者らはウイルスゲノムの3'非翻訳領域に特異的なプライマーおよびNのORF内のプライマーを使用した。同じ目的のために、他のプライマーを設計してもよい。NS1 / NS2遺伝子の不在は、PCR産物の長さおよび / またはヌクレオチド配列から明らかになる。NS1および / またはNS2遺伝子に特異的なプライマーは、ウイルスゲノムの3'末端の他の部分 (例えば非翻訳領域またはN、MもしくはFのORF) に特異的なプライマーと組み合わせて使用して、NS1またはNS2遺伝子の存在の陽性の同定を可能にすることができる。PCRだけでなく、分子クローニング、核酸ハイブリダイゼーションなどの種々の技法が同じ目的に使用可能である。

【0181】

実施例3: MPVの各種の血清型 / 亜群

2つの可能性のある遺伝的クラスターが、9種のウイルス単離体のN、M、FおよびLのORFの部分ヌクレオチド配列の分析によって同定される。1つのクラスター内では90~100%のヌクレオチド同一性が見られ、クラスター間では81~88%の同一性が見られた。更なるウイルス単離体について得られた配列情報から、2つの遺伝子型の存在が確認された。クラスターAのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/00/01、およびクラスターBのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/99/01を交差中和アッセイで使用して、遺伝子型が異なる血清型または亜群に関連するか否かを試験した。

【0182】

結果

ポリメラーゼ遺伝子内に位置するプライマーを使用するRT-PCRアッセイを用いて、本発明者らは鼻咽頭吸引サンプルから30種の更なるウイルス単離体を同定した。これらの新たな単離体のマトリックス遺伝子およびポリメラーゼ遺伝子の部分ならびに先の9種の単離体のものの配列情報を用いて、系統樹を構築した (図16)。これらの系統樹の分析から、2種の遺伝的クラスターの存在が確認された。すなわち、A群のプロトタイプウイルスとしてのウイルス単離体ned/00/00-1およびB群のプロトタイプウイルスとしてのウイルス単離

10

20

30

40

50

体 ned/99/01 である。1つの群の中でのヌクレオチド配列同一性は92%を上回り、一方、クラスター間では同一性は81～85%であった。

【0183】

ウイルス単離体 ned/00/01 および ned/99/01 を用いてフェレットに接種して、ウイルス特異的抗血清を生起させた。これらの抗血清は、両者のウイルスを用いるウイルス中和アッセイに用いた。

【0184】

表3：

ウイルス中和力価

| | 単離体 00-1 | 単離体 99-1 |
|----------------------------|----------|----------|
| 前血清 フェレット A (00-1) | □ 2 | □ 2 |
| フェレット A 22dpi (00-1) | 6 4 | □ 2 |
| 前血清 フェレット B (99-1) | □ 2 | □ 2 |
| フェレット B 22dpi (99-1) | 4 | 6 4 |

単離体 00-1 では、力価は 32 (64/2) 倍違う。

単離体 99-1 では、力価は 16 (64/4) 倍違う。

10

20

30

【0185】

更に、6匹のモルモットにウイルス (ned/00/01 と ned/99/01) のいずれか一方を接種した。鼻咽頭吸引サンプルについて RT-PCR アッセイを行ったところ、感染後2日目から10日目までウイルスの複製を示した。感染後70日目に、モルモットを同種または異種のウイルスでチャレンジしたところ、全4種の場合について、ウイルス複製が認められた。

【0186】

表4

| | 初回感染 | ウイルスの複製 | 2回目の感染 | ウイルスの複製 |
|-------------|------|---------|--------|---------|
| モルモット 1～3 | 00-1 | 3匹のうち2匹 | 99-1 | 2匹のうち1匹 |
| モルモット 4～6 | 00-1 | 3匹のうち3匹 | 00-1 | 3匹のうち1匹 |
| モルモット 7～9 | 99-1 | 3匹のうち3匹 | 00-1 | 2匹のうち2匹 |
| モルモット 10～12 | 99-1 | 3匹のうち3匹 | 99-1 | 3匹のうち3匹 |
| | | | | |

注：2回目の感染では、モルモット 2 および 9 はもはや生存していなかった。

40

【0187】

1回目のチャレンジ後の抗血清を用いたウイルス中和アッセイでは、フェレットを用いて

50

行ったVNアッセイと本質的に同じ結果が示された（VN力価の差は16倍を上回る）。

【0188】

この実施例で示される結果から、2つの遺伝子型の存在が確認される。それらはMPVの2つの血清型に対応し、異種および同種のウイルスによる繰り返し感染の可能性を示している。

【0189】

実施例4：更なる配列決定

この実施例では、MPVのオープンリーディングフレーム（ORF）の配列および遺伝子間配列、ならびにゲノム末端の部分配列の更なる分析を記載する。

【0190】

MPVの核タンパク質（N）、リン酸化タンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）および融合タンパク質（F）の遺伝子の配列解析から、APV血清型C（アメリカ合衆国で主に鳥類において見られるトリ・ニューモウイルス）と最も高い程度の配列相同性があることが明らかになった。また、これらの分析から、ウイルスゲノムの3'末端において非構造タンパク質NS1およびNS2が存在せず、マトリックスタンパク質のすぐ隣に融合タンパク質が位置することも明らかになった。ここで、本発明者らは、22K（M2）タンパク質、小さな疎水性（SH）タンパク質、接着（G）タンパク質およびポリメラーゼ（L）タンパク質の遺伝子、遺伝子間領域ならびにトレイラー配列の配列を示す。ここで示す配列を、先に記載されている配列と組み合わせれば、ゲノム末端の先端の12～15ヌクレオチドを除くMPVのゲノム配列が完全なものになり、MPVのゲノム構成が確立される。MPVゲノムの配列をAPV亜型A、BおよびC、RSV亜型AおよびB、PMVならびに他のパラミクソウイルスの配列と並べて比較すれば、MPVがメタニューモウイルス属に分類されることの強力な証拠が得られる。

【0191】

結果

配列ストラテジー

MPV単離体00-1（van den Hoogenら，2001）を、三次サル腎（tMK）細胞内で増殖させ、接種後3週間目に上清から単離されたRNAをRT-PCR分析の鋳型として用いた。プライマーは、MPV00-1について入手できる部分配列情報（van den Hoogenら，2001）ならびにAPVおよびRSVのリーダー配列およびトレイラー配列（Randhawaら，1997；Minkら，1991）に基づいて設計した。初めに、先に得られた産物の間の断片（長さが500bp～4Kbの範囲の大きさ）をRT-PCR増幅により作製し、直接配列決定した。次に、MPVゲノム全体に該当する一連の重複するRT-PCR断片（500～800bpの範囲の大きさ）を作製することにより、ゲノム配列を確認した。全てのPCR断片について、両方の鎖を直接配列決定して、増幅および配列決定の誤差を最小限にした。このヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を用いて、Genbankデータベースの配列との相同性をBLASTソフトウェア（www.ncbi.nih.gov/blast）を用いて検索した。タンパク質の名称は、既知のウイルス遺伝子との相同性ならびにそれらのゲノム内での位置に基づき、オープンリーディングフレーム（ORF）に対して割り当てた。この情報に基づいて、MPVのゲノム地図を構築した（図7）。MPVのゲノムの長さは13378ヌクレオチドであり、その構成はAPVのゲノム構成と類似する。以下に、本発明者らはMPVのORFおよび非コード配列と他のパラミクソウイルスのものとの間の比較を示し、重要な類似点と差異点について述べる。

【0192】

核タンパク質（N）遺伝子

示すように、MPVのゲノム地図の最初の遺伝子は、394アミノ酸（aa）のタンパク質をコードするものであり、他のニューモウイルスのNタンパク質と広い相同性を示す。NのORFの長さは、APV-CのNのORFの長さと同じであり（表5）、他のパラミクソウイルスのもの（Barrら，1991）よりも短い。アミノ酸配列の分析から、APV-Cと最も高い相同性（88%）を示し、他のパラミクソウイルスとは7～11%しか示さないことが明らかになった（表6）。

【0193】

Barrら（1991）は、他のモノネガウイルス目に属するウイルスA、BおよびCの間で類似す

10

20

30

40

50

る3つの領域を同定した(図8)。これらの領域は、類似性はウイルス科内では最も高いが、ウイルス科間では高度に保存されている。3つの領域全てにおいて、MPVは、APV-Cと97%、APV-Bと89%、APV-Aと92%、ならびにRSVおよびPVMと66~73%のアミノ酸配列同一性があることが判明した。アミノ酸残基160~340の間の領域は、メタニューモウイルス間で高度に保存されており、ニューモウイルス亜科ではそれより多少低いと思われる(Miyaharaら, 1992; Liら, 1996; Barrら, 1991)。これは、MPVがメタニューモウイルスであり、APV-Cと100%の類似性を示すことと一致する。

【0194】

リン酸化タンパク質(P)遺伝子

ゲノム地図の第2のORFは、294アミノ酸のタンパク質をコードするものであり、このタンパク質はAPV-CのPタンパク質と68%のアミノ酸配列相同性を共有するが、RSVのPタンパク質とは22~26%しかない(表6)。MPVのP遺伝子は1つの実質的なORFを含んでおり、それに関しては多くの他のパラミクソウイルス由来のPと類似する(LambおよびKolakofsky, 1996; Sedlmeierら, 1998に概説されている)。

【0195】

APVのAおよびBならびにPVMとは異なり、RSVおよびAPV-Cとは同様に、MPVのPのORFはシステイン残基が欠けている。Ling(1995)は、全てのニューモウイルス間で高い類似性がある領域(アミノ酸185~241)がRNA合成プロセスまたはヌクレオカプシド複合体の構造の完全性の維持においてある役割を担っていることを示唆していた。この高い類似性のある領域はMPVにおいても、特に保存的置換を考慮に入れた場合に見られており(図9)、APV-Cと100%、APV-AおよびBと93%、ならびにRSVと約81%の類似性を示す。MPVのPタンパク質のC末端はグルタミン酸残基に富み、これはAPVについても記載されている(Lingら, 1995)。

【0196】

マトリックス(M)タンパク質遺伝子

MPVゲノムの第3のORFは254アミノ酸のタンパク質をコードするものであり、これは他のニューモウイルスのMのORFと類似している。MPVのMのORFの大きさは他のメタニューモウイルスのMのORFと全く同じであり(表5)、APVのマトリックスタンパク質と高いアミノ酸配列相同性(78~87%)を示し、RSVおよびPVMのものとはそれより低い相同性(37~38%)を示し、および他のパラミクソウイルスのものとは10%以下の相同性を示す(表6)。

【0197】

Easton(1997)は、全てのニューモウイルスのマトリックスタンパク質の配列を比較し、残基14~19において保存されたヘプタペプチドを見出した。このヘプタペプチドはMPVにおいても保存されている(図10)。RSV、PVMおよびAPVでは、Mの主要なORFの内部に、またはそれと重複して、小さな第2のORFが同定されている(bRSVでは52アミノ酸および51アミノ酸、RSVでは75アミノ酸、PVMでは46アミノ酸、およびAPVでは51アミノ酸)(Yuら, 1992; Eastonら, 1997; Samalら, 1991; Satakeら, 1984)。本発明者らは、MPVのMのORF内にある2つの小さなORFに注目した。一方の小さなORF(54のアミノ酸残基)は、主要なMのORF内部に見られ(断片1、図7)、ヌクレオチド2281から始まっており、もう一方の小さなORF(33のアミノ酸残基)はMの主要なORFと重複して見られ、ヌクレオチド2893から始まっていた(断片2、図7)。RSVおよびAPVの第2のORFと同様に、これらの第2のORFと他のニューモウイルスの第2のORFとの間に有意な相同性はなく、開始シグナルまたは停止シグナルが欠けていると思われる。更に、APVおよびRSVのこれらの第2のORFに相当するタンパク質の合成についての証拠は報告されていない。

【0198】

融合タンパク質(F)遺伝子

MPVのFのORFはMのORFに隣接して位置しており、これはメタニューモウイルス属のメンバーの特徴である。MPVのF遺伝子は539アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-CのFよりもアミノ酸残基2個ぶんだけ長い(表5)。アミノ酸配列の分析から、APV-Cと81%、APV-AおよびBと67%、ニューモウイルスのFタンパク質と33~39%、および他のパラミクソ

10

20

30

40

50

ウイルスとは僅か10～18%の相同性があることが明らかになった(表6)。パラミクソウイルスのFタンパク質間で保存されていて、MPVでも見られる特徴の1つは、システイン残基の分布である(Morrison, 1988; Yuら, 1991)。メタニューモウイルスは、F1において12個のシステイン残基(7個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている)、およびF2において2個のシステイン残基(1個はすべてのパラミクソウイルス間で保存されている)を共有している。MPVのFのORF内に存在する3つの可能性のあるN結合グリコシル化部位のうち、RSVと共有するものはなく、2つ(74位および389位)がAPVと共有する。MPVの第3のユニークな可能性のあるN結合グリコシル化部位は206位に位置している(図11)。

【0199】

他のパラミクソウイルスとは配列相同性が低いにもかかわらず、MPVのFタンパク質は、他のパラミクソウイルス科のメンバーのFタンパク質について記載されている(Morrison, 1988)ものと一致する、典型的な融合タンパク質の特徴を示した。パラミクソウイルス科のメンバーのFタンパク質は、不活性な前駆体(F0)として合成され、それが宿主細胞のプロテアーゼにより切断されて、アミノ末端F2サブユニットおよび大きなカルボキシ末端F1サブユニットを生じる。提案される切断部位(Collinsら, 1996)は、パラミクソウイルス科の全てのメンバー間で保存されている。MPVの切断部位は、残基RQSRを含む。双方のアルギニン(R)残基はAPVおよびRSVで共有しているが、グルタミン(Q)残基およびセリン(S)残基はヒト・パラインフルエンザウイルス1型、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどの他のパラミクソウイルスと共有する(データは示さず)。

【0200】

F1のアミノ末端にある疎水性領域は、膜融合ドメインとして機能すると考えられ、パラミクソウイルスおよび麻疹ウイルスの間で高い配列類似性を、ニューモウイルスに対してはそれより低い程度の配列類似性を示す(Morrison, 1988)。これらの26個の残基(137～163位、図11)は、MPVとAPV-Cとの間で保存されており、これは、この領域がメタニューモウイルス間で高度に保存されていること(Naylorら, 1998; Sealら, 2000)と一致している。

【0201】

APVおよび他のパラミクソウイルスのF2サブユニットについて見られるように、MPVはRSVと比較して22個のアミノ酸残基(107～128位、図11)が欠失していることが明らかになった。更に、RSVおよびAPVでは、シグナルペプチドおよびアンカードメインが亜型内で保存されていることが判り、亜型間で高い多様性を示した(Plowsら, 1995; Naylorら, 1998)。F2のアミノ末端にあるMPVのシグナルペプチド(アミノ酸10～35、図11)は、APV-Cとある程度の配列類似性を示し(26個のアミノ酸残基のうち18個が類似する)、他のAPVまたはRSVとはあまり保存されていない。F1のカルボキシ末端にある膜アンカードメインでは、ずっと高い多様性が見られるが、APV-Cとはある程度の相同性がなお見られる。

【0202】

22K(M2)タンパク質

M2遺伝子はニューモウイルス亜科に固有のものであり、全てのニューモウイルスで2つの重複するORFが見られる。第1の主要なORFはM2-1タンパク質を示し、これはウイルスポリメラーゼの処理機能(Collinsら, 1995; Collins, 1996)およびその遺伝子間領域のリードスルー(readthrough)(Hardyら, 1998; Fearnら, 1999)を増大させる。MPVのM2-1遺伝子は、F遺伝子に隣接して位置しており、187アミノ酸のタンパク質をコードし(表5)、APV-CのM2-1と最も高い相同性(84%)を示す(表6)。全てのニューモウイルスのM2-1タンパク質の比較から、そのタンパク質のアミノ末端側の半分において最も高く保存されていることが明らかとなっており(Collinsら, 1990; Zamoraら, 1992; Ahmadianら, 1999)、これはMPVがそのタンパク質の最初の80個のアミノ酸残基においてAPV-Cと100%の類似性を示すという知見と一致する(図12A)。MPVのM2-1タンパク質は、最初の30個のアミノ酸残基内に位置する3個のシステイン残基を含んでおり、それらは全てのニューモウイルス間で保存されている。そのようなシステインの集中は、亜鉛結合タンパク質においてよく見られる(Ahmadianら, 1991; Cuestaら, 2000)。

【0203】

第2のORF (M2-2) は、ニューモウィルスのM2-1のORFと重複し、これは位置については保存されているが、配列においては保存されておらず、ウィルスのRNAの複製と転写との間の切り替えの制御に関与すると考えられる (Collinsら, 1985; Elangoら, 1985; Baybuttら, 1989; Collinsら, 1990; Lingら, 1992; Zamoraら, 1992; Alansariら, 1994; Ahmadianら, 1999; Berminghamら, 1999)。MPVでは、M2-2のORFは、M2-1のORFのヌクレオチド512から出発しており (図7)、これはAPV-Cと全く同じ出発位置である。M2-2のORFの長さは、APV-CとMPVとは同じであり、77個のアミノ酸残基である (表5)。M2-2のORFの配列比較 (図12B) から、MPVとAPV-Cとの間には64%のアミノ酸配列相同性があり、MPVとAPV-AおよびBの間には44~48%のアミノ酸配列相同性しかないことが明らかになった (表6)。

10

【0204】

小さな疎水性タンパク質 (SH) のORF

hMPVのM2に隣接して位置する遺伝子は、183アミノ酸のSHタンパク質をコードすると思われる (図1および7)。このORFと他のRNAウイルス遺伝子または遺伝子産物との間には認識できるような配列同一性はない。これは驚くことではない。何故ならば、ニューモウィルスのSHタンパク質間での配列類似性は一般に低いからである。hMPVの推定のSHのORFは、現在までに知られている最も長いSHのORFである (表1)。SHのORFのアミノ酸組成は、APV、RSVおよびPVMのものと比較的類似しており、トレオニン残基およびセリン残基の割合が高い (hMPV、APV、RSV A、RSV B、bRSVおよびPVMについて、それぞれ22%、18%、19%、20.0%、21%および28%)。hMPVのSHのORFは、10個のシステイン残基を含むが、APVのSHは16個のシステイン残基を含む。hMPVのSHのORFは、2個の可能性のあるN結合グリコシル化部位 (アミノ酸76および121) を含むが、APVは1個であり、RSVは2個または3個であり、PVMは4個である。

20

【0205】

推定のhMPVのSHタンパク質ならびにAPVおよびRSVのSHの親水性プロフィールから、類似する特徴が明らかになった (図7B)。APVおよびhMPVのSHのORFは、親水性のN末端、中心部の疎水性ドメイン (可能性のある膜貫通ドメインとして機能する可能性がある) (hMPVではアミノ酸30~53)、第2の疎水性ドメイン (アミノ酸151~179)、および親水性のC末端を有する。これに対して、RSVのSHでは、APVおよびhMPVのORFのC末端部が欠けている。全てのニューモウィルスのSHタンパク質において、疎水性ドメインは塩基性のアミノ酸残基に隣接しており、これはhMPVのSHのORFでも見られる (アミノ酸29および54)。

30

【0206】

接着糖タンパク質 (G) のORF

hMPVの推定のGのORFは、推定のSH遺伝子に隣接して位置し、236アミノ酸のタンパク質 (ヌクレオチド6262~6972、図1) をコードする。第2の小さなORFがこのORFのすぐ後ろに見られ、68個のアミノ酸残基 (ヌクレオチド6973~7179) をコードする可能性があるが、開始コドンが欠けている。194アミノ酸残基の第2のリーディングフレームにある第3の可能性のあるORFは、これらのORFの両者と重複しているが、これもまた開始コドンが欠けている (ヌクレオチド6416~7000)。このORFに続いて、同じリーディングフレームに65アミノ酸残基の可能性のある第4のORFがあり (ヌクレオチド7001~7198)、これもまた開始コドンが欠けている。最後に、97アミノ酸残基の可能性のあるORF (しかし開始コドンが欠けている) が、第3のリーディングフレーム内部に見られる (ヌクレオチド6444~6737、図1)。第1のORFとは違って、他のORFは明確な遺伝子開始配列も遺伝子終結配列も有していない (下記を参照)。236アミノ酸のGのORFはhMPVの接着タンパク質の少なくとも一部を示すと思われるが、更に別のコード配列があるRNA編集事象によって別のタンパク質または接着タンパク質の一部として発現されることは除外できない。APVおよびRSVの場合、主要なGのORFの後ろに第2のORFは同定されていないこと、しかしAPVおよびRSVの両者が、Gの主要なORFの内部に第2のORFを有していることに注目すべきである。しかし、これらのORFの発現の証拠はなく、異なるウィルスの推定されるアミノ酸配列の間に配列同一性はない (Lingら, 1992)。hMPVのGにおける第2のORFは、他のGタンパク質の特徴を示さず、

40

50

更なるORFが発現されるか否かについては、更に調べる必要がある。

【0207】

全てのORFを用いたBLAST分析から、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸配列レベルで、他の既知のウイルスの遺伝子または遺伝子産物と認識できる配列同一性がないことが判明した。これは、hRSV AおよびB (53%) (Johnsonら, 1987) ならびにAPV AおよびB (38%) (JuhászおよびEaston, 1994) のもののような他のGタンパク質について見られる配列同一性の割合が低いことと一致する。

【0208】

hMPVのORFのほとんどが、長さおよび配列の両方においてAPVのものと類似するが、hMPVの236アミノ酸残基の推定のGのORFは、APVのGのORFよりもかなり短い(表1)。アミノ酸配列から、セリンおよびトレオニンの含量が34%であることが判明したが、これはRSVの32%およびAPVの24%よりもなお高い。また、推定のGのORFは、8.5%のプロリン残基も含んでおり、これはRSVの8%およびAPVの7%よりも高い。APV、RSVおよびhMPVのGタンパク質中にプロリン残基が異常に豊富であることは、ムチン起源の糖タンパク質においても見られており、それはタンパク質の三次元構造の主な決定要因である(CollinsおよびWertz, 1983; Wertzら, 1985; Jentoft, 1990)。hMPVのGのORFは5個の可能性のあるN結合グリコシル化部位を含むが、hRSVは7個、bRSVは5個、APVは3~5個を有する。

【0209】

hMPVのGの推定される親水性プロフィールから、他のニューモウイルスに類似した特性が示された。N末端は親水性領域を含み、続いて短い疎水性領域(hMPVではアミノ酸33~53)および主に疎水性のC末端を含む(図8B)。この全体的な構成は、アンカー化II型の膜貫通タンパク質の構成と一致し、APVおよびRSVのGタンパク質のこれらの領域に十分に対応する。hMPVの推定のGのORFは、RSVおよびAPVとは違って(それぞれ5個および20個)、1個のシステイン残基しか含んでいない。注目すべきことに、G遺伝子内の4つの第2のORFのうち2つだけが、1個の追加のシステイン残基を含み、これらの4つの可能性のあるORFでは、セリン残基とトレオニン残基が12~20%、プロリン残基が6~11%であることが明らかになった。

【0210】

ポリメラーゼ遺伝子(L)

他のマイナス鎖ウイルスと同様に、MPVゲノムの最後のORFは、複製および転写の複合体のRNA依存性RNAポリメラーゼ成分である。MPVのL遺伝子は2005アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-Aのタンパク質よりも残基1個分だけ長い(表5)。MPVのLタンパク質は、APV-Aと64%、RSVと42~44%、他のパラミクソウイルスと約13%の相同性を共有する(表6)。Pochら(1989; 1990)は、非セグメント化マイナス鎖RNAウイルスのLタンパク質内の6つの保存されたドメインを同定し、その中で、ドメインIIIは、ポリメラーゼの機能に必要不可欠と考えられる4つのコアポリメラーゼモチーフを含んでいた。これらのモチーフ(A、B、CおよびD)は、MPVのLタンパク質において十分に保存されている。モチーフA、BおよびCでは、MPVは全てのニューモウイルスと100%の類似性を共有し、モチーフDでは、MPVはAPVと100%の類似性、およびRSVと92%の類似性を共有する。ドメインIII全体(LのORF内部のアミノ酸627~903)では、MPVはAPVと77%の同一性、RSVと61~62%の同一性、および他のパラミクソウイルスと23~27%の同一性を共有する(図15)。ポリメラーゼモチーフに加えて、ニューモウイルスのLタンパク質は、共通ATP結合モチーフK(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀Kとして確認される配列を含む(Stec, 1991)。MPVのLのORFは、APVと類似のモチーフを含み、中間の残基の間隔は1個だけ離れている: K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

【0211】

系統学的解析

MPVとニューモウイルス亜科のメンバーとの関係の指標として、N、P、MおよびFのORFに基づく系統樹が先に構築されており(van den Hoogenら, 2001)、MPVとAPV-Cとが近縁関係であることが明らかとなった。MPVのSH遺伝子およびG遺伝子と他のパラミクソウイルスのものとの相同性は低いので、これらの遺伝子についての信頼性のある系統樹は構築できな

10

20

30

40

50

い。更に、ニューモウイルス属のメンバーとメタニューモウイルス属のメンバーとの間のゲノム構成は異なっているので、ゲノム配列全体に基づく系統樹を作製することは不可能である。そこで、本発明者らは、先に公表されているものに加えて、M2遺伝子およびL遺伝子の系統樹だけを構築した。これら双方の系統樹から、ニューモウイルス亜科内でAPVとMPVとが近縁関係であることが確認された(図16)。

【0212】

MPVの非コード配列

パラミクソウイルスのゲノムの遺伝子接合部は、各遺伝子の開始部および終結部に短くて高度に保存されたヌクレオチド配列を含み(遺伝子開始シグナルおよび遺伝子終結シグナル)、これらは転写の開始および終結においてある役割を担っていると思われる(Curranら, 1999)。MPVの全ての遺伝子間の遺伝子間配列の比較から、N、P、M、F、M2およびGの遺伝子開始シグナルについての共通配列: GGGACAAGU(図17A)が明らかとなったが、これはメタニューモウイルスの共通遺伝子開始シグナルと同一である(Lingら, 1992; Yuら, 1992; Liら, 1996; Bayon-Auboyerら, 2000)。MPVのSH遺伝子およびL遺伝子の遺伝子開始シグナルは、この共通配列と僅かに異なることが判った(SH: GGGAUAAAU, L: GAGACAAAU)。APVでは、またLの遺伝子開始シグナルが共通配列と異なることが判った: AGGACCAAT(APV-A)(Randhawaら, 1996)、およびGGGACCAGT(APV-D)(Bayon-Auboyerら, 2000)。

【0213】

MPVとAPVの類似する遺伝子開始配列とは異なって、APVの共通遺伝子終結配列UAGUAAUU(Randhawaら, 1996)は、MPVの遺伝子間配列には見ることができなかった。G-L遺伝子間領域を除くほとんどの遺伝子に見られる反復配列はU AAAAA U/A/Cであったが、これは遺伝子終結シグナルとして作用する可能性がある。しかし、本発明者らはmRNAではなくウイルスRNAを配列決定したので、決定的な遺伝子終結シグナルを割り当てることができず、そのため更なる調査が必要である。ニューモウイルスの遺伝子間領域は、大きさや配列が様々に異なる(Curranら, 1999; Blumbergら, 1991; Collinsら, 1983)。MPVの遺伝子間領域は、APVおよびRSVのものと相同性を示さなかったが、大きさは10~228ヌクレオチドの範囲である(図17B)。MPVのMおよびFのORFの間の遺伝子間領域は、第2のORFの一部を含み、これは主要なMのORF内で出発している(上記を参照)。SHとGとの間の遺伝子間領域は192ヌクレオチドを含み、3つ全てのリーディングフレーム内に多くの停止コドンが存在することに基くと、コード能力を有するとは思われない。GとLとの間の遺伝子間領域は241ヌクレオチドを含み、もう1つのORFを含んでいる可能性がある(上記を参照)。興味深いことに、LのORFの開始点はこれらの第2のORF内に位置する。APVのL遺伝子は、その前にあるGのORF内では開始させないが、またRSVのLのORFはその前にあるM2遺伝子内で開始する。パラミクソウイルスのゲノムの3'および5'最末端において、短い遺伝子外領域はリーダー配列およびトレイラー配列と呼ばれ、リーダーのほぼ最初の12ヌクレオチドおよびトレイラーの最後の12ヌクレオチドが相補的であり、これはそれらがそれぞれ、ウイルスプロモーターの基本エレメントを含んでいるためであると思われる(Curranら, 1999; Blumbergら, 1991; Minkら, 1986)。MPVおよびAPVの3'側リーダーは双方とも、長さが41ヌクレオチドであり、両者のウイルスのヌクレオチド16と41の間の領域にはある程度の相同性が見られる(26ヌクレオチドのうち18)(図17B)。上記で述べたように、MPVのゲノム地図の最初の15ヌクレオチドは、APVゲノムに基づくプライマー配列に基づいている。MPVの5'側トレイラーの長さ(188ヌクレオチド)は、RSVの5'側トレイラーの大きさ(155ヌクレオチド)と似ており、これはAPVのもの(40ヌクレオチド)よりもかなり長い。MPVのトレイラーおよびAPVのトレイラーの先端の40ヌクレオチドのアライメントをとったところ、APVのゲノム配列に基づくプライマー配列を表す先端の12ヌクレオチドは別として、32ヌクレオチドのうち21が相同であることが判明した。本発明者らの配列解析から、NS1遺伝子およびNS2遺伝子がゲノムの3'末端に存在せず、ゲノム構成がメタニューモウイルスの構成と似ていることが明らかになった(3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')。MPV遺伝子とAPV遺伝子との間に見られる高い配列相同性は、これら2種のウイルスが近縁関係であること

を更に強調する。MPVのN、P、M、F、M2-1およびM2-2遺伝子では、APV-Cに対する全体のアミノ酸相同性が79%であることが判る。事実、これらの遺伝子では、APV-CとMPVとは配列相同性を示し、それらはRSV-AおよびBまたはAPV-AおよびBなどの他の属の亜群間で見られる配列相同性と同じ範囲であった。APV-CとMPVとの間のこの近縁関係は系統学的解析でも見られ、そこでは、MPVとAPV-Cが常に同じ分岐上にあり、APV-AおよびBを含む分岐とは離れていることが明らかになった。同一のゲノム構成、配列相同性および系統学的解析は全て、MPVを哺乳動物から単離されうるメタニューモウイルス属の最初のメンバーとして分類することに適する。N、M、FおよびL遺伝子においてMPVの各種のウイルス単離体間で見られる配列の多様性は、異なる遺伝子型が存在する可能性を示したことに注目すべきである (van den Hoogenら, 2001)。MPVとAPV-Cとが近縁関係であることは、宿主の範囲では反映されない。何故ならば、MPVとは違って、APVは鳥類に感染するからである (van den Hoogenら, 2001)。この宿主範囲の違いは、高度に分岐している両者のウイルスのSHタンパク質とGタンパク質との間の違いにより決定される可能性がある。MPVのSHタンパク質およびGタンパク質は、その他のいずれのウイルスのSHタンパク質およびGタンパク質とも有意なアミノ酸配列相同性を示さなかった。アミノ酸含量および疎水性プロットはこれらのORFをSHおよびGとして規定するのに適するが、それらの機能を評価するためには実験データが必要である。そのような分析もまた、これらのSH遺伝子およびG遺伝子内の更に重複するORFの役割の解明に役立つだろう。更に、APV-CのSHおよびG遺伝子の配列解析により、MPVのSHおよびGタンパク質の機能およびそれらとAPV-Cのものとの関係における更に詳細な見解が得られるかもしれない。MPVの非コード領域は、APVのものとかかなり類似していることが判った。APVおよびMPVの3'側リーダー配列および5'側トレイラー配列は高い程度の相同性を示した。遺伝子間領域の長さは必ずしもAPVとMPVとで同じではなかったが、ほとんどのORFの共通遺伝子開始シグナルは同一であることが判った。これに対して、APVの遺伝子終結シグナルは、MPVゲノムでは見られなかった。本発明者らは、ほとんどの遺伝子間領域内に反復配列 (U AAAAA U/A/C) を見出したが、それらの遺伝子終結配列を正式に概説するためには、ウイルスmRNAの配列解析が必要である。3'最末端にある15ヌクレオチドおよび5'最末端にある12ヌクレオチドについての配列情報が、改変したcDNA末端の迅速増幅 (RACE) 手順を用いることにより得られることに注目すべきである。この技法は、他の研究者によって、関連ウイルスについても成功していることが明らかにされている (Randhawa, J.S.ら, Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.*, 71, 9849-9854(1997); Mink, M.A.ら, Nucleotide sequences of the 3'leader and 5'trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24(1991))。3'vRNAリーダー配列の配列を決定するためには、ポリ-A-ポリメラーゼを用いてホモポリマーAテイルを精製vRNAに付加し、次にリーダー配列をPCRによりポリ-TプライマーおよびN遺伝子内のプライマーを用いて増幅する。5'vRNAトレイラー配列の配列を決定するためには、トレイラー配列のcDNAコピーを逆転写酵素およびL遺伝子内のプライマーを用いて作製し、次にそのcDNAをターミナルトランスフェラーゼを用いてホモポリマー-dGのテーリング (tailing) を行う。次に、ポリ-CプライマーおよびL遺伝子内のプライマーを用いてトレイラー領域を増幅する。別の戦略としては、vRNAをそれ自体または合成リンカーに連結し、その後、LおよびN遺伝子内のプライマーおよびリンカー特異的プライマーを用いてリーダー領域およびトレイラー領域を増幅する。5'トレイラー配列については、精製したvRNAの直接ジデオキシヌクレオチドシーケンシングも実行可能である (Randhawa, 1997)。これらの方法を用いて、本発明者らはhMPVゲノムの末端の正確な配列を分析できる。ここで提供される配列情報は、MPVおよびMPV感染に対する診断試験、ワクチンおよび抗ウイルス剤の作製に重要である。

【0214】

材料および方法

配列解析

ウイルス単離体00-1は、先の記載 (van den Hoogenら, 2001) のようにして、三次サル腎

10

20

30

40

50

細胞において高力価（約10,000のTCID₅₀/ml）まで増殖させた。ウイルスRNAは、感染細胞の上清から高純度RNA単離キットを用いて、製造元（Roch Diagnostics, Almere, The Netherlands）の説明書に従って単離した。プライマーは、APV/RSVのリーダーおよびトレイラーについて公表されている配列（Randhawaら, 1997; Minkら, 1991）に加え、先に公表されている配列（van den Hoogenら, 2001）に基づいて設計したが、それらは必要により入手可能である。RT-PCRアッセイは、ウイルスRNAを用い、ワンチューブアッセイを用いて、50mM Tris (pH 8.5)、50mM NaCl、4.5mM MgCl₂、2mM DTT、1μl 順方向プライマー、1μl 逆方向プライマー、0.6mM dNTP、20単位のRNasin (Promega, Leiden, The Netherlands)、10U AMV逆転写酵素 (Promega, Leiden, The Netherlands) および5単位のTaq Polymerase (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) を含む全容量50μlで行った。逆転写を42℃で30分間行い、続いて95℃で8分間不活性化した。cDNAは、95℃で1分、42℃で2分、72℃で3分を40サイクル、最後の伸長を72℃で10分行う間に増幅した。1%アガロースゲルで調べた後、RT-PCR産物をゲルからQiaquick Gel Extractionキット (Qiagen, Leusden, The Netherlands) を用いて精製し、Dyamic ETターミネーターシーケンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, the Netherlands) およびABI 373自動DNAシーケンサー (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan de IJssel, the Netherlands) を用いて、製造元の説明書に従って直接配列決定した。

10

【0215】

配列アライメントは、BioEditバージョン5.0.6. (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>; hall, 1999) のソフトウェアパッケージで利用可能なclustalソフトウェアパッケージを用いて行った。

20

【0216】

系統学的解析

系統樹を構築するために、ClustalWソフトウェアパッケージを用いてDNA配列をアライメントし、最尤系統樹はPhylip 3.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを用い、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した。ブートストラップ値は、共通パッケージ (Felsenstein, 1989) を用いて作製した共通系統樹 (consensus tree) についてコンピューターで算出した。

【0217】

MPVのゲノム配列は、Genbankからアクセッション番号AF371337で入手可能である。ここで使用する全ての他の配列は、Genbankから次のアクセッション番号で入手可能である：AB046218 (麻疹ウイルス、全てのORF)、NC-001796 (ヒト・パラインフルエンザウイルス3型、全てのORF)、NC-001552 (センダイウイルス、全てのORF)、X57559 (ヒト・パラインフルエンザウイルス2型、全てのORF)、NC-002617 (ニューカッスル病ウイルス、全てのORF)、NC-002728 (ニパウイルス、全てのORF)、NC-001989 (bRSV、全てのORF)、M11486 (hRSV A、L以外の全てのORF)、NC-001803 (hRSV、LのORF)、NC-001781 (hRSV B、全てのORF)、D10331 (PVM、NのORF)、U09649 (PVM、PのORF)、U66893 (PVM、MのORF)、U66893 (PVM、SHのORF)、D11130 (PVM、GのORF)、D11128 (FのORF)。PVMのM2のORFは、Ahmadian (1999) から採用した。AF176590 (APV-C、NのORF)、U39295 (APV-A、NのORF)、U39296 (APV-B、NのORF)、AF262571 (APV-C、MのORF)、U37586 (APV-B、MのORF)、X58639 (APV-A、MのORF)、AF176591 (APV-C、PのORF)、AF325443 (APV-B、PのORF)、U22110 (APV-A、PのORF)、AF187152 (APV-C、FのORF)、Y14292 (APV-B、FのORF)、D00850 (APV-A、FのORF)、AF176592 (APV-C、M2のORF)、AF35650 (APV-B、M2のORF)、X63408 (APV-A、M2のORF)、U65312 (APV-A、LのORF)、S40185 (APV-A、SHのORF)。

30

40

【0218】

表 5 : MPVおよび他のパラミクソウイルスのORFの長さ

| | N ¹ | P | M | F | M2-1 | M2-2 | SH | G | L |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MPV | 394 | 294 | 254 | 539 | 187 | 71 | 183 | 236 | 2005 |
| APV A | 391 | 278 | 254 | 538 | 186 | 73 | 174 | 391 | 2004 |
| APV B | 391 | 279 | 254 | 538 | 186 | 73 | - ² | 414 | - ² |
| APV C | 394 | 294 | 254 | 537 | 184 | 71 | - ² | - ² | - ² |
| APV D | - ² | - ² | - ² | - ² | - ² | - ² | - ² | 389 | - ² |
| hRSV A | 391 | 241 | 256 | 574 | 194 | 90 | 64 | 298 | 2165 |
| hRSV B | 391 | 241 | 249 | 574 | 195 | 93 | 65 | 299 | 2166 |
| bRSV | 391 | 241 | 256 | 569 | 186 | 93 | 81 | 257 | 2162 |
| PVM | 393 | 295 | 257 | 537 | 176 | 77 | 92 | 396 | |
| その他 ³ | 418-542 | 225-709 | 335-393 | 539-565 | - ⁴ | - ⁴ | - ⁴ | - ⁴ | 2183-2262 |

脚注 :

1. アミノ酸残基の長さ
2. 配列が入手できなかった
3. その他 : ヒト・パラインフルエンザウイルス2型および3型、センダイウイルス、麻疹ウイルス、ナパウイルス、アザラシジステンパーウイルス、およびニューカッスル病ウイルス
4. ウイルスゲノム内に存在しないORF

10

20

【 0 2 1 9 】

表 6 : MPV の ORF と他のパラミクソウイルスの ORF との間のアミノ酸配列同一性¹

| | N | P | M | F | M2-1 | M2-2 | L |
|------------------|------|-----|------|-------|----------------|----------------|----------------|
| APV A | 69 | 55 | 78 | 67 | 72 | 26 | 64 |
| APV B | 69 | 51 | 76 | 67 | 71 | 27 | - ² |
| APV C | 88 | 68 | 87 | 81 | 84 | 56 | - ² |
| hRSV A | 42 | 24 | 38 | 34 | 36 | 18 | 42 |
| hRSV B | 41 | 23 | 37 | 33 | 35 | 19 | 44 |
| bRSV | 42 | 22 | 38 | 34 | 35 | 13 | 44 |
| PVM | 45 | 26 | 37 | 39 | 33 | 12 | - ² |
| その他 ³ | 7-11 | 4-9 | 7-10 | 10-18 | - ⁴ | - ⁴ | 13-14 |

脚注 :

1. 既知の G および SH タンパク質との配列相同性は見られなかったもので、除外した。
2. 配列は入手不可能。
3. 表 5 の一覧の脚注 3 を参照。
4. ウイルスゲノム内に存在しない ORF。

30

40

【 0 2 2 0 】

引用文献

Current Protocols in Molecular Biology, 第1-3巻 (1994-1998). Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.およびStruhl, K.編,

50

John Wiley and sons, Inc., USA発行.

Current Protocols in Immunology, 第1-3巻. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M.およびStrobe, W.編, John Wiley and sons, Inc., USA発行. Sambrookら Molecular cloning, a laboratory manual, 第二版, 第1-3巻, (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Fields, Virology. 1996. 第1-2巻、第三版, Fields, B.N., Knipe, D.M.およびHowley, P.M.編, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.

1. Pringle, C.R. Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. Arch.Virol. 144/2, 2065-2070(1999).

2. Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin.Microbio.Rev. 12(2), 298-309 (1999). 概説. 10

3. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Vet.Rec. 119, 606-607 (1986).

4. Ling, R., Easton, A.J. & Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J.Gen.Virol. 73, 1709-1715 (1992).

5. Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein(M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. Virology 186, 426-434 (1992). 20

6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. & Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. J.Virol. 71, 9849-9854 (1997).

7. Evans, A.S. In: Viral Infections of Humans. Epidemiology and control. 第3版(Evans, A.S.編) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1989).

8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Groen, J., Teppema, J.S. & van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). Arch.of Virol. 86,239-251 (1985). 30

9. K.B. Chuaら Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288, 1432-1435 (2000).

10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. & McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. NAR. 20, 4965-4970 (1992).

11. Bayon-Auboyer, M., Arnauld, C., Toquin, D. & Etteradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J. of Gen. Virol. 81, 2723-2733 (2000).

12. Mulder, J. & Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. The Lancet, april 19, 810-814 (1958). 40

13. Pringle, C.R. In: The Paramyxoviruses. 第1版(D.W. Kingsbury編) 1-39 (Plenum Press, New York, 1991).

14. Rothbarth, P.H., Groen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R., & Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology-a comparative study. J. of Virol. Methods 78, 163-169 (1999).

15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Class, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H.J. & Osterhaus, A.D.M.E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. J.Med.Virol. 52, 97-104(1997). 50

16. Lennette, D.A. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 第7版. (Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T. 編) 3-25 ; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995).
15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
16. Schnell EMBO J 13, 4195-4203, 1994
17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. & Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. PNAS 92, 11563-11567 (1995).
18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G. & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. PNAS 97, 6108-6113 (2000).
19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. PNAS 93, 15400-15404 (1996).
20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. PNAS 93, 11354-11358 (1996).
21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. J.Virol. 73, 5001-5009 (1999).
22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. Virology 235, 323-332 (1997).
23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. J.Virol. 72, 2955-2961 (1998).
24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. J.Virol. 74, 6821-6831 (2000).
25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschalis, M., Tao, T., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. J.Virol. 72, 1762-1768 (1998).
26. Teng, N., Whitehead, S.S., Bermingham, A., St.Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. J.Virol. 74, 9317-9321 (2000).
27. Masurel, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. The Lancet May 3, 907-910 (1969).

【 0 2 2 1 】

実施例4で使用される更なる引用文献

AHMADIAN, G., CHAMBERS, P. および EASTON, A.J. (1996). Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. J Gen Virol 80, 2011-6.

- ALANSARI, H.およびPOTGIETER, L.N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K(M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 75, 3597-601.
- BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C.R.およびEASTON, A.J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 72, 677-85.
- BAYBUTT, H.N.およびPRINGLE, C.R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68, 2789-96.
- BAYON-AUBOYER, M.H., ARNAULD, C., TOQUIN, D.およびETERRADOSSI, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol* 81, 2723-33.
- BERMINGHAM, A.およびCOLLINS, P.L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11259-64.
- BLUMBERG, B.M., CHAN, J.およびUEDEM, S.A. (1991). Function of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences: In theory and practice. In 「the Paramyxoviruses」 (D. Kingbury編), pp. 235-247. Plenum, New York.
- COLLINS, P.L.およびWERTZ, G.W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3208-12.
- COLLINS, P.L.およびWERTZ, G.W. (1985). The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 54, 65-71.
- COLLINS, P.L., DICKENS, L.E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R.A., SPRIGGS, M.K., CAMARGO, E.およびCOELINGH, K.V.W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4594-98.
- COLLINS, P.L., HILL, M.G.およびJOHNSON, P.R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* 71, 3015-20.
- COLLINS, P.L., HILL, M.G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R.M.およびMURPHY, B.R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11563-7.
- COLLINS, P.L., MCINTOSH, K.およびCHANOCK, R.M. (1996). 「Respiratory syncytial virus.」 In: *Fields virology* (B.N. Knipe, Howley, P.M.編) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- COOK, J.K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* 19, 602-13.
- CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A.およびVILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Gen. Virol* 74, 9858-67.
- CURRAN, J.およびKOLAKOFSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 50, 403-422.
- EASTON, A.J.およびCHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res* 48, 27-33.
- ELANGO, N., SATAKE, M.およびVENKATESAN, S. (1985). mRNA sequence of three respir

10

20

30

40

50

atory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. J Virol 55, 101-10.

FEARNS, R.およびCOLLINS, P.L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. J Virol 73, 5852-64.

FELSENSTEIN, J. (1989). 「PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2. Cladistics 5)」.

GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M.およびTOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Vet Rec 119, 606-7.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.

HARDY, R.W.およびWERTZ, G.W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. J Virol 72, 520-6.

HORVATH, C.M.およびLAMB, R.A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. J Virol 66, 2443-55.

JENTOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? Trends Biochem Sci 15, 291-4.

JOHNSON, P.R., JR., OLMSTED, R.A., PRINCE, G.A., MURPHY, B.R., ALLING, D.W., WALSH, E.E.およびCOLLINS, P.L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. J Virol 61, 3136-6.

JUHASZ, K.およびEASTON, A.J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J Gen Virol 75, 2873-80.

Kyte, J.およびDoolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. J. Mol. Biol. 157, 105-142.

LAMB, R.A.およびKOLAKOFSKY, D. (1996). 「Paramyxoviridae: the viruses and their replication」. In: Fields virology (B.N. Knipe, Howley, P.M.編) Lippencott-Raven, Philadelphia.

LI, J., LING, R., RANDHAWA, J.S., SHAW, K., DAVIS, P.J., JUHASZ, K., PRINGLE, C.R., EASTON, A.J.およびCAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. Virus Res 41, 185-91.

LING, R., EASTON, A.J.およびPRINGLE, C.R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J Gen Virol 73, 1709-15.

LING, R., DAVIS, P.J., YU, Q., WOOD, C.M., PRINGLE, C.R., CAVANAGH, D.およびEASTON, A.J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. Virus Res. 36, 247-57.

MARRIOT, A.C., SMITH, J.M.およびEASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. J. Virol. 75, 6265-72.

MINK, M.A., STEC, D.S.およびCOLLINS, P.L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. Virology 185, 615-24.

MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISHINO, M.およびITO, Y. (1992). Molecular evolution

10

20

30

40

50

n of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 124, 255-68.

MORRISON, T.G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* 10, 113-35.

NAYLOR, C.J., BRITTON, P.およびCAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 79, 1393-8.

PLOWS, D.J.およびPRINGLE, C.R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* 11, 37-45. 10

POCH, O., BLUMBERG, B.M., BOUGUELERET, L.およびTORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71, 1153-62.

POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M.およびTORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8, 3867-74.

RANDHAWA, J.S., MARRIOTT, A.C., PRINGLE, C.R.およびEASTON, A.J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* 71, 9849-54. 20

RANDHAWA, J.S., WILSON, S.D., TOLLEY, K.P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C.R.およびEASTON, A.J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77, 3047-51.

SAMAL, S.K.およびZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72, 1715-20.

SATAKE, M.およびVENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* 50, 92-9.

SEAL, B.S., SELLERS, H.S.およびMEINERSMANN, R.J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* 66, 139-47. 30

SEDLMEIER, R.およびNEUBERT, W.J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv. Virus Res* 50, 101-39.

STEC, D.S., HILL, M.G., 3RDおよびCOLLINS, P.L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 183, 273-87.

VAN DEN HOOGEN, B.G., DE JONG, J.C., GROEN, J. KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHIER, R.A.およびOSTERHAUS, A.D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6), 719-24. 40

VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.

WERTZ, G.W., COLLINS, P.L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S.およびBALL, L.A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4075-9.

Yu, Q., DAVIS, P.J., BARRETT, T., BINNS, M.M., BOURSNEILL, M.E.およびCAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *J Gen Virol* 50

I 72, 75-81.

Yu, Q., DAVIS, P.J., LI, J.およびCAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-34.

ZAMORA, M.およびSAMAL, S.K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 73, 737-41.

【 0 2 2 2 】

既知のパラミクソウイルスのRT-PCR検出に用いたプライマー。hPIV-1～4、おたふくかぜ、麻疹、ツパイ、マプエラおよびヘンドラのためのプライマーは、社内で、入手可能な配列のアライメントに基づいて開発する。ニューカッスル病ウイルスのためのプライマーは、Seal, J., J.ら ; *Clin. Microb.*, 2624-2630, 1995から採用する。ニパのためのプライマーおよび一般的なパラミクソウイルス-PCRは、Chua, K.B.ら ; *Science*, 288, 2000年5月26日から採用する。

10

【 0 2 2 3 】

| ウイルス | | プライマー | タンパク質中の位置 | |
|----------------|-----|------------------------------------|-----------|----|
| HPiV-1 | 順方向 | 5' -TGTTGTCGAGACTATTCCAA-3' | HN | |
| | 逆方向 | 5' -TGTTG(T/A)ACCAGTTGCAGTCT-3' | | |
| HPiV-2 | 順方向 | 5' -TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -GGTGAC/TTC(T/C)AATAGGGCCA-3' | | |
| HPiV-3 | 順方向 | 5' -CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3' | NH | |
| | 逆方向 | 5' -CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3' | | 10 |
| HPiV-4 | 順方向 | 5' -TCC(A/G)GTTTTAGCTGCTTACG-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3' | | |
| ムンプス | 順方向 | 5' -TCGTAAGCTCTCGTGACC-3' | SH | |
| | 逆方向 | 5' -GGAGATCTTTCTAGAGTGAG-3' | | |
| NDV | 順方向 | 5' -CCTTGGTGAiTCTATCCGIAG-3' | F | |
| | 逆方向 | 5' -CTGCCACTGCTAGTTGiGATAATCC-3' | | |
| ツパイ | 順方向 | 5' -GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3' | N | 20 |
| | 逆方向 | 5' -GAATTTCCTTATGGACAAGCTCTGTGC-3' | | |
| マプエラ | 順方向 | 5' -GGAGCAGGAACCTCCAAGACCTGGAG-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3' | | |
| ヘンドラ | 順方向 | 5' -GAGATGGGCGGGCAAGTGCGGCAACAG-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -GCCTTTGCAATCAGGATCCAAATTGGG-3' | | |
| ニパ | 順方向 | 5' -CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3' | | 30 |
| HRSV | 順方向 | 5' -TTTGTTATAGGCATATCATTG-3' | F | |
| | 逆方向 | 5' -TTAACCAGCAAAGTGTTA-3' | | |
| 麻疹 | 順方向 | 5' -TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3' | N | |
| | 逆方向 | 5' -TTATAACAATGATGGAGGG-3' | | |
| 一般的なパラミクソウイルス科 | | | | |
| | 順方向 | 5' -CATTAAAAAGGGCACAGACGC-3' | P | |
| | 逆方向 | 5' -TGGACATTCTCCGCAGT-3' | | 40 |

RAP-PCR用のプライマー：

ZF1 : 5' -CCCACCACCAGAGAGAAA-3'
 ZF4 : 5' -ACCACCAGAGAGAAACCC-3'
 ZF7 : 5' -ACCAGAGAGAAACCCACC-3'
 ZF10 : 5' -AGAGAGAAACCCACCACC-3'
 ZF13 : 5' -GAGAAACCCACCACCAGA-3'
 ZF16 : 5' -AAACCCACCACCAGAGAG-3'
 CS1 : 5' -GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'
 CS4 : 5' -GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'

CS7 : 5' -AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'
 CS10 : 5' -CGAACGCAAGGAGGCAAG-3'
 CS13 : 5' -ACGCAAGGAGGCAAGCGA-3'
 CS16 : 5' -CAAGGAGGCAAGCGAACG-3'

うまく精製・配列決定された20の断片：

APVにおいて配列相同性があることが判った10の断片：

| | | |
|------|-------------|----------------|
| 断片1 | ZF7、335bp | N遺伝子 |
| 断片2 | ZF10、235bp | N遺伝子 |
| 断片3 | ZF10、800bp | M遺伝子 |
| 断片4 | CS1、1250bp | F遺伝子 |
| 断片5 | CS10、400bp | F遺伝子 |
| 断片6 | CS13、1450bp | F遺伝子 |
| 断片7 | CS13、750bp | F遺伝子 |
| 断片8 | ZF4、780bp | L遺伝子（タンパク質レベル） |
| 断片9 | ZF10、330bp | L遺伝子（タンパク質レベル） |
| 断片10 | ZF10、250bp | L遺伝子（タンパク質レベル） |

10

プロトタイプ単離体からの核酸のRAP-PCRに用いたプライマー：

実施例 5

hMPVの2つの亜型の更なる探索

これまでに得たhMPVの各種の単離体の系統学的解析に基づいて、ウイルス単離体00-1（遺伝子型Aのプロトタイプ）および単離体99-1（遺伝子型Bのプロトタイプ）を用いて、2つの遺伝子型を同定した。

20

【0224】

本発明者らは、これらの遺伝子型が亜型に関連し、そして両者の亜群のウイルスによる再感染は前もって存在する免疫の存在下で起こり、抗原の多様性は再感染を起こすのに厳密には必要ない可能性がある、と仮説を立てた。更に、hMPVは、トリ・ニューモウイルス（主に家禽で見られるウイルス）と近縁であると思われる。両者のウイルスのヌクレオチド配列は、SHタンパク質およびGタンパク質以外は高い相同性（%）を示す。ここで、これらのウイルスが試験において交差反応することを示すが、これは主に核タンパク質およびマトリックスタンパク質に基づくものであるが、それらは試験では異なった様式で応答し、それは接着タンパク質に基づくものである。ウイルス中和力価に違いがあることは、hMPVの2つの遺伝子型が1つのウイルスの2つの異なる血清型であることの更なる証拠となる。但し、APVは異なるウイルスである。

30

【0225】

2つの血清型間の交差反応およびAPVとhMPVとの交差反応

方法

hMPVについてのIgG、IgAおよびIgM抗体検出のプロトコール

hMPVについての間接IgG EIAは、マイクロタイタープレートで、本質的に先に記載（Rothbarth, P.H.ら, 1999; Influenza virus serotype-a comparative study. J. of Vir. Methods 78 (1999) 163-169）のようにして行った。

40

【0226】

簡単に説明すると、濃縮したhMPVを、1%のTriton X-100による処理により可溶化し、チェックボード滴定により最適実施希釈度を決定した後、PBS中でマイクロタイタープレートに室温で16時間コーティングした。次に、EIA緩衝液中の1:100に希釈したヒト血清サンプル100μl容量をウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。ヒトIgGの結合は、ヤギ抗ヒトIgGペルオキシダーゼコンジュゲート（Biosource, USA）の添加により検出した。

【0227】

基質としてTMBを添加してプレートを展開し、ODを450nmで測定した。結果はODのS（シグナル）/N（ネガティブ）比として表わした。S/N比がネガティブ対照+（基準値×3倍）

50

を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

【0228】

IgMクラスおよびIgAクラスのhMPV抗体は、本質的に先に記載 (Rothbarth, P.H.ら, 1999; Influenza virus serotype-a comparative study. J. Vir. Methods 78 (1999) 163-169) のような捕捉EIAにより血清中で検出した。IgAおよびIgMの検出では、抗ヒトIgMまたはIgA特異的モノクローナル抗体でコーティングした市販のマイクロタイタープレートを使用した。血清は1:100に希釈し、37℃で1時間インキュベートした後、最適実施希釈度のhMPVを各ウェルに添加し(100μl)、37℃で1時間インキュベートした。洗浄した後、ペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗hMPVを添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートした。基質としてTMBを添加することによりプレートを展開し、ODを450nmで測定した。結果はODのS(シグナル)/N(ネガティブ)比として表わした。S/N比がネガティブ対照+(基準値×3倍)を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

10

【0229】

APV抗体は、APV抑制アッセイで検出した。APV抑制試験のプロトコールは、APV-Ab SVANOVAR(登録商標)酵素免疫アッセイ(SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Swedenにより製造されたもの)を含む。結果はODのS(シグナル)/N(ネガティブ)比として表わした。S/N比がネガティブ対照+(標準×3倍)を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

【0230】

1. モルモット

20

A. hMPVの2つの亜型によるモルモットの(再)感染

ウイルス単離体ned/00/01(亜型A)およびned/99/01(亜型B)を用いて、亜型当たり6匹のモルモットに接種した(経気道、鼻および眼)。

【0231】

6匹のモルモットをhMPV00-1に感染させた(10e6, 5, TCID50)

6匹のモルモットをhMPV99-1に感染させた(10e4, 1, TCID50)

初回感染の54日後、モルモットに、同種または異種の亜型を接種した(10e4 TCID50)。

【0232】

2匹のモルモット：初回の感染は00-1; 2度目の感染は99-1(異種)

3匹のモルモット：初回の感染は00-1; 2度目の感染は00-1(同種)

30

2匹のモルモット：初回の感染は99-1; 2度目の感染は00-1(異種)

3匹のモルモット：初回の感染は99-1; 2度目の感染は99-1(同種)

感染後の12日間(初回の感染)または8日間(2度目の感染)にわたり咽喉および鼻のスワブを採取し、RT-PCRアッセイによりウイルスの存在について試験した。

【0233】

RT-PCRアッセイの結果：図29

結果のまとめ：ウイルス単離体ned/00/01を接種したモルモットは、感染後1~10日で上部気道に感染を示す。ned/99/01を接種したモルモットは、感染後1~5日で上部気道に感染を示す。ned/99/01による感染は、ned/00/01による感染ほど重篤ではないと思われる。モルモットの異種ウイルスによる2度目の接種により、4匹のモルモットのうち3匹に再感染が起こり、同種ウイルスでは6匹のモルモットのうち2匹に再感染が起こる。再感染を起こした動物では、臨床的症状は全く、あるいは殆ど気付かず、再感染から防御された動物では、臨床的症状は全く見られなかった。これは、野生型ウイルスの場合でさえも初回感染の保護効果を明らかであることを実証しており、ワクチンとして異種(もちろん同種も)の単離体が、たとえ弱毒化された形態であっても、使用できる可能性を示している。

40

【0234】

hMPVの両者の亜型は、モルモットに感染させることができるが、亜型B(ned/99/01)による感染は、亜型A(ned/00/01)による感染ほど重篤ではない(鼻および咽喉におけるウイルスの存在期間が短い)と思われる。これは、亜型Aが高い投薬量で与えられたためか、あるいは亜型Bの毒性が低いためであると思われる。

50

【0235】

前もって存在する免疫の存在は、同種ウイルスによるものも異種ウイルスによるものも再感染を完全に防御しないが、ウイルスの存在期間がより短く、全ての動物がウイルス陽性にはならない、という点で、感染はそれほど顕著ではないと思われる。

【0236】

B. hMPVの2つの亜型に感染させたモルモットの血清学

0、52、70、80、90、110、126および160日目に、血清をモルモットから採取し、1:100の希釈度で、ned/00/01抗原およびned/99/01抗原に対する全ウイルスELISAにおいて試験した。

【0237】

図30AおよびB: IgGは、個々のモルモットについてned/00/01およびned/99/01に対して応答する。

10

【0238】

図31: ned/00/01およびned/99/01のELISAの特異性。同種再感染させたモルモットからのデータだけを用いた。

【0239】

図32: 3匹の同種(00-1/00-1)、2匹の同種(99-1/99-1)、2匹の異種(99-1/00-1)および2匹の異種(00-1/99-1)感染させたモルモットのned/00/01およびned/99/01のELISAに対する平均IgG応答。

20

【0240】

結果のまとめ

上記2つの異なるELISAに反応して僅かな差異しか見られない。00-1または99-1に対する全ウイルスELISAは、それら2つの亜型を区別するのには使用できない。

【0241】

C. APV抗原を保有するモルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清の反応

感染モルモットから採取した血清を、APV抑制ELISAを用いて試験した。

【0242】

図33: hMPV感染モルモットのAPV抑制の平均割合(%)

結果のまとめ

モルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清は、hMPV IgG ELISAにおいて反応すると同様にして、APV抑制アッセイにおいて反応する。

30

【0243】

ned/99/01に対して生起させた血清は、APV抑制ELISAにおいて、ned/00/01に対して生起させた血清よりも低い抑制率(%)を示す。ned/99/01に感染させたモルモットは、ned/00/01の場合よりも(hMPV ELISAで見られるのと同様に)低い力価を有する可能性があるか、あるいはned/99/01とAPVとの交差反応が低い。それでも、APV-Ab抑制ELISAは、モルモットにおけるhMPV抗体の検出に使用できる。

【0244】

D. モルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清を用いたウイルス中和アッセイ

感染後0、52、70および80日目に採取した血清を、ned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cを用いたウイルス(交差)中和アッセイに用いた。出発希釈度は1~10であり、ウェル当たり100のTCID50のウイルスを用いた。中和後、ウイルスをtMK細胞に15分間接触させ、3500rpmで遠心分離し、その後、培地を新しいものと交換した。

40

【0245】

APV被験体は4日間増殖させ、hMPV被験体は7日間増殖させた。細胞を80%アセトンで固定し、FITC標識したサル抗hMPVを用いてIFAを行った。染色において陰性だったウェルは、力価を中和したと考えた。各ウイルスについて、ウイルスストックの10対数滴定および実施溶液の2倍滴定を含めた。

【0246】

図34: ned/00/01およびned/99/01に感染させたモルモットのned/00/01、ned/99/01およ

50

びAPV-Cに対するウイルス中和力価。

【0247】

2. カニクイザル

A. hMPVの2つの亜型によるカニクイザルの（再）感染

ウイルス単離体ned/00/01（亜型A）およびned/99/01（亜型B）（ 10^5 TCID₅₀）を用いて、亜型当たり2匹のカニクイザルに接種した（経気道、鼻および眼）。初回感染の6ヶ月後、2回目として、サルにned/00/01を接種した。咽喉のスワブを感染後の14日間（初回の感染）または8日間（二回目の感染）採取し、RT-PCRアッセイによりウイルスの存在について試験した。

【0248】

図35： ned/00/01を（2回）接種したカニクイザルの咽喉スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。

【0249】

結果のまとめ： ウイルス単離体ned/00/01を接種したカニクイザルは、感染後1～10日で上部気道に感染を示す。臨床的症状としては、化膿性鼻炎が挙げられる。サルに同種のウイルスで二回目の接種を行ったところ、PCRにより示されるように、再感染が起こるが、臨床的症状は全く見られなかった。

【0250】

B. hMPVに感染させたカニクイザルの採取血清についての血清学

ned/00/01を投与したカニクイザルから、初回感染後の6ヶ月間にわたり血清を採取した（再感染はサル3については240日目に起こり、サル6については239日目に起こった）。

【0251】

血清を用いて、ned/00/01またはAPVに対するIgG抗体の存在、ならびにned/00/01に対するIgA抗体およびIgM抗体の存在について試験した。

【0252】

結果： 図36A

ned/00/01に（再）感染させた2匹のカニクイザルの、ned/00/01に対するIgA、IgMおよびIgGの応答。

【0253】

図36B

ned/00/01に感染させた2匹のカニクイザルの、APVに対するIgGの応答。

【0254】

結果のまとめ

2匹のカニクイザルがned/00/01にうまく感染し、ned/00/01に対する抗体の存在下ではその同種ウイルスに再感染した。IgA抗体およびIgM抗体の応答は、初回の感染後にIgM抗体を増大させたが、それは再感染後には見られない。IgA抗体は再感染後にだけ検出され、これは初回の感染後の免疫応答が即時性であることを示している。APV抑制ELISAで試験したサルにおいてhMPVに対して生じた血清は、hMPV IgG ELISAと同様の応答を示す。

【0255】

考察 / 結論

カニクイザル内のhMPV抗体は、APV抑制ELISAにより、hMPV ELISAの場合と同様の感度で検出され、したがって、APV抑制EIAは、ヒトのサンプルをhMPV抗体の存在について試験するのに適する。

【0256】

C. hMPV感染カニクイザルから採取した血清を用いたウイルス（交差）中和アッセイ

結果のまとめ： 初回感染後0日目～229日目に採取した血清は、ned/00/01に対して低いウイルス中和力価しか示さず（0～80）、2回目の感染後に採取した血清はned/00/01に対して高い中和力価を示す（＞1280）。2回目の感染後に採取した血清だけが、ned/99/01に対して中和力価を示し（80～640）、どの血清もAPV Cウイルスを中和しない。

【0257】

10

20

30

40

50

ウイルス（交差）中和アッセイにおいて、APV-CとhMPVとの間で交差反応は起こらず、抗体応答をブーストした後でned/00/01とned/99/01との間に交差反応が起こる。

【0258】

3. ヒト

6ヶ月令未満～20歳以上の患者の血清を、予めIFAおよびned/00/01に対するウイルス中和アッセイで試験しておいた（特許の表1を参照）。

【0259】

ここで、これらの血清の幾つかを、ned/00/01に対するELISAでIgG、IgMおよびIgA抗体の存在について試験し、それらのサンプルをAPV抑制ELISAで試験した。

【0260】

結果：図37 ヒト血清におけるIgG抗体検出のためのhMPV ELISAとAPV抑制ELISAの使用の比較。IgG HMPV試験とAPV-Ab試験との間には強い相関関連があり、したがって、APV-Ab試験は、本質的にヒトにおけるhMPVに対するIgG抗体を検出できる。

【0261】

4. 家禽

96羽のニワトリを、APV抑制ELISAおよびned/00/01 ELISAの双方において、APVに対するIgG抗体の存在について試験した。

【0262】

結果のまとめ： hMPV ELISAもAPV抑制ELISAも、APVに対する抗体を検出する（データは示さず）。

【0263】

結果のまとめ

本発明者らは、ned/00/01（亜群Aのプロトタイプ）およびned/99/01（亜群Bのプロトタイプ）という、hMPVの2つの遺伝子型を見出した。

【0264】

「古典的な血清学的解析（例えば、公知のFrancki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L.およびBrown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. 付録2: p. 140-144）によれば、動物の血清を用いた定量的中和アッセイで判定した場合に、その免疫学的な違いに基づいて2つの亜型が定義できる。2つの異なる血清型は、互いに交差反応しないか、あるいは両方向で16を上回る異種 - 同種力価比を示す。中和が2種のウイルス間で一方向または両方向である程度の交差反応を示す場合（同種 - 異種力価比が8または16）、血清型の違い（特徴）は、DNAの実質的な生物物理学的 / 生化学的な差異が存在するか否かであると思われる。中和が2種のウイルス間で一方向または両方向で明らかな交差反応を示す場合（同種 - 異種力価比が8未満）、研究対象である単離体の血清型は同一であると推定される。」

RSVの場合、（同種、異種、共に）以前より存在している免疫の存在下で再感染が起こることが知られている。モルモットおよびカニクイザルをhMPVの同種血清型および異種血清型の両者に感染させたところ、このことがhMPVについても当てはまることが明らかになった。更に、hMPVに対するIgAおよびIgMのELISAからは、IgA抗体の反応が再感染の後にだけ起こることが明らかになった。hMPVまたはAPVに対して生起させた血清は、APVおよびhMPVのELISAにおいて同じように応答する。ヌクレオチド配列の比較から、これらのウイルスが、N、P、MおよびF遺伝子について約80%のアミノ酸相同性を示すことが判る。ELISAでは、Nタンパク質およびMタンパク質が、反応する主な抗原である。ウイルス中和アッセイ（表面の糖タンパク質G、SHおよびFに対して反応することが知られる）は、2つの異なる血清間の違いを示している。APVとhMPVはELISAで交差反応するが、hMPVとAPVのヌクレオチド配列の系統学的解析、これら2種の異なるウイルスに対して生起された血清のウイルス中和力価の違い、および宿主利用の違いからも、APV-CおよびhMPVが2種の異なるウイルスであることが明らかにされる。これらの結果に基づけば、哺乳動物におけるhMPV感染が、鳥類から哺乳動物へのゾーノシス事象により起こった可能性があると推測される。しかし

10

20

30

40

50

、これらのウイルス（すなわちGおよびSHタンパク質）は、鳥類におけるAVPの存在を考慮すると、再来（哺乳動物から鳥類への）ゾーノシス事象がまず起こらないような様式で順応してきた。

【0265】

追記

ニューモウイルス亜科に関する背景情報

パラミクソウイルス科は2つの亜科：パラミクソウイルス亜科およびニューモウイルス亜科を含む。ニューモウイルス亜科は2つの属：ニューモウイルスおよびメタニューモウイルスからなる。ニューモウイルス属は、ヒト、ウシ、ヒツジおよびヤギの呼吸器合胞体ウイルスならびにマウス・肺炎ウイルス（PVM）を含む。メタニューモウイルス属は、トリ・ニューモウイルス（APV、TRTVとも呼ばれる）を含む。

10

【0266】

ニューモウイルス亜科における属の分類は、古典的なウイルスの特徴、遺伝子の順序および遺伝子の布置（constellation）に基づいている。ニューモウイルス属のウイルスは、パラミクソウイルス科の中でも独特であり、ゲノム（3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'）の3'末端に2個の非構造タンパク質を有する。これに対して、メタニューモウイルス属のウイルスにはNS1遺伝子およびNS2遺伝子が欠けており、MとLのコード領域の間にある遺伝子の構成が異なる（3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）。

【0267】

パラミクソウイルス亜科の全てのメンバーは赤血球凝集活性を有しているが、この機能はニューモウイルス亜科を決定付ける特徴ではなく、RSVおよびAPVでは存在しないが、PVMには存在する。ノイラミニダーゼ活性は、パラミクソウイルス属およびルブラウイルス属（パラミクソウイルス亜科）のメンバーには存在するが、麻疹ウイルス属（パラミクソウイルス亜科）ならびにニューモウイルス属およびメタニューモウイルス属（ニューモウイルス亜科）には存在しない。

20

【0268】

ニューモウイルス亜科の第2の目立った特徴は、RSVによるmRNA内の選択的ORF（alternative ORFs）の利用が明らかに制限されていることである。これに対して、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどのパラミクソウイルス亜科の幾つかのメンバーは、リン酸化タンパク質（P）をコードするmRNA内の選択的ORFを利用して、新規なタンパク質の合成を指令する。

30

【0269】

ニューモウイルス亜科のGタンパク質は、パラミクソウイルス亜科のHNタンパク質またはHタンパク質と配列上の関連性も構造的な類似性も持たず、それらの鎖長のほぼ半分の大きさしかない。更に、Nタンパク質およびPタンパク質は、パラミクソウイルス亜科のNタンパク質およびPタンパク質よりも小さく、明確な配列相同性がない。多くの非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルスは、単一のマトリックス（M）タンパク質を有する。

【0270】

ニューモウイルス亜科のメンバーは、例外的に、2種のそうしたタンパク質（MおよびM2）を有している。このMタンパク質はパラミクソウイルス亜科のMタンパク質よりも小さく、パラミクソウイルス亜科と配列上の関連性を持たない。

40

【0271】

細胞培養物中で増殖させると、ニューモウイルス亜科のメンバーは典型的な細胞変性効果を示す。それらは特徴的な細胞の合胞体形成を誘発する。

【0272】

（Collinsら，1996）

ニューモウイルス亜科、ニューモウイルス属

hRSVはニューモウイルス属の基準種であり、幼児期～若年小児時の下部気道疾患の世界的に広がっている主な原因物質である（Selwyn, 1990）。更に、hRSVは、免疫不全の個体や老人を含む他の患者群において重要な病原体として次第に認識されてきている。また、RS

50

Vは、あらゆる年齢の入院成人の市中肺炎の重要な原因物質である（Englund, 1991; Falshey, 2000; Dowell, 1996）。RSVの2つの主要な抗原型（AおよびB）が、それらのモノクローナルおよびポリクローナル抗体との反応性の違いに基づいて、核酸配列解析により同定されている（Anderson, 1985; Johnson, 1987; Sullender, 2000）。特に、Gタンパク質は、それら2つの亜型を区別するのに使用される。RSV-AとBとは、Gにおいては53%のアミノ酸配列相同性しか示さないが、他のタンパク質はそれらの亜型間でそれより高い相同性を示す（表1）（Collins, 1996）。

【0273】

RSV感染の検出は、免疫蛍光法（DIF、IFA）、ウイルス中和アッセイおよびELISAもしくはRT-PCRアッセイにおいてモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて記載されている（Rothbarth, 1988; Van Milaan, 1994; Coggins, 1998）。hRSVと近縁であるものは、ウシ（bRSV）、ヒツジ（oRSV）およびヤギRSV（cRSV）であり、中でもbRSVは最も広範に研究されてきた。hRSVとの配列相同性に基づいて、反芻動物のRSVはニューモウイルス亜科のニューモウイルス属に分類される（Collins, 1996）。反芻動物のRSV感染の診断および亜型同定は、血清学、抗原検出、ウイルス単離およびRT-PCRアッセイを組合せて使用することがベースである（Uttenthal, 1996; Valarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994）。

10

【0274】

bRSVの分子構成についての幾つかの解析が、ヒトおよびウシの抗血清、モノクローナル抗体およびcDNAプローブを用いて行われてきた。これらの解析から、hRSVおよびbRSVのタンパク質組成が非常に類似しており、bRSVのゲノム構成がhRSVのものと似ていることが明らかになった。bRSVでもhRSVでも、Gタンパク質およびFタンパク質は、主な中和および保護抗原になっている。Gタンパク質は、hRSVの亜型間およびhRSVとbRSVとの間で非常に異なっている（それぞれ53%および28%）（Prozzi, 1997; Lerch, 1990）。hRSVおよびbRSVの株のFタンパク質は、同等の構造特性および抗原関連性を示している。bRSVのFタンパク質はhRSVと80～81%の相同性を示し、一方、2つのhRSVの亜型はFにおいて90%の相同性を示す（Walravens, K. 1990）。

20

【0275】

hRSVおよびbRSVに特異的なモノクローナル抗体の使用に基づく研究から、bRSVには異なる抗原亜型が存在することが示唆された。亜型A、BおよびABは、Gタンパク質に特異的なモノクローナル抗体の反応パターンに基づいて区別される（Furze, 1994; Prozzi, 1997; Elvander, 1998）。bRSVの疫学は、hRSVのものと非常に類似している。若齢のウシにおける自然発生的な感染は重篤な呼吸性の徴候と結びつく場合が多く、一方、実験的感染では、一般に、僅かな病理学的変化を伴う軽度の疾患となる（Elvander, 1996）。

30

【0276】

また、RSVは、自然に感染したヒツジ（oRSV）（LeaMaster, 1983）およびヤギ（cRSV）（Lehmkuhl, 1980）からも単離されている。両者の株は、ウシRSVとヌクレオチド配列が96%共通しており、抗原性交差反応性である。したがって、これらのウイルスもまた、ニューモウイルス属の中に分類される。

【0277】

ニューモウイルス亜科、ニューモウイルス属のもう1つのメンバーはマウス肺炎ウイルス（PVM）である。

40

【0278】

PVMは、実験動物コロニー、特に無胸腺マウスを含む該コロニーにおいて一般的な病原体である。自然に獲得した感染は無症候性であると考えられるが、マウスの肺で継代すると、上部気道感染から致命的な肺炎にまで及ぶ疾患の明らかな徴候が出てくる（Richter, 1988; Weir, 1988）。

【0279】

PVMおよびhRSVのヌクレオカプシドタンパク質（N）とリン酸化タンパク質（P）との間の制限された血清学的交差反応性は記載されているが、どの外部タンパク質も交差反応性を

50

示さず、これらのウイルスはウイルス中和アッセイにおいて互いに区別できる (Chambers, 1990a; Gimenez, 1984; Ling, 1989a)。PVMの糖タンパク質は、それらのグリコシル化のパターンに関して、他のパラミクソウイルスのものとは異なり、RSVのものとは類似していると思われる。しかし、それらは、プロセッシングに関しては異なっている。RSVとは違って、しかし他のパラミクソウイルスと同様に、PVMはネズミ赤血球を用いた場合に赤血球凝集活性を有し、それにGタンパク質が関与していると思われる。何故ならば、このタンパク質に対するモノクローナル抗体は赤血球凝集を抑制するからである (Ling, 1989b)。

【0280】

PVMのゲノムはhRSVのものと類似しており、その3'末端に2つの非構造タンパク質を含み、同じようなゲノム構成を有する (Chambers, 1990a; Chambers, 1990b)。PVMのNS1/NS2遺伝子のヌクレオチド配列はhRSVのものとは検出可能なほど相同ではない (Chambers, 1991)。PVMのタンパク質の中には、hRSVと強い相同性を示すものもあるが (N: 60%、F: 38~40%)、Gははっきり異なる (アミノ酸配列は31%長い) (Barr, 1991; Barr, 1994; Chambers, 1992)。PVMのP遺伝子は、RSVやAPVのものとは異なり、第2のORFをコードすることが報告されており、ユニークなPVMタンパク質となっている (Collins, 1996)。新規なPVMの単離体は、ウイルス単離、赤血球凝集アッセイ、ウイルス中和アッセイおよび種々の免疫学的蛍光法により同定される。

【0281】

追記の表; ニューモウイルス亜科ニューモウイルス属の各種ウイルス間のアミノ酸相同性

| 遺伝子 | hRSV | bRSV | oRSV対hRSV | bRSV対hRSV | bRSV対oRSV | PVM対hRSV |
|-----|------|--------|-----------|-----------|-----------|----------|
| NS1 | 87 | | | 68~69 | 89 | * |
| NS2 | 92 | | | 83~84 | 87 | * |
| N | 96 | | 93 | | | 60 |
| P | — | | 81 | | | |
| M | — | | 89 | | | |
| F | 89 | | | 80~81 | | 38~40 |
| G | 53 | 88~100 | 21~29 | 38~41 | 60~62 | * |
| M2 | 92 | | 94 | | | 41 |
| SH | 76 | | 45~50 | | 56 | |
| L | — | | | | | |

* 配列相同性は検出不可

【0282】

メタニューモウイルス属

トリ・ニューモウイルス (APV) は、七面鳥鼻気管炎の原因物質として同定され (McDougall, 1986; Collins, 1988)、したがって、七面鳥鼻気管炎ウイルス (TRTV) と呼ばれることも多い。この疾患は七面鳥の上部気道感染であり、高い罹患率と、変動性の (しかししばしば高い) 死亡率となる。雌の七面鳥では、このウイルスは実質的な産卵の低下を引き起こすこともある。同じウイルスがニワトリにも感染できるが、この種では、このウイルスの主な病原体としての役割はそれほど明確に定義されていないが、一般には繁殖ニワトリにおいて頭部膨張症候群 (SHS) と関連する (Cook, 2000)。ビリオンは多面体 (pleiomorphic) であるが、主に球状であり、大きさは70~600nmであり、ヌクレオカプシドは、線状の非セグメント化ネガティブセンスRNAゲノムを含んでおり、らせん対称を示す (Collins, 1986; Giraud, 1986)。この形態は、パラミクソウイルス科のメンバーのものと類似している。APVコード化タンパク質およびRNAの解析から、この科の2つの亜科 (パラミクソウイルス亜科とニューモウイルス亜科) の中で、APVはニューモウイルス亜科に最も近く類似していることが示唆された (Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanagh, 1988)。

10

20

30

40

50

【0283】

APVは、非構造タンパク質（NS1およびNS2）を有さず、遺伝子の順序（3' -N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）は、RSVなどの哺乳動物のニューモウイルスのものとは異なる。したがって、APVは近年、新しいメタニューモウイルス属の基準種として分類された（Pringle, 1999）。

【0284】

中和パターン、ELISAおよびモノクローナル抗体との反応性の違いから、APVの異なる抗原型の存在が明らかになった。G遺伝子のヌクレオチド配列から、2つのウイルス亜科（AおよびB）が定義され、それらは38%のアミノ酸相同性しか示さない（Collins, 1993; Juhasz, 1994）。アメリカ合衆国コロラド州から単離されたAPV（Cook, 1999）は、亜型AおよびBのウイルスとあまり交差中和しないことが示され、配列情報に基づいて新たな亜型Cと命名された（Seal, 1998; Seal, 2000）。フランスで2種の非A/非B APVが単離され、それらは亜型A、BおよびCとは抗原性が異なることが示された。F、LおよびG遺伝子のアミノ酸配列に基づいて、これらのウイルスもまた、新たな亜型Dとして分類された（Bayon-Auboyer, 2000）。

【0285】

APV感染の診断は、ニワトリまたは七面鳥の気管（tracheal organ）培養物（TOC）またはVero細胞培養物におけるウイルス単離により達成できる。細胞変性効果（CPE）は通常、更に一代または二代継代した後で見られる。このCPEは、散在している病巣領域の細胞が丸く膨れて合胞体形成を引き起こすことを特徴とする（Buys, 1989）。IFおよびウイルス中和アッセイを含む幾つかの血清学的アッセイが開発されている。ELISAによるAPVに対する抗体の検出は、最も一般的に使用されている方法である（O'Loan, 1989; Gulati, 2000）。近年、APV感染の診断に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が用いられている。食道から採取したスワブは、出発物質として使用できる（Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000）。

【0286】

Alansari, H and Potgieter, L.N.D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J. Gen. Virol.* 75: 401-404.

Alansari, H., Duncan R.B., Baker, J.C.およびPotgieter, L.N. 1999. Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:215-20.

Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernic, B.F., Stone, Y.およびMcIntosh, K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 151:626-633.

Barr, J., Chambers, Pringle, C.R., Easton, A.J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J. Gen. Virol.* 72:677-685.

Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C.R.およびEaston, A.J. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *J. Virol.* 68:5330-5334.

Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M.およびEteradossi, N. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Vir.* 144: 1091-1109.

Bayon-Auboyer, M.H., Arnould, C., Toquin, D.およびEteradossi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APC subgroup. *J. Gen. Virol.* 81: 2723-2733.

Buys, S.B., Du Preez, J.H.およびEls, H.J. 1989. The isolation and attenuation of

10

20

30

40

50

a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. Ondersteproot J. Vet. Res. 56:87-98

Cavanagh, D.およびBarrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. Virus Res. 11:241-256.

Chambers, P., Pringle, C.R.およびEaston, A.J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. J. Virol. 64:1869-1872.

Chambers, P., Matthews, D.A., Pringle, C.R.およびEaston, A.J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome. Virus Res. 18:263-270.

10

Chambers, P., Pringles, C.R.およびEaston, A.J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. J. Gen. Vir. 72:2545-2549.

Chambers, P. Pringle CR, Easton AJ. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. J. Gen. Virol. 73:1717-1724.

Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J.およびSullender, W.M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. J. Clin. Microbiol. 36:3552-3557.

20

Collins, M.S.およびGough, R.E., Lister, S.A., Chettle, N.およびEddy, R. 1986. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. Vet. Rec. 119:606.

Collins, M.S.およびGough, R.E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. J. Gen. Virol. 69:909-916.

Collins, M.S., Gough, R.E.およびAlexander, D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology 22:469-479.

Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M. 196. Respiratory syncytial virus. P. 1313-1351. In: B.N. Fields, D.M. KnipeおよびP.M. Howley (編). Fields virology, 第3版, 第1巻 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA.

30

Cock, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J.およびSenne, D.A. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. Avian pathol. 28:607-617.

Cook, J.K.A. 2000. Avian rhinotracheitis. Rev. Sci. tech. offint. Epiz. 19:602-613.

Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Marston, B.J.およびBreiman, R.F. 1006. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. J. Infect. Dis. 174:456-462.

40

Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet. Rec. 138:101-105.

Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Uttenthal, A., Ballagi-Pordany, A.およびBelak, S. 1998.

Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. J. Gen. Virol. 79:2939-2946.

Englund, J.A., Anderson, L.J.およびRhame, F.S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. J. Clin. Microbiol. 29:115-119.

Falsey, A.R.およびWalsh, E.E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adu

50

Its. Clin. Microb. Rev. 13:371-84.

Furze, J., Wertz, G., Lerch, R.およびTaylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 75:363-370.

【 0 2 8 7 】

Gimenez, H.B., Cash, P.およびMelvin, W.T. 1984. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. J. Gen. Virol. 65:963-971.

Gulati, B.R., Cameron, K.T., Seal, B.S., Goyal, S.M., Halvorson, D.A.およびNjenga, M.K. 2000.

10

Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. J. Clin. Microbiol. 38:4010-4.

Johnson, P.R., Spriggs, M.K., Olimsted, R.A.およびCollins, P.L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5625-5629.

Juhasz, K.およびEaston, A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J. Gen. Virol. 75:2873-2880.

20

LeaMaster, B.R., Evermann, J.F., Mueller, M.K., Prieur, M.K.およびSchlie, J.V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and Haemophilus somnus infections in sheep. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 26:265-276.

LeHmkuhl, H.D., Smith, M.H., Cutlip, R.C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus. Arch. Vir. 65:269-76.

Lerch, R.A., Anderson, K.およびWertz, G.W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. J. Virol. 64:5559-5569.

30

Ling, R.およびPringle, C.R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis. J. Gen. Virol. 69:917-923.

Ling, R.およびPringle, C.R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications. J. Gen. Virol. 70:1427-1440.

Ling, R.およびPringle, C.R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins. J. Gen. Virol. 70:1441-1452.

McDougall, J.S.およびCook, J.K.A. 1986. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. Vet. Rec. 118:206-207.

Oberst, R.D., M.P. Hays, K.J. Hennessy, L.C. Stine, J.F. EvermannおよびKelling, C.L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction product of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. J. Vet. Diagn. Investg. 5:322-328.

40

O'Loan, C.J., Allan, G., Baxter-Hohne, C.およびMcNulty, M.S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. J. Virol. Meth. 25:271-282.

Paccaud, M.F.およびJacquier, C., 1979. A respiratory syncytial virus of bovine origin. Arch. Ges. Virusforsch. 30:327-342.

Pringle, C.R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology. Sydney, Australia 1999. Arch. Virol. 144/2:2065-2070.

50

- Prozzi, D., Walravens, K., Langedijk, J.P.M., Daus, F., Kramps, J.A.およびLetesson, J.J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen.* 78:359-366.
- Randhawa, j.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R.およびA.J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses. *J. Virol.* 71:9849-9854.
- Richter, C.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S.およびMackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 38:255-261.
- Rothbarth, P.H., Habova, J.J.およびMasurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus. *Infection* 16:252.
- Seal, B.S. 1988. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res.* 58:45-52.
- Seal, B.S., Sellers, H.S., Meinersmann, R.J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res.* 66:139-147.
- Selwyn, B.J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection on young children: comparison findings from several developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 12:S870-S888.
- Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A.およびNagaraja, K.V. 2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch. Virol.* 145:1239-1246.
- Sullender, W.M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microb. Rev.* 13:1-15.
- Trudel, M., Nadon, F., Sinnard, C., Belanger, F., Alain, R., Seguin, C.およびLusier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 107:141-149.
- Uttenthal, A., Jensen, N.P.B.およびBlom, J.Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 139, 114-117.
- Valarcher, J., Bourhy, H., Gelfi, J.およびSchelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microb.* 37:1858-1862.
- Van Milaan, A.J., Sprenger, J.J., Rothbarth, P.H., Brandenburg, A.H., Masurel, N.およびClaas, E.C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.* 44:80-87.
- Vilcek, S, Elvander, M., Ballagi-Pordany, A.およびBelak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus clinical samples. *J. Clin. Microb.* 32:2225-2231.
- Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe. P.およびBurny, A., 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 3009-3014.
- Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L.およびJohnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 34:35-37.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 8 8 】

【図 1 a】図 1A は、単離体 00-1 とニューモウイルス亜科の他のメンバーのアミノ酸配列間で見られる相同性のパーセンテージを示した表 1 を示す。

【図 1 b】図 1B は、免疫蛍光アッセイおよびウイルス中和アッセイを用いた、年齢群で分類したヒトにおける MPV の血清陽性率を示した表 2 を示す。

【図 2】図 2 は、ウイルス単離体 00-1 について RAP-PCR および RT-PCR を用いて得られた断片の位置および大きさを含む、APV のゲノムの概略図である。

【図 3 - 1】図 3 は、ニューモウイルス亜科のメンバーおよびウイルス単離体 00-1 の間での N、P、M および F の ORF の比較を示す。図 3-1 は、核タンパク質およびリン酸化タンパク質のアライメントを示す。

【図 3 - 2】図 3 は、ニューモウイルス亜科のメンバーおよびウイルス単離体 00-1 の間での N、P、M および F の ORF の比較を示す。図 3-2 は、マトリックスタンパク質および融合タンパク質のアライメントを示す。

【図 3 - 3】図 3 は、ニューモウイルス亜科のメンバーおよびウイルス単離体 00-1 の間での N、P、M および F の ORF の比較を示す。図 3-3 は、L タンパク質の PCR 断片 8 および PCR 断片 9/10 のアライメントを示す。

【図 4】図 4 は、ニューモウイルス属のメンバーおよびウイルス単離体 00-1 の N、P、M および F の ORF の系統学的解析を示す。

【図 5】図 5 は、9 種の主な MPV 単離体と APV-C (遺伝的に最も近縁である) との、F (パネル A)、N (パネル B)、M (パネル C) および L (パネル D) の ORF の部分の系統学的関係を示す。

【図 6 A - 1】図 6A は、MPV 単離体 00-1 のゲノムの 3' 末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。

【図 6 A - 2】図 6A は、MPV 単離体 00-1 のゲノムの 3' 末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。図 6A-2 は図 6A-1 の続きである。

【図 6 A - 3】図 6A は、MPV 単離体 00-1 のゲノムの 3' 末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。図 6A-3 は図 6A-2 の続きである。

【図 6 B】図 6B は、MPV 単離体 00-1 のポリメラーゼ遺伝子 (L) 内の断片 8 から得られたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。

【図 6 C】図 6C は、MPV 単離体 00-1 のポリメラーゼ遺伝子 (L) 内の断片 9 および 10 の共通配列を示す。

【図 7】図 7 は、MPV 単離体 00-1 のゲノム地図を示す。

【図 8】図 8 は、MPV と他のニューモウイルスの核タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメントを示す。

【図 9】図 9 は、MPV のリン酸化タンパク質と他のニューモウイルスのリン酸化タンパク質のアミノ酸配列比較を示す。

【図 10】図 10 は、MPV のマトリックスタンパク質と他のニューモウイルスのマトリックスタンパク質の推定アミノ酸配列の比較を示す。

【図 11】図 11 は、MPV の融合タンパク質と他のニューモウイルスの融合タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメントを示す。

【図 12】図 12 は、MPV の M2 の ORF と他のニューモウイルスの M2 の ORF のアミノ酸配列比較を示す。

【図 13】図 13 は、MPV の SH の ORF のアミノ酸配列解析を示す。

【図 14】図 14 は、MPV の G の ORF のアミノ酸配列解析を示す。

【図 15】図 15 は、MPV および他のパラミクソウイルスのポリメラーゼ遺伝子の保存されたドメインのアミノ酸配列の比較を示す。

【図 16】図 16 は、MPV および選択したパラミクソウイルスの M2-1 および L の ORF の系統学的解析を示す。

【図 17】図 17 は、hMPV 単離体 00-1 の非コード配列を示す。

【図 18 a】図 18 は、2 種のプロトタイプの hMPV 単離体と APV-A および APV-C との比較を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 8 b】図18は、2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較を示す。

【図 1 9】図19は、2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較を示す。

【図 2 0】図20は、2種のプロトタイプのhMPV単離体の核タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 1】図21は、2種のプロトタイプのhMPV単離体のリン酸化タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 2】図22は、2種のプロトタイプのhMPV単離体のマトリックスタンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

10

【図 2 3】図23は、2種のプロトタイプのhMPV単離体の融合タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 4】図24は、2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 5】図25は、2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 6】図26は、2種のプロトタイプのhMPV単離体の短い疎水性タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 7】図27は、2種のプロトタイプのhMPV単離体の接着糖タンパク質のアミノ酸アライメントを示す。

20

【図 2 8】図28は、2種のプロトタイプのhMPV単離体のポリメラーゼタンパク質のN末端のアミノ酸アライメントを示す。

【図 2 9】図29は、ned/00/01および / またはned/99/01を接種した12匹のモルモットの咽喉スワブおよび鼻スワブについてのRT-PCRアッセイの結果を示す。+ = 陽性 ; - = 陰性 ; T = 咽喉スワブ ; NO = 鼻スワブ ; N = 実施せず ; ? = 不確定 ; D = 死亡 ; 0 ~ 12 : 感染後の日数。鼻スワブについては2回目の感染だけを試験する。

【図 3 0 A】図30Aは、ned/00/01に感染させ、ned/00/01 (GP4、5、6) またはned/99/01 (GP1、3) で再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答を示す。

【図 3 0 B】図30Bは、ned/99/01に感染させ、ned/00/01 (GP8、9) またはned/99/01 (GP10、11、12) のいずれかで再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答を示す。

30

【図 3 1】図31は、ned/00/01またはned/99/01に感染させたモルモットから採取した血清についてのned/00/01およびned/99/01 ELISAの特異性を示す。

【図 3 2】3匹の同種感染 (00-1/00-1) 、2匹の同種感染 (99-1/99-1) 、2匹の異種感染 (99-1/00-1) および2匹の異種感染 (00-1/99-1) させたモルモットのned/00/01およびned/99/01 ELISAに対する平均IgG応答を示す。

【図 3 3】図33は、hMPVに感染させたモルモットのAPV抑制の平均パーセンテージを示す。

【図 3 4】図34は、ned/00/01およびned/99/01に感染したモルモットのned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cに対するウイルス中和力価を示す。

40

【図 3 5】図35は、ned/00/01を (2回) 接種したカニクイザルの咽喉スワブについてのRT-PCRアッセイの結果を示す。+ = 陽性 ; - = 陰性 ; N = 実施せず ; ? = 不確定 ; 0 ~ 10 : 感染後の日数。

【図 3 6】図36Aは、ned/00/01に (再) 感染させた2匹のカニクイザルのned/00/01に対するIgA、IgMおよびIgG応答を示す。図36Bは、ned/00/01に感染させた2匹のカニクイザルのAPVに対するIgG応答を示す。

【図 3 7】図37は、ヒト血清においてhMPV IgG抗体を検出するためのhMPV ELISAおよびAPV抑制ELISAの使用を比較した図である。

【図 1 a】

| 表 1 | | | | | | | |
|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| M | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,77 | 0,87 | 0,75 |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,91 | 0,41 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,42 | 0,35 | 0,36 | 0,35 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,37 | 0,38 | 0,38 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,78 | 0,89 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,77 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| N | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,20 | 0,22 | 0,21 | 0,40 | 0,52 | 0,40 |
| hRSV | --- | 1,00 | --- | 0,59 | 0,30 | 0,18 | 0,21 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,31 | 0,21 | 0,23 | 0,21 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,21 | 0,23 | 0,21 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,42 | 1,00 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,42 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| F | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,32 | 0,32 | 0,37 | 0,67 | 0,80 | 0,66 |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,82 | 0,40 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,41 | 0,34 | 0,36 | 0,34 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,38 | 0,38 | 0,39 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,72 | 0,84 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,72 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| P | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,25 | 0,26 | 0,27 | 0,55 | 0,57 | --- |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,81 | 0,30 | 0,28 | 0,26 | --- |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,29 | 0,28 | 0,26 | --- |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,23 | 0,27 | --- |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,52 | --- |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| L9 | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- | --- |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- | --- |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,35 | --- | --- | --- |
| APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- | --- |
| L9/10 | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,30 | 0,30 | 0,53 | --- | --- | --- |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,83 | 0,34 | --- | --- | --- |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- | --- |
| APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- | --- |

【図 3 - 1】

核タンパク質

| 00-1 NP | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
|---------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 00-1 NP | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 NP | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 NP | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 NP | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 NP | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 NP | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| 00-1 NP | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 NP | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 NP | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 NP | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 NP | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 NP | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 NP | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |

リン酸化タンパク質

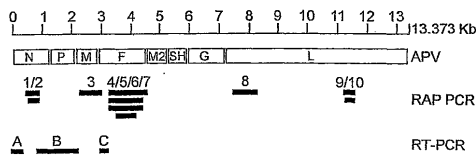
| 00-1 P | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
|--------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 00-1 P | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 P | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 P | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 P | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| 00-1 P | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 P | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 P | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 P | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 P | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |

【図 1 b】

| 表 2 | | | | | |
|--|-------|------|------------|------|--------|
| 免疫蛍光アッセイおよびウイルス中和アッセイを用いた、年齢群で分類したヒトにおけるhMPVの血清陽性率 | | | | | |
| 免疫蛍光アッセイ | | | ウイルス中和アッセイ | | |
| 年齢 (才) | 試験したN | 陽性のN | 試験したN | 陽性のN | 力価範囲 |
| < 1 | 20 | 5 | 12 | 3 | 16~32 |
| 1~2 | 20 | 11 | 13 | 4 | 16~32 |
| 2~5 | 20 | 14 | 8 | 3 | 16~512 |
| 5~10 | 20 | 20 | 4 | 4 | 32~256 |
| 10~20 | 20 | 20 | 4 | 3 | 32~128 |
| > 20 | 20 | 20 | 4 | 3 | 32~128 |
| 8~99 ¹ | 72 | 72 | 11 | 11 | 16~128 |

¹ 1958年に採取した血清を用いた血清考古学的分析

【図 2】



【図 3 - 2】

マトリックスタンパク質

| 00-1 matrix | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
|-------------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 00-1 matrix | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 matrix | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 matrix | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 matrix | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 matrix | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 matrix | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| 00-1 matrix | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 matrix | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 matrix | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 matrix | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 matrix | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 matrix | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 matrix | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |

| 00-1 P | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
|--------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| 00-1 P | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 P | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 P | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 P | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| 00-1 P | | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 P | hRSV | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | --- | --- |
| 00-1 P | bRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | --- | --- |
| 00-1 P | PMV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | --- | --- |
| 00-1 P | APV-C | --- | --- | --- | --- | 1,00 | --- |
| 00-1 P | APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |

LポリメラーゼRAP PCR断片 8

[illegible]

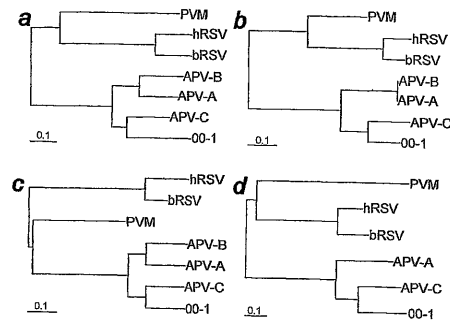
LポリメラーゼRAP PCR断片 9 / 10

[illegible]

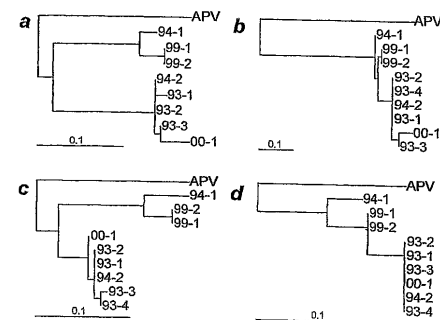
【 図 6 A - 1 】

[illegible]

【 図 4 】

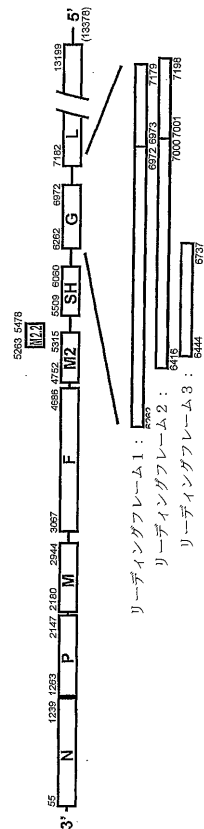


【 図 5 】



【 図 6 A - 2 】

5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640

[illegible][illegible][illegible]

【 図 8 】

HMVF MSLSQIHLSDLSYKHLKESQYTKKRVGTTATPTSSLOQITLGE 50
APVCQ.....R.VB.....
APVBE.....D.....R.....A.....I.....E.....PVST.....M
APVAE.....R.....E.....D.....R.....A.....I.....E.....PVST.....M
HRSVA .A.SKVK.N.TFM.DOL.SS.K.....Q.ST.DNDIDPNDV.KH.NK.....M
HRSVB .A.SKVK.N.TFM.DOL.SS.K.....Q.ST.DNDIDPNDV.KH.NK.....M
HRSV .A.SKVK.N.TFM.DOL.SS.K.....Q.ST.DNDIDPNDV.KH.NK.....M
PVMDLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHM.KALARTL.M

HMVF ILYAKHADVKAAREIGIYGTALSERVOQLIRNSSEVQVLTITSL 100
APVCT.SH.....V.M.V.....T.A.T.....K.....A.....K.....
APVBF.....EP.....OV.M.....ADKT.....KS.....G.M.KIVT.....
APVAV.F.....T.EP.....V.M.....ADKT.....KS.....G.M.KIVT.....
HRSVA .L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR.R.DTK.KDA.YB.KANGVDVTH
HRSVB .L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR.R.DTK.KDA.YB.KANGVDVTH
HRSV .L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR.R.DTK.KDA.YB.KANGVDVTH
PVMF.LATFNCEV.....L.AMSL.RDOSIX.....BA.VN.KC.D.OLKDF

HMVF GKIKNNRGEQLQMDLRGVKSVWEIDKARKATLTKSSGNTFQNG 150
APVCG.S.....E.....R.....I.....V.....SAT.DN.P.....
APVBPAGPGR.....KNEV.N.D.DGPA.ADNVERT.....E.SIAM.K-AQ.K.....
APVASABOSVR.....KNEV.N.D.DGPA.ADNVERT.....E.SIAM.K-AQ.K.....
HRSVA .RDI.G.EMKFEV.TLSSITSEIQN.EI.S.SYKKN.....M-EVAPYE
HRSVB .RDI.G.EMKFEV.TLSSITSEIQN.EI.S.SYKKN.....M-EVAPYE
HRSV .RDI.G.EMKFEV.TLSSITSEIQN.EI.S.SYKKN.....M-EVAPYE
PVMTILQSG.EKI.V.....V.IDAANLADLSE.....GVV.KK.TG-ARL.D.R

HMVF RPSADPTFIDUKVLEKRTKSTEVATATVHRNKRVSNAIRTER 200
APVCK.L.A.V.....I.....V.....A.....I.....S.....IS.....
APVBK.L.A.V.....I.....V.....A.....I.....S.....IS.....
APVAK.L.A.V.....I.....V.....A.....I.....S.....IS.....
HRSVA .HDS.CGM.IA.VI.....AGDRS.TAVI.....N.KHEM.....KG
HRSVB .HDS.CGM.IA.VI.....AGDRS.TAVI.....N.KHEM.....KG
HRSV .HDS.CGM.IA.VI.....AGDRS.TAVI.....N.KHEM.....KG
PVMHDS.CGM.IA.VI.....AGDRS.TAVI.....N.KHEM.....KG

HMVF MDIKRSESEVTEKQCHGSECEVEMVHSGSSSESHUNKNG 250
APVCI.....R.....K.....FE.....K.....Y.N.....T.....RM.....
APVBI.....R.....K.....FE.....K.....Y.N.....T.....RM.....
APVAI.....R.....K.....FE.....K.....Y.N.....T.....RM.....
HRSVA .LIPED.N.EV.KHPHIDV.VHF.I.QS.TRG.RV.GI.AGL.N
HRSVB .LIPED.N.EV.KHPHIDV.VHF.I.QS.TRG.RV.GI.AGL.N
HRSV .LIPED.N.EV.KHPHIDV.VHF.I.QS.TRG.RV.GI.AGL.N
PVMEVQ.....E.....R.P.YIDV.TF.L.QS.VRG.....V.G.SGL.N

HMVF KXGKSLNLRGKXKNSHSHVHAGDRGVEVADHMSHPSG 300
APVCR.....S.....S.....K.....K.....
APVBR.....S.....S.....K.....K.....
APVAR.....S.....S.....K.....K.....
HRSVA .S.V.....K.VK.....A.....ME.V.....EYAKL.G.A.
HRSVB .S.V.....K.VK.....A.....ME.V.....EYAKL.G.A.
HRSV .S.V.....K.VK.....A.....ME.V.....EYAKL.G.A.
PVMS.V.....K.VK.....A.....ME.V.....EYAKL.G.A.

HMVF HULLRSGPKAGHLSAANGKNAVAVUSGDRGVEVADHMSHPSG 350
APVCN.....L.....A.....L.....
APVBT.S.....A.....K.....A.....L.....
APVAT.S.....A.....K.....A.....L.....
HRSVA .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
HRSVB .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
HRSV .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
PVMFY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.

HMVF AESYAKSLKESNKINFSGLIDKCKRAEHPLANSDDG-ONDY 395
APVCR.....E.....N.....INEEG.....
APVBR.....E.....N.....INEEG.....
APVAR.....E.....N.....INEEG.....
HRSVA .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
HRSVB .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
HRSV .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
PVMKA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL

【 図 9 】

HMVF MSFPEKQILFMNGEAKLAEAFUKSLKPGHRS 50
APVCL.....A.....R.....K.....I.....R.....T.....V.D.
APVBL.....M.....S.....T.....Q.....IKNSTV.....R.....S.DP
APVAL.....M.....S.....T.....Q.....IKNSTV.....R.....S.DP
HRSVAM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
HRSVBM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
HRSVM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
PVMM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE

HMVF VMTVSEILFITSRAKPTIPSEKPLATKGMKRTIKQALKWDPT 100
APVCII.....V.K.....EST.V.T.P.R.B.GE.PPT.RCYTES.ANDAT.E
APVBS.....KVP.....PLCSESTS.....R.ACRPT-STLFPK-
APVAI.TA.KVP.....ELCH.TT.....SCI.PK-APVPRK-
HRSVATKKCFE.....KDPK.DS.ISVNS
HRSVBTKKCFE.....KDPK.DS.ISVNS
HRSVTKKCFE.....KDPK.DS.ISVNS
PVMPILRSSEK.SFRVA.NL.E.A.P.....TTPFF.PGM.EGOFRESOV

HMVF ESESTKVLPSSEKGTFAKPLKPTNKKK 150
APVCDSHLY.EVTA.T.....GKPEPE.....T.KND.S.R.
APVBV.SIYP.LPAPP.AMIDTAHFAGTAKK.R.....K.SSKA
APVAI.SIYP.LPAPP.AMIDTAHFAGTAKK.R.....K.SSKA
HRSVA .DI.VTK.SETTSN.IIIM.PHEUDTAG.KHYAKPL.....KEDPTSDM
HRSVB .DI.VTK.SETTSN.IIIM.PHEUDTAG.KHYAKPL.....KEDPTSDM
HRSV .DI.VTK.SETTSN.IIIM.PHEUDTAG.KHYAKPL.....KEDPTSDM
PVMDI.LPK.SETTSN.IIIM.PHEUDTAG.KHYAKPL.....KEDPTSDM

HMVF KLEKDALDLS-NEKEOASILLTEED-TSISIKARLESERK 200
APVCME.E.....DO.....V.....K.....A.....L.....D.....
APVBE.E.....DO.....V.....K.....A.....L.....D.....
APVAE.E.....DO.....V.....K.....A.....L.....D.....
HRSVA .PES.LYKETTETFINN-E.E.SYST.....INDQ.NN-T.....DR.D.
HRSVB .PES.LYKETTETFINN-E.E.SYST.....INDQ.NN-T.....DR.D.
HRSV .PES.LYKETTETFINN-E.E.SYST.....INDQ.NN-T.....DR.D.
PVMPES.LYKETTETFINN-E.E.SYST.....INDQ.NN-T.....DR.D.

HMVF MLCGLLTITATATAPADGIDRDMGVREJADITKARKK 250
APVCM.L.E.....V.....L.....N.....M.....
APVBM.L.E.....V.....L.....N.....M.....
APVAM.L.E.....V.....L.....N.....M.....
HRSVA .E.M.H.VV.S.....S.....V.L.....M.EK.RT.....LMTNDRL
HRSVB .E.M.H.VV.S.....S.....V.L.....M.EK.RT.....LMTNDRL
HRSV .E.M.H.VV.S.....S.....V.L.....M.EK.RT.....LMTNDRL
PVME.M.H.VV.S.....S.....V.L.....M.EK.RT.....LMTNDRL

HMVF -AREMESEBORSKINGSVKLEKAKLKVSGSSSESHUNKNG 300
APVCK.A.K.....K.....K.....K.....K.....
APVBK.A.K.....K.....K.....K.....K.....
APVAK.A.K.....K.....K.....K.....K.....
HRSVA .AM.LRN.SEMO.DTSE.S.NPTSEK.NL.C.....
HRSVB .AM.LRN.SEMO.DTSE.S.NPTSEK.NL.C.....
HRSV .AM.LRN.SEMO.DTSE.S.NPTSEK.NL.C.....
PVMAM.LRN.SEMO.DTSE.S.NPTSEK.NL.C.....

HMVF DNDGSGHDTYGLH 316
APVCHESNMF.L.S.T.....
APVBHESNMF.L.S.T.....
APVAHESNMF.L.S.T.....
HRSVA .SNDLSL.F.....
HRSVB .SNDLSL.F.....
HRSV .SNDLSL.F.....
PVMSNDLSL.F.....

HMVF HULLRSGPKAGHLSAANGKNAVAVUSGDRGVEVADHMSHPSG 350
APVCN.....L.....A.....L.....
APVBT.S.....A.....K.....A.....L.....
APVAT.S.....A.....K.....A.....L.....
HRSVA .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
HRSVB .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
HRSV .FY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.
PVMFY.IJNM.S.....TOP.H.S.....A.....M.E.....TFR.QD.YD.

HMVF AESYAKSLKESNKINFSGLIDKCKRAEHPLANSDDG-ONDY 395
APVCR.....E.....N.....INEEG.....
APVBR.....E.....N.....INEEG.....
APVAR.....E.....N.....INEEG.....
HRSVA .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
HRSVB .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
HRSV .KA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL
PVMKA.EQ.....NGV.Y.V.D.A.L.IKQ.PK.N-DVEL

【 図 10 】

HMVF MESLYDTYOGIETAAWDLLEKOLPASITNIFPEQANTPAVILL 50
APVCT.....V.....V.....V.....V.....T.....T.....E
APVBT.....V.....V.....V.....V.....T.....T.....E
APVAT.....V.....V.....V.....V.....T.....T.....E
HRSVA .T.VKLEB.ST.....YVNL.DD.....V.M.SSM.ADL.IK
HRSVB .T.VKLEB.ST.....YVNL.DD.....V.M.SSM.ADL.IK
HRSV .T.VKLEB.ST.....YVNL.DD.....V.M.SSM.ADL.IK
PVMT.VKLEB.ST.....YVNL.DD.....V.M.SSM.ADL.IK

HMVF QIKETITVILYASGSGNKLKNSGQAGNVLKNEVNTVALDEIS 100
APVCL.....A.....S.....S.....A.....
APVBS.....Q.TV.PE.V.O.....T.....A.....S.....S.....A.....
APVAS.....Q.TV.PE.V.O.....T.....A.....S.....S.....A.....
HRSVA .E.ASIN.LVROISTEK.S.R.TINSRS.VLQNH.SN.IZS.N.S.R.
HRSVB .E.ASIN.LVROISTEK.S.R.TINSRS.VLQNH.SN.IZS.N.S.R.
HRSV .E.ASIN.LVROISTEK.S.R.TINSRS.VLQNH.SN.IZS.N.S.R.
PVME.ASIN.LVROISTEK.S.R.TINSRS.VLQNH.SN.IZS.N.S.R.

HMVF KLEFVKLCEVETVITLTKPQYGVKSVKSGVCKNDLILALCDM 150
APVCL.....A.....S.....S.....A.....
APVBD.GV.....D.RA.....L.....I.....TMMT.....R.....I.....
APVAD.GV.....D.RA.....L.....I.....TMMT.....R.....I.....
HRSVA .AY.VT.P.I.ACS.CL.VNK.LATVOLDKMTNFP.....E.....S
HRSVB .AY.VT.P.I.ACS.CL.VNK.LATVOLDKMTNFP.....E.....S
HRSV .AY.VT.P.I.ACS.CL.VNK.LATVOLDKMTNFP.....E.....S
PVMAY.VT.P.I.ACS.CL.VNK.LATVOLDKMTNFP.....E.....S

HMVF DLKNTFTVITAPKNSVLEKESATVEAISESDALQATVAPAG 200
APVCI.....G.....I.....R.....
APVBI.....G.....I.....R.....
APVAI.....G.....I.....R.....
HRSVA .HITSK.I.TYR.I.VAKNDL.N.HITP.FGN.I.N.I.S.
HRSVB .HITSK.I.TYR.I.VAKNDL.N.HITP.FGN.I.N.I.S.
HRSV .HITSK.I.TYR.I.VAKNDL.N.HITP.FGN.I.N.I.S.
PVMHITSK.I.TYR.I.VAKNDL.N.HITP.FGN.I.N.I.S.

HMVF IMITNKNPGIKPKLAGOTVILEAYVQESKSKICKSHOCHTSY 250
APVCV.....R.....R.....
APVBV.....R.....R.....
APVAV.....R.....R.....
HRSVA .LWV.VTDR.A.YIKROS.F.D.....LEK.....YVYTH.K.TA.FA
HRSVB .LWV.VTDR.A.YIKROS.F.D.....LEK.....YVYTH.K.TA.FA
HRSV .LWV.VTDR.A.YIKROS.F.D.....LEK.....YVYTH.K.TA.FA
PVMLWV.VTDR.A.YIKROS.F.D.....LEK.....YVYTH.K.TA.FA

HMVF LKSR 258
APVC
APVB
APVA
HRSVA .L.FED.....
HRSVB .L.FED.....
HRSV .L.FED.....
PVML.FED.....

【 図 11 】

シグナルペプチド

HMVF MSFPEKQILFMNGEAKLAEAFUKSLKPGHRS 100
APVCL.....A.....R.....K.....I.....R.....T.....V.D.
APVBL.....M.....S.....T.....Q.....IKNSTV.....R.....S.DP
APVAL.....M.....S.....T.....Q.....IKNSTV.....R.....S.DP
HRSVAM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
HRSVBM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
HRSVM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE
PVMM.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE

融合ドメイン

HMVF LAREK 200
APVCK.A.....R.....G.....A.....G.....R.....
APVBK.A.....R.....G.....A.....G.....R.....
APVAK.A.....R.....G.....A.....G.....R.....
HRSVA .LAREK.....
HRSVB .LAREK.....
HRSV .LAREK.....
PVMLAREK.....

シグナルペプチド


HMVF VIMVQILGIVDT 400
APVCV.....I.....G.....I.....V.....D.....
APVBV.....I.....G.....I.....V.....D.....
APVAV.....I.....G.....I.....V.....D.....
HRSVA .VIMVQILGIVDT.....
HRSVB .VIMVQILGIVDT.....
HRSV .VIMVQILGIVDT.....
PVMVIMVQILGIVDT.....

膜アンカー

HMVF VIMVQILGIVDT 503
APVCV.....I.....G.....I.....V.....D.....
APVBV.....I.....G.....I.....V.....D.....
APVAV.....I.....G.....I.....V.....D.....
HRSVA .VIMVQILGIVDT.....
HRSVB .VIMVQILGIVDT.....
HRSV .VIMVQILGIVDT.....
PVMVIMVQILGIVDT.....

【 ㊦ 1 3 】

[illegible]


 1 4

A

MEVKEVNIRITDMLKARVKVKRVARSKCFKNASLWLGITTLISALNIYLI 50
 100
INYNKMQKNTISEHHTSSSPMESSRETPTVPTDNSDNTSSPOHPTQOSTE
 150
 GSTLYFAASASSPETEPETSTPTDITNRPFFVDTHHTFPSASRTKTSAPVHT 200
 KNNPRTSSRTHSPPRATTRTARRATTTTLATSSSRKRPSTASVQPDISATTH 236
 KNEEASPASQTSASTTRTIQRKSVENTSTYNTOTS

B

3 hMPV
 2
 1
 0
 -1
 -2
 -3

3 APV-A
 2
 1
 0
 -1
 -2
 -3

3 hRSV B
 2
 1
 0
 -1
 -2
 -3

平均親水性度

0 100 200 300 400

位置 (アミノ酸)

MITLDVKSIDGSSKCTHLKKIKDHSKGLVILVLIKILALLTFLTVTIGT
100
NYIKVNNLIGIQSKTESDKDSSNTSVTKTLNHDITQYFKSLIOR
150
YTNSAINSDTQWKINRNQCTNTITYKFLCFKSDETKTNNCKDLTLCRNK
183
PKPAVGVIYHIVECHCIYTVKWCYHYPTDETQS

B

hMPV

APV-A

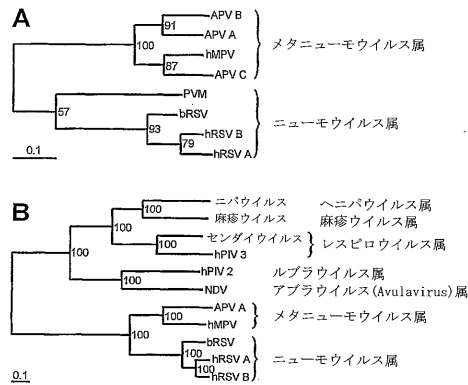
hRSV B

位置 (アミノ酸)

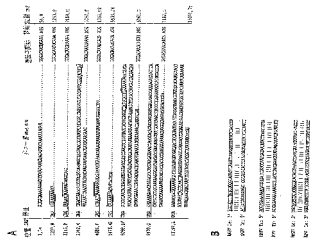
平均親水性度

| [15] | | | |
|--------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | | A | |
| HMVF | NYIARA | SYIDTDSFKINQAR | YETKATCAADAEHLGTOSLFCWMLHJ |
| AFVA | | | SV..... |
| HMV | SKG | | SC. S. L. |
| HMVSB | SKG | | SC. S. L. |
| BRGV | | | SC. S. L. |
| HMVSB | | | SC. S. L. |
| HMVSB | | | SC. S. L. |
| NDV | RRMVAIF | | |
| SV | YETISLFI | | |
| HMV3 | YETISLFI | | |
| HMV | YETISLFI | | |
| NIPAR | ETZYV | | |
| | | B | |
| HMVF | TMTCIA | HAPAPETQ | |
| AFVA | | | |
| HMV | | | |
| HMVSB | V. I. T. | | |
| BRGV | A. V. T. | | |
| HMVSB | S. L. D. P. G. F. N. | | |
| NDV | YVGFENP | | |
| SV | C. I. V. G. P. G. F. N. | | |
| HMV3 | S. I. V. G. P. G. F. N. | | |
| HMV | S. I. V. G. P. G. F. N. | | |
| NIPAR | SVIV | | |
| | | C | |
| HMVF | ISLW | SVKVKTRCSHLNDGNS | |
| AFVA | | | |
| HMV | | | |
| HMVSB | | | |
| BRGV | | | |
| HMVSB | | | |
| NDV | | | |
| SV | | | |
| HMV3 | | | |
| NIPAR | | | |
| | | D | |
| HMVF | RMKE | IRADYANIGKLGAGGTYISNDLQTSKV | |
| AFVA | | | |
| HMV | NS | | |
| HMVSB | NS | | |
| BRGV | NS | | |
| HMVSB | NS | | |
| NDV | NFF | | |
| SV | RYFQAD | | |
| HMV3 | RYFQAD | | |
| HMV | RYFQAD | | |
| NIPAR | LYFERI | | |

【図 16】



【図 17】



【図 18 b】

| 5' L | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,835 | N.A. | 0,596 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,605 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

5' L : 99-1の最初の1500ヌクレオチドだけが入手できた

N.A. : 配列を入手できなかった

【図 18 a】

DNA類似性マトリックス

| N | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,862 | 0,757 | 0,660 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,757 | 0,663 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,656 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| E | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,811 | 0,677 | 0,588 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,674 | 0,593 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,584 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,865 | 0,766 | 0,695 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,773 | 0,707 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,705 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| E | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,838 | 0,706 | 0,662 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,716 | 0,655 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,685 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M2-1 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,863 | 0,764 | 0,668 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,744 | 0,657 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,670 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M2-2 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,861 | 0,648 | 0,486 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,675 | 0,486 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,463 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| SH | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,688 | N.A. | 0,421 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,380 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| G | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,543 | N.A. | 0,262 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,263 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

【図 19】

タンパク質類似性マトリックス

| N | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,949 | 0,880 | 0,685 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,883 | 0,682 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,700 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| E | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,860 | 0,683 | 0,552 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,676 | 0,549 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,528 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,976 | 0,874 | 0,775 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,874 | 0,763 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,775 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| E | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,938 | 0,810 | 0,677 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,803 | 0,674 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,719 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M2-1 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,946 | 0,844 | 0,719 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,834 | 0,703 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,704 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| M2-2 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,901 | 0,563 | 0,246 |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,577 | 0,232 |
| APVC | --- | --- | 1,000 | 0,191 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| SH | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,570 | N.A. | 0,178 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,162 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| G | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,326 | N.A. | 0,094 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,107 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| 5' L | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,921 | N.A. | 0,600 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,594 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

5' L : 99-1の最初の500アミノ酸残基だけが入手できた

N.A. : 配列を入手できなかった

【図 20】

核タンパク質 (N)

| | | | | | | |
|------|------------|---------------|-----------|---------|---------|-------------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MSLQGIHLS | DLSSYKHAILKES | QYTIKR | DVGT | TAVTFSS | LQOEITLLCGEILYK |
| 99-1 | MSLQGIHLS | DLSSYKHAILKES | QYTIKR | DVGT | TAVTFSS | LQOEITLLCGEILYK |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | YAAEIGIQYI | STALGSE | RVQQLRNSG | SEVQVVL | TRTYS | LGKPKNNKGEDLQMLDIHGVE |
| 99-1 | YAAEIGIQYI | STALGSE | RVQQLRNSG | SEVQVVL | TRTYS | LGKPKNNKGEDLQMLDIHGVE |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | KSWVEEIDK | EARKTMTLLK | ESSGNIPQ | NRPSAD | PTPIILL | CVGALIFTKLASTIEVGL |
| 99-1 | KSWVEEIDK | EARKTMTLLK | ESSGNIPQ | NRPSAD | PTPIILL | CVGALIFTKLASTIEVGL |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | ETTVRANR | VLSDALKR | YPRMDIP | KIARSFY | DLFEQ | KVYHRSLFIEYKALGSSSTGSKA |
| 99-1 | ETTVRANR | VLSDALKR | YPRMDIP | KIARSFY | DLFEQ | KVYHRSLFIEYKALGSSSTGSKA |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| 00-1 | ESLFEVNI | FMQAYG | AGQTM | LRWGV | IARSSN | IMLGHVSVQAE |
| 99-1 | ESLFEVNI | FMQAYG | AGQTM | LRWGV | IARSSN | IMLGHVSVQAE |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 00-1 | LLHLRQSP | KAGLLS | LANCPN | FAVVL | GNASGL | GIGIMYGRV |
| 99-1 | LLHLRQSP | KAGLLS | LANCPN | FAVVL | GNASGL | GIGIMYGRV |
| | 370 | 380 | 390 | | | |
| 00-1 | SNKINFS | SLGLTDE | EKAAEH | FLNVS | DSQND | Y 394 |
| 99-1 | SNKINFS | SLGLTDE | EKAAEH | FLNVS | DSQND | Y 394 |

【図 21】

リン酸化タンパク質 (P)

| | | | | | | |
|------|---------|--------|--------|---------|-------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MSFPFGK | DILFMG | NEAAK | LAAAFQ | KSLEK | GHKRSQSI |
| 99-1 | MSFPFGK | DILFMG | NEAAK | LAAAFQ | KSLEK | GHKRSQSI |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | SSQTLSP | KPLAM | DA | SSQTLSP | KPLAM | DA |
| 99-1 | SSQTLSP | KPLAM | DA | SSQTLSP | KPLAM | DA |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | NKKKVS | FTNE | PGKY | TKLEK | DALD | LLSDNEEDAE |
| 99-1 | NKKKVS | FTNE | PGKY | TKLEK | DALD | LLSDNEEDAE |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | EKLSMIL | GLLRL | NIATAG | PTAARD | GIRD | AMIGVREEL |
| 99-1 | EKLSMIL | GLLRL | NIATAG | PTAARD | GIRD | AMIGVREEL |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | |
| 00-1 | RSKIGN | SVKLEK | AKELN | KIVED | ESTS | GESEEE |
| 99-1 | RSKIGN | SVKLEK | AKELN | KIVED | ESTS | GESEEE |

【図 22】

マトリックスタンパク質 (M)

| | | | | | | |
|------|--------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MESYIV | DTYQGI | PYTA | AVQD | LVLEK | DLLPASLI |
| 99-1 | MESYIV | DTYQGI | PYTA | AVQD | LVLEK | DLLPASLI |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | YAASNG | PILKVN | ASQA | AMSVLP | PKKFE | VNATVALDE |
| 99-1 | YAASNG | PILKVN | ASQA | AMSVLP | PKKFE | VNATVALDE |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | KPYGM | SVKFS | SAKSV | GKTH | DIAL | CFDMLEK |
| 99-1 | KPYGM | SVKFS | SAKSV | GKTH | DIAL | CFDMLEK |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | ISSEAD | QALQ | AKIAP | YAGL | IMIM | TNNPKG |
| 99-1 | ISSEAD | QALQ | AKIAP | YAGL | IMIM | TNNPKG |
| | 250 | | | | | |
| 00-1 | TWSHQ | GTRY | VLKSR | 254 | | |
| 99-1 | TWSHQ | GTRY | VLKSR | 254 | | |

【図 23】

融合タンパク質 (F)

| | | | | | | |
|------|-------|--------|-------|------|--------|---------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MSWKV | ITISLL | ITPQH | GKES | YLEESC | STITEGY |
| 99-1 | MSWKV | ITISLL | ITPQH | GKES | YLEESC | STITEGY |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | DGFS | LITEL | DLT | KSAL | RELR | VSADQL |
| 99-1 | DGFS | LITEL | DLT | KSAL | RELR | VSADQL |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | GVALA | KTIR | LES | EVPA | IKALK | QNEAV |
| 99-1 | GVALA | KTIR | LES | EVPA | IKALK | QNEAV |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | KCDI | ADL | KMA | VSF | QFNRR | FLNV |
| 99-1 | KCDI | ADL | KMA | VSF | QFNRR | FLNV |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| 00-1 | IKML | ENR | AMV | RRK | GFGL | IGVGS |
| 99-1 | IKML | ENR | AMV | RRK | GFGL | IGVGS |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 00-1 | CLL | RED | QGW | YCN | AGS | TVVYP |
| 99-1 | CLL | RED | QGW | YCN | AGS | TVVYP |
| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| 00-1 | CKV | ST | GR | PIS | MV | ALS |
| 99-1 | CKV | ST | GR | PIS | MV | ALS |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| 00-1 | DNT | VY | Q | L | S | K |
| 99-1 | DNT | VY | Q | L | S | K |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | |
| 00-1 | L | S | A | E | G | N |
| 99-1 | L | S | A | E | G | N |

【図 24】

22Kタンパク質 (M2-1)

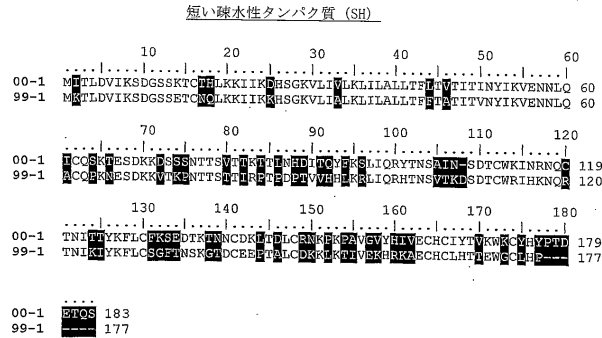
| | | | | | | |
|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MSRK | APCK | YE | VR | GK | CNR |
| 99-1 | MSRK | APCK | YE | VR | GK | CNR |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | GAG | RED | RT | Q | D | F |
| 99-1 | GAG | RED | RT | Q | D | F |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | SKH | VAL | HN | L | V | S |
| 99-1 | SKH | VAL | HN | L | V | S |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | EST | NQ | VQ | 187 | | |
| 99-1 | EST | NQ | VQ | 187 | | |

【図 25】

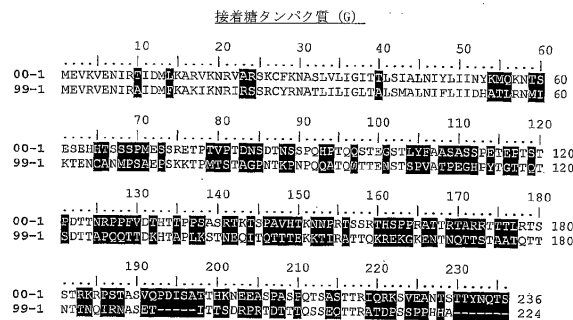
M2-2タンパク質 (M2-2)

| | | | | | | |
|------|-----|----|----|----|----|----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MTL | H | M | P | C | K |
| 99-1 | MTL | H | M | P | C | K |
| | 70 | | | | | |
| 00-1 | I | B | I | I | V | K |
| 99-1 | I | B | I | I | V | K |

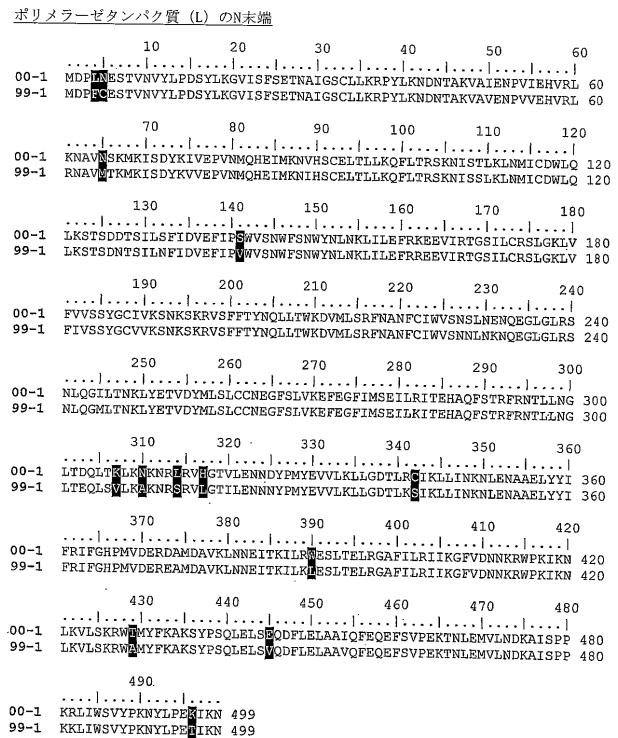
【図 26】



【図 27】



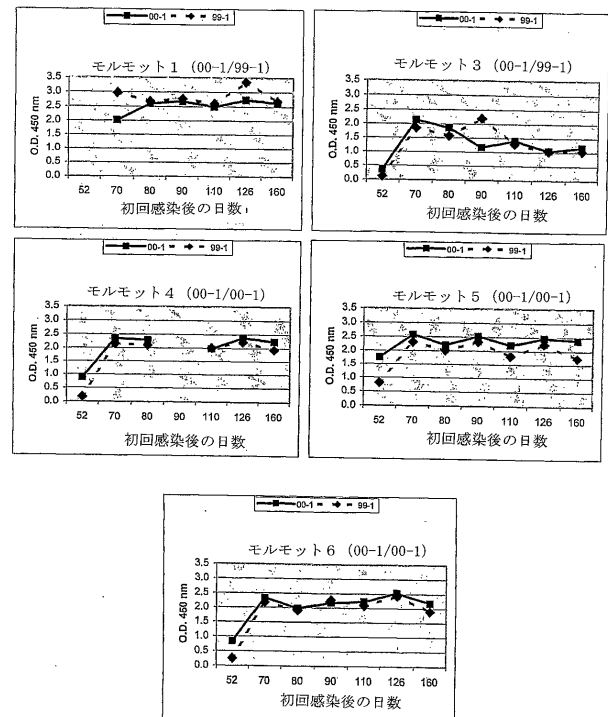
【図 28】



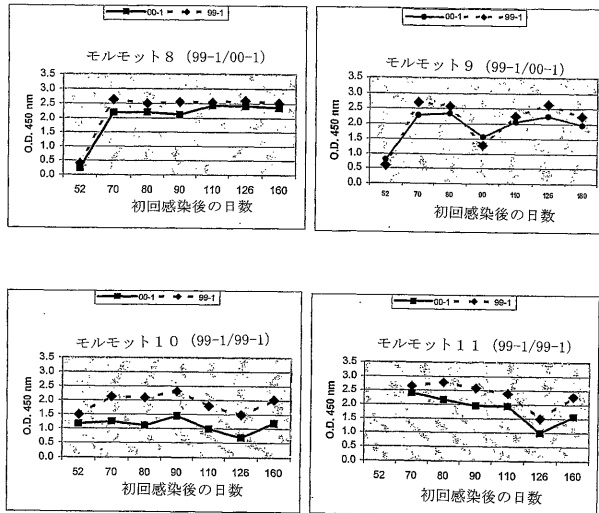
【図 29】

| 番号 | 初回感染 | スワブ | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 8 | 10 | 11 | 12 | 2回目の感染 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|------|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|------|--------|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 00-1 | T | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | + | N | + | - | | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 00-1 | T | - | + | + | + | + | + | + | - | - | D | | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | + | N | + | D | | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 00-1 | T | - | ? | ? | - | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | ? | ? | - | - | N | - | - | | | - | - | ? | + | + | - |
| 4 | 00-1 | T | - | + | + | + | + | + | + | - | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | + | N | ? | | | - | - | + | + | - | - |
| 5 | 00-1 | T | - | ? | + | + | + | + | + | + | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | + | + | - | | | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 00-1 | T | - | + | + | + | + | + | + | + | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | + | + | N | | | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 99-1 | T | - | - | - | + | + | + | + | D | - | - | | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | - | + | + | + | + | N | D | - | | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 99-1 | T | - | - | + | + | + | - | - | - | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | ? | - | + | + | ? | N | - | - | | | - | - | + | + | + | + |
| 9 | 99-1 | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - | ? | + | + | - |
| 10 | 99-1 | T | - | - | - | + | + | + | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | + | + | + | + | + | N | - | | | - | - | - | - | - | - |
| 11 | 99-1 | T | - | - | + | + | + | + | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | + | + | + | + | N | - | - | | | - | - | - | - | - | - |
| 12 | 99-1 | T | - | - | + | + | ? | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | + | + | + | + | N | - | - | | | - | - | - | - | - | - |

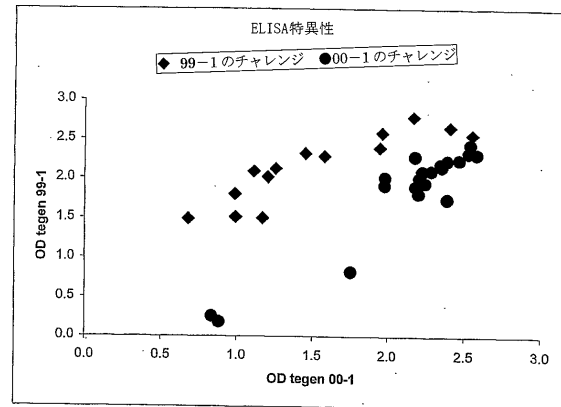
【図 30 A】



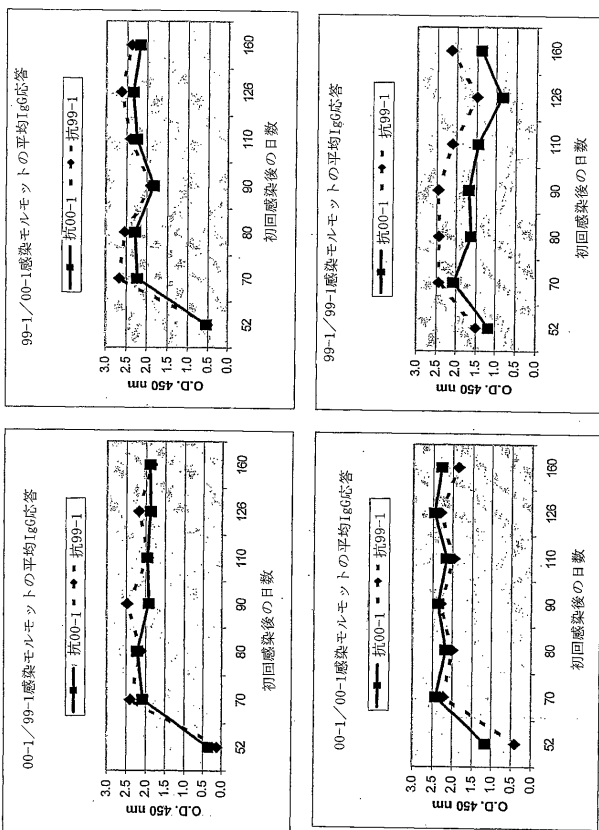
【図 30 B】



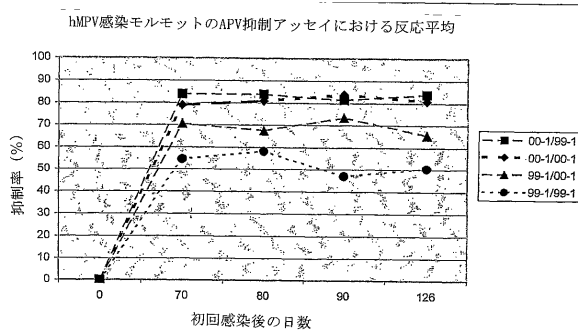
【図 31】



【図 32】



【図 33】



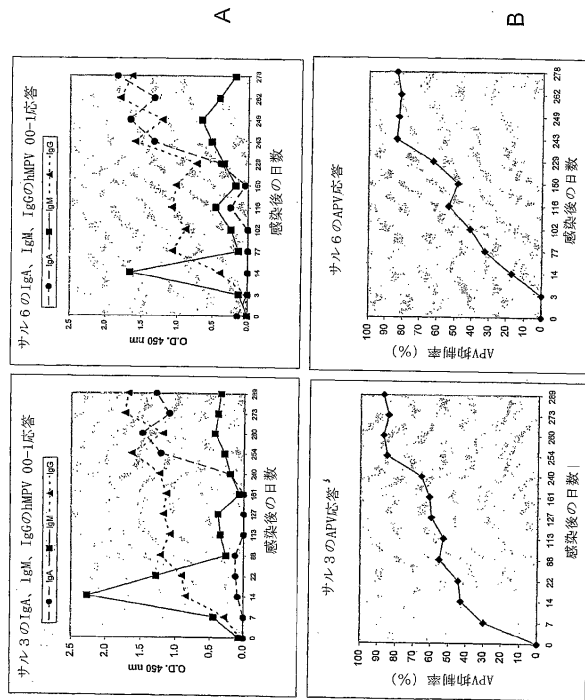
【図 34】

| | 抗001-1 | 抗99-1 | 抗APV-C |
|-----------|--------|-------|--------|
| 00-1で一度感染 | | | |
| 00-1で二度感染 | | | |
| 99-1で一度感染 | | | |
| 99-1で二度感染 | | | |

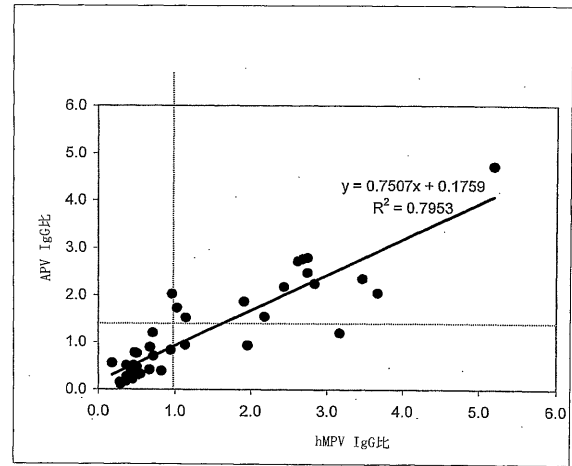
【図 35】

| 番号 | 1回目の感染 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 2回目の感染 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 10 |
|----|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--------|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 3 | 00-1 | - | - | + | + | + | + | + | N | - | | - | + | + | + | + | - | ? | - |
| 6 | 00-1 | - | + | + | + | + | + | + | - | - | | - | + | + | + | + | + | - | - |

【図 36】



【図 37】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057302 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/135
(21) International Application Number: PCT/NL02/00040
(22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
01200213.5 19 January 2001 (19.01.2001) EP
01263985.5 18 October 2001 (18.10.2001) EP
(61) Related by addition to earlier applications or grants:
CU Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished (ICA)
KP Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished
(71) Applicant (for all designated States except US): VIRO-CLINCS B.V. [NL/NL]; Dr. Molewaterplein 40, NL-3015 GD Rotterdam (NL).
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DE JONG, Jan, Cornelius [NL/NL]; Kragerlaan 205, NL-2806 EJ Gouda (NL). FOUCHER, Ronaldus, Adrianus, Maria [NL/NL]; Usseburgsingel 44a, NL-3021 AR Rotterdam (NL). VAN DEN HOOGEN, Bernadetta, Gerarda [NL/NL]; Essenburgsingel 44a, NL-3021 AR Rotterdam (NL). OSTERHAUS, Albertus, Dominicus, Marcellinus, Erasmus [NL/NL]; Dr. Breveestraat 16, NL-3981 CH Bunnik (NL). GROEN, Jan [I]; Anholikade 2, NL-3446 BM Woerden (NL).
(74) Agent: PRINS, A., W.; c/o Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU (inventor's certificate), CZ (utility model), DE (utility model), DK (utility model), DM, DZ, EC, IL (utility model), IS, FI (utility model), GB, GD, GH, GI, HN (utility certificate), GM, HR (consensual patent), HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP (inventor's certificate), KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PT, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN, TR, TT (utility certificate), TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/057302 A2

(54) Title: A VIRUS CAUSING RESPIRATORY TRACT ILLNESS IN SUSCEPTIBLE MAMMALS

(57) Abstract: The invention relates to the field of virology. The invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) within the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* and components thereof.

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

A virus causing respiratory tract illness in susceptible mammals.

5

The invention relates to the field of virology.

In the past decades several etiological agents of mammalian disease, in particular of respiratory tract illnesses (RTI), in particular of humans, have been identified⁷. Classical etiological agents of RTI with mammals are respiratory

10 syncytial viruses belonging to the genus *Pneumovirus* found with humans (hRSV) and ruminants such as cattle or sheep (bRSV and/or oRSV). In human RSV differences in reciprocal cross neutralization assays, reactivity of the G proteins in immunological assays and nucleotide sequences of the G gene are used to define 2

15 hRSV antigenic subgroups. Within the subgroups the aa sequences show 94 % (subgroup A) or 98% (subgroup B) identity, while only 53% aa sequence identity is found between the subgroups. Additional variability is observed within subgroups based on monoclonal antibodies, RT-PCR assays and RNase protection assays. Viruses from both subgroups have a worldwide distribution and may occur during a single season. Infection may occur in presence of pre-existing immunity and the

20 antigenic variation is not strictly required to allow re-infection. See for example Sullender, W.M., *Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity*. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1): p. 1-15; Collins, P.L., McIntosh, K. and Chanock, R.M., *Respiratory syncytial virus*. Fields virology, ed. B.N. Knipe, Howley, P.M. 1996, Philadelphia: lippencott-raven. 1313-1351; Johnson, P.R., et al., *The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive*

25 *sequence divergence between antigenically related proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(16): p. 5625-9; Collins, P.L., *The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus Pneumovirus*, in *The Paramyxoviruses*, D.W. Kingsbury, Editor. 1991, Plenum Press: New York. p. 103-153.

30 Another classical *Pneumovirus* is the pneumonia virus of mice (PVM), in general only found with laboratory mice. However, a proportion of the illnesses observed among mammals can still not be attributed to known pathogens.

WO 02/057302

2

PCT/NL02/00040

The invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus*. Said virus is identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* by determining a nucleic acid sequence of said virus and testing it in phylogenetic analyses, for example wherein maximum likelihood trees are generated using 100 bootstraps and 3 jumbles and finding it to be more closely phylogenetically corresponding to a virus isolate deposited as I-2614 with CNM, Paris than it is corresponding to a essentially avian virus isolate of avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis. For said phylogenetic analyses it is most useful to obtain the nucleic acid sequence of a non-MPV as outgroup to be compared with, a very useful outgroup isolate can be obtained from avian pneumovirus serotype C (APV-C), as is for example demonstrated in figure 5 herein.

Although phylogenetic analyses provides a convenient method of identifying a virus as an MPV several other possibly more straightforward albeit somewhat more course methods for identifying said virus or viral proteins or nucleic acids from said virus are herein also provided. As a rule of thumb an MPV can be identified by the percentages of a homology of the virus, proteins or nucleic acids to be identified in comparison with isolates, viral proteins, or nucleic acids identified herein by sequence or deposit. It is generally known that virus species, especially RNA virus species, often constitute a quasi species wherein a cluster of said viruses displays heterogeneity among its members. Thus it is expected that each isolate may have a somewhat different percentage relationship with one of the various isolates as provided herein.

When one wishes to compare with the deposited virus I-2614, the invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* by determining an amino acid sequence of said virus and determining that said amino acid sequence has a percentage amino acid homology to a virus isolate deposited as I-2614 with CNM, Paris which is essentially higher than the percentages provided herein for the L protein, the M protein, the N protein, the P protein, or the F protein, in comparison with APV-C or, likewise, an isolated

WO 02/057302

3

PCT/NL02/00040

essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family Pneumovirinae of the family Paramyxoviridae is provided as identifiable as phylogenetically corresponding to the genus Metapneumovirus by determining a nucleic acid sequence of said virus and determining that said nucleic acid sequence has a percentage nucleic acid identity to a virus isolate deposited as I-2614 with CNCM, Paris which is essentially higher than the percentages identified herein for the nucleic acids encoding the L protein, the M protein, the N protein, the P protein, or the F protein as identified herein below in comparison with APV-C.

Again as a rule of thumb one may consider an MPV as belonging to one of the two serological groups of MPV as identified herein when the isolates or the viral proteins or nuclear acids of the isolates that need to be identified have percentages homology that fall within the bounds and metes of the percentages of homology identified herein for both separate groups, taking isolates 00-1 or 99-1 as the respective isolates of comparison. However, when the percentages of homology are smaller or there is more need to distinguish the viral isolates from for example APV-C it is better advised to resort to the phylogenetic analyses as identified herein.

Again one should keep in mind that said percentages can vary somewhat when other isolates are selected in the determination of the percentage of homology.

With the provision of this MPV, the invention provides diagnostic means and methods and therapeutic means and methods to be employed in the diagnosis and/or treatment of disease, in particular of respiratory disease, in particular of mammals, more in particular in humans. However, due to the , albeit distant, genetic relationship of the essentially mammalian MPV with the essentially avian APV, in particular with APV-C, the invention also provides means and methods to be employed in the diagnosis and treatment of avian disease. In virology, it is most advisory that diagnosis and/or treatment of a specific viral infection is performed with reagents that are most specific for said specific virus causing said infection. In this case this means that it is preferred that said diagnosis and/or treatment of an MPV infection is performed with reagents that are most specific for MPV. This by no means however excludes the possibility that less specific, but sufficiently cross-reactive reagents are used instead, for example because they are more easily available and sufficiently address the task at hand. Herein it is for example provided to perform virological and/or serological diagnosis of MPV infections in mammals with reagents derived from APV, in particular with reagents derived from APV-C, in

WO 02/057302

4

PCT/NL02/00040

the detailed description herein it is for example shown that sufficiently trustworthy serological diagnosis of MPV infections in mammals can be achieved by using an ELISA specifically designed to detect APV antibodies in birds. A particular useful test for this purpose is an ELISA test designed for the detection of APV antibodies (e.g in serum or egg yolk), one commercially available version of which is known as APV-Ab SVANOVIR ® which is manufactured by SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden. The reverse situation is also the case, herein it is for example provided to perform virological and/or serological diagnosis of APV infections in mammals with reagents derived from MPV, in the detailed description herein it is for example shown that sufficiently trustworthy serological diagnosis of APV infections in birds can be achieved by using an ELISA designed to detect MPV antibodies. Considering that antigens and antibodies have a lock-and-key relationship, detection of the various antigens can be achieved by selecting the appropriate antibody having sufficient cross-reactivity. Of course, for relying on such cross-reactivity, it is best to select the reagents (such as antigens or antibodies) under guidance of the amino acid homologies that exist between the various (glyco)proteins of the various viruses, whereby reagents relating to the most homologous proteins will be most useful to be used in tests relying on said cross-reactivity.

For nucleic acid detection, it is even more straightforward, instead of designing primers or probes based on heterologous nucleic acid sequences of the various viruses and thus that detect differences between the essentially mammalian or avian *Metapneumoviruses*, it suffices to design or select primers or probes based on those stretches of virus-specific nucleic acid sequences that show high homology. In general, for nucleic acid sequences, homology percentages of 90% or higher guarantee sufficient cross-reactivity to be relied upon in diagnostic tests utilizing stringent conditions of hybridisation.

The invention for example provides a method for virologically diagnosing a MPV infection of an animal, in particular of a mammal, more in particular of a human being, comprising determining in a sample of said animal the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a MPV specific nucleic acid or antibody according to the invention, and a method for serologically diagnosing an MPV infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of an antibody specifically directed against an MPV or

WO 02/057302

5

PCT/NL02/00040

component thereof by reacting said sample with a MPV-specific proteinaceous molecule or fragment thereof or an antigen according to the invention.

The invention also provides a diagnostic kit for diagnosing an MPV infection comprising an MPV, an MPV-specific nucleic acid, proteinaceous molecule or

5 fragment thereof, antigen and/or an antibody according to the invention, and preferably a means for detecting said MPV, MPV-specific nucleic acid, proteinaceous molecule or fragment thereof, antigen and/or an antibody, said means for example comprising an excitable group such as a fluorophore or enzymatic detection system used in the art (examples of suitable diagnostic kit format comprise IF, ELISA, 10 neutralization assay, RT-PCR assay). To determine whether an as yet unidentified virus component or synthetic analogue thereof such as nucleic acid, proteinaceous molecule or fragment thereof can be identified as MPV-specific, it suffices to analyse the nucleic acid or amino acid sequence of said component, for example for a stretch of said nucleic acid or amino acid, preferably of at least 10, more preferably at least 15 25, more preferably at least 40 nucleotides or amino acids (respectively), by sequence homology comparison with known MPV sequences and with known non-MPV sequences (APV-C is preferably used) using for example phylogenetic analyses as provided herein. Depending on the degree of relationship with said MPV or non-MPV sequences, the component or synthetic analogue can be identified.

20 The invention also provides method for virologically diagnosing an MPV infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a cross-reactive nucleic acid derived from APV (preferably serotype C) or a cross-reactive antibody reactive with said APV, and a method for serologically diagnosing an MPV 25 infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of a cross-reactive antibody that is also directed against an APV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof or an antigen derived from APV. Furthermore, the invention provides the use of a diagnostic kit initially designed for APV or APV-antibody 30 detection for diagnosing an MPV infection, in particular for detecting said MPV infection in humans.

The invention also provides method for virologically diagnosing an APV infection in a bird comprising determining in a sample of said bird the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a cross-reactive

WO 02/057302

6

PCT/NL02/00040

nucleic acid derived from MPV or a cross-reactive antibody reactive with said MPV, and a method for serologically diagnosing an APV infection of a bird comprising determining in a sample of said bird the presence of a cross-reactive antibody that is also directed against an MPV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof or an antigen derived from MPV.

Furthermore, the invention provides the use of a diagnostic kit initially designed for MPV or MPV-antibody detection for diagnosing an APV infection, in particular for detecting said APV infection in poultry such as a chicken, duck or turkey.

As said, with treatment, similar use can be made of the cross-reactivity found, in particular when circumstances at hand make the use of the more homologous approach less straightforward. Vaccinations that can not wait, such as emergency vaccinations against MPV infections can for example be performed with vaccine-preparations derived from APV(preferably type C) isolates when a more homologous MPV vaccine is not available, and, vice versa, vaccinations against APV infections can be contemplated with vaccine preparations derived from MPV. Also, reverse genetic techniques make it possible to generate chimeric APV-MPV virus constructs that are useful as a vaccine, being sufficiently dissimilar to field isolates of each of the respective strains to be attenuated to a desirable level. Similar reverse genetic techniques will make it also possible to generate chimeric paramyxovirus-metapneumovirus constructs, such as RSV-MPV or PI3-MPV constructs for use in a vaccine preparation. Such constructs are particularly useful as a combination vaccine to combat respiratory tract illnesses.

The invention thus provides a novel etiological agent, an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (herein also called MPV) belonging to the subfamily *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* but not identifiable as a classical pneumovirus, and belonging to the genus *Metapneumovirus*, and MPV-specific components or synthetic analogues thereof. Mammalian viruses resembling metapneumoviruses, i.e. metapneumoviruses isolatable from mammals that essentially function as natural host for said virus or cause disease in said mammals, have until now not been found. Metapneumoviruses, in general thought to be essentially restricted to poultry as natural host or aetiological agent of disease, are also known as avian pneumoviruses. Recently, an APV isolate of duck was described (FR 2 801 607), further demonstrating that APV infections are essentially restricted to birds as natural hosts.

WO 02/057302

7

PCT/NL02/00040

The invention provides an isolated mammalian pneumovirus (herein also called MPV) comprising a gene order and amino acid sequence distinct from that of the genus *Pneumovirus* and which is closely related and considering its phylogenetic relatedness likely belonging to the genus *Metapneumovirus* within the subfamily *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae*. Although until now, metapneumoviruses have only been isolated from birds, it is now shown that related, albeit materially distinct, viruses can be identified in other animal species such as mammals. Herein we show repeated isolation of MPV from humans, whereas no such reports exists for APV. Furthermore, unlike APV, MPV essentially does not or only little replicates in chickens and turkeys where it easily does in cynomolgous macaques. No reports have been found on replication of APV in mammals. In addition, whereas specific anti-sera raised against MPV neutralize MPV, anti-sera raised against APV A, B or C do not neutralize MPV to the same extent, and this lack of full cross reactivity provides another proof for MPV being a different metapneumovirus. Furthermore, where APV and MPV share a similar gene order, the G and SH proteins of MPV are largely different from the ones known of APV in that they show no significant sequence homologies on both the amino acid or nucleic acid level. Diagnostic assays to discriminate between APV and MPV isolates or antibodies directed against these different viruses can advantageously be developed based on one or both of these proteins (examples are IF, ELISA, neutralization assay, RT-PCR assay). However, also sequence and/or antigenic information obtained from the more related N, P, M, F and L proteins of MPV and analyses of sequence homologies with the respective proteins of APV, can also be used to discriminate between APV and MPV. For example, phylogenetic analyses of sequence information obtained from MPV revealed that MPV and APV are two different viruses. In particular, the phylogenetic trees show that APV and MPV are two different lineages of virus. We have also shown that MPV is circulating in the human population for at least 50 years, therefore interspecies transmission has probably taken place at least 50 years ago and is not an everyday event. Since MPV CPE was virtually indistinguishable from that caused by hRSV or hPIV-1 in tMK or other cell cultures, the MPV may have well gone unnoticed until now. tMK (tertiary monkey kidney cells, i.e. MK cells in a third passage in cell culture) are preferably used due to their lower costs in comparison to primary or secondary cultures. The CPE is, as well as with some of the classical *Paramyxoviridae*, characterized by syncytium formation

WO 02/057302

8

PCT/NL02/00040

after which the cells showed rapid internal disruption, followed by detachment of the cells from the monolayer. The cells usually (but not always) displayed CPE after three passages of virus from original material, at day 10 to 14 post inoculation, somewhat later than CPE caused by other viruses such as hRSV or hPIV-1.

- 5 Classically, as devastating agents of disease, paramyxoviruses account for many animal and human deaths worldwide each year. The *Paramyxoviridae* form a family within the order of *Mononegavirales* (negative-sense single stranded RNA viruses), consisting of the sub-familys *Paramyxovirinae* and *Pneumovirinae*. The latter sub-family is at present taxonomically divided in the genera *Pneumovirus* and
- 10 *Metapneumovirus*¹. Human respiratory syncytial virus (hRSV), the type species of the *Pneumovirus* genus, is the single most important cause of lower respiratory tract infections during infancy and early childhood worldwide². Other members of the *Pneumovirus* genus include the bovine and ovine respiratory syncytial viruses and pneumonia virus of mice (PVM).
- 15 Avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis, an upper respiratory tract infection of turkeys³, is the sole member of the recently assigned *Metapneumovirus* genus, which, as said was until now not associated with infections, or what is more, with disease of mammals. Serological subgroups of APV can be differentiated on the basis of
- 20 nucleotide or amino acid sequences of the G glycoprotein and neutralization tests using monoclonal antibodies that also recognize the G glycoprotein. Within subgroups A, B and D the G protein shows 98.5 to 99.7% aa sequence identity within subgroups while between the subgroups only 31.2- 38% aa identity is observed. See for example Collins, M.S., Gough, R.E. and Alexander, D.J., *Antigenic differentiation of avian*
- 25 *pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies*. Avian Pathology, 1993. 22: p. 469-479.; Cook, J.K.A., Jones, B.V., Ellis, M.M., *Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies*. Avian Pathology, 1993. 22: p. 257-273; Bayon-Auboyer, M.H., et al., *Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian*
- 30 *pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup*. J Gen Virol, 2000. 81(Pt 11): p. 2723-33; Seal, B.S., *Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains*. Virus Res, 1998. 58(1-2): p. 45-52; Bayon-Auboyer, M.H., et al., *Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological*

WO 02/057302

9

PCT/NL02/00040

procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Arch Virol, 1999, 144(6): p. 1091-109; Juhasz, K. and A.J. Easton, *Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups*. J Gen Virol, 1994, 75(Pt 11): p. 2873-80.

5 A further serotype of APV is provided in WO00/20600, which describes the Colorado isolate of APV and compared it to known APV or TRT strains with *in vitro* serum neutralization tests. First, the Colorado isolate was tested against monospecific polyclonal antisera to recognized TRT isolates. The Colorado isolate was not neutralized by monospecific antisera to any of the TRT strains. It was, however, 10 neutralized by a hyperimmune antiserum raised against a subgroup A strain. This antiserum neutralized the homologous virus to a titre of 1:400 and the Colorado isolate to a titer of 1: 80. Using the above method, the Colorado isolate was then tested against TRT monoclonal antibodies. In each case, the reciprocal neutralization titer was <10. Monospecific antiserum raised to the Colorado isolate was also tested 15 against TRT strains of both subgroups. None of the TRT strains tested were neutralized by the antiserum to the Colorado isolate.

The Colorado strain of APV does not protect SPF chicks against challenge with either a subgroup A or a subgroup B strain of TRT virus. These results suggest that the Colorado isolate may be the first example of a further serotype of avian 20 pneumovirus, as also suggested by Bayon-Auboyer et al (J. Gen. Vir. 81:2723-2733 (2000)).

In a preferred embodiment, the invention provides an isolated MPV taxonomically corresponding to a (hereto unknown mammalian) metapneumovirus comprising a gene order distinct from that of the pneumoviruses within the sub- 25 family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae*. The classification of the two genera is based primarily on their gene constellation; metapneumoviruses generally lack non-structural proteins such NS1 or NS2 (see also Randhawa et al., J. Vir. 71:9849-9854 (1997) and the gene order is different from that of pneumoviruses (RSV: '3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5', APV: '3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') ^{4,5,6}. MPV as 30 provided by the invention or a virus isolate taxonomically corresponding therewith is upon EM analysis revealed by paramyxovirus-like particles. Consistent with the classification, MPV or virus isolates phylogenetically corresponding or taxonomically corresponding therewith are sensitive to treatment with chloroform; are cultured optimally on tMK cells or cells functionally equivalent thereto and are essentially

WO 02/057302

10

PCT/NL02/00040

trypsin dependent in most cell cultures. Furthermore, the typical CPE and lack of haemagglutinating activity with most classically used red blood cells suggested that a virus as provided herein is, albeit only distantly, related to classical pneumoviruses such as RSV. Although most paramyxoviruses have haemagglutinating activity, most of the pneumoviruses do not ¹³. An MPV according to the invention also contains a second overlapping ORF (M2-2) in the nucleic acid fragment encoding the M2 protein, as in general most other pneumoviruses such as for example also demonstrated in Ahmadian et al., J. Gen. Vir. 80:2011-2016 (1999)

To find further viral isolates as provided by the invention it suffices to test a sample, optionally obtained from a diseased animal or human, for the presence of a virus of the sub-family *Pneumovirinae*, and test a thus obtained virus for the presence of genes encoding (functional) NS1 or NS2 or essentially demonstrate a gene order that is different from that of pneumoviruses such as RSV as already discussed above. Furthermore, a virus isolate phylogenetically corresponding and thus taxonomically corresponding with MPV may be found by cross-hybridisation experiments using nucleic acid from a here provided MPV isolate, or in classical cross-serology experiments using monoclonal antibodies specifically directed against and/or antigens and/or immunogens specifically derived from an MPV isolate.

Newly isolated viruses are phylogenetically corresponding to and thus taxonomically corresponding to MPV when comprising a gene order and/or amino acid sequence sufficiently similar to our prototypic MPV isolate(s), or are structurally corresponding therewith, and show close relatedness to the genus *Metapneumovirus* within the subfamily *Pneumovirinae*. The highest amino sequence homology, and defining the structural correspondence on the individual protein level, between MPV and any of the known other viruses of the same family to date (APV subtype C) is for matrix 87%, for nucleoprotein 88%, for phosphoprotein 68%, for fusionprotein 81% and for parts of the polymerase protein 56-64%, as can be deduced when comparing the sequences given in figure 6 with sequences of other viruses, in particular of AVP-C. Individual proteins or whole virus isolates with, respectively, higher homology to these mentioned maximum values are considered phylogenetically corresponding and thus taxonomically corresponding to MPV, and comprise a nucleic acid sequence structurally corresponding with a sequence as shown in figure 6. Herewith the invention provides a virus phylogenetically corresponding to the deposited virus.

WO 02/057302

11

PCT/NL02/00040

It should be noted that, similar to other viruses, a certain degree of variation is found between different isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus isolates as provided herein. In phylogenetic trees, we have identified at least 2 genetic clusters of virus isolates based on comparative sequence analyses of parts of the L, M, N and F genes. Based on nucleotide and amino-acid differences in the viral nucleic acid or amino acid sequences (the viral sequences), and in analogy to other pneumoviruses such as RSV, these MPV genotypes represent subtypes of MPV. Within each of the genetic clusters of MPV isolates, the percentage identity at the nucleotide level was found to be 94-100 for L, 91-100 for M, 90-100 for N and 93-100 for F and at the amino acid level the percentage identity was found to be 91-100 for L, 98-100 for M, 96-100 for N and 98-100 for F. A further comparison can be found in figures 18 to 28. The minimum percentage identity at the nucleotide level for the entire group of isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus as provided herein (MPV isolates) identified so far was 81 for L and M, 83 for N and 82 for F. At the amino acid level, this percentage was 91 for L and N, 94 for M, and 95 for F. The viral sequence of a MPV isolate or an isolated MPV F gene as provided herein for example shows less than 81% nucleotide sequence identity or less than 82% (amino acid sequence identity with the respective nucleotide or amino acid sequence of an APV-C fusion (F) gene as for example provided by Seal et al., Vir. Res. 66:139147 (2000).

Also, the viral sequence of a MPV isolate or an isolated MPV L gene as provided herein for example shows less than 61% nucleotide sequence identity or less than 63% amino acid sequence identity with the respective nucleotide or amino acid sequence of an APV-A polymerase gene as for example provided by Randhawa et al., J. Gen. Vir. 77:3047-3051 (1996).

Sequence divergence of MPV strains around the world may be somewhat higher, in analogy with other viruses. Consequently, two potential genetic clusters are identified by analyses of partial nucleotide sequences in the N, M, F and L ORFs of 9 virus isolates. 90-100% nucleotide identity was observed within a cluster, and 81-88% identity was observed between the clusters. Sequence information obtained on more virus isolates confirmed the existence of two genotypes. Virus isolate ned/00/01 as prototype of cluster A, and virus isolate ned/99/01 as prototype of cluster B have been used in cross neutralization assays to test whether the genotypes are related to different serotypes or subgroups. From these data we conclude that essentially

WO 02/057302

12

PCT/NL02/00040

mammalian virus isolates displaying percentage amino acid homology higher than 64 for L, 87 for M, 88 for N, 68 for P, 81 for F 84 for M2-1 or 58 for M2-2 to isolate I-2614 may be classified as an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus as provided herein. In particular those virus isolates in general
 5 that have a minimum percentage identity at the nucleotide sequence level with a prototype MPV isolate as provided herein of 81 for L and M, 83 for N and/or 82 for F are members of the group of MPV isolates as provided herein. At the amino acid level, these percentage are 91 for L and N, 94 for M, and/or 95 for F. When the percentage amino acid sequence homology for a given virus isolate is higher than 90
 10 for L and N, 93 for M, or 94 for F, the virus isolate is similar to the group of MPV isolates displayed in figure 5. When the percentage amino acid sequence homology for a given virus isolate is higher than 94 for L, 95 for N or 97 for M and F the virus isolate can be identified to belong to one of the genotype clusters represented in figure 5. It should be noted that these percentages of homology, by which genetic clusters
 15 are defined, are similar to the degree of homology found among genetic clusters in the corresponding genes of RSV.

In short, the invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the
 20 genus *Metapneumovirus* by determining a nucleic acid sequence of a suitable fragment of the genome of said virus and testing it in phylogenetic tree analyses wherein maximum likelihood trees are generated using 100 bootstraps and 3 jumbles and finding it to be more closely phylogenetically corresponding to a virus isolate deposited as I-2614 with CNCM, Paris than it is corresponding to a virus isolate of
 25 avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis.

Suitable nucleic acid genome fragments each useful for such phylogenetic tree analyses are for example any of the RAP-PCR fragments 1 to 10 as disclosed herein in the detailed description, leading to the various phylogenetic tree analyses as
 30 disclosed herein in figures 4 or 5. Phylogenetic tree analyses of the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrixprotein (M) and fusion protein (F) genes of MPV revealed the highest degree of sequence homology with APV serotype C, the avian pneumovirus found primarily in birds in the United States

WO 02/057302

13

PCT/NL02/00040

In a preferred embodiment, the invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* by determining a nucleic acid sequence of a suitable fragment of the genome of said virus and testing it in phylogenetic tree analyses wherein maximum likelihood trees are generated using 100 bootstraps and 3 jumbles and finding it to be more closely phylogenetically corresponding to a virus isolate deposited as I-2614 with CNCM, Paris than it is corresponding to a virus isolate of avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis, wherein said suitable fragment comprises an open reading frame encoding a viral protein of said virus.

A suitable open reading frame (ORF) comprises the ORF encoding the N protein. When an overall amino acid identity of at least 91%, preferably of at least 95% of the analysed N-protein with the N-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. As shown, the first gene in the genomic map of MPV codes for a 394 amino acid (aa) protein and shows extensive homology with the N protein of other pneumoviruses. The length of the N ORF is identical to the length of the N ORF of APV-C (Table 5) and is smaller than those of other paramyxoviruses (Barr *et al.*, 1991). Analysis of the amino acid sequence revealed the highest homology with APV-C (88%), and only 7-11% with other paramyxoviruses (Table 6). Barr *et al* (1991) identified 3 regions of similarity between viruses belonging to the order *Mononegavirales*: A, B and C (Figure 8). Although similarities are highest within a virus family, these regions are highly conserved between virus families. In all three regions MPV revealed 97% aa sequence identity with APV-C, 89% with APV-B, 92 with APV-A, and 66-73% with RSV and PVM. The region between aa residues 160 and 340 appears to be highly conserved among metapneumoviruses and to a somewhat lesser extent the *Pneumovirinae* (Miyahara *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Barr *et al.*, 1991). This is in agreement with MPV being a metapneumovirus, this particular region showing 99% similarity with APV C.

Another suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the P protein. When an overall amino acid identity of at least 70%, preferably of at least 85% of the analysed P-protein with the P-protein of

WO 02/057302

14

PCT/NL02/00040

isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. The second ORF in the genome map codes for a 294 aa protein which shares 68% aa sequence homology with the P protein of APV-C, and only 22-26% with the P protein of RSV (Table 6). The P gene of MPV contains one substantial ORF and in that respect is similar to P from many other paramyxoviruses (Reviewed in Lamb and Kolakofsky, 1996; Sedlmeier *et al.*, 1998). In contrast to APV A and B and PVM and similar to RSV and APV-C the MPV P ORF lacks cysteine residues. Ling (1995) suggested that a region of high similarity between all pneumoviruses (aa 185-241) plays a role in either the RNA synthesis process or in maintaining the structural integrity of the nucleocapsid complex. This region of high similarity is also found in MPV (Figure 9) especially when conservative substitutions are taken in account, showing 100% similarity with APV-C, 93 % with APV-A and B, and approximately 81% with RSV. The C-terminus of the MPV P protein is rich in glutamate residues as has been described for APVs (Ling *et al.*, 1995).

Another suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the M protein. When an overall amino acid identity of at least 94%, preferably of at least 97% of the analysed M-protein with the M-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. The third ORF of the MPV genome encodes a 254 aa protein, which resembles the M ORFs of other pneumoviruses. The M ORF of MPV has exactly the same size as the M ORFs of other metapneumoviruses (Table 5) and shows high aa sequence homology with the matrix proteins of APV (76-87%) lower homology with those of RSV and PVM (37-38%) and 10% or less homology with those of other paramyxoviruses (Table 6). Easton (1997) compared the sequences of matrix proteins of all pneumoviruses and found a conserved hexapeptide at residue 14 to 19 that is also conserved in MPV (Figure 10). For RSV, PVM and APV small secondary ORFs within or overlapping with the major ORF of M have been identified (52 aa and 51 aa in bRSV, 75 aa in RSV, 46 aa in PVM and 51 aa in APV) (Yu *et al.*, 1992; Easton *et al.*, 1997; Samal *et al.*, 1991; Satake *et al.*, 1984). We noticed two small ORFs in the M ORF of MPV. One small ORF of 54 aa residues was found within the major M ORF, starting at nucleotide 2281 and one small ORF of 33 aa residues was found overlapping with the major ORF of M starting at nucleotide 2893 (data not shown). Similar to the secondary ORFs of RSV and APV there is no significant

WO 02/057302

15

PCT/NL02/00040

homology between these secondary ORFs and secondary ORFs of the other pneumoviruses, and apparent start or stop signals are lacking. In addition, evidence for the synthesis of proteins corresponding to these secondary ORFs of APV and RSV has not been reported.

- 5 Another suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the F protein. When an overall amino acid identity of at least 95%, preferably of at least 97% of the analysed F-protein with the F-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. The F ORF of MPV is located adjacent to the M ORF, which is
- 10 characteristic for members of the *Metapneumovirus* genus. The F gene of MPV encodes a 539 aa protein, which is two aa residues longer than F of APV-C (Table 5). Analysis of the aa sequence revealed 81% homology with APV-C, 67% with APV-A and B, 33-39% with pneumovirus F proteins and only 10-18% with other paramyxoviruses (Table 6). One of the conserved features among F proteins of
- 15 paramyxoviruses, and also seen in MPV is the distribution of cysteine residues (Morrison, 1988; Yu *et al.*, 1991). The metapneumoviruses share 12 cysteine residues in F1 (7 are conserved among all paramyxoviruses), and two in F2 (1 is conserved among all paramyxoviruses). Of the 3 potential N-linked glycosylation sites present in the F ORF of MPV, none are shared with RSV and two (position 66 and 389) are
- 20 shared with APV. The third, unique, potential N-linked glycosylation site for MPV is located at position 206 (Figure 11). Despite the low sequence homology with other paramyxoviruses, the F protein of MPV revealed typical fusion protein characteristics consistent with those described for the F proteins of other *Paramyxoviridae* family members (Morrison, 1988). F proteins of *Paramyxoviridae* members are synthesized
- 25 as inactive precursors (F0) that are cleaved by host cell proteases which generate amino terminal F2 subunits and large carboxy terminal F1 subunits. The proposed cleavage site (Collins *et al.*, 1996) is conserved among all members of the *Paramyxoviridae* family. The cleavage site of MPV contains the residues RQSR. Both arginine (R) residues are shared with APV and RSV, but the glutamine (Q) and
- 30 serine (S) residues are shared with other paramyxoviruses such as human parainfluenza virus type 1, Sendai virus and morbilliviruses (data not shown). The hydrophobic region at the amino terminus of F1 is thought to function as the membrane fusion domain and shows high sequence similarity among paramyxoviruses and morbilliviruses and to a lesser extent the pneumoviruses

WO 02/057302

16

PCT/NL02/00040

(Morrison, 1988). These 26 residues (position 137-163, Figure 11) are conserved between MPV and APV-C, which is in agreement with this region being highly conserved among the metapneumoviruses (Naylor *et al.*, 1998; Seal *et al.*, 2000).

As is seen for the F2 subunits of APV and other paramyxoviruses, MPV
 5 revealed a deletion of 22 aa residues compared with RSV (position 107-128, Figure 11). Furthermore, for RSV and APV, the signal peptide and anchor domain were found to be conserved within subtypes and displayed high variability between subtypes (Plows *et al.*, 1995; Naylor *et al.*, 1998). The signal peptide of MPV (aa 10-35, Figure 11) at the amino terminus of F2 exhibits some sequence similarity with
 10 APV-C (18 out of 26 aa residues are similar) and less conservation with other APVs or RSV. Much more variability is seen in the membrane anchor domain at the carboxy terminus of F1, although some homology is still seen with APV-C.

Another suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses
 15 comprises the ORF encoding the M2 protein. When an overall amino acid identity of at least 85%, preferably of at least 90% of the analysed M2-protein with the M2-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. M2 gene is unique to the *Pneumovirinae* and two overlapping ORFs have been observed in all pneumoviruses. The first major ORF
 20 represents the M2-1 protein which enhances the processivity of the viral polymerase (Collins *et al.*, 1995; Collins, 1996) and its readthrough of intergenic regions (Hardy *et al.*, 1998; Fearnly *et al.*, 1999). The M2-1 gene for MPV, located adjacent to the F gene, encodes a 187 aa protein (Table 5), and reveals the highest (84%) homology with M2-1 of APV-C (Table 6). Comparison of all pneumovirus M2-1 proteins revealed the
 25 highest conservation in the amino-terminal half of the protein (Collins *et al.*, 1990; Zamora *et al.*, 1992; Ahmadian *et al.*, 1999), which is in agreement with the observation that MPV displays 100% similarity with APV-C in the first 80 aa residues of the protein (Figure 12A). The MPV M2-1 protein contains 3 cysteine residues located within the first 30 aa residues that are conserved among all
 30 pneumoviruses. Such a concentration of cysteines is frequently found in zinc-binding proteins (Ahmadian *et al.*, 1991; Cuesta *et al.*, 2000).

The secondary ORFs (M2-2) that overlap with the M2-1 ORFs of pneumoviruses are conserved in location but not in sequence and are thought to be involved in the control of the switch between virus RNA replication and transcription (Collins *et al.*,

WO 02/057302

17

PCT/NL02/00040

1985; Elango *et al.*, 1985; Baybutt *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1990; Ling *et al.*, 1992; Zamora *et al.*, 1992; Alansari *et al.*, 1994; Ahmadian *et al.*, 1999; Bermingham *et al.*, 1999). For MPV, the M2-2 ORF starts at nucleotide 512 in the M2-1 ORF (Figure 7), which is exactly the same start position as for APV-C. The length of the M2-2 ORFs are the same for APV-C and MPV, 71 aa residues (Table 5). Sequence comparison of the M2-2 ORF (Figure 12B) revealed 56% aa sequence homology between MPV and APV-C and only 26-27% aa sequence homology between MPV and APV-A and B (Table 6).

Another suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the L protein. When an overall amino acid identity of at least 91%, preferably of at least 95% of the analysed L-protein with the L-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. In analogy to other negative strand viruses, the last ORF of the MPV genome is the RNA-dependent RNA polymerase component of the replication and transcription complexes. The L gene of MPV encodes a 2005 aa protein, which is 1 residue longer than the APV-A protein (Table 5). The L protein of MPV shares 64% homology with APV-A, 42-44% with RSV, and approximately 13% with other paramyxoviruses (Table 6). Poch *et al.* (1989; 1990) identified six conserved domains within the L proteins of non-segmented negative strand RNA viruses, from which domain III contained the four core polymerase motifs that are thought to be essential for polymerase function. These motifs (A, B, C and D) are well conserved in the MPV L protein: in motifs A, B and C: MPV shares 100% similarity with all pneumoviruses and in motif D MPV shares 100 % similarity with APV and 92% with RSVs. For the entire domain III (aa 625- 847 in the L ORF), MPV shares 83% identity with APV, 67-68% with RSV and 26-30% with other paramyxoviruses (Figure 15). In addition to the polymerase motifs the pneumovirus L proteins contain a sequence which conforms to a consensus ATP binding motif K(X)₂GEGAGN(X)₂₀K (Stec, 1991). The MPV L ORF contains a similar motif as APV, in which the spacing of the intermediate residues is off by one: K(X)₂₂GEGAGN(X)₁₉K.

A much preferred suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the SH protein. When an overall amino acid identity of at least 30%, preferably of at least 50%, more preferably of at least 75% of the analysed SH-protein with the SH-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. The gene

WO 02/057302

18

PCT/NL02/00040

located adjacent to M2 of MPV encodes a 183 aa protein (Figure 7). Analysis of the nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence revealed no discernible homology with other RNA virus genes or gene products. The SH ORF of MPV is the longest SH ORF known to date (Table 5). The composition of the aa residues of the SH ORF is relatively similar to that of APV, RSV and PVM, with a high percentage of threonine and serine (22%, 18%, 19%, 20.0%, 21% and 28% serine/threonine content for MPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV and PVM respectively). The SH ORF of MPV contains 10 cysteine residues, whereas APV SH contains 16 cysteine residues. All pneumoviruses have similar numbers of potential *N*-glycosylation sites (MPV 2, APV 1, RSV 2, bRSV 3, PVM 4).

The hydrophobicity profiles for the MPV SH protein and SH of APV and RSV revealed similar structural characteristics (Figure 13B). The SH ORFs of APV and MPV have a hydrophilic *N*-terminus (aa 1-30), a central hydrophobic domain (aa 30-53) which can serve as a potential membrane spanning domain, a second hydrophobic domain around residue 160 and a hydrophilic C-terminus. In contrast, RSV SH appears to lack the C-terminal half of the APV and MPV ORFs. In all pneumovirus SH proteins the hydrophobic domain is flanked by basic amino acids, which are also found in the SH ORF for MPV (aa 29 and 54).

Another much preferred suitable open reading frame (ORF) useful in phylogenetic analyses comprises the ORF encoding the G protein. When an overall amino acid identity of at least 30%, preferably of at least 50%, more preferably of at least 75% of the analysed G-protein with the G-protein of isolate I-2614 is found, the analysed virus isolate comprises a preferred MPV isolate according to the invention. The G ORF of MPV is located adjacent to the SH gene and encodes a 236 amino acid protein.

A secondary small ORF is found immediately following this ORF, potentially coding for 68 aa residues (pos. 6973-7179), but lacking a start codon. A third major ORF, in a different reading frame, of 194 aa residues (fragment 4, Figure 7) is overlapping with both of these ORFs, but also lacks a startcodon (nucleotide 6416-7000). This major ORF is followed by a fourth ORF in the same reading frame (nt 7001-7198), possibly coding for 65 aa residues but again lacking a start codon. Finally, a potential ORF of 97 aa residues (but lacking a startcodon) is found in the third reading frame (nt 6444-6737, Figure 1). Unlike the first ORF, the other ORFs do not have apparent gene start or gene end sequences (see below). Although the 236 aa residue G ORF probably represents at least a part of the MPV attachment protein it can not be

WO 02/057302

19

PCT/NL02/00040

excluded that the additional coding sequences are expressed as separate proteins or as part of the attachment protein through some RNA editing event. It should be noted that for APV and RSV no secondary ORFs after the primary G ORF have been identified but that both APV and RSV have secondary ORFs within the major ORF of

5 G. However, evidence for expression of these ORFs is lacking and there is no homology between the predicted aa sequences for different viruses (Ling *et al.*, 1992). The secondary ORFs in MPV G do not reveal characteristics of other G proteins and whether the additional ORFs are expressed requires further investigation. BLAST analyses with all four ORFs revealed no discernible homology at the nucleotide or aa

10 sequence level with other known virus genes or gene products. This is in agreement with the low sequence homologies found for other G proteins such as hRSV A and B (53%) (Johnson *et al.*, 1987) and APV A and B (38%) (Juhász *et al.*, 1994). Whereas most of the MPV ORFs resemble those of APV both in length and sequence, the G ORF of MPV is considerably smaller than the G ORF of APV (Table 5). The aa

15 sequence revealed a serine and threonine content of 34%, which is even higher than the 32% for RSV and 24% for APV. The G ORF also contains 8.5% proline residues, which is higher than the 8% for RSV and 7% for APV. The unusual abundance of proline residues in the G proteins of APV, RSV and MPV has also been observed in glycoproteins of mucinous origin where it is a major determinant of the proteins three

20 dimensional structure (Collins *et al.*, 1983; Wertz *et al.*, 1985; Jentoft, 1990). The number of potential N-linked glycosylation sites in G of MPV is similar to other pneumoviruses: MPV has 5, whereas hRSV has 7, bRSV has 5, and APV has 3 to 5.

The predicted hydrophobicity profile of MPV G revealed characteristics similar to the other pneumoviruses. The amino-terminus contains a hydrophilic region

25 followed by a short hydrophobic area (aa 33-53) and a mainly hydrophilic carboxy terminus (Figure 14B). This overall organisation is consistent with that of an anchored type II transmembrane protein and corresponds well with these regions in the G protein of APV and RSV. The G ORF of MPV contains only 1 cysteine residue in contrast to RSV and APV (5 and 20 respectively).

30

According to classical serological analyses as for example known from Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F., *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of*

WO 02/057302

20

PCT/NL02/00040

Viruses. Arch Virol, 1991. **Supplement 2**: p. 140-144. an MPV isolate is also identifiable as belonging to a serotype as provided herein, being defined on the basis of its immunological distinctiveness, as determined by quantitative neutralization with animal antisera (obtained from for example ferrets or guinea pigs as provided in the detailed description). Such a serotype has either no cross-reaction with others or shows a homologous-to heterologous titer ratio >16 in both directions. If neutralization shows a certain degree of cross-reaction between two viruses in either or both directions (homologous-to-heterologous tier ration of eight or 16), distinctiveness of serotype is assumed if substantial biophysical/biochemical differences of DNA's exist. If neutralization shows a distinct degree of cross-reaction between two viruses in either or both directions (homologous-to-heterologous tier ration of smaller than eight), identity of serotype of the isolates under study is assumed. As said, useful prototype isolates, such as isolate I-2614, herein also known as MPV isolate 00-1, are provided herein.

A further classification of a virus as an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus as provided herein can be made on the basis of homology to the G and/or SH proteins. Where in general the overall amino acid sequence identity between APV (isolated from birds) and MPV (isolated from humans) N, P, M, F, M2 and L ORFs was 64 to 88 percent, and nucleotide sequence homology was also found between the non-coding regions of the APV and MPV genomes, essentially no discernable amino acid sequence homology was found between two of the ORFs of the human isolate (MPV) and any of the ORFs of other paramyxoviruses. The amino acid content, hydrophobicity profiles and location of these ORFs in the viral genome show that they represent G and SH protein analogues. The sequence homology between APV and MPV, their similar genomic organization (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') as well as phylogenetic analyses provide further evidence for the proposed classification of MPV as the first mammalian metapneumovirus. New MPV isolates are for thus example identified as such by virus isolation and characterisation on tMK or other cells, by RT-PCR and/or sequence analysis followed by phylogenetic tree analyses, and by serologic techniques such as virus neutralisation assays, indirect immunofluorescence assays, direct immunofluorescence assays, FACs analyses or other immunological techniques. Preferably these techniques are directed at the SH and/or G protein analogues.

WO 02/057302

21

PCT/NL02/00040

For example the invention provides herein a method to identify further isolates of MPV as provided herein, the method comprising inoculating a essentially MPV-uninfected or specific-pathogen-free guinea pig or ferret (in the detailed description the animal is inoculated intranasally but other ways of inoculation such as intramuscular or intradermal inoculation, and using an other experimental animal, is also feasible) with the prototype isolate I-2614 or related isolates. Sera are collected from the animal at day zero, two weeks and three weeks post inoculation. The animal specifically seroconverted as measured in virus neutralisation (VN) assay and indirect IFA against the respective isolate I-2614 and the sera from the seroconverted animal are used in the immunological detection of said further isolates.

As an example, the invention provides the characterisation of a new member in the family of *Paramyxoviridae*, a human metapneumovirus or metapneumovirus-like virus (since its final taxonomy awaits discussion by a viral taxonomy committee the MPV is herein for example described as taxonomically corresponding to APV) (MPV) which may cause severe RTI in humans. The clinical signs of the disease caused by MPV are essentially similar to those caused by hRSV, such as cough, myalgia, vomiting, fever, broncheolitis or pneumonia, possible conjunctivitis, or combinations thereof. As is seen with hRSV infected children, especially very young children may require hospitalisation. As an example an MPV which was deposited January 19, 2001 as I-2614 with CNCM, Institute Pasteur, Paris or a virus isolate phylogenetically corresponding therewith is herewith provided. Therewith, the invention provides a virus comprising a nucleic acid or functional fragment phylogenetically corresponding to a nucleic acid sequence shown in figure 6a, 6b, 6c, or structurally corresponding therewith. In particular the invention provides a virus characterised in that after testing it in phylogenetic tree analyses wherein maximum likelihood trees are generated using 100 bootstraps and 3 jumbles it is found to be more closely phylogenetically corresponding to a virus isolate deposited as I-2614 with CNCM, Paris than it is related to a virus isolate of avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis. It is particularly useful to use an AVP-C virus isolate as outgroup in said phylogenetic tree analyses, it being the closest relative, albeit being an essentially non-mammalian virus.

We propose the new human virus to be named human metapneumovirus or metapneumovirus-like virus (MPV) based on several observations. EM analysis

WO 02/057302

22

PCT/NL02/00040

revealed paramyxovirus-like particles. Consistent with the classification, MPV appeared to be sensitive to treatment with chloroform. MPV is cultured optimal on tMK cells and is trypsin dependent. The clinical symptoms caused by MPV as well as the typical CPE and lack of haemagglutinating activity suggested that this virus is

5 closely related to hRSV. Although most paramyxoviruses have haemagglutinating activity, most of the pneumoviruses do not ¹³.

As an example, the invention provides a not previously identified paramyxovirus from nasopharyngeal aspirate samples taken from 28 children suffering from severe RTI. The clinical symptoms of these children were largely

10 similar to those caused by hRSV. Twenty-seven of the patients were children below the age of five years and half of these were between 1 and 12 months old. The other patient was 18 years old. All individuals suffered from upper RTI, with symptoms ranging from cough, myalgia, vomiting and fever to broncheolitis and severe pneumonia. The majority of these patients were hospitalised for one to two weeks.

The virus isolates from these patients had the paramyxovirus morphology in negative contrast electron microscopy but did not react with specific antisera against known human and animal paramyxoviruses. They were all closely related to one another as determined by indirect immunofluorescence assays (IFA) with sera raised against two of the isolates. Sequence analyses of nine of these isolates revealed that

20 the virus is somewhat related to APV. Based on virological data, sequence homology as well as the genomic organisation we propose that the virus is a member of *Metapneumovirus* genus. Serological surveys showed that this virus is a relatively common pathogen since the seroprevalence in the Netherlands approaches 100% of humans by the age of five years. Moreover, the seroprevalence was found to be

25 equally high in sera collected from humans in 1958, indicating this virus has been circulating in the human population for more than 40 years. The identification of this proposed new member of the *Metapneumovirus* genus now also provides for the development of means and methods for diagnostic assays or test kits and vaccines or serum or antibody compositions for viral respiratory tract infections, and for methods

30 to test or screen for antiviral agents useful in the treatment of MPV infections.

To this extent, the invention provides among others an isolated or recombinant nucleic acid or virus-specific functional fragment thereof obtainable from a virus according to the invention. In particular, the invention provides primers and/or probes suitable for identifying an MPV nucleic acid.

WO 02/057302

23

PCT/NL02/00040

Furthermore, the invention provides a vector comprising a nucleic acid according to the invention. To begin with, vectors such as plasmid vectors containing (parts of) the genome of MPV, virus vectors containing (parts of) the genome of MPV. (For example, but not limited to other paramyxoviruses, vaccinia virus, retroviruses, baculovirus),
5 or MPV containing (parts of) the genome of other virus or other pathogens are provided. Furthermore, a number of reverse genetics techniques have been described for the generation of recombinant negative strand viruses, based on two critical parameters. First, the production of such virus relies on the replication of a partial or full-length copy of the negative sense viral RNA (vRNA) genome or a complementary
10 copy thereof (cRNA). This vRNA or cRNA can be isolated from infectious virus, produced upon in-vitro transcription, or produced in cells upon transfection of nucleic acids. Second, the production of recombinant negative strand virus relies on a functional polymerase complex. Typically, the polymerase complex of pneumoviruses consists of N, P, L and possibly M2 proteins, but is not necessarily limited thereto.
15 Polymerase complexes or components thereof can be isolated from virus particles, isolated from cells expressing one or more of the components, or produced upon transfection of specific expression vectors.

Infectious copies of MPV can be obtained when the above mentioned vRNA, cRNA, or vectors expressing these RNAs are replicated by the above mentioned polymerase
20 complex^{16,17,18,19,20,21,22}. For the generation of minireplicons or, a reverse genetics system for generating a full-length copy comprising most or all of the genome of MPV it suffices to use 3'end and/or 5'end nucleic acid sequences obtainable from for example APV (Randhawa et al., 1997) or MPV itself.

Also, the invention provides a host cell comprising a nucleic acid or a vector according
25 to the invention. Plasmid or viral vectors containing the polymerase components of MPV (presumably N, P, L and M2, but not necessarily limited thereto) are generated in prokaryotic cells for the expression of the components in relevant cell types (bacteria, insect cells, eukaryotic cells). Plasmid or viral vectors containing full-length or partial copies of the MPV genome will be generated in prokaryotic cells for the
30 expression of viral nucleic acids in-vitro or in-vivo. The latter vectors may contain other viral sequences for the generation of chimeric viruses or chimeric virus proteins, may lack parts of the viral genome for the generation of replication defective virus, and may contain mutations, deletions or insertions for the generation of attenuated viruses.

WO 02/057302

24

PCT/NL02/00040

Infectious copies of MPV (being wild type, attenuated, replication-defective or chimeric) can be produced upon co-expression of the polymerase components according to the state-of-the-art technologies described above.

5 In addition, eukaryotic cells, transiently or stably expressing one or more full-length or partial MPV proteins can be used. Such cells can be made by transfection (proteins or nucleic acid vectors), infection (viral vectors) or transduction (viral vectors) and may be useful for complementation of mentioned wild type, attenuated, replication-defective or chimeric viruses.

10 A chimeric virus may be of particular use for the generation of recombinant vaccines protecting against two or more viruses ^{23,24,25}. For example, it can be envisaged that a MPV virus vector expressing one or more proteins of RSV or a RSV vector expressing one or more proteins of MPV will protect individuals vaccinated with such vector against both virus infections. A similar approach can be envisaged for PI3 or other paramyxoviruses. Attenuated and replication-defective viruses may
15 be of use for vaccination purposes with live vaccines as has been suggested for other viruses ^{25,26}.

In a preferred embodiment, the invention provides a proteinaceous molecule or metapneumovirus-specific viral protein or functional fragment thereof encoded by a nucleic acid according to the invention. Useful proteinaceous molecules are for
20 example derived from any of the genes or genomic fragments derivable from a virus according to the invention. Such molecules, or antigenic fragments thereof, as provided herein, are for example useful in diagnostic methods or kits and in pharmaceutical compositions such as sub-unit vaccines. Particularly useful are the F, SH and/or G protein or antigenic fragments thereof for inclusion as antigen or
25 subunit immunogen, but inactivated whole virus can also be used. Particularly useful are also those proteinaceous substances that are encoded by recombinant nucleic acid fragments that are identified for phylogenetic analyses, of course preferred are those that are within the preferred bounds and metes of ORFs useful in phylogenetic analyses, in particular for eliciting MPV specific antibodies, whether in vivo (e.g. for
30 protective purposes or for providing diagnostic antibodies) or in vitro (e.g. by phage display technology or another technique useful for generating synthetic antibodies).

Also provided herein are antibodies, be it natural polyclonal or monoclonal, or synthetic (e.g. (phage) library-derived binding molecules) antibodies that specifically react with an antigen comprising a proteinaceous molecule or MPV-

WO 02/057302

25

PCT/NL02/00040

specific functional fragment thereof according to the invention. Such antibodies are useful in a method for identifying a viral isolate as an MPV comprising reacting said viral isolate or a component thereof with an antibody as provided herein. This can for example be achieved by using purified or non-purified MPV or parts thereof (proteins, peptides) using ELISA, RIA, FACS or similar formats of antigen detection assays (Current Protocols in Immunology). Alternatively, infected cells or cell cultures may be used to identify viral antigens using classical immunofluorescence or immunohistochemical techniques.

Other methods for identifying a viral isolate as a MPV comprise reacting said viral isolate or a component thereof with a virus specific nucleic acid according to the invention, in particular where said mammalian virus comprises a human virus.

In this way the invention provides a viral isolate identifiable with a method according to the invention as a mammalian virus taxonomically corresponding to a negative-sense single stranded RNA virus identifiable as likely belonging to the genus *Metapneumovirus* within the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae*.

The method is useful in a method for virologically diagnosing an MPV infection of a mammal, said method for example comprising determining in a sample of said mammal the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a nucleic acid or an antibody according to the invention. Examples are further given in the detailed description, such as the use of PCR (or other amplification or hybridisation techniques well known in the art) or the use of immunofluorescence detection (or other immunological techniques known in the art)

The invention also provides a method for serologically diagnosing a MPV infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of an antibody specifically directed against a MPV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof or an antigen according to the invention

Methods and means provided herein are particularly useful in a diagnostic kit for diagnosing a MPV infection, be it by virological or serological diagnosis. Such kits or assays may for example comprise a virus, a nucleic acid, a proteinaceous molecule or fragment thereof, an antigen and/or an antibody according to the invention. Use of a virus, a nucleic acid, a proteinaceous molecule or fragment thereof, an antigen and/or an antibody according to the invention is also provided for the

WO 02/057302

26

PCT/NL02/00040

production of a pharmaceutical composition, for example for the treatment or prevention of MPV infections and/or for the treatment or prevention of respiratory tract illnesses, in particular in humans. Attenuation of the virus can be achieved by established methods developed for this purpose, including but not limited to the use of related viruses of other species, serial passages through laboratory animals or/and tissue/cell cultures, site directed mutagenesis of molecular clones and exchange of genes or gene fragments between related viruses.

A pharmaceutical composition comprising a virus, a nucleic acid, a proteinaceous molecule or fragment thereof, an antigen and/or an antibody according to the invention can for example be used in a method for the treatment or prevention of a MPV infection and/or a respiratory illness comprising providing an individual with a pharmaceutical composition according to the invention. This is most useful when said individual comprises a human, especially when said human is below 5 years of age, since such infants and young children are most likely to be infected by a human MPV as provided herein. Generally, in the acute phase patients will suffer from upper respiratory symptoms predisposing for other respiratory and other diseases. Also lower respiratory illnesses may occur, predisposing for more and other serious conditions.

The invention also provides method to obtain an antiviral agent useful in the treatment of respiratory tract illness comprising establishing a cell culture or experimental animal comprising a virus according to the invention, treating said culture or animal with an candidate antiviral agent, and determining the effect of said agent on said virus or its infection of said culture or animal. An example of such an antiviral agent comprises a MPV-neutralising antibody, or functional component thereof, as provided herein, but antiviral agents of other nature are obtained as well. The invention also provides use of an antiviral agent according to the invention for the preparation of a pharmaceutical composition, in particular for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of respiratory tract illness, especially when caused by an MPV infection, and provides a pharmaceutical composition comprising an antiviral agent according to the invention, useful in a method for the treatment or prevention of an MPV infection or respiratory illness, said method comprising providing an individual with such a pharmaceutical composition.

WO 02/057302

27

PCT/NL02/00040

The invention is further explained in the detailed description without limiting it thereto.

WO 02/057302

28

PCT/NL02/00040

Figure legends

Figure 1A comprises table 1: Percentage homology found between the amino acid sequence of isolate 00-1 and other members of the Pneumovirinae. Percentages (x100) are given for the amino acid sequences of N, P, M, F and two RAP-PCR fragments in L (8 and 9/10). Accession numbers used for the analyses are described in the materials and methods section.

Fig 1B comprises table 2: Seroprevalence of MPV in humans categorised by age group using immunofluorescence and virus neutralisation assays..

Fig. 2: Schematic representation of the genome of APV with the location and size of the fragments obtained with RAP-PCR and RT-PCR on virus isolate 00-1. Fragments 1 to 10 were obtained using RAP-PCR. Fragment A was obtained with a primer in RAP-PCR fragment 1 and 2 and a primer designed based on alignment of leader and trailer sequences of APV and RSV⁶. Fragment B was obtained using primers designed in RAP-PCR fragment 1 and 2 and RAP-PCR fragment 3. Fragment C was obtained with primers designed in RAP-PCR fragment 3 and RAP-PCR fragment 4,5,6 and 7.

For all phylogenetic trees, (figures 3-5) DNA sequences were aligned using the ClustalW software package and maximum likelihood trees were generated using the DNA-ML software package of the Phylip 3.5 program using 100 bootstraps and 3 jumbles¹⁵. Previously published sequences that were used for the generation of phylogenetic trees are available from Genbank under accessions numbers : For all ORFs: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; For the F ORF: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; For the N ORF: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; For the M ORF: PMV, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; For the P ORF: PVM, 09649; APV-A, U22110; APV-C, AF176591. Phylogenetic analyses for the nine different virus isolates of MPV were performed with APV strain C as outgroup.

Abbreviations used in figures: hRSV: human RSV; bRSV: bovine RSV; PVM: pneumonia virus of mice; APV-A,B, and C: avian pneumovirus type A, B and C.

Fig. 3 Comparison of the N, P, M and F ORFs of members of the subfamily *Pneumovirinae* and virus isolate 00-1. The alignment shows the amino acid sequence

WO 02/057302

29

PCT/NL02/00040

of the complete N, P, M and F proteins and partial L proteins of virus isolate 00-1. Amino acids that differ between isolate 00-1 and the other viruses are shown, identical amino acids are represented by periods, gaps are represented as dashes. Numbers correspond to amino acid positions in the proteins. Accession numbers used for the analyses are described in the materials and methods section. APV-A, B or C: Avian Pneumovirus type A, B or C, b-or hRSV: bovine or human respiratory syncytial virus, PVM: pneumonia virus of mice. L8: fragment 8 obtained with RAP-PCR located in L, L9/10: consensus of fragment 9 and 10 obtained with RAP-PCR, located in L. For the P alignment, no APV-B sequence was available from the Genebank, For the L alignment only bRSV, hRSV and APV-A sequences were available.

Fig. 4: Phylogenetic analyses of the N, P, M, and F ORF's of members of the genus Pneumovirinae and virus isolate 00-1. Phylogenetic analysis was performed on viral sequences from the following genes: F (panel A), N (panel B), M (panel C), and P (panel D). The phylogenetic trees are based on maximum likelihood analyses using 100 bootstraps and 3 jumbles. The scale representing the number of nucleotide changes is shown for each tree.

Fig. 5: Phylogenetic relationship for parts of the F (panel A), N (panel B), M (panel C) and L (panel D) ORFs of nine of the primary MPV isolates with APV-C, it's closest relative genetically. The phylogenetic trees are based on maximum likelihood analyses. The scale representing the number of nucleotide changes is shown for each tree. Accession numbers for APV-C: panel A: D00850; panel B: U39295; panel C: X58639; and panel D: U65312.

WO 02/057302

30

PCT/NL02/00040

Fig. 6A: Nucleotide and amino acid sequence information from the 3'end of the genome of MPV isolate 00-1. ORF's are given. N: ORF for nucleoprotein; P: ORF for phosphoprotein; M: ORF for matrix protein; F: ORF for fusion protein; GE: gene end; GS: gene start.

5

Fig. 6B and C: Nucleotide and amino acid sequence information from obtained fragments in the polymerase gene (L) of MPV isolates 00-1. Positioning of the fragments in L is based on protein homologies with APV-C (accession number U65312). The translated fragment 8 (Fig. 6B.) is located at amino acid number 8 to 243, and the consensus of fragments 9 and 10 (Fig. 6C) is located at amino acid number 1358 to 1464 of the APV-C L ORF.

10

Figure 7

Genomic map of MPV isolate 00-1. The nucleotide positions of the start and stop codons are indicated under each ORF. The double lines which cross the L ORF indicate the shortened representation of the L gene. The three reading frames below the map indicate the primary G ORF (nt 6262-6972) and overlapping potential secondary ORFs.

15

Figure 8:

Alignment of the predicted amino acid sequence of the nucleoprotein of MPV with those of other pneumoviruses. The conserved regions identified by Barr (1991) are represented by boxes and labelled A, B, and C. The conserved region among pneumoviruses (Li, 1996) is shown gray shaded. Gaps are represented by dashes, periods indicate the positions of identical amino acid residues compared to MPV.

20

25

Figure 9:

Amino acid sequence comparison of the phosphoprotein of MPV with those of other pneumoviruses. The region of high similarity (Ling, 1995) is boxed, and the glutamate rich region is grey shaded. Gaps are represented by dashes and periods indicate the position of identical amino acid residues compared to MPV.

30

WO 02/057302

31

PCT/NL02/00040

Figure 10:

Comparison of the deduced amino acid sequence of the matrix protein of MPV with those of other pneumoviruses. The conserved hexapeptide sequence (Easton, 1997) is grey shaded. Gaps are represented by dashes and periods indicate the position of identical

5 amino acid residues relative to MPV.

Figure 11:

Alignment of the predicted amino acid sequence of the fusion protein of MPV with those of other pneumoviruses. The conserved cysteine residues are boxed, N-linked glycosylation sites are underlined, the cleavage site of F0 is double underlined, the fusion peptide, signal peptide and membrane anchor domain are shown grey shaded. Gaps are represented by dashes and periods indicate the position of identical amino acids relative to MPV.

15 Figure 12

Comparison of amino acid sequence of the M2 ORFs of MPV with those of other pneumoviruses. The alignment of M2-1 ORFs is shown in panel A, with the conserved amino terminus (Collins, 1990; Zamora, 1999) shown grey shaded. The three conserved cysteine residues are printed bold face and indicated by #. The alignment of M2-2 ORFs is shown in panel B. Gaps are represented by dashes and periods indicate the position of identical amino acids relative to MPV.

Figure 13

Amino acid sequence analyses of the SH ORF of MPV. (A) Amino acid sequence of the SH ORF of MPV, with the serine and threonine residues grey shaded, cysteine residues in bold face and the hydrophobic region double underlined. Potential N-linked glycosylation sites are single underlined. Numbers indicate the positions of the basic amino acids flanking the hydrophobic domain. (B) Alignment of the hydrophobicity plots of the SH proteins of MPV, APV-A and hRSV-B. The procedure of Kyte and Doolittle (1982) was used with a window of 17 amino acids. Arrows indicate a strong hydrophobic domain. Positions within the ORF are given on the X-axis.

WO 02/057302

32

PCT/NL02/00040

Figure 14

Amino acid sequence analyses of the G ORF of MPV. (A) Amino acid sequence of the G ORF of MPV, with serine, threonine and proline residues grey shaded, the cysteine residue is in bold face and the hydrophobic region double underlined. The potential N-linked glycosylation sites are single underlined. (B) Alingment of the hydrophobicity plots of the G proteins of MPV, APV-A and hRSV-B. The procedure of Kyte and Doolittle (1982) was used with a window of 17 amino acids. Arrows indicate the hydrophobic region, and positions within the ORF are given at the X-axis.

Figure 15

Comparison of the amino acid sequences of a conserved domain of the polymerase gene of MPV and other paramyxoviruses. Domain III is shown with the four conserved polymerase motifs (A, B, C, D) in domain III (Poch 1998, 1999) boxed. Gaps are represented by dashes and periods indicate the position of identical amino acid residues relative to MPV. hPIV3: human parainfluenza virus type 3; SV: sendai virus; hPIV-2: human parainfluenza virus type 2; NDV: New castle disease virus; MV: measles virus; nipah: Nipah virus.

Figure 16:

Phylogenetic analyses of the M2-1 and L ORFs of MPV and selected paramyxoviruses. The M2-1 ORF was aligned with the M2-1 ORFs of other members of the genus *Pneumovirinae* (A) and the L ORF was aligned with L ORFs members of the genus *pneumovirinae* and selected other paramyxoviruses as described in the legends of figure 15 (B). Phylogenetic trees were generated by maximum likelihood analyses using 100 bootstraps and 3 jumbles. The scale representing the number of nucleotide changes is shown for each tree. Numbers in the trees represent bootstrap values based on the consensus trees.

Figure 17:

Noncoding sequences of hMPV isolate 00-1. (A) The noncoding sequences between the ORFs and at the genomic termini are shown in the positive sense. From left to right, stop codons of indicated ORFs are shown, followed by the noncoding sequences, the gene start signals and start codons of the indicated subsequent ORFs. Numbers indicate the first position of start and stop codons in the hMPV map. Sequences that

WO 02/057302

33

PCT/NL02/00040

display similarity to published gene end signals are underlined and sequences that display similarity to UAAAAAU/A/C are represented with a line above the sequence. (B) Nucleotide sequences of the genomic termini of hMPV. The genomic termini of hMPV are aligned with each other and with those of APV. Underlined regions represent the primer sequences used in RT-PCR assays which are based on the 3' and 5' end sequences of APV and RSV (Randhawa *et al.*, 1997; Mink *et al.*, 1991). Bold italicized nucleotides are part of the gene start signal of the N gene. Le: leader, Tr: trailer.

10 Figure 18:
Comparison of two prototypic hMPV isolates with APV-A and APV-C; DNA similarity matrices for nucleic acids encoding the various viral proteins.

Figure 19:
15 Comparison of two prototypic hMPV isolates with APV-A and APV-C; protein similarity matrices for the various viral proteins.

Figure 20:
Amino acid alignment of the nucleoprotein of two prototype hMPV isolates

20 Figure 21:
Amino acid alignment of the phosphoprotein of two prototype hMPV isolates

Figure 22:
25 Amino acid alignment of the matrix protein of two prototype hMPV isolates

Figure 23:
Amino acid alignment of the fusion protein of two prototype hMPV isolates

30 Figure 24:
Amino acid alignment of the M2-1 protein of two prototype hMPV isolates

Figure 25:
Amino acid alignment of the M2-2 protein of two prototype hMPV isolates

WO 02/057302

34

PCT/NL02/00040

Figure 26:

Amino acid alignment of the short hydrophobic protein of two prototype hMPV isolates

5

Figure 27:

Amino acid alignment of the attachment glycoprotein of two prototype hMPV isolates

10

Figure 28:

Amino acid alignment of the N-terminus of the polymerase protein of two prototype hMPV isolates

Figure 29: Results of RT-PCR assays on throat and nose swabs of 12 guinea pigs

15

inoculated with ned/00/01 and/or ned/99/01.

Figure 30A: IgG response against ned/00/01 and ned/99/01 for guinea pigs infected with ned/00/01 and re-infected with ned/00/01 (GP 4, 5 and 6) or ned/99/01 (GP 1 and 3).

20

Figure 30B: IgG response against ned/00/01 and ned/99/01 for guinea pigs infected with ned/99/01 and re-infected with either ned/00/01 (GP's 8 and 9) or with ned/99/01 (GP's 10, 11, 12).

25

Figure 31: Specificity of the ned/00/01 and ned/99/01 ELISA on sera taken from guinea pigs infected with either ned/00/01 or ned/99/01.

Figure 32: Mean IgG response against ned/00/01 and ned/99/01 ELISA of 3 homologous (00-1/00-1), 2 homologous (99-1/99-1), 2 heterologous (99-1/00-1) and 2 heterologous (00-1/99-1) infected guinea pigs.

30

Figure 33: Mean percentage of APV inhibition of hMPV infected guinea pigs.

WO 02/057302

35

PCT/NL02/00040

Figure 34: Virus neutralisation titers of ned/00/01 and ned/99/01 infected guinea pigs against ned/00/01, ned/99/01 and APV-C.

5 Figure 35: Results of RT-PCR assays on throat swabs of cynomolgous macaques inoculated (twice) with ned/00/01.

Figure 36 A (top two panels):

IgA, IgM and IgG response against ned/00/01 of 2 cynomolgous macaques (re)infected with ned/00/01.

10

Figure 36B (bottom panels)

IgG response against APV of 2 cynomolgous macaques infected with ned/00/01.

15 Figure 37: Comparison of the use of the hMPV ELISA and the APV inhibition ELISA for the detection of IgG antibodies in human sera.

20

WO 02/057302

36

PCT/NL02/00040

Detailed description

Virus isolation and characterisation

From 1980 till 2000 we found 28 unidentified virus isolates from patients with severe respiratory disease. These 28 unidentified virus isolates grew slowly in tMK cells, poorly in VERO cells and A549 cells and could not or only little be propagated in MDCK or chicken embryonated fibroblast cells. Most of these virus isolates induced CPE after three passages on tMK cells, between day ten and fourteen. The CPE was virtually indistinguishable from that caused by hRSV or hPIV in tMK or other cell cultures, characterised by syncytium formation after which the cells showed rapid internal disruption, followed by detachment of the cells from the monolayer. The cells usually (sometimes later) displayed CPE after three passages of virus from original material, at day 10 to 14 post inoculation, somewhat later than CPE caused by other viruses such as hRSV or hPIV.

We used the supernatants of infected tMK cells for EM analysis which revealed the presence of paramyxovirus-like virus particles ranging from 150 to 600 nanometer, with short envelope projections ranging from 13 to 17 nanometer. Consistent with the biochemical properties of enveloped viruses such as the *Paramyxoviridae*, standard chloroform or ether treatment⁸ resulted in >10⁴ TCID₅₀ reduction of infectivity for tMK cells. Virus-infected tMK cell culture supernatants did not display haemagglutinating activity with turkey, chicken and guinea pig erythrocytes. During culture, the virus replication appeared to be trypsin dependent on the cells tested. These combined virological data allowed that the newly identified virus was taxonomically classified as a member of the *Paramyxoviridae* family.

We isolated RNA from tMK cells infected with 15 of the unidentified virus isolates for reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses using primer-sets specific for *Paramyxovirinae*⁹, hPIV 1-4, sendai virus, simian virus type 5, New-Castle disease virus, hRSV, morbilli, mumps, Nipah, Hendra, Tupaia and Mapuera viruses. RT-PCR assays were carried out at low stringency in order to detect potentially related viruses and RNA isolated from homologous virus stocks were used as controls. Whereas the available controls reacted positive with the respective virus-specific primers, the newly identified virus isolates did not react with any primer set, indicating the virus was not closely related to the viruses tested.

WO 02/057302

37

PCT/NL02/00040

We used two of the virus-infected tMK cell culture supernatants to inoculate guinea pigs and ferrets intranasally. Sera were collected from these animals at day zero, two weeks and three weeks post inoculation. The animals displayed no clinical symptoms but all seroconverted as measured in virus neutralisation (VN) assays and indirect IFA against the homologous viruses. The sera did not react in indirect IFA with any of the known paramyxoviruses described above and with PVM. Next, we screened the so far unidentified virus isolates using the guinea pig and ferret pre- and post-infection sera, of which 28 were clearly positive by indirect IFA with the post-infection sera suggesting they were serological closely related or identical.

10

RAP PCR

To obtain sequence information on the unknown virus isolates, we used a random PCR amplification strategy known as RAP-PCR¹⁰. To this end, tMK cells were infected with one of the virus isolates (isolate 00-1) as well as with hPIV-1 which served as a control. After both cultures displayed similar levels of CPE, virus in the culture supernatants was purified on continuous 20-60% sucrose gradients. The gradient fractions were inspected for virus-like particles by EM, and RNA was isolated from the fraction containing approximately 50% sucrose, in which nucleocapsids were observed. Equivalent amounts of RNA isolated from both virus fractions were used for RAP-PCR, after which samples were run side by side on a 3% NuSieve agarose gel. Twenty differentially displayed bands specific for the unidentified virus were subsequently purified from the gel, cloned in plasmid pCR2.1 (Invitrogen) and sequenced with vector-specific primers. When we used these sequences to search for homologies against sequences in the Genbank database using the BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 10 out of 20 fragments displayed resemblance to APV/TRTV sequences.

These 10 fragments were located in the genes coding for the nucleoprotein (N; fragment 1 and 2), the matrix protein (M; fragment 3), the fusion protein (F; fragment 4, 5, 6, 7,) and the polymerase protein (L; fragment 8,9,10) (Fig.2). We next designed PCR primers to complete the sequence information for the 3' end of the viral genome based on our RAP PCR fragments as well as published leader and trailer sequences for the *Pneumovirinae*⁶. Three fragments were amplified, of which fragment A spanned the extreme 3' end of the N open reading frame (ORF), fragment B spanned the phosphoprotein (P) ORF and fragment C closed the gap between the M

WO 02/057302

38

PCT/NL02/00040

and F ORFs (Fig. 2). Sequence analyses of these three fragments revealed the absence of NS1 and NS2 ORFs at the extreme 3' end of the viral genome and positioning of the F ORF immediately adjacent to the M ORF. This genomic organisation resembles that of the metapneumovirus APV, which is also consistent with the sequence homology. Overall the translated sequences for the N, P, M and F ORFs showed an average of 30-33% homology with members of the genus *Pneumovirus* and 66-68% with members of the genus *Metapneumovirus*. For the SH and G ORF's no discernable homology was found with members of either of the genera. The amino acid homologies found for N showed about 40% homology with hRSV and 88% with APV-C, its closest relative genetically, as for example can be deduced by comparing the amino acid sequence of figure 3 with the amino acid sequence of the respective N proteins of other viruses. The amino acid sequence for P showed about 25% homology with hRSV and about 66-68% with APV-C, M showed about 36-39% with hRSV and about 87-89% with APV-C, F showed about 40% homology with hRSV and about 81% with APV-C, M2-1 showed about 34-36% homology with pneumoviruses and 84-86 % with APV-C, M2-2 showed 15-17% homology with pneumoviruses and 56% with APV-C and the fragments obtained in L showed an average of 44% with pneumoviruses and 64% with APV-C.

20 *Phylogeny*

Although BLAST searches using nucleotide sequences obtained from the unidentified virus isolate revealed homologies primarily with members of the Pneumovirinae, homologies based on protein sequences revealed some resemblance with other paramyxoviruses as well (data not shown). As an indication for the relation between the newly identified virus isolate and members of the *Pneumovirinae*, phylogenetic trees were constructed based on the N, P, M and F ORFs of these viruses. In all four phylogenetic trees, the newly identified virus isolate was most closely related to APV (Fig. 4). From the four serotypes of APV that have been described¹¹, APV serotype C, the metapneumovirus found primarily in birds in the USA, showed the closest resemblance to the newly identified virus. It should be noted however, that only partial sequence information for APV serotype D is available.

To determine the relationship of our various newly identified virus isolates, we constructed phylogenetic trees based on sequence information obtained from eight to

WO 02/057302

39

PCT/NL02/00040

nine isolates (8 for F, 9 for N, M and L). To this end, we used RT-PCR with primers designed to amplify short fragments in the N, M, F and L ORFs, that were subsequently sequenced directly. The nine virus isolates that were previously found to be related in serological terms (see above) were also found to be closely related 5 genetically. In fact, all nine isolates were more closely related to one another than to APV. Although the sequence information used for these phylogenetic trees was limited, it appears that the nine isolates can be divided in two groups, with isolate 94-1, 99-1 and 99-2 clustering in one group and the other six isolates (94-2; 93-1; 93-2; 93-3; 93-4; 00-1) in the other (Fig.5).

10

Seroprevalence

To study the seroprevalence of this virus in the human population, we tested sera from humans in different age categories by indirect IFA using tMK cells infected with one of the unidentified virus isolates. This analysis revealed that 25% of the 15 children between six and twelve months had antibodies to the virus, and by the age of five nearly 100% of the children were seropositive. In total 56 serum samples tested by indirect IFA were tested by VN assay. For 51 (91%) of the samples the results of the VN assay (titre >8) coincided with the results obtained with indirect IFA (titre >32). Four samples that were found positive in IFA, were negative by VN test 20 (titre <8) whereas one serum reacted negative in IFA (titre <32) and positive in the VN test (titre 16) (table 2).

IFA conducted with 72 sera taken from humans in 1958 (ages ranging from 8-99 years)^{13,27} revealed a 100% seroprevalence, indicating the virus has been circulating in the human population for more than 40 years. In addition a number of these sera 25 were used in VN assays to confirm the IFA data (table 2).

Genetic analyses of the N, M, P and F genes revealed that MPV has higher sequence homology to the recently proposed genus *Metapneumovirinae* (average of 63 %) as compared to the genus *Pneumovirinae* (average of 30 %) and thus demonstrates a 30 genomic organisation similar to and resembling that of APV/TRTV. In contrast to the genomic organisation of the RSVs ('3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'), metapneumoviruses lack NS1 and NS2 genes and have a different positioning of the genes between M and L ('3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). The lack of ORFs between the M and F genes in our virus isolates and the lack of NS1 and NS2 adjacent to N, and

WO 02/057302

40

PCT/NL02/00040

the high amino acid sequence homology found with APV are reasons to propose the classification of MPV isolated from humans as a first member of the *Metapneumovirus* genus of mammalian, in particular of human origin.

Phylogenetic analyses revealed that the nine MPV isolates from which sequence information was obtained are closely related. Although sequence information was limited, they were in fact more closely related to one another than to any of the avian metapneumoviruses. Of the four serotypes of APV that have been described, serotype C was most closely related to MPV based on the N, P, M and F genes. It should be noted however that for serotype D only partial sequences for the F gene were available from Genbank and for serotype B only M, N and F sequences were available. Our MPV isolates formed two clusters in phylogenetic trees. For both hRSV and APV different genetic and serological subtypes have been described. Whether the two genetic clusters of MPV isolates represent serological subgroups that are also functionally different remains unknown at present. Our serological surveys showed that MPV is a common human pathogen. The repeated isolation of this virus from clinical samples from children with severe RTI indicates that the clinical and economical impact of MPV may be high. New diagnostic assays based on virus detection and serology will allow a more detailed analysis of the incidence and clinical and economical impact of this viral pathogen.

The slight differences between the IFA and VN results (5 samples) maybe due to the fact that in the IFA only IgG serum antibodies were detected whereas the VN assay detects both classes and sub-classes of antibodies or differences may be due to the differences in sensitivity between both assays. For IFA a cut off value of 16 is used, whereas for VN a cut off value of 8 is used.

On the other hand, differences between IFA versus VN assay may also indicate possible differences between different serotypes of this newly identified virus. Since MPV seems most closely related to APV, we speculate that the human virus may have originated from birds. Analysis of serum samples taken from humans in 1958 revealed that MPV has been widespread in the human population for more than 40 years indicating that a tentative zoonosis event must have taken place long before 1958.

WO 02/057302

41

PCT/NL02/00040

Materials and Methods

Specimen collection

5 Over the past decades our laboratory has collected nasopharyngeal aspirates from children suffering from RTI, which are routinely tested for the presence of viruses. All nasopharyngeal aspirates were tested by direct immunofluorescence assays (DIF) using fluorescence labelled antibodies against influenza virus types A, and B, hRSV and human parainfluenza virus (hPIV) types 1 to 3. The nasopharyngeal
 10 aspirates were also processed for virus isolation using rapid shell vial techniques¹⁴ on various celllines including VERO cells, tertiary cynomolgous monkey kidney (tMK) cells, human endothelial lung (HEL) cells and marbin dock kidney (MDCK) cells. Samples showing cytopathic effects (CPE) after two to three passages, and which were negative in DIF, were tested by indirect immunofluorescence assays (IFA) using
 15 virus specific antibodies against influenza virus types A, B and C, hRSV types A and B, measles virus, mumps virus, human parainfluenza virus (hPIV) types 1 to 4, sendai virus, simian virus type 5, and New-Castle disease virus. Although for many cases the aetiological agent could be identified, some specimens were negative for all these viruses tested.

20

Direct Immunofluorescence Assay (DIF)

Nasopharyngeal aspirate samples from patients suffering from RTI were used for DIF and virus isolation as described^{14,15}. Samples were stored at -70 °C. In brief, nasopharyngeal aspirates were diluted with 5 ml Dulbecco MEM (BioWhittaker,
 25 Walkersville, MD) and thoroughly mixed on a vortex mixer for one minute. The suspension was thus centrifuged for ten minutes at 840 x g. The sediment was spread on a multispot slide (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands), the supernatant was used for virus isolation. After drying, the cells were fixed in acetone for 1 minute at room temperature. After washing the slides were incubated for 15 minutes at 37 °C
 30 with commercial available FITC-labelled virus specific anti-sera such as influenza A and B, hRSV and hPIV 1 to 3 (Dako, Glostrup, Denmark). After three washings in PBS and one in tap water, the slides were included in a glycerol/PBS solution (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) and covered. The slides were analysed using a Axioscop fluorescence microscope (Carl Zeiss B.V, Weesp, the Netherlands).

WO 02/057302

42

PCT/NL02/00040

Virus isolation

For virus isolation tMK cells (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) were cultured in 24 well plates containing glass slides (Costar, Cambridge, UK), with the medium described below supplemented with 10% fetal bovine serum (BioWhittaker, Vervier, Belgium). Before inoculation the plates were washed with PBS and supplied with Eagle's MEM with Hanks' salt (ICN, Costa mesa, CA) of which half a litre was supplemented with 0.26 gram NaHCO_3 , 0.025 M Hepes (Biowhittaker), 2 mM L-glutamine (Biowhittaker), 100 units penicilline, 100 μg streptomycine (Biowhittaker), 0.5 gram lactalbumine (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands), 1.0 gram D-glucose (Merck, Amsterdam, The Netherlands), 5.0 gram peptone (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) and 0.02% trypsin (Life Technologies, Bethesda, MD). The plates were inoculated with supernatant of the nasopharyngeal aspirate samples, 0.2 ml per well in triplicate, followed by centrifuging at $840 \times g$ for one hour. After inoculation the plates were incubated at 37°C for a maximum of 14 days changing the medium once a week and cultures were checked daily for CPE. After 14 days cells were scraped from the second passage and incubated 14 days. This step was repeated for the third passage. The glass slides were used to demonstrate the presence of the virus by indirect IFA as described below.

Animal immunisation

Ferret and guinea pig specific antisera for the newly discovered virus were generated by experimental intranasal infection of two specific pathogen free ferrets and two guinea pigs, housed in separate pressurised glove boxes. Two to three weeks later all the animals were bled by cardiac puncture, and their sera were used as reference sera. The sera were tested for all previous described viruses with indirect IFA as described below.

Antigen detection by indirect IFA

We performed indirect IFA on slides containing infected tMK cells. After washing with PBS the slides were incubated for 30 minutes at 37°C with virus specific antisera. We used monoclonal antibodies in DIF against influenza A, B and C, hPIV type 1 to 3 and hRSV as described above. For hPIV type 4, mumps virus, measles virus, sendai virus, simian virus type 5, New-Castle Disease virus polyclonal antibodies

WO 02/057302

43

PCT/NL02/00040

(RIVM) and ferret and guinea pig reference sera were used. After three washings with PBS and one wash with tap water, the slides were stained with a secondary antibodies directed against the sera used in the first incubation. Secondary antibodies for the polyclonal anti sera were goat-anti-ferret (KPL, Guilford, UK, 40 fold diluted), mouse-anti-rabbit (Dako, Glostrup, Denmark, 20 fold diluted), rabbit-anti-chicken (KPL, 20 fold dilution) and mouse-anti-guinea pig (Dako, 20 fold diluted). Slides were processed as described for DIF.

Detection of antibodies in humans by indirect IFA

For the detection of virus specific antibodies, infected tMK cells were fixed with cold acetone on coverslips, washed with PBS and stained with serum samples at a 1 to 16 dilution. Subsequently, samples were stained with FITC-labelled rabbit anti human antibodies 80 times diluted in PBS (Dako). Slides were processed as described above.

Virus culture of MPV

Sub-confluent mono-layers of tMK cells in media as described above were inoculated with supernatants of samples that displayed CPE after two or three passages in the 24 well plates. Cultures were checked for CPE daily and the media was changed once a week. Since CPE differed for each isolate, all cultures were tested at day 12 to 14 with indirect IFA using ferret antibodies against the new virus isolate. Positive cultures were freeze-thawed three times, after which the supernatants were clarified by low-speed centrifugation, aliquoted and stored frozen at -70 °C. The 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀) of virus in the culture supernatants were determined as described¹⁶.

Virus neutralisation assay

VN assays were performed with serial two-fold dilutions of human and animal sera starting at an eight-fold dilution. Diluted sera were incubated for one hour with 100 TCID₅₀ of virus before inoculation of tMK cells grown in 96 well plates, after which the plates were centrifuged at 840 x g. The media was changed after three and six days and IFA was conducted with ferret antibodies against MPV 8 days after inoculation. The VN titre was defined as the lowest dilution of the serum sample resulting in negative IFA and inhibition of CPE in cell cultures.

WO 02/057302

44

PCT/NL02/00040

Virus characterisation

Haemagglutination assays and chloroform sensitivity tests were performed as described^{8,14}. For EM analyses, virus was concentrated from infected cell culture supernatants in a micro-centrifuge at 4 °C at 17000 x g, after which the pellet was resuspended in PBS and inspected by negative contrast EM. For RAP-PCR, virus was concentrated from infected tMK cell supernatants by ultra-centrifugation on a 60% sucrose cushion (2 hours at 150000 x g, 4 °C). The 60% sucrose interphase was subsequently diluted with PBS and layered on top of a 20-60% continuous sucrose gradient which was centrifuged for 16 hours at 275000 x g at 4 °C. Sucrose gradient fractions were inspected for the presence of virus-like particles by EM and poly-acrylamide gel electrophoresis followed by silver staining. The approximately 50% sucrose fractions that appeared to contain nucleocapsids were used for RNA isolation and RAP-PCR.

RNA isolation

RNA was isolated from the supernatant of infected cell cultures or sucrose gradient fractions using a High Pure RNA Isolation kit according to instructions from the manufacturer (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands).

RT-PCR

Virus-specific oligonucleotide sequences for RT-PCR assays on known paramyxoviruses are described in addenda 1. A one-step RT-PCR was performed in 50 µl reactions containing 50 mM Tris.HCl pH 8.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 200 µM each dNTP, 10 units recombinant RNAsin (Promega, Leiden, the Netherlands), 10 units AMV RT (Promega, Leiden, The Netherlands), 5 units Amplitaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) and 5 µl RNA. Cycling conditions were 45 min. at 42 °C and 7 min. at 95 °C once, 1 min at 95 °C, 2 min. at 42 °C and 3 min. at 72 °C repeated 40 times and 10 min. at 72 °C once.

RAP-PCR

RAP-PCR was performed essentially as described¹⁰. The oligonucleotide sequences are described in addenda 2. For the RT reaction, 2 µl RNA was used in a 10 µl

WO 02/057302

45

PCT/NL02/00040

reaction containing 10 ng/ μ l oligonucleotide, 10 mM dithiothreitol, 500 μ M each dNTP, 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl and 3 mM MgCl₂. The reaction mixture was incubated for 5 min. at 70 °C and 5 min. at 37 °C, after which 200 units Superscript RT enzyme (Life Technologies) were added. The incubation at 37 °C was continued for 55 min. and the reaction terminated by a 5 min. incubation at 72 °C. The RT mixture was diluted to give a 50 μ l PCR reaction containing 8 ng/ μ l oligonucleotide, 300 μ M each dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8.3, 65 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂ and 5 units Taq DNA polymerase (PE Biosystems). Cycling conditions were 5 min. at 94 °C, 5 min. at 40 °C and 1 min. at 72 °C once, followed by 1 min. at 94 °C, 2 min. at 56 °C and 1 min. at 72 °C repeated 40 times and 5 min. at 72 °C once. After RAP-PCR, 15 μ l the RT-PCR products were run side by side on a 3% NuSieve agarose gel (FMC BioProducts, Heerhugowaard, The Netherlands). Differentially displayed fragments specific for MPV were purified from the gel with Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) and cloned in pCR2.1 vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) according to instructions from the manufacturer.

Sequence analysis

RAP-PCR products cloned in vector pCR2.1 (Invitrogen) were sequenced with M13-specific oligonucleotides. DNA fragments obtained by RT-PCR were purified from agarose gels using Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands), and sequenced directly with the same oligonucleotides used for PCR. Sequence analyses were performed using a Dyanamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) and an ABI 373 automatic DNA sequencer (PE Biosystem). All techniques were performed according to the instructions of the manufacturer.

WO 02/057302

46

PCT/NL02/00040

Generating genomic fragments of MPV by RT-PCR

To generate PCR fragments spanning gaps A, B and C between the RAP-PCR fragments (Fig. 2) we used RT-PCR assays as described before on RNA isolated from virus isolate 00-1. The following primers were used:

- 5 For fragment A: TR1 designed in the leader: (5'-AAAGAATTCACGAGAAAAACGC-3') and N1 designed at the 3'end of the RAP-PCR fragments obtained in N (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3')
- 10 For fragment B: N2 designed at the 5'end of the RAP-PCR fragments obtained in N: (5'-CATGCAAGCTTATGGGGC-3') and M1 designed at the 3'end of the RAP-PCR fragments obtained in M: (5'-CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3').
- For fragment C: M2 designed at the 5'end of the RAP-PCR fragment obtained in M: (5'-GTAGAACTAGGAGCATATG-3') and F1 designed at the 3'end of the RAP-PCR fragments obtained in F: (5'-TCCCAATGTAGATACTGCTTC-3').
- 15 Fragments were purified from the gel, cloned and sequenced as described before.

RT-PCR for diagnosing MPV.

- For the amplification and sequencing of parts of the N, M, F and L ORFs of nine of the MPV isolates, we used primers N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCCCTAG-3') and N4 (5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), amplifying a 151 nucleotide fragments, M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') and M4 (5'-GCCAACTGATTGGCTGAGCTC-3') amplifying a 252 nucleotide fragment, F7 (5'-TGCACTATCTCCTCTGGGGCTTTG-3') and F8 (5'-TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3') amplifying a 221 nucleotide fragment and L6 (5'-CATGCCCCACTATAAAAGGTCAG-3') and L7 (5'-CACCCAGTCTTTCTTGAAA-3') amplifying a 173 nucleotide fragment respectively. RT-PCR, gel purification and direct sequencing were performed as described above. Furthermore, probes used were:

30

Probe used in M: 5'-TGC TTG TAC TTC CCA AAG-3'

Probe used in N: 5'-TAT TTG AAC AAA AAG TGT-3'

Probe used in L: 5'-TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

WO 02/057302

47

PCT/NL02/00040

Phylogenetic analyses

For all phylogenetic trees, DNA sequences were aligned using the ClustalW software package and maximum likelihood trees were generated using the DNA-ML software package of the Phylip 3.5 program using 100 bootstraps and 3 jumbles¹⁵. Previously published sequences that were used for the generation of phylogenetic trees are available from Genbank under accessions numbers : For all ORFs: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; For the F ORF: PVM, D111128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; For the N ORF: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; For the M ORF: PMV, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; For the P ORF: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Phylogenetic analyses for the nine different virus isolates of MPV were performed with APV strain C as outgroup.

Abbreviations used in figures: hRSV: human RSV; bRSV: bovine RSV; PVM: pneumonia virus of mice; APV-A, B, and C: avian pneumovirus typ A, B and C.

Examples of methods to identify MPV*Specimen collection*

In order to find virus isolates nasopharyngeal aspirates, throat and nasal swabs, broncho alveolar lavages preferably from mammals such as humans, carnivores (dogs, cats, mustellids, seals etc.), horses, ruminants (cattle, sheep, goats etc.), pigs, rabbits, birds (poultry, ostriches, etc) should be examined. From birds cloaca swabs and droppings can be examined as well. Sera should be collected for immunological assays, such as ELISA and virus neutralisation assays.

Collected virus specimens were diluted with 5 ml Dulbecco MEM medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) and thoroughly mixed on a vortex mixer for one minute. The suspension was thus centrifuged for ten minutes at 840 x g. The sediment was spread on a multispot slide (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands) for immunofluorescence techniques, and the supernatant was used for virus isolation.

WO 02/057302

48

PCT/NL02/00040

Virus isolation

For virus isolation tMK cells (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) were cultured in 24 well plates containing glass slides (Costar, Cambridge, UK), with the medium
5 described below supplemented with 10% fetal bovine serum (BioWhittaker, Vervier, Belgium). Before inoculation the plates were washed with PBS and supplied with Eagle's MEM with Hanks' salt (ICN, Costa mesa, CA) supplemented with 0.52/liter gram NaHCO_3 , 0.025 M Hepes (Biowhittaker), 2 mM L-glutamine (Biowhittaker), 200 units/liter penicilline, 200 $\mu\text{g/liter}$ streptomycine (Biowhittaker), 1gram/liter
10 lactalbumine (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands), 2.0 gram/liter D-glucose (Merck, Amsterdam, The Netherlands), 10 gram/liter peptone (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) and 0.02% trypsin (Life Technologies, Bethesda, MD). The plates were inoculated with supernatant of the nasopharyngeal aspirate samples, 0,2 ml per well in triplicate, followed by centrifuging at 840x *g* for one hour. After
15 inoculation the plates were incubated at 37 °C for a maximum of 14 days changing the medium once a week and cultures were checked daily for CPE. After 14 days, cells were scraped from the second passage and incubated for another 14 days. This step was repeated for the third passage. The glass slides were used to demonstrate the presence of the virus by indirect IFA as described below.
20 CPE was generally observed after the third passage, at day 8 to 14 depending on the isolate. The CPE was virtually indistinguishable from that caused by hRSV or hPIV in tMK or other cell cultures. However, hRSV induces CPE starting around day 4. CPE was characterised by syncytia formation, after which the cells showed rapid internal disruption, followed by detachment of cells from the monolayer. For some
25 isolates CPE was difficult to observe, and IFA was used to confirm the presence of the virus in these cultures.

Virus culture of MPV

Sub-confluent monolayers of tMK cells in media as described above were inoculated
30 with supernatants of samples that displayed CPE after two or three passages in the 24 well plates. Cultures were checked for CPE daily and the media was changed once a week. Since CPE differed for each isolate, all cultures were tested at day 12 to 14 with indirect IFA using ferret antibodies against the new virus isolate. Positive cultures were freeze-thawed three times, after which the supernatants were clarified

WO 02/057302

49

PCT/NL02/00040

by low-speed centrifugation, aliquoted and stored frozen at -70 °C. The 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀) of virus in the culture supernatants were determined following established techniques used in the field¹⁶.

5 *Virus characterisation*

Haemagglutination assays and chloroform sensitivity tests were performed following well established and described techniques used in the field¹⁴. For EM analyses, virus was concentrated from infected cell culture supernatants in a micro-centrifuge at 4 °C at 17000 x g, after which the pellet was resuspended in PBS and inspected by negative contrast EM.

Antigen detection by indirect IFA

Collected specimens were processed as described and sediment of the samples was spread on a multispot slide. After drying, the cells were fixed in acetone for 1 minute at room temperature.

Alternatively, virus was cultured on tMK cells in 24 well slides containing glass slides. These glass slides were washed with PBS and fixed in acetone for 1 minute at room temperature.

After washing with PBS the slides were incubated for 30 minutes at 37 °C with polyclonal antibodies at a dilution of 1:50 to 1:100 in PBS. We used immunised ferrets and guinea pigs to obtain polyclonal antibodies, but these antibodies can be raised in various animals, and the working dilution of the polyclonal antibody can vary for each immunisation. After three washes with PBS and one wash with tap water, the slides were incubated at 37°C for 30 minutes with FITC labeled goat-anti-ferret antibodies (KPL, Guilford, UK, 40 fold diluted). After three washes in PBS and one in tap water, the slides were included in a glycerol/PBS solution (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) and covered. The slides were analysed using an Axioscop fluorescence microscope (Carl Zeiss B.V., Weesp, the Netherlands).

Detection of antibodies in humans, mammals, ruminants or other animals by indirect IFA

For the detection of virus specific antibodies, infected tMK cells with MPV were fixed with acetone on coverslips (as described above), washed with PBS and incubated 30 minutes at 37°C with serum samples at a 1 to 16 dilution. After two washes with PBS and one with tap water, the slides were incubated 30 minutes at 37°C with FITC-

WO 02/057302

50

PCT/NL02/00040

labelled secondary antibodies to the species used (Dako). Slides were processed as described above.

Antibodies can be labelled directly with a fluorescent dye, which will result in a direct immuno fluorescence assay. FITC can be replaced with any fluorescent dye.

5

Animal immunisation

Ferret and guinea pig specific antisera for the newly discovered virus were generated by experimental intranasal infection of two specific pathogen free ferrets and two guinea pigs, housed in separate pressurised glove boxes. Two to three weeks later the animals were bled by cardiac puncture, and their sera were used as reference sera.

10

The sera were tested for all previous described viruses with indirect IFA as described below. Other animal species are also suitable for the generation of specific antibody preparations and other antigen preparations may be used.

15 *Virus neutralisation assay (VN assay)*

VN assays were performed with serial two-fold dilutions of human and animal sera starting at an eight-fold dilution. Diluted sera were incubated for one hour with 100 TCID₅₀ of virus before inoculation of tMK cells grown in 96 well plates, after which the plates were centrifuged at 840 x g. The same culture media as described above was used. The media was changed after three and six days, and after 8 days IFA was performed (see above). The VN titre was defined as the lowest dilution of the serum sample resulting in negative IFA and inhibition of CPE in cell cultures.

20

WO 02/057302

51

PCT/NL02/00040

RNA isolation

RNA was isolated from the supernatant of infected cell cultures or sucrose gradient fractions using a High Pure RNA Isolation kit according to instructions from the manufacturer (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands). RNA can also be isolated following other procedures known in the field (*Current Protocols in Molecular Biology*).

10 *RT-PCR*

A one-step RT-PCR was performed in 50 µl reactions containing 50 mM Tris.HCl pH 8.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 200 µM each dNTP, 10 units recombinant RNAsin (Promega, Leiden, the Netherlands), 10 units AMV RT (Promega, Leiden, The Netherlands), 5 units Amplitaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands) and 5 µl RNA. Cycling conditions were 45 min. at 42 °C and 7 min. at 95 °C once, 1 min at 95 °C, 2 min. at 42 °C and 3 min. at 72 °C repeated 40 times and 10 min. at 72 °C once.

Primers used for diagnostic PCR:

In the nucleoprotein: N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCTAG-3') and N4 (5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), amplifying a 151 nucleotide fragment.
 In the matrixprotein: M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') and M4 (5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3') amplifying a 252 nucleotide fragment
 In the polymerase protein: L6 (5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') and L7 (5'-CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3') amplifying a 173 nucleotide fragment.
 Other primers can be designed based on MPV sequences, and different buffers and assay conditions may be used for specific purposes.

Sequence analysis

Sequence analyses were performed using a Dyanamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) and an ABI 373 automatic DNA sequencer (PE Biosystem). All techniques were performed according to the instructions of the manufacturer. PCR fragments were sequenced directly with the same oligonucleotides used for PCR, or the fragments were purified from the gel with Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) and cloned in

WO 02/057302

52

PCT/NL02/00040

pCR2.1 vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) according to instructions from the manufacturer and subsequently sequenced with M13-specific oligonucleotides.

- 5 *Oligonucleotides used for analysing the 3' end of the genome (absence of NS1/NS2).*
 Primer TR1 (5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') was designed based on published sequences of the trailer and leader for hRSV and APV, published by Randhawa (1997) and primer N1 (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3') was designed based on obtained sequences in the N protein. The RT-PCR assay and
 10 sequencing was performed as described above.
 The RT-PCR gave a product of approximately 500 base pairs which is too small to contain information for two ORFs, and translation of these sequences did not reveal an ORF.

- 15 *Detection of antibodies in humans, mammals, ruminants or other animals by ELISA*

In *Paramyxoviridae*, the N protein is the most abundant protein, and the immune response to this protein occurs early in infection. For these reasons, a recombinant source of the N proteins is preferably used for developing an ELISA assay for
 20 detection of antibodies to MPV. Antigens suitable for antibody detection include any MPV protein that combines with any MPV-specific antibody of a patient exposed to or infected with MPV virus. Preferred antigens of the invention include those that predominantly engender the immune response in patients exposed to MPV, which therefore, typically are recognised most readily by antibodies of a patient.

- 25 Particularly preferred antigens include the N, F and G proteins of MPV.
 Antigens used for immunological techniques can be native antigens or can be modified versions thereof. Well known techniques of molecular biology can be used to alter the amino acid sequence of a MPV antigen to produce modified versions of the antigen that may be used in immunologic techniques.

- 30 Methods for cloning genes, for manipulating the genes to and from expression vectors, and for expressing the protein encoded by the gene in a heterologous host are well-known, and these techniques can be used to provide the expression vectors, host cells, and the for expressing cloned genes encoding antigens in a host to produce

WO 02/057302

53

PCT/NL02/00040

recombinant antigens for use in diagnostic assays. See for instance: *Molecular cloning, A laboratory manual* and *Current Protocols in Molecular Biology*.

A variety of expression systems may be used to produce MPV antigens. For instance, a variety of expression vectors suitable to produce proteins in *E.Coli*, *B.subtilis*, yeast, insect cells and mammalian cells have been described, any of which might be used to produce a MPV antigen suitable to detect anti-MPV antibodies in exposed patients.

The baculovirus expression system has the advantage of providing necessary processing of proteins, and is therefor preferred. The system utilizes the polyhedrin promoter to direct expression of MPV antigens. (Matsuura et al. 1987, *J.Gen.Virol.* 68: 1233-1250).

Antigens produced by recombinant baculo-viruses can be used in a variety of immunological assays to detect anti-MPV antibodies in a patient. It is well established, that recombinant antigens can be used in place of natural virus in practically any immunological assay for detection of virus specific antibodies.

The assays include direct and indirect assays, sandwich assays, solid phase assays such as those using plates or beads among others, and liquid phase assays. Assays suitable include those that use primary and secondary antibodies, and those that use antibody binding reagents such as protein A. Moreover, a variety of detection methods can be used in the invention, including colorimetric, fluorescent, phosphorescent, chemiluminescent, luminescent and radioactive methods.

Example 1 of indirect anti-MPV IgG EIA using recombinant N protein

An indirect IgG EIA using a recombinant N protein (produced with recombinant baculo-virus in insect (Sf9) cells) as antigen can be performed. For antigen preparation, Sf9 cells are infected with the recombinant baculovirus and harvested 3-7 days post infection. The cell suspension is washed twice in PBS, pH 7.2, adjusted to a cell density of 5.0×10^6 cells/ml, and freeze-thawed three times. Large cellular debris is pelleted by low speed centrifugation ($500 \times g$ for 15 min.) and the supernatant is collected and stored at -70°C until use. Uninfected cells are processed similarly for negative control antigen.

100 μl of a freeze-thaw lysate is used to coat microtiter plates, at dilutions ranging from 1:50 to 1:1000. An uninfected cell lysate is run in duplicate wells and serves as a

WO 02/057302

54

PCT/NL02/00040

negative control. After incubation overnight, plates are washed twice with PBS/0.05%Tween. Test sera are diluted 1:50 to 1:200 in ELISA buffer (PBS, supplemented to 2% with normal goat sera, and with 0.5% bovine serum albumine and 0.1% milk), followed by incubation wells for 1 hour at 37°C.

5

Plates are washed two times with PBS/0.05%Tween. Horseradish peroxidase labelled goat anti-human (or against other species) IgG, diluted 1:3000 to 1:5000 in ELISA buffer, added to wells, and incubated for 1 hour at 37°. The plates are then washed two times with PBS/0.05%Tween and once with tap water, incubated for 15 minutes at room temperature with the enzyme substrate TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine, such as that obtained from Sigma, and the reaction is stopped with 100 µl of 2 M phosphoric acid. Colorimetric readings are measured at 450 nm using an automated microtiter plate reader.

10

15

Example 2: Capture anti-MPV IgM EIA using a recombinant nucleoprotein

A capture IgM EIA using the recombinant nucleoprotein or any other recombinant protein as antigen can be performed by modification of assays as previously described by Erdman et al (1990) J.Clin.Microb. 29: 1466-1471.

20

Affinity purified anti-human IgM capture antibody (or against other species), such as that obtained from Dako, is added to wells of a microtiter plate in a concentration of 250 ng per well in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6. After overnight incubation at room temperature, the plates are washed two times with PBS/0.05% Tween. 100 µl of test serum diluted 1:200 to 1:1000 in ELISA buffer is added to triplicate wells and incubated for 1 hour at 37°C. The plates are then washed two times with in PBS/0.05%Tween.

25

The freeze-thawed (infected with recombinant virus) Sf21 cell lysate is diluted 1:100 to 1: 500 in ELISA buffer is added to the wells and incubated for 2 hours at 37°C.

30

Uninfected cell lysate serves as a negative control and is run in duplicate wells. The plates are then washed three times in PBS/0.05% Tween and incubated for 1 hour at 37°C with 100 µl of a polyclonal antibody against MPV in a optimal dilution in ELISA buffer. After 2 washes with PBS/0.05% Tween , the plates are incubated

WO 02/057302

55

PCT/NL02/00040

with horseradish peroxidase labeled secondary antibody (such as rabbit anti ferret), and the plates are incubated 20 minutes at 37°C.

The plates are then washed five times in PBS/0.05% Tween, incubated for 15 minutes at room temperature with the enzyme substrate TMB, 3,3',5,5' tetramethylbenzidine, as, for instance obtained from "Sigma", and the reaction is stopped with 100 µl of 2M phosphoric acid. Colormetric readings are measured at 450 nm using automated microtiter plate reader.

The sensitivities of the capture IgM EIAs using the recombinant nucleoprotein (or other recombinant protein) and whole MPV virus are compared using acute and convalescent-phase serum pairs from persons with clinical MPV virus infection. The specificity of the recombinant nucleoprotein capture EIA is determined by testing serum specimens from healthy persons and persons with other paramyxovirus infections.

Potential for EIAs for using recombinant MPV fusion and glycoprotein proteins produced by the baculovirus expression.

The glycoproteins G and F are the two transmembraneous envelope glycoproteins of the MPV virion and represent the major neutralisation and protective antigens.

The expression of these glycoproteins in a vector virus system such as a baculovirus system provides a source of recombinant antigens for use in assays for detection of MPV specific antibodies. Moreover, their use in combination with the nucleoprotein, for instance, further enhances the sensitivity of enzyme immunoassays in the detection of antibodies against MPV.

A variety of other immunological assays (*Current Protocols in Immunology*) may be used as alternative methods to those described here.

In order to find virus isolates nasopharyngeal aspirates, throat and nasal swabs, broncho alveolar lavages and throat swabs preferable from but not limited to humans, carnivores (dogs, cats, seals etc.), horses, ruminants (cattle, sheep, goats etc.), pigs, rabbits, birds (poultry, ostriches, etc) can be examined. From birds, cloaca and intestinal swabs and droppings can be examined as well. For all samples,

WO 02/057302

56

PCT/NL02/00040

serology (antibody and antigen detection etc.), virus isolation and nucleic acid detection techniques can be performed for the detection of virus.

Monoclonal antibodies can be generated by immunising mice (or other animals) with purified MPV or parts thereof (proteins, peptides) and subsequently using established

5 hybridoma technology (*Current protocols in Immunology*). Alternatively, phage display technology can be used for this purpose (*Current protocols in Immunology*). Similarly, polyclonal antibodies can be obtained from infected humans or animals, or from immunised humans or animals (*Current protocols in Immunology*).

The detection of the presence or absence of NS1 and NS2 proteins can be performed using western-blotting, IFA, immuno precipitation techniques using a variety of antibody preparations. The detection of the presence or absence of NS1 and NS2 genes or homologues thereof in virus isolates can be performed using PCR with primer sets designed on the basis of known NS1 and/or NS2 genes as well as with a variety of nucleic acid hybridisation techniques.

15 To determine whether NS1 and NS2 genes are present at the 3' end of the viral genome, a PCR can be performed with primers specific for this 3' end of the genome. In our case, we used a primer specific for the 3' untranslated region of the viral genome and a primer in the N ORF. Other primers may be designed for the same purpose. The absence of the NS1/NS2 genes is revealed by the length and/or
20 nucleotide sequence of the PCR product. Primers specific for NS1 and/or NS2 genes may be used in combination with primers specific for other parts of the 3' end of the viral genome (such as the untranslated region or N, M or F ORFs) to allow a positive identification of the presence of NS1 or NS2 genes. In addition to PCR, a variety of techniques such as molecular cloning, nucleic acid hybridisation may be used for the
25 same purpose.

Example 3: Different serotypes/subgroups of MPV

30 Two potential genetic clusters are identified by analyses of partial nucleotide sequences in the N, M, F and L ORFs of 9 virus isolates. 90-100% nucleotide identity was observed within a cluster, and 81-88% identity was observed between the clusters. Sequence information obtained on more virus isolates confirmed the existence of two genotypes. Virus isolate ned/00/01 as prototype of cluster A, and

WO 02/057302

57

PCT/NL02/00040

virus isolate ned/99/01 as prototype of cluster B have been used in cross neutralization assays to test whether the genotypes are related to different serotypes or subgroups.

5 Results

Using RT-PCR assays with primers located in the polymerase gene, we identified 30 additional virus isolates from nasopharyngeal aspirate samples. Sequence information of parts of the matrix and polymerase genes of these new isolates together with those of the previous 9 isolates were used to construct phylogenetic trees (Figure 16). Analyses of these trees confirmed the presence of two genetic clusters, with virus isolate ned/00/00-1 as the prototype virus in group A and virus isolate ned/99/01 as the prototype virus in group B. The nucleotide sequence identity within a group was more than 92%, while between the clusters the identity was 81-85%.

Virus isolates ned/00/01 and ned/99/01 have been used to inoculate ferrets to raise virus-specific antisera. These antisera were used in virus neutralization assays with both viruses.

20 Table 3:

Virus neutralization titers

| | isolate 00-1 | isolate 99-1 |
|------------------------------|--------------|--------------|
| preserum | □2 | □2 |
| ferret A (00-1) | | |
| ferret A 22 dpi (00-1) | 64 | □2 |
| preserum | □2 | □ 2 |
| ferret B (99-1) | | |
| ferret B 22 dpi (99-1) | 4 | 64 |

WO 02/057302

58

PCT/NL02/00040

For isolate 00-1 the titer differs 32 (64/2) fold

For isolate 99-1 the titer differs 16 (64/4) fold

- 5 In addition, 6 guinea pigs have been inoculated with either one of the viruses (ned/00/01 and ned/99/01). RT-PCR assays on nasopharyngeal aspirate samples showed virus replication from day 2 till day 10 post infection. At day 70 post infection the guinea pigs have been challenged with either the homologous or the heterologous virus, and for in all four cases virus replication has been noticed.

10

Table 4

| | primary infection | virus replication | secondary infection | virus replication |
|------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| guinea pig 1-3 | 00-1 | 2 out of 3 | 99-1 | 1 out of 2 |
| guinea pig 4-6 | 00-1 | 3 out of 3 | 00-1 | 1 out of 3 |
| guinea pig 7-9 | 99-1 | 3 out of 3 | 00-1 | 2 out of 2 |
| guinea pig 10-12 | 99-1 | 3 out of 3 | 99-1 | 1 out of 3 |
| | | | | |

- 15 note: for the secondary infection guinea pig 2 and 9 were not there any more .

Virus neutralization assays with anti sera after the first challenge showed essentially the same results as in the VN assays performed with the ferrets (> 16-fold difference in VN titer).

20

The results presented in this example confirm the existence of two genotypes, which correspond to two serotypes of MPV, and show the possibility of repeated infection with heterologous and homologous virus

25

Example 4: Further sequence determination

5

This example describes the further analysis of the sequences of MPV open reading frames (ORFs) and intergenic sequences as well as partial sequences of the genomic termini.

Sequence analyses of the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrixprotein (M) and fusion protein (F) genes of MPV revealed the highest degree of sequence homology with APV serotype C, the avian pneumovirus found primarily in birds in the United States. These analyses also revealed the absence of non-structural proteins NS1 and NS2 at the 3'end of the viral genome and positioning of the fusion protein immediately adjacent to the matrix protein. Here we present the sequences of the 22K (M2) protein, the small hydrophobic (SH) protein, the attachment (G) protein and the polymerase (L) protein genes, the intergenic regions and the trailer sequence. In combination with the sequences described previously the sequences presented here complete the genomic sequence of MPV with the exception of the extreme 12-15 nucleotides of the genomic termini and establish the genomic organisation of MPV. Side by side comparisons of the sequences of the MPV genome with those of APV subtype A, B and C, RSV subtype A and B, PVM and other paramyxoviruses provides strong evidence for the classification of MPV in the *Melapneumovirus* genus.

25

Results**Sequence strategy**

MPV isolate 00-1 (van den Hoogen *et al.*, 2001) was propagated in tertiary monkey kidney (tMK) cells and RNA isolated from the supernatant 3 weeks after inoculation was used as template for RT-PCR analyses. Primers were designed on the basis of the partial sequence information available for MPV 00-1 (van den Hoogen *et al.*, 2001) as well as the leader and trailer sequences of APV and RSV (Randhawa *et al.*, 1997; Mink *et al.*, 1991). Initially, fragments between the previously obtained products,

WO 02/057302

60

PCT/NL02/00040

ranging in size from 500 bp to 4 Kb in length, were generated by RT-PCR amplification and sequenced directly. The genomic sequence was subsequently confirmed by generating a series of overlapping RT-PCR fragments ranging in size from 500 to 800 bp that represented the entire MPV genome. For all PCR fragments, both strands were sequenced directly to minimize amplification and sequencing errors. The nucleotide and amino acid sequences were used to search for homologies with sequences in the Genbank database using the BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). protein names were assigned to open reading frames (ORFs) based on homology with known viral genes as well as their location in the genome. Based on this information, a genomic map for MPV was constructed (Figure 7). The MPV genome is 13378 nucleotides in length and its organization is similar to the genomic organization of APV. Below, we present a comparison between the ORFs and non-coding sequences of MPV and those of other paramyxoviruses and discuss the important similarities and differences.

15

The nucleoprotein (N) gene

As shown, the first gene in the genomic map of MPV codes for a 394 amino acid (aa) protein and shows extensive homology with the N protein of other pneumoviruses. The length of the N ORF is identical to the length of the N ORF of APV-C (Table 5) and is smaller than those of other paramyxoviruses (Barr *et al.*, 1991). Analysis of the amino acid sequence revealed the highest homology with APV-C (88%), and only 7-11% with other paramyxoviruses (Table 6). Barr *et al* (1991) identified 3 regions of similarity between viruses belonging to the order *Mononegavirales*: A, B and C (Figure 8). Although similarities are highest within a virus family, these regions are highly conserved between virus families. In all three regions MPV revealed 97% aa sequence identity with APV-C, 89% with APV-B, 92% with APV-A, and 66-73% with RSV and PVM. The region between aa residues 160 and 340 appears to be highly conserved among metapneumoviruses and to a somewhat lesser extent the *Pneumovirinae* (Miyahara *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Barr *et al.*, 1991). This is in agreement with MPV being a metapneumovirus, showing 100% similarity with APV C.

20

25

30

The phosphoprotein (P) gene

WO 02/057302

61

PCT/NL02/00040

The second ORF in the genome map codes for a 294 aa protein which shares 68% aa sequence homology with the P protein of APV-C, and only 22-26% with the P protein of RSV (Table 6). The P gene of MPV contains one substantial ORF and in that respect is similar to P from many other paramyxoviruses (Reviewed in Lamb and Kolakofsky, 1996; Sedlmeier *et al.*, 1998).

In contrast to APV A and B and PVM and similar to RSV and APV-C the MPV P ORF lacks cysteine residues. Ling (1995) suggested that a region of high similarity between all pneumoviruses (aa 185-241) plays a role in either the RNA synthesis process or in maintaining the structural integrity of the nucleocapsid complex. This region of high similarity is also found in MPV (Figure 9) especially when conservative substitutions are taken in account, showing 100% similarity with APV-C, 93 % with APV-A and B, and approximately 81% with RSV. The C-terminus of the MPV P protein is rich in glutamate residues as has been described for APVs (Ling *et al.*, 1995).

The matrix (M) protein gene

The third ORF of the MPV genome encodes a 254 aa protein, which resembles the M ORFs of other pneumoviruses. The M ORF of MPV has exactly the same size as the M ORFs of other metapneumoviruses (Table 5) and shows high aa sequence homology with the matrix proteins of APV (78-87%), lower homology with those of RSV and PVM (37-38%) and 10% or less homology with those of other paramyxoviruses (Table 6).

Easton (1997) compared the sequences of matrix proteins of all pneumoviruses and found a conserved heptadpeptide at residue 14 to 19 that is also conserved in MPV (Figure 10). For RSV, PVM and APV small secondary ORFs within or overlapping with the major ORF of M have been identified (52 aa and 51 aa in bRSV, 75 aa in RSV, 46 aa in PVM and 51 aa in APV) (Yu *et al.*, 1992; Easton *et al.*, 1997; Samal *et al.*, 1991; Satake *et al.*, 1984). We noticed two small ORFs in the M ORF of MPV. One small ORF of 54 aa residues was found within the major M ORF (fragment 1, Figure 7), starting at nucleotide 2281 and one small ORF of 33 aa residues was found overlapping with the major ORF of M starting at nucleotide 2893 (fragment 2, Figure 7). Similar to the secondary ORFs of RSV and APV there is no significant homology between these secondary ORFs and secondary ORFs of the other pneumoviruses, and apparent start or stop signals are lacking. In addition, evidence for the synthesis of

WO 02/057302

62

PCT/NL02/00040

proteins corresponding to these secondary ORFs of APV and RSV has not been reported.

The fusion protein (F) gene

- 5 The F ORF of MPV is located adjacent to the M ORF, which is characteristic for members of the *Metapneumovirus* genus. The F gene of MPV encodes a 539 aa protein, which is two aa residues longer than F of APV-C (Table 5). Analysis of the aa sequence revealed 81% homology with APV-C, 67% with APV-A and B, 33-39% with pneumovirus F proteins and only 10-18% with other paramyxoviruses (Table 6). One
- 10 of the conserved features among F proteins of paramyxoviruses, and also seen in MPV is the distribution of cysteine residues (Morrison, 1988; Yu *et al.*, 1991). The metapneumoviruses share 12 cysteine residues in F1 (7 are conserved among all paramyxoviruses), and two in F2 (1 is conserved among all paramyxoviruses). Of the 3 potential N-linked glycosylation sites present in the F ORF of MPV, none are
- 15 shared with RSV and two (position 74 and 389) are shared with APV. The third, unique, potential N-linked glycosylation site for MPV is located at position 206 (Figure 11).
- Despite the low sequence homology with other paramyxoviruses, the F protein of MPV revealed typical fusion protein characteristics consistent with those described
- 20 for the F proteins of other *Paramyxoviridae* family members (Morrison, 1988). F proteins of *Paramyxoviridae* members are synthesized as inactive precursors (F0) that are cleaved by host cell proteases which generate amino terminal F2 subunits and large carboxy terminal F1 subunits. The proposed cleavage site (Collins *et al.*, 1996) is conserved among all members of the *Paramyxoviridae* family. The cleavage
- 25 site of MPV contains the residues RQSR. Both arginine (R) residues are shared with APV and RSV, but the glutamine (Q) and serine (S) residues are shared with other paramyxoviruses such as human parainfluenza virus type 1, Sendai virus and morbilliviruses (data not shown).
- The hydrophobic region at the amino terminus of F1 is thought to function as the
- 30 membrane fusion domain and shows high sequence similarity among paramyxoviruses and morbilliviruses and to a lesser extent the pneumoviruses (Morrison, 1988). These 26 residues (position 137-163, Figure 11) are conserved between MPV and APV-C, which is in agreement with this region being highly conserved among the metapneumoviruses (Naylor *et al.*, 1998; Seal *et al.*, 2000).

WO 02/057302

63

PCT/NL02/00040

As is seen for the F2 subunits of APV and other paramyxoviruses, MPV revealed a deletion of 22 aa residues compared with RSV (position 107-128, Figure 11). Furthermore, for RSV and APV, the signal peptide and anchor domain were found to be conserved within subtypes and displayed high variability between subtypes (Plows *et al.*, 1995; Naylor *et al.*, 1998). The signal peptide of MPV (aa 10-35, Figure 11) at the amino terminus of F2 exhibits some sequence similarity with APV-C (18 out of 26 aa residues are similar) and less conservation with other APVs or RSV. Much more variability is seen in the membrane anchor domain at the carboxy terminus of F1, although some homology is still seen with APV-C.

10

The 22K (M2) protein

The M2 gene is unique to the *Pneumovirinae* and two overlapping ORFs have been observed in all pneumoviruses. The first major ORF represents the M2-1 protein which enhances the processivity of the viral polymerase (Collins *et al.*, 1995; Collins, 1996) and its readthrough of intergenic regions (Hardy *et al.*, 1998; Fearn *et al.*, 1999). The M2-1 gene for MPV, located adjacent to the F gene, encodes a 187 aa protein (Table 5), and reveals the highest (84%) homology with M2-1 of APV-C (Table 6). Comparison of all pneumovirus M2-1 proteins revealed the highest conservation in the amino-terminal half of the protein (Collins *et al.*, 1990; Zamora *et al.*, 1992; Ahmadian *et al.*, 1999), which is in agreement with the observation that MPV displays 100% similarity with APV-C in the first 80 aa residues of the protein (Figure 12A). The MPV M2-1 protein contains 3 cysteine residues located within the first 30 aa residues that are conserved among all pneumoviruses. Such a concentration of cysteines is frequently found in zinc-binding proteins (Ahmadian *et al.*, 1991; Cuesta *et al.*, 2000).

The secondary ORFs (M2-2) that overlap with the M2-1 ORFs of pneumoviruses are conserved in location but not in sequence and are thought to be involved in the control of the switch between virus RNA replication and transcription (Collins *et al.*, 1985; Elango *et al.*, 1985; Baybutt *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1990; Ling *et al.*, 1992; Zamora *et al.*, 1992; Alansari *et al.*, 1994; Ahmadian *et al.*, 1999; Bermingham *et al.*, 1999). For MPV, the M2-2 ORF starts at nucleotide 512 in the M2-1 ORF (Figure 7), which is exactly the same start position as for APV-C. The length of the M2-2 ORFs

WO 02/057302

64

PCT/NL02/00040

are the same for APV-C and MPV, 71 aa residues (Table 5). Sequence comparison of the M2-2 ORF (Figure 12B) revealed 64% aa sequence homology between MPV and APV-C and only 44-48% aa sequence homology between MPV and APV-A and B (Table 6).

5

The small hydrophobic protein (SH) ORF

The gene located adjacent to M2 of hMPV probably encodes a 183 aa SH protein (Fig. 1 and 7). There is no discernible sequence identity between this ORF and other RNA virus genes or gene products. This is not surprising since sequence similarity between pneumovirus SH proteins is generally low. The putative SH ORF of hMPV is the longest SH ORF known to date (Table 1). The aa composition of the SH ORF is relatively similar to that of APV, RSV and PVM, with a high percentage of threonine and serine residues (22%, 18%, 19%, 20.0%, 21% and 28% for hMPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV and PVM respectively). The SH ORF of hMPV contains 10 cysteine residues, whereas APV SH contains 16 cysteine residues. The SH ORF of hMPV contains two potential *N*-linked glycosylation sites (aa 76 and 121), whereas APV has one, RSV has two or three and PVM has four.

The hydrophilicity profiles for the putative hMPV SH protein and SH of APV and RSV revealed similar characteristics (Fig. 7B). The SH ORFs of APV and hMPV have a hydrophilic N-terminus, a central hydrophobic domain which can serve as a potential membrane spanning domain (aa 30-53 for hMPV), a second hydrophobic domain (aa 155-170) and a hydrophilic C-terminus. In contrast, RSV SH appears to lack the C-terminal part of the APV and hMPV ORFs. In all pneumovirus SH proteins the hydrophobic domain is flanked by basic aa residues, which are also found in the SH ORF for hMPV (aa 29 and 54).

20

25

The attachment glycoprotein (G) ORF

The putative G ORF of hMPV is located adjacent to the putative SH gene and encodes a 236 aa protein (nt 6262-6972, Fig. 1). A secondary small ORF is found immediately following this ORF, potentially coding for 68 aa residues (nt 6973-7179) but lacking a start codon. A third potential ORF in the second reading frame of 194 aa residues is overlapping with both of these ORFs but also lacks a start codon (nt 6416-7000). This ORF is followed by a potential fourth ORF of 65 aa residues in the same reading frame (nt 7001-7198), again lacking a start codon. Finally, a potential ORF of 97 aa

30

WO 02/057302

65

PCT/NL02/00040

residues (but lacking a start codon) is found in the third reading frame (nt 6444-6737, Fig. 1). Unlike the first ORF, the other ORFs do not have apparent gene start or gene end sequences (see below). Although the 236 aa G ORF probably represents at least a part of the hMPV attachment protein it can not be excluded that the additional

5 coding sequences are expressed as separate proteins or as part of the attachment protein through some RNA editing event. It should be noted that for APV and RSV no secondary ORFs after the primary G ORF have been identified but that both APV and RSV have secondary ORFs within the major ORF of G. However, evidence for expression of these ORFs is lacking and there is no sequence identity between the

10 predicted aa sequences for different viruses (Ling *et al.*, 1992). The secondary ORFs in hMPV G do not reveal characteristics of other G proteins and whether the additional ORFs are expressed requires further investigation.

BLAST analyses with all ORFs revealed no discernible sequence identity at the nucleotide or aa sequence level with other known virus genes or gene products. This

15 is in agreement with the low percentage sequence identity found for other G proteins such as those of hRSV A and B (53%) (Johnson *et al.*, 1987) and APV A and B (38%) (Juhász and Easton, 1994).

Whereas most of the hMPV ORFs resemble those of APV both in length and sequence, the putative G ORF of 236 aa residues of hMPV is considerably smaller

20 than the G ORF of APV (Table 1). The aa sequence revealed a serine and threonine content of 34%, which is even higher than the 32% for RSV and 24% for APV. The putative G ORF also contains 8.5% proline residues, which is higher than the 8% for RSV and 7% for APV. The unusual abundance of proline residues in the G proteins of APV, RSV and hMPV has also been observed in glycoproteins of mucinous origin

25 where it is a major determinant of the proteins three dimensional structure (Collins and Wertz, 1983; Wertz *et al.*, 1985; Jentoft, 1990). The G ORF of hMPV contains five potential N-linked glycosylation sites, whereas hRSV has seven, bRSV has five and APV has three to five.

The predicted hydrophilicity profile of hMPV G revealed characteristics similar to the

30 other pneumoviruses. The N-terminus contains a hydrophilic region followed by a short hydrophobic area (aa 33-53 for hMPV) and a mainly hydrophilic C-terminus (Fig. 8B). This overall organization is consistent with that of an anchored type II transmembrane protein and corresponds well with these regions in the G protein of APV and RSV. The putative G ORF of hMPV contains only 1 cysteine residue in

WO 02/057302

66

PCT/NL02/00040

contrast to RSV and APV (5 and 20 respectively). Of note, only two of the four secondary ORFs in the G gene contained one additional cysteine residue and these four potential ORFs revealed 12-20% serine and threonine residues and 6-11% proline residues.

5

The polymerase gene (L)

In analogy to other negative strand viruses, the last ORF of the MPV genome is the RNA-dependent RNA polymerase component of the replication and transcription complexes. The L gene of MPV encodes a 2005 aa protein, which is 1 residue longer than the APV-A protein (Table 5). The L protein of MPV shares 64% homology with APV-A, 42-44% with RSV, and approximately 13% with other paramyxoviruses (Table 6). Poch *et al.* (1989; 1990) identified six conserved domains within the L proteins of non-segmented negative strand RNA viruses, from which domain III contained the four core polymerase motifs that are thought to be essential for polymerase function. These motifs (A, B, C and D) are well conserved in the MPV L protein: in motifs A, B and C: MPV shares 100% similarity with all pneumoviruses and in motif D MPV shares 100 % similarity with APV and 92% with RSV's. For the entire domain III (aa 627- 903 in the L ORF), MPV shares 77% identity with APV, 61-62% with RSV and 23-27% with other paramyxoviruses (Figure 15). In addition to the polymerase motifs the pneumovirus L proteins contain a sequence which conforms to a consensus ATP binding motif K(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀K (Stec, 1991). The MPV L ORF contains a similar motif as APV, in which the spacing of the intermediate residues is off by one: K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉ K.

Phylogenetic analyses

As an indicator for the relationship between MPV and members of the *Pneumovirinae*, phylogenetic trees based on the N, P, M, and F ORFs have been constructed previously (van den Hoogen *et al.*, 2001) and revealed a close relationship between MPV and APV-C. Because of the low homology of the MPV SH and G genes with those of other paramyxoviruses, reliable phylogenetic trees for these genes can not be constructed. In addition, the distinct genomic organization between members of the *Pneumovirus* and *Metapneumovirus* genera make it impossible to generate phylogenetic trees based on the entire genomic sequence. We therefore only constructed phylogenetic trees for the M2 and L genes in addition to those previously

30

WO 02/057302

67

PCT/NL02/00040

published. Both these trees confirmed the close relation between APV and MPV within the *Pneumovirinae* subfamily (Figure 16).

MPV non-coding sequences

- 5 The gene junctions of the genomes of paramyxoviruses contain short and highly conserved nucleotide sequences at the beginning and end of each gene (gene start and gene end signals), possibly playing a role in initiation and termination of transcription (Curran *et al.*, 1999). Comparing the intergenic sequences between all genes of MPV revealed a consensus sequence for the gene start signal of the N, P, M, 10 F, M2 and G: GGGACAAGU (Figure 17A), which is identical to the consensus gene start signal of the metapneumoviruses (Ling *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Bâyon-Auboyer *et al.*, 2000). The gene start signals for the SH and L genes of MPV were found to be slightly different from this consensus (SH: GGGAUAAAU, L: GAGACAAAU). For APV the gene start signal of L was also found to be different 15 from the consensus: AGGACCAAT (APV-A) (Randhawa *et al.*, 1996) and GGGACCAGT (APV-D) (Bâyon-Auboyer *et al.*, 2000).
- In contrast to the similar gene start sequences of MPV and APV, the consensus gene end sequence of APV, UAGUUAAUU (Randhawa *et al.*, 1996), could not be found in the MPV intergenic sequences. The repeated sequence found in most genes, except 20 the G-L intergenic region, was UAAAAA U/A/C, which could possibly act as gene end signal. However, since we sequenced viral RNA rather than mRNA, definitive gene end signals could not be assigned and thus requires further investigation. The intergenic regions of pneumoviruses vary in size and sequence (Curran *et al.*, 1999; Blumberg *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1983). The intergenic regions of MPV did not 25 reveal homology with those of APV and RSV and range in size from 10 to 228 nucleotides (Figure 17B). The intergenic region between the M and F ORFs of MPV contains part of a secondary ORF, which starts in the primary M ORF (see above). The intergenic region between SH and G contains 192 nucleotides, and does not appear to have coding potential based on the presence of numerous stop-codons in all 30 three reading frames. The intergenic region between G and L contains 241 nucleotides, which may include additional ORFs (see above). Interestingly, the start of the L ORF is located in these secondary ORFs. Whereas the L gene of APV does not start in the preceding G ORF, the L ORF of RSV also starts in the preceding M2 gene. At the 3' and 5' extremities of the genome of paramyxoviruses short extragenic

WO 02/057302

68

PCT/NL02/00040

region are referred to as the leader and trailer sequences, and approximately the first 12 nucleotides of the leader and last 12 nucleotides of the trailer are complementary, probably because they each contain basic elements of the viral promoter (Curran *et al.*, 1999; Blumberg *et al.*, 1991; Mink *et al.*, 1986). The 3'leader of MPV and APV are both 41 nucleotides in length, and some homology is seen in the region between nucleotide 16 and 41 of both viruses (18 out of 26 nucleotides) (Figure 17B). As mentioned before the first 15 nucleotides of the MPV genomic map are based on a primer sequence based on the APV genome. The length of the 5'trailer of MPV (188 nucleotides) resembles the size of the RSV 5'trailer (155 nucleotides), which is considerably longer than that of APV (40 nucleotides). Alignments of the extreme 40 nucleotides of the trailer of MPV and the trailer of APV revealed 21 out of 32 nucleotides homology, apart from the extreme 12 nucleotides which represent primer sequences based on the genomic sequence of APV. Our sequence analyses revealed the absence of NS1 and NS2 genes at the 3'end of the genome and a genomic organisation resembling the organisation of metapneumoviruses (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). The high sequence homology found between MPV and APV genes further emphasises the close relationship between these two viruses. For the N, P, M, F, M2-1 and M2-2 genes of MPV an overall amino acid homology of 79% is found with APV-C. In fact, for these genes APV-C and MPV revealed sequence homologies which are in the same range as sequence homologies found between subgroups of other genera, such as RSV- A and B or APV-A and B. This close relationship between APV-C and MPV is also seen in the phylogenetic analyses which revealed MPV and APV-C always in the same branch, separate from the branch containing APV-A and B. The identical genomic organisation, the sequence homologies and phylogentic analyses are all in favour of the classification of MPV as the first member in the *Metapneumovirus* genus that is isolatable from mammals. It should be noted that the found sequence variation between different virus isolates of MPV in the N, M, F and L genes revealed the possible existence of different genotypes (van den Hoogen *et al.*, 2001). The close relationship between MPV and APV-C is not reflected in the host range, since APV infects birds in contrast to MPV (van den Hoogen *et al.*, 2001). This difference in host range may be determined by the differences between the SH and G proteins of both viruses that are highly divergent. The SH and G proteins of MPV did not reveal significant aa sequence homology with SH and G proteins of any other virus. Although the amino acid content and hydrophobicity plots are in favour of

WO 02/057302

69

PCT/NL02/00040

defining these ORFs as SH and G, experimental data are required to assess their function. Such analyses will also shed light on the role of the additional overlapping ORFs in these SH and G genes. In addition, sequence analyses on the SH and G genes of APV-C might provide more insight in the function of the SH and G proteins of MPV and their relationship with those of APV-C. The noncoding regions of MPV

5 were found to be fairly similar to those of APV. The 3' leader and 5' trailer sequences of APV and MPV displayed a high degree of homology. Although the lengths of the intergenic regions were not always the same for APV and MPV, the consensus gene start signals of most of the ORFs were found to be identical. In contrast, the gene end

10 signals of APV were not found in the MPV genome. Although we did find a repetitive sequence (U AAAAA U/A/C) in most intergenic regions, sequence analysis of viral mRNAs is required to formally delineate those gene end sequences. It should be noted that sequence information for 15 nucleotides at the extreme 3' end and 12 nucleotides at the extreme 5' end is obtained by using modified rapid amplification of cDNA ends

15 (RACE) procedures. This technique has been proven to be successful by others for related viruses (Randhawa, J.S. et al., Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.* 71, 9849-9854 (1997); Mink, M.A., et al. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24

20 (1991).) To determine the sequence of the 3' vRNA leader sequence, a homopolymer A tail is added to purified vRNA using poly-A-polymerase and the leader sequence subsequently amplified by PCR using a poly-T primer and a primer in the N gene. To determine the sequence of the 5' vRNA trailer sequence, a cDNA copy of the trailer sequence is made using reverse transcriptase and a primer in the L gene, followed by

25 homopolymer dG tailing of the cDNA with terminal transferase. Subsequently, the trailer region is amplified using a poly-C primer and a primer in the L gene. As an alternative strategy, vRNA is ligated to itself or synthetic linkers, after which the leader and trailer regions are amplified using primers in the L and N genes and linker-specific primers. For the 5' trailer sequence direct dideoxynucleotide

30 sequencing of purified vRNA is also feasible (Randhawa, 1997). Using these approaches, we can analyse the exact sequence of the ends of the hMPV genome. The sequence information provided here is of importance for the generation of diagnostic tests, vaccines and antivirals for MPV and MPV infections.

WO 02/057302

70

PCT/NL02/00040

Materials and Methods

5 Sequence analysis

Virus isolate 00-1 was propagated to high titers (approximately 10,000 TCID₅₀/ml) on tertiary monkey kidney cells as described previously (van den Hoogen *et al.*, 2001). Viral RNA was isolated from supernatants from infected cells using a High Pure RNA Isolating Kit according to instructions from the manufacturer (Roch Diagnostics,

- 10 Almere, The Netherlands). Primers were designed based on sequences published previously (van den Hoogen *et al.*, 2001) in addition to sequences published for the leader and trailer of APV/RSV (Randhawa *et al.*, 1997; Mink *et al.*, 1991) and are available upon request. RT-PCR assays were conducted with viral RNA, using a one-tube assay in a total volume of 50 µl with 50 mM Tris pH 8.5, 50 mM NaCl, 4.5 mM
- 15 MgCl₂, 2 mM DTT, 1 µM forward primer, 1 µM reverse primer, 0.6 mM dNTP's, 20 units RNAsin (Promega, Leiden, The Netherlands), 10 U AMV reverse transcriptase (Promega, Leiden, The Netherlands), and 5 units Taq Polymerase (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands). Reverse transcription was conducted at 42°C for 30 minutes, followed by 8 minutes inactivation at 95°C. The
- 20 cDNA was amplified during 40 cycles of 95°C, 1 min.; 42°C, 2 min. 72°C, 3 min. with a final extension at 72°C for 10 minutes. After examination on a 1% agarose gel, the RT-PCR products were purified from the gel using a Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) and sequenced directly using a Dyanamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, the
- 25 Netherlands) and an ABI 373 automatic DNA sequencer (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan den IJssel, the Netherlands), according to the instructions of the manufacturer.

Sequence alignments were made using the clustal software package available in the software package of BioEdit version 5.0.6. ([http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/](http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html)

30 [bioedit.html](http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html); Hall, 1999).

Phylogenetic analysis

To construct phylogenetic trees, DNA sequences were aligned using the ClustalW software package and maximum likelihood trees were generated using the DNA-ML

WO 02/057302

71

PCT/NL02/00040

software package of the Phylip 3.5 program using 100 bootstraps and 3 jumbles. Bootstrap values were computed for consensus trees created with the consense package (Felsenstein, 1989).

The MPV genomic sequence is available from Genbank under accession number

- 5 AF371337. All other sequences used here are available from Genbank under accession numbers AB046218 (measles virus, all ORFs), NC-001796 (human parainfluenza virus type 3, all ORFs), NC-001552 (Sendai virus, all ORFs), X57559 (human parainfluenza virus type 2, all ORFs), NC-002617 (New Castle Disease virus, all ORFs), NC-002728 (Nipah virus, all ORFs), NC-001989 (hRSV, all ORFs),
10 M11486 (hRSV A, all ORFs except L), NC-001803 (hRSV, L ORF), NC-001781 (hRSV B, all ORFs), D10331 (PVM, N ORF), U09649 (PVM, P ORF), U66893 (PVM, M ORF), U66893 (PVM, SH ORF), D11130 (PVM, G ORF), D11128 (F ORF). The PVM M2 ORF was taken from Ahmadian (1999), AF176590 (APV-C, N ORF), U39295 (APV-A, N ORF), U39296 (APV-B, N ORF), AF262571 (APV-C, M ORF), U37586 (APV-B, M
15 ORF), X58639 (APV-A, M ORF), AF176591 (APV-C, P ORF), AF325443 (APV-B, P ORF), U22110 (APV-A, P ORF), AF187152 (APV-C, F ORF), Y14292 (APV-B, F ORF), D00850 (APV-A, F ORF), AF176592 (APV-C, M2 ORF), AF35650 (APV-B, M2 ORF), X63408 (APV-A, M2 ORF), U65312 (APV-A, L ORF), S40185 (APV-A, SH ORF).

20

WO 02/057302

72

PCT/NL02/00040

Table 5: Lengths of the ORFs of MPV and other paramyxoviruses.

| | N ¹ | P | M | F | M2- 1 | M2- 2 | SH | G | L |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MPV | 394 | 294 | 254 | 539 | 187 | 71 | 183 | 236 | 2005 |
| APV A | 391 | 278 | 254 | 538 | 186 | 73 | 174 | 391 | 2004 |
| APV B | 391 | 279 | 254 | 538 | 186 | 73 | . ² | 414 | . ² |
| APV C | 394 | 294 | 254 | 537 | 184 | 71 | . ² | . ² | . ² |
| APV D | . ² | . ² | . ² | . ² | . ² | . ² | . ² | 389 | . ² |
| hRSV A | 391 | 241 | 256 | 574 | 194 | 90 | 64 | 298 | 2165 |
| hRSV B | 391 | 241 | 249 | 574 | 195 | 93 | 65 | 299 | 2166 |
| bRSV | 391 | 241 | 256 | 569 | 186 | 93 | 81 | 257 | 2162 |
| PVM | 393 | 295 | 257 | 537 | 176 | 77 | 92 | 396 | . ² |
| others ³ | 418- | 225- | 335- | 539- | . ⁴ | . ⁴ | . ⁴ | . ⁴ | 2183- |
| | 542 | 709 | 393 | 565 | | | | | 2262 |

5

Footnotes:

1. length in amino acid residues.

2. sequences not available

3. others: human parainfluenza virus type 2 and 3, Sendai virus, measles virus,
 10 nipah virus, phocine distemper virus, and New Castle Disease virus.

4. . ORF not present in viral genome

WO 02/057302

73

PCT/NL02/00040

Table 6: Amino acid sequence identity between the ORFs of MPV and those of other paramyxoviruses¹.

5

| | N | P | M | F | M2- 1 | M2- 2 | L |
|---------------------|------|-----|------|-----|----------------|----------------|----------------|
| APV A | 69 | 55 | 78 | 67 | 72 | 26 | 64 |
| APV B | 69 | 51 | 76 | 67 | 71 | 27 | - ² |
| APV C | 88 | 68 | 87 | 81 | 84 | 56 | - ² |
| hRSV A | 42 | 24 | 38 | 34 | 36 | 18 | 42 |
| hRSV B | 41 | 23 | 37 | 33 | 35 | 19 | 44 |
| hRSV | 42 | 22 | 38 | 34 | 35 | 13 | 44 |
| PVM | 45 | 26 | 37 | 39 | 33 | 12 | - ² |
| others ³ | 7-11 | 4-9 | 7-10 | 10- | - ⁴ | - ⁴ | 13- |
| | | | | 18 | | | 14 |

Footnotes:

- 10
1. No sequence homologies were found with known G and SH proteins and were thus excluded
2. Sequences not available.
3. See list in table 5, footnote 3.
4. ORF absent in viral genome.

15

WO 02/057302

74

PCT/NL02/00040

References

- Current Protocols in Molecular Biology, volume 1-3 (1994-1998). Ed. by Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.
5 Published by John Wiley and sons, Inc., USA.
- Current Protocols in Immunology, volume 1-3. Ed. by Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strobe, W. Published by John Wiley and sons, Inc., USA.
- 10 Sambrook et al. Molecular cloning, a laboratory manual, second ed., vol. 1-3. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
- Fields, Virology. 1996. Vol. 1-2 3rd. Edition, Ed. by: Fields, B.N., Knipe, D.M. and
15 Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
1. Pringle, C.R. Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* **144/2**, 2065-2070 (1999).
2. Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin. Microbio. Rev.* **12(2)**,
20 298-309 (1999). Review.
3. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet. Rec.* **119**, 606-607 (1986).
- 25 4. Ling, R., Easton, A.J. & Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 1709-1715 (1992).
5. Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from
30 that of respiratory syncytial virus. *Virology* **186**, 426-434 (1992).
6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. & Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.* **71**, 9849-9854 (1997).

WO 02/057302

75

PCT/NL02/00040

7. Evans, A.S. In: *Viral Infections of Humans. Epidemiology and control*. 3th edn. (ed. Evans, A.S) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1989).
8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Groen, J., Teppema, J.S. & van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Arch. of Virol.* **86**, 239-251 (1985).
- 5 9. K.B. Chua *et al.* Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **288**, 1432-1435 (2000).
10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. & McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *NAR.* **20**, 4965-4970 (1992).
- 10 11. Bayon-Auboyer, M., Arnault, C., Toquin, D. & Eterradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. of Gen. Virol.* **81**, 2723-2733 (2000).
12. Mulder, J. & Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. *The Lancet*, **april 19**,
- 15 810-814 (1958).
13. Pringle, C.R. In: *The Paramyxoviruses*. 1th edn.(ed. D.W. Kingsbury) 1-39 (Plenum Press, New York,1991).
14. Rothbarth, P.H., Groen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R., & Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology-a comparative study. *J.of Virol. Methods* **78**, 163-169
- 20 (1999).
15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Claas, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H.J. & Osterhaus, A.D.M.E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J.Med.Virol.* **52**, 97-104 (1997).
- 25 16. Lennette, D.A. et al. In: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. 7th edn. (eds. Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T.) 3-25; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995).
15. Felsenstein, J. Department of Genetics, Universtity of Washington.
- 30 <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
16. Schnell et al EMBO J **13**, 4195-4203, 1994
17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. & Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an esential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal

WO 02/057302

76

PCT/NL02/00040

- open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *PNAS* **92**, 11563-11567 (1995).
18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G. & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. *PNAS* **97**, 6108-6113 (2000).
19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. *PNAS* **93**, 15400-15404 (1996).
20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *PNAS* **93**, 11354-11358 (1996).
21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* **73**, 5001-5009 (1999).
22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* **235**, 323-332 (1997).
23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. *J. Virol.* **72**, 2955-2961 (1998).
24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J. Virol.* **74**, 6821-6831 (2000).
25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschalis, M., Tao, T., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J. Virol.* **72**, 1762-1768 (1998).
26. Teng, N., Whitehead, S.S., Bermingham, A., St.Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. *J. Virol.* **74**, 9317-9321 (2000).

WO 02/057302

77

PCT/NL02/00040

27. Masurel, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. *The Lancet* May 3, 907-910 (1969).

5 Further references used with example 4.

- AHMADIAN, G., CHAMBERS, P., and EASTON, A. J. (1999). Detection and characterisation of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol* **80**, 2011-6.
- 10 ALANSARI, H., and POTGIETER, L. N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K (M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **75**, 3597-601.
- BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C. R., and EASTON, A. J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* **72**, 677-85.
- 15 BAYBUTT, H. N., and PRINGLE, C. R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **68**, 2789-96.
- 20 BAYON-AUBOYER, M. H., ARNAULD, C., TOQUIN, D., and ETERRADOSSI, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol* **81**, 2723-33.
- BERMINGHAM, A., and COLLINS, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11259-64.
- 25 BLUMBERG, B.M., CHAN, J., AND UDEM, S.A. (1991). Function of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences: In theory and practice. In "the Paramyxoviruses" (D. Kingsbury, Ed.), pp. 235-247. Plenum, New York.
- COLLINS, P. L., and WERTZ, G. W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3208-12.
- 30 COLLINS, P. L., and WERTZ, G. W. (1985). The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* **54**, 65-71.

WO 02/057302

78

PCT/NL02/00040

- COLLINS, P. L., DICKENS, L. E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., CAMARGO, E., AND COELINGH, K. V. W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4594-98.
- 5 COLLINS, P. L., HILL, M. G., and JOHNSON, P. R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* **71**, 3015-20.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R. M., and MURPHY, B. R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11563-7.
- 10 COLLINS, P. L., MCINTOSH, K. AND CHANOCK, R. M. (1996). "Respiratory syncytial virus." In: Fields virology (B. N. Knipe, Howley, P. M., Ed.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- 15 COOK, J. K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* **19**, 602-13.
- CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A., AND VILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Gen. Virol* **74**, 9858-67.
- 20 CURRAN, J., AND KOLAKOFSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* **50**, 403-422.
- EASTON, A. J., and CHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res* **48**, 27-33.
- 25 ELANGO, N., SATAKE, M., and VENKATESAN, S. (1985). mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. *J Virol* **55**, 101-10.
- FEARNS, R., and COLLINS, P. L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**, 5852-64.
- 30 FEISENSTEIN, J. (1989). "PHYLIIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2. Cladistics 5).".

WO 02/057302

79

PCT/NL02/00040

- GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M., and TOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec* **119**, 606-7.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- 5 HARDY, R. W., and WERTZ, G. W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* **72**, 520-6.
- HORVATH, C. M., and LAMB, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J*
- 10 *Virol* **66**, 2443-55.
- JENTOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**, 291-4.
- JOHNSON, P. R., JR., OLMSTED, R. A., PRINCE, G. A., MURPHY, B. R., ALLING, D. W., WALSH, E. E., and COLLINS, P. L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation
- 15 of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol* **61**, 3163-6.
- JUHASZ, K., and EASTON, A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol* **75**, 2873-80.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic
- 20 Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-142.
- LAMB, R. A., AND KOLAKOSKY, D. (1996). "Paramyxoviridae: the viruses and their replication". In: Fields virology (B. N. Knipe, Howley, P.M., Ed.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- LI, J., LING, R., RANDHAWA, J. S., SHAW, K., DAVIS, P. J., JUHASZ, K., PRINGLE, C. R.,
- 25 EASTON, A. J., and CAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Res* **41**, 185-91.
- LING, R., EASTON, A. J., and PRINGLE, C. R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol* **73**, 1709-15.
- 30 LING, R., DAVIS, P. J., YU, Q., WOOD, C. M., PRINGLE, C. R., CAVANAGH, D., and EASTON, A. J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res* **36**, 247-57.

WO 02/057302

80

PCT/NL02/00040

- MARRIOT, A.C., SMITH, J.M., AND EASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. *J. Virol.* **75**, 6265-72.
- 5 MINK, M. A., STEC, D. S., and COLLINS, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* **185**, 615-24.
- MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISHIO, M., and ITO, Y. (1992). Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human
- 10 parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* **124**, 255-68.
- MORRISON, T. G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* **10**, 113-35.
- NAYLOR, C. J., BRITTON, P., and CAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the
- 15 transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **79**, 1393-8.
- PIOWS, D. J., and PRINGLE, C. R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* **11**, 37-45.
- 20 POCH, O., BLUMBERG, B. M., BOUGUELERET, L., and TORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* **71**, 1153-62.
- POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M., and TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements.
- 25 *Embo J* **8**, 3867-74.
- RANDHAWA, J. S., MARRIOTT, A. C., PRINGLE, C. R., and EASTON, A. J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* **71**, 9849-54.
- RANDHAWA, J. S., WILSON, S. D., TOLLEY, K. P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C. R., and
- 30 EASTON, A. J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* **77**, 3047-51.
- SAMAL, S. K., and ZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus

WO 02/057302

81

PCT/NL02/00040

- demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **72**, 1715-20.
- SATAKE, M., and VENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* **50**, 92-9.
- 5 SEAL, B. S., SELLEERS, H. S., and MEINERSMANN, R. J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* **66**, 139-47.
- SEDLMEIER, R., and NEUBERT, W. J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res* **50**, 101-39.
- 10 STEC, D.S., HILL, M.G., 3RD, AND COLLINS, P.L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* **183**, 273-87.
- VAN DEN HOOGEN, B. G., DE JONG, J. C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHIER, R. A., and OSTERHAUS, A. D. (2001). A newly discovered human
- 15 pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* **7**(6), 719-24.
- VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.
- WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S., and BALL, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4075-9.
- YU, Q., DAVIS, P. J., BARRETT, T., BINNS, M. M., BOURSNEILL, M. E., and CAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey
- 25 rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *J Gen Virol* **72**, 75-81.
- YU, Q., DAVIS, P. J., LI, J., and CAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order
- 30 different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* **186**, 426-34.
- ZAMORA, M., and SAMAL, S. K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* **73**, 737-41.

WO 02/057302

82

PCT/NL02/00040

Primers used for RT-PCR detection of known paramyxo-viruses. Primers for hPIV-1 to 4, mumps, Tupaia, Mapuera and Hendra are developed in house and based on alignments of available sequences. Primers for New Castle Disease Virus are taken from Seal, J., J. et al; Clin. Microb., 2624-2630, 1995. Primers for Nipah and general paramyxovirus-PCR are taken from: Chua, K.B., et al; Science, 288 26 may 2000

| | Virus | | primers | located in protein |
|----|---------|------|-----------------------------------|--------------------|
| 10 | HPIV-1 | fwd | 5'-TGTTGTCGAGACTATTCCAA-3' | HN |
| | | Rev | 5'-TGTTG(T/A)ACCAGTTGCAGTCT-3' | |
| | HPIV-2 | Fwd | 5'-TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3' | N |
| | | Rev | 5'-GGTGAC/T TC(T/C)AATAGGGCCA-3' | |
| | HPIV-3 | Fwd | 5'-CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3' | HN |
| 15 | | Rev | 5'-CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3' | |
| | HPIV-4 | Fwd | 5'-TTC(A/G)GTTTTAGCTGCTTACG-3' | N |
| | | Rev | 5'-AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3' | |
| | Mumps | Fwd | 5'-TCGTAACGTCTCTGTGACC-3' | SH |
| | | Rev | 5'-GGAGATCTTTCTAGAGTGAG-3' | |
| 20 | NDV | Fwd | 5'-CCTTGGGTGAiCTATCCGIAG-3' | F |
| | | Rev | 5'-CTGCCACTGCTAGTTGiGATAATCC-3' | |
| | Tupaia | Fwd | 5'-GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3' | N |
| | | Rev | 5'-GAATTCCTTATGACAAGCTCTGTGC-3' | |
| | Mapuera | Fwd | 5'-GGAGCAGGAACTCCAAGACCTGGAG-3' | N |
| 25 | | Rev: | 5'-GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3' | |
| | Hendra | Fwd | 5'-GAGATGGGCGGGCAAGTGGGCAACAG-3' | N |
| | | Rev | 5'-GCCTTTGCAATCAGGATCCAAATTGGG-3' | |
| | Nipah | Fwd | 5'-CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3' | N |
| | | Rev | 5'-ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3' | |
| 30 | HRSV | Fwd | 5'-TTTGTATATAGGCATATCATTG-3' | F |
| | | Rev | 5'-TTAACCAGCAAAGTGTTA-3' | |
| | Measles | Fwd | 5'-TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3' | N |
| | | Rev | 5'-TTATAACAATGATGGAGGG-3' | |

General Paramyxoviridae :

WO 02/057302 83 PCT/NL02/00040

Fwd 5'-CATTAAAAAGGGCACAGACGC-3' P
Rev 5'-TGGACATTCTCCGCAGT-3'

Primers for RAP-PCR:

- 5 ZF1: 5'-CCCACCAACCAGAGAGAAA-3'
ZF4: 5'-ACCACCAAGAGAGAAACCC-3'
ZF7: 5'-ACCAGAGAGAAACCCACC-3'
ZF10: 5'-AGAGAGAAACCAACCACC-3'
ZF13: 5'-GAGAAACCAACCACCAGA-3'
10 ZF16: 5'-AAACCAACCACCAGAGAG-3'
- CS1: 5'-GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'
CS4: 5'-GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'
CS7: 5'-AAGCGAAGCAAGGAGGC-3'
15 CS10: 5'-CGAAGCAAGGAGGCAAG-3'
CS13: 5'-ACGCAAGGAGGCAAGCGA-3'
CS16: 5'-CAAGGAGGCAAGCGAAG-3'

20 fragments successfully purified and sequenced:

- 20
10 fragments found with sequence homology in APV

| | | | |
|----|-------------|----------------|------------------------|
| | Fragment 1 | ZF 7, 335 bp | N gene |
| | Fragment 2 | ZF 10, 235 bp | N gene |
| 25 | Fragment 3 | ZF 10, 800 bp | M gene |
| | Fragment 4 | CS 1, 1250 bp | F gene |
| | Fragment 5 | CS 10, 400 bp | F gene |
| | Fragment 6 | CS 13, 1450 bp | F gene |
| | Fragment 7 | CS 13, 750 bp | F gene |
| 30 | Fragment 8 | ZF 4, 780 bp | L gene (protein level) |
| | Fragment 9 | ZF 10, 330 bp | L gene (protein level) |
| | Fragment 10 | ZF10, 250bp | L gene (protein level) |

Primers used for RAP-PCR amplification of nucleic acids from the prototype isolate.

35

WO 02/057302

84

PCT/NL02/00040

Example 5

Further exploration of the two subtypes of hMPV

- 5 Based on phylogenetic analysis of the different isolates of hMPV obtained so far, two genotypes have been identified with virus isolate 00-1 being the prototype of genotype A and isolate 99-1 the prototype of genotype B.
- We hypothesise that the genotypes are related to subtypes and that re-infection with viruses from both subgroups occur in the presence of pre-existing immunity and the
- 10 antigenic variation may not be strictly required to allow re-infection.
- Furthermore, hMPV appears to be closely related to avian pneumovirus, a virus primarily found in poultry. The nucleotide sequences of both viruses show high percentages of homology, with the exception of the SH and G proteins. Here we show that the viruses are cross-reacting in tests, which are based primarily on the
- 15 nucleoprotein and matrixprotein, but they respond differently in tests, which are based on the attachment proteins. The differences in virus neutralisation titers provide further proof that the two genotypes of hMPV are two different serotypes of one virus, where APV is a different virus.
- 20 The cross reaction between the two serotypes and the cross reaction between APV and hMPV

Methods

- 25 Protocol for IgG, IgA and IgM antibody detection for hMPV:
- The indirect IgG EIA for hMPV was performed in microtitre plates essentially as described previously (Rothbarth, P.H. et al., 1999; Influenza virus serology-a comparative study. *J. of Vir. Methods* 78 (1999) 163-169.
- Briefly, concentrated hMPV was solubilized by treatment with 1% Triton X-100 and
- 30 coated for 16 hr at room temperature into microtitre plates in PBS after determination of the optimal working dilution by checkerboard titration.
- Subsequently, 100 µl volumes of 1:100 diluted human serum samples in EIA buffer were added to the wells and incubated for 1 h at 37°C. Binding of human IgG was detected by adding a goat anti-human IgG peroxidase conjugate (Biosource, USA).

WO 02/057302

85

PCT/NL02/00040

Adding TMB as substrate developed plates and OD was measured at 450 nm. the results were expressed as the S(signal)/N(egative) ratio of the OD. A serum was considered positive for IgG, if the S/N ratio was beyond the negative control plus three times the standard.

5

hMPV antibodies of the IgM and IgA classes were detected in sera by capture EIA essentially as described previously (Rothbarth, P.H et al. 1999; Influenza virus serology-a comparative study. J. Vir. methods 78 (1999) 163-169. For the detection of IgA and IgM commercially available microtiter plates coated with anti human IgM or

10

IgA specific monoclonal antibodies were used. Sera were diluted 1:100 and after incubation of 1 hr at 37C, an optimal working dilution of hMPV is added at each well (100 ul). Incubated 1 hr 37C. After washing polyclonal anti hMPV labeled with peroxidase was added, the plate was incubated 1 hr 37C. Adding TMB as substrate developed plates and OD was measured at 450 nm. the results were expressed as the

15

S(signal)/N(egative) ratio of the OD. A serum was considered positive for IgG, if the S/N ratio was beyond the negative control plus three times the standard.

AVP antibodies were detected in an AVP inhibition assay. Protocol for APV inhibition test is included the APV-Ab SVANOVIR © enzyme immunoassay which is manufactured by SVANOVA Biotech AB, Uppsal Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden. The results were expressed as the S(signal)/N(egative) ratio of the OD. A serum was considered positive for IgG, if the S/N ratio was beyond the negative control plus three times the standard.

20

25

1. Guinea pigs

A. (re) infection of guinea pigs with both subtypes of hMPV

30

Virus isolates ned/00/01 (subtype A) and ned/99/01 (subtype B) have been used to inoculate 6 guinea pigs per subtype (intratracheal, nose and eyes).

6 GP's infected with hMPV 00-1 (10e6,5 TCID50)

6 GP's infected with hMPV 99-1 (10e4,1 TCID50)

WO 02/057302

86

PCT/NL02/00040

54 Days after the primary infection, the guinea pigs have been inoculated with the homologous and heterologous subtypes (10e4 TCID50/ml):

- 2 guinea pigs: 1st infection 00-1; 2nd 99-1 (heterologous)
- 5 3 guinea pigs: 1st infection 00-1; 2nd 00-1 (homologous)
- 2 guinea pigs: 1st infection 99-1; 2nd 00-1 (heterologous)
- 3 guinea pigs: 1st infection 99-1; 2nd 99-1 (homologous)

- 10 Throat and nose swabs have been collected for 12 days (1st infection) or 8 days (2nd infection) post infection, and have been tested for presence of the virus by RT-PCR assays.

Results of RT-PCR assay: Figure 29

- 15 Summary of results: guinea pigs inoculated with virus isolate ned/00/01 show infection of the upper respiratory tract day 1 to 10 post infection. Guinea pigs inoculated with ned/99/01 show infection of the upper respiratory tract day 1 to 5 post infection. Infection with ned/99/01 appears to be less severe than infection with ned/00/01. A second inoculation of the guinea pigs with the heterologous virus results in re-infection in 3 out of
- 20 4 guinea pigs and with the homologous virus in 2 out of 6 guinea pigs. No or only little clinical symptoms were noted in those animals that became re-infected, and no clinical symptoms were seen in those animals that were protected against the re-infections, demonstrating that even with wild-type virus, a protective effect of the first infection is evident, showing the possible use of heterologous (and of course homologues) isolates as a
- 25 vaccine, even in an unattenuated form.
- Both subtypes of hMPV are able to infect guinea pigs, although infection with subtype B (ned/99/01) seems less severe (shorter period of presence of the virus in nose and throat) than infection with subtype A (ned/00/01). This may be due to the higher dose given for subtype A, or to the lower virulence of subtype B.
- 30 Although the presence of pre-existing immunity does not completely protect against re-infection with both the homologous and heterologous virus, the infection appears to be less prominent in that a shorter period of presence of virus was noted and not all animals became virus positive.

WO 02/057302

87

PCT/NL02/00040

I

B. Serology of guinea pigs infected with both subtypes of hMPV

At day 0, 52, 70, 80, 90, 110, 126 and 160 sera were collected from the guinea pigs and tested at a 1:100 dilution in a whole virus ELISA against ned/00/01 and ned/99/01 antigen.

Figure 30 A and B: IgG response against ned/00/01 and ned/99/01 for each individual guinea pig

Figure 31: Specificity of the ned/00/01 and ned/99/01 ELISA. Only data from homologous reinfected guinea pigs have been used.

Figure 32: Mean IgG response against ned/00/01 and ned/99/01 ELISA of 3 homologous (00-1/00-1), 2 homologous (99-1/99-1), 2 heterologous (99-1/00-1) and 2 heterologous (00-1/99-1) infected guinea pigs.

Summary of results:

Only a minor difference in response to the two different ELISA's is observed.

Whole virus ELISA against 00-1 or 99-1 cannot be used to discriminate between the two subtypes.

C. Reactivity of sera raised against hMPV in guinea pigs with APV antigen

Sera collected from the infected guinea pigs have been tested with an APV inhibition ELISA

Figure 33: Mean percentage of APV inhibition of hMPV infected guinea pigs.

Summary of results:

Sera raised against hMPV in guinea pigs, react in the APV inhibition test in a same manner as they react in the hMPV IgG ELISA's.

Sera raised against ned/99/01 reveal a lower percentage of inhibition in the APV inhibition ELISA than sera raised against ned/00/01. Guinea pigs infected with

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

88

ned/99/01 might have a lower titer (as is seen in the hMPV ELISA's) or the cross-reaction of ned/99/01 with APV is less than that of ned/00/01. Nevertheless, the APV-Ab inhibition ELISA can be used to detect hMPV antibodies in guinea pigs.

5 {D. Virus neutralisation assays with sera raised against hMPV in guinea pigs.

Sera collected at day 0, day 52, 70 and 80 post infection were used in a virus (cross) neutralisation assay with ned/00/01, ned/99/01 and APV-C. Starting dilution was 1 to 10 and 100 TCID₅₀ virus per well was used. After neutralisation, the virus was brought on tMK cells, 15 min. centrifuged at 3500 RPM, after which the media was refreshed.

The APV tests were grown for 4 days and the hMPV tests were grown for 7 days. Cells were fixed with 80% acetone, and IFA's were conducted with monkey-anti hMPV fitc labeled. Wells that were negative in the staining were considered as the neutralising titer. For each virus a 10-log titration of the virus stock and 2 fold titration of the working solution was included.

Figure 34: Virus neutralisation titers of ned/00/01 and ned/99/01 infected guinea pigs against ned/00/01, ned/99/01 and APV-C

20 **2. Cynomologous macaques**

A. (re) infection of cynomologous macaques with both subtypes of hMPV

Virus isolates ned/00/01 (subtype A) and ned/99/01 (subtype B) (1*5 TCID₅₀) have been used to inoculate 2 cynomologous macaques per subtype (intratracheal, nose and eyes). Six months after the primary infection, the macaque have been inoculated for the second time with ned/00/01. Throat swabs have been collected for 14 days (1st infection) or 8 days (2nd infection) post infection, and have been tested for presence of the virus by RT-PCR assays.

Figure 35: Results of RT-PCR assays on throat swabs of cynomolgous macaques inoculated (twice) with ned/00/01.

Summary of results:

WO 02/057302

89

PCT/NL02/00040

Summary of results: cynomolgous macaques inoculated with virus isolate ned/00/01 show infection of the upper respiratory tract day 1 to 10 post infection. Clinical symptoms included a suppurative rhinitis. A second inoculation of the macaques with the homologous virus results in re-infection, as demonstrated by PCR, however, no clinical symptoms were seen.

B. Serology on sera collected of hMPV infected cynomolgous macaques.

From the macaques which received ned/00/01 sera were collected during 6 months after the primary infection (re-infection occurred at day 240 for monkey 3 and day 239 for monkey 6).

Sera were used to test for the presence of IgG antibodies against either ned/00/01 or APV, and for the presence against IgA and IgM antibodies against ned/00/01.

Results: Figure 36A

IgA, IgM and IgG response against ned/00/01 of 2 cynomolgous macaques (re)infected with ned/00/01.

Figure 36B

IgG response against APV of 2 cynomolgous macaques infected with ned/00/01.

Summary of results:

Two macaques have been successfully infected with ned/00/01 and in the presence of antibodies against ned/00/01 been reinfected with the homologous virus. The response to IgA and IgM antibodies shows the raise in IgM antibodies after the first infection, and the absence of it after the reinfection. IgA antibodies are only detected after the re-infection, showing the immediacy of the immune response after a first infection. Sera raised against hMPV in macaques which were tested in an APV inhibition ELISA show a similar response as to the hMPV IgG ELISA.

Discussion/conclusion

hMPV antibodies in cynomolgous macaques are detected with the APV inhibition ELISA with a similar sensitivity as with an hMPV ELISA, and therefore the APV

WO 02/057302

90

PCT/NL02/00040

inhibition ELISA is suitable for testing human samples for the presence of hMPV antibodies.

5 C.Virus (cross) neutralisation assays with sera collected from hMPV infected cynomolgous macaques

10 Summary of results: The sera taken from day 0 to day 229 post primary infection show only low virus neutralisation titers against ned/00/01 (0-80), the sera taken after the secondary infection show high neutralisation titers against ned/00/01: >1280. Only sera taken after the secondary infection show neutralisation titers against ned/99/01 (80-640), and none of the sera neutralise the APV C virus.

15 There is no cross reaction between APV-C and hMPV in virus (cross)neutralisation assays, where there is a cross reaction between ned/00/01 and ned/99/01 after a boost of the antibody response.

20 3. Humans

Sera of patients ranging in age of <6 months to >20 years of age have previously been tested in IFA and virus neutralisation assays against ned/00/01. (See tabel 1 of patent).

25 Here we have tested a number of these sera for the presence of IgG, IgM and IgA antibodies in an ELISA against ned/00/01, and we tested the samples in the APV inhibition ELISA.

30 Results: Figure 37 Comparison of the use of the hMPV ELISA and the APV inhibition ELISA for the detection of IgG antibodies in human sera, there is a strong correlation between the IgG hMPV test and the APV-Ab test, therefore the APV-Ab test is essentially able to detect IgG antibodies to hMPV in humans.

WO 02/057302

91

PCT/NL02/00040

4. Poultry

5 96 chickens have been tested in both the APV inhibition ELISA and the ned/00/01 ELISA for the presence of IgG antibodies against APV.

Summary of results: Both the hMPV ELISA and the APV inhibition ELISA detect antibodies against APV (data not shown).

10

Summary of results.

We found two genotypes of hMPV with ned/00/01 being the prototype of subgroup A and ned/99/01 the prototype of subgroup B.

15

"According to classical serological analyses (as for example known Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F., *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Arch Virol, 1991, **Supplement 2**: p. 140-144), two subtypes can be defined on the basis of its immunological distinctiveness, as determined by quantitative neutralization assays with animal antisera. Two distinct serotypes have either no cross-reaction with each other or show a homologous-to heterologous titer ratio >16 in both directions. If neutralization shows a certain degree of cross-reaction between two viruses in either or both directions (homologous-to-heterologous titer ration of eight or 16), distinctiveness of serotype is assumed if substantial biophysical/biochemical differences of DNA's exist. If neutralization shows a distinct degree of cross-reaction between two viruses in either or both directions (homologous-to-heterologous titer ration of smaller than eight), identity of serotype of the isolates under study is assumed."

20

For RSV it is known that re-infection occurs in the presence of pre-existing immunity (both homologous and heterologous). Infection of guinea pigs and cynomolgous macaques with both the homologous and heterologous serotypes of hMPV revealed that this is also true for hMPV. In addition, IgA and IgM ELISA's against hMPV

25

30

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

92

revealed the reaction of IgA antibodies only occurs after re-infection. Sera raised against hMPV or APV respond in an equal way in APV and hMPV ELISAs. From the nucleotide sequence comparisons, it is known that the viruses show about 80% amino acid homology for the N, P, M, and F genes. In ELISA's the N and M proteins are the main antigens to react. Virus neutralisation assays (known to react against the surface glycoproteins G, SH and F) show a difference between the two different sera. Although APV en hMPV cross react in ELISAs, phylogenetic analyses of the nucleotide sequences of hMPV and APV, the differences in virus neutralisation titers of sera raised against the two different viruses, and the differences in host usage again reveal that APV-C and hMPV are two different viruses. Based on the results we speculate that hMPV infection in mammals is possible a result of a zoonotic event from birds to mammals. But the virus has adapted in such a way (i.e. the G and SH proteins) that a return (from mammals to birds) zoonotic event seems unlikely, considering the presence of AVP in birds.

WO 02/057302

93

PCT/NL02/00040

Addendum

Background information on *Pneumovirinae*

5 The family of *Paramyxoviridae* contains two subfamilies: the *Paramyxovirinae* and the *Pneumovirinae*. The subfamily *Pneumovirinae* consists of two genera: *Pneumovirus* and *Metapneumovirus*. The genus *Pneumovirus* contains the human, bovine, ovine and caprine respiratory syncytial viruses and the pneumonia virus of mice (PVM). The genus *Metapneumovirus* contains the avian pneumoviruses (APV, also referred to as TRTV).

The classification of the genera in the subfamily *Pneumovirinae* is based on classical virus characteristics, gene order and gene constellation. Viruses of the genus *Pneumovirus* are unique in the family of *Paramyxoviridae* in having two nonstructural proteins at the 3'end of the genome (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'). In contrast, viruses in the genus *Metapneumovirus* lack the NS1 and NS2 genes and the organisation of genes between the M and L coding regions is different: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'.

All members of the subfamily *Paramyxovirinae* have haemagglutinating activity, but this function is not a defining feature for the subfamily *Pneumovirinae*, being absent in RSV and APV but present in PMV. Neuraminidase activity is present in members of the genera *Paramyxovirus* and *Rubulavirus* (subfamily *Paramyxovirinae*) but is absent in the genus *Morbillivirus* (subfamily *Paramyxovirinae*) and the genera *Pneumovirus* and *Metapneumovirus* (subfamily *Pneumovirinae*).

25 A second distinguishing feature of the subfamily *Pneumovirinae* is the apparent limited utilization of alternative ORFs within mRNA by RSV. In contrast, several members of the subfamily *Paramyxovirinae*, such as Sendai and Measles viruses, access alternative ORFs within the mRNA encoding the phosphoprotein (P) to direct the synthesis of a novel protein.

30 The G protein of the *Pneumovirinae* does not have sequence relatedness or structural similarity to the HN or H proteins of *Paramyxovirinae* and is only approximately half the size of their chain length. In addition, the N and P proteins are smaller than their counterparts in the *Paramyxovirinae* and lack unambiguous sequence homology. Most nonsegmented negative stranded RNA viruses have a single matrix (M) protein.

WO 02/057302

94

PCT/NL02/00040

Members of the subfamily *Pneumovirinae* are an exception in having two such proteins, M and M2. The M protein is smaller than its *Paramyxovirinae* counterparts and lacks sequence relatedness with *Paramyxovirinae*.

When grown in cell cultures, members of the subfamily *Pneumovirinae* show typical cytopathic effects; they induce characteristic syncytia formation of cells.
(Collins, 1996).

The subfamily *Pneumovirinae*, genus *Pneumovirus*

hRSV is the type-species of the genus *Pneumovirus* and is a major and widespread cause of lower respiratory tract illness during infancy and early childhood (Selwyn, 1990). In addition, hRSV is increasingly recognised as an important pathogen in other patient groups, including immune compromised individuals and the elderly. RSV is also an important cause of community-acquired pneumonia among hospitalised adults of all ages (Englund, 1991; Falsey, 2000; Dowell, 1996). Two major antigenic types for RSV (A and B) have been identified based on differences in their reactivity with monoclonal and polyclonal antibodies and by nucleic acid sequence analyses (Anderson, 1985; Johnson, 1987; Sullender, 2000). In particular the G protein is used in distinguishing the two subtypes. RSV-A and B share only 53% amino acid sequence homology in G, whereas the other proteins show higher homologies between the subtypes (table 1) (Collins, 1996). Detection of RSV infections has been described using monoclonal and polyclonal antibodies in immunofluorescence techniques (DIF, IFA), virus neutralisation assays and ELISA or RT-PCR assays (Rothbarth, 1988; Van Milaan, 1994; Coggins, 1998). Closely related to hRSV are the bovine (bRSV), ovine (oRSV) and caprine RSV (cRSV), from which bRSV has been studied most extensively. Based on sequence homology with hRSV, the ruminant RSVs are classified within the *Pneumovirus* genus, subfamily *Pneumovirinae* (Collins, 1996). Diagnosis of ruminant RSV infection and subtyping is based on the combined use of serology, antigen detection, virus isolation and RT-PCR assays (Uttenthal, 1996; Valarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994). Several analyses on the molecular organisation of bRSV have been performed using human and bovine antisera, monoclonal antibodies and cDNA probes. These analyses revealed that the protein composition of hRSV and bRSV are very similar and the

WO 02/057302

95

PCT/NL02/00040

genomic organisation of bRSV resembles that of hRSV. For both bRSV and hRSV, the G and F proteins represent the major neutralisation and protective antigens. The G protein is highly variable between the hRSV subtypes and between hRSV and bRSV (53 and 28% respectively) (Prozzi, 1997; Lerch, 1990). The F proteins of hRSV and bRSV strains present comparable structural characteristics and antigenic relatedness. The F protein of bRSV shows 80-81% homology with hRSV, while the two hRSV subtypes share 90% homology in F (Walravens, K. 1990).

Studies based on the use of hRSV and bRSV specific monoclonal antibodies have suggested the existence of different antigenic subtypes of bRSV. Subtypes A, B, and AB are distinguished based on reaction patterns of monoclonal antibodies specific for the G protein (Furze, 1994; Prozzi, 1997; Elvander, 1998). The epidemiology of bRSV is very similar to that of hRSV. Spontaneous infection in young cattle is frequently associated with severe respiratory signs, whereas experimental infection generally results in milder disease with slight pathologic changes (Elvander, 1996).

RSV has also been isolated from naturally infected sheep (oRSV) (LeaMaster, 1983) and goats (cRSV) (Lehmkuhl, 1980). Both strains share 96% nucleotide sequence with the bovine RSV and are antigenically crossreacting. Therefore, these viruses are also classified within the *Pneumovirus* genus.

A distinct member of the subfamily *Pneumovirinae*, genus *Pneumovirus* is the Pneumonia virus of mice (PVM).

PVM is a common pathogen in laboratory animal colonies, particularly those containing atymic mice. The naturally acquired infection is thought to be asymptomatic, though passage of virus in mouse lungs resulted in overt signs of disease ranging from an upper respiratory tract infection to a fatal pneumonia (Richter, 1988; Weir, 1988).

Restricted serological crossreactivity between the nucleocapsid protein (N) and the phosphoprotein (P) of PVM and hRSV has been described but none of the external proteins show cross-reactivity, and the viruses can be distinguished from each other in virus neutralisation assays (Chambers, 1990a; Gimenez, 1984; Ling, 1989a).

The glycoproteins of PVM appear to differ from those of other paramyxoviruses and resemble those of RSV in terms of their pattern of glycosylation. They differ, however, in terms of processing. Unlike RSV, but similar to the other paramyxoviruses, PVM has haemagglutinating activity with murine erythrocytes, for which the G protein

WO 02/057302

96

PCT/NL02/00040

appears to be responsible since a monoclonal antibody to this protein inhibits haemagglutination (Ling, 1989b).

The genome of PVM resembles that of hRSV, including two nonstructural proteins at its 3' end and a similar genomic organisation (Chambers, 1990a; Chambers, 1990b).

- 5 The nucleotide sequences of the PVM NS1/NS2 genes are not detectably homologous with those of hRSV (Chambers, 1991). Some proteins of PVM show strong homology with hRSV (N: 60%, and F: 38 to 40%) while G is distinctly different (the amino acid sequence is 31 % longer) (Barr, 1991; Barr, 1994; Chambers, 1992). The PVM P gene, but not that of RSV or APV, has been reported to encode a second ORF, representing
- 10 a unique PVM protein (Collins, 1996). New PVM isolates are identified by virus isolation, haemagglutination assays, virus neutralisation assay and various immunofluorescence techniques.

Table with addendum: Amino acid homology between the different viruses within the genus *Pneumovirus* of the subfamily *Pneumovirinae*.

15

| Gene | hRSV's | bRSV's | oRSV v. hRSV | bRSV v. hRSV | bRSV v. oRSV | PVM vs. hRSV |
|------|--------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| NS1 | 87 | | | 68-69 | 89 | * |
| NS2 | 92 | | | 83-84 | 87 | * |
| N | 96 | | 93 | | | 60 |
| P | - | | 81 | | | |
| M | - | | 89 | | | |
| F | 89 | | | 80-81 | | 38-40 |
| G | 53 | 88-100 | 21-29 | 38-41 | 60-62 | * |
| M2 | 92 | | 94 | | | 41 |
| SH | 76 | | 45-50 | | 56 | |
| L | - | | | | | |

* No detectable sequence homology

The genus *Metapneumovirus*

Avian pneumoviruses (APV) has been identified as the aetiological agent of turkey

- 20 rhinotracheitis (McDougall, 1986; Collins, 1988) and is therefore often referred to as

WO 02/057302

97

PCT/NL02/00040

turkey rhinotracheitis virus (TRTV). The disease is an upper respiratory tract infection of turkeys, resulting in high morbidity and variable, but often high, mortality. In turkey hens, the virus can also induce substantial reductions in egg production. The same virus can also infect chickens, but in this species, the role of the virus as a primary pathogen is less clearly defined, although it is commonly associated with swollen head syndrome (SHS) in breeder chicken (Cook, 2000).

The virions are pleiomorphic, though mainly spherical, with sizes ranging from 70 to 600 nm and the nucleocapsid, containing the linear, non-segmented, negative-sense RNA genome, shows helical symmetry (Collins, 1986; Giraud, 1986). This morphology resembles that of members of the family *Paramyxoviridae*. Analyses of the APV-encoded proteins and RNAs suggested that of the two subfamilies of this family (*Paramyxovirinae* and *Pneumovirinae*), APV most closely resembled the *Pneumovirinae* (Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanagh, 1988).

APV has no non-structural proteins (NS1 and NS2) and the gene order (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') is different from that of mammalian pneumoviruses such as RSV. APV has therefore recently been classified as the type species for the new genus *Metapneumovirus* (Pringle, 1999).

Differences in neutralisation patterns, ELISA and reactivity with monoclonal antibodies have revealed the existence of different antigenic types of APV. Nucleotide sequencing of the G gene led to the definition of two virus subtypes (A and B), which share only 38% amino acid homology (Collins, 1993; Juhász, 1994). An APV isolated from Colorado, USA (Cook, 1999), was shown to cross-neutralize poorly with subtype A and B viruses and based on sequence information was designated to a novel subtype, C (Seal, 1998; Seal 2000). Two non-A/non-B APVs were isolated in France, and were shown to be antigenically distinct from subtypes A, B and C. Based on amino acid sequences of the F, L and G genes, these viruses were classified again as a novel subtype, D (Bayon-Auboyer, 2000).

Diagnosis of APV infection can be achieved by virus isolation in chicken or turkey tracheal organ cultures (TOCs) or in Vero cell cultures. A cytopathic effect (CPE) is generally observed after one or two additional passages. This CPE is characterised by scattered focal areas of cell rounding leading to syncytial formation (Buys, 1989). A number of serology assays, including IF and virus neutralisation assays have been developed. Detection of antibodies to APV by ELISA is the most commonly used method (O'Loan, 1989; Gulati, 2000). Recently, the polymerase chain reaction (PCR)

WO 02/057302

98

PCT/NL02/00040

has been used to diagnose APV infections. Swabs taken from the oesophagus can be used as the starting material (Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000)

- 5 Alansari, H. and Potgieter, L.N.D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J.Gen.Virol.* 75: 401-404.
- Alansari, H., Duncan R.B., Baker, J.C. and Potgieter, L.N. 1999. Analysis of
10 ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *J.Vet.Diagn.Invest.* 11: 215-20
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernic, B.F., Stone, Y. and McIntosh, K. 1985. Antigenic characterisation of respiratory syncytial virus strains
15 with monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 151: 626-633.
- Barr, J., Chambers, Pringle, C.R., Easton, A.J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses,
20 paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J.Gen.Virol.* 72: 677-685.
- Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C.R. and Easton, A.J. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *J. Virol.* 68: 5330-5334.
- 25 Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M. and Etteradossi, N. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch.Vir.* 144: 1091-1109.
- 30 Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D., and Etteradossi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J.Gen.Virol.* 81: 2723-2733.

WO 02/057302

99

PCT/NL02/00040

- Byus, S.B., Du Preez, J.H. and Els, H.J. 1989. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J.Vet.Res.* 56: 87-98.
- 5 Cavanagh, D. and Barrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 11: 241-256.
- Chambers, P., Pringle, C.R. and Easton, A.J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J. Virol.* 64: 1869-1872.
- 10 Chambers, P., Matthews, D.A., Pringle, C.R. and Easton, A.J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome. *Virus Res.* 18: 263-270.
- 15 Chambers, P., Pringle, C.R., and Easton, A.J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. *J.Gen.Vir.* 72: 2545-2549.
- 20 Chambers, P., Pringle CR, Easton AJ. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 73: 1717-1724.
- 25 Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J. and Sullender, W.M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3552-3557.
- 30 Collins, M.S. and Gough, R.E., Lister, S.A., Chettle, N. and Eddy, R. 1986. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 119: 606.
- Collins, M.S. and Gough, R.E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen.Virol.* 69: 909-916.

WO 02/057302

100

PCT/NL02/00040

- Collins, M.S., Gough, R.E., and Alexander, D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 22: 469-479.
- 5 Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M. 1996. Respiratory syncytial virus. P. 1313-1351. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.). *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA.
- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J. and Senne, D.A. 1999. Preliminary
10 antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian pathol.* 28: 607-617.
- Cook, J.K.A. 2000. Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci.tech. off int. Epiz.* 19 : 602-613.
- 15 Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Marston, B.J. and Breiman, R.F. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J. Infect .Dis.* 174: 456-462.
- 20 Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 138: 101-105.
- Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Uttenthal, A., Ballagi-Pordany, A. and Belak, S. 1998.
- 25 Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. *J. Gen. Virol.* 79: 2939-2946.
- Englund, J.A., Anderson, L.J., and Rhame, F.S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* 29: 115-
30 119.
- Falsey, A.R. and Walsh, E.E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microb. Rev.* 13: 371-84.

WO 02/057302

101

PCT/NL02/00040

- Furze, J., Wertz, G., Lerch, R. and Taylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 75: 363-370.
- Gimenez, H.B., Cash, P. and Melvin, W.T. 1984. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J. Gen. Virol.* 65: 963-971.
- Gulati, B.R., Cameron, K.T., Seal, B.S., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. and Njenga, M.K. 2000.
- 10 Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4010-4.
- Johnson, P.R., Spriggs M.K., Olmsted, R.A. and Collins, P.L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5625-5629.
- 15 Juhász, K. and Easton, A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75: 2873-2880.
- LeaMaster, B.R., Evermann, J.F., Mueller, M.K., Prieur, M.K. and Schlie, J.V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and *Haemophilus somnus* infections in sheep. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 26: 265-276.
- 25 Lehmkuhl, H.D., Smith, M.H., Cutlip, R.C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 65: 269-76.
- 30 Lerch, R.A., Anderson, K and Wertz, G.W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 64: 5559-5569.

WO 02/057302

102

PCT/NL02/00040

- Ling, R. and Pringle, C.R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: *in vivo* and *in vitro* polypeptide synthesis. *J. Gen. Virol.* 69: 917-923.
- 5 Ling, R. and Pringle, C.R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications. *J. Gen. Virol.* 70: 1427-1440.
- Ling, R. and Pringle, C.R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II.
- 10 Characterization of the glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 70: 1441-1452.
- McDougall, J.S. and Cook, J.K.A. 1986. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 118: 206-207.
- 15 Oberst, R.D., M.P. Hays, K.J. Hennessy, L.C. Stine, J.F. Evermann, and Kelling, C.L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Investig.* 5: 322-328.
- 20 O'Loan, C.J., Allan, G., Baxter-Jones, C. and McNulty, M.S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *J. Virol. Meth.* 25: 271-282.
- Paccaud, M.F. and Jacquier, C., 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin.
- 25 *Arch. Ges. Virusforsch.* 30: 327-342.
- Pringle, C.R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* 144/2: 2065-2070.
- 30 Prozzi, D., Walravens, K., Langedijk, J.P.M., Daus, F., Kramps, J.A. and Letesson, J.J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 78: 359-366.

WO 02/057302

103

PCT/NL02/00040

- Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R., and A.J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses. *J. Virol.* 71: 9849-9854.
- 5 Richter, C.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S. and Mackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 38: 255-261.
- Rothbarth, P.H., Habova, J.J. and Masurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus. *Infection* 16:252.
- 10 Seal, B.S. 1998. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res.* 58, 45-52.
- 15 Seal, B.S., Sellers, H.S., Meinersmann, R.J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res.* 66: 139-147.
- 20 Selwyn, B.J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison findings from several developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 12: S870-S888.
- Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. and Nagaraja, K.V. 2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch. Virol.* 145: 1239-1246.
- Sullender, W.M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microb. Rev.* 13: 1-15.
- 30 Trudel, M., Nadon, F., Sinnard, C., Belanger, F., Alain, R., Seguin, C. and Lussier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 107: 141-149.

WO 02/057302

104

PCT/NL02/00040

- Uttenthal, A., Jensen, N.P.B. and Blom, J.Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 139, 114-117.
- 5 Valarcher, J., Bourhy, H., Gelfi, J. and Schelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microb.* 37: 1858-1862
- 10 Van Milaan, A.J., Sprenger, J.J., Rothbarth, P.H., Brandenburg, A.H., Masurel, N. and Claas, E.C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.* 44:80-87.
- 15 Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A., and Belak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J. Clin. Microb.* 32: 2225-2231.
- 20 Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P. and Burny, A.. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 3009-3014.
- Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L. and Johnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 34: 35-37.
- 25

WO 02/057302

105

PCT/NL02/00040

Claims

1. An isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and
5 identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus*
2. An isolated negative-sense single stranded RNA virus (MPV) belonging to the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* by determining a
10 nucleic acid sequence of said virus and testing it in phylogenetic tree analyses wherein maximum likelihood trees are generated using 100 bootstraps and 3 jumbles and finding it to be more closely phylogenetically corresponding to a virus isolate deposited as I-2614 with CNCM, Paris than it is corresponding to a virus isolate of
15 avian pneumovirus (APV) also known as turkey rhinotracheitis virus (TRTV), the aetiological agent of avian rhinotracheitis.
3. A virus according to claim 2 wherein said avian pneumovirus comprises APV type C (APV-C).
- 20 4. A virus according to claim 1 to 3 wherein said nucleic acid sequence comprises an open reading frame (ORF) encoding a viral protein of said virus.
5. A virus according to claim 4 wherein said open reading frame is selected from the group of ORFs encoding the N, P, M, and F proteins.
- 25 6. A virus according to claim 5 wherein said open reading frame is selected from the group of ORFs encoding the SH or G proteins.
7. A virus according to anyone of claims 1 to 6 comprising a nucleic acid or
30 functional fragment phylogenetically corresponding to a sequence shown in figure 6.
8. A virus according to anyone of claims 1 to 7 comprising an MPV isolate deposited as I-2614 with CNCM, Institute Pasteur, Paris or a virus isolate phylogenetically corresponding therewith.

WO 02/057302

106

PCT/NL02/00040

9. A virus according to claim 8 isolatable from a human with respiratory tract illness.
- 5 10. An isolated or recombinant nucleic acid or MPV-specific functional fragment thereof obtainable from a virus according to anyone of claims 1 to 9.
11. A vector comprising a nucleic acid according to claim 10.
- 10 12. A host cell comprising a nucleic acid according to claim 10 or a vector according to claim 11.
13. An isolated or recombinant proteinaceous molecule or MPV-specific functional fragment thereof encoded by a nucleic acid according to claim 10.
- 15 14. An antigen comprising a proteinaceous molecule or MPV-specific functional fragment thereof according to claim 13.
15. An antibody specifically directed against an antigen according to claim 14.
- 20 16. A method for identifying a viral isolate as an MPV comprising reacting said viral isolate or a component thereof with an antibody according to claim 15.
17. A method for identifying a viral isolate as an MPV comprising reacting said
- 25 viral isolate or a component thereof with a nucleic acid according to claim 10.
18. A method according to claim 16 or 17 wherein said MPV comprises a human MPV.
- 30 19. A viral isolate identifiable with a method according to anyone of claims 16 to 18 as a mammalian negative-sense single stranded RNA virus within the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus*.

WO 02/057302

107

PCT/NL02/00040

20. A method for virologically diagnosing an MPV infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a nucleic acid according to claim 10 or an antibody according to claim 15.
- 5 21. A method for serologically diagnosing an MPV infection of a mammal comprising determining in a sample of said mammal the presence of an antibody specifically directed against an MPV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof according to claim 13 or an antigen according to claim 14.
- 10 22. A diagnostic kit for diagnosing an MPV infection comprising a virus according to anyone of claims 1 to 9, a nucleic acid according to claim 10, a proteinaceous molecule or fragment thereof according to claim 13, an antigen according to claim 14 and/or an antibody according to claim 15.
- 15 23. Use of a virus according to any one claims 1 to 9, a nucleic acid according to claim 10, a vector according to claim 11, a host cell according to claim 12, a proteinaceous molecule or fragment thereof according to claim 13, an antigen according to claim 14, or an antibody according to claim 15 for the production of a pharmaceutical composition.
- 20 24. Use according to claim 23 for the production of a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of an MPV infection.
- 25 25. Use according to claim 23 or 24 for the production of a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of respiratory tract illnesses.
- 30 26. A pharmaceutical composition comprising a virus according to any one claims 1 to 9, a nucleic acid according to claim 10, a vector according to claim 11, a host cell according to claim 12, a proteinaceous molecule or fragment thereof according to claim 13, an antigen according to claim 14, or an antibody according to claim 15.

WO 02/057302

108

PCT/NL02/00040

27. A method for the treatment or prevention of an MPV infection comprising providing an individual with a pharmaceutical composition according to claim 26.
28. A method for the treatment or prevention of a respiratory illness comprising providing an individual with a pharmaceutical composition according to claim 26.
29. A method according to claim 27 or 28 wherein said individual comprises a human.
30. A method to obtain an antiviral agent useful in the treatment of respiratory tract illness comprising establishing a cell culture or experimental animal comprising a virus according to any one of claims 1 to 9, treating said culture or animal with an candidate antiviral agent, determining the effect of said agent on said virus or its infection of said culture or animal, and selecting an antiviral agent with the desired effect.
31. An antiviral agent obtainable according to the method of claim 30.
32. Use of an antiviral agent according to claim 31 for the preparation of a pharmaceutical composition.
33. Use according to claim 33 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of respiratory tract illness.
34. Use according to claim 32 or 33 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of an MPV infection.
35. A pharmaceutical composition comprising an antiviral agent according to claim 31.
36. A method for the treatment or prevention of an MPV infection comprising providing an individual with a pharmaceutical composition according to claim 35.

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

109

37. A method for the treatment or prevention of a respiratory illness comprising providing an individual with a pharmaceutical composition according to claim 35.

38. A method according to claim 36 or 37 wherein said individual comprises a human.

39. A method for virologically diagnosing an MPV infection of an animal comprising determining in a sample of said animal the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a nucleic acid or an antibody specifically reactive with a component of an avian pneumovirus (APV), said nucleic acid or antibody being cross-reactive with a component MPV.

40. A method for serologically diagnosing an MPV infection of an animal comprising determining in a sample of said animal the presence of an antibody directed against an MPV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof or antigen derived from an APV isolate or component thereof, said molecule, fragment or antigen selected for being essentially homologous with a component of MPV.

41. A method for virologically diagnosing an APV infection of a bird comprising determining in a sample of said bird the presence of a viral isolate or component thereof by reacting said sample with a nucleic acid according to claim 10 or an antibody according to claim 15 said nucleic acid or antibody being cross-reactive with a component of APV.

42. A method for serologically diagnosing an APV infection of a bird comprising determining in a sample of said bird the presence of an antibody specifically directed against an APV or component thereof by reacting said sample with a proteinaceous molecule or fragment thereof according to claim 13 or an antigen according to claim 14, said molecule, fragment or antigen selected for being essentially homologous with a component of APV.

43. A method according to anyone of claims 39 to 42 wherein said APV comprises APV-C.

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

110

44. Use of a diagnostic test designed to detect APV specific antibodies for the detection of an antibody directed against MPV.

5 45 Use according to claim 44 wherein said test comprises an enzyme immune assay (EIA).

46. A method for the detection of an antibody directed against MPV in a sample comprising testing said sample in a diagnostic test designed to detect APV specific
10 antibodies.

47. A method according to claim 46 wherein said test comprises an enzyme immune assay (EIA).

15

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

1/45

TABLE 1

| M | | | | | | | |
|--------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,77 | 0,87 | 0,75 |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,91 | 0,41 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,42 | 0,35 | 0,36 | 0,35 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,37 | 0,38 | 0,38 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,78 | 0,89 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,77 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| N | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,20 | 0,22 | 0,21 | 0,40 | 0,52 | 0,40 |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,59 | 0,30 | 0,18 | 0,21 | 0,18 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,31 | 0,21 | 0,23 | 0,21 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,21 | 0,23 | 0,21 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,42 | 1,00 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,42 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| F | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | APV-B |
| 00-1 | 1,00 | 0,32 | 0,33 | 0,37 | 0,67 | 0,80 | 0,66 |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,82 | 0,40 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,41 | 0,34 | 0,36 | 0,34 |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,38 | 0,38 | 0,39 |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,72 | 0,84 |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,72 |
| APV-B | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 |
| P | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | PMV | APV-A | APV-C | |
| 00-1 | 1,00 | 0,25 | 0,26 | 0,27 | 0,55 | 0,67 | |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,81 | 0,30 | 0,28 | 0,26 | |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,29 | 0,28 | 0,26 | |
| PMV | --- | --- | --- | 1,00 | 0,23 | 0,27 | |
| APV-A | --- | --- | --- | --- | 1,00 | 0,52 | |
| APV-C | --- | --- | --- | --- | --- | 1,00 | |
| L8 | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | APV-A | | | |
| 00-1 | 1,00 | 0,36 | 0,35 | 0,56 | | | |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,79 | 0,36 | | | |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,35 | | | |
| APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | | | |
| L9/10 | | | | | | | |
| | 00-1 | hRSV | bRSV | APV-A | | | |
| 00-1 | 1,00 | 0,30 | 0,30 | 0,53 | | | |
| hRSV | --- | 1,00 | 0,83 | 0,34 | | | |
| bRSV | --- | --- | 1,00 | 0,32 | | | |
| APV-A | --- | --- | --- | 1,00 | | | |

Fig. 1a

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

2/45

PCT/NL02/00040

Table 2

Seroprevalence of hMPV in humans categorised by age group using immunofluorescence and virus neutralisation assays

| Age (Years) | Immunofluorescence assays | | Virus neutralisation assays | | |
|-------------------|---------------------------|------------|-----------------------------|------------|-------------|
| | N tested | N positive | N tested | N positive | Titre range |
| < 1 | 20 | 5 | 12 | 3 | 16-32 |
| 1-2 | 20 | 11 | 13 | 4 | 16-32 |
| 2-5 | 20 | 14 | 8 | 3 | 16-512 |
| 5-10 | 20 | 20 | 4 | 4 | 32-256 |
| 10-20 | 20 | 20 | 4 | 3 | 32-128 |
| > 20 | 20 | 20 | 4 | 3 | 32-128 |
| 8-99 ¹ | 72 | 72 | 11 | 11 | 16-128 |

¹Sero-archeological analysis using sera collected in 1958

Fig. 1b

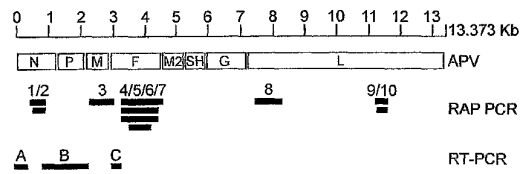


Fig. 2

[illegible]

Fig. 3, contd.

Fusion protein

[illegible]

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

6/45

Fig. 3, contd.

L polymerase RAP PCR fragment 8

```

00-1 fragment 8 -----TNNVLPESVLSFSDGAGTSCLLKSPYLNDNFAVALENVIERVLAKEVNSKASIDVK-----TWEPWQHE 77
APV-A      ME-LSRESV.....V.N...T.D.Y..B..HT.....Q..FAPK-LTSEB-R-----V..IM.K. 84
hRSV      MDPLDENST...T.....C.L.L.Y..DG.....Y.NLISRK.L...IN..KSLIQSPVTK.NRGELGLE..TYP.SL 90
hRSV      MDPLDNGSA...T.G.....C.L.L.YIPNG.....Y.NLISRK...L...NM..KSLTQSL..K.HGSHKLE..TYP.SL 90

00-1 fragment 8 LM--KAVNSCLL-----CLLQQLSRSHSLTALNMICDALLQL-----STSDOTSLSFDIVEH----- 13
APV-A      LM--VAVGAR.....KK..KH.G...D..SV..K.VT...K.S-----Q..PGRGK.LDR.Q..NE----- 13
hRSV      L.TY.SLST.S..IYTT..F.KIIR.ALE..DV.VYA.LNK.G..ENKNVRC-----DQTN.TLGNIVDNLVVISDRTSTKPNSSCK 17
hRSV      L.TY.SMT.S.QIATN...KILR.ALE..DV.VYA.LNK.G..SKDKISNNGQE.NSV.TTI.KODLSAVKNGSHLAGAGHSYK 18

00-1 fragment 8 -----PSWENWERNWNLNKLLEPRAGEVIRGSEIL-----CHSLGQLVPSVSGCIVANNGKGVSPPTYNALL 20
APV-A      -----D.LEH..DS.LI..DV.QST.CD..SQ.SA..--RK.SLNEF.A...F...II.R..R..IC.C..... 20
hRSV      EQPIKTTILCKLSRGHP.T.IER..HLYK..DILTOY.TN.ASH.Y..IDT.T..RFQ.LNQ.....YHK.L.KITIT....F. 26
hRSV      OKDPIATLLAGACSGHP...LER..HLYK..NULTQY.SN..KOH.FT.IDWCH.SGFQ.LNQ.....YHSEL..ITVT....F. 27

00-1 fragment 8 TNGDMLSHFHWCHPVSSELDNCHGSLSEHL-----Q----- 23
APV-A      ...LA.....L.V...C..SA.D.L...K.VGELLER----- 24
hRSV      ...LS...L.VCHIT.I..C..TLNKS...C----- 30
hRSV      ...LS...L.VCHIT.I..C..TLNKS...C----- 30

```

L polymerase RAP-PCR fragment 9/10

```

00-1 fragment 9/10 --KLVNKLTSQGHIPROKIM/TLGRMLMP--TIRGQRDQ--FLANKENYFYSNMLIESTGALACHNGHITDQC 72
APV-A      --F.S.B..VT.....N..H..IWK...L.L.--VSSNNON-----KEAT..F.N...IV.A.TSC..C...TV..LST 72
hRSV      --CKRMGVIR..M.L...SLSQVVELFSRE..L.NSFLSSRLAVH.NSD..LHXYV--..TN..G..IM.LQAK 76
hRSV      DTHGKGVIR..M.L...SLSQVVELFSRE..L.NSFLSSRLAVH.NSD..NPTI--..TN..G..IL.TQDK 77

00-1 fragment 9/10 TSNHIFKNDNGSGPISDHAIDMKIFLCVFKKILC 10
APV-A      T..S..Q.E.....T...IN.TW..MS...Y...HW 11
hRSV      DSEG..E...E.Y.T..M.L.LNV.FDAY..Y. 11
hRSV      DSEG..E...E.Y.T..M.LNV.FDAY..Y. 11

```

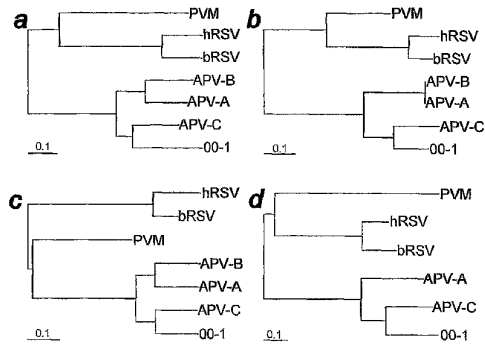


Fig. 4

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

8/45

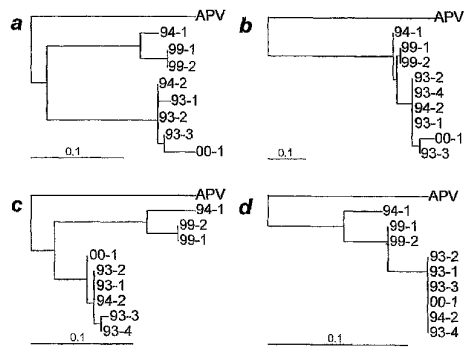


Fig. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

11/45

Fig. 6A, contd.

138C
 140C
 142C
 144C
 146C
 148C
 150C
 152C
 154C
 156C
 158C
 160C
 162C
 164C
 166C
 168C
 170C
 172C
 174C
 176C
 178C
 180C
 182C
 184C
 186C
 188C
 190C
 192C
 194C
 196C
 198C
 200C
 202C
 204C
 206C
 208C
 210C
 212C
 214C
 216C
 218C
 220C
 222C
 224C
 226C
 228C
 230C
 232C
 234C
 236C
 238C
 240C
 242C
 244C
 246C
 248C
 250C
 252C
 254C
 256C
 258C
 260C
 262C
 264C
 266C
 268C
 270C
 272C
 274C
 276C
 278C
 280C
 282C
 284C
 286C
 288C
 290C
 292C
 294C
 296C
 298C
 300C
 302C
 304C
 306C
 308C
 310C
 312C
 314C
 316C
 318C
 320C
 322C
 324C
 326C
 328C
 330C
 332C
 334C
 336C
 338C
 340C
 342C
 344C
 346C
 348C
 350C
 352C
 354C
 356C
 358C
 360C
 362C
 364C
 366C
 368C
 370C
 372C
 374C
 376C
 378C
 380C
 382C
 384C
 386C
 388C
 390C
 392C
 394C
 396C
 398C
 400C
 402C
 404C
 406C
 408C
 410C
 412C
 414C
 416C
 418C
 420C
 422C
 424C
 426C
 428C
 430C
 432C
 434C
 436C
 438C
 440C
 442C
 444C
 446C
 448C
 450C
 452C
 454C
 456C
 458C
 460C
 462C
 464C
 466C
 468C
 470C
 472C
 474C
 476C
 478C
 480C
 482C
 484C
 486C
 488C
 490C
 492C
 494C
 496C
 498C
 500C
 502C
 504C
 506C
 508C
 510C
 512C
 514C
 516C
 518C
 520C
 522C
 524C
 526C
 528C
 530C
 532C
 534C
 536C
 538C
 540C
 542C
 544C
 546C
 548C
 550C
 552C
 554C
 556C
 558C
 560C
 562C
 564C
 566C
 568C
 570C
 572C
 574C
 576C
 578C
 580C
 582C
 584C
 586C
 588C
 590C
 592C
 594C
 596C
 598C
 600C
 602C
 604C
 606C
 608C
 610C
 612C
 614C
 616C
 618C
 620C
 622C
 624C
 626C
 628C
 630C
 632C
 634C
 636C
 638C
 640C
 642C
 644C
 646C
 648C
 650C
 652C
 654C
 656C
 658C
 660C
 662C
 664C
 666C
 668C
 670C
 672C
 674C
 676C
 678C
 680C
 682C
 684C
 686C
 688C
 690C
 692C
 694C
 696C
 698C
 700C
 702C
 704C
 706C
 708C
 710C
 712C
 714C
 716C
 718C
 720C
 722C
 724C
 726C
 728C
 730C
 732C
 734C
 736C
 738C
 740C
 742C
 744C
 746C
 748C
 750C
 752C
 754C
 756C
 758C
 760C
 762C
 764C
 766C
 768C
 770C
 772C
 774C
 776C
 778C
 780C
 782C
 784C
 786C
 788C
 790C
 792C
 794C
 796C
 798C
 800C
 802C
 804C
 806C
 808C
 810C
 812C
 814C
 816C
 818C
 820C
 822C
 824C
 826C
 828C
 830C
 832C
 834C
 836C
 838C
 840C
 842C
 844C
 846C
 848C
 850C
 852C
 854C
 856C
 858C
 860C
 862C
 864C
 866C
 868C
 870C
 872C
 874C
 876C
 878C
 880C
 882C
 884C
 886C
 888C
 890C
 892C
 894C
 896C
 898C
 900C
 902C
 904C
 906C
 908C
 910C
 912C
 914C
 916C
 918C
 920C
 922C
 924C
 926C
 928C
 930C
 932C
 934C
 936C
 938C
 940C
 942C
 944C
 946C
 948C
 950C
 952C
 954C
 956C
 958C
 960C
 962C
 964C
 966C
 968C
 970C
 972C
 974C
 976C
 978C
 980C
 982C
 984C
 986C
 988C
 990C
 992C
 994C
 996C
 998C
 1000C

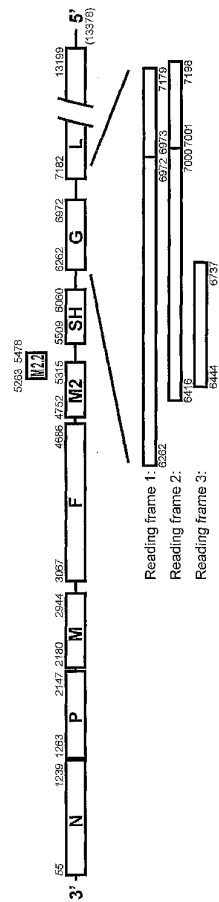


Fig. 7

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

14/45

Fig. 8

50
HMPV MSLQGIHLSDLSYKHALKESQYTIKRDVGTITAVTSSLOQOEITLCCGE
APVCQ.....R.VS....
APVB ..ES.R...E.....D.....R...A...I...E...PKVST...M
APVA ..ES.R...E.....ED.....R...A...I...E...PKVST...M
HRSVA .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KHLNK...M
HRSVB .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KHLNK...M
BRSV .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KHLNK...M
PVM ...DLIK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SHAM.KALARTL.M
100
HMPV ILYAKHADYKAAEIGIQYISTLGSERVOQLRNGSSEVOVLIPTISL
APVCT...SH...V.M.V...T...A...T...K.....A...K...
APVB ..F.....EE...QV.M.....ADWT...KS.....G.M.KIVT...
APVA V.F...T...EP...V.M.....AD.T...K.....G.M.KIVT...
HRSVA L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR..R.DTIK...DA.YH.KANGVDVTH
HRSVB L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR..R.DTIK...KDA.YH.KANGVDVTH
BRSV L.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR..R.DTIK...KDA.YH.KANGVDVTH
PVM F.LTAFNRCEEV...L.AMSL.RDDSIK...EA.YN.KC.D.QKDF
150
HMPV GKIKNNKGEDLQMLDTHGVKSWEEDKARKTMATLKESGNIQONO
APVC ..G.S...E.....R...I.V.....SAT.DN..P....
APVB PAECPIR--KREV.N.DIGPA.ADNVERT..E.SLMV..K-AQ..K...
APVA SAKGVR--KREV.N.D.GV.ADVVERTT.EA.GMVA..K-VOLTK...
HRSVA RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSTIQVN.EI.S.SYKKN...M-EVAPEY
HRSVB RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSTIQVN.EI.S.SYKKN...M-EVAPEY
BRSV RQDV.G.EMKFEV.TLSSLTSTIQVN.EI.S.SYKKN...M-EVAPEY
PVM TTKLQG.EYKI.V...V.IDAANLADLTQ..GVV.KE..TG-ARL.D.R
200
HMPV RPSADPTIIECVSEETETKESTIEVGLTUTVRANNVESDALKETPR
APVC ..S.A...I.....I.....A.....N.....F...
APVB K...L.A.V...I.....V...AI...S...IS...
APVA K...L.A.V...I.....V...AI...S...IS...
HRSVA .HDS..CGM...I..A..VI...AGDRS..TAVI...N.KNEM...KG
HRSVB .HDS..CGM...I..A..VI...AGDRS..TAVI...N.KNEM...KG
BRSV .HDS..CGM...I..A..VI...AGDRS..TAVI...N.KNEM...KG
PVM .HD...CGV...I..A..VVS...AGDRG..DAVR...LN.KAKKA...N
250
HMPV MDIKKARSEYEDDEQKQVHRSVLRNKSAGSSSESAGSBLKONIRNQ
APVC I.....
APVB ..R..K..FE...K...Y.N.....T.S..RM.....
APVA ..R..K..FE...K...Y.N.....T.S..RM.....
HRSVA LLPKD..N...EV..KHEPLDV.VHF.T.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
HRSVB LLPKD..N...EV..KHEPLDV.VHF.T.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
BRSV LLPKD..N...EV..KHEPLDV.VHF.T.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
PVM .EVK...E.....R..P.YLDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N
300
HMPV VZGAGQZMLRWG...TARSSNNILAHV...QAEKKGQWVYVYVRENGPESG
APVCR...V.....R...S.....K.....
APVBR...V.....R...S.....K.....
APVAR...V.....R...S.....K.....
HRSVAV.....L.K.VK...A...ME..V...EYAKL.G.A.
HRSVBV.....L.K.VK...A...ME..V...EYAKL.G.A.
BRSVV.....L.K.VK...A...ME..V...EYAKL.G.A.
PVMV.....L.K.VK...A...ME..V...EYAKL.G.A.
350
HMPV DMLKSGENAGILSLANCNEASVYLAJSESGHETIRGRVPATLPSA
APVCM.....L.....
APVBTS.....A.....K..A..L...
APVAT.....A.....K..A..L...
HRSVA FY.IIANN...S...TQF..H.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
HRSVB FY.IIANN...S...TQF..H.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
BRSV FY.IIANN...S...TQF..H.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
PVM FY.T.NN...S...T...T...A...S.K.APR..P...D.
385
HMPV AESVAKLSEKNKINFSSGLTDEEKAARHFLNVSDDS-QNDYE
APVCR.....E.....N...INEEG-...
APVBR.....ED.R...TST.GGD.EK-SQKE...
APVART.R.W...LA...D.R...TST.GGD.EK-SQKE...
HRSVA .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IK.O..PK.N--DVEL-
HRSVB .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IK.O..PK.N--DVEL-
BRSV .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IK.O..PK.N--DVEL-
PVM .KD..SR..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQO..IV..TFDD.I-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

15/45

Fig. 9

```

50
HMPV MSPFEGKDLPMNGEAKLAEPKSLKMPGHEKS-----OSIIGK
APVC .....L.....A.....R.K.I..R.I.....N.D
APVB .....M.S.....Y.O.IKISFV.....E.S.DP
APVA .....M.S.....M.D.Y.R...NTSAGS-----R.S..P
HRSVA ---M.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE.....
HRSVB ---M.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE.....
HRSV ---M.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE.....
FVM ---M.KFAPE.V.ED.N.K..E.L.HRSF.SE.FLAGINTATAVTKYM
100
HMPV VNTVSTELPTISRRPKTYISEKILMTAGGATKTKIQAIKVADEI
APVC LI.....V.K....KST.V.T.P.R.N..GE.PDZ.ASQTEZ.RNEAT.E
APVB .S...KVP..PLCSSTTS-----R.ACIPT-.STLFPK--
APVA I..IA.KVP..PLCN.TT.....SCI.PN-.APVPRVK--
HRSVA ---IKGKFTS.....KDPK.DS.ISVNS.
HRSVB ---IKGKFTS.....KDPK.DS.ISVNS.
HRSV ---LKGRITSS.....KDSK.DS.ISVNSV
FVM PPIRSSFK..SPVA.NL.E..A.P---TTPPP.PQON.SEQPKESDV
150
HMPV EEEESTKVKLPESDOKTBAKKLKATSTNHKK-----VSITPNEPGKYT
APVC DASRLV.EVFA.T.....GKETPEKP.....T.KND.S.R..
APVB .V.SIVP.LPIAPP.AMETAHPIGAKKQ.R-----K.ESSKA...
APVA .I.SIVP.LPIAPP.VD.TISTETESAKRS.....K.DMPKV...
HRSVA DI.VTK.SPITSN.TIIM.TRETDUAG.KPWYORKPL...KEDTPTSN
HRSVB DI.VTK.SPITSN.TIIM.TSEADSTETKAMVPRKPL...KEDTPTSN
HRSV DI.LPK.SPITSN.TIIM.TSEADSTETKAMVPRKPL...KEDTPTSN
FVM DI.THVC..FENPEHSAKPCGSDTD.NRT---RKM.T.VEP.EKTVG
200
HMPV KLEKDALDLSU-NEEDAEASSILTFEED--TSISTARLESIERKIS
APVC ..ME..E.....DD.....V.....K...A..L.....D...
APVB ..EE..E.....PD.DM.EK.V.....K...A.....A...
APVA ..EES.E.....PE.DM.EK..K...A.T.....A....
HRSVA FPS.LYKETITFTDMN--E.E.SYSY..INDQ.NDN--T...DR.D...
HRSVB FPS.LYKETITFTDMN--E.E.SYSY..INDQ.NDN--T...DR.D...
HRSV PPTRLYEETITFTDMN--E.E.SYSY..INDQ.NDN--T...DR.D...
FVM LGRSLYEETITFTDMN--E.N.S...TQERKLS.T.O..DE...
250
HMPV MTLGLLSTLNATAGPTAARDGIRDMDIGVRELIADITREKAKK-----
APVC .....V.....V.L.....
APVB .....M.K.E.S.....V.....NS.MA...
APVA .....M.R.....M.....NS.MT...D....
HRSVA E...M.H..VV.S...S.....L...M.EK.RT..LMTNDRL
HRSVB E...M.H..VV.S...S.....V.L...M.EK.RA..LMTNDRL
HRSV E.I.M.R..VV.S...S.....V.L...M.EK.RA..LMTNDRL
FVM Y.L...H.DM.....T...E.....EM.EK.LTNDRLV
300
HMPV -AENMEEMSGRSGKIGSGVGTAKAKELNITVEDETSCHSDEBEPK
APVC .....K.AK.K.....G.....L.....L.....L.....
APVB -I...IK..DA..A..D.....R...RM...S...S...S...
APVA -I...K..DT..A..D.....L...R...S...S...S...
HRSVA AM.RLRN..SERMA.DTSDE.S.NPTSEK..NLL.G-----N
HRSVB AM.RLRN..SERMA.DTSDE.P.NPTSEK..K.SDLG.....N
HRSV AM.RLRD..SERMA.DTSDE...FTSEK..MVL.....E
FVM AMEKLRD..C.RADTDGSAFY..DR.RI.D...SSNA-----E
316
HMPV CTQDMSQDDIYGLIM
APVC EEDSTNFD..L.S.T.
APVB EEDTDGDN...SFD.
APVA EESGDEBLS..N.DL
HRSVA .SDNDLSL.F-----
HRSVB .SDNDLSL.F-----
HRSV .SDNDLSL.F-----
FVM EAKEDLV...MGINF

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

16/45

Fig. 10

```

50
HMPV MRSYLVDTYQGTSTTAAYQVOLIETKDLLEASTITWFFLPQANTFFPAVLID
APVC .....V.....I.....V.....R.....V.....V.....P.....E
APVB .....II.....V.....I.....V.....RN.....K.....V.....SS.....AP....
APVA .....II.....V.....I.....SN.....T.....V.....SS.....AP....
HRSVA ..T.VNKLEH.SI.....XNVL.....DD.....V.M.....SSM.ADL.IK
HRSVB ..T.VNKLEH.SI.....XNVL.....DD.....V.M.....SSV.ADL.IK
BRSV ..T.VNKLEH.SI.....XNV.....DD.....V.M.....SSISADL.IK
PVM ..A.....EM.H.V.....LN.V.....HSANI.....V.I.M.....TSL.KNSVM.
100
HMPV QUKTLTITTLTARSGNGEILKVHSAQGANSEVLEKKETPMATVALDEIS
APVC .....D.....A.....S.D.S.S.....D...
APVB .....S.....Q.TV.PE.....V.Q.....T.....A.....S.S.AA.....
APVA .....S.....Q.T.PE.....V.Q.....A.....A.S.AA.....
HRSVA E.ANVN.LWKISTFK...S.R.MINSR.VLACH.S.TIC.N.S...R.
HRSVB E.ANVN.LWKISTFK...S.R.TINSR.VLACH.SM.LTS.N.S...R.
BRSV E.ANVN.LWKISTFK...S.XMINSR.VLACH.S.TIS.N.S...R.
PVM L.HDV.VICTQISTVN...MI..DL.SSN.GLATM.BQ.LI..II...IMG
150
HMPV KLEFDKLTVCETVTVLLTMKPYGMVSKVSSAKSVGKTHLIALCEPM
APVC .....L.A.....N.....A.....L
APVB ..D.GV.....D.RA.....L.....I.TRRRT..R.....I
APVA R..GT.....D.RSI.....L.....IMTVR..R.....I
HRSVA ..AY.VT.P..I.ACS..CL.SKN.LTTVKDLTKMTNF..I.....E.E
HRSVB ..AY.VT.P..I.ACS..CL.VKS.LTTVKDLTKMTNF..EI.....E.E
BRSV ..AY.IT.P..I.ACS..CL.VKN.LTTVKDLTKMTNF..EI.....E.E
PVM NMDYKVPVAFDR.SFCV.LL..RN.LTTVP.ITP.TRRF..E...V.S.H
200
HMPV DLEKHTPVITIPAKIKSVSINKSESATVEAIISSADQALTOAKIAPYAGL
APVC .....GV.....Y.....G.....I.....R.....
APVB ..M.RGI.....Y.A.....D.....G.....I.....R.....
APVA ..I..GV.I...Y.A.....D.....G.....I.....R.....
HRSVA NMTSKR.I..TYLR.I.VRNKDLN.L.NITTT.FKN.I.N...I..S..
HRSVB NMTSKR.I..TYLR.I.V.NKDLN.L.NIATT.FKN.I.N...I..S..
BRSV NMTSKR.V..T.LR.INV.AKDLN.L.NIATT.FKN.I.N...I..S..
PVM NMTYKSTN..V..RALY.RQGELS..Q.....DV.H.I.T.T.RV.....
250
HMPV IMIMTANNPAGIFKKLGASTQVIVELGAYVQRESISKICKTWSHQGTRYV
APVC .....V.....R..RN.....
APVB ..LLA.....A.....P.....LG.....N..R...I
APVA ..L.....M.....P.....LG.....N..R...I
HRSVA LLVI.VTDN..A..YIKQS.F..D.....LEK...YYVTIN.K.TA..FA
HRSVB LLVI.VTDN..A..YIKQS.F..D.....LEK...YYVTIN.K.TA..FS
BRSV LLVI.VTDN..A..YIKQS.F..D.....LEK...YYVTIN.K.TA..KS
PVM TLVINIST..A..L.X..S.IIA..P.LTQV.LHEVINN.K.T..S.I
258
HMPV LKSR-----
APVC .....
APVB .....
APVA ..R.....
HRSVA I.PMED--
HRSVB I.PLED--
BRSV I.PIED--
PVM ...SSTSG

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

17/45

Fig. 11

| Signal peptide | | 100 |
|----------------|---|-----|
| HRPV | -----MSKVVVIFSLITPQCKNESVLES-----TITTEGYSVLRTQNTNVTFLAVGVNLS-----ADGPS---LITKELDLKTSALRELRVTSADQ | |
| APVC | -----LLDLV.A.TG.B-----V.R-----R.E..R.E..K..... | |
| APVB | -----VQ.LLL.TV.VWSSGKD.T.S-----V.R.K-----S.QN.Q..... | |
| APVA | -----DVRCLLEF.IGN.SSCIQ.T.N-----V.R.K-----N.E.N..I.N-----D.V..N..K..... | |
| HRSPA | MEELLIKONALITFLAVPFCFASGQILTFYQSTAVSR.F.A.....S.I.I.LGNIEENHAGDAKVR...Q...KY.N.VT..QLIMOST | |
| HRSPB | WELLIRHAGIFILIA.HA.TL.SQNTL.EFYQSTAVSR.F.A.....S.I.I.LGNIEENHAGDAKVR...Q...KY.N.VT..QLIMOST | |
| HRSPV | WATTAMHII.IIIFITPTVH..LQNTL.EFYQSTAVSR.F.A.....S.V.I.LSGIQNNHAGDAKVR...Q...BRYNN.VV..QSLMONE | |
| PVM | ---HIFGRIPIVLIV..NTKIHFN.T.K.Y.SLVE.A.K.A.....HMT.MSTIKSQNTISA...SSN---LAE..ATYS..VD....L.SN- | |
| Fusion domain | | 200 |
| HRPV | LAREEQ-----TENPQSRFVIGALGVATAAVTAGVIAIARTILLESVTAIKNALAKTNEAVSTLNGVRLTAIVRLK | |
| APVC | ..K.RP-----MS..RS-----G.A...G.R.....ND.. | |
| APVB | ITK.NR-----LSR.NR-----G.K...L.RS.....ND.. | |
| APVA | V.K.SR-----LSR..SR-----L.G...G.R.....ND.. | |
| HRSPA | PPTNRRARELPRFNYTANAKSTNYTSK.RR.LG--FL..G--S.IAS..VS.VLH..G.NK..S.LS..K.VS.S..S..TSK.LD.. | |
| HRSPB | PANRRAREAPQYNTTPTQNLVNS.SK.RR.LG--FL..G--S.IAS.I.VS.VLH..G.NK.....LS..K.VS.S..S..TSK.LD.. | |
| HRSPV | P.SPSKAGSIPELHITRESANFYLESK.RR.LG--FL..G--S.AS..VS.VLH..G.NK.....LS..K.VS.S..S..TSK.LD.. | |
| PVM | -----ALASK..KCL.LG--LT..LG-----L...VQ....LRL.ND.VLNN...VS.T..MS...KV.DD.. | |
| | | 300 |
| HRPV | DVYKALTRANKONITADLQWVFSQNNRPLAVVROFSDNAGITFAISLDIWDAPLARAVSNMPTAGQTYLMLNHRMVRKQPGFLIGYQSS | |
| APVC | ..I..K..P...R...S.....G.Y.....V.....S.N..... | |
| APVB | E.I..K..P...Q...R...I..Z..G.N.....S...S.V.....VK.INR...S...S...N.....I...GT | |
| APVA | E.I..K..P...Q...R...I..I..G.N.....S...S.V.....D.V.INR...S...S...N.....I...DGT | |
| HRSPA | NYID.Q.LDV..QS.S.SNIEVIE.Q.K.N.L.EIA.E..V...V.TTP.TTML.NS..LSLIND..ITND.K...SS.VOI..QOSYSIMIEKEV | |
| HRSPB | NYID.Q.LDV..QS.S.SNIEVIE.Q.K.N.L.EIA.E..V...V.FEL.TTML.NS..LSLIND..ITND.K...SS.VOI..QOSYSIMIEKEV | |
| HRSPV | NYID.Q.LDV..QS.S.SNIEVIE.Q.K.N.L.EIA.E..V...V.FEL.TTML.NS..LSLIND..ITND.K...SS.VOI..QOSYSIMIEKEV | |
| PVM | N.I..E.LPK..RVE..VH.IEAVIR.Q.L.R.L.E.S.E..S...L.ETV.SFML.N..TSL.GG.NV...KRI..SSK..TM..N.LAI..SS.NDT | |
| | | 400 |
| HRPV | VIVVQLPFIQVIDTITVKAAMISG--KKNYSILREDDQFQKQAGSTVYYPNEKICSTAGDHVICTPAGINVAQCSQENINISITNYKVS | |
| APVC | ..V.I.....F.....D.V.S.....E.E..R...K..... | |
| APVB | ..V.....R.V..R--EES-----T.....A..D..V.D.Y.....SEVED..R...ST..... | |
| APVA | ..V.....E..R.V..R--E-----T.....A..A..KD..V.D.Y.....LEVED..Y...SK..... | |
| HRSPA | LA.V...LY.....RLATS..TPT.E.SN..T.T.R...D...VSFF.QAP..KVQSNR...NNSLPLESLIM..VD.FNR.K..IM | |
| HRSPB | LA.V...Y.....RLATS..TPT.E.SN..T.T.R...D...VSFF.QAP..KVQSNR...NNSLPLESLIM..VD.FNR.K..IM | |
| HRSPV | LA.V...Y.....RLATS..TPT.E.SN..T.T.R...D...VSFF.QAP..KVQSNR...NNSLPLESLIM..VD.FNR.K..IM | |
| PVM | LV.VI...L...M..L.VIRSSILNN--LADK..A.A.N..H...LS.F.SPT..KNGVA...LKSILPTDVM..TD.EN.K..IM | |
| | | 500 |
| HRPV | TSRHPSMELSELGALVAVKGVSTIGSNRVGIKQIAKESVITHQDADTVTIDNTVQLSKVEGEQHVIKGRFVSSDFPKFEDQFNVALDQVE | |
| APVC |D.M.....K...R.P.G...S.....T...K...N...IE.....I..... | |
| APVB |V...T..G..S..S.....K.....TH.P.NE..I.....V...RT..A..VNN.N.LL..... | |
| APVA |V...T..G..S..S.....K.....TH.P.NE..I.....V...RT..A..VNN.N.LL..... | |
| HRSPA | SKTDV.SSVITS..I.S.GUTH.PASNNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L..KLLYV..E.LINNY..LV..S.E.DASIS..N | |
| HRSPB | SKTDV.SSVITS..I.S.GUTH.PASNNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L..KLLYV..E.LINNY..LV..S.E.DASIS..N | |
| HRSPV | SKTDV.SSVITS..I.S.GUTH.PASNNR...TFSN..D.VS.KGV...SVG..L.YVN.L..KLLYV..E.LINNY..LV..S.E.DASIS..N | |
| PVM | SKTYY.TAV.TTL.C..L.GNH..VYN.DK...RT.ED..S.S.KGV.R.QVG...Y...EV.KSI.VR.E.LVLYT..LS..D.K.D..IRD.E | |
| HRB | | 583 |
| HRPV | ESTENQALVQSNRLSSAL---KNGTGFIVILLIIVLGGSMILVSVTLIKTKKPTG---AP-FELSGVTNNGFIPHN | |
| APVC | ..V.K.N.I...K..D.I.....A..V...V.VL.MLAAG.G.PVV..R.AAK---F..M.MN..N.K..... | |
| APVB | ..VDR.KD.I.K..DL.DLEV---S.I.ALA.TLIV..SMLI.VGIATVIV..R.AK.S---NGV.KTT.QS.M.Y.S-- | |
| APVA | ..DR..D.I.K..DL.GADR---SVA.IA.A.VVIV..ITFL.VVITYOSNR.TKRW---NGV.ATT.KSSRAVVS-- | |
| HRSPA | K.RQ..L.FTRK.DEL.HNVN--AS.ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IA.GLLYCKASS.P-VLSKDD...IN.IA.SN-- | |
| HRSPB | K.RQ..L.FTRK.DEL.HNVN--TG.ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IA.GLLYCKASS.P-VLSKDD...IN.IA.SN-- | |
| HRSPV | K.RQ..L.FTRK.DEL.H.VD--VG.ST.NIV.TT.I.VIIVVILM.IA.GLLYCKT.S.P-IMLKDQ...IN.IS.SK-- | |
| PVM | H..KCTPTTGA.DGL.DLS.NRBN.NIARV.LTT.LE.VILLI.NAVGPF.LY.VL.NRBNLAKSTP.L.VLS--- | |

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

18/45

Fig. 12

A

```

# # #
HMPV NSRKASCKEEMRCHGNGSEKAGSHNYGWEPRKYLIRSNVLEIKGLRNV
APVC ..S.....D.....N..M.EN...ST...Y
APVB ..GRN..R..T..R.....S.T.....HV..V.A..M...V...
APVA ..RN..R..T.....S.T.....HV..V.A..M...V...
HRSVA ..RN...F.I..H.LN.KR.H.S...FE..PHA..V.Q.FH..RI.KSM
HRSVB ..RN...F.I..H.LN.KR.H.S...FE..PHA..V.Q.FH..KI.KSM
HRSV ..RN...I..H.LN.KK.H.S...FE..PHA..V.Q.FH..KI.KSM
PVM ..VR...F..Q.F.S..RN..YS.K..E..LKT.ML.Q..M..RZY.FL

# 100
HMPV DRA-DGLSLTSGAAREDTQDFXLSSTNYQGYIDONOSITKAAACYSLE
APVC ..S.....L.....D.....N..M.EN...ST...Y
APVB ..T.....L.....A.....N..EG.TT..S...Y
APVA ..T.....L.....A.....N..EG.TT..S...Y
HRSVA ..KSI.T..E...AEL...EEYA..VVG.LES..GSINN...QS..VAMS
HRSVB ..KSI.T..E...AEL...EEYA..VVG.LES..GSINN...QS..VAMS
HRSV ..NM.T..E...AEL...EEYA..VIG.LES..GSINN...QS..VAMS
PVM ..TMP..AI.DV..FDAPQ..AEYA..VIG.LES..LEKTNV...SI..G..I

# 150
HMPV NIIKQLQEEVEVRQARDNKLSDSKHVALHNLVLSYEMS-KTPASLINNLK
APVC .....TD.....VD.....-.....-.....
APVB .....ND.KS...LAWD.P.....ID..-..N..N...S...
APVA .....ND.KTS...SM.E.F.....I...VD..-..N...S...
HRSVA KLIET.NEDDKKL...EEN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
HRSVB KLLAEINDDIKKL...EEN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
HRSV KLLAEINDDIKKL.NKEVPT.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
PVM TVLQN.DVGL.I...SNT.E.TNYLRSC.TI...IDKIL.K-RQI.HI..

# 195
HMPV RLPRKRLKRLKLLIDLSAGS--NDSSHALQSESTNQWQ---
APVC K..K.....E.....V..A..ASD---
APVB ..K.....I..Q...S.GE.AN.NT..KGD.S-----
APVA ..K.....I..Q...P..SD.A.GNT..KGD.N-----
HRSVA ..ADV...TI..IHKSIITN.PKESTVS.TNDHAKNDITG
HRSVB ..ADV...TI..IHKSIITN.PKESTVN.QMDQTKNDITG
HRSV ..ADV...TI..IHKSIITN.PKESTVN.QMDQTKNDITG
PVM ..VGV.CN.IQSV.SIEKINSKRT-----

# 50
HMPV -----MTLHMP-CKTVKALIKS-----EHGPVFTIIEVDIMW
APVC -----QLP...I..CT...G-----..H.LRMGL..V..
APVB -----FIVZ...R.T.V.R.N-----TL.VCLEPKTYEHN.I
APVA -----FVVI...R.R.T.I..N-----AL.LCMVKKIY.YS.A
HRSVA MTMPKIMILFDKY..-SITSI..TSRCRVMTYNGKNTLY.NQNNPNNHMY
HRSVB MTKPKIMILFDKY..-SISLI..SSSMLIATPNHKNILQ.NNNHL.NHQR
HRSV MNNGNIIIFPKY..-SISL...NENDVIVLSHQVLDLQFQFQNNY
PVM HQSDPICHLHSGEDKFTYENRM.RLPKTYPAIHRMYIIRVARNLTVDGS

# 97
HMPV THKDLKA---L---SDGIVKSKTNIYCNYLEIIEIYVKAYLS---
APVC ..KNS.VDI---I---TE...V.A..FK.R..D.....TF,----
APVB NLG..I.E---V---ARM.IID.I.RKQ.NECKRKDFEF.AV.T.YT--
APVA SWS..T.E---V---ANNVLID.I.RKQ.VECKRKDFEFAL.T.YN--
HRSVA SPNCTFNE---IHWT.QELIDTIQ.FLOHGLIED.YTIVILV,----
HRSVB LLNNIFDE---IHWT.PKNLLDATQGLQHLNIED.YTIVILV,----
HRSV SQNHMLD---IYWT.QELIDVLK.LHLGELS.SKYVIYVLV,----
PVM GPSTIID.GKSVVNRVDVLACVREALC.IEFSNNMQVITDFDYSQAR

```

B

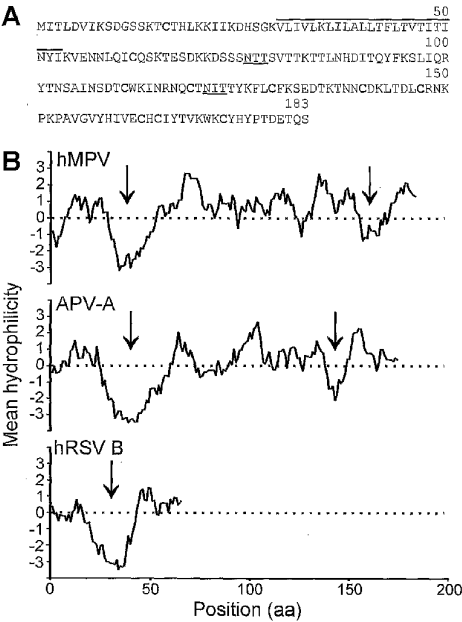
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

19/45

Fig. 13

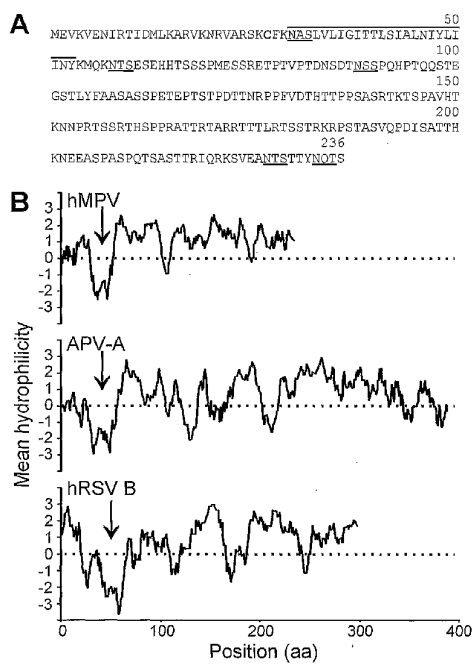


WO 02/057302

PCT/NL02/00040

20/45

Fig. 14



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

21/45

Fig. 15

A 674

HMPV NYIARSLIVTOLSKFNDAFRIYETTAICADVADRLHGTQSLFCWLHLIVFM
 APVASV.....T.SS
 HRSVASKQ.....I.....SC..S..L.....V.....F.....AI..H
 HRSVBSKQ.....I.....SC..S..L.....V.....S.....TI..L
 BRSVSKQ.....I.....SC..S..L.....V.....S.....TI..F
 HPIV2 FELSAGF.T...A.VCLNW.Q.IKLP.F.HAINQ.M.LPBF.E.I..RLDR
 NDV RRRVAF.F.T...Q.VCLNW.Q.IKLP.F.HAINQ.M.LPBF.E.I..RLDR
 SV YETLSGELT...K.VCLNW.F.S..LFGORCN.IF.FKTF.N.M.FVLEK
 HPIV3 YETVSGELT...K.VCLNW.F.S..LFGORCN.IF.FKTF.N.M.FVLEK
 MV YETVS.F.T...K.VCLNW.F.S..LFGORCN.IF.FKTF.N.M.FVLEK
 NIPAH FDTVS.F.T...K.VCLNW.F.S..LFGORCN.IF.FKTF.N.M.FVLEK

B 723

HMPV TTMICAYRHAPPETKGEYDIDKIEEDSLVRYHMGICGACORLWTEA
 APVAT.....D.C.G..I.....Q.P.....F.....M.....
 HRSVA V.I..T.....YIBDHIV.LMNVD.....I.....
 HRSVB V.I..T.....YIBDHIV.LMNVD.....I.....
 BRSV A.V..T.....YIBDHIV.LMNVD.....I.....
 HPIV2 S.LYVGDFPN..AATD-AF.L.VINGHIFIVSK.....L..M..IS
 NDVFVGDFFN..SDPT-DC.LSRVNDCHYIVSAR.....L.....IS
 SV C.IYVGDFYC.VADRM-HRQLQDRAHDSCTPIHNPR.....Y.....LIS
 HPIV3 S.IYVGDFYC..SD.E-HISLEHDFDSCTPIHNPR.....F.....LIS
 MV SVIVVSDP.C..DLR-HIPDI.VFNDCTFK.P.....Y.....TST
 NIPAH SVIVV.DENC..NIDK-HMELE.TP.DULETH.EK.....YS..T..IAT

C 772

HMPV ISLIDVSVKTRCQNHSLNGDNGSDVSKPKVLSGG-LDEVKADYSLAV
 APVARN.V.D.....R.TGA-QT.IQ.....I
 HRSVALI.L.GKFSI.A.I.....I.....R.M..-QTHAQ..L..L
 HRSVBLI.L.GKFSI.A.I.....I.....R.Y..-QTHAQ..L..L
 BRSVLI.L.GKFSI.A.I.....I.....I..N..-QTHAQ..L..L
 HPIV2 ..VILLS.ABSKTRV.MVQ...A.A.TTR.FR.LPSIQKELA.AASK
 NDV ..AALDAAARSH.RVCMVQ...V.A.TRE.RSDDSFEMVLTQLHQASD
 SV ..AALDAAARSH.RVCMVQ...V.A.TRE.RVQOTYKOKNHV.EEIT
 HPIV3 ..AALDAAARSH.RVCMVQ...V.A.TRE.RVQOTYKOKNHV.EEIT
 MV ..VY..VLAAYESCTK..VQ...T.A.T.R.FSTWPMKKREKAVR
 NIPAH ..EF..FLSAYE.NTRILATVQ...E..AATOK.BENLPMYKKEETCAKO.Q

D 822

HMPV KMLKEIRDAYRNIGHKLKEGETYISRDLOFISKVQSEGVMPTPIKRL
 APVA ...TAV...Y.....V.....M..T.....Y.AA...V..
 HRSVA NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V..
 HRSVB NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V..
 BRSV ..S..LLYKE.AS.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V..
 HPIV2 LFEERL.ANNYGL..Q..AQ..I..STFFIY..R.FYQ.RILTOAL.NAG
 NDV NFF..LIHVNH..N..DR..IR.DTFFIY..R.FYQ.RILTOAL.NAG
 SV RYFGAL.HVMDL..E..LN..I..SKMFVY..R.FYD.KIL.OCL.AHT
 HPIV3 REFDGL.EVMDL..E..LN..I..SKMFVY..R.FYD.KIL.OCL.AHT
 MV DYPVIL.OCLMD..H..AN..IV.SHEFFY..C.FYD.LVLSQAL.SAG
 NIPAH LYFERL.MNL.AL..N..AT..I..TH.FIY..K.FYD.LVLSQAL.SAG

847

HMPV RVGPWINTILODIKTSAESIGSLCQ
 APVAM.A.....
 HRSVAF.V.L.....T.
 HRSVBF.V.L.....T.
 BRSVF.V.M.....T.
 HPIV2 KLCLTADVLGECTQA.CSNSATTIM
 NDV KLVLVSGDLSENTVM.CAN.A.TVA
 SV .CVF..SE..LV..ETRSACSN.STSLA
 HPIV3 .CVF..SE..VI..ETRSACSN.STSLA
 MV .CVF..SE..V..ETRSACSN.ATTMA
 NIPAH .CCF..SE..LV..ETRSACSN.STTIA

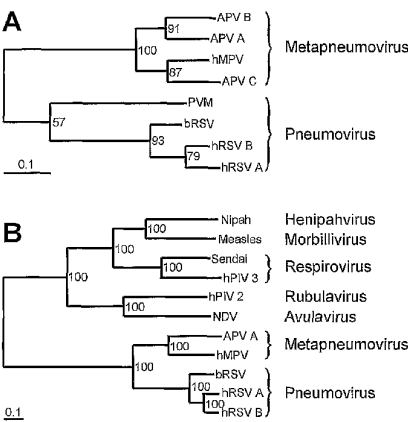
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

22/45

Fig. 16



[illegible]

Fig. 17

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

24/45

Fig. 18a

Comparison of two prototypic hMPV isolates with APV-A and APV-CDNA similarity matrices

| | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------------|
| N | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,862 | 0,757 0,660 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,757 0,663 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,656 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------------|
| P | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,811 | 0,677 0,588 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,674 0,593 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,584 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------------|
| M | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,865 | 0,766 0,695 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,773 0,707 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,705 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|----------|------|-------|-------|-------------|
| F | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,838 | 0,706 0,662 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,716 0,655 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,685 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|-------------|------|-------|-------|-------------|
| M2-1 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,863 | 0,764 0,668 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,744 0,657 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,670 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|-------------|------|-------|-------|-------------|
| M2-2 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,861 | 0,648 0,486 |
| 99-1 | --- | | 1,000 | 0,675 0,486 |
| APVC | --- | --- | | 1,000 0,463 |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|-----------|------|-------|------------|-------|
| SH | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,688 N.A. | 0,421 |
| 99-1 | --- | | 1,000 N.A. | 0,380 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|----------|------|-------|------------|-------|
| G | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | | 1,000 | 0,543 N.A. | 0,262 |
| 99-1 | --- | | 1,000 N.A. | 0,263 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

25/45

Fig. 18b

| <u>5'L</u> | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
|------------|-------|-------|------|-------|
| 00-1 | 1,000 | 0,835 | N.A. | 0,596 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,605 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

5'L: only the first 1500 nucleotides of 99-1 were available.
N.A.: sequence not available.

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

26/45

Protein similarity matrices

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------------|-------|
| N 00-1 | 99-1 | APVC | APVA | |
| 00-1 | 1,000 | 0,949 | 0,880 0,685 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,883 0,682 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,700 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

Fig. 19

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------------|-------|
| P 00-1 | 99-1 | APVC | APVA | |
| 00-1 | 1,000 | 0,860 | 0,683 0,552 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,676 0,549 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,528 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------------|-------|
| M 00-1 | 99-1 | APVC | APVA | |
| 00-1 | 1,000 | 0,976 | 0,874 0,775 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,874 0,763 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,775 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------------|-------|
| F 00-1 | 99-1 | APVC | APVA | |
| 00-1 | 1,000 | 0,938 | 0,810 0,677 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,803 0,674 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,719 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|------|-------|-------|-------------|-------|
| M2-1 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | 1,000 | 0,946 | 0,844 0,719 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,834 0,703 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,704 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|------|-------|-------|-------------|-------|
| M2-2 | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | 1,000 | 0,901 | 0,563 0,246 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | 0,577 0,232 | |
| APVC | --- | --- | 1,000 0,191 | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|------|-------|-------|------|-------|
| SH | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | 1,000 | 0,570 | N.A. | 0,178 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,162 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|--------|-------|-------|------------|-------|
| G 00-1 | 99-1 | APVC | APVA | |
| 00-1 | 1,000 | 0,326 | N.A. 0,094 | |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. 0,107 | |
| APVC | --- | --- | N.A. N.A. | |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

| | | | | |
|------|-------|-------|------|-------|
| 5'L | 00-1 | 99-1 | APVC | APVA |
| 00-1 | 1,000 | 0,921 | N.A. | 0,600 |
| 99-1 | --- | 1,000 | N.A. | 0,594 |
| APVC | --- | --- | N.A. | N.A. |
| APVA | --- | --- | --- | 1,000 |

5'L: only the first 500 amino acid residues of 99-1 were available.

N.A.: sequence not available.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

27/45

Fig.20

Amino acid sequence alignment of two prototype hMPV isolatesNucleoprotein (N)

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|------|---------------|-----------------|------------------|---------------|-------------|---------------------|
| 00-1 | MSLQGIHLSDDL | SYKHAILEKESQYTI | KRDVGTTTAVTPSSLQ | QEITLLCGEILYK | KHNDYK | 60 |
| 99-1 | MSLQGIHLSDDL | SYKHAILEKESQYTI | KRDVGTTTAVTPSSLQ | QEITLLCGEILYK | KHNDYK | 60 |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | YAAEIGIQYI | STALGSEVQQILRNS | SGSEVQVVLTRTYS | LGRKNNKGE | DLQMLDIHGVE | 120 |
| 99-1 | YAAEIGIQYI | STALGSEVQQILRNS | SGSEVQVVLTRTYS | LGRKNNKGE | DLQMLDIHGVE | 120 |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | KSWVEEIDKEARK | TMVTLKES | SGNIPQNRPS | ADPTPIILL | CVGALIFTK | LASTIEVGL 180 |
| 99-1 | KSWVEEIDKEARK | TMVTLKES | SGNIPQNRPS | ADPTPIILL | CVGALIFTK | LASTIEVGL 180 |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | ETTIVRRANRVLS | DALKRYPRMDIP | KIARSFYDLF | EQKVYHRS | LFIEYKAL | IGSSSTGSKA 240 |
| 99-1 | ETTIVRRANRVLS | DALKRYPRMDIP | KIARSFYDLF | EQKVYHRS | LFIEYKAL | IGSSSTGSKA 240 |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| 00-1 | ESLFVNIFMQAY | GAGQTMWRWGV | IARSSNNIML | GHVSVQAE | LKQVTEV | YDLVREMPESG 300 |
| 99-1 | ESLFVNIFMQAY | GAGQTMWRWGV | IARSSNNIML | GHVSVQAE | LKQVTEV | YDLVREMPESG 300 |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 00-1 | LLHLRQSPKAG | LLSLANCPNF | ASVVLGNAS | GLGIGMYR | GRVNT | ELFSAAESYAKSLKE 360 |
| 99-1 | LLHLRQSPKAG | LLSLANCPNF | ASVVLGNAS | GLGIGMYR | GRVNT | ELFSAAESYAKSLKE 360 |
| | 370 | 380 | 390 | | | |
| 00-1 | SNKINFSSLGL | TDDEEKEAAEH | FLNVS | DSQNDYE | | 394 |
| 99-1 | SNKINFSSLGL | TDDEEKEAAEH | FLNMS | DNQDDYE | | 394 |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

28/45

Fig.21

Phosphoprotein (P)

| | | | | | | | |
|------|-------------------------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|--|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| 00-1 | MSFPEGKDILFMGNEAAKLAEAFQKSLRKG | GHKRSQSIIGKVNTVSETLLEPTISRPAK | 60 | | | | |
| 99-1 | MSFPEGKDILFMGNEAAKLAEAFQKSLRKG | GHKRTQSIVGKVNTISETLLEPTISKPAR | 60 | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| 00-1 | PAIPSEPKLAWDKGGSTETETKPAKVMQPIREEST | EKKVLPSSDGKTPAEKKTKEST | 120 | | | | |
| 99-1 | STVILEPKLAWDNSQETETKPAKTPDPVEEEET | EKKVLPSSDGKTPAEKKTKEST | 120 | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| 00-1 | NKKKKVSFTENEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEDAE | SSILTFEERDTSSLSIEARLESIE | 180 | | | | |
| 99-1 | SKKKKVSFTSNEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEDAE | SSILTFEERDTSSLSIEARLESIE | 180 | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| 00-1 | EKLSMILGLRLTNIAATAGPTAARDGIRDAMIGVR | BELIADIIEAKGKAAEMMEEMSQ | 240 | | | | |
| 99-1 | EKLSMILGLRLTNIAATAGPTAARDGIRDAMIGVR | BELIADIIEAKGKAAEMMEEMNQ | 240 | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | | |
| 00-1 | RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEE | EPKDTQDNSQDDIYQLIM | 294 | | | | |
| 99-1 | RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEE | EPKDTQDNQDDIYQLIM | 294 | | | | |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

29/45

Fig.22

Matrix protein (M)

| | | | | | | |
|------|-------------------|------------|---------|--------|----------|------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MESYLVDITYQGIPYTA | AVQVDLIEKD | LLPASLT | IFWFLQ | ANTPPAV | LLDQLKTLTITTL 60 |
| 99-1 | MESYLVDITYQGIPYTA | AVQVDLIEKD | LLPASLT | IFWFLQ | ANTPPAV | LLDQLKTLTITTL 60 |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | YAASQNGPILKVN | ASAQGA | MSVLPKK | FEVNAT | VALDEYSK | LEFDKLTVC |
| 99-1 | YAASQNGPILKVN | ASAQGA | MSVLPKK | FEVNAT | VALDEYSK | LEFDKLTVC |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | KPYGMVSKFVSS | AKSVGK | KTHDLL | ALCDFM | DLKNT | PVTIPAFIKSVS |
| 99-1 | KPYGMVSKFVSS | AKSVGK | KTHDLL | ALCDFM | DLKNT | PVTIPAFIKSVS |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | ISSEADQALTQAK | IAPYAG | LIMIMT | MNNPKG | IFKKLG | AGTQVIVELGAY |
| 99-1 | ISSEADQALTQAK | IAPYAG | LIMIMT | MNNPKG | IFKKLG | AGTQVIVELGAY |
| | 250 | | | | | |
| 00-1 | TWSHQGTRIVL | KSR | 254 | | | |
| 99-1 | TWSHQGTRIVL | KSR | 254 | | | |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

30/45

Fig.23

Fusion protein (F)

| | | | | | | |
|------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MSWKVVIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC | 60 | | | | |
| 99-1 | MSWKVMIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC | 60 | | | | |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGATLGVATAAAVTA | 120 | | | | |
| 99-1 | TGDPISLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGATLGVATAAAVTA | 120 | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | GVIAIAKTIRLESEVDAIKKALKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTSAINKN | 180 | | | | |
| 99-1 | GVIAIAKTIRLESEVDAIKKALKKTNEAVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTSAINKN | 180 | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 00-1 | KCDIADLKMAVFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQ | 240 | | | | |
| 99-1 | KCDIADLKMAVFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQ | 240 | | | | |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| 00-1 | IKLMLENRAMVRRKGFCLIGVYGSSVIYMQLPPIFGVIDTPCWIVKAAAPSCSEKGNYA | 300 | | | | |
| 99-1 | IKLMLENRAMVRRKGFCLIGVYGSSVIYMQLPPIFGVIDTPCWIVKAAAPSCSEKGNYA | 300 | | | | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 00-1 | CLLRDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNY | 360 | | | | |
| 99-1 | CLLRDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFVCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNY | 360 | | | | |
| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| 00-1 | CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNVVGIIKQINRGCSYITNQDADTVTI | 420 | | | | |
| 99-1 | CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNVVGIIKQINRGCSYITNQDADTVTI | 420 | | | | |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| 00-1 | DNTIVYQLSKVEGEQHVIGRPFVSSSFDVVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI | 480 | | | | |
| 99-1 | DNTIVYQLSKVEGEQHVIGRPFVSSSFDVVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI | 480 | | | | |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | |
| 00-1 | LSSAEKGNTGFIIVVILVAVLGTMTISVSTIIIIKKTKKPTGAPPELNGVTNNGFIPHN | 539 | | | | |
| 99-1 | LNSAEKGNTGFIIVVILVAVLGTMTISVSTIIIIKKTKKPTGAPPELNGVTNNGFIPHS | 539 | | | | |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

31/45

Fig.24

22K protein (M2-1)

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|------|-------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| 00-1 | MSRKAPCKYEV | RGKCNRGSECK | FNHNYSWPD | RYLLIRSNYLL | NQLLENTDR | ADGLSIIS 60 |
| 99-1 | MSRKAPCKYEV | RGKCNRGSDCK | FNHNYSWPD | RYLLLRSNYLL | NQLLENTDK | ADGLSIIS 60 |

| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|------|-------------|-------------|-------------|----------|---------|----------------|
| 00-1 | GAGREDRTQDF | VLGSTNVVQGY | IDDNQSTTKAA | ACYSLHNI | IKQLQEV | RQARDNKLSD 120 |
| 99-1 | GAGREDRTQDF | VLGSTNVVQGY | IDDNQSTTKAA | ACYSLHNI | IKQLQEV | RQARDNKLSD 120 |

| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|------|------------|------------|-----------|----------|----------|---------------------|
| 00-1 | SKHVALHNLV | LSYMEMSKTP | PASLINNLK | RLPREKLK | KLAKLIID | LSAGENDSSYALQDS 180 |
| 99-1 | SKHVALHNLV | LSYMEMSKTP | PASLINNLK | RLPREKLK | KLAKLIID | LSAGENDSSYALQDS 180 |

| | 187 |
|------|-------------|
| 00-1 | ESTNQVQ 187 |
| 99-1 | ESTNQVQ 187 |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

32/45

Fig.25

M2-2 protein (M2-2)

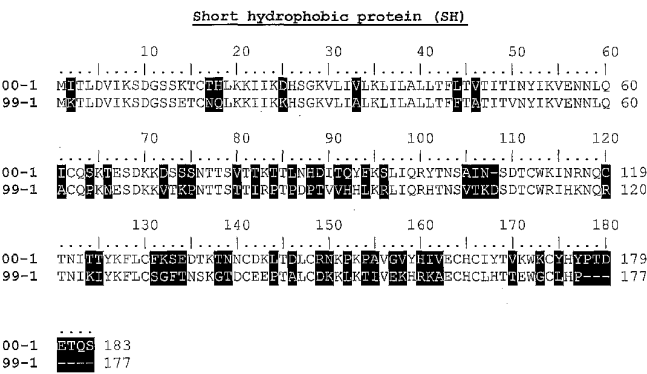
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|------|---|--------|--------------|------------|------------|----|
| | | | | | | |
| 00-1 | MTLHMPCKTVKALIKCSEHGP | VFITIE | DDMIWTHKDLKE | ALSDGIVKSH | TNIYNCYLEN | 60 |
| 99-1 | MTLHMPCKTVKALIKCSKHGPK | VFITIE | DDMIWTHKELKE | ALSDGIVKSH | TNIYNCYLEN | 60 |
| | | 70 | | | | |
| | | | | | | |
| 00-1 | IEIIYVK | YLS | 71 | | | |
| 99-1 | IEIIYVK | YLS | 71 | | | |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

33/45

Fig.26



WO 02/057302

PCT/NL02/00040

34/45

Fig.27

Attachment glycoprotein (G)

| | | | | | | |
|------|-----------|----------------|------------|---------|------------|---------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 00-1 | MEVKVENIR | TDMLKARVKNRVAR | SKCFKNASLV | LIGITL | LSIALNIYLI | INYKMKKNTS 60 |
| 99-1 | MEVRVENIR | TDMLKAKIKNNRIR | SRRCYRNATL | LILIGLT | LSMALNIFLI | DHATLRNMI 60 |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 00-1 | ESERH | SSSPMSSSR | ETPTIVET | DNSTNS | SPCHTQ | CSSTLYFASAS |
| 99-1 | KTENCAN | MPESAE | PSKKTP | MTSTAG | NTKENP | QATQMTTE |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 00-1 | PD | TNRPP | EVDTHT | EP | SASR | TKTS |
| 99-1 | SD | TA | PQQT | TD | HT | APL |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | |
| 00-1 | S | IRK | EP | ST | AS | VQ |
| 99-1 | N | T | W | N | I | R |

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

35/45

Fig.28

N-terminus of polymerase protein (L)

```

      10      20      30      40      50      60
00-1 MDPLNESTVNVVLPDSYLKGVISFSETNAIGSCLLRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL 60
99-1 MDPLNESTVNVVLPDSYLKGVISFSETNAIGSCLLRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL 60

      70      80      90     100     110     120
00-1 KNAVTSSKMKISDYKIVEPVNMQHEIMKNVHSCELTLLKQFLTRSKNISTIKLNMICDWLQ 120
99-1 RNAVTSSKMKISDYKIVEPVNMQHEIMKNVHSCELTLLKQFLTRSKNISSIKLNMICDWLQ 120

     130     140     150     160     170     180
00-1 LKSTSDDTSILSFIDVEFIPSWVSNWFSNWNYNLNLKLILEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV 180
99-1 LKSTSDNTSILNFIDVEFIPSWVSNWFSNWNYNLNLKLILEFRREEVIRTGSILCRSLGKLV 180

     190     200     210     220     230     240
00-1 FVVSSYGCIVKSNSKRVSFFTYNQLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNSLNENQEGLGLRS 240
99-1 FIVSSYGCVCVKSNKSKRVSFFTYNQLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNSNLNENQEGLGLRS 240

     250     260     270     280     290     300
00-1 NLQGLLTNKLYETVDYMLSLCCNEGFSLVKEFEGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG 300
99-1 NLQGMLTNKLYETVDYMLSLCCNEGFSLVKEFEGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG 300

     310     320     330     340     350     360
00-1 LTDQLTLRKNKNRRRVIGTVLENNDYPMYEVVLKLGDTLRCIKLLINKNLENAEELYYI 360
99-1 LTEQLSLLRKNKNRRRVIGTVLENNDYPMYEVVLKLGDTLRCIKLLINKNLENAEELYYI 360

     370     380     390     400     410     420
00-1 FRIFGHPMVDERDAMDAVKLNNEITKILRESLTELRGAFILRIKGFVDNNKRWPKIKN 420
99-1 FRIFGHPMVDEREAMDAVKLNNEITKILRESLTELRGAFILRIKGFVDNNKRWPKIKN 420

     430     440     450     460     470     480
00-1 LKVLSKRWEMYFKAKSYPSQELELSVQDFLELAAIQFEQEFSVPEKTNLEMVLNDKAISPP 480
99-1 LKVLSKRWEMYFKAKSYPSQELELSVQDFLELAAVQFEQEFSVPEKTNLEMVLNDKAISPP 480

     490
00-1 KRLIWSVYPKNYLPERIKN 499
99-1 KRLIWSVYPKNYLPERIKN 499
```

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

36/45

Fig. 29

+ = positive; - = negative; T = throatswabs; NO = nose swab; N = not done; ? = not sure;
D = dead; 0 to 12: days post infection. 2e infection is only tested on nose swabs.

| nr | 1 ^e infection | swab | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 8 | 10 | 11 | 12 | 2 ^e infection | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|--------------------------|------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 00-1 | T | - | + | + | + | - | + | + | + | - | - | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 00-1 | T | - | + | + | + | + | + | - | - | - | D | - | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | + | - | D | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 00-1 | T | - | - | ? | - | - | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | ? | N | N | N |
| | | NO | - | + | ? | ? | - | - | N | - | - | - | - | - | - | ? | + | + | - |
| 4 | 00-1 | T | - | + | + | + | + | + | - | ? | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | ? | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 5 | 00-1 | T | - | ? | + | + | + | + | + | + | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 00-1 | T | - | - | + | + | + | + | - | + | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | + | + | ? | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 99-1 | T | - | - | - | + | + | - | - | D | - | - | - | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | - | + | + | + | N | D | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 99-1 | T | - | - | + | + | - | - | - | - | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | ? | - | + | + | ? | N | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 9 | 99-1 | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | N | 00-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | - | - | - | + | + | N | - | - | - | - | - | ? | + | + | - | - |
| 10 | 99-1 | T | - | - | - | + | + | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | 99-1 | T | - | - | + | + | + | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | ? | + | + | + | N | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 12 | 99-1 | T | - | - | + | + | ? | - | - | - | - | N | 99-1 | N | N | N | N | N | N |
| | | NO | - | + | + | + | + | + | N | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

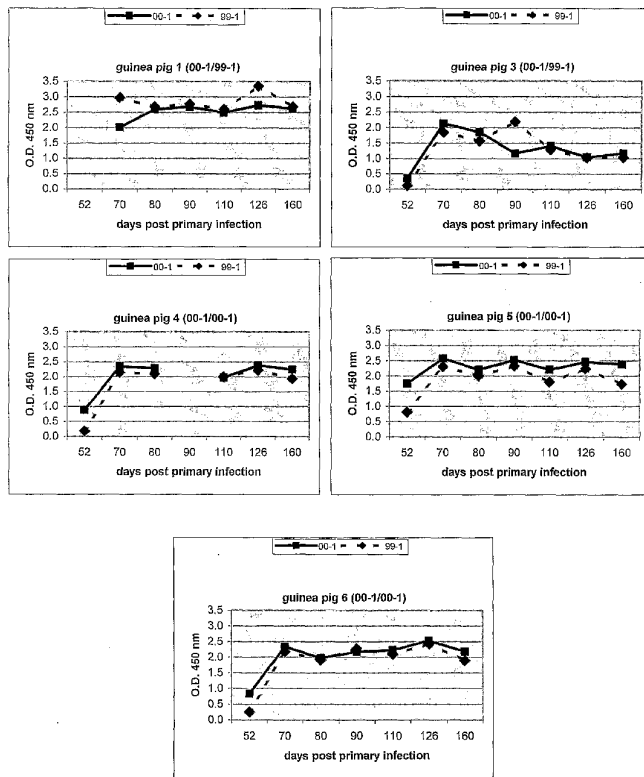
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

37/45

Fig. 30A



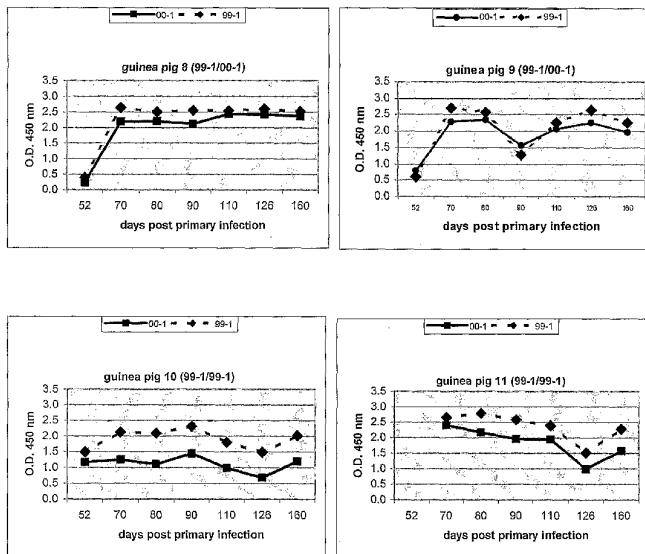
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

38/45

Fig. 30B



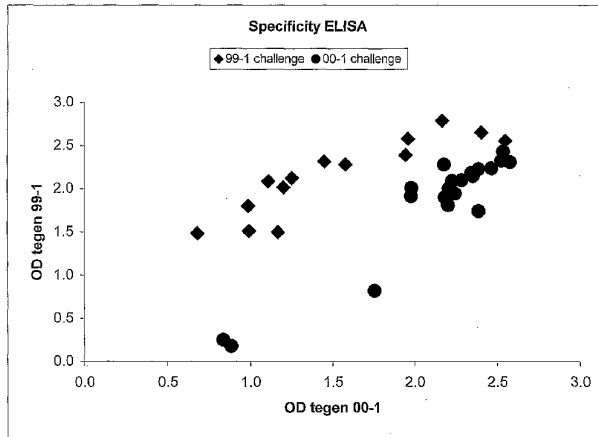
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

39/45

Fig. 31

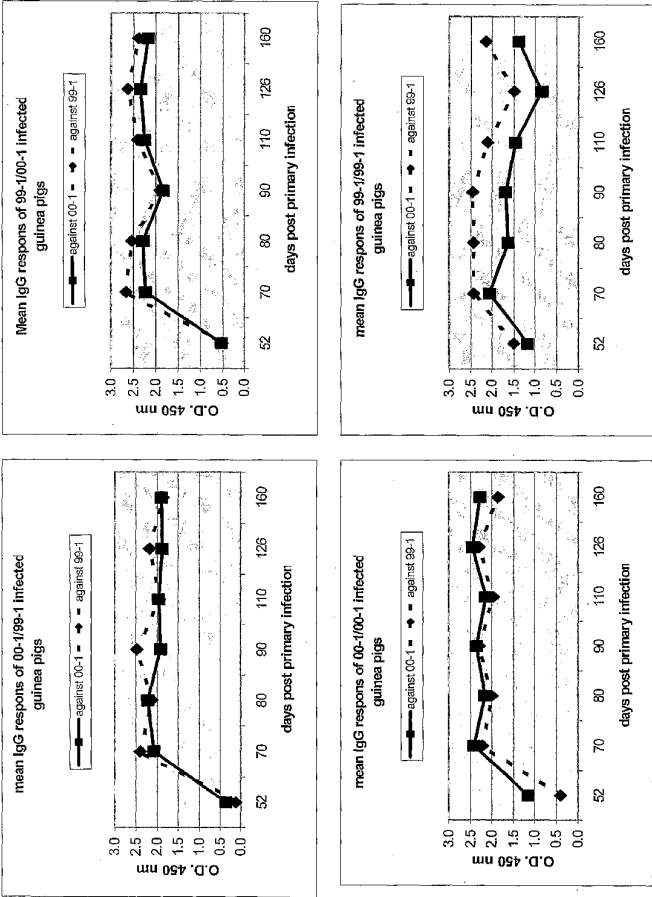


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

Fig. 32

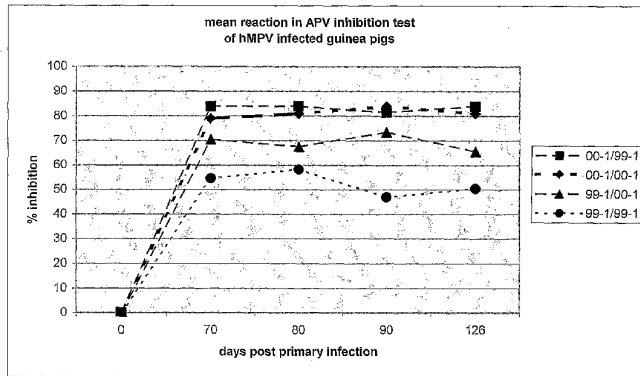


WO 02/057302

PCT/NL02/00040

41/45

Fig. 33



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/057302

PCT/NL02/00040

42/45

Fig. 34

| | Against 00-1 | Against 99-1 | Against APV-C |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 infection with 00-1 | | | |
| 2 infections with 00-1 | | | |
| 1 infection with 99-1 | | | |
| 2 infections with 00-1 | | | |

Fig. 35

+ = positive; - = negative; N = not done; ? = not sure; 0 to 10: days post infection

| nr | 1 st infection | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 2 nd infect ion | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 10 |
|----|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 3 | 00-1 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | N | - | - | + | + | + | + | - | ? | - |
| 6 | 00-1 | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - |

Fig. 36A

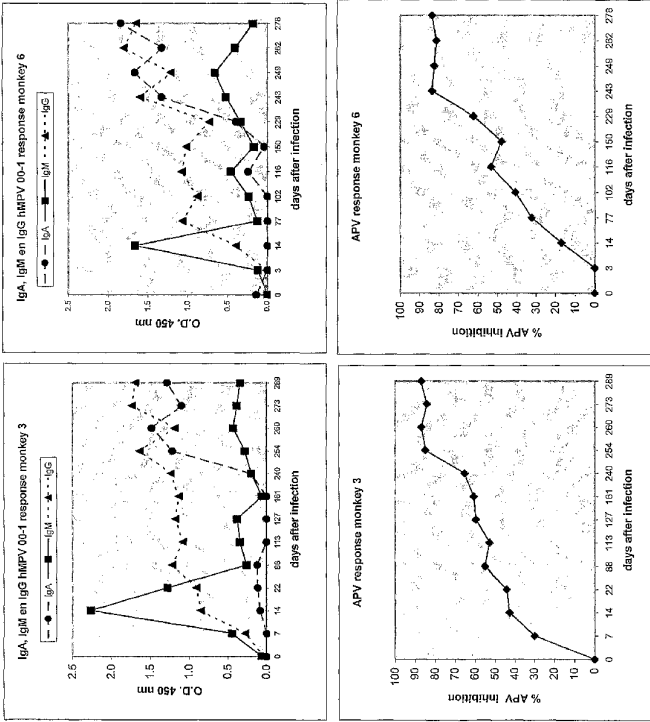
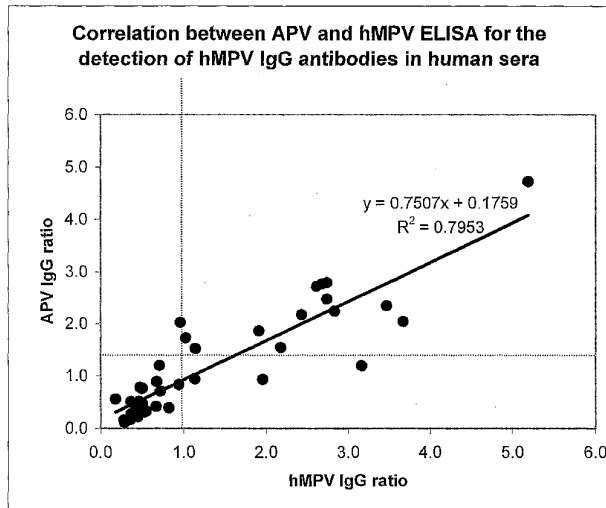


Fig. 36B

Fig. 37



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

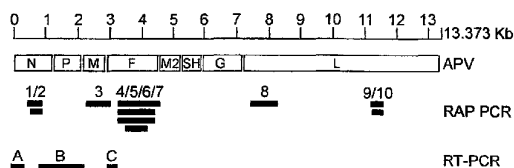
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057302 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/135 CH Bunnik (NL). GROEN, Jan [NL/NL]; Anholtkade 2, NL-3446 BM Woerden (NL).
- (21) International Application Number: PCT/NL.02/00040
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01/200213.5 19 January 2001 (19.01.2001) EP
01/203985.5 18 October 2001 (18.10.2001) EP
- (61) Related by addition to earlier applications or grants:
CU Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished (ICA)
KP Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished
- (71) Applicant (for all designated States except US): VI-
RONOVATIVE B.V. [NL/NL]; Burgemeester Oudlaan
50, NL-3062 PA Rotterdam (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DE JONG, Jan,
Cornelius [NL/NL]; Kragerlaan 205, NL-2806 BH
Gouda (NL). FOUCHIER, Ronaldus, Adrianus, Maria
[NL/NL]; Hszenburgsingel 44a, NL-3021 AR Rotterdam
(NL). VAN DEN HOOGEN, Bernadetta, Gerarda
[NL/NL]; Hszenburgsingel 44a, NL-3021 AR Rotterdam
(NL). OSTERHAUS, Albertus, Dominicus, Marcellinus,
Erasmus [NL/NL]; Dr. Breveestraat 16, NL-3981
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
27 December 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: A VIRUS CAUSING RESPIRATORY TRACT ILLNESS IN SUSCEPTIBLE MAMMALS



(57) Abstract: The invention relates to the field of virology. The invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) within the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* and components thereof.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057302 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/135

CH Bunnik (NL); GROEN, Jan [NL/NL]; Anholkade 2,
NL-3446 BM Woerden (NL).

(21) International Application Number: PCT/NL 02/00040

(22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)

(74) Agent: PRINS, A., W.; c/o Verenigde, Nieuwe Parklaan
97, NL-2587 BN The Hague (NL).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01200213.5 19 January 2001 (19.01.2001) EP
01203985.5 18 October 2001 (18.10.2001) EP(61) Related by addition to earlier applications or grants:
CU Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished
KP Not furnished (ICA)
Filed on Not furnished

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU (inventor's certificate), CZ (utility model), DE, DK (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH (utility certificate), GM, HR (consensual patent), HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP (inventor's certificate), KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT (utility certificate), TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

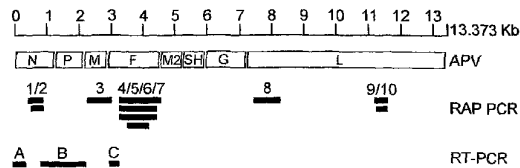
(71) Applicant (for all designated States except US): VIRONOVATIVE B.V. [NL/NL]; Burgemeester Oudlaan
50, NL-3052 PA Rotterdam (NL).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
27 December 2002

[Continued on next page]

(54) Title: A VIRUS CAUSING RESPIRATORY TRACT ILLNESS IN SUSCEPTIBLE MAMMALS

(57) Abstract: The invention relates to the field of virology. The invention provides an isolated essentially mammalian negative-sense single stranded RNA virus (MPV) within the sub-family *Pneumovirinae* of the family *Paramyxoviridae* and identifiable as phylogenetically corresponding to the genus *Metapneumovirus* and components thereof.

WO 02/057302 A3

WO 02/057302 A3 

- (48) Date of publication of this corrected version:** 13 November 2003 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*
- (15) Information about Correction:**
see PCT Gazette No. 46/2003 of 13 November 2003, Section II

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/NL 02/00040 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/135 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K | | |
| 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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 December 2001 (2001-12-01) "Nucleoprotein" Database accession no. Q91F57 XP002213817 abstract | 1-47 |
| X | -& DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 May 2000 (2000-05-01) "Nucleocapsid protein" Database accession no. Q90F48 XP002213818 abstract --- -/-- | 1-47 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the International search 18 September 2002 | | Date of mailing of the International search report 07/10/2002 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Novak, S |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

International Application No
PCT/NL 02/00040

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P, X | DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 December 2001 (2001-12-01) "Phosphoprotein" Database accession no. Q91KZ5 XP002213819 the whole document | 1-47 |
| X | -& DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 May 2000 (2000-05-01) "Phosphoprotein" Database accession no. Q9QF47 XP002213820 the whole document | 1-47 |
| P, X | DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 December 2001 (2001-12-01) "Matrix protein" Database accession no. Q91F56 XP002213821 the whole document | 1-47 |
| X | -& DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 November 1998 (1998-11-01) "Matrix protein" Database accession no. Q9Q244 XP002213822 the whole document | 1-47 |
| P, X | DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 December 2001 (2001-12-01) "Fusion protein" Database accession no. Q91F55 XP002213823 the whole document | 1-47 |
| X | -& DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 May 2000 (2000-05-01) "Fusion protein" Database accession no. Q9QDI1 XP002213824 the whole document | 1-47 |
| P, X | DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 December 2001 (2001-12-01) "RNA-dependent RNA polymerase" Database accession no. Q91L20 XP002213825 the whole document | 1-47 |
| X | -& DATABASE EBI 'Online! SWALL; 1 May 1997 (1997-05-01) "RNA-dependent RNA polymerase" Database accession no. P87509 XP002213826 the whole document | 1-47 |

-/--

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/NL 02/00040 |
|--|---|---|
| C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 00 20600 A (HUGGINS MICHAEL BRIAN ;DAVIS PHIL (GB); TARPEY IAN (GB); COOK JANE) 13 April 2000 (2000-04-13) the whole document | 1-47 |
| X | BAYON-AUBOYER M H ET AL: "Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus." ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 144, no. 6, 1999, pages 1091-1109, XP002213815 ISSN: 0304-8608 the whole document | 1-47 |
| X | BAYON-AUBOYER MARIE-HELENE ET AL: "Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 81, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 2723-2733, XP002176553 ISSN: 0022-1317 the whole document | 1-47 |
| X | RANDHAWA J S ET AL: "Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 71, no. 12, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 9849-9854, XP002083386 ISSN: 0022-538X | 1-6, 8, 10-14 |
| Y | abstract; figures 1,2 | 7, 9, 15-47 |
| Y | AHMADIAN G ET AL: "Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 80, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 2011-2016, XP002176552 ISSN: 0022-1317 abstract; figure 1 | 1-47 |
| | --- | |
| | --- -/-- | |

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/NL 02/00040

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | YU Q ET AL: "Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, READING, BERKS, GB, vol. 72, no. 1, 1991, pages 75-81, XP002095554 ISSN: 0022-1317 abstract; figure 2; table 1 | 1-47 |
| A | PRINGLE C R: "Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, August 9-13, 1999." ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 144, no. 10, 1999, pages 2065-2070, XP002213816 ISSN: 0304-8608 | |
| P,X | FR 2 801 607 A (MERIAL SAS) 1 June 2001 (2001-06-01) the whole document | 1-47 |
| T | HOOGEN VAN DEN BERNADETTE G ET AL: "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 7, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 719-724, XP002176554 ISSN: 1078-8956 | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No
PCT/NL 02/00040

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|---|--|
| WO 0020600 | A | 13-04-2000 | AU 6200399 A WO 0020600 A1 | 26-04-2000 13-04-2000 |
| FR 2801607 | A | 01-06-2001 | FR 2801607 A1 EP 1232249 A1 WO 0138497 A1 | 01-06-2001 21-08-2002 31-05-2001 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/00 | H 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 39/00 | A 6 1 K 39/395 | D 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 | N 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K 48/00 | A 6 1 K 48/00 | |
| A 6 1 P 11/00 | A 6 1 P 11/00 | |
| A 6 1 P 31/14 | A 6 1 P 31/14 | |
| C 0 7 K 14/115 | C 0 7 K 14/115 | |
| C 0 7 K 16/10 | C 0 7 K 16/10 | |
| C 1 2 N 1/15 | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 | C 1 2 N 7/00 | |
| C 1 2 N 7/00 | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/70 | |
| C 1 2 Q 1/70 | G 0 1 N 33/53 | N |
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/543 | 5 4 5 A |
| G 0 1 N 33/543 | G 0 1 N 33/569 | L |
| G 0 1 N 33/569 | C 1 2 N 5/00 | A |
| | A 6 1 K 37/02 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH, GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フォッチャー, ロナルダス, アドリアナス, マリア
オランダ国 エヌエル - 3 0 2 1 エーアール ロッテルダム, エッセンブルグシングル 4 4 エー

(72)発明者 ヴァン デン フーゲン, ベルナデッタ, ゲラルダ
オランダ国 エヌエル - 3 0 2 1 エーアール ロッテルダム, エッセンブルグシングル 4 4 エー

(72)発明者 オステルハウス, アルベルタス, ドミニクス, マルセリナス, エラスムス
オランダ国 エヌエル - 3 9 8 1 シーエイチ ブニク, ドクトル. プレヴェーシュトラート 1 6

(72)発明者 グルーン, ジャン
オランダ国 エヌエル - 3 4 4 6 ビーエム ウォエルデン, アンホルツケード 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA02 CA07 CA09 CA11 CA20 DA02 EA02
GA11 HA13 HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ10 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QQ91
QR32 QR35 QR39 QR48 QR56 QR72 QR77 QR80 QS31 QS33
QS34 QX02 QX10
4B065 AA01X AA58X AA72X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA43 CA44
CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 BA44 CA01 NA14 ZA592 ZB332
4C085 AA02 AA13 AA14 BA57 BB11 CC22 CC23 GG01 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZB33

| | | | | | | | | | | |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 4C087 | AA01 | AA02 | BB17 | BB65 | BC30 | BC83 | CA12 | NA14 | ZA59 | ZB33 |
| 4H045 | AA10 | AA11 | AA20 | AA30 | BA10 | BA41 | CA01 | DA75 | DA86 | EA20 |
| | EA53 | FA71 | FA74 | | | | | | | |

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2004531220A5 | 公开(公告)日 | 2005-12-22 |
| 申请号 | JP2002557978 | 申请日 | 2002-01-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | VIE俄罗斯新星恢复拜丢10埃因霍温笔记本闭嘴 | | |
| 申请(专利权)人(译) | VIE俄罗斯新星恢复, Besuroten埃因霍温笔记本闭嘴 | | |
| [标]发明人 | デジョンジャンコルネリウス フォッチャーロナルダスアドリアナスマリア ヴァンデンフーゲンベルナデッタゲラルダ オステルハウスアルベルタスドミニクスマルセリナスエラスムス グルーンジャン | | |
| 发明人 | デジョン,ジャン,コルネリウス フォッチャー,ロナルダス,アドリアナス,マリア ヴァン デン フーゲン,ベルナデッタ,ゲラルダ オステルハウス,アルベルタス,ドミニクス,マルセリナス,エラスムス グルーン,ジャン | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K31/7105 A61K35/64 A61K35/74 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/155 A61K39/395 A61K48/00 A61P11/00 A61P31/14 C07K C07K14/11 C07K14/115 C07K14/135 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/01 C12N15/09 C12N15/86 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/569 A61K35/76 | | |
| CPC分类号 | A61K39/12 A61K39/155 A61K2039/5254 A61K2039/5256 A61P11/00 C07K14/005 C07K16/1027 C12N7/00 C12N15/86 C12N2760/18321 C12N2760/18322 C12N2760/18334 C12N2760/18343 C12N2760/18622 C12N2840/203 C12Q1/701 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5091 G01N33 /56983 C12Q2600/158 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7105 A61K35/64 A61K35/74.A A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P11/00 A61P31/14 C07K14/115 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N33/569.L C12N5 /00.A A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA20 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063 /QQ91 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS31 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX10 4B065/AA01X 4B065 /AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065 /CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA01 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB332 4C085/AA02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA57 4C085 /BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZB33 4C087/AA01 4C087 /AA02 4C087/BB17 4C087/BB65 4C087/BC30 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA59 4C087/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045 /CA01 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA53 4H045/FA71 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 2001200213 2001-01-19 EP 2001203985 2001-10-18 EP | | |
| 其他公开文献 | JP5503096B2 JP2004531220A | | |

摘要(译)

本发明涉及病毒学领域。 本发明提供了在副粘病毒科的肺病毒科的亚家族内的分离的基本上是哺乳动物的负义单链RNA病毒 (MPV)，并且在系统发育上可鉴定为对应于偏肺病毒科及其组分。