

(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2015-533478

(P2015-533478A)

(43) 公表日 平成27年11月26日(2015.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/187 (2006.01)	A 6 1 K 39/187	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 B 0 6 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-528999 (P2015-528999)	(71) 出願人	510000976 インターベット インターナショナル ベー. フェー. オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
(86) (22) 出願日	平成25年8月28日 (2013. 8. 28)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月22日 (2015. 4. 22)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/067771	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(87) 国際公開番号	W02014/033149	(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝
(87) 国際公開日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		
(31) 優先権主張番号	12182260.5		
(32) 優先日	平成24年8月29日 (2012. 8. 29)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マーカーワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ウイルスタンパク質のエピトープに修飾を有する複製コンピテントな牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、ヒツジボーダー病ウイルス (BDV) および非定型ペスチウイルス、医薬品としてのこれらの使用、ワクチンとしてのこれらの使用、このような複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV を含むワクチン、ならびにこのようなウイルスに対する抗体を検出し、ワクチン接種動物を野外感染動物と区別するための診断テストに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスタンパク質のエピトープに修飾を有し、その結果として前記エピトープが、野生型 BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV におけるそのエピトープに対するモノクローナル抗体ともはや反応しない、前記エピトープが、非構造タンパク質 NS3 におけるヘリカーゼドメイン 2 に位置することを特徴とする、複製コンピテントな牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、非定型ペスチウイルスまたはヒツジボーター病ウイルス (BDV)。

【請求項 2】

前記ヘリカーゼドメインが、アミノ酸 1950 位から 2107 位の間に位置する CSFV Alfort Tuebingen、アミノ酸 1959 位から 2116 位の間に位置する BVDV-1 CP7、アミノ酸 1950 位から 2107 位の間に位置する BVDV-1 NCP7、アミノ酸 2040 位から 2197 位の間に位置する BVDV-1 NADL、アミノ酸 1950 位から 2107 位の間に位置する BVDV-1 Oregon C24V、アミノ酸 2024 位から 2181 位の間に位置する BVDV-2 890、およびアミノ酸 1947 位から 2104 位の間に位置する BDV X818 から成る群から選択されるヘリカーゼドメイン 2 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV。

10

【請求項 3】

前記エピトープが、モノクローナル抗体 mAb 8.12.7 NS3h とともはや反応しないことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV。

20

【請求項 4】

前記 BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV が不活化されていることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV。

【請求項 5】

請求項 1 から 3 に記載の複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスもしくは BDV、または請求項 4 に記載の不活化された複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスもしくは BDV、および医薬的に許容可能な担体を含むワクチン、

30

【請求項 6】

前記複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV が、E^rns または N^pr^o 遺伝子に弱毒化変異を有することを特徴とする、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 7】

前記ワクチンが、ワクチン接種される動物に対して病原性であるウイルスまたは微生物の追加の免疫原と、前記ウイルスまたは微生物の免疫原をコードする前記免疫原または遺伝情報に対する抗体とを含むことを特徴とする、請求項 5 または 6 に記載のワクチン。

40

【請求項 8】

ワクチン接種される動物に対して病原性である前記ウイルスまたは微生物が、ウシロタウイルス、家畜流行性出血性疾患ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、牛流行熱ウイルス、ウシヘルペスウイルス、パラインフルエンザ 3 型ウイルス、ウシバラミクソウイルス、ブルータングウイルス、オルトブンヤウイルス、口蹄疫ウイルス、マンヘミア・ヘモリチカ、パスツレラ・ムルトシダおよびウシ呼吸器合抱体ウイルスから成る群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載のワクチン。

【請求項 9】

ワクチン接種される動物に対して病原性である前記ウイルスまたは微生物が、ブラキスピラ・ヒオディセンテリア、アフリカ豚コレラウイルス、ニパウイルス、ブタサーコウイルス、ブタトルクテノウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブ

50

タパルボウイルス、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス（PRRS）、ブタ伝染性下痢ウイルス（PEDV）、口蹄疫ウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、ブタ丹毒菌、気管支敗血症菌、サルモネラ・コレラスイス、ヘモフィルス・パラスイス、パスツレラ・ムルトシダ、ブタ連鎖球菌、マイコプラズマ・ハイオニューモニエおよびアクチノバチルス・ブルロニューモニアから成る群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載のワクチン。

【請求項10】

ワクチン接種される動物に対して病原性である前記ウイルスまたは微生物が、口蹄疫ウイルス、小反芻獣疫、リフトバレー熱ウイルス、オルトブンヤウイルス、跳躍病、ナイロビ羊病ウイルス、ブルータングウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）、ヒツジヘルペスウイルス、大腸菌、オウム病クラミジア、ウェルシュ菌、クロストリジウム・セプティカム、破傷風菌、ノーヴィ菌、気腫疽菌、トキソプラズマ原虫、パスツレラ・ヘモリチカおよびパスツレラ・トレハロシから成る群から選択されることを特徴とする、請求項7に記載のワクチン。

10

【請求項11】

医薬品として使用するための、請求項1から4のいずれか一項に記載の複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDV。

【請求項12】

ワクチンにおいて使用するための、請求項1から4のいずれか一項に記載の複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDV。

20

【請求項13】

哺乳動物におけるペスチウイルス感染の予防において使用するための、請求項1から4のいずれか一項に記載の複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDV。

【請求項14】

診断テストが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVのNS3エピトープを含むことを特徴とする、請求項5から10のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テスト。

30

【請求項15】

診断テストが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVのNS3エピトープに対する抗体を含むことを特徴とする、請求項5から10のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テスト。

【請求項16】

診断テストが、非構造タンパク質NS3におけるヘリカーゼドメインのエピトープを含み、前記エピトープが修飾を有し、その結果として前記エピトープが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVにおけるそのエピトープに対するモノクローナル抗体ともはや反応しないことを特徴とする、請求項5から10のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テスト。

40

【請求項17】

診断テストが、非構造タンパク質NS3におけるヘリカーゼドメインのエピトープに対する抗体を含み、前記エピトープが修飾を有し、その結果として前記エピトープが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVにおけるそのエピトープに対するモノクローナル抗体ともはや反応しないことを特徴とする、請求項5から10のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テスト。

【請求項18】

50

請求項 5 から 10 のいずれか一項に記載のワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型 BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV に感染されている哺乳動物と区別するための、請求項 14 から 17 のいずれか一項に記載の診断テストの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルスタンパク質のエピトープに修飾を有する複製コンピテントな牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、ヒツジボーダー病ウイルス (BDV) および非定型ペスチウイルス、医薬品としてのこれらの使用、ワクチンとしてのこれらの使用、このような複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV を含むワクチン、ならびにこのようなウイルスに対する抗体を検出し、ワクチン接種動物を野外感染動物と区別するための診断テストに関する。

10

【背景技術】

【0002】

ペスチウイルス属は、特に牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、ヒツジボーダー病ウイルス (BDV)、ならびに HoBi ウイルスおよびコンケン (Khon Kaen) ウイルスなどの非定型ペスチウイルスとして知られるウイルス群を含む、フラビウイルス科内の属である。

【0003】

BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV は、世界的に経済的損失が著しい重篤な疾患を誘発する可能性がある。

20

【0004】

牛ウイルス性下痢の原因病原体であるペスチウイルスのメンバー、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、世界中の畜牛の経済的に重要な疾患である。BVDV 感染に起因する重大な経済的損失は、受精能の低下、流産、および致死的な「粘膜病」を発症し得る持続感染子牛の発生である。

【0005】

CSFV は、ブタにおける伝染性が高く場合によっては致死的な疾患、豚コレラを引き起こし、相当な経済的損失をもたらす可能性がある。

【0006】

ボーダー病 (BD) は、ヒツジおよびヤギの先天性ウイルス疾患である。ヒツジにおいて最も頻繁に見られる臨床徴候には、不妊雌羊、流産、死産、および小さく弱い子羊の誕生が挙げられる。

30

【0007】

CSFV、BVDV、非定型ペスチウイルスおよびヒツジボーダー病ウイルスは、遺伝的および構造的に密接に関連している。

【0008】

動物は、ワクチン接種により特に CSFV および BVDV に対して保護され得る。例えば CSFV および BVDV 感染に対してブタおよび牛を保護するための不活化または改変された従来生ワクチンが当技術分野で知られており、市販されている。

40

【0009】

ペスチウイルスゲノムは、正方向の一本鎖 RNA から成る。該 RNA は、少なくとも 12.3 kb の長さを有し、ゲノム両末端の非翻訳領域 (NTR) に隣接された 1 つの大きなオープンリーディングフレーム (ORF) を含有する。ペスチウイルス ORF は、1 つのポリタンパク質に翻訳され、該タンパク質は、ウイルスプロテアーゼおよび細胞プロテアーゼにより少なくとも 12 の成熟タンパク質に同時翻訳処理および翻訳後処理される。

【0010】

ペスチウイルス ORF の最初のタンパク質は、N^Pr^o (N 末端プロテアーゼ) である。N^Pr^o は、ORF コードポリタンパク質の残りから自身を切断し、これにより自身の C 末端と、ORF 中の最初の構造タンパク質、C (コア) タンパク質の正しい N 末端も作

50

り出す、非構造自己プロテアーゼである。

【0011】

ORF中のCタンパク質は、この後に他の構造タンパク質：E^{RNS}、E1、E2（この順で）が続く。カプシド（C）タンパク質および3つのグリコシル化エンベロープと共に、タンパク質（E^{RNS}、E1、E2）はペスチウイルスピリオンを構成する。該構造タンパク質は、この後に非構造タンパク質（p7、NS2 - NS3およびNS3、NS4A、NS4B、NS5A、ならびにNS5B）が続く。NS3（セリンプロテアーゼ）およびNS5（RNA依存的RNAポリメラーゼ活性）は、ウイルス複製に直接関与している。

【0012】

ペスチウイルスの複製に関する研究は、リバーズジェネティクス系および自己複製サブゲノムRNA（レプリコン）の発見により大幅に促進された（Behrensら、（1998）、Meyersら、（1996^b）、Lamp, B.（2011））。

【0013】

CSFV複製の最小必要要件は、例えば、構造タンパク質の遺伝子配列を欠く欠損CSFVゲノムを作成して調べられた。欠損CSFVゲノムは、ヘルパーA187 - CAT RNAと一緒にSK-6細胞に導入された場合、依然として複製し、ウイルス粒子にパッケージングされ得ることが見出された（Mosserら、（1999））。

【0014】

Npro遺伝子配列の一部、ならびにC、E^{RNS}、E1、E2、p7およびNS2をコードする遺伝子を欠く自己複製欠損BVDVゲノムは、Behrensら（1998）により記載されている。

【0015】

現在、ペスチウイルス感染に対処するための種々のアプローチが、ペスチウイルスが経済的損害をもたらす様々な国で適用されている。これらの種々のアプローチは並行して用いられるという事実が、下記にBVDVに関して例証されるように問題の原因となっている。しかし、問題は、全てのペスチウイルスに関する普遍的な問題である。

【0016】

BVDVおよびBDVは、幾つかの例外を除いて、反芻動物が飼育されている世界中全ての国で発生する。

【0017】

ペスチウイルスはまた、野生動物でも循環し、これらは故に、ウイルスが家畜に広がり得る保有宿主を形成する。

【0018】

BVDV診断テストの開発は、BVDV感染した群れの検出、ならびに持続感染動物の追跡および除去を可能にした。

【0019】

厳重な移動制限および衛生対策との併用で、この開発は、スカンジナビア諸国が家畜からBVDVを事実上根絶することを可能にした。しかし、結果としてワクチン接種は、現在これらの国で禁止されている。

【0020】

幾分同様の状況が欧州でCSFVに関して生じた。ワクチン接種によりCSFVが欧州で事実上根絶された時、非ワクチン接種政策が1980年代以降から導入された。

【0021】

しかし、圧倒的にほとんどの他の国は、高い牛密度、激しい貿易、および高いBVDV有病率のため、ワクチン接種のアプローチに依然として従うことを決めた。

【0022】

BVDV感染またはCSFV感染に対処する場合、これらの2つの異なるアプローチが並行して存在することは、次の相反する状況、すなわち、ワクチン接種牛が野外感染牛と容易に識別することができない状況をもたらした。なぜなら、両方の場合でウイルスに対

10

20

30

40

50

する抗体が存在することになるためである。故にBVDV抗体陽性動物が、感染による抗体陽性（この場合、牛はウイルスを保有している可能性がある）またはワクチン接種による抗体陽性かどうかは、大部分不明である。この理由のため、特にスカンジナビア諸国がBVDV抗体陽性の動物および肉の輸入を認めることはない。

【0023】

この問題は、いわゆるマーカーワクチンの使用により理論上解決することができる。このようなワクチンは、1つまたは複数の免疫原性ウイルスタンパク質を欠き、その結果、マーカーワクチン接種動物は、全ての免疫原性ウイルスタンパク質に対する抗体を産生しないことになる。ワクチン接種動物と感染動物の抗体パレットの違いは、このために設計された診断テストにおいて示すことができる。このようなテストは故に、ワクチン接種動物と感染動物の識別を可能にする。

10

【0024】

このアプローチは、例えば、CSFVに対するマーカーワクチンの開発のために従われた。このマーカーワクチンは、実際は、CSFV E2エンベロープタンパク質に基づくサブユニットワクチンである。このようなサブユニットワクチンは安全および有効であるが、欠点は、不活化全ウイルスワクチンおよび改変生ワクチンと比べた場合、免疫の発生という点でやや効果が低くなり得るという事実にある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】Behrens et al., J. Virol., 72: 2364-272, (1998).

【非特許文献2】Meyers, G. et al., J. virol. 70: 8606-8613 (1996) b.

【非特許文献3】Lamp, B. et al., J. Virol. 85: 3607-3620 (2011).

【非特許文献4】Moser et al., J. Virol. 73: 7787-7794 (1999).

【発明の概要】

【0026】

故に、改善された有効性プロフィールを有し、マーカーワクチンとして適切なワクチンが必要とされる。

30

【0027】

このような改善されたマーカーワクチンを提供することが本発明の目的である。

【0028】

このような改善されたマーカーワクチンは、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープの修飾により得られ得ることが、今や驚くべきことに見出された。

【0029】

非構造タンパク質NS3は、二重の機能、すなわちセリンプロテアーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性を有する。ペスチウイルスのヘリカーゼの主な機能は、ポリメラーゼ反応後のゲノムのプラスおよびマイナスRNA鎖の巻き戻しであると考えられている。さらに、Riedelら、2012により提案された、ヘリカーゼが感染性ウイルス粒子の細胞内構築において重要である強力な証拠がある。

40

【0030】

両方の酵素活性の役割および機能は、特にTautz, N. (2000)、Ming Xiao (2008)、Wei Cheng (2007)、Tackett, A. J. (2001)、Deregt, D. (2005)およびJian Xu (1997)により記載されている。Jian Xu (1997)による発表は、NS3領域、より具体的にはNS3タンパク質内のヘリカーゼが、例えばBVDVとCSFVの間でいかに関連し、よく保存されているかを明確に示している。

50

【0031】

NS3タンパク質のヘリカーゼは、モノクローナル抗体ベースのELISAアッセイなどの診断的抗体検出アッセイを開発するための主な標的であった。この理由は明らかである。NS3ヘリカーゼは、1)極めて免疫原性であり、2)ペスチウイルスの間で高度に保存されており、ヘリカーゼにおける変異は見出されない、または事実上見出されない。例えばCollet, M.S. (1992)およびBathia, S. (2008)を参照のこと。診断的観点から、これは、1)NS3のヘリカーゼに対する抗体は動物に容易に導入される、および2)ヘリカーゼの高い保存レベルにより、ヘリカーゼに対する抗体検出アッセイは、例えば全てのBVDVまたはCSFV株を認識するという利点を有する。

10

【0032】

図7は、NS3領域と反応するモノクローナル抗体を含む市販の診断テストの概観を示している。

【0033】

修飾エピトープを含むヘリカーゼドメインを有する、例えばBVDVまたはCSFVの変異体は、マーカーワクチンのベースを十分に形成することができ、動物へのこのようなワクチンの投与は、野生型ウイルスとは異なる抗体パネルを誘導し、故にワクチン接種は野生型感染と区別され得るであろう。

【0034】

しかし、この極めて高い保存レベルにより、NS3のヘリカーゼは、変異を可能にするまたは変異を作り出すのに、次の理由でウイルスゲノムのおよそ最も好ましくない領域となる：ヘリカーゼはウイルスに必須の酵素であり、すなわちウイルスは、ヘリカーゼ活性なしで複製することができない、すなわち複製コンピテントでない。ヘリカーゼの高いレベルの保存に対する理由は、極めて多くの酵素に共通している。ヘリカーゼは、その作用が一次、二次および三次構造に高度に依存しており、その結果、変異がヘリカーゼ活性を妨害し、これによりウイルスを生存不能にすることになる。故に、ヘリカーゼは実際、変異を作り出すのにウイルスゲノムの最も好ましくない領域となる。

20

【0035】

意外にも、変異を可能にするが、このような変異を有するウイルスが依然として複製コンピテントであるヘリカーゼドメイン内の特定の特異的領域があることが、今や驚くべきことに見出された。さらにこれらの変異は、ヘリカーゼドメインのエピトープにおいて、これらの修飾エピトープが、これらのエピトープの野生型形態と反応するモノクローナル抗体によりもはや認識されないように作り出すことができる。

30

【0036】

このようなウイルスは故に、一方では依然として複製することができ、故に生ワクチンのベースとして適切であるのに対し、他方では、野生型のBVDV、BDV、非定型ペスチウイルスまたはCSFVとは反対に、ウイルスが1つまたは複数のBVDV、BVD、非定型ペスチウイルスまたはCSFV特異的抗体との反応性を失っているという意味において、全ての他のBVDV、BVD、非定型ペスチウイルスまたはCSFVと識別され得るという利点を有する。さらにこのようなウイルスは、動物においてこれらの抗体をもはや誘導しない。

40

【0037】

故に、本発明者らは、予想されたものとは反対に、BVDV、BDV、非定型ペスチウイルスまたはCSFVのNS3タンパク質のヘリカーゼが、修飾され得るエピトープを含み、その結果としてエピトープは、野生型NS3タンパク質上の対応するエピトープに対する抗体ともはや反応しない(または該抗体を誘導しない)が、ウイルスにその複製能を喪失させないことを見出した。

【0038】

本発明は今や、マーカーワクチンのベースを形成し得る複製コンピテントなBVDV、BDV、非定型ペスチウイルスまたはCSFV変異体を当業者が生成できるようにする。

50

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】1：5希釈されたCode 4が、NS3ヘリカーゼドメイン2およびNS3ヘリカーゼへの明確な結合を示す図である。各レーンは、50ng精製タンパク質を含む。レーン1：pL200(NS3ヘリカーゼ)、レーン2：pW3 NS3h-D1)、レーン3：pW5(NS3h-D2)、レーン4：pW1(NS3h-D3)。

【図2】間接免疫ペルオキシダーゼアッセイにおけるmAb Code 4および49DE反応を示す図である。記号「+」陽性は、抗原が対応する抗体により検出できたことを意味し、「-」陰性は、抗原が対応する抗体により検出できなかったことを意味する。Vp1756について、Code 4およびDE 49の結合は検出できなかったが、一方、p447(陽性対照)は両方のモノクローナル抗体との結合に影響を与えた。陰性対照として使用された抗E2モノクローナル抗体は、Vp1756に結合することができた。これは、Vp1756がVp447対照と同程度に複製していることを示している。

【図3】a)は、一過性発現のためのNS3 D3におけるキメラCSFV/非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス構築物の概略図である。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス配列は黒、CSFV配列はグレーで示され、非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス配列終結アミノ酸が示されている。BVDV/C16-INTの結合は、pW111についてのみ検出されたが、一方、mAb WB103はpW109とも反応した。b)は、それぞれ、CSFV株AlfortおよびBVDV Ncp7または非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスの配列アライメントを示す図である(St
rider 1.4f6)。下にコンセンサス配列；アスタリスク：アミノ酸が保存されている；バー：アミノ酸が保存されていない。完全NS3非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス核酸配列は配列番号1で示され、アミノ酸配列は配列番号2で示される。

【図4】a)は、推定14E7エピトープ配列を示す図である。b)はpW95に挿入された変異配列のアライメント、下線が付された置換アミノ酸を示す図である。

【図5】VpW95感染細胞溶解物のウエスタンブロットを示す図である。14E7は、p447 CSFV Alfortにおいて125kDaでNS3を検出するが、VpW95変異体では検出しない。レーン1：VpW95、レーン2：Vp447、レーン3：偽感染細胞。

【図6】6つのペスチウイルスのNS3領域のヘリカーゼのアライメントを示す図である(注記：非B=非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス)。

【図7】NS3タンパク質に依存する市販の診断テストの概要を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0040】

故に、本出願の第1の実施形態は、ウイルスタンパク質のエピトープに修飾を有し、その結果としてエピトープが、野生型のBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVにおけるそのエピトープに対するモノクローナル抗体ともはや反応せず、エピトープが、非構造タンパク質NS3におけるヘリカーゼドメインに位置する、複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

【0041】

本明細書に定義されるように、複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVは、依然として複製することができる、すなわち感染性子孫ウイルスを産生することができるウイルスである。感染性子孫ウイルスは、複製コンピテント感染性子孫ウイルス、または複製欠損感染性子孫ウイルスであってもよい。

【0042】

このような複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVは、新たに感染された細胞でさらに複製する感染性子孫ウイルス(複製コンピテント感染性子孫ウイルス)を産生できるように十分な遺伝物質を含むウイルスであってもよい。

【0043】

それはまた、新たに感染された細胞でさらに複製するが、補完細胞中に存在する場合、

10

20

30

40

50

単一サイクル感染できる感染性子孫ウイルス（複製欠損感染性子孫ウイルス）を産生することができる感染性子孫ウイルスを産生できない程度に遺伝情報を欠くウイルスであってもよい。単に後者のタイプのウイルスの例として、E2またはE^r_n^s構造タンパク質をコードする遺伝子を欠くBVDVゲノムは、E2またはE^r_n^sタンパク質を産生する補完細胞系中に存在する場合、単一サイクル感染できる感染性子孫BVDウイルス、すなわち複製欠損感染性子孫ウイルスの産生をもたらすことができる。

【0044】

子孫ウイルスの複製率および量は、野生型ウイルスにより産生されるものより高いまたは低い場合があることが理解されよう。

【0045】

本明細書に定義されるように「野生型形態において前記BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVと反応するモノクローナル抗体ともはや反応しないエピトープ」は、野生型エピトープがこのようなモノクローナル抗体と反応する場合に示すであろう反応レベルでこのようなモノクローナル抗体と反応しないエピトープと見なされる。

【0046】

エピトープと、そのエピトープと反応するモノクローナル抗体の反応レベルは、当技術分野で公知の方法により決定することができる。モノクローナル抗体とウイルス（のエピトープ）の反応レベルを決定する単純な方法は、次の標準IPMAである：変異体ウイルスおよび野生型ウイルスは、SK6細胞またはMDBK細胞などの感受性細胞で両方とも並行して増殖される。細胞は次いで、PBS中4%パラホルムアルデヒドで20分間、40°で固定され、0.5% Triton-X100で透過処理される。このステップ後、細胞は問題のモノクローナル抗体とインキュベートされ、0.1% Tween 20を含むPBSで最適濃度に希釈される。二次HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgGおよび3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質溶液がシグナル検出に適用される。

【0047】

本発明による非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープに修飾を含むウイルスは、IPMAにおいて反応しないであろう。すなわち、該ウイルスは染色反応を示さないであろう。しかし、野生型ウイルスに感染された細胞は染色されるであろう。

【0048】

別の、モノクローナル抗体とウイルス（のエピトープ）の間の反応レベルを決定するさらにより単純な方法は、次の標準ELISAである：変異体NS3および野生型NS3（または関連するエピトープを含むこれらのさらにより短い断片）は両方とも、例えば大腸菌ベースまたはバキュロウイルスベースの発現系などの発現系において発現される。発現タンパク質は、マイクロタイタープレートのウェルにコーティングされる。このステップ後、ウェルは野生型エピトープに対するモノクローナル抗体とインキュベートされ、0.1% Tween 20を含むPBSで最適濃度に希釈される。二次HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgGおよびTMB基質溶液がシグナル検出に適用される。

【0049】

本発明による非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープに修飾を含むNS3構築物は、このELISAにおいて野生型NS3より程度は少ないがモノクローナル抗体と反応するであろう。およびこれは、野生型NS3より低い変異体NS3のELISAの光学密度（OD）値により反映されるであろう。

【0050】

モノクローナル抗体と修飾エピトープの間の実質的な反応を示さない、すなわち変異体がテストされるELISAテストのODが、バックグラウンドレベルのODを実質的に超えない、修飾されたヘリカーゼエピトープを有する本発明による変異体が、好ましくは提供される。しかし、モノクローナル抗体と修飾エピトープの間に、全か無かの反応の代わりに弱い反応があることは事実であり得る。

【0051】

ELISAテストにおいてODにより測定された80%未満の反応レベルを有する

10

20

30

40

50

エピトープは、野生型エピトープと比べた場合、もはや反応性でないと見なされる。

【0052】

上述の通り、ペスチウイルスのNS3タンパク質、およびより具体的にはNS3タンパク質のヘリカーゼ領域は、文献に広く記載されている。ヘリカーゼには、BV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに対して産生された抗血清と反応するエピトープを含む3つの領域がある。

【0053】

ヘリカーゼドメインの暫定位置は、ヘリカーゼ領域に先行するアミノ酸の数に当然ながら依存する。CSFV、BV DVおよびBDVの様々なメンバー間には、1つの属内でさえわずかなバリエーションがあり得る。そのため、幾つかの公知のCSFV、BV DVおよびBDV株に関するヘリカーゼドメイン1、2および3の暫定位置が表1に示されている。

10

【0054】

図6は、これらの株に関するヘリカーゼ領域のアライメントを提供し、当業者が他のCSFV、BV DVおよびBDV株におけるヘリカーゼドメインを、このような株のヘリカーゼ配列と図6に示された株のヘリカーゼ配列の間のコンセンサスに基づき同定できるようにする。

【0055】

この実施形態の好ましい形態は、ヘリカーゼドメインがヘリカーゼドメイン1、2または3から成る群から選択されることを特徴とする、本発明による複製コンピテントなBV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

20

【0056】

幾つかのBV DVおよびCSFV株の完全長クローンにおけるNS3プロテアーゼ領域およびヘリカーゼドメインの位置が、下の表1に示されている。表に示されたウイルスのポリタンパク質の番号付けは、「MEL」で始まる。

【表 1】

ウイルス株	プロテアーゼ位置	暫定位置 ヘリカーゼ ドメイン 1	暫定位置 ヘリカーゼ ドメイン 2	暫定位置 ヘリカーゼ ドメイン 3	関連するアクセ ッション番号
CSFV Alfort Tuebingen (p447)	1590- 1781	1782-1949	1950-2107	2108- 2272	J04358.2
BVDV-1 CP7	1599- 1790	1791-1958	1959-2116	2117- 2281	U63479.1
BVDV-1 NCP7	1590- 1781	1782-1949	1950-2107	2108- 2272	U63479.1;NS2 における 9aa の欠失
BVDV-1 NADL	1680- 1871	1872-2039	2040-2197	2198- 2362	NC_001461.1
BVDV-1 Oregon C24V	1590- 1781	1782-1949	1950-2107	2108- 2272	AF091605.1
BVDV-2 890	1664- 1855	1856-2023	2024-2181	2182- 2346	U18059.1
BDV X818	1587- 1778	1779-1946	1947-2104	2105- 2269	NC_003679.1
NS3、 「GPAVCKK」と して定義された 開始、「GL」と して定義された 終端	1-192	193-360	361-518	519-683	NS3 は全ての列 挙されたペスチ ウイルス単離株 において同じ長 さを有する

10

20

表 1 幾つかの BVDV および CSFV 株の完全長クローンにおける NS3 プロテアーゼ領域およびヘリカーゼドメインの位置。表に示されたウイルスのポリタンパク質の番号付けは、「MEL」で始まる。

【0057】

本発明のより好ましい形態は、ヘリカーゼドメインが、アミノ酸 1782 位から 2272 位の間に位置する CSFV Alfort Tuebingen、アミノ酸 1791 位から 2281 位の間に位置する BVDV-1 CP7、アミノ酸 1782 位から 2272 位の間に位置する BVDV-1 NCP7、アミノ酸 1872 位から 2362 位の間に位置する BVDV-1 NADL、アミノ酸 1782 位から 2272 位の間に位置する BVDV-1 Oregon C24V、アミノ酸 1856 位から 2346 位の間に位置する BVDV-2 890、およびアミノ酸 1779 位から 2269 位の間に位置する BDV X818 から成る群から選択されるヘリカーゼドメインであることを特徴とする、本発明による複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV に関する。

30

【0058】

実施例セクションは、本発明による複製コンピテントウイルスをもたらすこれらのドメインにおける幾つかの特異的変異を提供し、このような複製コンピテントウイルスを生成する方法が一般に適用できる。故に、実施例セクションに開示されたウイルスに加えて、本発明による追加の複製コンピテントウイルスを作成したい当業者は、そうするための十分な手引きを以下に見出すであろう。

40

【0059】

基本的に、必要とされるものは、NS3 タンパク質のヘリカーゼ領域と反応する少なくとも 1 つのモノクローナル抗体である。

【0060】

NS3 タンパク質のヘリカーゼ領域に対するモノクローナル抗体を得るには、ヘリカー

50

ゼ領域全体もしくはドメインの1つを含む前記領域の一部、またはドメインの一部を発現させることで十分である。ヘリカーゼ領域のエピトープに対するモノクローナル抗体を得るのに最も効率的な方法は、エピトープ(をコードするDNA断片)を同定し、このエピトープただ発現させるのに利用可能な多くの手法の1つを使用することである。

【0061】

この瞬間に、エピトープ(をコードするDNA断片)を容易に同定するための多様な単純な手法が利用可能である。

【0062】

より古い方法の中の1つは、特に、Geysenら(特許出願WO 84/03564、特許出願WO 86/06487、米国特許第4,833,092号、Proc. Natl Acad. Sci. 81: 3998~4002(1984)、J. Imm. Meth. 102, 259~274(1987)により記載された方法、いわゆるPEPSCAN方法である。これは、エピトープを検出するための、実施しやすい、迅速な、十分に確立された方法である。該方法は、当業者によく知られている。この(経験的)方法は、B細胞エピトープの検出に特に適している。

10

【0063】

同様に、任意のタンパク質をコードする遺伝子の配列ならば、現在知られているエピトープとの配列および/または構造の一致に基づき、コンピュータアルゴリズムが特定のエピトープの位置を特定することができる。これらの領域の決定は、Hopp T.P.およびWoods, K.R.(1981)による親水性基準、ならびにChouおよびFasman((1987)および米国特許第4,554,101号)による二次構造的側面の組み合わせに基づく。

20

【0064】

現代の方法に基づく方法は、特にMeyer, B.およびPeters, Th.,(2002)ならびにYingming ZhaoおよびChalt, B.T.(1994)により記載されている。

【0065】

ヘリカーゼ領域もしくはドメインの1つを含む前記領域の一部、またはドメインの一部の発現のため、細菌、酵母、真菌、昆虫および脊椎動物細胞発現系は、極めて頻繁に使用される系である。このような系は当技術分野でよく知られ、多量に市販されている。

30

【0066】

原核生物および真核生物発現に関するさらなる十分な手引きは、特に Trepe, K., Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 72, Number 2(2006)、211~222

Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Gellissen, G. 編 Publisher: Wiley-VCH, ISBN: 3527310363 2005年版

Expression systems, Michael DysonおよびYves Durocher 編, Scion Publishing Ltd, ISBN 9781904842439 2007年版

40

などの発現に関する最近のレビューおよび教科書に示されている。

【0067】

抗体は、実施例セクションに提供されたエピトープに対して、好都合には産生され得る。ヘリカーゼ領域の他のエピトープに対するさらなる抗体は、ヘリカーゼ領域の他の部分またはより大きい部分を単純に発現させ、これらを抗体の誘導に用いて得ることができる。

【0068】

モノクローナル抗体の産生は、当技術分野で広く記載されている。ヘリカーゼ領域と反

50

応するモノクローナル抗体は、同様に当技術分野で数十年間知られている手法 (Kohler および Milstein、(1975)) により、近交系マウスを免疫して調製することができる。

【0069】

本発明による抗体の大規模産生方法もまた、当技術分野で知られている。このような方法は、ファージディスプレイの繊維状ファージへの、本発明によるタンパク質をコードする遺伝情報 (の断片) のクローニングに依存する。このような手法は、特に Cortese, R. ら、(1994)、Clackson, T. および Wells, J. A. (1994)、Marks, J. D. ら、(1992)、Winter, G. ら、(1994) および Little, M. ら、(1994) による総説に記載されている。ファージは、その後、ラクダ重鎖抗体を発現するラクダ発現ライブラリーをスクリーニングするのに使用される。(Muyldermans, S. および Lauwereys, M. (1999) ならびに Ghahroudi, M. A. ら、(1997))。所望の抗体を発現するライブラリーからの細胞が複製され得、その後抗体の大規模発現に使用され得る。

10

【0070】

ペスチウイルスと特異的に反応するモノクローナル抗体の産生は、Deregt (1990) および Corapi (1990) により20年前に既に記載されている。

【0071】

さらにより具体的には、および NS3 タンパク質に直接関連して、NS3 と反応するモノクローナル抗体を産生するための十分な手引きは、特に、NS3 タンパク質上の2つの抗原ドメインのマッピングを記載する Deregt (2005) により示されている。さらに、NS3 タンパク質と反応する抗体に基づく幾つかの市販および非市販の ELISA テストが、Bourdeau, F. (2001)、Chimenzio Zoth, S. (2006)、Kramps, J. A. (1999)、Bathia, S. (20008) および Makoschey, B. (2007) により記載されている。

20

【0072】

そのため、結論として、NS3 タンパク質のヘリカーゼ領域のエピトープと反応するモノクローナル抗体は、ヘリカーゼ領域のそのエピトープに修飾を有する本発明によるウイルスを選択することで十分である。実施例セクションは、適切なモノクローナルの幾つかの例を提供し、上述された文献は、ヘリカーゼ領域と反応するさらなるモノクローナル抗体を開発するための十分な手引きを提供する。

30

【0073】

実施例セクションはまた、本発明によるヘリカーゼ領域のドメインに修飾を有するウイルスの例も提供する。実施例はまた、このようなウイルスを作成する一般的方法も開示する。したがって、実施例セクションは、実施例セクションに記載されたウイルスを使用する代わりに、本発明による他のウイルスを作成したい当業者に対し十分な手引きを提供する。

【0074】

非構造タンパク質 NS3 のヘリカーゼドメインのエピトープに修飾を有する複製コンピテントな BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV を、前記エピトープが、野生型形態において BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたは BDV の前記非構造タンパク質 NS3 と反応するモノクローナル抗体ともはや反応しないように作製/選択することは、単に、NS3 タンパク質のヘリカーゼ領域に修飾を有する感染性完全長クローンを作製する問題にすぎない。感染性完全長クローンの構築は、20年前に既に記載された。完全長の感染性 DNA コピーは、特に BVDV (Meyers ら、J., (1996)^b) および CSFV (Meyers ら、(1996)^a、Moormann ら、(1996)、Riedel, C. ら、PLoS Pathog. 2012; 8(3): e1002598. doi: 10.1371/journal.ppat.1002598. Epub 2012 Mar 22) に関して記載されている。

40

【0075】

50

それらの可用性は、科学者らがBVDVまたはCSFVの弱毒株を開発するために逆遺伝子操作を行えるようにする。

【0076】

所望であれば、当業者は、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープに修飾を行うときに、部位特異的変異誘発ステップの回避を選択することすらできよう。その場合、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープに修飾を既に含むDNA断片が、単に実験者により合成されてもよく、または商業的に得られてもよい。該DNA断片は次いで、基本的組換えDNA技術を用いて、完全長cDNAクローンにおいてそのヘリカーゼエピトープをコードする野生型DNAの領域とすぐに交換することができる。

10

【0077】

完全長の感染性クローンは、ひとたび作成されると、哺乳動物細胞にトランスフェクトされ得、細胞培養物はその後、子孫ウイルスの有無についてチェックされ得る。

【0078】

NS3タンパク質のヘリカーゼ領域に致死修飾を有する完全長クローンは複製能要件を満たさず、その結果、子孫ウイルスを産生しないであろう。そのため、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに対するこのステップは、自己選択的である。

【0079】

次のステップ、すなわちNS3タンパク質のヘリカーゼ領域のエピトープに修飾を有するウイルスの、野生型エピトープと反応するモノクローナル抗体との反応性の検査もまた、単純および簡単なものである。第1のステップにより得られた複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVは、例えば上に記載された古典的IPMAでテストすることができる(上記参照)。

20

【0080】

本発明のこの実施形態の別の好ましい形態は、前記エピトープが、次のモノクローナル、すなわち次の寄託番号：BVD/C16-INT、フェーズ2、09-07-2012の下、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)、Institut Pasteur、25 Rue du Docteur Roux、F-75724 Paris Cedex 15に寄託されたmAb BVD/C16-INT、mAb 8.12.7 NS3h、Code 4およびmAb 14E7 NS3h、GL3h6(さらに簡潔にBVD/C16-INT (CNCM I-4658)、mAb 8.12.7 NS3h、Code 4 (CNCM I-4668)およびmAb 14E7 NS3h、GL3h6 (CNCM I-4667)と呼ばれる)から成る群から選択されるモノクローナル抗体ともはや反応しない、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

30

【0081】

mAb 8.12.7 NS3h、Code 4 (CNCM I-4668)は、395 Pine Tree Road、Suite 310、Ithaca、NY 14850にオフィスを有するCornell Center for Technology Enterprise and Commercialization(「CCTEC」)に代表されるコーネル大学(「CORNELL」)により、Intervet International B.V.に提供された。Intervet International B.V.は、コーネル大とのライセンス契約を通じてこのmAbを寄託する権利を得た。

40

【0082】

この実施形態の別の好ましい形態は、修飾が完全長NSのアミノ酸aa193~aa683にわたる領域に位置し、NS3が保存アミノ酸配列「GPAVCKK」で始まる、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDV

50

に関する。

【0083】

この実施形態のより好ましい形態は、前記修飾が、BVDV-2株890におけるアミノ酸2262から2325の領域にわたるアミノ酸配列₂₂₆₂ IQLAYNSHENQIPVLLPKIKNGEVTDSYENYTYLNARKLGEDVPVYVYATEGEDLAVDLLGMDW₂₃₂₅、またはCSFV株p447におけるアミノ酸2188から2251の領域にわたる同等のアミノ酸配列₂₁₈₈ IQLAYNSYETQVPVLFPKIRNGEVTDTYDNYTFLNARKLGDDVPPYVYATEDEDLAVELLLGLDW₂₂₅₁に位置する、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

10

【0084】

この領域は、モノクローナル抗体BVD/C16-INTに結合する。モノクローナル抗体BVD/C16-INTは、CSFV、BVDVおよびBDV単離株全てのNS3タンパク質のヘリカーゼ領域に結合する。結合は、ヘリカーゼの幾つかのドメインの存在を必要とする。

【0085】

該モノクローナル抗体は、直接ELISAおよびブロッキングELISAなどの確立されたELISA系において反応性である。該モノクローナルは、真核生物発現系で発現された場合、完全長NS3タンパク質およびNS3のヘリカーゼドメインのいずれとも反応する。該モノクローナル抗体は、ウエスタンブロットでは反応性でない。

20

【0086】

単なる例として、上記のアミノ酸配列と修飾配列IQLAYNSLETPVPVAFPKVKNGEVTDAHETYE LMTCRKLEKDPPIYLYATEEEDとの置換は、複製コンピテントウイルスであるが、もはやモノクローナル抗体BVD/C16-INTにより認識されないウイルスを提供する。このようなウイルスは、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVの要件を満たし、故にマーカークワチンのウイルスとして適している。

【0087】

この実施形態の別のより好ましい形態は、前記修飾が、CSFV p447におけるアミノ酸1950~1988の領域またはBVDVにおける同等な領域にわたるアミノ酸配列GQKHPIEEFIAPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIPVEEMKNに位置する、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

30

【0088】

この領域は、モノクローナル抗体mAb 8.12.7 NS3h、Code 4に結合し、該抗体は、CSFV、BVDVおよびBDV単離株全てのNS3タンパク質のヘリカーゼ領域に結合する。該モノクローナル抗体は、直接ELISAおよびブロッキングELISAなどの確立されたELISA系において反応性である。mAb 8.12.7 NS3h、Code 4モノクローナルは、完全長NS3タンパク質およびNS3のヘリカーゼドメインのいずれとも反応する。さらに、該モノクローナルは、これらの領域が原核生物または真核生物発現系で発現されるかどうかにかかわらず、これらの領域と反応する。該モノクローナル抗体は、ウエスタンブロットでも反応性である。

40

【0089】

やはり単なる例として、アミノ酸配列GQKHPIEEFIAPEVMKGEDLGSEYLDIAGLKIPVE₁₉₈₄のGQKFTIEEVVPEVMKGEDLADDYIEIAGLKVPKKによる置換は、複製コンピテントウイルスであるが、もはやモノクローナル抗体mAb 8.12.7 NS3h、Code 4により認識されないウイルスを提供する（代償性変異がQ2108LおよびY2492Hで見出された）。

【0090】

一方、領域MKGEのMKLEへの変異は致死的であり、すなわち複製子孫ウイルスは

50

作られない。

【0091】

この実施形態のやはり別のより好ましい形態は、前記修飾が、アミノ酸配列_{2 1 7 4} L L I S E D L P A A V K N I M A_{2 1 8 9} (B V D V - 1 C P 7)、_{2 2 3 9} L L I S E D L P A A V K N I M A_{2 2 5 4} (B V D V - 2 8 9 0) または_{2 1 6 5} L L I S E E L P M A V K N I M A_{2 1 8 0} (C S F V A l f o r t T u e b i n g e n / p 4 4 7) に位置する、本発明による複製コンピテントな B V D V、C S F V、非定型ペスチウイルスまたは B D V に関する。

【0092】

この領域は、モノクローナル抗体 m A b 1 4 E 7 H N S 3 h、G L 3 h 6 に結合し、該抗体は、B V D V、C S F V および B D V 単離株全ての N S 3 タンパク質のヘリカーゼ領域に結合する。該モノクローナル抗体は、直接 E L I S A およびブロッキング E L I S A などの確立された E L I S A 系において反応性である。該モノクローナルは、完全長 N S 3 タンパク質および N S 3 のヘリカーゼドメインのいずれとも、およびヘリカーゼのわずかドメイン 3 とさえも反応する。さらに、該モノクローナルは、これらの領域が原核生物または真核生物発現系で発現されるかどうかにかかわらず、これらの領域と反応する。該モノクローナル抗体は、ウエスタンブロットでも反応性である。

10

【0093】

やはり単なる例として、アミノ酸配列 L L I S E D L P A A V K N I M A の L L I S R D L P V V T K N I M A による置換は、複製コンピテントウイルスであるが、もはやモノクローナル抗体 m A b 1 4 E 7 H N S 3 h、G L 3 h 6 により認識されないウイルスを提供する。

20

【0094】

上述の通り、本発明によるウイルスは、複製コンピテントでなければならない。なぜなら、さもなければ該ウイルスは産生され得ず、したがって例えばワクチンにおいてまたは診断目的で事実上使用され得ない。

【0095】

しかし、これはワクチンが、ワクチンとして作用するために標的動物において複製しなければならないことを必ずしも意味しない。本発明によるウイルスは、そのマーカー特性を本質的に有する（例えばヘリカーゼにおけるエピートープは、野生型ウイルスのそのエピートープと反応する抗体ともはや反応しない）。したがって、ウイルスは、標的動物において複製するか否かにかかわらず、標的動物においてマーカーワクチンとして機能する。

30

【0096】

故に、本実施形態の別の形態は、前記 B V D V、C S F V、非定型ペスチウイルスまたは B D V が不活化された、本発明による複製コンピテントな B V D V、C S F V、非定型ペスチウイルスまたは B D V に関する。

【0097】

本発明の別の実施形態は、本発明による B V D V、B D V、非定型ペスチウイルスまたは C S F V を含むマーカーワクチンを提供することを目的とする。

【0098】

マーカーワクチンは、不活化されている本発明によるウイルス全体に基づいてもよい（不活化ワクチン）。このようなワクチンは、その不活化特性のため安全であるという利点を有する。さらにこのようなワクチンは、ウイルス全体を含むためより良好な免疫応答を誘発するという、上述されたサブユニットベースのマーカーワクチンに勝る利点を有する。

40

【0099】

B V D V、C S F V、非定型ペスチウイルスおよび B D V は、B V D V、C S F V、非定型ペスチウイルスまたは B D V の不活化のための当技術分野で知られている多くの方法で不活化することができる。物理的不活化の例は、U V 照射、X 線照射、 γ 線照射および加熱である。全て当技術分野でよく知られている、 β -プロピオラクトン、グルタルアル

50

デヒド、バイナリーエチレンイミン、ホルムアルデヒド等などの不活化化学物質の例は、同様に適用できる。ウイルスを不活化する他の方法も、本発明において実施されることは明らかである。

【0100】

あるいは、本発明によるマーカーワクチンは、宿主動物において防御免疫応答を誘発するが、そのゲノムにおける変異のためウイルス疾患を惹起しない本発明による生弱毒化ウイルスを含む、弱毒化生ワクチンであってもよい。

【0101】

生弱毒化ワクチンは、自然感染をより綿密に模倣するという不活化ワクチンに勝る利点を有する。結果として、生弱毒化ワクチンは、その不活化対応物より概して高い防御レベルを提供する。

10

【0102】

既存の（非マーカー）生弱毒化ウイルスは、本発明によるマーカーワクチンを作成するための出発物質を形成することができる。このような生弱毒化ウイルスは、当技術分野で広く記載されている（下記参照）。

【0103】

BVDおよびCSFの生弱毒化ウイルスは、当技術分野で知られており、BVDおよびCSFの生弱毒化ウイルスワクチンが市販されている。

【0104】

故に、本発明の別の実施形態は、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスもしくはBDV、または本発明による不活化された複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスもしくはBDV、および医薬的に許容可能な担体を含むワクチンに関する。

20

【0105】

有望なワクチンの幾つかは、N^Pr^o遺伝子および/またはE^rn^s遺伝子に欠失を含み、好ましくは細胞変性パイオタイプである。このような欠失に基づくペスチウイルスワクチンは、特にPCT特許出願WO 99/64604、米国特許出願US 2004/0146854、欧州特許出願EP 1104676、欧州特許出願EP 1013757、欧州特許出願EP 1440149、欧州特許EP 1751276およびMayer, D.ら(2004)に記載されている。

30

【0106】

例えば、EP1161537には、E^rn^sタンパク質をコードする遺伝子が欠失され（およびトランスで補完され）たCSFV変異体が記載されている。

【0107】

Risattira(2007)は、E2領域に置換を有し、弱毒化表現型を示すCSFV変異体を記載している。Maurerら(2005)も、E2遺伝子の全部または部分を欠き、高病原性CSFVによる致命的チャレンジに対して部分的防御を示したCSFV E2変異体を記載する。Meyersら(1999)は、E^rn^sタンパク質をコードする遺伝子に変異を有し、変異をもたらしたCSFV変異体を記載する。CSFVのトランス補完E^rn^s欠失変異体は、Widjojoadmodjora(2000)により記載された。

40

【0108】

CSFVおよびBVDVのN^Pr^o欠失変異体をワクチン候補として使用することも示唆されている。

【0109】

CSFV N^Pr^o変異体は、Tratschin, J.らにおいて既に開示された。彼らは、N^Pr^o遺伝子をマウスユビキチン配列により置換し（該変異体はvA187-Ubiと呼ばれた）、N^Pr^oのタンパク質分解活性（Cタンパク質の正しいN末端の生成）はウイルス複製に不可欠であるが、この活性はユビキチンのタンパク質分解活性により置換することができる結論した。該変異体は、ブタにおいて完全に非病原性であるこ

50

とが見出された。

【0110】

Tratschinらは、N^P r^o 遺伝子が欠失され、別のプロテアーゼと置換されない場合、生存ウイルスは得られないことを見出した。

【0111】

N^P r^o がマウスユビキチンにより置換された変異体はまた、生弱毒化ワクチンとしての使用もテストされた(Mayerら、2004)。

【0112】

さらなる研究プロジェクトにおいて、全BV DV - N^P r^o コード配列が欠失され、得られた変異体がワクチン候補として提案された。EP1013757には、全N^P r^o 配列を欠く、細胞変性株NADLに基づくBV DV N^P r^o 欠失変異体が記載されている。得られた変異体は、その野生型対応物と比較して細胞培養物における感染性ははるかに低く、ゆっくり複製されると述べられた。その遅い増殖率は、弱毒化表現型をもたらすと示唆された。

【0113】

またLaiら(2000)は、NADL株に基づくBV DV N^P r^o ヌル変異体を記載した。該変異体は複製に高度な欠陥があり、野生型ウイルスより少なくとも10倍低い産生レベルをもたらした。この変異体もまた、その限られた複製能のためワクチン候補として使用され得る。

【0114】

WO2005111201には、N^P r^o 遺伝子およびE^r n^s 遺伝子の両方に欠失がなされたBV DV変異体が開示されている。N^P r^o 変異またはE^r n^s 変異のみでは、妊娠した未経産牛の胎児の感染を予防するのに十分でない結論された。2型BV DV株NY93に基づく二重変異体においてのみ、妊娠した未経産牛の胎児の感染は予防することができた(しかし、二重変異体は別の2型株による2型チャレンジに対してのみテストされ、1型BV DVチャレンジに対してはテストされなかった)。

【0115】

テストされた変異体は、N^P r^o 配列のN末端の4アミノ酸を除いて全てを欠いた。

【0116】

変異体の増殖は、野生型ウイルスより大幅に低いことが注目された。良好な増殖ウイルスを得るために、ウシユビキチン遺伝子断片またはウシLC3コード配列の断片のどちらかが、N^P r^o 遺伝子の大部分に取って代わる変異体が構築された。

【0117】

上記から結果として、例えばCSFVおよびBV DVの(非マーカ-)生弱毒化ウイルスが当技術分野で広く記載されており、BV DVおよびCSFVについては市販すらされている。

【0118】

故に、上述の通り、このようなウイルスは、本発明によるウイルス、すなわち非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピト- プに修飾を有し、前記エピト- プが、野生型形態において前記BV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVと反応するモノクローナル抗体ともはや反応しない、複製コンピテ- ントなBV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVを構築するための極めて適切な出発物質を成す。

【0119】

このようなウイルスは、その野生型対応物と比べて本質的に弱毒化された振る舞いをし、このようなウイルスは故に、マーカ- ワクチンにおけるマーカ- ウイルスのベースとして使用することができる。

【0120】

したがって、この実施形態の好ましい形態は、本発明による複製コンピテ- ントなBV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVを含み、前記複製コンピテ- ントなBV DV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVが、E^r n^s またはN^P r^o 遺伝子

10

20

30

40

50

に弱毒化変異を有するワクチンに関する。

【0121】

このようなウイルスは、製造者により指示されたまたは文献に示された量およびワクチン接種経路で与えられることは言うまでもない。

【0122】

BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスおよびBDVは、それぞれ反芻動物、ブタおよびヒツジ/ヤギにおいて疾患を引き起こす多くの病原体のほんの数例である。実際、反芻動物、ブタおよびヒツジ/ヤギは、多くの病原性ウイルスまたは微生物に対してワクチン接種される。

【0123】

したがって、特定の動物種に対する本発明によるワクチンを、その動物種に対して病原性であるウイルスもしくは微生物の追加の免疫原、または前記ウイルスまたは微生物の免疫原をコードする遺伝情報と組み合わせることは、実用的および経済的理由の両方で極めて魅力的である。

【0124】

故に、この実施形態の好ましい形態は、ワクチンが、ワクチン接種される動物に対して病原性であるウイルスまたは微生物の追加の免疫原と、前記ウイルスまたは微生物の免疫原をコードする前記免疫原または遺伝情報に対する抗体とを含む、本発明によるワクチンに関する。免疫原は、動物において免疫応答を誘導する化合物である。免疫原は、例えばウイルス全体もしくは細菌、またはそのウイルスもしくは細菌のタンパク質もしくは糖部分であってもよい。

【0125】

反芻動物にとって病原性である最も一般的なウイルスおよび微生物は、ウシロタウイルス、家畜流行性出血性疾患ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、牛流行熱ウイルス、ウシヘルペスウイルス、パラインフルエンザ3型ウイルス、ウシパラミクソウイルス、ブルータングウイルス、オルトブンヤウイルス(Orthobunyavirus)、口蹄疫ウイルス、マンヘミア・ヘモリチカ(Mannheimia haemolytica)、パストレラ・ムルトシダおよびウシ呼吸器合抱体ウイルスである。

【0126】

したがって、本発明のより好ましい形態は、反芻動物に対して病原性であるウイルスまたは微生物が、ウシロタウイルス、家畜流行性出血性疾患ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、牛流行熱ウイルス、ウシヘルペスウイルス、パラインフルエンザ3型ウイルス、ウシパラミクソウイルス、ブルータングウイルス、オルトブンヤウイルス、口蹄疫ウイルス、マンヘミア・ヘモリチカ、パストレラ・ムルトシダおよびウシ呼吸器合抱体ウイルスから成る群から選択される、本発明によるワクチンに関する。

【0127】

ブタにとって病原性である最も一般的な病原性ウイルスおよび微生物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリア、アフリカ豚コレラウイルス、ニバウイルス、ブタサーコウイルス、ブタトルクテノウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタパルボウイルス、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス(PRRS)、ブタ伝染性下痢ウイルス(PEDV)、口蹄疫ウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、ブタ丹毒菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)、気管支敗血症菌、サルモネラ・コレラスイス、ヘモフィルス・パラスイス、パストレラ・ムルトシダ、ブタ連鎖球菌、マイコプラズマ・ハイオニューモニエおよびアクチノバチルス・ブルロニューモニアである。

【0128】

したがって、本発明の同様により好ましい形態は、ブタに対して病原性であるウイルスまたは微生物が、ブラキスピラ・ヒオディセンテリア、アフリカ豚コレラウイルス、ニバウイルス、ブタサーコウイルス、ブタトルクテノウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタパルボウイルス、ブタ生殖器呼吸器症候群ウイルス(PRR

10

20

30

40

50

S)、ブタ伝染性下痢ウイルス(PEDV)、口蹄疫ウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、ブタ丹毒菌、気管支敗血症菌、サルモネラ・コレラシス、ヘモフィルス・パラシス、パストレラ・ムルトシダ、ブタ連鎖球菌、マイコプラズマ・ハイオニューモニエおよびアクチノパチルス・プルコニューモニアから成る群から選択される、本発明によるワクチンに関する。

【0129】

ヒツジ/ヤギにとって病原性である最も一般的な病原性ウイルスおよび微生物は、口蹄疫ウイルス、小反芻獣疫、リフトバレー熱ウイルス、オルトブンヤウイルス、跳躍病、ナイロビ羊病ウイルス、ブルータングウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、ヒツジヘルペスウイルス、大腸菌、オウム病クラミジア(*Chlamidia psitt* 10
aci)、ウェルシュ菌、クロストリジウム・セプティカム、破傷風菌(*Clostridium titani*)、ノーヴィ菌、気腫疽菌、トキソプラズマ原虫、パストレラ・ヘモリチカおよびパストレラ・トレハロシ(*Pasteurella trehalosi*)である。

【0130】

したがって、本発明のやはり同様により好ましい形態は、ヒツジ/ヤギに対して病原性であるウイルスまたは微生物が、口蹄疫ウイルス、小反芻獣疫、リフトバレー熱ウイルス、オルトブンヤウイルス、跳躍病、ナイロビ羊病ウイルス、ブルータングウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、ヒツジヘルペスウイルス、大腸菌、オウム病クラミジア、ウェルシュ菌、クロストリジウム・セプティカム、破傷風菌、ノーヴィ菌、気腫疽菌 20
、トキソプラズマ原虫、パストレラ・ヘモリチカおよびパストレラ・トレハロシから成る群から選択される、本発明によるワクチンに関する。

【0131】

ワクチンは一般に、だが特に、生弱毒化ウイルスを含むワクチンは、低温で保管されなければならない、または凍結乾燥形態にななければならない。凍結乾燥ワクチンは、穏やかな冷却条件下またはさらには室温で保持することができる。しばしば、ワクチンは、例えば変性しやすいタンパク質を変性から保護し、ワクチンの保存可能期間を増大させ、または凍結乾燥効率を向上させるために、安定剤と混合される。有用な安定剤は、特にSPGA、炭水化物(例えばソルビトール、マンニトール、トレハロース、デンプン、スクロース、デキストランまたはグルコース)、タンパク質またはその分解産物(アルブミンもしくはカゼインなどの)、およびアルカリ金属リン酸塩などの緩衝剤である。 30

【0132】

したがって、好ましくは、本発明によるワクチンは凍結乾燥形態にある。

【0133】

さらに、ワクチンは、生理学的に許容可能な希釈剤に懸濁されてもよい。このような緩衝液は、例えば滅菌水、緩衝液等であってもよい。

【0134】

ウイルスを乳化または安定化させる希釈剤および化合物もまた、本発明における実施形態であることは言うまでもない。

【0135】

ワクチン中の本発明によるウイルスの適切な量は、使用されるウイルスの弱毒化レベルに応じて 10^2 から 10^8 TCID₅₀の間となる。上記に引用された文献および当技術分野における知見は、必要とされるウイルスの量を決定するのに十分な手引きを当業者に与えるであろう。使用されるワクチン株が、N^Pr^o遺伝子および/またはE^rn^s遺伝子における欠失などの弱毒化欠失を含む既存の市販のウイルス株に基づく場合、どれぐらいの量のウイルスが使用されるべきかを知るのに製造者の指示書で十分であろう。 40

【0136】

大まかには、例えばN^Pr^oおよび/またはE^rn^s遺伝子に変異を有する株に対して、 10^5 TCID₅₀の量がウイルスの極めて適切な量となる。

【0137】

10

20

30

40

50

本発明によるワクチンは、公知の投与経路を介して投与することができる。このような経路は、特に鼻腔内、筋肉内、静脈内、皮内、経口および皮下経路を含む。

【0138】

本発明のさらに別の実施形態は、医薬品として使用するための本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

【0139】

本発明のやはり別の実施形態は、ワクチンにおいて使用するための本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

【0140】

本発明のやはり別の実施形態は、哺乳動物におけるペスチウイルス感染の予防において使用するための、本発明による複製コンピテントなBVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに関する。

10

【0141】

マーカーワクチンは原則的に、診断テストと併用して使用されるであろう。このような診断テストは、通常、抗体（例えば血清、血漿、唾液）を含有する動物から採取された検査試料に対して使用されるであろう。該診断テストは、野生型ウイルスと反応する抗体と、マーカーウイルスまたはマーカーワクチンと反応する抗体を識別できなければならない。

【0142】

診断テストは例えば、液相ブロックELISAまたはサンドイッチELISAの診断テストなどの、当技術分野で公知の標準的診断テストに基づいてもよい。このようなテストは特に、Wensvoort G.ら、(1988)、Robiolo B.ら、(2010)およびColijn, E.O.ら、(1997)により記載されている。

20

【0143】

基本的形態において、このような診断テストは、本発明によるウイルスにおいて修飾された、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープの野生型バージョンを含んでもよい。このようなテストは例えば、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインのエピトープでコーティングされたウェルを含んでもよい。これは、非構造タンパク質NS3のヘリカーゼドメインの前記エピトープを発現系で発現させ、この後にそうして得られたタンパク質でウェルをコーティングして容易に達成することができる（上記参照）。

30

【0144】

単にこのようなテストの例として、テストは、配列LLISEDLPAAVKNIMAを含むエピトープ（モノクローナル抗体mAb 14E7 HNS3h、GL3h6により認識される野生型エピトープ）を含んでもよいが、一方、マーカーウイルスは、配列LLISRDLPVVTKNIMAを含むエピトープ（モノクローナル抗体mAb 14E7 HNS3h、GL3h6により認識されない修飾エピトープ）を含む。

40

【0145】

本発明によるワクチンをワクチン接種された動物は、診断テストで使用される配列LLISEDLPAAVKNIMAを含む野生型エピトープに対する抗体を産生しないであろう。結果として、この野生型エピトープはブロックされることになる。洗浄ステップ後に、ウェルがHRPOコンジュゲートmAb 14E7 HNS3h、GL3h6とインキュベートされるならば、このmAbは結合し、基質、例えばTMBが添加された後に発色反応をもたらすであろう。

【0146】

しかし、野生型ウイルスに感染された動物は、野生型エピトープに対する抗体を産生することになり、そのためこれらの抗体は、診断テストで使用される野生型エピトープと反

50

応する。結果として、この野生型エピトープはブロックされることになる。洗浄ステップ後に、ウェルが m A b 1 4 E 7 H N S 3 h、G L 3 h 6 とインキュベートされるならば、この m A b は結合せず、そのため基質が添加された後に発色反応は見られない、または限られた発色反応のみが見られる。

【 0 1 4 7 】

故に、このような診断テストは、野生型ウイルスに感染された動物と、本発明によるウイルスをワクチン接種された動物を識別するのに使用することができる。同様に、ワクチン接種された動物およびその後感染された動物は、単に感染された動物と識別することができる。

【 0 1 4 8 】

野生型エピトープそれ自体は、本発明による診断テストにおいて使用することができるが、比較的短いエピトープそれ自体の代わりに、完全な N S 3 を含むタンパク質を使用することが好都合であり得ることは明らかである。特にエピトープが、標準的 E L I S A テストにおいてウェルのコーティングに例えば使用される場合、該エピトープを含むより大きなタンパク質をコーティングステップに使用することがより効率的であり得る。

【 0 1 4 9 】

診断テストの別の形態において、ウェルは例えば、非構造タンパク質 N S 3 のヘリカーゼドメインのエピトープ（本発明によるウイルスにおいて修飾された）の野生型形態と反応する（モノクローナルまたは単一特異性ポリクローナル）抗体でコーティングされてもよい。やはり単なる例として、コーティングに使用されるモノクローナル抗体は、例えば、捕捉 N S 3 に対する寄託モノクローナル抗体の 1 つ、m A b 1 4 E 7 H N S 3 h G L 3 h 6 であってもよいが、一方、捕捉された N S 3 の検出には、単一特異性ポリクローナル N S 3 ウサギ血清が使用され得る。

【 0 1 5 0 】

この原則に基づく診断テストは、例えば、モノクローナルでコーティングされたウェルを含んでもよい。

【 0 1 5 1 】

そのテストの第 1 ステップとして、テストされる動物から得られた抗体が、可溶化野生型 N S 3 タンパク質とチューブ中でプレインキュベートされ得、ヘリカーゼドメインのエピトープに結合され得る（プレインキュベーションステップ）。テストされる動物が野生型ウイルスに感染されているならば、動物において産生された抗体は、野生型エピトープ全てを含むチューブ中で N S 3 タンパク質に結合するであろう。この結果、前記エピトープは、プレインキュベーション工程においてブロックされるであろう。

【 0 1 5 2 】

一方、テストされる動物が、本発明によるウイルスをワクチン接種されている場合、ワクチンウイルスにおいて修飾された N S 3 エピトープに結合する抗体はないであろう。この結果、前記エピトープはブロックされず、故に、エピトープは、前記特定のエピトープと反応するコーティングされたモノクローナル抗体への結合に利用可能なままとなろう。

【 0 1 5 3 】

プレインキュベーションウェルからの反応混合物が、その後テストのウェルに添加される場合、エピトープが、テストされる動物の抗体によりブロックされない（すなわち動物はワクチン接種されるが、感染されない）ならば、エピトープは、ウェルにコーティングされた m A b に結合するであろう。捕捉された N S 3 は次いで、例えばコンジュゲートヤギ抗ウシ I g G 血清により次のステップにおいて検出することができる。基質が活性化され、（発色）シグナルが測定され得る。

【 0 1 5 4 】

しかし、全ての N S 3 エピトープが、テストされる動物の抗体によりブロックされた（すなわち動物が野生型ウイルスに感染されている）ならば、エピトープは、ウェルにコーティングされた m A b に結合しないであろう。その後の洗浄ステップは全ての N S 3 を除去し、そのため（発色）シグナルは現れないであろう。

10

20

30

40

50

【0155】

結果として、プレインキュベートNS3のウェルへの結合または結合の欠如は、テストされる動物の既往、すなわち、ワクチン接種されている（結合、したがって発色反応）、または野外感染されている（結合なし、したがって発色反応なし）を示す。

【0156】

例えば上記された2つのテストなどの診断テストにおいて、野生型エピトープの代わりに本発明による修飾NS3エピトープを使用することも可能である。その修飾エピトープを含む本発明によるウイルスは、多くの場合、そのエピトープに対する抗体を産生するであろう。

【0157】

やはり、単なる例として、このようなテストは、配列LLISRDLPVVTKNIMAを含むエピトープ（モノクローナル抗体mAb 14E7 HNS3h、GL3h6により認識されない修飾エピトープ）を含んでもよい。

【0158】

本発明によるワクチンをワクチン接種された動物は、配列LLISRDLPVVTKNIMA（モノクローナル抗体mAb 14E7 HNS3h、GL3h6により認識されない修飾エピトープ）に対する抗体を産生するであろう。結果として、このエピトープはブロックされるであろう。洗浄ステップ後、ウェルがmAb 14E7 HNS3h、GL3h6とインキュベートされるならば、このmAbは結合せず、基質が添加された後に発色反応の欠如をもたらすであろう。

【0159】

しかし、野生型ウイルスに感染された動物は、修飾エピトープに対する抗体を産生することにならず、そのため、診断テストに使用される修飾エピトープと反応する抗体はないであろう。結果として、この野生型エピトープはブロックされないであろう。洗浄ステップ後に、ウェルが修飾エピトープに対するmAbとインキュベートされるならば、このmAbは結合し、そのため、基質が添加された後に発色反応が生じるであろう。

【0160】

同じことが必要な変更を加えて、上記された2番目のテストに適用される。その場合、プレインキュベーションステップは、野生型エピトープの代わりに修飾エピトープを有するNS3タンパク質を用いて行われる。

【0161】

故に、このような診断テストは、野生型ウイルスに感染された動物と本発明によるウイルスをワクチン接種された動物を識別するのに、同様に使用することができる。

【0162】

故に、本発明のやはり別の実施形態は、診断テストが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVのNS3エピトープを含むことを特徴とする、本発明によるワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テストに関する。

【0163】

この実施形態の別の形態は、診断テストが、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVのNS3エピトープに対する抗体を含むことを特徴とする、本発明によるワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テストに関する。

【0164】

この実施形態の別の形態は、診断テストが、本発明に記載された修飾NS3エピトープを含むことを特徴とする、本発明によるワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テストに関する。

10

20

30

40

50

【0165】

この実施形態のやはり別の形態は、診断テストが、本発明に記載された修飾NS3エピトープに対する抗体を含むことを特徴する、本発明によるワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための診断テストに関する。

【0166】

本発明の別の実施形態は、本発明によるワクチンをワクチン接種された哺乳動物を、野生型BVDV、CSFV、非定型ペスチウイルスまたはBDVに感染されている哺乳動物と区別するための、本発明による診断テストの使用に関する。

【0167】

[実施例]

実施例1

モノクローナル抗体：

mAb Code 4 (mAb 8.12.7 NS3h、Code 4; Corapira 1988) は、BVDV 1「Singer」に対して産生された。このモノクローナル抗体は、ペスチウイルスとの広範な反応性を示し、非構造タンパク質3 (NS3) 内のエピトープを認識する。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3は、mAb Code 4により認識されない。ハイブリドーマ細胞を、無血清ISF培地 (Seromed) で増殖させた。上清を回収し、遠心分離により除去した。ハイブリドーマはE. J. Dubovi、コーネル大学、イサカ、NY) から入手した。

【0168】

mAb 49DEは、BVDV 1「NADL」を用いて産生された。このモノクローナル抗体は、ペスチウイルスとの広範な反応性を示し、NS3内のエピトープを認識する (Moennigら、1987; Beaudeauら、2000)。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3は、mAb 49DEにより認識されない。49DEを含有するBVD/BD診断的ELISAは、Laboratoire Service International、69380 Lissieu、フランスを通じて市販されている。49DEのハイブリドーマ上清は、Ernst Peterhans、ベルン大学ウイルス研究所、スイスによる好意により提供された。

【0169】

mAb C16 (mAb BVD/C16-INT; Petersら、1986) は、BVDV 1、「NADL」に対して産生された。このモノクローナル抗体は、ペスチウイルスとの広範な反応性を示し、NS3内のエピトープを認識する (Edwardsら、1991)。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3は、mAb C16により認識されない。mAb C16はMSDアニマルヘルスを通じて入手した。

【0170】

mAb WB103は、BVDV 1「Oregon C24V」 (Edwardsら、1988; Patonら、1991) に対して産生された。このモノクローナル抗体は、ペスチウイルスとの広範な反応性を示し、NS3内のエピトープを認識する。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3は、mAb WB103により認識されない。mAb WB103は、診断的ELISAテスト (PriocHECK、Prionics AG、VLAウェブリッジ、UKから購入した) の一部である。

【0171】

mAb WB112は、BVDV 1「Oregon C24V」 (Edwardsら、1988; Patonら、1991) に対して産生された。このモノクローナル抗体は、非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスを含むペスチウイルスとの広範な反応性を示し、NS3内のエピトープを認識する。mAb WB112は、診断的ELISAテスト (PriocHECK、Prionics AG、VLAウェブリッジ、UKから購入した) の一部である。

【0172】

10

20

30

40

50

mAb 14E7 (mAb 14E7 NS3h、GL3h6) は、ユストゥス・リービヒ大学ウイルス研究所、ギーセン、ドイツでBVDV 1「NCP7」の細菌発現NS3ヘリカーゼサブドメイン3に対して産生された。このモノクローナル抗体は、ペスチウイルスとの広範な反応性を示し、NS3のC末端部分のエピトープを認識する。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3は、mAb 17E7により認識されない。ハイブリドーマ細胞は、無血清ISF培地 (Seromed) で増殖させた。

【0173】

細胞

BHK 21およびSK-6 (Kaszas、1972) 細胞は、10%加熱不活化ウシ胎仔血清 (FCS) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で増殖させた。細胞は37 °Cおよび5%CO₂で維持した。

【0174】

細菌発現切断NS3ヘリカーゼの生成

BVDV NS3ヘリカーゼの切断は、C末端ポリヒスチジンタグを有するBVDV NCP7のNS3ヘリカーゼドメインをコードするプラスミドpL200に、欠失を導入して引き起こした。ヘリカーゼを、C型肝炎ウイルス (HCV) 由来の関連するNS3分子のNS3モデルに従って3つのドメインに分けた。単一のポリヒスチジンタグNS3ドメインのみを発現する一連のプラスミドを構築した (NS3 D1-his、NS3 D2-his、NS3 D3-his)。変異誘発は、供給者により推奨された表1に列挙されたプライマーを用いてPCRにより行った (Pfu DNAポリメラーゼ、Promega)。全ての構築物をヌクレオチド配列決定 (SeqLab) により確認した。

【表2】

表1：細菌発現プラスミドの生成に使用されたプライマーおよびプラスミド

生成プラスミド	プライマー	プライマー配列
pW1 NS3 D3-his	E1fw CST231rev	5' -CAGGAAACAGCAACCGGGTCAAAG-3' 5' -GCTAGCCATATGTATATCTCCTTC-3'
pW2 NS3 D1-his	E2fw E3rev	5' -CACCACCACCACCACCACCATC-3' 5' -TGTTGTGGTTACTGACCCTGC-3'
pW5 NS3 D2-his	E5fw CST231rev	5' -GGGCAAAAACACCCAATAGAAG-3' 5' -GCTAGCCATATGTATATCTCCTTC-3'
pW3 NS3 D1+D2-his	E2fw E4rev	5' -CACCACCACCACCACCACCATC-3' 5' -ACTTCTATAATACCTACCGGGTTTC-3'

【0175】

pW5 (NS3 D1 + D2 - his をコードする) の構築には、中間体プラスミド pW3 を設計した。

【0176】

あるいは、CSFV Alfort 配列に代わる非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス置換およびアミノ酸交換を、p1039プラスミド (Lamp、2010) に挿入した。非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3ヘリカーゼドメインおよびN末端ヘプタ-Hisタグを含有するプラスミドpL282を、非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス配列のドナーとして使用した。幾つかのプラスミドを、クローニングの中間体プラスミドとして使用した (p1708、p1717a、p1720、p1716、p1727a、p1722、p1729およびp1372)。安定性を向上させるために、p1710およびp1711と命名された2つのプラスミドをベクターpMT/BiP (Invitrogen) の骨格に構築した。P1710は、完全CSFV Alfort NS3をpMT/BiPベクター骨格に含有するが、一方、p1711は、完全非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3ヘリカーゼを同じpMT骨格に含有する。P1710およびp1711は、PCRでのテンプレートとして使用した。得られたインサートはpet11a細菌発現ベクター (Clontech) にライゲートした。これらのプラスミドに基づき、NS3ヘリカーゼサブドメイン2のN末端ストレッチに

10

20

30

40

50

非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス置換を有する幾つかの構築物を生成した。P1763は、プラスミドp1039に対する位置に点変異MK₁₉₈₇LEをプライマーで挿入して生成した。変異誘発NS3コード配列を、XhoIおよびBglII制限部位によりp1039ベクターにクローニングした。得られたプラスミド(p1723、p1734、p1742)は、Rosetta pLys細胞における新たに生成されたキメラNS3の細菌発現に使用した。

【表3】

表2：アミノ酸レベルでのCSFV配列における非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス置換、数はCSFV Alfortゲノム (GenBank: U90951.1) を指す。

10

プラスミド	類似の非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスコドンによる CSFV 置換におけるアミノ酸(aa)	aa 数
P1718	aa2004-aa2107	104
P1719	aa1950-aa2003	54
P1723	aa2003-aa1975	26
P1742	aa1950-1962	13
P1734	aa1950-1988	39
P1763	MK ₁₉₈₇ LE	2

20

【表4】

表3：前駆体プラスミドおよび細菌発現プラスミドの生成に使用されたプライマーおよびプラスミド（注記：非B=非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルス）。

プラスミド	PCR テンプレート	プライマー	配列
p1708 pET11a ベクターで置換されたキメラ CSFV NS3、D2 非 B	ベクター： p1039	CST451	5' -CAAGAAACACCTGTCGGCTC-3'
		CST458	5' -AGTGGTTGTTACTGTGCCTGCCG-3'
	インサート： pL282	CST452	5' -GGGCAGAAATTCACAATTGAG-3'
		CST453	5' -TCCTCTCAAGTACCTCCCAG-3'
p1716	ベクター： p1710	CST462	5' -GCAAAGAAATTGAAGGCCAAAGGATAC-3'
		CST463	5' -CGCCTCTACCGCCATGTTCTTG-3'
	インサート： p1711	CST464	5' -GCAAAAAAAAAATTAACCACACAGGGATAC-3'
		CST465	5' -TGTTTCCGATGCCATCTTCCTTG-3'
p1717a	ベクター： p1711	CST464	5' -GCAAAAAAAAAATTAACCACACAGGGATAC-3'
		CST465	5' -TGTTTCCGATGCCATCTTCCTTG-3'

30

	インサート: p1710	CST462 CST463	5'-GCAAAGAAATTGAAGGCCAAAGGATAC-3' 5'-CGCCTCTACCGCCATGTTCCCTG-3'
p1722	ベクター: p1711	CST471 CST464	5'-TTCGATGTAATCATCAGCAAGGTC-3' GCAAAAAAATTAACCACACAGGGATAC-3'
	インサート: p1710	CST470 pMT rev.	5'-ATTGCCGGACTGAAGATACCAGTA-3' 5'-CTTAGAAGGCACAGTCGAGGCTG-3'
p1729	ベクター: p1711	CST487 CST464	5'-ACCCTCTAACTCTTTCTTTGGCAC-3' 5'-GCAAAAAAATTAACCACACAGGGATAC
	インサート: p1710	CST486 pMT rev.	5'-AACATGCTAGTTTTTGTGCCAC-3' 5'-CTTAGAAGGCACAGTCGAGGCTG-3'
p1727a	ベクター: p1711	CST473 CST464	5'-TTCAGGTACTACCACCTCCTCAATTG-3' 5'-GCAAAAAAATTAACCACACAGGGATAC-3'
	インサート: p1710	CST472 pMT rev.	5'-GTGATGAAAGGAGAAGACTTGG-3' 5'-CTTAGAAGGCACAGTCGAGGCTG-3'
p1763 MK ₁₉₈₇ LE	PCR テンプレート: p1723	CST497	5'-GAGAATAACATGCTAGTTTTTGTGCCAC-3'
		CST498	5'-CAGCTCCTCTACTGGTATCTTCAGTCCGGC-3'

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4：細菌発現プラスミドのクローニング戦略（注記：非 B = 非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルス）。

プラスミド	参照断片
p1710 pMT における完全 CSFV NS3	インサート: p1039/XhoI/BglII ベクター: pMT-Bip-V5-His/XhoI/BglII
p1711 pMT ベクターで置換された キメラ CSFV NS3、D2 非 B	インサート: p1708/XhoI/BglII ベクター: pMT-Bip-V5-His/XhoI/BglII
p1718	ベクター: p1039/XhoI/BglII インサート: 1716/XhoI/BglII
p1719	ベクター: p1039/XhoI/BglII インサート: p1717/XhoI/BglII
p1723	ベクター: p1039/XhoI/BglII インサート: p1722/XhoI/BglII
p1734	ベクター: p1039/XhoI/BglII インサート: p1729/XhoI/BglII
p1742	ベクター: p1039/XhoI/BglII インサート: 1727a/XhoI/BglII

【0177】

組換えタンパク質の調製

組換え his タグタンパク質は、大腸菌 Rosetta 2 細胞 (Novagen) で発現させた。発現は、0.8 の最適密度で 1 mM イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG, AppliChem) を添加後、30 で 2 時間行った。回収のため、細胞を遠心分離し、溶解緩衝液 A (50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7.0 から 8.0) に再懸濁し、3 サイクルの凍結および解凍に供した。10⁵ × g で 1 時間の超遠心分離は、可溶および不溶画分への分離をもたらした。完全長 NS3 ヘリカーゼ (pL200) は、可溶画分において検出することができた。対象的に個々に発現された NS3 ドメインは、8 M 尿素を用いる可溶化を必要とした。タンパク質を、Ni²⁺ セファロースカラム (HisTrap; GE Healthcare) によるイオン

金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) を用いて精製した。タンパク質の純度および収量は、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で決定し、対照として抗ヒスタグモノクローナル抗体を用いて免疫ブロット分析で確認した。精製タンパク質は、ウエスタンブロット分析および ELISA におけるテスト抗原となった。

【0178】

SDS-PAGE および免疫ブロッティング

タンパク質または細胞溶解物の分離は、それぞれポリアクリルアミド - トリシゲルシステム (Schagger, 1987) で起こった。その後のタンパク質をニトロセルロース膜 (Pall Corporation) に移した。膜は、0.1% Tween 20 を含む PBS 中 4% 乾燥脱脂乳溶液でブロックした。化学発光試薬 (Western Lightning Plus ECL; Perkin-Elmer) をシグナル検出に使用した。

10

【0179】

キメラ完全長クローンの生成

細菌発現プラスミド p1719、p1723、p1734 または p1742 をそれぞれ、制限エンドヌクレアーゼ SalI および EcoRI で消化し、NS3 をコードするインサートを、p1372 (CSFV レプリコン) を介して p447 (CSFV 完全長クローン) にライゲートした (表 6 を参照のこと)。プラスミドを SmaI を用いて直線化し、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて転写した。2 μg の RNA 転写産物を、以前に記載されたように (Riedel, 2010) 5×10^6 SK6 細胞にエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞を 96 ウェルプレートに播種し、2~3 日間インキュベートした。ウイルス複製を、E2 特異的モノクローナル抗体 (A18) を用いて間接ペルオキシダーゼ単層アッセイ (IPMA) により評価した。CSFV 陽性細胞の上清を新たな SK-6 細胞の感染に使用してウイルスをさらに増殖させて、mAb Code 4 および 49DE との反応性の検査をできるようにした。pW95 の構築には、第 1 ステップにおいて変異を p989 に導入し (pET-11a ベクターに挿入された nt 4440~8340)、pW94 を得た。第 2 ステップにおいて、NS3 をコードする該インサートを、EcoRI および NgoMIV を介して完全長クローン p447 にクローニングし、完全長クローン pW95 を生じさせた。

20

30

【表 6】

表 5 : CSFV 完全長クローン p447 において置換された非 BVDV/CSFV

FV/BDV ペスチウイルスアミノ酸配列の概要

プラスミド	挿入された非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルス aa 配列	aa 数
p1721	aa1950-aa2003	54
p1725	aa1950-aa1975	26
p1744	aa1950-aa1962	13
p1740	aa1950-aa1988	39
p1756	aa1950-aa1975、 Q ₂₁₀₈ L、Y ₂₄₉₂ H	28
p1751	aa1950-aa1975、Q ₂₁₀₈ L	27
p1752	aa1950-aa1975、Y ₂₄₉₂ H	27
pW95	EE ₂₁₇₀ RD、AAV ₂₁₇₅ VV	5

40

表6：細菌発現プラスミドのクローニング戦略

プラスミド	参照断片
p1721	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1720/EcoRI/NgoMIV
p1720	ベクター:p1372/SalI/EcoRI インサート:p1719/SalI/EcoRI/Xho
p1725	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1724/EcoRI/NgoMIV
p1724	ベクター:p1372/SalI/EcoRI インサート:p1723/SalI/EcoRI/Xho
p1744	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1743/EcoRI/NgoMIV
p1743	ベクター:p1372/SalI/EcoRI インサート:p1742/SalI/EcoRI/Xho
p1740	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1739/EcoRI/NgoMIV
p1739	ベクター:p1372/SalI/EcoRI インサート:p1734/SalI/EcoRI/Xho
p1756	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1755/EcoRI/NgoMIV/SacII
p1750	ベクター:p1746/SalI/EcoRI インサート:p1723/SalI/EcoRI
p1751	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1749/EcoRI/NgoMIV/SacII
p1752	ベクター:p447/EcoRI/NgoMIV インサート:p1750/EcoRI/NgoMIV/SacII
p1749	ベクター:p1745/SalI/EcoRI インサート:p1723/SalI/EcoRI/Xho

10

20

表7：完全長クローンの生成に使用されたプライマーおよびプラスミド

プラスミド	PCR テンプレート	プライマー	プライマー配列
p1755	P1750	CST489	5'-CTAGAAACACCTGTCGGCTCTAAAG-3'
		CST490	5'-ACTCCTGTAGTATCTTCCAGGCTTC-3'
p1745	P989	CST489	5'-CTAGAAACACCTGTCGGCTCTAAAG-3'
		CST490	5'-ACTCCTGTAGTATCTTCCAGGCTTC-3'
p1746	P989	CST491	5'-CACAATAATCTGTCCAAAATAGTTGAAC-3'
		CST492	5'-GTTCCAGCTCTTGTATGTATAAGTC-3'
pW94	p989	CST482	5'-CAGATCTCGTGATATCAACAGGTTG-3'
		CST483	5'-CCGGTGGTAACAATAATATAATGGCC-3'

30

40

50

【0180】

RNA単離

トランスフェクション後の生存CSFVにおける導入された変異の潜在的復帰変異を評価するために、ウイルスRNAをRNeasyキット(QuiaGen)を用いて感染細胞から調製した。精製RNAをSuperscript逆転写酵素2(Invitrogen)を用いて逆転写し、CSFV特異的プライマーはNS3を含む3つのcDNA断片をもたらした。その後、断片をプラスミドにクローニングし、配列決定した。変異を断片中に見出すことができたならば、対応する変異を元の完全長クローンに挿入し、ウイルスを記載されたように細胞培養およびIPMAで増殖について確認した。

【0181】

間接免疫ペルオキシダーゼアッセイ

SK6およびBHK細胞を4°で20分間、PBS中4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.5%Triton-X100で透過処理した。固定後、細胞を問題のモノクロ

ーナル抗体とインキュベートし、0.1% Tween 20を含むPBSに最適濃度まで希釈した。二次HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgGおよび3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC、Sigma Aldrich)基質溶液を、シグナル検出に適用した。

【0182】

キメラCSFV/非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスpCiteプラスミドの生成

mAb WB103 WB112およびC16に対するエピトープは、これらの抗体が細菌発現タンパク質を用いるウエスタンブロット分析またはELISAで反応性ではないため、マッピングするのが困難であった。したがってNS3誘導体の一過性真核生物発現を用いた。この目的のため、キメラCSFV/非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスNS3ヘリカーゼ遺伝子をpCite 2a(+)ベクターにクローニングした。このベクターは、T7プロモーターおよび、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスMVA T7との併用で効率的な細胞質タンパク質発現を可能にする内部リボソーム進入部位(IRES)を含有する。pCiteプラスミドpL270を含有するCSFV NS3ヘリカーゼに基づき、各NS3ヘリカーゼサブドメイン(D1、D2、D3)をBugowannahウイルスNS3の類似ドメインにより置換した。上記の通り、pL282は、非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスNS3ヘリカーゼ配列のドナーとしての役割を果たした。pW91(非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスのドメインD3を有するNS3を含有する)およびpW92(非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスのドメインD1を有するNS3を含有する)を、PCRベースのクローニングにより構築した。pW93の場合、NS3は、NS3をコードする既存のプラスミド(p1708)から増幅させたが、一方、D1およびD3はCSFVに由来し、ドメインD2は非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルスに由来する。

【0183】

さらに、キメラD3を有するNS3ヘリカーゼ含有プラスミドを、pL270およびpW91に基づき改変した(pW109、pW110およびpW111)。pW119の場合、D3のN末端半分を非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルス(83aa)により置換した。pW110では、NS3h SD3のC末端における残りの82aaを非BV DV/CSFV/B DVペスチウイルス配列により置換した。pW111は、D3の最後の38aaのみを置換したプラスミドである。

10

20

30

【表 7】

表 8 : キメラ p C i t e クロンの構築に使用されたプライマーおよびプラスミド ; 挿入切断部位は下線が付されている (注記 : 非 B = 非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルス)

生成プラスミド	PCR テンプレート	プライマー	プライマー配列
pW91 NS3 D3 非 B	ベクタ ー:pL270	CST500 CST451	5' -GCTCCTGTAGTATCTTCCAGGCTTC-3' ' 5' -CAAGAAACACCTGTCGGCTC-3' '
	インサー ト:pL282	CST501 pet11a rev.	5' -CCTGAAAACTGCAGGTGAAAAGG-3' ' 5' -GGTTATGCTAGTTATTGCTCAG-3' '
pW92 NS3 D1 非 B	ベクタ ー:pL270	CST502 CST458	5' -CACTGGGCAGAAACACCCTATAGAG-3' ' 5' -AGTGGTTGTTACTGTGCCTGCCG -3' '
	Insert:pL282	CST503 pet11afw	5' -GTGCTCACAGTCCCGGATG-3' ' 5' -GGAATTGTGAGCGGATAAC-3' '
p1708 pet11a に おける NS3 D2 非 B	ベクタ ー:p1039	CST451 CST458	5' -CAAGAAACACCTGTCGGCTC-3' ' 5' -AGTGGTTGTTACTGTGCCTGCCG-3' '
	インサー ト:pL282	CST452 CST453	5' -GGGCAGAAATTCACAATTGAG-3' ' 5' -TCCTCTCAAGTACCTCCAG-3' '
pW93 NS3 D2 非 B	インサー ト:p1708	CST515 CST516	5' -AAACATATGAGTGGGATACAAACGG-3' /NdeI 5' -AAACTCGAGTTATAGACCAACCACCTG-3' /XhoI
	ベクター:XhoI/NdeI で消化した pL270		
pW109	ベクタ ー:pW91	CST528 CST386	5' -CAATTGTATAGGTTCCGGATG-3' ' 5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' '/XhoI
	インサー ト:pL270	CST529 E21	5' -GCGTATAACAGCTACGAGACAC-3' ' 5' -GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTA-3' '/XhoI
pW110	ベクタ ー:pL270	CST527 CST386	5' -GAGTTGAATTGGTTCTGGGTG-3' ' 5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' '/XhoI
	インサー ト:pW91	CST526 E21	5' -GCTTACAATAGTTTAGAAAACCC-3' ' 5' -GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTA-3' '/XhoI
pW111	ベクタ ー:pL270	CST102 CST386	5' -CACGTAGGGGGGTACGTCATCTCC-3' ' 5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' '/XhoI
	インサー ト:pW91	CST530 E21	5' -TATGCAACAGAAGAAGAAGATCTCG-3' ' 5' -GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTA-3' '/XhoI

10

20

30

40

【 0 1 8 4 】

欠失および切断 p C i t e プラスミドの生成

個々のドメインが欠失されたプラスミドを p L 2 7 0 に基づき調製し、p W 1 0 6 (N S 3 D 1)、p W 1 0 7 (N S 3 D 3) および p W 1 0 8 (N S 3 D 2) を得た。プラスミドのコレクション (p W 1 0 0、p W 1 0 1、p W 1 0 2、p W 1 0 3 および p W 1 0 4) は、D 3 の C 末端切断を有する N S 3 遺伝子を表す。P L 1 0 5 は、D 3 のみが発現された p C i t e ベースのプラスミドである。

【表 8】

表 9 : 切断 p C i t e プラスミドの構築に使用されたプライマーおよびプラスミド

生成プラスミド	PCR テンプレート	プライマー	プライマー配列
pW100	pL95	CST386 CST101	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -CTGCCAGCTTCCACGGTGCC-3'
pW101	pL95	CST386 CST102	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -CACGTAGGGGGGTACGTCATCTCC-3'
pW102	pL95	CST386 CST103	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -TCTTATTTTTGGGAATAATACC-3'
pW103	pL95	CST386 CST104	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -CTGCCATCGGCAGCTCTTCTG-3'
pW104	pL95	CST386 CST105	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -CGTAGTTCATCTCTCTGAAGG-3'
pW105	pL95	Core271 CST105	5' -CAAGAAACACCTGTGCGGCTC-3' 5' -CGTAGTTCATCTCTCTGAAGG-3'
pW106	pL270	CST397 CST502	5' -ATGGGTGGTGGCCATGGTATTATCATC-3' 5' -CACTGGGCAGAAACACCCTATAGAG-3'
pW107	pL270	CST386 CST480	5' -TAACTCGAGCACCACCACCACCAC-3' /XhoI 5' -ACTCCTGTAGTATCTTCCAGGCTTC-3'
pW108	pL270	CST525 Core271	5' -AGTGGTTGTTACTGTGCCTGCC-3' 5' -CAAGAAACACCTGTGCGGCTC-3'

10

20

【0185】

p C i t e プラスミドの一過性発現

T7 RNAポリメラーゼの作製を可能にするために、BHK細胞のコンフルエントな単層を100の感染多重度で2時間ワクシニアMVA T7に感染させた。次いで、製造者の指示に従ってSuperfect (Qiagen)を用いて、記載されたキメラ切断およびサブドメイン欠失p C i t e ベースのプラスミドで細胞をトランスフェクトした。全ては以前に、ワクシニアトランスフェクションアッセイで使用された。プラスミドpL270 (NS3ヘリカーゼ)、pL95 (完全長NS3)、pL261 (NS3プロテアーゼ)は、対照としての役割を果たした。免疫ペルオキシダーゼアッセイを上記の通りに行った。

30

【0186】

結果

mAb Code 4 / 49DEのエピトープマッピング

細菌発現タンパク質への結合特性

Code 4および49DEは両方ともウエスタンプロットにおいて十分に機能し、細菌発現NS3ヘリカーゼ単一サブドメイン、および対照としての完全長NS3ヘリカーゼでテストした。両方のモノクローナルは、NS3ヘリカーゼサブドメイン2への明白な結合を示した(図1に示されたCode 4)。NS3ヘリカーゼD2に対するCode 4および49DEの結合をELISAにより確認した。

40

【0187】

細菌発現キメラCSFV / 非BVDV / CSFV / BVDVペスチウイルスNS3ヘリカーゼを用いたウエスタンプロットでは、49DEおよびCode 4は類似した結合パターンを示した。予想通り、NS3 D2を非BVDV / CSFV / BVDVペスチウイルス配列により置換した場合、結合を検出することはできなかった。NS3 D2のN末端1 / 3の置換(p1719; aa1950~2003)は、両方のモノクローナル抗体の結合を阻害した。さらなる実験においてエピトープの本体を、CSFV NS3のaa1950~1975の間にわたる領域に絞り込むことができた。mAb 49DEは、非BVD

50

V / C S F V / B D V ペスチウイルス由来のアミノ酸 1 9 5 0 ~ 1 9 7 5 を有する N S 3 との反応性を示さなかった。C o d e 4 (および 4 9 D E) のエピトープは、p 1 7 6 3 における変異 M K _{1 9 8 7} L E が著しい結合低下をもたらしたことから、アミノ酸 1 9 8 7 および 1 9 8 8 を含有しているらしい証拠がある。

【表 9】

表 1 0 : キメラ N S 3 ヘリカーゼ抗原による免疫プロットからの結果の概要 ; 「 - 」 : 結合が検出されなかった ; 「 + 」 : モノクローナル抗体の結合が検出された ; 「 + / - 」 : 相当なシグナル低下。

プラスミド	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスに置換された CSFV におけるアミノ酸 (aa)	aa 数	免疫プロットにおける反応	
			Code4	49DE
P1718	aa2004-aa2107	104	-	-
P1719	aa1950-aa2003	54	-	-
P1723	aa1950-aa1975	26	+/-	-
P1742	aa1950-aa1962	13	+	+
P1734	aa1950-aa1988	39	-	-
P1763	MK ₁₉₈₇ LE	2	+/-	+/-

10

【 0 1 8 8 】

組換えウイルスにおける変異エピトープの認識

この試験の主な目標は、選択されたモノクローナル抗体の結合を阻害する生存ウイルスの生成であったため、細菌発現抗原との C o d e 4 結合を回避するキメラ配列を、完全長 p 4 4 7 C S F V クローンにクローニングした。挿入された非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルス配列を有するキメラウイルスのほとんどが生存できなかった。1つのクローン (p 1 7 2 5) は、ウイルス子孫を産生するのにエレクトロポレーション後 2 ~ 3 日を必要とした。レスキューウイルス V p 1 7 2 5 の配列決定は、Q _{2 1 0 8} L 位および Y _{2 4 9 2} H 位が変化していることを明らかにした。これらのレスキュー変異の機能的な重要性は、p 1 7 5 6 の構築により示された。表 1 1 は、構築された完全長クローンおよび細胞培養におけるその特性の概要を示している。

20

【表 1 0】

表 1 1 : C o d e 4 および 4 9 D E のエピトープマッピングのための構築された完全長クローン、細胞培養におけるその特性の概要。

プラスミド	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスに置換された CSFV におけるアミノ酸 (aa)	aa 数	エレクトロポレーション後の細胞培養における増殖	復帰変異後の生存クローン	代償性変異
p1721	aa1950-aa2003	54	無	無	無
p1725	aa1950-aa1975	26	無	有	Q ₂₁₀₈ L、Y ₂₄₉₂ H
p1744	aa1950-aa1962	13	有	無	無
p1740	aa1950-aa1988	39	無	無	無
p1756	aa1950-aa1975、 Q ₂₁₀₈ L、Y ₂₄₉₂ H	28	有	無	無
p1751	aa1950-aa1975、Q ₂₁₀₈ L	27	無	有	Y ₂₄₉₂ H
p1752	aa1950-aa1975、Y ₂₄₉₂ H	27	No	Yes	Q ₂₁₀₈ L

30

40

【 0 1 8 9 】

細胞培養で複製した完全長クローンのみを m A b C o d e 4 および 4 9 D E の結合についてテストすることができた。これには p 1 7 4 4 および復帰変異体 p 1 7 5 6 が含まれる。完全長クローン p 1 7 5 6 は、I P M A n s d ウエスタンプロットにおいて m A b C o d e 4 または m A b 4 9 D E のどちらにも認識されず、これらのモノクローナル抗体のエピトープは、N S 3 分子と同一または N S 3 分子の同じ領域の周辺に位置す

50

るという結論に達する。m A b C o d e 4 および 4 9 D E の反応性を図 2 および表 1 2 に概説する。

【表 1 1】

表 1 2 : 間接免疫ペルオキシダーゼアッセイにおける m A b C o d e 4 および 4 9 D E の反応性 ; 「-」 : 結合が検出されなかった ; 「+」 : モノクローナル抗体の結合が検出された ; 「+/-」 : 相当なシグナル低下。

ウイルス	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスに置換された CSFV におけるアミノ酸 (aa)	免疫ペルオキシダーゼアッセイにおける反応	
		Code4	49DE
Vp1744	aa1950-aa1962	+/-	-
Vp1756	aa1950-aa1975 Q ₂₁₀₈ L、Y ₂₄₉₂ H	-	-

10

【0190】

p 1 7 5 6 における代償性変異を確認するために、V p 1 7 5 1 および V p 1 7 5 2 を構築した。各完全長クローンは、V p 1 7 2 5 配列プラス V p 1 7 5 6 由来の 1 つの代償性変異 (V p 1 7 5 1 では Q₂₁₀₈L および V p 1 7 5 2 では Y₂₄₉₂H) を保持した。ウイルスは両方とも、2 ~ 3 日後、細胞培養において十分に増殖し、p 1 7 5 6 に存在するものと同じの欠損した代償性変異を確立した。

20

【0191】

m A b C 1 6 / W B 1 0 3 のエピトープマッピング

m A b C 1 6 および W B 1 0 3 は、細菌発現抗原を用いたウエスタンブロットまたは E L I S A でいずれの反応性も示さなかった。さらに C S F V または B V D V 感染細胞の溶解物への結合は、ウエスタンブロット分析で検出することができなかった。これは、C 1 6 および W B 1 0 3 が、恐らく翻訳後修飾を有する不連続エピトープを認識することを示している。その結果、ワクシニア M V A T 7 ウイルスベースの一過性真核生物発現、レポーター系として確立した。

【0192】

M V A T 7 一過性発現タンパク質に対する m A b の結合特性

m A b C 1 6 および W B 1 0 3 をマッピングするために、間接免疫ペルオキシダーゼアッセイを、様々な p C i t e 由来プラスミドをトランスフェクトしたワクシニア T 7 一過性 B H K 細胞の単層で行った。両方の m A b、C 1 6 および W B 1 0 3 は、NS 3 ヘリカーゼドメインに明らかに結合したが、一方、プロテアーゼドメインへの結合は検出することができなかった。非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルスによる C S F V 配列の置換は、m A b C 1 6 および W B 1 1 2 が両方とも NS 3 のドメイン 3 に結合することを明らかにした。D 3 を C 末端切断した場合、両方の m A b の結合は、a a 2 2 3 5 ~ 2 2 7 2 またはより大きなストレッチの a a が除去された場合 (a a 2 2 7 2 は NS 3 D 3 の C 末端に相当する) に抑制された。故に、D 3 を 2 つの部分に分けたが、一方、N 末端 (p W 1 0 9、a a 2 1 0 8 ~ 2 2 0 7) または C 末端 (p W 1 1 0、a a 2 2 0 8 ~ 2 2 7 2) のどちらかは、非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルス配列に相当した。さらに、より小さい非 B V D V / C S F V / B D V ペスチウイルスセグメントを有するプラスミドを調製した (p W 1 1 1、a a 2 2 3 5 ~ a a 2 2 7 2) (図 3)。m A b C 1 6 および W B 1 0 3 の結合親和性の違いは、p W 1 0 9 では観察することができなかった。m A b C 1 6 は p W 1 0 9 トランスフェクト細胞を認識しなかったが、一方、m A b W B 1 0 3 は明らかに認識した。したがって、W B 1 0 3 のエピトープの本体は、a a 2 2 0 7 から a a 2 2 6 5 の間に位置する。m A b C 1 6 のエピトープは、a a 2 2 0 7 のアミノ酸 N 末端を含んでいる可能性がある。

30

40

【0193】

m A b C 1 6 および m A b W B 1 0 3 はいずれも、個々に発現された NS 3 D 3

50

、またはD3がD1もしくはD2との関連で発現された構築物に結合しなかった。けれども、キメラNS3ヘリカーゼを用いた実験は、NS3D3への結合を明らかに示している。故に、C16およびWB103は、3つのサブドメイン全てから成る完全長NS3ヘリカーゼを除いて、正しく折り畳めない感受性の構造的エピトープに結合すると考えられる。

【表12】

表13：一過性発現NS3バリエーションへのC16およびWB103それぞれの結合。「+」：陽性シグナル、mAbの結合が検出された；「-」：陰性シグナル、結合は検出されなかった。

プラスミド	特性	C16	WB103
pL95	完全長 CSFV NS3	+	+
pL261	CSFV NS3 プロテアーゼ (protease)	-	-
pL270	CSFV NS3 ヘリカーゼ	+	+
pW91	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された NS3 D3	-	-
pW92	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された NS3 D1	+	+
pW93	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された NS3 D2	+	+
pW109	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された aa2108-2190	-	+
pW110	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された aa2191-2272	-	-
pW111	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換された aa2235-2272	+	+
pW100	aa2265-2272 欠失	+	+
pW101	aa2235-2272 欠失	-	-
pW102	aa2208-2272 欠失	-	-
pW103	aa2175-2272 欠失	-	-
pW104	aa2145-2272 欠失	-	-
pW105	D3 単体発現	-	-
pW106	NS3 D1 欠失	-	-
pW107	NS3 D3 欠失	-	-
pW108	NS3 D2 欠失	-	-

【0194】

mAb WB112のエピトープマッピング

mAb C16およびWB103に関して、mAb WB112は、ウエスタンブロットまたはELISAで細菌発現タンパク質と反応しなかった。したがって、一過性真核生

10

20

30

40

50

物発現系を使用した。

【0195】

一過性発現キメラCSFV/非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3ヘリカーゼの結合特性

mAb WB112は、表14に列挙したプラスミド構築物をトランスフェクトしたワクシニア感染BHK細胞を用いて、真核生物発現系においてテストした。mAb WB112は、ヘリカーゼドメイン内のNS3を認識し、非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3のスワップドメインと交差反応する。個々のドメインを欠くNS3構築物を用いると、D2が欠失された場合、結合は抑制された。mAb WB112のエピトープは、NS3のD2内に位置する可能性が極めて高い。

10

【表13】

表14：一過性発現NS3バリエーションへのmAb WB112の結合。

「+」：陽性シグナル、mAbの結合が検出された；「-」：陰性シグナル、結合は検出されなかった。

プラスミド	特性	WB112
pL95	完全長CSFV NS3	+
pL261	CSFV NS3 プロテアーゼ	-
pL270	CSFV NS3 ヘリカーゼ	+
pW91	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換されたNS3 D3	+
pW92	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換されたNS3 D1	+
pW93	非 BVDV/CSFV/BDV ペスチウイルスにより置換されたNS3 D2	+
pW106	NS3 D1 欠失	-
pW107	NS3 D3 欠失	+
pW108	NS3 D2 欠失	+

20

30

5

【0196】

mAb 14E7のエピトープマッピング

細菌発現タンパク質への結合特性

14E7は、マウスを細菌発現NS3で免疫して確立した。mAb 14E7は、ウエスタンブロット、ELISAおよびIPMAで幾つかのペスチウイルスと反応するが、非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスとは反応しない。

40

【0197】

切断NS3 D3を用いたmAb 14E7のマッピング

mAb 14E7を180個のアミノ酸にわたるNS3 D3に対して産生させた。エピトープをマッピングするために、約16コドンの連続C末端切断をプラスミドpL200に基づき実施した。mAb 14E7は、アミノ酸₂₁₈₅LLISEDLPAAVKNI_{MA2200}の欠失との反応性を失った。これは、線状エピトープがアミノ酸のこのストレッチ内または周辺に位置することを示している。他のペスチウイルス単離株とのアライメントは、さもなければ十分に保存される(14/16aa)ペプチド配列内の非BVDV/CSFV/BDVペスチウイルスNS3 D3の4つのアミノ酸変化を示した。プ

50

ライマーCST482およびCST483を用いて、対応する配列を完全長クローンpW95における「LLISRDLPVVTKNIMA」に変更した(変異配列を下線、図4も参照のこと)。pW95のトランスフェクションからレスキューしたウイルス(VpW95)は生存し、CSFV wtと区別不可能に複製した。VpW95感染細胞に存在する変異NS3は、mAb14E7により検出されなかった(図5)。これは、mAb14E7エピトープ内に同じ変異を有する細菌発現NS3にも当てはまる。

【0198】

参考文献：

- Bathia, S. et al., Res. In Vet. Science 85:339-45 (2008). 10
- Beau deau, F. et al., Vet Microbiol. 80:329-337 (2001).
- Behrens et al., J. Virol., 72:2364-272, (1998).
- Cay B., Chappuis G., Coulibaly C., Dinter Z., Edwards S., Greiser-Wilke I., Gunn M., Have P., Hess G., Juntti N., et al., Vet Microbiol. 20(2):123-129 (1989).
- Chimenzio Zoth, S. and Taboga, O., J. of Virol. Methods 138:99-108 (2006). 20
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D., Advances in Enzymology 47:45-148 (1987).
- Clackson, T. & Wells, J. A. in Trends Biotechnol. 12:173-183 (1994).
- Colijn, E. O. et al., Vet. Microbiology 59:15-25 (1997)
- Collett, M. S., Comp. Immunol., Microbiol. And Infect. Diseases 15:145-154 (1992).
- Corapi W. V., Donis R. O., Dubovi E. J. J., Vir 30
 ol. 62(8):2823-2827 (1988).
- Corapi, W. V. et al., Am. J. Vet. Res. 51:1388-1393 (1990).
- Cortese, R. et al., in Trends Biotechnol. 12:262-267 (1994).
- Deregt, D., et al., Can. J. Vet. Res. 54:343-348 (1990).
- Deregt, D. et al., Vet. Microbiol. 108:13-22 (2005).
- Dyson, M., Expression systems, edited by Michael Dyson and Yves Durocher, Scion Publishing Ltd, ISBN 9781904842439 (edition 2007). 40
- Edwards S., Sands J. J., Harkness J. W., Arch Virol. 102(3-4):197-206 (1988).
- Edwards S., Moennig V., Wensvoort G., Vet Microbiol. 29(2):101-108 (1991).
- Gellissen, G., Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Publisher: Wiley-VCH, ISBN: 3527310363 (edition 2005). 50

- Geysen M., et al., Proc. Natl Acad. Sci. 81: 3998 - 4002 (1984).
- Geysen M., et al., J. Imm. Meth. 102: 259 - 274 (1987).
- Ghahroudi, M. A. et al., FEBS Letters 414: 512 - 526 (1997).
- Hopp, T. P. and Woods, K. R., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 38248 - 3828 (1981).
- Jian Xu et al., J. of Virol., 71: 5312 - 5322 (1997) 10
- Kasza L., Shadduck J., Christofinis G., Res. Vet. Sci. 13: 46 - 51 (1972).
- Kohler, G and Milstein, C., Nature 256: 495 - 497 (1975).
- Kramps, J. A. et al., Vet. Microbiol. 64: 135 - 144 (1999).
- Lai, M. M. C., et al, J. Virol, 74: 6339 - 6347 (2000).
- Lamp, B. et al., J. Virol. 85: 3607 - 3620 (2011) 20
- Little, M. et al., Biotechn. Adv. 12: 539 - 555 (1994).
- Macpherson I. A., Stoker M. G. P., Virology 16: 147 - 151 (1962).
- Makoschey, B. et al., Vaccine 25: 6140 - 6145 (2007).
- Marks, J. D. et al., in J. Biol. Chem. 267: 16007 - 16010 (1992).
- Maurer, R. et al., Vaccine, 23: 3318 - 3328 (2005) 30
- Mayer, D. et al., Vaccine 22: 317 - 328 (2004).
- Meyer, B. and Peters, Th., in Angewandte Chemie International Edition, Volume 42, Issue 8, pages 864 - 890, February 24, 2003. (c) 2002 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Meyers, G. et al., J. virol. 70: 1588 - 1595 (1996)^a.
- Meyers, G. et al., J. virol. 70: 8606 - 8613 (1996)^b. 40
- Meyers, G. et al., J. Virol. 73: 10224 - 10235 (1999).
- Ming Xiao et al., J. gen. Virol. 89: 994 - 999 (2008).
- Moennig, V., Bolin, S. R., Coulibay, C. O. Z., D eut. Tierarztl. Woch. 94: 572 - 576 (1987).
- Moormann et al., J. of Virology 70: 763 - 770 (1996).
- Moser et al., J. Virol. 73: 7787 - 7794 (1999).
- Muyldermans, S. and Lauwereys, M., Journ. Mol 50

- ec. Recogn. 12: 131 - 140 (1999).
- Paton D. J., Ibata G., Edwards S., Wensvoort G. J., Virol Methods. 31: 315 - 24 (1991).
- Peters W., Greiser-Wilke I., Moennig V., Liess B., Vet Microbiol. 12: 195 - 200 (1986).
- Riedel C., Lamp B., Heimann M., Rumenapf T., J Virol. 84: 11523 - 31 (2010).
- Riedel, C. et al, PLoS Pathog. 2012; 8(3): e1002598. doi:10.1371/journal.ppat.1002598. Epub 2012 Mar 22. 10
- Risatti, G. R. et al., Virology 364: 371 - 382 (2007).
- Robiolo B. et al., J. Virol. Methods. 166(1-2): 21 - 27 (2010)
- Schagger H., von Jagow G. Anal Biochem. 166(2): 368 - 79 (1987).
- Tackett, A. J. et al., Nucleic Acids Res. 29: 565 - 572 (2001).
- Tautz, N. et al., Virology 273: 351 - 363 (2000) 20
- Tratschin, J., et al., Journ. Virol. 72: 7681 - 7684 (1998).
- Trepe, K., Applied Microbiology and Biotechnology: 211 - 222 (2006).
- Wei Cheng et al., P. N. A. S. 104: 13954 - 13959 (2007).
- Wensvoort G. et al., Vet. Microbiol. 17(2): 129 - 140 (1988)
- Widjojoatmodjo et al., J. Virol. 74: 2973 - 80 (2000). 30
- Winter, G. et al., in Annu. Rev. Immunol. 12: 433 - 455 (1994)
- Yingming Zhao and Chalt, B. T., Anal. Chemistry 66: 3723 - 3726 (1994).

【 図 1 】

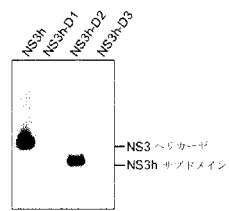


Figure 1

【 図 2 】

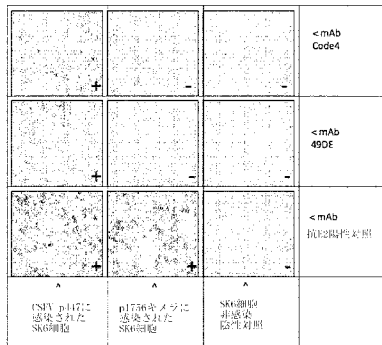


Figure 2

【 図 5 】

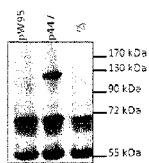


Figure 5

【 図 6 】

```

5  CSFV      NSGIQTVCKGATDTEMFKKITTMRIGEFQIILATGAGRTTELPGVIEEGRRHKRVLV
   BVD/CP7  NSGIQTVCRIADLTEMFKKITTMRIGDFRQIILATGAGRTTELPGAVIEEGRRHKRVLV
   BVD/90   NSGIQTVCRIADLTEMFKKITTMRIGDFRQIILATGAGRTTELPGAVIEEGRRHKRVLV
   BVD/ADL  NSGIQTVCRIADLTEMFKKITTMRIGDFRQIILATGAGRTTELPGAVIEEGRRHKRVLV
10  BVD/Oregon BNSGIQTVCRIADLTEMFKKITTMRIGDFRQIILATGAGRTTELPGAVIEEGRRHKRVLV
   BDX818   NSGIQTVCRIADLTEMFKKITTMRIGDFRQIILATGAGRTTELPGAVIEEGRRHKRVLV
   #B      NSGGVAKPCCDLEGVYRKLEIMRIGEFQIILATGAGRTTEMLPKLIEEGRRHKRVLV
15  CSFV      LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   BVD/CP7  LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   BVD/90   LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   BVD/ADL  LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   BVD/Oregon LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   BDX818   LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
   #B      LIPLRAAAEYVQYMRKHPSIGFHLRIGDKMGDMATGITYASVGYFQMPQPKLRAAM
20  CSFV      VEYSFTFLOEYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   BVD/CP7  VEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   BVD/90   VEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   BVD/ADL  VEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   BVD/Oregon VEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   BDX818   VEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFIAF
   #B      KEYSYFLEOYHCATPEGLAVNGKIHFRFESIRVAMTATPAGVTTTQGRHFIEEFVVF
30  CSFV      EVMKGEDLGSQFLDIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   BVD/CP7  EVMKGEDLGSQFLDIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   BVD/90   EVMKGEDLGSQFLDIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   BVD/ADL  EVMKGEDLGSQFLDIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   BVD/Oregon EVMKGEDLGSQFLDIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   BDX818   EVMKGEDLADDYIEIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
   #B      EVMKGEDLADDYIEIAGLKPPEEMNGHMLVFPVTRIMAVEARKLRARQVHSGYVYSGE
40  CSFV      DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
   BVD/CP7  DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
   BVD/90   DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
   BVD/ADL  DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
   BVD/Oregon DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR

```

【 図 3 】

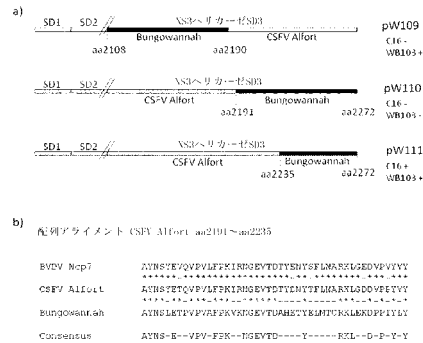


Figure 3

【 図 4 】

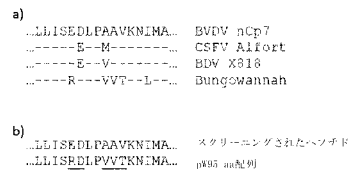


Figure 4

```

BDX818      DPAHLRVVTSQSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
Non-B      DPEGLRSTTSKSPYVVAATHAIESGVTLFDLDFVDTGLKCKEKRIRVSKMPEFIVTGLKR
CSFV       MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
BVD/CP7    MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
BVD/90     MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
BVD/ADL    MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
BVD/Oregon MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
BDX818     MAVTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
Non-B      MATTIGEQQRGRVGRVGRVYRYSQDTAVGSDYHDLQARQYIGDGINFKSFR
CSFV       RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
BVD/CP7    RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
BVD/90     RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
BVD/ADL    RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
BVD/Oregon RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
BDX818     RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
Non-B      RNYDNLSEEDSILMTOLELNNLLISEELPAVKNIMARTDHPFPIQLANSYEQVVF
CSFV       LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
BVD/CP7    LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
BVD/90     LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
BVD/ADL    LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
BVD/Oregon LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
BDX818     LFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE
Non-B      AFFKIRGEVTEYDNYFLNARKLGDVFPVYATESEDLAVLLGLMDFDQNGQVVE

```

Figure 6

【 図 7 】

キット名	製造者	使用されたmAb	対象	備考
BVD antibody compction Serclisa	BioX BVDV Synbiotics Europe	? ?	NS3 NS3	
Paracheck BVD	Prionics	WB103およびWB112	NS3	WB103/112と同じエピトープを認識する
Hercheck BVD	IDEXX	WB 112	NS3	WB112は非B-ヘスチウイルスも認識する
Pouquier ELISA BVD Ab	IDEXX	WB103(コーティング)およびWB112(検出)	NS3	WB103/112と同じエピトープを認識する
Svanovir BVD LSI BVD/BD p80	Svanova LSI	49DE	NS3 NS3	このMoabはCode4と同じエピトープを認識する

Figure 7

【 配 列 表 】

2015533478000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2013/067771

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/18	A61K39/12 G01N33/50	
ADD.		
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)		
C07K A61K G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
X	WO 2007/066188 A2 (PFIZER PROD INC [US]; HUANG CHICHI [US]; SHEPPARD MICHAEL G [AU]; CAO) 14 June 2007 (2007-06-14)	1
Y	the whole document	14-18
Y	DEREGT D ET AL: "Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus", VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 108, no. 1-2, 15 June 2005 (2005-06-15), pages 13-22, XP027620537, ISSN: 0378-1135 [retrieved on 2005-06-15] the whole document	14-18
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
26 November 2013	04/12/2013	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Renggli-Zulliger, N	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067771

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2007/121522 A1 (MINI FOR PRIMARY IND FOR AND O [AU]; FROST MELINDA JANE [AU]; KIRKLAND) 1 November 2007 (2007-11-01) abstract; sequences 2,23</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>CORAPI W V ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODY ANALYSES OF CYTOPATHIC AND NONCYTOPATHIC VIRUSES FROM FATAL BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS INFECTIONS", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 62, no. 8, 1 August 1988 (1988-08-01), pages 2823-2827, XP008027019, ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	14-18
Y	<p>CORAPI W V ET AL: "CHARACTERIZATION OF A PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR USE IN THE STUDY OF THE ANTIGENIC DIVERSITY OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS", AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, AMERICAN VETERINARY MEDICINE ASSOCIATION, US, vol. 51, no. 9, 1 September 1990 (1990-09-01), pages 1388-1394, XP009039619, ISSN: 0002-9645 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	14-18
A	<p>MAKOSCHEY ET AL: "Evaluation of the induction of NS3 specific BVDV antibodies using a commercial inactivated BVDV vaccine in immunization and challenge trials", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 32, 20 July 2007 (2007-07-20), pages 6140-6145, XP022162350, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.01.110 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/067771

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BHATIA S ET AL: "Development and evaluation of a MAb based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhea in cattle and buffaloes", RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, BRITISH VETERINARY ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 85, no. 1, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 39-45, XP022663778, ISSN: 0034-5288, DOI: 10.1016/J.RVSC.2007.09.013 [retrieved on 2007-11-05] the whole document</p> <p>-----</p>	1-18
A	<p>SIMON P. GRAHAM ET AL: "Characterisation of vaccine-induced, broadly cross-reactive IFN-[gamma] secreting T cell responses that correlate with rapid protection against classical swine fever virus", VACCINE, vol. 30, no. 17, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 2742-2748, XP055090114, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.02.029 the whole document</p> <p>-----</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/067771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007066188 A2	14-06-2007	AR 057225 A1	21-11-2007
		AU 2006323028 A1	14-06-2007
		BR P10619566 A2	04-10-2011
		CA 2639074 A1	14-06-2007
		CN 101355963 A	28-01-2009
		EP 1973565 A2	01-10-2008
		HK 1121698 A1	14-12-2012
		JP 2009519014 A	14-05-2009
		KR 20080065696 A	14-07-2008
		KR 20110045072 A	03-05-2011
		NZ 567668 A	29-07-2011
		US 2008305130 A1	11-12-2008
		US 2012021001 A1	26-01-2012
		WO 2007066188 A2	14-06-2007
		ZA 200803558 A	30-09-2009
WO 2007121522 A1	01-11-2007	AU 2007242061 A1	01-11-2007
		CA 2648481 A1	01-11-2007
		EP 2013346 A1	14-01-2009
		EP 2636743 A1	11-09-2013
		US 2010203063 A1	12-08-2010
		US 2012237519 A1	20-09-2012
		WO 2007121522 A1	01-11-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/12 (2006.01)	A 6 1 P	1/12	1 7 1
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 N	7/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q	1/70	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	L
	C 1 2 N	15/00	A

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

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 デ・シユミット, ハンス

オランダ国、エヌエル - 5 8 3 1 ・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

(72)発明者 ランプ, ベンジャミン

オーストリア国、アー - 1 2 1 0、ファイエナ、フエテリナープラッツ・1、インステイチユート・オブ・ピロロジー、フエトメドウニ・ファイエナ

(72)発明者 ルーメナプフ, ハンス, テイルマン

オーストリア国、アー - 1 2 1 0、ファイエナ、フエテリナープラッツ・1、インステイチユート・オブ・ピロロジー、フエトメドウニ・ファイエナ

(72)発明者 ベンツ, エベリン

オーストリア国、アー - 1 2 1 0、ファイエナ、フエテリナープラッツ・1、インステイチユート・オブ・ピロロジー、フエトメドウニ・ファイエナ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 BA80 CA02 DA02 DA20 EA02 EA04 GA11

HA15

4B063 QA18 QQ02 QQ03 QQ10 QQ79 QR48 QR72 QR79 QS33 QS36

QX01

4B065 AA95X AA95Y AB01 AB10 AC20 BA01 BA30 CA45

4C085 AA03 AA13 AA14 BA07 BA51 CC07 CC08 CC23 DD23 DD24

DD63 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10

专利名称(译)	标记疫苗		
公开(公告)号	JP2015533478A	公开(公告)日	2015-11-26
申请号	JP2015528999	申请日	2013-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	英特威国际基地.磷酸盐.		
[标]发明人	デシユミットハンス ランプベンジャミン ルーメナプフハンステイルマン ベンツエベリン		
发明人	デシユミット,ハンス ランプ,ベンジャミン ルーメナプフ,ハンス,テイルマン ベンツ,エベリン		
IPC分类号	C12N7/00 A61K39/187 A61K39/12 A61P37/04 A61P31/14 A61P1/12 A61K39/02 A61K39/395 A61P43/00 C12N7/04 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/09		
CPC分类号	A61K39/12 C07K14/005 C12N2770/24321 C12N2770/24322 C12N2770/24334 G01N33/56983 G01N2333/183 A61P1/12 A61K45/06 A61K2039/5252 C12N7/00 G01N33/573 G01N2333/9513		
FI分类号	C12N7/00.ZNA A61K39/187 A61K39/12 A61P37/04 A61P31/14 A61P1/12.171 A61K39/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.121 C12N7/04 C12Q1/70 G01N33/53.D G01N33/569.L C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA20 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR79 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AB10 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA30 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA07 4C085/BA51 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC23 4C085/DD23 4C085/DD24 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C085/GG10		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤健二		
优先权	2012182260 2012-08-29 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及具有复制能力的牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) , 猪瘟疫病毒 (CSFV) , 绵羊边界病病毒 (BDV) 和具有病毒蛋白表位修饰的非典型瘟病毒, 它们作为药物的用途, 它们作为疫苗, 包括复制能力的BVDV, CSFV, 非典型瘟病毒或BDV的疫苗的使用, 以及针对这种病毒的抗体, 并将接种疫苗的动物与野外感染的动物区分开来诊断测试。

(21) 出願番号	特願2015-528999 (P2015-528999)	(71) 出願人	510000976 インターベット インターナショナル ベー・フェー。
(86) (22) 出願日	平成25年8月28日 (2013. 8. 28)		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月22日 (2015. 4. 22)		
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/067771		
(87) 国際公開番号	WO2014/033149		
(87) 国際公開日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		
(31) 優先権主張番号	12182260.5	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成24年8月29日 (2012. 8. 29)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 暹明
		(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く