

申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人 (共5人)	姓 名 (中 文)	4. 寶達勉 5. 荒井節夫
	姓 名 (英 文)	4. 5.
	國 籍 (中 英 文)	4. 日本 JP 5. 日本 JP
	住 居 所 (中 文)	4. 日本國青森縣十和田市東23-35-1 5. 日本國埼玉縣北本市荒井6-111
	住 居 所 (英 文)	4. 5.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓 名 (中 文)	
	名稱或 姓 名 (英 文)	
	國 籍 (中 英 文)	
	住 居 所 (營 業 所) (中 文)	
	住 居 所 (營 業 所) (英 文)	
	代 表 人 (中 文)	
	代 表 人 (英 文)	



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

日本 JP

2002/07/04

2002-196290

有

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

五、發明說明 (1)

發明所屬之技術領域

本發明係關於預防因貓傳染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus; FIPV)之感染所引起之貓傳染性腹膜炎(FIP)，以及其治療。

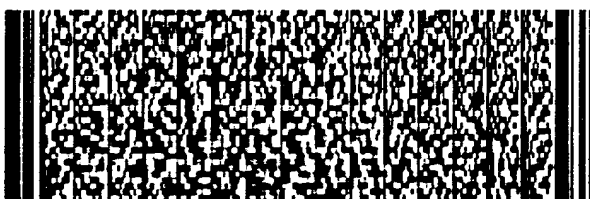
先前技術

貓傳染性腹膜炎(FIP)是一種與病毒感染及免疫機制有關的複雜疾病。FIP係一種特徵為腹腔內化膿性肉芽腫與腹水貯留之慢性進行性疾病。腹腔內化膿性肉芽腫會形成灰白質之隆起結節。該種病變不僅在腹腔內，還會擴及全身臟器。FIP之病型在臨床病理學上分為腹水型(滲出型)及乾燥型(非滲出型)。前者之特徵為纖維索性腹膜炎及因該纖維索性腹膜炎所產生之腹水貯留。後者之特徵為在各種臟器中形成多發性化膿性肉芽腫。但是，兩者並非完全獨立，也有不少是共存的。其感染後會進行何種病型被認為係依受感染貓隻之細胞性免疫的強度而定。

FIPV係一種約100~150nm之具外套膜之病毒，屬於冠狀病毒科之冠狀病毒屬。外套膜表面上具有長度約20nm、前端部分擴大之如王冠狀的突起物(spike)。病毒之基因體由單套之單股核糖核酸組成，病毒係在細胞質進行增殖，透過小胞體出芽，並成熟。病毒係由如下之三個主要構成蛋白質所組成。

核套殼蛋白(Nucleocapsid (N) protein)

跨膜蛋白(Transmembrane (M) protein)



五、發明說明 (2)

囊微粒蛋白(Peplomer (S) protein)

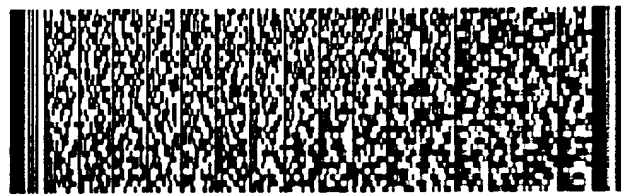
FIPV 分為增殖慢的I型和增殖快的II型。被分類為FIPV I型之病毒已有報告指出其基因鹼基排列有所變異，但被分類為FIPV II型之病毒則尚未有這類報告。另外，據報告，貓之FIPV感染約有70%是因I型之病毒所引起(寶達等，Arch. Virol. 117, 85, 1991)。

對於FIP之發病機轉，至今已有許多感染實驗或病毒學、免疫學的研究被進行。由結果已發現，免疫系統與FIPV感染中之症狀變嚴重化有關。

巨噬細胞具有一般性病毒感染症中作為一種非專一性生體防禦因子之重要功能。但，已知巨噬細胞之生體防禦作用有時會使感染增強。例如，在包括FIP之數種病毒感染症中，已確認抗體會有增強感染的現象。即，有與專一性抗體結合後病毒會透過Fc受體侵入巨噬細胞，結果反而會促進感染使症狀惡化之報告。當病毒透過抗體與Fc受體進入巨噬細胞，不需要巨噬細胞有病毒受體。

此種現象稱為抗體依存性感染增強作用(Antibdy-dependent Enhancement of Infection)。FIPV亦為一種會感染巨噬細胞的病毒。且，已有因上述抗體依存性感染增強作用使FIP之發病性增強的報告。先前之疫苗開發策略主要係以誘導中和抗體之產生作為目的。此種疫苗開發策略對於FIP被認為很難直接應用。

但是，FIP疫苗之研發到目前為止係以先前之疫苗開發策略為基礎來進行。因此，當未充分考慮FIP中抗體依



五、發明說明 (3)

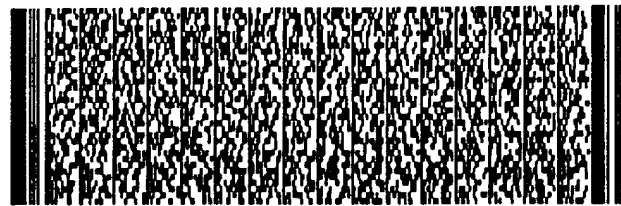
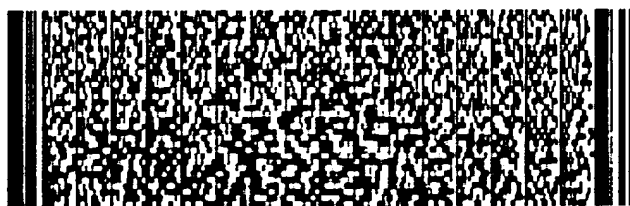
存性感染增強作用之機制時，不一定能得到所欲之結果。以下，對關於到目前為止之疫苗開發之嘗試作說明。

到目前已對FIPV之不活化疫苗、使FIPV減毒化後之活疫苗等各種疫苗進行感染防禦效果之檢驗。但，皆無法得到充分的效果，反而造成加速感染的結果。

1980年Pederson與Boyle利用將強毒株FIPV接種於事先FIPV抗體呈陽性之仔貓或以抗體陽性貓之血清或其純化之IgG進行被動免疫後之仔貓，顯示比起抗體陰性之仔貓更快速的會引起嚴重的症狀。(Pederson NC, Boyle JF. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. Am J Vet Res. 1980 Jun;41(6):868-76)

1981年Weiss與Scott等人亦以同樣方式，將受感染貓之血清對SPF之仔貓進行被動免疫，將病毒接種於腹腔內。該等結果亦顯示，在被動免疫抗體之貓，FIPV會提高在接種後24小時體溫上升，並持續到死亡為止。其生存期間為9~10日，比對照組之抗體陰性貓之14~52日明顯較短(Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1981;4(2):175-89.)。

其後，抗體依存性之感染增強作用亦經其他研究者確認。目前，因抗體產生之FIPV感染增強對FIP疫苗之開發是大阻礙之情事已在許多研究者間被廣泛認知。

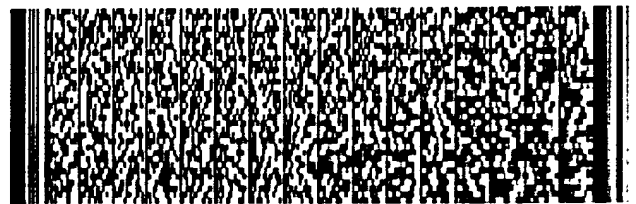
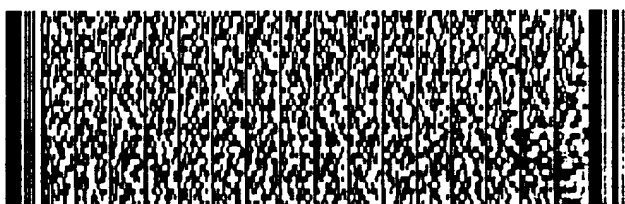


五、發明說明 (4)

如既述者，FIPV係由N、M及S這3種主要構造蛋白所構成。從至今的研究成果已可以了解，中和抗原決定基與感染增強之抗原決定基係存在於S蛋白上，且兩者有密切關連。在先前之疫苗開發策略中，最初所嘗試之疫苗係以S蛋白作為抗原。但，利用S蛋白之感染防禦疫苗同時會含有感染增強之抗原決定基，經常會伴隨有感染增強的危險性。

實際上製作了將編碼為與II型病毒中和有關的抗原決定基之基因(S蛋白)置入牛痘病毒內的重組疫苗，但不能防禦感染，且產生發病變快的結果(Vennema H, de Groot RJ, Harbour DA, Dalderup M, Gruffydd-Jones T, Horzinek MC, Spaan WJ. Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. J Virol. 1990 Mar;64(3):1407-9.)。

另外，美國的研究群開發了溫度感受性株之活病毒疫苗。該疫苗之目的係將溫度感受性株接種於鼻腔以提高局部免疫力(Gerber JD, Ingersoll JD, Gast AM, Christianson KK, Selzer NL, Landon RM, Pfeiffer NE, Sharpee RL, Becknhauer WH. Protection against feline infectious peritonitis by intranasal Inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine. Vaccine. 1990 Dec;8(6):536-42.)。推測可能是因為溫度感受性株在高溫下無法增殖，故即使侵入體

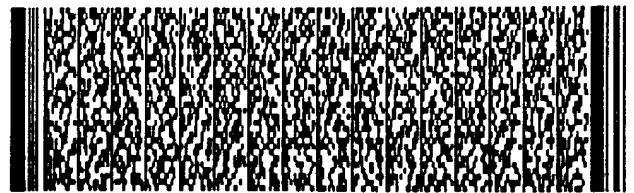
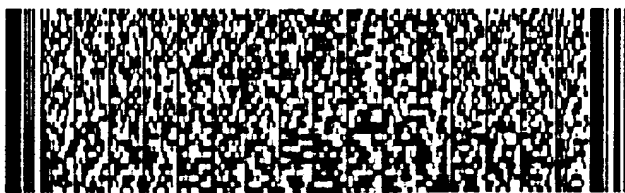


五、發明說明 (5)

內，其增殖部位亦受限制。

該疫苗已在美國、歐洲被應用於臨床。但，其效果與安全性之評價依研究者有所不同。對已接種疫苗之貓進行實驗性攻毒時，根據報告，有時依攻毒之病毒量，反而會使感染增強(Scott, FW., Corapi, WV., and Olsen, CW. Evaluation of the safety and efficacy of Primucell-FIP vaccine. Feline Hlth Top. 1992, 7:6-8.; Scott, FW., Corapi, WV., and Olsen, CW. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions. Feline Practice 1995, 23:74-76)。

又，將編碼為M蛋白或N蛋白之基因插入牛痘病毒或痘病毒內製成之重組活疫苗則有對於FIP之發病有某種程度效果的報告(Vennema H, de Groot RJ, Harbour DA, Horzinek MC, Spaan WJ. Primary structure of the membrane and nucleocapsid protein genes of feline infectious peritonitis virus and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses in kittens. Virology. 1991 Mar;181(1):327-35; Wasmoen TL, Kadakia NP, Unfer RC, Fickbohm BL, Cook CP, Chu HJ, Acree WM. Protection of cats from infectious peritonitis by vaccination with a recombinant raccoon poxvirus expressing the nucleocapsid gene of feline infectious peritonitis virus. Adv Exp Med Biol.



五、發明說明 (6)

1995;380:221-8.)。但是，因該疫苗為重組活疫苗，其野外應用上必需要澄清包含安全性等許多問題。

因此，在現時點尚未有可以充分滿足FIPV感染防禦效果與安全性開發之疫苗被開發。

發明內容

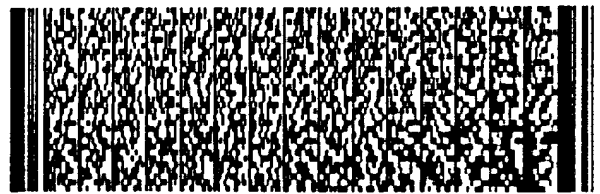
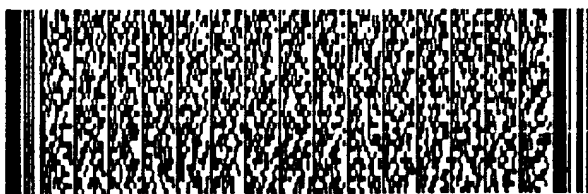
(發明之揭示)

本發明之目的係提供對FIP之感染預防或治療上有用的疫苗。

例如，由先前對病毒感染症疫苗之開發的一般方法類推，可以考慮2個有力的標的作為FIP感染防禦之機轉。首先，FIPV係經口、經鼻感染後，通過黏膜障壁，藉巨噬細胞以擴展到全身。黏膜障壁之通過與FIP症狀之展現依病毒之感染量與病原性之強度而有所不同。故，FIPV之感染預防第1標的即為抑制病毒在黏膜增殖與侵入組織。

其次，要使已通過黏膜障壁並在巨噬細胞內持續感染的FIPV不要增殖，必需使細胞性免疫提高。也就是說，若能以免疫系統排除病毒感染細胞是理想的。此為FIPV之感染防禦之第2標的。事實上有關於對FIPV感染耐受的貓之細胞性免疫提高的報告。

以此背景為基礎，本發明人等著眼在病毒構成蛋白中不含有感染增強抗原決定基之N蛋白。但是，因為一般N蛋白不會存在於病毒粒子或感染細胞的表面上，故推測僅用N蛋白免疫雖不會引起感染增強，但是，也很難完全防禦



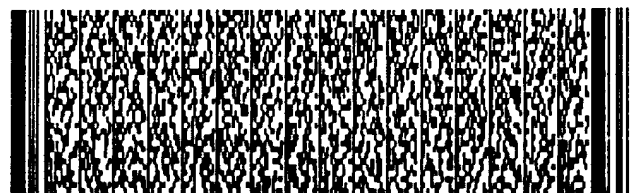
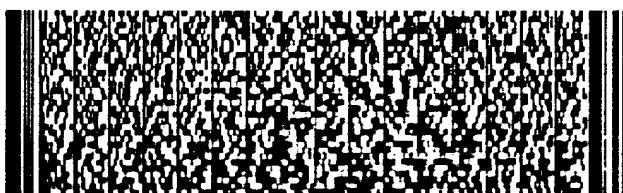
五、發明說明 (7)

感染。實際上，已有將編碼為II型FIPV N蛋白之基因邊界表現於牛痘病毒之重組體利用為疫苗之報告(US 5811104)。但該等結果顯示即使以FIPV II型之N蛋白作為抗原在開發對感染或發病預防效果良好的疫苗上是有困難的。

另外，沒有關於利用I型N蛋白之疫苗的報告。其主要原因可認為有以下理由。首先，I型之FIPV因為以組織培養增殖緩慢，故可以說是不易操作的實驗材料。再者，I型的FIPV對貓的病原性較II型，其FIP之發病率較低。因為這些使I型之FIPV感染實驗在設計上有難度之理由，使在FIP疫苗研究上以FIPV I型為實驗材料會伴隨有困難。但，並不能以這些理由而否定開發對FIPV I型有效之疫苗的重要性。因為，實際在臨床上FIP之70%以上感染原因為I型之感染，而II型病毒被分離出的比例較低。

故，本發明人等為得到可期待實用上效果的疫苗，考慮將使用來自I型之抗原作為一重要條件。且，持續探索可作為疫苗原料使用之來自I型病毒的抗原。結果，本發明人等發現了以具有來自I型病毒特定胺基酸序列之N蛋白作為抗原的疫苗可以對FIPV有廣泛預防效果，並完成本發明。即，本發明係關於以下所示之FIP預防或治療用疫苗及預防或治療方法。再者，本發明亦關於FIP之檢驗方法與檢驗用試藥。

[1]一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗，係含有以包括以下a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所



五、發明說明 (8)

編碼之胺基酸序列之蛋白質作為有效成分。

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1 所記載鹼基序列之編碼區、

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2 所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1 所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2 所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d) 中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

[2] 一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗，係含有以包括以下a)-e) 任一者所記載之聚核苷酸作為有效成分。

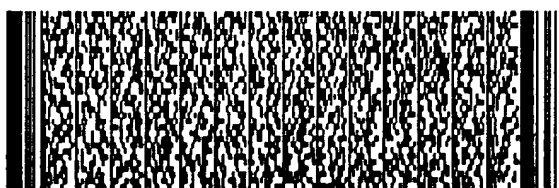
a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1 所記載鹼基序列之編碼區、

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2 所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1 所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2 所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d) 中任一者所記載之



五、發明說明 (9)

聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

[3] 如[1]或[2]所記載之疫苗，其中聚核苷酸係a)或b)中所記載之聚核苷酸。

[4] 一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用抗體製劑，係含有具有與包括以下a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質有結合能力之抗體作為有效成分。

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區、

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d)中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

[5] 一種用於貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防之方法，包括對貓投予[1]、[2]及[3]中任一項所記載之疫苗至少1次之過程。

[6] 一種用於貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防之方法，包括對貓投予[4]中所記載之抗體製劑至少1次之過



五、發明說明 (10)

程。

[7] 一種貓傳染性腹膜炎病毒感染之檢驗方法，包括將含有以下a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質與貓血清培養，並檢出與該蛋白質結合之抗體的過程。

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區、

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

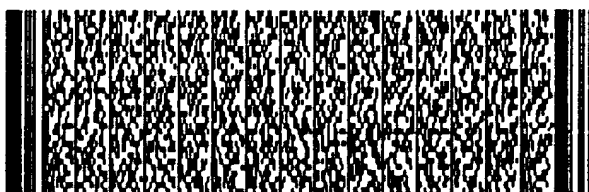
e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d)中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

[8] 一種貓傳染性腹膜炎病毒感染之檢驗用試藥，包括將含有以下a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質。

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區、

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列



五、發明說明 (11)

之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d)中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

或者，本發明係關於將上述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸或含有該聚核苷酸所編碼之胺基酸序列之蛋白質使用於貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗之製造。再者，本發明為將與上述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸或所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質有結合能力之抗體用於貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用抗體製劑之製造。

序列編號：1所示之鹼基序列，及以該鹼基序列編碼之胺基酸序列(序列編號：2)係來自FIPV之I型株KU-2。KU-2之基因鹼基序列及以基因編碼之胺基酸序列為公知的(K. Motokawa et al. Microbiol. Immunol., 40/6, 425-433, 1996)。但，利用該基因可預防或治療FIP之情事則是未為人所知的。

如前所述，分類為FIPV I型之株的鹼基序列其株間相同性是低的。表1整理了到目前為止以編碼為N蛋白質之基因其鹼基序列特定之FIPV代表株或其他相近病毒間的相同性。例如對KU-2之N蛋白質，其他株之N蛋白質相同性不到92%。該相同性與II型或貓·腸冠狀病毒之N蛋白質之相同



五、發明說明 (12)

性為同樣水平。

即，I型病毒之變異性大。N蛋白質之胺基酸序列比較結果示於第2圖。由第2圖可了解各病毒間胺基酸序列之不同或KU-2株之胺基酸序列與其他株不同的情形。故，可預測以任一I型之病毒為材料製成之疫苗其預防或治療效果會因株而不同。根據此先前之知識作反面推測，本發明係來自特定株之病毒抗原，對於製造對廣泛株有效且高安全性之疫苗上為有用的，這是一種新穎的卓見。

即，本發明為關於一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗，係含有以包括以下a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列之蛋白質作為有效成分。

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區、

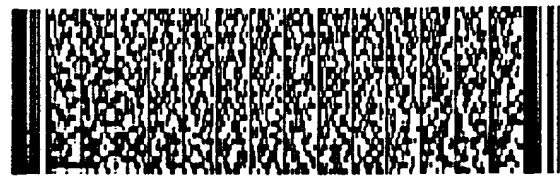
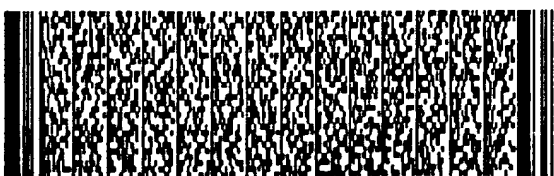
b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列、

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列、

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列、

e) 聚核苷酸，係編碼為擇自a)-d)中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列。

本發明之疫苗可用來自FIPV之KU-2株的N蛋白質為有效成分。KU-2株之N蛋白質之胺基酸序列為序列編號：2，



五、發明說明 (13)

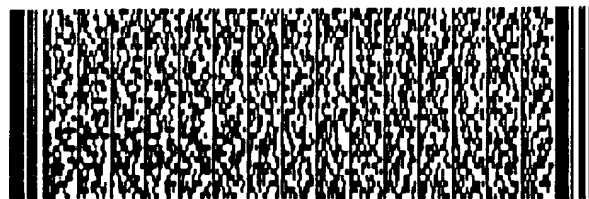
又，編碼為該胺基酸序列之鹼基序列為序列編號：1，並表示於第1圖。本發明疫苗之有效成分其他亦可使用c)含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度鹼基序列的聚核苷酸、或者d)含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度鹼基序列之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質。又，與分類為I型之已知FIPV之N蛋白質與KU-2株之N蛋白質任一者皆不到93%。

一般，由具有高相同性之胺基酸序列所構成之蛋白質其免疫學性狀是類似的。在本發明中，所期望之胺基酸序列係對於序列編號：2，為具有通常93%以上，更佳為95%以上，最佳為98%以上或99%以上相同性之胺基酸序列。

求得胺基酸序列相同性之方法為公知的。例如，Karlin與Altschul所發展的演算法BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)係用於決定胺基酸序列相同性之代表性演算法。實現該演算法的程式為BLASTX(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。以BLASTX解析胺基酸序列時，參數例如可設為score=50、wordlength=3。或使用BLAST及Gapped BLAST程式時，可使用各程式之預設參數。

例如，在實施例中，表1之相同度係以基因資訊處理軟體GENETYX之最大符合值算出(Takahashi K and Gotho O (1984) J. Biochem. 92:1173-1177)。參數如下。

Matching condition: matches=-1,



五、發明說明 (14)

mismatches=lgaps=1, *N+=2

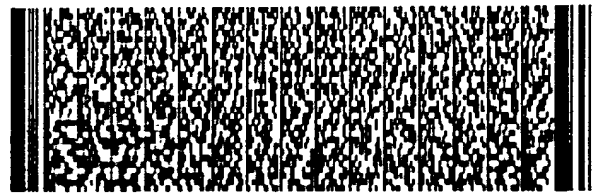
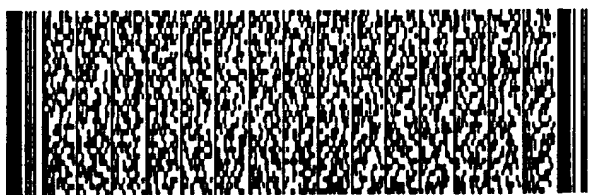
其他，亦可依Lipman-Pearson法(Lipman DJ and Pearson WR(1985) Science 227:1435-1441)決定相同度。Lipman-Pearson法中之參數如下。

Unit size to compare=2(amino acid) or 5(nucleotide)

本發明疫苗中作為有效成分的蛋白質之胺基酸序列中，可導入序列編號：2之胺基酸序列之胺基酸殘基變異數通常在25以下，或20以下，期望在0~15，更期望在0~5，又更期望在0~3。為使一般的蛋白質性質儘量不要受損，被置換之胺基酸以具有與置換前胺基酸類似性質者為佳。此種胺基酸置換稱為保守性置換。

例如，因胺基丙酸(Ala)、纈胺酸(Val)、白胺酸(Leu)、異白胺酸(Ile)、脯胺酸(Pro)、甲硫胺酸(Met)、苯胺基丙酸(Phe)、色胺酸(Trp)因被分類為非極性胺基酸，故彼此具有相似性質。又，非帶電性者例如有甘胺酸(Gly)、絲胺酸(Ser)、息寧胺酸(Thr)、半胱胺酸(Cys)、酪胺酸(Tyr)、天門冬醯胺(Asn)、麩胺酸醯胺(Gln)等。又，酸性胺基酸有天門冬胺酸(Asp)與麩胺酸(Glu)等。又，鹼基性胺基酸例如：離胺酸(Lys)、精胺酸(Arg)、組胺酸(His)。

再者，本發明之疫苗可利用含有e)擇自a)-d)中任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列、由45個以上胺基酸殘基所形成之連續胺基酸序列之蛋白質作為有效成

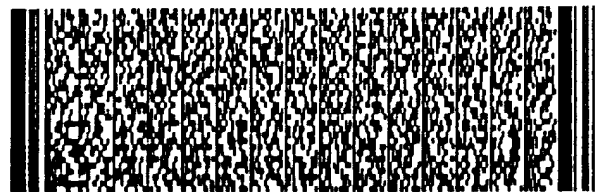


五、發明說明 (15)

分。疫苗之有效成分只要可以對負責免疫之細胞提供免疫學的刺激，並不一定要維持抗原蛋白質之全體構造。一般，以具有15個胺基酸殘基以上之聚核苷酸進行之免疫刺激可以無困難的檢出。另外，連續20個胺基酸或30個胺基酸所構成之胺基酸序列係構成該蛋白質固有的胺基酸序列。特別是超過了45個胺基酸殘基的胺基酸序列係在序列編號：2中構成專一性胺基酸序列。故，滿足條件e)之部分胺基酸序列所構成的蛋白質可與選自a)-d)之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列同樣的對負責免疫之細胞提供抗原刺激。本發明中所期望的多肽係含有45以上或50以上，較佳為55以上，更佳為65個以上的胺基酸殘基，為擇自序列編號：2所記載之胺基酸序列、具有連續胺基酸序列的多肽。

本發明中所欲之部分胺基酸序列可含有在前述a)-d)中記載之聚核苷酸編碼之胺基酸序列中預測為抗原決定基之鹼基序列。業者可以利用所給的胺基酸序列為準，預測抗原決定基。例如，親水性/疏水性、電荷、糖鏈鍵結序列、雙硫鍵、蛋白質2次結構、T細胞抗原性部位等資訊可用於參數的預測。蛋白質2次結構可利用周-法式門(Chou-Fasman)或羅伯森(Robson)法等預測。又，T細胞抗原性部位可依據IA圖案或如司巴德/泰勒(Rothbard/Taylor)圖案預測。

其他，亦可利用單株抗體解析抗原決定基，以實驗性的特定抗原決定基。此方法係根據對抗構成免疫原的胺基



五、發明說明 (16)

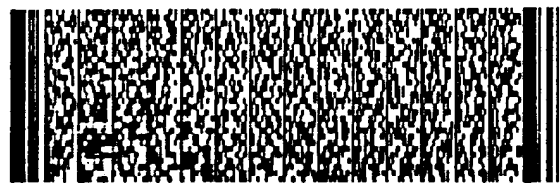
酸序列中部分胺基酸序列所構成之肽類片段的抗體反應性，以決定辨識該抗體的抗原決定位。肽類片段的胺基酸序列可以逐步重疊的方式設計。以該解析方法，可以了解免疫系統是否認識用作為免疫原之蛋白質及哪一個胺基酸序列。

由前述a)-d)所記載聚核苷酸編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質雖可誘導抑制FIPV增殖之免疫反應，但卻不含感染增強抗原決定基。故，可提供安全性及預防效果良好的疫苗。再者，由構成該蛋白質之抗原決定基之胺基酸序列所構成的蛋白質片段也同樣可達成誘導宿主免疫反應的FIPV預防效果。

本發明所欲的蛋白質片段可為與序列編號：2所記載之胺基酸序列構成之蛋白質具有免疫學上同等活性之片段。免疫學上同等是指在投予給宿主時，可以和投與序列編號：2所記載之胺基酸序列構成之蛋白質時誘導出同等的免疫反應。

本發明中的蛋白質片段可為單一者，亦可使用由不同的胺基酸序列所構成的複數片段。故，本發明包括即使單獨不能稱的上免疫學上同等的片段但藉由複數片段組合可顯示出免疫學上同等活性的片段組合。再者，本發明包括以含有蛋白質以外的輔助成分組合並可達成免疫學上同等活性片段的疫苗。

如，利用配合特定之佐劑，與序列編號：2所記載之胺基酸序列構成之蛋白質顯示具有免疫學上同等活性之蛋



五、發明說明 (17)

白質片段可用於本發明中。其他，利用與適當攜帶蛋白形成融合蛋白而維持免疫學上同等活性之蛋白質片段亦可用於本發明中。

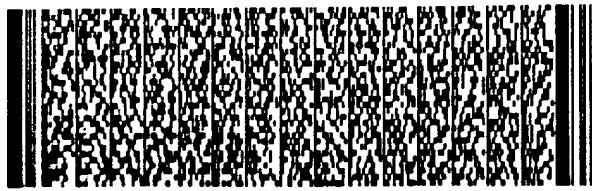
宿主對於被投予之蛋白質其免疫反應可用例如以下的指標為依據來比較。

- 對被投予蛋白質之抗體力價、
- 細胞性免疫之活化作用
- 生體防禦機制對感染源挑戰之水平

對被投予蛋白質之抗體力價可利用各種免疫分析方法測定。更具體的說，可在感作有序列編號：2所記載之胺基酸序列構成蛋白質之平盤上加入受測動物之血液試樣，再利用對抗該動物之免疫球蛋白的標識抗體反應，以測定抗體力價。

又，因被投予蛋白質產生之細胞性免疫活化作用可利用例如末梢血中T細胞之活化程度於體外測定來評價。具體而言，CTL試驗法為一種已知之測定受測T細胞對標的細胞之攻擊活性的方法。又，最近有一種以細胞素(cytokine)或穿孔素(perforin)作為指標，以掌握T細胞活化水平的方法亦被使用。T細胞活化之指標可用IL-2或 γ -IFN等。穿孔素係一種與細胞障礙有關之生體分子。一般，該等測定法較需要高度細胞培養技術之CTL測定法來的簡便。

再者，免疫學上之同等性亦可利用實際在投予蛋白質的固體內挑戰病原體，並比較其防禦水平來確認。防禦水



五、發明說明 (18)

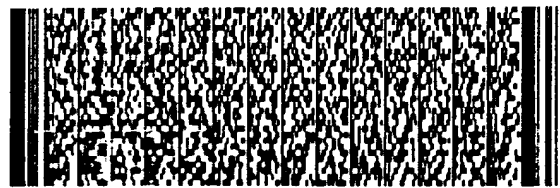
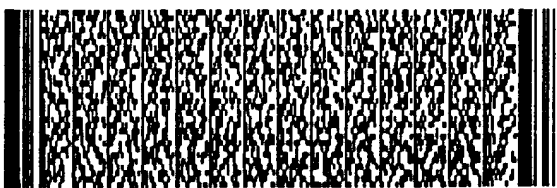
平可依據接種病原體後之體重或體溫變化、或生存日數等來比較。

本發明對於前述a)-e)所記載之聚核苷酸的來源並不限制。故，可為天然的聚核苷酸或人為的或自發性導入變異之聚核苷酸。又，亦可為由人工設計的序列所構成之聚核苷酸。

天然來源之聚核苷酸包括例如KU-2株之聚核苷酸或來自KU-2株誘導變異株之聚核苷酸。此外，亦可用具有來自與KU-2株有高相同性鹼基序列之FIPV之聚核苷酸。另外，本發明中以人工設計之聚核苷酸例如可為在KU-2鹼基序列上導入人為變異之聚核苷酸者。

本發明之聚核苷酸可利用公知之雜交技術(Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.)調製。去氧核糖核酸之單離亦可利用聚合酶連鎖反應技術(Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.)。

即，業者可依雜交法或PCR法，篩選來自病毒之去氧核糖核酸並單離去氧核糖核酸。雜交法所需之探針或PCR法所需之引子的鹼基序列可依據例如KU-2株N蛋白質之互補去氧核糖核酸(cDNA)序列(序列編號：1)設計。



五、發明說明 (19)

將變異導入胺基酸的方法是為人所知的。例如，可利用製作含有變異病毒之病毒庫或編碼為變異N蛋白質之去氧核糖核酸庫，以篩選編碼為所欲胺基酸序列的去氧核糖核酸來單離之。或者亦可由自然界中篩選含變異之病毒。再者，亦可利用公知的基因工程技術，在特定部位導入變異。為在特定部位導入變異，可利用例如

S0E(splicing-by-overlap-extension)-PCR法(Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R.(1989). Gene 77, 51-59)、Kunkel法(Kunkel, T.A.(1985) Proc Natl Acad Sci USA;82(2):488-92)。

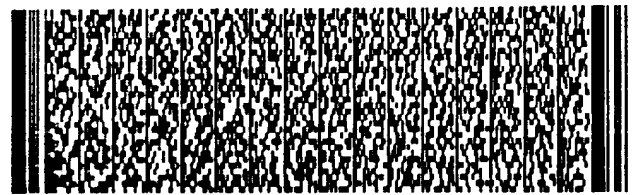
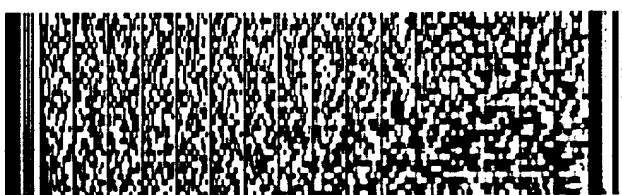
作為本發明疫苗有效成分之蛋白質可利用公知的方法得到。例如可將前述a)-e)任一項所記載之聚核苷酸插入適當之表現載體，藉導入宿主細胞來表現。可作為表現宿主者可為細菌、酵母菌、昆蟲細胞、哺乳動物細胞或哺乳動物等。更具體的說，細菌可用大腸桿菌

(*Escherichis coli*)、酵母可用分裂酵母

(*Schizosaccharomyces pombe*)或者可用哺乳動物細胞之CHO細胞或COS細胞表現。

可對該等宿主作轉形之載體可用公知載體。其中又以昆蟲細胞及桿狀病毒(baculovirus)載體之表現系在本發明疫苗之製造是有用的。

桿狀病毒(加州苜蓿夜蛾核多角體病毒;Autographa californica polyhedrosis virus;AcNPV)係一種以昆蟲為宿主，具有雙股環狀去氧核糖核酸基因體之病毒。在受



五、發明說明 (20)

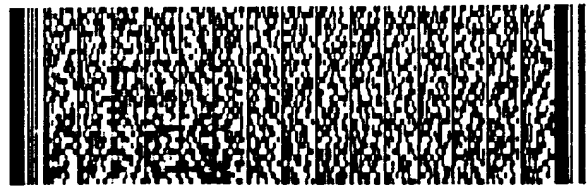
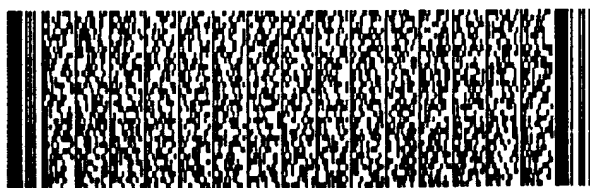
感染細胞核內作出之多角體(polyhedra)含有多數病毒粒子，是感染源。構成多角體之蛋白質之一的多角體蛋白質--多角體蛋白(polyhedrin)係利用強力促進子控制表現。利用該強力多角體蛋白促進子活性之表現系為桿狀病毒表現系。

多角體蛋白基因在感染後期顯示有非常高的表現量。但，在培養細胞中沒有病毒增殖所必需的蛋白質。故，若將多角體蛋白促進子下游之多角體蛋白基因以外來性基因重組，可期待與多角體蛋白同樣高表現。桿狀病毒表現系具體而言係以如下的步驟建構。

- 對外來性基因之轉形載體作次選殖
- 調製重組病毒
- 表現蛋白質

在大小約130kbp的桿狀病毒基因體要直接插入外來性基因是有困難的。故，外來性基因首先要先插入由約10kb左右之質體構成的轉形載體。將轉形載體與病毒去氧核糖核酸同時於宿主細胞內轉型並利用相同重組將外來性基因插入。

轉形載體可利用桿狀病毒重組用之市售載體。例如，pVL1392或pVL1393(皆為法明基恩(Pharmingen)製)，及pPAK8或pPAK9(皆為可龍德克(Clontech)製)為最佳可使用之轉形載體。其他，可在N端附加訊息序列之載體、可附加組胺酸標示之載體或配置複數促進子之載體等附加各種機能之載體都有市售。該等市售的載體任一者皆可用於本



五、發明說明 (21)

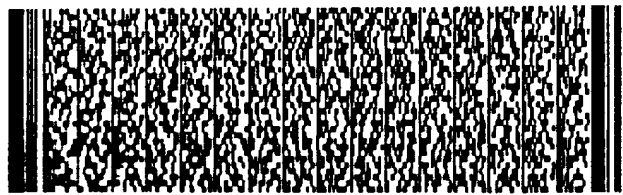
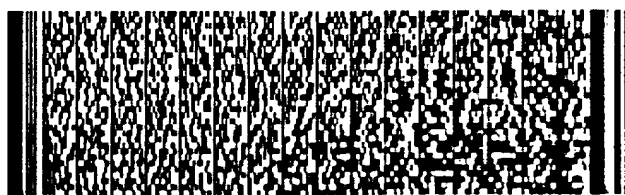
發明。

感染細胞之培養上清因係重組成功之病毒與未發生重組病毒兩者所產生的，故可依需要選擇出重組病毒。重組病毒可利用菌斑(plaque)之形成來進行選擇。即，受到重組病毒感染的細胞因無法形成多角體會形成菌斑，利用此特性來分離重組病毒。所得到之重組病毒為使其力價提高，可依需要進行反覆感染來放大。

對重組效率低的環狀野生型AcNPV之去氧核糖核酸，能使重組效率更高之變異病毒亦已實用化了。例如，使用市售之桿狀病毒時，可期待接近100%之高重組率。因此結果，不需要進行菌斑純化的步驟。具體而言，有Baculo GoldTM線狀化桿狀病毒(法明基恩製)或BacPAK6 viral DNA Bsu 36 I digested(可龍德克製)等變異桿狀病毒是市售的。

桿狀病毒之重組或蛋白質表現係利用昆蟲細胞。最普通之宿主細胞為昆蟲細胞株Sf9。Sf9可從法明基恩、可龍德克或ATCC等處購得。其他，本發明中亦可利用Sf21(因飛陀基恩(Invitrogen)、法明基恩)或High fiveTM(因飛陀基恩)等昆蟲細胞。

該等昆蟲細胞可維持在適當的培養基中。培養基可利用如葛雷司昆蟲培養基(Grace Insect Medium)、TMN-FH昆蟲培養基或Excell 400等市售培養基。昆蟲細胞一般係培養於27℃左右，不像如動物細胞需要二氧化碳。Sf9即使在單層培養或懸浮培養亦可增殖良好。



五、發明說明 (22)

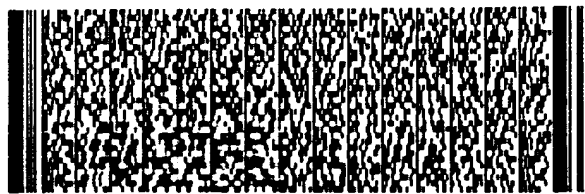
對昆蟲細胞之轉移載體及桿狀病毒去氧核糖核酸之轉染亦為公知的。具體而言，可使用脂質體(Lipofectin)試劑，使轉移載體及桿狀病毒去氧核糖核酸感染細胞。感染後若繼續培養，培養上清中會產生重組病毒。上清中之病毒可依需要放大，再使其感染更多昆蟲細胞，以大量表現外來性基因。將表現後之細胞回收，可將外來性基因之表現產物加以純化。

桿狀病毒表現系與以大腸桿菌等作為宿主之表現系比較，一般而言具有如下的優點。

- 表現量高
- 分子量大之蛋白質表現水平亦較高
- 可產生在動物細胞中表現同樣之轉譯後修飾
- 可進行複數種蛋白質之表現及再構成

另外，亦可以大腸桿菌中必要之複製基因(ColE1 ori)及支持在哺乳動物細胞中表現之複製基因(SV40 ori)及帶有SV40早期促進子之載體作成動物細胞表現載體。此種表現載體係將前述a)-e)中記載之聚核苷酸組入早期促進子下游並在大腸桿菌中選殖。將選殖後之表現載體回收，以磷酸鈣沉澱法或脂質體轉形到適當動物細胞(如來自猴腎之COS細胞等)，便可在動物細胞內表現N蛋白質。

以如上方式所表現之蛋白質可利用公知手法純化為純粹蛋白質。為求純化，亦可將N蛋白質表現為與各種結合性蛋白融合之蛋白質，再應用親和性層析來純化。此種精製方法公知者有將與組胺酸標記融合之蛋白質吸附於鎳管



五、發明說明 (23)

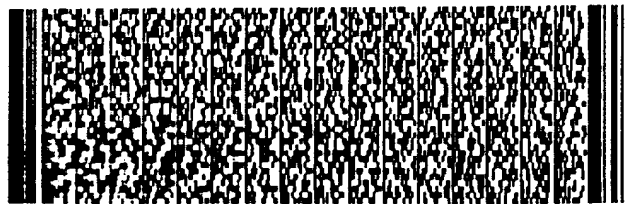
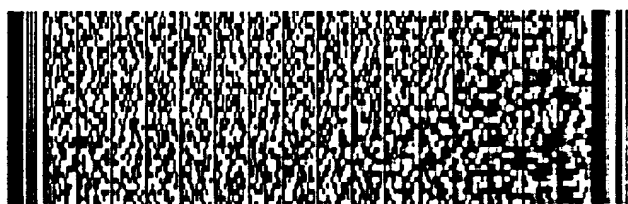
柱以純化之系統。以親和性層析法等所回收之N蛋白質可利用離子層析更進一步純化。

用於本發明疫苗中之蛋白質除依基因重組生產之外，亦可從使感染FIPV之培養細胞得到。FIPV之培養可使用來自哺乳動物之初代細胞或株化細胞。特別是來自貓的細胞對FIPV培養是適合的。源自貓之株化細胞例如有fcw4細胞或CRFK細胞。該等細胞可由細胞銀行取得。使用貓株化細胞之FIPV培養方法為公知的(Hodatsu T, Sasamoto T, Okada S, Koyama H. Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (Mabs): preparation of Mabs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. Vet Microbiol. 1991 Jun;28(1):13-24.)。

又，亦可使用來自豬或犬等其他動物之細胞。

再者，疫苗所需之必要蛋白質亦可以化學合成。將胺基酸依序鍵結以合成具有目的胺基酸序列之寡肽類之方法為公知的。特別是，由較短之胺基酸序列所構成之蛋白質片段可以很容易由化學合成。或，很難以化學合成之由長胺基酸構成的蛋白質亦可藉由將寡肽類相互鍵結而合成。

所得到之N蛋白質除將N蛋白質本身作為疫苗使用之外，亦可適用藥學處方使製劑化。例如，可以與藥理學上可容許之載體或媒介體，具體而言，滅菌水或生理食鹽水、植物油、乳化劑、懸濁劑、界面活性劑、安定劑等，進行適當組合以製劑化。本發明之疫苗亦可配合適當之佐



五、發明說明 (24)

劑。

本發明之疫苗可利用與任意之佐劑配合，使作用提高。本發明中可利用之佐劑例如有以下所示之成分。

鋁鹽等無機物

界面活性作用物質

微生物或來自微生物之物質

- 皂素

- BCG

- 去氧核酸等

- 胞壁醯雙胜(Muramyl dipeptide)

角鯊烯及其關連物

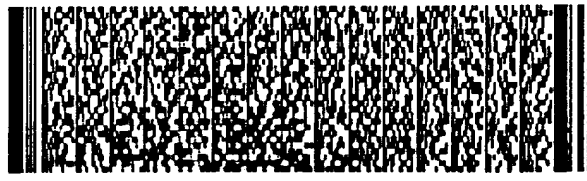
- 百日咳菌

- 百日咳毒素

- 霍亂毒素等

佐劑可單獨使用，或與複數物質組合使用。若為疫苗專家，可依實驗選擇適當佐劑之組合。佐劑依種類已知有主要刺激體液性免疫者與主要刺激細胞性免疫者。例如，主要刺激體液性免疫之佐劑已知有磷酸鋁。另外，Quil A 或QS-21 等皂素類、百日咳毒素、霍亂毒素等已知容易刺激細胞性免疫。一邊參考此類資訊的同時，可選擇與某種抗原組合使用之恰當佐劑。

又，本發明係關於含有前述a)-e) 中任一者記載之聚核苷酸為有效成分的貓傳染性腹膜炎病毒治療及/或預防用疫苗。如前所述，具有前述a)-e) 中任一者記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列的蛋白質對於貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗是有用的。故，將前述a)-e) 中任一者記載之聚核苷酸導入活體，利用在活體內表現，可期待與投予本發明疫苗有同樣之效果。



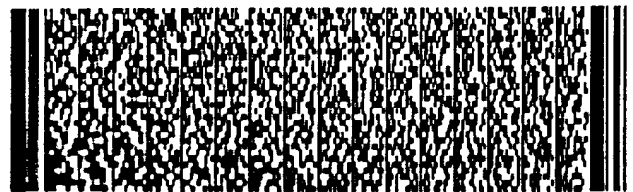
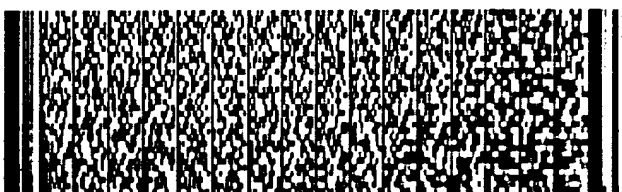
五、發明說明 (25)

本發明之疫苗中，前述聚核苷酸係於可表現狀態下被導入活體。為達此目標，可將例如在宿主中具有表現控制區功能之下游插入前述聚核苷酸的載體後導入活體內。若使用具有藥劑感受性之促進子作為表現控制區，可依藥劑之投予以誘導目的基因之表現。此種促進子已知例如有卡那黴素感受性之促進子。或者，可在特定部位誘導表現之促進子，可將目的基因之基因表現部位加以特定。

將編碼為抗原之基因對活體投予，在活體內表現以作為疫苗之手法稱為基因疫苗。基因疫苗中編碼為欲表現抗原之基因亦與適當之攜帶體或不附隨攜帶體而導入活體內。已知，僅將懸浮在適當緩衝液內之充足量去氧核糖核酸注射到肌肉內亦可誘導蛋白質之表現。另外，使用攜帶體時可利用載體或人工載體。

載體係利用牛痘病毒(*Vaccinia virus*)等病毒載體。牛痘病毒具有186kb之去氧核糖核酸基因體。是痘病毒屬之病毒。牛痘病毒是接種疫苗(vaccination)字彙起源之種痘疫苗，已有許多人接種且具有實績。再者，因牛痘病毒不會移行到核內而係在細胞質內進行轉錄與複製，故導入之基因插入宿主基因體的危險性小。因此，牛痘病毒為在科學性上看來安全性亦高的載體。除此之外，牛痘病毒載體對細胞性免疫之刺激活性較體液性免疫為大。其容易誘導細胞性免疫之特徵對於細胞性免疫重要性高的FIPV預防或治療是一種有利的特徵。

牛痘病毒之外，腺病毒、腺病毒伴隨病毒、反轉錄病



五、發明說明 (26)

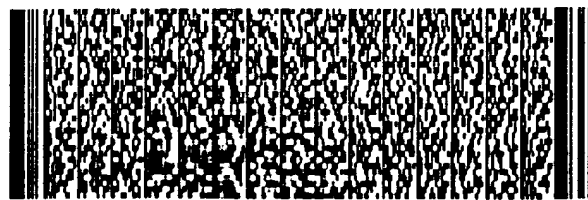
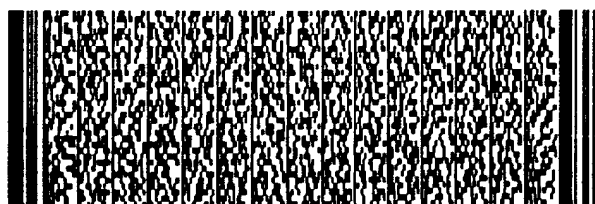
毒等被用為基因治療用載體使用。該等病毒載體任一者皆可使用在本發明。

病毒載體以外，使用人工攜帶體之基因疫苗亦被嘗試。人工攜帶體例如有脂質體或金膠體等。

例如，正電化脂質體會被具負電荷之去氧核糖核酸吸附。吸附去氧核糖核酸之脂質體若投予到活體，會結合到具有負電荷之細胞表面磷脂質層。接著，去氧核糖核酸會因吸附到細胞膜或因胞飲作用進入細胞膜內。此時若使用在促進子下游插入基因之載體作為去氧核糖核酸，在導入該基因之細胞中，基因會被轉錄並轉譯為蛋白質。金膠體係使用在以基因鎗(gene gun)將基因導入時。即，將吸附質體(裸露去氧核糖核酸)之金膠體粒子以壓縮氣體進行高壓接種。當金膠體粒子進入組織時，基因就會導入細胞內。使用基因鎗之基因導入方法可以藉導入少量去氧核糖核酸達成高蛋白質表現水平。即，意味著以少量去氧核糖核酸可達成充分的疫苗效果。

本發明疫苗對動物之投予除例如動脈內注射、靜脈內注射、皮下注射以外，可依鼻腔內、經支氣管、肌肉內或經口等該業界公知的方法進行。投予量依動物之體重或年齡、投予方法、使用目的等會有變動，只要是該業界之任應可適當選擇適當投藥量。一般，貓疫苗係於生下8週後以2~3週的間隔接種2次。

本發明之疫苗對於貓等貓科動物的FIP預防及/或治療是有用的。根據疫學或病毒學的資料，認為野生貓科動物



五、發明說明 (27)

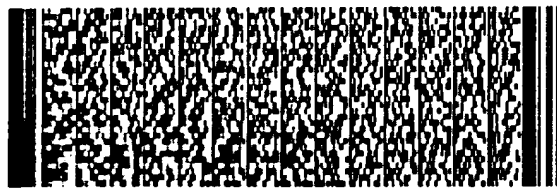
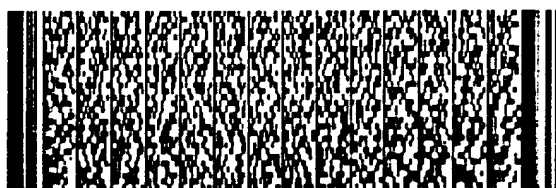
之FIPV亦與貓者為相近的。故，本發明之疫苗在貓科動物中亦為有效。

此外，本發明係關於以對含有前述a)-e)中任一者記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質有結合能力之抗體為有效成分的貓傳染性腹膜炎病毒治療及/或預防用抗體製劑。

如前所述，由前述a)-d)中任一者記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列構成之蛋白質雖可誘導抑制FIPV增殖之免疫反應，但不含感染增強抗原決定基。結果是，利用此蛋白質可以提供安全性與預防效果良好的疫苗。再者，利用將對前述a)-d)中任一者記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質有結合能力之抗體對宿主投予，亦可達成對貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防效果。

該等具有與蛋白質結合能力之抗體之投予可在短期內給予宿主得到與以蛋白質投予所誘導出之免疫反應類似之狀態。其結果為，被投予之抗體可抑制FIPV之增殖。又因前述蛋白質不含感染增強抗原決定基，可以避免因抗體所發生之感染增強誘導。

本發明之貓傳染性腹膜炎病毒治療及/或預防用抗體製劑可利用將前述a)-e)中任一者記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質作為抗原，對免疫動物免疫以得到。得到抗體之手法可為任意。例如，亦可將免疫動物之抗體產生細胞回收，利用選殖得到單株抗體。本發明之抗體製劑期望來自與投予抗體之動物為同種動物。來自



五、發明說明 (28)

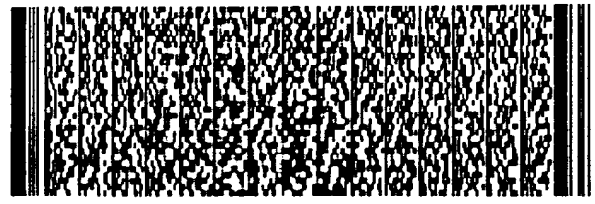
同種動物之抗體安全且更容易達到治療或預防的效果。

或也可將來自異種之抗體分子以抗體工程之方法使貓化。例如，將免疫球蛋白之不變區以貓免疫球蛋白置換以構築嵌合抗體之技術為公知的。更具體的說，利用將編碼為任意動物之免疫球蛋白變異區之基因接合在貓免疫球蛋白基因上，便可僅將免疫球蛋白之不變區形成貓由來蛋白質。

免疫球蛋白之不變區較變異區容易被辨識為異物。故，藉使不變區貓由來化，可以提高免疫球蛋白之安全性及在活體內之安定性。利用此技術，使具有目的結合親和性之抗體嵌合化，可得到適於對貓投予之免疫球蛋白。

利用此技術，已有將對貓疱疹病毒及貓卡利希病毒之小鼠單株抗體貓化的嵌合抗體被商品化(Umehasi M, Nishiyama K, Akiyama S, Kimachi K, Imamura T, Tomita Y, Sakaguchi S, Makino H, Shigaki T, Shinya N, Matsuda J, Tokiyoshi S. Development of Mouse-cat chimeric antibodies against feline viral rhinotracheitis and feline calicivirus infection. Sci. Rep. Chemo-Sero-Therap. Res. Inst., 6:39-48(1997))。

再者，亦可利用將貓免疫球蛋白之超變異區置換為具有與目的結合親和性抗體之超變異區，以得到貓化抗體。免疫球蛋白之變異區係由決定與抗原決定基之結合親和性的互補決定區(complementary determining region; CDR)與



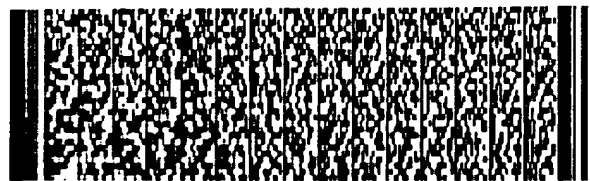
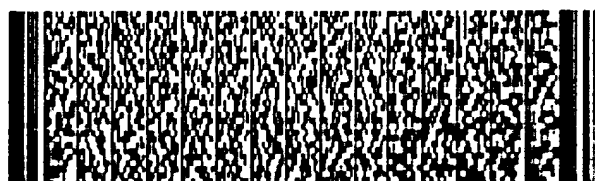
五、發明說明 (29)

其保持框架區構成。CDR之構造具有極高度變異，亦稱超變異區。另一方面，框架部分之保守性則高。因與抗原之結合親和性主要係依CDR決定，故利用置換CDR可以變更免疫球蛋白之結合親和性。

具體而言，設計可黏合框架部分之引子，以PCR取得編碼為CDR之互補去氧核糖核酸。若將所得到之互補去氧核糖核酸置換貓免疫球蛋白之CDR，則可得到具有由任意種免疫球蛋白所得到CDR之貓免疫球蛋白。即，利用將具有目的結合親和性之任一種免疫球蛋白之CDR置換貓免疫球蛋白之CDR，可以在貓免疫球蛋白中導入所需之結合親和性。

本發明之抗體製劑可含有與以前述a)-d)中記載聚核苷酸編碼之胺基酸序列構成之蛋白質具有結合能力之完全免疫球蛋白或其變異區作為有效成分。對免疫球蛋白抗原之結合活性係以變異區維持。故，可僅使用變異區作為有效成分。同時，因不變區在免疫反應中對與補體之結合活性、與淋巴球上Fc受體之結合活性等具有重要機能亦為事實。故，本發明之抗體製劑以具備不變區之免疫球蛋白分子作為有效成分的抗體製劑為佳。

本發明之抗體製劑中抗體不僅為免疫球蛋白本身，尚包括未純化之免疫球蛋白。故，抗血清等含免疫球蛋白區分亦包括在抗體中。另外，免疫球蛋白係對抗體以構造特徵為基礎說明時使用之用語。抗體及免疫球蛋白只要是含有具有所需結合親和性之免疫球蛋白，則可利用為本發明



五、發明說明 (30)

之抗體製劑。因此，並不一定非為純化抗體或單株抗體。

抗體可直接或應用藥學處方使製劑化。例如，可以與藥理學上可容許之載體或媒介體，具體而言，滅菌水或生理食鹽水、植物油、乳化劑、懸濁劑、界面活性劑、安定劑等，進行適當組合以製劑化。

本發明之抗體製劑對動物之投予除例如動脈內注射、靜脈內注射、皮下注射以外，可依鼻腔內、經支氣管、肌肉內或經口等該業界公知的方法進行。投予量依動物之體重或年齡、投予方法、使用目的等會有變動，只要是該業界之任應可適當選擇適當投藥量。

再者，本發明係關於包括將本發明疫苗或本發明抗體製劑對貓投予至少1次過程之用於貓傳染性腹膜炎病毒治療及/或預防用方法。本發明之方法可適用在屬於貓科所有的動物。疫苗或抗體製劑之調製方法及對動物之投予方法如前所述。

本發明之疫苗或抗體製劑對貓之FIPV預防及/或治療是有用的。本發明中，FIPV預防係指藉由對FIPV無感染經驗的動物或具有感染後發病前狀態之動物給予預防性投藥，以阻礙發病。發病之阻礙包括以下之作用。

防止發病本身之作用

延緩發病之作用

減輕發病後症狀之作用

使發病後治癒加快的作用

使發病後延命率提高之作用，或



五、發明說明 (31)

阻礙由已發病個體向其他個體傳染力之作用

又，本發明之治療係指對已發病個體投藥，以緩和疾病症狀。症狀之緩和例如包含如下作用。

緩和症狀之作用

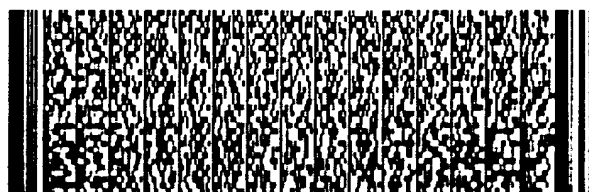
加快治癒之作用，或

使發病後延命率提高之作用

此外，本發明係關於一種貓傳染性腹膜炎病毒感染之檢驗方法，包括將含有前述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質與貓血清培養，並檢出與該蛋白質結合之抗體的過程。如實施例所示，來自KU-2之N蛋白質可與FIPV之廣泛株之抗血清強烈反應。此情形顯示KU-2之N蛋白質作為FIPV疫苗之有用性高，同時也可作為其作為診斷用抗原亦有用的證明。

病毒感染症之診斷一般係以活體試樣中所含有之病毒抗原或抗病毒抗體作為指標來實施。特別是抗病毒抗體因在病毒抗原消失之後仍可檢測到，故在作為診斷指標上是重要的。在抗病毒抗體之檢出上病毒抗原是必需的。

另外，先前，屬於FIPV I型之病毒顯示構造上之低類似性。故，為確實將受測動物之抗FIPV抗體存在檢出，被認為可能必需將每株所不同的蛋白質都要準備。若以單一蛋白質可能無法檢出對抗構造上不同抗原的抗體。但若依本發明之檢查方法，可用單一蛋白質作為抗原，以充分的感度檢驗對抗不同株之抗血清。故，本發明之檢查方法對於篩選貓FIPV是有用的。



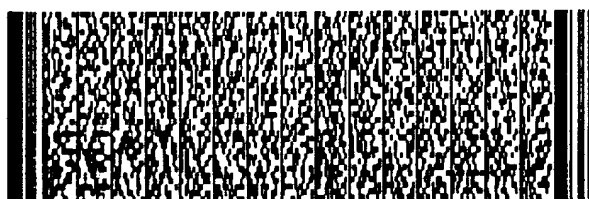
五、發明說明 (32)

即，本發明係提供一種貓傳染性腹膜炎病毒感染之篩選方法，包括將含有前述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質與貓血清培養，並檢出與該蛋白質結合之抗體的過程。本發明中，貓傳染性腹膜炎病毒感染之篩選方法係指以用於以不特定多數貓為對象，以找出有FIPV感染經驗可能性之貓的一種檢查方法。

使用特定抗原進行抗體檢測之方法是公知的。例如，可將抗原感作在固相上，並將結合於該抗原之抗體以可辨識抗體之抗體(2次抗體)檢測。或，將試樣中所含之抗體補捉在固相上，利用使該抗體與抗原反應，以檢驗出抗原專一性之抗體存在。在任一者之方法中為求可容易檢出抗體或抗原，可以先作標記。抗原或抗體之標記上使用酵素、螢光物質、發光物質、著色粒子或放射性同位素。使標記成分結合在蛋白質之方法是公知的。

此外，以固定有抗原之粒子載體因抗體所生之凝集作為指標檢出抗體之方法亦為公知的。以粒子凝集為指標之方法因為不需進行固相與液相之分離，對於將大量試樣連續檢驗之方法是有用的。

被檢出含有與前述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成蛋白質結合之抗體之個體被診斷為有FIPV之感染經驗。或，利用追蹤抗體力價之變化，亦可診斷症狀程度。例如，抗體力價之升高會繼續引起病毒增殖。故，抗體力價持續上升的個體伴隨病毒增殖的可能性高。若症狀減輕後抗體力價下降，該個體會被診斷為正



五、發明說明 (33)

在回復之可能性是高的。

本發明亦係關於一種貓傳染性腹膜炎病毒感染之檢驗試藥，包括前述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質。本發明之試藥中包括前述a)-e)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列所構成之蛋白質可依上述各種免疫試驗法形式，固定於固相或粒子上。又，可依上述各種免疫試驗法形式，將標記抗體、檢驗標記所需之附加試藥、陽性對照或陰性對照等組合以製成診斷用套組。

實施方式

用於實施發明之最佳形態

以下對本發明依實施例更具體說明。

[1] 病毒蛋白質之純化

FIPV I型KU-2株之由來：

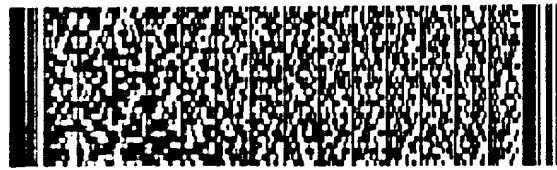
疫苗抗原之製作及重組體之製作係使用在北里大學獸醫畜產學部獸醫傳染病學教室內之FIP發病貓所分離到之FIPV KU-2株。該病毒被分類為FIPV I型。

FIPV II型KU-2株之由來：

純化N蛋白質之製作係使用在北里大學獸醫畜產學部獸醫傳染病學教室內之FIP發病貓所分離到之FIPV KU-1株。該病毒被分類為FIPV II型。

病毒之培養：

病毒係以貓胎兒由來株化細胞(felis catus whole



五、發明說明 (34)

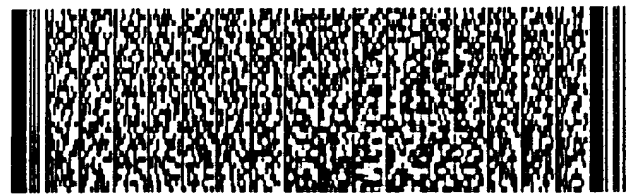
fetus(fcwf-4))培養。培養液係使用在依格式最小必需培養基(Eagles minimum essential medium, E-MEM)與L-15培養基等量混合後之培養基中加入牛胎兒血清(fetal calf serum:FCS)10%者。

病毒純化：

將 100TCID_{50} 之病毒接種於 225cm^2 之fcwf-4細胞內於 37°C 下吸附1小時後，加入培養液培養在二氧化碳培養箱內。將呈現CPE之細胞以細胞刮去器剝離並回收。將回收細胞以NTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH7.0), 100mM NaCl, 2mM EDTA)洗淨3次後懸浮於NTE緩衝液5ml。將懸浮細胞以當氏型均質機破碎後以 $1500 \times g$ 離心10分鐘以除去細胞片。將其堆層於30%蔗糖NTE緩衝液中以 $200000 \times g$ 離心2小時使病毒粒子沉澱。將沉澱以NTE緩衝液0.5ml溶解後以 $15000g$ 離心5分鐘，以其上清作為病毒溶液。

蛋白分畫：

在純化病毒中加入樣本緩衝液(100mM Tris-HCl(pH6.8), 4% SDS, 20% 甘油, 0.1% BPB)，於 100°C 下加熱處理5分鐘，再以11%聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)。將電泳後之凝膠取出，由標記蛋白之位置判斷相當於N蛋白質分子量的位置，把含有N蛋白質之位置的凝膠切出。用馬克司依耳德GP蛋白質回收器(ATT0, 東京)將切出之凝膠中所含的蛋白質回收，作為純化N蛋白質。所得到之純化N蛋白質作為西方墨點法、ELISA、皮內反應及次單元疫苗之抗原使用。



五、發明說明 (35)

[2]FIPV I型KU-2株之鹼基序列

病毒核糖核酸之調製：

在FIPV I型KU-2株之純化病毒中加入SDS0.5%後，進行苯酚萃取及乙醇沉澱以回收核糖核酸。將乾燥後之顆粒狀物溶解於無核糖核酸酶之水以形成核糖核酸溶液。

RT-PCR：

以下表示使用在選殖之引子鹼基序列。

IMPr-3F(順義

股)5'-ggggaarrcaattaaaggcaactactgcca-3'(序列編號：3)

BEP(dT)₂₁(反義

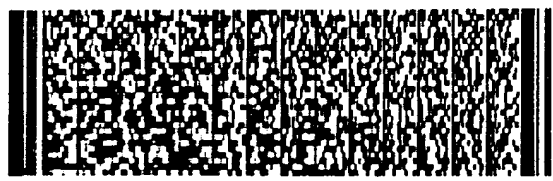
股)5'-ctgtgaattctgcaggatcctttttttttttttttttttttt-3'(序列編號：4)。

各引子上附加有選殖用之限制酶辨識序列。

在反轉錄酵素反應用緩衝液內加入負股引子、反轉錄酵素及病毒核糖核酸，於42℃下進行1小時反轉錄反應以轉錄為互補去氧核糖核酸。在PCR用緩衝液內加入PCR用引子、Tag聚合酶及互補去氧核糖核酸，進行95℃5分鐘-(95℃1分鐘-55℃1分鐘-72℃2分鐘)30循環-72℃5分鐘之PCR，使互補去氧核糖核酸放大。PCR產物之專一性以1%瓊脂凝膠電泳確認。

選殖：

選殖使用質體載體-pUC18。將PCR產物以乙醇沉澱後，以滅菌蒸餾水溶解，加入限制酶後10倍緩衝液與限制



五、發明說明 (36)

酶使消化。將pUC18以相同的限制酶消化後，以鹼性磷解酶進行脫磷酸化。將兩者皆以1%低融點瓊脂凝膠進行電泳後將含去氧核糖核酸之凝膠切出，並進行去氧核糖核酸之萃取精製。

將純化後之PCR產物與載體之去氧核糖核酸片段在連接用緩衝液中混合，並加入去氧核糖核酸連接酶於15℃下進行1小時之連接反應。將環狀化後之去氧核糖核酸於大腸桿菌JM109株之勝任細胞內進行轉型，並塗布於添加安必西林(ampicillin)之瓊脂平板培養基內於37℃下培養隔夜。

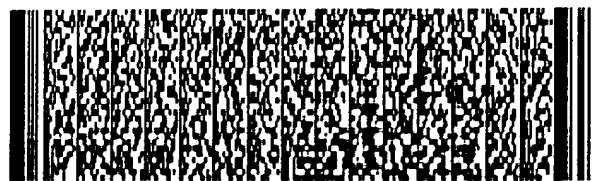
鈎出在培養基上長出之菌落以添加安必西林(ampicillin)之L-培養液1.5ml培養隔夜後，將質體抽出並以限制酶切斷，以1%瓊脂電泳確認去氧核糖核酸片段之大小以確認是否有選殖成功。將確認已選殖好之大腸桿菌添加安必西林(ampicillin)之L-培養液25ml培養隔夜後，進行重組質體去氧核糖核酸之萃取純化。

鹼基序列之決定：

將選殖後之互補去氧核糖核酸進一步於M13mp18/19噬菌體載體上次選殖，由所得到之噬菌體純化之單股去氧核糖核酸作為定序使用。鹼基序列係依據雙去氧核苷酸連鎖終結法(dideoxynucleotide chain termination)，以自動定序儀解析。

鹼基序列：

在FIPV基因核糖核酸全長約20kb中，吾等係對KU-2株



五、發明說明 (37)

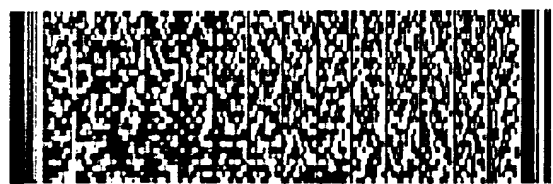
之3'末端側之9.2kb鹼基序列進行解析。KU-2株之N蛋白質其互補去氧核糖核酸之鹼基序列及所推定之胺基酸序列係表示於第1圖。N基因係由起始密碼子ATG起到終止密碼子TAA為止之1131個鹼基的ORF所構成，編碼為377個胺基酸，推定為表現為估計42.5kDa之早期蛋白質。

相同性：

第2圖表示屬於FIPV I型之KU-2株、Black株、UCD1株、FIPV II型之79-1146株、貓冠狀病毒II型(FECV) 79-1683株、貓冠狀病毒(CCV) Insvcl株及豬傳染性胃腸炎(TGEV) Purde株之N基因之蛋白質胺基酸序列的排列。利用比較該胺基酸序列，可了解KU-2株之基因上存在多數其他6株所沒有的特徵性胺基酸變異，是KU-2特有的序列。

表1表示N蛋白質胺基酸序列及鹼基序列之相同性。表中之相同性係使用基因資訊處理軟體GENETYX之最大符合度算出。參數如以下(Takahashi K and Gotho O (1984) J. Biochem. 92:1173-1177)。

Matchinh condition: matches=-1, mismatches=1 gaps=1, *N+=2



五、發明說明 (38)

表 1

	FIPV I 型			FIPV II 型	FECV 79-1683	CCV	TGEV	鹼基序列之相同性
	KU-2	Black	UCD1					
KU-2	100	91.2	92.2	91.3	91.3	76.7	76.6	
Black	90.72	100	90.9	92.5	93.7	77.7	77.3	
UCD1	91.51	91.51	100	92.2	90.9	77.7	77.4	
FIPV II 型	90.98	92.57	93.10	100	92.6	77.8	78.0	
FECV	92.31	94.43	93.37	93.90	100	77.9	77.6	
CCV	74.02	75.07	75.37	76.38	77.17	100	89.6	
TGEV	75.20	75.72	76.50	76.24	77.28	89.53	100	

胺基酸序列之相同性

表中之病毒名分別表示以下之病毒。又，表之數值係表示對角線上所記載之右上鹼基序列、及左下為胺基酸序列之相同性。

KU-2：FIPV I 型之KU-2株/I 型(基因銀行(GenBank)編號AB086881)

Black：FIPV I 型之Black株/I 型(基因銀行(GenBank)編號AB086903)

UCD1：FIPV I 型之UCD1株/I 型(基因銀行(GenBank)編號AB086902)

FIPV 型 II：FIPV I 型之79-1146株/II 型(基因銀行(GenBank)編號#X56496)

FECV：貓之腸冠狀病毒(Feline Enteric coronavirus)之79-1683株(基因銀行(GenBank)編號AB086904)

CCV：犬之冠狀病毒(Canine coronavirus)之CCV Insavc-1株(基因銀行(GenBank)編號#D13096)



五、發明說明 (39)

TGEV：傳染性腸胃炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus)之Purdue株(基因銀行(GenBank)編號#M21627, M14878)

在將KU-2株之N蛋白質胺基酸序列與其他病毒比較時，對貓之冠狀病毒即FIPV I型、II型、FECV II型為90%左右，對CCV與TGEV為75%左右。又，在貓之冠狀病毒彼此間比較時，分別亦有90%左右之相同性，顯示雖在該等病毒間基因大部分是保守性，但各別仍帶有獨特的基因序列。

系統樹：

第3圖表示由N基因之胺基酸序列作成的系統樹。

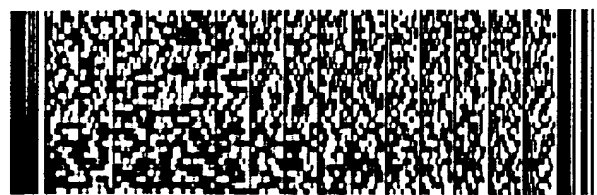
N基因之系統樹解析上，為貓冠狀病毒之FIPV I型、FIPV II型、FECV形成一群，該群與犬(CCV)或豬(TGEV)之冠狀病毒的距離遠。KU-2株之基因其差雖小，但在貓之冠狀病毒內具有最遠的進化距離。

[3] 重組N蛋白質之表現

RT-PCR：

以FIPV KU-2株之鹼基序列為原型，在可以表現N蛋白質全長之N蛋白質其開放讀取框架(open reading frame, ORF)上游與下游製作PCR用引子。在引子上附加有選殖用之限制酶辨識序列(BamH I及Sal I)。

以由FIPV KU-2株之純化病毒所調製之病毒核糖核酸作為模板，使用寡dT引子進行反轉錄反應以合成互補去氧核糖核酸。接著，進行95℃5分鐘-(95℃1分鐘-55℃1分鐘



五、發明說明 (40)

-72℃2分鐘)30循環-72℃5分鐘之PCR使互補去氧核糖核酸放大。PCR產物之專一性以1%瓊脂凝膠電泳確認。

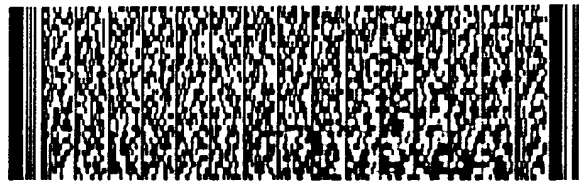
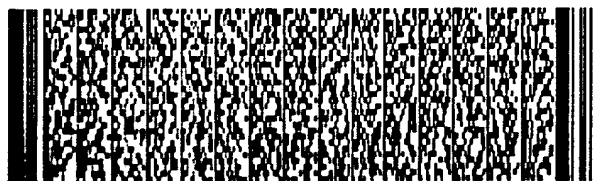
選殖：

質體載體pFastBac1之選殖係與對Puc18之選殖以同樣方法實施。使用BamH I及Sal I作為重組用之限制酶。宿主大腸桿菌使用HB101株。確認已選殖之大腸桿菌以添加安必西林之L-培養液培養隔夜，再進行重組pFastBac1質體去氧核糖核酸之萃取純化。

重組桿狀病毒之製作：

將純化質體去氧核糖核酸轉染大腸桿菌DH10BAC株之勝任細胞，並塗布在添加卡那黴素、四環黴素、慶大黴素(gentamycin)、IPTG及Bluo-gal之瓊脂平板培養基上，於37℃下培養隔夜。大腸桿菌DH10BAC株具有桿狀病毒穿梭載體bMON14272，轉染重組pFastBac1之DH10BAC可將N蛋白質基因重組為bMON14272。挑選培養基上產生之菌落中白色的菌落並鈎菌，以添加卡那黴素、四環黴素、慶大黴素(gentamycin)、IPTG及Bluo-gal之L-培養基25ml培養隔夜，再進行重組bMON14272去氧核糖核酸之萃取純化。

將純化後重組bMON14272去氧核糖核酸與CELLFECTIN混合，並轉染於玻璃器皿上之夜蛾科由來細胞福吉匹達夜蛾(*Spodoptera frugiperda*，(SF-9))。轉染後，除去混合液，於添加10%FCS之TC-100培養液(昆蟲培養液)培養2日。回收培養上清中所產生之桿狀病毒，並使用於重組桿狀病毒表現實驗。



五、發明說明 (41)

重組蛋白質之表現：

將SF-9細胞以 $1\sim 2 \times 10^6$ cells/ml接種於培養燒瓶(225cm²)並培養2日。除去培養液並接種重組桿狀病毒，於27℃下吸附1小時後，加入不含FBS之TC-100培養液培養。培養96小時後回收感染細胞以磷酸緩衝生理食鹽水(PBS⁽⁻⁾)洗淨，再加入添加0.2%NP-40之RSB溶液(0.01M NaCl, 0.0015M MgCl₂, 0.01M Tris-HCl(pH7.4))4ml使細胞溶解。將其以5000rpm離心10分鐘，將沉澱以PBS⁽⁻⁾1ml懸浮並作為重組N蛋白質使用於實驗。

[4] 專一性之確認

西方墨點法：

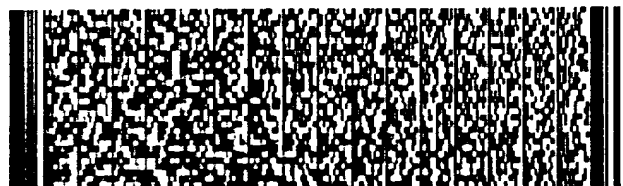
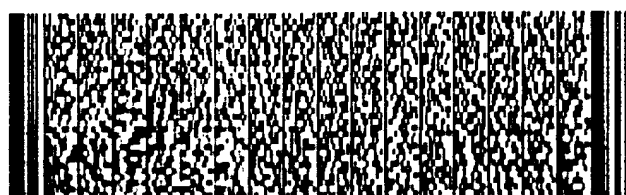
將樣本緩衝液加入製作好之抗原，以100℃進行5分鐘加熱處理後，以11%凝膠之SDS-PAGE展開。取出凝膠，使用半乾式轉印裝置轉印到PVDF膜上。將轉印膜以(PBS⁽⁻⁾)洗淨後，於4℃下以BlockAce浸泡隔夜使吸墨。

一次血清使用對抗FIPV N蛋白質之單株抗體(選殖體編號：E22-2)、對抗FIPV M蛋白質之單株抗體(選殖體編號：F18-2)及對抗FIPV S蛋白質之單株抗體(選殖體編號：6-4-2)培養上清的混合物。將轉印膜浸泡在培養上清於37℃使反應2小時後，以添加0.05%Tween20之PBS(-)洗淨3次。該等單株抗體係如下之公知的抗體。

選殖體編號：E22-2及選殖體編號：F18-2：

(Hohdatsh T, Sasamoto T, Okada S, Koyama H.

Antigenic analysis of feline coronaviruses with



五、發明說明 (42)

monoclonal antibodies (MAbs): Preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. Vet Microbiol. 1991 Jun;28(1):13-24)

選殖體編號：6-4-2：

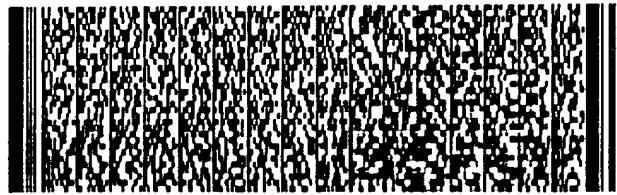
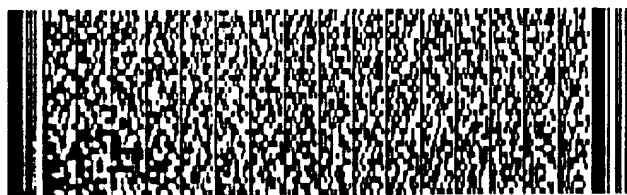
(Hohdatsh T, Okada S, Koyama H. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. Arch Virol. 1991 ;117(1-2):85-95)

二次血清使用HRPO標記山羊抗小鼠IgG+M+A。浸泡在加入標記抗體之血清稀釋液內於37℃下反應1小時後，以添加0.05%Tween20之PBS(-)洗淨3次。將轉印膜浸泡於基質液(0.02%DAB, 0.006% H₂O₂, 0.05M Tris-HCl(pH7.6))5~20左右使發色後，以蒸餾水洗淨使反應停止。

FIPV KU-2株之N蛋白質由該胺基酸序列計算，推定約為45kDa之表現產物。實際上，於昆蟲細胞表現之重組蛋白質在40~45kDa處檢出有特異之譜帶，確認為重組FIPV N蛋白質(第4圖)。又，純化N蛋白質亦在同樣位置可見特異之譜帶(第5圖)。

ELISA：

將製作好的抗原以固相化用緩衝液(0.1M碳酸緩衝液)以2倍系列稀釋為2~128倍並分注在ELISA平板，於4℃下靜



五、發明說明 (43)

置隔夜使固化。將各穴以添加0.05%Tween20之PBS(-)洗淨3次並用於ELISA。

一次血清使用對抗FIPV N蛋白質之單株抗體(選殖體編號:E22-2)之培養上清。將培養上清以0.1ml/well分注於固化之穴中後,於37℃使反應1小時,以添加0.05%Tween20之PBS(-)洗淨3次。二次血清使用HRP0標記山羊抗小鼠IgG+M+A。在加入標記抗體之血清稀釋液內於37℃下反應1小時後,以添加0.05%Tween20之PBS(-)洗淨3次。將TMB基質液(四甲基聯苯胺)以0.1ml/well分注後,於常溫反應20分鐘,將硫酸以0.05ml/well加入並測定450nm之吸光度。

重組N蛋白質(第6圖)與純化N蛋白質(第7圖)皆僅對抗FIPV N蛋白質單株抗體會抗原量依存的進行反應,可確認其專一性。

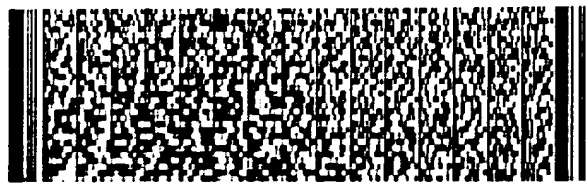
[5] 疫苗之製作

抗原之調製

抗原量之測定係使用西方墨點法。將製作之抗原以2倍系列稀釋為8倍~512倍並進行SDS-PAGE,使用抗FIPV N蛋白質單株抗體(選殖體編號E22-2)以西方墨點法測出。將可檢出之稀釋倍數最高之譜帶所含有之抗原量定為1單元,將其稀釋之倒數作為原液之抗原量。以PBS(-)稀釋調整,以使疫苗1用量份中含有16單元之抗原量。

佐劑:

佐劑使用日本市售之貓用3種混合不活化疫苗飛利德



五、發明說明 (44)

包PCR(InterVet公司)。該疫苗中含有佐劑L80與氫氧化鋁。將調整為16單元/ml之抗原1ml與飛利德包PCR1ml(1用量份)混合，並充分混合作成疫苗。此疫苗以2ml作為1用量份。

[6] 免疫試驗(1)

動物：

實驗動物使用7~9個月齡之SPF貓。重組N蛋白質疫苗之免疫群使用4隻。攻毒對照群使用4隻，並將與SF-9細胞重組N蛋白質之回收方法相同處理所得之抗原對其免疫。

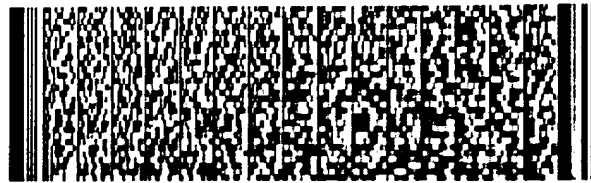
疫苗接種：

以疫苗用量1份間隔3週於頸部皮下接種3次(第8圖)。在各次免疫進行前採血並測定血清之抗體力價。

以ELISA測定抗體力價：

以固化用緩衝液稀釋純化N蛋白質使為2單位(約100ng/well)並分注於ELISA平板以4℃下固化隔夜。洗淨後，將所採血之貓血清以抗體稀釋液稀釋100倍者作為1次血清，並於37℃下反應1小時。洗淨後，使HRPO標記抗貓Ig於37℃下反應1小時。洗淨後，加入TMB基質液(四甲基聯苯胺)，於常溫使發色20分鐘，加入反應停止液並測定450nm之吸光度。

重組N蛋白質之疫苗接種群中任一隻貓在2次免疫後第3週(第3次免疫時)時雖未見抗體力價上升，但3次免疫後第4週(攻毒時)可確認抗體力價上升。其中，貓編號221可



五、發明說明 (45)

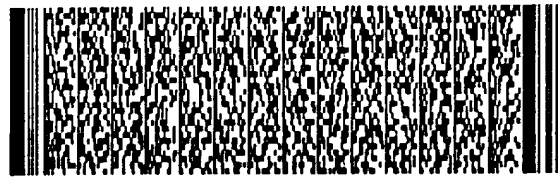
確認顯著抗體力價上升，但其餘3隻則僅有微弱反應。作為對照接種由SF-9細胞調製抗原之接種群中4隻全部未見ELISA O.D. 值之上升(第9圖)。

中和抗體力價之測定：

將96穴盤中已作2倍系列稀釋之貓血清0.025ml與調整為200TCD₅₀/0.025ml之病毒液等量混合，於4℃下使反應24小時。再將fcwf-4細胞以 1×10^6 /well加入，培養48小時。將完全抑制CPE(細胞變性效果)之貓血清其最高稀釋倍數之倒數作為中和抗體力價。

又，因為通常抗N蛋白質抗體不帶有中和活性，故認為以N蛋白質免疫所產生之抗體難以單獨用抗體抑制CPE，故添加補體實施中和試驗。即，在調整為200TCD₅₀/0.025ml之病毒液內添加10%山羊血清(補體)使同樣進行反應。

重組N蛋白質免疫群之中和抗體力價在免疫開始時及3次免疫後第4週(第70日)任一者皆無論補體是否存在，所有的貓都是10倍以下。在SF-9細胞抗原接種群中也是同樣結果(表2)。



五、發明說明 (46)

表 2

群	貓編號	中和抗體力價			
		有補體		無補體	
		抗原接種時	接種後 第 70 日	抗原接種時	接種後 第 70 日
桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接 種群	217	<10	<10	<10	<10
	221	<10	<10	<10	<10
	191	<10	<10	<10	<10
	6	<10	<10	<10	<10
SF-9 接種群	163	<10	<10	<10	<10
	210	<10	<10	<10	<10
	170	<10	<10	<10	<10
	173	<10	<10	<10	<10

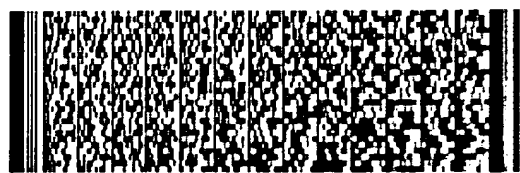
細胞免疫性之測定：

為確認因疫苗所附加之細胞免疫性程度，測定延遲型過敏反應對純化N蛋白質抗原之皮內反應。

將左脇腹剃毛後用70%酒精消毒，分別以皮內接種注射N蛋白質抗原(0.1mg/ml)及作為控制之PBS⁽⁻⁾0.1ml。抗原接種部位係約隔4cm之間隔接種。以游標尺測定於接種後24、48、72、96小時在接種部位出現腫脹之範圍。

重組N蛋白質免疫群之所有貓都可見到對純化N蛋白質之反應。貓編號217在接種後24小時起可看到腫脹，之後反應下降到96小時後消失。貓編號191及貓編號221同樣也在24小時起可看到腫脹，之後反應下降到96小時後仍可見到約2~3mm之腫脹。貓編號6在72小時腫脹最大時亦只有2mm之微弱反應，到96小時後消失(第10圖)。所有的貓對PBS⁽⁻⁾都沒有腫脹反應。由此結果，可確認因為重組N蛋白質疫苗可賦予細胞性免疫。

[7] 攻毒試驗(1)



五、發明說明 (47)

攻毒方法：

對免疫試驗(1)之貓，在第3次免疫後第4週時實施攻毒試驗(第8圖)。

攻毒用病毒使用FIPV II型79-1146株，將其 10^5 TCID₅₀(1ml)以經口及經鼻接種。自接種病毒起到實驗結束為止每日觀察臨床症狀。每3日測定體溫、體重。同樣，每3日採取直腸擦拭液，供之後實驗用。又，每6日採血並分離血清，供之後實驗用。

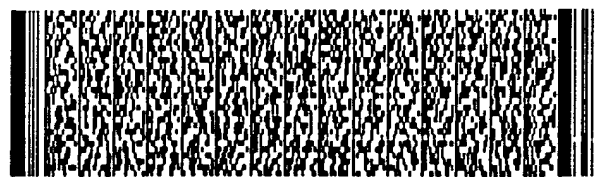
生存率：

攻毒對照群中4隻有4隻發生FIP症狀，貓編號170在攻毒後第23日、貓編號210在攻毒後第31日、貓編號163在攻毒後第44日死亡。相對於此，重組N蛋白質疫苗接種群之貓中，貓編號191發生FIP症狀並在第48日死亡，但其餘3隻雖可認為受感染但可防止發病，存活了下來(第11圖)。

體溫之變化：

重組N蛋白質抗原免疫群在剛攻毒後雖可見到發熱，但之後過程依個體而不同。貓編號217在接種後第3日超過40℃被認為有發熱但之後持續為平均熱度。貓編號221在接種後第3日及第27日到第42日間接近或超過40℃被認為有發熱但之後溫度下降。貓編號191在接種後第3日及第27日到第33日間超過40℃被認為有發熱但之後體溫急速下降，在第48日死亡。貓編號6在第3日超過40℃被認為有發熱但之後持續為平均熱度。

另一方面，攻毒對照群中4隻都確認為雙峰性的發



五、發明說明 (48)

熱。貓編號163在接種後第3日及第18日~第21日間、第30日~第36日間接近或超過40℃被認為有發熱，之後體溫急速下降，在第44日死亡。貓編號210在第3日及第12日~第27日間超過40℃被認為有發熱，在第44日死亡。貓編號170在第3日及第15日~第18日間接近或超過40℃被認為有發熱，之後體溫急速下降，在第23日死亡。貓編號173在第3日及第18日~第21日間超過40℃被認為有發熱，之後體溫急速下降，在第26日死亡。

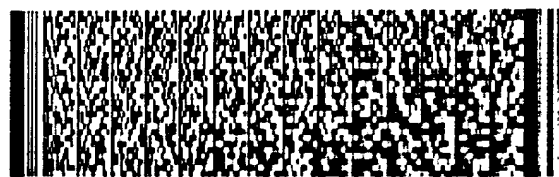
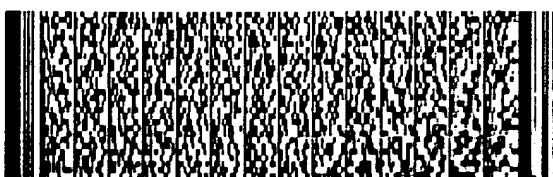
體重之變化：

重組N蛋白質抗原免疫群中貓編號217及貓編號6這兩隻的體種順利增加，貓編號221則雖略有下降但大致維持固定。貓編號191雖沒有急速下降但緩緩下降，在第48日死亡。攻毒對照群中4隻都從病毒攻毒後開始急速下降，直到死亡為止持續下降。

ELISA抗體力價：

攻毒後每6日將以純化N蛋白質作為抗原者之血清中抗體力價以ELISA測定(第12圖)。

重組N蛋白質抗原免疫群之4隻中疫苗免疫之反應高的貓編號221從攻毒後馬上抗體力價開始上升，到第18日左右達平穩。疫苗免疫之反應低的其餘3隻從攻毒後第6日開始抗體力價上升，也大約到第18日左右達平穩。攻毒對照群之抗體力價亦從攻毒後第6日開始上升，但其反應與免疫群比較，較不急速，到第12日抗體力價還有相當的升高。任一隻貓的抗體力價都一直上升到死亡時。



五、發明說明 (49)

中和抗體力價：

對攻毒時、攻毒後第12日、攻毒後第60日或死亡時的血清進行中和實驗(不使用補體)(表3)。

表 3

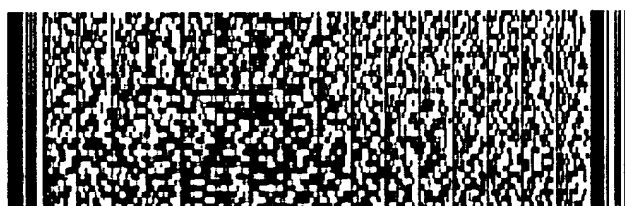
群	貓編號	中和抗體力價			生死
		79-1146株 接種時	79-1146株 接種後第 12 日	*79-1146株 接種後第 60 日	
桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接 種群	217	<10	20	6400	生存
	221	<10	160	6400	生存
	191	<10	40	6400	死亡
	6	<10	40	1600	生存
SF-9 接種群	163	<10	80	6400	死亡
	210	<10	80	1600	死亡
	170	<10	80	800	死亡
	173	<10	80	1600	死亡

*表示在接種後 60 日前死亡之貓其死亡時之值。

重組N蛋白質免疫群之中和抗體力價在攻毒時4隻貓全部在10倍以下。在攻毒後12日ELISA反應高之編號221其中和抗體力價雖為160倍，但其他3頭為20~40倍。攻毒後60日或死亡的中和抗體力價在生存之3隻中，1隻為1600、2隻為6400，死亡之1隻為6400倍。攻毒對照群之中和抗體力價在攻毒時4隻都在10倍以下，攻毒後12日4隻都是80倍，死亡時為800~6400倍。綜合免疫群、攻毒對照群，中和抗體力價與過程(生死)並不認為有相關性。

病毒分離：

從攻毒後每3日所採取之直腸擦拭液萃取核糖核酸，以RT-巢式PCR檢測病毒基因以確認活體內病毒之增殖(表4)。



五、發明說明 (50)

表 4

群	貓編號	79-1146 株接種後之日數						
		0	3	6	9	12	15	18
桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接 種群	217	-	-	-	-	-	-	-
	221	-	-	-	-	-	-	-
	191	-	-	-	-	-	-	+
	6	-	+	-	-	-	-	+
SF-9 接種群	163	-	-	-	-	+	+	-
	210	-	-	-	-	-	-	-
	170	-	+	-	+	+	+	+
	173	-	+	-	-	-	-	-

病毒核糖核酸之萃取使用市售套組Sepa Gene

RV-R(三光純藥,東京)。將萃取後之核糖核酸加入水
0.007ml 溶解,使成純化核糖核酸。純化核糖核酸溶液於
80℃、5分鐘急速加熱進行熱變性。將其與反轉錄酵素緩
衝液與引子與反轉錄酵素混合,並於42℃下反應1小時合
成互補去氧核糖核酸。其次於下述組成之反應液中,加入
以反轉錄反應得到之互補去氧核糖核酸1 μ l 作為模板,再
加滅菌蒸餾水36 μ l 使總量為50 μ l。

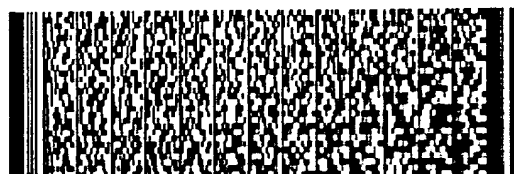
10× 反應緩衝液4.8 μ l

2.5mM/each DNTps 5 μ l

50mM 引子混合物1 μ l(外部引子套組;外部(+)與外部(-))

Tag 聚合酶(1單位/2.2 μ l)2.2 μ l

將該等設定於去氧核糖核酸熱循環機,以PCR法使去
氧核糖核酸放大。反應係於初始以94℃進行3分鐘熱變性
後、94℃1分鐘(熱變性)·55℃1分鐘(黏合)·72℃2分鐘
(伸長反應)之循環進行30個循環,最後進行72℃5分鐘之



五、發明說明 (51)

伸長反應。

使用以外部引子套組放大之PCR產物 $1\mu\text{l}$ ，以內部引子套組(內部(+))及內部(-))同樣實施PCR反應。用於PCR之引子可專一性的辨識FCoV之N基因。各引子之序列如以下所示。

外部(+): 5'-CAACTGGGGAGATGAACCTT-3' (序列編號: 5)

外部(-): 5'-GGTAGCATTTGGCAGCGTTA-3' (序列編號: 6)

內部(+): 5'-ATTGATGGAGTCTTCTGGGTTG-3' (序列編號: 7)

內部(-): 5'-TTGGCATTCTTAGGTGTTGTGTC-3' (序列編號: 8)

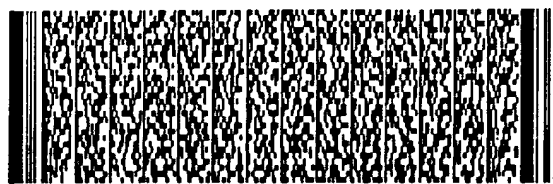
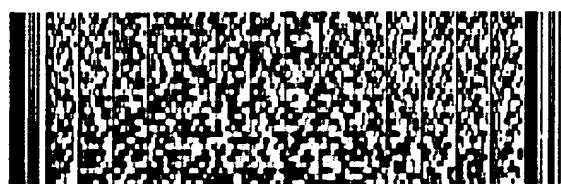
將PCR用引子、Tag聚合酶及互補去氧核糖核酸加入PCR用緩衝液，並實施30循環之PCR。PCR產物以1%瓊脂凝膠電泳確認，並判定在特定位置檢出有譜帶者為陽性。

重組N蛋白質免疫群中有2隻檢出病毒。貓編號191於攻毒後第18日、編號6為第3日及第18日各檢出核糖核酸。攻毒對照群有3隻檢出病毒。貓編號163在第12日及第15日、編號170在第3日及第9~18日、編號173在第3日檢出病毒。編號6、170、173在攻毒第3日檢出病毒，但與剛攻毒後之發熱時期重疊。由病毒分離之結果與生死無法確認其相關性。

[8] 免疫試驗(2)

動物：

使用6個月大之SPF貓與免疫試驗(1)以同樣方式實施。



五、發明說明 (52)

重組N蛋白質疫苗之免疫群使用4隻、FIPV II型KU-1株由來之純化N蛋白質疫苗之免疫使用4隻、攻毒對照群使用4隻。

疫苗接種：

疫苗接種與免疫試驗(1)以同樣方式實施。

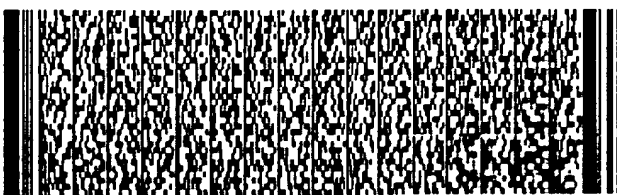
以ELISA進行抗體力價測定

重組N蛋白質免疫群在2次免疫第3週時數隻只有些許反應，3次免疫第4週時4隻都有明顯上升(第14圖)。純化N蛋白質免疫群亦在2次免疫第3週時數隻只有些許反應，3次免疫第4週時4隻都有明顯上升，且值比重組N蛋白質免疫群還要高。另外，對照群4隻都看不出有反應。

中和抗體力價之測定：

中和抗體之測定係於免疫開始前與3次免疫第4週(攻毒前)僅以不使用補體的方法對血清實施。

重組N蛋白質免疫群、純化N蛋白質免疫群、對照群任一者在免疫前，免疫後全部都在10倍以下，檢驗不出中和抗體(表5)。



五、發明說明 (53)

表 5

群	貓編號	中和抗體力價				生死
		免疫 開始時	79-1146 株接種時	79-1146 株 接種後第 12 日	*79-1146 株 接種後第 60 日	
桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接 種群	177	<10	<10	40	200	生存
	242	<10	<10	20	>6400	生存
	245	<10	<10	20	3200	死亡
	247	<10	<10	10	3200	生存
純化 FIPV 抗 原由來 N 蛋白 質抗原接種群	175	<10	<10	20	>6400	死亡
	180	<10	<10	40	80	死亡
	243	<10	<10	10	>6400	死亡
	252	<10	<10	40	>6400	死亡
SF-9 細胞抗原 接種群	178	<10	<10	10	400	死亡
	181	<10	<10	40	3200	死亡
	244	<10	<10	40	6400	死亡
	249	<10	<10	40	200	死亡

*表示在接種後 60 日前死亡之貓其死亡時之值。

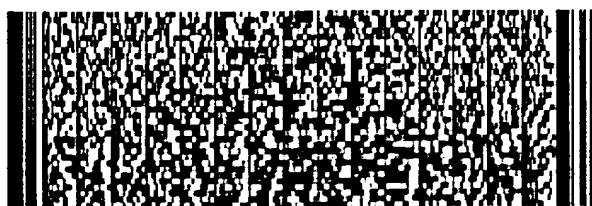
細胞性免疫之測定：

細胞性免疫係與免疫試驗(1)同樣測定對純化N蛋白質之延遲型過敏反應。結果以4隻之平均值表示於第15圖。重組N蛋白質免疫群從接種24小時後可見到腫脹，此24小時為最大值，之後緩緩消失。純化N蛋白質免疫群從接種24小時後開始可見到腫脹，到48小時達最大值，之後下降但直到96小時後仍殘有1mm左右之腫脹。

[9] 攻毒試驗(2)

攻毒方法：

免疫試驗(2)之貓，以與攻毒試驗(1)同樣方法使感染FIPV 79-1146。與攻毒試驗(1)以同樣方法實施臨床症狀之觀察、體溫體重測定、採血及直腸擦拭液之採取。此外每3日採取咽頭擦拭液以供分離病毒。



五、發明說明 (54)

生存率：

對照群中，貓編號249在攻毒後第23日、編號178在第29日、編號181在第60日死亡，但編號244生存，以結果看，4隻中有3隻死亡(第16圖)。相對於此，重組N蛋白質免疫之群中，僅有貓編號177在第19日死亡，其他3隻存活。純化N蛋白質免疫群中，貓編號180在第19日、編號175在第77日、編號252在第78日死亡，以結果看，4隻中有3隻死亡，但若與攻毒對照群比較，可認為有延命效果，可確認有某種程度的效果。

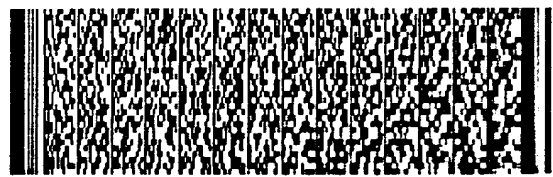
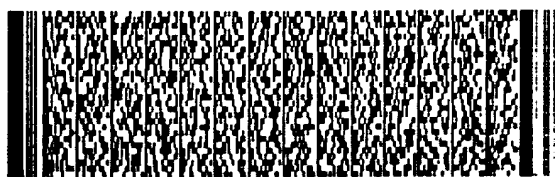
體溫之變化：

重組N蛋白質免疫之群中，貓編號177自攻毒起體溫持續上升，到第15日達到最高點後急速下降並死亡。編號242在第3日發熱後，雖一度下降但從第30日左右又再發熱並持續一段時間。其他2隻雖在感染初期有發熱，但之後大致過程為平均熱度。

純化N蛋白質免疫之群中，貓編號180在攻毒第3日與第12日發熱超過40度後體溫急速下降並死亡。編號252變化到40度左右之高熱後，體溫緩緩下降並死亡。編號175在感染初期發熱後大致維持平均熱度。攻毒對照群中貓編號244大致以平均熱度推移。死亡之3隻在感染初期發熱後於第12日時曾經下降，但馬上再發熱，並於死亡數日前持續體溫下降。

體重之變化：

重組N蛋白質免疫之群中，死亡的貓編號177從感染後



五、發明說明 (55)

馬上持續減少。編號245及編號247雖順利增加，但編號242緩緩減少。純化N蛋白質免疫之群中，貓編號180急速下降並死亡，但編號252緩緩下降並死亡。編號175為唯一體重有增加者但與編號252在同時期死亡。編號243之體重順利增加。攻毒對照群中，存活的貓編號244可看到體重些微增加，但死亡之3隻從剛感染後到死亡為止持續下降。

ELISA 抗體力價：

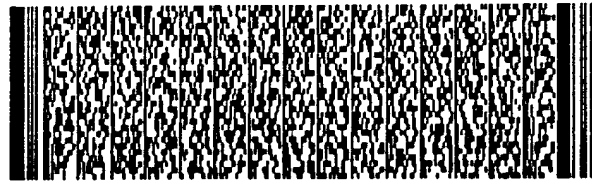
攻毒後每6日以純化N蛋白質ELISA測定血清中抗體力價(第17圖)。重組N蛋白質免疫群與純化N蛋白質免疫群基本上沒有不同，攻毒第6日可觀察到抗體上升到第12日達到平穩。純化N蛋白質免疫群之中，貓編號180在攻毒時已為高值，但攻毒後更加上升。攻毒對照群中4隻皆自攻毒後第12日開始可見到反應，到第30日時達到平穩。

中和抗體力價：

關於中和抗體力價之變化，重組N蛋白質免疫群、純化N蛋白質免疫群、攻毒對照群在基本上沒有不同(表5)。任一者之貓在攻毒前皆為10倍以下，但在攻毒後第12日顯示10~40倍之抗體力價，感染後第60日仍存活者為3200~6400倍以上。對60日以前死亡者，為80~200之低值，但可認為係在抗體充分產生前死亡。

用Fcwf4細胞分離病毒：

將咽頭擦拭液與直腸擦拭液各0.05ml/well接種於培養在48穴盤之fcwf-4細胞，於37℃下吸附1小時。將細胞



五、發明說明 (56)

面以培養液洗淨後，加入維持用MEM0.5ml/well並於37℃下培養。以2日以內觀察到CPE者當作是陽性。其結果與RT-PCR大致顯示同樣結果。直腸擦拭液所分離之病毒在攻毒第6日~第15日間，重組N蛋白質免疫群之2隻及純化N蛋白質免疫群中1隻各在1~2日呈現陽性(表6)。

表 6

	群	貓編號	FIPV 79-1146株接種後日數(日)					
			0	3	6	9	12	15
用 Fcwf4 細胞分離病毒	桿狀病毒重組 N蛋白質抗原 接種群	177	-	-	-	-	+	+
		242	-	-	-	-	-	-
		245	-	-	-	-	-	-
		247	-	-	-	-	+	-
	純化 FIPV 抗 原由來 N 蛋白 質抗原接種群	175	-	-	-	-	-	-
		180	-	-	+	-	+	-
		243	-	-	-	-	-	-
		252	-	-	-	-	-	-
	SF-9 細胞 抗原接種群	178	-	-	-	-	-	-
		181	-	-	-	-	-	-
		244	-	-	-	-	-	-
		249	-	-	-	-	-	-
以 RT-Npcr 檢出 FCoV 基因	桿狀病毒重組 N蛋白質抗原 接種群	177	-	-	-	-	+	+
		242	-	-	-	-	-	-
		245	-	-	-	+	+	-
		247	-	-	-	-	+	-
	純化 FIPV 抗 原由來 N 蛋白 質抗原接種群	175	-	-	-	+	-	-
		180	-	-	+	-	+	-
		243	-	-	-	-	-	-
		252	-	-	-	-	-	-
	SF-9 細胞 抗原接種群	178	-	-	-	+	-	-
		181	-	-	-	-	-	+
		244	-	-	+	-	-	-
		249	-	-	-	-	-	-

+：分離到病毒者，或檢出 FCoV 基因者

-：未分離到病毒者，或未檢出 FCoV 基因者

由咽頭擦拭液分離病毒者，各群皆為全數呈陽性，攻毒後第3~9日幾乎所有個體都分離到病毒(表7)。



五、發明說明 (57)

表 7

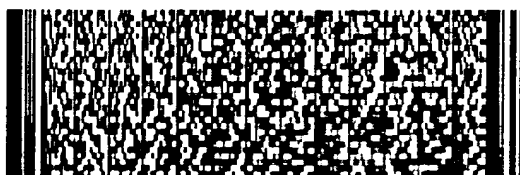
	群	貓編號	FIPV 79-1146株接種後日數(日)					
			0	3	6	9	12	15
用 Fcwf4 細胞分離病毒	桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接種群	177	-	+	+	+	-	-
		242	-	+	+	-	-	-
		245	-	+	+	+	-	-
		247	-	+	+	+	-	-
	純化 FIPV 抗原由來 N 蛋白質抗原接種群	175	-	+	+	+	-	-
		180	-	-	+	-	-	-
		243	-	+	+	-	-	-
		252	-	+	+	+	-	-
	SF-9 細胞抗原接種群	178	-	+	+	-	-	-
		181	-	+	-	+	-	-
		244	-	+	-	+	-	-
		249	-	+	+	+	-	-
以 RT-nPCR 檢出 FCoV 基因	桿狀病毒重組 N 蛋白質抗原接種群	177	-	+	+	+	-	-
		242	-	+	+	-	-	-
		245	-	+	+	+	-	-
		247	-	+	+	+	-	-
	純化 FIPV 抗原由來 N 蛋白質抗原接種群	175	-	+	+	+	-	-
		180	-	+	+	+	-	-
		243	-	+	+	-	-	-
		252	-	+	+	+	-	-
	SF-9 細胞抗原接種群	178	-	+	+	-	+	-
		181	-	+	-	+	-	-
		244	-	+	-	+	-	-
		249	-	+	+	+	+	-

+：分離到病毒者，或檢出 FCoV 基因者

-：未分離到病毒者，或未檢出 FCoV 基因者

病毒分離(RT-巢式PCR)：

因攻毒試驗(1)中由直腸擦拭液分離病毒之感度低，故在攻毒試驗(2)中亦實施由咽頭擦拭液分離病毒。直腸擦拭液及咽頭擦拭液係於攻毒後每3日採取，用於實驗。由直腸擦拭液之RT-PCR與攻毒試驗(1)所得到之結果大致相同，在重組N蛋白質免疫群中4隻中3隻、純化N蛋白質免疫群中有2隻、攻毒對照群有3隻各在1~2日呈現陽性(表



五、發明說明 (58)

6)。由咽頭擦拭液之RT-PCR在各群皆為全數呈陽性，攻毒後第3~9日幾乎所有個體都檢出病毒。但攻毒後第15日貓編號180反轉為陰性(表7)。

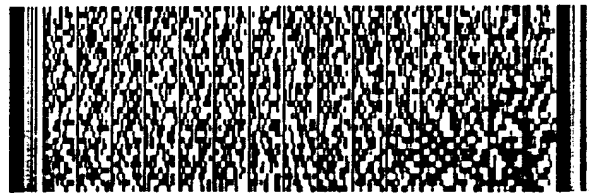
以大腸桿菌表現重組蛋白質：

大腸桿菌表現使用表現與谷胱甘肽-S-轉移酶融合蛋白質之質體載體-pGEX-2T(法馬喜亞(Pharmacia))。N蛋白質之表現使用FIPV I型KU-2株之基因。為表現N蛋白質整區，將起始密碼子ATG到終止密碼子TAA插入於GST編碼區下游之選殖區。S蛋白質之表現使用KU-2株與FIPV II型KU-1株之基因。S蛋白質中，除依株之不同變異大之區域訊息胜肽序列以外，將編碼為N末端約250個胺基酸區與N蛋白質以同樣方式選殖。將確認轉型之大腸菌於37℃下培養2小時後，加入IPTG1mM再培養3小時，以誘導重組蛋白質之表現。將此菌液離心收集菌體，以緩衝液洗淨後使用於西方墨點試驗法。以FIPV I型KU-2株N蛋白質與GST之融合蛋白質作為rIExN、FIPV I型KU-2株S蛋白質之一部與GST之融合蛋白質作為rIExS、FIPV II型KU-1株S蛋白質之一部與GST之融合蛋白質作為rIIExS。

感染貓血清：

對SPF貓5隻分別接種FIPV I型KU-2株、Black株、UCD1株、FIPV II型之79-1146株、FECV II型之79-1683株的培養液，使其感染，並經時採寫，以抗體力價達最大時之血清作為感染血清。

西方墨點法：



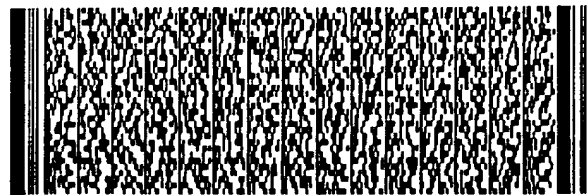
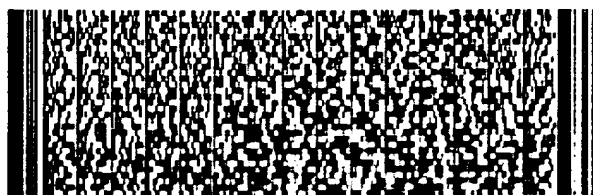
五、發明說明 (59)

將樣本緩衝液加入製作之抗原並加熱處理後，以11%之SDS-PAGE凝膠展開。將凝膠取出轉印於PVDF膜，洗淨後於4℃下浸泡於BlockAce下隔夜使吸墨。一次血清使用感染各貓冠狀病毒之感染貓血清。將轉印膜浸泡於一次血清於37℃下反應2小時後，以添加0.05%Tween20之PBS⁽⁻⁾洗淨3次。2次血清使用HRPO標記抗貓IgG+M+A。浸泡於添加標記抗體之血清稀釋液於37℃下反應1小時後，以添加0.05%Tween20之PBS⁽⁻⁾洗淨3次。將轉印膜浸泡於基質液(0.02%DAB、0.006%H₂O₂、0.05MTris-HCl(pH7.6))使發色後，以蒸餾水洗淨使反應停止。結果如第18圖。

FIPV I型KU-2株與Black株之感染貓血清會與rIExS蛋白質與rIExN蛋白質反應，但UCD1株感染貓血清雖會與rIExN蛋白質反應，卻不會與rIExS蛋白質反應。FIPV II型79-1146株之感染貓血清會與rIExS蛋白質與rIExN蛋白質反應。FECV II型79-1683株之感染貓血清僅會與rIExN蛋白質反應。即，KU-2株之重組蛋白質對任一者之貓冠狀病毒感染血清皆顯示良好之反應性。

產業上之可利用性

本發明提供用於貓傳染性腹膜炎病毒感染之治療及/或預防用疫苗及方法。本發明之疫苗係利用具有前述a)-e)所記載聚核苷酸編碼之胺基酸序列之蛋白質作為抗原。利用該等蛋白質，可製成對廣泛株可期待預防及/或治療效果之疫苗。又，因該等蛋白質不含有感染增強抗原



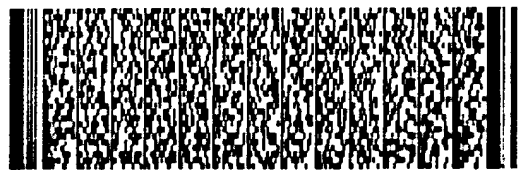
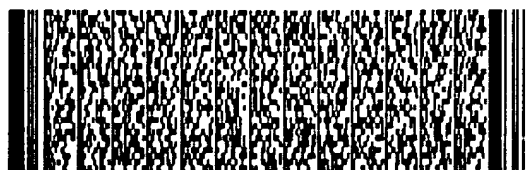
五、發明說明 (60)

決定基，本發明之疫苗可期待有高安全性。

貓傳染性腹膜炎病毒是一種發病後多數會致死的嚴重感染性疾病。到目前為止雖已嘗試各種疫苗，但評價仍未定。另一方面，本發明之疫苗與已知之疫苗比較，其預防效果良好，且安全性高。故，可了解本發明疫苗在貓傳染性腹膜炎病毒之預防或治療上是有用的。

再者，本發明提供利用具有前述a)-e)所記載聚核苷酸編碼之胺基酸序列之蛋白質作為抗原之貓傳染性腹膜炎病毒感染之診斷方法及用於該診斷方法之試藥。本發明之診斷方法或診斷試藥可容易且迅速診斷出廣泛之株感染。以貓傳染性腹膜炎病毒感染之診斷方法為依據之篩選，對該疾病之感染狀況調查是有用的。感染狀況之調查在FIPV預防醫學上是重要的資訊。

又，本說明書中所引用之先前技術文獻會放入本說明書作為參考之用。



圖式簡單說明

第1圖表示FIPV I型KU-2由來之N蛋白質基因的鹼基序列(序列編號:1)及胺基酸序列(序列編號:2)。

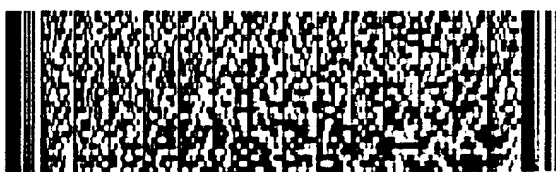
第2圖表示FIPV與近緣之病毒其N蛋白質之胺基酸序列排列的結果。各序列由上而下為FIPV I型KU-2株(序列編號:2)、Black株、UCD1株、FIPV II型79-1146株、FECV II型79-1683株、CCV Insvcl株及TGEV Purde株之蛋白質胺基酸序列。圖中...表示與KU-2株相同之胺基酸殘基,-表示缺口。

第3圖表示由FIPV I型KU-2株、Black株、UCD1株、FIPV II型79-1146株、FECV II型79-1683株、CCV Insvcl株及TGEV Purde株之N基因其胺基酸序列計算後之系統數。圖中數字表示進化距離。

第4圖為顯示以西方墨點法解析桿狀病毒重組N蛋白質抗原專一性之結果照片。圖中箭號表示N蛋白質譜帶之位置。a, b, c, d, e, f, g各為稀釋8倍、16倍、32倍、64倍、128倍、256倍及512倍之桿狀病毒重組N蛋白質抗原。h表示純化之FIPV可溶化抗原。

第5圖為顯示以西方墨點法解析桿狀病毒重組N蛋白質抗原專一性之結果照片。圖中箭號表示N蛋白質譜帶之位置。a為純化FIPV抗原由來N蛋白質抗原，c表示純化之FIPV可溶化抗原。

第6圖表示以ELISA法解析桿狀病毒重組N蛋白質抗原專一性之結果。橫軸表示抗原之稀釋倍數，縱軸表示450nm之吸光度。



圖式簡單說明

第7圖表示以ELISA法解析精製的FIPV抗原由來N蛋白質的專一性之結果。橫軸表示抗原之稀釋倍數，縱軸表示450nm之吸光度。

第8圖表示免疫試驗(1)及攻毒試驗(1)之日程。(a)表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原投予群、(b)表示SF-9細胞抗原接種群。

第9圖上表示以ELISA法測定接種桿狀病毒重組N蛋白質抗原後之抗體力價結果。第9圖下為顯示接種SF-9細胞抗原後的抗體力價。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示接種抗原後經過的時間，縱軸表示450nm的吸光度。

第10圖表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原免疫貓中之延遲型過敏症反應。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示接種抗原後經過的時間，縱軸表示腫脹範圍。

第11圖表示FIPV79-1146株攻毒後生存率的變化。橫軸表示79-1146株接種後之日數，縱軸表示生存率。實線為桿狀病毒重組N蛋白質抗原免疫貓之生存率、虛線表示接種SF-9細胞抗原後貓之生存率。

第12圖上表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原接種群中接種79-1146株後其抗FIPV抗體力價的變化。第12圖下表示在SF-9細胞抗原接種群中，接種79-1146株後其抗FIPV抗體力價的變化。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示接種79-1146後之日數，縱軸表示腫脹範圍。

第13圖表示免疫試驗(2)及攻毒試驗(2)之日程。(a)表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原接種群及純化FIPV由來N蛋



圖式簡單說明

白質抗原接種群、(b)表示SF-9細胞抗原接種群。

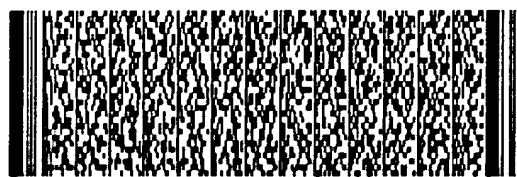
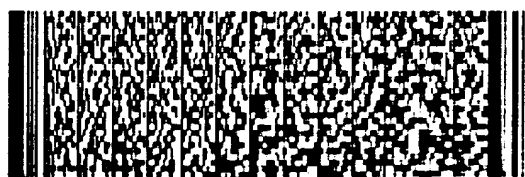
第14圖上表示以ELISA法測定接種桿狀病毒重組N蛋白質抗原後之抗體力價結果。第14圖中央表示純化FIPV由來抗原N蛋白質抗原接種後之抗體力價。第14圖下為SF-9細胞抗原接種後的抗體力價。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示接種抗原後經過的時間，縱軸表示450nm的吸光度。

第15圖表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原免疫貓中及純化FIPV由來抗原N蛋白質抗原免疫貓中之延遲型過敏症反應。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示接種抗原後經過的時間，縱軸表示腫脹範圍。

第16圖表示FIPV79-1146株攻毒後生存率的變化。橫軸表示79-1146株接種後之日數，縱軸表示生存率。

第17圖上表示桿狀病毒重組N蛋白質抗原接種群中79-1146株接種後其抗FIPV抗體力價之變化。第17圖中央表示純化FIPV由來抗原N蛋白質抗原接種群中79-1146株接種後其抗FIPV抗體力價之變化。第17圖下為SF-9細胞抗原接種群中79-1146株接種後其抗FIPV抗體力價之變化。圖中數字為用於實驗的貓編號。橫軸表示79-1146株接種後之日數，縱軸表示450nm的吸光度。

第18圖表示檢驗貓冠狀病毒感染貓血清對大腸桿菌表現抗原之反應性之西方墨點法試驗結果照片。在各帶上表示，以帶上所示抗原點墨之濾片感染上面記載之冠狀病毒株後與貓血清反應之結果。



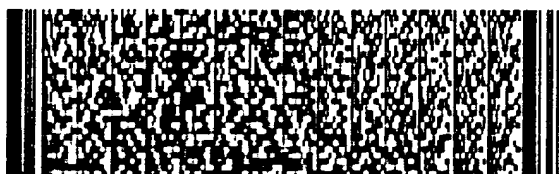
四、中文發明摘要 (發明名稱：貓傳染性腹膜炎疫苗)

提供以具有特定構造之N蛋白質或其片段作為抗原之FIP之疫苗。本發明中期望的抗原為來自特定之I型病毒株(KU-2)的N蛋白質。含有該N蛋白質之疫苗可對廣泛之FIPV提供預防效果。又，因N蛋白質不含感染增強抗原決定基，安全性高。再者，可對實際占FIP原因70%以上之I型病毒達成預防效果。

五、(一)、本案代表圖為：第1圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：無

六、英文發明摘要 (發明名稱：)

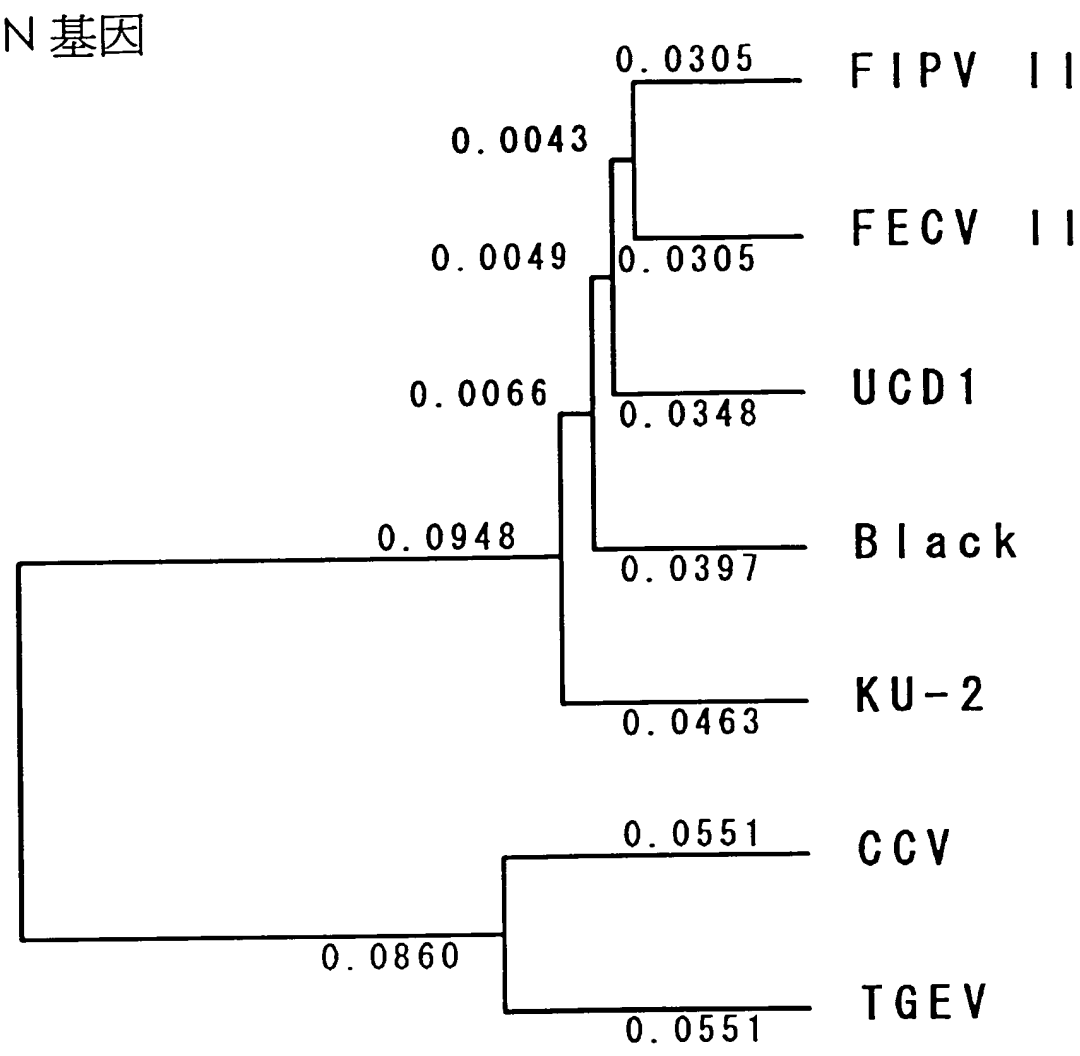


公告本

atg gcc aca cag gga caa cgc gtc aac tgg gga gat gaa cct tcc aaa	48
Met Ala Thr Gln Gly Gln Arg Val Asn Trp Gly Asp Glu Pro Ser Lys	
aga cgt gat cgt tct aac tct cgt ggt cgg aag aat aat ata cct	96
Arg Arg Asp Arg Ser Asn Ser Arg Gly Arg Lys Asn Asn Asn Ile Pro	
ctt tca ttc ttc aac ccc acc acc ctc gaa caa gga gct aaa ttt tgg	144
Leu Ser Phe Phe Asn Pro Thr Thr Leu Glu Gln Gly Ala Lys Phe Trp	
tat gta tgt ccg aga gac ttt gtt ccc aag gga ata ggt aat aag gat	192
Tyr Val Cys Pro Arg Asp Phe Val Pro Lys Gly Ile Gly Asn Lys Asp	
caa caa att ggt tat tgg aac aga cag gcg cgc ttt cgc att gtc aag	240
Gln Gln Ile Gly Tyr Trp Asn Arg Gln Ala Arg Phe Arg Ile Val Lys	
ggt cag cgt aag gaa ctc cct gag aga tgg ttt ttc tat ttc tta ggt	288
Gly Gln Arg Lys Glu Leu Pro Glu Arg Trp Phe Phe Tyr Phe Leu Gly	
aca gga cct cat gct gat gct aaa ttt aaa gat aag att gat gga gtc	336
Thr Gly Pro His Ala Asp Ala Lys Phe Lys Asp Lys Ile Asp Gly Val	
ttc tgg gtt gca aag gat ggt gcc atg aac aag cca aca tca ctt gcc	384
Phe Trp Val Ala Lys Asp Gly Ala Met Asn Lys Pro Thr Ser Leu Gly	
act cgt gga acc aac aat gaa tcc gaa cca ttg aga ttt gat ggt aag	432
Thr Arg Gly Thr Asn Asn Glu Ser Glu Pro Leu Arg Phe Asp Gly Lys	
ata cca cca caa ttc cag ctt gaa gta aac cgt tct agg aat aat tca	480
Ile Pro Pro Gln Phe Gln Leu Glu Val Asn Arg Ser Arg Asn Asn Ser	
agg tct ggt tct cag tct aga tct gcc tca aga aac agg tct caa tcc	528
Arg Ser Gly Ser Gln Ser Arg Ser Gly Ser Arg Asn Arg Ser Gln Ser	
agg gga aga caa caa tcc aat aac cag aat act aat gtt gag gat aca	576
Arg Gly Arg Gln Gln Ser Asn Asn Gln Asn Thr Asn Val Glu Asp Thr	
att gta gct gtg ctt cag aaa tta ggt gtt act gac aag caa agg tca	624
Ile Val Ala Val Leu Gln Lys Leu Gly Val Thr Asp Lys Gln Arg Ser	
cgt tct aaa tct aga gac cgt agt gac tct aaa tct aga gac aca aca	672
Arg Ser Lys Ser Arg Asp Arg Ser Asp Ser Lys Ser Arg Asp Thr Thr	
cct aaa aac gcc aac aaa cac acc tgg aag aaa act gca ggt aag ggt	720
Pro Lys Asn Ala Asn Lys His Thr Trp Lys Lys Thr Ala Gly Lys Gly	
gat gtg aca aat ttc ttt ggt gct aga agt gct tcg gct aac ttt ggt	768
Asp Val Thr Asn Phe Phe Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ala Asn Phe Gly	
gat agt gat ctc gtt gcc aat ggt aac gct gcc aaa tgc tac cct cag	816
Asp Ser Asp Leu Val Ala Asn Gly Asn Ala Ala Lys Cys Tyr Pro Gln	
ata gcc gaa tgc gtt cca tca gta tct agc gtg ctc ttc ggt agt caa	864
Ile Ala Glu Cys Val Pro Ser Val Ser Ser Val Leu Phe Gly Ser Gln	
tgg tcc gct gaa gaa gct gga gat caa gtg aaa gtc aca ctt act cac	912
Trp Ser Ala Glu Glu Ala Gly Asp Gln Val Lys Val Thr Leu Thr His	
acc tac tac ctg cca aaa ggt gat gcc aaa acc agt caa ttc cta gaa	960
Thr Tyr Tyr Leu Pro Lys Gly Asp Ala Lys Thr Ser Gln Phe Leu Glu	
cag att gac gct tac aag cgc cct tca caa gta gct aag gaa cag agg	1008
Gln Ile Asp Ala Tyr Lys Arg Pro Ser Gln Val Ala Lys Glu Gln Arg	
aaa cca aag cct cgc tct aag tct gct gat aag aag cct gag gaa ttg	1056
Lys Pro Lys Pro Arg Ser Lys Ser Ala Asp Lys Lys Pro Glu Glu Leu	
tct gta act ctt gta gag gca tac aca gat gtg ttt gat gac aca cag	1104
Ser Val Thr Leu Val Glu Ala Tyr Thr Asp Val Phe Asp Asp Thr Gln	
ggt gag atg att gat gag gtt acg aac taa (字列編號: 1)	1134
Val Glu Met Ile Asp Glu Val Thr Asn * (字列編號: 2)	

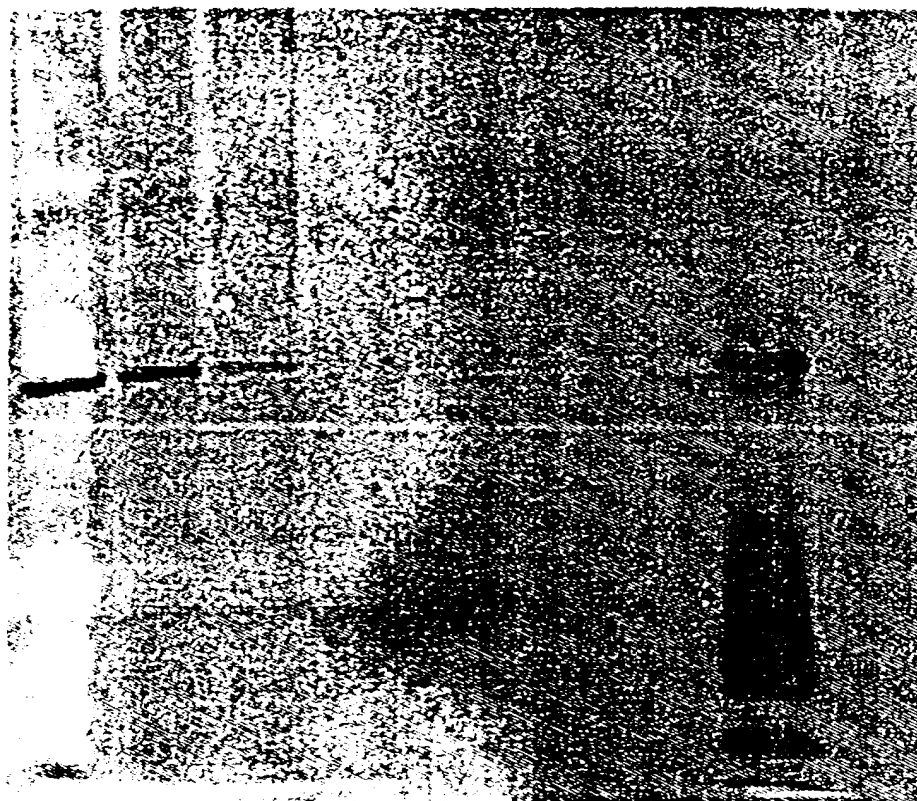
KU-2	MATOGORVNWGDEPSKRDRSNSRGKNNWIPLSFFNPPTLEOGAKFWYCPRPDVEKIGCNKDQOIGYWNROARFRIWKQORKELPERWFYELGTGPH	100
Black	G.....Y.....I.....S.....S.....NI.....V.....Y.....R.....S.....	100
UCD1	G.....V.....D.....YY.....I.....QP.....S.....N.....Y.....	100
FIPV II	G.....D.....Y.....I.....S.....NL.....L.....I.....Y.....A.....	100
FECV II	G.....D.....Y.....I.....D.....S.....NL.....Y.....V.....	100
CCV	..S...ST..G.....D.....I.....S.....DL.....T.....Y.....M.....R.....N.....K.....Y.....	100
TGEV	..N...S...ST..T..G.....I.....Q.....S.....NL.....R.....T.....Y.....M.....Y.....	100
KU-2	ADAKFKDKIDGVFWAKDGAMNKPTSLGTRGTNNESEPLRFDDKIPPOQOLEVNRSRNNSRSGSOSRSRSGSRNRSQSRGR-QOSNNOINTVEDTIVAVLQK	199
Black	R.....T.....K.....K.....P.....V.....S.....S.....	199
UCD1	R.....T.....K.....L.....V.....F.....ND.....	199
FIPV II	R.....T.....K.....V.....V.....-HH.....N.....E.....	199
FECV II	..A...R.....K.....K.....V.....	199
CCV	...Q.L..V...RGDS..T...KA.K..V.V.SE.H...QL.D..R...Q...QLSN.KKD...QAVL.A.K.	200
TGEV	...L..V...T..S.A...KA.K...V.GE...Q.D..R...R...Q.FN.KKDD...QAVL.A.K.	200
KU-2	LGV-TDK-QRSRSKSRSDSKSRDTPPKANKHTWKKTACKGVDVTNFFGASASANFGSDSLVANGNAKCYPOIAECVPVSVLEFGSQWSAEAGD	296
Black	...GE.NQ..P.....Y.....S.....A.....I.....	296
UCD1	...S...E...QL.....R.....Y.....L.....	296
FIPV II	...P.E...P.....T.Y...S.....II.....	296
FECV II	...GE..Q.....Y.....S.....I.....	296
CCV	..D.E.-Q...KE..S..T...E...R...K.Y...S...G.H..L...I...H.T.K.D..	299
TGEV	..D.E.QQ...KE..N..T...E...S.R...R.Y...S...T...SS.H..L...I...Y.TSK.D..	300
KU-2	QVKVTLHTYVLPKGDAKTSQFLEQIDAYKRPQVAKQKPKPRSKSADKKPEE-LSVTLVEAYTVDVFDQTQVEMIDEVTN (字々列編輯地：2)	377
Black	D.....Q.....E.....D.....QR.S.....	377
UCD1	D.....E.....D.....SR.S.....	377
FIPV II	D.....E.....D.....QRS.....	377
FECV II	..N...D.....E.....D.....QR.S.....	376
CCV	..IE..F..K.H...D.P..G...Q.N.A..E...QR.A...VERVEQ.VVPDA.T.N.....I.....	381
TGEV	..IE..F..K.H...D.P..G...Q.N.A..E...R.S...ERSEQDVVPDA.I.N.....I.....	382

第 2 圖



第 3 圖

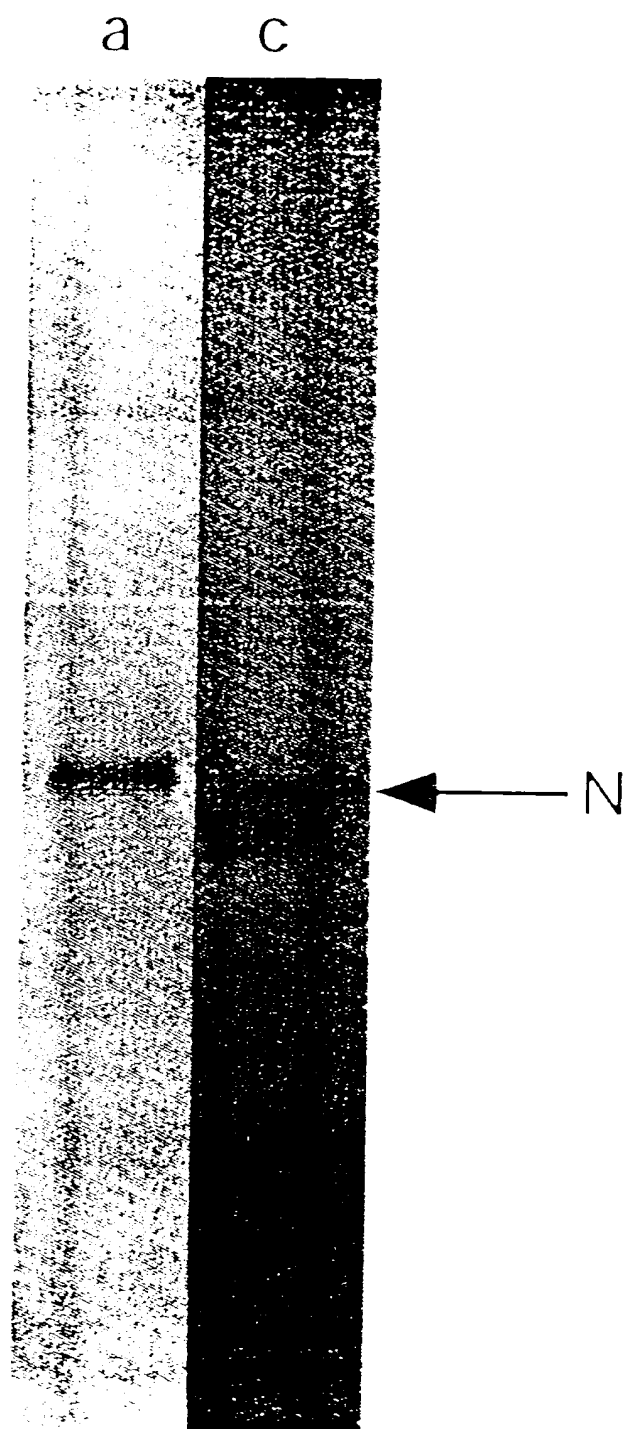
a b c d e f g h



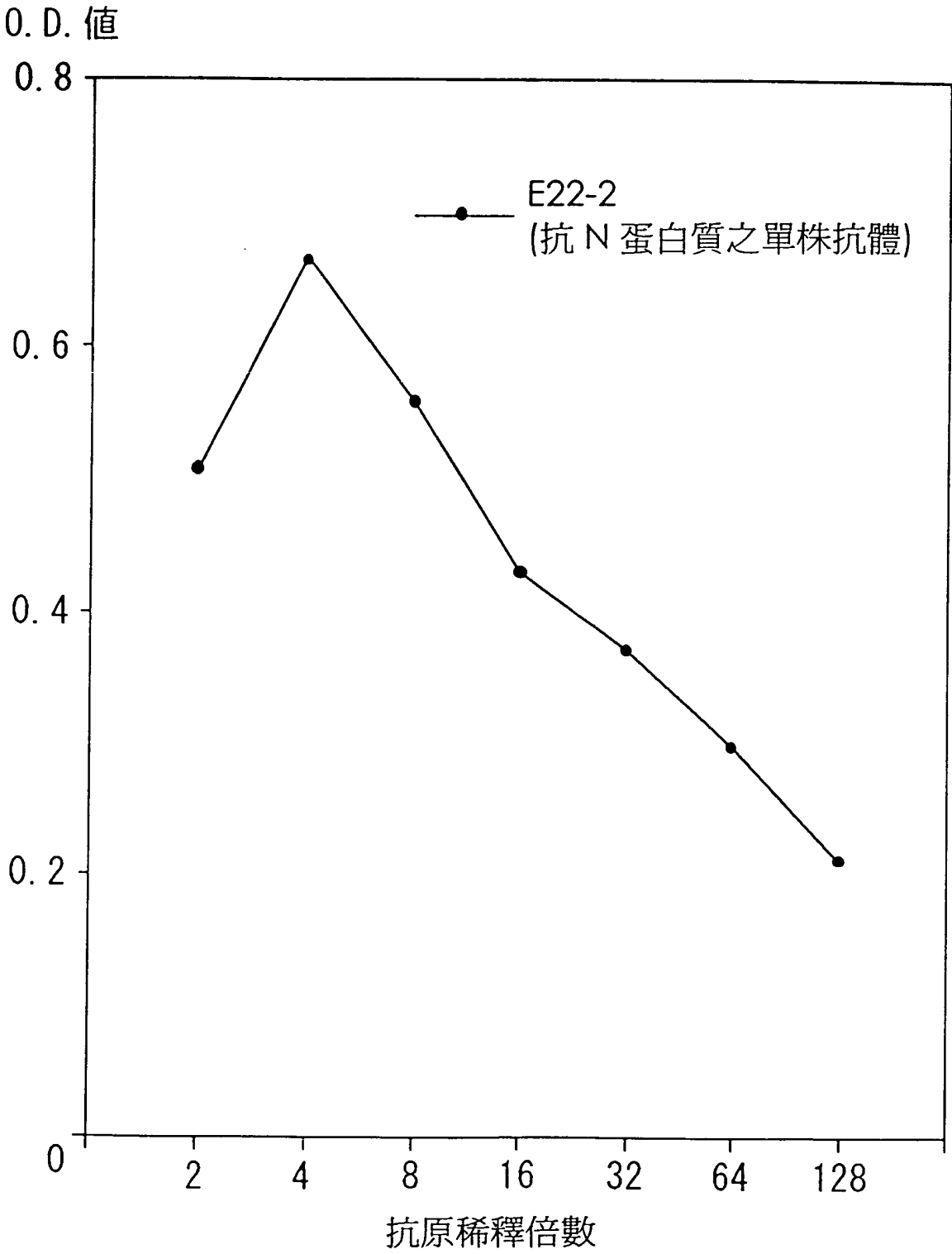
← N ●

第 4 圖

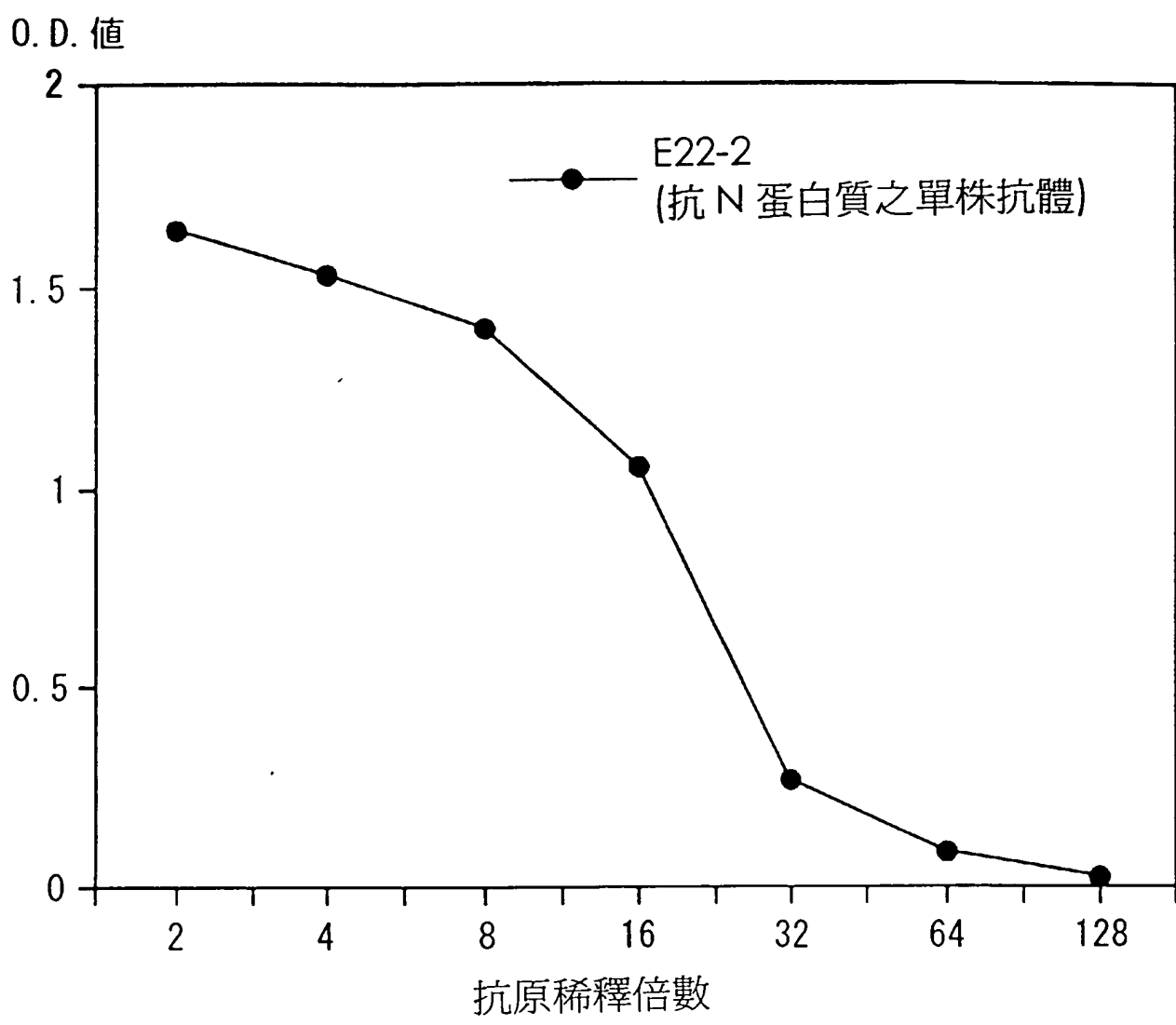
●



第 5 圖

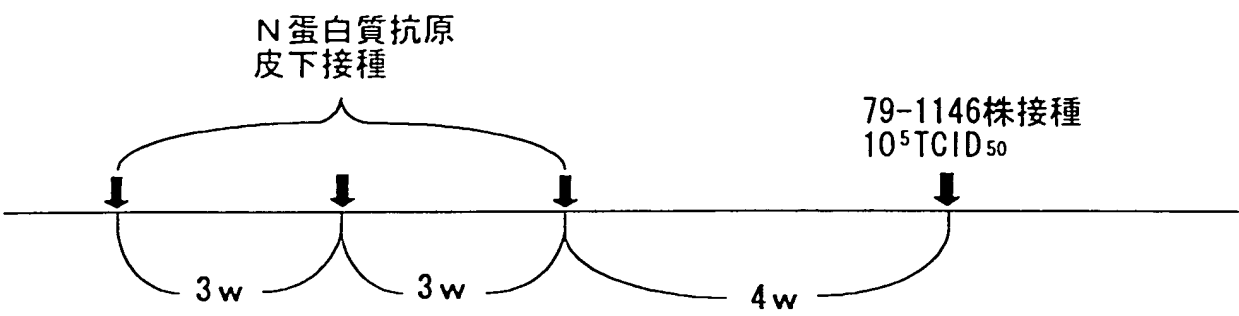


第 6 圖

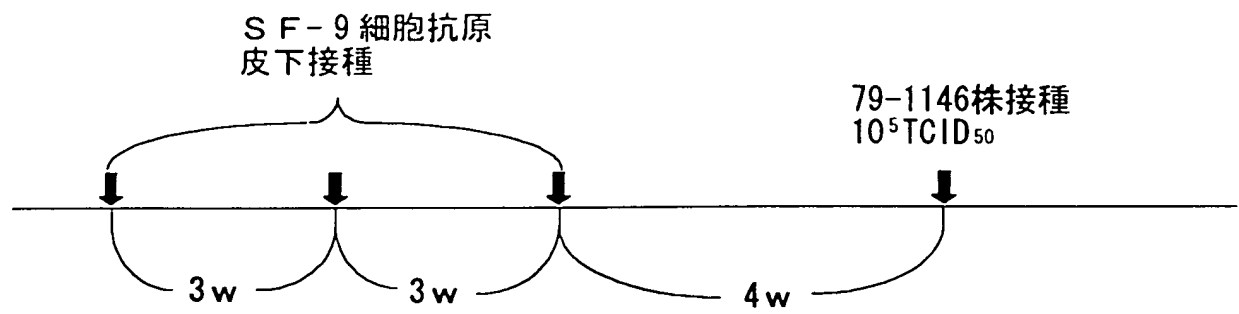


第 7 圖

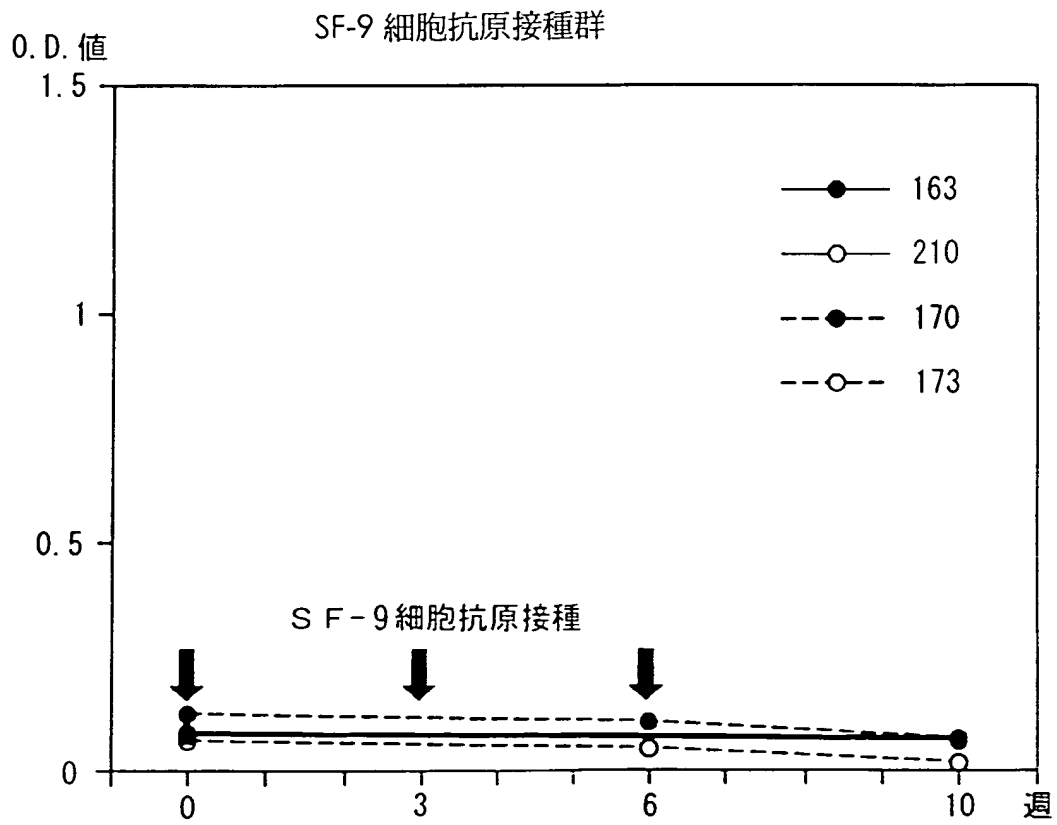
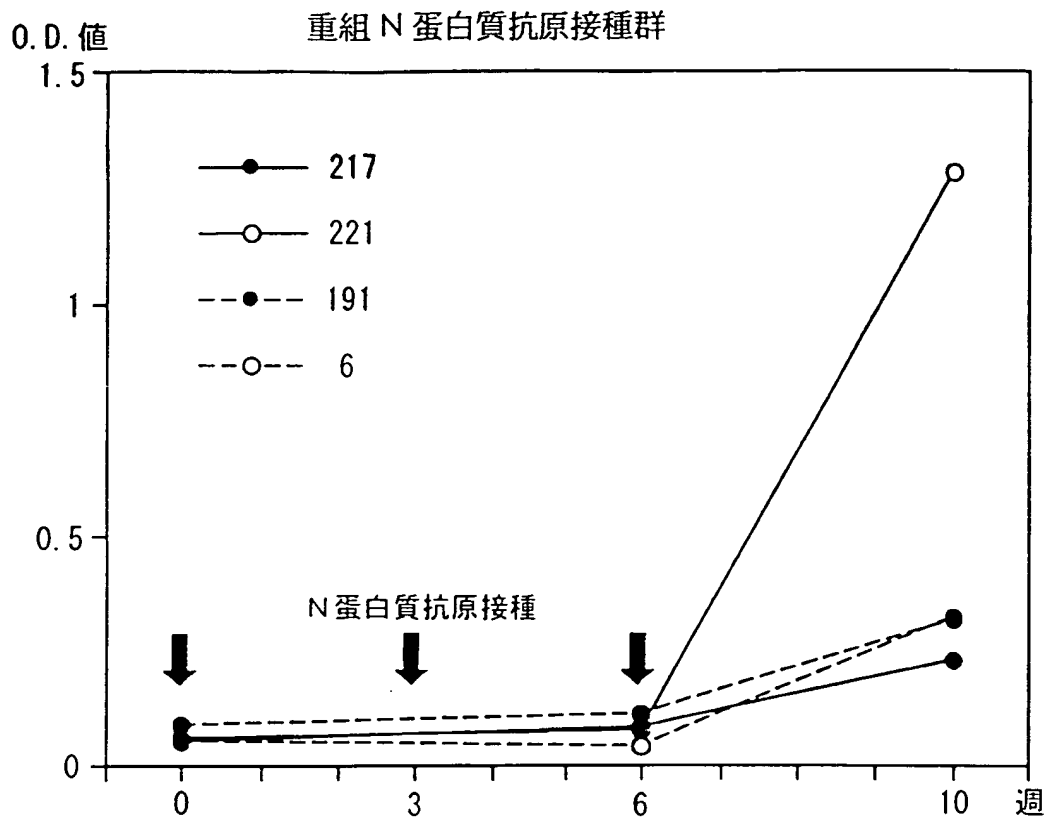
(a)



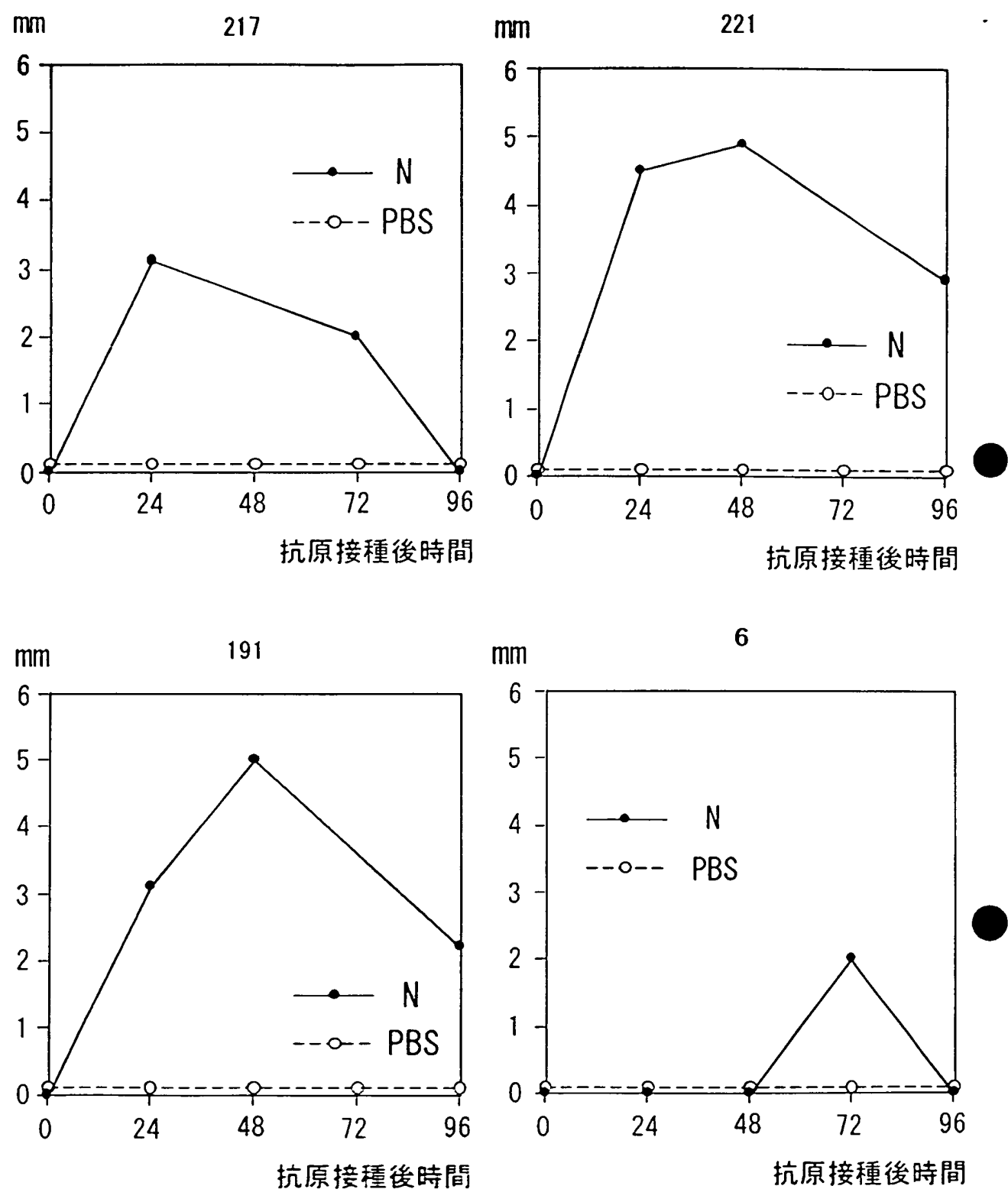
(b)



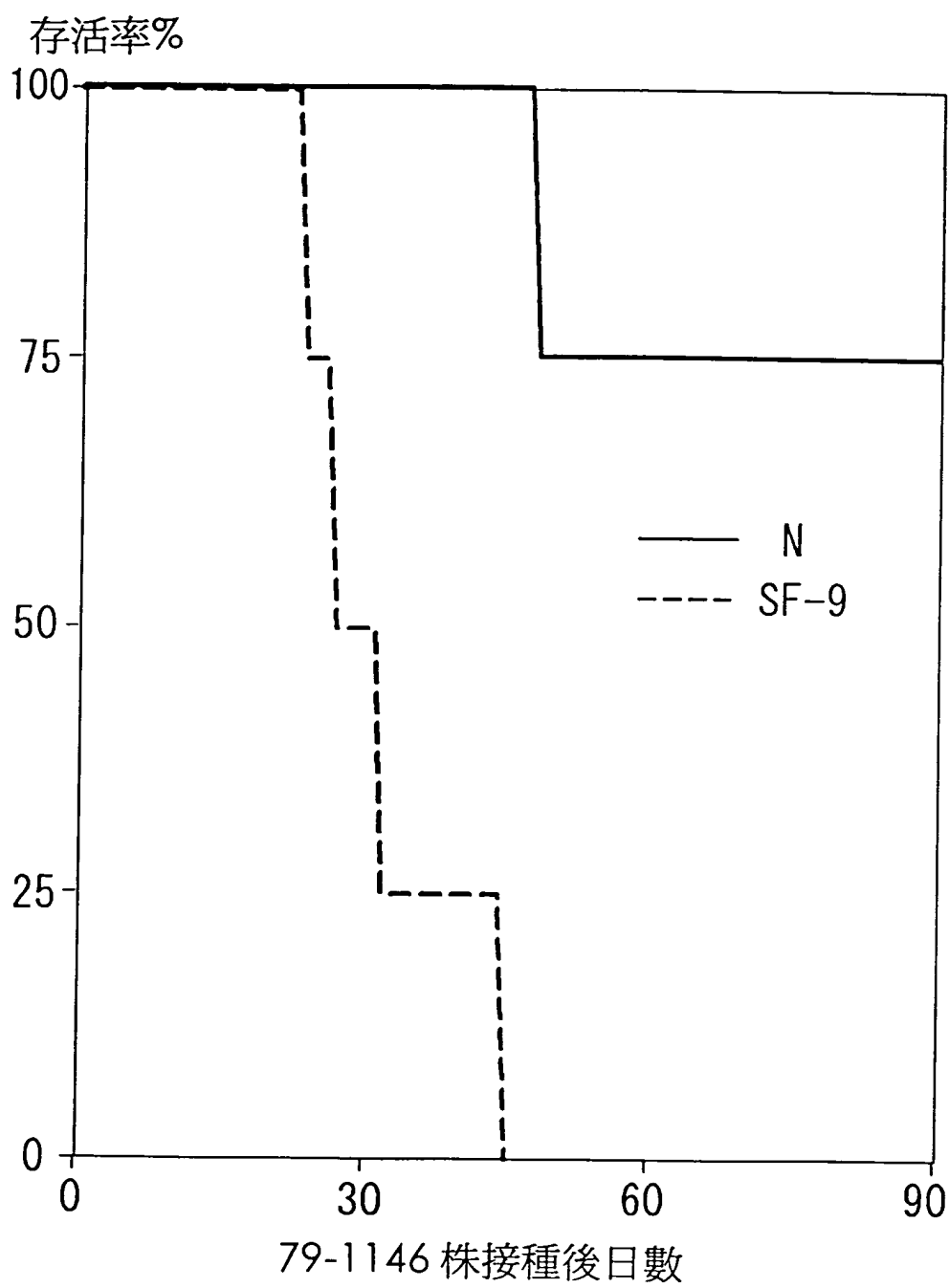
第 8 圖



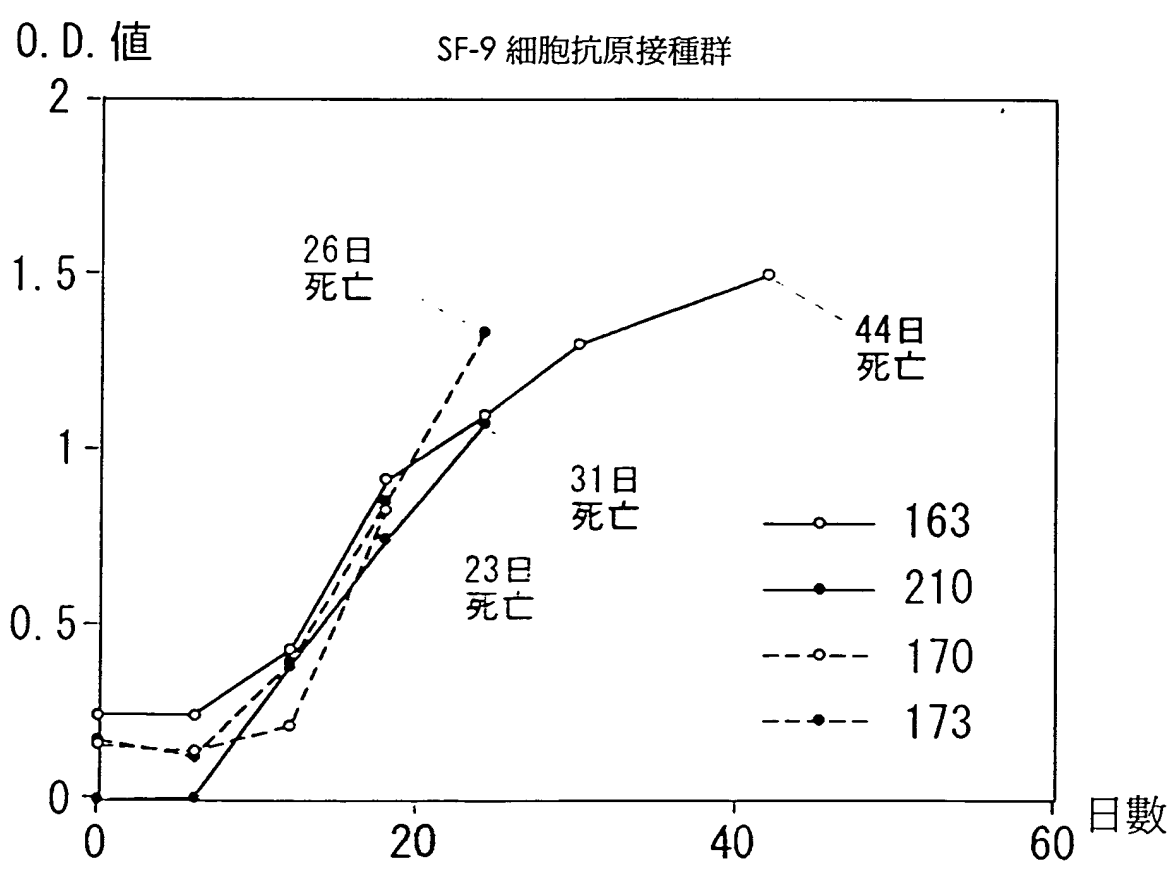
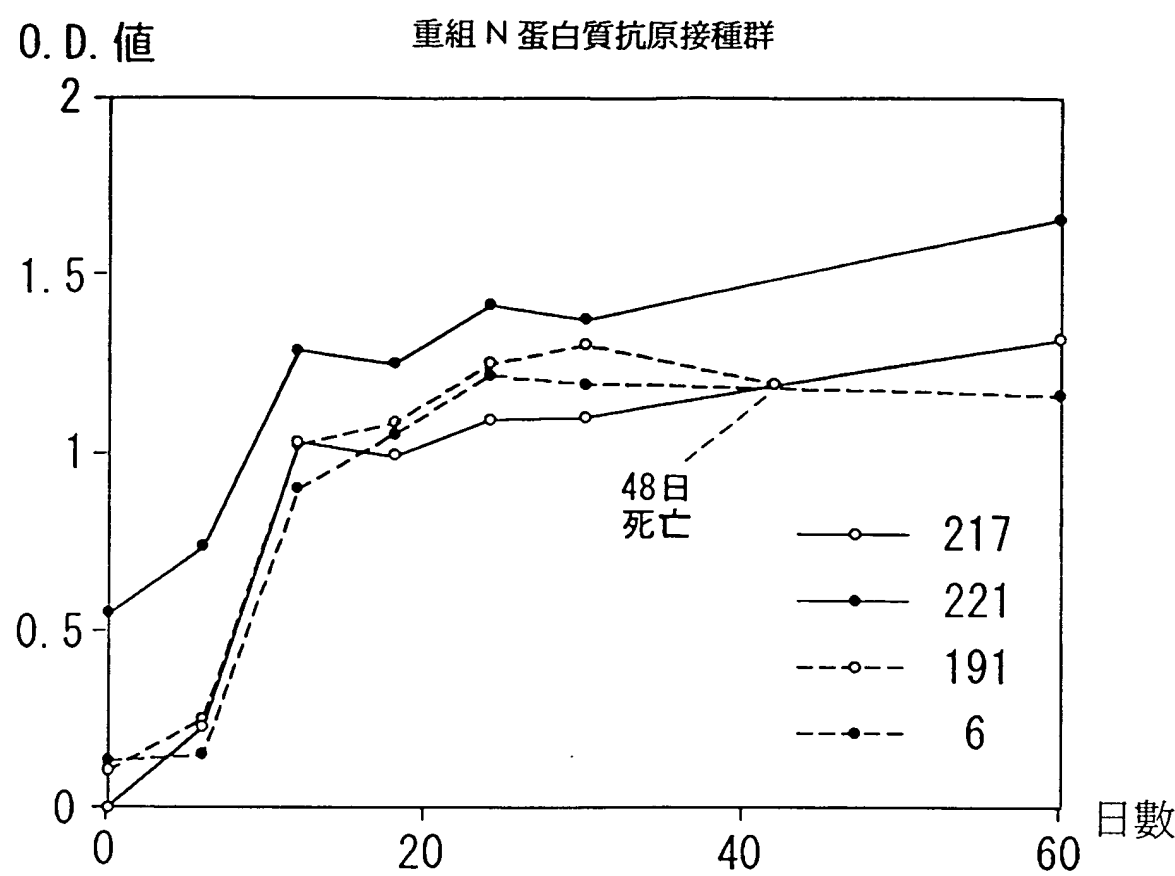
第 9 圖



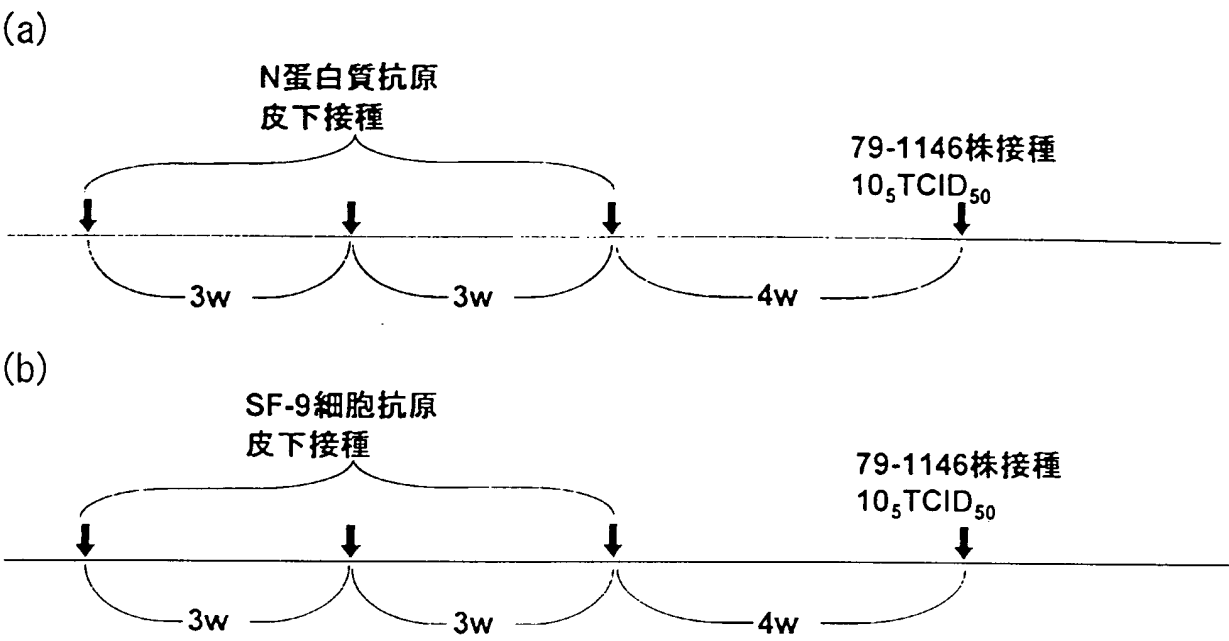
第 10 圖



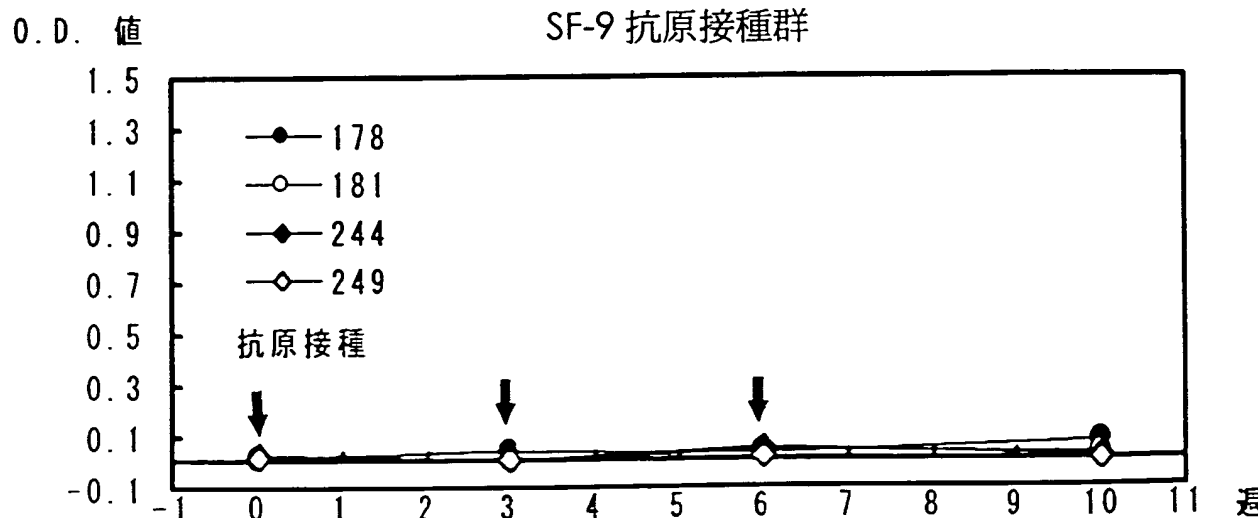
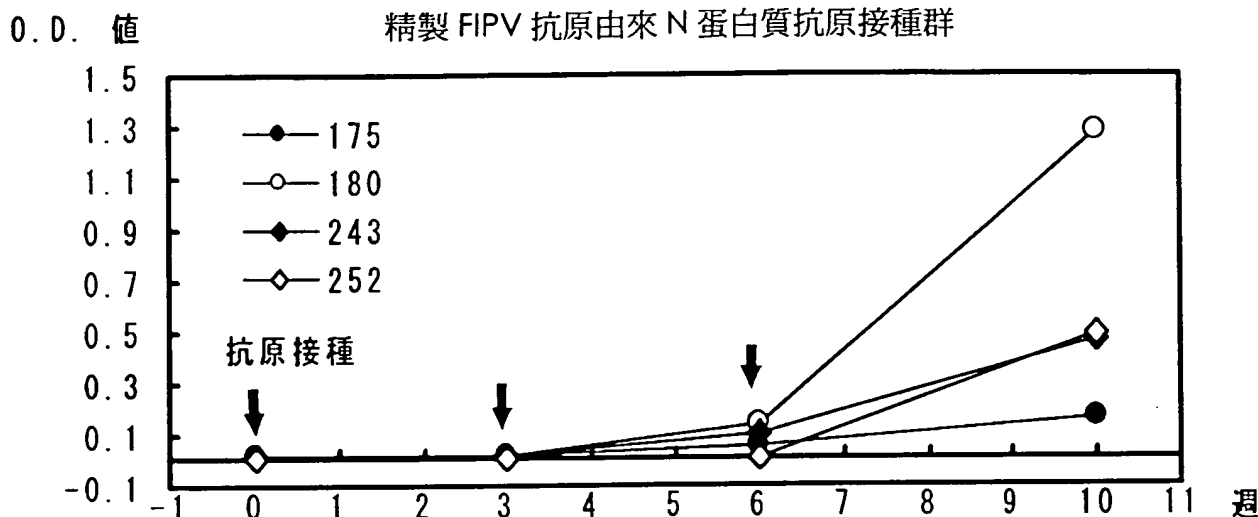
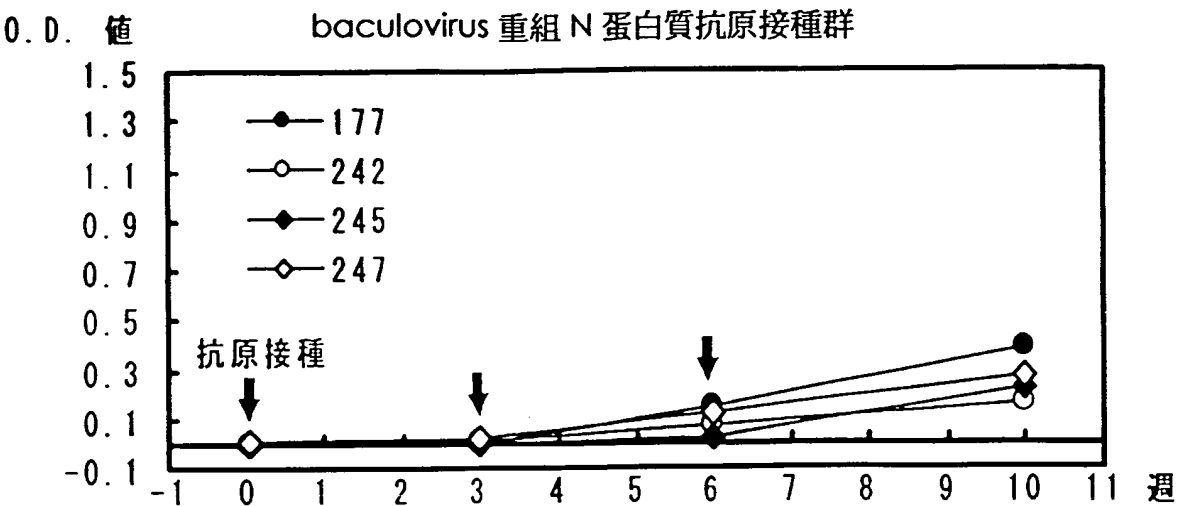
第 11 圖



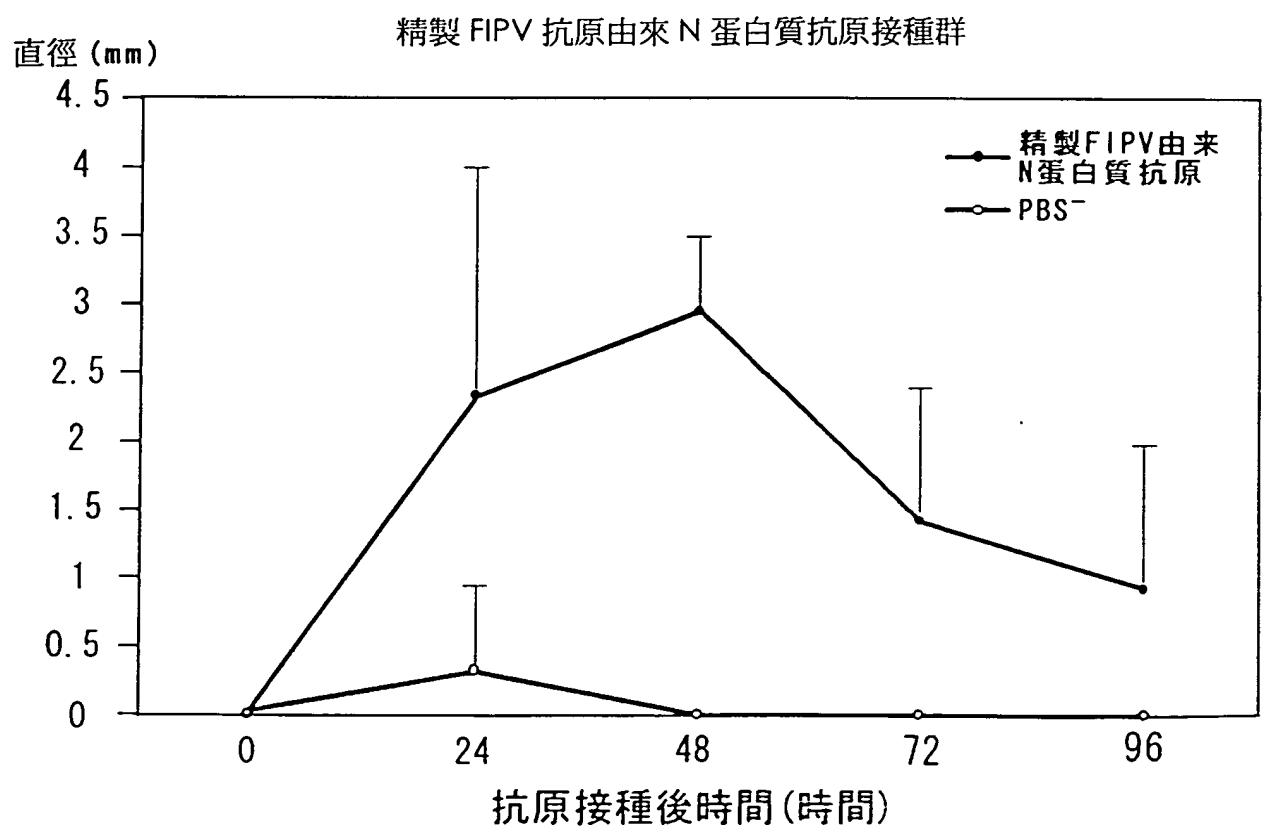
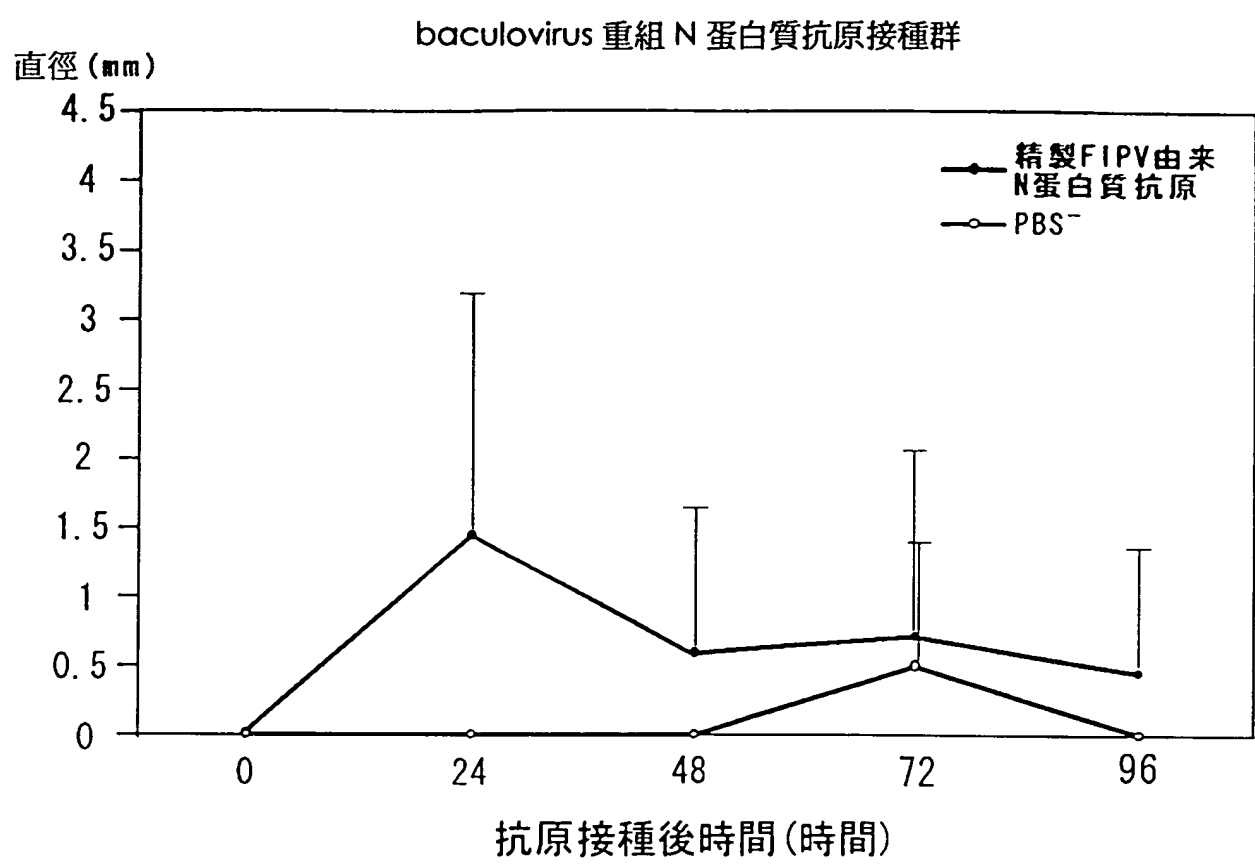
第 12 圖



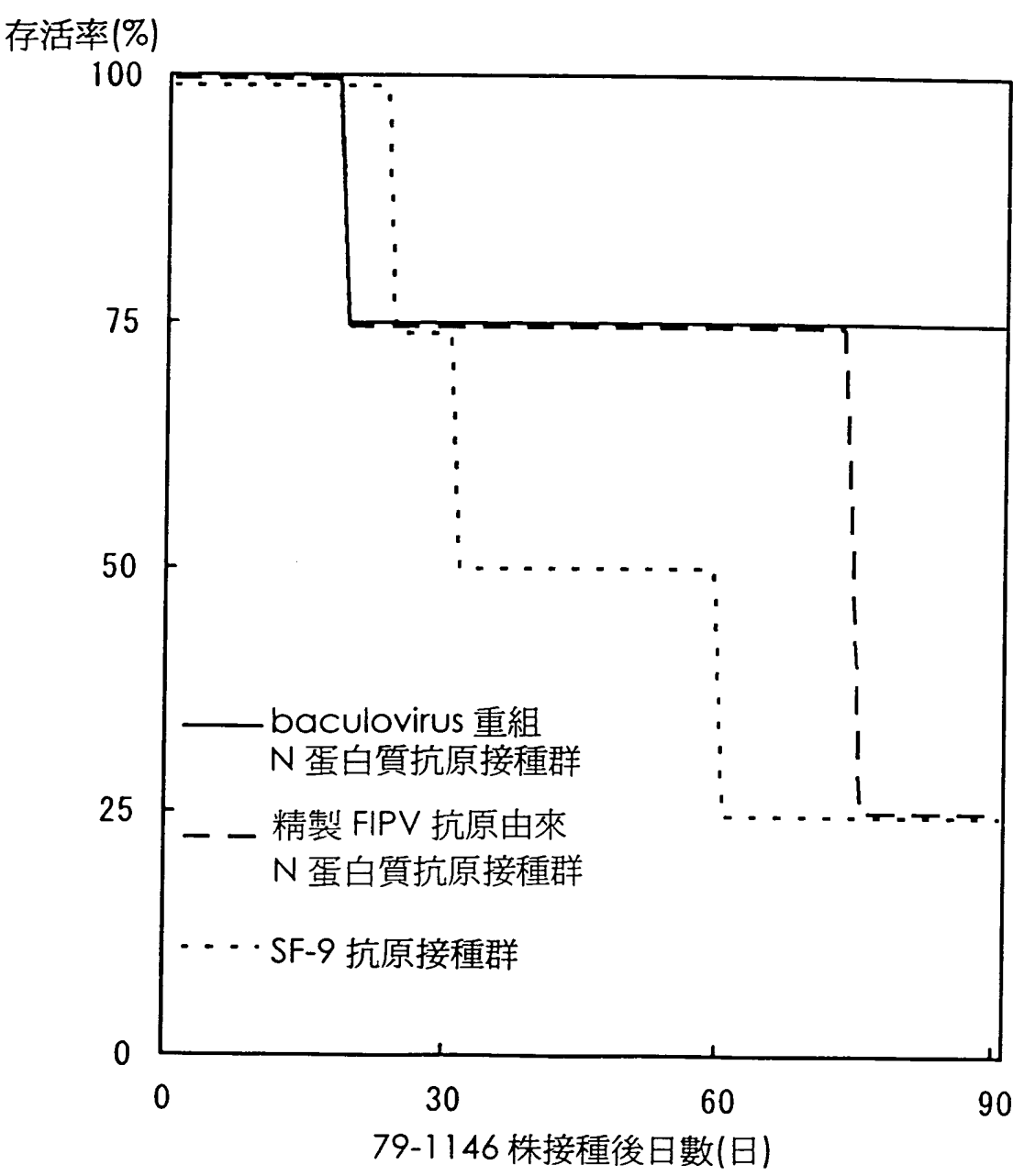
第 13 圖



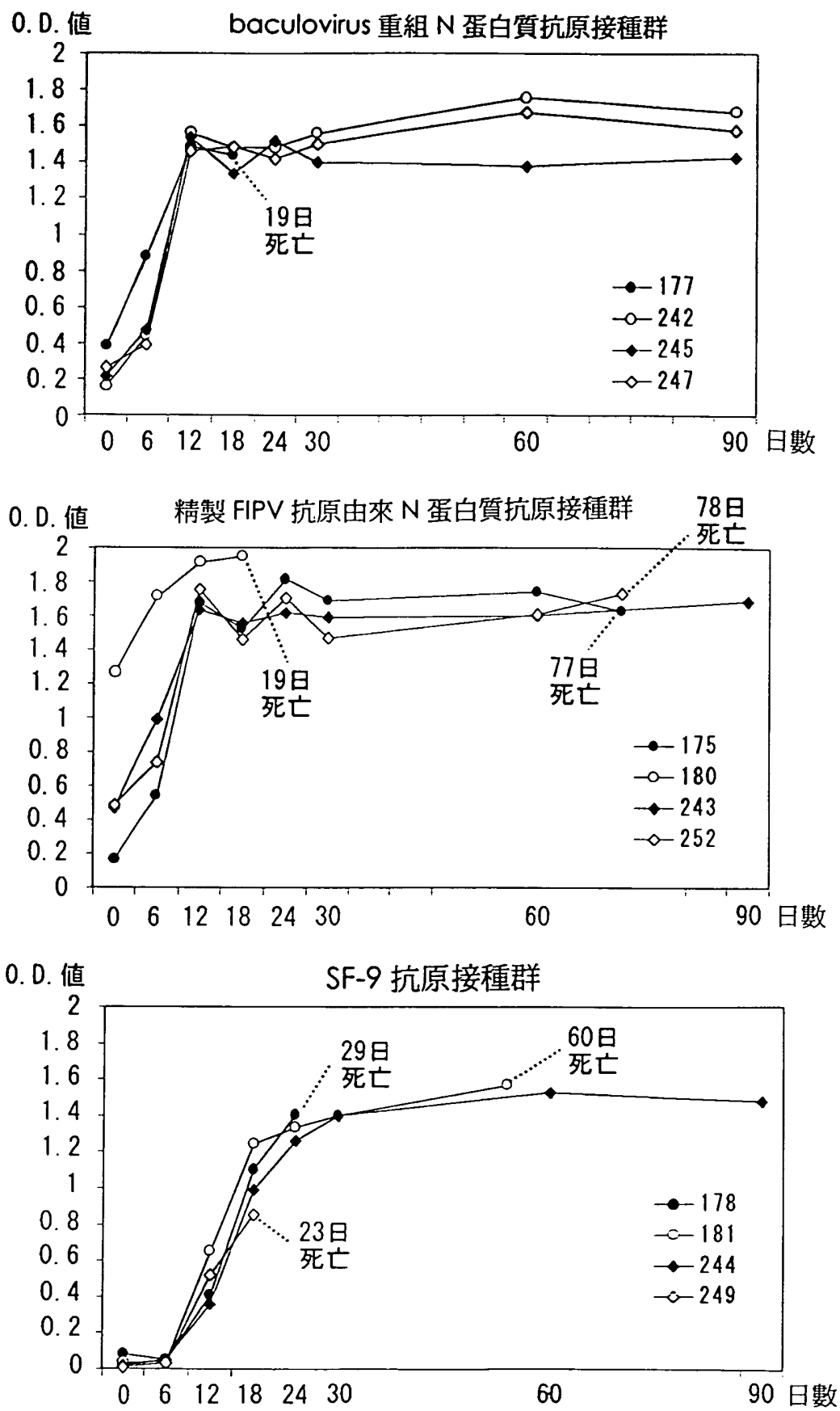
第 14 圖



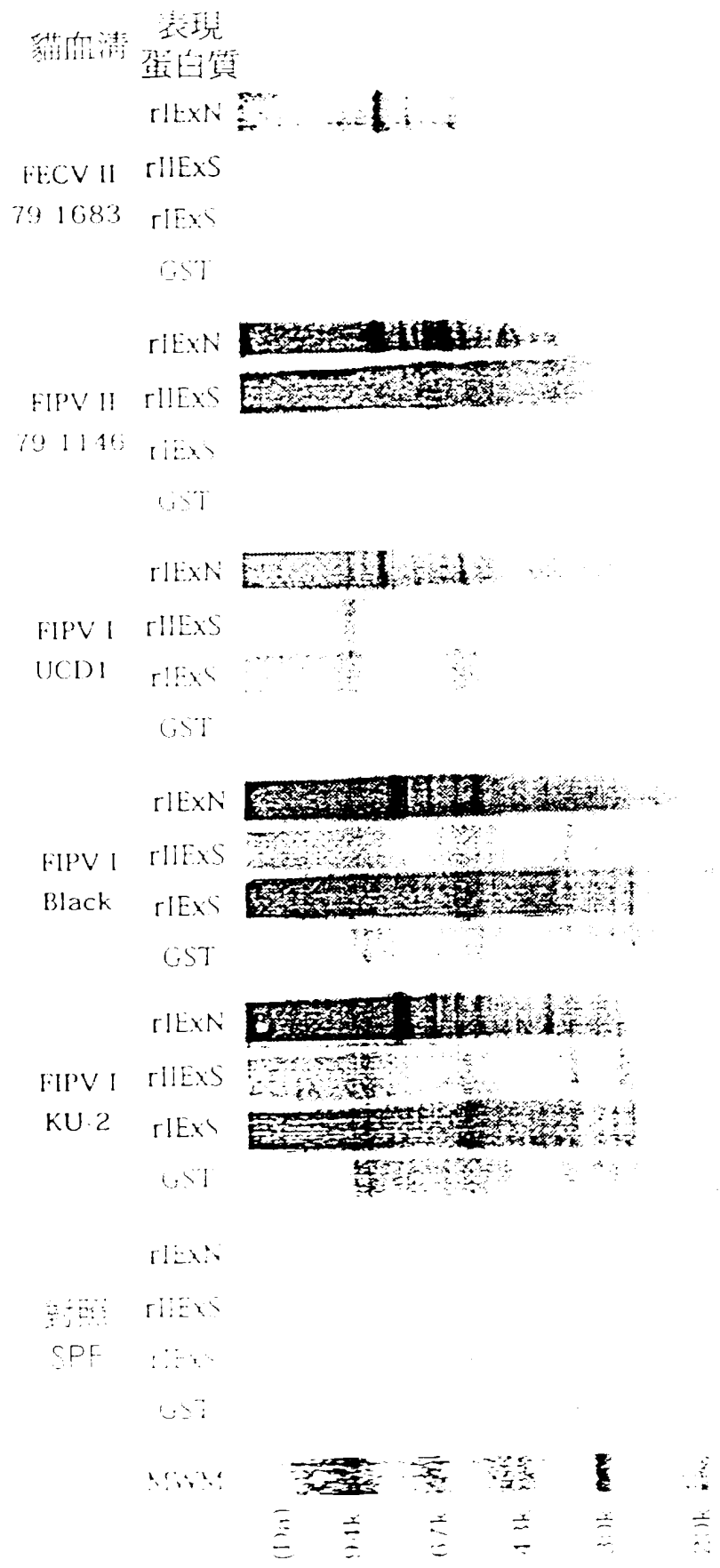
第 15 圖



第 16 圖



第 17 圖



第 18 圖

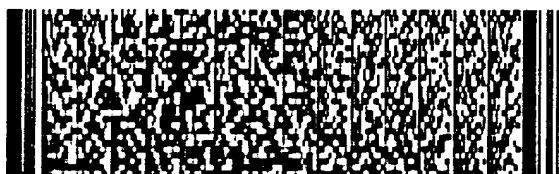
四、中文發明摘要 (發明名稱：貓傳染性腹膜炎疫苗)

提供以具有特定構造之N蛋白質或其片段作為抗原之FIP之疫苗。本發明中期望的抗原為來自特定之I型病毒株(KU-2)的N蛋白質。含有該N蛋白質之疫苗可對廣泛之FIPV提供預防效果。又，因N蛋白質不含感染增強抗原決定基，安全性高。再者，可對實際占FIP原因70%以上之I型病毒達成預防效果。

五、(一)、本案代表圖為：第1圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：無

六、英文發明摘要 (發明名稱：)



98年(月)12日修(更)正 換領 公告 修正

申請日期：92.7.2
申請案號：92118034

IPC分類

A61K39/245

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	貓傳染性腹膜炎疫苗
	英文	
二、 發明人 (共5人)	姓名 (中文)	1. 本川賢司 2. 楠原一 3. 小山弘之
	姓名 (英文)	1. 2. 3.
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP 2. 日本 JP 3. 日本 JP
	住居所 (中文)	1. 日本國埼玉縣北本市荒井6-111 2. 日本國埼玉縣北本市荒井6-111 3. 青森縣十和田市東23-35-1
	住居所 (英文)	1. 2. 3.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	1. 學校法人北里研究所
	名稱或 姓名 (英文)	1.
	國籍 (中英文)	1. 日本 JP
	住居所 (營業所) (中文)	1. 日本國東京都港區白金五丁目九番一號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1.
	代表人 (中文)	1. 柴忠義
	代表人 (英文)	1.



序列表

<110> 學校法人北里研究所 (The Kitasato Institute)

<120> 貓傳染性腹膜炎疫苗

<130> K4-A0201P

<140>

<141>

<150> JP 2002-196290

<151> 2002-07-04

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1134

<212> DNA

<213> 貓傳染性腹膜炎病毒

<400> 1

```
atggccacac agggacaacg cgtcaactgg ggagatgaac cttccaaaag acgtgatcgt 60
tctaactctc gtggtcggaa gaataataat atacctcttt cattcttcaa cccaccacc 120
ctcgaacaag gagctaaatt ttggtatgta tgtccgagag actttgttcc caagggaata 180
ggtaataagg atcaacaaat tggttattgg aacagacagg cgcgctttcg cattgtcaag 240
ggtcagcgta aggaactccc tgagagatgg tttttctatt tcttaggtac aggacctcat 300
gctgatgcta aatttaaaga taagattgat ggagtcttct gggttgcaaa ggatggtgcc 360
atgaacaagc caacatcact tggcactcgt ggaaccaaca atgaatccga accattgaga 420
tttgatggta agataccacc acaattccag ctgaagtaa accgttctag gaataattca 480
aggtctgggt ctcagtctag atctggctca agaaacaggt ctcaatccag gggaagacaa 540
caatccaata accagaatac taatgttgag gatacaattg tagctgtgct tcagaaatta 600
ggtgttactg acaagcaaag gtcacgttct aaatctagag accgtagtga ctctaaatct 660
agagacacaa cacctaaaaa cgccaacaaa cacacctgga agaaaactgc aggttaagggt 720
gatgtgacaa atttctttgg tgctagaagt gcttcggcta actttggtga tagtgatctc 780
gttgccaatg gtaacgctgc caaatgctac cctcagatag ccgaatgcgt tccatcagta 840
tctagcgtgc tcttcggtag tcaatgggtcc gctgaagaag ctggagatca agtgaaagtc 900
```

acacttactc acacctacta cctgccaaaa ggtgatgcca aaaccagtca attcctagaa 960
cagattgacg cttacaagcg cccttcacaa gtagctaagg aacagaggaa accaaagcct 1020
cgctctaagt ctgctgataa gaagcctgag gaattgtctg taactcttgt agaggcatac 1080
acagatgtgt ttgatgacac acaggttgag atgattgatg aggttacgaa ctaa 1134

<210> 2

<211> 377

<212> PRT

<213> 貓傳染性腹膜炎病毒

<400> 2

Met	Ala	Thr	Gln	Gly	Gln	Arg	Val	Asn	Trp	Gly	Asp	Glu	Pro	Ser	Lys
1				5					10					15	

Arg	Arg	Asp	Arg	Ser	Asn	Ser	Arg	Gly	Arg	Lys	Asn	Asn	Asn	Ile	Pro
			20					25					30		

Leu	Ser	Phe	Phe	Asn	Pro	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Gly	Ala	Lys	Phe	Trp
		35					40					45			

Tyr	Val	Cys	Pro	Arg	Asp	Phe	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Gly	Asn	Lys	Asp
	50					55					60				

Gln	Gln	Ile	Gly	Tyr	Trp	Asn	Arg	Gln	Ala	Arg	Phe	Arg	Ile	Val	Lys
65					70					75				80	

Gly	Gln	Arg	Lys	Glu	Leu	Pro	Glu	Arg	Trp	Phe	Phe	Tyr	Phe	Leu	Gly
			85					90						95	

Thr	Gly	Pro	His	Ala	Asp	Ala	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ile	Asp	Gly	Val
		100					105						110		

Phe	Trp	Val	Ala	Lys	Asp	Gly	Ala	Met	Asn	Lys	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly
		115					120					125			

Thr	Arg	Gly	Thr	Asn	Asn	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Arg	Phe	Asp	Gly	Lys
	130					135					140				

Ile Pro Pro Gln Phe Gln Leu Glu Val Asn Arg Ser Arg Asn Asn Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Ser Gln Ser Arg Ser Gly Ser Arg Asn Arg Ser Gln Ser
165 170 175

Arg Gly Arg Gln Gln Ser Asn Asn Gln Asn Thr Asn Val Glu Asp Thr
180 185 190

Ile Val Ala Val Leu Gln Lys Leu Gly Val Thr Asp Lys Gln Arg Ser
195 200 205

Arg Ser Lys Ser Arg Asp Arg Ser Asp Ser Lys Ser Arg Asp Thr Thr
210 215 220

Pro Lys Asn Ala Asn Lys His Thr Trp Lys Lys Thr Ala Gly Lys Gly
225 230 235 240

Asp Val Thr Asn Phe Phe Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ala Asn Phe Gly
245 250 255

Asp Ser Asp Leu Val Ala Asn Gly Asn Ala Ala Lys Cys Tyr Pro Gln
260 265 270

Ile Ala Glu Cys Val Pro Ser Val Ser Ser Val Leu Phe Gly Ser Gln
275 280 285

Trp Ser Ala Glu Glu Ala Gly Asp Gln Val Lys Val Thr Leu Thr His
290 295 300

Thr Tyr Tyr Leu Pro Lys Gly Asp Ala Lys Thr Ser Gln Phe Leu Glu
305 310 315 320

Gln Ile Asp Ala Tyr Lys Arg Pro Ser Gln Val Ala Lys Glu Gln Arg
325 330 335

Lys Pro Lys Pro Arg Ser Lys Ser Ala Asp Lys Lys Pro Glu Glu Leu

340

345

350

Ser Val Thr Leu Val Glu Ala Tyr Thr Asp Val Phe Asp Asp Thr Gln

355

360

365

Val Glu Met Ile Asp Glu Val Thr Asn

370

375

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 3

ggggaattca attaaaggca actactgcca

30

<210> 4
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 4

ctgtgaattc tgcaggatcc tttttttttt tttttttttt t

41

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 5
caactgggga gatgaacctt 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 6
ggtagcatTTT ggcagcgTTa 20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 7
attgatggag tcttctgggt tg 22

<210> 8
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：人工合成序列

<400> 8

ttggcattct taggtgttgt gtc

23

六、申請專利範圍

補充

1. 一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗，包括含有以下a)-d)任一者所記載之聚核苷酸所編碼之胺基酸序列之蛋白質作為有效成分：

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區；

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列；

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列；及

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列。

2. 一種貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用疫苗，包括以下a)-d)任一者所記載之聚核苷酸作為有效成分：

a) 聚核苷酸，其含有序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區；

b) 聚核苷酸，其含有編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列；

c) 聚核苷酸，其含有與序列編號：1所記載鹼基序列之編碼區具93%以上相同度的鹼基序列；及

d) 聚核苷酸，其含有與編碼為序列編號：2所記載胺基酸序列之鹼基序列具93%以上相同度的鹼基序列。

3. 如申請專利範圍第1項或第2項所述之疫苗，其中聚核苷酸為a)或b)所記載之聚核苷酸。



六、申請專利範圍

4. 一種申請專利範圍第1項或第2項所述之疫苗之使用，係用於製備貓傳染性腹膜炎病毒之治療及/或預防用藥劑。

