

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-516530

(P2014-516530A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(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 O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2014-511717 (P2014-511717)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月26日 (2012.4.26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月26日 (2013.11.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/074722  
 (87) 国際公開番号 W02012/159522  
 (87) 国際公開日 平成24年11月29日 (2012.11.29)  
 (31) 優先権主張番号 201110139528.3  
 (32) 優先日 平成23年5月26日 (2011.5.26)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 513296718  
 シャンハイ ベテリナリー リサーチ イ  
 ンスティテュート, シーイーイーエス  
 SHANGHAI VETERINARY  
 RESEARCH INSTITUTE  
 , CAAS  
 中華人民共和国 200241 シャンハ  
 イ ミンハン ディストリクト ズイーユ  
 エ ロード 518  
 No. 518 Ziyue Road,  
 Minhang District S  
 hanghai 200241 CHIN  
 A  
 (74) 代理人 100110973  
 弁理士 長谷川 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌインフルエンザ組み換えウイルス及びその製造方法、並びにその応用

(57) 【要約】

【課題】

本発明は、イヌインフルエンザ組み換えウイルスに関する。当該組み換えウイルスは、Z J C I V イヌインフルエンザウイルスのHA及びNA遺伝子並びにPR8ウイルスのPA、PB1、PB2、M、NP及びNSからなる六つの内部遺伝子を含む。本発明は、またイヌインフルエンザ組み換えウイルスの製造方法と応用に関する。本発明のイヌインフルエンザ組み換えウイルスは、ニワトリ胚とMDC K細胞において高いウイルス力価と赤血球凝集価を示し、イヌインフルエンザワクチンを開発する為に優れた接種ウイルスとして使用することができる。

【選択図】 図2

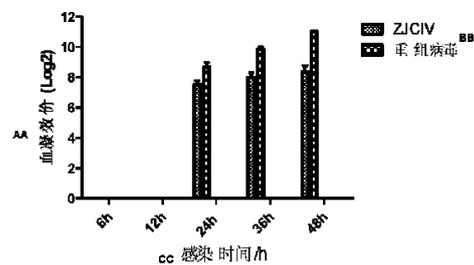


图2/ Fig.2

AA HEMAGGLUTINATION TITER  
 BB RECOMBINANT VIRUS  
 CC INFECTION TIME

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

Z J C I V イヌインフルエンザウイルスの H A 及び N A 遺伝子並びに P R 8 ウイルスの P A、P B 1、P B 2、M、N P 及び N S 遺伝子からなる六つの内部遺伝子を含むイヌインフルエンザ組み換えウイルスであって、

前記イヌインフルエンザウイルスの H A 遺伝子のヌクレオチド配列が、

( 1 ) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

( 2 ) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 9 8 % 以上のホモロジーを有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

からなる群から選択され；

10

前記イヌインフルエンザウイルスの N A 遺伝子のヌクレオチド配列が、

( 1 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；

( 2 ) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 9 8 % 以上のホモロジーを有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

からなる群から選択されるイヌインフルエンザ組み換えウイルス。

**【請求項 2】**

前記イヌインフルエンザウイルスの H A 遺伝子が、配列番号 3 に示すヌクレオチド配列を有し、または、前記イヌインフルエンザウイルスの H A 遺伝子が、配列番号 3 に示すヌクレオチド配列と 9 8 % 以上のホモロジーを有する配列を有する、請求項 1 に記載のイヌインフルエンザ組み換えウイルス。

20

**【請求項 3】**

前記イヌインフルエンザウイルスの N A 遺伝子が、配列番号 4 に示すヌクレオチド配列を有し、または、前記イヌインフルエンザウイルスの N A 遺伝子が、配列番号 4 に示すヌクレオチド配列と 9 8 % 以上のホモロジーを有する配列を有する、請求項 1 に記載のイヌインフルエンザ組み換えウイルス。

**【請求項 4】**

Z J C I V イヌインフルエンザウイルスの H A 遺伝子及び N A 遺伝子をそれぞれ別々に含む組み換えプラスミドを構築すること；

前記 H A 遺伝子の組み換えプラスミド及び N A 遺伝子の組み換えプラスミドと、P R 8 ウイルスの P A、P B 1、P B 2、M、N P、及び N S 内部遺伝子をそれぞれ別々に含む 6 つのプラスミドとを、2 9 3 T 細胞にトランスフェクションさせて、トランスフェクション後の細胞を培養すること；

30

培養細胞上清をニワトリ胚に接種し、ニワトリ胚尿膜腔液を得るために該ニワトリ胚をインキュベーター内で適切な時間培養すること、当該尿膜腔液の赤血球凝集性を測定すること、赤血球凝集活性がある場合、配列解析により意図しない変異が含まれないことを確認して、イヌインフルエンザ組み換えウイルスを得ることを含む、請求項 1 に記載のイヌインフルエンザ組み換えウイルスの製造方法。

**【請求項 5】**

前記組み換えプラスミドが、空ベクターとして使用した P B D ベクターを含有する、請求項 4 に記載の製造方法。

40

**【請求項 6】**

培養細胞上清が、9 ~ 1 1 日齢のニワトリ胚に接種され、ニワトリ胚尿膜腔液を得るために該ニワトリ胚が 3 7 のインキュベーターで 4 8 ~ 7 2 時間培養される、請求項 4 に記載の製造方法。

**【請求項 7】**

イヌインフルエンザを予防又は治療するための、請求項 1 に記載のイヌインフルエンザ組み換えウイルスの使用。

**【請求項 8】**

請求項 1 に記載のイヌインフルエンザ組み換えウイルスを含有するインフルエンザワクチン。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、生物学技術分野に関するものであり、特に、イヌインフルエンザ組み換えウイルス並びにその製造方法及び応用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

A型インフルエンザウイルスは人間の健康を脅威する重要な感染症の一種である。インフルエンザウイルスは厳格な宿主特異性を持っており、同類のウイルスが異なる宿主に感染した場合であっても、やはり宿主によって制限を受ける。2004年に、米国で初めてH3N8サブタイプイヌインフルエンザウイルスによるイヌインフルエンザのパンデミックが引き起こされたことが報告され、配列分析の結果、ウマインフルエンザウイルスが進化してこのサブタイプのインフルエンザウイルスがもたらされたことが発見された。その後、オーストラリアにおいてもウマインフルエンザの発生後にイヌインフルエンザウイルスが発生した。2008年韓国において、H3N2サブタイプイヌインフルエンザウイルスによってイヌインフルエが発生したが、配列分析の結果、H3N2サブタイプのイヌインフルエンザウイルスは家禽によって引き起こされたものであり、欧州及び米国におけるウマインフルエンザウイルス由来のイヌインフルエンザウイルスとは異なることが発見された。

10

## 【0003】

2006 - 2007年の間、中国華南地区において、罹患イヌの生体内からいくつかのH3N2サブタイプイヌインフルエンザウイルスが分離され、配列分析の結果、これらのウイルスは韓国で分離されたウイルスと高いホモロジーを有していることが発見された。中国華南地区のペット用イヌの血清に対する調査により、6.7%の該イヌ血清がインフルエンザ陽性であることが発見された。2010年、本発明者らの研究室は中国華南地区においてイヌインフルエンザウイルスを分離し、これらをA/canine/Zhejiang/01/2010(H3N2サブタイプ、略語ZJ CIV)と命名した。ZJ CIVウイルスの全ゲノム(genome)配列分析から、このウイルスは華南のイヌインフルエンザウイルス及び韓国のH3N2イヌインフルエンザウイルスと高いホモロジーを有することを発見した。動物感染実験により、ZJ CIVウイルスがイヌに感染することができることを発見し、イヌに病気を引き起こし、食欲不振、発熱、咳、鼻汁や膿性分泌物などの症状を示すこと、並びに、解剖後には、肺うっ血、出血、肺胞が炎症性滲出液で満たされる症状が現れることが見出された。

20

30

## 【0004】

2009年6月に、InterVet社はイヌインフルエンザウイルス不活化ワクチンの開発に成功し、米国ではすでに発売されている。しかし、中国でパンデミック(pandemic)を引き起こしたイヌインフルエンザウイルスと先に米国でパンデミックを惹起したイヌインフルエンザウイルスとは抗原性の差異が有り、二者は異なるH3インフルエンザウイルスに由来する。従って、H3N2サブタイプイヌインフルエンザウイルス流行株に対するワクチンを開発することは、イヌインフルエンザの予防及び制御のために多大な実用的意義がある。

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明が解決しようとする課題は、イヌインフルエンザ(influenza)組み換えウイルス(virus)を提供することにある。このウイルスは、イヌインフルエンザウイルスZJ CIVのHA及びNA遺伝子並びにPR8ウイルスの六つ内部遺伝子を含み、この組み換えウイルスにより、アジア地区に於けるイヌインフルエンザウイルスに対する不活化ワクチンを製造し、その応用を図ることができる。

## 【0006】

50

更に、本発明は上記イヌインフルエンザ組み換えウイルスの製造方法及び応用を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するために、以下の技術的解決手段により本発明を完成した。

【0008】

一態様において、本発明はイヌインフルエンザ組み換えウイルスを提供するものであり、ここで、該組み換えウイルスは、Z J C I V イヌインフルエンザウイルスのH A及びN A遺伝子並びにP R 8 ウイルスのP A、P B 1、P B 2、M、N P及びN Sからなる六つの内部遺伝子を含む。

10

【0009】

前記イヌインフルエンザウイルスH A遺伝子のヌクレオチド配列は、

【0010】

(1) 配列番号1に示すアミノ酸配列をコード(coding)のヌクレオチド(nucleotide)配列;

【0011】

(2) 配列番号1に示すアミノ酸配列と98%以上のホモロジー(homology)を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列から選択され;

【0012】

前記イヌインフルエンザウイルスN A遺伝子のヌクレオチド配列は、

20

【0013】

(1) 配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列;

【0014】

(2) 配列番号2に示すアミノ酸配列と98%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列から選択される。

【0015】

好ましくは、前記イヌインフルエンザウイルスH A遺伝子は、配列番号3に示すヌクレオチド配列を有し、あるいは上記イヌインフルエンザウイルスH A遺伝子は配列番号3に示すヌクレオチド配列と98%以上のホモロジーを有する配列を有する。

【0016】

好ましくは、上記イヌインフルエンザウイルスN A遺伝子は、配列番号4に示すヌクレオチド配列を有し、あるいは上記イヌインフルエンザウイルスN A遺伝子は配列番号4に示すヌクレオチド配列と98%以上のホモロジーを有する配列を有する。

30

【0017】

本発明において、配列番号1に示すアミノ酸配列と98%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、挿入または置換され、Z J C I V イヌインフルエンザウイルス赤血球凝集素(H A、hemagglutinin)活性を有するアミノ酸配列を含む。

【0018】

本発明において、配列番号2に示すアミノ酸配列と98%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列は、配列番号に示すアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸を欠失、付加、挿入または置換され、Z J C I V イヌインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ(N A、Neuraminidase)活性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0019】

H AとN Aは、インフルエンザウイルスの二つの主要な表面抗原であり、インフルエンザウイルスの抗原変異は主にH AとN Aの変異を指し、特にH Aより迅速に変異する。従って、本発明のイヌインフルエンザ組換えウイルスの中に含まれるZ J C I V イヌインフルエンザウイルスのH A遺伝子は、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であり、又は配列番号1に示すアミノ酸配列と98%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であり;本発明のイヌインフルエンザ組換え

50

ウイルスの中に含まれる Z J C I V イヌインフルエンザウイルスの N A 遺伝子は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であり、又は配列番号 2 に示すアミノ酸配列と 98% 以上のホモロジーを有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列である。

【0020】

他の態様において、本発明は前記イヌインフルエンザ組み換えウイルスの製造方法を提供するものであり、該製造方法は、

【0021】

Z J C I V イヌインフルエンザウイルスの H A 遺伝子及び N A 遺伝子をそれぞれ別々に含む組み換えプラスミドを構築すること；

10

【0022】

前記 H A 遺伝子の組み換えプラスミド及び N A 遺伝子の組み換えプラスミドと、 P R 8 ウイルスの P A、P B 1、P B 2、M、N P、及び N S 内部遺伝子をそれぞれ別々に含む六つのプラスミドとを一緒に、293T 細胞にトランスフェクションさせて、トランスフェクション後の細胞を培養すること；

【0023】

培養細胞上清をニワトリ胚に接種し、ニワトリ胚尿膜腔液を得るためにインキュベーターの中で適切な時間培養すること、当該尿膜腔液の赤血球凝集性を測定すること、赤血球凝集活性がある場合、配列解析により意図しない変異が含まれないことを確認して、イヌインフルエンザ組み換えウイルスを得ることを含む。

20

【0024】

好ましくは、培養細胞上清を 9 - 11 日齢のニワトリ胚に接種し、該ニワトリ胚を 37 のインキュベーターで 48 - 72 時間培養後、雛胚尿膜腔液を得る。

【0025】

前記組み換えプラスミドは、P B D ベクターを空ベクターとして使用する。

【0026】

更に別の態様において、本発明は、イヌインフルエンザの予防・治療用ウイルス不活化ワクチンの製造における前記イヌインフルエンザ組み換えウイルスの応用を提供するものである。

【0027】

更に他の態様において、本発明は、イヌインフルエンザ組み換えウイルスを含有するインフルエンザワクチンを提供するものである。

30

【発明の効果】

【0028】

本発明のイヌインフルエンザ組み換えウイルスは、ニワトリ胚と M D C K 細胞の両方において高いウイルス力価と赤血球凝集を生成することででき、イヌインフルエンザワクチンを開発するための優れた接種ウイルスとして使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

以下に添付の図面及び発明を実施するための形態を併せてさらに詳細に記載する。

40

【図 1】本願の実施例 1 における、イヌインフルエンザウイルス Z J C I V の H A と N A の R T - P C R 電気泳動図である。

【図 2】本願の実施例 3 における、組み換えウイルスと Z J C I V をニワトリ胚に接種させた後の異なる時間における赤血球凝集価を示したグラフである。

【図 3】本願の実施例 3 における、組み換えウイルスと Z J C I V のニワトリ胚での成長曲線の比較を示すグラフである。

【図 4】本願の実施例 3 における、組み換えウイルスと Z J C I V を M D C K 細胞に接種させた後の異なる時間における赤血球凝集価を示すグラフである。

【図 5】本願の実施例 3 における、組み換えウイルスと Z J C I V の M D C K 細胞での成長曲線の比較を示すグラフである。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0030】

次の実施例において、実験方法の具体的な条件が示されていない場合は、通常、一般的な方法に従って、例えば「精編分子生物学ラボマニュアル」(F. M. アオスポ(奥ス伯)、R. E. キングストン(金斯頓)、J. G. サイドマン編集者、馬学軍、舒躍龍翻訳。北京：科学プレス、2004)等の方法に従って実施する。

## 【0031】

イヌインフルエンザウイルスワクチンの開発のための重要な前提は良い接種ウイルスであるが、本発明者らの研究室で、以前分離されたA/canine/Zhejiang/01/2010ウイルス(H3N2サブタイプ、略語ZJ CIV)はニワトリ胚または細胞中での増幅の両方で、血球凝集力価は非常に低かった。そのため、本発明はZJ CIVイヌインフルエンザウイルスの主要抗原蛋白、即ち、HA及びNA遺伝子をPR8ウイルス残りの6つの内部遺伝子と一緒に組み換え、インフルエンザウイルスの逆遺伝学システムにより、ニワトリ胚と細胞の中で高いウイルス価及び赤血球凝集価を生成することができるイヌインフルエンザ組み換えウイルスを得た。本組み換えウイルスはイヌインフルエンザワクチンを開発する為の優れた接種ウイルスとして使用することができる。

10

## 【0032】

実施例1 組み換えプラスミドの構築と同定

## 1. PCR増幅

トリゾール(Trizol)(Invitrogen)を用いて、イヌインフルエンザウイルスZJ CIVの全RNAを抽出した。Reverse Transcription System kit逆転写キット(TAKARA)を用いて、そのマニュアルによって、12bpのプライマー5'-AGCAAAGCAGG-3'を特異的プライマーとして、cDNA第一鎖を合成した。得られたcDNAの第一鎖をテンプレート(template)として、sapI-HA-up、sapI-HA-downとsapI-NA-up、sapI-NA-downを上下流プライマー(BspQI制限酵素切断部位を含む、表1に示すように)として用いて、ZJ CIV断片(Fragment)のHAとNAを別々に増幅した。PCR増幅プログラムは、94 初期変性5 分間、次のサイクル、94 変性45s、53 アニーリング45秒、72 の延長1分間45sを30サイクルを実行し、最後に72 で再び延長を10 分間行った。同時にテンプレートを含まない陰性対照も置いた。反応後、PCR産物に対して1.0%アガロースゲル電気泳動(agarose gel electrophoresis)実験を行った。結果は図1に示すように、二つのPCRストリップ(strip)が現れた。サイズは、別々に約1700 bpのHAと1400 bpのNAであり、目的断片のサイズと一致した。図1において、M: DNA分子量標準; 1: ZJ CIV HA PCR産物; 2: ZJ CIV NA PCR産物を示す。

20

30

## 【0033】

## 【表 1】

表 1 A 型インフルエンザウイルス HA と NA 遺伝子のユニバーサルプライマー (universal primer)

プライマー名称	プライマー配列
sapI-HA-up	CACACAgcttettattAGCAAAAGCAGGGG (SEQ ID NO.5)
sapI-HA-down	CACACAgctetteggccAGTAGAAACAAGGGTGTITTT (SEQ ID NO.6)
sapI-NA-up	CACACAgcttettattAGCAAAAGCAGGAGT (SEQ ID NO.7)
sapI-NA-down	CACACAgctetteggccAGTAGAAACAAGGAGTITTTTT (SEQ ID NO.8)

10

20

## 【0034】

## 2. PCR産物のゲル抽出 (Gel Extraction)

電気泳動後、UV光の下で、ゲルから目的DNA断片のアガロースゲル (agarose gel) を切り出し、DNA迅速抽出キットを使用してDNAを抽出した。具体的方法は以下の通りである。UVランプ下で、目的DNAを含むアガロースゲルを切り出し、紙を使用してゲル表面の液体を吸収し、ゲルを小片に切断し、1.5mlの無菌EP管に入れて、ゲル容積の3倍の(100mgの=100 $\mu$ lの容積)バッファ (Buffer) DE - A (ゲル液) を加えて、混合した後、75 $^{\circ}$ C 加熱し、完全に溶解した(約6 - 8分間)ゲル片になるまで断続的に混合(2 - 3分間)した。バッファDE - Aの容積の半分のバッファDE - B (結合液) を加え、均一に混合し; 抽出するDNA断片が400bp未満である場合には、ゲルの容積と同量のイソプロパノール (Isopropanol) を添加した。混合液をDNA調製管に移して、12000 $\times$ gで遠心分離を1分間行い、回収管の廃液を捨てた。調製管を回収管に挿入して、500 $\mu$ lバッファ (Buffer) W1 (洗液) を加え、12000 $\times$ gで遠心分離を30秒間行い、回収管の廃液を捨てた。調製管を回収管に挿入し、700 $\mu$ lバッファ (Buffer) W2 (脱塩液) を加えて、12000 $\times$ gで遠心分離を1分間行い、回収管の廃液を捨てた。同様の方法で更に1回洗浄した。調製管を回収管に挿入し、12000 $\times$ gで遠心分離を1分間行った。最後に、調製管をきれいな1.5ml EP管に入れて、製造膜の中央に30 $\mu$ lの脱イオン水を加えて、室温で1分間放置し、12000 $\times$ gで遠心分離を1分間行い、溶出したDNAを-20 $^{\circ}$ Cで保管した。

30

40

## 【0035】

## 3. 酵素切断、連結及び形質転換

精製PCR産物とPBDベクター (本研究室に保管されている) は、BspQI制限エンドヌクレアーゼ (NEB) 作用下、説明書に従って、50 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。ゲル抽出キットを用いて、目的断片とPBDプラスミドの酵素切断産物を抽出し、1 $\mu$ lのT4リガーゼ (ligase) 緩衝液と1 $\mu$ lのT4リガーゼ (Takara) を加えた。連結反応は10 $\mu$ lで、均一に混合することにより行った。16 $^{\circ}$ Cで一晩静置して連結させた。連結産物はコンピテントセル (competent cell) JM109 (本研究室にて製造) に形質転換し、無菌条件下、クリーンベンチ (clean b

50

ench)内でAmpを含むLB固体培地上にコーティングして、37℃で8-20時間培養した。

#### 【0036】

##### 4. 組み換えプラスミドの鑑定

LB固体培地上の単コロニー(single colony)を採取し、Ampを含む約3mlのLB液体培地を加えた試験管に入れ、その後、震盪器に固定し、37℃で10時間又は一晩振盪培養した。アルカリ抽出法を用いて菌液から抽出したプラスミドを、PCR法により同定した。陽性として同定されプラスミドを配列決定(sequencing)し、DNASTAR配列分析ソフトウェアを用いて比較した。結果が示すように、組み換えプラスミドPBD-ZJCIVHA及びPBD-ZJCIVNAの構築に成功した。HA遺伝子配列は配列番号3に示し、NA遺伝子配列は配列番号4に示した。

10

#### 【0037】

##### 実施例2 組み換えPR8ウイルスの作製

##### 1. トランスフェクションプラスミド準備

ウルトラピュアプラスミド抽出キット(OMEGA)を用いてプラスミドを抽出した。操作手順は次のようにした：1)接種ループをグリセロール中に保存した細菌(プラスミドPBD-ZJCIVHA、PBD-ZJCIVNA、PBD-PR8M、PBD-PR8PB1、PBD-PR8PB2、PBD-PR8PA、PBD-PR8NS、PBD-PR8NPを含む。後者の六つのプラスミドは本研究室において保管されている。)に浸し、Ampを含むLBフラットプレートの表面上で線を描き、37℃で一晩放置した；2)単コロニーを採取して、5mlのアンピシリン含有LB培地に接種し、OD600値が1.0-1.5になるまで、37℃で振盪培養した；3)一晩培養した培養液の3mlを収集し、遠心分離により培地を完全に除去した；4)菌体の懸濁：RNase Aを含む0.25mlのSolution I溶液を用いて均質の状態になるまで菌体を懸濁させた；5)細菌の溶解：0.25ml Solution II溶液を添加し、穏やかに混合するために5回反転させた；6)中和：0.125mlのBuffer N3溶液を加え、穏やかに混合するためにすぐに5回反転させて白色の綿状沈殿物が形成させ、室温、12,000×gで10分間遠心分離した；7)慎重に上澄み液を清浄な1.5ml遠心分離管に移し、遠心分離管の容積の0.1倍の量のETR Solution(青色)を上澄み液に加え、7-10回転倒させ、その後、10分間氷浴させた；8)42℃の温水浴に加え5分間置き、再び混濁し、室温、12,000×gで、3分間遠心分離し、ETR溶液中、遠心分離管の底部に青色分層を形成させた；9)上澄み液を新しい1.5ml遠心分離管に移し、遠心分離管の容積の0.5倍の量の無水アルコール(absolute alcohol)を加え、6-7回反転し、室温で1-2分間放置した；10)予め2mlのE4溶液を用いて平衡化させたHiBand DNAMiniカラム(column)に上記混合液を加え、2mlの回収管の中に挿入して、室温、10,000×gで、1分間遠心分離し、溶解液がカラムを通過するようにした；11)回収管中の液体を捨て、残りの混合液をカラムに加え、室温、10,000×gで、1分間遠心分離し、溶解液が完全にカラムを通過するようにし；12)500µlのBuffer HBをカラムに加え、室温、10,000×gで、1分間遠心分離し、残留タンパク質の除去を確実にするためカラムを洗浄し、高品質のDNAを得た；13)液体を捨て、700µlのDNAウォッシュバッファー(Wash buffer)を用いて、洗浄し、室温、10,000×gで、1分間遠心分離し、液体を捨てた；14)操作を繰り返し、DNA Wash bufferを添加した；15)液体を捨て、空転させ、室温、12,000×gで2分間遠心分離し、液体を捨てた；16)カラムを清浄な1.5mlの遠心分離管に挿入して、30-50µlの無エンドトキシン(endotoxin-free)溶出液をカラムに加え、室温で2分間放置し、室温、12,000×gで、1分間遠心分離してDNAを溶出させた、溶出は二回行うことができる；17)電気泳動により検出し、Nanodrop 2000c紫外可視分光光度計を用いて、OD260、OD280を測定し、DNA含量と純度を推測した。結果：トランスフェクト時に必要な十分な量のプラスミドを得た。

20

30

40

50

## 【0038】

## 2. 293T細胞のトランスフェクション

前記抽出された超高純度プラスミドは、PBD-ZJCI VHA、PBD-ZJCI VNA、PBD-PR8M、PBD-PR8PB1、PBD-PR8PB2、PBD-PR8PA、PBD-PR8NSとPBD-PR8NPを含み、適切なりポソーム(liposome)2000によって、3.5cm直径の293T細胞にコトランスフェクション(cotransfection)した。トランスフェクションの6時間後、細胞上清を捨て、2mlのOPTI-MEM(Invitrogen)培養液を加え、37のCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて72時間培養した。

## 【0039】

## 3. 組み換えPR8ウイルスの作製

トランスフェクションの48時間後の細胞上清を、9-11日齢のSPFニワトリ胚(北京メリアヴィニオントン実験動物テクノロジー株式会社)に接種して、該ニワトリ胚をパラフィン(paraffin)で密封した後、37のインキュベーターの中で培養した。48-72時間後、該ニワトリ胚を4で一晚静置し、ニワトリ胚尿膜腔液を得るために取り出した。尿膜腔液が凝集活性を有するか否かは、赤血球凝集試験によって測定した。結果：尿膜腔液は、赤血球を凝集させることができ、ZJCI VのHAとNA遺伝子を含むPR8組み換えウイルスの作製に成功したことが明らかとなった。

## 【0040】

## 4. 組み換えウイルスの同定

Trizolを用いて、組み換えウイルスの尿膜腔液の全RNAを抽出し、12bpプライマーを用いて逆転写して、第一のcDNAを得た。第一のcDNAをテンプレートとして、sapI-HA-up、sapI-HA-downとsapI-NA-up、sapI-NA-downを上下流プライマーとして使って、ZJCI VのHAとNA断片をPCR増幅し、1%アガロースゲル電気泳動により同定した。更に、ZJCI VのHAとZJCI VのNAのPCR産物を会社により配列決定した。結果：アガロース電気泳動ゲルで二つのストリップが現れた。サイズは、それぞれ約1700bpと1400bpであり、標的とするサイズと完全に一致した。更に、配列決定による結果から、PCR産物がZJCI VのHAとNA断片であることが確認された。

## 【0041】

## 実施例3 得られた組み換えウイルスの成長特性の同定

## 1. 得られた組み換えウイルスとZJCI VのEID50測定

ウイルスを含むニワトリ胚尿膜腔液は10倍希釈倍率で希釈し、 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ の各希釈度のニワトリ胚尿膜腔液をそれぞれ5個の9-11日齢のSPFニワトリ胚に接種し、37で48時間連続培養した。感染胚尿膜腔液の赤血球凝集活性を測定して、感染したかどうかを決定し、Reed-Muench法を使用してEID50(ニワトリ胚の半分が感染する量)を計算した。結果：得られた組み換えウイルスとZJCI VのEID50は、それぞれ $107.5/100\mu\text{l}$ と $106.5/100\mu\text{l}$ であった。

## 【0042】

## 2. 得られた組み換えウイルスとZJCI VのTCID50測定

$1:10^{-3}$ から始まる10倍希釈、異なる希釈倍率の組み換えウイルスとZJCI Vを単層のMDCK細胞が成長した48ウェルプレート(well plate)に接種した。接種の過程は以下の通りとした：PBSを用いてMDCK細胞を2回洗浄し、その後、各ウェルに $100\mu\text{l}$ のウイルスを加え、各希釈倍率についてこの操作を3回繰り返した。48ウェルプレートを37のCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、ウイルスが細胞に吸収されるようにし、20分間隔で細胞を左右に一度振り、1.5-2時間後、細胞培養液中のウイルスを捨て、PBSを用いて細胞を2回洗浄して、その後、無血清培地 $300\mu\text{l}$ を添加した。ウイルスを吸収させた細胞は、CO<sub>2</sub>インキュベーターで72時間連続培養し、その後、各ウェルの赤血球凝集活性を測定し、Reed-Muench法を使用してTCID50(組織細胞の半分が感染する量)を計算した。結果：得られた組み換えウ

10

20

30

40

50

イルスとZJCVのTCID<sub>50</sub>は、それぞれ106.5/100 $\mu$ lと105.5/100 $\mu$ lであった。

【0043】

3. 得られた組み換えウイルスとZJCVが雛ニワトリ胚における成長特性比較

得られた組み換えウイルスとZJCVを100EID<sub>50</sub>となるように希釈し、この希釈倍率の液を、それぞれ18個の9-11日齢のSPFニワトリ胚に接種した。接種から6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、72時間後に、それぞれ接種したSPFニワトリ胚を3個取り出し、その尿膜腔液を収集して赤血球凝集価(図2)を測定した。それぞれの時間に収集した尿膜腔液を10倍希釈倍率で希釈し、各希釈倍率のウイルス液を3個の9-11日齢のSPFニワトリ胚に接種した。接種量は100 $\mu$ l/個となるようにした。接種から48時間後、ニワトリ胚尿膜腔液の赤血球凝集活性を測定して、異なる時間における尿膜腔液のウイルス含量を計算し、ウイルスの成長曲線(図3)を描いて、得られた組み換えウイルスとZJCVの胚上の成長状況を比較した。結果を図2に示す。接種後12時間以内では、ZJCVと組み換えウイルスの尿膜腔液はいずれも赤血球凝集性が認められなかった。接種後48時間では、組み換えウイルスの赤血球凝集価は2<sup>11</sup>に達しており、これはZJCVの赤血球凝集価よりも有意に高かった。結果を図3に示した。ZJCVと得られた組み換えウイルスはいずれも接種から6時間後には、ウイルスを検出することができなかった。接種から12時間後、得られた組み換えウイルスのウイルス力価はZJCVよりも有意に高く、接種から48時間後に最高に達した。

10

20

【0044】

4. 得られた組み換えウイルスとZJCVのMDCK細胞上での成長特性の比較

得られた組み換えウイルスとZJCVを100TCID<sub>50</sub>となるように希釈し、この希釈倍率の液を、それぞれ、80%のMDCK成長細胞を含むT25細胞瓶に接種した。接種から6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後、72時間後に、それぞれ細胞上清を回収してその赤血球凝集価(図4)を測定した。各時間に収集された細胞上清中のウイルス含量を次のように算出した。収集した細胞上清を10倍希釈倍率で希釈し、各希釈倍率のウイルス液を、24ウェルの細胞培養プレート上で80%まで成長したMDCK細胞の3ウェルに接種し、接種後48時間において赤血球凝集活性を測定し、各時間に収集された細胞上清中のウイルス含量(TCID<sub>50</sub>)を算出し、このTCID<sub>50</sub>に従って、ウイルスの成長曲線(図5)を描いて、得られた組み換えウイルスとZJCVのMDCK細胞上での成長を比較した。赤血球凝集価の結果を図4に示した。接種後12時間以内では、ZJCVの細胞上清には赤血球凝集活性が無かったが、組み換えウイルスの細胞上清には赤血球凝集活性が認められ、それは接種後36時間で最高に達し、その後比較的安定な状態となる傾向が認められた。全感染過程で、組み換えウイルスの赤血球凝集活性はZJCVの赤血球凝集活性よりも有意に高かった。ウイルス力価の結果を図5に示す。ZJCVと得られた組み換えウイルスは、接種から6時間後ではウイルスを検出することができなかった。接種後12時間に、得られた組み換えウイルスを検出することができたが、ZJCVは接種後24時間までは検出されなかった。接種から36時間後に、組み換えウイルスとZJCVのウイルス力価は最高に達し、その後減少した。全感染過程で、組み換えウイルスのウイルス力価はZJCVのウイルス力価よりも有意に高かった。

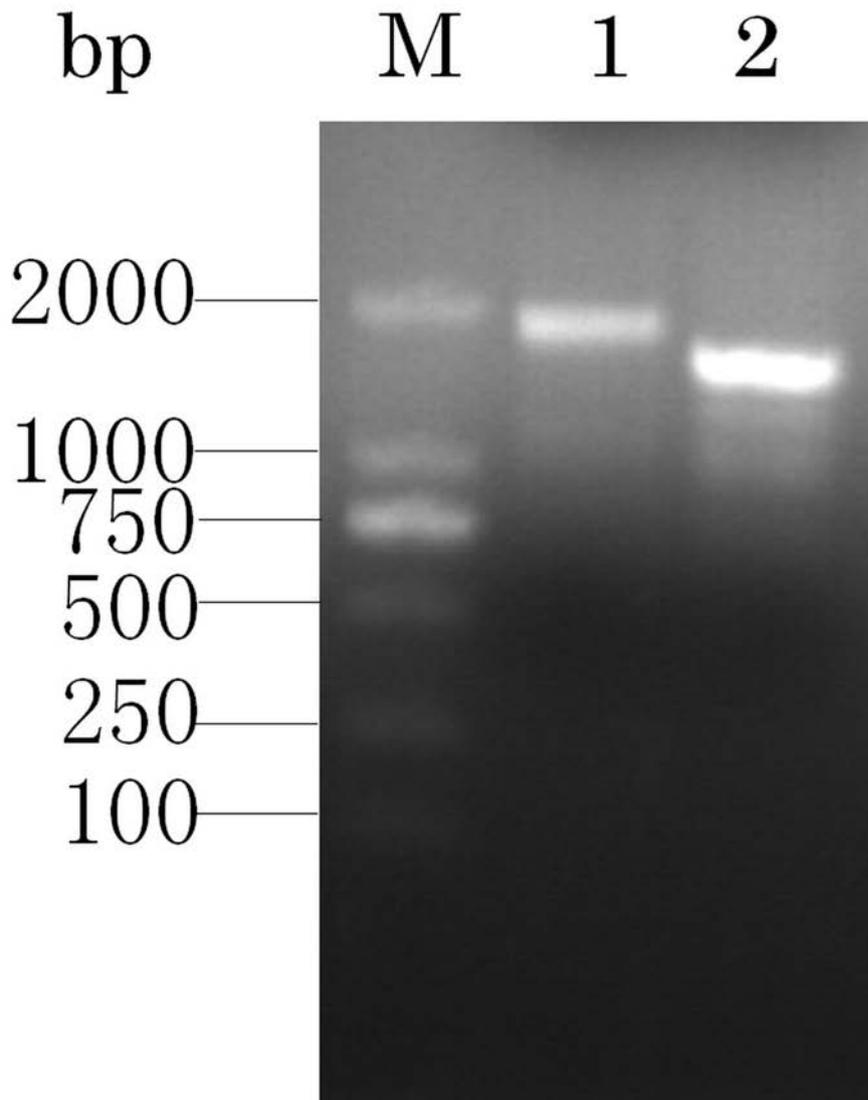
30

40

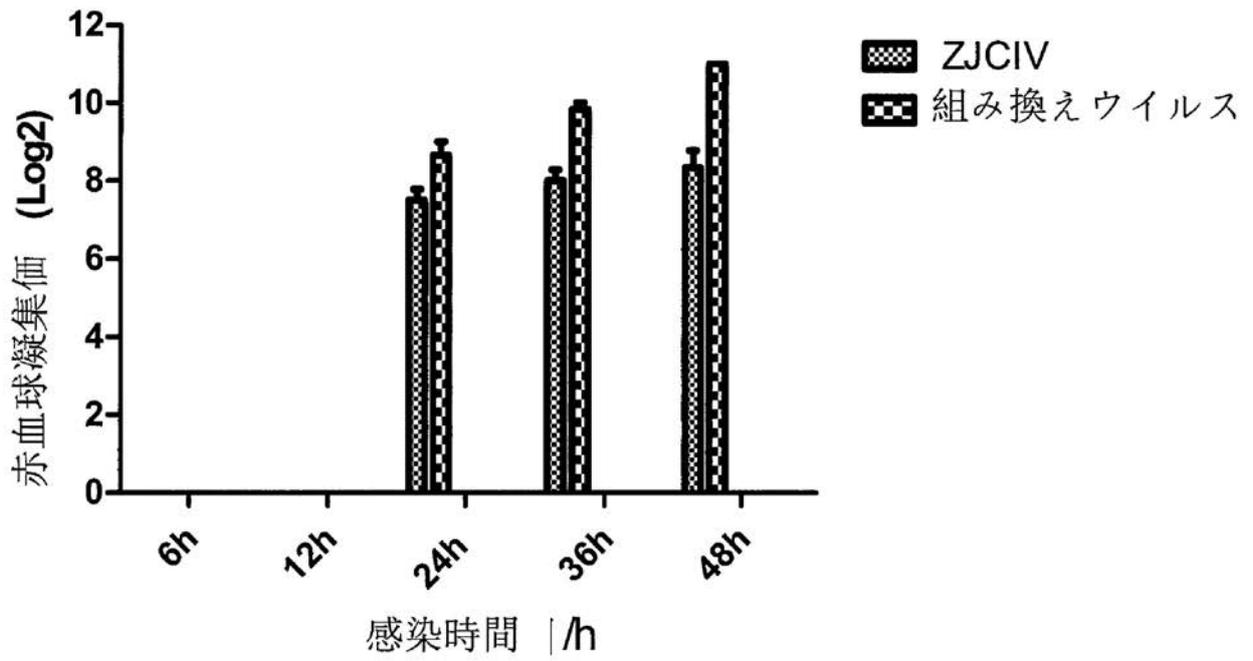
【0045】

以上、上記実施例は本発明の実施の形態を示しているにすぎず、その説明がより具体的かつ詳細であったとしても、本発明の請求の範囲を制限するものではない。本発明の属する当業者にとって、本発明の思想を逸脱しない限り、本発明に対する様々な変更及び改善は許容されるものとし、すべて本発明の保護範囲内に属するものとする。故に、本発明特許の保護範囲は特許請求の範囲を基準とされるべきものである。

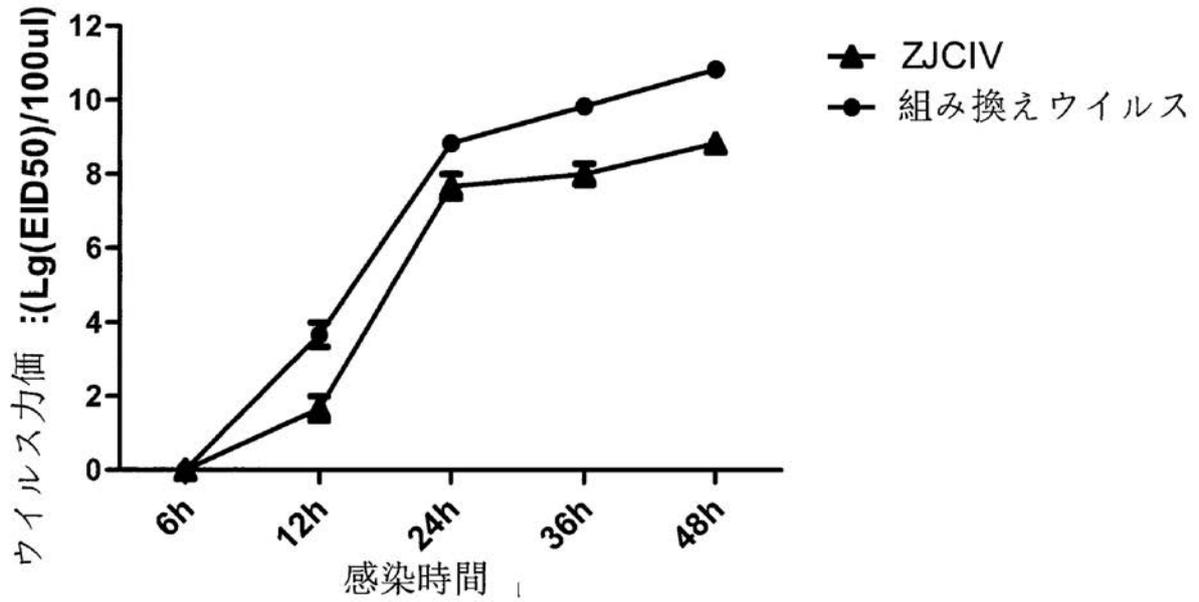
【 図 1 】



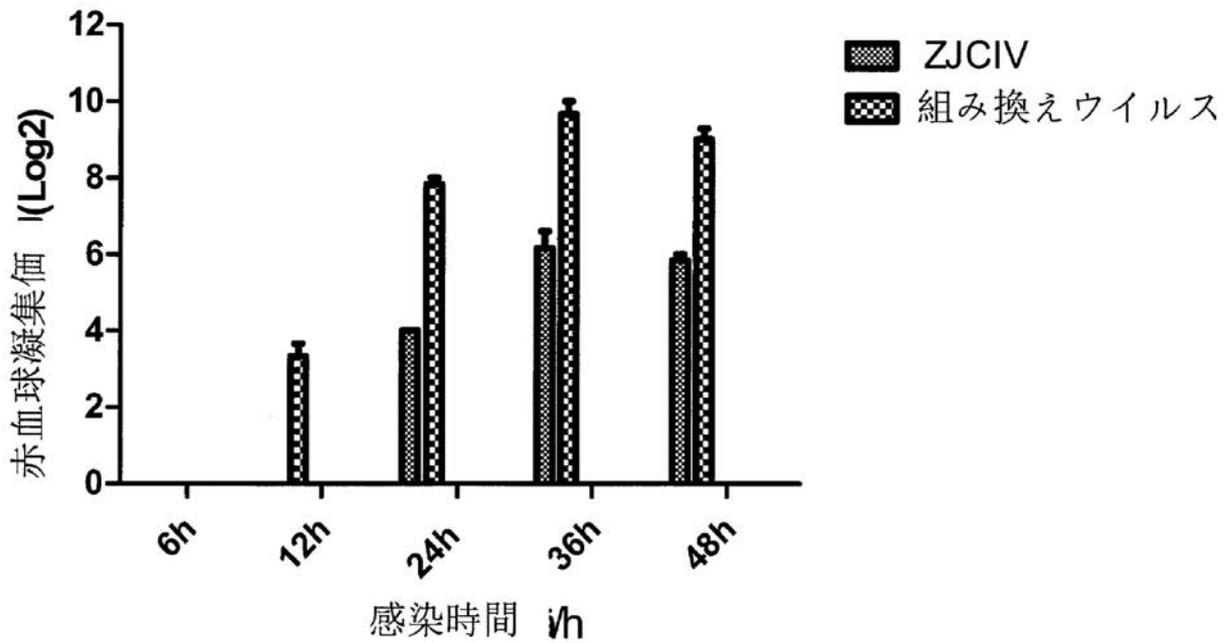
【 図 2 】



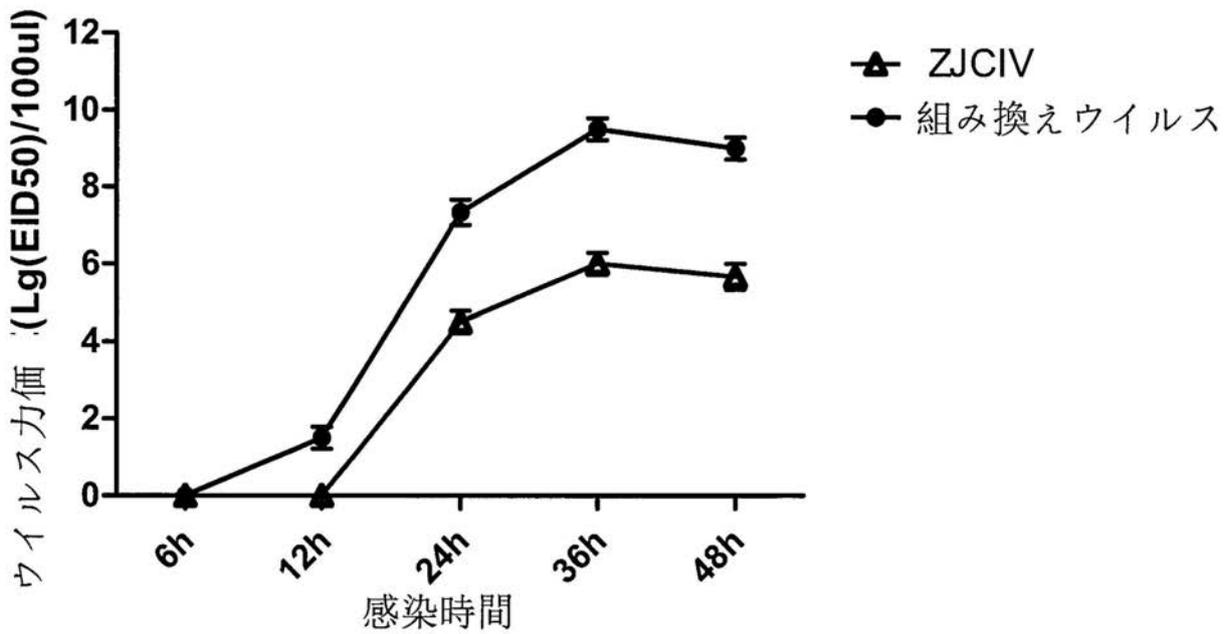
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2014516530000001.app](#)

## 【 国际调查报告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/CN2012/074722</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
See the extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K; C12N; A61K; A61P		
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)		
CNKI; CNPAT and search terms: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, influenza, virus, hemagglutinin, neuraminidase, etc.		
DWPI; CPEA; SIPOABS; EPIXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; CA; ELSEVIER; EMBASE and search terms: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, canine, influenza, hemagglutinin, neuraminidase, etc.		
GENBANK; EMBL; STN; National Bio-sequence Database of Chinese Patent and searched sequence: sequences 1-4		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1624116 A (HARBIN VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 08 June 2005 (08.06.2005), claims 1-3, and description, page 2, paragraph 5, and pages 5-6	1-8
Y	CN 101605898 A (BIONOTE, INC.), 16 December 2009 (16.12.2009), abstract, claims 1-21, and description, page 5, paragraphs 3-5, page 7, paragraphs 2-8, and page 8, paragraphs 4-8, SEQ ID NO: 9-10 and SEQ ID NO: 11-12	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 16 July 2012 (16.07.2012)		Date of mailing of the international search report <b>09 August 2012 (09.08.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451		Authorized officer <b>YUE, Lixi</b> Telephone No.: (86-10) 62411096

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/074722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GenBank registry number GU433356, 23 September 2010 (23.09.2010), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855729">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855729</a> > the whole document	1-8
Y	GenBank registry number GU433353, 23 September 2010 (23.09.2010), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855721">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/283855721</a> > the whole document	1-8
Y	GenBank registry number CY090035, 04 May 2011 (04.05.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/332078622">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/332078622</a> > the whole document	1-8
P, X	CN 102220293 A (SHANGHAI VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, THE CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 19 October 2011 (19.10.2011), claims 1-8, and description, pages 2-3	1-8
P, Y	LIN, Y., et al. Genetic and pathobiologic characterization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu Province of China in 2009-2010. VETERINARY MICROBIOLOGY, 17 February 2012 (17.02.2012), vol. 158, no. 3-4, pages 247-258, abstract, and figures 1-2	1-8
P, Y	GenBank registry number JN247595, 31 July 2011 (31.07.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612473">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612473</a> > the whole document	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2012/074722**

<b>C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>
P, Y	GenBank registry number JN247581, 31 July 2011 (31.07.2011), [retrieved on 16.07.2012], retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612441">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/341612441</a> > the whole document	1-8
A	CN 1350578 A (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 22 May 2002 (22.05.2002), the whole document	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2012/074722**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1624116 A	08.06.2005	CN 1261564 C	28.06.2006
CN 101605898 A	16.12.2009	KR 100850545 B1	05.08.2008
		WO 2009057843 A1	07.05.2009
		EP 2078083 A1	15.07.2009
		US 2010285063 A1	11.11.2010
		JP 2011501950 A	20.01.2011
		EP 2078083 B1	25.04.2012
		CN 101605898 B	23.05.2012
CN 102220293 A	19.10.2011	None	
CN 1350578 A	22.05.2002	WO 0060050 A2	12.10.2000
		AU 4073300 A	23.10.2000
		BR 0009580 A	02.01.2002
		EP 1185615 A2	13.03.2002
		KR 20010113044 A	24.12.2001
		US 2003035814 A1	20.02.2003
		JP 2003528570 A	30.09.2003
		MXPA 01010082 A	01.05.2002
		AU 2005202386 A1	23.06.2005
		US 2006057116 A1	16.03.2006
		US 2006134138 A1	22.06.2006
		EP 1185615 B1	01.08.2007
		EP 1820853 A2	22.08.2007
		DE 60035778 E	13.09.2007
		EP 1820853 A3	03.10.2007
		ES 2290024 T3	16.02.2008
		AU 2005202386 B2	03.01.2008
		DE 60035778 T2	30.04.2008
		KR 100702275 B1	30.03.2007
		AU 2008201521 A1	01.05.2008
		AU 2005202386 B9	10.07.2008
		MX 249328 B	24.09.2007
		US 2009246830 A1	01.10.2009
		IL 145702 A	15.04.2010
		CN 1350578 B	12.05.2010
		CN 101851636 A	06.10.2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2012/074722**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2011143424 A1	16.06.2011
		EP 2345716 A1	20.07.2011
		EP 1820853 B1	21.09.2011
		JP 2011182797 A	22.09.2011
		MX 288647 B	25.07.2011
		WO 0060050 A3	18.01.2001
		HK 1148778 A0	16.09.2011
		ES 2373405 T3	03.02.2012
		AU 2008201521 B2	02.02.2012

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2012/074722**

**CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 7/01 (2006.01) i

C07K 14/11 (2006.01) i

C12N 15/44 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/145 (2006.01) i

A61P 31/16 (2006.01) i

C12R 1/93 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 <b>PCT/CN2012/074722</b>
<b>A. 主题的分类</b>		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K; C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNKI; CNPAT 和检索词: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, 流感, 病毒, 血凝素, 神经氨酸酶等; DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; IPTXT; CA; ELSEVIER; EMBASE 和检索词: HA, NA, PA, PB, M, NP, NS, PR, canine, influenza, hemagglutinin, neuraminidase 等; GENBANK; EMBL; STN; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 序列 1-4		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 1624116 A (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 08. 6 月 2005 (08.06.2005) 权利要求 1-3、说明书第 2 页第 5 段、第 5-6 页	1-8
Y	CN 101605898 A (韩国安捷公司) 16. 12 月 2009 (16.12.2009) 摘要、权利要求 1-21、说明书第 5 页第 3-5 段、第 7 页第 2-8 段、 第 8 页第 4-8 段、SEQ ID NO: 9-10、SEQ ID NO: 11-12	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 16. 7 月 2012 (16.07.2012)		国际检索报告邮寄日期 <b>09.8 月 2012 (09.08.2012)</b>
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员  <b>岳礼溪</b> 电话号码: (86-10) <b>62411096</b>

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/074722

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	GenBank 登录号 GU433356, 23. 9 月 2010 (23.09.2010) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/283855729">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/283855729</a> > 全文	1-8
Y	GenBank 登录号 GU433353, 23. 9 月 2010 (23.09.2010) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/283855721">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/283855721</a> > 全文	1-8
Y	GenBank 登录号 CY090035, 04. 5 月 2011 (04.05.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/332078622">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/332078622</a> > 全文	1-8
P, X	CN 102220293 A (中国农业科学院上海兽医研究所) 19. 10 月 2011 (19.10.2011) 权利要求 1-8、说明书第 2-3 页	1-8
P, Y	LIN, Y.,等. Genetic and pathobiologic characterization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu Province of China in 2009–2010. <i>Veterinary Microbiology</i> , 17. 2 月 2012 (17.02.2012), 第 158 卷, 第 3-4 期, 第 247-258 页 摘要、图 1-2	1-8
P, Y	GenBank 登录号 JN247595, 31. 7 月 2011 (31.07.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/341612473">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/341612473</a> > 全文	1-8

## 国际检索报告

国际申请号 <b>PCT/CN2012/074722</b>
-----------------------------------

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
P, Y	GenBank 登录号 JN247581, 31. 7 月 2011 (31.07.2011) [检索于 16.07.2012], 检索自 NCBI[联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/341612441">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/341612441</a> > 全文	1-8
A	CN 1350578 A (威斯康星校友研究基金会) 22. 5 月 2002 (22.05.2002) 全文	1-8

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2012/074722	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1624116 A	08. 06.2005	CN1261564 C	28. 06.2006
CN101605898 A	16. 12.2009	KR100850545 B1	05. 08.2008
		WO2009057843 A1	07. 05.2009
		EP2078083 A1	15. 07.2009
		US2010285063 A1	11. 11.2010
		JP2011501950 A	20. 01.2011
		EP2078083 B1	25. 04.2012
		CN101605898 B	23. 05.2012
CN102220293 A	19. 10.2011	无	
CN1350578 A	22. 05.2002	WO0060050 A2	12. 10.2000
		AU4073300 A	23. 10.2000
		BR0009580 A	02. 01.2002
		EP1185615 A2	13. 03.2002
		KR20010113044 A	24. 12.2001
		US2003035814 A1	20. 02.2003
		JP2003528570 A	30. 09.2003
		MXPA01010082 A	01. 05.2002
		AU2005202386 A1	23. 06.2005
		US2006057116 A1	16. 03.2006
		US2006134138 A1	22. 06.2006
		EP1185615 B1	01. 08.2007
		EP1820853 A2	22. 08.2007
		DE60035778 E	13. 09.2007
		EP1820853 A3	03. 10.2007
		ES2290024 T3	16. 02.2008
		AU2005202386 B2	03. 01.2008
		DE60035778 T2	30. 04.2008
		KR100702275 B1	30. 03.2007
		AU2008201521 A1	01. 05.2008
AU2005202386 B9	10. 07.2008		
MX249328 B	24. 09.2007		
US2009246830 A1	01. 10.2009		
IL145702 A	15. 04.2010		
CN1350578 B	12. 05.2010		
CN101851636 A	06. 10.2010		

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 <b>PCT/CN2012/074722</b>	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US2011143424 A1	16.06.2011
		EP2345716 A1	20.07.2011
		EP1820853 B1	21.09.2011
		JP2011182797 A	22.09.2011
		MX288647 B	25.07.2011
		WO0060050 A3	18.01.2001
		HK1148778 A0	16.09.2011
		ES2373405 T3	03.02.2012
		AU2008201521 B2	02.02.2012

国际检索报告

国际申请号

**PCT/CN2012/074722**

续: A.主题的分类

C12N 7/01 (2006.01) i

C07K 14/11 (2006.01) i

C12N 15/44 (2006.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 39/145 (2006.01) i

A61P 31/16 (2006.01) i

C12R 1/93 (2006.01) i

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100120293

弁理士 中谷 智子

(72)発明者 リー , ゼジュン

中華人民共和国 200241 シャンハイ ミンハン ディストリクト ズイーユェ ロード  
518

(72)発明者 テン , チャオヤン

中華人民共和国 200241 シャンハイ ミンハン ディストリクト ズイーユェ ロード  
518

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 DA02 EA02 GA11 HA01

4B065 AA95X AA95Y AB01 AC20 BA02 BB23 CA45